

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie

EMBRYONÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY

RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.
Ústav experimentální biologie PŘF MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Program přednášky:

- vlastnosti kmenových buněk
- embryonální kmenové buňky
- linie kmenových buněk v podmínkách *in vitro*
- indukované pluripotentní buňky

Totipotence

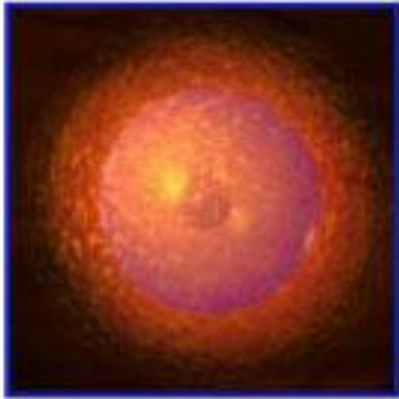
- nelimitovaný diferenciační potenciál
- schopnost tvořit embryonální i extraembryonální tkáně
- časná stádia rýhování zygoty

Pluripotence

- schopnost tvořit buňky všech 3 zárodečných listů
- buňky ICM (embryonální kmenové buňky)

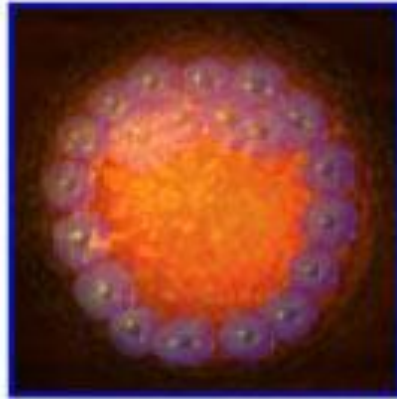
Multipotence

- schopnost tvořit buňky příslušného typu tkáně
- např. hematopoetické kmenové buňky, neuronální kmenové buňky...



Single Cell Embryo

Totipotent



5-7 Day Embryo

Embryonic Stem (ES) Cells
Pluripotent



Infant



Adult

"Adult" Stem Cells
Multipotent

Cord Blood Stem Cells
Placental Stem Cells
Multipotent

VLASTNOSTI KMENOVÝCH BUNĚK



Kmenové buňky (Stem Cells, SCs)

= buňky z embrya, fetu nebo dospělého organismu, které se za určitých podmínek mohou neomezeně množit a rovněž dávat vzniknout specializovaným buňkám různých typů tkání

- **zdroje kmenových buněk:**

embryo, fetus, dospělý organismus

[+ placenta, pupečnicková krev]

TERMINOLOGIE:

- embryonální SCs (ESCs):
 - embryonální kmenové (Embryonic Stem Cells)
 - embryonální zárodečné (Embryonic Germ Cells)
 - embryonální karcinomové (Embryonic Carcinoma)
 - **linie** embryonálních kmenových buněk
- dospělé (adultní) SCs (ASCs)
- kmenové buňky nádorů (Cancer SCs, CSCs)

HUMAN STEM CELLS

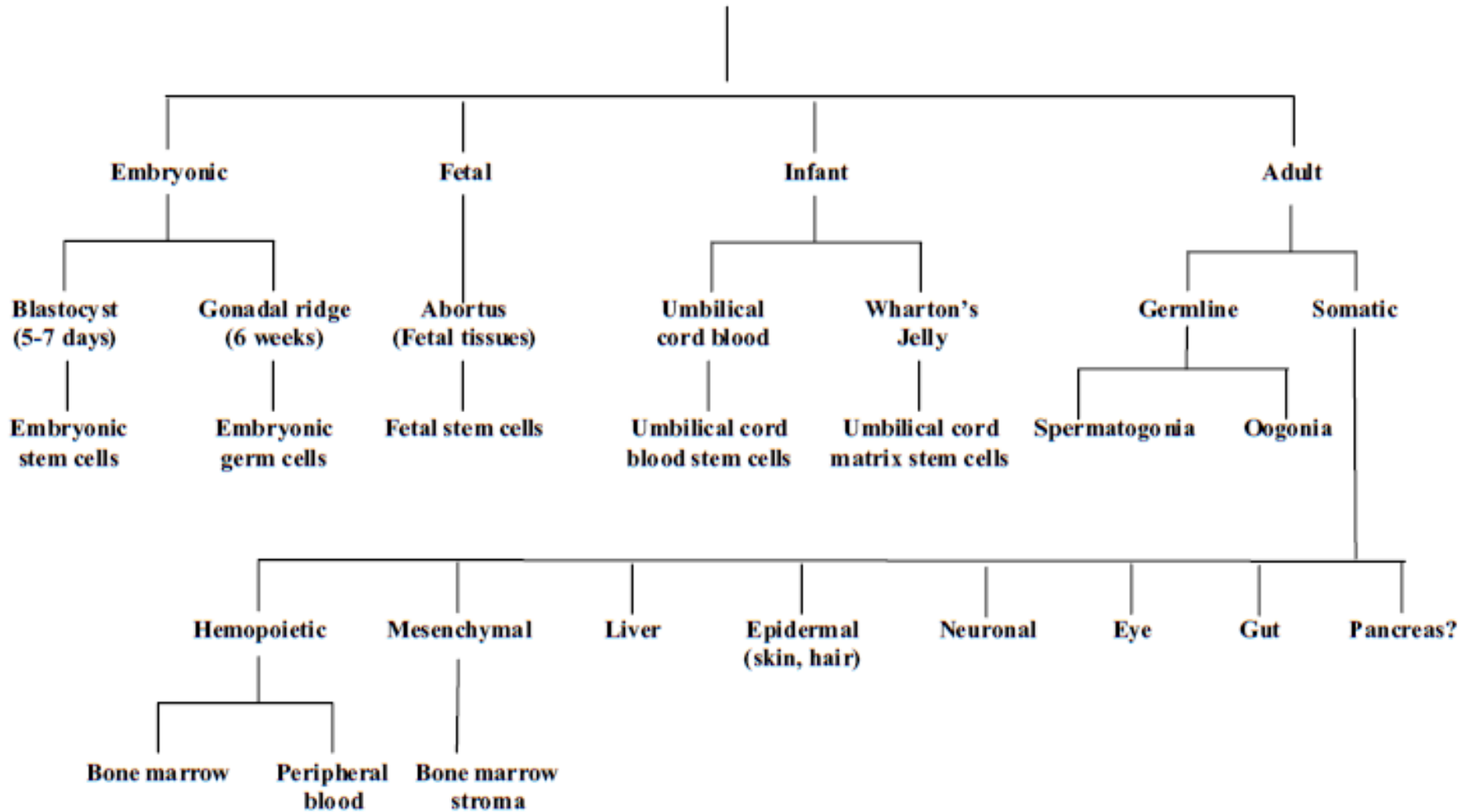
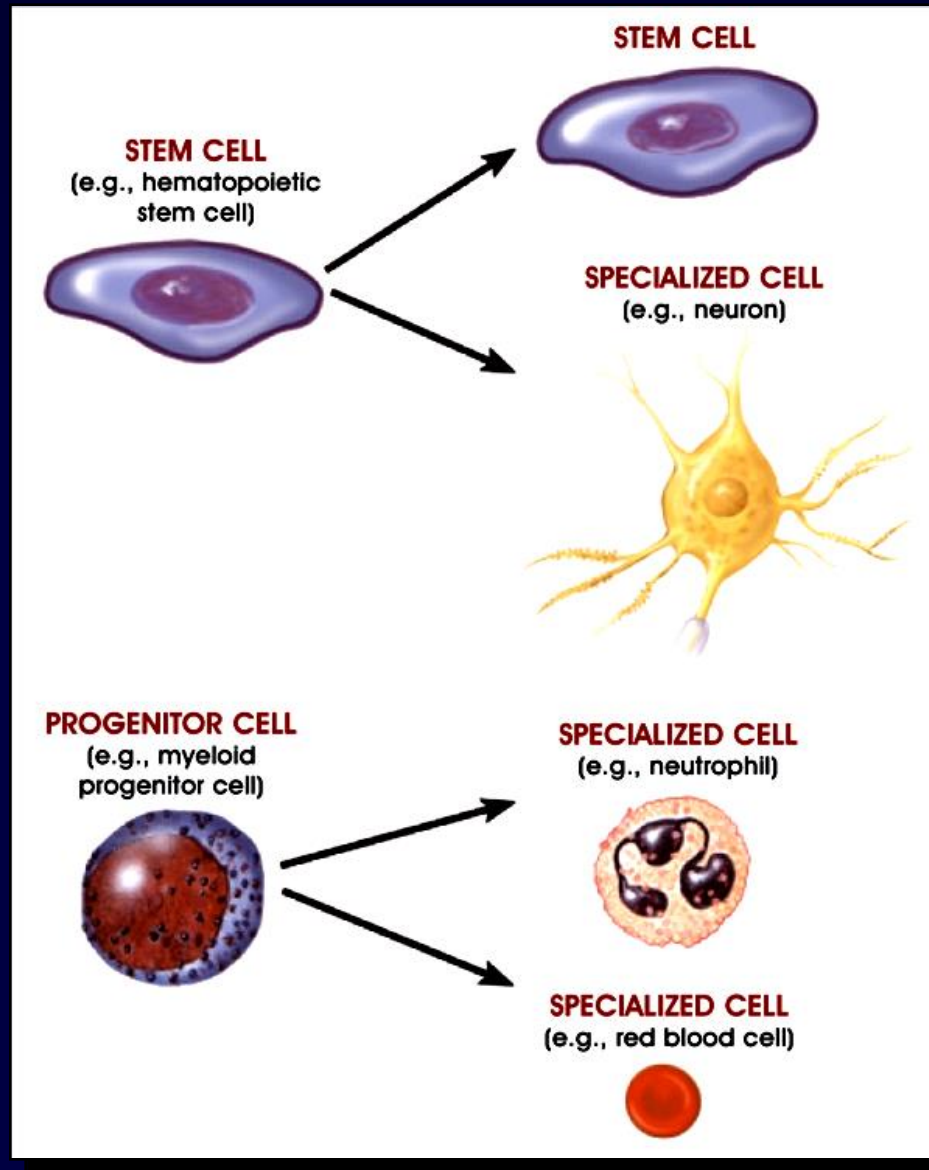


Figure 1. Classification of human stem cells.

Stemness

- sebeobnova
- diferenciacie

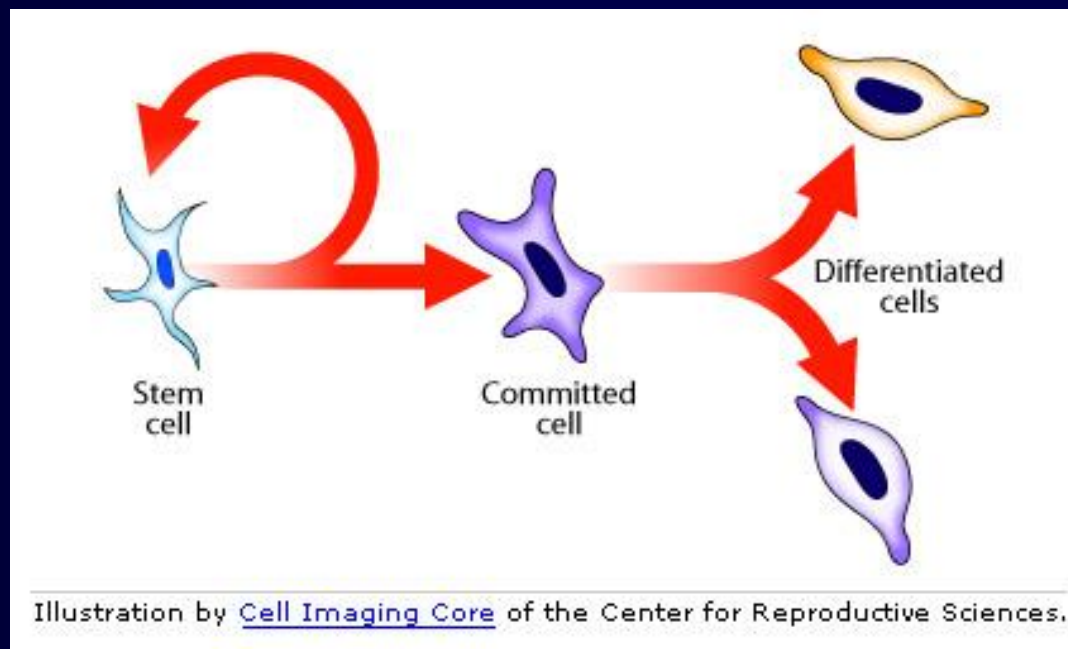


Sebeobnova (self-renewal)

SCs se mohou dělit po „neomezeně“ dlouhou dobu, narozdíl od ostatních buněk organismu

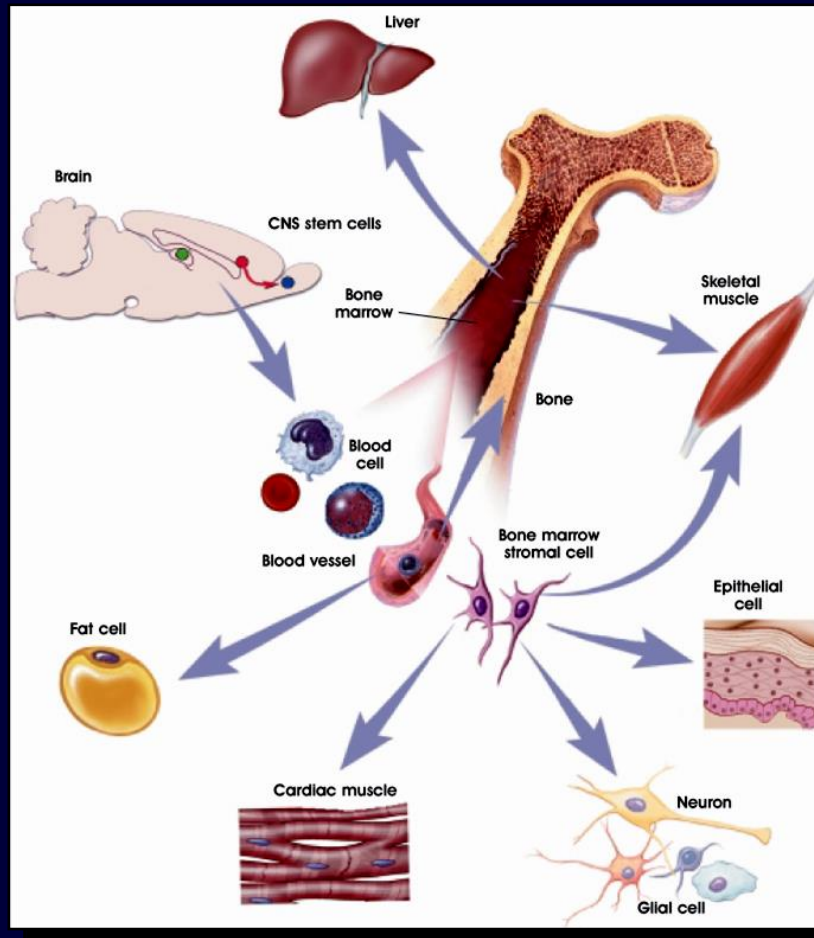
Diferenciace

SCs jsou nesespecializované buňky, postupnou diferenciací vznikají specializované typy buněk



Plasticita (Transdiferenciace)

schopnost adultních SCs určitého orgánu nebo tkáně diferencovat do jiného druhu tkáně



Replikační potenciál SCs:

In vivo

- ESCs - tvorba ICM ve stádiu blastocysty
- ASCs - po celou dobu života organismu

In vitro

- ESCs, neuronální ASCs - neomezeně
- většina ASCs – omezené dělení

- telomerázová aktivita

ESCs - symetrická mitóza

ASCs - asymetrická mitóza

Replikační potenciál SCs:

A – kmenová buňka

B – progenitorová buňka

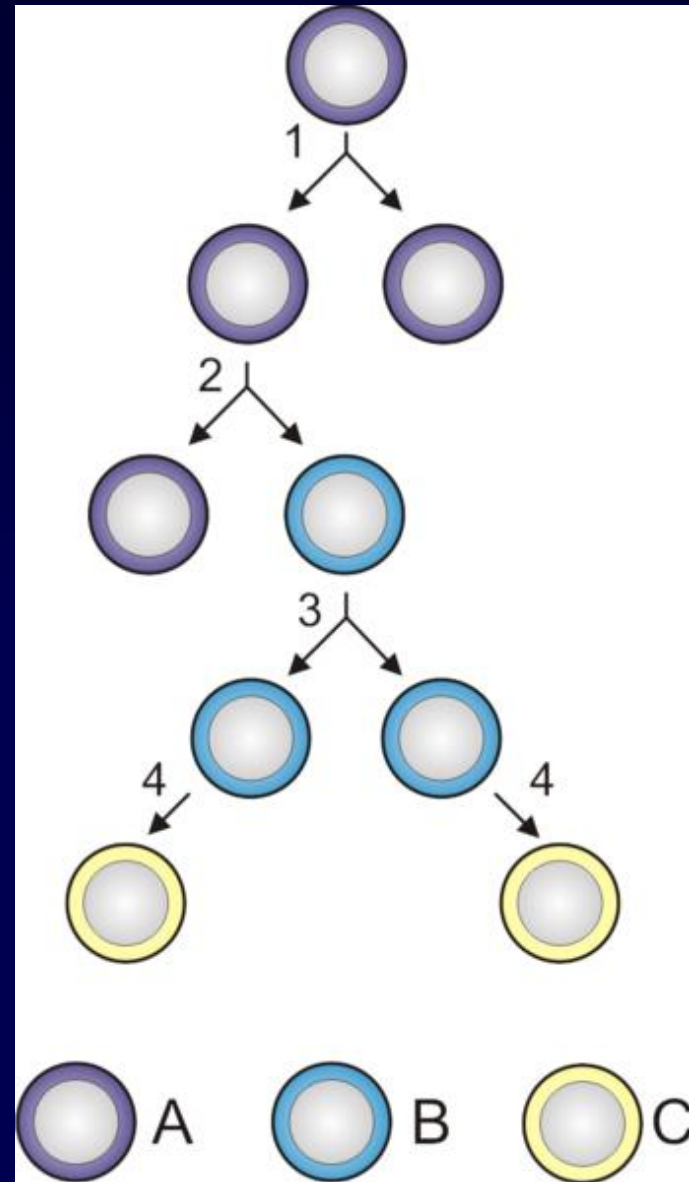
C – diferencovaná buňka

1 – symetrické dělení

2 – asymetrické dělení

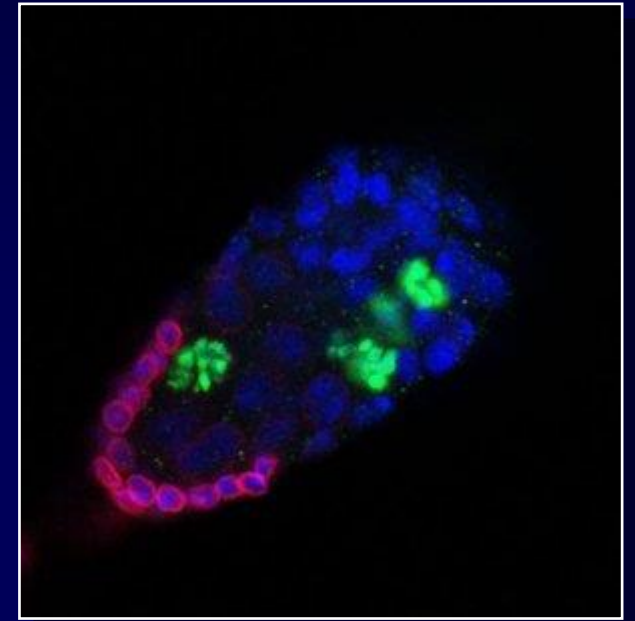
3 – dělení progenitorů

4 – terminální diferenciace



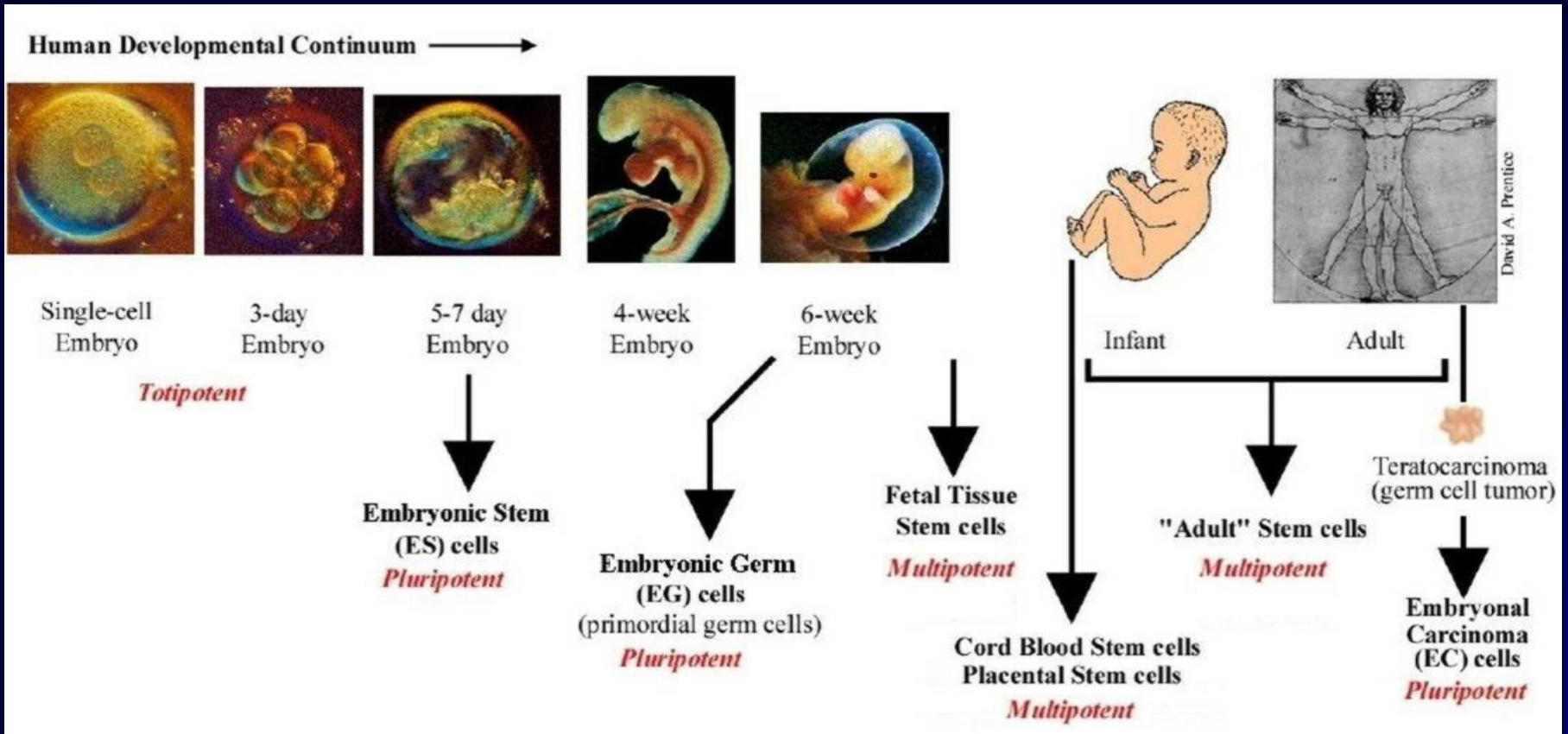
“Niche” (hnízdo) SCs

- mikroprostředí (microenvironment):
podpůrné buňky, extracelulární matrix, adhezní molekuly a signální molekuly
- udržuje self-renewal SCs
- chrání před deplecí živin
- reguluje proliferaci SCs
- ASCs - po celou dobu života organismu



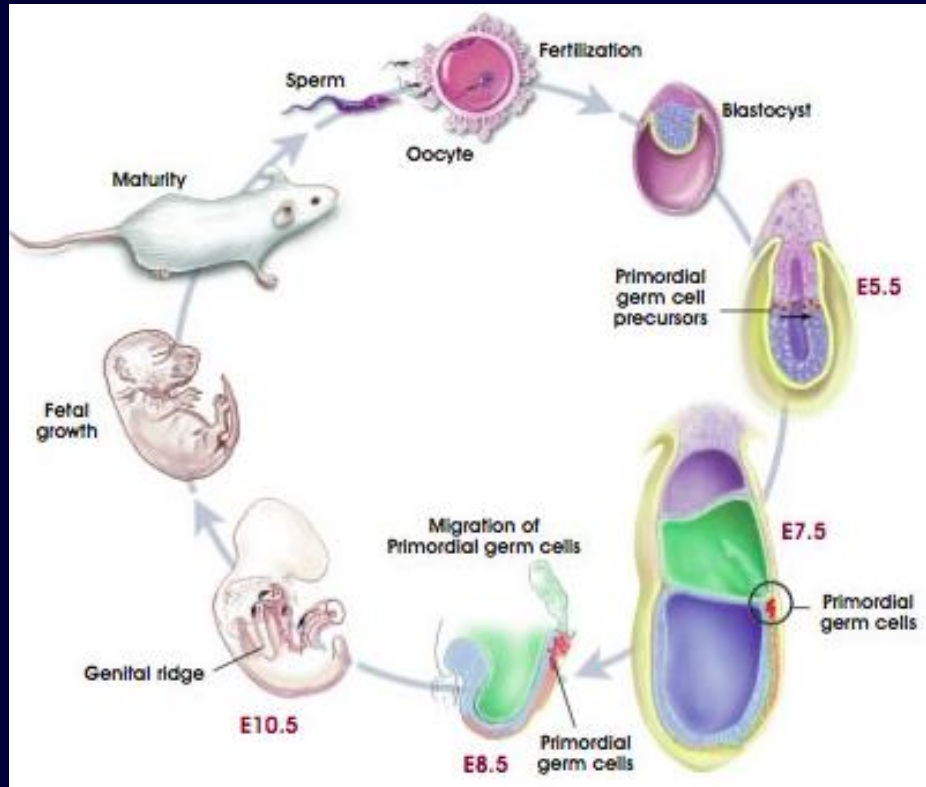
niche cells
SCs (mitóza)

Diferenciační potenciál lidských SCs



Embryonální zárodečné buňky (EG cells)

- vznik z primordiálních zárodečných buněk (PG cells)
- migrují v embryu do genitální lišty
- později společně se somatickými buňkami tvoří gonády
- izolace ve vhodný čas + kultivace *in vitro* → pluripotentní (EG cells)
- lidské EGCs netvoří teratomy ani chiméry



Fetální kmenové buňky

- primitivní (málo diferencované) buňky v orgánech fétu
- např: KB neurální lišty, hematopoetické KB, pankreatické progenitory, neurální KB
- izolovány z abortovaných fétů

Kmenové buňky z pupečníku

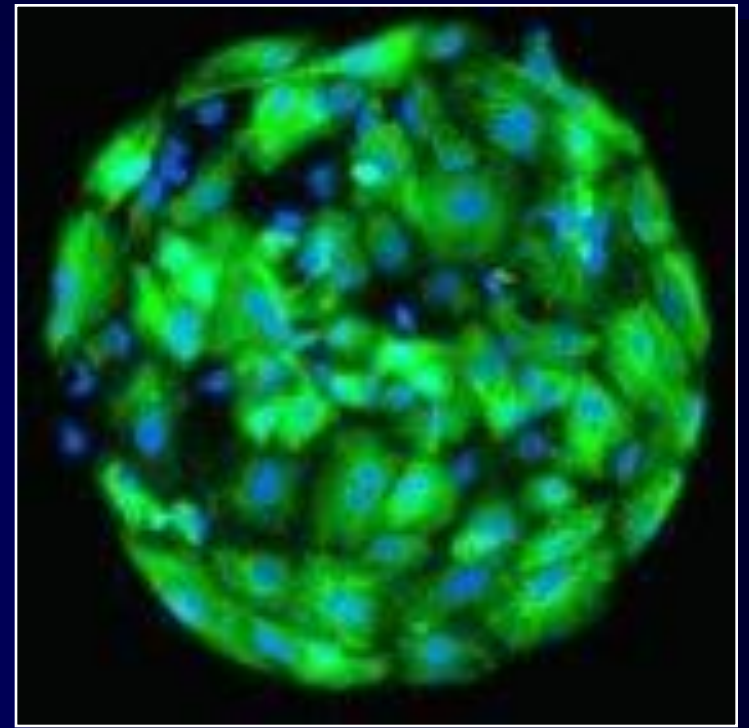
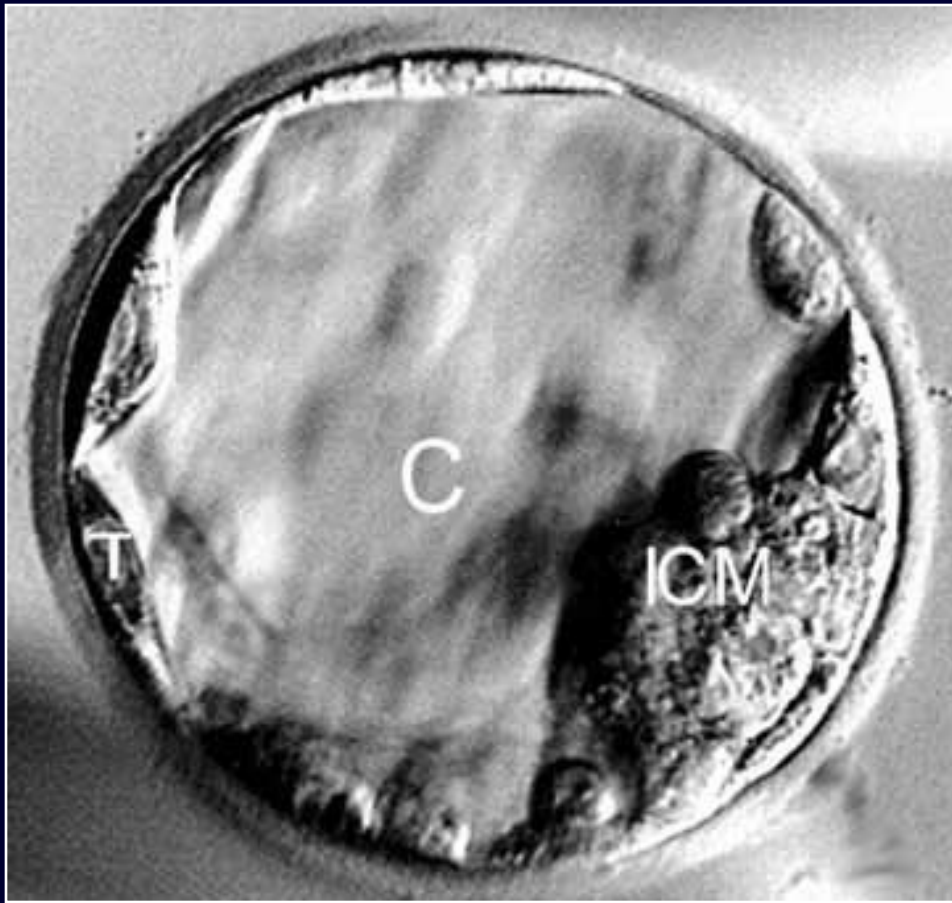
pupečnicková krev – hematopoetické KB (HSCs), endoteliální progenitory, mezenchymální KB (MSCs), VSELs...

Whartonův rosol – zdroj mezenchymálních KB (MSCs)

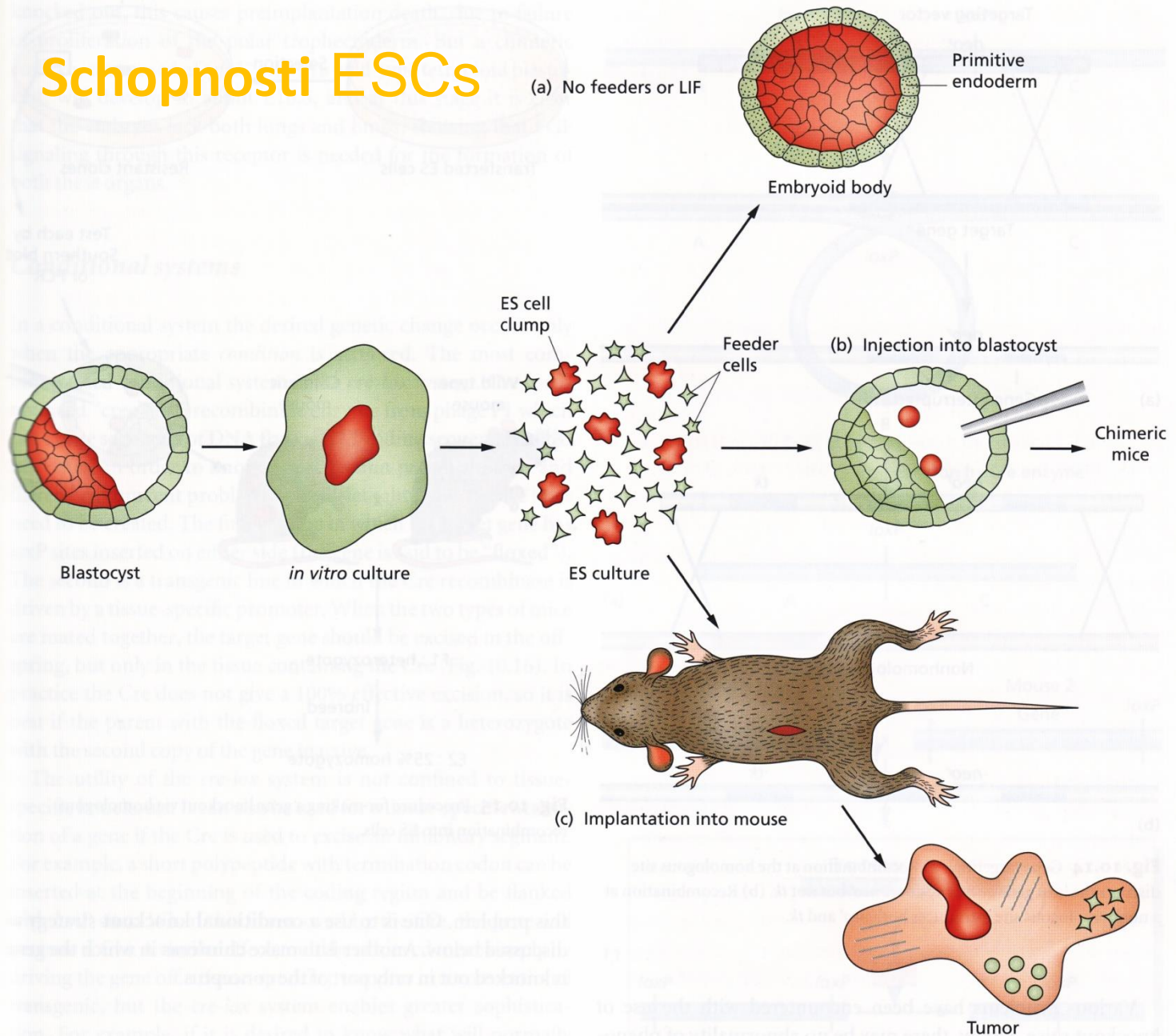
- většinou jsou multipotentní
- buňky tvoří kolonie, mohou být kultivovány a mají dlouhé telomery
- vyšší imunologická kompatibilita než buňky KD
- HSCs - frekvence výskytu minimálně stejná jako v kostní dřeni

EMBRYONÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY

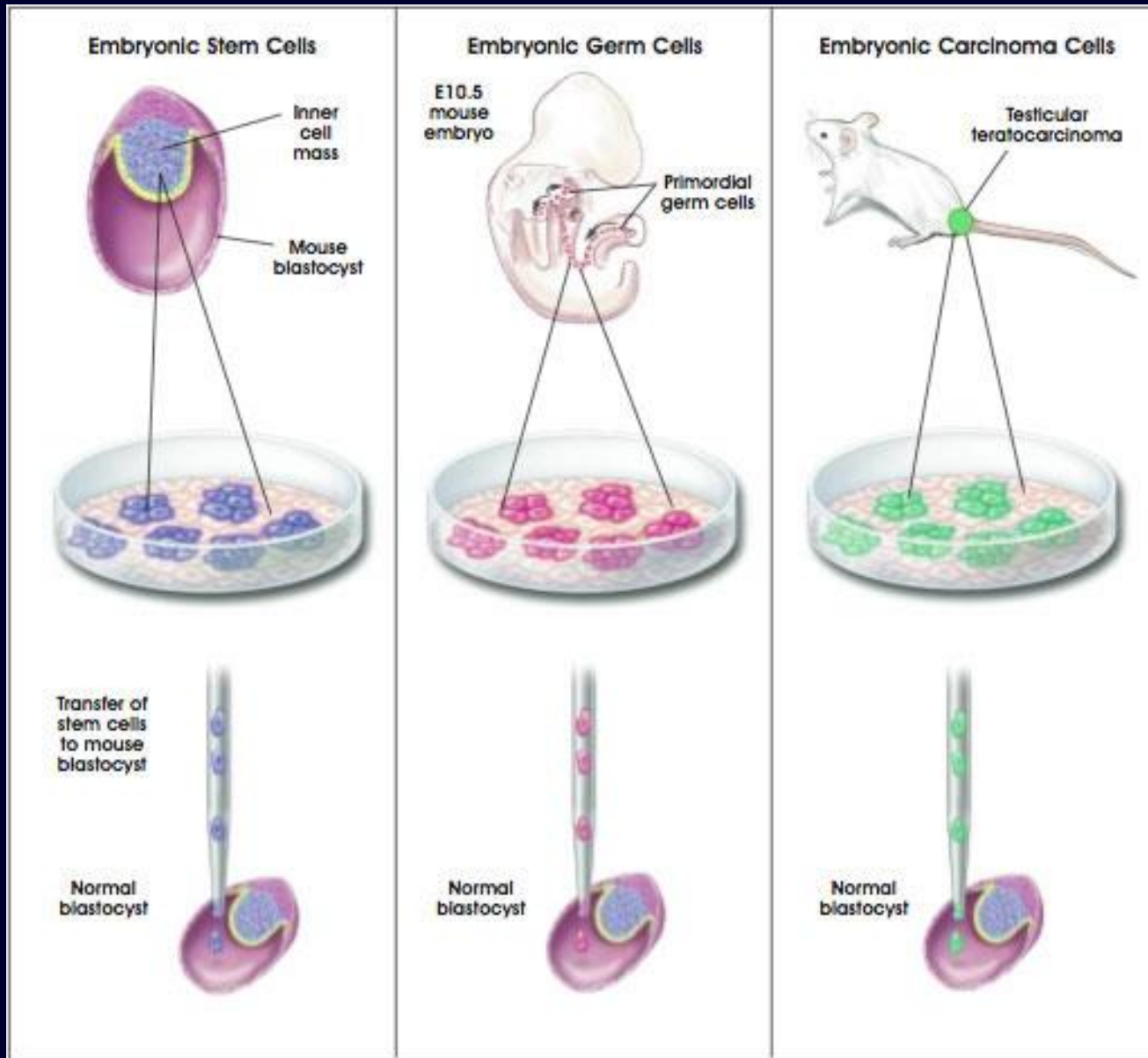
5denní blastocysta



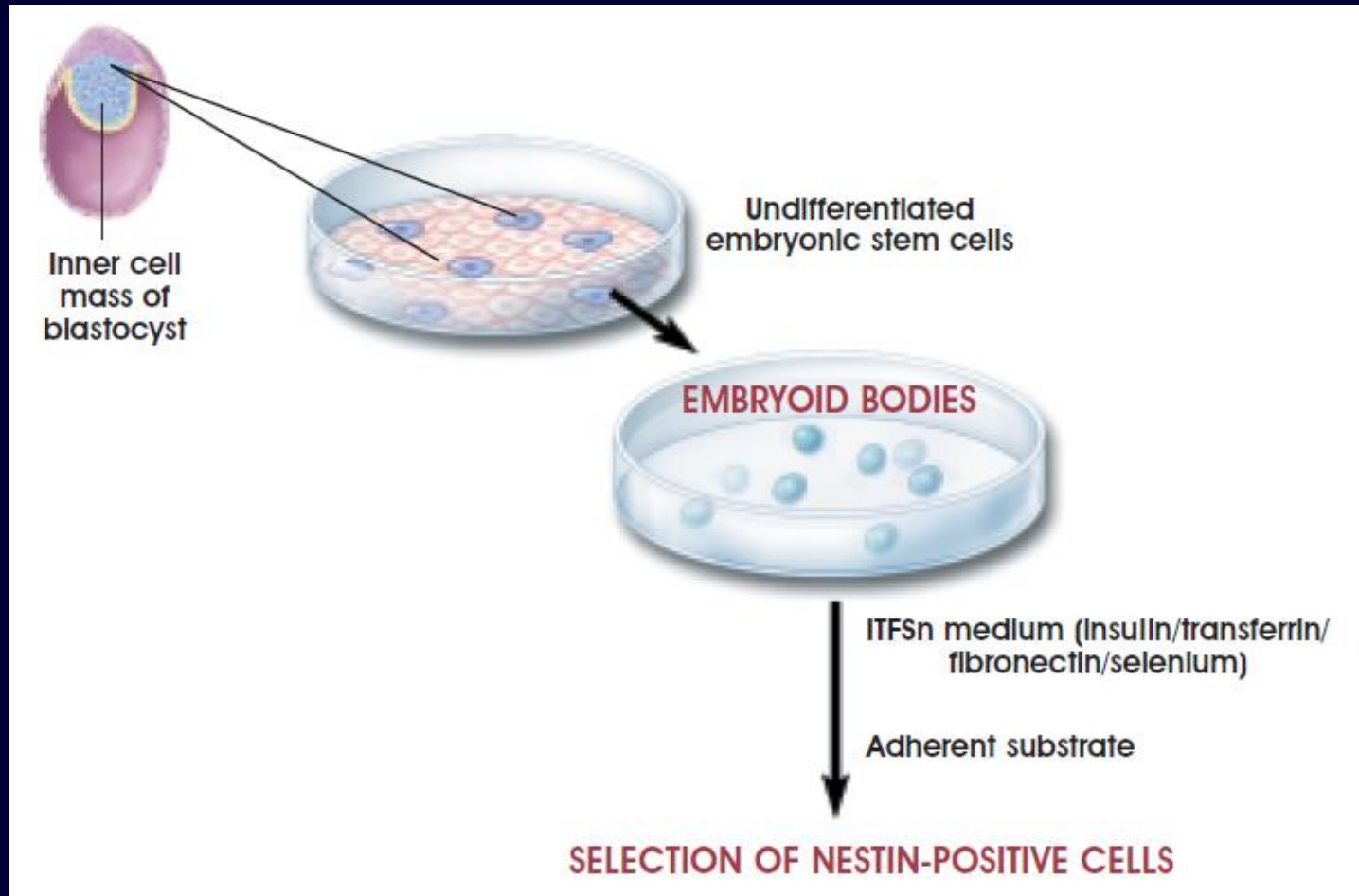
Schopnosti ESCs



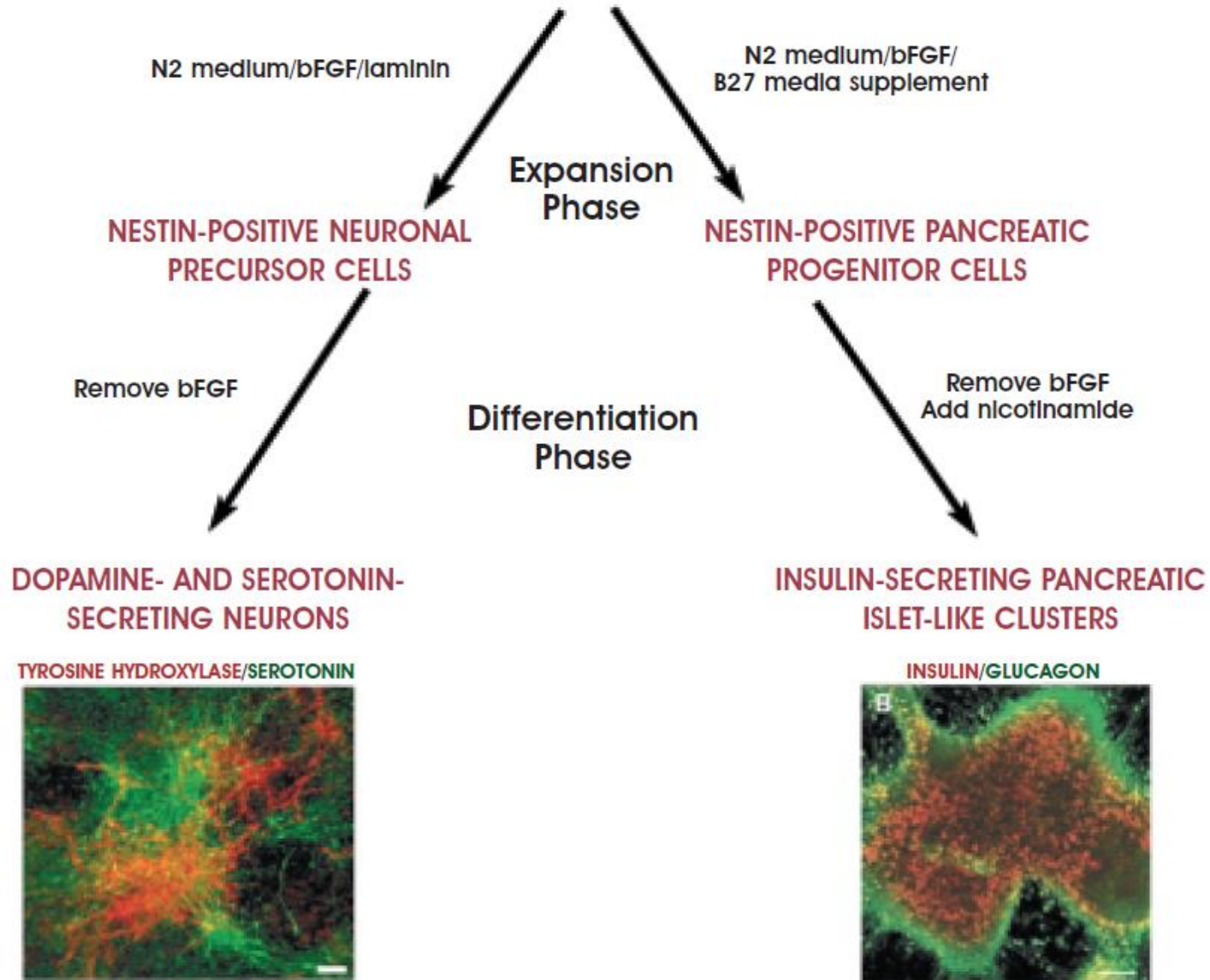
Typy mESCs



Izolace a indukovaná diferenciace ESCs



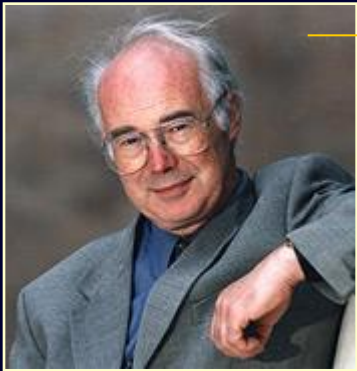
SELECTION OF NESTIN-POSITIVE CELLS



LINIE EMBRYONÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK V PODMÍNKÁCH IN VITRO



1981 - myší ES buněčná linie:



Nobel Prize 2007

M.J. Evans and M.H. Kaufman
University of Cambridge, UK

Gail R. Martin

University of California,
San Francisco, CA, USA

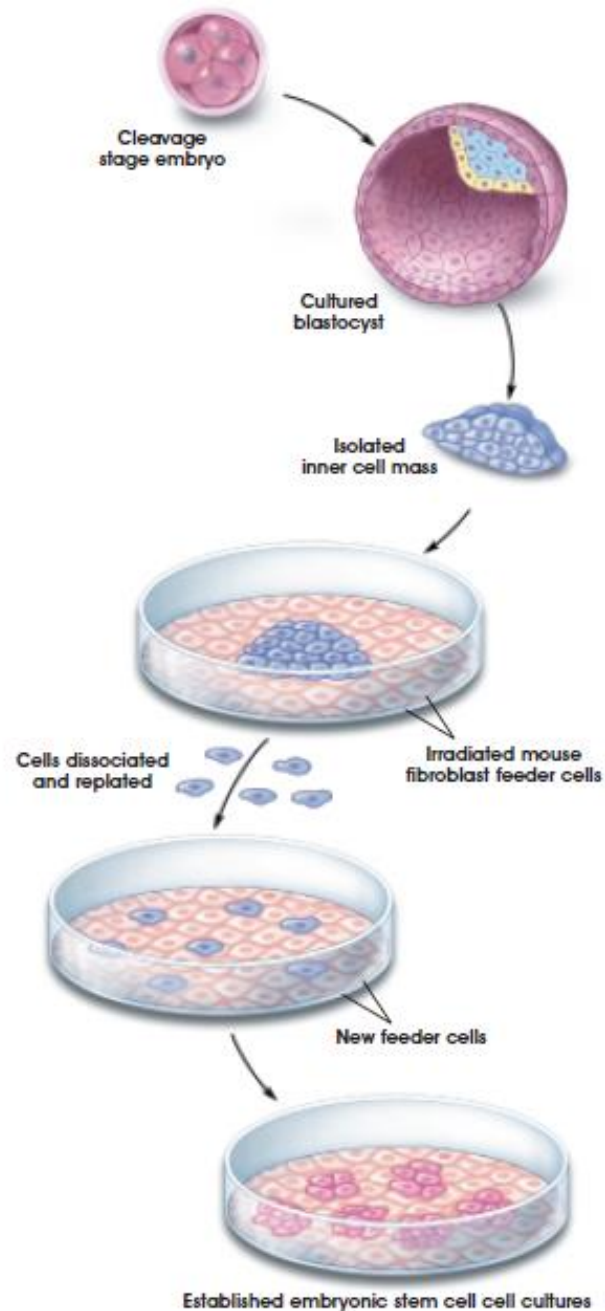
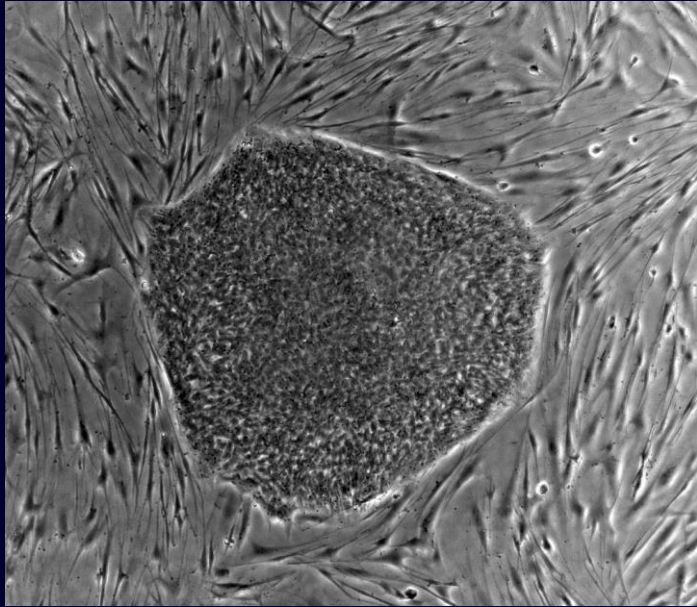


1998 - lidská ES buněčná linie:



J.A. Thomson et al.
University of Wisconsin,
Madison, WI, USA

Postup při vytvoření linie ESCs:

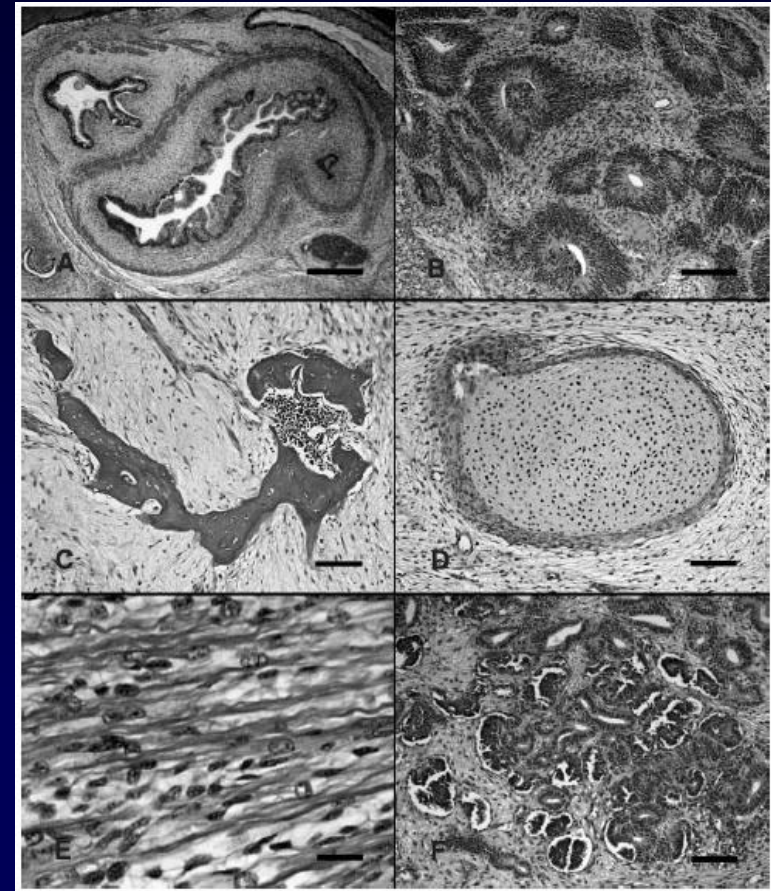
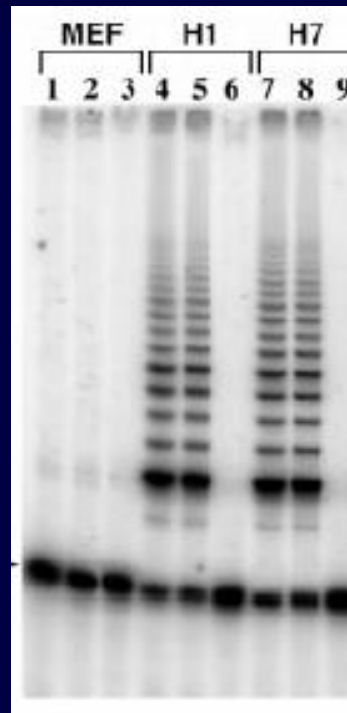
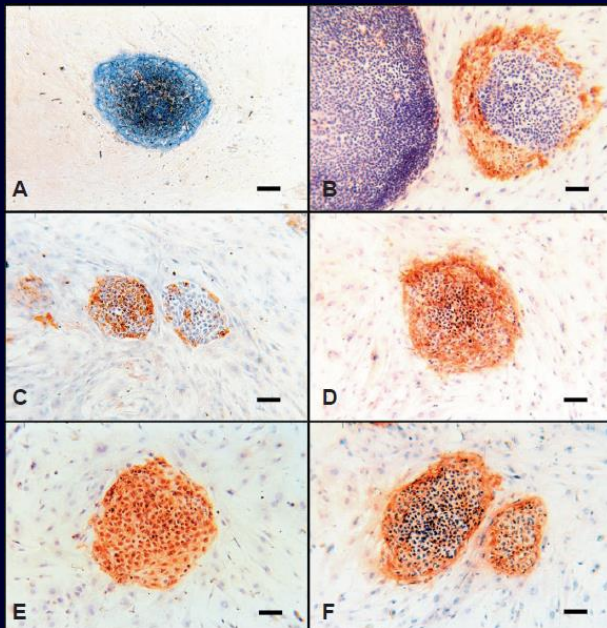


Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts

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

Science **282**, 1145 (1998);

expresují aktivitu
telomerázy



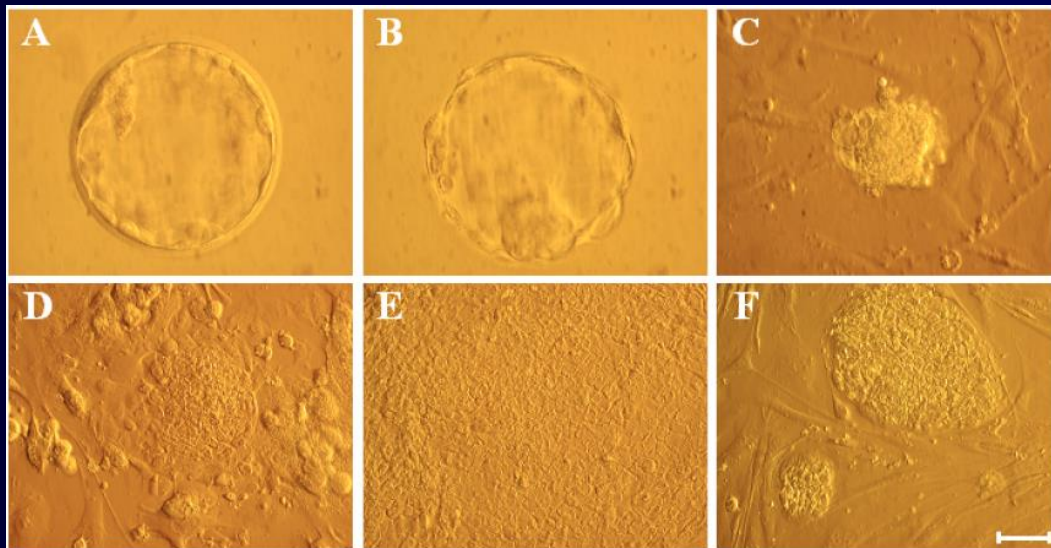
(A) Gut-like structures (B) Rosettes of neural epithelium (C) Bone (D) Cartilage (E) Striated muscle (F) Tubules interspersed with structures resembling fetal glomeruli.

expresují: AP, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81

Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines in Czech Republic

Aleš Hampl^{1,2,3}, Stanislava Košková¹, Martina Vodinská¹, and Petr Dvořák^{1,2,3}

- odstanění zony pelucidy pronázou (proteáza)
- imunochirurgické uvolnění ICM (anti-lidský IgG, komplement)
- přenesení ICM na feeder-layer (MEFs)
- pasážování mechanicky nebo enzymaticky



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. But Eva Syková, 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. ■

NATURE | VOL 424 | 7 AUGUST 2003 | www.nature.com/nature

227

ZÁKON

ze dne 26. dubna 2006

**o výzkumu na lidských embryonálních kmenových buňkách
a souvisejících činnostech a o změně některých souvisejících zákonů**

<http://portal.gov.cz/app/zakony/zakon.jsp?page=0&fulltext=&nr=227~2F2006&part=&name=&rpp=15#seznam>

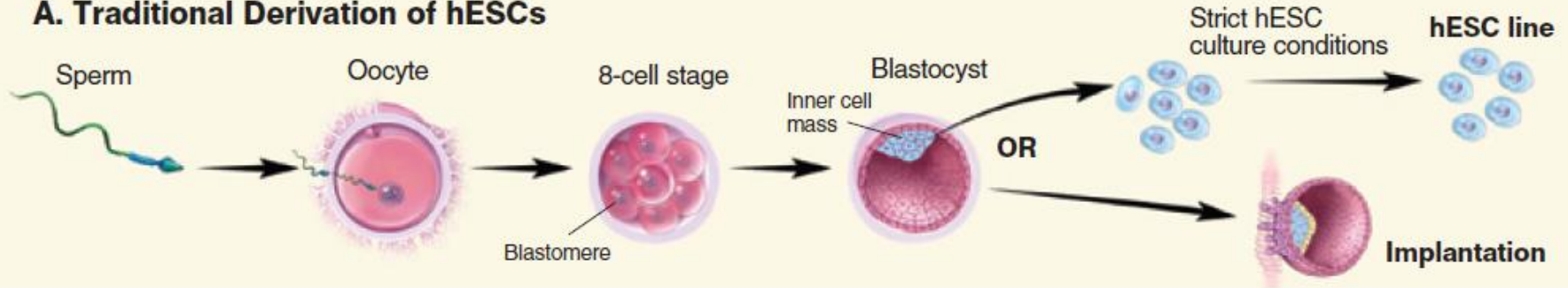
Zákon č. 40/2009 Sb., trestní zákoník

§ 167 Nedovolené nakládání s lidským embryem a lidským genomem

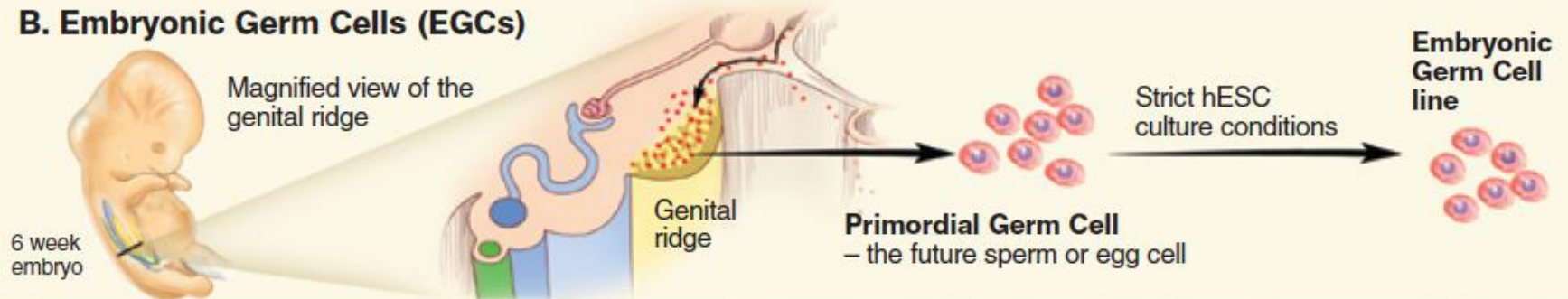
- (1)** Kdo v rozporu s jiným právním předpisem
- a) použije pro výzkum lidské embryo nebo větší množství lidských embryonálních kmenových buněk nebo jejich linií,
 - b) doveze nebo vyveze lidské embryo nebo větší množství lidských embryonálních kmenových buněk nebo jejich linií, nebo
 - c) přenese lidský genom do buněk jiného živočišného druhu nebo naopak,
- bude potrestán odnětím svobody až na tři léta nebo zákazem činnosti.
- (2)** Stejně bude potrestán,
- a) kdo provádí zákroky směřující k vytvoření lidského embrya pro jiný účel než pro přenesení do ženského organismu,
 - b) kdo přenese vytvořené lidské embryo do dělohy jiného živočišného druhu, nebo
 - c) kdo během výzkumu na lidských embryonálních kmenových buňkách provádí s těmito buňkami manipulace směřující k vytvoření nového lidského jedince (reprodukční klonování).
- (3)** Odnětím svobody na tři léta až osm let nebo propadnutím majetku bude pachatel potrestán,
- a) spáchá-li čin uvedený v odstavci 1 nebo 2 jako člen organizované skupiny,
 - b) spáchá-li takový čin opětovně, nebo
 - c) získá-li takovým činem pro sebe nebo pro jiného značný prospěch.
- (4)** Odnětím svobody na pět až dvanáct let nebo propadnutím majetku bude pachatel potrestán,
- a) spáchá-li čin uvedený v odstavci 1 nebo 2 ve spojení s organizovanou skupinou působící ve více státech, nebo
 - b) získá-li takovým činem pro sebe nebo pro jiného prospěch velkého rozsahu.
- (5)** Příprava je trestná.

Alternativní metody získání pluripotentních SCs

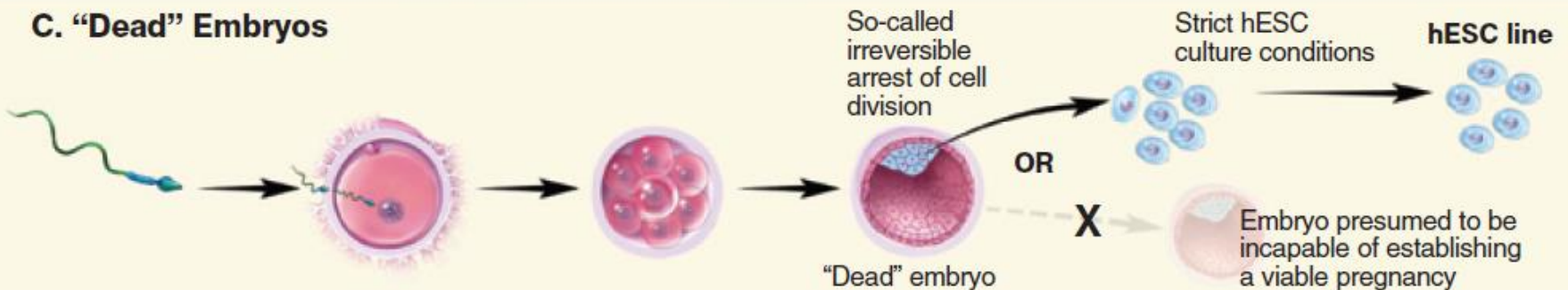
A. Traditional Derivation of hESCs



B. Embryonic Germ Cells (EGCs)

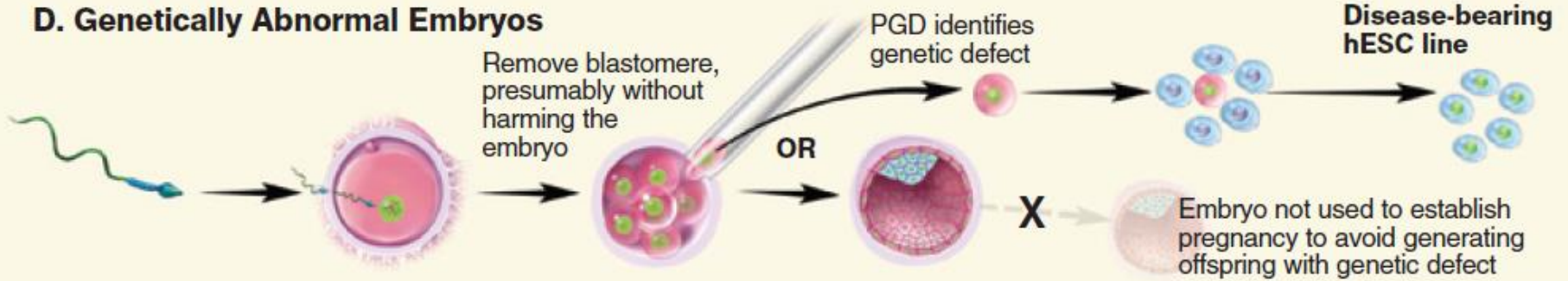


C. "Dead" Embryos

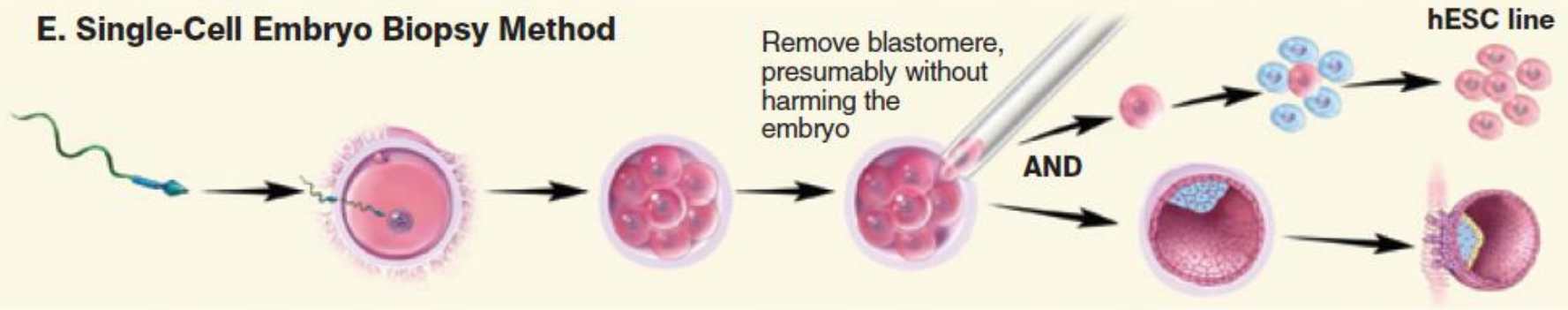


Alternativní metody získání pluripotentních SCs

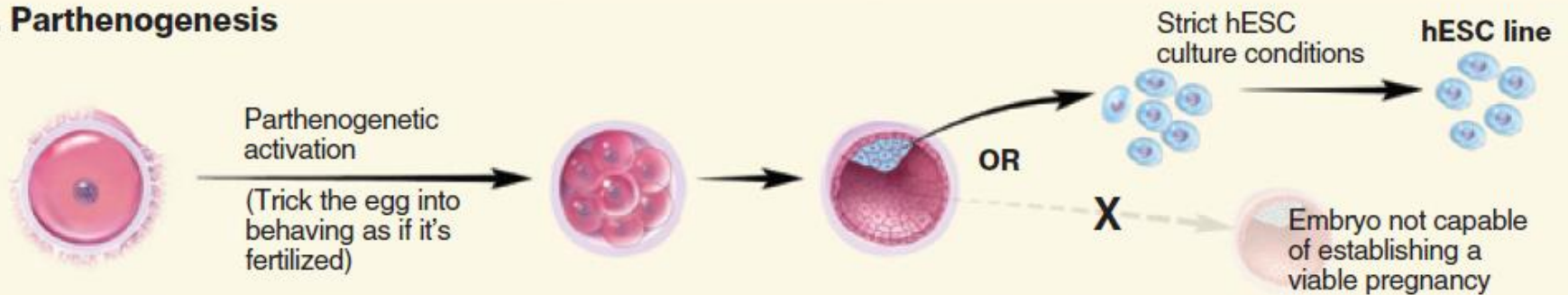
D. Genetically Abnormal Embryos



E. Single-Cell Embryo Biopsy Method

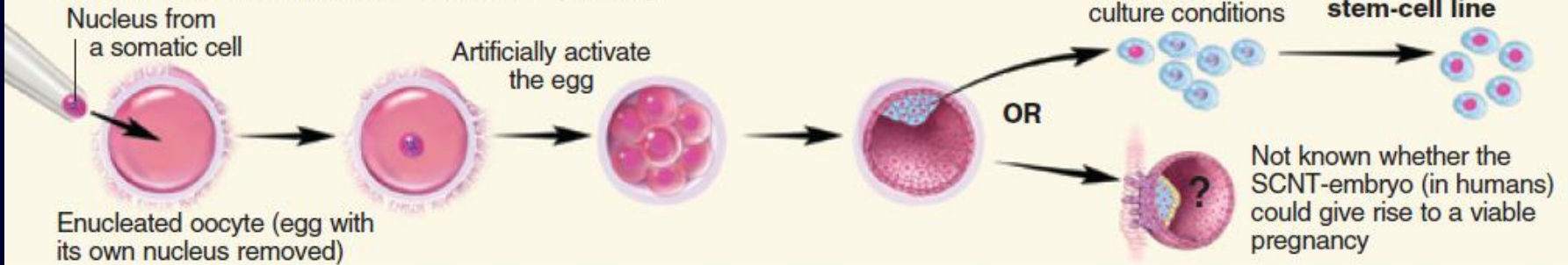


F. Parthenogenesis

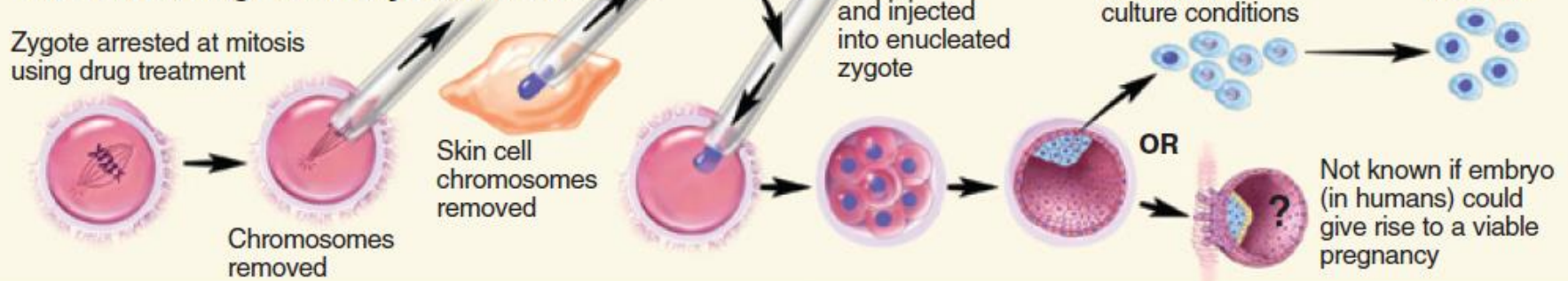


Alternativní metody získání pluripotentních SCs

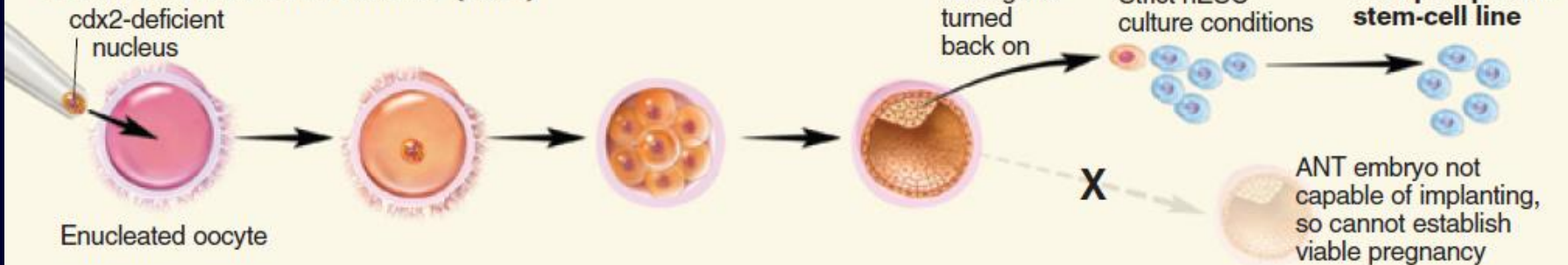
G. Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT)



H. SCNT Using an Embryo at Mitosis



I. Altered Nuclear Transfer (ANT)



Markery lidských ESCs:

- Oct-4 (TF, octamer-4 binding protein)
- Nanog (homeobox TF)
- SSEA3
SSEA4
(povrchové markery: Stage Specific Embryonic Antigen)
- Tra-1-60
Tra-1-81
(Tumor-Rejection Antigen)
- alkalická fosfatáza (Tra-2-54)

Kultivační médium pro izolaci lidských ESCs:

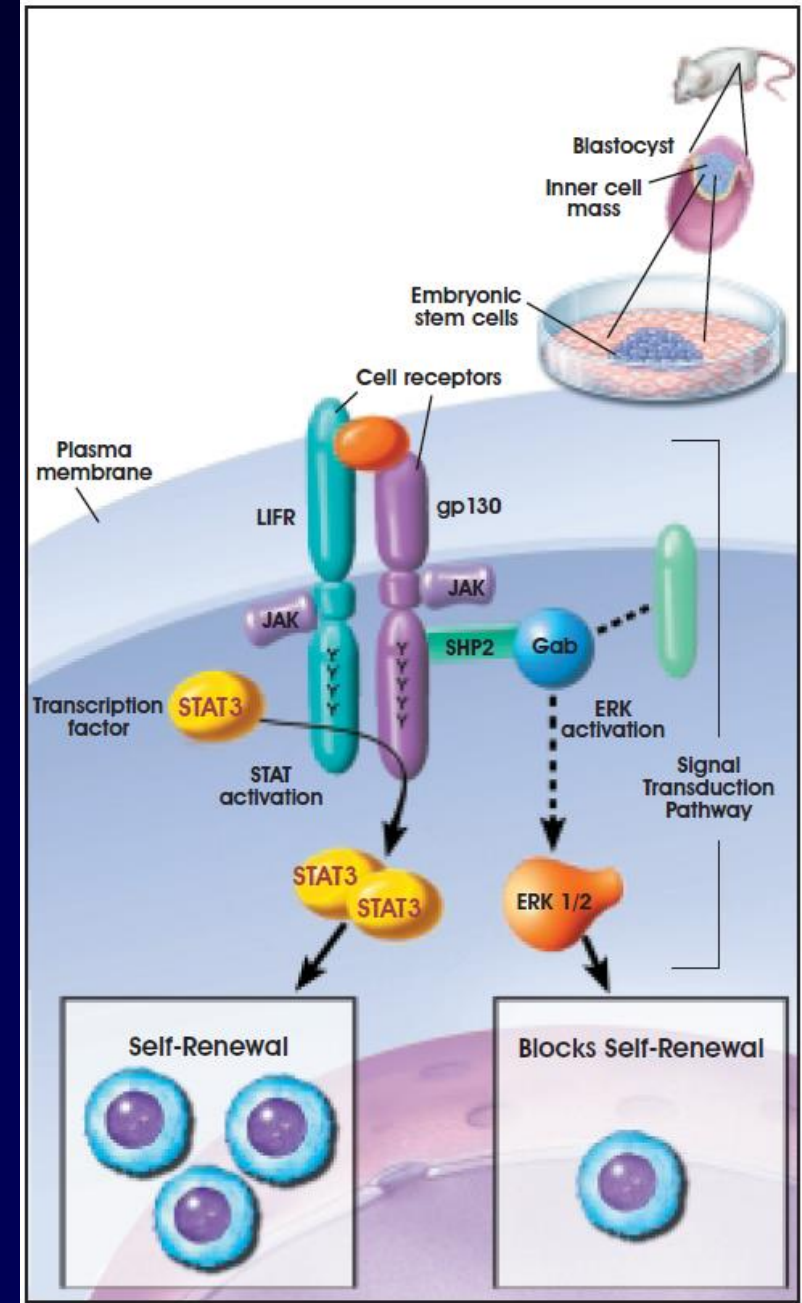
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- 20% FBS nebo KO-SR (serum replacement)
- aditiva (β -merkaptoethanol, Gln, AAs, Atb)
- růstové faktory: bFGF (FGF2)
- feeder-layer (myší embryonální fibroblasty, lidské fibroblasty): inaktivace mitomycinem-C
- matrigel

Metody diferenciacie lidských ESCs:

- kultivace při vyšší densitě
- kultivace v přítomnosti dalších buněčných linií
- přidavek růstových faktorů / cytokinů do média
- aktivace endogenních transkripčních faktorů
- suspenzní kultura (tvorba embryoid bodies)

Zachování self-renewal mESCs vs. hESCs

- nepotřebují feeder
- LIF (leukemia inhibitory factor)
- vazba na LIF R a gp130 receptor
- aktivace (fosforylace)
transcripčního faktoru STAT3
- protiháč: ERK1/2 → diferenciacce
- specifický marker SSEA-1



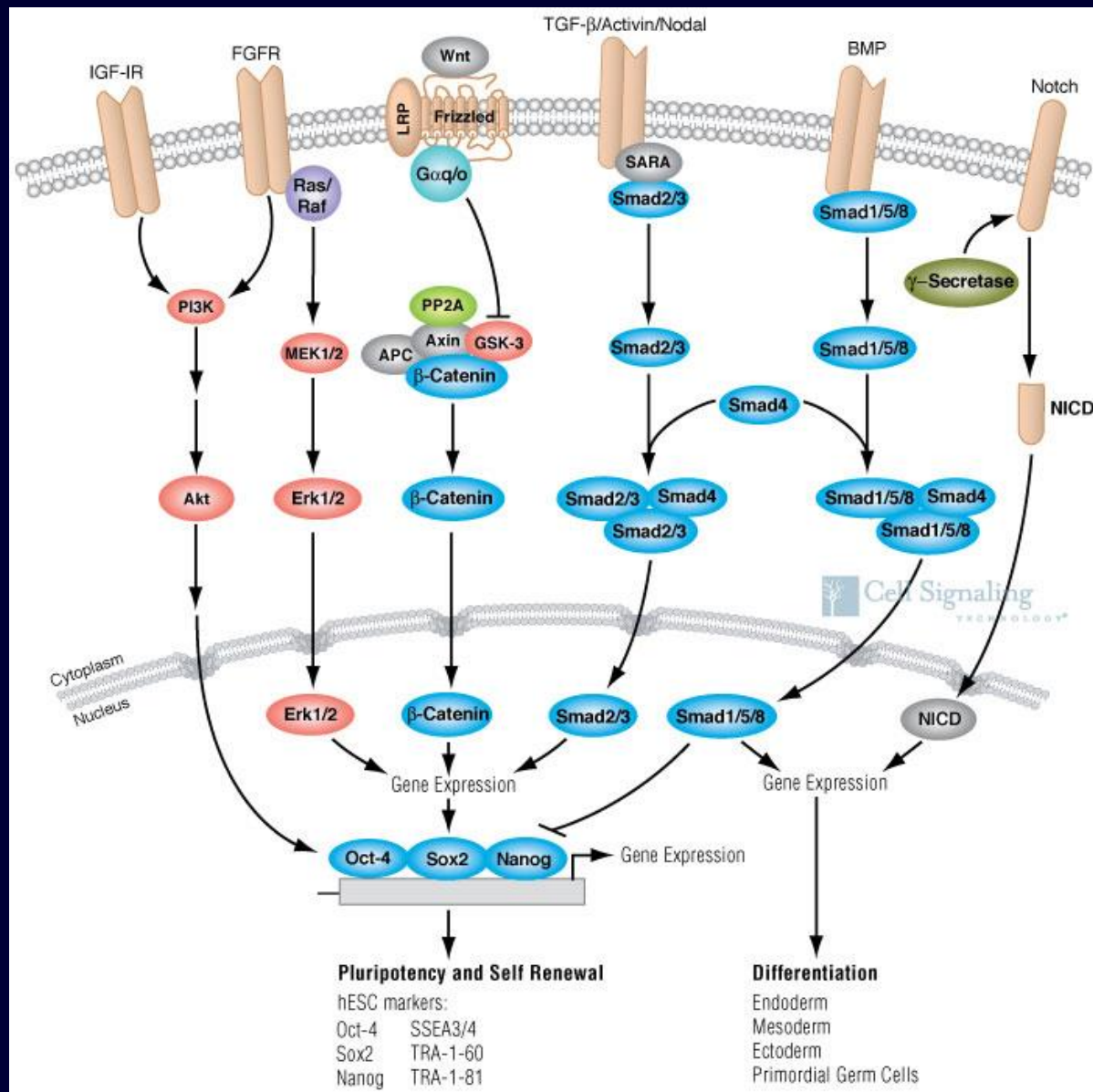
Zachování self-renewal mESCs vs. hESCs

- potřebují feeder layer nebo
- adhezivní matrix (laminin, kolagen IV, heparan sulfát proteoglykany(HSPGs), entaktin – Matrigel)
- kondiciované médium z MEF
- KO - serum replacement (insulin, transferin, BSA)
- FGF-2 (4ng/ml)

- aktivace signálních drah: FGF, TGF β rodina - activin, nodal
- protiháč: BMP \rightarrow diferenciaci



Základní signální dráhy ovlivňující self-renewal a pluripotenci

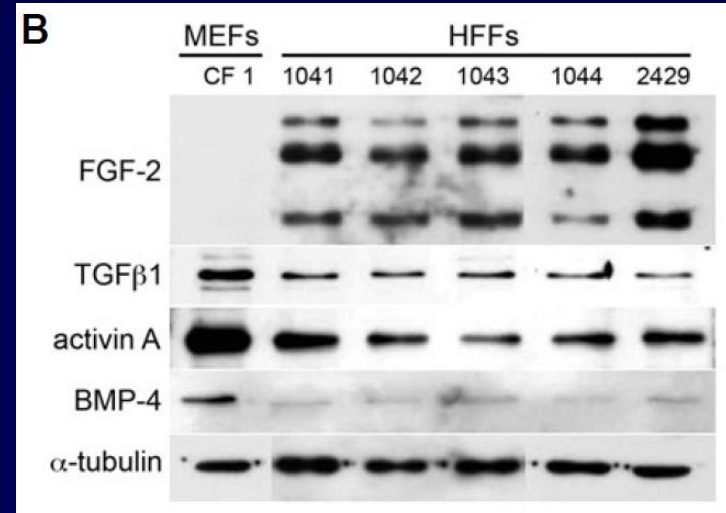
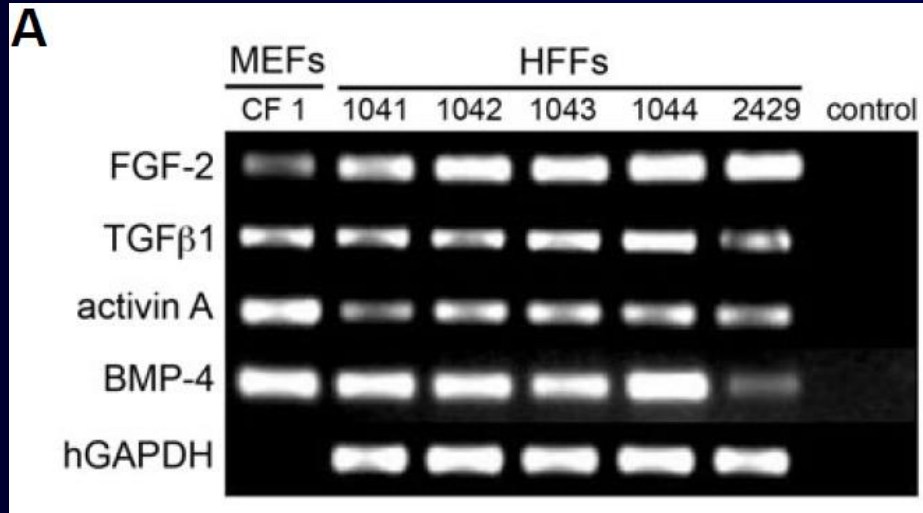
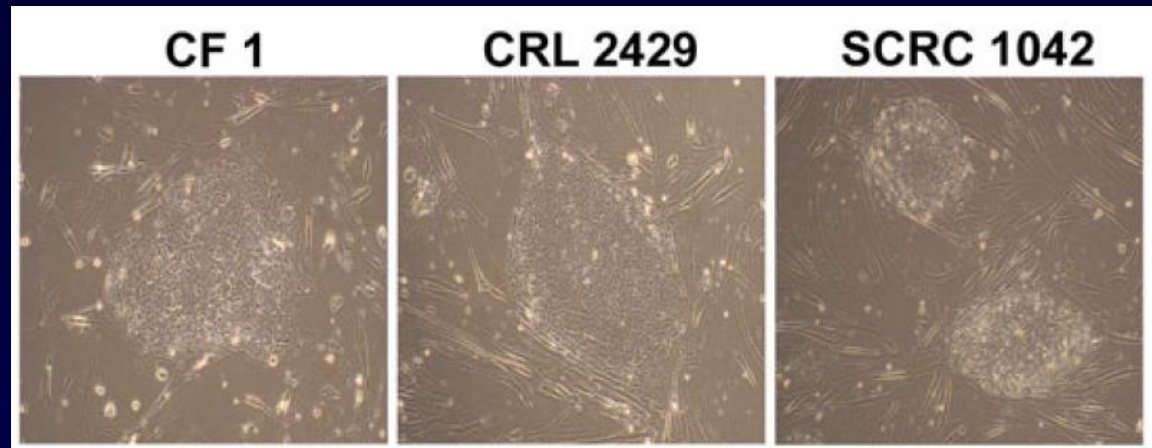


myší

lidský

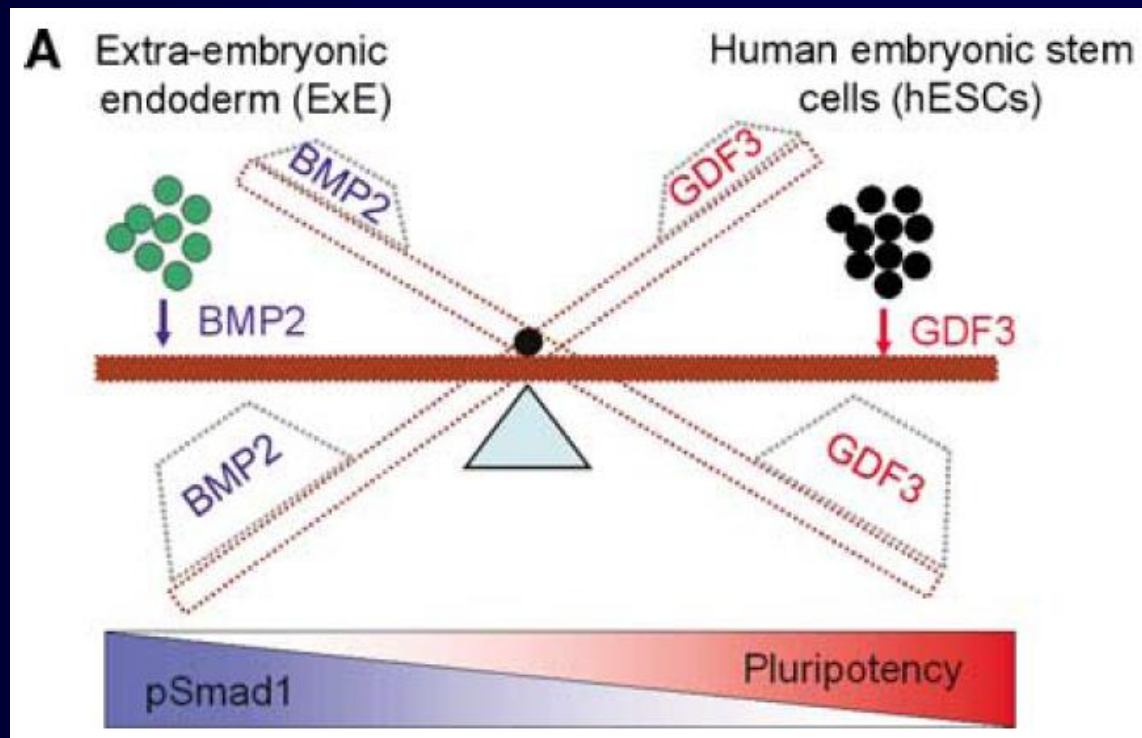
feeder-layer myší vs. lidský

- druhová odlišnost
- odlišnosti v produkci růstových faktorů



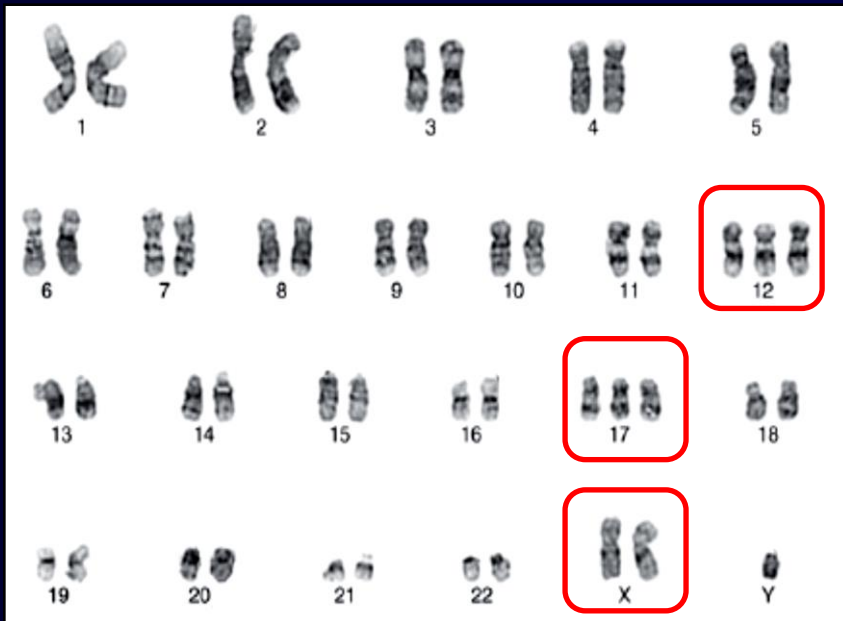
hESCs niche

- regulace Smad1 signální (diferenciační) dráhy
- agonista-BMP2 (bone morphogenic factor)
- produkován extra-embryonálním endodermem
- antagonist – GDF3 (growth and differentiation factor (GDF)
- produkován hESCs

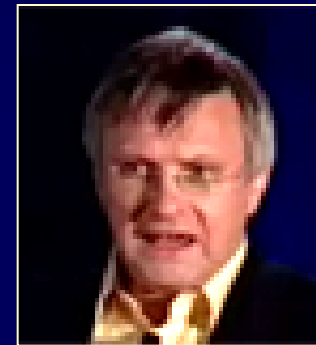


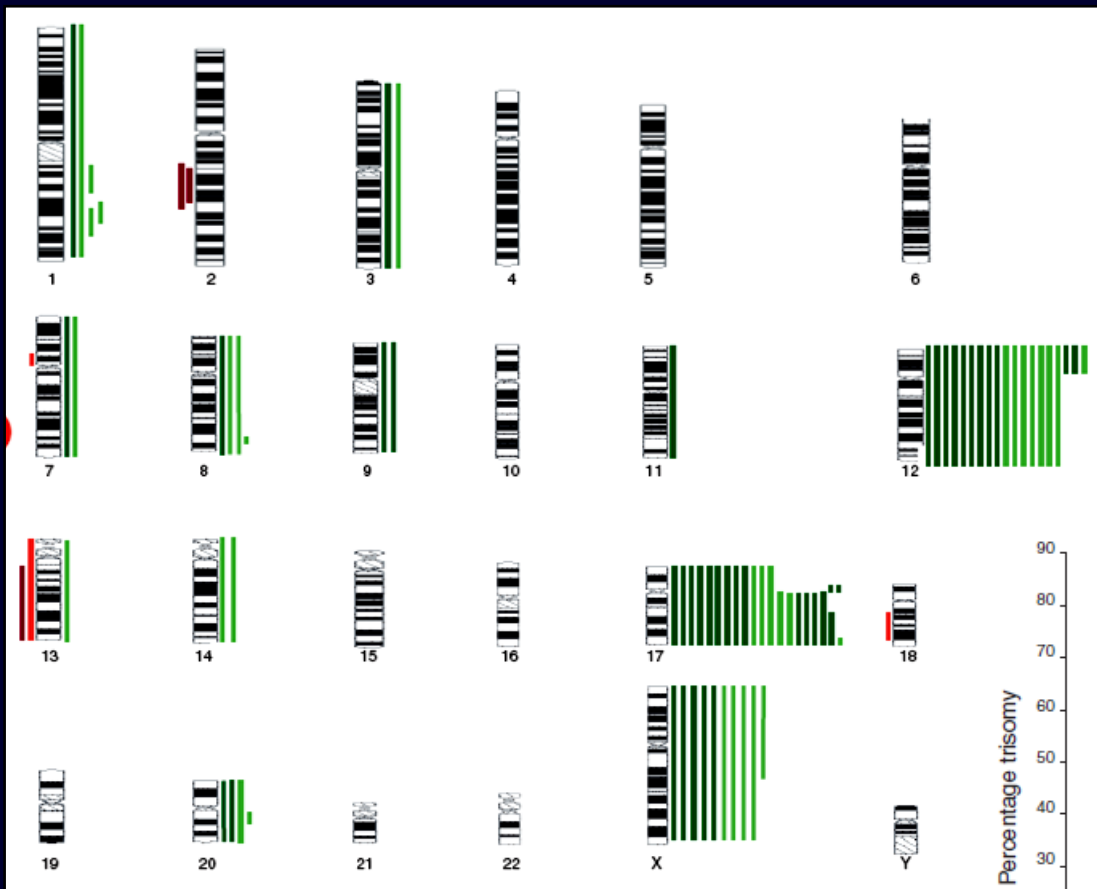
„Adaptované“ lidské ESCs:

- ESCs v podmínkách *in vitro*
- změny v karyotypu
- nejčastěji zisky (gains) na chromosomech 12, 17 a X
- obdobné změny - markery germinálních nádorů
- prokázáno již od nízkých pasáží



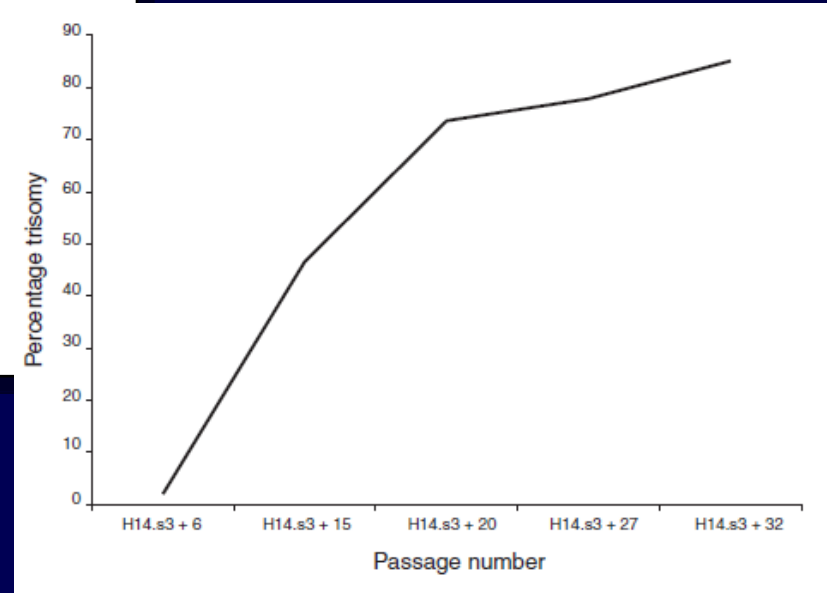
Peter Andrews
University of Sheffield





trisomie ch17

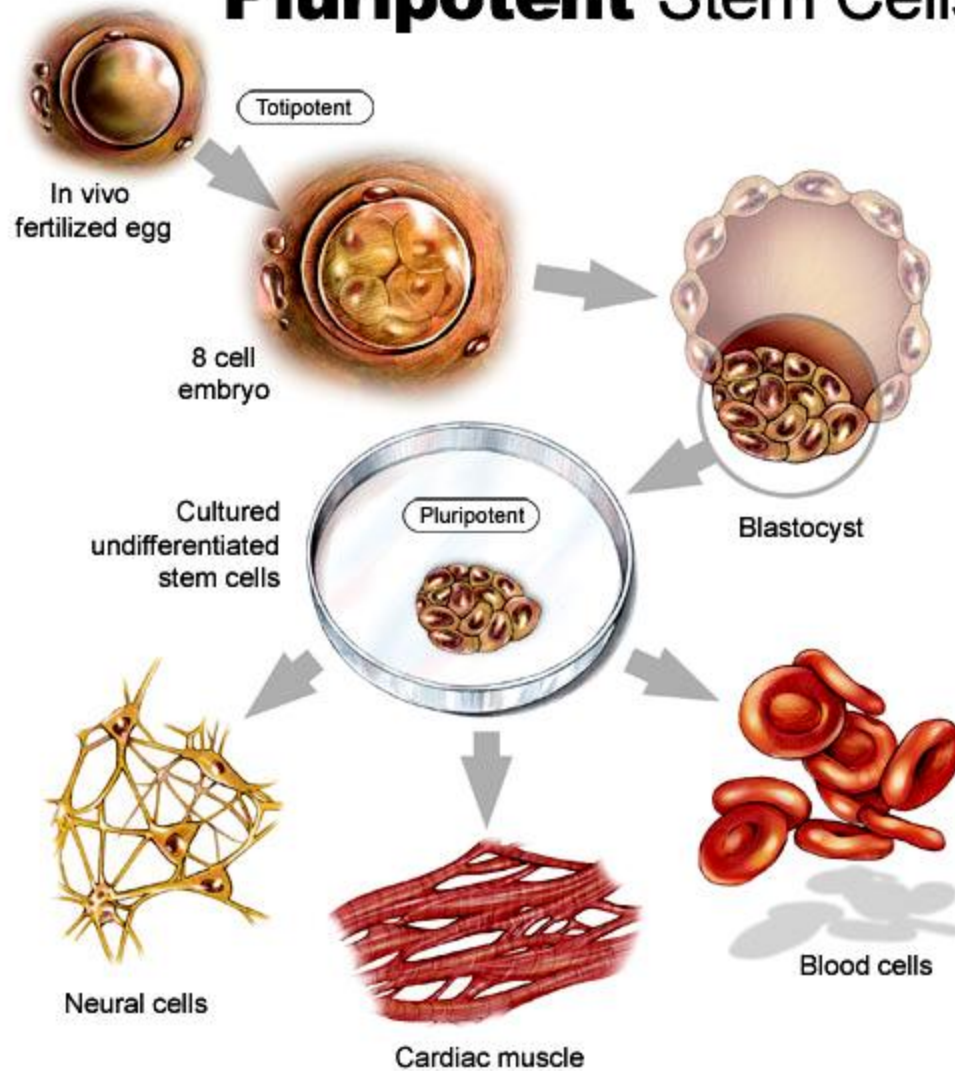
zisky a ztráty
části chromozomů



Baker et al., Nature Biotechnology 2007



Pluripotent Stem Cells



Diferenciační protokoly pro ESCs *in vitro*:

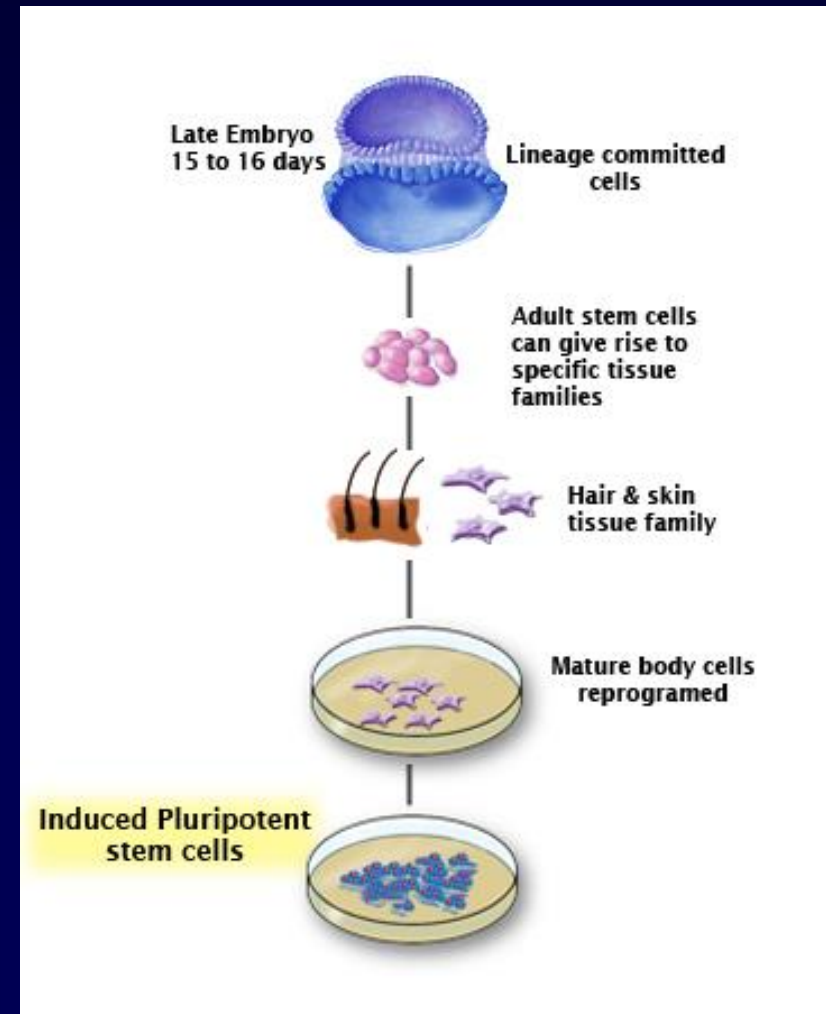
- neurony, astrocyty, oligodendrocyty
- kardiomyocyty
- endoteliální buňky
- pankreatické β -buňky
- CD34+ hematopoetické progenitorové buňky
- antigen-prezentující buňky a NK-buňky
- buňky plicního epitelu
- osteoblasty
- hepatocyty
- melanocyty
- buňky prostaty

Přínos studia kmenových buněk

- Studium vývoje organismů na buněčné a molekulární úrovni
- Nádorová biologie – nádorové KB
- Tvorba modelů různých onemocnění
- Studium „genových cílů“ pro nová léčiva
- Testování léčiv, teratogenních a toxických sloučenin
- Studium mechanismů regenerace tkání
- Buněčná terapie - náhrada chybějící nebo nefunkční buněčné populace

Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs)

- diferencovaná somatická buňka
- reprogramace vývoje
- vnesením a spuštěním vhodných genů
- změna do „embryonálního“ stádia



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 332-0012, Japan

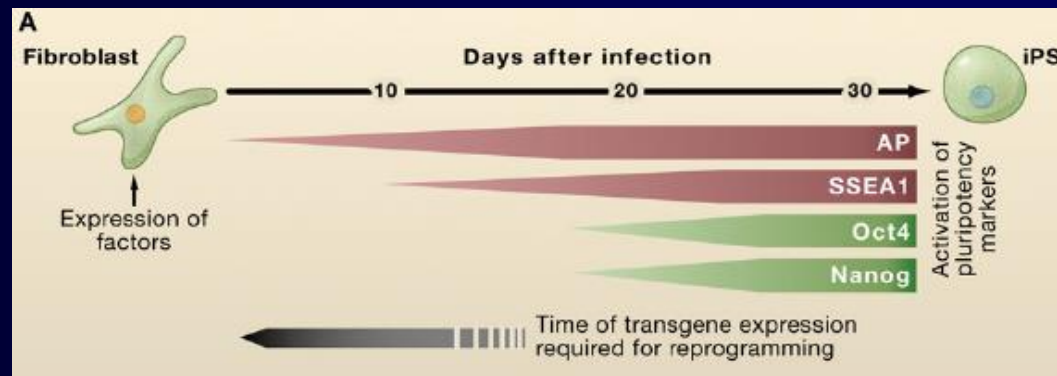
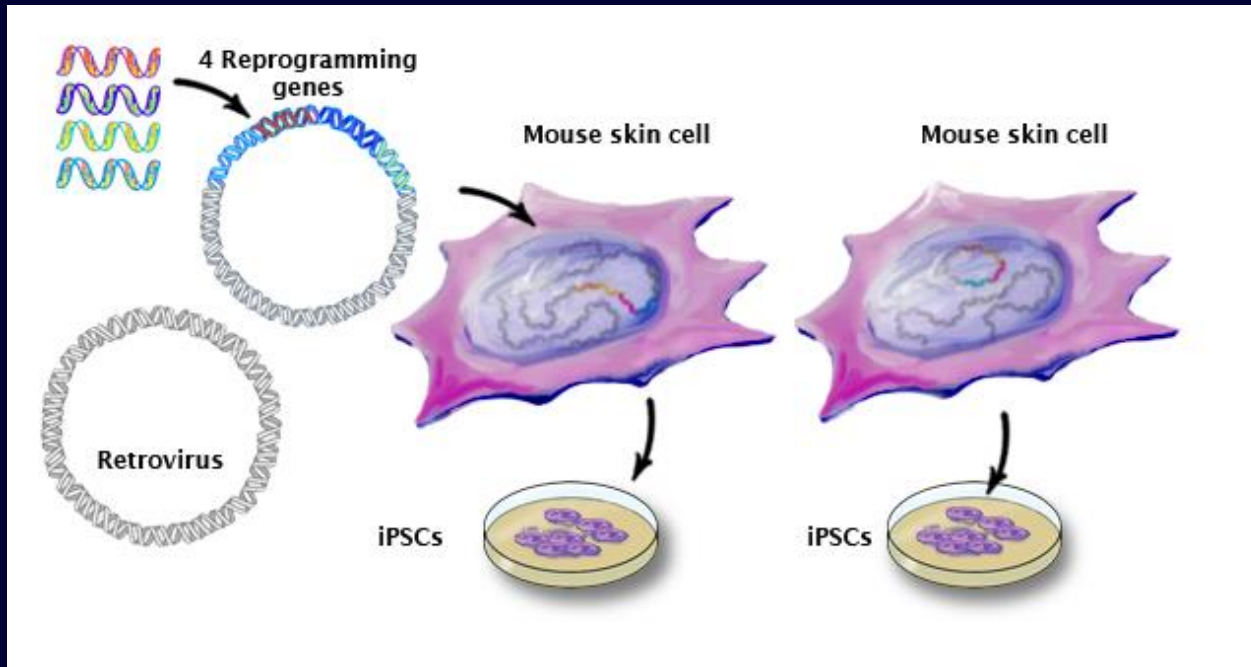
*Contact: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp

DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024

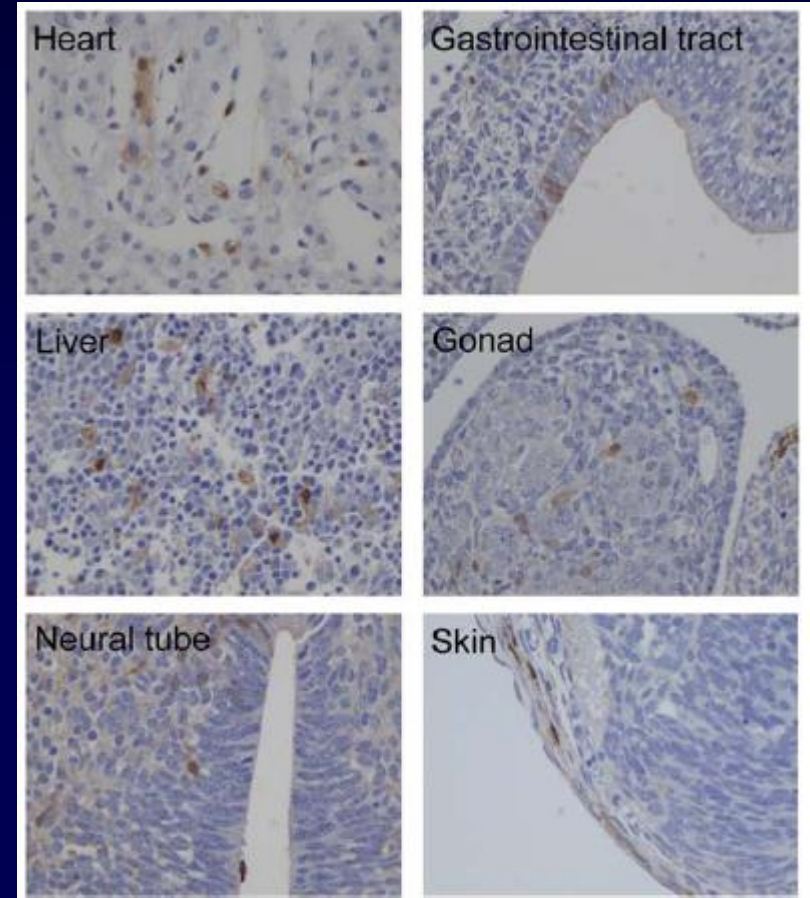
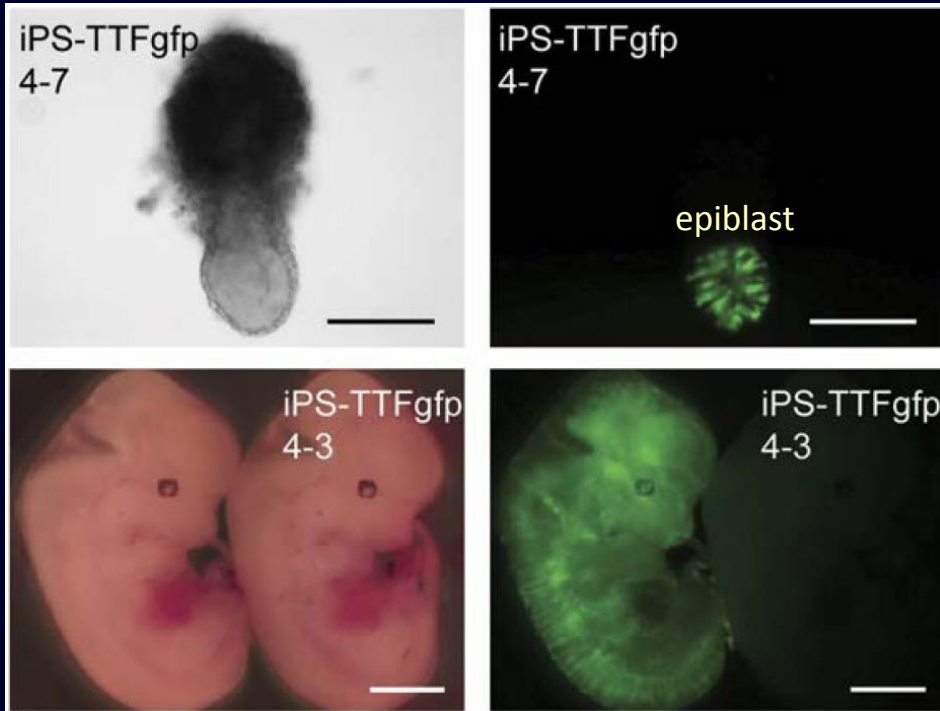
Cell 126, 663–676, August 25, 2006

- vytvoření iPSCs bez využití embrya
- metoda: “jaderné programování somatických buněk”
- 4 geny : **Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4**
- retrovirové vektory (náhodná integrace, nádorová transformace buněk)
- přeprogramování kožní buňky na pluripotentní
- ověřeno diferenciací a podílem iPSCs na tvorbě embrya (chimerické embryo)

Schéma tvorby myších iPSCs



Podíl iPSCs na chimerickém myším embryu



Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells

Junying Yu,^{1,2*} Maxim A. Vodyanik,² Kim Smuga-Otto,^{1,2} Jessica Antosiewicz-Bourget,^{1,2}
Jennifer L. Frane,¹ Shulan Tian,³ Jeff Nie,³ Gudrun A. Jonsdottir,³ Victor Ruotti,³
Ron Stewart,³ Igor I. Slukvin,^{2,4} James A. Thomson^{1,2,5*}

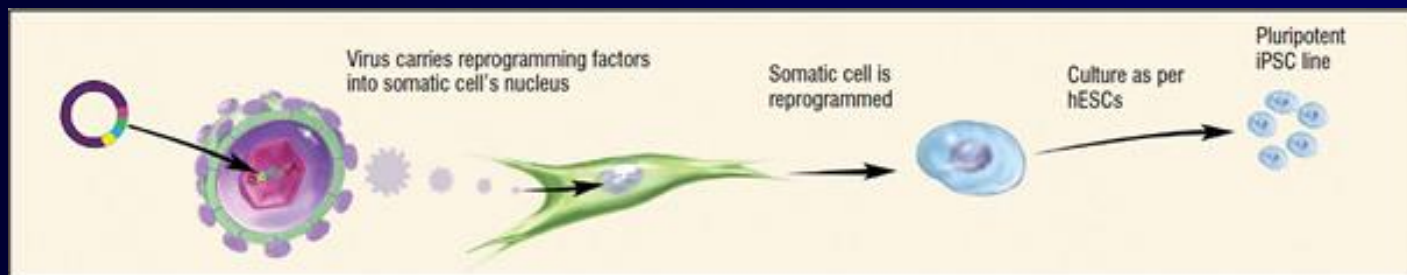
Science 318, 1917 (2007);

- 4 geny : Oct4, Sox2, Nanog, Lin28
- lentivirové vektory (náhodná integrace, nádorová transformace buněk, nekontrolovaná exprese)
- přeprogramování kožní buňky na pluripotentní
- ověřeno: celogenomová exprese podobná hESCs, exprese povrchových antigenů, tvorba teratomů po injekci do imunodeficientní myši

využití iPSCs

- studium vývoje a funkce tkání
- transplantační medicína (vlastní buňky)
- vývoj a testování léčiv
- modelování chorob
- léčba genetických poruch (genové inženýrství)
- náhrada za hESCs z embryí

rizika spojená s přenosem a indukcí exprese nových genů



Příprava tělu vlastních iPSCs

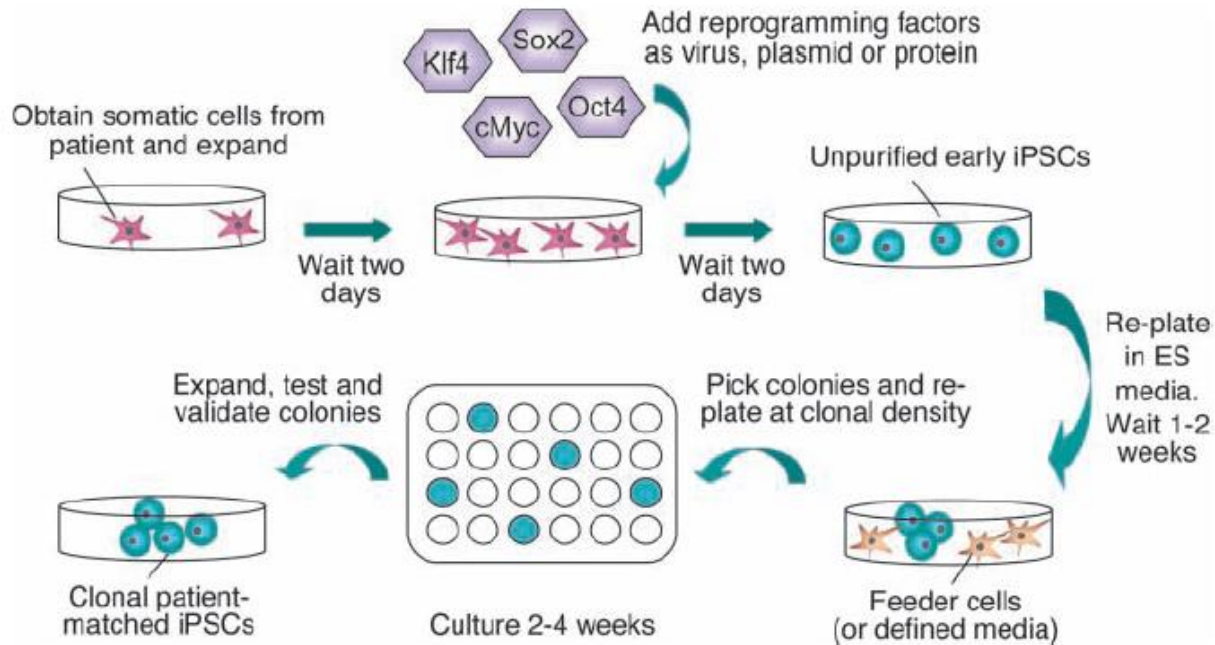


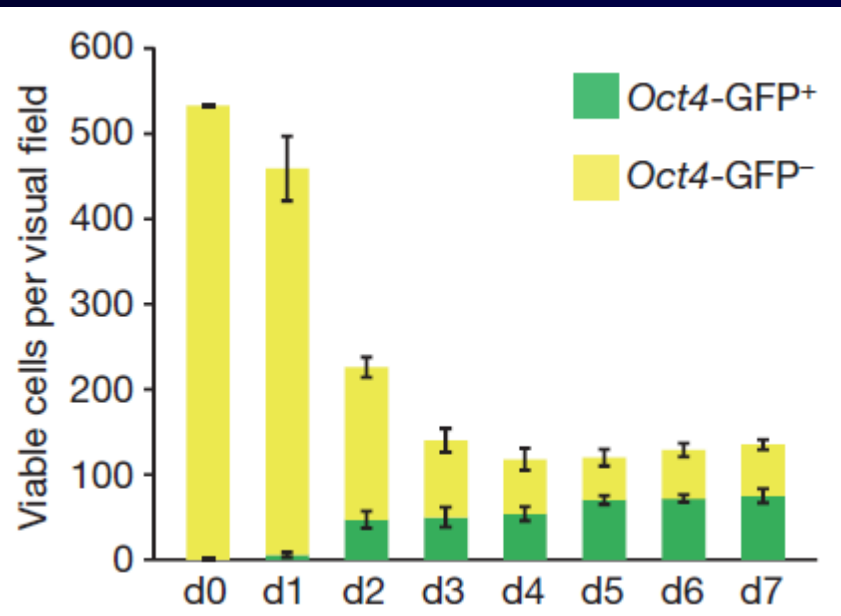
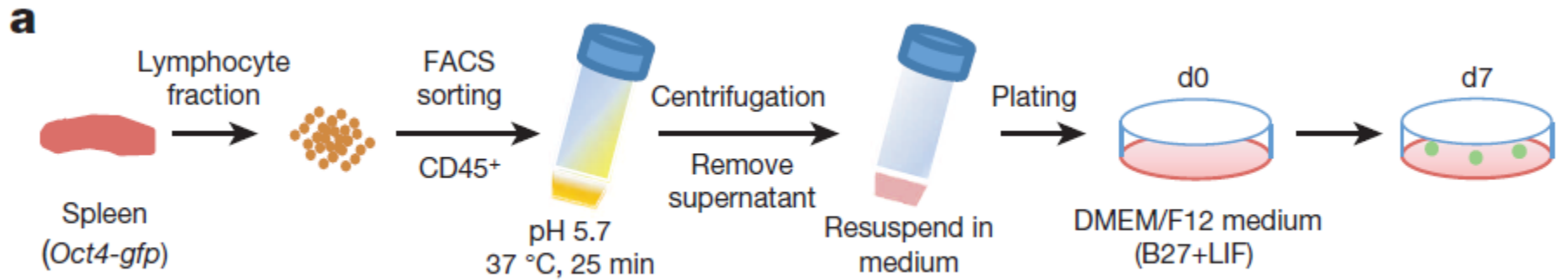
FIG. 1. Direct reprogramming. Somatic cells are obtained from a patient and expanded if necessary. Reprogramming factors are added, and the pluripotent state is induced. iPSCs are cultured in embryonic stem (ES) cell media for 1–2 weeks, after which colonies are isolated at clonal densities and expanded. iPSCs, induced pluripotent stem cells.

Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency

Haruko Obokata^{1,2,3}, Teruhiko Wakayama^{3†}, Yoshiki Sasai⁴, Koji Kojima¹, Martin P. Vacanti^{1,5}, Hitoshi Niwa⁶, Masayuki Yamato⁷ & Charles A. Vacanti¹

Here we report a unique cellular reprogramming phenomenon, called stimulus-triggered acquisition of pluripotency (STAP), which requires neither nuclear transfer nor the introduction of transcription factors. In STAP, strong external stimuli such as a **transient low-pH stressor reprogrammed mammalian somatic cells** resulting in the generation of pluripotent cells. Through real-time imaging of STAP cells derived from purified lymphocytes, as well as gene rearrangement analysis, we found that committed somatic cells give rise to STAP cells by reprogramming rather than selection. STAP cells showed a substantial decrease in DNA methylation in the regulatory regions of pluripotency marker genes. Blastocyst injection showed that STAP cells efficiently contribute to chimaeric embryos and to offspring via germline transmission. We also demonstrate the derivation of robustly expandable pluripotent cell lines from STAP cells. Thus, our findings indicate that epigenetic fate determination of mammalian cells can be markedly converted in a context-dependent manner by strong environmental cues.

30 JANUARY 2014 | VOL 505 | NATURE | 641



- Expres: Oct4, Nanog, Sox2
- Diferenciace: ektoderm, mesoderm, endoderm
- Tvorba teratomů
- Tvorba chimér



Obokata falsified data in STAP papers: probe

Riken report slams scientist's lack of 'ethics'

A glossary for stem-cell biology

Austin Smith¹

Stem-cell biology is in a phase of dynamic expansion and is forming connections with a broad range of basic and applied disciplines. The field is simultaneously exposed to public and political scrutiny. A common language in the stem-cell community is an important tool for coherent exposition to these diverse audiences, not least because certain terms in the stem-cell vocabulary are used differently in other fields.

Asymmetric division Generation of distinct fates in progeny from a single mitosis. Oriented division may position daughter cells in different microenvironments or intrinsic determinants may be segregated into only one daughter. Observed in some but not all stem cells and can occur in other types of progenitor cell.

Cancer cell of origin Precancerous cell that gives rise to a cancer stem cell. May be a mutated stem cell, or a committed progenitor that has acquired self-renewal capacity through mutation.

Cancer-initiating cell General term that encompasses both cancer cell of origin and cancer stem cell.

Cancer stem cell Self-renewing cell responsible for sustaining a cancer and for producing differentiated progeny that form the bulk of the cancer. Cancer stem cells identified in leukaemias and certain solid tumours are critical therapeutic targets.

Cell replacement therapy Reconstitution of tissue by functional incorporation of transplanted stem-cell progeny. Distinct from 'bystander' trophic, anti-inflammatory or immunomodulatory effects of introduced cells.

Clonal analysis Investigation of properties of single cells. Essential for formal demonstration of self-renewal and potency.

Niche Cellular microenvironment providing support and stimuli necessary to sustain self-renewal.

Plasticity Unproven notion that tissue stem cells may broaden potency in response to physiological demands or insults.

Potency The range of commitment options available to a cell.

Totipotent Sufficient to form entire organism. Totipotency is seen in zygote and plant meristem cells; not demonstrated for any vertebrate stem cell.

Pluripotent Able to form all the body's cell lineages, including germ cells, and some or even all extraembryonic cell types. Example: embryonic stem cells.

Multipotent Can form multiple lineages that constitute an entire tissue or tissues. Example: haematopoietic stem cells.

Oligopotent Able to form two or more lineages within a tissue. Example: a neural stem cell that can create a subset of neurons in the brain.

Unipotent Forms a single lineage. Example: spermatogonial stem cells.

Progenitor cell Generic term for any dividing cell with the capacity to differentiate. Includes putative stem cells in which self-renewal has not yet been demonstrated.

Commitment Engaging in a programme leading to differentiation. For a stem cell, this means exit from self-renewal.

Embryonic stem cell Pluripotent stem-cell lines derived from early embryos before formation of the tissue germ layers.

Founder/ancestor/precursor cell General terms for cell without self-renewal ability that contributes to tissue formation. In some cases they generate tissue stem cells.

Immortal strand The hypothesis of selective retention of parental DNA strands during asymmetric self-renewal. Potential mechanism to protect stem cells from the mutations associated with replication.

In vitro stem cell Self-renewal *ex vivo* in cells that do not overtly behave as stem cells *in vivo*. Occurs due to liberation from inductive commitment signals or by creation of a synthetic stem-cell state.

Label-retaining cell Candidate for adult tissue stem cell because of slow division rate and/or immortal strand retention. Interpret with caution.

Lineage priming Promiscuous expression in stem cells of genes associated with differentiation programmes.

Long-term reconstitution Lifelong renewal of tissue by transplanted cells. The definitive assay for haematopoietic, epidermal and spermatogonial stem cells. Transplantation assay may not be appropriate for all tissues.

Regenerative medicine Reconstruction of diseased or injured tissue by activation of endogenous cells or by cell transplantation.

Reprogramming Increase in potency. Occurs naturally in regenerative organisms (dedifferentiation). Induced experimentally in mammalian cells by nuclear transfer, cell fusion, genetic manipulation or *in vitro* culture.

Self-renewal Cycles of division that repeatedly generate at least one daughter equivalent to the mother cell with latent capacity for differentiation. This is the defining property of stem cells.

Stem cell A cell that can continuously produce unaltered daughters and also has the ability to produce daughter cells that have different, more restricted properties.

Stem-cell homeostasis Persistence of tissue stem-cell pool throughout life. Requires balancing symmetric self-renewal with differentiative divisions at the population level, or sustained asymmetric self-renewal.

Stemness Unproven notion that different stem cells are regulated by common genes and mechanisms.

Tissue stem cell Derived from, or resident in, a fetal or adult tissue, with potency limited to cells of that tissue. These cells sustain turnover and repair throughout life in some tissues.

Transit-amplifying cell Proliferative stem-cell progeny fated for differentiation. Initially may not be committed and may retain self-renewal.