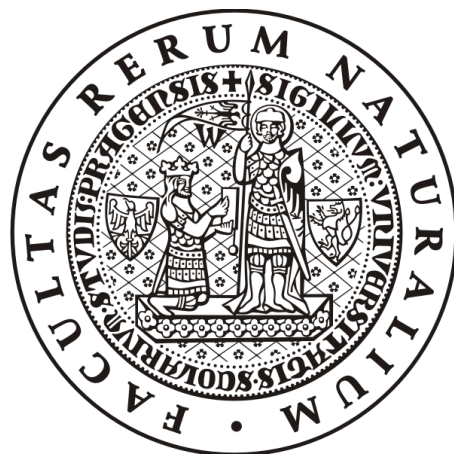


**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Biochemistry**

Doktorský studijní program: Biochemie
Ph.D. study program: Biochemistry

Autoreferát dizertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



**Transplantace kadaverózní kostní dřeně:
Vliv hypoxie a metabolické starvace
na myší krvetvorné kmenové buňky**

**Cadaveric bone marrow transplantation:
Effects of hypoxia and metabolic starvation
on mouse hematopoietic stem cells**

Mgr. Jana Michalová

Školitel/Supervisor: RNDr. Luděk Šefc, CSc.

Praha 2012

This work was supported by grants LC06044, MSM021620806 and SVV-2011-262507 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

Obsah/Contents

| | |
|---|----|
| Abstrakt | 2 |
| Abstract | 3 |
| Česká část | |
| 1 ÚVOD | 4 |
| 2 CÍLE PRÁCE | 6 |
| 3 MATERIÁL A METODY | 7 |
| 4 VÝSLEDKY A DISKUZE | 9 |
| 4.1 Vliv ischemie na buňky kostní dřeně a na krvevorné kmenové buňky..... | 9 |
| 4.2 Inhibice metabolismu buněk kostní dřeně <i>in vitro</i> | 14 |
| 4.3 Vliv skladování <i>in vitro</i> na transplantabilitu krvevorných kmenových buněk | 17 |
| 5 ZÁVĚR..... | 18 |
| English part | |
| 1 INTRODUCTION..... | 19 |
| 2 AIMS OF THE STUDY..... | 21 |
| 3 MATERIALS AND METHODS | 22 |
| 4 RESULTS AND DISCUSSION | 24 |
| 4.1 Effect of ischemia on bone marrow cells and hematopoietic stem cells..... | 24 |
| 4.2 Inhibition of bone marrow cells metabolism <i>in vitro</i> | 29 |
| 4.3 Effect of <i>in vitro</i> storage on transplantability of hematopoietic stem cells..... | 32 |
| 5 CONCLUSIONS..... | 33 |
| POUŽITÁ LITERATURA/REFERENCES | 34 |
| <i>Curriculum vitae</i> | 36 |
| SEZNAM PUBLIKACÍ/LIST OF PUBLICATIONS..... | 37 |

Abstrakt

Východisko: Transplantace krvetvorných kmenových buněk slouží k léčbě poruch krvetvorby, autoimunitních chorob i některých nehematologických onemocnění. Ne pro všechny pacienty se však podaří nalézt vhodného dárce krvetvorných kmenových buněk (HSC). Protože HSC vykazují nízkou proliferační a metabolickou aktivitu, lze u nich přepokládat odolnost vůči nedostatku kyslíku a metabolických substrátů, který nastává při ischemii, např. v kadaverózní kostní dřeni. Cílem této práce bylo pomocí experimentálního myšího modelu ověřit možnost odběru HSC z kadaverózní kostní dřene. Navíc byla testována tolerance HSC k inhibitorům metabolismu a k uchování *in vitro*.

Metody: V experimentech byl použit modelový organismus *Mus musculus* C57Bl/6 („wild-type“ a p53 knock-out). Kostní dřeň byla po určitou dobu (0 až 48 hod) ponechána v uzavřených femurech dárců při teplotě 37°C, 20°C nebo 4°C v podmínkách ischemie, nebo byla ihned odebrána a buňky byly vystaveny inhibitoru dýchacího řetězce kyanidu draselnému či inhibitoru glykolýzy 2-deoxy-D-glukose, příp. pouze skladovány *in vitro*. Vliv ischemie, metabolických inhibitorů a skladování *in vitro* na transplantabilitu HSC byl studován na myším kongenním modelu Ly5.1/Ly5.2 metodou kompetitivní repopulace. Poměry živých, apoptotických a mrtvých buněk v subpopulacích kostní dřene, a zastoupení LSK SLAM (Lin^{low}Sca-1⁺c-Kit⁺CD150⁺CD48⁻) a LSK SP (side population) buněk, reprezentujících HSC, byly měřeny pomocí průtokové cytometrie.

Výsledky: Na základě chimerismu buněk dárcovského původu sledovaného v periferní krvi příjemců po dobu 6 měsíců od transplantace bylo zjištěno, že dlouhodobá repopulační schopnost HSC vystavených ischemii zůstává při 37°C, 20°C resp. 4°C zachována po dobu minimálně 2, 6 resp. 12 hodin. S následným poklesem transplantability klesalo i zastoupení LSK SLAM a LSK SP buněk v kostní dřeni (BM). Ischemie způsobila také zvýšení počtu apoptotických a mrtvých buněk v BM, přičemž v LSK populaci (bohaté na HSC) byl pozorován menší nárůst než v populacích diferencovaných prekurzorů krevních buněk. U HSC odebraných z kadaverózní dřene p53^{-/-} myši nebyly v porovnání s „wild-type“ HSC pozorovány významné rozdíly v přežívání ani v transplantabilitě. Po inkubacích s inhibitory byla zjištěna vyšší odolnost LSK buněk k inhibici KCN; k inhibici 2-DG byly citlivé všechny buňky kostní dřene. Dvoudenní skladování buněk při 37°C ani čtyřdenní skladování při 4°C transplantabilitu HSC neovlivnilo.

Závěr: Výsledky naší studie prokázaly, že HSC přežívají v kadaverózní kostní dřeni po významnou dobu, aniž by ztrácely svou repopulační schopnost. Ukázalo se, že představují populaci kostní dřene nejodolnější k nedostatku kyslíku a metabolických substrátů. Přežívání HSC bylo významně prodlouženo při skladování *in vitro*, proto by buňky měly být vždy odebrány co nejdříve.

Abstract

Objectives: Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a widely used method for treatment of hematological disorders and some other diseases. However, sometimes a suitable donor of hematopoietic stem cells (HSC) is not found for a patient. Because HSC have been described as cells with low proliferative and metabolic activity, their tolerance to the lack of oxygen or metabolic substrates may be assumed. In this study, we explored cadaveric bone marrow as an alternative source of HSC for HSCT, using a mouse experimental model. In addition, the effect of *in vitro* metabolic inhibition and short-term *in vitro* storage (1 - 4 days) on functional properties of mouse HSC was investigated.

Methods: C57Bl/6 mice (wild-type or p53^{-/-}) were used in the experiments. To explore cadaveric HSC, bone marrow (BM) was left in intact femurs at 37°C, 20°C and 4°C under the conditions of ischemia. The bone marrow cells were harvested after defined time periods ranging 0 – 48 hours. For metabolic inhibition, the electron transport chain inhibitor potassium cyanide (KCN) and inhibitor of glycolysis 2-deoxy-D-glucose (2-DG) were used *in vitro*. To determine the impact of ischemia, metabolic inhibition, or *in vitro* storage on transplantability of HSC, the competitive repopulation assay using Ly5.1/Ly5.2 congenic model was used. Besides, live/apoptotic/dead cells ratio in BM subpopulations was measured, and frequencies of LSK SLAM (Lin^{low}Sca-1^c-Kit⁺CD150⁺CD48⁻) and LSK SP (side population) cells (highly enriched in HSC) were detected by flow cytometry.

Results: Chimerism arisen from the transplanted cadaveric donor bone marrow cells (followed up in recipient's peripheral blood (PB) for 6 months after transplantation) revealed that the long-term repopulating ability of HSC is fully preserved for at least 2 hours, 6 hours and 12 hours of ischemia at 37°C, 20°C and 4°C, respectively. Number of LSK SLAM and LSK SP cells decreased in compliance with the transplantability. Furthermore, the LSK subpopulation (enriched in HSC) contained less apoptotic and dead cells as compared to more differentiated subpopulations of the BM exposed to ischemia at 37°C. Cadaveric p53^{-/-} HSC did not differ from wild-type HSC in their survival or transplantability. The incubations with inhibitors showed the LSK cells as more resistant to KCN in comparison with other populations tested; however the 2-DG inhibition was lethal for all bone marrow cells. Two-day or four-day *in vitro* storage of bone marrow cells at 37°C or 4°C, respectively, did not influence the transplantability of HSC.

Conclusions: Our findings suggest that HSC survive in cadaveric bone marrow for considerable time, without loss of their repopulating ability. They represent the most resistant population of BM to oxygen and metabolic starvation. The HSC survival is significantly extended during *in vitro* storage even without growth factors, thus bone marrow cells should be harvested as soon as possible.

1 ÚVOD

Transplantace krvetvorných kmenových buněk je zavedenou terapeutickou metodou, která každoročně zachrání život mnoha lidí po celém světě. Během transplantační procedury je pacientovi po (sub)myeloablaci intravenózně podán štěp krvetvorných kmenových buněk (HSC z angl. hematopoietic stem cells). Pomocí cytokinového gradientu, produkovaného stromálními buňkami kostní dřeně (BM z angl. bone marrow), HSC směřují do BM (tzv. „homing“), kde se následně usadí a obnoví krvetvorbu příjemce [1].

Aby byla transplantace úspěšná, musí být pro pacienta nalezen vhodný dárcce [2]. Nejčastěji se jím stane někdo z příbuzných, příp. dobrovolník z registru dárců kostní dřeně [3]. Občas však obě tyto možnosti selžou a vyvstává otázka, zda existuje ještě jiná možnost odběru HSC, např. od kadaverózních dárců orgánů. Protože HSC jsou buňky s omezenou metabolickou a proliferační aktivitou [4], lze předpokládat jejich odolnost k nedostatku kyslíku a metabolických substrátů, který nastává v důsledku zástavy krevního oběhu.

Krvetvorné kmenové buňky zajišťují v průběhu celého života tvorbu všech typů krvinek, do kterých diferencují na základě stimulace růstovými faktory, interleukiny a cytokiny [5]. HSC se nacházejí ve speciálním mikroprostředí kostní dřeně, označovaném termínem „niche“. V literatuře byly popsány dva typy „nichí“, endostální (osteoblastický) a endoteliální (vaskulární) [6]. Endostální „niche“ jsou tvořeny osteoblasty, fibroblasty a dalšími stromálními buňkami. Nacházejí se v hypoxických oblastech kostní dřeně, blízko povrchu kosti. Uvnitř těchto „nichí“ se nalézají primitivní krvetvorné kmenové buňky, většinou v G0 fázi buněčného cyklu. Endoteliální „niche“ jsou tvořeny především CAR buňkami (CXCL12 abundant reticular cells – retikulární buňky produkující cytokin CXCL12) a nacházejí se v blízkosti sinusoid. Obsahují aktivované HSC, které se dělí a produkují dceřiné HSC nebo krvetvorné progenitory. Multipotentní progenitorové buňky, na rozdíl od HSC, nemají schopnost sebeobnovy, stále však mohou diferencovat do všech typů krevních buněk. Jejich diferenciací vznikají progenitory determinované pro určité krevní linie, prekursorů krevních buněk a nakonec zralé krvinky, které vstupují do cirkulace [7-10].

V „nichí“ probíhají regulační mechanismy, které kontrolují proliferaci, sebeobnovu a diferenciaci HSC, a udržují tak jejich stálou zásobu v kostní dřeni. Za fyziologických podmínek se asi 75 % HSC nachází v G0 fázi buněčného cyklu [4]. Tato jejich unikátní vlastnost se nazývá „quiescence“ (z angl. quiet – klidný). Na regulaci „quiescence“ se podílí řada proteinů účastnících se vnější a vnitřní buněčné signalizace [11-14], mimo jiné i

nádorový supresor p53 [15, 16]. Ačkoli p53 hraje důležitou úlohu v apoptóze, jeho nízká exprese v HSC pomáhá udržet primitivní charakter těchto buněk. Kromě proteinových regulátorů se na udržování „quiescence“ podílí také hypoxický charakter „niche“ pro HSC.

Kvůli hypoxickému mikroprostředí se HSC odlišují od diferencovaných buněk také svým metabolismem. Mají nižší mitochondriální potenciál a k získávání energie používají spíše anaerobní glykolýzu než aerobní respiraci [17]. Přepnutí na anaerobní metabolismus jim umožňuje hypoxií indukovaný faktor 1 (HIF-1). Jedná se o transkripční faktor, který se za hypoxických podmínek váže na DNA a zvyšuje expresi cílových genů, včetně transportérů glukosy a glykolytických enzymů [18-20].

Navzdory popsaným vlastnostem krvetvorných kmenových buněk, HSC pro transplantace jsou odebírány výhradně od žijících dárců. Koncem devadesátých let bylo publikováno pouze několik prací, zabývajících se výzkumem HSC odebraných kadaverózním dárcům pomocí *in vitro* studií [21, 22]. Bylo např. zjištěno, že buňky odebrané z kadaverózní kostní dřevě mohou být skladovány až týden aniž by u nich docházelo k apoptóze a že v průběhu tří denního skladování nedochází k ovlivnění CD34-pozitivní frakce, bohaté na lidské krvetvorné kmenové a progenitorové buňky. Podle Soderdahl et al. [21] by tyto buňky mohly mít vysokou repopulační schopnost. Funkční vlastnosti krvetvorných kmenových buněk ovlivněných ischemií však dosud nebyly prostudovány *in vivo*.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem předkládané práce bylo pomocí modelového organismu myši domácí (*Mus musculus*) prověřit možnost odběru krvetvorných kmenových buněk (HSC) z kadaverózní kostní dřeně, jako alternativního zdroje buněk pro transplantaci. Pro řešení uvedené problematiky byly stanoveny následující dílčí cíle:

- Vyšetřit repopulační schopnost HSC vystavených po určitou dobu ischemii při 37°C, 20°C a 4°C a transplantovaných subletálně ozářeným kongenním příjemcům.
- Vyšetřit schopnost kompetitivní repopulace HSC vystavených po určitou dobu ischemii při 37°C, 20°C a 4°C a transplantovaných spolu s buňkami čerstvě odebrané kostní dřeně v poměru 1:1 letálně ozářeným příjemcům.
- Stanovit zastoupení HSC v kostní dřeni vystavené po určitou dobu ischemii při 37°C, 20°C a 4°C. Porovnat apoptózu a nekrózu v populaci kostní dřeně bohaté na kmenové buňky ($\text{Lin}^{\text{low}}\text{Sca-1}^+\text{c-Kit}^+$) a v diferencovaných populacích kostní dřeně.
- Otestovat vliv ischemie při 37°C na transplantabilitu HSC myší s cílenou delecí nádorového supresoru *p53*, na zastoupení *p53*^{-/-} HSC a na apoptózu a nekrózu v kostní dřeni.
- Zhodnotit účinek inhibitorů metabolismu kyanidu draselného a 2-deoxy-D-glukosy *in vitro* na viabilitu populací kostní dřeně a na repopulační schopnost a přežívání HSC.
- Ověřit transplantabilitu HSC po krátkodobém (několikadenním) skladování *in vitro* v suspenzi bez specifických krvetvorných růstových faktorů.

3 MATERIÁL A METODY

Pokusná zvířata

- Myši kmene C57Bl/6 Ly5.1 a Ly5.2 a C57Bl/6J *Trp53^{tm1Tyj}* ($p53^{-/-}$) byly chovány v Centru pro experimentální biomodely 1. LF UK v konvenčním klecovém chovu (dvanáctihodinový cirkadiální cyklus, strava ad libitum). V experimentech byly použity myši stáří 2 až 6 měsíců a hmotnosti 20 až 25 g. Experimenty byly schváleny Odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty 1. LF UK a prováděny v souladu s národními a mezinárodními stanovami pro zacházení s laboratorními zvířaty.

Odběr buněk kostní dřeně

- Myši dárce byli usmrceni cervikální dislokací; z kadaverů byly odebrány femury, které byly očištěny od svalů.
- Buňky kostní dřeně (BMC z angl. bone marrow cells) byly vypláchnuty stříkačkou s jehlou tloušťky 21G do roztoku PBS* s 0.5 % (w/v) hovězím sérovým albuminem (BSA, Carl Roth GmbH, Německo) (dále jen PBS/BSA) a drženy na ledu. Opakovaným proplachováním pomocí jehly tloušťky 25G byla vytvořena jednobuněčná suspenze. Počet jaderných buněk byl stanoven pomocí automatizovaného počítáče buněk Cellometer AUTO T4 (Nexcelom Bioscience, USA).

Příprava kadaverózní kostní dřeně

- Od C57Bl/6 Ly5.1 dárců resp. C57Bl/6J $p53^{-/-}$ dárců byly odebrány neporušené femury. Femury od Ly5.1 dárců byly po dobu 0 až 48 hod ponechány v temperovaném PBS/BSA při 37°C, 20°C a 4°C. Femury od $p53^{-/-}$ dárců byly ponechány v předehřátém PBS/BSA 0 až 6 hod při 37°C.

Metabolické inhibice

- BMC odebrané z jednoho femuru (přibližně 2×10^7 buněk) C57Bl/6 Ly5.1 myši byly po dobu 0, 2 a 20 hod inkubovány *in vitro* v DMEM** (Sigma-Aldrich, USA) s 1 mM KCN (Sigma-Aldrich, USA), 10 mM KCN, 50 mM 2-deoxy-D-glukosou (2-DG, Sigma-Aldrich, USA), 50 mM D-glukosou (Lachema, ČR) nebo s kombinací 10 mM KCN a 50 mM 2-DG. Jako kontrola byla použita inkubace v DMEM bez přidání chemikálií.

Skladování buněk kostní dřeně *in vitro*

- Buňky kostní dřeně odebrané z femurů C57Bl/6 Ly5.1 myši byly skladovány v IMDM*** (Lonza Biologics, USA) s 10 % fetálním hovězím sérem (FBS, Sigma-Aldrich, USA) při koncentraci 1×10^7 buněk/ml média po dobu 1 a 2 dny při teplotě 37°C a 2 a 4 dny při teplotě 4°C.

Transplantace kostní dřeně

- V experimentech byl použit kongenní transplantační model CD45.1/CD45.2 (Ly5.1/Ly5.2) umožňující snadné rozlišení buněk dárce a příjemce na základě CD45 antigenu.
- Čerstvé nebo kadaverózní buňky kostní dřeně byly transplantovány subletálně (6 Gy) nebo letálně (9 Gy) ozářeným (^{60}Co) kongenním příjemcům. Subletálně ozářeným

* phosphate buffered saline – fosfátový pufr

** Dulbecco's Modified Eagle Medium

*** Iscove's Modified Dulbecco's Medium

příjemcům byl podán transplantát o velikosti odpovídající polovině femuru, tedy přibližně 1×10^7 buněk. Letálně ozářeným příjemcům byla transplantována směs kadaverózních kongenních buněk Ly5.1 a čerstvých syngenních buněk Ly5.2 (1:1), polovina femuru od každého dárce. Předpokládaný chimerismus byl v tomto případě 50 % u kontrolní skupiny. Transplantát byl podán intravenózně v 0.5 ml PBS/BSA. Ve skupinách byli min. 4 příjemci.

- Čerstvé nebo kadaverózní buňky p53^{-/-} kostní dřeně a buňky po metabolické inhibici nebo skladované *in vitro* byly transplantovány subletálně ozářeným příjemcům dle výše uvedeného postupu.
- Transplantabilita dárcovských buněk byla určována z chimerismu v periferní krvi příjemců po dobu 6 měsíců od transplantace, který odráží přihojení buněk zajišťujících krátkodobou repopulaci (STRC – 2 týdny a 1 měsíc po transplantaci) a buněk zajišťujících dlouhodobou repopulaci (LTRC – 3 až 6 měsíců po transplantaci). Vzorky krve byly barveny specifickými fluorescenčně značenými protilátkami anti-Ly5.2-FITC a anti-Ly5.1-PE (BioLegend, USA). Chimerismus (zastoupení buněk odvozených od dárcovského štetu) byl stanovován pomocí průtokové cytometrie (BD FACS Canto II, Becton-Dickinson, USA).

Detekce LSK SLAM a LSK SP buněk

- Četnost HSC v kostní dřeni byla stanovována jako zastoupení LSK SLAM (Lin^{low}Sca-1⁺c-Kit⁺CD150⁺CD48⁻) podle Kiela et al. [9] a LSK SP (side population, Hoechst 33342 negativní) podle Goodelové et al. [23].
- Přibližně 2×10^7 buněk bylo barveno vitálním barvivem Hoechst 33342 (Honeywell Riedel-de Haën, Germany) a následně specifickými fluorescenčně značenými protilátkami: lineage cocktail-biotin (Miltenyi Biotec, Germany), anti-Sca-1-APC, anti-c-Kit-APC-Cy7, anti-CD150-PE, anti-CD48-FITC, streptavidin-PE-Cy7 (BioLegend, USA).
- Obarvené buňky byly analyzovány pomocí průtokové cytometrie (BD FACS Aria IIu, Becton-Dickinson, USA).

Analýza apoptózy a nekrózy v subpopulacích kostní dřeně

- Poměr živých, apoptotických a mrtvých buněk byl měřen v plné kostní dřeni a v populacích kostní dřeně: LSK (populace bohatá na kmenové buňky), B-lymfopoetické (B220⁺), erythropoetické (Ter119⁺) a granulo-monopoetické (Gr-1⁺Mac-1⁺).
- Přibližně 2×10^6 buněk bylo barveno anti-lineage-FITC, anti-Sca-1-APC a anti-c-Kit-APC-Cy7 protilátkami a 5×10^5 buněk anti-B220-Alexa700, anti-Ter119-FITC, anti-Gr-1-APC a anti-Mac-1-APC protilátkami (všechny od BioLegend, USA).
- Apoptotické a mrtvé buňky byly detekovány pomocí DNA vázajících barviv Hoechst 33342 a propidiumiodidu, podle Ormeroda et al. [24]. Buňky byly analyzovány pomocí BD FACS Aria IIu.

Statistická analýza

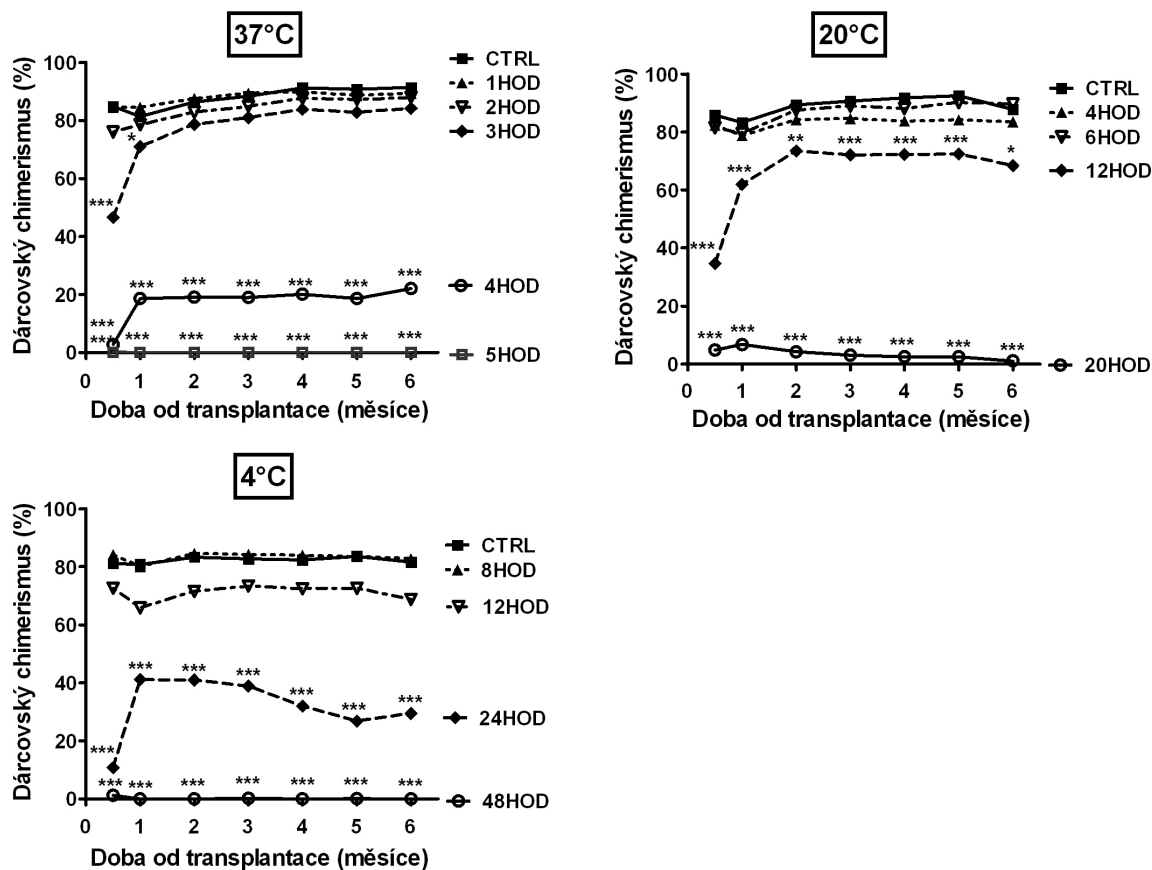
- Získaná data byla statisticky zpracována pomocí programu GraphPad Prism, verze 5.00 pro Windows (GraphPad Software, USA). Data jsou prezentována jako průměrné hodnoty v XY grafech a jako průměr \pm SEM ve sloupcových grafech. K porovnání skupin vůči kontrole byla použita jednocestná ANOVA s Dunettovým post-testem. Pro vzájemné porovnání dvou skupin byl použit Studentův dvousměrný t-test. Za signifikantní byla stanovena *P*-value < 0.05 .

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky předkládané dizertační práce je možno rozčlenit do tří částí. První část je zaměřena na analýzu krvetvorných kmenových buněk, které byly po určitou dobu vystaveny ischemii při teplotě 37°C, 20°C nebo 4°C, s důrazem na transplantabilitu těchto buněk. Ve druhé části je popsán vliv metabolických inhibitorů KCN a 2-deoxy-D-glukosy *in vitro* na buňky kostní dřene, včetně krvetvorných kmenových buněk. Třetí část ukazuje transplantabilitu krvetvorných kmenových buněk krátkodobě skladovaných *in vitro*.

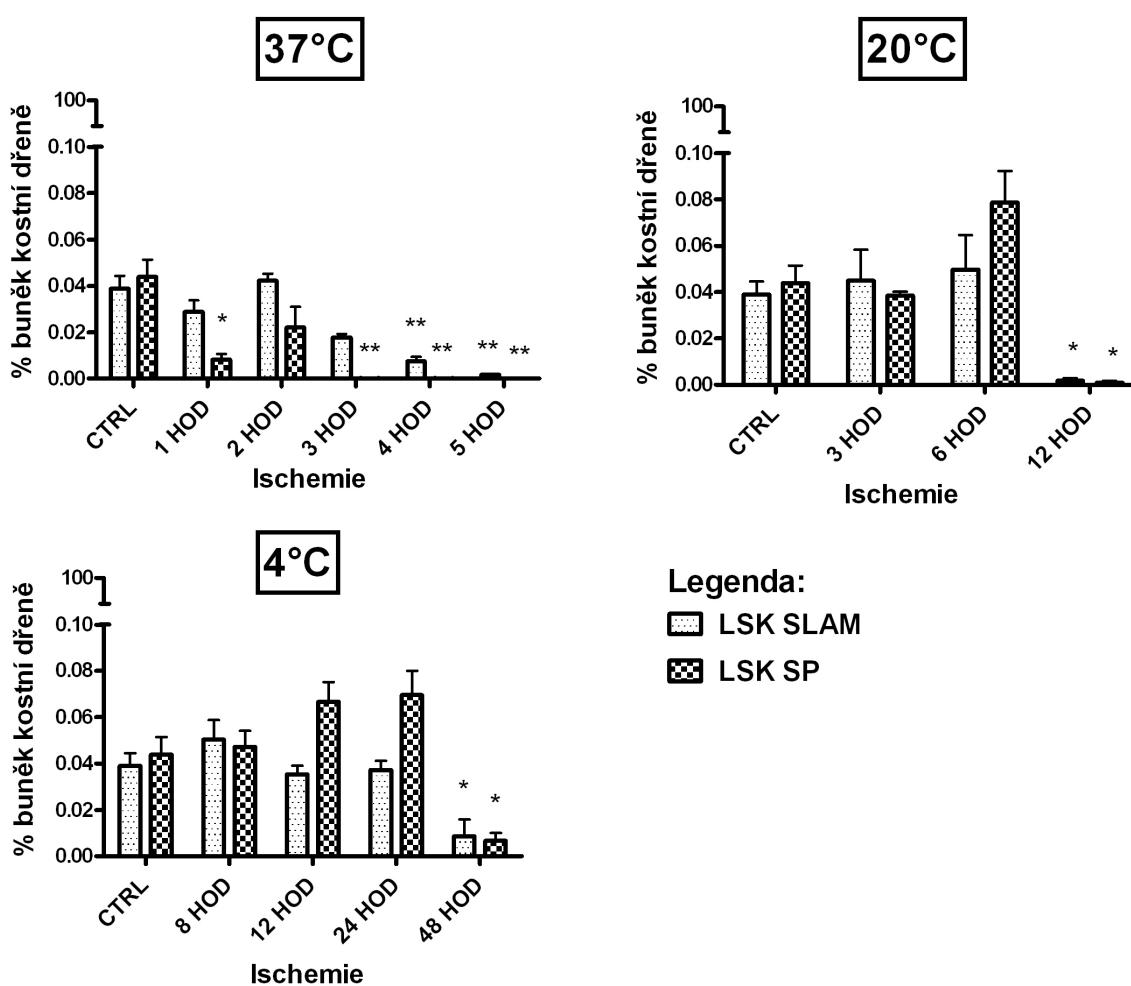
4.1 Vliv ischemie na buňky kostní dřene a na krvetvorné kmenové buňky

Krvetvorné kmenové buňky by díky svému anaerobnímu metabolismu a omezené proliferaci [4, 17] měly být odolné vůči ischemii – kombinovanému nedostatku kyslíku a metabolických substrátů jako následku zástavy krevního oběhu. V této části práce byl při různých teplotách studován vliv ischemie na fenotyp a funkci buněk kostní dřene a krvetvorných kmenových buněk. Ischemie byla navozena v intaktních femurech, vyjmutých z těl *post mortem*. Získané výsledky ukazují, že myší krvetvorné kmenové buňky přežívají v ischemii po poměrně významnou dobu, a to i při 37°C. Jak je zřejmé z Obr. 1 (str. 10), repopulační schopnost krátkodobě i dlouhodobě repopulujících buněk (STRC a LTRC) vystavených ischemii při 37°C a odebraných 2 hodiny *post mortem* byla plně zachována. U LTRC zůstala transplantabilita zachována i po 3 hodinách ischemie při 37°C, zatímco u STRC došlo k jejímu snížení. Tento rozdíl je možné vysvětlit vyšší proliferací aktivitou progenitorů (STRC), která mohla způsobit jejich vyšší citlivost k ischemii v porovnání s méně proliferujícími kmenovými buňkami (LTRC). Při 20°C a 4°C byla doba, kdy si krvetvorné kmenové buňky uchovaly svou repopulační schopnost, výrazně prodloužena (Obr. 1, str. 10). Podobné výsledky, demonstrující odolnost HSC vůči ischemii, byly získány také v případě kompetitivní transplantace letálně ozářeným příjemcům (data neuvedena).



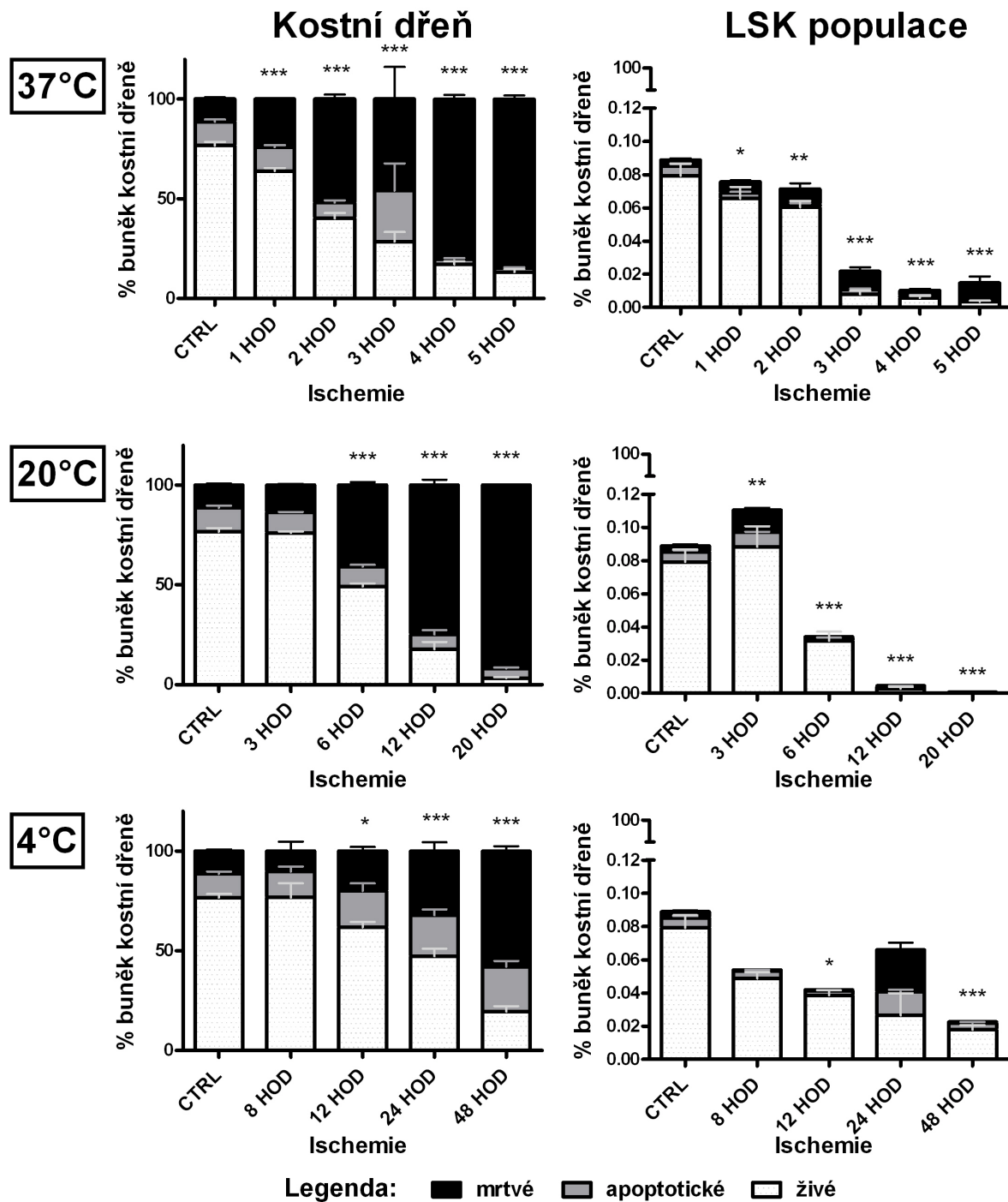
Obrázek 1 – Přihojení ischemických krvetvorných kmenových buněk subletálně ozářeným příjemcům. Buňky kostní dřeně dárce (Ly5.1) byly vystaveny ischemii po dobu až 5 hod při 37°C, až 20 hod při 20°C a až 48 hod při 4°C. Polovina femuru ischemických dárcovských buněk byla transplantována subletálně (6 Gy) ozářeným příjemcům Ly5.2 (n=4-10). Přihojení dárcovských buněk je prezentováno jako chimerismus Ly5.1+ buněk (průměr) stanovený v periferní krvi Ly5.2 příjemců. Statistická významnost vůči kontrole (při jednotlivých odběrech): *** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Uvedené výsledky jsou v souladu se zastoupením LSK SLAM a LSK SP buněk, reprezentujících krvetvorné kmenové buňky v kostní dřeni (Obr. 2). Počet LSK SLAM buněk zůstal nezměněný stejně dlouhou dobu, po jakou byla udržena i transplantabilita dlouhodobě repopulujících buněk. Stejný výsledek byl získán i u LSK SP buněk, s výjimkou ischemie při 37°C, při které počet LSK SP buněk prudce poklesl již po 1 hodině (Obr. 2). Tento pokles je pravděpodobně způsoben nedostatkem energie pro ATP-dependentní ABCG2 transportér, který z SP buněk vylučuje Hoechst 33342 [25]. SP populace je definována jako Hoechst 33342 negativní, vyřazení ABCG2 transportéru tedy vede ke ztrátě SP fenotypu, zatímco funkční vlastnosti kmenových buněk zůstávají zachovány.



Obrázek 2 – Zastoupení LSK SLAM a LSK SP buněk v ischemické kostní dřeni. LSK SLAM a LSK SP buňky byly detekovány v kostní dřeni vystavené ischemii po dobu až 5 hod při 37°C, až 20 hod při 20°C a až 48 hod při 4°C. Data jsou prezentována jako průměr ± SEM (n=3). Statistická významnost vůči kontrole: *** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Analýza apoptózy a nekrózy v kadaverózní kostní dřeni ukázala nižší frakci apoptotických a mrtvých buněk v LSK populaci v porovnání s plnou kostní dření. Tento rozdíl se zřetelně projevuje u všech testovaných teplot, dokud je LSK fenotyp detekovatelný (Obr. 3).



Obrázek 3 – Viabilita buněk kostní dřene a LSK buněk v průběhu ischemie. Poměr živých, apoptotických a mrtvých buněk v plné kostní dřeni a v LSK populaci byl stanoven v kostní dřeni vystavené ischemii po dobu až 5 hod při 37°C, až 20 hod při 20°C a až 48 hod při 4°C. Data jsou prezentována jako průměr ± SEM (n=3). Statistická významnost vůči kontrole (pro frakci živých buněk): *** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

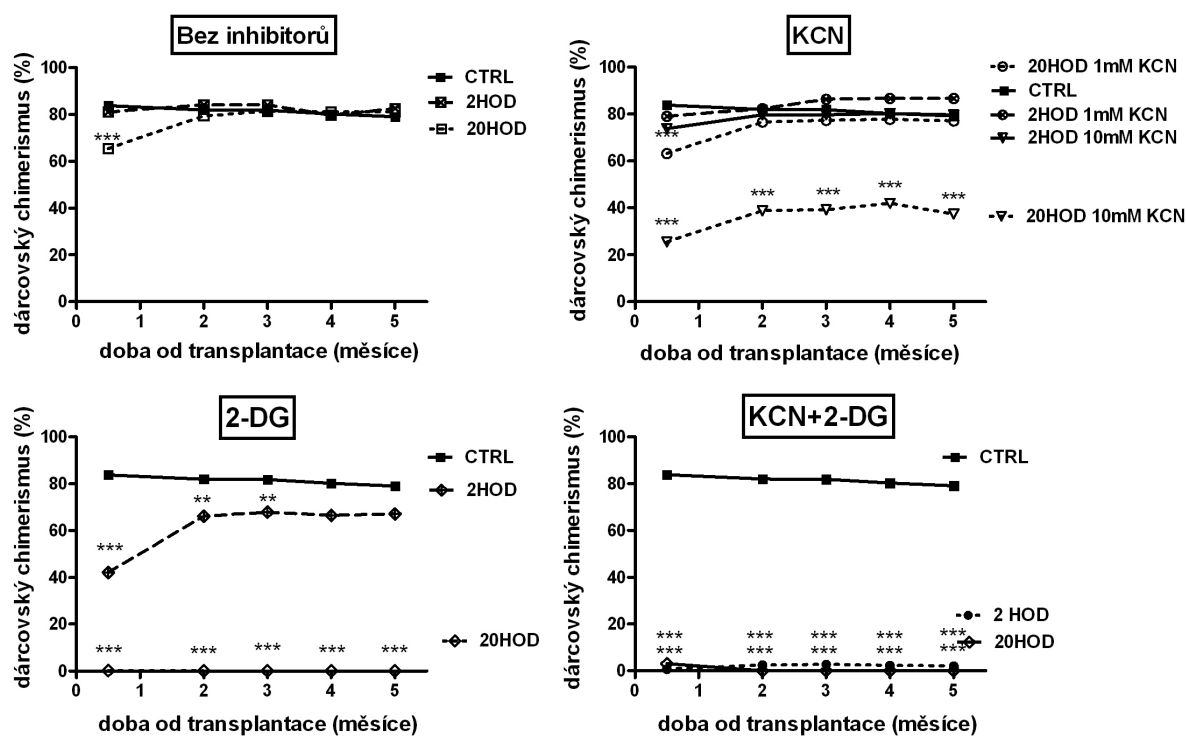
Při 37°C přežívaly LSK buňky lépe i v porovnání s diferencovanými populacemi kostní dřeně: B-lymfopoetickou, eryтропоetickou a granulo-monopoetickou (data neuvedena). Protože více než 50 % prekursorů krevních buněk se aktivně dělí [26], zatímco proliferace krvetvorných kmenových buněk a progenitorů obsažených v LSK populaci je nízká, získaný výsledek opět odráží proliferační aktivitu buněk.

Další výsledky byly získány studiem kadaverózní kostní dřeně odebrané z C57Bl/6J p53^{-/-} myši. Nádorový supresor p53 hraje důležitou roli v regulaci apoptózy [27], zároveň však reguluje i „quiescence“ krvetvorných kmenových buněk [15, 16]. Na základě těchto poznatků jsme očekávali u populací kostní dřeně změny v apoptotické frakci a/nebo zvýšenou citlivost p53^{-/-} krvetvorných kmenových buněk k ischemii. Mezi p53^{-/-} kostní dření a „wild-type“ kostní dření však nebyly pozorovány žádné rozdíly (data neuvedena). Přítomnost apoptotické frakce v p53^{-/-} kostní dření po ischemii poukazuje na indukci apoptotické dráhy nezávislé na p53. Co se týká transplantability krvetvorných kmenových buněk, v reakci na ischemii se mezi p53^{-/-} HSC a „wild-type“ HSC neprojevil žádný rozdíl, a to ani v kontrolních skupinách (data neuvedena). Tyto výsledky poukazují na přítomnost primitivních kmenových buněk v kostní dření p53^{-/-} myši, schopných dlouhodobého přijetí a odolných k nedostatku kyslíku a energie.

4.2 Inhibice metabolismu buněk kostní dřeně *in vitro*

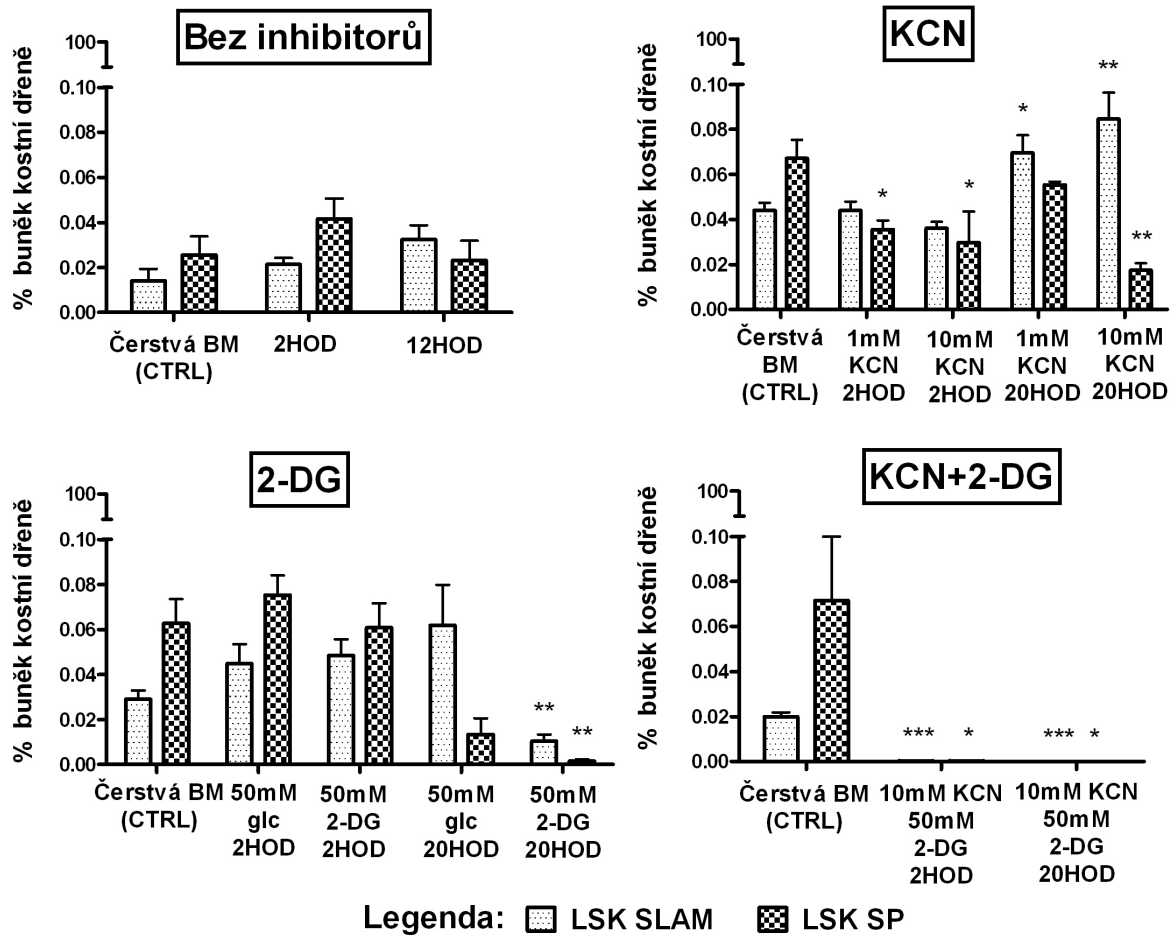
Za účelem ověření odolnosti krvetvorných kmenových buněk k nedostatku energie *in vitro* byly buňky kostní dřeně inkubovány po dobu 0, 2 a 20 hod v přítomnosti metabolických inhibitorů KCN (1 mM a 10 mM), 2-deoxy-D-glukosy (2-DG, 50 mM) a 10 mM KCN spolu s 50 mM 2-DG. Po inkubacích byly buňky použity pro experimentální transplantaci a fenotypovou analýzu.

Repopulační schopnost krvetvorných kmenových buněk transplantovaných subletálně ozářeným příjemcům byla v případě kyanidu snížena až po dvacetihodinové inhibici 10 mM KCN (Obr. 4). V případě inhibice 2-deoxy-D-glukosou došlo ke snížení již po 2 hodinách a po 20 hodinách se dárcovské buňky vůbec nepřihojily. Kombinace obou inhibitorů měla na transplantabilitu fatální vliv.



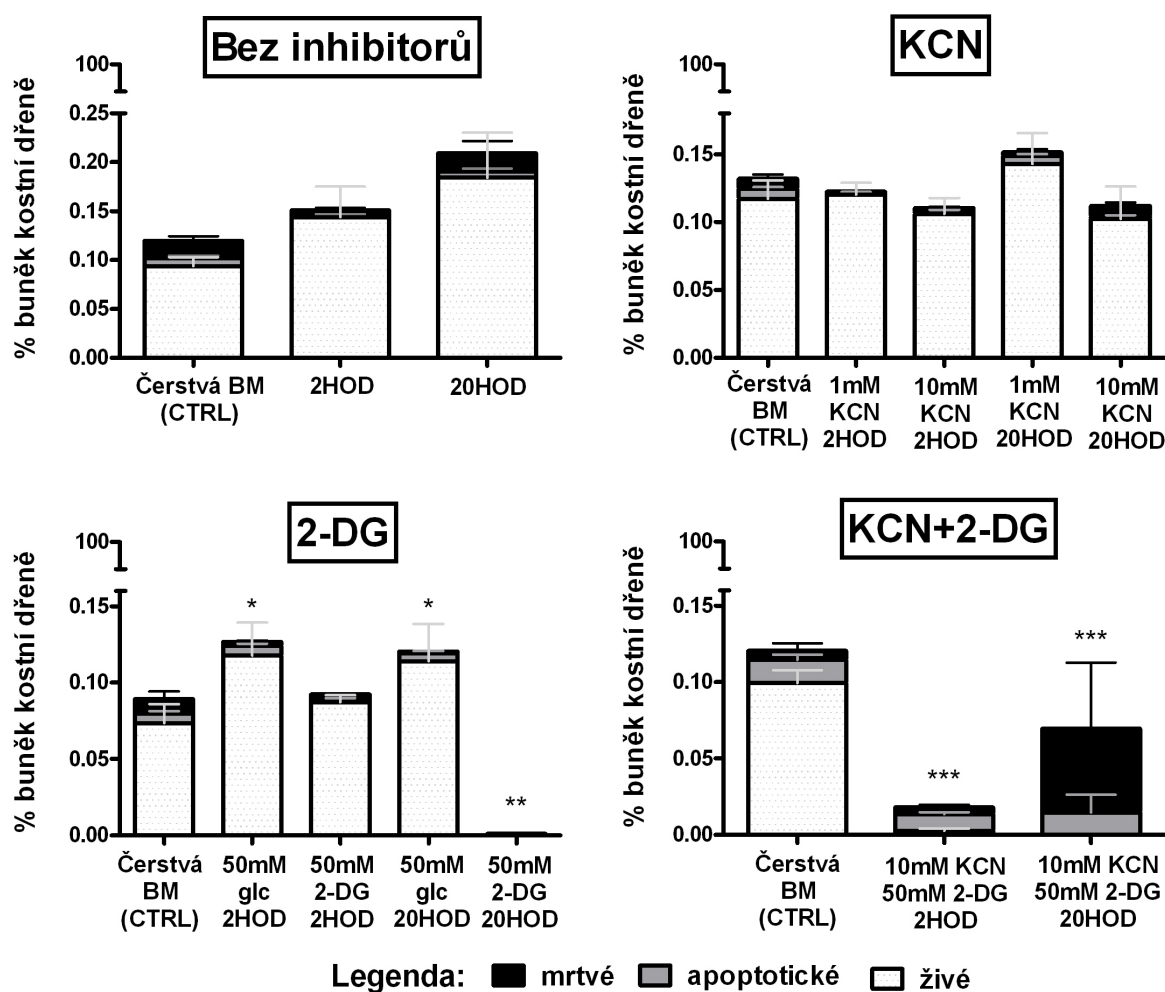
Obrázek 4 – Přihojení krvetvorných kmenových buněk vystavených inhibitorům metabolismu subletálně ozářeným příjemcům. Dárcovské buňky (Ly5.1) byly po dobu 0 (CTRL), 2 nebo 20 hod inkubovány v médiu bez inhibitorů, s 1 mM KCN, 10 mM KCN, 50 mM 2-deoxy-D-glukosou, nebo 10 mM KCN a 50 mM 2-deoxy-D-glukosou. Polovina femuru dárcovských buněk byla transplantována subletálně (6 Gy) ozářeným příjemcům Ly5.2 (n=4-14). Přihojení dárcovských buněk je prezentováno jako chimerismus Ly5.1+ buněk (průměr) stanovený v periferní krvi Ly5.2 příjemců. Statistická významnost vůči kontrole (při jednotlivých odběrech): *** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Zastoupení primitivních HSC (LSK SP a LSK SLAM) v kostní dřeni po metabolické inhibici také potvrdilo odolnost těchto buněk ke kyanidu (Obr. 5). Nárůst v LSK SLAM populaci po dvacetihodinové inhibici 10 mM KCN je způsoben jejich relativní odolností k inhibici v porovnání s diferencovanými buňkami kostní dřene, které se již rozpadly.



Obrázek 5 - Zastoupení LSK SLAM a LSK SP buněk v kostní dřeni (BM) vystavené inhibitorům metabolismu. LSK SLAM a LSK SP buňky byly detekovány v kostní dřeni inkubované 0 (CTRL), 2 a 20 hod v médiu bez inhibitorů, s 1 mM KCN, 10 mM KCN, 50 mM 2-deoxy-D-glukosou, nebo 10 mM KCN a 50 mM 2-deoxy-D-glukosou. Inkubace s 50 mM D-glukosou (glc) představuje kontrolu pro 2-DG. Data jsou prezentována jako průměr ± SEM (n=3). Statistická významnost vůči kontrole: *** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Inhibice pomocí KCN i 2-DG způsobila pokles počtu jaderných buněk v kostní dřeni a nárůst frakcí apoptotických a mrtvých buněk v obou testovaných intervalech (data neuvedena). LSK populace (bohatá na HSC) se podle předpokladu projevila vyšší odolností k inhibici KCN než k inhibici 2-DG (Obr. 6). Zároveň se ukázala být odolnější vůči inhibici KCN než diferencované populace krevních prekurzorů, B-lymfopoetická a erythropoetická (data neuvedena), pravděpodobně díky anaerobnímu metabolismu krvetvorných kmenových buněk [17].

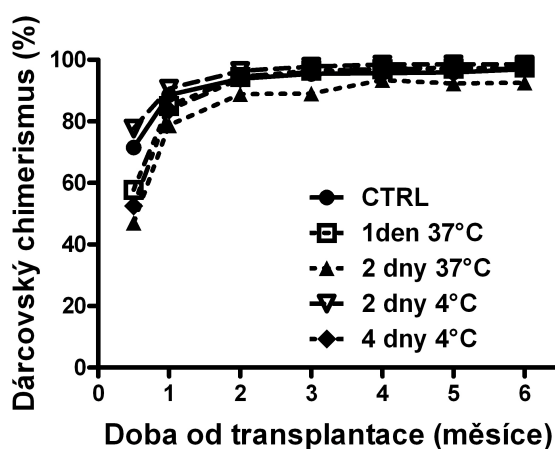


Obrázek 6 – Viabilita LSK populace v kostní dřeni vystavené inhibitorům metabolismu. Poměr živých, apoptotických a mrtvých buněk v LSK populaci byl stanoven v kostní dřeni inkubované 0 (CTRL), 2 a 20 hod v médiu bez inhibitorů, s 1 mM KCN, 10 mM KCN, 50 mM 2-deoxy-D-glukosou, nebo 10 mM KCN a 50 mM 2-deoxy-D-glukosou. Inkubace s 50 mM D-glukosou (glc) představuje kontrolu pro 2-DG. Data jsou prezentována jako průměr ± SEM (n=3). Statistická významnost vůči kontrole (pro frakci živých buněk): *** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Relativní odolnost krvetvorných kmenových buněk k inhibici KCN a jejich citlivost ke 2-deoxy-D-glukose znovu prokazuje anaerobní charakter jejich metabolismu.

4.3 Vliv skladování *in vitro* na transplantabilitu krvetvorných kmenových buněk

V poslední části práce jsme testovali odolnost krvetvorných kmenových buněk ke skladování *in vitro*. Buňky byly ponechány v médiu s FBS a bez specifických hematopoetických růstových faktorů. Ukázalo se, že HSC skladované takovýmto způsobem přežívají výrazně delší dobu, než když jsou ponechány *in situ* v podmínkách ischemie. Kompetitivní transplantace skladovaných buněk subletálně ozářeným příjemcům potvrdila zachování jejich repopulační schopnosti po dobu nejméně dvoudenního skladování při 37°C a čtyřdenního skladování při 4°C (Obr. 7).



Obrázek 7 – Přihojení krvetvorných kmenových buněk skladovaných *in vitro* subletálně ozářeným příjemcům. Dárcovské buňky (Ly5.1) byly skladovány po dobu 1 a 2 dnů při 37°C, a po dobu 2 a 4 dnů při 4°C *in vitro*. Polovina femuru dárcovských buněk byla transplantována subletálně (6 Gy) ozářeným příjemcům Ly5.2 (n=4-5). Přihojení dárcovských buněk je prezentováno jako chimerismus Ly5.1+ buněk (průměr) stanovený v periferní krvi Ly5.2 příjemců. Statistická významnost vůči kontrole (při jednotlivých odběrech): *** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

5 ZÁVĚR

- Repopulační schopnost krvetvorných kmenových buněk transplantovaných subletálně ozářeným příjemcům nebyla ovlivněna ischemií při 37°C po dobu nejméně 2 hodin. Při 20°C a 4°C se tato doba prodloužila na 6 hodin resp. 12 hodin.
- Krvetvorné kmenové buňky vystavené ischemii po dobu 2 hodin, 12 hodin resp. 24 hodin při 37°C, 20°C resp. 4°C rovnocenně kompetovaly s krvetvornými kmenovými buňkami čerstvé kostní dřeně.
- Zastoupení LSK SLAM a LSK SP buněk (frakce krvetvorných kmenových buněk) v kostní dřeni vystavené ischemii při 37°C, 20°C a 4°C zůstalo zachováno v souladu s udržením schopnosti repopulace. Měření viability buněčných populací kostní dřeně prokázalo výraznou odolnost LSK populace (bohatá na krvetvorné kmenové a progenitorové buňky) vůči ischemii při 37°C v porovnání s diferencovanými populacemi.
- Kostní dřeň myši s cílenou delecí regulátoru apoptózy a „quiescence“ proteinu p53 se repopulační schopností krvetvorných kmenových buněk ani zastoupením LSK SLAM a LSK SP populací nelišila od kostní dřeně „wild-type“ myši, a to ani v případě okamžitého odběru ani po vystavení ischemii při 37°C.
- Krvetvorné kmenové buňky byly relativně odolné vůči *in vitro* působení inhibitoru dýchacího řetězce kyanidu draselného, což poukazuje na důležitou úlohu jejich anaerobního metabolismu pro přežívání ischemie.
- Repopulační schopnost krvetvorných kmenových buněk skladovaných *in vitro* zůstala plně zachována po dobu dvoudenního a čtyřdenního skladování při 37°C resp. 4°C, a to i navzdory nepřítomnosti specifických krvetvorných růstových faktorů.

Na základě získaných poznatků bylo prokázáno, že **kadaverózní kostní dřeň** by bylo možné používat jako alternativní **zdroj krvetvorných kmenových buněk** pro transplantaci. S ohledem na prodlouženou dobu přežití kmenových buněk *in vitro* by však buňky měly být vždy odebrány co nejdříve.

1 INTRODUCTION

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a standard therapeutic procedure which saves every year many lives world-wide. During HSCT, hematopoietic stem cells (HSC) are administered intravenously to a (sub)myeloablated host. By means of cytokine gradient produced by the stromal cells of bone marrow (BM) HSC find a way to the BM, home to it and can restore damaged hematopoiesis [1].

For a successful HSCT, a suitable HLA-matched donor must be found [2]. Most often, the donor is a relative of the patient, or a volunteer from the bone marrow donor register [3]. However, sometimes these options fail and a question arises of whether an additional way of obtaining hematopoietic stem cells exists, e.g. by harvesting of bone marrow from cadaveric organ donors. Because HSC are known as quiescent cells with a restricted proliferative and metabolic activity [4], they should be resistant to the lack of oxygen and metabolic substrates which occurs as a consequence of circulatory arrest.

During the whole life-span, a population of primitive **hematopoietic stem cells** in bone marrow gives rise to any kind of mature blood cell, depending on stimulation by growth factors, interleukins and cytokines [5]. In BM, HSC are located in special microenvironment, called the “niche”. Two types of niches have been characterized: endosteal (osteoblastic) niche and endothelial (vascular) niche [6]. The endosteal niche is formed by osteoblasts, fibroblasts, and other stromal cells. It is found in the hypoxic regions of BM, near to the bone surface. Primitive HSC, mostly in G₀-phase of the cell cycle, reside in these niches. The endothelial niche is formed mainly by CAR cells (CXCL12 abundant reticular cells) and is located close to sinusoids. In endothelial niches, activated HSC divide and produce new HSC or hematopoietic progenitors. The multipotent progenitor cell is no more able to self-renew, but it can still give rise to all the blood cell lineages. Subsequent differentiation provides lineage-restricted progenitors, precursors, and finally mature blood cells, which enter the circulation [7-10].

Regulatory mechanisms, which occur in the niche, maintain a pool of HSC in BM by controlling their proliferation, self-renewal, and differentiation. Under physiological conditions, about 75 % of HSC are arrested in G₀-phase of the cell cycle. This feature of HSC is called hematopoietic stem cell quiescence. Studies on knock-out animals have revealed a number of both extrinsic and intrinsic quiescence regulators [11-14], among them the tumor suppressor p53 [15, 16]. Although p53 plays an important role in apoptosis, its lower

expression in HSC preserves their primitive character. Apart from protein regulators, the hypoxic character of hematopoietic stem cell niche also participates in regulation of quiescence.

Because of the hypoxic microenvironment, the metabolism of HSC differs from that of differentiated cells. HSC have been shown to have a low mitochondrial potential as well as low ATP levels, and instead of aerobic respiration utilize anaerobic glycolysis to gain energy [17]. The switch to anaerobic metabolism is enabled by hypoxia inducible factor 1 (HIF-1). HIF-1 is a transcription factor, which under hypoxic conditions binds to DNA and upregulates expression of target genes, including glucose transporters and glycolytic enzymes [18-20].

Despite the properties of HSC described above, the cells for HSCT are harvested exclusively from living voluntary donors. In the late nineties, several studies were published exploring the HSC harvested from cadaveric organ donors using *in vitro* assays [21, 22]. It was shown that cadaveric bone marrow cells can be stored up to seven days without an increase in apoptosis and that three-day storage does not affect the CD34-positive fraction (enriched in human hematopoietic stem and progenitor cells). Soderdahl et al. [21] assumed that these cells could be procured with a high degree of engraftment potential. However, an *in vivo* functional study of HSC which have been exposed to ischemia has not been performed to our knowledge.

2 AIMS OF THE STUDY

The aim of the presented study was to explore cadaveric bone marrow as an alternative source of hematopoietic stem cells (HSC) for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), using mouse as a model organism. In order to address this task, several specific objectives were established:

- To investigate the repopulating ability of HSC, which have been exposed to ischemia at 37°C, 20°C, and 4°C for defined time periods, after transplantation to sublethally irradiated congenic recipients.
- To investigate the competitive repopulating ability of HSC, which have been exposed to ischemia at 37°C, 20°C, and 4°C for defined time periods, after co-transplantation with fresh bone marrow cells (1:1 ratio) to lethally irradiated congenic recipients.
- To determine the frequencies of HSC in bone marrow exposed to ischemia at 37°C, 20°C, and 4°C for defined time periods. To compare apoptosis and necrosis in population enriched in HSC (Lin^{low}Sca-1⁺c-Kit⁺) with differentiated subpopulations of bone marrow.
- To explore the impact of ischemia at 37°C on repopulating ability of p53^{-/-} HSC, their frequencies, and apoptosis and necrosis in bone marrow.
- To examine an effect of metabolic inhibition by potassium cyanide and 2-deoxy-D-glucose *in vitro* on survival of bone marrow subpopulations, and on the repopulating ability and survival of HSC.
- To confirm the repopulating ability of hematopoietic stem cells after short-term *in vitro* storage (up to 4 days) in suspension without specific hematopoietic growth factors.

3 MATERIALS AND METHODS

Animals

- C57BL/6 wild-type mice Ly5.2 and Ly5.1 and C57Bl/6J *Trp53^{tm1Tyj}* (*p53^{-/-}*) mice (all bred in Center of Experimental Biomodels, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague) were maintained in a clean conventional animal facility with a light-dark cycle of 12 hours and fed ad libitum. Two- to 6-months-old mice, 20 – 25 g of body weight, were used in the experiments. All experiments were approved by the Laboratory Animal Care and Use Committee of the First Faculty of Medicine, Charles University, and were performed in accordance with national and international guidelines for laboratory animal care.

Harvesting of bone marrow cells

- Donor mice were sacrificed by cervical dislocation; femurs were removed from the body and rid of muscles.
- Bone marrow cells (BMC) were flushed with a syringe (21G needle) into PBS* containing 0.5 % bovine serum albumin (Carl Roth GmbH, Germany) solution (PBS/BSA further on) and kept on ice. A single cell suspension was prepared by repeated flushing through 25G needle. The number of nucleated cells was determined using the AUTO T4 Cellometer (Nexelom Bioscience, USA).

Cadaveric bone marrow

- Intact femurs were removed from C57Bl/6 Ly5.1 wild-type donors or from C57Bl/6 *p53^{-/-}* donors. Femurs from wild-type mice were kept in preheated/precooled PBS at 37°C, 20°C and 4°C, respectively, for various time periods up to 48 hours. Femurs from *p53^{-/-}* donors were kept in preheated PBS at 37°C up to 6 hours.

Metabolic inhibition

- BMC harvested from 1 femur (approximately 2×10^7 cells) of C57Bl/6 Ly5.1 wild-type donors were incubated *in vitro* in DMEM** (Sigma-Aldrich, USA) with 1 mM KCN (Sigma-Aldrich, USA), 10 mM KCN, 50 mM 2-deoxy-D-glucose (2-DG, Sigma-Aldrich, USA), 50 mM glucose (Lachema, Czech Republic) or 10 mM KCN with 50 mM 2-DG for 2 hours and 20 hours at 37°C. Incubation in DMEM without drugs was used as a control.

In vitro storage of bone marrow cells

- BMC from the femurs of C57Bl/6 Ly5.1 donors were stored in IMDM*** (Lonza Biologics, USA) with 10 % fetal bovine serum (Sigma Aldrich, USA) at a concentration of 1×10^7 cells/ml. Cells were maintained in the medium for 1 and 2 days at 37°C, or for 2 and 4 days at 4°C.

Bone marrow transplantation

- CD45.1/CD45.2 (Ly5.1/Ly5.2) congenic mouse model which enables to distinguish donor-derived cells from recipient's cells was used in the experiments.
- Fresh or cadaveric BMC were transplanted to sublethally (6 Gy) or lethally (9 Gy) irradiated (^{60}Co) congenic recipient mice. Sublethally irradiated recipients were

* phosphate buffered saline

** Dulbecco's Modified Eagle Medium

*** Iscove's modified Dulbecco's medium

transplanted with BMC from half of the femur (approximately 1×10^7 cells). Lethally irradiated recipients were transplanted with a 1:1 ratio mixture of cadaveric congenic (Ly5.1) and fresh syngenic (Ly5.2) BMC from half of the femur of each donor. The expected chimerism was 50 % in this case. A single-cell suspension of bone marrow cells was administered intravenously through the retrobulbar plexus in volume of 0.5 ml PBS/BSA. At least four recipient mice were used per group.

- Fresh or cadaveric BMC from p53^{-/-} donors, and BMC after metabolic inhibition/*in vitro* storage were transplanted to sublethally irradiated congenic recipients, as described above.
- The engraftment of donor cells was determined from peripheral blood for 6 months after transplantation to distinguish the short-term repopulating cells (STRC – 2 weeks and 1 month after transplantation) and long-term repopulating cells (LTRC – 3 to 6 months after transplantation). Blood samples were stained with anti-Ly5.2-FITC and anti-Ly5.1-PE fluorochrome-conjugated antibodies (BioLegend, USA). Chimerism (percentage of donor-derived cells) was determined by flow cytometry (BD FACS Canto II, Becton-Dickinson, USA).

LSK SLAM and LSK SP cells determination

- Frequency of hematopoietic stem cells in bone marrow was determined as representation of LSK SLAM (Lin^{low}Sca-1⁺c-Kit⁺CD150⁺CD48⁻) cells according to Kiel et al. [9] and as LSK SP (side population, Hoechst 33342 negative) cells according to Goodell et al. [23].
- Approximately 2×10^7 cells were stained with Hoechst 33342 (Honeywell Riedel-de Haën, Germany) and with specific fluorochrome-conjugated antibodies: lineage-cocktail-biotin (Miltenyi Biotec, Germany), anti-Sca-1-APC, anti-c-Kit-APC-Cy7, anti-CD150-PE, anti-CD48-FITC, streptavidin-PE-Cy7 (BioLegend, USA).
- Stained cells were analyzed by flow cytometry (BD FACS Aria IIu equipped with blue, red and UV lasers, Becton-Dickinson, USA).

Analysis of apoptosis and necrosis in bone marrow subpopulations

- Ratio of live, apoptotic and dead cells was measured in whole bone marrow and in bone marrow subpopulations: LSK (enriched in HSC), B-lymphopoietic (B220⁺), erythropoietic (Ter119⁺) and granulo-monopoietic (Gr-1⁺Mac-1⁺).
- Approximately 2×10^6 cells were stained with anti-lineage-FITC, anti-Sca-1-APC and anti-c-Kit-APC-Cy7 antibodies. Approximately 5×10^5 cells were stained with anti-B220-Alexa700, anti-Ter119-FITC, anti-Gr-1-APC and anti-Mac-1-APC antibodies (all from BioLegend, USA).
- For detection of apoptotic and dead cells, Hoechst 33342 and propidium iodide were used, as according to Ormerod et al. [24]. Analysis was performed using BD FACS Aria IIu.

Statistical analysis

- Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, USA). Data are presented as the mean in XY graphs and as the mean \pm SEM in column graphs. One-way ANOVA using Dunnett's post test was used to compare each group to the controls. Student's two-tailed t-test was used for comparison of two groups to each other. *P*-values < 0.05 were considered statistically significant.

4 RESULTS AND DISCUSSION

This thesis is divided into three parts. The first part is focused on analysis of bone marrow cells exposed to ischemia at various temperatures (37°C, 20°C, 4°C), with special regard to the transplantability of hematopoietic stem cells. In the second part, the effect of metabolic inhibition by KCN and 2-deoxy-D-glucose *in vitro* on bone marrow cells including hematopoietic stem cells was determined. In the last part, transplantability of hematopoietic stem cells after short-term *in vitro* storage (up to 4 days) was explored.

4.1 Effect of ischemia on bone marrow cells and hematopoietic stem cells

Because of the anaerobic metabolism and proliferative quiescence [4, 17], hematopoietic stem cells should be resistant to ischemia (combined lack of oxygen and metabolic substrates as a consequence of circulatory arrest). In this part of the study, the influence of extended ischemia at various temperatures on the phenotype and on the functional characteristics of mouse bone marrow cells and HSC was investigated. Bone marrow ischemia was modeled in intact femurs after removal from the body. Our results demonstrate that mouse HSC survive ischemia for a considerable length of time, even when the temperature of the bone marrow is maintained at 37°C. As shown in Figure 1 (p. 25), the repopulating ability of both short- and long-term repopulating cells kept in femurs at 37°C and harvested 2 hours *post mortem* was fully preserved. LTRC maintained the transplantability also after 3 hours of ischemia at 37°C, whereas the engraftment of STRC declined. The difference could be explained by higher proliferation rate of progenitors as compared to HSC, which caused higher sensitivity to ischemia. At 20°C and 4°C, the period of ischemia which does not affect the transplantability of HSC was significantly extended (Figure 1, p. 25). Similar results were obtained also from competitive transplantation assay in lethally irradiated recipients (data not shown).

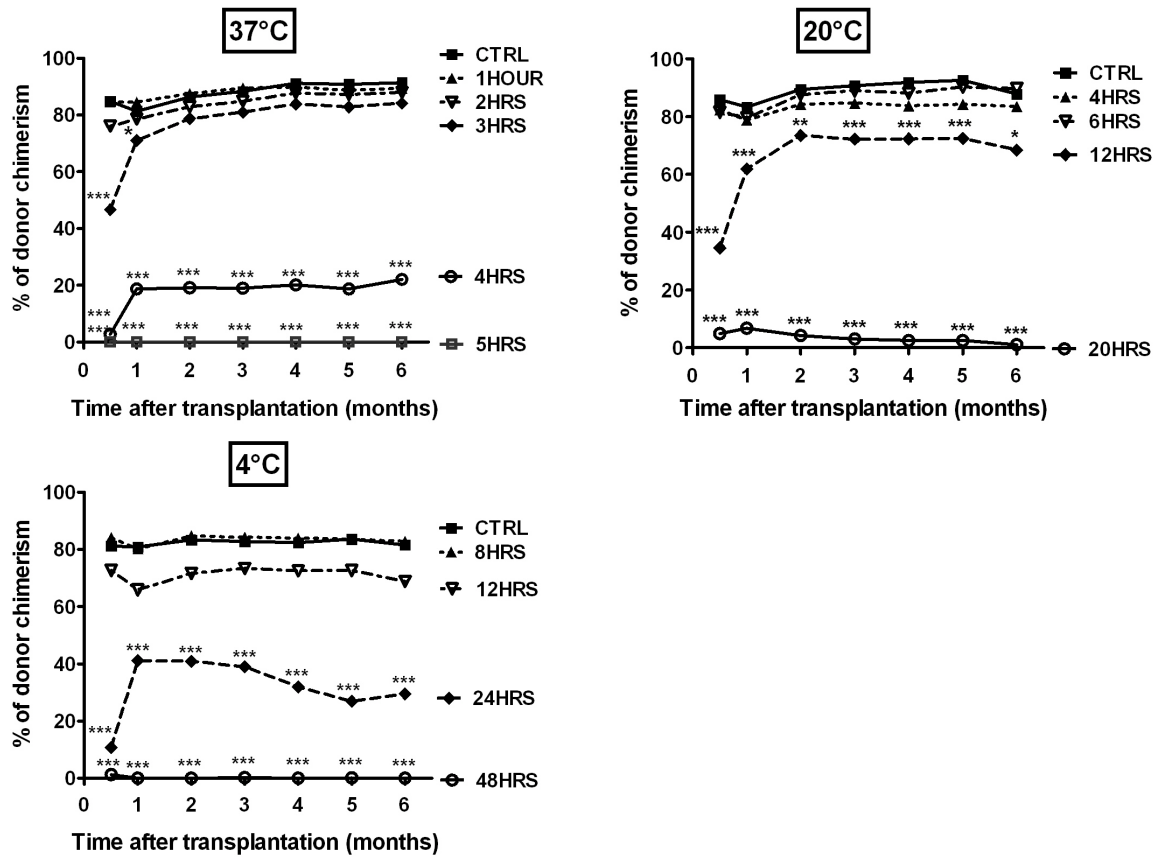


Figure 1 – Engraftment of ischemic HSC in sublethally irradiated recipients. Donor cells (Ly5.1) were exposed to ischemia for up to 5 hours at 37°C, for up to 20 hours at 20°C, or for up to 48 hours at 4°C. Ly5.2 recipients (n=4-10) were irradiated with 6 Gy and transplanted with half of the donor femur. Representation of donor-derived cells is presented as chimerism of Ly5.1+ cells (mean) detected in peripheral blood of Ly5.2 recipients. Significance of difference from the controls at individual time points: *** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

These results are in agreement with the cytometric determination of LSK SLAM and LSK SP cell numbers, which represent fractions of hematopoietic stem cells (Figure 2). The percentage of LSK SLAM cells was not significantly decreased in cadaveric BM as long as the transplantability was maintained. This was also true of LSK SP cells, except for at 37°C, when the number of LSK SP decreased only after 1 hour of ischemia (Figure 2). The decline is probably due to the lack of energy for the ATP-dependent ABCG2 transporter, which effluxes Hoechst 33342 from SP cells [25]. As a consequence, SP phenotype (Hoechst 33342 negative) was lost, whereas the functional properties of HSC were maintained for a prolonged period of time.

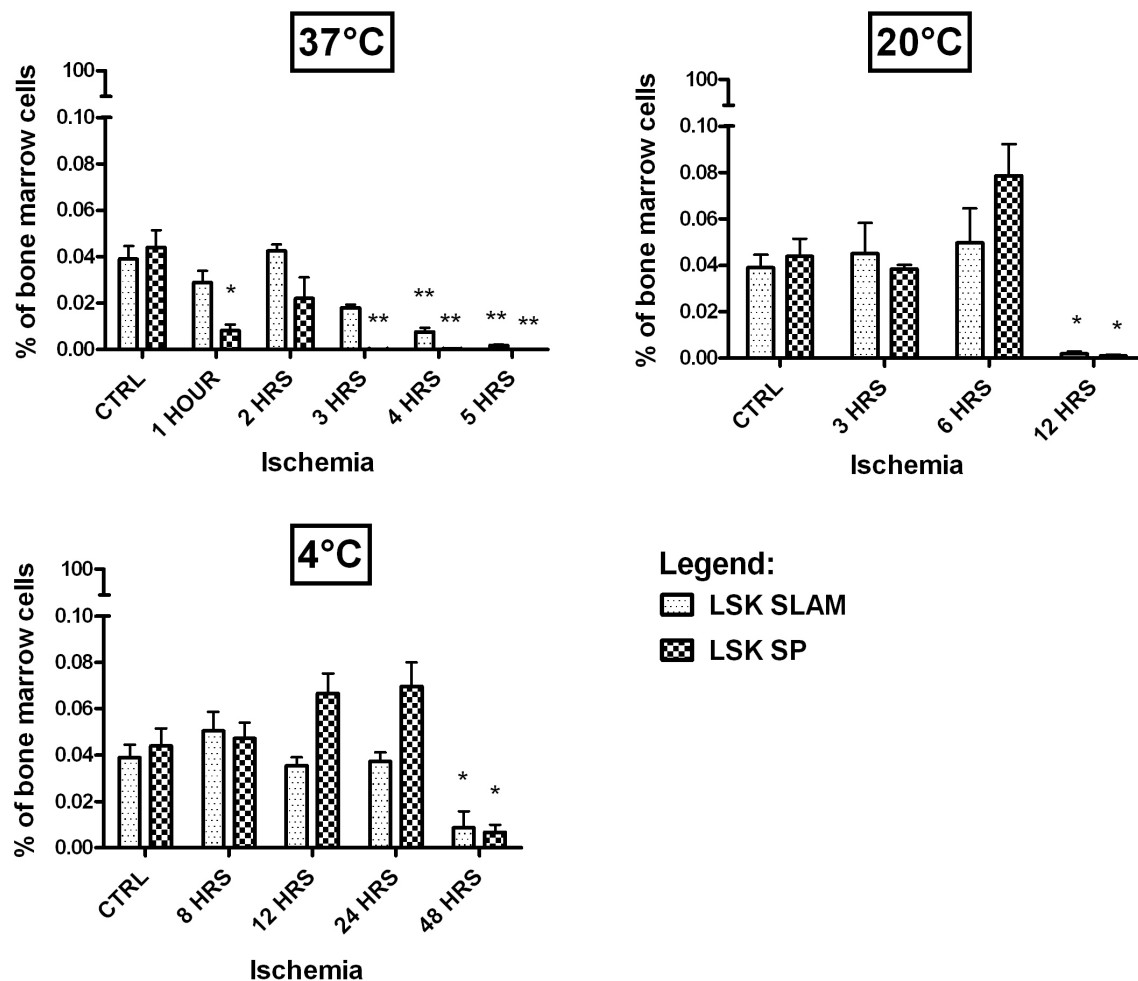


Figure 2 – Representation of LSK SLAM and LSK SP cells in ischemic bone marrow. LSK SLAM and LSK SP cells were detected in BM exposed to ischemia for up to 5 hours at 37°C, for up to 20 hours at 20°C, or for up to 48 hours at 4°C. Data are presented as mean \pm SEM (n=3). Significance of difference from the controls: *** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Analysis of apoptosis and necrosis in cadaveric BM revealed a lower fraction of apoptotic and dead cells in the LSK population compared to all bone marrow cells. The difference was clearly visible until the LSK phenotype disappeared (Figure 3).

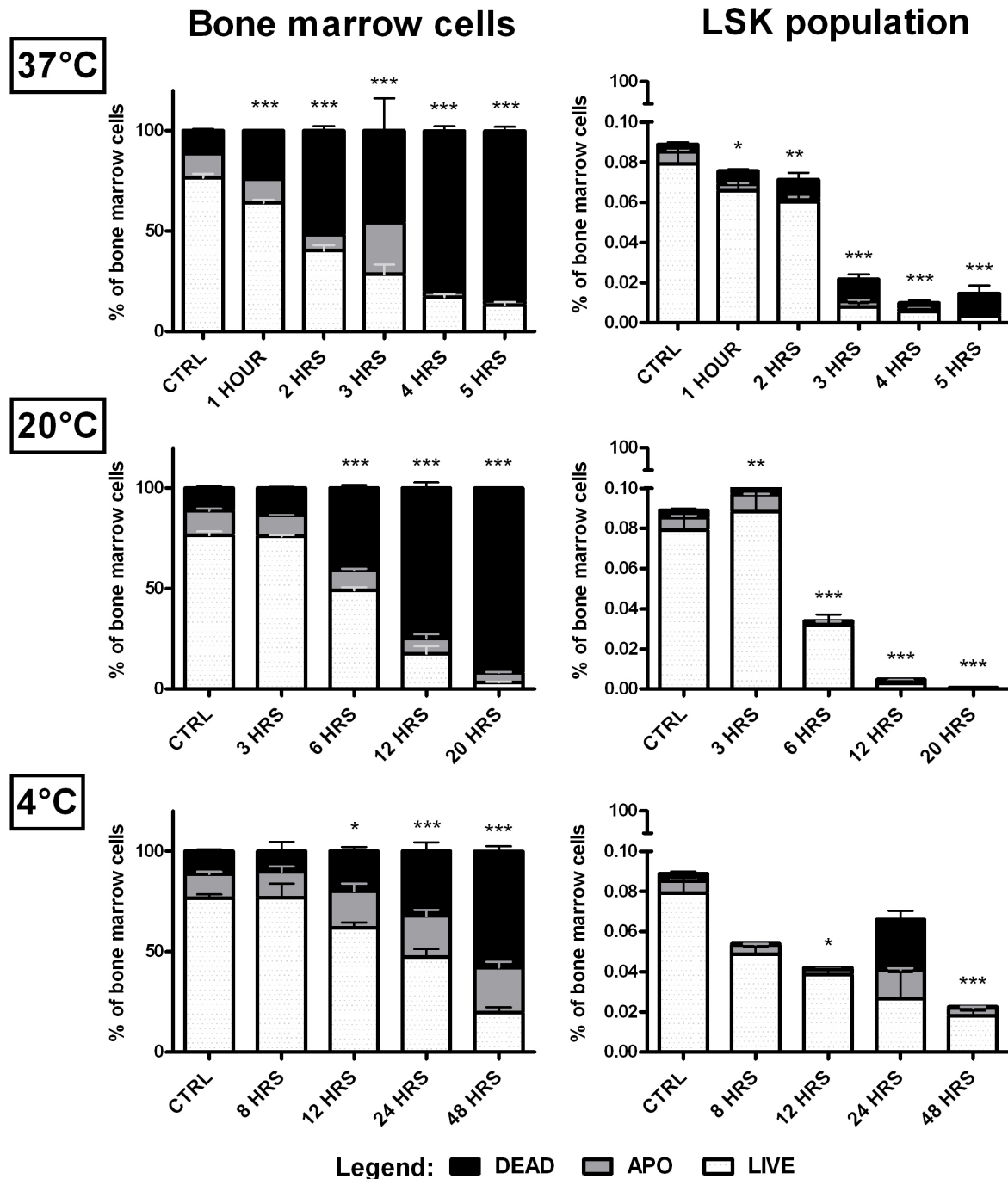


Figure 3 – Viability of bone marrow cells and LSK cells during ischemia. Ratio of live, apoptotic and dead cells in whole bone marrow and in LSK population was determined in BM exposed to ischemia for up to 5 hours at 37°C, for up to 20 hours at 20°C, and for up to 48 hours at 4°C. Data are presented as mean \pm SEM (n=3). Significance of difference from the controls (for live cell fraction): *** P < 0.005, ** P < 0.01, * P < 0.05.

Comparison of the LSK population with more differentiated populations of the BM (B-lymphopoietic, erythropoietic and granulo-monopoietic) showed better survival of LSK cells in ischemia at 37°C (data not shown). LSK cells represent a fraction of BMC highly enriched in hematopoietic stem and progenitor cells, which are slow-cycling. Since more than 50 % of differentiated precursors of blood cells are actively proliferating [26], the result appears to correlate with the proliferation rate.

In addition, we explored cadaveric bone marrow harvested from C57Bl/6J p53^{-/-} mice. Tumor suppressor p53 plays an important role in regulation of apoptosis [27] but also in regulation of hematopoietic stem cell quiescence [15, 16]. Based on this knowledge, we expected changes in apoptotic fractions in bone marrow subpopulations and/or higher sensitivity of p53^{-/-} HSC to ischemia due to their escape from quiescence. However, our findings did not show any difference between p53^{-/-} BM and wild-type BM. An apoptotic fraction was still present in p53^{-/-} BM after ischemia, which indicates that p53-independent apoptosis was induced. Regarding the regulation of quiescence, our findings did not show any difference between p53^{-/-} HSC and wild-type HSC, not even in the control (fresh) bone marrow (data not shown). Our results indicate that a fraction of primitive HSC remains in bone marrow of p53^{-/-} mice, capable of long-term engraftment and resistant to the lack of oxygen and energy.

4.2 Inhibition of bone marrow cells metabolism *in vitro*

To investigate the resistance of HSC to energy shortage *in vitro*, we incubated bone marrow cells for either 2 hours or 20 hours with metabolic inhibitors KCN (1 mM or 10 mM), 2-deoxy-D-glucose (50 mM) and 10 mM KCN together with 50 mM 2-DG. Phenotypic analysis and experimental transplantation were performed after the incubations.

Just the twenty-hour inhibition by KCN resulted in a decreased engraftment of HSC in sublethally irradiated recipients (Figure 4). The repopulating ability was also decreased after 2 hours of 2-DG inhibition, and was completely lost after 20 hours. Combination of inhibitors was shown to be fatal for the functional properties of HSC.

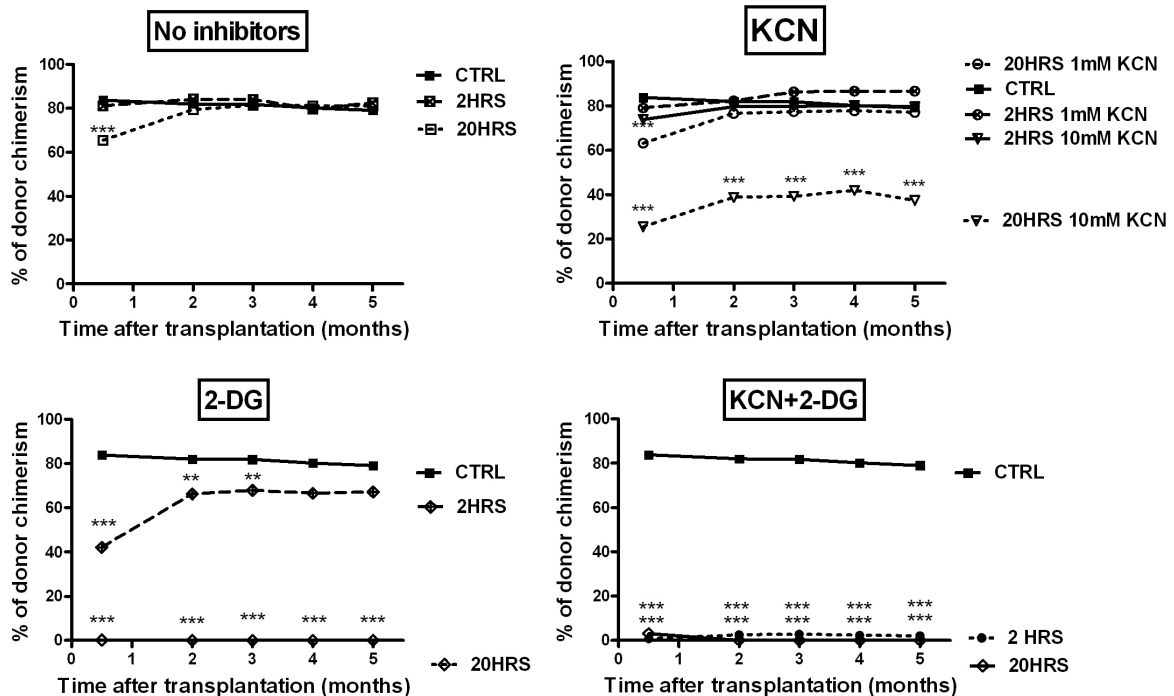


Figure 4 – Engraftment of hematopoietic stem cells after metabolic inhibition in sublethally irradiated recipients. Donor cells (Ly5.1) were incubated for 0 (CTRL), 2 and 20 hours in medium without inhibitors, with 1mM KCN, 10 mM KCN, 50 mM 2-deoxy-D-glucose (2-DG) or 10 mM KCN and 50 mM 2-deoxy-D-glucose. Ly5.2 recipients (n=4-14) were irradiated with 6 Gy and transplanted with half of the donor femur. The engraftment is presented as chimerism of Ly5.1+ cells (mean) detected in peripheral blood of Ly5.2 recipients. Significance of difference from the controls at individual time points: *** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

Frequency of primitive HSC (LSK SP and LSK SLAM) in the BM after the metabolic inhibition also confirmed their resistance to KCN (Figure 5). An increase in the frequency of LSK SLAM cells in bone marrow after twenty-hour inhibition by 10 mM KCN is due to their relative resistance compared to more differentiated bone marrow cells, which have already been depleted.

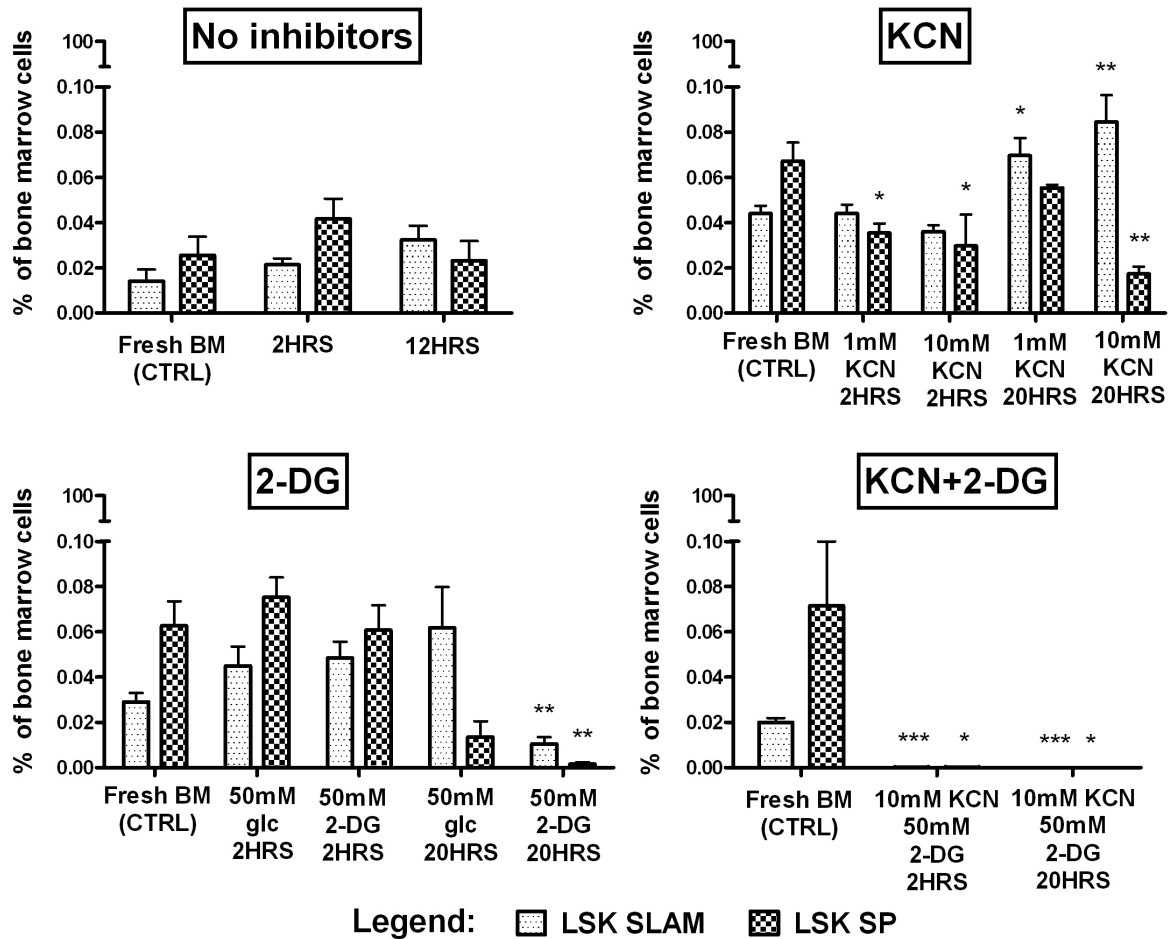


Figure 5 – Representation of LSK SLAM and LSK SP cells in bone marrow after metabolic inhibition. Frequencies of LSK SLAM and LSK SP cells in BM were detected after 0 (CTRL), 2 and 20 hours of incubation in media without metabolic inhibitors, with 1 mM KCN, 10 mM KCN, 50 mM 2-deoxy-D-glucose (2-DG) or 10 mM KCN and 50 mM 2-DG. D-glucose (glc) was used as a comparative treatment for 2-DG. Data are presented as mean \pm SEM (n=3). Significance of difference from the controls: *** P < 0.005, ** P < 0.01, * P < 0.05.

In the whole BM, both KCN and 2-DG caused a decline in the number of nucleated cells and an increase in the dead cell fraction in all intervals tested as compared to the samples incubated without inhibitors (data not shown). As expected, analysis of apoptosis and necrosis in LSK population showed higher resistance of LSK cells (enriched in HSC) to KCN inhibition than to 2-DG or to combined inhibition (Figure 6). Moreover, the LSK population (enriched in HSC) survived the KCN inhibition better than the more differentiated populations, namely the B-lymphopoietic and the erythropoietic (data not shown), which is probably caused by anaerobic metabolism of HSC [17].

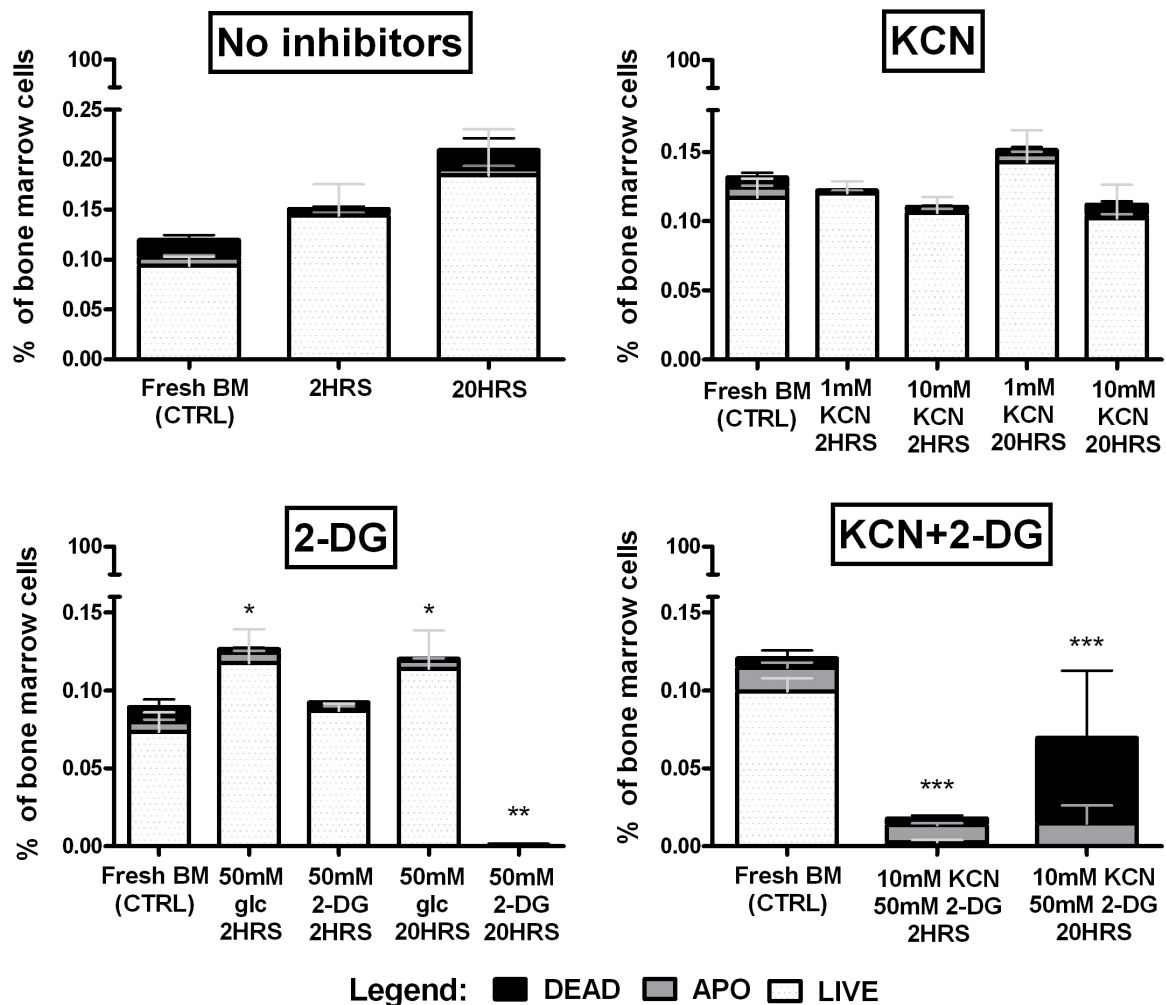


Figure 6 – Viability of LSK population in bone marrow exposed to metabolic inhibitors. Ratio of live, apoptotic and dead cells in LSK population was determined in BM after 0 (CTRL), 2 and 20 hours of incubation in media without metabolic inhibitors, with 1 mM KCN, 10 mM KCN, 50 mM 2-deoxy-D-glucose (2-DG) or 10 mM KCN and 50 mM 2-DG. D-glucose (glc) was used as a comparative treatment for 2-DG. Data are presented as mean \pm SEM (n=3). Significance of difference from the controls (for live cell fraction): *** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

The relative resistance of the HSC to KCN inhibition and their susceptibility to 2-DG inhibition provides an additional evidence of the anaerobic nature of their metabolism.

4.3 Effect of *in vitro* storage on transplantability of hematopoietic stem cells

In addition, we examined the tolerance of HSC to unfavorable conditions *in vitro*, when bone marrow cells were stored in medium containing fetal bovine serum but lacking specific hematopoietic growth factors. HSC stored *in vitro* in a suspension of bone marrow cells survived for a significantly longer period than those left *in situ* under ischemic conditions. Competitive transplantation of these cells to sublethally irradiated recipients demonstrated a preserved transplantability of HSC for at least 2 days of storage at 37°C and 4 days of storage at 4°C (Figure 7).

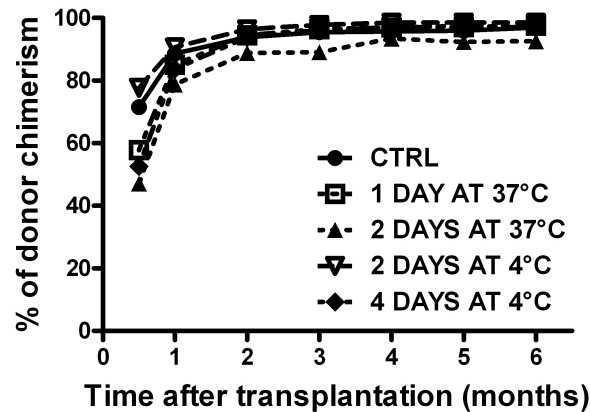


Figure 7 - Engraftment of *in vitro* stored HSC in sublethally irradiated recipients. Donor cells (Ly5.1) were stored for 1 and 2 days at 37°C, and for 2 and 4 days at 4°C in medium (IMDM) with FBS without specific growth factors. Ly5.2 recipients (n=4-5) were irradiated with 6 Gy and transplanted with half of the donor femur. Representation of donor-derived cells is presented as chimerism of Ly5.1+ cells (mean) detected in peripheral blood of Ly5.2 recipients. Significance of difference from the controls at individual time points: *** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

5 CONCLUSIONS

- The repopulating ability of hematopoietic stem cells exposed to ischemia at 37°C was maintained for up to 2 hours, when the HSC were transplanted to sublethally (6 Gy) irradiated recipients. This time was extended to 6 hours and 12 hours after ischemia at 20°C and 4°C, respectively.
- In lethally irradiated recipients, HSC exposed to ischemia successfully competed with HSC from fresh bone marrow for up to 2 hours, 12 hours, and 24 hours at 37°C, 20°C, and 4°C, respectively.
- Frequencies of LSK SLAM and LSK SP cells (highly enriched in HSC) in bone marrow exposed to ischemia at 37°C, 20°C, or 4°C were preserved in compliance with the repopulating ability. LSK population (enriched in hematopoietic stem cells and progenitors) was significantly more resistant to ischemia at 37°C than differentiated populations of bone marrow when fractions of live, apoptotic and dead cells were compared.
- HSC with targeted deletion of apoptotic and quiescence regulator p53 did not differ from the wild-type HSC in repopulating ability or in frequencies of LSK SLAM and LSK SP cells in BM, fresh or exposed to ischemia at 37°C.
- HSC were shown to be relatively resistant to *in vitro* inhibition by electron transport chain inhibitor potassium cyanide, which indicates an important role of their anaerobic metabolism in their survival of ischemia.
- Repopulating ability of HSC was fully preserved for at least 2 days of *in vitro* storage at 37°C and for at least 4 days of *in vitro* storage at 4°C, despite the absence of specific hematopoietic growth factors.

Based on our findings, we can conclude that **cadaveric bone marrow** could be used as an alternative **source of HSC for transplantation**. However, regarding the prolonged survival of HSC *in vitro*, cells for transplantation should be harvested as soon as possible.

POUŽITÁ LITERATURA/REFERENCES

1. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*. 2005; 106:1901-1910. Review.
2. Duncombe A. ABC of clinical haematology. Bone marrow and stem cell transplantation. *BMJ*. 1997; 314:1179-1182. Review.
3. Raffoux C. Collaboration between hematopoietic stem cell donor registry and cord blood banks. *Transplant Proc*. 2010; 42:3258-3259.
4. Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:3120-3125
5. Robb L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene*. 2007; 26:6715-6723
6. Wilson A, Oser GM, Jaworski M, Blanco-Bose WE, Laurenti E, Adolphe C, Essers MA, Macdonald HR, Trumpp A. Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1106:64-75. Review.
7. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:5431-5436
8. Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*. 2001; 97:2293-2299
9. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005; 121:1109–1121
10. Kopp HG, Hooper AT, Avecilla ST, Rafii S. Functional heterogeneity of the bone marrow vascular niche. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1176:47-54
11. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Matsuoka S, Miyamoto K, Miyazaki H, Takahashi T, Suda T. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*. 2007; 1:685-697
12. Nie Y, Han YC, Zou YR. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med*. 2008; 205:777-783
13. Thompson BJ, Jankovic V, Gao J, Buonamici S, Vest A, Lee JM, Zavadil J, Nimer SD, Aifantis I. Control of hematopoietic stem cell quiescence by the E3 ubiquitin ligase Fbw7. *J Exp Med*. 2008; 205:1395-1408
14. Chen C, Liu Y, Liu R, Ikenoue T, Guan KL, Liu Y, Zheng P. TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J Exp Med*. 2008; 205:2397-2408

15. TeKippe M, Harrison DE, Chen J. Expansion of hematopoietic stem cell phenotype and activity in Trp53-null mice. *Exp Hematol.* 2003; 31:521-527
16. Liu Y, Elf SE, Miyata Y, Sashida G, Liu Y, Huang G, Di Giandomenico S, Lee JM, Deblasio A, Menendez S, Antipin J, Reva B, Kord A, Nimer SD. p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell.* 2010; 4:37-48
17. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, Deberardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, Schneider JW, Zhang CC, Sadek HA. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell.* 2010; 7:380-390
18. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:4304-4308
19. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1994; 269:23757-23763
20. Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, Shima H, Johnson RS, Hirao A, Suematsu M, Suda T. Regulation of the HIF-1 α levels is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010; 7:391-402
21. Soderdahl G, Tammik G, Remberger M, Ringden O. Cadaveric bone marrow and spleen cells for transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 32:79-84
22. Machalinski B, Baskiewicz-Masiuk M, Pabisiak K, Grymula K, Sienko J, Domanski L, Ostrowski M, Machalinska A. The evaluation of apoptosis and reactive oxygen species in hematopoietic cells derived from heparinized cadaveric organ donors stored short-term at 4°C. *Transplant Proc.* 2005; 37:2281-2284
23. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med.* 1996; 183:1797-1806
24. Ormerod MG, Collins MK, Rodriguez-Tarduchy G, Robertson D. Apoptosis in interleukin-3-dependent haemopoietic cells. Quantification by two flow cytometric methods. *J Immunol Methods.* 1992; 153:57-65
25. Kim M, Turnquist H, Jackson J, Sgagias M, Yan Y, Gong M, Dean M, Sharp JG, Cowan K. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res.* 2002; 8:22-28
26. Passegue E, Wagers AJ, Giuriato S, Anderson WC, Weissman IL. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med.* 2005; 202:1599-1611
27. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene.* 2003; 22:9030-9040

Curriculum vitae

Mgr. Jana Michalová

Datum a místo narození: 25.8.1983, Havlíčkův Brod, Česká republika

Vzdělání

Od 2006 Postgraduální studium, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie

2001 – 2006 Mgr., Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Obor biochemie

Zaměstnání

Od 2007 Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav patologické fyziologie; vědecký pracovník

2005-2006 Akademie věd České republiky, Mikrobiologický ústav; laborant

Kurzy, konference

2011 40th International Society for Hematology and Stem Cells (ISEH) Annual Scientific Meeting, 25. – 28. 8. 2011, Vancouver, Canada; plakátové sdělení
XXV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, 22. – 25. 6. 2011, Olomouc, ČR; plakátové sdělení

2010 52nd American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, 3. – 7.12.2010, Orlando, USA; abstrakt publikovaný ve sborníku
8th International Stem Cell School in Regenerative Medicine, 3. – 5. 9. 2010, Stockholm, Sweden; plakátové sdělení

36th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, 21. – 24. 3. 2010, Vienna, Austria; abstrakt publikovaný ve sborníku

Konference DNA analýza a buněčná analýza, 1. – 2. 6. 2010, Praha, ČR; orální prezentace

2009 Internal conference of Center of Experimental Hematology, Praha, ČR; orální prezentace

7th International Stem Cell School in Regenerative Medicine; Praha, ČR, plakátové sdělení

Studentská vědecká konference 1. lékařské fakulty UK; orální prezentace

2008 Minikurz průtokové cytometrie, Praha, ČR

2007 Kurz práce s laboratorními zvířaty – Osvědčení o způsobilosti podle §17 zákona ČNR č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání, v platném znění.

2006 17th International Mass Spectrometry Conference, Praha, ČR; plakátové sdělení

Jazykové znalosti

Angličtina pokročilý, FCE Cambridge

Francouzština mírně pokročilý

SEZNAM PUBLIKACÍ/LIST OF PUBLICATIONS

Hlobenova T, Sefc L, Chang KT, Savvulidi F, **Michalova J**, Necas E. B-lymphopoiesis gains sensitivity to subsequent inhibition by estrogens during final phase of fetal development. *Dev Comp Immunol*. 2012; 36(2):385-389. **IF = 3.293**

Michalova J, Savvulidi F, Sefc L, Faltusova K, Forgacova K, Necas E. Hematopoietic stem cells survive circulation arrest and reconstitute hematopoiesis in myeloablated mice. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011; 17(9):1273-1281. **IF = 3.275**

Vojtova L, Zima T, Tesar V, **Michalova J**, Prikryl P, Dostalova G, Linhart A. Study of urinary proteomes in Anderson-Fabry disease. *Ren Fail*. 2010; 32(10):1202-1209. **IF = 0.84**

Michalova J, Savvulidi F, Sefc L, Forgacova K, Necas E. Cadaveric bone marrow as potential source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Chimerism*. 2011; 2(3):86-87.

Dosud bez IF/Not impact factor yet

Manuskripty v přípravě/Manuscripts in preparation

Forgacova K, Savvulidi F, **Michalova J**, Sefc L, Necas E. Transplantation window induced by submyeloablative irradiation depends on fitness of hematopoietic stem cells.

Savvulidi F, Forgacova K, **Michalova J**, Paral P, Necas E, Sefc L. Two novel strategies for detecting murine hematopoietic stem cells by flow cytometry ignoring lineage markers.