

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Mgr. Tomáš Koblas

Diferenciace dospělých kmenových buněk na inzulín produkující beta buňky
Differentiation of adult stem cells into insulin-producing beta cells

Doktorská disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Prof. MUDr. František Saudek, DrSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30.05.2011

Podpis:

Prohlášení:

Prohlašuji, že Mgr. Tomáš Koblas rozhodujícím způsobem přispěl ke vzniku všech 5 článků, které jsou přílohami této disertační práce. Sám provedl většinu experimentů a významně se podílel i na jejich plánování, interpretaci výsledků a sepsání publikací.

V Praze, 30.05.2011

.....

Prof. MUDr. František Saudek, DrSc.

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych na tomto místě poděkoval zejména svému školiteli Prof. MUDr. Františku Saudkovi, DrSc. za vynikající odborné vedení, všestrannou pomoc, laskavý a vstřícný přístup při vypracovávání této práce a především možnost účastnit se výzkumu na tak vzrušující a zajímavé problematice jakou buněčná terapie diabetu bezesporu je.

Dále bych chtěl poděkovat celému kolektivu laboratoře Langerhansových ostrůvků za vstřícný přístup, ochotu, potřebné rady, pomoc a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt disertační práce:

Diabetes mellitus je chronické onemocnění charakterizované metabolickou poruchou při relativním nebo absolutním nedostatku inzulínu. Diabetes mellitus 1. typu (DM1) je způsoben autoimunitní reakcí, která postupně vede k selektivní destrukci inzulín produkujících beta-buněk pankreatu. Důsledkem je minimální nebo zcela chybějící tvorba vlastního inzulínu, která vede k závislosti na podávání exogenního inzulínu. DM je také příčinou řady pozdních komplikací. Přestože dlouhodobé přiblížení fyziologické hladině glykémie s použitím intenzifikovaných inzulínových režimů může manifestaci diabetických komplikací oddálit, dosáhnout takovéto kompenzace se však daří jen asi u 5% pacientů. Z toho je patrné, že současné způsoby léčby nevedou ani k vyléčení diabetu, ale většinou ani k prevenci pozdních komplikací. Jedním z nejatraktivnějších léčebných přístupů je proto takový způsob léčby, který by nahradil chybějící inzulínovou sekreci. Takovou metodou je transplantace inzulín produkující tkáně. Nedostatečný počet dárců je ovšem hlavním limitujícím faktorem pro využití tohoto léčebného postupu v širším měřítku. Je tedy patrné, že pro získání dostatečného množství inzulín produkující tkáně musí být nalezeny alternativní zdroje. V současné době se jako nejnadějnější jeví využití kmenových buněk.

Pankreatické kmenové/progenitorové buňky (PSC) splňují požadavky na takovýto zdroj. I přes nezpochybnitelný průkaz existence PSC se doposud nepodařilo tyto buňky plně identifikovat. S cílem rozšířit paletu známých markerů PSC jsme se rozhodli charakterizovat populace pankreatických buněk exprimující markery kmenových buněk. V naší práci se nám podařilo identifikovat dva nové markery dospělých pankreatických kmenových/progenitorových buněk. Populace CXCR4 pozitivních pankreatických buněk exprimovala markery a transkripční faktory pluripotentních a dospělých kmenových buněk. CXCR4 pozitivní pankreatické buňky byly rovněž schopné in vitro diferenciaci na inzulín produkující beta buňky. Další identifikovaný PSC marker byl membránový glykoprotein CD133. CD133 pozitivní pankreatické buňky také exprimovaly transkripční faktory nezbytné pro zajištění pluripotence a rovněž byly schopné in vitro diferenciaci na inzulín produkující beta-buňky.

S cílem zvýšit míru diferenciaci pankreatických kmenových/progenitorových buněk jsme se zaměřili na úlohu fosfatidylinositol-3-kinázové signální dráhy (PI3K) v diferenciaci beta-buněk. Zjistili jsme že aktivace PI3K výrazně zvyšuje míru diferenciaci pankreatických progenitorů na beta-buňky.

Rovněž jsme testovali vliv epigenetických modifikací na průběh diferenciaci pankreatických progenitorů. Zjistili jsme, že inhibice metylace DNA a histonů také zvyšuje míru diferenciaci na pankreatické endokrinní buňky včetně beta-buněk.

Nakonec jsem ověřili schopnost diferenciaci buněk lidské pupečnickové krve (HUCB) na inzulín produkující beta-buňky. Zjistili jsme, že HUCB buňky jsou schopné in vivo diferenciaci na inzulín produkující beta-buňky, nicméně nezbytnou podmínkou pro úspěšnou diferenciaci je celotělové ozáření před podáním HUCB buněk. Rovněž počet diferencovaných HUCB buněk je relativně nízký.

Souhrnem lze říci, že naše výsledky přispěly k rozšíření znalostí o pankreatických kmenových/progenitorových buňkách, jejich diferenciaci na inzulín produkující beta-buňky a také o vhodnosti využití buněk pupečnickové krve pro léčbu diabetu.

Ph.D. Thesis abstract:

Diabetes mellitus is a chronic disease characterized by a metabolic disorder in which there is a low level or complete lack of the insulin. Diabetes mellitus type 1 (DM1) is caused by an autoimmune reaction leading to the destruction of the insulin producing beta cells in the pancreas. In consequence, low or non-existent insulin production leads to a complete dependence on exogenous insulin supplementation. DM1 causes serious long-term complications. Although strict control of blood sugar could prevent the onset and development of diabetic complications only 5% of diabetic patients are able to achieve such control. Hence it is evident that the current methods of treatment are neither sufficient to treat this disease, nor prevent late complications in most patients. The most promising therapeutic approach in the treatment of diabetes is the restoring of insulin production. One such method is the transplantation of insulin-producing tissue. However, a lack of available insulin-producing tissue limits such therapeutic approach. Therefore an alternative source of insulin producing cells have to be found to obtain a sufficient amount of safe and efficient insulin producing tissue.

Pancreatic stem/progenitor cells could represent such an available alternative source. Despite the evidence of permanent beta cell neogenesis during the adult life a putative pancreatic stem cell (PSC) has not yet been identified. With the aim to expand a list of available PSC markers we have focused on the characterization of pancreatic cell populations based on the expression of stem cell markers. In our work we have identified two new markers of adult pancreatic stem/progenitor cells which allow their isolation. Population of CXCR4 positive pancreatic cells express markers and transcription factors of pluripotent and adult stem cells. Upon in vitro differentiation CXCR4 positive pancreatic cells are able to differentiate into insulin producing cells. Similarly CD133 positive pancreatic cells also express transcription factors of pluripotent stem cells and are able to differentiate into insulin producing cells.

We have also focused on the role of phosphoinositide 3 kinase signaling pathway (PI3K) on beta-cells differentiation, in the attempt to improve the process of pancreatic stem/progenitor cells differentiation into beta-cells. We found that activation of PI3K significantly increase a number of beta-cells differentiated from adult pancreatic progenitor cells.

With the same aim we have also studied the effect of epigenetic factors on differentiation of adult pancreatic progenitor cells. We found that inhibition of DNA and histone methylation also improves the rate of differentiation into beta-cells.

Finally we have examined the potential of human umbilical cord blood cells (HUCB) to differentiate into insulin producing cells with the aim to evaluate their possible clinical application for the treatment of diabetes. We found that HUCB cells are able to differentiate into insulin producing cells upon irradiation of transplanted animals. However the number of insulin producing cells derived from HUCB was not significantly high.

In conclusion our results provide new information about pancreatic adult stem/progenitor cells, about their differentiation into insulin producing beta cells and also about suitability of HUCB cells for the treatment of diabetes

Obsah

Seznam použitých zkratk	9
1. ÚVOD	12
1.1 Diabetes mellitus	12
1.2 Pankreatické β -buňky a inzulín	13
1.3 Vývoj pankreatu a pankreatických β -buněk	18
1.4 Zdroje buněk diferencujících se na pankreatické β -buňky	24
1.5 Signální dráhy ovlivňující diferenciaci β -buněk	27
1.5.1 Notch signální dráha	27
1.5.2 PI3K/Akt signální dráha	30
1.5.3 TGF- β signální dráha	32
1.6 Epigenetické změny ovlivňující diferenciaci β -buněk	34
2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE	37
3. MATERIÁL A METODY	38
3.1 Použitý materiál a chemikálie	38
3.2 Použité přístroje	40
3.3 Metodika	41
3.3.1 Izolace Langerhansových ostrůvků	41
3.3.2 Disociace exokrinních a duktálních buněk pankreatu	42
3.3.3 Izolace duktálních buněk a pankreatických endokrinních progenitorů	42
3.3.4 Izolace CXCR-4 pankreatické buněčné populace	42
3.3.5 Izolace CD133 pankreatické buněčné populace	43
3.3.6 Izolace mononukleárních buněk z pupečnickové krve	44
3.3.7 Transplantace mononukleárních buněk izolovaných z pupečnickové krve	44
3.3.8 Izolace myších Langerhansových ostrůvků	45
3.3.9 Kultivace CXCR4 pozitivních pankreatických buněk	45

3.3.10 Kultivace CD133 pozitivních pankreatických buněk	47
3.3.11 Kultivace duktálních buněk a pankreatických progenitorů Vliv PI3K/Akt signální dráhy na diferenciaci β -buněk	48
3.3.12 Příprava bezsérového média kondiciovaného lidskou neonatální fibroblastovou linií Hs68	51
3.3.13 Kultivace duktálních buněk a pankreatických progenitorů Vliv epigenetických faktorů na diferenciaci β -buněk.....	51
3.3.14 Izolace RNA.....	53
3.3.15 Stanovení koncentrace RNA.....	54
3.3.16 PCR s reversní transkripcí (RT-PCR).....	54
3.3.17 DNA elektroforéza.....	56
3.3.18 Imunochemické stanovení antigenů s fluorescenčním vyhodnocením	57
3.3.19 Fluorescenční in-situ hybridizace	58
3.3.20 Testování produkce C-peptidu Statické inkubace	60
3.3.21 Stanovení koncentrace DNA.....	61
4. VÝSLEDKY	62
4.1 Izolace a charakterizace lidských CXCR4 pozitivních pankreatický buněk	62
4.2 Izolace a diferenciaci lidských CD133 pozitivních pankreatických buněk	70
4.3 Vliv aktivace PI3K/Akt signální dráhy na diferenciaci pankreatických progenitorových buněk na β -buňky	74
4.4 Vliv modulace epigenetických faktorů na diferenciaci pankreatických progenitorových buněk na β -buňky	82
4.5 In-vivo diferenciaci kmenových buněk izolovaných z pupečnickové krve na pankreatické β -buňky	88
5. DISKUZE	94
6. SOUHRN A ZÁVĚR	101
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	103
8. PŘÍLOHY PUBLIKACÍ	109

Seznam použitých zkratk

5Aza - 5-Aza-2'-deoxycytidin

Akt - proteinkináza B

ALDH - aldehyd dehydrogenáza

ATP - adenosin-5-trifosfát

b. - buňka

bFGF - zásaditý fibroblastový růstový faktor, z anglického „basic fibroblast growth factor“

BMP - z anglického „bone morphogenetic protein“

BSA - hovězí sérový albumín, z anglického „bovine serum albumin“

CA II - karboanhydráza II

cDNA - komplementární DNA

CXCR4 - C-X-C chemokinový receptor typ 4, CD184, SDF receptor

DAPI - 4,6-diamidino-2-fenylindol

DM1 - diabetes mellitus prvního typu

DM2 - diabetes mellitus druhého typu

DMEM - z anglického „Dulbecco's modified Eagle medium“

DMSO - dimethylsulfoxid

DNA - deoxyribonukleová kyselina, z anglického „deoxyribonucleic acid“

dNTP - deoxynukleosid trifosfát

EBSS - iontový roztok podle Earlese, z anglického „Earle's balanced salt solution“

EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina ve formě dvojsodné soli

EGF - epidermální růstový faktor, z anglického „epidermal growth factor“

FBS - fetální hovězí sérum, z anglického „fetal bovine serum“

FCS - fetální telecí sérum, z anglického „fetal calf serum“

FGF - fibroblastový růstový faktor, z anglického „fibroblast growth factor“

FISH - fluorescenční in situ hybridizace

g - gravitační zrychlení

GAPDH - glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa

GLUT2 - glukosový transportér 2

GLP-1 - glukagonu podobný peptid 1, z anglického „glukagon-like peptide 1“

GSK3 β - kináza glykogen syntázy

HBSS - iontový roztok podle Hankse, z anglického „Hanks balanced salt solution“
HGF - jaterní růstový faktor, z anglického „hepatocyte growth factor“
hTERT - lidská telomeráza
HSA - lidský sérový albumín, z anglického „human serum albumin“
IBMX - 3-isobutyl-1-methylxanthin
IKEM - Institut klinické a experimentální medicíny
i.m. - intra muskulární
i.v. - intra venózní
iPS - indukované pluripotentní kmenové buňky
Ig - protilátka, imunoglobulín
ILCC - ostrůvky připomínající buněčné shluky, z anglického „Islet-like cell cluster“
ITS - inzulín, transferin, selen
Km - konstanta Michaelis-Mentenové
kb - kilobáze
LIF - faktor, který inhibuje leukemické buňky (leukemia inhibitory factor)
LO - Langerhansovy ostrůvky
MEM - neesenciální aminokyseliny
min. - minuta
MNC - mononukleární buňka
mRNA - mediátorová RNA
mTOR - z anglického „mammalian Target of Rapamycin“
NaBu - butyrát sodný
ngn-3 - neurogenin 3
PBS - fosfátový pufr, z anglického „phosphate buffered saline“
PDX-1 - z anglického „pancreatic and duodenum homeobox 1“
PI3K - fosfatidylinositol-3-kináza
PIP3 - fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát
PSC - pankreatická kmenová buňka
PSG - penicilin, streptomycin, glutamin
RIA - radioimuno analýza, z anglického „radioimmunoassay“
RIPA - pufr pro radioimuno analýzu, z anglického „radio-immunoprecipitation assay“
RNA - ribonukleová kyselina, z anglického „ribonucleic acid“
RT-PCR - z anglického „reverse transcription polymerase chain reaction“

SDF - z anglického „stromal cell derived factor“

SDS - dodecylsulfát sodný

sec. - sekunda

Shh - hedgehog signální dráha, z anglického „Sonic hedgehog“

SSC - solný pufr s citrátem, z anglického „saline-sodium citrate“

TBE - pufr, který se skládá z trisu, kyseliny borité, EDTA

TGF - z anglického „transforming growth factor“

TRIS - tris (hydroxymethyl) aminomethan

TSA - Trichostatin A

1. ÚVOD

1.1 *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus je chronická metabolická porucha charakterizovaná buď nedostatečným účinkem hormonu inzulínu, nebo jeho úplným nedostatkem. V obou případech dochází ke zvýšení hladiny glukózy v krvi, která se za fyziologických okolností pohybuje v rozmezí 4 - 8 mmol/l . Rozlišujeme dva základní typy diabetu a to diabetes mellitus typu 1 (DM1) a diabetes mellitus typu 2 (DM2). DM2 se z počátku projevuje sníženou citlivostí cílových tkání na inzulín a následnou postupnou ztrátou schopnosti produkovat endogenní inzulín. Progrese vzniku DM2 je poměrně zdlouhavá a zpočátku postačuje léčba spočívající v podávání perorálních antidiabetik. Pouze dlouhodobě trvající DM2 a jeho nedostatečná kompenzace vyžaduje podávání inzulínu nutného k udržení uspokojivé hladiny glukózy v krvi. Naopak v případě DM1 se jedná o relativně akutní vývoj vzniku tohoto onemocnění, charakterizovaného selektivní destrukcí inzulín produkujících β -buněk. Léčba pacientů s DM1 vyžaduje celoživotní podávání inzulínu s cílem normalizovat hladinu glukózy v krvi. Počet diabetiků závislých na inzulínu v ČR vysoce přesahuje 50 tisíc (ÚZIS, 2009) a celosvětově DM1 postihuje přibližně 0,3% populace (Morales, 2001). Důsledkem absolutního nebo relativního nedostatku inzulínu je postupný rozvoj mnohočetného orgánového poškození se závažnou morbiditou a mortalitou. Tomu lze teoreticky zabránit trvalým dodáváním přiměřeného množství inzulínu. Podávání inzulínu podkožními injekcemi v předem stanovených dávkách a intervalech nechává jen malou flexibilitu reagovat na aktuální metabolické potřeby. Těsnější kontroly lze dosáhnout pomocí kontinuální podkožní infuze programovatelnou pumpou, ale ani tento postup z praktického hlediska nemůže vést k optimální kompenzaci, neboť chybí kontinuální zpětnovazebná

regulace. V praxi se daří zabránit rozvoji orgánových komplikací u pouhých 5% nemocných DM1.

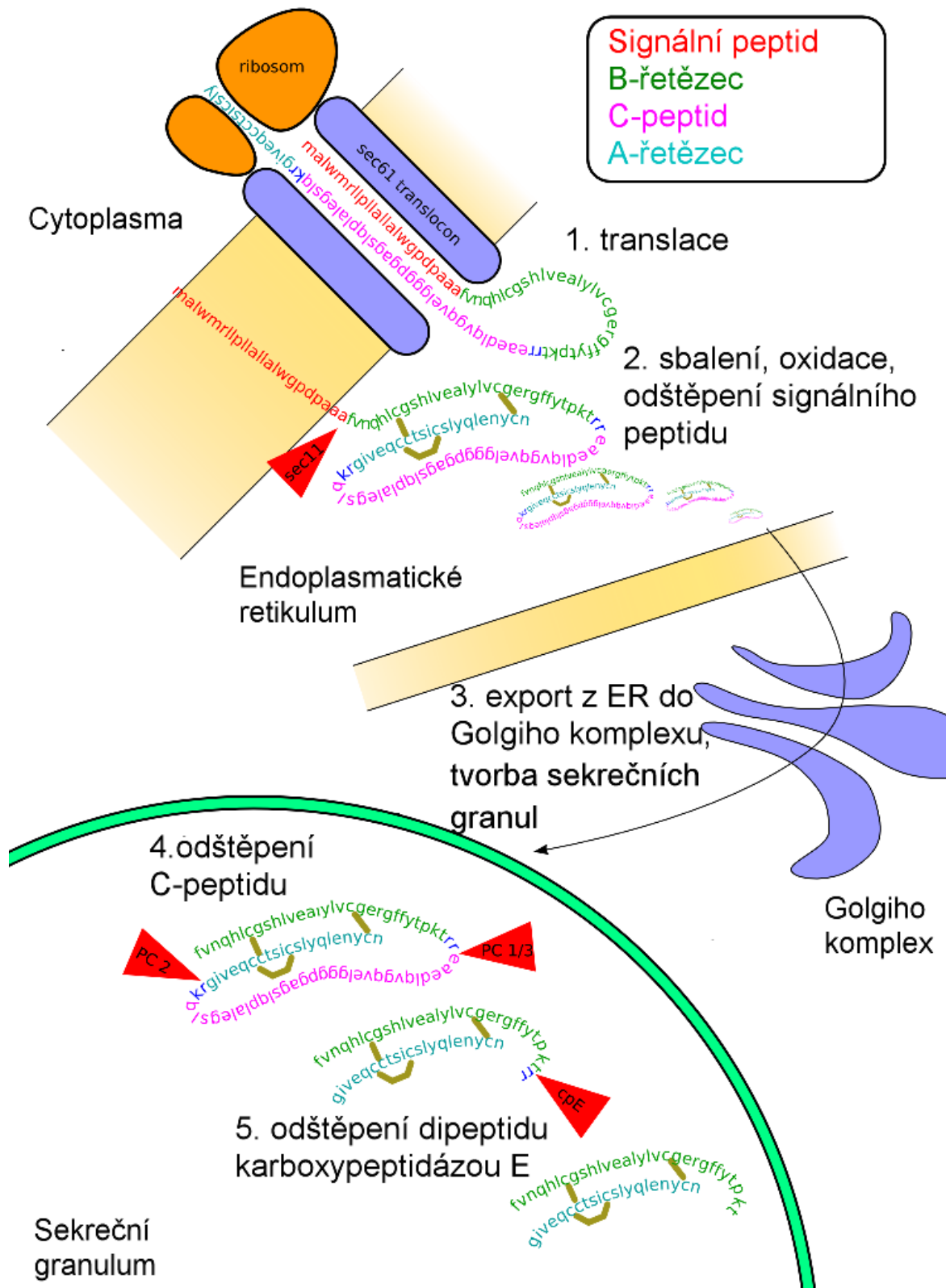
Naproti tomu při transplantaci inzulín-produkující tkáně si dodané β -buňky zachovávají fyziologickou schopnost kontinuální odpovědi na aktuální glykemii, a proto dochází k vyléčení diabetu (normalizaci glykemie). Je dokonce popisována částečná regrese dříve vzniklých orgánových komplikací. V současné době se transplantují Langerhansovy ostrůvky in situ - orgánová transplantace pankreatu, nebo se suspenze izolovaných ostrůvků infunduje do portální žíly. V obou případech je zdrojem allogenní inzulín-produkující tkáně slinivka z kadaverózního dárce. Tím jsou dány dvě základní nevýhody: nedostatečné množství pankreatů a trvalá imunosupresní léčba nutná k zamezení imunitní reakce příjemce vůči transplantované tkáni. V ČR s rozvinutým transplantačním programem byla inzulín-produkující tkáň dosud transplantována asi 450 nemocným, tedy méně než 1% pacientů závislých na inzulínu. K tomu, aby se kurativní léčba transplantací stala dostupnou významnějšímu podílu diabetiků, je nutno hledat nové alternativní zdroje inzulín-produkujících buněk.

1.2 Pankreatické β -buňky a inzulín

Inzulín produkující β -buňky se nacházejí v pankreatu, kde spolu s dalšími endokrinními buňkami tvoří buněčné shluky označované jako Langerhansovy ostrůvky. Endokrinní buňky Langerhansových ostrůvků zastupují přibližně jedno procento všech pankreatických buněk. β -buňky tvoří většinu buněk nacházejících se v Langerhansových ostrůvcích (50%-80%). Kromě endokrinních buněk se v Langerhansových ostrůvcích nachází i hustá síť kapilár, tvořená endoteliálními buňkami. Intenzivní krevní zásobení Langerhansových ostrůvků je nezbytné nejen pro zajištění hlavní úlohy endokrinních buněk pankreatu, kterou je sekrece pankreatických hormonů, ale

i pro dostatečné zásobení endokrinních buněk kyslíkem, který je nezbytný pro jejich velmi specifický metabolismus. Pankreatické endokrinní buňky mají zásadní vliv na regulaci koncentrace glukózy v krvi a s tím související metabolismus glukózy v řadě tkání. Kontrola hladiny krevní glukózy je zajištěna především působením hormonu inzulínu produkovaného β -buňkami a hormonu glukagonu produkovaného α -buňkami.

Sekrece inzulínu β -buňkami je závislá především na koncentraci glukózy v krvi. Prostřednictvím glukózového transportního kanálu GLUT2 dochází při zvýšení koncentrace glukózy v krvi k jejímu transportu skrz membránu β -buněk. GLUT-2 je na inzulínu nezávislý glukózový transportní kanál a zajišťuje transport glukózy na základě koncentračního gradientu. Glukóza je v β -buňce fosforylována na glukóza-6-fosfát enzymem glukokinázou. Tento enzym nacházející se v β -buňkách, neuronech a hepatocytech patří do široké skupiny isoenzymů hexokináz. Ve srovnání s dalšími hexokinázami má však glukokináza nízkou afinitu ke glukóze a vysokou hodnotu K_m (8 mmol/l). Právě tato vlastnost glukokinázy umožňuje β -buňkám reagovat na změny koncentrace glukózy ve fyziologickém rozmezí (4 - 8 mmol/l) a slouží jako senzor koncentrace glukózy v krvi. Následnou anaerobní glykolýzou se z glukóza-6-fosfátu tvoří pyruvát, jehož další metabolizací vzniká ATP při oxidační fosforylaci. V důsledku zvýšení hladiny intracelulárního ATP dochází k uzavření ATP-dependentní K^+ membránových kanálů a následné depolarizaci buněčné membrány. V důsledku depolarizace buněčné membrány dochází k otevření voltáž-dependentních Ca^{2+} kanálů a nárůstu intracelulárního Ca^{2+} . Zvýšení hladiny intracelulárního Ca^{2+} aktivuje uvolnění sekrečních granul obsahujících inzulín do krevního oběhu.

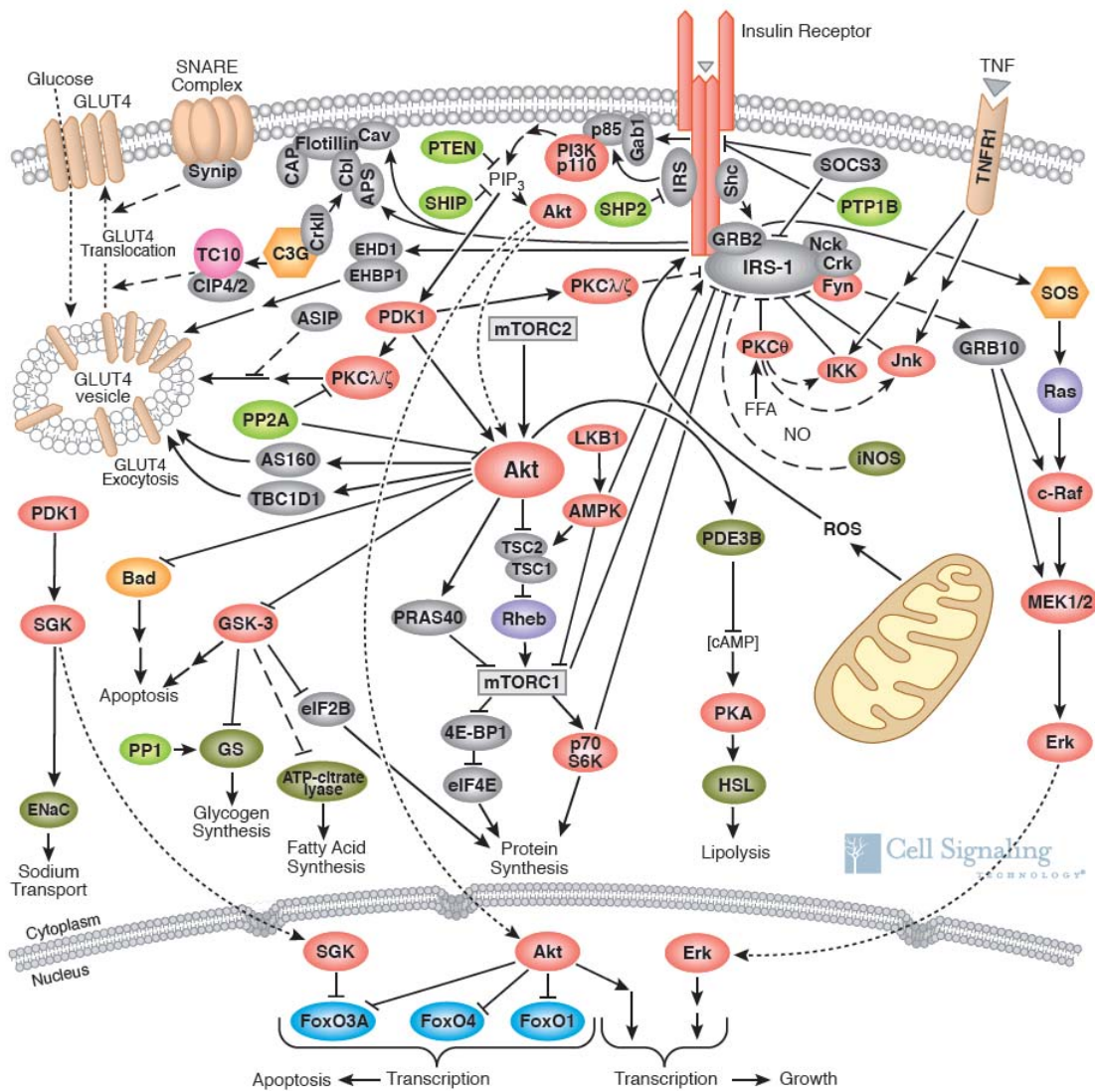


Obrázek 1.1 postranlační úpravy inzulínu. Převzato a upraveno dle <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Insulinpath.png>

β -buňky mají ve srovnání s ostatními buňkami organismu ve své metabolické výbavě několik modifikací nutných pro přesnou odpověď na hladinu glukózy. Jsou to jak již výše zmíněný glukózový přenašeč GLUT2 a enzym glukokináza, tak i chybějící exprese enzymu laktát dehydrogenáza, který katalyzuje přeměnu pyruvátu na laktát. Přeměnou pyruvátu na laktát, který není dále metabolizován, by se oslaboval signál pro sekreci inzulínu indukovaný zvýšenou tvorbou ATP z pyruvátu. Dále β -buňky neexprimují monokarboxylátový transporter, který umožňuje přechod pyruvátu a laktátu přes buněčnou membránu. Transport pyruvátu přes membránu β -buňky do extracelulárního prostoru by mohl oslabit signál pro sekreci inzulínu, nebo by mohl naopak zvýšit sekreci inzulínu v důsledku zvýšení intracelulárního pyruvátu (Newgard, 2002).

Inzulín je peptidový hormon tvořený 51 aminokyselinami. Inzulín se skládá ze dvou polypeptidových řetězců, řetězce A (21 aminokyselin) a řetězce B (30 aminokyselin) spojených disulfidickými můstky (Ryle a spol., 1955). Biosyntéza inzulínu je několika krokový proces složený z řady posttranslačních modifikací (viz obr. 1.1). Ty se odehrávají jak v lumen endoplasmatického retikula, v golgiho aparátu tak i v sekrečních granulích. Nejprve vzniká v ribozomech při překlada z mRNA genu pro inzulín peptidový prekurzor tzv. preproinzulín. Preproinzulín obsahuje signální sekvenci, řetězec B, C-peptid a řetězec A. V endoplazmatickém retikulu je z molekuly preproinzulínu odštěpena signální sekvence za vzniku proinzulínu (Steiner a spol., 1967). Proinzulín je tvořen inzulínovými řetězci A a B spojenými C-peptidem (connecting peptide). Vzniklý proinzulín je transportován do golgiho aparátu a následně do sekrečních granul, kde je působením enzymů prohormon konvertáza 1/3 a prohormon konvertáza 2 proteolyticky rozštěpen na C-peptid a inzulín v ekvimolárním množství (Clark a spol., 1969). Ekvimolární sekrece C-peptidu a inzulínu je často

využívána při stanovení inzulínové sekreční kapacity β -buněk v buněčných kulturách. Stanovení samotného inzulínu může poskytovat falešně pozitivní hodnoty, z důvodů využívání inzulínu jako doplňku kultivačního média.



Obrázek 1.2 Vliv inzulínu na buněčné pochody a signální kaskády. Převzato z http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Insulin_Receptor.html

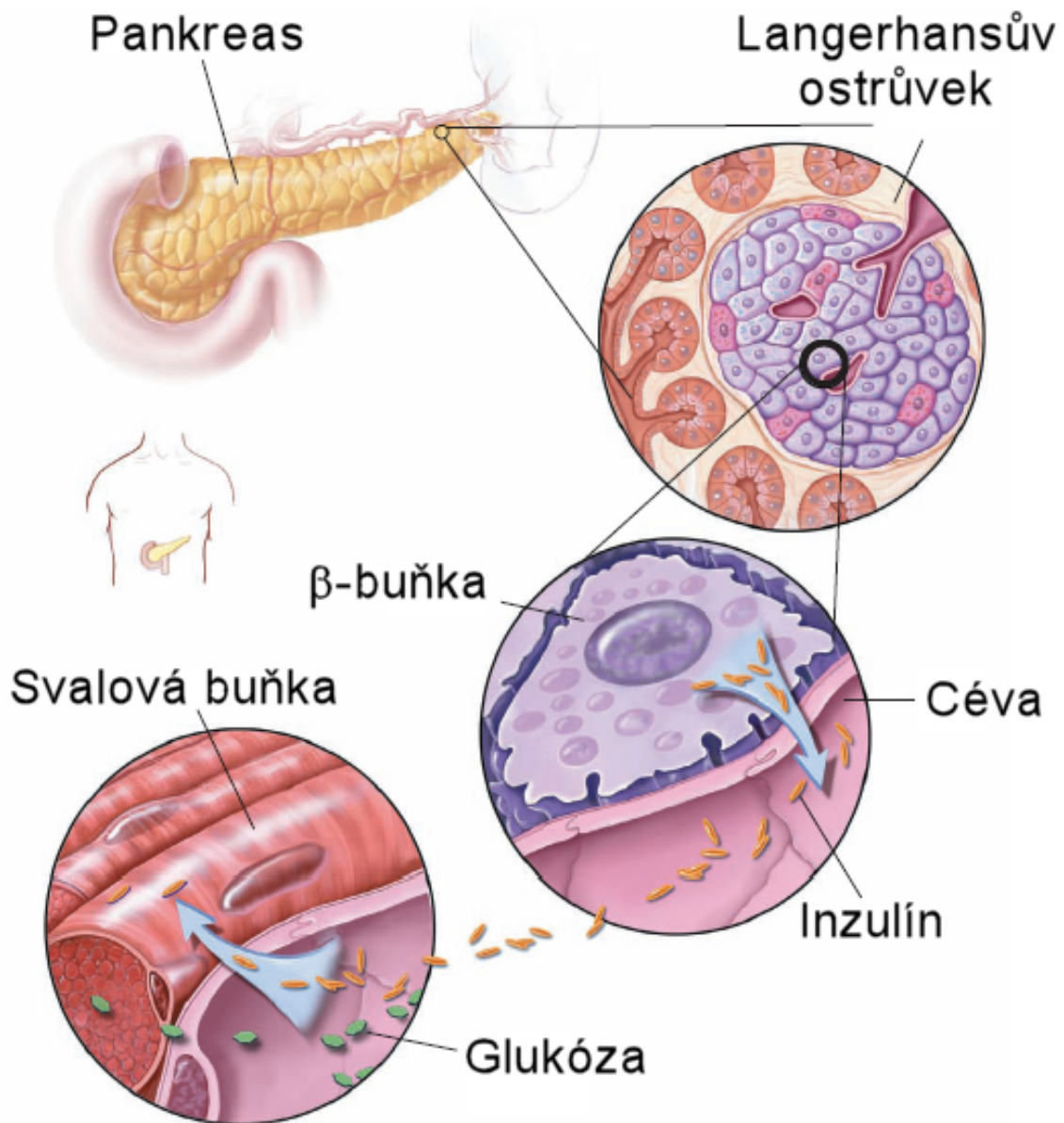
Fyziologický efekt inzulínu je značný a ovlivňuje řadu metabolických a buněčných pochodů. Hlavní úlohou inzulínu je zajištění transportu glukózy přes buněčnou membránu svalových a tukových buněk viz. obrázek 1.3.

Transport glukózy je zajištěn translokací glukózového transportéru GLUT4 na povrch buněčné membrány (Bell a spol., 1990). Translokace je aktivována právě navázáním inzulínu na inzulínový receptor nacházející se na buněčné membráně. Kromě glukózy stimuluje inzulín i resorpci aminokyselin a dalších živin buňkami (Manchester, 1970; Akedo a spol., 1962). Efekt inzulínu na biochemické děje a metabolismus je evidentní především v případě jaterních buněk. U hepatocytů inzulín nejen aktivuje řadu enzymů účastnících se glykolýzy a syntézy glykogenu, ale stimuluje přímo i jejich expresi (Foufelle a spol., 2002). Inzulín má ovšem vliv nejen na metabolické děje, ale prostřednictvím signálních kaskád, které aktivuje, i na řadu buněčných pochodů jako je proteosyntéza, exprese genů, proliferace, apoptóza a další viz obrázek 1.2.

1.3 Vývoj pankreatu a pankreatických β -buněk

Pankreas je laločnatý orgán patřící do trávicí soustavy. Pankreas se nachází v dutině břišní mezi duodenem a slezinou a jeho hmotnost se pohybuje mezi 60-150 gramy. Funkčně spadá mezi žlázy s vnitřní a vnější sekrecí. Vnější sekreci zajišťuje exokrinní složka, která tvoří větší část pankreatické tkáně (70-80%). Exokrinní část pankreatu produkuje především trávicí enzymy ve formě proenzymů mezi něž patří karboxypeptidáza A, trypsinogen, chymotrypsinogen. V pankreatu jsou dále produkovány pankreatická elastáza, pankreatická lipáza a α -amyláza. Exokrinní část pankreatu je rozčleněna do lalůčků (acinů), jež jsou tvořeny exokrinními buňkami na povrchu a duktálními buňkami v centrální části. Duktální buňky formují rozvětvenou síť kanálků, do kterých jsou sekretovány trávicí enzymy z exokrinních buněk. Kanálky tvořené duktálními buňkami se sbíhají do velkého a malého

pankreatického vývodu. Velkým a malým vývodem pankreatu jsou sekretovány trávicí enzymy do dvanáctníku ve formě pankreatické šťávy.



Obrázek 1.3 Uložení pankreatu v dutině břišní, struktura Langerhansových ostrůvků a sekrece inzulínu β -buňkou do krevního oběhu. Převzato a upraveno z <http://stemcells.nih.gov/info/2006report/2006Chapter7.htm>

Úlohu žlázy s vnitřní sekrecí zajišťuje v pankreatu její endokrinní část, která je tvořená shluky endokrinních buněk tzv. Langerhansovými ostrůvky viz. obrázek 1.3. Ty se nacházejí v počtu přibližně 1 000 000 rozptýlené v celém pankreatu. Mezi hlavní endokrinní buňky, které se nacházejí v Langerhansových ostrůvcích patří α -buňky, β -buňky, δ -buňky produkující somatostatin, PP buňky produkující pankreatický polypeptid a ϵ -buňky produkující ghrelin.

Během embryonálního vývoje vzniká pankreas z buněk zárodečné endodermální lišty. Spojením dorsální a ventrální části budoucího pankreatu, které vznikají jako výchlípky formujícího se střeva, vzniká později dospělý pankreas. Dorsální část pankreatu se u člověka objevuje ve 26. dni embryonálního vývoje vychlípáním formující se stěny dvanáctníku. Ventrální pankreas vzniká o 6 dní později z jaterně-žlučové výchlípky. Dorsální a ventrální část pankreatu splývá do celistvé struktury během 37. - 42. dne embryonálního vývoje. V období kolem 56. dne embryonálního vývoje se pankreas začíná morfologicky podobat dospělému pankreatu. V průběhu embryonálního vývoje je nově formovaný pankreas vystaven působení okolních tkání a struktur, které mají výrazný vliv nejen na průběh morfogeneze pankreatu, ale i na diferenciaci jednotlivých pankreatických buněk. Notochord, aorta a mezenchym patří mezi okolní struktury, které mají nejvýraznější vliv na embryonální vývoj pankreatu (Jacquemin a spol., 2006). Působení těchto struktur je zajištěno prostřednictvím řady růstových faktorů, které jsou uvolňovány do jejich okolí. V případě notochordu se jedná především o růstové faktory activin- β B a FGF2, které inhibují hedgehog signální dráhu (Shh) (Kim a spol., 2001). Inhibice Shh umožňuje aktivaci exprese transkripčního faktoru Pdx-1, který je nezbytný pro vznik a diferenciaci pankreatických progenitorů (Kim a spol., 1997). Aorta má vliv především na vývoj dorsální části pankreatu a expresi transkripčního faktoru

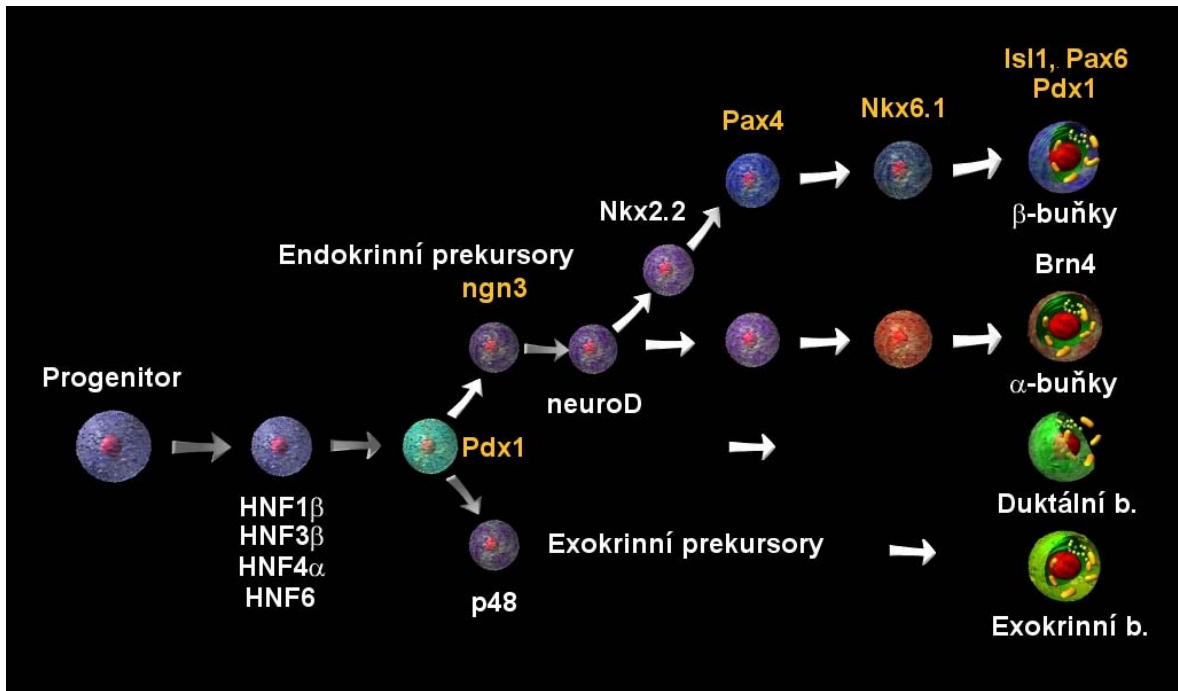
Ptf1a (Yoshitomi a spol., 2004), který je spolu s transkripčním faktorem Pdx-1 nezbytný pro vývoj pankreatických progenitorů (Kawauchi a spol., 2002). Pankreatické epiteliální buňky pod vlivem sousedních mezodermálních struktur postupně prolifерují a vytváří rozvětvené struktury. Formující se pankreas je postupně obklopen okolním mezenchymem, který ovlivňuje další morfogenezi pankreatu a zároveň má vliv na proliferaci a diferenciaci jednotlivých typů pankreatických buněk (Gittes a spol., 1996).

V průběhu vývoje pankreatu se specializované pankreatické buňky diferencují z multipotentních progenitorů pocházejících z endodermu (Jonsson a spol., 1995). Všechny tři základní typy pankreatických buněk vznikají postupnou diferenciací multipotentních pankreatických progenitorů, které exprimují transkripční faktory Pdx-1 a Ptf1 (Gu a spol., 2003). Diferenciace multipotentních pankreatických progenitorů je komplexní děj regulovaný řadou signálních drah a aktivitou řady transkripčních faktorů. Proliferace pankreatických progenitorů je zajištěna aktivací Notch signální dráhy a prostřednictvím transkripčního faktoru Sox9 (Seymour a spol., 2007). Proliferace pankreatických progenitorů během embryonálního vývoje je nezbytná pro zajištění dostatečného množství progenitorů pro pozdější fáze diferenciaci.

Diferenciace multipotentních progenitorů na jednotlivé typy pankreatických buněk probíhá již v raných fázích embryonálního vývoje pankreatu, avšak k masivní diferenciaci dochází, až v pozdějších fázích vývoje během tzv. druhotné tranzice (Pictet a spol., 1972; Gradwohl a spol., 2000). Na diferenciaci a funkci exokrinních buněk se podílí především transkripční faktor p48 a Mist1 (Pin a spol., 2001). Spolu s těmito transkripčními faktory se diferenciaci exokrinních buněk účastní i transkripční faktor Ptf1 (Rovira a spol., 2008). Zatímco ostatní typy diferencovaných pankreatických buněk již dále neexprimují transkripční faktor Ptf1, který rovněž exprimují pankreatické

progenitory, v případě exokrinních buněk přetrvává jeho exprese i po ukončení diferenciaci.

Vzhledem k rozsáhlému spektru všech endokrinních pankreatických buněk je diferenciaci na jednotlivé typy endokrinních buněk poměrně komplikovaný proces řízený řadou transkripčních faktorů viz. obrázek 1.4. Během embryonálního vývoje se všechny pankreatické endokrinní buňky diferencují z Pdx-1/Ptf-1 pozitivních progenitorů. Nezbytnou podmínkou pro aktivaci diferenciaci na endokrinní buňky je inhibice notch signální dráhy, která zajišťuje proliferaci pankreatických progenitorů. Notch signální dráha inhibuje expresi transkripčního faktoru neurogeninu-3, klíčového transkripčního faktoru a nezbytného pro aktivaci diferenciaci všech typů pankreatických endokrinních buněk (Gragwohl a spol., 2000). Neurogenin-3 je exprimován výlučně pankreatickými endokrinními progenitory a jeho exprese je v průběhu diferenciaci endokrinních buněk postupně utlumena (Habener a spol., 2005). Další diferenciaci na jednotlivé typy endokrinních buněk je řízena transkripčními faktory, jejichž exprese je v řadě případů aktivována právě neurogeninem-3. Mezi klíčové transkripční faktory aktivující další diferenciaci pankreatických endokrinních progenitorů směrem na β -buňky patří transkripční faktory Nkx6.1, Nkx2.2, Pax4, Pax6, NeuroD a Mafa (Sander a spol., 2000; Collombat a spol., 2003; Brink a spol., 2001; Ritz-Larsen a spol., 2002; Nishimura a spol., 2006; Jensen a spol., 2000). Postupná aktivace těchto transkripčních faktorů je nezbytná pro další průběh diferenciaci na plně diferencované β -buňky. Řada uvedených transkripčních faktorů aktivuje a řídí expresi proteinů nezbytných pro správnou funkci β -buněk a jsou proto přítomny i v terminálně diferencovaných β -buňkách.



Obrázek 1.4 Expres transkripčních faktorů regulujících diferenciaci pankreatických buněk

Ačkoliv β -buňky tvoří většinu pankreatických endokrinních buněk, během raných fází embryonálního vývoje se v pankreatu nacházejí především α -buňky. Teprve v průběhu druhotné tranzice dochází k masivnímu nárůstu počtu β -buněk (Herrera a spol., 1991). β -buňky vznikají především v oblasti nově zformovaných pankreatických duktů, z nichž postupně migrují do okolní tkáně, kde spolu s ostatními endokrinními buňkami vytváří buněčné shluky Langerhansových ostrůvků (Schwitzgebel a spol., 2000). Právě místo vzniku β -buněk v pankreatických duktech a přítomnost pankreatických progenitorů charakterizovaných expresí transkripčních faktorů Pdx-1 a Sox9 nejen během embryonálního vývoje, ale i v dospělosti nasvědčují tomu, že β -buňky se diferencují z buněk nacházejících se v pankreatických duktech (Li a spol., 2010). Rovněž současná exprese cytokeratinu-19, markeru duktálních buněk, a inzulinu u diferencujících se β -buněk svědčí pro původ β -buněk v pankreatických duktech (Bouwens a spol., 1997). Ačkoliv většina β -buněk

vzniká diferenciací z pankreatických progenitorů, část β -buněk vzniká i následující replikací v pozdějších fázích embryogeneze (Kassem a spol., 2000).

1.4 Zdroje buněk diferencujících se na pankreatické β -buňky

Po narození je počet β -buněk do značné míry daný, avšak v průběhu života dochází k neustálé obnově a částečné expanzi počtu pankreatických endokrinních buněk. Endokrinní buňky se po ukončení vývoje obnovují nejen z důvodu náhrady za buňky zaniklé v důsledku fyziologické apoptózy, ale i v důsledku patologických změn v organismu (Klöppel a spol., 1985; Butler a spol., 2003). Ačkoliv řada experimentů na zvířecích modelech prokázala, že β -buňky jsou po narození doplňovány především replikací již existujících β -buněk (Dor spol., 2004), v případě člověka dochází prokazatelně i k neogenezi a diferenciaci nově vzniklých β -buněk (Bouwens a spol., 1998 ; Butler a spol., 2003; Patti a spol., 2005). I přes velmi intenzivní výzkum v této oblasti zůstává detailní charakter pankreatických endokrinních progenitorů, ze kterých vznikají nové β -buňky během dospělého života, stále neobjasněn. Doposud bylo identifikováno několik buněčných markerů (c-Met, CD133, CXCR-4, ALDH1), pomocí kterých se podařilo izolovat pankreatické neendokrinní buňky, jež byly schopny in vitro diferenciaci na inzulín produkující buňky s fenotypem β -buněk (Suzuki a spol., 2004; Koblas a spol., 2008; Koblas a spol., 2007; Rovira a spol., 2010). Všechny uvedené markery jsou v pankreatu exprimovány především duktálními buňkami. Zda-li tyto buňky slouží jako zdroj in-vivo diferencovaných β -buněk je stále otázkou. Nicméně pomocí studií na geneticky modifikovaných zvířecích modelech bylo prokázáno, že pankreatické duktální buňky jsou schopné in vivo diferenciaci na β -buňky i u dospělých jedinců (Inada a spol., 2008).

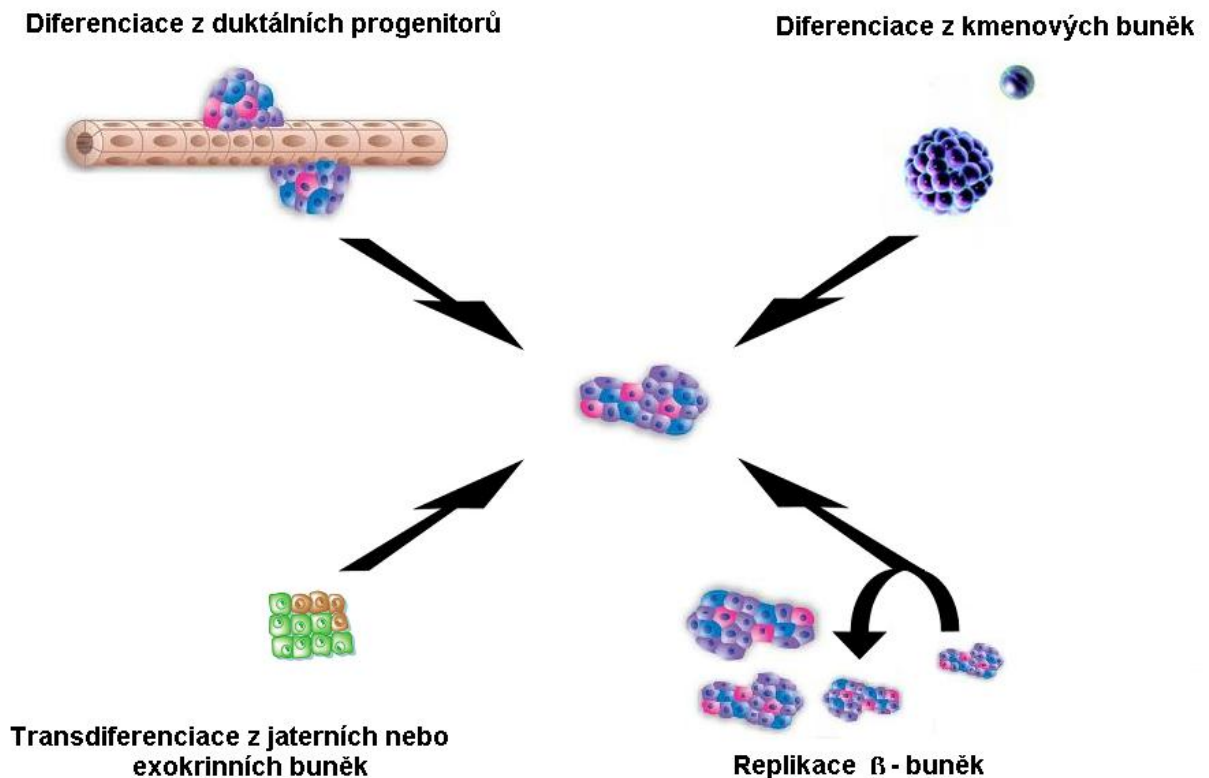
Kromě duktálních buněk a β -buněk samotných mohou sloužit jako zdroj nových β -buněk i ostatní pankreatické endokrinní buňky. Po vyvolání selektivní destrukce všech pankreatických β -buněk (>99%) bylo prokázáno, že část nově vzniklých β -buněk vzniká transdiferenciací z α -buněk. V průběhu regenerace byly detekovány α -buňky, které exprimovaly řadu transkripčních faktorů (Pdx-1 a Nkx6.1) účastnících se diferenciaci β -buněk (Thorel a spol., 2010).

Dalším potenciálním zdrojem β -buněk mohou být pankreatické exokrinní buňky. Za fyziologických podmínek nejsou exokrinní buňky zdrojem nově formovaných β -buněk (Desai a spol., 2007). Nicméně po indukci exprese klíčových transkripčních faktorů účastnících se diferenciaci β -buněk, mohou být pankreatické exokrinní buňky diferencovány na plně funkční β -buňky schopné normalizovat glykemii u diabetických zvířat (Zhou a spol., 2008). Podobným postupem je rovněž možné transdiferencovat jaterní buňky na plně funkční β -buňky rovněž schopné normalizovat glykemii u diabetických zvířat (Ferber a spol., 2000; Yang a spol., 2002). Schopnost exokrinních a jaterních buněk transdiferencovat se na plně funkční β -buňky je bezpochyby dán společným původem během embryonálního vývoje obou orgánů a příslušných buněčných podtypů (Deutsch a spol., 2001).

Kromě buněk pocházejících z pankreatu resp. z jater byla prokázána schopnost diferenciaci na plně funkční β -buňky i u kmenových buněk pocházejících z jiných zdrojů. Jedná se především o pluripotentní kmenové buňky odvozené z embryonálních buněk nebo získaných metodou přípravy tzv. indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPS). S využitím růstových a diferenciacních faktorů, které se uplatňují během embryonálního vývoje pankreatu a následné diferenciaci β -buněk byly vypracovány velmi efektivní postupy in vitro přípravy β -buněk z pluripotentních kmenových

buněk (D'Amour a spol., 2006; Kroon a spol., 2008; Maehr a spol., 2009). Schopnost těchto buněk se diferencovat na β -buňky je dána jejich pluripotencí, schopností diferenciaci na jakoukoliv buňku organismu.

Dalším nadějným zdrojem β -buněk by mohly být kmenové buňky získané z kostní dřeně nebo pupečnickové krve. Ačkoliv význam těchto buněk pro eventuální klinické použití při léčbě diabetu je značně diskutabilní, byla i u těchto buněk prokázána schopnost diferenciaci na inzulín produkující buňky (Ianus a spol., 2003; Koblas a spol., 2009; Yoshida a spol., 2005).



Obrázek 1.5 Buněčné zdroje s potenciálem vytvářet nové β -buňky

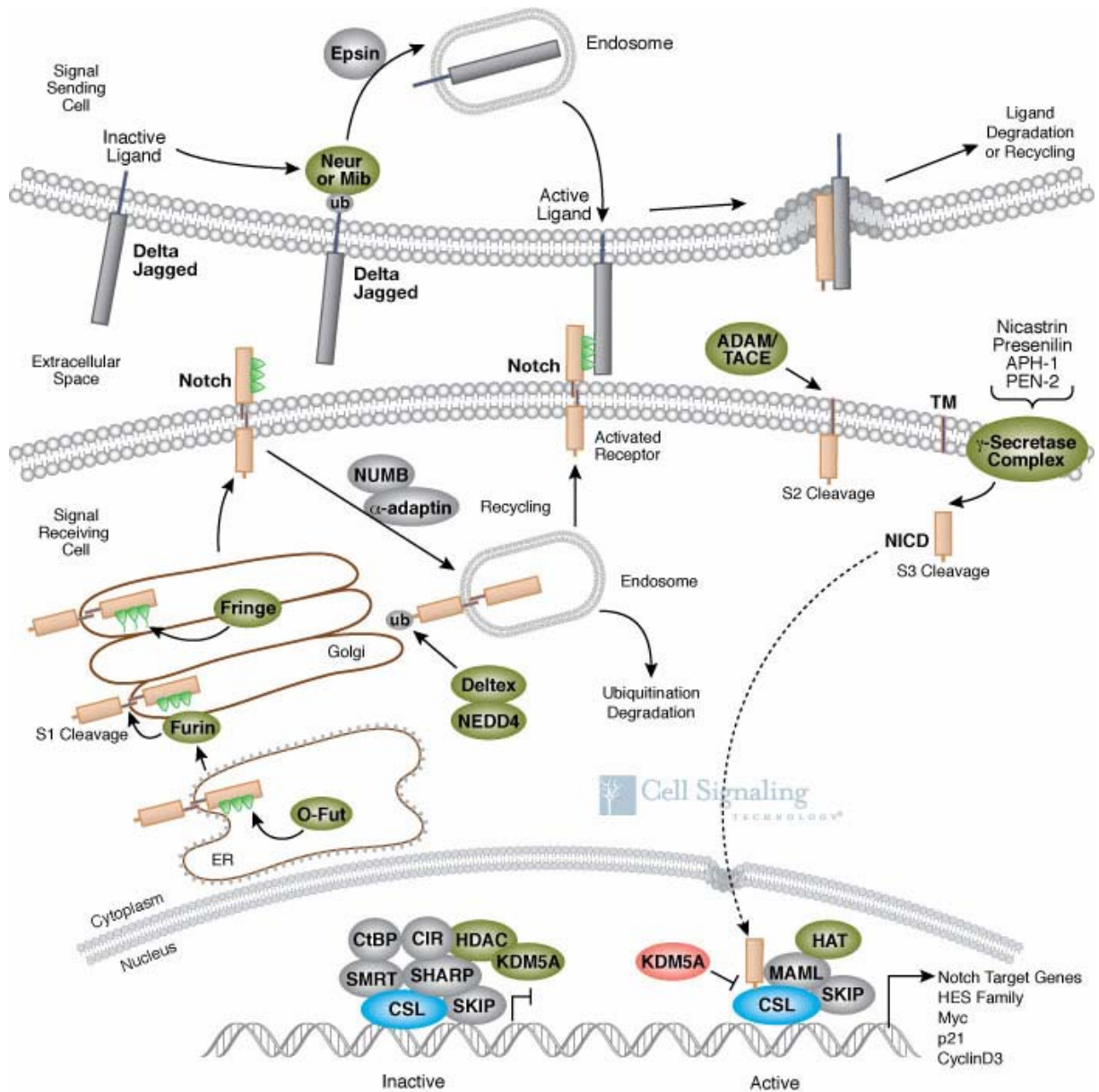
1.5 Signální dráhy ovlivňující diferenciaci β -buněk

Diferenciace buněk, stejně jako ostatní buněčné pochody, je do značné míry řízena prostřednictvím buněčné signalizace. Buněčná signalizace je zajištěna komplexem signálních drah, které umožňují přenos určitého signálu z povrchu buňky do buněčného jádra a rovněž také modifikaci biologicky aktivních proteinů. Signálem pro aktivaci konkrétní signální dráhy, bývá molekula ligandu, který se váže na svůj specifický receptor na buněčné membráně. Po vazbě a následné aktivaci příslušného receptoru dochází k postupné aktivaci jednotlivých mediátorů, které jednak postupně zesilují indukovaný signál a jednak slouží k přenosu signálu do příslušného buněčného kompartmentu nebo k cílové molekule. Řada signálních drah aktivuje široké spektrum mediátorů, které následně ovlivňují velké množství buněčných pochodů a cílových molekul viz. efekt inzulínu. Pro diferenciaci pankreatických β -buněk je klíčových několik signálních drah zde uvedených.

1.5.1 Notch signální dráha

Notch signální dráha je jednou z klíčových buněčných signálních drah nejen v průběhu embryogeneze, ale i v následném postnatálním vývoji. Notch signální dráha je příkladem juxtakrinní signalizace, kdy dochází k signalizaci mezi dvěma bezprostředně sousedícími buňkami prostřednictvím membránových proteinů resp. ligandů a receptorů (Rozante a spol., 2007). Součástí notch signální dráhy je široká rodina membránových receptorů, které se skládají z extracelulární a intracelulární domény. Po vazbě specifických ligandů na extracelulární doménu receptoru se aktivuje odštěpení intracelulární domény, která se translokuje do buněčného jádra. V jádře vytváří intracelulární doména notch receptoru transkripční komplex

s transkripčními faktory RBP-J a MAML. Tento transkripční komplex následně aktivuje expresi transkripčního faktoru Hes-1, který funguje jako represor řady genů nezbytných pro diferenciaci kmenových buněk (Jarriault a spol., 1995).

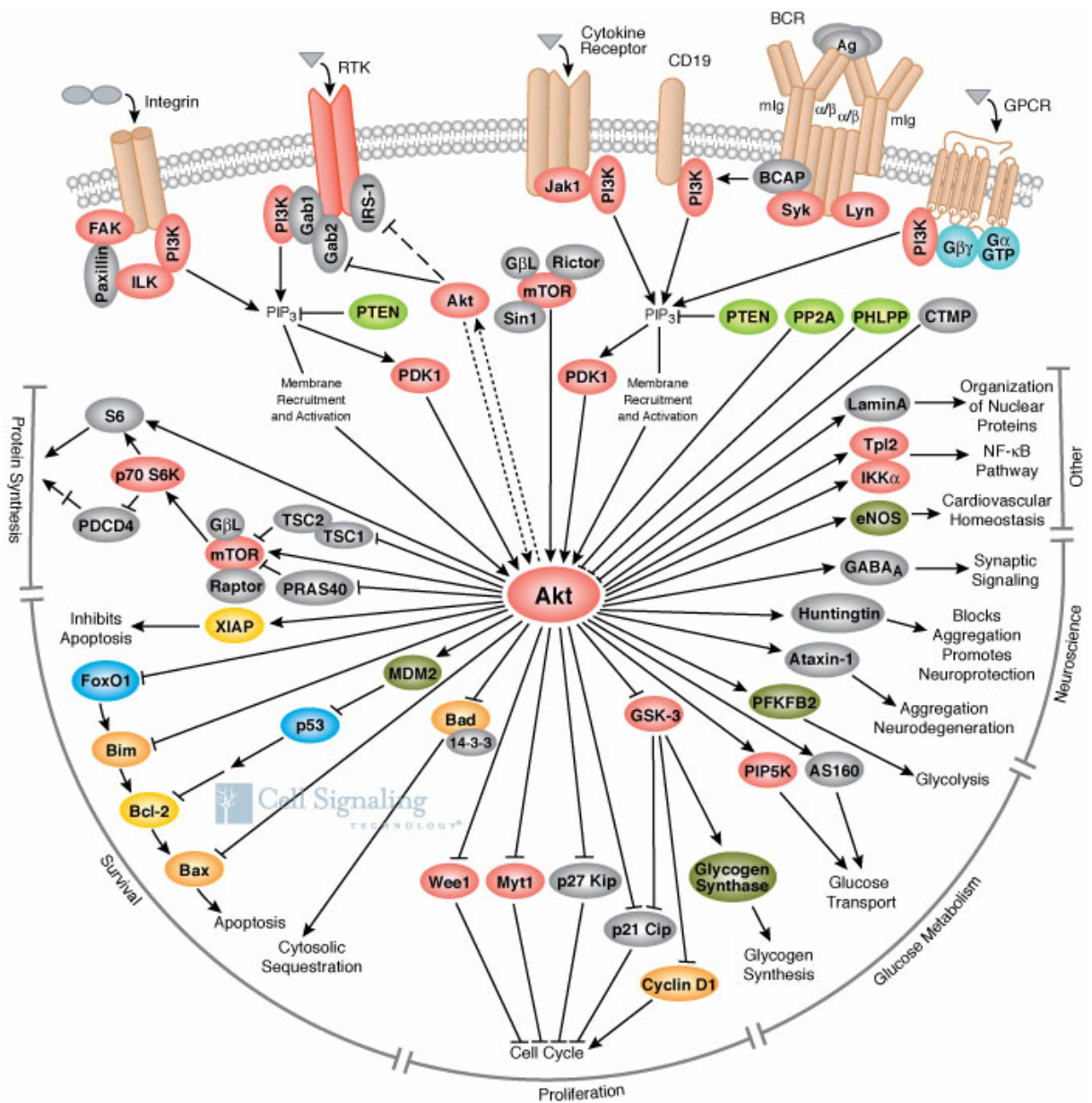


Obrázek 1.6 Aktivace notch signální dráhy a následné intracelulární pochody vedoucí k expresi důležitých transkripčních faktorů. Převzato z <http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Notch.html>

V pankreatu má tato signální dráha vliv nejen na proliferaci, ale především na diferenciaci progenitorů na jednotlivé typy pankreatických buněk. Notch signální dráha je aktivní nejen u pankreatických progenitorů charakterizovaných expresí transkripčních faktorů Pdx-1 a Sox9 (Seymour a spol., 2007), ale i u plně diferencovaných pankreatických buněk (Bar a spol., 2008). V průběhu diferenciaci progenitorů na endokrinní i exokrinní buňky dochází k inhibici notch signální dráhy (Murtaugh a spol., 2003; Esni a spol., 2004). Inhibice notch signální dráhy při diferenciaci je nezbytná vzhledem k tomu, že notch signální dráha inhibuje expresi transkripčního faktoru neurogeninu-3, nezbytného pro diferenciaci pankreatických endokrinních progenitorů (Lee a spol., 2001). Notch signální dráha inhibuje expresi transkripčního faktoru neurogeninu-3 prostřednictvím aktivace transkripčního faktoru Hes-1, který je represorem genu pro neurogenin-3 (Lee a spol., 2001). O důležitosti tohoto transkripčního faktoru pro diferenciaci pankreatických endokrinních buněk svědčí experimenty se selektivní inhibicí notch signální dráhy. U myší jimž byla zablokována notch signální dráha, docházelo během embryonálního vývoje k masivní diferenciaci pankreatických progenitorů výlučně na endokrinní buňky a minimální diferenciaci na exokrinní buňky (Apelgvist a spol., 1999). Z tohoto důvodu je nutná velmi přesná regulace exprese neurogeninu-3, která je zajištěna mechanismem laterální inhibice. Při laterální inhibici dochází prostřednictvím vazby notch ligandů nacházejících se na buňce exprimující neurogenin-3 k aktivaci notch receptorů na všech sousedících buňkách a k následnému zamezení exprese neurogeninu-3 v těchto buňkách prostřednictvím aktivace exprese Hes-1 represoru (Murtaugh a spol., 2003). Díky tomuto mechanismu je exprese neurogeninu-3 omezená na poměrně malé množství pankreatických buněk.

1.5.2 PI3K/Akt signální dráha

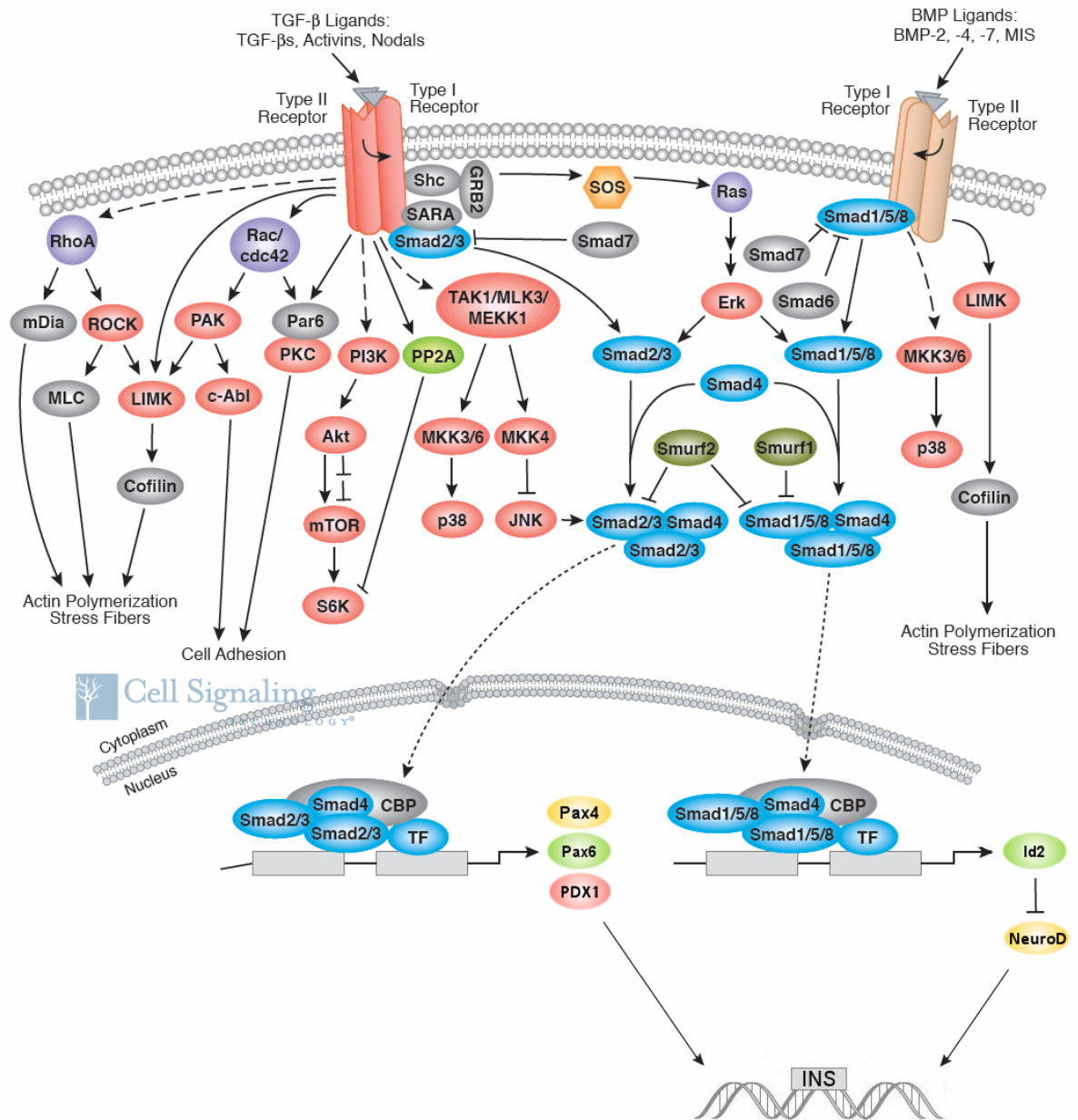
Fosfatidylinositol-3-kinasová signální dráha je jednou z nejdůležitějších signálních drah, která ovlivňuje řadu buněčných pochodů jako je proliferace a apoptóza, aktivitu enzymů a kináz a rovněž reguluje expresi genů a proteosyntézu. PI3K/Akt signální dráha je aktivovaná širokým spektrem hormonů, růstových faktorů ale i inkretinů jako jsou např. inzulin, EGF, IGF, TGF- β a GLP-1. Po vazbě hormonu nebo růstového faktoru na příslušný receptor dochází k aktivaci PI3K. Aktivovaná PI3K katalyzuje fosforylaci volného hydroxyly fosfatidylinositolbifosfátu za vzniku fosfatidylinositoltrifosfátu (PIP3). PIP3 následně aktivuje proteinkinázu B (Akt), která aktivuje (mTOR, S6Kináza, PKC), nebo inhibuje (GSK3 β , p21) řadu regulátorů buněčných pochodů. V případě pankreatických β -buněk má PI3K/Akt signální dráha nejen na jejich proliferaci (Trümper a spol., 2000), ale i na diferenciaci. Hlavní roli v ovlivnění diferenciaci β -buněk PI3K/Akt signální dráhou sehrává transkripční faktor FoxO1. Aktivace PI3K/Akt signální dráhy způsobuje fosforylaci FoxO1. Fosforylovaný FoxO1 je následně transportován z buněčného jádra do cytoplasmy, takže nemůže ovlivnit expresi cílových genů. Mezi geny regulované FoxO1 patří kromě jiných i klíčové transkripční faktory diferenciaci a funkce β -buněk jako jsou Pdx-1 (Kitamura a spol., 2002), Mafa a NeuroD (Kitamura a spol., 2005). Zatímco v případě transkripčního faktoru Pdx-1 působí FoxO1 jako represor exprese u transkripčních faktorů Mafa a NeuroD naopak aktivuje jejich expresi. FoxO1 má rovněž i výrazný vliv na embryonální vývoj pankreatu a diferenciaci pankreatických endokrinních buněk. Selektivní aktivace FoxO1 utlumuje diferenciaci pankreatických progenitorů na exokrinní buňky a stimuluje diferenciaci na α -buňky (Kitamura a spol., 2009).



Obrázek 1.7 Aktivace PI3K/Akt signální dráhy a následné intracelulární pochody vedoucí k řadě důležitých buněčných pochodů. Převzato z http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Akt_PKB.html

1.5.3 TGF- β signální dráha

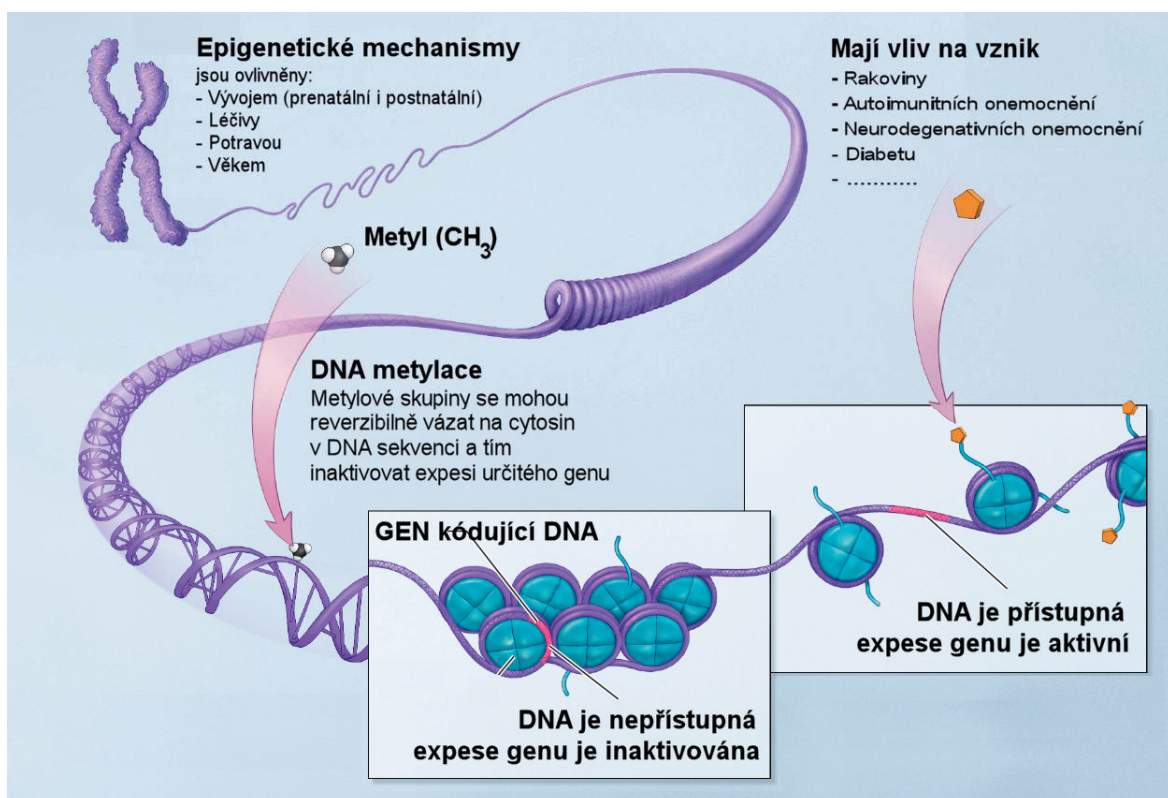
TGF- β signální dráha je tvořena širokým spektrem ligandů, jejich antagonistů, receptorů a intracelulárních signálních molekul. Po vazbě TGF- β ligandů na příslušný receptor dochází k fosforylaci intracelulárních SMAD proteinů. Fosforylované SMAD proteiny se následně translokují do buněčného jádra, kde aktivují expresi cílových genů (Massagué a spol., 2000). TGF- β signální dráha hraje významnou roli v embryonálním vývoji pankreatu stejně tak jako u diferencovaných β -buněk. Během embryonálního vývoje TGF- β aktivuje formování entodermu, z kterého se následně formuje i pankreas (D'Amour a spol., 2005). V případě pankreatu aktivace TGF- β signální dráhy stimuluje diferenciaci endokrinních buněk z pankreatických progenitorů na úkor exokrinních buněk (Sanvito a spol., 1994). Naopak inhibice TGF- β prostřednictvím follistatinu, antagonisty TGF- β , stimuluje diferenciaci progenitorů na exokrinní buňky na úkor endokrinních (Miralles a spol., 1998). Stimulace exokrinní buněčné linie Activinem A, jedním z mnoha ligandů patřících do TGF- β rodiny, kombinaci s HGF růstovým faktorem aktivuje expresi neurogeninu-3 a následnou transdiferenciaci na endokrinní buňky (Ogihara a spol., 2003).



Obrázek 1.8 Aktivace TGF-β signální dráhy a následné intracelulární pochody vedoucí k expresi důležitých transkripčních faktorů ovlivňujících diferenciaci β-buněk Převzato a upraveno z http://www.cellsignal.com/reference/pathway/TGF_beta.html

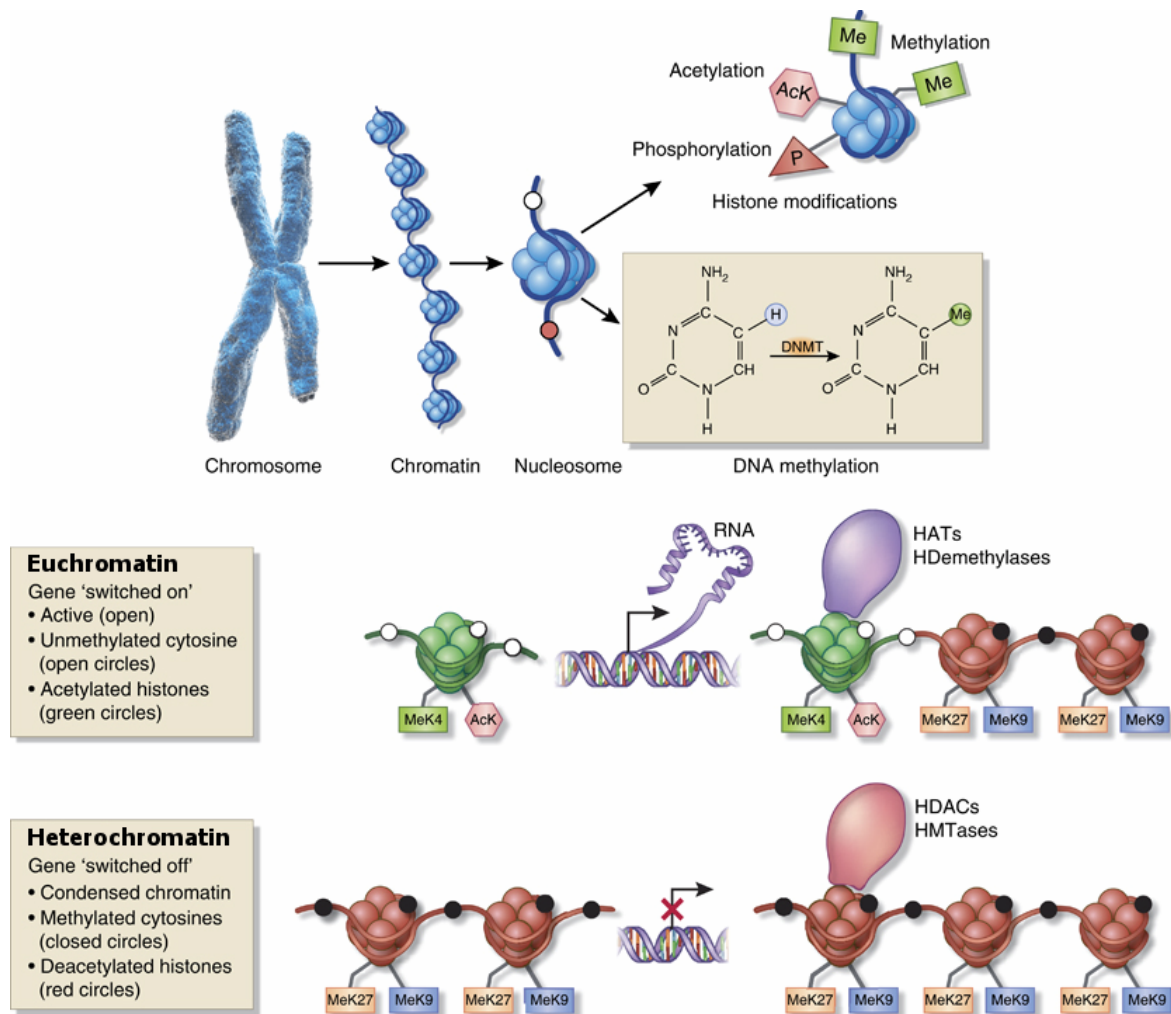
1.6 Epigenetické změny ovlivňující diferenciaci β -buněk

Ačkoliv exprese transkripčních faktorů aktivujících diferenciaci je nezbytný předpoklad pro diferenciaci kmenových resp. progenitorových buněk, nejedná se o dostačující podmínku. Další nezbytnou podmínkou pro aktivaci diferenciačního programu buňky která musí být splněna je možnost navázání transkripčního faktoru na DNA cílového genu jehož expresi aktivuje nebo potlačuje. Struktura DNA se může nacházet ve dvou základních podobách chromatinu. Kondenzovaném heterochromatinu, který není přístupný pro transkripční faktory, nebo volném euchromatinu s nímž mohou transkripční faktory interagovat díky své rozvolněné podobě. O struktuře chromatinu rozhoduje značný počet modifikací jak samotné DNA, tak i histonů, vazebných proteinů kolem nichž se dvouvláknová DNA obtáčí a vytváří strukturu zvanou nukleozom.



Obrázek 1.9 Epigenetické ovlivnění genové exprese - metylace DNA. Převzato a upraveno z <http://www.genome.gov/27532724>

Modifikace jenž ovlivňují strukturu v jaké se DNA nachází aniž by zasahovaly do primární struktury DNA se souhrně nazývají epigenetické modifikace. Mezi epigenetické modifikace jenž mají nejvýraznější vliv na strukturu DNA se řadí metylace cytosinu a acetylace a metylace kladně nabitých koncových řetězců histonových proteinů (obrázek 1.9 a 1.10).



Obrázek 1.10 Epigenetické ovlivnění genové exprese – vliv metylace DNA a kovalentních modifikací histonových proteinů na expresi genů. Převzato z <http://www.genome.gov/27532724>

Nedávno byl prokázán vliv epigenetických modifikací i na diferenciaci pankreatických endokrinních buněk. Inhibice enzymu DNA metyl transferázy, který katalyzuje metylaci DNA, podstatně zvýšila míru exprese

genů pro neurogenin-3 u pankreatické duktální buněčné linie. Methylace DNA výrazně přispívá k formování heterochromatinu a následnému utlumení genové exprese. Inhibice DNA metyl transferázy u pankreatických duktálních buněk rovněž vedla k větší míře exprese genů pro glukagon, somatostatin a důležité transkripční faktory ovlivňující diferenciaci pankreatických endokrinních buněk (Lefebvre a spol., 2010). Dalším potvrzením vlivu epigenetických změn na diferenciaci pankreatických endokrinních buněk byla studie v níž se autoři zaměřili na inhibici histon deacetyláz. Histon deacetylázy jsou enzymy jež aktivují deacetylaci histonových proteinů. Deacetylace histonů obecně přispívá k formování heterochromatinu, čímž dochází k utlumení exprese příslušných genů. Kultivace fetálních pankreatických buněk v přítomnosti nesespecifického inhibitorů histon deacetyláz výrazně zvýšila míru diferenciace na inzulín produkující β -buňky na úkor ostatních typů pankreatických buněk (Haumaitre a spol., 2008).

2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem předkládané disertační práce bylo rozšíření současných znalostí v oblasti diferenciaci inzulín produkujících β -buněk a identifikace možných alternativních zdrojů β -buněk pro eventuelní buněčnou terapii diabetu. V rámci disertační práce byly řešeny následující problematiky:

Identifikace buněčných markerů pankreatických kmenových buněk / progenitorů schopných diferenciaci na inzulín produkující β -buňky

Účelem této práce bylo identifikovat povrchové markery pankreatických kmenových buněk, s jejichž využitím by bylo možné izolovat a expandovat pankreatické kmenové buňky schopné diferenciaci na β -buňky.

Ovlivnění diferenciaci pankreatických progenitorů na inzulín produkující β -buňky

Cílem této práce bylo zvýšit míru diferenciaci pankreatických progenitorových buněk na β -buňky. V rámci tohoto cíle byl studován vliv PI3K/Akt signální dráhy na diferenciaci. Rovněž byl studován vliv inhibitorů enzymů ovlivňujících epigenetické vlastnosti buněčné DNA.

In-vivo diferenciaci kmenových buněk pupečnickové krve na inzulín produkující β -buňky

V rámci plánované klinické studie vlivu transplantace kmenových buněk izolovaných z pupečnickové krve byl řešen rovněž i tento projekt, který měl ověřit schopnost *in-vivo* diferenciaci kmenových buněk pupečnickové krve na inzulín produkující β -buňky.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Použitý materiál a chemikálie

Ambion (USA) - RNase ZAP

Baxter (USA) - Lidský albumin 20%

Bayer (USA) - OTC TissueTek

BeckmanCoulter (USA) - C-peptide Immunoradiometric kit

Biochrom (Německo) - Biocoll, M199 medium

DAKO (Kanada) - Antibody diluent

Exbio (ČR) - myší anti C-peptid IgG, myší anti cytokeratin-19 IgG

Fermentas (Kanada) - 6X DNA Loading Dye, GeneRuler 50 bp DNA Ladder

Fresenius (Německo) - Viaspan

Invitrogen (USA) - Agarosa, Alexa555-conjugated ALU-species-specific probe, Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG, Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG, Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG, B27, Glutamax, ITS, KnockOut DMEM medium, KnockOut Serum Replacement, MEM, Qubit dsDNA HS Assay Kit, Qubit RNA Assay Kit

Jackson Immunoresearch Laboratoriem (USA) - kozí sérum

LGC Promochem (Velká Británie) - neonatální fibroblastová linie Hs68

Linco Research (USA) - rabbit anti-human C-peptide IgG

Linde (ČR) - kapalný dusík

Lékárna IKEM (ČR) - Krebsův roztok I, Krebsův roztok II, Krebsův roztok III, 1 M kyselina chlorovodíková, 1 M hydroxid sodný, 0,05 M citrátový pufr

Millipore Corp. (USA) - 40 µm cell strainer

Miltenyi biotech (Německo) - CD133 MicroBead Kit, Rat anti-Mouse IgG2a+b

Peprtech (USA) - bFGF, EGF, FGF10, follistatin, HGF, IGF

Qiagen (Německo) - Omniscript RT Kit, HotStarTaq Master Mix Kit, RneasyPlus Mini Kit, RNase-Free DNase Set

SantaCruz Biotechnology (USA) - mouse anti CXCR4 Ig, goat anti-CXCR4, goat anti-glucagon, rabbit anti-insulin, rabbit anti-LIFR, goat anti-nestin

Serva (Německo) - Collagenase NB 1 Premium Grade, Neutral Protease NB

Sevapharma (ČR) - kolagenáza

Sigma-Aldrich (Německo) - 2-merkapt ethanol, 20xSSC, Accutasa, 5'-Aza-2'-deoxycytidin, BIX01294, Bouinsův roztok, butyrát sodný, CMRL medium, dabco-mowiol, dexamethason, dimethylsulfoxid, DAPI, dithizon, Dextran sulfát, DMEM/F12, DMSO, EBSS, EDTA, ethanol, ethidium bromid, Exendin-4, FBS, FCS, fibronectin, Ficoll-Hypaque 1.077, formamid, forskolin, glukóza, glycerol, glycín, HBSS, HEPES, chlorid sodný, chlorid zinečnatý, IBMX, kyselina boritá, kyselina chlorovodíková, MC1268, nikotinamid, PSG, PIPES, pyruvát sodný, RIPA pufr, SB 216763, Scriptaid, SDS, SP600125, streptozotocín, Trichostatin A, Triton X-100, wortmannin,

Zentiva - Heparin

3.2 Použité přístroje

Analytické váhy - A&D Engineering, GR120 (USA)

Aparatura pro elektroforézu - Appalex, Midigel 2, PS304 (Francie)

Automatické mikropipety - BioHit (Finsko), Nichiryo (Japonsko)

Buněčné separátory - Gambro BCT, COBE 2991 (Švédsko), Miltenyi, MidiMACS (Německo)

Centrifugy - Hettich Micro 200, Universal 320R, Rotanta 460R (Švýcarsko)

CO₂ inkubátor - MCO17-AIC, Sanyo (Japonsko)

Dokumentační systém - Syngene, G:Box (Velká Británie)

Fluorimetr - Invitrogen, Qubit (USA)

Fluorescenční kamera - Olympus, DP71 (Japonsko)

Laminární box - Steril, Polaris 72 (Itálie), ESCO, Airstream PCR (Singapur)

pH metr - Eutech, pH 2700 (Nizozemsko)

Přístroj pro přípravu neionizované vody - Millipore, YLXS50034 (USA)

Vodní lázeň - Julabo, TW12 (Německo)

Mikroskopy - Olympus, CKXC41, BX41FL (Japonsko)

PCR termocykléry - Applied Biosystems, Veriti (USA), Biometra T-personal (Německo)

Předvážky - Ohaus, Scout (Švýcarsko)

3.3 Metodika

3.3.1 Izolace Langerhansových ostrůvků

Pankreas určený pro izolaci Langerhansových ostrůvků byl odebrán chirurgickým týmem Kliniky transplantační chirurgie TC IKEM. Odebraný pankreas byl perfundován roztokem Viaspan a sterilně uložen na led.

Složení všech roztoků použitých během izolace Langerhansových ostrůvků a exokrinní tkáně je uvedeno v tabulce 1. Po odstranění sleziny a duodena se provedlo hrubé očištění pankreatu a podvázání společného pankreatického vývodu a žlučovodu. Následně byl proveden řez v oblasti krčku na přední straně pankreatu a byly zavedeny dvě kanyly pro plnění enzymatického roztoku do velkého pankreatického vývodu. Pankreas byl prostřednictvím kanyly naplněn 150 ml roztoku kolagenázy (Collagenase NB 1 Premium Grade) a neutrální proteázy (Neutral Protease NB) a rozdělen na 8 - 10 částí. Následnou homogenizací v třepací komoře obsahující jednotlivé části pankreatu, zbylou enzymovou směs a 500 ml HBSS byl pankreas disociován při 37 °C. V momentu, kdy byly ve vzorcích z trávicí komory, obarvených roztokem dithizonu, detekovány první uvolněné Langerhansovy ostrůvky, byl zahájen sběr tkáně. Disociovaná pankreatická tkáň byla sbírána do 500 ml zkumavek obsahujících 30 ml lidského albumínu postupným plněním trávicí komory vychlazeným HBSS roztokem. Získaná tkáň byla spojena centrifugací (2 min., 200 g) jednotlivých vzorků získaných z komory při 4 °C. Spojená disociovaná pankreatická tkáň byla následně rozdělena na kontinuálním hustotním gradientu Biocollu a Viaspanu (1065 - 1092 g/l) v buněčném separátoru COBE 2991 (5 min., 1500 g) při 4 °C. Po ukončení separace pankreatické tkáně byly sbírány jednotlivé frakce z hustotního gradientu a frakce obsahující Langerhansovy ostrůvky byly spojeny. Zbylá

exokrinní tkáň byla následně spojena a sloužila jako výchozí materiál pro příslušné experimenty.

3.3.2 Disociace exokrinních a duktálních buněk pankreatu

Částečně disociovaná pankreatická tkáň zbavená Langerhansových ostrůvků byla následně promyta 250 ml HBSS roztoku a centrifugována (5 min., 200 g). 5 ml tkáně bylo následně dále disociováno ve 100 ml enzymatického roztoku Accutasy po dobu 30 min. při 37 °C. Disociovaná pankreatická tkáň byla následně separována na jednobuněčnou suspenzi promýváním přes 40 µm a následně 11 µm sítko. Takto získaná buněčná suspenze byla dále zpracována.

3.3.3 Izolace duktálních buněk a pankreatických endokrinních progenitorů

Disociovaná buněčná suspenze byla následně rozdělena na diskontinuálním hustotním gradientu tvořeným směsí Biocollu a HBSS roztoku. 100 ml disociované buněčné suspenze bylo umístěno na hustotní gradient spodní vrstvou o hustotě 1080 g/l a objemu 250 ml a vrchní vrstvou o hustotě 1050 g/l a objemu 150 ml. Po centrifugaci (20 min., 400 g) byla odebrána frakce z rozmezí 1050 - 1080 g/l a dvakrát promyta HBSS roztokem.

3.3.4 Izolace CXCR-4 pankreatické buněčné populace

Pro izolaci pankreatických buněk na základě jejich povrchových markerů byla vždy použita buněčná suspenze získaná po disociaci exokrinních a duktálních buněk viz. 3.3.2. Buněčná suspenze v počtu 5×10^8 buněk byla promyta v 5 ml značícího roztoku (PBS; 0,5% HSA; 2 mM EDTA; pH 7,2) a následně

centrifugována (10 min. 300 g). Buněčný sediment byl resuspendován v 0,5 ml značícího pufru spolu s primární protilátkou anti-CXCR4 v koncentraci (1 $\mu\text{g}/10^6$ buněk) a inkubován (10 min, 4 °C). Buněčná suspenze s navázanou protilátkou byla promyta v 5 ml značícího roztoku a inkubována s 1 ml superparamagnetických částic s navázanou Rat Anti-Mouse IgG2a+b primární protilátkou (15 min, 4 °C). Po následném promytí v 9 ml značícího pufru byl buněčný sediment nesuspendován v 3 ml značícího pufru a aplikován přes 30 μm sítko na LS kolonku umístěnou v magnetickém separátoru MidiMACS. Po promytí kolony (2 x 5 ml) značícím pufrem byla kolona vyjmuta ze seperátoru a navázaná CXCR4 pozitivní buněčná populace byla eluována 5 ml značícího pufru.

3.3.5 Izolace CD133 pankreatické buněčné populace

Pro izolaci pankreatických buněk na základě jejich povrchových markerů byla vždy použita buněčná suspenze získaná po disociaci exokrinních a duktálních buněk viz. 3.3.2. Buněčná suspenze v počtu 5×10^8 buněk byla promyta v 5 ml značícího roztoku (PBS; 0,5% HSA; 2 mM EDTA; pH 7,2) a následně centrifugována (10 min. 300 g). Buněčný sediment byl resuspendován v 0,5 ml superparamagnetických částic s navázanou CD133 primární protilátkou a inkubován (15 min, 4 °C). Po následném promytí v 9 ml značícího pufru byl buněčný sediment nesuspendován v 3 ml značícího pufru a aplikován přes 30 μm sítko na LS kolonku umístěnou v magnetickém separátoru MidiMACS. Po promytí kolony (2 x 5 ml) značícím pufrem byla kolona vyjmuta ze seperátoru a navázaná CXCR4 pozitivní buněčná populace byla eluována 5 ml značícího pufru.

3.3.6 Izolace mononukleárních buněk z pupečnickové krve

Pupečnicková krev byla získána z Gynekologicko porodnického oddělení Fakultní Thomayerovy nemocnice. Odebraná krev byla nejdříve naředěna v poměru 1:2 s EBSS médiem. Naředěná krev byla nanesena na Ficoll-Hypaque 1.077 a centrifugována (20 min., 1500 g). Mononukleární buňky byly izolovány z rozhraní mezi sérem a dolní vrstvou tvořenou roztokem Ficoll-Hypaque 1.077. Buňky byly následně naředěny v kryoprezervačním médiu (10% DMSO, 10% FBS, 1% PSG v Iscove's modified Dulbecco's mediu) a zamrazeny pro následné použití.

3.3.7 Transplantace mononukleárních buněk izolovaných z pupečnickové krve

Izolované mononukleární buňky lidské pupečnickové krve byly aplikovány athymickým imunodeficitním CD-1 nude myším, které slouží jako vhodný model pro studium xenotransplantovaných kmenových buněk pocházejících od jiných živočišných druhů. CD-1 Nude myši postrádají thymus a nejsou schopny produkovat T-lymfocyty. Tím je zabráněno vzniku rejekce po transplantaci buněk jiného živočišného druhu. Myším byla aplikována i.v. do ocasní žily suspenze mononukleárních buněk lidské pupečnickové krve o objemu 100 μ l obsahující 10^7 buněk. Myši byly rozděleny do skupin po 10 a některé byly před aplikací mononukleárních buněk ozářeny radiační dávkou ve výši 1 nebo 3 Gy a některým byl před aplikací buněk rovněž navozen diabetes i.v. aplikací streptozotocinu (250 mg/kg váhy) rozpuštěném v 0,05 citrátovém pufru o pH 4,5. Rozdělení myši do skupin dle dávky ozáření a vyvolání diabetu je ukázáno v tabulce 3.1

Skupina	Radiační dávka (Gy)	Vyvolaný diabetes	Aplikace buněk
1	0	Ne	Ano
2	1	Ne	Ano
3	3	Ne	Ano
4	0	Ano	Ano
5	1	Ano	Ano
6	3	Ano	Ano
7	0	Ne	Ne

Tabulka 3.1 - složení reakční směsi pro přepis do cDNA

3.3.8 Izolace myších Langerhanových ostrůvků

Langerhansovy ostrůvky z myší transplantovaných mononukleárními buňkami izolovanými z lidské pupečnickové krve byly izolovány dle zavedeného postupu (). Po navození anestezie i.m. aplikací Dexdomitoru a Narketanu byl pankreas naplněn 1 ml roztoku kolagenázy v HBSS (2 mg/ml) a odebrán. Následovala 15 min. inkubace při 37 °C v roztoku kolagenázy o objemu 10 ml za neustálého míchání. Disociovaná tkáň byla třikrát promyta ve vychlazeném roztoku 0,5% BSA v HBSS a centrifugována (2 min., 100 g). Následně byla tkáň rozdělena na diskontinuálním hustotním gradientu (1034 - 1055 - 1075 - 1162 g/L) centrifugací (20 min., 200 g). Langerhansovy ostrůvky byly sebrány z rozmezí hustot 1055 a 1075, třikrát promyty vychlazeným roztokem HBSS a centrifugovány (2 min., 100 g). Následně byly ostrůvky zpracovány pro další analýzu.

3.3.9 Kultivace CXCR4 pozitivních pankreatických buněk

Izolované CXCR4 pozitivní pankreatické buňky v koncentraci 3×10^6 /ml byly postupně kultivovány po dobu 10 dnů ve třech druzích média o různém

složení. První 3 dny byly buňky kultivovány v médiu se sérem, které sloužilo jako zdroj živin pro proliferaci buněk viz. tabulka 3.2. Následující 3 dny byly CXCR4 pozitivní buňky kultivovány v bezsérovém médiu s přidavkem růstových faktorů stimulujících proliferaci viz. tabulka 3.3. Na závěr byly buňky kultivovány v bezsérovém médiu s přidavkem růstových faktorů a suplementů, které stimulují diferenciaci pankreatických β -buněk viz. tabulka 3.4. Kultivační médium bylo vždy před použitím filtrováno přes 0,22 μ m filtr. Médium bylo měněno obden.

Složka	Koncentrace/množství
CMRL 1066	87 ml
FBS	10 %
PS	1 %
Glutamax	1 %
HEPES	1 %
Streptozotocín	2 mM

Tabulka 3.2 - složení kultivačního média se sérem pro první 3 dny kultivace

Složka	Koncentrace/množství
DMEM/F12	93 ml
HSA	0,5 %
PS	1 %
Glutamax	1 %
HEPES	1 %
ITS	1 %
Pyruvát sodný	1 mM
bFGF	10 ng/ml
EGF	20 ng/ml

Tabulka 3.3 - složení bezsérového kultivačního média pro 4 - 6 den kultivace

Složka	Koncentrace/množství
DMEM/F12	93 ml
HSA	0,5 %
PS	1 %
Glutamax	1 %
HEPES	1 %
ITS	1 %
Pyruvát sodný	1 mM
bFGF	10 ng/ml
EGF	20 ng/ml
Exendin-4	100 pM
Nikotinamid	10 mM
Activin-A	2 nM
HGF	10 pM
LIF	2 nM

Tabulka 3.4 - složení bezsérového kultivačního média pro 7 - 10 den kultivace

3.3.10 Kultivace CD133 pozitivních pankreatických buněk

Izolované CD133 pozitivní pankreatické buňky v koncentraci 3×10^6 /ml byly postupně kultivovány po dobu 2 týdnů ve dvou druzích média o různém složení. Prvních 9 dnů byly buňky kultivovány v bezsérovém médiu s přídatkem růstových faktorů stimulujících proliferaci viz. tabulka 3.5. Následně byly buňky kultivovány v bezsérovém médiu s přídatkem růstových faktorů a suplementů, které stimulují diferenciaci pankreatických β -buněk viz. tabulka 3.6. Kultivační médium bylo vždy před použitím filtrováno přes 0,22 μ m filtr. Médium bylo měněno obden.

Složka	Koncentrace/množství
KnockOut DMEM	93 ml
HSA	0,5 %
PS	1 %
Glutamax	1 %
HEPES	1 %
ITS	1 %
bFGF	10 ng/ml
HGF	2 ng/ml

Tabulka 3.5 - složení bezsérového kultivačního média pro 1 - 9 den kultivace

Složka	Koncentrace/množství
DMEM/F12 low glucose	87 ml
HSA	0,5 %
PS	1 %
Glutamax	1 %
HEPES	1 %
ITS	1 %
Exendin-4	100 pM
Nikotinamid	10 mM
Activin-A	2 nM
HGF	10 pM
LIF	2 nM

Tabulka 3.6 - složení bezsérového kultivačního média pro 9 - 14 den kultivace

3.3.11 Kultivace duktálních buněk a pankreatických progenitorů Vliv PI3K/Akt signální dráhy na diferenciaci β -buněk

Izolované duktální buňky a pankreatické progenitory v koncentraci 3×10^6 /ml byly postupně kultivovány po dobu 10 dnů ve třech druzích média o různém složení. První 3 dny byly buňky kultivovány v bezsérovém médiu

s přidavkem růstových faktorů stimulujících proliferaci viz. tabulka 3.7. K médiu bylo rovněž přidáno v poměru 1:1 kondiciované médium získané po kultivaci s neonatální fibroblastovou buněčnou linií Hs68. Příprava kondiciovaného média je uvedena v kapitole 3.3.12. Kondiciované médium podporovalo tvorbu ostrůvky připomínajících buněčných shluků (ILCC), které byly dále stimulovány a diferencovány směrem na buňky endokrinního pankreatu. Po prvních třech dnech kultivace byly buňky rozděleny do 6ti skupin a kultivovány po dobu 4 dnů v bezsérovém médiu s přidavkem růstových faktorů a suplementů, které stimulují nebo blokují PI3K/Akt signální dráhu viz tabulka 3.8 a 3.9. Rovněž bylo sníženo pH media na hodnotu 6,0. Na závěr byly buňky kultivovány v mediu s přidavkem séra a růstových faktorů stimulujících diferenciaci pankreatických β -buněk viz. tabulka 3.10. Kultivační médium bylo vždy před použitím filtrováno přes 0,22 μ m filtr. Médium bylo měněno obden.

Složka	Koncentrace/množství
KnockOut DMEM	87 ml
KnockOut Serum Replacement	10 ml
PSG	1 %
MEM	1 %
2-merkaptoethanol	0,1 mM
ITS	1 %
bFGF	10 ng/ml
EGF	20 ng/ml

Tabulka 3.7 - složení bezsérového kultivačního média pro 1 - 3 den kultivace

Složka	Koncentrace/množství
KnockOut DMEM	87 ml
KnockOut Serum Replacement	10 ml
PSG	1 %
B27	1 %
PIPES	2 mM
FGF10	25 ng/ml
Follistatin	100 ng/ml
Dexamethason	100 nM
Forskolin	10 μ M

Tabulka 3.8 - složení bezsérového kultivačního média pro 4 - 7 den kultivace

Složka (koncentrace) / Skupina	1	2	3	4	5	6
EGF (20 ng/ml)			x	x	x	
Exendin-4 (40 ng/ml)			x	x	x	
IGF-1 (80 ng/ml)			x	x	x	
ZnCl ₂ (200 μ M)	x	x		x	x	
Wortmannin (100 nM)		x			x	

Tabulka 3.9 - rozdělení vzorků do skupin dle obsahu stimulátorů (EGF, Exendin-4, IGF-1, ZnCl₂) nebo inhibitoru (wortmannin) PI3K/Akt signální dráhy během kultivace 4-7 den

Složka	Koncentrace/množství
CMRL 1066	91 ml
FCS	5 %
PSG	1 %
HEPES	1 %
ITS	1 %
SB 216763	10 μ M
SP600125	10 μ M

Exendin-4	40 ng/ml
Nikotinamid	10 mM
Fibronectin	5 µg/ml
HGF	10 ng/ml
IGF-1	80 ng/ml
NGF	20 ng/ml

Tabulka 3.10 - složení kultivačního média pro 7 - 10 den kultivace

3.3.12 Příprava bezsérového média kondiciovaného lidskou neonatální fibroblastovou linií Hs68

Do T150 kultivační láhve plně porostlé buněčnou linií lidských neonatálních fibroblastů bylo přidáno 25 ml bezsérového média o stejném složení jako je uvedeno v tabulce 3.7. Následně byla kultivační láhev umístěna do CO₂ inkubátoru a ponechána 24 hodin. Kondiciované médium by následně odebráno, přefiltrováno přes 0,22 µm filtr a zamraženo pro pozdější použití.

3.3.13 Kultivace duktálních buněk a pankreatických progenitorů Vliv epigenetických faktorů na diferenciaci β-buněk

Izolované duktální buňky a pankreatické progenitory v koncentraci 3×10^6 /ml byly kultivovány po dobu 7 dnů postupně ve dvou druzích média o různém složení. První 4 dny byly buňky kultivovány v bezsérovém médiu s přidavkem růstových faktorů stimulujících proliferaci viz. tabulka 3.11. K médiu bylo rovněž přidáno v poměru 1:1 kondiciované médium získané po kultivaci s neonatální fibroblastovou buněčnou linií Hs68. Příprava kondiciovaného média je uvedena v kapitole 3.3.11. Kondiciované médium podporovalo tvorbu ostrůvky připomínajících buněčných shluků (ILCC), které byly dále stimulovány a diferencovány směrem na buňky endokrinního

pankreatu. Během první fáze byly buňky rozděleny do 13ti skupin na základě přídávku inhibitorů enzymů, které ovlivňují epigenetické změny a stav chromatinu viz. tabulka 3.12. V druhé fázi byly buňky kultivovány v mediu s přídávkem séra a růstových faktorů stimulujících diferenciaci pankreatických β -buněk viz. tabulka 3.13. Kultivační médium bylo vždy před použitím filtrováno přes 0,22 μ m filtr. Médium bylo měněno obden.

Složka	Koncentrace/množství
KnockOut DMEM	87 ml
KnockOut Serum Replacement	10 ml
PSG	1 %
MEM	1 %
2-merkaptoethanol	0,1 mM
ITS	1 %
bFGF	10 ng/ml
EGF	20 ng/ml

Tabulka 3.11 - složení bezsérového kultivačního média pro 1 - 4 den kultivace

Složka (koncentrace)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
5Aza (1 μ M)	x	x	x	x	x	x							
Scriptaid (1 μ M)			x			x			x			x	
NaBu (500 mM)	x			x			x			x			
MC1268 (5 μ M)		x			x			x			x		
BIX01294 (2 μ M)	x	x	x				x	x	x				

Tabulka 3.12 - rozdělení vzorků do skupin dle obsahu inhibitorů enzymů ovlivňujících epigenetický stav DNA během kultivace 1-4 den

Složka	Koncentrace/množství
CMRL 1066	92 ml
FCS	5 %
PSG	1 %
HEPES	1 %
ITS	1 %
SB 216763	10 μ M
SP600125	10 μ M
Exendin-4	40 ng/ml
Nikotinamid	10 mM
Fibronectin	5 μ g/ml
Forsklin	10 μ M
IGF-1	80 ng/ml

Tabulka 3.13 - složení kultivačního média pro 5 - 7 den kultivace

3.3.14 Izolace RNA

Buněčná RNA byla izolována přibližně z 10^7 buněk, aby bylo dosaženo ekvivalentního množství izolované RNA u všech analyzovaných vzorků. Izolace i následná práce s RNA byla prováděna v laminárním boxu (Airstream PCR) pro eliminaci možné kontaminace RNázami. RNA byla izolována pomocí izolačních kolon a roztoků RNeasy Plus MiniKitu. Izolace je založena na afinitní vazbě RNA na kolonu a následné vymytí buněčné DNA a proteinů. Buněčný sediment byl nejdříve lyzován v 600 μ l denaturačního pufru RLT obsahujícího 1% 2-merkaptoethanolu. Vzorek byl následně nanesen na kolonku gDNA Eliminator column pro eliminaci genomické DNA a centrifugován (2 min., 10 000 g). Eluát byl následně naředěn v poměru 1:1 70% ním ethanollem, nanesen na kolonu RNeasy spin column a centrifugován (30 sec., 10 000 g). Kolona byla následně promyta

700 μ l RW1 pufru a dvakrát 500 μ l RPE pufru (30 sec., 10 000 g). RNA byla eluována přidáním 100 μ l vody.

3.3.15 Stanovení koncentrace RNA

Stanovení koncentrace RNA ve vzorku bylo provedeno s pomocí kitu Qubit RNA Assay Kit. 1 μ l vzorku bylo smícháno s 199 μ l pracovního roztoku. Pracovní roztok byl připraven z 1 μ l fluorescenční sondy Qubit RNA Reagent a 199 μ l Qubit RNA pufru. Po 3min. inkubaci byla změřena koncentrace RNA na fluorometru QubitTM. Pro kalibraci byly použity roztoky dvou standardů. Oba standardy byly připraveny smícháním 10 μ l standardu a 190 μ l pracovního roztoku. Všechny vzorky byly následně naředěny na stejnou koncentraci podle nejméně koncentrovaného.

3.3.16 PCR s reversní transkripcí (RT-PCR)

Analýza izolované RNA a stanovení exprese genů bylo prováděno pomocí dvoukrokové RT-PCR reakce. V prvním kroku byla přepsána mRNA do komplementární cDNA a následně bylo pomocí PCR reakce semi-kvantitativně stanoveno množství mRNA v izolovaném vzorku. Složení reakční směsi pro přepis mRNA do cDNA je uvedena v tabulce 3.14. Reakční směs byla inkubována 60 min. při 37 °C a následně použita pro PCR reakci. Složení reakční směsi pro PCR je uvedeno v tabulce 3.15. Reakce probíhala za podmínek uvedených v tabulce 3.16. Sekvence použitých specifických primerů a velikosti výsledných produktů jsou uvedeny v tabulce 3.17.

Složka	Objem (μl)
10 x RT pufr	2
Směs dNTP (10 mM)	1
Random primery (200 uM)	1
Omniscript reverzní transkriptáza	1
Inhibitor RNáz	1
Vzorek RNA (2 ug/10 ul)	10
Voda bez RNáz a DNáz	4

Tabulka 3.14 - složení reakční směsi pro přepis do cDNA

Složka	Objem (μl)
10 x PCR pufr	2
Směs dNTP (10 mM)	0,5
Forward specifický primer (10 uM)	1
Reverse specifický primer (10 uM)	1
HotStarTaq DNA polymeráza	0,2
Vzorek cDNA (2 ug/10 ul)	1
Voda bez RNáz a DNáz	14,3

Tabulka 3.15 - složení reakční směsi pro PCR reakci

Krok	čas (sec.)	teplota (°C)
Aktivace polymerázy a denaturace cDNA	900	95
30 cyklů :		
Denaturace	30	94
Navázání primerů	30	61
Prodloužení DNA	60	72
Závěrečné prodloužení DNA	300	72

Tabulka 3.16 - průběh PCR reakce a příslušné teploty

Gen	Forward primer	Reverse primer	Produkt
Inzulín	ccatcaagcacatcactgtcc	ccatctctctcgggtgcagg	414 bp
Inzulín lidský	agccgcagcctttgtgaac	agctccacctgccccac	141 bp
Inzulín myši	ctataatcagagaccatcagcaagc	gtagagggagcagatgctgg	344 bp
Glukagon	cacactaccagaagacagcagaa	cttcaacaatggcgacctc	444 bp
Somatostatin	ttgaccagccactctccag	atagccgggtttgagtagca	327 bp
Glut-2	cactgtctctctgtattccttgtg	aaactcagccaccatgaacc	223 bp
PDX-1	ctgttctctcctccggctcc	ctgtctctctctcttttccac	202 bp
NeuroD	aggaattcgcccacgcag	gtctctgggctttgatcgtc	346bp
Neurogenin-3	tctattctttgcccggtag	agtccaactcgtcttagg	256 bp
Nkx2.2	ctacgacagcagcagacaacc	gccttgagaaaagcactcg	219 bp
Nkx6.1	gctctacttcagccccagc	ggaaccagacctgacctgac	332 bp
Pax4	actcccagtgtctctccatc	ggaaaaccagaccctcacc	298 bp
Pax6	gccctggagaaagagtttgag	gcgctgtaggtttgtgagg	314 bp
Isl-1	ggagcaactgtagagatgacg	agtactttccaaggtggctgg	245 bp
HNF6	cgcaggtcagcaatggaag	gatgagttgcctgaattggag	535 bp
HNF3beta	tggagcagctactatgcagagc	atggagttcatgttggcgtag	356 bp
Hlx9	taagatgcccgaactcaactcc	caaatctcacctgggtctcg	192 bp
HGF-R	agtgaagtggatggctttgg	gggcagtattcgggttag	162 bp
GLP1-R	tggcattgggggtgaacttcc	caggcgtggagtctcagc	462 bp
LIF-R	cttgcgagcctatacagatgg	ctgcttccctcacagacactc	249 bp
CD117	agatgctcaagccgagtgc	actatcgtgcaggaagactcc	284 bp
CD133	tcttctcatggttggagttgg	ttaccagtctgagccaagtagc	478 bp
ABCG2	gatatggatttacggcttgc	aaggccacgtgattcttcc	175 bp
Nanog	gcaacaaccaacttctgc	aggccttctcgctcacac	288 bp
Oct-4iso1	agctggagaaggagaagctgg	tcggaccacatccttctcgag	458 bp
Oct-4iso2	ggggagattgataactggtgtg	tcggaccacatccttctcgag	480 bp
Sox17	cagaatccagacctgcacaac	ctgctcggggaactggag	294 bp
GAPDH	ggagtcaacggatttggctg	catgggtggaatcatattggaac	142 bp
GAPDH lidský	gagtcaacggatttggctg	catgggtggaatcatattgg	141 bp

Tabulka 3.17 - seznam použitých specifických primerů a velikost příslušných produktů

3.3.17 DNA elektroforéza

DNA produkty z RT-PCR byly analyzovány pomocí agarózové horizontální elektroforézy. Elektroforéza probíhala v 1,5 % agarózovém gelu složeném

z 1,5 g agarózy, 10 μ l (5mg/ml) ethidia bromidu, 15 ml TBE pufru a 135 ml deionizované vody. Pufr TBE se skládal z 890 mM TRISu, 890 mM kyseliny borité a 20 mM EDTA. pH pufru bylo upraveno na hodnotu 8,3 pomocí 2M NaOH. Po nanesení 20 μ l vzorků smíchaných v poměru 6:1 s 6X DNA Loading Dye a 5 μ l standardu GeneRuler 50 bp DNA Ladder na gel byla zahájena elektroforéza při napětí 150 V po dobu 45 minut. Elektroforéza byla následně vyhodnocena na dokumentačním systému G:Box.

3.3.18 Imunochemické stanovení antigenů s fluorescenčním vyhodnocením

Metoda imunochemického stanovení antigenů s fluorescenčním vyhodnocením je založena na specifické vazbě protilátky na antigen. Antigen ve vzorku je detekován pomocí specifické monoklonální primární protilátky. Navázaná primární protilátky na antigenu je následně zviditelněna pomocí sekundární fluorescenčně značené protilátky, která je specifická vůči primární protilátce. Fluorescenční signál je zesílen vazbou několika fluorescenčně značených protilátek na primární protilátku. Pro všechny uváděné experimenty byly použity primární protilátky v příslušném ředění uvedeném v tabulce.

Příprava řezů vzorků tkání nebo ILCC probíhala na pracovišti klinické a transplantační patologie IKEM. Řezy o tloušťce 8 μ m byly fixovány na podložní sklíčko a třikrát promyty roztokem PBS. Následně proběhla inkubace v blokovacím roztoku, obsahujícím 5% oslí sérum a promývací roztok. Promývací roztok obsahoval 0,1M glycin a 0,05% Triton X rozpuštěné ve fosfátovém pufru. Blokace trvala 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byly řezy inkubovány s primární protilátkou po dobu jedné hodiny při laboratorní teplotě. Protilátky byly ředěny v roztoku Antibody diluent v poměru uvedeném v tabulce 3.18 po ukončení inkubace s primární protilátkou byly vzorky třikrát promyty

roztokem PBS. Následovala inkubace se sekundární protilátkou za stejných časových a teplotních podmínek jako u protilátky primární. Sekundární protilátky byly rozpuštěny v blokovacím roztoku. Poměr ředění sekundární protilátky s blokovacím roztokem byl 1:400. Jako sekundární protilátky byly použity oslí protilátky proti myším kozím a králíčím protilátkám s navázaným fluorochromem Alexa emitujícím světlo o příslušné vlnové délce. Vzorky byly následně třikrát promyty roztokem PBS a inkubovány dobu 5 minut při pokojové teplotě v roztoku DAPI. DAPI byl naředěn v poměru 1:500 v destilované vodě. Následovalo trojnásobné promytí v roztoku PBS. Nakonec byly vzorky zakápnuty roztokem Dabco-Mowiol v glycerolu, překryty krycím sklem a zalakovány lakem na nehty. Vyhodnocení probíhalo na mikroskopu Olympus BX 41 se zdrojem fluorescenčního záření. Počítání celkového počtu buněk (i pozitivních) probíhalo manuálně v pěti náhodně vybraných zorných polích.

antigen	primární protilátka	Ředění
inzulín	rabbit anti-insulin	1:100
C-peptid	rabbit anti-C-peptide	1:200
C-peptid	mouse anti-C-peptide	1:200
cytokeratin-19	goat anti-cytokeratin19	1:100
CXCR4	mouse anti CXCR4	1:100
glukagon	goat anti-glucagon	1:100
LIFR	rabbit anti-LIFR	1:100
nestin	goat anti-nestin	1:100

Tabulka 3.18 - seznam použitých primárních protilátek s příslušným ředěním

3.3.19 Fluorescenční in-situ hybridizace

Metoda fluorescenční in-situ hybridizace (FISH) je založena na specifické vazbě DNA sondy na komplementární úsek DNA v analyzovaném vzorku.

DNA sekvence ve vzorku je detekována pomocí specifické FISH sondy s navázaným fluorochromem.

Příprava řezů vzorků tkání probíhala na pracovišti klinické a transplantační patologie IKEM. Řezy o tloušťce 8 μm byly fixovány na podložní sklíčko a třikrát promyty roztokem PBS. Následně proběhlo obnažení antigenů v 0,01 M roztoku citrátu sodného o pH 6,0 zahřátím vzorků v mikrovlné troubě po dobu 4min. při 900 W. Vzorky byly poté inkubovány v blokovacím roztoku, obsahujícím 5% oslí sérum a promývací roztok. Blokace trvala 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byly řezy dehydratovány v rostoucí řadě 70%, 90% a 100% ethanolu, každý po dobu 2 min. Denaturace vzorků proběhla v roztoku formamidu a 2x SSC v poměru 1:1 po dobu 5 minut při 75 °C. Po denuraci byly vzorky inkubovány s ALU specifickou FISH sondou rozpuštěnou v hybridizačním pufru. Hybridizační pufr se skládal z 10 % dextran sulfátu, 0,15 % SDS, 50 % formamidu rozpuštěných v 2x SSC. Sonda byla rozpuštěna v koncentraci 50 ng/100 ul. DNA sekvence sondy byla navržena tak aby se specificky vážala na ALU sekvence nacházející se v genomu primátů. Sonda specificky reaguje pouze s lidskou a opičí DNA jak bylo potvrzeno na testovacích vzorcích. Sekvence navržené sondy je `ctgtaatcccagctactcgggaggctgaggcaggagaatcgcttgaacc` s Alexa555 fluorochromem navázaným na 5' konci. Inkubace s ALU specifickou sondou probíhala přes noc při 37 °C. Po ukončení hybridizace byly vzorky třikrát promyty v roztoku formamidu a 2x SSC v poměru 1:1 po dobu 5 minut při 42 °C. Pro FISH analýzu kombinovanou s imunochemickým stanovením antigenu byly vzorky následně inkubovány v blokovacím roztoku, obsahujícím 5% oslí sérum rozpuštěným v promývacím roztoku. Blokace trvala 30 minut při laboratorní teplotě. Následovala inkubace s primární protilátkou rabbit anti-C-peptide po dobu jedné hodiny při laboratorní teplotě. Protilátka byla ředěna v blokovacím roztoku. Po ukončení inkubace s primární protilátkou byly vzorky třikrát promyty roztokem PBS. Následovala inkubace se sekundární protilátkou Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG za stejných

časových a teplotních podmínek jako u primární protilátky. Sekundární protilátka byla rozpuštěna v blokovacím roztoku v poměru 1:400. Vzorky byly následně třikrát promyty roztokem PBS a inkubovány dobu 5 minut při pokojové teplotě v roztoku DAPI. DAPI byl naředěn v poměru 1:500 v destilované vodě. Následovalo trojnásobné promytí v roztoku PBS. Nakonec byly vzorky zakápnuty roztokem Dabco-Mowiol v glycerolu, překryty krycím sklem a zalakovány lakem na nehty. Vyhodnocení probíhalo na mikroskopu Olympus BX 41 se zdrojem fluorescenčního záření.

3.3.20 Testování produkce C-peptidu Statické inkubace

Schopnost ILCC a diferencovaných buněk produkovat inzulin byla testována in-vitro pomocí kultivace v médiích s nízkou a vysokou koncentrací glukózy.

Statické inkubace byly prováděny ve dvou roztocích glukózy o koncentracích 5 mM a 20 mM. ILCC byly dvakrát promyty základním roztokem, který byl připraven smícháním 20 ml každého z Krebsových roztoků (I, II, III), 1,6 ml HEPES pufru a 10,4 ml deionizované vody. Výsledné pH bylo upraveno na hodnotu 7,4. K 4,5 ml základního roztoku ohřátého na 37°C bylo přidáno 1 ml suspenze ILCC ukončení diferenciaci. Následně se vzorek nechal 5 minut stát při pokojové teplotě.

Po odsání supernatantu byly ILCC dvakrát promyty bazálním roztokem. Bazální roztok byl připraven smícháním 40 ml základního roztoku a 200 µl 1M glukózy. Po promytí bylo k suspenzi ILCC přidáno 4,5 ml bazálního roztoku a ponecháno 5 minut při pokojové teplotě. Po odsátí supernatantu byly ILCC resuspendovány v 1,5 ml bazálního roztoku a inkubovány ve vodní lázni při 37°C. Po inkubaci byl odsán supernatant a ILCC byly dvakrát promyty stimulačním roztokem. Stimulační roztok byl připraven smícháním

20 ml základního roztoku, 1,15 mg IBMX a 400 μ l 1 M glukózy. Po promytí ILCC bylo přidáno 4,5 ml stimulačního roztoku a opět ponecháno stát 5 minut při pokojové teplotě. Po odsátí supernatantu byly ILCC resuspendovány v 1,5 ml stimulačního roztoku a inkubovány ve vodní lázni při 37°C po dobu 60 minut. Po inkubaci byly buňky uloženy do C-peptid pufru, zamraženy na -80 °C a následně bylo stanoveno množství C-peptidu metodou RIA pomocí C-peptide Immunoradiometric kitu. Stanovení proběhlo v Izotopovém servisním středisku IKEM. Rovněž byl odebrán vzorek pro stanovení obsahu DNA.

3.3.21 Stanovení koncentrace DNA

Stanovení koncentrace DNA ve vzorku bylo provedeno s pomocí kitu Qubit dsDNA HS Assay Kit. 1 μ l vzorku bylo smícháno s 199 μ l pracovního roztoku. Pracovní roztok byl připraven z 1 μ l fluorescenční sondy Qubit dsDNA HS Reagent a 199 μ l Qubit dsDNA HS pufru. Po 3min. inkubaci byla změřena koncentrace DNA na fluorometru QubitTM. Pro kalibraci byly použity roztoky dvou standardů. Oba standardy byly připraveny smícháním 10 μ l standardu a 190 μ l pracovního roztoku.

4. VÝSLEDKY

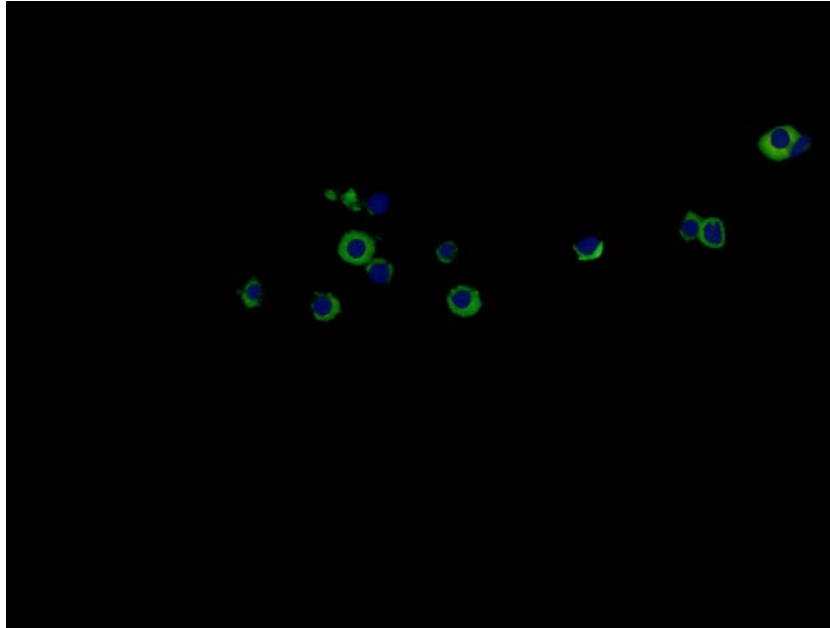
4.1 Izolace a charakterizace lidských CXCR4 pozitivních pankreatických buněk

Cílem této práce bylo charakterizovat lidské CXCR4 pozitivní pankreatické buňky a ověřit jejich schopnost diferenciaci na inzulín produkující β -buňky. Z pankreatické tkáně (n=7) získané po izolaci Langerhansových ostrůvků bylo izolováno $22,1 \pm 6,6$ % CXCR4 pozitivních buněk. Kontaminace β -buňkami byla ověřena imunofluorescenčním barvením izolovaných buněk (obrázek 4.1.4). Průměrná zastoupení β -buněk v izolované CXCR4 pozitivní frakci byla $0,04 \pm 0,02$ %. U izolovaných CXCR4 pozitivních pankreatických buněk byla rovněž ověřena přítomnost CXCR4 receptoru, která byla prokázána u více než 90% izolovaných buněk (obrázek 4.1.1). CXCR4 pozitivní buňky byly dále charakterizovány na přítomnost nestinu, markeru pankreatických progenitorů (obrázek 4.1.2) a na přítomnost receptoru pro LIF (obrázek 4.1.3).

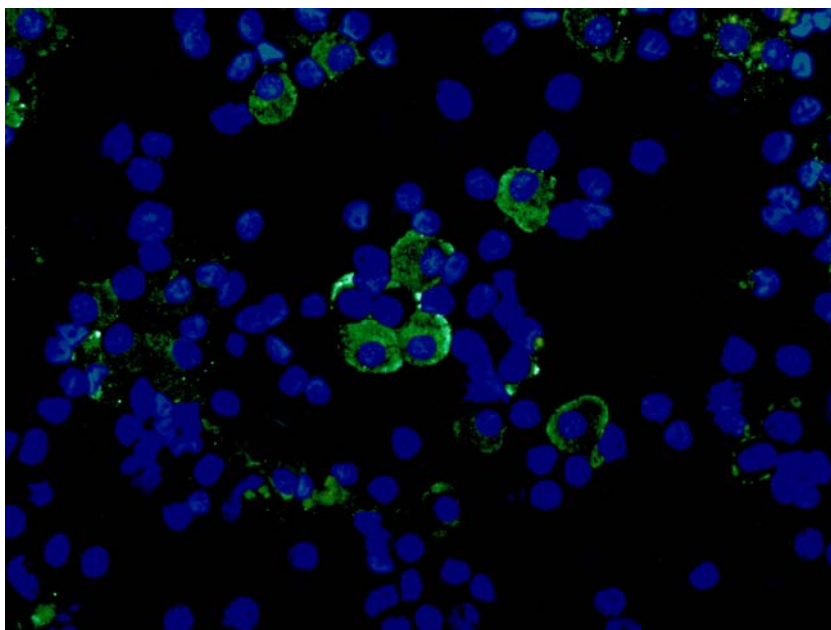
Dále byla u izolovaných buněk provedena analýza genové exprese pomocí RT-PCR. U CXCR4 pozitivních pankreatických buněk byla prokázána exprese markerů pluripotentních (Oct4 a Nanog) a dospělých (ABCG2 a CD133) kmenových buněk. Rovněž byla detekována exprese transkripčních faktorů účastnících se diferenciaci pankreatických endokrinních buněk (PDX-1, NeuroD, Nkx2.2, Nkx6.1, Pax4, Pax6, Isl1) nicméně detekce těchto transkripčních faktorů mohla být způsobena slabou kontaminací diferencovaných β -buněk, které rovněž exprimují uvedené transkripční faktory. Detekce exprese genu pro neurogenin-3 ovšem jasně potvrdila přítomnost pankreatických endokrinních progenitorů. Neurogenin-3 je exprimován pouze progenitory a není exprimován plně diferencovanými endokrinními buňkami. CXCR4 pozitivní buňky rovněž exprimovaly ve

zvýšené míře transkripční faktor HNF6, marker duktálních buněk a aktivátor exprese neurogeninu-3 (obrázek 4.1.5)

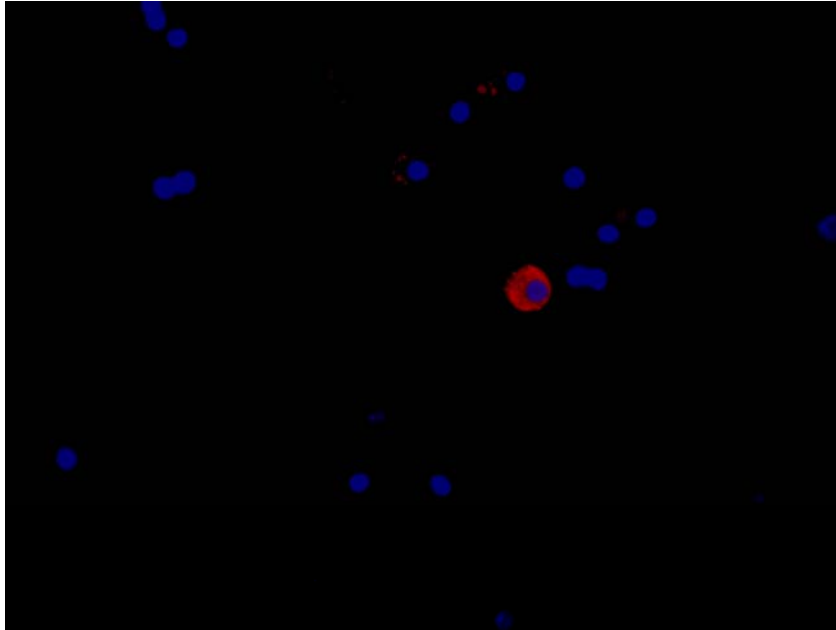
Pro ověření schopnosti diferenciaci na inzulín produkující β -buňky, byly CXCR4 pozitivní buňky kultivovány v médiu, které obsahovalo růstové faktory stimulující diferenciaci pankreatických β -buněk. V počáteční fázi kultivace docházelo u části buněk k formování buněčných shluků připomínajících Langerhansovy ostrůvky (obrázek 4.1.6). Následnou kultivací v médiu obsahujícím růstové faktory activin-A, HGF, LIF a suplementy exendin-4 a nicotinamid bylo dosaženo částečné diferenciaci na inzulín produkující β -buňky. Diferenciaci na β -buňky byla prokázána u $5,8 \pm 1,1$ % (obrázek 4.1.8) a na α -buňky u $13,3 \pm 2,8$ % (obrázek 4.1.9) CXCR4 pozitivních pankreatických buněk. Expresi pankreatických hormonů včetně somatostatinu byla potvrzena RT-PCR analýzou (obrázek 4.1.7). Pomocí RT-PCR byla rovněž detekována exprese charakteristických markerů diferencovaných β -buněk, jako jsou glukózový transportér GLUT2 a receptor pro GLP-1 peptid. Dále byla detekována přetrvávající exprese charakteristických markerů pluripotentních a dospělých kmenových buněk.



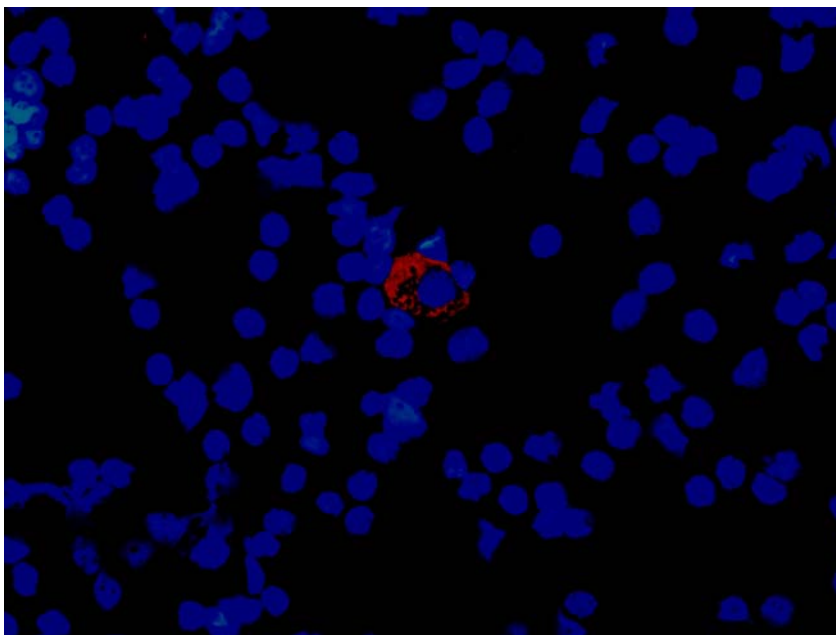
Obrázek 4.1.1 - imunofluorescenční barvení CXCR4 pozitivních pankreatických buněk na CXCR4 (zelená). Buněčná jádra barvená DAPI (modrá).



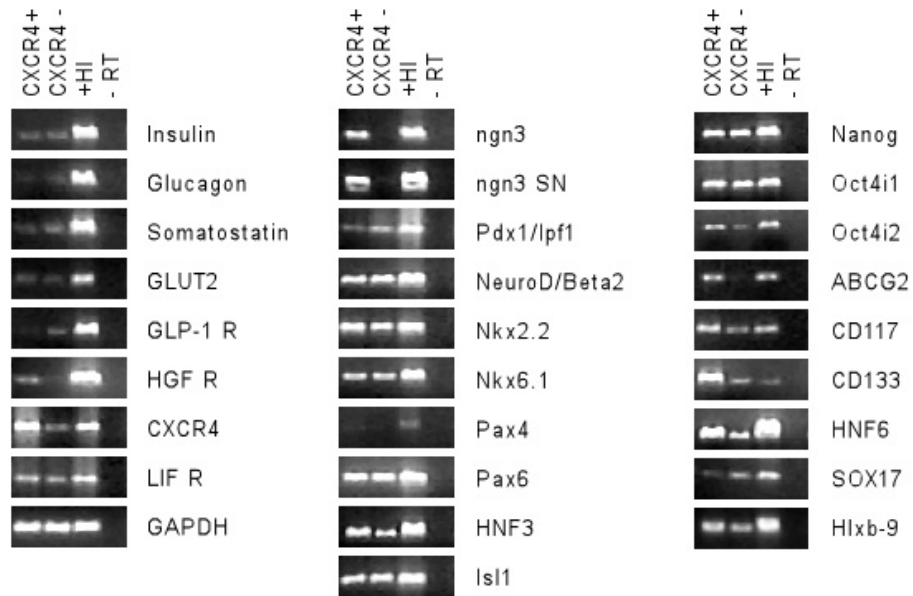
Obrázek 4.1.2 - imunofluorescenční barvení CXCR4 pozitivních pankreatických buněk na nestin (zelená). Buněčná jádra barvená DAPI (modrá).



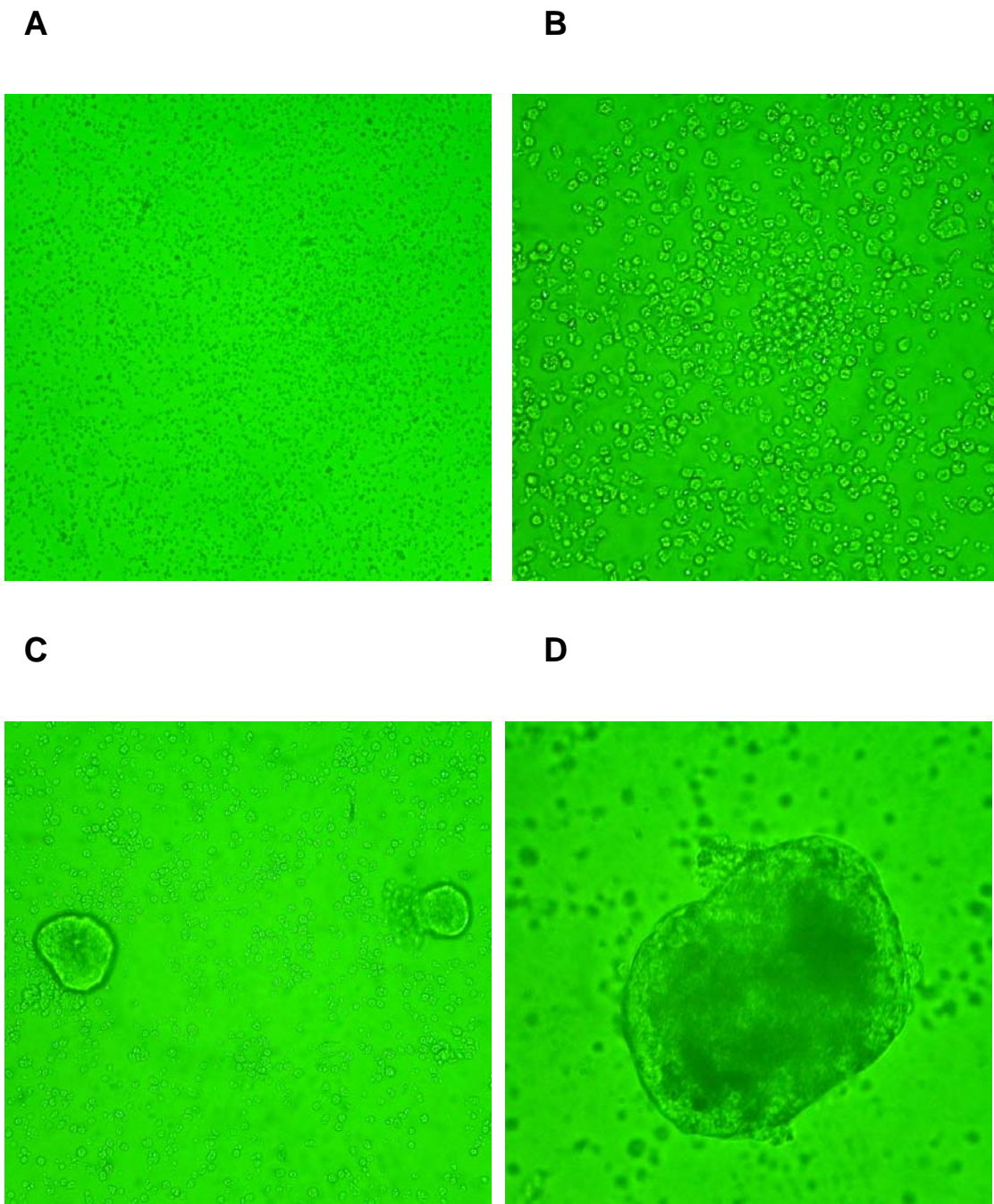
Obrázek 4.1.3 - imunofluorescenční barvení CXCR4 pozitivních pankreatických buněk na LIFR (červená). Buněčná jádra barvená DAPI (modrá).



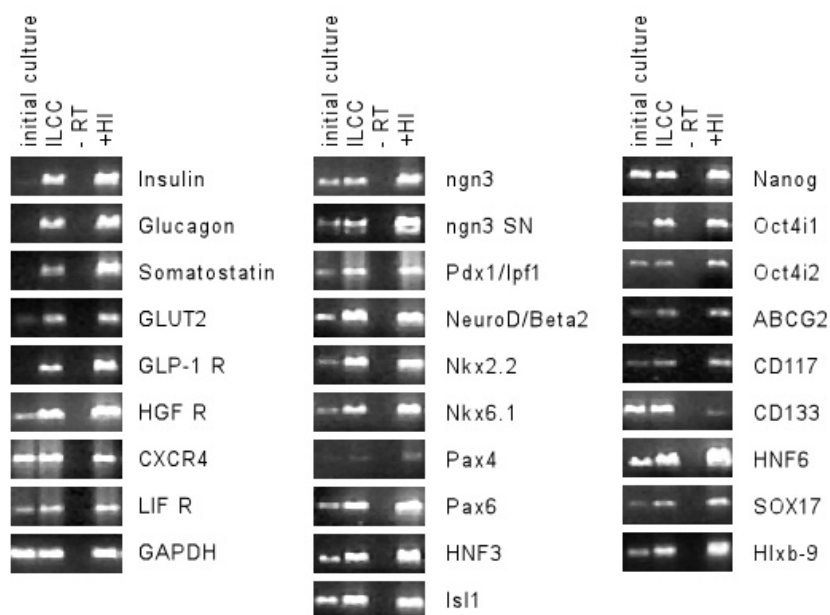
Obrázek 4.1.4 - imunofluorescenční barvení CXCR4 pozitivních pankreatických buněk na izulín (červená). Buněčná jádra barvená DAPI (modrá).



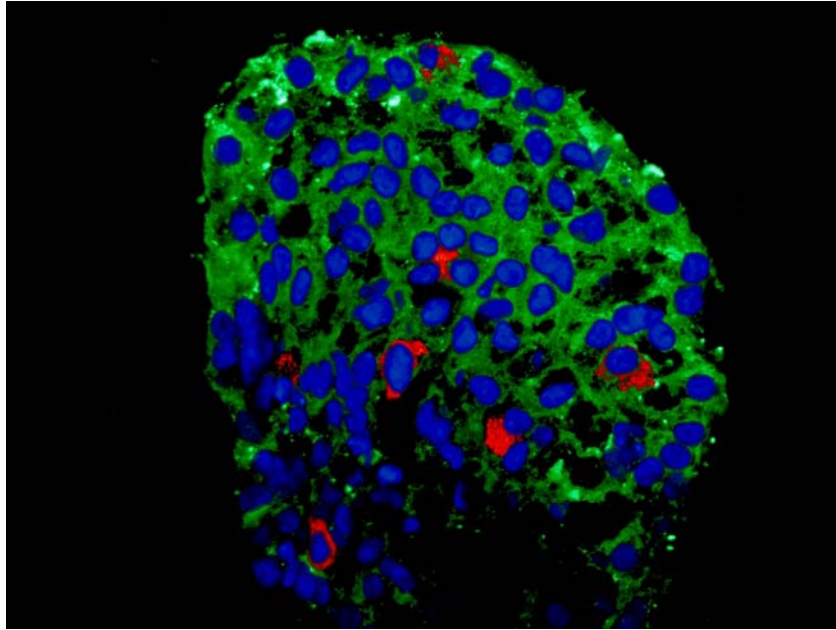
Obrázek 4.1.5 - Průkaz exprese genů ve vzorcích CXCR4 pozitivních a CXCR4 negativních pankreatických buněk. Jako pozitivní kontrola sloužil vzorek lidských Langerhansových ostrůvků (+HI). Jako negativní kontrola sloužil vzorek Langerhansových ostrůvků bez reverzní transkripce (-RT).



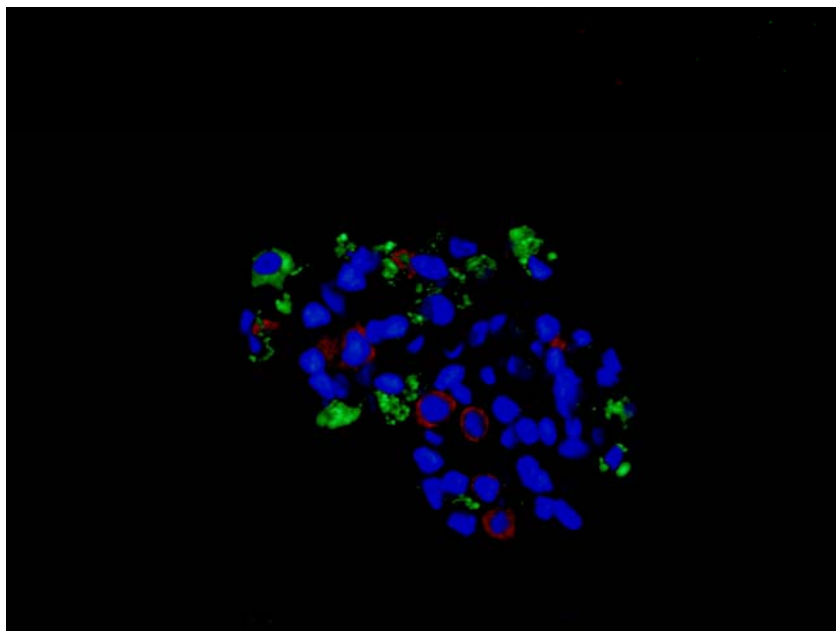
Obrázek 4.1.6 - Formování ostrůvky připomínajících buněčných shluků (ILCC) během kultivace CXCR4 pozitivních pankreatických buněk. Počáteční buněčná suspenze bezprostředně po izolaci (A), migrace a shlukování buněk druhý den po zahájení kultivace (B), formování buněčných shluků 4 den po zahájení kultivace (C) a (D)



Obrázek 4.1.7 - Analýza exprese genů v průběhu diferenciaci CXCR4 pozitivních pankreatických buněk. Vzorek CXCR4 pozitivních pankreatických buněk před zahájením kultivace (initial culture). Vzorek po ukončení kultivace a diferenciaci CXCR4 pozitivních pankreatických buněk (ILCC). Jako pozitivní kontrola sloužil vzorek lidských Langerhansových ostrůvků (+HI). Jako negativní kontrola sloužil vzorek Langerhansových ostrůvků bez reverzní transkripce (-RT).



Obrázek 4.1.8 - imunofluorescenční barvení diferencovaných CXCR4 pozitivních pankreatických buněk v podobě ILCC na C-peptid (červená) a nestin (zelená). Buněčná jádra barvená DAPI (modrá).



Obrázek 4.1.9 - imunofluorescenční barvení diferencovaných CXCR4 pozitivních pankreatických buněk v podobě ILCC na CXCR4 (červená) a glukagon (zelená). Buněčná jádra barvená DAPI (modrá).

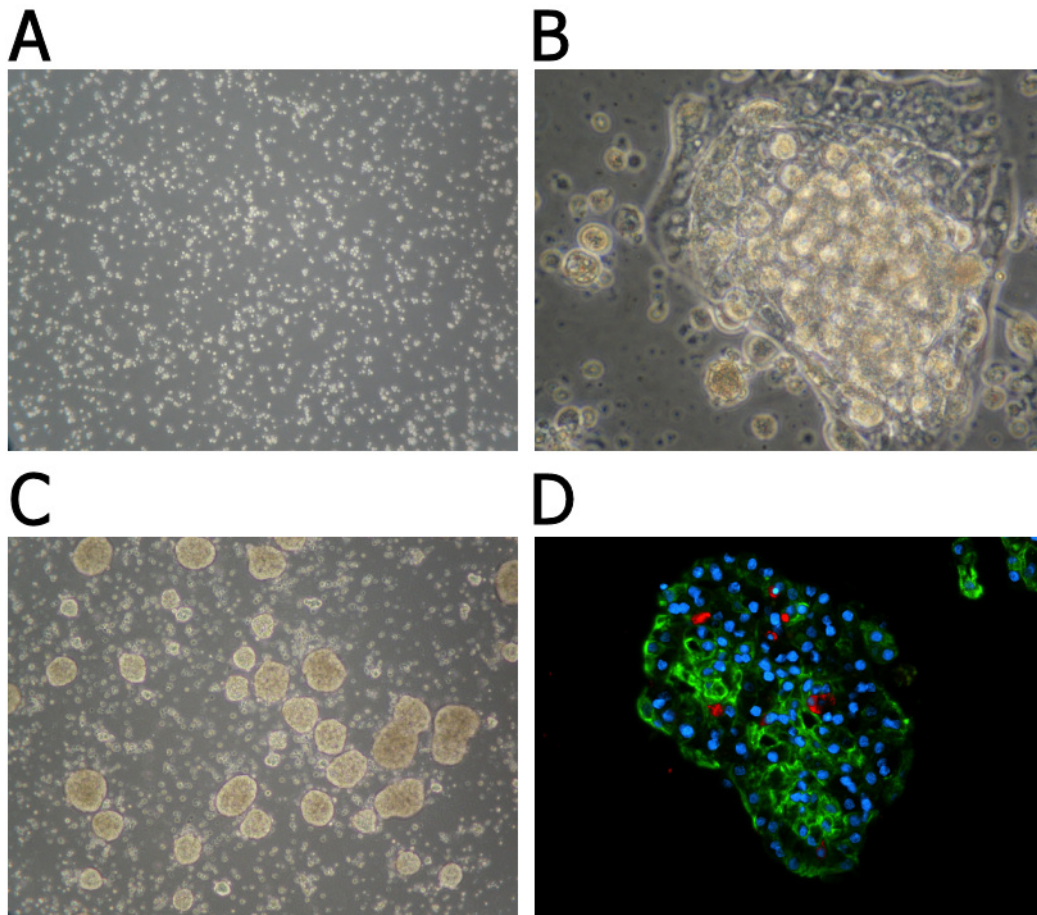
4.2 Izolace a diferenciacie lidských CD133 pozitivních pankreatických buněk

Cílem této práce bylo charakterizovat lidské CD133 pozitivní pankreatické buňky a ověřit jejich schopnost diferenciacie na inzulín produkující β -buňky. Z pankreatické tkáně (n=5) získané po izolaci Langerhansových ostrůvků bylo izolováno $12,1 \pm 3,6$ % CD133 pozitivních buněk. Kontaminace β -buňkami byla ověřena imunofluorescenčním barvením izolovaných buněk. Průměrná zastoupení β -buněk v izolované CD133 pozitivní frakci byla $0,08 \pm 0,05$ %.

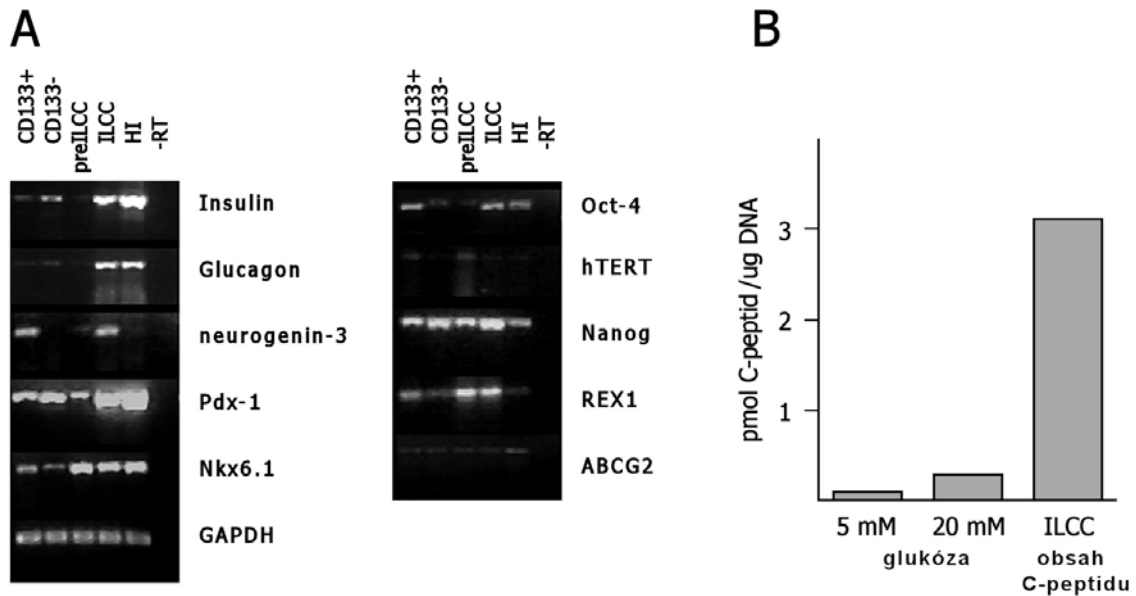
Dále byla u izolovaných buněk provedena analýza genové exprese pomocí RT-PCR. U CD133 pozitivních pankreatických buněk byla prokázána exprese markerů pluripotentních (Oct4, Nanog, Rex, hTERT) a dospělých (ABCG2) kmenových buněk. Rovněž byla detekována exprese transkripčních faktorů účastnících se diferenciacie pankreatických endokrinních buněk (PDX-1, NeuroD, Nkx6.1, Pax4) nicméně detekce těchto transkripčních faktorů mohla být způsobena slabou kontaminací diferencovaných β -buněk, které rovněž exprimují uvedené transkripční faktory. Detekce exprese genu pro neurogenin-3 ovšem jasně potvrdila přítomnost pankreatických endokrinních progenitorů (obrázek 4.2.2)

CD133 pozitivní buňky byly dále kultivovány v médiu, které obsahovalo růstové faktory stimulující diferenciaci pankreatických β -buněk pro ověření schopnosti diferenciacie na inzulín produkující β -buňky. V počáteční fázi kultivace docházelo u části buněk k formování buněčných shluků připomínajících Langerhansovy ostrůvky (obrázek 4.2.1). Následnou kultivací v médiu obsahujícím růstové faktory activin-A, HGF, LIF a suplementy exendin-4 a nikotinamid bylo dosaženo částečné diferenciacie na inzulín produkující β -buňky. Diferenciacie na β -buňky byla prokázána u $6,2 \pm 1,1$ %

(obrázek 4.2.1) CD133 pozitivních pankreatických buněk. Větší část zformovaných ILCC byla tvořena cytokeratin-19 pozitivními buňkami (obrázek 4.2.1). Exprese pankreatických hormonů inzulínu a glukagonu byla potvrzena RT-PCR analýzou (obrázek 4.2.2 A). Pomocí RT-PCR byla rovněž detekována exprese charakteristických markerů diferencovaných β -buněk, jako jsou glukózový transportér GLUT2 a receptor pro GLP-1 peptid. Dále byla detekována přetrvávající exprese charakteristických markerů pluripotentních a dospělých kmenových buněk. Rovněž byla ověřena schopnost sekrece C-peptidu na základě změny koncentrace glukózy v médiu. Statické inkubace potvrdily schopnost sekrece inzulínu resp. C-peptidu v důsledku zvýšení koncentrace glukózy. ILCC sekretovaly 0.11 pmol C-peptidu/ μ g DNA při 5 mM glukózy a 0.42 pmol C-peptide/ μ g DNA při 20 mM glukózy. Pomocí RIA analýzy byla rovněž potvrzena přítomnost C-peptidu 3.1 ± 0.5 pmol C-peptidu/ μ g DNA ve vzorcích diferencovaných CD133 pozitivních pankreatických buněk (obrázek 4.2.2 B).



Obrázek 4.2.1 - Formování ostrůvky připomínajících buněčných shluků (ILCC) během kultivace CD133 pozitivních pankreatických buněk. Počáteční buněčná suspenze bezprostředně po izolaci (A), migrace a shlukování buněk druhý den po zahájení kultivace (B), formování buněčných shluků během konečné fáze diferenciacce (C). Imunofluorescenční barvení diferencovaných CD133 pozitivních pankreatických buněk v podobě ILCC na C-peptid (červená) a cytokeratin-19 (zelená). Buněčná jádra barvená DAPI (modrá) (D).



Obrázek 4.2.2 - Analýza exprese genů u izolovaných CD133 pozitivních (CD133+), CD133 negativních (CD133-) pankreatických buněk a v průběhu diferenciace CD133 pozitivních pankreatických buněk. Vzorek CD133 pozitivních pankreatických buněk před zahájením diferenciace 9 den kultivace (preILCC). Vzorek po ukončení kultivace a diferenciace CD133 pozitivních pankreatických buněk (ILCC). Jako pozitivní kontrola sloužil vzorek lidských Langerhansových ostrůvků (+HI). Jako negativní kontrola sloužil vzorek Langerhansových ostrůvků bez reverzní transkripce (-RT) (A).

Ověření sekreční kapacity diferencovaných CD133 pozitivních pankreatických buněk. Glukózou stimulovaná sekrece C-peptidu v médiu s 5 mM glukózou a následně 20 mM glukózou. Celkový obsah C-peptidu v diferencovaných CD133 pozitivních pankreatických buňkách (ILCC obsah C-peptidu)

4.3 Vliv aktivace PI3K/Akt signální dráhy na diferenciaci pankreatických progenitorových buněk na β -buňky

Cílem této práce bylo zvýšit efektivitu diferenciaci pankreatických duktálních a progenitorových buněk na inzulín produkující β -buňky. K dosažení tohoto cíle jsme využili modulaci PI3K/Akt signální dráhy, která výrazným způsobem ovlivňuje řadu buněčných pochodů včetně diferenciaci.

Jako počáteční buněčný zdroj byly použity pankreatické buňky získané po izolaci Langerhansových ostrůvků. Buněčná frakce získaná dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.3 obsahovala ve zvýšené míře buňky exprimující transkripční faktor neurogenin-3 a byla minimálně kontaminována zbývajícími β -buňkami (obrázek 4.3.1)

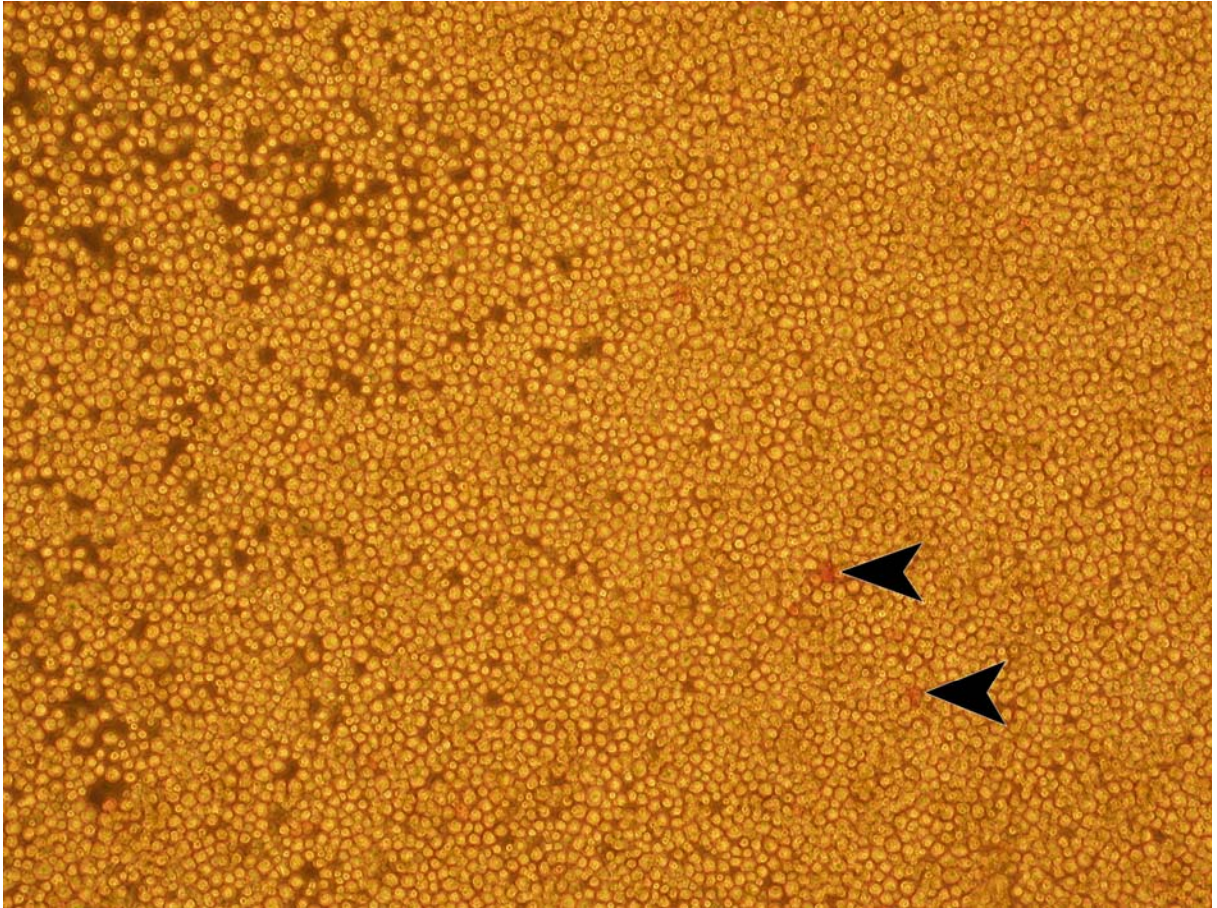
V první fázi kultivačního postupu bylo dosaženo formování buněčných shluků připomínajících Langerhansovy ostrůvky (obrázek 4.3.2), které obsahovaly $25,2 \pm 2,1$ % cytokeratin-19 pozitivních buněk (obrázek 4.3.3 A) a pouze $25,2 \pm 2,1$ % C-peptid pozitivních buněk (obrázek 4.3.4 A). Následnou kultivací v médiu obsahujícím různé kombinace stimulátorů (EGF, Exendin-4, IGF-1, $ZnCl_2$) nebo inhibitoru (wortmannin) PI3K/Akt signální dráhy bylo dosaženo rozdílné exprese cytokeratinu-19 a C-peptidu (tabulka 4.3.1) o ukončení kultivace/diferenciaci.

Největší podíl C-peptid pozitivních buněk $12,2 \pm 3,3$ byl dosažen u vzorku, který byl kultivován spolu s růstovými faktory EGF, Exendin-4 a IGF-1 (obrázek 4.3.4 D). Naopak nejnižší míry diferenciaci na β -buňky $0,7 \pm 0,4$ bylo dosaženo u vzorku, který byl kultivován v přítomnosti $ZnCl_2$ a wortmanninu (obrázek 4.3.4 C). Počet C-peptid pozitivních buněk u kontrolního vzorku bez jakéhokoliv suplementu byl $9,1 \pm 3,2$ (obrázek 4.3.4 G). Rovněž počet cytokeratin-19 pozitivních buněk byl v jednotlivých vzorcích rozdílný viz. tabulka 4.3.1 a obrázek 4.3.3.

Výsledky z imunofluorescenční analýzy byly potvrzeny i pomocí RT-PCR analýzy. Ve vzorku kultivovaném spolu s EGF, Exendinem-4 a IGF-1 byla prokázána zvýšená exprese genu pro inzulin ve srovnání s ostatními vzorky. U tohoto vzorku byla rovněž i zvýšená exprese genů pro glukagon, somatostatin a neurogenin-3 (obrázek 4.3.5 A). Exprese genů pro transkripční faktory PDX-1 a NeuroD ovšem byla nejvyšší ve vzorku kultivovaném v přítomnosti $ZnCl_2$, EGF, Exendin-4, IGF-1, wortmanninu. Schopnost sekrece C-peptidu v závislosti na koncentraci glukózy v médiu byla rovněž potvrzena (obrázek 4.3.5 B), stejně jako obsah C-peptidu (obrázek 4.3.5 C)

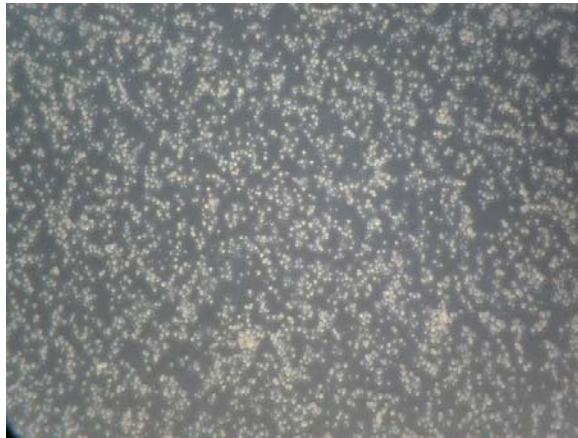
Kombinace modulátorů PI3K/Akt	Cytokeratin-19	C-peptid
$ZnCl_2$	9,2±3,3	2,9±0,9
$ZnCl_2$, wortmannin	6,1±1,8	0,7±0,4
EGF, Exendin-4, IGF-1	57,1±5,9	12,2±3,3
$ZnCl_2$, EGF, Exendin-4, IGF-1	42,4±4,6	5,1±2,4
$ZnCl_2$, EGF, Exendin-4, IGF-1, wortma	37,9±3,8	3,6±1,7
Kontrola	32,3±4,7	9,1±3,2

Tabulka 4.3.1 - počet pozitivních buněk na jednotlivé markery β -buněk (C-peptid) a duktálních buněk (cytokeratin-19)

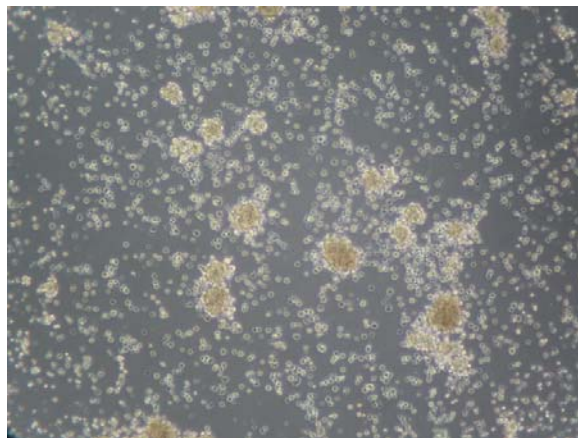


Obrázek 4.4.1 - průkaz β -buněk v suspenzi izolovaných duktálních a progenitorových pankreatických buněk. Barvení pomocí dithizonu specificky se váže na sekreční granula β -buněk obsahujících zvýšenou koncentraci zinku. Po reakci se zinkem barví dithizon β -buňky načerveno viz. černá šipka

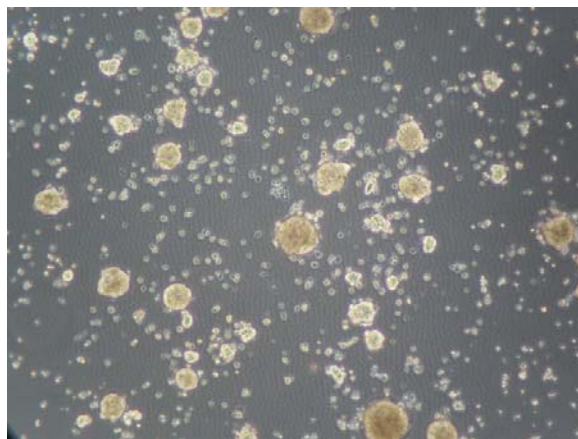
A



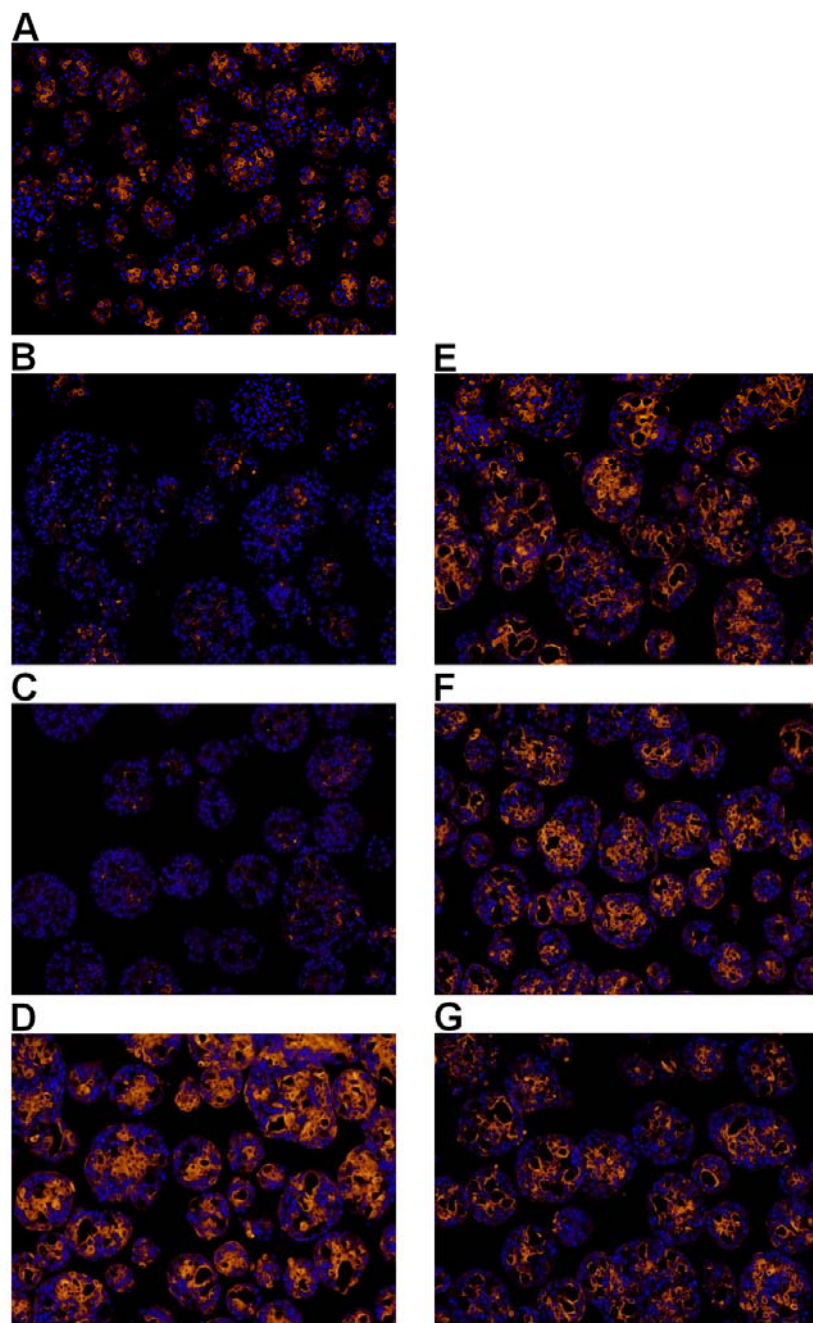
B



C

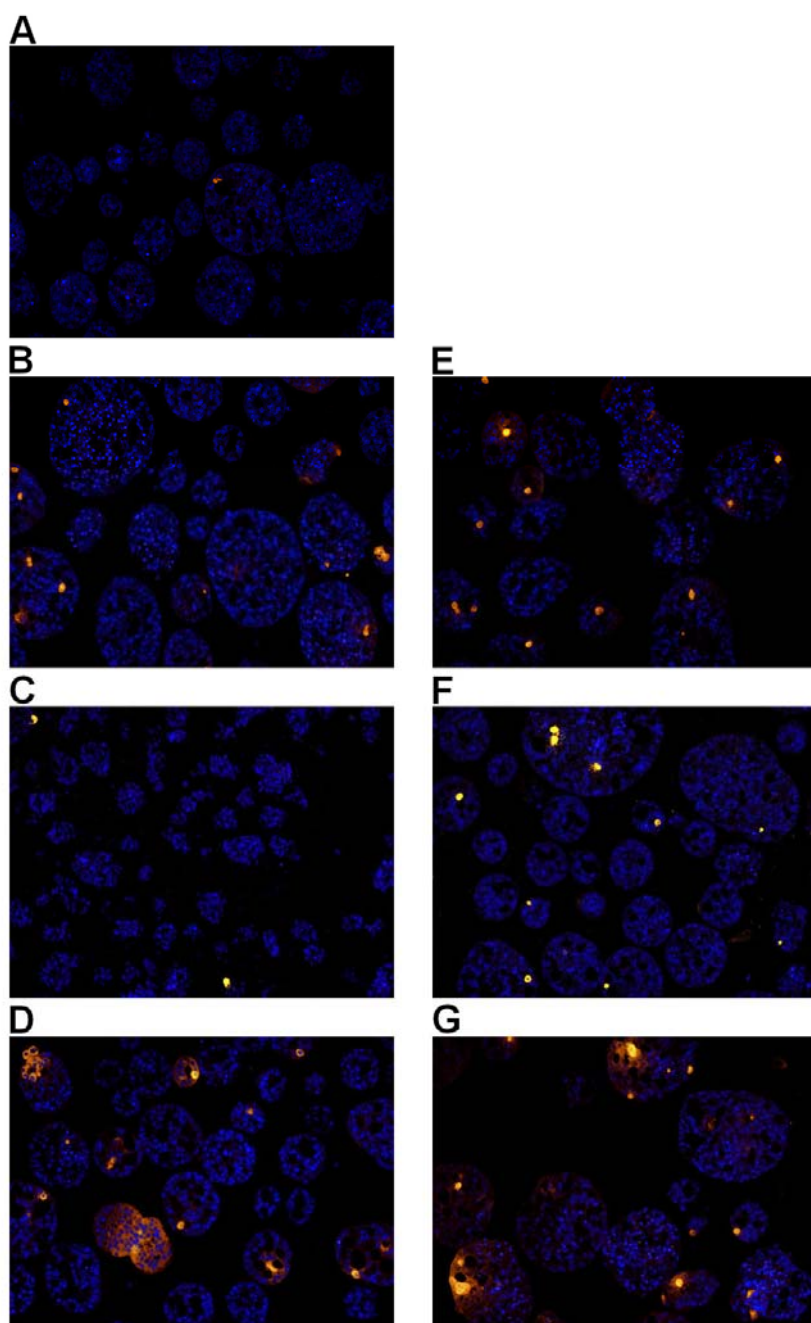


Obrázek 4.3.2 - Formování ostrůvky připomínajících buněčných shluků (ILCC) během kultivace pankreatických duktálních a progenitorových buněk. Počáteční buněčná suspenze bezprostředně po izolaci (A), migrace a shlukování buněk druhý den po zahájení kultivace (B), formování buněčných shluků třetí den kultivace (C).

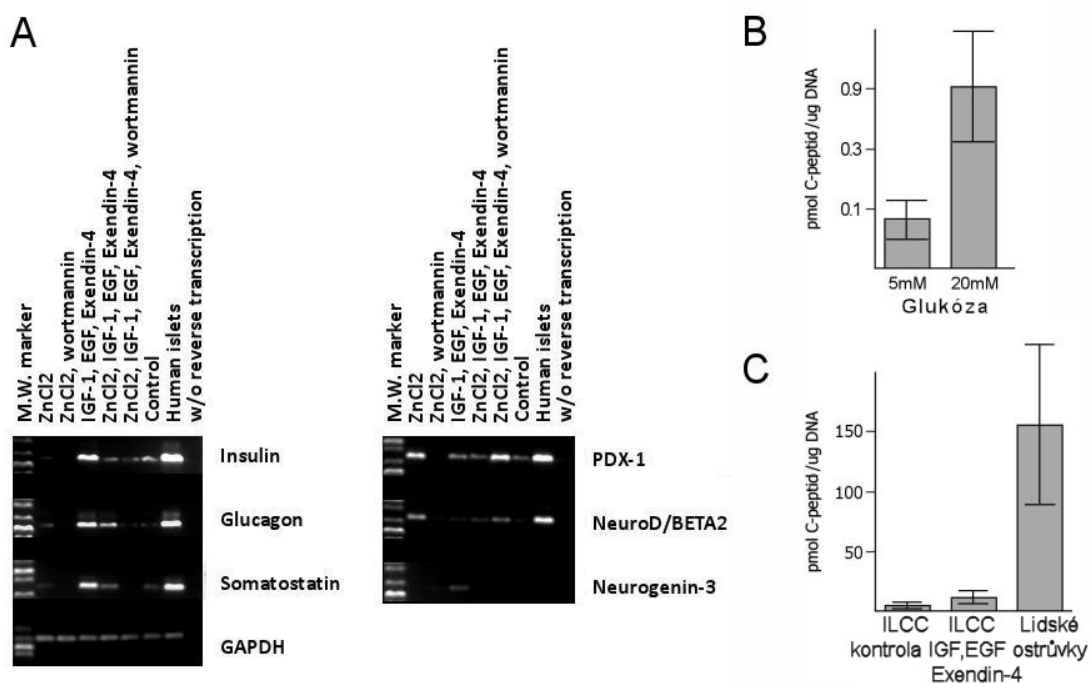


Obrázek 4.3.3 - imunofluorescenční barvení na cyokeratin-19 (oranžová) během diferenciacie pankreatických duktálních a progenitorových buněk. Vzorek ILCC 3 dny od počátku kultivace (A) a vzorky ILCC 10den po ukončení kultivace a diferenciacie inkubované s přidavkem ZnCl₂ (B), s přidavkem ZnCl₂ a wortmanninu (C), s přidavkem EGF, Exendin-4 a IGF-1 (D), s přidavkem ZnCl₂, EGF, Exendin-4 a IGF-1 (E), s přidavkem ZnCl₂,

wortmanninu, EGF, Exendin-4 a IGF-1 (F), a kontrolní vzorek ILCC inkubovaných bez jakéhokoliv z uvedených přísadků (G). Buněčná jádra barvená DAPI (modrá).



Obrázek 4.3.4 - imunofluorescenční barvení na C-peptid (oranžová) během diferenciacie pankreatických duktálních a progenitorových buněk. Vzorek ILCC 3 dny od počátku kultivace (A) a vzorky ILCC 10den po ukončení kultivace a diferenciacie inkubované s přidavkem $ZnCl_2$ (B), s přidavkem $ZnCl_2$ a wortmanninu (C), s přidavkem EGF, Exendin-4 a IGF-1 (D), s přidavkem $ZnCl_2$, EGF, Exendin-4 a IGF-1 (E), s přidavkem $ZnCl_2$, wortmanninu, EGF, Exendin-4 a IGF-1 (F), a kontrolní vzorek ILCC inkubovaných bez jakéhokoliv z uvedených přidavků (G). Buněčná jádra barvená DAPI (modrá).



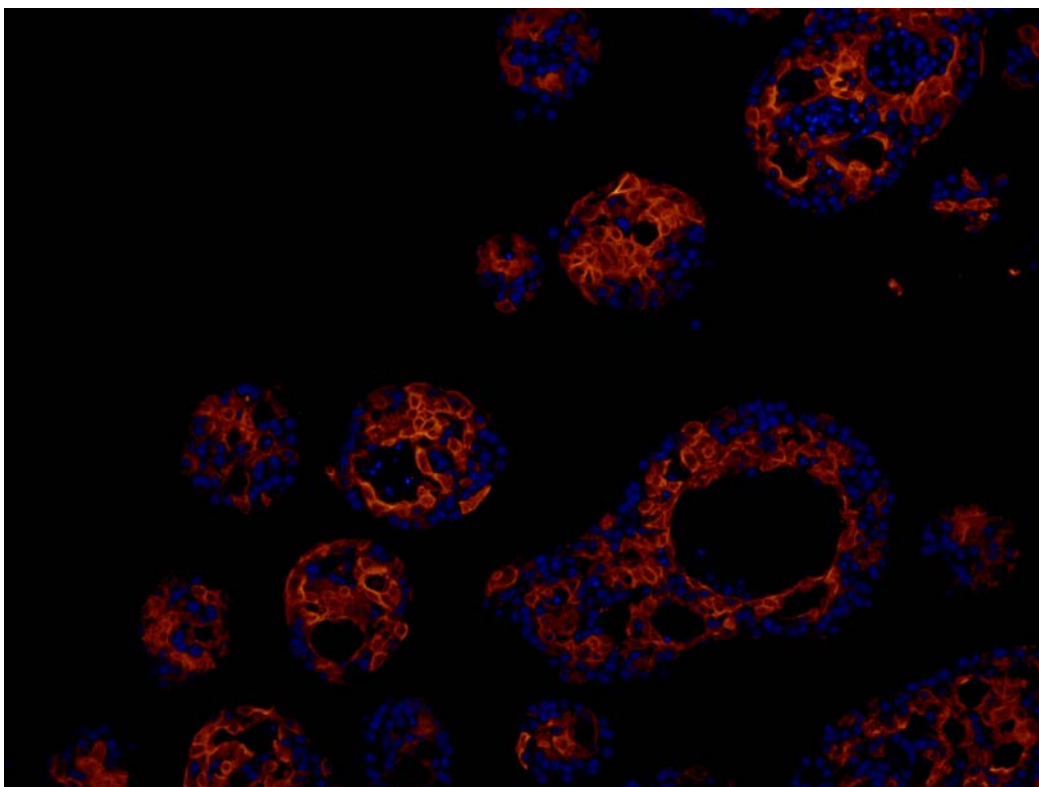
Obrázek 4.3.5 - Analýza exprese genů u vzorků pankreatických duktálních a progenitorových buněk kultivovaných v médiích s přidavkem stimulátorů (EGF, Exendin-4, IGF-1, $ZnCl_2$) nebo inhibitoru (wortmannin) PI3K/Akt signální dráhy. Vzorky jsou uvedeny dle rozdělení do jednotlivých skupin dle tabulky 3.9. Jako pozitivní kontrola sloužil vzorek lidských Langerhansových ostrůvků (Human Islets). Jako negativní kontrola sloužil vzorek Langerhansových ostrůvků bez reverzní transkripce (w/o reverse transcription) (A).

Ověření sekreční kapacity diferencovaných pankreatických duktálních a progenitorových buněk kultivovaných v médiu s přidavkem EGF, Exendin-4 a IGF růstových faktorů. Glukózou stimulovaná sekrece C-peptidu v médiu s 5 mM glukózou a následně 20 mM glukózou (B).

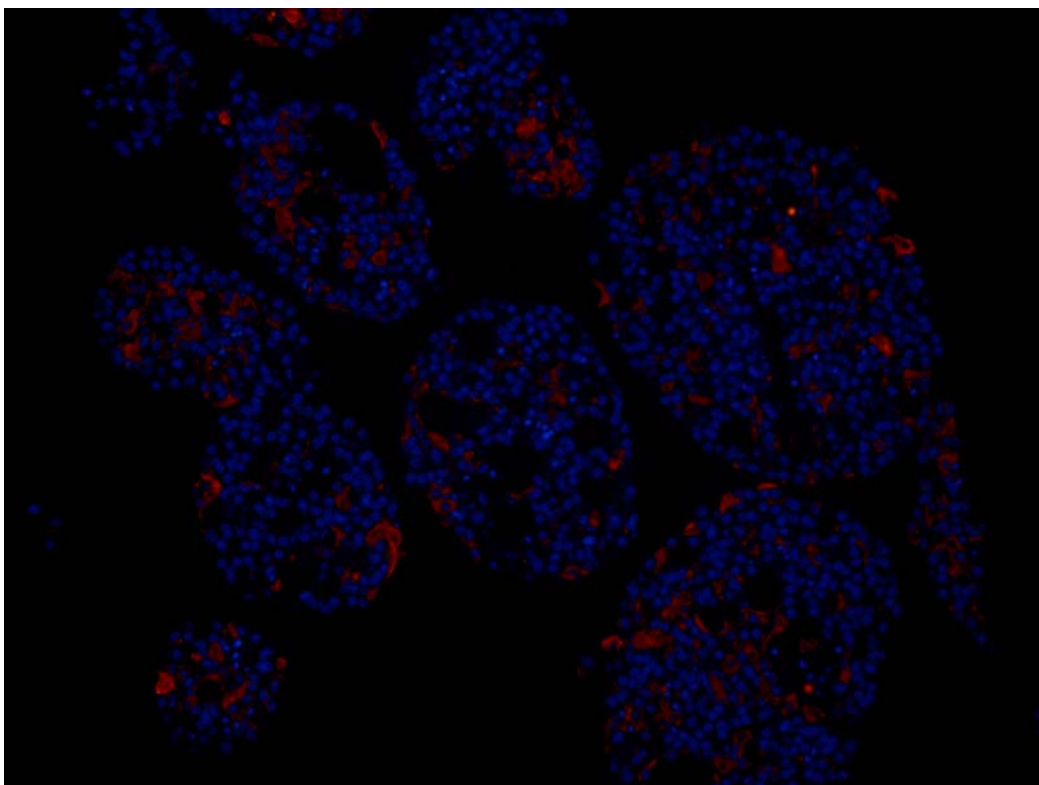
Celkový obsah C-peptidu ve vzorku diferencovaných pankreatických duktálních a progenitorových buněk kultivovaných v médiu s přidavkem EGF, Exendin-4 a IGF růstových faktorů. Pro srovnání je uvedena sekrece C-peptidu u kontrolního vzorku a u vzorku lidských Langerhansových ostrůvků (C).

4.4 Vliv modulace epigenetických faktorů na diferenciaci pankreatických progenitorových buněk na β -buňky

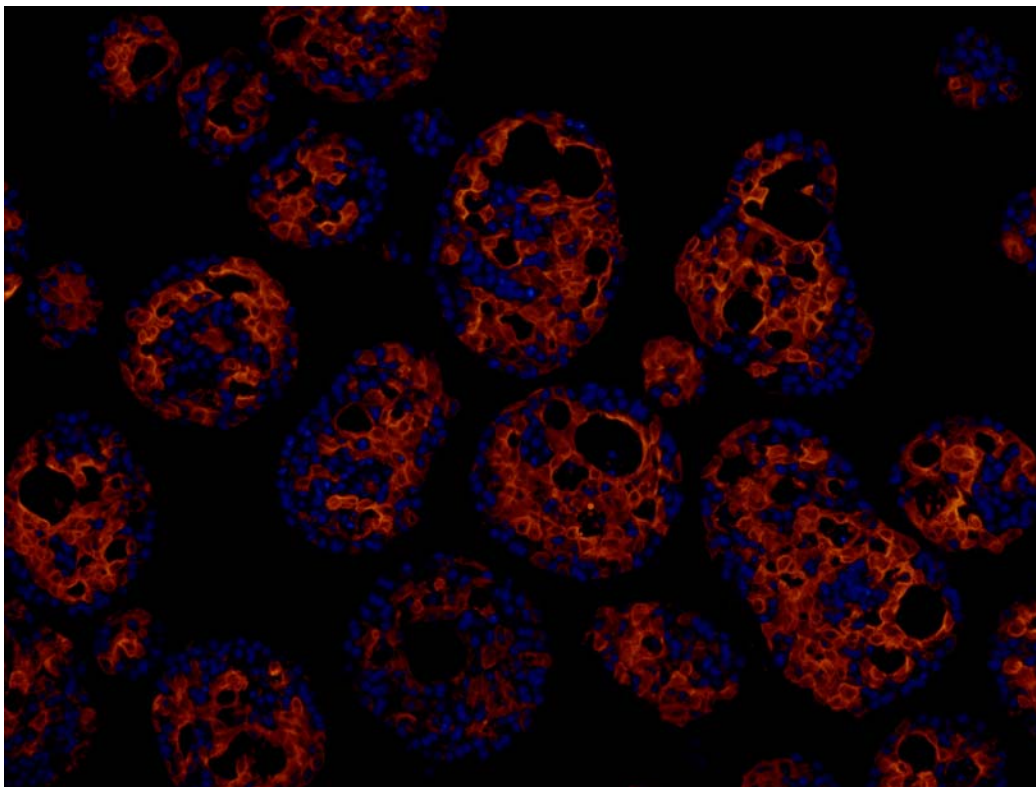
Cílem této práce bylo ověřit vliv epigenetických modifikací na diferenciaci pankreatických duktálních a progenitorových buněk na inzulín produkující β -buňky. Pro tyto účely jsme využili skupinu inhibitorů enzymů, které se výrazným vlivem podílí na epigenetických změnách DNA a histonových proteinů. Jednalo se o inhibitor DNA metyl transferázy 5-Aza-2'-Deoxycytidin, nescifické inhibitory histon deacetyláz Scriptaid a butyrát sodný, inhibitor histon deacetyláz II. třídy MC1268 a specifický inhibitor metyl transferázy lysinu 9 na histonu 3 BIX01294. Uvedené sloučeniny byly přidány do kultivačního média v různých kombinacích uvedených v tabulce 3.12. Nejvýraznější efekt byl pozorován u vzorků jež byly kultivovány v přítomnosti inhibitorů 5AZA, MC1568 a BIX01294. V této skupině došlo k výrazně větší míře diferenciaci (10,3 \pm 2,9%) na β -buňky než v kontrolním vzorku (7,2 \pm 2,8 %). Naopak nejmenší míra diferenciaci na β -buňky byla pozorována u vzorku s přidavkem 5AZA a MC1568 (3,5 \pm 1,6%). Rozdílné výsledky byly ovšem získány ve vztahu k počtu glukagon pozitivních. Nejvyšší počet α -buněk (8,1 \pm 1,4%) byl pozorován ve vzorcích kultivovaných v přítomnosti 5AZA a MC1568 zatímco vzorky kultivované v přítomnosti 5AZA, MC1568 a BIX01294 obsahovaly 7,2 \pm 2,8 glukagon pozitivních buněk. Výsledky z imunofluorescenční analýzy byly potvrzeny i pomocí RT-PCR. Opět byla pozorována nejvyšší míra exprese genu pro inzulín u vzorku kultivovaném v přítomnosti 5AZA, MC1568 a BIX01294. Dále byl pozorován výrazný vliv 5Aza na zvýšenou expresi transkripčního faktoru neurogenin-3 stejně jako pozitivní vliv BIX01294 na expresi transkripčního faktoru PDX-1.



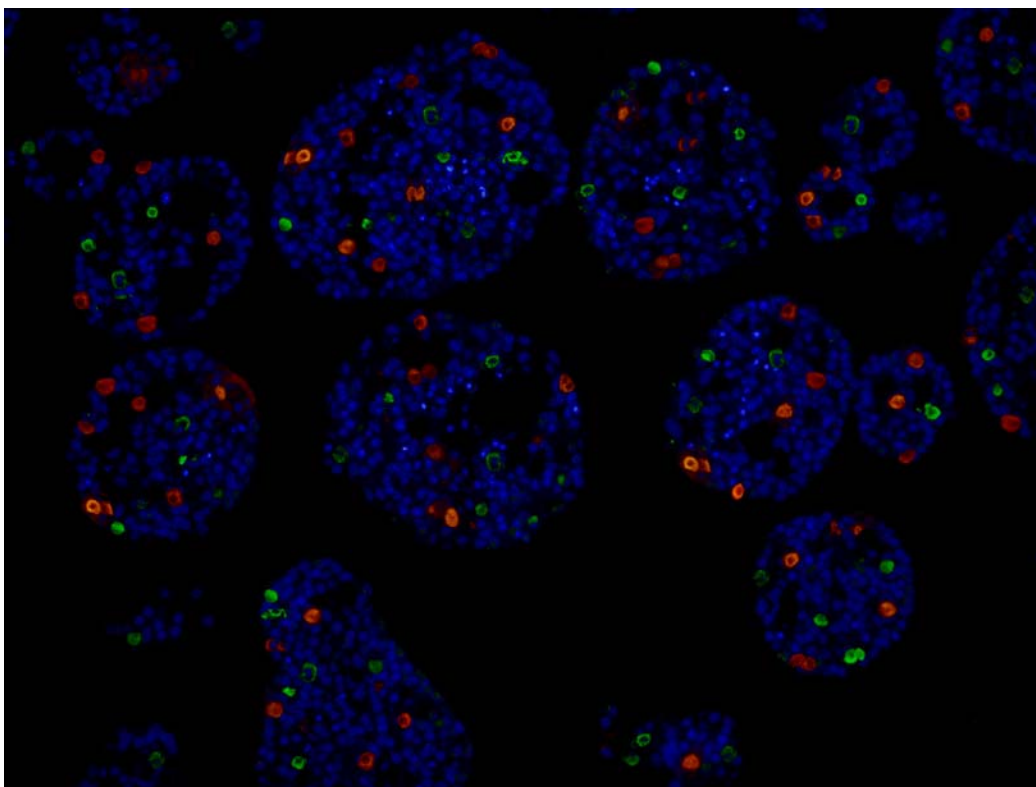
Obrázek 4.4.1 - imunofluorescenční barvení na cytokeratin-19 (oranžová). Buněčná jádra barvená DAPI (modrá). Vzorek ILCC kultivovaných v přítomnosti 5AZA, MC1568 a BIX01294.



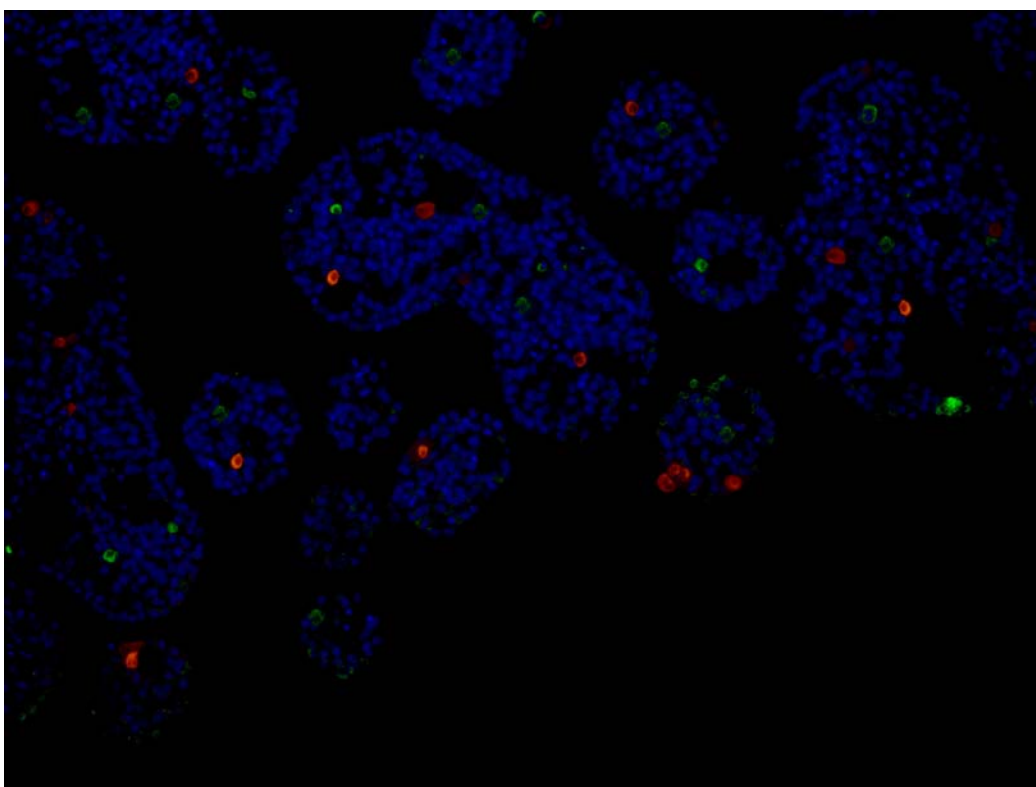
Obrázek 4.4.2 - imunofluorescenční barvení na cytokeratin-19 (oranžová). Buněčná jádra barvená DAPI (modrá). Vzorek ILCC kultivovaných v přítomnosti 5AZA a MC1568.



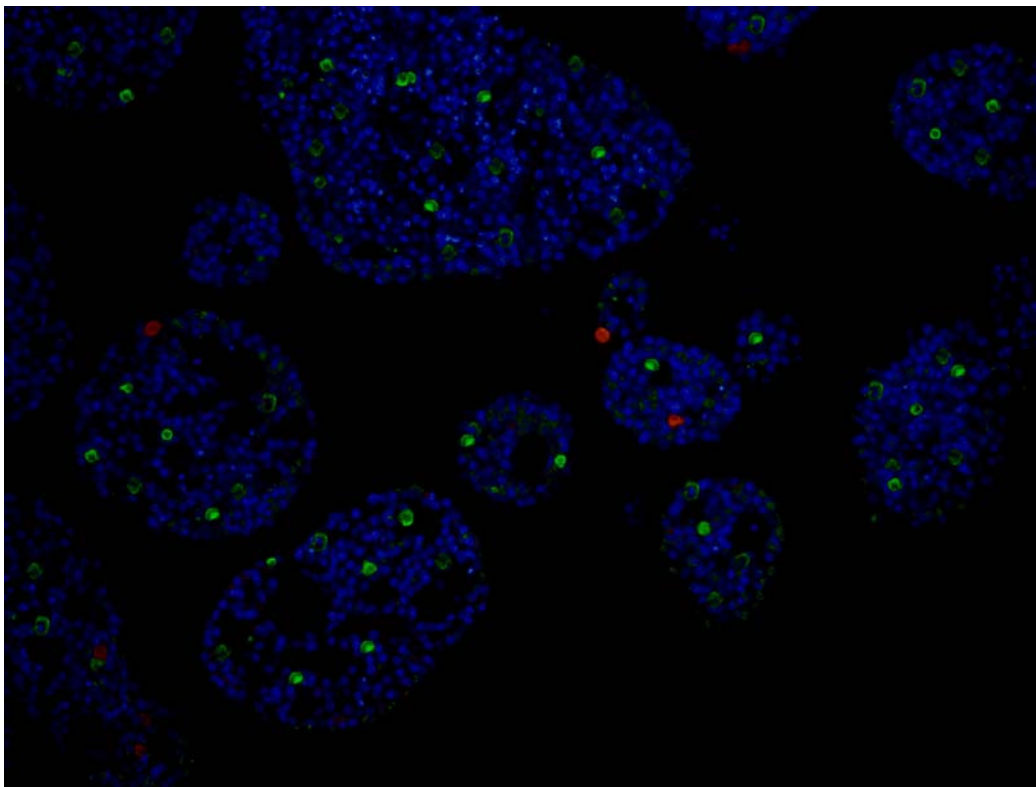
Obrázek 4.4.3 - imunofluorescenční barvení na cytokeratin-19 (oranžová). Buněčná jádra barvená DAPI (modrá). Kontrolní vzorek ILCC bez jakéhokoliv z testovaných inhibitorů.



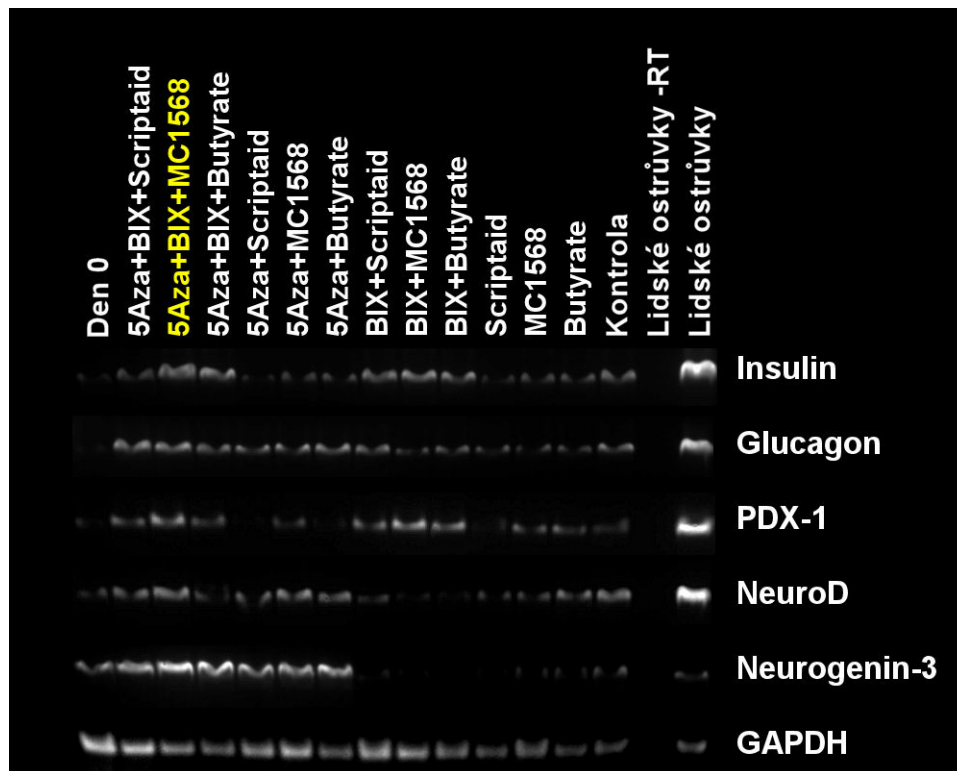
Obrázek 4.4.4 - imunofluorescenční barvení na C-peptid (oranžová) a glukagon (zelená). Buněčná jádra barvená DAPI (modrá). Vzorek ILCC kultivovaných v přítomnosti 5AZA, MC1568 a BIX01294.



Obrázek 4.4.5 - imunofluorescenční barvení na C-peptid (oranžová) a glukagon (zelená). Buněčná jádra barvená DAPI (modrá). Vzorek ILCC kultivovaných v přítomnosti 5AZA a MC1568.



Obrázek 4.4.6 - imunofluorescenční barvení na C-peptid (oranžová) a glukagon (zelená). Buněčná jádra barvená DAPI (modrá). Kontrolní vzorek ILCC bez jakéhokoliv z testovaných inhibitorů.



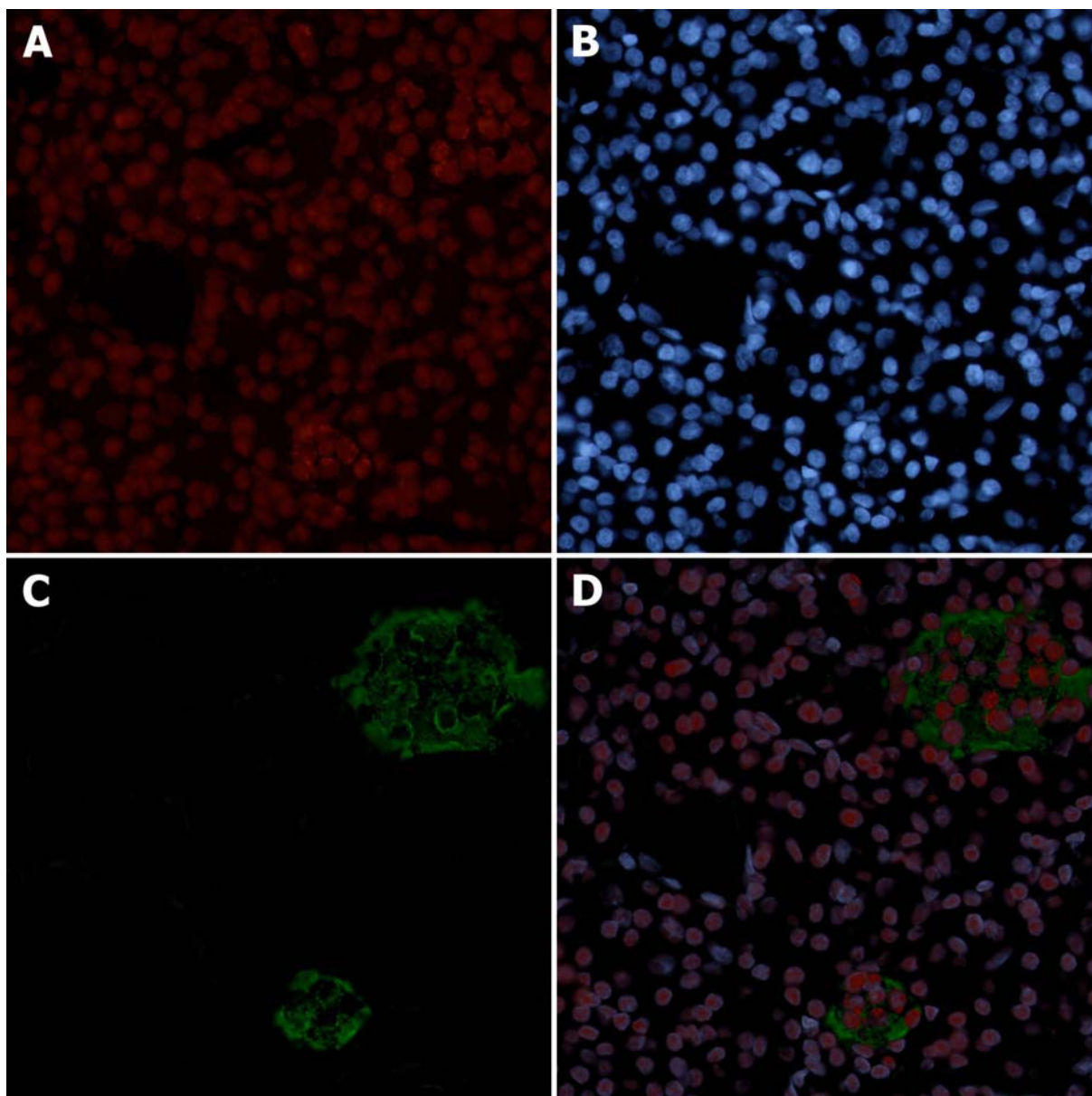
Obrázek 4.4.7 - Průkaz exprese genů v jednotlivých vzorcích inkubovaných v přítomnosti uvedených inhibitorů. Den0 značí počáteční buněčnou suspenzi před počátkem kultivace, kontrola značí vzorek inkubovaný bez jakéhokoliv z testovaných inhibitorů. Jako pozitivní kontrola sloužil vzorek lidských Langerhansových ostrůvků.

4.5 In-vivo diferenciacie kmenových buněk izolovaných z pupečnickové krve na pankreatické β -buňky

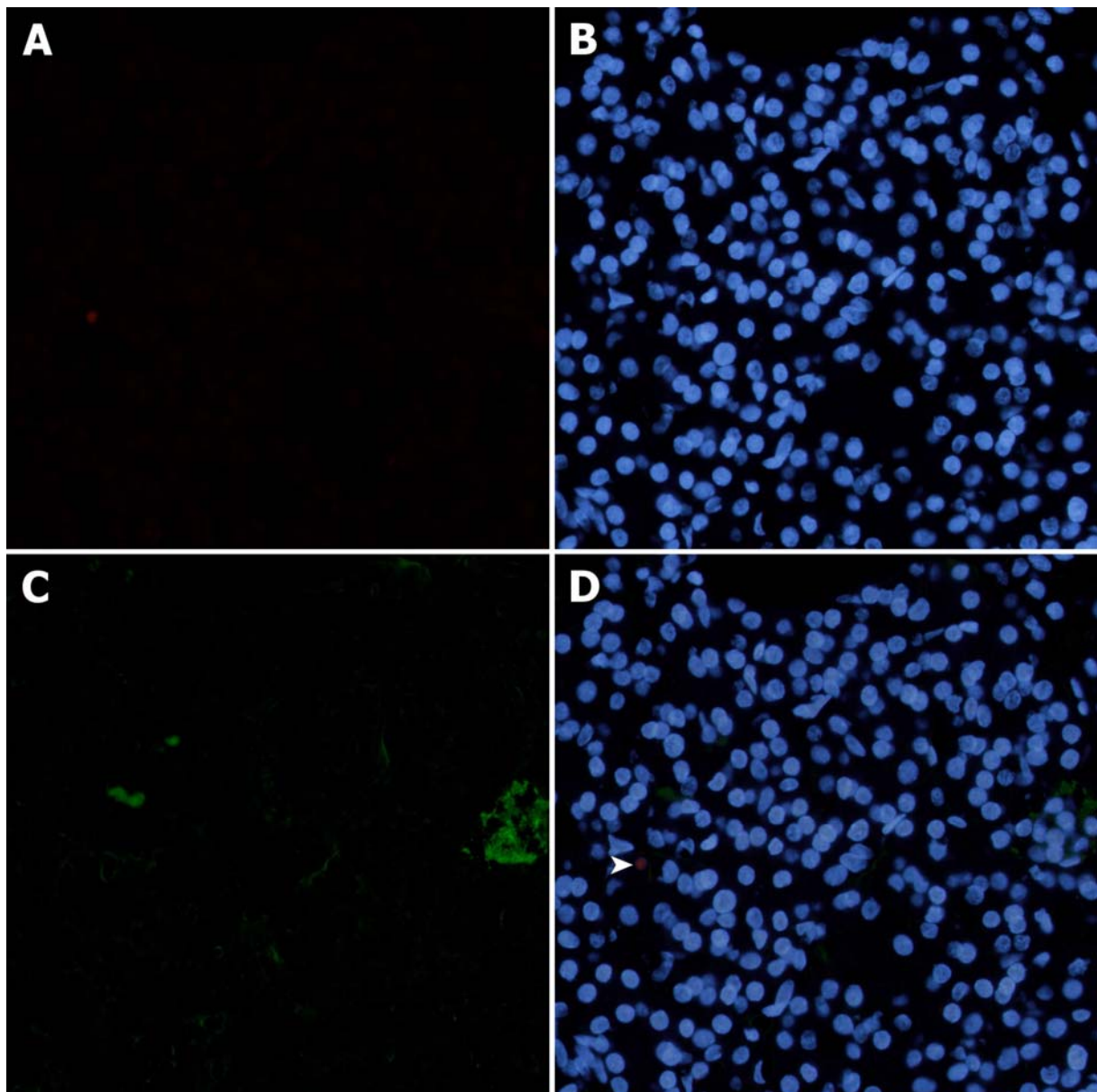
Cílem této studie bylo ověřit možnost zda-li kmenové buňky izolované z lidské pupečnickové krve jsou po vystavení určitým podmínkám schopny *in vivo* diferenciacie na inzulín produkující β -buňky.

Nezbytnou podmínkou pro úspěšnou *in vivo* diferenciaci transplantovaných buněk na inzulín produkující β -buňky bylo ozáření experimentálních zvířat před podáním buněk pupečnickové krve. Bez předchozího ozáření nedošlo k přihojení transplantovaných buněk v pankreatu ani v ostatních vyšetřovaných tkáních jak bylo prokázáno pomocí RT-PCR analýzy (obrázek 4.5.4). Rovněž diferenciacie transplantovaných buněk byla přímo závislá na dávce radiace. U zvířat ozářených radiační dávkou odpovídající 1 Gy došlo k přihojení transplantovaných buněk v kostní dřeni, slezině i pankreatu (obrázek 4.5.4 a 4.5.2), nebyly však detekovány žádné inzulín produkující buňky lidského původu. Inzulín produkující β -buňky byly detekovány pouze v pankreatické tkáni zvířat ozářených dávkou 3 Gy před transplantací buněk pupečnickové krve (obrázek 4.5.3)

Tento potenciál byl nezávislý na hladině glykémie a byl prokázán u nediabetických experimentálních zvířat. Výsledky experimentu byly potvrzeny jak kombinovaným FISH a imunohistochemickým průkazem lidských β -buněk, tak i pomocí detekce exprese lidských genů metodou RT-PCR. V průběhu následujících 4 týdnů od transplantace buněk do systémového oběhu došlo k migraci kmenových buněk do pankreatické tkáně a následné diferenciaci na inzulín produkující β -buňky. β -buňky pocházející z transplantovaných buněk pupečnickové krve byly prokázány v oblasti Langerhansových ostrůvků a zároveň i v okolní pankreatické tkáni především pankreatických duktech.

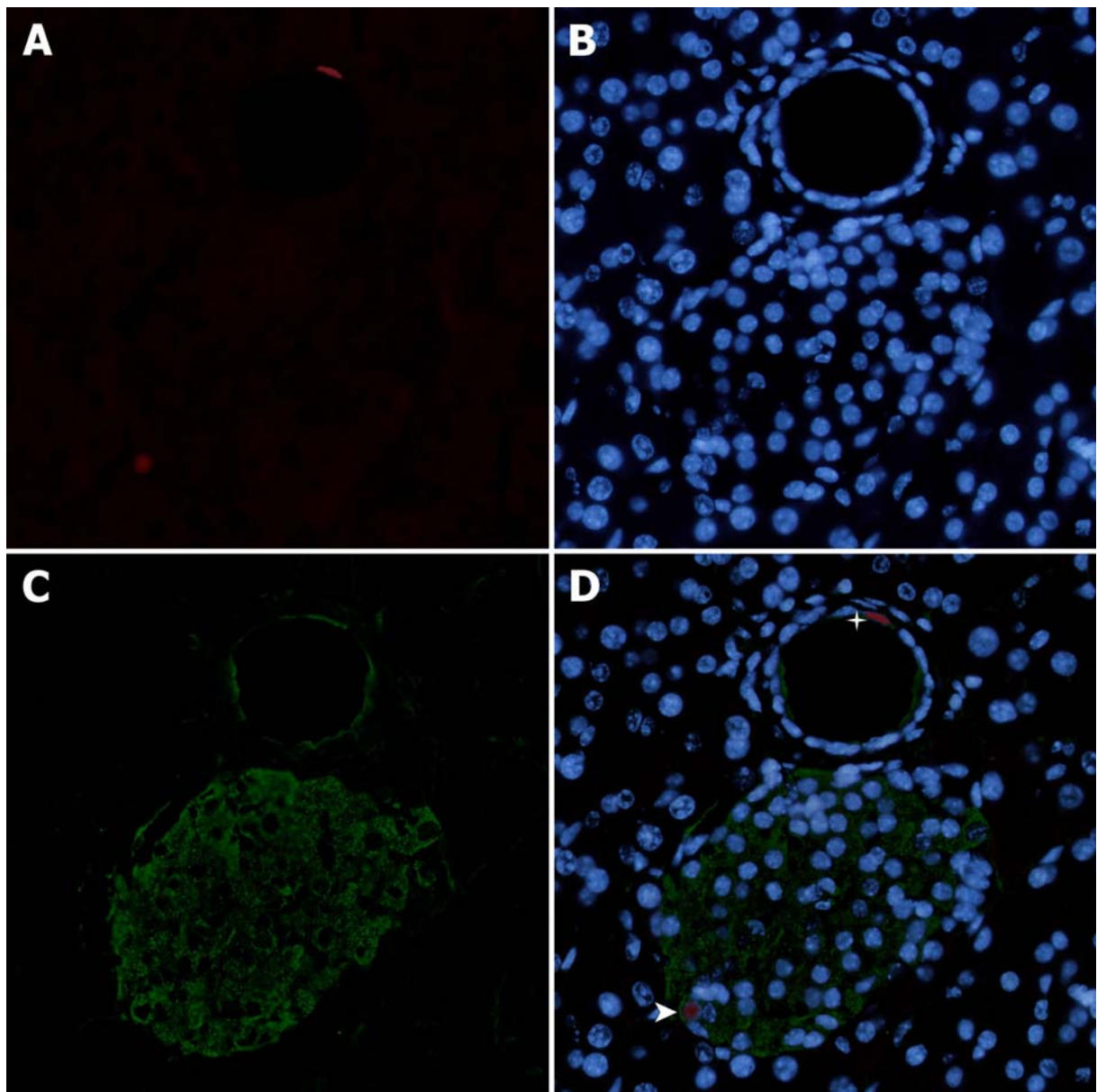


Obrázek 4.5.1 - Průkaz β -buněk lidského původu pomocí imunofluorescenčního značení na C-peptid a fluorescenční in situ hybridizace prokazující specifické lidské ALU sekvence: (A) FISH průkaz lidských buněk sondou specifickou na ALU sekvence lidské DNA (červená) (B) barvení buněčných jader pomocí DAPI (modrá) (C) imunofluorescenční průkaz inzulin produkujících β -buněk pomocí barvení na C-peptid (zelená) (D) kolokalizace inzulin produkujících beta-buněk (zelená) a lidských buněk (červená) na řezu lidské pankreatické tkáně.



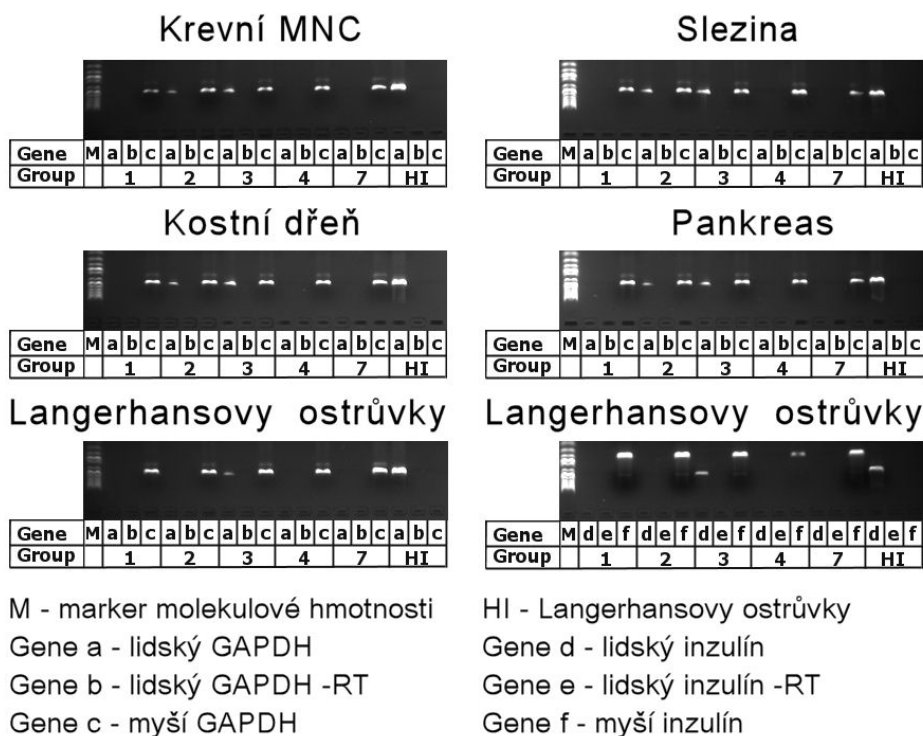
Obrázek 4.5.2 - Průkaz migrace transplantovaných buněk lidské pupečnickové krve do pankreatické tkáně po předchozím ozáření: (A) FISH průkaz lidských buněk sondou specifickou na ALU sekvence lidské DNA (červená) (B) barvení buněčných jader pomocí DAPI (modrá) (C) imufluorescenční průkaz inzulin produkujících β -buněk pomocí barvení na C-peptid (zelená) (D) kolokalizace inzulin produkujících β -buněk (zelená) a lidských buněk (červená) na řezu pankreatické tkáně získané z experimentálního zvířete transplantovaného buňkami lidské pupečnickové krve po předchozím ozáření.

Buňka pocházející z transplantované lidské pupečnickové krve není pozitivní na C-peptid (šipka).



Obrázek 4.5.3 - Průkaz in vivo diferenciacce buněk lidské pupečnickové krve na inzulín produkující β -buňky pomocí imunofluorescenčního značení na C-peptid a fluorescenční in situ hybridizace prokazující specifické lidské ALU sekvence: (A) FISH průkaz lidských buněk sondou specifickou na ALU sekvence lidské DNA (červená) (B) barvení buněčných jader pomocí DAPI (modrá) (C) imuflorescenční průkaz inzulín produkujících beta-buněk pomocí barvení na C-peptid (zelená) (D) kolokalizace inzulín produkujících

beta-buněk (zelená) a lidských buněk (červená) na řezu pankreatické tkáně získané z experimentálního zvířete transplantovaného buňkami lidské pupečnickové krve. Inzulín produkující beta-buňky pocházející z transplantované lidské pupečnickové krve se nacházejí v rámci Langerhansova ostrůvku (šipka) a v oblasti pankreatického ductu.



Obrázek 4.5.4 - Průkaz exprese genů v jednotlivých tkáních experimentálních zvířat transplantovaných buňkami lidské pupečnickové krve. U zvířat, která nepodstoupila celotělové ozáření nebyla pozorována přítomnost mRNA pro lidský GAPDH nebo inzulín v žádné z vyšetřovaných tkáních. U zvířat jež podstoupila ozáření v dávce 1 Gy byla pozorována přítomnost mRNA pro lidský GAPDH ve vzorcích získaných z krevních MNC buněk, sleziny, kostní dřeně a pankreatu. U zvířat jež podstoupila ozáření v dávce 3 Gy byla pozorována přítomnost mRNA pro lidský GAPDH ve vzorcích získaných z krevních MNC buněk, sleziny, kostní dřeně, pankreatu a Langerhansových

ostrůvcích a rovněž byla detekována mRNA pro inzulín ve vzorku z izolovaných Langerhansových ostrůvků.

5. DISKUZE

Diabetes mellitus je v současnosti bezesporu civilizační onemocnění postihující značnou část celosvětové populace. Většina diabetických pacientů je postižena diabetem 2. typu, který ve většině případů nevyžaduje zevní podávání inzulínu. Nicméně část pacientů s diabetem 2. typu a všichni pacienti s diabetem 1. typu je odkázáno na celoživotní podávání inzulínu, nezbytného pro normalizaci glykémie. V současné době je transplantace celého pankreatu nebo izolovaných Langerhansových ostrůvků jediným dostupným způsobem léčby diabetu 1. typu. Hlavní nevýhodou tohoto způsobu léčby je však nedostatek vhodné tkáně k transplantaci. Je tedy patrné, že transplantace pankreatu nebo Langerhansových ostrůvků je pouze dočasným stádiem v léčbě diabetu a pro získání dostatečného množství tkáně a eliminaci negativních efektů léčby musí být nalezeny alternativní zdroje inzulín produkující tkáně. Dostupný a bezpečný alternativní zdroj by mohla představovat inzulín produkující tkáň získaná diferenciací kmenových nebo progenitorových buněk. Z hlediska samotné diferenciace se jako nejnadějnější alternativní zdroj jeví pankreatické kmenové resp. progenitorové buňky.

I přes velmi intenzivní výzkum v této oblasti zůstává detailní charakter pankreatických endokrinních progenitorů, ze kterých vznikají nové β -buňky během dospělého života, stále neobjasněn. Doposud bylo identifikováno pouze několik buněčných markerů jako jsou c-Met a ALDH1, pomocí kterých se podařilo izolovat pankreatické neendokrinní buňky schopné in vitro diferenciace na inzulín produkující β -buňky. (Suzuki a spol., 2004; Rovira a spol., 2010). S cílem rozšířit spektrum markerů pankreatických kmenových buněk jsme se zaměřili na povrchové markery, které byly identifikovány u tkáňově specifických kmenových buněk izolovaných z jiných orgánů resp.

tkání. Mezi takovéto markery se řadí i transmembránový receptor CXCR4 (Ni a spol., 2004) a membránový glykoprotein CD133 (Uchida a spol., 2000). Oba tyto markery byly identifikovány u řady tkáňově specifických kmenových buněk stejně jako u embryonálních kmenových buněk.

Ligandem transmembránového receptoru CXCR4 je chemokin SDF-1. Chemokin SDF-1 je důležitým chemoatraktantem, který aktivuje migraci CXCR4 pozitivních buněk na základě vysoké specifity receptoru CXCR4 vůči tomuto ligandu (Zou a spol., 1998). SDF-1 je ve zvýšené míře sekretován buňkami v důsledku lokálního poškození. Zvýšená lokální hladina SDF-1 vede k aktivaci a migraci CXCR4 pozitivních tkáňově specifických kmenových buněk do místa poškození a následné obnově tkáně (Kucia a spol., 2005). Na základě těchto průkazů o úloze CXCR4-SDF-1 interakce v buněčné regeneraci jsme se zaměřili na charakterizaci CXCR4 pozitivních pankreatických buněk. CXCR4 pozitivní buňky izolované z pankreatické tkáně zbývající po izolaci Langerhansových ostrůvků vykazovaly znaky dospělých tkáňově specifických kmenových buněk jako jsou nestin, ABCG2 a CD133. Izolované CXCR4 pozitivní buňky rovněž exprimovaly transkripční faktory nezbytné pro zajištění pluripotence jako jsou Oct4 a Nanog. Kromě uvedených markerů kmenových buněk byla prokázána i exprese transkripčního faktoru neurogenin-3, markeru pankreatických endokrinních progenitorů. CXCR4 pozitivní buňky rovněž exprimovaly ve zvýšené míře transkripční faktor HNF6, marker duktálních buněk a aktivátor exprese neurogeninu-3.

Na základě těchto výsledků jsme se rozhodli ověřit schopnost diferenciaci na β -buňky u CXCR4 pozitivních pankreatických buněk. Ačkoliv pouze 5,8% CXCR4 pozitivních buněk se diferencovalo na inzulín pozitivní β -buňky v součtu s glukagon pozitivními α -buňkami dosahovala celková míra

diferenciace na endokrinní buňky 19,1 %. Úspěšný průkaz diferenciace na endokrinní pankreatické buňky a rovněž i exprese markeru kmenových buněk svědčí o možnosti využití CXCR4 markeru pro izolaci pankreatických kmenových/progenitorových buněk. Ovšem vzhledem k relativně velkému poměru 22,1 % CXCR4 pozitivních pankreatických buněk se nejedná o specifický marker pankreatických kmenových/progenitorových buněk. Pro výlučnou izolaci pankreatických kmenových/progenitorových buněk je tudíž nutné zkombinovat CXCR4 receptor s dalšími markery pankreatických kmenových/progenitorových buněk.

Mezi nedávno prokázaný marker tkáňově specifických kmenových buněk patří membránový glykoprotein CD133. CD133 byl prokázán u hematopoetických, nervových a dalších typů tkáňově specifických kmenových buněk (Hombach-Klonisch a spol., 2008). V naší práci se nám podařilo prokázat, že CD133 pozitivní pankreatické buňky rovněž vykazují znaky kmenových buněk. U CD133 pozitivních pankreatických buněk byla prokázána exprese transkripčních faktorů nezbytných pro zajištění pluripotence jako jsou Oct4, Nanog, Rex a telomeráza. CD133 pozitivní buňky také exprimovaly transkripční faktory účastníci se diferenciace pankreatických endokrinních buněk. Nicméně detekce těchto transkripčních faktorů mohla být způsobena slabou kontaminací diferencovaných β -buněk, které rovněž exprimují uvedené transkripční faktory. Detekce exprese genu pro neurogenin-3 ovšem jasně potvrdila přítomnost pankreatických endokrinních progenitorů ve frakci CD133 pozitivních buněk. Rovněž CD133 pozitivní pankreatické buňky byly schopné *in-vitro* diferenciace na inzulín produkující β -buňky. Diferencované inzulín produkující buňky byly schopné sekrece C-peptidu na základě zvýšení koncentrace glukózy což je nezbytnou podmínkou pro plně funkční β -buňky. Ovšem větší část buněk tvořících ILCC byla pozitivní na marker duktálních buněk cytokeratin-19. Přetrvávající

expresi charakteristických markerů pluripotentních a dospělých kmenových buněk i po ukončení diferenciaci svědčí pro diferenciaci pouze části z CD133 pozitivních buněk. Výsledky této práce byly posléze potvrzeny dalšími publikovanými články potvrzujícími vlastnosti kmenových buněk u CD133 pozitivních pankreatických buněk (Hori a spol., 2008).

S cílem zvýšit efektivitu diferenciaci izolovaných pankreatických kmenových / progenitorových buněk jsme se dále zaměřili na signální dráhy ovlivňující diferenciaci pankreatických endokrinních buněk. Ze všech studovaných signálních drah jsme dosáhli nejvýznamnějších výsledků v rámci modulace PI3K/Akt signální dráhy. Tato signální dráha hraje významnou roli v řadě buněčných pochodů jako jsou proliferace, regulace metabolických dějů, proteosyntéza a apoptóza. Z hlediska β -buněk se jedná o klíčovou signální dráhu nejen vzhledem k uvedeným buněčným pochodům, ale i vzhledem k regulaci aktivity transkripčního faktoru FoxO1. FoxO1 významným způsobem ovlivňuje expresi řady transkripčních faktorů účastnících se nejen diferenciaci, ale i samotné funkce β -buněk.

V naší práci jsme se zaměřili na ovlivnění PI3K/Akt signální dráhy prostřednictvím $ZnCl_2$ a růstových faktorů EGF, Exendin-4 a IGF-1 aktivujících PI3K/Akt signální dráhu. Rovněž jsme ověřili vliv wortmanninu, inhibitoru PI3K/Akt signální dráhy, na diferenciaci pankreatických duktálních a progenitorových buněk na β -buňky. Stimulováním pankreatických duktálních a progenitorových buněk růstovými faktory EGF, Exendin-4 a IGF-1 bylo dosaženo nejvyšší míry diferenciaci na inzulín produkující β -buňky. Naopak přidáním inhibitoru PI3K/Akt signální dráhy byla míra diferenciaci výrazně snížena. Stejně negativní efekt měl wortmannin i na počet cytokeratin-19 pozitivních buněk. Ačkoliv nebyl pozorován výrazný vliv na expresi transkripčních faktorů bezprostředně regulovaných

transkripčním faktorem FoxO1, byla u vzorku kultivovaném v přítomnosti EGF, Exendinu-4 a IGF pozorována zvýšená exprese neurogeninu-3. Tento nálezh svědčí pro zvýšenou míru diferenciaci pankreatických duktálních a progenitorových buněk na endokrinní buňky. Rovněž i výsledky této studie byly nezávisle potvrzeny publikací z jiného pracoviště, která potvrdila pozitivní vliv aktivace PI3K/Akt signální dráhy na diferenciaci pankreatických duktálních buněk na β -buňky (Watanabe a spol., 2008).

V rámci další práce byl studován vliv epigenetických modifikací na diferenciaci pankreatických duktálních a progenitorových buněk na inzulín produkující β -buňky. Doposud nebyla tato problematika detailně studována nicméně již je známo několik příkladů kdy ovlivnění epigenetického stavu DNA mělo vliv na diferenciaci pankreatických endokrinních buněk (Haumaitre a spol., 2008; Lefebvre a spol., 2010). V naší práci se nám podařilo potvrdit výsledky uvedených prací a podstatně rozšířit spektrum epigenetických modulátorů, které mají vliv na diferenciaci pankreatických β -buněk. Jednak jsme využili nově připraveného inhibitoru histon deacetyláz II. třídy MC1268 a rovněž jsme použili selektivní inhibitor metyl transferázy lysinu 9 na histonu 3 BIX01294. Především v případě sloučeniny BIX01294 byl pozorován výrazně kladný efekt na diferenciaci β -buněk. Tento efekt může být dán zvýšenou expresí transkripčního faktoru PDX-1, která byla pozorována u všech vzorků k nimž byl BIX01294 přidán. Vzhledem k tomu, že BIX01294 selektivně inhibuje metylaci lysinu 9 na histonu 3 může být zvýšená exprese PDX-1 právě důsledkem této inhibice. BIX01294 má pozitivní vliv na expresi řady transkripčních faktorů a kromě jiného je využíván pro indukci transkripčních faktorů zajišťujících pluripotenci kmenových buněk. V naší práci se dále potvrdil pozitivní vliv inhibice metylace DNA na expresi transkripčního faktoru neurogenin-3. U všech vzorků kultivovaných v přítomnosti 5Aza byla pozorována zvýšená exprese

tohoto transkripčního faktoru a rovněž i zvýšená míra diferenciaci na α -buňky.

Poslední z uvedených prací se zabývala možností využití buněk lidské pupečnickové krve pro buněčnou terapii diabetu. V rámci tohoto projektu se nám podařilo prokázat schopnost *in vivo* diferenciaci buněk pupečnickové krve na inzulín produkující β -buňky. Tuto schopnost se nám podařilo prokázat po transplantaci buněk pupečnickové krve nediabetickým zvířatům, u nichž není primárně potřeba zvýšené obnovy β -buněk. Nicméně nezbytnou podmínkou pro úspěšnou *in vivo* diferenciaci buněk pupečnickové krve na inzulín produkující β -buňky bylo předchozí ozáření zvířat jimž byly buňky pupečnickové krve podány. Tento předpoklad může souviset s pozitivním efektem ozáření na migraci a přihojení transplantovaných buněk i do ostatních tkání, nejen do pankreatu, jak se nám podařilo rovněž prokázat. V průběhu následujících 4 týdnů od transplantace buněk do systémového oběhu došlo k migraci buněk pupečnickové krve do kostní dřeně, sleziny a rovněž i do pankreatické tkáně. Při zvýšené dávce ozáření byla pozorována následná diferenciaci na inzulín produkující β -buňky. β -buňky pocházející z transplantovaných buněk pupečnickové krve byly prokázány v oblasti Langerhansových ostrůvků a zároveň i v okolní pankreatické tkáni především pankreatických duktech. Tento poznatek je obzvláště důležitý, protože potvrzuje předchozí nálezy *in vivo* studií, které prokázaly probíhající diferenciaci a tvorbu nových β -buněk právě v oblasti pankreatických duktů. Z tohoto nálezu lze usuzovat, že prostředí pankreatických duktů má stimulační efekt na diferenciaci kmenových buněk a následnou tvorbu nových β -buněk i za fyziologických podmínek. Ačkoliv se nám úspěšně podařilo prokázat schopnost diferenciaci buněk pupečnickové krve na inzulín produkující β -buňky, relativně nízký počet takto diferencovaných β -buněk by neměl pravděpodobně velký klinický význam. V případě klinického využití by byla

nutná identifikace a následné nabohacení příslušné buněčné populace schopné diferenciace na inzulín produkující β -buňky.

6. SOUHRN A ZÁVĚR

Předkládaná disertační práce přispívá k rozšíření znalostí v oblasti diferenciaci dospělých kmenových buněk na inzulín produkující beta buňky a charakterizaci možných alternativních zdrojů inzulín produkující tkáně. Nejdůležitější poznatky zjištěné v rámci disertační práce lze shrnout následovně:

Identifikace CXCR-4 receptoru jako možného markeru pankreatických kmenových/progenitorových buněk

CXCR-4 pozitivní pankreatické buňky vykazují expresi markerů a transkripčních faktorů charakteristických pro kmenové buňky. CXCR-4 pozitivní pankreatické buňky jsou rovněž schopné *in vitro* diferenciaci na inzulín produkující β -buňky

Identifikace CD133 membránového glykoproteinu jako možného markeru pankreatických kmenových/progenitorových buněk

CD133 pozitivní pankreatické buňky vykazují expresi markerů a transkripčních faktorů charakteristických pro kmenové buňky. CD133 pozitivní pankreatické buňky jsou rovněž schopné *in vitro* diferenciaci na inzulín produkující β -buňky. Inzulín produkující buňky diferencované z CD133 pozitivních pankreatických buněk vykazují vlastnosti plně diferencovaných β -buněk, především schopnost sekrece C-peptidu v závislosti na změně koncentrace glukózy.

Vliv PI3K/Akt signální dráhy na diferenciaci pankreatických duktálních a progenitorových buněk na inzulín produkující β -buňky.

Aktivace PI3K/Akt signální dráhy výrazným způsobem zvyšuje počet β -buněk diferencovaných z pankreatických duktálních a progenitorových buněk.

Aktivace PI3K/Akt signální dráhy rovněž zvyšuje expresi transkripčního faktoru neurogenin-3, nezbytného pro diferenciaci pankreatických endokrinních buněk.

Ovlivnění diferenciace pankreatických duktálních a progenitorových buněk na inzulín produkující β -buňky prostřednictvím epigenetických faktorů.

Ovlivněním epigenetických faktorů během diferenciace pankreatických duktálních a progenitorových buněk výrazným způsobem zvyšuje počet diferencovaných β -buněk. Především inhibice metylace lysinu 9 na histonu 3 zvyšuje jednak počet diferencovaných β -buněk a rovněž i expresi transkripčního faktoru PDX-1 nezbytného pro diferenciaci a funkci pankreatických β -buněk.

Schopnost *in vivo* diferenciace buněk pupečnickové krve na inzulín produkující β -buňky

Kmenové buňky izolované z lidské pupečnickové krve jsou za vhodných podmínek schopné migrace a *in vivo* diferenciace na inzulín produkující β -buňky. Nezbytnou podmínkou pro *in vivo* diferenciaci na inzulín produkující β -buňky je ovšem předchozí ozáření transplantovaných zvířat.

Předkládaná disertační práce přináší originální vědecké poznatky. Většina těchto výsledků již byla publikována formou časopiseckých publikací ve vědeckých periodikách. Takto byly publikovány 4 práce, které tvoří součást disertační práce jako přílohy 1, 2, 3 a 5. Další práce je v současné době v recenzním řízení (viz. rukopis publikace uvedené jako příloha 4).

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Akedo H., Christensen H. N.: *J Biol Chem.* 237, 118 (1962)

Apelgvist A., Sommer L., Beatus P., Anderson D. J., Honjo T., Hrabe de Angelis M., Lendahl U., Edlund H.: *Nature.* 400, 877 (1999)

Bar Y., Russ H. A., Knoller S., Ouziel-Yahalom L., Efrat S.: *Diabetes* 57, 2413 (2008)

Berkow & Fletcher, 1992

Bell G. I., Kayano T., Buse J. B., Burant C. F., Takeda J., Lin D., Fukumoto H., Seino S.: *Diabetes Care.* 13, 198 (1990)

Bouwens L., Pipeleers D. G.: *Diabetologia.* 41, 629 (1998)

Bouwens L., Lu W. G., De Krijger R.: *Diabetologia.* 40, 398 (1997)

Brink C., Chowdhury K., Gruss.: *Mech Dev.* 100, 37 (2001)

Butler A. E., Janson J., Bonner-Weir S., Ritzel R., Rizza R. A., Butler P. C.: *Diabetes.* 52, 102 (2003)

Clark J. L., Cho S., Rubenstein A. H., Steiner D. F.: *Biochem Biophys Res Commun.* 35, 456 (1969)

Collombat P., Mansouri A., Hecksher-Sorensen J., Serup P., Krull J., Gradwohl G., Gruss P.: *Genes Dev.* 17, 2591 (2003)

D`Amour K. A., Bang A. G., Eliazar S., Kelly O. G., Agulnick A. D., Smart N. G., Moorman M. A., Kroon E., Carpenter M. K., Baetge E. E.: *Nat Biotechnol.* 24 1392 (2006)

D`Amour K. A., Agulnick A. D., Eliazar S., Kelly O. G., Kroon E., Baetge E. E.: *Nat Biotechnol.* 23, 1534 (2005)

Desai B. M., Oliver-Krasinski J., De Leon D. D., Farzad C., Hong N., Leach S. D., Stoffers D. A.: *J Clin Invest.* 117, 971 (2007)

Deutsch G., Jung J., Zheng M., Lóra J., Zaret K. S.: *Development.* 128, 871 (2001)

Dor Y., Brown J., Martinez O. I., Melton D. A.: *Nature.* 429, 41 (2004)

Esni F., Ghosh B., Biankin A. V., Lin J. W., Albert M. A., Yu X., MacDonald R. J., Civin C. I., Real F. X., Pack M. A., Ball D. W., Leach S. D.: *Development.* 131, 4213 (2004)

Ferber S., Halkin A., Cohen H., Ber I., Einav Y., Golberg I., Barshack I., Seijffers R., Kopolovic J., Kaiser N., Karasik A.: *Nat Med.* 6, 568 (2000)

Foufelle F., Ferré P.: *Biochem J.* 366, 377 (2002)

Gittes G. K., Galante P. E., Hanahan D., Rutter W. J., Debase H. T.: *Development.* 122, 439 (1996)

Gradwohl G., Dierich A., LeMeur M., Guillemont F.: *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 1607 (2000)

Gu G., Brown J. R., Melton D. A.: *Mech Dev.* 120, 35 (2003)

Habener J. F., Kemp D. M., Thomas M. K.: *Endocrinology.* 146, 1025 (2005)

Haumaitre C, Lenoir O, Scharfmann R.: *Mol Cell Biol.* 28, 6373 (2008)

Herrera P. L., Huarte J., Sanvito F., Meda P., Orci L., Vassalli J. D.: *Development.* 113, 1257 (1991)

Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, Seifert A, Alberti E, Pocar P, Kurpisz M, Schulze-Osthoff K, Mackiewicz A, Los M.: *J Mol Med.* 86, 1301 (2008)

Hori Y, Fukumoto M, Kuroda Y.: *Stem Cells.* 26, 2912 (2008)

Ianus A., Holz G. G., Theise N. D., Hussain M. A.: *J Clin Invest.* 111, 843 (2003)

Inada A., Nienaber C., Katsuta H., Fujitani Y., Levine J., Morita R., Sharma A., Bonner-Weir S.: *Proc Natl Acad Sci USA.* 105, 19915 (2008)

- Jacquemin P., Yoshitomi H., Kashima Y., Rousseau G. G., Lemaigre F. P., Zaret K. S.: *Dev Biol.* 290, 189 (2006)
- Jarriault S., Brou C., Logeat F., Schroeter E. H., Kopan R., Israel A.: *Nature* 377, 355 (1995)
- Jensen J., Heller R. S., Funder-Nielsen T., Pedersen E. E., Lindsell C., Weinmaster G., Madsen O. D., Serup P.: *Diabetes* 49, 163 (2000)
- Jonsson J., Ahlgren U., Edlund T., Edlund H.: *Int Dev Biol.* 39, 789 (1995)
- Kassem S. A., Ariel I., Thornton P. S., Scheimberg I., Glaser B.: *Diabetes* 49, 1325 (2000)
- Kawauchi Y., Cooper B., Gannon M., Ray M., MacDonald R. J., Wright C. V.: *Nat Genet.* 32, 128 (2002)
- Kim S. K., Hebrok M.: *Genes Dev.* 15, 111 (2001)
- Kim S. K., Hebrok M., Melton D. A.: *Development.* 124, 4243 (1997)
- Kitamura T., Kitamura Y., Kobayashi O., Kikuchi O., Sasaki T., Depinho R. A., Accili D.: *Mol Cell Biol.* 29, 4417 (2009)
- Kitamura T., Kitamura Y., Kruse J. P., Raum J. C., Stein R., Gu W., Accili D.: *Cell Metab.* 2, 153 (2005)
- Kitamura T., Nakae J., Kitamura Y., Kido Y., Biggs W. H. 3rd., Wright C. V., White M. F., Arden K. C., Accili D.: *J Clin Invest* 110, 1839 (2002)
- Klöppel G., Löhr M., Habich K., Oberholzer M., Heitz P. U.: *Surv Synth Pathol Res.* 4, 110 (1985)
- Koblas T., Pektorová L., Zacharovová K., Berková Z., Girman P., Dovolilová E., Karasová L., Saudek F.: *Transplant Proc.* 40, 415 (2008)
- Koblas T., Zacharovová K., Berková Z., Leontovic I., Dovolilová E., Zámečník L., Saudek F.: *Folia Biol (Praha).* 55, 224 (2009)

Koblas T., Zacharovová K., Berková Z., Mindlová M., Girman P., Dovolilová E., Karasová L., Saudek F.: *Folia Biol (Praha)*. 53, 13 (2007)

Kroon E., Martinson L. A., Kadoya K., Bang A. G., Kelly O. G., Eliazzer S., Young H., Richardson M., Smart N. G., Cunningham J., Agulnick A. D., D'Amour K. A., Carpenter M. K., Baetge E. E.: *Nat Biotechnol*. 26, 443 (2008)

Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ.: *Stem Cells*. 23, 879 (2005)

Lee J. C., Smith S. B., Watada H., Lin J., Scheel D., Wang J., Mirmira R. G., German M. S.: *Diabetes*. 50, 928 (2001)

Lefebvre B, Belaich S, Longue J, Vandewalle B, Oberholzer J, Gmyr V, Pattou F, Kerr-Conte J.: *Biochem Biophys Res Commun*. 391, 305 (2010)

Li W. C., Rukstalis J. M., Nishimura W., Tchিপashvili V., Habener J. F., Sharma A., Bonner-Weir S.: *J Cell Sci*. 123, 2792 (2010)

Massagué J., Chen Y. G.: *Genes Dev*. 14, 627 (2000)

Maehr R., Chen S., Snitow M., Ludwig T., Yagasaki L., Goland R., Leibel R. L., Melton D. A.: *Proc Natl Acad Sci USA*. 106, 15768 (2009)

Manchester K. L.: *Biochem J*. 117, 457 (1970)

Miralles F., Czernichow P., Scharfmann R.: *Development*. 125, 1017 (1998)

Morales AE, She JX, Schatz DA.: *Curr Diab Rep*. 1, 28 (2001)

Murtaugh L. C., Stanger B. Z., Kwan K. M., Melton D. A.: *Proc Natl Acad Sci USA*. 100, 14920 (2003)

Newgard CB.: *Diabetes*. 51, 3141 (2002)

Ni HT, Hu S, Sheng WS, Olson JM, Cheeran MC, Chan AS, Lokensgard JR, Peterson PK.: *Brain Res Dev Brain Res*. 152, 159 (2004)

Nishimura W., Kondo T., Salameh T., El Khattabi I., Dodge R., Bonner-Weir S., Sharma A.: *Dev Biol.* 293, 526 (2006)

Notkins A. L.: *J Biol Chem.* 277, 43545 (2002)

Ogihara T., Watada H., Kanno R., Ikeda F., Nomiya T., Tanaka Y., Kankao A., German M. S., Kojima I., Kawamori R.: *J Biol Chem* 278, 21693 (2003)

Patti M. E., McMahon G., Mun E. C., Bitton A., Holst J. J., Goldsmith J., Hanto D. W., Callery M., Arky R., Nose V., Bonner-Weir S., Goldfine A. B.: *Diabetologia.* 48, 2236 (2005)

Pictet R. L., Clark W. R., Williams R. H., Rutter W. J.: *Dev Biol.* 29, 436 (1972)

Pin C. L., Rukstalis J. M., Johnson C., Konieczny S. F.: *J Cell Biol.* 155, 519 (2001)

Ritz-Larsen B., Estreicher A., Gauthier B. R., Mamin A., Edlund H., Philippe J.: *Diabetologia.* 45, 97 (2002)

Rovira M., Delaspre F., Masumi M., Serra S. A., Valverde M. A., Lloreta J., Dufresne M., Payré B., Konieczny S. F., Savatier P., Real F. X., Skoudy A.: *Gastroenterology.* 135, 1301 (2008)

Rovira M., Scott S. G., Liss A. S., Jensen J., Thayer S. P., Lesch S. D.: *Proc Natl Acad Sci USA.* 107, 75 (2010)

Rozante L. C., Gubitoso M. D., Matioli S. R.: *Genet Mol Res.* 6, 821 (2007)

Ryle A. P., Sanger F., Smith L. F., Kitai R.: *Biochem J.* 60, 541 (1955)

Sander M., Sussel L., Connors J., Scheel D., Dela Cruz F., Schwitzgeber V., Hayes-Jordan A., German M.: *Development.* 127, 5533 (2000)

Sanvito F., Herrera P. L., Huarte J., Nichols A., Montesano R., Orci L., Vassalli J. D.: *Development* 120, 3451 (1994)

Seymour P. A., Freude K. K., Tran M. N., Mayes E. E., Jensen J., Kist R., Scherer G., Sander M.: *Proc Natl Acad Sci USA.* 104, 1865 (2007)

Schwitzgebel V. M., Scheel D. W., Connors J. R., Kalamaras J., Lee J. E., Anderson D. J., Steiner D. F., Oyer P. E.: *Proc Natl Acad Sci USA*. 57, 473 (1967)

Sussel L., Johnson J. D., German M. S.: *Development*. 127, 3533 (2000)

Suzuki A., Nakauchi H., Taniguchi H.: *Diabetes*. 53, 2143 (2004)

Thorel F., Népote V., Avril I., Kohno K., Desgras R., Chera S., Herrera P. L.: *Nature*. 464, 1149 (2010)

Trümper K., Trümper A., Trusheim H., Arnold R., Göke B., Hörsch D.: *Ann N Y Acad Sci* 921, 242 (2000)

Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL.: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 14720 (2000)

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR: Péče o nemocné cukrovkou (2009)

Watanabe H, Saito H, Ueda J, Evers BM.: *Biochem Biophys Res Commun*. 370, 33(2008)

Yang L., Li S., Hatch H., Ahrens K., Cornelius J. G., Petersen B. E., Peck A. B.: *Proc Natl Acad Sci USA*. 99, 8078 (2002)

Yoshida S., Ishikawa F., Kawano N., Shimoda K., Nagafuchi S., Shimoda S., Yasukawa M., Kanemaru T., Ishibashi H., Shultz L. D., Harada M.: *Stem Cells*. 23, 1409 (2005)

Yoshitomi H., Zaret K.S.: *Development*. 131, 807 (2004)

Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton D. A.: *Nature*. 455, 627 (2008)

Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR.: *Nature*. 393, 595 (1998)

8. PŘÍLOHY PUBLIKACÍ

Příloha 1

Koblas Tomáš, Zacharovová Klára, Berková Zuzana, Mindlová Martina, Girman Peter, Dovolilová Eva, Karasová Ludmila, Saudek František: Isolation and characterization of human CXCR4-positive pancreatic cells. Folia Biol. 53, 13-22 (2007) IF=0,596

Příloha 2

Koblas Tomáš, Pektorová Lenka, Zacharovová Klára, Berková Zuzana, Girman Peter, Dovolilová Eva, Karasová Ludmila, Saudek František: Differentiation of CD133-positive pancreatic cells into insulin-producing islet-like cell clusters. Transplant Proc. 40, 415-418 (2008) IF=1,055

Příloha 3

Koblas Tomáš, Zacharovová Klára, Berková Zuzana, Girman Peter, Saudek František: An acidic pH and activation of phosphoinositide 3-kinase stimulate differentiation of pancreatic progenitors into insulin-producing cells. Transplant Proc. 42, 2075-2080 (2010) IF=0,994

Příloha 4

Leontovyč Ivan, **Koblas Tomáš, Pektorová Lenka, Zacharovová Klára, Berková Zuzana, Saudek František: The effect of epigenetic factors on differentiation of pancreatic progenitor cells into insulin producing cells.** Transplant Proc. V recenzním řízení

Příloha 5

Koblas Tomáš, Zacharovová Klára, Berková Zuzana, Leontovyč Ivan, Zámečník Lubomír, Saudek František: In vivo differentiation of human umbilical cord blood-derived cells into insulin-producing beta cells. Folia Biol. 55, 224-232 (2009) IF=1,14

Isolation and Characterization of Human CXCR4-Positive Pancreatic Cells

(diabetes mellitus / insulin / pancreas / β cell / islets / stem cells / CXCR4)

T. KOBLAS, K. ZACHAROVÁ, Z. BERKOVÁ, M. MINDLOVÁ, P. GIRMAN, E. DOVOLILOVÁ, L. KARASOVÁ, F. SAUDEK

Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Abstract. The existence of an adult PSC that may be used in the treatment of diabetes is still a matter of scientific debate as conclusive evidence of such a stem cell in the adult pancreas has not yet been presented. The main reason why putative PSC has not yet been identified is the lack of specific markers that may be used to isolate and purify them. In order to increase the list of potential PSC markers we have focused on the human pancreatic cells that express cell surface receptor CXCR4, a marker of stem cells derived from different adult tissues. Here we report that CXCR4-positive pancreatic cells express markers of pancreatic endocrine progenitors (neurogenin-3, nestin) and markers of pluripotent stem cells (Oct-4, Nanog, ABCG2, CD133, CD117). Upon *in vitro* differentiation, these cells form ILCC and produce key islet hormones including insulin. Based on our results, we assume that CXCR4 marks pancreatic endocrine progenitors and in combination with other cell surface markers may be used in the attempt to identify and isolate PSC.

Diabetes mellitus (DM) is a chronic, life-threatening disease characterized by a metabolic disorder in which there is a lack of action or production of insulin. Type 1 DM is caused by an autoimmune reaction leading to the destruction of the insulin-producing β -cells in the pancreas. Current methods of DM treatment are not capable to achieve tight control of blood sugar level

resulting in serious long-term complications, including eye, kidney, nerve and heart disease. Presently, the only approaches to achieving normal glucose control are transplantation of the whole pancreas or transplantation of isolated pancreatic islets (Shapiro et al., 2000; Robertson et al., 2006). This kind of treatment is currently available only for a highly selected group of patients. Whole organ pancreas transplantation is usually performed in diabetic patients with kidney failure who are simultaneously undergoing kidney transplantation (Robertson et al., 2006). A major obstacle to providing whole pancreas or islet transplantation to those in need is the lack of organs as they can only be obtained from cadaver donors. Therefore, the research in the diabetes field has focused on the identification of new sources of insulin-producing tissue.

The embryonic or adult stem cells are considered to be the most promising source of such tissue. Embryonic stem cells (ESC) may seem to be the best material for generating new β -cells as they are pluripotent and can differentiate into any cell of three germ layers including endoderm-derived pancreas. Indeed, some studies have reported generations of insulin-producing cells from ESC (Soria et al., 2000; Lumelsky et al., 2001). However, the insulin content was significantly lower in comparison with mature islet β -cells and when transplanted into animals, ESC-derived cells developed tumours (Fujikawa et al., 2005). In addition, the ESC research and eventual clinical application is hindered by serious ethical concerns.

Since the adult stem cells do not raise such ethical issues, they may be considered as a more suitable source of insulin-producing tissue. Moreover, adult stem cells are partially committed and are supposed to give rise to all cell types of the organ in which they reside. Thus, further manipulation of adult stem cells in an attempt to acquire fully differentiated cells with a mature phenotype would be much easier than in the case of uncommitted ESC.

A large body of evidence supports the assumption that in postnatal life newly formed β -cells are at least partially derived from the pancreatic stem cell. However, conclusive evidence of such a stem cell that can give rise to β -cells in the adult pancreas is still lacking. Pancreatic

Received January 3, 2007. Accepted January 19, 2007.

This work was supported by research grant NR/8031-3/2004 from the Internal Grant Agency of the Ministry of Health, Czech Republic.

Corresponding author: František Saudek, Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videňská 1958/9, 140 21 Prague 4, Czech Republic. Phone: (+420) 261 364 107, e-mail: frsa@medicon.cz

Abbreviations: DAPI – 4,6-diamidino-2-phenylindole; DM – diabetes mellitus; ESC – embryonic stem cell(s); HGF – hepatocyte growth factor; ILCC – islet-like cell cluster; ITS – insulin transferrin selenium; LIF – leukaemia inhibitory factor; MACS – magnetic activated cell sorting; NGN-3 – neurogenin-3; PI – propidium iodide; PSC – pancreatic stem cell(s); RT-PCR – reverse transcriptase polymerase chain reaction; SDF – stromal derived factor; TCSC – tissue-committed stem cell(s).

stem cells (PSC) are believed to reside within ductal tissue or the islets themselves. The notion that ductal tissue harbours PSC is supported by the mechanism of islet development during organogenesis when new islets arise from pancreatic ducts (Pictet *et al.*, 1972; Edlund, 2002). Indeed, it has been reported in several studies that cultures of mouse and human ductal cells give rise to insulin-producing cells (Bonner-Weir *et al.*, 2000; Ramiya *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2003). Similar results have been achieved in studies using islet-derived cells (Lechner *et al.*, 2005). Although the transplantations of these cells were capable to treat diabetic animals in some of the cases, low insulin content and the possible contribution of β cells present in the original islet and ductal tissues may weaken the stem cell character of the applied cells. For instance, simple β -cell replication may explain the reappearance of insulin-producing cells (Dor *et al.*, 2004).

The main reason why a putative pancreatic stem cell has not yet been discovered is the lack of specific markers that could be used to recognize and purify them. Cell surface markers in particular may be very valuable for the attempt to isolate and further study stem cells. One of the few cell surface molecules that are considered as a pancreatic stem cell marker is c-Met, a receptor for hepatocyte growth factor (HGF) (Suzuki *et al.*, 2004). In addition to other cell surface markers, the c-Met is also expressed in the recently identified human tissue-committed stem cells (TCSC) (Kucia *et al.*, 2004). Another surface molecule that belongs to the family of TCSC markers is CXCR4. The CXCR4 receptor and its ligand, stromal derived factor SDF-1 α , are required for appropriate patterning during ontogeny and stimulate the growth and differentiation of critical cell types. Moreover, CXCR4/SDF-1 α axis is an obligatory component in the maintenance of pancreatic duct cell survival, proliferation, and migration during pancreatic organogenesis and regeneration (Kayali *et al.*, 2003). As noted above, the results of several studies suggest that pancreatic duct epithelium itself serves as a pool for progenitors and PSC that are able to migrate toward the existing or newly forming islets and differentiate into new β -cells. In this case, CXCR4 could play an important role in the process of stem cell differentiation and migration during islet neogenesis.

The aim of our study was to characterize the population of CXCR4-positive human pancreatic cells, their ability to differentiate toward insulin-producing cells and determine whether these cells share the markers of stem cells and pancreatic endocrine progenitors. Here we report that CXCR4-positive cells from the islet-depleted pancreatic fraction express markers of pancreatic endocrine progenitors (neurogenin-3, nestin) and markers of pluripotent stem cells (Oct-4, Nanog, ABCG2, CD133, CD117). Upon *in vitro* differentiation, these cells form islet-like cell clusters (ILCC) that produce key islet hormones and acquire a β -cell like phenotype.

Material and Methods

Tissue preparation

To isolate CXCR4-positive cells, we used human pancreatic acinar tissue that remains after the islet isolation and is discarded. The programme of isolation and transplantation of human pancreatic islets was approved by the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer's Teaching Hospital.

Human islets and pancreatic tissue were isolated according to previously described methods (Shapiro *et al.*, 2000). Briefly, islets were isolated from pancreata obtained from 7 donors (mean age 49 ± 18 years, range 29–69). The pancreatic duct was perfused with a cold enzyme mixture containing Liberase HI (Roche, Indianapolis, IN). Tissue was then transferred to a modified Ricordi chamber (Shapiro *et al.*, 2000) and separated by gentle mechanical agitation and enzymatic digestion at 37°C. Islets were purified with the use of continuous gradients of Ficoll-diatrizoic acid in an aphaeresis system (model 2991, Gambro, Píerov, Czech Republic). The continuous Ficoll gradient was layered before the separation step. The solution densities ranged from 1.064 to 1.092 g/ml with the densest solution at the bottom of density gradient. During centrifugation, islets migrated to the interface between 1.070 and 1.080 g/ml. The remaining cellular material from the denser layer was pooled and further processed.

Cell separation by magnetic activated cell sorting (MACS)

Cellular material obtained from islet isolation (3×10^8 cells) was filtered through a 70- μ m cell strainer to remove residual islets. Filtered tissue suspension was digested with Accutase solution (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) for 10 min at 37°C. The single-cell suspension was washed in staining buffer (PBS, 0.5 %HSA, 2 mM EDTA, pH 7.2) and centrifuged at 300 g for 10 min. Cell pellet was resuspended in staining buffer with diluted ($1 \mu\text{g}/10^6$ cells) primary mouse anti-CXCR4 antibody (SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 10 min at 4°C. After washing in staining buffer and centrifugation (300 g, 10 min.), the cell pellet was incubated with microbeads conjugated to a monoclonal antibody against primary CXCR4 antibody Rat Anti-Mouse IgG2a+b MicroBeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) for 15 min. at 4°C. After the final washing, cells were resuspended in staining buffer and processed in a MidiMACS magnetic separation unit (Miltenyi Biotech) with attached LS column (Miltenyi Biotech). The column was rinsed with cold staining buffer to wash out unlabelled cells. CXCR4-positive cells trapped in the second LS column were eluted after the column had been removed from the magnet field of the MidiMACS separation unit. The purity of cells was determined by immunofluorescence staining using goat anti-CXCR4 antibody (SantaCruz Biotechnology).

Cell culture studies

CXCR4-positive islet-derived pancreatic cells were pre-cultured for the first three days in CMRL 1066 medium (Sigma-Aldrich) containing 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10 mM HEPES, 10 µl/ml Glutamax-I (Gibco BRL, Paisley, UK) and 2 mmol/l streptozotocin. On the 3rd day after isolation, cells were washed with HBSS (Biocoll, Seattle, WA) and further cultured in serum-free DMEM/F12 expansion medium supplemented with 0.5 % human albumin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 10 µg/ml insulin, 5.5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml selenium (ITS) (all Sigma-Aldrich) and 10 µl/ml Glutamax-I (Gibco). To promote cell proliferation, the medium was supplemented with 10 ng/ml of basic fibroblast growth factor (FGF2) and 20 ng/ml epithelial growth factor (EGF) (both Peprotech, Rocky Hill, NJ). To induce differentiation into pancreatic endocrine cells, the medium was supplemented with 100 pM exendin-4, 10 nM nicotinamide (both Sigma-Aldrich), 2 nM activin-A, 10 pM

HGF and 2 nM LIF (all Peprotech), and cultured for one week.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA (from approximately 10⁶ cells and 10⁵ cells in case of ILC) was isolated using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and treated with DNase using RNase-Free DNase Set (Qiagen). RNA was isolated from approximately 1x10⁶ cells and 10⁵ cells in case of ILCC. Isolated RNA (2 µg) was reverse transcribed with Omniscript RT Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was amplified using HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen). Total RNA from the islet fraction was used as positive control. Gene-specific primer pairs, annealing temperatures, and product sizes are listed in Table 1. All of the primers span at least one of the introns and most of them are designed to span the intron/exon boundary. PCR products were separated and visualized on 2% agarose gel containing ethidium bromide.

Table 1. Sequences of specific primer pairs employed for RT-PCR

Gene name	Forward primer	Reverse primer	Annealing temperature	Product length
Insulin	ccatcaagcacatcactgtcc	ccatctctctcggtgcagg	61	414
PDX-1	ctgttctctccggctcc	ctgtctctctctcttttccac	61	202
Glucagon	gcgagattcccagaagagg	agcaggtgatgttggaagatg	61	198
GLP-1 Receptor	tggcattggggtgaacttcc	caggcgtggagtctcagc	61	462
Neurogenin-3	tctattctttgcccggtag	agtccaactcgtcttagg	61	256
NeuroD/BETA2	aggaattgcccacgcag	gtctctgggctttgatcgtc	61	346
Isl1-1	ggagcaactgtagagatgacg	agtacttccaaggtggctgg	61	245
Nkx2.2	ctacgacagcagcacaacc	gccttgagaaaagcactcg	61	219
Nkx6.1	gtctacttcagccccagc	ggaaccagacctgactgac	61	332
OCT-4iso1	agctggagaaggagaagctgg	tcggaccacatcttctcgag	61	458
OCT-4iso2	ggggagattgataactggtgtg	tcggaccacatcttctcgag	61	480
ABCG2	gataggtttacggctttgc	aaggccacgtgattcttc	61	175
Nanog	gcaacaaccactctctgc	aggccttctcgtcacac	61	288
Glut2	cactgctgtctgtattcctgtg	aaactcagccaccatgaacc	61	223
Pax4	actcccagtgtctctccate	ggaaaaccagacctcacc	61	298
Pax6	gccttgagaaagagtttgag	gcgctgtaggtgtttgtgagg	61	314
HNF3beta	tggagcagctactatgcagagc	atggagttcatgttggcgtag	61	356
HNF6	cgcaggtcagcaatggaag	gatgagttgcctgaattggag	61	535
HLXB-9	taagatgcccgactcaactcc	caaatctcactgggtctcg	61	192
LIFR	cttgcgagcctatacatgatgg	ctgctccctcacagactc	61	249
HGF-R	agtgaagtggatggctttgg	gggcagtattcgggtttag	61	162
CD117	agatgctcaagccgagtgc	actatcgtgcaggaagactcc	61	284
CD133	tcttctcatggttgagttgg	ttaccagtctgagccaagtagc	61	478
GAPDH	ggagtcaacggatttgctcg	catgggtggaatcatattggaac	61	142
SOX17	cagaatccagacctgcacaac	ctgctcggggaactggag	61	294

Immunocytochemistry

MACS-separated cell suspension was washed with PBS and then centrifuged onto microscope slides at 55 g for 10 min. Cytospin slides were fixed in 4% PFA for 15 min and rinsed in PBS before staining.

ILCL were washed with PBS, fixed for 15 min in 4% PFA, rinsed with PBS, suspended in a 2% agarose-PBS solution and centrifuged at 100 g for 3 min to form compact pellets. After overnight submersion in 30% sucrose, ILCC were embedded in OCT mounting medium (TissueTek, Bayer Corp, Pittsburgh, PA), frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C .

After several washes in PBS, 8- μm sections of frozen ILCC or fixed cytopsin slides were incubated in blocking solution containing 10% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) in 0.2% Triton X-100, 0.1 M glycine (Sigma-Aldrich) and PBS for 1 h at room temperature to prevent unspecific binding. Incubation with primary antibodies in appropriate dilution was performed in a blocking solution for 1 h at 37°C . The following primary antibodies were used at the following dilutions: goat anti-CXCR4, 1 : 100 (SantaCruz Biotechnology), mouse anti-CXCR4, 1 : 100 (SantaCruz Biotechnology), goat anti-nestin, 1 : 100 (SantaCruz Biotechnology), rabbit anti-LIFR, 1 : 100 (SantaCruz Biotechnology), goat anti-glucagon, 1 : 100 (SantaCruz Biotechnology), rabbit anti-insulin, 1 : 100 (SantaCruz Biotechnology), mouse anti-human C-peptide 1 : 200 (ExBio, Czech Republic). After intensive washing with PBS, sections were incubated with the specific secondary antibody diluted in the blocking solution for 1 h at 37°C . The secondary antibodies were: Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG Alexa fluor 546, Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG, Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG (all from Molecular Probe, Eugene, OR). 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) at a concentration 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was used to label the nuclei for 10 min at 37°C . After rinsing with PBS, sections were mounted with antifade solution and examined with a fluorescence microscope (Model BX 41, Olympus, Japan).

C-peptide cell content

Cell protein extract was isolated using AllPrep RNA/Protein Kit (Qiagen). Human C-peptide was determined using a C-peptide IRMA kit (Beckman Coulter, Fullerton, CA) according to the manufacturer's instructions.

Results

Pancreatic tissue obtained after islet isolation from human pancreata ($N = 7$) was filtered through a strainer to remove any remaining islets. Dithionite staining of tissue samples confirmed the absence of pancreatic islets, which typically stain red due to their zinc content. Cellular material was further dissociated to obtain single-cell suspension. The ratio of β -cells present

within the cell suspension was assessed by immunofluorescence detection of C-peptide-positive cells and was as low as $0.04 \pm \text{SD } 0.02\%$ (Fig. 1D).

CXCR4-positive cells represented $22.1 \pm 6.6\%$ of all cells processed by MACS. The purity of cell fractions revealed by immunostaining was more than 90% in the case of CXCR4-positive as well as -negative fractions (Fig. 1A). Slight contamination of both fractions by β -cells was confirmed by RT-PCR (Fig. 2). The expression of transcription factors involved in pancreatic endocrine cell differentiation (Pdx1, NeuroD1, Pax6, Nkx2.2, Nkx6.1, Isl1 and HNF-3 β) was also detected in both fractions (Fig. 2). Detection of these transcription factors could be caused by the presence of mature β -cells; however, other cell types could also express some of these transcription factors. In particular, the detection of the neurogenin-3 mRNA within CXCR4-positive cell population (Fig. 2) reveals the presence of pancreatic endocrine progenitors. Neurogenin-3 was also expressed in the islet cell fraction (Fig. 2).

Immunostaining for nestin, a putative marker of PSC, showed some positive cells in the CXCR4 cell fraction (Fig. 1B). Positive staining for leukaemia inhibitory factor receptor (LIFR) (Fig. 1C), another cell surface marker of TCSC, is in accordance with RT-PCR detection (Fig. 2). RT-PCR analysis further revealed the expression of several markers of pluripotent and adult stem cells, including transcription factors Oct4 and Nanog, and cell surface receptors CD117, CD133, and ABCG2.

To explore the potential of CXCR4-positive cells to differentiate toward islet endocrine cells we have decided to deplete contaminating β -cells. The objective of this step was to exclude the possible contribution of β -cells that could proliferate or re-differentiate during further culturing. After three days of cultivation in a medium containing streptozotocin and a subsequent 10 days of cultivation in a serum-free medium no insulin-positive cells were detected either by immunofluorescence or by RT-PCR.

The initial 3-day cultivation was accompanied with extensive cell apoptosis and necrosis that resulted in a $62.4 \pm 8.2\%$ reduction in the total cell number. During the 10-day culture in a serum-free medium, βFGF and EGF growth factors, which are known for their beneficial effects on proliferation of precursors, were added. The rate of cell apoptosis determined by PI staining had decreased to $8.7 \pm 2.1\%$ (data not shown). Concomitantly, there was an increase in the number of cells that reached $92.1 \pm 15.1\%$ of the original cell number. During cultivation, most of the cells were attached to the surface of the flask and possessed an epithelial-like, round morphology (Fig. 3A, B). The cell population obtained after cultivation in the serum-free medium no longer expressed insulin, glucagon, and somatostatin. On the other hand, the expression of

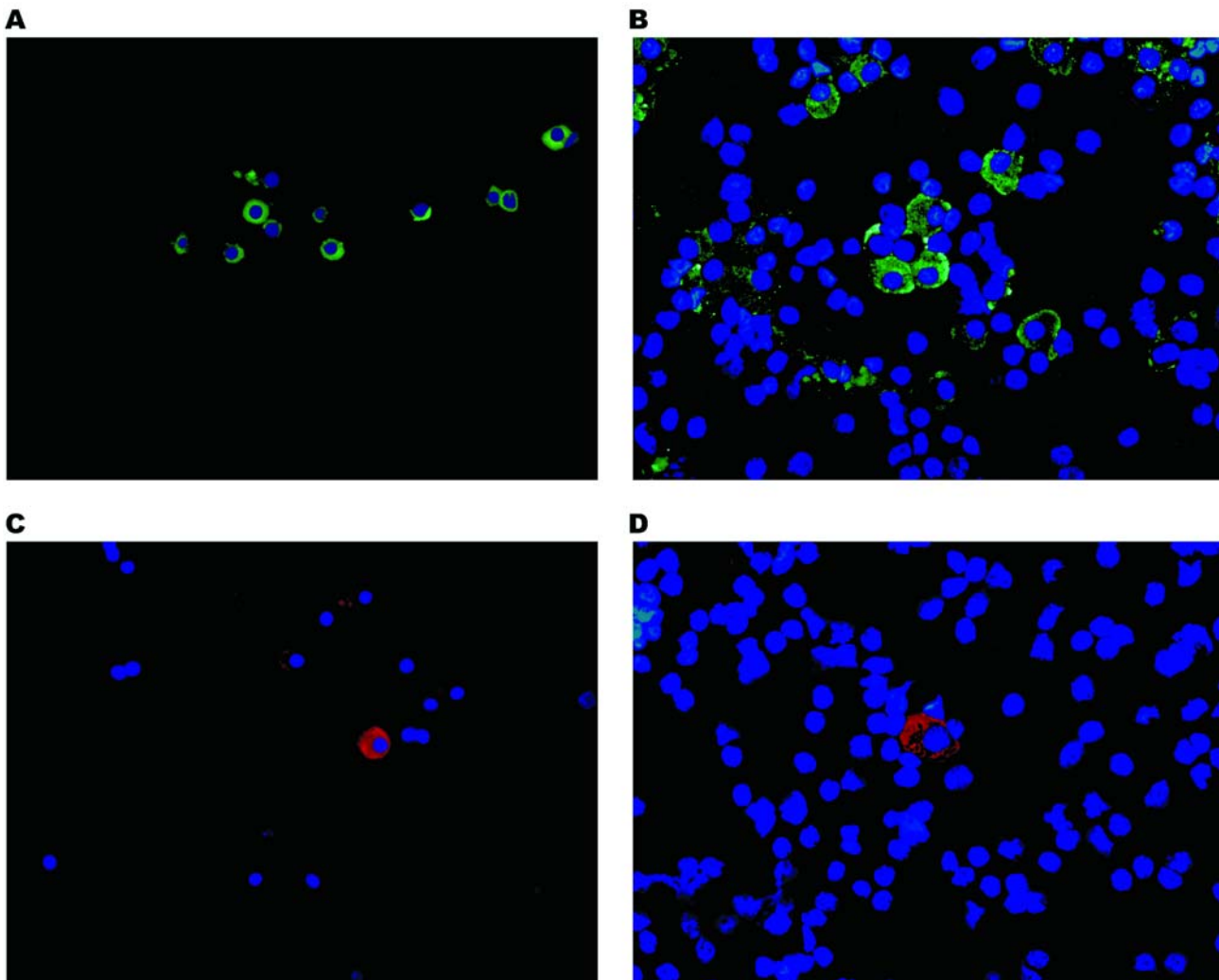


Fig. 1. Immunofluorescence detection of CXCR4 (A), nestin (B), LIFR (C) and insulin (D) in CXCR4 positive cells. All nuclei in A-D are stained blue with DAPI.

Pdx1, Nkx6.1, NeuroD1, Pax6, Isl1 and ngn-3 was still observed (Fig. 4).

Afterwards, cells were seeded at a high density in a medium supplemented with exendin-4, nicotinamide, activin-A, HGF and LIF, supplements that have been reported to support differentiation of insulin-producing cells. Two days after the initial seeding, some of the cells began to form colonies (Fig. 3C) that gave rise to the ILCC (Fig. 3D-F). The first ILCC were observed after four days of culturing in a differentiation medium (Fig. 3D). Within seven days, 108 ± 28 ILCC had formed from 5×10^6 cells. The average size of ILCC was $134 \pm 87 \mu\text{m}$ and one of the ILCC contained 1231 ± 574 cells.

Differentiation of cells was associated with the expression of key pancreatic hormones insulin glucagon and somatostatin as well as transcription factors of endocrine differentiation (Fig. 4). The expression of preproinsulin and glucagon by ILCC was confirmed by immunostaining for both of these hormones (Fig. 5A). The proportion of ILCC C-peptide-

positive cells ($5.8 \pm 1.1 \%$) was significantly lower than the number of glucagon-positive cells (13.3 ± 2.8) (Fig. 5B). C-peptide protein content was $0.38 \pm 0.11 \text{ pmol}/\mu\text{g}$ of total protein as determined by radioimmunoassay of ILCC cellular extracts. One of the most intriguing findings was almost homogenous staining for nestin in most of the ILCC cells (Fig. 5A). Within ILCC cells, CXCR4-positive cells were also detected (Fig. 5B).

Discussion

Here we report that the population of CXCR4-positive pancreatic cells contains endocrine progenitors that are able to give rise to different endocrine cells bearing characteristics of differentiated islet cells (β -cells, α -cells, δ -cells). Upon differentiation, CXCR4-positive cells isolated from non-endocrine pancreatic tissue form islet-like cell clusters that produce islet hormones such as insulin, glucagon, and somatostatin. In addition, we have shown that cells expressing markers of pluripotent and tissue-committed stem cells are present

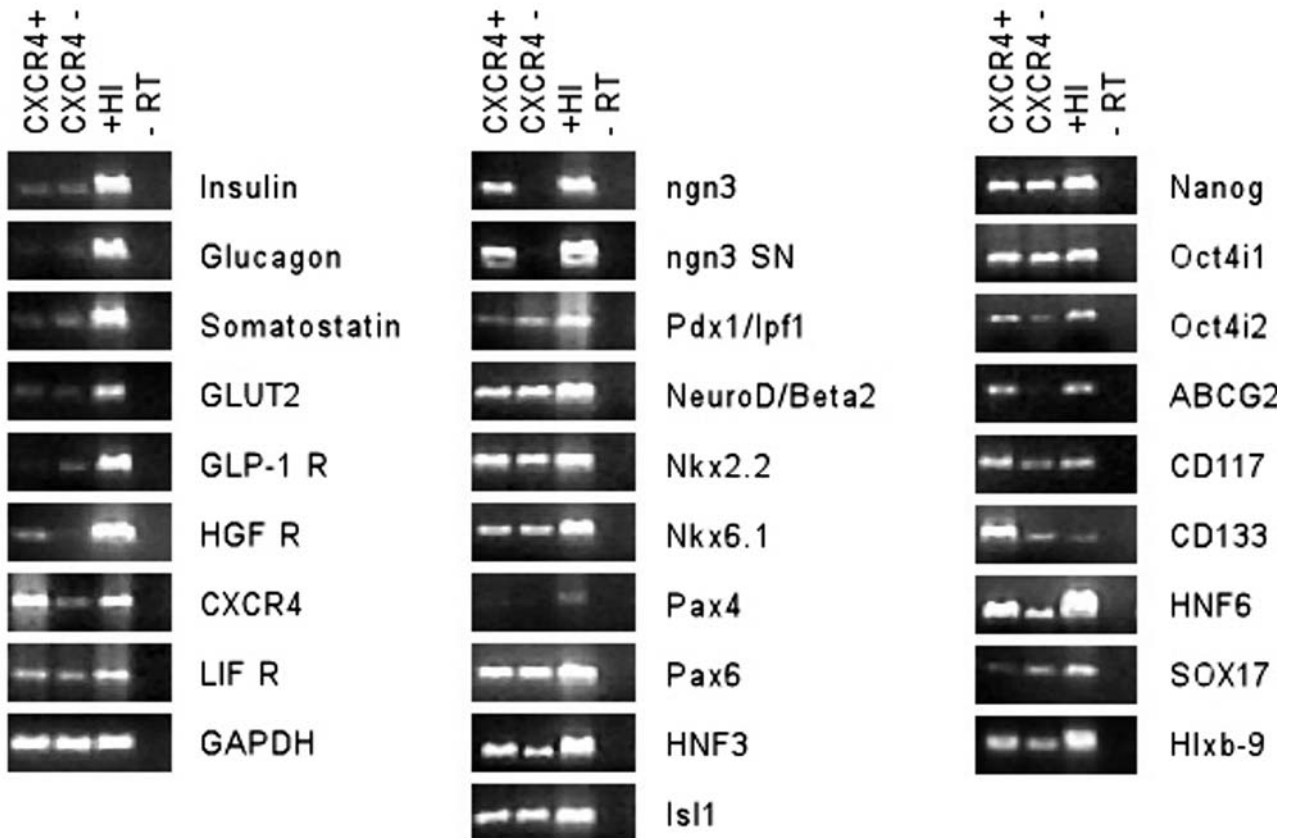


Fig. 2. RT-PCR analysis of gene expression in CXCR4-positive (CXCR4+) and CXCR4-negative (CXCR4-) cells. Transcripts were analysed with the indicated primers, in comparison with a negative control (-RT) and a positive control (+HI, human islet RNA).

within the pancreatic non-endocrine tissue. These cells may represent the source of newly formed endocrine progenitors as well as differentiated islet endocrine cells.

In an attempt to identify a pancreatic endocrine progenitor and a stem cell, we have employed genetic markers that are involved in the development of endocrine pancreas and β -cell neogenesis. Among the best defined and studied markers are transcription factors that regulate gene expression during the differentiation process. Unfortunately, most of the transcription factors involved in β -cell differentiation could not be used as exclusive markers of endocrine progenitors since they are also expressed by mature endocrine cells and other pancreatic cell types (Edlund, 2002; Murtaugh *et al.*, 2003). So far, the basic helix-loop-helix transcription factor neurogenin-3 (ngn-3) represents the only exception of this unfavourable rule.

The expression of ngn-3 is only transient. ngn-3 is exclusively expressed in islet cell progenitors and not in differentiated islet cells (Schwitzgebel *et al.*, 2000). In rodents, ngn-3-positive cells give rise to all four endocrine cell types not only during embryogenesis, but

also in postnatal life (Gu *et al.*, 2002). In adult human pancreas ngn-3 expression was recently revealed only in islets (Lechner *et al.*, 2005). It has led to the assumption that progenitor/stem cells exist only within islets, an idea supported by a few animal studies (Gu *et al.*, 2002; Kodama *et al.*, 2005). On the other hand, our finding that ngn-3-positive cells are present within adult non-endocrine tissue as well as in islets supports the hypothesis that newly formed β -cells bud from pancreatic ducts. Our result is in accordance with a study that employed a highly sensitive immunostaining method (Wang *et al.*, 2005). In this study, ngn-3-positive cells were not only detected in islets of adult pancreas, but were also observed in duct-like cells of diabetes-prone rats. The discrepancy between these results and those obtained in earlier studies may stem from different immunostaining techniques and primers used for the detection of ngn-3 and its expression.

The expression of ngn-3 was more abundant in the CXCR4-positive cells in comparison with the CXCR4-negative population. Thus, it may be assumed that the CXCR4 receptor serves as a marker of pancreatic endocrine progenitors.

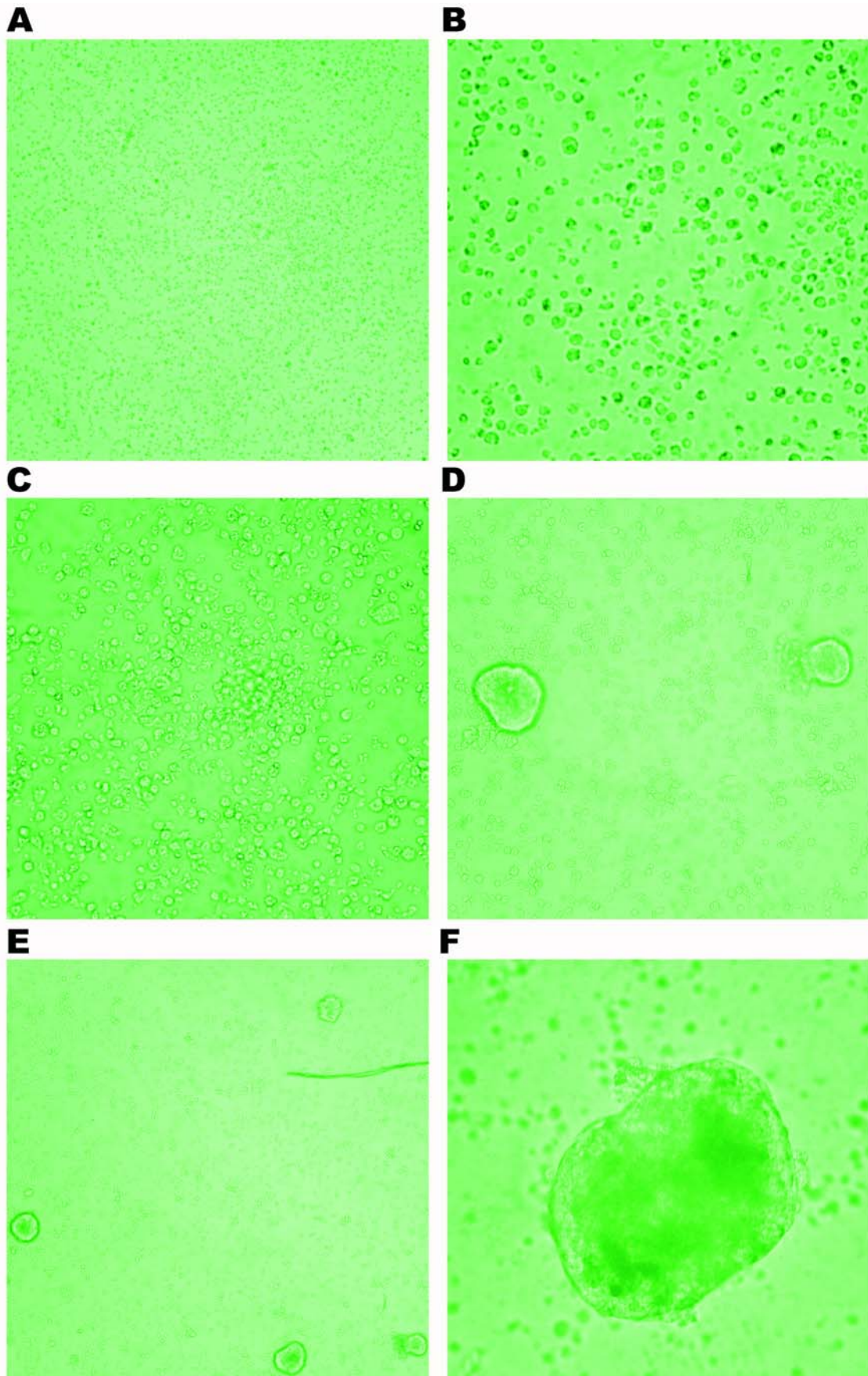


Fig. 3. Phase contrast images of: (A) cell suspension derived from CXCR4-positive cells, (B) 3x magnification of A, (C) forming cell clusters, (D-E) ILCC buds appear 4 days after the initiation of differentiation, (F) some of the ILCC attain a diameter of more than 200 μm .

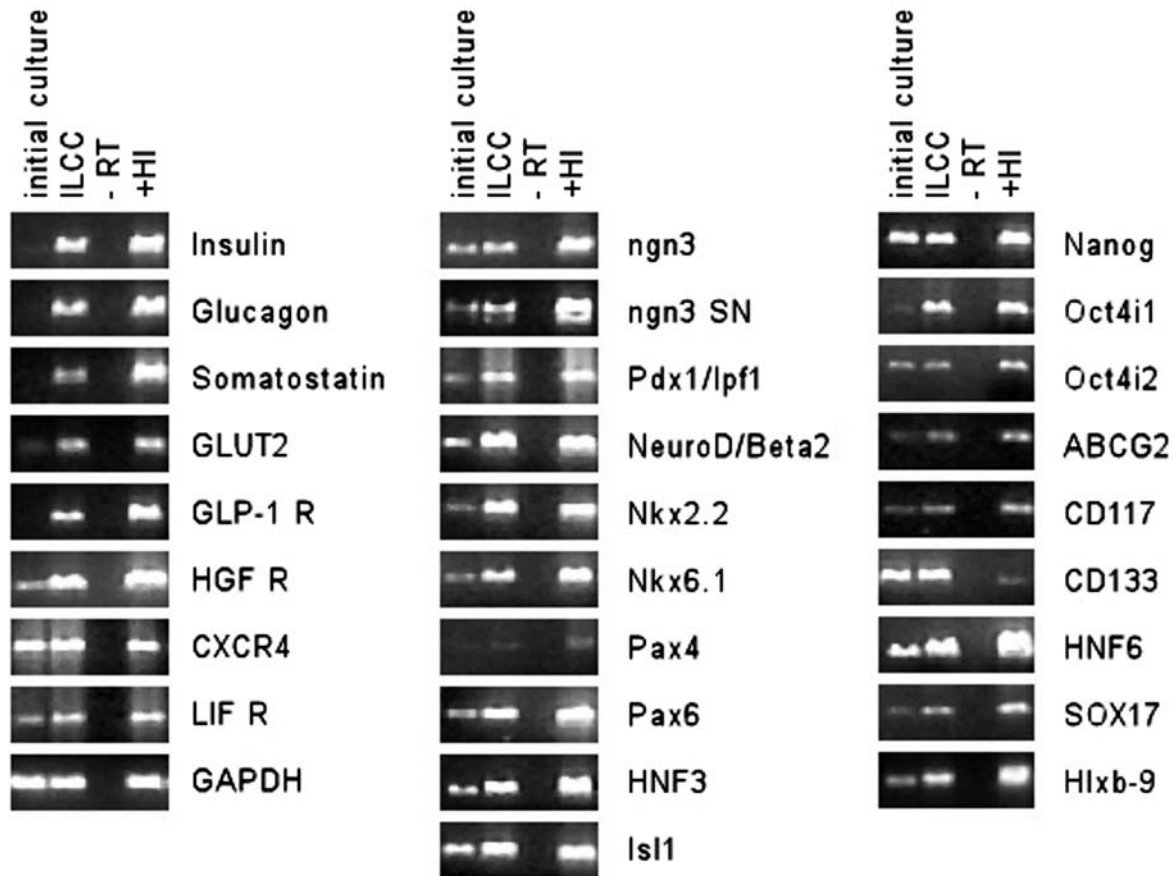


Fig. 4. RT-PCR analysis of gene expression in ILCC and initial culture prior to differentiation into ILCC. Transcripts were analysed with the indicated primers, in comparison with a negative control (-RT) and a positive control (+HI, human islet RNA).

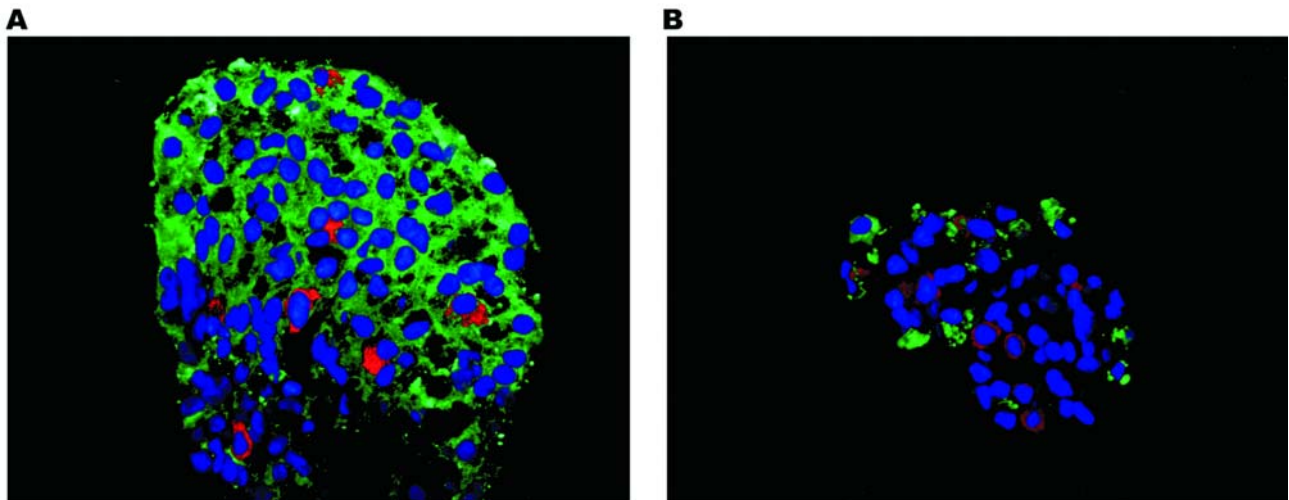


Fig. 5. Immunofluorescence double staining of C-peptide (red) and nestin (green) in ILCC (A), glucagon (green) and CXCR4 (red) in ILCC (B). All nuclei in panels A and B are stained blue with DAPI.

Based on this finding we wanted to determine whether the CXCR4-positive cell population also contains more primitive cells with stem cell characteristics. We have focused on the markers that are expressed by the pluripotent stem cells and TCSC. RT-PCR analysis

revealed the expression of several markers of pluripotent stem cells including transcription factors Oct4 and Nanog that are required to maintain the pluripotency of embryonic cells (Cauffman *et al.*, 2006), and markers of adult stem cells (Zhou *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002;

Wang et al., 2004) such as receptor for stem cell factor CD117, cell surface receptor CD133, and the side population stem cell marker ABCG2.

The potential of CRCX4-positive cells that give rise to insulin-producing cells was tested by *in vitro* culture stimulated by selected growth factors and nutrients. Although the total number of insulin-positive cells within newly formed ILCC was significantly lower in comparison with native islets, the number of glucagon-positive cells was almost the same as in freshly isolated islets. It could have been caused by the culture medium used during differentiation. Our selection of growth factors and supplements could prefer α -cell differentiation of endocrine progenitors at the expense of β -cell differentiation.

Another interesting finding is that almost all the cells in ILCC were positive for nestin. Nestin is thought to be a marker of PSC that is expressed during differentiation of insulin-producing cells. Although the role of nestin as a marker of PSC has been disputed (Selander et al., 2002; Treutelaar et al., 2003), most of the studies addressing the expression of nestin during β -cell differentiation supports the conclusion that nestin marks PCS (Wang et al., 2005; Eberhardt et al. 2006). With a low proportion of hormone-positive cells within ILCC and the high number of nestin-positive cells we may assume that some hormone-negative progenitors or stem cells were still present within ILCC. This assumption is supported by the results of the RT-PCR that demonstrated the expression of *ngn-3* and stem cell markers.

Although the formation of ILCC from pancreatic tissue has already been presented by other authors (Bonner-Weir et al., 2000; Ramiya et al. 2000; Gao et al., 2003; Wang et al., 2004; Lechner et al., 2005), our group is the first to describe the derivation of ILCC from CXCR4-positive pancreatic cells.

However, the mechanism of the differentiation of our ILCC could be explained by different means. In addition to the differentiation from stem cells, new β -cells could be derived by trans-differentiation from other pancreatic and even non-pancreatic cell types, which could have happened in our case as we used mainly acinar and ductal tissue. Another possible explanation could be de-differentiation of mature β -cells into a more primitive cell type such as progenitor or stem cells and their further re-differentiation into insulin-producing cells. However, the low β -cell number in the original sample does not necessarily support this explanation.

The formation of ILCC from the different cell types was described by many authors (Bonner-Weir et al., 2000; Ramiya et al. 2000; Gao et al., 2003; Lechner et al., 2005); however, only some of these experiments were successfully reproduced. In some of the cases, the detected insulin could be absorbed by cells from the culture medium which contained insulin supplements (Rajagopal, 2003; Hansson et al., 2004). In our study,

for insulin production we employed the detection of C-peptide that is not added to the medium. C-peptide is a part of the pro-insulin peptide that is produced by β -cells and later separated into mature insulin and C-peptide.

The origin of newly formed β -cells in postnatal life still remains unclear. Although a large body of evidence supports the assumption that newly formed β cells are derived from PSC, the conclusive evidence of such specific stem cell type in the adult pancreas has not yet been presented. In our study, we have shown one possible source of β cells that could be easily obtained and, upon *in vitro* differentiation, give rise to insulin-producing cells. In future research, we will focus on the potential of these cells to produce insulin *in vivo* and possibly treat diabetic animals.

References

- Bonner-Weir, S., Taneja, M., Weir, G. C., Tatarkiewicz, K., Song, K. H., Sharma A., O'Neil, J. J. (2000) *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7999-8004.
- Cauffman, G., Liebaers, I., Van Steirteghem, A., Van de Velde, H. (2006) POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Stem Cells* **24**, 2685-2691.
- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I., Melton, D. A. (2004) Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* **429**, 41-46.
- Eberhardt, M., Salmon, P., von Mach, M. A., Hengstler, J. G., Brulport, M., Linscheid, P., Seboek, D., Oberholzer, J., Barbero, A., Martin, I., Muller, B., Trono, D., Zulewski, H. (2006) Multipotential nestin and *Isl-1* positive mesenchymal stem cells isolated from human pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 1167-1176.
- Edlund, H. (2002) Pancreatic organogenesis – developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 524-532.
- Fujikawa, T., Oh, S. H., Pi, L., Hatch, H. M., Shupe, T., Petersen, B. E. (2005) Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. *Am. J. Pathol.* **166**, 1781-1791.
- Gao, R., Ustinov, J., Pulkkinen, M. A., Lundin, K., Korsgren, O., Otonkoski, T. (2003) Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes* **52**, 2007-2015.
- Gu, G., Dubauskaite, J., Melton, D. A. (2002) Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* **129**, 2447-2457.
- Hansson, M., Tønning, A., Frandsen, U., Petri, A., Rajagopal, J., Englund, M. C., Heller, R. S., Hakansson, J., Fleckner, J., Skold, H. N., Melton, D., Semb, H., Serup, P. (2004) Artificial insulin release from differentiated embryonic stem cells. *Diabetes* **53**, 2603-2609.
- Kayali, A. G., Van Gunst, K., Campbell, I. L., Stotland, A., Kritzik, M., Liu, G., Flodstrom-Tullberg, M., Zhang, Y. Q., Sarvetnick, N. (2003) The stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 ligand-receptor axis is critical for progenitor

- survival and migration in the pancreas. *J. Cell Biol.* **163**, 859-869.
- Kodama, S., Toyonaga, T., Kondo, T., Matsumoto, K., Tsuruzoe, K., Kawashima, J., Goto, H., Kume, K., Kume, S., Sakakida, M., Araki, E. (2005) Enhanced expression of PDX-1 and Ngn3 by exendin-4 during β cell regeneration in STZ-treated mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 1170-1178.
- Kucia, M., Ratajczak, J., Reza, R., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, M. Z. (2004) Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol. Dis.* **32**, 52-57
- Lechner, A., Nolan, A. L., Blacken, R. A., Habener, J. F. (2005) Redifferentiation of insulin-secreting cells after *in vitro* expansion of adult human pancreatic islet tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 581-588.
- Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R., McKay, R. (2001) Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* **292**, 1389-1394.
- Murtaugh, L. C., Melton, D. A. (2003) Genes, signals, and lineages in pancreas development. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **19**, 71-89.
- Pictet, R. L., Clark, W. R., Williams, R. H., Rutter, W. J. (1972) An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev. Biol.* **29**, 436-467.
- Ramiya, V. K., Maraist, M., Arfors, K. E., Schatz, D. A., Peck, A. B., Cornelius, J. G. (2000) Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated *in vitro* from pancreatic stem cells. *Nat. Med.* **6**, 278-282.
- Rajagopal, J., Anderson, W. J., Kume, S., Martinez, O. I., Melton, D. A. (2003) Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science* **299**, 363.
- Robertson, R. P., Davis, C., Larsen, J., Stratta, R., Sutherland, D. E., American Diabetes Association. (2006) Pancreas and islet transplantation in type 1 diabetes. *Diabetes Care* **29**, 935.
- Schwitzgebel, V. M., Scheel, D. W., Connors, J. R., Kalamaras, J., Lee, J. E., Anderson, D. J., Sussel, L., Johnson, J. D., German, M. S. (2000) Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* **127**, 3533-3542.
- Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbitt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., Rajotte, R. V. (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* **343**, 230-238.
- Selander, L., Edlund, H. (2002) Nestin is expressed in mesenchymal and not epithelial cells of the developing mouse pancreas. *Mech. Dev.* **113**, 189-192.
- Soria, B., Roche, E., Berna, G., Leon-Quinto, T., Reig, J. A., Martin F. (2000) Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* **49**, 157-162.
- Suzuki, A., Nakauchi, H., Taniguchi, H. (2004) Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes* **53**, 2143-2152.
- Treutelaar, M. K., Skidmore, J. M., Dias-Leme, C. L., Hara, M., Zhang, L., Simeone, D., Martin, D. M., Burant, C. F. (2003) Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet. *Diabetes* **52**, 2503-2512.
- Yu, Y., Flint, A., Dvorin, E. L., Bischoff, J. (2002) AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. *J. Biol. Chem.* **277**, 20711-20716.
- Wang, G. S., Rosenberg, L., Scott, F. W. (2005) Tubular complexes as a source for islet neogenesis in the pancreas of diabetes-prone BB rats. *Lab. Invest.* **85**, 675-688.
- Wang, R., Li, J., Yashpal, N. (2004) Phenotypic analysis of c-Kit expression in epithelial monolayers derived from post-natal rat pancreatic islets. *J. Endocrinol.* **182**, 113-122.
- Wang, R., Li, J., Yashpal, N., Gao, N. (2005) Nestin expression and clonal analysis of islet-derived epithelial monolayers: insight into nestin-expressing cell heterogeneity and differentiation potential. *J. Endocrinol.* **184**, 329-339.
- Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., Colapietro, A. M., Sampath, J., Morris, J. J., Lagutina, I., Grosfeld, G. C., Osawa, M., Nakauchi, H., Sorrentino, B. P. (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* **7**, 1028-1034.
- Zulewski, H., Abraham, E. J., Gerlach, M. J., Daniel, P. B., Moritz, W., Muller, B., Vallejo, M., Thomas, M. K., Habener, J. F. (2001) Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* **50**, 521-533.

Differentiation of CD133-Positive Pancreatic Cells Into Insulin-Producing Islet-Like Cell Clusters

T. Koblas, L. Pektorova, K. Zacharovova, Z. Berkova, P. Girman, E. Dovolilova, L. Karasova, and F. Saudek

ABSTRACT

Adult pancreatic stem and progenitor cells could represent an alternative source of insulin-producing tissue for diabetes treatment. In order to identify these cells, we have focused on the human pancreatic cells expressing cell surface molecule CD133, a marker of adult stem cells. We found that population of human CD133-positive pancreatic cells contains endocrine progenitors expressing neurogenin-3 and cells expressing human telomerase, ABCG2, Oct-3/4, Nanog, and Rex-1, markers of pluripotent stem cells. These cells were able to differentiate into insulin-producing cells *in vitro* and secreted C-peptide in a glucose-dependent manner. Based on our results, we suppose that the CD133 molecule represents another cell surface marker suitable for identification and isolation of pancreatic endocrine progenitors.

ADULT pancreatic stem or progenitor cells could represent an alternative source of insulin-producing tissue. Pancreatic stem cells are believed to reside within ductal tissue or the islets themselves. Although a putative pancreatic stem cell has not yet been discovered, a large body of evidence supports the assumption that in postnatal life newly formed β cells are at least partially derived from the pancreatic stem cell. One of the few cell surface molecules that is considered to be a pancreatic stem cell marker is c-Met, a receptor for hepatocyte growth factor (HGF).¹ Another surface molecule that belongs to the family of tissue-committed stem cell markers in other organs is CD133.²

The aims of our study were to isolate and to characterize human pancreatic CD133-positive cells from the exocrine pancreatic tissue and to further evaluate their potential to differentiate into insulin-producing cells.

METHODS

Tissue Preparation

For isolation of the CD133-positive cells, we used human pancreatic acinar tissue that remains after islet isolation and is discarded. The program of isolation and transplantation of human pancreatic islets was approved by the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and the Thomayerova Teaching Hospital. Human islets and pancreatic tissue were isolated

From the Laboratory of Pancreatic Islets, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

This study was supported by grant NR/9060-4/2006 from Internal Grant Agency of the Ministry of Health, Czech Republic.

Address reprint requests to Frantisek Saudek, Department of Diabetes, Diabetes Centre, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, 140 21 Prague, Czech Republic. E-mail: frantisek.saudek@medicon.cz

according to previously described methods.³ Briefly, islets were isolated from pancreata obtained from 5 donors (mean age, $45 \pm$ SD of 13 years). The pancreatic duct was perfused with a cold enzyme mixture containing Liberase HI (Roche, Indianapolis, Ind, United States). Tissue was then transferred to a modified Ricordi chamber³ and separated by gentle mechanical agitation and enzymatic digestion at 37°C. Islets were purified with the use of a continuous density gradient of Ficoll-diatrizoic acid in an aphaeresis system (model 2991, Gambro, Stockholm, Sweden). The continuous Ficoll gradient was layered before the separation step. The solution densities ranged from 1.064 to 1.092 g/mL with the densest solution at the bottom of the density gradient. Due to their lower density, the islets were separated from the remaining cellular material at the bottom of the gradient, which was pooled and further processed.

Cell Separation by Magnetic Activated Cell Sorting

Cellular material obtained from islet isolation (approximately 3×10^8 cells) was filtered through a 40- μ m cell strainer to remove residual islets. Filtered tissue suspension was digested with Accutase solution (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) for 10 minutes at 37°C. The single-cell suspension was washed in staining buffer (PBS, 0.5% HSA, 2 mmol/L EDTA, pH 7.2) and centrifuged at 300g for 10 minutes. Cell pellet was incubated with microbeads conjugated to a monoclonal antibody against CD133 (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) for 15 minutes at 4°C. After washing, cells were resuspended in the staining buffer and processed in a MidiMACS magnetic separation unit (Miltenyi Biotech) using a LS column (Miltenyi Biotech). The column was rinsed with cold staining buffer to wash out the unlabelled cells. CD133-positive cells trapped in the second LS column were eluted after the column had been removed from the magnet field of the MidiMACS separation unit. The number of cells was assessed by counting in a Burkert-Turk counting chamber.

Cell Culture Studies

CD133-positive pancreatic cells were cultured for 2 weeks in serum-free Knockout DMEM medium (Invitrogen, Paisley, United Kingdom) containing 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 10 mmol/L Hepes, 10 μ L/mL Glutamax-I (Gibco BRL, Paisley, United Kingdom), 10 μ g/mL insulin, 5.5 μ g/mL transferrin, 5 ng/mL selenium (ITS) (all Sigma-Aldrich), 10 ng/mL basic fibroblast growth factor (FGF2), and 2 ng/mL HGF (both from Peprotech, Rocky Hill, NJ, United States).

To induce differentiation into pancreatic endocrine cells, the medium was changed for DMEM/F12 low glucose medium supplemented with 100 pmol/L exendin-4, 10 nmol/L nicotinamide (both Sigma-Aldrich), 2 nmol/L activin-A, 10 pmol/L HGF, and 2 nmol/L LIF (all Peprotech), and cultured for 5 days.

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Total RNA (from approximately 10^6 cells) was isolated using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and treated with DNase using RNase-Free DNase Set (Qiagen). RNA was isolated from approximately 1×10^6 cells and 10^5 cells in case of islet-like cell clusters. Isolated RNA (2 μ g) was reverse transcribed with Omniscript RT Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was amplified using HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen). Total RNA from islet fraction was used as the positive control. Gene-specific primer pairs, annealing temperatures, and product size are available at

Koblas et al.⁴ Polymerase chain reaction (PCR) products were separated and visualized on 2% agarose gel containing ethidium bromide.

Immunocytochemistry

ILCC were washed with PBS, fixed for 15 minutes in 4% paraformaldehyde, rinsed with PBS, suspended in a 2% agarose-PBS solution, and centrifuged at 100g for 3 minutes to form compact pellets. After overnight submersion in 30% sucrose, ILCC were embedded in OCT mounting medium (TissueTek, Bayer Corp, Pittsburgh, Penn, USA), frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C .

After several washes in PBS, 8- μ m sections of frozen ILCC, slides were incubated in blocking solution containing 10% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Penn, USA) in 0.2% Triton X-100, 0.1 mol/L glycine (Sigma-Aldrich), and PBS for 1 hour at room temperature to prevent unspecific binding. Incubation with primary antibodies in appropriate dilution was performed in a blocking solution for 1 hour at 37°C. The following primary antibodies were used at the following dilutions: goat anti-cytokeratin 19, 1:100 (SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif, USA), rabbit anti-C-peptide, 1:100 (Millipore, Billerica, Mass, USA), rabbit anti-CD31, 1:100 (Abcam, Cambridge, UK), and rabbit anti-insulin, 1:100 (SantaCruz Biotechnology). After intensive washing with PBS, sections were incubated with the specific secondary antibody diluted in the blocking solution for 1 hour at 37°C. The secondary antibodies were as follows: Alexa Fluor 488 donkey anti-goat immunoglobulin (Ig)G, and Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG (all from Molecular Probe, Carlsbad, Calif, USA). 4-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) at a concentration 5 μ g/mL was used to label the nuclei for 10 minutes at 37°C. After rinsing with PBS, the sections were mounted with antifade solution and examined with a fluorescent microscope (Olympus BX41, Olympus, Tokyo, Japan).

C-Peptide Cell Content and Glucose-Stimulated Secretion

C-peptide release was measured by incubating 100 ILCC in 1 mL of Krebs-Ringer solution containing 5 mmol/L glucose for 1 hour and than in 20 mmol/L glucose solution for another hour. Cell protein extract was isolated using AIIPrep RNA/Protein Kit (Qiagen). Human C-peptide was determined using a C-peptide IRMA kit (Beckman Coulter, Fullerton, Calif, United States) according to the manufacturer's instructions.

RESULTS

CD133+ cell population obtained after magnetic activated cell sorting (MACS) represented $12.1 \pm 3.6\%$ of pancreatic cells from the islets depleted tissue. Immunostaining revealed that CD133+ fraction contained mainly cytokeratin-19 (CK19)-positive ductal cells and CD31-positive endothelial cells, whereas insulin-positive cells comprised only $0.08 \pm 0.05\%$ of isolated cells (data not shown). Low contamination by islet β cells was confirmed using dithi-zone staining. The expression of PDX-1, neurogenin-3, NEUROD1, Nkx 6.1, and Pax4 genes that are characteristic of mature β cells and their progenitors was detected in CD133+ fraction (Fig 1A). These cells also expressed (mRNA) for human telomerase, ABCG2, Oct-3/4, Nanog, and Rex-1, transcription factors that are required to

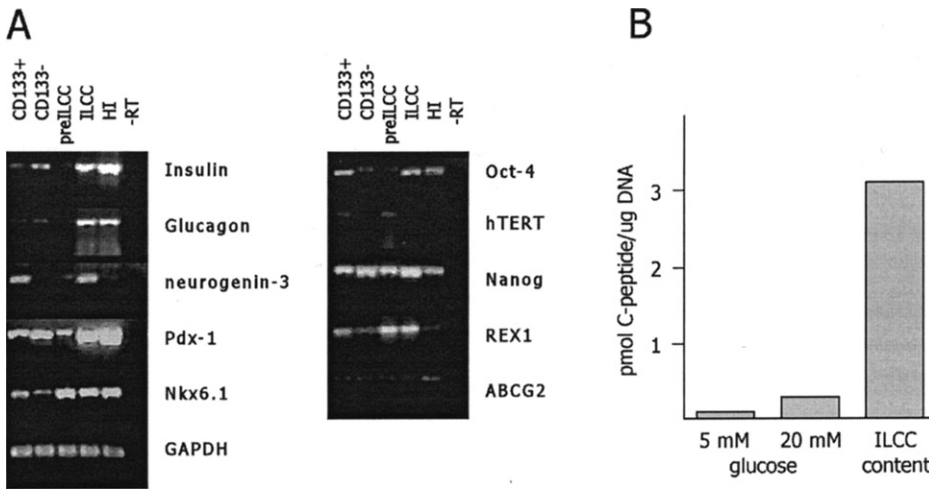


Fig 1. RT-PCR analysis of gene expression in CD133-positive cells (CD133+), CD133-negative cells (CD133-), cultured CD133-positive cells prior to differentiation (preILCC) and differentiated CD133-derived ILCC. A negative control (-RT) and a positive control (+HI, human islets RNA) (A). Glucose stimulated C-peptide secretion and content of ILCC as determined using IRMA (B).

maintain an undifferentiated state of pluripotent embryonic and adult stem cells (PSC). A similar expression pattern was observed for the CD133- cell population with the exception for neurogenin-3 that was expressed only by the CD133+ cells. A weak expression of insulin and glucagon mRNAs confirmed slight contamination by pancreatic islets cells.

On the basis of neurogenin-3 expression, which is typical for the differentiation of islet cell progenitors into mature

endocrine cells, we have decided to further evaluate the potential of CD133+ pancreatic cells to differentiate into endocrine cells. For the initial phase of the culture protocol we chose a serum-free medium that is used for the cultivation of pluripotent stem cells with the aim to maintain cells in an undifferentiated state and eventually deplete the remaining β cells. During the 2-week period, the cells that attached to the culture dish formed colonies displaying epithelial and endothelial-like morphologies (Fig 2B). Cul-

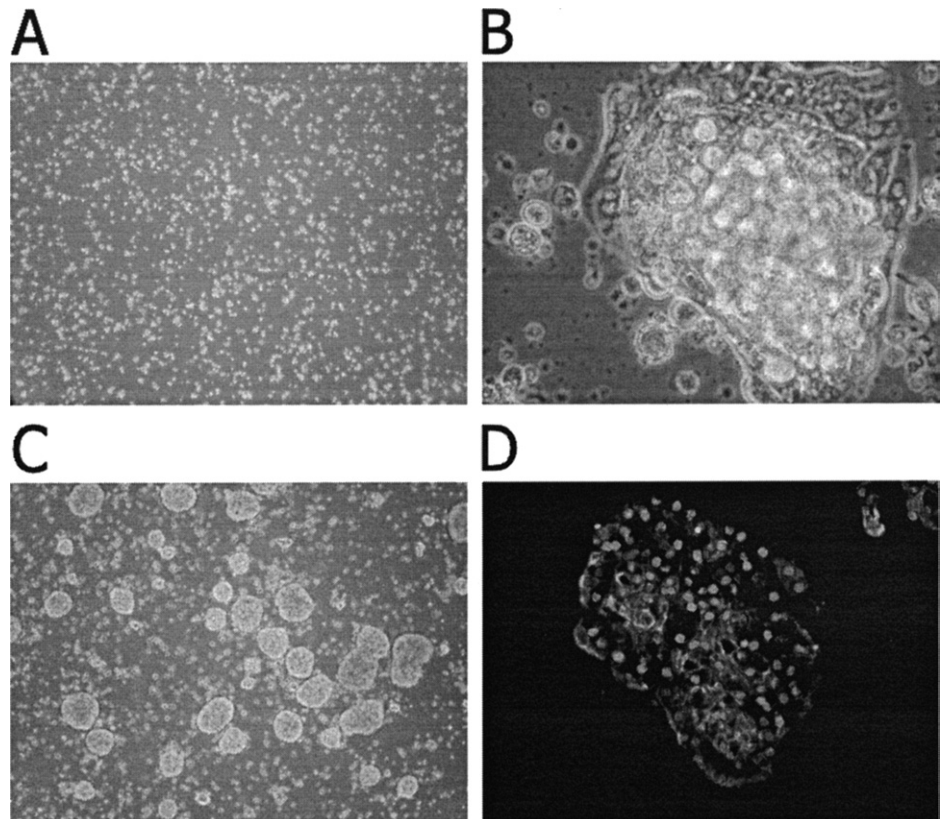


Fig 2. Phase contrast images of the following: cell suspension derived from CD133-positive pancreatic cells (A), CD133-positive pancreatic cells cultured for 2 weeks (B), ILCC buds derived from CD133-positive pancreatic cells (C), and immunofluorescence double staining of c-peptide (red) and cytokeratin-19 (green) in ILCC (D). Bar = 100 μ m.

tured cells retained expression of the stem cells markers (Oct-3/4, Nanog, Rex-1, ABCG2, and human telomerase) as well as of some of the pancreatic precursor markers (PDX-1 and Nkx6.1) (Fig 1A). The expression of insulin and glucagon genes was undetectable at this stage. At the end of the initial culture period, cultured cells were detached and dispersed into single cell suspension. A high cell density suspension (5×10^5 cells/mL) was cultured in a medium containing the endocrine cell differentiation stimulating factors. Two days after reseeding, the cells began to aggregate and finally, after 5 days, formed the islet-like cell clusters (ILCC) (Fig 2C). Immunostaining revealed that the CK19+ cells were the predominant cell type present within the ILCCs (Fig 2D). C-peptide or insulin-positive cells comprised approximately $6.2 \pm 1.1\%$ and glucagon-positive cells $7.4 \pm 1.6\%$ of all ILCC cells. The differentiation of the cultured cells was confirmed by the detection of insulin and glucagon mRNA expression. The glucagon and insulin RNAs were expressed at a higher level than in freshly isolated or undifferentiated cultured cells. On average, the ILCC contained 3.1 ± 0.5 pmol C-peptide/ μ g DNA. Under basal (5 mmol/L) and stimulated (20 mmol/L) glucose concentrations they secreted 0.11 and 0.42 pmol C-peptide/ μ g DNA, respectively (Fig 1B).

DISCUSSION

In an attempt to identify markers that are characteristic for the pancreatic stem/progenitor cells, we have revealed that the cell surface molecule CD133 may represent one of these rare markers. Isolated CD133-positive human pancreatic cells formed ILCC on in vitro manipulation and differentiated into endocrine cells producing insulin and glucagon. Moreover, the insulin-producing cells were able to secrete C-peptide and insulin in response to increased glucose concentration.

The fact that insulin-producing cells were present in a rather low number may be explained by the still ongoing differentiation process that was detected by neurogenin-3 expression within ILCC cells even 5 days after cultivation in differentiation medium. Neurogenin-3 is exclusively expressed in islet cell progenitors and not in differentiated islet cells.⁵ We assume that some of the CK19-positive cells forming the substantial mass of the ILCCs might still have the potential to differentiate into endocrine cells. The persistent expression of pluripotent stem cells markers suggests that even a population of uncommitted progenitor or stem cells may be still present within ILCCs.

The results of our study are in accordance with the findings of 2 recent studies^{6,7} that used the CD133 marker for the isolation of progenitor cells from mouse and human embryonic pancreata. They also showed that the CD133-positive pancreatic cells expressed neurogenin-3 and, upon in vitro manipulation, these cells differentiated into pancreatic endocrine cells including β cells. In combination with c-met, the authors were able to isolate a population of cells that possessed even higher differentiation and proliferative capacity than the pure CD133+ population. In our previous work, using the cell surface receptor CXCR-4, we achieved similar results as in this current study.⁴ Similarly as the CD133+, the CXCR-4-positive pancreatic cells also expressed markers of pancreatic endocrine progenitors (neurogenin-3 and nestin) and markers of PSC. On in vitro differentiation, these cells formed ILCCs and produced key islet hormones including insulin.

Based on these results, we assume that the pancreatic cells bearing the CD133, CXCR-4, and c-met markers may represent the pancreatic progenitor/stem cells resembling the tissue-committed stem cells present in some other adult tissues.² This cell population, isolated from the adult pancreas, should be further tested as a possible alternative source of insulin-producing tissue needed for the treatment of diabetes.

REFERENCES

1. Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H, et al: Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flowcytometric cell sorting. *Diabetes* 53:2143, 2004
2. Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R, et al: Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* 18:29, 2004
3. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al: Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343:230, 2000
4. Koblas T, Zacharovova K, Berkova Z, et al: Isolation and characterization of human CXCR4-positive pancreatic cells. *Folia Biol* 53:13, 2007
5. Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, et al: Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127:3533, 2000
6. Oshima Y, Suzuki A, Kawashimo K, et al: Isolation of mouse pancreatic ductal progenitor cells expressing CD133 and c-Met by flow cytometric cell sorting. *Gastroenterology* 132:720, 2007
7. Sugiyama T, Rodriguez RT, McLean GW, et al: Conserved markers of fetal pancreatic epithelium permit prospective isolation of islet progenitor cells by FACS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:175, 2007



An Acidic pH and Activation of Phosphoinositide 3-Kinase Stimulate Differentiation of Pancreatic Progenitors Into Insulin-Producing Cells

T. Koblas, K. Zacharovova, Z. Berkova, P. Girman, and F. Saudek

ABSTRACT

Adult pancreatic nonendocrine cells represent a potential alternative source of insulin-producing tissue for the treatment of diabetes. Differentiation of these cells is regulated by various signaling pathways including the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway. Therefore, we evaluated the effect of PI3K on this process. Compared with untreated cells the differentiation of human nonendocrine pancreatic cells into insulin-producing elements was increased after treatment with IGF-1, EGF, and Exendin-4, growth factors known to be activators of the PI3K pathway ($12.2 \pm 3.2\%$ vs $9.1 \pm 3.2\%$). Treatment with PI3K pathway inhibitor wortmannin reduced the number of differentiated beta cells from 9.1 ± 3.2 to $0.7 \pm 0.4\%$. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis revealed that insulin-like growth factor-1 (IGF-1), epidermal growth factor (EGF), and Exendin-4 significantly increased the expression of the transcription factor neurogenin-3, whereas the expressions of pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX-1), neurogenic differentiation 1 (NeuroD) were increased only among samples treated with ZnCl₂ and not significantly affected by treatment with the tested growth factors. Successful differentiation of IGF-1, EGF-, and Exendin-4-treated cells into functional beta cells was confirmed by C-peptide secretion in response to 5 versus 20 mmol glucose stimulation (0.24 vs 0.91 pmol C-peptide/ μ g DNA). These results showed that activation of the PI3K signaling pathway might be used to stimulate the differentiation of nonendocrine pancreatic cells into insulin-producing elements.

INSULIN-producing tissue derived from pancreatic endocrine progenitors is considered to be an alternative source for the treatment of diabetes. However, differentiation of these cells is a complex process regulated by various signaling pathways. The phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling pathway is one of the key cascades affecting not only cell growth, proliferation, and apoptosis but also differentiation.¹ PI3K indirectly regulates endocrine cell differentiation via inactivation of transcription factor Forkhead box O1 (FoxO1), which blocks the expression of pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX-1) and stimulates expression of neurogenic differentiation 1 (NeuroD) and mammalian homologue of avian MafA (Mafa).² All of these 3 transcription factors participate in endocrine cell differentiation and insulin gene expression among pancreatic beta cells.³ Therefore, activation of PI3K, which results in nuclear exclusion of FoxO1, may be one of the important events in pancreatic endocrine cell differentiation. The aim of our study was to evaluate the effects of PI3K activation on differentiation of pancreatic exocrine precursor cells

into insulin-producing beta cells and on expression of transcription factors participating in this process.

METHODS

Tissue Preparation

Human nonendocrine pancreatic cells were obtained from remaining pancreatic acinar tissue after islet isolation. The program of isolation and transplantation of human pancreatic islets was approved by our Ethics Committee. Human islets and pancreatic tissue were isolated according to previously described methods.⁴ Briefly, islets were isolated from pancreata obtained from 4 donors of mean age of 49 ± 18 years. After the pancreatic duct was perfused with a cold enzyme mixture containing Liberase HI

From the Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

Supported by Grant NS/9712-4/2008 from the internal grant agency of the Ministry of Health, Czech Republic.

Address reprint requests to Tomas Koblas, Langerhans Islet Laboratory, Institute for Clinical and Experimental Medicine, 14021 Prague; Videnska 1958/9, Czech Republic. E-mail: tokb@ikem.cz

(Roche, Indianapolis, Ind, United States), tissue transferred to a modified Ricordi chamber⁴ was separated by gentle mechanical agitation and enzymatic digestion at 37°C. Islets were purified with continuous Ficoll-diatrizoic acid gradients in an apheresis system (model 2991, Gambro, Prerov, Czech Republic). The densities of the continuous gradient ranged from 1.065–1.092 g/mL with the densest solution at the bottom of the separation bag. During the centrifugation, islets migrated to the interface between 1.070 and 1.080 g/mL. The remaining cellular suspension from the denser layer was pooled and further digested in Accutase solution (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) for 20 minutes at 37°C. A single-cell suspension obtained after filtration through an 11- μ m strainer was purified with the use of continuous gradient of Ficoll-diatrizoic acid in an apheresis system. The cell suspension obtained from the 1.050/1.080 g/mL interface was pooled and washed in Hank's solution (Sigma-Aldrich) for further processing.

Cell Culture Studies

Nonendocrine cells were cultured for 3 days (stage 1) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), containing 10% knock out (KO) serum replacement, 1% insulin-transferrin-selenium (ITS) solution, 25 U/mL penicillin, 25 g/mL streptomycin, 1 mmol/L L-glutamine, 1% nonessential amino acids, and 0.1 mmol/L 2-mercaptoethanol (all from Invitrogen, Paisley, United Kingdom). To this solution were added 10 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF), 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF) (both from Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), and conditioned medium derived from neonatal fibroblasts cell line Hs68 (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Afterward, cells were cultured for 4 days (stage 2) in DMEM containing 10% KO serum replacement, 1% ITS, and 1% B27 supplements (all from Invitrogen) in addition to 25 ng/mL fibroblast growth factor 10 (FGF10), 100 ng/mL follistatin (both from Peprotech), as well as 100 nmol/L dexamethasone, 10 μ mol/L forskolin, and 2 mmol/L PIPES (all from Sigma-Aldrich) with the pH adjusted to 6.0. During stage 2, cells were divided into 6 groups and supplemented with 200 μ mol/L ZnCl₂ (group I); 200 μ mol/L ZnCl₂ plus 100 nmol/L wortmannin (group II); 80 ng/mL IGF-1, 20 ng/mL EGF, and 40 ng/mL Exendin-4 (group III); 200 μ mol/L ZnCl₂, 80 ng/mL IGF-1, 20 ng/mL EGF, and 40 ng/mL Exendin-4 (group IV); 200 μ mol/L ZnCl₂, 100 nmol/L wortmannin, 80 ng/mL IGF-1, 20 ng/mL EGF, and 40 ng/mL Exendin-4 (group V); or Group VI, the control sample. Finally, cells were cultured for 3 days (stage 3) in chemically defined basal medium containing 5% fetal calf serum (FCS), 10 μ mol/L SP600125, 10 μ mol/L SB 216763, 5 μ g/mL fibronectin, 10 mmol/L nicotinamide, 40 ng/mL Exendin-4 (all from Sigma-Aldrich) as well as 10 ng/mL hepatocyte growth factor (HGF), 80 ng/mL IGF, and 20 ng/mL nerve growth factor (all from Peprotech). After a 3-day culture cellular clusters formed, which were further referred to as islet-like, cell clusters (ILCCs).

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Total RNA (from approximately 106 cells) isolated using a Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was treated with DNase using RNase-Free DNase Set (Qiagen). Isolated RNA (1 μ g) was reverse transcribed with an Omniscript RT Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was amplified using HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen). Total RNA from the islet fraction was used as the positive control. Gene-specific primer pairs, annealing temperatures, and product sizes are available in the article by Koblas et al.⁵ Separated

polymerase chain reaction (PCR) products on 2% agarose gels were visualized with ethidium bromide.

Immunocytochemistry

ILCCs were washed with phosphate buffered saline, fixed for 60 minutes in Bouin's solution (Sigma-Aldrich), rinsed with PBS, suspended in a 2% agarose-PBS solution, and centrifuged at 100g for 3 minutes to form compact pellets. After overnight submersion in 30% sucrose, ILCCs were embedded in optimal cutting temperature mounting medium (TissueTek, Bayer Corp, Pittsburgh, PA, USA), frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C .

After several washes in PBS, slides of 8- μ m sections of frozen ILCCs were incubated in blocking solution containing 10% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) in 0.2% Triton X-100, 0.1 mmol/L glycine (Sigma-Aldrich), and PBS for 1 hour at room temperature to prevent nonspecific binding. Incubation with primary antibodies of appropriate dilutions was performed in a blocking solution for 1 hour at 37°C. The following primary antibodies were used at the following dilutions: mouse anti-cytokeratin 19, 1:100; mouse anti-C-peptide, 1:100 (both from Exbio, Prague, Czech Republic). After intensive washing with PBS, sections were incubated with a specific secondary antibody diluted in the blocking solution for 1 hour at 37°C. The secondary antibody was Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse immunoglobulin Ig(G) (Invitrogen), 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich) at a concentration 5 μ g/mL was used to label the nuclei for 10 minutes at 37°C. After rinsing with PBS, sections mounted with antifade solution were examined under a fluorescent Olympus BX41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

C-Peptide Cell Content and Glucose-Stimulated Secretion

C-peptide release was measured by incubating 100 ILCCs in 1 mL Krebs-Ringer's solution containing 5 mmol/L glucose for 1 hour and then in 20 mmol/L glucose solution for another hour. Cell protein extract was isolated using AllPrep RNA/Protein Kit (Qiagen). Human C-peptide was determined using a C-peptide Immunoradiometric (IRMA) kit (Beckman Coulter, Fullerton, Calif, United States) according to the manufacturer's instructions.

RESULTS

Single-cell suspensions of nonendocrine pancreatic cells obtained after islet isolation formed ILCC within 3 days of culture in serum-free, neonatal fibroblast-conditioned medium (stage 1). ILCC contained only a few cytokeratin-19-positive cells ($25.2 \pm 2.1\%$; Fig 1A) and were almost negative for C-peptide-positive cells ($0.3 \pm 0.1\%$; Fig 2 A). At the end of stage 2 (day 7), the number of cytokeratin-19-positive cells had significantly increased ($57.1 \pm 5.9\%$) upon addition of IGF-1, EGF, and Exendin-4 growth factors (Fig 1D). ILCC cultured in control medium without IGF-1, EGF, and Exendin-4 contained only $32.3 \pm 4.7\%$ cytokeratin-19-positive cells (Fig 1G). The lowest number of cytokeratin-19-positive cells was observed in samples treated with ZnCl₂ and wortmannin ($6.1 \pm 1.8\%$; Fig 1C). The proportion of C-peptide-positive cells was assessed after the completion of stage 3 of the culture period. The highest number of C-peptide-positive cells was observed among samples treated with IGF-1, EGF, and Exendin-4 ($12.2 \pm 3.2\%$; Fig 2D). ILCCs cultured in control medium

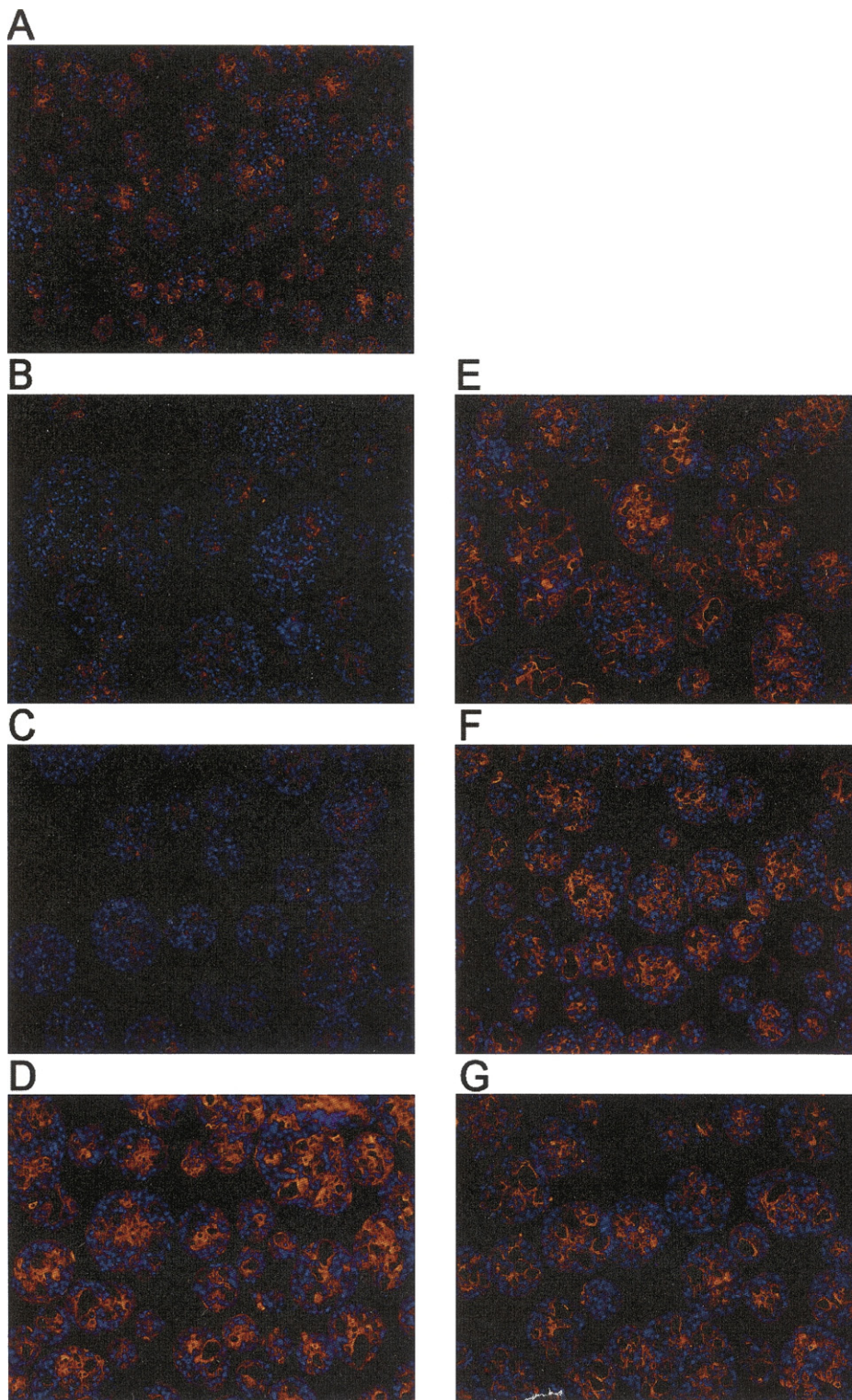


Fig 1. Cytokeratin-19 immunofluorescence staining of ILCCs. Immunofluorescence staining of cyokeratin-19 (orange): ILCCs after 3 days of cultivation (**A**); group I ILCCs after 7 days of cultivation (**B**); group II ILCCs after 7 days of cultivation (**C**); group III ILCCs after 7 days of cultivation (**D**); group IV ILCCs after 7 days of cultivation (**E**); group V ILCCs after 7 days of cultivation (**F**); and group VI ILCCs after 7 days of cultivation (**G**). DAPI (blue) stain was performed as counter stain (magnification 100 \times).

contained $9.1 \pm 3.2\%$ C-peptide-positive cells (**Fig 2G**). The lowest number of C-peptide-positive cells was present in samples treated with ZnCl_2 and wortmannin ($0.7 \pm$

0.4% ; **Fig 2C**). The negative effect of these 2 compounds on the number of C-peptide-positive cells was further evidenced among samples containing IGF-1, EGF, and Ex-

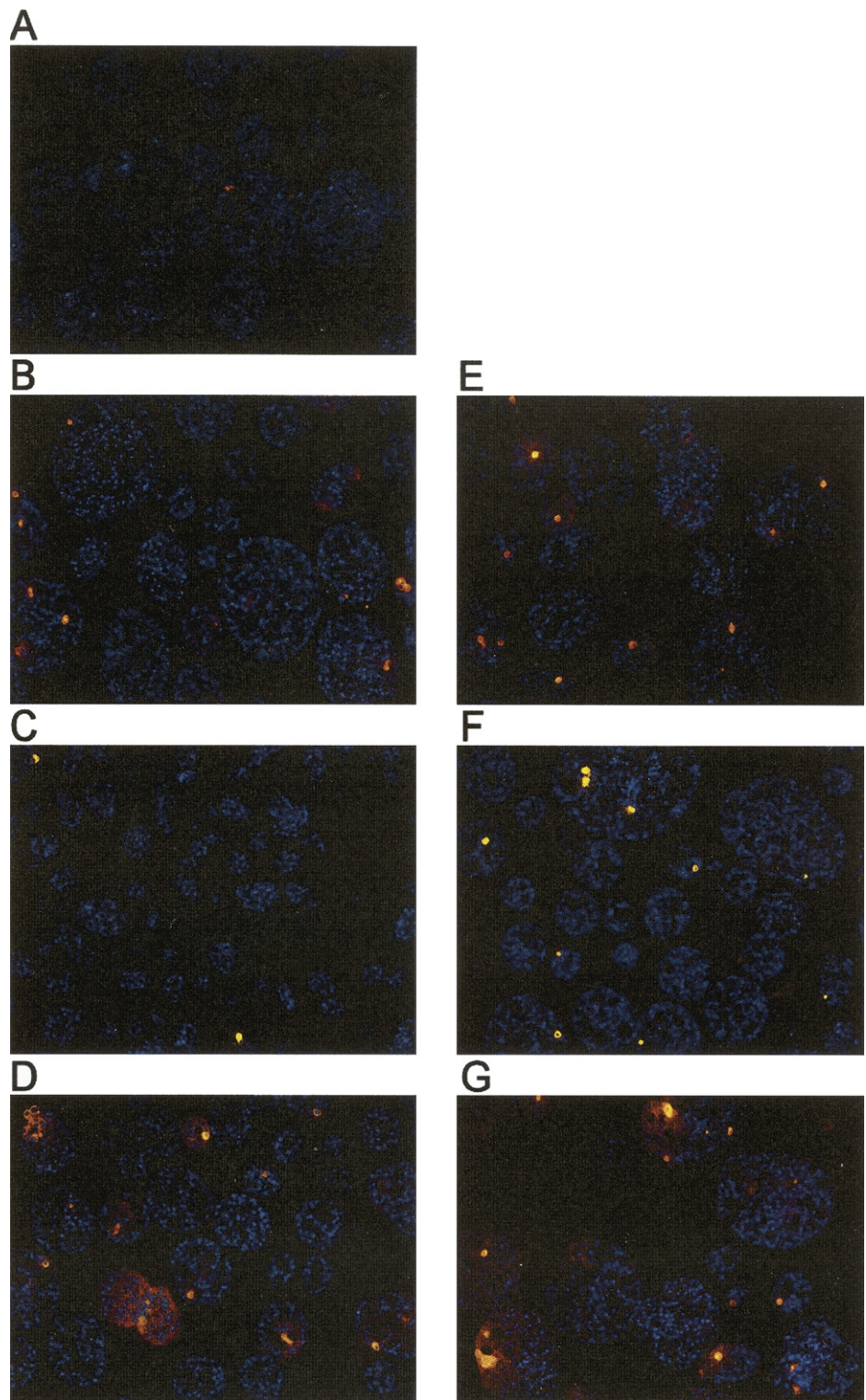


Fig 2. C-peptide immunofluorescence staining of ILCCs. Immunofluorescence staining of C-peptide (orange): ILCCs after 3 days of cultivation (**A**); group I ILCCs after 10 days of cultivation (**B**); group II ILCCs after 10 days of cultivation (**C**); group III ILCCs after 10 days of cultivation (**D**); group IV ILCCs after 10 days of cultivation (**E**); group V ILCCs after 10 days of cultivation (**F**); and group VI ILCCs after 10 days of cultivation (**G**). DAPI (blue) stain was performed as counter stain (magnification 100 \times).

endin-4 supplemented with ZnCl_2 ($5.1 \pm 2.4\%$; **Fig 2E**) or ZnCl_2 and wortmannin ($3.6 \pm 1.7\%$; **Fig 2F**). Analysis of C-peptide protein content agreed with the immunofluores-

cence staining results. The highest C-peptide content was detected among samples treated with IGF-1, EGF, and Exendin-4 (11.6 ± 4.2 pmol C-peptide/ μg DNA), whereas

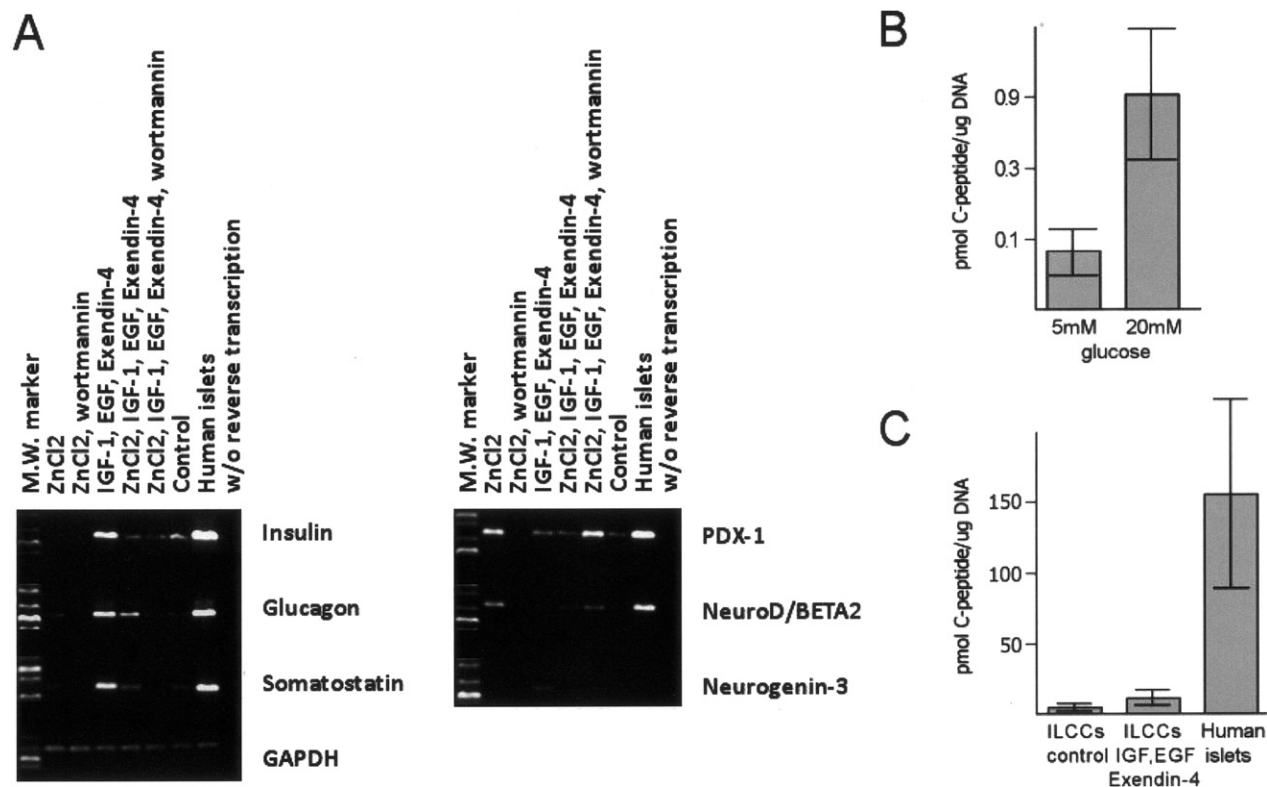


Fig 3. Gene expression, C-peptide secretion, and content of differentiated ILCCs. RT-PCR analysis of gene expression in treated ILCCs. A negative control (without RT) and a positive control (human islets) (A). Glucose-stimulated C-peptide secretion of group III ILCCs (B) and C-peptide content of group VI (control) and group III ILCCs as determined using IRMA (C).

sample C-peptide content was significantly lower in controls ($7.1 \pm 3.1\%$ pmol C-peptide/ug DNA; Fig 3C). Insulin secretion capacity of differentiated ILCC cells was confirmed by glucose-stimulated C-peptide secretion. In response to glucose stimulation (5 vs 20 mmol/L), ILCC treated with IGF-1, EGF, and Exendin-4 secreted 0.24 versus 0.91 pmol C-peptide/ μ g DNA (Fig 3B).

Results from immunofluorescence staining were also consistent with the results of reverse transcriptase (RT) PCR analysis (Fig 3A). The greatest expression of the insulin gene was observed among ILCCs treated with IGF-1, EGF, and Exendin-4. The expression of glucagon and somatostatin genes was likewise higher among samples treated with IGF-1, EGF, and Exendin-4 compared with the other samples.

However, IGF-1, EGF, and Exendin-4 growth factors had no effect on the expression of key transcription factors of endocrine cell differentiation. The expression of PDX-1 and NeuroD genes was significantly higher only when samples were treated with ZnCl₂. IGF-1, EGF, and Exendin-4 treatment only stimulated the expression of neurogenin-3 transcription factor.

DISCUSSION

The results of our study showed that activation of the PI3K signaling pathway by IGF-1, EGF, and Exendin-4 stimu-

lated differentiation of human nonendocrine pancreatic cells into insulin-producing cells. In contrast, inhibition of PI3K by wortmannin significantly reduced the number of differentiated beta cells. These findings are consistent with a recent study that showed a positive effect of PI3K activation on the differentiation of mouse pancreatic ductal elements into beta cells.⁶ Another important condition to increase differentiation into insulin-producing cells was acidification of the culture medium during the treatment with PI3K activators. However, we have not yet studied the exact mechanism by which acidification affects this process.

We also observed a positive effect of IGF-1, EGF, and Exendin-4 on the number of cytokeratin-19-positive cells that emerged during the cultivation of ILCCs derived from nonendocrine cells. Cytokeratin-19 is a marker of ductal cells that are supposed to be a potential source of pancreatic endocrine progenitors.⁷ This finding is important because a larger pool of those progenitors may give rise to a greater number of endocrine cells.

A direct effect of compounds stimulating PI3K on endocrine differentiation was evidenced by RT-PCR. The treatment with IGF-1, EGF, and Exendin-4 induced expression of neurogenin-3, a marker of pancreatic endocrine progenitors. Treatment with ZnCl₂ increased the expression of PDX-1 and NeuroD transcription factors participating in differentiation of endocrine cells and insulin gene expres-

sion. Different effects of these compounds on gene expression may be explained by their effects on other signaling pathways that are also involved in differentiation of pancreatic endocrine cells, such as the Notch signaling pathway.⁸

In conclusion, our study demonstrated that activation of the PI3K signaling pathway stimulated the differentiation not only of rodent but also of human nonendocrine pancreatic cells into insulin-producing elements and the expression of key transcription factors of endocrine cell differentiation. Further study of the role of PI3K in the differentiation of nonendocrine cells may improve the yield of differentiated beta cells, bringing this potential source of insulin-producing tissue to the stage of in vivo testing.

REFERENCES

1. Cantley LC: The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655, 2002
2. Kitamura T, Ido Kitamura Y: Role of FoxO proteins in pancreatic beta cells. *Endocr J* 54:507, 2007
3. Docherty HM, Hay CW, Ferguson LA, et al: Relative contribution of PDX-1, MafA and E47/beta2 to the regulation of the human insulin promoter. *Biochem J* 389:813, 2005
4. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al: Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343:230, 2000
5. Koblas T, Zacharovova K, Berkova Z, et al: Isolation and characterization of human CXCR4-positive pancreatic cells. *Folia Biol.* 53:13, 2007
6. Watanabe H, Saito H, Ueda J, et al: Regulation of pancreatic duct cell differentiation by phosphatidylinositol-3 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 370:33, 2008
7. Trucco M: Regeneration of the pancreatic beta cell. *J Clin Invest* 115:5, 2005
8. Baek SH, Kim MY, Mo JS, et al: Zinc-induced downregulation of Notch signaling is associated with cytoplasmic retention of Notch1-IC and RBP-Jk via PI3k-Akt signaling pathway. *Cancer Lett* 255:117, 2007

Article title: The effect of epigenetic factors on differentiation of pancreatic progenitor cells into insulin producing cells

Ivan Leontovč, ¹⁾, ivan.leontovyc@ikem.cz
Tomas Koblas, ¹⁾, tomas.koblas@ikem.cz
Lenka Pektorova, ¹⁾, lenka.pektorova@ikem.cz
Klara Zacharovova, ¹⁾, klara.zacharovova@ikem.cz
Zuzana Berkova, ¹⁾, zuzana.berkova@ikem.cz
Frantisek Saudek, ¹⁾, frantisek.saudek@ikem.cz

1) Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958/9, Prague, 14021, Czech Republic

Corresponding author:

Tomas Koblas
Langerhans islet laboratory
Institute for Clinical and Experimental Medicine
14021 Prague; Videnska 1958/9
Czech Republic
Email: tokb@ikem.cz - can be published
Tel: +420261364107; Fax: +420261362282

Guarantor of the study:

prof. Frantisek Saudek, MD/PhD
Diabetes Center
Institute for Clinical and Experimental Medicine
14021 Prague; Videnska 1958/9
Czech Republic
Email: frantisek.saudek@ikem.cz

A source of financial support:

Grant GAUK 91909-B-CH-PrF from Grant Agency of the Charles University, Czech Republic
Grant NS/9712-4/2008 from IGA of the Ministry of Health, Czech Republic

Figures: 3 (3 color figures)
Tables: 1
Words: 1795
Characters: 10309

Abstract:

Differentiation of pancreatic progenitors into insulin-producing beta-cells is regulated by various transcription factors. The expression of these genes requires an accessible DNA in a form of active euchromatin structure. The structure of chromatin and DNA is regulated by many epigenetic factors. In our study we have evaluated the effect of various epigenetic modifiers on differentiation of human non-endocrine cells into insulin producing cells.

Non-endocrine cells formed islet-like cell clusters (ILCCs) containing mainly cytokeratin-19 positive cells within 3 days of cultivation. After the cultivation with epigenetic modifiers and further differentiation the highest number of C-peptide positive cells ($10.3 \pm 2.9\%$) as well as glucagon positive cells ($7.2 \pm 2.8\%$) was achieved in a sample supplemented with a combination of 5-Aza-2'-Deoxycytidine, BIX01294 and MC1568 modifiers. In response to glucose stimulation (5 vs. 20 mM) these ILCCs secreted increased amount of C-peptide (0.45 vs 1.05 pmol C-peptide/ μgDNA). Control sample treated with no any of epigenetic modifiers had significantly lower number of C-peptide positive cells ($3.5 \pm 1.6\%$).

These results show that a combination of epigenetic modifiers 5-Aza-2'-Deoxycytidine, BIX01294 and MC1568 significantly improves reproducible differentiation of non-endocrine pancreatic cells into insulin producing cells.

Introduction:

The application of insulin producing tissue derived from alternative sources is a promising and an attractive idea for a treatment of diabetes mellitus. However, the rate of differentiation of various cell sources into insulin producing cells is still relatively low despite the advancement achieved in the differentiation protocols. One of the key obstacles in this goal could be the DNA structure of genes coding key proteins involved in differentiation and function of mature β -cells [1]. The expression of genes requires a less compact and an accessible DNA in a form of active euchromatin structure. On the other hand genes that are present in a form of condensed DNA structure called heterochromatin are inactive. The condensation of chromatin is regulated by methylation of DNA as well as by various modifications of histone proteins that DNA is wrapped around. Generally all the modifications which determine the state of chromatin structure are called epigenetic modifications. Recently published studies have shown that the epigenetic modifications have significant effect on differentiation of pancreatic endocrine cells. Treatment of fetal pancreases with Trichostatin A (TSA), non-specific inhibitor of histone deacetylases, increased a number of differentiated endocrine cells including β -cells [2]. Similar results were achieved with the application of 5'-Aza-2'-deoxycytidine (5Aza), an inhibitor of DNA methyl transferase, in differentiation of pancreatic ductal cell line. 5Aza stimulated expression of transcription factors involved in differentiation of pancreatic endocrine cells and improved differentiation of ductal cells into α and δ cells [3]. Therefore we have decided to evaluate the effect of various epigenetic modifiers on the differentiation of pancreatic non-endocrine cells into insulin producing β -cells.

Methods:

Tissue preparation

Human non-endocrine pancreatic cells were obtained from remaining pancreatic acinar tissue after islet isolation. The program of isolation and transplantation of human pancreatic islets was approved by the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer's Teaching Hospital. Human islets and pancreatic tissue were isolated according to the previously described methods [4]. Briefly, islets were isolated from pancreata obtained from 5 donors (mean age $46 \pm$ SD 20 years). The pancreatic duct was perfused with a cold enzyme mixture containing Collagenase NB 1 Premium Grade and Neutral Protease NB (Serva, Heidelberg, Germany). Tissue was then transferred to a modified Ricordi chamber and separated by gentle mechanical agitation and enzymatic digestion at 37°C. Islets were purified with the use of continuous gradients of Biocoll (Biochrom, Berlin, Germany) in an aphaeresis system Cobe model 2991 (Gambro, Czech Republic). The densities of the continuous gradient ranged from 1.065 to 1.092 g/ml. During centrifugation, islets migrated to the interface between 1.070 - 1.080 g/ml. The remaining cellular suspension from the denser layer was pooled and further digested in Accutase solution (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) for 20 min at 37°C. Single-cell suspension was obtained after a filtration through 11- μ m cell strainer and purified with the use of Biocoll continuous gradient in an aphaeresis system. Cell suspension obtained from the 1.050 - 1.080 g/ml interface was pooled, washed in Hanks solution (Sigma-Aldrich) and further processed.

Cell culture studies

Non-endocrine cells were cultured for 4 days (stage 1) in DMEM medium containing 10% KnockOut serum replacement, 1% insulin–transferrin–selenium (ITS), 25 U/ml penicillin, 25 μ g/ml streptomycin, 1 mM L-glutamine, 1% nonessential amino acids, 0.1 mM 2-mercaptoethanol (all from Invitrogen, Paisley, UK), 10 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF (both from

Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA) and conditioned medium derived from neonatal fibroblasts cell line Hs68 (LGC Promochem, Teddington, UK). During stage 1, cells were divided into 13 groups and supplemented with epigenetic modifiers according to the table 1. Studied epigenetic modifiers and their concentrations were 1 μ M 5-Aza-2'-deoxycytidine a DNA methyltransferase inhibitor, 1 μ M Scriptaid an inhibitor of class I+II histone deacetylases, 500 mM sodium butyrate an inhibitor of class I+II histone deacetylases, 5 μ M MC1268 an inhibitor of class II histone deacetylases, 2 μ M BIX01294 an inhibitor of G9a histone H3K9 methyl transferase (all from Sigma-Aldrich). Afterwards, cells were cultured for 3 days (stage 2) in CMRL medium containing 5% FCS, 10 μ M SP600125, 10 μ M SB 216763, 10 μ M forskolin, 5 μ g/ml fibronectin, 10 mM nicotinamide, 40 ng/ml Exendin-4 (all from Sigma-Aldrich) and 100 ng/ml IGF (Peprtech).

Within first 3 days cells formed cellular cluster further referred as islet-like cell cluster (ILCC).

Reverse transcriptase polymerase chain reaction

Total RNA (from approximately 10^6 cells) was isolated using Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and treated with DNase using RNase-Free DNase Set (Qiagen). Isolated RNA (1 μ g) was reverse transcribed with Omniscript RT Kit (Qiagen) according to the manufacturer instructions. cDNA was amplified using HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen). Total RNA from islet fraction was used as the positive control. Gene specific primer pairs, annealing temperatures and product size are available at [5]. PCR products were separated and visualized on 2 % agarose gel containing ethidium bromide.

Immunocytochemistry

ILCC were washed with PBS, fixed for 60 min in Bouins solution (Sigma-Aldrich), rinsed with PBS, suspended in a 2% agarose-PBS solution and centrifuged at 100 g for 3 min to form compact pellets. After overnight submersion in 30% sucrose, ILCC were embedded in OCT

mounting medium TissueTek (Bayer Corp, Pittsburgh, PA, USA), frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C.

After several washes in PBS, 8 µm sections of frozen ILCC, slides were incubated in blocking solution containing 10% normal goat serum (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA) in 0.2% Triton X-100, 0.1 M glycine (Sigma-Aldrich) and PBS for 1 h at room temperature to prevent unspecific binding. Incubation with primary antibodies in appropriate dilution was performed in a blocking solution for 1 hour at 37 °C. The following primary antibodies were used at the 1:100 dilution: mouse anti-cytokeratin 19, mouse anti-C-peptide (both from Exbio, Czech Republic) and rabbit anti-glucagon (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). After intensive washing with PBS, sections were incubated with the specific secondary antibody diluted in the blocking solution for 1 hour at 37 °C. The secondary antibodies were Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG and were Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen). 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) at a concentration 5 µg/ml was used to label the nuclei for 10 min at 37 °C. After rinsing with PBS, sections were mounted with antifade solution and examined with fluorescent microscope Olympus BX41 (Olympus, Tokyo, Japan).

C-peptide cell content and glucose stimulated secretion

C-peptide release was measured by incubating 100 ILCC in 1 ml of Krebs-Ringer solution containing 5 mM glucose for 1 hour and then in 20 mM glucose solution for another hour. Cells were lysed in RIPA buffer (Sigma-Aldrich) and human C-peptide was determined using a C-peptide IRMA kit (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) according to the manufacturer instructions.

Results:

Single cell suspension of non-endocrine pancreatic cells formed islet-like cell clusters (ILCC) resembling islets of Langerhans within 3 days of culture in serum-free neonatal fibroblasts conditioned medium. ILCC were formed mainly by cytokeratin-19 positive cells with the exception of 5Aza and MC1568 treated ILCC that contained only rare cytokeratin-19 positive cells after 7 days of cultivation (**fig. 1**). The highest number of C-peptide positive cells ($10.3\pm 2.9\%$) was observed in the samples treated with a combination of 5Aza, BIX01294 and MC1568. There was also high number of glucagon positive cells ($7.2\pm 2.8\%$) in the samples treated with this combination of epigenetic modifiers. Control sample treated without any of epigenetic modifiers contained only $3.5\pm 1.6\%$ C-peptide positive cells. Samples treated with 5Aza + MC1568 had the lowest number of C-peptide positive cells ($1.8\pm 0.9\%$) while a number of glucagon positive cells ($8.1\pm 1.4\%$) was the highest of all the samples (**fig. 2**). Analysis of C-peptide protein content was in agreement with results from immunofluorescence staining. The highest C-peptide content was detected in samples treated with 5Aza, BIX01294 and MC1568 (10.2 ± 3.2 pmol C-peptide/ μ g DNA) while in control sample C-peptide content was significantly lower (5.1 ± 2.2 pmol C-peptide/ μ g DNA) (**fig.3**). Insulin secretory capacity of differentiated ILCCs cells was confirmed by glucose stimulated C-peptide secretion. In response to glucose stimulation (5 vs. 20 mM) ILCCs treated with 5Aza, BIX01294 and MC1568 secreted 0.45 vs. 1.05 pmol C-peptide/ μ g DNA (**fig.3**).

Results from immunofluorescence staining were also in accordance with results from RT-PCR analysis (**fig.3**). The highest expression of insulin gene was observed in ILCCs treated with 5Aza, BIX01294 and MC1568. The expression of glucagon gene was also high in sample treated with 5Aza, BIX01294 and MC1568 in comparison with most of the other samples.

Treatment of pancreatic cells by epigenetic modifiers also affected the expression of key transcription factors of endocrine cells differentiation. The expression of PDX-1 transcription factor was significantly higher in samples treated with BIX01294 while treatment with 5AZA

stimulated the expression of neurogenin-3 transcription factor.

Discussion:

The results of our study show that epigenetic factors significantly affect differentiation of human non-endocrine pancreatic cells into insulin producing cells. Our findings are in accordance with recent study that showed a positive effect of histone deacetylase inhibitor TSA on differentiation of mouse fetal pancreatic cells into β -cells [2]. In another study the treatment of human ductal cells with DNA methyltransferase inhibitor 5AZA stimulated differentiation into α and δ cells and the expression of neurogenin-3 an important transcription factor involved in differentiation of pancreatic endocrine cells [3].

Therefore we decided to evaluate the effect of various combinations of epigenetic modifiers that have already shown the effect on differentiation of pancreatic endocrine cells as well as other cell types. We found that combination of 5AZA (DNA methyltransferase inhibitor), MC1568 (specific inhibitor of class II histone deacetylases) and BIX01294 (specific inhibitor of G9a histone H3K9 methyl transferase) improved differentiation of human pancreatic non-endocrine cells. The effect of that combination could be based on different targets of epigenetic changes. While 5AZA decreases methylation of DNA, MC1568 blocks enzymes responsible for deacetylation of histones and BIX01294 inhibits methylation of lysine 9 on histone 3. All of these modifiers are supposed to stimulate change of DNA structure into euchromatin state a necessary condition for gene expression. Indeed in our study combination of various epigenetic modifiers led to stimulation of differentiation into endocrine cells, however with significantly different results. Combination of 5AZA and MC1568 deteriorated differentiation into β -cells while stimulated differentiation into α -cells in comparison with control sample. On the other hand combination of 5AZA, MC1568 and BIX01294 stimulated differentiation into β -cells. Therefore addition of BIX01294 played a key role in directing differentiation of pancreatic cells into β -cell

phenotype. While 5AZA could trigger endocrine differentiation process by stimulating expression of neurogenin-3, addition of BIX01294 which increased the expression of PDX-1 transcription factor could stimulate differentiation into β -cell phenotype. In addition to the effect on endocrine cells differentiation we also observed a negative effect of 5AZA and MC1568 treatment on formation of cytokeratin-19 positive ILCCs cells.

In conclusion, our study demonstrated that application of various epigenetic modifiers stimulate differentiation of human non-endocrine pancreatic cells into insulin producing cells and the expression of key transcription factors of endocrine cells differentiation. Combination of these modifiers with other agents that stimulate differentiation of pancreatic non-endocrine cells may improve the yield of differentiated beta cells and bring this potential source of insulin producing tissue into the clinical treatment of diabetes.

References:

1. Mutskov V, Felsenfeld G. The human insulin gene is part of a large open chromatin domain specific for human islets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; **106**: 17419-24.
2. Haumaitre C, Lenoir O, Scharfmann R. Histone deacetylase inhibitors modify pancreatic cell fate determination and amplify endocrine progenitors. *Mol Cell Biol*. 2008; **28**: 6373-83.
3. Lefebvre B, Belaich S, et al. 5'-AZA induces Ngn3 expression and endocrine differentiation in the PANC-1 human ductal cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; **391**: 305-9.
4. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000; **343**: 230-8.
5. Koblas T, Zacharovova K, Berkova Z, et al. Isolation and characterization of human CXCR4-positive pancreatic cells. *Folia Biol*. 2007; **53**: 13-22.

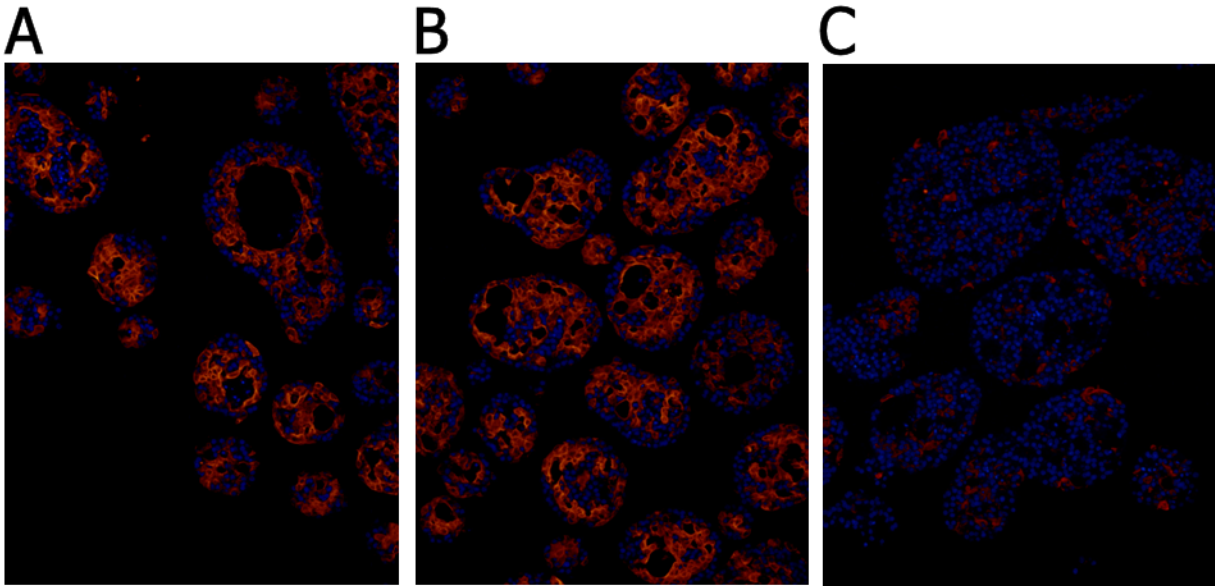


Figure 1. Cytokeratin-19 immunofluorescence staining of ILCCs

Immunofluorescence staining of cytokeratin-19 (orange): ILCCs treated with a combination of 5AZA, MC1568 and BIX01294 (A), control ILCCs treated with no any of epigenetic modifiers (B), ILCCs treated with a combination of 5AZA, MC1568 and BIX01294 (C). DAPI (blue) stain was performed as counter stain (magnification 100x).

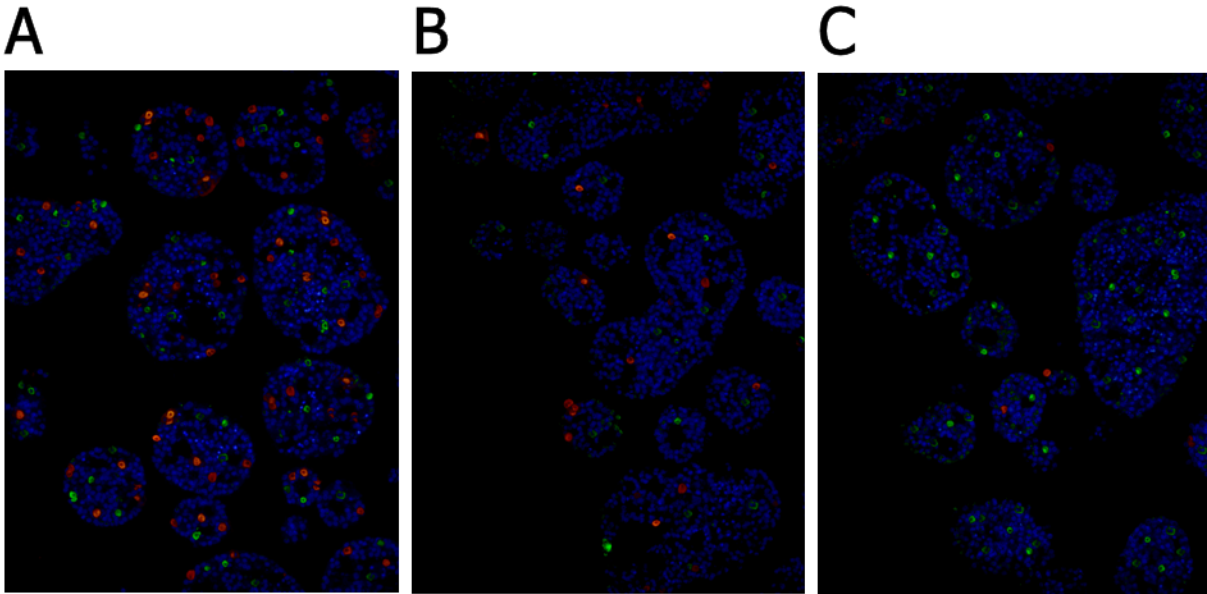


Figure 2. C-peptide and glucagon immunofluorescence staining of ILCCs

Immunofluorescence staining of C-peptide (orange) and glucagon (green): ILCCs treated with a combination of 5AZA, MC1568 and BIX01294 (A), control ILCCs treated with no any of epigenetic modifiers (B), ILCCs treated with a combination of 5AZA, MC1568 and BIX01294 (C). DAPI (blue) stain was performed as counter stain (magnification 100x).

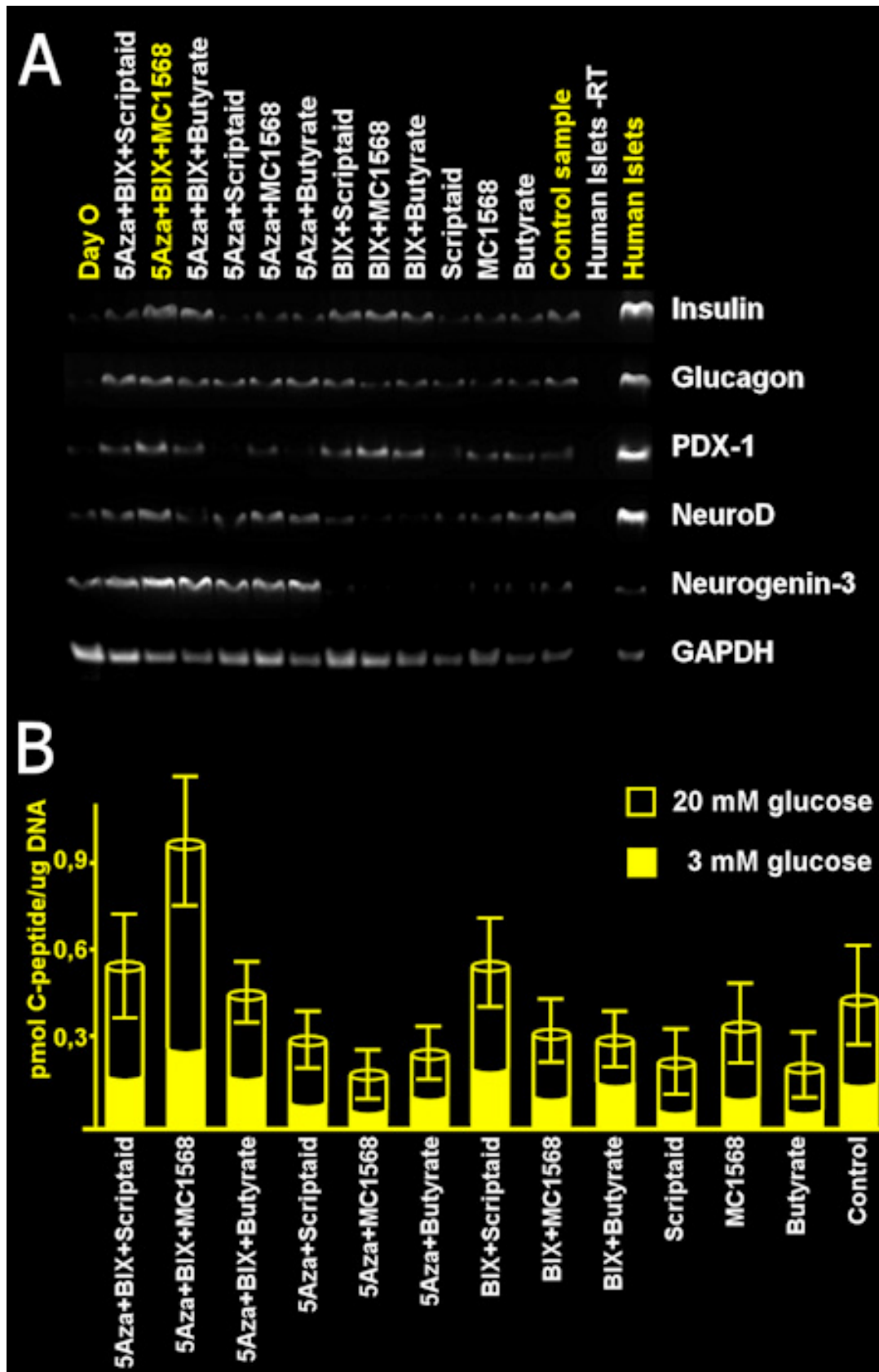


Figure 3. Gene expression and C-peptide secretion capacity of differentiated ILCCs

RT-PCR analysis of gene expression in treated ILCCs. A negative control (w/o reverse transcription) and a positive control (Human islets) (A). Glucose stimulated C-peptide secretion of differentiated ILCCs as determined by IRMA (B).

Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
5AZA	A	A	A	A	A	A							
Sodium butyrate			SB			SB			SB			SB	
Scriptaid	S			S			S			S			
MC1268		M			M			M			M		
BIX01294	B	B	B				B	B	B				

Table1. Combinations of epigenetic modifiers used in the study

Combinations of epigenetic modifiers used in the study. Cell samples were divided into 12 groups with various combinations of 5AZA (A), sodium butyrate (SB), Scriptaid (S), MC1268 (M) and BIX01294 (B). Control sample was treated with no any of epigenetic modifiers.

Original Article

In Vivo Differentiation of Human Umbilical Cord Blood-Derived Cells into Insulin-Producing β Cells

(diabetes mellitus / insulin / pancreas / β cell / islets / stem cells / umbilical cord blood / differentiation / *in vivo* / radiation/transplantation)

T. KOBLAS¹, K. ZACHAROVÁ¹, Z. BERKOVÁ¹, I. LEONTOVIČ¹,
E. DOVOLILOVÁ¹, L. ZÁMEČNÍK², F. SAUDEK¹

¹Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

²Thomayer University Hospital with Polyclinic, Prague, Czech Republic

Abstract. In our study we confirmed the potential of human umbilical cord blood cells to differentiate into insulin-producing cells following transplantation into immunocompromised mice. The average number of C-peptide-positive human cells per animal was 18 ± 13 as assessed by immunofluorescence staining and fluorescence *in situ* hybridization specific for human ALU sequence. Differentiation into insulin-producing cells was further confirmed by reverse transcription-polymerase chain reaction specific for human insulin mRNA. Successful differentiation required sublethal irradiation of xenogeneic recipient at least at a dose of 3 Gy. However, transplantation of human umbilical cord blood cells did not improve hyperglycaemia in diabetic animals. The results of our study show that human umbilical cord blood may be considered as a potential source of stem cells for treatment of diabetes mellitus.

Introduction

Despite advances in the treatment of diabetic patients, diabetes remains one of the most serious health care

problems of our civilization. Clinical islets or pancreas transplantations are the only available therapies able to establish insulin independence and long-lasting normoglycaemia (Shapiro et al., 2000; White et al., 2009). However, the lack of donors limits the application of this therapy for all type 1 diabetic patients in need.

The discovery of stem cells and their successful differentiation into insulin-producing β cells gave a new hope to all diabetic patients. Within last few years various types of stem cells able to give rise to the pancreatic β cells have been identified. They include embryonic and foetal stem cells (Zhang et al., 2005; D'Amour et al., 2006) as well as adult stem cells derived from pancreas, liver, bone marrow and central nervous system (Bonner-Weir et al., 2000; Yang et al., 2002; Ianus et al., 2003).

In addition to these "traditional" sources of adult stem cells, umbilical cord blood-derived stem cells have emerged as a new potential source for cell-based therapies. The main advantages of human umbilical cord blood (HUCB) include plentiful availability, safe and non-invasive procedure of collection, possible expansion and modification of cells *in vitro* and an existing network of umbilical cord blood banks, a large-scale source of cells that allows matching the donor and host human leukocyte antigen (HLA) systems. HUCB, highly enriched for haematopoietic stem cells, has already been successfully applied for the treatment of various blood diseases (Roche et al., 2000; Laughlin et al., 2004). Moreover, several recent reports have shown that some of the HUCB cells are able to differentiate into multiple cell types of non-haematopoietic origin (Kogler et al., 2004; McGuckin et al., 2005). These findings suggest that umbilical cord blood contains multipotent stem cells or primitive progenitors that might have the potential to differentiate into cells of non-haematopoietic phenotype, including pancreatic β cells.

Denner as the first demonstrated successful *in vitro* differentiation of HUCB stem cells into insulin- and C-peptide-producing cells (Denner et al., 2007). Two other groups lately reported similar results using differ-

Received October 9, 2009. Accepted October 28, 2009.

This work was supported by research grant NR/9060-4/2006 from the Internal Grant Agency of the Ministry of Health, Czech Republic.

Corresponding author: František Saudek, Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Vídeňská 1958/9, 140 21 Prague 4, Czech Republic. Phone: (+420) 261 364 107; e-mail: frsa@medicon.cz

Abbreviations: DAPI – 4,6-diamidino-2-phenylindole, EBSS – Earle's balanced salt solution, FISH – fluorescence *in situ* hybridization, HLA – human leukocyte antigen, HUCB – human umbilical cord blood, GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, MNCs – mononuclear cells, NK – natural killer, NOD/SCID – non-obese diabetic/severe combined immunodeficient/ β_2 -microglobulin null mice, PCR – polymerase chain reaction, RT-PCR – reverse transcriptase polymerase chain reaction.

ent approaches (Sun et al., 2007; Gao et al., 2008). Sun's group used a specific subpopulation of HUCB cells expressing embryonic markers Oct-4 and SSEA-4. These cells were differentiated by a protocol using only nicotinamide and extracellular matrix proteins laminin and fibronectin. Gao's group worked with HUCB-derived mesenchymal stem cells and employed a more complicated protocol including retinoic acid, nicotinamide, exendin-4 and extracellular matrix proteins. In spite of successful differentiation into insulin-producing cells, the secretion of insulin in response to increased glucose levels was not significantly higher than that at basal conditions. This phenomenon is quite common in case of *in vitro* derived β cells and may be explained by immaturity of this cell type (D'Amour et al., 2006).

In vivo differentiation of HUCB cells into the pancreatic β cells has so far been demonstrated only by Yoshida et al. The presence of human insulin-producing cells in mouse pancreatic tissue after transplantation of T cell-depleted HUCB mononuclear cells (MNCs) into newborn non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice have been reported by the authors. However, the average number of HUCB-derived insulin-producing cells per total number of islet cells was only 0.65%. The low rate of human β cells within mouse pancreas could be explained by a non-diabetic status of the animals (Yoshida et al., 2005). Under diabetic conditions, the demand for neogenesis of insulin-producing cells might be increased and the higher rate of HUCB cell differentiation might represent a compensatory effect in face to a decreased β -cell mass.

In light of these results we decided to investigate the conditions that stimulate *in vivo* differentiation of HUCB mononuclear cells into insulin-producing cells. Survival, homing and differentiation of HUCB cells were studied in athymic nude mice, which do not reject xenografts and thus represent a suitable model for transplantation of human cells. We tested the effect of the whole body irradiation, which had been shown to increase homing and engraftment of human cells in transplanted mice (Becker et al., 2002). Finally, we also examined the possibility to treat the streptozotocin-induced diabetes by transplantation and possible differentiation of HUCB cells into insulin-producing cells.

Here we report that HUCB-derived mononuclear cells convincingly do have the potential to differentiate into a β cell-like phenotype, though, with the use of current protocols, only at a very low rate that still does not reach a therapeutic significance.

Material and Methods

Study design

For the purpose of our study mice were divided into the groups based on the applied radiation dose and eventual induction of diabetes (Table 1). All animals with the exception of the control group were injected with 10^7 unpurified HUCB mononuclear cells into the tail vein. Mice in groups 2, 3, 5 and 6 underwent total body irradiation one day prior to the application of HUCB cells at the dose of 1 (groups 2 and 5) or 3 Gy (groups 3 and 6). In groups 4, 5 and 6 diabetes was induced by streptozotocin three days prior to the application of HUCB cells. In diabetic animals, fed blood glucose was monitored at weekly intervals during the experiment. Animals were sacrificed at the end of 4th week and tissue samples were collected for further analysis.

Isolation of HUCB Cells

Samples of HUCB (40–120 ml) were obtained at the end of physiological delivery. At the admission to hospital, all donors signed an informed consent approved by the Institutional Ethical Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer Teaching Hospital. Samples of HUCB were collected into standard blood donor bags containing 15 ml of citrate phosphate dextrose (Baxter Healthcare, Deerfield, IL). HUCB was diluted in a ratio 1 : 2 with Earle's balanced salt solution (EBSS) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and centrifuged at 400 g for 20 min at 4 °C on a layer of Ficoll-Hypaque 1.077 (Sigma-Aldrich). Mononuclear cells (MNCs) at the interface of supernatant were washed twice with EBSS. Viability was determined by the trypan blue dye exclusion method. MNCs were resuspended in Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma-Aldrich) containing 20% foetal bovine serum (Biochrom, Berlin, Germany) and cryopreserved with 10% (vol/vol) DMSO (Sigma-Aldrich).

Mice

Female nude athymic mice (CrI:CD1-nu strain, An-Lab, Prague, Czech Republic) were maintained under defined flora with irradiated food and sterile water in sterile cages at the animal facility. All experiments were approved by the Committee for Animal Ethical Treatment of the Institute for Clinical and Experimental Medicine.

Table 1. Groups of animals based on the radiation dose and diabetes induction

	Radiation dose (Gy)	Induction of diabetes	HUCB transplantation
Group 1	0	No	Yes
Group 2	1	No	Yes
Group 3	3	No	Yes
Group 4	0	Yes	Yes
Group 5	1	Yes	Yes
Group 6	3	Yes	Yes
Group 7 (control group)	0	No	No

Induction of diabetes

Athymic mice aged 6–8 weeks were treated with a single intravenous dose of 250 mg/kg streptozotocin (Sigma-Aldrich) freshly dissolved in citrate buffer (0.05 mM, pH 4.5). Mice were considered as diabetic when non-fasting blood glucose levels were > 16 mmol/l on three consecutive days.

HUCB Transplantation

Prior to transplantation, cryopreserved HUCB MNCs were thawed, counted and tested for viability by the trypan blue dye exclusion method. The amount of 10^7 MNCs was injected intravenously into the tail vein of non-diabetic or diabetic mice (8 weeks old). Two groups of diabetic and two groups of non-diabetic mice were conditioned with 1 or 3 Gy of total body irradiation one day prior to the transplantation.

Pancreatic Islet Isolation

Mouse pancreatic islets from the HUCB cell recipients and control animals were isolated using the collagenase digestion method as previously described (Berkova et al., 2005). The pancreases were injected with 1 ml of collagenase at a concentration of 2 mg/ml (Sevapharma, Prague, Czech Republic) and incubated at 37 °C for 15 min in a total of 10 ml of digestion solution under constant shaking. Islets were subsequently washed three times in Hank's balanced salt solution (HBSS) (Biochrom) with bovine serum albumin (BSA) (5 mg/ml) and purified with the use of discontinuous gradients of Ficoll-diatrizoic acid (Sigma-Aldrich). The solution densities of discontinuous Ficoll gradient ranged from 1.034 to 1.1162 g/ml with the densest solution at the bottom of density gradient. During centrifugation, islets migrated to the interface between 1.070 and 1.080 g/ml. The remaining cellular material from the denser layer was also pooled and further processed for gene expression analysis.

FISH and Immunofluorescence Analysis

After the pancreatic tissues were harvested from the recipient mice, the tissues were fixed with Bouin's solution (Sigma-Aldrich) for 2 h at room temperature. The tissues were rinsed with PBS, embedded in OCT mounting medium (Bayer Corp, Pittsburgh, PA), frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C.

After several washes in PBS, 8- μ m sections of frozen tissue were incubated in a solution containing 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS for 20 min. Antigen retrieval method for immunofluorescence staining was performed prior to fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Slides were heated twice in 0.01 M sodium citrate (Sigma-Aldrich), pH 6.0, in a microwave oven for periods of 4 min at the maximal power setting (900 W) with 120–140 s of boiling. Slides were incubated in blocking solution containing 5% normal goat serum (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). After dehydration in 70%, 90% and 100% ethanol for 2 min each, slides were incubated in 50% formamide/2 \times SSC denaturing solution for 5 min at 75 °C. After denaturation, the slides were incubated overnight at 37 °C with Alexa555-conjugated ALU-species-specific probe diluted in hybridization buffer (50 ng/100 μ l). An Alu-specific probe binds the ALU-sequence that is present only in primate genomes. Alu sequences are about 300 base pairs long and form about 10 % of the human genome. The sequence of the Alu-specific probe is given in Table 2.

After the hybridization, slides were washed three times in 50% formamide/2 \times SSC for 5 min each at 42 °C. For immunofluorescence co-staining, slides were blocked in 5% donkey serum (Jackson Immunoresearch Laboratories) diluted in 0.2% Triton X-100, 0.1 M glycine (Sigma-Aldrich) and PBS for 1 h at room temperature to prevent unspecific binding. Incubation with rabbit anti-human C-peptide antibody (Linco-Research, St. Charles, MO) diluted 1 : 200 was performed in the same blocking solution for 1 h at 37 °C. After intensive washing with PBS, slides were incubated with the secondary antibody Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probe, Eugene, OR) diluted in the blocking solution for 1 h at 37 °C. 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich) at a concentration 5 μ g/ml was used to label the nuclei for 10 min at 37 °C. After rinsing with PBS, sections were mounted with antifade solution and examined with a fluorescence microscope (BX 41, Olympus, Tokyo, Japan).

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

RNA was isolated from pancreatic islets and remaining pancreatic tissue of the recipient mice using Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Isolated RNA was treated with DNase using RNase-Free DNase Set

Table 2. Primers and Alu-specific probe sequences used for the RT-PCR and FISH analysis

Primer	sequence	product size (bp)	annealing temp. (°C)	cycle number
human insulin forward	agccgcagcctttgtgaac	141	63	45
human insulin reverse	agctccacctgccccac	141	63	45
mouse insulin forward	ctataatcagagaccatcagcaagc	344	60	35
mouse insulin reverse	gtagaggagcagatgctgg	344	60	35
human GAPDH forward	gagtcaacggattggtcg	141	59	40
human GAPDH reverse	catgggtggaatcatattgg	141	59	40
Alu-specific probe	cctgtaatcccagctactcgggagg ctgaggcaggagaatccttgaacc		37	

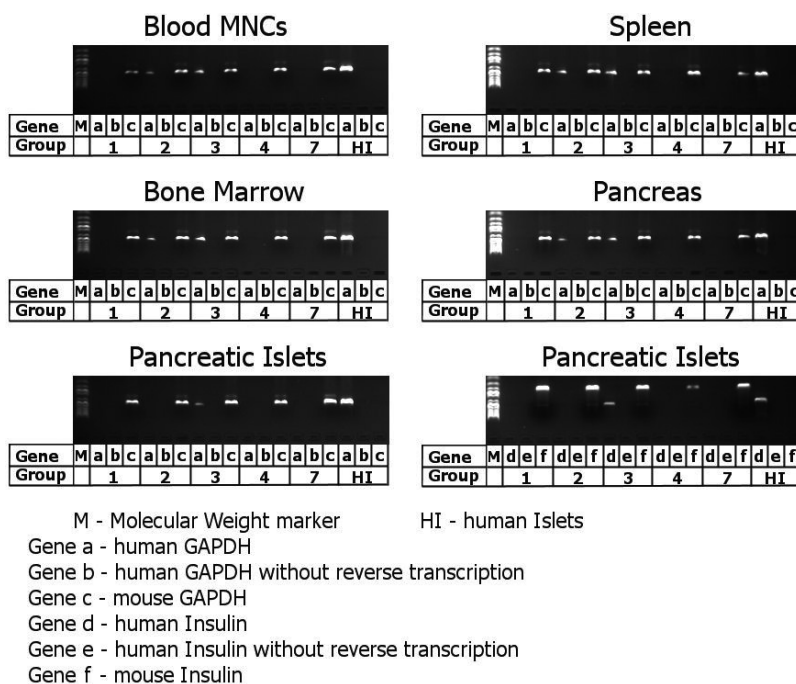


Fig. 1. RT-PCR analysis of gene expression in mouse tissues. Transcripts of human *GAPDH* (a) and insulin (d) were analysed and compared with transcripts of mouse *GAPDH* (c) and insulin genes (f). The products of PCR reaction without reverse transcription served as a negative control (b, e). Human islet RNA was used as a positive control.

(Qiagen) and 1 μ g of RNA was reverse transcribed with Omniscript RT Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was amplified using HotStar-Taq Master Mix Kit (Qiagen). Gene-specific primer pairs, annealing temperatures, and product sizes are listed in Table 2. All of the primers span at least one of the introns to prevent false-positive results. PCR products were separated and visualized on 2% agarose gel containing ethidium bromide.

Results

Successful HUCB transplantation was confirmed by detection of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) mRNA in samples isolated from mouse blood MNCs 4 h after the transplantation (Fig. 1). Further detection of human cells within mouse tissues was performed four weeks after the application of HUCB cells using the primers specific for human *GAPDH*. The expression of human *GAPDH* was detected only in samples derived from mice exposed to both 1 and 3 Gy radiation doses. Human *GAPDH* was detected in all of the examined tissues (spleen, bone

marrow, blood MNCs and pancreatic tissue). No expression of human *GAPDH* was detected in tissue samples from mice that had not been subjected to total body irradiation (Table 3, Fig. 1).

In order to evaluate the potential of HUCB-derived cells to differentiate into human insulin-producing cells we performed RT-PCR analysis of human insulin gene expression. We used RNA isolated from fresh pancreatic tissue and Langerhans islets of the recipient mice. The expression of human insulin mRNA was observed exclusively in pancreatic tissue derived from mice irradiated with 3 Gy. We did not detect any expression of human insulin gene either in the isolated islets or pancreatic tissue derived from mice irradiated with only 1 Gy or in samples from unirradiated mice. For the detection of human insulin mRNA, we designed the forward and reverse primers that specifically amplified human but not mouse insulin cDNA or human gDNA. The amplified products derived from the recipients' pancreata were clearly seen on agarose gel (Fig. 1). The product size corresponded to the expected size of PCR reaction product amplified by specific primers. These results indicate that human insulin was produced by donor

Table 3. Detection of human cells within examined mouse tissues in the study groups

Tissue	Blood	Spleen	Bone Marrow	Pancreas	Islets	Human β cells
Group 1	-	-	-	-	-	-
Group 2	+	+	+	+	+	+
Group 3	+	+	+	+	+	+
Group 4	-	-	-	-	-	-
Group 5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Group 6	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Group 7	-	-	-	-	-	-

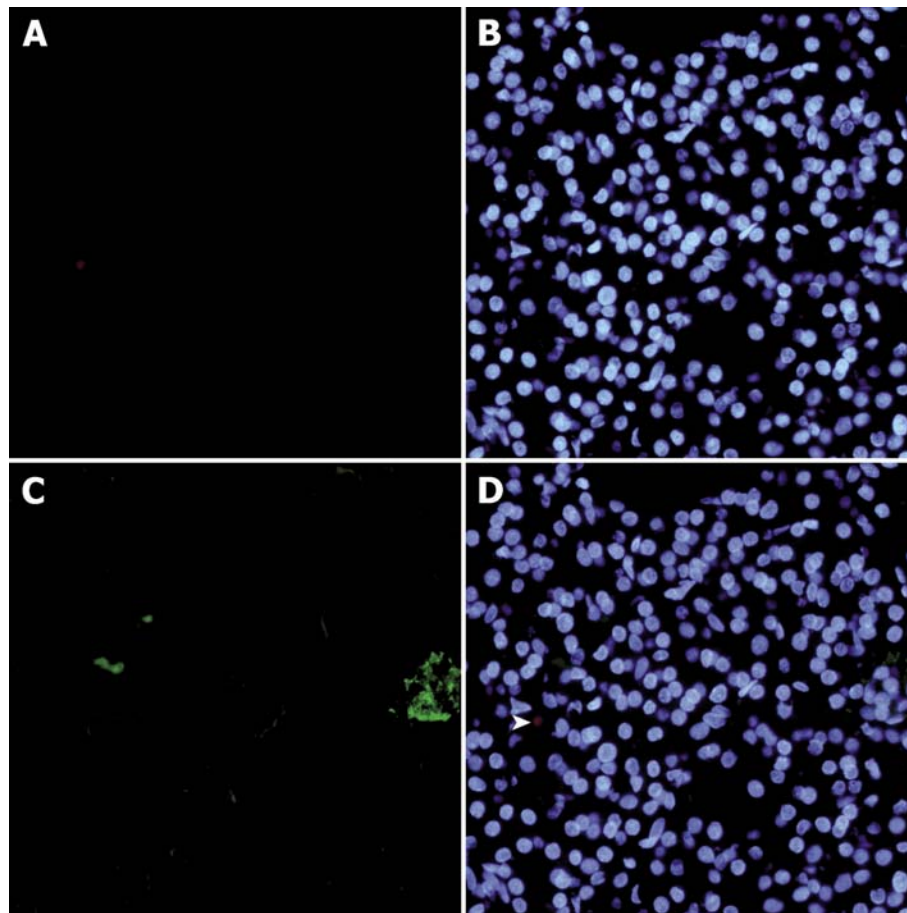


Fig. 2. FISH and immunofluorescence staining of mouse pancreatic tissue four weeks after the irradiation with 1 Gy. (A) FISH for human ALU sequence (red), (B) DAPI staining of nuclei (blue), (C) C-peptide immunofluorescence staining (green) and (D) merged images A–C. HUCB-derived ALU sequence-positive cell is shown (arrowhead).

HUCB-derived cells in the recipient pancreas at the RNA level. Insulin-specific cDNA in the tissue obviously did not originate from passenger haematopoietic cells as this reaction was negative in all starting MNC samples.

The presence of human cells within pancreatic tissue was further confirmed by the fluorescence *in situ* hybridization specific for the human ALU sequence. Rare human cells were detected within the acinar tissue, islets and also in the pancreatic ducts of recipient mice (Fig. 2 and Fig. 3).

In the next step we performed immunofluorescence labelling of human C-peptide in combination with human ALU sequence-specific FISH to confirm the expression of human insulin at the protein level. C-peptide-positive human cells were clearly demonstrated within the pancreatic islets of mice irradiated with 3 Gy, although only in a low number (Fig. 3). The average number of C-peptide-positive human cells per animal was 18 ± 13 . The whole pancreata were cut into 10- μ m sections and the investigation was performed in all of them.

Transplantation of HUCB into severely diabetic animals did not lead to metabolic improvement. All seven animals progressively wasted and died before the end of

the study period. Therefore, the presence of human cells within their tissues could not be studied.

Discussion

For their availability and easy storage, umbilical cord stem or precursor cells have been regarded as a promising source for cellular therapy of diabetes, though the scientific and practical reasons for this hope have still been lacking. The ability to differentiate into the β -cell phenotype undoubtedly depends on selection of the right cell type, on its culture conditions and last but not least, on the post-transplant care of the recipient. Cure or significant improvement of experimental diabetes by HUCB transplantation has not been achieved in any study so far. However, the results of our study demonstrated that the potential of HUCB mononuclear cells to engraft in the host pancreas and to differentiate into insulin-producing cells does exist. The origin of the transplanted cells was confirmed not only by fluorescence *in situ* hybridization staining for specific human DNA sequence in combination with immunofluorescence staining for human insulin in transplanted immunocompromised mice, but also by highly sensitive RT-PCR detection of human insulin mRNA.

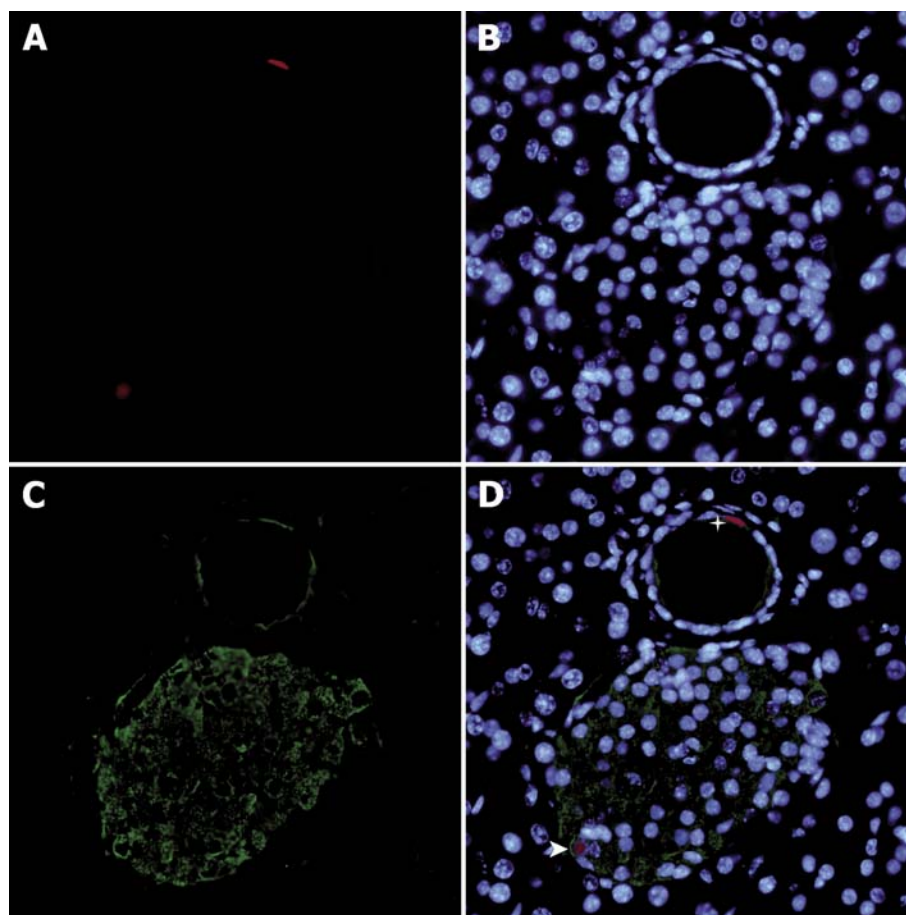


Fig. 3. FISH and immunofluorescence staining of mouse pancreatic tissue four weeks after the irradiation with 3 Gy. (A) FISH for human ALU sequence (red), (B) DAPI staining of nuclei (blue), (C) C-peptide immunofluorescence staining (green) and (D) merged images A–C. HUCB-derived ALU sequence and C-peptide-positive cell in pancreatic islet is shown (arrowhead) and HUCB-derived ALU sequence-positive cell in pancreatic duct is shown (star).

Our results are in agreement with those published by Yoshida's group (Yoshida et al., 2005). They also observed the presence of human insulin-producing cells in pancreatic tissue after the transplantation of HUCB mononuclear cells into the normoglycaemic mice. In their experiment, the rate of differentiation was significantly higher in comparison with our study. The difference between the numbers of differentiated human β cells may be due to different mouse strains used in the studies as well as the type and number of transplanted cells. Yoshida et al. (2005) used non-obese diabetic/severe combined immunodeficient/ β_2 -microglobulin null mice (NOD/SCID/ β_2 m null), which lack mature T as well as B cells and show extremely low activity of natural killer (NK) cells. This profound immunological incompetence obviously enables high engraftment rates of human cells in NOD/SCID/ β_2 m null mice (Ishikawa et al., 2002). In our study we used the CD-1-nu/nu nude mouse strain, which lacks only mature T lymphocytes but still shows functional antibody-producing B and NK cells. The nude mouse strain may provide a lower engraftment potential for xenografts in comparison with the NOD/SCID strain as demonstrated by transplanta-

tion of foetal porcine pancreatic tissue into the NOD/SCID and nude mice (Tuch et al., 1999).

We have therefore decided to use whole-body irradiation in the effort to increase engraftment efficiency of human cells. Without irradiation pretreatment we found neither any human insulin-producing cells nor any human cells in pancreatic or any other examined tissues. Conversely, after a 1 Gy total body irradiation we detected expression of human GAPDH in haematopoietic organs such as spleen, blood and bone marrow using PCR detection. Nevertheless, we did not detect any expression of human insulin gene in pancreatic tissue. Further increase of the radiation dose up to 3 Gy led not only to the engraftment of human cells in pancreatic tissue but also allowed differentiation of human cells into insulin-producing cells. While most of the human cells within the host pancreatic tissue were insulin-negative, we convincingly detected a few insulin-positive human cells in the pancreatic islets. Noteworthy is also the presence of human cells in pancreatic ducts. Since islet cell neogenesis is thought to occur in pancreatic ducts (Slack, 1995), it could be speculated that human cells present in pancreatic ducts may undergo differentiation

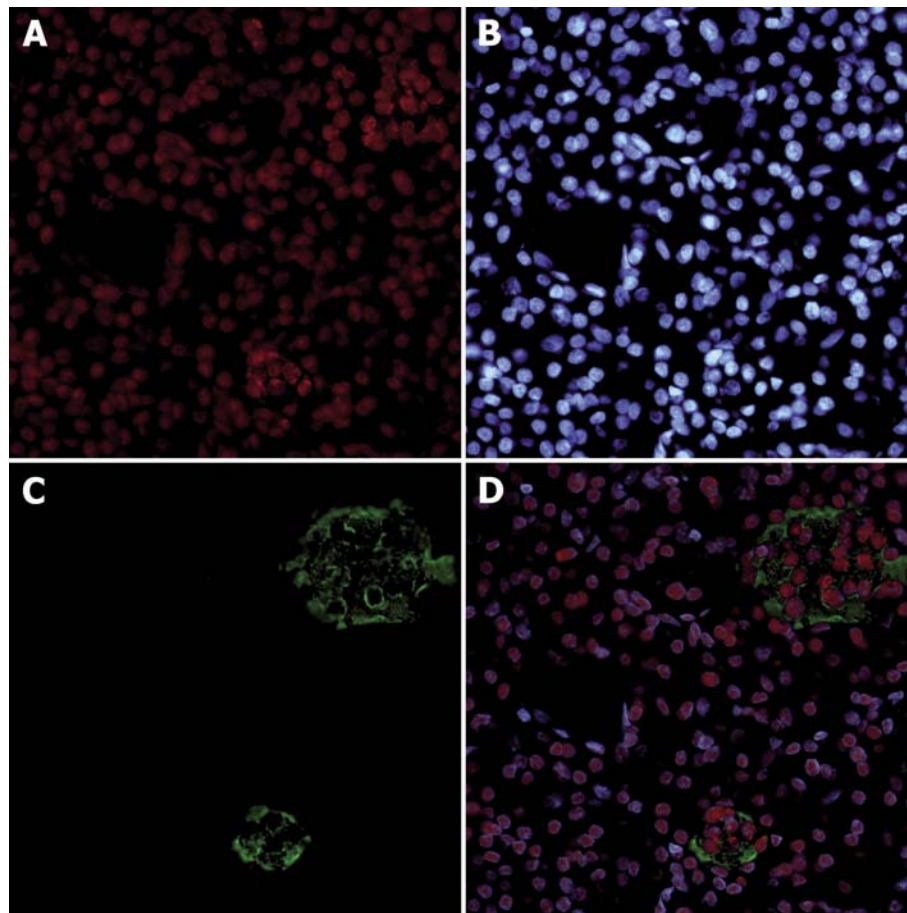


Fig. 4. FISH and immunofluorescence staining of human pancreatic tissue. (A) FISH for human ALU sequence (red), (B) DAPI staining of nuclei (blue), (C) C-peptide immunofluorescence staining (green) and (D) merged images A–C.

into the endocrine cells under the influence of pancreatic ductal niche.

In contrast to the paper of Yoshida et al. (2005), the presence of human insulin-producing cells in the host pancreas and in isolated pancreatic islets was undoubtedly confirmed by specific PCR detection of human insulin mRNA. The lower number of human insulin-positive cells in our study may also be explained by the lower number of transplanted cells. Isolation of HUCB cells from one donor enabled transplantation of 10^7 MNC into 5–10 mouse recipients. Yoshida et al. reported application of 10^7 CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺-depleted MNCs, which represents approximately 35 % of all HUCB MNCs (Pranke et al., 2001). Therefore, we assume that for one mouse recipient they had to use a higher amount of HUCB than we used.

The explanation for successful engraftment and differentiation of HUCB cells in pancreatic tissue after the radiation treatment is not evident from our results. One could speculate that the tissue damage caused by radiation stimulates migration and engraftment of human stem cells into the injured organs. For example, depletion of the host immune system and haematopoietic stem cell pool by radiation-mediated myeloablation led to successful engraftment of donor stem cells in haematopoietic organs (Stewart et al., 1998). The positive ef-

fect of radiation on the engraftment of stem cells and tissue regeneration is not characteristic only for haematopoietic tissue, but also for neural (Marshall et al., 2005) and hepatic tissues (Guha et al., 2001).

Another condition which could have allowed engraftment of human cells is the radiation-mediated myeloablation of the mouse immune system. Depletion of host immune cells caused by myeloablation may have impaired xenograft rejection mediated by the remaining B and NK cells (Yoshino et al., 2000). Although we have no direct evidence how severe the depletion of the mouse immune system caused by irradiation was, we suppose that increasing doses of radiation allowed higher engraftment rate of HUCB cells into haematopoietic tissue with consequent restoration of the impaired immune system. A rather high prevalence of GAPDH-positive cells that we found in the peripheral blood and bone marrow supports this assumption.

An important stimulus for stem cell differentiation into insulin-producing cells might be the diabetes-related hyperglycaemia (Wang et al., 2005). In our study, HUCB administration did not cure or improve streptozotocin-induced experimental diabetes. Previous study conducted by Ende et al. has shown improvement in glycaemia and survival of diabetic mice after the transplantation of HUCB cells (Ende et al., 2004). However,

in their study the dose of HUCB cells was 200×10^6 , 20-fold higher than in our study. In this paper, however, no investigation of insulin-positive human cells had been performed. For further study, a longer time period and milder hyperglycaemia enabling survival will be necessary.

In conclusion, our study confirmed the possibility of human umbilical cord blood mononuclear cells to differentiate into human insulin-producing cells *in vivo*. However, successful differentiation occurred at a rather low rate and required preceding irradiation of the immunodeficient mouse recipient. Further investigation should focus on other potential conditions that might stimulate β -cell differentiation *in vivo* such as hyperglycaemia, administration of incretins, and on identification of the appropriate umbilical cord blood cell type suitable for transplantation.

Acknowledgment

We would like to thank the Department of Gynaecology and Obstetrics of Thomayer University Hospital with Polyclinic in Prague, namely Dr. Tomas Peterka and his colleagues, for collection of umbilical cord blood samples.

References

- Becker, M., Nitsche, A., Neumann, C., Aumann, J., Junghahn, I., Fichtner, I. (2002) Sensitive PCR method for the detection and real-time quantification of human cells in xenotransplantation systems. *Br. J. Cancer* **11**, 1328-1335.
- Berkova, Z., Kriz, J., Girman, P., Zacharovova, K., Koblas, T., Dovolilova, E., Saudek, F. (2005) Vitality of pancreatic islets labeled for magnetic resonance imaging with iron particles. *Transplant. Proc.* **8**, 3496-3498.
- Bonner-Weir, S., Taneja, M., Weir, G. C., Tatarikiewicz, K., Song, K. H., Sharma, A., O'Neil, J. J. (2000) In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7999-8004.
- D'Amour, K. A., Bang, A. G., Eliazar, S., Kelly, O. G., Agulnick, A. D., Smart, N. G., Moorman, M. A., Kroon, E., Carpenter, M. K., Baetge, E. E. (2006) Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **11**, 1392-1401.
- Denner, L., Bodenburg, Y., Zhao, J. G., Howe, M., Cappel, J., Tilton, R. G., Copland, J. A., Forraz, N., McGuckin, C., Urban, R. (2007) Directed engineering of umbilical cord blood stem cells to produce C-peptide and insulin. *Cell Prolif.* **3**, 367-380.
- Ende, N., Chen, R., Reddi, A. S. (2004) Effect of human umbilical cord blood cells on glycemia and insulinitis in type 1 diabetic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 665-669.
- Gao, F., Wu, D. Q., Hu, Y. H., Jin, G. X., Li, G. D., Sun, T. W., Li, F. J. (2008) In vitro cultivation of islet-like cell clusters from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Transl. Res.* **6**, 293-302.
- Guha, C., Deb, N. J., Sappal, B. S., Ghosh, S. S., Roy-Chowdhury, N., Roy-Chowdhury, J. (2001) Amplification of engrafted hepatocytes by preparative manipulation of the host liver. *Artif. Organs* **7**, 522-528.
- Ianus, A., Holz, G. G., Theise, N. D., Hussain, M. A. (2003) In vivo derivation of glucose competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J. Clin. Invest.* **111**, 843-850.
- Ishikawa, F., Livingston, A. G., Wingard, J. R. (2002) An assay for long-term engrafting human hematopoietic cells based on newborn NOD/SCID/ β 2-microglobulin(null) mice. *Exp. Hematol.* **30**, 488-494.
- Kogler, G., Sensken, S., Airey, J. A., Trapp, T., Muschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R. V., Fischer, J., Rosenbaum, C., Greschat, S., Knipper, A., Bender, J., Degistirici, Ö., Gao, J., Caplan, A. I., Colletti, E. J., Almeida-Porada, G., Müller, H. W., Zanjani, E., Wernet, P. (2004) A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J. Exp. Med.* **200**, 123-135.
- Laughlin, M. J., Eapen, M., Rubinstein, P., Wagner, J. E., Zhang, M. J., Champlin, R. E. (2004). Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2265-2275.
- Marshall, G. P. 2nd, Scott, E. W., Zheng, T., Laywell, E. D., Steindler, D. A. (2005) Ionizing radiation enhances the engraftment of transplanted in vitro-derived multipotent astrocytic stem cells. *Stem Cells* **23**, 1276-1285.
- McGuckin, C. P., Forraz, N., Baradez, M. O., Navran, S., Zhao, J., Urban, R., Tilton, R., Denner, L. (2005) Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif.* **38**, 245-255.
- Pranke, P., Failace, R. R., Allebrandt, W. F., Steibel, G., Schmidt, F., Nardi, N. B. (2001) Hematologic and immunophenotypic characterization of human umbilical cord blood. *Acta Haematol.* **2**, 71-76.
- Roche, V., Wagner, J. E., Sobocinski, K. A., Klein, J. P., Zhang, M. J., Horowitz, M. M., Gluckman, E. (2000) Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International bone marrow transplant registry working committee on alternative donor and stem cell sources. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1846-1854.
- Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbitt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., Rajotte, R. V. (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* **343**, 230-238.
- Slack, J. M. (1995) Developmental biology of the pancreas. *Development* **121**, 1569-1580.
- Stewart, F. M., Zhong, S., Wu, J., Hsieh, C., Nilsson, S. K., Quesenberry, P. J. (1998) Lymphohematopoietic engraftment in minimally myeloablated hosts. *Blood* **10**, 3681-3687.
- Sun, B., Roh, K. H., Lee, S. R., Lee, Y. S., Kang, K. S. (2007) Induction of human umbilical cord blood-derived stem cells with embryonic stem cell phenotypes into insulin producing islet-like structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4**, 919-923.
- Tuch, B. E., Casamento, F. M. (1999) Outcome of xenografted fetal porcine pancreatic tissue is superior in inbred scid

- (C.B-17/Icr-scid/scid) compared to outbred nude (CD-1-nu/nu) mice. *Cell Transplant.* **8**, 259-264.
- Wang, G. S., Rosenberg, L., Scott, F. W. (2005) Tubular complexes as a source for islet neogenesis in the pancreas of diabetes-prone BB rats. *Lab. Invest.* **5**, 675-688.
- White, S. A., Shaw, J. A., Sutherland, D. E. (2009) Pancreas transplantation. *Lancet* **9677**, 1808-1817
- Yang, L., Li, S., Hatch, H., Ahrens, K., Cornelius, J. G., Petersen, B. E., Peck, A. B. (2002) In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8078-8083.
- Yoshida, S., Ishikawa, F., Kawano, N., Shimoda, K., Nagafuchi, S., Shimoda, S., Yasukawa, M., Kanemaru, T., Ishibashi, H., Shultz, L. D., Harada, M. (2005) Human cord blood-derived cells generate insulin-producing cells in vivo. *Stem Cells* **9**, 1409-1416.
- Yoshino, H., Ueda, T., Kawahata, M., Kobayashi, K., Ebihara, Y., Manabe, A., Tanaka, R., Ito, M., Asano, S., Nakahata, T., Tsuji, K. (2000) Natural killer cell depletion by anti-asialo GM1 antiserum treatment enhances human hematopoietic stem cell engraftment in NOD/Shi-scid mice. *Bone Marrow Transplant.* **11**, 1211-1216.
- Zhang, L., Hu, J., Hong, T. P., Liu, Y. N., Wu, Y. H., Li, L. S. (2005) Monoclonal side population progenitors isolated from human fetal pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2**, 603-608.