

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

Stanovení frekvence mutací u lidských  
embryonálních kmenových buněk:  
souboj stability genomu s evolucí

Tereza Juráková

Brno 2012

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

## Obor SOČ: 06. Zdravotnictví

Stanovení frekvence mutací u lidských embryonálních  
kmenových buněk:  
souboj stability genomu s evolucí

Determination of the mutation frequency in human  
embryonic stem cells:  
fight of the genome stability with evolution

**Autor:** Tereza Juráková  
**Škola:** Gymnázium, Brno-Řečkovice  
Terezy Novákové 2  
**Konzultant:** Mgr. Vladimír Rotrekl, PhD.  
Mgr. Michal Kuňák, PhD.

Brno 2012

## **Prohlášení**

*Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně, použila jsem pouze podklady (literaturu, SW atd.) citované v práci a uvedené v přiloženém seznamu a postup při zpracování práce je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v plném znění.*

V Brně dne 20.2.2012

podpis.....

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu Mgr. Vladimíru Rotreklovi Ph.D. za odborné vedení práce, objasnění veškeré problematiky a podmětné připomínky. Dále děkuji svému školnímu konzultantovi Mgr. Michalu Kuňákovi Ph.D. za cenné rady při sestavování práce a pomoc s formální stránkou textu. Velice děkuji Mgr. Miriam Kruté za pomoc při experimentech a výpočtech a čas, který mi věnovala. Bez jejich vstřícné pomoci a aktivního přístupu by tato práce nemohla vzniknout. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Jihomoravskému kraji za finanční podporu.

## Anotace

Embryonální kmenové buňky představují díky svým unikátním vlastnostem velikou naději pro regenerativní medicínu. V současné době je jejich využití limitováno nestabilitou genomu a etickými problémy. Právě etickou stránku by mohlo vyřešit nahrazení lidských embryonálních kmenových buněk uměle vytvořenými lidskými indukovanými pluripotentními buňkami. Avšak u tohoto typu buněk existuje podezření, že jejich mutační tempo je ještě větší než u embryonálních kmenových buněk. Tato práce nově zavádí metodu, využívající změny v HPRT genu pro stanovení frekvence indukovaných a spontánních mutací na lidské indukované pluripotentní kmenové buňky. Dále pak porovnává tyto hodnoty s údaji naměřenými pro embryonální kmenové buňky. Porovnáním bylo zjištěno, že frekvence mutací u indukovaných pluripotentních kmenových buněk je více než o jeden řád vyšší než u embryonálních kmenových buněk. Z tohoto zjištění vyplývá, že proces reprogramace, případně kultivace lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk bude muset projít změnami, aby tyto buňky netrpěly nestabilitou genomu a neohrožovaly tak jejich další využití v medicíně a vědě.

**klíčová slova:** lidské embryonální kmenové buňky, indukované pluripotentní kmenové buňky, frekvence mutací, genomová stabilita

## Annotation

Embryonic stem cells are, due to their unique qualities, a great promise for regenerative medicine. Currently, their use is limited by complications connected with genome instability and ethical issues. The ethical aspect may be resolved by the replacement of the human embryonic stem cells by the artificially created induced pluripotent stem cells. However, for this type of cells there is a suspicion that their mutation rate is even greater than in the embryonic stem cells. This study newly introduces a method, which uses mutations in HPRT gene to determine a frequency of induced and spontaneous mutations to the human induced pluripotent stem cells. Furthermore it compares these values with those, measured for the embryonic stem cells. By comparison it was discovered that the mutation frequency in the human induced pluripotent stem cells is more than 10 times higher than in the embryonic stem cells. From this finding follows, that the process of reprogramming or cultivation of the human induced pluripotent stem cells will have to go through certain changes, not to suffer from genome instability and not to endanger their further use in medicine and science.

**key words:** human embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, mutation frequency, genome stability

# Obsah

<b>Obsah.....</b>	<b>6</b>
<b>Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>Seznam použitých zkratek.....</b>	<b>10</b>
<b>1. Teoretická část.....</b>	<b>11</b>
1.1 Kmenové buňky .....	11
1.2 Druhy kmenových buněk.....	11
1.2.1 Tkáňové (dospělé, somatické) kmenové buňky.....	12
1.2.2 Nádorové kmenové buňky.....	13
1.3 Indukované pluripotentní kmenové buňky .....	13
1.4 Lidské embryonální kmenové buňky.....	14
1.4.1 Využití .....	14
1.4.2 Kultivace .....	15
1.5 Mutace .....	15
1.5.1 Genové mutace.....	16
1.5.2 Chromozomální mutace .....	18
1.5.3 Genomové mutace .....	19
1.6 Frekvence mutací.....	19
1.6.1 Sekvenování DNA .....	20
1.6.2 HPRT assay.....	21
1.7 Frekvence mutací u kmenových buněk .....	24
<b>2. Cíle práce .....</b>	<b>26</b>
<b>3. Praktická část.....</b>	<b>27</b>
3.1 Kultivace lidských embryonálních KB.....	27
3.1.1 Média.....	28

3.1.2 Kultivační podklady.....	29
3.1.3 Pasážování .....	31
3.2 HPRT assay.....	32
3.2.1 Příprava KB pro experiment .....	32
3.2.2 Indukce mutací ionizačním zářením .....	34
3.2.3 Fotografování kolonií a vyhodnocování výsledků .....	35
3.3 Výsledky.....	36
<b>4. Diskuse .....</b>	<b>46</b>
<b>5. Závěr .....</b>	<b>48</b>
<b>Literatura .....</b>	<b>49</b>



## Úvod

Kmenové buňky představují slibnou budoucnost pro regenerativní medicínu a naději pro pacienty s nemocemi, na jejichž léčbu doposud neznala medicína odpověď. Jedná se o jedinečnou populaci nediferencovaných buněk, které se od buněk specializovaných tkání liší zejména dvěma vlastnostmi. Právě jimi jsou také velice zajímavé pro medicínu. První z těchto vlastností je schopnost přeměnit se v jeden z mnoha definitivních buněčných typů – schopnost diferenciací. Druhou vlastností, kterou se tyto buňky odlišují, je schopnost sebeobnovy – tzv. proliferace. Buňka je schopna se nekonečně dělit a produktem tohoto dělení je buňka dceřiná, která je totožná s buňkou původní (mateřskou).

Podle výskytu v těle a podle vlastností rozdělujeme kmenové buňky do několika skupin. Dvě základní skupiny jsou somatické a embryonální kmenové buňky. Somatické kmenové buňky jsou tkáňově specifické buňky a jsou přítomny v organismu po celou dobu jeho života. Mají zcela vyvinutou schopnost proliferace, ale schopnost diferencovat se je značně omezená. Nečinně přečkávají ve tkáních, dokud nejsou potřebné k náhradě zničených nebo opotřebovaných buněk – slouží k udržování stálého počtu buněk organismu. Embryonální kmenové buňky se nacházejí pouze v embryu a jsou základem pro vývoj všech buněk v těle. Pro svoje jedinečné vlastnosti vzbudily zejména v poslední době zájem vědců po celém světě.

Oblast výzkumu kmenových buněk zaznamenala za několik posledních desetiletí obrovský krok dopředu a to především v oblasti výzkumu buněk embryonálních. Přesto zbývá ujít ještě velmi dlouhou cestu, než budou tyto buňky zařazeny do běžných léčebných postupů. Jedním z problémů spojených s využitím embryonálních kmenových buněk v medicíně je, že při jejich dlouhodobé kultivaci *in vitro* dochází k mutacím DNA a tím i ke zhoršení jejich kvality a nepoužitelnosti k léčebným účelům. Takto zmutované embryonální kmenové buňky by nemusely mít požadované zdravotní účinky a dokonce by mohly ohrozit zdraví pacienta. Další překážku, stojící v cestě běžnému používání embryonálních buněk v medicíně, představují etické problémy.

Jednou z možností jak vyřešit výše uvedené problémy spojené s kultivací embryonálních kmenových buněk, by bylo najít takové buňky, které by měly schopnost proliferace a diferenciaci, ale zároveň by medicínu zbavovaly problémů jako jsou mutace a etické otázky spojené s použitím embryonálních kmenových buněk. A právě tímto typem by mohly být uměle vytvořené indukované pluripotentní kmenové buňky. Tyto buňky vznikají reprogramováním z již diferencovaných tkáňových buněk. Aby ovšem mohlo dojít k nahrazení embryonálních kmenových buněk buňkami indukovanými, je zapotřebí provést řadu výzkumů, které by ověřily, zda je použití indukovaných pluripotentních buněk v medicíně vhodné.

Práce se věnuje problematice týkající se frekvencí mutací genetického materiálu kmenových buněk a porovnává tyto mutace u embryonálních a indukovaných pluripotentních kmenových buněk. Cílem práce je vyhodnotit, zdali jsou indukované pluripotentní kmenové buňky vhodné pro použití v medicíně jako náhrada embryonálních kmenových buněk. Dále práce porovnává počty mutací vzniklých spontánně a mutací, které vznikly indukci po ozáření.

## Seznam použitých zkratek

CM – kondiciované médium

DNA – deoxyribonukleová kyselina

Gy – Grey

hES médium – médium pro kultivaci lidských embryonálních kmenových buněk

HPRT – hypoxantin-guanin phosphorybosil transferáza

IR – ionizující záření

KB – kmenová buňka

PBS – fosfátový pufr s NaCl

PCR – polymerázová řetězová reakce

PM6 – Petriho miska pro tkáňovou kulturu s poloměrem 6 cm

6-TG – 6-thioguanin

# 1. Teoretická část

## 1.1 Kmenové buňky

Kmenové buňky (KB) jsou příslibem do budoucnosti právě díky svým jedinečným vlastnostem, které nemá žádný jiný typ buněk v těle. Kombinace dvou jejich nejdůležitějších schopností – schopnosti nekonečně produkovat sama sebe a diferencovat se do jakéhokoliv buněčného typu, dělá z těchto nediferencovaných buněk zajímavý a velmi slibný předmět výzkumu. Právě podle schopnosti diferenciaci rozlišujeme několik typů KB:

- *Totipotentní* kmenové buňky jsou buňky s nejširším diferenciačním potenciálem a jsou schopny se proměnit do jakéhokoliv buněčného typu v organismu. Řadíme sem zygotu – buňku, která vznikla splynutím vajíčka a spermie a dává vzniknout všem buňkám celého organismu. Tato buňka není schopna sebeobnovy. Také prvním dělením zygoty vznikají buňky totipotentní.
- *Pluripotentní* kmenové buňky jsou jejich přímými potomky a jsou schopny se diferencovat do široké škály buněčných typů kromě buněk totipotentních. Patří sem také embryonální KB.
- *Multipotentní* jsou takové buňky, které jsou schopny se diferencovat pouze do určitých buněčných typů. Jejich potomstvo je vždy stejného fenotypu. Mezi multipotentní patří například dospělé KB.
- *Unipotentní* buňky (prekurzory) již mají schopnost proměnit se pouze do jednoho určitého druhu. Mají schopnost proliferace, proto se ještě řadí ke KB. <sup>(1)</sup>

## 1.2 Druhy kmenových buněk

Nejjednodušší a nejčastější způsob dělení KB je podle jejich původu v těle. Rozlišujeme tkáňové (angl. adult = dospělé) a embryonální a dále nádorové a indukované KB. Nyní bych se každému z těchto typů věnovala trochu

podrobněji. Embryonálním kmenovým buňkám a indukovaným pluripotentním KB věnuji celou kapitolu, neboť jejich význam pro moji práci i pro medicínu je největší.

### **1.2.1 Tkáňové (dospělé, somatické) kmenové buňky**

Tkáňové KB se vyznačují multipotencí – jedná se o zadané buňky, schopné přeměnit se pouze do některých buněčných typů. Vyskytují se ve všech tkáních dospělých organismů a mají za úkol udržovat homeostázu této tkáně. V případě, že dojde k poškození buněk, nebo jsou-li některé buňky staré a ztrácí svoji funkčnost, zasáhnou somatické KB a vytvoří nové tím, že se diferencují do buněčného typu tkáně, ve které se nacházejí.

Somatické KB jsou velice zajímavé pro medicínu. V tkáních se nacházejí v různém množství a podobě. Nejzajímavější a nejvyužívanější jsou dospělé KB, získané z kostní dřeně pacientů. Zralá kostní dřeň obsahuje dva typy buněk. Prvním z nich jsou hematopoetické KB, které jsou schopny vytvořit různé krevní elementy. Druhý typ se nazývá mezenchymové KB a jedná se o buňky, které mají potenciál diferencovat se do širokého spektra tkání – mají vlastnosti pluripotentních buněk. <sup>(2,3)</sup>

Právě tyto buňky daly vzniknout teorii, že existuje schopnost již zadaných buněk reprogramovat se a produkovat i jiný typ buněk, než jim bylo předurčeno. K tomuto jevu dojde, když se buňka dostane do nového prostředí (niche). Zde buňka získává znaky tohoto prostředí nebo dojde k její transdiferenciaci. Tato vlastnost se nazývá plasticita KB a její existence je v dnešní době velmi diskutovaný problém. Přestože několik experimentů dokázalo existenci plasticity, řada odborníků se k této problematice staví skepticky. <sup>(2)</sup>

Pro terapeutické účely jsou kromě kostní dřeně používány somatické KB z periferní a pupečnickové krve. Mají uplatnění zejména při léčbě poruch krvetvorby.

### **1.2.2 Nádorové kmenové buňky**

Nádorové (tumorigenní) KB se za běžných podmínek v tkáních organismů nevyskytují. Mají vlastnosti kmenových buněk – schopnost proliferace a diferenciaci, ale vyznačují se velkou intenzitou dělení a schopností vytvořit nádor. Mohou vznikat různými způsoby – buď z dospělých kmenových buněk patologickou transformací do nekontrolovatelně se množících buněk nebo, když nádorové buňky získají vlastnosti KB a začnou samovolně proliferovat. Nádorové kmenové buňky způsobují závažná onemocnění, jejichž léčení je náročné a nese velké riziko, že po ukončení léčby nebyly odstraněny všechny zhoubné buňky a může dojít k opětovnému vzniku nádoru. <sup>(1)</sup>

### **1.3 Indukované pluripotentní kmenové buňky**

S použitím embryonálních KB je spojena řada problémů a nevýhod. Proto je předmětem snahy mnoha vědců vytvořit typ KB, které by si zachovávaly unikátní vlastnosti embryonálních KB, a přitom by řešili komplikace spojené s jejich použitím v medicíně. A právě těmto kritériím odpovídají indukované pluripotentní KB. Tento typ buněk se nevyskytuje v přírodě a byl vytvořen uměle člověkem, a to poprvé roku 2006 japonským týmem vědců, vedeným Takahashim a Yamanakou. <sup>(4)</sup> Indukované KB vznikají přeměnou již zadaných buněk na buňky nezadané (reprogramováním).

První studie, z roku 2006, zabývající se reprogramováním dospělých KB byla provedena na myších fibroblastech a využila transdukce 24 transkripčních faktorů, které určují identitu embryonálních KB. Následnými experimenty bylo zjištěno, že vliv na vznik uměle vytvořených KB mají pouze čtyři z nich, a to Oct3/4, Sox2, cMyc a Klf4. <sup>(4)</sup> O rok později se podařilo pomocí stejných čtyř faktorů reprogramovat lidské somatické buňky na pluripotentní KB, které byly v mnoha aspektech podobné lidským embryonálním KB. <sup>(5)</sup>

Indukované pluripotentní KB mají velký potenciál využití pro terapeutické účely díky řadě výhod. Jednou z nich je, že jsou vytvořeny přímo z tkáně pacienta, proto nedochází k rejekci při transplantacích. Navíc je možné vytvořit

indukovanou buňku z buňky s geneticky podmíněnou chorobou a zkoumat tak jevy, které není možno jinou metodou pozorovat. Další obrovskou výhodou tohoto typu KB je etická bezproblémovost jejich použití. <sup>(2,3)</sup>

## **1.4 Lidské embryonální kmenové buňky**

Organismus se skládá z velkého množství různých typů tkání, s rozdílnou funkcí, vlastností i stavbou. Jedno mají ovšem tyto tkáně a buňky, ze kterých jsou složeny, společné – původ. Každá buňka v těle pochází z embrya a z nich odvozených embryonálních kmenových buněk. Nejdříve vzniká totipotentní zygota, ze které se rýhováním vyvine morula a z ní pak blastocysta. V blastocystě dojde k oddělení trofoblastu, ze kterého vzniká placenta, od embryoblastu, ze kterého vzniká embryo. Embryoblast blastocysty se rozdělí na tři zárodečné listy – ektoderm, mezoderm a endoderm. Jejich buňky jsou pluripotentní a produkují postupně více a více zadané buňky, až vzniknou jednotlivé orgány a celý organismus. <sup>(2)</sup>

Právě kmenové buňky odvozené z raného stádia embrya (4-5 dnů starého embrya-blastocysty) mají veliký potenciál pro využití v medicíně. Jejich využití je však zatím pouze ve stádiu klinických testů.

### **1.4.1 Využití**

Embryonální KB jsou předmětem velkého zájmu vědců po celém světě, neboť mají obrovský potenciál využití a to zejména v regenerativní medicíně a buněčné terapii. Jedná se o nevyčerpatelný zdroj nových a nových buněk jakéhokoliv buněčného typu. Mohly by být použity na vývoj nových léčiv a léčebných metod a stát se tak odpovědí na otázky v oblasti léčby po úrazech, různých neurodegenerativních chorob (např. Parkinsonova choroba), léčby diabetiků atd. Než ovšem dojde k zařazení embryonálních KB do standardního používání v medicíně, musí se odstranit několik problémů spojených s jejich kultivací. Další významnou oblastí využití lidských embryonálních KB v

medicině je modelování lidských chorob pomocí zvířecích modelů, u kterých byla utlumená či jinak upravená exprese genů. KB se dále využívají k modelování ontogeneze člověka .<sup>(1,6)</sup>

### 1.4.2 Kultivace

Aby mohly být embryonální KB využívány jako léčiva pro širokou veřejnost je potřeba zajistit dostatek buněk, a to jde nejlépe jejich kultivací *in vitro*. Kultivují se buňky 5 - 7 dnů staré z časné fáze embrya z embryoblastu. Pro úspěšnou kultivaci je potřeba navodit podmínky, ve kterých se embryonální buňky nacházejí *in vivo*. Metodám kultivace KB se budu podrobněji věnovat v praktické části. S kultivací KB je ovšem spojena řada problémů. Jedním z nich je fakt, že při dlouhodobé kultivaci dochází ke ztrátě kvality kultivovaných buněk, a to často i do té míry, že je znemožněno jejich další použití. Bylo zjištěno, že u buněk z pozdních pasáží<sup>1</sup> kultivace dochází k zhoršování jejich vlastností. K nejčastějším komplikacím patří poškození DNA. K tomu může dojít buď z důvodu mutace nebo v důsledku selhání opravných mechanismů DNA.<sup>(6)</sup>

### 1.5 Mutace

Jednou z důležitých vlastností DNA je neměnnost a schopnost se replikovat do naprosto stejných kopií. Díky tomu je zajištěna stálost živočišných druhů. Na druhou stranu je pro fylogenetický vývoj živých organismů nezbytně nutné, aby genetický materiál podléhal občasným změnám (mutacím). Nebýt těchto změn, nebyla by taková různorodost živočišných druhů, organismy by se zastavily na stávajícím vývojovém stupni a neprobíhala by evoluce. Proto nelze vnímat mutace pouze jako záporný jev.<sup>(7,8)</sup>

---

<sup>1</sup> pasážování je metoda kultivace, při které se přenáší kolonie na nový podklad a zředí se hustota kultury



Mutace jsou náhodné změny v genetickém materiálu, které zůstávají v DNA až do konce života buňky a jsou tedy trvalé. Dochází ke změně významu genetické informace, ale nejsou porušena pravidla zápisu. Mezi regulací stálosti genomu, který je nezbytný pro udržení druhu a zároveň drobných změn zajišťující evoluční vývoj, je velmi tenká hranice.

Příčiny mutací mohou být velice různorodé, některé ještě ani neznáme. Stejně tak i místa jejich vzniku jsou zdánlivě náhodná. Přesto existují místa v DNA, kde je frekvence mutací mnohonásobně vyšší než jinde. Tyto oblasti se označují jako *hot spots* (horká místa).<sup>(7)</sup>

Mutace můžeme dělit z několika hledisek. Základním kritériem je důvod jejich vzniku, podle kterého se dělí na *spontánní* a *indukované*. Spontánní mutace vznikají přirozeně (bez zásahu člověka) nebo dalších faktorů. Mezi indukované řadíme takové mutace, které byly vyvolány působením vnějších faktorů – tzv. mutagenů. Může se jednat o fyzikální, chemické, biologické, či další faktory.<sup>(9)</sup>

Dalším aspektem třídění mutací je rozsah způsobených změn. Podle tohoto kritéria dělíme mutace na *genové*, *chromozomální* a *genomové*.<sup>(7)</sup>

### 1.5.1 Genové mutace

Genové (bodové) mutace mají nejmenší rozsah a působí na omezený počet nukleotidů. Jsou známy jednonukleotidové i vícenukleotidové genové mutace. U nukleotidových mutací dochází nejčastěji k substituci (záměně) jednoho nukleotidu za druhý (v jednořetězcových DNA) nebo záměně celých párů nukleotidů (dvouřetězcová DNA). Substitute může probíhat transverzí nebo tranzicí. Mezi další typy genových mutací patří delece a inverze, při nichž se mění počty nukleotidů v řetězci nukleové kyseliny.<sup>(8)</sup>

*Tranzice* je proces, při kterém se vyměňují nukleotidy s bázemi stejného typu (dojde k výměně purinového za purinový nebo pyrimidinového za pyrimidinový nukleotid). Může dojít ke čtyřem typům tranzice. Při *transverzi* dochází k výměně nukleotidů s bází různého typu (purinového za pyrimidinový

a naopak). Celkem tak existují 4 možnosti transverze. Dalšími mechanismy mutací jsou takové, při kterých se mění počet nukleotidů. *Delece* (ztráta) je proces, při kterém dojde k odstranění jednoho nebo více nukleotidů z řetězce nukleové kyseliny. *Inzerce* je naopak děj, při kterém se vloží jeden nebo více nukleotidů do sekvence DNA. (8, 10)

Poměrně často dochází u bodových mutací (zejména substitucí) ke změně v sekvenci DNA, kódující protein. Potom je praktické rozdělit mutace podle vlivu na strukturu daného proteinu:

- a. *mutace neměníci smysl* (synonymous nebo silent mutation): velmi často při substituci dvou bází v aminokyselině tvořící protein nedojde k záměně aminokyseliny a nezmění se stavba proteinu. Tato mutace, tedy nemá vliv na správnou funkci dané bílkoviny. K tomuto jevu dochází v důsledku degenerovanosti genetického kódu, tj. faktu, že jedna aminokyselina může být kódována různými kodony (triplety). U aminokyselin většinou záleží na kombinaci prvních dvou bází, a ať je třetí báze kodonu jakákoliv, nezmění to typ aminokyseliny. Proto, když dojde k substituci třetí báze tripletu, mutace až na výjimky nemění smysl proteinu.
- b. *mutace měnící smysl* (missense): u tohoto typu mutací dojde k záměně celého kodonu aminokyseliny za jiný, vzniká tedy zcela jiná aminokyselina. Jaký má tato substituce dopad na funkci proteinu, záleží na tom, jak moc se nová aminokyselina liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi od původní. Jestliže jsou si aminokyseliny podobné, hovoříme o tzv. konzervativní záměně.
- c. *nesmyslné mutace* (nonsense): jsou takové mutace, které způsobí vznik terminačních kodonů tj. tripletů, které jsou zodpovědné za ukončení syntézy proteinového řetězce. Jedná se o velmi drastické změny, obzvláště objeví-li se tato stop-mutace na začátku řetězce proteinu. Ve většině případů vzniká v důsledku nesmyslné mutace nefunkční protein.
- d. *posunové mutace* (frameshift): jsou posledním, velmi drastickým typem bodové mutace. Nastávají, když dojde k deleci nebo inzerci jednoho nebo více nukleotidu kodonu. Čtecí rámce začnou překládat téměř stejný

proteinový řetězec zcela jiným způsobem a navíc velmi často dojde k předčasnému ukončení řetězce, neboť vznikne terminační kodon. Posunová mutace nemá tak fatální následky, nastane-li na konci řetězce nebo, když dojde k deleci nebo inserci tří nukleotidů, tedy celého kodonu. (8, 9,10)

## 1.5.2 Chromozomální mutace

Chromozomální mutace (aberrace) postihují celé úseky DNA a mohou mít různý rozsah. Mají za následek strukturní změnu chromozomů. Význam a dopad mutace na chromozomální úrovni určuje zejména její umístění, a to převážně, jestli se nachází na centromere nebo telomerách. Mutace mohou probíhat i mezi chromozomy navzájem. Rozlišujeme několik typů – delece, inserce a duplikace, translokace a transpozice a v neposlední řadě inverze. (11)

Při deleci dojde stejně jako u genových mutací ke ztrátě, ale tentokrát se jedná o delší úsek řetězce DNA. Naopak k zisku sekvence řetězce DNA dochází při inserci a duplikaci. Při duplikaci vzniká totožná sekvence DNA a nově vzniklý úsek může ležet přímo vedle původního (tandemová duplikace) nebo ve zcela jiné části řetězce nukleové kyseliny. Úseky, které podlehly tandemové duplikaci, jsou velkým potenciálem pro další mutace, neboť totožné chromozomy, ležící vedle sebe mají tendenci rekombinace. Na tomto úseku tedy vzniká delece a inserce. (8)

K přesunu úseku DNA na jiné místo v řetězci dochází při *translokacích* a *transpozicích*. U translokace si dané sekvence genomu vymění polohu a při transpozici dochází k přemístění pouze jednoho úseku. (8)

Dalším typem chromozomální mutace je *inverze*, při níž dochází k vystřihnutí části řetězce nukleové kyseliny a jeho následné vložení na stejné místo naopak orientovaný.

### 1.5.3 Genomové mutace

K mutacím na úrovni celého genomu dochází mnohem častěji a většinou mívají fatální následky. Změny v genomu mohou vést i k rakovinovému bujení a vzniku nádoru. Jedná se o mechanismy, jež mají za následek změnu počtů chromozomů. Podle rozsahu změn mluvíme o *aneuploidních* (odchylka na úrovni jednotlivých chromozomů), *polyploidních* (získání celé sady chromozomů) a *haploidních* (ztráta celé sady chromozomů) mutacích. <sup>(11)</sup>

## 1.6 Frekvence mutací

Mutace DNA jsou nezbytnou součástí evoluce a do jisté míry jsou potřebné. Jejich počet by ovšem neměl přesáhnout nezbytně nutné množství. Příroda našla optimální počet těchto mutací, aby organismy neustrnuly na stávajícím vývojovém stupni a zároveň nedocházelo k nadměrným změnám genetické informace. <sup>(8)</sup>

Frekvence mutací udává počet chyb na jednom místě (tzv. lokus) vzniklých za jednu generaci. Její hodnota je velice variabilní a je závislá na mnoha faktorech. Záleží jednak na typu buňky, na pozměněném genomu, ale také na prostředí a nukleotidech, které sousedí s postiženým místem. Mutační tempo se také liší s každým typem mutace. Mnohými experimenty bylo zjištěno, že průměrná frekvence mutací je přibližně  $1 \times 10^{-6}$  na lokus na generaci <sup>(12)</sup>. To znamená, že když bychom měli jeden milion buněk, přibližně jedna z nich by nesla změnu ve své genetické informaci.

Pro moderní genetiku a medicínu je nevyhnutelně nutné porozumět mutačním procesům v živých organismech. Zjišťování četnosti mutací je nezbytný krok v procesu poznání genetiky člověka a diagnostice genetických poruch. Velký rozvoj zaznamenala tato oblast výzkumu zejména díky technologiím zjišťující frekvenci mutací. Diagnostika DNA se podle tradičního dělení rozlišuje na přímou a nepřímou. Nepřímá diagnostika je spíše otázkou minulosti a pro moji práci nemá větší význam, proto se jí nebudu podrobněji věnovat. <sup>(7)</sup>

V současné době je asi nejpoužívanější metodou při vyšetřování DNA a jejích mutací sekvenace. Tato metoda umožňuje odhalení největšího množství znaků genetické informace. Je však limitována omezeným počtem vzorků a také je technicky náročné určit frekvenci vzniku mutací. Sekvenace spíše zjistí všechny mutace nakumulované v buněčné populaci během předchozího života buňky. Není ji tedy možné použít ke zjištění aktuální frekvence mutací. K tomu slouží speciální techniky, z nichž jednou je tzv. HPRT assay, která bude hlavní náplní praktické části mé práce.

### 1.6.1 Sekvenování DNA

Sekvenace je poměrně jednoduchou a levnou metodou, která umožňuje zkoumat genetický materiál a především jeho mutace. Obzvláště důležité je, že dokáže zkoumat nejenom chyby, které mají za následek změnu genomu, ale i mutace neměnící smysl. Tuto metodu je možné použít na jakýkoliv fragment libovolného organismu. <sup>(10)</sup>

Sekvenací lze analyzovat konkrétní fragment DNA a lze určit přesné pořadí jeho bází. Díky tomu lze také odhalit mutace vzniklé na řetězci DNA. Jednotlivé úseky pro samotnou sekvenci se připravují revoluční metodou polymerázové řetězové reakce (PCR), jejíž objev způsobil veliký posun v diagnostice DNA.

Pomocí PCR je možné během krátké chvíle zmnožit potřebný fragment v prakticky neomezeném množství. Podle tohoto úseku DNA se vyrobí oligonukleotidové PCR-primery (okolo 20 nukleotidů), které jsou komplementární ke koncům sekvence, kterou potřebujeme namnožit. Vlastní reakce má celkem tři fáze – denaturační, renaturační a syntetickou, které se několikrát opakují. Celý proces začíná denaturací DNA, kdy se dvouřetězcové molekuly rozpadají na jednořetězcové. V dalším kroku dojde k renaturaci a PCR-primery se naváží na cílovou sekvenci. Tato část musí probíhat za nízké tzv. anelovací teploty. V syntetické fázi se úsek mezi primery opakovaně množí působením polymerázy. <sup>(7,10, 12)</sup>

Úseky se množí exponenciálním způsobem, tj. po dokončení jednoho cyklu se počet kopií zdvojnásobí. Každý cyklus trvá pouze několik minut, proto je možné vytvořit během chvíle mnoho kopií. Výsledný produkt se může použít na rozbor mutací. PCR je základem získávání dostatku materiálu pro samotné sekvenování.

Sekvenování – jednoduchý způsob analýzy genetického materiálu, může být prováděno několika metodami. Nejznámější a v současné době zřejmě nejpoužívanější metodu zavedl britský biochemik Frederick Sanger. Tato metoda využívá PCR, ale k syntéze používá pouze jediný primer a k množení dochází v jednom směru. <sup>(12)</sup>

Syntéza se provádí ve čtyřech zkumavkách. Ve všech jsou obsaženy stejné látky, ale v každé je navíc jeden ze čtyř fluorescenčně barvených dideoxyribonukleotidů. Ty způsobí, že se do nově vznikajícího řetězce DNA nezabuduje standardní báze, ale syntéza se v daném cyklu ukončí a díky tomu můžeme určit pozici vybrané báze. Tak vznikají po několikanásobném zopakování celého cyklu sekvence, které jsou komplementární se syntetizovaným řetězcem, ale každý je ukončen v jiném místě a získáváme tak široké spektrum různě dlouhých sekvencí. <sup>(7, 10)</sup>

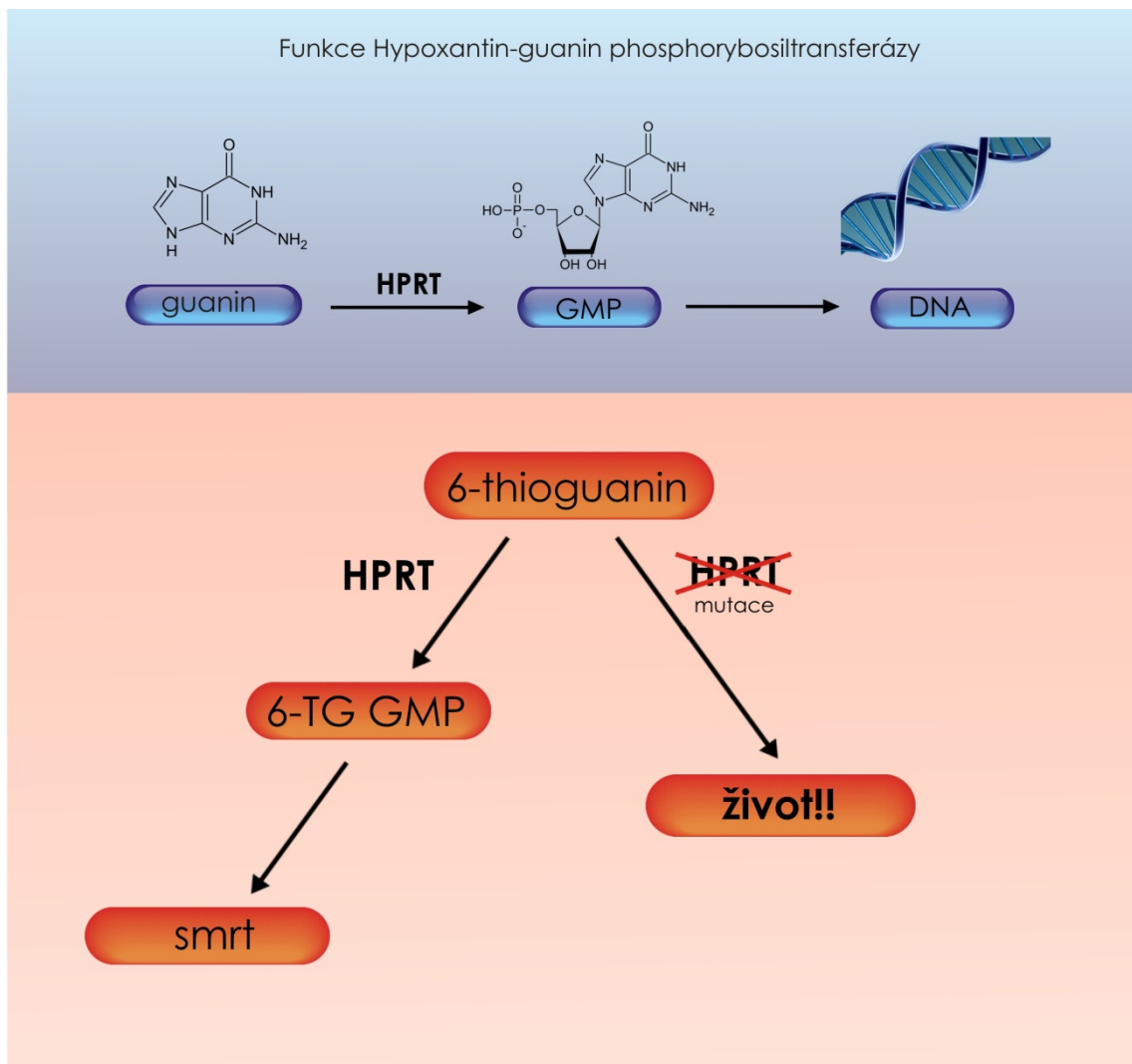
Takto získané fragmenty se dále zpracovávají pomocí elektroforézy. Směs obsahující řetězce ze všech čtyř zkumavek se rozdělí podle velikosti. Komplementární konce se seřadí do jedné linie a podle fluorescenčně zbarvených konců můžeme přečíst přesné pořadí bází v řetězci. Sekvenováním můžeme analyzovat celou řadu znaků, ale především se používá na odhalení mutací. <sup>(7)</sup>

### **1.6.2 HPRT assay**

Hypoxantin-guanin phosphorybosiltransferáza (HPRT) je klíčový enzym zodpovědný za správný chod metabolismu buňky. Je kódován HPRT1 genem a podílí se na správném fungování syntézy DNA. Hlavní úlohu hraje HPRT enzym při vzniku purinu (hypoxantinu a guaninu) a jeho zabudování do řetězce

nukleové kyseliny. <sup>(13)</sup> Při jeho špatné funkci nastává překyselení organismu a s tím spojené psychické problémy. Nedostatek genu způsobuje neurologickou chorobu známou jako Lesh-Nyhanův syndrom, kterou roku 1964 popsal M. Lesh a W. Nyhan. <sup>(14)</sup>

HPRT assay je metoda používaná na liniích buněk savců, případně na modelových savčích organismech. Jedná se o jednoduchý a účinný test, který prokazuje přítomnost mutací na koloniích buněk a především frekvenci těchto mutací. Metoda spočívá v tom, že se buňky, jejichž mutaci chceme zjišťovat, dají do média obsahujícího 6-thioguanin (6-TG). Tato látka je toxická pro buňky, které nemají mutaci v HPRT1 genu, neboť způsobuje, že se z 6-TG syntetizuje 6thio-GMP, a proto všechny zdravé buňky zahynou (obr. 1). Spočítáním kolonií, které přežily, zjistíme frekvenci mutací. Jelikož se v každé zdravé buňce prokariotického organismu nachází právě jedna kopie HPRT1 genu, víme s naprostou přesností, že všechny přeživší buňky mají mutaci v tomto genu.



Obr. 1: Schéma funkce enzymu hypoxantinguaninphosphorybosyltransferázy a efektu 6-thioguaninu na růst buněk.

Při počítání kolonií, které byly odolné vůči 6-TG a následnému vypočítávání frekvence mutace musíme započítat účinnost nasazení, která udává kolik z nasazených buněk se uchytlí a bude se dále rozrůstat v kolonie. Počítá se jako podíl počtu nasazených buněk a buněk a kolonií, které vzniknou po určité době kultivace bez použití selekčního agens. Účinnost nasazení se většinou udává v procentech, proto se poměr původního a konečného počtu buněk násobí stem. Aby HPRT assay byla nezkreslená, musíme vždy při provádění této metody nasadit alespoň jednu misku buněk navíc, na kterých počítáme frekvenci mutace. Do této misky se nepřidává 6-TG a počítáme z ní účinnost



nasazení, podle které pak vztahujeme počty mutací, zjištěných na dané linii buněk.

HPRT assay se dá použít u celé řady druhů buněk. Doposud byla tato metoda aplikována například na liniích čínského křečka CHO (chinese hamster overy), derivované z vaječníků křečka. Tyto buňky měly neúplnou sadu chromozomů. <sup>(15)</sup> Dále byla HPRT assay použita na bílých krvinkách myši a buněčné linie čínského křečka V79, odvozených z plicního fibroblastu. <sup>(16)</sup> Další studie se zabývá aplikací této metody na myši embryonální KB a porovnání mutací s linií V79. <sup>(17)</sup> Práce se zabývá použitím HPRT assay na lidské embryonální KB a lidské indukované pluripotentní KB. Také budu porovnávat frekvenci spontánních mutací a mutací indukovaných ionizujícím zářením.

## 1.7 Frekvence mutací u kmenových buněk

Na základě předchozích výzkumů bylo zjištěno, že u embryonálních KB, je stejně jako u některých dalších typů buněk frekvence mutace přibližně rovna jedné buňce z milionu. Mutační tempo je ovšem závislé na mnoha faktorech, a to nejen v souvislosti s indukovanými a spontánními mutacemi. Velký vliv má doba, po kterou buňky kultivujeme, neboť se zvyšujícím se počtem pasáží rapidně roste počet mutací u embryonálních KB. Tento problém výrazně omezuje možnosti použití těchto pluripotentních buněk v medicíně.

Zajímavé je také porovnání mutací u KB embryonálních a somatických. Různé studie nezávisle na sobě dokazují, že frekvence mutací je mnohonásobně vyšší u dospělých KB <sup>(18)</sup>. Při zkoumání mutací liniích myších embryonálních KB a linie odvozené z myších fibroblastů (linie V79) bylo zjištěno, že frekvence spontánních i indukovaných mutací v HPRT1 genu je u myších fibroblastových buněk z linie V79 10x vyšší než u embryonálních KB. <sup>(17)</sup>

Embryonální KB musí mít menší počet mutací ve své genetické informaci, neboť zachování genomové stability je nezbytně nutné pro správné fungování organismu, který se z těchto buněk později vyvine. Kdyby bylo větší množství

mutací již v zárodečné linii, tyto chyby by byly předávány dalším generacím a měly by za následek vznik geneticky podmíněných chorob.

Přestože je frekvence mutací dospělých KB poměrně vysoká, tak při většině nedochází v důsledku změn genetické informace k větším následkům, neboť tyto chyby nejsou dědičné. Na druhou stranu i mutace v somatických KB mohou mít fatální následky. Někdy může u somatických KB vlivem různých faktorů (např. typ a poloha mutace) dojít ke přeměně na nádorové KB a jejich nekontrolovatelným množением ke vzniku tumoru.

## 2. Cíle práce

1. Zavést metodu měření frekvence mutací za pomoci HPRT genu na lidských indukovaných pluripotentních kmenových buňkách, protože žádná studie se doposud nezabývala použitím metody HPRT assay na tomto typu buněk.
2. Změřit spontánní a indukovanou frekvenci mutací za pomoci HPRT genu v lidských embryonálních kmenových buňkách a indukovaných pluripotentních kmenových buňkách a porovnat kvalitu reprogramovaných buněk s embryonálními kmenovými buňkami a ověřit tak bezpečnost jejich použití v medicíně.

## 3. Praktická část

Předmětem experimentu bylo stanovení frekvence mutací u linie indukovaných pluripotentních kmenových buněk. Experiment navazuje na předchozí pokusy využívající HPRT assay na linii embryonálních kmenových buněk. Dále pak byla porovnána mutace lidských indukovaných pluripotentních KB a lidských embryonálních KB. Součástí mojí práce je optimalizace kultivace KB, indukovaných KB a samotná HPRT assay, stanovující spontánní i indukovanou frekvenci mutací. Indukované mutace byly vyvolány pomocí ionizujícího záření. Experiment byl proveden v Biologickém ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity.

### 3.1 Kultivace lidských embryonálních KB

Lidské embryonální KB potřebují k přežití specifické podmínky a tomu je přizpůsobena jejich kultivace. Ta probíhá v kultivační laboratoři, ve které je udržováno zcela sterilní prostředí. Pro udržení sterility je důležité při práci používat rukavice a roušku. Také je nutné se přezout a obléci si plášť, který byl před tím ozářen UV světlem. U vchodu do laboratoře je umístěná lepicí páska, odstraňující nečistoty z bot.

Laboratoř je vybavena speciálními přístroji potřebnými pro kultivaci. Mezi základní zařízení v laboratoři patří sterilní box, ve kterém je zajištěna stálá ventilace směrem z vrchu dolů, zaručující odstraňování nečistot. Jedná se o tzv. flow box nebo laminární box. Sterilní prostředí uvnitř boxu je zajištěno jednak ionizujícím zářením, jednak filtrací proudícího vzduchu přes speciální HEPA filtry. V laboratoři se dále nachází termostat plnicí funkci inkubátoru. Zde se uchovávají a pěstují buňky, proto je nutné v něm navodit podmínky, ve kterých buňky přežijí. Je zde konstantní teplota 37 °C, vlhkost a definovaná koncentrace CO<sub>2</sub>, která snižuje parciální tlak kyslíku.

Embryonální KB se uchovávají v podmínkách podobným jejich přirozenému prostředí. Aby se buňky mohly dobře dělit a růst, musí být ve speciálním

kultivačním prostředí. Kultivační prostředí se skládá ze dvou základních složek – kultivačního média a podkladu.

### 3.1.1 Média

Jedním ze základních předpokladů pro úspěšnou kultivaci KB je pravidelná výměna vhodného kultivačního média. Jedná se o roztok, který zajišťuje výživu buněk. Složení kultivačního média se liší podle způsobu použití a také každá laboratoř dává přednost jinému složení média. Některé složky jsou ovšem vždy stejné (tab. 1). Patří mezi ně KO-DMEM (KnockOut- Dulbecco's modified Eagle's medium), L-glutamin, neesenciální aminokyseliny, merkaptoethanol a antibiotika.

složka média	objem
	(v 500 ml)
DMEM F12	407 ml
Knockout SR	75 ml
L-Glutamine	5 ml
Neesenciální aminokyseliny	5 m
P/S	2,5 ml
2-ME	5 ml
hFGF	500 µl

Tab. 1: Složení hES média

Další důležitou složkou kultivačního média je směs bílkovin. Ta se může vyskytovat v podobě séra, které podporuje adhezi a růst kultivovaných buněk. Alternativní možností je náhražka tohoto séra. Při kultivaci na bezbuněčných

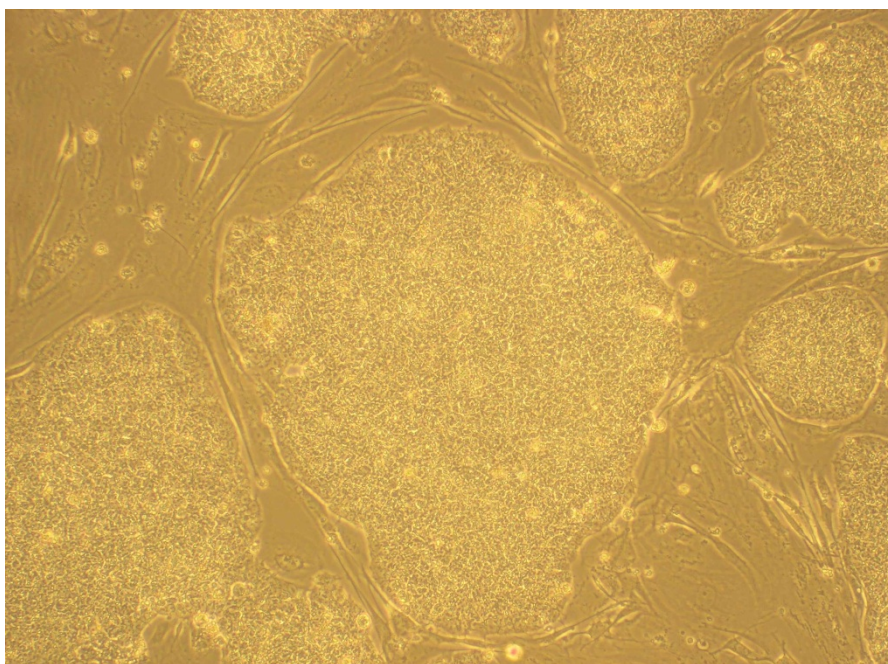
podkladech se používá kondiciované médium (CM), které se vyrábí inkubací standardního média s myšími embryonálními fibroblasty po dobu jednoho dne. Následně je médium filtrováno a obohaceno o specifický růstový faktor FGF2 a L-glutamin.

### **3.1.2 Kultivační podklady**

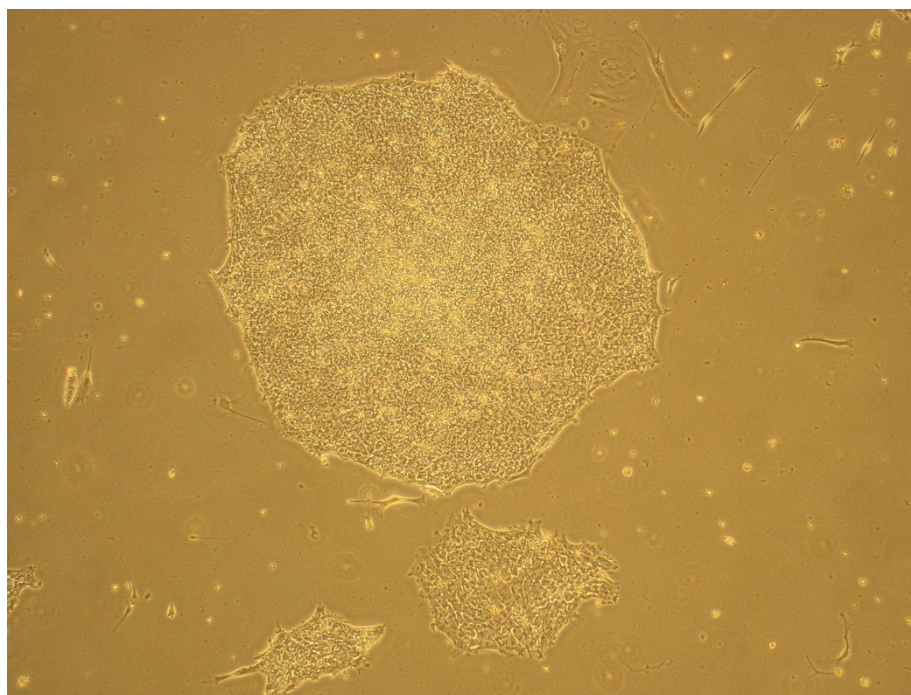
Aby mohly buňky přežít v laboratorních podmínkách, musí být kultivovány na vhodném kultivačním podkladu. Používají se dva druhy podkladových vrstev, které zajišťují přilnutí buněk k misce a uvolňují růstové faktory. Jedná se buď o podpůrnou vrstvu buněk (obr. 2) nebo bezbuněčné matrice (obr. 3).

Podpůrné buněčné vrstvy bývají většinou myší, ale mohou být i lidské. Jednou možností je použít mitoticky inaktivované myší fibroblasty, které se nemohou dělit a slouží pouze k výživě buněk na nich kultivovaných. Fibroblasty jsou vhodné pro propagaci menšího množství buněk.

Dalším hojně využívaným podkladem je Matrigel. Jedná se o extracelulární hmotu z myších sarkomů, obohacenou o proteiny. Matrigel je vhodný pro produkci velkého množství buněk. Není však vhodný pro dlouhodobou kultivaci. Byl použit jako podklad pro kultivaci KB využitých pro tuto práci.



*Obr. 2: Kolonie lidských kmenových embryonálních buněk na podpůrné vrstvě mitoticky inaktivovaných myších fibroblastech*



*Obr. 3: Kolonie lidských embryonálních kmenových buněk na bezbuněčné matrici (Matrigelu)*

### 3.1.3 Pasážování

Kromě každodenní výměny média je nutné jednou za 4-8 dní<sup>2</sup> buňky přesadit na nový podklad. V opačném případě by se buňky příliš rozrostly a začaly by se diferencovat. Pasážování se provádí, když je porostlých přibližně 70 % povrchu misky (v případě Matrigelu), případně pokud kolonie dosáhnou své limitní velikosti, která je závislá na konkrétní linii (v případě kultivace na vrstvě podpůrných buněk).

Pasážování buněk může probíhat dvěma způsoby – rozlišujeme enzymatické a mechanické pasážování. Pro embryonální kmenové buňky používá laboratoř, ve které jsem prováděla svůj experiment, pasáž za pomoci enzymu kolagenázy, pokud získáje třeba získat větší shluky buněk a pasáž za pomoci trypsinu (přípravek TrypLE), při které vznikají jednotlivé buňky (single cells). Pasáž přípravkem TrypLE má následující postup.

- Nejprve se musí zkontrolovat populaci, kterou chceme přesazovat. Spolu se starým médiem se odsají morfologicky špatné kolonie, které byly předtím odstraněny pomocí Pasteurovy pipety upravené nad plamenem.
- Buňky se propláchnou PBS. Na PM6 se napipetuje 2 ml Trypsinu (TrypLE™ Express 12605-010). Trypsin rozruší vazby mezi buňkami a vrstvou na které jsou kultivovány. Misky se vloží do inkubátoru, kde je nastavena teplota na 37 °C a látka se nechá 2 minuty působit.
- Petriho miska s koloniemi buněk se přenesse pod lupu a kolonie, které se začínají na okrajích odlupovat, se odfoukají pipetou. Následně se směs přenesse do zkumavky s 12 ml hES média.
- Centrifuguje se na 1000 otáček pět minut při teplotě 4°C. Směs se rozdělí na pelet, který se usadí na dně zkumavky a supernatan. Supernatan se odsaje, tak že zbude sediment, který představují jednotlivé KB.
- Pelet se rozpipetuje v 1 ml hES média a nasadí na PM6 s Matrigelem a CM médiem.

---

<sup>2</sup> tento údaj udává, jak je tomu v ideálním případě, protože doba, po které je nutné provést pasáž se liší u různých linií a podmínek



Při kolagenázové pasáži je postup téměř totožný, s tím rozdílem, že enzym kolagenáza neporuší úplně vazby mezi buňkami, ale vznikají shluky buněk, které se nasadí na nový podklad. Alternativním postupem je mechanická pasáž, která probíhá podobně, jenom se buňky z povrchu, na kterém byly kultivovány, mechanicky pipetou odpichují.

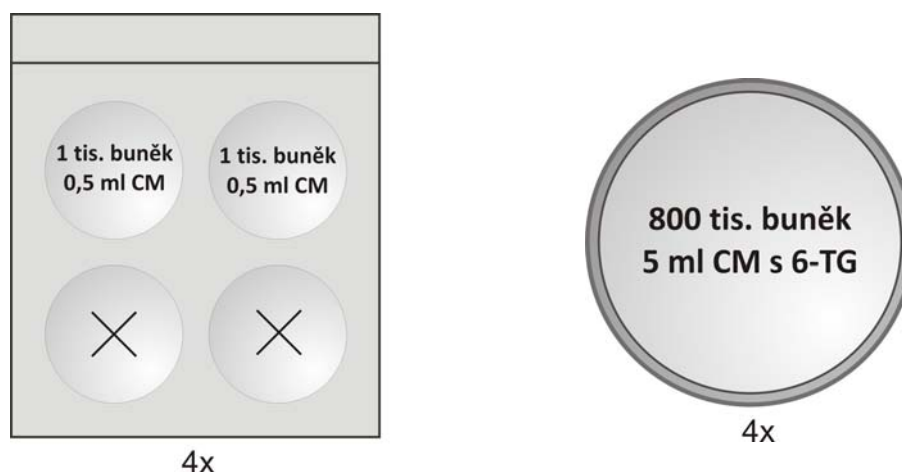
## **3.2 HPRT assay**

Náplní mojí práce bylo stanovení mutačního tempa na kultuře indukovaných pluripotentních buněk pomocí metody HPRT assay. Součástí této metody je stanovení množství buněk hematocytometrem, indukce mutací ionizujícím zářením, selekce mutantů v 6TG médiu a následné fotografování a počítání kolonií. Použity byly buňky z první pasáže na Matrigelu. Pokus jsem prováděla na linii Cl14 z pasáže 77+2 indukovaných KB a následně porovnávala s výsledky pro linii L14 embryonálních KB z pasáže 22+3.

### **3.2.1 Příprava KB pro experiment**

Nejdříve je třeba připravit si misky s Matrigelem, na které se nasadily buňky na samotný pokus. Na kompletní HPRT assay jsou potřeba tyto formáty misek (obr. 4):

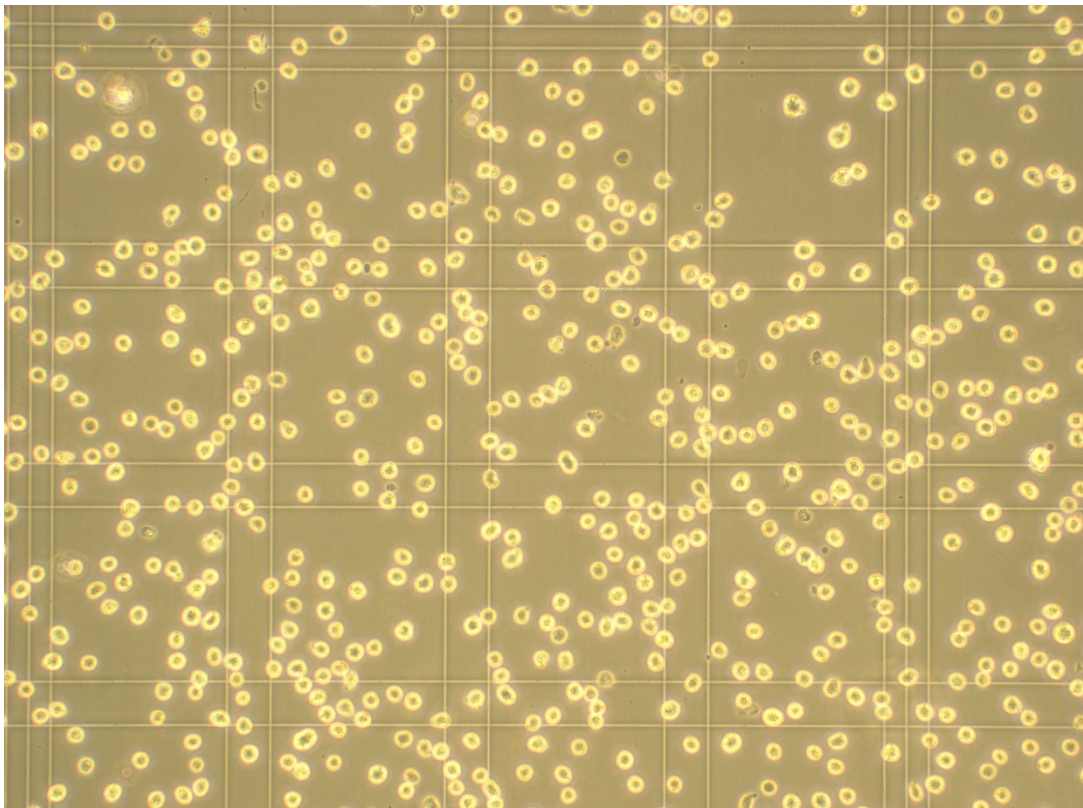
- 4 x 4jamky (o průměru 1,5cm): u každé se používají pouze 2 jamky, do všech se sadí 1 tisíc buněk, které slouží k zjištění účinnosti nasazení
- 4 x Petriho miska o průměru 6cm (PM6): v každé misce je nasazeno 800 tisíc buněk a ty pak slouží pro samotnou selekci mutantů



Obr. 4: Schéma nasazení buněk na experiment

Z misek se odsaje předem nachystaný Matrigel, který se musí nanést na misku minimálně 1 hodinu před použitím. Misky se promyjí PBS a napipetuje se médium. Do 4 jamkových misek se dává 0,5 ml CM do každé jamky. Do všech PM6 se pipetuje 5 ml CM obsahující 6-TG s koncentrací 2,5 µg/ml.

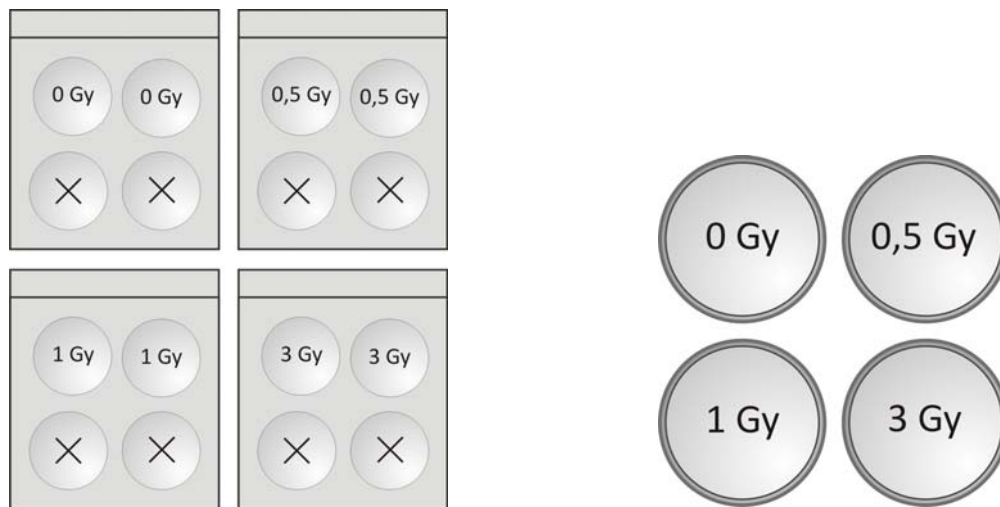
Dále se vezmou z inkubátoru buňky, které musí být dostatečně narostlé pro pasážování a výše popsaným postupem se přepasážují. Před nasazením buněk se musí spočítat, a to pomocí Bürkerovy komůrky (obr. 5). Toto jednoduché zařízení má prostor, do kterého se umístí buňky, které chceme spočítat. Prostor je rozdělen mřížkou na čtverce, jenž jsou dále rozděleny na 16 menších čtverců. Obsah větších čtverců je 1 mm<sup>2</sup>. Do Bürkerovy komůrky (hematocytometru) se napipetuje 10 µl suspence a pomocí mřížky se spočítá množství buněk v jednom čtverci a následně přepočítá množství buněk na 1 ml. Suspence se naředí na koncentraci 1 milion buněk na 1ml. Nakonec se nasadí na jednotlivé misky požadovaný počet buněk.



*Obr. 5: Počítání buněk Bürkerovou komůrkou (hematocytometrem)*

### **3.2.2 Indukce mutací ionizačním zářením**

Den po nasazení pokusu se musí buňky ozářit ionizačním zářením (IR), aby se mohla porovnat frekvence indukovaných mutací. Je potřeba vložit buňky do sterilní polystyrenové krabičky a přenést k iradiátoru. Ozařování se provádí v cesiovém ozařovači, který využívá izotopu cesia  $^{137}\text{Cs}$ , jehož dávkový příkon v pracovní komoře činí 2Gy/min. Buňky se ozařují různou dávkou IR podle následujícího schématu (obr. 6):



Obr. 6: Schéma ozáření kmenových buněk různými dávkami ionizujícího záření

Ozářené buňky se přenesou zpět do kultivační místnosti a vymění se jim médium. Médium se vyměňuje každý den, ale osmý den od ozáření se mění koncentrace 6TG z 2,5 µg/ml na 8 µg/ml.

### 3.2.3 Fotografování kolonií a vyhodnocování výsledků

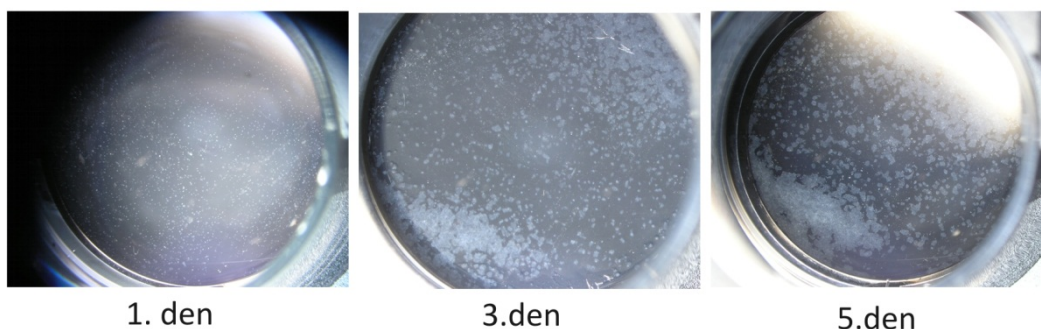
Od druhého dne po nasazení buněk se fotografuje pomocí lupy kolonie vzniklé na 4jamkových miskách. Focení se musí provést každý den přibližně 5-7 dní po nasazení. Z těchto fotek se počítá efektivita nasazení. Dále už nemají tyto buňky pro experiment žádný význam.

Buňky sloužící na samotnou selekci mutantů se nadále kultivují v CM médiu, obsahujícím 6-TG a pravidelně fotí. Přibližně tři týdny po nasazení pokusu se vyselektují zmutované kolonie a je nutné pořídit kvalitní fotky, ze kterých se spočítá počet narostlých kolonií a z nich následně za použití údaje o účinnosti nasazení vypočítá vlastní frekvence mutací dle vzorce:

Frekvence mutací = počet kolonií v 6-TG/(počet nasazených buněk\*účinnost nasazení).

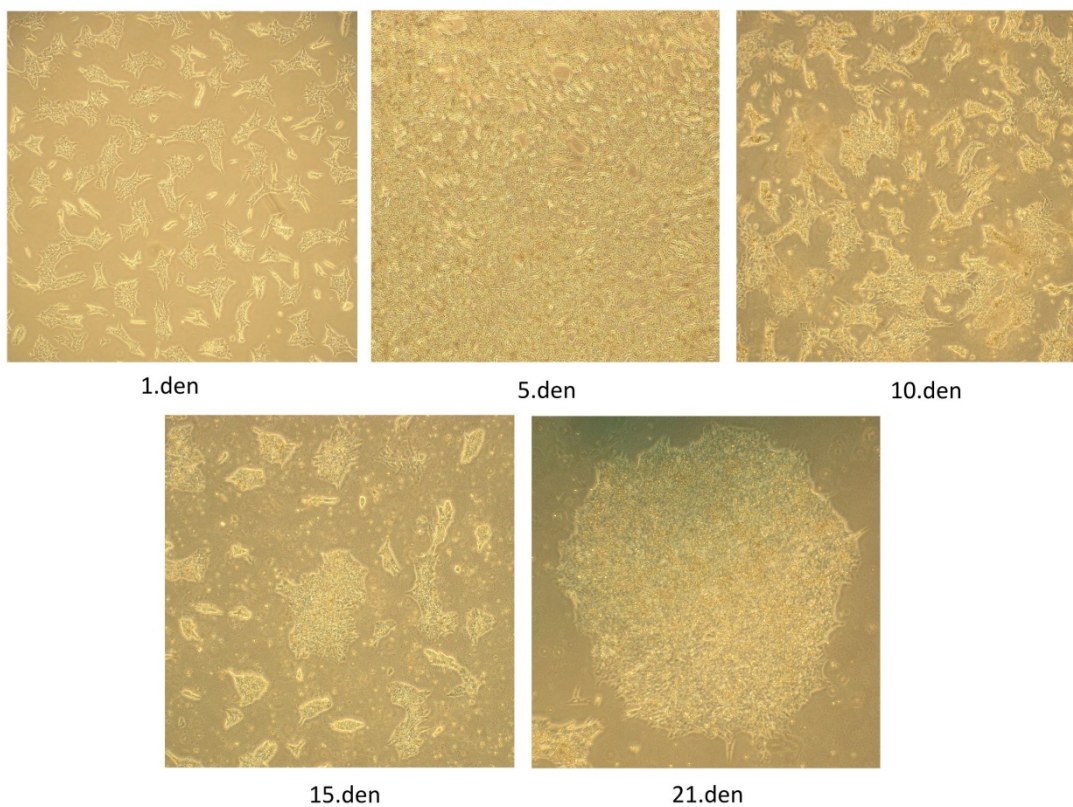
### 3.3 Výsledky

Součástí práce bylo zvládnutí standardních kultivačních postupů s kmenovými buňkami. Byly napěstovány kultury KB linie CCTL14 a indukovaných pluripotentních KB linie 4 na podpurné vrstvě mitoticky inaktivovaných myších embryonálních fibroblastů. Pro ilustraci je na následujícím obrázku znázorněn růst embryonálních KB linie CCTL14 (obr. 7).



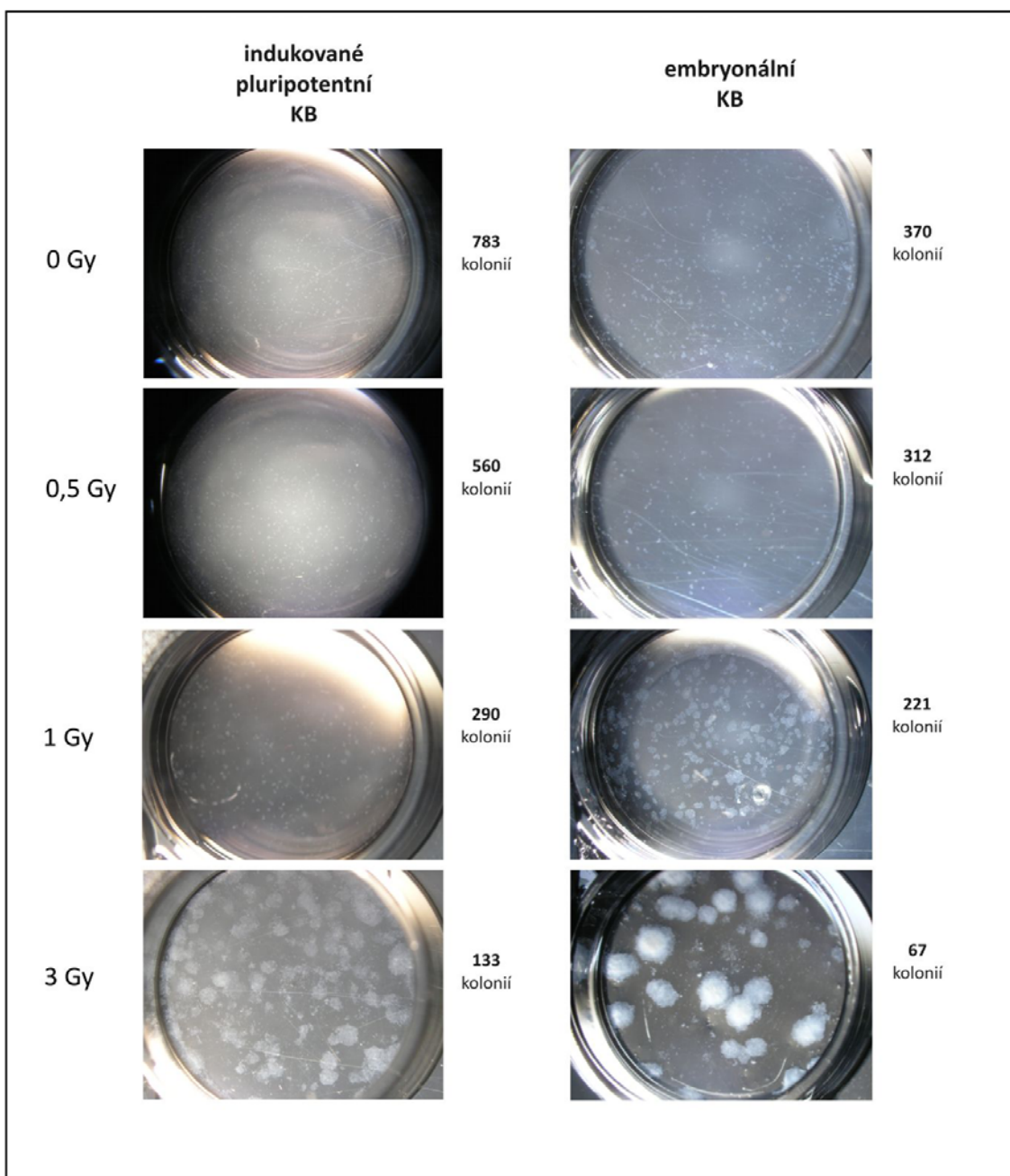
*Obr. 7: Růst embryonálních KB na Matrigelu*

Dále byla stanovena frekvence mutací u linie 4 indukovaných pluripotentních KB pomocí selekce 6-TG. Selektce mutantů v médiu s 6-TG trvá přibližně tři týdny. Po tuto dobu byly misky, na kterých byla selekce prováděna, fotografovány. Buňky se několik dnů po nasazení rozrostly do jednotné vrstvy. Většina buněk následně odumře a vyčlení se kolonie ze zmutovaných buněk. Následující Obr. zobrazuje průběh selekce 6-TG na indukovaných pluripotentních KB (obr. 8). Číslo dne pod obrázkem udává, kolikátý den po nasazení byl daný snímek pořízen.



*Obr. 8: Selekcce mutantů v CM obsahujícím 6-TG. Poslední fotografie znázorňuje jednu kolonii, vzniklou z jedné mutované buňky*

Pro správné stanovení frekvence mutací KB byla měřena účinnost nasazení použitých buněk (obr. 9). Důležité bylo stanovit tuto hodnotu jednotlivě pro každou dávku ionizujícího záření.

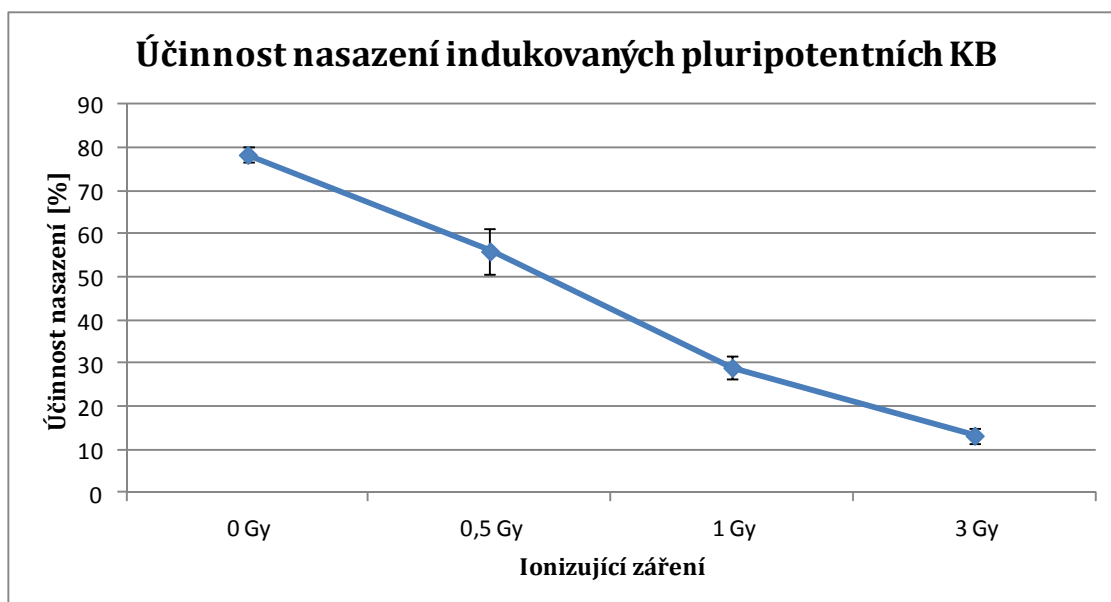


Obr. 9: Účinnost nasazení indukovaných pluripotentních KB a embryonálních KB bez použití selekčního činidla.

Pro všechny dávky ionizujícího záření byly spočítány počty kolonií. Účinnost nasazení byla následně vypočítána jako podíl počtu narostlých kolonií a počtu nasazených buněk. Naměřené údaje pro studovanou linii indukovaných pluripotentních KB jsou uvedeny v Tabulce 2 a Grafu 1, hodnoty pro linii CCTL14 embryonálních KB jsou uvedeny v Tabulce 3 a Grafu 2 a jejich porovnání v Grafu 3.

<b>Účinnost nasazení indukovaných pluripotentních KB</b>					
dávka IR	1. jamka	2. jamka	průměr	účinnost nasazení (%)	směrodatná odchylka
0 Gy	770	796	783	78	2
0,5 Gy	523	596	560	56	9
1 Gy	271	309	290	29	9
3 Gy	144	121	133	13	12

Tab. 2: Účinnost nasazení indukovaných pluripotentních KB

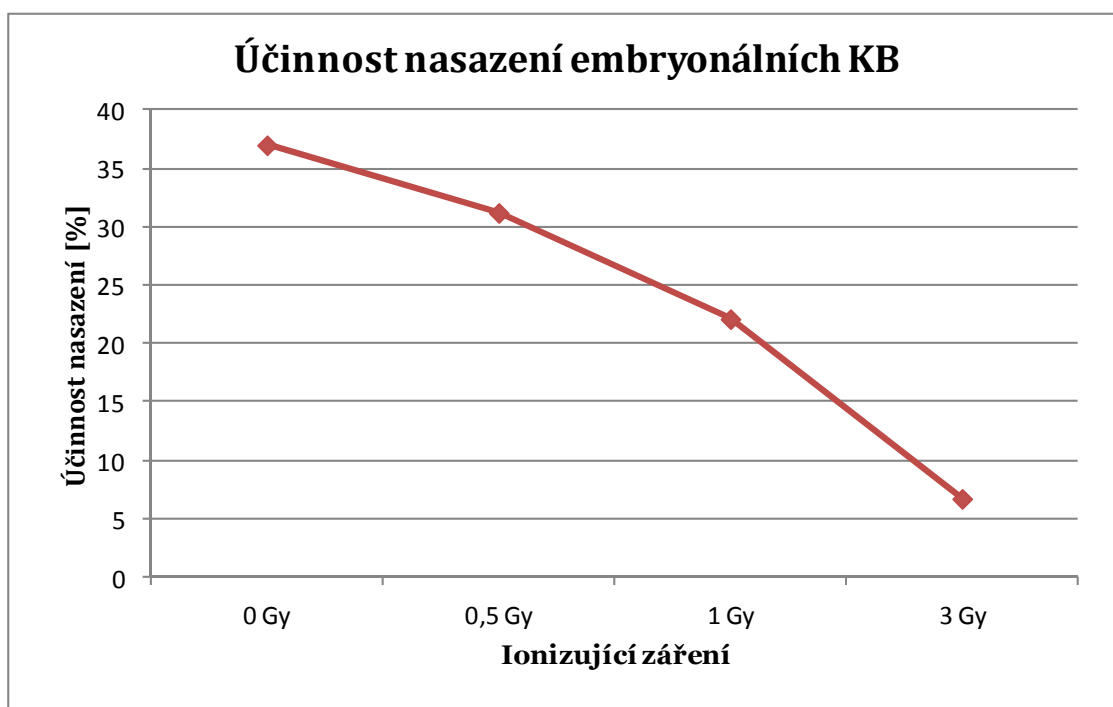


Graf 1: Účinnost nasazení indukovaných pluripotentních KB

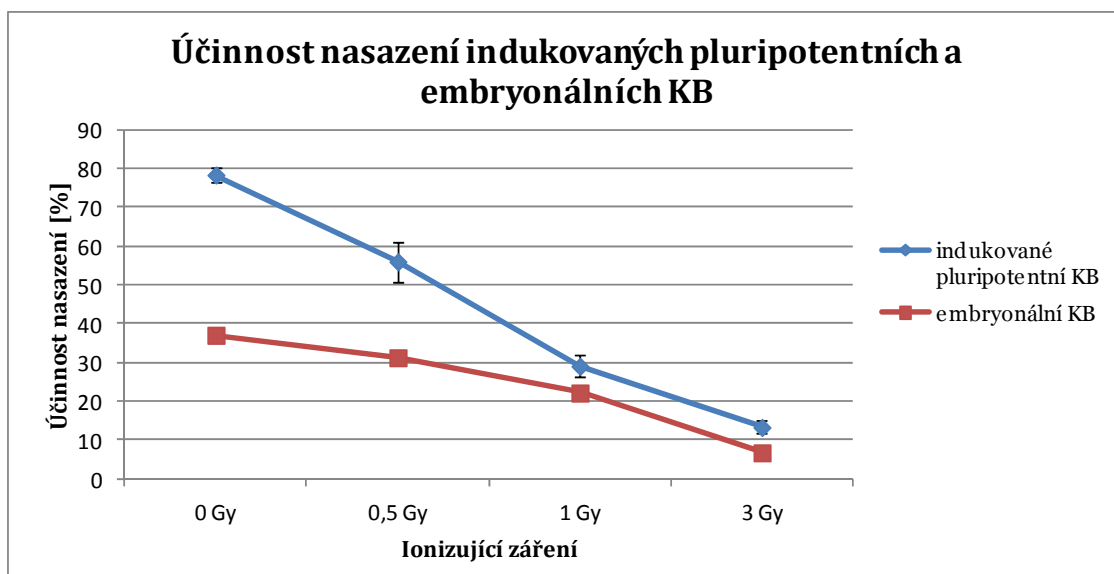


Účinnost nasazení embryonálních KB		
dávka IR	kolonie	účinnost nasazení (%)
0 Gy	370	37
0,5 Gy	312	31
1 Gy	221	22
3 Gy	67	7

Tab. 3: Účinnost nasazení embryonálních KB

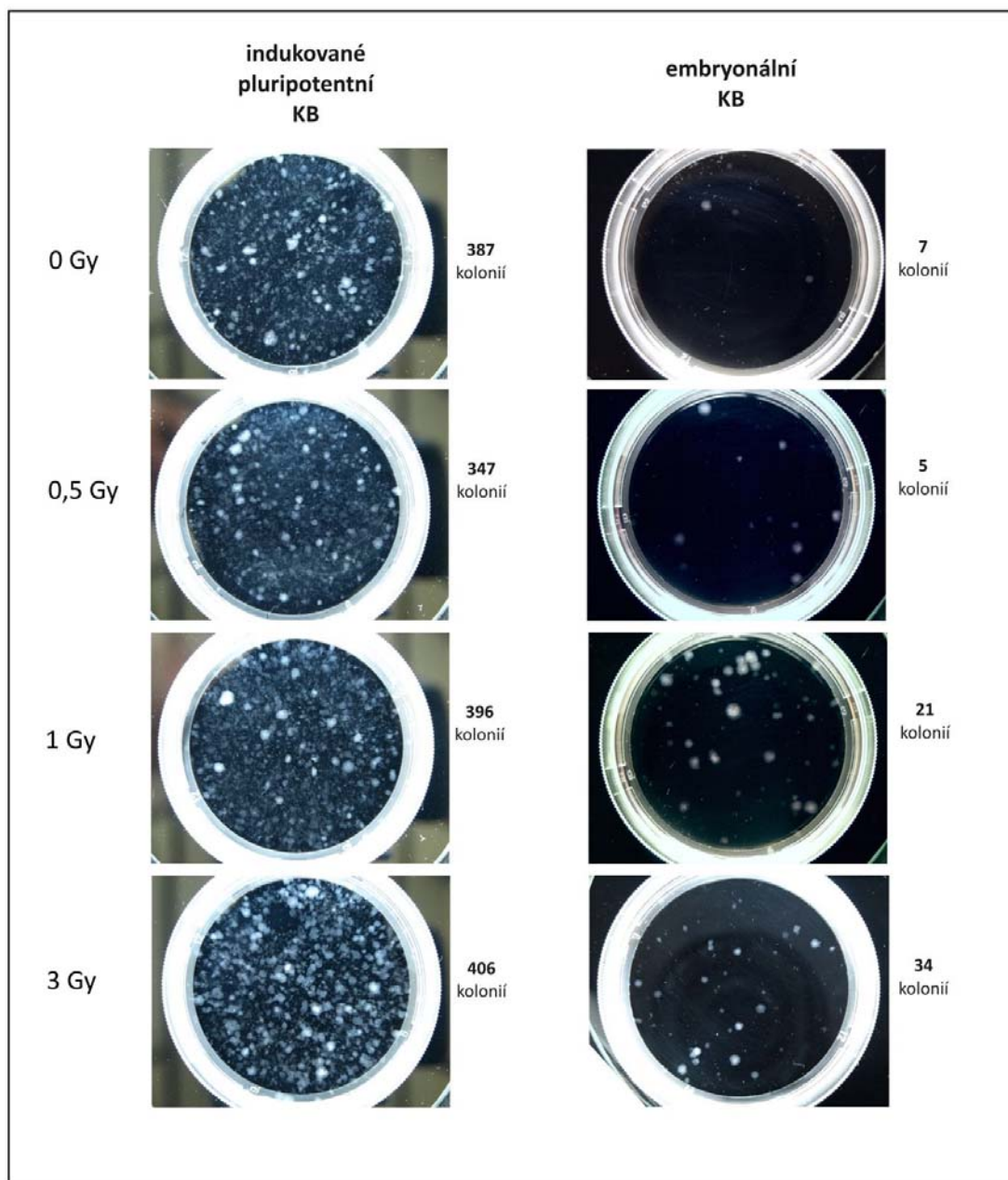


Graf 2: Účinnost nasazení embryonálních KB



*Graf 3: Porovnání účinnosti nasazení u indukovaných pluripotentních a embryonálních KB*

Dalším, a to možná nejpodstatnějším krokem HPRT assay bylo vyhodnocení samotné selekce mutantů v médiu s 6-TG. Nejdříve byl vyhodnocen počet zmutovaných kolonií při jednotlivých dávkách ozáření (obr. 10).

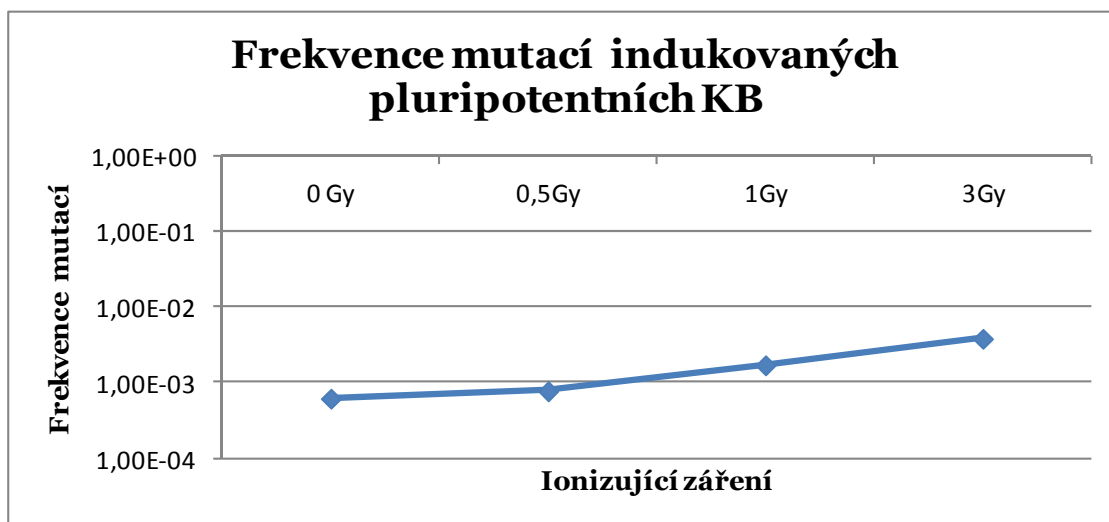


Obr. 10: Počet mutantních kolonií embryonálních KB a indukovaných pluripotentních KB za použití selekčního činidla 6-TG po selekci, trvající 3 týdny.

Následně se z výše uvedených hodnot vypočítala frekvence mutací u indukovaných pluripotentních KB a porovnála se s hodnotami pro embryonální kmenové buňky. Níže jsou uvedeny hodnoty frekvence mutací indukovaných pluripotentních KB při různých dávkách ionizujícího záření (tab. 4 a graf 4), dále mutační tempo buněk embryonálních (tab. 5 a graf 5) a porovnání hodnot těchto dvou typů KB (graf 6).

<b>Frekvence mutací indukovaných pluripotentních KB</b>		
dávka IR	počet kolonií	frekvence mutací
0 Gy	387	6,18E-04
0,5Gy	347	7,75E-04
1Gy	396	1,71E-03
3Gy	406	3,82E-03

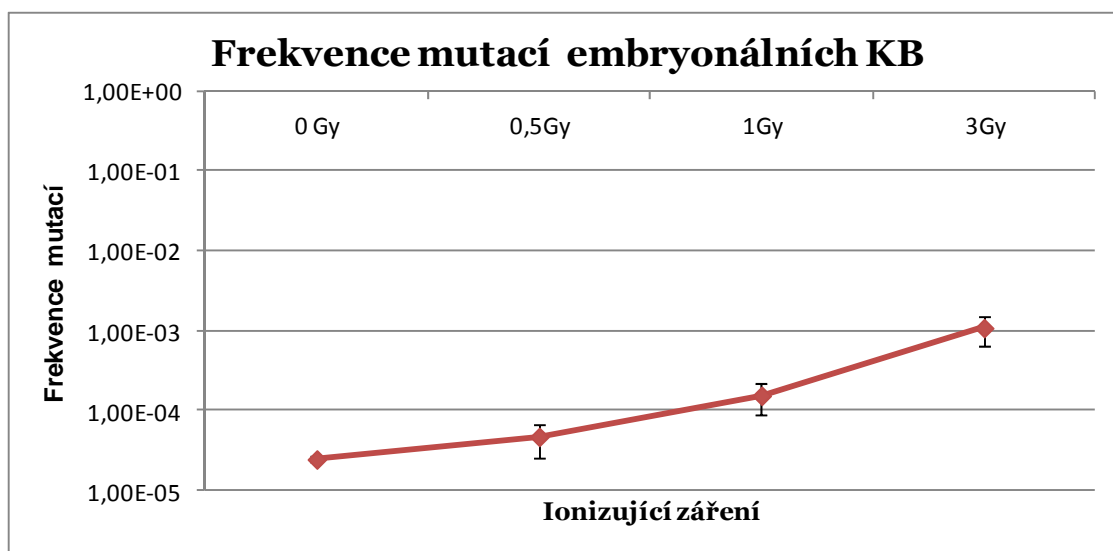
Tab. 4: Frekvence mutací indukovaných pluripotentních KB



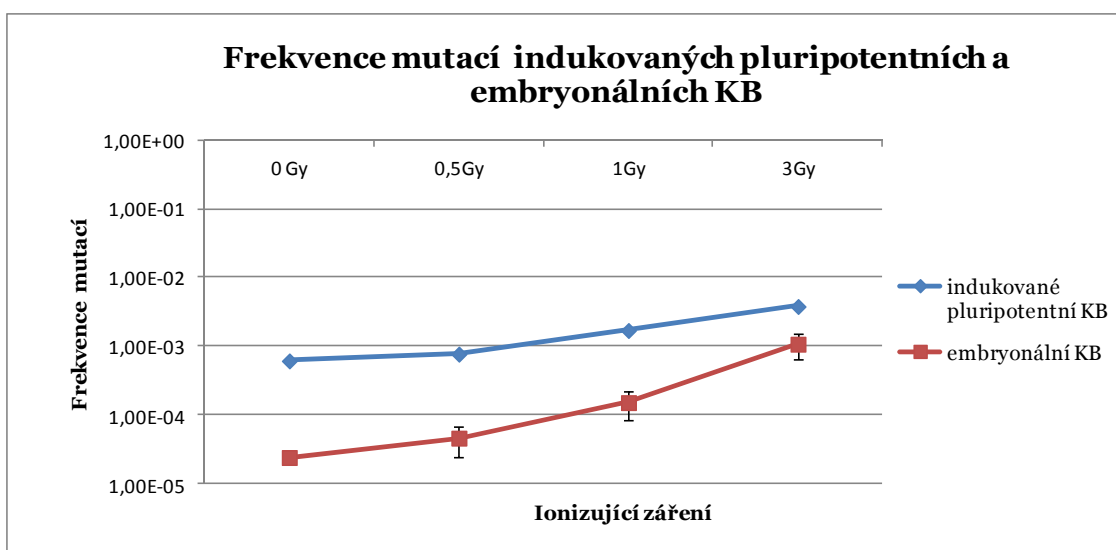
Graf 4: Frekvence mutací indukovaných pluripotentních KB

Frekvence mutací embryonálních KB			
dávka IR	počet kolonií	frekvence mutací	směrodatná odchylka
0 Gy	7	2,44E-05	2,23E-06
0,5Gy	5	4,67E-05	2,15E-05
1Gy	21	1,53E-04	6,68E-05
3Gy	34	1,08E-03	4,42E-04

Tab. 5: Frekvence mutací embryonálních KB



Graf 5: Frekvence mutací embryonálních KB



*Graf 6: Porovnání frekvence mutací indukovaných pluripotentních a embryonálních KB*

## 4. Diskuse

Buňky, které byly uměle vytvořené reprogramováním z tkáňově specifických buněk tzv. indukované pluripotentní KB, by mohly mít v budoucnu významné využití v regenerativní medicíně. Mají potenciál stát se kvalitní náhradou embryonálních kmenových buněk, se kterými je spojena řada problémů jako nestabilita genomu, etická rozporuplnost jejich použití nebo rejekce při transplantacích. Indukované kmenové buňky by měly reprogramací získávat vlastnosti embryonálních kmenových buněk, a to jednak schopnost diferencovat se do jakéhokoliv buněčného typu a nekonečně se dělit. Také by však měly být schopny udržovat zvýšenou stabilitu genomu, jako je tomu u kmenových buněk. Bohužel tomu tak není a i tento experiment dokázal, že frekvence mutací indukovaných pluripotentních KB je mnohonásobně vyšší než u KB embryonálních.

Experiment využíval selekci mutantních buněk pomocí média obsahující toxickou látku 6-TG u indukovaných pluripotentních KB linie 4. Následně byly hodnoty frekvencí mutací těchto buněk porovnány s údaji pro embryonální KB linie CCTL14. Z naměřených a vypočítaných hodnot vyplývá, že četnost mutací u indukovaných pluripotentních KB je přibližně o jeden řád vyšší než u embryonálních KB a to při použití všech různých množství dávek ionizujícího záření. Vzhledem k dlouhodobému charakteru pokusu a omezené délce stáže bylo měření na indukovaných pluripotentních buňkách, na rozdíl od embryonálních kmenových buněk, provedeno zatím pouze jednou. V provádění dalších opakování budu na pracovišti školitele pokračovat i v budoucnu. Vzhledem k tomu, že standardní odchylka se u měření mutací pohybuje v řádu jednotek, zatímco rozdíl mezi hodnotami naměřenými pro indukované pluripotentní kmenové buňky a embryonální kmenové buňky je větší, než jeden řád, přičemž je tento fenomén opakován u různých dávek indukce zářením, je možné naměřený rozdíl považovat za ověřený a skutečný.

Zjištění, že indukované pluripotentní KB mají víc než desetkrát větší frekvenci mutací než embryonální kmenové buňky, je pro medicínu a vědu

obecně značně znepokojující. Mutační tempo se tak blíží hodnotě, kterou nabývají somatické buňky diferencované. To znamená, že reprogramace, jejímž cílem mělo být vytvořit buněčný typ podobný embryonálním kmenovým buňkám, nezahrnovala nezbytné zvýšení údržby a ochrany genomu. Tento experiment tedy poukazuje ne nebezpečí, které plyne z případného použití indukovaných pluripotentních KB v klinické medicíně. Zvýšená frekvence mutací a tím snížená stabilita genomu by mohla v krajním případě vést k nefunkčnosti transplantovaných buněk, případně i k nádorovému bujení.

Experimentálně ověřená technika analýzy frekvence mutací poskytuje základní nástroj na jednoduché a spolehlivé testování stability genomu, kterého bude možné využít při hledání cest, jak prokázané nestabilitě genomu indukovaných pluripotentních KB zabránit. Dále zavedení této techniky na indukované pluripotentní KB, na kterých tato metoda nebyla dříve dostupná, otevírá možnosti ke zlepšení podmínek reprogramace a kultivace, které povedou k zabránění tohoto nechtěného fenoménu zvýšené frekvence mutací. V návaznosti bude možné buď samotný reprogramační proces nebo následnou kultivaci v budoucnosti pozměnit tak, že jeho produktem budou indukované pluripotentní buňky, které budou mít nejenom schopnost proliferace a diferenciací, ale také budou mít hodnotu frekvence mutací na stejné úrovni jako embryonální KB.



## 5. Závěr

Úspěšně jsem zvládla standardní kultivační postupy s KB a naučila jsem se HPRT assay – metodu, kterou lze stanovit frekvenci mutací KB na základě selekce mutantních kolonií v médiu obsahujícím 6-TG. Tato metoda byla aplikována na indukované pluripotentní KB. Následným srovnáním výsledků s hodnotami frekvence mutací u embryonálních KB jsem bylo potvrzeno, že indukované pluripotentní KB nemají stejné vlastnosti vzhledem k údržbě stability genomu jako embryonální KB. Jejich příliš četné mutace by mohly mít za následek neúspěšnost léčby a v krajním případě i ohrožením zdraví pacienta. U KB s velkou mírou mutací hrozí omezená funkčnost tkání obsahujících transplantované buňky, případně hrozí vznik rakovinových buněk,

Na tento dílčí experiment bych ráda navázala sérií dalších pokusů, které by umožnily statistické vyhodnocení výsledků. Také je nezbytné provést experiment na jiné nezávislé linii indukovaných pluripotentních KB, aby byla ověřena obecná platnost předpokládaných výsledků této práce.

## Literatura

- [1] **Koledová Z, Divoký V., Horváthová M., Felnerová I.**, Kmenové buňky využití ve výzkumu a klinické praxi, 1. vyd. Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. ISBN 978-80-244-2690-7. strany 14-15, 25-27.
- [2] **Filip S., Mokrý J., Hruška I.**, Kmenové buňky biologie, medicína, filozofie.1. vyd. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-401-6. strany 17, 69-75.
- [3] **Bárta T., Doležalová D., Hampl A., Holubcová Z., Jaroš J., Vinarký V.**, Od fyziologie k medicíně, 1. vyd. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2010. ISBN 978-80-7305-097-9. strany 16.
- [4] **Takahashi K., Yamanaka S.**, Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell(2006) 126(4). strany 663–676.
- [5] **Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S.**, Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell (2007), 131(5). strany 861-872
- [6] **Hejnová, R.**, Dynamika oprav DNA u lidských kmenových buněk, vydala Masarykova Univerzita. Brno 2009. strany 8 – 10
- [7] **Brdička R.**, Lidský genom na rozhraní tisíciletí, 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2001. ISBN 80-2470-118-9. strany 62-68, 222-228
- [8] **Flegr J.**, Evoluční biologie, 2. vydání, Praha: Academia, 2009. ISBN 978-80-200-1767-3, strany 81-91, 450 - 452

- [9] **Rozsypal S.**, Úvod do molekulární biologie (První a druhý díl), 1. vyd. Brno, 1996., strany 406 – 408
- [10] **Ferák V., Sršeň Š.**, Genetika člověka, 2. vyd. Bratislava: Slovenské pedagogické nakladatelství, 1990. ISBN 80-08-00349-9. strany 42 – 44
- [11] **Dzimková M.**, Vliv polymorfizmů na genovou expresi, vydala Masarykova Univerzita, Brno 2010. strany 13-16.
- [12] **Thompson S.**, Thompson M., Klinická genetika, 1. vyd, Martin: Osveta, 1988. ISBN 2-0935.614. strany 54 – 58.
- [13] **L. Balakireva, N. Godard.**, A continuous spectrophotometric assay for rapid measurement of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) activity in cell lysates, 1. vyd, Lyon: NovoCIB SAS. Dostupné z URL: [http://www.nature.com/app\\_notes/nmeth/2011/111406/full/an7991.html](http://www.nature.com/app_notes/nmeth/2011/111406/full/an7991.html)
- [14] **Torres R., Puig J.**, Hypoxanthin-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesh-Nyhan syndrom. Orphanet Journal of Rare Diseases. 2, 2007. strana 49.
- [15] **Wiley J. a synové**, Preclinical development handbook: Toxicology, vydáno v Hoboken, New Jersey a zároveň v Kanadě, 2008, ISBN 978-0-470-24846-1. strana 146.
- [16] **Jianhua Z., Lian X., Shuanlai Z., Juan D., Shuanxi Y.**, DNA Lesion and *Hprt* Mutant Frequency in Rat Lymphocytes and V79 Chinese Hamster Lung Cell Exposed to Cadmium, Journal of Occupational Health, 48, 2006. strany 93 - 96

[17] **Tsuda H, Sasaki K., Tanaka N.**, Establishment of Hypoxanthine Phosphorybosyltransferase(HPRT)-locus Mutation Assay System in Mouse ES Cells. AATEX Journal 11(2), 2005. strany 118-126.

[18] **Cervantes R. B., Stringer J. R., Shao Ch., Tischfield J. A., Stambrook P. J.**, Embryonic stem cells and somatic cells differ in mutation frequency and type. PNAS 2002 99 (6), 2002 strany 3586-3590.