

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Tereza Tejklová**

**Imunogenita indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC)**

**Immunogenicity of induced pluripotent stem cells (iPSC)**

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Karel Drbal, PhD.

Praha, 2018

**Prohlášení:**

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

V Praze dne 8.5.2018

Podpis

**Poděkování:**

Děkuji svému školiteli RNDr. Karlu Drbalovi Ph.D za cenné rady při zpracování mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině a kamarádům za podporu, kterou mi během studia projevíli.

## Abstrakt

Ektopickou expresí vybraných transkripčních faktorů jsme dnes schopní dediferencovat somatické buňky do stádia indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC), které se staly prostředkem pro regenerativní medicínu a personalizované modelování onemocnění včetně diagnostických nástrojů. Unikátní vlastností iPSC je tvorba pacientovi vlastních autologních buněk, které nebudou aktivovat jeho imunitní systém při terapeutickém použití. Ukazuje se však, že imunogenita se nevyhýbá ani těmto autologním iPSC. iPSC typicky exprimují sníženou hladinu MHC glykoproteinů I. třídy a tím přímo aktivují NK buňky přirozené imunity. T buňky, které jsou součástí adaptivní imunitní odpovědi, jsou aktivované po rozpoznání antigenního peptidu nebo MHC I dárce pouze ve spolupráci s kostimulačními signály, které se na iPSC zpravidla neexprimují. Během diferenciaci si iPSC zachovávají epigenetický profil zdrojové buňky, který se projeví abnormální expresí genů buněčných linií. Výsledná imunogenita závisí také na metodě přípravy iPSC, která může narušit genomovou stabilitu buňky. Dalším kritickým faktorem je konkrétní imunitní prostředí místa pro transplantaci a poškození tkáně při podání, které se projeví vylitím „danger associated molecular pattern“ (DAMP), které jsou rozeznány „pattern recognition receptors“ (PRR) na antigen prezentujících buňkách.

**Klíčová slova:** přirozená a adaptivní imunita, imunogenita, kmenová buňka, indukovaná pluripotentní kmenová buňka, buněčná de/diferenciaci

## **Abstract**

Ectopic expression of several transcription factors into the somatic cells allows us to artificially dedifferentiate them into induced pluripotent stem cells (iPSC), which show great promise in regenerative medicine and personalized disease modelling, as well as diagnostic tools. Unique attribute of iPSC is the possibility of creating autologous cells for each patient, which could be used for transplantation without fear of immune rejection. However, cells differentiated from iPSC generally display decreased expression of MHC I glycoproteins, which leads to the activation of NK cells of innate immunity. T cells, the part of adaptive immunity, are activated after recognition of antigen peptide or foreign MHC I glycoproteins only in co-operation with costimulatory molecules, which are not usually expressed on iPSC. During dedifferentiation, cells keep the epigenetic profile of the source cell, which can result in the abnormal expression of genes within derived cell lines. Overall immunogenicity depends on the method of iPSC preparation, with respect to genomic stability. Another important factor is the immune environment of transplantation site as well as the tissue damage caused during transplantation. This results in the presentation of danger signals (DAMPs), which are then recognized by pattern recognition receptors on antigen presenting cells.

**Key words:** innate and adaptive immune responses, immunogenicity, stem cell, induced pluripotent stem cell, cellular de/differentiation

## Seznam použitých zkratek

APC	antigen presenting cell	buňka prezentující antigen
B2M	$\beta$ -2-microglobulin	$\beta$ -2-mikroglobulin
CD	cluster of differentiation	
DAMP	danger associated molecular pattern	
DC	dendritic cell	dendritická buňka
ELISPOT	enzyme linked immuno spot assay	
ESC	embryonic stem cell	embryonální kmenová buňka
HLA	human leukocyte antigen	lidský leukocytární antigen
iPSC	induced pluripotent stem cells	indukovaná pluripotentní kmenová buňka
KIR	killer-cell immunoglobulin-like receptors	
MHC	major histocompatibility complex	hlavní histokompatibilní komplex
NK	natural killer cell	přirozená zabíječská buňka
OSKM	OCT4, SOX2, KLF4, MYC	
PAMP	pathogen associated molecular pattern	
PMBC	peripheral blood mononuclear cells	periferní krevní mononukleární buňky
RLR	RIG-I-like receptors	
PRR	pattern recognition receptor	receptor rozpoznávající patern
RPE	retinal pigment epithelium	retinální pigmentový epitel
SLAM	signalling lymphocyte activating molecule	
TCR	T-cell receptor	T-buněčný receptor
TF	transcription factor	transkripční faktor
TLR	toll-like receptor	

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>1</b>
1.1	Transplantace .....	2
1.2	Imunitní odpověď při odmítnutí štěpu .....	2
1.3	Buněčná diferenciacce .....	3
<b>2</b>	<b>Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC).....</b>	<b>5</b>
2.1	Příprava iPSC .....	5
2.1.1	Integrační metody.....	6
2.1.2	Neintegrační metody .....	6
2.1.2.1	Transflammatce .....	7
<b>3</b>	<b>Imunogenita iPSC .....</b>	<b>10</b>
3.1	Zhodnocení imunogenity iPSC .....	10
3.2	Imunogenita autologních iPSC.....	10
3.3	Potenciální faktory imunogenity .....	15
3.4	Cílové molekuly na iPSC .....	16
3.4.1	Expresce MHC glykoproteinů a proteinů účastnících se antigenní prezentace ...	16
3.4.2	Expresce kostimulačních molekul .....	17
3.4.3	Expresce ligandů receptorů NK buněk .....	19
3.4.4	Expresce CD47 .....	20
3.5	Klinické studie.....	21
<b>4</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>23</b>

# 1 Úvod

Kmenové buňky mají výjimečnou schopnost diferenciaci do různých buněčných typů a zároveň ponechat si schopnost sebeobnovy, která spočívá v asymetrickém dělení. Během jednoho dělení vznikají dvě buňky, jedna kmenová, která si zachovává kmenovost (schopnost plné diferenciaci a sebeobnovy) a druhá dceřiná, která dává vznik konkrétnímu specializovanému buněčnému typu. Největší škálu buněčných typů mohou poskytnout buňky totipotentní, které umožňují vznik buňkám všech tří zárodečných vrstev (endodermu, mezodermu, ektodermu), včetně trofoblastu. Pluripotentní kmenové buňky mohou poskytnout všechny buňky vyjma trofoblastu. Z dospělé kmenové buňky vznikají pouze buňky jednoho orgánu, jsou takzvaně multipotentní. Posledním typem jsou buňky unipotentní, například spermatogonie, ze kterých vznikají buňky jednoho buněčného typu (Jaenisch a Young 2008). Pro schopnost sebeobnovy a možnost vzniku jakéhokoliv buněčného typu se velký potenciál v regenerační medicíně a léčbě neléčitelných chorob připisuje právě pluripotentním kmenovým buňkám.

Ve své bakalářské práci se budu zabývat indukovanými pluripotentními kmenovými buňkami (iPSC) a problematikou jejich autologního využití, tedy otázkou aplikace iPSC stejnému jedinci, ze kterého byly izolované.

iPSC jsou buňky, které byly pomocí indukce ektopicky exprimovaných genů navráceny do pluripotentního stadia s cílem vytvořit autologní transplantát. Teoreticky mají iPSC obrovský potenciál v léčbě degenerativních a autoimunitních onemocnění, jako jsou například makulární degenerace, *diabetes mellitus* prvního typu či Parkinsonova choroba, nebo pro personalizovanou regenerativní medicínu či buněčnou terapii (Brouwer *et al.* 2016; Mora *et al.* 2017). Jejich využití je také výhodné z etického hlediska a může celosvětově nahradit kontroverzní použití embryonálních kmenových buněk. Zavedení iPSC do praxe však brání především konfliktní data a názory na jejich imunogenitu (Zhao *et al.* 2011; Guha *et al.* 2013; Scheiner *et al.* 2014; Wood *et al.* 2016).

Imunitní systém je obecně aktivovaný přítomností signálů nebezpečí (DAMP), které aktivují přirozenou imunitu, a následně rozeznává detailní struktury, které se ve vlastním těle většinou nevyskytují a spouští adaptivní imunitu. Za cizorodé látky jsou přitom považovány struktury, s nimiž se T buňky nesetkaly během vývoje v thymu nebo B buňky během vývoje

v kostní dřeni, nebo látky obsahující univerzální patogenní motivy (PAMP). Takové univerzální antigeny jsou typicky rozeznávány přes povrchové receptory PRR. Na odhojení (rejekci) autotransplantátu buněk odvozených z iPSC se podílí jak přirozená, tak adaptivní imunita. Podílejí se na ní tedy NK buňky (natural killer) a dendritické buňky (DC), které následně aktivují antigen-specifické T a B lymfocyty (Scheiner *et al.* 2014). Imunogenita iPSC je závislá na metodě indukce nebo na stupni diferenciaci transplantovaných buněk a expresi jejich povrchových antigenů (Wood *et al.* 2016; Liu *et al.* 2017).

## 1.1 Transplantace

Výsledek transplantací závisí na původu a genetické shodě dárce a příjemce, především v majoritních a minoritních histokompatibilních genech. Stejně předpokládáme, že i při transplantaci iPSC bude tento vztah klíčový pro výsledek přihojení štěpu transplantovaných buněk. Pokud buňky pochází od geneticky identického dárce (identická dvojčata, inbrední kmeny) nazýváme je syngenní. Jedná-li se o jedince geneticky neidentické, ale téhož živočišného druhu, jde o alogenní buňky, a v případě nepříbuzných jedinců různých druhů buňky xenologní. Můžeme hovořit také o autologii, kdy transplantát pochází přímo z buněk jedinci vlastních. Imunitní reakce proti autologním i alogenním iPSC je závislá na aktivaci přirozené a adaptivní imunity v tomto pořadí (Murphy a Weaver 2016).

## 1.2 Imunitní odpověď při odmítnutí štěpu

Imunitní odpověď je reakce imunitních buněk jednoho jedince na antigeny tkání jiného jedince. To je způsobeno genetickým polymorfismem jedinců téhož druhu, což znamená, že v populaci se vyskytují dvě a více alel pro určitý gen s frekvencí více než 1 % a v důsledku toho se mohou lišit i aminokyseliny příslušných proteinů. Hlavními tkáňově-kompatibilními antigeny zodpovědnými za imunitní odpověď během alogenní transplantace jsou MHC glykoproteiny (MHC gp). Pokud se příjemce a dárce shodují v MHC gp, jsou klíčové další tkáňové antigeny – vedlejší histokompatibilní antigeny. Schopnost vyvolat imunitní odpověď může v podstatě polymorfismus jakéhokoliv genu, který kóduje antigeny s epitopy schopnými se vázat na MHC I a II (Boyd *et al.* 2012).

Na rejekci iPSC se podílejí složky vrozené (NK buňky) a adaptivní imunitní (cytotoxické T lymfocyty) odpovědi. Oba buněčné typy jsou schopny zahubit buňku, kterou považují za potenciálně nebezpečnou, avšak řídí se vlastními aktivačními a inhibičními signály (Yoon *et al.* 2015).

Pokud je peptid-MHC gp dárce a příjemce velmi odlišný, je rozpoznáný receptorem TCR (T cell receptor) T lymfocytů příjemce, a to buď s ohledem na navázaný peptid nebo samotné MHC I. Tyto antigeny jsou odvozeny z polymorfních endogenních (MHC I) a exogenních (MHC II) proteinů, mají rozdílnou sekvenci aminokyselin, jsou rozpoznávány T buňkami a vyvolávají aloimunitní reakci. Aktivace nezkušených cytotoxických T buněk je závislá na dvou signálech. Tím prvním je rozpoznání peptidu prezentovaného v komplexu s MHC I (rozeznáváno TCR za pomoci koreceptoru CD8), druhým je přítomnost kostimulačních molekul (CD80/86) na APC (antigen-presenting cell), které jsou rozeznávány CD28 receptorem na povrchu T buňky. Pro cytotoxické T lymfocyty existuje navíc řada inhibičních molekul, jakými jsou například PD-1 či CTLA-4 (Murphy a Weaver 2016).

V případě NK buněk je k cytotoxické aktivitě nutné převážení aktivačních signálů nad těmi inhibičními, které jsou dominantní u části NK buněk, které se během vývoje setkaly s vlastními MHC I. Nejdůležitější inhibiční dráhu u těchto licencovaných NK buněk přitom zabezpečují KIR proteiny (killer-cell immunoglobulin-like receptor), které jsou receptory pro klasické MHC I molekuly. Aktivita NK buněk je tedy inhibována normální hladinou MHC I buněk s navázanými známými endogenními peptidy. Stimulace aktivačních receptorů nebo inhibice inhibičních způsobí vylití cytotoxických granúl NK buněk, které obsahují perforiny a granzymy (Prf1 a GzmB). Perforin vytváří póry v membráně buňky, dovnitř se tak dostávají granzymy, které následně aktivují kaspázy a vedou k apoptotické buněčné smrti (Yoon *et al.* 2015).

### **1.3 Buněčná diferenciac**

Buněčná diferenciac je spontánní a přirozeně nevratný proces, při kterém dochází vlivem okolních faktorů k vytvoření buněk, jejichž proteom je specializovaný pro plnění určité funkce a pro každý buněčný typ je unikátní a neměnný. iPSC si zachovávají epigenetickou paměť zdrojových buněk (Kim *et al.* 2010). To způsobuje zvýšenou expresi proteinů, které mohou aktivovat nebo inhibovat buňky imunitního systému (*kap. 3.3 - Potenciální faktory imunogenity*). V různých diferenciacních stádiích je imunogenita iPSC různá (Zhao *et al.* 2015).

## **Cíl práce:**

Cílem bakalářské práce je shrnutí současných znalostí o buněčných a molekulárních mechanismech imunitní reakce iPSC, kterou je nutné detailně pochopit pro jejich potenciální budoucí terapeutickou aplikaci.

## 2 Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC)

Příprava iPSC se poprvé zdařila dvojici Yamanaka a Takahashi v roce 2006 na myším modelu. Toho docílili výběrem 24 kandidátních genů s potenciálem indukovat pluripotenci v dospělých somatických buňkách, konkrétně v myších fibroblastech. Eliminační metodou vyselekovali čtyři geny jejichž použití navodí pluripotentní kmenový fenotyp buněk. Konkrétně se jedná o kombinace genů *POU5F1* (*OCT3/4*), *SOX2*, *MYC* (*c-Myc*) a *KLF4* (*Klf4*) označované zkratkou OSKM (Takahashi a Yamanaka 2006). Klíčové pro dediferenciaci jsou transkripční faktory Oct3/4, Sox2 a Klf4, zatímco ostatní faktory c-Myc, *MYCL* (l-Myc) a *LIN28A* (Lin-28) jsou pouze doplňující pro zvýšení efektivity (Schmidt a Plath 2012). V roce 2012 obdrželi Shinya Yamanaka spolu s Johnem B. Gurdonem Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství za přínos ve výzkumu indukovaných pluripotentních kmenových buněk.

V roce 2007 použil Okita a kol. pro selekci vhodných iPSC z myších fibroblastů protein NANOG. Vytvořil tak iPSC, které mají podobné vlastnosti jako embryonální kmenové buňky (ESC), a to stejnou diferenační aktivitu, proliferační vlastnosti, morfologii, genovou expresi a schopnost tvorby teratomů, což je útvar složený z buněk všech tří zárodečných vrstev (Okita *et al.* 2007). Stejnou kombinací transkripčních faktorů byly vytvořeny také plně funkční iPSC z lidských dospělých fibroblastů (Takahashi *et al.* 2007).

Jedním z největších úskalí dediferenciace somatických buněk na iPSC je nebezpečí reaktivace tumorigenního potenciálu transgenu *MYC* (*c-MYC*) vkládaného do genomu buňky, jelikož se jedná o transkripční faktor, který je univerzálním aktivátorem genové exprese, ovlivňuje buněčný cyklus a apoptózu a je proto potenciálním protoonkogenem (Dang *et al.* 2006, [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org), 2018, online). Yu a kol. proto připravili iPSC kombinací genů *POU5F1*, *SRY-box 2*, *NANOG* a *LIN28A* bez přítomnosti *MYC*, bez výrazných rozdílů v efektivitě ve srovnání s Yamanakovými buňkami (Yu *et al.* 2007; Takahashi a Yamanaka 2006).

### 2.1 Příprava iPSC

Pro přípravu iPSC byla již využita široká škála buněčných typů. Dle Raab a kol. například fibroblasty, krevní buňky, buňky moči, keratinocyty, hepatocyty, mezenchymální buňky a další (Raab *et al.* 2014). V současné době se nejčastěji využívají fibroblasty, které jsou snadno dostupné a lehce se izolují a kultivují. Mezi jejich nevýhody však patří nízká účinnost přeprogramování a invazivita při biopsii kůže. Kromě fibroblastů jsou hojně využívány také

krevní buňky (periferní mononukleární buňky), které se filtrují z krve (El Hokayem *et al.* 2016).

Účinnost přeprogramování, imunogenní a tumorigenní potenciál a kvalita výsledných indukovaných pluripotentních buněk, závisí mimo jiné na způsobu vnesení transkripčních faktorů do buňky, které můžeme dělit na integrační a neintegrační. Neintegrační metody jsou považovány za bezpečnější (Miura *et al.* 2009), oproti použití integračních metod, které zahrnují použití virových vektorů a mohou vyvolat zvýšenou imunogenitu v důsledku integrace viru do genomu hostitele (Morizane *et al.* 2013). Názory se však různí, například Almeida a kol. popírá závislost imunogenity iPSC na způsobu přenosu (Almeida *et al.* 2014), zatímco ve studii Zhaa a kol. 10 – 20 % epizomálně připravených iPSC a téměř všechny retrovirem připravené iPSC byly příjemcem odmítnuty (Zhao *et al.* 2011). Pozitiva a negativa jednotlivých aplikací jsou shrnuta v tabulce 1.

### **2.1.1 Integrační metody**

Mezi integrační metody indukce dediferenciace řadíme užití retrovirů či lentivirů, jejichž mechanismus vnesení transkripčních faktorů vyžaduje integraci vektoru do genomu hostitelské buňky. Mezi výhody užití integračních metod patří snadná manipulace, univerzálnost cílených buněk, efektivnost dopravení transkripčních faktorů a relativně vysoká účinnost dediferenciace. Lentiviry jsou na rozdíl od retrovirů schopny infikovat také nedělící se buňky (Takahashi a Yamanaka 2006; Sommer *et al.* 2009). Další výhodou je využití polycistronních virových vektorů, které nesou všechny 4 faktory dohromady na jedné kazetě, u kterých nedochází k opakované integraci virových částic, čímž je sníženo riziko genomových mutací v iPSC (Sommer *et al.* 2009). Nevýhodou užití virových vektorů je často trvalá aktivita OSKM faktorů po integraci. Ta se dá v současnosti vypnout užitím loxP-Cre systému, kdy je vnesením specifických loxP míst do transgenů umožněno jejich následné vystřížení Cre rekombinázou (Soldner *et al.* 2009; Kadari *et al.* 2014). Imunitní odpověď může vyvolat i samotný vstup viru do buňky a jeho integrace do genomu může podmínit nádorovou transformaci (Lee *et al.* 2013).

### **2.1.2 Neintegrační metody**

Mezi neintegrační metody indukce dediferenciace řadíme viry a biopolymery, jejichž užití nevyžaduje integraci do genomu hostitele, které jsou z hlediska bezpečnosti preferované. Mezi takové metody patří Sendai viry, adenoviry, epizomální exprese mRNA molekul či přenos samotných proteinů přes plazmatickou membránu (Fusaki *et al.* 2009; Stadtfeld *et al.*

2008; Warren *et al.* 2010; Zhou *et al.* 2009). Neintegrační metody mají řadu výhod a nevýhod. Užití virů umožňuje jednoduchou manipulaci na úkor nízké účinnosti, naopak užití mRNA či proteinů je relativně účinnější, avšak mnohem náročnější.

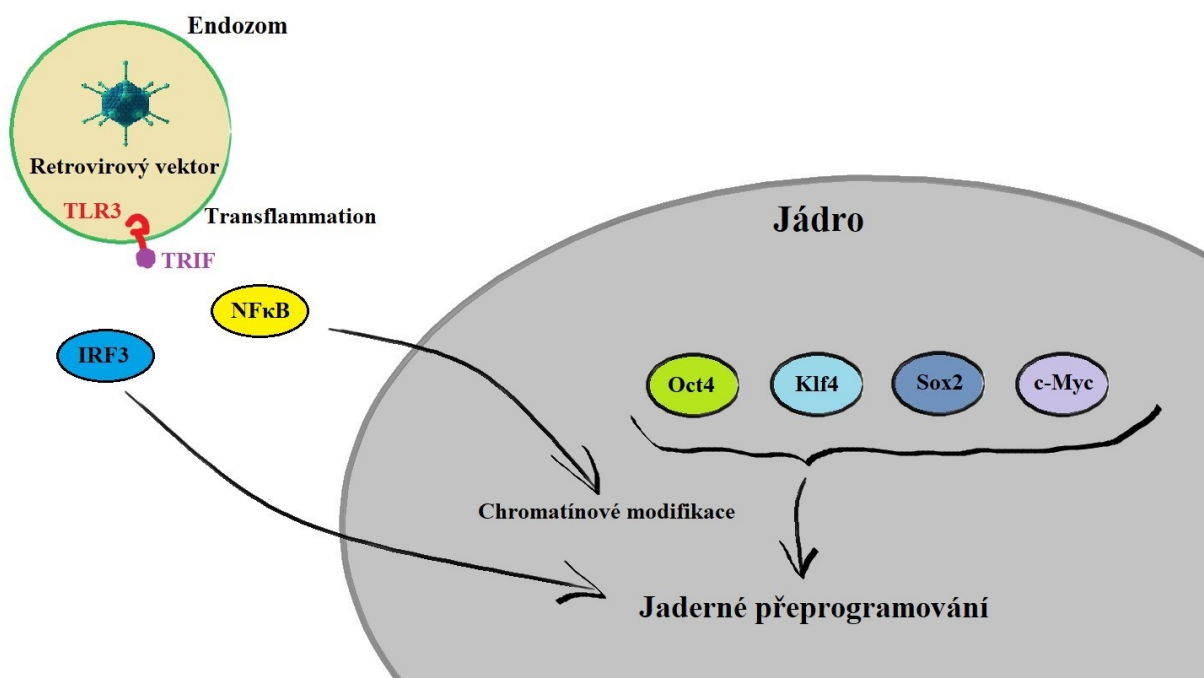
Přeprogramováním iPSC buněk pomocí proteinů se jako první zabývali Zhou a kol. a Cho a kol. v letech 2009 a 2010. Zhou a kol. použili rekombinantní proteiny exprimované v bakterii *E. coli*, které byly upraveny tak, že na C-konci transkripčních faktorů Oct4, Sox2, Klf4 a c-Myc měly přidanou polyargininovou doménu (11R), která jim umožnila proniknout plazmatickou membránou do cílových buněk (Zhou *et al.* 2009). Cho a kol. využili k přeprogramování buněk směs reprogramujících transkripčních faktorů pocházejících z ESC, které vnesli do diferencované somatické buňky permeabilizované *streptolysin O* (Cho *et al.* 2010).

Dle novějších studií lze pluripotenci dosáhnout nejen vnesením Yamanakových transkripčních faktorů (OSKM), ale i působením chemických sloučenin s molekulovou hmotností menší než 900 Da. Mezi tyto jsou řazeny látky histon deacetyláza (HDAC) a kyselina valproová (VPA), které nahradily účinek TF c-Myc a Klf-4 (Huangfu *et al.* 2008), a jejich účinnost byla 100× vyšší oproti Yamanakovi a kol. V současné době lze nahradit dokonce všechny TF použitím sedmi malých molekul konkrétně VC6TFZ, k. valproová, CHIR99021, kinázový inhibitor TGF- $\beta$  RI II, Tranylcypromin, Forskolinn, 2-methyl-5-hydroxytryptamin a D4476 (Hou *et al.* 2013).

I přes stále novější metody dediferenciace konkrétních buněčných typů není tento proces globálně optimalizován, a tak se velmi často využívají virové metody s použitím transkripčních faktorů (Kamao *et al.* 2014; Hallett *et al.* 2015; Kim *et al.* 2017).

### **2.1.2.1 Transflammation**

Retroviry použité pro indukci pluripotence v buňce spouští reakci přirozené imunity, která napomáhá rozvolnění chromatinu, čímž je usnadněna vazba TF na příslušné geny. Tato reakce se nazývá *transflammation* a jedná se o protizánětlivou signalizaci spouštěnou receptorem TLR3, který reaguje na přítomnost virové dsRNA v endozómech. TLR3 aktivuje transkripční faktory NF- $\kappa$ B a IRF3, které se v jádře podílejí na remodelaci chromatinu pomocí změny v epigenetických modifikátorech. Výsledkem je jeho rozvolnění a usnadnění přístupu vnášených TF na cílové geny (obr. č. 1). Z tohoto důvodu je použití virových metod účinnější (Lee *et al.* 2012).



**Obrázek č. 1: Schéma průběhu procesu „transflammation“** – Receptor TLR3 aktivuje transkripční faktory  $\text{NF-}\kappa\beta$  a IRF3 přes adaptorovou molekulu TRIF.  $\text{NF-}\kappa\beta$  se účastní indukce histonacetyltransferáz a histonmethyltransferáz. Výsledkem je snížení methylace histonu H3K9, která kromě jiného umlčuje promotor genu OCT4, a naopak zvýšení metylace histonu H3K4. Upraveno podle (Lee *et al.* 2012).

Bylo zjištěno, že podobnou imunitní odpověď v buňkách vyvolávají dvouřetězcové oligonukleotidy tvořené inosinem a cytosinem nazývané poly I:C, které jsou syntetickým agonistou receptoru TLR3. Jejich použití společně s metodou indukce pluripotence pomocí rekombinantních proteinů potenciálně zvyšuje účinnost nevirových metod přeprogramování a zároveň snižuje riziko virové infekce, které se pojí s použitím virových metod (Lee *et al.* 2012).

Zvýšení účinnosti přeprogramování bylo zjištěno také po stimulaci RLR (RIG-I-like) receptorů, které patří do rodiny PRR receptorů a reagují na jednořetězcovou a dvouřetězcovou RNA. Počáteční signalizace je sice zprostředkována jiným mechanismem, ale vede k aktivaci stejných TF  $\text{NF-}\kappa\beta$  a IRF3. Výsledkem je opět rozvolnění chromatinu vhodné pro nasednutí transkripčních faktorů (Sayed *et al.* 2017). Procentuální zvýšení účinnosti přeprogramování nebylo vyjádřeno.

**Tabulka 1: Shrnutí integračních a neintegračních metod pro přeprogramování iPSC**

Vektor	Účinná látka	Geny	Účinnost	Integrativní	Plusy	Mínusy	Reference
<b>Retrovirus</b>		OSKM	0,001 - 1 %	ANO	Poměrně efektivní, jednoduché	Začlenění do genomu, možná reaktivace virových genů	(Takahashi a Yamanaka 2006)
<b>Lentivirus</b>		OSKM	0,1 - 1 %	ANO	Velmi efektivní	Začlenění do genomu, možná reaktivace virových genů	(Sommer <i>et al.</i> 2009)
<b>Adenovirus</b>		OSKM	0,001 %	NE	Nezačleňuje se do genomu	Nízká účinnost, nepoužitelné pro lidské buňky	(Stadtfeld <i>et al.</i> 2008)
<b>Sendai virus</b>		OSKM	0,1 %	NE	Nezačleňuje se do genomu	Nízká účinnost, možná reaktivace virových genů	(Fusaki <i>et al.</i> 2009)
	<b>mRNA</b>	OSKM, Lin28	4,4 %	NE	Nezačleňuje se do genomu, vysoká účinnost	Náročná metoda	(Warren <i>et al.</i> 2010)
	<b>miRNA</b>	OSMK	10 %	NE	Vysoká účinnost	Přenesení na virovém vektoru	(Anokye-Danso <i>et al.</i> 2011)
	<b>Proteiny</b>	OSMK	0,01 %	NE	Žádné genetické modifikace	Nízká účinnost, stabilita rekombinantních proteinů	(Zhang <i>et al.</i> 2012)

## 3 Imunogenita iPSC

### 3.1 Zhodnocení imunogenity iPSC

Imunogenita iPSC je hodnocena na základě *in vitro* i *in vivo* testů. *In vitro* testy jsou založeny na sledování imunitní odpovědi hostitelských T buněk a řadíme mezi ně směsnou lymfocytární reakci (MLR), použití fluorescenčního barviva *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE) a *enzyme linked immuno spot assay* (ELISPOT). Nejprísnějším kritériem zhodnocení imunogenity jsou testy *in vivo*, konkrétně transplantace buněk příjemci a sledování funkčnosti orgánu, nebo detekce infiltrátu T buněk v místě štěpu (Scheiner *et al.* 2014).

Při MLR se zjišťuje aloreaktivita T lymfocytů smísením lymfocytů dárce a příjemce. Pokud T lymfocyt rozpozná alogenní peptid-MHC aktivuje se a dále proliferuje (Weksler *et al.* 1981).

Fluorescenční barvivo CFSE po přidání difunduje do buňky během proliferace a označí všechny proteiny, což díky měnící se intenzitě fluorescence umožňuje pozorovat buněčné dělení, případně lokalizaci a migraci lymfocytů *in vivo* (Mannering *et al.* 2003).

Metoda ELISPOT se užívá k detekci a kvantifikaci buněk schopných sekrece cytokinů a protilátek na úrovni jednotlivých buněk. Jedná se o extrémně citlivou metodu spočívající v zachycení sekretovaného produktu na specifických protilátkách v jamkách a následné fluorescenční detekci (Czerkinsky *et al.* 1983).

### 3.2 Imunogenita autologních iPSC

Jak již bylo řečeno, aplikace iPSC teoreticky představuje neomezenou zásobu autologních transplantátů v biobankách, avšak jejich reálnému využití v praxi brání jejich schopnost vyvolat imunitní reakci s mnoha konfliktními názory publikovanými v minulých letech.

Pohled na imunogenitu iPSC se v průběhu let kontinuálně měnil od jejich úspěšné přípravy v roce 2006 až do současnosti. Prvním, kdo zpochybnil toleranci štěpu buněk odvozených z iPSC byl Zhao v roce 2011, který poukázal na imunitní rejekci syngenního štěpu (transplantát buněk z geneticky identického jedince) u inbredních C57/B16 myši. Dceřiné buňky byly odmítnuty imunitním systémem u syngenních příjemců a vytvořily v 80 % teratom, který vykazoval vysokou infiltraci T buněk (56. den téměř ve 100 %) a masivní nekrózu. Nedostatkem této studie však bylo zaměření na jedinou linii iPSC (Zhao *et al.* 2011).

Na závěry Zhaa a kol. přímo navázala studie Arakiho v roce 2013, která srovnala imunogenitu 7 linií diferencovaných autologních iPSC s 5 liniemi syngenních ESC. Terminálně diferencované iPSC a ESC na buňky kůže a kostní dřeně přežily s úspěšností 98,3 % u iPSC a 92,5 % u ESC a to až dva měsíce po transplantaci. Závěrem této studie tedy můžeme říci, že terminálně diferencované autologní iPSC ani syngenní ESC nevyvolávají imunitní reakci, a to bez rozdílu (Araki *et al.* 2013). Závěry Zhaa a kol. vyvrací také Guha a kol., který tvrdí, že v případě štěpů transplantovaných alogenním myším byly diferencované i nediferencované iPSC a ESC odmítnuty. U myši syngenních naopak prospívaly, nebyly odmítnuty, ale tvořily teratomy, které poukazují na jejich tumorigenní potenciál, který je další překážkou v jejich klinickém využití (Guha *et al.* 2013).

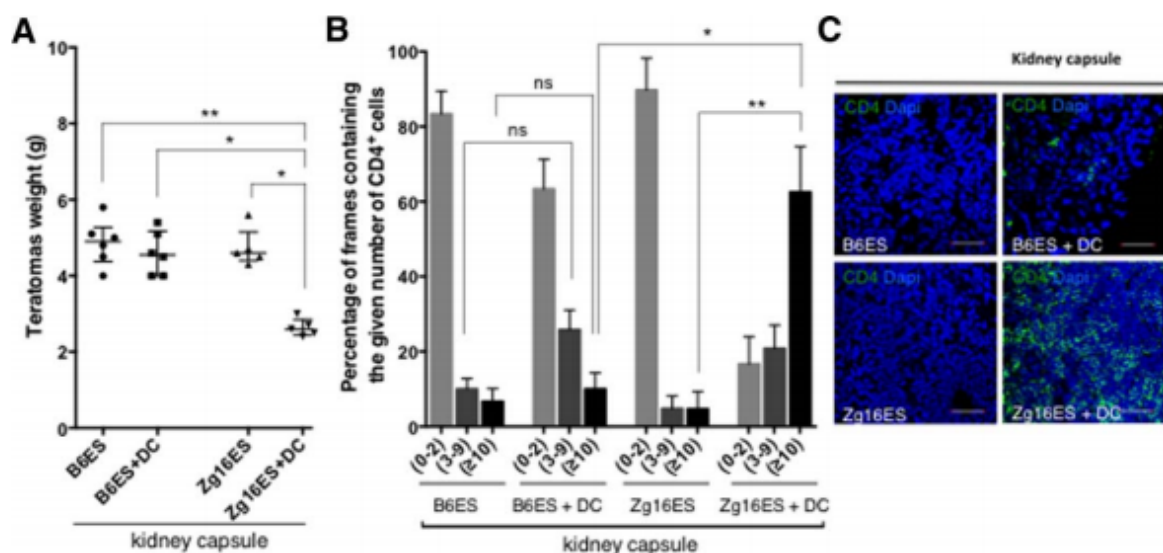
Imunogenitou autologních a alogenních diferencovaných iPSC se zabýval také Morizane a kol., který *in vitro* připravené nervové buňky, konkrétně dopaminergní neurony, zavedl do mozku makaků. Autologní přeživaly bez imunosuprese, naopak alogenní buňky vykazovaly vyšší infiltraci T buněk a to hlavně 2–3 měsíce po transplantaci (Morizane *et al.* 2013).

Almeida a kol. naopak poukazuje na imunitní T buněčnou rejekci nediferencovaných iPSC a přijetí autologních diferencovaných iPSC v buňkách endotelu. Tyto buňky vykazovaly reakce vlastní tolerance, kterou potvrzuje zvýšená expresí 19 genů, například IL-10 a TGF- $\beta$  působících protizánětlivě. Naopak autologní nediferencované iPSC byly odmítnuty a docházelo k lymfocytární infiltraci doprovázené expresí interferonu- $\gamma$  a cytotoxických faktorů (granzym-B a perforin) (Almeida *et al.* 2014). Studie tedy podporuje závěry Zhaa a kol. o odmítnutí autologních nediferencovaných iPSC.

V roce 2015 potvrdil Zhao svou předešlou teorii o imunogenitě nediferencovaných iPSC. Po syngenní transplantaci nediferencovaných iPSC do humanizované myši (původně imunodeficientní myš, která má transplantovaný plně funkční lidský imunitní systém) došlo v těchto myších k rozvoji teratomů, které obsahovaly místa s vysokým infiltrátem T lymfocytů, což potvrzuje jejich vysokou imunogenitu. Jelikož však byla infiltrace T lymfocytů do teratomu heterogenní, lze předpokládat, že buňky obsažené v teratomu mají různou úroveň imunogenity. Ta souvisí také s buněčným typem vkládaných diferencovaných buněk, protože po transplantaci buněk diferencovaných na buňky hladkého svalstva docházelo v myši k masivnímu odmítnutí, zatímco buňky diferencované na buňky retinálního pigmentového epitelu (RPE) byly tolerovány (Zhao *et al.* 2015).

Rozdílné výsledky výše zmíněných studií vysvětluje Todorova a kol., která provedla transplantaci stejných buněk subkutánně, intramuskulárně a pod ledvinové pouzdro. Tím dokázala, že iPSC a jejich deriváty mají odlišnou imunogenitu v závislosti na imunitním prostředí a místě transplantace, jelikož buňky odvozené z iPSC B6 myši transplantované pod ledvinové pouzdro, na rozdíl od ostatních míst, nevykazovaly imunogenní charakter (Guha *et al.* 2013; Todorova *et al.* 2016). Experiment, při kterém byly současně s iPSC transplantovány pod ledvinové pouzdro DC buňky, došlo k odmítnutí štěpu. Z toho vyplývá, že snížená imunogenita iPSC souvisí s absencí funkčních APC v tomto místě (obr. č. 2) (Todorova *et al.* 2016).

Rozdílná imunitní odpověď může být také způsobena rozdílným poškozením tkáně při samotném podání štěpu. Při invazivní transplantaci dochází k fyzickému narušení integrity tkáně a k vystavení DAMP (Wood *et al.* 2016).



**Obrázek č. 2: Velikost a infiltrát teratomů vzniklých po transplantaci iPSC pod ledvinové pouzdro. A** Závislost velikosti nádoru na přítomnosti DC. **B** Podíl náhodně vybraných ploch obsahujících CD4+ buňky ze skupin iPSC s nebo bez DC. **C** Imunofluorescenční barvení řezu nádoru. Horní snímek, zeleně CD4+ T buňky; spodní snímek, zeleně DC, červeně CD4+ buňky; měřítko 50  $\mu$ m. Převzato z (Todorova *et al.* 2016).

V lidském těle jsou místa, která jsou imunitně privilegovaná (gonády, oko, chrupavka, mozek atd.). Tato místa nejsou tolik vaskularizovaná, tudíž jsou částečně chráněna před imunitními buňkami, nebo jsou polarizovaná na Th2 typ imunitní odpovědi. V případě transplantace diferencovaných iPSC do těchto míst nedochází k imunitní rejekci, a to ani v případě alogenní transplantace (Kimura *et al.* 2016).

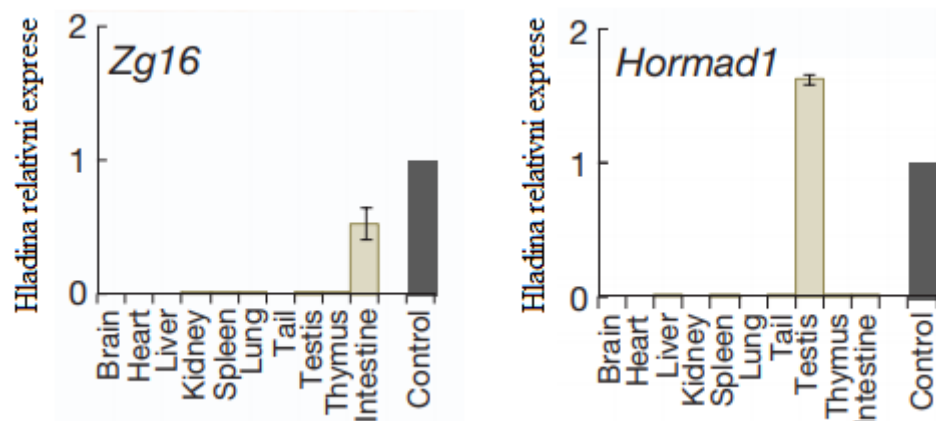
Pro klinické využití iPSC je zásadní zhodnocení imunogenity diferencovaných buněk, které budou připraveny *in vitro* a následně transplantovány příjemci. V následujících studiích byly diferencované iPSC odmítnuty pouze v případě buněk hladké svaloviny (tabulka 2).

**Tabulka 2: Shrnutí imunogenity nediferencovaných a diferencovaných autologních iPSC**

Studie	Způsob reprogramace	Původ iPSC	Místo transplantace	Diferenční stav	Výsledek transplantace
(Guha <i>et al.</i> 2013)	lentivirus STEMCCA epizomální vektor Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	fibroblasty z ocasu myši	ledvinové pouzdro	<b>NEDIFERENCOVANÉ</b>	tolerovány
(Guha <i>et al.</i> 2013)	lentivirus STEMCCA Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	fibroblasty z ocasu myši	ledvinové pouzdro	endoteliální buňky hepatocyty neuronální buňky	tolerovány
(Almeida <i>et al.</i> 2014)	nevirové minicircle, lentivirus Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	fibroblasty z ocasu myši	intramuskulárně subkutánně	<b>NEDIFERENCOVANÉ</b>	<b>odmítnuty</b>
(Almeida <i>et al.</i> 2014)	nevirové minicircle, lentivirus Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	fibroblasty z ocasu myši	subkutánně	CD144 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> buňky endotelu	tolerovány
(Araki <i>et al.</i> 2013)	pCX-OKS-2A a pCXc-Myc plasmid	kůže chimerické myši kostní dřev chimerické myši	záda recipientní myši ocasní žíla	<b>NEDIFERENCOVANÉ</b>	tolerovány
(Araki <i>et al.</i> 2013)	pCX-OKS-2A a pCXc-Myc plasmid Oct4, Sox2, Klf4, Myc	C57BL/6 myš	záda recipientní myši ocasní žíla	buňky kůže buňky kostní dřevě	tolerovány
(Morizane <i>et al.</i> 2013)	retrovirus - Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28 plazmidy - Oct4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28, shRNA pro TP53 a EBNA1	fibroblasty z dutiny ústní (opice) buňky periferní krve (opice)	mozek (putamen)	<b>NEDIFERENCOVANÉ</b>	tolerovány
(Morizane <i>et al.</i> 2013)	retrovirus - Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28 plazmidy - Oct4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28, shRNA pro TP53 a EBNA1	fibroblasty z dutiny ústní (opice) buňky periferní krve (opice)	mozek (putamen)	dopaminergní neurony	tolerovány
(Doi <i>et al.</i> 2014)	Episomálně Oct3/4, Sox2, Klf4, L-myc, Lin28, Glis1	404C2 a 836B3 lidské iPSC	mozek (putamen)	progeny dopaminergních neuronů	tolerovány
(Hallett <i>et al.</i> 2015)	retrovirus Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	kožní fibroblasty makaka	mozek (putamen)	dopaminergní neurony	tolerovány
(Kamao <i>et al.</i> 2014)	retrovirus, Sendai virus Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4	lidské dospělé dermální fibroblasty	subretinální prostor oka	retinální pigmentový epitel	tolerovány
(Sun <i>et al.</i> 2015)	retrovirus, Sendai virus Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4	lidské dospělé dermální fibroblasty	subretinální prostor oka	retinální pigmentový epitel	tolerovány
(Zhao <i>et al.</i> 2011)	retrovirus, epizomálně Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4	myši embryonální fibroblasty	subkutánně	<b>NEDIFERENCOVANÉ</b>	<b>odmítnuty</b>
(Zhao <i>et al.</i> 2015)	Episomálně Oct4, Sox2, Nanog, Lin28	myši fibroblast	kosterní sval kosterní sval, oko	buňky hladké svaloviny pigmentový epitel sítnice	<b>odmítnuty</b> tolerovány
(Kim <i>et al.</i> 2017)	lentivirus	myši embryonální fibroblasty	subkutánně	<b>NEDIFERENCOVANÉ</b>	<b>odmítnuty</b>

### 3.3 Potenciální faktory imunogenity

Když Zhao v roce 2011 jako první poukázal na imunogenitu autologních iPSC v C57/B16 myších, odhalil na základě genové analýzy několik genů, které by mohly hrát roli v indukci T buněčné odpovědi (Zhao *et al.* 2011). Jako zodpovědné za aktivaci T lymfocytů z nich byly vybrány produkty genů *HORMAD1* a *ZG16*. Gen *HORMAD1* se účastní organizace chromatinu a pokud je vystaven na povrchu buňky může být imunogenní, zatímco funkce *ZG16* zatím není zcela známá (www.genecards.org, 2018, online). Tento názor zůstává kontroverzní, protože navazující studie tyto výsledky jednoznačně nepotvrzují. Araki a kol. a Guha a kol. nedetekovali infiltraci T lymfocytů ani zvýšenou expresi genů *ZG16* a *HORMAD1*, ale poukázali na rozdílnou hladinu jejich exprese v různých tkáních (obr. č. 3) (Araki *et al.* 2013; Guha *et al.* 2013).



**Obrázek č. 3: Rozdílná exprese genů ZG16 a HORMAD1 v různých tkáních odvozených od iPSC. Převzato z (Araki *et al.* 2013).**

V roce 2015 Zhao opět pozoroval imunogenní potenciál nediferencovaných a diferencovaných iPSC. Imunitní odpověď byla rozdílná v případě dvou typů diferencovaných tkání, konkrétně k ní docházelo v případě hladké svaloviny a nedocházelo v případě RPE. Analýza genové exprese těchto diferencovaných linií byla v 90 % ve shodě, avšak u buněk hladké svaloviny byla opět pozorována zvýšená exprese *ZG16* a *HORMAD1*. Tím podpořil teorii, že imunitní rejekce štěpu může být způsobena nadměrnou expresí *ZG16* a *HORMAD1* (Zhao *et al.* 2015).

### 3.4 Cílové molekuly na iPSC

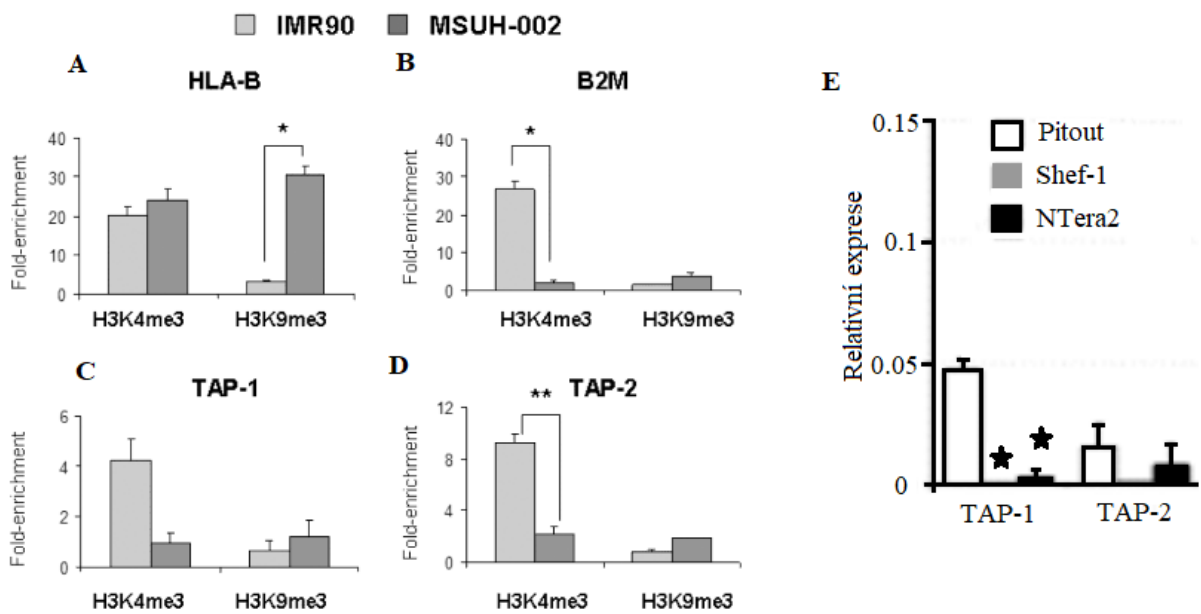
Imunitní odpověď proti iPSC je zprostředkována složkami vrozené i adaptivní imunity, aktivace kterých je typicky závislá na řadě povrchových či sekretovaných spouštěčů, kterými jsou především MHC gp a kostimulační molekuly (*kap. 1.2. Imunitní odpověď při odmítnutí štěpu*).

#### 3.4.1 Exprese MHC glykoproteinů a proteinů účastnících se antigenní prezentace

Jedna z největších imunitních překážek během transplantace je rozdíl v MHC gp, u lidí označovaných HLA. Tento problém však teoreticky odpadá v případě autologních transplantátů, ačkoliv snížená hladina MHC I působí aktivačně na část NK buněk.

iPSC exprimují celkově nižší množství MHC antigenů. Díky tomu nejsou rozpoznávané T buňkami, jelikož nejsou schopny sloužit jako APC, ale mohou aktivovat NK buňky (Suárez-Álvarez *et al.* 2010; Pick *et al.* 2012). Hladina exprese MHC glykoproteinů se však zvýší po buněčné diferenciaci, minimálně v případě retinálního epitelu (Kamao *et al.* 2014).

Snížená exprese MHC I u iPSC koreluje se sníženou expresí genů *TAP1* a *TAP2*, které jsou zásadní pro transport endogenních peptidů z cytoplazmy do endoplasmatického retikula, kde dochází k jejich navázání na MHC I a prezentaci na povrchu buňky (obr. č. 4). Důvodem snížené exprese *TAP1* a *TAP2* je demethylace histonu H3K4me3, díky čemuž dochází ke snížené transkripci genů pro proteiny účastnící se antigenní prezentace (obr. č. 4, obr. č. 6) (Suárez-Álvarez *et al.* 2010; Kruse *et al.* 2015).



**Obrázek č. 4: Snížená hladina proteinů účastnících se zpracování a prezentace antigenů - A, B, C, D** Rozdíly v metylaci histonů v oblasti genů pro HLA-B,  $\beta$ -2-mikroglobulin a přenašeče TAP-1 a TAP-2 mezi lidskými fibroblasty a iPSC. **E** Relativní exprese transportérů antigenních peptidů TAP-1/TAP-2. Data získána qPCR.

Pitout – lymfoblast; SHEF-1 - lidské ESC; NTera2 - linie teratokarcinomu; IMR90 - lidské fibroblasty; MSUH-002 - indukované pluripotentní kmenové buňky. Převzato z (Suárez-Álvarez *et al.* 2010).

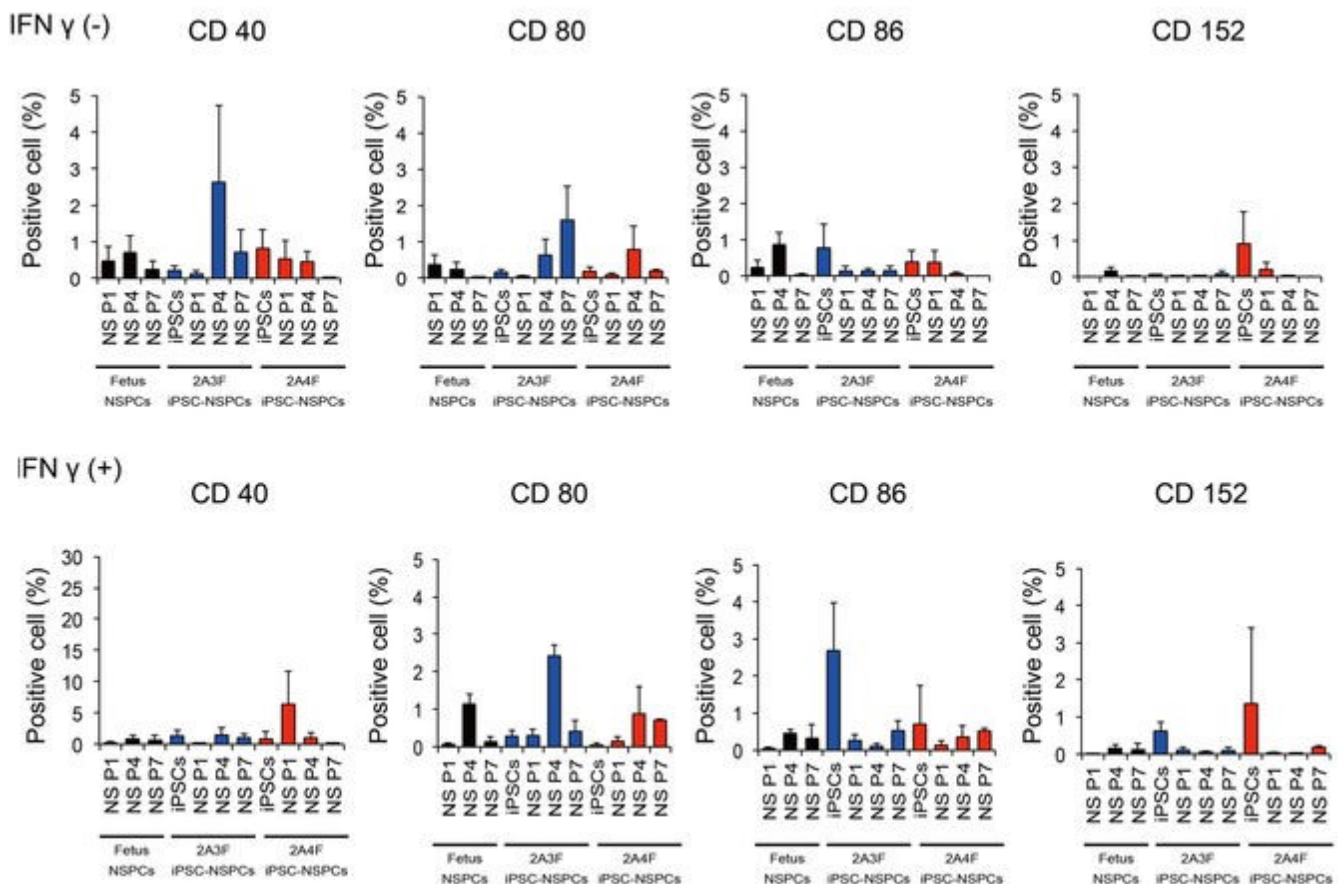
Snížené množství MHC-I v nediferencovaných lidských iPSC bylo prokázáno také ve studii Chen a kol. 2015. Studie uvádí 2–7 $\times$  nižší množství MHC I v nediferencovaných iPSC než v buňkách somatických. Během spontánní diferenciace *in vitro* se hladina MHC I zvyšuje, ale stále je nižší v porovnání se somatickými buňkami (Chen *et al.* 2015). Nízkou hladinu MHC I u iPSC oproti kontrolním syngenním splenocytům potvrdil také Gao a kol. (Gao *et al.* 2016).

### 3.4.2 Expresa kostimulačních molekul

Pouze rozpoznání MHC molekul T lymfocyty nestačí k vyvolání kompletní imunitní odpovědi. Antigenní prezentace na MHC komplexech vyžaduje pomoc několika kostimulačních molekul, zejména CD80 a CD86 na povrchu antigen prezentujících buněk. Jednou z příčin imunogenity iPSC by tedy mohla být přítomnost těchto kostimulačních molekul přímo na jejich povrchu.

Prítomnosť CD80 a CD86 na iPSC však nebola prokázána ani po stimulácii  $IFN\gamma$ , ktorý se používa k simulácii zánětlivého prostredia (Lu *et al.* 2014), avšak během *in vitro* diferenciácie se procento těchto buněk exprimujících CD80, CD86 a CD11c, který je markerem DC buněk, po stimulaci prozánětlivým cytokinem  $INF-\gamma$  zvyšuje (obr. č. 5) (Itakura *et al.* 2017). S tímto pozorováním však nesouhlasí Kim a kol., který nepozoroval expresi kostimulačních molekul CD80/86 za normálních podmínek, ani po stimulaci  $INF-\gamma$  (Kim *et al.* 2013). Stejně závěry přinesl Chen a kol., který potvrdil nízkou expresi CD80/86 a CD11c na iPSC (CD11c 2,2 – 2,9 %, CD80 0,3 – 0,8 %, CD86 1,3 – 3,1 %) (Chen *et al.* 2015).

Další způsob k vyvolání imunitní odpovědi za pomoci kostimulačních molekul je produkce a vystavení/sekrece DAMP na povrchu iPSC, na které se vážou PRR receptory APC, které poté reagují zvýšenou expresí kostimulačních molekul.



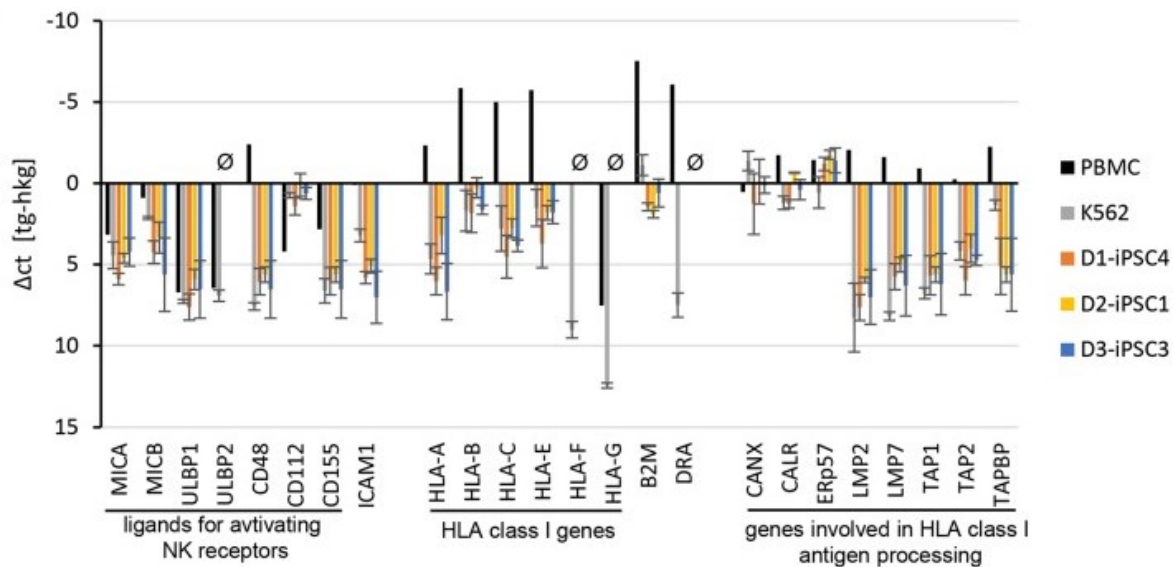
**Obrázek č. 5: Relativní exprese kostimulačních molekul CD40, CD80, CD86 a CTLA-4 (CD152) před a po stimulaci  $IFN-\gamma$ .**

Fetus NSPCs - fetální neurální kmenové buňky; 2A3F/2A4F - neurální buňky odvozeny od iPSC. Převzato a upraveno dle (Itakura *et al.* 2017).

### 3.4.3 Exprese ligandů receptorů NK buněk

Na buňkách derivovaných z iPSC byla prokázána exprese ligandů (CD247, FCER1G, CD112, CD155) aktivačních receptorů NK buněk (NKp30, NKp46, NKG2D a DNAM-1) (Chen *et al.* 2015), mezi které patří také neklasické MHC Ib MIC-A a MIC-B ligandy, které jsou velmi polymorfní a jsou nejčastěji vystavovány na stresových, infikovaných a nádorových buňkách (Bahram *et al.* 1994). Ty se vážou konkrétně na aktivační receptor NKG2D na NK buňkách (Kruse *et al.* 2015) a  $\gamma\delta$  a CD8+ receptory na T lymfocytech, a po jejich vazbě dochází k cytotoxické NK odpovědi (obr. č. 6) (www.uniprot.org/, 2018, online).

To bylo potvrzeno *in vitro testy*, kdy byly iPSC účinně napadány aktivovanými NK buňkami, jelikož exprimují ligandy aktivačního receptoru NKG2D (Dressel *et al.* 2010; Gröschel *et al.* 2017).



**Obrázek č. 6:** Analýza genové exprese (qPCR) aktivačních ligandů vyjádřena jako „cycle threshold“ různých genů; ligandů pro NKG2D (vlevo), nízká exprese HLA (MHC-I) (uprostřed) a snížená exprese proteinů důležitých pro zpracování a prezentaci antigenu na MHC I (vpravo).

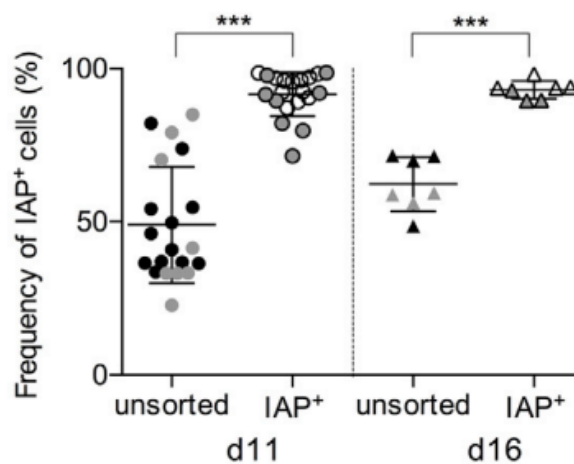
PMBC - periferní mononukleární krevní buňky, K542 - buňky lidské myeloidní leukemie; D1-iPSC4/D2-iPSC1/D3-iPSC3 - linie indukovaných pluripotentních kmenových buněk. Převzato z (Kruse *et al.* 2015).

Například při diferenciaci iPSC do hematopoetických buněk jsou na jejich povrchu vystavovány kromě aktivačních ligandů MIC-A a MIC-B také ligandy pro inhibiční receptory NK buněk HLA G. Výsledná aktivace nebo inhibice NK buněk a následné spuštění imunitní odpovědi tedy závisí na rovnováze mezi těmito signály (Kim *et al.* 2013).

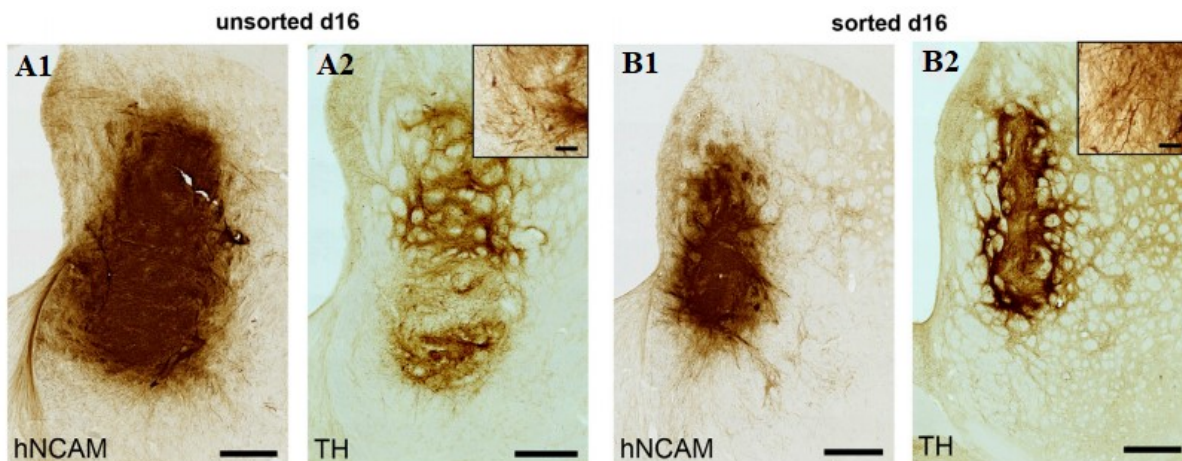
NK buňky hrají roli v odmítnutí iPSC, ale studie zkoumající jejich aktivační a inhibiční ligandy se neshodují v mechanismech aktivace.

### 3.4.4 Exprese CD47

Další z potenciálních markerů, který ovlivňuje imunogenitu iPSC je univerzální sebepoznávací znak CD47 (IAP), který se váže na SIRP $\alpha$  receptor na povrchu makrofágů, čímž inhibuje fagocytózu a slouží jako „*don't eat me*“ signál. Nedostatečná inhibice makrofágů způsobená jeho absencí vede k vystavení fragmentů peptidů iPSC v komplexu s MHC II na makrofázích a následné aktivaci T lymfocytů. Hladina CD47 se však spontánně zvyšuje během diferenciaci iPSC (obr. č. 7), čímž se snižuje imunogenita štěpů, které obsahují již diferencované IAP<sup>+</sup> buňky. To se projevuje nejčastěji sníženou hladinou adhezivních molekul a menší plochou léze (obr. č. 8) (Lehnen *et al.* 2017).



**Obrázek č. 7: Frekvence IAP<sup>+</sup> buněk v buňkách sortovaných a nesortovaných na IAP<sup>+</sup> během diferenciaci 11. a 16. den. Převzato z (Lehnen *et al.* 2017).**



**Obrázek č. 8: Histologická analýza velikosti štěpu 6 týdnů po transplantaci nesortovaných (A1-A2) a sortovaných buněk (B1-B2). Štěpy byly histochemicky barveny na přítomnost hNCAM (A1, B1) a TH (A2, B2).**

*HNCAM – lidská neurální buněčná adhezní molekula, TH – tyrosinhydroxyláza. Převzato z (Lehnen et al. 2017)*

### 3.5 Klinické studie

I přes rozporuplné výsledky imunogenity iPSC v současné době aktivně probíhají čtyři klinické studie, které se většinou zabývají modelováním onemocnění ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), online 2018). Pro personalizovanou medicínu je zatím nejúspěšnější využití iPSC při léčbě očních degenerací. Po úspěšných preklinických studiích na zvířecích modelech následovala první klinická studie iPSC. Provedena byla v září roku 2014 v Japonsku zatím na jediném pacientovi pro zjištění bezpečnosti autologních buněk RPE odvozených od iPSC pro léčbu věkem podmíněné makulární degenerace. U pacienta nebyl pozorován žádný nežádoucí efekt, nedošlo k odmítnutí štěpu a buňky nevykazovaly tumorigenní potenciál (Garber 2015). Plánovaná transplantace u druhého pacienta však byla pozastavena z důvodu genových abnormalit v iPSC, které měly být použity (Mandai et al. 2017).

## 4 Závěr

Za imunogenitu iPSC jsou zodpovědné především jejich povrchové molekuly, které mohou aktivovat buňky přirozené (NK buňky) i adaptivní (T buňky) imunity. Jedněmi z těchto molekul jsou MHC I gp, jejichž nízká hladina na povrchu iPSC je zodpovědná za aktivaci NK buněk. Pro aktivaci T buněk je kromě MHC I vyžadovaná přítomnost dalších kostimulačních molekul, jejichž přítomnost na povrchu iPSC dosud nebyla prokázána, tudíž mechanismus spuštění odpovědi adaptivní imunity na přítomnost iPSC zůstává neznámý.

Imunogenita iPSC však může být způsobena také zvýšenou expresí aktivačních ligandů MIC-A a MIC-B NKG2D receptoru NK buněk, což vede k jejich aktivaci, nebo absencí sebepoznávacího znaku CD47, který zabraňuje fagocytóze štěpu makrofágy a tím spuštění odpovědi adaptivní imunity.

Pro komplexní posouzení imunogenity jsou zásadní studie *in vivo*, které zohledňují podmínky během transplantace (koncentrace interferonů, cytokinů, místo transplantace) ovlivňují výslednou reakci. Imunogenita iPSC se liší zejména v závislosti na použitém buněčném typu, stupni jejich diferenciaci při transplantaci, přičemž současné studie naznačují, že během diferenciaci ztrácí imunogenní potenciál, nebo na místě transplantace, jelikož vložení iPSC buněk do imunoprivilegovaných míst (gonády, chrupavky, oči) jsou díky nepřítomnosti buněk imunitního systému úspěšnější. Klinické testování transplantací do těchto míst je do budoucna nejpravděpodobnější, jak naznačuje již provedená transplantace RPE při léčbě makulární degenerace.

Použití iPSC v klinické praxi se kromě jejich imunogenity potýká i s dalšími problémy, jako jsou výběr, optimalizace a normalizace metody přeprogramování. Pro jejich plnou aplikaci v klinické praxi jsou proto nezbytné nové poznatky z primárních a klinických studií.

## 5 Použitá literatura

ALMEIDA, Patricia E. de, Everett H. MEYER, Nigel G. KOOREMAN, Sebastian DIECKE, Devaveena DEY, Veronica SANCHEZ-FREIRE, Shijun HU, Antje EBERT, Justin ODEGAARD, Nicholas M. MORDWINKIN, Thomas P. BROUWER, David LO, Daniel T. MONTORO, Michael T. LONGAKER, Robert S. NEGRIN a Joseph C. WU, 2014. Transplanted terminally differentiated induced pluripotent stem cells are accepted by immune mechanisms similar to self-tolerance. *Nature Communications* [online]. 2014, roč. 5, s. 3903. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms4903

ANOKYE-DANSO, Frederick, Chinmay M. TRIVEDI, Denise JUHR, Mudit GUPTA, Zheng CUI, Ying TIAN, Yuzhen ZHANG, Wenli YANG, Peter J. GRUBER, Jonathan A. EPSTEIN a Edward E. MORRISSEY, 2011. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* [online]. 2011, roč. 8, č. 4, s. 376–388. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2011.03.001

ARAKI, Ryoko, Masahiro UDA, Yuko HOKI, Misato SUNAYAMA, Miki NAKAMURA, Shunsuke ANDO, Mayumi SUGIURA, Hisashi IDENO, Akemi SHIMADA, Akira NIFUJI a Masumi ABE, 2013. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature* [online]. 2013, roč. 494, č. 7435, s. 100–104. Dostupné z: doi:10.1038/nature11807

BAHRAM, S, M BRESNAHAN, D E GERAGHTY a T SPIES, 1994. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994, roč. 91, č. 14, s. 6259–6263.

BOYD, Ashleigh S., Neil P. RODRIGUES, Kathy O. LUI, Xuemei FU a Yang XU, 2012. Concise review: Immune recognition of induced pluripotent stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* [online]. 2012, roč. 30, č. 5, s. 797–803. Dostupné z: doi:10.1002/stem.1066

BROUWER, Marinka, Huiqing ZHOU a Nael NADIF KASRI, 2016. Choices for Induction of Pluripotency: Recent Developments in Human Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming Strategies. *Stem Cell Reviews* [online]. 2016, roč. 12, č. 1, s. 54–72. Dostupné z: doi:10.1007/s12015-015-9622-8

CZERKINSKY, Cecil C., Lars-Åke NILSSON, Håkan NYGREN, Örjan OUCHTERLONY a Andrej TARKOWSKI, 1983. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1983, roč. 65, č. 1, s. 109–121. Dostupné z: doi:10.1016/0022-1759(83)90308-3

DANG, Chi V., Kathryn A. O'DONNELL, Karen I. ZELLER, Tam NGUYEN, Rebecca C. OSTHUS a Feng LI, 2006. The c-Myc target gene network. *Seminars in Cancer Biology* [online]. 2006, roč. 16, č. 4, s. 253–264. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcancer.2006.07.014

DOI, Daisuke, Bumpei SAMATA, Mitsuko KATSUKAWA, Tetsuhiro KIKUCHI, Asuka MORIZANE, Yuichi ONO, Kiyotoshi SEKIGUCHI, Masato NAKAGAWA, Malin PARMAR a Jun TAKAHASHI, 2014. Isolation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Dopaminergic Progenitors by Cell Sorting for Successful Transplantation. *Stem Cell Reports* [online]. 2014, roč. 2, č. 3, s. 337–350. Dostupné z: doi:10.1016/j.stemcr.2014.01.013

DRESSEL, Ralf, Jessica NOLTE, Leslie ELSNER, Peter NOVOTA, Kaomei GUAN, Katrin STRECKFUSS-BÖMEKE, Gerd HASENFUSS, Rudolf JAENISCH a Wolfgang ENGEL, 2010. Pluripotent stem cells are highly susceptible targets for syngeneic, allogeneic, and xenogeneic natural killer cells. *The FASEB Journal* [online]. 2010, roč. 24, č. 7, s. 2164–2177. Dostupné z: doi:10.1096/fj.09-134957

EL HOKAYEM, Jimmy, Holly N CUKIER a Derek M DYKXHOORN, 2016. Blood Derived Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs): Benefits, Challenges and the Road Ahead. *Journal of Alzheimer's disease & Parkinsonism* [online]. 2016, roč. 6, č. 5 [cit. 20. apríl 2018]. Dostupné z: doi:10.4172/2161-0460.1000275

FUSAKI, Noemi, Hiroshi BAN, Akiyo NISHIYAMA, Koichi SAEKI a Mamoru HASEGAWA, 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* [online]. 2009, roč. 85, č. 8, s. 348–362. Dostupné z: doi:10.2183/pjab.85.348

GAO, Mou, Hui YAO, Qin DONG, Hongtian ZHANG, Zhijun YANG, Yang YANG, Jianwei ZHU, Minhui XU a Ruxiang XU, 2016. Tumourigenicity and Immunogenicity of Induced Neural Stem Cell Grafts Versus Induced Pluripotent Stem Cell Grafts in Syngeneic Mouse Brain. *Scientific Reports* [online]. 2016, roč. 6, s. 29955. Dostupné z: doi:10.1038/srep29955

GARBER, Ken, 2015. RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology* [online]. 2015, roč. 33, č. 9, s. 890–891. Dostupné z: doi:10.1038/nbt0915-890

GRÖSCHEL, Carina, Daniela HÜBSCHER, Jessica NOLTE, Sebastian MONECKE, André SASSE, Leslie ELSNER, Walter PAULUS, Claudia TRENKWALDER, Bojan POLIĆ, Ahmed MANSOURI, Kaomei GUAN a Ralf DRESSEL, 2017. Efficient Killing of Murine Pluripotent Stem Cells by Natural Killer (NK) Cells Requires Activation by Cytokines and Partly Depends on the Activating NK Receptor NKG2D. *Frontiers in Immunology* [online]. 2017, roč. 8 [cit. 17. srpna 2017]. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2017.00870

GUHA, Prajna, John W. MORGAN, Gustavo MOSTOSLAVSKY, Neil P. RODRIGUES a Ashleigh S. BOYD, 2013. Lack of Immune Response to Differentiated Cells Derived from Syngeneic Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* [online]. 2013, roč. 12, č. 4, s. 407–412. 1875-9777. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2013.01.006

HALLETT, Penelope J., Michela DELEIDI, Arnar ASTRADSSON, Gaynor A. SMITH, Oliver COOPER, Teresia M. OSBORN, Maria SUNDBERG, Michele A. MOORE, Eduardo PEREZ-TORRES, Anna-Liisa BROWNELL, James M. SCHUMACHER, Roger D. SPEALMAN a Ole ISACSON, 2015. Successful function of autologous iPSC-derived dopamine neurons following transplantation in a non-human primate model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell* [online]. 2015, roč. 16, č. 3, s. 269–274. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2015.01.018

HOU, Pingping, Yanqin LI, Xu ZHANG, Chun LIU, Jingyang GUAN, Honggang LI, Ting ZHAO, Junqing YE, Weifeng YANG, Kang LIU, Jian GE, Jun XU, Qiang ZHANG, Yang ZHAO a Hongkui DENG, 2013. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2013, roč. 341, č. 6146, s. 651–654. Dostupné z: doi:10.1126/science.1239278

HUANGFU, Danwei, Kenji OSAFUNE, René MAEHR, Wenjun GUO, Astrid EIJKELBOOM, Shuibing CHEN, Whitney MUHLESTEIN a Douglas A. MELTON, 2008. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature Biotechnology* [online]. 2008, roč. 26, č. 11, s. 1269–1275. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.1502

CHEN, Hsin-Fu, Chun-Ying YU, Mei-Jou CHEN, Shiu-Huey CHOU, Ming-Shan CHIANG, Wen-Hsi CHOU, Bor-Sheng KO, Hsiang-Po HUANG, Hung-Chih KUO a Hong-Nerng HO, 2015. Characteristic Expression of Major Histocompatibility Complex and Immune Privilege Genes in Human Pluripotent Stem Cells and Their Derivatives. *Cell Transplantation* [online]. 2015, roč. 24, č. 5, s. 845–864. Dostupné z: doi:10.3727/096368913X674639

CHO, Hyun-Jai, Choon-Soo LEE, Yoo-Wook KWON, Jae Seung PAEK, Sun-Hee LEE, Jin HUR, Eun Ju LEE, Tae-Young ROH, In-Sun CHU, Sun-Hee LEEM, Youngsoo KIM, Hyun-Jae KANG, Young-Bae PARK a Hyo-Soo KIM, 2010. Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood* [online]. 2010, roč. 116, č. 3, s. 386–395. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2010-02-269589

ITAKURA, Go, Masahiro OZAKI, Narihito NAGOSHI, Soya KAWABATA, Yuichiro NISHIYAMA, Keiko SUGAI, Tsuyoshi IIDA, Rei KASHIWAGI, Toshiki OOKUBO, Kaori YASTAKE, Kohei MATSUBAYASHI, Jun KOHYAMA, Akio IWANAMI, Morio MATSUMOTO, Masaya NAKAMURA a Hideyuki OKANO, 2017. Low immunogenicity of mouse induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells. *Scientific Reports* [online]. 2017, roč. 7, č. 1, s. 12996. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-017-13522-w

JAENISCH, Rudolf a Richard YOUNG, 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* [online]. 2008, roč. 132, č. 4, s. 567–582. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2008.01.015

KADARI, Asifiqbal, Min LU, Ming LI, Thileepan SEKARAN, Rajkumar P. THUMMER, Naomi GUYETTE, Vi CHU a Frank EDENHOFER, 2014. Excision of viral reprogramming cassettes by Cre protein transduction enables rapid, robust and efficient derivation of transgene-free human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* [online]. 2014, roč. 5, č. 2, s. 47. Dostupné z: doi:10.1186/scrt435

KAMAO, Hiroyuki, Michiko MANDAI, Satoshi OKAMOTO, Noriko SAKAI, Akiko SUGA, Sunao SUGITA, Junichi KIRYU a Masayo TAKAHASHI, 2014. Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Sheets Aiming for Clinical Application. *Stem Cell Reports* [online]. 2014, roč. 2, č. 2, s. 205–218. Dostupné z: doi:10.1016/j.stemcr.2013.12.007

KIM, Eun-Mi, Gohar MANZAR a Nicholas ZAVAZAVA, 2013. Human iPS cell-derived hematopoietic progenitor cells induce T-cell anergy in in vitro-generated alloreactive CD8(+) T cells. *Blood* [online]. 2013, roč. 121, č. 26, s. 5167–5175. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2012-11-467753

KIM, Eun-Mi, Gohar MANZAR a Nicholas ZAVAZAVA, 2017. Induced pluripotent stem cell-derived gamete-associated proteins incite rejection of induced pluripotent stem cells in syngeneic mice. *Immunology* [online]. 2017. Dostupné z: doi:10.1111/imm.12722

KIM, K., A. DOI, B. WEN, K. NG, R. ZHAO, P. CAHAN, J. KIM, M. J. ARYEE, H. JI, L. I. R. EHRLICH, A. YABUUCHI, A. TAKEUCHI, K. C. CUNNIFF, H. HONGGUANG, S. MCKINNEY-FREEMAN, O. NAVEIRAS, T. J. YOON, R. A. IRIZARRY, N. JUNG, J. SEITA, J. HANNA, P. MURAKAMI, R. JAENISCH, R. WEISSLEDER, S. H. ORKIN, I. L. WEISSMAN, A. P. FEINBERG a G. Q. DALEY, 2010. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* [online]. 2010, roč. 467, č. 7313, s. 285–290. Dostupné z: doi:10.1038/nature09342

KRUSE, Vanessa, Carina HAMANN, Sebastian MONECKE, Lukas CYGANEK, Leslie ELSNER, Daniela HÜBSCHER, Lutz WALTER, Katrin STRECKFUSS-BÖMEKE, Kaomei GUAN a Ralf DRESSEL, 2015. Human Induced Pluripotent Stem Cells Are Targets for Allogeneic and Autologous Natural Killer (NK) Cells and Killing Is Partly Mediated by the Activating NK Receptor DNAM-1. *PLOS ONE* [online]. 2015, roč. 10, č. 5, s. e0125544. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0125544

LEE, Andrew S., Chad TANG, Mahendra S. RAO, Irving L. WEISSMAN a Joseph C. WU, 2013. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nature Medicine* [online]. 2013, roč. 19, č. 8, s. 998–1004. Dostupné z: doi:10.1038/nm.3267

LEE, Jieun, Nazish SAYED, Arwen HUNTER, Kin Fai AU, Wing H. WONG, Edward S. MOCARSKI, Renee Reijo PERA, Eduard YAKUBOV a John P. COOKE, 2012. Activation of Innate Immunity Is Required for Efficient Nuclear Reprogramming. *Cell* [online]. 2012, roč. 151, č. 3, s. 547–558., 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2012.09.034

LEHNEN, Daniela, Serena BARRAL, Tiago CARDOSO, Shane GREALISH, Andreas HEUER, Andrej SMIYAKIN, Agnete KIRKEBY, Jutta KOLLET, Harold CREMER, Malin PARMAR, Andreas BOSIO a Sebastian KNÖBEL, 2017. IAP-Based Cell Sorting Results in Homogeneous Transplantable Dopaminergic Precursor Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* [online]. 2017, roč. 9, č. 4, s. 1207–1220. Dostupné z: doi:10.1016/j.stemcr.2017.08.016

LIU, Xin, Wenjuan LI, Xuemei FU a Yang XU, 2017. The Immunogenicity and Immune Tolerance of Pluripotent Stem Cell Derivatives. *Frontiers in Immunology* [online]. 2017, roč. 8 [cit. 30. marec 2018]. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2017.00645

LU, Qiao, Meixing YU, Chongyang SHEN, Xiaoping CHEN, Ting FENG, Yongchao YAO, Jinrong LI, Hong LI a Wenwei TU, 2014. Negligible Immunogenicity of Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Human Skin Fibroblasts. *PLoS ONE* [online]. 2014, roč. 9, č. 12 [cit. 17. marec 2018]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0114949

MANDAI, Michiko, Akira WATANABE, Yasuo KURIMOTO, Yasuhiko HIRAMI, Chikako MORINAGA, Takashi DAIMON, Masashi FUJIHARA, Hiroshi AKIMARU, Noriko SAKAI, Yumiko SHIBATA, Motoki TERADA, Yui NOMIYA, Shigeki TANISHIMA, Masahiro NAKAMURA, Hiroyuki KAMAO, Sunao SUGITA, Akishi ONISHI, Tomoko ITO, Kanako FUJITA, Shin KAWAMATA, Masahiro J. GO, Chikara SHINOHARA, Ken-ichiro HATA, Masanori SAWADA, Midori YAMAMOTO, Sachiko OHTA, Yasuo OHARA, Kenichi YOSHIDA, Junko KUWAHARA, Yuko KITANO, Naoki AMANO, Masafumi UMEKAGE, Fumiyo KITAOKA, Azusa TANAKA, Chihiro OKADA, Naoko TAKASU, Seishi OGAWA, Shinya YAMANAKA a Masayo TAKAHASHI, 2017. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *New England Journal of*

*Medicine* [online]. 2017, roč. 376, č. 11, s. 1038–1046. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoal608368

MANNERING, Stuart I, Jessica S MORRIS, Kent P JENSEN, Anthony W PURCELL, Margo C HONEYMAN, Peter M VAN ENDERT a Leonard C HARRISON, 2003. A sensitive method for detecting proliferation of rare autoantigen-specific human T cells. *Journal of Immunological Methods* [online]. 2003, roč. 283, č. 1, s. 173–183. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2003.09.004

MIURA, Kyoko, Yohei OKADA, Takashi AOI, Aki OKADA, Kazutoshi TAKAHASHI, Keisuke OKITA, Masato NAKAGAWA, Michiyo KOYANAGI, Koji TANABE, Mari OHNUKI, Daisuke OGAWA, Eiji IKEDA, Hideyuki OKANO a Shinya YAMANAKA, 2009. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nature Biotechnology* [online]. 2009, roč. 27, č. 8, s. 743–745. Dostupné z: doi:10.1038/nbt.1554

MORA, Cristina, Marialaura SERZANTI, Antonella CONSIGLIO, Maurizio MEMO a Patrizia DELL'ERA, 2017. Clinical potentials of human pluripotent stem cells. *Cell Biology and Toxicology* [online]. 2017, roč. 33, č. 4, s. 351–360. Dostupné z: doi:10.1007/s10565-017-9384-y

MORIZANE, Asuka, Daisuke DOI, Tetsuhiro KIKUCHI, Keisuke OKITA, Akitsu HOTTA, Toshiyuki KAWASAKI, Takuya HAYASHI, Hirotaka ONOE, Takashi SHIINA, Shinya YAMANAKA a Jun TAKAHASHI, 2013. Direct Comparison of Autologous and Allogeneic Transplantation of iPSC-Derived Neural Cells in the Brain of a Nonhuman Primate. *Stem Cell Reports* [online]. 2013, roč. 1, č. 4, s. 283–292. Dostupné z: doi:10.1016/j.stemcr.2013.08.007

OKITA, Keisuke, Tomoko ICHISAKA a Shinya YAMANAKA, 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* [online]. 2007, roč. 448, č. 7151, s. 313–317. Dostupné z: doi:10.1038/nature05934

PICK, Marjorie, Daniel RONEN, Ofra YANUKA a Nissim BENVENISTY, 2012. Reprogramming of the MHC-I and Its Regulation by NFκB in Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *STEM CELLS* [online]. 2012, roč. 30, č. 12, s. 2700–2708. Dostupné z: doi:10.1002/stem.1242

RAAB, Stefanie, Moritz KLINGENSTEIN, Stefan LIEBAU a Leonhard LINTA, 2014. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells International* [online] [cit. 20. apríl 2018]. Dostupné z: doi:10.1155/2014/768391

SAYED, Nazish, Frank OSPINO, Farhan HIMMATI, Jieun LEE, Palas CHANDA, Edward S. MOCARSKI a John P. COOKE, 2017. Retinoic Acid Inducible Gene 1 Protein (RIG1)-Like Receptor Pathway Is Required for Efficient Nuclear Reprogramming. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* [online]. 2017, roč. 35, č. 5, s. 1197–1207. Dostupné z: doi:10.1002/stem.2607

SCHEINER, Zachary S., Sohel TALIB a Ellen G. FEIGAL, 2014. The Potential for Immunogenicity of Autologous Induced Pluripotent Stem Cell-derived Therapies. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2014, roč. 289, č. 8, s. 4571–4577. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.R113.509588

SCHMIDT, Ryan a Kathrin PLATH, 2012. The roles of the reprogramming factors Oct4, Sox2 and Klf4 in resetting the somatic cell epigenome during induced pluripotent stem cell

generation. *Genome Biology* [online]. 2012, roč. 13, č. 10, s. 251. Dostupné z: doi:10.1186/gb-2012-13-10-251

SOLDNER, Frank, Dirk HOCKEMEYER, Caroline BEARD, Qing GAO, George W. BELL, Elizabeth G. COOK, Gunnar HARGUS, Alexandra BLAK, Oliver COOPER, Maisam MITALIPOVA, Ole ISACSON a Rudolf JAENISCH, 2009. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* [online]. 2009, roč. 136, č. 5, s. 964–977. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2009.02.013

SOMMER, Cesar A., Matthias STADTFELD, George J. MURPHY, Konrad HOCHEDLINGER, Darrell N. KOTTON a Gustavo MOSTOSLAVSKY, 2009. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* [online]. 2009, roč. 27, č. 3, s. 543–549. Dostupné z: doi:10.1634/stemcells.2008-1075

STADTFELD, Matthias, Nimet MAHERALI, David T. BREAUULT a Konrad HOCHEDLINGER, 2008. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* [online]. 2008, roč. 2, č. 3, s. 230–240. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2008.02.001

SUÁREZ-ÁLVAREZ, Beatriz, Ramón M. RODRIGUEZ, Vincenzo CALVANESE, Miguel A. BLANCO-GELAZ, Steve T. SUHR, Francisco ORTEGA, Jesus OTERO, Jose B. CIBELLI, Harry MOORE, Mario F. FRAGA a Carlos LÓPEZ-LARREA, 2010. Epigenetic Mechanisms Regulate MHC and Antigen Processing Molecules in Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE* [online]. 2010, roč. 5, č. 4 [cit. 15. marec 2018].. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0010192

SUN, Jianan, Michiko MANDAI, Hiroyuki KAMAO, Tomoyo HASHIGUCHI, Masayuki SHIKAMURA, Shin KAWAMATA, Sunao SUGITA a Masayo TAKAHASHI, 2015. Protective Effects of Human iPS-Derived Retinal Pigmented Epithelial Cells in Comparison with Human Mesenchymal Stromal Cells and Human Neural Stem Cells on the Degenerating Retina in rd1 mice. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* [online]. 2015, roč. 33, č. 5, s. 1543–1553. Dostupné z: doi:10.1002/stem.1960

TAKAHASHI, Kazutoshi, Koji TANABE, Mari OHNUKI, Megumi NARITA, Tomoko ICHISAKA, Kiichiro TOMODA a Shinya YAMANAKA, 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* [online]. 2007, roč. 131, č. 5, s. 861–872. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2007.11.019

TAKAHASHI, Kazutoshi a Shinya YAMANAKA, 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* [online]. 2006, roč. 126, č. 4, s. 663–676. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2006.07.024

TODOROVA, Dilyana, Jinchul KIM, Sara HAMZEINEJAD, Jingjin HE a Yang XU, 2016. Brief Report: Immune Microenvironment Determines the Immunogenicity of Induced Pluripotent Stem Cell Derivatives. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* [online]. 2016, roč. 34, č. 2, s. 510–515. Dostupné z: doi:10.1002/stem.2227

WARREN, Luigi, Philip D. MANOS, Tim AHFELDT, Yui-Han LOH, Hu LI, Frank LAU, Wataru EBINA, Pankaj K. MANDAL, Zachary D. SMITH, Alexander MEISSNER, George Q. DALEY, Andrew S. BRACK, James J. COLLINS, Chad COWAN, Thorsten M.

SCHLAEGER a Derrick J. ROSSI, 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* [online]. 2010, roč. 7, č. 5, s. 618–630. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2010.08.012

WEKSLER, Marc E., Charles E. MOODY a Robert W. KOZAK, 1981. The Autologous Mixed-Lymphocyte Reaction. V: Henry G. KUNKEL a Frank J. DIXON, ed. *Advances in Immunology* [online]. B.m.: Academic Press, s. 271–312 [cit. 8. květen 2018]. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2776(08)60923-2

WOOD, Kathryn J., Fadi ISSA a Joanna HESTER, 2016. Understanding Stem Cell Immunogenicity in Therapeutic Applications. *Trends in Immunology* [online]. 2016, roč. 37, č. 1, s. 5–16. Dostupné z: doi:10.1016/j.it.2015.11.005

YOON, Suk Ran, Tae-Don KIM a Inpyo CHOI, 2015. Understanding of molecular mechanisms in natural killer cell therapy. *Experimental & Molecular Medicine* [online]. 2015, roč. 47, č. 2, s. e141. Dostupné z: doi:10.1038/emm.2014.114

YU, Junying, Maxim A. VODYANIK, Kim SMUGA-OTTO, Jessica ANTOSIEWICZ-BOURGET, Jennifer L. FRANE, Shulan TIAN, Jeff NIE, Gudrun A. JONSDOTTIR, Victor RUOTTI, Ron STEWART, Igor I. SLUKVIN a James A. THOMSON, 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2007, roč. 318, č. 5858, s. 1917–1920. Dostupné z: doi:10.1126/science.1151526

ZHANG, Hui, Yu MA, Junjie GU, Bing LIAO, Jiwen LI, Jiemin WONG a Ying JIN, 2012. Reprogramming of somatic cells via TAT-mediated protein transduction of recombinant factors. *Biomaterials* [online]. 2012, roč. 33, č. 20, s. 5047–5055. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2012.03.061

ZHAO, Tongbiao, Zhen-Ning ZHANG, Zhili RONG a Yang XU, 2011. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011, roč. 474, č. 7350, s. 212–215.

ZHAO, Tongbiao, Zhen-ning ZHANG, Peter D. WESTENSKOW, Dilyana TODOROVA, Zheng HU, Tongxiang LIN, Zhili RONG, Jinchul KIM, Jingjin HE, Meiyang WANG, Dennis O. CLEGG, Yong-guang YANG, Kun ZHANG, Martin FRIEDLANDER a Yang XU, 2015. Humanized Mice Reveal Differential Immunogenicity of Cells Derived from Autologous Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* [online]. 2015, roč. 17, č. 3, s. 353–359. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2015.07.021

ZHOU, Hongyan, Shili WU, Jin Young JOO, Saiyong ZHU, Dong Wook HAN, Tongxiang LIN, Sunia TRAUER, Geoffery BIEN, Susan YAO, Yong ZHU, Gary SIUZDAK, Hans R. SCHÖLER, Lingxun DUAN a Sheng DING, 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* [online]. 2009, roč. 4, č. 5, s. 381–384.. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2009.04.005

## **Knížní zdroje**

MURPHY, Kenneth a Casey WEAVER, 2016. *Janeway's Immunobiology, 9th edition*. B.m.: Garland Science. ISBN 978-1-315-53324-7.

## Internetové zdroje

HORMAD1 Gene - GeneCards | HORM1 Protein | HORM1 Antibody. GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search [online]. Copyright © 1996 [cit. 08.05.2018]. Dostupné z: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HORMAD1&keywords=Hormad1>

MYC – Myc proto-oncogene protein – Homo sapiens (Human) – MYC gene & protein. Uniprot [online]. Copyright © 2002 [cit. 22.04.2018]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P01106>

KLRK1 - NKG2-D type II integral membrane protein - Homo sapiens (Human) - KLRK1 gene & protein. UniProt [online]. Copyright © 2002 [cit. 02.04.2018]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/P26718>

Search of: Active, not recruiting Studies | iPSC - List Results - ClinicalTrials.gov. Home - ClinicalTrials.gov [online] [cit. 22.4.2018] Dostupné z: [https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=iPSC&recrs=d&age\\_v=&gndr=&type=&rslt=&Search=Apply](https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=iPSC&recrs=d&age_v=&gndr=&type=&rslt=&Search=Apply)

ZG16 Gene - GeneCards | ZG16 Protein | ZG16 Antibody. GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search [online]. Copyright © 1996 [cit. 08.05.2018]. Dostupné z: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZG16&keywords=Zg16>