

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Imunologie (NIMUN)



Bc. Lucie Fryntová

Transdiferenciace somatických buněk do hepatocytů
a klinicky relevantní editace genu *Tight junction proteinu 2*

Transdifferentiation of somatic cells into hepatocytes
and clinical relevant edition of the *Tight junction protein 2* gene

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Lucie Janečková, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze, 29.4.2019

Bc. Lucie Fryntová

Poděkování

Toutu cestou bych ráda poděkovala především mé školitelce Mgr. Lucii Janečkové, Ph.D. za její trpělivost, cenné rady a čas, který mi věnovala po celou dobu magisterského studia. Poděkování patří také vedoucímu Laboratoře buněčné a vývojové biologie na ÚMG AV ČR panu RNDr. Vladimíru Kořínkovi, CSc. za možnost vypracovávat diplomovou práci na takto specializovaném pracovišti a celému kolektivu laboratoře za výpomoc s některými experimenty, předané poznatky a zkušenosti a příjemné pracovní prostředí. V neposlední řadě bych ráda poděkovala i panu prof. MUDr. Mgr. Milanu Jirsovi, CSc z IKEMu za vzájemnou spolupráci s jejich laboratoří a podklady, poskytnuté pro realizaci editační části projektu.

Abstrakt

Transdiferenciace v buňce indukuje strukturní přestavby chromatinu a epigenetické změny, které ovlivňují spektrum genové exprese a způsobují celkovou remodelaci buňky. Během transdiferenciace dochází k přímé konverzi určité zralé linie somatických buněk na zralou buněčnou linii jiného typu, napříč jednotlivými zárodečnými vrstvami. Diplomová práce byla zaměřena na transdiferenciaci mezenchymálních buněk - myších embryonálních fibroblastů na endodermální buňky - hepatocyty *in vitro* s použitím kombinace transkripčních faktorů *Hnf4a* a *Foxa1*. Mapování přeměny fibroblastů bylo zahájeno bezprostředně po vyvolání konverze a definitivní vznik tkáňové kultury indukovaných hepatocytů byl potvrzen morfologickými a funkčními testy. Myši indukované hepatocyty následně sloužily pro modelaci lidského jaterního onemocnění, ilustrujícího anamnézu pacienta z Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze, u kterého nebyla možná imunohistochemická detekce proteinu z jater. Pro genetickou editaci indukovaných hepatocytů byla použita technologie CRISPR/Cas9, při které byl nukleázou Cas9 a navigující gRNA (guide RNA) vytvořen dvouvláknový zlom v genu *Tight junction proteinu 2*, a následnou syntézou komplementárního řetězce podle DNA templátu byla vyvolána bodová mutace, měnící triplet aminokyseliny v cílovém proteinu. Diplomová práce je součástí rozsáhlejšího projektu, jehož myšlenkou je, díky transdiferenciacím, snížit četnost biopsií a ostatních bolestivých zákroků pro získání těžko dostupných lidských tkání a současně umožnit simulaci klinicky relevantních onemocnění, které tak usnadní jejich studium a vývoj vhodných terapeutických metod.

Klíčová slova: Konverze somatických buněk, *Hnf4a*, *Foxa1*, indukované hepatocyty, mutace *Tjp2*, intrahepatální cholestáza, CRISPR/Cas9

Abstract

Transdifferentiation induces chromatin reconstructions and epigenetic changes that affect gene expression spectrum and cause cell remodeling in general. Direct conversion of mature somatic cell line into another mature cell type occurs during the transdifferentiation thereby differences between individual germ layers are eliminated. The aim of the master thesis is transdifferentiation of mesenchymal cells - mouse embryonic fibroblast into endodermal cells - hepatocytes *in vitro*, using combination of transcription factors *Hnf4 α* and *Foxa1*. Detection of fibroblasts transformation has been initiated immediately after retroviral transduction and final generation of induced hepatocyte culture was confirmed by morphological and function analysis. The population of mouse induced hepatocytes served as a possible model for human liver disease in case of a patient whose liver proteins could not be detected immunohistochemically. Genome editing of induced hepatocytes was realized by CRISPR/Cas9 technology which is based on cooperation of guideRNA and Cas9 nuclease followed in addition to generation of DNA-specific double strand breaks. These specific breaks in the *Tight junction protein 2* gene were repaired via homologous recombination that induced a missense mutation with amino acid changes in the target protein. This master thesis is a part of bigger project which has a goal to reduce the amount of biopsies and another painful surgical interventions by utilization of transdifferentiation and also facilitate to develop appropriate therapeutic methods via genome editing and modeling of clinical relevant diseases.

Key words: Conversion of somatic cells, *Hnf4 α* , *Foxa1*, induced hepatocytes, mutation in *Tjp2*, intrahepatic cholestasis, CRISPR/Cas9

Obsah

Seznam zkratk	8
I. Teoretický úvod	11
1. Pluripotence buněk	11
2 Vývoj reprogramovacích a transdiferenčních metod	13
3 Zavedené metody pro přeměnu buněčných linií	14
3.1 Reprogramování	15
3.1.1 Meziprogramová kmenová buňka	18
3.2 Transdiferenciace	18
3.2.1 Transdiferenciace buněk imunitního systému	20
4 Přímá a nepřímá konverze myších fibroblastů na hepatocyty	22
4.1 Fibroblasty	22
4.2 Játra a buňky jater	23
4.2.1 Hepatocyty a cholangiocyty	23
4.2.2 Kupfferovy buňky	24
4.3. Přímá konverze fibroblastů na indukované hepatocyty	25
4.4 Nepřímá konverze fibroblastů na indukované hepatocyty	26
5 Genová editace a přehled editačních metod	27
5.1 ZFN technologie	28
5.2 TALEN technologie	30
5.3 CRISPR/Cas9	32
6 Tvorba klinicky relevantního modelu onemocnění	34
6.1 Progresivní familiární intrahepatální cholestáza 4. typu	34
6.2 TJP2	35
II. Cíl práce	38
III. Materiály	39
1. Organismy	39
2. Kultivační media	39
3 Kvantitativní PCR	40
4. Klonování	40
4.1 Reagencie	40
4.2 Vektory	41
5. Imunocytochemické barvení	42
6. Elektroforéza	43
7. Izolace MEF	44
8. CRISPR/Cas9	44
9. Přístrojové vybavení	45
10. Ostatní materiály	45
IV. Metody	48
1. Transdiferenciace MEF na iHep	48
1.1 Izolace myších embryonálních fibroblastů	48
1.2 Příprava rekombinantních retrovirů a transdukce MEF	48
1.3 Kultivace iHep	49
1.4 Syntéza cDNA	50

1.5	Analýza indukovaných hepatocytů	51
1.5.1	Kvantitativní PCR	51
1.5.2	Imunocytochemické barvení	52
1.5.3	PAS barvení	53
1.5.4	LDL uptake	53
1.6	Izolace buněčných klonů ze směsné populace iHep	54
2.	Genová editace iHep - CRISPR/Cas9	54
2.1	Příprava plasmidů pro genovou editaci	54
2.1.1	Transkripce DNA templátu pro homologní rekombinaci <i>in vitro</i>	54
2.1.2	Syntéza a izolace sg RNA	55
2.2	Elektroporace (Neon)	55
2.3	Příprava genomové DNA	56
2.3.1	Extrakce DNA z elektroporovaných iHep	56
2.3.2	PCR amplifikace a DNA purifikace	56
2.3.3	Elektroforéza a izolace DNA z gelu	57
2.3.4	Ligace DNA	57
2.3.5	Rozmnožení a teplotní šok kompetentních bakterií	58
2.3.6	PCR monoklonálních bakterií	58
2.3.7	Štěpení DNA TaqI polymerázou <i>in vitro</i>	58
2.4	Minipreparace	59
2.5	Sekvence	59
V.	Výsledky	60
1.	Transdiferenciace MEF na iHep <i>in vitro</i>	60
1.1	Transdukce rekombinantními retroviry	60
1.2	Genová exprese iHep	62
1.3	Cytomorfologie iHep	64
1.4	Funkce iHep	66
1.5	Genová exprese hepatocytárních markerů v různých vývojových stádiích iHep	67
1.6	Hepatocytární markery v buněčných klonech iHep	70
2.	Genová editace - CRISPR/Cas9	72
2.1	Editace iHep pro modelaci lidského onemocnění	72
2.2	Stanovení přítomnosti Tight junction proteinu 2 v iHep	74
2.3	CRISPR pro substituční bodovou mutaci v genu <i>Tjp2</i>	75
2.4	Optimalizace elektroporace	76
2.5	Sortování geneticky editovaných iHep	77
2.6	Analýza editovaného proteinu <i>Tjp2</i>	79
2.7	Sekvence	80
VI.	Diskuze	81
1.	Transdiferenciace MEF na iHep	81
2.	Genová editace iHep - CRISPR/Cas9	85
VII.	Závěr	93
VIII.	Seznam obrázků	95
IX.	Seznam tabulek	96
X.	Reference	97

Seznam zkratek

Zkratka Význam v českém jazyce

ABCB11	ATP-vázající člen 11 podrodiny B
AFP	Alfa-fetoprotein
AHR	Aryl hydrouhlikový receptor
APC	Antigen prezentující buňka
ATP8B1	
Bcl11b	
BSEP	Pumpa exportující žlučové soli
Car2	Karbonická anhydráza 2
CCR5	C-C chemokinový receptor 5
C/EBPβ	
cgRNA	Chimerická navádějící ribonukleová kyselina
CK 7	Cytokeratin 7
c-Myc	
CRISPR	Segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitivních sekvencí
DAPI	4',6-diamino-2-fenylindol
dNTP	Deoxynukleotid trifosfát
DSB	Dvouvláknový zlom
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EGF	Epidermální růstový faktor
EGFP	Zelený fluorescenční protein
EpCAM	Adhezivní molekula epiteliálních buněk
ESC	Embryonální kmenová buňka
FAH	Familiární hypercholanémie
FCS	Fetální telecí sérum
FGF	Fibroblastový růstový faktor
FOXA1	
FOXP3	
GAM	Kozi anti myši protilátka
GAR	Kozi anti králičí protilátka
GS	Glutamin syntetáza
GSTM3	Glutathion S-transferáza M3
HAF	Lidský zralý fibroblast
HCC	Hepatocelulární karcinom
HDR	Přímá homologní oprava
HFF	Lidský fetální fibroblast
HGF	Hepatocytární růstový faktor
HNF	Hepatocytární nukleární faktor 4 alfa
HR	Homologní rekombinace
HSC	Hematopoetická kmenová buňka
IBD	Idopatické záněty střev
ICC	Imunocytochemické barvení

Význam v anglickém jazyce

ATP Binding Cassette Subfamily B Member 11
Alpha-fetoprotein
Aryl Hydrocarbon Receptor
Antigen Presenting Cell
ATPase Phospholipid Transporting 8B1
B Cell CLL/Lymphoma 11B
Bile Salt Export Pump
Carbonic Anhydrase 2
C-C chemokine receptor type 5
CCAAT/Enhancer-Binding Protein Beta
Chimeric Single-Guide Ribonucleic Acid
Cytokeratin 7
Cellular Myelocytomatosis Oncogene
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
4',6-diamidino-2-phenylindole
Deoxynucleoside triphosphate
Double-Strand Break
Ethylenediaminetetraacetic acid
Epidermal Growth Factor
Enhanced Green Fluorescent Protein
Epithelial Cell Adhesion Molecule
Embryonic Stem Cell
Familial Hypercholanemia
Fetal Calf Serum
Fibroblast Growth Factor
Forkhead box protein A1
Forkhead box P3
Goat-Anti-Mouse
Goat-Anti-Rabbit
Glutamine Synthetase
Glutathione S-Transferase M3
Human Adult Fibroblast
Hepatocellular Carcinoma
Homology Directed Repair
Human Fetal Fibroblast
Hepatocyte Growth Factor
Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha
Homologous Recombination
Hematopoietic Stem Cell
Inflammatory Bowel Diseases
Immunocytochemistry

iHep	Indukovaný hepatocyt	Induced H epatocyte-like cell
IL	Interleukin	I nterleukin
iPSC	Indukovaná pluripotentní kmenová buňka	Induced P luripotent Stem Cell
IRES	Vnitřní ribosomální vstupní místo	I nternal R ibosome Entry Site
iRSC	Meziprogramová kmenová buňka	I ntermediately R eprogrammed Stem Cell
KLF4		K ruppel-Like Factor 4
LB	Luria-Bertani medium	L uria- B ertani medium; L ysogeny B roth
LDL	Lipoprotein o nízké hustotě	L ow D ensity L ipoprotein
MEF	Myší embryonální fibroblasty	M ouse E mbyronic F ibroblast
MET	Mezenchymo-epiteliální tranzice	M esenchymal- E pithelial T ransition
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex	M ajor H istocompatibility C omplex
NES	Jaderný exportní signál	N uclear E xport S ignal
NF-κB	Nukleární faktor kappa B	N uclear F actor K appa B
NHEJ	Nehomologní spojení konců	N on- H omologous E nd J oining
NK	NK buňka	N atural K iller cell
NLS	Jaderný lokalizační signál	N uclear L ocalization S ignal
NR1H4	Nukleární receptor podrodiny 1 skupina H člen 4	N uclear R eceptor Subfamily 1 Group H Member 4
OCT4	Oktamer-vázající transkripční faktor 4	O ctamer- B inding T ranscription factor 4
OSM	Onkostatin M	O ncostatin M
PAM	Protospacer přiléhající motiv	P rotospacer A djacent M otif
PAS	Reakce kyseliny jodisté s Schiffovým činidlem	P eriodic A cid S chiff
PBS	Fosfátový pufr	P hosphate- B uffered S aline
PECAM	Adhezivní molekula krevních destiček a endotelia	P latelet E ndothelial C ell A dhesion M olecule 1
PEI	Polyetylenimin	P olyethylenimine
PFIC	Progresivní familiární intrahepatální cholestáza	P rogressive F amilial I ntrahepatic C holestasis
PPARγ		P eroxisome P roliferator- A ctivated R eceptor γ
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce	Q uantitative P olymerase C hain R eaction
RFP	Červený fluorescenční protein	R ed F luorescent P rotein
RORγt		R AR-related O rphan R eceptor G amma
ROX	Rhodamin X	R hodamine X
RT	Reverzní transkripce	R everse T ranscription
RT	Pokožová teplota	R oom T emperature
RVD	Opakující se variabilní diresidua	R epet V ariable D iresidues
SAF-B		S caffold A ttachment F actor B
SALL4		S al-Like P rotein 4
SB	Borát sodný	S odium B orate
SC-35		S plicing F actor 35
sgRNA	Jednoduchá navádějící ribonukleová kyselina	S ingle- G uide R ibonucleic A cid
SOX2		S ex determining region Y B ox 2
SSEA1	Stádiově specifický embryonální antigen 1	S tage- S pecific E mbyronic A ntigen- 1
SUMO	Malý modifikátor příbuzný ubikvitinu	S mall U biquitin-like M odifier
TAE	Tris-acetát-ethylendiamintetraoctová kyselina	T ris- A cetate- E thylendiaminetetraacetic acid
TALEN	Efektorové nukleázy aktivující transkripci	T ranscription A ctivator- L ike E ffector N uclease
TBX4		T -box transcription factor 4

TGFβ	Transformující růstový faktor beta	Transforming Growth Factor Beta
TJ	Těsný spoj	Tight Junction
TJP2	Protein těsných spojů 2	Tight Junction Protein 2
TLR4		Toll-Like Receptor 4
Treg	T regulační buňka	Regulatory T cell
UBB	Ubikvitin	Ubiquitin
ZFN	Nukleázy se zinkovými prsty	Zinc Finger Nuclease

I. Teoretický úvod

Reprogramovací techniky, umožňující přeměnu odlišných typů buněk, představují významný vědecký pokrok, který otvírá nové možnosti pro různá odvětví medicíny. Indukcí a monitorováním průběhu konverze buněk lze totiž ovlivňovat a korigovat různé patologie. Tyto metody by současně měly velmi usnadnit odběr lidských těžko dostupných tkání, což by mělo za následek snížení počtu bioptických zákroků. Konkrétně u jaterních onemocnění by již nebyla nezbytně nutná biopsie jater, poněvadž řešení by poskytovala transdiferenciace lidských dermálních fibroblastů na jaterní buňky *in vitro*. Možností léčby by pak mohla být transplantace zdravých proliferujících se jaterních buněk, získaných *in vitro*, která by umožnila návrat fyziologické funkce jater. Další alternativou by byl transport transkripčních faktorů a dalších stimulačních molekul do poškozeného místa, kde by jimi byla vyvolána konverze na zdravé buňky nebo buňky imunitního systému, které by okamžitě zesílily imunitní odpověď organismu. Výhoda modifikace vlastních buněk pacienta je postavena především na navození imunitní reakce, která je pro organismus přirozená. Zatímco pro transplantace je nezbytné nasazení imunosupresiv, která zajišťují potlačení rejekce a zamezení komplikací spojených s odhojováním štěpu.

Propojením reprogramovacích technologií s genovou editací lze poté simulovat onemocnění na předem indukovaných buňkách, za účelem objasnění příčin jejího vzniku a navržení adekvátní terapie. Cílená úprava genomu buňky slouží jako patologický model, u které je tak možné pozorovat změny, nastávající v důsledku rozvoje onemocnění. Hlavním záměrem je schopnost aplikovat tyto technologie na jakýchkoli lidských buňkách pro vývoj nových účinných terapeutických metod.

1. Pluripotence buněk

Embryonální kmenové buňky (ESC) představují buňky zárodku ve stádiu blastocysty (Evans, M. J. a M. H. Kaufman, 1981; Thomson JA et al., 1998), která se v průběhu gastrulace přeměňuje na vývojové stádium gastruly (Tam, P.P.L., & Zhou, S.X., 1996). Klíčovou vlastností těchto buněk je tzv. pluripotence, což je schopnost, která jim umožňuje diferencovat se na jakýkoli typ fetálních i dospělých buněk. Diferenciace v konkrétní buněčný typ poté spočívá v přítomnosti extraembryonální tkáně a konzervativnosti regulačních sítí, složených z mnoha transkripčních faktorů a signalizačních kaskád. Pluripotence ESC se

vymezuje právě ve fázi gastruly (Nichols, J., & Austin S., 2009), kdy se její vrstvy transformují na tři základní zárodečné listy - endoderm, mezoderm a ektoderm, které dávají vznik jednotlivým buněčným liniím (Tam, P.P.L., & Zhou S.X., 1996). Na této úrovni buněčného vývoje totiž dochází k demetylaci DNA a následnému sestavení nového metylačního vzoru buňky. Nejprve tedy probíhá zkonstruování housekeeping genů, které jsou za určitých podmínek exprimovány téměř ve všech tkáních organismu a používají proto jako referenční markery při kvantitativní polymerázové řetězové reakci (qPCR). Později během poimplantačního vývoje dochází ke koncovému formování epigenetického vzorce, který je pro každý typ buňky zcela specifický a současně se objevují první známky exprese typických buněčných markerů. Tyto genomické metylační vzory jsou v somatických diferencovaných buňkách zpravidla neměnné a dědičné, zatímco u zárodečných buněk a preimplantačních embryí mohou být metylační kostry pozměněny (shrnutí v Kim *et al.*, 2010).

Pluripotence buněk je vždy vyjádřena jejich diferenciací kapacitou (Nishizawa, *et al.*, 2016). Kromě buněk pluripotentních, z nichž probíhá diferenciace do mnoha různých buněčných typů, existují tedy i buňky unipotentní, multipotentní nebo totipotentní. Buňky unipotentní dávají vznik pouze jednomu typu buněk, tudíž jsou opozitem k pluripotenci (Blanpain, C., *et al.*, 2007). Buňky multipotentní jsou odvozené od jednotlivých zárodečných listů a jsou také schopné se diferencovat do mnoha typů buněk jako buňky pluripotentní, avšak pouze v rámci dané tkáně. Mezi tyto buňky jsou řazeny hematopoetické kmenové buňky, mezenchymální kmenové buňky a nervové kmenové buňky, (Park, I.-K., *et al.*, 2002; Arion, N. W. a Mao J. J., 2006; Gage, F. H., 2000). Všem výše vyjmenovaným buňkám jsou nadřazeny buňky totipotentní, které obsahují kompletní genetickou informaci a mohou od nich být odvozeny všechny buněčné typy v organismu (Honecker, F., *et al.*, 2006).

Uměle vytvořenou alternativou embryonálních kmenových buněk jsou indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC), které jsou generovány během reprogramování. Reprogramování je proces, při kterém dochází k přeměně jednoho typu buněčné populace na populaci jinou, a to je zajištěno právě indukovanými pluripotentními buňkami, které se cíleně diferencují v přítomnosti specifických transkripčních faktorů (Takahashi, K., & Yamanaka, S., 2006; Takahashi, K., & Yamanaka, S., 2007).

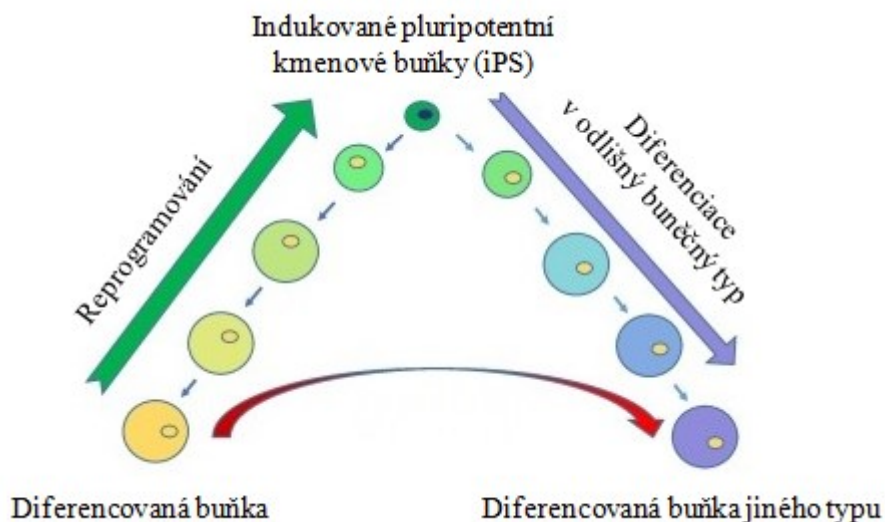
2 Vývoj reprogramovacích a transdiferenciačních metod

V průběhu uplynulých 60 let byla vyvinuta spousta technologií, zabývajících se indukovanou pluripotencí. Zavedení těchto technologií zapříčinilo pokrok v oblasti reprogramování buněk, kterým bylo umožněno indukované generování pluripotentních buněk a studium genetické informace diferencujících se buněk a jejich transkripčních faktorů. Jedním z průkopníků v oblasti reprogramování se v roce 1962 stal Sir John B. Gurdon, který jako první popsal vývojovou kapacitu jádra v střevních epitelálních buňkách žab. Díky jeho výzkumu klonování žab, prostřednictvím přenosu jader, dal prvopočátek buněčnému jadernému reprogramování (Gurdon, J. B., 1962). Sir Gurdon současně definoval reprogramovací technologii jako proces, při kterém je genová exprese jedné buňky převáděna do genové exprese jiného buněčného typu (Candy, D. J., 1974). O necelých dvacet let později Martin J. Evans a Matthew H. Kaufman zavedli tkáňovou kulturu pluripotentních buněk, izolovaných z *in vitro* kultury myších blastocyt, která se byla schopna diferencovat *in vitro*, ale i *in vivo* po jejich injikaci zpět do myši. Tato kultura byla definována jako myší embryonální kmenové buňky (ESC) (Evans, M. J., & Kaufman, M. H., 1981). V roce 1987 byla izolována a klonována myoblastová cDNA, z níž byly vyselektovány 3 vhodné klony - MyoA, MyoD, MyoM pro další analýzu. Gen *MyoD*, který byl běžně exprimován pouze v myších kosterních svalových buňkách a myogenních buněčných liniích, byl označen za klíčový atribut pro myogenezi. *MyoD* byl tedy pomocí vektoru transdukován do fibroblastů s inhibovanými růstovými faktory, kde proběhla první konverze myších fibroblastů na buňky, odpovídající svým spektrem exprimujících markerů buňkám svalovým (Davis, R. L., *et al.*, 1987). V následujícím desetiletí vytvořil britský embryolog Ian Wilmut prvního savce, který byl klonován ze somatických buněk dospělého jedince. Dospělé ovci byla odebrána vajíčka, jimž odstranil vlastní DNA a nahradil ji DNA z epitelu mléčné žlázy jiné dospělé ovce. Klonováním ovčího vajíčka tak dosáhl zrození známé ovce Dolly (Wilmut, I., *et al.*, 1997). Přesně 17 let uplynulo od objevení myších ESC a v roce 1998 byla Jamesem A. Thomsonem popsána rovněž první linie lidských embryonálních kmenových buněk. Proliferující lidské ESC udržovaly vývojový potenciál v tvorbě trofoblastu a umožňovaly odvození všech tří zárodečných listů (Thomson, J. A., 1998). V roce 2004 bylo provedeno první reprogramování lymfoidních buněk na buňky myeloidní, konkrétně B buněk na makrofágy, pomocí exprese *C/EBPβ* (CCAAT/enhancer-binding protein beta) (Xie, H., *et al.*, 2004). Rozkvět v oblasti

reprogramování však nastal až ve 21. století, zásluhou japonských vědců Kazutoshi Takahashi a Shiya Yamanaka, kteří se zabývali problematikou indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC). V roce 2006 zveřejnili protokol pro iPSC, odvozené od myších embryonálních fibroblastů, transdukovaných přesně definovanou kombinací 4 transkripčních faktorů (Takahashi, K., & Yamanaka, S., 2006). Následující rok zavedli lidské iPSC, vytvořené z kultury lidských kožních fibroblastů, v přítomnosti shodné kombinace faktorů (Takahashi, K., *et al.*, & Yamanaka, S., 2007). Zásadní převrat nastal v roce 2012, kdy Sir J. B. Gurdon společně s S. Yamanaka objasnili podstatu reprogramování svým výzkumem, který evokoval skutečnost, že jakákoli zralá buňka může být vhodnými transkripčními faktory indukována na pluripotentní kmenovou buňku, z níž lze následně diferencovat jakoukoli jinou buňku v těle. Za tento objev získali oba vědci v roce 2012 Nobelovou cenou (Wade, N., 2012). Později byla popsána i tzv. meziprogramová kmenová buňka, která usnadnila objasnění zákonitosti reprogramování a monitorování jeho průběhu, díky schopnosti pozastavit svou reprogramovací aktivitu a následně jí vhodnými stimuly opět obnovit (Nishimura, K., *et al.*, 2014).

3 Zavedené metody pro přeměnu buněčných linií

Principem metod, zajišťujících řízenou buněčnou přeměnu, je docílit diferenciaci určitého typu zralých buněk na jiný zcela odlišný buněčný typ. Tato diferenciaci může být přímá - transdiferenciaci, kdy probíhá přímá konverze jednotlivých buněk (Davis, R. L., *et al.*, 1987), nebo nepřímá - reprogramování, jehož průběh vyžaduje určitý mezikrok v podobě produkce pluripotentních kmenových buněk (Takahashi, K., & Yamanaka, S., 2006; Takahashi, K., & Yamanaka, S., 2007). Oba typy buněčných přeměn jsou doprovázeny rozsáhlými morfologickými i epigenetickými změnami (Weaver, J. R., *et al.*, 2009).



Obrázek 1 Schéma odlišující průběh reprogramování a transdiferenciace (Ciešlar-Pobuda, A., *et al.*, 2017)

3.1 Reprogramování

Objevem myších a lidských iPSC nastala nová éra, která přinesla přesně definovaný postup pro reprogramování jakýchkoli somatických buněk. Princip spočívá v navrácení zralých buněk do indukovaných pluripotentních kmenových buněk, které jsou schopny se samy regulovat a dělit do mnoha různých buněčných typů, během čehož dochází k eliminaci a současnému obnovení epigenetických buněčných znaků. Opětovná diferenciace do nového buněčného typu je iniciována po identifikaci a stimulaci charakteristického aktivačního či inhibičního genu pro danou buněčnou linii. Nezbytnou součástí reprogramování je základní koktejl transkripčních faktorů, který je nejprve vložen do vhodného vektoru a následně transdukci vnesen do zvolené buňky. Reprogramovací kombinace, která může být označována zkratkou OSKM nebo nazývána jako „*Yamanaka factors*“, je tvořena 4 transkripčními faktory: *Oct4* (octamer-binding transcription factor 4), *Sox2* (Sex determining region Y-box 2), *Klf4* (Kruppel-like factor 4) a *c-Myc* (Cellular Myelocytomatosis Oncogene) (Takahashi, K., & Yamanaka, S., 2006). Dnes existují i některé alternativní genové sety - *OCT4*, *SOX2*, *LIN28* (Lin-28 Homolog A), *NANOG* (Yu, J., *et al.*, 2007) nebo *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *TBX3* (T-box 3) (Storm, M. P., *et al.*, 2009).

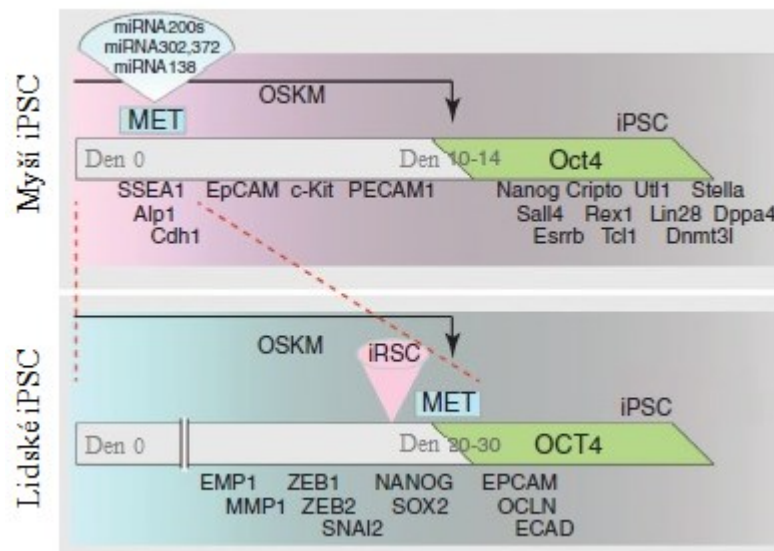
Pro zanesení OSKM genů do buňky jsou jako vektory využívány některé retroviry. Retroviry mají schopnost se reverzní transkripcí integrovat do genomu hostitelské buňky a řídit tak expresi reprogramovacích faktorů (Takahashi, K., & Yamanaka, S., 2006). Nejčastěji jsou k produkci iPSC používány *Lentiviry*, které patří mezi členy rodiny Retrovirů. Na rozdíl od ostatních retrovirů totiž umožňují transdukovat i nedělitelné buňky a mají

schopnost alternativního tropismu (Bayart, E., & Cohen-Haguenaer, O., 2013). Značnou nevýhodou těchto virů je však jejich imunogenita, reziduální exprese a možnost aktivace transgenů. Vyskytuje se zde tedy riziko, že důsledkem včlenění virů do genomu, bude vyvolána inserční mutagenese (Gutierrez-Aranda, I., et al., 2010). Ačkoli jsou retrovirové transgeny v iPSC inaktivovány a exprimovány jsou pouze geny zachovávající pluripotenci buněk, vzácně mohou být znovu aktivovány ve spojitosti s *c-Myc* (Bayart, E., & Cohen-Haguenaer, O., 2013). Riziko může být eliminováno použitím některých nevirových metod, využívající konvenčních plasmidů nebo samoreprodukčních epizomálních plasmidů k doručení OSMK faktorů do buňky. Avšak v takových případech je nezbytná mnohonásobná transfekce a účinnost reprogramování je v porovnání s retrovirovou transdukcí nižší (Kim, J., et al., 2015). Řešením potenciálního vzniku karcinogezí je úplná absence transkripčních faktorů při reprogramování. Bylo prokázáno, že pluripotentní buňky mohou být kromě OSMK faktorů generovány i na základě stimulace, vyvolané inhibicí signální dráhy TGFβ a MEK (Vrbsky, J., et al., 2015). Současně je možné docílit produkce iPSC i přítomností cytokinů, růstových faktorů a dalších molekul, ovlivňujících signální dráhy, vedoucí k výstavbě požadovaných buněk (Du, C., et al., 2018). Novým přístupem je i reprogramování, fungující na synergické aktivitě synteticky modifikovaných mRNA, které zvyšují efektivitu přeměny fibroblastů na iPSC (Kogut, I., et al., 2018). Nebezpečí vzniku nádoru představují nekontrolovatelně se dělicí iPSC i samotné reprogramovací faktory, neboť se jedná o proteonkogeny, běžně se vyskytující při metastatickém karcinomu. Těchto charakteristik lze využít pro modelaci karcinogeneze ve specifických tkáních, studium mechanismů karcinomu a vývoj efektivních terapií (Kim, J., et al., 2013; Feng, H., et al., 2019)

U myši probíhá reprogramming v následujících krocích: aktivace alkalické fosfatázy, inhibice somatické exprese, exprese *SSEA1* (Stage-specific embryonic antigen-1, také CD15) a potlačení exogenních genů se současnou stimulací endogenních genů *Oct4* a *Nanog*, které hrají významnou roli pro pluripotentní stav buňky (Brambrink, T., et al., & Jaenisch, R., 2008). Povrchové markery *EpCAM* (Epithelial cell adhesion molecule), *c-Kit* (Proto-oncogene c-kit) a *PECAM1* (Platelet endothelial cell adhesion molecule 1), přítomné na *SSEA1* pluripotentních buňkách, umožňují jejich shromažďování a snazší reprogramování (Polo, J. M., et al., 2012). Nepostradatelným krokem pro tvorbu iPSC z myších embryonálních fibroblastů (MEF) je mezenchymo-epiteliální tranzice (MET), která se u myši objevuje již v počáteční fázi reprogramování (Stadtfeld, M., et al., 2008; Li, R., et al., 2010).

Reverzibilní proces MET zajišťuje přechod mezi multipolárními mezenchymálními buňkami a polarizovanými buňkami epitelu tím, že reguluje zvýšení exprese epiteliálních (*E-cadherin*, *EpCAM*, *miRNA-200*) a snížení mezenchymálních (*Snail*, *Zeb*, *N-Cadherin*) genů. Exogenní *Oct4* a *Sox2* tak svojí vazbou na *miRNA-200* spustí transkripci a MET. Při potlačení *miRNA-200* specifickými inhibitory je rovněž utlumena i tranzice a produkce iPSC (Polo, J. M., *et al.*, 2012; Lamouille, S., *et al.*, 2013). V důsledku MET dochází tedy, v průběhu přechodu somatických buněk na pluripotentní linii, nejen k morfologickým změnám, ale i změnám v expresi několika tisíců genů (Li, R., *et al.*, 2010).

Některé z částí reprogramovacího procesu jsou pro lidské i myší buňky shodné, avšak v některých krocích se zásadně liší. U myší nastává MET v počáteční fázi, tudíž ještě před aktivací endogenního *Oct4* (Li, R., *et al.*, 2010). Na rozdíl od lidí, kde se MET vyskytuje v pozdější fázi, která časově odpovídá i aktivaci OCT4, což nasvědčuje tomu, že oba jevy jsou na sobě vzájemně nezávislé. V této souvislosti tedy myší buňky docílí navrácení do nezralé formy dříve než-li získají *Oct4*-indukovanou pluripotenci, oproti lidským buňkám, které to mají opačně a téměř ve stejnou dobu (Yang, S.-H., *et al.*, 2014). V reprogramingu lidských somatických buněk hrají zásadní roli geny *OCT4*, *SOX2* a *NANOG*, které slouží jako stabilizátory pluripotentní molekulární sítě, která usnadňuje formování iPSC (Theunissen, T. W., *et al.*, 2011).



Obrázek 2 Průběh reprogramování myších a lidských somatických buněk na iPSC (Teshigawara, R., *et al.*, 2017)

3.1.1 Meziprogramová kmenová buňka

Novým aspektem v oblasti reprogramování bylo zavedení lidské meziprogramové kmenové buňky (iRSC), tedy reprogramovaná buňka pozastavená na úrovni negativního endogenního faktoru OCT4 a transgenně pozitivní pre-MET fázi. Její zastavení či aktivaci je regulována expresí genu *KLf4*. Zvýšením exprese *KLf4* dochází k uvedení iRSC opět do chodu, a tím je obnoveno i reprogramování somatických buněk do již OCT4-pozitivních iPSC (Nishimura, K., *et al.*, 2014). Zanesením GFP vizualizace do *OCT4* v živých iRSC je umožněno monitorovat průběžné kroky jako například aktivaci *OCT4* nebo počátek MET. Postupy, využívající fluorescenční vizualizaci iRSC, tak objasňují zákonitosti reprogramování a popisují sled epigenetických událostí v buňce. Lidské iRSC jsou odvozeny od buněčné linie reprogramovaných plicních fibroblastů plodu pomocí retrovirové transdukce OSMK (Teshigawara, R., *et al.* & Tada, T., 2015).

3.2 Transdiferenciace

Termín transdiferenciace lze v literatuře nalézt pod několika různými synonymy - přímá diference či konverze. Ve všech těchto případech se jedná o proces, při kterém dochází k přeměně jednoho typu zralé buňky na jiný zralý buněčný typ, který mnohdy má zcela odlišný zárodečný původ. Zásadní rozdíl oproti reprogramování je zde v tom, že konverze probíhá přímo, bez přítomnosti iPSC jako meziproduct (Davis, R. L., *et al.*, 1987). Klíčem úspěšné transdiferenciace je výběr vhodné kombinace transkripčních faktorů (příp. jiných stimulů) a jejich genová exprese, řízená specifickými intracelulárními a extracelulárními signály (Zhou, Q., *et al.*, 2008). V jejím průběhu dochází k celkové buněčné reorganizaci, a to nejen na transkripční úrovni. Remodelace buňky společně se změnami v její genové expresi je vyvolána strukturními přestavbami chromatinu - histonovými modifikacemi, které stimulují či inhibují specifické markery a ovlivňují tím genové spektrum buňky (Zuryn, S., *et al.*, 2014).

Navzdory tomu, že byl postup transdiferenciace popsán podstatně dříve, není o něm známo tolik informací jako o reprogramování. Odrazovým můstek byla první přímá diference fibroblastů ve svalové buňky, zapříčiněná expresí faktoru *MyoD* (Davis, R. L., *et al.*, 1987). Následovaly konverze buněk převratem se stala úplná eliminace bariéry mezi jednotlivými zárodečnými listy. Otevřely se tak nové možnosti, konvertující určitou buněčnou populaci na populaci s odlišným zárodečným původem, například fibroblasty (mezoderm)

na neurony (ektoderm) či hepatocyty (endoderm) (Sekiya, S., & Suzuki, A., 2011; Marro, S., *et al.*, 2011).

Díky absenci pluripotentní fáze jsou u transdiferenciace redukována i s ní spjatá rizika vzniku karcinogeneze a inzerční mutagenese. Nebezpečí evokuje pouze zanesení transgenů v průběhu transdukce buněk rekombinantními retroviry. Transdiferenciace je tedy považována za bezpečnější alternativu reprogramování a našla si tak své uplatnění v regenerativní medicíně (Grath, A., & Dai, G., 2019). Buňky mohou být transplantovány z přirozeného mikroprostředí do jiného místa, kde vyvolají vlastní transdiferenciaci díky přítomným indukčním faktorům v recipientní tkáni (Meivar-Levy, I., *et al.*, 2019). Popsány byly rovněž definované kombinace transkripčních faktorů, vyvolávající přímou transdiferenciaci nádorových buněk na zdravou buněčnou linii, a to má významný potenciál v nádorové terapii (Cheng, Z., *et al.*, 2019).

Tabulka 1 Příklady buněčných transdiferenciací *in vitro* (Davis, R. L., *et al.*, 1987; Xie, H., *et al.*, 2004; Li, P., *et al.*, 2010; Noguchi, H., *et al.*, 2003; Zhou, Q., *et al.*, 2008; Aviv, V., *et al.*, 2009; Sekiya, S., & Suzuki, A., 2011; Vierbuchen, T., *et al.*, 2010; Berninger, B., *et al.*, 2007; Caiazzo, M., *et al.*, 2011; Efe, J. A., *et al.*, 2011)

Původní buňka	Transdiferenciační faktory	Cílová buňka
Fibroblasty	<i>MyoD</i>	Myocyty
B lymfocyty	<i>C/EBPα</i> , <i>C/EBPβ</i>	Makrofágy
T lymfocyty	<i>Bcl11b delece</i>	NK buňky
Buňky pankreatu	<i>Pdx1</i>	Beta buňky
Exokrinní buňky pankreatu	<i>Ngn3</i> , <i>Mafa</i> , <i>Pdx1</i>	Beta buňky
Hepatocyty	<i>Exendin-4</i> , <i>Pdx1</i>	Beta buňky
Fibroblasty	<i>Hnf4</i> , <i>Foxa1</i> / <i>Foxa2</i> / <i>Foxa3</i>	Hepatocyty
Fibroblasty	<i>Ascl1</i> , <i>Brn2</i> , <i>Myt1l</i>	Neurony
	<i>miR-124</i> , <i>Brn2</i> , <i>Myt1l</i>	
Astrocyty	<i>Pax6</i> , <i>neurogenin 2</i> , <i>Ascl1</i>	Neurony
Fibroblasty	<i>Ascl1</i> , <i>Nurr1</i> , <i>Lmx1a</i>	Dopaminergické neurony
	<i>Ascl1</i> , <i>Brn2</i> , <i>Myt1l</i> , <i>Lmx1a</i> , <i>Foxa2</i>	
Fibroblasty	<i>Oct4</i> , <i>Sox2</i> , <i>Klf4</i> , <i>c-Myc</i>	Kardiomyocyty
	<i>Tbx5</i> , <i>Mef2c</i> , <i>Gata-4</i> , <i>Mesp1</i>	

Většina transdiferenciačních postupů je si v principu velmi podobná tím, že jsou všechny založeny na přímé konverzi odlišných typů buněk, která je stimulovaná expresí specifických transkripčních faktorů nebo jiných buněčných stimulů a následnou kultivací buněk za vhodných podmínek. Výjimku tvoří tzv. nepřímá transdiferenciace, během které

dochází nejprve k dediferenciaci buněk do časného progenitorového stádia a poté následuje rediferenciace do odlišného buněčného typu (Cobaleda, C., *et al.*, 2007). Dediferenciace může být vyvolána regulátory pluripotentních genů, které se využívají při reprogramování do iPSC, nebo synergií transkripčních faktorů, specifických pro diferenciaci daných buněk. Ačkoli je v tomto případě produkován progenitorový meziprodukt, což mechanicky odpovídá spíše reprogramování, progenitorové buňky s iPSC nevykazují shodu. Dediferencovaný stav je považovaný za relativně nestabilní a na rozdíl od iPSC rovněž méně náchylný k akumulaci genetických mutací (Xu, L., *et al.*, 2014). Dediferenciace a rediferenciace je řízena epigenetickou variací specifických genů, které svou zvýšenou/sníženou expresí ovlivňují proliferaci nové buněčné linie z progenitoru a mohou se tak podílet na regeneraci tkáně (Gao, Y., *et al.*, 2019). Dediferenciací lze docílit i produkce multipotentních kmenových buněk *in vivo*, umožňujících obnovení široké škály buněk a modelaci onemocnění (Jones, J. C., 2019).

Transdiferenciace může být vyvolána nejen experimentálně, ale může k ní dojít i zcela přirozeně, v rámci odpovědi organismu na některá poranění. Poprvé byl tento aspekt popsán u druhu ryb Zebrafish, které mají schopnost srdeční regenerace pomocí dediferenciace buněk a proliferace nových kardiocyocytů (Jopling, Ch., *et al.*, 2010). S fyziologickou transdiferenciací je možné se nejčastěji setkat v orgánech, které pocházejí ze dvou vývojově si blízkých tkání (játra, pankreas). Po poranění jater nastává inhibice charakteristických genů pro hepatocyty, což má za následek, že přestávají plnit svoji metabolickou a syntetickou funkci. Genová exprese se převrátí směrem k markerům specifickým pro epiteliální buňky žlučových cest, a tím se začíná přizpůsobovat i jejich vzhled a velikost buňkám žlučovým (Tarlow, B. D., *et al.*, 2014).

3.2.1 Transdiferenciace buněk imunitního systému

První popsanou transdiferenciací imunitních buněk byla přeměna B lymfocytů na makrofágy, potlačující rozdíly mezi buňkami myeloidní a lymfoidní linie. Transdiferenciace byla indukovaná expresí transkripčních faktorů *C/EBP α* , *C/EBP β* , které efektivně inhibují vývoj B lymfocytů a zároveň stimulují jejich konverzi v makrofágy (Xie, H., *et al.*, 2004). Později byly transdiferenciační postupy, konvertující jednotlivé buňky imunitního systému, zaměřeny na jejich uplatnění při imunoterapii, především při potlačování vrozených imunodeficiencí a autoimunitních onemocnění, nebo při nádorové terapii. Konkrétním

příkladem je transdiferenciace T lymfocytů na NK buňky, podmíněná delecí *Bcl11b* (B Cell CLL/Lymphoma 11B), která je indukována kultivací buněk s 4-hydroxytamoxifenem (Li, P., *et al.*, 2010). *Bcl11b* je, podobně jako ostatní transkripční faktory, angažované ve vývoji thymocytů, řízen vnějšími signály a vazbou na některé povrchové receptory. Bylo tedy potvrzeno, že konverze T lymfocytů na linii NK buněk může být rovněž spuštěna deficiencí CD147. Ztráta tohoto receptoru, který je exprimován především nádorovými buňkami, má za následek narušení Wnt dráhy a snížení exprese *Bcl11Bb*. Cílená blokáce CD147 pomocí specifické monoklonální protilátky tedy zajišťuje produkci lymfocytární populace buněk vrozené imunity, zahrnující $\gamma\delta$ T, NKT a NK buňky, což představuje potenciálně významnou úlohu při léčbě rakoviny (Geng, J. J., *et al.*, 2017).

Transdiferenciace imunitních buněk s potenciálem v imunoterapii byla popsána například na konverzi odlišných T buněčných populací, za účelem eliminace rozvoje některých zánětlivých a autoimunitních onemocnění. Rovnováha mezi T regulačními buňkami (Treg) a pomocnými T lymfocyty, konkrétně Th17, se totiž ukázala jako klíčová pro rozvoj onemocnění jako je revmatoidní artritida, systematický lupus erythematoses, idiopatické záněty střev (IBD) nebo pro některé těhotenské komplikace (preeklampsie). Byly tedy popsány postupy vzájemné indukované konverze těchto buněk ve směru Treg na Th17, ale i obráceně. Jejich plasticita je závislá na přítomnosti *TGF β* , *IL6* (interleukin 6), *Foxp3* (forkhead box P3), *IL17* (interleukin 17) a produkci progenitorové buňky, z níž jsou obě buňky odzveny. Obě populace buněk pocházejí ze shodného CD4⁺ prekurzoru, který jim během transdiferenciace slouží jako pomyslná meziprogramová buňka. Inkorporací genu *IL17A* do DNA Treg vyvolá jejich přeměnu na IL17⁺Foxp3⁺CD4⁺T buňky, které po delší kultivaci ztrácejí expresi *Foxp3* a formují se v prozánětlivé Th17 s expresí charakteristických markerů IL17, Sox4, transkripčního faktor ROR γ t (RAR-related orphan receptor gamma) a receptoru CCR6. Prokázána byla i diferenciaci Treg na Th17, indukovaná zánětlivým mikroprostředím, například v podobě synoviální tekutiny a synoviálních fibroblastů v kloubu při revmatoidní artritidě. Opačným procesem je transdiferenciace Th17 buněk na imunosupresivní Treg, která je podpořena signalizací *TGF β* a aktivací receptoru AHR (Aryl hydrocarbon receptor). Opět vzniká nejprve přechodná buňka IL17⁺Foxp3⁺CD4⁺T, která je následně přeměněna na regulační Treg (Tr1) buňky, exprimující *Foxp3* a *IL10* (Komatsu, N., *et al.*, 2013; Gagliani, N., *et al.*, 2015)

4 Přímá a nepřímá konverze myších fibroblastů na hepatocyty

4.1 Fibroblasty

Fibroblast je základní jednotka pojivové tkáně, která má plochý, podlouhlý tvar s velkým oválným jádrem uvnitř. Jedná se o velmi heterogenní a dynamickou populaci buněk, která je řazena k nejrozšířenějším buněčným liniím v lidském těle. Fibroblasty tak mohou díky své nespecifitě na různých místech plnit odlišné funkce (Croft, C. B., & Tarin, D., 1970). Klíčovým aspektem fibroblastů je produkce prekurzorů pro kolagen, který vyplňuje prostor mezi vlákny a buňkami v pojivové tkáni. Díky této vlastnosti jsou nedílnou součástí mnoha fyziologických procesů jako je syntéza extracelulární matrix, epiteliální diferenciaci, regulace zánětu a regenerace tkáně. Nejpočetnější skupinou jsou dermální fibroblasty, které se vyskytují v pokožce. Jejich specifita a množství produkce určitého typu kolagenu je závislá na hloubce, ve které se v pokožce nachází. Fibroblasty ve svrchní vrstvě pokožky vytvářejí velké množství kolagenové mRNA, jejíž kvantita s každou nižší vrstvou postupně klesá (Ali Bahar, M., *et al.*, 2004).

Fibroblasty, jakožto buňky mezenchymálního původu, mají schopnost se za určitých podmínek konvertovat do fenotypu ostatních buněk pojivové tkáně se stejným zárodečným původem. Při vhodné stimulaci je tudíž umožněna jejich přeměna například na adipocyty, chondroblasty nebo myofibroblasty (Denu, R. A., *et al.*, 2016). Především neonatální fibroblasty vykazují vysokou plasticitu, která je s největší pravděpodobností způsobena expresí solubilních signálních molekul a molekulárním rámcem extracelulárního mikroprostředí fibroblastů, které ovlivňují jejich aktivitu (Mateu, R., *et al.*, 2016). Díky této tvárnosti byly zcela prvními somatickými buňkami reprogramovanými do iPSC a rovněž první buněčnou populací transdiferencovanou na buňky svalové. (Takahashi, K., & Yamanaka, S., 2006; Davis, R. L., *et al.*, 1987). Dnes jsou fibroblasty běžně využívány pro účely reprogramování, především kvůli jejich dostupnosti a snadné kultivaci *in vitro*. Základní kulturou jsou myší embryonální fibroblasty (MEF), ale existují i další fibroblastové linie se specifickým použitím jako například NIH3T3, pocházející z embryonální tkáně Swiss albino myši se stabilní rychlostí růstu (Kantawong, F., *et al.*, 2018). Pro klinické využití je především tendence nahrazení myších fibroblastů za lidské dermální fibroblasty, u kterých je možné pomocí guide RNA aktivovat pluripotentní geny, a tím reprogramování buněk (Xiong,

K., *et al.*, 2017), nebo specifickými faktory vyvolat přímou konverzi na jiný buněčný typ, za účelem regenerace tkání (Boullaraoui, S. M., *et al.*, 2018).

4.2 Játra a buňky jater

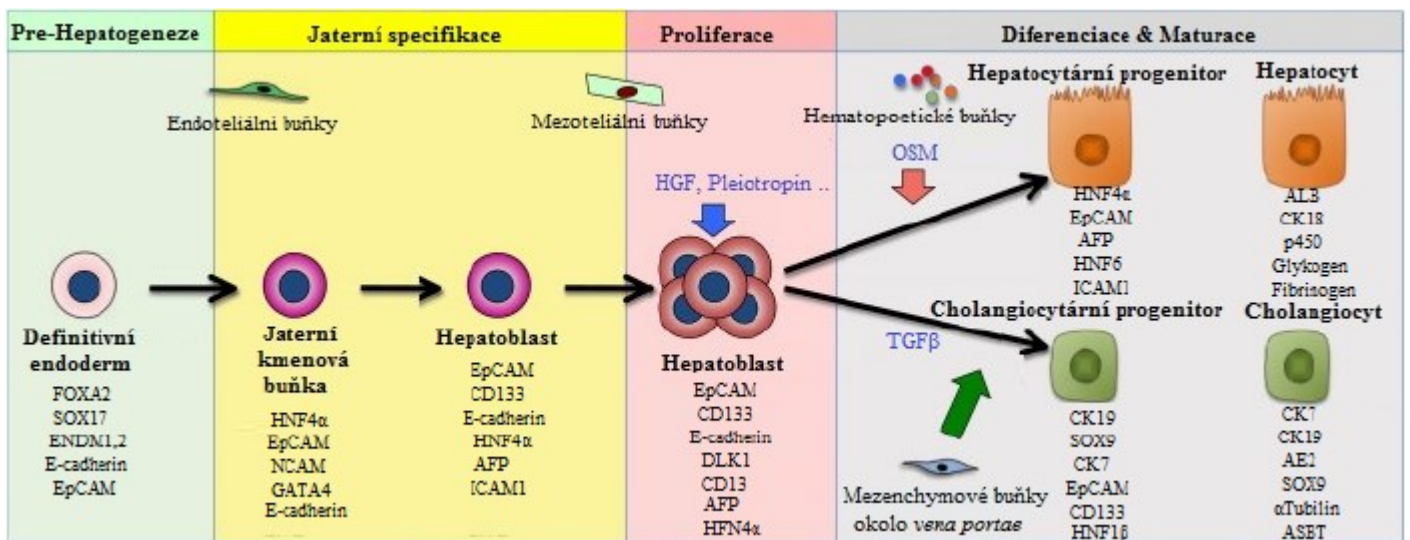
Anatomií, fyziologií a patologickými poruchami jater, žlučníku, žlučových cest a mnohdy i pankreatu se zabývá lékařský obor hepatologie. Játra se u lidí objevují na konci 3. týdne embryonálního vývoje. Jejich výstavba probíhá z okolní pojivové tkáně mesenchymálního původu (vazivový obal) a soustavy jaterních buněk uvnitř, které pocházejí z endodermu. Až od konce 4. embryonálního týdne lze hovořit o tvorbě primitivních jaterních sinusoid, které úzce korelují s hepatocyty. Základní funkční jednotkou jater je jaterní acinus, který je rozdělen na 3 zóny. V první probíhá glukoneogeneze, tvorba močoviny, žluči a cholesterolu, druhá je označována jako přechodná a třetí terminální zóna slouží ke glykolýze a syntéze lipidů a ketolátek. Základní stavební jednotkou jater jsou hepatocyty, které se akumulují do větších komplexů - trámců (shrnutí v Crawford, J. M., *et al.*, 2018).

4.2.1 Hepatocyty a cholangiocyty

Jaterní parenchym je z velké části tvořen jaterními buňkami (hepatocyty) a buňkami epitelu žlučových cest (cholangiocyty). Hepatocyty jsou buňky o velikosti desítek nanometrů, které jsou morfologicky uzpůsobeny ke skladování jaterního glykogenu, efektivnímu vstřebávání živin a zprostředkování metabolických dějů. V tom jim napomáhá mikrotubulární a mikrofilamentární povaha cytoskeletu, obsahující *tight junctions*, které regulují prostupnost membrány. Na rozhraní dvou hepatocytů se nacházejí intrahepatální žlučové kanálky, které jsou tvořeny pouze stěnami jednotlivých buněk, do nichž je produkována žluč, která slouží k eliminaci bilirubinu, cholesterolu a xenobiotik. Cholangiocyty jsou epiteliální buňky, které vytváří trojrozměrnou síť žlučových cest a díky regulovanému transportu vody, iontů a dalších rozpuštěných látek skrz jejich plasmatickou membránu, přispívají k sekreci žluči (shrnutí v Crawford, J. M., *et al.*, 2018).

Hepatocyty i cholangiocyty jsou odvozeny od shodného bipotentního jaterního progenitoru, tzv. hepatoblast (Haruna, Y., *et al.*, 1996). Ačkoli je hepatoblast endodermálního původu, jeho exprese a diferenciaci je řízena signálními molekulami, pocházejícími z mezodermu. Pro jeho správný vývoj je tedy nezbytná rovnováha mezi signálními

dráhami TGF β (Transforming growth factor β), WNT, FGF (Fibroblast growth factor) a BMP (Bone morphogenetic protein), která vede k expresi specifických markerů *EpCAM* (Epithelial cell adhesion molecule), *CD133* (Prominin-1), *SOX9* (Sex-Determining Region Y Box 9), *NCAM* (Neural cell adhesion molecule), *HNF4 α* (Hepatocyte nuclear factor 4 alpha) a některých cytokeratinů (Dessimoz, J., et al., 2006; Berg, T., et al., 2007; Matsumoto, K., et al., 2008). Bylo prokázáno, že raná fáze hepatocytární specifikace je rovněž pozitivně ovlivněna geny *FOXA1* (Forkhead box A1) a *FOXA2* (Forkhead box A2) (Li, Z., et al., 2009). V průběhu 8. embryonálního týdne dochází k diferenciaci hepatoblastu a oddělení jednotlivých linií se specifickými změnami v expresi. Hepatoblasty, nacházející se v blízkosti *vena portae*, se diferencují v populaci cholangiocyty. Ty exprimují charakteristický transkripční faktor *SOX9* a faktor *SALL4* (Sal-like protein 4), inhibující vývoj směrem k hepatocytární linií (Antoniou, A., et al., 2009). Oproti tomu hepatoblasty, ovlivněné přítomností *OSM* (oncostatin M) a *HGF* (Hepatocyte growth factor), dozrávají v hepatocyty, produkující albumin a α -fetoprotein (Kamiya, A., et al., 2001).



Obrázek 3 Schéma diferenciacie hepatocytů a cholangiocyty (Miyajima, A., et al., 2014; Chaudhari, P., et al., 2016).

4.2.2 Kupfferovy buňky

Kupfferovy buňky se poprvé objevily v roce 1876, kdy je v jaterním parenchymu indentifikoval Karl Wilhelm von Kupffer, po kterém dnes nesou své jméno (Kupffer, C., 1876). Jedná se o specializované jaterní makrofágy, odvozené od cirkulujících monocytů a představující největší populaci reziduálních makrofágů. Funkčně i morfologicky jsou velmi

provázané s běžnými tkáňovými makrofágy, ačkoli bylo dokázáno, že na nich nejsou jakkoli závislé. Jaterní makrofágy jsou přítomné v lumenu jaterních sinusoid, kde se účastní vrozené imunitní odpovědi. Jejich nepravidelný tvar s výběžky jim umožňuje prostupovat do perisinusoidálního prostoru, kde tak mohou pomocí hydrolytických enzymů (lysozomy, fagozomy) efektivně likvidovat cizorodé částice, nádorové buňky, makromolekuly a všobecně reagovat na jakékoli poškození jater. (Fox, E. S., *et al.*, 1987). Kupfferovy buňky jsou aktivovány prostřednictvím TLR4 receptoru na svém povrchu, kterým interagují s přítomným endotoxinem a zahajují tak prozánětlivou odpověď a fibrózu jater (Rivera, Ch. A., *et al.*, 2007; Meng, F., *et al.*, 2012). Jejich hlavní funkcí je však kromě obrany imunitního systému i navození tolerance vůči antigenům, adsorbovaným z gastro-intestinálního traktu. V této souvislosti lze Kupfferovy buňky považovat za tzv. tolerogenní APC buňky, které mohou prostřednictvím MHC molekul potlačit aktivitu T buněk a regulovat imunitní odpověď (You, Q., *et al.*, 2008). Imunomodulační funkci mají i při transplantaci jater, kdy navozují toleranci k dárcovskému jaternímu štěpu. V tomto případě k reprogramování Kupfferových buněk směrem k tolerantnímu fenotypu napomáhá regulovaná exprese *TNF α* (tumor necrosis factor alpha) a *PGE2* (Prostaglandin E2) mezenchymálními kmenovými buňkami (You, Y., *et al.*, 2015). Vysoká plasticita Kupfferových buněk jim rovněž umožňuje polarizovat se na prozánětlivé makrofágy M1 nebo na hojivé protizánětlivé makrofágy M2, v závislosti na okolním prostředí jater a aktivaci NF κ B signalizace skrz receptor PPAR- γ (Luo, W., *et al.*, 2017).

4.3. Přímá konverze fibroblastů na indukované hepatocyty

V roce 2011 byla popsána přímá konverze somatických buněk ne-hepatocytární linie na hepatocyty *in vitro*. Bylo tak dokázáno, že kromě jaterních progenitorových buněk lze i v jiných typech buněk po specifické stimulaci vyvolat řízenou hepatocytární diferenciaci společně s aktivací fenotypu, který odpovídá jaterním buňkám. Na základě výběru genů, souvisejících s vývojem a diferenciací hepatocytů (*Hnf4a* a *Foxa1/Foxa2/Foxa3*), byl připraven plasmid, vnášející danou kombinací genů do izolovaných myších embryonálních fibroblastů (MEF) (Sekiya, S., & Suzuki, A., 2011). Kombinace genů byla zvolena na základě jimi kódovaných proteinů, které jsou nezbytnými kompetenty při správném vývoji a funkci jater a jaterních buněk. *Hnf4a* (Hepatocyte nuclear factor 4a) hraje klíčovou roli při

diferenciaci a genové expresi hepatocytů, *Foxa1*, *Foxa2* a *Hnf1 β* ovlivňují vývoj jater a *Hnf1 α* a *Foxa3* se účastní regenerace jater (Huang, P., et al., 2011). Stimulací těmito geny byl vyvolán vznik populace indukovaných hepatocytů (iHep), jejíž buňky se začaly postupně shlukovat do klastrů a měnit morfologický vzhled, vzdalující se linii fibroblastů. U populace indukovaných hepatocytů byly následně imunocytochemicky obarveny markery, charakteristické pro danou konverzi (Albumin, α -fetoprotein, E-cadherin, Vimentin) a současně byly provedeny testy, ověřující přítomnost zásobních glykogenových váček (PAS reakce) a kompetenci iHep pro lipoprotein LDL (LDL uptake) (Sekiya, S., & Suzuki, A., 2011).

Transdiferenciace lidských fetální (HFF) a lidských dospělých fibroblastů (HAF) na hepatocytární buňky byla zajištěna transdukcí retrovirálního vektoru, nesoucího některou z kombinací transkripčních faktorů *HNF4 α* , *FOXA2*, *C/EBP β* (Kogiso, T., et al., 2013); *FOXA3*, *HNF1 α* , *HNF4 α* (Huang, P., et al., 2014); *FOXA2*, *FOXA3*, *HNF4 α* , *ATF5* (Activating transcription factor), *PROX1* (Prospero homeobox protein 1) (Nakamori, D., et al., 2017). Efektivita transdiferenciace může být zvýšena i *Kdm2b* (Lysine Demethylase 2B) v přítomnosti faktorů *Hnf4 α* a *Foxa3* (Zakikhan, K., et al., 2016). Následně na lidských indukovaných hepatocytech (hiHep), generovaných pomocí lentivirové exprese *FOXA3*, *HNF1 α* a *HNF4 α* , byla znázorněna jejich schopnost integrace do jaterní tkáně a jaterní funkce *in vivo*, na základě transplantace hiHep do imunodeficientní myši s jaterní chorobou, kde byla navozena regenerace jater a obnovení přibližně 50% jaterních funkcí (Huang, P., et al., 2014; Huang, P., et al., 2019). Kromě výše vyjmenovaných kombinací transkripčních faktorů lze přímé konverze docílit i stimulací *Hnf1 α* s malými molekulami (A-83-01, CHIR99021, BMP4), které se účastní inhibice TGF β signalizační drahy a aktivace MET, což má za následek robustní proliferaci vysoce maturovaných iHep (Lim, K. T., et al., 2016).

4.4 Nepřímá konverze fibroblastů na indukované hepatocyty

Produkce iHep může být docílena kromě transdiferenciace také reprogramováním či nepřímou konverzí z MEF. Během reprogramování dochází k produkci indukovaných pluripotentních kmenových buněk a následně vhodnou stimulací k diferenciaci na hepatocytární buněčnou linii (Li, H.Y., et al., 2011). V této souvislosti bylo již provedeno i reprogramování lidských indukovaných pluripotentních buněk na hepatocyty *in vitro*,

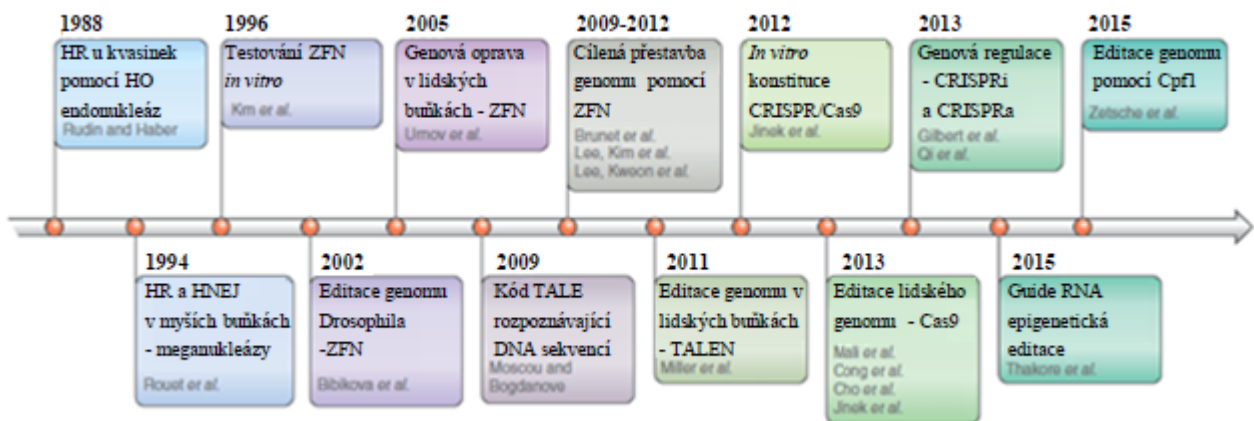
podmíněné transdukci transkripčních faktorů *HNFa* a *FOXA2* (Takayama K, *et al.*, 2012). Kvalita reprogramování zralých lidských fibroblastů na hepatocyty *in vitro* byla zvýšena díky upravené kombinaci reprogramovacích faktorů, kdy došlo k nahrazení *c-Myc* za *Parp1* a hiPSC tak byly generovány na základě přítomnosti reprogramovací kombinace *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *Parp1* (Poly [ADP-ribose] polymerase 1). Absencí *c-Myc* bylo docíleno snížení nebezpečí, spojeného se vznikem tumorogeneze během reprogramování (Huang, Ch-S., *et al.*, 2018).

Na základě zákonitostí organogeneze jater byla však popsána i konverze myších embryonálních fibroblastů na indukovanou jaterní kmenovou buňku (iHepSC) pomocí kombinace faktorů *Hnf1β* a *Foxa3*. Indukovaná bipotentní buňka tedy exprimovala nejen markery charakteristické pro jaterní progenitorovou buňku (*Sox9*, *AFP*, *EpCAM*), ale rovněž i hepatocytární markery (*Albumin*, *Hnf4α*, *Transthyretin*), cholangiocytární markery (cytokeratiny - *CK7*, *CK19*) a společné markery (*CK8*, *CK18*). Příslušnou stimulací specifickými kombinacemi transkripčních faktorů byla tak umožněna produkce hepatocytů (*OSM*, *EGF*) nebo cholangiocytů (3D kultura) *in vitro*. Implantací iHepSC do myši došlo k jejich integraci do jater, kde se vlivem prostředí diferencovaly ve zralé hepatocyty a cholangiocyty *in vivo*, a byla tak zahájena obnova poškozené jaterní tkáně (Yu, B., *et al.*, 2013; Chaudhari, P., *et al.*, 2016). Podle nedávných studií lze však z MEF generovat *in vitro* i *in vivo* bipotentní jaterní kmenovou buňku, která je maturována pouze na cholangiocytární linii. Dochází tak ke vzniku iHepSC, která byla stimulována kombinací faktorů *Hnf1α* a *Foxa3*. Důraz je zde kladen na význam *Hnf1β* ve vývoji cholangiocytů s potlačenými hepatocytárními markery a současně roli *Hnf1α* ve formování bipotentních jaterních buněk a produkci hepatocytů (Lim, K. T., *et al.*, 2018). Výhodou přímé konverze fibroblastů na hepatocyty je tedy eliminace rizika rozvoje nádorů, které se pojí s iPSC, a cílená diferenciací v hepatocytární buněčnou linii, která není doprovázená produkcí cholangiocytů.

5 Genová editace a přehled editačních metod

Editace genomu je cílená genetická úprava (mutace) DNA na úrovni bází i celých nukleotidů, která probíhá na konkrétním místě v genomu organismu. Genetické mutace (inserce, delece, substituce) jsou způsobeny speciálně navrženými nukleázami nebo tzv. molekulárními nůžkami, založenými na schopnosti specificky rozštěpit dsDNA. Indukované

dvouvláknové zlomy jsou následně opraveny nehomologním spojením konců (NHEJ), kdy dochází k ligaci konců zlomu, nebo přímou homologní opravou (HDR), která je zprostředkována vloženou templátovou DNA, podle které je syntetizováno opravené komplementární vlákno. HDR mechanismem tak může docházet k záměrným substitucím nukleotidových bazí, kterými jsou do genomu vnášeny mutace, podporující remisí nebo rozvoj onemocnění. Zatímco neúplná komplementarita koncových přesahů v rámci NHEJ může způsobit inzerci nebo delecí páru bází v místě zlomu, tudíž i narušení čtecího rámce a knock-out určitého genu (Rouet, P., et al., 1994). Oprava může být zprostředkována i mikrohomologním spojením konců (MMEJ), kdy jsou odhaleny krátké (5-25bp) mikrohomologické sekvence na obou koncích dvouvláknového zlomu (DSB), kterými je následně řízena oprava. V případě MMEJ dochází nejčastěji k delecí úseku DNA mezi mikrohomologiemi (McVey, M., & Lee, S. E., 2008). Mezi nejpoužívanější editační metody patří ZFNs, TALEN a CRISPR/Cas9, které se záměrnou manipulací genomu snaží dosáhnout modelace některých onemocnění a návržení efektivních terapií.



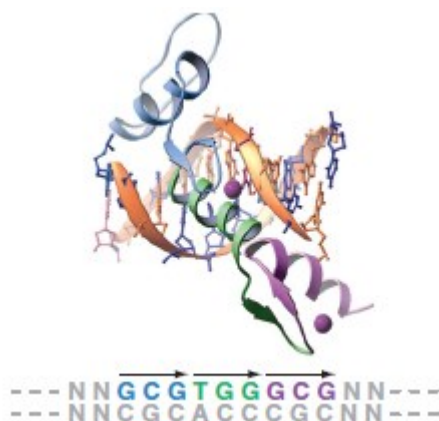
Obrázek 4 Počátek a průběh vývoje jednotlivých metod pro editaci genomu (Kim, J.-S., 2016)

5.1 ZFN technologie

Zinc Finger Nuclease technologie (ZFN) funguje na principu, který využívá k cílené editaci genomu zinc finger nukleáz, vytvářejících dvouřetězcové zlomy ve specifických místech DNA. ZFN představují jednu z DNA vázajících proteintových tříd, které jsou zkonstruovány ze dvou domén - Zinc Finger (ZF) doména a katalytická nukleázová doména (Kim, Y. G., et al., 1996). ZF doména je odvozena od Cys2-His2 ZF proteinů, které jsou schopny rozpoznávat 3 nukleotidové báze (Enuameh, M. S., et al., 2013). ZFN je zcela

kompletní až po připojení i druhé domény - nukleázy FokI. Tato restriční endonukleáza II. typu je izolovaná z *Flavobacterium okeanoikoites* a efektivně štěpí DNA (Kim, Y. G., *et al.*, 1996). Teprve spojením obou domén je vytvořený pár vysoce specifických genomických nůžek (Bibikova, M., *et al.*, 2001). Ty mohou být do buněk transportovány ve formě DNA nebo RNA a lze je navrhnout pro jakýkoli gen v lidském genomu (Urnov, F. D., *et al.*, 2005). Nukleázové štěpení je řízeno pomocí předem definovaných ZF domén, které rozpoznávají konkrétní místo nejčastěji podle jedné ze sekvencí: 5-CNN-3-, 5-GNN-3-, 5-ANN-3-, na kterou se specificky vážou (Dreier, B., *et al.*, 2005). Dvouvláknový zlom je následně opraven jedním z opravných mechanismů NHEJ nebo HDR (Rouet, P., *et al.*, 1994).

Každý z tzv. zinkových prstů se skládá ze 30 párů cysteinových a histidinových zbytků, které vždy váží jeden zinkový ion (Zn^{2+}). Koncové části zinkových prstů jsou vkládány do jamek DNA, kde probíhá interakce s již zmíněným tripletem bází. Většina ZF proteinů je tvořena 2 a více zinkovými prsty, které jim umožňují rozeznávat delší nukleotidové sekvence, a tím se zvyšuje jejich specifčnost. Modularita jednotlivých zinkových prstů poskytuje kooperaci 3 až 6 ZF proteinů dohromady, tudíž se specificky váží až na 9-16bp. Synteticky připravené ZF proteiny jsou pak schopny rozpoznat téměř jakoukoli DNA sekvenci (Händel, E. M., *et al.*, 2008).



Obrázek 5 Zinc Finger - Protein se třemi zinkovými prsty, interagující se třemi specifickými tripletovými sekvencemi DNA (převzato z Gene Expression, 2017).

Modelovým organismem pro testování ZFN byla *Drosophila melanogaster*, u jejichž larev byly exprimovány ZF nukleázy, kterými byl vytvořen specifický dvouvláknový zlom na y genu na chromozomu X. Prostřednictvím NHEJ opravy pak byly vyvolány somatické mutace především u samčí linie (Bibikova, M., *et al.*, 2002). Tato technologie byla urychlena

a usnadněna pomocí injikace syntetické mRNA, kódující pár ZFN, což umožnilo editaci genů v jakémkoli lokusu u dvou generací *D. melanogaster* (Beumer, K. J., *et al.*, 2008). Později bylo docíleno i úpravy lidské DNA v definovaných genomických úsecích (Urnov, F., D., *et al.*, 2005). Konkrétně bylo navrženo více než sto syntetických ZFN, zaměřených na různé úseky CCR5 genu, tedy koreceptoru, nezbytného pro infekci HIV. Cílem knock-out CCR5 byla produkce T buněk, rezistentních k HIV infekci u AIDS pacientů. (Perez, E. E., *et al.*, 2008). ZFN se podílely i na vývoji terapie pro pacienty s X-vázanými těžkými kombinovanými imunodeficiencemi, na základě korekce genu IL2RG v hematopoetických kmenových buňkách (Genovese, P., *et al.*, 2014). Vkládání ZFN bylo umožněno pomocí plasmidu, který byl navrženy tak, aby kromě dané sekvence obsahoval i transgeny nebo fluorescenční barviva, kterými je možné indukovat specifickou mutaci nebo označit požadované geny (Gaj, T., *et al.*, 2012; Bonawitz, N. D., *et al.*, 2018). ZFN mohou být však poměrně cytotoxické pro hostitelské buňky a mohou se objevovat i chybná štěpení míst, která vykazují homologii s cílovou sekvencí (Bonawitz, N. D., *et al.*, 2018). Pro dosažení specifitějšího a účinnějšího štěpení byla vyvinuta nová sada ZF nukleáz, která zvyšuje konfigurační možnosti tím, že je zacílena na 23-28bp zvoleného genomického lokusu. Jejich štěpné FokI domény jsou připojeny na N-terminální konec jednoho nebo obou zinkových prstů v ZFN dimeru a je jim současně umožněno přeskokovat baze mezi jednotlivými cílovými tripletami u sousedících zinkových prstů (Paschon, D. E., *et al.*, 2019).

5.2 TALEN technologie

Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) je efektivní technologií pro editaci genů v živých buňkách téměř jakéhokoli hostitele, včetně bakterií, kvasinek, rostlin i savců. TALEN jsou enzymy, produkované bakteriemi z rodu *Xanthomonas*, které jsou známé jako rostlinné patogeny (Pérez-Quintero, *et al.*, 2013). TAL efektorové nukleázy jsou, podobně jako ZF nukleázy, sestaveny ze dvou odlišných domén - TAL efektorové domény a katalytické nukleázové domény, tvořené restriční endonukleázou FokI. TAL doména je vystavěna z několika různých aminokyselinových repetic, přičemž každá z nich obsahuje 33-35 aminokyselin. Tyto domény vyhledávají konkrétní místa DNA, která rozpoznávají pomocí dvou vysoce variabilních aminokyselinových zbytků, tzv. repeat variable diresidues (RVDs), nacházejících se vždy na 12.-13. pozici každé repetice. Na rozdíl

od ZFN, každá repetice TAL-efektorové nukleázy rozpoznává jednu určitou bázi. Vždy mohou být spojeny až 4 různé repetice pro vytvoření nové TAL domény. (Moscou, M. J. & Bogdanove, A., 2009).

TAL domény se přirozeně váží na DNA infikovaných rostlin, čímž ovlivňují jejich genovou expresi a vyvolávají rozvoj onemocnění. Synteticky připravené TAL domény jsou zkonstruovány tak, aby jejich RVDs dokázaly rozpoznávat jakoukoli sekvenci nejen v rostlinném genomu (Pérez-Quintero, et al., 2013). Hotové genomické nůžky, sestavené fúzí obou domén, jsou fluorescenčně značeným plasmidem transfekovány do jádra hostitelské buňky, kde se TAL doména specificky váže na danou sekvenci DNA. Principem TALEN metody je rozštěpení dvoušrobovice restriční endonukleázou v místě, které je označeno TAL doménou. Tím je aktivován opravný mechanismus NHEJ, spojující nehomologní konce DNA z obou stran dvouvláknového zlomu, nebo HDR, kdy zvýšení úrovně homologní rekombinace a úspěšná intrograsa může být zajištěna TAL-efektorovými nukleázami, transportovanými plasmidem ve formě mRNA, (Miller, J. C., et al., 2011; Kim, Y., et al., 2013).

TAL efektorové nukleázy byly nejprve navrženy pro *in vitro* editaci lidských buněk (Miller, J. C., et al., 2011) a *in vivo* editaci modelových organismů *Zebrafish* a *D. melanogaster* (Bedell, V. M., et al., 2012). Prvního klinického využití se metoda TALEN dočkala v roce 2015, kdy byla použita při léčbě akutní lymfoblastické leukemie u 11-ti měsíčního dítěte. Byly vyvinuty univerzální autologní T buňky, exprimující chimerický antigenní receptor proti B buněčnému antigenu CD19 (CD19-CAR T), které byly lentivirální transdukcí dopraveny do lidských buněk. U takto zkonstruovaných buněk bylo dokázáno, že jsou schopny vyvolat remisi nejen u pacientů s akutní, ale i s chronickou lymfoidní leukemií a non-Hodgkinovým lymfomem. Výhodou TALEN je především poměrně nízká cytotoxicita a imunogenicita v lidských buňkách (Lee, D. W., et al., 2015). TAL efektorové nukleázy mohou být také zavedeny do embryí různých živočišných druhů, kde genetickými změnami ovlivňují zárodečný vývoj. Sestavením fluorescenčně značeného specifického páru TALEN pro první exon genu *OCT4* a jeho injekcí do fertilizované zygoty byla prostřednictvím homologní rekombinace vyvolána cílená modifikace embryí non-human primátů (Chu, C., et al., 2019). Editace TAL efektorovými nukleázami je rovněž testována jako terapeutický nástroj pro léčbu HIV na různých zvířecích modelech. Cílená úprava je zaměřena na knock-genů vstupních virových receptorů - CCR5, CXCR4 (Benjamin, R., et

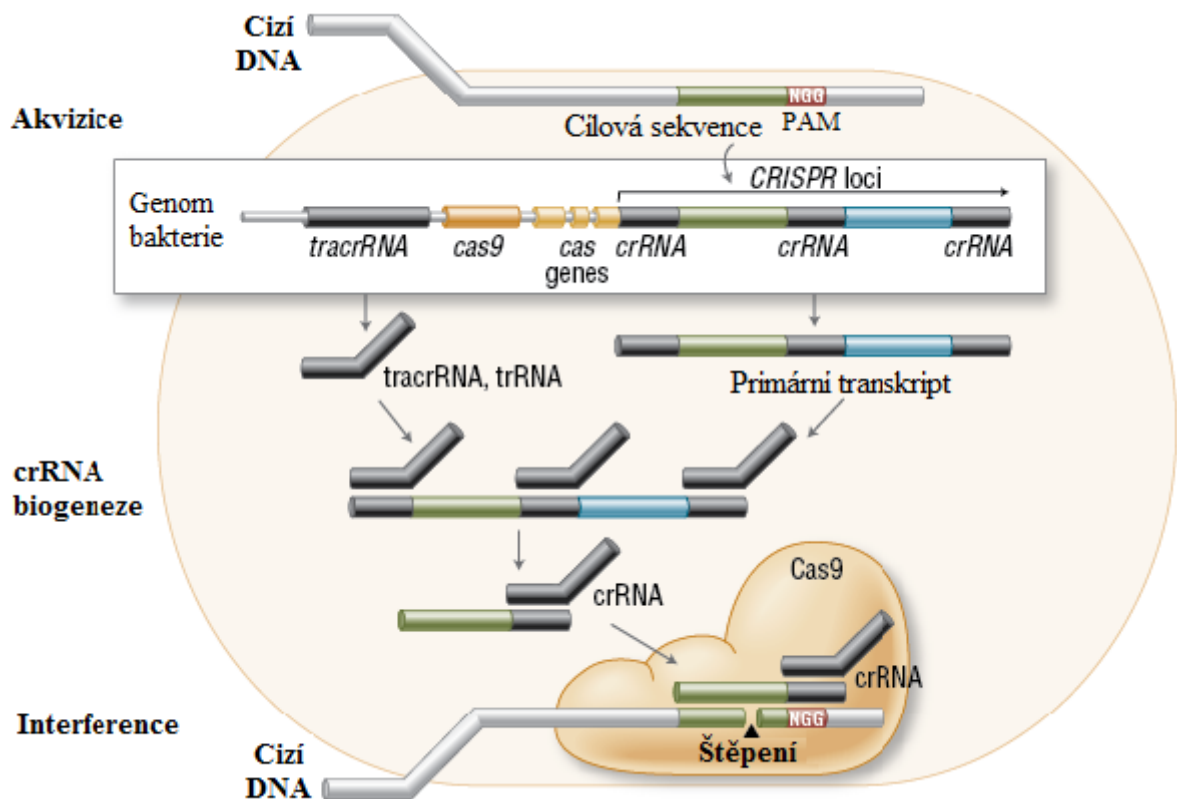
al., 2016), a HIV intergačního kofaktoru LEDGF/p75 (Lens epithelium-derived growth factor/p75) (Lampi, Y., *et al.*, 2019).

5.3 CRISPR/Cas9

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) je mikrobiální nukleázový systém, odvozený od adaptivní imunitní odpovědi prokaryot, který je chrání před ataky fágů a plasmidů. Bakterie totiž reagují na napadení fágem, přepisem příslušného DNA spaceru a přilehlých palindromových repetit do dlouhé RNA molekuly (sgRNA), která je díky nukleáze rozštěpena na kratší RNA (Mojica, F. J. M., *et al.*, 2005). Existují tři základní typy CRISPR systémů, identifikované v širokém spektru bakteriálních a archeálních hostitelů. Všechny z nich jsou však tvořeny kombinací CRISPR asociovaných genů, řadou opakujících se prvků (repetit) a nekódujícími sekvencemi RNA, řídicími specifické štěpení nukleázovou kyselinou Cas9. Repetice se nacházejí mezi krátkými variabilními sekvencemi tzv. protospacery, které jsou odvozeny od cílových sekvencí DNA. Dohromady pak vytváří crisp RNA (crRNA) (Hale, C. R., *et al.*, 2009). Principem všech typů metod je specifické štěpení DNA pomocí Cas9 nukleázy, která k lokalizaci cílové sekvence využívá nekódující RNA. Rozstřížené dvouvlákno je následně opraveno mechanismem NHEJ nebo HDR. CRISPR/Cas9 je metoda navržená především pro cílenou úpravu savčího genomu, prostřednictvím indukovaného knock-out genu, způsobeného insercí nebo delecí v průběhu NHEJ reparace, nebo knock-in genu během opravy HDR (Deltcheva, E., *et al.*, 2011).

Nejlépe popsáním systémem CRISPR je typ II., jehož klíčovými editačními molekulami jsou bílkovina Cas9 a guide RNA (gRNA). Guide RNA nese informaci o krátké cílové sekvenci (crRNA) a o dlouhé sekvenci, navigující Cas9 nukleázu (tracr RNA). Fúzí crisp a transkripční RNA single guide RNA (sgRNA), která zprostředkovává transport Cas9 na libovolné místo v genomu. Sekvence crRNA je tvořena 20 nukleotidy, které jsou homologní s požadovaným editačním úsekem. Pro tento úsek DNA je nezbytné, aby svým 3'koncem byl těsně navázán na sekvenci PAM (Protospacer Adjacent Motif), neboť Cas9 vytváří dvouřetězcový zlom v místě, které je vzdálené přibližně 3 báze od PAM. PAM je 2-6bp dlouhá DNA, která je rozpoznávána nukleázou Cas9 (Jinek, M., *et al.*, 2012). Všeobecně zavedenou sekvencí je 5' NGG 3', která je odvozena od bakterie *Streptococcus pyogenes*. Jedná se o jakoukoli nukleobázi N, po níž následují dvě guaninové báze (Cong, L., *et al.*,

2013). Je možné se setkat rovněž s ortology Cas9, které jsou derivovány od jiných bakterií a kooperují tudíž s jinými PAM sekvencemi jako např. *S. thermophilus* - 5' NNAGAA 3' pro CRISPR1 nebo 5' NGGNG 3' pro CRISPR3. PAM sekvence je součástí invazivního viru nebo plasmidu, který je transfekován do buňky, nesmí být však obsažena ve 20bp sekvenci sgRNA (Sapranaukas, R., *et al.*, 2011). Kromě sgRNA byla popsána i tzv. chimerická single guide RNA (cgRNA), která obsahuje nejen sekvence pro vytvoření dvouvláknového zlomu (cr + tracr RNA), ale i opravnou templátovou sekvenci, iniciující homologní rekombinaci (Butt, H., *et al.*, 2017).



Obrázek 6 Mikrobiální nukleázový systém CRISPR/Cas9 - Adaptivní imunita bakterií *in vivo* (Reis, A., 2014).

V roce 2012 byl CRISPR/Cas9 uveden jako nová metoda, umožňující *in vitro* editaci genomu (Jinek, M., *et al.*, 2012). O rok později byla provedena cílená úprava lidského genomu, založená na II bakteriálním typu CRISPR, využívající komplex crRNA-tracrRNA a nukleázu Cas9 (Mali, P., *et al.*, 2013). Terapeutický význam metody byl podnícen jejím aplikováním *in vivo*, což poskytovalo snazší modelování lidských onemocnění na zvířecích modelech (Yin, H., *et al.*, 2014). Modelace byla zaměřena především na nervové poruchy (Swiech, L., *et al.*,

2014). a některá dědičná neurodegenerativní onemocnění, například Huntingtonova (Monteys, A. M., *et al.*, 2017) nebo Parkinsonova choroba (Chen, Y., *et al.*, 2016). Pomocí CRISPR/Cas9 bylo docíleno epigenetické editace, která zajistila efektivní regulaci genů a korekci vrozených mutací u modelových organismů (Hilton, I. B., *et al.*, 2015). Expresí opraveného genu dystrophin byla obnovena funkce proteinu dystrophin v kosterních a srdečních svalech, a tím byla u myši zahájena terapie Duchennovy svalové dystrofie (Nelson, C. E., *et al.*, 2015). Bylo prokázáno, že synteticky připravená sgRNA zvyšuje účinnost editace lidských CD34⁺ hematopoetických kmenových a progenitorových buněk (Hendel, A., *et al.*, 2015). Imunoterapie upravenými hematopoetickými kmenovými buňky (HSC) byla zaměřena na léčbu X-vázaných těžkých kombinovaných imunodeficiencí, chronických granulomatóz nebo akutní lymfoblastické leukemie (Schirotti, G., *et al.*, 2017; Eyquem, J., *et al.*, 2017). Autologní transplantací HSC s opraveným genem β -globinu bylo docíleno jejich diferenciaci v erytrocyty a eliminaci β -hemoglobinopatií (Dever, D. P., *et al.*, 2016). Prostřednictvím CRISPR/Cas 9 editace β -globinu byl poprvé ovlivněn i vývoj lidských buněk na zárodečné úrovni. Zygota, vytvořená *in vitro* polyspermatikou fertilizací, tak nesla opravený lokus chromozomu 11, který přísluší genu, kódujícímu hemoglobinovou podjednotku (Liang, P., *et al.*, 2015). Převrat v oblasti genomiky nastal koncem roku 2018, kdy se narodila první lidská dvojčata s CRISPR/Cas9 editovaným genomem, který má být přirozeně rezistentní k HIV infekci (Cyranoski, D., 2018). Současně druhý aktuálně nejvýznamější projekt, který by měl být v blízké době zrealizován, se zabývá genovou editací, probíhající přímo v těle lidského dospělého jedince, která by usnadnila léčbu pacienta (Marchione, M., 2019).

6 Tvorba klinicky relevantního modelu onemocnění

6.1 Progresivní familiární intrahepatální cholestáza 4.typu

Progresivní familiární intrahepatální cholestáza (PFIC) je heterogenní skupina dědičných, autosomálně recesivních onemocnění jater, které jsou způsobeny mutacemi genů, souvisejícími se sekrecí a transportem lipidů a žlučových solí. Narušení těchto funkcí vede k akumulaci toxických složek žluči v organismu a zapříčiní vznik ikteru a pruritu (Clayton, R. J., *et al.*, 1969). Existuje celkem pět typů PFIC, které jsou rozděleny na základě fenotypu onemocnění a přítomnosti patogenních mutací v genech ATP8B1 (Paulusma, C., C., *et al.*,

2006), ABCB11 (Scheimann, A. O., *et al.*, 2007), ABCB4 (Wendum, D., *et al.*, 2012), TJP2 (Sambrotta, M., *et al.*, 2014) a NR1H4 (Gomez-Ospina, N., *et al.*, 2016).

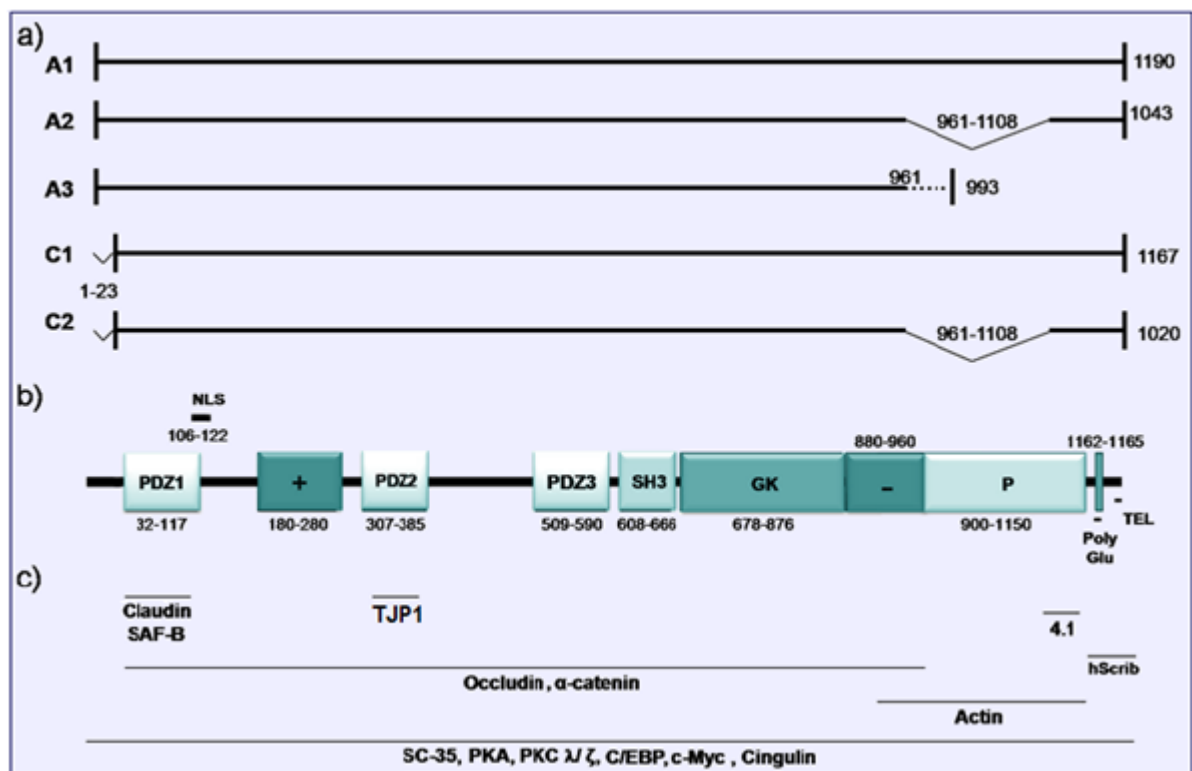
Progresivní familiární intrahepatální cholestáza 4. typu (PFIC4) byla poprvé popsána v roce 2014 jako jaterní onemocnění, vyvolané homozygotní či heterozygotní mutací genu *Tight junction protein 2 (TJP2)* (Sambrotta, M., *et al.*, 2014; Ge, T., *et al.*, 2019). Ztráta TJP2 je doprovázena eliminací integrálního proteinu těsných spojů Claudin 1 v kanalikulárních membránách jaterních buněk, a to má za následek poškození intracelulárních spojení a únik žluči z paracelulárního prostoru do jaterního parenchymu. PFIC4 může být, díky podobným klinickým projevům, spojován s progresivní familiární intrahepatální cholestázou 2. typu (PFIC2) (Sambrotta, M., *et al.*, 2014). Ta je způsobena mutací genu *ABCB11*, který kóduje kanalikulární protein ABCB11/BSEP. Protein BSEP (bile salt export protein) zajišťuje transport žlučových solí z jaterních buněk, tudíž poruchou jeho funkce dochází k hromadění žlučových solí v jaterních buňkách (Scheimann, A. O., *et al.*, 2007). Rozvoj PFIC4 rovněž souvisí se zvýšeným rizikem vzniku hepatocelulárního karcinomu u dospělých i dětí (Zhou, S., *et al.*, 2015; Vij, M., *et al.*, 2017).

6.2 TJP2

Protein těsných spojů 2 (Tight junction protein 2, TJP2), latinským názvem také Zonula occludens 2 (ZO2), je transmembránový protein, přítomný v těsných spojeních epiteliálních a endoteliálních buněk. Jedná se o protein s molekulovou hmotností okolo 160 kDa, který je kódovaný stejnojmenným genem *TJP2*, nacházejícím se na 9q21.11 chromozomu (Gumbiner, B., *et al.*, 1991). Existují dvě základní izoformy TJP2 - TJP2A (1-3) a TJP2C (1-2). Vzájemně se od sebe liší absencí N-koncového peptidu 23 aminokyseliny u izoformy TJP2C a aktivací transkripce samostatnými promotory. Téměř ve všech tkáních jsou exprimovány obě nebo alespoň jedna izoforma. Vysoká exprese TJP2C je typická pro ledviny, pankreas, srdce a placentu, zatímco v mozku a kosterních svalech je exprimován pouze TJP2A (Chlenski, A., *et al.*, 1999).

TJP2 patří do rodiny membránově asociovaných guanylátových kináz, která se vyznačuje přítomností PDZ, SH3 a GuK domén. Na C terminálním konci TJP2 se nachází i doména P, reprezentující oblast bohatou na prolin, jejíž délka se proměnlivá podle délky dané izoformy. Domény umožňují TJP2 spolupracovat s širokou škálou různých molekul -

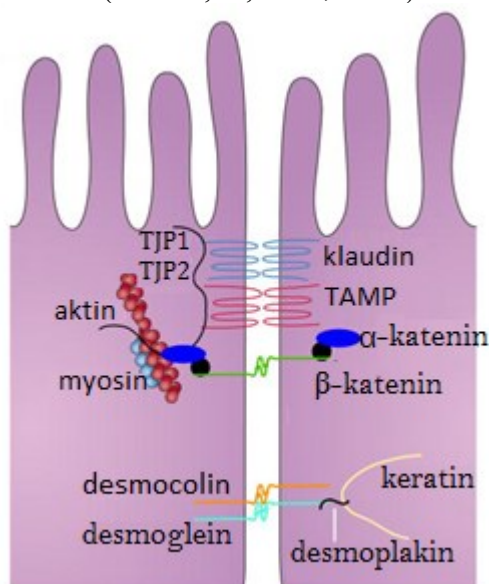
cytoskeletárními komponenty, adhezivními proteiny i některými nukleárními faktory (Itoh, M., *et al.*, 1999). Konkrétně TJP2 koprecipituje s tight junction proteinem 1 (TJP1) a v rámci těsným spojení interaguje s aktinem, cingulinem, okludinem a členy rodiny klaudin. Společně s těmito proteiny se podílí na výstavbě těsných buněčných spojení, která zajišťují transcelulární transport tkáňově specifických molekul a osmotickou rovnováhu buněk (Umeda, K., *et al.*, 2006; Raya-Sandino, A., *et al.*, 2017). Přítomnost proteinů těsných spojů v Sertoliho buňkách zdůrazňuje i roli TJP2 v bariéře krev-testis (Xu, J., *et al.*, 2009). Tento protein se vyskytuje rovněž v těsných spojích ledvinných podocytů, kde se společně s TJP1 účastní regulace jejich filtrační aktivity (Itoh, M., *et al.*, 2018).



Obrázek 7 Struktura a interkace TJP2. a) Izoformy TJP2 se samostatnými promotory - TJP2A(1-3) a TJP2C(1-2); b) Postavení jednotlivých TJP2 domén - PDZ, SH3, GuK. Oblast za doménou PDZ1 (značená +) představuje místo bohaté na bazické aminokyseliny, oblast za doménou GuK (značená -) je místo bohaté na kyselé aminokyseliny a oblast P na C terminálním konci reprezentuje prolin bohatý region. 3) Interakce s molekulami, se kterými se podílí na buněčné adhezi, výstavbě těsných spojení a přenosu signálu, prostřednictvím TJP2 domén. (převzato z Gonzalez-Mariscal, L., *et al.*, 2011)

Vyjma těsných spojení se TJP2 u některých epiteliálních buněk akumuluje i v jádře, kde se v interakci se SC-35 (splicing factor 35) a SAF-B (scaffold attachment factor B) účastní

nukleárního exportního signálu (NES) a nukleárního lokalizačního signálu (NLS) (Traweger, A., et al., 2003; González-Mariscal, L., et al., 2006). Svou lokalizací v jádře může zároveň ovlivňovat i proliferaci a apoptózu buněk (Walsh, T., et al., 2010). TJP2 vstupuje do jádra v pozdní G1 fázi buněčného cyklu a vystupuje v průběhu mitózy. V době vstupu může inhibovat transkripci lidského cyklinu D1 (CD1), jehož degradace má za následek blokování buněčného cyklu na úrovni přechodu G1 fáze na S fázi, a tím inhibici proliferace, což může mít souvislost se zvýšeným rizikem rozvoje již zmíněného hepatocelulárního karcinomu při ztátě funkčního TJP2 (Tapia, R., et al., 2009). Distribuce a funkce TJP2 je rovněž ovlivňována postranní modifikací, tzv. sumoylací, během které se protein SUMO (Small ubiquitin-like modifier) navazuje na lysinový postranní řetězec daného proteinu. Fúze TJP2 se SUMO konjugovanými či dekonjugovanými enzymy tedy ovlivňuje jeho aktivaci/inhibici a působí na intracelulární lokalizaci (Wetzel, F., et al., 2016).



Obrázek 8 Komunikace jednotlivých epiteliálních buněk prostřednictvím komponent těsných buněčných spojení (Odenwald, M. A., & Turner, J. R., 2016)

Kromě progresivní familiární intrahepatální cholestázy 4.typu a hepatocelulárního karcinomu je TJP2 jedním z markerů kolorektálního karcinomu a současně s mutací BAAT (Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase) je také asociován s rozvojem dědičného onemocnění familiární hypercholanemie, která se projevuje zvýšenou koncentrací žlučových kyselin v séru a malabsorpčním syndromem (Carlton, V., et al., 2003; Kim, Y.-J., et al., 2013).

II. Cíl práce

Diplomová práce je rozdělena na dvě metodické části. Cílem první části je přímá konverze somatických buněk, konkrétně myších embryonálních fibroblastů, na hepatocyty *in vitro* pomocí specifické kombinace transkripčních faktorů a vhodných kultivačních podmínek. Následně plánujeme analyzovat nově vytvořenou populaci indukovaných hepatocytů a ověřit jejich funkční a cytomorfologickou shodu s jaterními buňkami. V průběhu transdiferenciace se především zaměříme na mapování dílčích kroků procesu, které dosud nebyly detailně popsány, a určení heterogenity populace a různých vývojových stádií konvertovaných buněk.

Cílem druhé části je modelace lidského jaterního onemocnění, shodujícího se s anamnézou pacienta, na již transdiferencovaných myších indukovaných hepatocytech. Podmínky elektroporace a kultivace elektroporovaných buněk pro dosažení vysoké účinnosti při vkládání genetického materiálu do buněk je třeba nejprve optimalizovat. Poté vneseme missense mutaci do genu *Tjp2* pomocí technologie CRISPR/Cas9 a pokusíme se analyzovat mutovaný protein Tjp2 v indukovaných hepatocytech.

III. Materiály

1. Organismy

Rosa26-Blueflirt	myší kmen pro izolaci MEF
TOP10 bakteriální kmen <i>E. coli</i>	kompetentní buňky
Pheonix ECO HEK 293	ekotropní obalové buňky

2. Kultivační media

2.1 MEF

Myší embryonální fibroblasty jsou kultivovány v IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) s přidáním antibiotik. Příprava IMDM na ÚMG.

IMDM	450 ml
FCS (telecí sérum) - 10 %; Gibco	50 ml
L-Glutamin - 200mM; Gibco	5 ml
ATB - penicilin, streptomycin; Gibco	5 ml

2.2 Pheonix ECO

Retrovirální obalové buňky Pheonix ECO jsou kultivovány v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) s přidáním antibiotik. Příprava DMEM na ÚMG.

DMEM	450 ml
FCS (telecí sérum) - 10 %; Gibco	50 ml
L-Glutamin - 200mM; Gibco	5 ml
ATB - penicilin, streptomycin; Gibco	5 ml

2.3 Transfekované Pheonix ECO

Retrovirálním obalovým buňkám Pheonix ECO je před/po transfekci měněno médium za DMEM s (Dulbecco's Modified Eagle Medium) s různými koncentracemi telecího séra (FCS), bez antibiotik. Příprava DMEM na ÚMG.

2 % FCS; Gibco + DMEM (2 ml+98 ml); 5 % FCS; Gibco + DMEM (17,5 ml+350 ml)
10 % FCS; Gibco + DMEM (50 ml +450 ml)

2.4 iHep

Indukované hepatocyty jsou kultivovány v tzv. Hepatomedium, jehož základem je DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) s přidanými antibiotiky, růstovými faktory a dalšími látkami, podporujícími hepatocytární vývoj.

<u>Reagencie</u> (výsledná koncentrace)	<u>Objem</u>
DMEM/F12; Gibco	439 ml
FCS - telecí sérum - 10%	50 ml
Nikotinamid (10 mM); Sigma Aldrich	5 ml
GlutaMax (2 mM); Gibco	5 ml
Penicilin/Streptomycin (50 µM); Gibco	5 ml
β-merkaptoetanol (50 µM); Gibco	500 µl
Insulin (1 µg/ml); Sigma Aldrich	500 µl
Dexametazon (10^{-7} M); Sigma Aldrich	100 µl
Hepatocytární růstový faktor - HGF (20 µg/ml); Peprotech	
Epidermální růstový faktor - EGF (20 µg/ml); Peprotech	
Kolagen I; Sigma Aldrich - na potažení kultivačních misek	

3 Kvantitativní PCR

2xSYBRGreen PCR Master Mix, 384 jamková mikrotitrační destička; Thermo Scientific

4. Klonování

4.1 Reagencie

Transfekce a transdukce:

PEI (Polyethylenimine) - reagent pro efektivní spojení plasmidové DNA s lentivirem během transfekce; Sigma Aldrich

Opti-MEM (Minimal Essential Medium) - medium, umožňující kultivaci se sníženým podílem FCS bez změn morfologie a rychlosti růstu; Thermo Scientific

Izolace RNA a reverzní transkripce:

Reverzní transkriptáza (RevertAid H Minus M-Mulv - 200 U/µl); Thermo Scientific

Random primery (250 ng/µl) - oligodeoxyribonucleotidy; Thermo Scientific

dNTP mix (10mM); RT pufr 5x (first strand buffer 5x); Thermo Scientific
 Inhibitor ribonukleáz (40µg/µl), Tryzol, Chloroform, Isopropanol, 70% etanol; Penta
 PCR: 2x EliZyme HS Robust PCR Mix; Elisabeth Pharmacon

4.2 Vektory

Seznam použitých vektorů (Addgene: www.addgene.org) :

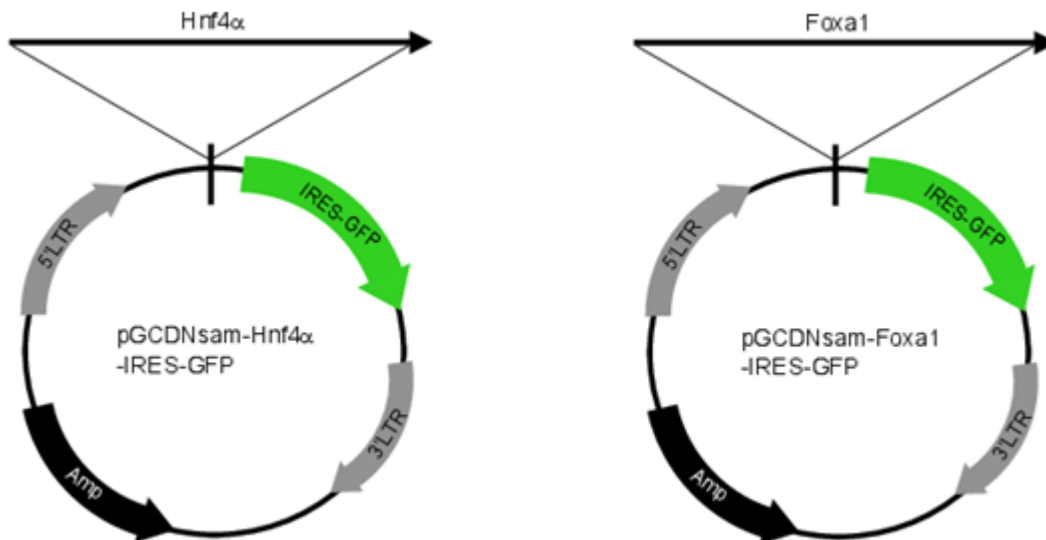
Transfekce: pGCDNsam-Hnf4α-IRES-GFP

pGCDNsam-Foxa1-IRES-GFP

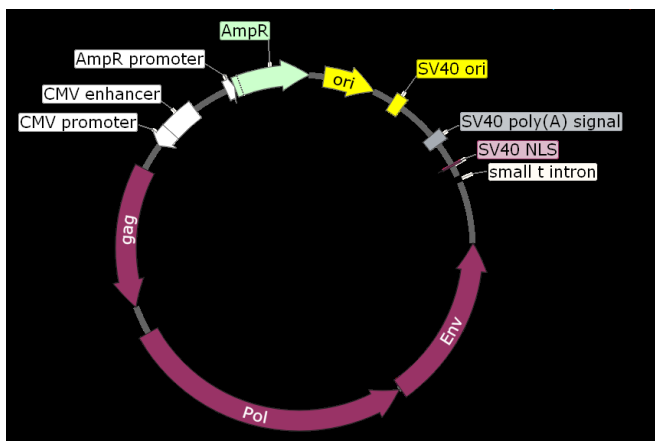
pCL-ECO (2907ng/µl)

CRISPR/Cas9: pFPV-mCherry

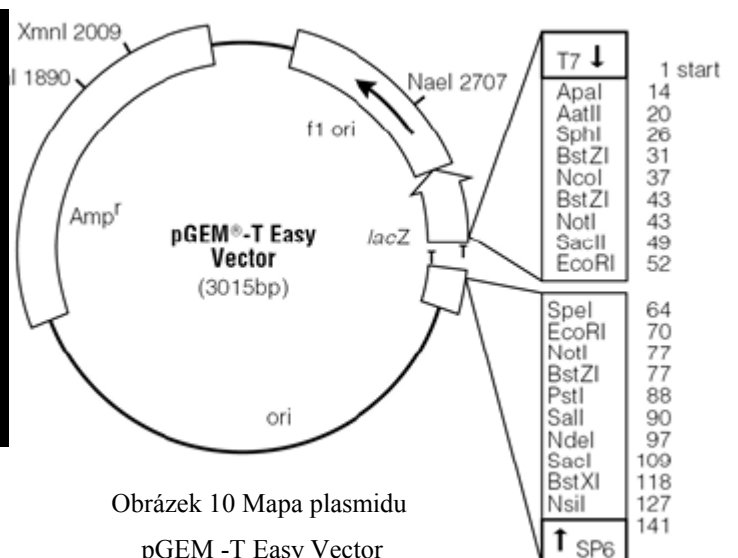
pGEM-T Easy Vector



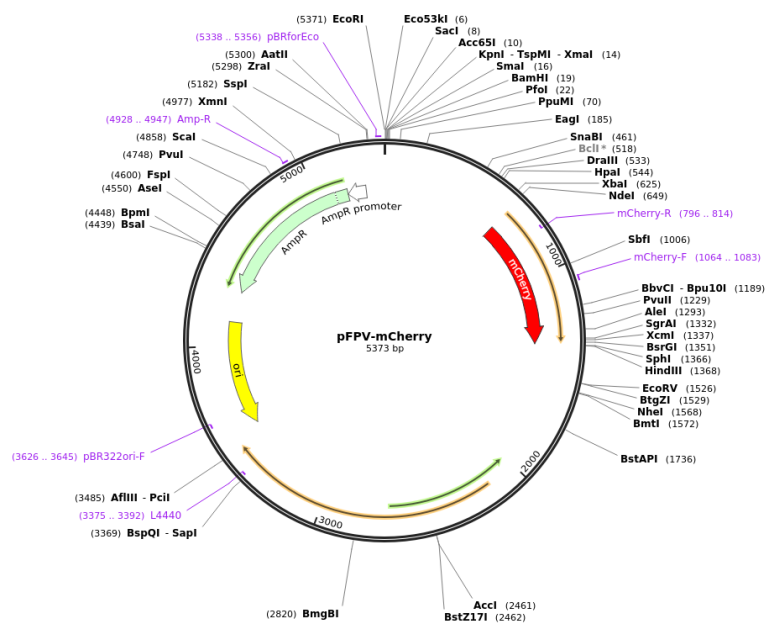
Obrázek 9 Mapa plasmidu Hnf4α a plasmidu Foxa1



Obrázek 11 Mapa plasmidu pCL-Eco



Obrázek 10 Mapa plasmidu
 pGEM -T Easy Vector



Obrázek 12 Mapa plasmidu pFPV-mCherry

5. Imunocytochemické barvení

Tabulka 2 Primární protilátky

Primární protilátka	Původ	mAb/pAb	Výrobce	Ředění
E-cadherin	myš	mono IgG	BD Transduction	1:200
Vimentin	králík	mono IgG2a	Cell Signalling	1:500
EGFP	králík	poly IgG	Abcam	1:200
TJP2	králík	poly IgG	Thermo Scientific	1:100

Tabulka 3 Sekundární protilátky

Sekundární protilátka	Původ	Imunogen	Výrobce	Ředění
GAM Alexa 488 (goat-anti-mouse)	koza	IgG H+L	Molecular probes	1:750
GAR Alexa 488 (goat-anti-rabbit)	koza	IgG H+L	Molecular probes	1:750
GAM Alexa 594 (goat-anti-mouse)	koza	IgG H+L	Molecular probes	1:750
GAR Alexa 594 (goat-anti-rabbit)	koza	IgG H+L	Molecular probes	1:750

Tabulka 4 Ostatní barvení

Vizualizační reakce	Barvené buněčné komponenty	Barvivo	Kit	Výrobce
DAPI	Jádra	flurofor	DAPI nuclear stain	Sigma-Aldrich
PAS reakce	Polysacharidy	Schiffovo činidlo	Hotchkiss-McManus	DiaPath
LDL uptake	LDL receptor, lipoprotein LDL	Fluorescenčně značený LDL	Dil complex (DilAcLDL)	Thermo Scientific

Další reagentie: 4% paraformaldehyd (Thermo Scientific) v PBS; 0,25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) v PBS; 0,01% Triton X-100 v PBS; 10% DMEM; Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich)

6. Elektroforéza

50x TAE (Tris-acetate-EDTA) pufr - 40mM Tris, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA

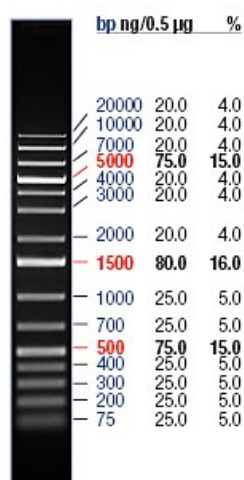
1x TAE pufr - 20ml 50x TAE do 980ml dH₂O

6x nanášecí pufr (Loading dye); žebřík - GeneRuler 1kb plus DNA Ladder; Thermo Sc.

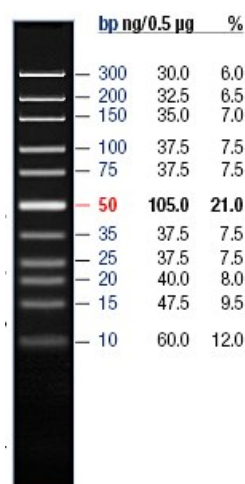
žebřík - GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder; Thermo Scientific

- 1% agarózový gel (příp. 2%, 3%) - 1g agarózy do 100ml 1x TAE pufru

- 3% SB (sodium borate) gel - 3g agarózy do 100ml SB pufru + 2 μ l Etidium bromid



Obrázek 14 Žebřík - GeneRuler 1kb plus



Obrázek 13 Žebřík - Gene Ruler Ultra Low Range

7. Izolace MEF

Fosfátový pufr (PBS), 0,05% Trypsin/EDTA (Thermo Scientific), kompletní IMDM, 70% etanol

8. CRISPR/Cas9

Fúze DNA templátu - Fúzní pufr (Phusion HF Buffer; Thermo S.); dNTP - 10mM

Fúzní DNA polymeráza (Phusion HF DNA polymerase - 2U/μl; Thermo S.);

T7 FwdVar (1μM), T7 RevLong (1μM), T7 FwdAmp (100μM),

T7RevAmp (100μM) - viz Tabulka 5

Transkripce DNA temlátu *in vitro* - Hi Scribe T7 In Vitro Transcription Kit; BioLabs

Syntéza a izolace sgRNA - Hi Scribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit; BioLabs

Elektroporace (Neon) - Cas9 - 62μM (Thermo Scientific), resuspendační R pufr (Thermo

Scientific), sgRNA, DNA plasmid - pFPV mCherry (RFP) - viz Obrázek 12,

Neon Transfection System (Thermo Scientific)

Extrakce DNA - Proteináza K - 20mg/ml (Thermo Scientific), pufr pro Proteinázu K,

70% etanol, isopropanol, DNA

PCR Amplifikace - 2x EliZyme HS Robust PCR Mix, DNA, DNA polymeráza

- 5U/μl (Thermo S), Fm Tjp2, Rm Tjp2, Fm IL2Rα, Rm IL2Rα - viz Tabulka 6

- Betaine 2,5mM (Sigma-Aldrich) - aditivum, zvyšující amplifikaci CG bohatých sekvencí

Purifikace DNA - DNA Clean & Concentrator Kit; Zymo Research

Izolace DNA z gelu - High Pure DNA Isolation Kit; Roche

Ligace - T4 DNA ligáza - 3U/μl (Thermo Scientific), 10x T4 DNA ligační pufr

(Thermo Scientific), plasmid - pGEM-T Easy Vector (50ng)- viz Obrázek 11

Rozmnožení; tepelný šok kompetentních bakterií - TOP10 bakteriální kmen *E. coli*,

bakteriální LB medium (Luria-Bertani), 100 mg/ml ampicilin (Sigma-Aldrich)

Štěpení - 10x FastDigest pufr, Taq I restriční enzym-10U/μl (Thermo Scientific)

Minipreparace - Hybrid-Q Plasmid mini (GeneAll)

Sekvenace - SeqMe - DNA sekvenování (www.seqme.eu)

9. Přístrojové vybavení

Přístroje: inkubátor MCO-18AIC (SANYO); tkáňový box BioUltra4 (Telstar Industrial); centrifuga 5810 R, centrifuga 5415 D; vodní lázeň SUB Aqua Pro 5 l (Grant); invertovaný mikroskop CK2 (Olympus); mikrobiologická třepačka SI6R (SHEL LAB); vortex REAX (Heidolph); horizontální elektroforetická komůrka Mini-Sub® Cell GT Cell (BIO-RAD); UV transiluminátor MUV series (Major Science); NanoDrop ND-1000 Spektrofotometr (Thermo Scientific); termocykler T100TM (BIO-RAD); vysokorychlostní sorter BD Influx (BD Biosciences); LightCycler® 480 (Roche); mikrocentrifuga MiniStar silverline (VWR); rotator RS-24 (Biosan); Neon Transfection System (Thermo Scientific); Fluorescenční mikroskop Leica DM6000 (PragoLab); Průtokový cytometr LSRII (BD Biosciences); EVOS™ XL Core Imaging System (Thermo Scientific)

Počítačové programy pro analýzu dat: FlowJo V10; Origin 6.0 Professional; ImageJ-Fiji64; Leica LAS AF Lite; Microsoft Excel; BD FACSDiva8.0.1 software

10. Ostatní materiály

Tabulka 5 Primery - CRISPR/Cas9 - DNA templát pro homologní rekombinaci *in vitro*; Sigma-Aldrich

Primery	Sekvence (5'-3')	Délka
mTjp2 templát 2732 A	ROX- GACCGCATGTCCTACTTAACCGCCATGGGCGC c GACTATCT GAGTTGTGACAGCCGTCTCATCAGTGACTT c GAAGACACCG	82
mTjp2 templát 2732 A>G	ROX- GACCGCATGTCCTACTTAACCGCCATGGGCGC c GACT g TCT GAGTTGTGACAGCCGTCTCATCAGTGACTT c GAAGACACCG	82
mTjp2 sgRNA T7 FwdVar	GGATCCTA ATAACGACTCACTATAG CTACTTAACCGCCATGG GCGGTTTTAGAGCTAGAA	59
T7 RevLong	AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAAC GGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC	82
T7 FwdAmp	GGATCCTAATAACGACTCACTATAG	24
T7 RevAmp	AAAAAAGCACCGACTCGG	18

ROX - červený fluorofor Rhodamin X, konjugovaný s templátovou DNA

Tabulka 6 Primery - Kvantitativní PCR - Specifické hepatocytární markery; Sigma-Aldrich

Primery	Sekvence (5'-3')	Délka
Fm α -fetoprotein Rm α -fetoprotein	GGAGGCTATGCATCACCAGT CCGAGAAATCTGCAGTGACA	20 20
Fm Albumin Rm Albumin	CAGGTGTCAACCCCAACTCT TTCCACCAGGGATCCACTAC	20 20
Fm β -aktin Rm β -aktin	GATCTGGCACCACACCTTCT GGGGTGTGTAAGGTCTCAA	20 20
Fm Car2 (Karbonická anhydráza) Rm Car2 (Karbonická anhydráza)	TGGTTCACCTGGAACACCAA CACGCTTCCCCTTTGTTTTA	20 20
Fm E-cadherin Rm E-cadherin	AGCCATTGCCAAGTACATCC AAAGACCGGCTGGGTAAACT	20 20
Fm EGFP (Zelený fluorescenční protein) Rm EGFP (Zelený fluorescenční protein)	GACGTAAACGGCCACAAGTT GAACTTCAGGGTCAGCTTGC	20 20
Fm GAPDH Rm GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG ATCCACAGTCTTCTGGGTGG	20 20
Fm GS (Glutamin syntetáza) Rm GS (Glutamin syntetáza)	AGCGACATGTACCTCCATCC GCCGTCTGTTCCATAAGAG	20 20
Fm Gstm3 (Glutation S-transferáza M3) Rm Gstm3 (Glutation S-transferáza M3)	TCACACAAGGTCACCCAGAG AGGGATGGCCTTCAAGAACT	20 20
Fm Hnf4 α (Hepatocytární nukleární faktor) Rm Hnf4 α (Hepatocytární nukleární faktor)	GGTCAAGCTACGAGGACAGC ATGTACTIONGGCCACTCGAC	20 20
Fm Ubiquitin Rm Ubiquitin	ATGTGAAGGCCAAGATCCAG TAATAGCCACCCCTCAGACG	20 20
Fm Vimentin Rm Vimentin	ACTGCTGCCCTGCGTGATGTG GGTACTCGTTTGACTCCTGCTTGG	21 24

Tabulka 7 Primery - CRISPR/Cas9 - PCR produkt; Sigma-Aldrich

Primery	Sekvence (5'-3')	Délka
Fm IL2R α (Interleukin 2-receptor α)	CGGGCAGAACTGTGTCTGTA	20
Rm IL2R α (Interleukin 2-receptor α)	GTTGCTGCTCCAGGAGTTTC	20
Fm Tjp2 short 1 (Tight junction protein 2)	GCAGTCTGGGTCTCTGAAGG	20
Rm Tjp2 short 1 (Tight junction protein 2)	CTGGGCTGGATTTCCCTTATG	20
Fm Tjp2 short 2 (Tight junction protein 2)	TGAAGGACAGCATTCAGCAG	20
Rm Tjp2 short 2 (Tight junction protein 2)	CTAGCAGCCCTCCTCATCTG	20
Fm Tjp2 nested A (Tight junction protein 2)	CGGATTCCAGACAAGGTGTT	20
Rm Tjp2 nested A (Tight junction protein 2)	GCTCTCAGGCATAGGGACTG	20
Fm Tjp2 nested B (Tight junction protein 2)	GCAGTCTGGGTCTCTGAAGG	20
Rm Tjp2 nested B (Tight junction protein 2)	GGGGAGGTTTGACTTGGAGT	20

IV. Metody

1. Transdiferenciace MEF na iHep

1.1 Izolace myších embryonálních fibroblastů

Myší embryonální fibroblasty byly izolovány z imbredního myšího kmene Rosa26-Blueflirt, vytvořeného Cre-LoxP rekombinací lokusu Rosa26. Izolace MEF z březí samice proběhla dva týdny po vytvoření kopulační hlenové zátky, tedy v rozmezí 13.-14. dne embryonálního vývoje. Myš byla usmrcena zlomením vazů a prostřížením peritonea ji byla otevřena břišní dutina. Oba cípy dělohy byly vyjmuty na Petriho misku s PBS, kde z nich byla preparována jednotlivá myší embrya. Práce byla přesunuta do čistého tkáňového boxu, kde embryům ve vyměněném PBS byla odstraněna hlava a hematopoetické orgány. Zbytek jednotlivých těl mechanicky rozmělněn v eppendorf zkumavkách (2ml) s 200 μ l Trypsin/EDTA. Eppendorf byly inkubovány v termostatu po dobu 15min a v průběhu byl jejich obsah každých 5min promíchán pipetou. Trypsinizace byla zastavena 1ml IMDM, vyhotovená suspenze přenesena na 10cm kultivační misku, která byla doplněna 10ml kompletního IMDM (FCS, L-Glutamin, ATB) a inkubovány v termostatu. Některé kultury MEF byly zamrazeny pro další použití a zbylá část MEF byla udržována pasážováním. Pro účely transdukce jsou MEF pěstovány na 6-ti nebo 12-ti jamkových destičkách.

1.2 Příprava rekombinantních retrovirů a transdukce MEF

Obalové buňky PheonixECO HEK 293, vyznačující se kódovaným obalovým proteinem, který se váže na ekotropní receptor na povrchu myších buněk, byly kultivovány na 10cm a 15cm kultivačních miskách v kompletním DMEM (FCS, L-Glutamin, ATB).

Den 0 (den před transfekcí) - Příprava PheonixECO HEK293

- 80% kompetentní buněčná kultura PheonixECO na 2x15cm miskách
- výměna media za 10% DMEM (bez ATB)

Den 1 - Příprava plasmidů Hnf4 α , Foxa1, pCL-ECO a transfekce PheonixECO HEK293

- 1. směs: 2ml OptiMEM, 80 μ l PEI, 20 μ g pCL-ECO, 40 μ g Foxa1
- 2. směs: 2ml OptiMEM, 80 μ l PEI, 20 μ g pCL-ECO, 40 μ g Hnf4 α
- inkubace obou plasmidových směsí 20min při RT
- výměna media PheonixECO - 16ml 2% DMEM; ukončení inkubace

- transfekce jedné misky PheonixECO plasmidem Foxa1 a druhé misky Hnf4 α
- práce přesunuta do virové místnosti; inkubace misek 4h při 37°C v termostatu
- výměna média - 18ml 5% DMEM, inkubace při 37°C

Den 2 - Produkce rekombinantních retrovirů

- výměna média - 18ml 5% DMEM, inkubace při 37°C

Den 3 - Sběr koncentrovaného média s rekombinantními retroviry a transdukce MEF

- sběr média z 2x15cm misek do 2x50ml flakonek, centrifugace 500*g, 3min 20°C
- výměna média na 15cm miskách - 18ml - 5% DMEM, inkubace při 37°C
- filtrace a zakoncentrování supernatantu ve 2x20ml filtračních flakonkách (AdEasy Virus Purification Kit; Agilent Technologies), centrifugace 1500*g ,25min, 20°C (příp. do objem zkoncentrovaného média 1ml)
- transdukce 6 jamek z 12-ti jamkové destičky MEF zakoncentrovaným médiem s virovými partikulami:
 - 5 jamek - 150 μ l Foxa1 + 150 μ l Hnf4 α (1:1) + 700 μ l IMDM
 - 1 jamka - 1000 μ l IMDM (kontrola)
- inkubace transdukované destičky při 37°C

Den 4 - Sběr koncentrovaného média s rekombinantními retroviry a transdukce MEF

- shodný postup jako Den 3; po sběru média - likvidace 2x15cm misek
- odsátí média z transdukovaných buněk
- 2. transdukce - stejným objemem, shodných 6 jamek z 12-ti jamkové destičky
- inkubace transdukované destičky při 37°C

Ověření účinnosti transdukce průtokovým cytometrem - přítomnost GFP⁺ buněk (iHep)

Analýza dat z průtokového cytometru LSRII byla provedena v programu FlowJo V10

Sebraná média s koncentrovanými rekombinantními retroviry, uvolňujícími Foxa1, Hnf4 α

- zvýšení transdukčního objemu - nezvyšuje účinnost transdukce
- zamražení nebo odložená transdukce - klesá účinnost transdukce

1.3 Kultivace iHep

Po transdukci probíhá přibližně 2 - 3 týdenní proces transdiferenciace MEF na iHep, za vhodných kultivačních podmínek. V této době dochází ke změně cytomorfologie buněk, která je doprovázená odlišnou genovou expresí a funkčními změnami. Kromě buněk s již

dokončenou transdiferenciací, byla současně analyzována i jednotlivá vývojová stádia iHep po transdukci.

Tabulka 8 Mapovaná vývojová stádia iHep a jejich kultivační podmínky

Vývojové stádium	Den po transdukci	Médium	Kolagenový podklad	Růstové faktory HGF + EGF
1.	4. den	IMDM	✗	✗
2.	7. den	Hepatomedium	✓	✗
3.	10. den	Hepatomedium	✓	✓
4.	14. den	Hepatomedium	✓	✓
5.	21. den	Hepatomedium	✓	✓

Kolagen - 500µl do každé jamky 12-ti jamkové destičky, inkubace 1h při RT

- odsátí kolagenu zpět do flakonky - opakované použití
- zůstane kolagenový podklad (nahrazení bazální membrány epitel. buněk)

HGF (20 µg/ml) - 1:1000 Hepatomedie; EGF (20 µg/ml) - 1:1000 Hepatomedie

1.4 Syntéza cDNA

Z MEF i již transdiferenciovaných iHep byla fenol-chloroformovou extrakcí získána RNA, která byla reverzní transkripcí přepsána do cDNA a ta následně analyzována qPCR.

Izolace RNA - odsátí média z jamek 12-ti jamkové destičky, promytí PBS

- uvolňování a lyzace buněk 1ml Trizolu - 2min, přenesení suspenze do eppendorf
- separace tří fází: 1.vodná (RNA), 2.interfáze (DNA), 3.organická (proteiny) pomocí 200µl chloroform, vortex - 20s, centrifugace - 13500*g, 5min, 4°C
- precipitace vodné fáze v 500µl isopropanolu, inkubace - 5min, 4°C
 - centrifugace - 13500*g, 20min, 4°C, odstranění supernatantu
- 2x promytí RNA pelety 200µl 70% etanolem
 - 2x centrifugace - 13500*g, 5min, 4°C, odstranění etanolu
- sušení RNA pelety 5min při RT, rozpouštění v TK H₂O dle velikosti pelety
- koncentrace RNA stanovena na NanoDrop ND-1000 Spektrofotometr

Reverzní transkripce - každý vzorek RNA - 2 zkumavky PCR stripu (RT⁺, RT⁻), na ledu

- RT⁺ reakce: 1µg RNA, 1µl random primery (250ng/µl), TK H₂O do 13,5µl

RT⁻ reakce: 1µg RNA, 1µl random primery (250ng/µl), TK H₂O do 14,5µl

Termocyklér T100TM (BIO-RAD): 5min, 70°C - ochlazení, krátká centrifugace

- RT⁺ reakce: 4µl RT pufr 5x, 1µl dNTP mix (10mM), 0,5µl inhibitor RNáz (40µg/µl)

RT⁻ reakce: 4µl RT pufr 5x, 1µl dNTP mix (10mM), 0,5µl inhibitor RNáz (40µg/µl)

Termocyklér T100TM (BIO-RAD): 5min, 25°C - ochlazení, krátká centrifugace

- pouze RT⁺ reakce: 1µl reverzní transkriptáza (celkový objem RT⁺ - 20µl)

RT⁻ reakce: (celkový objem RT⁻ - 20µl)

Termocyklér T100TM (BIO-RAD): 1)5min, 25°C; 2)60min, 42°C; 3)10min, 70°C

- 10x ředění RT⁺ i RT⁻ cDNA (celkový objem 200µl), na ledu

1.5 Analýza indukovaných hepatocytů (včetně jednotlivých vývojových stádií iHep)

1.5.1 Kvantitativní PCR

Expres referenčním a specifických hepatocytárních genů byla stanovena kvantitativní PCR (qPCR) z cDNA iHep pomocí platformy LightCycler® 480 (Roche), která udává Ct hodnoty jednotlivých genů. Platforma detekuje fluorescenci amplifikovaných nukleových kyselin a zaznamenává cyklus (Ct hodnotu), v němž dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí v reakci. Čím je počet cyklů nižší, tím více bylo cDNA v reakci a naopak. Kontrolou byla qPCR z cDNA MEF. Kvantitativní PCR byla připravována v 384 jamkové mikrotitrační (Roche) destičce, která byla pro jednotlivé markery rozdělena vždy na 3x RT⁺ jamky a 1x RT⁻ jamku u každé cDNA (iHep, MEF).

Primerový mix: 180µl TK H₂O, 10µl Fm primer, 10µl Rm primer - viz Tabulka 6

Reakce qPCR v jedné jamce destičky - 2µl cDNA (10x zředěná)

2,5µl 2x SYBRGreen PCR Master Mix

0,5µl primerový mix sledovaného markeru

Celkový objem reakce: 5 µl

Tabulka 9 Průběh qPCR s rychlým cyklováním pro 384 jamkovou destičku v LightCycler® 480 (Roche)

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)	Cyklus
Denaturace	95	30	1
Denaturace	95	10	45
Nasedání primerů	60	30	
Elongace	72	1	

Expres genů byla stanovena relativní kvantifikací, kdy se vycházelo z poměru počtu amplifikovaných kopií cílového cDNA vůči počtu amplifikovaných kopií referenční cDNA, která sloužila jako kontrola efektivity qPCR. Výpočty byly prováděny v programu Excel a grafy generovány prostřednictvím Origin 6.0 Professional.

Výpočet relativní exprese:

$$\Delta Ct_1 = Ct_{(\text{cílový gen 1})} - Ct_{(\text{referenční gen})}$$

$$\Delta Ct_2 = Ct_{(\text{cílový gen 2})} - Ct_{(\text{referenční gen})}$$

$$\Delta Ct = 2^{\Delta Ct_1 - \Delta Ct_2}$$

1.5.2 Imunocytochemické barvení

Během kultivace iHep byla před ICC barvením do jamek nové 12-ti jamkové destičky vkládána krycí sklička, která byla potažena kolagenovým podkladem pro zachování kultivačních podmínek iHep. Po dosažení konfluence buněk na skličku bylo odstraněno médium, následovalo promytí buněk PBS, fixace 4% paraformaldehydem a barvení, založené na vazbě primárních protilátek na specifické antigeny a jejich vizualizaci sekundárními fluorescenčními protilátkami.

Den 1 - Vazba primárních protilátek proti specifickým hepatocytárním markerům

- proděravění membrán - 300μl 0,25% Triton X-100 v PBS, 10min
- 1x oplach PBS; 3x promývání PBS po 5min
- blokování - 200μl 10% DMEM, inkubace 60min při RT, odstranit médium
- navázání primární protilátky - primární protilátky - viz Tabulka 2,
v příslušném ředění v 10%DMEM, inkubace přes noc, 4°C

Den 2 - Vizualizace sekundárními fluorescenčními protilátkami

- odsátí primární protilátky do zkumavky, opakované použití

- 1x oplach 300 μ l 0,01% Triton X-100 v PBS; 4x promytí PBS po 5min
- navázání sekundární protilátky - sekundární protilátky - viz Tabulka 3,
v příslušném ředění v kompl. DMEM, inkubace 60min při RT ve tmě
- 1x oplach 300 μ l 0,01% Triton X-100 v PBS; 3x promytí PBS po 5min
- vizualizace jader - 200 μ l DAPI (100x ředěný PBS), 5min
- 2x oplach PBS a montování do mowiolu na podložní sklo

Detekce proběhla na mikroskopu Leica DM6000 ve fluorescenčním kanálu.

Analýza dat byla provedena v programech: Leica LAS AF Lite a ImageJ-Fiji64

1.5.3 PAS barvení

Během kultivace iHep byla před PAS barvením do jamek nové 12-ti jamkové destičky vkládána krycí sklíčka, která byla potažena kolagenovou podkladem pro zachování kultivačních podmínek iHep. Po dosažení konfluency buněk na sklíčku bylo odstraněno médium, následovalo promytí buněk PBS, fixace 4% paraformaldehydem a barvení polysacharidů Schiffovým činidlem.

PAS reakce byla provedena dle protokolu PAS Hotchkiss-Mc Manus kit, DiaPath, ref# 010231, a detekce proběhla na mikroskopu Leica DM6000 v kanálu brightfield. Analýza dat byla provedena v programech: Leica LAS AF Lite a ImageJ-Fiji64.

1.5.4 LDL uptake

Během kultivace iHep byla před ICC barvením do jamek nové 12-ti jamkové destičky vkládána krycí sklíčka, která byla potažena kolagenovým pokladem pro zachování kultivačních podmínek iHep. Po dosažení konfluency buněk na sklíčku byla v médiu inkubována DyLightTM488 (1:50ml) přes noc. Další den následovalo promytí buněk v PBS, fixace 2% paraformaldehydem a vizualizace lipoproteinu LDL.

LDL uptake byla provedena dle protokolu Dil complex (DilAcLDL) kit, Thermo Scientific, a detekce proběhla na mikroskopu Leica DM6000 ve fluorescenčním kanálu. Analýza dat byla provedena v programech: Leica LAS AF Lite a ImageJ-Fiji64.

1.6 Izolace buněčných klonů ze směsné populace iHep

Jednotlivé buněčné klony byly vypichovány z heterogenní populace iHep pomocí invertovaného mikroskopu se zabudovaným kamerovým systémem EVOS™ XL Core Imaging System (Thermo Scientific). Směsná kultura byla nejprve trypsinem uvolněna od povrchu kultivační destičky a následně při zobrazení ve fázovém kontrastu mikroskopu byly pipetou nasávány samostatné buněčné klony, které byly dále kultivovány ve 48-ti jamkové destičce s kolagenovým podkladem a hepatomediem s růstovými faktory. Izolované klony byly zvoleny zcela náhodně a až na základě rychlosti růstu a kvality buněk bylo vyselektováno 5 klonů (A-E) pro další analýzu - qPCR a ICC.

2. Genová editace iHep - CRISPR/Cas9

2.1 Příprava plasmidů pro genovou editaci

2.1.1 Transkripce DNA templátu pro homologní rekombinaci *in vitro*

Fúze DNA templátu: 4μl 5x fúzní pufr (Phusion HF Buffer)
 1μl dNTP (10mM)
 0,5μl T7 FwdVar (1μM)
 0,5μl T7 RevLong (1μM)
 0,5μl T7 FwdAmp (100μM)
 0,5μl T7 RevAmp (100μM)
 0,5μl fúzní DNA polymeráza (2U/μl)
 12,5μl TK H₂O

Celkový objem reakce: 20μl

Tabulka 10 Průběh fúze DNA templátu v termocykleru T100™ (BIO-RAD)

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)	Cyklus
Denaturace	95	30	1
Denaturace	95	10	34
Nasedání primerů	57	10	
Elongace	72	10	
Elongace	72	120	1

Elektroforéza DNA templátu na 3% agarózovém gelu

- reakce: 3 μ l DNA, 2 μ l nanášecí pufr (6x Loading dye), 4 μ l TK H₂O
- žebřík - GeneRuler 1kb plus DNA Ladder - viz Obrázek 13
- elektroforéza v horizontální elektroforetické komůrce Mini-Sub: 120V, 30min

Purifikace DNA dle protokolu DNA Clean & Concentrator Kit; Zymo Research

In vitro T7 transkripce DNA templátu dle protokolu Hi Scribe T7 In Vitro Transcription Kit

Inkubace transkripčního mixu - 18h, 37°C v termocykleru T100TM (BIO-RAD)

Inkubace transkribované RNA - 1 μ l deoxyribonukleáza (RNase-free DNase), 20min, RT

2.1.2 Syntéza a izolace sg RNA

Izolace sgRNA dle protokolu Hi Scribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit; BioLabs

Stanovení koncentrace sgRNA na NanoDrop ND-1000 Spektrofotometr

2.2 Elektroporace (Neon)

Sestavení ribonukleoproteinového komplexu - nukleáza Cas9 (158 kDa)

sgRNA (100nt - 36kDa)

Optimalizace elektroporace - plasmid pFPV mCherry (RFP) - viz Obrázek 12

Elektroporace ribonukleoproteinového komplexu do iHep

- po dosažení konfluencie buněk, pasážování a přenesení iHep do zkumavky
- centrifugace 200*g, 5min, 20°C, odsátí supernatantu
- rozpuštění peletu - 10 μ l resuspendačního R-pufu
 - 1. případ - optimalizace: přidání 0,5 μ g plasmid (mCherry)
 - 2. případ - editace TJP2: přidání Cas9 (62 μ M), sgRNA, ssDNA templát

Elektroporace dle protokolu Neon Transfection System (Thermo Scientific)

- vysoká účinnost: 1x 1300V, 50ms nebo 3x 1650V, 10ms

Účinnost elektroporace během optimalizace byla stanovena BD FACSDiva8.0.1 softwarem pro analýzu dat z průtokového cytometru LSRII (BD Biosciences)

Elektroporované buňky s vloženým CRISPR/Cas9 byly sortovány vysokorychlostním sorterem BD Influx (BD Biosciences)

Kultivace elektroporovaných buněk v kondicionovaném médiu ve 12-ti jamkové destičce

2.3 Příprava genomové DNA

2.3.1 Extrakce DNA z elektroporovaných iHep

Den 1 - Uvolnění DNA z iHep

- PBS promytí 12-ti jamkové destičky s iHep
- uvolnění DNA z buněk - 500 μ l pufr pro proteinázu K
 - 5 μ l proteináza K (20mg/ml)
- přenesení suspenze buněk s proteinázou K a pufrem do effendorf
- inkubace při 56°C ve vodní lázni, přes noc

Den 2 - Izolace DNA z iHep

- precipitace iHep DNA - 500 μ l isopropanol, vortex - 1min
 - centrifugace - 13500*g, 20min, 4°C, odstranění supernatantu
- 2x promytí DNA pelety 200 μ l 70% etanolem
 - 2x centrifugace - 13500*g, 5min, 4°C, odstranění etanolu
- sušení DNA pelety 5min při RT, rozpouštění v TK H₂O dle velikosti pelety
- koncentrace DNA stanovena na NanoDrop ND-1000 Spektrofotometr

2.3.2 PCR amplifikace a DNA purifikace

Primerový mix: 180 μ l TK H₂O, 10 μ l Fm Tjp2, 10 μ l Rm Tjp2 - viz Tabulka 7

PCR reakce v jedné jamce stripu - 25 μ l - 2x EliZyme HS Robust PCR Mix

15 μ l betaine

5 μ l primerový mix Tjp2

5 μ l cDNA

Tabulka 11 Průběh PCR DNA v termocykleru T100TM (BIO-RAD)

Krok	Teplota (°C)	Čas (s)	Cyklus
Denaturace	95	120	1
Denaturace	95	20	37
Nasedání primerů	56	20	
Elongace	72	20	
Elongace	72	120	1

Celkový objem reakce: 50 μ l

Purifikace DNA dle protokolu DNA Clean & Concentrator Kit; Zymo Research

Syntéza konců DNA- 25 μ l 2x DreamTaq Green PCR Master Mix k 25 μ l eluované DNA

Inkubace transkripčního mixu - 10min, 72°C v termocykleru T100TM

2.3.3 Elektroforéza a izolace DNA z gelu

Elektroforéza DNA na 1% agarózovém gelu

- žebřík - GeneRuler 1kb plus DNA Ladder - viz Obrázek 13

- elektroforéza v horizontální elektroforetické komůrce Mini-Sub: 120V, 15min

Odečítání proužků - UV transiluminátor MUV series

Vyřezávání proužků z gelu do zvážených eppendorf pomocí skalpelu

Rozpuštění proužků v pufru (binding buffer) - objem dle váhy proužků

- inkubace při 56°C ve vodní lázni, 10min; vortex - 1min

Izolace DNA z gelu dle protokolu High Pure DNA Isolation Kit; Roche

2.3.4 Ligace DNA

Ligace DNA dle protokolu pGEM-T and pGEM-T Easy Vector

Tabulka 12 Komponenty reakce a průběh ligace DNA

Komponenty reakce	Standardní reakce (μ l)	Pozitivní kontrola (μ l)	Negativní kontrola (μ l)
2x Rapid ligační pufr, T4 DNA ligáza	5	5	5
pGEM-T Easy Vector (50ng)	1	1	1
PCR produkt	2	-	-
Kontrolní inzert DNA	-	2	-
T4 DNA ligáza (3U/ μ l)	1	1	1
TK H ₂ O	1	1	2

Celkový objem reakce: 10 μ l

Inkubace ligačních reakcí při 4°C přes noc

2.3.5 Rozmnožení a teplotní šok kompetentních bakterií

Rozmražení 100 μ l alikvotů kompetentních buněk - TOP10 bakteriální kmen *E. coli*

- bakterie s chemicky navozenou kompetencí - transformace chloridem rubidným

Klonování DNA v kompetentních buňkách - 50 μ l TOP 10 buněk do každé ligační reakce

Inzerce DNA do kompetentních bakterií teplotním šokem: 120 sekund - na ledu

90 sekund - vodní lázeň 42°C

120 sekund - na ledu

Inkubace kompetentních bakterií v 1ml LB média 1h při 37°C

Centrifugace - 6000**g*, 5min, 20°C; odstranit většinu supernatantu

Pelet se zbytkem média promíchat - přenést na kultivační misku a rozočkovat kličkou

Inkubace kultivačních misek při 37°C v termostatu přes noc

2.3.6 PCR monoklonálních bakterií

Špičkou vypíchnout 10 monoklonálních kolonií z kultivační misky na novou misku

PCR reakce v jedné jamce stripu - 5 μ l - 2x EliZyme HS Robust PCR Mix

3 μ l betaine

1 μ l primerový mix Tjp2 - short2

1 μ l TK H₂O

část vypíchnuté monoklonální kolonie

Celkový objem reakce: 10 μ l

Průběh PCR monoklonálních kolonií v termocykleru T100TM - viz Tabulka 11

2.3.7 Štěpení DNA TaqI polymerázou *in vitro*

PCR reakce v jedné jamce stripu: 4 μ l DNA - PCR produkt z kroku 2.3.6

1,2 μ l 10x FastDigest pufr

0,3 μ l Taq I restrikční enzym - 10U/ μ l

6,5 μ l TK H₂O

Celkový objem reakce: 12 μ l

PCR FastDigest v termocykleru T100TM: 1) 37°C; 30min

2) 65°C, 20min

Elektroforéza DNA na 3% SB gelu

- žebřík - GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder - viz Obrázek 14
- elektroforéza v horizontální elektroforetické komůrce Mini-Sub: 120V, 30min

2.4 Minipreparace

Výběr monoklonárních kolonií pro sekvenování dle SB elektroforézy

Kultivace vybraných monoklonálních kolonií v 12-ti jamkové destičce

- kolonie bakterií + 1ml LB media + 1μl Ampicilin (100 mg/ml)
- inkubace 12-ti jamkových destiček při 37°C na třepačce přes noc

Minipreparace dle protokolu Hybrid-Q Plasmid mini; GeneAll

- izolace DNA s inzertními mutacemi
- koncentrace DNA stanovena na NanoDrop ND-1000 Spektrofotometr
- 5μl izolované DNA zaslat na sekvenaci

2.5 Sekvence

Detekce inzertní mutace v iHep, zanesené prostřednictvím templátové DNA *in vitro* homologní rekombinací, byla provedena metodou Sangerova sekvenování, kterou zprostředkovala firma SeqMe (www.seqme.eu).

V. Výsledky

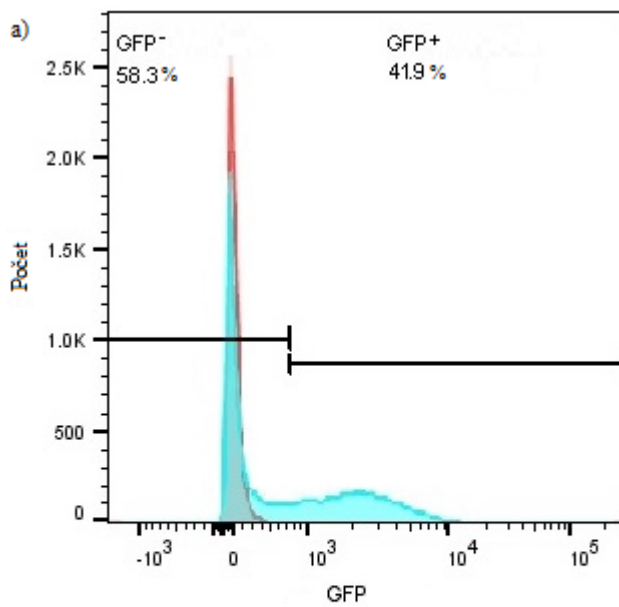
1. Transdiferenciace MEF na iHep *in vitro*

1.1 Transdukce rekombinantními retroviry

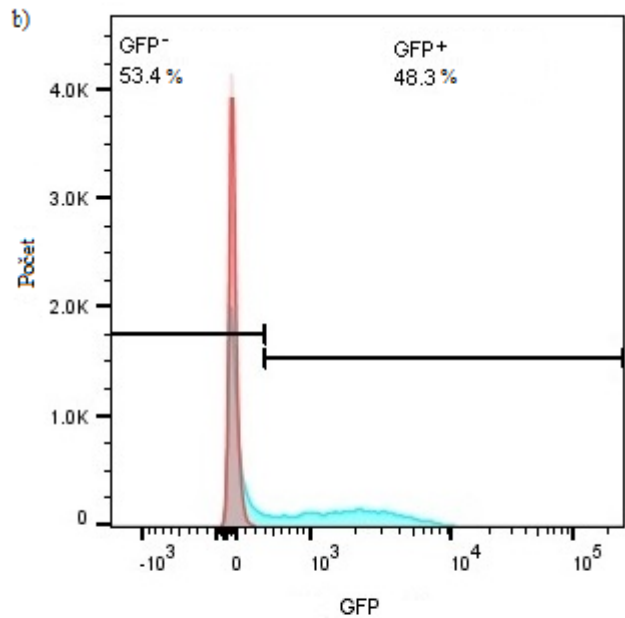
Transkripční faktory *Hnf4a* a *Foxa1* byly v podobě GFP značených plasmidových vektorů - pGCDNsam-Hnf4a-IRES-GFP a pGCDNsam-Foxa1-IRES-GFP, společně s plasmidem pCL-ECO, zvyšujícím účinnost transfekce, obaleny do tzv. packaging cell Pheonix ECO HEK 293. Pheonix ECO, jakožto ekotropní buněčná linie, odvozená od 293 T buněk, umožnila amplifikaci viru a produkci rekombinantních retrovirů, kterými jsou infikovány výhradně myší buňky. Uvolněnými rekombinantními retroviry byla transdukována kultura myších embryonálních fibroblastů (MEF), do jejichž DNA byla zcela náhodně přepsána a inkorporována rekombinantní RNA, nesoucí *Hnf4a* a *Foxa1*. Vložená kombinace značených transkripčních faktorů indukovala transdiferenciaci MEF na indukované hepatocyty (iHep) *in vitro*.

Populace iHep byla indentifikována na základě přítomnosti GFP, jehož detekci průtokovým cytometrem LSRII byl stanoven počet živých a úspěšně transdukových iHep, v porovnání s netransdukovanou kulturou MEF. Analyzovány byly tři populace buněk - iHep1A, iHep1B, MEF. V kultuře iHep1A bylo tři dny po transdukcii čerstvým virovým médiem s koncentrovanými virovými partikulami 41,9% GFP⁺ buněk, ve shodné kultuře iHep1B bylo za identických podmínek transdukce 48,3% GFP⁺ buněk a kultura MEF sloužila jakou negativní kontrola s 99,4% GFP⁻ buněk (viz Obrázek 15).

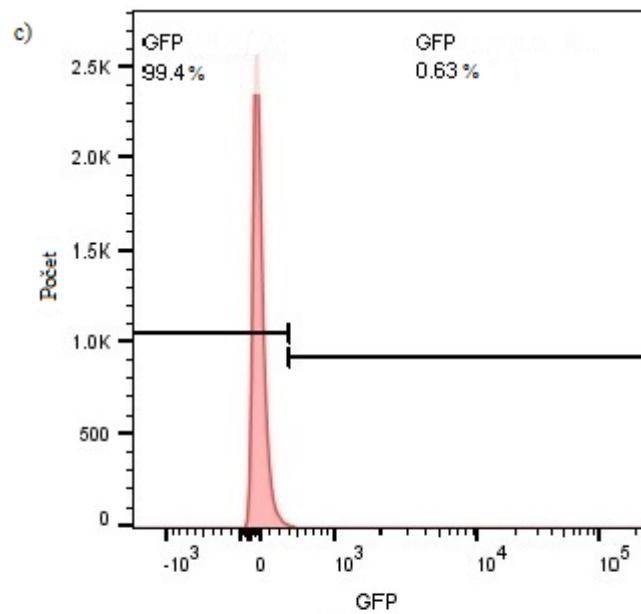
V průběhu optimalizace jednotlivých kroků transdiferenciace bylo prokázáno, že nejvyšší účinnosti je docíleno při transdukcii čerstvě sebraným virovým médiem s koncentrovanými virovými partikulami (filtrační flakonky - AdEasy Virus Purification Kit, Agilut Technologie). Účinnost transdukce klesala v závislosti na stáří média a některých formách skladování (chlazení, mražení). Efektivita byla rovněž nižší při transdukcii virovým médiem s nezakcentrovanými virovými partikulami. Množství virového média, kterým byly buňky transdukovány, nijak výrazně neovlivňovalo úspěšnost transdiferenciace ani životnost buněk. MEF byly transdukovány čerstvým koncentrovaným médiem s *Hnf4a* rekombinantními retroviry a čerstvým koncentrovaným médiem s *Foxa1* rekombinantními retroviry v poměru 1:1. Zvyšujícím se objemem těchto médií nedocházelo k nárůstu procentuálního zastoupení iHep v transdukové kultuře.



Kultura iHep1A	MEF ■	iHep ■
Procento (%)	58,3	41,9
Počet	15701	23245
Međian : GFP (488B)-A	79,6	289



Kultura iHep1B	MEF ■	iHep ■
Procento (%)	53,4	48,3
Počet	17336	24435
Međian : GFP (488B)-A	65,5	283



Kultura MEF	MEF ■	iHep ■
Procento (%)	99,3	0,63
Počet	16098	
Međian : GFP (488B)-A	80,9	

Obrázek 15 Analýza účinnosti transdukce rekombinantními retroviry pomocí průtokové cytometrie. Zastoupení GFP⁺ buněk v kultuře a) iHep1A, b) iHepB, c) MEF (negativní kontrola)

1.2 Genová exprese iHep

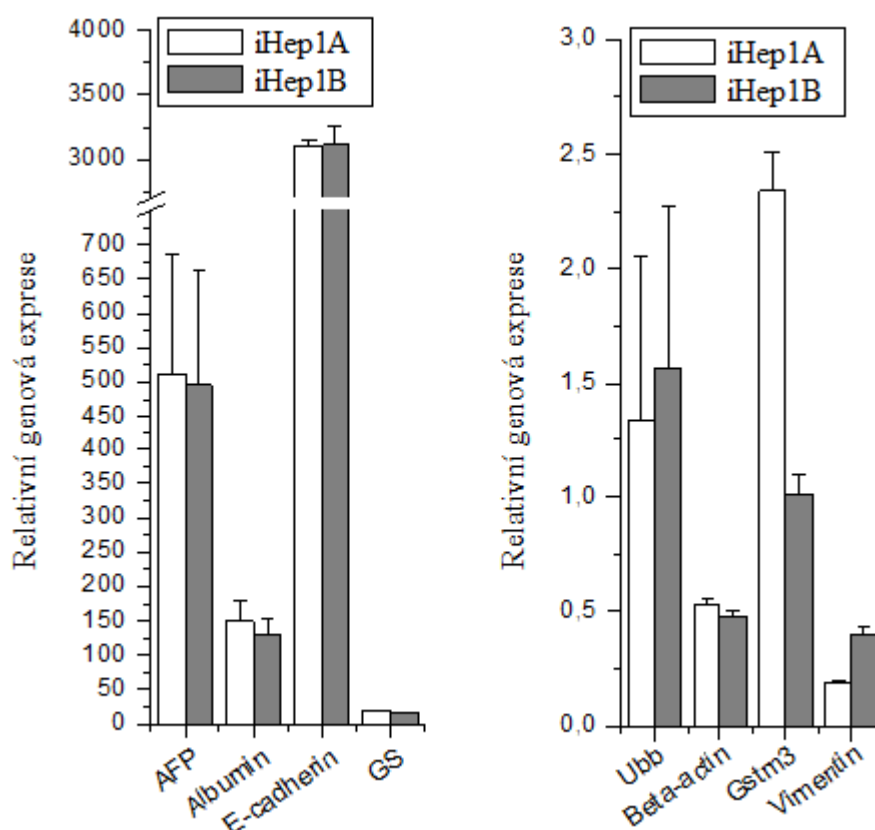
Populace úspěšně transdukováných GFP⁺ buněk iHep1A a iHep1B byly kultivovány 2 týdny na kolagenovém podkladu (Kolagen I) ve speciálním Hepatomediu s epidermálním (EGF) a hepatocytárním (HGF) růstovým faktorem. Současně byla udržována i buněčná linie MEF, kultivována v obohaceném IMDM. Ze všech tří buněčných kultur byly fenol-chloroformovou extrakcí izolovány RNA, které byly reverzní transkripcí přepsány do cDNA, z nichž byly, za základě vložených primerů (viz Tabulka 6), pomocí qPCR stanoveny exprese 3 referenčních genů (*ubiquitin*, *β-aktin*, *GAPDH*) a 6 specifických genů (*α-fetoprotein*, *albumin*, *E-cadherin*, *glutamin syntetáza*, *glutathione S-transferáza M3*, *vimentin*). qPCR byla realizována platformou LightCycler® 480 (Roche), která vygenerovala Ct hodnoty sledovaných genů (viz Tabulka 13).

Tabulka 13 Genová exprese iHep - přehled Ct hodnot 3 referenčních genů a 6 specifických genů, u populací iHep1A, iHep1B a MEF, stanovených qPCR z platformy LightCycler® 480

Referenční a specifické geny	iHep1A	iHep1B	MEF
<i>Ubiquitin (Ubb)</i>	17,11	17,34	17,76
<i>Beta-actin</i>	16,12	15,99	15,07
<i>GAPDH</i>	17,00	17,00	17,00
<i>α-fetoprotein (AFP)</i>	22,61	22,56	31,56
<i>Albumin</i>	20,56	20,37	27,59
<i>E-cadherin</i>	20,05	20,06	31,66
<i>Glutamin syntetáza (GS)</i>	19,29	18,95	23,24
<i>Glutathione S-transferáza M3 (Gstm3)</i>	23,88	22,66	23,89
<i>Vimentin</i>	22,06	23,12	20,74

Relativní genová exprese byla zanesena do grafů, v nichž byla vztažena k MEF=1 a normalizována na GAPDH (viz Obrázek 16). Selekcce genů byla provedena za základě lokalizace a funkce jimi kódovaných proteinů ve spojitosti s játerními buňkami. Nejvyšší exprese iHep byly zaznamenány u specifických hepatocytálních markerů - *α-fetoprotein*

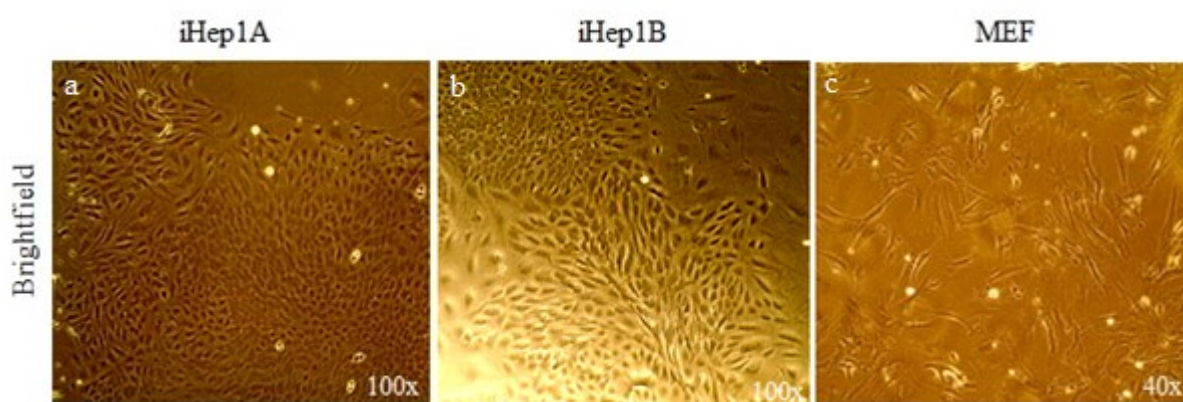
a *albumin*, kterými byly prokázány změny fyziologie buněk během transdiferenciace. *α -fetoprotein* lze považovat za marker hepatoblastomu a fetálních jater, poněvadž je nimi ve vysoké míře exprimován v časných stádiích vývoje jater. Po narození má hladina tohoto proteinu v těle výrazně klesající tendenci. Na rozdíl od albuminu, který je syntetizován hepatocyty až po jejich maturaci. Hladina albumin tedy signifikantně roste až po narození. Morfologickými markery, detekujícími remodelaci buněk, byly zvoleny *E-cadherin* a *vimentin*, které ilustrovaly posun buněk pojivové tkáně směrem k buňkám epiteliální tkáně. Vysoká exprese genu pro adhezivní molekuly *E-cadherin*, podílející se na výstavbě mezibuněčných spojů v epitelu, svědčila o přítomnosti jaterních epiteliálních buněk v kulturách v iHep1A a iHep1B. Zatímco redukovaná exprese *vimentinu* byla průkazem potlačení výchozí fibroblastové buněčné linie. Vimentin sloužil jako negativní kontrola, protože se jedná o protein středních filament a cytoskeletárních vláken, vyskytující se převážně během zárodečného vývoje a v dospělosti u fibroblastů a některých imunitních buněk (makrofágy, granulocyty). Exprese genů pro enzym glutamin syntetázu (GS), která je běžně lokalizovaná v lemu hepatocytů, obklopujících jaterní žílu, a pro enzym glutatione S-transferázu M3 byla u obou iHep populací rovněž zvýšena.



Obrázek 16 Analýza relativní genové exprese iHep1A a iHep1B, vztažená k MEF = 1. Normalizace GAPDH.

1.3 Cytomorfologie iHep

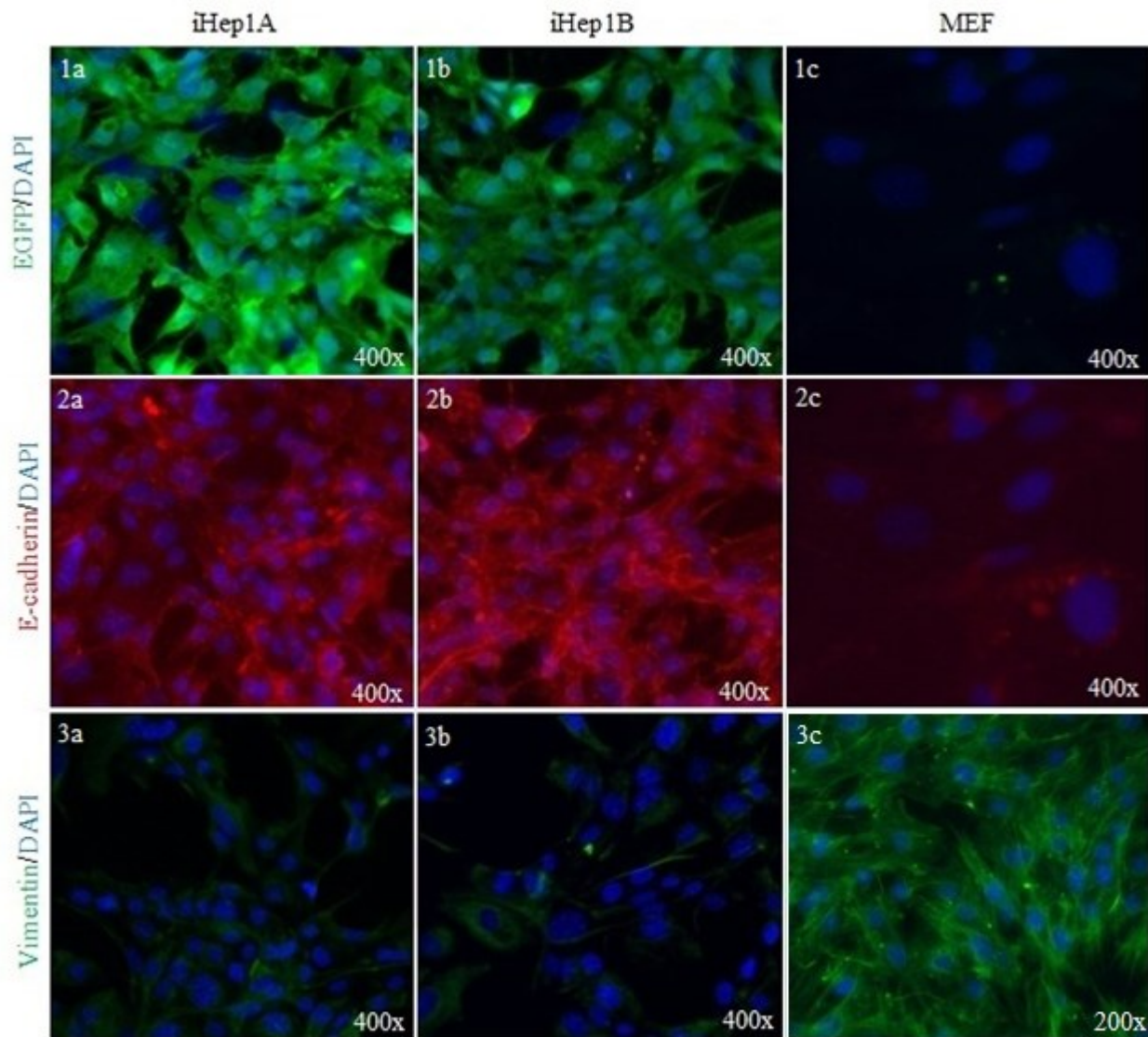
Změny cytomorfologie MEF, indukované v průběhu transdiferenciace na iHep, byly detekovány mikroskopováním v brightfield kanálu a fluorescenčním kanálu mikroskopu Leica DM6000. Mikroskopií ve světlém poli byla vizualizována počáteční linie MEF, v jejíž kultuře byly široce rozprostřeny poměrně velké buňky fibroblastů (zvětšení 40x), které vykazovaly charakteristický plochý, podlouhlý tvar (viz Obrázek 17c). Zatímco v kultuře iHep1A a iHep1B byly proliferovány drobné epitelové buňky dlaždicového tvaru (zvětšení 100x), které se akumulovaly do klastrů (viz Obrázek 17a,b).



Obrázek 17 Analýza morfologických změn v průběhu transdiferenciace MEF na iHep, pomocí mikroskopu Leica DM6000 v kanálu brightfield. Morfologie buněk a) iHep1A, 100x; b) iHep1B, 100x; c) MEF, 40x.

Imunocytochemická analýza morfologických změn byla založena na barvení strukturních markerů - E-cadherin, vimentin a zeleného fluorescenčního proteinu EGFP pomocí navázaných specifických primárních protilátek (viz Tabulka 2) a jejich vizualizace sekundární fluorescenční protilátkou (viz Tabulka 3). GFP, inkorporovaný do DNA iHep1A a iHep1B společně s kombinací transkripčních faktorů *Hnf4a* a *Foxa1*, prokazatelně zeleně svítil u obou hepatocytárních populací (viz Obrázek 18/1a,1b), kdežto v kultuře MEF byla viditelná pouze velká oválná jádra, obarvená DAPI, bez přítomnosti EGFP (viz Obrázek 18/1c). Epiteliální marker E-cadherin byl rovněž vizualizován výhradně v iHep1A a iHep1B (viz Obrázek 18/2a,2b), v porovnání s MEF, kde tato adhezivní molekula není téměř produkována (viz Obrázek 18/2c). Na rozdíl od markeru pojivové tkáně vimentinu, který v kultuře MEF jednoznačně převládal (viz Obrázek 18/3c), zatím co u iHep1A a iHep1B byl

v průběhu transdiferenciace výrazně redukován (viz 18/3a,3b). Imunocytochemická analýza tedy korelovala se získanými daty o genové expresi iHep z qPCR.



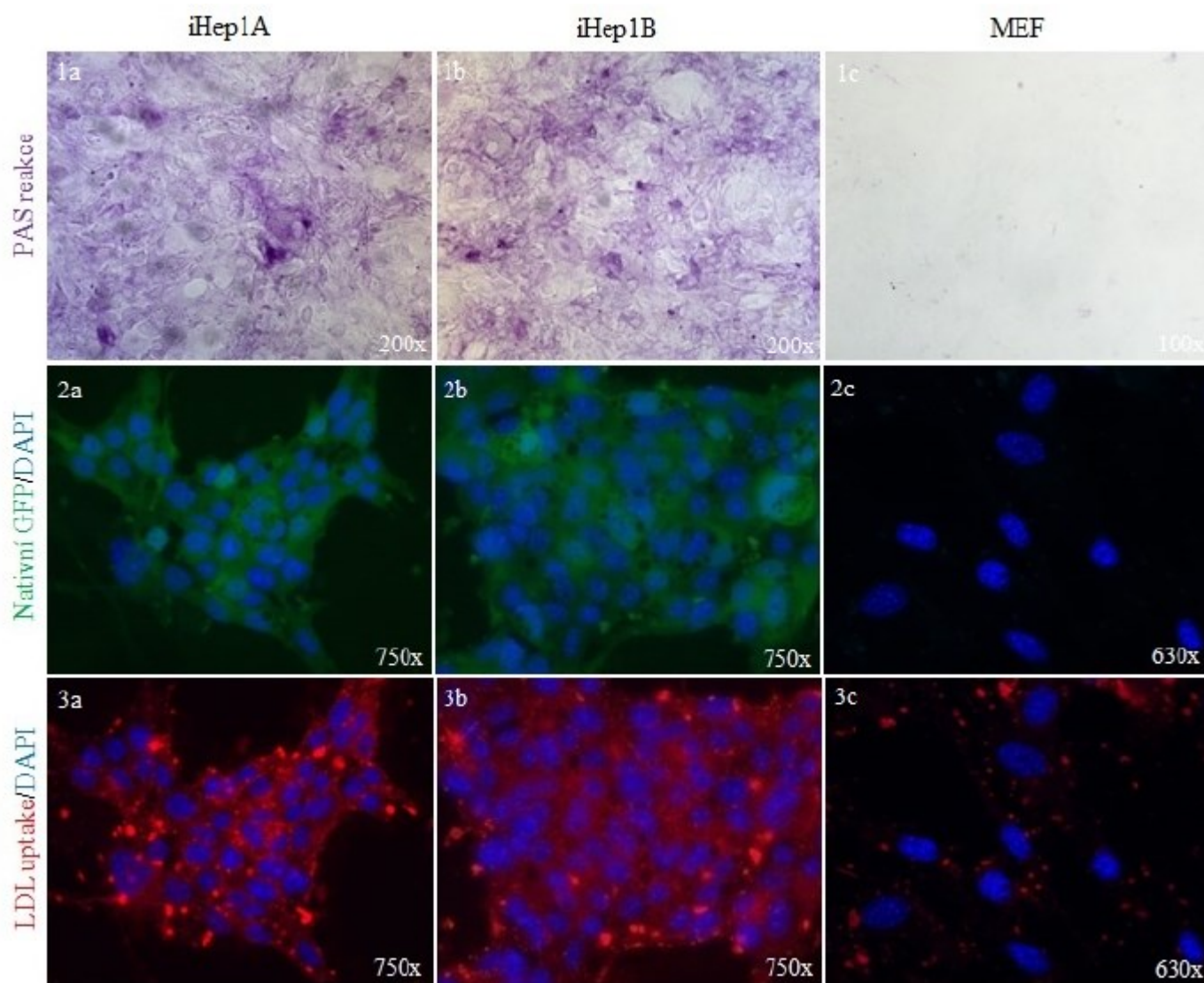
Obrázek 18 Analýza cytomorfologických změn v průběhu transdiferenciace MEF na iHep pomocí imunocytochemického barvení a detekce v mikroskopu Leica DM6000 ve fluorescenčním kanálu. Cytomorfologické změny specifických markerů - 1) EGFP, 2) E-cadherinu, 3) Vimentinu v kulturách a) iHep1A, 400x; b) iHep1B, 400x; c) MEF, 200, 400x. Vizualizace DNA fluoroforem DAPI.

1.4 Funkce iHep

Funkční změny MEF, indukované v průběhu transdiferenciace na iHep, byly detekovány mikroskopováním v brightfield kanálu a ve fluorescenčním kanálu mikroskopu Leica DM6000. První analýza byla zaměřena na vizualizaci polysacharidů, protože hepatocyty se fyziologicky podílejí na syntéze a akumulaci glykogenu. Jaterní glykogen bývá během PAS reakce výrazně fialově zbarven Schiffovým činidlem, čímž byla potvrzena jeho přítomnost v buňkách iHep1A a iHep1B (viz Obrázek 19/1a,1b). Buněčná populace MEF byla na přítomnost polysacharidů negativní (viz Obrázek 19/1c).

V rámci funkční analýzy byla také zaznamenávána fluorescence nativního GFP, která byla pozitivní pouze v kulturách iHep (viz Obrázek 19/2a,2b), zatímco v MEF nebyl GFP vůbec inkorporován a vizualizována byla tudíž pouze DNA (viz Obrázek 19/2c). Fluorescence nativního GFP byla však u iHep podstatě slabší v porovnání s ICC barvením (viz Obrázek 18/1a,1b).

Směrodatným funkčním testem byl i LDL uptake, který značí LDL (low density lipoprotein), konkrétně jeho vazbu a vychytávání skrz LDL receptor na povrchu hepatocytů. LDL receptory byly zviditelněny vložením značeného acetylovaného apoproteinu (Dil complex kit; DilAcLDL), který se na ně během inkubace v kultuře iHep1A a iHep1B specificky navázal (viz Obrázek 19/3a,3b). V případě MEF, postrádajících LDL receptory, nedošlo k vazbě a v kultuře svítily pouze stopy po důkladně nevymytém acetylovaném LDL apoproteinu (viz Obrázek 19/3c).



Obrázek 19 Analýza funkčních změn v průběhu transdiferenciace MEF na iHep - 1) PAS reakce a detekce v mikroskopu Leica DM6000 kanál bightfield v kulturách a) iHep1A, 200x; b) iHep1B, 200x; c) MEF; 100x.

2) Fluorescence nativního GFP a detekce v mikroskopu Leica DM6000 fluorescenční kanál v kulturách a) iHep1A, 750x; b) iHep1B, 750x; c) MEF; 630x. Vizualizace DNA fluoroforu DAPI. 3) Test LDL uptake a detekce v mikroskopu Leica DM6000 fluorescenční kanál v kulturách a) iHep1A, 750x; b) iHep1B, 750x; c) MEF; 630x. Vizualizace DNA fluoroforem DAPI.

1.5 Genová exprese hepatocytárních markerů v různých vývojových stádiích iHep

Genová exprese iHep byla analyzována v pěti různých stádiích transdiferenciace při odlišných kultivačních podmínkách. Stanovena byla exprese 2 referenčních genů (GAPDH, Ubiquitin) a 6 hepatocytárních genů (*α-fetoprotein*, *albumin*, *karbonická anhydráza*, *E-cadherin*, *glutamin syntetáza*, *hepatocytární nukleární faktor 4α*) v průběhu 3 týdenní

kultivace. První sběr buněk proběhl 4. den po transdukci, kdy byly iHep stále kultivovány v obohaceném IMDM, další 7. den po transdukci, kdy bylo medium nahrazeno speciálním Hepatomeziem a následně 10., 14., a 21. den po transdukci, kdy měly iHep ideální podmínky v podobě kolagenového podkladu (Kolagen I) a Hepatomezia s epidermálním (EGF) a hepatocytálním (HGF) růstovým faktorem (viz Tabulka 8). Oproti analýze genové exprese iHep1A a iHep1B (viz Tabulka 13) došlo k nahrazení sledovaných markerů *Gstm3* a *vimentinu* za *Hepatocytární nukleární faktor (Hnf4α)* a gen pro jaterní enzym *Karbonickou anhydrázu (Car2)*. U transdiferenčních stádií iHep byla analýza zaměřena více na funkční specifikaci hepatocytů během jejich vývoje, zatímco v rámci analýzy iHep1A a iHep1B byla sledována především jejich morfologická změna. Gen *Gstm3* nebyl během první analýzy zcela signifikantní marker iHep. Stanovení bylo provedeno z nasyntetizované cDNA jednotlivých transdiferenčních stádií a kontrolní populace MEF, pomocí qPCR, za základě vložených primerů (viz Tabulka 6). qPCR byla realizována platformou LightCycler® 480 (Roche), která vygenerovala Ct hodnoty sledovaných genů (viz Tabulka 14).

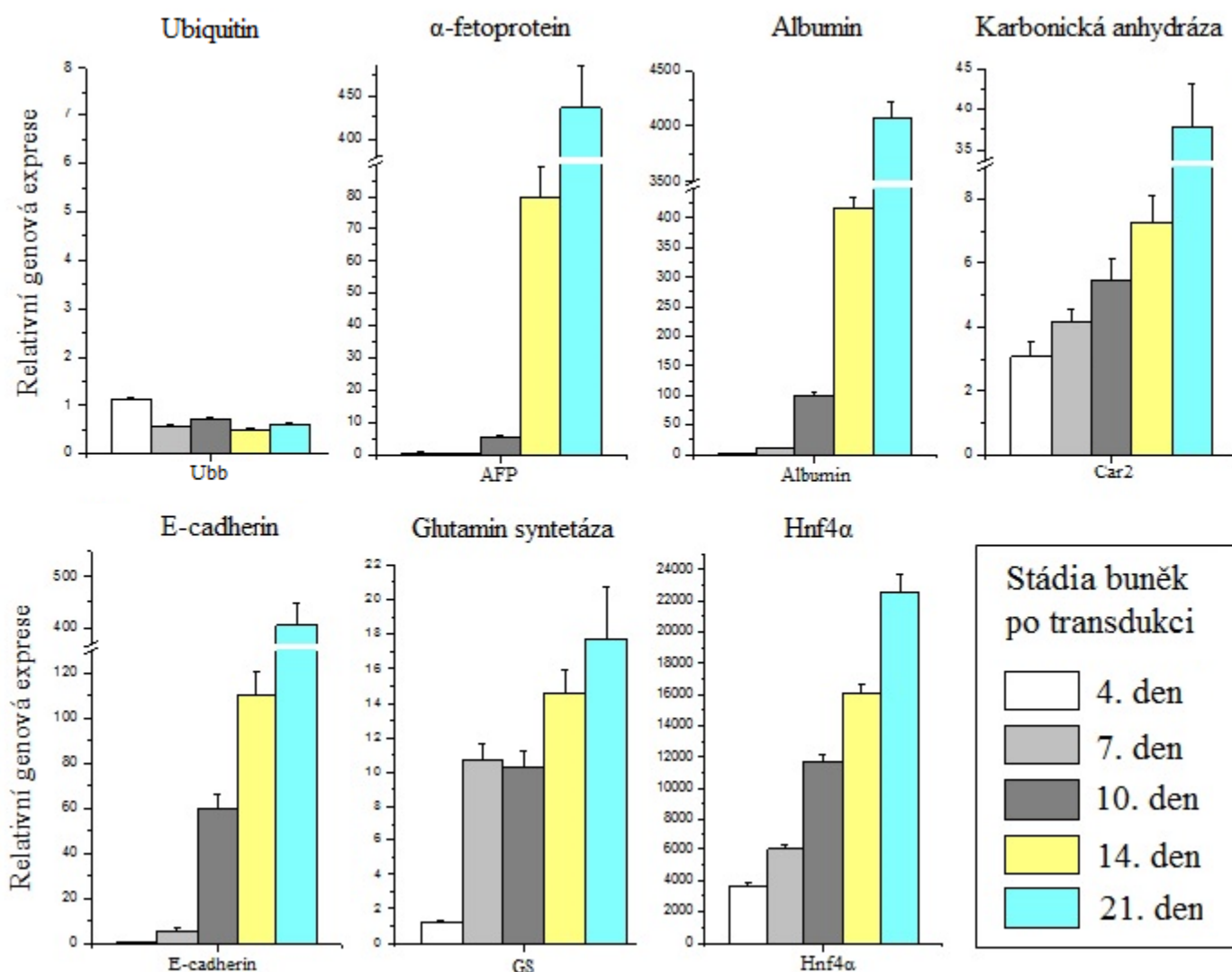
Tabulka 14 Genová exprese v různých transdiferenčních stádiích iHep - přehled Ct hodnot 2 referenčních genů a 6 specifických genů u 5 buněčných populací iHep - 4., 7., 10., 14. a 21. den po transdukci, a MEF.

Stanoveneno qPCR z platformy LightCycler® 480.

Referenční a specifické geny	MEF	4.den	7.den	10.den	14.den	21.den
<i>Ubiquitin (Ubb)</i>	18,68	18,19	17,20	17,66	17,15	17,37
<i>GAPDH</i>	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00
<i>α-fetoprotein (AFP)</i>	32,74	33,63	35,20	31,24	25,56	22,17
<i>Albumin</i>	31,63	30,92	25,56	23,80	21,08	17,02
<i>Karbonická anhydráz (Car2)</i>	31,54	30,51	28,83	27,72	27,31	24,95
<i>E-cadherin</i>	34,91	34,35	29,40	27,24	24,80	23,13
<i>Glutamin syntetáza (GS)</i>	25,14	24,30	20,15	20,54	19,36	19,41
<i>Hepatocytární nukleární faktor (Hnf4α)</i>	34,05	23,30	21,45	20,95	19,74	19,38

Relativní genová exprese byla zanesena do grafů, v nichž byla vztažena k MEF=1 a normalizována na GAPDH (viz Obrázek 20). U všech šesti hepatocytárních markerů byla

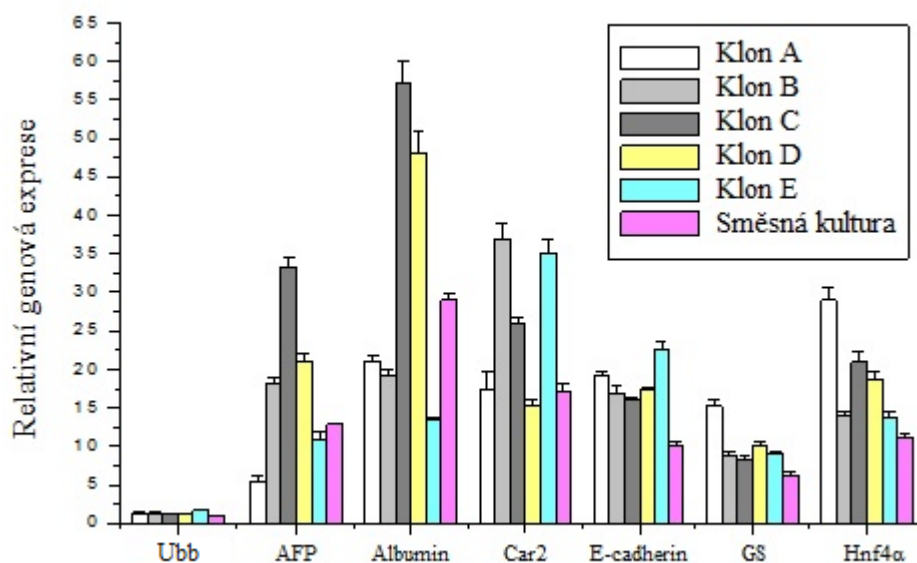
pozorována zvyšující se tendence genové exprese, v závislosti na kultivačních podmínkách a délce kultivace iHep po transdukci MEF rekombinantními retroviry, obdobně jako při diferenciaci běžných hepatocytů z progenitorové buňky. Nárůst byl zaznamenán především během 2. a 3. týdne, což podnítilo nahrazení IMDM za Hepatomedium, stimulace růstovými faktory a kolagenový podklad. Zejména *albumin*, marker maturovaných hepatocytů, vykazoval markantní zvýšení exprese až 21. den po transdukci, tedy ve finální fázi transdiferenciace. Nárůst exprese specifických markerů je odvozen od změny fenotypu kultury, ve které se kromě již přeměněných iHep mohou vyskytovat i pozůstatky fibroblastů a nediferencovaná stádia hepatocytů, které lze přirovnat k hepatocytárním prekurzorům. Zvyšující se genová exprese je proto podobná diferenciaci primárních hepatocytů z ESC.



Obrázek 20 Analýza relativní genové exprese hepatocytárních markerů u 5 buněčných populací iHep v různých stádiích transdiferenciace, vztažená k MEF = 1. Normalizace GAPDH.

1.6 Hepatocytární markery v buněčných kloněch iHep

Buněčné klony byly izolovány ze směsné kultury iHep, za účelem vymezení heterogenity indukované populace. Celkem bylo vypichováním získáno 48 buněčných klonů (48-ti jamková destička), z čehož bylo selektováno 5 klonů (A-E) pro qPCR a ICC, na základě kvality a rychlosti růstu. V rámci analýzy byly sledovány jednotlivé homogenní populace buněčných klonů (A-E) mezi sebou i v porovnání s heterogenní směsnou kulturou iHep a počáteční populace MEF. qPCR (platforma LightCycler® 480; Roche) byla stanovena exprese 2 referenčních genů (GAPDH, Ubiquitin) a 6 hepatocytárních genů (*α -fetoprotein*, *albumin*, *karbonická anhydráza*, *E-cadherin*, *glutamin syntetáza*, *hepatocytární nukleární faktor 4 α*), které byly shodné jako při analýze transdiferenciačních stádií iHep. Relativní genová exprese klonů A-E a směsné kultury byla zanesena do grafů, v nichž byla vztažena k MEF=1 a normalizována na GAPDH (viz Obrázek 21).

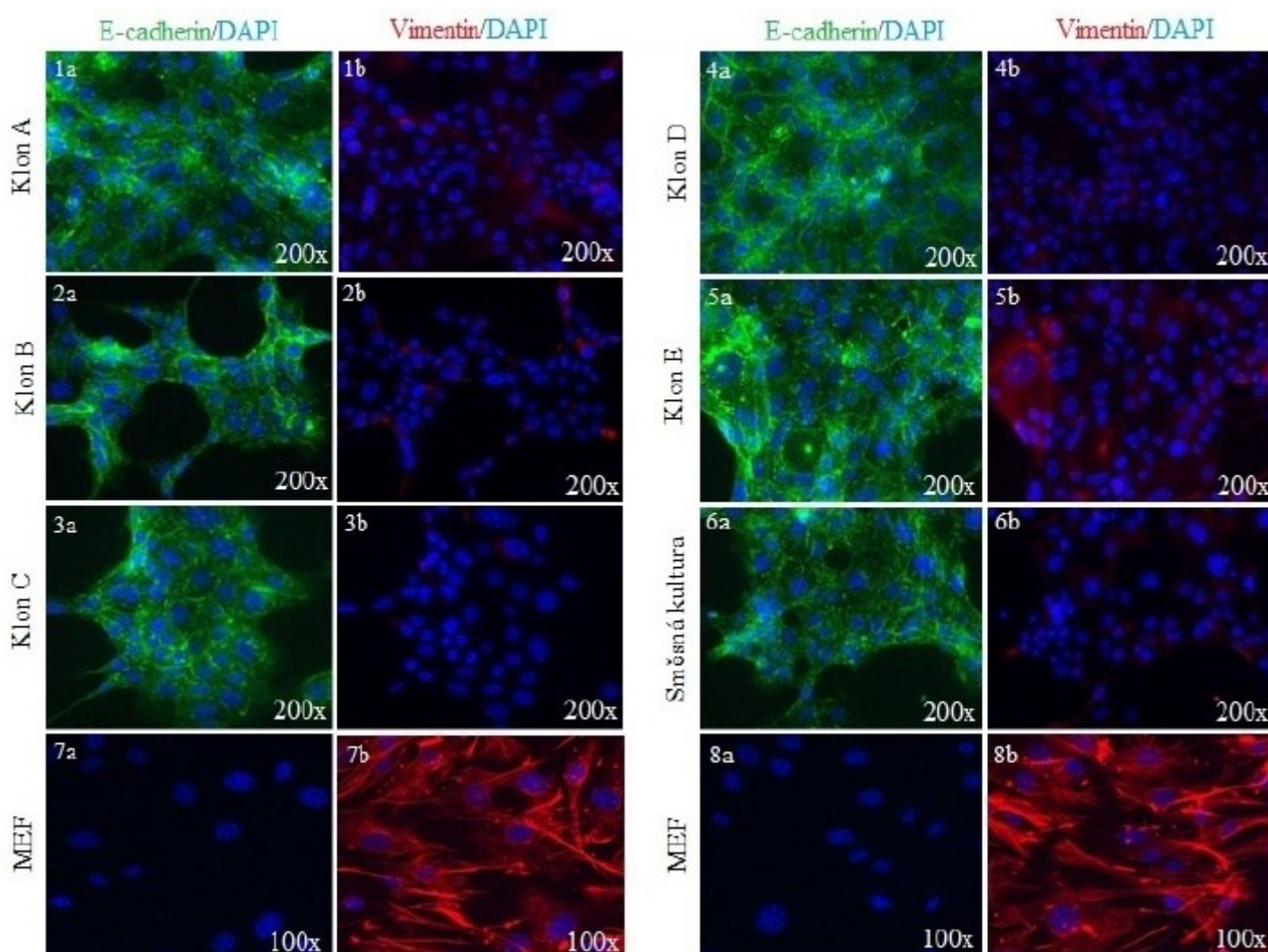


Obrázek 21 Analýza relativní genové exprese hepatocytárních markerů u heterogenní směsné kultury iHep a z ní získaných homogenních buněčných klonů A-E, vztažená k MEF = 1. Normalizace GAPDH.

Jednotlivé klony vždy vykazovaly majoritní expresi některého z genů: klonu A - *Hnf4 α* a *GS*, klon B - *Car2*, klon C - *α -fetoprotein* a *albumin*, klon E - *E-cadherin*, což mohlo být odvozeno od fáze buněčného cyklu nebo různě dokončeného stádia transdiferenciace. Na základě analýzy vývojových stádií iHep by konkrétně klon C odpovídal terminační fázi,

dle vysoké exprese *albuminu*, zatímco klon Klon E s vysokou expresí *E-cadherinu* a stále potlačenou přítomností *α -fetoprotein* a *albumin* by se pravděpodobně nacházel přibližně v polovině transdiferenčního procesu. Směsná populace iHep měla u všech sledovaných markerů průměrnou expresi, a to svědčí o přítomnosti různě diferencovaných buněk v kultuře a heterogenitě linie.

Imunocytochemická analýza buněčných klonů byla zaměřena na monitorování cytomorfologických změn pomocí barvením strukturních markerů - E-cadherin a vimentin, navázanými specifickými primárními protilátkami (viz Tabulka 2) a jejich vizualizací sekundárními fluorescenčními protilátkami (viz Tabulka 3). Detekce byla provedena mikroskopováním ve fluorescenčním kanálu mikroskopu Leica DM6000 (viz Obrázek 22).



Obrázek 22 Analýza cytomorfologických změn v homogenních buněčných klonech iHep pomocí imunocytochemického barvení a detekce v mikroskopu Leica DM6000 ve fluorescenčním kanálu. Cytomorfologické změny specifických markerů - a) E-cadherinu a b) vimentinu v kulturách 1) klon A, 200x; 2) klon B, 200x; 3) klon C, 200x; 4) klon D, 200x; 5) klon E, 200x; 6) heterogenní populace - směsná kultura iHep, 200x; 7,8) počátní populace MEF, 100x. Vizualizace DNA fluoroforem DAPI.

Jednotlivé buněčné klony iHep se mezi sebou ani v porovnání se směsnou kulturou iHep v cytomorfologických změnách nijak výrazně nelišily. Všechny klony A-E byly pozitivní na přítomnost adhezivní molekuly E-caderinu (viz Obrázek 22/1a-5a), obdobně jako směsná kultura, z níž byly původně izolovány (viz Obrázek 22/6a). V kultuře MEF byla detekována pouze velká jádra, obarvená DAPI, bez známek E-cadherinu (viz Obrázek 22/7a,8a). Současně byla ve směsné kultuře (viz Obrázek 22/6b) i u všech klonů A-E (viz Obrázek 22/1b-5b) potlačena produkce vimentinu. Vimentin byl redukován v závislosti na vývojové fázi buněčné linie, tudíž u klonu E bylo možné ještě pozorovat zbytky nepřeměněné pojivové tkáně (viz Obrázek 22/5b), což pravděpodobně koreluje s daty o genové expresi klonu E z qPCR (viz Obrázek 21). Kontrolní populace MEF byla na přítomnost vimentinu silně pozitivní (viz Obrázek 22/7b,8b).

2. Genová editace - CRISPR/Cas9

2.1 Editace iHep pro modelaci lidského onemocnění

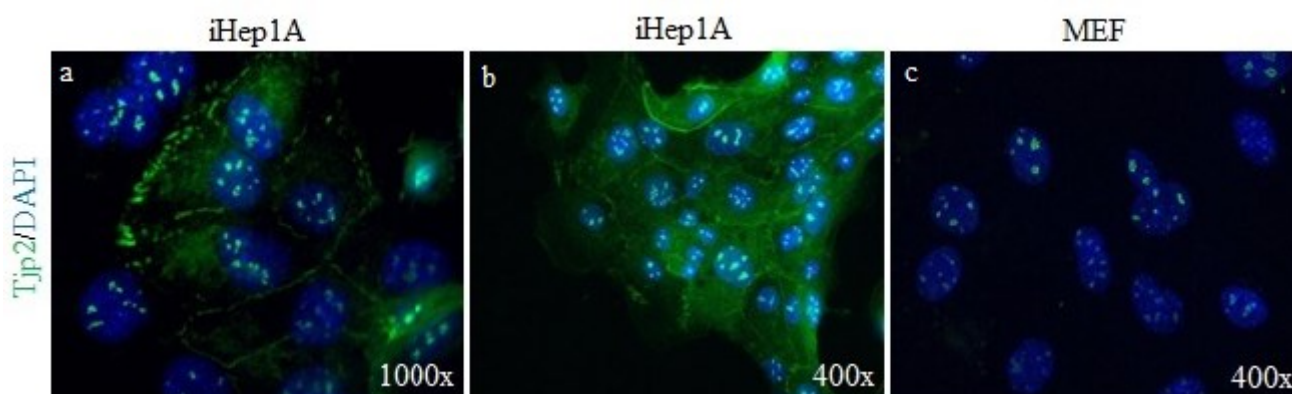
Editace myších indukovaných hepatocytů pro modelaci lidského jaterního onemocnění byla zvolena v rámci úzké spolupráce laboratoře s prof. MUDr. Mgr. Milan Jirsa, CSc z Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze, na základě anamnézy konkrétního pacienta. Pacient nese 2 mutace v genu *ABCB11* a substituční bodovou mutaci v genu *TJP2* - nt2732A>G (p.Tyr911Cys), u které však nelze protein imunohistochemicky detekovat z jater. Tato alela dosud nebyla popsána a není známé k jaké změně na úrovni proteinu zde dochází. Naším cílem je proto modelovat tuto mutaci lidského genu *TJP2* na myších indukovaných hepatocytech *in vitro*. Uvědomujeme si, že myší a lidské geny nejsou vždy identické, proto výsledek nelze považovat za jednoznačně specifický. Sledovaný gen *TJP2* však vykazuje u lidí a myší 75% shodu po celé jeho délce a pacientova mutace se nachází v části genu, která je pro oba organismy konzervovaná (viz Obrázek 23). Jedná se o 911 aminokyselinu proteinu TJP2. Kompletní deficit tohoto proteinu je pak asociován s rozvojem jaterního onemocnění. Z anamnézy pacienta vyplývá, že by se mohlo jednat o rozvoj Progresivní familiární intrahepatální cholestázy 4. typu (PFIC4). Pro simulaci toho onemocnění byl v tomto případě zvolen myší model z hlediska snazší dostupnosti a reprogramovatelnosti buněk a současně aby sloužil jako předvoj k editaci lidských buněk.

NW Score	Identities	Positives	Gaps
4367	897/1197(75%)	937/1197(78%)	184/1197(15%)
Query 1	MFVVRGDRGFPPPRELSGNLRAPGMEELINEQYIVTLQKDSKRGFGIIVSNGRDNPHFENG	EE+INEQYIVTLQKDSKRGFGIIVSNGRDNPHFENG	60
Sbjct 1	M-----EEVINEQYIVTLQKDSKRGFGIIVSNGRDNPHFENG		37
Query 61	ETSIVISDVLPGGPADGLLQENDRVVM/NGT PMEDVLHSFAVQQLRKSGKVAIVVKRFR		120
Sbjct 38	ETSIVISDVLPGGPADGLLQENDRVVM/NGT PMEDVLHSFAVQQLRKSGKIAIVVKRFR		97
Query 121	KVQVAALQASPLDQDDRAFEVMDDEFDGRSFRSGYSESRSLNSHGGRSRSWEDSPERGRP		180
Sbjct 98	KVQVA LQ SPPL DDR FEV++EFDGRSFRSGYSESR +SH S SWE + ERGRP		157
Query 181	HERARSERDLRSRDRSRGRSLERGLDQ-DHARTDRSRGRSLERGLDHDHDFGFSRDRDRR		239
Sbjct 158	H+R +SRER+ RSRGRSLERGLDQ D+ R+R+RSRGRSLERGLD DF SRD R R		212
Query 240	SRGRSIDQDYERAYHRAYDPDYERAYSPEYRRGARHDARSRGFRSRREHPHRSRSPSEP		299
Sbjct 213	S R D+DYER+YH AY+PDY YSP Y R A + R RSRREH SRSPSE		270
Query 300	RGR-----PGPIGVLLMKSRANEYGLRLGSQIFVKEMTRTGLATKDGNLHEGDII		350
Sbjct 271	R R PIGVLL KS+ANEYGLRLGSQIF+KEMTRTGLATKDGNLHEGDII		330
Query 351	LKINGTVTENMSLTDARKLIEKSRGKLQLVVLRDSQQILINIPSLNDSSEIEDISEIES		410
Sbjct 331	LKINGTVTENMSLTDARKLIEKSRGKLQLVVLRDS+QILINIP+LNDSDSE+EDISEIES		390
Query 411	NRSFSPERRHQYSDYDHSSEKLERPSSREDTPSRLSRMGATPTPFKSTGDIAGTV		470
Sbjct 391	NRSFSPERRQYSDQYDHSSTEKLERPSSREETSGLSRMGATPTPFKSTGDIAGV		450
Query 471	PETINKEPRYQEDFPAPQKGAAPRTFLRPSFEDEAIYGENTKMVRFKKGDVGLRLAGGND		530
Sbjct 451	E ++EPRYQE+ P PQP+ APR FLRPSFEDEAIYGENTKMVRFKKGDVGLRLAGGND		510
Query 531	VGIFVAGIQEGTSAEQESLQEGDQILKVNTQDFRGLVREDAVLYLLEIPKGMVTLAQS		590
Sbjct 511	VGIFVAGIQEGTSAEQESLQEGDQILKVNTQDFRGLVREDAVLYLLEIPKGETVTLAQS		570
Query 591	RADVYRDILACGRGDSFFIRSHFECEKETPQSLAFTRGEVFRVVDLYDGKLGWLVAVRI		650
Sbjct 571	RADVYRDILACGRGDSFFIRSHFECEKETPQSLAFTRGEVFRVVDLYDGKLGWLVAVRI		630
Query 651	GNELEKGLIPNKSRAEQMASVQNAQRDNAGDRADFWRMRGQRS--GVKKNLRKSREDLTA		708
Sbjct 631	GNELEKGLIPNKSRAEQMASVQNAQRDNAGDRADFWRMRGQRS GVKKNLRKSREDLTA		690
Query 709	VVSSTKFPAYERVLLREAGFKRPVVLFGPIADIAMEKLANELPDWFQIAKTEPKDAGSE		768
Sbjct 691	VVSSTKFPAYE+VLLREAGFKRPVVLFGPIADIAME+LA ELPD FQIAKTEPKDAGSE		750
Query 769	KSTGVVRLNTRVQIIIEQDKHALLDVT PKAVDLLNYTQWFPPIVIFPNPDSRQGVKTRQEL		828
Sbjct 751	KS+GVVRLNTRVQIIIEQDKHALLDVT PKAVDLLNYTQWFPPIVIFPNPDSRQGVKTRQEL		810
Query 829	NPTSNKSSRKLFDQANKLKKTC+HLFTATINLNSANDSWFGSLKDTIQHQQGEAVVWSEG		888
Sbjct 811	SPTSNKSSRKLFDQANKLKKTC+HLFTATINLNSANDWFGSLKDSIQHQQNEAVVWSEG		870
Query 889	KMEGMDDDPEDRMSYLTAMGADYLSCD SRLISDFEDTDGEGGAYTDNELDEPAEEPLVSS		948
Sbjct 871	KMEGMDDDAEDRMSYLTAMGADYLSCD SRLISDFEDTDGEGGAYTDNELEEPAEEPLVSS		930
Query 949	ITRSSEPVQHEE-----		960
Sbjct 931	ITRSSEPVQHEE-----		990
Query	-----		
Sbjct 991	YSKSNLPATAGSEIPGGSTKGYPPPIAAKPAFGRPILKPTFVPMPESEEVGSTEEDQED		1050

Obrázek 23 Porovnání myšního a lidského proteinu TJP2 - konzervovaná část proteinu (červeně); sekvence v níž se nachází mutace (zeleně).

2.2 Stanovení přítomnosti Tight junction proteinu 2 v iHep

Přítomnost Tight junction proteinu 2 (Tjp2) v iHep byla nejprve ověřena imunocytochemicky, pomocí navázané specifické primární králičí protilátky TJP2 (viz Tabulka 2) a její vizualizací sekundární fluorescenční protilátkou GAR Alexa 488 (viz Tabulka 3). Detekce byla provedena mikroskopováním ve fluorescenčním kanálu mikroskopu Leica DM6000. Tjp2 se v populaci iHepA nejen podílel na výstavbě těsných buněčných spojení, ale rovněž byl lokalizován i v jádře, kde má funkci signalizačního proteinu (viz Obrázek 24a). Kontury těsných spojení epiteliálních buněk byly zviditelněny použitím imerzního objektivu (viz Obrázek 24b). V kultuře MEF se Tjp2 nacházel pouze uvnitř DAPI-vizualizovaných jader, nikoli v těsných buněčných spojeních (viz Obrázek 24c).



Obrázek 24 Analýza Tjp2 v iHep pomocí imunocytochemického barvení a detekce v mikroskopu Leica DM6000 ve fluorescenčním kanálu. Přítomnost Tjp2 v kulturách: a) iHep1A, 1000x; b) iHep1A, 400x; c) MEF, 400x.

Vizualizace DNA fluoroforem DAPI.

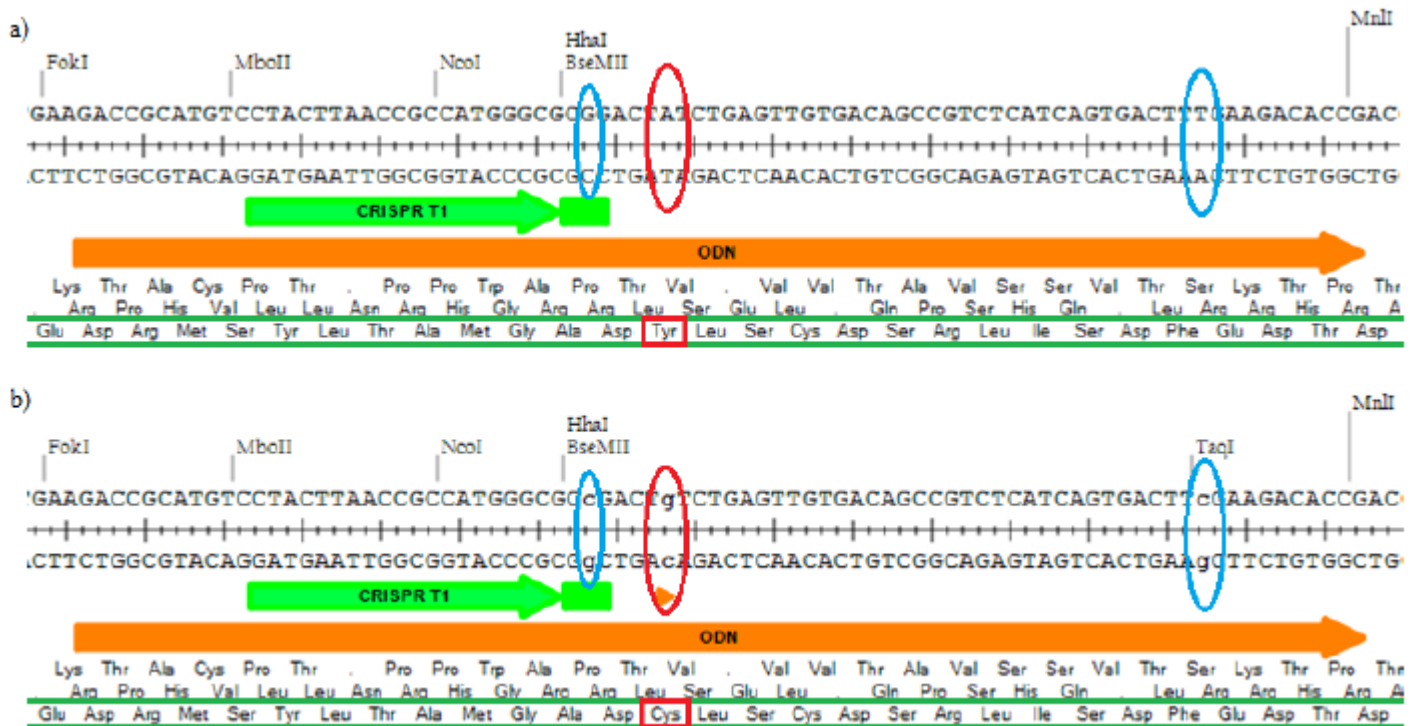
Prokázána byla také exprese *Tjp2* z cDNA hepatocytárních linií iHep1A, iHep1B a původní populace MEF, pomocí qPCR, za základě vložených primerů (viz Tabulka 7). Kromě *Tjp2* byla pro kontrolu stanovena i exprese 2 referenčních genů (*Ubiquitin*, *GAPDH*) a 2 specifických genů (*Hnf4α*, *EGFP*). qPCR byla realizována platformou LightCycler® 480 (Roche), která vygenerovala Ct hodnoty pro sledované geny, včetně *Tjp2* (viz Tabulka 15). V kulturách iHep byla, v porovnání s MEF, exprese *Tjp2* značně vyšší, což by vypovídalo o jeho přítomnosti v obou buněčných kompartmentech - jádře i těsných spojeních.

Tabulka 15 Genová exprese *Tjp2* v iHep- přehled Ct hodnot 2 referenčních genů a 2 specifických genů a sledovaného *Tjp2* v populacích iHep1A, iHep1B a MEF. Stanoveneno qPCR z platformy LightCycler® 480.

Referenční a specifické geny	iHep1A	iHep1B	MEF
<i>Ubiquitin</i>	18,11	18,53	18,70
<i>GAPDH</i>	18,00	18,00	18,00
<i>Hepatocytární nukleární faktor 4α (Hnf4α)</i>	19,32	19,63	35,17
<i>Zelený fluorescenční protein (EGFP)</i>	18,25	18,51	31,58
<i>Tight junction protein 2 (Tjp2)</i>	23,64	23,06	26,19

2.3 CRISPR pro substituční bodovou mutaci v genu *Tjp2*

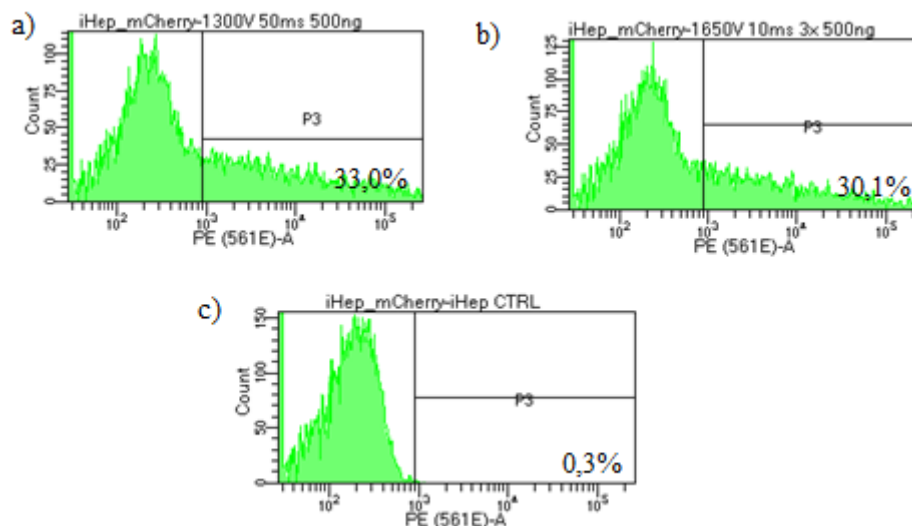
Vnesení substituční bodové mutace nt2732A>G (p.Tyr911Cys) genu *Tjp2* do iHep je umožněno aplikací editačního systému CRISPR/Cas9. Pro tuto metodu byla navržena templátová DNA, podle které by mělo dojít k opravě specificky rozštěpeného místa nukleázou Cas9, na základě syntézy komplementárního řetězce, a tím k indukci missense mutace *Tjp2*. CRISPR byl sestaven z sgRNA nesoucí sekvenci pro vytvoření dvouvláknového zlomu (cr + tracr RNA) a z opravného templátu pro homologní rekombinaci *in vitro* (viz primery Tabulka 5). Templátová sekvence byla navržena tak, aby vyvolala mutaci, identickou s pacientem, při které dochází k záměně adeninu za guanin (A>G), která má za následek změnu kodónu aminokyseliny z tyrosinu (Tyr) na cystein (Cys). Do konstruktů templátové DNA byly současně zaneseny další dvě záměny, vyvolávající tzv. tiché mutace, při kterých aminokyseliny zůstávají neměnné. Tichá mutace v PAM sekvenci 5' CGG 3' (G>C) bránila rozštěpení ssDNA templátu nukleázou Cas9 a druhá kontrolní tichá mutace (T>C) sloužila k zavedení štěpného místa pro TaqI restriční endonukleázu pro snazší detekci buněk, ve kterých korektně proběhl editační proces (viz Obrázek 25).



Obrázek 25 CRISPR pro substituční bodovou mutaci v genu *Tjp2* - a) Genová sekvence bez přítomnosti mutace v *Tjp2*;
 b) Chimerická guide RNA, nesoucí teplátovou sekvenci, indukující 2 tiché mutace (modré) - kontrolní (T>C), PAM (G>C)
 a 1 missense mutaci (A>G), měnící kodón aminokyseliny z Tyrosinu na Cystein (červená).

2.4 Optimalizace elektroporace

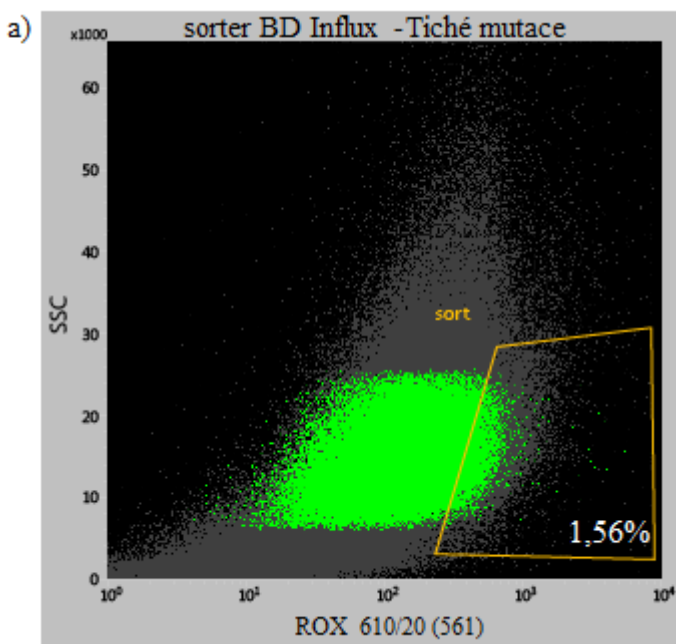
Pro zanesení CRISPR/Cas9 do iHep byla zvolena metoda elektroporace, při které došlo krátkými elektrickými impulsy k narušení membrány iHep a vytvoření dočasných pórů, kterými byl genetický materiál vkládán do buněk. Neon Transfection System (Thermo Scientific) byl nejprve optimalizován pomocí plasmidu pFPV-mCherry (viz Obrázek 12), který je členem rodiny monomerních červených fluorescenčních proteinů (RFP) mFruit. Optimalizovaná elektroporace vykazovala účinnost 33% při 1x impulsu 1300V po dobu 50ms (viz Obrázek 26a) a 30,1% při 3x impulsu 1650V po dobu 10ms (viz Obrázek 26b). Účinnost byla stanovena BD FACSDiva8.0.1 softwarem pro analýzu dat z průtokového cytometru LSRII (BD Biosciences), na základě přítomnosti RFP v elektroporovaných iHep. Ke zvýšení účinnosti a především životnosti buněk přispěla především jejich kultivace v kondiciovaném mediu ihned po elektroporaci. Negativní kontrolou zde byla neelektroporovaná populace iHep (viz Obrázek 26c).



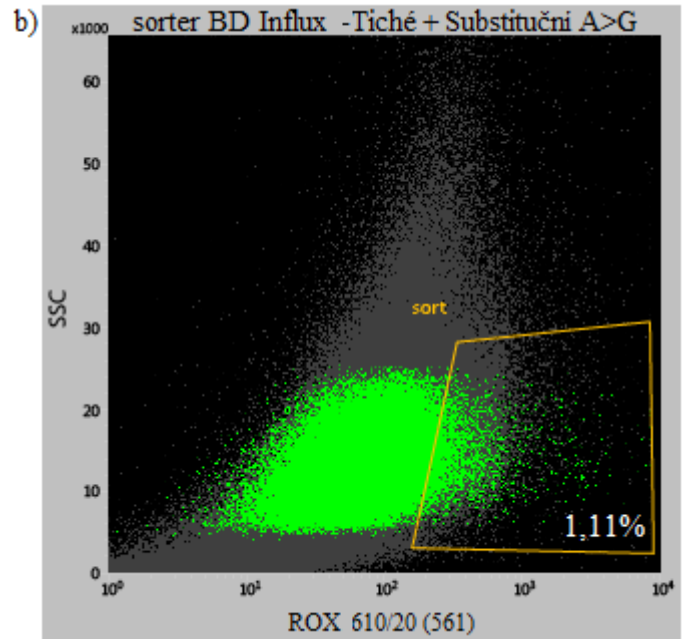
Obrázek 26 Optimalizace elektroporace (Neon Transfection System) pomocí vkládání fluorescenčního plasmidu pFPV-mCherry do iHep - a) elektroporace 1x 1300V 50ms; b) elektroporace 3x1650V 10ms; c) neelektroporované iHep. Detekce fluorescence průtokovým cytometrem LSRII, analýza BD FACSDiva8.0.1.

2.5 Sortování geneticky editovaných iHep

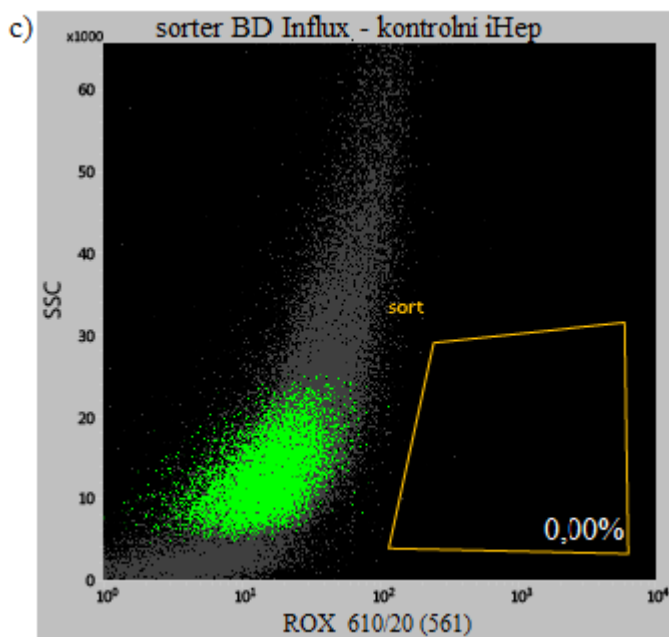
Optimalizovanou elektroporací 1x impulsem 1300V po dobu 50ms byl skrz membránu do buněk iHep inkorporován nukleoproteinový komplex, obsahující nukleázu Cas9, sgRNA a templátovou sekvenci DNA, vyvolávající substituční mutaci nt2732A>G (p.Tyr911Cys) společně se dvěma tichými mutacemi v genu *Tjp2*. Navrženy byly celkem dvě homologní předlohy, z nichž jedna indukovala pouze tiché mutace, na rozdíl od druhé, která nesla všechny tři zmiňované mutace. Obě vložené oligonukleotidové templátové sekvence byly konjugovány s červeným fluoroforem Rhodaminem X (ROX), tudíž bylo umožněno sortování editovaných iHep vysokorychlostním sorterem BD Influx (BD Biosciences). Z první populace iHep, editované CRISPRem s tichými mutacemi, bylo vysortováno pouze 1,56% buněk, u kterých byla s nejvyšší pravděpodobností vyvolána kontrolní mutace (T>C) s mutací v PAM sekvenci (G>C) (viz Obrázek 27a). U druhé populace iHep, editované CRISPRem se všemi třemi mutacemi, byla úspěšnost při použití stejně přísného sortování (gatování) nižší. Sortováno bylo 1,11% iHep, u kterých lze předpokládat, že nesou kromě obou tichých mutací i substituční bodovou mutaci A>G, měnící kodon aminokyseliny z tyrosinu na cystein (viz Obrázek 27b). Kontrolní populací zde byla kultura iHep bez vloženého CRISPR/Cas9 (viz Obrázek 27c).



Populace	Události (počet)	Procento (%)
Tiché mutace		
Všechny události	285562	100,00
Buňky	137311	48,08
Singlety	110223	38,60
Buněčný prostor	106717	37,37
GFP ⁺	77475	27,23
Sort	4450	1,56
Debris	148251	51,92



Populace	Události (počet)	Procento (%)
Tiché + Substituční		
Všechny události	354546	100,00
Buňky	209159	58,99
Singlety	154763	43,65
Buněčný prostor	149045	42,04
GFP ⁺	113080	31,89
Sort	3941	1,11
Debris	145387	41,01



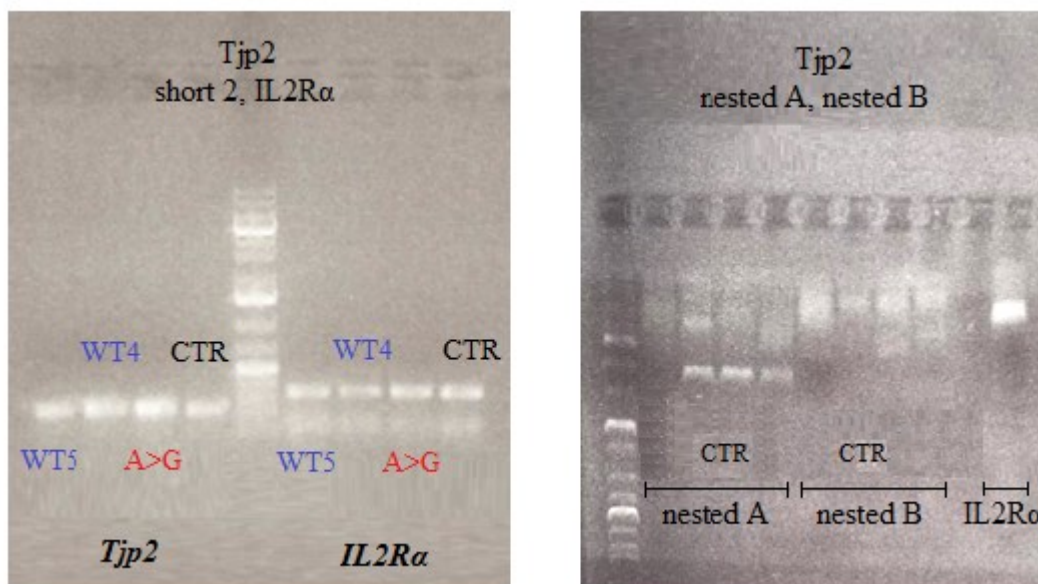
Populace	Události (počet)	Procento (%)
Kontrolní iHep		
Všechny události	51457	100
Buňky	24265	47,16
Singlety	15609	30,33
Buněčný prostor	14393	27,97
GFP ⁺	9415	18,30
Sort	0	0,00
Debris	27192	52,84

Obrázek 27 Sortování iHep, editovaných systémem CRISPR/Cas9, pomocí vysokorychlostního sorteru BD Influx na základě přítomnosti Rhodaminu X. Sortování kultury - a) iHep s vloženými tichými mutacemi (kontrolní, PAM); b) iHep s vloženými tichými mutacemi (kontrolní, PAM) a missense mutací A>G; c) kontrolní iHep bez vloženého CRISPRu.

2.6 Analýza editovaného proteinu Tjp2

V sortovaných populacích - WT4 a WT5 (buňky nesoucí pouze 2 tiché mutace), A>G (buňky nesoucí 3 mutace, včetně pacientovy), CTR (buňky kontrolní bez vloženého CRISPR/Cas9), u nichž byl předpoklad, že obsahují vložené mutace, došlo k PCR amplifikaci a přečištění mutovaného fragmentu a jeho detekci pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu. Amplifikace byla provedena vícekrát s odlišnými primery, ohraničujícími DNA fragment, protože některé z nich nasedaly nespecificky. Nakonec byly vybrány primery označené Tjp2 - short2, nested A, nested B a kontrolní IL2R α (viz Tabulka 7) a výsledná velikost amplifikovaného PCR produktu byla stanovena elektroforeticky.

Výrazné bandy, které svou velikostí odpovídaly fragmentu Tjp2, byly vizualizovány v případě Tjp2-short2 a Tjp2-nested A. V obou těchto případech se jevílo, že produkty měly správnou velikost, proto byly vyříznuty z gelu a štěpeny restriční endonukleázou. Rozštěpené fragmenty však svou velikostí přesně neodpovídaly předpokladu. Elektroforetický produkt Tjp2-nested B nebylo možné po vizualizaci považovat za signifikantní, proto se domníváme, že primery nasedaly nespecificky v závislosti na nevyrovnaném počtu GC:AT párů. Kontrolními PCR primery byly zvoneny IL2R α , poněvadž je u nich ověřená specifita nasedání produktu (viz Obrázek 28).



Obrázek 28 Amplifikovaný Tjp2 fragment s vloženými mutacemi, vizualizovaný na elektroforetickém gelu. V prvním případě (vlevo) primery nasedaly během PCR při teplotě 56°C a v druhém případě (vpravo) gradientové PCR v rozmezí 58°C-64°C. Elektroforetické produkty se správnou velikostí: Tjp2-short2 a Tjp2-nested A; nespecifický produkt: Tjp2-nested B; kontrolní produkt: IL2R α . (WT = 2 tiché mutace, A>G = 3 mutace).

2.7 Sekvenace

Amplifikované *Tjp2* fragmenty s vloženými mutacemi, jejichž bandy měly na elektroforetickém gelu odpovídající velikost - *Tjp2-short2* a *Tjp2-nested A*, byly z gelu vyříznuty, přečištěny na kolonce a ligovány do vektoru pGEM-T Easy Vector (viz Obrázek 11). Plasmidová DNA byla klonována v kompetentních bakteriích TOP10 *E. coli*, které jsou přirozeně uzpůsobené k pojmutí cizorodé DNA. Bakterie, transformované vektorem pGEM-T Easy Vector, byly kultivovány na ampicilínových plotnách a ze směsných kultur bylo vypíchnuto vždy 11 monoklonálních kolonií (od každé PCR se stejnými primery) pro tzv. Kolony PCR, během které dochází k amplifikaci fragmentu z konkrétní monoklonární kolonie. Přítomnost plasmidové DNA byla ověřena štěpením *TaqI* restriční endonukleázou, kdy po elektroforetické separaci došlo k identifikaci velikosti vektoru k inzertem. Nicméně bandy po restričním štěpení u některých kolonií o správně velikosti zcela nevytvářely. Z vybraných kolonií byla proto minipreparací izolována plasmidová DNA, která byla poslána na sekvenaci. Detekce inzertu v *iHep* byla provedena metodou Sangerova sekvenování, kterou zprostředkovala firma SeqMe. Sekvenování s primery T7 promotor však bylo negativní a přítomnost *Tjp2* fragmentu, který měl být zaklonovaný do *iHep*, se nepotvrdila.

V rámci práce se nepodařilo ověřit vložení substituční mutace do genu *Tjp2* *iHep*, proto nebylo možné studovat změny konformace proteinu, indukované danou mutací, ani odhalit příčiny zvýšené degradace proteinu u sledovaného pacienta. V projektu se však bude dál pokračovat s cílem navrhnout metodu, zvyšující specifitu nasedání primerů, a prokázat přítomnost missense mutace, aby mohly editované *iHep* sloužit jako vhodný model pro jaterní onemocnění.

VI. Diskuze

1. Transdiferenciace MEF na iHep

Přeměna myších či lidských fibroblastů na hepatocyty může mít výsadní postavení jako potenciální nástroj pro regenerativní medicínu nebo pro léčbu jaterních onemocnění a hepatocelulárních karcinomů. Usnadnění představuje především při odběru lidských těžko dostupných tkání, kdy lze díky transdiferenčními a reprogramovacím postupům výrazně snížit počet biopsií jater. Těmito technologiemi je umožněno získat velké množství dobře a dlouho kultivovaných buněk pacienta, na kterých je tedy možné například *in vitro* testovat potenciální léčiva. V klinické praxi však mohou být konverze buněk doprovázeny některými omezeními či riziky.

V tomto projektu byla pro generování indukovaných hepatocytů (iHep) zvolena přímá metoda transdiferenciace, vycházející z původní publikace, popisující úplně první konverzi myších embryonálních fibroblastů na hepatocyty *in vitro* (Sekiya, S., & Suzuki, A., 2011). Pro účely transfekce byla zvolena kombinace transkripčních faktorů *Foxa1*, ovlivňujícího vývoj jater, a *Hnf4a*, uplatňujícího se při diferenciaci a genové expresi hepatocytů, protože se v našem případě osvědčila daleko lépe než-li spojení s *Foxa2* nebo *Foxa3*. Kromě naší aplikované kombinace, existuje i celá řada dalších faktorů a stimulačních molekul, které ovlivňují signální dráhy fibroblastů k posunu směrem k hepatocytární linii, jako například *Gata4*, *Hnf1a*, *Foxa3*; *Hnf4a*, *Foxa3*, *Kdm2b*; *HNF1a*, *HNF4a*, *FOXA3*; *HNF4*, *FOXA2*, *C/EBPβ* nebo *FOXA2*, *FOXA3*, *HNF4a*, *ATF5*, *PROX1* (viz Teoretický úvod - Kapitola 4.3). Bylo totiž prokázáno, že molekuly *C/EBPβ* a *GATA4* pozitivně ovlivňují vývoj i expresi iHep a přítomnost *Kdm2b* v definované kombinaci zvyšuje kvalitu transdiferencace.

Ve všech těchto případech jsou však vybrané sestavy transkripčních faktorů transportovány do fibroblastů pomocí retrovirové/lentivirové transdukce. Obalení fluorescenčně značených plasmidů *Hnf4a* a *Foxa1* do ekotropní buňky PhoenixECO HEK 293 a produkce rekombinantních retrovirů může tedy v klinickém využití vzbuzovat určité obavy. Transdukce virovými vektory bývají často spjaty s rizikem genotoxicity a inzerčních mutagenéz během integrace vektorů do hostitelského genomu. Východisko by mohlo poskytnout použití episomálního vektoru, který se v jádře cílové buňky chová jako samostatný extrachromozomální element. Například episomální vektor oriP/Epstein Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1), nesoucí zvolené transkripční faktory, je schopen vyvolat

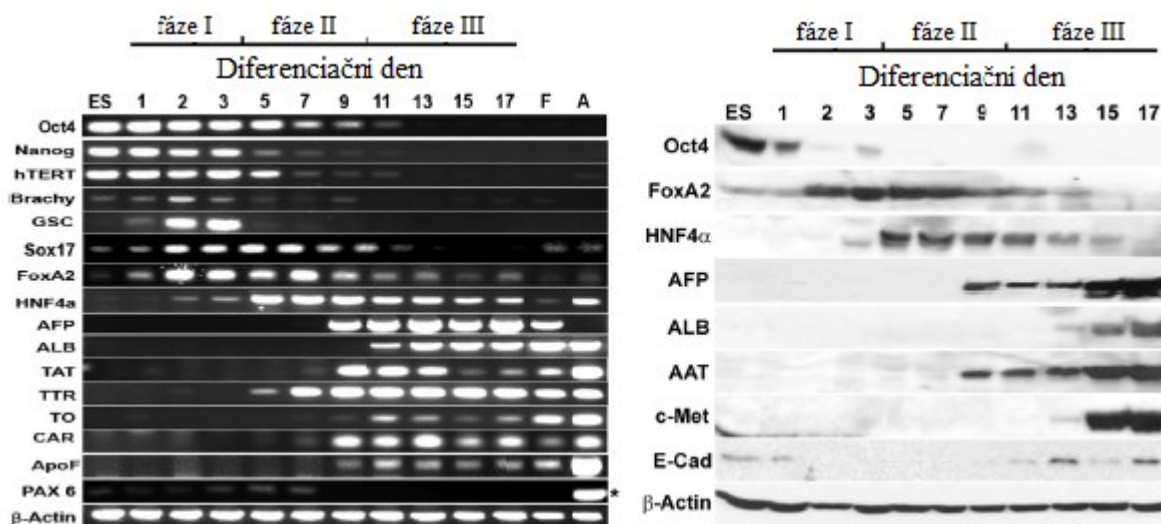
proliferaci maturovaných iHep v průběhu 4-5 týdnů po jeho nukleofekci do fibroblastů. Episomální transdiferenciací by tedy mohl být potlačen vznik inzerní mutagenese, avšak její průběh se zdá být časově náročnější a především ve výsledku vykazuje podstatně nižší funkční kapacitu iHep a nižší expresi hepatocytárních markerů, vzhledem k retrovirálně indukovaným iHep (Kim, J., *et al.*, 2015).

K expresi hepatocytárních markerů v našem případě docházelo po 2-3 týdenní kultivaci ve speciálním hepatomediu s růstovými faktory a kolagenovým podkladem, který měl nahradit bazální membránu, z níž vyrůstají epiteliální buňky. Doba transdiferenciace MEF na maturované iHep by teoreticky mohla být zkrácena stimulací *Klf4* a *c-Myc*, které inhibují TGF β a tím akcelerují MET a signalizační dráhu Wnt, čímž dochází k potlačení fibroblastové linie a velmi robustní produkci iHep se specifickou genovou expresí již za 9 dní (Lim, K. T., *et al.*, 2016). V tomto případě by však urychlení procesu mohlo být pravděpodobně na úkor kvality generované populace. Účast *c-Myc* při formování teratomů a jiných karcinomů je známá už z reprogramování buněk do pluripotentní fáze, tudíž by integrace toho onkogenu do genomu hostitelské buňky podnítil vznik karcinogeneze.

Pro studium genové exprese iHep byly vybrány některé charakteristické hepatocytární markery α -fetoprotein, albumin, které svědčí o jejich funkční kapacitě, i nehepatocytární markery, vypovídající i struktuře buněk. Indukce exprese specifických markerů iHep byla mírně opožděná ve srovnání s primárními hepatocyty, pocházejícími z embryonální kmenové buňky (ESC), které exprimovaly hepatocytární geny 1-2 týdenní diferenciací *in vivo* (viz Obrázek 29; Hay, D. C., *et al.*, 2008).

Expresе všech sledovaných markerů během jednotlivých transdiferenciačních fází iHep neustále narůstala a přibližně 3-4 týdny po transdiferenciaci by se tedy dalo předpokládat, že dochází k ustálení genové exprese iHep, na podobné úrovni jako u maturovaných primárních hepatocytů. Konkrétně u albuminu docházelo k výraznému nárůstu až po dvoutýdenní kultivaci iHep, protože se jedná o protein, syntetizovaný zralými hepatocyty, což by se shodovalo s primárními hepatocyty. Zatímco α -fetoprotein, marker hepatoblastomu a nezralých hepatocytů, byl u iHep exprimován téměř se stejnou incidencí nárůstu jako albumin, a to i v pozdějších transdiferenciačních stádiích, u kterých by se s dosažením zralosti dala očekávat zpomalující se až klesající tendence. Za signifikantní marker je možné považovat i *Hnf4 α* , neboť se jedná o gen posilující se na diferenciaci hepatocytů, i přestože jeho expresе mohla být ovlivněna *Hnf4 α* -plasmidem inkorporovaným do DNA MEF v průběhu transdukce.

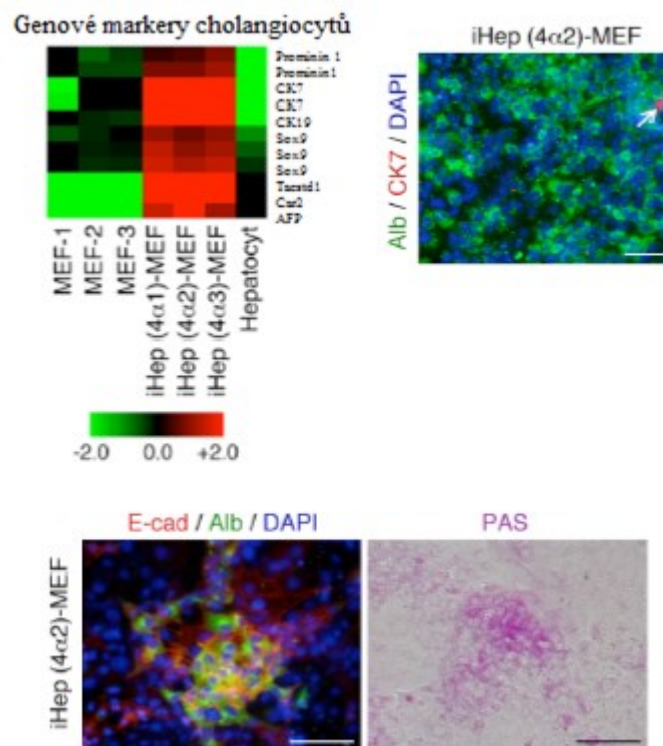
Detekce byla zaměřena i na jeden z jaterních enzymů karbonickou anhydrázou (*Car2*), která zde zajišťuje sekreci bikarbonátových iontů do žlučových kanálek. Sledovány byly rovněž geny, které nelze řadit mezi typické markery hepatocytů - *E-cadherin* a *vimentin*, za účelem porovnání cytomorfologických změn a monitorování přechodu mezi buňkami pojivové tkáně a buňkami epitelu. V rámci studia heterogenity iHep vykazovala směsná populace průměrnou genovou expresí, na rozdíl od homogenních klonů iHep, kde každý jeden klon majoritně exprimoval vždy jeden až dva hepatocytární geny. Žádný z klonů výrazně nevyčníval robustní expresí všech markerů, nasvědčovalo by to tedy o jejich různě dokončené transdiferenční fázi. U klonů iHep s nedokončenou konverzí proto bylo možné ještě zaznamenat některé znaky fibroblastů. Průměrnost směsné populace iHep je důkazem vysoce heterogenní hepatocytární linie, v níž se nachází více typů buněk v různých vývojových stádiích.



Obrázek 29 Genová exprese hepatocytů diferencovaných z embryonální kmenové buňky. Změny exprese z mezendodermálních markerů na hepatocytární markery v průběhu 3 diferenačních fází (I. definitivní endoderm, II. jaterní progenitorová buňka, III. maturovaný hepatocyt). ES - embryonální kmenová buňka; F - fetální jaterní RNA; A - dospělá jaterní RNA (Hay, D. C., *et al.*, 2008).

Heterogenní populace iHep může být tvořena nejen různě transdiferencovanými hepatocyty a redukujícími se mezenchymálními fibroblasty, ale současně také cholangiocyty. V průběhu diplomové práce nebyla provedena analýza, zaměřená na expresi typických cholangiocytárních markerů, ale na základě bipotentního charakteru progenitorové jaterní buňky a blízkého vztahu hepatocytů a buněk epitelu žlučových cest nelze zcela vyloučit, že v průběhu transdiferenciace byly kromě iHep proliferovány zároveň i indukované

cholangiocyty. Publikace, z níž práce vycházela, se však expresí cholangiocyturních markerů zabývala a poněvadž transfekce zde byla realizována shodnými transkripčními faktory (*Hnf4a* a *Foxa1*), lze se tedy domnívat, že se námi transdiferencované iHep budou chovat identicky. Detekce specifických markerů byla aplikována na buněčné kultury iHep, které v ní byly pozitivní nejen k hepatocyturním, ale i cholangiocyturním genům. iHep, exprimující *CK7* i *CK19*, však svou funkční specifitou (albumin, PAS) odpovídaly maturovaným hepatocytům, tudíž se můžeme domnívat, že jsou do transdiferencovaných hepatocytů zaneseny transgeny nebo se v kultuře kromě populace iHep může nacházet i malé zastoupení cholangiocytů (viz Obrázek 30; Sekiya, S., & Suzuki, A., 2011).



Obrázek 30 Genová exprese iHep (transdukované *Hnf4a* a *Foxa1/Foxa2/Foxa3*), zaměřená na charakteristické geny cholangiocyturn (Prominin1, Cytokeratin7, Cytokeratin 19, Sox9). Současně ICC barvení funkční specifity maturovaných iHep - albumin, PAS reakce (Sekiya, S., & Suzuki, A., 2011).

Eliminaci produkce cholangiocyturn by bylo možné pravděpodobně zajistit inhibicí TGF β signalizační dráhy, která by měla za následek blokování diferenciacce směrem k buňkám epitelu žlučových cest. Aktivace TGF β se totiž podílí na přeměně hepatocytů na cholangiocyty, exprimující typické markery *Hnf1 β* a *CK19* (Kamath, B., & Mack, C. L.;

2018). K vytvoření čistě dominantní populace iHep by mohla přispět i inhibice faktoru *Oct4*, která je podnětem k transdiferenciace hepatocytů na cholangiocyty, a to je doprovázeno celkovým potlačením cholangiocytní linie (Doffou, M., et al., 2018). Zcela jistě se však můžeme domnívat, že se v iHep kultuře nevyskytují bipotentní progenitorové jaterní buňky, protože jejich transdiferenciace je zajištěna definovanou kombinací faktorů *Hnflβ* a *Foxa3*. Záměnou *Hnflβ* za *Hnflα* jsou pak produkovány bipotentní prekurzory s vysokou diferenciací kapacitou pro maturované cholangiocyty (viz Teoretický úvod - Kapitola 4.4).

Kromě transdiferenciace lze samozřejmě indukované populace iHep docílit i prostřednictvím reprogramování, kdy nejprve dochází k návratu k iPSC a následně k formování hepatocytárních buněk. Lidské fibroblasty jsou v tomto případě transdukovány retroviry, nesoucími OSMK faktory, a po 6-10-ti denní kultivaci se objevují první iPSC s karyotypem a genovou expresí, odpovídající pluripotentním kmenovým buňkám. V této fázi je spuštěn druhý reprogramovací krok, během kterého je specifickými endodermálními diferenciacími medii podněten vznik definitivního endodermu. Během dalšího týdne se z definitivního endodermu začínají diferencovat hepatocytární progenitorové buňky, které jsou po stimulaci oncostatinem M a HGF maturovány ve zralé hepatocyty (Wang, J., et al., 2016). Jako nevýhoda reprogramování se jeví podstatně delší a složitější postup, který opět evokuje rizika spojená s inzerčními mutagenézmi a vznikem karcinogeneze, vázané na přítomnosti OSMK. Reprogramovací čas by bylo možné zkrátit stimulací malými molekulami (*TGFβ*, *activin A*, *BMP4*, *Wnt3*, *FGF*), které ovlivňují signální dráhy, vedoucí k výstavbě jater. Řešením pro eliminaci potenciálních rizik by opět mohlo být použití episomálního vektoru, obsahujícího pouze kombinaci transkripčních faktorů bez onkogenu *c-Myc* či *Lin28* (Kamath, A., et al., 2018), nebo přístup s úplnou absencí transkripčních faktorů. Pluripotentní fáze by měla být indukována i skrz inhibici MEK a TGFβ signalizace nebo prostřednictvím synergické aktivity synteticky modifikovaných mRNA (viz Teoretický úvod - Kapitola 3.1).

2. Genová editace iHep - CRISPR/Cas9

Genová editace umožňuje cílenou úpravu nukleových kyselin s léčebným, výzkumným, ale i patologickým záměrem. Úpravami na úrovni genomu může být simulováno téměř jakékoli onemocnění, tudíž se její aplikace jeví jako ideální terapeutický prostředek. Genovou editací jaterních buněk lze tedy například odstranit přítomnou patologickou mutaci nebo

naopak u zdravých buněk navodit patologický stav autentický pro konkrétní jaterní chorobu, za účelem monitorování jejího průběhu a odhnutí příčin jejího vzniku. Získané informace by tak mohly být přínosným zdrojem pro inhibici rozvoje jaterního onemocnění nebo pro stanovení vhodné léčby. Další perspektiva se nabízí při testování účinnosti medikamentů na editovaných jaterních buňkách, případně určení vedlejších nežádoucích účinků. Nicméně stejně jako u reprogramovaných metod jsou i editační technologie doprovázeny některými úskalími, které je mohou limitovat při klinickém využití.

Editace genomové DNA lze realizovat různými metodami, z nichž nejznámější a nejpoužívanější jsou ZFN, TALEN a CRISPR/Cas9. Základní princip těchto metod je založen na specifickém štěpení nukleové kyseliny a vytvoření dvouvláknového zlomu (DSB), který je záhy opraven buď mechanismem NHEJ nebo HR. Jednotlivé editační přístupy se od sebe liší pouze svým provedením a použitím jiných molekulárních prostředků (viz Teoretický úvod - Kapitola 5). Pro účel editace indukovaných hepatocytů (iHep) byl zvolen systém CRISPR/Cas9, který je odvozen od imunitní adaptivní odpovědi bakterií, například *E. coli*, které se tak běžně brání před atakou virů a plasmidů. Elektroporací byly do iHep vloženy CRISPR editační molekuly - sgRNA a Cas9, společně se značenou oligonukleotidovou templátovou sekvencí podle níž probíhala oprava DSB.

Analogického závěru mohlo být rovněž dosaženo i dvěma výše zmiňovanými metodami, ale pro konkrétní model byly posouzeny za méně vhodné. ZFN je majortině využíváno při genetické modifikaci rostlin, u nichž bývá indukována tkáňová proliferace a regenerace se šlechtitelským záměrem nebo pro vyšší zemědělský výnos plodin. Kromě rostlin mohou být nukleázami ligovanými na zinkové prsty editovány také buňky živočišné, tedy i lidské, avšak v nich byla potvrzena značná chybovost a cytotoxicita. Editace ZF nukleázami je nejvíce diskutována v kontextu s lidskými buňkami, napadenými virem HIV, u kterých bývají v rámci terapie pozměněny různé úseky koreceptoru CCR5, cíleně regulovány molekuly, účastníci se rozvoje AIDS nebo transfúzí dopraveny geneticky modifikované krevní buňky do těla nemocného jedince (Tebas P, *et al.*, 2014). Integrací synteticky sestaveného ZF proteinu do pluripotentních buněčných linií prostřednictvím lentiviru byla zaznamenána inhibice replikace HIV1 v T buňkách SupT1, což by mohlo poskytovat nový terapeutický prostředek, avšak nelze opomenout rizika spojená s přítomností lentivirového vektoru (Moonmuang, S., *et al.*, 2018). Modifikace jaterních buněk ZF nukleázami *in vivo* byla poprvé popsána u pacienta s Hunterovým syndromem.

Onemocnění, vyvolené deficitem enzymu induronát-2-sulfatázy, se projevuje akumulací škodlivých látek v různých orgánech (játra, slezina, mozek). Pacientovi s absencí toho enzymu byl tedy do těla injikován vektor, nesoucí ZFN pro úpravu jaterních buněk, která by podněcovala proliferaci zdravých buněk. Použitím adeno-asociovaného vektorem byla snížena míra cytotoxicity ZFN technologie, nikoli však zcela eliminována (převzato z Kaiser, J, 2017). Stále mohou být indukovány mutagenese, vyvolané chybnou lokalizací štěpného místa, což bývalo pro tuto metodu poměrně časté. Zvýšení efektivity ZFN, a tím i potenciálu pro klinické využití, by mohlo být zajištěno novou sadou ZF nukleáz, které poskytují 23-28bp dlouhou sekvenci, specificky se vázající na DNA (viz Teoretický úvod - Kapitola 5.1).

Editace TAL efektorovými nukleázami je rovněž navržena pro různé modelové organismy, včetně rostlin, bezobralých i obratlovců. Editačním postupem je tato metoda velmi blízká ZFN, přesto však vykazuje podstatně nižší cytotoxicitu, snazší sestavení konstruktů a do nedávna nejspíš i větší specifitu při nasedání na cílovou sekvenci, proto by se mohla jevit jako vhodnější alternativa. Předností TALEN je především schopnost navázání na jakoukoli DNA sekvenci, na jejíž 5' konci je přítomný thymin. Nicméně pro vazbu na jednotlivé nukleotidy je vyžadován poměrně velký editační konstrukt (přibližně 34 aminokyselin), který během rozpoznání cílového úseku může vytvářet DSB i na jiných nespecifických místech. Objevuje se zde opět i nebezpečí spojené s inzerčními mutagenesemi, které by bylo možné vyřešit neviróvou fúzí TALEN s peptidem (Tat protein), pronikajícím do buněk, ale tento bezpečnější přístup je limitován sníženou účinností editace (Liu J, *et al*, 2014). Nevýhodou je i nízký počet publikací zabývajících se editací hepatocytů TAL nukleázami, tudíž tato problematika není příliš prozkoumána. Modifikace lidských genů metodou TALEN je také zaměřena především na studium a potlačení infekce HIV (viz Teoretický úvod - Kapitola 5.2).

CRISPR/Cas9 systém byl pro editaci iHep vybrán na základě spolehlivosti metody a již ověřených postupů, které byly několikrát úspěšně realizovány i naší laboratoří, ve které jsou na ní dostupné potřebné prostředky. Zároveň spousta publikací zveřejnila různé *in vitro* a *in vivo* modifikace myších i lidských hepatocytů systémem CRISPR/Cas9. Potenciální rizika inzerčních mutagenesí by mohla být u této metody eliminována nahrazením lentiCRISPRU za méně nebezpečné adenovirové vektory, obdobně jako u ZFN (Singh, K., *et al.*, 2018) nebo použitím elektroporace pro transport editačních molekul do buněk. Použití elektroporace je však spjato s nižším procentem životaschopných editovaných buněk, protože úmrtnost buněk

po zásahu krátkým elektrickým impulsem je poměrně vysoká. Z toho důvodu byla provedena nejdříve optimalizace pomocí plasmidu mCherry, kterou byl vytyčen nejúčinnější elektroporační postup, zahrnující kultivaci iHep v kondiciovaném médiu ihned po elektroporaci. Chybavost CRISPR/Cas9 je poměrně ojedinělá, ale ani tuto technologii nelze stále pro klinickou praxi považovat za stoprocentně bezpečný editační nástroj. Objevily se studie deklarující výskyt potenciálně ohrožujících genetických změn, které nejsou indukovány zcela záměrně. Existují případy, kdy je součástí komplexu sgRNA-Cas9 i enzym deamináza, který může podnítit nekontrolovatelnou záměnu některých párů bazí (převzato z Cohen, J., 2019). Objasněním této problematiky by se mohl systém CRISPR/Cas9 stát ještě spolehlivější, ale i přesto je pro editaci lidských buněk pokládán za nejvhodnější.

Rozštěpení dvoušroubovice DNA v definovaném místě iHep, indukované kooperací navádějící sgRNA s nukleázou Cas9, bylo opraveno homologní rekombinací (HR), v rámci níž byl syntetizován komplementární řetězec k vloženému jednořetězcovému DNA templátu. Aplikace HR umožňuje vyvolání missense mutace v genu *Tjp2* iHep, protože v jejím průběhu může dojít k nahrazení bazí adeninu za guanin (A>G), a to zapříčiní záměnu aminokyseliny tyrosinu za cystein. Oprava nehomologním spojením konců by zde měla za následek inzerci či delecii určitého páru bazí, doprovázenou ztrátou nukleotidu, nikoli však substituci bazí. Reparační DSB nebyla tedy zajištěna opravným mechanismem NHEJ, poněvadž by nebyl vytvořen přesný model patologického stavu jaterních buněk, shodující se s anamnézou pacienta.

Snahou bylo zkonstruovat model pro bodovou mutaci v lidském genu *TJP2* na myších indukovaných hepatocytech. Samozřejmě nebyl opomenut fakt, že lidské a myší geny nejsou vždy zcela identické, proto byly oba geny vzájemně porovnány a ukázalo se, že vykazují vysokou míru shody, včetně sekvence obsahující sledovanou mutaci. Mutace byla lokalizována v úseku *TJP2*, který je pro oba organismy konzerovaný (viz Obrázek 23). Na základě komparace byly zvoleny myši iHep jako adekvátní model pro lidské onemocnění, nýbrž dostupnost lidských hepatocytů bývá výrazně složitější. Kromě omezení spjatých s myším konstruktem je vnímán i případný výskyt odchylek a odlišností v chování buněk oproti primárním hepatocytům, které mohou být iniciovány předcházejícím transdiferenčním procesem.

Monitorovaný pacient je nositelem bodové mutace nt2732A>G (p.Tyr911Cys) v genu *TJP2* a současně dvou mutací v genu *ABCB11*, což diagnosticky svědčí o přítomnosti

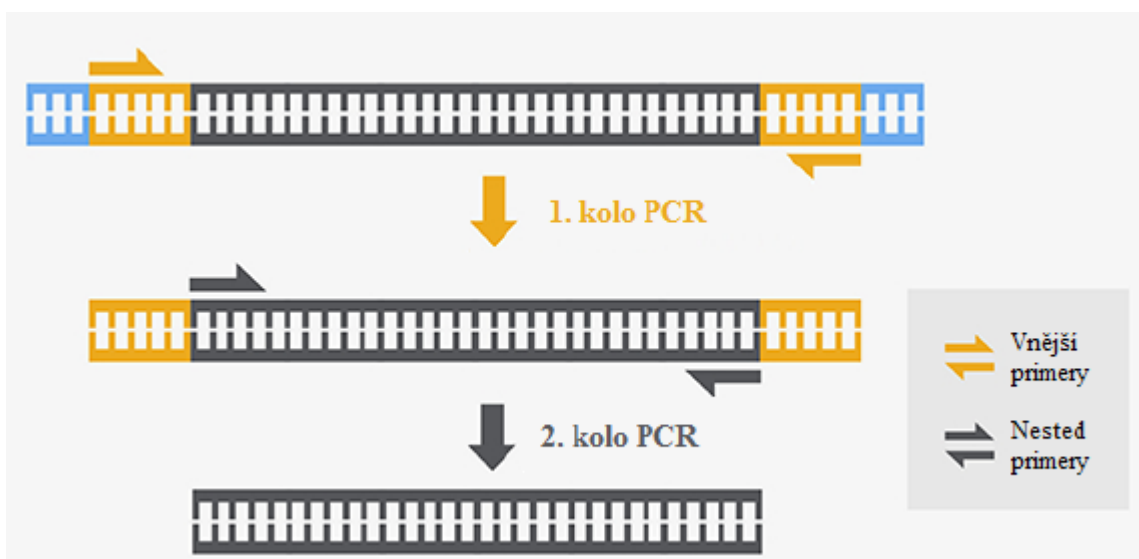
progresivní familiární intrahepatální cholestázy typu 4 (viz Kapitola 6.1). Pacientova játra jsou sice zdravá, ale dochází v nich k úniku žlučových kyselin z primárních žlučových kanálků do plasmy, což je způsobeno netěsností buněčných spojení. Kompletní deficit TJP2 je asociován s rozvojem jaterního onemocnění, tudíž by se mohlo teoreticky jednat i o familiární hypercholanémii (FHA), která je zapříčiněna také mutací *TJP2* a někdy doprovázená i mutací genu BAAT. V případě FHA je však detekována homozygotní mutace *TJP2*, lokalizovaná převážně v první PDZ doméně (Carlton, V. E. H., *et al.*, 2003; Kim, Y.-J., *et al.*, 2013). U námi sledovaného pacienta je přítomná mutovaná alela, kterou se nedaří vyšetřit imunohistochemicky, ze sekvence genu je však známo, že se mutace nachází na úrovni 911 aminokyseliny TJP2 proteinu, tedy za doménou GuK v oblasti bohaté na prolin (viz Obrázek 7). Existují i případy, kdy homozygotní a heterozygotní mutace *TJP2* vyvolaly rozvoj hepatocelulárního karcinomu (HCC). Například u pacientky s heterozygotními mutacemi c.2668-1G>T /c.2438dupT (p.Asn814Glnfs) v *TJP2* nebyla také exprese tohoto genu imunohistochemicky detekovatelná, došlo k výraznému snížení exprese *Claudin 1* a následně byla potvrzena přítomnost multifokálního HCC. Na rozdíl od námi sledovaného pacienta, ale nenesla mutaci v genu *ABCB11* (Zhou, S., *et al.*, 2015). Bylo také prokázáno, že mutace *TJP2* může mít negativní vliv na činnost sluchu. Inverzní genomová duplikace *TJP2* indukuje zvýšenou expresi tohoto genu společně s geny regulujícími apoptózu, které působí na GSK-3 β dráhu a zvyšují náchylnost buněk středního ucha k apoptóze, což má za následek ztrátu sluchu (Walsh, T., *et al.*, 2010).

Elektroporací byl tedy do iHep zanesen systém CRISPR/Cas9, včetně homogenní sekvence, kde byla indukována missense mutace v *Tjp2*. Současně byly vyvolány i další dvě tiché mutace, v jejichž přítomnosti nedochází ke změně sledu aminokyselin v proteinu. Záměna C>G v PAM sekvenci templátu by měla zabránit jejímu rozštěpení nukleázou Cas9 během genové editace a vytvoření restriční místa (záměna T>C) v blízkosti modelované pacientovy mutace sloužilo k usnadnění lokalizace a ověření správnosti průběhu HR. Úspěšně editované iHep byly detekovány na vysokorychlostním sorteru, který roztřídil iHep nesoucí pouze tiché mutace (označeny WT4, WT5) a iHep se všemi třemi mutacemi (označeny A>G), na základě přítomnosti červeného fluoroforu Rhodamin X, který byl konjugovaný k templátové sekvenci. Excitační a emisní maxima Rhodaminu X se pohybovala v rozmezí 550-600nm. Počet živých sortovaných iHep, které byly pravděpodobně nositeli substitučních mutací, byl však velmi nízký, proto měla být pro kontrolu stanovena i přesná

sekvence nukleových bazí v cílovém úseku DNA iHep prostřednictvím sekvenování. U populace iHep byl tedy editovaný úsek ohraničen specificky nasedajícími primery TJP2-nestedA a TJP2-short2 a jeho ligací do pGEM-T Easy Vectoru byl úsek klonován v kompetentních bakteriích. Zmnožený DNA produkt, obsahující cílovou sekvenci, byl vyštěpen a poslán na sekvenaci, která však přítomnost fragmentu Tjp2 s vloženými substitučními mutacemi v iHep opakovaně nepotvrdila.

V průběhu procesu byly již některé primery vyřazeny kvůli jejich nespecifitě při nasedání na DNA iHep. Specifita primerů je založená na jejich vhodné délce, vyrovnaném poměru GC:AT párů a nekompatibilitě forward a reverse primeru, aby se tak předešlo jejich vzájemnému párování. Snížená specifita primerů TJP2-nestedB a TJP2-short1 mohla být způsobena převažujícím podílem CG párů v rámci jejich sekvence (viz Tabulka 7). Ačkoli byly pro sekvenování použity teoreticky vhodné primery, jejichž nasedací teplota byla optimalizovaná gradientovou PCR, mohlo dojít k chybám v některých z navazujících kroků, které mohly výsledek také negativně ovlivnit. Problém mohl být spojený s vektorem pGEM T Easy, který je velmi citlivý na kontaminaci, tudíž někdy může nastat i jeho ztráta. Nevýhodou některých T vektorů je i jejich volnost při klonování zprostředkovaná otevřeným čtecím rámcem, kdy dochází k tvorbě párů bazí mezi 3'T a 3'A přesahy, tudíž komplex vektor-inzert může mít shodnou orientaci jako PCR produkt. V případě uzavřeného čtecího rámce se iniciační kodón nachází v těsné blízkosti kodónu terminačního, tudíž zde není tolik prostoru pro volné párování. pGEM Easy Vector obsahuje 3'T přesahy na straně inzertu a kompatibilní přesahy pro PCR. Během klonování je tedy připojován deoxyadenosin na 3'konec amplifikovaného fragmentu bez přítomnosti jakéhokoli templátu (viz pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems protokol). Pro eliminaci plasmidu, obsahujících otevřené čtecí rámce ve špatné orientaci, byly proto zavedeny postupy, založené na selekci plasmidů vloženými restriktivními endonukleázami před jejich transformací do kompetentních bakterií (Goda N, *et al.*, 2004). Nabízí se zde také vysvětlení, že i primery Tjp2-NestedA a Tjp2-short2 nasedaly na genomovou DNA nespecificky, i přestože na elektroforetickém gelu vykazovaly správnou velikost. Výsledky sekvenování totiž prokázaly i přítomnost některých pGEM Easy vektorů se zaklonovaným fragmentem chromozomu X, což mohlo být pravděpodobně způsobeno primerovým ohraničením jiného PCR produktu než-li Tjp2, který měl pouze shodnou velikost. Zvýšení efektivity při nasedání primerů a získání těžko dostupného lokusu Tjp2 by mohlo být dosaženo použitím Nested PCR, která disponuje

vysokou senzitivitou a specifitou. Během tohoto procesu dochází k dvěma na sebe navazujícím PCR reakcím, které probíhají v přítomnosti dvou sad odlišných primerů. Prvními je ohraničený delší fragment cílového genu a vzniklé jednořetězcové amplikony pak fungují jako templáty pro druhou amplifikační reakci, zajištěnou druhou sadou primerů. Druhými primery je amplifikována pouze cílová sekvence z první PCR, tudíž dochází ke zvýšení účinnosti a eliminaci nespécifického produktu (viz Obrázek 31). V průběhu Nested PCR však mu být dbáno především na čistotu a pečlivost, protože při ní hrozí vyšší riziko přenosu kontaminace během manipulace s PCR produkty (Llop, P., *et al.*, 2000).



Obrázek 31 Schéma průběhu Nested PCR, využívající 2 sady primerů (převzato z Thermo Scientific)

Nezdařilá modelace pacientovi mutace v iHep mohla být teoreticky způsobena i odlišnou izoformou TJP2. U člověka byly popsány 2 základní izoformy TJP2 - A a C. Ačkoli konkrétně se jedná o pět izoform, protože existují 3 typy A - A1, A2, A3, a 2 typy C - C1, C2 (viz Teoretický úvod - Kapitola 6.2). Nedávno byly dokonce popsány i dvě další - TJP2 izoforma 6 a izoforma 7. Všechny vyjmenované izoformy se od sebe vzájemně liší svou délkou, ale vždy zůstává fixní rozestavení charakteristických domén: aminokyseliny 33-120 PDZ1, 307-385 PDZ2, 509-590 PDZ3, 604-669 SH3 a 678-876 GuK. Konzervovaná sekvence všech sedmi izoform se nachází v rozmezí aminokyselin 23-961, tudíž by modelace pacientovy mutace na 911 pozici (nt2732A>G (p.Tyr911Cys)) měla být umožněna v jakékoli z nich. U myši byla prozatím popsána pouze jedna izoforma Tjp2, pro kterou platí stejné charakteristiky jako pro lidský TJP2, pouze jsou jednotlivé domény přibližně

o 20 aminokyselin posunuty (10-97 PDZ1, 287-365 PDZ2, 489-570 PDZ3, 584-649 SH3 a 660-858 GuK). Tyto informace se shodují s konzervovaným úsekem Tjp2 v komparativním Obrázku 23 a pravděpodobně vypovídají i o nezávislosti na typu izoformy TJP2 (převzato z www.uniport.org).

Jelikož se nepodařilo ověřit zanesení mutací do DNA kultivovaných buněk iHep, otázka - proč není mutovaná alela *TJP2* u pacienta imunohistochemicky detekovatelná z jater, zůstává stále nezodpovězena. Jednou z nabízejících se odpovědí je změna konformace proteinu, vyvolaná přítomností dané mutací, což může mít za následek zvýšenou tendenci k degradaci. Mutace může mít vliv na funkci chaperonů, které se účastní skládání terciární struktury proteinu, a tím může docházet k tvorbě nestabilních produktů. Ty jsou potom rozpoznávány proteazomy, které proteolýzou štěpí na peptidové vazby v proteinu. Zvýšená degradace mutovaných proteinu tedy někdy může být vyřešena inhibicí proteazomů.

Plánem do budoucna zůstává izolace Tjp2 fragmentu a ověření úspěšnosti editovaného úseku. Po dosažení kultury iHep, nesoucí substituční bodovou mutaci nt2732A>G (p.Tyr911Cys) v genu Tjp2, budou z této heterogenní buněčné populace vypichovány jednotlivé buněčné klony, které budou sloužit pro studium vlivu přítomné mutace na konformaci a stabilitu proteinu. Všechny cíle nebylo možné realizovat během dvouletého studia, protože náplň celého projektu přesahuje rámec diplomové práce, která zde představuje odrazový můstek pro navazující experimenty.

VII. Závěr

V průběhu diplomové práce bylo docíleno přímé konverze myších embryonálních fibroblastů na indukované hepatocyty *in vitro*, která byla iniciována kombinací transkripčních faktorů *Foxa1* a *Hnf4a*, které byly prostřednictvím rekombinantních retrovirů inkorporovány do myší DNA. Transdiferenciace fibroblastů byla doprovázena cytomorfologickými a funkčními změnami, kdy indukovaný fenotyp následně vypovídal o přítomnosti hepatocytárních buněčných linií. Zahájena byla také charakteristická genová exprese, jejíž změny byly monitorovány i u jednotlivých transdiferenčních stádií iHep. Iniciace exprese hepatocytárních markerů byla pouze mírně zpožděná oproti primárním hepatocytům, diferencovaným z embryonální kmenové buňky. Ačkoli genová exprese i funkční kapacita buněk byla specifická pro hepatocyty, nebyla v rámci práce uskutečněna analýza cholangiocytárních markerů, tudíž nelze zcela jednoznačně určit, zda se jedná pouze o iHep nebo jsou v kultuře přítomny i jiné jaterní buňky. Reprogramovací technologie jsou studovány za účelem usnadnění odběru lidských těžkodostupných tkání, které by tak bylo možné generovat z dermálních fibroblastů a aplikovat na ně vhodnou terapii, případně *in vivo* indukovat proliferaci zdravých jaterních buněk bez nutnosti modulovat imunitní odpověď pacienta.

Druhou část práce se kvůli nespecifitě primerů, opakujícím se negativním výsledkům a také časovým důvodům nepodařilo zcela dokončit, tudíž byly splněny pouze některé z vytyčených cílů. Buňky iHep byly použity jako model pro lidskou bodovou mutaci v genu *TJP2*, která do nich byla vložena během homologní rekombinace, prostřednictvím metody CRISPR/Cas9. Editační molekuly, včetně teplátové sekvence, byly do iHep zaneseny optimalizovanou elektroporací, čímž byla snížena rizika spojená s inzerčními mutagenézemi, a detekce editovaných iHep byla zajištěna vysokorychlostním sorterem. Přítomnost missense mutace ale sekvenováním nebyla potvrzena, proto prozatím iHep nelze považovat za adekvátní model pro pacientovo onemocnění. Diplomová práce je součástí většího projektu, tudíž genová editace iHep bude pokračovat i nadále. Zvýšení specifity při amplifikaci editovaného úseku *Tjp2* bude realizováno prostřednictvím Nested PCR a pokud se podaří vyvolat specifickou mutaci v iHep, tak aby byla genová sekvence autentická s mutovaným *TJP2* genem pacienta, bude pravděpodobně umožněno pomocí iHep objasnit příčinu nedetekovatelnosti mutovaného proteinu a studovat průběh jaterního onemocnění.

V neposlední řadě budou iHep sloužit pro testování vhodné léčby a sloužit jako potenciální terapeutický nástroj nejen pro sledovaného jedince, ale i pro další pacienty. Vizi do budoucna je využití reprogramovacích a editačních technologií v klinické praxi, kde by se podílely na tvorbě jaterních organoidů a simulaci jaterních onemocnění.

VIII. Seznam obrázků

Obrázek 1 Schéma odlišující průběh reprogramování a transdiferenciace	15
Obrázek 2 Průběh reprogramování myších a lidských somatických buněk na iPSC.....	17
Obrázek 3 Schéma diferenciacie hepatocytů a cholangiocytů	24
Obrázek 4 Počátek a průběh vývoje jednotlivých metod pro editaci genomu	28
Obrázek 5 Zinc Finger - Protein se třemi zinkovými prsty	29
Obrázek 6 Mikrobiální nukleázový systém CRISPR/Cas9	33
Obrázek 7 Struktura a interkace TJP2.....	36
Obrázek 8 Komunikace epiteliálních buněk prostřednictvím těsných buněčných spojení	37
Obrázek 9 Mapa plasmidu Hnf4 α a plasmidu Foxa1	41
Obrázek 10 Mapa plasmidu pCL-Eco	41
Obrázek 11 Mapa plasmidu pGEM -T Easy Vector	41
Obrázek 12 Mapa plasmidu pFPV-mCherry.....	42
Obrázek 13; 14 Žebřík - GeneRuler 1kb plus; Žebřík - Gene Ruler Ultra Low Range	43
Obrázek 15 Analýza účinnosti transdukce rekombinantními retroviry	61
Obrázek 16 Analýza relativní genové exprese iHep1A a iHep1B.....	63
Obrázek 17 Analýza morfologických změn v průběhu transdiferenciace MEF na iHep.....	64
Obrázek 18 Analýza cytomorfologických změn v průběhu transdiferenciace MEF na iHep..	65
Obrázek 19 Analýza funkčních změn v průběhu transdiferenciace MEF na iHep	67
Obrázek 20 Analýza relativní genové exprese iHep v různých stádiích transdiferenciace	69
Obrázek 21 Analýza relativní genové exprese homogenních buněčných klonů iHep.....	70
Obrázek 22 Analýza cytomorfologických změn v homogenních buněčných klonech iHep ..	71
Obrázek 23 Porovnání myšího a lidského proteinu TJP2	73
Obrázek 24 Analýza Tjp2 v iHep pomocí imunocytochemického barvení	74
Obrázek 25 CRISPR pro substituční bodovou mutaci v genu <i>Tjp2</i>	76
Obrázek 26 Optimalizace elektroporace pomocí plasmidu pFPV-mCherry.....	77
Obrázek 27 Sortování iHep, editovaných systémem CRISPR/Cas9.....	78
Obrázek 28 Elektroforeticky vizualizovaný fragment Tjp2 s vloženými mutacemi	79
Obrázek 29 Genová exprese hepatocytů diferencovaných z embryonální kmenové buňky.....	83
Obrázek 30 Genová exprese iHep, zaměřená na charakteristické geny cholangiocytů	84
Obrázek 31 Schéma průběhu Nested PCR.....	91

IX. Seznam tabulek

Tabulka 1 Příklady buněčných transdiferenciací <i>in vitro</i>	19
Tabulka 2 Primární protilátky	42
Tabulka 3 Sekundární protilátky	42
Tabulka 4 Ostatní barvení	43
Tabulka 5 Primery - CRISPR/Cas9 - DNA templát pro homologní rekombinaci	45
Tabulka 6 Primery - Kvantitativní PCR - Specifické hepatocytární markery.....	46
Tabulka 7 Primery - CRISPR/Cas9 - PCR produkt	47
Tabulka 8 Mapovaná vývojová stádia iHep a jejich kultivační podmínky	50
Tabulka 9 Průběh qPCR s rychlým cyklováním pro 384 jamkovou destičku	52
Tabulka 10 Průběh fúze DNA templátu	54
Tabulka 11 Průběh PCR DNA	56
Tabulka 12 Komponenty reakce a průběh ligace DNA	57
Tabulka 13 Genová exprese iHep	62
Tabulka 14 Genová exprese v různých transdiferenciačních stádiích iHep	68
Tabulka 15 Genová exprese <i>Tjp2</i> v iHep	75

X. Reference

- Ali Bahar, M., Bauer, B., Tredget, E. E., Ghahary, A. (2004). Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and types I and III procollagen mRNA. *Wound Repair and Regeneration*, 12(2), 175-182
- Antoniou, A., Raynaud, P., Cordi, S., et al.(2009). Intrahepatic Bile Ducts Develop According to a New Mode of Tubulogenesis Regulated by the Transcription Factor SOX9. *Gastroenterology*, 136(7), 2325-2333.
- Arion, N. W. a Mao J. J. (2006). Mesenchymal Stem Cells and Tissue Engineering. *Stem Cell Tools and Other Experimental Protocols*. Elsevier, 2006, s. 339-361.
- Aviv, V., Meivar-Levy, I., Rachmut, I. H., Rubinek, T., Mor, E., & Ferber, S. (2009). Exendin-4 Promotes Liver Cell Proliferation and Enhances thePDX-1-induced Liver to Pancreas Transdifferentiation Process. *Journal of Biological Chemistry*, 284(48), 33509–33520.
- Bayart, E., & Cohen-Haguenaer, O. (2013). Technological Overview of iPS Induction from Human Adult Somatic Cells. *Current Gene Therapy*, 13(2), 73–92.
- Bedell, V. M., Wang, Y., Campbell, J. M., et al. (2012). In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, 491(7422), 114-118
- Benjamin, R., Berges, B. K., Solis-Leal, A., Igbinedion, O., Strong, C. L., & Schiller, M. R. (2016). TALEN gene editing takes aim on HIV. *Human genetics*, 135(9), 1059-70.
- Berg, T., Rountree, C.B., Lee, L., Estrada, J., Sala, F.G., Choe, A., Veltmaat, J.M., De Langhe, S., Lee, R., Tsukamoto, H., Crooks, G.M., Bellusci, S., Wang, K.S. (2007). Fibroblast growth factor 10 is critical for liver growth during embryogenesis and controls hepatoblast survival via beta-catenin activation. *Hepatology*, 46, 1187–97
- Berninger, B., Costa, M. R., Koch, U., Schroeder, T., Sutor, B., Grothe, B., & Gotz, M. (2007). Functional Properties of Neurons Derived from In Vitro Reprogrammed Postnatal Astroglia. *Journal of Neuroscience*, 27(32), 8654–8664.

- Beumer, K. J., Trautman, J. K., Bozas, A., Liu, J. L., Rutter, J., Gall, J. G., & Carroll, D. (2008). Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50), 19821-6.
- Bibikova, M., Carroll, D., Segal, D. J., Trautman, J. K., Smith, J., Kim, Y. G., & Chandrasegaran, S. (2001). Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Molecular and cellular biology*, 21(1), 289-97.
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G., & Carroll, D. (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 161(3), 1169-75.
- Blanpain, C., Horsley, V., Fuchs E. (2007). Epithelial Stem Cells: Turning over New Leaves. *Cell*, 128(3), 445-458.
- Bonawitz, N. D., Ainley, W. M., Itaya, A., et al. (2018). Zinc finger nuclease-mediated targeting of multiple transgenes to an endogenous soybean genomic locus via non-homologous end joining. *Plant Biotechnology Journal*.
- Boularaoui, S. M., Abdel-Raouf, K. M. A., Alwahab, N. S. A., Kondash, M. E., Truskey, G. A., Teo, J. Ch. M., Christoforou, N. (2018). Efficient transdifferentiation of human dermal fibroblasts into skeletal muscle. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(2), e918-e936
- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G. G., Lengner, C. J., Wernig, M., Suh, H., & Jaenisch, R. (2008). Sequential Expression of Pluripotency Markers during Direct Reprogramming of Mouse Somatic Cells. *Cell Stem Cell*, 2(2), 151–159.
- Butt, H., Eid, A., Ali, Z., Atia, M., Mokhtar, M. M., Hassan, N., Lee, C. M., Bao, G., ... Mahfouz, M. M. (2017). Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing Using a Chimeric Single-Guide RNA Molecule. *Frontiers in plant science*, 8, 1441.

- Caiazzo, M., Dell'Anno, M. T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., ... Broccoli, V. (2011). Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*, 476(7359), 224–227.
- Candy, D. J. (1974). Cell biology — a molecular approach. *Biochemical Education*, 2(3), 59.
- Carlton, V. E. H., Harris, B. Z., Puffenberger, E. G., Batta, A. K., Knisely, A. S., Robinson, D. L., ... Bull, L. N. (2003). Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nature Genetics*, 34(1), 91–96.
- Cieślak-Pobuda, A., Knoflach, V., Ringh, M. V., Stark, J., Likus, W., Siemianowicz, K., ... Łos, M. J. (2017). Transdifferentiation and reprogramming: Overview of the processes, their similarities and differences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864(7), 1359–1369.
- Clayton, R. J., et al. (1969). Byler Disease. *American Journal of Diseases of Children*, 117(1)
- Cobaleda, C., Jochum W., Busslinger M. (2007). Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature*, 449(7161), 473-477
- Cohen, J. (2019). CRISPR offshoot still makes mistakes editing DNA, raising concerns about its medical use. *Science*. doi: 10.1126/science.aax1843. ISSN 0036-8075.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 819-23.
- Crawford, J. M., Bioulac-Sage, P., & Hytioglou, P. (2018). Structure, Function, and Responses to Injury. *Macswen's Pathology of the Liver*, 1–87
- CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 25(1), 12-23.
- Croft, C. B., & Tarin, D. (1970). Ultrastructural studies of wound healing in mouse skin. I. Epithelial behaviour. *Journal of anatomy*, 106(Pt 1), 63-77.

- Cyranoski, David (27 November 2018). How the genome-edited babies revelation will affect research. *Nature*. Archived from the original on 27 November 2018.
- Davis, R. L., Weintraub, H., & Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 51(6), 987–1000.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., ... Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602-7.
- Denu, R. A., Nemcek, S., Bloom, D. D., Goodrich, A. D., Kim, J., Mosher, D. F., a Hematti, P. (2016). Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable. *Acta Haematologica*, 136(2), 85-97
- Dessimoz, J., Opoka, R., Kordich, J.J., Grapin-Botton, A., Wells, J.M. (2006). FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo. *Mech Dev*, 123, 42–55
- Dever, D. P., Bak, R. O., Reinisch, A., Camarena, J., Washington, G., Nicolas, C. E., Pavel-Dinu, M., Saxena, N., Wilkens, A. B., Mantri, S., Uchida, N., Hendel, A., Narla, A., Majeti, R., Weinberg, K. I., ... Porteus, M. H. (2016). CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature*, 539(7629), 384-389.
- Dheda, K., Huggett, J. F., Bustin, S. A., Johnson, M. A., Rook, G., a Zumla, A. (2004), Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques*, 37(1), 112-119
- Doffou, M., Adams, G., Bowen, W. C., Paranjpe, S., Parihar, H. S., Nguyen, H., ... Bhave, V. S. (2018). Oct4 Is Crucial for Transdifferentiation of Hepatocytes to Biliary Epithelial Cells in an In Vitro Organoid Culture Model. *Gene expression*, 18(1), 51–62.

- Dreier, B., Fuller, P. F., Segal, D.J., Lund, C. V., Blancafort, P., Huber, A., Koksche, B., Barbas, C. F. (2005). Development of Zinc Finger Domains for Recognition of the 5'-CNN-3' Family DNA Sequences and Their Use in the Construction of Artificial Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry*. 280(42), 35588-35597
- Du, C., Feng, Y., Qiu, D., Xu, Y., Pang, M., Cai, N., ... Zhang, Q. (2018). Highly efficient and expedited hepatic differentiation from human pluripotent stem cells by pure small-molecule cocktails. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1).
- Efe, J. A., Hilcove, S., Kim, J., Zhou, H., Ouyang, K., Wang, G., ... Ding, S. (2011). Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nature Cell Biology*, 13(3), 215–222.
- Enuameh, M. S., Asriyan, Y., Richards, A., Christensen, R. G., Hall, V. L., et al. (2013). Global analysis of *Drosophila* Cys₂-His₂ zinc finger proteins reveals a multitude of novel recognition motifs and binding determinants. *Genome research*, 23(6), 928-40.
- Evans, M. J. & Kaufman M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154-156.
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156.
- Eyquem, J., Mansilla-Soto, J., Giavridis, T., van der Stegen, S. J., Hamieh, M., Cunanan, K. M., Odak, A., Gönen, M., ... Sadelain, M. (2017). Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*, 543(7643), 113-117.
- Feng, H., Zhu, M., Zhang, R., et al. (2019). GATA5 inhibits hepatocellular carcinoma cells malignant behaviours by blocking expression of reprogramming genes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*.
- Fox, E. S., Thomas, P., Broitman, S. A., (1987). Comparative studies of endotoxin uptake by isolated rat Kupffer and peritoneal cells. *Infect Immun*; 55: 2962–6.
- Gage, F. H. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. *Science*. 287(5457), 1433-1438

- Gagliani, N., Amezcu Vesely, M. C., Iseppon, A., Brockmann, L., Xu, H., Palm, N. W., de Zoete, M. R., Licona-Limón, P., Paiva, R. S., Ching, T., Weaver, C., Zi, X., Pan, X., Fan, R., Garmire, L. X., Cotton, M. J., Drier, Y., Bernstein, B., Geginat, J., Stockinger, B., Esplugues, E., Huber, S., ... Flavell, R. A. (2015). Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature*, 523(7559), 221-5.
- Gaj, T., Guo, J., Kato, Y., Sirk, S. J., & Barbas, C. F. (2012). Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins. *Nature methods*, 9(8), 805-7.
- Gao, Y., Zhao, M., Wu, X.-H., Li, D., Borthakur, D., Ye, J.-H., Zheng, X.-Q., Lu, J.-L. (2019). Analysis of Differentially Expressed Genes in Tissues of *Camellia sinensis* during Dedifferentiation and Root Redifferentiation. *Scientific Reports*, 9(1)
- Ge, T., Zhang, X., Xiao, Y., Wang, Y., Zhang, T. (2019). Novel compound heterozygote mutations of TJP2 in a Chinese child with progressive cholestatic liver disease. *BMC Medical Genetics*, 20(1).
- Gene Expression *. (2017). *Cell Biology*, 165–187.
- Geng, J. J., Tang, J., Yang, X. M., Chen, R., Zhang, Y., Zhang, K., Miao, J. L., Chen, Z. N., ... Zhu, P. (2017). Targeting CD147 for T to NK Lineage Reprogramming and Tumor Therapy. *EBioMedicine*, 20, 98-108.
- Genovese, P., Schirotti, G., Escobar, G., Tomaso, T. D., Firrito, C., Calabria, A., Moi, D., Mazzieri, R., Bonini, C., Holmes, M. C., Gregory, P. D., van der Burg, M., Gentner, B., Montini, E., Lombardo, A., ... Naldini, L. (2014). Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature*, 510(7504), 235-240.
- Goda N, Tenno T, Takasu H, Hiroaki H, Shirakawa M. (2004). The PRESAT-vector: asymmetric T-vector for high-throughput screening of soluble protein domains for structural proteomics. *Protein Sci.* Mar;13(3):652-8.

- Gomez-Ospina, N., Potter, C. J., Xiao, R., Manickam, K., Kim, M. S., Kim, K. H., Shneider, B. L., Picarsic, J. L., et al. (2016). Mutations in the nuclear bile acid receptor FXR cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nature communications*, 7, 10713.
- Gonzalez-Mariscal, L., Garay, E., Quiros, M., & Tapia, R. (2011). TJP2 (tight junction protein 2 (zona occludens 2)). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, (4).
- González-Mariscal, L., Ponce, A., Alarcón, L., & Jaramillo, B. E. (2006). The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals. *Experimental Cell Research*, 312(17), 3323–3335.
- Grath, A., & Dai, G. (2019). Direct cell reprogramming for tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of Biological Engineering*, 13(1)
- Gumbiner, B., Lowenkopf, T., & Apatira, D. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(8), 3460-4.
- Gurdon, J. B. (1962), The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Development*, 10, 622-640
- Gutierrez-Aranda, I., Ramos-Mejia, V., Bueno, C., Munoz-Lopez, M., Real, P. J., Mácia, A., Menendez, P., et al. (2010). Human Induced Pluripotent Stem Cells Develop Teratoma More Efficiently and Faster Than Human Embryonic Stem Cells Regardless the Site of Injection. *STEM CELLS*, 28(9), 1568–1570.
- Hale, C. R., Zhao, P., Olson, S., Duff, M. O., Graveley, B. R., Wells, L., Terns, R. M., ... Terns, M. P. (2009). RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*, 139(5), 945-56.
- Händel, E. M., Alwin, S., & Cathomen, T. (2008). Expanding or restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: the inter-domain linker as a major determinant of target site selectivity. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene*

Therapy, 17(1), 104-11.

- Haruna, Y., Saito, K., Spaulding, S., Nalesnik, M. A., Gerber, M. A. (1996). Identification of bipotential progenitor cells in human liver development. *Hepatology*, 23(3), 476-481
- Hay, D. C., Zhao, D., Fletcher, J., Hewitt, Z. A., McLean, D., Urruticoechea-Uriguen, A., ... Cui, W. (2008). Efficient Differentiation of Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells Exhibiting Markers Recapitulating Liver Development In Vivo. *Stem Cells*, 26(4), 894–902.
- Hendel, A., Bak, R. O., Clark, J. T., Kennedy, A. B., Ryan, D. E., Roy, S., Steinfeld, I., Lunstad, B. D., Kaiser, R. J., Wilkens, A. B., Bacchetta, R., Tsalenko, A., Dellinger, D., Bruhn, L., ... Porteus, M. H. (2015). Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nature biotechnology*, 33(9), 985-989.
- Hilton, I. B., D'Ippolito, A. M., Vockley, C. M., Thakore, P. I., Crawford, G. E., Reddy, T. E., & Gersbach, C. A. (2015). Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature biotechnology*, 33(5), 510-7.
- Honecker, F., Stoop, H., Mayer, F., Bokemeyer, C., Castrillon, D. H., Lau, Y.-F. C., Oosterhuis, J. W., et al. (2006). Germ cell lineage differentiation in non-seminomatous germ cell tumours. *The Journal of Pathology*, 208(3), 395–400.
- Huang, Ch-S., Lin, H-Ch., Lu, K-H., et al. (2018). Generation of high quality of hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells with Parp1 but lacking c-Myc. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(10), 871-877
- Huang, P., He, Z., Ji, S., et al. (2011) Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature*, 475(7356), 386-389
- Huang, P., Sun, L., Zhang, L., Hui, L. (2019). Conversion of Fibroblasts to Hepatocytes In Vitro. Tanimuzu, Naoki, ed. *Hepatic Stem Cells*, New York, NY: Springer New York, 2019-12-09, s. 93-101

- Huang, P., Zhang, L., Gao, Y., et al. (2014). Direct Reprogramming of Human Fibroblasts to Functional and Expandable Hepatocytes. *Cell Stem Cell*, 14(3), 370-384
- Chaudhari, P., Tian, L., Deshmukh, A., a Jang, Y-Y. (2016). Expression kinetics of hepatic progenitor markers in cellular models of human liver development recapitulating hepatocyte and biliary cell fate commitment. *Experimental Biology and Medicine*, 241(15), 1653-1662.
- Chen, Y., Xiong, M., Dong, Y., Haberman, A., Cao, J., Liu, H., Zhou, W., ... Zhang, S. C. (2016). Chemical Control of Grafted Human PSC-Derived Neurons in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Cell stem cell*, 18(6), 817-26.
- Cheng, Z., He, Z., Cai, Y., et al., (2019). Conversion of hepatoma cells to hepatocyte-like cells by defined hepatocyte nuclear factors. *Cell Research*, 29(2), 124-135
- Chlenski, A., Ketels, K. V., Engeriser, J. L., Talamonti, M. S., Tsao, M.-S., Koutnikova, H., ... Scarpelli, D. G. (1999). zo-2 gene alternative promoters in normal and neoplastic human pancreatic duct cells. *International Journal of Cancer*, 83(3), 349–358.
- Chu, C., Yang, Z., Yang, J., Yan, L., Si, C., Kang, Y., Chen, Z., Chen, Y., Ji, W., ... Niu, Y. (2019). Homologous recombination-mediated targeted integration in monkey embryos using TALE nucleases. *BMC biotechnology*, 19(1), 7.
- Isagawa, T., Nagae, G, Shiraki, N.,Hiraki, et al. (2011). DNA Methylation Profiling of Embryonic Stem Cell Differentiation into the Three Germ Layers. *PLoS ONE*, 6(10).
- Itoh, M., Morita, K., Tsukita, S. (1999). Characterization of ZO-2 as a MAGUK Family Member Associated with Tight as well as Adherens Junctions with a Binding Affinity to Occludin and α Catenin. *Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5981-5986
- Itoh, M., Nakadate, K., Matsusaka, T., Hunziker, W., & Sugimoto, H. (2018). Effects of the differential expression of ZO-1 and ZO-2 on podocyte structure and function. *Genes to Cells*, 23(7), 546–556.

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816-21.
- Jones, J. C., Brindley, C. D., Elder, N. H., et al. (2019). Cellular Plasticity of Defa4-Expressing Paneth Cells in Response to Notch Activation and Intestinal Injury. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 7(3), 533-554
- Jopling, Ch., Sleep, E., Raya, M., Martí, M., Raya, A., Belmonte, J. C. I. (2010). Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*, 464(7288), 606-609
- Kaiser, J (2017). A human has been injected with gene-editing tools to cure his disabling disease. Here's what you need to know. *Science*. doi: 10.1126/science.aar5098. ISSN 0036-8075.
- Kalkan, T., Olova, N., Roode, M, et al. (2017). Tracking the embryonic stem cell transition from ground state pluripotency. *Development*, 144(7), 1221-1234.
- Kamath, A., Ternes, S., McGowan, S., & Moy, A. B. (2018). Virus-free and oncogene-free induced pluripotent stem cell reprogramming in cord blood and peripheral blood in patients with lung disease. *Regenerative Medicine*, 13(8), 889–915
- Kamath, B., & Mack, C. L. (2018). From hepatocyte to cholangiocyte: the remarkable potential of transdifferentiation to treat cholestatic diseases. *Hepatology*.
- Kamiya, A., Kinoshita, T., a Miyjima, A. (2001). Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Letters*, 492(1-2), 90-94.
- Kantawong, F., Saksiriwisitkul, Ch., Riyapa, Ch., Limpakdee, S., Wanachantararak, P., a Kuboki, T. (2018). Reprogramming of mouse fibroblasts into neural lineage cells using biomaterials. *BioImpacts* 8(2), 129-138.

- Kim, J., Hoffman, J. P., Alpaugh, R. K., et al. (2013). An iPSC Line from Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Undergoes Early to Invasive Stages of Pancreatic Cancer Progression. *Cell Reports*, 3(6), 2088-2099.
- Kim, J., Kim, K.-P., Lim, K. T., Lee, S. C., Yoon, J., Song, G., ... Han, D. W. (2015). Generation of integration-free induced hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts. *Scientific Reports*, 5(1)
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M. J., Ehrlich, L. I., et al. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells, *Nature*, 467, 285-290
- Kim, Y. G., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(3), 1156-60.
- Kim, Y., Kweon, J., Kim, A., et al. (2013). A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nature Biotechnology*, 31(3), 251-258
- Kim, Y.-J., Jung, Y.-D., Kim, T.-O., & Kim, H.-S. (2013). Alu-related transcript of TJP2 gene as a marker for colorectal cancer. *Gene*, 524(2), 268–274.
- Kogiso, T., Nagahara, H., Otsuka, M., Shiratori, K., Dowdy, S. F. (2013). Transdifferentiation of human fibroblasts into hepatocyte-like cells by defined transcriptional factors. *Hepatology International*, 7(3), 937-944
- Kogut, I., McCarthy, S. M., Pavlova, M., Astling, D. P., Chen, X., Jakimenko, A., ... Bilousova, G. (2018). High-efficiency RNA-based reprogramming of human primary fibroblasts. *Nature Communications*, 9(1).
- Komatsu, N., Okamoto, K., Sawa, S., Nakashima, T., Oh-hora, M., Kodama, T., ... Takayanagi, H. (2013). Pathogenic conversion of *Foxp3*⁺ T cells into *TH17* cells in autoimmune arthritis. *Nature Medicine*, 20(1), 62–68.
- Kupffer, C. (1876). Ueber Sternzellen der Leber. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 12(1), 353-358.

- Lamouille, S., Subramanyam, D., Belloch, R., & Derynck, R. (2013). Regulation of epithelial–mesenchymal and mesenchymal–epithelial transitions by microRNAs. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(2), 200–207.
- Lampi, Y., Van Looveren, D., Vranckx, L. S., Thiry, I., Bornschein, S., Debyser, Z., & Gijssbers, R. (2019). Targeted editing of the PSIP1 gene encoding LEDGF/p75 protects cells against HIV infection. *Scientific reports*, 9(1), 2389.
- Lee, D. W., Kochenderfer, J. N., Stetler-Stevenson, M., et al. (2015). T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet*, 385(9967), 517-528
- Li, P., Burke, S., Wang, J., Chen, X., Ortiz, M., Lee, S.-C., ... Liu, P. (2010). Reprogramming of T Cells to Natural Killer-Like Cells upon Bcl11b Deletion. *Science*, 329(5987), 85–89.
- Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., ... Pei, D. (2010). A Mesenchymal-to-Epithelial Transition Initiates and Is Required for the Nuclear Reprogramming of Mouse Fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 7(1), 51–63.
- Li, Z., White, P., Tuteja, G., Rubins, N., Sackett, S., a Kaestner, K.H. (2009). Foxa1 and Foxa2 regulate bile duct development in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1537-1545
- Li, H.Y., Chien, Y., Chen, Y.J., Chen, S.F., Chang, Y.L., Chiang, C.H., et al. (2011). Reprogramming induced pluripotent stem cells in the absence of c-Myc for differentiation into hepatocyte-like cells, *Biomaterials*, 32, pp. 5994-6005.
- Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., Sun, Y., Bai, Y., Songyang, Z., Ma, W., Zhou, C., ... Huang, J. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein & cell*, 6(5), 363-372.
- Lim, K. T., Kim, J., Hwang, S. I., Zhang, L., Han, H., Bae, D., ... Han, D. W. (2018). Direct Conversion of Mouse Fibroblasts into Cholangiocyte Progenitor Cells. *Stem Cell Reports*, 10(5), 1522–1536.

- Lim, K. T., Lee, S. C., Gao, Y., Kim, K.-P., Song, G., An, S. Y., ... Han, D. W. (2016). Small Molecules Facilitate Single Factor-Mediated Hepatic Reprogramming. *Cell Reports*, 15(4), 814–829.
- Liu J, Gaj T, Patterson JT, Sirk SJ, Barbas CF 3rd. Cell-penetrating peptide-mediated delivery of TALEN proteins via bioconjugation for genome engineering. *PLoS One*. 2014 Jan 20;9(1):e85755.
- Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J., & López, M. M. (2000). Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and environmental microbiology*, 66(5), 2071–2078.
- Luo, W., Xu, Q., Wang, Q., Wu, H., Hua, J. (2017). Effect of modulation of PPAR-gamma activity on Kupffer cells M1/M2 polarization in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep.*, 7:44612.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., ... Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 823-6.
- Marchione, Marilyn (7 February 2019). Tests suggest scientists achieved 1st 'in body' gene editing. AP News. Retrieved 7 February 2019.
- Marro, S., Pang, Z. P., Yang, N., Tsai, M.-C., Qu, K., Chang, H. Y., ... Wernig, M. (2011). Direct Lineage Conversion of Terminally Differentiated Hepatocytes to Functional Neurons. *Cell Stem Cell*, 9(4), 374–382.
- Mateu, R., Živicová, V., Krejčí, E. D., et al. (2016). Functional differences between neonatal and adult fibroblasts and keratinocytes: Donor age affects epithelial-mesenchymal crosstalk in vitro. *International Journal of Molecular Medicine*, 38(4), 1063-1074
- Matsumoto, K., Miki, R., Nakayama, M., Tatsumi, N., Yokouchi, Y. (2008). Wnt9a secreted from the walls of hepatic sinusoids is essential for morphogenesis, proliferation, and glycogen accumulation of chick hepatic epithelium. *Dev Biol*, 319, 234–47

- McVey, M., & Lee, S. E. (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends in Genetics*, 24(11), 529–538.
- Meivar-Levy, I., Zoabi, F., Nardini, G., et al. (2019). The role of the vasculature niche on insulin-producing cells generated by transdifferentiation of adult human liver cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1)
- Meng, F., Wang, K., Aoyama, T., et al. (2012). Interleukin-17 Signaling in Inflammatory, Kupffer Cells, and Hepatic Stellate Cells Exacerbates Liver Fibrosis in Mice. *Gastroenterology*, 143(3), 765-776.e3
- Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., et al. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*, 29(2), 143-148
- Miyajima, A., Tanaka, M., & Itoh, T. (2014). Stem/Progenitor Cells in Liver Development, Homeostasis, Regeneration, and Reprogramming. *Cell Stem Cell*, 14(5), 561–574.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villasenor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182
- Moonmuang, S., Saoin, S., Chupradit, K., Sakkhachornphop, S., Israsena, N., Rungsiwiwut, R., & Tayapiwatana, C. (2018). Modulated expression of the HIV-1 2LTR zinc finger efficiently interferes with the HIV integration process. *Bioscience Reports*, BSR20181109.
- Moscou, M. J. & Bogdanove, A. (2009). A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors. *Science*, 326(5959), 1501-1501
- Nakamori, D., Akamine, H., Takayama, K., Sakurai, F. & Mizuguchi, H. (2017). Direct conversion of human fibroblasts into hepatocyte-like cells by ATF5, PROX1, FOXA2, FOXA3, and HNF4A transduction. *Scientific Reports*, 7(1)

- Nelson, C. E., Hakim, C. H., Ousterout, D. G., Thakore, P. I., Moreb, E. A., Castellanos Rivera, R. M., Madhavan, S., Pan, X., Ran, F. A., Yan, W. X., Asokan, A., Zhang, F., Duan, D., ... Gersbach, C. A. (2015). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science (New York, N.Y.)*, 351(6271), 403-7.
- Nichols, J., & Smith, A. (2009). Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell*, 4(6), 487-492.
- Nishimura, K., Kato, T., Chen, C., Oinam, L., Shiomitsu, E., Ayakawa, D., Hisatake, K., *et al.* (2014). Manipulation of KLF4 Expression Generates iPSCs Paused at Successive Stages of Reprogramming. *Stem Cell Reports*, 3(5), 915–929.
- Nishizawa, Masatoshi, Kazuhisa Chonabayashi, Masaki Nomura, *et al.* (2016). Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity. *Cell Stem Cell*, 19(3), 341-354.
- Noguchi, H., Kaneto, H., Weir, G. C., & Bonner-Weir, S. (2003). PDX-1 Protein Containing Its Own Antennapedia-Like Protein Transduction Domain Can Transduce Pancreatic Duct and Islet Cells. *Diabetes*, 52(7), 1732–1737.
- Odenwald, M. A., & Turner, J. R. (2016). The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(1), 9–21.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyunjong, H., Yamanaka, S. (2008). Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science*, 322(5903), 949-953.
- Park, I.-K., *et al.* (2002). Differential gene expression profiling of adult murine hematopoietic stem cells. *Blood*, 99(2), 488-498.
- Paschon, D. E., Lussier, S., Wangzor, T., *et al.* (2019). Diversifying the structure of zinc finger nucleases for high-precision genome editing. *Nature Communications*, 10(1)
- Paulusma, C., C., Groen, A., Kunne, C., *et al.* (2006). Atp8b1 deficiency in mice reduces resistance of the canalicular membrane to hydrophobic bile salts and impairs bile salt transport. *Hepatology*, 44(1), 195-204

- Perez, E. E., Wang, J., Miller, J. C., Jouvenot, Y., Kim, K. A., Liu, O., Wang, N., Lee, G., Bartsevich, V. V., Lee, Y. L., Guschin, D. Y., Rupniewski, I., Waite, A. J., Carpenito, C., Carroll, R. G., Orange, J. S., Urnov, F. D., Rebar, E. J., Ando, D., Gregory, P. D., Riley, J. L., Holmes, M. C., ... June, C. H. (2008). Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology*, 26(7), 808-16.
- Pérez-Quintero, A. L., Rodríguez-R, L. M., Dereeper, A., López, C., Koebnik, R., Szurek, B., & Cunnac, S. (2013). An improved method for TAL effectors DNA-binding sites prediction reveals functional convergence in TAL repertoires of *Xanthomonas oryzae* strains. *PLoS one*, 8(7), e68464.
- Polo, J. M., Anderssen, E., Walsh, R. M., Schwarz, B. A., Nefzger, C. M., Lim, S. M., ... Hochedlinger, K. (2012). *A Molecular Roadmap of Reprogramming Somatic Cells into iPS Cells*. *Cell*, 151(7), 1617–1632.
- Raya-Sandino, A., Castillo-Kauil, A., Domínguez-Calderón, A., Alarcón, L., Flores-Benitez, D., Cuellar-Perez, F., ... González-Mariscal, L. (2017). *Zonula occludens-2 regulates Rho proteins activity and the development of epithelial cytoarchitecture and barrier function*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1864(10), 1714–1733.
- Reis, A. (2014). CRISPR/Cas9 & Targeted Genome Editing: New Era in Molecular Biology. New England BioLabs, Inc, 2014(1), 3-6.
- Rivera, Ch. A., Adegboyega, P., Van Rooijen, N., Tagalicud, A., Allman, M., Wallace, M. (2007). Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*, 47(4), 571-579.
- Rouet, P., Smih, F., & Jasin, M. (1994). Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Molecular and cellular biology*, 14(12), 8096-106.
- Sambrotta, M., Strautnieks, S., Papouli, E., Rushton, P., Clark, B. E., ... Thompson, R. J. (2014). *Mutations in TJP2 cause progressive cholestatic liver disease*. *Nature Genetics*, 46(4), 326–328.

- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, 39(21), 9275-82.
- Sekiya, S., & Suzuki, A. (2011). Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature*, 475(7356), 390–393.
- Scheimann, A. O., Strautnieks, S. S., Knisely, A. S., Byrne, J. A., Thompson, R. J., Finegold, M. J. (2007). Mutations in Bile Salt Export Pump (ABCB11) in Two Children with Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis and Cholangiocarcinoma. *The Journal of Pediatrics*, 150(5), 556-559
- Schiroli, G., Ferrari, S., Conway, A., et al. (2017) Preclinical modeling highlights the therapeutic potential of hematopoietic stem cell gene editing for correction of SCID-X1. *Science Translational Medicine*, 9(411)
- Siegfried, Z., Eden, S., Mendelsohn, M., Feng, X., Tsuberi B.-Z., a Cedar, H. (1999). DNA methylation represses transcription in vivo. *Nature Genetics*, 22(2), 203-206.
- Singh, K., Evens, H., Nair, N., Rincón, M. Y., Sarcar, S., Samara-Kuko, E., ... VandenDriessche, T. (2018). *Efficient In Vivo Liver-Directed Gene Editing Using CRISPR/Cas9*. *Molecular Therapy*, 26(5), 1241–1254.
- Si-Tayeb, K., Noto, F. K., Sepac, A., Sedlic, F., Bosnjak, Z. J., Lough, J. W., Duncan, S. A. (2010). Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *BMC Developmental Biology*, 10(1).
- Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T., & Hochedlinger, K. (2008). Defining Molecular Cornerstones during Fibroblast to iPS Cell Reprogramming in Mouse. *Cell Stem Cell*, 2(3), 230–240.

- Storm, M. P., Kumpfmüller, B., Thompson, B., Kolde, R., Vilo, J., Hummel, O., Welham, M. J., *et al.* (2009). Characterization of the Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent Transcriptome in Murine Embryonic Stem Cells: Identification of Novel Regulators of Pluripotency. *Stem Cells*, 27(4), 764–775.
- Swiech, L., Heidenreich, M., Banerjee, A., Habib, N., Li, Y., Trombetta, J., Sur, M., ... Zhang, F. (2014). In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nature biotechnology*, 33(1), 102-6.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872.
- Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Sugawara M, Kikuchi K, Higuchi M, et al. (2012). Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1alpha transduction. *J Hepatol*, 57, 628e36.
- Tam, P.P.L., & Zhou, S.X. (1996). The Allocation of Epiblast Cells to Ectodermal and Germ-Line Lineages Is Influenced by the Position of the Cells in the Gastrulating Mouse Embryo. *Developmental Biology*, 178(1), 124-132.
- Tapia, R., Huerta, M., Islas, S., Avila-Flores, A., Lopez-Bayghen, E., Weiske, J., Huber, O., ... González-Mariscal, L. (2009). Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle. *Molecular biology of the cell*, 20(3), 1102-17.
- Tarlow, B. D., Pelz, C., Naugler, W. E., Wakefield, L., Wilson, E. M., Finegold, M. J., & Grompe, M. (2014). Bipotential Adult Liver Progenitors Are Derived from Chronically Injured Mature Hepatocytes. *Cell Stem Cell*, 15(5), 605–618.

- Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, Spratt SK, Surosky RT, Giedlin MA, Nichol G, Holmes MC, Gregory PD, Ando DG, Kalos M, Collman RG, Binder-Scholl G, Plesa G, Hwang WT, Levine BL, June CH. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*. 2014 Mar 6;370(10):901-10.
- Teshigawara, R., Hirano, K., Nagata, S., Ainscough, J., & Tada, T. (2015). OCT4 activity during conversion of human intermediately reprogrammed stem cells to iPSCs through mesenchymal-epithelial transition. *Development*, 143(1), 15–23
- Theunissen, T. W., van Oosten, A. L., Castelo-Branco, G., Hall, J., Smith, A., & Silva, J. C. R. (2011). Nanog Overcomes Reprogramming Barriers and Induces Pluripotency in Minimal Conditions. *Current Biology*, 21(1), 65–71.
- Thomson, J. A. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147.
- Thomson, J.A., et al. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts . *Science*, 282(5391), 1145 – 1147.
- TJP2 - Tight junction protein ZO-2 - Homo sapiens (Human) - TJP2 gene & protein. UniProt (online). Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9UDY2>
- Traweger, A., Fuchs, R., Krizbai, I. A., Weiger, T. M., Bauer, H.-C., & Bauer, H. (2003). The Tight Junction Protein ZO-2 Localizes to the Nucleus and Interacts with the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein Scaffold Attachment Factor-B. *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2692–2700.
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., ... Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 Independently Determine Where Claudins Are Polymerized in Tight-Junction Strand Formation. *Cell*, 126(4), 741–754.
- Urnov, F. D., Miller, J.C., Lee, Y-L., et al. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 435(7042), 646-651.

- Urnov, F., D., Miller, J. C., Lee, Y-L., et al. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, **435**(7042), 646-651.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C., & Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, **463**(7284), 1035–1041.
- Vij, M., Shanmugam, N. P., Reddy, M. S., Sankaranarayanan, S., & Relu, M. (2017). Paediatric hepatocellular carcinoma in tight junction protein 2 (TJP2) deficiency. *Virchows Archiv*, **471**(5), 679–683.
- Vrbsky, J., Tereh, T., Kyrylenko, S., Dvorak, P., & Krejci, L. (2015). MEK and TGF-beta Inhibition Promotes Reprogramming without the Use of Transcription Factor. *PLoS one*, **10**(6), e0127739.
- Wade, N., (2012). Cloning and Stem Cell Work Earns Nobel. *New York Times* | Order Reprints | Today's Paper 8 Oct. 2012, p.A9.
- Walsh, T., Pierce, S. B., Lenz, D. R., Brownstein, Z., Dagan-Rosenfeld, O., Shahin, H., ... Avraham, K. B. (2010). Genomic duplication and overexpression of TJP2/ZO-2 leads to altered expression of apoptosis genes in progressive nonsyndromic hearing loss DFNA51. *American journal of human genetics*, **87**(1), 101–109.
- Walsh, T., Pierce, S. B., Lenz, D. R., Brownstein, Z., Dagan-Rosenfeld, O., Shahin, H., Roeb, W., McCarthy, S., Nord, A. S., Gordon, C. R., Ben-Neriah, Z., Sebat, J., Kanaan, M., Lee, M. K., Frydman, M., King, M. C., ... Avraham, K. B. (2010). Genomic duplication and overexpression of TJP2/ZO-2 leads to altered expression of apoptosis genes in progressive nonsyndromic hearing loss DFNA51. *American journal of human genetics*, **87**(1), 101-9.
- Wang, J., Zhao, P., Wan, Z., Jin, X., Cheng, Y., Yan, T., ... Xin, S. (2016). Differentiation of human foreskin fibroblast-derived induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *Cell Biochemistry and Function*, **34**(7), 475–482.

- Weaver, J. R., Susiarjo, M., & Bartolomei M. S. (2009). Imprinting and epigenetic changes in the early embryo. *Mammalian Genome*, 20(9-10), 532-543
- Wendum, D., Barbu, V., Rosmorduc, O., Arrivé, L., Fléjou, J-F., Poupon, R. (2012). Aspects of liver pathology in adult patients with MDR3/ABCB4 gene mutations. *Virchows Archiv*, 460(3), 291-298
- Wetzel, F., Mittag, S., Cano-Cortina, M., Wagner, T., Krämer, O. H., Niedenthal, R., ... Huber, O. (2016). SUMOylation regulates the intracellular fate of ZO-2. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(2), 373–392.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), 810–813.
- Xie, H., Ye, M., Feng, R., & Graf, T. (2004). Stepwise Reprogramming of B Cells into Macrophages. *Cell*, 117(5), 663–676.
- Xiong, K., Zhou, Y., Blichfeld, K. A., Hyttel, P., Bolund, L., Freude, K. K. & Luo, Y. (2017). RNA-Guided Activation of Pluripotency Genes in Human Fibroblasts. *Cellular Reprogramming*, 19(3), 189-198.
- Xu, J., Anuar, F., Ali, S. M., Ng, M. Y., Phua, D. C., & Hunziker, W. (2009). Zona occludens-2 is critical for blood-testis barrier integrity and male fertility. *Molecular biology of the cell*, 20(20), 4268-77.
- Xu, L., Zhang, K., Wang, J., Loh, Y-H. (2014). Exploring the Mechanisms of Differentiation, Dedifferentiation, Reprogramming and Transdifferentiation. *PLoS ONE*, 9(8)
- Yang, S.-H., Kalkan, T., Morissroe, C., Marks, H., Stunnenberg, H., Smith, A., & Sharrocks, A. D. (2014). Otx2 and Oct4 Drive Early Enhancer Activation during Embryonic Stem Cell Transition from Naive Pluripotency. *Cell Reports*, 7(6), 1968–1981.
- Yin, H., Xue, W., Chen, S., Bogorad, R. L., Benedetti, E., Grompe, M., Koteliansky, V., Sharp, P. A., Jacks, T., ... Anderson, D. G. (2014). Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nature biotechnology*, 32(6), 551-3.

- You, Q., Cheng, L., Kedl, R. M. Ju, C. (2008) Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology*, 48(3), 978-990.
- You, Y., Zhang, J., Gong, J., Chen, Y., Li, Y., Yang, K., Liu, Z. (2015). Mesenchymal stromal cell-dependent reprogramming of Kupffer cells is mediated by TNF- α and PGE2 and is crucial for liver transplant tolerance. *Immunologic Research* 62(3), 292-305.
- Yu, B., He, Z-Y., You, P., et al. (2013). Reprogramming Fibroblasts into Bipotential Hepatic Stem Cells by Defined Factors. *Cell Stem Cell*, 13(3), 328-340.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Thomson, J. A., et al. (2007). *Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. Science*, 318(5858), 1917–1920.
- Zakikhan, K., Pournasr, B., Nassiri-Asl, M., & Baharvand, H. (2016). Enhanced direct conversion of fibroblasts into hepatocyte-like cells by Kdm2b. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 474(1), 97–103.
- Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., & Melton, D. A. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature*, 455(7213), 627–632.
- Zhou, S., Hertel, P. M., Finegold, M. J., Wang, L., Kerkar, N., Wang, J., ... Knisely, A. S. (2015). Hepatocellular carcinoma associated with tight-junction protein 2 deficiency. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 62(6), 1914–1916.
- Zhou, S., Hertel, P. M., Finegold, M. J., Wang, L., Kerkar, N., Wang, J., Wong, L. J., Plon, S. E., Sambrotta, M., Foskett, P., Niu, Z., Thompson, R. J., ... Knisely, A. S. (2015). Hepatocellular carcinoma associated with tight-junction protein 2 deficiency. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 62(6), 1914-6.c
- Zuryn, S., Ahier, A., Portoso, M., White, E. R., Morin, M.-C., Margueron, R., & Jarriault, S. (2014). Sequential histone-modifying activities determine the robustness of transdifferentiation. *Science*, 345(6198), 826–829.