



Závěrečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-17-0037**

Vývoj nových in vitro modelov pre amyotrofickú laterálnu sklerózu a testovanie bezpečnosti neurálnych prekursorov odvodených z ľudských indukovaných pluripotentných kmeňových buniek

Zodpovedný riešiteľ **Ing. Ján Strnád, PhD.**

Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave - Jesseniova lekárska fakulta v Martine**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Laboratórium prietokovej cytometrie, fenotypizácie buniek a tkanivového inžinierstva (<https://www.biomedmartin.sk/en/laboratory-of-flow-cytometry-cell-phenotyping-and-engineering/>)

Martinské centrum pre biomedicínu,
Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Univerzita Komenského v Bratislave

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Ústav živočíšnej fyziológie a genetiky, vvi AV ČR v Liběchově, Česká Republika

Laboratoř buněčné regenerace a plasticity

(<https://www.iapg.cas.cz/cs/laboratore/lab-bunecne-regenerace-a-plasticity/lide/>)

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

European Patent Application No. 19218710.2

Title: "3D MESH"

Applicant: Comenius University in Bratislava

Your Ref.: Mesh-Plate

Our Ref.: CUB16881EP

Link:

<https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/069061077/publication/EP3839033A1?q=strnadel%20MESH>

Patentované v spolupráci s EU patentovou kanceláriou Schiweck Weinzierl Koch

Patentanwälte Partnerschaft mbB, Ganghoferstr. 68B 80339 München.

(Patent predstavuje návrh zariadenia, umožňujúceho ľahkú výmenu média a mikroskopovanie štruktúr, rastúcich v 3D prostredí na platničke. Podnet k tomuto patentu dali problémy, spojené s 3D kultiváciou tzv. embryoid bodies pri príprave neurálnych prekursorov z iPSc buniek, ako aj problémy spojené s 3D kultiváciou nádorových sféroidov.)

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

PUBLIKÁCIE, KTORÉ VZNIKLI V RÁMCI PROJEKTU

(1) Strnadel, J., Zahumenska, R., Nosal, V., Smolar, M., Marcinek, J., Kalman, M., Juhas, S., Juhasova, J., Studenovska, H., Dumortier, H., Chromec, T., Skovierova, H., Mitruskova, B., Kapralik, I., Mersakova, S., Brany, D., & Halasova, E. (2020). Generation of ORIONi001-A induced pluripotent stem cell line for in vitro modeling of sporadic form of amyotrophic lateral sclerosis. *Stem cell research*, 48, 101981. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.10198> (IF=4,489)

(2) Strnadel, J., Dumortier, H. M., Hajduchova, D., Zahumenska, R., Nosal, V., Smolar, M., Marcinek, J., Kalman, M., Mersakova, S., Brany, D., Juhas, S., Juhasova, J., Studenovska, H., Mitruskova, B., Suroviakova, S., Novakova, S., Skovierova, H., Kurca, E., Pecova, R., Plank, L., ... Halasova, E. (2022). In vitro modeling of amyotrophic lateral sclerosis with induced pluripotent stem cell technology-derived cell line ORIONi002-A. *Stem cell research*, 63, 102870. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2022.102870> (IF=1,587)

(3) Zahumenska, R., Nosal, V., Smolar, M., Okajcekova, T., Skovierova, H., Strnadel, J., & Halasova, E. (2020). Induced Pluripotency: A Powerful Tool for In Vitro Modeling. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 8910. <https://doi.org/10.3390/ijms21238910> (CC, IF=4,556)

(4) Kertys, M., Grendar, M., Horak, V., Zidekova, N., Kupcova Skalnikova, H., Mokry, J., Halasova, E., & Strnadel, J. (2021). Metabolomic characterisation of progression and spontaneous regression of melanoma in the melanoma-bearing Libečov minipig model. *Melanoma Research*, 31(2), 140–151. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000722> (IF=3,199)

(5) Zahumenska, R., Kalman, M., Marcinek, J., Mersakova, S., Kertys, M., Pindura, M., Palkoci, B., Kycina, R., Vojtko, M., Chromec, T., Dumortier, H. M., Skovierova, H., Novakova, S., Mitruskova, B., Kapralik, I., Loderer, D., Grendar, M., Brany, D., Mokry, J., Bouvet, M., ... Strnadel, J. (2022). Establishment of PANDA - a new human pancreatic ductal adenocarcinoma cell line with 3D cell culture technology. *Neoplasma*, 69(1), 165–173. https://doi.org/10.4149/neo_2021_210924N1360 (IF=2,575)

(6) Strnádél J., Záhumenská R., Hajdúchová D., et al.(2020). Indukovaná pluripotencia v in vitro modelovaní chorôb a regeneratívnej medicíny. *Bioprojekt* 30 (4), 50-52. http://bts.vscht.cz/sites/default/files/Bioprojekt_c.4_1.pdf

(7) Strnádél J., Juhásová J., Záhumenská R. et al. (2021) Projekt XenoPig — bunkové inžinierstvo a transplantácia chirurgia v boji proti nádorom pankreasu *Bioprojekt* 31(4), 24-27. http://bts.vscht.cz/sites/default/files/Bioprojekt_4_2021.pdf

ŠVOČ, DIPLOMOVÉ A DIZERTAČNÉ PRÁCE, SPOJENÉ S PROJEKTOM

V roku 2020 vznikla v rámci projektu nová téma dizertačnej práce s názvom „Modelovanie neuromuskulárnych degeneratívnych ochorení in vitro metódami indukovanej pluripotencie“. Meno študentky: Dominika Hajdúchová, školiteľ: Prof. MUDr. Renata Péčová, PhD., školiteľ špecialista: Ing. Ján Strnádél, PhD

V roku 2021 bola študentkou RNDr. Romanou Záhumenskou úspešne obhájená dizertačná práca s názvom Aplikácia techniky reprogramovania buniek a 3D kultivácie pri vývoji nových in vitro biomedicínskych modelov. (Školiteľ: prof. RNDr. Erika Halašová, PhD., školiteľ špecialista: Ing. Ján Strnádél, PhD.)

V roku 2021 bola zahraničným študentom Hugom M. Dumortierom úspešne obhájená diplomová práca (Advanced cell-reprogramming technology for in vitro disease modeling and therapy), ktorá vznikla v minulom roku v rámci tohto APVV projektu. Vedúci diplomovej práce: Ing. Ján Strnádél, PhD.

V rámci riešenia projektu sa zahraniční študenti Hugo M. Dumortier (Francúzsko) a Tomáš Chromec (Česká republika) úspešne zapojili do ŠVOČ projektov, v ktorých postupne získali

zlatú, striebornú a bronzovú medailu Posledný ročník súťaže je možné nájsť tu: (https://www.jfmed.uniba.sk/fileadmin/jlf/Pracoviska/ustav-lekarskej-biofyziky/SVOC/SVOC_vysledky.pdf). Témy ich ŠVOČ projektov sa zároveň stali východiskovými témami ich diplomových prác.

Do riešenia projektu sa zapojila aj študenti programu ERASMUS ERASMUS (Claire Le Dreau (Francúzsko) a Sakurako Nagano (Hokaido, Japonsko). Títo študenti sa zúčastnili experimentov, zameraných na charakterizáciu reprogramovaných buniek pomocou prietokovej cytometrie a fluorescenčnej mikroskopie.

Do projektu sa ako dobrovoľníčka zapojila aj stredoškolská študentka Saška Dronžeková, ktorú táto skúsenosť (podľa jej slov) motivovala na štúdium biochémie a imunológie v Českej Republike.

POPULARIZAČNÉ AKTIVITY ČLENOV RIEŠITELSKÉHO KOLEKTÍVU

1) Zapojene sa do súťaže Zvedavec roka 2020 pod záštitou OZ Žijem vedu (Video prezentácia (RNDr. Romana Záhumenská) o projekte dizertačnej práce, ktorá vznikla v rámci tohto APVV projektu).

2) Odborná prednáška, Prírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Katedra Biochémie, 19. 10. 2020, Bratislava, SR (Henrieta Škovierová: Využitie regeneračného potenciálu kmeňových buniek v medicíne.)

3) Prednáška (12.2 2020) v rámci kurzu Metodológia vedeckej práce (v rámci tejto prednášky je každoročne, už po tretíkrát predstavovaná technológia indukovanej pluripotencie a jej zavedenie na našom pracovisku v rámci Jesseniovej lekárskej fakulty UK).

4) Terézia Okajčeková et al.: Mesenchymal stem cells and fibroblasts: Two sides of the same coin? (12. ročník Prevedy, Interaktívna Konferencia Mladých Vedcov, Bratislava, 7. 5. 2020 – 10. 6. 2020, prezentácia. Zborník abstraktov ISBN 978-80-972360-6-9. Ocenené ako „Vynikajúci príspevok“ v sekcii „Bunkový metabolizmus, fyziológia, molekulárna biológia a genetika.“

5) Študent Hugo M. Dumortier prezentoval výskumnú časť projektu formou interview v časopise Naša Univerzita, v spomínanom čísle sa objavil dokonca na titulnej stránke časopisu (číslo z dátumu 3/8/2021 <https://uniba.sk/spravodajsky-portal/nasa-univerzita/browse/2/>)

PREDNÁŠKY NA KONFERECII

Prednáška na medzinárodnej hybridnej konferencii v Martine. Prednáška s názvom „Development of novel in vitro models for human cancers and neurodegenerative diseases“ bola odprezentovaná v anglickom jazyku dňa 16. Septembra 2022 na konferencii s názvom 4th International Conference on Pharmaceutical and Medical Sciences (Martí, Kraków, Szeged).

Uplatnenie výsledkov projektu

Riešenie projektu umožnilo a viedlo k zavedeniu unikátnej, eticky prijateľnej technológie prípravy kmeňových resp. indukovaných pluripotentných kmeňových buniek na Slovensku, ktoré je jednou z mála krajín, ktorá (z etických dôvodov) neumožňuje výskum iných pluripotentných kmeňových buniek (embryonálnych).

Zavedenie technológie indukovanej pluripotencie, s ktorou sa hlavný riešiteľ grantu zoznámil počas svojho post-doktorálneho pôsobenia na Kalifornskej univerzite v San Diegu predstavuje vedecko-technologické podhubie, na základe ktorého je v budúcnosti možná príprava terapeuticky aplikovateľných protokolov s použitím eticky akceptovateľných buniek, ktoré sú na rozdiel od embryonálnych buniek autológnej povahy (priamo derivované od pacienta) a nevyžadujú teda použitie finančne náročných a pacienta zaťažujúcich imunosupresívnych protokolov.

Zavedenie tejto technológie má veľký praktický význam aj v oblasti in vitro modelovania chorôb za účelom ich výskumu. Toto je v súčasnosti najdôležitejší, priamo aplikovateľný

výstup projektu. V rámci projektu vzniklo hneď niekoľko unikátnych in vitro modelov ALS ochorenia a ďalších neuromuskulárnych ochorení (napr. Duchennevej muskulárnej dystrofie), niektoré in vitro modely už boli v rámci projektu charakterizované a publikované. Novovytvorené bunkové modely boli okrem toho registrované v hPSC reg portáli (ide o európsky portál pluripotentných kmeňových buniek) ako vôbec prvé slovenské bunkové modely (linie) tohto typu. Registráciou na tomto portáli sa tieto modely stali viditeľné pre potenciálnych užívateľov z oblasti výskumu ALS ochorenia. Registrácia bunkových modelov na tomto portáli prebieha formou recenzného konania (podobne, ako je tomu v prípade recenzného konania vo vedeckých časopisoch), je teda veľkým úspechom, že sa nášmu pracovisku podarilo umiestniť hneď dve bunkové línie (onedlho bude nasledovať ďalšia bunková línia).

In vivo experimenty, vykonané v spolupráci s Ústavom živočíšnej fyziológie a genetiky AV ČR v Liběchově viedli k optimalizácii a návrhu modifikovaného protokolu na xenotransplantáciu ľudských buniek do imunosuprimovaného prasaťa. Riešitelia grantu navrhli aj ďalšie spôsoby monitorovania imunosupresie, ktorá je dôležitou súčasťou transplantačného protokolu. Táto modifikácia sa použije pri riešení nového projektu a plánujeme aj jej publikovanie v zahraničnom časopise.

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

Riešenie APVV projektu umožnilo vznik veľmi unikátnej, hoci malej výskumnej jednotky na pôde Jesseniovej lekárskej fakulty v Martine. Zapojenie zahraničných študentov medicíny, dobrovoľníkov, diplomových a PhD študentov do projektu viedlo k vzniku laboratória (známeho ako Cellphie alebo Laboratórium prietokovej cytometrie, fenotypizácie buniek a tkanivového inžinierstva, <https://www.biomedmartin.sk/en/laboratory-of-flow-cytometry-cell-phenotyping-and-engineering/>), so zavedenou sofistikovanou technológiou reprogramovania somatických buniek na pluripotentné kmeňové bunky. Vedeckí pracovníci tohto laboratória v spolupráci so spomínanými študentami začali vďaka APVV projektu s prípravou unikátnych bunkových in vitro modelov (bunkových línií) na výskum neurodegeneratívnych ochorení a aj rakoviny. Prvé dve indukované pluripotentné kmeňové bunkové línie, pripravené v rámci projektu technológiou, ocenenou Nobelovou cenou sú historicky prvými a zatiaľ jedinými takto pripravenými bunkovými líniami na Slovensku. Tieto bunkové línie boli zaregistrované v európskom registri pluripotentných kmeňových buniek (hPSCreg, <https://hpscereg.eu>) a budú v rámci vedeckej spolupráce k dispozícii výskumníkom v oblasti výskumu ALS ochorenia z celého sveta.

V rámci riešenia projektu sa nám tiež podarilo adaptovať protokol prípravy prasačích neurálnych prekursorov, odvodených z indukovaných pluripotentných kmeňových buniek na protokol, umožňujúci jedného dňa pripraviť ľudské, terapeuticky aplikovateľné neurálne prekursor v xeno-free podmienkach. Technológiu reprogramovania buniek sme medzitým využili aj na prípravu ďalších unikátnych in vitro modelov (bunkových línií) neuromuskulárnych ochorení (napr. Duchennevej muskulárnej dystrofie, ochoreniu spôsobeného špecifickou mutáciou).

In vivo experimenty, zamerané na testovanie bezpečnosti transplantovaných buniek a tiež ich schopnosti prežitia v mieche imunosuprimovaného prasaťa boli v rámci projektu realizované v spolupráci s Ústavom živočíšnej fyziológie a genetiky, AV ČR v Liběchově, Českej republike. Aj keď tieto experimenty zatiaľ nedokázali v plnej miere zodpovedať všetky otázky spojené s bezpečnosťou a prežívaním transplantovaných buniek, riešenie niektorých problémov v in vivo experimentoch viedlo k návrhu nových metód monitorovania imunosupresie a výberu vhodného miesta pre transplantáciu buniek. In vivo transplantačné protokoly preto plánujeme naďalej (v spolupráci s českým pracoviskom) optimalizovať pre rôzne typy buniek aj v budúcnosti. Spolupráca so spomenutým českým pracoviskom viedla k príprave ďalších spoločných projektov.

Na záver chceme konštatovať, že obdobie riešenia projektu APVV bolo spojené s publikovaním niekoľkých článkov v impaktovaných vedeckých časopisoch ako aj podaním európskeho patentu v priamej súvislosti s riešeným projektom a tiež s až nečakaným záujmom a aktívnym a úspešným zapojením zo strany študentov medicíny, zahraničných študentov, študentov programu ERASMUS, dobrovoľníkov a študentov diplomových a PhD projektov. V mene celého výskumného tímu ďakujeme agentúre APVV.

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

This APVV project allowed the establishment of a new research unit at Jessenius Faculty of Medicine, in Martin. Involvement of foreign medical students, volunteers, diploma students and students of PhD program led to the generation of state-of-the art technology holding lab (nicknamed as Cellphie, Cell phenotyping, imaging and engineering lab, official name Laboratory of flow cytometry, cell phenotyping and engineering, <https://www.biomedmartin.sk/en/laboratory-of-flow-cytometry-cell-phenotyping-and-engineering/>). Thanks to APVV project, the research scientists of this lab, together with mentioned enthusiastic students started to produce unique in vitro cell models (cell lines) to study human neuromuscular diseases and also cancer. The first two iPSc-derived cell lines, derived from ALS patients are historically the first and the only cell lines prepared with Nobel prize winning technology from Slovakia. Our first cell models were registered in hPSC reg (human pluripotent stem cell registry, <https://hpscereg.eu>) and will be offered to all researchers with interest in ALS research.

Within the project we adopted the protocol for generation of swine neural precursor cells for the protocol that will one day allow generation of xeno-free, clinically applicable human neural precursor cells.

The technology that allows reprogramming somatic cells into induced pluripotent stem cells was also already used for derivation of cell models for other types of neuromuscular diseases (Duchenne muscular dystrophy, a mutation driven illness).

In vivo experiments that were focused on testing the safety of transplanted cells and their ability to survive in spinal cord of immunosuppressed pigs were also performed in collaboration with Institute of Animal Physiology and Genetics, CAS, in Libečov, Czech Republic. Although our in vivo experiments have not yet answered all our questions related to safety of iPS cells transplanted, dealing with in vivo experiment-related issues allowed us to propose new strategies in immunosuppression monitoring and transplantation site selection. We also aim to continue optimizing the in vivo protocol for iPS cells xenografting in future. Also, the establishment of collaboration with mentioned Institute was very fruitful as it also led to preparation of new joint project between Slovak and Czech Institutes.

In conclusion, with several research papers published, patent application and huge interest toward involvement in project manifested from volunteers, international ERASMUS and PhD and diploma students, we consider 4 years spent on research in this project as very rewarding and fascinating time. On behalf of our research team we would like to say thank you to Slovak Research and development (APVV) agency.