

Seminář UNCE

26.11.2012

- UNIVERZITNÍ CENTRUM
- „Experimentální patologie založená na genové manipulaci kmenových buněk“
- 4 cíle
- 4 senioři/14 juniorů

Rozpočet

- Celkem **23,427** mil Kč (2012-2017)
- Podpora (2012) : **3,3645** mil Kč
- Dominantní složkou je mzdový fond
- Rok 2012 : provozní náklady (175 tis Kč) kryjí náklady z Centra biomodelů
- Projekt komplementuje PRVOUK, jež zajišťuje další prostředky pro platy a provoz. V neposlední řadě je projekt provázán s navazujícími granty.

Výsledky a jejich prezentace

- Semináře 2x ročně
- Prezentace výsledků - veřejná
- Webové stránky <http://unce1.lf1.cuni.cz/> slouží jako informační centrum a vytvářejí historii grantovému projektu
- Bude vytvořena tvář WEBu, jež bude upozorňovat na novinky – především prestižní publikace.

Pedagogické aktivity

Školitelé Ph.D. studentů:

Doc. Tomáš Stopka, Doc. Jan Živný, MUDr. Pavel Klener, Prof. Emanuel Načas, RNDr. Luděk Šefc

Obhájené disertační práce – Ph.D. (2012):

14.6.2012 **Jana Linhartová** (školitel RNDr. Luděk Šefc): Cadaveric bone marrow transplantation: Effects of hypoxia and metabolic starvation on mouse hematopoietic stem

28.6.2012 **Nikola Čuřík** (školitel Doc. Tomáš Stopka): Transkripční faktor PU.1 jako cíl diferenační terapie myelodysplastického syndromu 5-azacytidinem

Výuka na Ústavu patologické fyziologie:

Přednášky pro mediky ZS 2012/13 – česky (anglická paralelka)

Doc. Tomáš Stopka	1 (1)
MUDr. Pavel Klener	3 (2)
Prof. Emanuel Načas	1 (1)

Přednášky pro zubaře ZS 2012/13 – česky (anglická paralelka)

Doc. Tomáš Stopka	0 (1)
Doc. Jan Živný	4 (4)
MUDr. Pavel Klener	1 (1)
MUDr. Jiří Šedý	2 (2)

Kruhové a blokové semináře ZS 2012/13

Doc. Tomáš Stopka	36
Doc. Jan Živný	14
MUDr. Pavel Klener	26
MUDr. Jan Molinský	9
MUDr. Bokang Maswabi	13
MUDr. Magdalena Klánová	29
Mgr. Vít Pospíšil	9
Mgr. Nikola Čuřík	2

Další pedagogické aktivity

13.11. 2012 přednáška: Haematological malignancies and microRNAs
(v rámci předmětu Pokroky v molekulární biologii a genetice, Ústav molekulární genetiky AV ČR)

Odborné stáže studentů IFMSA na ÚPF (2012) – 5 studentů (Doc. Tomáš Stopka)

Řešení Cíl 1

SHRNUTÍ ZA PRVNÍ ROK PROJEKTU 2012

1a **Studium role genové transkripce a remodelace chromatinové struktury v diferenciaci kmenových buněk** a příprava dalších myších transgenních modelů.

Cíl 2b. **Studium molekulárních mechanismů buněčné transdiferenciace.**

Senior: T Stopka (1 a 2)

Junioři: P Burda (2), V Pospíšil (2), N Čuřík (1), K Vargová (1), P Vlčková (1)

Obecné principy

- **Experimentální hematologie**: modelování funkce rozličných molekul, jež se účastní diferenciaci kmenové buňky.
- **Myší transgenika**: gene knockout (delece) a knock in (vnesení) v ES buňkách mechanismem homologní rekombinace.

Molekulární úroveň

- Transkripční faktory: **PU.1** – hlavní regulátor diferenciaci kmenové krvetvorné buňky, „leukemia suppressor“.
- Chromatin remodelační faktory: **Smarca5**, skládá a rozkládá nukleozóm, účastní se dějů na DNA.
- Postranskripční regulace: **mikroRNA** (inhibitory exprese).

Medicínská úroveň

- **Hematologické malignity**: AML, CML, MDS, CLL – role vybraných molekul v downregulaci PU.1 (prognostický význam)
- **Epigenetická terapie** (5-AZA u MDS): ovlivňuje krvetvorbu mechanismem odblokování exprese některých tumor supresorových genů (např. PU.1).

Metodika

- **Experimentální modely:** transgenní myši, derivované buněčné linie, genetická manipulace v buněčné linii.
- **Molekulární metodiky:** vnesení nukleových kyselin do buňky, celogenomová analýza fenotypu, zobrazovací metodiky v myši, RNA FISH.
-

Nejvýznamnější výstupy v r. 2012

- **5-azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity.**
Curik N, Burda P, Vargova K, Pospisil V, Belickova M, Vlckova P, Savvulidi F, Necas E, Hajkova H, Haskovec C, Cermak J, Krivjanska M, Trneny M, Laslo P, Jonasova A, Stopka T. *Leukemia*. 2012 Feb 20. **IF: 9,56**

Teze publikace:

- a) 5-AZA ovlivňuje chromatinovou strukturu a expresi genu PU.1 v MDS
- b) 5-AZA vlivem na PU.1 zapíná krvetvornou diferenciaci
- c) míra represe PU.1 u MDS koreluje s přežíváním na 5-AZA – plánuje se klinické testování (AZA/G-CSF)

- **Aggressive acute myeloid leukaemia in PU.1/ p53 double mutant mice.**
Petra Vlckova, Libor Stanek, Pavel Burda, Vít Pospíšil, Filipp Savvulidi, Karin Vargova, Martina Kapalova, Peter Laslo, Ulrich Steidl, and Tomas Stopka, Cancer Research IF: 8.164 (11/2012 resubmission of the response to critiques)

Teze publikace:

- a) Downregulace PU.1 hraje roli v agresivitě myší AML
- b) Mechanismus downregulace PU.1 u AML zahrnuje mikroRNA-155 a onkogen Myb
- c) Lidské případy AML vykazují poruchu dráhy MYB/miR-155/PU.1

Plánované aktivity 2012/2013

Publikace v běhu:

Vlčková et al. (**PU.1 v agresivitě AML**) resubmitování
Vargová et al. (**role miR-155 u CLL**)
Stopka et al. (**review, Leukemia**)
Kokavec et al. (**role Smarca5 v kmenových buňkách a erytropoéze**)

Publikace v přípravě:

Kapalová et al. (**role Smarca5 jako onkogenu**)
Zikmund et al. (**role Smarca5 v T-buňkách**)



UNCE 204021

1. lékařská fakulta
Univerzita Karlova v Praze

- » Rozpracování cílů projektu
- » Výstupy grantového projektu
- » Program akcí
- » Řešitelský tým

semináře

tstopka 07.05.2012

27.5.2013 & 25.11.2013 Prezentace výsledků jednotlivých skupin UNCE 204021 (12h, Seminární místnost ÚPF, U nemocnice 5, Praha 2).
Součástí prezentace je představení řešitelského kolektivu, cílů, předběžných výsledků a eventuelních změn v návrhu řešení. Účast zástupce rektorátu je vyhrazena.

15.3.2013 Genes, Genetics & Genomics G3 Prague Meeting 2013
<http://g3.lf1.cuni.cz/en/schedule> (U nemocnice 4, Praha 2)

Speakers:

John Strouboulis (*Institute of Molecular Oncology, BSRC Alexander Fleming, Varkiza, Greece*): "GATA-1 regulatory networks in erythroid cells."

Peter Laslo (*Leeds Institute of Molecular Medicine, University of Leeds, United Kingdom, Leeds, UK*): "Pathological Interference of Myeloid Differentiation by the BCR-ABL Oncogene"

Tomas Stopka (*Pathophysiology & BIOCEV, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague*): "Regulation of PU.1 gene transcription in MDS and AML."

8-11.12.2012 ASH Meeting 2012

<http://www.hematology.org/> Atlanta, GA.

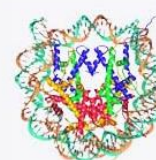
Abstracts: Burda P. and Čuřík N. et al.: *Divalent metal transporter 1 (DMT1) regulates EPO receptor gene expression via GATA-1.*

Kapalová et al: *Transcription factor CTCF inhibits effects of 5-azacitidine in MDS/AML cells.*

Vlčková et al: *PU.1 and p53 double mutant mice develop aggressive AML with dysplastic features.*



Genes, Genetics & Genomics



1st Faculty of Medicine
Charles University in Prague

- » Welcome
- » Program
- » Organizers
- » Sponsors
- » Symposium Info

Genes, Genetics & Genomics (G3) 2012

josmart 22.02.2012

International Symposium on Gene Regulation in Normal and Pathologic States

May 10th -11th, 2012



You can read a Medical Tribune symposium report (in Czech) [here](#).

This two-day symposium is organized by the First Faculty of Medicine of the Charles University in Prague and its Institute of Pathological Physiology, and it aims to summarize recent discoveries on physiological as well as pathological cellular and molecular processes achieved by using global "omics-" and systems-biology methodologies as well as focused biochemical functional approaches.

Řešení Cíl 2

Kmenové buňky krvetvorné tkáně (HSCs)

Kmenové buňky krvetvorné tkáně (HSCs - Hematopoietic Stem Cells) **jsou nejlépe přístupné poznání**, v porovnání s kmenovými buňkami jiných tkání, především protože **je lze snadno transplantovat** a umožňují kvantifikaci sledovaných procesů.

HSCs jsou prototypem kmenových buněk

HSCs jsou nejstudovanějším druhem somatických kmenových buněk se zachovalou funkcí po vytvoření tkáně během celého života organismu.

Jsou prototypem kmenových buněk a

jejich biologie je do značné míry obecná pro kmenové buňky komplexních tkání.

Studium HSCs je obtížné

především z důvodu **jejich malého počtu** mezi velkým počtem jiných buněk:

představme si, že mezi obyvateli Severní Ameriky (USA a KANADA: asi **340 milionů** obyvatel) je roztroušeno **8000** jedinců, které máme studovat.

Čím se liší 8000 HSCs od 340 milionů buněk krvetvorné tkáně?

Ohromným **proliferačním potenciálem**, spojeným se **schopností sebeobnovy a diferenciací** v asi 10 druhů vysoce specializovaných buněk.

Větší spektrum diferenciačního potenciálu mají jen embryonální kmenové buňky.

Potenciál kmenových buněk se manifestuje po poškození krvetvorné tkáně nebo po transplantaci HSCs

Situaci můžeme připodobnit „**morové ráně**“, která by postihla populaci Severoamerického kontinentu.

Pokud by ji přežilo třeba jen 10 jedinců s potenciálem odpovídajícím HSC, v extrémním případě jen 1, celá populace 340 milionů jedinců by se obnovila. V takovém případě by byli přijímáni „HSCs-imigranti“ z jiné části světa“.

Pokud je však počet HSCs plný, tj. asi 8000, imigranti mají velmi malou šanci uchycení, „teritorium Severní Ameriky, je pro ně uzavřeno“.

Sebereprodukce HSCs je možná jen sebeobnovujícím typem buněčného dělení

Unikátní pro kmenové buňky, je to, že po "morové ráně" **obnoví i samy sebe**, ale jen do počtu maximálně 8000.

Potenciál přitom mají pro vytvoření 340 milionů buněk, ale v podstatě ještě několikanásobně většího množství, protože se „soubor obyvatel“ stále omlazuje.

Řídící mechanismy HSCs jsou proto velmi striktní, v současnosti jsou však takřka zcela nepoznané.

Jak lze HSCs studovat?

- pomocí **průtokové cytometrie** (1/50 000 buněk kostní dřeně).
- **transplantací** jedincům zbavených všech nebo velké části vlastních HSCs.
- jejich počet lze stanovit **kompetitivní transplantací**, kdy jsou transplantované se známým množstvím rozlišitelných kmenových buněk.

Zavedli jsme novou metodu jejich stanovení založenou na míře přijmutí standardního počtu "imigrantů".

Transplantačními testy a dalšími metodami jsou HSCs studovány již asi 50 let.

V čem spočívá naše současné snažení?

Náš výzkum je zaměřen na

1. **asymetrický a symetrický typ sebeobnovujícího dělení HSCs** (*Katarina Forgáčová*).
2. **zdatnost (fitness) HSCs** v případě kompetice různých HSCs (*Katarina Forgáčová*).
3. energetický metabolismus HSCs, **zdroje ATP** (*Jana Linhartová*).
4. metodické možnosti jejich **stanovení průtokovou cytometrií** (*Filipp Savvilidi, Luděk Šefc*).
5. unikátní průběh **obnovení populační homeostázy po poškození krvetvorné tkáně jednou dávkou cyklofosfamidu** (*Petr Páral*).

Nové publikační výstupy

- Forgáčová, Nečas: **Availability of hematopoietic niches for transplanted stem cells.** Review. Folia Biologica. V tisku.
- Forgáčová et al: **All hematopoietic stem cells engraft in submyeloablatively irradiated mice.** Zasláno do recenzního řízení.
- Linhartová et al: **Glycolysis dominates over oxidative phosphorylation in providing energy to hematopoietic stem cells.** Rukopis je připraven z 90%.
- Forgáčová et al: **Asymmetric cell divisions of hematopoietic stem cells prevail in initial phases of regeneration of hematopoietic tissue.** Rukopis je připraven z 50%.
- Savvulidi et al: **Two novel strategies for detecting murine hematopoietic stem cells by flow cytometry ignoring lineage markers.** Rukopis je připravován.

Řešení Cíl 3

Specifický cíl č.3: Vývoj a studium myších modelů xenotransplantace lidských nádorových buněk leukémií a lymfomů

Senior: doc. Jan Živný, Ph.D.

Junioři: MUDr. Pavel Klener, Ph.D., MUDr. Jan Molinský, MUDr. Magdalena Klánová, MUDr. Bokang Maswabi

Základní uvedení do problematiky specifického cíle

- Obecné principy

-imunodeficientní myši umožňují engraftment buněčných linií lidských leukémií a lymfomů v myším organismu

-růst xenotransplantátu v myším organismu umožňuje preklinické studium role mikroprostředí, šíření tumoru, novotvorby cév či experimentální in vivo terapii

Základní uvedení do problematiky specifického cíle

- Molekulární úroveň

1. Analýza genové exprese, exprese microRNA a imunofenotypu buněk rostoucích in vivo v porovnání s in vitro rostoucími liniemi

1. vliv cílené změny exprese vybraných genů (např. adhezivních molekul) na engraftment, růst, šíření a neovaskularizaci xenotransplantovaných tumorů.

- Medicínská úroveň

-myší model lidské leukémie a lymfomu nám umožní studium patogeneze lidských malignit na preklinickém modelu

-myší model bude sloužit pro preklinické zhodnocení účinnosti vybraných protinádorových látek, zejména těch, které nelze plnohodnotně testovat in vitro (monoklonální protilátky, prolátky, antiangiogenní látky aj.)

Konkrétní vědecké otázky

- 1) charakterizace engraftmentu a šíření buněk linií lymfomu z plášťových buněk (MCL) v jednotlivých myších orgánech pomocí imunohistochemie a průtokové cytometrie
- 2) studium genové exprese, exprese micro RNA a imunofenotypu buněk MCL buněk získaných ex vivo z myších orgánů ve srovnání s in vitro rostoucími MCL buňkami.
- 3) role exprese adhezivních molekul CD31/PECAM a CD44/Hermes v engraftmentu, růstu, šíření a neovaskularizaci MCL tumorů
- 4) role exprese VEGF receptorů (VEGFR1, 2, 3) v engraftmentu, růstu, šíření a neovaskularizaci MCL tumorů
- 5) studium molekulárních mechanismů regulujících neovaskularizaci podkožních MCL tumorů
- 6) experimentální terapie MCL (kombinovaná antiangiogenní terapie, inhibitory NEDD8, nové chelátory železa, buněčná terapie modifikovanými T-lymfocyty (CAR) aj.)

Metodika

- Experimentální modely:
- Stabilní kohorta cca 80-120 myšek v pokuse + cca 60-80 myšek v chovném jádře
- Molekulární metodiky:
- příprava transgenních linií se stabilně zvýšenou či sníženou expresí vybraných genů
- studium změn genové exprese pomocí real-time RT-PCR a mikročipů
- Studium změn exprese microRNA pomocí mikrofluidních destiček
- studium proteinové exprese pomocí western blottingu a průtokové cytometrie
- izolace buněčných subpopulací pomocí magnetických kolon

Nejvýznamnější výstup

- In Vivo Growth of Mantle Cell Lymphoma Xenografts in Immunodeficient Mice Is Positively Regulated by VEGF and Associated with Significant Upregulation of CD31/PECAM-1. Folia Biologica, IF=1.13

Teze:

1. Angiogeneze hraje důležitou roli v engraftmentu a růstu MCL.
2. Anti-angiogenní léčebné strategie jsou účinné v terapii MCL
3. In vivo růst xenotransplantátů je asociován s upregulací CD31/PECAM1.

Výstupy projektu

- Rukopis před odesláním: *Mouse model of human mantle cell lymphoma (MCL) for the study of MCL biology and for preclinical assessment of experimental treatment approaches.*
- Abstrakta a další výstupy.
- ASH 2012, Atlanta, USA: Mouse model
- Celkový výsledek cíle: *celkový počet prací s IF =1 a souhrnný IF= 1.13.*

Plánované aktivity

Experimenty:

1. Charakterizace myšího modelu MCL za použití xenotransplantace primárních buněk izolovaných od pacientů s blastoidním MCL.
2. Charakterizace dvou nových linií MCL odvozených od pacientů s MCL a DLBCL: UPF1G, UPF4A. Včetně xenotransplantací do imunodeficientních myší.
3. Studium dynamiky microRNA na myším modelu MCL.
4. Experimentální terapie lymfomů: antiangiogenní přístupy, nové chelátory železa, inhibitory NEDD8, buněčná terapie modifikovanými T-lymfocyty (CAR), nové chelátory železa.

Publikace: zatím ne.

Řešení Cíl 4

Studium kmenových buněk ve vztahu k doplňování rozličných tkání

Senior: Doc. René Foltán

Junioři: Dr. Jiří Šedý, Dr. Erika Kužmová

Základní uvedení do problematiky specifického cíle

Cílem projektu je posoudit možnosti implantace kmenových buněk a osteoindukčních biomateriálů do kostěných defektů na modelu laboratorního potkana.

- MSCs reprezentují v současné době roli hlavního kandidáta v regenerativní medicíně, včetně augmentace kosti, pomocí přímých i nepřímých mechanismů, kterými potencují regeneraci kosti.
- Lepší pochopení těchto mechanismů umožní zdokonalit techniky lokální terapie kostních defektů, optimalizaci jejich využití, indikací a napomůže maximální využití jejich společných účinků s biomateriály
- MSCs mají obrovský terapeutický potenciál, který je zatím jen velmi málo využitý.
- Neexistují žádné spolehlivé selektivní markery pro MSCs.
- I proto jsou vlastnosti MSCs stále neprobádané.
- Jedna z teorií o MSCs předpokládá „MSCs niche“ centralizovanou v jednom orgánu/tkáni, odkud jsou MSCs mobilizované a migrují k místu léze, ale zabezpečují i neustálou fyziologickou obnovu tkání.
- Incidence MSCs v tkáních není dostatečná a pro terapeutické cíle je nutná jejich expanze *ex vivo*.
- MSCs izolované z různých tkání se mírně od sebe liší nejen fenotypově, ale i terapeutickým potenciálem.
- Podmínky *in vitro* kultivace zásadně ovlivňují přežívání, proliferaci, diferenciaci a jiné vlastnosti MSCs *in vivo*.
- Stále přibývající práce o 3-D kultivaci MSCs *in vitro* ukazují, že 2-D kultury velmi zkreslují přirozené projevy MSCs (produkce jiných signálních molekul, exprese jiných povrchových markerů, ...).

Konkrétní vědecké otázky

- 1) Jak nejlépe MSCs kultivovat
- 2) Jak nejlépe MSCs a biomateriály aplikovat na místo určení
- 3) Jaká doba je nutná k reparaci kostěného defektu
- 4) Jaká je kvalita reparované kosti
- 5) Jaký je osud MSCs v lézi

Metodika

- 1. Ustavení anestetické jednotky**
(bylo nutné optimalizovat, zvířata umírala v průběhu operace)
- 2. Optimalizace odběru buněk/tkání z pánevní kosti pro účely autologní transplantace**
 - a) aspirace buněk kostní dřeně injekční stříkačkou
(*Kinebuchi et al. 2010 IJU*)
 - b) odstranění *crista ilica ossis ilii* – perfuze dřevné dutiny a izolace buněk a tkání z kostní dřeně
 - c) **resekce povrchové části pánevní kosti a exkochleace kostní dřeně, následně zatmelení defektu**
- 3. Izolace MSC z tkáně pánevní kosti a kostní dřeně pánevní kosti**
 - a) izolace mezenchymálních buněk z mononukleární frakce buněk kostní dřeně (*Kulterer et al. 2007 BMCG*)
 - b) enzymatické rozvolnění tkáně kostní dřeně a následná kultivace adheovaných buněk
 - c) enzymatická izolace buněk z rozdrčené pánevní kosti
(*Zhu et al. 2010 NP*)
 - d) **kultivace adheovaných buněk** (*Pittenger et al. 1999 S*)
 - e) kultivace adheovaných buněk společně s hematopoetickými bunkami (*Pytlík et al. 2009 B*)
- 4. Optimální kultivace MSC (různé kombinace faktorů)**
 - a) optimalizace séra (3 typy)
 - b) koncentrace séra 5%, 10%, 20% (proliferace v P0, P1, P2, vyhodnocení diferenciací a exprese jednotlivých povrchových markerů)
 - c) **Dexametazon**
 - d) **L-askorbát 2-fosfát**
 - e) **FGF-2**
 - f) **Glutamax**
 - g) médium (DMEM, α -MEM)

Je nutné vyhodnotit vliv uvedených faktorů z hlediska formování sfér a exprese povrchových markerů (CD45-, CD 235-, CD 164+ nebo CD 271+)

Aktuální výstup

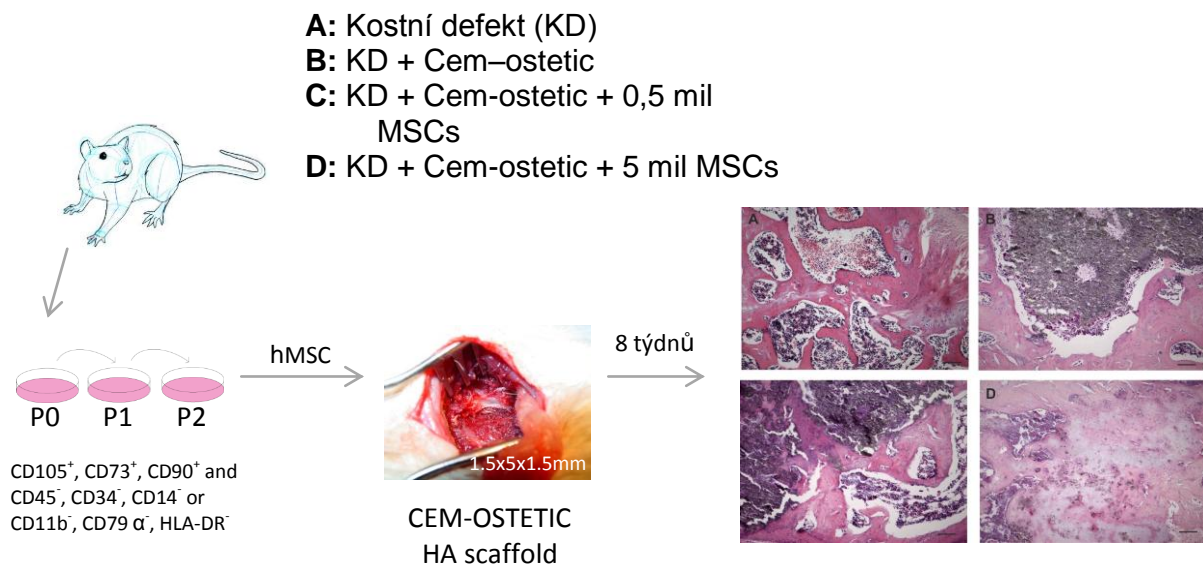
- **Bone scaffold combined with mesenchymal stem cells in the treatment of vertebral body defects.**

Vaněček V, Klíma K, Kohout A, Foltán R, Jiroušek O, Šedý J, Štulík J, Syková E.
Připraveno k odeslání do redakce Eur Spine J. IF=1.965

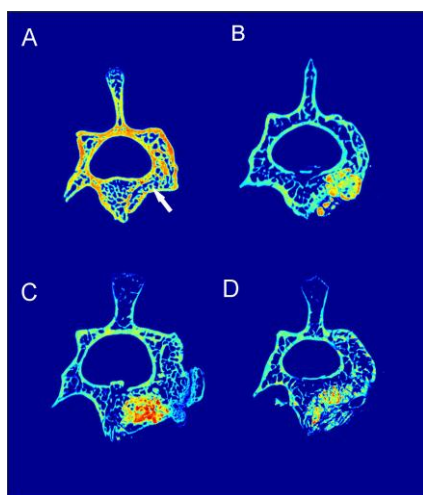
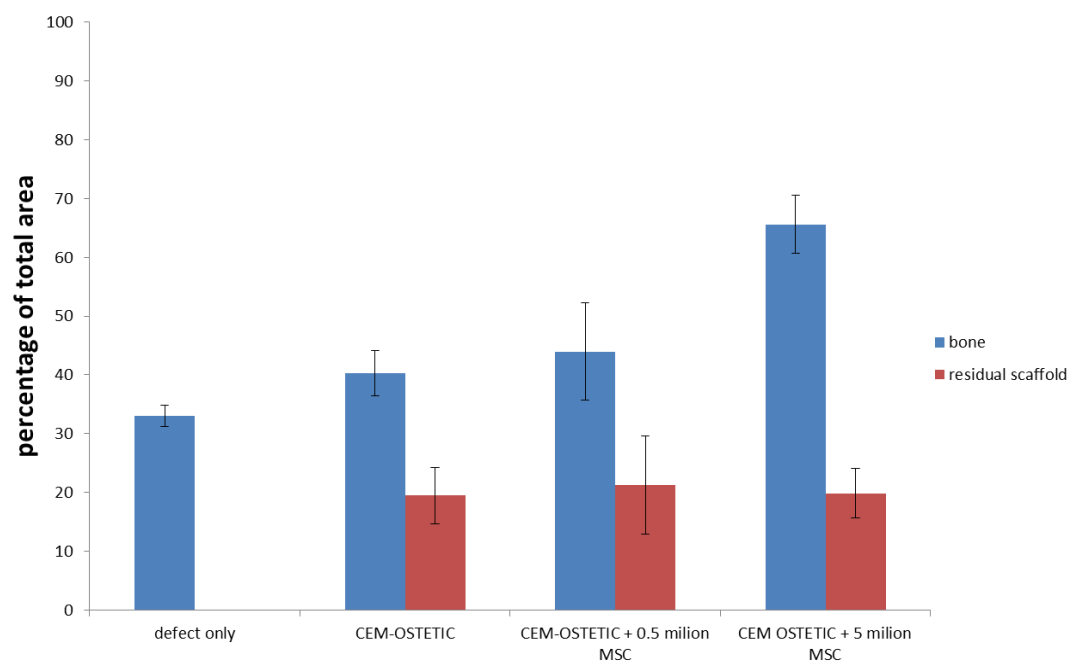
- Teze publikace:

- a) hMSCs v kombinaci s CEM-Ostetic jsou bezpečnou modalitou v reparaci kosti
- b) hMSCs v kombinaci s CEM-Ostetic mají vysoký reparativní potenciál v kosti
- c) optimální je velké množství buněk (5 milionů)

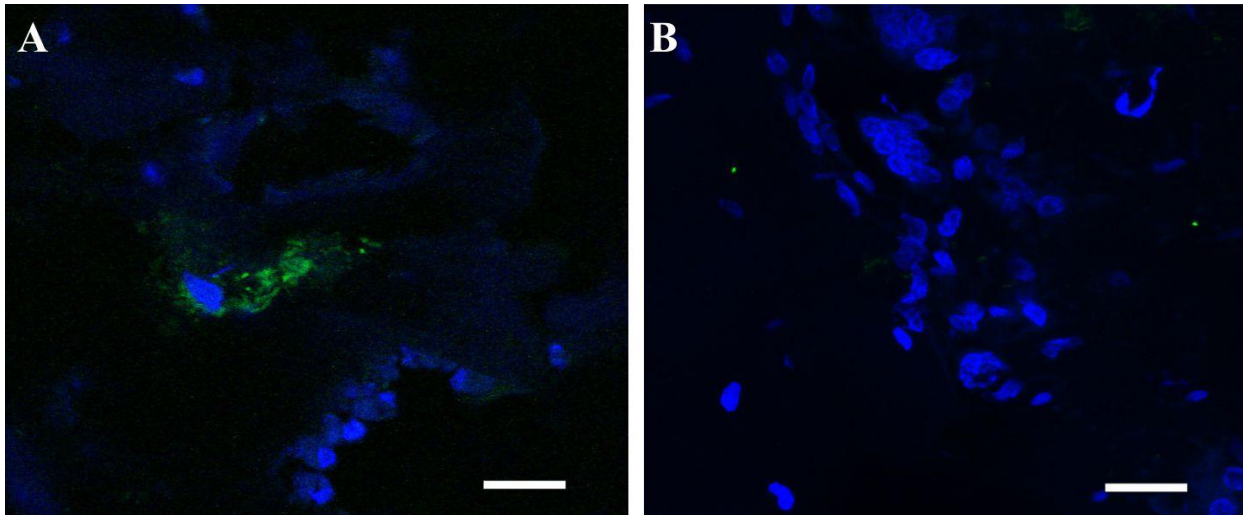
Metodika a výsledky



Výsledky-histomorfometrická analýza



- A:** Kostní defekt (KD)
- B:** KD + Cem-ostetic
- C:** KD + Cem-ostetic + 0,5 mil MSCs
- D:** KD + Cem-ostetic + 5 mil MSCs



A: KD + Cem-ostetic + hMSCs

průkaz přítomnosti hMSC v kostním defektu potkana pomocí lidského mitochondriálního markeru MTCO2 (zeleně)

B: KD + Cem-ostetic

Jádra buněk – DAPI (modře)

Další výstupy

- 2 publikace menšího rozsahu

Šedý J, Foltán R. Time dependency of traumatic neuroma development: Comments on "Reduction of osttraumatic neuroma and epineural scar formation in rat sciatic nerve by application of microcrystalline chitosan". *Microsurgery* 2012, 32: 590.

Šedý J, Foltán R, Pánek T. Nové pohledy na funkci temporomandibulárního skloubení. *Progresdent* 2012, 5: 16-23.

- 2 práce v přípravě

Klíma et al. The role of bone scaffold and mesenchymal stem cells in the reparation of vertebral body defects fused with miniplates.

Klíma et al. Bone scaffold materials. Review.

- Plánované publikace

Review – MSCs in bone regeneration (2013)

Primární paper (2013)