

Příloha č. 2

Komentář k experimentálním přístupům, které budou použity k dosažení vědeckovýzkumných cílů

1. *Transport nadbytečných lidských embryí z kliniky asistované reprodukce na pracoviště*

Pro transport nadbytečných lidských embryí bude použit kvalifikovaný přenosný inkubátor ICT-P (FALC Instruments) a médium pro manipulaci s lidskými embryi v normální atmosféře (Cook Medical), které je určené pro IVF (in vitro fertilizaci) a je opatřeno certifikátem. Zaměstnanci budou proškoleni tak, aby byl zajištěn bezpečný transport z centra asistované reprodukce na pracoviště.

Transport proběhne až po udělení informovaného souhlasu oběma dárci. Všichni dárci budou podrobeni testování na přítomnost nemocí, které by mohly být přeneseny po kontaktu s infikovanými embryi.

2. *Derivace linií lidských embryonálních kmenových buněk pro pre/klinické aplikace z nadbytečných lidských embryí*

Derivace linií lidských embryonálních kmenových buněk pro pre/klinické aplikace z nadbytečných lidských embryí bude prováděna v čistých prostorách s využitím mikromanipulátoru (Eppendorf), mikrokapilár (Microtech IVF) a médií určených pro IVF od výrobce Cook Medical.

Veškerá manipulace s nadbytečnými lidskými embryi bude prováděna až po udělení informovaného souhlasu oběma dárci.

Všechny materiály a pomůcky budou opatřeny certifikátem CE a budou určeny pro IVD (in vitro diagnostiku) nebo pro IVF. Všechny chemikálie a média budou zakoupeny v cGMP kvalitě nebo k nim bude provedeno testování kvality. Ke všem materiálům, pomůckám, chemikáliím a testování kvality bude veden záznam.

3. *Kultivace lidských embryonálních kmenových buněk pro pre/klinické aplikace in vitro*

Pro propagaci *in vitro* budou lidské embryonální kmenové buňky (dále jen hESC) pro pre/klinické aplikace kultivovány v čistých prostorách s mikrobiálním i částicovým monitoringem. Pro kultivaci budou používána media speciálně k těmto účelům deklarována jako např. médium NutriStem (Biological Industries). Jako podkladová vrstva budou sloužit např. methanolem fixované lidské mezenchymální kmenové buňky a fibroblasty, které budou za tímto účelem fixovány na pracovišti. Pro kultivace se mohou používat i jiné podkladové vrstvy k těmto účelům deklarované a certifikované jako např. Biolaminin 521 CTG (Biolamina). Ke kultivaci budou používány výhradně pomůcky a materiály (misky, lahvičky, pipety) k jednorázovému použití. Pasážování bude prováděno buď manuální desintegrací kolonií hESC ostrým nástrojem nebo desintegrací kolonií hESC pomocí roztoku EDTA. Kultivace hESC bude realizována ve výhradně k tomuto účelu vyčleněných laboratořích se speciálním režimem, čímž bude eliminováno riziko neoprávněného použití hESC.

Všechny materiály a pomůcky budou opatřeny certifikátem CE a budou určeny pro IVD (in vitro diagnostiku) nebo pro IVF. Všechny chemikálie a média budou zakoupeny

v cGMP kvalitě nebo k nim bude provedeno testování kvality dle platných SOP. Ke všem materiálům, pomůckám, chemikáliím a testování kvality bude veden záznam.

4. Kryokonzervace a kryoskladování lidských embryonálních kmenových buněk pro pre/klinické aplikace

Lidské embryonální kmenové buňky pro pre/klinické aplikace budou kryokonzervovány postupným/řízeným ochlazováním na teplotu tekutého dusíku buď ve zmrazovací nádobce (Nalgene Cryo 1°C freezing container). Kryokonzervace hESC bude prováděna v kryokonzervačních zkumavkách o objemu 2 ml v médiu obsahujícím vhodné kryokonzervanty (20% dimetylsufoxid, DMSO) nebo v kryoprezervačním médiu CryoStor® CS10 (Stemcell Technologies). Dále mohou být zamraženy způsobem vitrifikace.

Kryokonzervované buňky budou skladovány v kapalném dusíku v kriotanku umístěném v kryobance se zvláštním režimem. Způsob skladování je organizován tak, aby zajistil dostatečnou ochranu hESC před manipulací nedovolenými osobami.

Všechny materiály a pomůcky budou opatřeny certifikátem CE a budou určeny pro IVD (in vitro diagnostiku) nebo pro IVF. Všechny chemikálie a média budou zakoupeny v cGMP kvalitě nebo k nim bude provedeno testování kvality. Ke všem materiálům, pomůckám, chemikáliím a testování kvality bude veden záznam.

5. Kultivace lidských embryonálních kmenových buněk in vitro pro neklinické aplikace

Pro dlouhodobou propagaci *in vitro* budou lidské embryonální kmenové buňky (dále jen hESC) kultivovány v médiu mTESR™1 (Stemcell Technologies), NutriStem (Biological Industries) a dalších komerčně dostupných médiích určených ke kultivaci hESC. Jako substrát budou sloužit methanolem fixované lidské mezenchymální kmenové buňky a fibroblasty, které budou za tímto účelem fixovány na pracovišti a také komerčně prodávané substráty jako Matrigel (Corning), Vitronectin XF™ (Stemcell Technologies), Fibronectin (Merck). Ke kultivaci budou používány výhradně pomůcky a materiály (misky, lahvičky, pipety) k jednorázovému použití. Pasážování bude prováděno buď manuální desintegrací kolonií hESC ostrým nástrojem nebo desintegrací kolonií hESC enzymem kolagenázou či pomocí roztoku EDTA. Kultivace hESC bude realizována ve výhradně k tomuto účelu vyčleněných laboratořích se speciálním režimem, čímž bude eliminováno riziko neoprávněného použití hESC.

6. Kryokonzervace a kryoskladování lidských embryonálních kmenových buněk

Lidské embryonální kmenové buňky budou kryokonzervovány postupným/řízeným ochlazováním na teplotu tekutého dusíku buď ve zmrazovací nádobce (Nalgene Cryo 1°C freezing container) nebo pomocí počítačem řízeného zmrazovacího zařízení (ICE cube Computer Controlled Rate Freezer 14S, SY-LAB). Kryokonzervace hESC bude prováděna v kryokonzervačních zkumavkách o objemu 2 ml v médiu obsahujícím vhodné kryokonzervanty (20% dimetylsufoxid, DMSO). Kryokonzervované buňky budou skladovány v kapalném dusíku v kriotanku umístěném v kryobance se zvláštním režimem. Způsob skladování je organizován tak, aby zajistil dostatečnou ochranu hESC před manipulací nedovolenými osobami.

7. *Analýza exprese genů na úrovni RNA a proteinů*

Ke studiu exprese genů v hESC na úrovni mRNA budou využívány techniky RT-PCR, buď semikvantitativní, nebo kvantitativní (Real Time PCR). RNA bude z buněk izolována po jejich lýze vhodným činidlem pomocí komerčně dostupných kitů (např. firmy Qiagen). K analýze exprese proteinů budou využívány imunologické techniky využívající specifické protilátky proti studovaným proteinům: Western blot analýza, imunoprecipitace (IP) a imunofluorescence (IF). Pro potřeby Western blot a IP analýz budou hESC lyzovány vhodným činidlem (pufrem) a lyzáty pak budou dále zpracovány standardním způsobem. Pro IF analýzy budou hESC fixovány/usmrceny buď aldehydickým (paraformaldehyd) či alkoholickým (etanol, metanol) fixativem a dále zpracovány standardním způsobem. Ve všech případech se jedná o standardní techniky analýzy neživých buněk nebo jejich komponent, které nepředstavují žádné riziko z hlediska možného zneužití hESC.

8. *Analýza průtokovou cytometrií*

Průtoková cytometrie (FACS analýza) bude používána k analýze proliferačních vlastností hESC (parametry buněčného cyklu) a k fenotypizaci hESC pomocí markerů typických pro nediferencované a diferencující se hESC. Pro zjištění parametrů buněčného cyklu budou buňky metabolicky značeny bromodeoxyuridem (BrdU), převedeny do suspenze, fixovány etanolem a inkorporovaný BrdU bude vizualizován anti-BrdU protilátkou. Takto označené buňky pak budou analyzovány průtokovou cytometrií standardním způsobem. Pro fenotypizaci budou hESC převedeny do suspenze, fixovány vhodným fixativem a značeny na požadované markery odpovídajícími protilátkami. Označené buňky budou analyzovány průtokovou cytometrií standardním způsobem. Pracoviště žadatele je vybaveno požadovaným technickým zařízením pro cytometrickou analýzu, což vylučuje nutnost transportu hESC mimo prostory podléhající speciálnímu režimu pro práci s hESC.

9. *Analýza ultrastruktury lidských embryonálních kmenových buněk pomocí elektronové mikroskopie*

Pro analýzu ultrastruktury budou hESC adherované na kultivační podložce fixovány glutaraldehydem a dále zpracovány standardním způsobem pro elektronovou mikroskopii. Elektronová mikroskopie bude využívána také ve formátu umožňujícím vizualizaci specifických molekul/proteinů, který je založen na detekci daných molekul specifickými protilátkami. Obě varianty elektronmikroskopické analýzy jsou z principu realizovány na fixovaných/neživých hESC a nepředstavují proto žádné riziko z pohledu možného zneužití hESC.

10. *Cytogenetická analýza lidských embryonálních kmenových buněk*

Cytogenetická analýza (analýza karyotypu) představuje jednu z klíčových a zcela nezbytných součástí rutinní charakterizace hESC dlouhodobě propagovaných in vitro. Za účelem cytogenetické analýzy budou rostoucí nediferencované hESC ošetřeny kolchicinem (mitotický blok) a následně fixovány. Suspenze fixovaných/hESC pak budou aplikovány na podložní skla a kondenzované chromosomy budou vizualizovány standardní technikou G pruhování. Hodnocení karyotypu (počtu a integrity chromosomů) bude prováděno akreditovaným specialistou. Cytogenetická analýza je standardní

technika, která je realizována na fixovaných/neživých buňkách a nepředstavuje tak žádné riziko z hlediska možného zneužití hESC.

externě?

11. Analýza sekvencí DNA vybraných genů

Analýza sekvencí vybraných genů je součástí studia (odhalování) genetických změn, k nimž dochází během propagace hESC v podmínkách in vitro. Tyto genetické změny mohou být součástí adaptace hESC na kultivační podmínky, která se projevuje mnoha různými modifikacemi ve fenotypu hESC. Kódující sekvence vybraných genů budou získány sekvenováním odpovídajících cDNA získaných reverzní transkripcí mRNA. RNA bude z buněk izolována po jejich lýze vhodným činidlem pomocí komerčně dostupných kitů (např. firmy Qiagen). Tento přístup využívá standardních technik analýzy RNA/DNA a nepředstavuje žádné riziko z pohledu možného zneužití.

12. Analýza aktivity buněčných enzymů.

Aktivita enzymů nacházejících se v lidských embryonálních kmenových buňkách, např. enzym alkalická fosfatáza, slouží jako ukazatel pluripotence a může sloužit k lepšímu pochopení vnitřních dějů, které v lidských embryonálních kmenových buňkách probíhají. Stanovení aktivity enzymů bude provedeno pomocí kitů (např. firmy Merck).

13. Genetické modifikace lidských embryonálních kmenových buněk

Genetické modifikace představují zcela nezbytný přístup k odhalení molekulárních mechanismů zodpovědných za unikátní vlastnosti hESC (sebeobnova, schopnost diferenciací). Tyto modifikace budou zahrnovat eliminace exprese/funkce genů homologní rekombinací, snížení exprese genů technologiemi siRNA a shRNA, zvýšení exprese genů, expresi geneticky upravených genů a expresi reportérových genů za pomoci technologie CRISPR/CAS. V současné době jsou tyto technologie rutinně používány ke genetické modifikaci mnoha typů lidských buněk (normálních i nádorově transformovaných) a nebyly nikdy shledány rizikovými z pohledu introdukce genetických modifikací/abnormalit do lidské populace. Toto platí také pro geneticky modifikované hESC.

14. Indukce diferenciací lidských embryonálních kmenových buněk chemickými sloučeninami, růstovými faktory, kokultivací s buňkami jiného typu a jinou modifikací kultivačních podmínek

Jedním z klíčových předpokladů pro klinickomedicínské použití hESC je vyvinutí technologií umožňujících regulovanou diferenciaci hESC do různých typů dospělých funkčních buněk. Tyto technologie jsou proto v současnosti vyvíjeny v mnoha laboratořích na celém světě jako součást obsáhlého prepre/klinického výzkumu biologie hESC. Obecně vývoj těchto technologií stojí na in vitro kultivaci hESC spojené s působením biologických, fyzikálních či chemických faktorů, které, vzhledem k jejich četnosti nelze předem jednoznačně definovat. Analýzy diferencujících se hESC buněk budou nevyhnutně zahrnovat in vitro analýzy jejich molekulárního fenotypu (proteiny, mRNA) a analýzu jejich chování in vivo po implantaci experimentálním zvířatům, tak jak jsou popsány v ostatních paragrafech tohoto komentáře.

15. Externí analýza biologického materiálu

Poskytování vzorků imortalizovaných lidských embryonálních kmenových buněk externím subjektům pro analýzy karyotypů. Poskytování vyizolované DNA z lidských embryonálních kmenových buněk pro analýzy mikrosatelitní DNA pomocí metody PCR, stanovení přítomnosti virů v genomu pomocí analýzy DNA a stanovení krevní skupiny a HLA analýzou DNA. Poskytování vzorků kultivačního média, které přišlo do styku s lidskými embryonálními kmenovými buňkami při kultivaci, pro stanovení přítomnosti mykoplazmat, stanovení sterility a stanovení hladiny endotoxinů. Živé buňky které musí být dále analyzovány, budou poskytnuty jen na pracoviště s povolením pro práci s hESCC.

Reference uvedené v textu:

- Ben-Hur T., Idelson M., Khaner H., Pera M., Reinhartz E., Itzik A., Reubinoff B. E., 2004, Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats. *Stem Cells*. 22(7):1246-55.
- Nistor G. I., Totoiu M. O., Haque N., Carpenter M. K., Keirstead H. S., 2005, Human Embryonic Stem Cells Differentiate into Oligodendrocytes in High Purity and Myelinate After Spinal Cord Transplantation. *Glia* 49:385–396.
- Lerou P. H., Daley G. O., 2005, Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Reviews* 19:321–331.
- Oh S. K., Kim H. S., Park Y. B., Seol H. W., Kim Y. Y., Cho M. S., Ku S. Y., Choi Y. M., Kim D-W, Moon S. Y., 2005, Methods for expansion of human embryonic stem cells., *Stem Cells*. May;23(5):605-9.
- Reubinoff B. E., Pera M. F., Fong C-Y., Trounson A., Bongs A., 2000, Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotech.* 18:399-404.
- Cheng L., Hammond Y., Ye Z., Zhan X., Dravid G., 2003, Human adult marrow stem cells support prolonged expansion of hESCs in culture. *Stem Cells* 21:131-142.
- Itsykson P., Ilouz N., Turetsky T., Goldstein R. S., Pera M. F., Fishbein I., Segal M., Reubinoff B. E., 2005, Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin. *Mol Cell Neurosci.* 30:24-36.
- Matulka K., Lin H. H., Hribkova H., Uwanogho D., Dvorak P., Sun Y. M., PTP1B Is an Effector of Activin Signaling and Regulates Neural Specification of Embryonic Stem Cells., *CELL STEM CELL* 2013, Volume: 13, Issue: 6, Pages: 706-719.
- Pesl M., Acimovic I., Pribyl J., Hezova R., Vilotic A., Fauconnier J., Vrbsky J., Kruzliak P., Skladal P., Kara T., Rotrekl V., Lacampagne A., Dvorak P. Meli A. C., Forced aggregation and defined factors allow highly uniform-sized embryoid bodies and functional cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells., *HEART AND VESSELS* 2014, volume: 29, Issue: 6, Pages: 834-846.
- Jendelová P., Herynek V., Urdzíkova L., Glogarová K., Kroupová J., Bryja V., Andersson B., Burian M., Hájek M., Syková E., 2004, Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J. Neurosci. Res.* 76:232-243.

O'Brien CA1, Pollett A, Gallinger S, Dick JE., A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice., *Nature*. 2007 Jan 4;445(7123):106-10.