

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI**  
Ústav patologické fyziologie



**MOŽNOSTI A VÝZNAM DLOUHODOBÉ**  
**KULTIVACE EMBRYONÁLNÍCH**  
**BUNĚK RŮZNÝCH ŽIVOČIŠNÝCH**  
**DRUHŮ**

**ABILITIES AND IMPORTANCE OF LONG-TERM**  
**CULTIVATION OF EMBRYONIC CELLS IN**  
**DIFFERENT SPECIES OF ANIMALS**

Disertační práce  
Mgr. Zbyněk Houdek

Školitel: Doc. MUDr. František Vožeh, CSc.

Plzeň 2012

## **Předmluva**

Tato práce vznikla na základě spolupráce Ústavu patologické fyziologie, Ústavu histologie a embryologie a Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni a pod odborným vedením školitele Doc. MUDr. Františka Vožeha, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracoval samostatně a veškeré převzaté údaje jsem řádně citoval.

## Obsah

Předmluva.....	2
1 Seznam použitých zkratk .....	4
2 Abstrakt.....	6
3 Abstract.....	7
4 Úvod.....	8
4.1 Embryonální buňky a jejich typy .....	8
4.2 Současný stav výzkumu embryonálních kmenových buněk .....	10
4.3 Charakterizace kmenových buněk .....	11
4.4 Leukemický inhibiční faktor (LIF) a jeho funkce .....	12
4.5 LIF a jeho vliv na ES a EC buňky .....	15
4.6 Časná embryogeneze a diferenciacie embryonálních kmenových buněk .....	19
4.7 Diferenciacie embryonálních kmenových buněk <i>in vitro</i> .....	19
4.8 Buněčná terapie a neurotransplantace.....	21
5 Východiska a cíle .....	26
5.1 Kultivace, neurodiferenciacie a následná charakterizace myších ES buněk .....	26
5.2 Transplantace nediferencovaných EC P19 buněk a z nich odvozených diferencovaných neurálních progenitorů do CNS modelových laboratorních myší s neurodegenerativním onemocněním.....	27
5.3 Studium mutací v genu pro leukemický inhibiční faktor (LIF) a jejich vztahu k plodnosti žen.....	27
6 Materiál a metody.....	28
6.1 Kultivace, neurodiferenciacie a následná charakterizace myších ES buněk .....	28
6.2 Transplantace nediferencovaných EC P19 buněk a z nich odvozených diferencovaných neurálních progenitorů do CNS modelových laboratorních myší s neurodegenerativním onemocněním.....	34
6.3 Studium mutací v genu pro leukemický inhibiční faktor (LIF) a jejich vztahu k plodnosti žen.....	37
7 Výsledky.....	41
7.1 Kultivace, neurodiferenciacie a následná charakterizace myších ES buněk .....	41
7.2 Transplantace nediferencovaných EC P19 buněk a z nich odvozených diferencovaných neurálních progenitorů do CNS modelových laboratorních myší s neurodegenerativním onemocněním.....	49
7.3 Studium mutací v genu pro leukemický inhibiční faktor (LIF) a jejich vztahu k plodnosti žen.....	63
8 Diskuze .....	65
8.1 Charakterizace myších ES buněk .....	65
8.2 Transplantace EC P19 buněk do mozečku myší .....	67
8.3 Studium mutací v genu pro leukemický inhibiční faktor (LIF) a jejich vztahu k plodnosti žen.....	73
9 Závěry .....	75
9.1 Kultivace, neurodiferenciacie a následná charakterizace myších ES buněk.....	75
9.2 Transplantace EC P19 buněk do mozečku myší .....	75
9.3 Závěry pro praxi ve studii mutací v genu pro LIF a jejich vztahu k plodnosti žen .....	76
10 Seznam použité literatury .....	77
11 Přehled publikační činnosti .....	100
11.1 Články v časopisech .....	100
11.2 Postery na odborných setkáních .....	100
11.3 Prezentace na odborných setkáních .....	101
12 Poděkování .....	104

# 1 Seznam použitých zkratek

AP	alkalická fosfatáza
AFP	$\alpha$ -fetoprotein
BDNF	neurotrofický faktor odvozený z mozku (brain-derived neurotrophic factor)
bFGF	bazický fibroblastový růstový faktor (basic fibroblast growth factor)
BMP	kostní morfogenní protein (bone morphogenic protein)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CIV	tvorba chimér <i>in vivo</i> (chimera production <i>in vivo</i> )
CLC	kardiotrofinu podobný cytokin (cardiotrophin-like cytokine)
CMP	cevní mozková příhoda
CNS	centrální nervový systém
CNTF	ciliární neurotrofický faktor (ciliary neurotrophic factor)
CT	kardiotrofin
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid
DIV	diferenciace různých buněk <i>in vitro</i> (differentiation <i>in vitro</i> )
DMEM	základní kultivační médium (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMEM/F12	bezsérové diferenciační médium
DNA	deoxyribonukleová kyselina
D0-D15	1.-15. den kultivace nebo diferenciace buněk
EBs	embryoidní tělíška (embryoid body)
EC	embryonální karcinomové buňky (embryonic carcinoma)
EG	primordiální zárodečné buňky (embryonic germ)
EpiSCs	kmenové buňky epiblastu (epiblast stem cells)
ES	embryonální kmenové buňky (embryonic stem)
ESGRO	komerčně dostupná forma rekombinantního myšího LIF
FBS	fetální bovinní sérum (fetal calf serum)
FITC	fluoresceinizothiokyanát
FORSE-1	primární protilátka proti LeX antigenu
GATA	transkripční faktor
GFAP	gliální fibrilární kyselý protein (glial fibrillary acidic protein)
GFP	zeleně fluoreskující protein (green fluorescent protein)
gp130	transmembránový glykoprotein 130
hES	lidské embryonální kmenové buňky (human embryonal stem)
HPRT	housekeeping gen
HSCs	hematopoetické kmenové buňky (hematopoetic stem cells)
ICM	buňky embryoblastu (inner cell mass)
IGF	insulinu podobný růstový faktor (insulin-like growth factor)

Ig	imunoglobulin
IHC a ICC	imunohistochemie a imunocytochemie
IL	interleukin
JAK	kinázy Janusovy rodiny (Janus kinase)
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
Lc	Lurcher (+/Lc)
LeX	karbohydrátový povrchový buněčný epitop Lewis-X
LIF	leukemický inhibiční faktor (leukemia inhibitory factor)
LIFR	receptor pro LIF
MAP-2	protein nacházející se v tělech a dendritech neuronů (microtubuli-associated protein-2)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
M+M	morfologické a další markery ES buněk (morphology and markers ES cells)
MASH-1	gen exprimovaný v diferencujících neuronech
n	rozsah souboru
Nanog	transkripční faktor
N-CAM	protein na povrchu neuronů (neural cell adhesion molecule)
NGF	nervový růstový faktor (nerve growth factor)
NK buňky	lymfocyty „přirození zabíječi“ (natural killer cells)
NP	neurotrofin
NPG	neuroprogenitory
Oct-3/4	transkripční faktor (octamer binding protein 4)
OSM	onkostatin M (oncostatin M)
PAX-6	gen pro transkripční faktor (paired box gene 6)
PD	Parkinsonova choroba
PBS	fyzilogický roztok
Pcd	Purkynje cell degeneration
PCOS	syndrom polycystických ovárií
PID	hluboký pánevní zánět (pelvic inflammatory disease)
PNS	periférní nervový systém
PR	pregnancy rate
RA	kyselina retinová (retinoic acid)
RNA	ribonukleová kyselina
RT-qPCR	reverzní transkripce - kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce
SCA	spinocerebelární atrofie, spinocerebelární ataxie
Smad	proteinové mediátory aktivace transkripce
SSEA	povrchové karbohydrátové epitopy (stage-specific embryonic antigen)
STAT	intracelulární proteiny zprostředkující aktivaci transkripce (signal transducer and activator of transcription)
TATA box	počáteční nukleotidová sekvence DNA
TIV	tvorba teratomů <i>in vivo</i> (teratoma production <i>in vivo</i> )
TRA	povrchové glykoproteinové epitopy
WB	western blot
WT	wild type (+/+)

## 2 Abstrakt

Embryonální buňky uvnitř blastocysty, které se dále dělí a diferencují v buňky všech tkání organismu se nazývají embryonální kmenové (ES) buňky. Využití lidských ES buněk formou transplantací je jednou z možných cest regenerativní medicíny.

Předložená práce zahrnuje studium 2 různých linií myších pluripotentních buněk - embryonálních karcinomových buněk (EC) P19 a ES buněk linie D3. Buňky jsme kultivovali v základním kultivačním médiu s fetálním bovinním sérem (FBS) a navíc u ES buněk s leukemickým inhibičním faktorem (LIF). Tyto složky zajišťují jejich pluripotenci a sebeobnovu. Následovala jejich neurodiferenciace změnou kultivačního média, bez FBS a u ES buněk i bez LIF. Naopak do média byla přidávána k indukci neurodiferenciace retinová kyselina (RA) a u ES buněk byla navíc zařazena kultivace embryoidních tělísek (EBs). Pluripotence a neurodiferenciace buněk byla ověřena molekulárně-biologickými metodami, kterými byly zjištěny u obou linií nediferencovaných buněk markery pluripotence a po jejich neurodiferenciaci přítomnost neuronálních markerů.

Následovaly transplantace, při nichž byly myší EC P19 buňky trvale transfekované genem pro zeleně fluoreskující protein (GFP) aplikovány do zdravého mozečku myší typu wild (WT) a postiženého mozečku myší typu Lurcher (Lc). Byly použity nediferencované buňky (P19) a od nich odvozené neuroprogenitory (NPG) a hodnoceno bylo přežívání, morfologie a lokalizace transplantátu.

Přežívání obou typů GFP pozitivních transplantátů bylo srovnatelné a nezávislé na typu myši. Přežívání NPG i P19 buněk bylo významně nižší u myší Lc než u myší WT. Destrukce uvnitř transplantátu byly zjištěny pouze v transplantátech s NPG, expanze byla přítomna vždy po aplikaci P19 buněk a méně u NPG. Transplantované buňky nemigrovaly a nešířily se v rámci mozečku. Fenotyp GFP pozitivních transplantovaných buněk byl prokázán imunohistochemicky přítomností neuronálních markerů. Z hlediska lokalizace se transplantát vyskytoval u myší WT převážně v mozečku, ale u myší Lc vždy mimo mozeček s neurodegenerací.

LIF jsme se dále věnovali v širším kontextu – význam tohoto cytokinu v časně embryogenezi a tím pádem i v plodnosti je široce zkoumán nejen na buněčných liniích, ale i u lidí. Zkoumali jsme tedy i význam LIF na plodnost žen a věnovali jsme se přímé korelaci mutací v genu pro LIF s jejich plodností. Vyšetřovali jsme mutace v tomto genu jak v populaci infertilních žen, tak v kontrolní populaci zdravých plodných žen. U 15 neplodných žen byla nalezena identická mutace v exonu 3 na pozici 3400 genu pro LIF, která vede při translaci k záměně valinu za methionin v kodónu 64 (V64M), jež je součástí AB klíčky LIF proteinu, klíčové oblasti v interakci s receptorem pro LIF. Následně byl zkoumán vliv této mutace na úspěšnost léčby neplodnosti těchto žen ve srovnání se skupinou neplodných žen bez přítomnosti mutace.

### 3 Abstract

Embryonic cells inside the blastocyst, which divide and differentiate into cells of all tissues of organism, are called embryonic stem (ES) cells. Using the ES cells for transplantations is one of the potential ways in regenerative medicine.

The present study deals with two different lines of mouse pluripotent cells: embryonic carcinoma (EC) cells line P19 and ES cells line D3. The *in vitro* cultivation was performed in basal cultivation medium with fetal bovine serum (FBS) and in addition of leukemia inhibitory factor (LIF) in case of ES cells. The neurodifferentiation was induced by medium without FBS and without LIF in case of ES cells and supported by retinoic acid in case of P19 cells and embryoid bodies cultivation in case of ES cells. Pluripotency and neurodifferentiation of the cells were confirmed by presence of molecular markers of pluripotency and neurodifferentiation in both lines in nondifferentiated and differentiated states.

Mouse EC P19 cells were transfected by gene for green fluorescent protein (GFP) and used for transplantation in cerebellum of wild type (WT) and Lurcher (Lc) mutant mice. Nondifferentiated cells (P19) and neuroprogenitors (NPG) derived from these cells were used. The study followed the survival, morphology and localization of the grafts.

The survival of both types of GFP grafts was similar in both types of mouse. Survival of NPG and P19 cells was significantly lower in cerebellum of Lc than WT mice. Destructions of grafts were found only in NPG grafts; expansions were more frequent in grafts with P19 cells, than in NPG grafts. The transplanted cells didn't migrate nor spread into cerebellum. The phenotype of GFP transplanted cells was confirmed by presence of neuronal markers by using immunohistochemistry. Grafts were localized in WT mouse mainly in cerebellum on the contrary to Lc mouse, where they were localized outside the degenerated cerebellum only.

Part of the presented study was focused on the characteristic of LIF and its impact on early embryogenesis. This also means its importance for fertility which is deeply investigated also in humans and not only in cell lines. So the part of the study was dedicated to the correlation of the LIF gene status and fertility in women. We investigated the prevalence of the LIF gene mutations in the population of infertile and control healthy fertile women. In fifteen infertile women the potentially functional LIF gene mutation, the G to A transitions at the position 3400 leading to the valin to methionin exchange at codon 64 (V64M) in the AB loop region of the LIF protein, were detected. Finally, the possible impact of this mutation on the infertility treatment outcome was followed.

## 4 Úvod

### 4.1 Embryonální buňky a jejich typy

První embryonální buňky vzniklé z oplozeného vajíčka se nazývají blastomery a mají schopnost rýhováním vytvářet a diferencovat se v dceřiné buňky všech 3 zárodečných listů (ektoderm, mesoderm a entoderm) a také v buňky extraembryonálních tkání. Takové buňky nazýváme, stejně jako zygotu, totipotentní. Pak následuje stadium moruly a dále u savců blastocysty, jež obsahuje embryoblast, ze kterého jsou odvozeny embryonální kmenové buňky (ES – embryonic stem cells). Tyto buňky jsou pluripotentní, lze je *in vitro* za určitých laboratorních podmínek nejen diferencovat v buňky ektodermu, mesodermu a entodermu, ale také nekonečně množit [Filip et al., 2006]. Mezi embryonální buňky s vysokou schopností diferenciací náleží též primordiální zárodečné buňky (EG – embryonic germ c.) a nakonec embryonální nádorové buňky (EC – embryonic carcinoma c.) neboli kmenové buňky tumorů. U myší byly odvozeny kmenové buňky epiblastu (epiblast stem cells – EpiSCs) [Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007].

Myší ES buňky byly poprvé získány z embryoblastu myších blastocyst [Evans a Kaufman, 1981]. Nejdříve se myší ES buňky udržovaly na podpůrných vrstvách myších fibroblastů. Následným výzkumem bylo zjištěno, že klíčovým faktorem pro udržení pluripotence myších ES buněk je leukemický inhibiční faktor (LIF-leukemia inhibitory factor).

Lidské ES buňky byly izolovány obdobným postupem jako myší, ale mnohem později, až v r. 1998 [Thomson et al., 1998]. Bohužel při získávání lidských embryonálních kmenových buněk jsou nasnadě zásadní etické problémy.

Embryonální zárodečné (EG) buňky jsou odvozeny od embryonálních primordiálních zárodečných buněk embryí (8,5-12,5 dne), ze kterých se později diferencují spermie a vajíčka. Získat je lze přímo z ventromediální části urogenitální lišty (*plica genitalis*) časného embrya. Tyto buňky se pak za přítomnosti cytokinů LIF a bazického fibroblastového růstového faktoru (bFGF-basic fibroblast growth faktor) mohou reprogramovat v méně diferencované elementy [Filip et al., 2006].

Linie buněk odvozené od nediferencovaných kmenových buněk z tumorů zárodečných buněk jsou nazývány embryonální nádorové kmenové buňky (EC - [Brinster, 1974; McBurney a Rogers, 1982; Andrews et al., 1984]). Tento druh buněk byl získán dříve, než výše uvedené kmenové buňky a slouží jako důležitý diferenciační model *in vitro*. Genetická stabilita těchto buněk je nižší. Naopak jejich výhodou



je menší závislost na specifických růstových faktorech (např. je lze kultivovat bez LIF).

Každá tkáň dospělého organismu obsahuje malou subpopulaci buněk, které jsou schopné sebeobnovy a neomezené proliferace, tzv. multipotentní adultní kmenové buňky. V léčbě jsou nejvíce používány lidské hematopoetické kmenové buňky (HSCs), které jsou získávány z kostní dřeně. Mikroprostředí v kostní dřeni (niche) podporuje HSCs buňky, obsahuje všechny potřebné faktory pro jejich životnost a následně umožňuje vyváženou produkci zralých buněk po celou dobu života [Filip et al., 2006].

## 4.2 Současný stav výzkumu embryonálních kmenových buněk

V tabulce 1 jsou uvedeny živočišné druhy, od kterých byly získány linie nediferencovaných buněk *in vitro* z moruly nebo blastuly, jež se vyznačují morfologickými a dalšími markery (M+M-morfology and markers ES cells) ES buněk, diferenciací v různé typy buněk *in vitro* (DIV-differentiation), vytvářejí teratomy (TIV-teratoma production *in vivo*) nebo chiméry *in vivo* (CIV-chimera production *in vivo*) [Gardner et al., 2006]:

Tabulka 1- Seznam živočišných druhů, od kterých byly získány linie nediferencovaných buněk *in vitro*

Živočišný druh	Základní charakteristika
<i>Rattus norvegicus</i> (Potkan obecný)	M+M, CIV
<i>Mesocricetus auratus</i> (Křeček zlatý)	DIV
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Králík domácí)	M+M, CIV, DIV
<i>Mustela lutreola</i> (Norek evropský)	M+M, DIV
<i>Sus scrofa</i> (Prase domácí)	M+M, CIV, DIV
<i>Ovis ammon</i> (Ovce domácí)	M+M
<i>Bos primigenius</i> (Tur domácí)	M+M, DIV, CIV
<i>Eguus caballus</i> (Kůň domácí)	DIV
<i>Callithrix pygmaea</i> (Kosman zakrslý)	DIV
<i>Macaca mulatta</i> (Makak rhesus)	TIV
<i>Gallus gallus</i> (Kur domácí)	DIV, CIV
<i>Oryzias latipes</i> (Medaka japonská)	DIV, CIV
<i>Danio rerio</i> (Danio pruhované)	DIV, CIV
<i>Sparus aurata</i> (Mořan zlatý)	DIV, CIV

### 4.3 Charakterizace kmenových buněk

ES buňky patří mezi pluripotentní buňky, jež není možné jakkoliv využívat bez jejich detailní *in vitro* charakterizace. Charakterizace jednotlivých linií ES buněk se provádí např. z důvodu zvýšení bezpečnosti buněčné terapie před jejich transplantací [Gersh et al., 2009], kdy jsou studovány vedlejší účinky a řešeny další problémy spojené s přežíváním a funkcí transplátátu (např. nízké přežívání či naopak neomezená proliferace a tím vznik tumorů z transplátovaných buněk). Tabulka 2 zahrnuje některé molekulární znaky, které charakterizují pluripotentní embryonální buňky lidí a myši:

Tabulka 2 – Seznam molekulárních znaků myších a lidských embryonálních kmenových buněk

Název markeru	Lokalizace markeru	Myší EC	Myší ESC	Lidské EC	Lidské ESC
SSEA-1	Membrána	+	+	-	-
SSEA-3	Membrána	-	-	+	+
SSEA-4					
TRA-1-60	Membrána	-	-	+	+
TRA-1-81					
Oct-3/4	Transkripční faktor	+	+	+	+
AP	Membrána	+	+	+	+
Aktivita telomerázy	Intracelulární	+	+	+	+

SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen) je povrchový antigen (glykosfingolipid) blastomer, vznikajících při rýhování embryoblastu (ICM-inner cell mass) a trofektodermu pozdní blastuly nebo moruly myši. Jde o charakteristický povrchový karbohydrát ES a EC buněk, jenž je u myši zastoupen epitopem Lewis X [Muramatsu et al., 2008].

SSEA-3, -4 jsou podobné povrchové antigeny ES a EC buněk člověka.

TRA-1-60, -1-81 (tumor rejection antigen) náleží do rodiny kyseliny sialové ES a EC buněk člověka.

Oct-3/4 patří k transkripčním faktorům rodiny POU, který je exprimován v totipotentních a pluripotentních buňkách, kam náleží i EC a ES buňky [Gardner et al., 2006].

AP (alkalická fosfatáza) se vyskytuje nejen v kmenových buňkách, dále i v buňkách placenty, střeva, jater, ledvin a kostí, ale v menším množství se nachází téměř ve všech tkáních těla a její nárůst je také vázán na počátek vzniku entodermu.

Telomeráza je reverzní transkriptáza, která působí na telomery. Existuje vztah mezi jejich délkou a počtem dělení buňky. Nejedná se o přímý intracelulární znak kmenových buněk, ale pouze o znak pomocný.

#### 4.4 Leukemický inhibiční faktor (LIF) a jeho funkce

LIF je vysoce glykosylovaný protein (38-67 kDa), který byl jako jeden z prvních používán pro kultivaci ES buněk. Náleží mezi cytokiny rodiny interleukinu 6 (IL-6), kam patří i interleukin 11 (IL-11), kardiotropin (CT-1), ciliární neurotrofický faktor (CNTF), onkostatin M (OSM), kardiotropinu podobný cytokin (CLC) a neurotrofin (NP). Cytokiny rodiny IL-6 se ve svých funkcích v dospělém organismu doplňují a uplatňují se v krvevorném, nervovém, kardiovaskulárním a endokrinním systému a také při změnách kostní a tukové tkáně. Rozmanitost jejich účinku je zajištěna jejich časově i prostorově specifickou expresí, ale i specifickou expresí jejich receptorových podjednotek [Kotasová, 2009]. První jeho nalezená funkce *in vitro* byla inhibice růstu leukemické buněčné linie M1, kde byl LIF schopen tyto buňky terminálně diferencovat v makrofágy a tím ukončit jejich sebeobnovu [Gearing et al., 1987]. LIF má velice důležitou úlohu i v embryo-endometriální komunikaci savců [Herrler et al., 2003; Stewart et al., 1992; Stewart, 1994].

Význam LIF byl prokázán již během embryogeneze u myši, kdy homozygotní samičky s inaktivovaným genem pro LIF nejsou schopny zabřeznout, protože LIF je nutný pro uhníždění blastocysty ve sliznici dělohy [Stewart et al., 1992]. V průběhu vývoje nervové lišty LIF též podporuje diferenciaci a přežívání sensorických neuronů [Murphy et al., 1997]. Po narození myši s inaktivním genem pro LIF jsou u ní pozorovány anatomické abnormality v hipokampu či zvýšený počet čichových sensorických neuronů a zejména redukované množství krvevorných kmenových buněk [Escary et al., 1993; Bugga et al., 1998; Lin et al., 2005]. LIF blokuje také diferenciaci myších ES buněk za přítomnosti séra nebo jeho náhražek [Smith et al., 1988; Williams et al., 1988], kde hlavní složkou, která se podílí na sebeobnově buněk, je kostní morfogenetický protein 4 (BMP4). Nepřítomnost receptoru pro LIF (LIFR) má též závažné důsledky pro myši. Z tohoto důvodu mají březí myši špatně vyvinutou placentu a následnou hypoxií dochází u embryí k redukci kostní tkáně a motorických neuronů [Ware et al.,

1995]. Kromě toho LIF zvyšuje expresi podskupiny genů regulovaných progesteronem (insulin-like growth factor - IGF-binding protein 3, amphiregulin a immune response gene-1) na luminálním jednovrstevném cylindrickém epitelu [Sherwin et al., 2004].

Jednou z funkcí LIF, s ohledem na endometrium, je i regulace populace uterinních leukocytů. To bylo potvrzeno zkoumáním *LIF* knockout myši, která má ve druhé polovině sekreční fáze menstruačního cyklu dvojnásobný počet NK buněk oproti myši typu wild [Schofield a Kimber, 2005].

Cai aj. přidávali LIF nebo jeho protilátky do média při kultivaci myší blastocysty *in vitro* a zjistili značný přírůstek blastocysty na děložním jednovrstevném epitelu [Cai et al., 2000]. Stejní autoři dále pozorovali, že se LIF vyskytuje během „implantation window“ myši zejména v epiteliálních buňkách lumen dělohy. Zde jeho základní prokázanou úlohou je právě zprostředkovat přírůstek trofoblastu, ale ne stimulovat přisednutí blastocysty. Nicméně, jiné studie předpokládají, že LIF podporuje i decidualizaci [Stewart, 1994; Stewart a Cullinan, 1997].

Při studiu lidského LIF bylo zjištěno, že gen kódující primární strukturu LIF se nachází v oblasti q12 na 22. chromozomu. Jeho nukleotidová sekvence je v kódujících částech i v určitých segmentech nekódujících oblastí vysoce konzervativní [Stahl et al., 1990; Willson et al., 1992]. Promotorová oblast genu obsahuje čtyři konzervované TATA boxy a dvě oblasti startující transkripci. Kódující oblast je rozčleněna do tří exonů [Haines et al., 1999]. Mutace genu pro LIF mohou vést ke snížení dostupnosti či aktivity LIF proteinu a takto mohou být součástí genetické predispozice k snížené plodnosti [Giess et al., 1999; Steck et al., 2004; Králíčková et al., 2006]. V endometriu plodných žen jsou totiž LIF protein a mRNA pro LIF exprimovány v průběhu celého menstruačního cyklu, nejvíce však v polovině jeho sekreční fáze. LIF se váže na nízkoafinitní receptorový řetězec LIFR a vysokoafinitní gp130, čímž je uskutečňován transmembránový přenos. Blastocysty a endometrium exprimují mRNA pro LIFR a gp130, a to nejvíce v době předpokládané implantace [Charnock-Jones et al., 1994; Cullinan et al., 1996; Kojima et al., 1994; Vogliagis et al., 1996]. Lidský a myší LIF také napomáhají procesu invaze trofoblastu, a to tím, že regulují expresi proteináz [Harvey et al., 1995; Morrish et al., 1998; Poehlmann et al., 2005]. Laird aj. navíc předpokládají, že abnormální hladiny tohoto důležitého cytokinu u idiopaticky neplodných žen mohou přispívat k snížení jejich plodnosti [Laird et al., 1997].

Seli aj. ve své studii zkoumali hladinu exprese LIF v endometriu infertilních žen s hlubokým pánevním zánětem (PID), během druhé poloviny sekreční fáze menstruačního cyklu, což odpovídá připravenému endometriu k nidaci. U neplodných žen byla hladina

LIF opět nižší než u fertilních kontrol a k jejímu zvýšení došlo až po salpingektomii [Seli et al., 2005].

Předpokládalo se, že vysoká hladina exprese LIF by mohla být indikátorem připravenosti endometria fertilní ženy. Avšak během studií u infertilních žen byly zjištěny velice rozdílné výsledky exprese LIF v endometriu. Dokonce ani po vyloučení dalších příčin infertility (ovariální, tubární a andrologický faktor a endometrióza), není samotné zjištění hladiny LIF pro stanovení potenciálu implantace embrya u žen s idiopatickou infertility dostačující. To je v kontrastu s výše uvedenými příklady klíčové role LIF v endometriu myší. Toto zjištění bylo potvrzeno ve velkých komplexních studiích, kdy byl rekombinantní lidský LIF podáván opakovaně infertilním pacientkám 2x denně s.c. po dobu 7 dní bezprostředně po embryotransferu, avšak k žádnému zlepšení výsledků léčby metodou *in vitro* fertilizace (IVF) u nich nedošlo [Aghajanova, 2010].

LIF je produkován NK buňkami endometria a proto nepochybně hraje určitou roli v interakcích mezi deciduálními leukocyty matky a invadujícím trofoblastem. Podrobně však tento proces ještě zcela objasněn nebyl.

Nalézt lze nicméně též studie s odlišnými výsledky. Např. autoři Tapia aj. zjistili, že LIF nemá přímý vliv na buněčný povrchový integrin v lidském trofoblastu placenty, ale na expresi mRNA integrinu  $\beta 6$  uvnitř buněk trofoblastu [Tapia et al., 2008].

Nichols aj. zjistili, že mutace v gp130 a méně obvyklé v LIFR snižují schopnost přežití myších preimplantujících embryí během období prodloužené implantace [Nichols et al., 2001]. To podporuje hypotézu o prodloužené implantaci, která je fyziologickou adaptací na existenci ještě sajících mláďat a umožňuje embryím přežít po několik týdnů bez jejich implantace. Teprve po odstavu mláďat dochází k implantaci těchto embryí a k jejich dalšímu normálnímu vývoji. Mutanti gp130 ztrácejí část epiblastu po 6-denním prodloužení implantace a tím i schopnost déle připravovat embryo na prodlouženou implantaci.

#### 4.5 LIF a jeho vliv na ES a EC buňky

ES buňky mají schopnost sebeobnovy, která je charakteristická pro všechny typy kmenových buněk. U myších ES buněk je tato vlastnost závislá na signálech cytokinů LIF nebo BMP4. Navíc na této vnější regulaci genové exprese se podílí ještě přítomnost vnitřních transkripčních faktorů nediferencovaného stavu, jako jsou Oct-3/4 a Nanog. Dokonce při overexpresi Nanog není ke schopnosti sebeobnovy nutná ani přítomnost signálních molekul LIF a BMP4. Tato nezávislost Nanog na signálu LIF doplňuje představu o efektivitě drah sebeobnovy a poukazuje na souvislost s Oct-3/4 [Chambers a Smith, 2004].

Výsledky dalších studií poukazují na kaskádu následných reakcí po dimerizaci gp130, kterými jsou tyrosinová fosforylace, dimerizace a jaderná translokace STAT3 (intracelulární protein zprostředkující aktivaci transkripce - signal transducer and activator of transcription) [Niwa et al., 1998]. Tato aktivace STAT3 je dostatečná pro sebeobnovu ES buněk v sérovém médiu [Matsuda et al., 1999]. Při těchto studiích však nelze vyloučit produkci LIF buňkami, protože byly prováděny při vysoké buněčné denzitě. Tato zjištění podporují hypotézu, že přítomnost séra působí kladně na sebeobnovu ES buněk, protože je zdrojem BMP4. Tato a jiné studie říkají, že LIF/STAT3 a BMP/Smad signální dráhy spolu souvisí a udržují ES buňky v nediferencovaném stavu. To podporuje názor, že rovnováha mezi těmito signálními dráhami je pro udržitelnost pluripotence nebo diferenciaci ES buněk klíčová [Ying et al., 2003].

U geneticky neupravovaných myších ES buněk v médiu bez LIF dochází k diferenciaci a k současné postupné redukci exprese Oct-3/4, což dokazuje, že Oct-3/4 nemůže sám udržovat pluripotenci a že existuje(i) další faktor(y), které spolu s Oct-3/4 ovlivňují aktivitu klíčové signální dráhy gp130.

Jak již bylo uvedeno, mutace v genech kódujících cytokiny podobné LIF nebo STAT3 brání další embryogenezi během období zahájení a udržování pluripotence v myším embryu [Chambers a Smith, 2004]. Totéž platí pro mutace v gp130, které mohou narušit schopnost preimplantačního embrya přežít období embryonální diapauzy [Nichols et al., 2001]. Je zřejmé, že takto poškozené růstové faktory nemusí být funkční z hlediska pluripotence ani při kultivaci ES buněk *in vitro* [Nichols et al., 1996].

Existenci další signální dráhy pro sebeudržování ES buněk dokazuje schopnost LIF<sub>-/-</sub> ES buněk se obnovovat při neutralizaci gp130 specifickými protilátkami [Dani et al., 1998]. Jedním z nepřímých markerů pluripotence je alkalická fosfatáza, kterou tvoří jak myši, tak lidské ES buňky kultivované bez přítomnosti LIF [Chambers et al., 2003]. Myší ES buňky se tedy obnovují pouze, pokud jsou exprimovány oba klíčové geny pro Nanog a Oct-3/4. Když dochází k

jejich eliminaci, pak se identita buněk mění od buněk podobných epiblastu až po extraembryonální buňky (Oct-3/4\_/\_\_) nebo se diferencují do dalších typů embryogenetických buněk (Nanog\_/\_). Ke kultivaci myších pluripotentních buněk je nutná aktivace STAT3. Pokud je tato aktivace tlumena nepřítomností LIF nebo její funkční eliminací, pak se buňky kultivované v séru diferencují ve směsnou populaci buněk, které exprimují entodermální a mezodermální znaky. Tyto vztahy mezi Nanog a STAT3 naznačují, že u geneticky nemodifikovaných ES buněk bez LIF dochází ke ztrátě exprese Nanog. Zajímavá je podobná diferenciací pozorovaná, pokud je snižena funkce STAT3 a přeexprimovaná hladina Oct-3/4 za současné stimulace gp130. Z toho poté plyne, že Oct-3/4 funguje jako kofaktor pluripotence pouze za přítomnosti určitého množství LIF a jeho aktivita je řízena signálními drahami LIF/STAT3.

Lidské ES buňky tedy, stejně jako myší, exprimují Oct-3/4 a Nanog, ale podmínky sebeobnovy lidských ES buněk za přítomnosti Nanog nejsou ještě zcela jasné. Bylo však zjištěno, že schopnost sebeobnovy myších kmenových buněk klesá pod vlivem lidského Nanog v porovnání s působením myšího Nanog, což poukazuje na rozdíly ve struktuře tohoto proteinu u těchto dvou různých druhů savců.

Lidské ES buňky mají, jak jsme se již zmínili, navíc schopnost sebeobnovy i bez vnějšího přidávání LIF [Thomson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000] a podobně tyto podmínky platí pro sebeobnovu myších kmenových buněk epiblastu – EpiSCs [Tesar et al., 2007; Gardner a McKay, 2007]. To znamená, že aktivace STAT3 není pro jejich sebeobnovu nezbytně nutná a tudíž ani důležitá. Avšak přítomnost Oct-3/4 se jeví být nutná k potlačení extraembryonální diferenciací jak lidských, tak i myších ES buněk [Hay et al., 2004; Matin et al., 2004].

Alternativním vysvětlením může být také možná vyšší efektivní hladina exprese Nanog u lidských ES buněk, než u myších. Pak lidské ES buňky nepotřebují pomocnou vazbu mezi STAT3 a endogenním Nanog k účinné sebeobnově. Další potenciálně jednoduché vysvětlení pro popisovaný nedostatečný efekt LIF na lidské ES buňky v některých studiích může spočívat v široce rozšířeném používání ESGRO. To je komerčně dostupná forma rekombinantního myšího LIF, která se používala v mnoha studiích za situace, že nedošlo k vazbě myšího LIF na LIFR lidských embryonálních kmenových buněk (hES) [Layton et al., 1994].

K vlivu LIF a dalších růstových faktorů, jako je např. BMP4 na pluripotenci ES buněk můžeme konstatovat, že jejich funkce jsou spíše obecné a nejsou specifické pro všechny typy ES buněk. Naopak zde byly popsány funkce některých jedinečných transkripčních faktorů ES buněk, jako je Nanog a Oct-3/4. Na závěr lze tedy uvést, že blokací funkce Oct-3/4 se lidské ES buňky



diferencují v neurony a jestliže je blokován Nanog, pak se diferencují směrem extraembryonálního entodermu [Dvořák, 2007]. Autoři Chambers a Smith navíc ve své studii předpokládají, že tyto vnitřní faktory Nanog a Oct-3/4 jsou potřebné k pokračování vývoje ES buněk do epiblastu a vnější faktory (BMP4 a LIF) jsou nutné k zastavení diferenciace ES buněk do zárodečných tkání [Chambers a Smith, 2004]. Bylo zjištěno, že LIF znemožňuje diferenciaci myších ES a EC buněk do buněk mesodermu a entodermu [Pruitt a Natoli, 1992].

Z pohledu sebeobnovy lidských ES buněk je zajímavý výzkum linií EC buněk, které se většinou také sebeobnovují bez LIF nebo bez podpůrné vrstvy buněk. Při tomto pozorování se zjistilo, že EC buňky mají řadu chromozomálních abnormalit. Mezi ty běžné patří zmnožení chromozomu 12, což je zajímavé, protože gen pro Nanog je lokalizován právě na tomto chromozomu. Podobně bylo objeveno, že opakované kultivace hES buněk bez podpůrných buněk vyvolává duplikaci sekvencí chromozomu 12 [Draper et al., 2004]. Tento objev by mohl vnést světlo do problematiky tenké hranice mezi pluripotencí ES a rakovinností EC buněk. Tato pozorování chromozomálních mutací u ES a EC buněk navíc podporují názory, že nejen Nanog, ale i další důležité geny pro růstové faktory jsou lokalizovány ve stejném regionu chromozomů u potkanů, myší i lidí [Payer et al., 2003; Clark et al., 2004].

LIF nemá vliv jen na sebeobnovu a pluripotenci ES buněk, ale i na jejich diferenciaci. Ve studii autorů He aj. byl předmětem studia právě vliv LIF signální dráhy na diferenciaci ES buněk. Byla zde zkoumána role LIF v neurodiferenciaci ES buněk přes gp130 zprostředkované signální dráhou JAK/STAT3 a ERK/MEK [He et al., 2006]. Bylo zjištěno, že LIF hraje pozitivní roli v neurodiferenciaci ES buněk, což lze vysvětlit inhibicí této LIF signální dráhy přes MEK a STAT3, různými specifickými inhibitory chemické povahy. Výsledkem této studie bylo též zjištění, že tyto obě aktivované signální dráhy LIF mají vliv na regulaci diferenciace embryoidních tělísek (EBs) do buněk charakteru glie. Dále bylo objeveno, že přítomnost LIF v období EBs diferenciace snižuje apoptózu a zvyšuje proliferaci buněk. Avšak LIF naopak brzdí diferenciaci ES buněk do kardiomyocytů [Bader et al., 2000]. Z těchto dvou studií tedy vyplývá, že LIF podporuje produkci neuroektodermálních prekurzorů, ale na druhou stranu má negativní roli na diferenciaci EBs do mezodermu nebo extraembryonálního entodermu.

Klíčovými podmínkami, za kterých by LIF mohl ovlivňovat neurální diferenciaci ES buněk, je jejich nízká denzita a jejich kultivace v médiu bez séra, kdy byly identifikovány progenitory s neurálními znaky [Tropepe et al., 2001]. Za těchto podmínek byl LIF nezbytný pro neuronální diferenciaci ES buněk a navíc byl zjištěn i nárůst produkce těchto neuroprogenitorů, jež byl závislý na jeho zvýšeném množství v médiu. Tyto výsledky neukazují pouze na kladný

jednosměrný vliv signální dráhy LIF na neurodiferenciaci ES buněk v době tvorby EBs, ale navíc silně zdůrazňují její multifunkčnost v různých stádiích diferenciaci ES buněk.

V další studii EC buněk byla zjištěna funkce LIF, která je zprostředkována přes STAT3 signální dráhu a může hrát roli během časně neurogeneze *in vivo* [Pacherník et al., 2007]. Je pravděpodobné, že tento proneurální vliv LIF je závislý na spolupůsobení dalších neurodiferenčních faktorů. U myších ES/EC buněk je reprezentují kaskády JAK2 -> STAT3 a RAS -> MEK -> ERK (MAPK) hlavních signálních drah, které reagují na LIF. LIF také způsobuje rychlou aktivaci ERK a STAT3 signálních drah u EC P19 buněk [Ernst et al., 1996; Schuringa et al., 2002]. Bylo prokázáno, že LIF -/- myši přežívají [Stewart et al., 1992] díky substituci LIF jinými gp130 cytokiny ve stadiu časného embrya [Seiler et al., 2001], ale deficientní STAT3 embrya se vyvíjejí jen do „cylinder-like“ stadia vajíčka (D6) a pak nastává mezi 6,5. a 7,5. dnem rychlá degenerace tohoto embrya [Takeda et al., 1997]. Vyhodnocení vlivu STAT3 nebo ERK signální dráhy za spolupůsobení LIF, který způsobuje akceleraci neurální diferenciaci buněk linie P19 za přítomnosti AG490, specifického inhibitoru JAK2 [Schuringa et al., 2002] a UO126, specifického inhibitoru MEK [Jo et al., 2005], měla za úkol studie Pacherníka aj. Zde bylo zjištěno, že transkripční aktivita STAT3 se podílí na potenciaci neurální diferenciaci vyvolané LIF a RA u P19 buněk kultivovaných v monovrstvě v médiu bez séra [Pacherník et al., 2007].

Výše uvedené výsledky svědčí o důležitosti STAT3 signální dráhy pro neurální diferenciaci. Také zjištění, že P19 buňky jsou nejvíce podobné „egg cylinder-like“ buňkám vývojového stadia vajíčka ukazují na možnou řídicí funkci signální dráhy LIF->STAT3 v časně neurogenezi [Chambers et al., 2003]. Expres těchto klíčových molekul v raném embryu odpovídá předpokladům, že RA je syntetizována a JAK->STAT jsou exprimovány již v blastocystě [Parrow et al., 1998; Akira, 1999]. V tomto stadiu jsou přítomné i další induktory a startovací molekuly této dráhy jako právě LIF a vysoce afinitní receptory LIFR a gp130 [Murray, 1990; Nichols et al., 1996]. Tyto výsledky naznačují parakrinní interakce, kterými by mohla produkce cytokinů působit na regulaci časně embryogeneze. Tato data proto demonstrují možnou aktivní úlohu signálních drah LIF/gp130->JAK2->STAT3 v časných krocích embryogeneze. Výsledky této studie nám doplnily znalosti o roli STAT3 během časně embryogeneze, kdy k jeho aktivitě, přispívající k neurogenezi u pluripotentních P19 buněk, je navíc nutná RA. Již dříve pozorované proneurální efekty LIF mohou být pravděpodobně zprostředkovány indukcí aktivity STAT3 bez ovlivňování ERK signální dráhy. Dále bylo zjištěno, že indukce cytokinem LIF způsobuje zvýšení fosforylace STAT3 u EC P19 buněk [Kotasová, 2009]. Pro navození podobného účinku při aktivaci gp130 signalizace u těchto buněk byla

nutná řádově vyšší koncentrace jiného růstového faktoru CNTF (ciliární neurotrofní faktor = ciliary neurotrophic factor).

#### 4.6 Časná embryogeneze a diferenciace embryonálních kmenových buněk

Diferenciace představuje proces, ve kterém dochází ke strukturní a funkční specializaci buněk. *In vivo* tento proces probíhá při vývoji embrya a dochází při něm nejprve k proliferaci, kdy zygota prochází sérií mitóz, tzv. rýhováním, přičemž nedochází k růstu embrya. Následně se u savců tzv. morula vyvíjí v dutou blastocystu, kde se stupňuje proces diferenciace. Stěnu blastocysty tvoří souvislá vrstva buněk tzv. trofoblast (později vytváří plodové obaly), k němuž z vnitřní strany přiléhá shluk buněk, ICM neboli tzv. embryoblast (základ pro vlastní embryo). Poté dochází k implantaci blastocysty do sliznice dělohy. Na počátku její implantace vzniká na straně embryoblastu blastocel, jež je obrácen do dutiny blastocysty. Jedná se o primitivní entoderm, tzv. hypoblast (tvorba extraembryonálních tkání). Ostatní buňky embryoblastu jsou základem pro primitivní ektoderm (epiblast). Migrací buněk z epiblastu vzniká tzv. primitivní proužek, který je hlavním morfogenním centrem, kde se buňky epiblastu zanořují a dávají vznik další nové vrstvě buněk, entodermu a nakonec se mezi ektodermem a entodermem vytvoří mezoderm [Kotasová, 2009].

#### 4.7 Diferenciace embryonálních kmenových buněk *in vitro*

Podíl diferencovaných ES buněk v laboratorních podmínkách je většinou mnohem menší, než *in vivo*. Nezastupitelnou roli při tomto procesu zaujímá metoda embryoidních tělísek (EBs – embryoid bodies), při které dochází k odstranění LIF a ES buňky se kultivují ve visící kapce [Wiles, 1993; Keller, 1995; Weiss a Orkin, 1996; Dang et al., 2004]. EBs jsou tvořena mnoha buňkami, které se skládají v rozmanité tvary (kulovité až cystovité), a postupně se diferencují do různých typů. Výsledkem tohoto složitého procesu může být jednak chaotická struktura nebo může docházet k diferenciaci ES buněk v buňky srdeční, kosterní i hladké svaloviny, keratinocyty, melanocyty, neurony, gliové, epitelové, hematopoetické buňky, buňky secernující inzulin a mohou vytvořit i žloutkový váček. Při této spontánní diferenciaci je efektivita její indukce na specifické buněčné linie velice odlišná, a tak byly vypracovány postupy, jak ji zefektivnit. Jedním z nich je přidávání různých cytokinů, prodiferenciačních induktorů a růstových faktorů. Typickými příklady použití cytokinů je přidání růstového faktoru ES (SCF – stem cell factor) a vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF – vascular endothelial growth factor), které navozují diferenciaci ES buněk v hematopoetické progenitorové a vaskulární endotelové buňky [Kennedy et al., 1997; Cerdan et al., 2004]. Dalším podobným

případem je použití cytokinů a růstových faktorů k indukci diferenciaci ES buněk v gliové buňky. Kdy přidáním kombinace bFGF a růstového faktoru odvozeného od krevních destiček (PDGF-platelet-derived growth factor) do kultivačního média je indukována diferenciaci gliových prekurzorových buněk. Jako důsledek vysazení těchto růstových faktorů byla zaznamenána i postupná diferenciaci těchto buněk v oligodendrocyty a astrocyty [Filip et al., 2006].

U EC buněk indukuje neurální diferenciaci např. bezsérové prostředí. Tento proces může být umocněn působením prodiferenciačního induktoru jako je kyselina retinová (RA-retinoic acid) [Jones-Villeneuve et al., 1983; Bain a Gottlieb, 1998; Pacherník et al., 2002a; Pacherník et al., 2005] o níž je známo, že *in vitro* podporuje diferenciaci pluripotentních buněk různými směry v závislosti na koncentraci a dalších podmínkách kultivace [Phillips et al., 2004].

Kromě toho u ES buněk způsobuje tento prodiferenciační induktor neurogenezi [Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995]. Její efekt je v tomto směru rychlý a silný, ale diferenciaci buněk je vedena převážně do motoneuronů [Maden, 2007]. Pro neurodiferenciaci ES buněk je jedním z nejpoužívanějších Bainův protokol, který využívá diferenciaci přes EBs (4 dny) a následnou indukci RA. Rozdíl mezi diferenciací ES a EC buněk užitím RA je větší účinnost neurogeneze u EC buněk a možnost jejich diferenciaci i v jednovrstevné kultuře buněk, adherovaných na tkáňových kultivačních miskách. Přestože se tento mechanismus diferenciaci neustále intenzivně studuje, stále není zcela objasněn [Kotasová et al., 2011]. Tyto studie prokázaly, že diferenciaci myších ES buněk *in vitro* může vést ke vzniku dopaminergních neuronů, které jsou terminálně diferencovány ve fyziologicky zralý fenotyp a skutečně mohou normálně fungovat nejen *in vitro*, ale i *in vivo* [Bain et al., 1995].

Postupem, umožňujícím vznik a vývoj velmi homogenních kultur diferencovaných buněk, je jejich selekce pomocí vložených genů, které těmto genově modifikovaným buňkám umožňují rezistenci na určité léky (drug resistance gene). Tímto způsobem byly např. získány velice čisté kultury buněk srdeční svaloviny (99%). Stalo se tak prostřednictvím fúzního genu, který obsahuje  $\alpha$ -kardiální myozin (specifický pro kardiomyocyty) a cDNA (kóduje aminoglykosid fosfotransferázu jako gen rezistentní na neomycin), jež byly stabilně přeneseny do ES buněk. Následně byly ES buňky diferencovány metodou tvorby EBs a vystaveny selekci působením analogu neomycinu G418 [Whetton a Spooncer, 1998; Zhao et al., 2001; Predle et al., 2002]. Podobná strategie byla použita při diferenciaci ES buněk na buňky, které mají schopnost secernovat inzulín. I zde byla použita fúze genů, které kódují inzulín a rezistenci k antibiotiku [Soria et al., 2000; Filip et al., 2006].

#### 4.8 Buněčná terapie a neurotransplantace

V současné době jsou vkládány velké naděje do léčebných postupů založených právě na využití kmenových buněk. Pro buněčnou terapii jsou vhodné nemoci, které jsou výsledkem destrukce či dysfunkce určitého omezeného počtu typů buněk. Mezi tyto nemoci patří např. *diabetes mellitus* I. typu, při němž dochází k odumírání beta-buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu nebo Parkinsonova nemoc, jejíž příčinou je destrukce dopaminergních neuronů v oblasti *substantia nigra* středního mozku [Filip et al., 2006]. Přínos transplantace kmenových buněk pacientům s Huntingtonovou choreou, s cévní mozkovou příhodou či s míšním poraněním je v současnosti ověřován v rámci mnoha studií na laboratorních zvířatech, a v mnoha případech již i formou klinických studií [Zhang et al., 1996; Studer et al., 1998; Brustle et al., 1999; McDonald et al., 1999; Bachoud-Lévi et al., 2000; Kondziolka et al., 2000; Ma et al., 2002; Syková et al., 2006; Amariglio et al., 2009; Kim a de Vellis, 2009]. Transplantace embryonální tkáně do *substantia nigra* je v klinické praxi používána od 80. let 20. století k léčbě Parkinsonovy choroby u pacientů, kde není účinná konzervativní léčba, a tato transplantace u nich často vede k dlouhodobému zlepšení stavu [Björklund a Lindvall, 2000].

Mezi rozsáhlou heterogenní skupinu neurodegenerativních chorob patří i dědičné ataxie, které postihují mozeček, jeho spoje a případně další části nervového systému (míchu, mozkový kmen, bazální ganglia či periferní nervový systém) [Cendelín, 2008]. Přestože nepatří zdaleka k nejčastějším neurodegenerativním onemocněním (např. ve srovnání s Alzheimerovou nebo Parkinsonovou nemocí), i tak jejich výskyt není zanedbatelný. Z hlediska typu dědičnosti se ataxie dělí na autosomálně recesivní a autosomálně dominantní [Harding, 1983; Klockengether a Evert, 1998]. Autosomálně recesivní ataxie jsou způsobené ztrátou správně fungujícího proteinu, který je nezbytný pro funkci a přežívání určité populace neuronů [Klockengether a Evert, 1998]. Mezi tyto poruchy řadíme Friedreichovu ataxii nebo ataxii-teleangiektazii. Autosomálně dominantní ataxie jsou důsledkem patologického působení proteinu s abnormálními vlastnostmi [Klockengether a Evert, 1998]. Sem patří rozsáhlá skupina spinocerebelárních ataxií (SCA, neboli spinocerebelární atrofie), jež byly dříve nazývány autosomálně dominantní mozečkové ataxie.

Pro výzkum neurotransplantací jsou vhodným experimentálním modelem laboratorní zvířata postižená nějakým neurodegenerativním onemocněním nebo ischemicky, chemicky či mechanicky navozeným poškozením centrálního nervového systému (CNS) [Cendelín, 2008]. Existuje např. několik různých typů mutantních nebo transgenních myší postižených mozečkovou degenerací. Jednotlivé myší modely těchto onemocnění mozečku se

liší kombinací různých typů mozečkových buněk, které zanikají, dále mírou jejich postižení a také funkčními projevy onemocnění. Pokud je navíc postižena další část CNS, pak rozlišujeme například modely degenerace olivocerebelární nebo spinocerebelární. Některé z laboratorních myších kmenů jsou přímo modelem konkrétního lidského onemocnění (například myši typu SCA1 nebo SCA2 - spinocerebelární ataxie typu 1 a 2). Ty pak nesou stejnou nebo podobnou mutaci, která se vyskytuje u postižených lidí. Onemocnění u jiných typů myší je lidským chorobám pouze podobné a je spíše obecným modelem degenerativních chorob mozečku. K nejznámějším přirozeným mutantům s degenerací mozečku patří pcd mutanti, myši typu weaver, staggerer, hot-foot, nervous, reeler a Lurcher. Např. posledně jmenovaný typ mutantní myši Lurcher je modelem olivocerebelární degenerace, kdy heterozygoti nesou mutaci genu pro  $\delta 2$  podjednotku glutamátového receptoru. Tato porucha vyvolává apoptózu Purkyňových buněk, která následně vede k sekundárnímu úbytku granulárních buněk mozečku a neuronů dolní olivy. Důsledkem této degenerace jsou ataxie, porucha prostorového učení a orientace. Postižené homozygotní myši (Lc/Lc) nesoucí tuto mutaci nejsou životaschopné, ale nepostižení homozygoti (+/+) typu wild jsou zcela zdraví [Cendelín, 2008].

Neurotransplantace jsou prováděny s různými typy ES buněk za účelem objasnění, jaký typ bude nejvhodnější pro tuto buněčnou terapii [Kim a de Vellis, 2009].

Jednou z možností je transplantace neuronů nebo neuroprogenitorů diferencovaných z kmenových buněk pocházejících z teratokarcinomu [Brinster, 1974; McBurney a Rogers, 1982; Andrews et al., 1984]. Ta se ukázala být prospěšnou u zvířecích modelů několika neurologických onemocnění a poruch [Borlongan et al., 1998; Hurlbert et al., 1999; Baker et al., 2000; Garbuzova-Davis et al., 2002; Saporta et al., 2002]. Přitom bylo potvrzeno, že tyto buňky diferenciací ztrácí svoji tumorogenní kapacitu, ale zachovávají si některé své pozitivní vlastnosti, např. vysokou schopnost přežití v orgánech příjemce [Bliss et al., 2006; Hara et al., 2008].

Jak bylo řečeno výše, před transplantací jakékoliv linie nebo diferencovaného stadia ES buněk, je zapotřebí jejich důkladná charakterizace. Ta umožní lépe pochopit jejich fenotypové vlastnosti, vývojový potenciál a schopnost „nastartovat“ regenerační mechanismy vlastních tkání příjemce po jejich transplantaci. Důvodem nutnosti této charakterizace je skutečnost, že tyto kultury diferencovaných ES buněk mohou obsahovat i multipotentní progenitory [Okabe et al., 1996] či tumorogenní subklony, s následnou možností tvorby nádorů [Thomson et al., 1995; Thomson et al., 1998]. Bylo také prokázáno, že pokud se ES buňkám umožní plná diferenciaci v postmitotické terminálně diferencované deriváty, je přítomnost nediferencovaných kmenových buněk nižší, stejně jako

pravděpodobnost vzniku tumoru po jejich transplantaci [Brustle et al., 1997; Brustle et al., 1999; McDonald et al., 1999].

Zralé neurony je možno charakterizovat podle jedinečné morfologie, což není *in vitro*, ale ani *in vivo* vždy dostačující. Proto je třeba imunocytochemicky nebo imunohistochemicky dokazovat přítomnost obecných neuronálních znaků viz. tabulka 3 [Filip et al., 2006]:

Tabulka 3 – Seznam markerů neuronálních buněk

Název markeru	Popis markeru	Lokalizace markeru
MAP-2	Váže se na mikrotubuly v neuronech	Dendrity neuronů
$\beta$ -III tubulin	Podílí se na stavbě a funkci cytoskeletu v neuronech	Axony a dendrity neuronů
NCAM	Modulátor migrace, růstu a usměřování axonů	Povrchová adhesivní molekula neuronů
PAX-6	Transkripční faktor vyskytující se hojně v neuronálních kmenových buňkách a progenitorech	Glie mozkové kůry
MASH-1	Transkripční faktor exprimovaný v neuronálních prekurzorech	Diferencující neuronální kmenové buňky a autonomní neurony
GFAP	Proteinová složka intermediálních filament astrocytů v CNS	Astrocyty CNS
Kalbindin	Protein exprimovaný Purkyňovými buňkami	Purkyňovy buňky mozečku

MAP-2 (microtubule-associated protein 2) - mRNA a protein jsou lokalizovány v dendritech, ale ne vždy v tělech neuronů, což dokazuje, že nově syntetizovaná RNA je transportována do dendritů

diferencujících neuronů, kde dochází k proteosyntéze [Dehmelt a Halpain, 2004].

$\beta$ -III tubulin - mRNA pro tento protein je lokalizována výlučně v tělech neuronů, zatímco vznikající tubulin je přítomen v axonech i dendritech [Korzhevskii et al., 2011].

NCAM (neural cell adhesion molecule) je protein exprimovaný na povrchu neuronů, který náleží mezi imunoglobuliny (Ig) identifikované v mozku. V dospělém mozku je exprimován na regenerujících neuritech [Hansen et al., 2008].

PAX-6 (paired box gene 6) - exprese tohoto genu je klíčová v buňkách při vývoji CNS a zejména pro glie mozkové kůry [Osumi et al., 2008]. Případná absence tohoto transkripčního faktoru při neurogenезi může znamenat abnormality ve vývoji mozkové kůry, způsobené neschopností migrace buněk a pozměněnou adhezí neuronů [Aronne et al., 2008; Fotaki et al., 2008].

MASH-1 (ASCL1 - Achaete-scute complex-like 1) tento gen je exprimován v diferencujících se neuronech při vývoji jak centrálního, tak i periferního NS. Zde hraje zásadní roli zejména ve vývoji autonomních neuronů [Torii et al., 1999].

GFAP (glial fibrillary acidic protein) - je cytoskeletální protein, který je složkou intermediárních filament astrocytů a je jejich hlavním markerem. Hraje důležitou roli při komunikaci mezi neurony a astrocyty [Fuchs a Weber, 1994].

Kalbindin (calcium-binding protein) - protein exprimovaný Purkyňovými buňkami mozečku. Může zlepšovat pohybovou koordinaci. Podílí se na formování synapsí mezi těmito buňkami. Exprimovat ho mohou i další neurony mozku [Barski et al., 2003].

Buněčná terapie z pohledu neurotransplantace je nejvíce prozkoumána u Parkinsonovy choroby. Tato neurodegenerativní choroba byla zatím nejčastěji studována a také jako první klinicky léčena transplantací dopaminergních neuronů získaných z fetální tkáně. V této terapeutické studii se naplno ukázaly problémy týkající se např. přežívání a funkčnosti transplantátu. Nezralé dopaminergní neurony aplikované do *corpus striatum* sice v mnoha případech dokázaly v CNS příjemce přežít (myší laboratorní model), ale jejich schopnost alespoň částečně obnovit dopaminergní inervaci v poškozené tkáni a zlepšit funkce však zůstává za původním očekáváním [Hauser et al., 1999; Brundin et al., 2000; Piccini et al., 1999; Freed et al., 2001; Björklund et al., 2002; Takahashi, 2007].

Další nevýhodou buněčné terapie založené na transplantaci ES buněk je možnost vzniku teratomů. Tyto teratomy se objevují spontánně po transplantaci ES buněk jak u myší, tak u lidí. Vnitřní



část teratomu obsahuje nediferencované buňky, ze kterých mohou vzniknout tumory nazývané se teratokarcinomy. To je další důvod pro odklon buněčné terapie od ES buněk k dospělým kmenovým buňkám [Blum a Benvenisty, 2008; Kooreman a Wu, 2010].

## 5 Východiska a cíle

### 5.1 *Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES buněk*

#### 5.1.1 **Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších EC P19 buněk**

Nediferencované EC P19 buňky byly kultivovány na tkáňových kultivačních miskách a v sérovém médiu, pak byly diferencovány pomocí RA a média bez séra do stadia neuronů. Následně byla obě stadia charakterizována dle přítomnosti znaků (markerů) některými molekulárně-biologickými metodami (imunocytochemie, RT-qPCR a western blotu-WB).

#### 5.1.2 **Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES D3 buněk**

Nediferencované myší ES buňky linie D3 byly kultivovány na tkáňových kultivačních miskách v sérovém médiu s LIF. Neurodiferenciace byla zahájena čtyřdenní kultivací D3 buněk na neadhesivních bakteriologických kultivačních miskách v médiu bez LIF. Vzniklá embryoidní tělíska (EBs) byla přenesena ve stejném médiu na kultivační misku a standardní médium vyměněno za bezsérové, do kterého byla po dva dny přidávána RA. ES D3 buňky byly celkově diferencovány patnáct dní. Následně byla obě stadia charakterizována dle přítomnosti znaků (markerů) opět molekulárně-biologickými metodami (imunocytochemie a western blotu-WB).

## *5.2 Transplantace nediferencovaných EC P19 buněk a z nich odvozených diferencovaných neurálních progenitorů do CNS modelových laboratorních myší s neurodegenerativním onemocněním*

Aby mohly být transplantované EC P19 buňky ve tkáni mozečku myší pozorovány fluorescenčním mikroskopem, byly trvale transfekovány genem pro fluorescenční protein (GFP). Takto upravené EC P19 buňky byly transplantovány do mozečků dospělých myší typu Lurcher kmene B6CBA a typu wild téhož kmene. Cílem tohoto pokusu bylo zjistit úspěšnost přežívání buněk transplantátu.

## *5.3 Studium mutací v genu pro leukemický inhibiční faktor (LIF) a jejich vztahu k plodnosti žen*

Stanovili jsme výskyt mutací v genu pro LIF ve sledované populaci neplodných žen a porovnali je s kontrolní populací zdravých plodných žen. Následně jsme se pokusili charakterizovat vliv těchto mutací na úspěšnost léčby neplodnosti u studovaných žen.

## **6 Materiál a metody**

### **6.1 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES buněk**

#### **6.1.1 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších EC P19 buněk**

##### **Kultivace nediferencovaných EC P19 buněk**

Linie myších buněk EC P19 byla získána z European Collection of Cell Culture, Wiltshire, UK. Tyto buňky byly kultivovány v nediferencovaném stavu v inkubátoru při 37°C, ve vlhké atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>. Pro proliferaci těchto buněk jsme použili kultivační médium (Dulbecco's modified Eagle's medium - DMEM) doplněné 10% tepelně inaktivovaným fetálním bovinním sérem (FBS), 100 IU/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (GIBCO BRL, Chemos CZ, Prague, Czech Republic). Buňky byly kultivovány na poželatinovaných kultivačních miskách a pasážovány pomocí trypsinu podle potřeby [Pacherník et al., 2005; Hong et al., 2008].

##### **Neurodiferenciace EC P19 buněk**

Za účelem diferenciaci EC P19 buněk v neuronální buňky bylo použito bezsérové médium DMEM/F12 (1:1) doplněné o směs insulínu, transferinu, selénia a antibiotik. K indukci neurogeneze byla do tohoto média po 2 dny (D0-D2) přidávána retinová kyselina (RA, c= 5x10<sup>-7</sup> M, Sigma, Prague, Czech Republic). Po 2 dnech bylo toto médium vyměněno za totožné médium, ale bez RA [Pacherník et al., 2005; Houdek et al., 2010].

##### **Charakterizace nediferencovaných a diferencovaných EC P19 buněk**

EC P19 buňky byly charakterizovány metodami RT-qPCR (reverzní transkripce - kvantitativní real-time polymerázová řetězová reakce), imunocytochemie a western blotu, nejprve v nediferencovaném stavu (D0), pak po 3 dnech diferenciaci (D3 - stadium neuroprogenitorů) a nakonec po 10 dnech neurodiferenciaci (D10).

## RT-qPCR

Vzorky EC P19 buněk získané v uvedených intervalech diferenciaci (D0, D3, D10) byly zamrazeny a skladovány do analýzy v 1,5 ml zkumavkách (Eppendorf) při -80°C. Celková RNA byla ze vzorků získána užitím izolačního kitu Fast RNA Pro Green Kit (Q-BIOgene, Irvine, CA, USA). Reverzní transkripce (RT) byla provedena ze 3 µg celkové RNA reverzní transkriptázou Superscript III (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) za použití oligo d(T)<sub>21</sub> jako primerů. Sekvence použitých primerů pro kvantifikaci příslušných mRNA jsou uvedeny v tabulce 4 [Ešner et al., 2002; Hong et al., 2008]. Primery byly syntetizovány firmou GeneriBiotech (Hradec Králové). Kvantitativní stanovení bylo provedeno na přístroji iCycler (Bio-Rad). Jako housekeeping gen byl zvolen HPRT (gen pro hypoxanthin fosforibosyltransferázu). Tento gen patří mezi konstitutivně exprimované [Pernas-Alonso et al., 1999]. Hladina mRNA pro HPRT je velmi malá, 1 - 10 molekul na buňku [Steen et al., 1990], a tak je možno jej ustanovit jako vnitřní kontrolní mRNA (normalizér) pro RT-qPCR kvantifikaci mRNA vyskytujících se v buňce v malém množství kopií [Rey et al., 2000; Specht et al., 2001; Sellner a Turbett, 1996]. Gen pro α-fetoprotein (AFP) a jeho exprese je důležitým znakem diferenciaci v buňky entodermálního původu *in vivo* i *in vitro* při vývoji EBs. Je také prvním α-globulinem objevujícím se v krvi obratlovců během jejich ontogeneze. Jeho primárními funkcemi je zajištění specifického transportu a řízení aktivity mnoha ligandů. Mezi ně náleží i retinová kyselina, bilirubin, inhibitor serinové proteázy, které jsou esenciální pro vývoj embryonálních orgánů [Lafuste et al., 2002].

Také gen GATA-4 náleží mezi markery buněk raného entodermálního původu během diferenciaci ES buněk. Je také základním transkripčním faktorem pro vývoj kardiomyocytů a tedy morfogenezi srdce [Holtzinger et al., 2010].

Gen Brachyury (z řečtiny “brakhus” znamená krátký a “oura” ocas) náleží mezi esenciální transkripční faktory během ontogeneze buněk mesodermálního původu a to především při vývoji hřbetní struny [Kispert a Hermann, 1993; Ramirez et al., 2006; Pekkanen-Mattila et al., 2010].

Pro ověření specifity PCR produktů byla použita analýza křivky tání a elektroforéza na 1,5% agarosovém gelu (barvení ethidium bromidem). Výsledky kvantifikace exprese vybraných genů jsou udány jako relativní (vztažené k expresi housekeeping genu) a byly získány za užití  $2^{-\Delta C_t}$  přístupu [Koike et al., 2007].

Tabulka 4 – Primery užívané pro analýzu exprimovaných genů

Gen	Forward primer	Reverse primer	Délka (bp)
PAX-6	5'-TGCCCTTCCATCTTTGCTTG-3'	5'-TCTGCCCGTTCAACATCCTTAG-3'	178
MASH-1	5'-CTCGTCCTCTCCGGAAGTATG-3'	5'-CGACAGGACGCCCGCCTGAAAG-3'	303
Brachyury	5'-GAGAGAGAGCGAGCCTCCAAAC-3'	5'-GCTGTGACTGCCTACCAGAATG-3'	230
GATA-4	5'-GAAAACGGAAGCCCAAGAACC-3'	5'-TGCTGTGCCCATAGTGAGATGAC-3'	186
AFP	5'-ATGTATGCCCCAGCCATTCTGTCC-3'	5'-GAGATAAGCCTTCAGGTTTGACGC-3'	466
HPRT	5'-CTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTC-3'	5'-CAAATCAAAGTCTGGGGACGC-3'	350

### Imunocytochemie (ICC)

Nediferencované a diferencované EC P19 buňky byly kultivovány dle příslušných výše uvedených protokolů, ale na speciálních poželatinovaných krycích sklíčkách a ve speciálních kultivačních miskách. Takto získané kultury buněk byly opláchnuty PBS a fixovány 30 minut ve 4% roztoku paraformaldehydu při teplotě 4°C. Poté byly opět 2x opláchnuty roztokem PBS a permeabilizovány roztokem PBS s detergenty (Triton X100-0,2%, Nonidet - NP 40 - 0,5%) 10 minut při teplotě 4°C. Dále byl aplikován na 10 minut blokovací roztok (1% FBS, 0,05% Tween + 0,01% azid sodný v PBS) při teplotě 4°C. Značení buněk primárními protilátkami (viz tabulka 5) probíhalo v blokovacím roztoku přes noc při 4°C. Následující den byly buňky 4x propláchnuty roztokem 0,05% Tweenu 20 v PBS. Potom byly přeznačeny za tmy a při pokojové teplotě příslušnými sekundárními protilátkami dle tabulky 5 v roztoku PBS s 1% FBS s 0,05% Tweenem 20 po 10 minut. Nenavázaná sekundární protilátka byla 4x vymyta roztokem 0,05% Tweenu 20 v PBS za stejných podmínek. Značené buňky na poželatinovaných krycích sklíčkách byly zality montovacím médiem s DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid-MILIPORE) a vzniklé trvalé preparáty byly další den pozorovány fluorescenčním mikroskopem Olympus BX 41.

U nediferencovaných EC buněk byla prováděna IHC na buňkách kultivovaných 2 dny po pasáži a byl stanoven povrchový marker Lewis X antigen (protilátka FORSE-1 – se váže na karbohydrátový povrchový buněčný epitop Lewis-X (LeX), blízký stage-specific embryonic antigen (SSEAs)) a transkripční faktor (Oct-3/4). Oba markery jsou charakteristické pouze pro pluripotentní buňky. U diferencovaných buněk byla imunocytochemie prováděna 10. den diferenciací (D0) a byl stanoven neuronální marker (MAP-2), který je charakteristický pro dendrity.

Tabulka 5 – Protilátky a jejich ředění použité při imunocytochemii

EC P19 buňky	Primární protilátky	Ředění	Sekundární protilátky	Ředění
Nediferencované	Hybridoma FORSE-1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa)	1:1	anti-mouse IgG+IgM (FITC, Invitrogen)	1:750
	Oct-3/4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1:200	anti-mouse IgG Alexa Fluor 568 (Invitrogen)	1:200
Diferencované	MAP-2 (SIGMA- ALDRICH)	1:500	anti-mouse IgG (FITC, SIGMA- ALDRICH)	1:150

### Western blot (WB)

Analyzované buňky byly promyty 2x PBS a destruovány pomocí lyzačního pufru (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10% glycerol) s roztokem dodecyl sulfátu sodného (1% SDS). Koncentrace proteinů byla určována použitím DC Protein Assay Kit (Bio-Rad). Jednotlivé lyzáty byly doplněny bromfenolovou modří (0.01%) a  $\beta$ -merkptoethanolem (1%). Odpovídající množství získaných proteinů (10  $\mu$ g/ řada) byla analyzována pomocí SDS-PAGE na 10% gelu. Po elektroforéze byly separované proteiny pomocí elektroblotingu přeneseny na polyvinylidindifluoridovou membránu (Immobilon-P, SIGMA-ALDRICH), příslušné proteiny detekovány užitím odpovídajících primárních a sekundárních protilátek a vizualizovány dle návodu ECL+Plus reagent (Amersham Pharmacia Biotech). Byly použity následující protilátky: myší monoklonální protilátka proti N-CAM (neural-cell adhesion molecule; C0678, Sigma), myší monoklonální protilátka proti isotypu neuronálně-specifického  $\beta$ -III tubulinu (11-264-C100, ExBio), králičí polyklonální protilátka proti p27 (sc-528, Santa Cruz Biotech.), králičí polyklonální protilátka proti Oct-3/4 (sc-9081, Santa Cruz Biotech.) a králičí polyklonální protilátka proti cdk4 (sc-260, Santa Cruz Biotech.).

## 6.1.2 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších (m) ES D3 buněk

### Kultivace nediferencovaných mES D3 buněk

Linie myších ES buněk D3 byla získána z European Collection of Cell Culture, Wiltshire, UK. Tyto buňky byly kultivovány na tkáňových kultivačních miskách potažených 0,1% vodným roztokem želatiny na mitomycinem C ošetřených myších embryonálních fibroblastech v DMEM obsahujícím 20% FBS, 0,05 mM  $\beta$ -mercaptoethanolu, 100 i.u./ml penicilinu, 0,1 mg/ml streptomycinu a 1000 u/ml leukemického inhibičního faktoru (LIF). Před procesem diferenciace byly tyto buňky adaptovány na kultivaci bez podpůrné vrstvy fibroblastů.

### Neurodiferenciace myších mES D3 buněk

Neurodiferenciace myších ES buněk byla započata vytvořením embryoidních tělísek (EBs) – čtyřdenní kultivací D3 buněk na neadhesivních bakteriologických kultivačních miskách bez potažení želatinou v DMEM médiu, doplněném o stejné přísady viz výše, ale bez LIF. Vzniklá embryoidní tělíška byla přenesena ve stejném médiu na standardní kultivační misku, která již byla potažena želatinou. Následně byla neurodiferenciace indukována chemicky, kdy následující den bylo standardní médium vyměněno za DMEM/F12 (1:1) doplněné o roztok ITS (insulin, transferrin, selenium - PAA Laboratoreis GmbH) a stejná antibiotika. Pak byla do jedné kultivační misky na 2 dny přidána RA o výsledné koncentraci v médiu  $c = 5 \times 10^{-7} \text{M}$  [Bain et al., 1995; Okabe et al., 1996; Pacherník et al., 2002a], zatímco do druhé ne. Potom byly všechny ES D3 buňky diferencovány v bezsérovém médiu 8 dní.

### Charakterizace nediferencovaných a diferencovaných ES D3 buněk

ES D3 buňky byly charakterizovány imunocytochemicky nejprve v nediferencovaném stavu (D0), pak po 15 dnech diferenciace (D15) působením RA. Western blot byl prováděn u obou diferenciačních pokusů 7., 11., 13. a nakonec 15. den diferenciace (D15).

### Imunocytochemie

Nediferencované a diferencované mES D3 buňky byly kultivovány dle příslušných výše uvedených protokolů, ale na speciálních poželatinovaných krycích sklíčkách a ve speciálních kultivačních miskách. Takto získané kultury buněk byly opláchnuty PBS a fixovány 30 minut ve 4% roztoku



paraformaldehydu při teplotě 4°C. Po té byly opět 2x opláchnuty roztokem PBS a permeabilizovány roztokem PBS s detergenty (Triton X100-0,2%, Nonidet - NP 40 - 0,5%) 10 minut při teplotě 4°C. Dále byl aplikován na 10 minut blokovací roztok (1% FBS, 0,05% Tween + 0,01% azid sodný v PBS) při 4°C. Značení buněk primárními protilátkami probíhalo dle tabulky 6 v blokovacím roztoku přes noc při 4°C (povrchový marker LeX antigen byl opět značen primární protilátkou FORSE-1). Následující den byly buňky 4x propláchnuty roztokem 0,05% Tweenu 20 v PBS. Potom byly přeznačeny za tmy a při pokojové teplotě sekundární protilátkou v roztoku PBS s 1% FBS a 0,05% Tweenem 20 po dobu 10 minut viz tabulka 6. Nenavázaná sekundární protilátka byla 4x vymyta 0,05% roztokem Tweenu 20 v PBS za stejných podmínek. Značené buňky na poželatinovaných krycích sklíčkách byly zality montovacím médiem s DAPI (MILIPORE) a vzniklé trvalé preparáty byly další den pozorovány fluorescenčním mikroskopem Olympus BX 41.

Tabulka 6 – Protilátky a jejich ředění použité při imunocytochemii

ES D3 buňky	Primární protilátky	Ředění	Sekundární protilátky	Ředění
Nediferencované	Hybridoma FORSE-1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa)	1:1	anti-mouse IgG+IgM (FITC, Invitrogen)	1:750
	Oct-3/4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1:200	anti-mouse IgG (Alexa Fluor 568, Invitrogen)	1:200
Diferencované	MAP-2 (SIGMA-ALDRICH)	1:500	anti-mouse IgG (FITC, SIGMA-ALDRICH)	1:150
	β-III tubulin (SIGMA-ALDRICH)	1:500	anti-mouse IgG (FITC, SIGMA-ALDRICH)	1:150

## Western blot (WB)

Analyzované buňky byly promyty 2x PBS a zlyzovány pomocí lyzačního pufru (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10% glycerol) s roztokem dodecyl sulfátu sodného (1% SDS). Koncentrace proteinů byla určována použitím DC Protein Assay Kit (Bio-Rad). Jednotlivé lyzáty byly doplněny bromfenolovou modří (0.01%) a  $\beta$ -merkaptoethanolem (1%). Odpovídající množství získaných proteinů (10  $\mu$ g/ řada) byla analyzována pomocí SDS-PAGE na 10% gelu. Po elektroforéze byly separované proteiny pomocí elektrolotingu přeneseny na polyvinylidindifluoridovou membránu (Immobilon-P, SIGMA-ALDRICH), a příslušné proteiny imunodetekovány užitím odpovídajících primárních a sekundárních protilátek a vizualizovány dle návodu ECL+Plus reagent (Amersham Pharmacia Biotech). Byly použity následující protilátky: myší monoklonální protilátka proti N-CAM (neural-cell adhesion molecule; C0678, SIGMA-ALDRICH), myší monoklonální protilátka proti isotypu neuronálně-specifického  $\beta$ -III tubulinu (11-264-C100, ExBio) a králičí polyklonální protilátka proti cdk4 (sc-260, Santa Cruz Biotech).

## **6.2 Transplantace nediferencovaných EC P19 buněk a z nich odvozených diferencovaných neurálních progenitorů do CNS modelových laboratorních myší s neurodegenerativním onemocněním**

### **6.2.1 Kultivace nediferencovaných a permanentní transfekce EC P19 buněk**

Kultivace EC P19 buněk získaných z European Collection of Cell Culture, Wiltshire, UK byla prováděna *in vitro* za výše uvedených podmínek a v kultivačním médiu o shodném složení.

Permanentní transfekce buněk P19 byla provedena užitím GFP plasmidu (Clontech Laboratories, Inc.) dle návodu CalPhos<sup>TM</sup> Mammalian Transfection Kit.

### **6.2.2 Diferenciace neuroprogenitorů EC P19 buněk**

Trvale transfekované EC P19 buňky byly diferencovány do stadia neuroprogenitorů kultivací v diferenciálním médiu o výše uvedeném složení a indukovány RA o stejné koncentraci a době působení. Jejich diferenciace však byla ukončena již 3. den. Následně byly neuroprogenitory užity k transplantaci do mozečku myší.

### 6.2.3 Pokusná zvířata

Použito bylo celkem 101 dospělých laboratorních myší typu wild a Lurcher kmene B6CBA. Průměrný věk v den operace byl 258,4 dne (směrodatná odchylka 62,4 dne). Myši byly chovány za standardních podmínek konvenčního chovu: periody světla a tmy se střídaly pravidelně po 12 hodinách (6-18/18-6). Teplota v chovném zařízení byla 22-24 °C a vlhkost vzduchu byla udržována v rozmezí 60-80%. Voda a potrava byly dostupné *ad libitum*. Myši byly drženy v plastových chovných klecích s drátěným víkem (1-2 myši v kleci o rozměrech 11 x 25 cm a výšce 14 cm, 2-4 myši v klecích o rozměrech 18 x 25 cm a výšce 14 cm).

25 myším typu wild (12 samců, 13 samic) a 25 myším typu Lurcher (12 samců, 13 samic) byly transplantovány nediferencované EC P19 buňky. 26 myší typu wild (13 samců a 13 samic) a 25 myší Lurcher (13 samců, 12 samic) dostalo neuroprogenitory odvozené od linie P19.

### 6.2.4 Transplantace

Transplantace byla provedena v celkové anestezii směsí ketaminu (100 mg/kg tělesné hmotnosti) a xylazinu (16 mg/kg tělesné hmotnosti) aplikovanou intraperitoneálně. Nejprve byla anestetizovaná myš ostříhána srst v parietální a okcipitální oblasti hlavy, která pak byla potřena dezinfekčním roztokem. Myš byla upevněna do stereotaxického aparátu a operační pole bylo opět vydezinfikováno. Na oční rohovky byl kápnut fyziologický roztok a oči byly překryty vrstvičkou buničité vaty, zvlhčené rovněž fyziologickým roztokem k prevenci osychání rohovek. Kožní řez byl veden skalpelem ve střední čáře v parietální a okcipitální oblasti hlavy. Délka řezu byla asi 1 cm. V okcipitální kosti ve střední čáře mezi lambdou a úpony šíjových svalů (bregma – 7,0 mm) byl vyvrtán otvor o průměru do 2 mm. Mikrostríkačkou Hamilton vloženou do automatické mikropumpy byl otvorem do mozečku příjemce injikován 1 µl buněčné suspenze (celkový počet buněk 50 000/1 µl DMEM média) konstantní rychlostí 0,5 µl/min. Hrot jehly zasahoval 1,6 mm pod vnější povrch lebky. V průběhu aplikace byl hrot jehly posunut o 0,1 mm výše. Po aplikaci transplantátu byla jehla ponechána 5 minut v otvoru, aby se zabránilo zpětnému úniku buněčné suspenze z lebky a poté byla jehla plynule vytažena. Rána byla sešita v jedné vrstvě vstřebatelným šicím materiálem (Monolac, Chirlac rapid, Chirmax s.r.o.). Myš byla pak uvolněna ze stereotaxického držáku, rána byla dezinfikována a zvíře uloženo na vyhřívanou podložku, dokud se neobjevila spontánní motorická aktivita. Poté byla vrácena do chovné klece.

### 6.2.5 Histopatologické vyhodnocení transplantací

21 dnů po transplantaci byly pokusné myši usmrceny hlubokou anestezií intraperitoneálně aplikovaným tiopentalem (0,2 ml 10% roztoku) a transkardiálně perfundovány fosfátovým pufrům (pH 7,4) a následně 4% paraformaldehydem ve fosfátovém pufru (pH 7,4). Mozky byly vyjmuty a vloženy k postfixaci na několik dnů do 4% paraformaldehydu (pH 7,4). Pak byly vloženy přes noc na 16-20 hodin do 30% roztoku sacharózy ke kryoprotekci a zamraženy. Následně byly mozečky krájeny na kryostatu tak, že 40  $\mu$ m silné frontální řezy byly ukládány jednotlivě do 24 jamkové destičky s fosfátovým pufrům (pH 7,4). Na skla zamontované řezy byly potom vyšetřeny fluorescenčním mikroskopem. Transplantované a další z nich odvozené buňky byly identifikovány podle přirozené zelené fluorescence GFP. Fluorescenční mikroskopie umožnila rovněž posoudit lokalizaci a základní morfologii transplantátu (velikost, kompaktnost, expanzi nebo naopak destrukci fluoreskující transplantované tkáně). Řezy obsahující GFP pozitivní buňky byly fotograficky dokumentovány. Každý druhý řez byl poté obarven hematoxylin-eosinem a zbylé řezy byly obarveny dle Nissla, což je speciální barvení znázorňující typické endoplasmatické retikulum neuronů. Obě výše jmenovaná barvení pomohla podrobněji vizualizovat morfologii transplantátu a okolní tkáně.

Za myš s přežívajícím transplantátem, byla považována ta, u níž byla nalezena zeleně fluoreskující tkáň, byť se jednalo o několik buněk. Pokud byl zjištěn pouze zeleně fluoreskující detritus (nikoliv však buňky), anebo když nebyly patrné žádné známky fluorescence, byl transplantát považovaný za zaniklý. Za expanzivně se chovající transplantát byl považován takový, který deformoval tvar okolních struktur (mozečku, mezencefala) a odkláněl nebo stlačoval jejich části. Za destrukci transplantátu byl považován otvor uvnitř transplantátu anebo dutina, v jejíž stěně se nacházel GFP pozitivní detritus a buňky. U každého přežívajícího transplantátu byla sledována také jeho lokalizace a charakter ohraničení v rámci celého mozku.

### 6.2.6 Imunohistochemie (IHC)

15 laboratorním myším typu wild kmene B6CBA byly obdobně transplantovány GFP neuroprogenitory odvozené od EC P19 buněk. 2 měsíce po transplantaci byly pokusné myši usmrceny a jejich mozky zpracovány již zmíněným postupem na jednotlivé řezy. Řezy obsahující GFP pozitivní buňky byly též fotograficky zdokumentovány. Vybrané GFP řezy byly poté obarveny, tak abychom identifikovali transplantované buňky

pozitivní na MAP-2 (neurony), GFAP (astrocyty) a kalbindin (Purkyňovy buňky). Pro obarvení těchto typů buněk jsme použili následující fluorescenční imunohistologickou metodu:

Nejprve byl na řezy aplikován na 1hod. blokovací roztok (10% kozí serum, 0,5% roztok Tweenu, 0,1% roztok FBS v PBS) při laboratorní teplotě. Značení primárními protilátkami probíhalo v PBS přes noc při 4°C (anti-GFAP-Cy3 produced in mouse, SIGMA-ALDRICH, ředění 1:800; anti-MAP-2, SIGMA-ALDRICH, ředění 1:400; anti-calbindin, SIGMA-ALDRICH, ředění 1:1000 produced in rabbit). Následující den byly buňky 3x propláchnuty roztokem PBS. Potom byly po dobu 2 hod. přeznačeny za tmy a při pokojové teplotě sekundární protilátkou v roztoku PBS (goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 568, Invitrogen, ředění 1:200). Nenavázaná sekundární protilátka byla 3x vymyta roztokem PBS za stejných podmínek. Obarvené řezy byly přeneseny na podložní sklíčka a zality montovacím médiem s DAPI (MILIPORE). Takto připravené preparáty byly následující den pozorovány fluorescenčním mikroskopem Olympus BX 41.

#### 6.2.7 Statistické vyhodnocení

V jednotlivých experimentálních skupinách myší byla hodnocena frekvence přežívání transplantátu a výskytu různých typických morfologických charakteristik transplantované tkáně (lokalizace, expanse a destrukce). Statistická významnost rozdílů mezi skupinami myší (wild typ a Lurcher, nediferencované buňky P19 a neuroprogenitory) byla hodnocena Fisherovým testem. Za statisticky významné byly považovány rozdíly, pro které platí  $p < 0,05$ .

Všechny pokusy byly prováděny se souhlasem Odborné komise pro práci s pokusnými zvířaty LF UK v Plzni a v souladu s etickými a právními normami ČR.

### 6.3 *Studium mutací v genu pro leukemický inhibiční faktor (LIF) a jejich vztahu k plodnosti žen*

Vyšetřili jsme celkem 151 infertilních a 205 plodných žen (věk mezi 22. a 41. rokem života). K analýze výskytu mutací jsme použili elektroforézu probíhající v teplotním gradientu (TGGE) s následnou sekvenací všech TGGE pozitivních vzorků. Soubor neplodných žen jsme rozdělili na základě výskytu imunopatií na 2 skupiny. Do skupiny A byly zařazeny ženy bez imunopatií, ale s ovariálním, tubárním a andrologickým faktorem ( $n=107$ ). Do skupiny B ženy s předpokládanými imunopatiemi, jako je idiopatická infertilita a endometrióza ( $n=44$ ). Pacientky klasifikované v naší studii jako idiopaticky neplodné měly

ovulační cykly, laparoskopicky prokázanou průchodností obou vejcovodů a absenci pelvických adhezí či endometriózy, a též normální hysteroskopický či hysterosalpingografický nález. Jejich partneři měli normální spermioqramy a nebyly u nich prokázány antispermatické protilátky.

### 6.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) a vyšetřování mutací v genu pro LIF

Pro sériová vyšetření DNA jsme používali gelovou elektroforézu probíhající v teplotním gradientu. Analyzovány byly kódující oblasti a exon-intronové spoje genu. Exon 3 bylo nutno rozdělit pro potřeby TGGE na tři části, takže jsme vyšetřovali celkem pět PCR fragmentů. Za účelem vytvoření termostabilních domén byly primery modifikovány pomocí Poland java script přidáním GC svorek ([www.biophys.uni-duesseldorf.de/POLAND/poland.html](http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/POLAND/poland.html)) viz tabulka 7. PCR reakce byla sestavena takto: 12.5 µl HotStart Taq PCR Master Mix (QIAGEN), 10 pmol příslušných primerů, 100 ng DNA a destilovaná voda do celkového objemu 25 µl. Amplifikační program se skládal z denaturace při 95 °C po dobu 15 minut a pak 35 cyklů skládajících se z denaturace při 95 °C po dobu 30 sekund, annealingu při 60 °C po dobu 30 sekund a extenze při 72 °C po dobu 1 minuty. PCR byla zakončena finální extenzí při 72 °C po dobu 7 minut. Amplifikační program se shodoval pro všechny analyzované exony, s výjimkou exonu 1, u něhož byla teplota annealingu 50 °C. Délka a kvalita PCR produktů byla kontrolována na standardním agarózovém gelu.

Tabulka 7 – Použité primery

Exon	Jméno	Sekvence 5' → 3'
E1	E1F-GC	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGC CCG CTATGATGCACCTCAAACAA*
	E1R	GGGGCGGGTGTATTTA*
E2	E2F	GCCACCCTTTCCTGCCTTCTAC**
	E2R-GC	CGGGCGGGGGCGGGCGGGCCGGGCGCGGGGCGCGGGCG GGCG TCCCTGCCATCTCCTGTTCAGTATC**
E3.1	E3.1F-GC	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGC CCGACAATTCCAGATGCTTACAGGG **
	E3.1R-GC	GCGGG GCCAAGGTACACGACTATGC**
E3.2	E3.2F	CCCAACAACCTGGACAAGCTATG**
	E3.2R-GC	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGC CCCCCGTAGGTCACGTCCACATG**
E3.3	E3.3F-GC	CCCGC CCTCCTTAGCAACGTGCTGT*
	E3.3R-GC	CGGGCGGGGGCGGGCGGGCCGGGCGCGGGGCGCGGGCG GGCGACATCTGGACCCAACCTCCTG*

Vyhledávání mutací bylo prováděno analýzou heteroduplexů TGGE (Biometra, Goettingen, Germany) za použití akrylamidových gelů (8% akrylamid (AA:bis-AA [37,5:1]), 6M urea, 1x MOPS, 2% glycerol).

TGGE analýzy byly prováděny ve dvou krocích – nejprve byly podmínky elektroforézy optimalizovány pro každý PCR fragment zvlášť na perpendikulárních gelech. Jednotlivé vzorky pacientek byly analyzovány na paralelních gelech. Všechny paralelní gely běžely po dobu 1 hodiny 30 minut. Teplotní gradienty byly pro každý fragment specifické a jsou zaznamenány v tabulce 8. DNA byla detekována metodou barvení stříbrem.

Tabulka 8 - Teplotní gradienty používané při paralelních TGGE gelech

Exon	Teplotní gradient
E1	55°C - 63°C
E2	53°C - 65°C
E3.1	58°C - 66°C
E3.2	60°C - 65°C
E3.3	58°C - 62°C

Všechny vzorky pozitivní v TGGE jsme následně sekvenovali na sekvenátoru ABI Prism 310 (PE/Applied Biosystems, Foster City, USA) při 11.3 kV po dobu 20 minut.

Statistické zhodnocení rozdílu mezi skupinou neplodných pacientek s mutacemi v genu pro LIF a skupinou infertilních žen bez mutací bylo provedeno pomocí Fisherova exaktního testu pro čtyřpolní tabulky.

Tato studie byla též schválena etickou komisí LF UK v Plzni a všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas.



## 7 Výsledky

### 7.1 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES buněk

#### 7.1.1 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších EC P19 buněk

Získané hodnoty kvantifikačního stanovení exprese vybraných genů jsou udány jako relativní  $C_t$  (vztažené k expresi housekeeping genu) a relativní počty kopií (R) jsou uvedeny v následující tabulce 9:

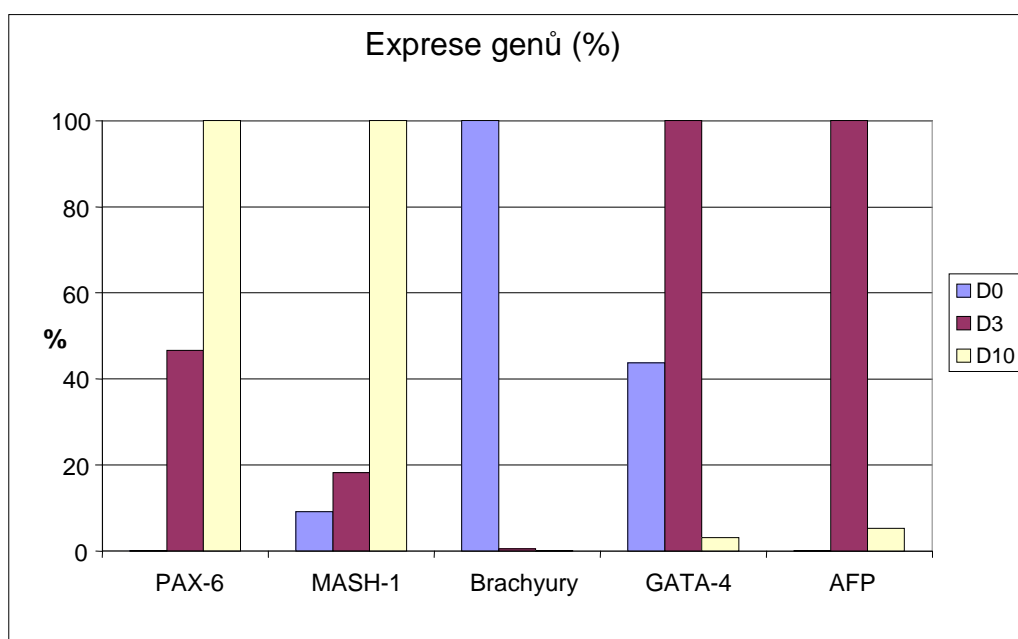
Tabulka 9 – Výsledky kvantifikace mRNA -  $C_t$  hodnoty a relativní počty kopií (R)

Gen	Den	Průměrná $C_t$	R
HPRT	D0	19.15	-
	D3	19.55	-
	D10	19.70	-
Pax-6	D0	32.30	0.00011
	D3	22.50	0.12941
	D10	21.55	0.27739
Brachyury	D0	21.70	0.17076
	D3	29.65	0.00091
	D10	32.75	0.00012
Mash-1	D0	29.75	0.00064
	D3	29.00	0.00143
	D10	26.85	0.00704
GATA-4	D0	29.75	0.00064
	D3	29.00	0.00143
	D10	34.15	0.00005
AFP	D0	36.45	0.00001
	D3	25.50	0.01618
	D10	29.90	0.00085

Pro jednodušší porovnání získaných hladin exprese jednotlivých genů v různých stadiích diferenciace EC buněk, byly jejich relativní hodnoty přepočítány na procentuální viz tabulka 10 a pro lepší představu znázorněny grafem viz obrázek 1. Tyto hodnoty exprese jsou uvedeny jako poměrná čísla, kde nejnižší hodnoty exprese jednotlivých markerů byly stanoveny na 1%.

Tabulka 10 – Výsledky kvantifikace mRNA –  
přepočítané relativní hladiny (maximální exprese je  
zvýrazněna tučně)

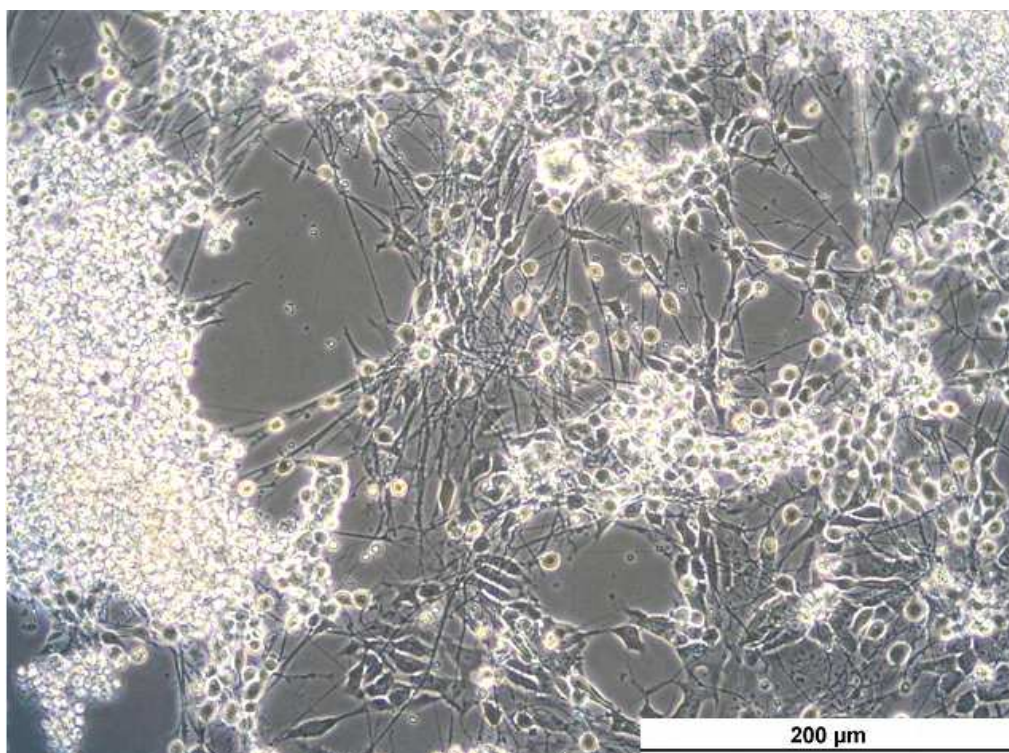
Gen	D0	D3	D10
PAX-6	1	1176	<b>2521</b>
MASH-1	1	2	<b>11</b>
Brachyury	<b>1448</b>	8	1
GATA-4	14	<b>32</b>	1
AFP	1	<b>2610</b>	137



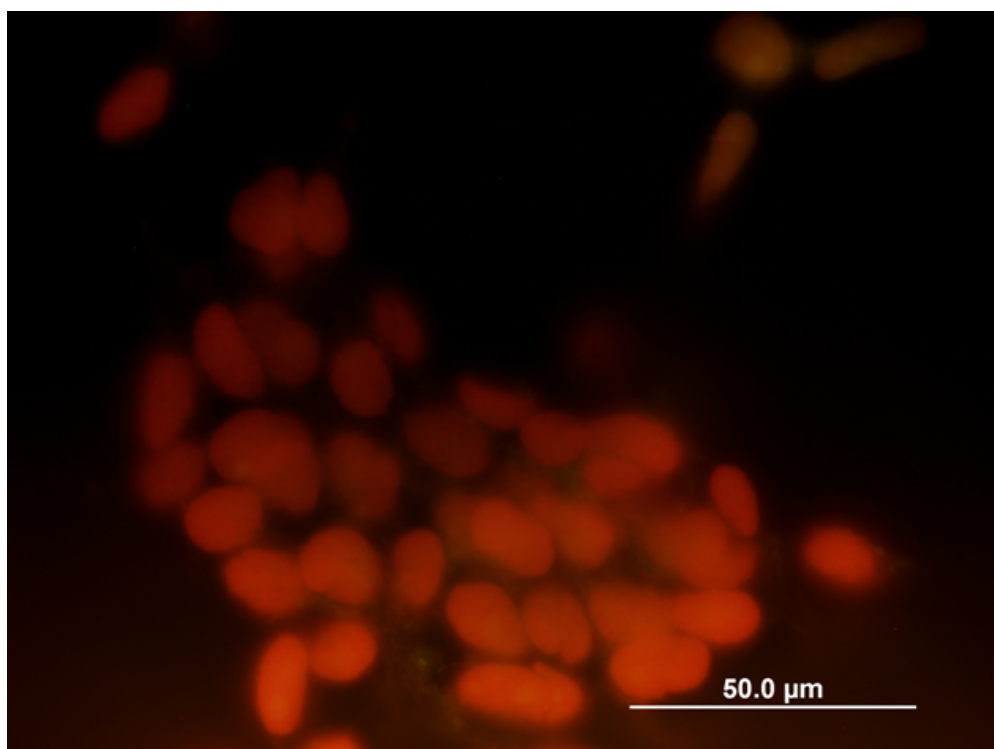
Obrázek 1 – Graficky zpracované výsledky kvantifikace mRNA z tabulky 10, které jsou znázorněny v procentech, kdy nejvyšší hodnota exprese markeru není zaznamenána, jelikož přesahuje

Hladiny exprese genů PAX-6 a MASH-1 mají rostoucí tendenci a naopak exprese genu Brachyury klesá během procesu neurodiferenciace. Hladiny exprimovaných genů GATA-4 a AFP byly nejvyšší po indukci diferenciaci RA [Babuška et al., 2010].

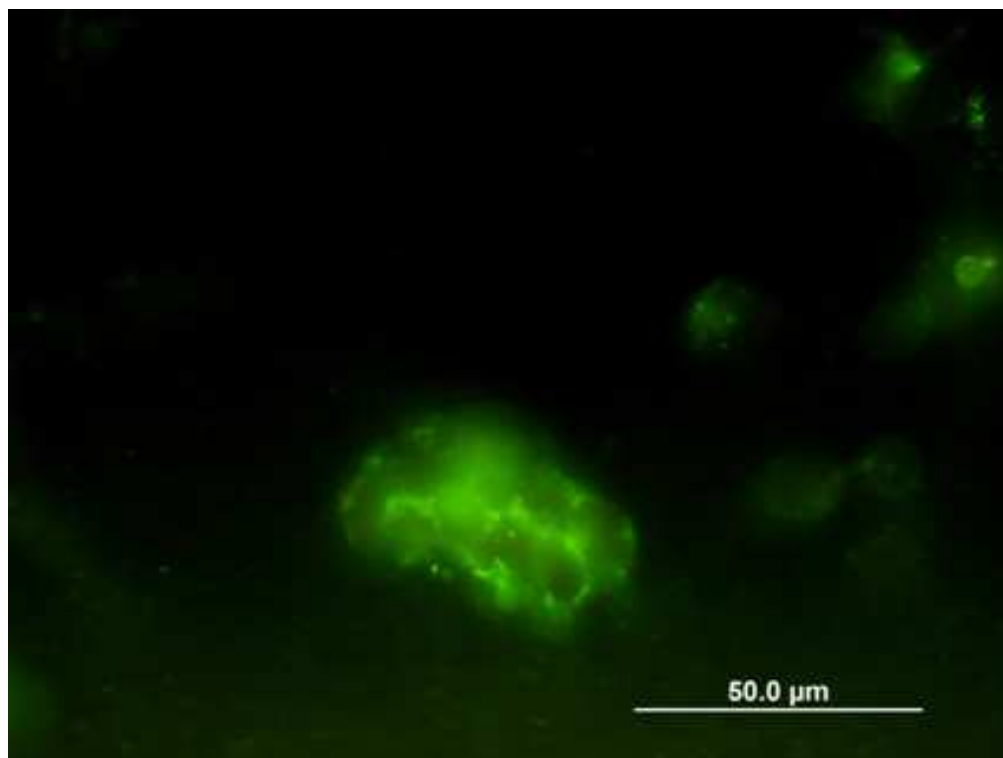
Nediferencované EC buňky byly imunocytochemicky pozitivně testovány na přítomnost markerů pluripotence - Oct-3/4 a antigen LeX (obrázek 3, 4). Během diferenciaci (D10) postupně převládají kolonie buněk s neuronálním fenotypem (obrázek 2). EC buňky se nejprve zakulatí, tvoří výběžky a nakonec se organizují v kolonie tvaru neurosfér s neurity. Tento charakter buněk byl opět imunocytochemicky potvrzen přítomností markeru MAP-2 (obrázek 5). Dále byly tyto buňky shledány pozitivními na další neuronální markery - N-CAM a  $\beta$ -III tubulin pomocí western blotu (obrázek 6).



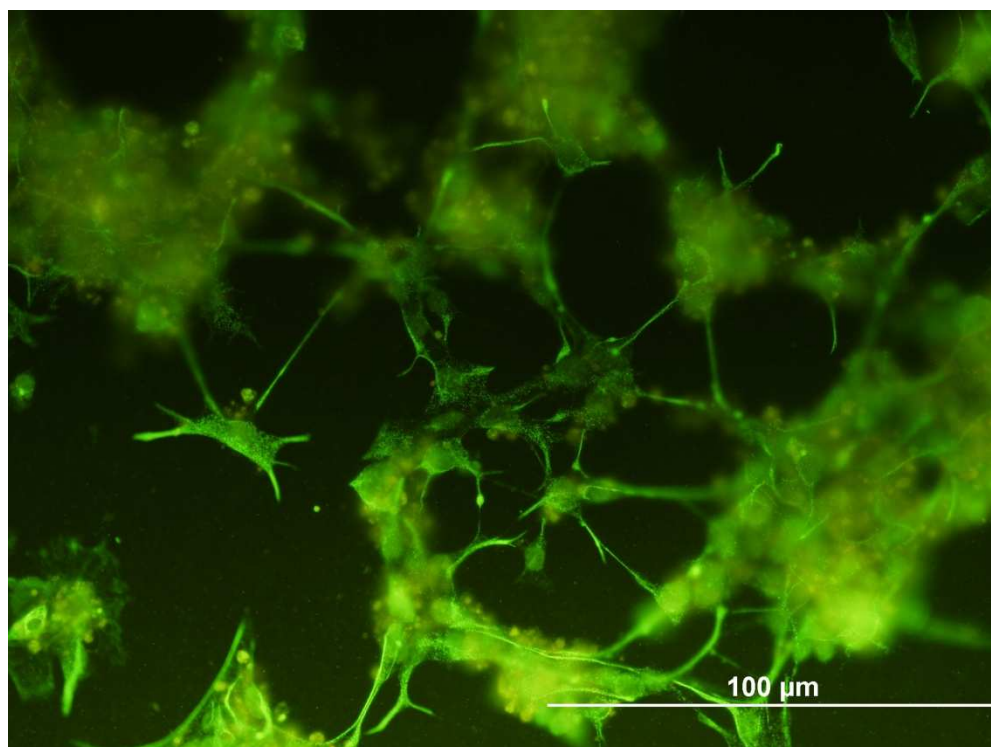
Obrázek 2 – Neurální fenotyp EC P19 buněk po indukci RA (D10)



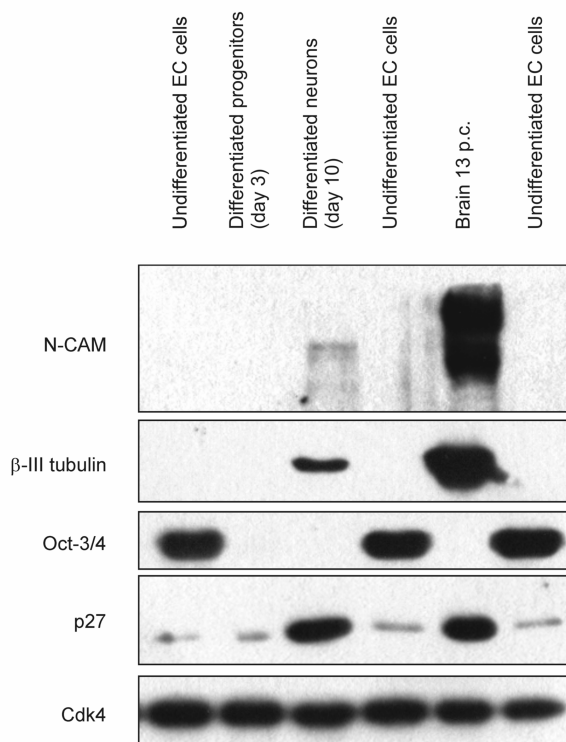
Obrázek 3 – Immunocytochemické stanovení Oct-3/4 u nediferencovaných EC P19 buněk



Obrázek 4 – Imunocytochemické stanovení nediferencovaných EC P19 buněk na Lewis X antigen



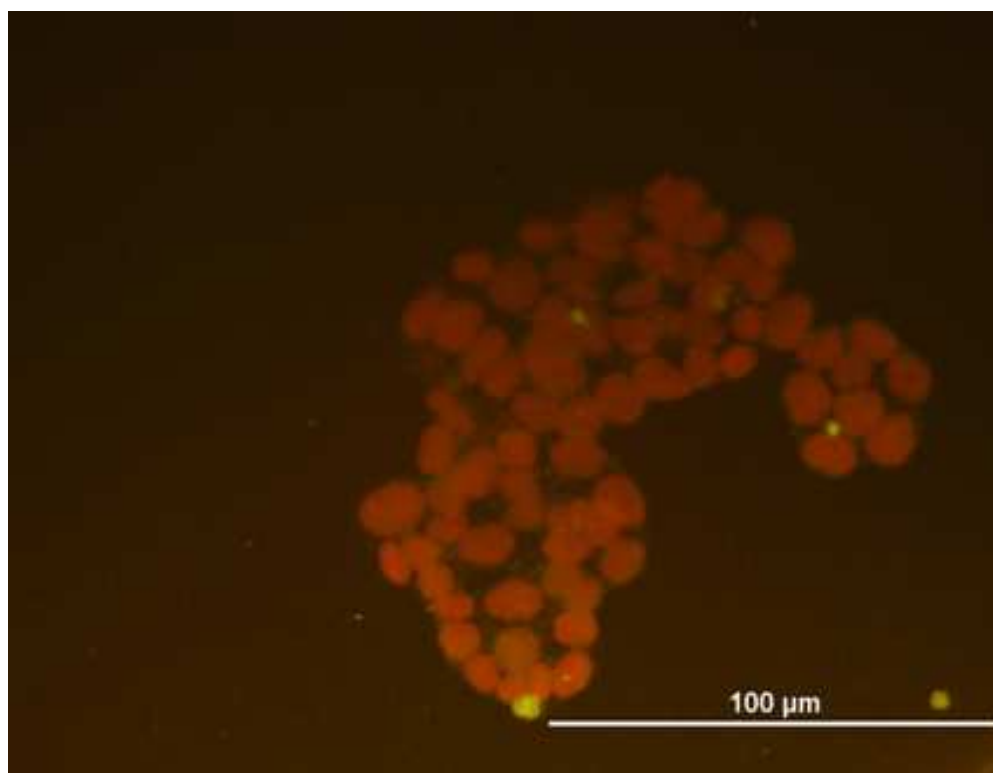
Obrázek 5 – Imunocytochemické stanovení MAP-2 u diferencovaných EC P19 buněk



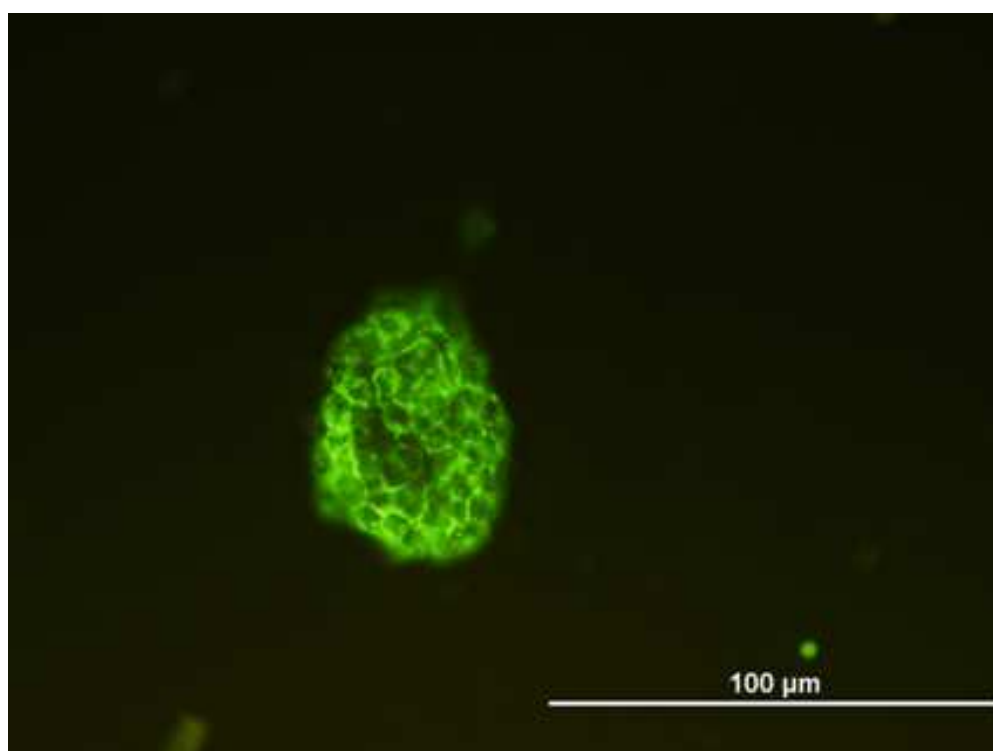
Obrázek 6 – Western blot nediferencovaných a diferencovaných EC P19 buněk

### 7.1.2 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES D3 buněk

Nediferencované myší kmenové buňky linie D3 byly v kultuře kulovité a bez výběžků. Imunocytochemicky u nich byla prokázána přítomnost markerů pluripotence – Oct-3/4 a LeX antigen (obrázek 7, 8).



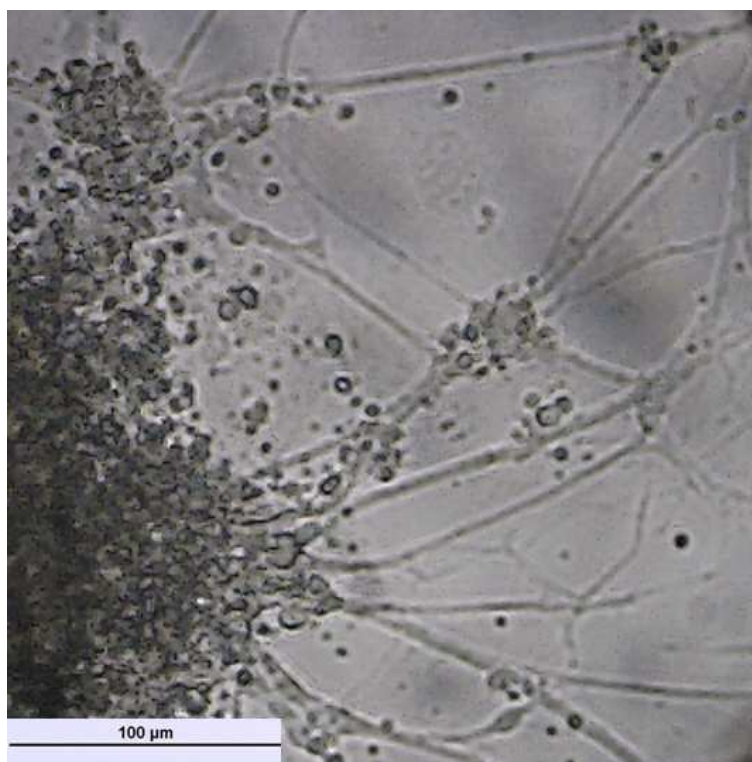
Obrázek 7 – Immunocytochemické stanovení Oct 3/4 u nediferencovaných ES D3 buněk.



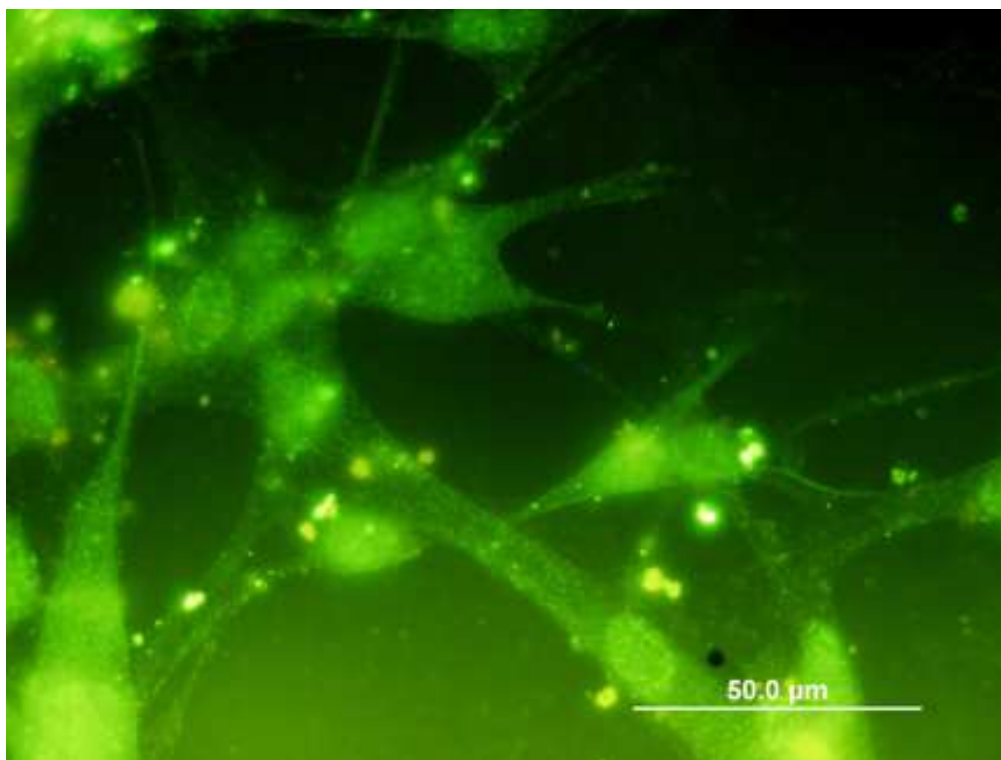
Obrázek 8 – Immunocytochemické stanovení nediferencovaných ES D3 buněk na LeX antigen



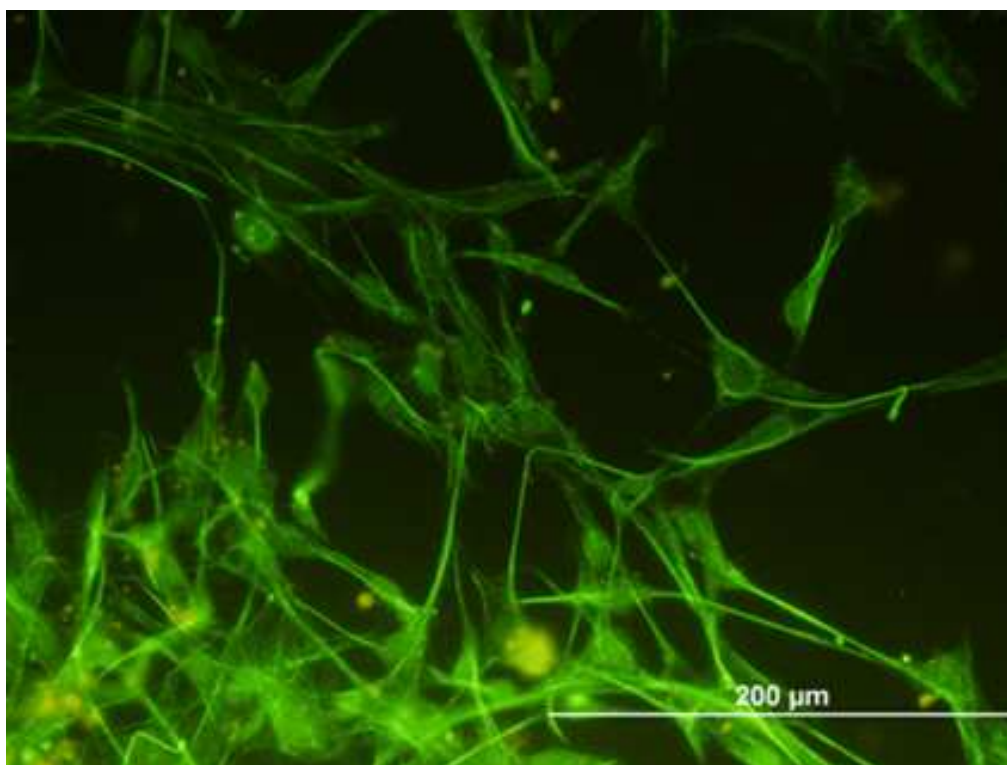
Výsledkem diferenciací pomocí RA byl růst buněčných výběžků v průběhu 7 až 15 dní a změna morfologie buněk v elementy neuronálního fenotypu, s charakteristickou somadendritickou morfologií (obrázek 9). Neuronální diferenciaci těchto buněčných elementů potvrzovala i imunocytochemicky prokázaná přítomnost markerů MAP-2 a  $\beta$ -III tubulinu (obrázek 10 a 11). S využitím western blotu byla u této diferenciací potvrzena pozitivita i na neuronální marker N-CAM (obrázek 12). Western blot provedený v lyzátech elementů diferencovaných bez indukce RA ukázal na nízkou pozitivitu neuronálního markeru N-CAM a na negativitu  $\beta$ -III tubulinu (obrázek 12). Neefektivnost tohoto postupu neurodiferenciací potvrdila i morfologie buněk, které byly bez neuronálních výběžků.



Obrázek 9 – mES buňky s neuronálním fenotypem, s charakteristickou somatodendritickou morfologií po 15 dnech diferenciací

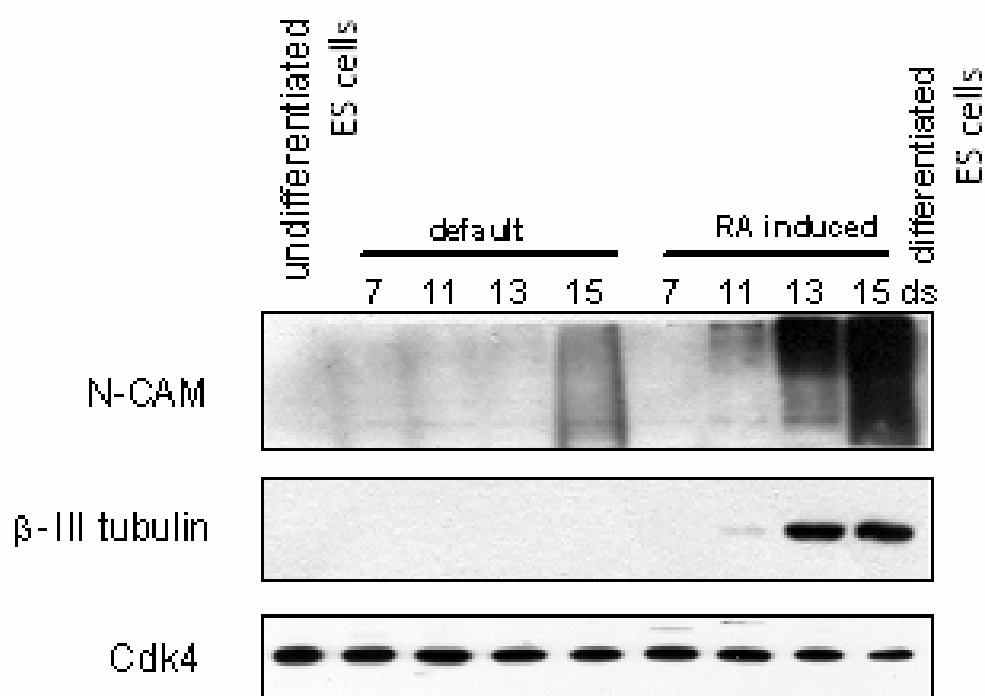


Obrázek 10 – Imunocytochemické stanovení  $\beta$ -III tubulinu u diferencovaných ES D3 buněk



Obrázek 11 – Imunocytochemické stanovení MAP-2 u diferencovaných ES D3



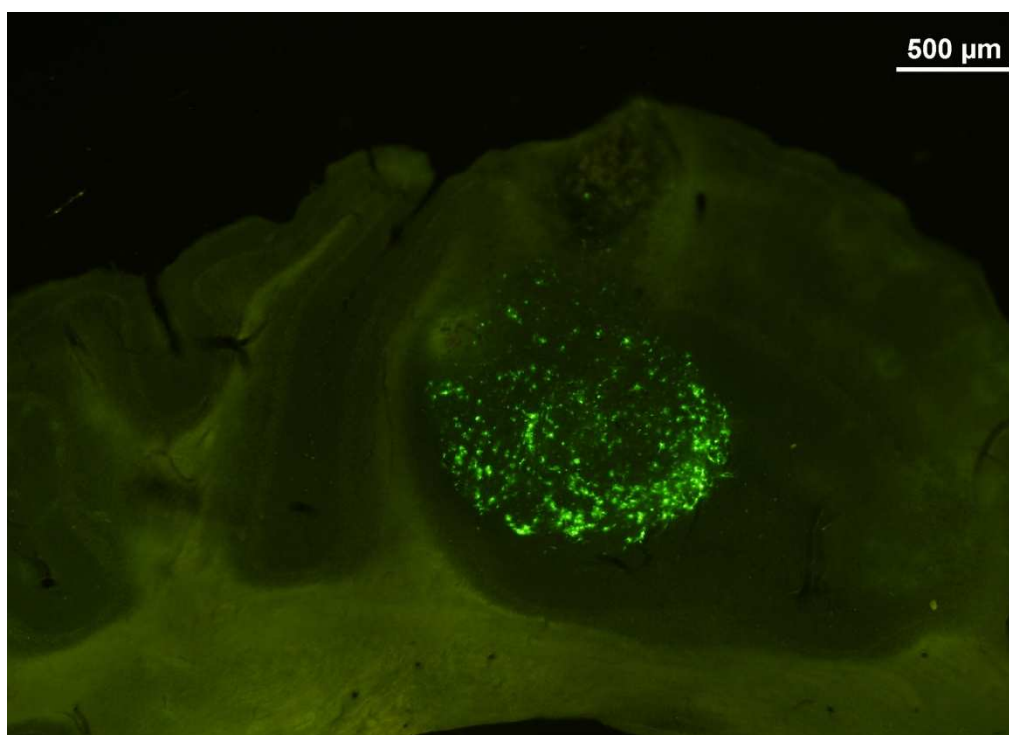


Obrázek 12 – Western blot nediferencovaných a diferencovaných ES D3 buněk

## 7.2 Transplantace nediferencovaných EC P19 buněk a z nich odvozených diferencovaných neurálních progenitorů do CNS modelových laboratorních myší s neurodegenerativním onemocněním

Transplantované nediferencované buňky P19 i neuroprogenitory vytvářely ložiska fluoreskujících buněk v oblasti aplikace viz obrázek 13.

Transplantované buňky se nešířily do vzdálenějších oblastí a nekolonizovaly mozečkovou kůru příjemce. V některých případech neměl fluoreskující transplantát ostrou hranici oproti nefluoreskujícímu okolí, v jiných byla naopak patrná ostrá hranice a deviace nebo komprese okolních struktur tímto útvarem.



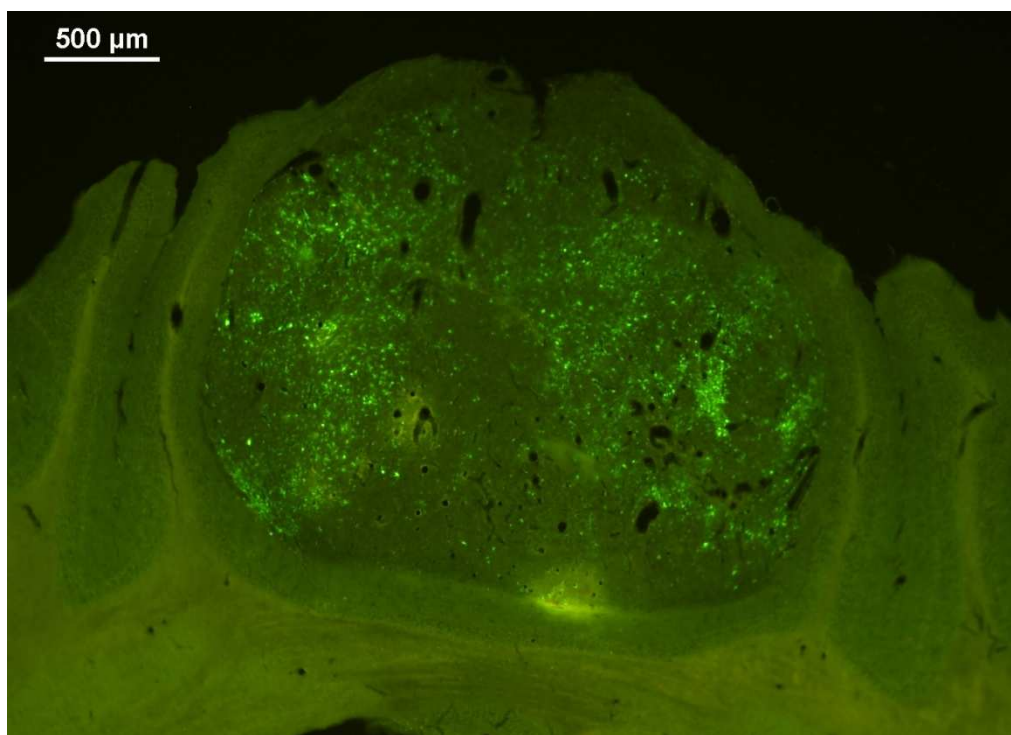
Obrázek 13 – GFP pozitivní buňky na řezu mozečku WT myši po transplantaci neuroprogenitorů

### **Přežití transplantovaných buněk**

U myši shodného typu, tedy u myši WT či Lc, 3 týdny po aplikaci nebyl v přežívání transplantátů složených z neuroprogenitorů a nediferencovaných EC buněk linie P19 statisticky významný rozdíl viz tabulka 11 a 12, obrázky 17 a 18. Při srovnání přežívání transplantátu z neuroprogenitorů bylo zjištěno významně vyšší přežívání u myši typu WT ( $p=0,0078$ ) než u mutantů Lc (tabulka 12, obrázky 17 a 18). U myši typu WT transplantovaných pro imunohistologii, kterým byly aplikovány pouze neuroprognitory, byly 2 měsíce po jejich aplikaci objeveny transplantáty u 11 z 15 myši (73,3%).

### **Morfologie transplantátu**

Z hlediska sledované morfologie transplantátu byl expanzivní charakter vždy přítomen po aplikaci nediferencovaných buněk P19 (tabulka 13, 14, obrázek 14, 25) na rozdíl od neuroprogenitorů, kde byla expanze výrazně nižší (obrázek 19, 25, tabulka 13 a 14). Ve skupinách transplantovaných myši typu WT byla expanze významně častější po aplikaci nediferencovaných buněk P19 v poměru k neuroprogenitorům ( $p=0,0017$ , viz tabulka 15, obrázek 25).

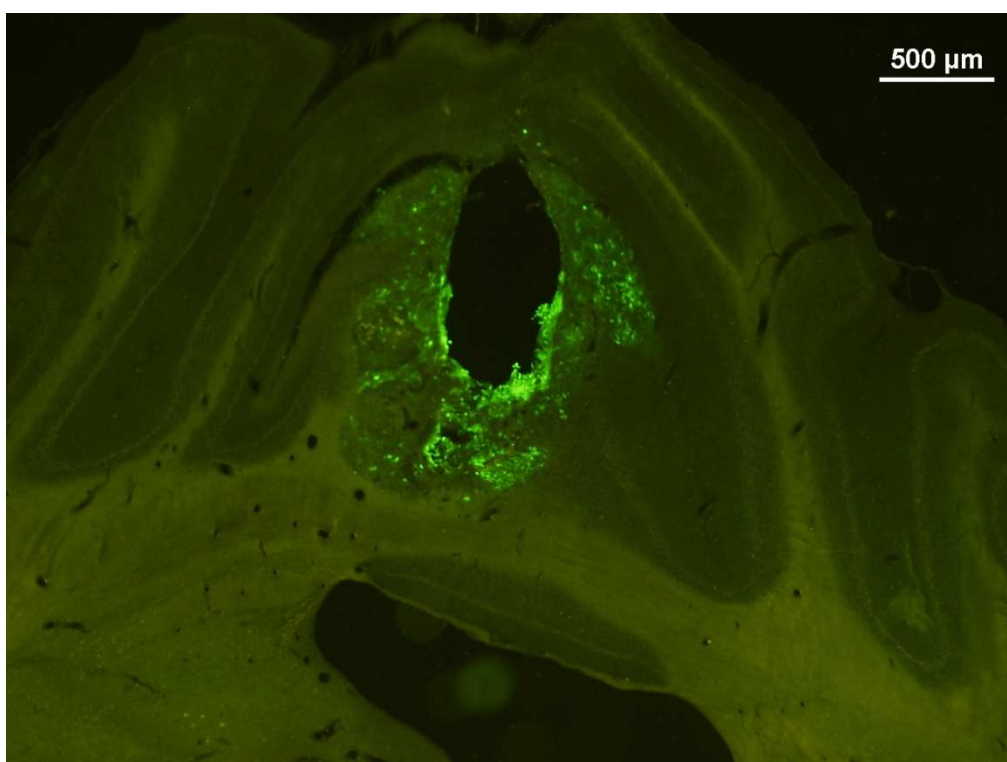


Obrázek 14 – Expanze transplantátu v mozečku myši typu WT po aplikaci nediferencovaných EC P19 buněk

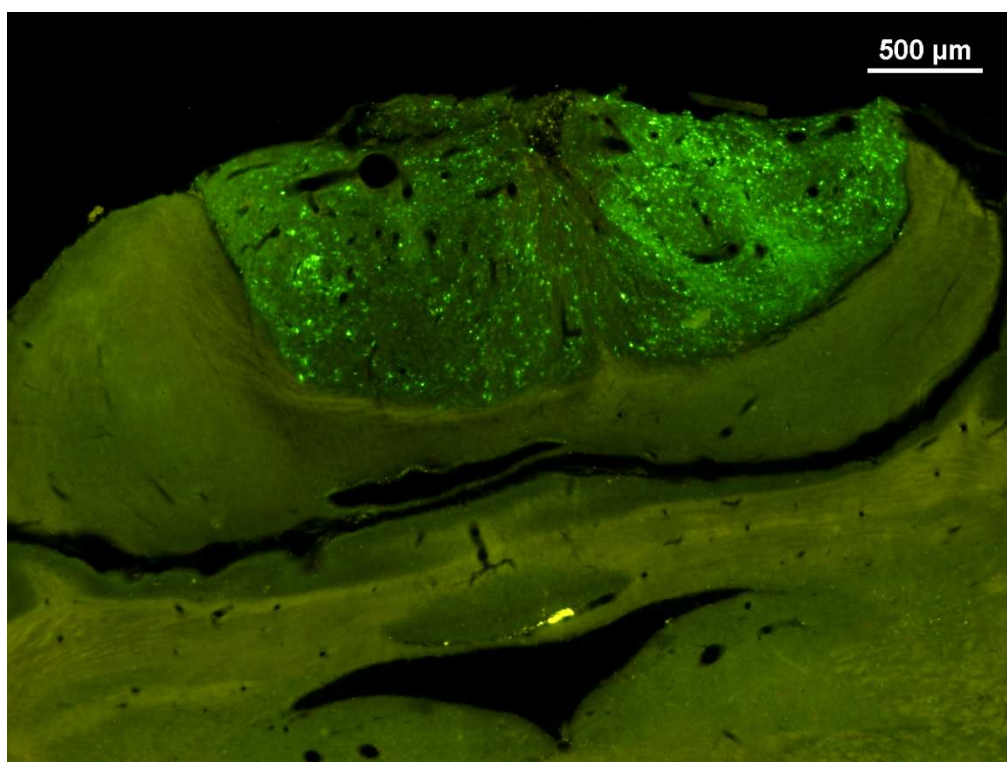
Destrukce v transplantátu se vyskytovala po transplantaci neuroprogenitorů bez ohledu na typ myši jako příjemce (obrázek 15, 20, 23 a 26, tabulka 13 a 14). Nikdy se však nevyskytla po transplantaci nediferencovaných buněk P19 (tabulka 13 a 14, obrázek 26).

### **Lokalizace transplantátu**

Po aplikaci neuroprogenitorů i nediferencovaných EC buněk do mozečků myší byly buňky pozitivní na přítomnost GFP nalezeny ve středu mozečku u většiny myší typu wild (tabulka 13 a 16, obrázek 13, 14, 21 a 27). U mutantů Lc byl transplantát lokalizován vždy mimo mozeček a to nejčastěji v mezencefalu, případně na hranici mezencefala a mozkového kmene (tabulka 14 a 16, obrázek 16, 18, 24 a 27). Pokud byl transplantát v kontaktu s mozečkem myši s olivocerebelární degenerací, tak do něj nikdy nevrůstal. Jeho ohraničení vzhledem k mozečku bylo zřetelné, ale směrem k mezencefalu naopak nevýrazné (obrázek 16). Lokalizace obou stadií transplantovaných buněk v mezencefalu myší typu Lc byla natolik odlišná oproti lokalizaci transplantátu v mozečku myší typu wild, že hodnoty Fisherova testu výrazně přesahují hladinu významnosti ( $p < 0,05$  - NPG: Lc vs WT je  $p=0,0049$ ; P19: Lc vs WT je  $p=0,0101$  viz tabulka 16 a obrázek 27).



Obrázek 15 – Destrukce v transplantátu v mozečku myši typu WT po aplikaci neuroprogenitorů



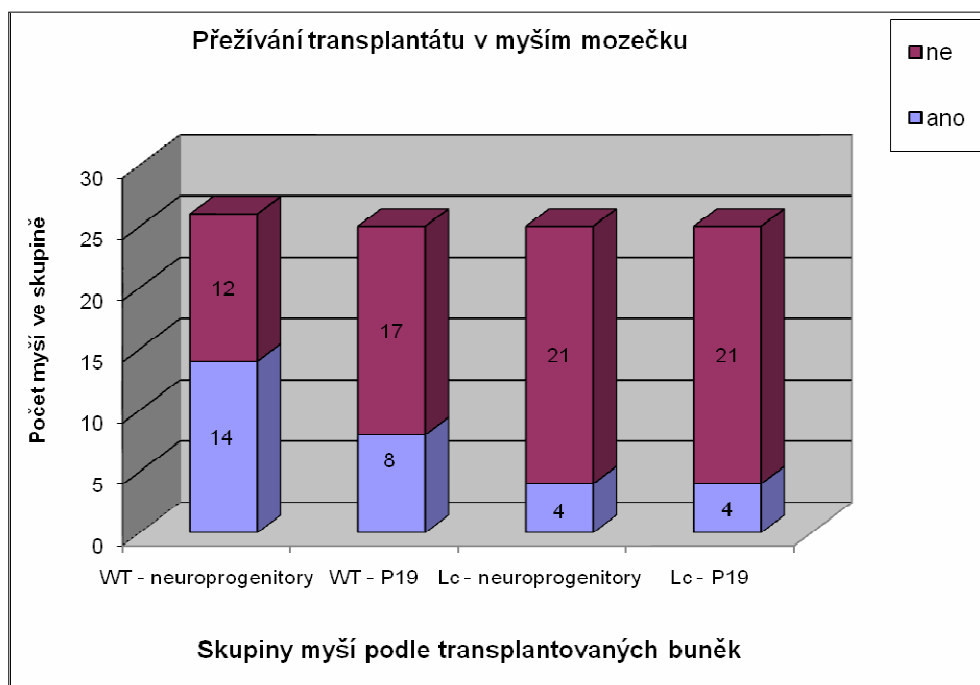
Obrázek 16 – Lokalizace transplantátu v mezencefalu myši typu Lc po aplikaci neuroprogenitorů

Tabulka 11 – Přežívání transplantovaných stadií EC P19 buněk v různých skupinách myší

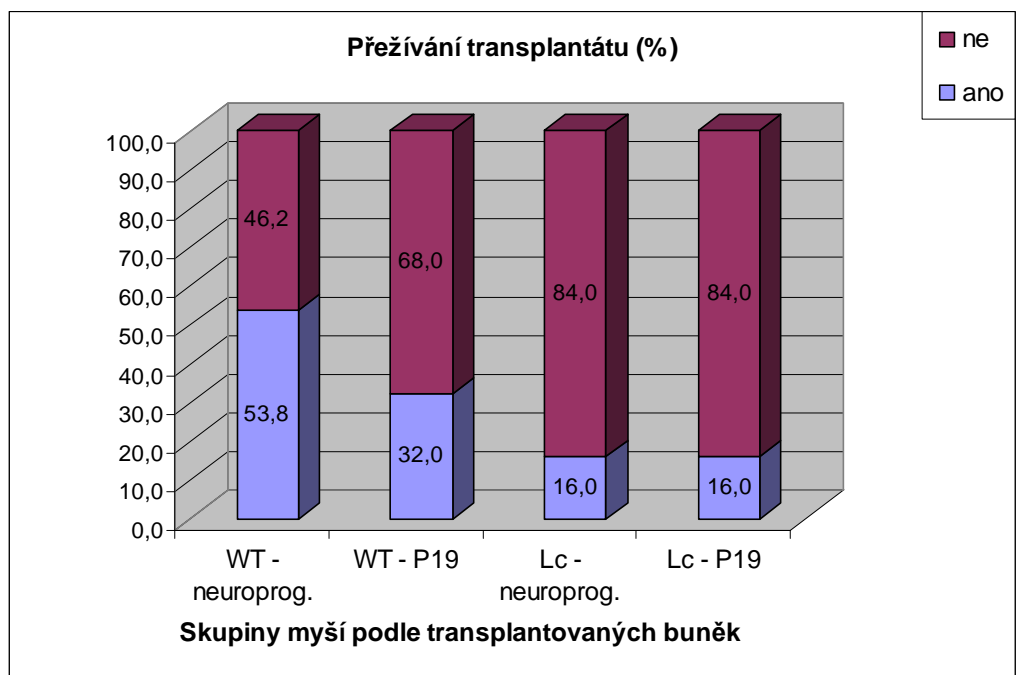
Přežívání transplantátu	Celkový počet myší (n)	ano	ne	ano (%)	ne (%)
WT - neuroprogenitory	26	14	12	53,8	46,2
WT - P19	25	8	17	32,0	68,0
Lc - neuroprogenitory	25	4	21	16,0	84,0
Lc - P19	25	4	21	16,0	84,0

Tabulka 12 – Porovnání přežívání transplantovaných stadií EC P19 buněk v různých skupinách myší pomocí Fisherova testu

Fisherův test		p
Skupiny transplantovaných myší		
WT neuroprogenitory	WT P19	0.1599
Lc neuroprogenitory	Lc P19	shoda
<b>WT neuroprogenitory</b>	<b>Lc neuroprogenitory</b>	<b>0.0078</b>
WT P19	Lc P19	0.3209



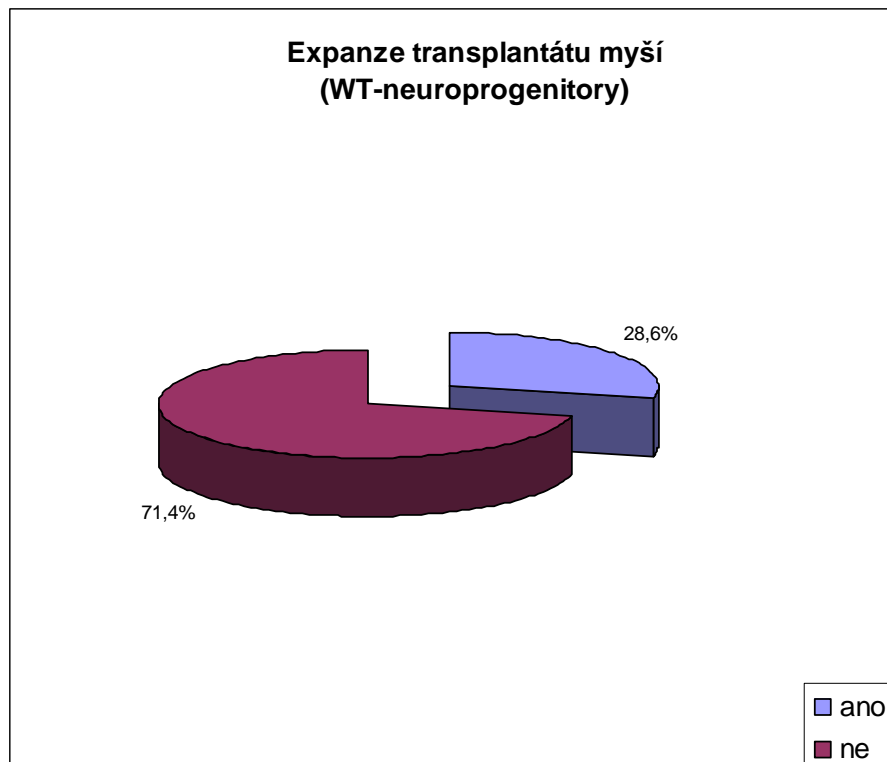
Obrázek 17 – Přežívání transplantátů v rámci skupin transplantovaných myší ve vztahu k počtu myší



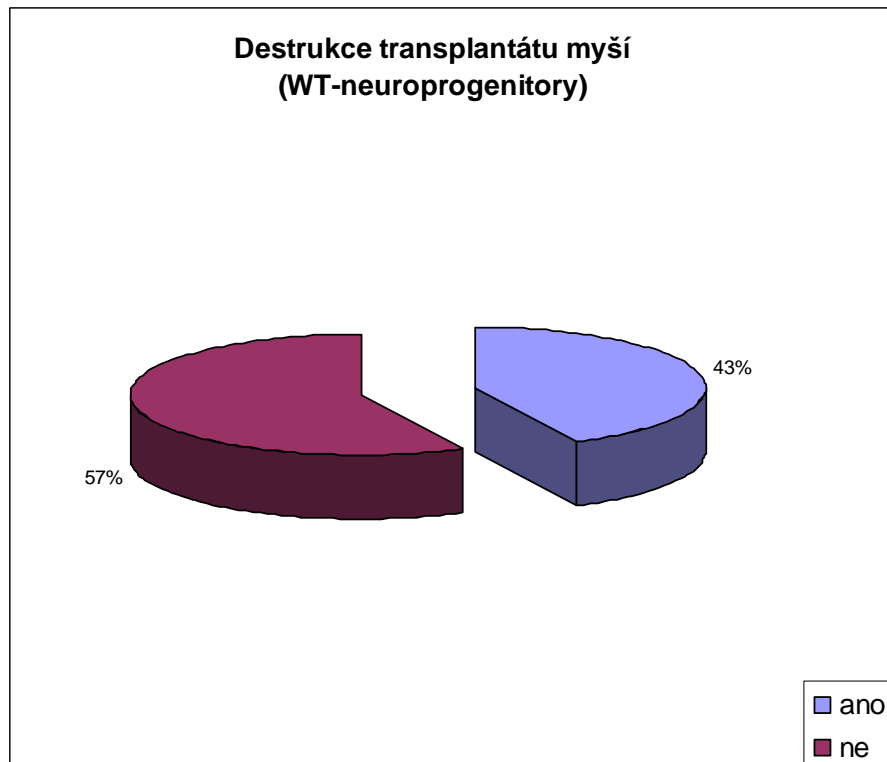
Obrázek 18 – Přežívání transplantátů v rámci skupin transplantovaných myší vyjádřených v procentech

Tabulka 13 – Morfologická charakteristika a lokalizace transplantátů ve skupině myší typu WT po aplikaci NPG a nediferencovaných EC buněk

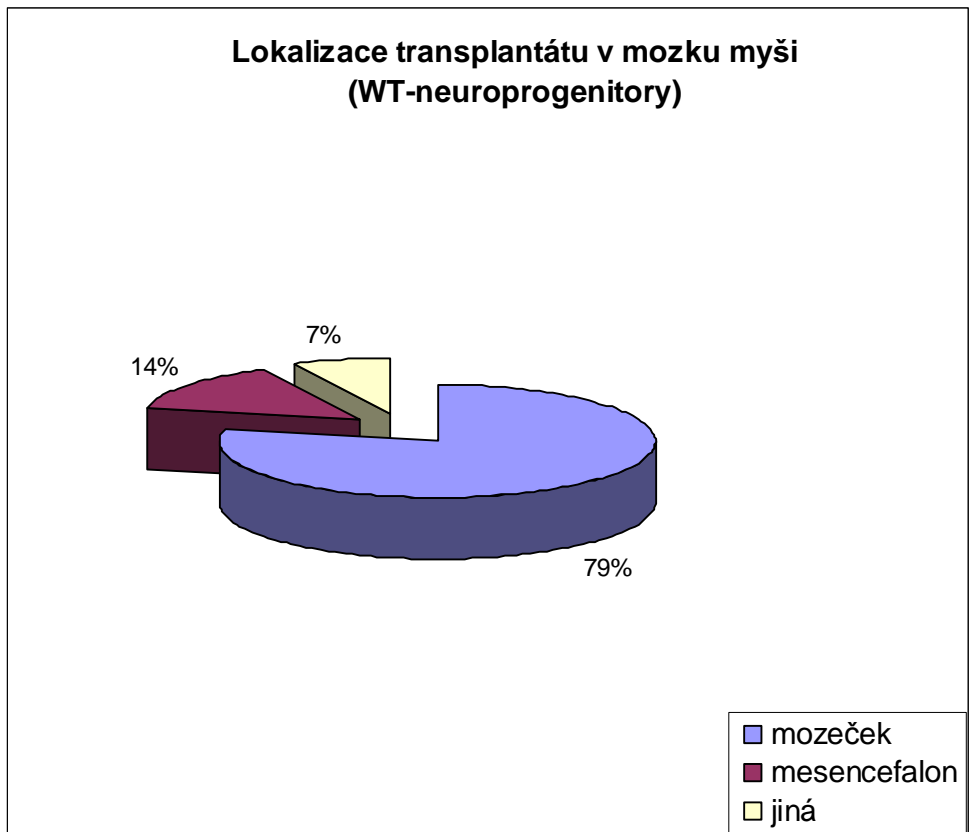
WT		NPG	P19
Expanze (%)	ano	28,6	100,0
	ne	71,4	0,0
Destrukce (%)	ano	42,9	0,0
	ne	57,1	100,0
Lokalizace (%)	mozeček	78,6	87,5
	mesencefalon	14,3	0,0
	jiná	7,1	12,5



Obrázek 19 – Grafické znázornění expanze transplantátu u myší typu WT po transplantaci neuroprogenitorů



Obrázek 20 – Grafické znázornění destrukce v transplantátu u myší typu WT po transplantaci neuroprogenitorů

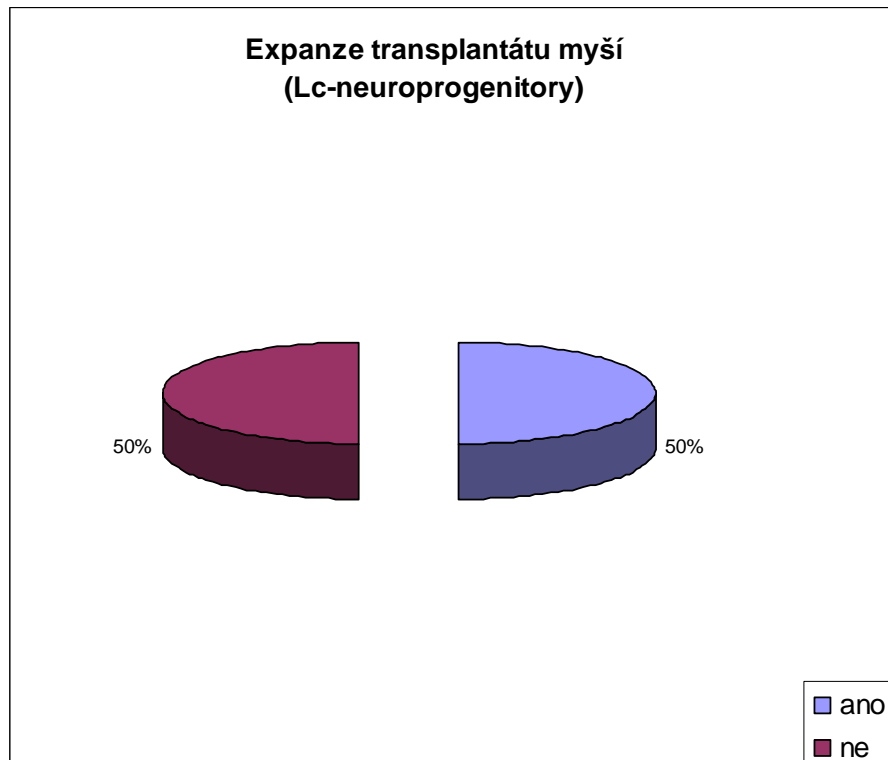


Obrázek 21 – Grafické znázornění lokalizace transplantátu u myší typu WT po transplantaci neuroprogenitorů

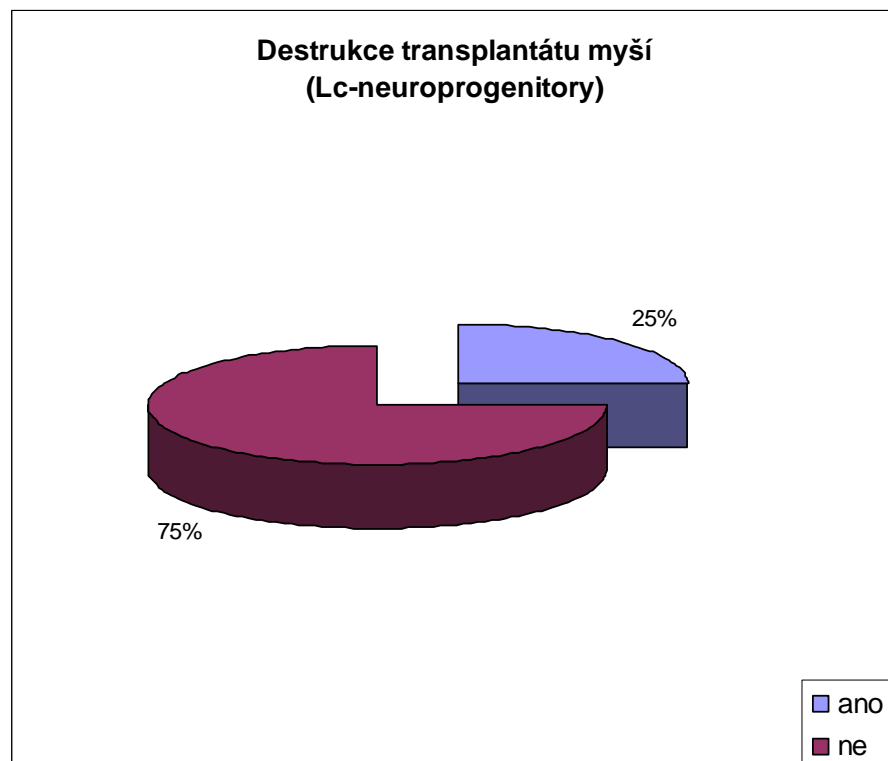
Tabulka 14 – Morfologická charakteristika a lokalizace transplantátů ve skupině myší typu Lc po aplikaci NPG a nediferencovaných EC buněk

Lc		NPG	P19
Expanze (%)	ano	50	100
	ne	50	0
Destrukce (%)	ano	25	0
	ne	75	100
Lokalizace (%)	mozeček	0	0
	mesencefalon	50	75
	jiná	50	25

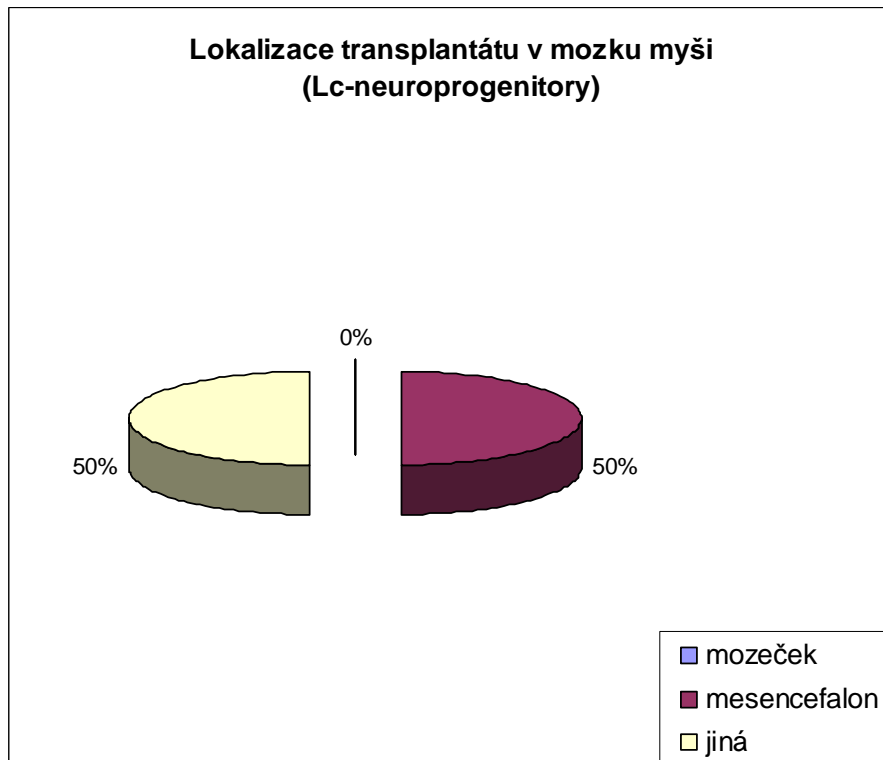




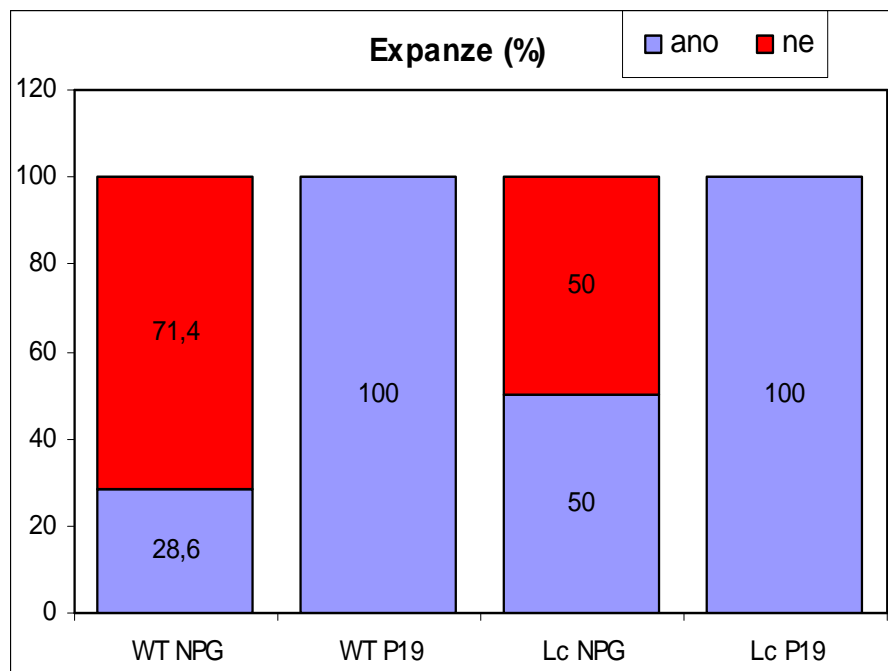
Obrázek 22 – Grafické znázornění expanze transplantátu u myší typu Lc po transplantaci neuroprogenitorů



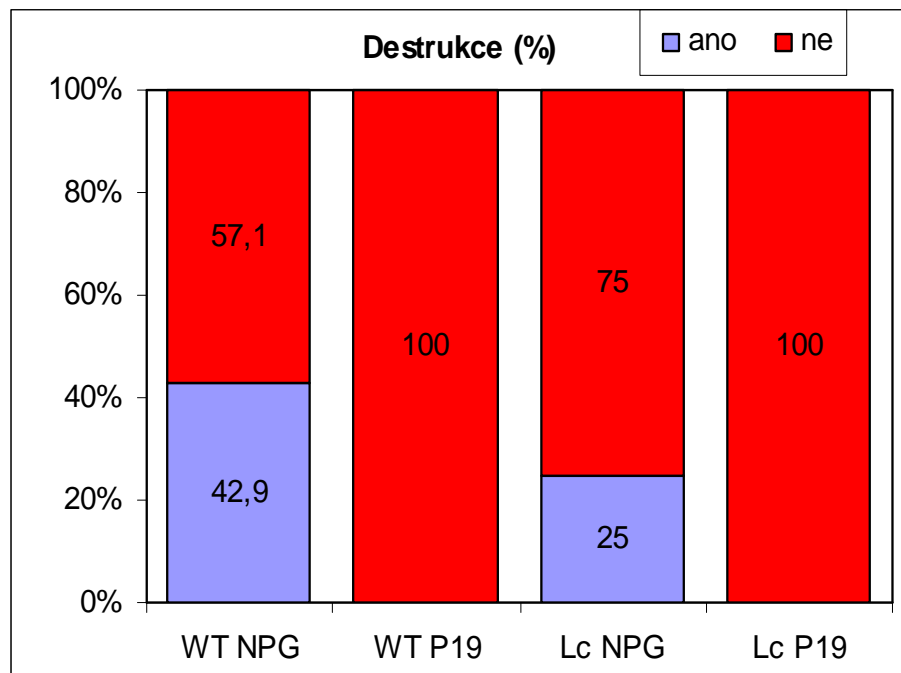
Obrázek 23 – Grafické znázornění destrukce v transplantátu u myší typu Lc po transplantaci



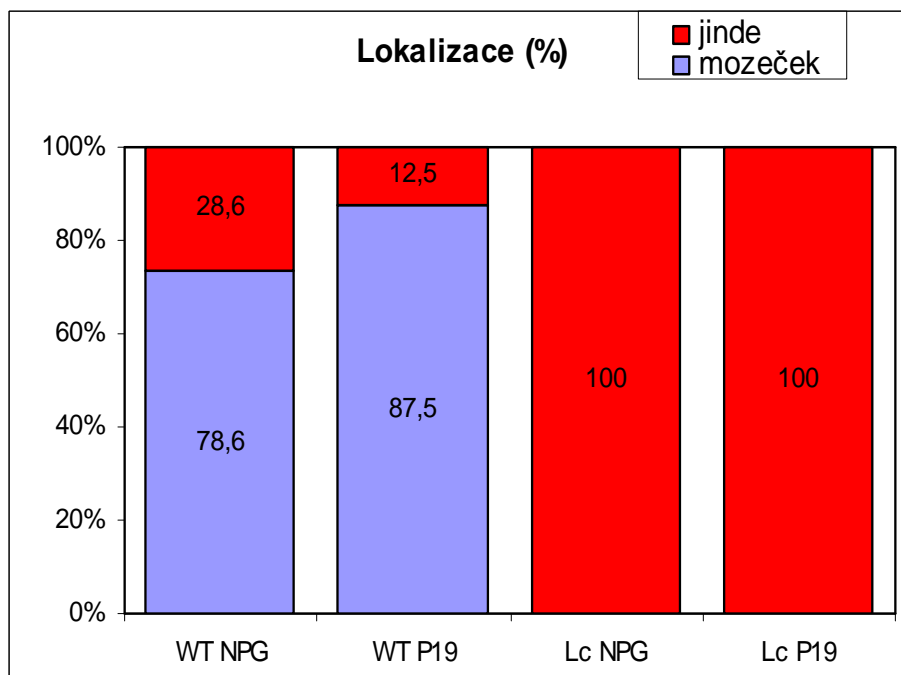
Obrázek 24 – Grafické znázornění lokalizace transplantátu u myši typu Lc po transplantaci neuroprogenitorů



Obrázek 25 – Výskyt expanze transplantátu v mozečku myši typu WT a Lc po aplikaci neuroprogenitorů a nediferencovaných EC P19 buněk



Obrázek 26 – Výskytu destrukce transplantátu v mozečku myší typu WT a Lc po aplikaci neuroprogenitorů a nediferencovaných EC P19 buněk



Obrázek 27 – Lokalizace transplantátu v mozečku a mimo mozeček myší typu WT a Lc po aplikaci neuroprogenitorů a nediferencovaných EC P19 buněk

Tabulka 15 – Porovnání expanze dle stupně diferenciaci buněk transplantátu (neuroprogenitory a nediferencované P19 buňky) u myší typu WT pomocí Fisherova testu

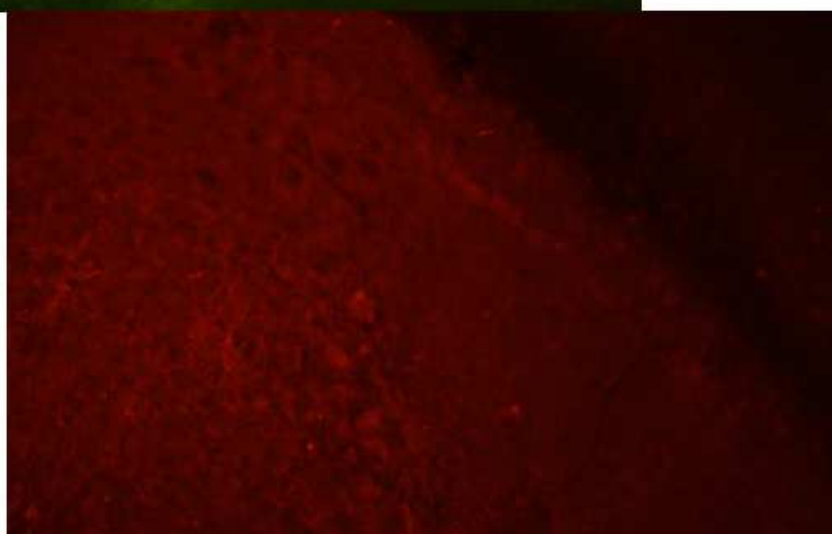
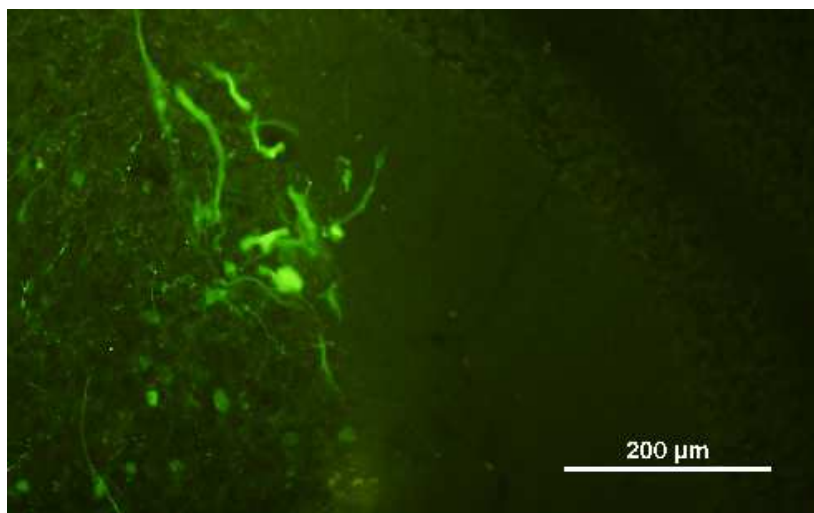
Expanze P19 vs NPG: WT	ano	ne
NPG	4	10
P19	8	0
Fisherův test:	p	0.0017

Tabulka 16 – Porovnání lokalizace transplantátu z neuroprogenitorů či nediferencovaných EC buněk u transplantovaných myší typu WT a Lc pomocí Fisherova testu

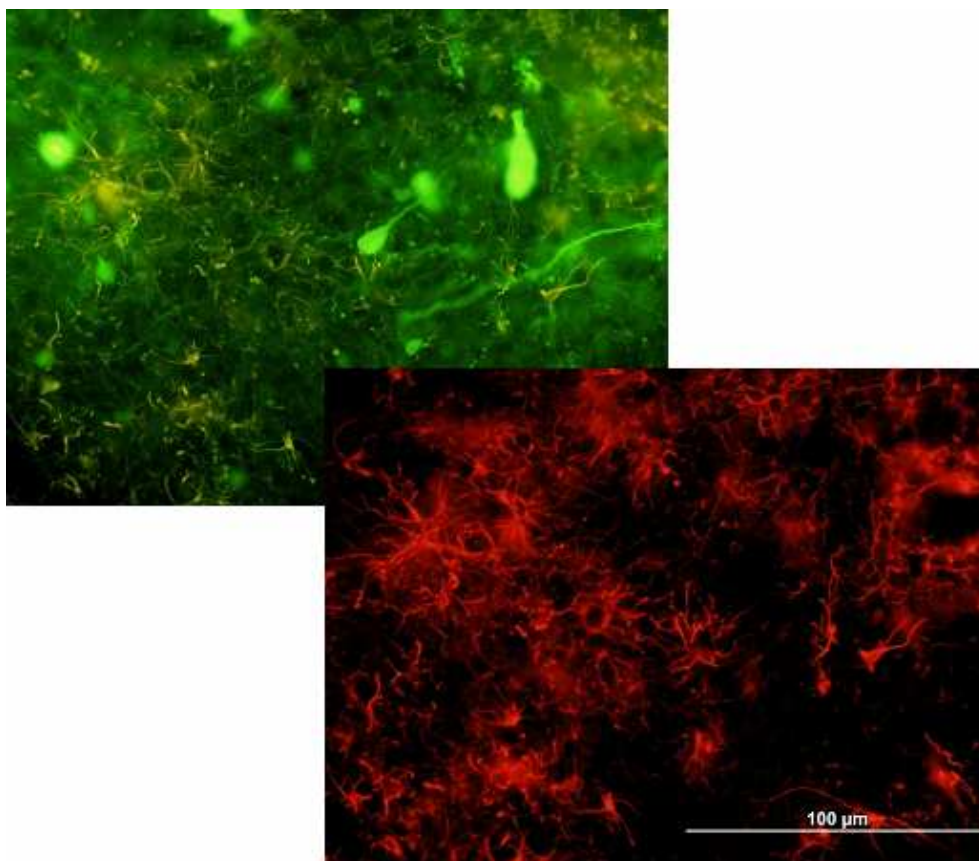
WT vs Lc	mozeček	mezencefalón
WT: NPG	12	2
Lc: NPG	0	4
Fisherův test:	p	0.0049
WT: P19	7	1
Lc: P19	0	4
Fisherův test:	p	0.0101

### Funkčnost transplantátu

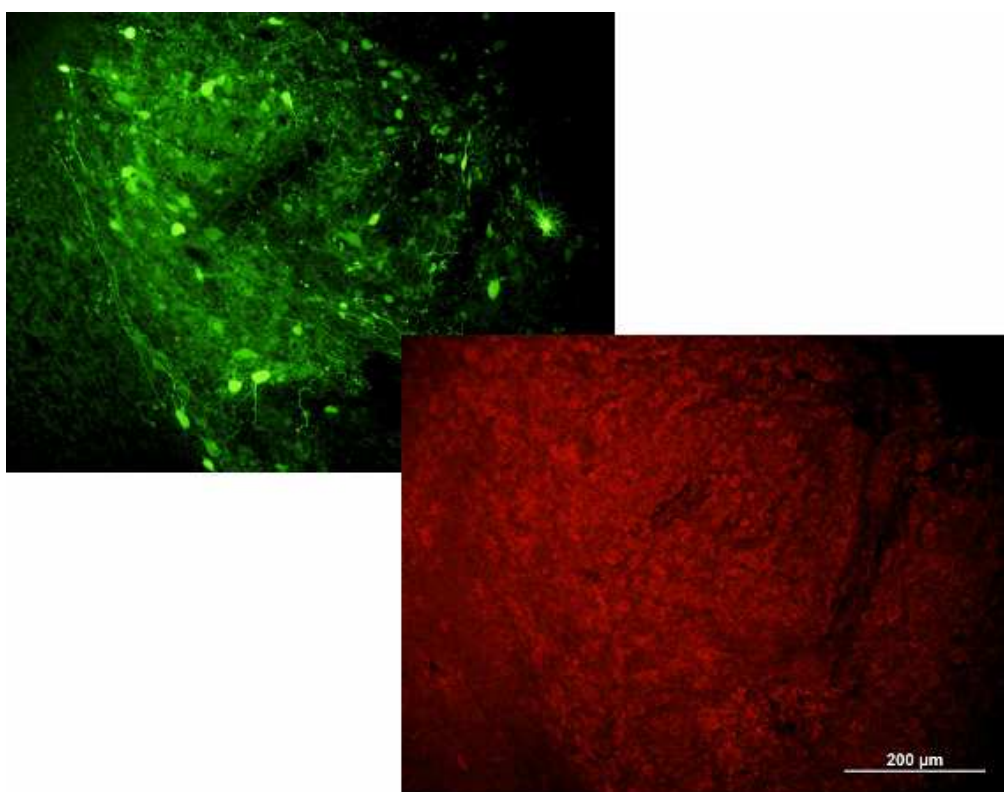
Funkčnost transplantovaných buněk byla ověřena fluorescenční imunohistologií, kdy byly nalezeny GFP buňky, které byly zároveň obarveny na MAP-2 (neurony), GFAP (astrocyty) a kalbindin (Purkyňovy buňky). V transplantátech byly takto identifikovány všechny jmenované buněčné typy, které byly nejen pozitivní na jmenované markery, ale odpovídající byla i jejich morfologie viz obrázky 28, 29 a 30.



Obrázek 28 – Transplantované GFP a na MAP-2 pozitivní buňky



Obrázek 29 – Transplantované GFP a na GFAP pozitivní buňky



Obrázek 30 – Transplantované GFP a na kalbindin pozitivní buňky

### **7.3 Studium mutací v genu pro leukemický inhibiční faktor (LIF) a jejich vztahu k plodnosti žen**

Ve skupině plodných žen nebyla nalezena žádná s mutací v genu pro LIF. Ve skupině 151 neplodných žen bylo zjištěno 15 infertilních žen, které měly bodovou mutaci G za A (transice) na pozici 3400 genu pro LIF, která vede při translaci k záměně valinu za methionin v kodónu 64 (V64M), jež je součástí AB kličky LIF proteinu, klíčové oblasti pro interakci s receptorem pro LIF. Z toho vyplývá, že tato mutace by mohla vést ke snížení biologické aktivity LIF proteinu [Giess et al., 1999] a tím omezit plodnost žen. Těchto 15 pozitivních žen jsme rozdělili dle předpokládaného výskytu imunopatologií na skupiny A a B. Ve skupině A byly diagnostikovány 4 s idiopatickou infertilitou a 3 s endometriózou (celkem 7 žen), ve skupině B byly 3 pacientky se syndromem polycystických ovárií (PCOS), 3 s andrologickým faktorem, 1 s tubárním faktorem a 1 s hyperprolaktinémií (celkem 8 žen). U zbylých infertilních žen (n=136 žen) nebyla zjištěna mutace a jejich infertilita byla způsobena u 10 z nich endometriózou, u 27 byla diagnostikována idiopatická infertilita (skupina C, celkem 37 žen), 41 pacientek mělo andrologický, 28 tubární faktor a 30 PCOS (skupina D, celkem 99 žen).

7 z 15 pozitivních žen otěhotnělo po IVF léčbě, z toho pět hned při prvním IVF cyklu při prvním embryotransferu (viz. tabulka 17), z čehož plyne hodnota pregnancy rate (PR) v celé skupině 47%. Z těchto 7 vyléčených pacientek nebyla ani u 1 diagnostikována idiopatická neplodnost a pouze u 1 pacientky byla potvrzena endometrióza. Ostatní vyléčené pacientky trpěly PCOS, andrologickým a tubárním faktorem. Mezi skupinami A a B je statisticky signifikantní rozdíl v pregnancy rate IVF ( $P=1,1\%$ , Fisherova exaktního testu pro čtyřpolní tabulky).

Porovnání úspěšnosti IVF léčby mezi ženami s diagnózou idiopatické neplodnosti a endometriózy s mutací a bez ní (pozitivní, n=7 a bez mutace, n=37) prokázalo u pozitivních žen nižší pregnancy rate (14%), než ve skupině bez mutace (49%), ale z důvodu malých počtů pacientek ve skupinách je tento rozdíl nesignifikantní ( $P=11\%$ ). Rozdíly pregnancy rate mezi jednotlivými počty diagnostikovaných pacientek jsou statisticky nevýznamné v rámci skupiny neplodných žen bez mutace (viz tabulka 18).

Tabulka 17 - Infertilní ženy s mutací v genu pro LIF

Věk	Příčina neplodnosti	Typ infertility	Výsledek 1. cyklu IVF léčby
<b>Skupina A, PR=14%</b>			
30	Idiopatická inf.	Primární	Neotěhotněla
39	Idiopatická inf.	Primární	Neotěhotněla
40	Idiopatická inf.	Sekundární	Neotěhotněla
34	Idiopatická inf.	Primární	Neotěhotněla
39	Endometrióza	Primární	Neotěhotněla
33	Endometrióza	Primární	Neotěhotněla
33	Endometrióza	Sekundární	Otěhotněla
<b>Skupina B, PR=75%</b>			
27	PCOS	Primární	Neotěhotněla
28	PCOS	Primární	Otěhotněla
28	PCOS	Sekundární	Otěhotněla
31	Androlog. faktor	Primární	Otěhotněla
31	Androlog. faktor	Primární	Otěhotněla
24	Androlog. faktor	Primární	Otěhotněla
31	Tubární faktor	Primární	Neotěhotněla
33	Hyperprolaktinémie	Sekundární	Otěhotněla

Tabulka 18 - Kontrolní skupina žen (bez mutace v genu pro LIF)

Příčina neplodnosti	Počet pacientek	Úspěšná léčba po 1. cyklu IVF	Pregnancy rate (PR)
<b>Skupina C</b>			
Idiopatická inf.	27	14	51%
Endometrióza	10	4	40%
<b>Skupina D</b>			
PCOS	30	15	50%
Androlog. faktor	41	23	56%
Tubární faktor	28	14	50%
<b>Celkový počet</b>	<b>136</b>	<b>70</b>	



## 8 Diskuze

### 8.1 Charakterizace myších ES buněk

#### 8.1.1 Charakterizace EC P19 buněk

Pro charakterizaci EC P19 buněk v nediferencovaném stavu a v různých stádiích diferenciaci (D3, D10) vyvolané pomocí RA v bezsérovém médiu byly vybrány 3 různé molekulárně-biologické metody: RT-qPCR, imunocytochemie a western blot, které používají i jiní autoři [Pacherník et al., 2007]. Těmito metodami byly stanoveny základní markery pluripotence (proteiny Oct-3/4, antigen Lewis X) a u neuroprogenitorů a neuronálních buněk byla zaznamenána exprese genů - PAX-6, MASH-1 a přítomnost proteinů MAP-2, N-CAM a  $\beta$ -III tubulinu jako neurálních markerů.

Hladina exprese genu Brachyury zjištěná pomocí RT-qPCR byla nejvyšší v D0 a pak klesala (D3, D10), což odpovídá výskytu tohoto klíčového transkripčního faktoru, který je charakteristický pro diferenciaci ES buněk mesodermálním směrem [Pan a Thomson, 2007]. Hladina jeho exprese rychle klesá po indukci diferenciaci EC buněk pomocí RA. Naopak rostla hladina exprese genů PAX-6 a MASH-1, jako neurodiferenčních markerů, což je v souladu s daty obdobných studií [Bauwens et al., 2008; Kusakabe et al., 2002; Yang et al., 2008]. Také výskyt proteinu MAP-2 jako specifického dendritického proteinu je dobrým znakem výsledné neurodiferenciaci (D10) EC buněk. Hladina exprese genu GATA-4 rostla pouze na začátku diferenciaci buněk P19 po indukci RA a byla nejvyšší 3. den (D3), pak klesala. GATA-4 je transkripční faktor, který je nejčastěji uváděn jako marker entodermálního charakteru diferenciaci pluripotentních kmenových buněk [Soudais et al., 1995; Xie et al., 2010], což vysvětluje i pokles hladiny jeho exprese během pokračující diferenciaci P19 buněk. GATA-4 je také používán jako marker diferenciaci kmenových buněk v kardiomyocyty, které jsou odvozeny z mezodermu [Pikkarainen et al., 2004], což může vysvětlovat pokles jeho hladiny exprese během neurodiferenciaci P19 buněk. Podobně po indukci neurodiferenciaci silně vzrostla exprese AFP, ale u pluripotentních buněk byla tato exprese nízká. Je známo, že příslušný gen se aktivuje během diferenciaci v buňky entodermálního charakteru a navíc bylo nedávno zjištěno, že také indukce diferenciaci pomocí RA má podobný efekt na růst exprese AFP. Ta je zprostředkována přes gen FOXA-1, jež náleží do genové rodiny Forkhead [Taube et al., 2010], což vysvětluje naše výsledky. Pomocí western blotu byla ověřena neurodiferenciaci EC P19 10. den (D10), kdy byly přítomny důležité neurálně specifické markery NCAM a  $\beta$ -III tubulin. Jejich přítomnost uvádí též Pacherník aj. již 4. a 6. den diferenciaci EC P19 buněk po indukci RA v médiu bez séra

[Pacherník et al., 2007]. Stejní autoři navíc prováděli indukci neurodiferenciace ještě i přidáním LIF kromě RA, pak samozřejmě byla přítomnost těchto dvou proteinů vyšší než po indukci pouze pomocí RA.

### 8.1.2 Charakterizace ES D3 buněk

Námi použité myší kmenové buňky linie D3 byly v nediferencovaném stavu oválné až kulovité a bez výběžků. Jejich charakteristická schopnost pluripotence byla potvrzena imunocytochemicky přítomností charakteristických markerů Oct-3/4 a Lewis X antigenu, které uvádí např. Lovell-Badge [Lovell-Badge, 2007] a Muramatsu [Muramatsu et al., 2008].

Následně jsme vyzkoušeli a ověřili jejich diferenciaci v neuronální buňky a to pomocí indukce RA, podobně jako u neurodiferenciace EC P19 buněk, ale navíc přes stadium EBs v médiu bez LIF [Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Pacherník et al., 2002a]. Neurodiferenciace ES buněk byla potvrzena jednak morfologicky, dle růstu neuronálních výběžků, dále imunocytochemicky průkazem přítomnosti markerů MAP-2 a  $\beta$ -III tubulinu a nakonec western blotem, kdy byly vzorky pozitivní i na další neuronální marker N-CAM.

Neurodiferenciace myších ES buněk byla také úspěšně provedena v bezsérovém médiu s ITS, ale bez RA, kdy byl navíc přidáván fibronectin. Tuto variantu neurodiferenciace myších ES buněk provedli úspěšně Okabe aj. v r. 1986 [Okabe et al., 1996]. Uvedení autoři prováděli také imunocytologickou charakteristiku diferencovaných mES buněk, které byly po 6. dni (D6) diferenciaci pozitivní na GFAP (antigen specifický pro astrocyty), O4 (antigen specifický pro oligodendrocyty) nebo také na MAP-2, MAP-5, NF200 a synaptofysin (neuronální cytoskeletální proteiny). Dokonce některé *in vitro* diferencované neurony byly pozitivní na aktivitu acetylcholinesterázy nebo expresi dekarboxylázy glutamové kyseliny, což dokazuje schopnost diferenciaci mES v GABA- a cholinergní neurony [Fraichard et al., 1995]. Podobně také Okabe aj. při imunocytologických zkouškách zjistili neurodiferencované mES buňky pozitivní na neuronální proteiny GFAP, O4, MAP-2, GABA a též BrDU (specifický pro neurální progenitory až po neurální kmenové buňky [Nieoullon et al., 2005; Chu *et al.*, 2004]) [Okabe et al., 1996]. Také Pacherník aj. provedli imunocytologickou analýzu diferencovaných buněk a potvrdili přítomnost MAP-2 a GFAP markerů [Pacherník et al., 2002a]. Navíc, při western blotu zaznamenali proteiny  $\beta$ -III tubulin (specifický pro neurony), N-CAM a GAP-43 (specifické pro neurony/glie).

Ve studii od Su aj. byl publikován postup neurodiferenciace myších ES buněk do granulárních a Purkyňových buněk cerebela, který je

pro nás velice důležitý a zajímavý z hlediska budoucích transplantačních studií. Autoři zde charakterizují tyto buňky pomocí markeru L7, specifického právě pro Purkyňovy buňky [Su et al., 2006].

## **8.2 Transplantace EC P19 buněk do mozečku myši**

Je všeobecně známo, že schopnost regenerace CNS je ve srovnání s ostatními tkáněmi velmi omezená. Tato regenerace je dnes prokázána v dospělosti i u savců [Gould a Gross, 2002; Dyer, 2003], avšak obnova neuronů z hlediska nápravy poškození CNS je u člověka nevýznamná a tedy nedostatečná. Onemocnění CNS, která jsou spojena s větší ztrátou neuronů, mají většinou závažné a více či méně nevratné důsledky [Cendelín, 2008]. V současné době se studie v rámci buněčné terapie CNS ubírají několika směry: od xenotransplantací, přes transplantace embryonální nervové tkáně, transplantace embryonálních nebo adultních kmenových buněk, až po transplantace geneticky upravených buněk. Tyto buňky produkují specifické neurotrofické nebo růstové faktory. Embryonální kmenové buňky jsou jedním ze slibných zdrojů diferencovaných neuronálních buněk, které mohou být užity k léčbě neurodegenerativních chorob a následků traumat. Jejich aplikace je však závislá na jejich schopnosti se úspěšně diferencovat v dostatečném množství v definované typy neuronálních buněk *in vitro* [Ronaghi et al., 2010]. Ty pak mohou být použity k jejich transplantaci do cílové části CNS, včetně jejich schopnosti troficky ovlivňovat okolní tkáň a podporovat tak vnitřní regenerační mechanismy.

Řada studií podporuje zjištění, že přežívání a funkčnost transplantátu může být zvýšena právě exogenní léčbou neurotrofickými nebo růstovými faktory, podáním imunosupresiv, odstraněním volných radikálů nebo aplikací anti-apoptotických protilátek [Ali et al., 2009; Buzanska et al., 2009; Karimi-Abdolrezaee et al., 2010].

Embryonální karcinomové kmenové buňky linie P19 patří mezi nediferencované pluripotentní buňky, které se dají dobře ireverzibilně diferencovat do stadia neuroprogenitorů a následně neuronů po indukci RA [Pacherník et al., 2005]. Tato a další linie EC kmenových buněk se úspěšně používaly k transplantacím do CNS laboratorních zvířat bez postižení, pouze k ověření přežívání a funkčnosti transplantátu [Wojcik et al., 1993; Magnuson et al., 1995; Staines et al., 1996]. Byly také transplantovány modelovým laboratorním zvířatům s neurodegenerací, ať již šlo o modely Parkinsonovy choroby [Baker et al., 2000; Nakao et al., 2000] či vrozené amyotrofické laterální sklerózy [Garbuzova-Davis et al., 2002]. Též pro lidské pacienty s CMP byly tyto transplantace přínosné [Meltzer et al., 2001; Kondziolka et al., 2005; Hara et al., 2007].

Naše studie je první, která sleduje osud myších EC P19 GFP buněk transplantovaných do zdravého (WT) a postiženého mozečku myši

Lurcher a hodnotí přežívání, morfologii a lokalizaci těchto transplantátů. Byly transplantovány jak nediferencované P19, tak od nich odvozené neuroprogenitory.

### **Přežití transplantovaných buněk**

Naše studie potvrdila, že neuroprogenitory přežívají srovnatelně s nediferencovanými EC buňkami v obou typech myší. Na druhou stranu, přežívání neuroprogenitorů i nediferencovaných EC buněk je pochopitelně významně menší u myší typu Lc s olivocerebelární degenerací než u myší bez neurodegenerací. Přestože přežívání neuroprogenitorů u myší typu WT (53,8%) není statisticky významně vyšší než u nediferencovaných EC buněk (32,0%), jsou tyto výsledky velmi rozdílné. Jsou v rozporu s daty získanými v podobných studiích s transplantacemi ES buněk, kde transplantované částečně diferencované neuroprogenitory přežívají méně než nediferencované ES buňky [Hildebrand et al., 2005; Gulino et al., 2010].

### **Morfologie transplantátu**

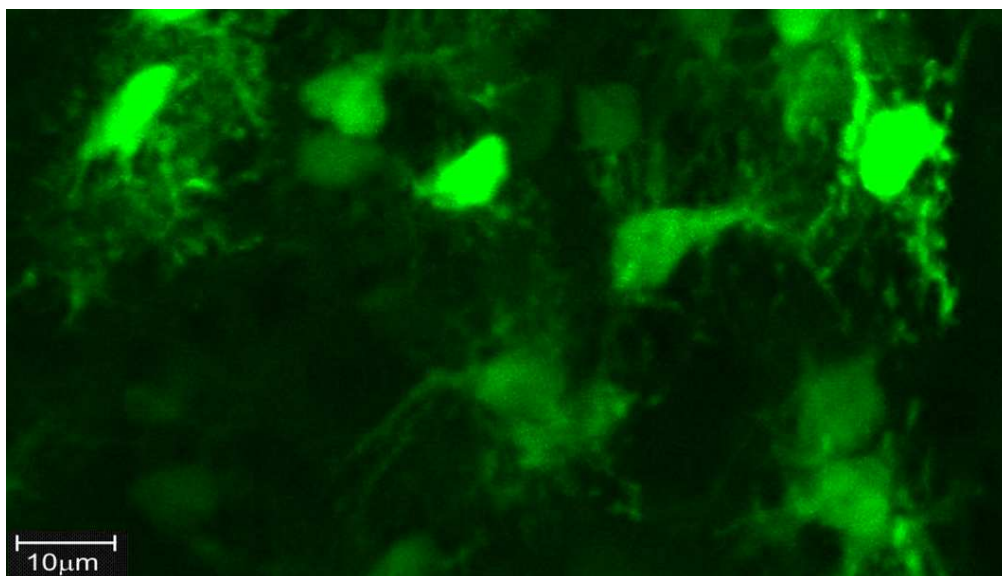
Známky destrukce byly zjištěny pouze v transplantátech pocházejících z neuroprogenitorů bez ohledu na typ transplantovaných myší. U transplantátů z nediferencovaných P19 buněk se destrukce vůbec nevyskytla (obrázek 26). Předpokládáme, že morfologické znaky destrukce transplantátu mohou souviset se stupněm diferenciací transplantovaných P19 buněk a s výskytem apoptózy. Pro potvrzení této teorie plánujeme provést studii s delším přežíváním transplantátu než jsou tři týdny a pokusit se zjistit přítomnost markerů apoptózy nebo nekrózy u myší s destrukcemi i bez nich. Dalším zajímavým poznatkem je přítomnost destrukce u transplantátů z neuroprogenitorů a její souvislost s nižším výskytem expanzí v tomto typu transplantátu. Morfologické známky expanze jsou přítomny ve všech případech transplantovaných nediferencovaných P19 buněk a méně u transplantovaných neuroprogenitorů (obrázek 25). V této souvislosti předpokládáme, že důležitá může být přítomnost neurogeninu. To je proneurální transkripční faktor, který hraje hlavní roli v neuronální diferenciaci v mnoha oblastech CNS a u P19 buněk je, na rozdíl od ostatních typů kmenových buněk, velice nestabilní [Vosper et al., 2007]. Z tohoto důvodu plánujeme provést v budoucnu obdobné transplantační pokusy i s dalšími typy kmenových buněk s cílem sledovat expresi neurogeninu.

P19 buňky, které jsme transplantovali, neměly dle našich morfologických nálezů tendenci migrovat a šířit se v rámci mozečku, což je v rozporu s dřívějšími experimenty s transplantovanými granulárními a Purkyňovými buňkami [Kawamura et al., 1988]. Také zjištěné morfologické charakteristiky transplantátu nevzbuzují velké naděje ve funkčnost, která by byla žádoucí vzhledem k přítomné neurodegeneraci u hostitele, jak je tomu v případě myší typu Lc, na

rozdíl od jiných studií [Rossi and Cattaneo, 2002; Kawamura et al., 1988; Rolando et al., 2010; Zawadska et al., 2009]. V této souvislosti by mohlo být užitečné podpořit transplantace P19 buněk přidáním některého z neurotrofických faktorů (LIF, NGF- nervový růstový faktor nebo BDNF-neurotrofický faktor odvozený z mozku) [Molteni et al., 2004; Vaynman et al., 2003, 2004, 2006]. Ty mají navíc antiapoptotický efekt pro neuronální buňky a mohou tedy zvýšit nejen přežití neuroprogenitorů, ale i zmírnit zmíněnou destrukci transplantátu [Perrelet et al., 2000]. Zatím jsme podle morfologie GFP buněk zjistili, že se transplantované buňky diferencovaly v buňky neuronálního fenotypu, což je dobře patrné na obrázku 31, kde jsou jasně viditelné nervové výběžky, typické pro neuronální buňky. Naše studie byla zaměřená především na základní stanovení přežívání transplantátu a jeho strukturu. U vybraných myší, kterým byly transplantovány neuroprogenitory byla však provedena též imunohistochemická analýza, do jakých buněčných typů se transplantované buňky v hostitelské tkáni mozečku diferencovaly. Ta odhalila jejich diferenciaci v neurony (MAP-2), astrocyty (GFAP) a dokonce i v Purkyňovy buňky (kalbindin). V budoucích studiích bychom rádi ověřili funkčnost těchto transplantovaných buněk, a to hlavně behaviorálními testy u transplantovaných myší s neurodegenerací, u nichž by mělo dojít k vylepšení motorických schopností.

Z naší i dalších studií plyne [Houdek et al., 2011; Garbuzova-Davis et al., 2002], že použití EC buněk pro transplantaci může být přínosné, avšak až po jejich diferenciaci. Důvodem je, že nediferencované EC buňky mají tendenci tvořit karcinomy, z nichž byly odvozeny, což jsme též našimi nálezy potvrdili. Dále jsme zjistili, že *in vitro* diferenciaci P19 buněk do neuroprogenitorů nemusí znamenat jejich nižší schopnost přežívání po transplantaci. Tato pozorování mají význam pro budoucí možné využití takto diferencovaných EC buněk při dalších transplantačních studiích v rámci regenerativní medicíny.

Pokud hodnotíme pouze přežívání buněk transplantovaných do mozečku myší typu Lurcher, tak výsledky této práce lze srovnat např. s výsledky transplantací embryonální mozečkové tkáně těmito myším, které provedl Cendelín aj. [Cendelín et al., 2009]. Zde však bylo přežívání transplantátu vyšší (69,2% u dospělých myší typu WT na rozdíl od našich 53,8% u transplantovaných neuroprogenitorů). Přežívání transplantátu se v této studii zvyšovalo v souvislosti s aplikací embryonálních buněk mozečku dospělým myším typu Lurcher (88,2%), což je rozdílné od našich nálezů, kde bylo přežívání výrazně nižší, tj. pouze 16% u transplantací neuroprogenitorů, ale i nediferencovaných P19 buněk dospělým myším tohoto typu.



Obrázek 31 – GFP pozitivní buňky nalezené při histologickém vyšetření transplantátu, u nichž je jasně viditelný neuronální charakter, včetně nervových výběžků

Při porovnání lokalizace, se transplantát v naší práci vyskytoval u myší typu WT v převážné většině v mozečku (NPG-78,6% a P19-87,5%) a u myší typu Lc vždy mimo mozeček. Nejčastěji to bylo v mezencefalu, případně na hranici mezencefala a mozkového kmene. Ve studii věnované transplantacím embryonální mozečkové tkáně do mozečku myší, byl transplantát také nalezen na různých místech [Cendelín, 2008]. Většinou to bylo na povrchu nebo přímo v mozečku. Vzácně se transplantát vyskytl na ventrálním nebo laterálním povrchu pontu nebo dorzálně od mozečku na povrchu prodloužené míchy a to jak u dospělých myší typu WT, tak mutantů Lurcher. Výjimečně byl transplantát uložen laterálně mezi mozečkem a kmenem a byl tak v kontaktu s oběma strukturami. Někdy se jeden transplantát nacházel na mozečku a další ještě na kmeni.

Pro transplantace byla v minulosti využívána i lidská linie EC buněk NTera 2/D1 (NT2), kterou lze s pomocí dlouhodobé kultivace s RA také diferencovat do neuronálního fenotypu z 95% [Pleasure et al., 1992]. Tyto diferencované buňky byly nejprve transplantovány do modelových myší [např. Trojanowski et al., 1997; Lee et al., 2000; Willing et al., 2001; Garbuzova-Davis et al., 2002], potkanů [Borlongan et al., 1998a,b,c; Hurlbert et al., 1999; Saporta et al., 1999, 2002; Willing et al., 1999, 2002; Baker et al., 2000; Fricker-Gates et al., 2004; Hara et al., 2007] a nakonec i lidským pacientům postižených cévní mozkovou příhodou [Kondziolka et al., 2000; 2005].

Trojanowski aj. transplantovali NT2N (neurodiferencované) buňky do různých částí CNS dospělých a mladých imunodeficientních myší [Trojanowski et al., 1997]. Živé NT2N buňky byly identifikovány v

89% transplantovaných imunodeficientních „nude“ myší. Podobně jako v naší studii byly imunodeficientním myším transplantovány i nediferencované NT2 buňky, které měly schopnost vytvořit letální tumory, ale po transplantaci do nucleus caudatus a putamen se proliferace buněk zastavila a žádná nekróza či apoptóza se nevyskytovala ani 20 týdnů po transplantaci. Tento proces byl obdobný tomu, který nastal po transplantaci diferencovaných NT2N. Tuto podobnost by mohla vysvětlit přítomnost signálních molekul a dalších jevů (např. mezibuněčných spojů), které mohou regulovat tyto děje a jsou přítomny v bazálních gangliích myší.

Willing aj. transplantovali větší dávku NT2N buněk ( $200 \times 10^3$ ) s lithiem modelovým potkanům s Parkinsonovou chorobou (PD) [Willing et al., 2002]. Jako místo pro transplantaci bylo vybráno striatum a přežívání transplantátu bylo větší než 60% a narůstalo s dávkou Li. Stejní autoři ale v dřívější transplantáčnické studii injikovali pouze  $20 \times 10^3$  NT2N buněk bez Li do striata potkanům s PD a výskyt transplantátu byl v rozsahu 50–100% [Willing et al., 1999]. Baker aj. uvádí přežívání transplantátu v rozmezí 47,8–50,5% po aplikaci  $800 \times 10^3$  NT2N buněk s Li opět modelovým potkanům s PD [Baker et al., 2000]. Místem pro transplantaci bylo opět striatum.

Hara aj. transplantovali upravené buňky NT2N.Nurr1 ( $200 \times 10^3$ ) modelovým potkanům s cévní mozkovou příhodou (CMP: MCAO – model makroarteriopatie, která má za příčinu primární striatální infarkt, kterým je také částečně poškozena motorická kůra mozku) [Hara et al., 2007]. Striatum je pak opět místem transplantace, ale její úspěšnost je mnohem menší, pouze 1,5%. Podobně Saporta aj. zjistili při transplantaci různých dávek NT2N buněk ( $0–160 \times 10^3$ ) do striata stejného potkaního modelu CMP přežívání 0,5–15%, v závislosti na dávce transplantovaných buněk [Saporta et al., 1999]. Podobnou míru přežívání transplantátu (15%) z NT2N buněk ve striatu stejného zvířecího modelu CMP, po aplikaci  $40 \times 10^3$  stejných buněk, popisují i Borlongan aj. [Borlongan et al. 1998a,b].

Porovnáním námi sledovaného přežívání transplantátu z EC P19 s přežíváním transplantátů z NT2N buněk z výše uvedených studií (bez ohledu na transplantované množství buněk, které se pohybovalo většinou v desítkách až stovkách tisíc buněk, kam námi transplantované množství -  $50 \times 10^3$  buněk - také náleží) dojdeme k následujícímu závěru. Přežívání transplantátu u modelu olivocerebelární degenerace (16%) je nižší, než u zvířecího modelu PD (>47,8%), ale obdobná s modelem CMP (0,5-15%) bez ohledu na stadium diferenciací EC buněk.

Jestliže srovnáme výsledky našich vyšetření morfologie transplantátu s výsledky výše uvedených studií, pak dojdeme k podobným poznatkům. Protože u našich transplantací nediferencovaných EC buněk myším typu Lurcher se vyskytoval pouze expanzivní charakter transplantátu (100%) (obdobně jako při transplantacích

nediferencovaných NT2 buněk do subarachnoidálního prostoru a do superficiálního neocortexu), převažovala jejich neregulovaná proliferace a apoptóza nad jejich neurodiferenciací [Hara et al., 2008]. Výjimkou jsou jen výše uvedené transplantace nediferencovaných NT2 buněk do nucleus caudatus a putamen, kde nedochází vlivem okolního prostředí k jejich proliferaci ani apoptóze, ale k neurodiferenciaci [Trojanowski et al., 1997; Hara et al., 2008]. Možným vysvětlením tohoto jevu je proto působení mikroprostředí těchto bazálních ganglií, které má podobný efekt na tyto buňky jako RA *in vitro*. Navíc bylo zjištěno, že vyvíjející se i dospělé striatum potkana vylučuje RA [Zetterstrom et al., 1994], a tak může řídit diferenciaci buněk [Faiella et al., 1994, 2000]. K tomu nejspíše docházelo i v případě transplantace nediferencovaných NT2 buněk do bazálních ganglií mozku potkana.

Morfologie transplantátů z neuroprogenitorů EC buněk jak v naší, tak ve výše uvedených studiích, vykazuje již méně podobné výsledky, protože při našich transplantacích neuroprogenitorů z P19 buněk myším typu Lurcher nacházíme jak expanzivní charakter (50%), tak destrukci transplantátu (25%). Celkově, transplantované P19 buňky nemají velkou schopnost se šířit do vzdálenějších oblastí a kolonizovat mozečkovou kůru příjemce. Transplantované nediferencované buňky P19 i neuroprogenitory vytvářely ložiska fluoreskujících buněk pouze v oblasti aplikace.

Transplantované NT2N buňky přežívají ve zvířecím modelu CMP v podobné míře a velice dobře se integrují do hostitelské mozkové tkáně [Borlongan et al., 1998c; Bliss et al., 2006]. Nevytvářejí žádné tumory v imunosuprimovaném mozku potkanů (tato imunosuprese je zde na místě, protože se jedná o xenotransplantace), ale vedou k obnovování tkáně poškozeného CNS a zlepšují jeho funkčnost. To bylo prokázáno expresí synaptických proteinů [Sheridan a Maltese, 1998; Mallory et al., 1999]. Zde byla u postižených nebo operovaných myší a potkanů ještě imunohistochemicky zkoumána též synaptická integrace mezi transplantovanými NT2N a hostitelskými buňkami přes synaptofysin [Miyazono et al., 1996; Zhang et al., 2005]. Také tomu chceme věnovat naši pozornost v příští studii. Ve většině uvedených transplantačních prací s NT2N buňkami byla zjištěna různá zlepšení u transplantovaných zvířat v behaviorálních a/nebo kognitivních testech [Hara et al., 2008]. Stejně i my jsme zařadili obdobné testování do plánu experimentů navazujících na transplantační studii, která právě probíhá.

Při porovnání výsledků naší transplantační studie, pokud jde o lokalizaci transplantátu EC P19 buněk u myší typu Lurcher s již výše zmiňovanými transplantacemi NT2N buněk do zvířecích modelů lidských onemocnění, bylo zjištěno, že se v podstatě neliší. To se týká jak hodnot přežívání transplantátu (doba a stav) s ohledem na typ transplantovaného stadia P19 buněk (nediferencované buňky přežívají v 16% a neuroprogenitory také), tak i lokalizace přežívajícího transplantátu. Ten se nachází pouze v mezencefalu



postižených myší (100%), třebaže cílem transplantace byl jako u myší typu wild, mozeček. U těch naopak významně převažuje lokalizace právě v mozečku (kolem 80%) a ne v mezencefalu (kolem 20%). Z toho plyne, že mozeček mutantů Lurcher se zdá být méně příznivým prostředím pro transplantované P19 buňky než zdravá mozečková tkáň.

Podobně Hara aj. uvádí, že pokud se jedná o transplantace nediferencovaných NT2 buněk nebo diferencovaných NT2N buněk do zdravého mozku, pak je vliv mikroprostředí na lokalizaci transplantovaných buněk minimální [Hara et al., 2008]. Naopak, poškozený mozek s patologickým mikroprostředím může upozornit na nevhodné podmínky cíleného místa a pozměnit tím místo úchyty transplantátu. Ve zvířecích modelech CMP existuje stratifikace ischemických vrstev na hlavní a převažující nekrotické jádro a apoptotickou penumbrou. Ischemická penumbra je doporučována jako mnohem vhodnější pro transplantát než nekrotické jádro. Proto při transplantaci do penumbry přežívá vyšší počet NT2N buněk než při transplantacích do nekrotického jádra [Borlongan et al., 1998c; Nishino a Borlongan, 2000]. To samozřejmě platí i pro transplantáty z nediferencovaných NT2 buněk [Hara et al., 2008]. Zatímco bylo zjištěno, že v ischemické penumbře přeživalo okolo 15% transplantovaných NT2N buněk, pak v ischemickém jádře to bylo mnohem méně (<10 jednotlivých buněk). V dalších transplantčních studiích, kde byly transplantovány NT2N buňky s Li do striata modelových potkanů s PD, byl zaznamenán nejen nárůst exprese tyrosinhydroxylázy, ale i lepší přežívání transplantovaných buněk [Willing et al., 2002]. To může být důležité pro budoucí transplantace těchto, ale i námi používaných P19 buněk. Podobně jejich možná genetická modifikace diferenciace do buněk vylučujících přenašeče, může znamenat nejen zlepšení léčby CMP, ale i dalších neurodegenerativních onemocnění.

### ***8.3 Studium mutací v genu pro leukemický inhibiční faktor (LIF) a jejich vztahu k plodnosti žen***

Výsledky dřívějších studií prokázaly [Giess et al., 1999], že frekvence mutací v genu pro LIF je ve skupině neplodných žen signifikantně vyšší ve srovnání se zkoumanou populací plodných žen, což by mohlo mít souvislost s narušením určitého cytokinového prostředí, které je potřebné pro úspěšné periimplantační děje [Carp, 2004]. Jak plyne i z naší studie, bodová záměna G za A na pozici 3400 genu pro LIF neznámá, že žena nebude moci být úspěšně léčena pomocí IVF.

7 z 15 infertilních žen, nesoucích tuto mutaci bylo diagnostikováno jako s idiopatickou neplodností nebo endometriózou. Tyto diagnózy bývají spojovány s celou řadou imunopatologií [Kučera et al., 2004; Kučera et al., 1994; Novotný et al., 1986; Tsai et al., 2000; Ulčová-

Gallová et al., 1996]. Domníváme se, že to by mohl být důvod, proč pouze 1 z těchto žen po prvním IVF cyklu otěhotněla. Naopak ženy s mutací s PCOS, andrologickým faktorem a hyperprolaktinémií neotěhotněly při prvním embryotransferu pouze 2. Na ženy s idiopatickou neplodností a endometriózou mají vliv další imunopatologie (např. přítomnost embryotoxických cytokinů) a jejich interakce s mutacemi v genu pro LIF.

Náš soubor 15 neplodných žen s identickou mutací v genu pro LIF je největší, jaký byl v literatuře popsán. Fakt, že se u všech žen jedná o identickou mutaci, nám umožňuje začít sledovat její vliv na klinický obraz. K přesnějším statistickým analýzám, je však zapotřebí mít vzorek těchto žen ještě početnější.

Třebaže se mutace v genu pro LIF vyskytují vzácně, mají během implantace embrya a jeho časného vývoje vliv na příslušné molekulární děje. Proto někteří autoři vkládají naděje do kultivačních médií doplněných o LIF nebo i další cytokiny a růstové faktory [Cheung et al., 2003; Sirisathien et al., 2003]. Porozumění těmto reakcím na molekulární úrovni, které ovlivňuje LIF by mohlo sloužit k vytvoření nových směrů léčby, které by podpořily přežívání embrya i zvýšení počtu dosažených těhotenství.

## 9 Závěry

### 9.1 Kultivace, neurodiferenciace a následná charakterizace myších ES buněk

Myší embryonální kmenové buňky, jmenovitě linie EC P19 a ES D3, byly úspěšně kultivovány *in vitro*. Pluripotence takto kultivovaných buněk byla potvrzena molekulárně-biologickými metodami, jejichž výsledky prokázaly přítomnost specifických markerů: proteiny Oct-3/4 a antigen Lewis X. Následně byla optimalizována jejich neurodiferenciace, která byla indukována RA. Neuronální charakter diferencovaných buněk byl opět ověřen rostoucí expresí genů PAX-6, MASH-1 a proteinů NCAM,  $\beta$ -III tubulinu a MAP-2, které náleží mezi neuronální markery. Naopak během neurodiferenciace poklesla exprese genů Brachyury a GATA-4, jež jsou markery mesodermálního a entodermálního vývoje buněk. Tyto znaky byly doloženy neuronálním fenotypem diferencovaných buněk.

### 9.2 Transplantace EC P19 buněk do mozečku myší

Tato transplantační studie je první, která sleduje osud myších EC P19 GFP buněk transplantovaných do zdravého (WT) a postiženého mozečku myší (Lc) a hodnotí jejich přežívání, morfologii, lokalizaci a funkčnost. K transplantaci byly použity jak zeleně fluoreskující nediferencované P19 buňky, tak od nich odvozené neuroprogenitory. V rámci jednoho typu myší bylo přežívání obou typů transplantátu srovnatelné. Přežívání neuroprogenitorů i nediferencovaných EC buněk je nižší u myší typu Lurcher než u myší bez neurodegenerací, ale statistické významnosti dosahuje pouze po aplikaci neuroprogenitorů. Morfologie transplantátu vykazuje známky destrukce i expanze vůči hostitelské tkáni. Destrukce byly zjištěny pouze v transplantátech pocházejících z neuroprogenitorů bez ohledu na typ transplantovaných myší. Předpokládáme, že tyto destrukce mohou souviset se stupněm diferenciace transplantovaných buněk a s výskytem apoptózy. Pro potvrzení této hypotézy bude zapotřebí provést studii zaměřenou na delší přežívání transplantátu než 3 týdny a pokusit se zjistit přítomnost markerů apoptózy či nekrózy. Expanze transplantátu je přítomna ve všech případech aplikace nediferencovaných P19 buněk a méně u neuroprogenitorů. Transplantované P19 buňky neměly tendenci migrovat a šířit se v rámci mozečku, což nevzbuzuje velké naděje v jejich funkčnost. Proto uvažujeme tyto transplantace podpořit neurotrofními faktory (LIF, NGF nebo BDNF), které mají i antiapoptotický efekt. Funkčnost transplantovaných buněk byla ověřena u vybraných myší s transplantovanými neuroprogenitory imunohistologicky. Tato analýza prokázala přítomnost GFP transplantovaných buněk v hostitelské tkáni mozečku, které byly zároveň pozitivní na neuronální markery MAP-2 (neurony), GFAP (astrocyty) a kalbindin

(Purkyňovy buňky). V budoucích studiích bychom rádi ověřily tuto funkčnost transplantovaných buněk behaviorálními testy. Z hlediska lokalizace transplantovaných buněk u myši typu WT se vyskytoval transplantát převážně v mozečku a naopak, u myši typu Lc vždy mimo něj, nejčastěji v mezencefalu. Z toho vyplývá, že mozeček mutantů Lc se zdá být méně příznivým prostředím pro transplantované P19 buňky než zdravá mozečková tkáň. Právě z pohledu okolního prostředí transplantátu by mohla být zajímavá neurotransplantační studie zaměřená na další model lidské neurodegenerativní choroby, dědičnou autozomálně dominantní spinocerebelární ataxii typu 2.

### ***9.3 Závěry pro praxi ve studii mutací v genu pro LIF a jejich vztahu k plodnosti žen***

Naše studie vlivu mutace v genu pro LIF na neplodnost žen ústí v otázku týkající se možné suplementace kultivačních a transferových médií tímto a jinými cytokiny při IVF léčbě pacientek.

## 10 Seznam použité literatury

Adjaye, J.; Huntriss, J.; Herwig, R.; BenKahla, A.; Brink, T.C.; Wierling, C.; Hultschig, C.; Groth, D.; Yaspo, M.L.; Picton, H.M. aj. Primary differentiation in the human blastocyst: comparative molecular portraits of inner cell mass and trophectoderm cells. *Stem Cells*. Nov.-Dec. 2005, vol. 23, no. 10, s. 1514-1525.

Aghajanova, L. Update on the role leukemia inhibitory factor in assisted reproduction. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* Jun. 2010, vol. 22, no 3, s. 213-219.

Akira, S. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells*. May 1999, vol. 17, no. 3, s. 138-146.

Ali, H.; Jurga, M.; Kurgonaitė, K.; Forraz, N.; McGuckin, C. Defined in vitro serum-free culturing conditions for neural tissue engineering from umbilical cord blood stem cells. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. 2009, vol. 69, no. 1, s. 11-23.

Amariglio, N.; Hirshberg, A.; Scheithauer, B.W.; Cohen, Y.; Loewenthal, R.; Trakhtenbrot, L.; Paz, N.; Koren-Michowitz, M.; Waldman, D.; Leider-Trejo, L. aj. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med.* [online]. Feb. 2009, vol. 6, no. 2 [cit. 2012-1-24]. Dostupný z WWW: <http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.1000029>.

Andrews, P. W. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev. Biol.* Jun. 1984, vol. 103, no. 2, s. 298-293.

Andrews, P. W.; Damjanov, I.; Simon, D.; Banting, G. S.; Carlin, C.; Dracopoli, N.; Fogh, J. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. *Lab. Invest.* Feb. 1984, vol. 50, no. 2, s. 147-162.

Aronne, M.P.; Evrard, S.G.; Mirochnic, S.; Brusco, A. Prenatal ethanol exposure reduces the expression of the transcriptional factor Pax6 in the developing rat brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Oct. 2008, vol. 1139, no. 1, s. 478-98.

Babuška, V.; Kulda, V.; Houdek, Z.; Pešta, M.; Cendelín, J.; Zech, H.N.; Pacherník, J.; Vožeh, F.; Uher, P.; Kralíčková, M. Characterization of P19 cells during retinoic acid induced differentiation, *Prague Med. Rep.* 2010, vol. 111, no. 4, s. 288-298.

Bader, A.; Al-Dubai, H.; Weitzer, G. Leukemia inhibitory factor modulates cardiogenesis in embryoid bodies in opposite fashions. *Circ. Res.* Apr. 2000, vol. 86, no. 7, s. 787-794.

Bachoud-Lévi, A.C.; Rémy, P.; Nguyen, J.P. aj. Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet.* Dec. 2000, vol. 356, no.9246, s.1975-1979.

Bain, G.; Gottlieb, D.I. Neural cells derived by in vitro differentiation of P19 and embryonic stem cells. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 1998, vol. 5, no. 2-3, s. 175-178.

Bain, G.; Kitchens, D.; Yao, M.; Huettner, J.E.; Gottlieb, D.I. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev. Biol.* Apr. 1995, vol. 168, no. 2, s. 342-357.

Baker, K.A.; Hong, M.; Sadi, D.; Mendez, I. Intrastratial and intranigral grafting of hNT neurons in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* Apr. 2000, vol. 162, no. 2, s. 350-360.

Baker, R.A. Prospects for the treatment of Parkinson's disease using neural grafts. *Expert Opin. Pharmacother.* Jul. 2000, vol. 1, no. 5, s. 889-902.

Barski, J.J.; Hartmann, J.; Rose, Ch.R.; Hoebeek, F.; Mörl, K.; Noll-Hussong, M.; De Zeeuw, C.I.; Konnerth, A.; Meyer, M. Calbindin in Cerebellar Purkinje Cells Is a Critical Determinant of the Precision of Motor Coordination. *J. Neurosci.* Apr. 2003, vol. 23, no. 8, s. 3469-3477.

Bauwens, C.L.; Peerani, R.; Niebruegge, S.; Woodhouse, K.A.; Kumacheva, E.; Husain, M.; Zandstra, P. W. Control of human embryonic stem cell colony and aggregate size heterogeneity influences differentiation trajectories. *Stem Cells.* Sep. 2008, vol. 26, no. 9, s. 2300-2310.

Björklund, A.; Lindvall, O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat. Neurosci.* Jun. 2000, vol. 3, no. 6, s. 537-544.

Bjorklund, L.M.; Sánchez-Pernaute, R.; Chung, S. aj. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Feb. 2002, vol. 99, no. 4, s. 2344-2349.

Bliss, T.M.; Kelly, S.; Shah, A.K.; Foo, W.C.; Kohli, P.; Stokes, C.; Sun, G.H.; Ma, M.; Masel, J.; Kleppner, S.R.; Schallert, T.; Palmer, T.; Steinberg, G.K. Transplantation of hNT neurons into the ischemic cortex: cell survival and effect on sensorimotor behavior. *J. Neurosci. Res.* May 2006, vol. 83, no. 6, s. 1004-1014.

Blum, B.; Benvenisty, N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv. Cancer Res.* 2008, vol. 100, s. 133-158.

Borini, A.; Bulletti, C.; Cattoli, M. aj. Use of recombinant leukemia inhibitory factor in embryo implantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Sep. 1997, vol. 828, s. 157-161.

Borlongan, C.V.; Saporta, S.; Poulos, S.G.; Othberg, A.; Sanberg, P.R. Viability and survival of hNT neurons determine degree of functional recovery in grafted ischemic rats. *Neuroreport.* Aug. 1998a, vol. 9, no. 12, s. 2837-2842.

Borlongan, C.V.; Tajima, Y.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.; Sanberg, P.R. Cerebral ischemia and CNS transplantation: differential effects of grafted fetal rat striatal cells and human neurons derived from a clonal cell line. *Neuroreport.* Nov. 1998b, vol. 9, no. 16, s. 3703-3709.

Borlongan, C.V.; Tajima, Y.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.; Sanberg, P.R. Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinomaderived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats. *Exp. Neurol.* 1998c, vol. 149, no. 2, s. 310-321.

Brinster, R.L. The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *J. Exp. Med.* Oct. 1974, vol. 140, no. 4, s. 1049-1056.

Brons, I.G.; Smithers, L.E.; Trotter, M.W.; Rugg-Gunn, P.; Sun, B.; Chuva de Sousa Lopes, S. M.; Howlett, S. K.; Clarkson, A.; Ahrlund-Richter, L.; Pedersen, R. A. aj. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature.* Jul. 2007, vol. 7150, no. 448, s. 191-195.

Brundin, P.; Karlsson, J.; Emgard, M.; Schierle, G. S.; Hansson, O.; Petersen, A.; Castilho, R. F. Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: a review over current approaches. *Cell Transplant.*, Mar.-Apr. 2000, vol. 9, no. 2, s. 179-195.

Brüstle, O.; Jones, K.N.; Learish, R.D.; Karam, K.; Choudhary, K.; Wiestler, O.D.; Duncan, I.D.; McKay, R.D. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science.* Jul. 1999, vol. 285, no. 5428, s. 754-756.

Brüstle, O.; Spiro, A.C.; Kartám, K.; Choudhary, K.; Okabe, S.; McKay, R.D. In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Dec. 1997, vol. 94, no. 26, s. 14809-14814.

Bugga, L.; Gadiant, R.A.; Kwan, K.; Stewart, C.L.; Patterson, P.H. Analysis of neuronal and glial phenotypes in brains of mice deficient

in leukemia inhibitory factor. *J. Neurobiol.* Sep. 1998, vol. 36, no. 4, s. 509-524.

Buzanska, L.; Sypecka, J.; Nerini-Molteni, S.; Compagnoni, A.; Hogberg, H.T.; del Torchio, R.; Domanska-Janik, K.; Zimmer, J.; Coecke S. A human stem cell-based model for identifying adverse effects of organic and inorganic chemicals on the developing nervous system. *Stem Cells.* Oct. 2009b, vol. 27, no. 10, s. 2591-2601.

Cai, C.; Thorne, J.; Grabel, L. Hedgehog serves as a mitogen and survival factor during embryonic stem cell neurogenesis. *Stem Cells.* May 2008, vol. 26, no. 5, s. 1097-1108.

Cai, L.Q.; Cao, Y.J.; Duan, E.K. Effects of leukaemia inhibitory factor on embryo implantation in the mouse. *Cytokine.* Nov. 2000, vol. 12, no. 11, s. 1676-1682.

Carp, H. Cytokines in recurrent miscarriage. *Lupus.* 2004, vol. 13, no. 9, s. 630-634.

Cendelín, J. Vliv transplantace tkáně mozečku a fyzické aktivity na schopnost prostorové orientace u mutantních myší typu Lurcher. Plzeň, 2008. 78 s. Disertační práce (PhD). Univerzita Karlova. Lékařská fakulta v Plzni. Ústav patologické fyziologie.

Cendelín, J.; Korelusová, L.; Vožeh, F. The effect of cerebellar transplantation and enforced physical activity on motor skills and spatial learning in adult Lurcher mutant mice. *Cerebellum.* Mar. 2009a, vol. 8, no. 1, s. 35-45.

Cerdan, C.; Rouleau, A.; Bhatia, M. VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. *Blood.* Apr. 2004, vol. 103, no. 7, s. 2504-2512.

Clark, A.T.; Rodriguez, R.T.; Bodnar, M.S.; Abeyta, M.J.; Cedars, M.I.; Turek, P.J.; Firpo, M.T.; Reijo Pera, R.A. Human STELLAR, NANOG and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma. *Stem Cells.* Mar. 2004, vol. 22, no. 2, s. 169-179.

Cullinan, E.B.; Abbondanzo, S.J.; Anderson, P.S.; Pollard, J.W.; Lessey, B.A.; Stewart, C.L. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Apr. 1996, vol. 93, no. 7, 3115-3120.

Dang, S.M.; Gerecht-Nir, S.; Chen, J.; Itskovitz-Eldor, J.; Zandstra, P. W. Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells.* Dec. 2004, vol. 22, no. 3, s. 275-282.



Dani, C.; Chambers, I.; Johnstone, S.; Robertson, M.; Ebrahimi, B.; Saito, M.; Taga, T.; Li, M.; Burdon, T.; Nichols, J.; Smith, A. Paracrine induction of stem cell renewal by LIF-deficient cells: a new ES cell regulatory pathway. *Dev. Biol.* Jun. 1998, vol. 128, no. 12, s. 149-162.

Dehmelt, L.; Halpain, S. Actin and Microtubules in Neurite Initiation: Are MAPs the Missing Link? *J. Neurobiol.* Jan. 2004, vol. 58, no. 1, s. 18-33.

Draper, J.S.; Smith, K.; Gokhale, P. aj. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* Jan. 2004, vol. 22, no. 1, s. 53-54.

Dvořák, P. Poodhalené tajemství kmenových buněk. *Vesmír.* 2007, roč. 86, č. 8, s. 514-518.

Dyer, M.A. Regulation of proliferation, cell fate specification and differentiation by the homeodomain proteins Prox1, Six3, and Chx10 in the developing retina. *Cell Cycle.* Jul.-Aug. 2003, vol. 2, no. 4, s. 350-357.

Ernst, M.; Oates, A.; Dunn, A. R. Gp130-mediated signal transduction in embryonic stem cells involves activation of Jak and Ras/mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* Nov. 1996, vol. 271, no. 47, s. 30136-30143.

Escary, J.L.; Perreau, J.; Duménil, D.; Ezine, S.; Brûlet, P. Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature.* May 1993, vol. 6427, no. 363, s. 361-364.

Ešner, M.; Pacherník, J.; Hampl, A.; Dvořák, P. Targeted disruption of fibroblast growth factor receptor-1 blocks maturation of visceral endoderm and cavitation in mouse embryoid bodies. *Int. J. Dev. Biol.* Sep. 2002, vol. 46, no. 6, s. 817-825.

Evans, M.J.; Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryo. *Nature.* Jul. 1981, vol. 5819, no. 292, s. 154-156.

Faiella, A.; Wernig, M.; Consalez, G.G.; Hostick, U.; Hofmann, C.; Hustert, E.; Boncinelli, E.; Balling R.; Nadeau, J.H. A mouse model for valproate teratogenicity: parental effects, homeotic transformations, and altered HOX expression. *Hum. Mol. Genet.* Jan. 2000, vol. 9, no. 2, s. 227-236.

Faiella, A.; Zappavigna, V.; Mavilio, F.; Boncinelli, E. Inhibition of retinoic acid-induced activation of 3' human HOXB genes by antisense oligonucleotides affects sequential activation of genes

located upstream in the four HOX clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Jun. 1994, vol. 91, no. 12, s. 5335-5339.

Filip, S.; Mokřý, J.; Hruška, I. *Kmenové buňky*. Praha: Galén, 2006. 223 s. ISBN 80-7262-401-6.

Fotaki, V.; Yu, T.; Zaki, P.A.; Mason, J.O.; Price, D.J. Abnormal positioning of diencephalic cell types in neocortical tissue in the dorsal telencephalon of mice lacking functional Gli3. *J. Neurosci.* Sep. 2006, vol. 26, no. 36, s. 9282-9292.

Fraichard, A.; Chassande, O.; Bilbaut, G.; Dehay, C.; Savatier, P.; Samarut, J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J. Cell Sci.* Oct. 1995, vol. 108, s. 3181-3188.

Freed, C.R.; Greene, P.E.; Breeze, R.E.; Wei-Yann, T.; DuMouchel, W.; Kao, R. aj. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* Mar. 2001, vol. 344, no. 10, s. 710-719.

Fricker-Gates, R.A.; Muir, J.A.; Dunnett, S.B. Transplanted hNT cells ("LBS neurons") in a rat model of Huntington's disease: good survival, incomplete differentiation, and limited functional recovery. *Cell Transplant.* 2004, vol. 13, no. 2, s. 123-136.

Fuchs, E.; Weber, K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease". *Annu. Rev. Biochem.* 1994, vol. 63, s. 345-382.

Gage, F.H. Mammalian neural stem cells. *Science*. Feb. 2000, vol. 287, no. 5457, s. 1433-1438.

Garbuzova-Davis, S.; Willing, A.E.; Milliken, M.; Saporta, S.; Zigova, T.; Cahill, D.W.; Sanberg, P.R. Positive effect of transplantation of hNT neurons (Ntera 2/D1 cell-line) in a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* Apr. 2002, vol. 174, no. 2, s. 169-180.

Gardner, R.L. *Essentials of Stem Cell Biology: ES-like Cells in Other Species*. In Lanza, R.; Gearhart, J.; Hogan, B.; Melton, D.; Pedersen, R.; Thomson, J.; Thomas, E.D.; West, M. (ed.). *Elsevier Academic Press*. Burlington (USA). 2006, s. 2-4. ISBN-13: 978-0-12-088-442-1. ISBN-10:0-12-088442-9.

Gearing, D.P.; Gough, N.M.; King, J.A.; Hilton, D.J.; Nicola, N.A.; Simpson, R.J.; Nice, E.C.; Kelso, A.; Metcalf, D. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J.* Dec. 1987, vol. 13, no. 6. s. 3995-4002.

Gersh, B.J.; Simari, R.D.; Behfar, A.; Terzic, C.M.; Terzic, A. Cardiac cell repair therapy: a clinical perspective. *Mayo Clin. Proc.* Oct. 2009, vol. 84, no. 10, s. 876-892.

Giess, R.; Tanasescu, I.; Steck, T.; Sendtner, M. Leukaemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. *Mol. Hum. Reprod.* Jun. 1999, vol. 5, no. 6, s. 581–586.

Gould, E.; Gross, C.G. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J. Neurosci.* Feb. 2002, vol. 22, no. 3, s. 619-623.

Gulino, R.; Litrico, L.; Leanza, G. Long-term survival and development of fetal ventral spinal grafts into the motoneuron-depleted rat spinal cord: Role of donor age. *Brain Res.* Apr. 2010, vol. 1323, s. 41-47.

Haines, B.P.; Voyle, R.B.; Pelton, T.A.; Forrest, R.; Ratejen, P.D. Complex Conserved Organization of the Mammalian Leukemia Inhibitory Factor Gene: Regulated Expression of Intracellular and Extracellular Cytokines. *J. Immunol.* Apr. 1999, vol. 162, no. 8, s. 4637-4646.

Hammerschmidt, M.; Brook, A.; McMahon, A.P. The world according to hedgehog. *Trends Genet.* Jan. 1997, vol. 13, no. 1, s. 14-21.

Hansen, S.M.; Køhler, L.B.; Li, S.; Kiselyov, V.; Christensen, C.; Owczarek, S.; Bock, E.; Berezin, V. NCAM-derived peptides function as agonists for the fibroblast growth factor receptor. *J. Neurochem.* Sep. 2008, vol. 106, no. 5, s. 2030-41.

Hara, K.; Matsukawa, N.; Yasuhara, T.; Xu, L.; Yu, G.; Maki, M.; Kawase, T.; Hess, D.C.; Kim, S.U.; Borlongan, C.V.. Transplantation of post-mitotic human neuroteratocarcinoma-overexpressing Nurr1 cells provides therapeutic benefits in experimental stroke: in vitro evidence of expedited neuronal differentiation and GDNF secretion. *J. Neurosci. Res.* May 2007, vol. 85, no. 6, s. 1240-1251.

Hara, K.; Yasuhara, T.; Maki, M. aj. Neural progenitor NT2N cell lines from teratocarcinoma for transplantation therapy in stroke. *Prog. Neurobiol.* Jul. 2008, vol. 85, no. 3, s. 318-334.

Harding, A.E. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet.* May 1983, vol. 321, no. 8334, s. 1151-1155.

Harvey, M.B.; Leco, K.J.; Arcellana-Panlilio, M.Y.; Zhang, X.; Edwards, D.R.; Schultz, G.A. Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukemia inhibitory factor and epidermal growth factor. *Development.* Apr. 1995, vol. 121, no. 4, s. 1005-1014.

Hauser, R.A.; Freeman, T.B.; Snow, B.J.; Nauert, M.; Gauger, L.; Kordower, J.H.; Olanow, C.W. Long-term Evaluation of Bilateral Fetal Nigral Transplantation in Parkinson Disease. *Arch. Neurol.* Feb.1999, vol. 56, no. 2, s. 179-187.

Hay, D.C.; Sutherland, L.; Clark, J.; Burdon, T. Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.* Mar. 2004, vol. 22, no. 2, s. 225-235.

He, Z.; Li, J.J.; Zhen, C.H.; Feng, L.Y.; Ding, X.Y. Effect of leukemia inhibitory factor on embryonic stem cell differentiation: implications for supporting neuronal differentiation. *Acta Pharmacol. Sin.* Jan. 2006, vol. 27, no. 1, s. 80-90.

Herrler, A.; von Rango, U.; Beier, H.M. Embryo–Maternal signaling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. *Reprod. Biomed. Online.* Mar. 2003, vol. 6, no. 2, s. 244-256.

Hildebrand, M.S. *et al.* Survival of partially differentiated mouse embryonic stem cells in the scala media of the guinea pig cochlea. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* Dec. 2005, vol. 6, no. 4, s. 341-354.

Holtzinger, A.; Rosenfeld, G.E.; Evans, T. Gata4 directs development of cardiac-inducing endoderm from ES cells. *Dev. Biol.* Jan. 2010, vol. 337, no. 1, s. 63-73.

Hong, S.; Heo, J.; Lee, S.; Heo, S.; Kim, S.S.; Lee, Y.; Kwon, M.; Hong, S. Methyltransferase-inhibition interferes with neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Dec. 2008, vol. 377, no. 3, s. 935-940.

Houdek, Z.; Cendelín, J.; Kulda, V.; Vožeh, F.; Babuška, V.; Hatina, J.; Hájková, L.; Králíčková, M.; Zech, N.; Pacherník, J.; Uher, P. Neurální diferenciacie myších embryonálních karcinomových a embryonálních kmenových buněk pomocí kyseliny retinové – Pilotní studie. *Plzeň. Lék. Sborn.* 2010, roč. 76, s. 37-40.

Houdek, Z.; Cendelín, J.; Kulda, V.; Babuška, V.; Vožeh, F.; Hatina, J.; Králíčková, M.; Zech, N.; Veselá, I.; Pacherník, J.; Uher, P. The comparison of P19-derived neuroprogenitors and naive cells survival after intracerebellar application in B6CBA mice. *Folia Biol. (Praha).* 2011, vol. 57, no. 4, s. 162-169.

Huynh, D.P.; Figueroa, K.; Hoang, N.; Pulst, S.M. Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not center for *Datx2* sequence information and *Drosophila* stocks used necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nat. Genet.* Sep. 2000, vol. 26, no. 1, s. 44-50.

Chambers, I.; Colby, D.; Robertson, M.; Nichols, J.; Lee, S.; Tweedie, S.; Smith, A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. May 2003, vol. 113, no. 5, s. 643-655.

Chambers, I.; Smith, A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*. Sep. 2004, vol. 23, no. 43, s. 7150-7160.

Charnock-Jones, D.S.; Sharkey, A.M.; Fenwick, P.; Smith, S.K. Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. *J. Reprod. Fertil.* Jul 1994, vol. 101, no. 2, s. 421-426.

Cheon, Y.P.; Li, Q.; Xu, X.; Demayo, F.J.; Bagchi, I.C.; Bagchi, M.K. A genomic approach to identify novel progesterone receptor regulated pathways in the uterus during implantation. *Mol. Endocrinol.* Dec. 2002, vol. 16, no. 12, s. 2853-2871.

Cheung, L.P.; Leung, H.Y.; Bongso, A. Effect of supplementation of leukemia inhibitory factor and epidermal growth factor on murine embryonic development in vitro, implantation, and outcome of offspring. *Fertil. Steril.* Sep. 2003, vol. 80, Suppl. 2, s. 727-735.

Jiao, J.; Chen, D.F. Induction of neurogenesis in nonconventional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals. *Stem Cells*. May, 2008, vol. 26, no. 5, s. 1221-1230.

Jo, D.; Liu, D.; Yao, S.; Collins, R.D.; Hawiger, J. Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis. *Nat. Med.* Aug. 2005, vol. 11, no. 8, s. 892-898.

Jones-Villeneuve, E.M.; Rudnicki, M.A.; Harris, J.F.; McBurney, M.W. Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* Dec. 1983, vol. 3, no. 12, s. 2271-2279.

Kabir-Salmani, M.; Nikzad, H.; Shiokawa, S. aj. Secretory role for human uterodomes (pinopods): secretion of LIF. *Mol. Hum. Reprod.* Aug. 2005, vol. 11, no. 8, s. 553-559.

Karimi-Abdolrezaee, S.; Eftekharpour, E.; Wang, J.; Schut, D.; Fehlings M.G. Synergistic effects of transplanted adult neural stem/progenitor cells, chondroitinase, and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured spinal cord. *J. Neurosci.* Feb. 2010, vol. 30, no. 5, s. 1657-1676.

Kawamura, K.; Nanami, T.; Kikuchi, Y.; Kitakami, A. Grafted granule and Purkinje cells can migrate into the mature cerebellum of normal adult rats. *Exp. Brain Res.* 1988, vol. 70, no. 3, s. 477-484.

Keller, G. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* Dec. 1995, vol. 7, no. 6, s. 862-869.

Kennedy, S.G.; Wagner, A.J.; Conzen, S.D.; Jordan, J.; Bellacosa, A.; Tschlis, P.N.; Hay, N. The PI-3 kinase/ Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev.* Mar. 1997, vol. 11, no. 6, s. 701-713.

Kim, S.U.; de Vellis J. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review. *J. Neurosci. Res.* Aug. 2009, vol. 87, no. 10, s. 2183-2200.

Kispert, A.; Herrmann, B.G. Immunohistochemical analysis of the Brachyury protein in wild-type and mutant mouse embryos. *Dev. Biol.* Jan. 1994, vol. 161, no. 1, s. 179-193.

Klockengether, T.; Evert, B. Genes involved hereditary ataxias. *Trends Neurosci.* Sep. 1998, vol. 21, no. 9, s. 413-418.

Knackstedt, M.K.; Zenclussen, A.C.; Hertwig, K.; Hagen, E.; Dudenhausen, J.W.; Clark, D. A. aj. Th1 cytokines and the prothrombinase fgl2 in stress-triggered and inflammatory abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.* Apr. 2003, vol. 49, no. 4, s. 210-220.

Koike, M.; Sakaki, S.; Amano, Y.; Kurosawa, H. Characterization of embryoid bodies of mouse embryonic stem cells formed under various culture conditions and estimation of differentiation status of such bodies. *J. Biosci. Bioeng.* Oct. 2007, vol. 104, no. 4, 294-299.

Kojima, K.; Kanzaki, H.; Iwai, M. aj. Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biol. Reprod.* Apr. 1994, vol. 50, no. 4, s. 882-887.

Kondziolka, D.; Steinberg, G.K.; Wechsler, L.; Meltzer, C.; Elder, E.; Gebel, J.; DeCesare, S.; Jovin, T.; Zafonte, R.; Leibowitz, J.; Flickinger, J.C.; Tong, D.; Marks, M.; Jamieson, C.; Luu, D. Bell-Stephens, T.; Teraoka, J. Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J. Neurosurg.* Jul. 2005, vol. 103, no. 1, s. 38-45.

Kondziolka, D.; Wechsler, L.; Goldstein, S.; Meltzer, C.; Thulborn, K.R.; Gebel, J.; Jannetta, P.; DeCesare, S.; Elder, E.M.; McGrogan, M. aj. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology.* Aug. 2000, vol. 55, no. 4, s. 565-569.

Kooreman, N.G.; Wu, J.C. Tumorigenicity of pluripotent stem cells: biological insights from molecular imaging. *J. R. Soc. Interface*. Dec. 2010, vol. 7, Suppl. 6, S753-S763.

Korzhevskii, D.E.; Karpenko, M.N.; Kirik, O.V. Microtubule-associated proteins as markers of nerve cell differentiation and functional status. *Morfologija*. 2011, vol. 139, no. 1, s. 13-21.

Kotasová, H.; Veselá, I.; Kučera, J.; Houdek, Z.; Procházková, J.; Králíčková, M.; Pacherník, J. Phosphoinositide 3-kinase inhibition enables retinoic acid-induced neurogenesis in monolayer culture of embryonic stem cells. *J. Cel. Biochem.* [online]. Feb. 2012, vol. 113, no. 2, s. 563-570 [cit. 2012-1-24]. Dostupný z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.23380/abstract;jsessionid=39C1BE807FD6BFE838C43EAEB21C9FC1.d02t04>>.

Kotasová, H. Regulace diferenciacce embryonálních pluripotentních buněk prostřednictvím receptoru gp130. Brno, 2009. 74 s. Diplomová práce (Mgr.). Masarykova univerzita. Přírodovědecká fakulta. Dostupný také z WWW: <[http://is.muni.cz/th/151025/prif\\_m/](http://is.muni.cz/th/151025/prif_m/)>.

Králíčková, M.; Šíma, R.; Vaněček, T.; Šíma, P.; Rokyta, Z.; Ulčová-Gallová, Z.; Suchá, R.; Uher, P.; Hes, O. Leukemia inhibitory factor gene mutations in the population of infertile women are not restricted to nulligravid patients. *Eur. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol.* Aug. 2006, vol. 127, no. 2, s. 231-235.

Králíčková, M.; Ulčová-Gallová, Z.; Šíma, R.; Vaněček, T.; Šíma, P.; Křížan, J.; Suchá, R.; Uher, P.; Hes, O.; Novotný, Z.; Rokyta, Z.; Větvicka, V. Preliminary report on the association of the leukemia inhibitory factor gene mutation and the antiphospholipid antibodies in the peripheral blood of infertile women. *Folia Microbiol.* 2007, vol. 52, no. 5, s. 543-548.

Kučera, E.; Madar, J.; Jirásek, J.E. aj. Imunopatologické a histopatologické aspekty ektopické implantace. *Čes. Gynek.* 2004, roč. 69, Suppl. 1, s. 3-8.

Kučera, E.; Presl, J.; Uher, J. aj. Glykosaminoglykany v peritoneální tekutině neplodných žen s endometriózou. *Čes. Gynek.* 1994, roč. 59, č. 2, s. 59-61.

Kusakabe, Y.; Miura, H.; Hashimoto, R.; Sugiyama, C.; Ninomiya, Y.; Hino, A. The neural differentiation gene Mash-1 has a distinct pattern of expression from the taste reception-related genes gustducin and T1R2 in the taste buds. *Chem. Senses*. Jun. 2002, vol. 27, no. 5, s. 445-451.

Lafuste, P.; Robert, B.; Danan J.L. aj. Alphafetoprotein gene expression in early and full-term human trophoblast. *Placenta*. Sep.-Oct. 2002, vol. 23, no. 8-9, s. 600-612.

Lai, K.; Kaspar, B.K.; Gage, F.H.; Schaffer, D.V. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat. Neurosci.* Jan. 2003, vol. 6, no. 1, s. 21-27.

Laird, S.M.; Tuckerman, E.M.; Dalton, C.F.; Dunphy, B.C.; Li, T.C.; Zhang, X. The production of leukemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum. Reprod.* Mar. 1997, vol. 12, no. 3, s. 569-574.

Layton, M.J.; Lock, P.; Metcalf, D.; Nicola, N.A. Cross-species receptor binding characteristics of human and mouse leukemia inhibitory factor suggest a complex binding interaction. *J. Biol. Chem.* Jun. 1994, vol. 269, no. 25, s. 17048-17055.

Ledee-Bataille, N.; Koepfel, B.; Frydman, R. aj. The impact of stress in the maternofetal relationship: an immunological approach. *Gynecol. Obstet. Fertil.* Sep. 2003, vol. 31, no. 9, s. 778-781.

Lee, V.M.; Hartley, R.S.; Trojanowski, J.Q. Neurobiology of human neurons (NT2N) grafted into mouse spinal cord: implications for improving therapy of spinal cord injury. *Prog. Brain Res.* 2000, vol. 128, s. 299-307.

Lin, M.J.; Lao, X.J.; Ma, H.M.; Tang, Y. The relationship between leukemia inhibitory factor and neurokinin receptors in a rat model of asthma. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* Dec. 2005, vol. 28, no. 12, s. 820-824.

Lovell-Badge, R. Many ways to pluripotency. *Nat. Biotechnol.* Oct. 2007, vol. 25, no. 10, s. 1114-1116.

Ma, Y.; Feigin, A.; Dhawan, V. aj. Dyskinesia after fetal cell transplantation for Parkinsonism: a PET study. *Ann. Neurol.* Nov. 2002, vol. 52, no. 5, s. 628-634.

Maden, M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* Oct. 2007, vol. 8, no. 10, s. 755-765.

Magnuson, D.S.; Morassutti, D.J.; McBurney, M.W.; Marshall, K.C.. Neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells develop responses to excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Brain Res. Dev. Brain Res.* Dec. 1995, vol. 90, no. 1-2, s. 141-150.

Machold, R.; Hayashi, S.; Rutlin, M.; Muzumdar, M.D.; Nery, S.; Corbin, J.G.; Gritli-Linde, A.; Dellovade, T.; Porter, J.A.; Rubin, L.L.; Dudek, H.; McMahon, A.P.; Fishell, G. Sonic hedgehog is required



for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron*. Sep. 2003, vol. 39, no. 6, s. 937-950.

Mallory, M.; Honer, W.; Hsu, L.; Johnson, R.; Rockenstein, E.; Masliah, E. In vitro synaptotrophic effects of cerebrolysin in NT2N cells. *Acta Neuropathol*. May 1999, vol. 97, no. 5, s. 437-446.

Marwood, M.; Visser, K.; Salamonsen, L.A.; Dimitriadis, E. Interleukin-11 and leukemia inhibitory factor regulate the adhesion of endometrial epithelial cells: Implications in fertility regulation. *Endocrinology*. Jun. 2009, vol. 150, no. 6, s. 2915-2923.

Matin, M.M.; Walsh, J.R.; Gokhale, P.J.; Draper, J.S.; Bahrami, A.R.; Morton, I.; Moore, H.D.; Andrews, P.W. Specific knockdown of oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells*. Sep. 2004, vol. 22, no. 5, s. 659-668.

Matsuda, T.; Nakamura, T.; Nakao, K.; Arai, T.; Katsuki, M.; Hejle, T.; Yokota, T. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J*. Aug. 1999, vol. 18, no.15, s. 4261-4269.

McBurney, M. W.; Rogers, B. J. Isolation of male murine embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev. Biol*. Feb. 1982, vol. 89, no. 2, s. 503-508.

McDonald, J.W.; Liu, X. Z.; Qu, Y.; Liu, S.; Mickey, S.K. aj. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat. Med*. Dec. 1999, vol. 5, no. 12, s. 1410-1412.

Meltzer, C.C.; Kondziolka, D.; Villemagne, V.L. aj. Serial {18F} fluorodeoxyglucose positron emission tomography after human neuronal implantation for stroke. *Neurosurgery*. Sep. 2001, vol. 49, no.3, s. 586-592.

Mikolajczyk, M.; Wirstlein, P.; Skrzypczak, J. Leukaemia inhibitory factor and interleukin 11 levels in uterine flushings of infertile patients with endometriosis. *Hum. Reprod*. 2006, vol. 21, s. 3054-3058.

Miyazono, M.; Nowell, P.C.; Finan, J.L.; Lee, V.M.; Trojanowski, J.Q. Long-term integration and neuronal differentiation of human embryonal carcinoma cells (NTera-2) transplanted into the caudoputamen of nude mice. *J. Comp. Neurol*. Dec. 1996, vol. 376, no. 4, s. 603-613.

Molteni, R.; Wu, A.; Vaynman, S.; Ying, Z.; Barnard, R.J.; Gomez-Pinilla, F. Exercise reverses the effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of

brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*. 2004, vol. 123, no. 2, s. 429-440.

Morrish, D.W.; Dakour, J.; Li, H. Functional regulation of human trophoblast differentiation. *J. Reprod. Immunol.* Aug. 1998, vol. 39, no. 1-2, s. 179-195.

Muramatsu, H.; Kusano, T.; Sato, M.; Oda, Y.; Kobori K.; Muramatsu, T. Embryonic stem cells deficient in I  $\beta$ 1,6-*N* acetylglucosaminyltransferase exhibit reduced expression of embryoglycan and the loss of a Lewis X antigen, 4C9. *Glycobiology*. Mar. 2008, vol. 18, no. 3, s. 242-249.

Murphy, M.; Dutton, R.; Koblar, S.; Cheema, S.; Bartlett, P. Cytokines which signal through the LIF receptor and their actions in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* Aug. 1997, vol. 52, no. 5, s. 355-378.

Murray, R.; Lee, F.; Chiu, C.P. The genes for leukemia inhibitory factor and interleukin-6 are expressed in mouse blastocysts prior to the onset of haemopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* Sep. 1990, vol. 10, no. 9, s. 4953-4956.

Nakao, N.; Yokote, H.; Nakai, K., Itakura, T. Promotion of survival and regeneration of nigral dopamine neurons in a rat model of Parkinson's disease after implantation of embryonal carcinoma-derived neurons genetically engineered to produce glial cell line-derived neurotrophic factor. *J. Neurosurg.* Apr. 2000, vol. 92, no. 4, s. 659-670.

Nichols, J.; Davidson, D.; Taga, T.; Yoshida, K.; Chambers, I.; Smith, A. G. Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* Jul. 1996, vol. 57, no. 2, s. 123-131.

Nichols, J.; Chambers, I.; Taga, T.; Smith, A. Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development.* Jun. 2001, vol. 128, no. 12, s. 2333-2339.

Nishino, H.; Borlongan, C.V. Restoration of function by neural transplantation in the ischemic brain. *Prog. Brain Res.* 2000, vol. 127, s. 461-476.

Niwa, H.; Burdon, T.; Chambers, I.; Smith, A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.*, Jul. 1998, vol. 12, no. 13, s. 2048-2060.

Novotný, Z.; Křížan, J.; Šíma, R.; Šíma, P.; Uher, P.; Zech, N.; Hüttelová, R.; Baborová, P.; Ulčová-Gallová, Z.; Šubrt, I.; Ulmanová, E.; Houdek, Z.; Rokyta, Z.; Babuška V.; Králíčková, M. Leukemia

inhibitory factor (LIF) gene mutations in women diagnosed with unexplained infertility and endometriosis have a negative impact on the IVF outcome. A pilot study. *Folia Biol. (Praha)*. 2009, vol. 55, no. 3, s. 92-97.

Novotný, Z.; Tomášek, J.; Macků, F. Mimoděložní těhotenství-podrobný rozbor 10ti letého souboru pacientek. *Čes. Gynek.* 1986, roč. 51, č. 6, s. 803-806.

Okabe, S.; Forsberg-Nilsson, K.; Spiro, A.C.; Segal, M.; McKay, R.D.G. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech. Dev.* Sep. 1996, vol. 59, no. 1, s. 89-102.

Osumi, N.; Shinohara, H.; Numayama-Tsuruta, K.; Maekawa, M. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells*. Jul. 2008, vol. 26, no. 7, s. 1663-72.

Pacherník, J.; Bryja, V.; Ešner, M.; Kubala, L.; Dvořák, P.; Hampl, A. Neural differentiation of pluripotent mouse embryonic carcinoma cells by retinoic acid: Inhibitory effect of serum. *Physiol. Res.* 2005, vol. 54, s. 115-122.

Pacherník, J.; Ešner, M.; Bryja, V.; Dvořák, P.; Hampl, L.A. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells growth in monolayer. *Reprod. Nutr. Dev.* Jul.-Aug. 2002a, vol. 42, no. 4, s. 317-326.

Pacherník, J.; Horváth, V.; Kubala, L.; Dvořák, P.; Kozubík, A.; Hampl, A. Neural differentiation potentiated by the leukaemia inhibitory factor through STAT3 signalling in mouse embryonic carcinoma cells. *Folia Biol. (Praha)*. Sep. 2007, vol. 53, no. 5, s. 157-163.

Pan, G.; Thomson, J.A. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* Jan. 2007, vol. 17, no. 1, s. 42-49.

Parrow, V.; Horton, C.; Maden, M.; Laurie, S.; Notarianni, E. Retinoids are endogenous to the porcine blastocyst and secreted by trophectoderm cells at functionally-active levels. *Int. J. Dev. Biol.* May 1998, vol. 42, no. 2, s. 629-632.

Payer, B.; Saitou, M.; Barton, S.C.; Thresher, R.; Dixon, J.P.; Zahn, D.; Colledge, W.H.; Carlton, M.B.; Nakano, T.; Surani, M.A.. Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice. *Curr. Biol.* Dec. 2003, vol. 13, no. 23, s. 2110-2117.

Pekkanen-Mattila, M.; Kerkelä, E.; Tanskanen, J.M.; Pietilä, M.; Pelto-Huikko, M. aj. Substantial variation in the cardiac differentiation of human embryonic stem cell lines derived and propagated under

the same conditions-a comparison of multiple cell lines. *Ann. Med.* 2009, vol. 41, no. 5, s. 360-370.

Pernas-Alonso, R.; Morelli, F.; di Porzio, U.; Perrone-Capano, C. Multiplex semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of low abundance neuronal mRNAs. *Brain Res. Brain Res. Protoc. Dec.* 1999, vol. 4, no. 3, s. 395-406.

Perrelet, D.; Ferri, A.; MacKenzie, A.E.; Smith, G.M.; Korneluk, R.G.; Liston, P.; Sagot, Y.; Tetrado, J.; Monnier, D.; Kato, A.C. IAP family proteins delay motoneuron cell death in vivo. *Eur. J. Neurosci.* Jun. 2000, vol. 12, no. 6, s. 2059-2067.

Phillips, B.W.; Vernochet, C.; léhlé, C.; Dani, C. Handbook of Stem Cells: Differentiation of Embryonic Stem Cells into Adipose Cells. In Lanza R.; Gearhart, J.; Hogan, B.; Melton, D.; Pederson, R.; Thomson, J. (ed.). *Elsevier Academic Press*. Burlington (USA), 2004, s. 329-335. ISBN: 0-12436642-2 (vol. 1).

Piccini, P.; Brooks, D.J.; Bjorklund, A.; Gunn, R.N.; Grasby, P.M.; Rimoldi, O.; Brundin, P.; Hagell, P.; Rehncrona, S.; Widner, H.; Lindvall, O. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat. Neurosci.* Dec. 1999, vol. 2, no. 12, s. 1137-1140.

Pikkarainen, S.; Tokola, H.; Kerkela, R.; Ruskoaho, H. GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc. Res.* Aug. 2004, vol. 63, no. 2, s. 196-207.

Pleasure, S.J.; Page, C.; Lee, V., M. Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J. Neurosci.* May 1992, vol. 12, no. 5, s. 1802-1815.

Poehlmann, T.G.; Fitzgerald, J.S.; Meissner, A.; Wengenmayer, T.; Schleussner, E.; Friedrich, K. aj. Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3. *Placenta.* Apr. 2005, vol. 26, Suppl. A, s. S37-S41.

Predle, K.; Zink, N.; Wolf, E. Pluripotent stem cells-model of embryonic development, to gene targeting and basis of cell therapy. *Anat. Histol. Embryol.* Jun. 2002, vol. 31, no. 3, s. 169-186.

Pruitt, S.C.; Natoli, T.A. Inhibition of differentiation by leukemia inhibitory factor distinguishes two induction pathways in P19 embryonal carcinoma cells. *Differentiation.* May 1992, vol. 50, no. 1, s. 57-65.

Ramírez, M.A.; Pericuesta, E; Fernandez-Gonzalez, R.; Moreira, P.; Pintado, B.; Gutierrez-Adan, A. Transcriptional and post-

transcriptional regulation of retrotransposons IAP and MuERV-L affect pluripotency of mice ES cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* Nov. 2006, vol. 4, no. 55.

Reubinoff, B.E.; Pera, M.F.; Fong, C.Y.; Trounson, A.; Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* Apr. 2000, vol. 18, no. 4, s. 399-404.

Rey, J.M.; Pujol, P.; Callier, P.; Cavailles, V.; Freiss, G.; Maudelonde, T.; Brouillet, J.P. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to evaluate the expression patterns of genes involved in the oestrogen pathway. *J. Mol. Endocrinol.* Jun. 2000, vol. 24, no. 3, s. 433-440.

Rolando, C.; Gribaudo, S.; Yoshikawa, K.; Leto, K.; De Marchis, S.; Rossi, F. Extracerebellar progenitors grafted to the neurogenic milieu of the postnatal rat cerebellum adapt to the host environment but fail to acquire cerebellar identities. *Eur. J. Neurosci.* Apr. 2010, vol. 31, no. 8, s. 1340-1351.

Ronaghi, M.; Erceg, S.; Moreno-Manzano, V.; Stojkovic, M. Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells? *Stem Cells.* Jan. 2010; vol. 28, no. 1, s. 93-99.

Rossi, F.; Cattaneo, E. Neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nat. Rev. Neurosci.* May 2002, vol. 3, no. 5, s. 401-409.

Saporta, S.; Borlongan, C.V.; Sanberg, P.R. Neural transplantation of human neuroteratocarcinoma (hNT) neurons into ischemic rats. A quantitative dose-response analysis of cell survival and behavioral recovery. *Neuroscience.* 1999, vol. 91, no. 2, s. 519-525.

Saporta, S.; Makoui, A.S.; Willing, A. aj. Functional recovery after complete contusion injury to the spinal cord and transplantation of human neuroteratocarcinoma neurons in rats. *J. Neurosurg.* Jul. 2002, vol. 97, suppl. 1, s. 63-68.

Seiler, P.; Plenz, G.; Deng, M. C. The interleukin-6 cytokine system in embryonic development, embryo-maternal interactions and cardiogenesis. *Eur. Cytokine Netw.* Mar. 2001, vol. 12, no. 1, s. 15-21.

Seli, E.; Kayisli, U.; Cakmak, H.; Bukulmez, O; Bildirici, I.; Guzeloglu-Kayisli, O.; Arici, A. Removal of hydrosalpinges increases endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) expression at the tie of

the implantation window. *Hum. Reprod.* Nov. 2005, vol. 20, no. 11, s. 3012-17.

Sellner, L.N.; Turbett, G.R. The presence of a pseudogene may affect the use of HPRT as an endogenous mRNA control in RT-PCR. *Mol. Cell. Probes.* Dec. 1996, vo. 10, no. 6, s. 481-3.

Sheridan, K.M.; Maltese, W.A. Expression of Rab3A GTPase and other synaptic proteins is induced in differentiated NT2N neurons. *J. Mol. Neurosci.* Apr. 1998, vol. 10, no. 2, s. 121-128.

Sherwin, J.; Freeman, T.; Stephens, R.; Kimber, S.; Smith, A.; Chambers, I.; Smith, S.; Sharkey, A. Identification of genes regulated by leukaemia inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation. *Mol. Endocrinol.* Sep. 2004, vol. 18, no. 9, s. 2185-2195.

Shimomura, Y.; Ando, H.; Furugori, K.; Kajiyama, H.; Suzuki, M. aj. Possible involvement of crosstalk cell-adhesion mechanism by endometrial CD26/dipeptidyl peptidase IV and embryonal fibronectin in human blastocyst implantation. *Mol. Hum. Reprod.* Aug. 2006, vol. 12, no. 8, s. 491-495.

Schofield, G.; Kimber, S.J. Leukocyte subpopulations in the uteri of leukemia inhibitory factor knockout mice during early pregnancy. *Biol. Reprod.* Apr. 2005, vol. 72, no. 4, s. 872-878.

Schuringa, J.J.; Van der Schaaf, S.; Vellenga, E.; Eggen, B.J.L.; Kruijer, W. LIF-induced STAT3 signaling in murine versus human embryonal carcinoma (EC) cells. *Exp. Cell. Res.* Mar. 2002, vol. 274, no. 1, s. 119-129.

Sirisathien, S.; Hernandez-Fonseca, H.J.; Bosch, P. aj. Effect of leukemia inhibitory factor on bovine embryos produced in vitro under chemically defined conditions. *Theriogenology.* Apr. 2003, vol. 59, no. 8, s. 1751-1763.

Smith, A.G.; Heath, J.K.; Donaldson, D.D.; Wong, G.G.; Moreau, J.; Stahl, M.; Rogers, D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature.* Dec. 1988, vol. 6200, no. 336, s. 688-690.

Soria, B.; Roche, E.; Berna, G.; Leon-Quinto, T.; Reig, J.A.; Martin, F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes.* Feb. 2000, vol. 49, no. 2, s. 157-162.

Soudais, C.; Bielinska, M.; Heikinheimo, M.; MacArthur, C.A.; Narita, N.; Saffitz, J.E., Simon, M.C.; Leiden, J.M.; Wilson, D.B. Targeted mutagenesis of the transcription factor GATA-4 gene in mouse

embryonic stem cells disrupts visceral endoderm differentiation in vitro. *Development*. Nov. 1995, vol. 121, no. 11, s. 3877-3888.

Specht, K.; Richter, T.; Müller, U.; Walch, A.; Werner, M.; Höfler, H. Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am. J. Pathol.* Feb. 2001, vol. 158, no. 2, s. 419-429.

Stahl, J.; Gearing, D.P.; Willson, T.A.; Brown, M.A.; King, J.; Gough, N.M. Structural organization of the genes for murine and human leukemia inhibitory factor (LIF): evolutionary conservation of coding and non-coding regions. *J. Biol. Chem.* May 1990, vol. 265, no. 15, s. 8833-8841.

Staines, W.A.; Craig, J.; Reuhl, K.; McBurney, M.W. Retinoic acid treated P19 embryonal carcinoma cells differentiate into oligodendrocytes capable of myelination. *Neuroscience*. Apr. 1996, vol. 71, no. 3, s. 845-853.

Steck, T.; Giess, R.; Suetterlin, M.W.; Bolland, M.; Wiest, S.; Poehls, U.G.; Dietl, J. Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of implantation after IVF and embryo transfer. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* Jan 2004, vol. 112, no. 1, s. 69-73.

Steen, A.M.; Luthman, H.; Hellgren, D.; Lambert, B. Levels of hypoxanthine phosphoribosyltransferase RNA in human cells. *Exp. Cell Res.* Feb. 1990, vol. 186, no. 2, s. 236-244.

Stewart, C.L. The role of leukemia inhibitory factor (LIF) and other cytokines in regulating implantation in mammals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Sep. 1994, vol. 734, no. 30, s. 157-165.

Stewart, C.L.; Kaspar, P.; Brunet, L.J.; Bhatt, H.; Gadi, I.; Köntgen, F.; Abbondanzo, S.J. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*. Sep. 1992, vol. 6390, no. 359, s. 76-79.

Studer, L.; Tabar, V.; McKay, R.D. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat. Neurosci.* Aug. 1998, vol. 1, no. 4, s. 290-295.

Syková, E.; Homola, A.; Mazanec, R. aj. Autologous Bone Marrow Transplantation in Patients With Subacute and Chronic Spinal Cord Injury. *Cell Transplant.* 2006, vol. 15, no. 8-9, s. 675-687.

Takahashi, J. Stem cell therapy for Parkinson's disease. *Expert. Rev. Neurother.* Jun. 2007, vol. 7, no. 6, s. 667-675.

Takeda, K.; Noguchi, K.; Shi, W.; Tanaka, T.; Matsumoto, M.; Yoshida, N.; Kishimoto, T.; Akira, S. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Apr. 1997, vol. 94, no. 8, s. 3801-3804.

Tapia, A.; Salamonsen, L.A.; Manuelpillai, U.; Dimitriadis, E. Leukemia inhibitory factor promotes human first trimester extravillous trophoblast adhesion to extracellular matrix and secretion of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2. *Hum. Reprod.* Aug. 2008, vol. 23, no. 8, s. 1724-1732.

Taube, J.H.; Allton, K.; Duncan, S.A.; Shen, L.L.; Barton, M.C. FOXA-1 functions as a pioneer transcription factor at transposable elements to activate AFP during differentiation of embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* May 2010, vol. 285, no. 21, s. 16135-16144.

Tesar, P.J.; Chenoweth, J.G.; Brook, F.A.; Davies, T.J.; Evans, E.P.; Mack, D.L.; Gardner, R.L.; McKay, R.D. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*. Jul. 2007, vol. 7150, no. 448, s. 196-199.

Thompson, S.W.N.; Priestley, J.V.; Southall, A. gp130 cytokines, LIF and IL-6, induce neuropeptide expression in intact adult rat sensory neurons in vivo: time course, specificity and comparison with sciatic nerve axotomy. *Neuroscience*. Jun. 1998, vol. 84, no. 4, s. 1247-1255.

Thomson, J.A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S.S.; Waknitz, M.A.; Swiergiel, J.J.; Marshall, V.S.; Jones, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. Nov. 1998, vol. 5391, no. 282, s. 1145-1147.

Thomson, J.A.; Kalishman, J.; Golos, T.G.; Durning, M.; Harris, C.P.; Becker, R.A.; Hearn, J.P. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Aug. 1995, vol. 92, no. 17, s. 7844-7848.

Tomey, D.A.; Heckroth, J.A. Transplantation of normal embryonic cerebellar cell suspensions into the cerebellum of Lurcher mutant mice. *Exp. Neurol.* Jul. 1993, vol. 122, no.1, s. 165-170.

Torii, M.; Matsuzaki, F.; Osumi, N.; Kaibuchi, K.; Nakamura, S.; Casarosa, S.; Guillemot, F.; Nakafuku, M. Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system. *Development*. Feb. 1999, vol. 126, no. 3, s. 443-456.

Triarhou, L.C.; Zhang, W.; Lee, W.H.. Amelioration of the behavioral phenotype in genetically ataxic mice through bilateral intracerebellar



grafting of fetal Purkinje cells. *Cell Transplant.* Mar.-Apr. 1996, vol. 5, no. 2, s. 269-277.

Triarhou; L.C.; Wei, Z.; Wei-Hua, L. Graft-induced restoration of function in hereditary cerebellar ataxia. *Neuroreport.* Oct. 1995. vol. 6, no. 14, s. 1827-1832.

Trojanowski, J.Q.; Kleppner, S.R.; Hartley, R.S.; Miyazono, M; Fraser, N.W.; Lesaŕi, S.; Lee, V.M. Transfectable and transplantable postmitotic human neurons: a potential "platform" for gene therapy of nervous system diseases. *Exp. Neurol.* Mar. 1997, vol. 144, no. 1, s. 92-97.

Tropepe, V.; Hitoshi, S.; Sirard, C.; Mak, T.W.; Rossant, J.; van der Kooy, D. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron.* Apr. 2001, vol. 30, no. 1, s. 65-78.

Tsai, H.D.; Chang, C.C.; Hsieh, Y.Y. aj. Leukemia inhibitory factor expression in different endometrial locations between fertile and infertile women throughout different menstrual phases. *Assist. Reprod. Genet.* Sep. 2000, vol. 17, no. 8, s. 415-418.

Ulčová-Gallová, Z.; Novotný, Z.; Bouše, V. aj. Sledování některých faktorů imunity v séru a v peritoneální tekutině u laparoskopovaných žen. II. Protilátky proti spermiím a zona pellucida. *Čes. Gynek.* 1996, roč. 61, č. 3, s. 139-141.

Vaillant, C.; Monard, D. SHH pathway and cerebellar development. *Cerebellum.* Sep. 2009, vol. 8, no.3, s. 291-30.

Vaynman, S.; Ying, Z.; Gomez-Pinilla, F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur. J. Neurosci.* Nov. 2004b, vol. 20, no. 10, s. 2580-2590.

Vaynman, S.; Ying, Z.; Gomez-Pinilla, F. Interplay between BDNF and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. *Neuroscience.* 2003a, vol. 122, no. 3, s. 647-657.

Vaynman, S.; Ying, Z.; Wu, A.; Gomez-Pinilla, F. Coupling energy metabolism with a mechanism to support brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity. *Neuroscience.* 2006, vol. 139, no. 4, s. 1221-1234.

Vogiagis, D.; Marsh, M.M.; Fry, R.C.; Salamonsen, L.A. Leukaemia inhibitory factor in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J. Endocrinol.* Jan. 1996, vol. 148, no. 1, s. 95-102.

Vosper, J.M.; Fiore-Heriche, C.S.; Horan, I. aj. Regulation of neurogenin stability by ubiquitin-mediated proteolysis. *Biochem. J.* Oct. 2007, vol. 407, no. 2, s. 277-284.

Ware, C.B.; Horowitz, M.C.; Renshaw, B.R. aj. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development.* May 1995, vol. 121, no. 5, s.1283-1299.

Weiss, M.J.; Orkin, S.H. In vitro differentiation of murine embryonic stem cells. *J. Clin. Invest.* Feb. 1996, vol. 97, no. 3, s. 591-595.

Whetton, A.D.; Spooncer, E. Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haemopoietic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* Dec. 1998, vol. 10, no. 6, s. 721-726.

Wiles, M.V. Embryonic stem cell differentiation in vitro. *Methods Enzymol.* 1993, vol. 225, s. 900-918.

Williams, R.L.; Hilton, D.J.; Pease, S.; Willson, T.A.; Stewart, C.L.; Gearing, D.P.; Wagner, E.F.; Metcalf, D.; Nicola, N.,A.; Gough, N.M. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature.* Dec. 1988, vol. 6200, no. 336, s. 684-687.

Willing, A.E.; Sudberry, J.J.; Othberg, A.I.; Saporta, S.; Poulos, S.G.; Cameron, D.F.; Freeman, T.B.; Sanberg, P.R. Sertoli cells decrease microglial response and increase engraftment of human hNT neurons in the hemiparkinsonian rat striatum. *Brain Res. Bull.* Mar. 1999, vol. 48, no. 4, s. 441-444.

Willing, A.E.; Zigova, T.; Milliken, M.; Poulos, S.; Saporta, S.; McGrogan, M.; Smahle, G.; Sanberg, P.R. Lithium exposure enhances survival of NT2N cells (hNT neurons) in the hemiparkinsonian rat. *Eur. J. Neurosci.* Dec. 2002, vol. 16, no. 12, s. 2271-2278.

Willson, T.A.; Metcalf, D.; Gough, N.M. Cross-species comparison of the sequence of the leukaemia inhibitory factor gene - and its protein. *Eur. J. Biochem.* Feb. 1992, vol. 204, no. 1, s. 21-30.

Wojcik, B.E.; Nothias, F.; Lazar, M.; Jouin, H.; Nicolas, J.; Peschanski, M. Catecholaminergic neurons result from the intracerebral implantation of embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Feb. 1993, vol. 90, no. 4, s.1305-1309.

Xie, D.; Chen, C.C.; Ptaszek, L.M.; Xiao, S.; Cao, X. aj. Rewirable gene regulatory networks in the preimplantation embryonic

development of three mammalian species. *Genome Res.* Jun. 2010, vol. 20, no. 6, s. 804-815.

Yang, Y.; Zhang, L.; Wei, Y.; Wang, H.; Fukuma, M.; Xu, H.; Xiong, W.; Zheng, J. Neural differentiation arrest in embryonal carcinoma cells with forced expression of EWS-FLI1. *J. Neurooncol.* Nov. 2008, vol. 90, no. 2, s. 141-150.

Ying, Q.L.; Nichols, J.; Chambers, I.; Smith, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell.* Oct. 2003, vol. 115, no. 3, s. 281-292.

Zawadzka, M.; Lukasiuk, K.; Machaj, E.K., Pojda, Z.; Kamińska, B. Lack of migration and neurological benefits after infusion of umbilical cord blood cells in ischemic brain injury. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).* 2009, vol. 69, no. 1, s. 46-51.

Zetterstrom, R.H.; Simon, A.; Giacobini, M.M.J.; Eriksson, U.; Olson, L. Localization of cellular retinoid-binding proteins suggest specific roles for retinoids in the adult central nervous system. *Neuroscience.* Oct. 1994, vol. 62, no. 3, s. 899-918.

Zhang, C.; Saatman, K.E.; Royo, N.C.; Soltesz, K.M.; Millard, M.; Schouten, J.W.; Motta, M.; Hoover, R.C.; McMillan, A.; Watson, D.J.; Lee, V.M.; Trojanowski, J.Q.; McIntosh, T.K. Delayed transplantation of human neurons following brain injury in rats: a long-term graft survival and behavior study. *J. Neurotrauma.* Dec. 2005, vol. 22, no. 12, s. 1274-1456.

Zhang, W.; Lee, W.H.; Triarhou, L.C. Grafted cerebellar cells in a mouse model of hereditary ataxia express IGF-I system genes and partially restore behavioral function. *Nat. Med.* Jan. 1996, vol. 2, no. 1, s. 65-71.

Zhao, R.; Fahs, S.A.; Weiler, H.; Duncan, S.A. An efficient method to successively introduce transgenes into a given genomic locus in the mouse. *BMC Dev. Biol.* [online]. Jun. 2001, 1:10 [cit. 2012-1-24].  
Dostupný z WWW:  
<<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-213X-1-10.pdf>>.

## 11 Přehled publikační činnosti

### 11.1 Články v časopisech

Novotný, Z.; Křížan, J.; Šíma, R.; Šíma, P.; Uher, P.; Zech, N.; Hüttelová, R.; Baborová, P.; Ulčová-Gallová, Z.; Šubrt, I.; Ulmanová, E.; **Houdek, Z.**; Rokyta, Z.; Babuška V.; Králíčková, M. Leukemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women diagnosed with unexplained infertility and endometriosis have a negative impact on the IVF outcome. A pilot study. *Folia Biol. (Praha)*. 2009, vol. 55, no. 3, s. 92-97. [IF 0.729]

Babuška, V.; Kulda, V.; **Houdek, Z.**; Pešta, M.; Cendelín, J.; Zech, H.N.; Pacherník, J.; Vožeh, F.; Uher, P.; Králíčková, M. Characterization of P19 cells during retinoic acid induced differentiation, *Prague Med. Rep.* 2010, vol. 111, no. 4, s. 288-298. [RIV]

**Houdek, Z.**; Cendelín, J.; Kulda, V.; Vožeh, F.; Babuška, V.; Hatina, J.; Hájková, L.; Králíčková, M.; Zech, N.; Pacherník, J.; Uher, P. Neurální diferenciace myších embryonálních karcinomových a embryonálních kmenových buněk pomocí kyseliny retinové – Pilotní studie. *Plzeň. Lék. Sborn.* 2010, roč. 76, s. 37-40. [RIV]

**Houdek, Z.**; Cendelín, J.; Kulda, V.; Babuška, V.; Vožeh, F.; Hatina, J.; Králíčková, M.; Zech, N.; Veselá, I.; Pacherník, J.; Uher, P. The comparison of P19-derived neuroprogenitors and naive cells survival after intracerebellar application in B6CBA mice. *Folia Biol. (Praha)*. 2011, vol. 57, no. 4, s. 162-169. [IF 0.729]

Kotasová, H.; Veselá, I.; Kučera, J.; **Houdek, Z.**; Procházková, J.; Králíčková, M.; Pacherník, J. Phosphoinositide 3-kinase inhibition enables retinoic acid-induced neurogenesis in monolayer culture of embryonic stem cells. *J. Cel. Biochem.* [online]. Feb. 2012, vol. 113, no. 2, s. 563-570 [cit. 2012-1-24]. Dostupný z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.23380/abstract;jsessionid=39C1BE807FD6BFE838C43EAEB21C9FC1.d02t04>>. [IF 3.122]

### 11.2 Postery na odborných setkáních

**Houdek, Z.**; Králíčková, M.; Šíma, R.; Šíma, P.; Křížan, J.; Váchalová, L.; Babuška, V.; Uher, P. Mutace v genu pro leukemický inhibiční faktor (LIF) v populaci neplodných žen – jejich prevalence a vliv na léčbu neplodnosti. XII. Kongres českých a slovenských imunologů, Praha, ČR, 29. 10. 2008.

Králíčková, M.; Martínek, P.; **Houdek, Z.**; Šíma, R.; Hes, O.; Rokyta, Z.; Babuška, V.; Uher, P. Mutace v genech pro interleukin

11 (IL-11) a leukemický inhibiční faktor (LIF) a přítomnost NK buněk v endometriu – jak spolupracují a ovlivňují fertilitu? XII. Kongres českých a slovenských imunologů, Praha, ČR, 29. 10. 2008.

**Houdek, Z.;** Cendelín, J.; Kulda, V.; Králíčková, M.; Vožeh, F.; Babuška, V.; Hatina, J.; Pacherník, J.; Zech, N.; Uher P. Comparison of survival and further differentiation of P19-derived neuroprogenitors and P19 naive cells in a model of neurodegeneration. Pilot results. Joint Conference of the Czech and Slovak Neuroscience Societies, Praha, ČR, 1.-4. 10. 2009.

Pitule, P.; Čedíková, M.; **Houdek, Z.;** Cendelín, J.; Kulda, V.; Králíčková, M.; Vožeh, F.; Babuška, V.; Pacherník, J.; Zech, N.; Uher, P. The comparison of the survival of P19-derived neuroprogenitors and P19 naive cells after intracerebellar application in a mice model with and without neurogeneration. 8th International Stem Cell School in Regenerative Medicine, Stockholm, Sweden, 3.- 5. 9. 2010.

Čedíková, M.; Krákorová, K.; Pitule, P.; **Houdek, Z.;** Cendelín, J.; Kulda, V.; Králíčková, M.; Vožeh, F.; Babuška, V.; Pacherník, J.; Zech, N.; Uher, P. Immunohistological characterization of grafted tissue after neurotransplantation in the mouse model of cerebellar degeneration. A pilot study. XX. Biologické dny, Plzeň, ČR, 25.- 27.10. 2011.

**Houdek, Z.;** Cendelín, J.; Králíčková, M.; Čedíková, M.; Babuška, V.; Kulda, V.; Hatina, J.; Vožeh, F. Intracerebellar transplantation of P19 carcinoma stem cells and P19-derived neuroprogenitors in Lurcher mutant and wild type mice. XX. Biologické dny, Plzeň, ČR, 25.- 27.10. 2011.

### **11.3 Prezentace na odborných setkáních**

Svatoň, M.; Řehoř, L., **Houdek, Z.;** Kulda, V.; Králíčková, M. Neurodiferenciace myších kmenových buněk. 49. Studentská vědecká konference LF UK v Plzni, Plzeň, ČR, 6. 5. 2009.

Králíčková, M.; Uher, P.; Šíma, R.; Hüttelová, R.; Baborová, P.; **Houdek, Z.;** Zech, N.H. Leukemia inhibitory factor (*LIF*) gene mutations in women diagnosed with idiopathic infertility and endometriosis have a negative impact on the IVF/ICSI outcome. European Congress of Reproductive Immunology, 16-20. 9. 2009, Greece, Marathon.

**Houdek, Z.;** Cendelín, J.; Kulda, V.; Babuška, V.; Vožeh, F.; Králíčková, M.; Hatina, J.; Uher, P.; Zech, N.; Pacherník, J. The comparison of P19-derived neuroprogenitors and undifferentiated cells survival after intracerebellar application into B6CBA mice. 45.

Mezinárodní kongres anatomie: Morphology 2009, Plzeň, ČR, 7.-9. 9. 2009.

Králíčková, M.; **Houdek, Z.**; Šíma, R.; Uher, P.; Hüttelová, R.; Baburová, P.; Křížan, J.; Šíma, P.; Zech, N. The developmental potential of embryo and the success of infertility treatment correlate with the presence of leukemia inhibitory factor (LIF) gene mutations and natural killer T (NKT) cells in follicular fluid in infertile women. 45. Mezinárodní kongres anatomie: Morphology 2009, Plzeň, ČR, 7.-9. 9. 2009.

**Houdek, Z.**; Cendelín, J.; Kulda, V.; Králíčková, M.; Vožeh, F.; Babuška, V.; Hatina, J.; Zech, N.; Pacherník, J.; Uher, P. Does the neurodegeneration in Lurcher mutant mice affect the survival and further differentiation of P19-derived neuroprogenitors? Pilot results. World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Germany, 29.-31.10. 2009.

**Houdek, Z.**; Kulda, V.; Veselá, I. Srovnání přežívání neuroprogenitorů a nediferencovaných EC buněk linie P19 po intracerebelární transplantaci myším. 50. Studentská vědecká konference LF UK v Plzni, Plzeň, ČR, 12. 5. 2010.

**Houdek, Z.**; Kulda, V.; Veselá, I. The comparison of P19-derived neuroprogenitors and naive cells survival after intracerebellar application in B6CBA mice. 7th International Medical Postgraduate Conference Hradec Kralove, Hradec Kralové, ČR, 18.- 20. 11. 2010.

Čedíková, M.; Pitule, P.; **Houdek, Z.**; Cendelín, J.; Kulda, V.; Vožeh, F.; Babuška, V.; Pacherník, J.; Uher, P.; Králíčková, M. Vliv neurodegenerace na přežívání neuroprogenitorů a nediferencovaných EC buněk linie P19 po intracerebelární transplantaci u myší. Diagnostika, léčba a prevence závažných civilizačních onemocnění, Plzeň, ČR, 25. 11. 2010.

Babuška, V.; Kulda, V.; **Houdek, Z.**; Pešta, M.; Cendelín, J.; Zech, N.; Pacherník, J.; Vožeh, F.; Uher, P.; Králíčková, M. Charakterizace EC buněk v průběhu indukované neurodiferenciace. 20. Neuroontogenetický diskusní den, Praha, ČR, 14. 12. 2010.

**Houdek, Z.**; Cendelín, J.; Kulda, V.; Králíčková, M.; Babuška, V.; Vožeh, F. Transplantace embryonálních karcinomových (EC) kmenových buněk linie P19 a z nich odvozených neuroprogenitorů do mozečku myší typu Lurcher a wild. 20. neuroontogenetický diskusní den, Praha, ČR, 14. 12. 2010.

**Houdek, Z.**; Kulda, V.; Čedíková, M. Transplantace embryonálních karcinomových kmenových buněk a odvozených neuroprogenitorů

do mozečku myši Lurcher a wild. 51. Studentská vědecká konference LF UK v Plzni, Plzeň, ČR, 19. 5. 2011.

Čedíková, M.; Babuška, V.; Cendelín, J.; **Houdek, Z.**; Pitule, P.; Vožeh, F.; Králíčková, M.; Uher, P. Výsledky neurotransplantace kmenových buněk u myši s a bez neurodegenerativního onemocnění. Experimentální výzkum v medicíně a jeho klinická aplikace, Plzeň, ČR, 3.11.2011.

Babuška, V.; Cendelín, J.; **Houdek, Z.**; Kulda, V.; Čedíková, M.; Králíčková, M.; Vožeh, F. Transplantace neuroprogenitorů u myši typu Lurcher a její vliv na motorické schopnosti. 21. neuroontogenetický diskusní den, Praha, ČR, 13. 12. 2011.

**Houdek, Z.**; Cendelín, J.; Kulda, V.; Babuška, V.; Čedíková, M.; Králíčková, M.; Vožeh, F. Porovnání vývoje dvou typů transplantátů do mozečku myši Lurcher a wild kmene B6CBA z pohledu imunohistologie. 21. neuroontogenetický diskusní den, Praha, ČR, 13. 12. 2011.

## 12 Poděkování

Tato disertační práce vznikla na Ústavu patologické fyziologie Lékařské fakulty v Plzni Univerzity Karlovy. Děkuji svému školiteli Doc. MUDr. Františku Vožehovi, CSc. a školitelce specialiste Doc. MUDr. Mileně Králíčkové, PhD. za laskavé vedení, pomoc při výběru tématu a za cenné rady při tvorbě práce. Děkuji také pracovníkům, zejména MUDr. Janu Cendelínovi, PhD. z Ústavu patologické fyziologie za pomoc při přípravě histologických preparátů a při operacích. Dále děkuji MUDr. Vlastimilovi Kuldovi, MUDr. Miroslavě Čedíkové a Ing. Václavovi Babuškovi, PhD. za pomoc při kultivaci kmenových buněk. Dále děkuji Mgr. Jiřímu Pacherníkovi, Ph.D., který mi umožnil studijní pobyt ve své laboratoři na Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně, kde jsem se pod jeho vedením seznámil s metodami kultivace a diferenciací embryonálních kmenových buněk. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat panu prof. Frans van der Werfovi, který mi umožnil studijní pobyt ve své laboratoři na Department of Neuroscience, Erasmus MC, Rotterdam, kde jsem se seznámil s metodou fluorescenční imunohistochemie.

Práce byla součástí širší problematiky řešené v rámci projektu výzkumného záměru VZ MSM 0021620816, grantů IGA MZd NR/9135-3, COST B 30/2007 OC 152 MŠMT a COST OC 10038. Studie byla dále podpořena projekty SVV 260 806/2010, SVV 262805/2011 a SVV 262806/2011.