

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Diferenciace pankreatických kmenových buněk na β -buňky produkující inzulín

Mgr. Ivan Leontovyč

Praha 2019

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Biologie a patologie buňky

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Ivan Raška, DrSc.

Školící pracoviště: Institut klinické a experimentální medicíny

Školitel: prof. MUDr. František Saudek, DrSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

Abstrakt:	4
Abstract	5
1. Úvod	6
2. Hypotézy a cíle práce	8
3. Materiál a metodika	9
4. Výsledky	10
5. Diskuse	13
6. Závěry	16
7. Použitá literatura	17
8. Seznam publikací doktoranda	20

Abstrakt:

Diabetes mellitus (DM) je závažné a časté metabolické onemocnění s rostoucí prevalencí. Jeho současná léčba nedokáže zabránit pozdním komplikacím, a proto je nutné hledat nové terapeutické postupy. V experimentech zaměřených na buněčnou léčbu DM v rámci disertační práce „Diferenciace pankreatických kmenových buněk na β -buňky produkující inzulín“ jsme se zabývali hledáním nových zdrojů pro získání tkáně produkující inzulín, které by mohly být použity k transplantační náhradě. Na základě postupného testování řady postupů jsme nakonec vypracovali definitivní protokol pro transdiferenciaci exokrinních buněk pankreatu na buňky produkující inzulín pomocí třech klíčových transkripčních faktorů, a sice Pdx1, Neurogenin3 a MafA, dodávaných ve formě syntetické mRNA. S podporou růstových a epigenetických faktorů jsme ve 4 nezávislých experimentech získali transdiferenciací $14.3 \pm 1.9\%$ inzulín pozitivních buněk. Navíc tyto buňky byly schopné významně reagovat na zvýšení hladiny glukózy (z 2.5 na 20 mmol/l glukózy) sekrecí inzulínu (z 842 ± 72 na $1\,157 \pm 58$ pg inzulín/ μ g DNA/ml; n=5) a depolarizačního činidla KCl (30 mmol/l) z 863 ± 78 na $1\,025 \pm 66$ pg inzulín/ μ g DNA/ml (n=5). Originálním transdiferenciačním postupem jsme tedy prokázali, že exokrinní buňky mohou být jedním z možných zdrojů pro buněčnou terapii diabetu. Zvláštností našeho protokolu je také skutečnost, že nezahrnuje trvalou genetickou modifikaci připravených linií a s ní spojená rizika.

Klíčová slova: diabetes mellitus, inzulín, exokrinní buňky pankreatu, β -buňky, transkripční faktory, syntetická mRNA, transdiferenciace, Pdx1, Neurogenin3, MafA, transplantace

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a severe and frequent disease with increasing prevalence. It is not possible to achieve long term cure without late complications. Recent advances in cell fate modifications open a pathway to alternative cell therapies for DM cure. My doctoral thesis “Differentiation of pancreatic stem cells into insulin producing β -cells” is focused on the development of a new source of insulin secreting cells for transplantation. Combinatorial testing of numerous potential transcription factors and epigenetic modifiers resulted in a final protocol for the reprogramming pancreatic of exocrine cells into insulin secreting cells. The key transcriptional factors TF (Pdx1, Neurogenin3 a MafA) were applied in the form of synthetic mRNA. In four independent experiments we applied transcriptional factors in a specific sequence, thus obtaining 14.3 ± 1.9 % insulin positive cells. When challenged *in vitro* by the glucose levels of 2.5 and 20 mmol/l glucose, respectively, these cells exhibited glucose-sensitivity of insulin secretion (842 ± 72 and $1\ 157 \pm 58$ pg insulin/ μ g DNA/ml, n=5). They also demonstrated a sensitivity of insulin secretion (863 ± 78 and $1\ 025 \pm 66$ pg insulin/ μ g DNA/ml, n=5) to the concentration of depolarization agent KCl applied at 0 and 30 mmol/l, respectively together with 2.5 mmol/l glucose. We demonstrated that our original protocol applied to exocrine cells can generate a potential cell source for therapy of diabetes. A distinct feature of our protocol is the absence of permanent genetic modification of the cells, in the principle, avoids such serious associated risk as cancer development.

Key words: diabetes mellitus, insulin, pancreatic exocrine cells, β -cells, transcription factors, synthetic mRNA, transdifferentiation, Pdx1, Neurogenin3, MafA, transplantation

1. Úvod

Diabetes mellitus prvního typu (T1D) je nemoc vyvolaná autoimunitní destrukcí β -buněk pankreatu produkujících inzulin. Následná ztráta sekrece inzulinu vede zejména k narušení kontroly metabolismu glukózy a k hyperglykémii. To se projevuje nejen aktuálním zhoršením zdravotního stavu, ale z dlouhodobého hlediska vede ke vzniku tzv. pozdních komplikací diabetu, které zhoršují kvalitu života a zkracují jeho délku. Základním způsobem léčby je celoživotní farmakologická substituce inzulinu. Udržovat dlouhodobě fyziologickou hladinu glukózy je dnes také možné pomocí transplantace inzulin produkující tkáně, a to formou orgánové transplantace pankreatu nebo transplantací izolovaných Langerhansových ostrůvků. Obě metody jsou ale limitovány nedostatkem vhodných orgánů pro transplantaci a dále nutností trvale podávat imunosupresivní léčbu. Výsledky orgánových transplantací pankreatu jsou nyní na našem pracovišti v Institutu klinické a experimentální medicíny velmi dobré. Bez potřeby exogenního inzulinu zůstává po 10 letech více než 75% příjemců. Transplantace Langerhansových ostrůvků sice zatím nedosahuje takto dobrých výsledků, ale je ve srovnání s orgánovou transplantací podstatně méně invazivní. Obě metody se zatím provádějí jen ve vysoce selektovaných případech diabetu, a to zejména v kombinaci s transplantací ledviny nebo u pacientů s tzv. syndromem porušeného vnímání hypoglykémie. Na našem pracovišti probíhá dlouhodobý výzkum zaměřený na získání alternativních zdrojů β -buněk, které by umožnily rozšířit možnosti transplantační léčby pro mnohem širší okruh příjemců a učinily je bezpečnější.

Jednou z možností je transdiferenciace exokrinních buněk pankreatu směrem k β -buněkám produkujícím inzulin. Transdiferenciace je přeměna dospělých buněk na jiný typ buněk (Zaret et al. 2011). Bylo prokázáno, že transdiferenciaci dospělých kožních buněk na indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs) je možné provést pomocí kombinace čtyř TF důležitých k udržení pluripotentního charakteru a proliferace kmenových buněk (Oct3/4, Sox2, c-Myc a Klf4) (Takahashi et al. 2006). iPSCs mají potenciál neomezeného buněčného dělení, což ale současně představuje určité riziko nádorového bujení (Simonson et al. 2015). Bezpečnější alternativou je přímá transdiferenciace dospělých buněk na jiný typ plně diferencovaných buněk. Transdiferenciací je možné získat funkční β -buňky z různých buněčných typů pro léčbu T1D a T2D (Wei et al. 2016). Pro transdiferenciaci buněk je možno použít více přístupů pro navození umělé exprese TF nezbytných pro aktivaci transdiferenciace. Efektivním způsobem je vnesení genetické informace pro TF pomocí

virových nosičů a následné integrování virové DNA do genomu buňky (Zhou et al. 2008). Tento postup ovšem není vhodný pro klinické použití kvůli riziku nádorového zvratu. Jako alternativní postup je možné použít virový nosič bez integrace genu pro TF do genomu (Schlaeger et al. 2015) nebo transfekci buněk TF ve formě proteinu nebo mRNA (Leontovyč et al. 2017). Všechny uvedené nosiče je možné využít při transdiferenciaci buněk pankreatu na β -buňky produkující inzulín. V naší stěžejní práci jsme pro transdiferenciaci exokrinních buněk pankreatu na β -buňky produkující inzulín použili podání TF (Pdx1, Neurogenin3 a MafA) ve formě mRNA (Koblas et al. 2016).

2. Hypotézy a cíle práce

Cílem práce bylo získat buňky produkující inzulín z exokrinních buněk pankreatu bez zásahu do genomické DNA.

Hypotéza: Exokrinní buňky pankreatu je možné in vitro transdiferencovat na buňky produkující inzulín.

Dílčí cíle:

1. Testování kultivačního media s přidavkem vhodných růstových faktorů a malých molekul při diferenciaci exokrinních buněk pankreatu na buňky produkující inzulín.

Hypotéza: Růstové faktory zapojené do procesu diferenciaci směrem k β -buňkám produkujícím inzulín a vhodné malé molekuly jsou důležitou složkou diferenciacního media.

2. Zhodnocení účinků epigenetických faktorů na diferenciaci exokrinních buněk pankreatu na buňky produkující inzulín.

Hypotéza: Vhodné epigenetické faktory rozvolňují dvoušroubovici DNA do struktury euchromatinu a umožňují správnou funkci transkripčních faktorů nezbytných pro diferenciaci pankreatických β -buněk.

3. Testování efektivity ovlivnění buněčné DNA bioaktivní molekulou ve formě rekombinantního proteinu nebo syntetické mRNA.

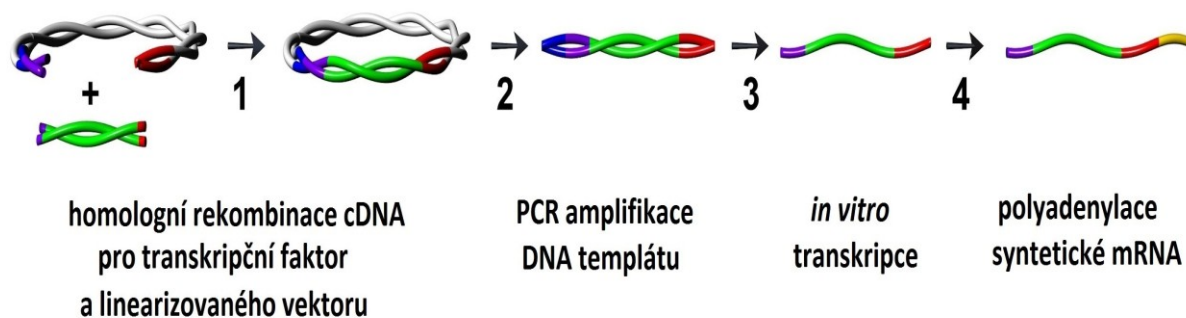
Hypotéza: Pro efektivní ovlivnění diferenciaci β -buněk transkripčními faktory bez trvalé změny v genomické DNA je vhodná forma syntetické mRNA.

4. Zhodnocení účinků vhodných růstových, epigenetických a transkripčních faktorů na vznik β -buněk.

Hypotéza: Kombinací vhodných růstových, epigenetických a transkripčních faktorů je možné aktivovat transdiferenciaci exokrinních pankreatických buněk na buňky produkující inzulín.

3. Materiál a metodika

V rámci disertační práce byl na základě postupného testování vypracován protokol pro diferenciaci exokrinních buněk pankreatu směrem k buňkám produkujícím inzulin (Koblas et al. 2009, Leontovyč et al. 2011, Koblas et al. 2012, Leontovyč et al. 2017). Základem protokolu bylo diferenciacní medium složené z dříve otestovaného souboru růstových a epigenetických faktorů. Toto medium bylo obohaceno syntetickou mRNA pro TF Pdx1, Neurogenin3 a MafA (PNM). Schéma přípravy je znázorněno na obr. 1. Připravená syntetická mRNA pro transkripční faktory PNM byla transfekována do potkaní, exokrinní buněčné linie AR42J v koncentraci 20 ng/μl za použití transfekčního činidla Lipofectamine MessengerMAX (Life Technologies). Následně byla přidána do kultivačního media společně s 200 ng/ml inhibitoru interferonu B18R (eBioscience). Buňky byly pro opakovanou transfekci trojkombinací mRNA pro PNM kultivovány v bezsérovém mediu po dobu 10 dnů. Buňky byly následně vyhodnoceny na základě genové exprese. Produkce na proteinové úrovni byla stanovena imunofluorescenčním barvením. U buněk byla také měřena sekrece inzulinu na základě zvýšení hladiny glukózy.



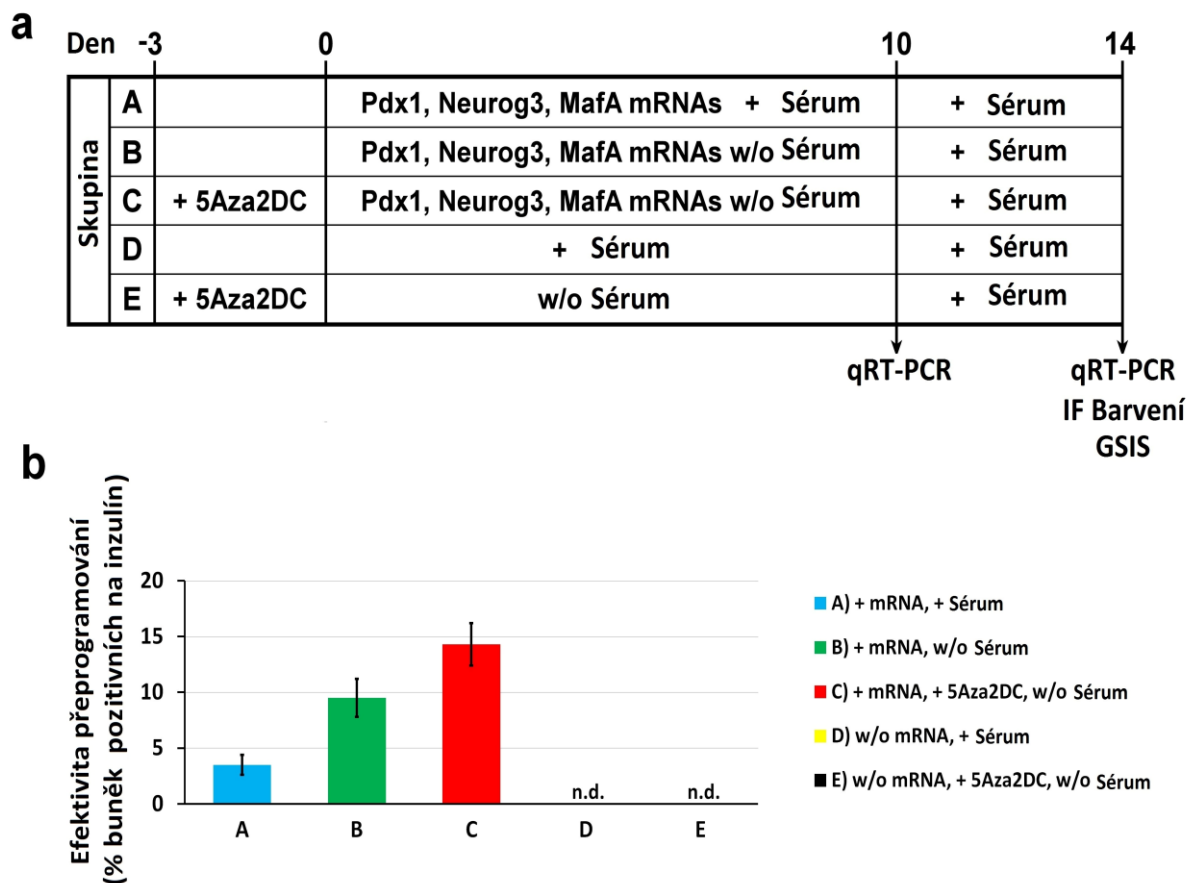
Obr. 1 Schéma přípravy DNA templátu a mRNA pro transkripční faktory Pdx1, Neurogenin3 a MafA,

Příprava DNA templátu a syntéza mRNA: (1) homologní rekombinace cDNA pro TF a linearizace vektoru obsahujícího T7 promotor, 5'UTR (nepřekládaná oblast) z genu pro potkaní β -globin a 3'UTR z genu pro lidský β -globin; (2) PCR amplifikace DNA templátu; (3) *in vitro* transkripce; (4) polyadenylace syntetické mRNA.

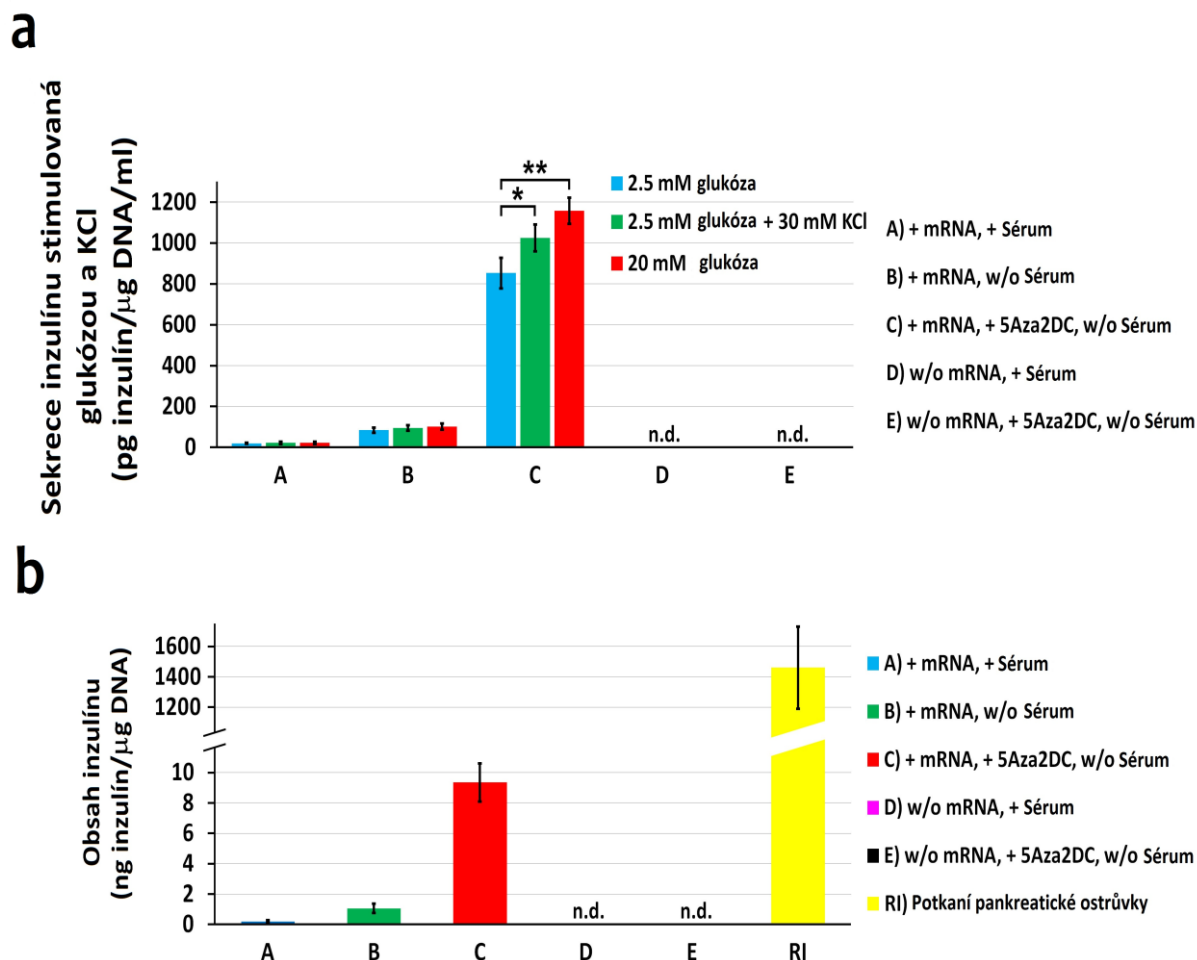
4. Výsledky

Prvním krokem k úspěšné transdiferenciaci je efektivní vnitrobuněčná exprese podávaných transkripčních faktorů (TF). Pomocí fluorescenčního barvení jsme stanovili efektivitu exprese jednotlivých TF. Ta byla u TF Pdx1 po podání 1 μ g mRNA/ml media nejvyšší s nižší variabilitou ($72.1 \pm 7.4\%$, n=5). U TF MafA ($66.7 \pm 11.3\%$, n=5) a Neurogenin3 ($36.9 \pm 10.9\%$, n=5) po podání stejného množství (1 μ g mRNA/ml media) byla efektivita nižší s vyšší variabilitou. Dále byla vyhodnocena simultánní exprese transkripčních faktorů v rámci jedné buňky. Množství dvojité pozitivních buněk bylo $16.1 \pm 3.8\%$ (n=4) pro Pdx1 a MafA, $13.3 \pm 2.8\%$ (n=4) pro Pdx1 a Neurogenin3 a $11.7 \pm 3.6\%$ (n=4) pro MafA a Neurogenin3. Negativní účinky mRNA na přežívání buněk jsme se snažili snížit přidáním rekombinantního proteinu B18R (rozpustný interferonový receptor typu I). Přidání B18R do media výrazně zvýšilo přežívání buněk při opakované transfekci mRNA. Použití B18R nám v dalších experimentech umožnilo transferovat cílovou buněčnou linii po dobu 10 dnů. Po jeho podání bylo dosaženo dvojité pozitivnosti ve výši $20.5 \pm 3.2\%$ (n=4) buněk pro kombinaci Pdx1 a MafA, $17.8 \pm 3.4\%$ (n=4) pro Pdx1 a Neurogenin3 a $15.1 \pm 5.1\%$ (n=4) pro MafA a Neurogenin3. Dalším krokem bylo posouzení efektivit syntetických mRNA pro Pdx1, Neurogenin3 a MafA při transdiferenciaci exokrinních pankreatických buněk na buňky produkující inzulín. Buněčná linie AR42J byla transfekována po dobu 10 dnů kombinací všech tří mRNA v množství 500 ng/ml od každé v kultivačním mediu obsahujícím fetální hovězí sérum, obr. 2a), skupina A. Nicméně efektivita byla nízká a odpovídala množství $3.5 \pm 0.9\%$ (n=4) buněk pozitivních na inzulín, obr. 2b), skupina A. Pro zlepšení efektivit transdiferenciace jsme dále optimalizovali složení kultivačního média. Bylo prokázáno, že efektivitu transdiferenciace lze zvýšit při kultivaci buněk v mediu bez použití fetálního hovězího séra (Lima et al. 2013). To se v naší práci potvrdilo nahrazením fetálního hovězího séra v kultivačním mediu za lidský sérový albumin obr. 2a), skupina B. Pro další zvýšení efektivit transdiferenciace jsme do kultivačního media použili 5-Aza-2'-deoxycytidin. Jedná se o činidlo ovlivňující strukturu chromatinu inhibicí aktivity DNA metyltransferázy. Výsledkem je demethylace DNA, změny struktury chromatinu a následné zvýšení přístupnosti genů pro TF, což je nezbytné podmínka pro aktivaci genové exprese. Použití 5-Aza-2'-deoxycytidinu před transfekcí syntetickými mRNA (obr. 2a, skupina C), zvýšilo efektivitu transdiferenciace buněk ve 4 nezávislých experimentech na $14.3 \pm 1.9\%$ inzulín pozitivních buněk, obr. 2b) skupina C. Navíc pouze u buněk ošetřených 5-Aza-2'-deoxycytidinem v rámci protokolu pro transdiferenciaci byla prokázána senzitivita na změnu koncentrace glukózy v mediu. Stimulovaná sekrece inzulínu

prokázala zvýšení z 842 ± 72 na $1\,157 \pm 58$ pg inzulin/ μ g DNA/ml (n=5) po inkubaci v roztoku s vysokou koncentrací glukózy (2.5 versus 20 mmol/l), obr. 3a)



Obr. 2 Schéma průběhu experimentu a vyhodnocení efektivity přeprogramování buněk AR42J. **(a)** Přehled protokolu pro přeprogramování. Pokus probíhal v pěti skupinách rozlišených složením kultivačního media a podáním všech tří transkripčních faktorů (Pdx1, Neurogenin3 a MafA) ve formě syntetické mRNA v dávce 500 ng každé mRNA/ml media po dobu 10 dnů. Buňky byly kultivovány v kultivačním mediu se sérum s podáním mRNA (skupina A), v mediu bez séra s podáním mRNA (skupina B), s přidávkem 5-Aza-2'-deoxycytidine 3 dny před kultivací v mediu bez séra s podáním mRNA (skupina C). Expresní profil byl porovnán s buňkami bez podané mRNA v mediu bez séra (kontrolní skupina D), se skupinou, s přidávkem 5-Aza-2'-deoxycytidine 3 dny před kultivací v mediu bez séra a bez podané mRNA (kontrolní skupina E) a s potkaními pankreatickými ostrůvkami (kontrolní skupina RI). **(b)** Vyhodnocení efektivity přeprogramování pomocí imunofluorescenčního barvení na inzulin a následné statistické zpracování. Hodnota je vyjádřena průměrem \pm standardní odchylka (n=4). n.d., hodnota pod mezí detekce.



Obr. 3 Vyhodnocení efektivity přeprogramování buněk AR42J a jejich sekrece inzulinu.

(a) Glukózový stimulační test sekrece inzulinu byl proveden inkubací buněk v mediu s nízkou hladinou glukózy (2.5 mmol/l) po dobu 60 min. a následně v mediu s vysokou hladinou glukózy (20 mmol/l) po dobu 60 min. Efekt depolarizačního činidla KCl na sekreci inzulinu byl vyhodnocen při inkubaci buněk v mediu s nízkou hladinou glukózy (2.5 mmol/l) po dobu 60 min. a následně s přidavkem 30 mmol/l KCl.

(b) Obsah inzulinu v buněčném lyzátu byl stanoven po stimulaci sekrece KCl. Hodnota je vyjádřena průměrem \pm standardní odchylka (n=5). n.d., hodnota pod mezí detekce. Statistická analýza byla vyhodnocena pomocí nepárového Studentova *t*-testu. Statistická významnost je vyjádřena hvězdičkami: *P<0.05, **P<0.01.

5. Diskuse

Dosažené výsledky v průběhu studia (Koblas et al. 2009), (Leontovyč et al. 2011), (Koblas et al. 2012), (Leontovyč et al. 2017) nás dovedly ke stěžejní práci, ve které jsme využili poznatků ohledně růstových, epigenetických a transkripčních faktorů (Koblas et al. 2016). V této práci jsme se zabývali transdiferenciací pankreatických exokrinních buněk AR42J na buňky, které produkují inzulín za použití transkripčních faktorů (Pdx1, Ngn3 a MafA) jejichž exprese byla vyvolána podáním syntetické mRNA kódující příslušné TF. U transdiferencovaných buněk byla prokázána tvorba inzulínu a c-peptidu, vedlejšího produktu při vzniku inzulínu z proinzulínu. Tvorba inzulínu byla rovněž prokázána na úrovni genové exprese. Získané buňky rovněž exprimovaly geny důležité pro sekreci inzulínu v závislosti na glukóze kódující např. glukózový transportér Glut2 a podjednotku draslíkového kanálu Sur1a Kir6.2, který je nezbytný pro vnímání hladiny glukózy a pro správnou sekreci inzulínu. Buňky proto sekretovaly inzulín v závislosti na hladině glukózy v mediu, i když v nižší míře než přirozené β -buňky. Také celkový obsah inzulínu byl nižší než u potkaních Langerhansových ostrůvků, což ukazuje na nedostatečnou maturaci získaných transdiferencovaných buněk. To je možné vysvětlit nedostatečnou expresí transkripčních faktorů a genů důležitých pro dospělé β -buňky.

Zvýšení efektivity transdiferenciace by mohlo ovlivnit rozšíření počtu transkripčních faktorů. Bylo prokázáno, že TF Nkx6.1, Pax6 a Isl1 jsou exprimovány ve zvýšené míře v pozdních fázích diferenciaci β -buněk (Schaffer et al. 2013, Sander et al. 1997, Schwitzgebel et al. 2000) a mají pozitivní efekt na expresi genu pro inzulín a další důležité regulátory glukózové sekrece (Taylor et al. 2013, Gosmain et al. 2012, Ediger et al. 2014). Je známo, že expresi genů Pax6 a Isl1 ovlivňuje Neurogenin3 (Schwitzgebel et al. 2000, White et al. 2008). To by mohlo znamenat, že exprese Neurogenin3 nebyla dostatečná. Naše pozorování jsou ve shodě s prací, zabývající se přeměnou lidských pankreatických duktálních buněk na β -buňky produkující inzulín (Lee et al. 2013). Ve studii byla také pozorována nedostatečná exprese Pax6 po podání Pdx1, Neurogenin3 a MafA. Dalším prostorem pro vylepšení transdiferenciačního protokolu by mohlo být rozšíření epigenetického ovlivnění buněk před použitím TF. Naše výsledky prokázaly, že rozvolnění chromatinové struktury 5-Aza-2'-deoxycytidinem má pozitivní vliv na buněčnou transdiferenciaci. Nicméně je možné, že jeho účinek nebyl dostatečný. Struktura chromatinu je důležitá pro možný účinek TF. Mezi hlavní faktory, které vedou k neaktivní heterochromatinové struktuře patří trimetylace lyzínu 27 na histonu H3 (H3K27) (Chen et al. 2014), (Arensbergen et al. 2010). Ve studii porovnávací

modifikace histonů u pankreatických exokrinních buněk a β -buněk byla u exokrinních buněk prokázána represivní modifikace H3K27 např. v genech pro TF Nkx6.1, Pax6 a Isl1, které jsou exprimovány β -buňkami. Navíc byla H3K27 modifikace genů důležitých pro funkci β -buněk pozorována *in vitro* studii zabývající se diferenciací embryonálních kmenových buněk na buňky produkující inzulín (Xie et al. 2013). V této práci byl pozorován negativní dopad represivní H3K27 modifikace na expresi Glp1r a Urokortin3, což je ve shodě i s našimi výsledky.

To vše ukazuje na důležitost, v jakém stavu je chromatinová struktura při transdiferenciaci buněk. Nami přeprogramované buňky nevykazovaly produkci více hormonů, tak jak se může při diferenciaci stát (Bruin et al. 2014). Proto předpokládáme, že náš protokol vedl přímo k přeprogramování na β -buňky produkující inzulín. To odpovídá i našemu pozorování, kdy jsme zaznamenali zvýšenou indukci TF Pax4, který je ve zvýšené míře exprimován v časných fázích diferenciaci pankreatických endokrinních buněk (Sosa-Pineda et al. 1997) Navíc Pax4 a Nkx2.2, které se také exprimovaly během transdiferenciaci ve zvýšené míře podporují diferenciaci směrem k β -buňkám produkujícím inzulín (Wang et al. 2004). Řada studií uvádí přeprogramování exokrinních buněk na buňky produkující inzulín pomocí adenovirových vektorů (Akinci et al. 2012), (Lima et al. 2012), (Banga et al. 2012), (Zhou et al. 2008), (Banga et al. 2014), (Li et al. 2014). Ty jsou sice pro expresi vnášeného genu velmi efektivní, nicméně mohou způsobit mutagenní změny (Stephen et al. 2010), (Stephen et al. 2008).

Přeprogramování je dynamická záležitost a expresní profil buněk se v jeho průběhu mění. Dlouhodobá exprese některých transkripčních faktorů by mohla v pozdějším stádiu negativně ovlivnit finální fáze přeprogramování (Lee et al. 2013). Tyto problémy řeší námi navržené použití mRNA jako nosiče genetické informace pro tvorbu příslušného proteinu. Při použití mRNA nehrozí riziko mutagenese. Navíc jde o krátkodobé ovlivnění, které je možné načasovat, díky endogenní degradaci mRNA. Proto je možné efektivně napodobit přirozený proces diferenciaci, při které se některé TF exprimují déle a jiné po kratší časový úsek (Schwitzgebel et al. 2000, Arda et al. 2013, White et al. 2008). Nevýhodami použití mRNA pro přeprogramování jsou jednak nutnost transfekci opakovat a dále možnost následného cytotoxického efektu.

Tyto nevýhody může vyřešit optimální sekvence mRNA pro zvýšení stability a efektivitu translace, což následně vede ke snížení počtu opakování transfekce mRNA do buněk (Thess et al. 2015). Cytotoxický efekt mRNA je způsoben přítomností plně nedosyntetizovaných mRNA produktů během *in vitro* syntézy (Triana-Alonso et al. 1995, Kariko et al. 2011). Je

možné ho snížit pomocí purifikace vysoko účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). HPLC purifikace snižuje zastoupení nechtěných mRNA produktů, snižuje cytotoxický efekt a aktivaci nespecifické zánětlivé odpovědi u transfekovaných buněk (Kariko et al. 2011). Cytotoxický efekt jsme v naší práci snížili použitím B18R receptoru viru vaccinia, který tlumí aktivaci nespecifické zánětlivé odpovědi. Použití B18R v našem protokolu pro přeprogramování vedlo k možnosti prodloužení transfekce syntetickou mRNA snížením jejích cytotoxických účinků. Naše výsledky ukazují, že protokol pro přeprogramování pankreatických exokrinních buněk na buňky produkující inzulín založený na syntetické mRNA kódující pankreatické transkripční faktory může být slibným přístupem pro léčbu diabetu mellitu. Pro získání plně funkčních a maturovaných β -buněk je žádoucí dále optimalizovat přípravu syntetické mRNA, kultivační podmínky buněk a kombinaci transkripčních faktorů.

Námi navržené metody a postupy budou využity v dalším výzkumu při přeprogramování lidských neendokrinních buněk a publikovány v práci, která je aktuálně přijatá do tisku: Reprogramming of human pancreatic organoid cells into the insulin-producing beta-like cells by small molecules and in vitro-transcribed modified mRNA encoding Neurogenin3 transcription factor.

6. Závěry

- V práci (Activation of the Jak/Stat signalling pathway by leukaemia inhibitory factor stimulates trans-differentiation of human non-endocrine pancreatic cells into insulin-producing cells) jsme prokázali pozitivní vliv vybraných růstových faktorů a malých molekul na diferenciaci lidských pankreatických buněk na buňky produkující inzulin. V rámci zavedeného diferenciačního protokolu jsme použitím kombinace LIF (leukemický inhibiční faktor), nikotinamidu a dexametazonu dosáhli sekrece c-peptidu u 10.2 ± 2.1 buněk ($n=5$).
- V práci (The effect of epigenetic factors on differentiation of pancreatic progenitor cells into insulin-producing cells) jsme prokázali pozitivní vliv epigenetických faktorů na diferenciaci lidských pankreatických buněk na buňky produkující inzulin. Po použití kombinace 5-Aza-2'-deoxycytidin, BIX01294 a MC1568 jsme dosáhli $10.3 \pm 2.9\%$ C-peptid pozitivních buněk a $7.2 \pm 2.8\%$ glukagon pozitivních buněk ($n=3$). Diferenciované buňky sekretovaly c-peptid v závislosti na změně hladiny glukózy ($0.45 \text{ pmol}/\mu\text{g DNA}$ při koncentraci 5 mmol/L a $1.05 \text{ pmol}/\mu\text{g DNA}$ při koncentraci 20 mmol/L).
- V práci (Synthetic mRNA is a more reliable tool for the delivery of DNA-targeting proteins into the cell nucleus than fusion with a protein transduction domain) zabývající se srovnáním efektivity ovlivnění DNA bioaktivní molekulou jsme prokázali vysokou efektivitu ($60\text{-}90\%$) syntetické mRNA u všech tří testovaných buněčných linií. Ovlivnění DNA formou rekombinantního proteinu bylo efektivní pouze u jedné ze tří testovaných buněčných linií (70%). Výsledkem studie je zjištění, že použití syntetické mRNA je efektivnější a univerzálnější přístup k ovlivnění buněčné DNA než podání rekombinantního proteinu.
- V závěrečné práci (Reprogramming of pancreatic exocrine cells AR42J into insulin-producing cells using mRNAs for Pdx1, Ngn3, and MafA transcription factors) jsme kombinací růstových, epigenetických a transkripčních faktorů získali $14.3 \pm 1.9\%$ ($n=4$) inzulin pozitivních buněk. Vyhodnocením stimulované sekrece inzulinu jsme navíc prokázali schopnost buněk reagovat na zvýšení hladiny glukózy (2.5 versus 20 mmol/l) z 842 ± 72 na $1\ 157 \pm 58 \text{ pg inzulin}/\mu\text{g DNA/ml}$ ($n=5$).

7. Použitá literatura

- Akinci E, Banga A, Greder LV, Dutton JR, Slack JMW. (2012). Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a Beta (β) cell character using Pdx1, Ngn3 and MafA. *The Biochemical Journal* 442 (3): 539–50.
- Arda HE, Benitez CM, Kim SK. (2013). Gene regulatory networks governing pancreas development. *Developmental Cell* 25 (1): 5–13.
- Arensbergen J, García-Hurtado J, Moran I, Maestro MA, Xu X, Castele M, Skoudy AL, Palassini M, Heimberg H, Ferrer J. (2010). Derepression of polycomb targets during pancreatic organogenesis allows insulin-producing β -Cells to adopt a neural gene activity program. *Genome Research* 20 (6): 722–32.
- Banga A, Greder LV, Dutton JR, Slack JMW. (2014). Stable insulin-secreting ducts formed by reprogramming of cells in the liver using a three-gene cocktail and a PPAR agonist. *Gene Therapy* 21 (1): 19–27.
- Banga A, Akinci E, Greder LV, Dutton JR, Slack JMW. (2012). In vivo reprogramming of Sox9⁺ cells in the liver to insulin-secreting ducts. *PNAS* 109 (38): 15336–41.
- Bruin JE, Erener S, Vela J, Hu X, Johnson JD, Kurata HT, Lynn FC, et al. (2014). Characterization of polyhormonal insulin-producing cells derived in vitro from human embryonic stem cells. *Stem Cell Research* 12 (1): 194–208.
- Chen T, Dent S. (2014). Chromatin modifiers: regulators of cellular differentiation. *Nat Rev Genet.* 15 (2): 93–106.
- Ediger BN, Du A, Liu J, Hunter CS, Walp ER, Kaestner KH, Stein R, Stoffers DA, May CL. (2014). Islet-1 is essential for pancreatic β -cell function *Diabetes* 63 (12): 4206–17.
- Gosmain Y, Katz LS, Masson MH, Cheyssac C, Poisson C, Philippe J. (2012). Pax6 is crucial for β -cell function, insulin biosynthesis, and glucose-induced insulin secretion *Mol Endocrinol* 26 (4): 696–709.
- Kariko K, Muramatsu H, Ludwig J, Weissman D. (2011). Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucleic Acids Research* 39 (21): e142.
- Koblas T, Leontovyč I, Loukotová S, Kosinová L, Saudek F. (2016). Reprogramming of pancreatic exocrine cells AR42J into insulin-producing cells using mRNAs for Pdx1, Ngn3, and MafA transcription factors. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 5 (e320) doi: 10.1038/mtna.2016.33.
- Koblas T, Leontovyč I, Zacharovová K, Berková Z, Kříž J, Girman P, Saudek F. (2012).

- Activation of the Jak/Stat signalling pathway by leukaemia inhibitory factor stimulates trans-differentiation of human non-endocrine pancreatic cells into insulin-producing cells. *Folia Biologica* 58 (3): 98–105.
- Koblas T, Zacharovová K, Berková Z, Leontovyč I, Dovolilová E, Zámečník L, Saudek F. (2009). In vivo differentiation of human umbilical cord blood-derived cells into insulin-producing β cells. *Folia Biologica* 55 (6): 224–32.
- Lee J, Sugiyama T, Liu Y, Wang J, Gu X, Lei J, Markmann JF, et al. (2013). Expansion and conversion of human pancreatic ductal cells into insulin-secreting endocrine cells. *ELife* 2: e00940.
- Leontovyč I, Habart D, Loukotová S, Kosinová L, Kříž J, Saudek F, Koblas T. (2017). Synthetic mRNA is a more reliable tool for the delivery of DNA-targeting proteins into the cell nucleus than fusion with a protein transduction domain *PLoS ONE* 12 (8): e.0182497.
- Leontovyč I, Koblas T, Pektorová L, Zacharovová K, Berková Z, Saudek F. (2011). The effect of epigenetic factors on differentiation of pancreatic progenitor cells into insulin-producing cells. *Transplantation Proceedings* 43 (9): 3212–16.
- Li W, Nakanishi M, Zumsteg A, Shear M, Wright C, Melton DA, Zhou Q. (2014). In vivo reprogramming of pancreatic acinar cells to three islet endocrine subtypes. *ELife* 3: e01846.
- Lima MJ, Docherty HM, Chen Y, Docherty K. (2012). Efficient differentiation of AR42J cells towards insulin-producing cells using pancreatic transcription factors in combination with growth factors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 358 (1): 69–80.
- Lima MJ, Muir KR, Docherty HM, Drummond R, McGowan NW, Forbes S, Heremans Y, Houbracken I, Ross A, Forbes SJ, Ravassard P, Heimberg H, Casey J, Docherty K. (2013). Suppression of epithelial to mesenchymal transitioning (EMT) enhances ex vivo reprogramming of human exocrine pancreatic tissue towards functional insulin producing β -like cells. *Diabetes* 62 (8): 2821–33.
- Sander M, Neubiiser A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS. (1997). Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes & Development* 11 (13): 1662–73.
- Schaffer AE, Taylor BL, Benthuisen JR, Liu J, Thorel F, Yuan W, Jiao Y, et al. (2013). Nkx6.1 controls a gene regulatory network required for establishing and maintaining pancreatic beta cell identity *PLoS Genet.* 9 (1): e1003274.
- Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L,

- Johnson JD, German MS. (2000). Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127 (16): 3533–42.
- Sosa-Pineda B, Gruss P, Chowdhury K, Torres M, Oliver G. (1997). The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386 (6623): 399–402.
- Stephen SL, Montini E, Sivanandam VG, Al-Dhalimy M, Kestler HA, Finegold M, Grompe M, Kochanek S. (2010). Chromosomal integration of adenoviral vector DNA in vivo. *Journal of Virology* 84 (19): 9987–94.
- Stephen SL, Sivanandam VG, Kochanek S. (2008). Homologous and heterologous recombination between adenovirus vector DNA and chromosomal DNA. *The Journal of Gene Medicine* 10 (11): 1176–89.
- Taylor BL, Liu F, Sander M. (2013). Nkx6.1 is essential for maintaining the functional state of pancreatic beta cells. *Cell Reports* 4 (6): 1262–75.
- Thess A, Grund S, Mui BL, Hope MJ, Baumhof P, Schlake T. (2015). Sequence-engineered mRNA without chemical nucleoside modifications enables an effective protein therapy in large animals. *Molecular Therapy* 23 (9): 1456–64.
- Triana-Alonso FJ, Dabrowski M, Wadzack J, Nierhaus K. (1995). Self-coded 3'-extension of run-off transcripts produces aberrant products during in vitro transcription with T7 RNA polymerase *J Biol Chem.* 270 (11): 6298–6307.
- Wang J, Elghazi L, Parker SE, Kizilocak H, Asano M, Sussel L, Sosa-Pineda B. (2004). The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic β -cell differentiation. *Developmental Biology* 266 (1): 178–89.
- White P, May CL, Lamounier RN, Brestelli JE, Kaestner KH. (2008). Defining pancreatic endocrine precursors and their descendants. *Diabetes* 57 (3): 654–68.
- Xie R, Everett LJ, Lim H, Patel NA, Schug J, Kroon E, Kelly OG, et al. (2013). Dynamic chromatin remodeling mediated by polycomb proteins orchestrates pancreatic differentiation of human embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 12 (2): 224–37.
- Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -Cells. *Nature* 455 (7213): 627–32.

8. Seznam publikací doktoranda

1. Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

s IF

Leontovyč I, Habart D, Loukotová S, Kosinová L, Kříž J, Saudek F, Koblas T. (2017). Synthetic mRNA is a more reliable tool for the delivery of DNA-targeting proteins into the cell nucleus than fusion with a protein transduction domain *PLoS ONE* 12 (8): e.0182497. **IF 2,766.**

Leontovyč I, Koblas T, Pektorová L, Zacharovová K, Berková Z, Saudek F. (2011). The effect of epigenetic factors on differentiation of pancreatic progenitor cells into insulin-producing cells. *Transplantation Proceedings* 43 (9): 3212–16. **IF 1,005.**

Koblas T, **Leontovyč I**, Loukotová S, Kosinová L, Saudek F. (2016). Reprogramming of pancreatic exocrine cells AR42J into insulin-producing cells using mRNAs for Pdx1, Ngn3, and MafA transcription factors. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 5 (e320) doi: 10.1038/mtna.2016.33. **IF 5,882.**

Koblas T, **Leontovyč I**, Zacharovová K, Berková Z, Kříž J, Girman P, Saudek F. (2012). Activation of the Jak/Stat signalling pathway by leukaemia inhibitory factor stimulates trans-differentiation of human non-endocrine pancreatic cells into insulin-producing cells. *Folia Biologica* 58 (3): 98–105. **IF 1,219.**

Koblas T, Zacharovová K, Berková Z, **Leontovyč I**, Dovolilová E, Zámečník L, Saudek F. (2009). In vivo differentiation of human umbilical cord blood-derived cells into insulin-producing β cells. *Folia Biologica* 55 (6): 224–32. **IF 0,924.**

2. Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

s IF

Kosinová L, Cahová M, Fábryová E, Týcová I, Koblas T, **Leontovyč I**, Saudek F, Kříž J. (2016). Unstable expression of commonly used reference genes in rat

pancreatic islets early after isolation affect results of gene expression studies. *PLoS ONE* 11 (4): e0152664. **IF 2,806.**

Berková Z, Saudek F, Leontovyč I, Benešík M, Štveráková D. (2018). Testing of a new collagenase blend for pancreatic islets isolation produced by *Clostridium histolyticum*. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 9 (1): 26-35. **IF 1,778**

Berková Z, Saudek F, Girman P, Zacharovová K, Berková Z, Kříž J, Fábryová E, Leontovyč I, Koblas T, Kosinová L, Skibová J, et al. (2016). Combining donor characteristic with immunohistological data improves the prediction of islet isolation success. *J Diabetes Res.* 2016: e4214328. **IF 2,890**

Voglová B, Zahradnická M, Girman P, Kříž J, Berková Z, Koblas T, Vávrová E, Némětová L, Kosinová L, Habart D, Fábryová E, Dovolilová E, Leontovyč I, Saudek F, et al. (2017). Benefits of islet transplantation as an alternative to pancreas transplantation: Retrospective study of more than 10 years of experience in a single centre. *Rev Diabet Stud.* 14 (1): 10-21. **IF 3,455**