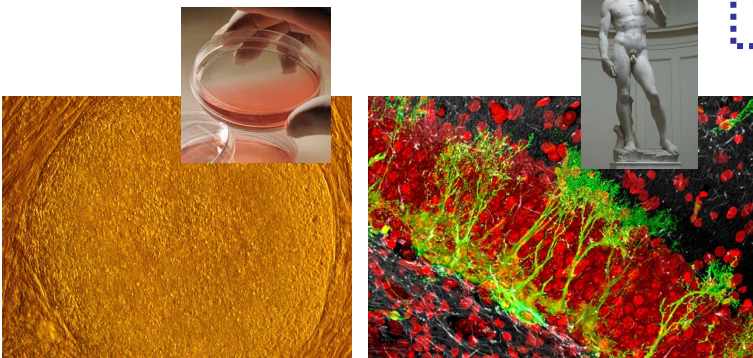
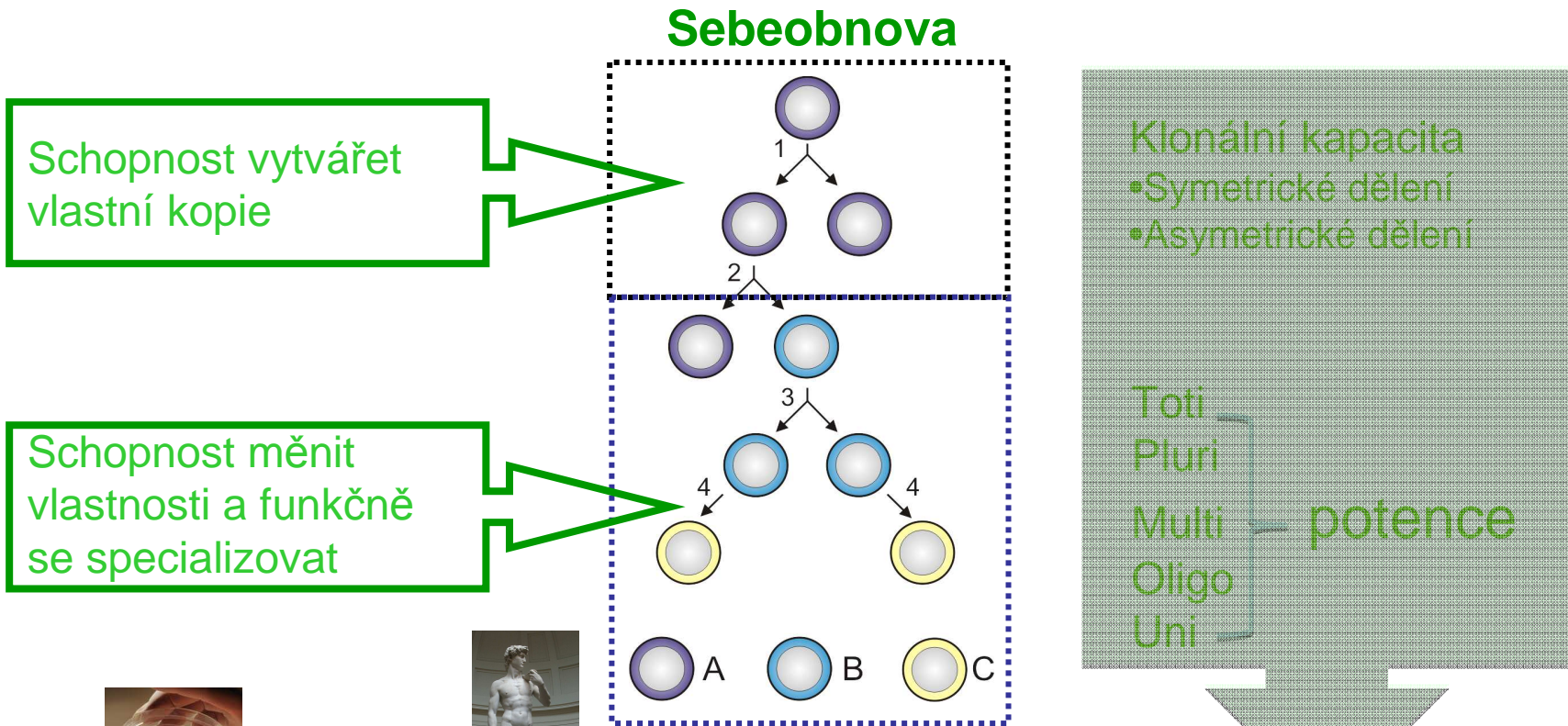


Kmenové buňky a strategie buněčné terapie



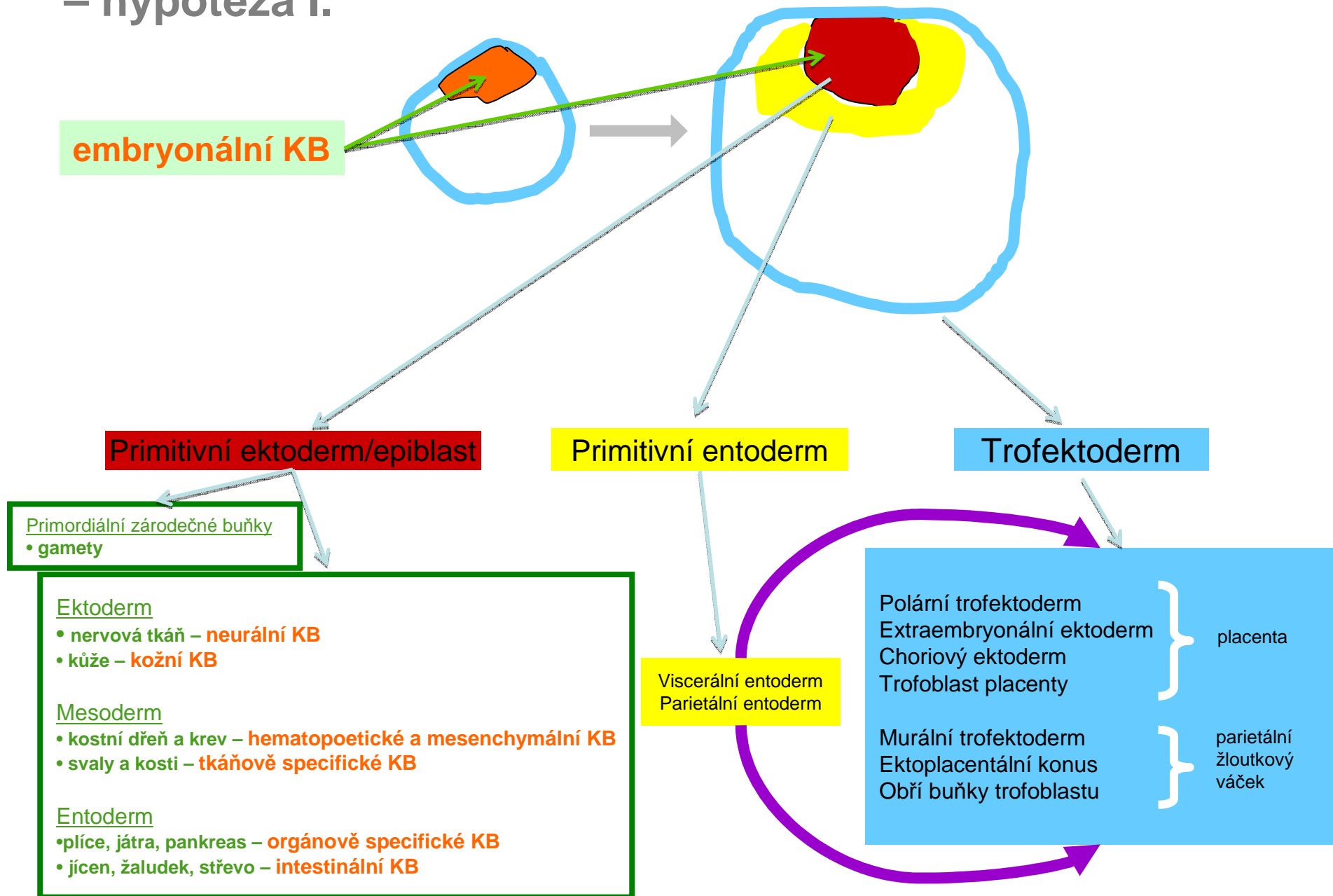
**Vyjmenujte co nejvíce rozdílů mezi
embryonálními kmenovými buňkami
a tzv. dospělými kmenovými buňkami**

Kmenové buňky: kriteria a definice

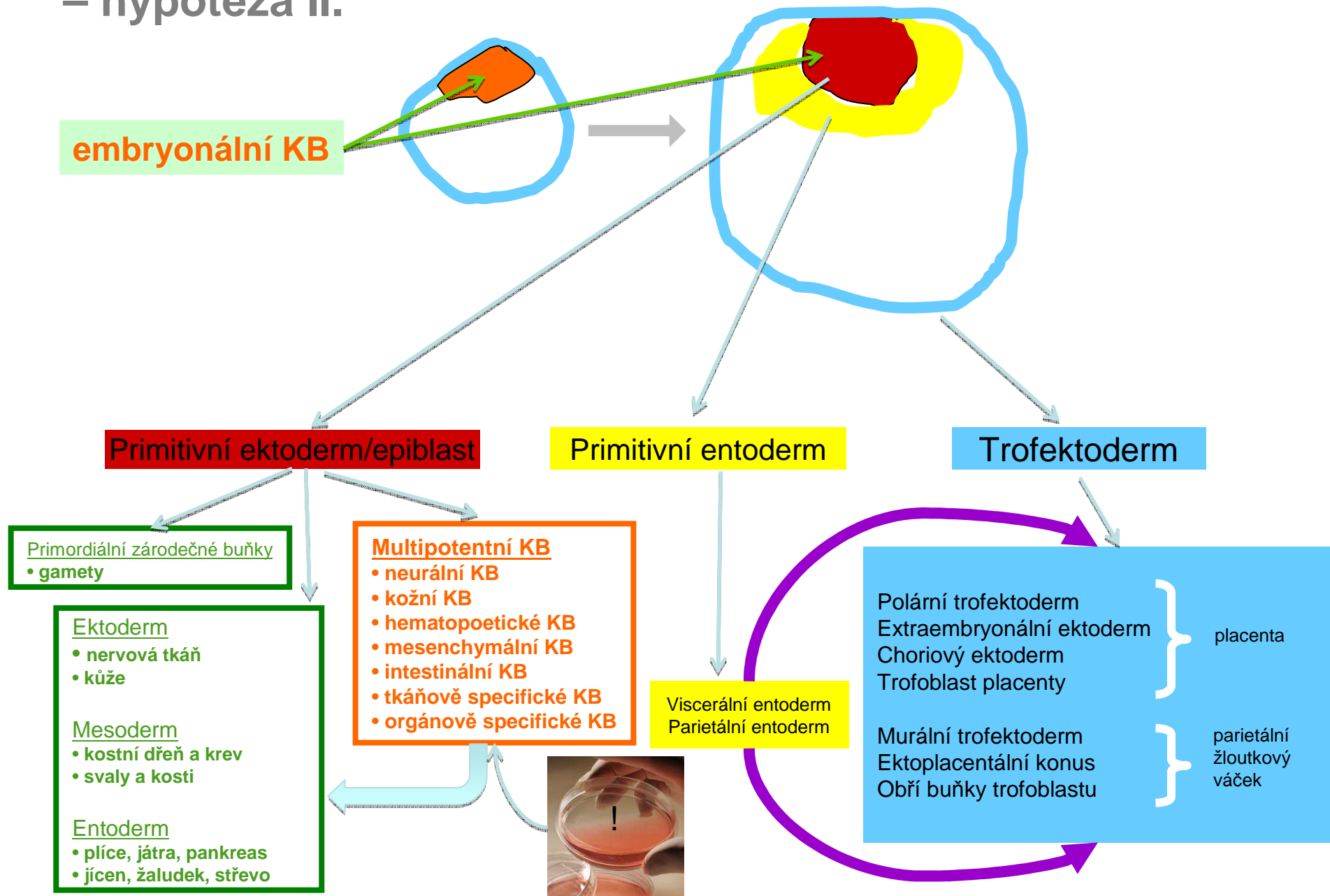


- Embryonální kmenové buňky
- “Dospělé” kmenové buňky
- Indukované pluripotentní kmenové buňky

Původ a vývojová ontogeneze kmenových buněk (KB) – hypotéza I.



Původ a vývojová ontogeneze kmenových buněk (KB) – hypotéza II.



Použití KB: “From bench to bedside”

Téma pro výzkum

- Mechanismus sebeobnovy KB
- Mechanismus diferenciací a zastavení diferenciací - nádorové paradigma
- Mechanismus dělení buněk a regulací buněčného cyklu
- Vznik genomických abnormalit se vztahem k nádorům
- Mechanismus časného vývoje člověka

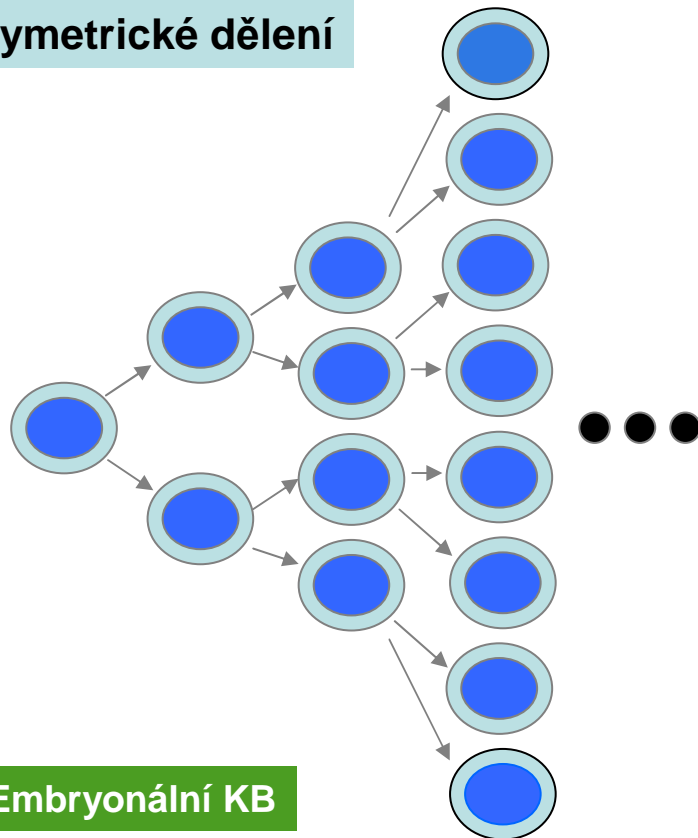
Budoucnost biomedicíny

- Buněčná terapie
- Modely nemocí
 - Vývoj léčiv
- Testování toxicity

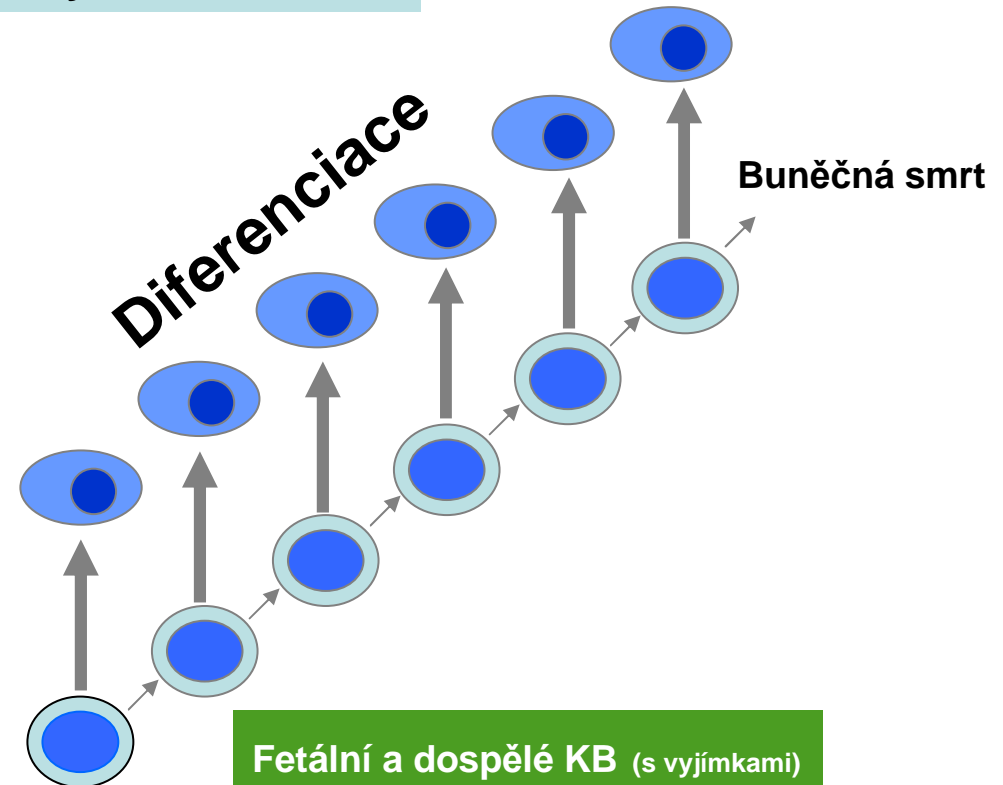
Mechanismus sebeobnovy kmenových buněk (KB)

Sebeobnova = tzv. self-renewal; nejdůležitější vlastnost kmenových buněk; schopnost vytvořit identické dceřiné buňky

Symetrické dělení



Asymetrické dělení

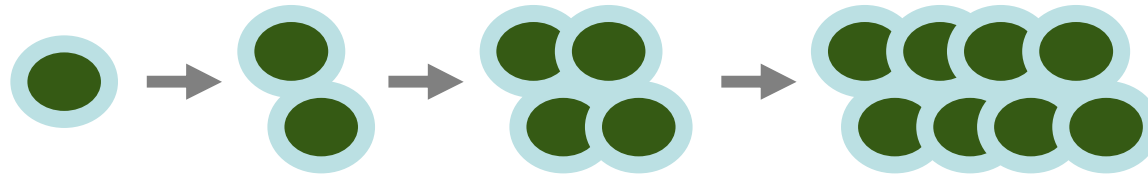


Kombinace obou mechanismů = neurální KB !!!

Kmenové buňky mají obecně velké jádro, tzv. otevřený chromatin a málo cytoplazmy

Kapacita KB replikovat se *in vivo* a *in vitro*

Replikační kapacita = počet zdvojení populace



IN VIVO

Embryonální a indukované KB -v podmínkách *in vivo* neexistují !!!
Dospělé KB -po celý život (???)

IN VITRO

Embryonální a indukované KB -neomezená
Neurální KB -neomezená (?)
Dospělé KB -několik dělení

Pro srovnání



Somatické buňky

Transformované (nádorové) buňky

-0-50x

-neomezená

Diferenciační kapacita KB

totipotence → pluripotence → multipotence → oligopotence → unipotence

zygota

Embryonální KB

Hematopoetické KB

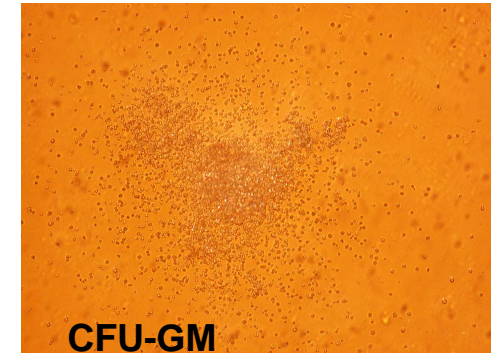
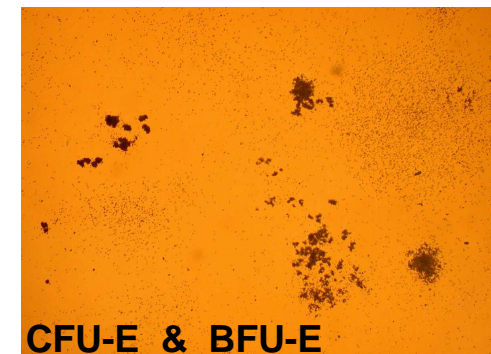
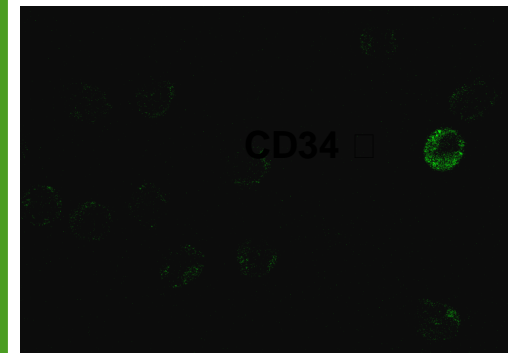
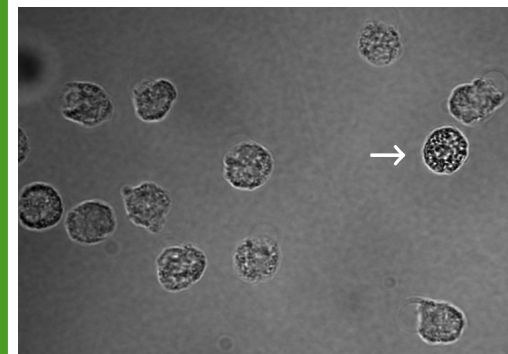
Gastrointestinální KB

KB prostaty

Nediferencované KB

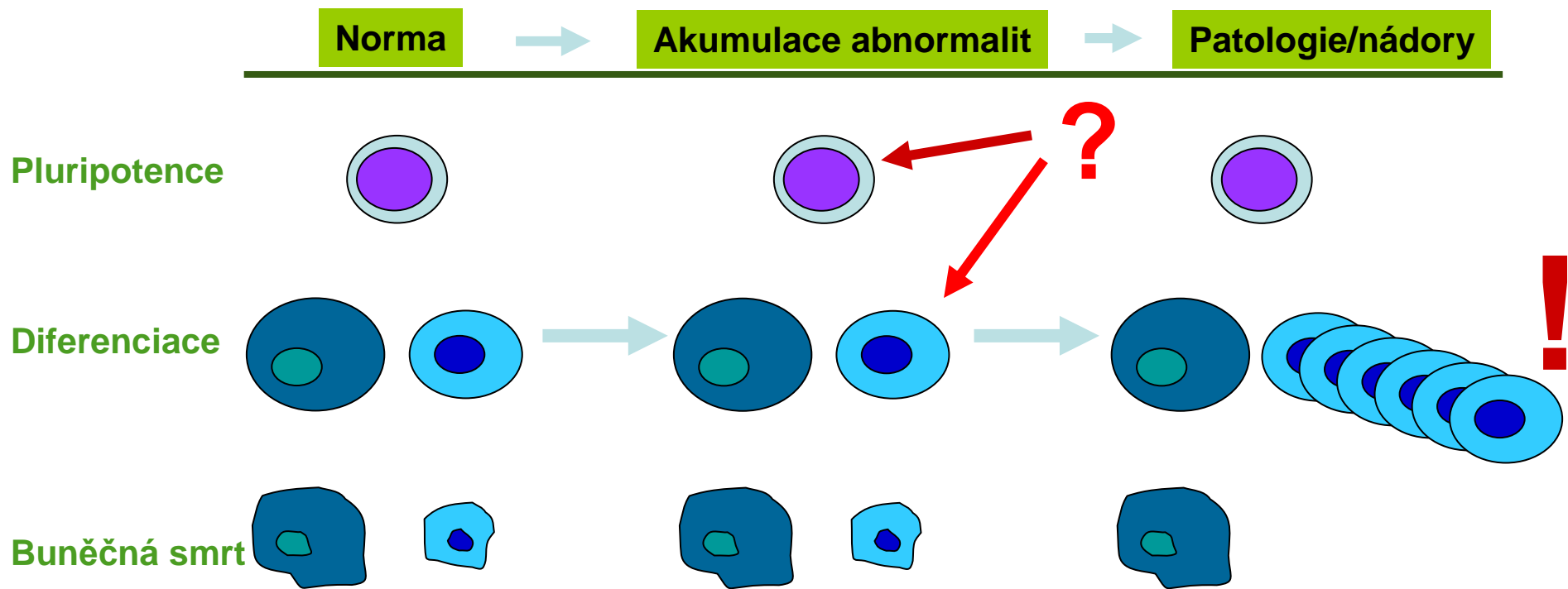
Kolonie mnoha tisíc buněk

Neurony



Příklady

Pochopení molekulárních mechanismů, které řídí sebeobnovu a diferenciaci normálních KB představuje klíč k pochopení vzniku mnoha nádorových onemocnění !!!



+ Hypotéza nádorových kmenových buněk

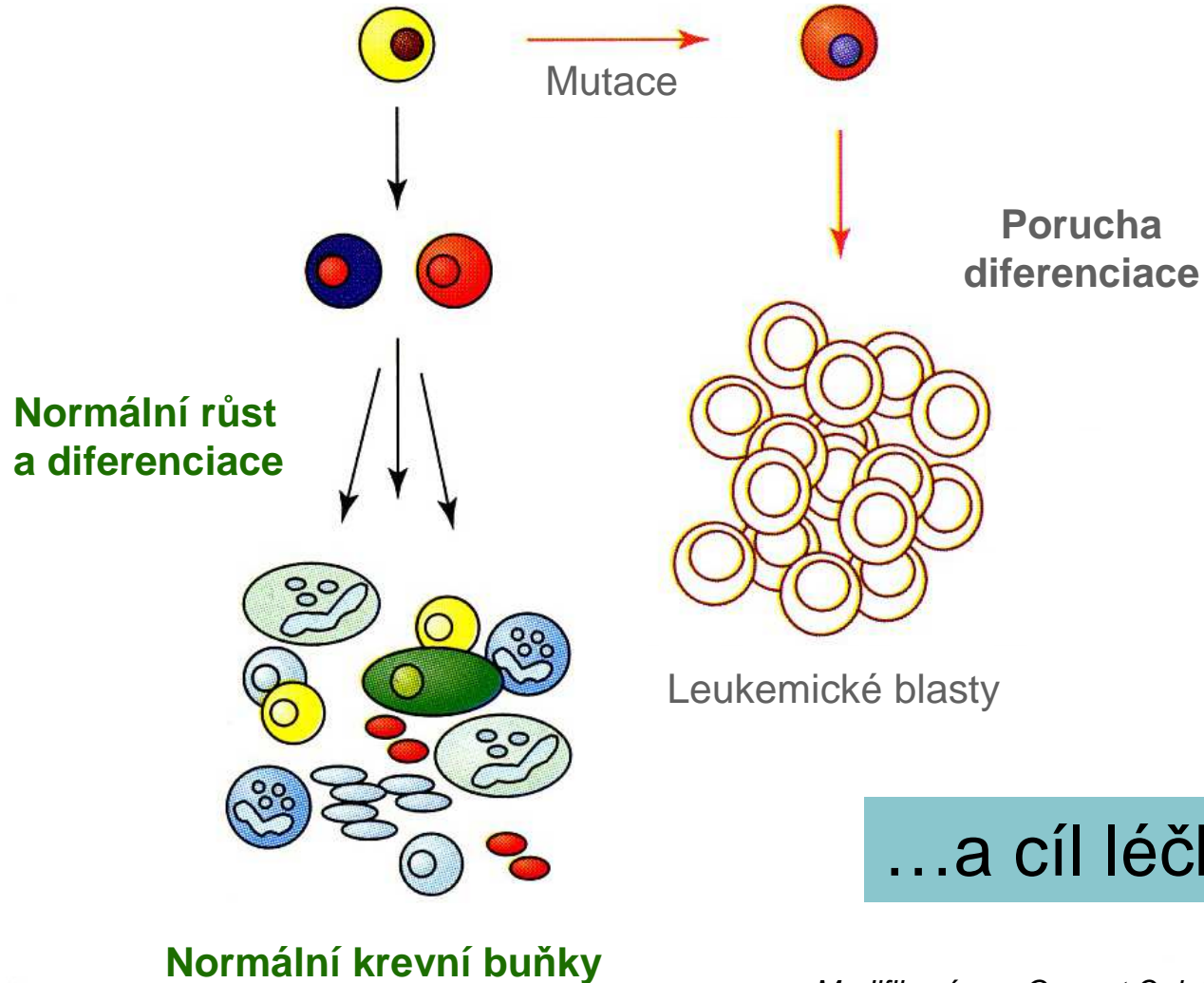
Nádory obsahují "mutované" KB, které jsou schopné re-populovat nádor nebo mohou být dokonce jeho počátkem - např. nádory tlustého střeva a nádory mozku

Porucha diferenciace jako zdroj nemoci

Jeden příklad za všechny

Hematopoetická kmenová buňka

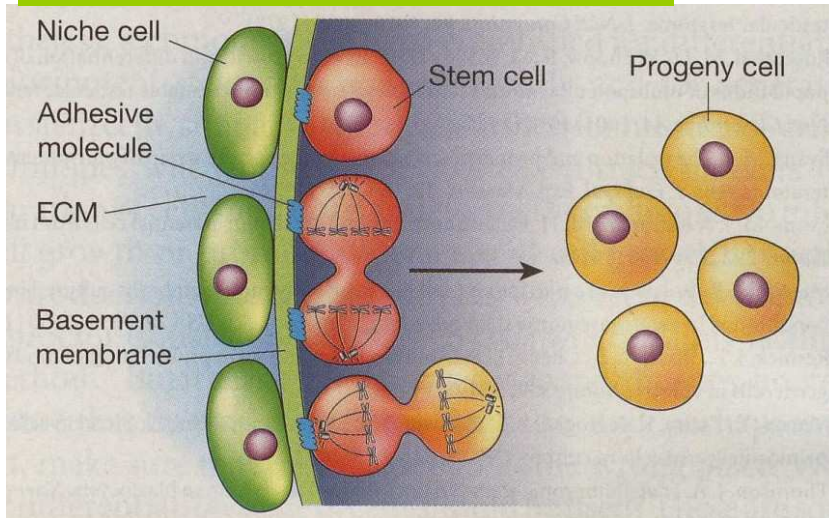
Leukemická kmenová buňka



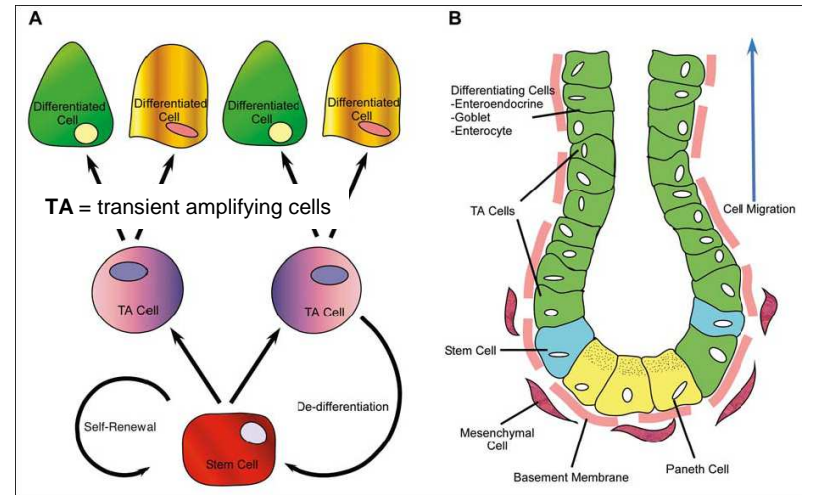
Modifikováno z Current Opinion in Cell Biology

Dospělé KB a jejich „niche“

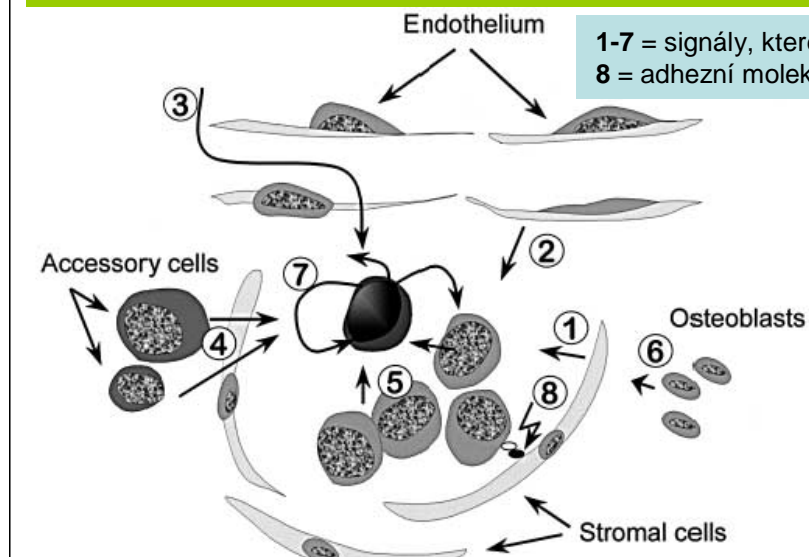
Obecná struktura a funkce „niche“



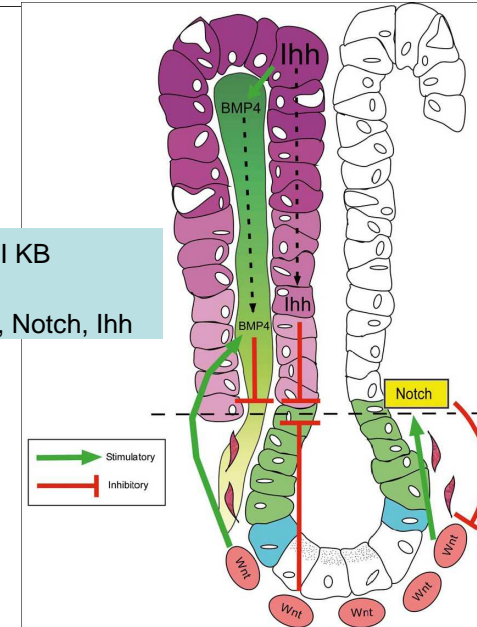
Hierarchie KB v jejich „niche“ (epiteliální GI KB)



Hematopoetické KB jsou v kostní dřeni



Signály, které definují „niche“ GI KB a regulují jejich proliferaci a diferenciaci - např. Wnt, BMP, Notch, Ihh



“Niche” je charakterizováno přítomností několika typů podpůrných buněk a mnoha signálními molekulami, které společně vytvářejí podmínky pro přežívání, případně diferenciaci KB

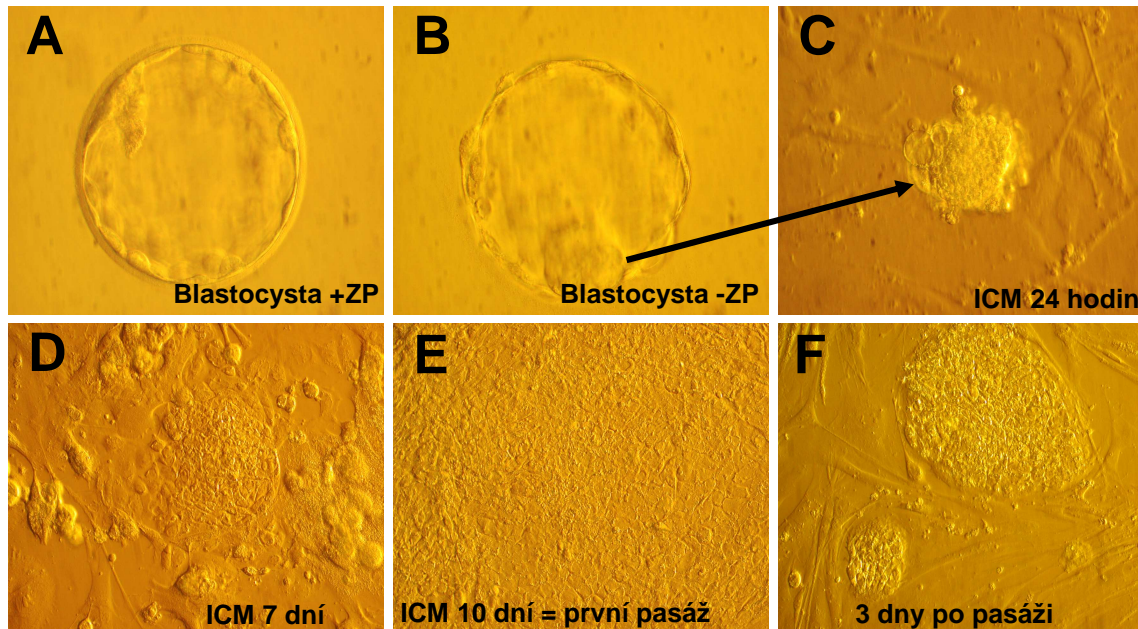
Linie KB - neomezený zdroj pluripotentních buněk

(“Dostupnost” kmenových buněk pro manipulace *in vitro*)

Příklady dospělých KB

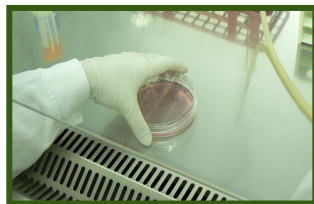
Embryonální KB

Hematopoetické KB



- „niche“ KB
- mobilizace KB
- buněčné třídění

CD34+
CD133+
c-kit+
HLA-DR-
CD38-
CD71-
CD45-



Schopnost růst a replikovat se *in vitro*

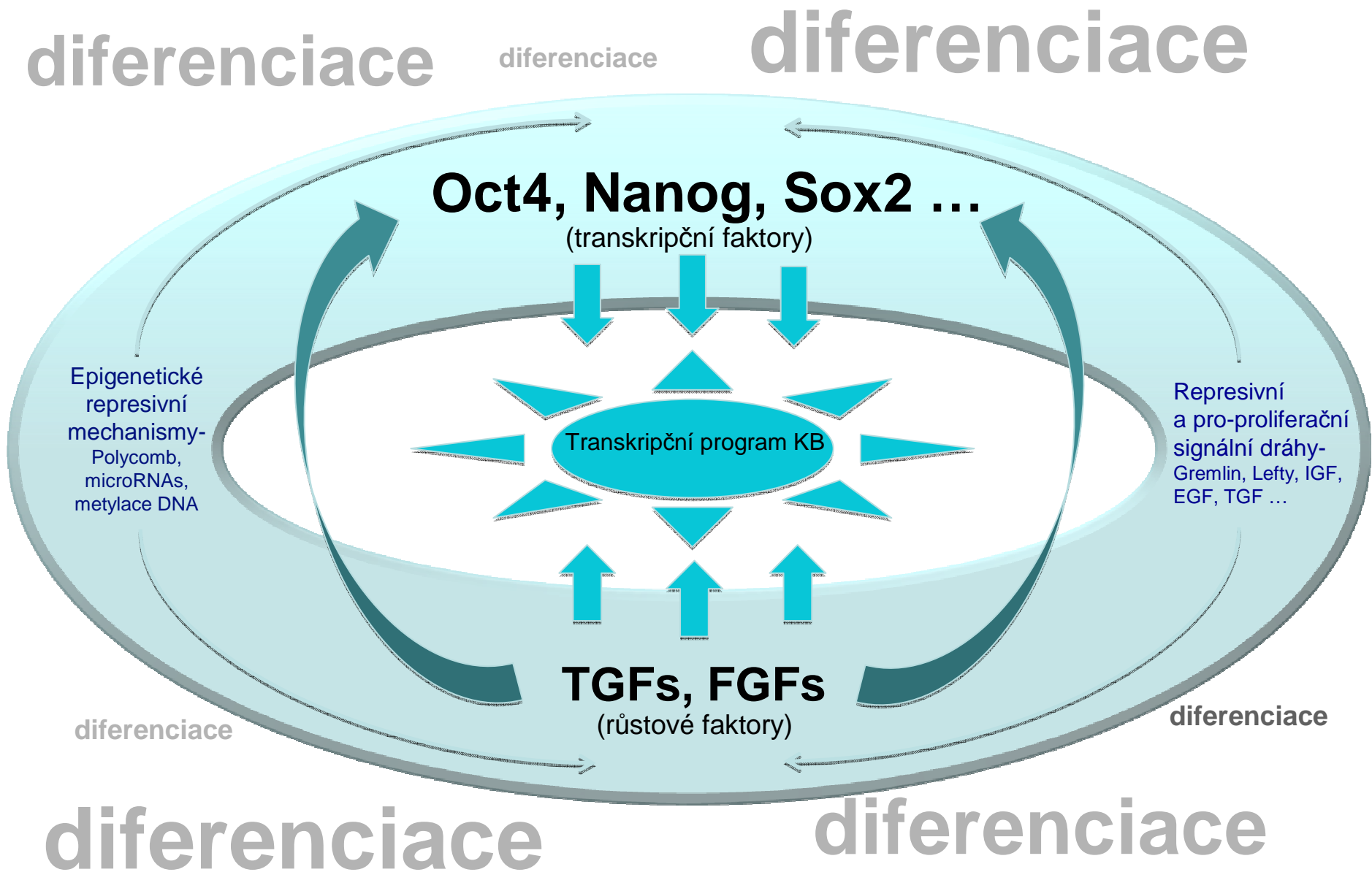
Buněčná linie !!!

X

Buněčná subpopulace !!!

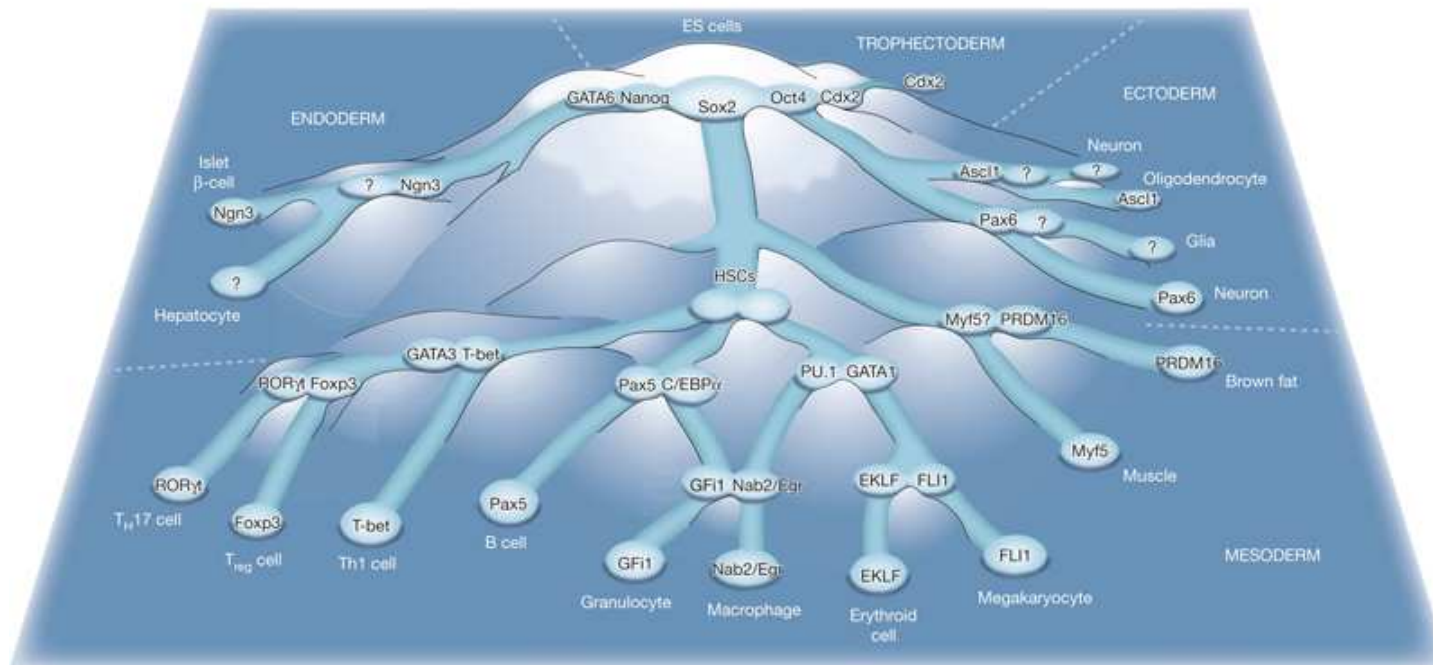
Možnost derivací linií KB jako modelů genetických onemocnění

Tajemství kmenovosti pluripotentních kmenových buněk



Co řídí a určuje diferenciaci KB *in vivo* a *in vitro*:

Liniová diferenciace embryonálních kmenových buněk ve “svažitě krajině hlubokých údolí” (= STABILITA) a “vysokých kopců” (= NESTABILITA)



Thomas Graf & Tariq Enver *Nature* **462**, 587-594 (2009) doi:10.1038/nature08533

Transkripční a růstové faktory!

nature

Historie objevů kmenových buněk (KB)

Od Prométhea k...



- „Omnis cellula e cellula“ - Rudolf Virchow 1855
- Buňky s regeneračním potenciálem v krvi -1917
- „Kolonie-formující“ buňky v kostní dřeni -1961
- Embryonální karcinomové buňky -1974

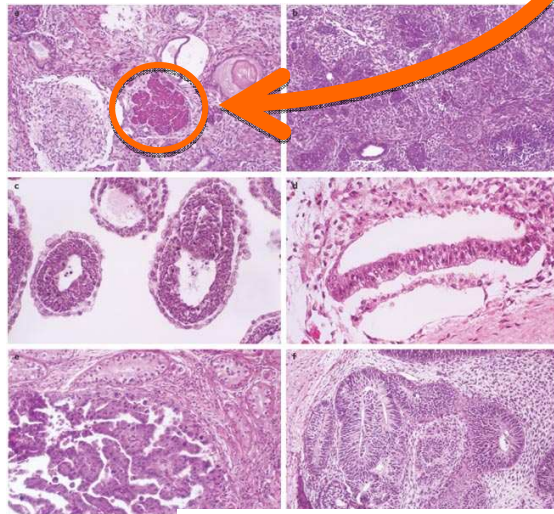
- Tkáňové a orgánové KB ~1980
- Myší embryonální KB -1981
- Embryonální KB z lidských blastocyst -1998
- Indukované pluripotentní KB (tzv. iPS cells) - 2006

Možnost kultivací KB *in vitro* a preklinické testy !!!

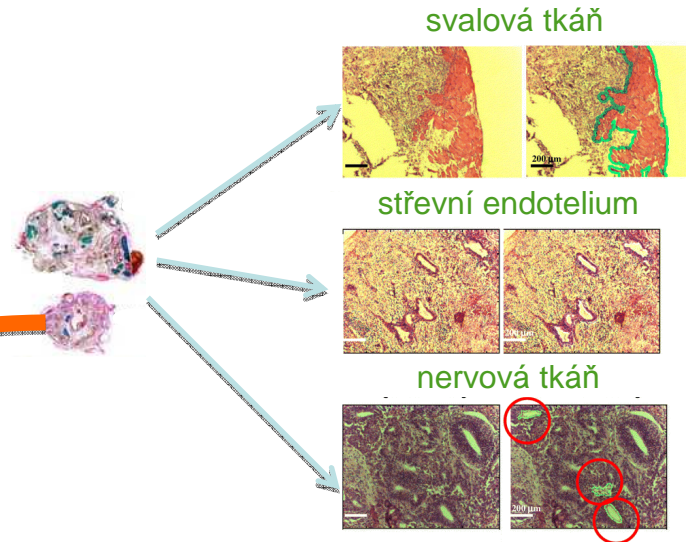
Kde je skutečný počátek éry pluripotentních KB in vitro?

1954 – Stevens & Little

“Spontánně” vznikající testikulární nádory,
teratokarcinomy, u myši kmene 129



Davor Solter, Nat Rev Genet., 2006



1964 – Kleinsmith & Pierce

Teratokarcinomy obsahují morfologicky
rozlíšitelnou populaci buněk, které mají
kapacitu diferencovat do různých buněčných
typů – **embryonální karcinomové buňky**



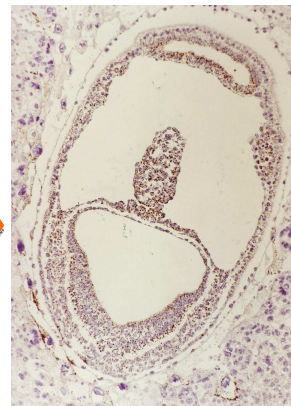
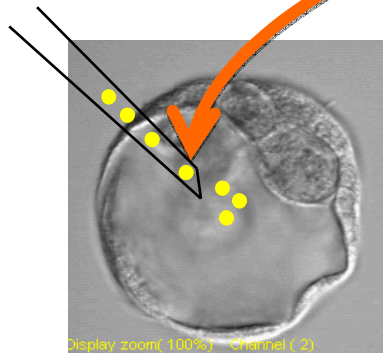
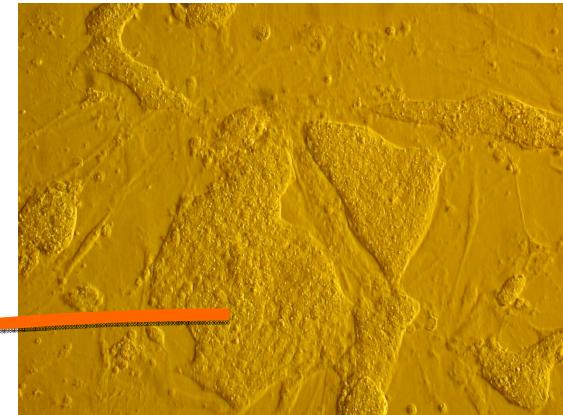
Gail
Martin

Martin
Evans

Buňky získané z teratokarcinomů a udržované *in vitro* jsou pluripotentní

1974 – Martin & Evans

Embryonální karcinomové buňky lze udržovat dlouhou dobu *in vitro* a stále si udržují původní morfologii a exprimují markery nediferencovaných buněk - **SEBEOBNOVA**



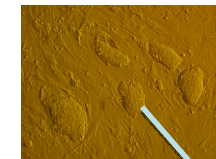
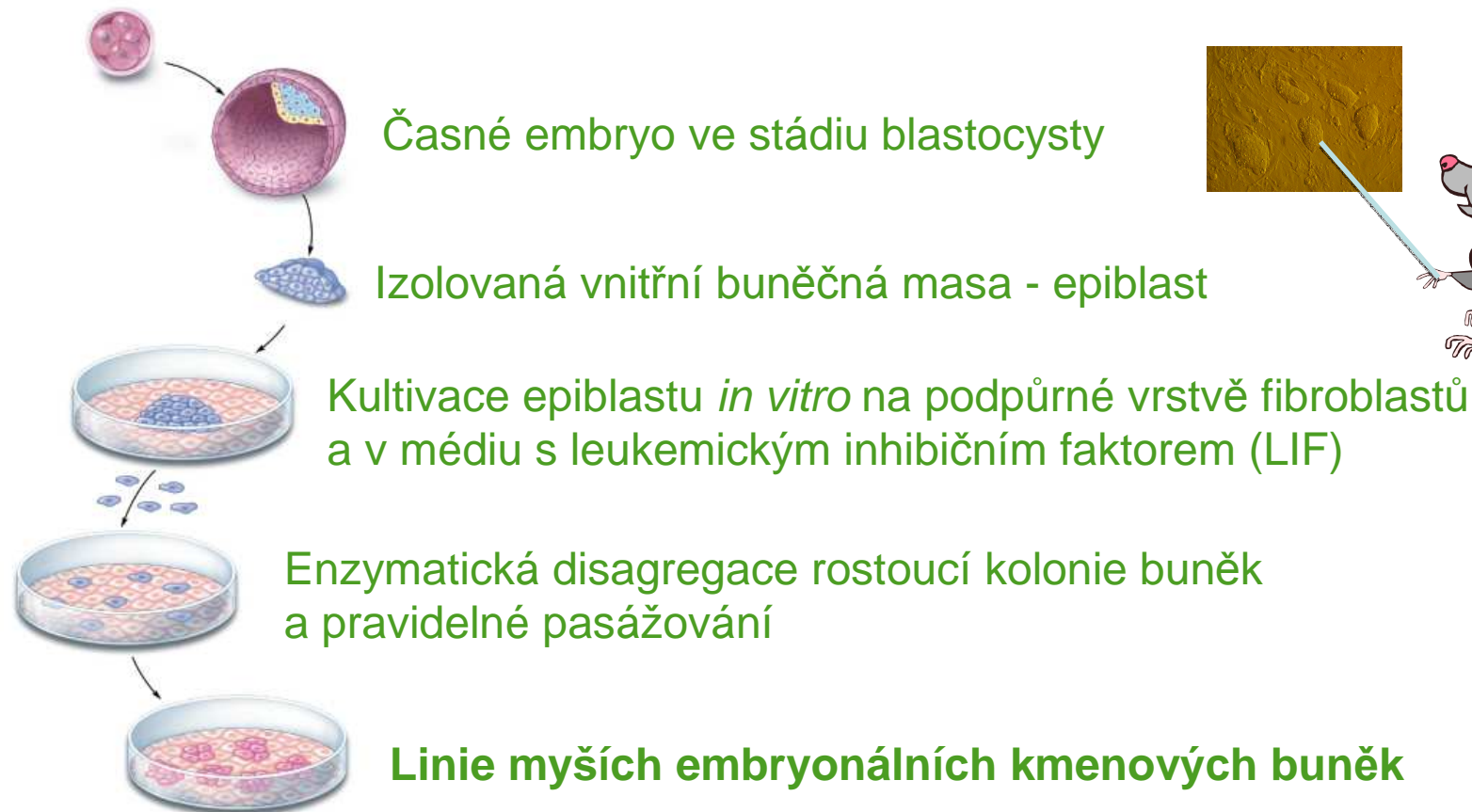
1974 – Martin & Evans

Po injekci embryonálních karcinomových buněk do embrya ve stádiu blastocysty je možné získat myši chiméry
-PLURIPOTENCE

1981 – Martin & Evans

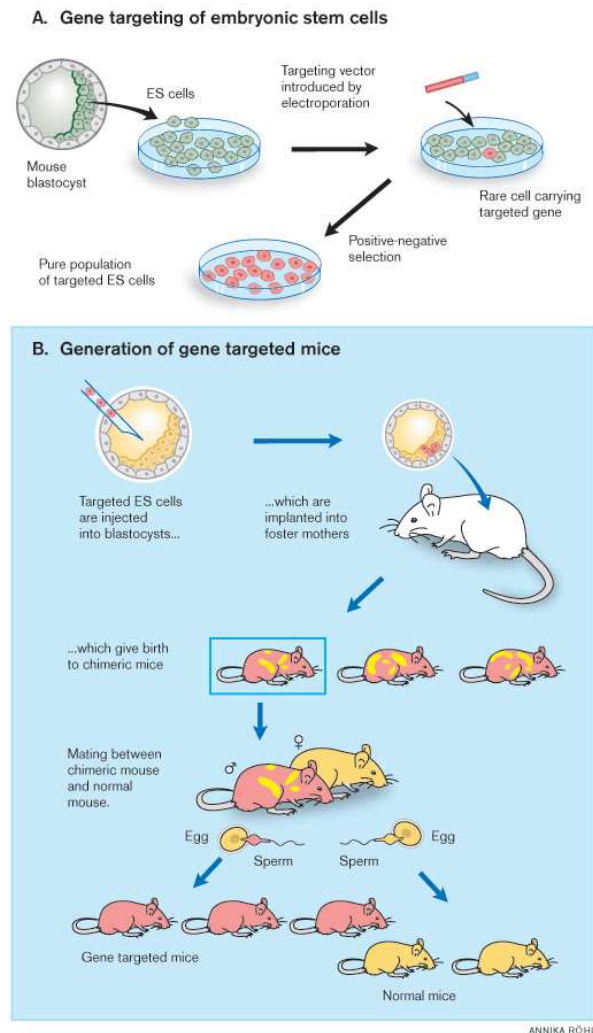
Linie pluripotentních kmenových buněk z myších embryí

– zásadní krok od pluripotentních buněk s nádorovým charakterem k normálním pluripotentním kmenovým buňkám



Nobelova cena za fyziologii a medicínu 2007

Vývoj technik pro produkci tzv. “knockout” myší prostřednictvím embryonálních kmenových buněk jako nosičů genů – možnost vytvořit živý organismus s požadovanou mutací v každé buňce těla



Sir Martin Evans

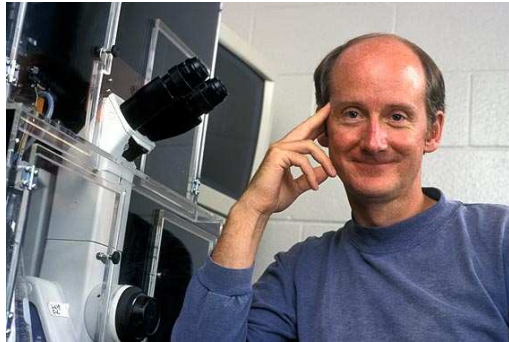


Mario R. Capecchi



Oliver Smithies

Embryonální kmenové buňky z lidských embryí v Madisonu a Brně



1998 - James Thomson

www.sciencemag.org SCIENCE VOL 282 6 NOVEMBER 1998

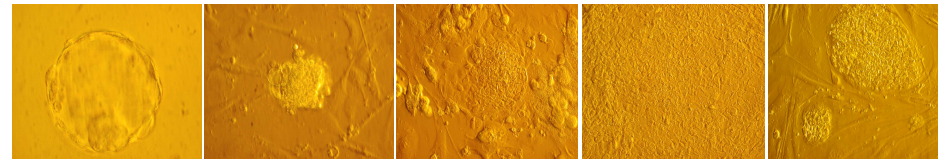
REPORTS

Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts

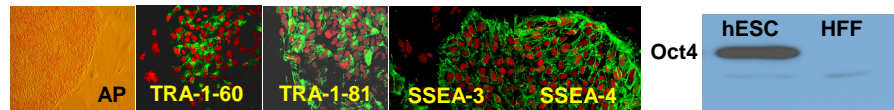
James A. Thomson,* Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall, Jeffrey M. Jones



2002/3 – Aleš Hampl & Petr Dvořák



Derivace a charakterizace linií



Martina Vodinská
Táňa Košková
Klára Koudelková
Iveta Peterková

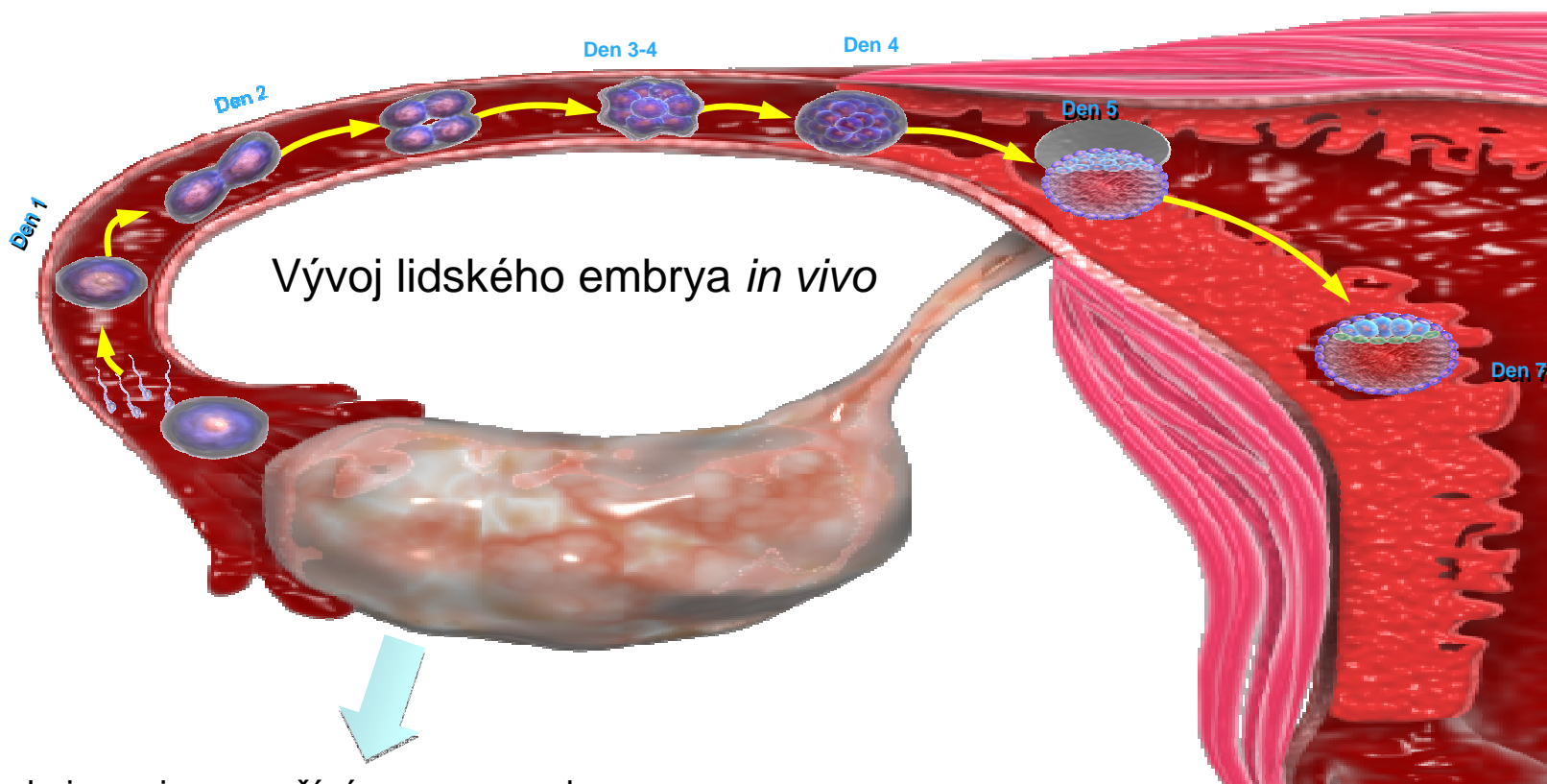
Czech stem-cell work heightens calls for EU ruling

Alison Abbott
Czech scientists say they have derived three human embryonic stem-cell lines from spare embryos stored at an *in vitro* fertilization clinic in Brno. This makes the Czech Republic the first of the eastern European countries poised to join the European Union (EU) to move into this controversial research area. It also adds to pressure on the EU to decide whether to fund research on newly derived stem-cell lines. This research is

allowed under strict ethical supervision in some EU countries, such as Britain and Sweden, but is banned in others, including Germany and Italy. Last week the Spanish government changed sides and approved a proposed law to allow the production of cell lines from spare embryos for research. The Czech Republic has no law controlling human embryonic stem-cell research. Eva Šyková, head of the Centre for Cell Therapy and Tissue Repair at Charles University in Prague, who developed the three cell lines

together with colleagues at the Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, says they are working to high ethical standards. They received informed consent from donor couples undergoing *in vitro* fertilization, she points out. The scientists are now characterizing the lines, and plan to study the cells' potential to develop into differentiated cells such as neurons, which they believe could have therapeutic potential. They presented their results at a meeting in Prague last month.

Etické a legislativní aspekty derivace kmenových buněk z lidských embryí



Pro derivace jsou používána pouze embrya získaná po fertilizaci a vývoji *in vitro*

&

- Embrya nepoužitelná pro léčbu
- Informovaný souhlas dárců
- Souhlas etické komise
- Dobrý vědecký důvod
- Potenciál pro medicínu

+

Year 2006

COLLECTION OF LAWS OF THE CZECH REPUBLIC

PROFILE OF THE REGULATION:

Title of the Regulation:
Act on Research on Human Embryonic Stem Cells and Related Activities and on
Amendment to Some Related Acts
Citation: 227/2006 Coll. *Part:* 75/2006 Coll.

=



Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors

Kazutoshi Takahashi¹ and Shinya Yamanaka^{1,2,*}

¹Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

²CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 339-0015, Japan

*Contact: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp

DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024



Albert Lasker basic medical research award 2009



John Gurdon
University of Cambridge



Shinya Yamanaka
Kyoto University





The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012
Sir John B. Gurdon, Shinya Yamanaka

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012

Sir John B. Gurdon

Shinya Yamanaka



Photo: Creative Commons Attrib. 2.0
Generic license

Sir John B. Gurdon

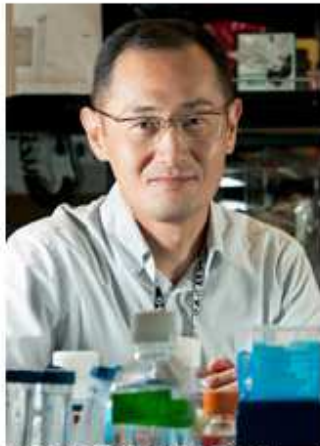
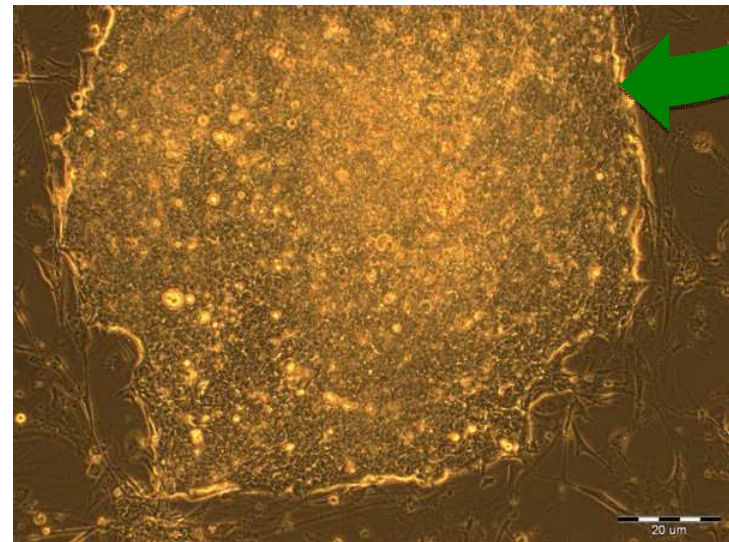
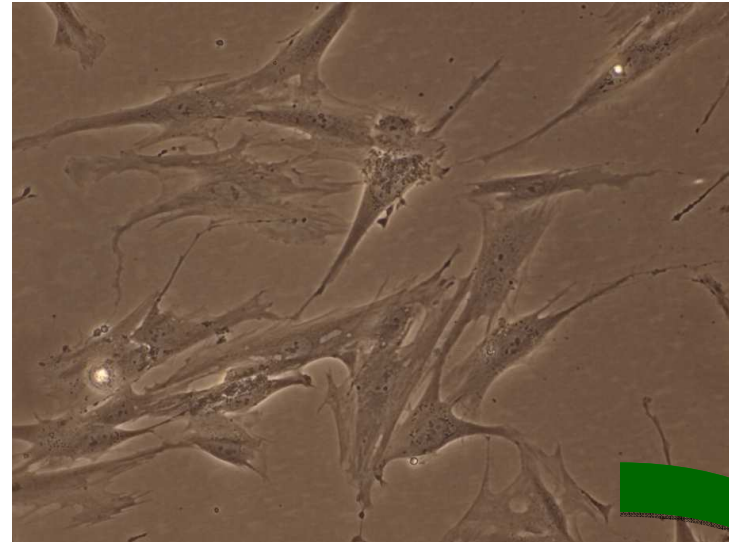


Photo: Gladstone Institutes/Chris
Goodfellow

Shinya Yamanaka

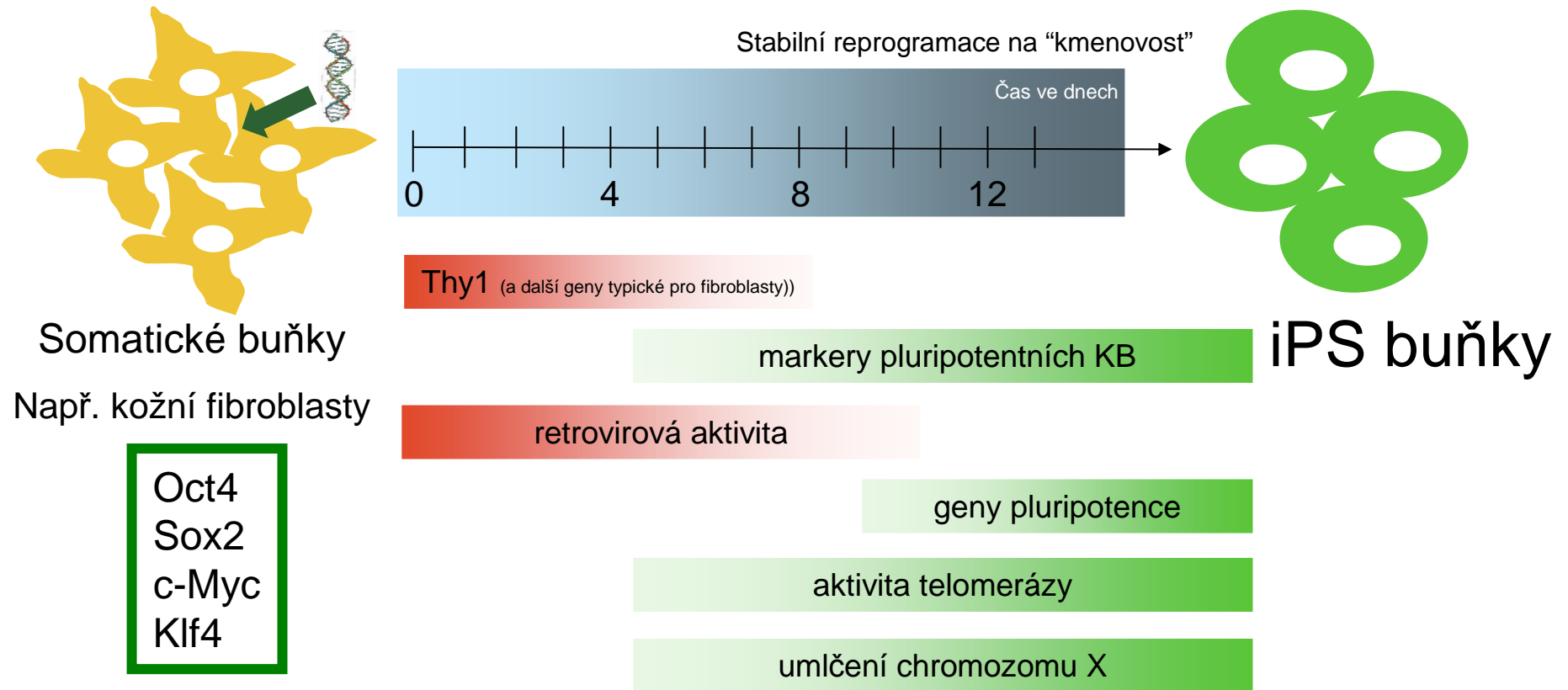
The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012 was awarded jointly to Sir John B. Gurdon and Shinya Yamanaka "for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent"



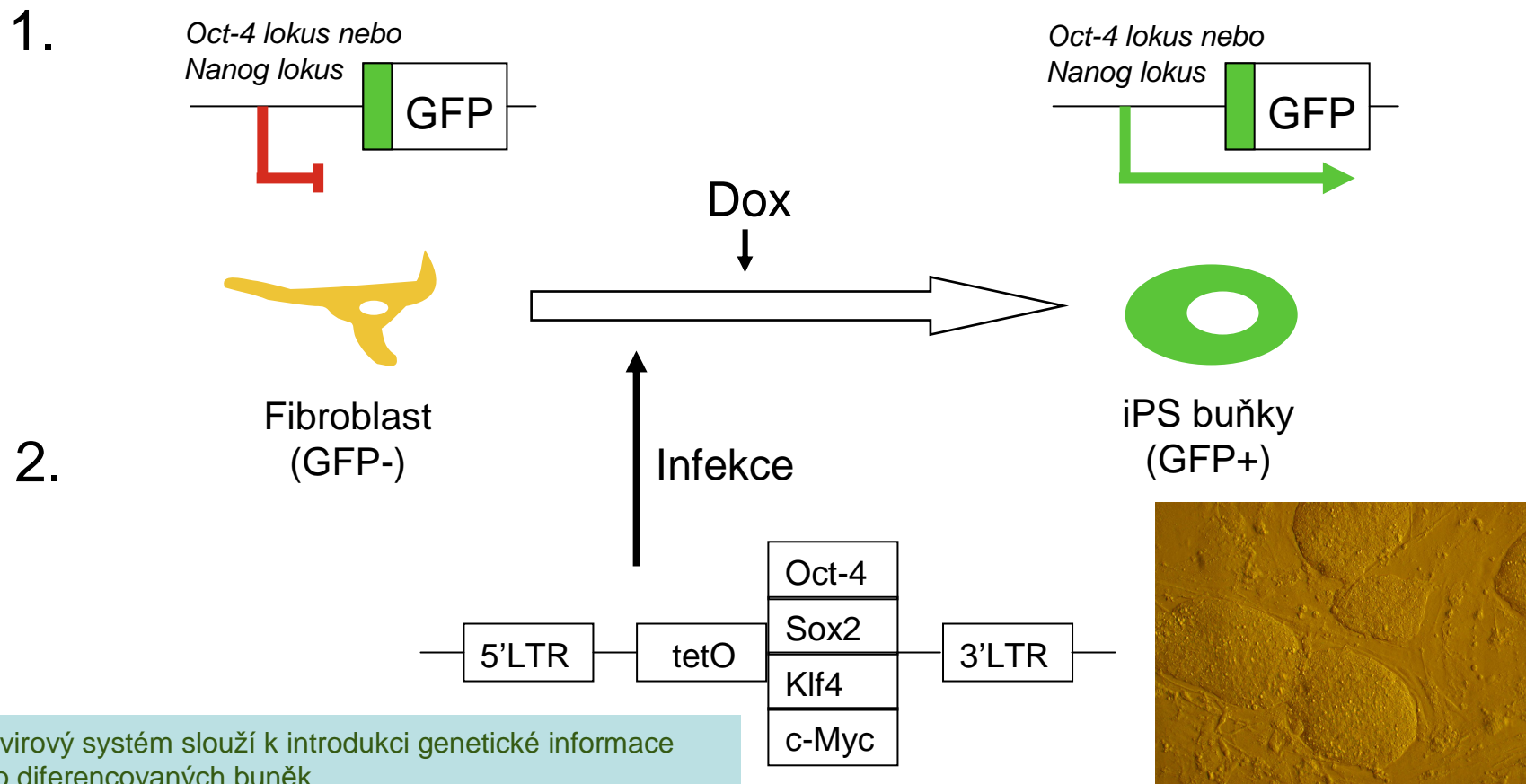
Indukované pluripotentní KB (Yamanaka 2006)

Alternativní zdroj pluripotence - **Indukované pluripotentní KB (iPS cells)**
- KB vytvořené ze somatických tj. diferencovaných buněk pomocí genetické metody

Kinetika reprogramace fibroblastů do pluripotentních KB - *relativně krátká cesta zpět*



Technologie derivace indukovaných pluripotentních KB pomocí indukovatelného lentivirového systému - dvoukrokový proces

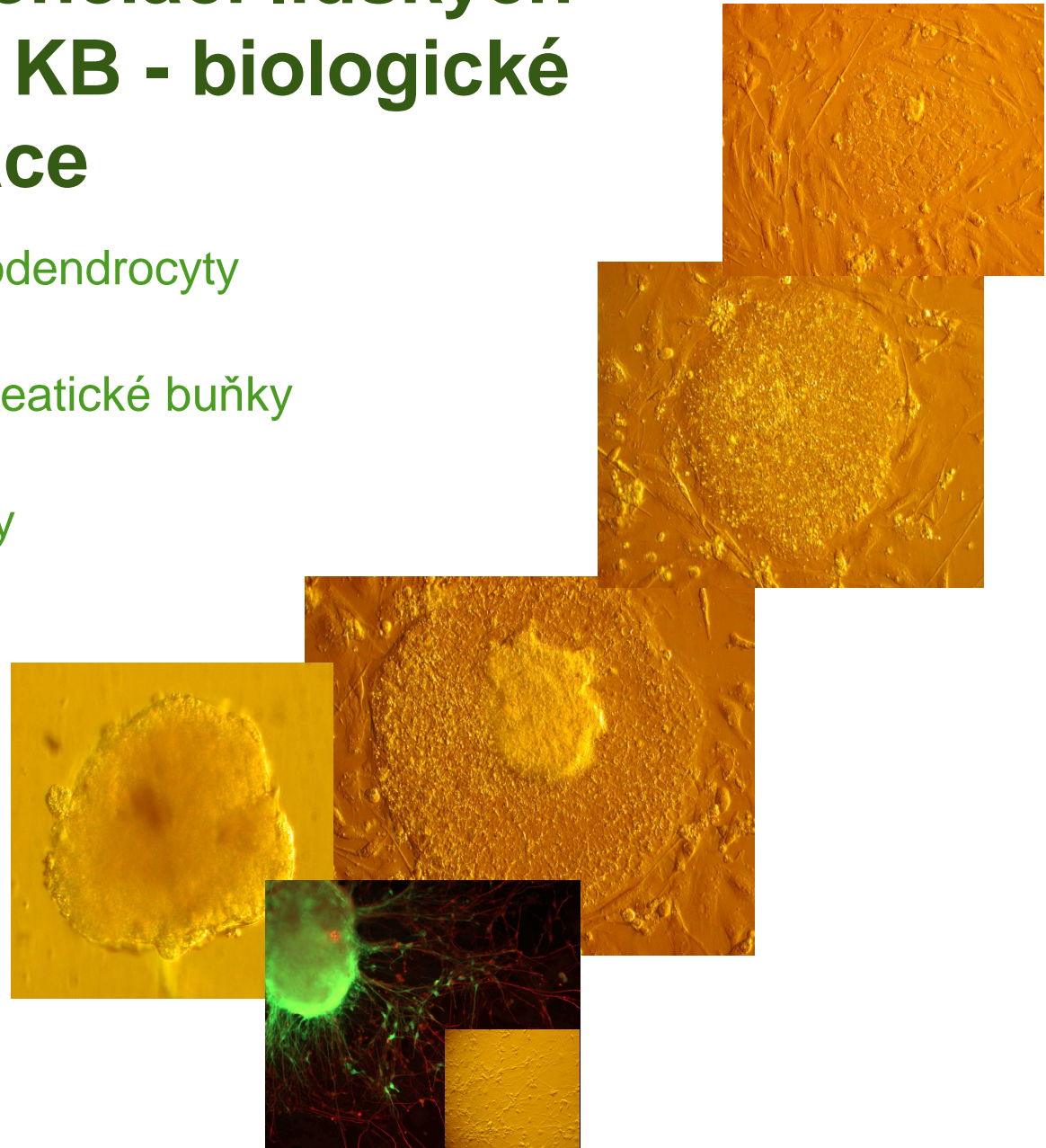


- Lentivirový systém slouží k introdukci genetické informace (TF) do diferencovaných buněk
- Transkripční faktory reprogramují diferencované buňky na „kmenovost“ se všemi vlastnostmi
- Jsou vyvíjeny nové strategie reprogramace, např. bez virových vektorů**

GFP = Green Fluorescent Protein

Pokroky v diferenciaci lidských pluripotentních KB - biologické modely a aplikace

- Neurony, astrocyty, oligodendrocyty
- Kardiomyocyty
- Insulin-produkující pankreatické buňky
- Krevní buňky
- Imunokompetentní buňky
- Endoteliální buňky
- Buňky trofoblastu
- Respiratorní buňky
- Osteoblasty
- Hepatocyty
- Melanocyty
- Buňky prostaty
- Zárůdečné buňky



Lidské pluripotentní kmenové buňky mají největší vědecký i terapeutický potenciál do budoucnosti:

- Protože je umíme množit v podmínkách *in vitro* aniž by diferencovaly
- Protože se relativně dobře studují (také na molekulární úrovni)
- Protože mají velkou diferenciační kapacitu
- Protože jsou vyvinuty nebo vyvíjeny účinné diferenciační protokoly
- Protože jsou relativně snadno geneticky manipulovatelné

Protože o nich víme nejvíce !

Pluripotent stem cells in treatment of human diseases

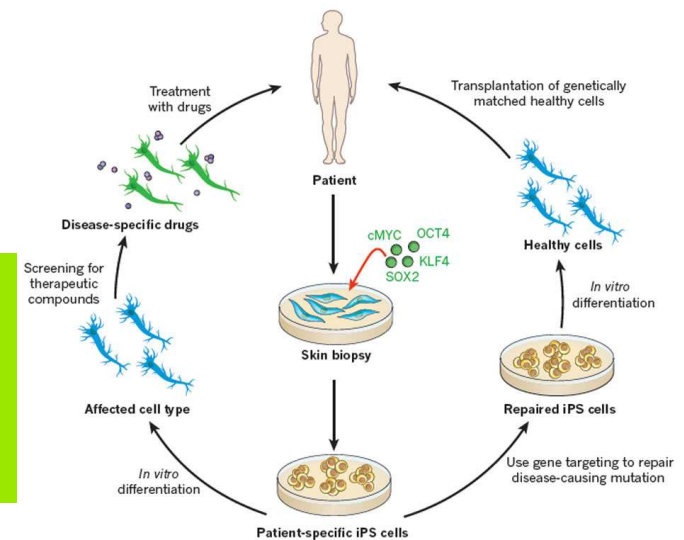
Three major access roads to get:

- Generation of mutant pluripotent stem cells for studies of the pathophysiology of diseases and drug development

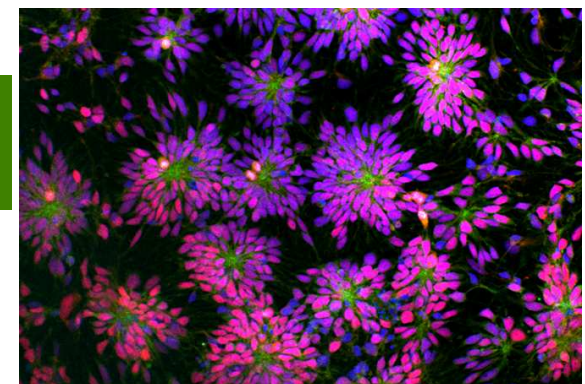
- *Ex vivo* repair of genetic mutations in patient-derived somatic cells that are reprogrammed into pluripotent stem cells (iPS cells) followed by differentiation into desired cell types and transplantation

- Replacement of missing or damaged cells by functional cells derived from pluripotent stem cells

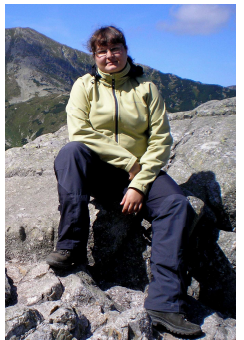
← About 45 human diseases modelled with iPS cells
13 diseases phenocopied in differentiated cells



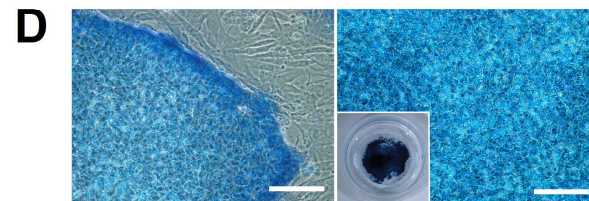
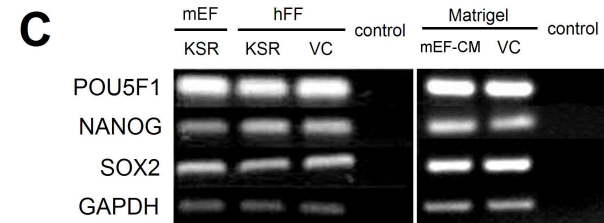
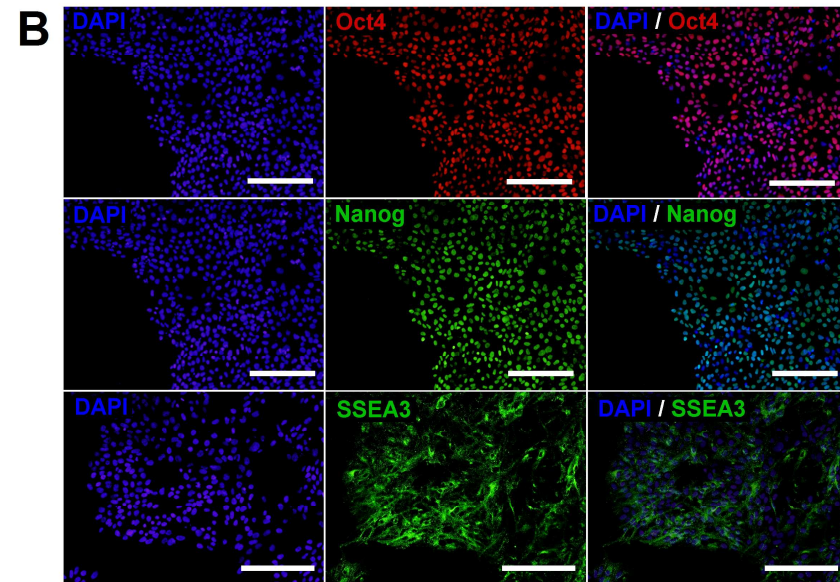
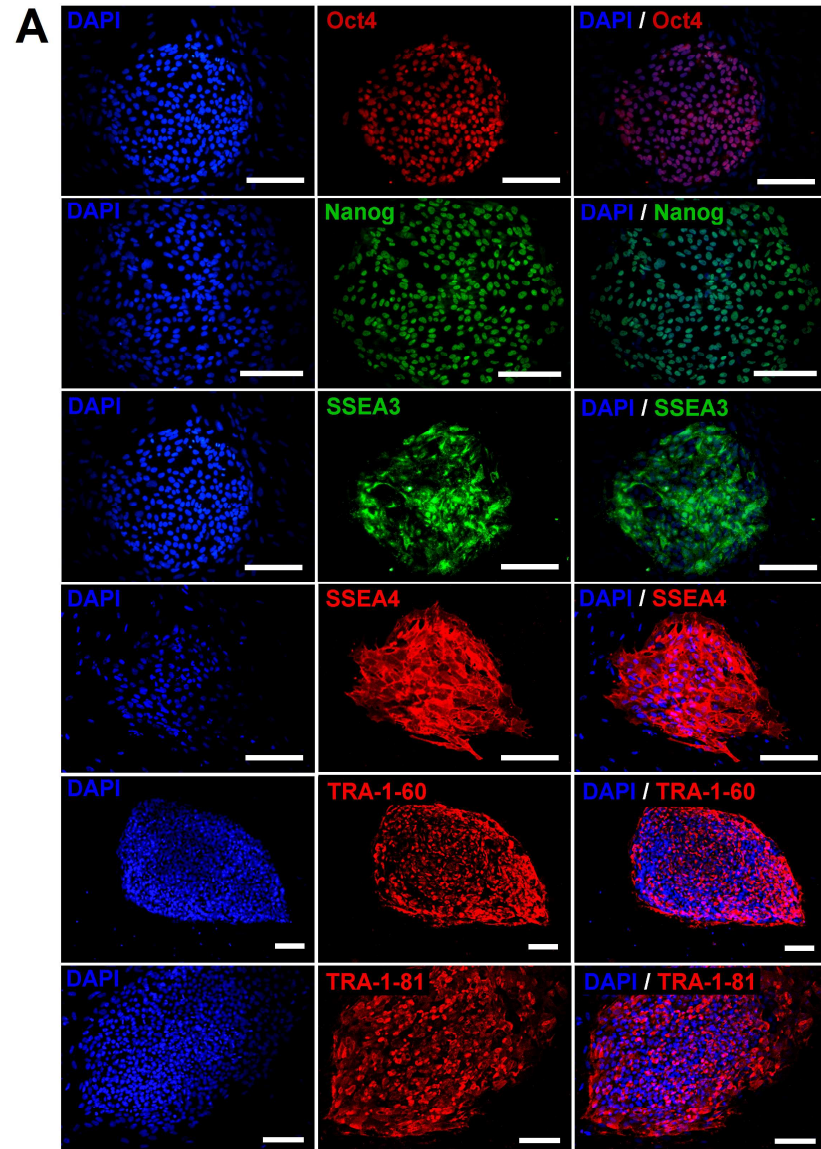
From Robinton and Daley, Nature, 481:295, 2012



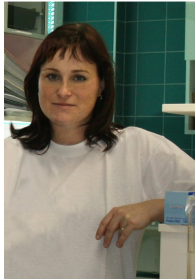
Humanizované kultivační podmínky a VegetaCell



Humanizované kultivační podmínky a VegetaCell

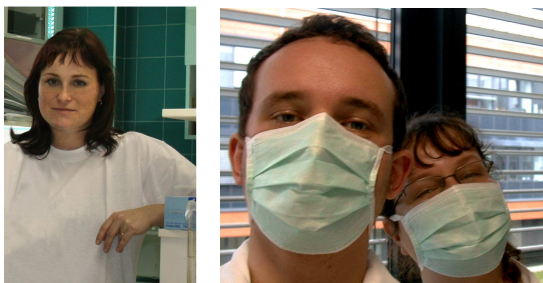
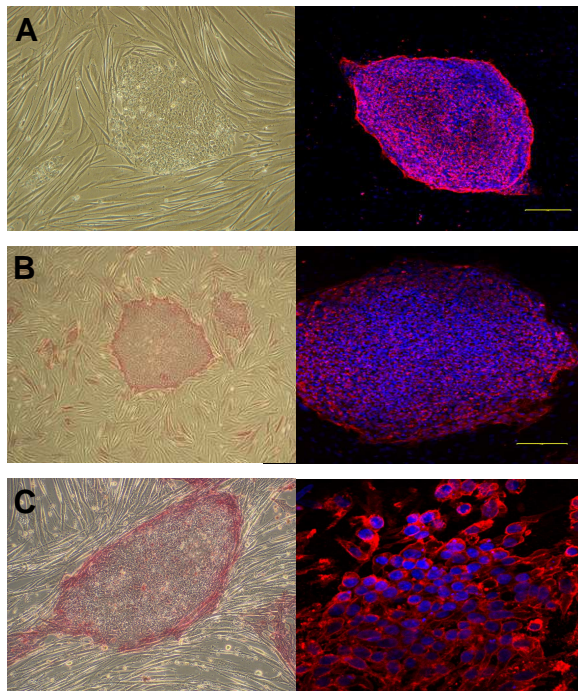


Humanizované kultivační podmínky a syntetické substráty

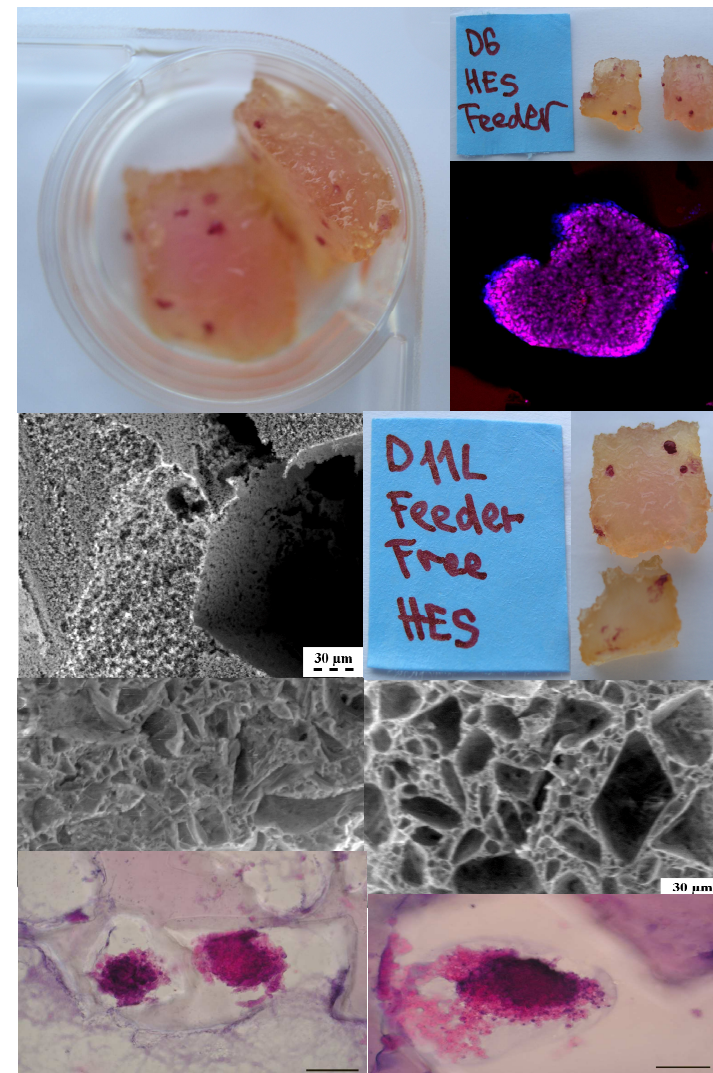


Humanizované kultivační podmínky a syntetické substráty

- (A) Human foreskin fibroblasts
- (B) hESC-derived fibroblasts
- (C) Humanized culture medium and human fibroblasts



Hydrogels and collagen scaffolds for propagation and expansion of hESCs



Tkáňové inženýrství

Způsob vytvoření komplexního orgánu nebo tkáně s použitím kmenových buněk nebo diferencovaných buněk a často v kombinaci s biokompatibilními nosiči

Příklady:

Biokompatibilní nosiče jsou důležité pro funkce buněk v uměle vytvořených orgánech

Umělé (chemické) nosiče a kmenové buňky

- + Neomezené zdroje
- Pouze “jednoduché” aplikace
- Absence bioaktivních molekul a indukčních signálů

Biologické bezbuněčné nosiče a zdravé funkční buňky

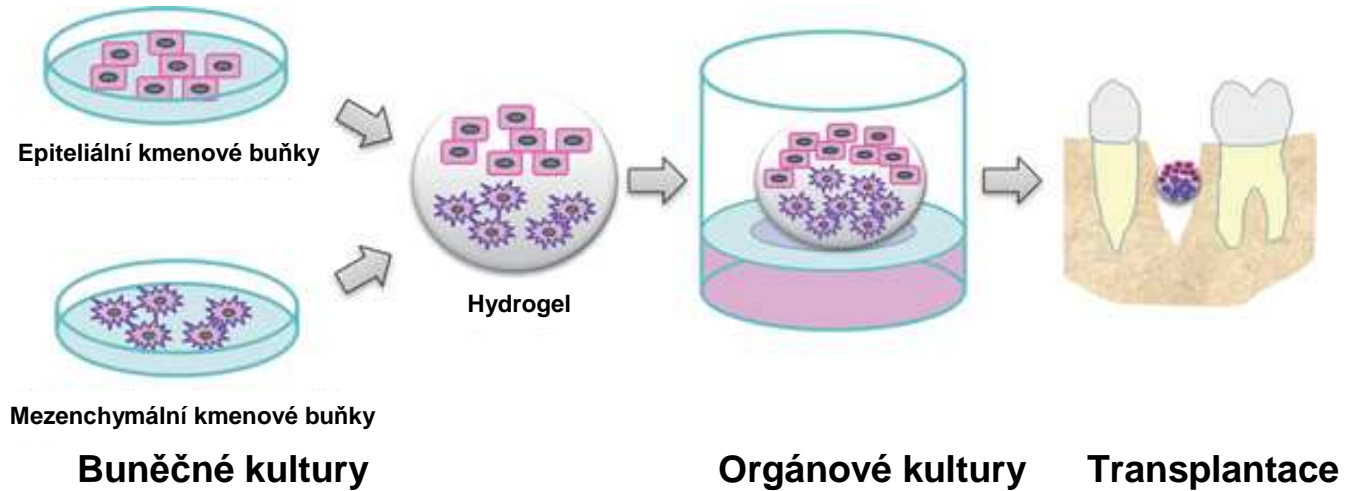
- Limitace podobné jako s orgány
- + Klinicky použitelné

Lidské orgány ve zvířatech

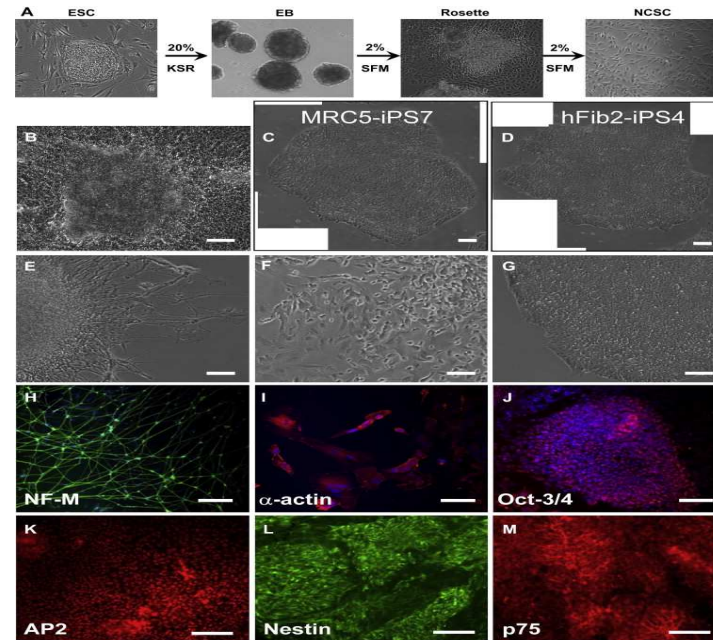
- + Perspektivní
- Legislativní a etické bariéry
- Nejasná biologie

Zubní lékařství příští generace?

“Dospělé” kmenové buňky
& orgánové kultury



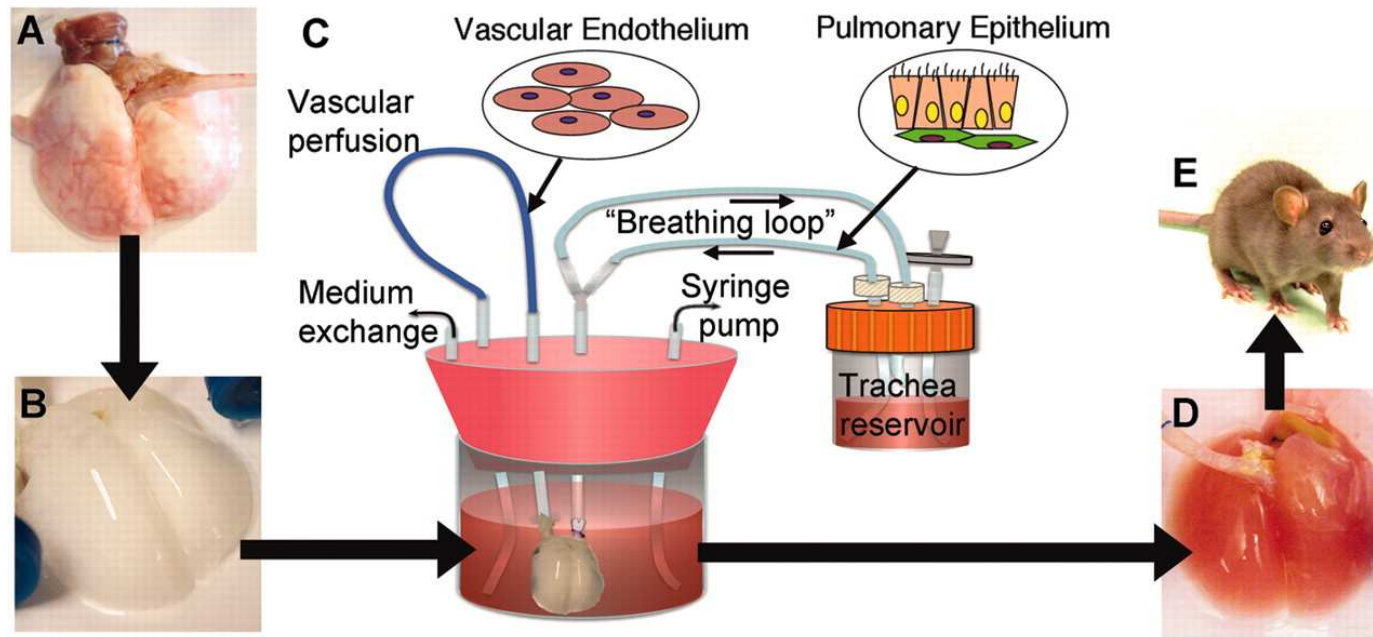
Pluripotentní kmenové buňky
& syntetické nosiče



Diferenciace buněk nervové lišty,
odontogenních a osteogenních buněk



Repopulace bezbuněčné plicní matrix plicními buňkami a implantace funkčních plic do experimentálního zvířete

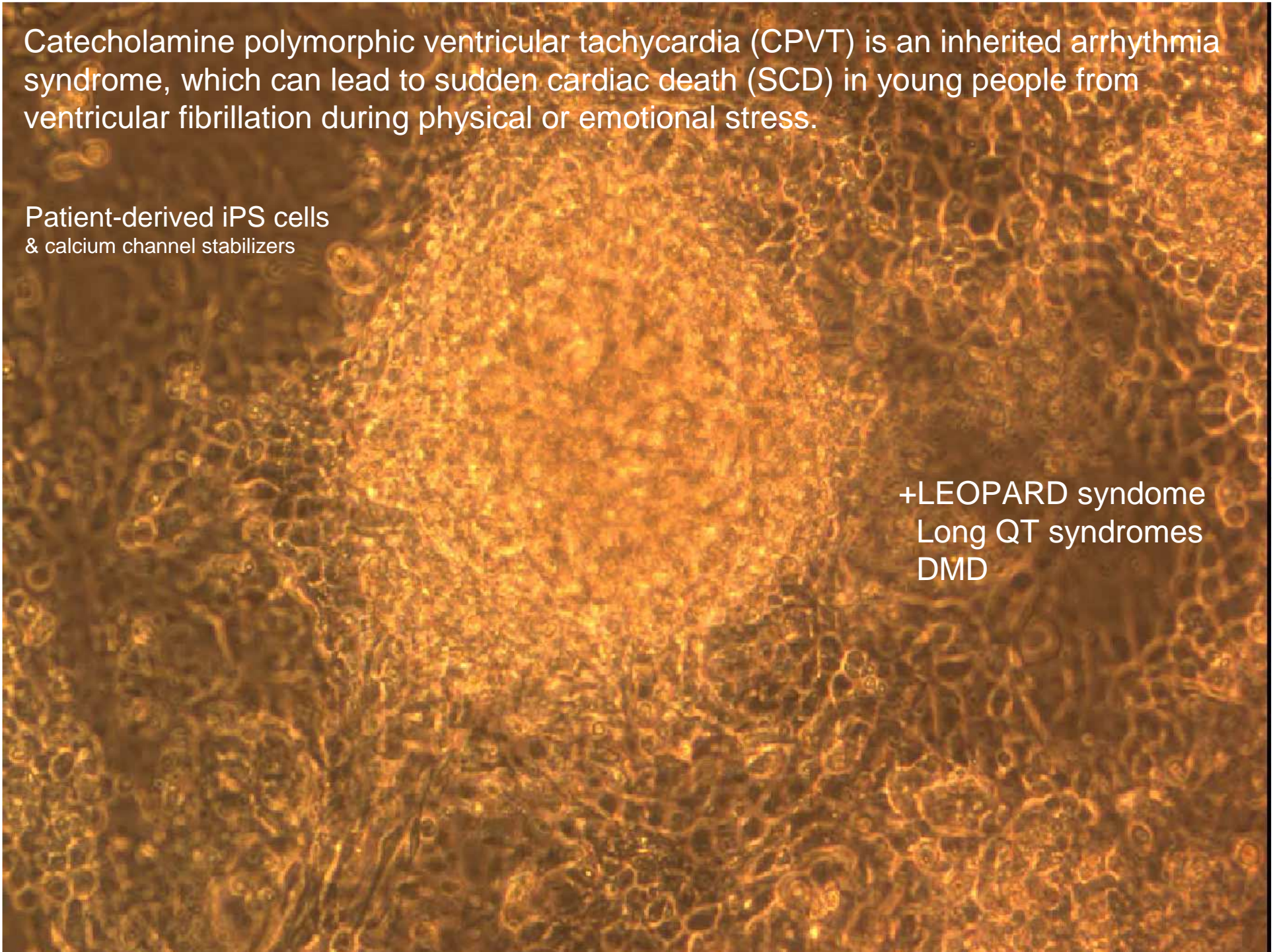


T. H. Petersen et al., *Science* 329, 538-541 (2010)

Catecholamine polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) is an inherited arrhythmia syndrome, which can lead to sudden cardiac death (SCD) in young people from ventricular fibrillation during physical or emotional stress.

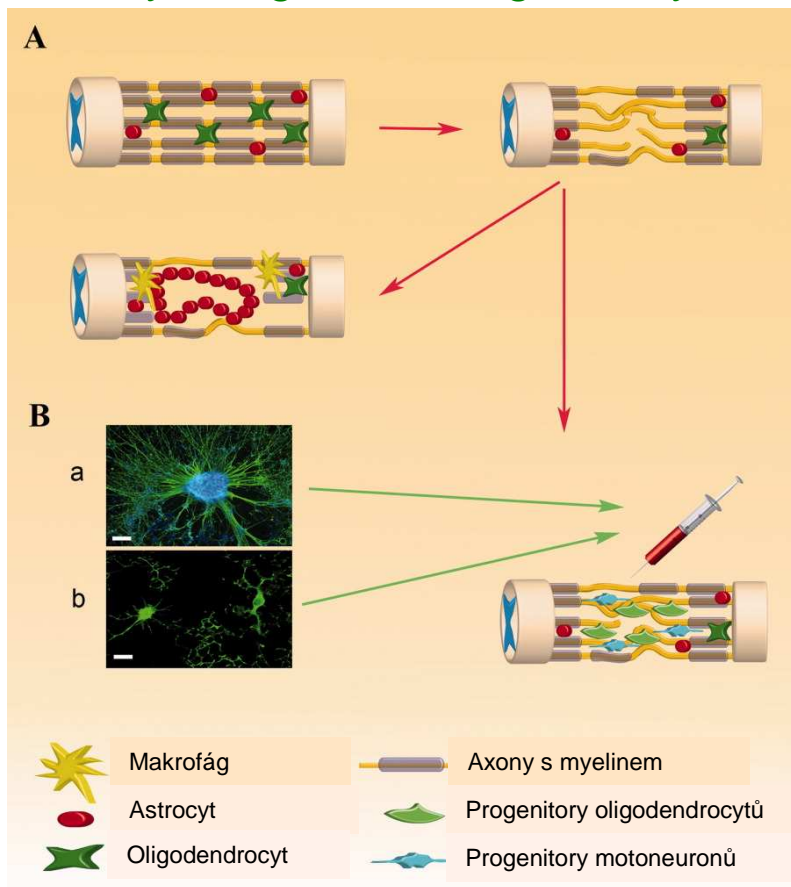
Patient-derived iPS cells
& calcium channel stabilizers

+LEOPARD syndrome
Long QT syndromes
DMD

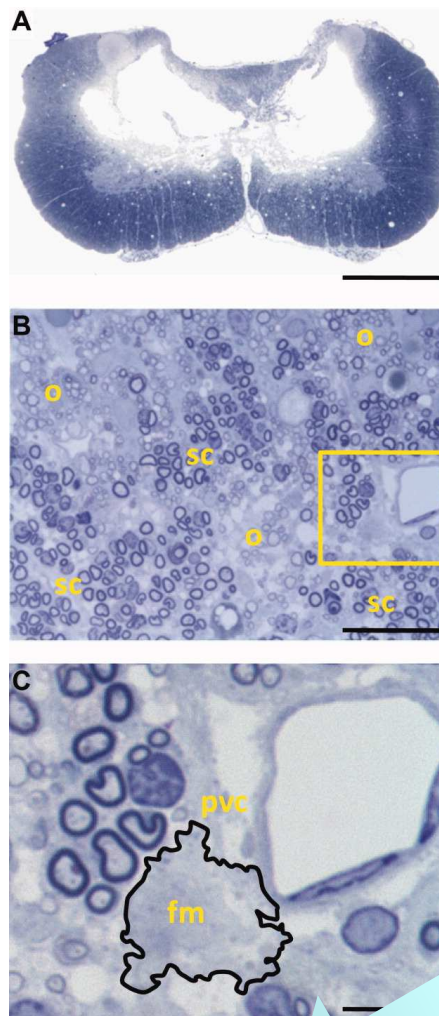


Příklad: traumatické poškození krční míchy, myelopatie a léčba kmenovými buňkami

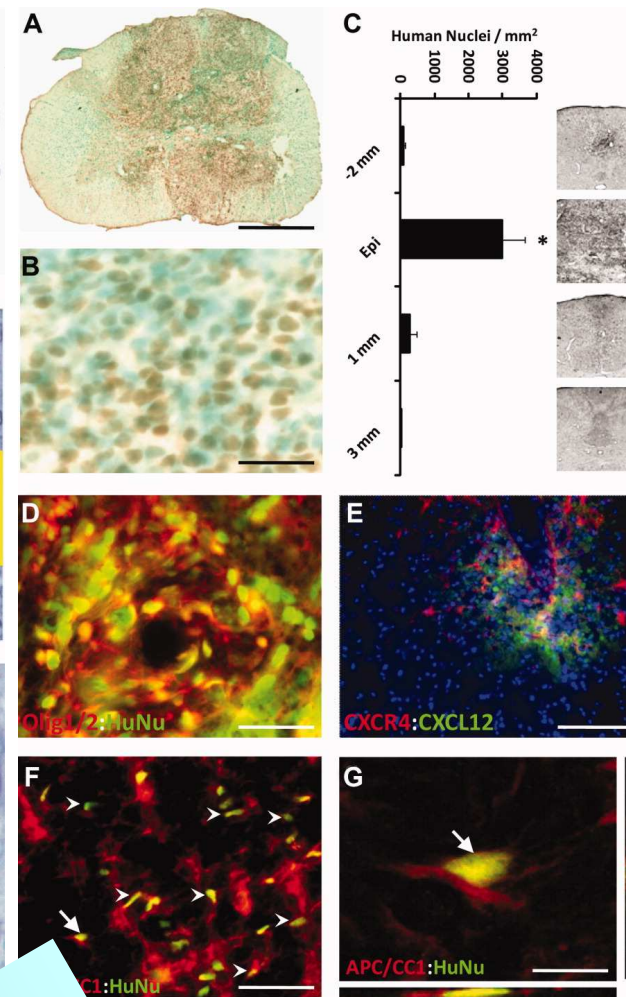
Patofyziologie a strategie léčby KB



Anatomie poškození



Stav po transplantaci



Výsledek: obnovení bílé a šedé hmoty v místě poškození
 obnovení funkčnosti motorických neuronů
 obnovení pohybových funkcí

Model: laboratorní potkan

Adaptováno ze *Stem Cells*, 2010

Generation of functional thyroid from embryonic stem cells

Francesco Antonica¹, Dominika Figini Kasprzyk¹, Robert Opitz¹, Michelina Iacovino², Xiao-Hui Liao³, Alexandra Mihaela Dumitrescu³, Samuel Refetoff^{3,4}, Kathelijne Peremans⁵, Mario Manto⁶, Michael Kyba² & Sabine Costagliola¹

The primary function of the thyroid gland is to metabolize iodide by synthesizing thyroid hormones, which are critical regulators of growth, development and metabolism in almost all tissues. So far, research on thyroid morphogenesis has been missing an efficient stem-cell model system that allows for the *in vitro* recapitulation of the molecular and morphogenic events regulating thyroid follicular-cell differentiation and subsequent assembly into functional thyroid follicles. Here we report that a transient overexpression of the transcription factors NKX2-1 and PAX8 is sufficient to direct mouse embryonic stem-cell differentiation into thyroid follicular cells that organize into three-dimensional follicular structures when treated with thyrotropin. These *in vitro*-derived follicles showed appreciable iodide organification activity. Importantly, when grafted *in vivo* into athyroid mice, these follicles rescued thyroid hormone plasma levels and promoted subsequent symptomatic recovery. Thus, mouse embryonic stem cells can be induced to differentiate into thyroid follicular cells *in vitro* and generate functional thyroid tissue.

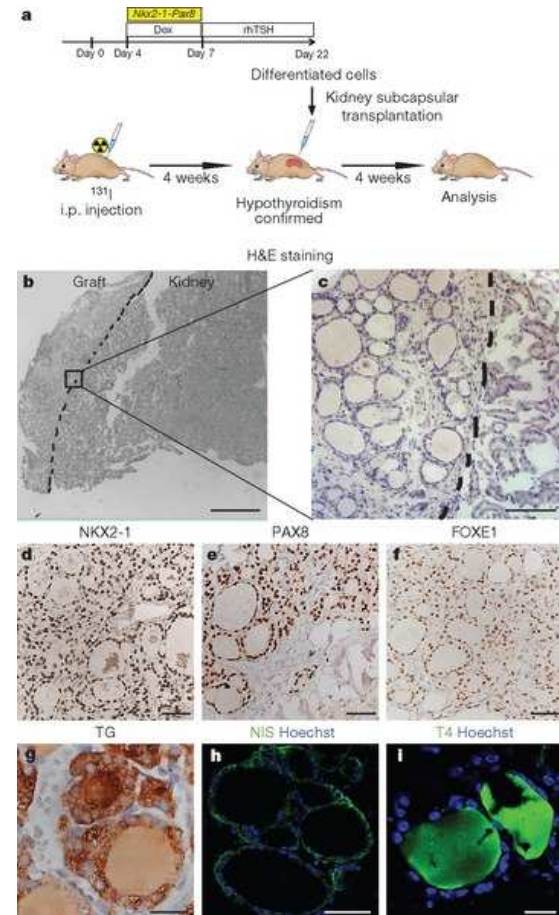
The mammalian thyroid consists of two endocrine cell types, the thyroid follicular cells (TFCs) that produce the thyroid hormones T3 and T4 and the C-cells that produce calcitonin¹. In the adult thyroid gland, TFCs are organized into follicular structures², in which a monolayer of polarized TFCs enclose a luminal compartment filled with a colloidal mass containing thyroid hormone precursors bound to thyroglobulin³. A follicular organization of TFCs is considered to be the prerequisite for efficient thyroid hormone biosynthesis⁴. It has been demonstrated that NKX2-1 (ref. 5) and PAX8 (ref. 6) function are vital for TFC survival, differentiation² and function during thyroid organogenesis and in mature thyroid tissue¹. During thyroid organogenesis, the onset of NKX2-1 (ref. 7) and PAX8 (ref. 8) co-expression in a small group of ventral foregut endodermal cells represents the first molecular marker of cell specification towards a TFC fate. Although NKX2-1 (ref. 7) and PAX8 (ref. 8) are expressed individually in a variety of tissues and cell types, their co-expression is restricted to cells committed to differentiate into TFCs. Induced overexpression of defined transcription factors has been shown to have a directing effect on the differentiation of embryonic stem cells (ESCs) into specific cell types^{9–11}. Despite the success of this experimental approach for cell differentiation or reprogramming, protocols promoting coordinated self-assembly of differentiated cells into distinct morphological units with functional properties reminiscent of organs and tissues *in vivo*^{12–14} are still very sparse. In this study, we explore whether overexpression of the transcription factors NKX2-1 and PAX8 could promote differentiation of murine ESCs into TFCs and subsequent self-formation of thyroid follicles.

In vitro thyroid cell differentiation

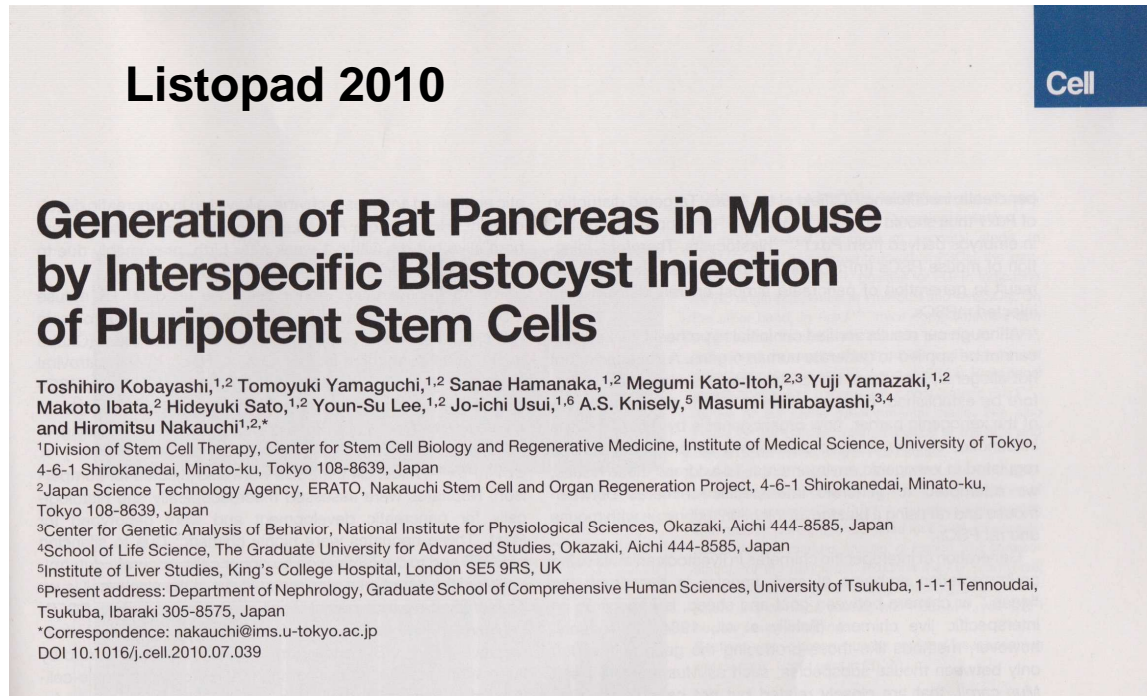
Because the factors and signalling pathways inducing concurrent expression of NKX2-1 and PAX8 have not yet been resolved², we generated recombinant ESC lines (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1a, c, e) in which expression of these transcription factors can be temporally induced on the addition of doxycycline (Dox; 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) to the

medium¹⁵ (Supplementary Fig. 1b, d, f). These genetic manipulations did not affect the pluripotent state of the ESCs (Supplementary Fig. 1g). In our experimental set-up, Dox induction of NKX2-1 and PAX8 was initiated after a 4-day ESC culture in hanging drops to allow for differentiation into embryoid bodies (Fig. 1b). We first used a recombinant ESC line in which Dox treatment induces NKX2-1 and PAX8 overexpression (Supplementary Fig. 1a, b). After 3 days of Dox treatment (on days 4, 5 and 6), co-expression of NKX2-1 and PAX8 was detectable by immunofluorescence in almost all Dox-treated cells on day 7 but never in cells incubated in the absence of Dox (Supplementary Fig. 2a). To determine whether the combined activity of NKX2-1 and PAX8 promotes TFC differentiation, we first examined the expression of various TFC markers by quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR). Notably, messenger RNA expression of functional markers, including the thyroid-stimulating hormone (TSH) receptor (*Tshr*), the sodium/iodide symporter NIS (*Slc5a5*) and thyroglobulin (*Tg*), was strongly upregulated within 3 days of Dox treatment (Supplementary Fig. 2b). The expression of *Foxe1*, another key transcription factor for thyroid development¹⁶, was also upregulated (Supplementary Fig. 2b), and NKX2-1⁺ FOXE1⁺ cells were prominent throughout cell cultures (Supplementary Fig. 2c). Interestingly, our qRT-PCR analyses also demonstrated a robust increase in endogenous *Nkx2-1* and *Pax8* mRNA levels (Supplementary Fig. 2d), indicating an auto-induction of these transcription factors. Together, these data demonstrate that forced co-expression of NKX2-1 and PAX8 readily acts on cell fate, driving the differentiation towards a TFC lineage. However, assembly of Dox-treated cells into three-dimensional aggregates reminiscent of follicle-like epithelial structures was rarely observed under these conditions. This was true for cell cultures using a variety of distinct Dox treatment protocols, suggesting that additional factors might be required to promote follicular morphogenesis. We therefore revised the treatment protocol on the basis of two critical observations. First, we limited the Dox treatment to a 3-day period from day 4 to day 6 (Fig. 1b), as this seemed to be sufficient to induce the auto-induction of

Nature, 491:66-71, 2012



Mezidruhové chiméry, genetické manipulace a vývoj lidských orgánů ve zvířatech



Lidské orgány v praseti ???

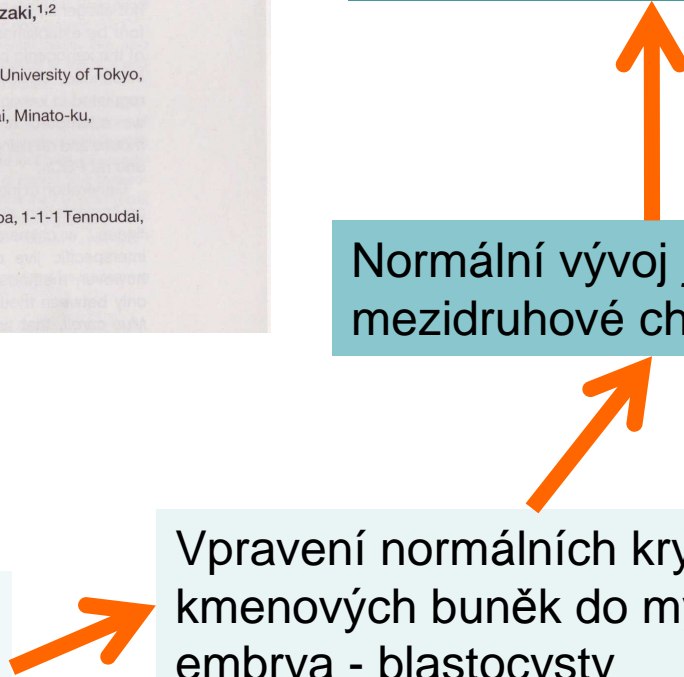
Krysí pankreas v myši

Normální vývoj jedince – mezidruhové chiméry

Myš s nefunkčním genem Pdx-1 (Pdx-1 je klíčový gen pro vznik pankreatu)

Časné myší embryo (blastocysta) s nefunkčním genem Pdx-1

Vpravení normálních krysích kmenových buněk do myšího embrya - blastocysty



... (Fig. 4D). The dispersive nature of AV waves is best illustrated by the presence of phase accumulation, as waves travel across the dorsal cuticle. High-frequency waves (40 to 50 kHz) incur some 260° phase lag within a 200- μ m travel length, whereas low-frequency waves (10 kHz), traveling 400 μ m, accumulate up to 300° (Fig. 4C). The velocity of wave propagation varies with frequency from 4 ms⁻¹ (10 kHz) to 8 ms⁻¹ (50 kHz), exhibiting a pattern similar to those reported for mammals and other insects (13, 19).

Deflection shape analysis conducted in the spectral domain (5- to 50-kHz sweeps) confirms the unambiguous presence of traveling waves (fig. S6) (14). The data imply that AV provides the anisotropic medium enabling dispersive wave propagation and tonotopic delivery to the auditory receptors. Further experiments establish that both an intact AV and its fluid are required for frequency decomposition as well as for generation of traveling waves (fig. S7). In contrast to observations from the phaneropterine katydid *Mecopoda elongata* (13), removal of the dorsal cuticle in *C. gorgonensis* markedly alters AV

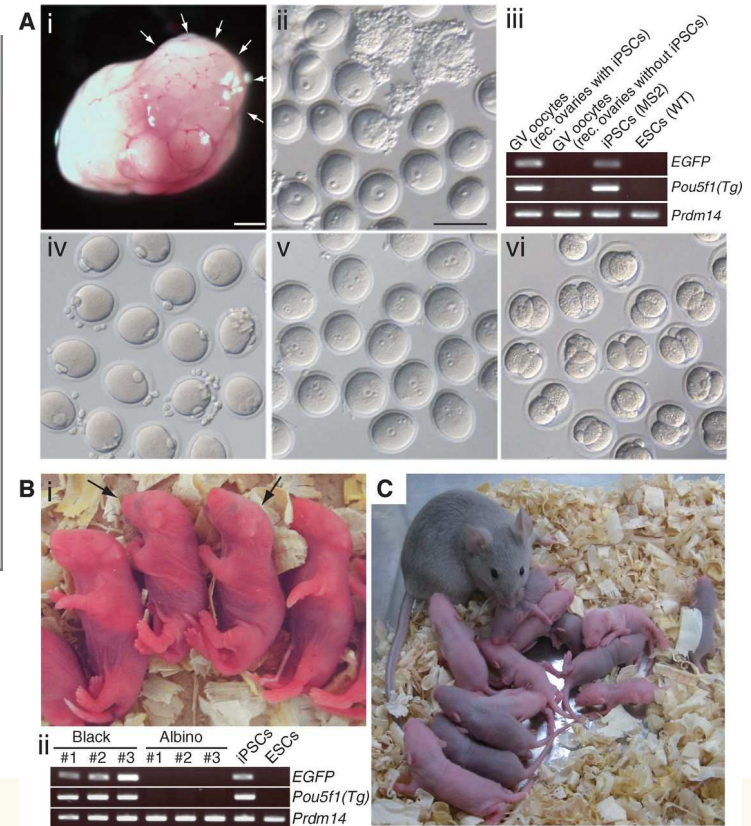
Offspring from Oocytes Derived from in Vitro Primordial Germ Cell-like Cells in Mice

Katsuhiko Hayashi,^{1,2,3*} Sugako Ogushi,^{1,4} Kazuki Kurimoto,^{1,5} So Shimamoto,¹ Hiroshi Ohta,^{1,5} Mittinori Saitou^{1,2,5,6*}

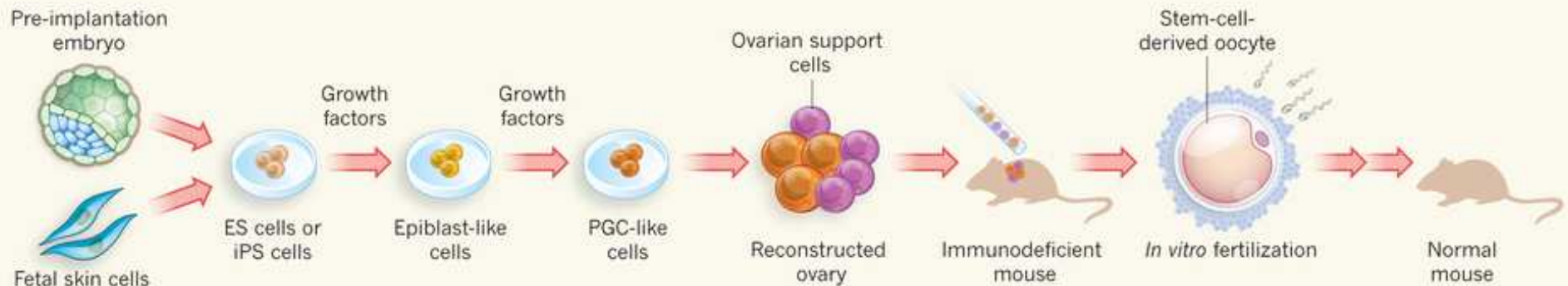
Reconstitution of female germ cell development in vitro is a key challenge in reproductive biology and medicine. We show here that female (XX) embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells in mice are induced into primordial germ cell-like cells (PGCLCs), which, when aggregated with female gonadal somatic cells as reconstituted ovaries, undergo X-reactivation, imprint erasure, and cyst formation, and exhibit meiotic potential. Upon transplantation under mouse ovarian bursa, PGCLCs in the reconstituted ovaries mature into germinal vesicle-stage oocytes, which then contribute to fertile offspring after in vitro maturation and fertilization. Our culture system serves as a robust foundation for the investigation of key properties of female germ cells, including the acquisition of totipotency, and for the reconstitution of whole female germ cell development in vitro.

The germ cell lineage in mammals originates from pluripotent epiblasts as primordial germ cells (PGCs) and undergoes sexually dimorphic development, generating spermatozoa in males and oocytes in females. These cells fertilize to form zygotes with full developmental

Download



K Hayashi et al. Science 2012;338:971-975



Obdobnou strategií byly získány i spermie !!!

Hlavní překážky na cestě pluripotentních kmenových buněk z laboratoří k pacientům

- Lepší pochopení mechanismů sebeobnovy a vývoj nových kultivačních systémů
- Lepší pochopení mechanismů diferenciaci a vývoj “negenetických”
diferenciačních protokolů
- Problém “bezpečnosti” buněčných transplantátů derivovaných z pluripotentních KB
- Problémy rejekce KB imunitním systémem a omezené genetické diverzity linií
- Legislativní a etické překážky

Hlavní překážky na cestě pluripotentních kmenových buněk z laboratoří k pacientům

LETTER

doi:10.1038/nature11807

Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells


Ryoko Araki^{1,2}, Masahiro Uda¹, Yuko Hoki¹, Misato Sunayama¹, Miki Nakamura¹, Shunsuke Ando¹, Mayumi Sugiura¹, Hisashi Ideno^{1,3}, Akemi Shimada³, Akira Nifuji^{1,3} & Masumi Abe¹

- Problémy rejekce KB imunitním systémem a omezené genetické diverzity linií
- Legislativní a etické překážky

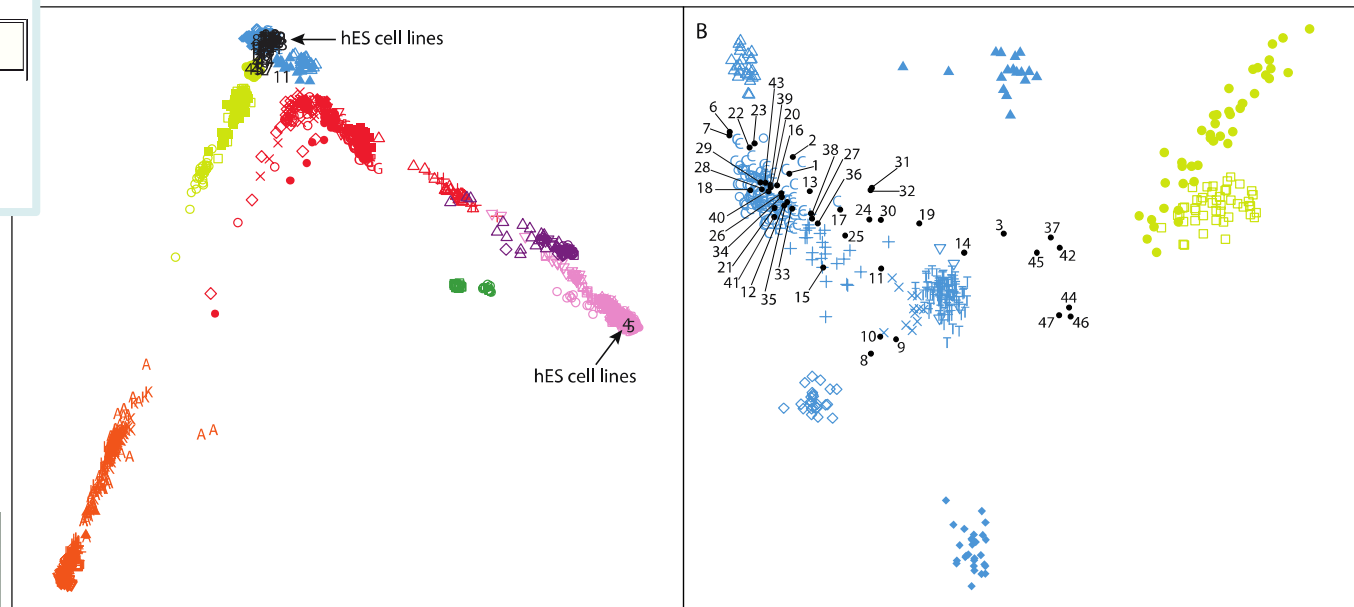
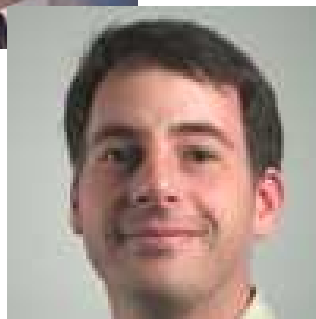
Potřebujeme nové linie lidských embryonálních KB když máme indukované pluripotentní KB? Buněčné banky a registry linií pluripotentních KB a populační diverzita existujících linií lidských embryonálních KB

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

CORRESPONDENCE



Lack of Population Diversity in Human Embryonic Stem-Cell Lines



Masaryk University (Czech Republic)	Spanish Stem Cell Bank / CIPF (Spain)	18 HUES8	31 HUES26	NSCB / UCSF (USA)
1 CCTL-6	8 VAL4	19 HUES10	32 HUES27	42 UC06 (HSF6)
2 CCTL-8	9 VAL5	20 HUES12	33 HUES28	
	10 VAL7	21 HUES14	34 HUES42	NSCB / WICell (USA)
NSCB / Technion (Israel)	11 VAL10b	22 HUES16	35 HUES44	43 WA01 (H1)
3 TE03 (I3)		23 HUES17	36 HUES45	44 WA07 (H7)
	Harvard University (USA)	24 HUES18	37 HUES49	45 WA09 (H9)
NSCB / ES Cell International (Singapore)	12 HUES2	25 HUES19	38 HUES53	46 WA13 (H13)
4 ES02 (HES-2)	13 HUES3	26 HUES20	39 HUES62	47 WA14 (H14)
5 ES03 (HES-3)	14 HUES4	27 HUES21		
6 ES05 (HES-5)	15 HUES5	28 HUES22	NSCB / Novocell (USA)	
7 ES06 (HES-6)	16 HUES6	29 HUES23	40 BG01 (BGN-01)	
	17 HUES7	30 HUES24	41 BG03 (BGN-03)	

hES cell lines

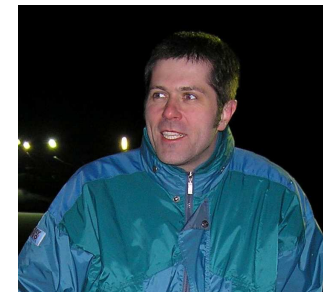
■ Africa	▲ Adygei	+ Dai	○ Karitiana	○ Orcadian	□ Surui	A ASW (African American)
■ Europe	× Balochi	+ Daur	◇ Lahu	○ Oroqen	■ Tu	C CEU (N. & W. European)
■ Middle East	▲ Bantu Kenya	● Druze	◇ Makrani	□ Palestinian	* Tujia	B CHB (Han Chinese)
■ C/S Asia	▲ Bantu (S. Africa)	+ French	◇ Mandenka	▽ Papuan	▽ Tuscan	D CHD (Han Chinese)
■ East Asia	◇ Basque	+ Han	▲ Maya	▽ Pathan	+ Uyghur	G GHJ (Gujarati)
■ Oceania	■ Bedouin	× Han (N. China)	▽ Mbuti Pygmy	▽ Pima	■ Xibo	J JPT (Japanese)
■ America	◆ Biakha Pygmy	+ Hazara	◇ Melanesian	△ Russian	▽ Yakut	L LWK (Luhya)
	■ Brahui	▲ Hezhen	+ Miao	□ San	○ Yi	K MKK (Maasai)
	■ Burusho	× Italian	+ Mongola	+ Sardinian	○ Yoruba	T TSI (Toscani)
	○ Cambodian	◇ Japanese	● Mozabite			Y YRI (Yoruba)
	◇ Colombian	● Kalash	+ Naxi			

reference samples

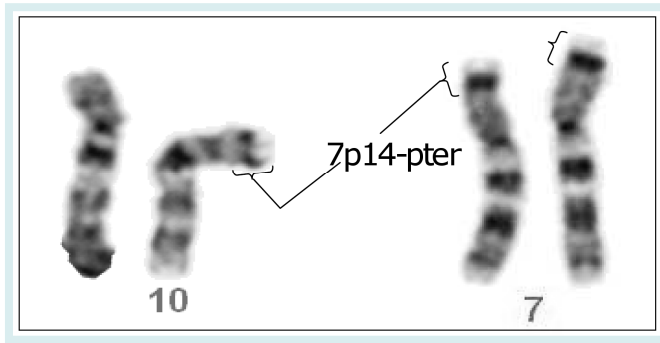
Tolerable HLA mismatch?

- Cell banks?
- Gene targeting?
- iPS cells?

Genomická nestabilita pluripotentních KB *in vitro*



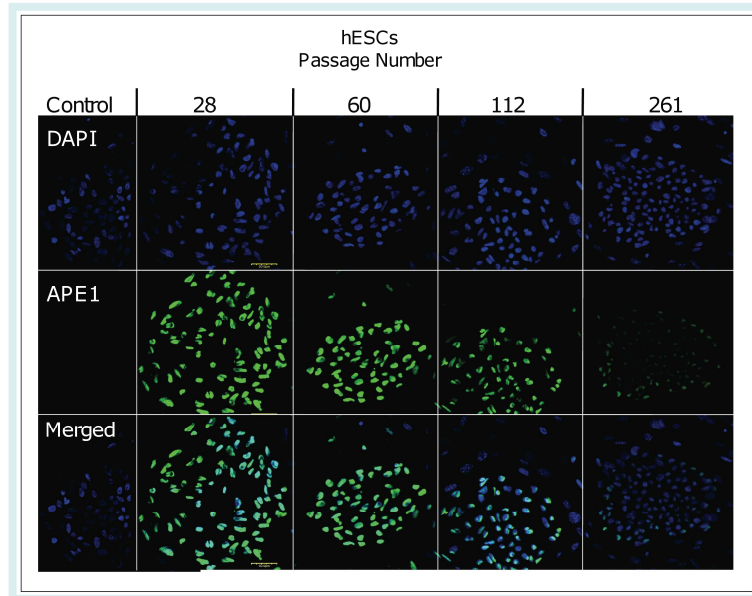
Genomická nestabilita pluripotentních KB *in vitro*



Numerical chromosomal abnormalities – gain or loss
 Large chromosomal aberrations >3Mb
 Small chromosomal aberrations <3Mb (CNV, LOH)

Possible mechanism – APE and BER ?

Sample	CN State	Type	Chr	Start	End	Size(kb)	%CNV	Start	Name of Variation	RefSeq Genes on the area
HS306 p35	3	Gain	4	q22.1	q22.2	1081	25	93332297	10054	<i>GRID2</i>
CCTL-12 p143	3	Gain	5	q14.2	q14.3	2534	2	81717787	22770	<i>XRCC4 VCAN HAPLN1 EDIL3</i>
I3.2 p55	3	Gain	10	q11.21	q11.22	1203	100	46010225	0136	<i>PTPN20B FRMPD2L2 FAM35B SYT15 GPRIN2 PPYR1 ANXA8 ANXA8L1</i>
H7 s6 p128	1	Loss	10	q21.2	q21.3	1288	15	63869872	30508	<i>ZNF365 C10orf22 EGR2</i>
H7 s6 p132	1	Loss	10	q21.2	q21.3	1288	15	63869872	30508	
H7 s6 Tera p125	1	Loss	10	q21.2	q21.3	1288	15	63869872	30508	
H7 s6 Tera p127	1	Loss	10	q21.2	q21.3	1288	15	63869872	30508	<i>NRBF2 JMJD1C REEP3</i>
HS401 p53	1	Loss	15	q11.2	q11.2	1009	100	18875309	0318	<i>HERC2P3 POTE15</i>
H1 p61	1	Loss	15	q11.2	q11.2	1243	100	18846092	0318	
H9 p25	3	Gain	15	q11.2	q11.2	1357	100	18732853	0318	
H9 p34	3	Gain	15	q11.2	q11.2	1434	100	18655531	0318	
HS237 p135	3	Gain	18	q21.32	q21.33	1713	19	56145790	3171	<i>MC4R CDH20 RNF152</i>
CCTL-14 p38	3	Gain	20	q11.21	q11.21	1829	38	29298698	35916	<i>DEFB115/116/118/119/121/123/124 REM1 HM13 ID1 COX412 BCL2L1 TPA2 MYLK2 FKBP18 DUSP15 TLL19 PDRG1 XKR7 C20orf160 HCK TM9SF4 PLAGL2 POFUT1 KIF3B ASXL1 C20orf112 LOC149950 COMMD7 DNMT3B MAPRE1 SPAG4L BPL1 BPL3 C20orf185</i>
CCTL-14 p49	3	Gain	20	q11.21	q11.21	1831	38	29298698	35916	



- Why do they occur? What could be the source?
- Can we manipulate with mechanism(s) of their genesis?
- What could be their biological significance *in vivo*?



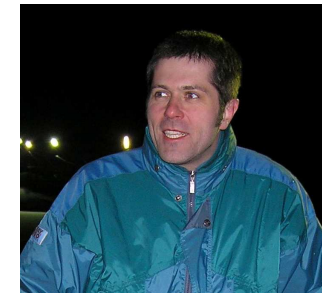
nature biotechnology

High-resolution DNA analysis of human embryonic stem cell lines reveals culture-induced copy number changes and loss of heterozygosity

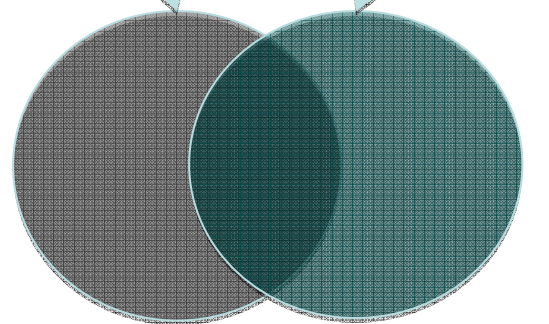
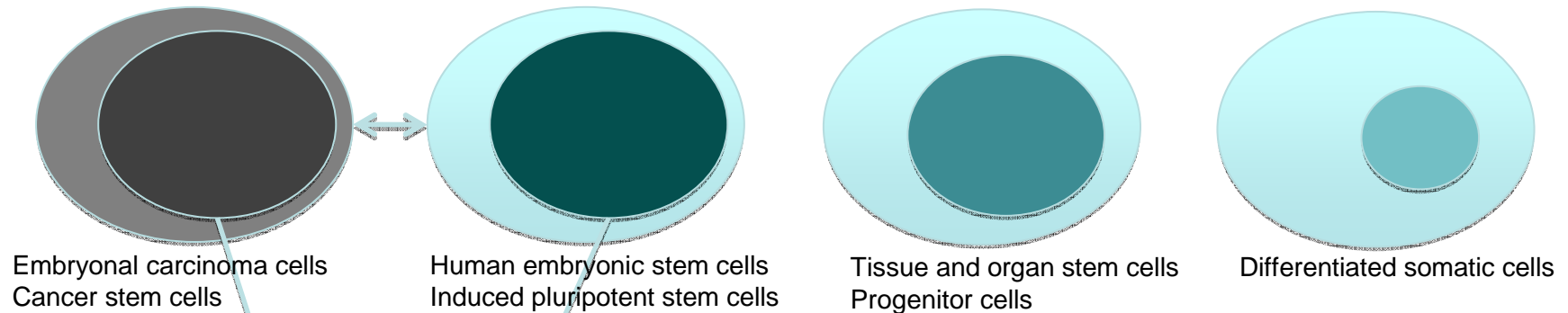
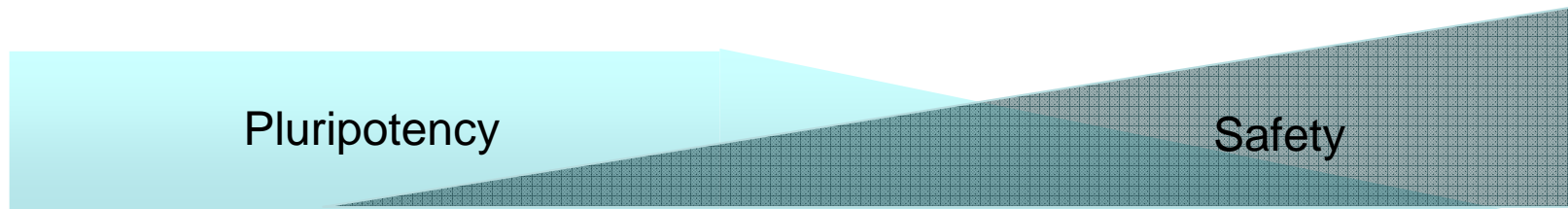
Eliisa Niemi, Reija Anttila, Nelli Rauhamaa, Lingling Kong, Neil Harrison, Dennis Kitzberg, Leena Korpela, Jouni Rintala, David H. Kim, David H. Kim, Paul Drenth, Dori Hovatta, Teru Okamoto, Tero Tervahauta, Wei Gu, Oliver Brdiczka, Duncan Baker, Erika Mäkitie, Henry C Moore, Heikki Savolainen, Peter W Andrews, Chyi Yui-Hsia & Riitta Lahesmaa

Nature Biotechnology 28, 271–277 (2010) | doi:10.1038/nbt.1615
 Received 24 June 2009 | Accepted 18 February 2010 | Published online 28 March 2010

Abstract
 Prolonged culture of human embryonic stem cells (hESCs) can lead to adaptation and the acquisition of chromosomal abnormalities, underscoring the need for genetic analysis of these cells. Here we report the high-resolution study of hESCs in culture using an Affymetrix SNP 6.0 array containing 900,000 probes for single nucleotide polymorphisms (SNPs) and 940,000 probes for copy number variations (CNVs). Analyses of 17 different hESC lines maintained in different laboratories identified 843 CNVs of 50 bp–3 Mb in size. We identified, on average, 5.0% of the total of heterozygous SNPs and 8.6% of the CNVs changed in culture between early and late passages of the same line. Thirty percent of the genes identified with CNVs also had altered expression compared to controls with normal copy number status, of which 24.6% were found to be involved in cancer. Furthermore, LOH of the copy of chromosome 16, which has not been observed previously in hESCs, was detected.

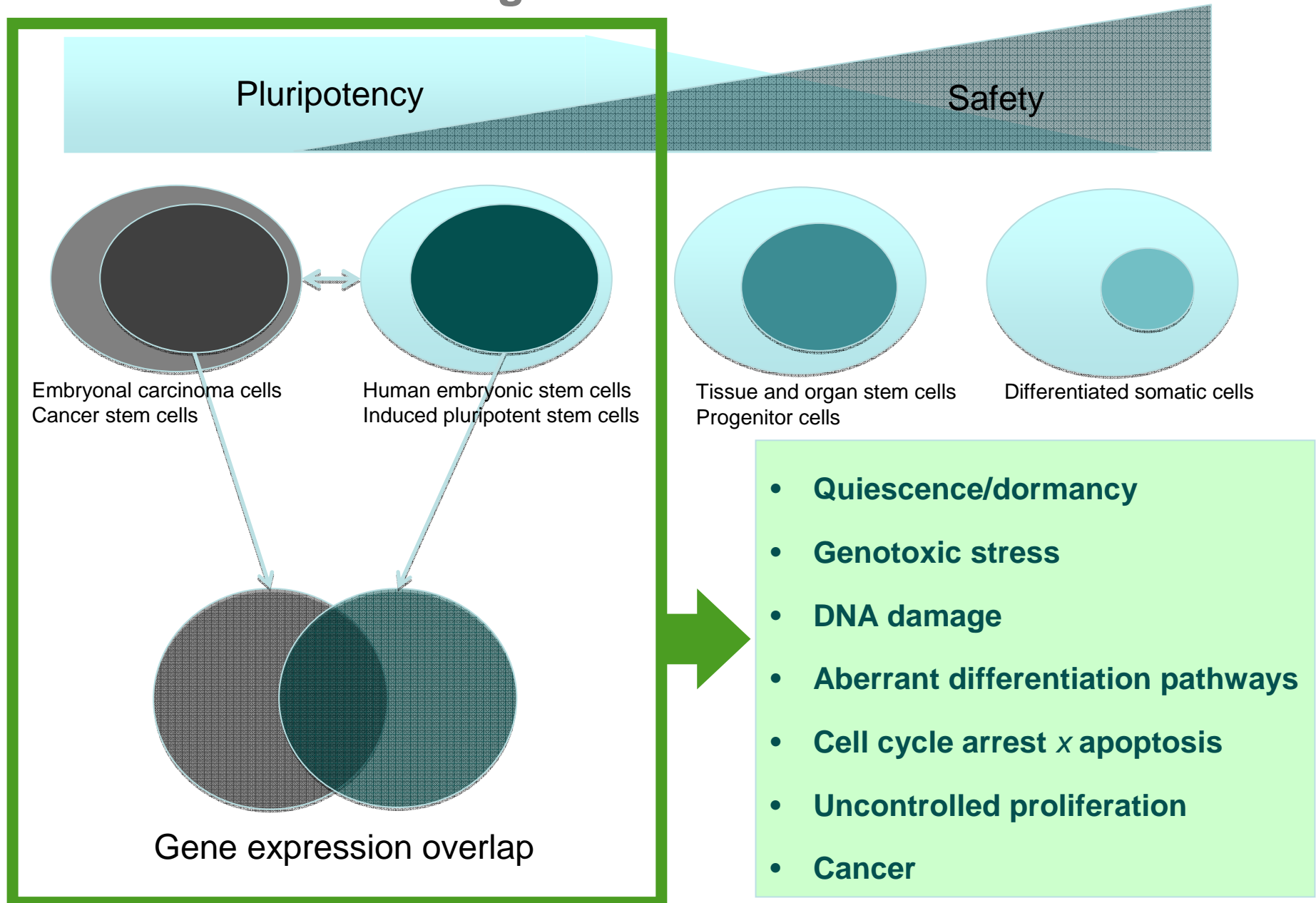


Tumor formation is still a concern!



Cancer stem cell hypothesis
Tumors are maintained by a small population of stem cells that might even be at the origin of a tumor and are the only cells capable of tumor re-initiation

...however pluripotent stem cells hold great promise for the understanding of human disease!



Phase 1 clinical trials using GMP-grade hES cells

- Spinal cord injury – *hES cell-derived oligodendrocytes*
- Stargardt macular dystrophy and dry age-related macular degeneration – *hES cell-derived RPE cells*



Thank you for your attention!



Petr Dvorak
Masaryk University
Brno, Czech Republic

Definice I.

- **Embryonální KB** jsou buňky embryonálního původu se schopností sebeobnovy, multilineární diferenciace *in vitro* a *in vivo*, klonogenní kapacitou, normálním karyotypem, dostatečnou proliferační kapacitou *in vitro* v definovaných podmínkách a schopností hlubokého zamrazení a rozmrazení bez výrazné ztráty životaschopnosti. Kombinace těchto vlastností je nazývána “kmenovostí” (stemness).

Definice II.

- **Dospělé KP** jsou buňky s klonálním potenciálem, které jsou za fyziologických podmínek přítomné v různých orgánech a tkáních, sebeobnovují se, a průběžně, nebo když dostanou vnější signál, začínají diferencovat a vytvářejí funkčně specializované buňky potřebné k regeneraci orgánů a tkání.

Definice III.

- **Indukované pluripotentní buňky** (tzv. induced pluripotent stem cells; iPS cells) jsou buňky vytvořené z dospělých diferencovaných buněk (tj. somatických buněk) pomocí „jednoduché“ metody - geny kodující několik (2-4) transkripčních faktorů jsou klonovány do virového vektoru a jednoduchým přidáním takových vektorů do *in vitro* kultury somatických buněk (např. fibroblastů) dojde za určitých podmínek k „reprogramaci“ buněk do pluripotentního embryonálního stavu.