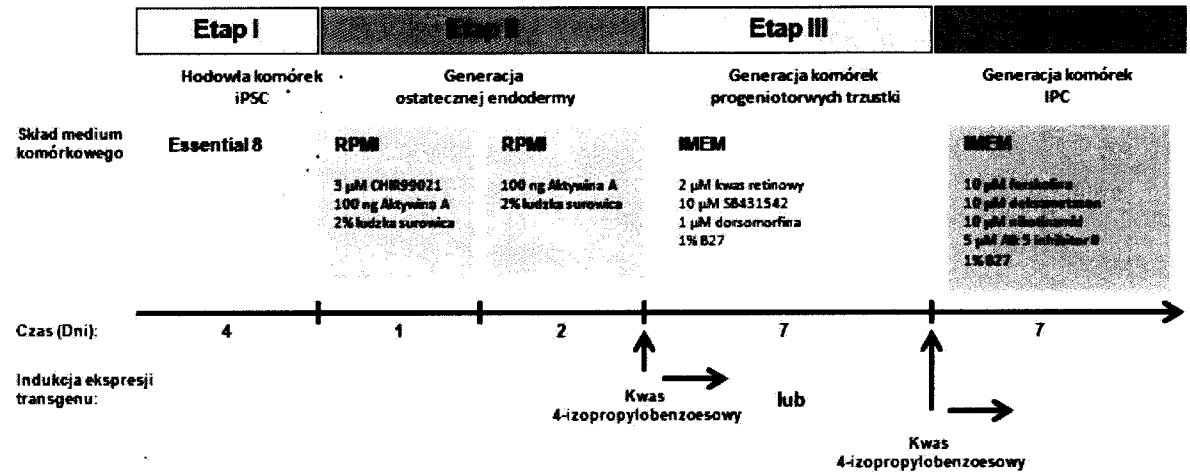
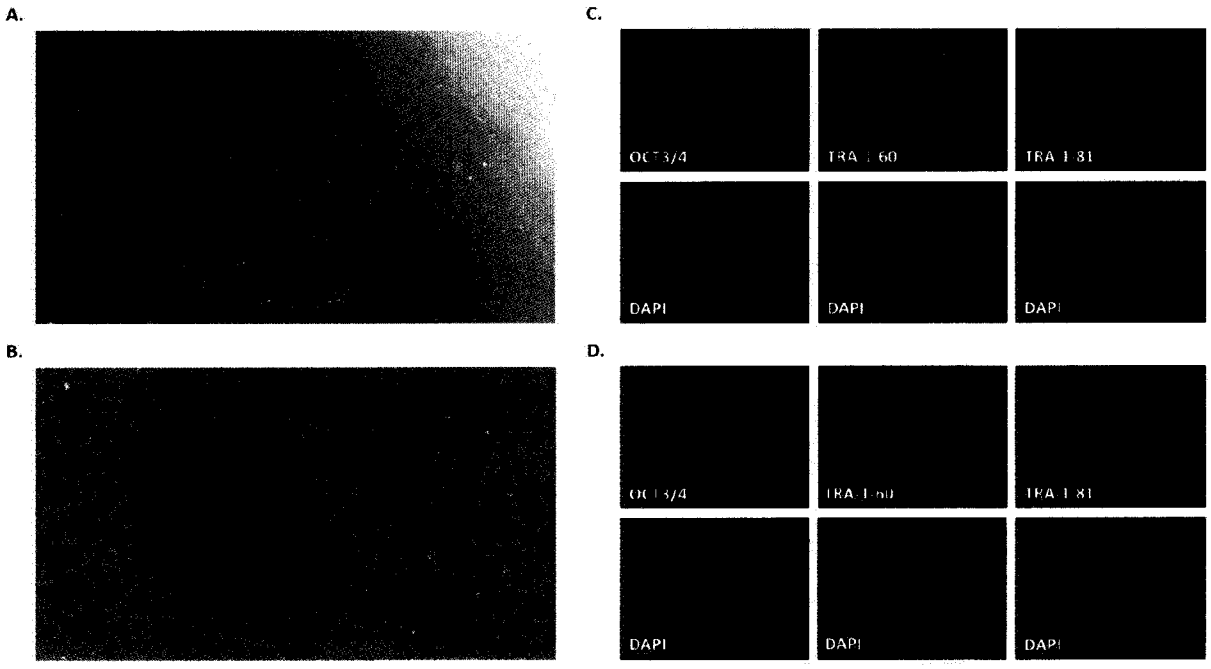
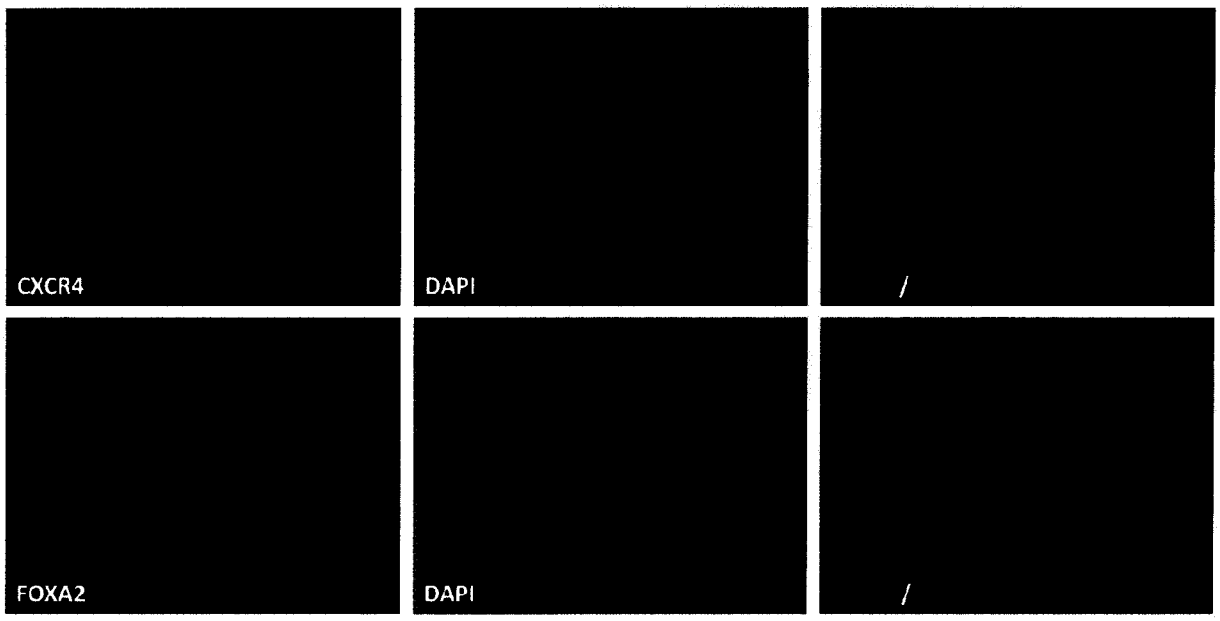


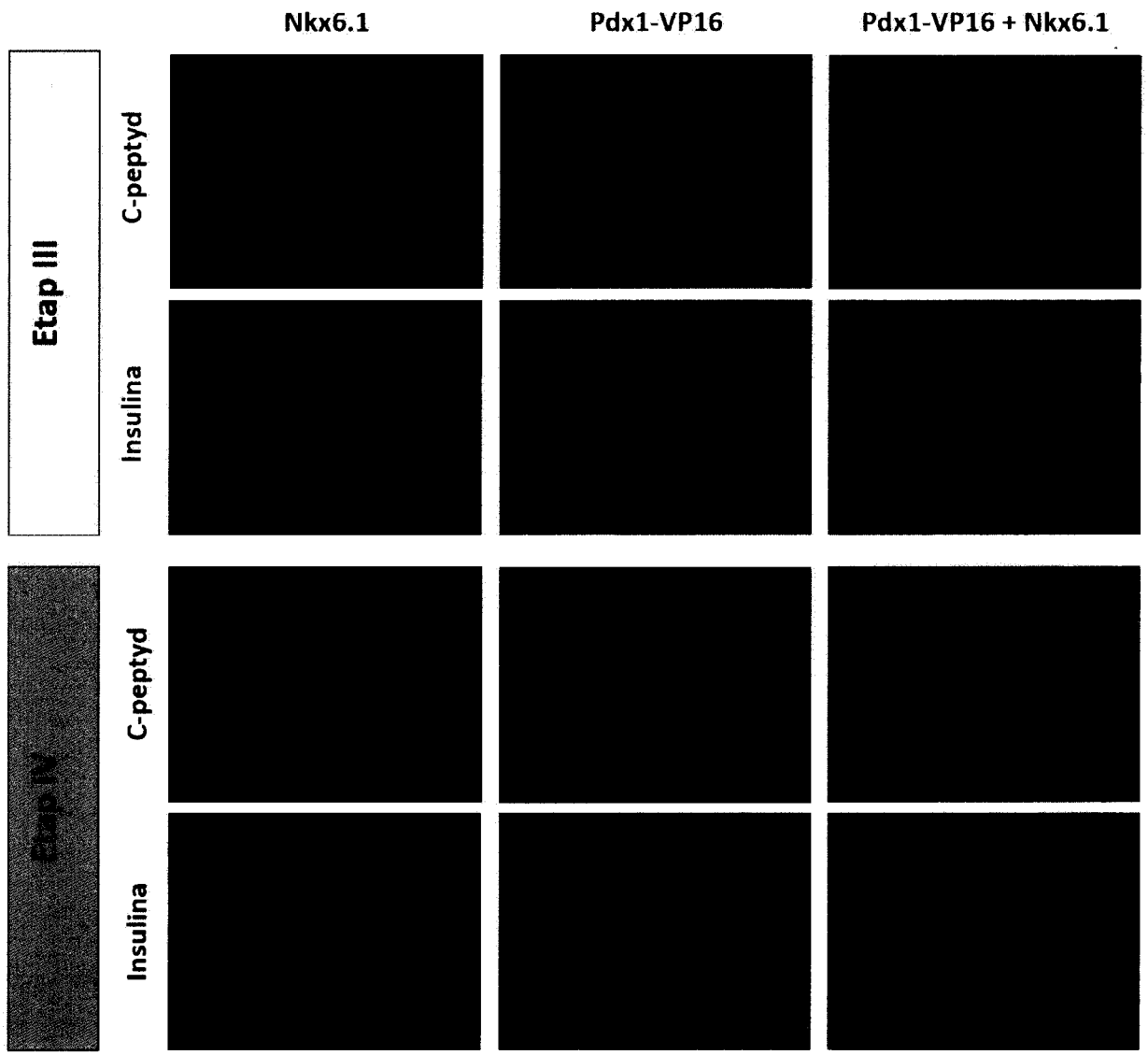
Rycina 1. Schemat różnicowania komórek pluripotentnych w kierunku komórek produkujących insulinę (IPC).



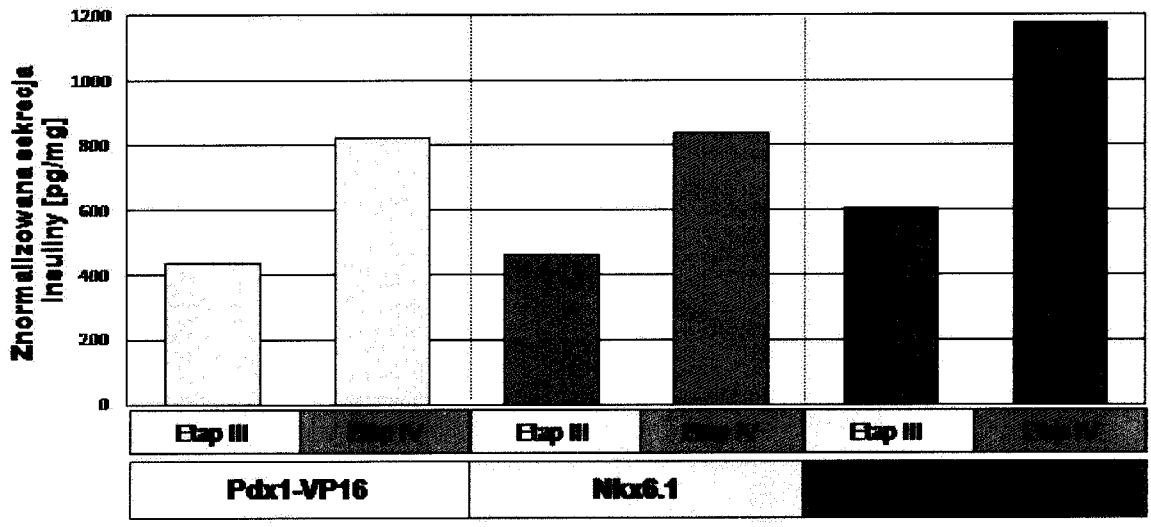
Rycina 2. Potwierdzenie pluripotentnego stanu otrzymanych iPSC. A.) Przykładowa kolonia otrzymanych iPSC o morfologii przypominającej embrionalne komórki macierzyste - drobne komórki upakowane ściśle w kolonie o wyraźnych brzegach. B.) Barwienie na aktywność alkalicznej fosfatazy. Enzym alkaliczna fosfataza jest aktywny w komórkach pluripotentnych i umożliwia przekształcenie substratu BCIP/NBT w nierozpuszczalny, fioletowy produkt reakcji. C.) Barwienie immunocytochemiczne otrzymanych iPSC z zastosowaniem przeciwciał przeciwko OCT3/4, TRA-1-60 i TRA-1-81. Obecność tych białek jest charakterystyczna dla komórek pluripotentnych. D.) Barwienie immunocytochemiczne fibroblastów z zastosowaniem przeciwciał przeciwko OCT3/4, TRA-1-60 i TRA-1-81.



Rycina 3. Potwierdzenie tożsamości otrzymanych komórek ostatecznej endodermy. Zróżnicowane komórki zostały scharakteryzowane przy pomocy barwienia immunocytochemicznego z użyciem przeciwciał przeciwko FOXA2 i E-kadherynie. Kanał zielony - odpowiednio FOXA2 i CXCR4, kanał niebieski - DAPI. Zdjęcia zostały również nałożone na siebie



Ryc. 4. Produkcja insuliny i c-peptydu przez komórki IPC uzyskane przez różnicowanie indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych (iPSC) z zastosowaniem opracowanego protokołu. Rycina przedstawia wyniki barwienia immunocytochemicznego na komórkach IPC z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko Insulinie i C-peptydowi. Kwas 4-izopropylobenzoesowy był dodawany do medium na III lub IV etapie różnicowania. Eksperyment został przeprowadzony na komórkach, które uprzednio zostały ustabilizowane z konstruktami zawierającymi czynniki transkrypcyjne Nkx6.1, Pdx1-VP16 lub Nkx6.1 i Pdx1-VP16



Rycina 5. Produkcja insuliny przez komórki IPC z wykorzystaniem testu ELISA. Otrzymane komórki IPC, w których indukowano ekspresję wprowadzonych transgenów na różnych etapach, poddano testowi na sekrecję insuliny. Wykres przedstawia znormalizowaną produkcję insuliny względem białka całkowitego.