

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-14-0348**

Príprava špecifických protilátok pre izoláciu hematopoietických kmeňových buniek kráľika pre vytvorenie banky kmeňových buniek

Zodpovedný riešiteľ **Ing. Jaromír Vašíček, PhD.**

Príjemca **Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum - Výskumný ústav živočíšnej výroby Nitra**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Výskumný ústav živočíšnej výroby Nitra
Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Tumor Microenvironment Laboratory, Drug & Target Screening Unit (DTSU),
Comprehensive Cancer Center, Medical University of Vienna, Rakúsko

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

Patenty a úžitkové vzory sú v štádiu prípravy, vzhľadom na stále prebiehajúcu prípravu nových CD34 monoklonálnych protilátok.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

AAA – Vedecké monografie v zahraničných vydavateľstvách

Chrenek P., Pivko J., Makarevič A., Kubovičová E., Olexiková L., Vašíček J., Kuželová L., Dragin S.: Ultrastructure of rabbit gametes and stem cells, University of Novi Sad, Serbia, 1. ed. Novi Sad : Faculty of Agriculture, 2017, 79 p, ISBN 978-86-7520-401-5, AH: 7,00.

AAB – Vedecké monografie v domácich vydavateľstvách

Chrenek P., Pivko J., Makarevič A., Kubovičová E., Olexiková L., Vašíček J., Kuželová L.: Ultraštruktúra pohlavných a kmeňových buniek kráľika. Vedecká monografia, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 1. vyd., 2017, p. 97, ISBN 978-80-552-1692-8, AH: 8,69.

ADC - Vedecké práce v zahraničných karentovaných časopisoch

Kovac M., Vasicek J., Kulikova B., Olexikova L., Balazi A., Chrenek P.: Different RNA and protein expression of surface markers in rabbit amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. Biotechnology Progress, 33, 2017, 1601-1613.

Vašíček J., Shehata M., Schnabl S., Hilgarth M., Hubmann R., Jäger U., Bauer M., Chrenek P. Critical assessment of the efficiency of CD34 and CD133 antibodies for enrichment of rabbit hematopoietic stem cells. Biotechnology Progress, 34, 2018, 1278-1289.

ADE - Vedecké práce v zahraničných nekarentovaných časopisoch

Vašíček J., Baláži A., Parkányi V., Bauer M. (2018). Different MACS sorting strategies for the enrichment of Lin- (CD34+CD45-) hematopoietic progenitor cells: preliminary study. Annales Universitatis Paedagogicae Cracoviensis Studia Naturae, 3(supplement):83–89.

DOI: 10.24917/25438832.3supp.11

ADF - Vedecké práce v domácich nekontrovaných časopisoch

Tomková M., Kulíková B., Baláží A., Vašíček J., Chrenek P.: Comparison of rabbit endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells: Cytogenetic approach. *Slovak J. Anim. Sci.*, 50, (2), 2017, 73-76.

ADM - Vedecké práce v zahraničných časopisoch registrovaných v databázach Web of Science alebo SCOPUS

Kovac M., Vasicek J., Kulikova B., Bauer M., Curlej. J., Balazi A., Chrenek P.: Phenotype and ultrastructure of stem cells derived from amniotic fluid of Nitra rabbit. *Journal of Central European Agriculture*, 18, (1), 2017, 226–234.

AEC - Vedecké práce v zahraničných recenzovaných vedeckých zborníkoch

Vašíček J., Baláží A., Kulíková B., Bauer M., Chrenek P.: Characterization of rabbit blood-derived endothelial progenitor cells. *Animal Physiology 2016 – Proceedings of International Conference [elektronický zdroj]*, Bořetice, jún 2016, ISBN 978-80-7509-416-2, 282-291.

Vašíček J., Baláží A., Chrenek P.: Flow cytometric evaluation of different passages of rabbit endothelial cells. *Proceedings of the International Symposium on Animal Science 2017*, Herceg Novi, June 2017, ISBN 978-86-7520-403-9, 122-129.

AED - Vedecké práce v domácich recenzovaných vedeckých zborníkoch

Chrenek P., Kubovičová E., Vašíček J., Makarevič A., Bulla J., Rafay J.: Využitie králikov v biotechnologickom výskume na VÚŽV Nitra. *Zborník vedeckých a odborných prác: 50 rokov genetiky a experimentálnej biológie vo VÚŽV Nitra*, VÚŽV Nitra, Máj 2018, ISBN 978-80-89162-68-0, 33-36.

AFG - Abstrakty príspevkov zo zahraničných konferencií

Vašíček J., Baláží A., Chrenek P.: Crossreactivity of different CD34 antibodies to rabbit and human cells. *International Conference Analytical Cytometry IX – Book of Abstracts*, Praha, October 2017, ISBN 978-80-88214-06-9, 143-144.

Vašíček J., Baláží A., Bauer M., Chrenek P.: Unknown CD34+CD45- cell population observed in rabbit PBMCs and BMSCs by newly produced anti-rabbit CD34 monoclonal antibodies. *CYTO 2018 – 33rd Congress of the International Society for Advancement of Cytometry (Abstract Book)*, Praha, April-May 2018, 233.

Vašíček J., Baláží A., Kulíková B., Olexiková L., Makarevič A., Chrenek P.: Multi-microscopic analysis of rabbit blood-derived endothelial progenitor cells designated for the preservation in stem cell bank. *Mikroskopie 2018 – Konferencia ČSMS (Zborník abstraktov)*, Lednice na Morave, May 2018, 56.

Vašíček J., Baláží A., Bauer M., Chrenek P.: Changes in the relative expression of selected markers during the culture of rabbit endothelial progenitor cells. *Book of abstracts “The International Symposium on Animal Science (ISAS) 2019*, Herceg Novi, Montenegro, jún 2019, 16, ISBN 978-86-7520-467-1.

Vašíček J., Baláží A., Svoradová A., Tomková M., Makarevič A. V., Chrenek P.: Application of Aldefluor assay for the microscopic assessment of rabbit stem and progenitor cells. *Proceedings of the conference „Microscopy 2019“*, Lednice, Czech Republic, máj 2019, 92.

AFH - Abstrakty príspevkov z domácich konferencií

Vašíček J., Bauer M., Baláží A., Chrenek P.: Expression of CD34 in different passages of rabbit endothelial progenitor cells. *Animal Physiology 2017 – Proceedings of International Conference*, Stará Lesná, jún 2017, ISBN 978-80-971428-4-1, p.81.

Vašíček J., Baláží A., Bauer M., Chrenek P.: New CD34 antibody sub-clones for the hematopoietic stem cells phenotyping in the rabbit blood and bone marrow. *Slovak J. Anim. Sci.*, 50, (4), (Special issue on 5th International Scientific Conference “Animal Biotechnology”) 2017, 174.

Vašíček J., Baláží A., Bauer M., Chrenek P.: Evaluation of novel antibodies raised against the rabbit CD34 synthetic peptide (G1SJT2). *Slovak J. Anim. Sci.*, 51, (4), (Special issue on 6th International Scientific Conference “Animal Biotechnology”) 2018, 177.

Vašíček J., Tomková M., Svoradová A., Baláží A., Chrenek P.: Expression of aldehyde dehydrogenase in rabbit adipose-derived mesenchymal stem cells. *Book of abstracts “Animal Physiology 2019*, Vyhne, máj 2019, 65, ISBN 978-80-552-1998-1.

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky projektu môžu byť resp. sú uplatniteľné pre základné poznanie ako aj v praxi vo forme nových poznatkov o preskúmaných králičích endotelových progenitorových bunkách

pochádzajúcich z krvi a kostnej drene ako aj samotné kryouchovávanie týchto buniek z domácich plemien králikov (Nitriansky a Zoborský králik) vo forme živočíšnych genetických zdrojov. Okrem toho je možné doteraz pripravené a ako aj ďalšie pripravované CD34 monoklonálne protilátky využiť pre identifikáciu a prípadnú izoláciu králičích hematopoiетických kmeňových buniek ako aj pre ďalší biomedicínsky výskum v oblasti hematopoiетických ochorení.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Hlavným cieľom riešeného projektu bolo overiť resp. získať vhodné CD34 protilátky pre identifikáciu a následnú izoláciu králičích hematopoiетických kmeňových a progenitorových buniek (HSCs a HPCs). Z hľadiska nedostupnosti CD34 protilátok špecifickým voči králikovi bola na vzorkách ľudskej a králičej krvi a králičej kostnej drene testovaná väčšina v tom čase dostupných komerčných monoklonálnych aj polyklonálnych protilátok s rôznou afinitou voči ľudskému, reps. myšiemu a potkaniu CD34 proteínu. Z uvedených analýz boli vybrané 2 klony protilátok (AC136 a Qbend-10), ktoré vykazovali najlepšiu afinitu k testovaným vzorkám. Tieto klony boli následne použité pre nepriamu magnetickú separáciu CD34 pozitívnych buniek (HSCs a HPCs) z ľudskej a králičej krvi. Hodnotenie úspešnosti separácií pomocou prietokovej cytometrie a PCR analýz bohužiaľ poukázali na nevhodnosť využitia týchto klonov pre izoláciu králičích HSCs a HPCs, kvôli zvýšeniu počtu mŕtvych buniek a zároveň nízkemu obohateniu CD34+ buniek v pozitívne separovaných frakciách v porovnaní s ľudskými vzorkami. Tento jav bol najskôr spôsobený slabou špecifitou daných protilátok voči králičiemu CD34 proteínu. Z tohto dôvodu bolo nutné pripraviť nové monoklonálne protilátky s vysokou afinitou voči králičiemu CD34 proteínu. Keďže králičie HSCs a HPCs exprimujúce CD34 neboli priamo izolovateľné resp. získateľné ako imunogén pre prípravu nových protilátok, v rámci spolupráce s Neuroimunologickým ústavom SAV v Bratislave boli navrhnuté 2 syntetické peptidy dostatočne imunogénne pre imunizáciu myší a prípravu monoklonálnych protilátok hybridómovou technológiou. Zo získaných monoklonálnych protilátok boli vytypované viaceré vhodné subizotypy, ktoré detegujú zatiaľ neznámu populáciu CD34+ buniek v rámci králičej krvi a kostnej drene. Zároveň sú v štádiu prípravy ďalšie protilátky voči iným 2 syntetickým peptidom ako aj voči rekombinantnému králičiemu CD34 proteínu exprimovaného v E. coli. Okrem pripravovaných protilátok bolo vhodné nájsť populáciu králičích buniek inú ako HSCs a HPCs, ktorá by aspoň čiastočne exprimovala CD34 a slúžila ako kontrola pre pripravované protilátky. Je známe, že ľudské endotelové bunky (ECs) exprimujú CD34. Keďže CD34 proteín je evolučne konzervovaný u cicavcov, vznikol predpoklad, že aj králičie ECs by mohli exprimovať CD34. Z tohto dôvodu bola optimalizovaná metodika pre izoláciu progenitorových ECs z králičej krvi a kostnej drene. Expresia CD34 u týchto buniek bola overená pomocou už spomínaných dostupných komerčných CD34 protilátok. Prietoková cytometria však neodhalila zvýšenú expresiu CD34, čo môže byť spôsobené už spomínanou nízkou afinitou daných protilátok voči králikovi. Zároveň však PCR analýza týchto buniek poukázala na klesajúcu expresiu CD34 s následnou pasážou. Rovnako tak to bolo pozorované u ľudských ECs, kedy pasážovanie buniek znižovalo expresiu CD34. Z tohto hľadiska teda králičie ECs nie sú najvhodnejšou bunkovou populáciou pre testovanie novo pripravovaných CD34 protilátok. Napriek tomu predstavujú tieto bunky ďalší potencionálny zdroj génovej rezervy domácich plemien králika. Kvôli tomu boli králičie ECs z oboch biologických zdrojov dôkladne preskúmané z hľadiska fenotypu a morfológie pomocou prietokovej cytometrie, PCR analýz a mikroskopických techník. Analýzy odhalili typický tvar a fenotyp endotelových buniek ako aj viaceré znaky kmeňových buniek ako je expresia SSEA-4, MSCA-1 a aldehyd dehydrogenázy (ALDH). Vo všeobecnosti sa zdá byť ALDH vhodným spoločným markerom pre rôzne typy králičích kmeňových a progenitorových buniek. Okrem spomínaných analýz bola optimalizovaná metodika obohatenia CD34+ buniek v krvi a kostnej dreni králika pomocou odstránenia zreých CD45+ hematopoiетických buniek. Vyseparované bunky boli následne úspešne proliferované v špeciálnom médiu pre expanziu CD34+ buniek. Po 2-dňovej kultivácii sa výrazne zvýšila expresia CD34 a zároveň znížila expresia CD45. Okrem toho vykazovali CD34 obohatené bunky zvýšenú expresiu CD117 (marker ľudských a myších hematopoiетických kmeňových buniek). V konečnom dôsledku, riešený projekt priniesol nové poznatky z hľadiska izolácie a kultivácie králičích HSCs, HPCs a ECs ako aj nové funkčné králičie CD34 protilátky. Zároveň boli vďaka projektu ECs bunky získané z

domácich plemien králikov (Zoborský a Nitriansky) zamrazené a uskladnené v génovej banke živočíšnych genetických zdrojov.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The main aim of the project was to test or obtain CD34 antibodies suitable for the identification and subsequent isolation of the rabbit hematopoietic stem and progenitor cells (HSCs and HPCs). Since there were no available antibodies that are specific to rabbit CD34, the majority of commercially available CD34 monoclonal and polyclonal antibodies with different affinity to human, mouse or rat were tested on the rabbit blood and bone marrow samples. The analyses revealed two antibody clones (AC136 and Qbend-10) that showed higher affinity to tested samples. Those clones were then used for the indirect magnetic separation of CD34 positive cells (HSCs and HPCs) from human and rabbit blood and rabbit bone marrow. However, the efficiency of separation evaluated by flow cytometry and PCR analyses demonstrated that used clones are not suitable for the isolation of rabbit HSCs and HPCs, due to the increased proportion of dead cells and low enrichment of CD34+ cells in positive fractions in comparison to the human samples. This might be caused by the low specificity of used antibodies for rabbit CD34 protein. For this reason, it was necessary to generate novel monoclonal antibodies with higher affinity to rabbit CD34. Because the rabbit HSCs and HPCs that should express CD34 were not directly available as the immunogen for the antibody generation, two synthetic CD34 peptides were designed in collaboration with the Institute of Neuroimmunology SAS in Bratislava that were immunogenic enough for the immunization of mice and the antibody generation using hybridoma technology. Several appropriate subisotypes that detect unknown CD34+ cell population within rabbit blood and bone marrow were chosen from the raised antibodies. Furthermore, next antibodies against other two synthetic CD34 peptides and against rabbit recombinant CD34 expressed in *E. coli* are still in production. Besides the antibody generation, it was desired to obtain some rabbit cell population other than HSCs and HPCs that at least partially express CD34 and could be used as control sample for the generated antibodies. It is known that human endothelial cells (ECs) express CD34. As CD34 protein is conserved among mammalian species, it can be assumed that also rabbit ECs might express CD34. For this reason, a new methodology for the isolation of progenitor ECs from rabbit blood and bone marrow was optimized. Expression of CD34 by these cells were assessed by above mentioned commercially available CD34 antibodies. However, flow cytometry did not reveal higher CD34 expression that could be caused by the low specificity of used antibodies for rabbit cells. Anyway, also PCR analysis showed decreasing expression of CD34 with the following passage. The same was noticed in human ECs, when the cell passaging decreased CD34 expression by those cells. Thus, rabbit ECs seem not to be an appropriate sample for the testing of new generated CD34 antibodies. Despite that, these cells present another source of genetic resources of domestic rabbit breeds. Therefore, rabbit ECs from both biological sources were thoroughly studied in terms of their phenotype and morphology using flow cytometry, PCR analyse and microscopic techniques. Those analyses revealed typical endothelial shape and phenotype as well as other stem cell features such as expression of SSEA-4, MSCA-1 and aldehyde dehydrogenase (ALDH). In general, ALDH seems to a suitable mutual marker for different types of rabbit stem and progenitor cells. Besides the mentioned studies, a new methodology for the enrichment of CD34+ cells via the elimination of mature CD45+ hematopoietic cells from rabbit blood and bone marrow was optimized. Separated cells were successfully proliferated in special medium for the expansion of CD34+ cells. Significant increase of CD34 expression and decrease of CD45 expression was noticed after 2 days of culture. Moreover, these CD34 enriched cells showed higher expression of CD117 (marker of human and mice hematopoietic stem and progenitor cells). At last, this project brought novel knowledge about the isolation and culture of rabbit HSCs, HPCs and ECs as well as new working anti-rabbit CD34 antibodies. Moreover, ECs obtained from domestic rabbit breeds (Zobor and Nitra rabbit) were frozen and stored in the gene bank of animal genetic resources due to this project.