

Biotechnologické procesy

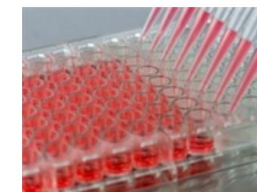
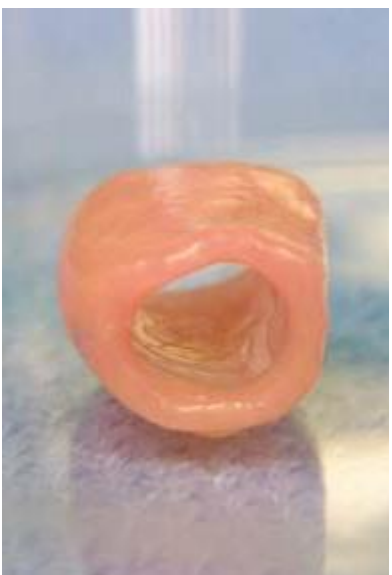
Dnes o živočišných buňkách, potažmo pak o skupině živočišných buněk,
kterým říkáme kmenové buňky

Vladimír Rotrekl @ 2023

Co mají společného živočišné tkáňové kultury a kmenové buňky s biotechnologií?



- Produkce vakcín
- Produkce protilátek (monoklonálních a rekombinantních)
- Testování metabolismu léčiv (farma industry)
- Testování cytotoxicity látek
- Produkce biologických látek (růstové faktory, hormony, terapeutické proteiny)
- Produkce buněk k buněčné transplantaci
- Tvorba náhradních tkání/orgánů k transplantaci



Biotechnologické procesy: Živočišné tkáňové kultury a kmenové buňky:

Sylabus

- 1) Úvod do živočišných buněk a jejich specifik, potence a diferenciacie, Hayflickuv limit, imortalizované linie, kultivace a jejich diferenciacie (včetně large scale, GMP a industry grade)
- 2) Použití živočišných buněk k výrobě léčiv, použití živočišných, potažmo kmenových buněk ve screeningu a výrobě léčiv
- 3) Živočišné buňky a buněčná terapie, kde končí transplantace a začíná biotechnologie, metody, příklady, požadavky SUKL/EMA na jejich výrobu a použití
- 4) Speciální aplikace a výhled do budoucna (3D kultivace, Organoidy, 3D tisk buněk, in vitro tvorba náhražek tkání a orgánů, genová)

Historický pohled na živočišné tkáňové kultury

1878: Claude Bernard proposed that physiological systems of an organism can be maintained in a living system after the death of an organism.

1885: Roux maintained embryonic chick cells in a saline culture.

1897: Loeb demonstrated the survival of cells isolated from blood and connective tissue in serum and plasma.

1903: Jolly observed cell division of salamander leucocytes in vitro.

1907: Harrison cultivated frog nerve cells in a lymph clot held by the 'hanging drop' method and observed the growth of nerve fibres in vitro for several weeks. He was considered by some as the father of cell culture.

1910: Burrows succeeded in long-term cultivation of chicken embryo cell in plasma clots. He made detailed observation of mitosis.

1911: Lewis and Lewis made the first liquid media consisted of sea water, serum, embryo extract, salts and peptones. They observed limited monolayer growth.

1913: Carrel introduced strict aseptic techniques so that cells could be cultured for long periods.

1916: Rous and Jones introduced proteolytic enzyme trypsin for the subculture of adherent cells.

1923: Carrel and Baker developed 'Carrel' or T-flask as the first specifically designed cell culture vessel. They employed microscopic evaluation of cells in culture.

1927: Carrel and Rivera produced the first viral vaccine – Vaccinia.

1933: Gey developed the roller tube technique.

1940s: The use of the antibiotics penicillin and streptomycin in culture medium decreased the problem of contamination in cell culture.

1948: Earle isolated mouse L fibroblasts which formed clones from single cells. Fischer developed a chemically defined medium, CMRL 1066.

Historický pohled na živočišné tkáňové kultury

1949: Enders reported that polio virus could be grown on human embryonic cells in culture.

1952: Gey established a continuous cell line from a human cervical carcinoma known as HeLa (Helen Lane) cells. Dulbecco developed plaque assay for animal viruses using confluent monolayers of cultured cells.

1954: Abercrombie observed contact inhibition: motility of diploid cells in monolayer culture ceases when contact is made with adjacent cells.

1955: Eagle studied the nutrient requirements of selected cells in culture and established the first widely used chemically defined medium.

1961: Hay flick and Moorhead isolated human fibroblasts (WI-38) and showed that they could be grown in culture.

1964: Littlefield introduced the HAT medium for cell selection.

1965: Ham introduced the first serum-free medium which was able to support the growth of many cell lines.

1965: Harris and Watkins were able to fuse human and mouse cells by the use of polyethylene glycol.

1975: Kohler and Milstein produced the first hybridoma capable of secreting a monoclonal antibody.

1978: Sato established the basis for the development of serum-free media from fetal calf serum.

1982: Human insulin became the first recombinant protein to be licensed as a pharmaceutical.

1985: Human growth hormones produced from recombinant bacteria was accepted for clinical use.

1986: Lymphoblastoid γ IFN licensed.

1987: Tissue-type plasminogen activator (tPA) from recombinant animal cells became available for clinical use.

1989: Recombinant erythropoietin in trial.

1990: Recombinant products in clinical trial (HBsAG, factor VIII, HIVgp120, CD4, etc.).



in in culture.

rowth factors.

).

Historický pohled na živočišné tkáňové kultury

1949: Enders reported that polio virus could be grown on human embryonic cells in culture.

1952: Gey established a continuous cell line from a human cervical carcinoma known as HeLa (Helen Lane) cells. Dulbecco developed plaque assay for animal viruses using confluent monolayers of cultured cells.

1954: Abercrombie observed contact inhibition: motility of diploid cells in monolayer culture ceases when contact is made with adjacent cells.

1955: Eagle studied the nutrient requirements of selected cells in culture and established the first widely used chemically defined medium.

1961: Hay flick and Moorhead isolated human fibroblasts (WI-38) and showed that they have a finite life-span in culture.

1964: Littlefield introduced the HAT medium for cell selection.

1965: Ham introduced the first serum-free medium which was able to support the growth of some cells.

1965: Harris and Watkins were able to fuse human and mouse cells by the use of a virus.

1975: Kohler and Milstein produced the first hybridoma capable of secreting a monoclonal antibody.

1978: Sato established the basis for the development of serum-free media from cocktails of hormones and growth factors.

1982: Human insulin became the first recombinant protein to be licensed as a therapeutic agent.

1985: Human growth hormones produced from recombinant bacteria was accepted for therapeutic use.

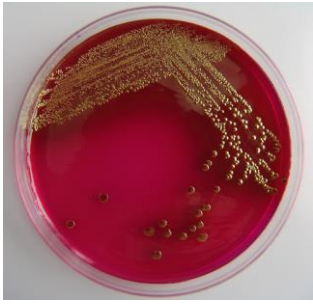
1986: Lymphoblastoid γ IFN licensed.

1987: Tissue-type plasminogen activator (tPA) from recombinant animal cells became commercially available.

1989: Recombinant erythropoietin in trial.

1990: Recombinant products in clinical trial (HBsAG, factor VIII, HIVgp120, CD4, GM-CSF, EGF, mAbs, IL-2).

E.coli



Porovnání bakteriálních a živočišných kultur

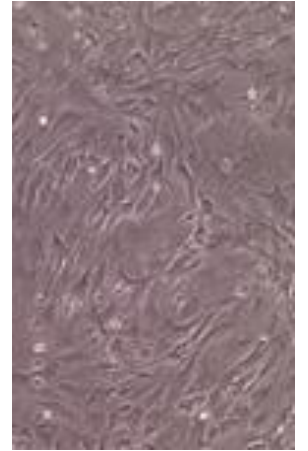
Výhody bakteriálních buněk

- Robustní reprodukovatelný systém
- Levná média
- Rychle rostoucí
- Vysoká produktivita (produkce proteinů)

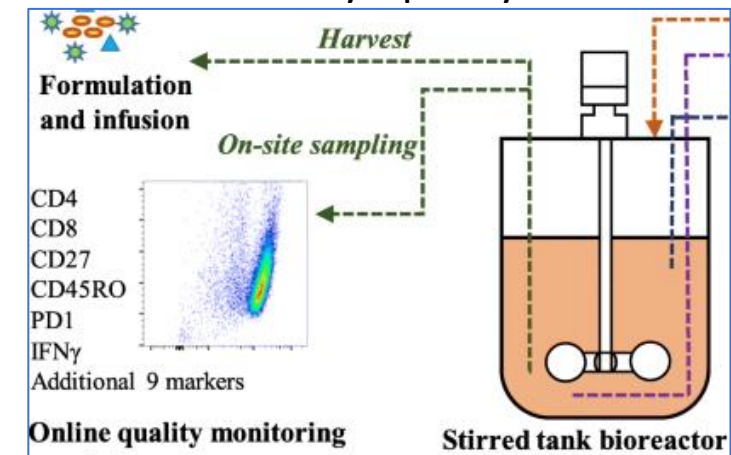
Nevýhody bakteriálních kultur

- Intracelulární lokalizace produktů
- Kontaminace endotoxiny (nutná purifikace)
- Absence posttranslačních modifikací
- Absolutní nemožnost adresovat mezibuněčnou a orgánovou komunikaci
- Omezené možnosti adresovat řízení buněčného cyklu vícebuněčného organismu

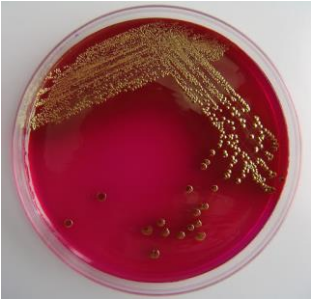
Mouse fibroblast



Human lymphocytes

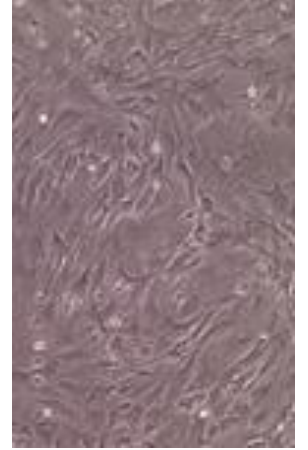


E.coli



Porovnání bakteriálních a živočišných kultur

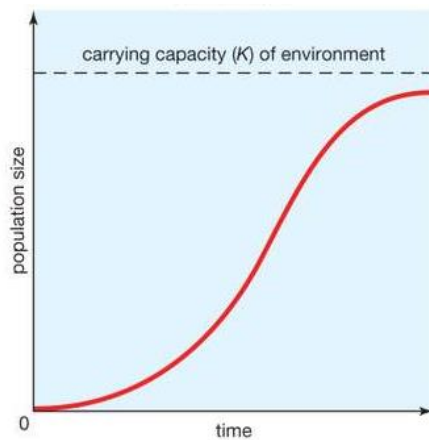
Mouse fibroblast



Nevýhody živočišných kultur

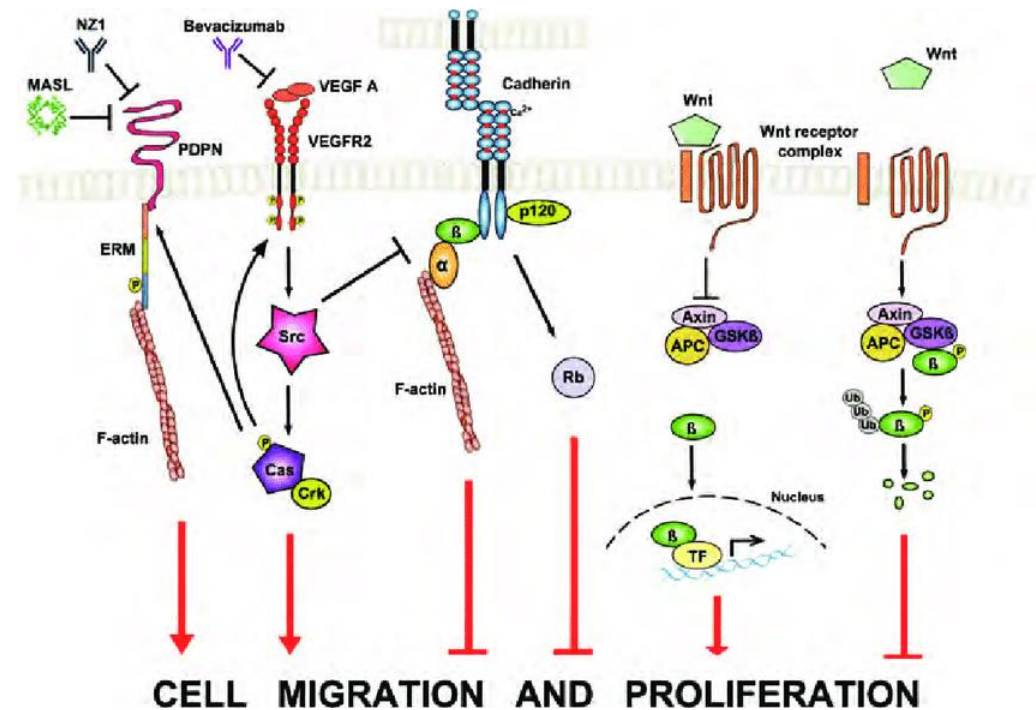
- Získání tkáně (etika a dostupnost)
- Finanční náročnost
- Řadu buněčných typů neumíme kultivovat
- Výtěžek - kontaktní inhibice

Bakterie rostou dokud mají živiny



Živočišné buňky:

Vazbou kadherinu se aktivuje kaskáda fosforylace až k RB proteinu, která vede k aktivaci G1/S kontrolního bodu buněčného cyklu a ke vstupu do G0 fáze.. (v té je většina buněk v tělech živočichů)





Srovnání živočišných kultur se zvířaty

Výhody:

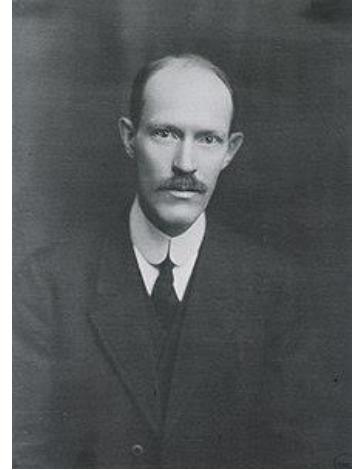
- 1) Levnější a rychlejší a kvantitativnější a eticky schůdnější (vyjímky), než práce se zvířaty
- 2) Srovnatelné posttranslační procesy s lidskou buňkou (fosforylace, glykosylace, sumoylace, ubiquitylace atd)
- 3) Mechanizmy účinku látek srovnatelné mezi savčími buňkami

Nevýhody:

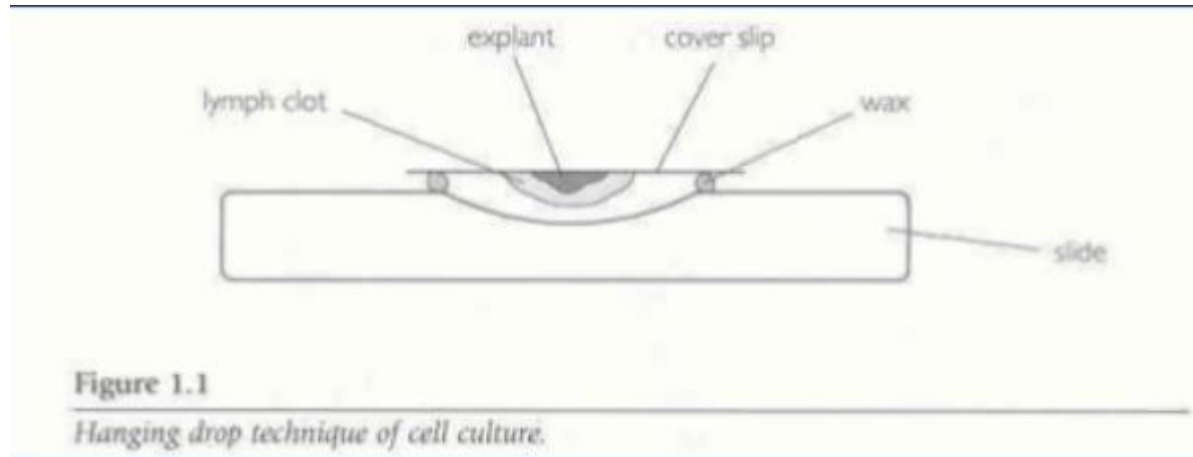
Změna charakteristik v průběhu kultivace -

- 1) Vlivem nesrovnatelného selekčního tlaku s prostředím *in vivo*
- 2) Vlivem zkracování telomer
- 3) Vlivem mutačního tlaku v důsledku vysoké proliferace

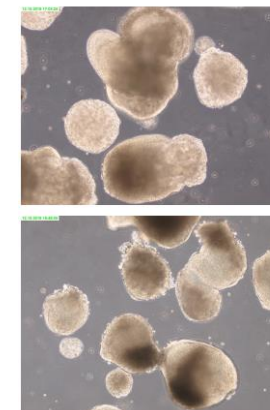
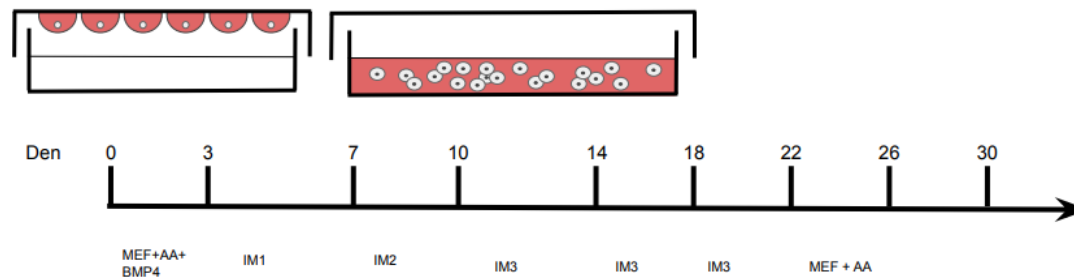
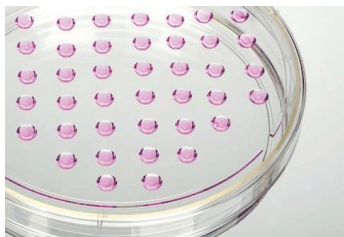
První kultivace živočišné buňky – Ross G Harrison (1907)



Kultivace ve visící kapce.. část žabího embrya



I dnes se tato technika stále využívá.. např. kultivace organoidů..



Pešl a kol., Heart Vessels, 2014

Tepající embryonální tělíska
– srdeční organoidy

Dlouhodobá kultivace v lahvi.. Alexis Carrel



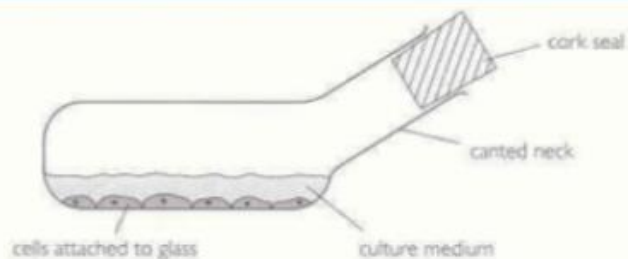
tkáňová kultura za slepičího embrya (asi slepičí fibroblasty)

...nasazena do lahne v roce 1912

...asepticky kultivována do roku 1946 (34 let!!!)

..proto v první polovině 20 století... přesvědčení, že se buňky mohou dělit při dodávání živin NEOMEZENĚ

... NIKOMU se nepodařilo experiment zopakovat



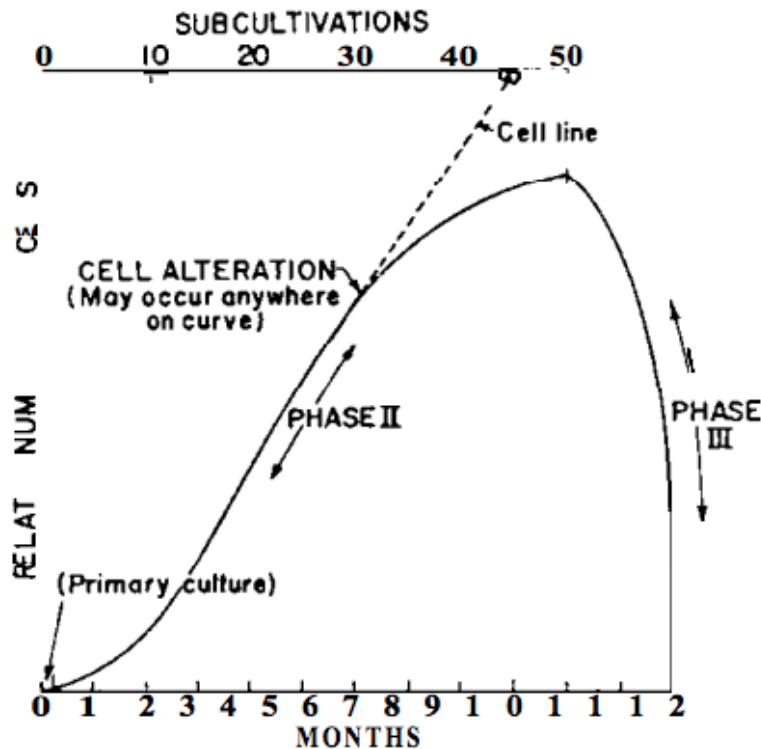
... a pak přišel Leonard Heyflick s jeho objevem...

Figure 1.2
The Carrel flask.

Hayflickův limit



Leonard Hayflick



Živočišné buňky mohou prodělat jen omezený počet buněčných dělení...

Maximální počet generací závisí na druhu, buněčném typu, věku zdrojového organismu

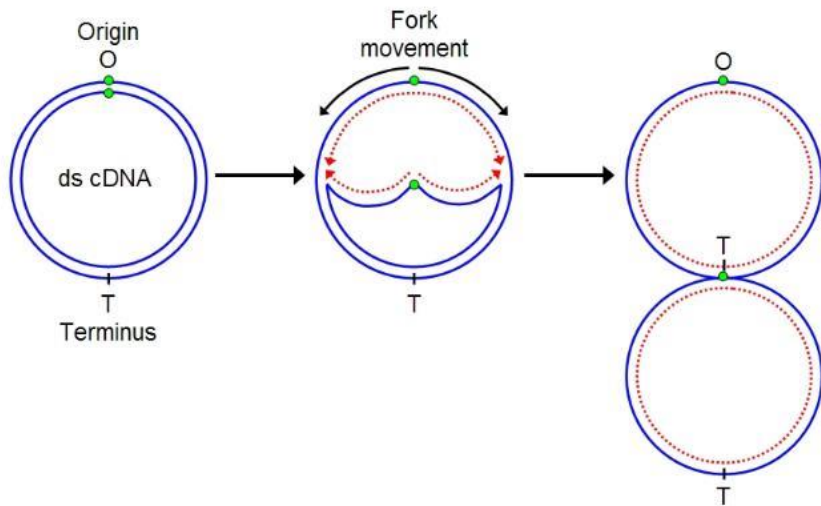
Lidské buňky od embrya ... maximálně 48 - 50 generací (zkrácení cca 11kB DNA)

Hayflickův limit



Leonard Haiflick

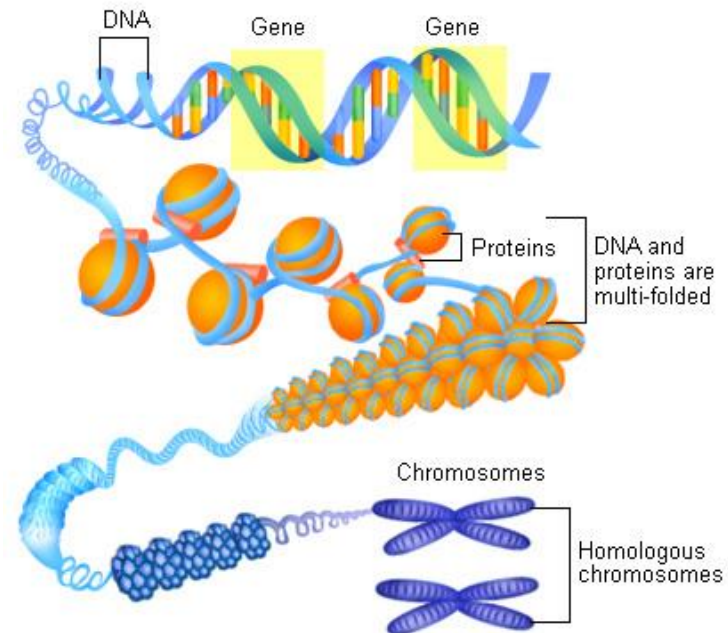
Bakteriální DNA (chromozom)



Semi-conservative replication of circular DNA in bacteria

Replikovaná DNA identická..
..možnost replikace do nekonečna.

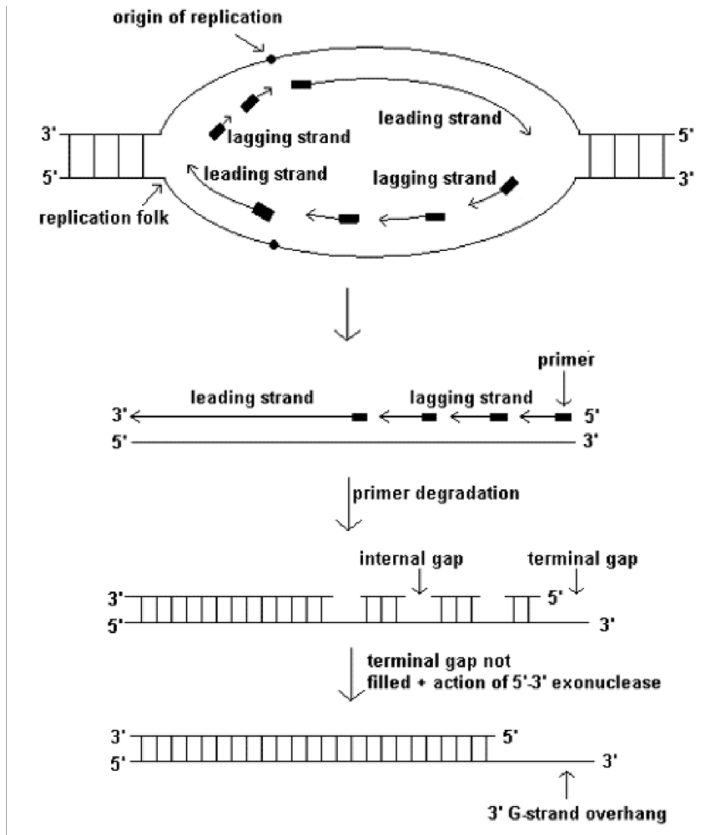
Eukaryotický chromozom



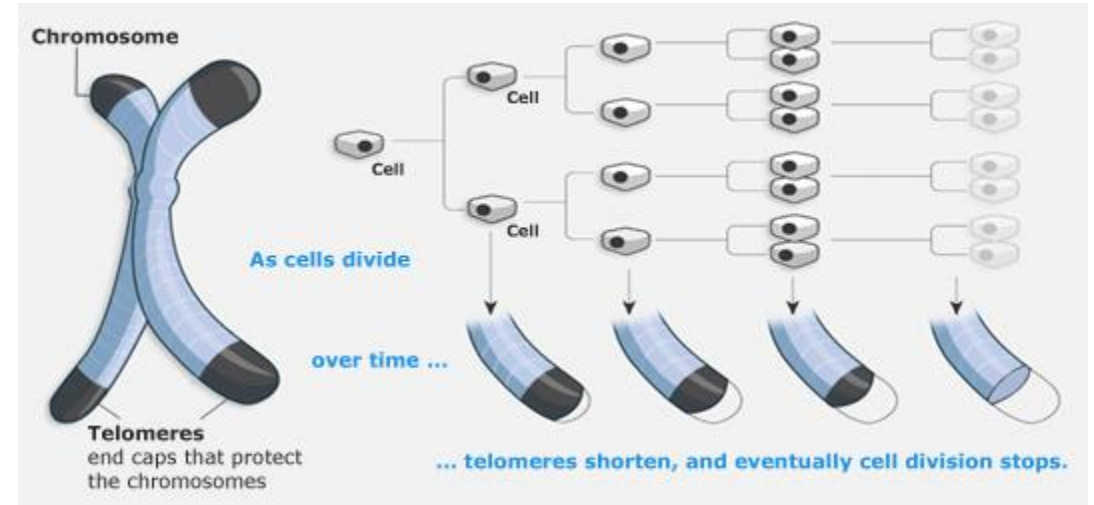
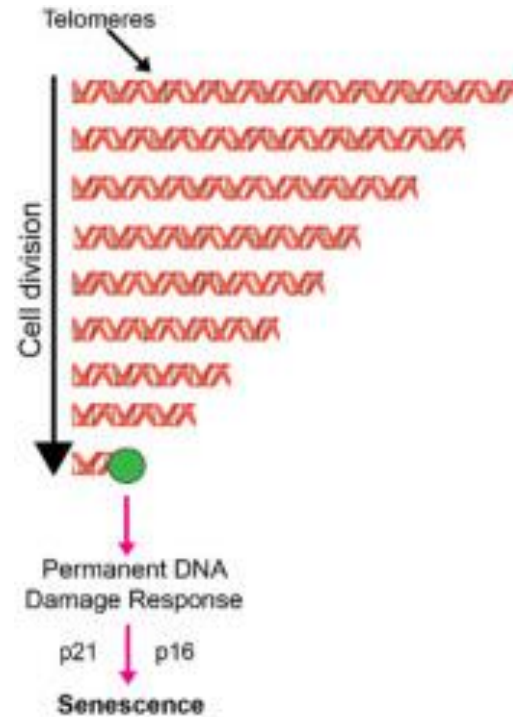
Lineární molekula – replikace ale musí někde začít..

Hayflickův limit

Zkracování telomer při replikaci DNA..



Mescape.com



TA65.co.za

Zkrácené telomery jsou rozpoznány jako poškození DNA a aktivují kontrolní bod G2/S, který nepustí buňku do metafáze...
... spouští se program senescence

Dlouhodobá kultivace v lahvi.. Alexis Carrel



tkáňová kultura za slepičího embrya (asi slepičí fibroblasty)

...nasazena do lahne v roce 1912

...asepticky kultivována do roku 1946 (34 let!!!)

..proto v první polovině 20 století... přesvědčení, že se buňky mohou dělit při dodávání živin NEOMEZENĚ

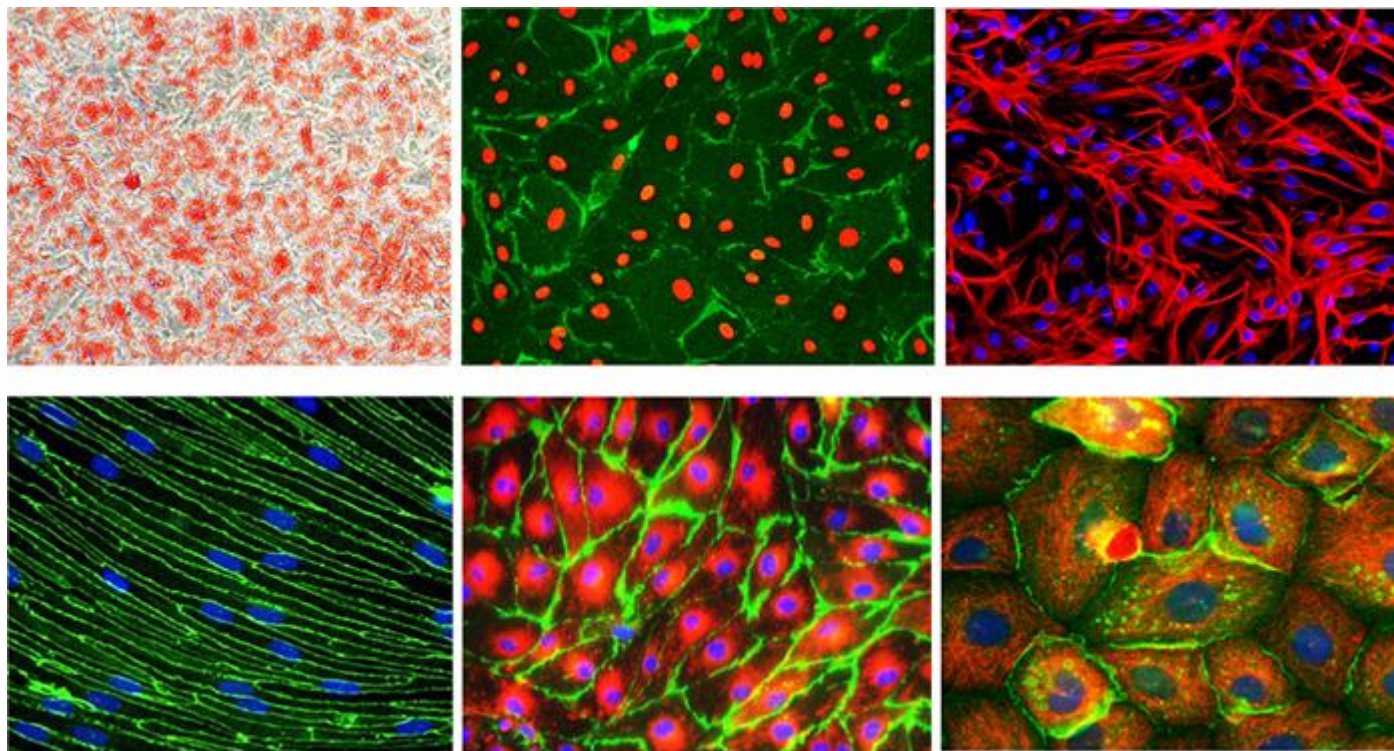
... NIKOMU se nepodařilo experiment zopakovat

Jak je tedy možné, že Alexis Carrel dokázal kultivovat fibroblasty 34 let?

A) Byl to podvod B) Podařilo se mu kultivovat embryonální kmenové buňky C) vykultivoval imortalizovanou buněčnou linii

Primární tkáňové kultury

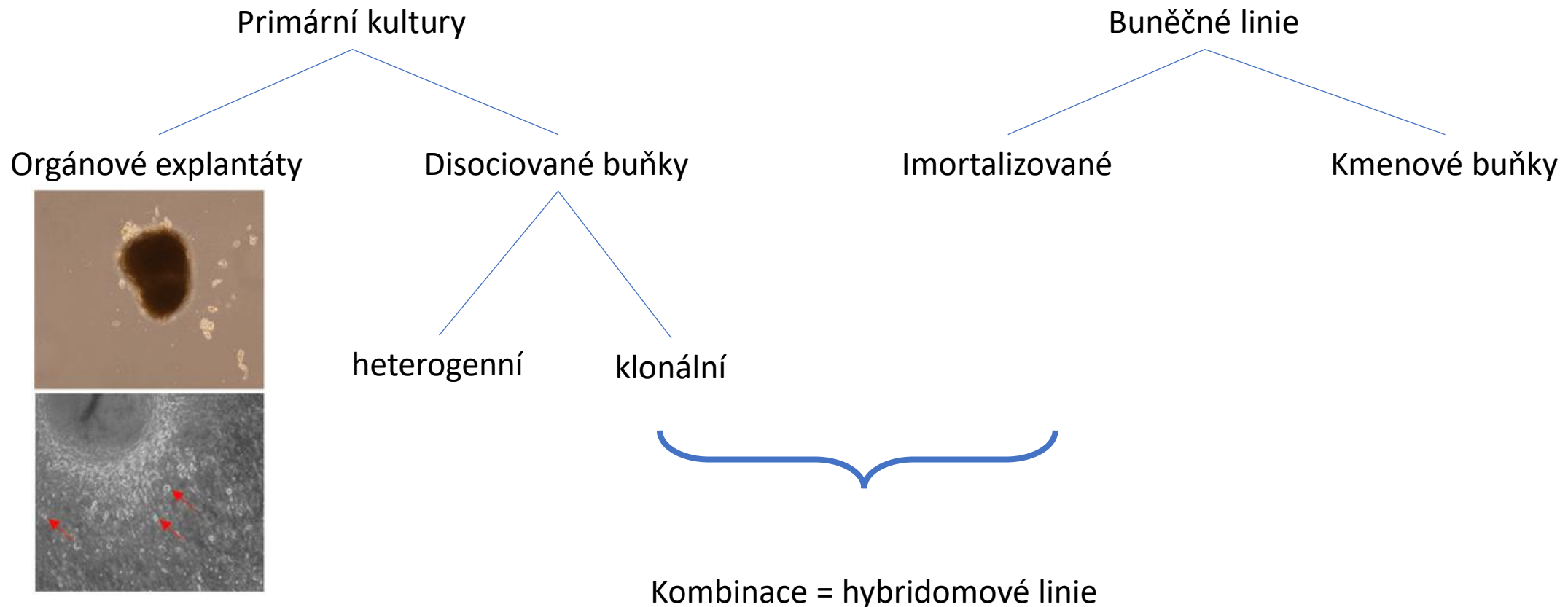
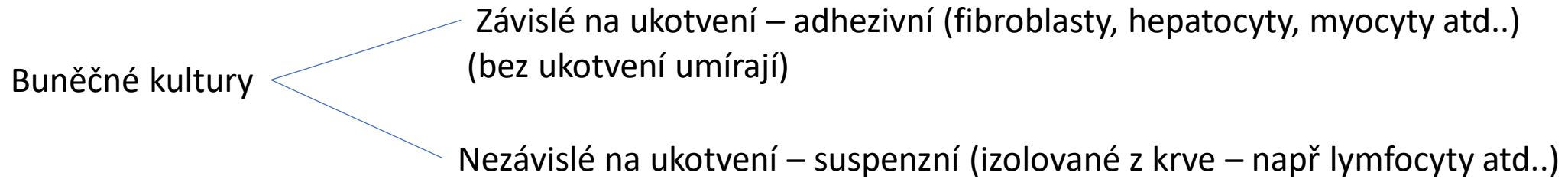
Astrocyty
Chondrocyty
Hepatocyty
Adipocyty
Fibroblasty
Myofibroblasty
Synoviocyty
Kosterní svalovina
Myocyty
Kardiomyocyty
Melanocyty
Keratinocyty
Buňky vlasového folikulu
Melanocyty
Osteoblasty
Krevní buňky
Neurony



Sigma-Aldrich

Kmenové buňky (nejsou omezeny zkracováním telomer)

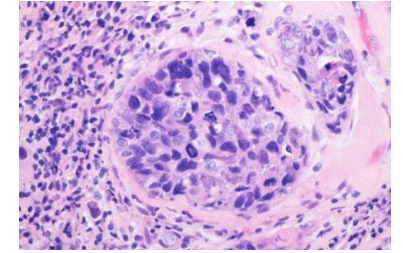
Běžné typy živočišných tkáňových kultur





Běžné typy živočišných tkáňových kultur

Srovnání primárních tkáňových kultur s buněčnými liniemi



Nádorová tkáň

disekce



disociace



Primární kultura

Vlastnost	Primární kultura	Buněčná linie
Biologická relevance	High	Low
Doba proliferace	Omezená/konečná	Neomezená/nekonečná
Heterogenita	Střední až vysoká	Minimální (klonální)
Genetická Integrita	Ponechává si genotyp původní tkáně <i>In Vivo</i>	Genetický drift v důsledku selekce
Snadnost použití	Potřebuje optimalizaci	Dobře definovaná média a podmínky kultivace
Finanční a časová náročnost	Pomalejší růst, dražší	Rychlejší růst a levnější
Dostupnost lidských..	Minimální - žádná	Velké množství

Selekce



Buněčná linie

Klonální selekce, immortalizace

Živočišné kultury v biotechnologických procesech..

Krátkodobé (primární tkáňové kultury)

Disociace

Enzymatická (**Kolagenáza**, Trypsin, další enzymy – většinou proteázy)

... a často jejich kombinace

Mechanická (především měkké tkáně např. mozek, slezina atd..)



disekce



disociace

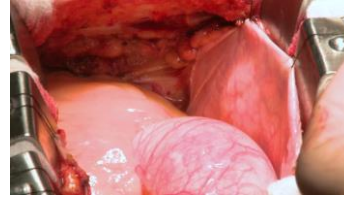


Primární kultura

Živočišné kultury v biotechnologických procesech..

Krátkodobé (primární tkáňové kultury)

Human heart



Craniotomy



- Buňky z mnoha orgánů je obtížné/nemožné získat
- Většina savčích buněk se *in vitro* nemnoží
- Kultivace naráží na Hayflickův limit

Z těchto důvodů je využití primárních savčích, potažmo lidských kultur omezené..

Jak je možné překonat tato omezení?...

Živočišné kultury v biotechnologických procesech..

Krátkodobé (primární tkáňové kultury)

Linie „nesmrtelné“

- Imortalizované linie
- Kmenové buňky

Živočišné kultury v biotechnologických procesech..

Krátkodobé (primární tkáňové kultury)

Linie „nesmrtelné“

- Imortalizované linie

- Kmenové buňky

- Jednoduchý model složitých biologických systémů
- Biochemická a buněčná analýza savčích buněk vč. Člověka
- Odhalování savčích a lidských patologií
- Screening léčiv

- Jejich největší výhodou je jejich ... imortalizace

Imortalizovaná linie = nekonečně proliferující buněčná kultura..

Živočišné kultury v biotechnologických procesech..

Krátkodobé (primární tkáňové kultury)

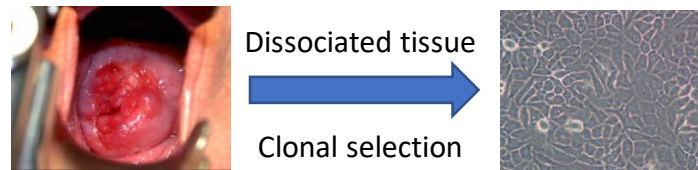
Linie „nesmrtelné“

- Imortalizované linie

- Kmenové buňky

Mutace DNA způsobující imortalizaci:

- Vzniklé *in vivo* (rakovinné linie)



Henrietta Lacks



Karcinom děložního čípku

George and Margaret Gey



1951

HeLa cell line
(human negroid cervix epithel)
Merck

Geyova laboratoř testovala stovky rakovinných kultur, než objevili vysoce metaplastickou linii HeLa..

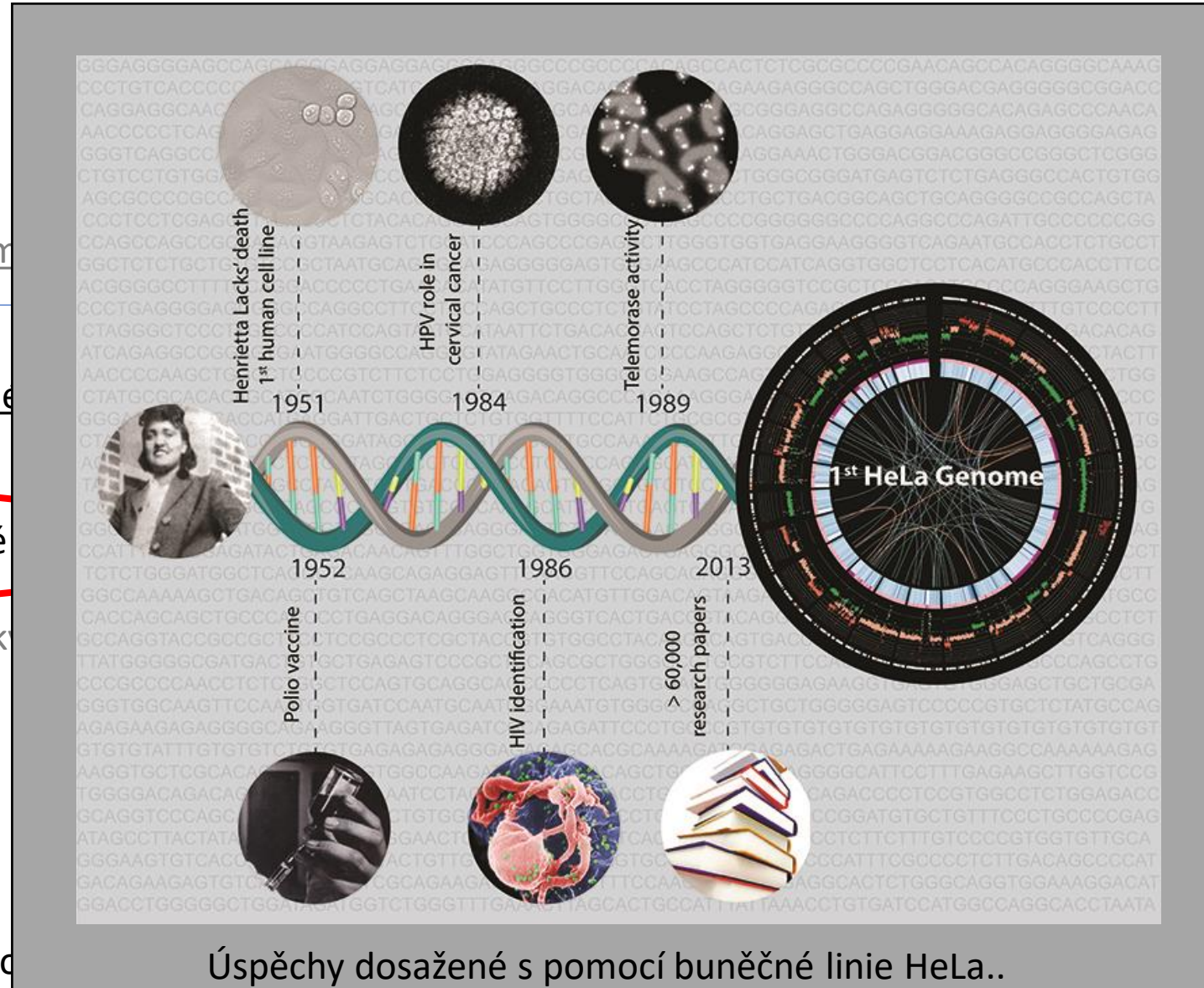
Živočišné kultury v biotechnologických procesech..

Krátkodobé (prim

Linie „nesmrtelné

- Imortalizované

- Kmenové buňk



Geyova laborato

Úspěchy dosažené s pomocí buněčné linie HeLa..

Henrietta Lacks



Karcinom děložního čípku

George and Margaret Gey



1951



HeLa cell line
(negroid cervix epithel)
Merck

linii HeLa..

Živočišné kultury v biotechnologických procesech..

Krátkodobé (primární tkáňové kultury)

Linie „nesmrtelné“

- Imortalizované linie

- Kmenové buňky

Mutace DNA způsobující imortalizaci:

- Vzniklé *in vivo* (rakovinné linie)
- Uměle vyvolané

Imortalizovaná linie = nekonečně proliferující buněčná kultura..

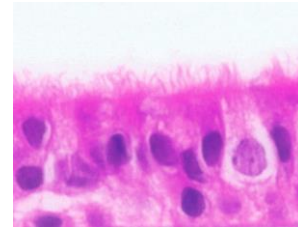
Živočišné kultury v biotechnologických procesech..

Krátkodobé (primární tkáňové kultury)

Linie „nesmrtelné“

- **Imortalizované linie**

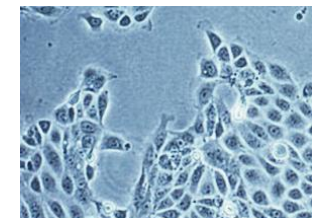
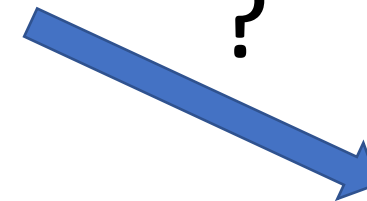
- Kmenové buňky



Plicní epitel

Uměle vyvolaná imortalizace

?



Imortalizovaná linie

Znáte tkáň/buněčný typ a potřebujete buněčnou linii
(například pro studium SARS, nebo tvorbu vakcíny na COVID)

Imortalizovaná linie = nekonečně proliferující buněčná kultura..

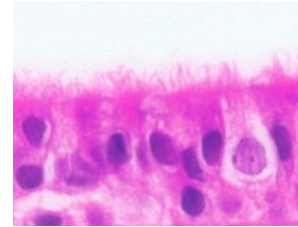
Živočišné kultury v biotechnologických procesech..

Krátkodobé (primární tkáňové kultury)

Linie „nesmrtelné“

- **Imortalizované linie**

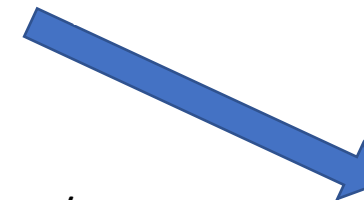
- Kmenové buňky



Plicní epitel

Uměle vyvolaná imortalizace

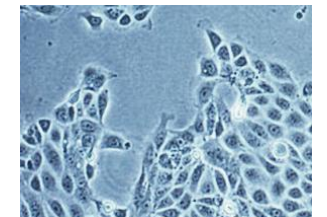
- Virovou indukci



Nejčastěji používané:

- geny EBV, HPV-16 E6/7
- Opičí Virus 40 (SV40) T antigen

**Cíli tumorsupresorové geny P53, pRB,
nebo vyvolávají expresi telomerázy**



Imortalizovaná linie

Znáte tkáň/buněčný typ a potřebujete buněčnou linii
(například pro studium SARS, nebo tvorbu vakcíny na COVID)

Imortalizovaná linie = nekonečně proliferující buněčná kultura..

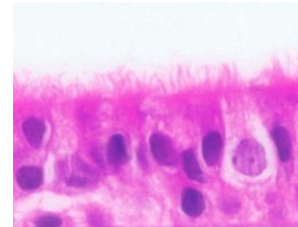
Živočišné kultury v biotechnologických procesech..

Krátkodobé (primární tkáňové kultury)

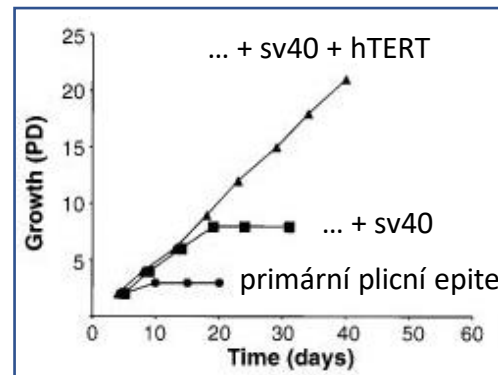
Linie „nesmrtelné“

- **Imortalizované linie**

- Kmenové buňky



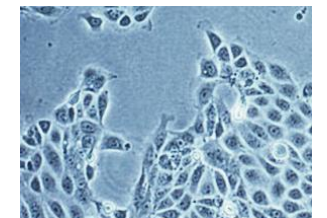
Plicní epitel



Lundberg, Oncogene, 2002

Uměle vyvolaná imortalizace

- Virovou indukci
- Expresí hTERT



Imortalizovaná linie

Znáte tkáň/buněčný typ a potřebujete buněčnou linii (například pro studium SARS, nebo tvorbu vakcíny na COVID)

Imortalizovaná linie = nekonečně proliferující buněčná kultura..

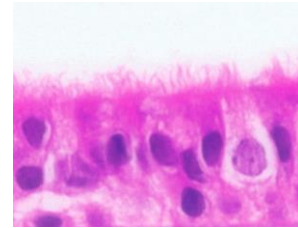
Živočišné kultury v biotechnologických procesech..

Krátkodobé (primární tkáňové kultury)

Linie „nesmrtelné“

- **Imortalizované linie**

- Kmenové buňky

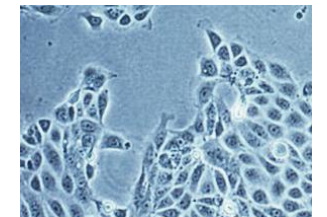


Plicní epitel

Uměle vyvolaná imortalizace

- Virovou indukci
- Expresí hTERT
- Inaktivací tumor supresorových genů

- Snížení exprese P53 a/nebo pRB (stačí siRNA; v kombinaci s expresí hTERT)
- Řízená mutageneze genů Ras a Myc



Imortalizovaná linie

Znáte tkáň/buněčný typ a potřebujete buněčnou linii (například pro studium SARS, nebo tvorbu vakcíny na COVID)

Imortalizovaná linie = nekonečně proliferující buněčná kultura..

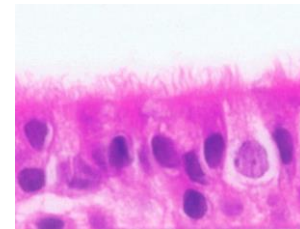
Živočišné kultury v biotechnologických procesech..

Krátkodobé (primární tkáňové kultury)

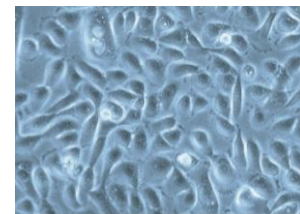
Linie „nesmrtelné“

- **Imortalizované linie**

- Kmenové buňky



Plicní epitel

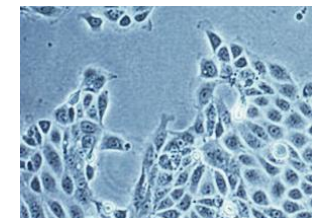


Primární kultura

Uměle vyvolaná imortalizace

- Virovou indukci
- Expresí hTERT
- Inaktivací tumor supresorových genů

imortalizace



Imortalizovaná linie

...nebo si ji můžete koupit třeba jako linii 16HBE14o

...a amplifikovat na této kultuře coronavirus CoNV-19 (Sinovac, Sinopharm)

Imortalizovaná linie = nekonečně proliferující buněčná kultura..

Živočišné kultury v biotechnologických procesech..

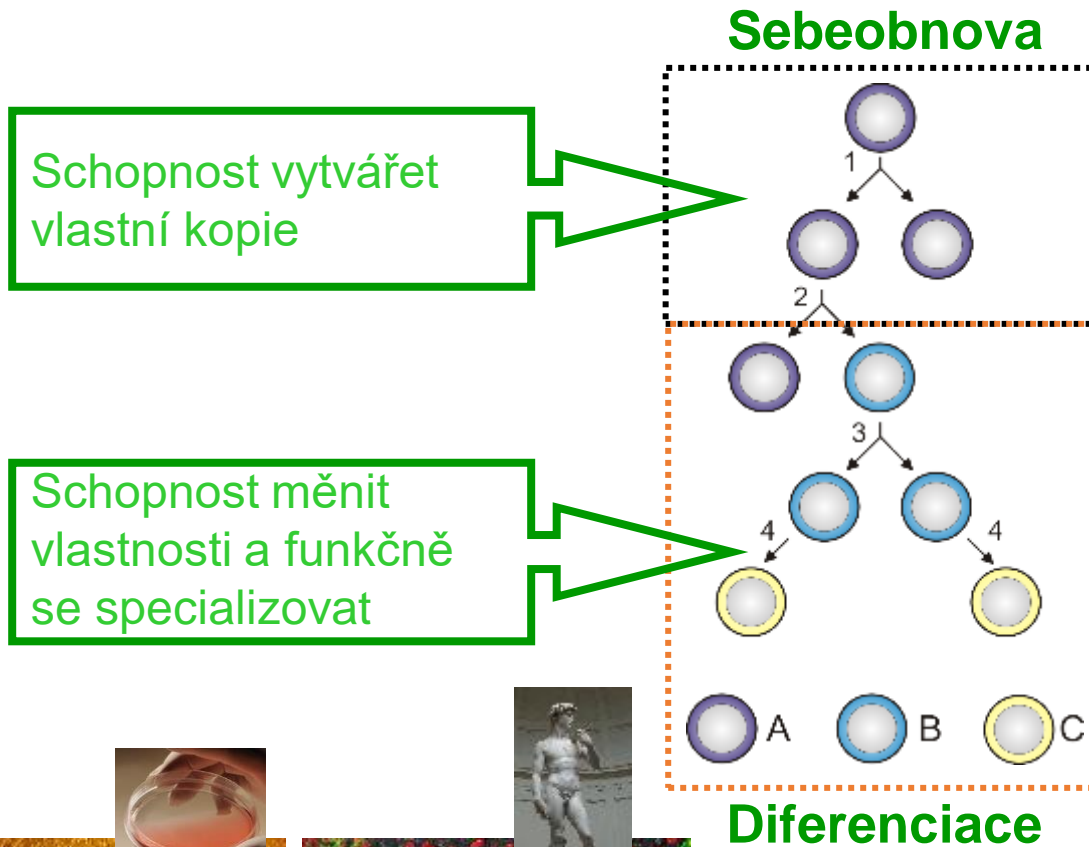
Krátkodobé (primární tkáňové kultury)

Linie „nesmrtelné“

- Imortalizované linie

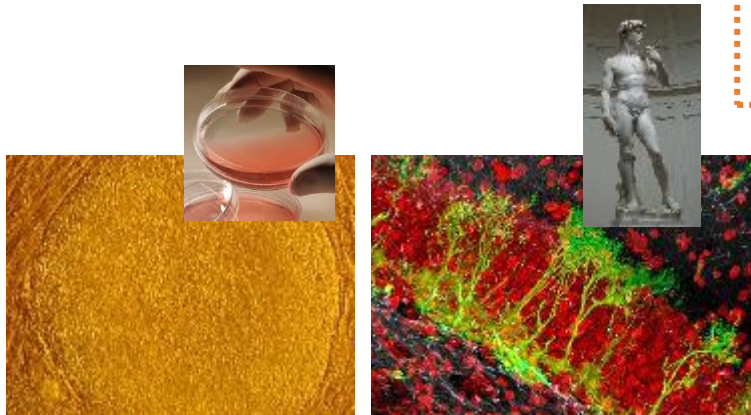
- Kmenové buňky

Kmenové buňky: kriteria a definice



Klonální kapacita

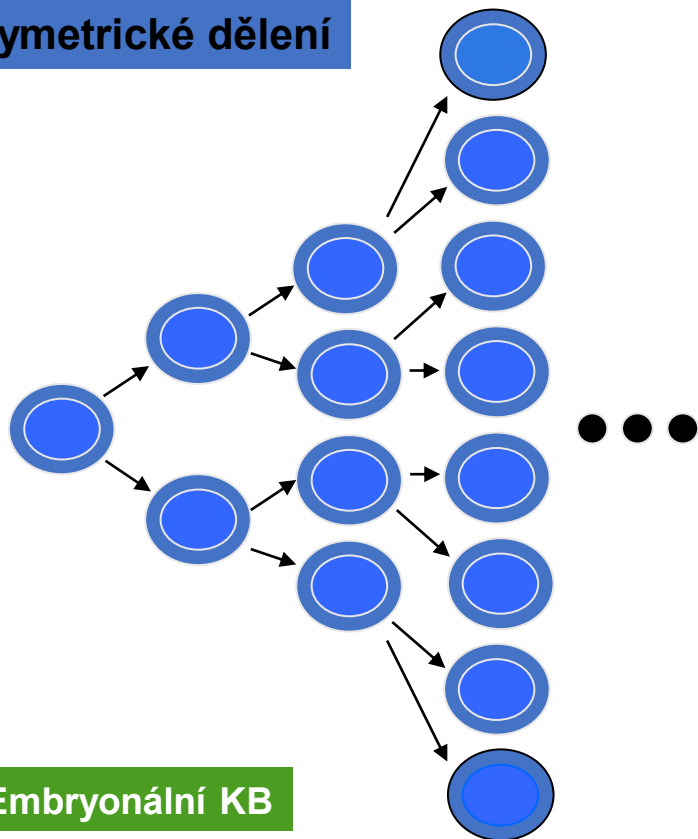
- Symetrické dělení
- Asymetrické dělení



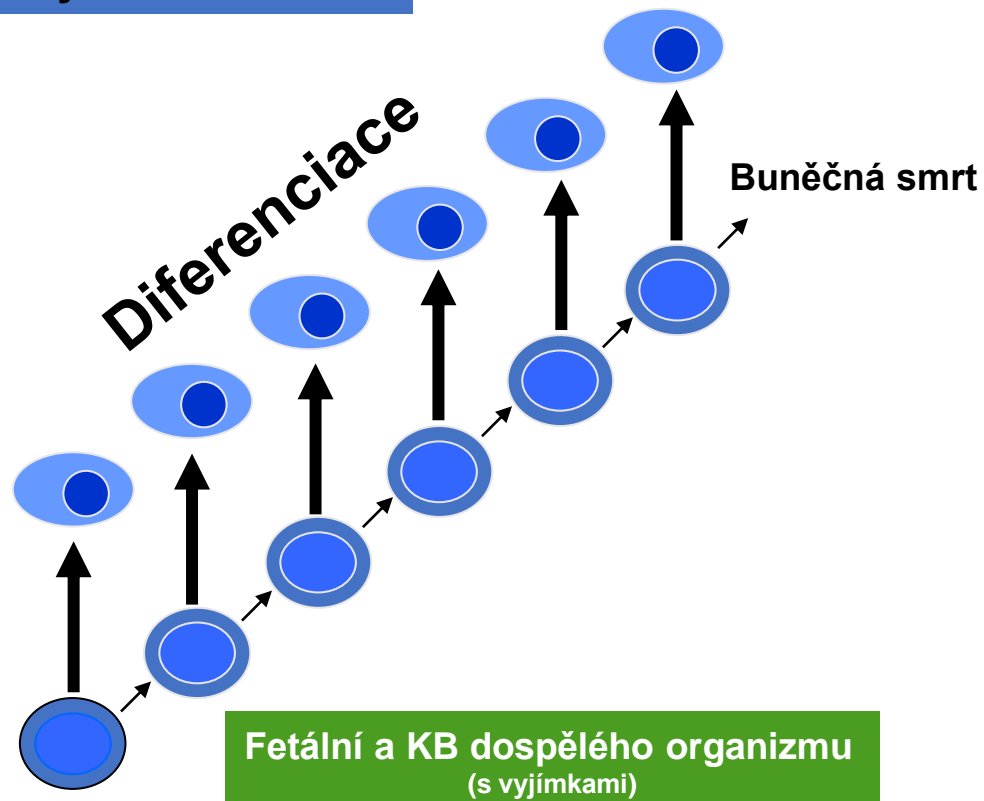
Kmenové buňky se sebeobnovují, množí

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

Symetrické dělení

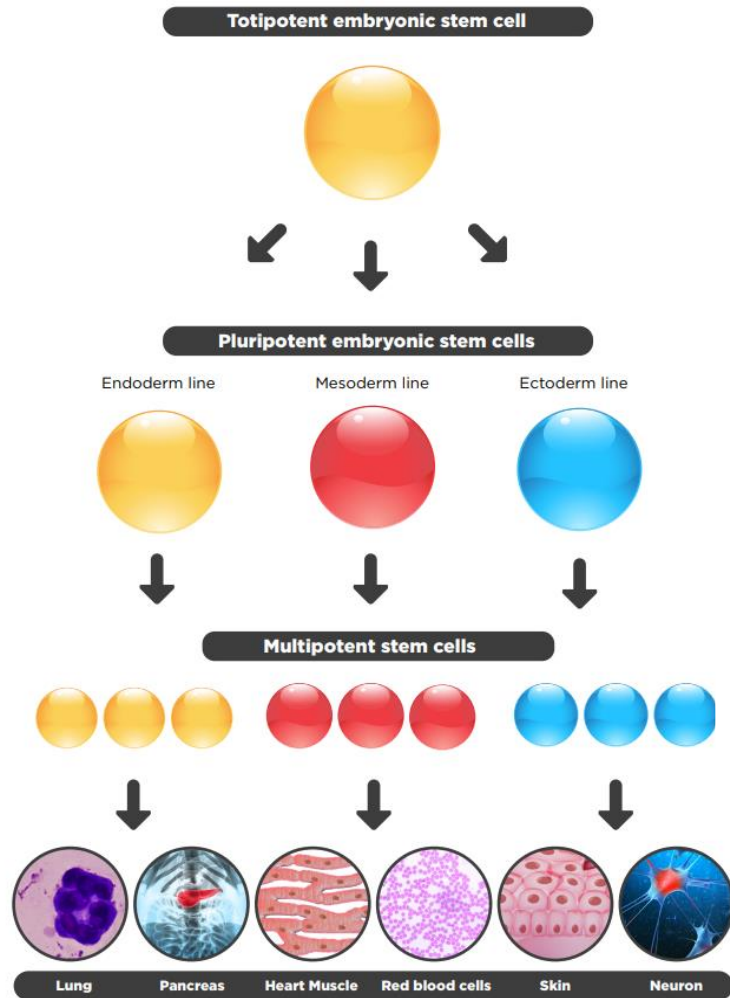


Asymetrické dělení



Kombinace obou mechanismů = neurální KB !!!

.... a diferencují a regenerují tkáně orgány



Totipotentní/Pluripotentní buňky časného embrya

Zárodečné listy v embryonálním vývoji

Multipotentní buňky v embryonálním vývoji a progenitory dospělého jedince

Specializované buněčné typy se nemnoží a dále nediferencují

.... a diferencují a regenerují tkáně orgány

totipotence → pluripotence → multipotence → oligopotence → unipotence

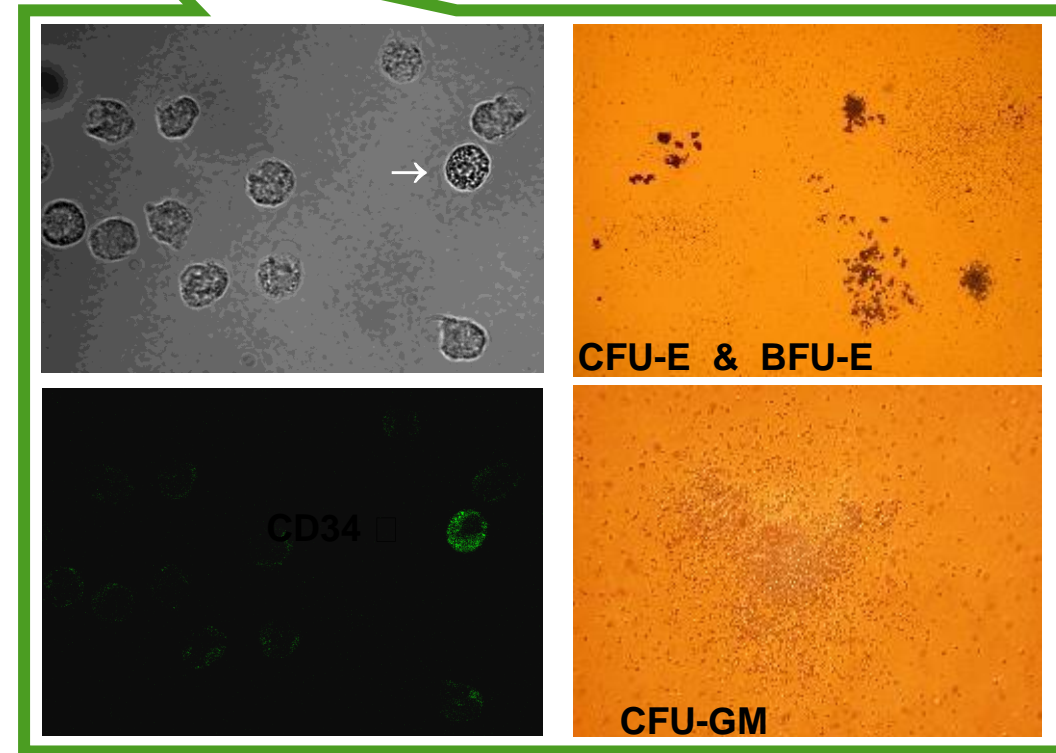
zygota

Embryonální KB

Hematopoetické KB

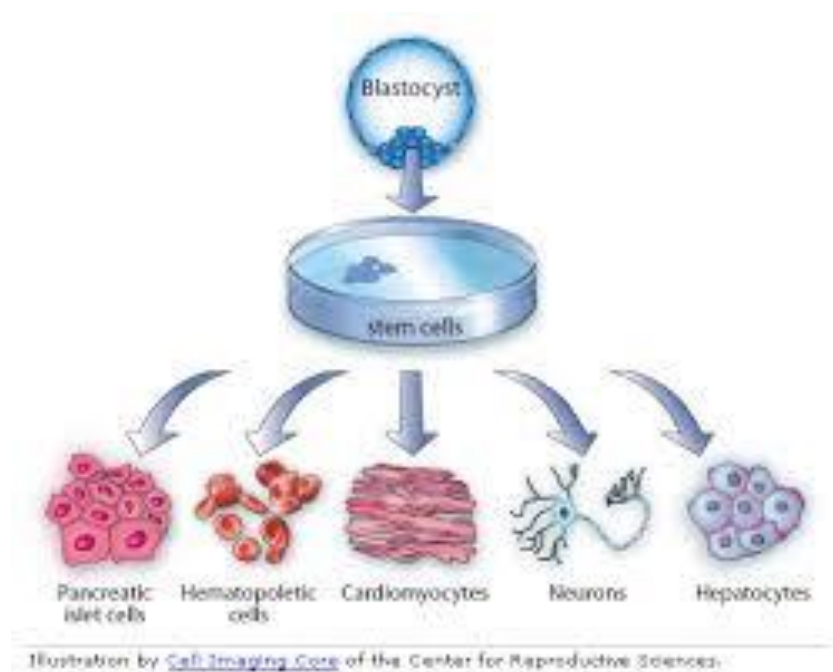
Gastrointestinální KB

KB prostaty



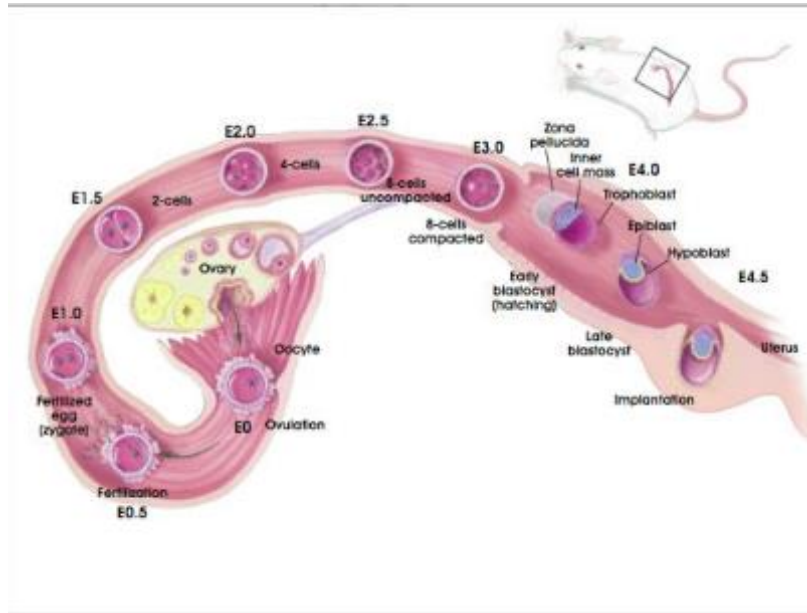
Příklady

Pluripotentní kmenové buňky



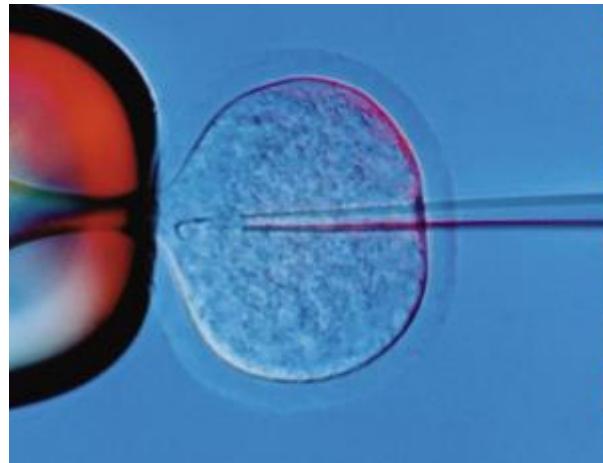
One Ring to Rule Them All...

...nebo to mělo být:
One cell to rise them all...?



Co myslíme EMBRYEM, když mluvíme O embryonálních kmenových buňkách

- preimplantační stádium
- blastocysta 4 dny stará
- tvoří ji několik desítek buněk
- embryoblast a trofoblast



~9000 embryí implantováno (většinou po třech) ročně v ČR
zbytek >50% zůstane zamražen a ...

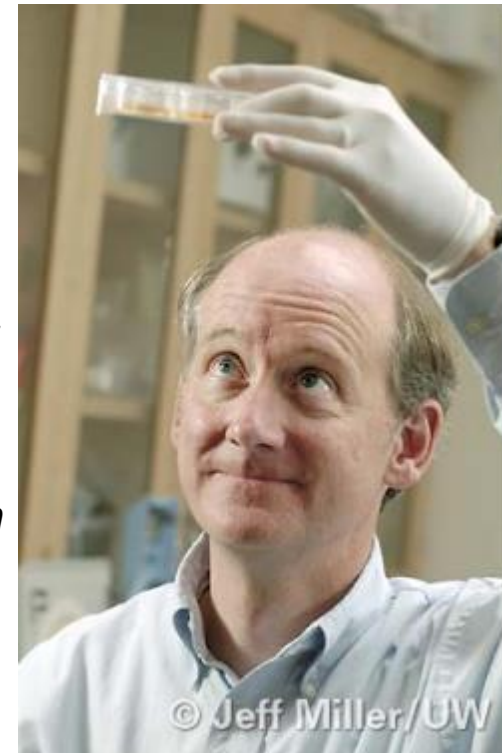


Benedict XIV

The destruction of human embryos to harvest stem cells is "not only devoid of the light of God but is also devoid of humanity" and "does not truly serve humanity."

James Thompson

"[T]he bottom line is that there are 400,000 frozen embryos in the United States, and a large percentage of those are going to be thrown out. Regardless of what you think the moral status of those embryos is, it makes sense to me that it's a better moral decision to use them to help people than just to throw them out. It's a very complex issue, but to me it boils down to that one thing."



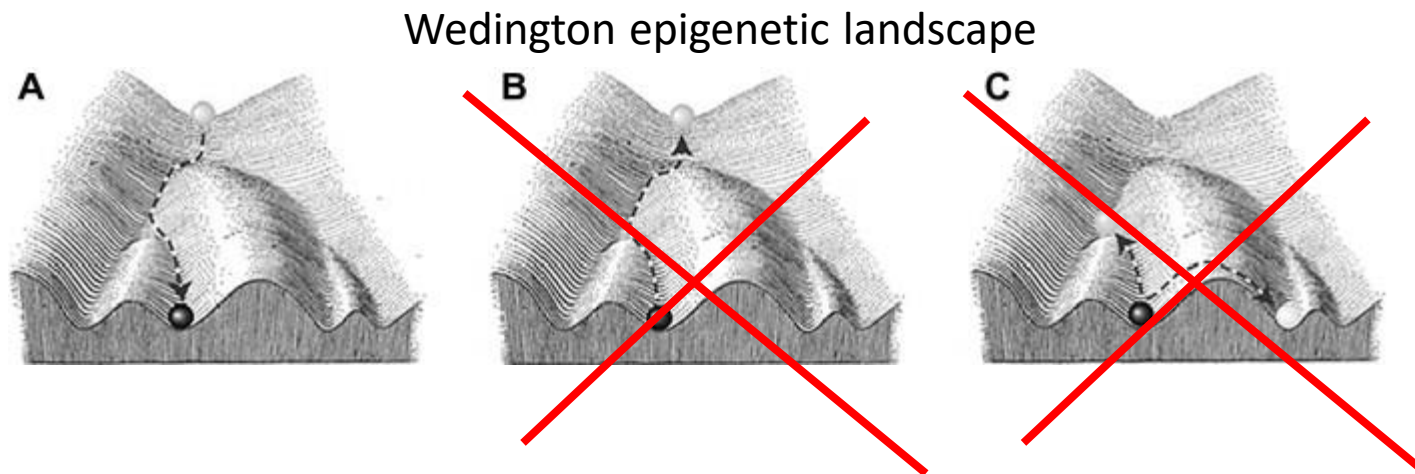
Diferenciace kmenových buněk



Conrad Hal Waddington

Diferenciace

- proces, při kterém nezralá buňka získá vlastnosti zralé specializované buňky
- epigenetický proces, při které se umlčuje exprese nepotřebných genů a naopak aktivuje exprese genů, které vedou ke specializaci
- proces diferenciace je přirozeně nezvratný proces... viz kulička ve Waddingtonově krajině



Uměle (řízenou transkripcí specifických transkripčních faktorů) umíme:

REPROGRAMOVAT

TRANSDIFERENCIOVAT

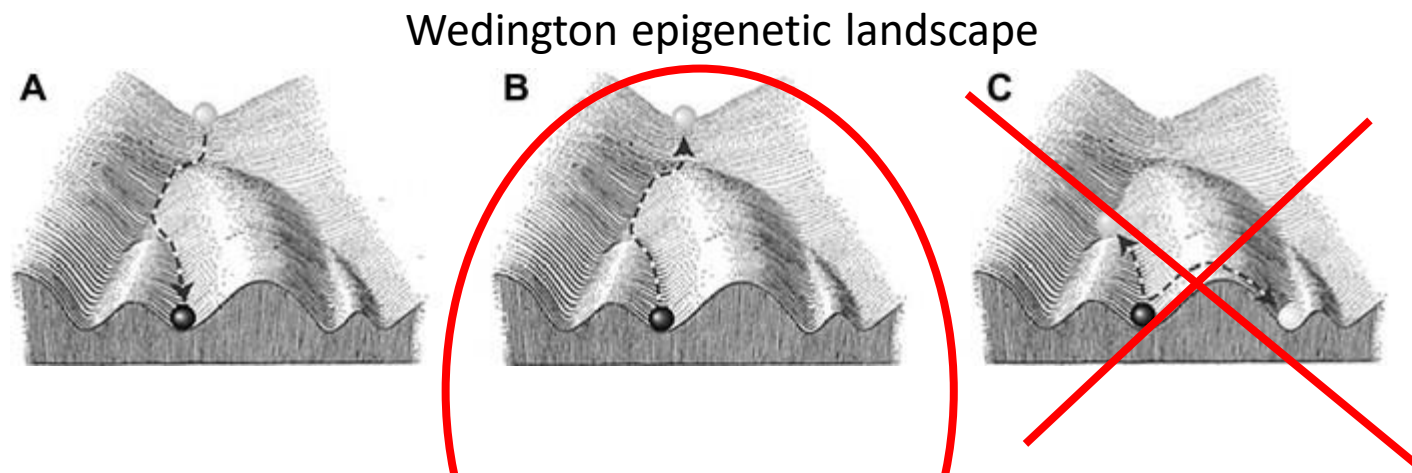
Diferenciace kmenových buněk



Conrad Hal Waddington

Diferenciace

- proces, při kterém nezralá buňka získá vlastnosti zralé specializované buňky
- epigenetický proces, při které se umlčuje exprese nepotřebných genů a naopak aktivuje exprese genů, které vedou ke specializaci
- proces diferenciace je přirozeně nezvratný proces... viz kulička ve Waddingtonově krajině



Uměle (řízenou transkripcí specifických transkripčních faktorů) umíme:

REPROGRAMOVAT

TRANSDIFERENCIOVAT

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

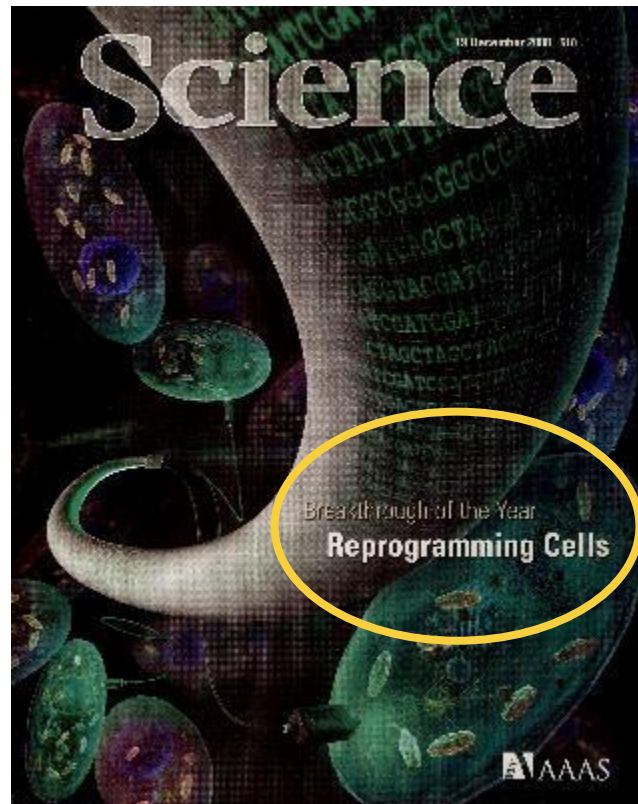
Kazutoshi Takahashi¹ and Shinya Yamanaka^{1,2,*}

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

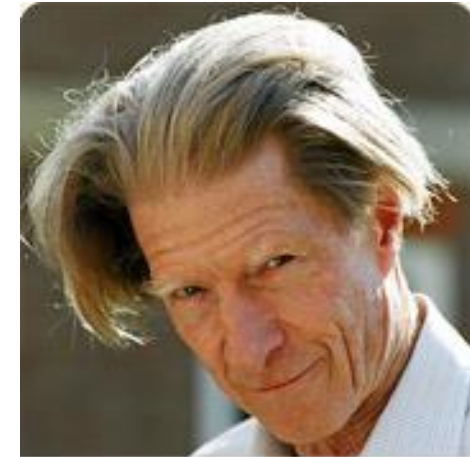
²CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan

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

DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024



Shinya Yamanaka
Kyoto University



John Gurdon
University of Cambridge



Rudolf Jaenisch

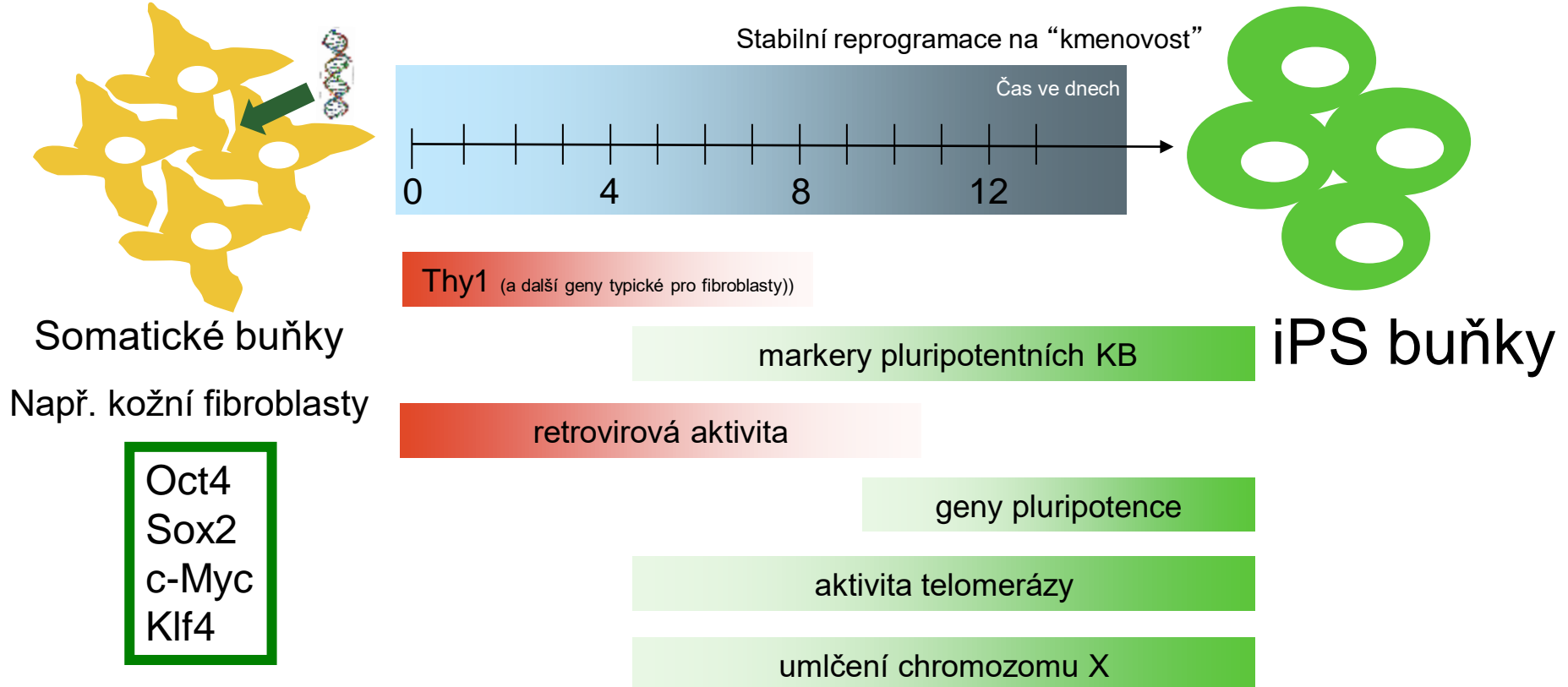
Albert Lasker basic medical research award 2009

Indukované pluripotentní KB (Yamanaka 2006)

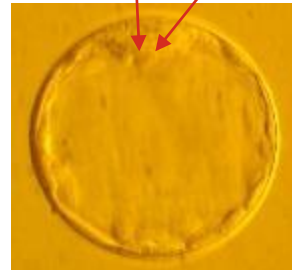
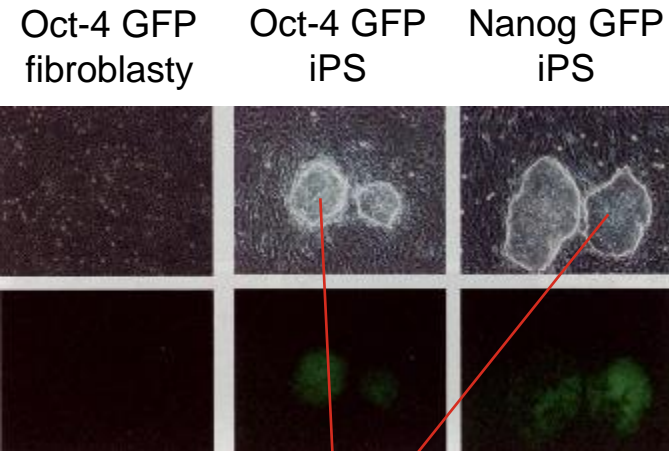
Alternativní zdroj pluripotence - Indukované pluripotentní KB (iPS cells)

- KB vytvořené ze somatických tj. diferencovaných buněk pomocí genetické metody

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



iPS jsou schopny vytvořit chimérní organizmus



Injekce chiméry
(bílá a hnědá srst)

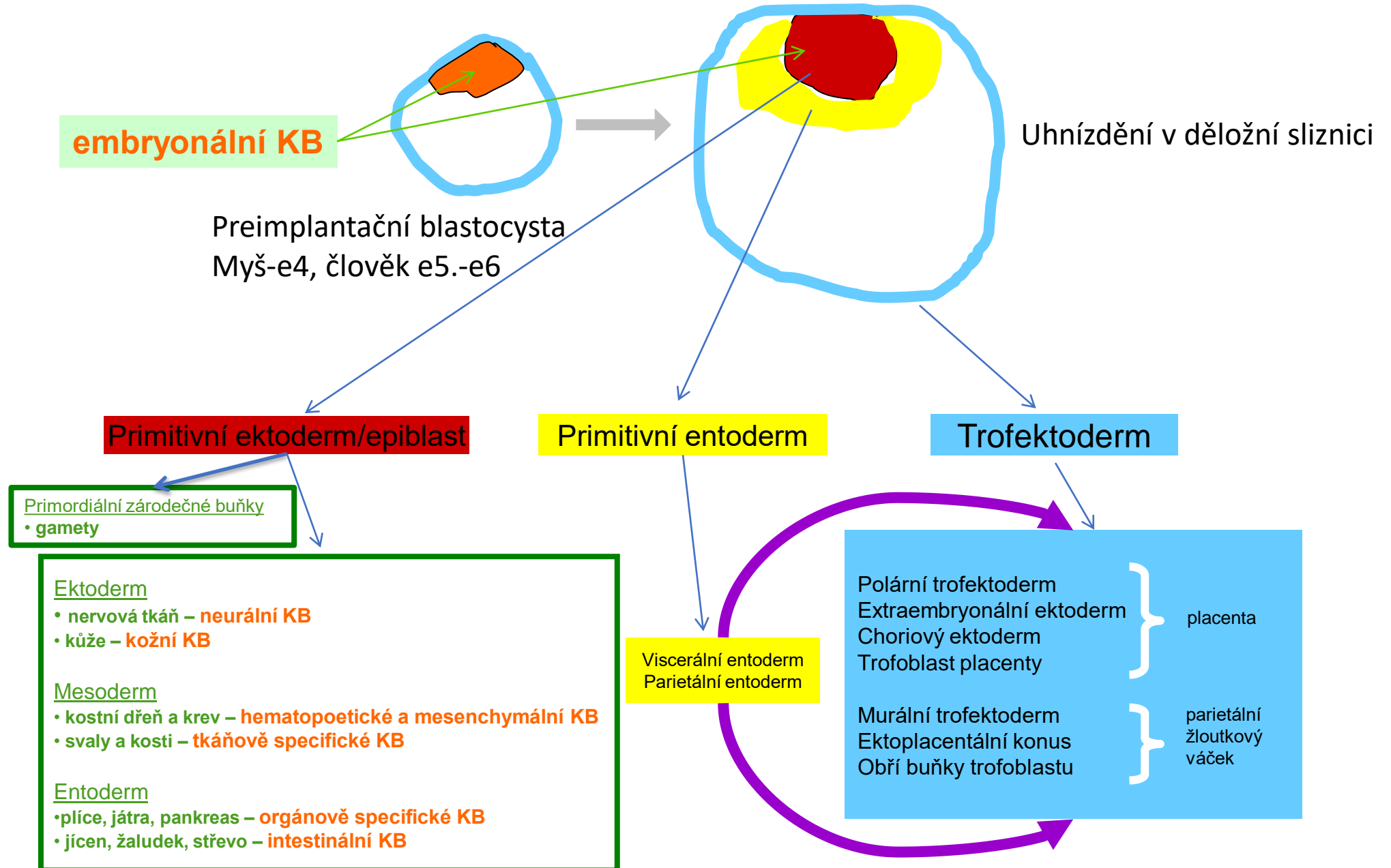


Nanog GFP iPS chiméra

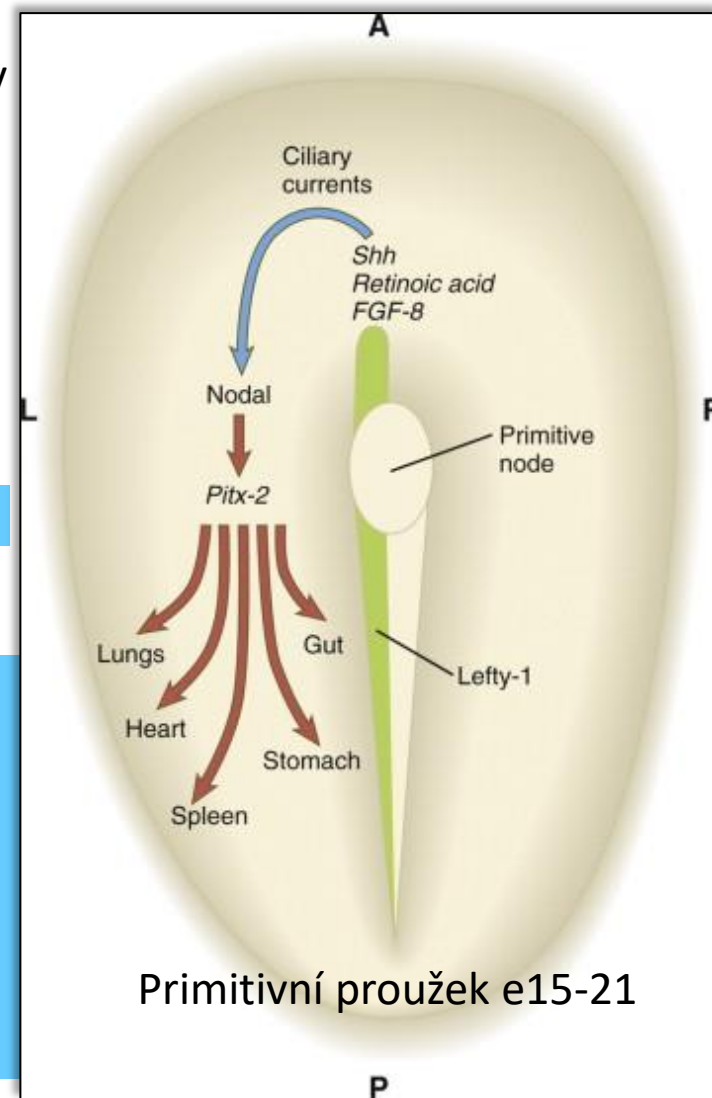
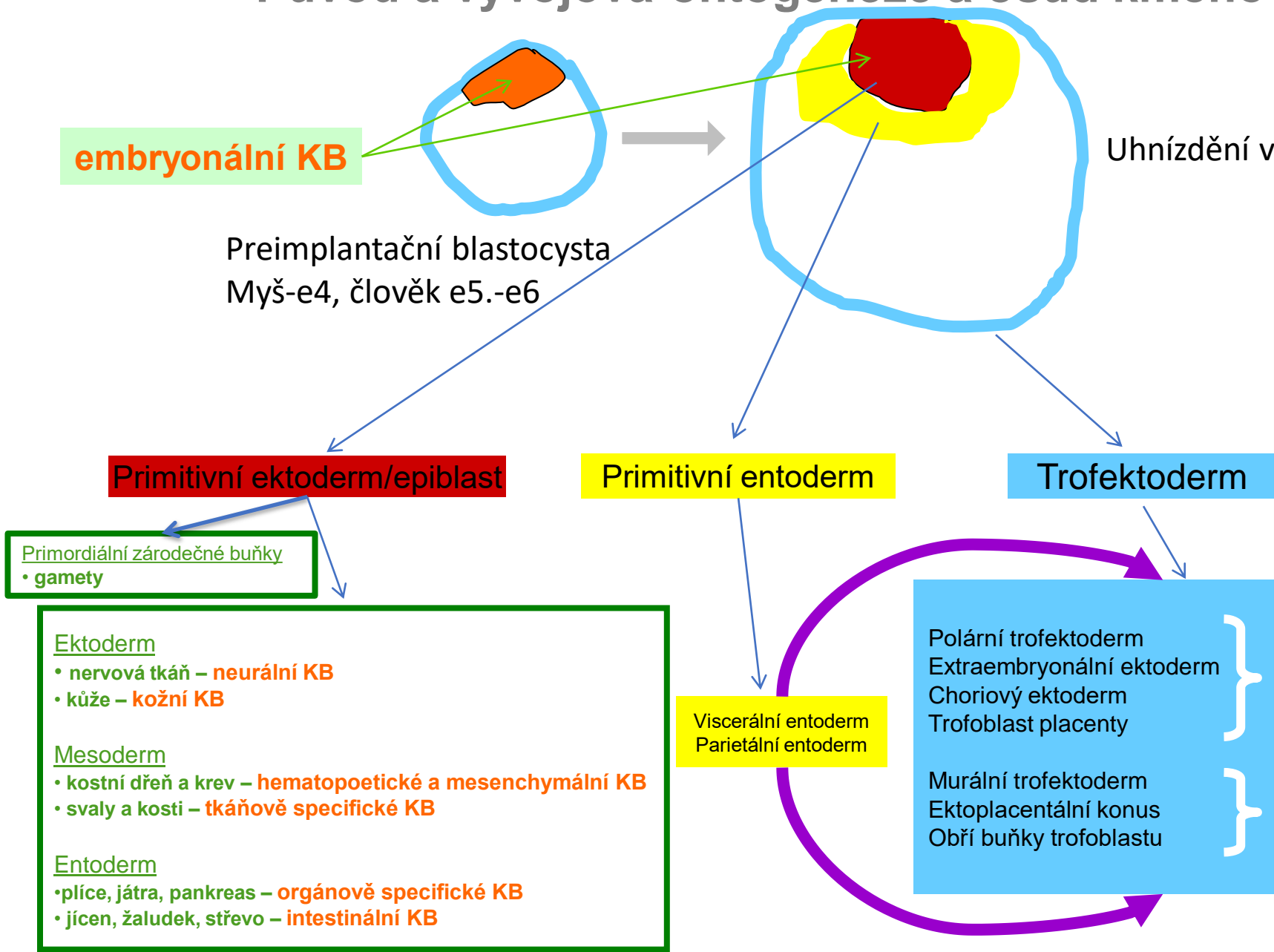


Oct-4 GFP iPS chiméra

Původ a vývojová ontogeneze a osud kmenových buněk (KB)



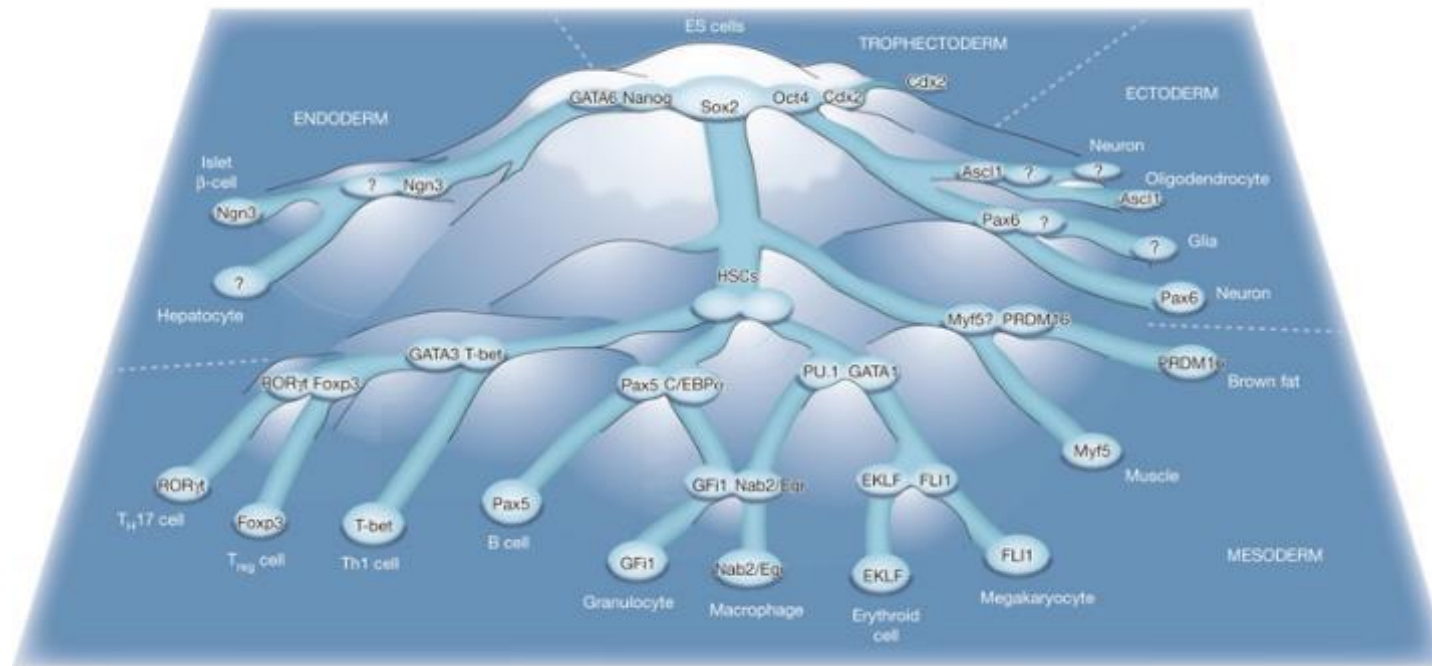
Původ a vývojová ontogeneze a osud kmenových buněk (KB)



Chceme-li získat konkrétní buněčný typ, musíme napodobit embryonální vývoj

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

Liniová diferenciacie embryonálních kmenových buněk ve členité krajině vysokých kopců (=NESTABILNÍ STAV BUNĚK), horských údolí (=RELATIVNĚ STABILNÍ ALE REVERZIBILNÍ STAV BUNĚK) a hluboké nížiny (=TERMINÁLNÍ DIFERENCIACE BUNĚK)

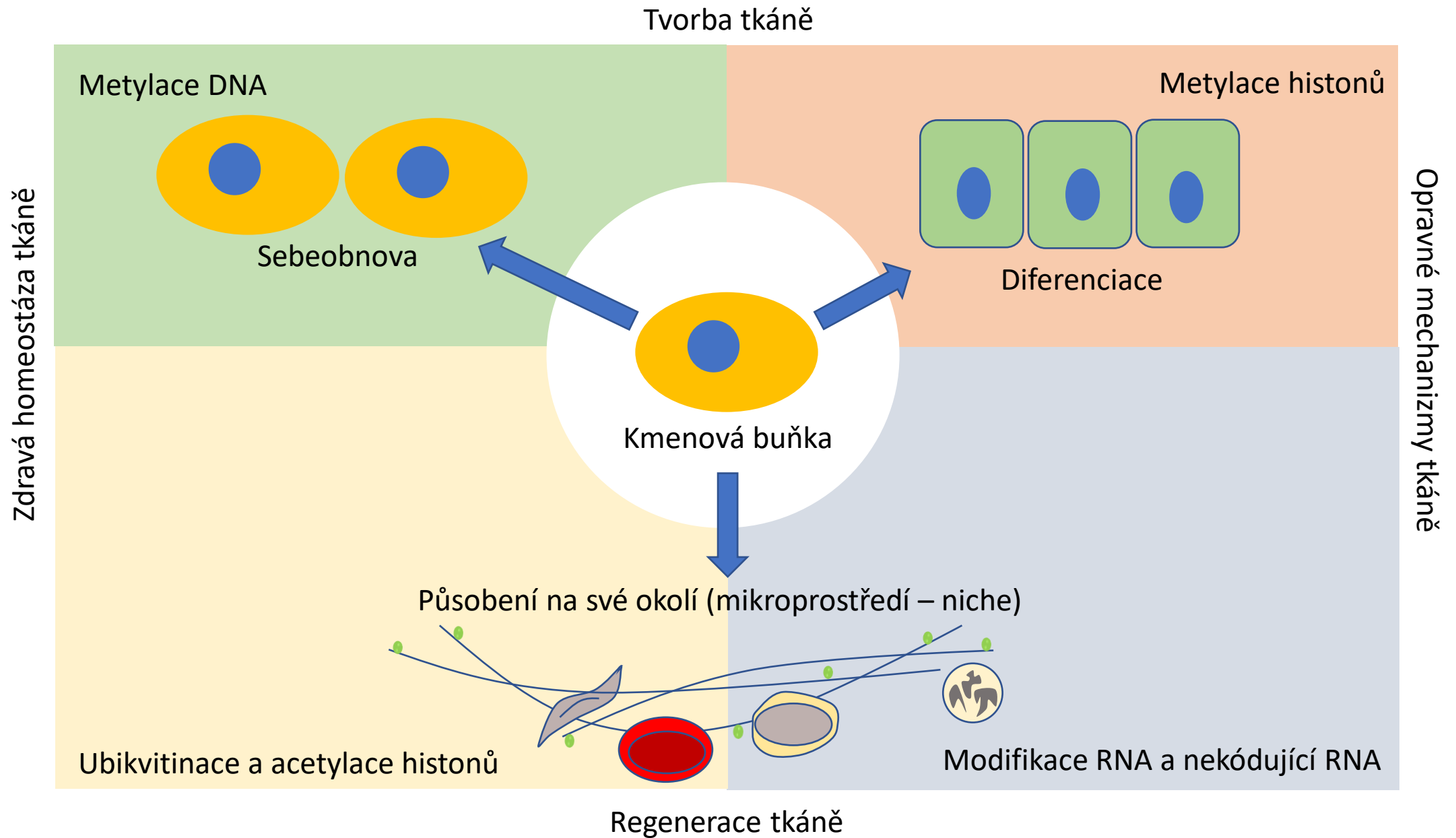


Thomas Graf & Tariq Enver *Nature* **462**, 587-594 (2009) doi:10.1038/nature08533

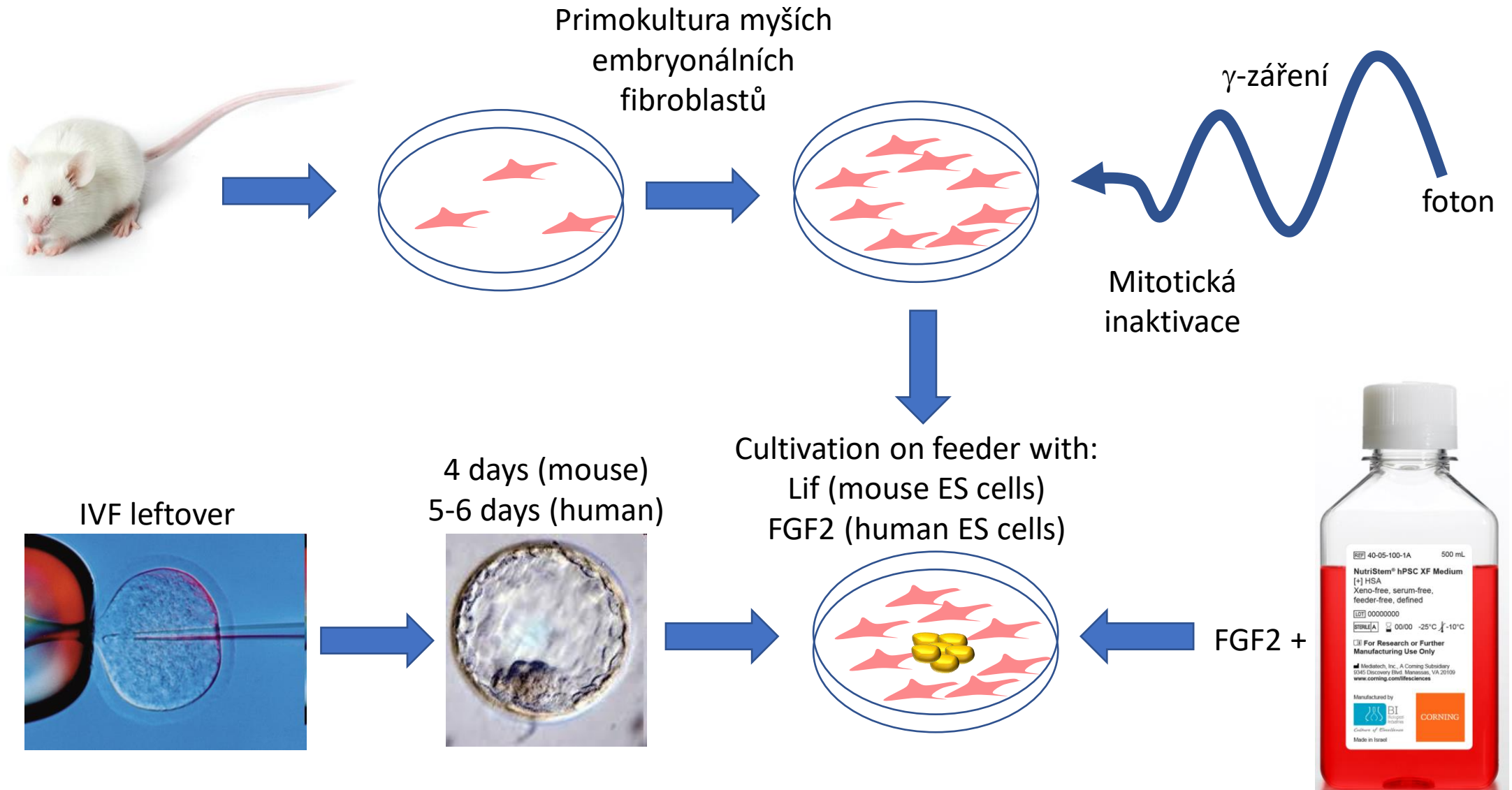
Cesta je řízena transkripčními a růstovými faktory a
Vede k celé řadě různých typů kmenových buněk..

nature

Regulace osudu kmenové buňky epigenetickými mechanizmy: Sebeobnova a Diferenciace



Uměle vytvořené mikroprostředí pro udržení pluripotence - sebeobnovu

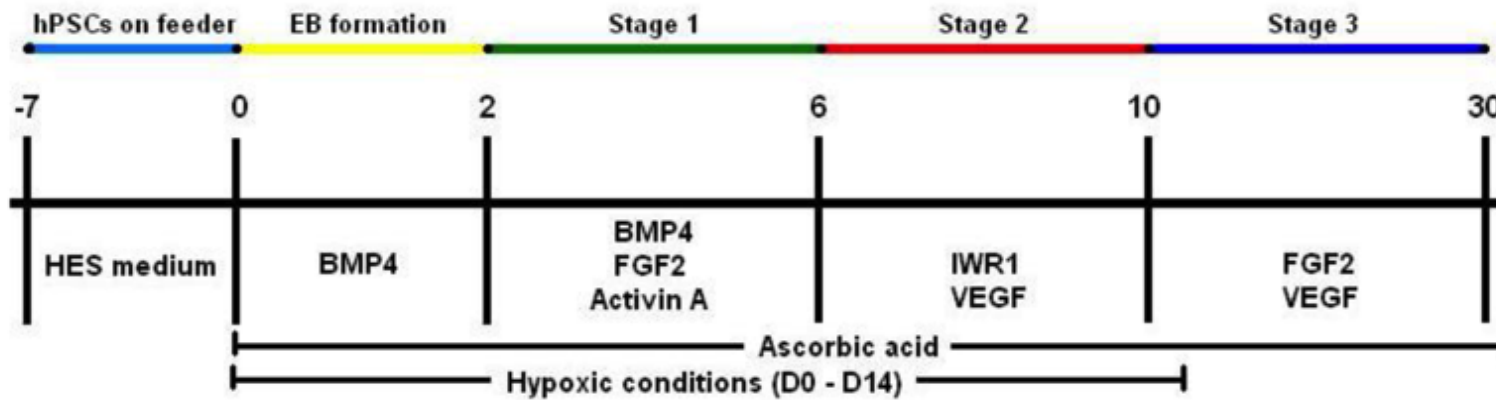


Myší fibroblasty mimikují trofoblast; bezsérové médium mimikuje prostředí blastocoelu; FGF2 mimikuje parakrinní signalizaci blastomer (příště si povíme více o mikroprostředí – niche)

DIFFERENCIACE PSC DO FUNKČNÍCH KARDIOMYOCYTŮ, aneb napodobujeme embryo...

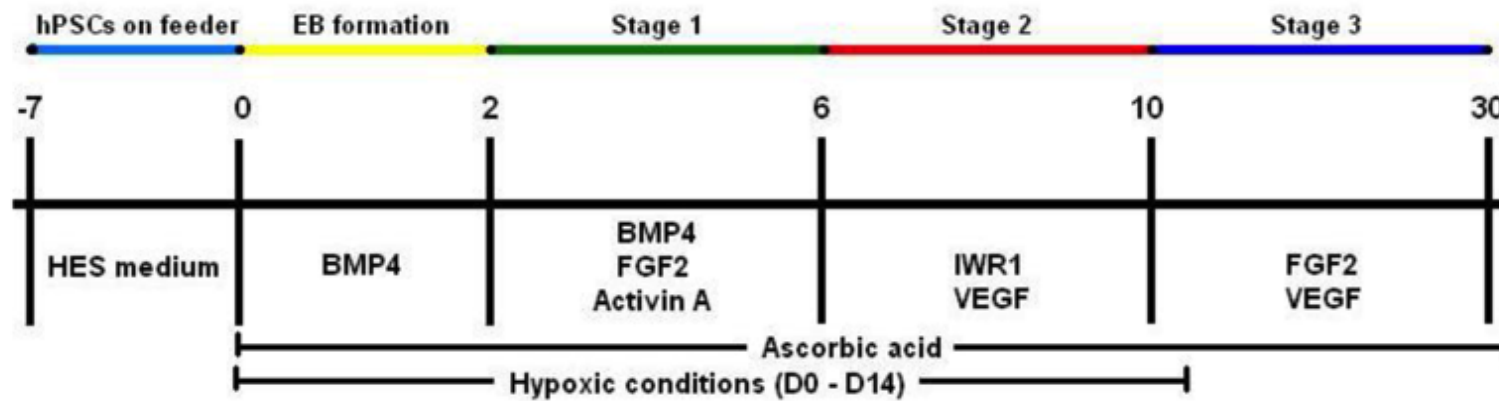
Technologické zadání: Potřebujeme model srdce na testování arytmogenicity existujících léčiv

DIFFERENCIACE PSC DO FUNKČNÍCH KARDIOMYOCYTŮ, aneb napodobujeme embryo...



Pešl, Heart and Vessels, 2014

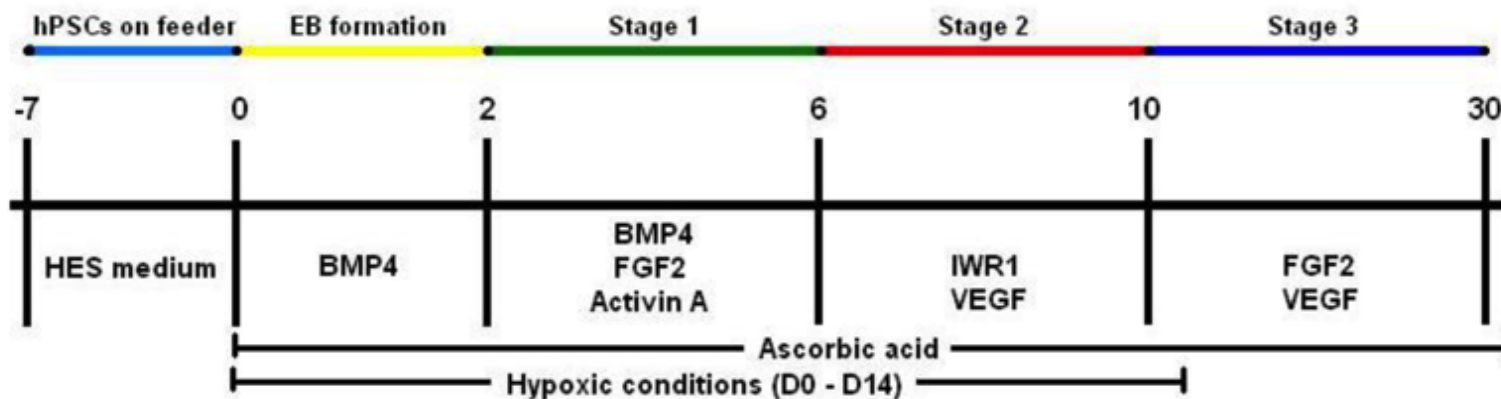
DIFFERENCIACE PSC DO FUNKČNÍCH KARDIOMYOCYTŮ, aneb napodobujeme embryo...



Pešl, Heart and Vessels, 2014

BMP4 pomáhá polarizaci embrya při gastrulaci (primitivní mesendoderm)

DIFFERENCIACE PSC DO FUNKČNÍCH KARDIOMYOCYTŮ, aneb napodobujeme embryo...



Pešl, Heart and Vessels, 2014

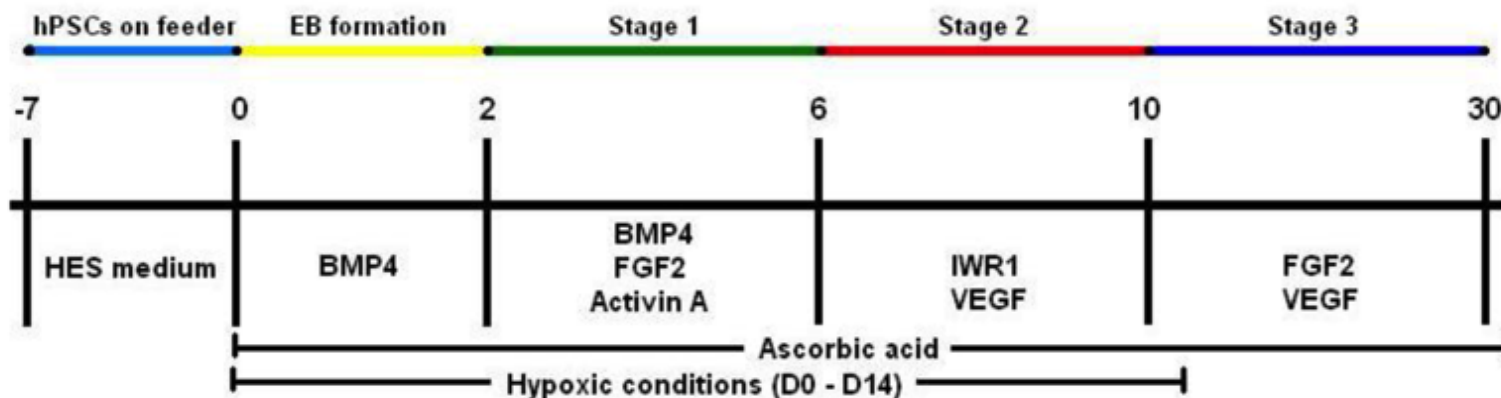
BMP4 pomáhá polarizaci embrya při gastrulaci (primitivní mesendoderm)

Hensenův uzel v přítomnosti FGF2 spouští kardiogenezi

Activin A spouští tvorbu mezodermu

1mm

DIFFERENCIACE PSC DO FUNKČNÍCH KARDIOMYOCYTŮ, aneb napodobujeme embryo...



Pešl, Heart and Vessels, 2014

BMP4 pomáhá polarizaci embrya při gastrulaci (primitivní mesendoderm)

Activin A spouští tvorbu mezodermu

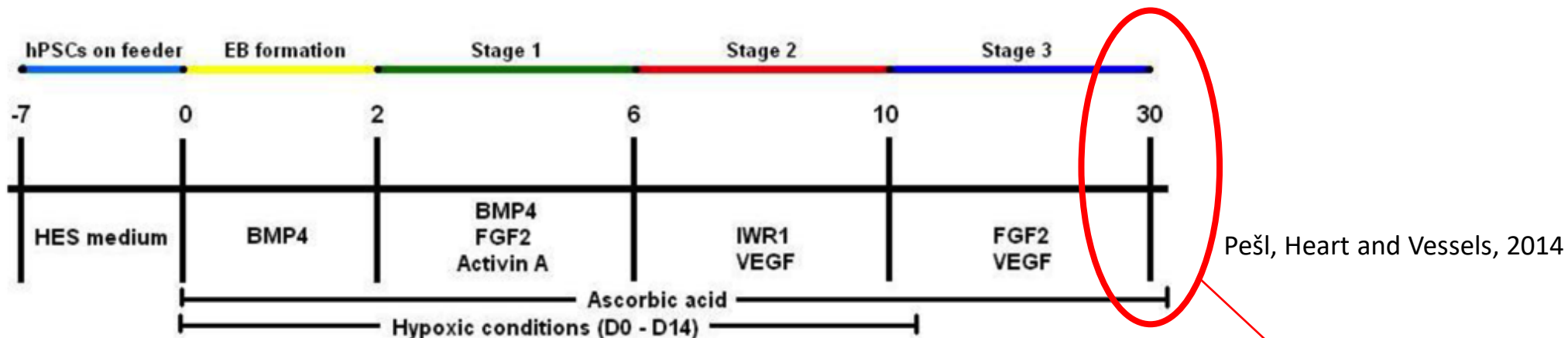
Hensenův uzel v přítomnosti FGF2 spouští kardiogenezi

IWR inhibuje Wnt signál – zabrání neurodiferenciaci atp.

VEGF is je třeba pro pozdní morfogenezi srdce (tvorba komor)

1mm

DIFFERENCIACE PSC DO FUNKČNÍCH KARDIOMYOCYTŮ, aneb napodobujeme embryo...



Pešl, Heart and Vessels, 2014

BMP4 pomáhá polarizaci embrya při gastrulaci (primitivní mesendoderm)

Activin A spouští tvorbu mezodermu

Hensenův uzel v přítomnosti FGF2 spouští kardiogenezi

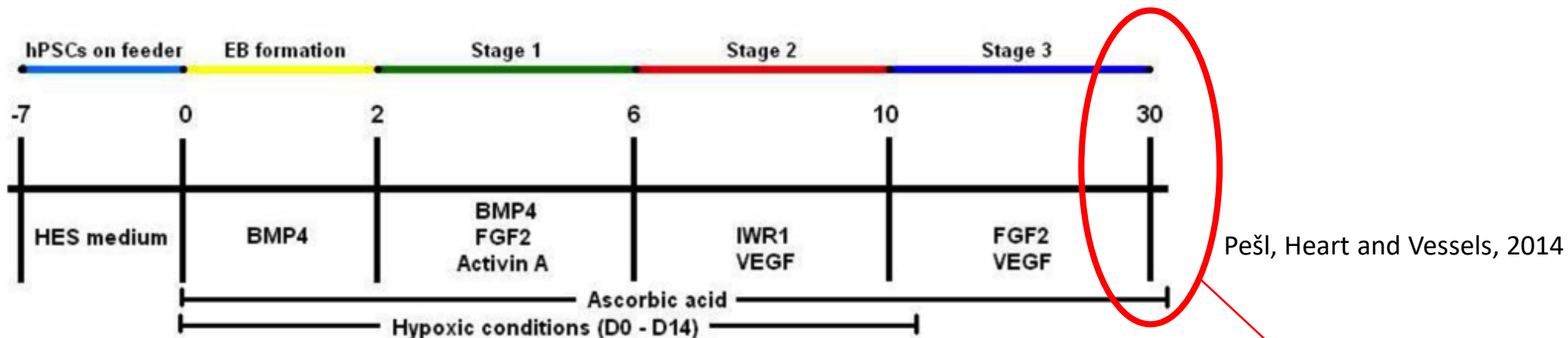
IWR inhibuje Wnt signál – zabrání neurodiferenciaci atp.

VEGF is je třeba pro pozdní morfogenezi srdce (tvorba komor)

Kardiomyocyty začínají spontánně bít



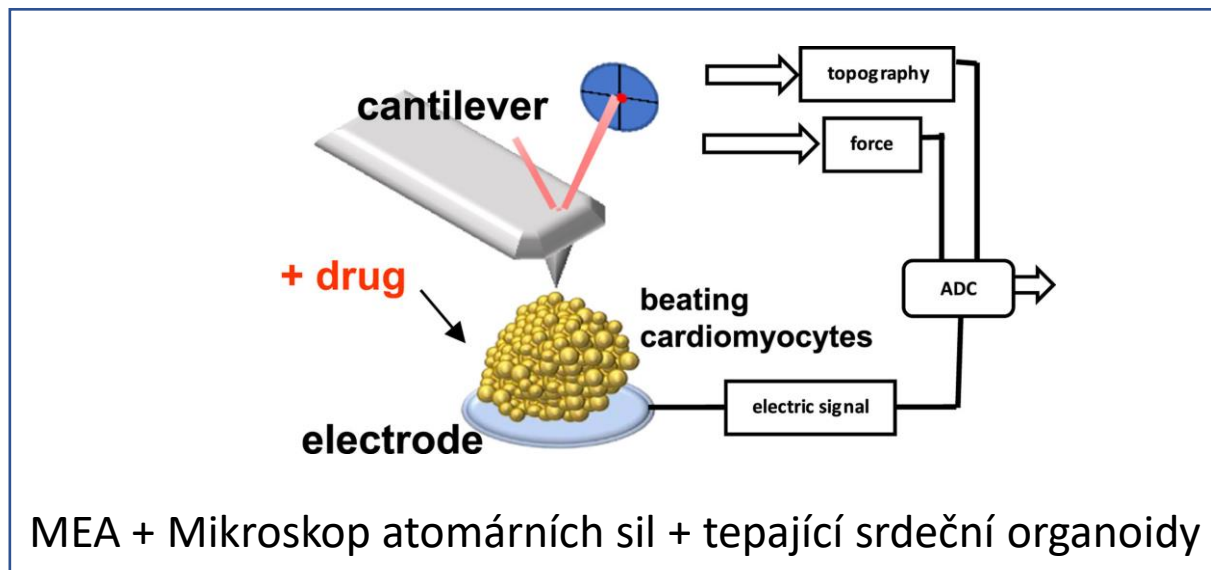
DIFFERENCIACE PSC DO FUNKČNÍCH KARDIOMYOCYTŮ, aneb napodobujeme embryo...



Pešl, Heart and Vessels, 2014

Biotechnologické aplikace

Tvorba „biosenzoru“ na detekci arytmogenni aktivity látek

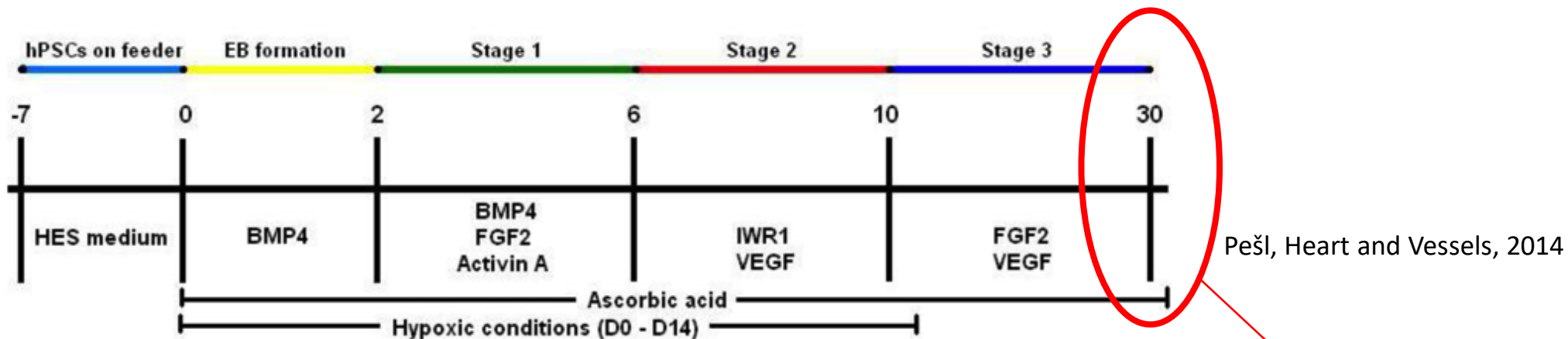


MEA + Mikroskop atomárních sil + tepající srdeční organoidy

Kardiomyocyty začínají spontánně bít

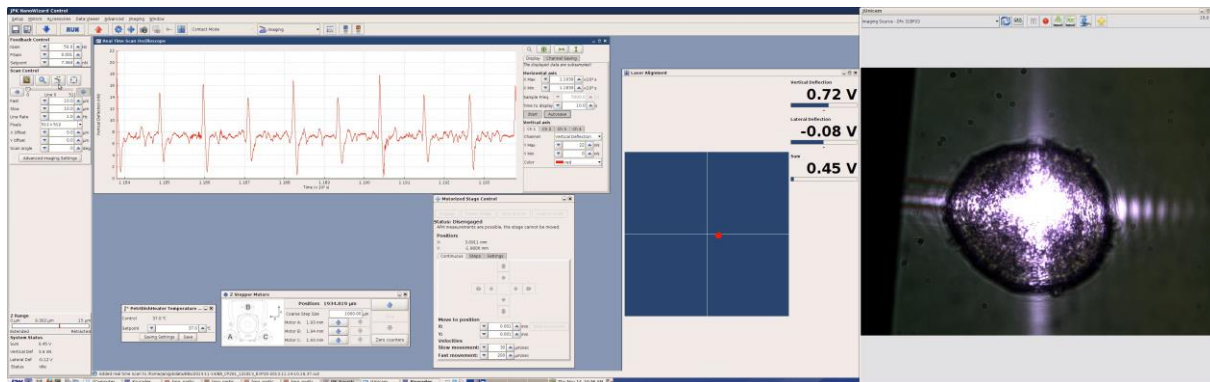


DIFFERENCIACE PSC DO FUNKČNÍCH KARDIOMYOCYTŮ, aneb napodobujeme embryo...



Biotechnologické aplikace

- Funkční analýza v přítomnosti léčiv – precizní medicína



Kardiomyocyty začínají spontánně bít



- Transplantace buněk
- Toxikologie
- a mnoho jiných...

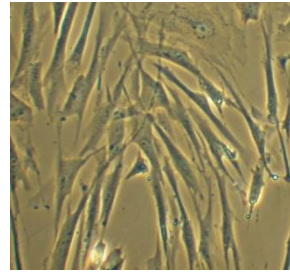
Modely chorob z kmenových buněk:
- indukované pluripotentní kmenové buňky s mutací z pacienta



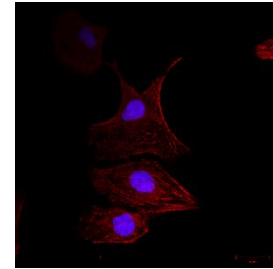
hiPSC



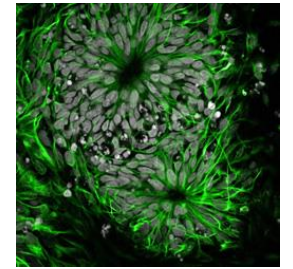
neurony



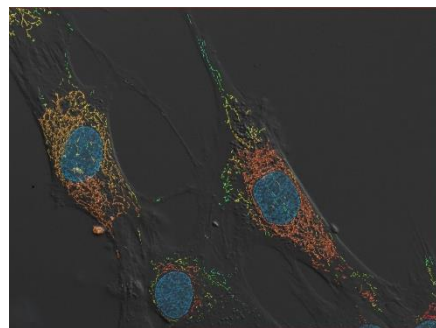
fibroblasts



cardiomyocytes

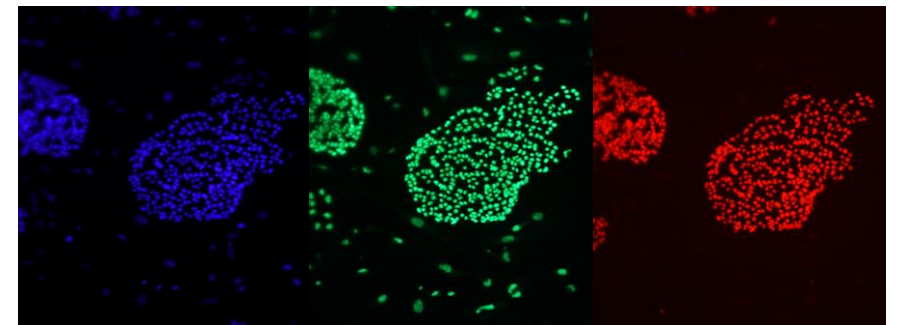


neurons



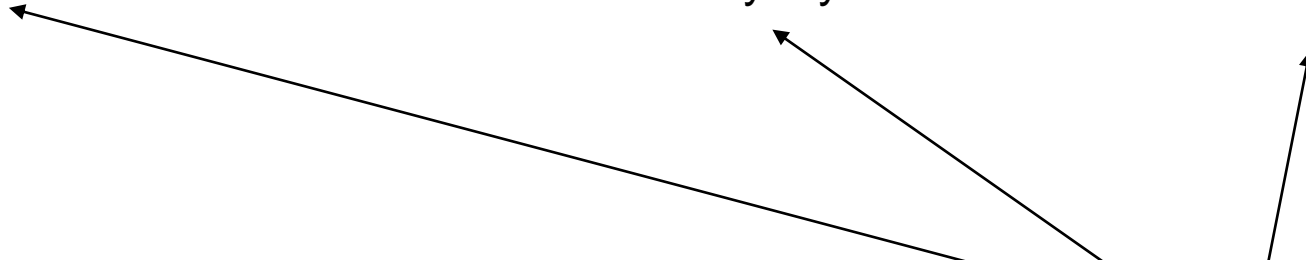
diferencovaná buňka

epigenetický reset
Yamanakovým „koktejlem“



Pluripotentní buňka

Diferenciace in vitro



Můžete se těšit na příště – po hlavě do aplikací

Lekce II.: Aplikace živočišných tkáňových kultur

1. Vakcíny proti virovým onemocněním
 2. Monoklonální protilátky
 3. Rekombinantní glykoproteiny
 4. Hormony a růstové faktory
 5. Enzymy
-

Lekce III.:

6. Testování léčiv
7. Buněčná transplantace
8. Tkáňové inženýrství
9. Výroba organoidů a orgánů

Biotechnologické procesy

Živočišné tkáňové kultury a kmenové buňky



Děkuji za pozornost..

Vladimír Rotrekl
vrotrekl@med.muni.cz

Konec I. bloku: Úvod do problematiky živočišných tkáňových kultur a kmenových buněk