

Buňky s velkým potenciálem

3. Možné využití indukovaných pluripotentních buněk v medicíně

V prvním a druhém dílu seriálu (Živa 2016, 4: 150–154 a 2017, 3: 98–100) jsme představili proces přípravy indukovaných pluripotentních buněk (iPSC, induced Pluripotent Stem Cells) – nediferencovaných buněk se schopností neomezeného dělení a diferenciace do různých buněčných typů – reprogramováním z funkčně specializovaných tělních buněk. Přiblížili jsme jejich charakteristiky a také širokou škálu způsobů ověřování úspěšnosti reprogramování a kvality vytvořených iPSC buněk. Kromě přínosu pro studium procesu buněčné diferenciace a reprogramování mají iPSC buňky také mnoho potenciálních využití v aplikovaném medicínském výzkumu a případné léčbě.

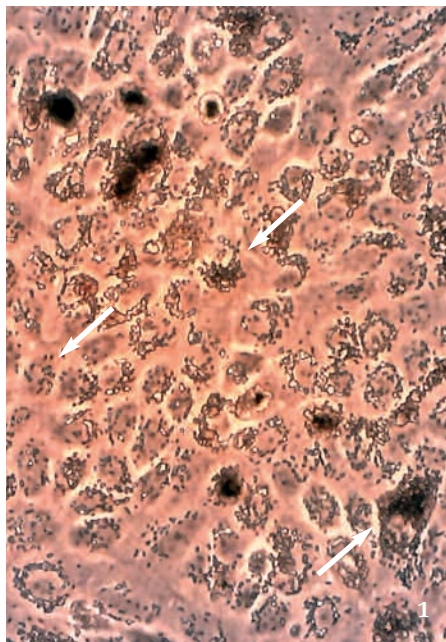
Regenerativní medicína a buněčné terapie

Cílem buněčných terapií je nahradit buňky a tkáň poškozené úrazem nebo onemocněním. To vyžaduje zdroj buněk odpovídající poškozené buněčné populaci, který je přitom schopen poskytnout dostatečné množství buněk. Většina terminálně diferencovaných buněk dospělého organismu nemá dostatečnou schopnost buněčného dělení, a přichází tak v úvahu pouze pro orgánové a tkáňové transplantace (ledvin, srdce, kožní štěpy). Pro některé aplikace lze využít tělní (somatické) kmenové buňky, např. mezenchymové nebo krvetvorné (transplantace kostní dřeně). Díky své teoreticky neomezené schopnosti sebeobnovy a diferenciace ve všechny buněčné populace představují embryonální kmenové buňky (Embryonic Stem Cells, ESC) a iPSC ideální zdroj buněk. Problémem ESC je nutnost zničení lidského embrya, což činí jejich použití eticky kontroverzním. Navíc takto vytvořené buňky nejsou imunologicky identické příjemci, a proto vyžadují potlačení imunitní reakce (imunosuprese).

Oba tyto problémy se dají obejít použitím iPSC buněk, které lze vytvořit pro každého pacienta na míru a prostřednictvím jeho vlastních (autologních) buněk se vyhnout nutnosti imunosuprese. Odpadá také problém se získáním buněk z těžko přístupných tkání, jako např. srdeční nebo mozkové (nervové) tkáň. K reprogramování v iPSC buňky můžeme použít snadno přístupné buňky z biopsií kůže (fibroblasty a keratinocyty), nebo z běžného odběru krve. Příprava buněk *in vitro* má ale i nevýhody. Buňky jsou vystaveny působení mnoha faktorů, od látek přidaných do kultivačního média až po vnější prostředí během kultivace. Všechny tyto podmínky mohou ovlivnit opakovatelnost a kvalitu přípravy buněk. Před terapeutickým využitím musí být jisté, že jsou buňky plně diferencované a nebudou tedy tvořit nádoro-

ry (teratomy). Musejí být geneticky i fenotypově stabilní, funkční a neměly by vyvolávat imunitní odpověď. K tomu někdy dochází, i když jsou buňky autologní, protože abnormální genová exprese špatně reprogramovaných buněk může vyvolat T-buněčnou imunitní odpověď (vlastnost označovaná jako imunogenicita; viz např. Živa 2010, 3: 101–103). Proto by měla být imunogenicita ověřena před vlastní aplikací buněk pacientovi.

Mnoho studií je zaměřeno na diferenciaci iPSC buněk do nervových buněk. Z fibroblastů odvozené iPSC buňky mohou být diferencovány do prekursorů nervových buněk a poté do neuronů a glií (podpůrných buněk neuronů). Po experimentální transplantaci do mozkových komor vyvíjejícího se myšího mozku se tyto buňky přemístily do různých oblastí mozku a funkčně se tam zapojily.



U Parkinsonovy choroby (PD), jednoho z nejběžnějších neurodegenerativních onemocnění, dochází k úbytku dopaminergních neuronů v oblasti mozku nazývané substantia nigra („černá hmota“, podle tmavé barvy dopaminergních neuronů). Během této degenerace vznikají v buňkách Lewyho tělíska – inkluze tvořené α -synukleinem a dalšími proteiny. Krysí model PD může být připraven oboustranným nebo jednostranným poškozením této oblasti mozku. Výhoda jednostranného poškození spočívá v možnosti sledovat tzv. rotační chování (viz video na www.youtube.com/watch?v=00EOZJm2KoU). Protože je poškozená pouze jedna strana mozku, v odpovědi na stimulaci apomorfínem začne zvíře rotovat. Úspěšná terapie PD by měla tento projev omezit. Tímto způsobem se podařilo potvrdit úspěšné funkční začlenění transplantovaných dopaminergních neuronů odvozených z iPSC buněk do zvířecího mozku.

První klinické zkoušky buněčné terapie pomocí iPSC buněk byly zahájeny v r. 2014 v Japonsku. Výzkumnice z ústavu Riken Masayo Takahashi použila autologní iPSC buňky pro náhradu pigmentového epitelu sítnice (Retinal Pigmented Epithelium, RPE; viz obr. na 2. str. obálky) u 70leté pacientky trpící vlhkou formou makulární degenerace. Jde o chorobu sítnice, která se vyskytuje v pozdějším věku a je způsobena abnormální tvorbou nových cév. To vede k poškození buněk pigmentového epitelu sítnice, zkrácenému vidění nebo ztrátě ostroty zraku až k úplné slepotě. Z iPSC buněk odvozené RPE buňky vykazovaly nejen stejnou morfologii a funkci, ale i genovou expresi jako přirozené buňky. V podmínkách *in vitro* je snaha dosáhnout, aby se buňky co nejvíce podobaly nativním, ať už jde o kultivace buněk odvozených z iPSC buněk, nebo z primárních buněk (obr. 1). Po transplantaci byla pacientka jeden rok sledována a nebyly zaznamenány komplikace po chirurgickém zákroku ani jiné zásadní nepříznivé události. Dokonce došlo k lehkému zlepšení zraku. Během přípravy buněk pro druhého pacienta se ale v buňkách objevila mutace. Z obavy, že by v autologních buňkách mohla po transplantaci vést ke vzniku nádoru, byly klinické zkoušky pozastaveny. Nakonec bylo rozhodnuto, že je v tomto případě bezpečnější použít dárcovské (alogenní) buňky. Řešení sice znamená nutnost imunosuprese, ale zároveň může sloužit jako bezpečnostní pojistka. V případě vzniku nádoru by vysazení imunosuprese mělo umožnit imunitnímu systému pacienta vnesené buňky odstranit (blíže internetové odkazy na webu Živa).

Genetická korekce buněk před terapií

Proliferační a diferenciační potenciál iPSC buněk má velkou výhodu i pro genovou terapii. U geneticky způsobených chorob je možno pokusit se opravit poškození *in situ*, tedy přímo v buňkách postiženého organismu či tkáň. Proces je ale velmi komplikovaný kvůli nutnosti provést přes-

1 Primární buňky pigmentového epitelu sítnice (Retinal Pigmented Epithelium, RPE) kultivované *in vitro* (zvětšení 20 \times). Šipky ukazují na pigmentová zrna (melanin), která jsou typická pro pigmentový epitel sítnice. Foto K. Vodičková Kepková

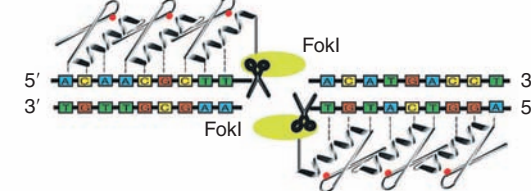
DNA sekvence



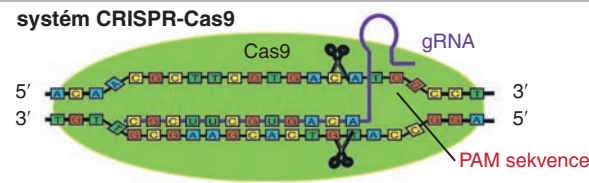
A TALE nukleázy



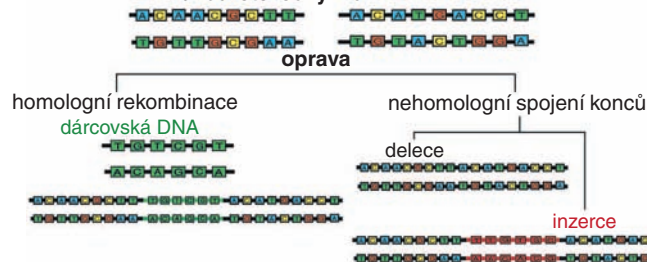
B nukleázy se zinkovými prsty



C systém CRISPR-Cas9



D dvouřetězcový zlom v DNA



2 Metody pro cílenou editaci genomu. A – TALE nukleázy (Transcription Activator-Like Effector Nucleases, TALENs) jsou proteiny rozeznávající cílovou sekvenci DNA pomocí domén, které specificky vážou jednotlivé nukleotidy. Navázaná nukleáza FokI pak DNA naštěpí. B – nukleázy se zinkovými prsty (Zinc Finger Nucleases, ZFNs) rozlišují DNA na podobném principu, ale oproti TALEN doménám každý zinkový prst rozpoznává trojici nukleotidů. Kombinací různých zinkových prstů lze opět specificky vázat a pomocí nukleázy FokI štěpit libovolnou sekvenci DNA. C – CRISPR-Cas9 systém využívá k identifikaci cílové sekvenční DNA řetězec „naváděcí“ RNA (guide, gRNA) s komplementární sekvencí nukleotidů k rozeznávání cíli. Pokud cílová DNA obsahuje hned vedle úseku rozpoznávaného gRNA tzv. PAM sekvenci (nejčastěji trinukleotid NGG), je rozštěpena nukleázou CAS9. D – všechny tři představené metody vyvolávají dvouřetězcový zlom v DNA (Double Strand Break, DSB). Ten je pak opraven buď vznikem nehomologního koncového spoje (Non-Homologous End Joining, NHEJ), nebo homologní rekombinací (Homologous Recombination, HR). NHEJ obvykle vede k vložení (inzerce), nebo ke ztrátě (deleci) krátké sekvenční v místě opraveného zlomu. HR používá jinou DNA jako vzor pro opravu zlomu. Tímto způsobem lze do přerušené sekvenční vložit požadovaný úsek DNA. Orig. K. Vodičková Kepková

nou opravu ve všech takto postižených buňkách a zároveň se vyhnout sekundárním genetickým poškozením. Další možnost představuje cílený zásah do genů *in vitro*, v iPS buňkách připravených pro daného pacienta. Tak jsme schopni vybrat a namnožit buňku, ve které zamýšlená oprava proběhla úspěšně. Získané opravené buňky mohou být diferencovány a transplantovány. Jako příklad uvádíme experimentální terapii Fanconiho anémie (FA), dědičného (autozomálně recesivního) onemocnění s mutací v genech *FANCA*. Autozomálně recesivní onemocnění jsou taková, která se projeví jen v případě poškození/mutace obou kopií genu. Proto k jejich opravě teoreticky stačí oprava nebo vnesení jedné funkční kopie genu. Mutace v genech *FANCA*

mají mnoho projevů a mohou způsobit rakovinu, nejčastěji ve formě akutní myeloidní leukémie. Pomocí lentivirového vektoru nesoucího gen *FANCA* nebo *FANCD2* se povedlo úspěšně opravit genetický defekt v iPS buňkách odvozených ze somatických buněk pacienta s FA. Buňky byly následně diferencovány do krevních kmenových buněk, které měly normální fenotyp bez projevů onemocnění. Tento typ genových manipulací s využitím lentivirových vektorů je ale značně rizikový. Vložená DNA s funkčním genem se do genomu zapojí víceméně náhodně a hrozí poškození nějakého důležitého genu s následky stejně vážnými jako cílené onemocnění (např. nádorový supresor p53). Výhodou provedení této opravy v iPS buňkách a ne přímo v pacientovi je možnost přesného určení místa, kde se gen začlenil. Pouze buňky s bezpečným místem začlenění a bez dalších poruch by pak byly použity k léčbě.

Nedávné pokroky v molekulární biologii přinesly několik metod k cílené editaci sekvenční DNA. Tyto metody, zahrnující TALE nukleázy (Transcription Activator-Like Effector Nucleases – TALENs, viz obr. 2A), nukleázy se zinkovými prsty (Zinc Finger Nucleases – ZFNs, obr. 2B) a CRISPR-Cas9 systémy (obr. 2C), slouží k vystřížení cíleného úseku DNA. Takto je buď gen vyřazen z funkce, nebo vystřížený úsek nahradíme opravenou sekvencí (o uvedených metodách také v Živě 2017, 2: 70–72 a XLIV–XLIX).

TALE nukleázy využívají upraveného bakteriálního proteinu TALE, který má schopnost vázat se k specifické sekvenci DNA. Oblast TALE proteinu zprostředkovávající vazbu k DNA se v proteinu opakuje a za specifitu rozpoznávané sekvenční zodpovídají zejména dvě aminokyseliny. Kombinováním těchto DNA vazebných oblastí, případně jejich úpravou lze připravit TALE protein, jenž váže jakoukoli požadovanou sekvenci a upravený TALE pak lze využít k dopravení endonukleázy FokI (enzymu, který štěpí DNA) na požadované místo. TALE protein spojený s FokI endonukleázou se označuje právě TALEN.

Na velmi podobném principu fungují i ZFN. Zde se proteinová část rozpoznávající DNA označuje jako zinkový prst (Zinc Finger, ZF), protože proteinový řetězec je zatočen do výběžku („prstu“), který zapadá do žlábků na šroubovici DNA, a tento výběžek je stabilizován přítomností iontů

zinku. Na rozdíl od TALE každý jednotlivý ZF rozpoznává trojici nukleotidů – triplet. Kombinací vybraných zinkových prstů lze dosáhnout vazby na požadovanou oblast DNA a takto připravené ZF se zkombinují s nukleázou, která DNA naštěpí.

Nejnovější a rychle se rozšiřující metodou editace DNA se stalo využití CRISPR-Cas9 systému. CRISPR je zkratkou pro „sdružené pravidelně rozložené krátké palindromické repetice“ (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Jde o krátké úseky DNA, které jsou základem obranného systému prokaryotických buněk proti virovým infekcím. Každý tento krátký úsek DNA představuje vzorek genetické informace viru, který někdy bakterii napadl. Tento vzorek umožní buňce rozpoznat virovou genetickou informaci, když se s ní znovu setká. Pomocí Cas (CRISPR associated system) nukleázy je pak genom viru naštěpen a tedy zneškodněn. Velká výhoda využití CRISPR-Cas9 systému pro editaci DNA spočívá ve skutečnosti, že rozpoznání cílové DNA je řízeno pomocí krátké RNA sekvenční (gRNA – guide RNA neboli „naváděcí“ RNA) odvozené z CRISPR DNA. Protože *in vitro* příprava nukleových kyselin o požadované sekvenci probíhá výrazně rychleji než příprava specifického proteinu, bývá editace DNA pomocí CRISPR-Cas9 většinou mnohem jednodušší než použití TALEN a ZFN. Nevýhodou může představovat větší riziko účinku na jinou než vybranou sekvenci.

U všech tří uvedených metod (TALENs, ZFNs, CRISPR-Cas9) výsledně vznikne dvouřetězcový zlom (Double Strand Break, DSB) v cílovém místě DNA. Protože poškození DNA znamená pro buňku nebezpečí, jsou DSB rychle identifikovány a opraveny jedním ze dvou způsobů. Při nehomologním spojení konců (Non-Homologous End Joining, NHEJ) jsou konce zlomené DNA spojeny s nejbližší dostupnou volnou DNA sekvencí, což vede obvykle k malé inzerce nebo deleci na 3' konci cílové sekvenční (obr. 2D). Postup může sloužit k vyřazení genu z funkce. Při homologní rekombinaci (Homologous Recombination, HR) je k opravě zlomu v DNA použita jako vzor identická neporušená sekvence. Toho lze využít k vnesení požadované informace do genomu. Zároveň s vyvoláním zlomu v požadovaném místě DNA pomocí CRISPR-Cas9 nebo jiné metody do buňky vložíme dlouhý úsek DNA identický s oběma stranami

zlomu. Uprostřed této identické oblasti pak je umístěna požadovaná změna. Buňka použije identické úseky k opravení zlomu a s nimi začlení i změněnou část.

Jedním z vrozených onemocnění, pro něž představuje genetická oprava velkou nadějí, je spinální svalová atrofie. Toto autozomálně recesivní onemocnění způsobuje mutace v genu *SMN1* (Survival of Motor Neuron 1, „přežití motorických neuronů“), která vede k degeneraci a odumírání motorických neuronů míchy nutných pro přenos signálů volných pohybů. Následkem jejich odumření dojde k úbytku svalové hmoty, ochrnutí dýchacích svalů a končí smrtí. Z fibroblastů pacienta se spinální svalovou atrofií byly připraveny iPS buňky a pomocí TALEN se v nich opravila mutace v genu *SMN1*. Opravené iPS buňky byly pak diferencovány *in vitro* do motorických neuronů (viz dále).

Většina případů Parkinsonovy choroby je sporadická, bez známé příčiny. Existují ale i familiární verze PD, způsobené např. dominantními mutacemi v α -synukleinu. Pomocí ZFN se podařilo tyto mutace opravit v liniích iPS buněk připravených z buněk pacientů s danou mutací. Opravené iPS buňky byly opět diferencovány *in vitro* do dopaminergních neuronů, tedy buněk, které při PD odumírají. Diferencované dopaminergní neurony nejevily známky exprese mutovaného α -synukleinu.

Pomocí CRISPR-Cas9 systému byla provedena genová korekce iPS buněk nesoucí delecii F508 v genu *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator). Tato mutace představuje jednu z hlavních příčin cystické fibrózy. Opravené iPS buňky byly diferencovány do zdravých buněk plicního epitelu, jedné z poškozených tkání.

Kombinace metod pro přípravu iPS buněk s metodami editace DNA se staly velmi rychle se vyvíjející oblastí výzkumu a výše uvedené příklady ukazují jen malý výběr z mnoha probíhajících projektů.

Rizika klinického využití iPS buněk

Všechny výše popsané možnosti využití iPS buněk v buněčných a genových terapiích jsou až na léčbu makulární degenerace (ve fázi klinických zkoušek) teprve v preklinickém stadiu. S klinickým využitím iPS buněk je totiž spojeno i mnoho rizik. Protože reprogramování buněk v iPSC je většinou provedeno vnesením transkripčních faktorů do genomu, hrozí poškození původní genetické informace buňky. Navíc některé z použitých transkripčních faktorů mohou působit jako onkogeny. Obě tyto skutečnosti mohou vést ke zhoubnému bujení. Tato rizika spolu s potenciálně bezpečnějšími strategiemi přípravy iPS buněk byla podrobně diskutována v prvním dílu seriálu. Proces reprogramování, namnožení buněk na potřebné množství a případně ještě genetické manipulace vyžadují dlouhodobou kultivaci *in vitro*, spojenou s dalšími riziky. Podmínky *in vitro* nejsou nikdy úplně stejné jako v živém organismu a buňky jsou tam vystaveny např. oxidativnímu stresu a dalším vlivům, které mohou vést k necílenému poškození DNA nebo epigenetické informace. Metody k ověření průběhu reprogramování a kvality připravených buněk byly popsány v druhém dílu seriálu. Cesta ke klinickému uplatnění iPS

buněk je proto ještě dlouhá a zatím mají větší uplatnění v aplikovaném lékařském výzkumu, zejména pro modelování onemocnění a vývoj léčiv.

Modely nemocí

Indukované pluripotentní buňky poskytují významný nástroj pro rozšíření našich znalostí o patofyziologii a molekulárních mechanismech vzácných a zatím neléčitelných chorob. Metoda přípravy iPS buněk umožňuje oproti ESC snadné získání vzácných genetických variant vedoucích k onemocnění. Somatické buňky jsou odebrány lidem s určitým onemocněním. Následně se reprogramují do iPS buněk a diferencují do specifických požadovaných buněk, např. u Parkinsonovy choroby do dopaminergních neuronů. Takto vytvořené specializované buňky poslouží k výzkumu v *in vitro* podmínkách. Kromě buněk nesoucích mutaci způsobující onemocnění musíme vždy mít také kontrolní zdravé buňky.

Alzheimerova choroba (AD), nejčastější neurodegenerativní onemocnění současnosti, se většinou rovněž objeví bez jasně identifikované příčiny. Známe však i geneticky podmíněné varianty AD, dané mutacemi v genech kódujících tři zásadní proteiny – amyloidový prekurzorový protein (APP), tau a presenilin. Tyto proteiny se podílejí na patogenezi také u sporadické AD. Studium mutovaných verzí způsobujících AD u svých nositelů je proto důležité pro objasnění mechanismu vzniku onemocnění. Pro všechny tyto mutace již byly vytvořeny iPS linie. Downův syndrom (DS), vyvolaný trizomií chromozomu 21 (vyskytuje se ve třech místo ve dvou kopiích u zdravých jedinců), se mimo jiné projevuje velice raným nástupem AD, pravděpodobně způsobeným zvýšenou expresí APP, jehož gen leží právě na chromozomu 21. Indukované pluripotentní buňky připravené z buněk dospělého pacienta s DS byly diferencovány do kortikálních neuronů. Tyto neurony sekretovaly APP, dále štěpený na patogenní amyloid- β 42, který tvořil uvnitř buněk i mimo ně nerozpustné toxické agregáty. U stejných buněk byla prokázána i nadměrná fosforylace proteinu tau uvnitř buněk a dendritů, jež vedla k buněčné smrti.

Testování léčiv *in vitro*

Linie iPS buněk mohou rovněž sloužit jako spolehlivý zdroj lidských buněk pro předběžné rychlé testování mnoha chemických látek. Cílem analýz je odhalit látky s případným biologickým účinkem. Ty se pak dále zkoumají a vybírají se z nich látky s potenciální léčebnou aplikací.

Při vývoji léčiv musí každá látka projít sérií testů, jež ověří její účinek na specifické onemocnění a případně nežádoucí působení a toxicitu. Prvním stadiem bývá většinou právě *in vitro* testování na buněčných kulturách, které je dobře kontrolovatelné a relativně levné. Hodnotí se přežívání buněk, jejich dělení nebo změny v buněčných funkcích a morfologii. Buňky mohou být sledovány i na molekulární úrovni, kdy lze podrobně charakterizovat vliv látky na transkripci a translaci (expresi genů a jejich překlad do proteinů). Nezanedbatelné uplatnění zdravých iPS buněk najdeme v obecných testech toxicity léků na buňky, stanovení bezpečné dávky a vedlejších účinků.

Zvolený typ buněk závisí na plánovaném využití testovaného léčiva. Linie lidských iPS buněk (human, hiPSC) ze zdravých jedinců mohou sloužit jako neomezený zdroj specifických buněk a nahradit částečně využití zvířecích modelů. V morfologii a fyziologii jsou mezi člověkem a zvířecími modely značné rozdíly. Např. myší kardiomyocyty mají až 10násobně rychlejší srdeční rytmus než člověk. Pro testování léků ovlivňujících srdeční rytmus jsou tak kardiomyocyty odvozené z hiPS buněk mnohem vhodnější. U nových léků určených k terapii neuropsychiatrických onemocnění (souhrnné označení pro nemoci centrální nervové soustavy vedoucí ke změnám chování a vnímání, od bipolární poruchy přes neurodegenerace jako Alzheimerova a Parkinsonova choroba, schizofrenii apod.) se také hojně využívají zdravé iPS buňky diferencované do neurálních buněk, na nichž se testuje aktivace příslušných signálních drah. Příkladem může být Wnt/ β -katenin signální dráha, která se podílí na regulaci neurogeneze a hraje roli např. u bipolární poruchy.

Pro některé testy lze také použít iPS buňky odvozené z pacientů pro dané onemocnění (viz modelování chorob výše). Tyto buňky jsou diferencovány do postižené buněčné populace a na ní se pak testuje terapeutický účinek.

Závěrem seriálu

Možná aplikace lidských iPS buněk v regenerativní medicíně závisí na mnoha okolnostech. Od výběru transkripčních faktorů pro reprogramování (snaha omezit použití onkogenů c-Myc a Klf4), přes výběr vhodné doručovací metody, hlavním cílem je vyvinout iPS buňky, které nemají trvalé změny v genotypu a fenotypu. O iPS buňkách toho víme mnoho, ale stále nemohou být a nejsou rovnocennou náhradou ESC. Musíme pokračovat v jejich studiu se zaměřením na vysvětlení molekulárních, epigenetických a funkčních rozdílů mezi indukovanými pluripotentními a embryonálními kmenovými buňkami. Dále je potřeba objasnit důvody variability iPS buněk mezi pacienty specifického onemocnění a variability mezi jednotlivými iPS buněčnými liniemi připravenými z buněk jednoho pacienta. Už teď ale výzkum iPS buněk přináší mnoho prakticky využitelných informací a zároveň posouvá naše celkové poznání biologických procesů. Jde zejména o studium molekulární patogeneze onemocnění, testování léčiv a možné využití genetických modifikací a buněčných terapií. Všechny tyto znalosti přispívají k budoucí bezpečné přímé aplikaci indukovaných pluripotentních buněk v regenerativní medicíně.

Tímto seriálem jsme chtěli ukázat, jak významný byl objev iPS buněk, který začal v r. 2006 v Japonsku pod vedením S. Yamaky, pro regenerativní medicínu. Věříme, že jsme vám podali základní přehled o buňkách s velkým potenciálem.

Výzkum financuje Národní program udržitelnosti Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (č. LO1609).

Doporučenou literaturu a internetové odkazy najdete na webové stránce Živý.