

# Matične stanice iz limfoidnoga tkiva i njihova diferencijacija

---

Skelin, Josipa

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:688901>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Josipa Skelin

# **MATIČNE STANICE IZ LIMFOIDNOGA TKIVA I NJIHOVA DIFERENCIJACIJA**

Doktorski rad

Zagreb, 2018.



University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Josipa Skelin

# **ADULT STEM CELLS FROM LYMPHOID TISSUE AND THEIR DIFFERENTIATION**

Doctoral thesis

Zagreb, 2018.

Ovaj doktorski rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković,  
pod vodstvom prof.dr.sc. Marijestefanije Antice, u sklopu  
Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Doktorski rad izrađen je u sklopu projekata voditeljice prof.dr.sc. Marijestefanije Antice:  
Projekti Hrvatske zaklade za znanost „Notch u diferencijaciji hematopoetskih stanica matica i u razvoju leukemija“ IP-11-2013 7140 i „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“,

Sedmi okvirni projekt za istraživanje i tehnološki razvoj Europske unije (FP7) “Development of Stem Cell Based Therapy for Thymic Regeneration - THYMISTEM” 602587,

Međunarodni znanstveni projekt u okviru bilateralne suradnje s Tsinghua University School of Medicine, MZO RH i Ministarstva znanosti NR Kine “The function of transcription factors in the development of lymphocytes and dendritic cells”,

Projekt zaklade Terry Fox i Hrvatske lige protiv raka

Te projekta voditelja akademika Slobodana Vukičevića: Znanstveni centar izvrsnosti za reproduktivnu i regenerativnu medicinu „Regenerativna i reproduktivna medicina – istraživanje novih platformi i potencijala“ KK01.1.1.01.0008 sufinanciran od Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj.

*Od srca zahvaljujem mentorici, prof.dr.sc. Marijistefaniji Antici, na iskazanom povjerenju, pruženom vodstvu, pomoći i potpori tijekom izrade doktorske disertacije.*

*Najljepše zahvaljujem dr. Draženu Belini na susretljivosti, angažmanu i iskrenom interesu za znanstveni rad. Veliko hvala dr.sc. Danki Grčević na pomoći pri izvedbi i analizi pokusa te na strpljenju i susretljivosti s kojima je uvijek pristupala.*

*Također zahvaljujem cijelome timu medicinskih tehničara i vozača KBC Zagreb „Rebro“ čiji je rad uvelike olakšao moj. Srdačno hvala svim pacijentima, njihovim roditeljima i skrbnicima koji su se u teškome trenutku u životu odlučili biti dio znanstvenog istraživanja, bez njih ova disertacija ne bi bila moguća.*

*Mnogo zahvaljujem dr.sc. Maji Matulić i Luki Horvatu, mag.biol.mol., na suradnji, razgovorima i savjetima.*

*Zahvalnost dugujem dr. Delfi Radić-Krišto iz KB „Merkur“ čiji je angažman omogućio značajan dio eksperimentalnog pristupa ovog rada.*

*Hvala dr.sc. Ranku Stojkoviću i Višnji Novalić iz Pogona laboratorijskih životinja za trud i vrijeme uloženo u rad s eksperimentalnim životinjama žrtvovanim za izradu ove disertacije.*

*Hvala Darku Heckelu, dr.sc. Isidoru Feliciellu i Kati Križić na pruženoj pomoći i suradnji.*

*Za tehničku pomoć prilikom izrade rada te, iznad svega, na potpori, ohrabrenju, lijepim riječima i vječnom optimizmu veliko i iskreno hvala kem. teh. Nevenki Hiršl. Dr.sc. Ani Čipak Gašparović, dr.sc. Lidiji Milković, Tei Vuković i Tei Kečkeš iz Laboratorija za oksidacijski stres neizmjereno hvala na svim idejama, savjetima i pruženoj pomoći, kako znanstvenoj tako i životnoj. Hvala i na druženjima, razgovorima i smijehu, bez kojih bi moji dani u laboratoriju bili daleko manje zabavni.*

*Svim dragim prijateljima koji su bili uz mene tijekom izrade ovoga rada veliko hvala na podršci. Ivana, hvala na neograničenom strpljenju i potpori, na slušanju jadicovanja o neuspjelim pokusima i na razumijevanju za sve odgođene i otkazane sastanke. Lado, hvala na svim lijepim riječima ohrabrenja i vjeri u moj znanstveni rad.*

*Na kraju, mojoj obitelji, koja je vjerovala u moj uspjeh čak i kada ja nisam, od srca hvala na svojoj ukazanoj ljubavi i bezuvjetnoj podršci koju su mi pružali, makar nikada u potpunosti nisu shvatili što to točno radim. Posebno hvala Nii koja me redovito podsjećala na ono bitno u životu, na način na koji to samo dijete može.*

*Igore, hvala ti na svojoj sreći koju si podijelio sa mnom tijekom dobrih dana, svoj utjesi koju si mi pružio tijekom loših i razumijevanju tijekom cijelog ovog putovanja. Hvala što kročiš sa mnom kroz život, ruku pod ruku.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Matične stanice iz limfoidnoga tkiva i njihova diferencijacija

Josipa Skelin

Zavod za molekularnu biologiju,  
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb

Timus je mjesto formacije adaptivnog imunskog sustava, gdje epitelne stanice upravljaju sazrijevanjem limfocita T. Matične stanice i progenitori nalaze se u nišama unutar tkiva odraslog organizma i sudjeluju u regeneraciji i održavanju homeostaze. Postojanje matičnih stanica koje sudjeluju u održavanju timusne strome prethodno je pokazano u odrasloj miši, no ne i u čovjeku. Cilj ovoga rada bio je u timusu ljudi pronaći matične epitelne stanice. Sekvencijskom razgradnjom tkiva timusa i nasađivanjem stanica u uvjetima prilagođenima uzgoju matičnih stanica u tri dimenzije dosljedno smo uspostavili metodu stvaranja organoida kao pokazatelja prisutnosti matičnih stanica. Dokazali smo da organoidi nisu agregati stanica, već su nastali iz pojedinačnih stanica koje imaju svojstva matičnosti - samoobnavljanje, umnožavanje i diferencijacija. Otklanjanje limfocita iz suspenzije stanica pomoću magnetske delecije ili inkubacije s 2'-deoksiguanozinom povećava broj organoida. Stanice organoida ekspimiraju gene nužne za funkciju epitela, no i gene aktivne tijekom organogeneze timusa. Proteinska ekspresija markera zrelosti epitelnih stanica pronađena je na manjem dijelu stanica organoida. Dobiveni organoidi su sposobni usmjeravati diferencijaciju hematopoetskih matičnih stanica u zrele limfocite T.

(114 stranica, 41 slika, 11 tablica, 218 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: timus, stroma, matične stanice, diferencijacija, izolacija

Mentor: prof.dr.sc. Mariastefania Antica, znanstveni savjetnik na Institutu Ruđer Bošković

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić, doc.dr.sc. Inga Marijanović, izv. prof. dr. sc. Danka Grčević

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

Adult stem cells from lymphoid tissues and their differentiation

Josipa Skelin

Department of Molecular Biology,  
Rudjer Boskovic Institute, Bijenicka cesta 54, 10 000 Zagreb

The thymus is the central hub of T lymphocyte differentiation, where epithelial cells guide the process of their maturation. Progenitors and stem cells are found in niches deep within the tissues of an adult organism. Their function is tissue regeneration and maintenance of homeostasis. The existence of stromal stem cells within the postnatal mouse thymus has been shown, but these have not been proven to exist in the human thymus. The aim of this research was to find epithelial stem cells within the human thymus. Sequential tissue digestion and plating the obtained cells in a manner suited for 3D cultures, we established a method that consistently leads to a formation of organoids indicating the presence of stem cells. The organoids are not mere cell aggregates, they are formed from individual cells with the capability of self-renewal, as well as other properties of stem cells, such as maintaining their immature state while giving rise to differentiated cells. The removal of lymphocytes from the cell suspension by either magnetic depletion or incubation with 2'-deoxyguanosine leads to an increase of organoid number. The cells within the organoid express genes necessary for thymic epithelial function, but also genes active during thymic organogenesis. The expression of protein markers of mature epithelial cells has been found on a smaller proportion of organoid cells. The organoids are capable to lead the differentiation of a hematopoietic stem cell into mature single positive T lymphocytes.

(114 pages, 41 figures, 11 tables, 218 references, original in: Croatian)

Key words: thymus, stroma, stem cells, differentiation, isolation

Supervisor: prof. Mariastefania Antica, PhD, senior researcher at Rudjer Boskovic Institute

Reviewers: Maja Matulic, PhD; Inga Marijanovic, PhD; Danka Greecevic, MD, PhD



# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1.	Svrha i ciljevi istraživanja .....	4
2.	LITERATURNI PREGLED .....	5
2.1.	Timus .....	5
2.1.1.	Organogeneza timusa.....	7
2.2.	Razvoj i sazrijevanje limfocita T.....	10
2.3.	Matične stanice .....	15
2.4.	Uzgoj stanica u posebnim uvjetima in vitro .....	19
2.4.1.	Uzgoj limfocita T.....	21
3.	MATERIJALI I METODE .....	23
3.1.	Tkiva ljudi.....	23
3.2.	Mehanička i enzimatska disocijacija tkiva .....	23
3.3.	Testiranje enzima i protokola .....	24
3.4.	Uspostavljanje uvjeta za rast matičnih stanica .....	25
3.5.	Procjena bioloških razlika između uzoraka te učinkovitosti tretmana .....	26
3.6.	Protočna citometrija.....	26
3.6.1.	Obilježavanje površinskih antigena .....	27
3.6.2.	Obilježavanje unutarstaničnih antigena .....	27
3.6.3.	Obilježavanje površinskih i unutarstaničnih antigena .....	27
3.6.4.	Sortiranje stanica.....	27
3.6.5.	Obrada podataka .....	28
3.7.	Obogaćivanje prekursora magnetskom deplecijom.....	28
3.8.	Obogaćivanje prekursora centrifugiranjem u gradijentnom mediju.....	29
3.9.	Obogaćivanje prekursora inkubacijom s 2'-deoksiguanozinom .....	30
3.10.	Uzgoj stanica u hidrogelu .....	30

3.11.	Utvrđivanje frekvencije matičnih stanica u tkivu – serija razrjeđenja.....	31
3.12.	Reformacija organoida.....	31
3.13.	Utjecaj čimbenika rasta na broj organoida.....	31
3.14.	Imunofluorescencija.....	32
3.15.	Izolacija, reverzno prepisivanje i umnožavanje RNA .....	32
3.16.	„Multiplex“ PCR.....	34
3.17.	Funkcionalni test .....	37
3.17.1.	Izolacija hematopoetskih prekursora .....	37
3.17.2.	Izolacija i uzgoj mišjih embrionalnih fibroblasta .....	38
3.17.3.	Uzgoj stanica u funkcionalnom testu.....	38
3.18.	Statistička obrada podataka.....	38
4.	REZULTATI.....	39
4.1.	Obogaćenje prekursora u suspenziji stanica timusa .....	39
4.1.1.	Suspenzije dobivene ciklusima razgradnje timusa razlikuju se prema udjelu stromalnih stanica.....	39
4.1.2.	Razdvajanje stanica po gustoći .....	40
4.1.3.	Usavršavanje protokola magnetske delecije stanica .....	41
4.1.4.	Analiza stanica timusa prije i nakon obogaćenja protočnim citometrom	43
4.2.	Dokazivanje matičnosti .....	47
4.2.1.	Test podloge za uzgoj obogaćenih matičnih stanica.....	47
4.2.2.	Pojava organoida i biološke razlike između pacijenata .....	49
4.3.	2'-deoksiguanozin obogaćuje udio matičnih stanica .....	55
4.3.1.	Inkubacija stanica dovodi do gubitka vijabilnosti i materijala .....	55
4.3.2.	Optimalno vrijeme inkubacije tkiva poboljšava udio matičnih stanica ...	56
4.3.3.	Analiza stanica timusa prije i nakon inkubacije tkiva s 2'-dGuo protočnim citometrom.....	59
4.3.4.	2'-dGuo u mediju za uzgoj organoida inhibira njihov nastanak .....	61
4.4.	Organoidi nastaju od pojedinačnih stanica .....	62

4.5. Utvrđivanje broja prekursora u suspenziji stanica razgrađenog timusa .....	63
4.6. Sposobnost samoobnavljanja.....	64
4.7. Organoidi nastaju neovisno o ekspresiji CD326 i CD24.....	66
4.8. Utjecaj faktora rasta na organoide .....	68
4.9. Analiza stanica organoida.....	71
4.9.1. Ekspresija specifičnih gena u stanicama organoida.....	71
4.9.2. Ekspresija proteina na stanicama u organoidima.....	73
4.10. Sposobnost podržavanja razvoja limfocita kao dokaz funkcionalnosti matičnih stanica epitela .....	77
5. RASPRAVA.....	79
6. ZAKLJUČAK .....	89
7. POPIS OZNAKA I KRATICA .....	90
7.1. Kratice .....	90
7.2. Geni .....	91
LITERATURA .....	92
ŽIVOTOPIS .....	114
Popis znanstvenih radova .....	114

## 1. UVOD

Stanice hematopoetskog sustava potječu i razvijaju se od ishodišne matične stanice u koštanoj srži koja diferencira u limfoidni progenitor. Prekursori limfocita B koji se slabo do umjereno vežu za tkivne antigene u koštanoj srži sazrijevaju u limfocite B, dok prekursori limfocita T migriraju u timus gdje njihovu daljnju diferencijaciju usmjeravaju epitelne stanice timusne kore (korteks) i srži (medule).

Tijekom embrionalnog razvoja ljudi, epitelna komponenta timusa počinje se razvijati početkom 7. tjedna gestacije. Dva timusna primordija rastu ventralno i spajaju se u perikardnom prostoru sredinom 8. tjedna. U periodu rasta timusnih primordija epitelne stanice istovremeno izražavaju keratine 5 i 8 iz čega se može zaključiti kako nisu diferencirane. Njihovo usmjeravanje u specifične kortikalne i medularne stanice počinje sredinom 8. tjedna gestacije, kada se ovi stanični markeri počinju razdvajati, a zasebne kortikalne i medularne regije timusa vidljive su do 16. tjedna gestacije. Ove tvrdnje prati i ekspresija funkcionalnog markera diferencijacije timusnih epitelnih stanica, molekule MHC II, te transkripcijskog faktora AIRE nužnog za pravilnu funkciju medularnih epitelnih stanica koji je eksprimiran u 13. tjednu gestacije<sup>1</sup>. Prvi prekursori limfocita T timus naseljavaju početkom 8. tjedna gestacije, a prvi zreli jednostruko pozitivni limfociti T napuštaju timus između 14. i 16. tjedna gestacije .

Prekursori limfocita T koji naseljavaju timus (timociti) eksprimiraju marker nezrelih hematopoetskih stanica, molekulu CD34, glikoprotein CD7, specifičan za prekursore limfocita T, te su negativni za glikoproteine markere zrelosti limfocita T, CD4 i CD8. U timusu počinju izražavati CD4 molekule i tada se nazivaju nezrele CD4 pozitivne stanice (engl. *CD4 immature single positive*, CD4ISP). Prva funkcionalna promjena i test koju timociti prolaze tijekom sazrijevanja je prekrajanje  $\beta$  lanca receptora TCR čime se osigurava jedinstvenost svakog limfocita T i prepoznavanje širokog spektra antigena. Uspješno prekrojeni lanac  $\beta$  se na površini stanice veže s lancem  $\alpha$  i stvara receptor pre-TCR  $\alpha\beta$  koji se veže s kompleksom CD3/ $\zeta$  čime se osigurava uspješna provodljivost signala. Prekursori koji ne stvore funkcionalan receptor pre-TCR  $\alpha\beta$  neće nastaviti razvoj<sup>2,3</sup>. Po završetku  $\beta$  selekcije počinje preslagivanje i lanca  $\alpha$  čime se stvara cjeloviti receptor. U ovom stadiju timociti počinju eksprimirati glikoproteine CD4 i CD8<sup>4</sup>.

Epitelne stanice kore timusa na površini prezentiraju glavni sustav tkivne podudaranosti, molekule MHC I i II. Dvostruko pozitivni timociti koji se putem receptora TCR vežu na MHC primiti će signal za preživljenje, dok će oni koji taj signal ne prime ići u apoptozu. Ovaj proces naziva se pozitivna selekcija<sup>5,6</sup>. Ovisno o tome veže li se receptor TCR za MHC I ili II, dvostruko pozitivni prekursor razviti će se u citotoksični CD8<sup>+</sup> limfocit T (MHC I) ili u pomoćnički CD4<sup>+</sup> limfocit T (MHC II)<sup>7</sup>.

Prekursori koji prežive selekciju migriraju prema granici kore i srži. Kako bi se izbjeglo otpuštanje auto-reaktivnih limfocita T u periferiju, epitelne stanice srži ekspimiraju antigene s tjelesne periferije na molekulama MHC I ili II. Vežu li se jednostruko pozitivni timociti prejako za molekulu MHC u njima će se pokrenuti signalni put koji vodi u apoptozu. Ovaj proces naziva se negativna selekcija<sup>8</sup>. Po uspješnom završetku pozitivne i negativne selekcije jednostruko pozitivni limfociti T otpuštaju se u periferiju.

Iako timus kroz godine prolazi involuciju i smanjuje se njegova funkcija, ona se nikada u potpunosti ne dokida<sup>9-11</sup>. Uzevši u obzir i kratak životni vijek epitelnih stanica timusa, može se pretpostaviti da u odraslom timusu postoje mehanizmi održavanja funkcionalnog odjeljka. Istraživanjem na miševima pokazano je kako kortikalne i medularne epitelne stanice imaju zajedničkog pretka koji i u odraslih miševa ima mogućnost samoobnavljanja i diferencijacije. Izolacija i pročišćavanje ovog tipa stanica te njihovo ugrađivanje pod bubrežnu kapsulu miša dovodi do razvoja oba tipa epitelnih stanica koje imaju mogućnost privlačenja prekursora limfocita T te podržavanja njihove diferencijacije u zrele limfocite<sup>12</sup>. Mehanizmi održavanja funkcionalnog odjeljka timusa u ljudi nisu poznati, kao ni postojanje prekursora epitelnih stanica.

Testirane su metode mehaničke i enzimatske disocijacije tkiva, pri čemu su izmjenjivani uvjeti inkubacija te koncentracije i vrste enzima. Sastav suspenzije stanica dobivene disocijacijom analiziran je multiparametarskim obilježavanjem stanica protutijelima te analizom na protočnom citometru. Epitelne stanice i njihovi prekursori u tkivu timusa čine malen udio ukupnih stanica te je stoga bilo potrebno obogatiti ciljanu populaciju. nakon enzimatske razgradnje tkiva, stanice su obilježene protutijelima specifičnima za sve zrele oblike stanica u timusu te su magnetskom selekcijom odstranjene iz mješavine stanica. Ovakva selekcija osigurala je obogaćenu nezrelu populaciju stromalnih stanica timusa, a učinkovitost pročišćavanja utvrđena je protočnom citometrijom. Testirani su i gradijentni mediji za izdvajanje različitih tipova stanica iz dobivene suspenzije. Obogaćenje ciljanog tipa stanica pokušano je i inkubacijom tkiva i stanica sa 2'-deoksiguanozinom. 2'-deoksiguanozin je

nukleozid, a specifičnost ovog spoja je da u limfocitima T i B inhibira proliferaciju i djeluje toksično. Inkubacija tkiva dovela je do povećanja udjela stromalnih stanica što je analizirano protočnom citometrijom. Uz navedeno, stanice pozitivne za specifične markere od interesa (CD24 i CD326) sortirane su i uzgajane.

Obogaćene stanice uzgajane su u posebnim uvjetima koji onemogućavaju kontakt stanica s podlogom te u mediju s dodanim faktorima. U ovim uvjetima progenitorske stanice dijeljenjem stvaraju sferne nakupine tj. organoide. Nasađivanjem malog broja obogaćenih stanica određen je broj nastalih organoida te su utvrđeni utjecaji promjena protokola izolacije i obogaćivanja te promjena uvjeta uzgoja kao i biološke razlike između pojedinih uzoraka. Izmjenama u sastavu medija i praćenjem opisanih parametara usavršeni su uvjeti za uzgoj i propagaciju. Nasađivanjem u uvjetima prilagođenima rastu matičnih stanica u seriji razrjeđenja utvrđen je udio matičnih stanica u suspenziji.

Navedenim metodama dobiveni prekursori testirani su za samoobnavljanje i jednostanično porijeklo. Nasađivanjem stanica u hidrogelu, koji je u čvrstom stanju pri 37°C, testirano je stvaranje organoida iz pojedinačnih stanica. Disocijacijom organoida na pojedinačne stanice, praćenjem njihova broja, uzgojem u istim uvjetima te praćenjem ponovne formacije utvrđena je mogućnost samoobnavljanja. Uzgojem stanica dobivenih disocijacijom organoida u seriji razrjeđenja ustanovljeno je kako nemaju sve stanice organoida jednaku mogućnost samoobnavljanja.

Antigeni stanica organoida imobiliziranih na predmetnom stakalcu obilježeni su protutijelima te vizualizirani fluorescentnim ili konfokalnim mikroskopu. Također, analizirani su i protočnom citometrijom. Ekspresija specifičnih gena eksprimiranih u zrelim (*KERATIN -5 i -8, CD326, AIRE i PDGFR $\beta$* ) i nezrelim (*HOXA3, PAX1 i PAX9*) stromalnim stanicama timusa utvrđena je metodom PCR.

Kako bi se utvrdilo imaju li stanice nastale diferencijacijom iz organoida funkcionalne sposobnosti epitelnih stanica timusa, uzgojeni organoidi pomiješani su s nezrelim hematopoetskim stanicama u uvjetima uzgoja limfocita *in vitro*. Nakon inkubacije stanice su obilježene protutijelima za markere zrelosti limfocita te analizirane na protočnom citometru. Funkcionalni test pokazao je kako stanice organoida imaju sposobnost voditi diferencijaciju nezrelih hematopoetskih stanica do zrelih limfocita T.

### ***1.1. Svrha i ciljevi istraživanja***

S obzirom na fiziološku značajnost epitelnih stanica timusa za funkciju adaptivnog imunskog sustava, hipoteza rada je da odrasli ljudski timus sadrži prekursore sposobne diferencirati u epitelne stanice timusne kore i srži. Svrha ovog istraživanja je dokazati kako odrasli ljudski timus sadrži nezrele stanice sposobne za stvaranje svih staničnih tipova potrebnih za podržavanje rasta, razvoja i diferencijacije limfocita T.

Pojedinačni ciljevi su:

1. Uspostaviti uvjete izolacije matičnih stanica iz tkiva timusa i njihova obogaćenja u suspenziji stanica
2. Uspostaviti uvjete za uzgoj matičnih stanica u kulturi koja podržava rast u tri dimenzije
3. Dokazati autentičnost organoida nastalih od matične stanice
4. Pokazati kako matične stanice imaju sposobnost samoobnavljanja
5. Karakterizirati stanice koje čine organoide, opisati aktivnost gena u stanicama organoida na molekularnoj i proteinskoj razini
6. Pomoću stanica organoida usmjeriti diferencijaciju hematopoetskih matičnih stanica u lozu limfocita T.

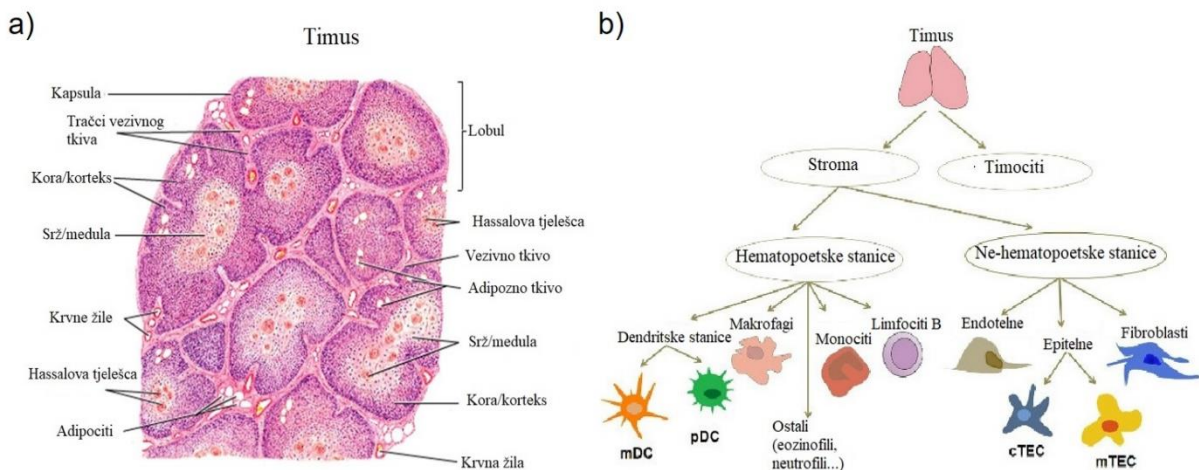
Izolacija i karakterizacija prekursora epitelnih stanica iz odraslog timusa ljudi prvi je korak ka boljem razumijevanju razvoja limfocita u ljudi te stvaranju staničnih metoda primarne ili dopunske terapije pacijenata koji zbog urođenih (SCID, DiGeorge sindrom) ili stečenih bolesti (HIV/AIDS), terapija za postojeća stanja (kemoterapija i radioterapija) ili operacija (timektomija nužna tijekom operacije srca) pate od smanjene ili dokinute funkcije adaptivnog imunskog sustava.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. *Timus*

Timus ili prsna žlijezda je organ smješten u prsnoj šupljini, iznad srca i ispod prsne kosti, čija je uloga selekcija i vođenje diferencijacije limfocita T<sup>13</sup>. Organ se sastoji od dva režnja, svaki od kojih je podijeljen u više lobusa – odjeljaka. Histološki, tkivo timusa sastoji se od fibrozne kapsule, kore (korteksa) te srži (medule) (Slika 1).

Iako većinu mase timusa čine limfociti T u raznim fazama razvoja, njegov funkcionalni dio čine dva tipa epitelnih stanica raspoređena u dvije odvojene histološke cjeline - epitelne stanice kore (engl. *cortical thymic epithelial cells*, cTEC) i epitelne stanice srži (engl. *medulary thymic epithelial cells*, mTEC). Uz limfocite T i epitelne stanice, u timusu nalazimo i fibroblaste, dendritske stanice te endotelne stanice, kao i razne stanice imunskog sustava kao što su limfociti B, monociti, makrofagi te prirodno ubilačke stanice (engl. *natural killer*, stanice NK) (Slika 1).

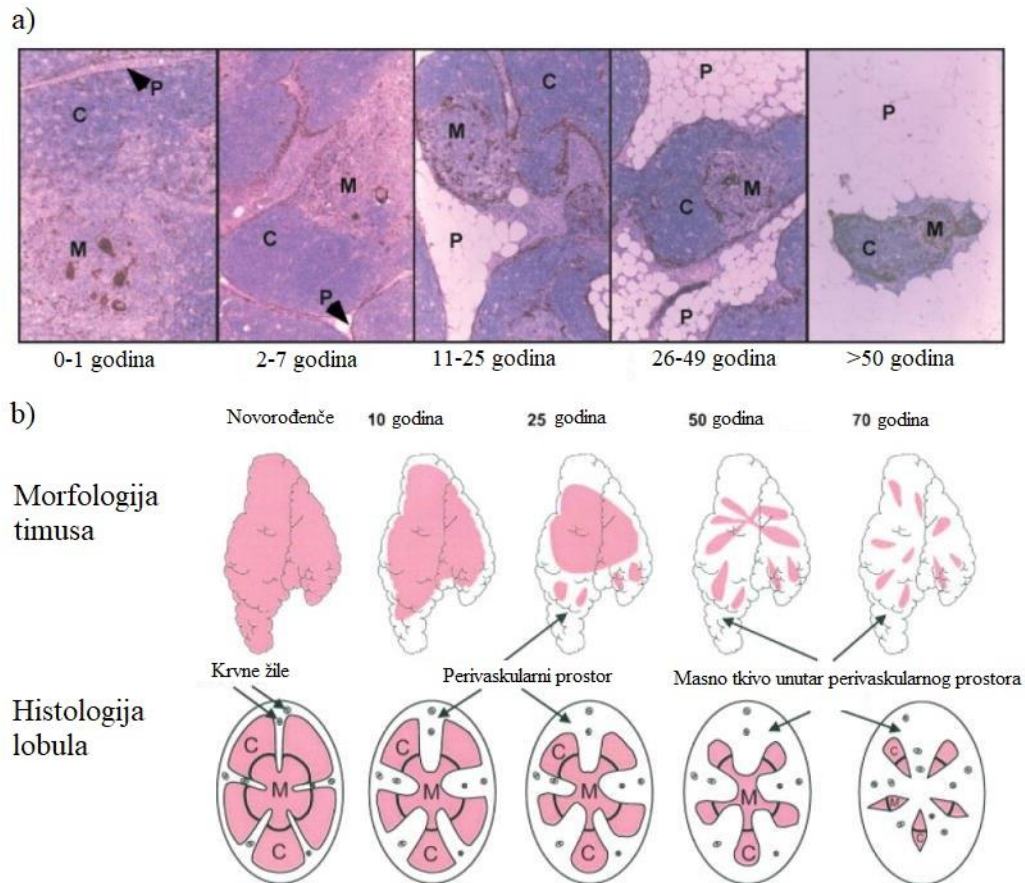


**Slika 1.** a) Histološki izgled tkiva timusa s označenim ključnim cjelinama (preuzeto i prilagođeno s [slideplayer.com/slide/8331162/](https://slideplayer.com/slide/8331162/)). b) Shematski prikaz tipova stanica koje čine timus

Histološki izgled te stanični sastav timusa mijenjaju se kroz život odrasle jedinke. Timus je najveći i funkcionalno najaktivniji od rođenja i ranog postnatalnog perioda do puberteta, nakon čega počinje proces degeneracije timusa tj. involucije. Za razliku od miševa, masa



ljudskog timusa se starenjem ne smanjuje, već se u njemu smanjuje epitelni prostor<sup>14</sup>. Perivaskularni prostor, kojeg sačinjavaju adipociti, periferni limfociti te fibroblasti, se starenjem povećava i površinom zamjenjuje epitelni (Slika 2)<sup>14</sup>. Unatoč smanjenju volumena sa starenjem, u timusnom epitelnom prostoru se nastavlja normalno sazrijevanje i diferencijacija limfocita T, iako količina proizvedenih limfocita T opada<sup>9-11</sup>.



**Slika 2.** Histološki (a) i shematski (b) prikaz rasporeda perivaskularnog i epitelnog prostora humanog timusa kroz godine života. Preuzeto i prilagođeno prema Gruver i sur., 2007<sup>15</sup>. Slovo P označa perivaskularni prostor, M srž timusa, a C koru.

Timus je posljednji veći organ u tijelu kojem je otkrivena funkcija<sup>13</sup>. Limfopoetska funkcija timusa nedvojbeno je ustanovljena tek 1950-ih godina, a imunokompetencija malih limfocita u perifernoj krvi tek kroz sljedeće desetljeće<sup>16</sup>. Trebalo je proći još nekoliko godina prije nego li se dokazalo kako postoje dva tipa limfocita te kako su upravo limfociti T, nastali u timusu, odgovorni za prezentiranje antigena<sup>17</sup>.

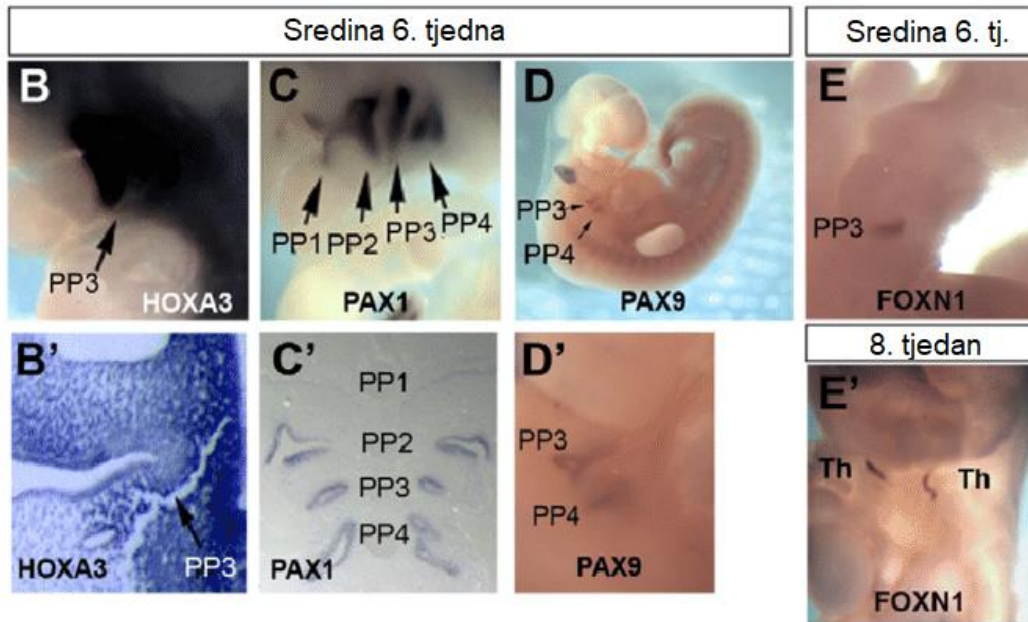
### 2.1.1. Organogeneza timusa

Tijekom embrionalnog razvoja kralježnjaka, u bočnim stranicama ždrijela embrija formira se pet pari izbočenja endoderma nazvanih ždrijelne vreće<sup>18</sup>. U ljudi se epitelna komponenta timusa počinje razvijati zajedno s doštitnim žlijezdama bilateralno iz treće ždrijelne vreće početkom 7. tjedna gestacije. Od samoga su početka bilateralni zametci organa (primordiji) zaštićeni mezenhimskom kapsulom nastalom od neuralnog žlijeba. Iz neuralnog žlijeba razvijaju se i ostale mezenhimske komponente timusa. Tijekom migracije timusni i doštitni rudimenti ostaju međusobno spojeni. Dva primordija rastu ventralno i spajaju se u perikardnom prostoru sredinom 8. tjedna, kada nestaje i struktura koja spaja timus s doštitnim žlijezdama<sup>19</sup>.

U ranoj fazi razvoja timusa nisu vidljivi odjeljci u njegovoj građi. Histološke jedinice nastaju tek po spajanju timusnih rudimenata i vidljive su u 10. tjednu gestacije. Ove tvrdnje prati i ekspresija glavnog sustava tkivne podudaranosti - molekule MHC II (engl. *major histocompatibility complex*), funkcionalnog markera diferencijacije timusnih epitelnih stanica, čija ekspresija je zabilježena tek nakon spajanja dvaju timusnih primordija<sup>1</sup>.

Pretpostavlja se kako migrirajući timusni primordij sadrži nediferencirane epitelne stanice te da diferencijacija počinje spajanjem bilateralnih primordija u cjelovitu strukturu. U periodu rasta timusnih primordija nediferencirane epitelne stanice istovremeno izražavaju KERATINE 5 (keratin specifičan za medularne epitelne stanice) i 8 (keratin specifičan za kortikalne epitelne stanice). Njihovo usmjeravanje u specifične kortikalne i medularne stanice počinje sredinom 8. tjedna gestacije, kada se KERATIN 5 i KERATIN 8 postupno prestaju izražavati na istim stanicama. Zasebne kortikalne i medularne regije timusa vidljive su do 16. tjedna gestacije<sup>20</sup>.

Usmjereni prekursori limfocita iz koštane srži naseljavaju timus prije negoli je završena njegova organogeneza. Ovi prekursori još uvijek imaju sposobnost diferencijacije u obje loze limfocita<sup>21-23</sup>. U ljudi naseljavanje timusa počinje u 8. tjednu gestacije<sup>24</sup>. Dinamiku sazrijevanja limfocita T tijekom embrionalnog razvoja prati ekspresija transkripcijskog faktora AIRE nužnog za prezentaciju tkivnih antigena putem molekule MHC kod medularnih epitelnih stanica timusa. Ovaj je transkripcijski faktor eksprimiran tek u 13. tjednu gestacije<sup>1</sup>.



Slika 3. Ekspresija ranih markera timusne organogeneze u humanim embrijima i tkivu primordija timusa. Preuzeto i prilagođeno prema Farley et al., 2013<sup>1</sup>. Oznaka PP s brojem označava ždrijelne vrećice.

Istraživanja molekularnih mehanizama u pozadini organogeneze timusa većinom su izvedena na miševima uz rijetke primjere koji su se bavili primjenjivošću takvih istraživanja na ljude. Najraniji transkripcijski faktor koji utječe na razvoj timusa nakon formacije ždrijelnih vreća je *HOXA3* (engl. *Homeobox A3*). Gen *HOXA3* eksprimiran je u trećoj ždrijelnoj vrećici te u stanicama neuralnog žlijeba. U embrijima miševa u čijoj se trećoj ždrijelnoj vreći eksprimira defektan oblik proteina *HOXA3* ne dolazi do razdvajanja treće ždrijelne vrećice u timus i doštitne žlijezde. Ako je gen *HOXA3* mutiran u stanicama neuralnog žlijeba, dolazi do početne polarizacije treće ždrijelne vrećice, no ne i do migracije i separacije organa<sup>25,26</sup>. Gen *HOXA3* ostaje eksprimiran i kasnije tijekom organogeneze, no njegova delecija nakon prvotne formacije organa ne dovodi do ikakvih očitih poteškoća u stanicama<sup>27</sup>. Utjecaj proteina *HOXA3* na diferencijaciju humanih embrionalnih matičnih stanica promatran je u eksperimentalnom sustavu gdje su stanice uzgajane u prilagođenom mediju u kojem je bio prisutan rekombinantni protein *HOXA3* fuzioniran s transaktivatorom transkripcije iz virusa HIV i *FOXN1* transkripcijskim faktorom specifičnim za TEC. Ovakvim uzgojem poboljšana je diferencijacija u progenitore epitelnih stanica timusa<sup>28</sup>.

U embrionalnim stanicama ljudi diferenciranim u timusne epitelne progenitore (bez izlaganja rekombinantnim transkripcijskim faktorima) također se javlja i ekspresija faktora *EYA1* (engl. *Eyes Absent Homolog 1*)<sup>29</sup>. Gen *eya* (engl. *eyes absent*), čiji je *EYA1* homolog,

otkriven je u modelnom organizmu *Drosophila melanogaster* gdje njegova mutacija uzrokuje nepravilnu formaciju očiju mušice<sup>30</sup>. Ovaj transkripcijski faktor evolucijski je očuvan, a aktivan je u trećoj ždrijelnoj vrećici i mezenhimu koji ga okružuje. Miševi s mutiranim genom *Eyal* pokazuju fenotip sličan onima s mutiranim genom *Hoxa3*<sup>31</sup>.

U ovom ranom periodu diferencijacije organa uključeni su i geni *SIX1 i 4* (engl. *Sine Oculis Homeobox Homolog*) koji djeluju sinergistički kako bi održali ekspresiju drugih gena potrebnih za morfološko oblikovanje timusa<sup>32</sup>. Mutacijama u genima *EYA1* ili *SIX1* kod ljudi dolazi do branhio-oto-renalnog (vrat-uho-bubreg) sindroma ili branhio-oto (vrat-uho) sindroma. Ovi poremećaji su autosomalno dominantni i u njima dolazi do malformacija tkiva vrata, ušiju i bubrega<sup>33</sup>.

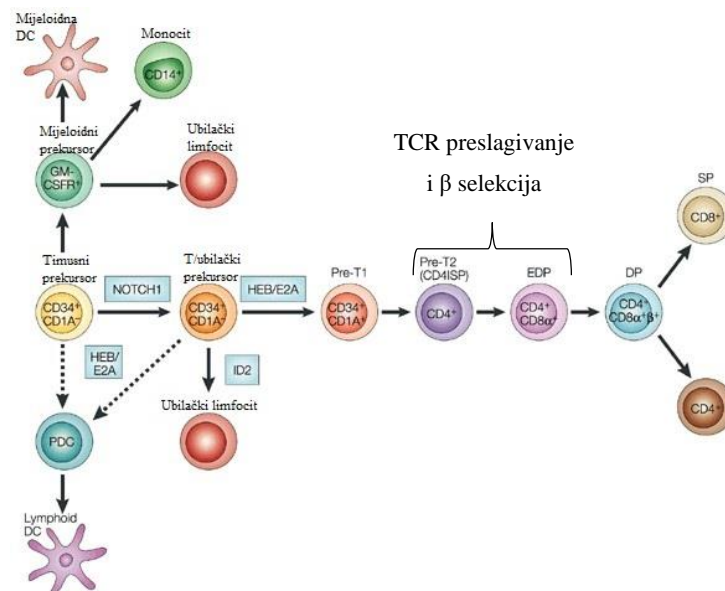
U bliskoj suradnji s faktorima *EYA1* i *HOXA3* su i transkripcijski faktori *PAX1* i *PAX9* (engl. *Paired Box*). Pronađeno je kako je protein *PAX9* neizostavan za organogenezu velikog broja tkiva tijekom razvoja embrija budući da miševi s mutacijama u genu *Pax9* ne preživljavaju dugo nakon rođenja, a imaju kongenitalne malformacije lica, glave i zubi te im nedostaje timus i doštitne žlijezde<sup>34</sup>. Miševi s točkastom mutacijom u genu *Pax1* imaju nešto blaži fenotip, no smanjenu veličinu timusa i slabiju produkciju zrelih limfocita T. Ekspresija gena *Pax1* primijećena je tijekom embrionalnog razvoja, no i postnatalno u manjem djelu cTEC<sup>35</sup>.

*FOXN1* (engl. *Forkhead Box N1*) je transkripcijski faktor specifičan za TEC. Sudjeluje u diferencijaciji epitelnih stanica iz zajedničkog progenitora, no ne utječe na odabir smjera diferencijacije (mTEC ili cTEC). Također, nije nužan za inicijaciju timusne organogeneze<sup>36,37</sup>. Ovaj transkripcijski faktor i njegova uloga otkriveni su genomskim istraživanjima životinja i ljudi rođenih bez timusa. U ovakvih jedinki pronađena je inaktivirajuća mutacija gena *FOXN1*<sup>38-40</sup>. Iako je poznato kako je faktor *FOXN1* nužan za pravilnu diferencijaciju i funkciju TEC, molekularni mehanizam u pozadini ovog procesa još uvijek nije razjašnjen. Protein *FOXN1* potreban je za ekspresiju gena uključenih u razvoj timocita, no nisu pronađeni njegovi vezni partneri ni način na koji upravlja sudbinom timusa pa se smatra kako pojedinačno ne upravlja određenim aspektom biologije epitelnih stanica, već je dio njihove ključne mašinerije<sup>41</sup>. Sukladno ulozi, faktor *FOXN1* inducira ekspresiju transkripcijskog faktora *AIRE* (engl. *Autoimmune Regulator*) u srži timusa. Protein *AIRE* neophodan je za sprječavanje autoimunskih reakcija budući da je njegova glavna uloga omogućavanje prikazivanja proteina iz različitih dijelova tijela na molekulama glavnog sustava tkivne podudarnosti<sup>42,43,44,45</sup>.

Specifičnosti istraživanja na ljudima otežavaju histološke analize organogeneze te definiranje očuvanosti područja i razine transkripcije ciljnih gena među vrstama, pa je tako većina istraživanja navedenih gena izvršena na životinjama, no potvrđeno je kako geni *HOXA3*, *PAX1* te *PAX9* imaju isti uzorak ekspresije kod miševa i kod ljudi<sup>1</sup>.

## 2.2. Razvoj i sazrijevanje limfocita T

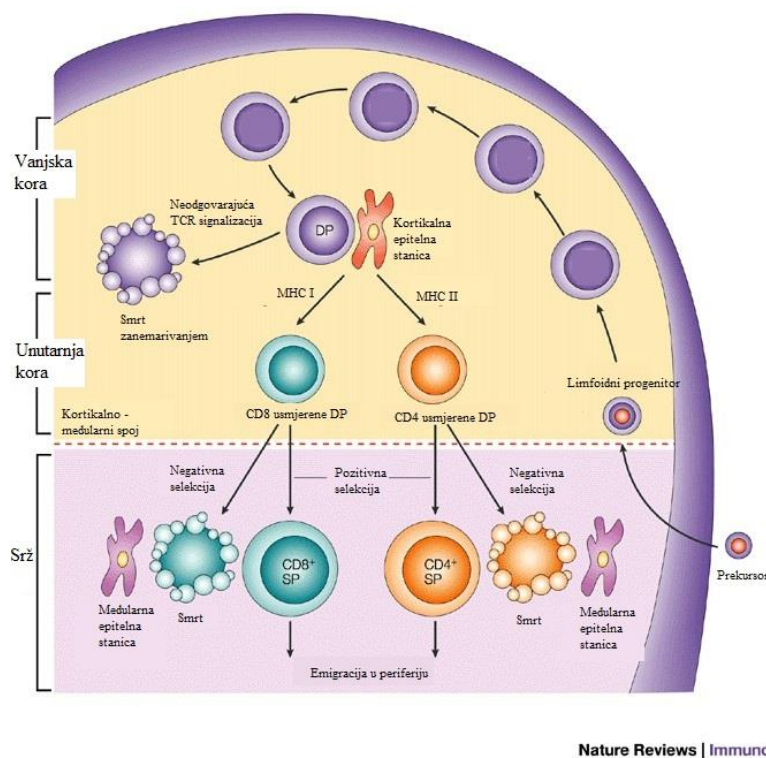
Sve stanice krvi razvijaju se od ishodišne hematopoetske matične stanice (engl. *hematopoietic stem cell*, HSC) u koštanoj srži<sup>46</sup>. U miševa, HSC eksprimira proteine c-Kit i Sca-1 i ne eksprimira markere zrelih stanica krvi<sup>46</sup>. Slično ovome, u ljudi je HSC karakterizirana izražavanjem glikoproteina CD34 te manjkom ekspresije markera zrelih loza limfocita<sup>47</sup>. HSC se diferenciraju u limfoidne progenitore (engl. *common lymphoid progenitor*, CLP) a onda se usmjeravaju u limfoidnu lozu B, koja svoju diferencijaciju dovršava u koštanoj srži, ili limfoidnu lozu T, koja diferencijaciju nastavlja u timusu<sup>48</sup>. CLP koji u ovoj fazi razvoja ne pokazuju odgovarajući afinitet prema tkivnim antigenima umiru apoptozom. Timusni prekursori u ovoj fazi razvoja nisu izričito i nepovratno usmjereni u lozu limfocita T. Budući da su nađene stanice bipotentne za limfocite T i B, limfocite T i prirodnoubilačke stanice, kao i progenitori prirodnoubilačkih stanica, dendritskih stanica i limfocita T, smatra se kako se konačno opredjeljenje stanica u lozu limfocita T događa tek nakon ulaska progenitora u timus (Slika 4)<sup>21–23</sup>.



Nature Reviews | Immunology

**Slika 4.** Shematski prikaz razvoja limfocita iz hematopoetskog prekursora koji naseljava timus. Preuzeto i prilagođeno prema radu Hergena Spitzza (2002)<sup>49</sup>. DC (engl. *dendritic cell*) označava dendritsku stanicu, EDP (engl. *early double positive*) označava rani dvostruko pozitivni stadij, DP dvostruko pozitivivan stadij, a SP (engl. *single positive*) jednostruko pozitivne limfocite T.

Otkriće molekule CD7 eksprimirane na prekursorima limfocita T u miševa omogućilo je njihovu izolaciju i detaljnije eksperimente o ranim fazama razvoja limfocita T<sup>50-52</sup>. Molekula CD7 specifična je za progenitore usmjerene u lozu limfocita T, no nisu svi prekursori koji izražavaju ovu molekulu ireverzibilno usmjereni ka sazrijevanju u limfocite T<sup>24,48,53</sup>. Uz protein CD7, na prekursorima limfocita T nalazi se i molekula CD34, no još uvijek nije u potpunosti jasno koja je razina njene ekspresije na prekursorima koji naseljavaju timus, budući da jedna skupina istraživača tvrdi da prekursori izražavaju veliku količinu (CD34<sup>hi</sup>), a druga da izražavaju srednju količinu molekule CD34 (CD34<sup>int</sup>)<sup>1,54</sup>.



Nature Reviews | Immunology

**Slika 5.** Shema timusa s naznačenim mjestima događaja bitnih u diferencijaciji limfocita T. Preuzeto i prilagođeno prema Hsieh i sur., 2012.<sup>55</sup>

Istraživanjima na miševima pokazano je da progenitori ulaze u timus na granici između kore i srži<sup>56</sup> (Slika 5). U timusu prekursori CD34<sup>+</sup> počinju eksprimirati molekulu CD1a<sup>57</sup>. Prelazak prekursora iz stadija CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> u stadij CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> povezuje se s jačim opredjeljenjem ka limfocitima T. Ovakvi prekursori još uvijek zadržavaju slabu mogućnost diferencijacije u stanice NK, no izgubili su mogućnost diferencijacije u dendritske stanice<sup>58</sup>. Prekursori potom počinju izražavati molekulu CD4. Ovaj stadij razvoja naziva se stadij nezrele CD4 pozitivne stanice tj. CD4ISP (engl. *CD4 immature single positive*)<sup>57,59-61</sup>.

U ovim stanicama je već započelo preslagivanje gena za TCR  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  (engl. *T cell receptor*, receptor limfocita T) putem V(D)J rekombinacije (engl. *Variable (Diversity) Joining*)<sup>62-66</sup> (Slika 4). Način na koji je prekrojena regija V i složeni segmenti V, D i J u svakom pojedinom limfocitu određuju specifične antigene koje će taj limfocit vezati. Kako bi se preslagivanje gena moglo nazvati uspješnim, gen mora dati upute za sintezu potpunog proteina koji se može povezati s partnerskim lancem i ugraditi se u membranu ( $\beta$  s lancem pre- $\alpha$ ,  $\gamma$  s lancem  $\delta$ )<sup>2,67</sup>.

Proces provjere uspješnosti preslagivanja lanca  $\beta$  TCR te stvaranja pre-TCR zajedno s lancem pre- $\alpha$  naziva se  $\beta$  selekcija, prema lancu na kojega je usmjerena. Stanice koje su uspješno završile ovaj proces dobiti će signal za preživljenje i/ili proliferaciju (Slika 5). Još uvijek nije u potpunosti jasno u kojem stadiju diferencijacije limfocita T se događa  $\beta$  selekcija budući da su presloženi lokusi V-D-J lanca  $\beta$ , pa čak i cjeloviti TCR $\beta$  u citoplazmi, pronađeni u manjem dijelu CD4ISP te u četvrtini stanica CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup><sup>66</sup>. Suprotno ovim otkrićima, pronađeno je kako je pre-TCR kompleks eksprimiran na površini timocita tek na dvostruko pozitivnim, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, stanicama<sup>68</sup>. Uzevši ova saznanja u obzir, izgledno je kako  $\beta$  selekcija počinje u manjem dijelu CD4ISP te se nastavlja paralelno sa stjecanjem ekspresije CD8 $\alpha$  te CD8 $\beta$ .

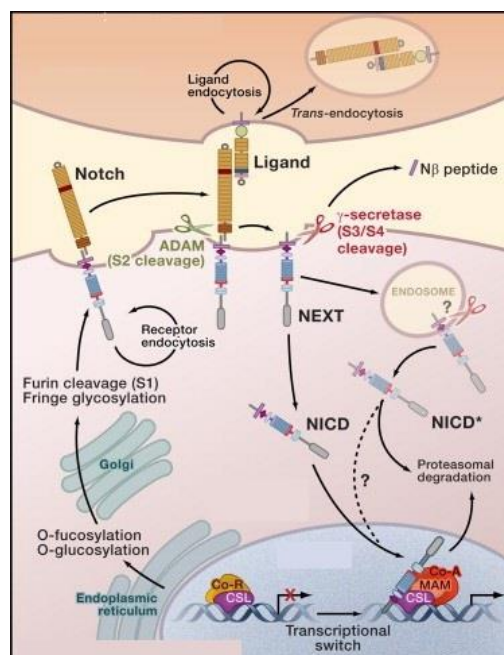
U stanicama koje su dobile signal za preživljenje sada se konačno određuje sudbina limfocita T. Većina limfocita T eksprimira TCR koji se sastoji od lanaca  $\alpha$  i  $\beta$  ( $\alpha\beta$  limfocit T), no u manjem dijelu limfocita T TCR se sastoji od lanaca  $\gamma$  i  $\delta$  ( $\gamma\delta$  limfocit T). Za razliku od  $\alpha\beta$  limfocita T,  $\gamma\delta$  limfociti aktiviraju se većinom neovisno o molekulama MHC i prepoznaju fosforilirane mikrobne ili eukariotske metabolite, markere staničnog stresa i lipidne antigene<sup>69-71</sup>. Njihova aktivnost usmjerena je na održavanje homeostaze tkiva, protu-tumorsko djelovanje te borbu protiv infekcija. Još uvijek nije u potpunosti jasno na koji način limfociti T odabiru svoju sudbinu. Prekursori limfocita T mogu ekspimirati pre-TCR ili TCR  $\gamma\delta$  i zadržavati potencijal diferencijacije u oba tipa limfocita T. Trenutno je najizgledniji model snage signala koji tvrdi kako akumulacija snage signala dobivenih putem TCR  $\gamma\delta$  dovodi do pojačane aktivacije signalnog puta ERK-MAPK čime se pojačava transkripcija faktora EGR1 i 3 (engl. *Early Growth Response*) te ID3 (engl. *Inhibitor of DNA Binding 3*). Akumulacija proteina ID3 inhibira regulator staničnog ciklusa E2A bitan u timocitima i dovodi do ekspresije gena specifičnih za  $\gamma\delta$  limfocite T<sup>72</sup>. Zajedno s TCR u određivanju sudbine limfocita T sudjeluje i mikrookoliš u kojem se nalaze prekursori putem signalnog puta Notch. Kombinacijom jake aktivacije signalnog puta Notch i slabih signala s TCR  $\gamma\delta$  inducira se diferencijacija u  $\gamma\delta$

limfocite T koji proizvode citokin IL-17; jaka aktivacija signalnog puta Notch i TCR  $\gamma\delta$  dovodi do diferencijacije u stanice koje proizvode citokin IFN $\gamma$ <sup>73,74</sup>.

Diferencijacija u  $\alpha\beta$  limfocite T nepovratno je određena prekrajanjem lokusa TCR $\alpha$  budući da ovo prekrajanje dovodi do delecije lokusa  $\delta$ <sup>75</sup>. Prekrajanje TCR $\alpha$  dovodi do stvaranja cjelovitog i funkcionalnog receptora limfocita T.

Epitelne stanice kore timusa na površini eksprimiraju molekule glavnog sustava tkivne podudaranosti, molekule MHC I i II. Dvostruko pozitivni timociti koji se putem receptora TCR slabo vežu na MHC primiti će signal za preživljenje, dok će oni koji taj signal ne prime umrijeti apoptozom. Ovaj proces naziva se pozitivna selekcija<sup>5,6</sup> (Slika 5). Ovisno o tome veže li se TCR za MHC I ili II, dvostruko pozitivni prekursor razviti će se u citotoksični CD8<sup>+</sup> limfocit T (MHC I) ili u pomagački CD4<sup>+</sup> limfocit T (MHC II)<sup>7</sup>.

Nezreli limfociti koji prežive selekciju migriraju prema granici kore i srži. Kako bi se izbjeglo otpuštanje auto-reaktivnih limfocita T u periferiju, epitelne stanice srži eksprimiraju periferne antigene na molekulama MHC I ili II. Vežu li se jednostruko pozitivni timociti prejako za molekulu MHC u njima će se pokrenuti signalni put koji vodi u apoptozu. Ovaj proces naziva se negativna selekcija<sup>8</sup> (Slika 5). Po uspješnom završetku pozitivne i negativne selekcije jednostruko pozitivni limfociti T otpuštaju se u periferiju. Svega 2-4% prekursora limfocita T sazrije do otpuštanja u periferiju.



Slika 6. Signalni put Notch. Preuzeto i prilagođeno iz Kopan i Ilagan, 2009<sup>76</sup>.



U procesu diferencijacije limfocita T izuzetno je bitan signalni put Notch, prvi puta otkriven u T-ALL (akutna limfoblastična leukemija limfocita T) gdje njegova konstitutivna aktivacija dovodi do nekontroliranog umnažanja prekursora limfocita T<sup>77,78</sup>. Notch je signalni put koji ovisi o međusobnom kontaktu dvije stanice putem jednoga od 4 receptora NOTCH s jednim od 5 liganada (JAGGED-1 i -2 te DLL-1, -3 i -4, engl. *Delta-Like Ligand*). U ljudi i sisavaca, receptori sadrže izvanstaničnu domenu, transmembransku domenu i unutarstaničnu domenu. Vezanjem liganda za receptor oslobađa se izvanstanična domena receptora Notch pomoću obitelji proteaza ADAM (engl. *A Disintegrin And Metalloprotease*); nakon izvanstanične oslobađa se i unutarstanična domena receptora putem kompleksa  $\gamma$ -sekretaze. Unutarstanična domena premješta se u jezgru gdje heterodimerizira s koaktivatorima i transkripcijskim faktorom CBF-1 (RBPJ, engl. *Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J Region*) čime postaje transkripcijski aktivator ciljanih gena (Slika 6). Signalni put Notch prisutan je u svakom koraku diferencijacije limfocita T, počevši od prisutnosti liganada i receptora na CD34<sup>+</sup> prekursorima, stanicama strome koštane srži te timusnim epitelnim stanicama<sup>79-81</sup>. Različiti receptori i ligandi signalnog puta Notch te njihova interakcija, upravljaju različitim aspektima hematopoeze, omogućuju samoobnavljanje matičnih stanica te utječu na odluke o staničnoj sudbini. Ovo je posebno točno za timus, gdje je u miševa pronađena različita ekspresija liganda signalnog puta Notch u različitim zonama timusa<sup>82</sup>. Zonalna podjela ekspresije receptora i liganada potvrđena je i u ljudi<sup>83</sup>. Aktivacija signalnog puta Notch putem receptora NOTCH-1 uzrokuje diferencijaciju prekursora u limfocite T, nauštrb diferencijacije u limfocite B<sup>84,85</sup>. Jednako tako, ciljana inaktivacija signalnog puta Notch dovodi do zastoja u razvoju timocita<sup>86</sup>.

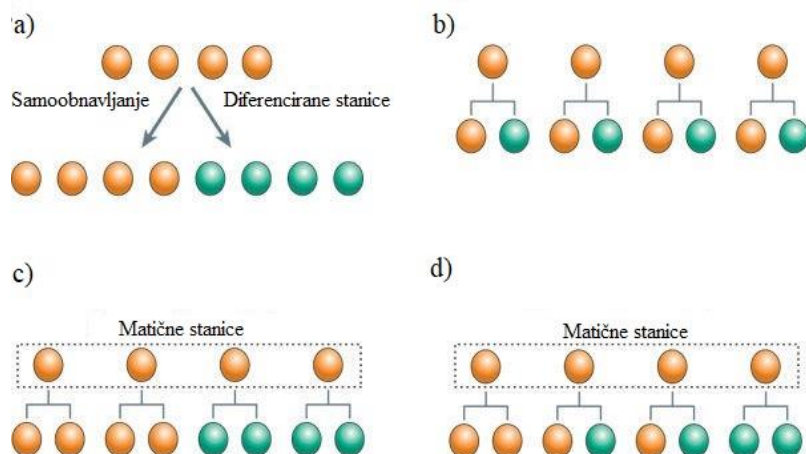
Uz signalni put Notch, u ranim procesima sazrijevanja prekursora limfocita T sudjeluje i signalizacija putem interleukina-7 (IL-7). Inhibicija IL-7 u eksperimentalnim uvjetima dovodi do smanjenja broja timocita, a poznato je i kako ovaj citokin regulira ekspresiju gena *TCR- $\gamma$* <sup>87,88</sup>. U miševa, delecija gena za IL-7 dovodi do inhibicije progresije sazrijevanja pro-B u pre-B prekursore limfocita B u koštanoj srži, do izraženog smanjenja timusne staničnosti te do inhibicije diferencijacije  $\gamma\delta$  limfocita T<sup>89,90</sup>. U ljudi s poremećajem signalizacije putem citokina IL-7 dolazi do teške imunodeficijencije tj. sindroma SCID (engl. *severe combined immunodeficiency*). Ekspresija receptora za IL-7 (IL7-R) smanjuje se nakon  $\beta$  selekcije kada timociti migriraju u koru<sup>91</sup>. U miševa, timociti pokazuju sniženu ekspresiju IL7-R dok ne prođu pozitivnu selekciju, nakon čega se ekspresija povećava i služi prenošenju signala preživljenja<sup>92,93</sup>. Nije poznato postoji li slična dinamika u timusu ljudi.

Signalni put Wnt (iz dva imena: wg, engl. *wingless*, gen u *Drosophili melanogaster*, i int, engl. *proto-oncogene integration-1*, homolog genu wg u sisavcima) uključen je u svim fazama razvoja limfocita T, no posebno u dvostruko negativnom stadiju<sup>94-96</sup>. Aktivacija signalnog puta Wnt uzrokuje transkripciju faktora TCF1 (engl. *Transgenic T cell Factor 1*) koji je nužan za ekspanziju dvostruko negativnih timocita<sup>97</sup>. Transkripcijski faktor LEF-1 (engl. *Lymphoid Enhancer Binding Factor 1*) djeluje sinergistički s faktorom TCF-1 i regulira diferencijaciju limfocita T i ekspresiju TCR $\alpha$ . Aktivacija signalnog puta Wnt je bitna tijekom i nakon  $\beta$  selekcije kada uzrokuje proliferaciju prekursora kao i tijekom pozitivne i negativne selekcije kada ubrzava stvaranje jednostruko pozitivnih CD8 limfocita T<sup>96,98,99</sup>.

Uz navedene signalne puteve, neovisno ili zajedno s njima, u razvoj limfocita T uključen je i cijeli niz transkripcijskih faktora koji sudjeluju u diferencijaciji, preživljenju, ekspanziji, selekciji i migraciji prekursora.

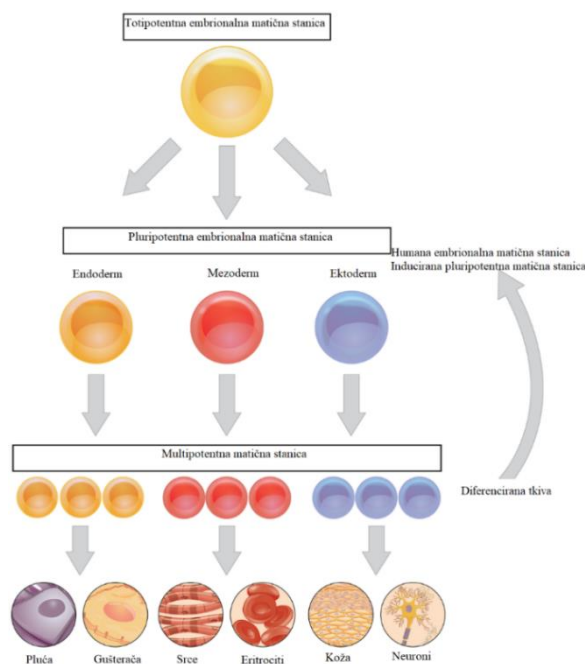
### 2.3. Matične stanice

Matične stanice su stanice koje imaju mogućnost samoobnavljanja te koje diobom mogu stvoriti stanice jednake sebi (klonalnost) i stanice usmjerene jednu od nekoliko staničnih sudbina (multipotentnost). Ove značajke ne mogu se razmatrati nezavisno jedna od druge. Samoobnavljanje nije samo dioba stanice već i osiguravanje opstanka populacije matičnih stanica u tkivima i razvojnog potencijala matične stanice tj. multipotentnosti. Očuvanje značajki matičnih stanica odvija se kroz nekoliko strategija koje nisu međusobno isključive (Slika 7). Asimetrična dioba stanica stvara jednu stanicu s matičnim karakteristikama te jednu stanicu koja je usmjerena u diferencijaciju. Ovakvom diobom se održava postojeći broj matičnih stanica i homeostaza tkiva, no njome se ne može povećati populacija matičnih stanica (Slika 7a i 7b). Matične stanice mogu se i simetrično podijeliti i tako stvoriti dvije matične stanice ili dvije stanice usmjerene u diferencijaciju (Slika 7c). Jednolika populacija matičnih stanica ne mora se uniformno dijeliti (Slika 7d). Na sudbinu stanica nastalih diobom matične stanice utječu unutarnji faktori ishodišne stanice, no i faktori iz okoliša.



Slika 7. Modeli diobe populacije matičnih stanica. Preuzeto i prilagođeno prema Morrison i Kimble, 2006

Matične stanice nalaze se u svim multicelularnim organizmima, počevši od žarnjaka. Prema potencijalu za diferencijaciju, razlikujemo pluripotentne (stvaraju stanice sva tri zametna sloja) i multipotentne (stvaraju stanice jednog zametnog sloja). Prema tkivu porijekla razlikujemo embrionalne matične stanice, dobivene iz unutarnje stanične mase blastociste; matične stanice pojedinih zametnih listića, dobivene iz embrija; matične stanice karcinoma; inducirane matične stanice, proizvedene reprogramiranjem diferenciranih stanica te tkivne ili somatske matične stanice koje nalazimo u odraslim tkivima (Slika 8).

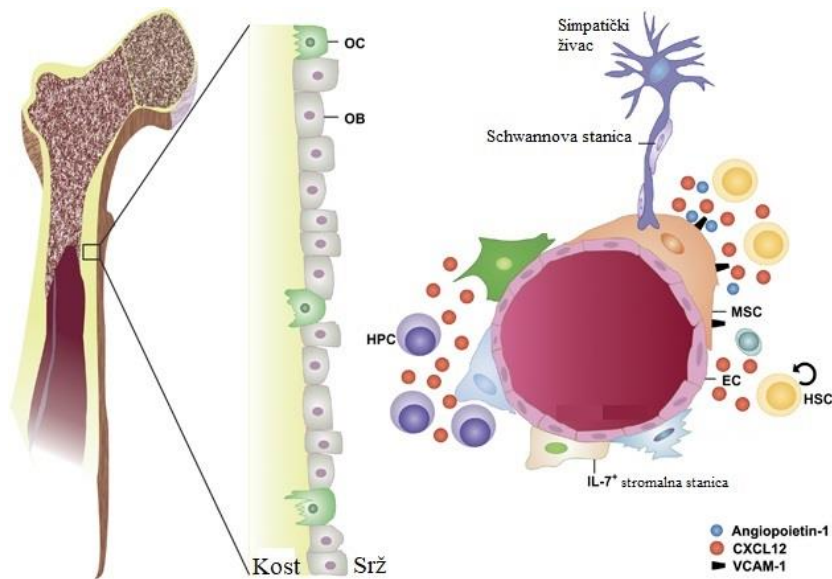


Slika 8. Različiti tipovi matičnih stanica prema porijeklu i potencijalu za diobu. Preuzeto i prilagođeno prema cnx.org

Tkivne matične stanice su nediferencirane stanice prirodno prisutne u postnatalnim tkivima u kojima imaju funkciju održavanja, obnavljanja te saniranja ozljeda. Uz samoobnavljanje, karakterizira ih i sposobnost diferencijacije u nekoliko tipova stanica određenog organa. Ova njihova svojstva čine ih idealnim za primjenu u regenerativnoj medicini. Postojanje populacija ovih stanica u svim ili gotovo svim tkivima otvara mogućnost za njihovu ekspanziju *in vivo* ili *ex vivo*, stimulaciju i diferencijaciju. Uz potencijal u pomlađivanju tkiva te liječenju ozljeda, tkivne matične stanice potencijalno bi se mogle iskoristiti i za liječenje nasljednih ili tkivno degenerativnih bolesti te čak i karcinoma. S druge strane, postoje dokazi kako tkivne matične stanice s godinama akumuliraju genetske i epigenetske promjene i oštećenja koja mogu uzrokovati njihovu transformaciju u maligne matične stanice karcinoma.

Iako je prva uspješna alogena transplantacija koštane srži izvedena 1968. godine, hematopoetske matične stanice iz koštane srži izolirane su dva desetljeća kasnije. Koštana srž je prvo tkivo odrasle jedinke iz kojega su izolirane matične stanice<sup>46</sup>. U godinama koje su slijedile, tkivne matične stanice izolirane su iz krvnih žila, adipoznog tkiva, skeletalnih i srčanih mišića, pluća, jetre, tankog i debelog crijeva, kože, dojke, prostate i jajnika<sup>100-108</sup>. Istraživanja kojima bi se u potpunosti karakterizirale tkivne matične stanice još uvijek traju, no njihova primjena u regenerativne i kurativne svrhe već se razvija.

Tkivne matične stanice u organizmu se nalaze u specifičnom mikrookolišu nazvanom niša matičnih stanica. Mikrookoliš matičnih stanica nije samo njihova fiziološka lokacija već uključuje i razmjenu signala među stanicama te između stanica i izvanstaničnog matriksa. Stanice niše komuniciraju s matičnim stanicama koje se u njima nalaze, pružaju im signale koji reguliraju njihovu diobu i diferencijaciju, osiguravaju očuvanje populacije matičnih stanica, njihovog potencijala za diobu te kontroliraju sudjelovanje matičnih stanica u regeneraciji tkiva (Slika 9)<sup>109-111</sup>.



**Slika 9.** Niša hematopoetske matične stanice kao primjer mikrookoliša. Preuzeto i prilagođeno prema Riether i sur., 2014<sup>112</sup>. OC su osteoklasti, OB osteoblasi, MSC mezenhimske matične stanice, EC endotelne stanice, HSC hematopoetske matične stanice, HPC hematopoetski progenitori

Niše su jedinstvene i specifične za matične stanice koje u njima obitavaju, pa su tako i signalni putevi i njihova međudjelovanja koji osiguravaju opstanak matičnih stanica u svakoj niši posebni, no neki se signali ipak dosljedno javljaju u većini dobro opisanih niša. Uz već opisani signalni put Notch, koji ulogu ima i u nišama matičnih stanica, signalni putevi Wnt (kanonski i dva tipa ne-kanonskog) pronađeni su u nizu matičnih stanica gdje reguliraju samoobnavljanje<sup>113,114</sup>. Molekule iz superobitelji BMP/TGF $\beta$  (engl. *bone morphogenic protein*, engl. *Transforming Growth Factor beta*) uključene su u procese održavanja matičnih stanica, no, budući da postoji 20 različitih proteina BMP, njihova je funkcija različita u svim nišama pa tako u intestinalnim matičnim stanicama inhibira aktivaciju i ekspanziju dok kod hematopoetskih matičnih stanica kontrolira veličinu niše i samim time broj matičnih stanica<sup>115,116</sup>. Signalni put Hedgehog (SHH) nužan je tijekom organogeneze kralježnjaka, no ima i ulogu u odraslim tkivima gdje kontrolira diobu matičnih stanica. Njegov utjecaj na matične stanice pronađen je u mozgu, mokraćnom mjehuru, koštanoj srži te mnogim drugim tkivima<sup>117–119</sup>. Uz istaknute, poznat je i utjecaj faktora SCF (engl. *stem cell factor*, faktor matičnih stanica) i HGH (engl. *human growth hormone*, ljudski hormon rasta), različitih fibroblastnih faktora rasta, više raznih interleukina te ostalih citokina i kemokina.

#### 2.4. Uzgoj stanica u posebnim uvjetima *in vitro*

Od početka 20. stoljeća moguće je stanice primarnih tkiva izolirati te uzgajati izvan tijela. Potencijal primarnih stanica za diobu je ograničen, no njihovom imortalizacijom dobivene su uniformne stanične loze koje se, za razliku od primarnih stanica, mogu neograničeno dijeliti i održavati *in vitro*. Stanice se, ovisno o tipu, uzgajaju u suspenziji ili adherirane za podlogu. U posljednjih 120 godina, tehnike za izolaciju stanica te njihov uzgoj napredovali su pa tako danas postoje posebno prilagođene tekuće, krute i polukrute podloge te dodaci.

Bez obzira na razvoj metodologije, stanice i stanične linije se još uvijek većinom uzgajaju u „dvije dimenzije“ tj. u jednom sloju, zalijepljene na podlogu koja može sadržavati različite molekule ekstracelularnog matriksa ili naboje, s medijem koji je statičan iznad njih. Ovakav uzgoj održava stanice na životu i omogućuje im proliferaciju, no nije reprezentativan za tkivni rast prirodan za stanice u kojem značajnu ulogu imaju interakcije među stanicama te između stanica i ekstracelularnog matriksa<sup>120</sup>. Stanicama koje rastu na podlozi neizbježno se mijenja oblik i geometrija, dolazi do promjena u citoskeletu te obliku jezgre što može modificirati ekspresiju gena<sup>121,122</sup>.

Ovo je posebno važno za matične stanice koje se u kulturi mogu održavati jedino ako su uspješno reproducirani uvjeti njihovog prirodnog mikrokoliša. Osiguravanje dostupnosti faktora rasta, interakcije između stanica te između stanica i matriksa omogućava zadržavanje pluripotencije i mogućnosti samoobnavljanja. U određenim tipovima kulture humanih matičnih stanica koriste se kokulture s inaktiviranim mišjim embrionalnim fibroblastima koji podržavaju rast i sprječavaju diferencijaciju, no uzgoj humanih stanica sa animalnim komponentama uvijek sa sobom nosi rizik kontaminacije i smanjene reproducibilnosti zbog varijacija između proizvodnih serija komponenti.

Kulturu staničnih agregata, koju su tijekom 1940-ih i 1950-ih razvili razvojni biolozi J. Holtfreter i A. Moscona, 1971. su godine Sutherland, McCredie i Inch prilagodili za eksperimente istraživanja karcinoma<sup>123</sup>. Naime, otkrili su kako stanična linija pluća kineskog hrčka V79 u kulturi stvara sferoide morfološki slične nodulima koje stvara mišja stanična linija karcinoma dojke C3H kada se transplantira u srodnog miša. Ovi noduli primijećeni su i u pacijenata s rakom dojke te je ubrzo prepoznata važnost uzgoja tumorskih stanica u obliku agregata za terapijska ispitivanja<sup>123</sup>. Nedugo potom, tehnika je translirana i na istraživanja

interakcije i komunikacije između stanica, invazije tumora, angiogeneze te, napokon, na istraživanje matičnih stanica.

Stanični agregati se u istraživanjima nazivaju različitim imenima, kao što su sfere, mikromase, sferoidi i organoidi. Sfere i sferoidi se najčešće koriste za agregate stvorene od jednog tipa stanica, dok se izraz organoidi koristi za opisivanje heterogenih agregata koji *in vitro* prikazuju mikroanatomiju tkiva. Tkivne i inducirane matične stanice, uzgajane na odgovarajući način, proliferiraju i samoorganiziraju se te stvaraju organoidne strukture. Organoidi se mogu disocirati i propagirati te, u mnogim sustavima, neograničeno održavati u kulturi<sup>124</sup>. Do danas, organoidi su stvoreni od matičnih stanica niza organa kao što su jetra, gušterača, prostata i dojka, no najpoznatiji primjer primjene organoida nastalih od matičnih stanice je enteroidni model stanica gastrointestinalnog trakta<sup>124-127</sup>. Formirani organoidi enteroidnog modela mogu se nasaditi u jednosloj u kojem formiraju sličnu arhitekturu tkiva kao što se nalazi *in vivo*, s četiri različita stanična tipa<sup>128,129</sup>. Ovakav model tankog crijeva već je pronašao primjene u bazičnim istraživanjima kao što su interakcije među stanicama te između stanica i patogena, no i u primijenjenim istraživanjima poput djelovanja lijekova<sup>130-132</sup>.

Interakcija stanica u ovakvim kulturama u tri dimenzije daleko bolje oponaša tkivni okoliš stanica od njihovog uzgajanja u jednosloju. Sukladno tome, i ponašanje stanica se drastično mijenja. Primjerice, primarni artikularni hondrociti i hepatociti gube svoj normalni fenotip ukoliko ih se odstrani iz tkiva i uzgaja kao adherentnu kulturu, no uzgajani kao sferoidi zadržavaju svoja svojstva<sup>133,134</sup>. Razlike u ponašanju stanica ovisne o formi njihove kulture mogu se pripisati utjecaju interakcija između stanica te interakciji stanica s ekstracelularnim matriksom kojega, u sferoidima, luče same stanice.

Veličina agregata ograničena je manjkom vaskularne mreže, zbog čega dolazi do nejednake distribucije kisika i nutrijenata. Iz tog razloga, stanice unutar agregata rastu u pojasevima i podijeljene su na vanjsku zonu koja aktivno proliferira, srednju zonu koja većinom nije u diobi te, u većih agregata, unutarnju nekrotičnu zonu<sup>123,135</sup>.

Kako bi se omogućilo stvaranje sferoida potrebno je stanicama onemogućiti stvaranje trajnog kontakta s podlogom tj. osigurati uvjete u kojima su kontakti između stanica jači od onih ostvarenih s podlogom. Povijesno su se u ove svrhe koristile kulture stanica u kojima je medij stalno miješan ili je boca pomicana kako se stanice ne bi mogle istaložiti na podlogu, korištena je i agarozom prekrivena podloga koja je onemogućavala kontakt stanica s podlogom. Korišteni su supstrati za imobilizaciju pojedinačnih stanica u polutekućem gelu koji stanicama

služi kao prilagodljivi nosač. Tehnika viseće kapi još uvijek se primjenjuje kako bi se stvorili agregati na dnu kapi. Ovisno o posebnostima i potrebama pokusa, u današnje vrijeme najčešće se koristi posebno pripremljena plastika. Kako bi se izbjegla primjena životinjskih komponenti u mediju, umjesto fetalnog goveđeg seruma korištenog u standardnim jednoslojnim kulturama, koriste se dobro definirani dodaci i faktori rasta.

#### 2.4.1. Uzgoj limfocita T

Za razliku od mnogih primarnih tkiva, limfociti T i njihovi prekursori izolirani iz periferne krvi ili timusa, ne mogu rasti i preživljavati *in vitro* bez prisutnosti potporne strome. Uzgajani s jednoslojem primarnih timusnih stromalnih stanica, timociti i hematopoetski prekursori mogu se razviti u zrele, jednostruko pozitivne limfocite T<sup>136-138</sup>. Iako su u stanju podržati njihov razvoj, kulture stromalnih stanica uskoro izgube ovu mogućnost. Iz ovog se razloga dugo smatralo kako su trodimenzionalne kulture nužne za uzgoj limfocita T. Zaista, stanice timusne strome uzgajane na biokompatibilnim matricama podržavaju rast i razvoj limfocita T<sup>139,140</sup>. Uskoro je postalo jasno kako signalni put Notch zauzima centralnu ulogu u procesu diferencijacije limfocita T te su, sukladno s time, izvedeni pokusi kojima je utvrđen značaj pojedinih liganda i receptora<sup>82,84,141</sup>. Kasnijim istraživanjima s timusnom stromom pronađeno je kako stanice strome gube mogućnost održavanja diferencijacije limfocita T jer prelaskom iz trodimenzionalne arhitekture u dvodimenzionalnu izgube ekspresiju liganda signalnog puta Notch DLL1 i -4<sup>142</sup>.

Donedavno je jedini način uzgoja limfocita T *in vitro* bio korištenje tkiva timusa fetusa miševa starih 11.5 dana. U ovom periodu razvoja timusa miša još nije razvijena njegova vaskulatura, no timus miša počinju naseljavati prekursori limfocita T<sup>143</sup>. U ovom sustavu, nazvanom FTOC, timusni se lobusi nasele hematopoetskim prekursorima tijekom zajedničke inkubacije u visećoj kapi. Timusni lobusi s prekursorima zatim se uzgajaju na filteru položenom na želatinoznu spužvicu uronjenu u odgovarajući medij. Na ovakav je način moguće pratiti razvoj limfocita T u željenim vremenskim točkama. U hibridnom sustavu u kojem su korišteni ljudski prekursori i mišji fetalni timus, iz fetalnih i postnatalnih timocita, ali i prekursora iz koštane srži, dobiveni su jednostruko pozitivni, zreli, limfociti T, no potrebno je naglasiti kako je kolonizacija timusnih lobusa uvjetovana prisutnošću stromalnih elemenata ljudskog timusa<sup>144-146</sup>. Specifičan način uzgoja u sustavu FTOC, zajedno s pokusima koji su se bavili povećanjem njegove učinkovitosti, naglašavaju važnost oksigenacije za funkciju timusa<sup>147</sup>.



Za razliku od sustava FTOC, sustav RTOC za uzgoj timusnog organa iz reagriranih stanica, usredotočen je na proučavanje uloge različitih komponenata timusne strome u usmjeravanju diferencijacije limfocita T. Stanice timusa se sortiraju na stanične tipove koji se zatim, u točno definiranim omjerima, miješaju s hematopoetskim prekursorima ili prekursorima limfocita T. Na ovaj je način otkriveno kako su i mezenhimske stanice nužne za potpunu diferencijaciju timocita<sup>148</sup>.

Organski sustavi poput RTOC i FTOC pružili su istraživačima mogućnost da pobliže analiziraju mehanizme diferencijacije limfocita T iz njihovih usmjerenih prekursora ili matičnih stanica

Potreba za stvaranjem jednostavne jednoslojne kulture stanica koja bi podržavala razvoj limfocita T dovela je do stvaranja sustava kokulture s mišjim stanicama OP9 transficiranim s ligandom signalnog puta Notch DLL1. Uzgajanje HSC i drugih prekursora limfocita T u raznim nezrelim stadijima sa stanicama OP9-DLL1 *in vitro* uspješno dovodi do sazrijevanja u limfocite T<sup>149-151</sup>.

Iako ovaj način uzgoja omogućava proučavanje razvoja limfocita T i njihovih progenitora, ipak postoje i praktični nedostaci. Stanice OP9 ekspimiraju mišje molekule MHC I, no ne i MHC II pa stoga omogućavaju razvoj mišjih CD8<sup>+</sup>, ali ne i CD4<sup>+</sup> limfocita T. Sukladno tome, stanice OP9-DLL1 podržavaju diferencijaciju ljudskih prekursora limfocita T do dvostruko pozitivnog stadija razvoja, no stvaranje zrelih limfocita T vrlo je ograničeno<sup>152</sup>. Smatra se kako je krajnja diferencijacija humanih limfocita T u ovakvom sustavu posljedica interakcije između timocita. Interakcija između prekursora može služiti kao nadomjestak za pozitivnu selekciju, čak i bez prisutnosti molekula MHC II<sup>153</sup>. Čak i kada bi se stanice OP9 transficirale humanim molekulama MHC II, uzgojeni limfociti T imali bi vrlo ograničen repertoar.

S obzirom na opisano, jasno je kako uzgoj ljudskih limfocita T u *in vitro* uvjetima ostaje dugotrajan i zahtjevan proces. Uzgoj i propagacija većih količina autoloških ljudskih limfocita T u svrhu transplantacije za sada ostaje nemoguća

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Tkiva ljudi

Timusi odstranjeni kako bi se omogućile i olakšale izvedbe operacija srca pri Kliničkom bolničkom centru Zagreb, Rebro, namijenjeni zbrinjavanju kao medicinski otpad, korišteni su u istraživanjima uz informirani pristanak pacijenata ili njihovih skrbnika.

Disertacija je financirana iz projekata koji su dobili pozitivno mišljenje bioetičkih povjerenstava Instituta Ruđer Bošković (BP-5865/1-2013) i Kliničkog bolničkog centra Zagreb (Klasa: 8.1.-13/88-2, broj:02/21-BTB) u skladu s Helsinškom deklaracijom. Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu zaključilo je kako je doktorska disertacija etički prihvatljiva (Ur. broj: 380-59-10106-17-100/55, klasa: 641-01/17-02/01).

#### 3.2. Mehanička i enzimatska disocijacija tkiva

Timusi odstranjeni prilikom operacija srca u Kliničkom bolničkom centru Zagreb po primitku su izvagani i očišćeni od masnog tkiva, kapilara i ugrušaka. Komad očišćenog tkiva (~ 1 gram) konzerviran je u 4% puferiranom formaldehidu za daljnje imunohistokemijske metode. Ostatak timusa usitnjen je te ispiran fosfatnim puferom (engl. *phosphate buffer saline*, PBS) s dodatkom 5% seruma (engl. *foetal calf serum*, FCS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, MA, SAD) kako bi se odstranila što veća količina timocita oslobođenih tijekom usitnjavanja.

Jedan gram usitnjenog tkiva odvojen je u staklenu epruvetu te resuspendiran u 3 ml 1 mg/ml otopine kolagenaze 2 (Worthington, NJ, SAD) pri 37°C. Kolagenaza je enzim koji razgrađuje peptidne veze u molekulama kolagena čime se uništava izvanstanični matriks i oslobađaju pojedinačne stanice. DNaza I (Roche, SUI) je enzim koji razgrađuje molekule DNA, u ovom slučaju korišten kao dodatak kolagenazi kako bi spriječio agregaciju stanica uslijed eventualnog oslobađanja DNA iz oštećenih ili mrtvih stanica. Tkivo je inkubirano u vodenoj kupelji zagrijanoj na 37°C tijekom 15 min, a komadići tkiva su svakih 5 min resuspendirani pomoću plastične Pasteur-ove pipete. Po isteku vremena inkubacije, suspenzija oslobođenih stanica je sakupljena, a tkivo ponovno resuspendirano u zagrijanoj otopini enzima. Ovaj postupak ponovljen je četiri puta nakon čega je na tkivo nanoseno 3 ml 0,02% EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina, Lonza, SUI) zagrijanog na 37°C i inkubirano 15 min.

Po završetku finalne inkubacije, u epruvetu s razgrađenim tkivom dodano je 3 ml PBS s 5% FCS i 0,1 mg/ml DNaze I te je suspenzija stanica propuštena kroz sito promjera pora 70 µm (Falcon, BD, NJ, SAD). Opisani protokol digestije dovodi do potpune razgradnje tkiva.

Stanična suspenzija dobivena posljednjim ciklusom razgradnje tkiva korištena je u daljnjim eksperimentima.

Broj te vijabilnost stanica u prikupljenim suspenzijama dobivenim razgradnjom tkiva izmjereni su dva puta, od strane dva neovisna istraživača, u Neubauer komorici uz prisutnost tripanskog modrila koje stanice s narušenim integritetom membrane (mrtve stanice) boji u plavo. Također, broj stanica potvrđen je brojenjem pomoću automatskog brojača stanica Bio-Rad (CA, USA).

### 3.3. Testiranje enzima i protokola

Kako bi se usavršio protokol koji daje najbolji prinos i vijabilnost stanica svaki pojedini korak protokola je testiran. U Tablici 1 nalaze se testirani enzimi, metode i vrijeme inkubacije.

Tablica 1. Testirane komponente protokola razgradnje tkiva timusa

Testirana komponenta	Varijabla
Tip i snaga kolagenaze	Worthington 125 U/mg
	Worthington 255 U/mg
	Worthington 355 U/mg
	Roche 250 U/mg
Posljednji ciklus razgradnje	TripLE Select
	Trypsin-EDTA
	Versene (EDTA)
Koncentracija kolagenaze	0,5 mg/ml
	1 mg/ml
	2 mg/ml
Koncentracija DNaze I	0,05 mg/ml
	0,1 mg/ml
Trajanje pojedinih inkubacija	15 min
	20 min
	30 min

Tablica 1. – nastavak Testirane komponente protokola razgradnje tkiva timusa

Testirana komponenta	Varijabla
Mehanička komponenta	Inkubacija na tresilici s grijanjem
	Inkubacija u vodenoj kupelji uz periodičko mehaničko miješanje

Svaka od komponenti navedenih u Tablici 1 testirana je na jednakoj masi tkiva istog pacijenta. Kao parametar učinkovitosti enzima, nakon svakog ciklusa digestije određen je broj stanica i njihova vijabilnost pomoću tripanskog modrila. Također, stanice dobivene posljednjim ciklusom razgradnje tkiva obilježene su mišjim protutijelima za ljudske glikoproteine CD3, CD4, CD8 i CD45 te analizirane na protočnom citometru (FACSCalibur, BD) kako bi se utvrdila očuvanost cjelovitosti antigena pod utjecajem enzima.

### 3.4. Uspostavljanje uvjeta za rast matičnih stanica

Kako bi se ostvarili uvjeti za uzgoj stanica koje u tri dimenzije ostvaruju kontakt jedna s drugom te s okolišem *in vivo*, potrebno im je onemogućiti vezanje za podlogu. Iz ovog razloga, za uspostavu kulture korištena je plastika posebno tretirana za potrebe trodimenzionalne kulture (Corning®, NY, SAD). Kultura organoida pokušala se uspostaviti i u netretiranom plastičnom posuđu (Nunc, Thermo Fisher Scientific), no ovo nije spriječilo vezanje stanica za podlogu.

Cilj uspostave kulture organoida bio je očuvati uzgojene stanice nezrelim i spriječiti njihovo sazrijevanje. Kako bi se postigla takva kultura u kulturi nije korišten fetalni goveđi serum već niz faktora rasta i suplemenata navedenih u Tablici 2, budući da je sastav seruma nedefiniran. Za podlogu je korišten medij  $\alpha$ MEM (engl. *Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification*, Gibco).

Tablica 2. Sastav medija za uzgoj organoida

Komponenta	Proizvođač	Koncentracija
B27 – A0	Gibco	1x
Osnovni fibroblastni faktor rasta (bFGF)	Peptotech	20 ng/ml
Epitelni faktor rasta (EGF)	Peptotech	20 ng/ml
Inzulin	Gibco	5 $\mu$ g/ml

Tablica 2. – nastavak Sastav medija za uzgoj organoida

Komponenta	Proizvođač	Koncentracija
Heparin	Sigma	4 µg/ml
Hidrokortizon	Sigma	5 µg/ml

Osim navedenog testirane su i podloge MEBM (engl. *Mammary Epithelial Cell Basal Medium*, Lonza), DMEM/F12 (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*, Gibco) te X-VIVO (Lonza).

Uz ovo, testirana je i nužnost prisutnosti bFGF za formaciju organoida. Odgovarajući medij izabran je prema sposobnosti formulacije da podrži rast što većeg broja organoida.

### 3.5. Procjena bioloških razlika između uzoraka te učinkovitosti tretmana

Kako bi se procijenio potencijal tkiva različitih pacijenata za stvaranje organoida *in vitro* tj. sadržaj matičnih stanica timusa različitih pacijenata, stanice posljednjeg ciklusa razgradnje nasadene su u kvintaplikatima u koncentraciji od  $10^5$  stanica/ml u uvjetima pogodnima za stvaranje organoida. Trinaest dana nakon nasađivanja nastali organoidi u svakoj pojedinoj jažici izbrojeni su na svjetlosnom mikroskopu (Nikon, JP) te fotografirani na invertnom fluorescencijskom mikroskopu EVOS FL (Thermo Fisher Scientific). Ukupan broj nastalih organoida na svakih  $10^4$  nasađenih stanica razmatran je kao parametar matičnosti u pokusima koji su uključivali procjenu bioloških razlika između pojedinih timusa, optimizaciju uvjeta rasta te učinkovitost tretmana.

### 3.6. Protočna citometrija

Protočna citometrija je metoda koja se temelji na korištenju lasera za pobuđivanje fluorescencije kojom su obilježene stanice. Stanice u suspenziji se usmjeravaju putem tekućine u sustav uskih kapilara do lasera. Laser pogađa stanice, a rasapom svjetla detektiraju se fizikalne značajke stanice, poput gustoće i veličine. Ukoliko je stanica fluorescentno obilježena vlastitim unutarnjim fluorokromom ili umjetno dodanim, fluorokrom će uslijed ekscitacije s laserom emitirati svjetlost određene, specifične, valne duljine. Svjetlost se detektira pomoću fotomultiplikatorskih tuba ili fotodioda te pretvara u digitalni signal koji se šalje u računalo povezano s citometrom u kojem se dobiveni podaci obrađuju<sup>154</sup>.

Ukoliko je bilo potrebno, adherirane stanice namijenjene za analizu prethodno su odlijepljene pomoću 0,02% EDTA (15 min).

Stanice namijenjene za analizu isprane su dva puta s puferom za ispiranje (PBS s 5% FCS), raspoređene te centrifugirane pri 289 g 10 min 4°C. Korištena protutijela i njihova funkcionalna razrjeđenja testirana su na staničnim linijama i tkivima s poznatom ekspresijom odgovarajućih antigena. Radne koncentracije protutijela pripravljene su razrjeđivanjem u puferu za ispiranje. Ukoliko su protutijela korištena za obilježavanje antigena unutar stanice, razrjeđenja su pripravljena u puferu za permeabilizaciju (Perm/Wash®, BD).

#### *3.6.1. Obilježavanje površinskih antigena*

Stanice pripremljene na opisan način su inkubirane s protutijelima obilježenim s fluorokromima 20 min na ledu u mraku, nakon čega su isprane i resuspendirane. Propidij jodid korišten je kako bi se iz analize isključile mrtve stanice. Kada su korištena neobilježena protutijela na određene antigene stanice su nakon ispiranja inkubirane s odgovarajućim obilježenim protutijelom na već opisan način.

#### *3.6.2. Obilježavanje unutarstaničnih antigena*

Za obilježavanje unutarstaničnih protutijela stanice su prvo obilježene aminskom bojom koja se kovalentno veže za amine unutar stanice i na njenoj površini (LIVE/DEAD® fixable red cell stain, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, prema uputama proizvođača). Stanice koje imaju kompromitiranu membranu daju jači signal jer je boja u mogućnosti vezati se za unutarstanične amine. Vezanje boje na amine je ireverzibilno i otporno na fiksaciju koja slijedi nakon toga. Stanice su fiksirane u puferu koji za bazu sadrži metanol (Cytotfix/Cytoperm otopine™, BD, prema uputama proizvođača) te permeabilizirane pomoću pufera sa saponinom (Perm/Wash™ otopine, BD, prema uputama proizvođača). Po ispiranju stanice su obilježene protutijelima na prethodno opisan način te prije analize resuspendirane u odgovarajućem volumenu pufera za ispiranje.

#### *3.6.3. Obilježavanje površinskih i unutarstaničnih antigena*

Za multiparametarsku analizu antigena različito eksprimiranih u/na stanici, primijenjeni su prethodno opisani protokoli. Uzorak je prvo obilježen aminskom bojom, zatim protutijelima za površinske antigene nakon čega je fiksiran te obilježen protutijelima za unutarstanične antigene.

#### *3.6.4. Sortiranje stanica*

Stanice razgrađenog timusa obilježene su površinskim protutijelima, kao što je opisano, te resuspendirane u odgovarajućem volumenu pufera za ispiranje s dodatkom antibiotika

(penicilin/streptomycin) pa sortirane na protočnom citometru Sony SH800 (Sony, JP). Prilikom sortiranja održavani su aseptični uvjeti te su stanice razdvojene prema odabranim markerima isprane i nasađene u uvjetima prilagođenima stvaranju organoida *in vitro*.

### 3.6.5. Obrada podataka

Podaci dobiveni protočnom citometrijom analizirani su pomoću programskog rješenja FlowJo (FlowJo, LLC, OR, SAD). Pomoću ovog programa napravljeni su i grafički prikazi rezultata.

### 3.7. Obogaćivanje prekursora magnetskom deplecijom

Suspenzija stanica dobivena u zadnjem ciklusu razgradnje tkiva inkubirana je 30 min na ledu u mraku s protutijelima za ljudske antigene napravljenima u mišu. Sva protutijela kupljena su od proizvođača eBioscience (Thermo Fisher Scientific), osim CD4, koji je kupljen od proizvođača Tonbo Bioscience (CA, SAD). Antigeni prepoznati od strane korištenih protutijela te stanice koje u ljudi obilježavaju navedena su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Popis antigena koje prepoznaju protutijela korištena za magnetsku depleciju stanica

Antigen	Stanice na kojima je eksprimiran
CD3	Limfociti T
CD4	Pomagački limfociti T
CD8	Citotoksični limfociti T
CD11b	Monociti/makrofagi, granulociti
CD14	Monociti/makrofagi, granulociti
CD16	NK stanice, monociti/makrofagi, dendritske stanice
CD19	Limfociti B, dendritske stanice
CD56	NK stanice, limfociti T
CD233	Eritrociti

Po završetku inkubacije i ispiranja, talog obilježenih stanica pomiješan je u malome volumenu (100-200  $\mu$ l) sa željeznim kuglicama na kojima su imobilizirana kozja protutijela za mišje imunoglobuline. Stanice su inkubirane sa željeznim kuglicama 20 min pri 4°C u mraku uz rotaciju. Po završetku inkubacije, stanice s kuglicama su resuspendirane u 4 ml PBS s 5%

FCS i 0,1 mg/ml DNaze I te izložene magnetu. Suspenzija iz koje su izdvojene obilježene stanice sakupljena je i obogaćenje je analizirano na protočnom citometru.

Vremena inkubacije s protutijelima, željeznim kuglicama, kombinacije protutijela te tipovi kuglica testirani su i njihova učinkovitost je utvrđena analizom na protočnom citometru prije i nakon obogaćenja. U Tablici 4 navedeni su svi parametri prema kojima je prilagođavan protokol.

**Tablica 4.** Testirane komponente protokola za magnetsku depleciju stanica

Testirana komponenta	Varijabla
Vrijeme obilježavanja s protutijelima	20 min
	30 min
Vrijeme inkubacije s željeznim kuglicama	20 min
	30 min
	40 min
Protutijela kojima su obilježene stanice	CD45
	CD45 <sup>FITC</sup>
	CD45 <sup>PerCP-Cy5.5</sup>
	CD3 <sup>PE</sup> i CD8 <sup>PE</sup>
	CD45 <sup>PerCP Cy5.5</sup> , CD8 <sup>PerCP Cy5.5</sup> , CD14 <sup>PerCP Cy5.5</sup> , CD11c, CD16
	CD45 <sup>PerCP Cy5.5</sup> , CD8 <sup>PE</sup> , CD4 <sup>FITC</sup>
	CD3, CD8, CD11b, CD14, CD16, CD56
	CD45, CD14, CD11b, CD16, CD56, CD3 <sup>PE</sup> , CD8 <sup>PE</sup> , CD19 <sup>PE</sup>
Tip protutijela na kuglicama	Kozja protu-mišja
	Ovčja protu-mišja

### 3.8. Obogaćivanje prekursora centrifugiranjem u gradijentnom mediju

Populacija stanica dobivenih razgradnjom timusa sastoji se od više različitih tipova stanica, većinu kojih čine limfociti T u različitim stupnjevima razvoja. Centrifugiranjem stanica u mediju poznate gustoće moguće je odvojiti različite tipove stanica na temelju njihovih različitih gustoća. Stanice razgrađenog timusa resuspendirane su u PBS-u s 5% FCS te



nadslojene na medij poznate gustoće. Testirani su komercijalno dostupni mediji Lymphoprep (Nycomed, SUI), Percoll (Pharmacia, NJ, SAD) i Nycodenz (Axis-Shield, UK), svi gustoće 1,070 g/ml. Epruvete su zatim centrifugirane pri 394 g i 20°C bez kočenja, nakon čega je sakupljen prsten između dvaju faza te talog stanica. Stanice su izbrojene, utvrđena im je vijabilnost, analizirane su na protočnom citometru te nasađene u uvjetima pogodnim za stvaranje organoida.

### **3.9. Obogaćivanje prekursora inkubacijom s 2'-deoksiguanozinom**

2'-deoksiguanozin (2'-dGuo) je nukleozid koji sadrži bazu gvanin i deoksiribožu. Svojstvo 2'-deoksiguanozina da selektivno ubija zrele limfocite T iskorišteno je 1982. godine za stvaranje prvog timusnog organskog sustava *in vitro* jer omogućava očuvanje timusne strome i eksperimente s transferom progenitora limfocita T<sup>155</sup>. Iz istog razloga korišten je za obogaćenje udjela stromalnih stanica u ukupnim stanicama dobivenim razgradnjom timusa.

Očišćeno i nasjeckano tkivo timusa inkubirano je na filteru s porama od 40 µm (Merck Milipore, MA, SAD) položenom na spužvicu uronjenu u medij αMEM (Gibco) s dodatkom 10% FCS i 1,35 mM 2'-deoksiguanozina (Sigma-Aldrich, Merck). Nakon kraćeg (1-2 dana) ili duljeg (5-6 dana) vremena inkubacije tkivo je razgrađeno na već opisan način. Stanice dobivene razgradnjom analizirane su protočnom citometrijom. Kako bismo procijenili potencijal za stvaranje organoida, stanice su nasađene u uvjetima prilagođenima stvaranju organoida u koncentraciji od 10<sup>5</sup> stanica/ml. Nakon 13 dana od nasađivanja, organoidi su izbrojeni i fotografirani. Tkivo korišteno za kontrolu je tretirano i inkubirano na jednak način, no bez prisutnosti 2'-dGuo u mediju.

2'-deoksiguanozin je testiran i kao dodatak mediju za uzgoj organoida. Stanice dobivene zadnjim ciklusom digestije timusnog tkiva resuspendirane su u mediju za uzgoj organoida uz dodatak 1,35 mM 2'-deoksiguanozina, nasađene u kvinataplikatu te uzgajane 13 dana. Kao kontrola su korištene iste stanice uzgajane bez 2'-deoksiguanozina u mediju.

### **3.10. Uzgoj stanica u hidrogelu**

Hidrogel je termoreverzibilni polimer koji je pri niskim temperaturama u tekućem stanju dok je pri temperaturama višim od sobne u čvrstom stanju. Nasađivanjem stanica u hidrogelu one se imobiliziraju i sprječava se njihova agregacija što je posebno korisno za dokazivanje jednostaničnog porijekla organoida. Stanice razgrađenog timusa resuspendirane su u Mebiol gelu® (Cosmo bio, JP) te nasađene u pločicu s 96 jažica. Na hidrogel u čvrstom stanju nadslojen

je medij za uzgoj kako bi stanice imale dostupne čimbenike rasta. Nakon 13 dana u kulturi, organoidi su fotografirani. Isto je izvedeno i sa stanicama disociranih organoida.

### 3.11. Utvrđivanje frekvencije matičnih stanica u tkivu – serija razrjeđenja

Obogaćene i neobogaćene stanice timusa nasađene su u kvadriplikatima u seriji razrjeđenja i njihov rast je praćen tijekom 13 dana kada su zabilježene jažice u kojima su se stvorili organoidi. Učestalost prekursora koje tvore organoide izračunata je iz podataka o razrjeđenjima pomoću programa „ELDA: Extreme limiting dilution analysis“. Budući da je zamijećeno kako nemaju sve stanice organoida jednak potencijal za samoobnavljanje, isti test ponovljen je i sa pojedinačnim stanicama primarnih organoida.

### 3.12. Reformacija organoida

Jedan od glavnih pokazatelja matičnosti je samoobnavljanje. Kako bi se stanica nazivala matičnom ona diobom mora biti sposobna stvoriti stanicu upućenu u diferencijaciju te stanicu koja zadržava matične karakteristike. Nastali primarni organoidi razgrađeni su na pojedinačne stanice inkubacijom s tripsin-EDTA te ponovno nasađeni u uvjete prilagođene stvaranju organoida. Praćeno je ponovno stvaranje organoida te je disocijacija i nasađivanje stanica ponavljano sve dok su to dopuštali broj organoida i stanica dobivenih od njih.

### 3.13. Utjecaj čimbenika rasta na broj organoida

Kako bi se utvrdilo djeluju li, i na koji način, čimbenici rasta, citokini i proteini na diobu stanica koje tvore organoide, isti su dodani u medij za njihov uzgoj prilikom nasađivanja primarnih stanica razgrađenog tkiva. Organoidi su nastali te su uzgajani u ovakvome mediju tijekom 13 dana, nakon čega su izbrojeni. Isto je ponovljeno i sa disociranim stanicama već nastalih organoida.

Testirani čimbenici rasta, citokini i proteini te koncentracije u kojima su korišteni navedeni su u Tablici 5. Svi korišteni reagensi kupljeni su od proizvođača Peprotech (NJ, SAD).

**Tablica 5.** Testirani čimbenici rasta, proteini i citokini s pripadajućim koncentracijama

Čimbenik rasta	Testirane koncentracije (ng/ml)		
Ljudski hormon rasta (engl. <i>human growth hormone</i> , HGH)	10	50	100
Keratinocitni čimbenik rasta (engl. <i>keratinocyte growth factor</i> , KGF)	10	20	30

Tablica 5. – nastavak Testirani čimbenici rasta, proteini i citokini s pripadajućim koncentracijama

Čimbenik rasta	Testirane koncentracije (ng/ml)		
	Koštani morfogenični protein 4 (engl. <i>bone morphogenic protein 4</i> , BMP4)	50	100
WNT1 protein	10	50	100
Interleukin 22	1	5	10

### 3.14. *Imunofluorescencija*

Organoidi nastali i uzgojeni na već opisan način sakupljeni su i isprani u PBS s 5% FCS, nakon čega su fiksirani 15 min te permeabilizirani pomoću Cytifix/Cytoperm kemikalija (BD). Po završetku fiksacije i permeabilizacije, epitopi na stanicama su blokirani tijekom 60 min pomoću PBS s dodanim mišjim serumom, budući da su korištena mišja protutijela. Primarno protutijelo razrijeđeno u PBS + 1% BSA (engl. *bovine serum albumine*, goveđi serum albumin) naneseo je na organoide te inkubirano preko noći pri 4°C. Organoidi su po isteku inkubacije isprani tri puta u PBS. Kada je tako bilo potrebno, na organoide je nakon ispiranja dodano sekundarno protutijelo, također razrijeđeno u PBS +1% BSA te inkubirano sat vremena na sobnoj temperaturi. Organoidi su centrifugiranjem 4 min pri 1000 g na StatSpin centrifugi (Beckman Coulter, CA, SAD) zalijepljeni na predmetno stakalce te imobilizirani pomoću uklopnog medija (Dako, Agilent, CA, SAD) s dodanom bojom DAPI koja obilježava jezgru stanice. Ovako pripremljeni preparati analizirani su najkasnije 48 h nakon izrade. Fotografiranje je izvedeno na fluorescencijskom mikroskopu EVOS FL (Thermo Fisher Scientific) ili Zeiss te na konfokalnom mikroskopu FV3000 (Olympus, JP).

### 3.15. *Izolacija, reverzno prepisivanje i umnožavanje RNA*

Stanice disociranih organoida isprane su dva puta u PBS-u, nakon čega je na rahli talog stanica naneseo 500 µl TRIzol-a (Thermo Fisher Scientific) i uzorak je homogeniziran na tresilici. Izolacija RNA iz ovako pripremljenog uzorka izvedena je prema uputi proizvođača. Ukratko, u uzorak u TRIzol-u dodan je kloroform te je uzorak ponovno homogeniziran te inkubiran 10 min na ledu. Po isteku inkubacije, uzorak je centrifugiran 15 min pri 11 800 g i 4°C. Vodena faza koja sadrži RNA oprezno je izdvojena u novu epruvetu. Kako bi se RNA sedimentirala, u epruvetu je dodan izopropanol te je inkubirana 30 min pri -80°C. Nakon inkubacije, RNA je sedimentirana centrifugiranjem 10 min pri 12 000 g i 4°C. Supernatant je odbačen, a talog ispran dva puta u 75% etanolu (EtOH), osušen na zraku i otopljen u 10 µl DEPC vode. Otopljenoj RNA izmjerena je koncentracija i čistoća na uređaju BioSpec-nano

(Shimadzu, JP). Jedan mikrogram RNA je reverzno prepisan u cDNA slijedeći upute iz kita High-capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, CA, SAD). Reakcijska mješavina i uvjeti reakcije prikazani su u Tablici 6.

**Tablica 6.** Reagensi i uvjeti reakcije reverzne transkripcije. RT: reverzna transkripcija; DEPC: dietil pirokarbonat

Reagens	Količina	Temperatura	Vrijeme
2 x RT pufer	10 $\mu$ l	37°C	60 min
20 x RT enzim	1 $\mu$ l	95°C	5 min
RNA	1 $\mu$ g	4°C	$\infty$
DEPC H <sub>2</sub> O	Do 20 $\mu$ l		

Ciljni fragmenti cDNA umnoženi su u reakcijskoj mješavini i pod uvjetima prikazanim u Tablici 7. Korištene su početnice navedene u Tablici 11. Svaka reakcija sadržavala je 20 ng cDNA. Umnožavanje je izvedeno u 40 ciklusa.

**Tablica 7.** Reakcijska mješavina i uvjeti reakcije za specifično umnožavanje cDNA

Reagens	Količina	Temperatura	Vrijeme
10 x pufer II (Applied biosystems; 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)	2 $\mu$ l	94°C	5 min
25 mM MgCl <sub>2</sub> (Applied biosystems)	1,6 $\mu$ l	94°C	30 sek
10 mM mješavina dNTP (Applied biosystems)	0,5 $\mu$ l	55°C	30 sek
10 $\mu$ M F2 početnica	0,5 $\mu$ l	72°C	45 sek
10 $\mu$ M R početnica	0,5 $\mu$ l	72°C	7 min
Taq polimeraza (Sigma)	0,1 $\mu$ l	4°C	$\infty$
cDNA	20 ng		
DEPC H <sub>2</sub> O	Do 20 $\mu$ l		

} x 40

Produkti reakcija nanoseni su na 1,8% agarozni gel dobiven otapanjem agaroze (Sigma-Aldrich) u TAE puferu. Elektroforeza je izvedena pri 100 V 5 min, a zatim pri 80 V 60 min u sustavu za horizontalnu elektroforezu Sub-Cell® GT cell (Bio-Rad) uz uređaj za napajanje Powerpac 300 (Bio-Rad). Veličina produkta reakcije verificirana je prema DNA markeru VIII

(Sigma-Aldrich). Produkti su vizualizirani uz pomoć interkalirajuće boje za nukleinske kiseline GelRed® (Biotium, CA, SAD), a gel je osvjetljen UV zračenjem te fotografiran na transiluminatoru Uvitec (Cleaver Scientific, UK).

### 3.16. „Multiplex“ PCR

Zbog male količine dostupnog materijala tj. organoida, bilo je potrebno primijeniti metodu „multiplex“ PCR za detekciju genomske aktivnosti. Ova metoda temeljena je na metodi „single cell PCR“ tj. PCR jedne stanice koja je posebno prilagođena za potrebe umnažanja transkriptoma populacije 50 do 500 stanica te za gene od interesa u razvoju timusa<sup>156</sup>. Manji broj organoida (50-100 cjelovitih) sakupljen je iz kulture i ispran u PBS-u dva puta. Talog je zatim resuspendiran u 5 µl PBS, mješavini je dodan 1 µl inhibitora Rnaze te je naglo smrznuta u tekućem zraku pa izvađena na led dok se ne otopi. Postupak naglog smrzavanja i otapanja ponovljen je tri puta kako bi se stanice organoida rasprsnule i otpustile stanični sadržaj. Ovako pripremljen uzorak zatim je zagrijan na 65°C tijekom 2 min te je izvedena reverzna transkripcija prema uputama u Tablici 8. Specifičnim prepisivanjem ciljanih mRNA povećava se njihov udio u ukupnoj smjesi i olakšava kasnije umnožavanje.

**Tablica 8.** Reakcijska mješavina i uvjeti reakcije za reverzno prepisivanje RNA u uvjetima prilagođenima za multiplex PCR. Označka N uz reverzne početnice označava broj specifičnih početnica korištenih u reakciji, svaka od kojih je 10 µM.

Reagens	Količina	Temperatura	Vrijeme
10 x pufer II (Applied biosystems; 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)	1,5 µl	37°C	60 min
25 mM MgCl <sub>2</sub> (Applied biosystems)	2 µl	95°C	5 min
10 mM mješavina dNTP (Applied biosystems)	1,5 µl	4°C	∞
N x 10 µM R početnica	N x 0,195 µl		
M-MuLV reverzna transkriptaza (Applied biosystems)	0,7 µl		
Uzorak (s dodanim inhibitorom RNaze)	6 µl		
DEPC H <sub>2</sub> O	Do 15 µl		

Produkt reakcije reverzne transkripcije dalje je umnožen u prvoj reakciji PCR opisanoj u Tablici 9. U ovoj reakciji korištene su početnice za iste gene koji su reverzno prepisani. Svi produkti umnoženi su u istoj reakciji tijekom 15 ciklusa umnožavanja.

**Tablica 9.** Reakcijska mješavina i uvjeti reakcije za specifično umnožavanje cDNA u reakciji PCR I

Reagens	Količina	Temperatura	Vrijeme
10 x pufer II (Applied biosystems; 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)	2,5 $\mu$ l	94°C	5 min
25 mM MgCl <sub>2</sub> (Applied biosystems)	2 $\mu$ l	94°C	30 sek
10 mM mješavina dNTP (Applied biosystems)	0,5 $\mu$ l	55°C	30 sek
N x 1 $\mu$ M F1 početnica	N x 0,375 $\mu$ l	72°C	20 sek
N x 1 $\mu$ M R početnica	N x 0,375 $\mu$ l	72°C	7 min
Taq polimeraza (Sigma)	0,18 $\mu$ l	4°C	$\infty$
cDNA	2,5 nl		
DEPC H <sub>2</sub> O	Do 25 $\mu$ l		

} x 15

Produkt reakcije PCR I nadalje je umnožen u nizu zasebnih specifičnih reakcija tijekom 40 ciklusa umnožavanja. Detalji i uvjeti reakcija nalaze se u Tablici 10. Produkti umnoženi u zajedničkoj reakciji PCR I, u reakciji PCR II specifično se umnožavaju u zasebnim reakcijama. Kombinacija početnica F1 i R u reakciji PCR I daje dulje produkte. Početnica F2 veže se na nastali produkt i, zajedno s početnicom R, umnožava njegov kraći segment (Tablica 11). Ovakvom reakcijom se povećava osjetljivost sustava, a zadržava njegova specifičnost.

Tablica 10. Reakcijska mješavina i uvjeti reakcije za specifično umnožavanje cDNA u reakciji PCR II

Reagens	Količina	Temperatura	Vrijeme
10 x pufer II (Applied biosystems; 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl)	2,5 µl	94°C	5 min
25 mM MgCl <sub>2</sub> (Applied biosystems)	2 µl	94°C	30 sek
10 mM mješavina dNTP (Applied biosystems)	0,625 µl	55°C	30 sek
10 µM F2 početnica	0,625 µl	72°C	20 sek
10 µM R početnica	0,625 µl	72°C	7 min
Taq polimeraza (Sigma)	0,18 µl	4°C	∞
Produkt PCR I reakcije	2,5 n		
DEPC H <sub>2</sub> O	Do 25 µl		

} x 40

Produkti reakcije PCR II vizualizirani su putem gel elektroforeze na isti način kao i produkti konvencionalno izvedene reakcije PCR. Tablica 11 navodi sljedove početnica korištenih u reakcijama PCR i „multiplex“ PCR.

Tablica 11. Početnice korištene u reakcijama PCR

Gen	Slijed
GUSB	F1: ACTTCTCTGACAACCGACGC
	F2: GTACGAACGGGAGGTGATCC
	R: CATTACCCACACGATGGCA
KRT5	F1:AGGGCGAGGAATGCAGACTC
	F2: TGGACCAGTCAACATCTCTGT
	R:ACTGCTACCTCCGGCAAGA
KRT8	F1:GCTCCAGGCTGAGATTGAGG
	F2:TAAGGATGCCAACGCCAAGT
	R: CTCAGACCACCTGCATAGCC
AIRE	F1:ACTTCTGGAGGGTGCTGTTC
	F2: AGACTCCCCACCAAGAGGAA
	R: CCTTCAGTTGAGAGCCTGGG

Tablica 11. – nastavak Početnice korištene u reakcijama PCR

Gen	Slijed
EpCAM	F1: AGAGCAAACCTGAAGGGGC
	F2: TCCATGTGCTGGTGTGTGAA
	R: TCTGAAGTGCAGTCCGCAA
PDGFRB	F1: CCCTTCCTCCATCCCTCTGT
	F2: GGAGAGGGCAGTAAGGAGGA
	R: GAAGCCGCATGGTGTCCCTTG
HOXA3	F1: GGCAAGGACACAGCATCTTG
	F2: GACACCGGAAAAGGCGATTC
	R: CCCGCGCAGACCTAGAAAGA
PAX1	F1: GCTGCCCTACAACCACATCT
	F2: TGGGCATCCGGACGTTTATG
	R: GGAGGCCGACTGAGTGTATTTA
PAX9	F1: CTTTTAGGGCGTGTCCCCAG
	F2: CTTTCATCGGGGCACAGACT
	R: AAGGCTGGCTCCATTGCTC

### 3.17. Funkcionalni test

Ključan test matičnosti stanica je test kojim se utvrđuje sposobnost stvaranja zrelih i potpuno funkcionalnih stanica. Za matične stanice timusa ovo znači da organoidi moraju moći voditi sazrijevanje hematopoetskih prekursora do zrelih limfocita T. Kako bi se ispitalo posjeduju li stanice organoida ovo svojstvo, modificirana je metoda reagregirane timusne organske kulture (engl. *reaggregate thymic organ culture*, RTOC)<sup>148</sup>.

Organoidi su pripremljeni na već opisan način te disocirani na pojedinačne stanice inkubacijom s tripsinom-EDTA uz protresanje.

#### 3.17.1. Izolacija hematopoetskih prekursora

Pripravak periferne krvi obogaćen s nezrelim hematopoetskim stanicama razrijeđen je s PBS + 5% FCS, nadslojen u epruveti na 3 ml Lymphoprep-a te centrifugiran 20 min bez kočnice pri 394 g i 18°C kako bi se u prstenu između faza odvojili limfociti i ostale mononuklearne stanice. Stanice iz prstena sakupljene su i isprane, utvrđen im je broj i vijabilnost te su poznati stanični tipovi uklonjeni deplecijom na magnetskim kuglicama na isti način kao što je učinjeno



i prilikom obogaćenja stanica timusa. Dobivene obogaćene stanice obilježene su na već opisan način mišjim protutijelom za humani fosfoglikoprotein CD34 – marker hematopoetskih prekursora. Uz njega, stanice su obilježene i mišjim protutijelima za glikoproteine CD4 i CD8 – markere zrelih limfocita T. Obilježene stanice sortirane su na citometru Sony SH800 (Sony), a sakupljene su stanice ekspresijskog profila CD34<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>.

### *3.17.2. Izolacija i uzgoj mišjih embrionalnih fibroblasta*

Mišji embrionalni fibroblasti u funkcionalnom testu imaju strukturnu i potpurnu ulogu. Miševi soja CD1 spareni su, a mišice žrtvovane 13 dana nakon parenja (gestacijski dan 12.5). Embriji su izvađeni iz maternica, odstranjena im je glava i viscera te su razgrađeni u tripsinu-EDTA. Dobivene stanice profiltrirane su kroz sito s porama od 70 µm te nasadene u medij DMEM s 10% FCS, 2 mM L-glutaminom, 20 mM puferom HEPES te penicilinom i streptomycinom. Za pokuse su korištene 1. pasaže embrionalnih fibroblasta.

### *3.17.3. Uzgoj stanica u funkcionalnom testu*

Disocirani organoidi pomiješani su s hematopoetskim prekursorima i mišjim embrionalnim fibroblastima te centrifugirani. Otklonjen je supernatant, a gusti je talog stanica nanesen na filter s porama od 40 µm (Merck Milipore) položen na spužvicu uronjenu u medij αMEM s dodanih 20% FCS i 5 ng/ml interleukina 7 (Peprotech). Stanice su uzgajane u uvjetima povećane vlage zraka u komori s navlaženim filter papirom i 5% CO<sub>2</sub>. Po isteku predviđenog vremena inkubacije (dva i tri tjedna), stanice, sada čvrsto organizirane u organel, isprane su s filtra, disocirane pomoću mješavine enzima kolagenaze i DNaze I te obojene direktno obilježenim primarnim protutijelima za markere zrelosti limfocita T. Stanice su zatim analizirane na protočnom citometru Attune (Thermo Fischer Scientific) ili Sony SH800 (Sony).

### **3.18. Statistička obrada podataka**

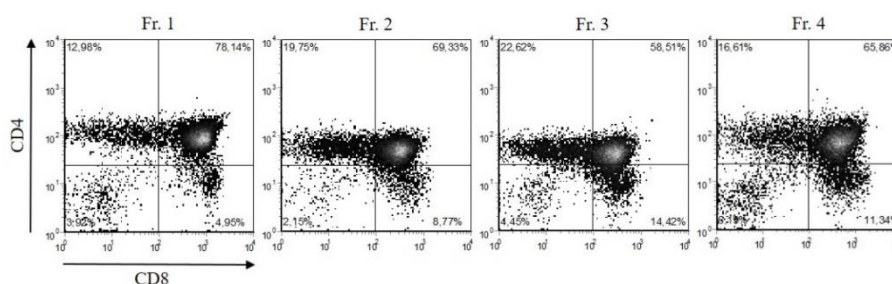
Statistička značajnost podataka utvrđena je neuparenim t-testom u programu GraphPad (CA, SAD). Značajnost je razmatrana unutar 95% intervala pouzdanosti ( $p < 0.05$ ). Broj uzoraka na kojemu je temeljen prikaz i zaključak naveden je u opisu svake slike. Svi grafički prikazi podataka izrađeni su u programu Microsoft Excel 2016 (Microsoft, WA, SAD). U istome programu utvrđeni su i koeficijenti korelacije.

## 4. REZULTATI

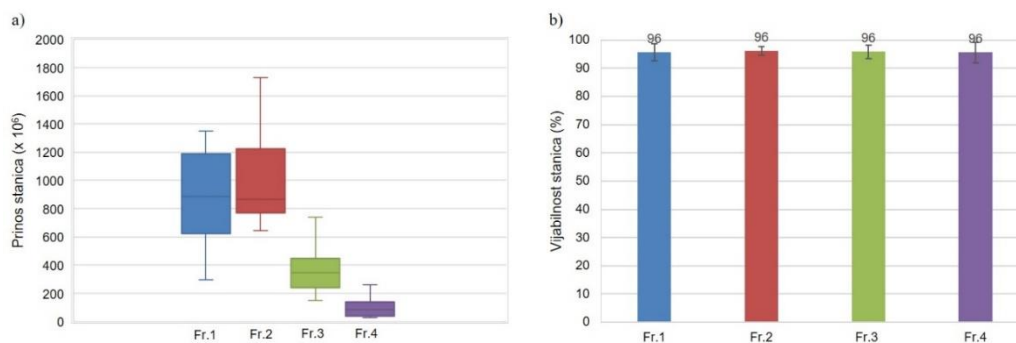
### 4.1. Obogaćenje prekursora u suspenziji stanica timusa

#### 4.1.1. Suspenzije dobivene ciklusima razgradnje timusa razlikuju se prema udjelu stromalnih stanica

Suspenzije stanice timusa dobivene su enzimskom i mehaničkom razgradnjom tkiva kojima se cijepaju međustanične veze i stanice se oslobađaju u suspenziju. Cilj je bio odstraniti što veći broj timocita iz tkiva te povećati udio stromalnih stanica. Sekvencijskom razgradnjom tkiva timusa kroz nekoliko ciklusa postupno se obogaćuje udio stanica negativnih za timocitne markere CD4 i CD8 (Slika 10). Prinos stanica između bioloških uzoraka varira, no najveći je u prva dva ciklusa razgradnje (Slika 11a). Vrijeme razgradnje i koncentracija enzima prilagođeni su tako da vijabilnost stanica nakon svakog ciklusa razgradnje ostaje vrlo visoka (iznad 96%) (Slika 11b).



**Slika 10.** Repräsentativni rezultat analize stanica protočnom citometrijom svake od populacija dobivenih razgradnjom timusa. Stanice su obojane s fluorescentno obilježenim protutijelima za antigene CD4 i CD8. Podaci dobiveni protočnim citometrom FACSCalibur analizirani su pomoću programskog rješenja FlowJo. Fr. označava populaciju stanica dobivenu nakon pojedinih ciklusa razgradnje.

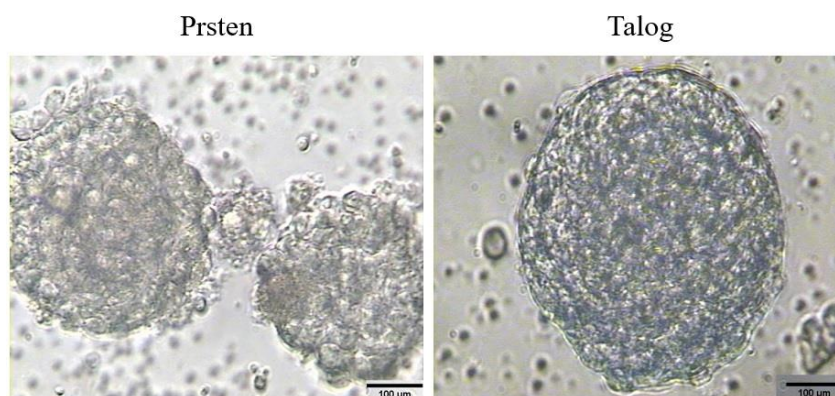


**Slika 11.** a) Prinos stanica izražen u milijunima u pojedinim populacijama dobivenim razgradnjom timusa. Slika je rezultat 10 neovisnih pokusa s 10 različitih tkiva timusa. Naznačene su standardne devijacije. b) Srednja vrijednost preživljenja stanica za pojedine populacije razgradnje timusa. Slika je rezultat 10 neovisnih pokusa s 10 različitih tkiva timusa. Fr. označava populaciju stanica dobivenu nakon pojedinih ciklusa razgradnje.

#### 4.1.2. Razdvajanje stanica po gustoći

Iako, usporedivši s populacijama dobivenim prvim ciklusima digestije, posljednja populacija stanica razgrađenog timusa ima povećan udio stromalnih stanica, ona se ipak sastoji od više staničnih tipova, najveći dio kojih čine timociti. Stanični tipovi međusobno imaju različitu gustoću zbog koje ih je, ukoliko je ta gustoća poznata, moguće razdvojiti na gradijentnom mediju.

Testirana su tri medija poznate gustoće – 1,069 g/cm<sup>2</sup> (Lymphoprep), 1,070 g/cm<sup>2</sup> (Nycodenz) i 1,129 g/cm<sup>2</sup> (Percoll), čija je gustoća prije upotrebe prilagođena na 1,070 g/cm<sup>2</sup>. Stanice u međusloju (prstenu) i talogu testirane su metodom koja indirektno pokazuje prisutnost i obogaćenje matičnih stanica. Pronađeno je kako prsten i talog sva tri testirana medija sadrže matične stanice što ukazuje na važnost točne procjene gustoće za pravilno odjeljivanje prekursora. Ovaj pronalazak ukazuje na to kako je gustoća ciljanih stanica viša od 1,070 g/cm<sup>2</sup> te kako je potreban opsežan niz testova za utvrđivanje točnije gustoće prekursora te medija za njihovo obogaćenje na gradijentu. Iz ovog razloga odabrana je izravnija metoda obogaćivanja prekursora, sličnija onoj korištenoj za otkrivanje limfocitnih prekursora u miševa, koja ujedno omogućava manji gubitak ukupnih stanica (Slika 12)<sup>157</sup>.

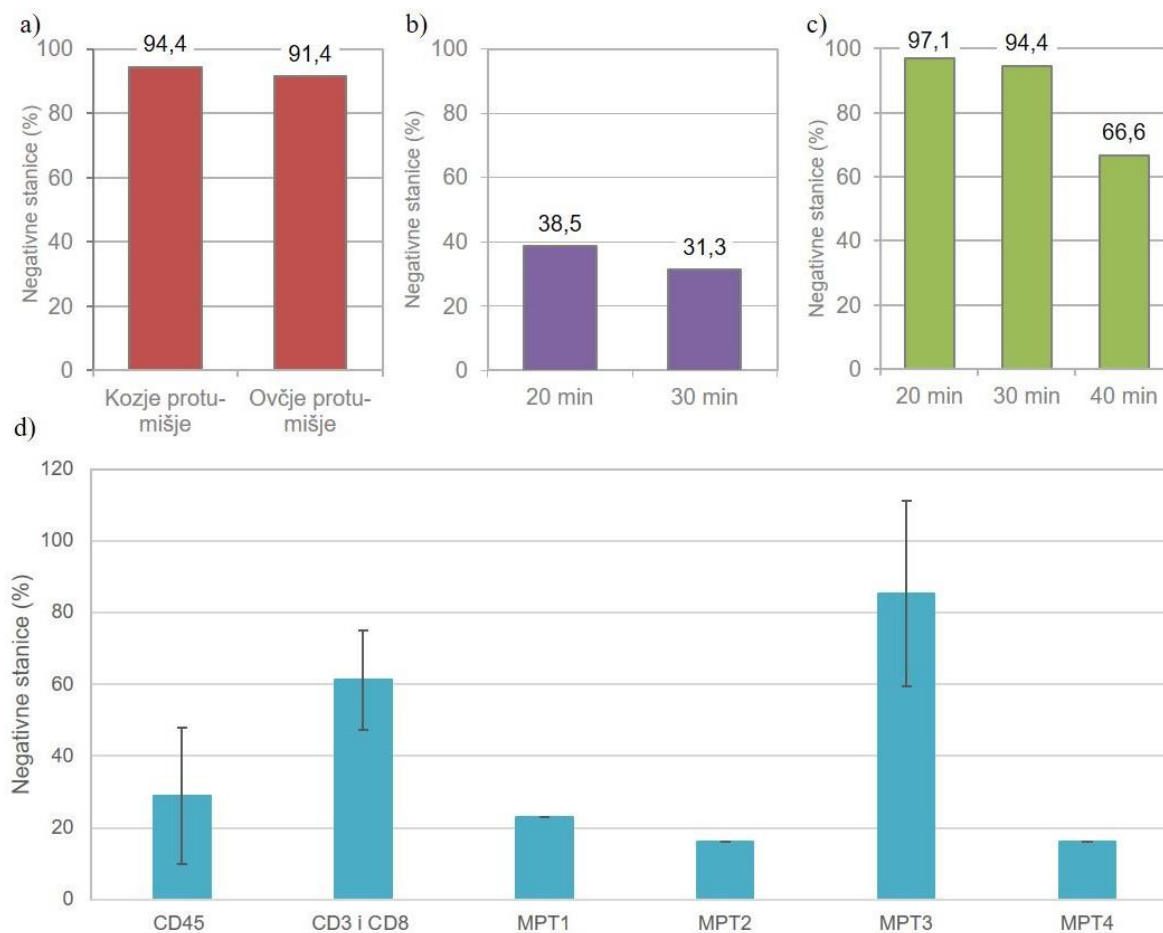


**Slika 12.** Kolonije nastale iz stanica posljednjeg ciklusa razgradnje timusa razdvojenih u prsten i talog centrifugiranjem na Nycodenz gradijentnom mediju (1,070 g/cm<sup>2</sup>). Povećanje 250x. Ljestvica veličine predstavlja 100 µm.

#### 4.1.3. *Usavršavanje protokola magnetske deplecije stanica*

Prije nego li je protokol obogaćenja magnetskom deplecijom definiran, testirane su njegove komponente: koncentracija protutijela, tip željeznih kuglica te vrijeme inkubacije. Učinkovitost deplecije određena je analizom udjela stanica negativnih za protutijela kojima je izvršena deplecija na protočnom citometru.

Nakon enzimske razgradnje tkiva uklanjaju se stanice koje izražavaju poznate antigene. Pronađeno je kako nema razlike u učinkovitosti deplecije koristeći željezne kuglice obilježene protutijelima različitog porijekla (iz kože i iz ovce) (Slika 13a), kao ni primjenom različitih vremena inkubacije s protutijelima (20 i 30 min) (Slika 13b). Povećanje vremena inkubacije sa željeznim kuglicama s 20 min na 30 min ne povećava učinkovitost metode, a povećanje na 40 min može dovesti do smanjenja učinkovitosti deplecije pa je zato odabrano najkraće učinkovito vrijeme (Slika 13c). Testirane su različite mješavine i pojedinačna protutijela za depleciju: CD45, CD3 s CD8, mješavina protutijela 1 (CD8, CD11c, CD14 i CD45), mješavina protutijela 2 (CD4, CD8 i CD45), mješavina protutijela 3 (CD3, CD8, CD11, CD14, CD16 i CD56) i mješavina protutijela 4 (CD3, CD8, CD11, CD14, CD16, CD19, CD45 i CD56). Mješavina protutijela 3 odabrana je kao najučinkovitija. Ovoj mješavini dodan je još i anti-CD19, anti-CD4 te anti-CD233 te je mješavina kao takva korištena u svim eksperimentima obogaćenja timusnih prekursora (Slika 13d).

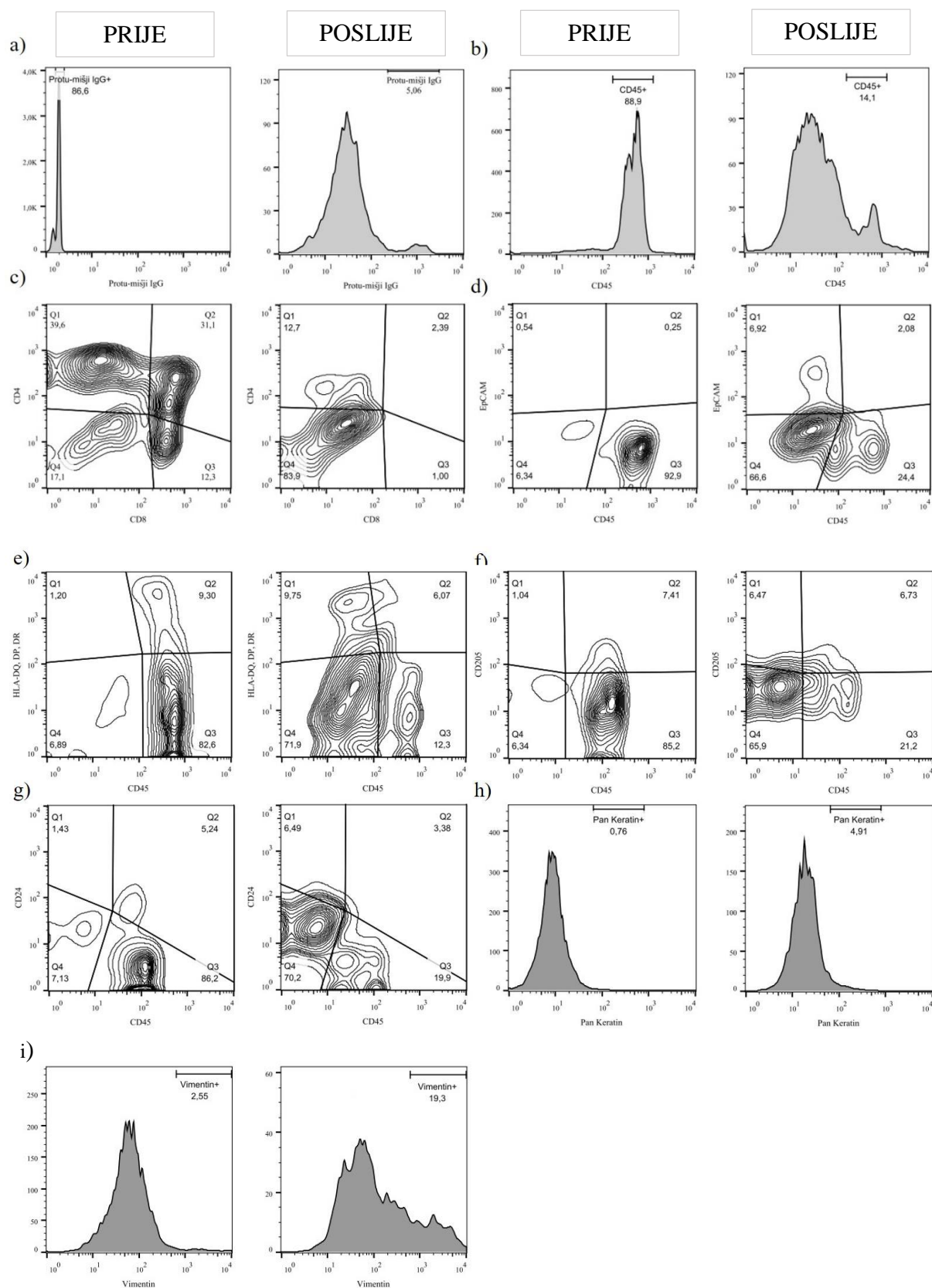


**Slika 13.** Optimizacije protokola obogaćivanja matičnih stanica metodom negativne selekcije magnetskim kuglicama. a) Testirane su željezne kuglice s imobiliziranim protutijelima iz koze i ovce. b) Isprobana su dva različita vremena inkubacije s protutijelima (20 i 30 min). c) Obilježene stanice inkubirane su sa željeznim kuglicama 20, 30 i 40 min. d) Testirana su različita protutijela na temelju kojih se izvodila negativna selekcija. Mješavina protutijela (MPT) 1 sastojao se od CD8, CD11c, CD14 i CD45; mješavina protutijela 2 od CD4, CD8 i CD45; mješavina protutijela 3 od CD3, CD8, CD11, CD14, CD16 i CD56; a mješavina protutijela 4 od CD3, CD8, CD11, CD14, CD16, CD19, Cd45 i CD56. Eksperimenti s CD45, CD3 i CD8 te MPT3 ponovljeni su barem 3 puta, a s ostalim mješavinama protutijela jednom.

#### *4.1.4. Analiza stanica timusa prije i nakon obogaćenja protočnim citometrom*

Kako bi se pobliže utvrdio identitet stanica čiji se udio obogaćuje magnetskom deplecijom te, posljedično, populacije koje su odgovorne za povećanje broja matičnih stanica u kulturi, stanice prije i nakon deplecije karakterizirane su prema antigenima koje izražavaju (Slika 14). Analizom protočnim citometrom utvrđena je učinkovitost obogaćenja te je pokazano da je preko 95% stanica negativno za markere korištene tijekom magnetske deplecije (Slika 14a). Dobivene obogaćene stanice obilježene su protutijelima od interesa. Iz analize su isključene mrtve stanice pomoću propidij jodida koji ulazi u mrtve stanice i interkalira u DNA. Multiparametarskom analizom okarakterizirane su dobivene negativne stanice iz timusa. Dodatna provjera učinkovitosti deplecije bila je bojanje za zrele markere razvoja limfocita T: CD4 i CD8. Hematopoetske stanice obilježene su protutijelima na antigen CD45, a stanice negativne za ovaj marker analizirane pomoću protutijela na CD326 (EpCAM), HLA-DQ, DP, DR, CD205, CD24, pan keratin te vimentin.

Podaci dobiveni analizom na protočnom citometru FACSCalibur obrađeni su programom FlowJo pomoću kojega je napravljen i grafički prikaz prikazan na Slici 14.



**Slika 14.** Analiza antigena na stanicama prije (lijevo) i nakon (desno) obogaćivanja metodom magnetske deplecije. Prisutnost antigena na testiranim stanicama prikazana je kao histogram, u jednoj dimenziji (a, b, h i i) ili kao gustoća zabilježenih događaja u dvije dimenzije (c-g). Na svakoj osi prikaza gustoće događaja u dvije dimenzije naznačeno je protutijelo. Analizirana je prisutnost antigena a) protutijela korištena pri depleciji detektirana su pomoću anti-mišjeg protutijela obilježenog s fluorokromom FITC; b) CD45; c) CD4 i CD8; d) EpCAM i CD45; e) HLA-DQ, DP, DR i CD45; f) CD205 i CD45; g) CD24 i CD45; h) pan keratin i i) vimentin.

Udio stanica koje izražavaju pan-leukociti marker CD45 smanjio se na 14%, a raspodjela stanica pozitivnih za CD45 između dvije populacije (visoko i nisko pozitivne) promijenila se u korist niske razine ekspresije (Slika 14b). Populacija stanica timusa nakon deplecije pokazuje znatno manji udio stanica pozitivnih za CD4 i CD8 (16% nakon deplecije naspram 83% prije nje) (Slika 14c). Molekula CD326 (EpCAM), koju specifično izražavaju sve epitelne stanice, eksprimirana je na jedva zamjetnom dijelu stanica prije deplecije (0,54%). Otklanjanjem limfocita višestruko se povećava udio ovih stanica (6,92%) (Slika 14d).

HLA-DQ,DP, DR su molekule glavnog sustava tkivne podudaranosti, eksprimirane na stanicama koje prezentiraju antigene kao što su dendritske stanice, fagociti, endotelne stanice, timusne epitelne stanice i limfociti B. Ove molekule prisutne su na 10,5% stanica, većina kojih pripada skupini CD45<sup>+</sup>, prije magnetske deplecije. Ovaj udio povećava se na 15,82% nakon deplecije, pri čemu se znatno povećava broj stanica koje eksprimiraju molekule HLA, a ne eksprimiraju CD45 (s 1,2% na 9,75%) (Slika 14e).

Slično molekulama HLA, receptor CD205 eksprimiran je na antigen-prezentirajućim stanicama, no njegova ekspresija je ograničena na kortikalne epitelne stanice timusa i dio dendritskih stanica. Udio stanica koje izražavaju ovaj antigen povećan je nakon deplecije (s 8,45% na 13,2%) (Slika 14f).

CD24 je glikoprotein bitan za interakciju između stanica, a eksprimiran je na površini većine limfocita B. Uz njih, molekula CD24 nalazi se na mezenhimskim matičnim stanicama koštane srži, intestinalnim epitelnim matičnim stanicama te na matičnim stanicama niza karcinoma<sup>158,159</sup>. Iz ovog razloga, molekula CD24 bila je kandidat za specifičnu molekulu koju izražavaju matične stanice timusa. U stanicama razgrađenog timusa prije deplecije postoji populacija koja eksprimira glikoprotein CD24, no uz njega eksprimira i CD45 (5,24%). Uz nju, postoji i vrlo mala populacija stanica jednostruko pozitivnih za CD24 (1,43%). Ova populacija višestruko se povećava deplecijom (6,49%) (Slika 14g).

Epitelne stanice u pravilu eksprimiraju keratinska vlakna. Postoji minimalno 20 tipova keratina, a ekspresija određenih tipova je tkivno specifična. Ovdje korišteno protutijelo obuhvaća keratine 4, 5, 6, 8, 10, 13 i 18., od kojih je za keratine 4, 8, 10, 13 i 18 poznato da su eksprimirani u timusu ljudi<sup>160</sup>. Prema ekspresiji keratina, postotak epitelnih stanica u promatranim uzorcima povećava se magnetskom deplecijom (s 0,76% na 4,91%) (Slika 14h).



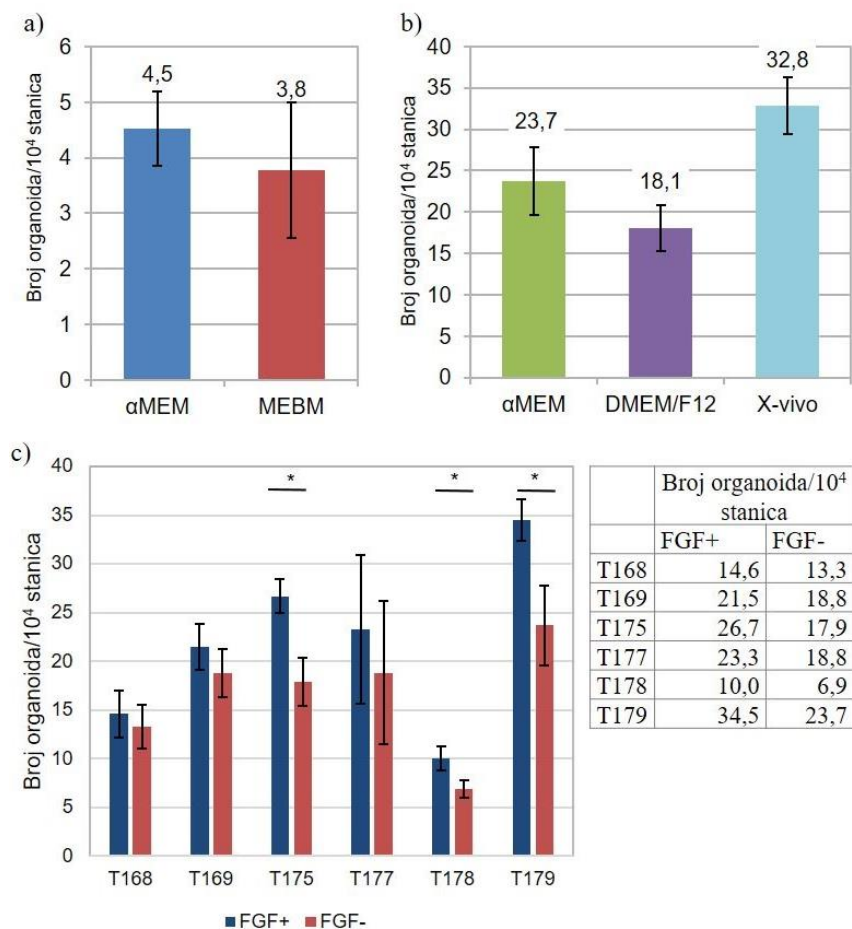
Vimentin je također citoskeletni protein, eksprimiran u mezenhimskim stanicama i stanicama koje prolaze epitelno-mezenhimsku tranziciju, no i u velikom broju epitelnih karcinoma. Obogaćenje stanica timusa dovodi i do višestrukog povećanja udjela stanica koje izražavaju ovaj antigen (s 2,55% na 19,3%) (Slika 14i).

## 4.2. Dokazivanje matičnosti

### 4.2.1. Test podloge za uzgoj obogaćenih matičnih stanica

Selekcija odgovarajuće podloge za uzgoj napravljena je uzgajajući stanice u prisutnosti kombinacije faktora bFGF, EGF, inzulina, heparina i hidrokortizona, navedenih u Tablici 2 (Materijali i metode), no otopljenih u različitim podlogama (medijima za uzgoj). Kombinacija faktora preuzeta je i prilagođena prema radu Ucar et al. 2014<sup>161</sup>. Nastanak kolonija iz jedne stanice praćen je do trenutka kada se njihov rast usporio u odnosu na početni period formacije. Trinaesti dan odabran je za procjenu broja kolonija. Inicijalno su testirani mediji  $\alpha$ MEM (engl. *Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification*; osnovna podloga za uzgoj stanica) i MEM (engl. *Mammary Epithelial Cell Basal Medium*; podloga prilagođena za uzgoj epitelnih stanica dojke) uzgojem stanica razgrađenog timusa. Pronađeno je kako više organoida nastaje u mediju  $\alpha$ MEM (Slika 15a). Zbog preciznije analize i daljnjeg usavršavanja protokola,  $\alpha$ MEM je zatim uspoređen s medijem DMEM/F12 (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*; Dulbecco modificirani Eagle medij s mješavinom nutrijenata F12) te medijem X-VIVO (medij prilagođen za uzgoj tumor-inicirajućih limfocita) uzgojem magnetski obogaćenih stanica timusa. Pronađeno je kako najviše organoida nastaje u mediju X-VIVO (Slika 15b).

Nužnost prisutnosti bFGF (engl. *basic fibroblast growth factor*, fibroblastni čimbenik rasta) testirana je uzgojem stanica u mediju za uzgoj organoida s  $\alpha$ MEM kao bazom. Medij za uzgoj organoida bez bFGF uspoređen je s onim s bFGF. Prisutnost bFGF nije nužna za formaciju organoida, no njegovo djelovanje povećava broj nastalih organoida. Značajnost ove razlike u broju unutar 95% intervala pouzdanosti primijećena je u polovici izvedenih eksperimenata (3/6). Razlika u broju je ovisna o pojedinom timusu, no primjetna je kod svih testiranih (Slika 15c).

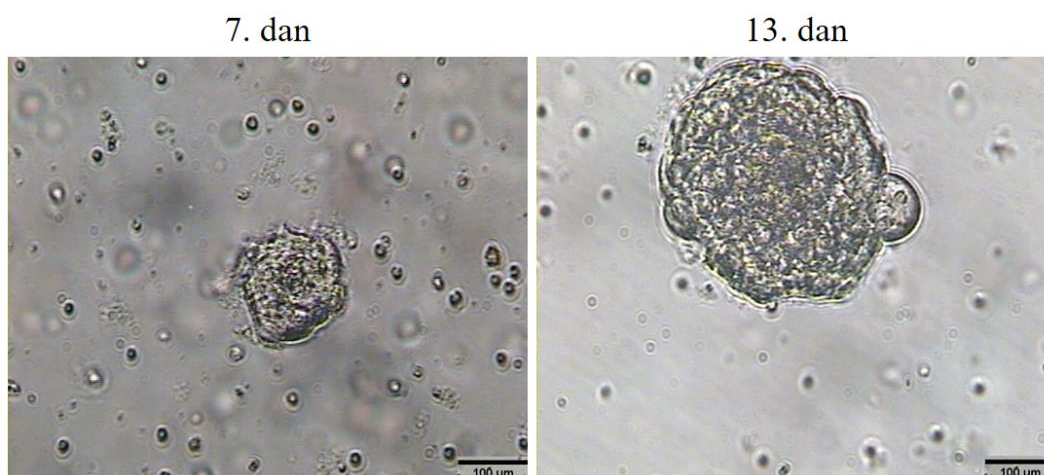


**Slika 15.** Utjecaj sastava medija na rast organoida iz stanica razgrađenog timusa. Stanice su nasadene u pet bunarića, izračunat je broj organoida na 10<sup>4</sup> nasadenih stanica za svaki bunarić. Na slikama su prikazane srednje vrijednosti i standardne devijacije. a) Usporedba medija αMEM i MEMBM za uzgoj stanica razgrađenog timusa. b) Usporedba medija αMEM, DMEM/F12 i X-VIVO za uzgoj stanica timusa obogaćenih magnetskom deplecijom. c) Utjecaj prisutnosti bFGF u mediju za stvaranje organoida. Eksperiment je ponavljen 6 puta. Oznaka „T“ s različitim brojevima označava različite timuse. Zvijezdice iznad pojedinih eksperimenata označavaju statistički značajnu razliku (p<0,05).

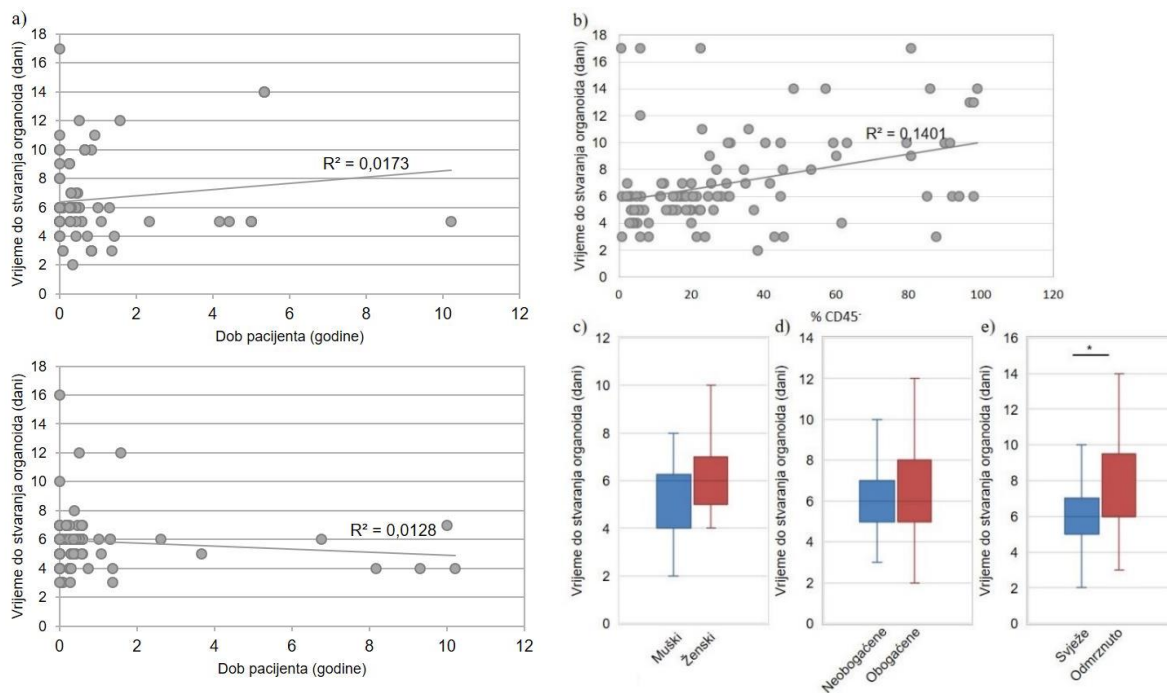
4.2.2. *Pojava organoida i biološke razlike između pacijenata*

Kada se stanice dobivene razgradnjom timusa uzgajaju na opisanoj podlozi, iz istih pouzdano i dosljedno razvijaju organoidi. Sedam dana nakon nasađivanja stanica primjećuju se prve multicelularne skupine koje se kroz vrijeme povećavaju (Slika 16).

Prvi parametar za analizu sposobnosti tkiva da stvori organoide bilo je vrijeme potrebno za njihovu pojavu. Vrijeme potrebno za pojavu organoida nije ovisno o dobi i spolu pacijenta od kojega potječe timus (Slika 17a i 17c). Stanice s većim udjelom stanica CD45<sup>-</sup> sporije dostižu veličinu organoida koja se može identificirati s koeficijentom korelacije  $R^2=0,1401$  (Slika 17b). Nije pronađena ni značajna razlika između vremena potrebnog za nastajanje organoida između obogaćenih i neobogaćenih stanica (Slika 17d). Također, primijećeno je kako stanice prethodno zamrznutog tkiva sporije stvaraju organoide ( $p < 0.05$ ) (Slika 17e).

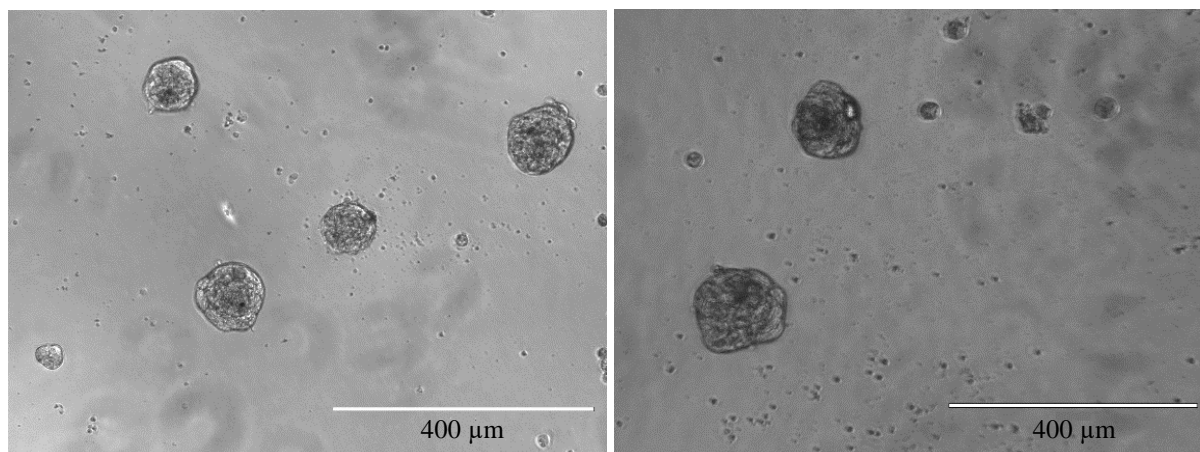


**Slika 16.** Progresija rasta organoida istog timusa od pojave (7. dan) do vremena brojenja (13. dan). Organoidi su fotografirani na invertnom mikroskopu s kamerom (Nikon). Povećanje 250x. Ljestvica veličine predstavlja 100 µm.



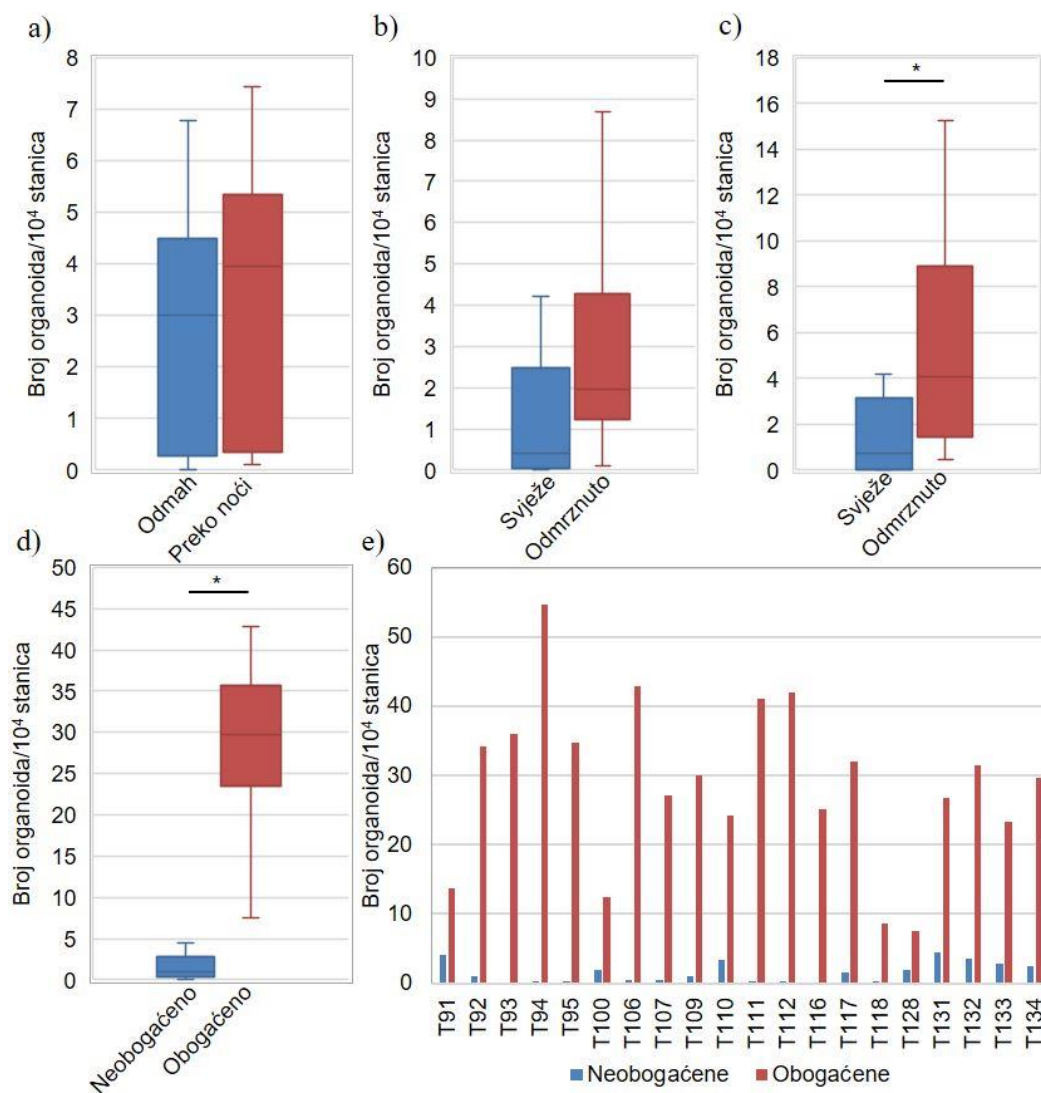
**Slika 17.** Vremenski period potreban za nastanak organoida iz stanica razgrađenog timusa. Slike 17a i 17b prikazuju pojedinačne točke vremena potrebnog za stvaranje organoida izražene u danima za neovisne eksperimente u ovisnosti o dobi pacijenata izraženoj u godinama. Slike 17c do 17e prikazuju distribuciju vremenskih perioda potrebnih za stvaranje organoida, s istaknutim standardnim devijacijama. a) Ovisnost vremena pojave organoida o dobi pacijenta za obogaćene (gore) i neobogaćene (dolje) stanice. Slika vremena pojavnosti za obogaćene stanice obuhvaća pokuse s 49 timusa, a za neobogaćene stanice obuhvaća eksperimente s 48 timusa. Svaki eksperiment ponovljen je barem dva puta. b) Vremenski period potreban za stvaranje organoida u odnosu na udio stanica CD45<sup>+</sup> u nasađenoj populaciji, temeljeno podacima dobivenim od 58 timusa. Svaki eksperiment ponovljen je barem dva puta. Koeficijent korelacije  $R^2=0,1401$  c) Vremenski period potreban za formiranje organoida u ovisnosti o spolu pacijenta. Obuhvaćena su 42 eksperimenta s timusima muških pacijenata i 27 eksperimenata s timusima ženskih pacijenata. d) Usporedba distribucije vremenskog perioda do stvaranja organoida za neobogaćene (62 eksperimenta) i obogaćene (99 eksperimenata) stanice. e) Razlika u vremenskom periodu potrebnom za rast organoida iz stanica dobivenih iz svježeg (135 eksperimenata) i prethodno smrznutog (28 eksperimenata) tkiva.. Statistička značajnost utvrđena je pomoću neuparenog t-testa s intervalom pouzdanosti  $p<0,05$  i označena zvjezdicom iznad grafa.

Organoidi se međusobno razlikuju po veličini, sastoje se od minimalno 50-100 stanica, a njihova veličina može dosegnuti nekoliko stotina mikrometara u promjeru (Slika 18).



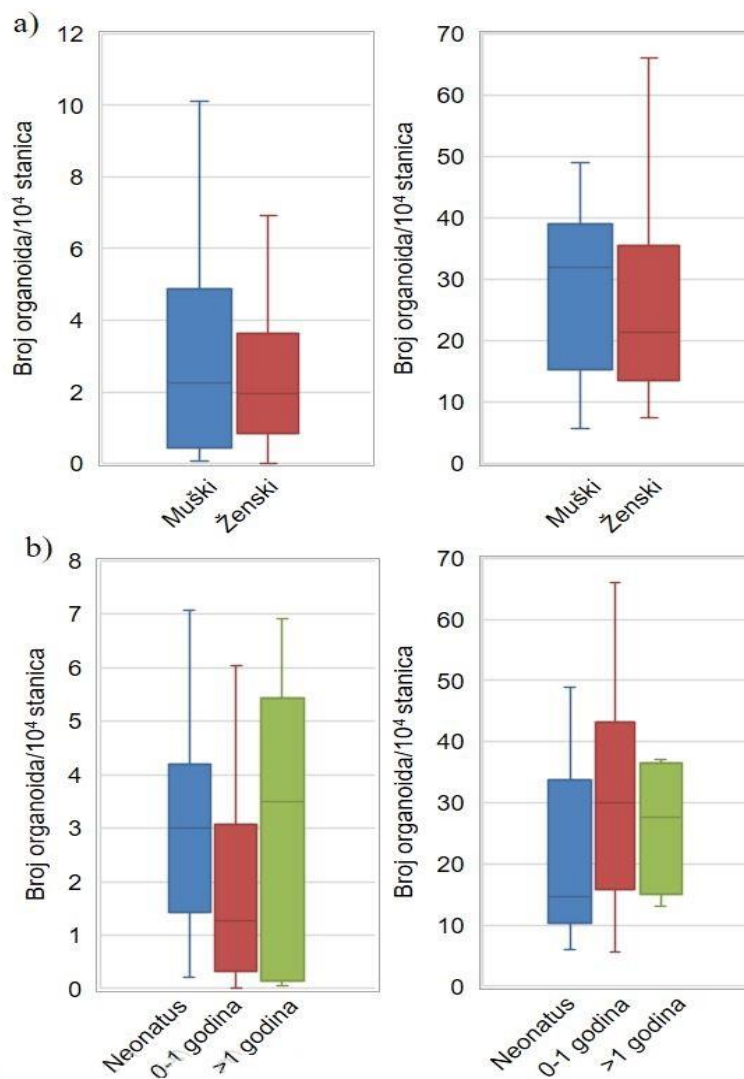
**Slika 18.** Organoidi nastali od stanica obogaćenih magnetskom deplecijom (lijevo) i neobogaćenih (desno) stanica dobivenih razgradnjom tkiva timusa. Na fotografijama je vidljiva razlika u veličini između pojedinih organoida. Organoidi su fotografirani na invertnom mikroskopu s kamerom (EVOS FL). Povećanje 100x. Ljestvica veličine na fotografiji označava 400 µm.

Drugi parametar sposobnosti stanica tkiva da stvore organoide je broj nastalih organoida prema broju nasađenih stanica. Ovim parametrom procijenjena je djelotvornost i uspješnost pojedinih protokola za razgradnju tkiva te uzgoja organoida. Analizom organoida dobivenih iz neobogaćenih stanica pronađeno je kako nema značajne razlike u broju organoida dobivenih iz tkiva obrađenog odmah i tkiva koje je preko noći čuvano na +4°C ( $p > 0,05$ ) (Slika 19a). Ovo ukazuje kako su prekursori koji tvore organoide zaštićeni unutar tkiva dovoljno da na njihov kratak period izvan fizioloških ili uvjeta kulture *in vitro* ne utječe. Statistička analiza pomoću uparenog t-testa pokazala je kako stanice svježeg i prethodno smrznutog tkiva imaju isti potencijal stvaranja organoida (Slika 19c). Ukoliko se neobogaćene stanice smrznju, one će po odmrzavanju stvoriti veći broj organoida na svakih  $10^4$  nasađenih živih stanica. Prethodno pohranjene stanice razgrađenog timusa stvaraju značajno veći broj organoida ( $p < 0,05$ ) (Slika 19b). Broj nastalih organoida iz stanica obogaćenih magnetskim otklanjanjem zrelih oblika limfocita T višestruko je i dosljedno veći od broja nastalog iz neobogaćenih ( $p < 0,5$ ). Povećanje broja organoida nakon obogaćivanja stanica je od 3,3 do 418 puta ( $\bar{x} = 18,64$ ), s naglašenim razlikama među pacijentima. Ovim dramatičnim povećanjem broja organoida potvrđena je metoda obogaćenja populacije stanica (Slika 19d i 19e).



**Slika 19.** Broj organoida nastalih iz različito obrađenog tkiva. Statistička značajnost rezultata utvrđena je neuparenim t-testom ( $p < 0,05$ ) i označena zvjezdicom iznad grafa. a) Broj organoida nastalih u ovisnosti o vremenskom periodu proteklom prije obrade tkiva. Podaci su dobiveni na temelju 11 eksperimenata (11 pojedinačnih timusa) obrađenih dva dana za redom. b) Broj organoida nastalih od stanica dobivenih iz svježeg tkiva te stanica dobivenih iz tkiva koje je prethodno bilo smrznuto. Prikazani su rezultati 6 različitih timusa čije je tkivo razgrađeno svježe te nakon smrzavanja. c) Broj organoida nastalih od svježih te smrznutih stanice dobivenih razgradnjom timusa. Prikazani su rezultati 9 različitih timusa analizirane svježe te nakon smrzavanja. d) Broj organoida nastalih od neobogaćenih te stanica obogaćenih magnetskom deplecijom. Analiza je rezultat 20 pojedinačnih eksperimenata (20 timusa). e) Broj organoida na svakih 10<sup>4</sup> stanica za neobogačene i obogačene stanice pojedinih pacijenata. Prikazani podaci su jednaki kao ishodišni podaci za Sliku 19d.

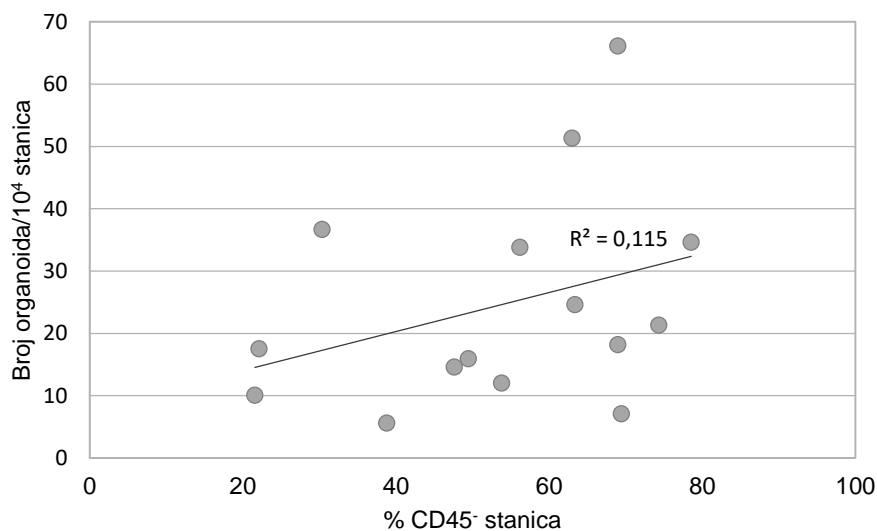
Biološke razlike između pacijenata procijenjene su na jednak način i pronađeno je kako ne postoje razlike u potencijalu za stvaranje organoida između pacijenata ovisno o njihovom spolu (Slika 20a) i dobi (Slika 20b).



**Slika 20.** Ovisnost broja nastalih organoida o spolu i dobi pacijenata. a) Broj nastalih organoida prema spolu kod neobogaćenih (lijevo) i stanica obogaćenih magnetskom deplecijom (desno). b) Broj nastalih organoida kod neonatusa, djece ispod godinu dana te djece iznad godine dana kada su stanice neobogaćene (lijevo) i obogaćene magnetskom deplecijom (desno). Statistička značajnost rezultata utvrđena je neuparenim t-testom ( $p < 0,05$ ) i označena zvjezdicom iznad grafa.



Kao što je prikazano Slikom 17b, uzorci koji imaju veći udio stanica negativnih za CD45 sporije dostižu detektabilnu veličinu organoida (koeficijent korelacije  $R^2=0,1401$ ). Pod istim uvjetima primijećeno je kako se broj organoida povećava s povećanjem udjela CD45<sup>-</sup> stanica koeficijentom korelacije  $R^2=0,115$  što ukazuje na veći broj matičnih stanica u uzgajanoj populaciji (Slika 21).

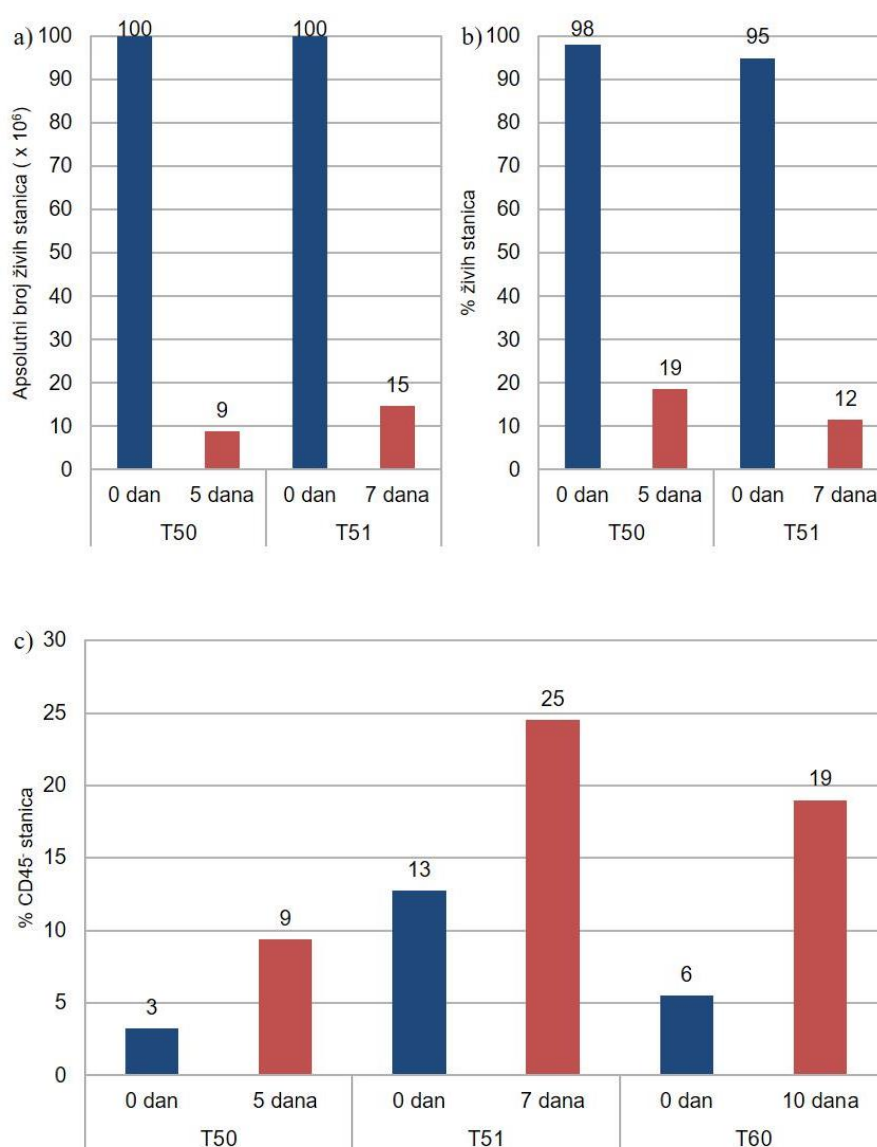


**Slika 21.** Ovisnost broja organoida o udjelu stanica CD45<sup>-</sup>. Broj organoida dobivenih od 10<sup>4</sup> stanica pokazuje trend rasta koji prati porast udjela stanica CD45<sup>-</sup>. Prikazani su podaci dobivenih razgradnjom i obogaćenjem 15 timusa. Koeficijent korelacije iznosi  $R^2=0,115$

### 4.3. 2'-deoksiguanozin obogaćuje udio matičnih stanica

#### 4.3.1. Inkubacija stanica dovodi do gubitka vijabilnosti i materijala

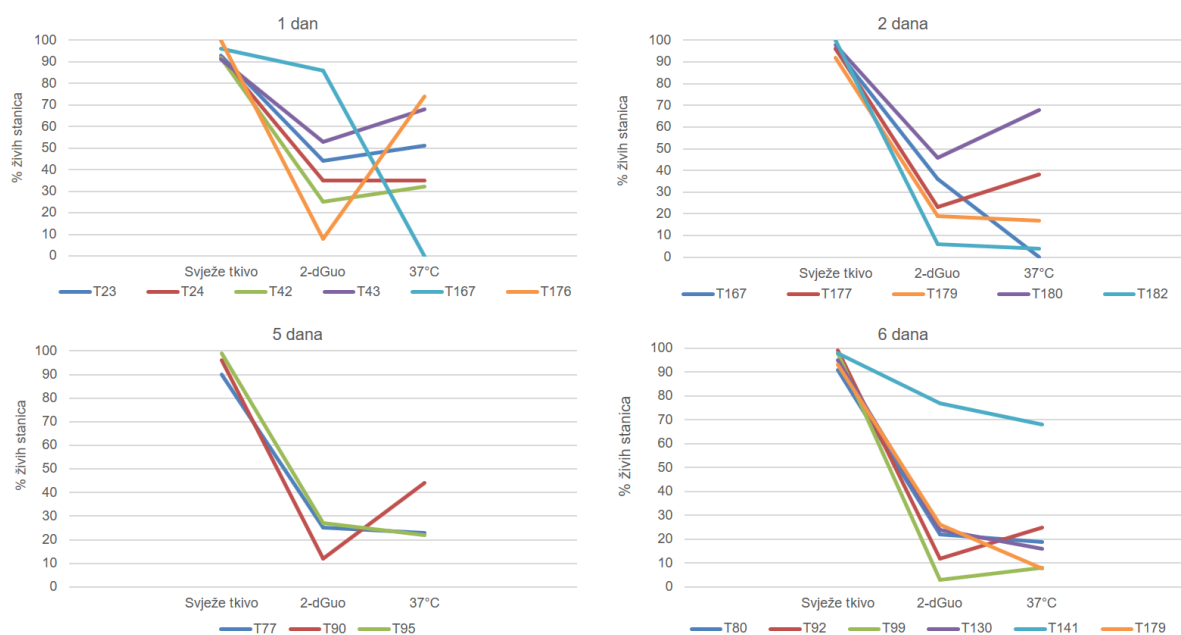
2'-deoksiguanozin (2'-dGuo) je nukleozid čiji metabolizam ciljano ubija limfocite B i T<sup>155</sup>. Stanice razgrađenog timusa inkubirane su u podlozi s 1,35 mM 2'-dGuo te su analizirane nakon 5, 7 i 10 dana inkubacije. Primijećeno je kako ovakva inkubacija stanica dovodi do gubitka staničnog materijala i vijabilnosti (Slika 22a i 22b). Stanice inkubirane s 2'-dGuo malo su do umjereno obogaćene za nelimfocitne stanice (Slika 22c).



**Slika 22.** Očuvanje staničnog materijala, vijabilnosti stanica te udio stanica CD45<sup>+</sup> u populaciji inkubiranoj s 2'-deoksiguanozinom (2'-dGuo). a) Broj živih stanica na početku te nakon 5 i 7 dana inkubacije s 1,35 mM 2'-dGuo; b) Udio živih stanica u populaciji stanica prije te nakon 5 i 7 dana inkubacije s 1,35 mM 2'-dGuo; c) Udio stanica CD45<sup>+</sup> na početku i nakon 5, 7 i 10 dana inkubacije s 1,35 mM 2'-dGuo

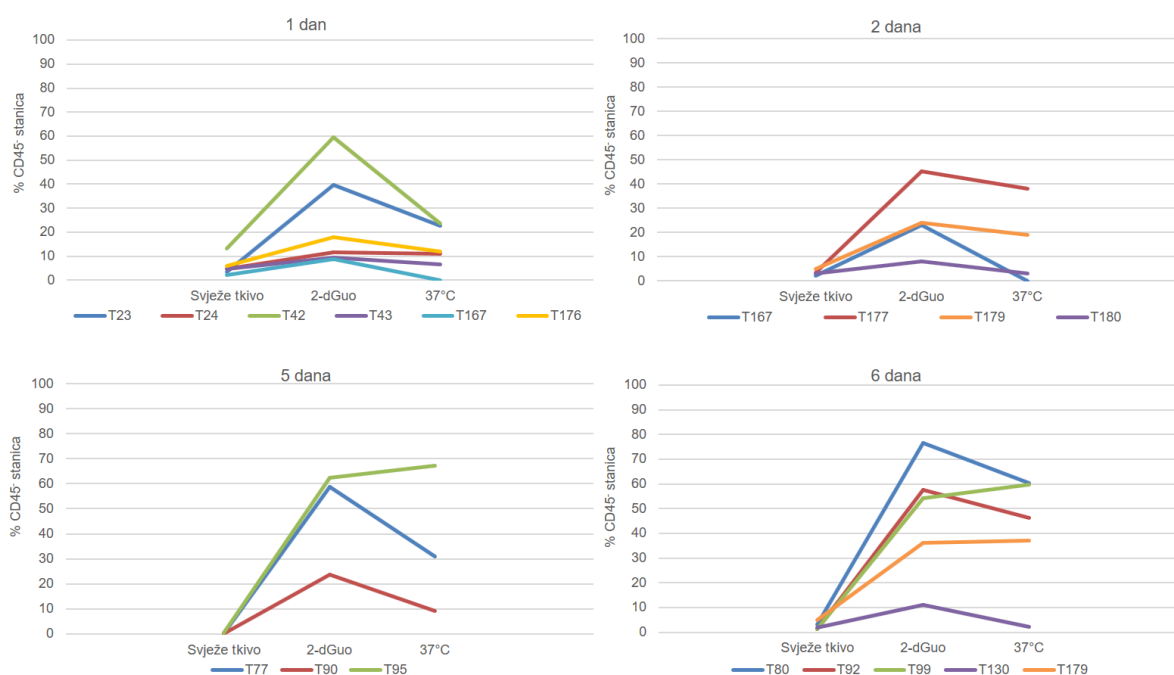
#### 4.3.2. Optimalno vrijeme inkubacije tkiva poboljšava udio matičnih stanica

Tkivo timusa inkubirano je u uvjetima obogaćenima kisikom u mediju koji sadrži 2'-dGuo tijekom kraćeg (1-2 dana) i duljeg (5-6 dana) vremenskog perioda. Po isteku vremena inkubacije, tkivo je razgrađeno na već opisan način, a enzimatski obogaćenim stanicama određena je vijabilnost metodom mikroskopskog brojenja stanica uz diskriminaciju mrtvih i živih stanica pomoću tripanskog modrila te protočnom citometrijom uz određivanje vijabilnosti pomoću propidij jodida. Rezultati su uspoređeni s uzorcima inkubiranim pod istim uvjetima bez 2'-dGuo te sa svježe razgrađenim tkivom. U svim inkubiranim uzorcima, neovisno o korištenom tkivu i vremenu inkubacije, primijećena je smanjena vijabilnosti u odnosu na kontrolu netretiranu s 2'-dGuo. U uzorcima koji su kraće inkubirani (1 i 2 dana), vijabilnost stanica tretiranih s 2'-dGuo bila je manja od stanica inkubiranih bez 2'-dGuo, dok se ta razlika smanjuje s produljenjem vremena inkubacije (5 i 6 dana) (Slika 23). Iako sama inkubacija tkiva evidentno utječe na vijabilnost stanica, vidljivo je kako 2'-dGuo djeluje na preživljenje limfocita koji čine većinu stanične mase timusa.



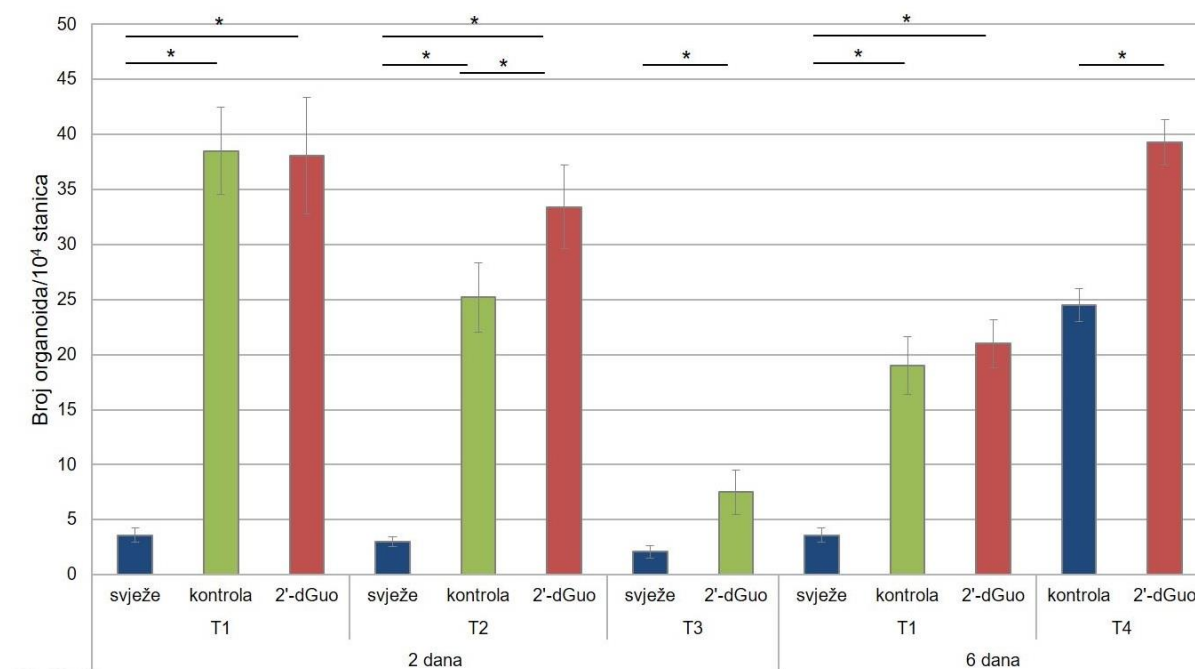
**Slika 23.** Udio živih stanica razgrađenog netretiranog, inkubiranog i tkiva inkubiranog s 2'-deoksiguanozinom (2'-dGuo) nakon 1, 2, 5 i 6 dana inkubacije. Stanice su dobivene razgradnjom timusnog tkiva i određene brojenjem na mikroskopu uz prisutnost tripanskog modrila. Linije prikazuju neovisne pojedinačne timuse. Svaka inkubacija izvedena je s najmanje tri različita timusa. Slovo „T“ označava pojedine timuse korištene u eksperimentima.

Uz vijabilnost, na protočnom je citometru praćeno obogaćenje udjela nelimfocitnih stanica. Primijećeno je kako je udio stanica negativnih za marker CD45 prilikom kraće inkubacije najviši kod stanica inkubiranih s 2'-dGuo. Stanice inkubirane bez prisutnosti spoja također pokazuju porast u udjelu CD45<sup>-</sup> stanica u odnosu na stanice koje nisu inkubirane, no vidljivo je kako je 2'-dGuo zaslužen za depleciju limfocita iz tkiva. Stanice dulje inkubiranog tkiva prate isti trend, no ovdje je on podložniji razlikama između pacijenata (Slika 24).



**Slika 24.** Udio stanica CD45<sup>-</sup> dobivenih razgradnjom netretiranog (svježeg) i tkiva timusa inkubiranog na 37°C sa i bez 2'-deoksiguanozina (2'-dGuo) nakon 1, 2, 5 i 6 dana inkubacije. Broj stanica je određen brojenjem na mikroskopu uz prisutnost tripanskog modrila te analiziran za prisutnost antigena na protočnom citometru. Linije prikazuju neovisne pojedinačne timuse. Svaka inkubacija izvedena je s najmanje tri različita timusa. Slovo „T“ označava pojedine timuse korištene u eksperimentima. „Svježe tkivo“ označava netretirano tkivo obrađeno odmah po dolasku, „2-dGuo“ označava tkivo tretirano spojem, a „37°C“ tkivo koje je inkubirano, no bez 2'-dGuo.

Učinkovitost 2'-dGuo u obogaćenju prekursora u tkivu potvrđena je uzgojem enzimatski obogaćenih stanica razgrađenog timusa u *in vitro* uvjetima za stvaranje organoida. U svim analiziranim timusima, inkubacija tkiva pri 37°C sa ili bez 2'-dGuo dovodi do stvaranja većeg broja organoida. Stanice tkiva inkubiranog bez 2'-dGuo stvaraju od 5,3 do 10,7 puta više organoida od stanica tkiva koje nije inkubirano. Stanice tkiva inkubiranog s 2'-dGuo stvaraju između 1,6 i 10,6 puta više organoida, u odnosu na tkivo koje nije inkubirano. Stanice tkiva inkubirane tijekom dva dana s 2'-dGuo proizvele su značajno veći broj organoida od stanica tkiva inkubiranog bez prisustva 2'-dGuo ( $p < 0,05$ ). Produljenje vremena inkubacije tkiva na 6 dana nije dovelo do poboljšanja. Dulja inkubacija dovodi do manje razlike između tkiva inkubiranog sa i bez 2'-dGuo tako da ta razlika nije značajna ( $p > 0,05$ ) (Slika 25). Značajnost razlike u broju organoida utvrđena je neuparenim T-testom.

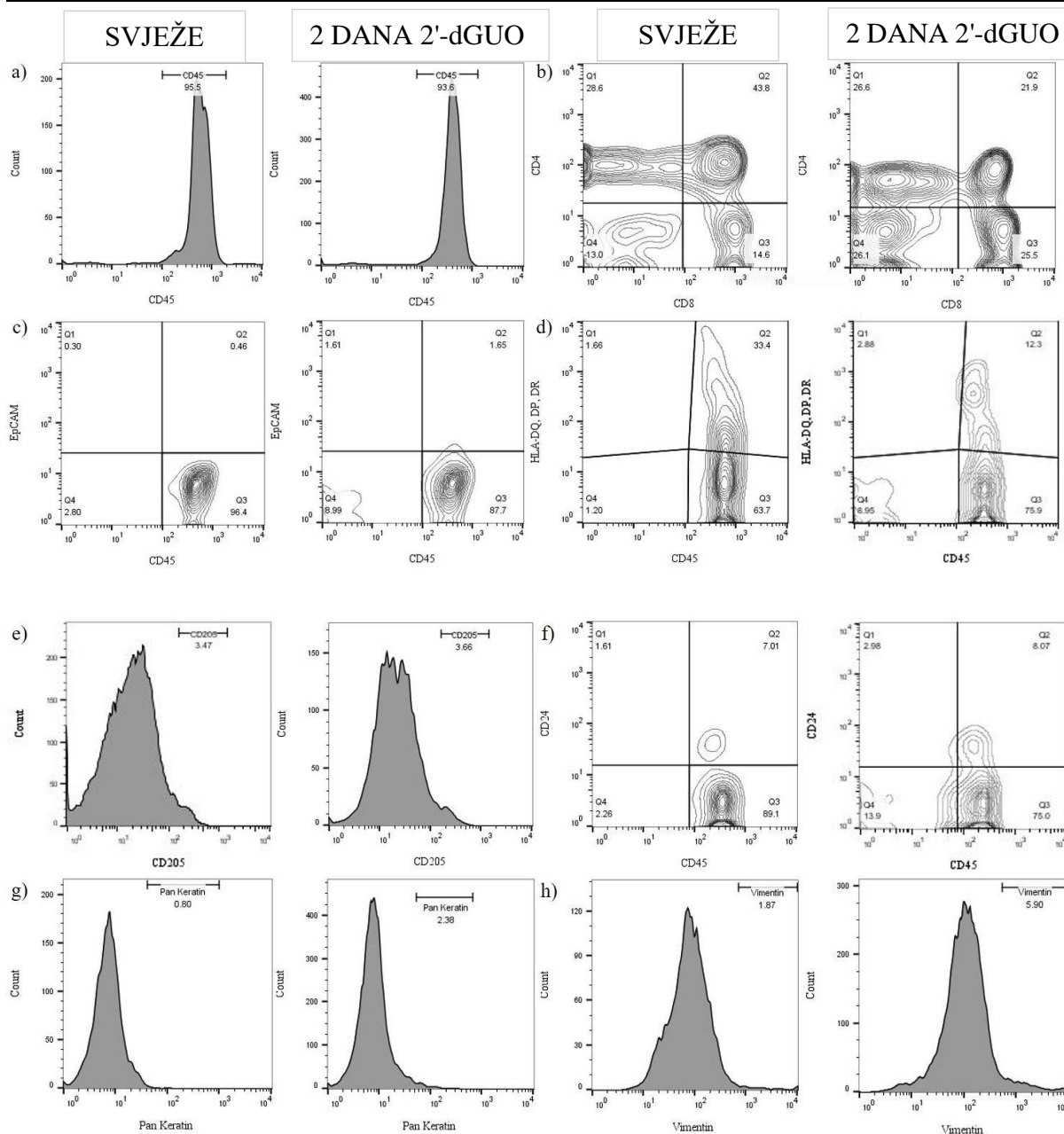


**Slika 25.** Broj organoida na  $10^4$  nasađenih stanica razgrađenog timusa za tkivo pojedinih timusa u različitim uvjetima uzgoja. Tkivo timusa inkubirano je 2 i 6 dana u prisutnosti 2'-deoksiguanozina (2'-dGuo) i bez njega (kontrola) te uspoređeno s tkivom razgrađenim odmah po dolasku (svježe). Pokus učinka 2'-dGuo ponovljen je s barem dva timusa. Stanice dobivene razgradnjom tkiva nasađene su u pet bunarića, za svaki je izračunat broj organoida po  $10^4$  nasađenih stanica, a na slici je prikazana srednja vrijednost i standardna derivacija dobivena iz pet replika. Statistička značajnost utvrđena je neuparenim t-testom i naznačena je zvjezdicom. Slovo „T“ označava pojedine timuse korištene u eksperimentima.

#### *4.3.3. Analiza stanica timusa prije i nakon inkubacije tkiva s 2'-dGuo protočnim citometrom*

Kako bi se utvrdilo na koju vrstu stanica 2'-dGuo najviše utječe, odnosno koje stanice su odgovorne na primijećeno povećanje broja organoida kao indirektnog pokazatelja povećanja broja matičnih stanica, analizirana je ekspresija markera limfoidne loze, antigen-prezentirajućih stanica te epitelnih stanica (Slika 26). Stanice dobivene razgradnjom tkiva analizirane su na isti način kao i stanice nakon obogaćenja magnetskim otklanjanjem zrelih limfocita.

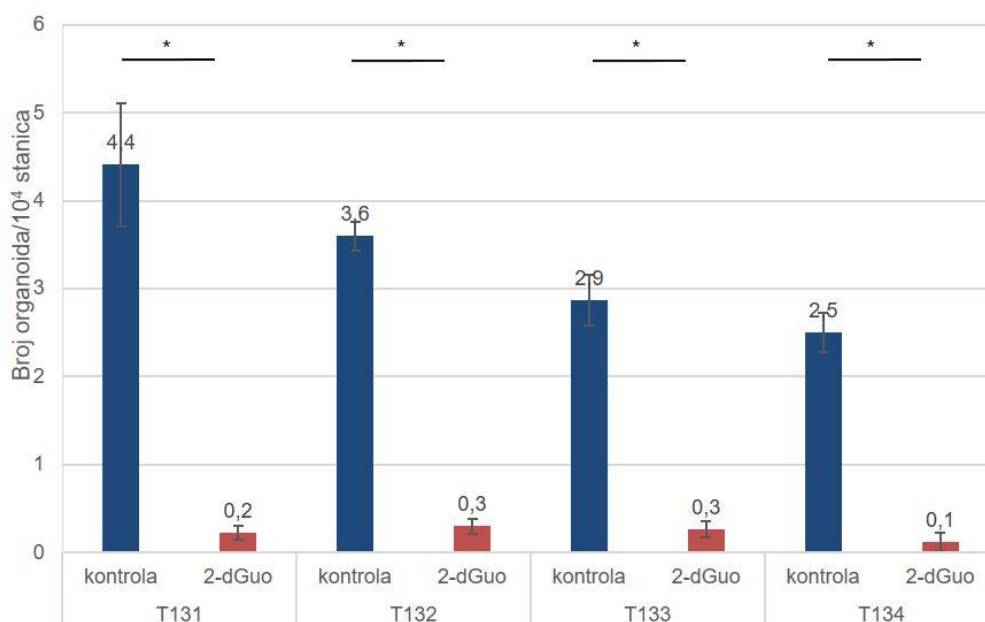
Slika 26 prikazuje reprezentativne rezultate analize stanica dobivenih od tkiva koje nije inkubirano (svježe tkivo) i tkiva razgrađeno nakon dva dana inkubacije s 2'-dGuo. Vidljivo je kako je inkubacija tkiva s 2'-dGuo smanjila udio stanica pozitivnih za CD4 te dvostruko pozitivnih za CD4 i CD8 (s 44% na 22%) (Slika 26b). Sukladno tome, povećan je postotak stanica koje ne ekspimiraju ova dva antigena (s 13% na 26%). Smanjen je i broj stanica koje ekspimiraju CD45, no za razliku obogaćivanja pomoću magnetskih kuglica, ovdje nestaje populacija slabo pozitivna za CD45 (Slika 26a). Populacija stanica pozitivnih za EpCAM povećala se, no ne značajno (s 0,3% na 1,61%) (Slika 26c). Smanjila se populacija stanica koja izražava HLA-DQ, DP, DR zajedno s CD45, no povećala populacija jednostruko pozitivnih za HLA-DQ, DP, DR (s 1,7% na 2,9%) (Slika 26d). Nije zamijećena promjena u udjelu stanica koje ekspimiraju molekule CD205 i CD24 (Slika 26e i 26f). Vimentin je nakon inkubacije prisutan na 2,5 x više stanica (Slika 26h). Značajno je naglasiti kako se udio stanica pozitivnih za keratine trostruko povećao (s 0,8% na 2,4%) (Slika 26g).



**Slika 26.** Analiza ekspresije antigena na stanicama posljednjeg ciklusa razgradnje tkiva razgrađenog odmah po primitku (lijevo) i nakon 2 dana inkubacije s 2'-deoksiguanozinom (2'-dGuo) (desno). Stanice su analizirane protočnim citometrom nakon inkubacije s odgovarajućim protutijelima a) CD45; b) CD4 i CD8; c) EpCAM i CD45; d) HLA-DQ,DP,DR i CD45; e) CD205; f) CD24 i CD45; g) pan keratin; h) vimentin. Prisutnost antigena na testiranim stanicama prikazana je kao histogram, u jednoj dimenziji (a, e, g i h) ili je kao gustoća zabilježenih događaja (b, c, d i f). Fluorescencija je na histogramima istaknuta na osi x, a broj stanica na kojima je zabilježena na osi y. Na svakoj osi prikaza gustoće događaja u dvije dimenzije naznačeno je protutijelo.

4.3.4. 2'-dGuo u mediju za uzgoj organoida inhibira njihov nastanak

Kako bi se ispitalo ima li 2'-dGuo poticajan učinak na progenitore ili jednostavno povećava njihov udio u smjesi stanica dobivenih razgradnjom putem eliminacije timocita, 2'-dGuo dodan je u medij za uzgoj organoida u koncentraciji 1,35 mM te je kultura matičnih stanica održavana 13 dana. Usporedno s tretmanom, iste stanice uzgajane su u mediju za uzgoj organoida bez 2'-dGuo. Pronađeno je kako dodatak 2'-dGuo u medij dovodi do smanjenja ukupnog broja nastalih organoida između 9,7 i 25 puta. Srednja vrijednost broja organoida na  $10^4$  stanica bez tretmana je  $3,35 \pm 0,72$ , dok ista vrijednost u prisutnosti 2'-dGuo pada na  $0,23 \pm 0,08$  (Slika 27). Razlika je statistički značajna u svim analiziranim uzorcima.

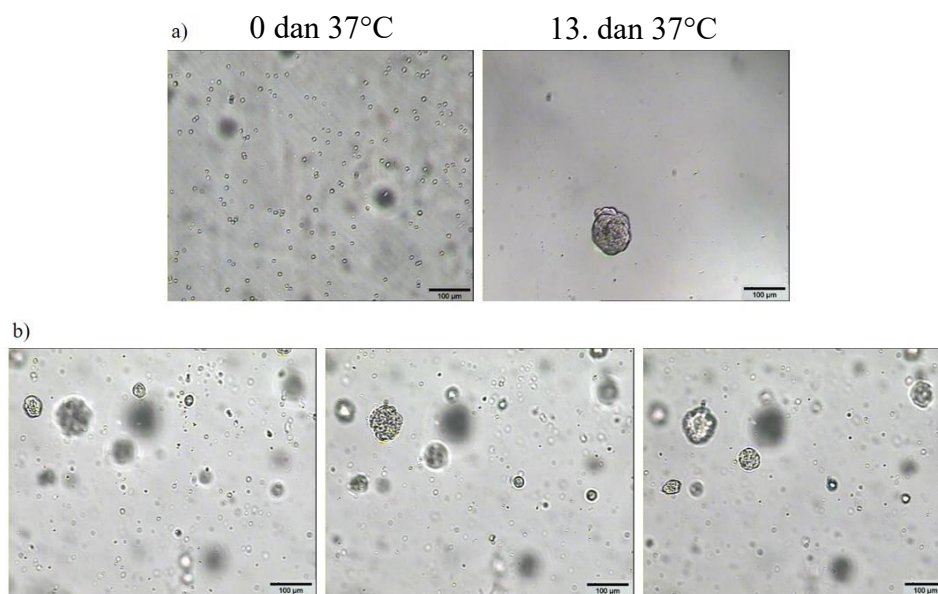


**Slika 27.** Broj nastalih organoida na  $10^4$  nasađenih stanica istog tkiva dobivenih razgradnjom. Stanice su nasađene u pet bioloških replika te su uzgajane u mediju za uzgoj organoida u prisutnosti 2'-deoksiguanozina (2'-dGuo) ili bez njega (kontrola). Nakon formiranja organoida određen im broj po  $10^4$  nasađenih stanica, a na slici je prikazana prosječna vrijednost i standardna devijacija određena na temelju replika. Statistička značajnost utvrđena je T-testom. Svaki od rezultata statistički je značajan ( $p < 0,05$ ) što je označeno zvjezdicom iznad grafa. Slovo „T“ označava pojedine timuse korištene u eksperimentima.



#### 4.4. Organoidi nastaju od pojedinačnih stanica

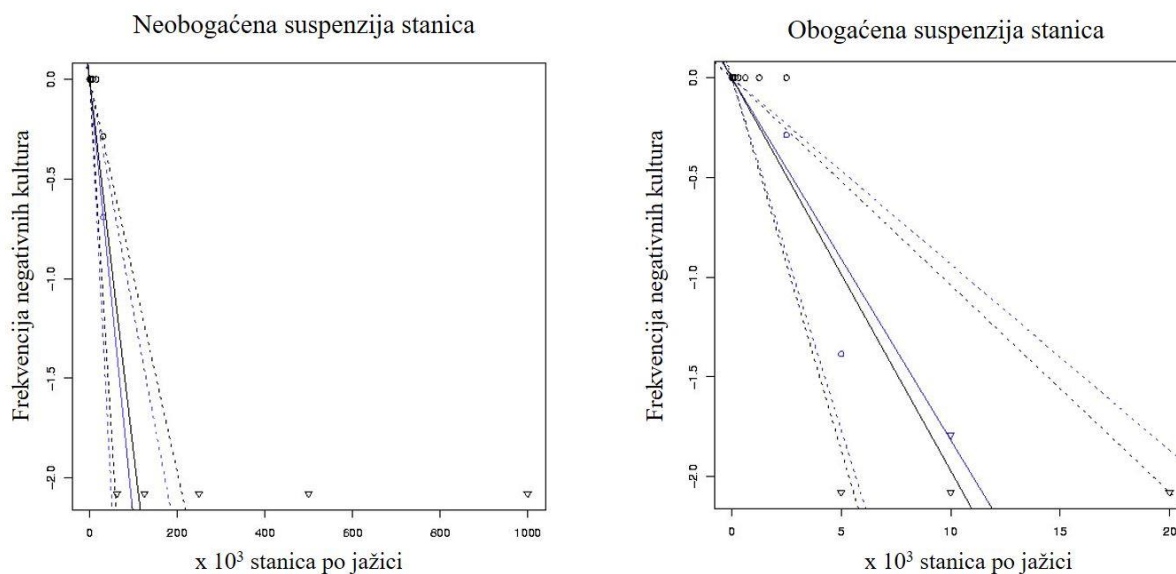
Kako bi se isključila mogućnost da su organoidi agregati pojedinačnih stanica, a ne kolonije nastale od jedne stanice, suspenzija stanica razgrađenog timusa nasađena je u termoreverzibilnom hidrogelu. Ova supstanca je polimer koji je pri 4°C u tekućem agregatnom stanju, zbog čega se u njemu mogu stanice raspršiti u obliku jednostanične suspenzije. Pri 37°C polimer prelazi u čvrsto agregatno stanju čime se sprječava nastanak staničnih agregata, odnosno, pojedinačne stanice ostaju fiksirane u podlozi (Slika 28a). Otapanje hidrogela u mediju prilagođenom stvaranju organoida osigurava dostupnost svih potrebnih faktora rasta. Za razliku od kultura matičnih stanica gdje se organoidi neosporno mogu identificirati 7 dana nakon nasađivanja, organoidi nastali od pojedinačnih stanica su u hidrogelu primijećeni 9 dana nakon nasađivanja (Slika 28a i 28b). Isti pokus je ponovljen s disociranim stanicama organoida koje su, također, stvorile sekundarne organoide u hidrogelu.



**Slika 28.** Stanice dobivene razgradnjom timusa nasađene u hidrogelu. Organoidi su slikani 13 dana nakon nasađivanja invertnim mikroskopom (Nikon) pod povećanjem 250x, ljestvica veličine označava 100 µm. a) Stanice dobivene razgradnjom timusa raspršene i imobilizirane u hidrogelu pri 4°C fiksirane su kao pojedinačne na 37°C bez mogućnosti stvaranja organoida (lijevo). Organoidi nastali od fiksiranih stanica (desno). b) Vidno polje slikano u više ravnina pokazuje imobilizaciju organoida u hidrogelu u tri dimenzije.

#### 4.5. Utvrđivanje broja prekursora u suspenziji stanica razgrađenog timusa

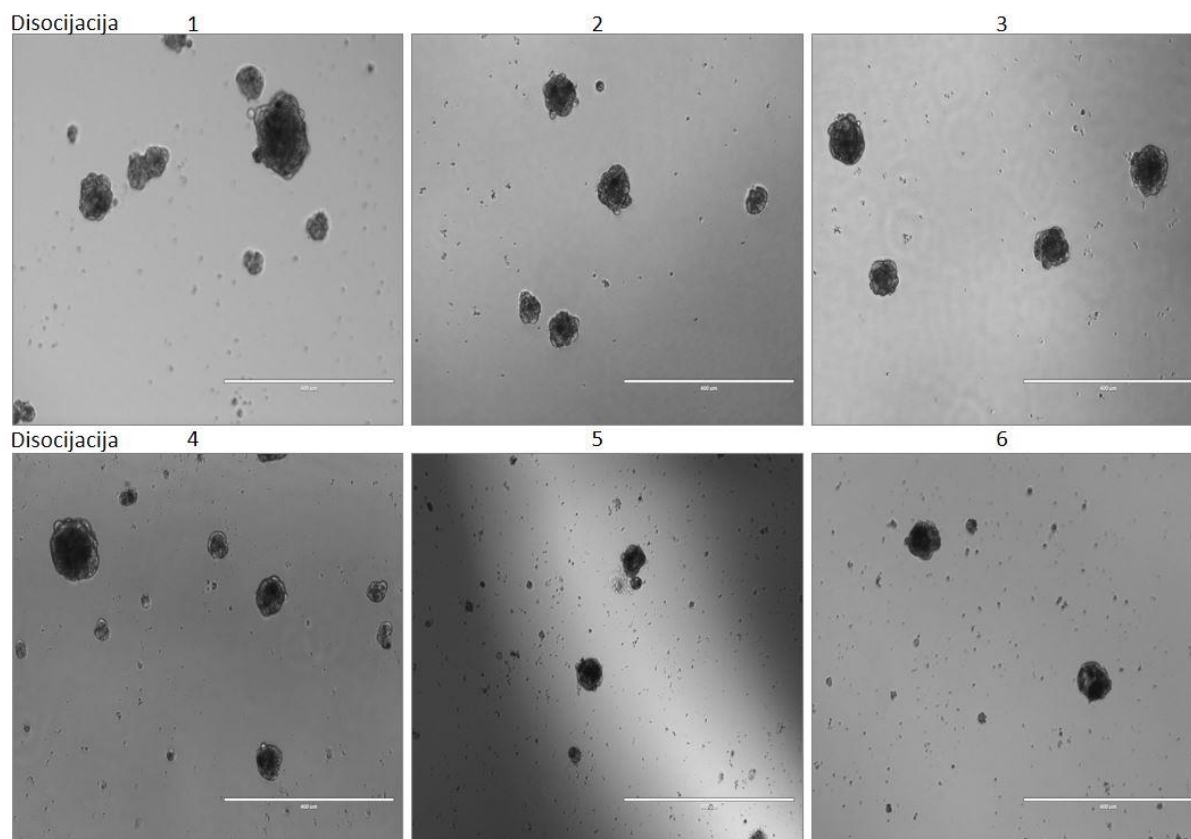
Točan broj stanica koje tvore organoide u tkivu određen je nasađivanjem stanica timusa u seriji razrjeđenja u kojoj, nakon početnog, svako sljedeće razrjeđenje ima dvostruko manji broj stanica. Neobogaćene stanice nasađene su u seriji razrjeđenja koja počinje od  $10^5$  stanica i završava s 488 stanica. Obogaćene stanice nasađene su u seriji razrjeđenja od  $2 \times 10^4$  stanica do 10 stanica. Trinaest dana nakon nasađivanja, organoidi su dosegli veličinu za brojenje i zabilježene su gustoće stanica pri kojima su se pojavili. Podaci su uneseni u program „ELDA“ (engl. *Extreme Limiting Dilution Analysis*) kojim je analizirana pojavnost organoida kao pokazatelja prisutnosti matičnih stanica<sup>162</sup>. Prikazani su rezultati tri neovisna pokusa (Slika 29). Jedna od 50 675 stanica dobivenih razgradnjom tkiva ima sposobnost stvoriti organoide. Obogaćivanje ne-limfoidnih stanica timusa ovaj broj podiže na 1/5288, što ponovno ukazuje na ne-limfocitno porijeklo stanica koje tvore organoide.



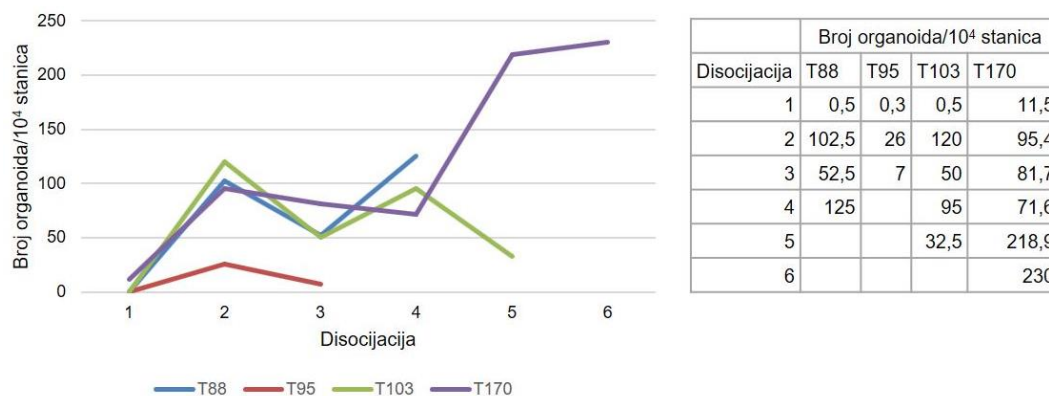
**Slika 29.** Frekvencija pojavnosti kultura u kojima se nisu stvorili organoidi naspram broja stanica nasađenih u kulturi. Trokutići uz os x označavaju broj stanica u kulturama u kojima se jesu stvorili organoidi, kružići označavaju kulture u kojima se nisu stvorili organoidi, broj stanica u njima i njihovu frekvenciju među replikama izraženu u logaritamskoj vrijednosti, puna crta je procijenjena frekvencija aktivnih stanica izračunata prema linearnoj regresiji, a područje između dva iscrtkana pravca označava 95% interval pouzdanosti. Prikazana je frekvencija za neobogaćene stanice dobivene razgradnjom timusa (lijevo) i suspenziju stanica obogaćenu magnetskom deplecijom (desno). Na svakoj slici su prikazani rezultati tri neovisna eksperimenta.

#### 4.6. Sposobnost samoobnavljanja

Jedna od glavnih karakteristika matičnih stanica je sposobnost samoobnavljanja. Kako bi se testirala ova sposobnost, organoidi su disocirani na pojedinačne stanice, nasađeni u uvjete pogodne za njihovo stvaranje te je kultura praćena. Disocirani su organoidi dosljedno tvorili nove. Isto je ponovljeno do šest puta (do pojave sedmih organoida) što ukazuje na otpornost matičnih stanica i njihovu mogućnost samoobnavljanja. Eksperiment je trajao 3 mjeseca, nakon čega je prekinut. Ukupan broj stanica se tijekom trajanja pokusa smanjivao kod svake disocijacije, a broj organoida na  $10^4$  nasađenih stanica je rastao (Slika 30, Slika 31).

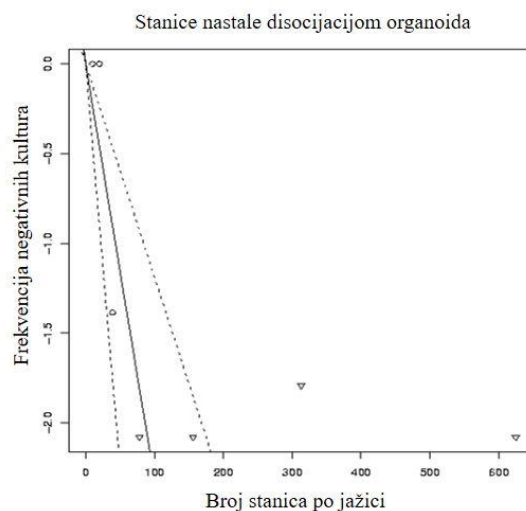


**Slika 30.** Fotografije organoida nastalih nakon svake disocijacije i ponovnog uzgoja. Broj disocijacije naznačen je iznad svake fotografije. Organoidi su fotografirani invertnim mikroskopom (EVOS FL) pri povećanju 100x. Ljestvica veličine na fotografiji označava 400 µm.



**Slika 31.** Broj organoida nastalih od 10<sup>4</sup> stanica nakon svake disocijacije. Na slici i pripadajućoj tablici prikazani su podaci dobiveni iz četiri zasebna eksperimenta. Slovo „T“ označava pojedine timuse korištene u eksperimentima.

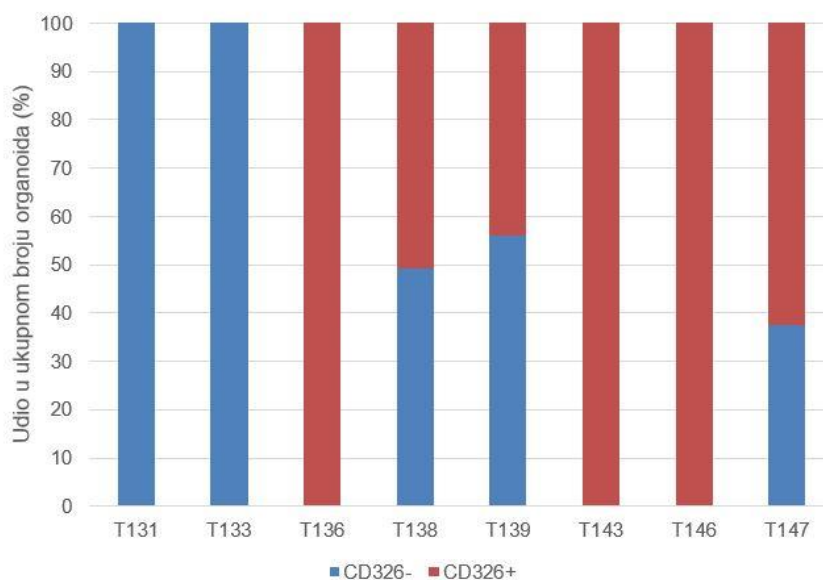
Osim tehničkih razloga (gubitak stanica zbog manipulacije, razgradnje i nasađivanja), smanjenje ukupnog broja stanica dobivenih disocijacijom organoida upućuje na mogućnost da samo određen dio tih stanica ima svojstvo samoobnavljanja. Iz ovog razloga je bilo potrebno utvrditi koji udio stanica primarnih organoida zadržava mogućnost stvaranja novih organoida. Pojedinačne stanice nasađene su u seriji razrjeđenja, u rasponu od 2 x 10<sup>4</sup> do 10 stanica, te je pomoću programa „ELDA“ utvrđeno kako jedna od svakih 43,2 nasađenih stanica ima sposobnost stvoriti nove organoide<sup>162</sup> (Slika 32).



**Slika 32.** Frekvencija pojavnosti kultura u kojima se nisu stvorili sekundarni organoidi naspram broja stanica nasađenih u kulturu. Trokutići uz os x označavaju broj stanica u kulturama u kojima se jesu stvorili organoidi, kružići označavaju kulture u kojima se nisu stvorili organoidi, broj stanica u njima i njihovu frekvenciju među replikama izraženu u logaritamskoj vrijednosti, puna crta je procijenjena frekvencija aktivnih stanica izračunata prema linearnoj regresiji, a područje između dva crtkana pravca označava 95% interval pouzdanosti. Eksperiment je ponovljen dva puta.

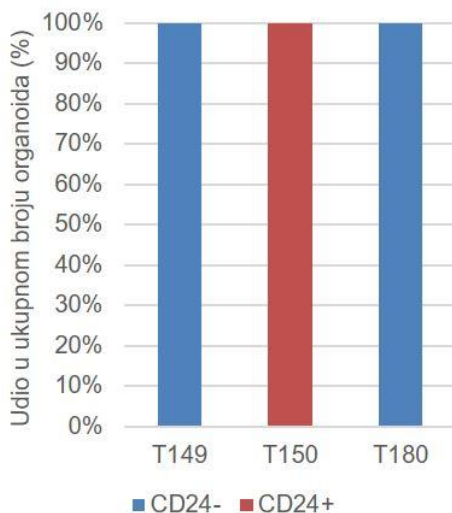
#### 4.7. Organoidi nastaju neovisno o ekspresiji CD326 i CD24

Stanice razgrađenog timusa sortirane su na temelju ekspresije CD326 (EpCAM, engl. *Epithelial cell adhesion molecule*) na negativne i pozitivne. Ova molekula nalazi se na površini zrelih epitelnih stanica. Organoidi su uzgajani 13 dana te izbrojeni. Organoidi su nastali iz nasađenih populacija stanica pozitivnih i negativnih za molekulu CD326, u varijabilnim udjelima u ukupnom broju organoida, ovisno o korištenom biološkom uzorku (Slika 33). S obzirom na vrlo mali broj stanica dobivenih sortiranjem moguće je da je jedna populacija stanica bila manje ili više kontaminirana matičnim stanicama iz druge populacije.



**Slika 33.** Udio organoida dobivenih od stanica sortiranih prema CD326 u ukupnom broju dobivenih organoida. Budući da je rezultat ovisan o pojedinačnim eksperimentima, prikazani su rezultati eksperimenata s 8 timusa. Eksperimenti s T138 i T147 ponovljeni su 2 puta, eksperiment s T139 tri puta, a ostali eksperimenti jednom. Slovo „T“ označava pojedine timuse korištene u eksperimentima.

Slično sortiranju prema molekuli CD326, ni sortiranje prema ekspresiji CD24 ne daje jednoznačne odgovore na ekspresijski profil stanica koje iniciraju organoide. Glikoprotein CD24 nije diskriminatorski marker za stanice koje tvore organoide. Sortiranjem prema ovom markeru organoidi nastaju ovisno o timusu (Slika 34.)



**Slika 34.** Udio organoida dobivenih od stanica sortiranih prema molekuli CD24 u ukupnom broju dobivenih organoida. Svaki eksperiment izveden je jednom. Slovo „T“ označava pojedine timuse korištene u eksperimentima.

#### 4.8. Utjecaj faktora rasta na organoide

Organogeneza timusa, njegova diferencijacija i uloga u sazrijevanju limfocita T, kompleksni su procesi koji zahtijevaju uključenost složene stanične mašinerije i više različitih signalnih puteva. Simulacijom aktivnosti signalnih puteva, kao i njihovim dokidanjem, moguće je dobiti uvid u njihovu ulogu u nastanku, proliferaciji i preživljenju organoida dobivenih iz timusa.

Signalni put Wnt neizostavan je za pravilan rad timusa i sazrijevanje limfocita T. Pokusi na miševima pokazali su kako delecija  $\beta$ -katenina, nizvodnog efektor signalnog puta Wnt, dovodi do smanjene funkcije timusa i smanjenog broja limfocita T u periferiji<sup>163</sup>. Također, inhibicija djelovanja molekula Tcf-1 (engl. *T cell factor*) i Lef-1 (engl. *Lymphoid enhancer-binding factor 1*), koji čine kompleks transkripcijskih čimbenika direktno aktiviran kanonskim putem signalizacije Wnt, dovodi do blokade razvoja dvostruko-negativnih prekursora limfocita T<sup>97,164,165</sup>. Novija istraživanja govore o tome kako, za razliku od epitelnih stanica drugih tkiva, diferencijacija timusnih epitelnih stanica nije ovisna o aktivnosti signalnog puta Wnt već da pretjerana aktivacija ovog signalnog puta može dovesti do poremećaja u morfologiji organa<sup>166</sup>. U ovdje opisanom eksperimentalnom modelu, aktivacija signalnog puta Wnt dodavanjem topivog liganda WNT-1 primarnoj kulturi dovodi do povećanja broja nastalih organoida pri 10 ng/ml i 50 ng/ml dok je suprotan utjecaj primijećen pri 100 ng/ml (Slika 35a).

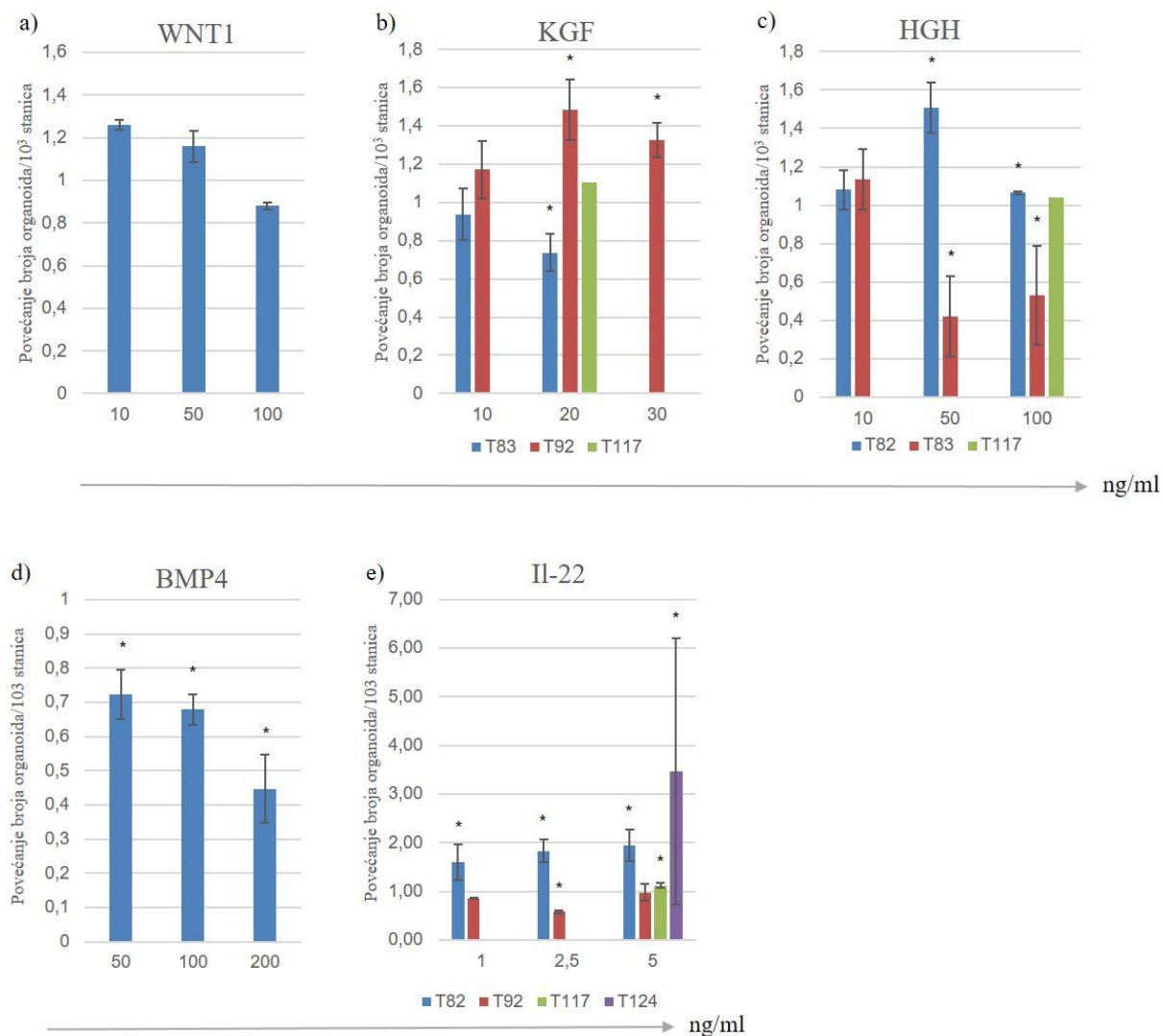
Čimbenik rasta keratinocita (KGF, engl. *keratinocyte growth factor*) je dio obitelji fibroblastnih faktora rasta koji u timusu djeluje poticajno na proliferaciju epitelnih stanica<sup>167,168</sup>. Uz to, sistemsko izlaganje miševa čimbeniku KGF djeluje protektivno na timus i ubrzava njegov oporavak nakon zračenja te nakon tretmana kortikosteroidima i citostaticima<sup>169</sup>. Djelovanje KGF na primarne organoide je ovisno o pojedinom timusu kojega se tretira pa tako na jedan timus djeluje proliferativno, a na drugi inhibitorno pri koncentracijama od 10, 20 i 30 ng/ml (Slika 35b).

Ljudski timociti i epitelne stanice timusa prirodno luče hormon rasta (HGH, engl. *human growth hormone*) koji, indukcijom inzulinu-sličnog čimbenika rasta I, djeluje autokrino i parakrino kao čimbenik rasta i povećava izlučivanje timusnog hormona te stopu proliferacije u timusnim epitelnim stanicama<sup>170,171</sup>. Uzgoj primarne kulture organoida u prisutnosti HGH ne daje jednoznačne odgovore po pitanju proliferativnog učinka budući da je i za ovaj faktor primijećen individualan odgovor (Slika 35c).

Timusne epitelne stanice proizvode koštane morfogene proteine 2 i 4 (BMP2 i 4, engl. *bone morphogenic protein*) koji djeluju na način da u tim istim epitelnim stanicama podižu razinu ekspresije transkripcijskog čimbenika FOXP1, putem kojega stimuliraju regeneraciju epitelnih stanica, no u isto vrijeme zaustavljaju diferencijaciju timocita<sup>172-174</sup>. Osim timusnih epitelnih stanica, i endotelne stanice te timociti doprinose prisutnosti proteina BMP2 i 4 u timusu. Protein BMP4 u kulturama primarnih organoida pri 50, 100 i 200 ng/ml dovodi do smanjenja broja organoida (Slika 35d).

Stanice imunskog sustava proizvode interleukin-22 (IL-22) koji pozitivno utječe na proliferaciju epitelnih i mezenhimskih stanica. Iako ne postoje istraživanja o utjecaju IL-22 na ljudski timus, istraživanjima na miševima pokazano je kako IL-22 potiče diobu epitelnih stanica timusa te tako doprinosi oporavku timusa nakon ozljede<sup>175</sup>. Interleukin-22 pri 5 ng/ml u primarnim kulturama organoida doprinosi njihovom većem broju, dok se pri 1 ng/ml i 2,5 ng/ml odgovor organoida na prisutnost IL-22 razlikuje među različitim timusima (Slika 35e).





**Slika 35.** Utjecaj prisutnosti čimbenika rasta, hormona i citokina na broj primarnih organoida dobivenih od  $10^4$  stanica, izražen kao omjer broja organoida u tretiranim i netretiranim kulturama. Stanice su nasadene u tri biološke replike, tretirane naznačenim koncentracijama spojeva te uzgajane tijekom 13 dana. Broj organoida na svakih  $10^4$  stanica izračunat je za svaku repliku stanica s tretmanom te je potom izračunat omjer broja organoida za replike i srednje vrijednosti kontrole. Na slici je prikazana srednja vrijednost omjera s izraženim standardnim devijacijama. Brojevi organoida po  $10^4$  stanica za svaku od replika kontrole i tretmana uspoređeni su neuparenim T-testom i statistički je značajna razlika pronađena u uzorcima označenima zvjezdicom iznad stupića. Koncentracija i tretman naveden je na osi x. a) WNT1 (10, 50 i 100 ng/ml); b) KGF (10, 20 i 30 ng/ml); c) HGH (10, 50 i 100 ng/ml); d) BMP4 (50, 100 i 200 ng/ml); d) Il-22 (1, 2,5 i 5 ng/ml). Slovo „T“ označava pojedine timuse korištene u eksperimentima.

#### 4.9. Analiza stanica organoida

##### 4.9.1. Ekspresija specifičnih gena u stanicama organoida

Metodom PCR iz ukupne mRNA izolirane iz stanica organoida te metodom „multiplex“ PCR analizirana je ekspresija specifičnih gena u stanicama organoida. „Multiplex“ PCR analiza korištena je jer su stanice koje stvaraju organoide rijetka populacija u tkivu te se njihovim uzgojem teško dobije dovoljan broj stanica za izolaciju putem TRIZola. Kao endogena kontrola umnožavanja cDNA korišten je gen za beta-glukuronidazu (*GUSB*), enzim koji katalizira razlaganje složenih ugljikohidrata. Ovaj enzim eksprimiran je u svim tkivima.

Stanice organoida pozitivne su za *KERATIN 5* koji je eksprimiran u medularnim epitelni stanicama timusa te u fetalnim prekursorima medularnih i kortikalnih epitelnih stanica, gdje se nalazi eksprimiran zajedno s *KERATINOM 8*. Ovaj strukturalni protein eksprimiran je od početka organogeneze timusa, a njegova se ekspresija nastavlja u timusu i tijekom života jedinke<sup>1,20</sup>. Kao pokazatelj prisutnosti kortikalnih epitelnih stanica, eksprimiran je i *KERATIN 8*<sup>20</sup>. Gen *AIRE* (engl. *Autoimmune Regulator*), transkripcijski faktor nužan za ekspresiju tkivno specifičnih antigena, također je eksprimiran u stanicama organoida uzgajanih *in vitro* tijekom 30 dana. Ekspresija transkripcijskog faktora *AIRE* u fiziološkim uvjetima nalazi se isključivo u zrelih, diferenciranih medularnim epitelnim stanicama<sup>176</sup>. Prisutnost zrelih epitelnih stanica potvrđuje i ekspresija gena *EpCAM (CD326)* koji je njihov specifični marker. Uz ove markere timusnog epitela eksprimiran je i gen *PDGFRβ*, receptor tipa β za trombocitni faktor rasta. Gen *PDGFRβ* je uobičajeno eksprimiran na mezenhimskim stanicama te mezenhimskim matičnim stanicama, a njegova ekspresija je od posebnog značaja za endotelne progenitore u kojima signali primljeni putem *PDGFRβ* djeluju proliferativno i kontroliraju formaciju vaskulature<sup>177,178,179,180</sup> (Slika 36).

Geni *HOXA-3* (engl. *Homeobox A3*), *PAX-1* te *PAX-9* (engl. *Paired Box*) eksprimirani su vrlo rano tijekom fetalnog razvoja i neizostavni su prilikom organogeneze timusa te razvoja njegovog stromalnog odjeljka. Defekti u navedenim genima dovode do potpunog izostanka formacije timusne strome ili do izraženih defekta u istoj. Svi navedeni eksprimirani su u organoidima dobivenim iz postnatalnog humanog timusa što potvrđuje postojanje nezrelih prekursora (Slika 36).

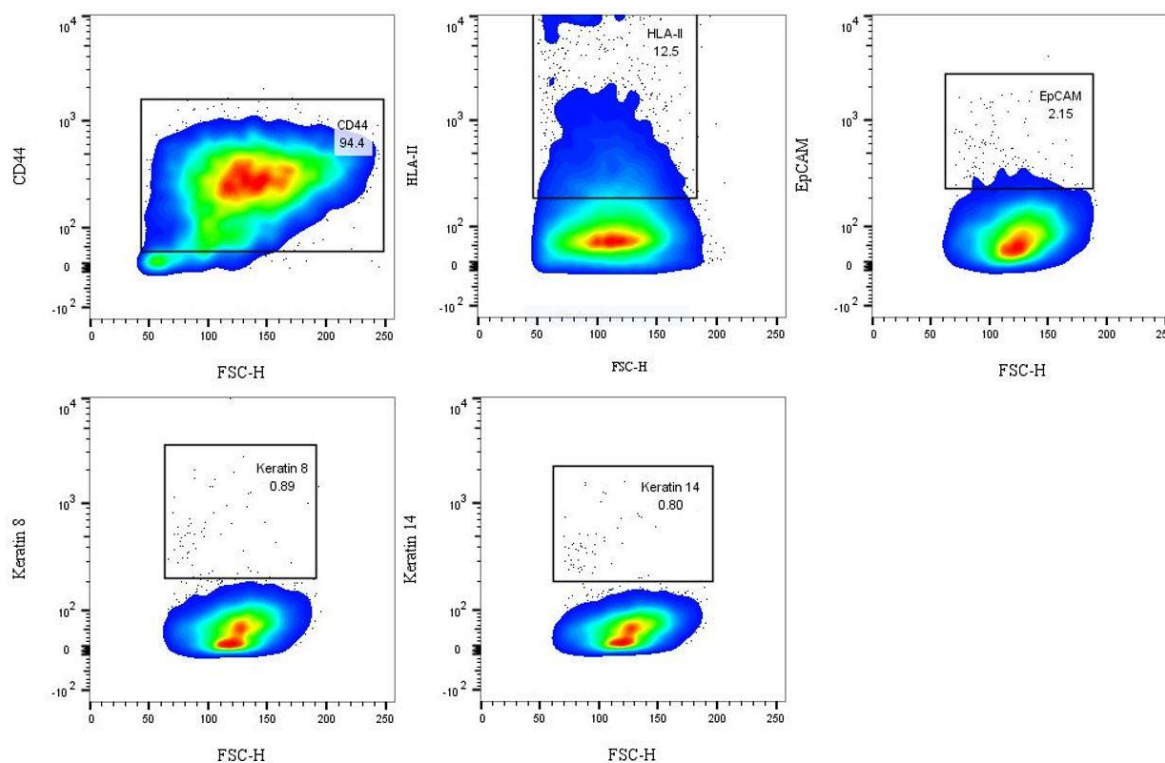


**Slika 36.** Ekspresija gena od interesa u stanicama organoida. Korišteni su uzorci dobiveni na konvencionalan način (gornji red) te metodom „multiplex“ PCR (donji red). Kao kontrola umnožavanja korištena je beta-glukuronidaza (GUSB). Za referencu pri provjeri veličine produkta korišten je DNA marker VIII.

4.9.2. Ekspresija proteina na stanicama u organoidima

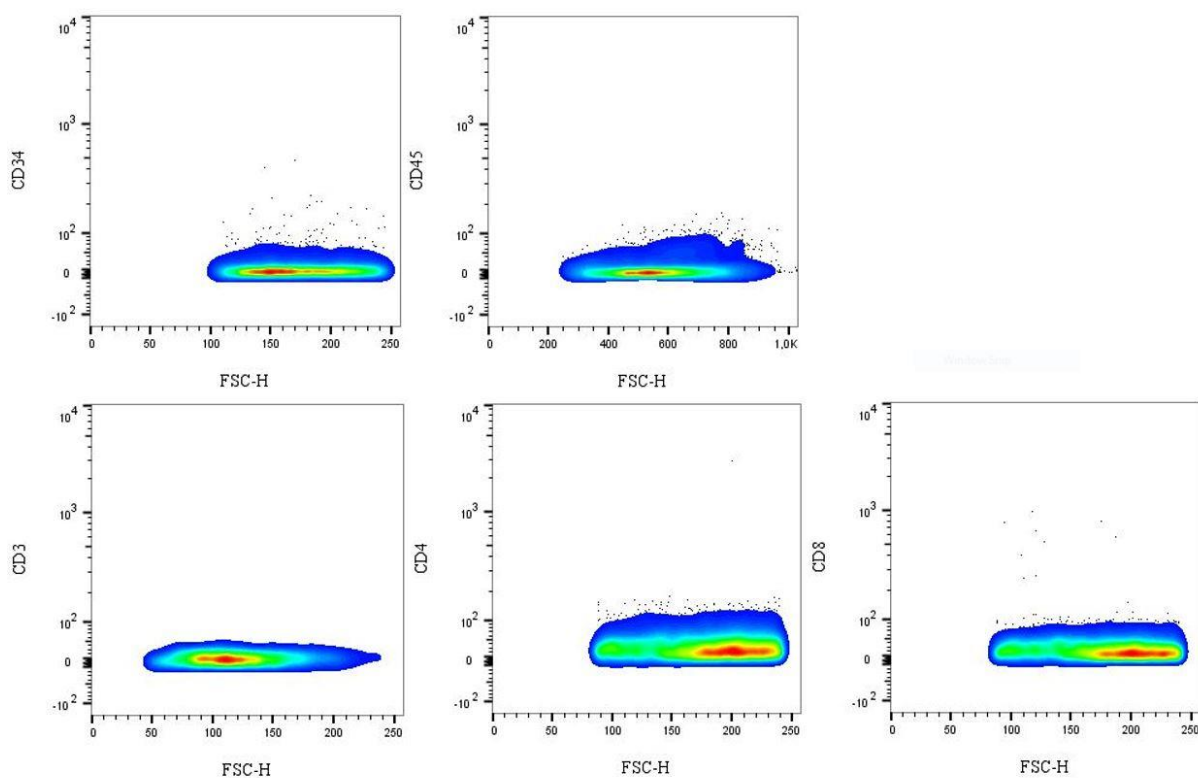
Organoidi su disocirani inkubacijom uz EDTA kako bi se očuvala cjelovitost antigena. Nakon disocijacije, pojedinačne stanice su inkubirane s protutijelima za zrele stromalne markere i analizirane na protočnom citometru. Manje od 1% stanica organoida ekspimiraju zrele markere epitelnih stanica timusa kao što su KERATIN 14 (marker medularnih epitelnih stanica) i KERATIN 7/8 (marker kortikalnih epitelnih stanica). EpCAM (pan-epitelni marker) je ekspimiran na 2% stanica. U suprotnosti s navedenim, pronađeno je kako 13% stanica organoida ekspimiraju molekule MHC II, tipično ekspimirane isključivo na antigen-prezentirajućim stanicama.

Jedina molekula gotovo univerzalno izražena na stanicama organoida je CD44 – površinski glikoprotein uključen u interakcije između stanica. Ova molekula nalazi se na velikom broju staničnih tipova i sudjeluje u aktivaciji limfocita, migraciji stanica te hematopoezi (Slika 37.).



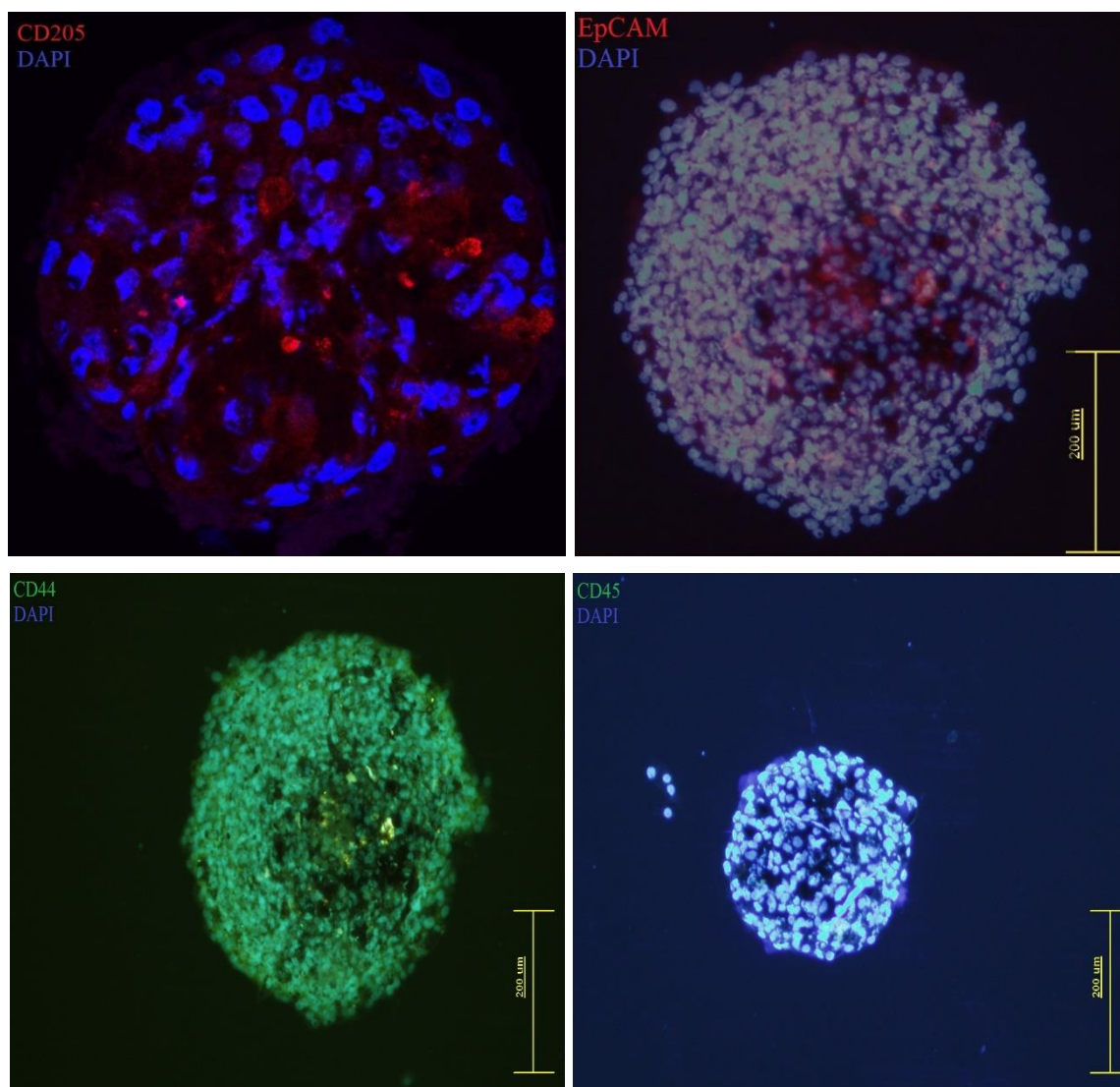
**Slika 37.** Ekspresija markera stromalnih stanica timusa u/na stanicama organoida analizirana protočnom citometrijom i prikazana na način ovisan o gustoći zabilježenih događaja u dvije dimenzije. Na x-osi je parametar veličine analiziranih stanica, a na y-osi protutijelo koje je korišteno za obilježavanje. Korištena su protu-ljudska protutijela CD44, HLA-DQ, DP, DR, EpCAM, KERATIN 7/8 i KERATIN 14. Odgovarajuće pozitivne i negativne kontrole uključene su u pokus.

Budući da velik dio staničnog sadržaja timusa čine upravo limfociti T te njihovi prekursori u raznim razvojnim fazama, uključujući i one najranije, bilo je potrebno utvrditi kako organoidi nemaju hematopoetsko porijeklo. Obilježavanjem na već navedeni način, pokazano je kako su stanice organoida negativne za pan-leukocitni marker CD45, za molekulu CD34 koja se nalazi na hematopoetskim matičnim stanicama te za markere zrelosti limfocita T kao što su CD4, CD8 i CD3 (Slika 38).



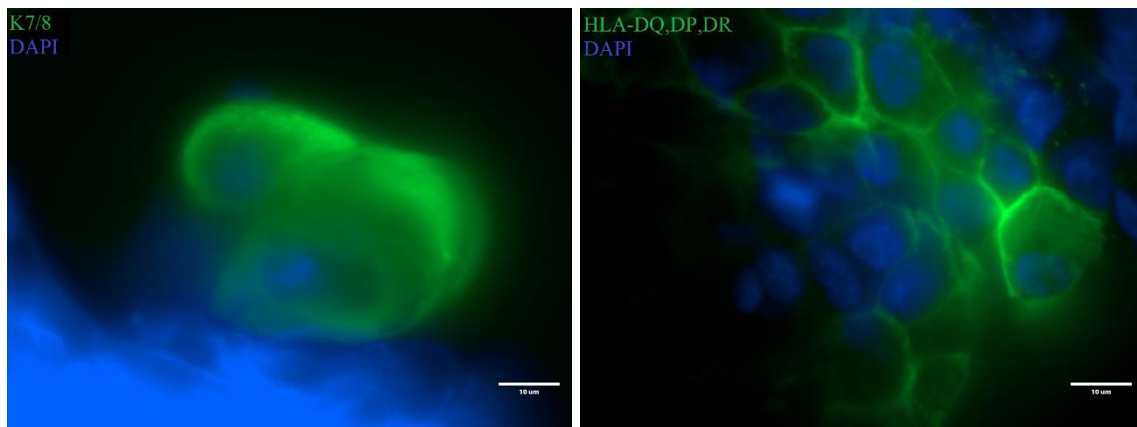
**Slika 38.** Ekspresija markera limfocitnih zrelih i nezrelih stanica timusa na stanicama organoida analizirana protočnom citometrijom i prikazana na način ovisan o gustoći zabilježenih događaja u dvije dimenzije. Na x-osi je parametar veličine analiziranih stanica, a na y-osi protutijelo koje je korišteno za obilježavanje. Korištena su protu-ljudska protutijela CD34, CD45, CD4, CD8 i CD3.

Uz protočnu citometriju, ekspresija i raspored proteina na cjelovitim organoidima analizirani su i fluorescentnom i konfokalnom mikroskopijom. Jezgre stanica obilježene su pomoću plave boje DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole). Pronađeno je kako dio stanica organoida pokazuje pozitivan signal za molekulu CD205 – transmembranski receptor važan za procesiranje i preradu antigena kojega eksprimiraju dendritske stanice i cTEC. Potvrđena je i ekspresija CD44 molekule na svim stanicama te molekule EpCAM na dijelu stanica. Također je potvrđeno da organoidi ne izražavaju molekulu CD45 (Slika 39).



**Slika 39.** Ekspresija molekula CD205, CD44, EpCAM i CD45 analizirana na konfokalnom (Olympus FV3000), u slučaju CD205 molekule, i fluorescentnom mikroskopu (Zeiss), u slučaju CD44, EpCAM i CD45. Povećanje 250x. Ljestvica veličine označava 200 µm.

Analizom pri većem povećanju detektirane su i pojedinačne stanice koje eksprimiraju KERATIN 7/8 – marker kortikalnih epitelnih stanica, lokaliziran unutar stanica. Uz njih, pronađena je i ekspresija molekula glavnog sustava tkivne podudaranosti HLA-DQ,DP,DR na površini antigen prezentirajućih stanica (Slika 40). Iz ovoga je vidljivo kako, iako stanice eksprimiraju molekule MHC II, njihovo izražavanje nije nužno povezano s ekspresijom keratinskih markera zrelosti epitelnih stanica.

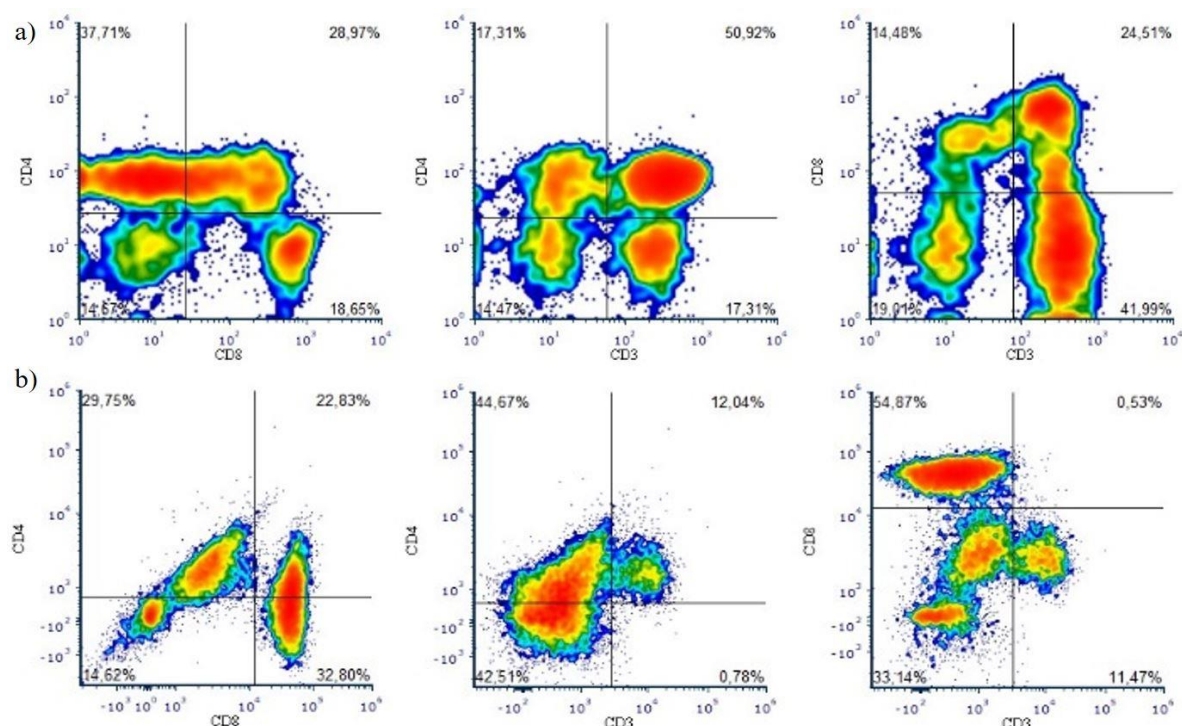


**Slika 40.** Ekspresija molekula keratin 7/8 i HLA-DQ, DP,DR na organoidima, analizirana na fluorescentnom mikroskopu EVOS FL (Thermo Fisher Scientific) pri povećanju 1600x. Ljestvica označava 10 µm.

**4.10. Sposobnost podržavanja razvoja limfocita kao dokaz funkcionalnosti matičnih stanica epitela**

Kako bi se dokazalo da su stanice organoida zaista ishodišne stanice za potpuno funkcionalne epitelne stanice timusa, uzgajane su zajedno s hematopoetskim matičnim stanicama (HSC) te mišjim embrionalnim fibroblastima kao potpornom stromom. Mješavina stanica uzgajana je u uvjetima obogaćenim kisikom, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C te visokim udjelom vlage u atmosferi. Kontrolni uzorci bez stanica organoida postavljeni su za svaki pokus, međutim nisu mogli biti analizirani jer stanice na filteru bez organoida ne agregiraju već ostaju u obliku u kojem su nanesene te nakon inkubacije ostaje vrlo mali broj stanica, većina kojih nije vijabilna.

Dan nakon postavljanja mješavina HSC, fibroblasta te stanica organoida se zaokružila i nabubrila. Tri i pet tjedana nakon nasađivanja, identitet stanica utvrđen je bojanjem protutijelima specifičnim za zrele limfocite T –CD4, CD8 te TCRαβ. Analizirane su stanice koje veličinom i granuliranošću odgovaraju veličini limfocita T.



**Slika 41.** Analiza funkcionalnog testa tri (a) i pet tjedana (b) nakon nasađivanja. Prikazani su rezultati analize markera zrelosti limfocita T dobiveni protočnom citometrijom. Korištena su mišja protutijela CD34 PE, CD4 PE, CD8 FITC te TCR αβ APC. Na osima prikaza u dvije dimenzije naznačena su korištena protutijela.



Analiza protočnim citometrom u obje vremenske točke pokazala je kako su sve stanice dobivene u kulturi negativne za marker nezrelosti krvotvornih stanica, CD34. Tri tjedna nakon nasađivanja stanice izražavaju CD4 te CD8. Ovi markeri eksprimirani su pojedinačno, 57% stanica je CD4<sup>+</sup>, 12,4% stanica CD8<sup>+</sup>. Manji dio stanica, 13,4%, izražava oba markera zajedno (Slika 41a). CD3 molekula, oznaka zrelosti limfocita T, detektirana je na 68% analiziranih stanica i koeksprimirana je većinom sa CD4 molekulom (50% svih CD4<sup>+</sup> stanica). Nakon pet tjedana u kulturi 7% stanica izražava potpuni antigenski receptor limfocita T (TCR) tipa  $\alpha\beta$ , 49% ih je dvostruko pozitivno za CD4 i CD8, a manji dio (18% i 21%) za CD4 i CD8 (Slika 41b).

## 5. RASPRAVA

Posljednja tri desetljeća istraživanja matičnih stanica otvorila su, do tada nezamislive, mogućnosti u području medicine i biomedicinskih znanosti. Somatske matične stanice su nađene u većini tkiva odraslih sisavaca, a izgledno je kako su prisutne u svim tkivima. Njihovo otkriće čini regeneraciju tkiva vjerojatnom opcijom za liječenje u budućnosti, s obzirom da dokida komplikacije vezane uz alotransplantaciju, poput pronalaska odgovarajućeg donora i bolesti transplantata protiv primatelja (GVDH, engl. *graft-versus-host disease*).

U miševa je zajedničko porijeklo epitelnih stanica timusa, kao i postojanje bipotentnog progenitora u postnatalnom mišjem timusu, dokazano praćenjem razvoja epitelnih stanica *in vivo*<sup>12</sup>. Uz bipotentne, pronađeni su i usmjereni progenitori za svaku od pojedinih loza epitelnih stanica (kortikalne i medularne), no ova istraživanja nisu potvrđena u različitim okruženjima i rađena su samo na mišjem modelu<sup>181–183</sup>.

Tkivne matične stanice nalaze se zaštićene u nišama duboko unutar tkiva te se ne dijele osim u kriznim stanjima oštećenja tkiva zbog ozljede, bolesti ili samog liječenja. Posebnosti svakog organa, stanica koje ga čine i vezivnog tkiva unutar njega zahtijevaju prilagođene protokole izolacije koji uspješno raskidaju međustanične veze i oslobađaju pojedinačne stanice iz specifičnog tkiva, no nisu toliko agresivni da bi narušili vijabilnost i svojstva stanica. Analogno mišjem timusu, cilj ovoga rada bio je pronaći matične stanice epitela timusa ljudi. Protokol opisan u ovoj disertaciji zasniva se na radovima i saznanjima o izolaciji raznih timusnih dendritskih stanica i tzv. „*nurse*“ stanica, odnosno prekursora limfocita iz mišjih timusa<sup>21,184</sup>. Sekvencijskom digestijom uz mijenjanje otopine enzima postupno se smanjuje udio timocita, no dobivena završna suspenzija još uvijek sadrži razmjerno malen udio stromalnih stanica zbog čega je razvijen protokol obogaćenja stromalnih stanica magnetskom deplecijom. U miševa se uspješnost tih obogaćenja mjeri udjelom nezrelih stanica u suspenziji među kojima se očekuju i matične stanice. Presudnim za učinkovitost deplecije pokazalo se korištenje više različitih protutijela za istovremeno obilježavanje stanica. Diversifikacijom obilježenih receptora na površini leukocita i eritrocita povećava se vjerojatnost da će se one vezati za protutijela na željeznim kuglicama i time biti izdvojene iz suspenzije. Multiparameterska analiza obogaćenih stanica protočnim citometrom pokazala je znatno smanjeni udio stanica koji izražavaju limfocitne markere i višestruko povećanje tipično epitelnih markera poput EpCAM i keratina. Uz njih, povećava se i udio antigen-prezentirajućih

stanica negativnih za limfocitne markere, no i fibroblasta. Ovako obogaćena suspenzija stanica uzgajana je *in vitro*. Uvjeti uzgoja i formulacija podloge prilagođeni su iz onih opisanih u radu Ucar i suradnika (2014)<sup>161</sup>.

U navedenom radu, kao i u nekoliko drugih, u miševa su opisani organoidi dobiveni iz postnatalnog mišjeg timusa, nazvani timosfere, no autori ovih radova se ne slažu o mnogočemu vezanom uz prirodu i porijeklo mišjih timosfera. Jedna skupina istraživača tvrdi kako se bipotentni prekursori nalaze unutar populacije timusnih stanica negativnih za molekule EpCAM i FOYN1, markere zrelih i funkcionalnih epitelnih stanica<sup>161,185</sup>. Suprotno ovome, Sheridan i sur. smatraju kako EpCAM<sup>-</sup>FOYN1<sup>-</sup> timosfere nastaju od mezenhimskih stanica koje imaju potencijal diferencijacijom stvarati adipocite, no ne i epitelne stanice, te kako su epitelne stanice nađene unutar timosfera agregacijom uklopljene u iste<sup>186</sup>. Wong i sur. su 2014. godine identificirali EpCAM<sup>+</sup>FOYN1<sup>+</sup> podskupinu TEC s klonogenim potencijalom te mogućnošću diferencijacije u cTEC i mTEC<sup>187</sup>. Slično njima, Ulyanchenko i sur. su iz odraslog mišjeg timusa izolirali bipotentne epitelne progenitore, također pozitivne za EpCAM i FOYN1, no njihovi eksperimenti nisu uključivali potencijal stvaranja sferoida *in vitro*<sup>188</sup>. Izuzev rada Ucar i sur. (2014), koji su pokazali postojanje, no ne i karakteristike, klonogenih stanica unutar postnatalnog humanog timusa, navedeni se radovi nisu bavili progenitorima u ljudskome tkivu<sup>161</sup>.

Prema informacijama dostupnim autorici, progenitori otkriveni u timusu miša nisu pronađeni u ljudskom timusu. Iz ovog razloga, kao i zbog kontradiktornih saznanja o progenitorima u mišjem timusu, primijenjena je strategija izolacije i karakterizacije prekursora iz ljudskog timusa koja se temelji na izuzimanju poznatih populacija stanica iz suspenzije. Otklanjanjem poznatih stanica te uzgojem u prilagođenim uvjetima, dobiveni su organoidi kao značajka prisutnosti matičnih stanica. Naziv organoidi umjesto sferoidi odabran je nakon što je fluorescentnom i konfokalnom mikroskopijom te protočnom citometrijom utvrđeno da stanice organoida imaju diferencijalnu ekspresiju molekula MHC II, CD205, keratina te EpCAM-a što upućuje na heterogenost stanica tj. različite stupnjeve zrelosti stanica unutar tvorbi. Utvrđeno je da se organoidi pojavljuju u kulturama u istom broju neovisno o dobi i spolu pacijenta. Ni brzina njihova rasta ne može se povezati s ovim parametrima. Biološke razlike između pojedinih uzoraka te učinkovitost obogaćenja i tretmana procijenjene su brojem nastalih organoida na svakih 10<sup>4</sup> nasađenih stanica. Pronađeno je kako ne postoje značajne razlike u potencijalu stvaranja organoida ovisno o dobi ili spolu, no kako znatno više organoida nastaje

nakon obogaćenja stromalne populacije stanica te porastom udjela stanica negativnih za limfocitni marker CD45 što upućuje na njihovo porijeklo.

Poznato je kako metabolizam 2'-deoksiguanozina u limfocitima T dovodi do stvaranja deoksiguanozin trifosfata koji inhibira ribonukleotid reduktazu. Inhibicija ovog enzima dovodi do nemogućnosti redukcije ostalih nukleotid difosfata u 2'-deoksi derivate, čime se depletiraju raspoloživi deksinukleozid trifosfati i inhibira sinteza DNA što naposljetku vodi do stanične smrti<sup>155</sup>. 2'-deoksiguanozin, se koristi kao alat u pripremi fetalnog timusa miša u FTOC sustavu i eksperimentima koji su razjasnili diferencijaciju limfocita T<sup>144-147</sup>. U ovome radu je 2'-dGuo prvi puta uspješno korišten u sustavu obogaćivanja matičnih stanica u zreloom tkivu timusa. Otklanjanjem prekursora limfocita T iz timusa inkubacijom tkiva s 2'-dGuo olakšana je razgradnja strome i obogaćen udio uspješno izoliranih matičnih stanica iz tkiva. Očekivano, inkubacija tkiva s 2'-dGuo dovodi do smanjenja ukupne vijabilnosti ali i do povećanja udjela ne-limfocitnih matičnih stanica. Protočnom citometrijom i analizom stanica nakon enzimatske razgradnje pokazano je da podvrgavanje tkiva 2'-dGuo dovodi do povećanja udjela stanica koje eksprimiraju markere epitelnih i antigen-prezentirajućih stanica.

Međutim, željeni efekt tj. smanjenje udjela limfocita primijećen nakon inkubacije tkiva s 2'-dGuo, nije postignut dodatkom 2'-dGuo u podlogu za kulturu matičnih stanica. Moguće je da je uzrok spomenutome to što se stanice nalaze u mikrookolišu pa tkivo na njih ima protektivni utjecaj dok produženo izlaganje jednostanične suspenzije 2'-dGuo omogućava neposredan utjecaj spoja na sve stanice. Također, tkivo timusa inkubirano je s 2'-dGuo 1, 2, 5 i 6 dana dok je jednostanična suspenzija bila izložena utjecaju spoja tijekom trajanja kulture (13 dana) pa je moguć toksičan utjecaj na matične stanice uslijed produženog izlaganja.

Jedno od prvih i glavnih dilema koje je bilo potrebno riješiti je jesu li organoidi istinski nastali od jedne stanice ili su agregati pojedinačnih stanica. Identitet organoida potvrđen je uzgojem stanica u hidrogelu. Ova metoda je varijacija na metodu stvaranja kolonija stanica u agaru ili metilcelulozi iz pojedinačnih stanica (engl. *colony forming assay*) u svrhu dokazivanja proliferativne sposobnosti matičnih stanica<sup>189-191</sup>. Pokazano je da se bez obzira na fiksiranje stanica na jednome mjestu stvaraju kolonije koje izravno dokazuju klonogeno porijeklo organoida. Inhibicijom staničnog kontakta otklonjena je mogućnost da su organoidi zapravo agregati stanica.

Udio progenitora u tkivu određen je nasađivanjem u seriji razrjeđenja i dobivena je procjena kako jedna od svakih 50 675 stanica timusa ima potencijal stvaranja organoida.

Postupak obogaćivanja stanica koji je opisan u ovome radu povećava frekvenciju stanica koje tvore organoide 10 puta. Dosadašnja istraživanja stromalnih progenitora timusa miša su prekursore obogaćivali direktnim sortiranjem stromalnih stanica te su unutar stromalne populacije mjerili njihovu učestalost. Iz tog razloga, do sada nije objavljena procjena broja progenitora u ukupnim stanicama mišjeg timusa<sup>161,187</sup>.

Stanice unutar organoida pokazuju svojstva matičnih stanica jer imaju potencijal za samoobnavljanje, što je pokazano nizom disocijacija i ponovnih formacija nakon nasađivanja jednostaničnih suspenzija. Sposobnost stvaranja sekundarnih kolonija kao svojstvo matičnosti prvi puta je opisano na granulocitno/makrofagnim kolonijama nastalim iz hematopoetske matične stanice, koje su nakon disocijacije i presađivanja stvarale nove kolonije<sup>192</sup>. Nedugo nakon ovih eksperimenata, isto je primijenjeno i na neurosfere u 3D kulturi te nadalje u nizu istraživanja matičnih stanica<sup>193–195</sup>. Ponovna formacija organoida dovodi do znatnog povećanja broja organoida na svakih  $10^4$  nasađenih stanica u odnosu na početni stanični materijal. Iako su nastali organoidi manji i apsolutni broj nastalih organoida pada s vremenom i ponovnim disocijacijama, moguće je da samo manipuliranje i uzgoj utječu na vijabilnost tih stanica. S druge strane, ova saznanja upućuju na ograničenost sposobnosti samoobnavljanja ili na iscrpljenje te mogućnosti uslijed disocijacija u zadanim uvjetima kulture. Uzgoj primarnih stanica *in vitro* sa sobom nosi ograničenja u vidu broja diobi te manjeg vremena koje stanice mogu provesti u kulturi. Svaka disocijacija i formacija organoida do detektabilne veličine podrazumijeva više diobi nego što bi bio slučaj s jednostavnim kulturama u jednosloju. Stanice organoida su u svrhu eksperimenta reformacije uzgajane tijekom tri mjeseca što je, samo po sebi, pokazatelj dugovječnosti izolirane populacije. U svrhu procjene broja stanica koje zadržavaju mogućnost samoobnavljanja, stanice organoida nasađene su u nizu razrjeđenja te je utvrđeno kako jedna od svakih 43,2 stanice ima mogućnost stvoriti novi organoid. Ovo otkriće je u skladu s prethodno opisanom heterogenošću stanica unutar organoida te je odraz procesa diferencijacije koji se odvija prilikom dioba stanica u organoidima.

Uz opća obilježja matičnih stanica koje pronađene stanice timusa iskazuju, bilo je potrebno pobliže morfološki karakterizirati stanice organoida. Protočnom citometrijom, fluorescentnom i konfokalnom mikroskopijom te molekularnom analizom ekspresije gena utvrđeno je kako stanice organoida ne ekspimiraju CD45, pan-leukocitni marker. Uz ovo, negativne su i za CD34 čime je isključena mogućnost da se radi o hematopoetskim matičnim stanicama. Također, nije pronađena ekspresija niti jednog od markera limfocita T. Manji dio stanica organoida ekspimirira molekule MHC II sustava, kojeg nalazimo na antigen-

prezentirajućim stanicama. Podaci o ekspresiji HLA molekula na humanim matičnim stanicama su vrlo ograničeni, no poznato je kako ih, bez stimulacije s  $\text{IFN}\gamma$ , ne ekspimiraju mezenhimske tkivne matične stanice ni embrionalne matične stanice<sup>196–198</sup>. Ekspresija MHC II pronađena je na manjoj subpopulaciji humanih fetalnih neuralnih matičnih stanica<sup>199</sup>. Nije u potpunosti jasno ekspimiraju li timusni epitelni progenitori pronađeni u mišu MHC II molekule budući da su dvije skupine istraživača objavile oprečne rezultate<sup>187,188</sup>. Ekspresija CD205 pronađena je na dijelu stanica organoida. Ova molekula, prirodno ekspimirana na cTEC, jedan je od biljega mišjih timosfera nastalih od stanica izoliranih iz odraslog timusa i negativnih za EpCAM i FOXN1, no u ovome je slučaju CD205 pronađen na svima ili većini stanica, dok je u ovdje opisanim humanim timusnim organoidima mnogo restriktivnije ekspimiran<sup>161,185,188</sup>. CD205 je pronađen i na prekursorima dva tipa epitelnih stanica u fetalnom mišjem timusu<sup>200</sup>. EpCAM i keratini 7/8 i 14 pronađeni su na vrlo malom postotku stanica organoida što je u skladu s istraživanjima Ucar et al., (2014) i Sheridan et al., (2017) koji su u timusu miša pronašli EpCAM stanice koje stvaraju timosfere<sup>161,186</sup>. S druge strane, bipotentni progenitori izolirani iz odraslog mišjeg timusa također ekspimiraju EpCAM te keratin 5 i 8<sup>187,188</sup>. Također, poznato je kako ljudski i mišji prekursori diferenciranih timusnih epitelnih stanica (TEC) tijekom fetalnog razvoja ekspimiraju EpCAM te keratine 5 i 8<sup>1,201</sup>. Opsežna ekspresija molekule CD44, površinskog glikoproteina uključenog u adheziju i interakcije između stanica, na stanicama organoida detektirana je protočnom citometrijom i fluorescentnom mikroskopijom. Molekula CD44 uključena je u širok spektar staničnih procesa kao što su aktivacija limfocita, privlačenje stanica (engl. *homing*), angiogeneza, agregacija i migracija stanica. Zbog svoje važne uloge ne iznenađuje da je nađen na različitim tkivnim matičnim stanicama, ali i matičnim stanicama karcinoma. Njegova ekspresija detektirana je na somatskim matičnim stanicama prostate, želuca, bubrega, crijeva te mezenhimijskim matičnim stanicama izoliranim iz niza tkiva<sup>159,202–205</sup>.

Molekularna analiza ekspresije gena u organoidima otkrila je ekspresiju markera zrelih epitelnih stanica timusa miševa i ljudi – *EpCAM*, *AIRE*, *K5* i *K8*<sup>20,201,206</sup>. Prvi puta otkriven kao marker melanoma i hepatocelularnog karcinoma, *EpCAM* se u normalnim tkivima pokazao kao specifičan marker zrelih epitelnih stanica<sup>207</sup>. Njegova ekspresija pokazala se važnom i za matične stanice u kojima sudjeluje u regulaciji proliferacije i održavanju plastičnosti<sup>208–210</sup>. Transkripcijski faktor *AIRE* (engl. *Autoimmune Regulator*), prirodno je prisutan u srži timusa gdje pokreće ekspresiju tkivno-specifičnih antigena na mTEC<sup>42,43,45</sup>. U miševa je pronađeno kako je ekspresija transkripcijskog faktora *AIRE* specifična za terminalno diferencirane

medularne epitelne stanice timusa što ukazuje na prisutnost ove populacije unutar organoida<sup>176</sup>. AIRE je neizostavan za pravilnu funkciju mTEC. Budući da je AIRE nužan za izražavanje tkivno-specifičnih antigena na mTEC u timusu i da je se bez njegove prisutnosti ne može izvršiti proces negativne selekcije, mutacije a u genu za AIRE u ljudi dovode do autoimunih bolesti, kao što je APECED (engl. *autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy*) te su povezane s reumatoidnim artritisom<sup>42,211</sup>. Uz navedene, eksprimiran je i *KERATIN 5*, koji je najdulje eksprimiran marker epitelnih stanica timusa budući da se u fetalnom timusu nalazi na progenitorima epitelnih stanica, a njegova se prisutnost u timusu zadržava na medularnim epitelnim stanicama<sup>1,20</sup>. Ekspresija *KERATINA 8* ukazuje na prisutnost kortikalnih epitelnih stanica timusa, za koje je specifičan<sup>20</sup>. *KERATINI 5 i 8* također se nalaze i u zajedničkim progenitorima medularnih i kortikalnih epitelnih stanica tijekom embrionalnog razvoja<sup>1,20</sup>. Stanice organoida dobivene u *in vitro* uvjetima nakon 30 dana u kulturi izražavaju i receptor tipa  $\beta$  za PDGF (engl. *Platelet Derived Growth Factor*). *PDGFR $\beta$*  najčešće je eksprimiran na mezenhimskim stanicama, pa tako i na mezenhimskim matičnim stanicama<sup>177,178</sup>. Uz gene specifične za zrele TEC, pronađeni su i geni prisutni tijekom organogeneze timusa. *EYA-1*, *HOXA-3*, *PAX-1* te *PAX-9* su geni neizostavni za pravilan razvoj i formaciju timusne strome. Ovi geni eksprimirani su u ranim fazama organogeneze timusa i defekti u njihovoj ekspresiji dovode do poremećaja u formaciji timusa, nepravilnoj diferencijaciji te nemogućnosti stvaranja mikrookoliša potrebnog za pravilnu funkciju timusa<sup>25,26,29,34,35</sup>.

Osim karakterizacijom stanica u suspenziji te u organoidima, staničnim metodama je i uspostavljeno izdvajanje specifičnih skupina stanica iz suspenzije obilježavanjem protutijelima za CD24 i EpCAM (CD326). Protočnim smo citometrom analizirali i sortirali stanice prema ekspresiji ove dvije molekule. Sortirane su stanice zatim nasađivane i uzgajane u uvjetima prilagođenima stvaranju organoida kako bi se testirao njihov potencijal i obogaćenje populacije matičnih stanica. CD24 je sialoglikoprotein prisutan na raznim epitelnim i hematopoetskim staničnim tipovima, no pronađen je i na progenitorima gušterače te, uz CD44, na humanim intestinalnim epitelnim stanicama koje imaju značajke matičnih stanica<sup>158,159</sup>. U slučaju timusnih matičnih stanica, CD24 se nije pokazao kao diskriminatorski marker, kao ni EpCAM.

Ekspresija EpCAM na stanicama koje tvore organoide je predmet diskusije među autorima koji proučavaju matične stanice timusa i trenutni su pronalasci podijeljeni po ovome pitanju<sup>161,186–188</sup>. I ovdje prikazani eksperimenti nisu pružili konkluzivne rezultate budući da su sortirane EpCAM<sup>+</sup> i EpCAM<sup>-</sup> stanice ljudskog timusa u mogućnosti su tvoriti organoide.

Sortiranjem je dobiven vrlo malen broj stanica te je moguće kako su ovi rezultati odraz tehničke pogreške, odnosno kontaminacije populacija.

Razne su molekule uključene u procese održavanja matičnosti i usmjeravanja diferencijacije matičnih stanica. Organoidi, tj. trodimenzionalna kultura stanica, oponašaju *in vivo* uvjete, no ne može se sa sigurnošću reći kako su svi uvjeti ispunjeni ili se oni mogu poboljšati i učiniti sličnijima tkivnim. S ovim ciljem, primarne stanice su uzgajane u prisutnosti faktora rasta i citokina za koje je pronađeno da su važni prilikom timusne organogeneze ili održavanja matičnih stanica. Broj nastalih organoida praćen je kako bi se utvrdilo imaju li ovi faktori mogućnost pokretanja diobe progenitora koji bi pod eksperimentalnim uvjetima ostali u zastoju staničnog ciklusa. U većini promatranih slučajeva, utjecaj faktora rasta bio je izrazito individualan i ovisio o pojedinom timusu.

Aktivacija Wnt signalnog puta putem Wnt1 molekule dovela je do umjerenog povećanja u broju organoida, ovisnog o koncentraciji spoja. Uloga ovog signalnog puta u matičnim stanicama te njegova važnost za proliferaciju i održavanje nediferenciranog stanja opisana je u nekoliko tipova progenitora u odraslom tkivu<sup>113,114,210</sup>. Većina istraživanja o utjecaju Wnt signalnog puta na funkciju timusa temelji se na dokidanju signalizacije putem inhibicije receptora ili nizvodnih efektoru koja dovodi do smanjene funkcije timusa<sup>97,164,165</sup>. Suprotno ovim saznanjima, aktivacija Wnt signalnog puta nije nužna za indukciju diferencijacije epitelnih stanica timusa, a inducirana aktivacija i pretjerana ekspresija molekula signalnog puta *in vivo* u miševa dovodi do poremećene morfologije timusa, doštitne i štitne žlijezde<sup>166</sup>. Ovi rezultati upućuju na važnost precizne kontrole Wnt signalnog puta.

Čimbenik rasta keratinocita (KGF) u ovdje opisanim eksperimentima je imao izrazito individualan učinak, ovisan o pojedinim timusima. Dodatak KGF u kulturu doveo je do povećanja, ali i do smanjenja broja organoida. Prethodnim istraživanjima na miševima pokazano je kako KGF djeluje proliferativno na epitelne stanice timusa te da intravenozna primjena KGF u miševa djeluje protektivno na timus i njegovu funkciju<sup>167-169</sup>. KGF se trenutno koristi kao dopunska terapija za sprječavanje mukozitisa u pacijenata koji primaju visoke doze kemoterapije, no ne postoje kliničke studije koje ocjenjuju učinak KGF na funkciju timusa u ovih pacijenata<sup>212</sup>.

Slično KGF, ljudski hormon rasta (HGH) djelovao je individualno na stanice različitih timusa u kulturi te se ne može donijeti jednoznačan zaključak o njegovome učinku. U *in vitro* uvjetima, HGH luče limfociti T i epitelne stanice timusa te on na njih djeluje autokrino i



parakrino kao faktor rasta<sup>170</sup>. Također, pokazano je kako terapijska primjena HGH u pacijenata zaraženih HIV-om dovodi do povećanja ukupne timusne mase te proizvodnje novih zrelih limfocita T<sup>213</sup>. Uz to, primjena HGH kod pacijenata koji pate od nedostatka hormona rasta (engl. *adult growth hormone deficiency*, AGHD) povećala je proizvodnju zrelih limfocita T<sup>214</sup>. Iako obje studije pokazuju djelovanje HGH na funkciju timusa, sam utjecaj HGH na stromalne stanice timusa nije u potpunosti poznat.

BMP4, koji u TEC uzrokuje povećanje ekspresije FOXN1, je doveo do smanjenja broja organoida. Budući da je FOXN1 eksprimiran u krajnje diferenciranim TEC i kako je prethodno pokazano da indukcija njegove ekspresije dovodi do reprogramiranja stanične mašinerije i diferencijacije potpuno nesrodnog tipa stanica (fibroblasta) u TEC, moguće je kako povećanje ekspresije FOXN1 putem BMP4 uzrokuje diferencijaciju izoliranih prekursora te kako se tom efektu može pripisati utjecaj BMP4 na broj organoida<sup>173</sup>.

Interleukin-22 je, dodan u kulturu *in vitro*, uzrokovao je značajno povećanje broja organoida. Prethodno je pokazano kako ozljeda timusa u miševa dovodi do povećane produkcije interleukina-22 *in vivo* te kako intravenozna primjena interleukina-22 u miševa nakon zračenja doprinosi oporavku timusa nakon ozljede. Točan mehanizam ovog oporavka nije poznat, no u navedenom je radu pokazana proliferacija timusnog epitela uslijed djelovanja IL-22<sup>175</sup>. Iz povećanja broja organoida je vidljivo kako IL-22 djeluje proliferativno na prekursore koji formiraju organoide, no i na stanice koje u normalnim uvjetima kulture ne bi proliferirale.

Ovi rezultati ukazuju na važnost precizne kontrole signalnih puteva koji djeluju u stanicama organoida i njihovih komponenti. Ova kontrola prirodno je postignuta u *in vivo* uvjetima, no njezino prenošenje *in vitro* zahtjeva iscrpne eksperimente i opsežnije testiranje većeg broja koncentracija opisanih molekula i njihovih kombinacija kako bi se dobio egzaktni odgovor na pitanje koji čimbenici rasta djeluju na stromu timusa te koji je njihov mehanizam djelovanja.

Manjak ekspresije hematopoetskih markera, trend broja organoida i morfološki izgled pokazatelj su kako organoidi nemaju hematopoetsko porijeklo te nisu prekursori limfocita T. Stanice organoida eksprimiraju molekule koje se uglavnom mogu naći na epitelnim, iako ekspresiju nekih, poput PDGFR $\beta$ , dijele s mezenhimijskim stanicama. Identitet stanica koje tvore organoide složeniji je nego li je pretpostavljeno inicijalnim istraživanjima timusa. Molekularna i proteinska ekspresija stanica ne daje jednoznačne odgovore o njihovom porijeklu, no

molekularnim potpisom govori o nezrelosti stanica koje čine organoide. Ove analize zajedno s rezultatima sortiranja stanica ostavljaju prostora za interpretaciju. Jasno je kako su izolirane stanice koje iniciraju formaciju organoida matične. Moguće je kako su izolirani nezreli prekursori epitelnih stanica te da su organoidi integrirali mezenhimske stanice ili obratno<sup>186</sup>. Također, postoji mogućnost da su izolirana dva tipa prekursora koji mogu rasti i napredovati u istim uvjetima kulture i nemoguće ih je odvojiti bez poznavanja diskriminatornih markera. Uz to, prema genima koje izražavaju organoidi, stanice koje ih iniciraju mogu biti izuzetno rani prekursori epitelnih stanica. Epitelne matične stanice su tijekom normalnog razvoja kontrolirane epitelno-mezenhimskim interakcijama i moguće je kako one u organoidima prolaze epitelno-mezenhimsku tranziciju (EMT). Za EMT je pokazano kako je povezan sa stjecanjem karakteristika matičnosti<sup>215</sup>. Istraživanja vezana uz EMT u timusu upućuju na mogućnost da je ovaj proces odgovoran za timusnu involuciju i zamjenu epitelnih stanica za mezenhimske<sup>216-218</sup>. Tijekom embrionalnog razvoja, epitel timusa razvija se iz izbočenja u endodermu, dok se mezenhim razvija iz neuralnog žlijeba, no interakcije između dva stanična tipa iniciraju razvoj organa i sudjeluju u diferencijaciji stromalnih staničnih tipova timusa. U svrhu utvrđivanja jesu li prekursori u mogućnosti stvoriti funkcionalno kompetentne diferencirane stanice razvijena je metoda temeljena na RTOC sustavu u kojoj su disocirani organoidi uzgajani s nezrelim hematopoetskim prekursorima i mišjim embrionalnim fibroblastima. Shodno utvrđenom razvoju *in vivo*, tri tjedna nakon nasađivanja nezrelih hematopoetskih prekursora pronađeni su jednostruko i dvostruko pozitivni limfociti T. Nakon pet tjedana inkubacije, na limfocitima je pronađen TCR $\alpha\beta$  – pokazatelj zrelosti i funkcionalnosti limfocita T. Zbog nemogućnosti diferencijacije limfocita T *in vitro* bez složene timusne strome, ovaj rezultat upućuje na prisutnost funkcionalnih timusnih epitelnih stanica nastalih iz matične stanice, koje su u mogućnosti voditi sazrijevanje od potpuno nezrelih hematopoetskih matičnih stanica do zrelih CD4 pozitivnih limfocita T. Funkcionalni test izveden u ovom obliku u potpunosti je jedinstven među eksperimentima koji za zadatak imaju identifikaciju matičnih stanica timusa, no i među eksperimentalnim sustavima koji se bave proučavanjem diferencijacije limfocita T. Do sada izvedeni funkcionalni testovi uključivali su usađivanje reagregata timusnih i hematopoetskih matičnih stanica pod bubrežnu kapsulu timusa te kasniju analizu, no ovim eksperimentom pokazano je kako su matične stanice timusa u mogućnosti „odgojiti“ limfocite T čak i u uvjetima koji se znatno razlikuju od fizioloških<sup>187</sup>. Postojeći sustavi za uzgoj i diferencijaciju hematopoetskih prekursora u limfocite T uključivali su korištenje fetalnog mišjeg tkiva (FTOC) ili transfecirane mišje loze stanica (OP9 DLL1), zbog čega nisu prikladni za proučavanje terminalne diferencijacije limfocita T, budući da ona

zahtjeva ekspresiju glavnog tkivnog sustava podudarnosti. Uzgojem hematopoetskih prekursora i njihovom diferencijacijom u limfocite T zajedno sa stanicama timusa diferenciranim *in vitro* uspješno je dokazana funkcionalnost izoliranih prekursora što otvara nove mogućnosti za proučavanje sazrijevanja oba stanična tipa, njihove međusobne interakcije tijekom diferencijacije te molekularne pozadine navedenih procesa. Također, teoretski omogućava odgoj imunokompetentnih limfocita T što, osim eksperimentalnih, ima i translativne potencijale.

## 6. ZAKLJUČAK

Eksperimenti opisani u ovome radu i njihovi rezultati razmotreni u kontekstu dosadašnjih istraživanja dovode do zaključaka:

1. Razgradnja timusnog tkiva kolagenazom tipa 2 tijekom četiri ciklusa osigurava maksimalan prinos vijabilnih stanica s uvećanim udjelom stanica timusne strome. Obogaćenje populacije matičnih stanica moguće je postići magnetskom deplecijom limfocitnih populacija.
2. Postnatalni timus ljudi sadrži matične stanice koje u uvjetima za uzgoj u tri dimenzije (3D kulture) tvore kuglaste nakupine, kolonije tj. organoide, nastale iz jedne stanice.
3. Vrijeme potrebno za postizanje veličine kolonije koja se može nesporno identificirati kao ni njihov broj dobiven iz pojedinog tkiva nije ovisan o dobi i spolu.
4. Novootkriveni prekursori ne izražavaju površinske markere CD24 ni CD326.
5. Inkubacija tkiva s 2'-deoksiguanozinom dovodi do povećavanja broja prekursora dobivenih razgradnjom tkiva timusa dok inkubacija stanica na isti način dovodi do suprotnog učinka.
6. Dokazane su karakteristike matičnosti izoliranih prekursora
  - a. Prekursori imaju mogućnost samoobnavljanja te dosljedno ponovno stvaraju organoide i nakon njihove disocijacije.
  - b. Izolirani prekursori imaju mogućnost proliferacije i diferencijacije u zrele stanične tipove. Ekspimiraju gene tipične za zrele stromalne stanice timusa kao što su *KERATIN-5 i -8*, *CD326*, *AIRE* i *PDGFRβ*.
7. Stanice uzgojene iz prekursora u *in vitro* uvjetima ekspimiraju gene važne u ranom formiranju timusne strome - *HOXA3*, *PAX1* i *PAX9*.
8. Prekursori mogu biti uzgojeni i diferencirani *in vitro* u stromalne stanice timusa koje, ne samo morfološki, ekspresijom specifičnih gena, već i funkcionalno zadovoljavaju osobine epitelnih stanica jer imaju mogućnost voditi diferencijaciju CD34<sup>+</sup> hematopoetskih prekursora u zrele limfocite T u uvjetima *in vitro*.

Naravno, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se neosporno utvrdio identitet izoliranih stanica, no ovim radom je otklonjena sumnja u njihovo postojanje u humanom timusu.

## 7. POPIS OZNAKA I KRATICA

### 7.1. *Kratice*

**2'-dGuo** – 2'-deoksiguanozin

**αMEM** (engl. *Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification*) – minimalni esencijalni medij Eagle – alfa modifikacija

**BMP/TGFβ** (engl. *bone morphogenic protein*, engl. *Transforming Growth Factor beta*) – koštani morfogenični protein/transformirajući factor rasta β

**CD4ISP** (engl. *CD4 immature single positive*) – nezrela CD4 pozitivna stanica

**CLP** (engl. *common lymphoid progenitor*) – limfoidni progenitor

**cTEC** (engl. *cortical thymic epithelial cells*) – epitelne stanice kore timusa

**DC** (engl. *dendritic cell*) - dendrijska stanica

**DP** - dvostruko pozitivan stadij razvoja limfocita T

**EDP** (engl. *early double positive*) - rani dvostruko pozitivni stadij razvoja limfocita T

**EDTA** - etilendiamintetraoctena kiselina

**FCS** (engl. *foetal calf serum*) – fetalni teleći serum

**FTOC** (engl. *foetal thymic organ cultures*) - organske kulture fetalnog timusa

**GVDH** (engl. *graft-versus-host disease*) - bolesti transplantata protiv primatelja

**HGH** (engl. *human growth hormone*) - ljudski hormon rasta

**HSC** (engl. *hematopoietic stem cell*) - hematopoetske matične stanice

**IL-7** – interleukin 7

**IL7-R** – receptor za interleukin 7

**MEBM** (engl. *Mammary Epithelial Cell Basal Medium*) – bazni medij za uzgoj epitela dojke

**DMEM/F12** (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*) – Dulbecco modificirani Eagle medij s mješavinom nutrijenata F12

**MHC** (engl. *major histocompatibility complex*) - glavni sustav tkivne podudaranosti

**mTEC** (engl. *medulary thymic epithelial cells*) – epitelne stanice srži timusa

**PBS** (engl. *phosphate buffer saline*) – fosfatni pufer

**RTOC** (engl. *reaggregate thymic organ culture*) - reagregirana organska kultura timusa

**SCF** (engl. *stem cell factor*) - faktor matičnih stanica

**SCID** (engl. *severe combined immunodeficiency*) – teška imunodeficijencija

**SP** (engl. *single positive*) - jednostruko pozitivni limfociti T

**TCR** (engl. *T cell receptor*) – receptor limfocita T

**TEC** (engl. *Thymic epithelial cells*) – timusne epitelne stanice

## 7.2. Geni

**ADAM** (engl. *A Disintegrin And Metalloprotease*)

**AIRE** (engl. *Autoimmune Regulator*)

**DLL-1, -3 i -4** (engl. *Delta-Like Ligand*)

**EGR1 i 3** (engl. *Early Growth Response*)

**EYA1** (engl. *Eyes Absent Homolog 1*)

**FOXP1** (engl. *Forkhead Box P1*)

**HOXA3** (engl. *Homeobox A3*)

**ID3** (engl. *Inhibitor of DNA Binding 3*)

**PAX9** (engl. *Paired Box*)

**RBPJ** (engl. *Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J Region*)

**SIX** (engl. *Sine Oculis Homeobox Homolog*)

**LITERATURA**

1. Farley, AM, Morris, LX, Vroegindeweij, E, Depreter, MLG, Vaidya, H, Stenhouse, FH, Tomlinson, SR, Anderson, R a, Cupedo, T, Cornelissen, JJ & Blackburn, CC. Dynamics of thymus organogenesis and colonization in early human development. *Development* **140**, 2015–26 (2013).
2. Shortman, K, Egerton, M, Spangrude, GJ & Scollay, R. The generation and fate of thymocytes. *Semin. Immunol.* **2**, 3–12 (1990).
3. Petrie, HT, Livak, F, Schatz, DG, Strasser, A, Crispe, IN & Shortman, K. Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J. Exp. Med.* **178**, 615 LP-622 (1993).
4. Boyd, RL, Tucek, CL, Godfrey, DI, Izon, DJ, Wilson, TJ, Davidson, NJ, Bean, AGD, Ladyman, HM, Ritter, MA & Hugo, P. The thymic microenvironment. *Immunol. Today* **14**, 445–459 (1993).
5. Bevan, MJ. Killer cells reactive to altered-self antigens can also be alloreactive. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 2094 LP-2098 (1977).
6. Zinkernagel, RM, Callahan, GN, Althage, A, Cooper, S, Klein, PA & Klein, J. On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition? *J. Exp. Med.* **147**, 882 LP-896 (1978).
7. Teh, HS, Kisielow, P, Scott, B, Kishi, H, Uematsu, Y, Blüthmann, H & von Boehmer, H. Thymic major histocompatibility complex antigens and the  $\alpha\beta$  T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* **335**, 229 (1988).
8. Kappler, JW, Roehm, N & Marrack, P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* **49**, 273–280 (1987).
9. Douek, DC, McFarland, RD, Keiser, PH, Gage, EA, Massey, JM, Haynes, BF, Polis, MA, Haase, AT, Feinberg, MB, Sullivan, JL, Jamieson, BD, Zack, JA, Picker, LJ & Koup, RA. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* **396**, 690–695 (1998).
10. Flores, KG, Li, J, Sempowski, GD, Haynes, BF & Hale, LP. Analysis of the human

- thymic perivascular space during aging. *J. Clin. Invest.* **104**, 1031–1039 (1999).
11. Jamieson, BD, Douek, DC, Killian, S, Hultin, LE, Scripture-Adams, DD, Giorgi, J V., Marelli, D, Koup, RA & Zack, JA. Generation of functional thymocytes in the human adult. *Immunity* **10**, 569–575 (1999).
  12. Bleul, CC, Corbeaux, T, Reuter, A, Fisch, P, Mönning, JS & Boehm, T. Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* **441**, 992–996 (2006).
  13. Miller, JF. Immunological function of the thymus. *Lancet (London, England)* **2**, 748–749 (1961).
  14. Steinmann, GG, Klaus, B & Muller-Hermelink, HK. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand. J. Immunol.* **22**, 563–575 (1985).
  15. Gruver, AL, Hudson, LL & Sempowski, GD. Immunosenescence of ageing. *J. Pathol.* **211**, 144–156 (2007).
  16. Billingham, RE, Brent, L & Medawar, PB. Quantitative Studies on Tissue Transplantation Immunity. III. Actively Acquired Tolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **239**, 357–414 (1956).
  17. Miller, JFAP & Mitchell, GF. Cell To Cell Interaction In The Immune Response : I. Hemolysin-Forming Cells In Neonatally Thymectomized Mice Reconstituted With Thymus Or Thoracic Duct Lymphocytes. *J. Exp. Med.* **128**, 801–820 (1968).
  18. Sudler, MT. The development of the nose, and of the pharynx and its derivatives in man. *Am. J. Anat.* **1**, 391–416 (2018).
  19. Norris EH. The morphogenesis and histogenesis of the thymus gland in man: in which the origin of the Hassall's corpuscle of the human thymus is discovered. *Contrib Embryol Carneg Instn* **27**, 197–201 (1938).
  20. Haynes, BF, Scarce, RM, Lobach, DF & Hensley, LL. Phenotypic characterization and ontogeny of mesodermal-derived and endocrine epithelial components of the human thymic microenvironment. *J. Exp. Med.* **159**, 1149 LP-1168 (1984).
  21. Wu, L, Antica, M, Johnson, GR, Scollay, R & Shortman, K. Developmental potential of



- the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *J. Exp. Med.* **174**, 1617–1627 (1991).
22. Sánchez, MJ, Muench, MO, Roncarolo, MG, Lanier, LL & Phillips, JH. Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J. Exp. Med.* **180**, 569–576 (1994).
  23. Res, P, Martínez-Cáceres, E, Cristina Jaleco, A, Staal, F, Noteboom, E, Weijer, K & Spits, H. CD34<sup>+</sup>CD38<sup>dim</sup> cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood* **87**, 5196–5206 (1996).
  24. Haynes, BF. Early human T cell development: analysis of the human thymus at the time of initial entry of hematopoietic stem cells into the fetal thymic microenvironment. *J. Exp. Med.* **181**, 1445–1458 (1995).
  25. Chisaka, O & Capecchi, MR. Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5*. *Nature* **350**, 473–479 (1991).
  26. Manley, NR & Capecchi, MR. The role of *Hoxa-3* in mouse thymus and thyroid development. *Development* **121**, 1989–2003 (1995).
  27. Chojnowski, JL, Masuda, K, Trau, HA, Thomas, K, Capecchi, M & Manley, NR. Multiple roles for *HOXA3* in regulating thymus and parathyroid differentiation and morphogenesis in mouse. *Development* **141**, 3697–3708 (2014).
  28. Su, M, Hu, R, Jin, J, Yan, Y, Song, Y, Sullivan, R & Lai, L. Efficient in vitro generation of functional thymic epithelial progenitors from human embryonic stem cells. *Sci. Rep.* **5**, 9882 (2015).
  29. Parent, AV, Russ, HA, Khan, IS, LaFlam, TN, Metzger, TC, Anderson, MS & Hebrok, M. Generation of Functional Thymic Epithelium from Human Embryonic Stem Cells that Supports Host T Cell Development. *Cell Stem Cell* **13**, 219–229 (2013).
  30. Bonini, NM, Leiserson, WM & Benzer, S. The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **72**, 379–395 (1993).
  31. Xu, P-X, Zheng, W, Laclef, C, Maire, P, Maas, RL, Peters, H & Xu, X. *Eya1* is required for the morphogenesis of mammalian thymus, parathyroid and thyroid. *Development* **129**, 3033–3044 (2002).

32. Zou, D, Silvius, D, Davenport, J, Grifone, R, Maire, P & Xu, P-X. Patterning of the third pharyngeal pouch into thymus/parathyroid by Six and Eya1. *Dev. Biol.* **293**, 10.1016/j.ydbio.2005.12.015 (2006).
33. Abdelhak, S, Kalatzis, V, Heilig, R, Compain, S, Samson, D, Vincent, C, Levi-Acobas, F, Cruaud, C, Le Merrer, M, Mathieu, M, Konig, R, Vigneron, J, Weissenbach, J, Petit, C & Weil, D. Clustering of mutations responsible for branchio-oto-renal (BOR) syndrome in the eyes absent homologous region (eyaHR) of EYA1. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 2247–2255 (1997).
34. Peters, H, Neubüser, A, Kratochwil, K & Balling, R. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev.* **12**, 2735–2747 (1998).
35. Wallin, J, Eibel, H, Neubüser, A, Wilting, J, Koseki, H & Balling, R. Pax1 is expressed during development of the thymus epithelium and is required for normal T-cell maturation. *Development* **122**, 23–30 (1996).
36. Blackburn, CC, Augustine, CL, Li, R, Harvey, RP, Malin, MA, Boyd, RL, Miller, JF & Morahan, G. The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 5742 LP-5746 (1996).
37. Nehls, M, Kyewski, B, Messerle, M, Waldschütz, R, Schüddekopf, K, Smith, a J & Boehm, T. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science* **272**, 886–889 (1996).
38. Flanagan, SP. ‘Nude’, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res.* **8**, 295–309 (1966).
39. FESTING, MFW, LOVELL, D, SPARROW, S, MAY, D & CONNORS, TA. An athymic nude mutation in the rat. *Nature* **274**, 365 (1978).
40. Frank, J, Pignata, C, Panteleyev, AA, Prowse, DM, Baden, H, Weiner, L, Gaetaniello, L, Ahmad, W, Pozzi, N, Cserhalmi-Friedman, PB, Aita, VM, Uyttendaele, H, Gordon, D, Ott, J, Brissette, JL & Christiano, AM. Exposing the human nude phenotype. *Nature* **398**, 473–474 (1999).
41. Nowell, CS, Bredenkamp, N, Tetélin, S, Jin, X, Tischner, C, Vaidya, H, Sheridan, JM, Stenhouse, FH, Heussen, R, Smith, AJH & Blackburn, CC. Foxn1 regulates lineage

- progression in cortical and medullary thymic epithelial cells but is dispensable for medullary sublineage divergence. *PLoS Genet.* **7**, (2011).
42. Aaltonen, J, Björnses, P, Perheentupa, J, Horelli-Kuitunen, N, Palotie, A, Peltonen, L, Lee, YS, Francis, F, Henning, S, Thiel, C, Leharach, H & Yaspo, M. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat. Genet.* **17**, 399 (1997).
  43. Anderson, MS, Venanzi, ES, Klein, L, Chen, Z, Berzins, SP, Turley, SJ, von Boehmer, H, Bronson, R, Dierich, A, Benoist, C & Mathis, D. Projection of an Immunological Self Shadow Within the Thymus by the Aire Protein. *Science* (80-. ). **298**, 1395 LP-1401 (2002).
  44. Bredenkamp, N, Nowell, CS & Blackburn, CC. Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. *Development* **141**, 1627–1637 (2014).
  45. Kyewski, B & Peterson, P. Aire, Master of Many Trades. *Cell* **140**, 24–26 (2010).
  46. Spangrude, GJ, Heimfeld, S & Weissman, IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**, 58–62 (1988).
  47. Civin, CI, Strauss, LC, Brovall, C, Fackler, MJ, Schwartz, JF & Shaper, JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.* **133**, 157–165 (1984).
  48. Kondo, M, Weissman, IL & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661–672 (1997).
  49. Spits, H. Development of  $\alpha\beta$  T cells in the human thymus. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 760–772 (2002).
  50. Haynes, BF, Eisenbarth, GS & Fauci, AS. Human lymphocyte antigens: production of a monoclonal antibody that defines functional thymus-derived lymphocyte subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 5829 LP-5833 (1979).
  51. Sutherland, DR, Rudd, CE & Greaves, MF. Isolation and characterization of a human T lymphocyte-associated glycoprotein (gp40). *J. Immunol.* **133**, 327 LP-333 (1984).
  52. Denning, SM, Kurtzberg, J, Leslie, DS & Haynes, BF. Human postnatal CD4- CD8- CD3- thymic T cell precursors differentiate in vitro into T cell receptor delta-bearing

- cells. *J. Immunol.* **142**, 2988 LP-2997 (1989).
53. Haynes, BF, Martin, ME, Kay, HH & Kurtzberg, J. Early events in human T cell ontogeny. Phenotypic characterization and immunohistologic localization of T cell precursors in early human fetal tissues. *J. Exp. Med.* **168**, 1061–80 (1988).
  54. Haddad, R, Guimiot, F, Six, E, Jourquin, F, Setterblad, N, Kahn, E, Yagello, M, Schiffer, C, Andre-Schmutz, I, Cavazzana-Calvo, M, Gluckman, JC, Delezoide, AL, Pflumio, F & Canque, B. Dynamics of thymus-colonizing cells during human development. *Immunity* **24**, 217–230 (2006).
  55. Hsieh, C-S, Lee, H-M & Lio, C-WJ. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 157–167 (2012).
  56. Lind, EF, Prockop, SE, Porritt, HE & Petrie, HT. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J. Exp. Med.* **194**, 127–134 (2001).
  57. Galy, A, Verma, S, Bárcena, A & Spits, H. Precursors of CD3+CD4+CD8+ cells in the human thymus are defined by expression of CD34. Delineation of early events in human thymic development. *J. Exp. Med.* **178**, 391–401 (1993).
  58. Spits, H, Blom, B, Jaleco, AC, Weijer, K, Verschuren, MC, van Dongen, JJ, Heemskerk, MH & Res, PC. Early stages in the development of human T, natural killer and thymic dendritic cells. *Immunol. Rev.* **165**, 75–86 (1998).
  59. Alvarez-Vallina, L, Gonzalez, A, Gambon, F, Kreisler, M & Diaz-Espada, F. Delimitation of the proliferative stages in the human thymus indicates that cell expansion occurs before the expression of CD3 (T cell receptor). *J. Immunol.* **150**, 8–16 (1993).
  60. Kraft, DL, Weissman, IL & Waller, EK. Differentiation of CD3-4-8- human fetal thymocytes in vivo: characterization of a CD3-4+8- intermediate. *J. Exp. Med.* **178**, 265–77 (1993).
  61. Takeuchi, Y, Fujii, Y, Okumura, M, Inada, K, Nakahara, K & Matsuda, H. Characterization of CD4+ single positive cells that lack CD3 in the human thymus. *Cell. Immunol.* **151**, 481–490 (1993).
  62. Dreyer, WJ & Bennett, JC. The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **54**, 864–869 (1965).
63. Hozumi, N & Tonegawa, S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 3628–3632 (1976).
64. Brack, C, Hirama, M, Lenhard-Schuller, R & Tonegawa, S. A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* **15**, 1–14 (1978).
65. Seidman, JG, Leder, A, Edgell, MH, Polsky, F, Tilghman, SM, Tiemeier, DC & Leder, P. Multiple related immunoglobulin variable-region genes identified by cloning and sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 3881–3885 (1978).
66. Blom, B, Res, P, Noteboom, E, Weijer, K & Spits, H. Prethymic CD34+ progenitors capable of developing into T cells are not committed to the T cell lineage. *J. Immunol.* **158**, 3571–3577 (1997).
67. H T Petrie, F Livak, D G Schatz, A Strasser, I N Crispe, KS. Multiple rearrangements in T cell receptor alpha chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J. Exp. Med.* **178**, 615–622 (1993).
68. Carrasco, YR, Trigueros, C, Ramiro, AR, De Yébenes, VG & Toribio, ML.  $\beta$ -Selection is associated with the onset of CD8 $\beta$  chain expression on CD4+ CD8 $\alpha\alpha$ + pre-T cells during human intrathymic development. *Blood* **94**, 3491–3498 (1999).
69. Groh, V, Porcelli, S, Fabbi, M, Lanier, LL, Picker, LJ, Anderson, T, Warnke, RA, Bhan, AK, Strominger, JL & Brenner, MB. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J. Exp. Med.* **169**, 1277 LP-1294 (1989).
70. Janis, EM, Kaufmann, SH, Schwartz, RH & Pardoll, DM. Activation of gamma delta T cells in the primary immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Science* **244**, 713–716 (1989).
71. Uldrich, AP, Le Nours, J, Pellicci, DG, Gherardin, NA, McPherson, KG, Lim, RT, Patel, O, Beddoe, T, Gras, S, Rossjohn, J & Godfrey, DI. CD1d-lipid antigen recognition by the gammadelta TCR. *Nat. Immunol.* **14**, 1137–1145 (2013).
72. Hayes, SM, Shores, EW & Love, PE. An architectural perspective on signaling by the pre-, alphabeta and gammadelta T cell receptors. *Immunol. Rev.* **191**, 28–37 (2003).

73. Shibata, K, Yamada, H, Sato, T, Dejima, T, Nakamura, M, Ikawa, T, Hara, H, Yamasaki, S, Kageyama, R, Iwakura, Y, Kawamoto, H, Toh, H & Yoshikai, Y. Notch-Hes1 pathway is required for the development of IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells. *Blood* **118**, 586 LP-593 (2011).
74. Turchinovich, G & Hayday, AC. Skint-1 Identifies a Common Molecular Mechanism for the Development of Interferon- $\gamma$ -Secreting versus Interleukin-17-Secreting  $\gamma\delta$  T Cells. *Immunity* **35**, 59–68 (2011).
75. Verschuren, MCM, Blom, B, Bogers, AJJC, Spits, H & Dongen, JJM Van. PJA-BP expression and TCR  $\delta$  deletion during human T cell differentiation. **10**, 1873–1880 (1998).
76. Kopan, R & Ilagan, MXG. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell* **137**, 216–233 (2009).
77. Ellisen, LW, Bird, J, West, DC, Soreng, AL, Reynolds, TC, Smith, SD & Sklar, J. TAN-1, the human homolog of the Drosophila Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* **66**, 649–661 (1991).
78. Schmitt, TM, Ciofani, M, Petrie, HT & Zúñiga-Pflücker, JC. Maintenance of T Cell Specification and Differentiation Requires Recurrent Notch Receptor–Ligand Interactions. *J. Exp. Med.* **200**, 469–479 (2004).
79. Milner, LA, Kopan, R, Martin, DI & Bernstein, ID. A human homologue of the Drosophila developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors. *Blood* **83**, 2057–2062 (1994).
80. Varnum-Finney, B, Purton, LE, Yu, M, Brashem-Stein, C, Flowers, D, Staats, S, Moore, KA, Le Roux, I, Mann, R, Gray, G, Artavanis-Tsakonas, S & Bernstein, ID. The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood* **91**, 4084–4091 (1998).
81. Karanu, FN, Murdoch, B, Miyabayashi, T, Ohno, M, Koremoto, M, Gallacher, L, Wu, D, Itoh, A, Sakano, S & Bhatia, M. Human homologues of Delta-1 and Delta-4 function as mitogenic regulators of primitive human hematopoietic cells. *Blood* **97**, 1960–1967 (2001).
82. Anderson, G, Pongracz, J, Parnell, S & Jenkinson, EJ. Notch ligand-bearing thymic

- epithelial cells initiate and sustain Notch signaling in thymocytes independently of T cell receptor signaling. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3349–3354 (2001).
83. Gotter, J, Brors, B, Hergenbahn, M & Kyewski, B. Medullary Epithelial Cells of the Human Thymus Express a Highly Diverse Selection of Tissue-specific Genes Colocalized in Chromosomal Clusters. *J. Exp. Med.* **199**, 155–166 (2004).
  84. Pui, JC, Allman, D, Xu, L, DeRocco, S, Karnell, FG, Bakkour, S, Lee, JY, Kadesch, T, Hardy, RR, Aster, JC & Pear, WS. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* **11**, 299–308 (1999).
  85. De Smedt, M, Reynvoet, K, Kerre, T, Taghon, T, Verhasselt, B, Vandekerckhove, B, Leclercq, G & Plum, J. Active Form of Notch Imposes T Cell Fate in Human Progenitor Cells. *J. Immunol.* **169**, 3021–3029 (2002).
  86. Radtke, F, Wilson, A, Stark, G, Bauer, M, van Meerwijk, J, MacDonald, HR & Aguet, M. Deficient T Cell Fate Specification in Mice with an Induced Inactivation of Notch1. *Immunity* **10**, 547–558 (1999).
  87. Plum, J, De Smedt, M, Leclercq, G, Verhasselt, B & Vandekerckhove, B. Interleukin-7 is a critical growth factor in early human T-cell development. *Blood* **88**, 4239–4245 (1996).
  88. Kang, J, Coles, M & Raulet, DH. Defective development of gamma/delta T cells in interleukin 7 receptor-deficient mice is due to impaired expression of T cell receptor gamma genes. *J. Exp. Med.* **190**, 973–982 (1999).
  89. von Freeden-Jeffry, U, Vieira, P, Lucian, LA, McNeil, T, Burdach, SE & Murray, R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J. Exp. Med.* **181**, 1519 LP-1526 (1995).
  90. Moore, TA, von Freeden-Jeffry, U, Murray, R & Zlotnik, A. Inhibition of gamma delta T cell development and early thymocyte maturation in IL-7  $-/-$  mice. *J. Immunol.* **157**, 2366–2373 (1996).
  91. Yui, MA & Rothenberg, E V. Deranged early T cell development in immunodeficient strains of nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* **173**, 5381–5391 (2004).
  92. Van De Wiele, CJ, Marino, JH, Murray, BW, Vo, SS, Whetsell, ME & Teague, TK. Thymocytes between the beta-selection and positive selection checkpoints are

- nonresponsive to IL-7 as assessed by STAT-5 phosphorylation. *J. Immunol.* **172**, 4235–4244 (2004).
93. Zamisch, M, Moore-Scott, B, Su, D, Lucas, PJ, Manley, N & Richie, ER. Ontogeny and regulation of IL-7-expressing thymic epithelial cells. *J. Immunol.* **174**, 60–67 (2005).
94. Frank JT, S, Jan, M, Petra, M, Philippe, J, M.,+van de WBC, Seppo, V, P., NG & Hans, C. Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. *Eur. J. Immunol.* **31**, 285–293 (2000).
95. Gounari, F, Aifantis, I, Khazaie, K, Hoeflinger, S, Harada, N, Taketo, MM & Von Boehmer, H. Somatic activation of  $\beta$ -catenin bypasses pre-TCR signaling and TCR selection in thymocyte development. *Nat. Immunol.* **2**, 863–869 (2001).
96. Weerkamp, F, Baert, MRM, Naber, BAE, Koster, EEL, de Haas, EFE, Atkuri, KR, van Dongen, JJM, Herzenberg, LA & Staal, FJT. Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 3322–3326 (2006).
97. Schilham, MW, Wilson, A, Moerer, P, Benaissa-Trouw, BJ, Cumano, A & Clevers, HC. Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes. *J. Immunol.* **161**, 3984–3991 (1998).
98. Yu, Q & Sen, JM.  $\beta$ -Catenin Regulates Positive Selection of Thymocytes but Not Lineage Commitment. *J. Immunol.* **178**, 5028–5034 (2007).
99. Yu, Q, Sharma, A & Sen, JM. TCF1 and beta-catenin regulate T cell development and function. *Immunol. Res.* **47**, 45–55 (2010).
100. Cotsarelis, G, Sun, TT & Lavker, RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* **61**, 1329–1337 (1990).
101. Asahara, T, Murohara, T, Sullivan, A, Silver, M, van der Zee, R, Li, T, Witzenbichler, B, Schattman, G & Isner, JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964–967 (1997).
102. Collins, AT, Habib, FK, Maitland, NJ & Neal, DE. Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. *J. Cell Sci.* **114**, 3865–3872 (2001).



103. Zuk, PA, Zhu, M, Ashjian, P, De Ugarte, DA, Huang, JI, Mizuno, H, Alfonso, ZC, Fraser, JK, Benhaim, P, Hedrick, MH & Raff, M. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4279–4295 (2002).
104. Messina, E, De Angelis, L, Frati, G, Morrone, S, Chimenti, S, Fiordaliso, F, Salio, M, Battaglia, M, Latronico, MVG, Coletta, M, Vivarelli, E, Frati, L, Cossu, G & Giacomello, A. Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells From Human and Murine Heart. *Circ. Res.* **95**, 911 LP-921 (2004).
105. Sabatini, F, Petecchia, L, Taviani, M, Jodon de Villeroche, V, Rossi, GA & Brouty-Boye, D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab. Invest.* **85**, 962–971 (2005).
106. Herrera, MB, Bruno, S, Buttiglieri, S, Tetta, C, Gatti, S, Deregibus, MC, Bussolati, B & Camussi, G. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* **24**, 2840–2850 (2006).
107. Barker, N, van Es, JH, Kuipers, J, Kujala, P, van den Born, M, Cozijnsen, M, Haegebarth, A, Korving, J, Begthel, H, Peters, PJ & Clevers, H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003 (2007).
108. Jung, P, Sato, T, Merlos-Suarez, A, Barriga, FM, Iglesias, M, Rossell, D, Auer, H, Gallardo, M, Blasco, MA, Sancho, E, Clevers, H & Batlle, E. Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat. Med.* **17**, 1225–1227 (2011).
109. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7–25 (1978).
110. Kimble, JE & White, JG. On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **81**, 208–219 (1981).
111. Xie, T & Spradling, AC. decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Cell* **94**, 251–260 (1998).
112. Riether, C, Schürch, CM & Ochsenschein, AF. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. *Cell Death Differ.* **22**, 187 (2014).
113. Reya, T, Duncan, AW, Ailles, L, Domen, J, Scherer, DC, Willert, K, Hintz, L, Nusse, R & Weissman, IL. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409–414 (2003).

114. Lo Celso, C, Prowse, DM & Watt, FM. Transient activation of beta-catenin signalling in adult mouse epidermis is sufficient to induce new hair follicles but continuous activation is required to maintain hair follicle tumours. *Development* **131**, 1787–1799 (2004).
115. Zhang, J, Niu, C, Ye, L, Huang, H, He, X, Tong, W-G, Ross, J, Haug, J, Johnson, T, Feng, JQ, Harris, S, Wiedemann, LM, Mishina, Y & Li, L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836 (2003).
116. He, XC, Zhang, J, Tong, W-G, Tawfik, O, Ross, J, Scoville, DH, Tian, Q, Zeng, X, He, X, Wiedemann, LM, Mishina, Y & Li, L. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt- $\beta$ -catenin signaling. *Nat. Genet.* **36**, 1117 (2004).
117. Ahn, S & Joyner, AL. In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* **437**, 894 (2005).
118. Trowbridge, JJ, Scott, MP & Bhatia, M. Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 14134 LP-14139 (2006).
119. Shin, K, Lee, J, Guo, N, Kim, J, Lim, A, Qu, L, Mysorekar, IU & Beachy, PA. Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. *Nature* **472**, 110–114 (2011).
120. Bissell, MJ, Hall, HG & Parry, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J. Theor. Biol.* **99**, 31–68 (1982).
121. Thomas, CH, Collier, JH, Sfeir, CS & Healy, KE. Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 1972–1977 (2002).
122. Vergani, L, Grattarola, M & Nicolini, C. Modifications of chromatin structure and gene expression following induced alterations of cellular shape. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1447–1461 (2004).
123. Sutherland, RM, McCredie, JA & Inch, WR. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **46**, 113–120 (1971).
124. Huch, M, Gehart, H, van Boxtel, R, Hamer, K, *et al.* Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell* **160**, 299–312 (2015).

125. Kruse, C, Birth, M, Rohwedel, J, Assmuth, K, Goepel, A & Wedel, T. Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas. *Appl. Phys. A* **79**, 1617–1624 (2004).
126. Karthaus, WR, Iaquinta, PJ, Drost, J, Gracanin, A, van Boxtel, R, Wongvipat, J, Dowling, CM, Gao, D, Begthel, H, Sachs, N, Vries, RGJ, Cuppen, E, Chen, Y, Sawyers, CL & Clevers, HC. Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell* **159**, 163–175 (2014).
127. Linnemann, JR, Miura, H, Meixner, LK, Irmeler, M, Kloos, UJ, Hirschi, B, Bartsch, HS, Sass, S, Beckers, J, Theis, FJ, Gabka, C, Sotlar, K & Scheel, CH. Quantification of regenerative potential in primary human mammary epithelial cells. *Development* **142**, 3239–3251 (2015).
128. Sato, T, Vries, RG, Snippert, HJ, van de Wetering, M, Barker, N, Stange, DE, van Es, JH, Abo, A, Kujala, P, Peters, PJ & Clevers, H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**, 262–265 (2009).
129. Foulke-Abel, J, In, J, Kovbasnjuk, O, Zachos, NC, Ettayebi, K, Blutt, SE, Hyser, JM, Zeng, X-L, Crawford, SE, Broughman, JR, Estes, MK & Donowitz, M. Human enteroids as an ex-vivo model of host–pathogen interactions in the gastrointestinal tract. *Exp. Biol. Med.* **239**, 1124–1134 (2014).
130. Grabinger, T, Luks, L, Kostadinova, F, Zimmerlin, C, Medema, JP, Leist, M & Brunner, T. Ex vivo culture of intestinal crypt organoids as a model system for assessing cell death induction in intestinal epithelial cells and enteropathy. *Cell Death & Disease* **5**, e1228- (2014).
131. Rogoz, A, Reis, BS, Karssemeijer, RA & Mucida, D. A 3-D enteroid-based model to study T-cell and epithelial cell interaction. *J. Immunol. Methods* **421**, 89–95 (2015).
132. Rajan, A, Vela, L, Zeng, X-L, Yu, X, Shroyer, N, Blutt, SE, Poole, NM, Carlin, LG, Nataro, JP, Estes, MK, Okhuysen, PC & Maresso, AW. Novel Segment- and Host-Specific Patterns of Enteroaggregative Escherichia coli Adherence to Human Intestinal Enteroids. *MBio* **9**, (2018).
133. Von Der Mark, K, Gauss, V, Von der Mark, H & Müller, P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* **267**, 531 (1977).

134. Bierwolf, J, Lutgehetmann, M, Feng, K, Erbes, J, Deichmann, S, Toronyi, E, Stieglitz, C, Nashan, B, Ma, PX & Pollok, JM. Primary rat hepatocyte culture on 3D nanofibrous polymer scaffolds for toxicology and pharmaceutical research. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 141–150 (2011).
135. Mueller-Klieser, W, Freyer, JP & Sutherland, RM. Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids. *Br. J. Cancer* **53**, 345 (1986).
136. Sen-majumdar, BA, Lieberman, M, Alpert, S, Weissman, IL & Small, M. Differentiation of CD3 - 4- 8- Thymocytes in Short-Term Thymic Stromal Cell Culture. *J. Exp.* **176(2)**, 543–51 (1992).
137. Akashi, K & Weissman, IL. The c-kit<sup>+</sup> maturation pathway in mouse thymic T cell development: Lineages and selection. *Immunity* **5**, 147–161 (1996).
138. Rosenzweig, M, Marks, DF, Zhu, H, Hempel, D, Mansfield, KG, Sehgal, PK, Kalams, S, Scadden, DT & Johnson, RP. In vitro T lymphopoiesis of human and rhesus CD34<sup>+</sup> progenitor cells. *Blood* **87**, 4040–8 (1996).
139. Poznansky, MC, Evans, RH, Foxall, RB, Olszak, IT, Piascik, AH, Hartman, KE, Brander, C, Meyer, TH, Pykett, MJ, Chabner, KT, Kalams, SA, Rosenzweig, M & Scadden, DT. Efficient generation of human T cells from a tissue-engineered thymic organoid. *Nat. Biotechnol.* **18**, 729–734 (2000).
140. Suematsu, S & Watanabe, T. Generation of a synthetic lymphoid tissue-like organoid in mice. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1539–1545 (2004).
141. Jaleco, AC, Neves, H, Hooijberg, E, Gameiro, P, Clode, N, Haury, M, Henrique, D & Parreira, L. Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J. Exp. Med.* **194**, 991–1002 (2001).
142. Mohtashami, M & Zúñiga-Pflücker, JC. Cutting Edge: Three-Dimensional Architecture of the Thymus Is Required to Maintain Delta-Like Expression Necessary for Inducing T Cell Development. *J. Immunol.* **176**, 730 LP-734 (2006).
143. Palacios, R & Samaridis, J. Thymus colonization in the developing mouse embryo. *Eur. J. Immunol.* **21**, 109–113 (1991).
144. Fisher, AG, Larsson, L, Goff, LK, Restall, DE, Happerfield, L & Merckenschlager, M.

- Human thymocyte development in mouse organ cultures. *Int. Immunol.* **2**, 571–578 (1990).
145. Merckenschlager, M & Fisher, AG. CD45 isoform switching precedes the activation-driven death of human thymocytes by apoptosis. *Int. Immunol.* **3**, 1–7 (1991).
146. Yeoman, H, Gress, RE, Bare, C V, Leary, AG, Boyse, EA, Bard, J, Shultz, LD, Harris, DT & DeLuca, D. Human bone marrow and umbilical cord blood cells generate CD4+ and CD8+ single-positive T cells in murine fetal thymus organ culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10778–10782 (1993).
147. Plum, J, De Smedt, M, Verhasselt, B, Kerre, T, Vanhecke, D, Vandekerckhove, B & Leclercq, G. Human T lymphopoiesis. In vitro and in vivo study models. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **917**, 724–731 (2000).
148. Anderson, G, Jenkinson, EJ, Moore, NC & Owen, JJT. MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus. *Nature* **362**, 70–73 (1993).
149. Schmitt, TM, Zú, JC & Cker, I-P. Induction of T Cell Development from Hematopoietic Progenitor Cells by Delta-like-1 In Vitro. *Immunity* **17**, 749–756 (2002).
150. De Smedt, M, Hoebeke, I & Plum, J. Human bone marrow CD34 + progenitor cells mature to T cells on OP9-DL1 stromal cell line without thymus microenvironment. *Blood Cells, Mol. Dis.* **33**, 227–232 (2004).
151. Motte-mohs, RN La, Herer, E & Zu, JC. Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 in vitro. *Blood* **105**, 1431–1440 (2005).
152. La Motte-Mohs, RN, Herer, E & Zuniga-Pflucker, JC. Induction of T-cell development from human cord blood hematopoietic stem cells by Delta-like 1 in vitro. *Blood* **105**, 1431–1439 (2005).
153. Choi, EY, Jung, KC, Park, HJ, Chung, DH, Song, JS, Yang, SD, Simpson, E & Park, SH. Thymocyte-thymocyte interaction for efficient positive selection and maturation of CD4 T cells. *Immunity* **23**, 387–396 (2005).
154. Dittrich, W & Gohde, F. Flow-through chamber for photometers to measure and count

- particles in a dispersion medium. (1968).
155. Jenkinson, EJ, Franchi, LL, Kingston, R & Owen, JTT. Effect of deoxyguanosine on lymphopoiesis in the developing thymus rudiment *in vitro*: Application in the production of chimeric thymus rudiments. *Eur. J. Immunol.* **12**, 583–587 (1982).
  156. Monteiro, M, Rocha, B & Veiga-fernandes, H. Quantification of Multiple Gene Expression in Individual Cells. 1938–1947 (2004). doi:10.1101/gr.2890204.cell
  157. Antica, M, Wu, L, Shortman, K & Scollay, R. Intrathymic lymphoid precursor cells during fetal thymus development. *J. Immunol.* **151**, 5887–5895 (1993).
  158. Jiang, W, Sui, X, Zhang, D, Liu, M, Ding, M, Shi, Y & Deng, H. CD24: a novel surface marker for PDX1-positive pancreatic progenitors derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells* **29**, 609–617 (2011).
  159. Gracz, AD, Fuller, MK, Wang, F, Li, L, Stelzner, M, Dunn, JCY, Martin, MG & Magness, ST. Brief report: CD24 and CD44 mark human intestinal epithelial cell populations with characteristics of active and facultative stem cells. *Stem Cells* **31**, 2024–2030 (2013).
  160. Shezen, E, Okon, E, Ben-Hur, H & Abramsky, O. Cytokeratin expression in human thymus: immunohistochemical mapping. *Cell Tissue Res.* **279**, 221–231 (1995).
  161. Ucar, A, Ucar, O, Klug, P, Matt, S, Brunk, F, Hofmann, TG & Kyewski, B. Adult thymus contains foxN1- epithelial stem cells that are bipotent for medullary and cortical thymic epithelial lineages. *Immunity* **41**, 257–269 (2014).
  162. Hu, Y & Smyth, GK. ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *J. Immunol. Methods* **347**, 70–78 (2009).
  163. Xu, Y, Banerjee, D, Huelsken, J, Birchmeier, W & Sen, JM. Deletion of  $\beta$ -catenin impairs T cell development. *Nat. Immunol.* **4**, 1177 (2003).
  164. Okamura, RM, Sigvardsson, M, Galceran, J, Verbeek, S, Clevers, H & Grosschedl, R. Redundant Regulation of T Cell Differentiation and TCR $\alpha$  Gene Expression by the Transcription Factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity* **8**, 11–20 (1998).
  165. Yu, S, Zhou, X, Steinke, FC, Liu, C, Chen, S-C, Zagorodna, O, Jing, X, Yokota, Y,

- Meyerholz, DK, Mullighan, CG, Knudson, CM, Zhao, D-M & Xue, H-H. The TCF-1 and LEF-1 Transcription Factors Have Cooperative and Opposing Roles in T Cell Development and Malignancy. *Immunity* **37**, 813–826 (2012).
166. Swann, JB, Happe, C & Boehm, T. Elevated levels of Wnt signaling disrupt thymus morphogenesis and function. *Sci. Rep.* **7**, 1–15 (2017).
167. Erickson, M, Morkowski, S, Lehar, S, Gillard, G, Beers, C, Dooley, J, Rubin, JS, Rudensky, A & Farr, AG. Regulation of thymic epithelium by keratinocyte growth factor. *Blood* **100**, 3269–3278 (2002).
168. Rossi, SW, Jeker, LT, Ueno, T, Kuse, S, Keller, MP, Zuklys, S, Gudkov, A V, Takahama, Y, Krenger, W, Blazar, BR & Hollander, GA. Keratinocyte growth factor (KGF) enhances postnatal T-cell development via enhancements in proliferation and function of thymic epithelial cells. *Blood* **109**, 3803–3811 (2007).
169. Alpdogan, Ö, Hubbard, VM, Smith, OM, Patel, N, Lu, S, Goldberg, GL, Gray, DH, Feinman, J, Kochman, AA, Eng, JM, Suh, D, Muriglian, SJ, Boyd, RL & van den Brink, MRM. Keratinocyte growth factor (KGF) is required for postnatal thymic regeneration. *Blood* **107**, 2453–2460 (2006).
170. Sabharwal, P & Varma, S. Growth hormone synthesized and secreted by human thymocytes acts via insulin-like growth factor I as an autocrine and paracrine growth factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 2663–2669 (1996).
171. De Mello-Coelho, V, Savino, W, Postel-Vinay, MC & Dardenne, M. Role of prolactin and growth hormone on thymus physiology. *Dev. Immunol.* **6**, 317–323 (1998).
172. Hager-Theodorides, AL, Outram, S V, Shah, DK, Sacedon, R, Shrimpton, RE, Vicente, A, Varas, A & Crompton, T. Bone Morphogenetic Protein 2/4 Signaling Regulates Early Thymocyte Differentiation. *J. Immunol.* **169**, 5496 LP-5504 (2002).
173. Tsai, PT, Lee, RA & Wu, H. BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis. *Blood* **102**, 3947–3953 (2003).
174. Wertheimer, T, Velardi, E, Brede, C, Xiao, S, Kloss, CC, Beilhack, A, Manley, N, Butler, JM, Rafii, S, van den Brink, M & Dudakov, JA. Production of BMP4 By Endothelial Cells Is Crucial for Endogenous Thymic Regeneration. *Blood* **126**, 637 LP-637 (2015).
175. Dudakov, JA, Hanash, AM, Jenq, RR, Young, LF, Ghosh, A, Singer, N V, West, ML,

- Smith, OM, Holland, AM, Tsai, JJ, Boyd, RL & van den Brink, MRM. Interleukin-2 drives endogenous thymic regeneration in mice. *Science* **336**, 91–95 (2012).
176. Yano, M, Kuroda, N, Han, H, Meguro-Horike, M, Nishikawa, Y, Kiyonari, H, Maemura, K, Yanagawa, Y, Obata, K, Takahashi, S, Ikawa, T, Satoh, R, Kawamoto, H, Mouri, Y & Matsumoto, M. Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J. Exp. Med.* **205**, 2827–2838 (2008).
177. Hui, Z, Noboru, M, Andrew, K, W., BL, Kenneth, W, L., BM, Achilles, D & D., WG. The Role of the Hyaluronan Receptor CD44 in Mesenchymal Stem Cell Migration in the Extracellular Matrix. *Stem Cells* **24**, 928–935 (2009).
178. Veevers-Lowe, J, Ball, SG, Shuttleworth, A & Kielty, CM. Mesenchymal stem cell migration is regulated by fibronectin through  $\alpha 5\beta 1$ -integrin-mediated activation of PDGFR- $\beta$  and potentiation of growth factor signals. *J. Cell Sci.* **124**, 1288 LP-1300 (2011).
179. Song, S, Ewald, AJ, Stallcup, W, Werb, Z & Bergers, G. PDGFR $\beta$ <sup>+</sup> perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat. Cell Biol.* **7**, 870 (2005).
180. Olson, LE & Soriano, P. PDGFR $\beta$  signaling regulates mural cell plasticity and inhibits fat development. *Dev. Cell* **20**, 815–826 (2011).
181. E., MC, Saulius, Ž, Saule, Z, Izumi, O, Hong-Ying, T, N., SS, Noriko, S, Katrin, H, C., MI, E., DM, P., PC, Yousuke, T & A., HG. Dynamic spatio-temporal contribution of single  $\beta 5t^+$  cortical epithelial precursors to the thymus medulla. *Eur. J. Immunol.* **46**, 846–856 (2015).
182. Ohigashi, I, Zuklys, S, Sakata, M, Mayer, CE, Hamazaki, Y, Minato, N, Hollander, GA & Takahama, Y. Adult Thymic Medullary Epithelium Is Maintained and Regenerated by Lineage-Restricted Cells Rather Than Bipotent Progenitors. *Cell Rep.* **13**, 1432–1443 (2015).
183. Lucas, O, Veronika, N, Elke, S, Qian, C, Hung-Wei, C, Sonja, C, Mario, N, David, B, Reinhard, M, Florian, M, Birgit, L, Burkhard, B, Ari, W & Burkhard, L. Alternative NF- $\kappa$ B signaling regulates mTEC differentiation from podoplanin-expressing precursors in the cortico-medullary junction. *Eur. J. Immunol.* **45**, 2218–2231 (2015).



184. Shortman, K, Vremec, D, D'Amico, A, Battye, F & Boyd, R. Nature of the thymocytes associated with dendritic cells and macrophages in thymic rosettes. *Cell. Immunol.* **119**, 85–100 (1989).
185. Ucar, O, Li, K, Dvornikov, D, Kreutz, C, Timmer, J, Matt, S, Brenner, L, Smedley, C, Travis, MA, Hofmann, TG, Klingmüller, U & Kyewski, B. A Thymic Epithelial Stem Cell Pool Persists throughout Ontogeny and Is Modulated by TGF- $\beta$ . *Cell Rep.* **17**, 448–457 (2016).
186. Sheridan, JM, Keown, A, Policheni, A, Roesley, SNA, Rivlin, N, Kadouri, N, Ritchie, ME, Jain, R, Abramson, J, Heng, TSP & Gray, DHD. Thymospheres Are Formed by Mesenchymal Cells with the Potential to Generate Adipocytes, but Not Epithelial Cells. *Cell Rep.* **21**, 934–942 (2017).
187. Wong, K, Lister, NL, Barsanti, M, Lim, JMC, Hammett, MV, Khong, DM, Siatskas, C, Gray, DHD, Boyd, RL & Chidgey, AP. Multilineage Potential and Self-Renewal Define an Epithelial Progenitor Cell Population in the Adult Thymus. *Cell Rep.* **8**, 1198–1209 (2014).
188. Ulyanchenko, S, O'Neill, KE, Medley, T, Farley, AM, Vaidya, HJ, Cook, AM, Blair, NF & Blackburn, CC. Identification of a Bipotent Epithelial Progenitor Population in the Adult Thymus. *Cell Rep.* **14**, 2819–2832 (2016).
189. Puck, TT, Marcus, PI & Cieciura, SJ. Clonal growth of mammalian cells in vitro. *J. Exp. Med.* **103**, 273 LP-284 (1956).
190. Donald, M. Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. I. Continuous cluster formation and relation of clusters to colonies. *J. Cell. Physiol.* **74**, 323–332 (2018).
191. Hamburger, AW & Salmon, SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**, 461–463 (1977).
192. Ploemacher, E & Sluijs, P Van Der. in the Mouse. **74**, 2755–2763 (1989).
193. Reynolds, BA & Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* **255**, 1707–1710 (1992).
194. Coles, BLK, Angénioux, B, Inoue, T, Del Rio-Tsonis, K, Spence, JR, McInnes, RR, Arsenijevic, Y & van der Kooy, D. Facile isolation and the characterization of human

- retinal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15772–15777 (2004).
195. Kakarala, M, Brenner, DE, Korkaya, H, Cheng, C, Tazi, K, Ginestier, C, Liu, S, Dontu, G & Wicha, MS. Targeting breast stem cells with the cancer preventive compounds curcumin and piperine. *Breast Cancer Res. Treat.* **122**, 777–785 (2010).
196. Drukker, M, Katz, G, Urbach, A, Schuldiner, M, Markel, G, Itskovitz-Eldor, J, Reubinoff, B, Mandelboim, O & Benvenisty, N. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 9864 LP-9869 (2002).
197. Le Blanc, K, Tammik, C, Rosendahl, K, Zetterberg, E & Ringdén, O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* **31**, 890–896 (2003).
198. Romieu-Mourez, R, François, M, Boivin, M-N, Stagg, J & Galipeau, J. Regulation of MHC Class II Expression and Antigen Processing in Murine and Human Mesenchymal Stromal Cells by IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , and Cell Density. *J. Immunol.* **179**, 1549 LP-1558 (2007).
199. Vagaska, B, New, SEP, Alvarez-Gonzalez, C, D'Acquisto, F, Gomez, SG, Bulstrode, NW, Madrigal, A & Ferretti, P. MHC-class-II are expressed in a subpopulation of human neural stem cells in vitro in an IFN $\gamma$  3-independent fashion and during development. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
200. Baik, S, Jenkinson, EJ, Lane, PJJ, Anderson, G & Jenkinson, WE. Generation of both cortical and Aire+ medullary thymic epithelial compartments from CD205+ progenitors. *Eur. J. Immunol.* **43**, 589–594 (2013).
201. Klug, CA, Morrison, SJ, Masek, M, Hahm, K, Smale, ST & Weissman, IL. Hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors express different Ikaros isoforms, and Ikaros is localized to heterochromatin in immature lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 657–662 (1998).
202. Pittenger, MF, Mackay, AM, Beck, SC, Jaiswal, RK, Douglas, R, Mosca, JD, Moorman, MA, Simonetti, DW, Craig, S & Marshak, DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143–147 (1999).
203. Bussolati, B, Bruno, S, Grange, C, Buttiglieri, S, Deregibus, MC, Cantino, D & Camussi,

- G. Isolation of Renal Progenitor Cells from Adult Human Kidney. *Am. J. Pathol.* **166**, 545–555 (2005).
204. Leong, KG, Wang, BE, Johnson, L & Gao, WQ. Generation of a prostate from a single adult stem cell. *Nature* **456**, 804–810 (2008).
205. Barker, N, Huch, M, Kujala, P, van de Wetering, M, Snippert, HJ, van Es, JH, Sato, T, Stange, DE, Begthel, H, van den Born, M, Danenberg, E, van den Brink, S, Korving, J, Abo, A, Peters, PJ, Wright, N, Poulsom, R & Clevers, H. Lgr5+ve Stem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro. *Cell Stem Cell* **6**, 25–36 (2010).
206. Farr, AG & Braddy, SC. Patterns of keratin expression in the murine thymus. *Anat. Rec.* **224**, 374–378 (1989).
207. Herlyn, D, Herlyn, M, Steplewski, Z & Koprowski, H. Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma. *Eur. J. Immunol.* **9**, 657–659 (1979).
208. Anderson, R, Schaible, K, Heasman, J & Wylie, C. Expression of the homophilic adhesion molecule, Ep-CAM, in the mammalian germ line. *J. Reprod. Fertil.* **116**, 379–384 (1999).
209. Dollé, L, Theise, ND, Schmelzer, E, Boulter, L, Gires, O & van Grunsven, LA. EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **308**, G233–G250 (2015).
210. Maimets, M, Rocchi, C, Bron, R, Pringle, S, Kuipers, J, Giepmans, BNG, Vries, RGJ, Clevers, H, De Haan, G, Van Os, R & Coppes, RP. Long-Term in Vitro Expansion of Salivary Gland Stem Cells Driven by Wnt Signals. *Stem Cell Reports* **6**, 150–162 (2016).
211. Garcia-Lozano, J-R, Torres-Agrela, B, Montes-Cano, M-A, Ortiz-Fernandez, L, Conde-Jaldon, M, Teruel, M, Garcia, A, Nunez-Roldan, A, Martin, J & Gonzalez-Escribano, M-F. Association of the AIRE gene with susceptibility to rheumatoid arthritis in a European population: a case control study. *Arthritis Res. Ther.* **15**, R11 (2013).
212. Min, D, Taylor, PA, Panoskaltsis-Mortari, A, Chung, B, Danilenko, DM, Farrell, C, Lacey, DL, Blazar, BR & Weinberg, KI. Protection from thymic epithelial cell injury by keratinocyte growth factor: a new approach to improve thymic and peripheral T-cell

- reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood* **99**, 4592–4600 (2002).
213. Napolitano, LA, Schmidt, D, Gotway, MB, Ameli, N, Filbert, EL, Ng, MM, Clor, JL, Epling, L, Sinclair, E, Baum, PD, Li, K, Killian, ML, Bacchetti, P & McCune, JM. Growth hormone enhances thymic function in HIV-1–infected adults. *J. Clin. Invest.* **118**, 1085–1098 (2008).
214. Morrhaye, G, Kermani, H, Legros, J-J, Baron, F, Beguin, Y, Moutschen, M, Cheynier, R, Martens, HJ & Geenen, V. Impact of growth hormone (GH) deficiency and GH replacement upon thymus function in adult patients. *PLoS One* **4**, e5668 (2009).
215. Mani, SA, Guo, W, Liao, M-J, Eaton, EN, Ayyanan, A, Zhou, AY, Brooks, M, Reinhard, F, Zhang, CC, Shipitsin, M, Campbell, LL, Polyak, K, Brisken, C, Yang, J & Weinberg, RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704–715 (2008).
216. Yang, H, Youm, Y-H & Dixit, VD. Inhibition of Thymic Adipogenesis by Caloric Restriction Is Coupled with Reduction in Age-Related Thymic Involution. *J. Immunol.* **183**, 3040–3052 (2009).
217. Youm, Y-H, Yang, H, Sun, Y, Smith, RG, Manley, NR, Vandanmagsar, B & Dixit, VD. Deficient ghrelin receptor-mediated signaling compromises thymic stromal cell microenvironment by accelerating thymic adiposity. *J. Biol. Chem.* **284**, 7068–7077 (2009).
218. Dixit, V, Youm, Y-H, Yang, H, Venkov, C, Manley, N, Nielson, E, Leff, T & Vandanmagsar, B. Origin of Thymic Adipocytes in Aging: Incidental to Thymopoiesis or Instigator of Immunosenescence? (132.22). *J. Immunol.* **184**, 132.22 LP-132.22 (2010).

## ŽIVOTOPIS

Josipa Skelin rođena je 1989. godine u Zagrebu gdje je završila osnovno i srednjoškolsko obrazovanje. Preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2009. godine, a završava 2011. godine obranivši seminarski rad pod naslovom „Inteligencija i civilizacija“. Iste godine upisuje diplomski studij molekularne biologije. Zvanje magistra molekularne biologije stječe 22. siječnja 2014. godine kada je obranila diplomski rad pod naslovom „Aktivirani signalni putevi stanične smrti kod mišjih embrionalnih fibroblasta nakon UVB zračenja“, izrađen pod vodstvom doc.dr.sc. Inge Marijanović. U kolovozu 2014. godine zapošljava se na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković kao suradnik na projektu „Development of stem cell based therapy for thymic regeneration – THYMISTEM“ (FP7 – Health 2013.1.4-1) čiji je glavni istraživač u Hrvatskoj prof.dr.sc. Marijastefanija Antica. Na projektu je zaposlena do siječnja 2015. godine, kada se zapošljava na istom zavodu kao znanstveni novak – doktorand s mentoricom prof.dr.sc. Marijomstefanijom Anticom u sklopu „Projekta razvoja karijera mladih istraživača - izobrazba novih doktora znanosti“. Tada upisuje i poslijediplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Sve obaveze predviđene nastavnim planom poslijediplomskog studija izvršila je unutar tri godine te je u ovom periodu bila na kraćem studijskom boravku na Tsinghua Sveučilištu u Pekingu (NR Kina). Članica je Hrvatskog imunološkog društva (od 2014. godine) te Hrvatskog društva za istraživanje raka (od 2013. godine). Sudjelovala je na 9 znanstvenih skupova i koautor je u dva znanstvena rada.

### *Popis znanstvenih radova*

1. Matulic M, Skelin J, Radic-Kristo D, Kardum-Skelin I, Grcevic D, Antica M. (2015); Notch affects the prodifferentiating effect of retinoic acid and PMA on leukemic cells. *Cytometry Part A*. 87A:129-136.
2. Horvat L, Skelin J, Jelic Puskaric B, Feliciello I, Heckel D, Madunic J, Kardum-Skelin I, Matulic M, Radic-Kristo D, Antica M. (2018); Notch pathway connections in primary leukaemia samples of limited size. *Translational Medicine Communications*. 3:8