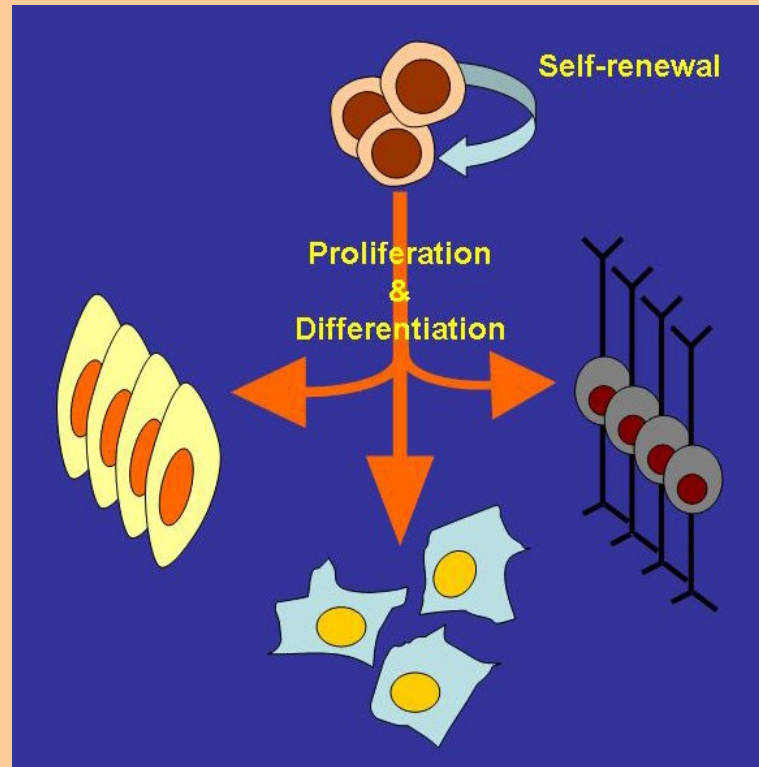


# Fyziologie kmenových buněk

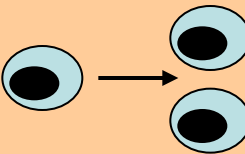


**Jiří Pacherník**

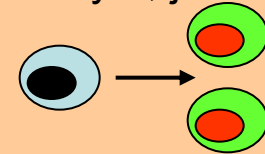
E-mail: [jipa@sci.muni.cz](mailto:jipa@sci.muni.cz)

Tel: 532 146 223 / 116

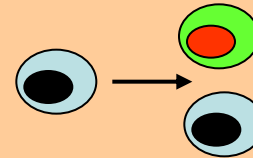
## Dělení buněk (proliferace)

**Symetricky** – vznikají dvě identické buňky 

**Diferenciační dělení** – obě nově vzniklé buňky mají i nový fenotyp, jsou dalším stupněm v dané diferenciační linii

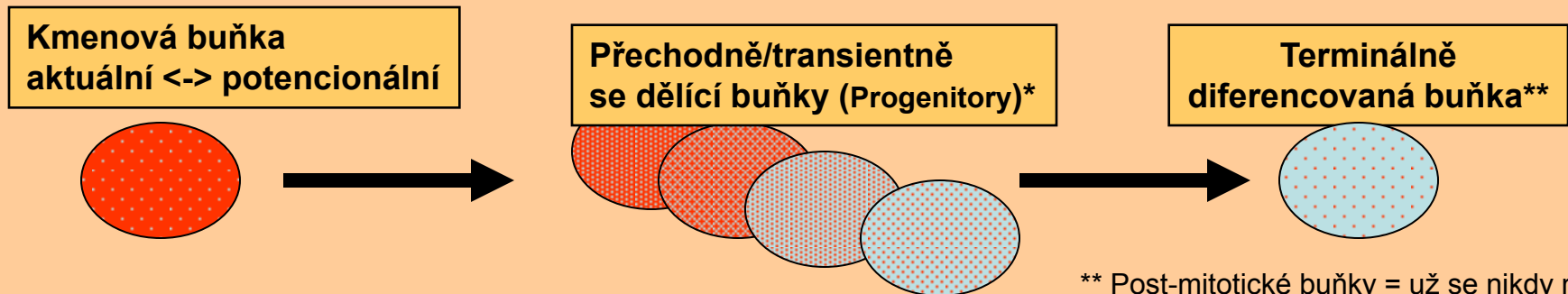


**Asymetricky** – jedna si zachovává původní fenotyp, druhá je již jiná



## Diferenciace (rozdířování) buněk

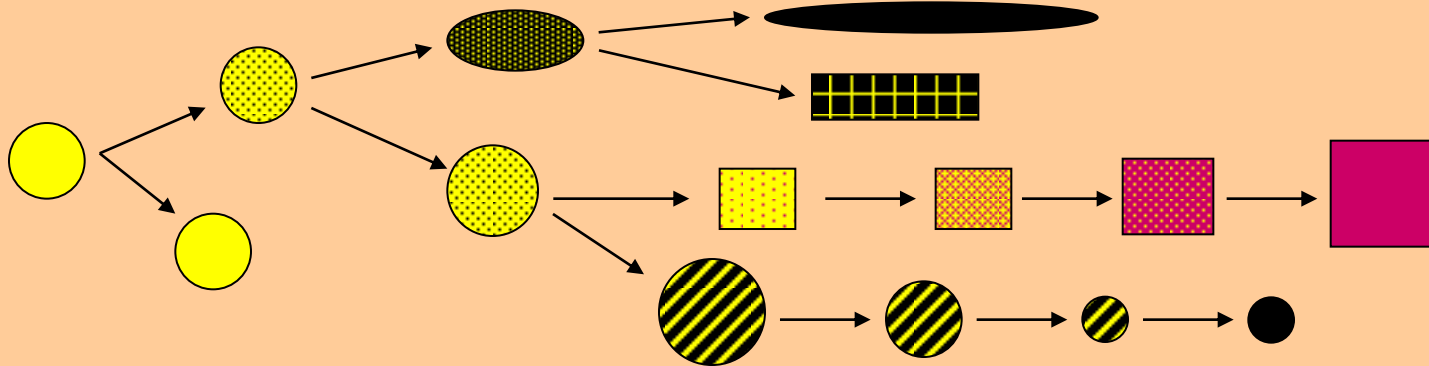
- Buňky mění svůj fenotyp v na základě změny exprese svého genotypu v důsledku vnějších signálů.
- Regulace diferenciace je často provázána s proliferací (epigenetické změny v jádře během mitotického cyklu?).



\* Často proliferují a mají schopnost krátkodobé sebeobnovy.

\*\* Post-mitotické buňky = už se nikdy nedělí. Ne všechny terminálně diferencované buňky jsou post-mitotické.

## Diferenciace buněk



přestavba genomu / chromatinu → exprese jiného paternu genů → jiná morfologie, jiné funkce a potenciál

**Determinace** – předurčení pro danou diferenciační linii / dráhu

### geny a jejich produkty

- „*housekeeping*“ (metabolismus, transkripce / translace, základy cytoskeletu)
- **všeobecně abundantní** (transkripce/translace, cytoskelet, komponenty signálních drah)
- **specifické** (enzymy, specifické transkripční faktory, cytoskelet – komponenty intermediálních filament, s cytoskeletem asociované proteiny)

## Z hlediska schopnosti tvořit další buněčné typy se buňky dělí na:

**Totipotentní** – mohou z nich vznikat všechny buňky daného živočišného druhu

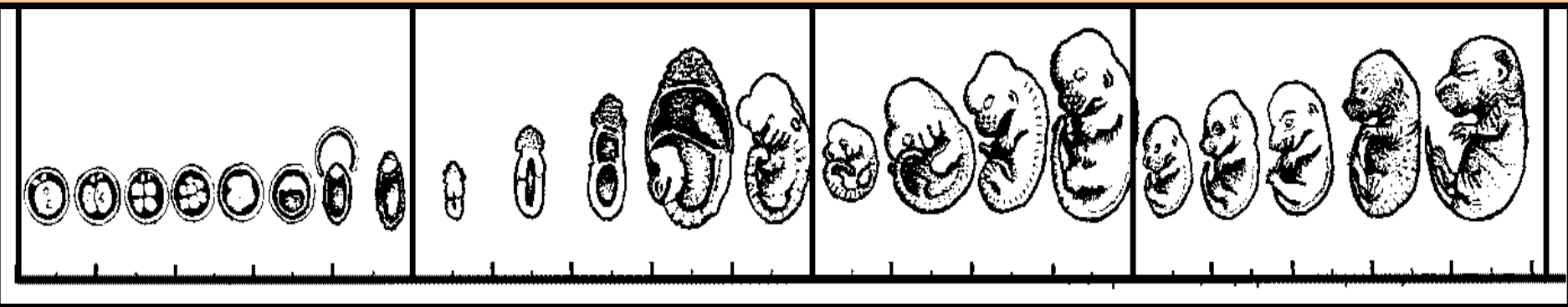
**Pluripotentní** – mohou dát vznik všem buňkám budoucího jedince (všechny tři zárodečné listy)

**Multipotentní** – může z nich vznikat větší počet buněčných typů dané buněčné řady

(**Oligopotentní** – podobné jako multipotentní, ale méně typů)

**Unipotentní** – dávají vznik jen dvěma typům buněk

**Nullipotentní** – mohou se pouze dělit, nemění fenotyp



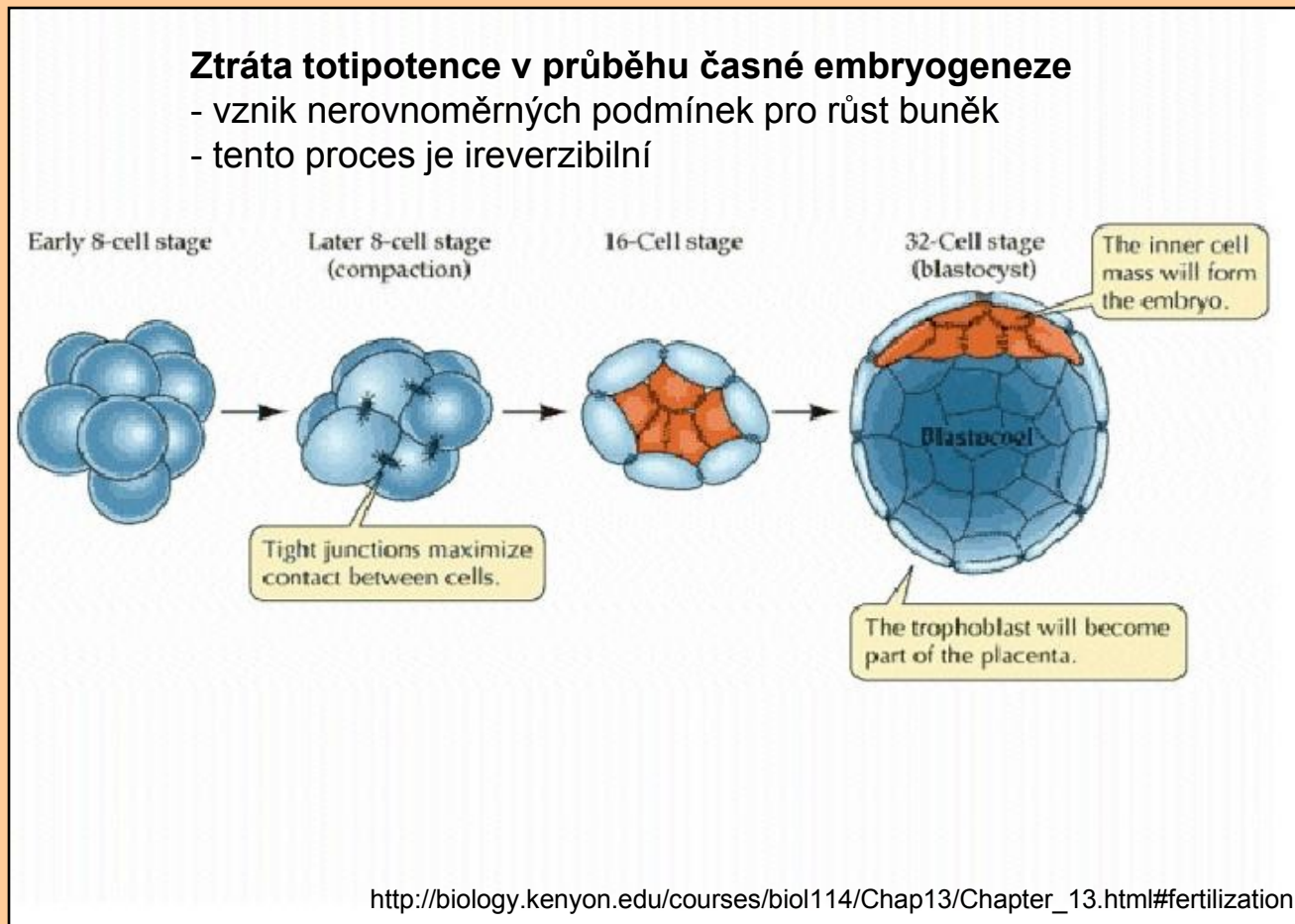
**totipotentní  
buňky**



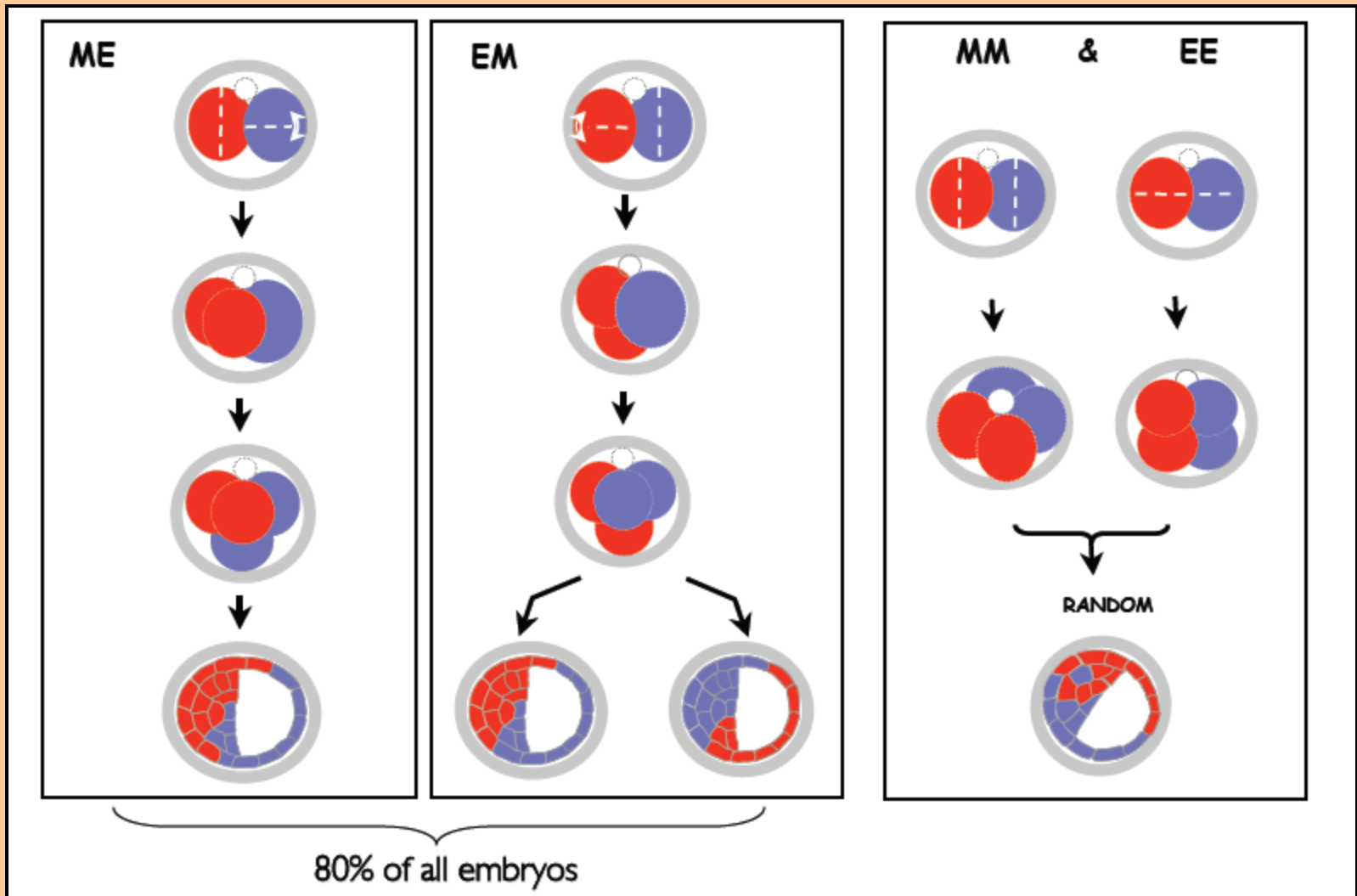
**pluripotentní, multipotentní, ....  
buňky**

## Totipotentní buňky

- 1- až 8-buněčné embryo (= Embryonální nespecifikované - pouze savci)
- Omezené možnosti dělení (neprobíhá transkripce; myš 2/4 b., člověk 8 b.)
- Existují pouze přechodně

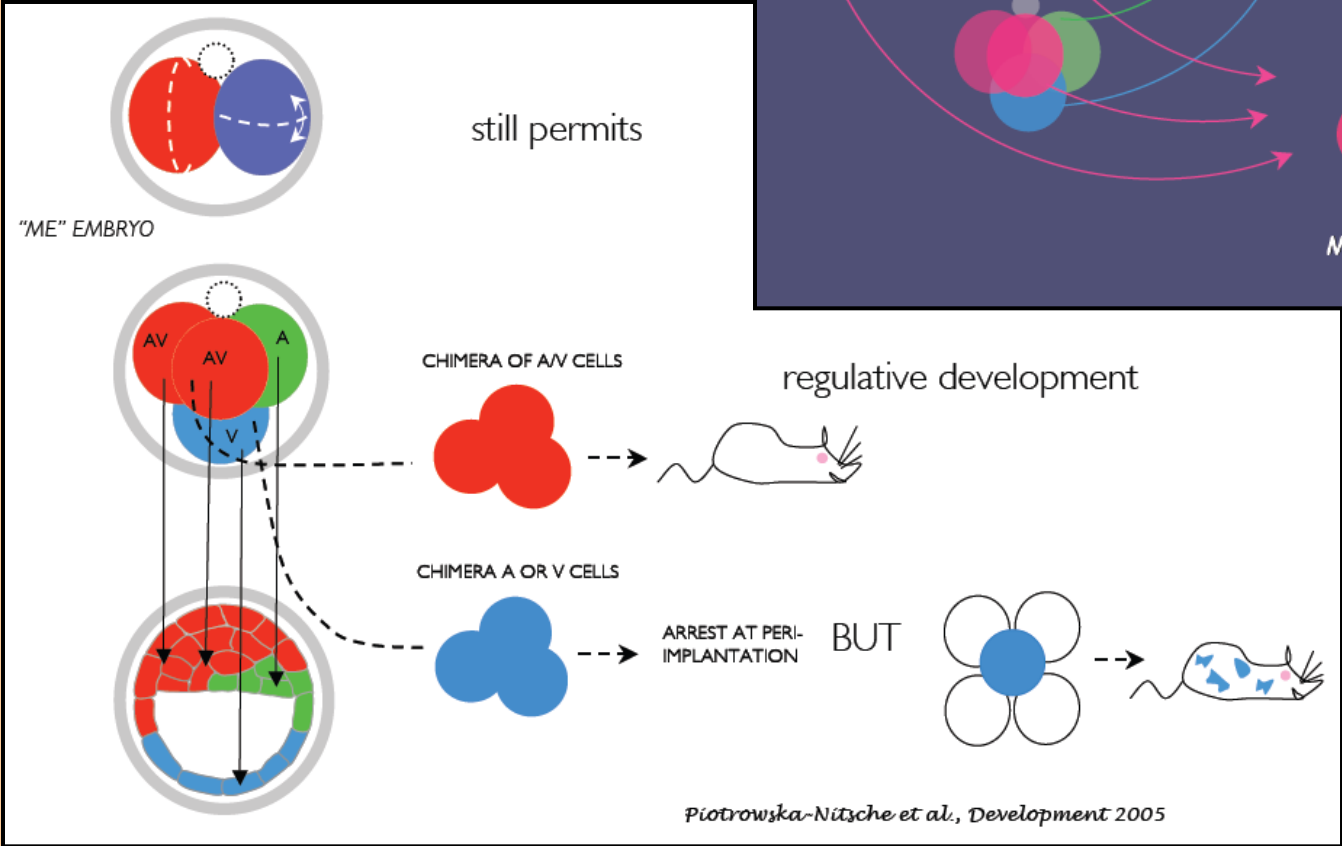
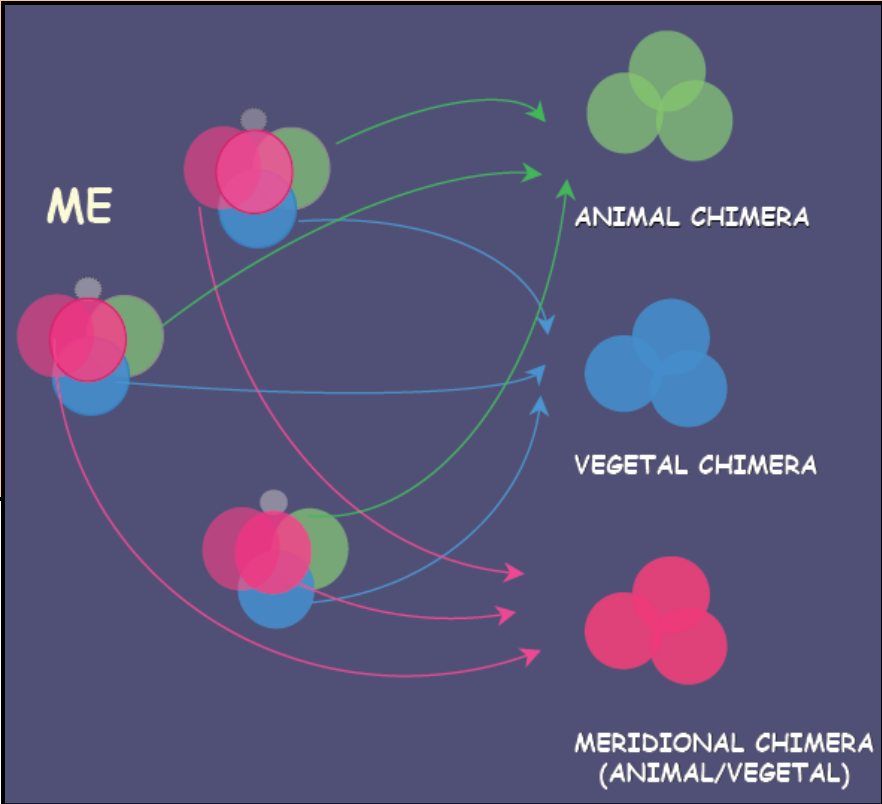


**Dělení buněk 2-buněčného embrya, určení polaritu a její vliv na další osud blastomer**  
Magdalena Zernicka-Goetz 2006



M – meridiální / E - ekvatoriální

**Orientace blastomer 4-buněčného embrya a její vliv na zachování absolutní totipotence těchto buněk**



*Piotrowska-Nitsche et al., Development 2005*

## Pluripotentní buňky (savci)

a) **In vivo**: buňky vnitřní buněčné masy

buňky epiblastu / primitivního ektodermu

buňky nerální lišty (4tý zárodečný list)

kmenové buňky teratomů (???)

**(somatické kmenové buňky?)**

b) **In vitro**: embryonální kmenové buňky

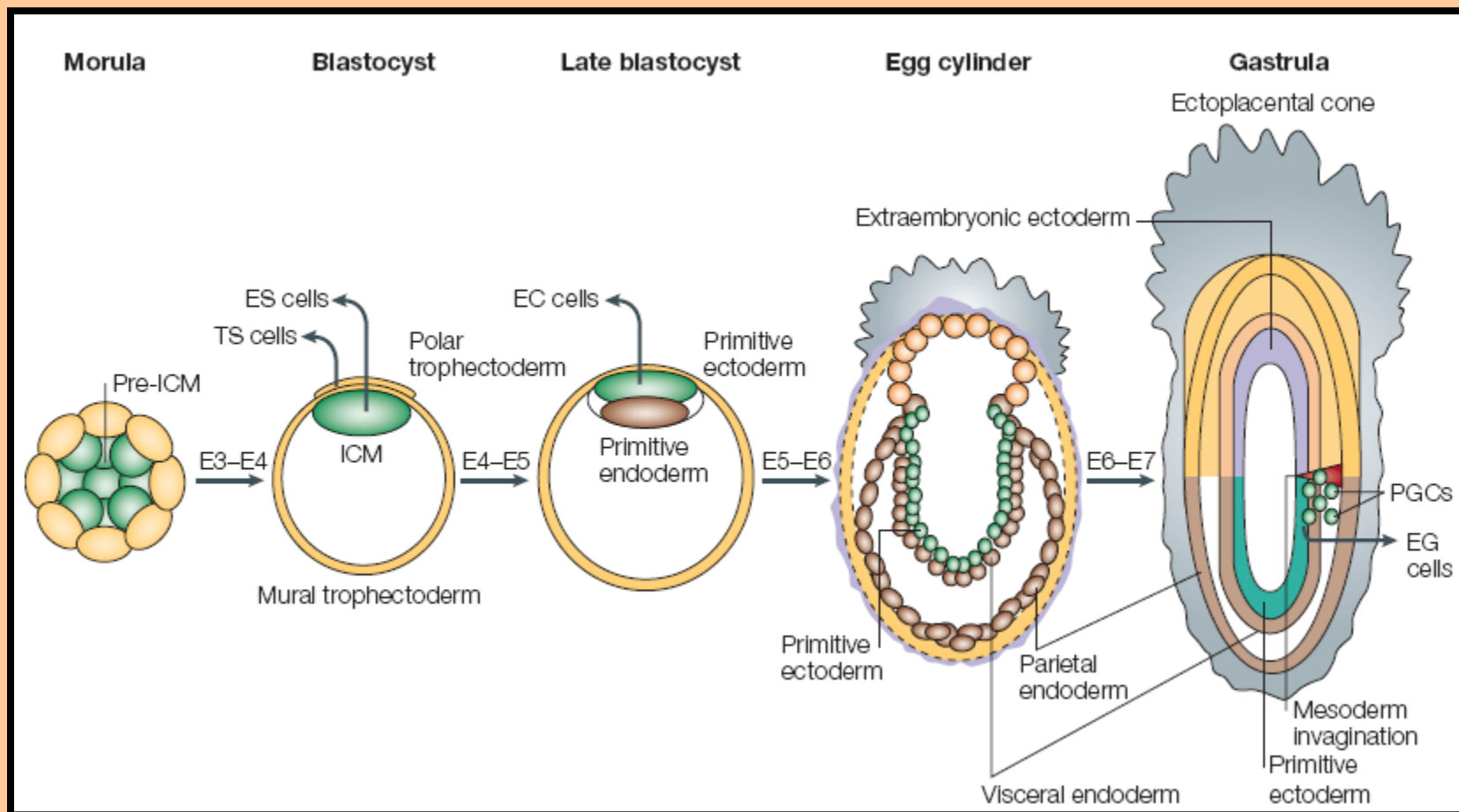
embryonální zárodečné buňky

embryonální nádorové buňky

(kmenové buňky teratomů)

**(somatické kmenové buňky?)**

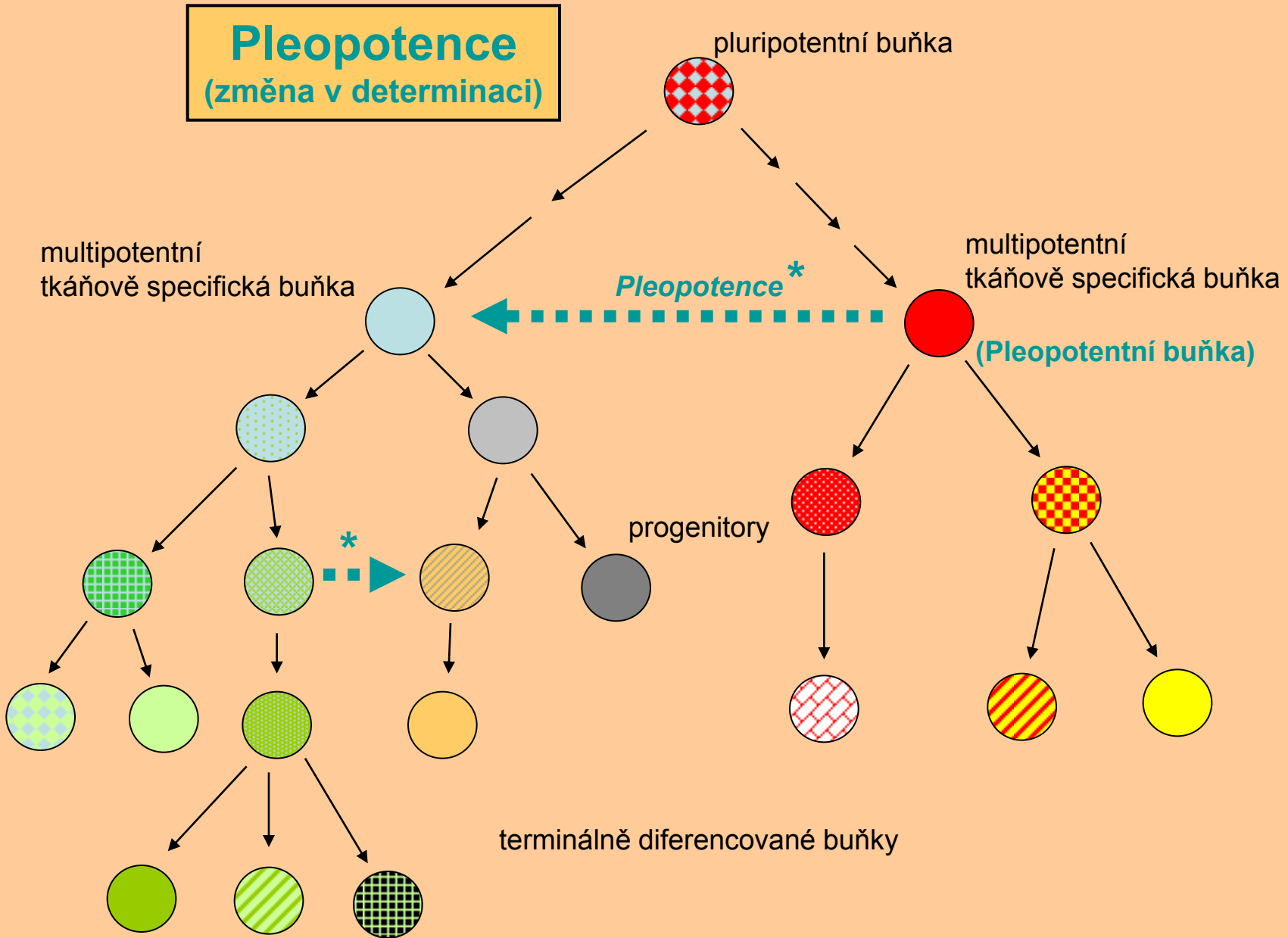




Boiani & Scholer 2005

Kmenové buňky mohou být pluripotentní, multipotentní,...  
ale pluripotentní nebo multipotentní buňky nemusí být kmenové.

# Pleopotence (změna v determinaci)



# KMENOVÉ BUŇKY

**Schopnost sebeobnovy** = self-renewal

**Schopnost dávat vznik jiným typům buněk** = pluripotence / multipotence / .....

=> **kmenovost = stemness**

- Společné znaky s embryonálními a nádorovými buňkami, nezralý fenotyp / relativně nediferencované (= dlouhé telomery / vysoká aktivita telomeráz, specifické proteinové markery, velké jádro / plasmový poměr,...)

= **VYHRAZENÉ (PROFESIONÁLNÍ) KMENOVÉ BUŇKY**

- Některé somatické, terminálně diferencované buňky si zachovávají schopnost sebeobnovy a v případě potřeby i multipotence, normálně jsou ale quiescentní (spící)

= **FAKULTATIVNÍ KMENOVÉ BUŇKY**

- Některé diferencované buňky si také dlouhodobě zachovávají schopnost proliferace, sebeobnovování a podílejí se tak na udržení homeostáze v tkáni

= **Sebeobnovující se diferencované buňky**

## KMENOVÉ BUŇKY PRIMÁRNÍ = existují „in vivo“

- dávají vznik buňkám dané buněčné struktury / tkáně / orgánu / (organismu)
- relativně pomalá proliferace
- jsou nejčastěji multipotentní, snad některé i pluripotentní či unipotentní
- jsou základním zdrojem buněk pro regeneraci organismu a homeostázi
- mají schopnost sebeobnovy (**self-renewal**) = *in vivo* asymetrické dělení
- s věkem jich ubývá, ale pravděpodobně nikdy během života jedince úplně nevymizí

### *profesionální SC*

- v tkáni jsou lokalizovány ve specifické oblasti, „**niche**“ (koutek)
- mají společné znaky s embryonálními a nádorovými buňkami = dlouhé telomery, specifické proteinové markery, velký jádro / plasmový poměr,...
- ???

## Somatické kmenové buňky (embryonální a adultní)

**Buňky některých zárodečných linií (neurální lišta) a kmenové buňky trofoblastu**

## KMENOVÉ BUŇKY ODVOZENÉ/SEKUNDÁRNÍ = existují jen „in vitro“

- jsou připravené z populací pluripotentních embryonálních buněk, ze zárodečných buněk, nebo z progenitorů embryonálních a dospělých tkání
- relativně rychle proliferují
- některé jsou multipotentní (z embryonálních a dospělých tkání), některé pluripotentní (embryonální původ)
- mohou být zdrojem buněk pro regeneraci organismu
- mají schopnost sebeobnovy (**self-renewal**) = „asymetrické/symetrické“ dělení
- mají společné znaky s embryonálními a nádorovými buňkami = dlouhé telomery, specifické proteinové markery, velké jádro / plasmový poměr,...
- ???

### **Embryonální kmenové buňky**

-> odvozené z vnitřní buněčné masy  
(**Kmenové buňky epiblastu**)

### **Embryonální zárodečné buňky**

-> odvozené z primordiálních zárodečných buněk

### **Embryonální nádorové buňky**

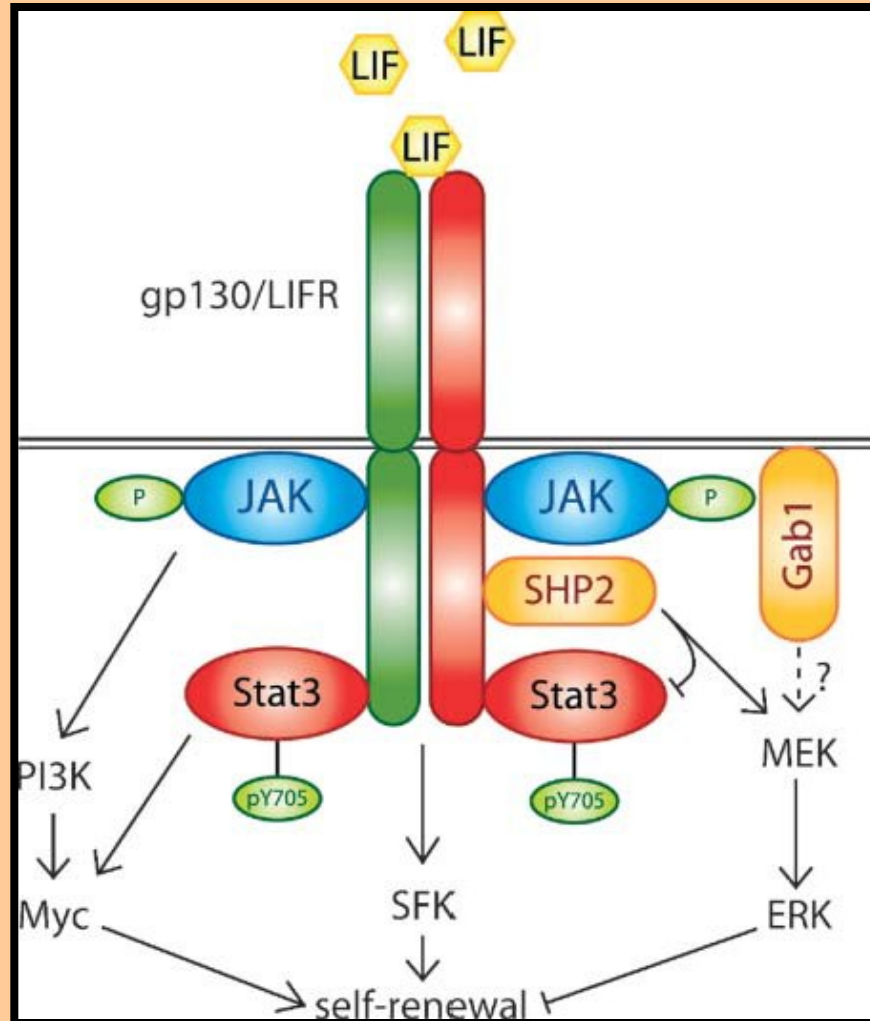
-> odvozené z kmenových buněk teratomů

### **Somatické kmenové buňky odvozené**

-> odvozené ze somatických kmenových buněk

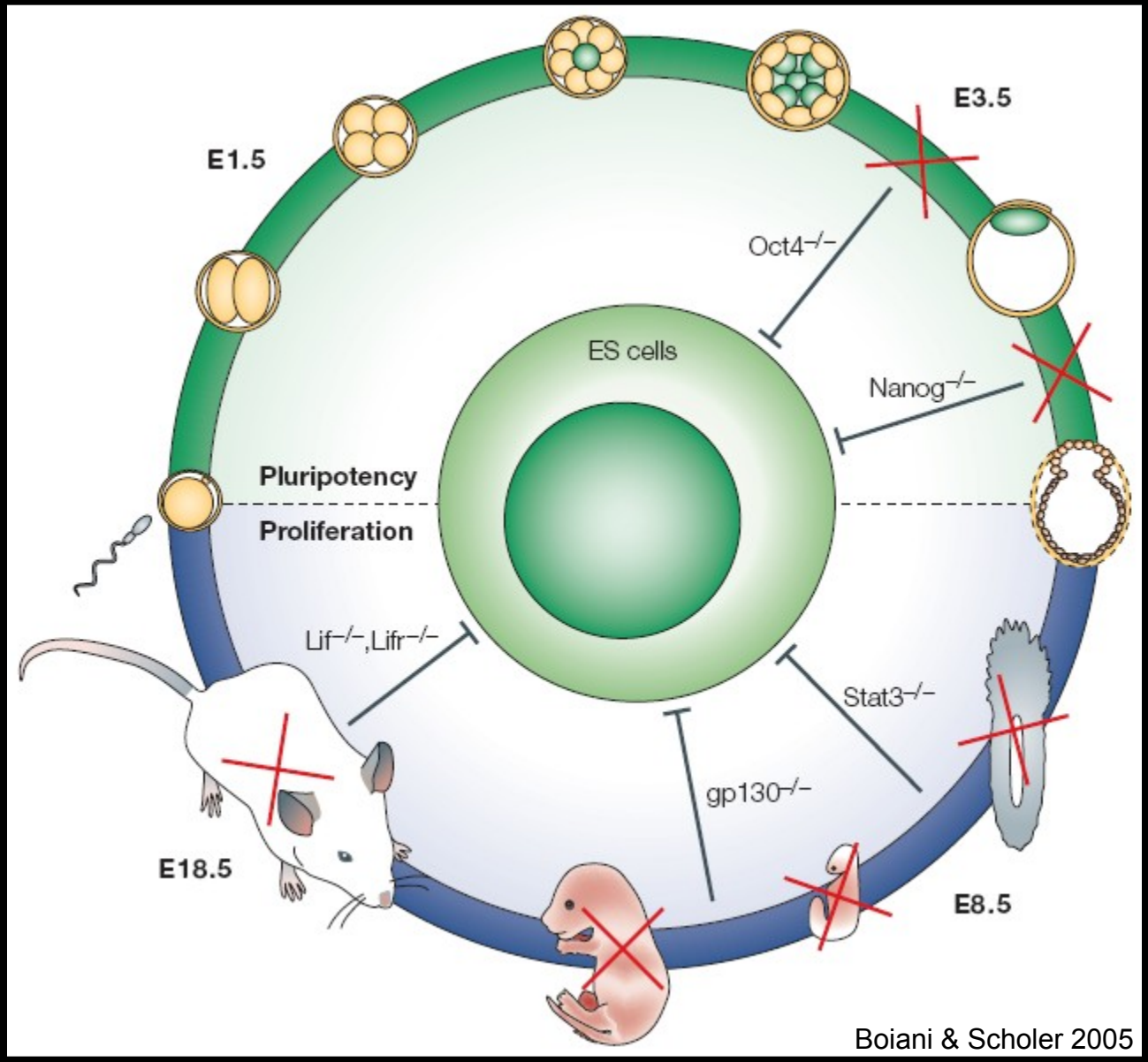
## Vybrané signální dráhy

Signální dráha LIF (leukemii inhibující faktor) -> *gp130 signalling*

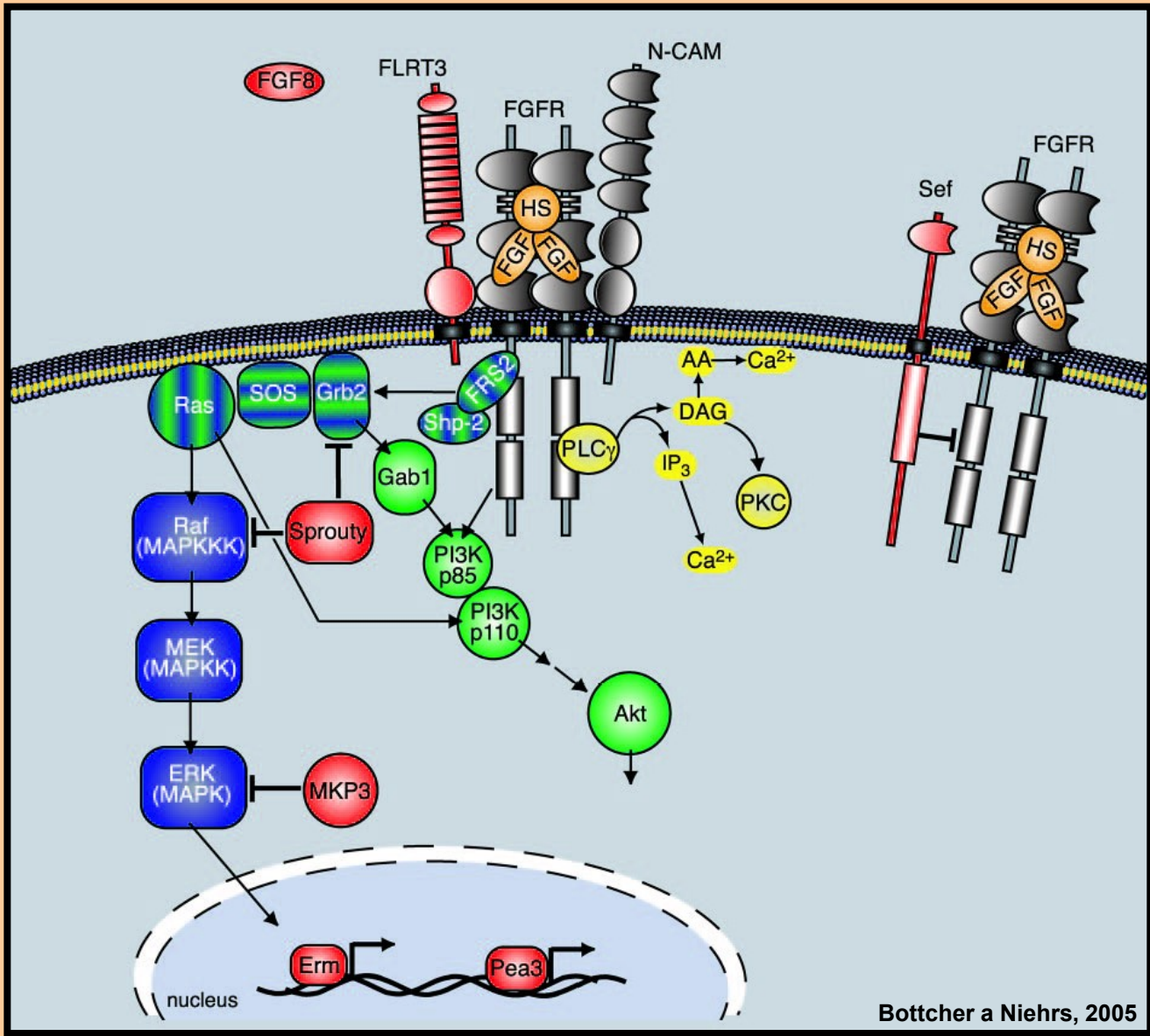


Evolučně se zdá, že tato dráha hraje důležitou úlohu v regulaci pluripotentních a snad i multipotentních buněk u živočichů obecně (prokázáno i u *Drosophily*)

# Význam gp130 signalizace v průběhu embryogeneze



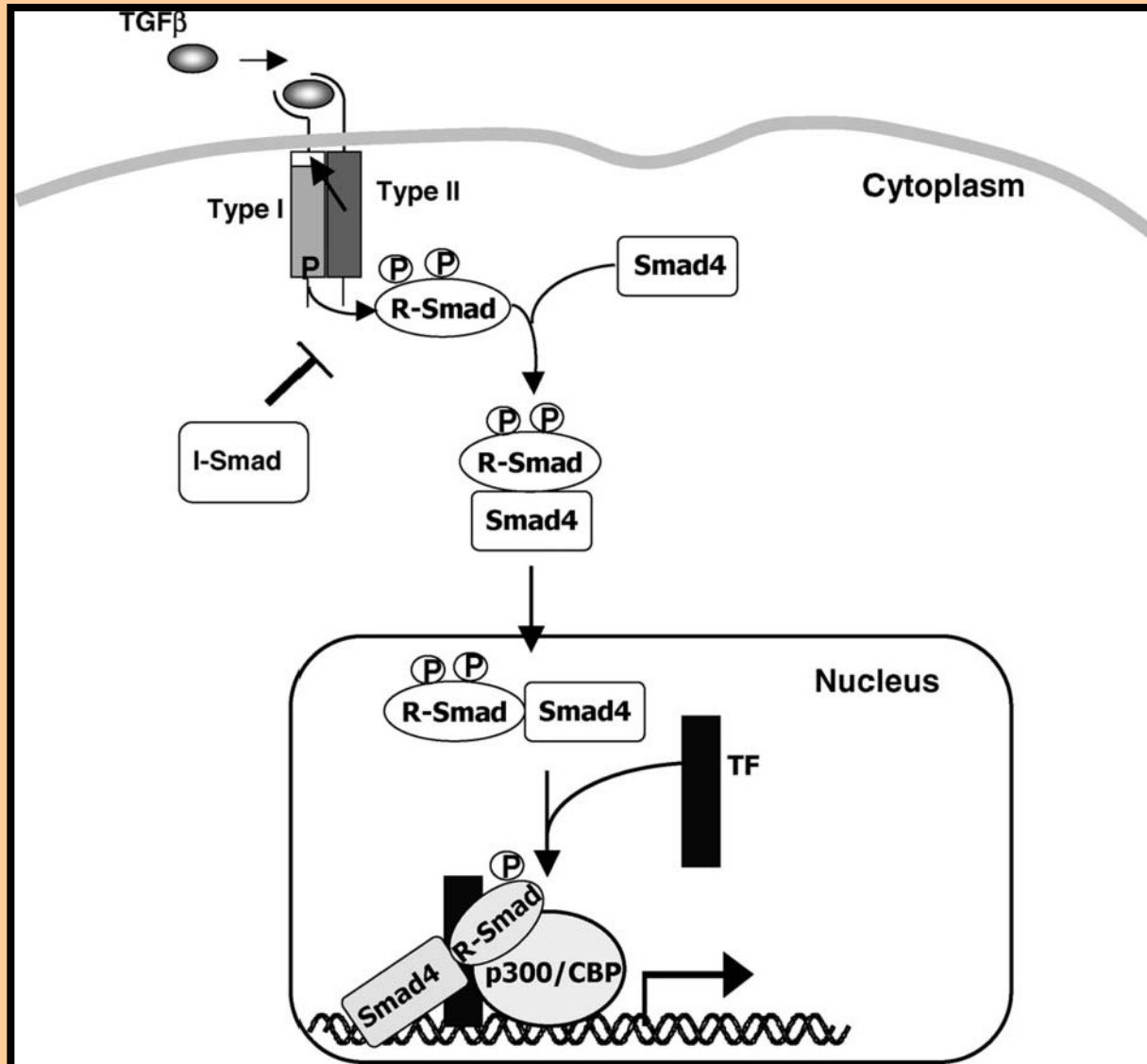
# Signální dráha FGFs (Fibroblastové růstové faktory)





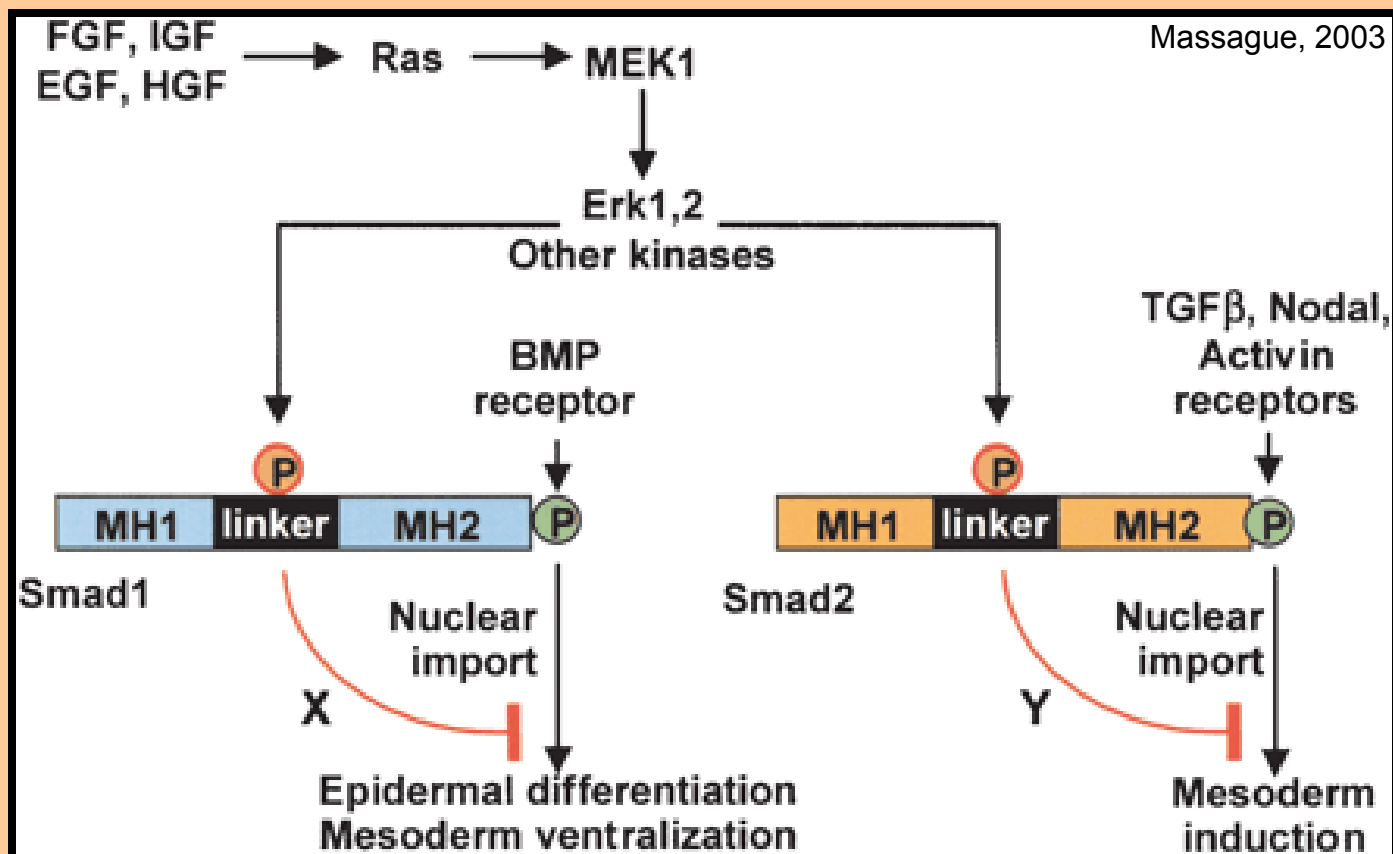
# Signální dráha TGF $\beta$ / BMPs

(Transformující růstový (*growth*) faktor  $\beta$   
kostní (*bone*) morfogenetické proteiny)



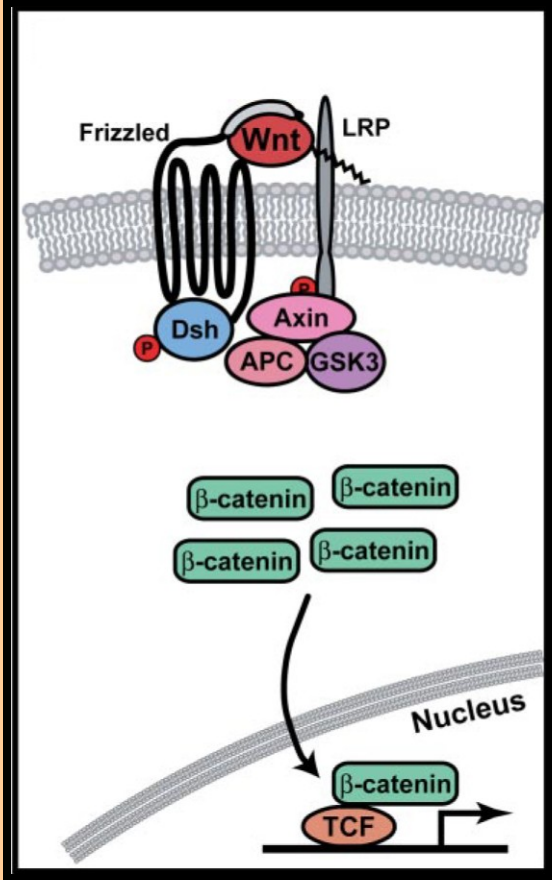
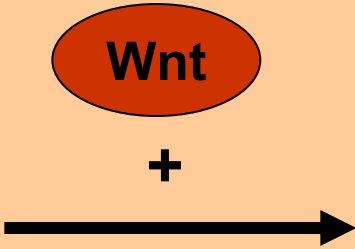
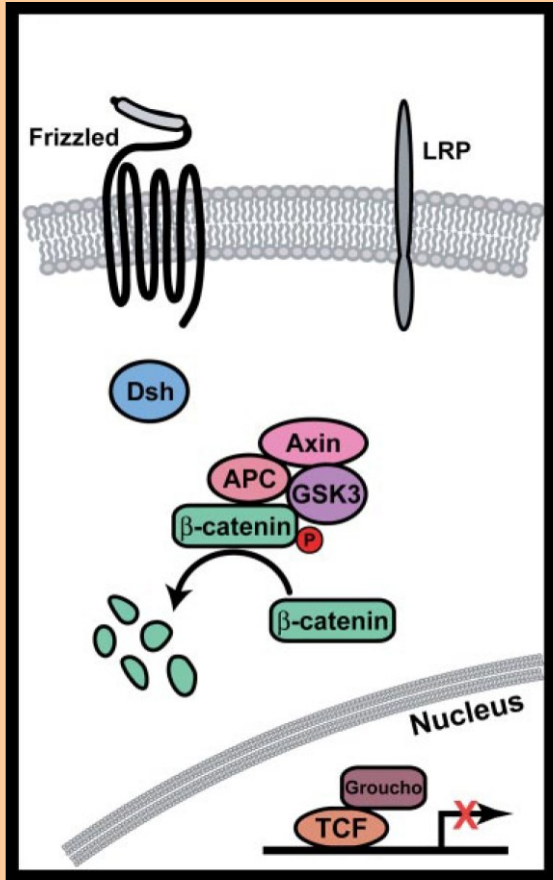
# CROSSTALK FGF & TGF $\beta$ DRÁHY TRANSDUKCE SIGNÁLU

Potlačení sérového BMP přidáním FGF-2 => inhibice diferenciace hES

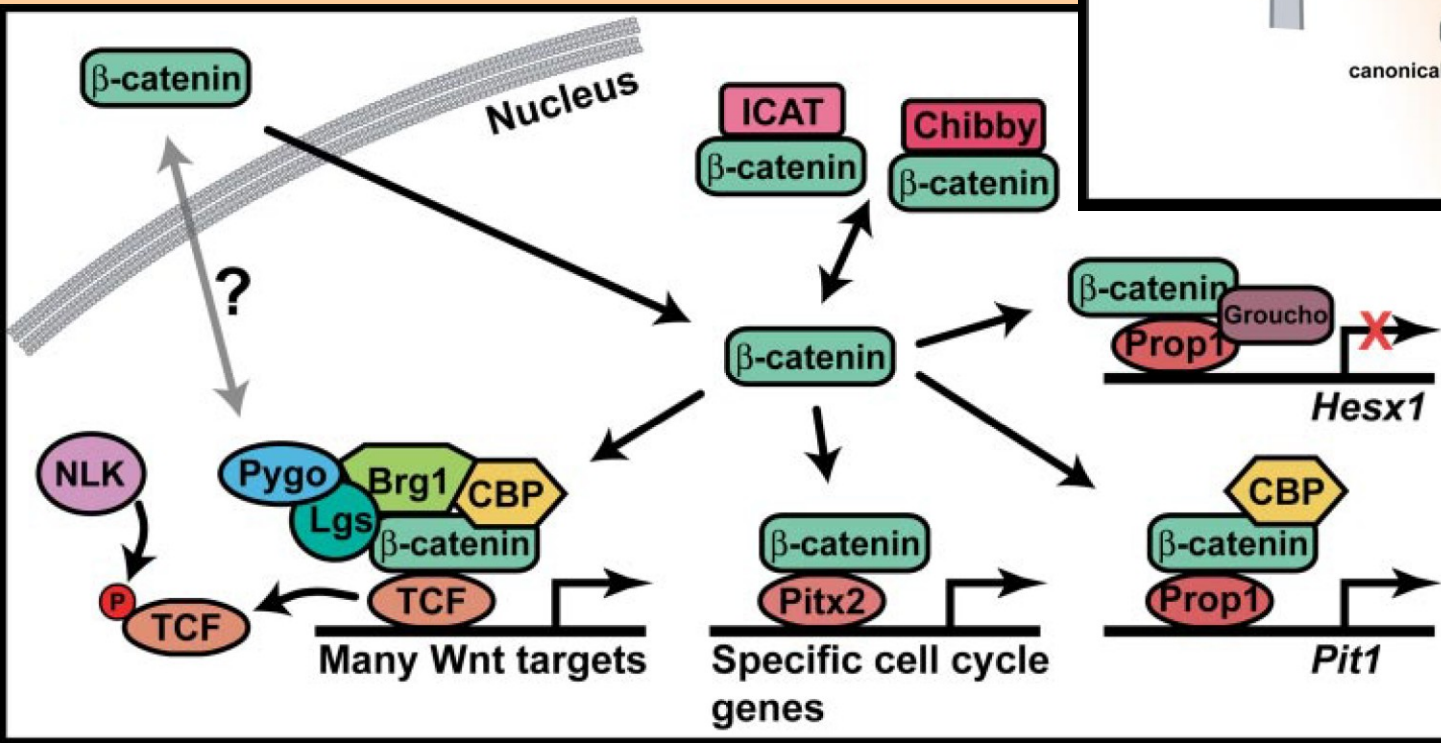
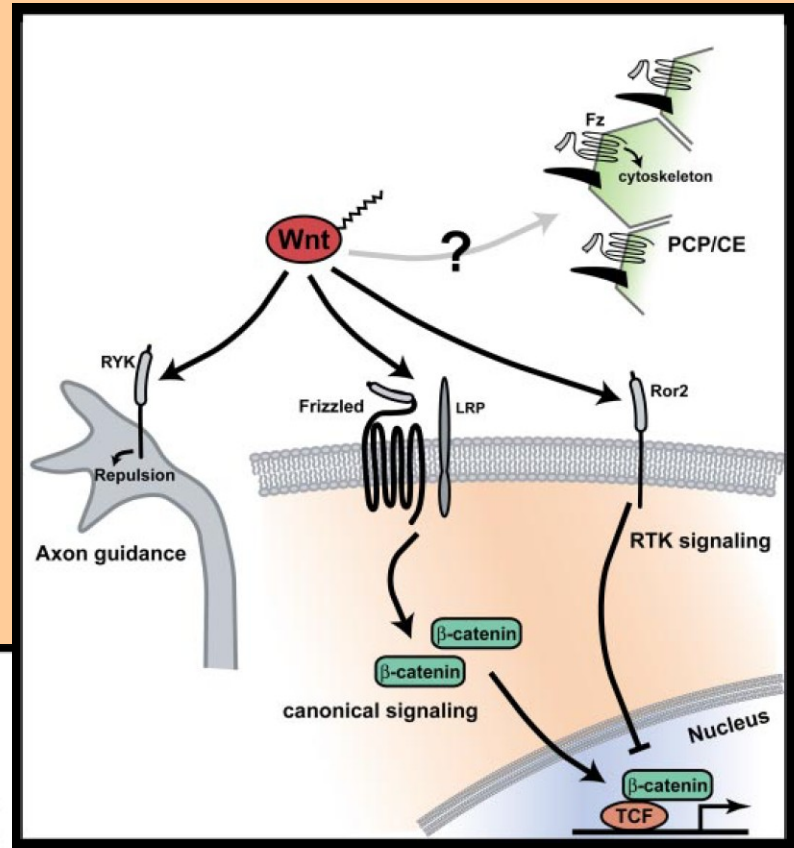


# Signální dráha Wnts

<http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>

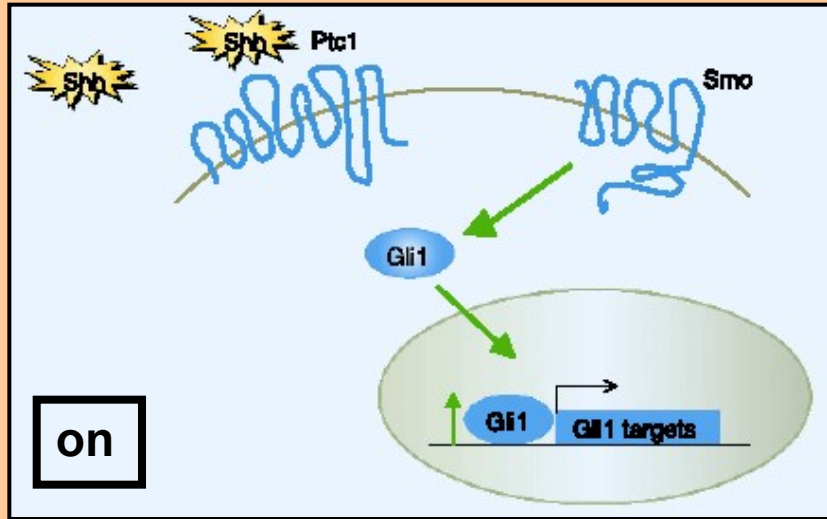
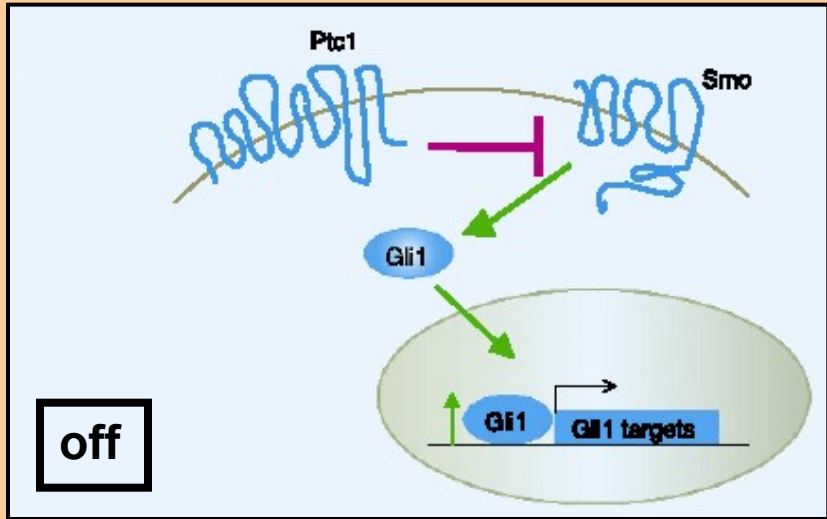


# Signální dráha Wnts

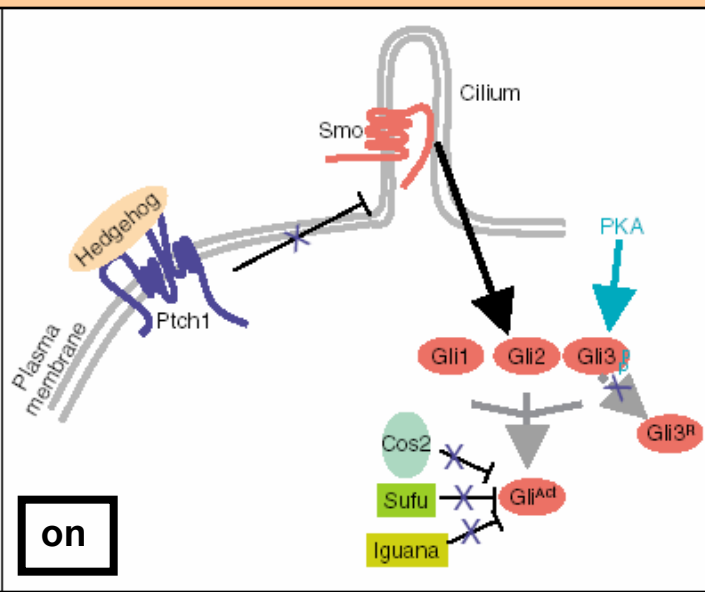
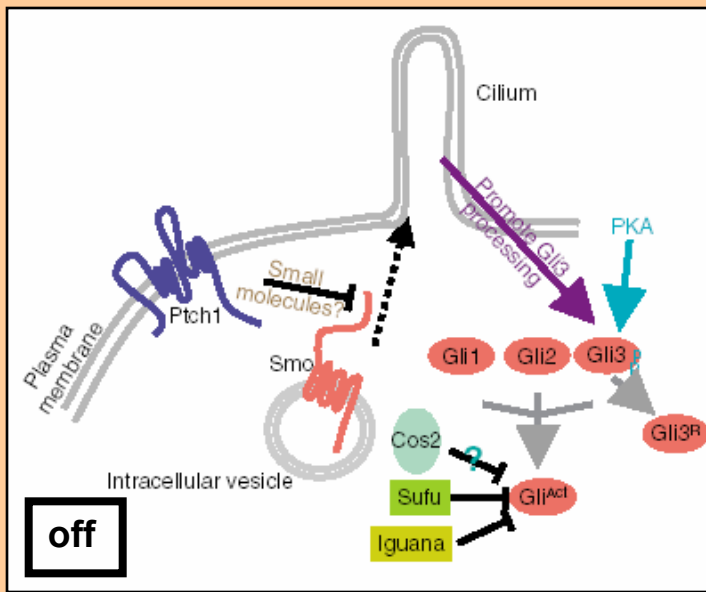


# Signální dráha Hedgehog

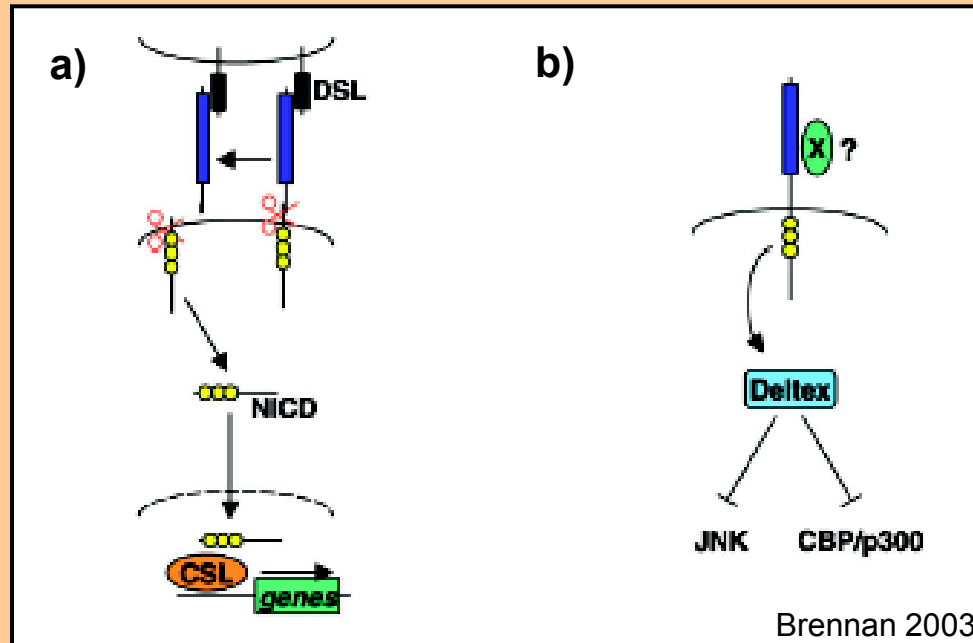
sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh)



*Ptc* – Patched      *Smo* - Smoothened

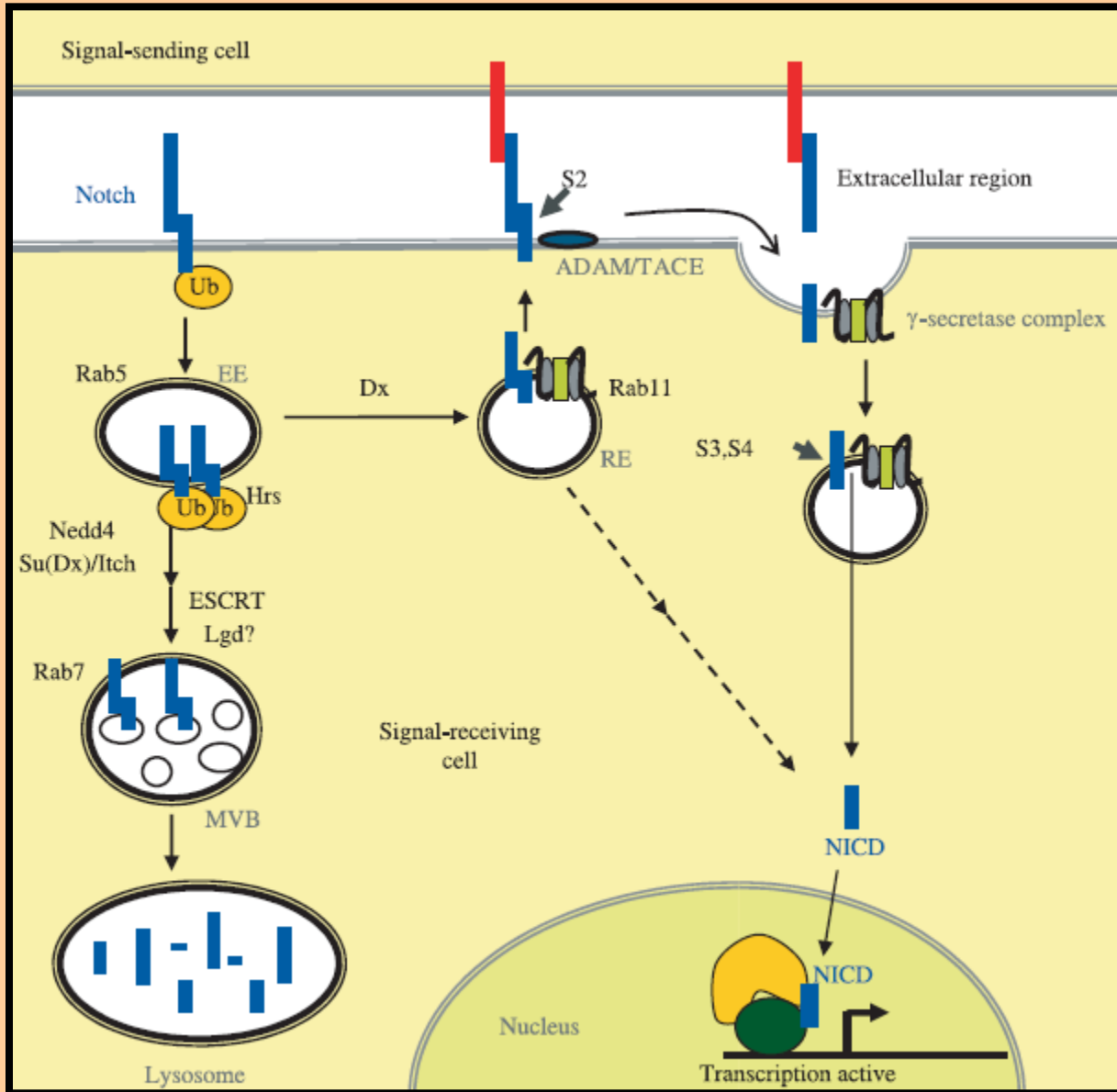


## Signální dráha Notch

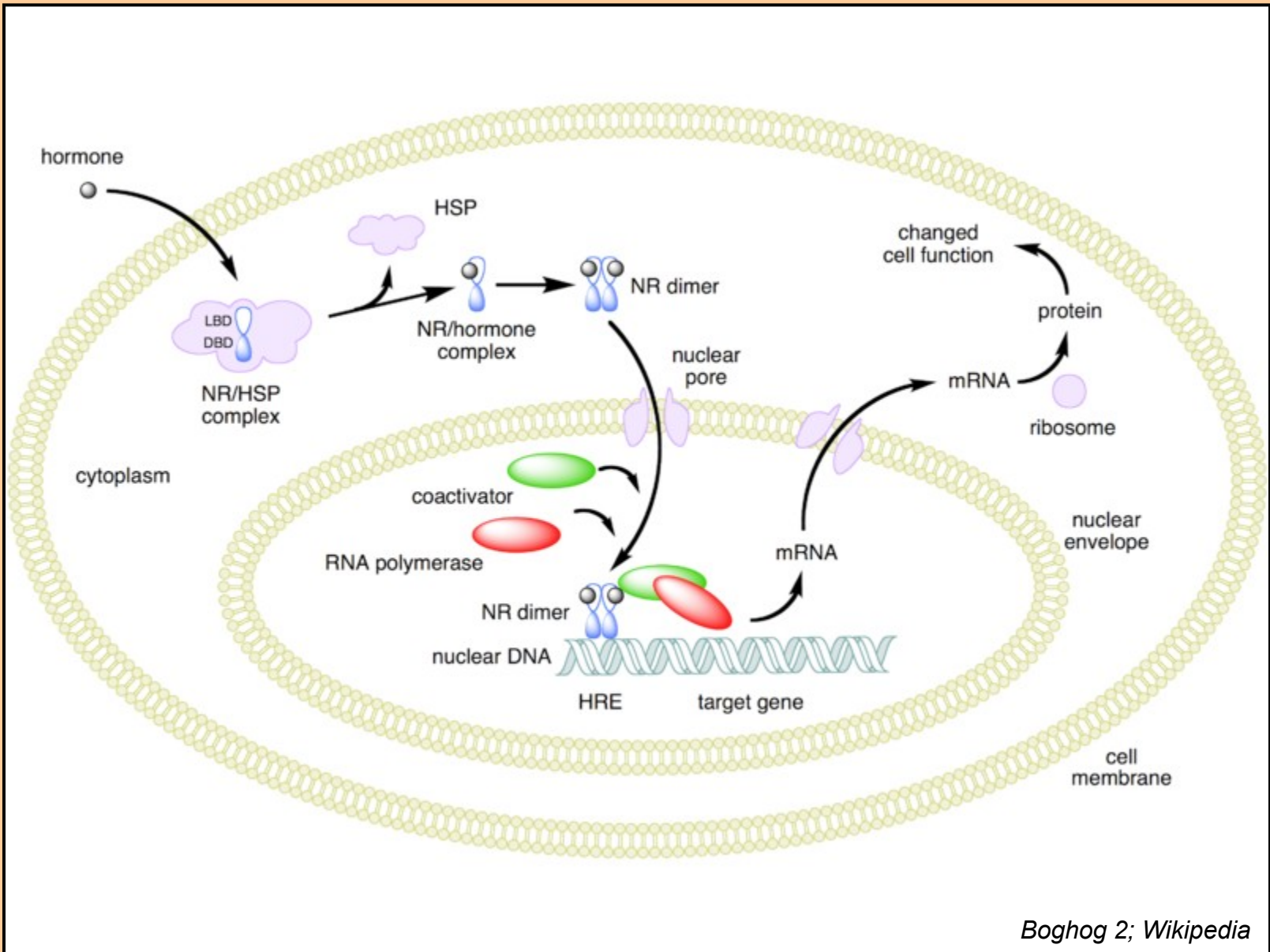


- a) klasická dráha signální transdukce Notch, po navázání ligandu (DSL rodina = Delta, Serrate, Lag-2; Jagged) dojde k odštěpení extracelulární části receptoru a následně i intracelulární (NICD – Notch intracellular domain), ta translokuje do jádra a v dimeru s CSL (= CBF1 – Cp binding factor 1) aktivuje transkripci.
- b) dráha snad aktivovaná dosud neznámým faktorem, kdy dochází k aktivaci proteinu Deltax, který pak inhibuje JNK a CBP/p300 aktivitu.

# Signální dráha Notch

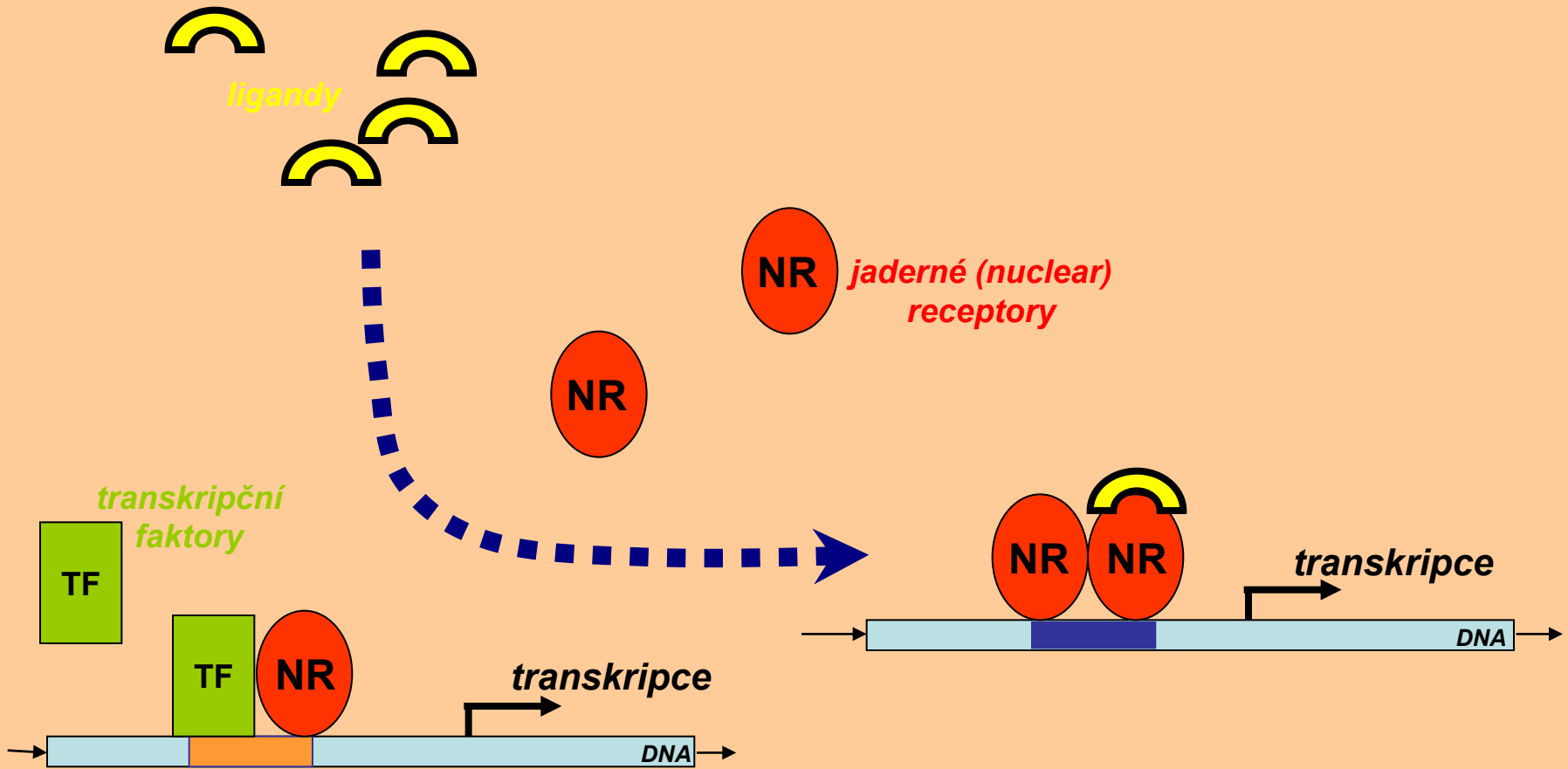


# Signální dráha jaderných receptorů obecně



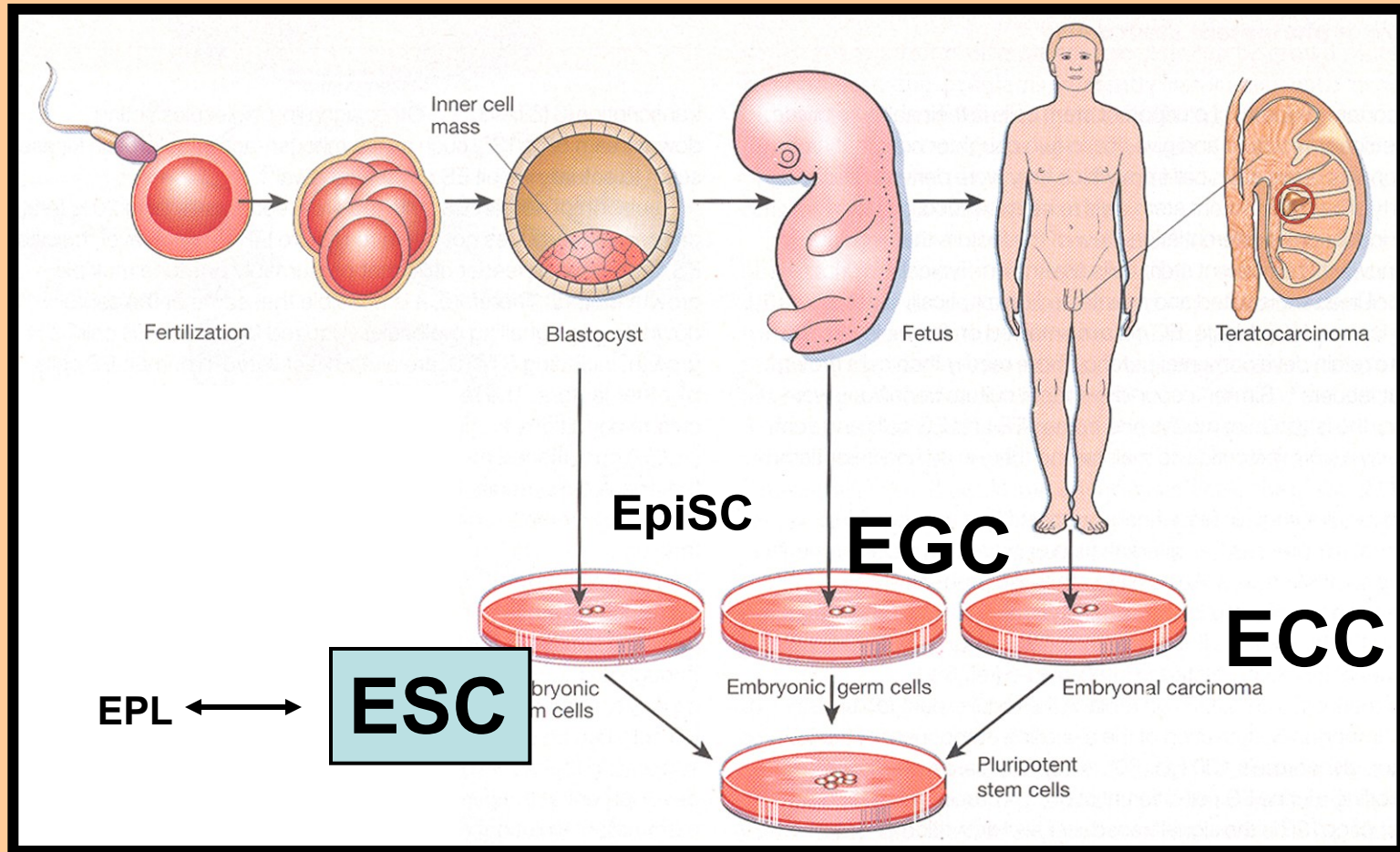


# Signální dráha jaderných receptorů



sebeobnova x diferenciace  
?diferenciace x sebeobnova?

# Pluripotentní, odvozené kmenové buňky



**Embryonální kmenové buňky (Embryonic stem cell – ESC)**

**Embryonální zárodečné buňky (Embryonic germ cell – EGC)**

**Embryonální nádorové buňky (Embryonal carcinoma cell – ECC)**

**Kmenové buňky epiblastu (Epiblast stem cell – EpiSC)**

**Early-primitive ectoderm-like - EPL**

# Embryonální kmenové buňky (Embryonic stem cell) ESC

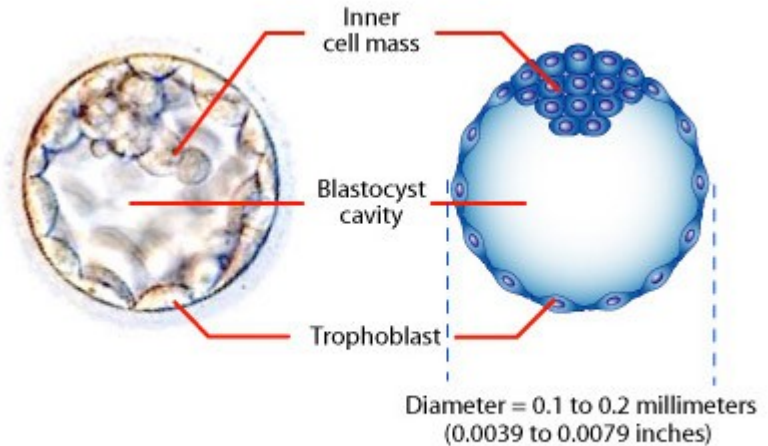
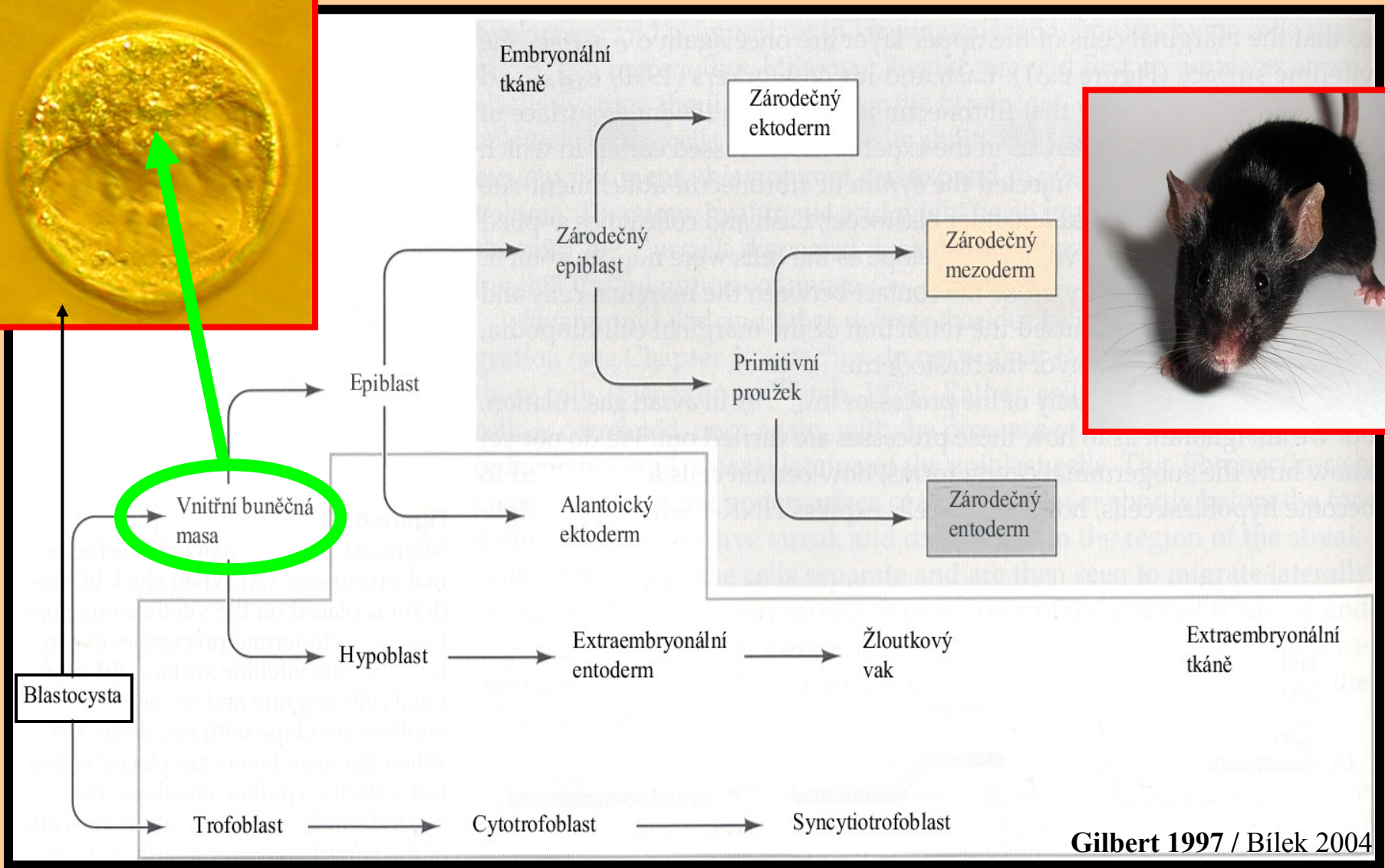
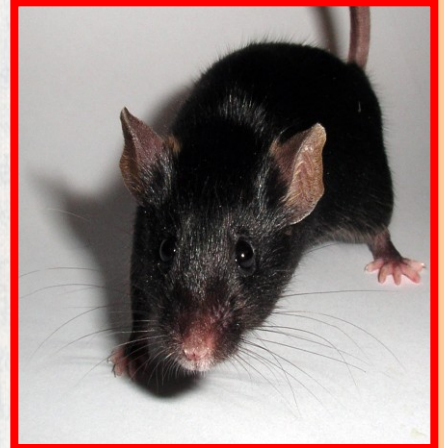
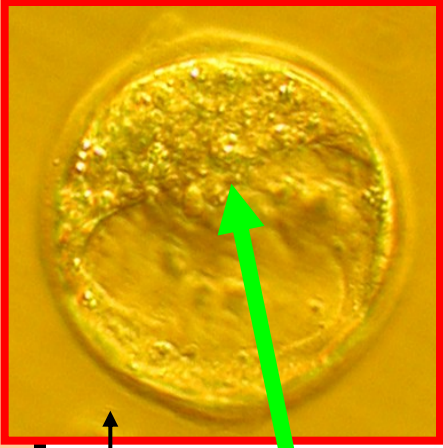


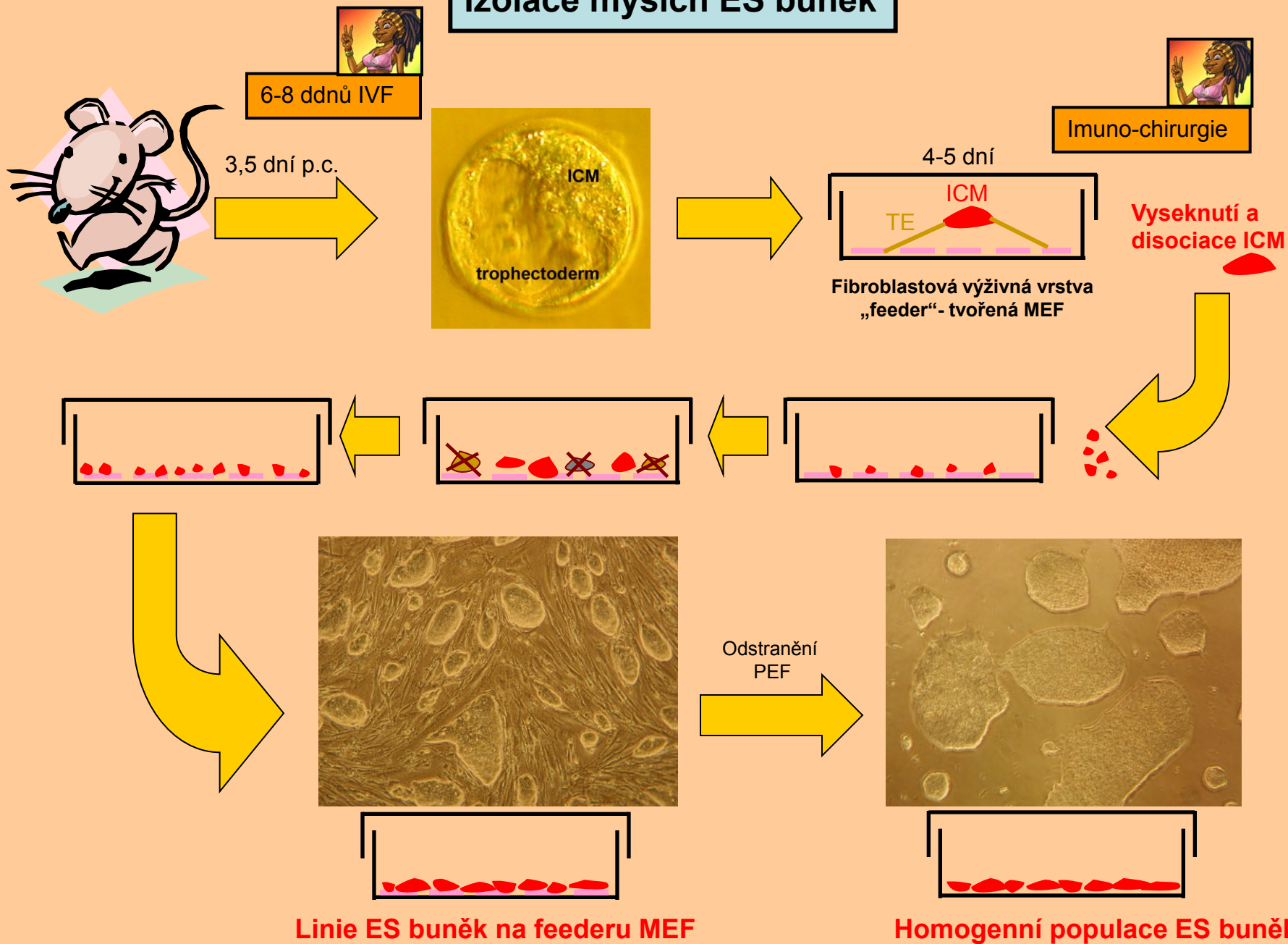
Illustration by [Cell Imaging Core](#) of the Center for Reproductive Sciences.

- jsou odvozené z vnitřní buněčné masy blastocysty
- fenotypem odpovídají přibližně buňkám vnitřní buněčné masy (mESC, ICM – inner cell mass) nebo epiblastu (hESC, EpiSC)
- jsou pluripotentní
- přirozeně neexistují, pouze *in vitro*
- jsou nesmrtelné
- mají schopnost si udržet stabilní genotyp (!?)
- po injikaci do imunitně tolerantního organismu tvoří teratomy (důkaz pluripotence)
- po injikaci do blastocysty mají schopnost tvořit kompletní chiméry (známo jen u mESC, důkaz pluripotence)

# Ontogeneze a diferenciační potenciál buněk vnitřní buněčné masy



# Izolace myších ES buněk



Linie ES buněk na feederu MEF

Homogenní populace ES buněk

## TERATOM

Nádor, který obsahuje buňky více jak jednoho zárodečného listu, většinou všech tří. Tyto buňky mohou být fenotypu od časných stádií až po terminálně diferencované

Teratomy jsou typické nádory původem ze zárodečných buněk (ovariální a testikulární teratomy). Teratomy jsou jak benigní, tak maligní (teratokarcinom)

Kmenové buňky teratokarcinomu = embryonální nádorové buňky  
**(Embryonal carcinoma (EC) cells)**



## CHIMÉRA

Organismus je směsí geneticky odlišných buněk / tkání / orgánů

**Chimeričtí jedinci vzniklí injikací ES buněk (dárce) do blastocysty (příjemce)  
Jsou směsí geneticky odlišných buněk na úrovni všech tkání, a tak také vytváří pohlavní buňky s genotypem jak dárce, tak příjemce!**



# Růst a kultivace ES buněk

## PROLIFERACE – DIFERENCIACE - APOTÓSA

Existence a charakter ES buněk je udržován kombinací účinků vnějších (**extrinsic**) a vnitřních (**intrinsic**) faktorů. Vnější faktory si ES buňky částečně syntetizují samy, ale ve větší míře musí být dodávány. Významným zdrojem těchto faktorů je výživná vrstva na které se ES buňky kultivují = **FEEDER**. Vnitřní faktory si ES buňky nesou jako pozůstatek svého embryonálního původu.

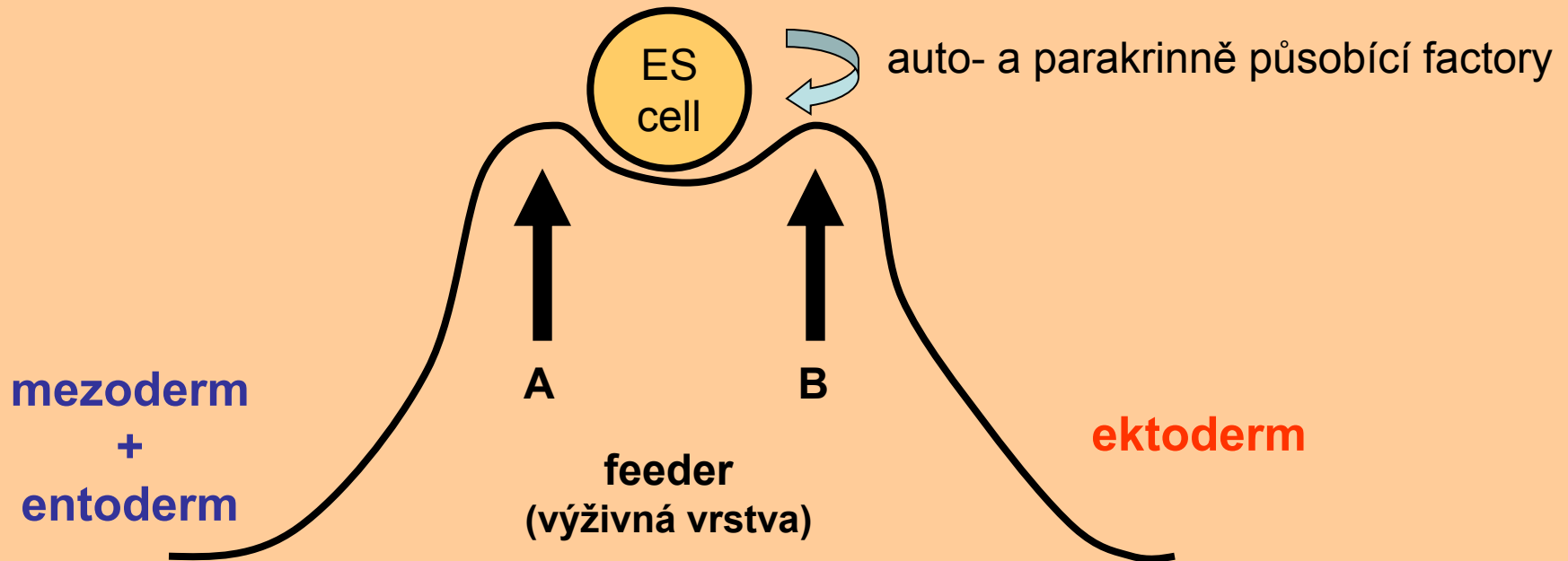
### FEEDER

- výživná vrstva = zdroj růstových faktorů (cytokiny, ECM, ..) a vhodný podklad
- nejčastěji se používají myší embryonální fibroblasty (13d p.c., MEF (PEF))
- bez „feederu“ z MEF = definované podmínky, ale horší ES buňky
- tendence používat druhově identické MEF = snížení rizika přenosu virů, ...
- MEF lze nahradit i jinými typy fibroblastů případně jinými buňkami
- MEF lze částečně nahradit komponenty ECM, specifickými cytokiny a přísadami, matrigelem, ..., obecně definovanějšími preparáty

Důležitou komponentou kultivačního média pro ES jsou také nedefinované faktory séra, které lze nahradit dodáváním specifických růstových faktorů. Často se také používá tzv. Serum-replacement = lépe definovaná náhražka séra (patentované složení).

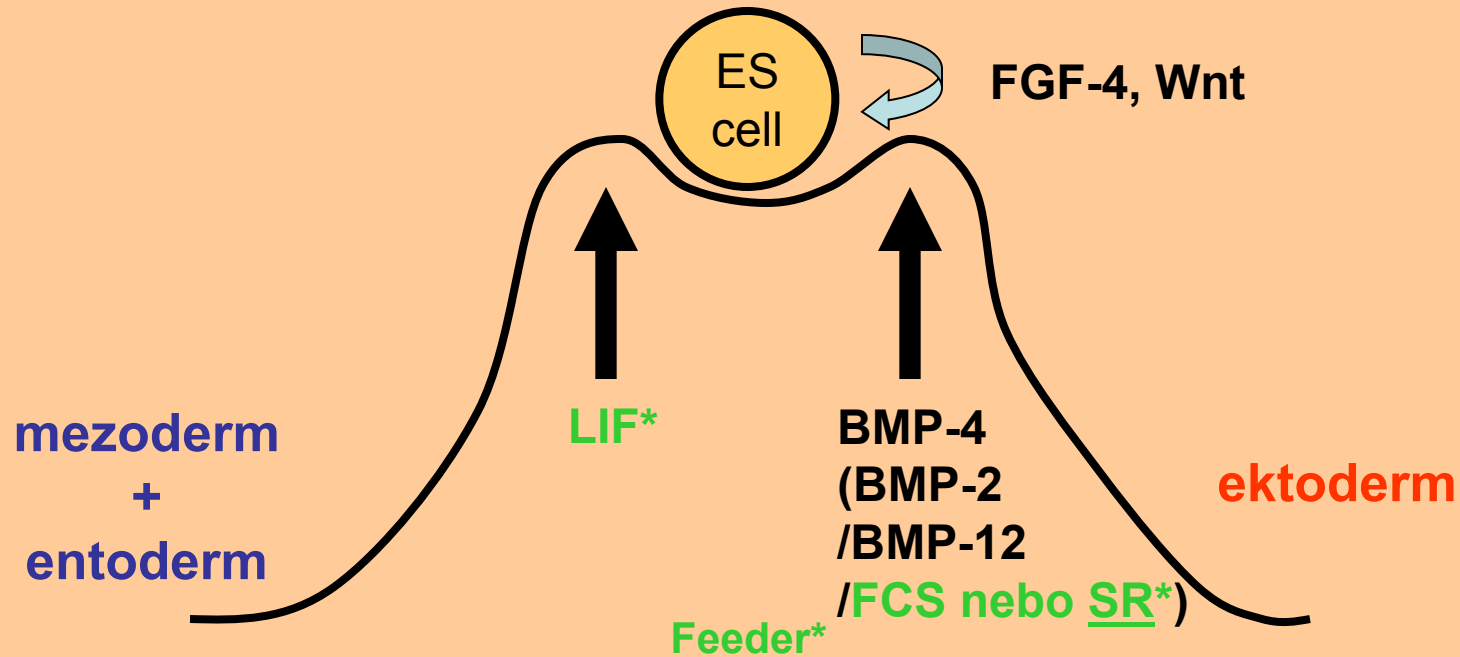
## Obecný model inhibice diferenciacie ES buněk

- ES buňky spontáně diferencují, v kultuře je třeba této diferenciaci zabránit
- diferenciacie je často spojená s apoptózou
- vhodnými kultivačnými podmímkami, lze diferenciaci inhibovat
- faktory inhibující diferenciaci ES buněk se částečně liší u různých druhů, ale existují výjimky i v rámci jednoho druhu!





## Model inhibice diferenciace myších ES buněk



- existují i linie mES buněk nezávislé na LIF
- zdá se, že z LIF závislé linie, lze vyselektovat LIF nezávislou (!?)
- mES buňky pěstované bez „feederu“ ztrácí schopnost tvořit chiméry *in vivo*
- některé linie nelze bez „feederu“ pěstovat vůbec

⇒ vlastnosti mES buněk jsou ovlivněny genotypem imbredního kmene myši z kterého byly izolovány!

LIF – leukemia inhibitory factor

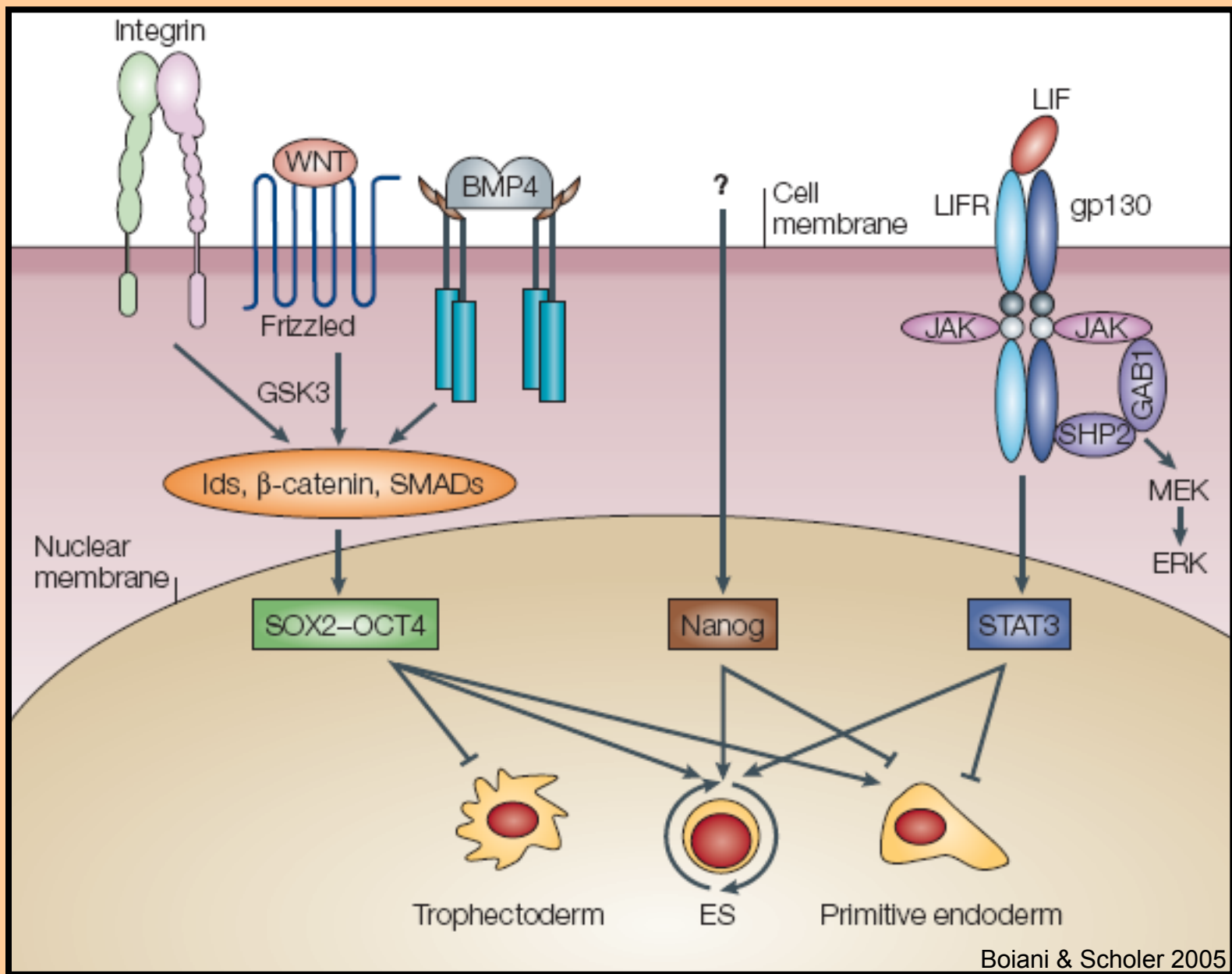
BMP-2,4,12 bone morphogenetic protein 2,4,12

FCS – fetal calf serum

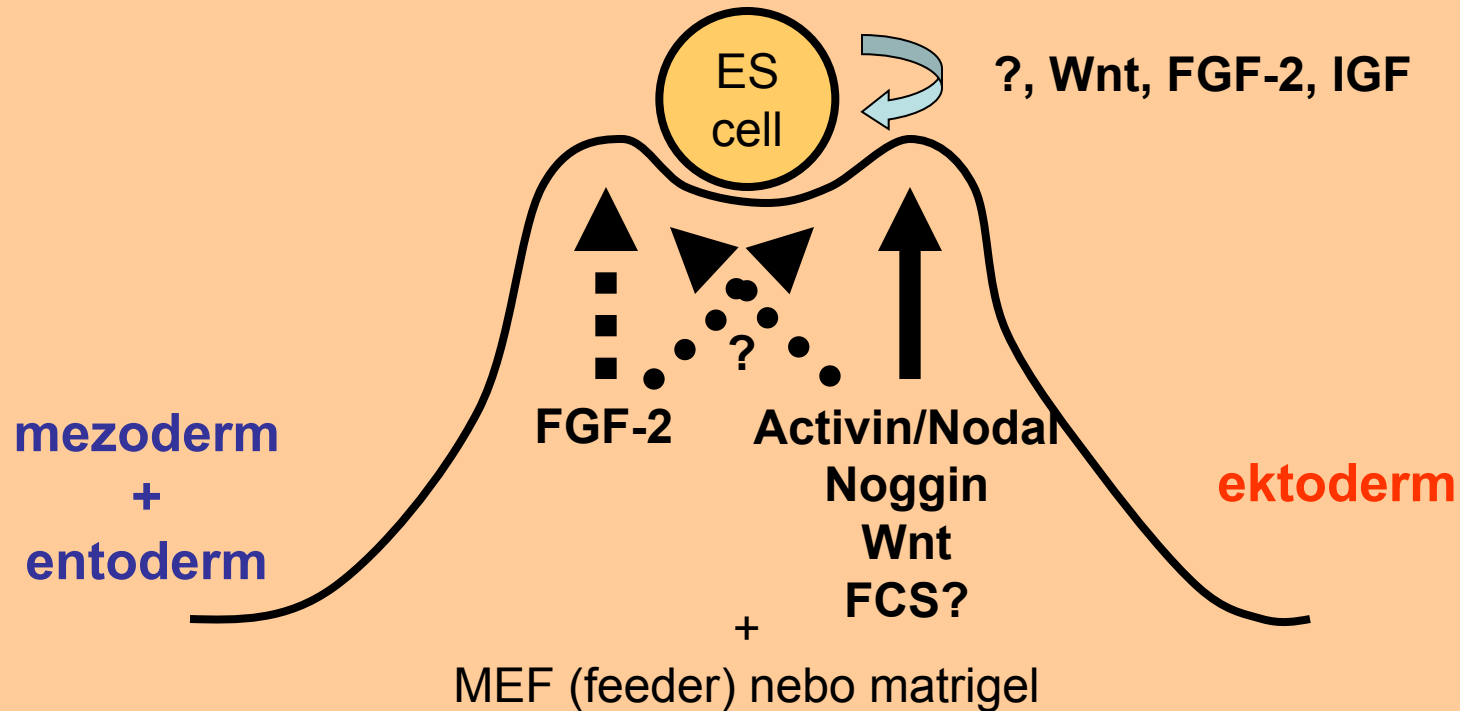
FGF-4 – fibroblast growth factor

SR – serum replacement

\*ABSOLUTNÍ OPTIMUM



## Model inhibice diferenciacie lidských ES buněk



**FCS** – obsahuje jak diferenciaci indukující, tak diferenciaci inhibující faktory. Kvalitu FCS také ovlivňuje titr protilátek a složek kplementu. FCS se liší mezi jednotlivými šaržemi = je třeba je testovat. Lépe je používat náhrady FCS se sníženou koncentrací negativně působících látek na kultivaci ES buněk, např. Serum-Replacement ( fy. Invitrogene-Gibco)

## Vnitřní faktory charakterizující / regulující ES buňky (pluripotentní embryonální buňky)

### **Oct-4** (Oct-3/4, Oct-3, *Pou5f1* – master of pluripotency)

- transkripční faktor, homeoprotein
- exprimuje se již u 2/4 (myš – aktivace transkripce) buněčného embrya
- ve stádiu blastuly je jeho exprese výrazně zvýšena
- ve stádiu blastocysty je pouze v buňkách ICM
- později jeho exprese vymizí, zachovává se pouze v PGC (a později v zárodečných buňkách), nízká exprese se předpokládá i v somatických kmenových buňkách ?!?
- nebyl nalezen u kuřat
- reguluje expresi FGF-4 (Oct-4/Sox-2), PDGF $\alpha$ , ....
- v průběhu diferenciaci za snížení jeho exprese odpovídá GCNF( germ cell nuclear factor, RA (retinoic acid),...
- V primitivním ektodermu je exprese Oct-4 podporována LRH-1 (liver receptor homologue 1)

### **Nanog**

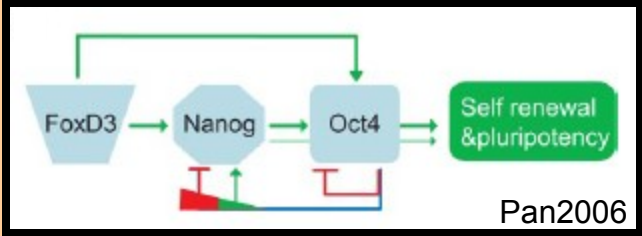
- transkripční faktor, homeoprotein
- jeho exprese vede k udržení vysoké hladiny Oct-4
- objevuje se již ve vnitřních buňkách moruly

### **Sox-2**

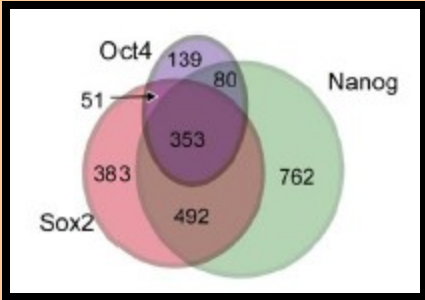
- Transkripční faktor Sry-rodiny (sex-determining region Y protein)
- Kooperuje s Oct-4 na vlastní expresi
- V průběhu indukce neurální diferenciaci se jeho exprese zvyšuje

# Regulace transkripce faktory Oct-4, Nanog a Sox-2

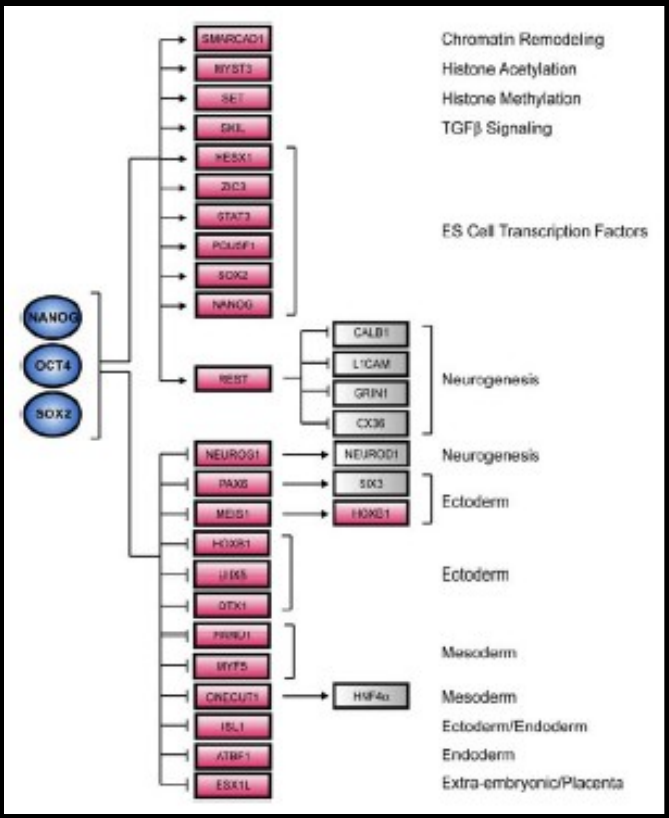
Předpokládaný model vzájemné regulace exprese FoxD3, Nanog a Oct-4 u mES. FOxD3 není exprimován u hES.



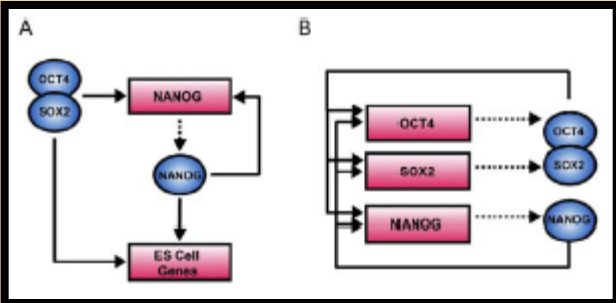
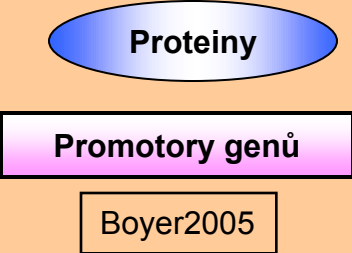
Vzájemná regulace Oct-4 a Nanog není dosud plně objasněna. Je však již jasné, že Oct-4 řídí transkripci Nanog přímou vazbou v jeho promotoru (společně se Sox-2), jak u mES tak hES. Pro self-renewal ES buněk je klíčové zachovat rovnováhu v hladinách Oct-4 a Nanog (viz. výše).



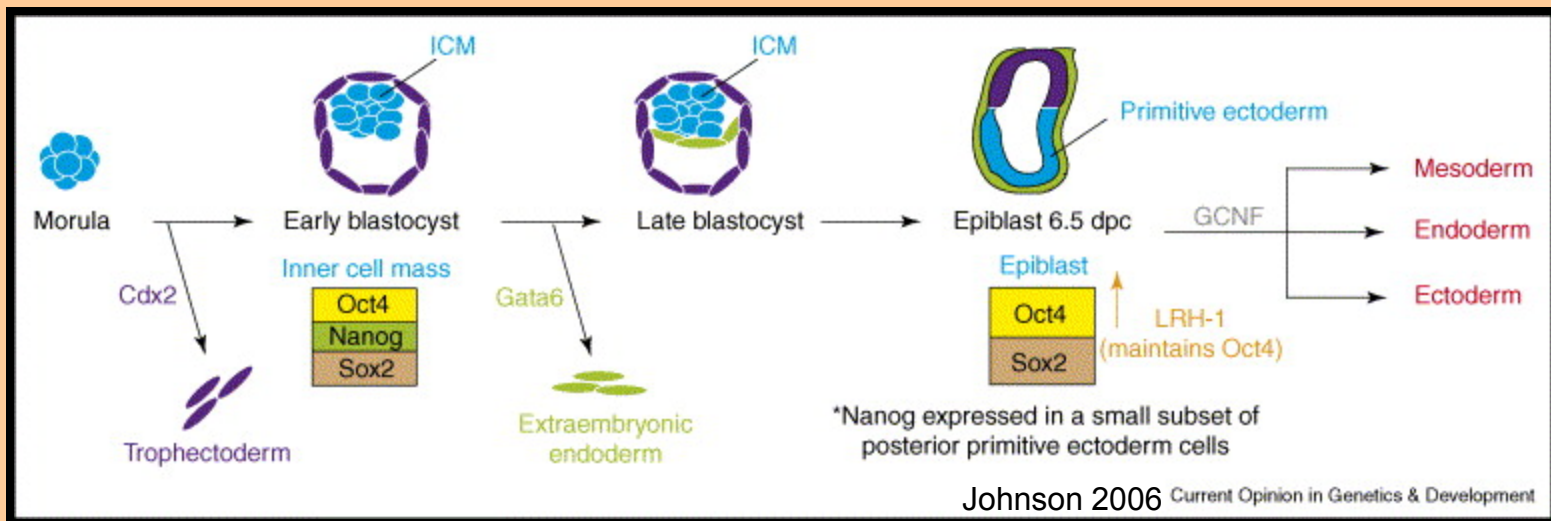
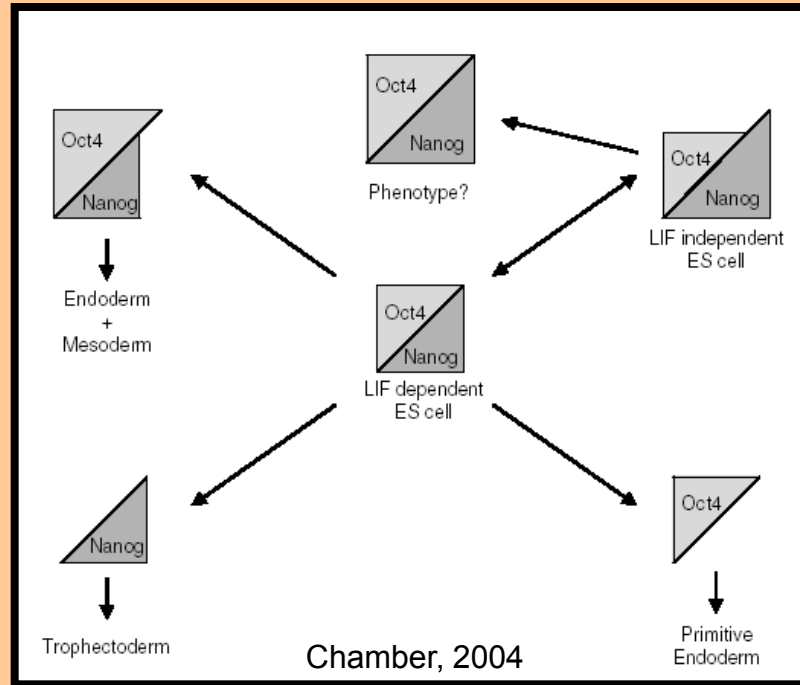
Promotorové sekvence rozpoznávané Oct-4, Nanog a Sox-2 u hES.



Model vzájemné regulace Oct-4, Nanog a Sox-2 a některé jimi řízené geny u hES.



# Ztráta pluripotence u ES buněk v důsledku deregulace rovnováhy mezi hladinou Oct-4 a Nanog

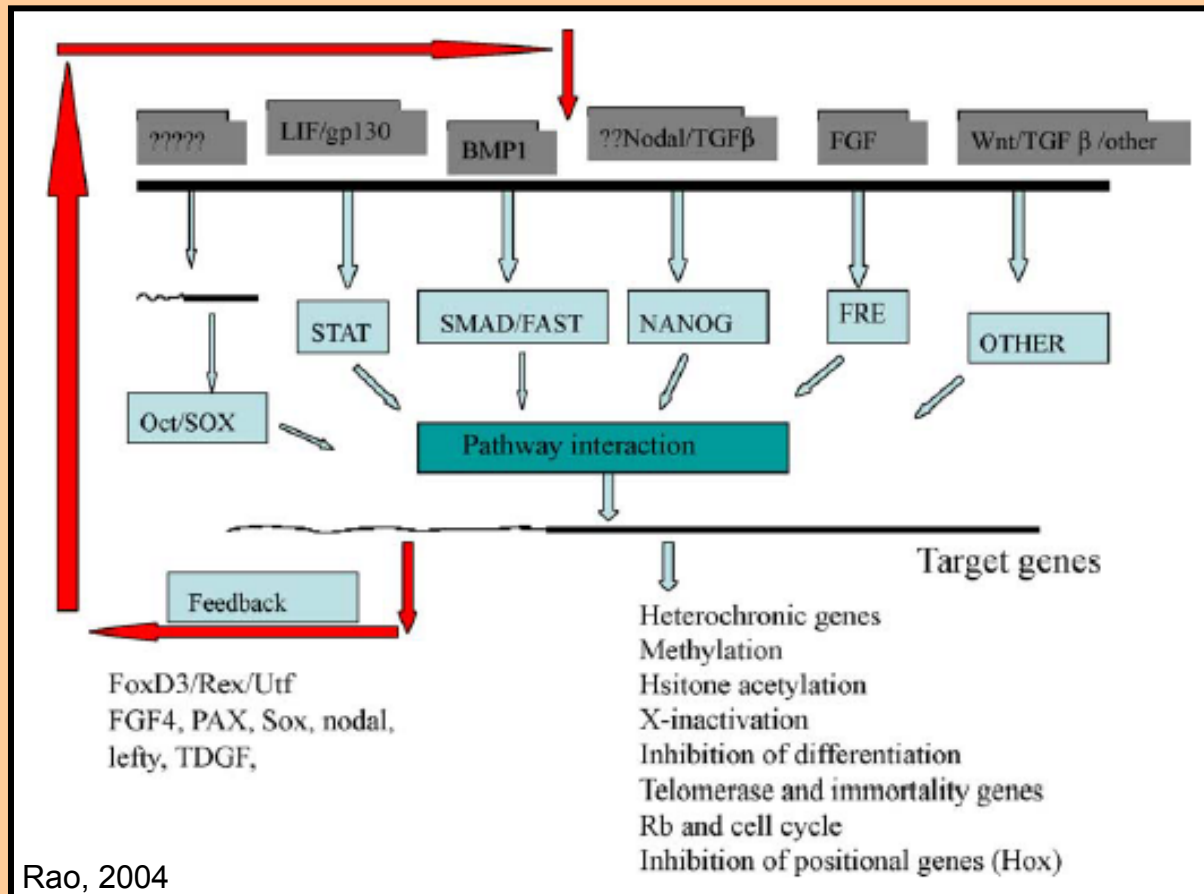


# ES BUŇKY

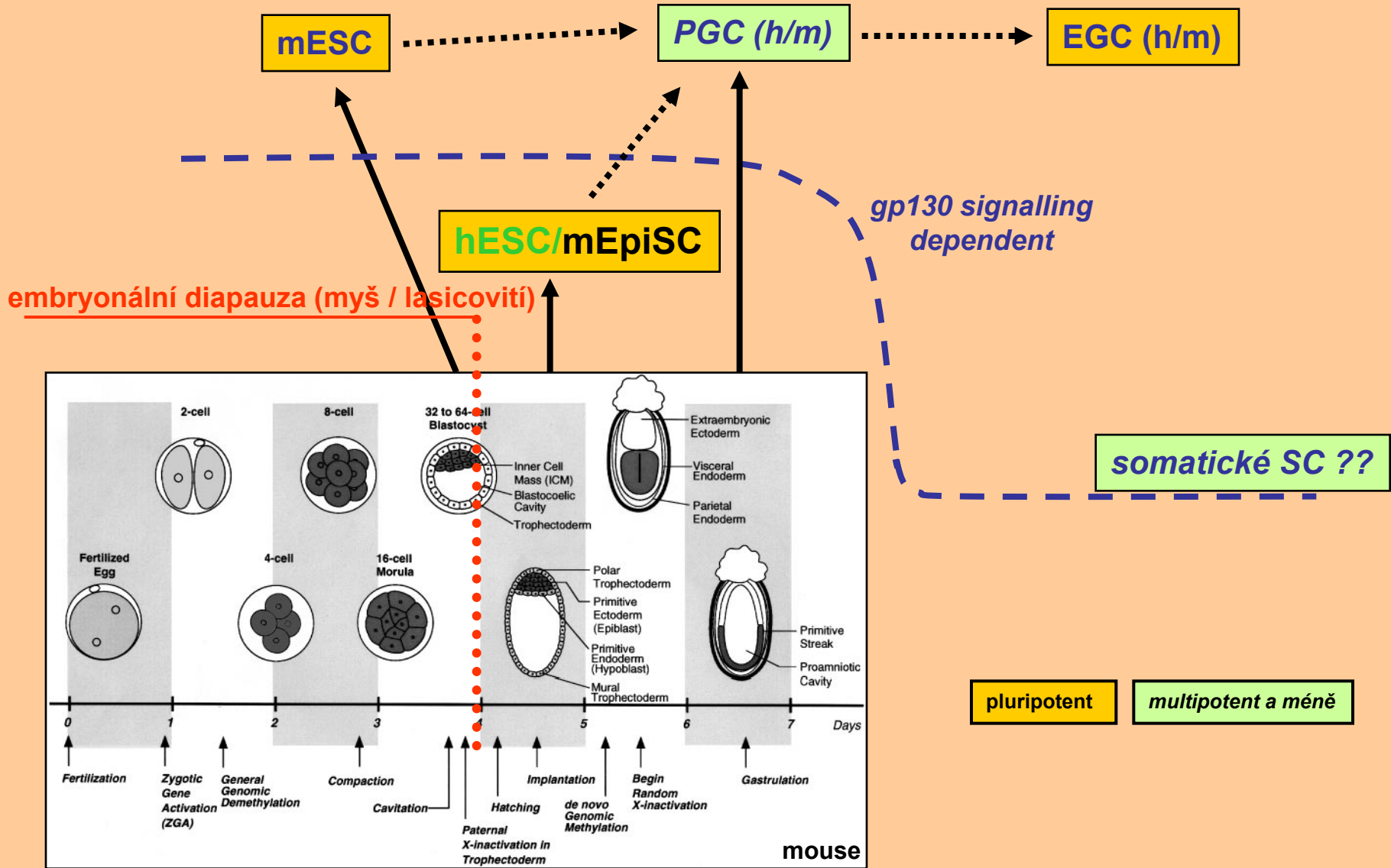
a) myší ES (mES)  
(LIF / gp130\* / STAT3 dependent)

x b) lidské ES (hES)  
(LIF / gp130\* / STAT3 independent)

Toto rozdělení je pravděpodobně dáno možností některých živočišných druhů mít skrytou březnost ve stádiu blastocysty (embryonální diapauza).

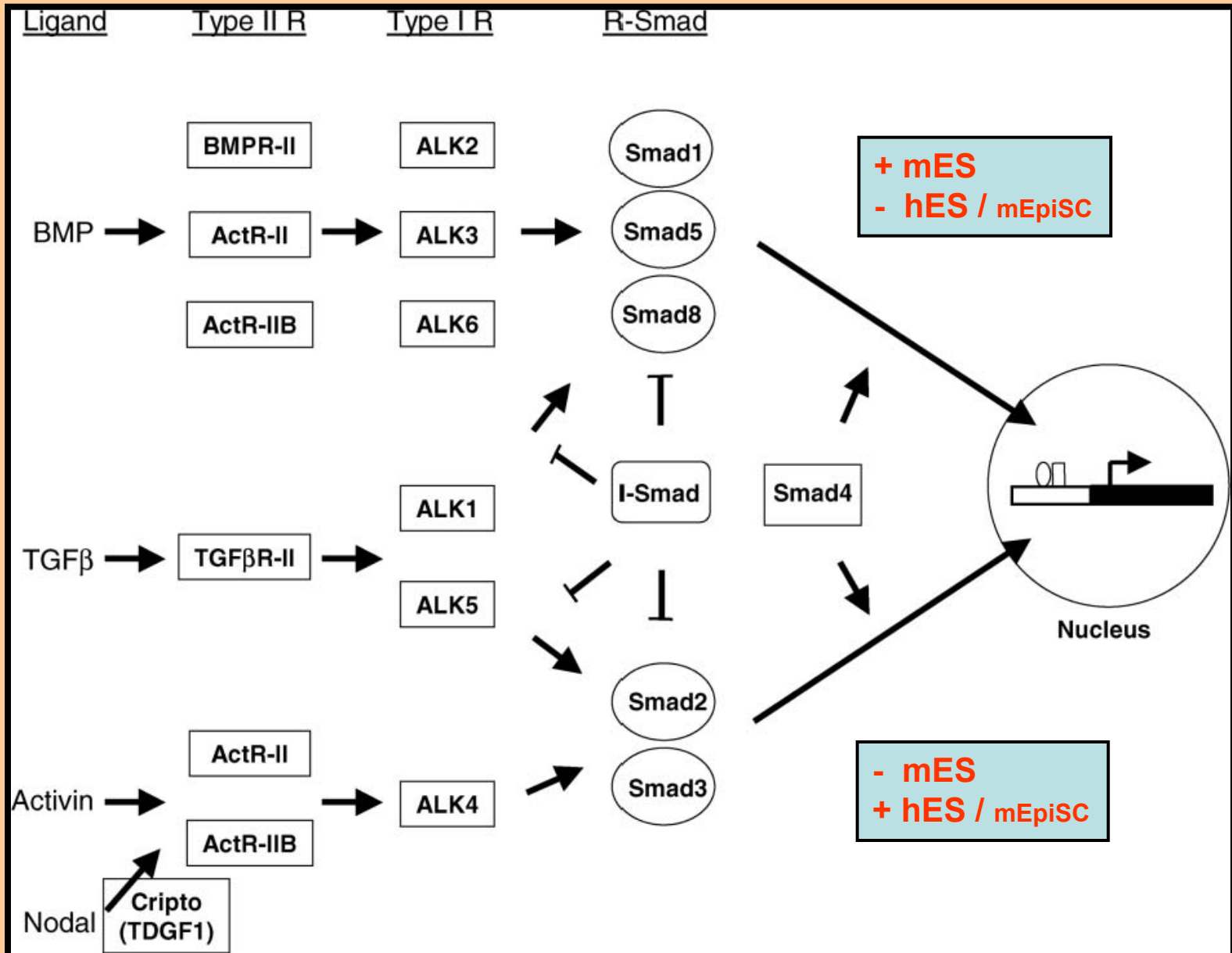


# Signální dráha gp130 -> STAT3 ve vztahu k pluripotentním buňkám u člověka a myši





# Signální dráha TGFbeta / BMPs



## Některé charakteristické znaky myších a lidských ES buněk

	Mouse ES	Human ES
Alkaline Phosphatase	+	+
SSEA-1	+	-
SSEA-3	-	+
SSEA-4	-	+
TRA-1-60	-	+
TRA-1-81	-	+
OCT 3/4	+	+
SOX 2	+	+
<u>REX 1</u>	+	+
TERT	+	+
<u>FGF4</u>	+	+
UTF-1	+	+
<u>FOXD3</u>	+	-
CX45	+	+
CX43	+	+
BCRP-1	+	+
<u>LIFR</u>	+	+
gp130	+	+
STAT3	+	+
Nanog	+	+

Table 1 | **The best-characterized ESC markers\***

Undifferentiated state marker	Mouse	Human
<b>Cell-surface and nuclear antigens</b>		
SSEA1 <sup>‡</sup>	+	–
SSEA3/4 <sup>‡</sup>	–	+
TRA1–60/81 <sup>§</sup>	–	+
TRA2-54	–	+
GCTM-2 <sup>§</sup>	–	+
TG343 <sup>§</sup>	?	+
TG30 <sup>¶</sup>	?	+
CD9 <sup>¶</sup>	+	+
CD133/prominin	+	+
OCT4	+	+
NANOG	+	+
SOX2	+	+
<b>Enzymatic activities</b>		
AP	+	+
Telomerase	+	+
<b>In vitro culture requirements</b>		
Feeder-cell dependent	+	+
LIF dependent	+	–
FGF4	+	–
<b>Growth characteristics</b>		
Ability to form trophoblast	–	+
Teratoma formation <i>in vivo</i>	+	+
Growth characteristics <i>in vitro</i>	Form tight, rounded, multi-layer clumps; can form EBs	Form flat, loose aggregates; can form EBs
Ability to form germ cells <i>in vitro</i>	+	NR

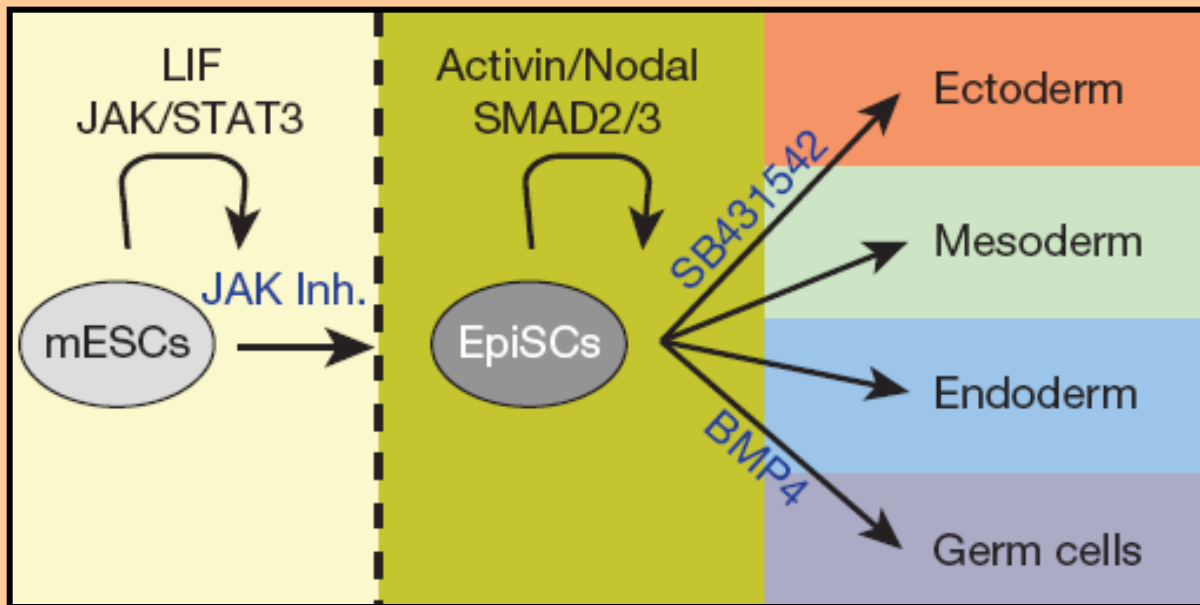
<sup>‡</sup>Glykolipidy, <sup>§</sup> Keratan chondroitin sulfát proteoglycan, <sup>¶</sup>Tetraspannin transmembránové proteiny, AP – alkalická fosfatáza, EB – embryoidní tělísko, ESC – embryonální kmenové buňky, SSEA – vývojově specifický embryonální antigen (stage-specific embryonic antigen), TRA – antigen odmítnutí nádoru (tumor-rejection antigen), NR – nestudováno (not reported)

# Kmenové buňky epiblastu – EpiSC (Epiblast stem cell)

Brons, 2007 & Tesar, 2007

## EpiSC

- neintegrují se do moruly a blastocysty => rozdíl s mES
- netvoří kompletní chiméry
- nebyla detekována aktivní alkalická fosfatáza (AP)  
(mES, hES, EC, EG, PGC, mají aktivní AP)
- EpiSC částečně vysvětlují rozdíly mezi mES a hES

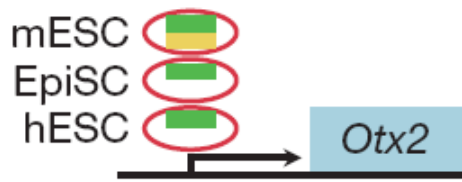
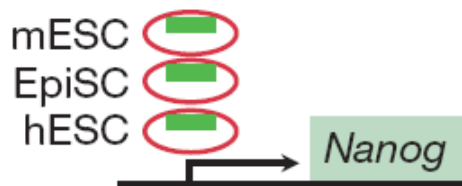
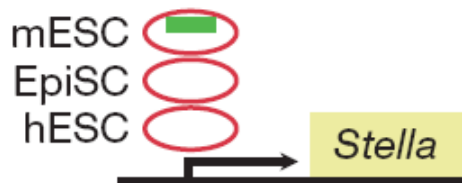


Kmenové buňky epiblastu – EpiSC (Epiblast stem cell)

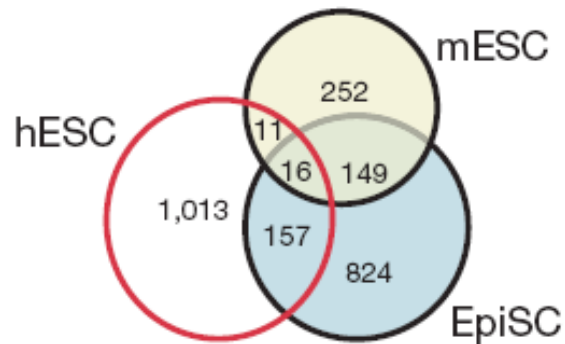
Brons, 2007 & Tesar, 2007

## Histone methylation

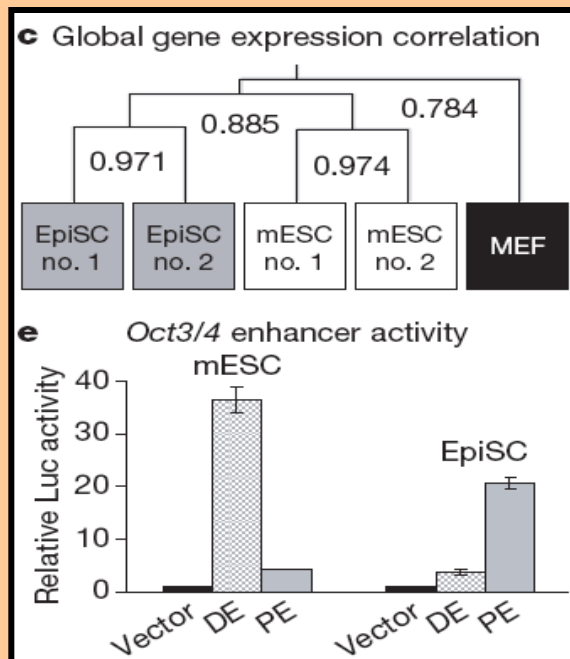
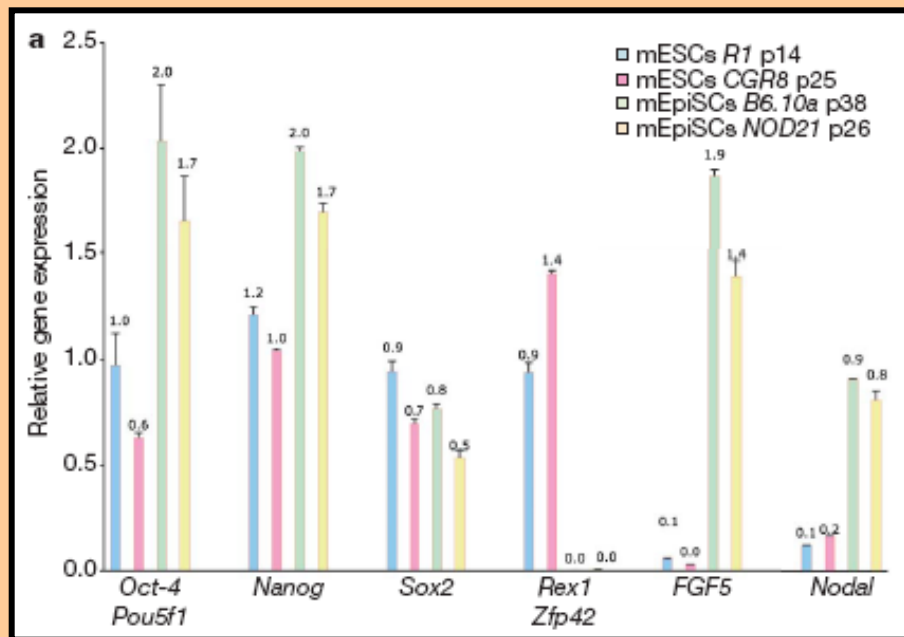
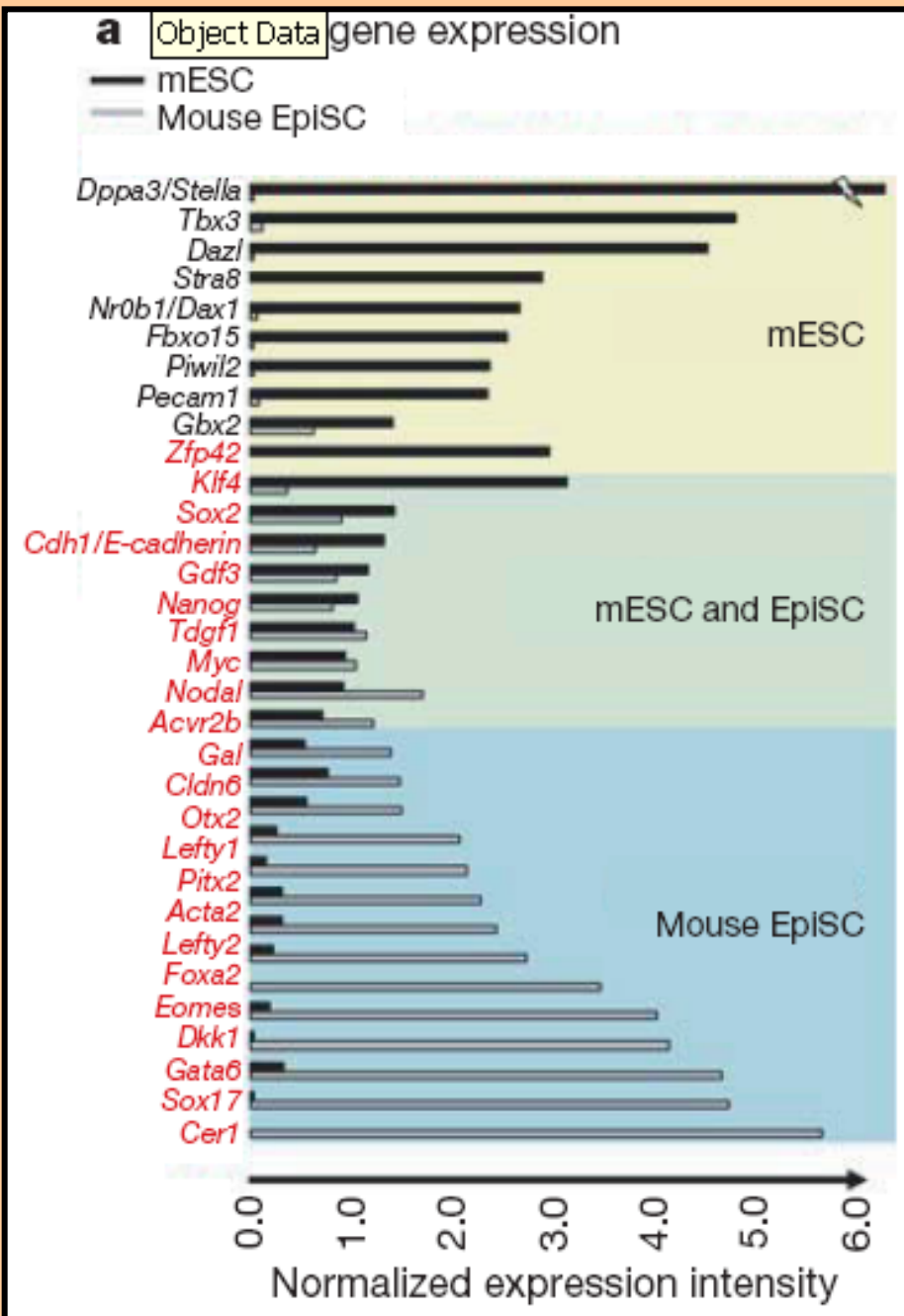
■ H3K4me3  
■ H3K27me3



## Genes bound by Oct3/4

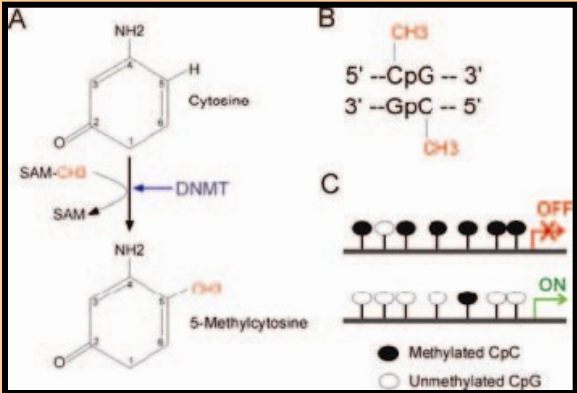
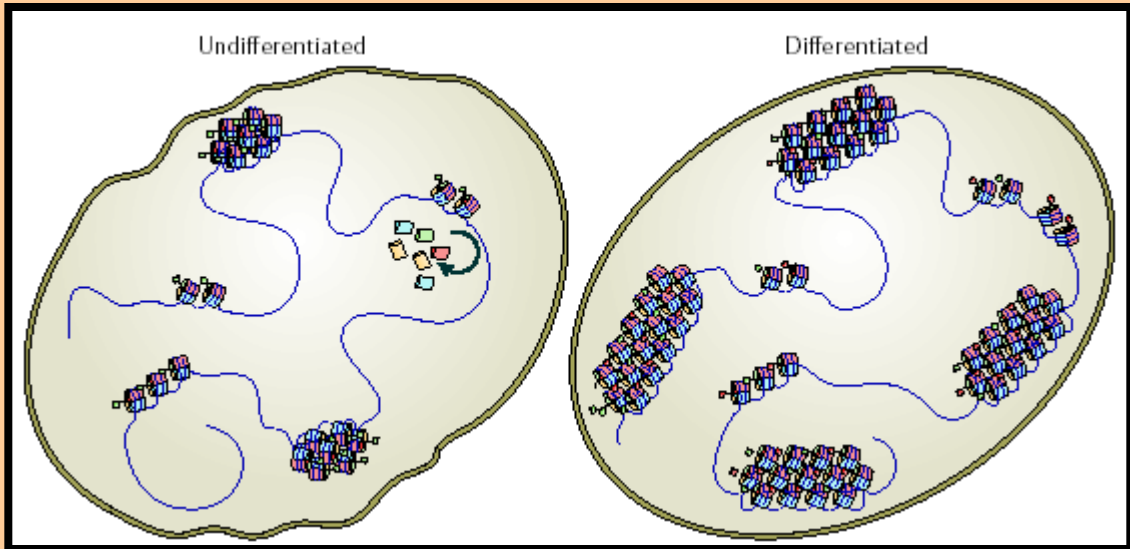
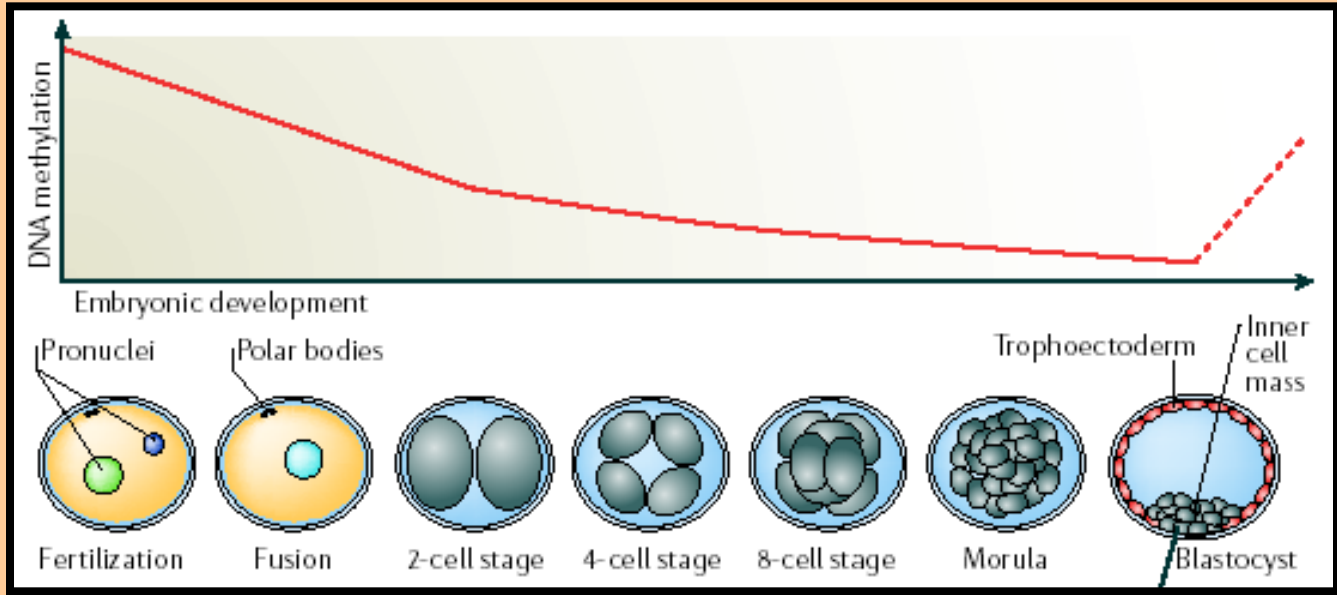


Kmenové buňky epiblastu – EpiSC (Epiblast stem cell)  
 Brons, 2007 & Tesar, 2007

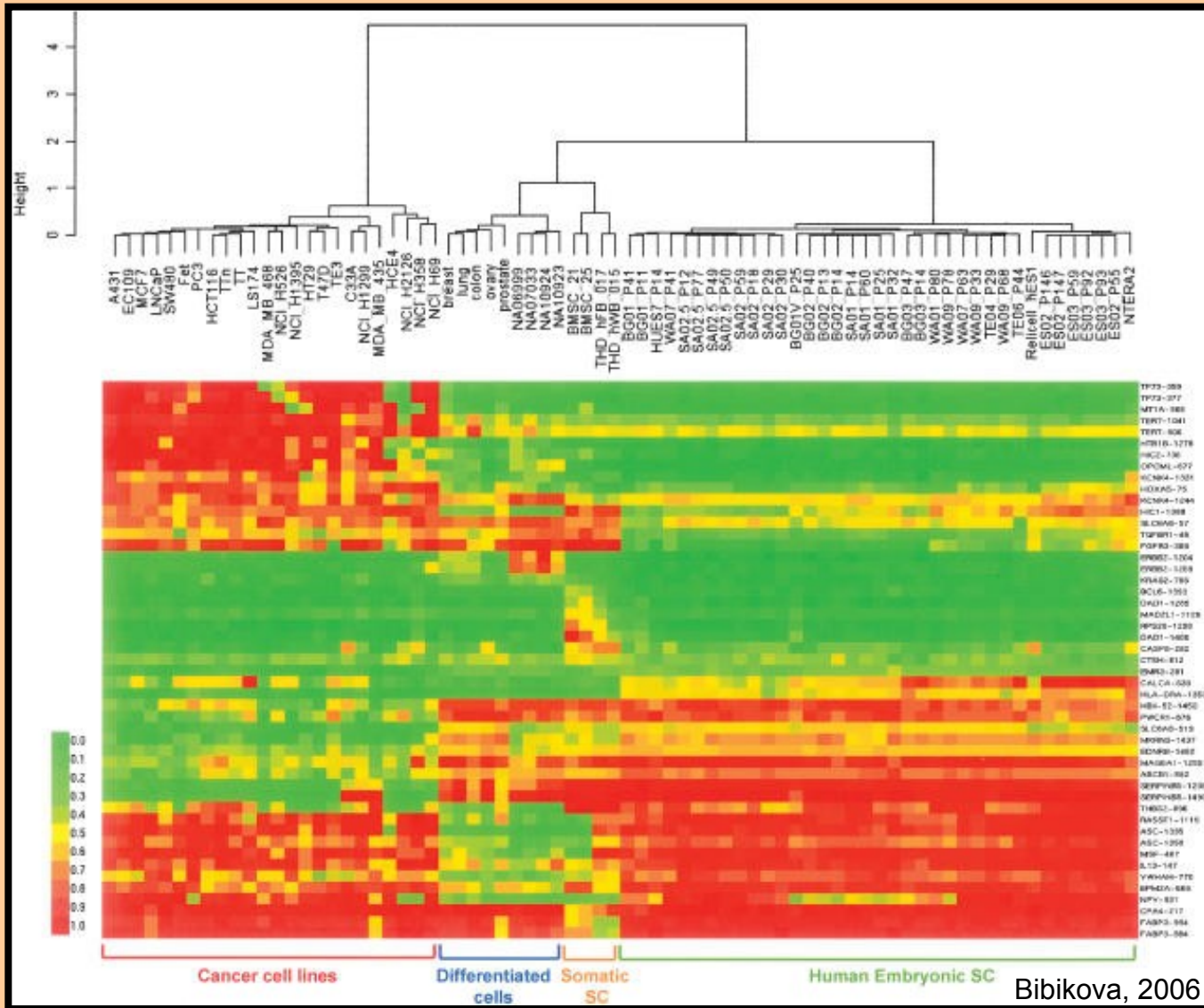


# Epigenetika ES buněk

## Metylace DNA a kondenzace chromatinu u ES buněk



# Profil metylace DNA u různých typů buněk (40 genů, 49 CpG míst)

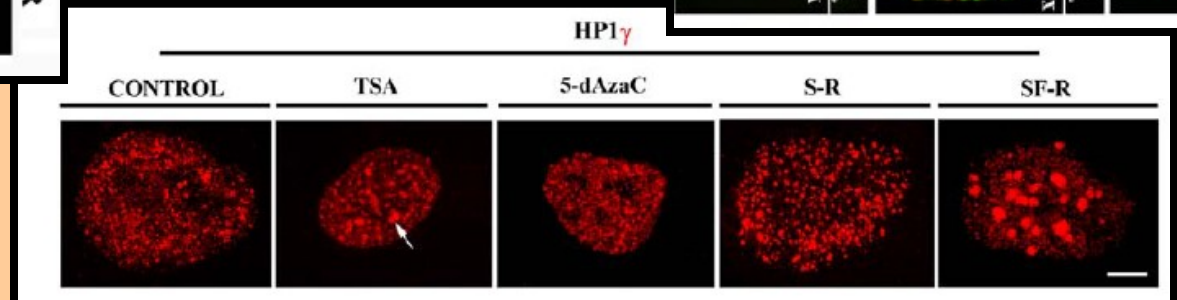
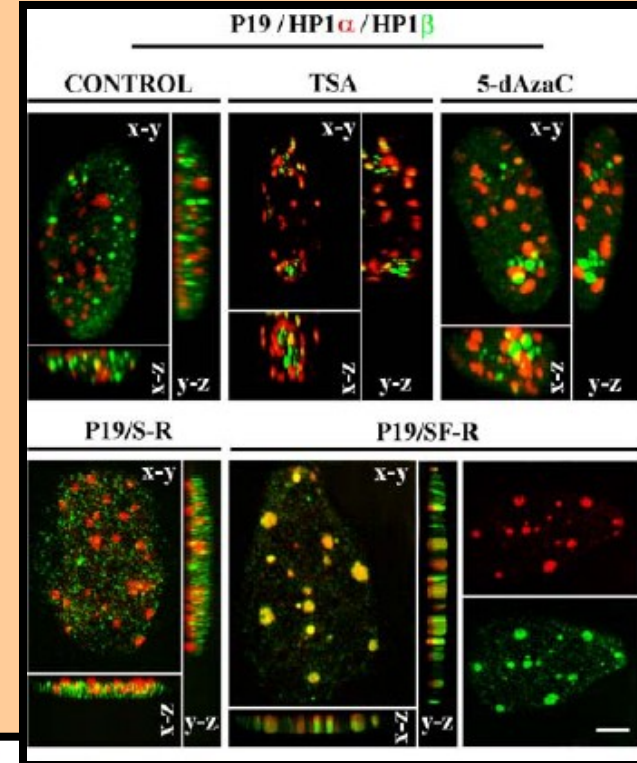
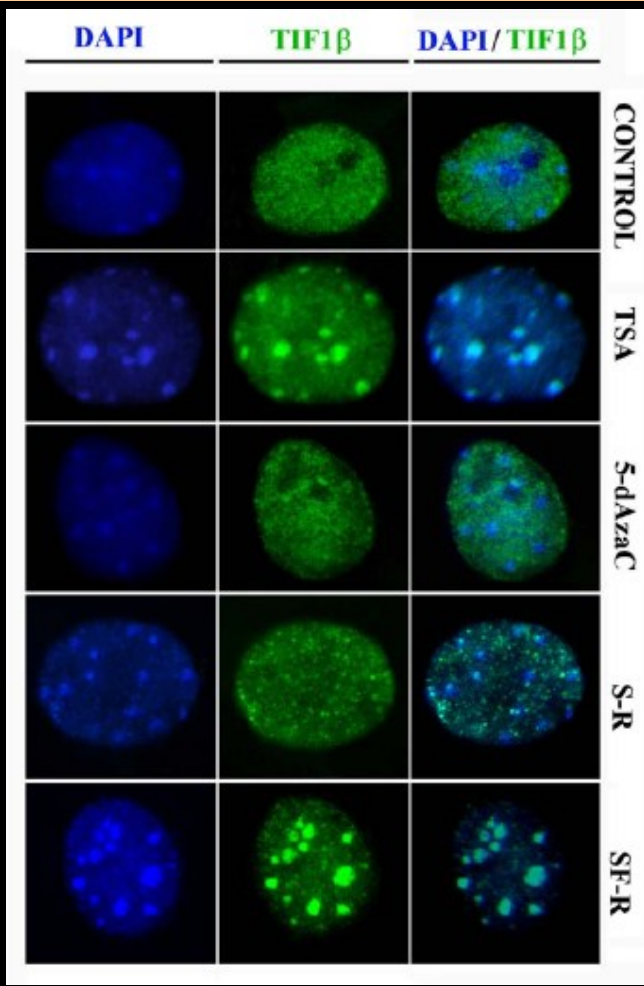


## Změny v distribuci HP1 a TIF1 $\beta$ v průběhu indukce diferenciaci embryonal. pluripotent. buněk (EC P19)

V průběhu diferenciaci pluripotentních buněk dochází ke kondenzaci chromatinu, což je možno detekovat i v podobě výraznějších/kondenzovanějších chromocenter (DAPI-modře kontrastovaná DNA) a akumulací s chromatinem asociovaných proteinů (jako zde ukázaný TIF1 $\beta$  a HP1 proteiny) do těchto oblastí. Současně dochází také ke specifické asociaci mezi jednotlivými typy HP1 proteinů spojených s konkrétními diferenciálními drahami.

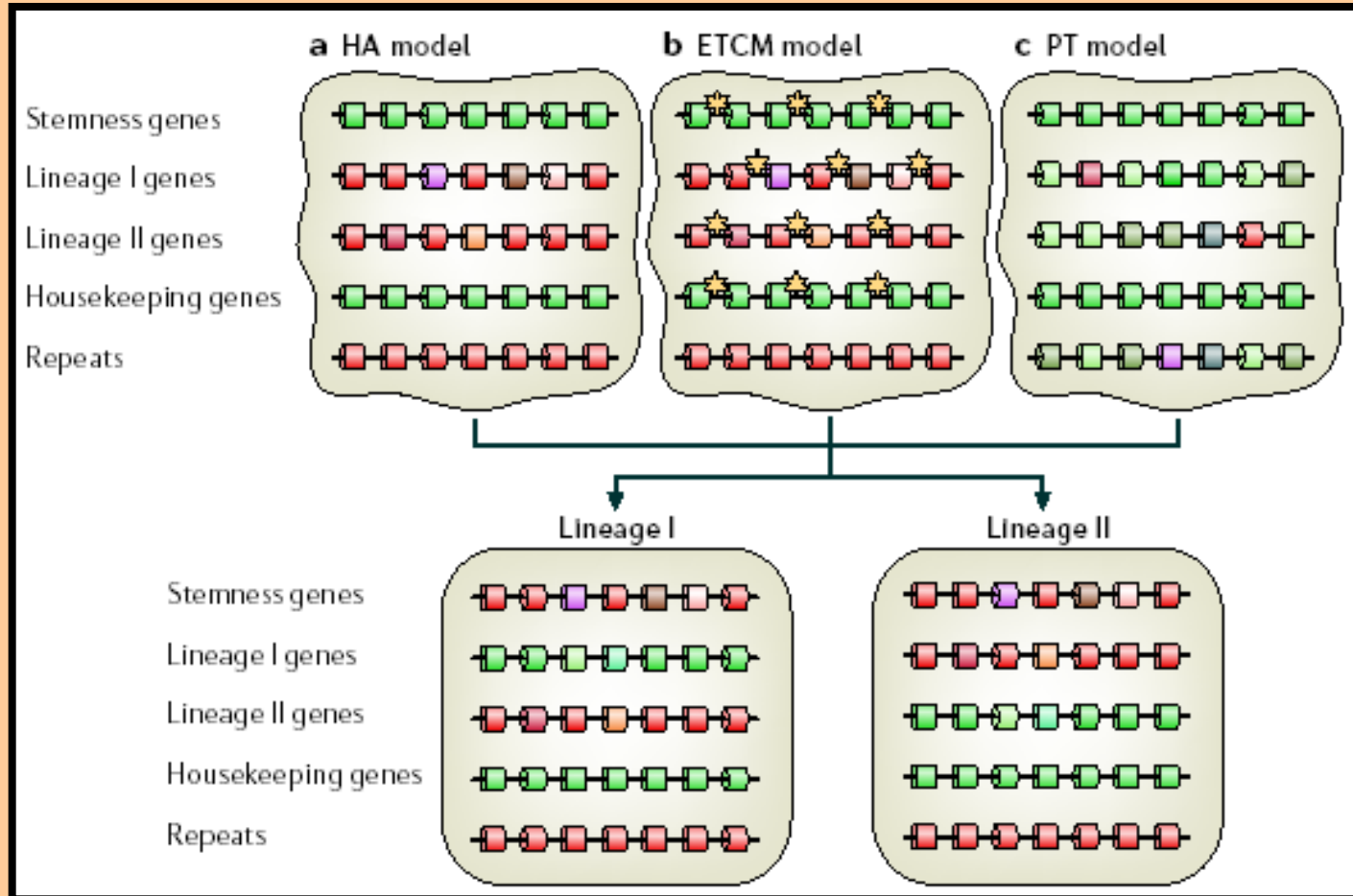
CONTROL – nediferencované buňky  
 S-R a SF-R – různé typy diferenciaci  
 TSA – inhib. Acetyltransferáz  
 5dAzaC – inhibitor metyltransferáz

Bártová, 2007





# Model změn transkripčního profilu v průběhu indukce diferenciace ES buněk

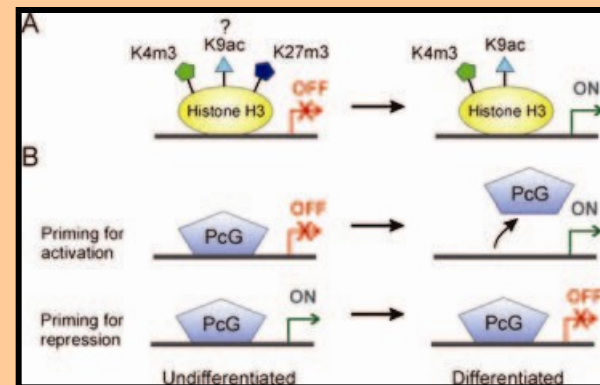
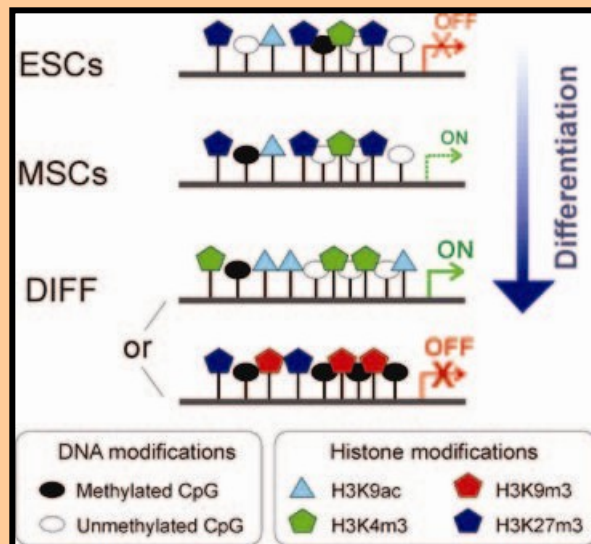
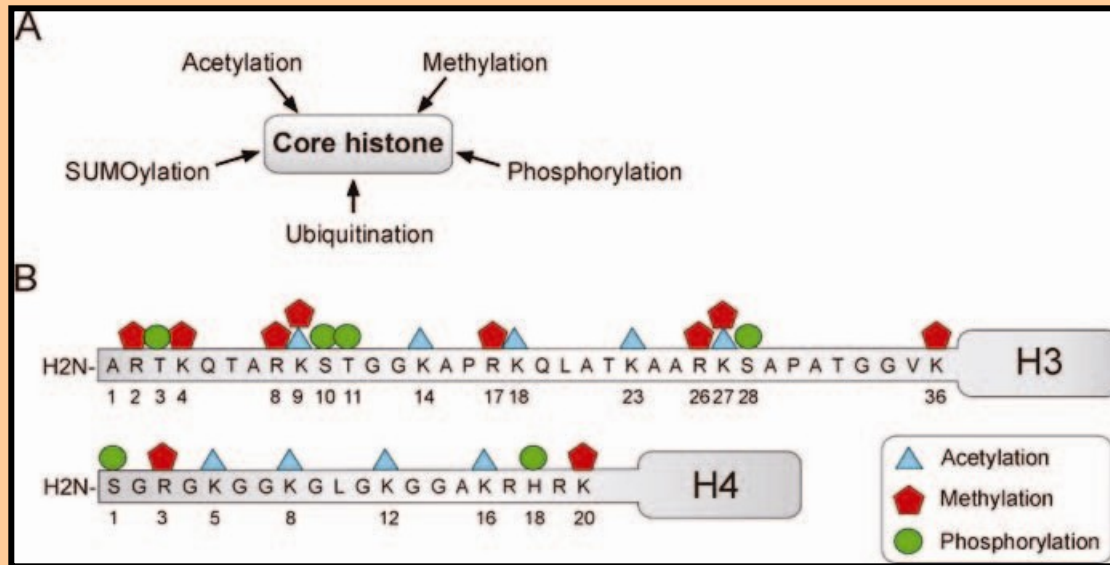


**HA** – model postupné (hierarchické) aktivace (hierarchical activation) → metylace DNA

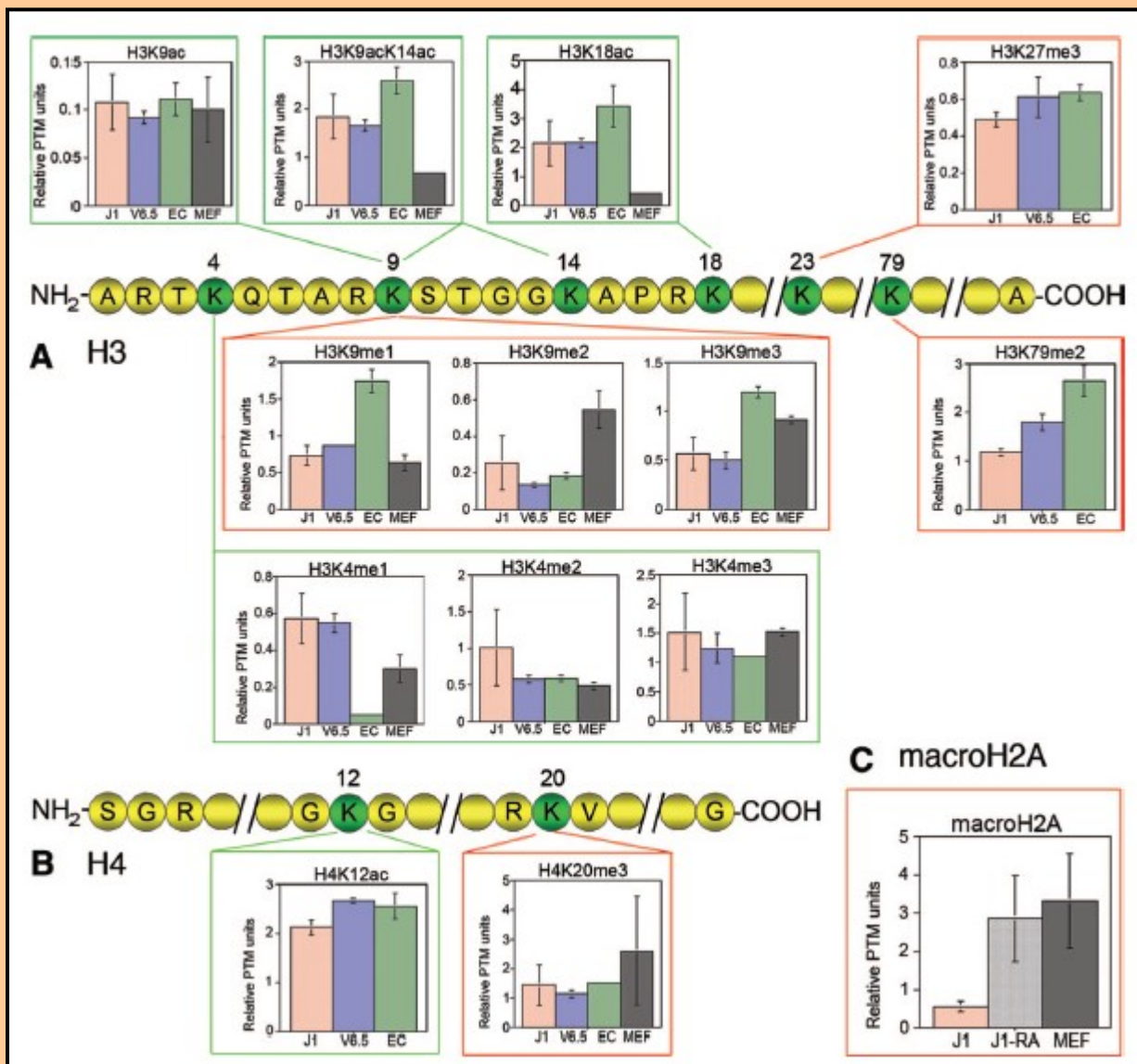
**ETCM** – model povolené/umožněné transkripce (early transcription competence marks) → modifikace histonů

**PT** – model promiskuitní transkripce (promiscuous transcription) → kombinace transkripčních faktorů a transdukce signálu

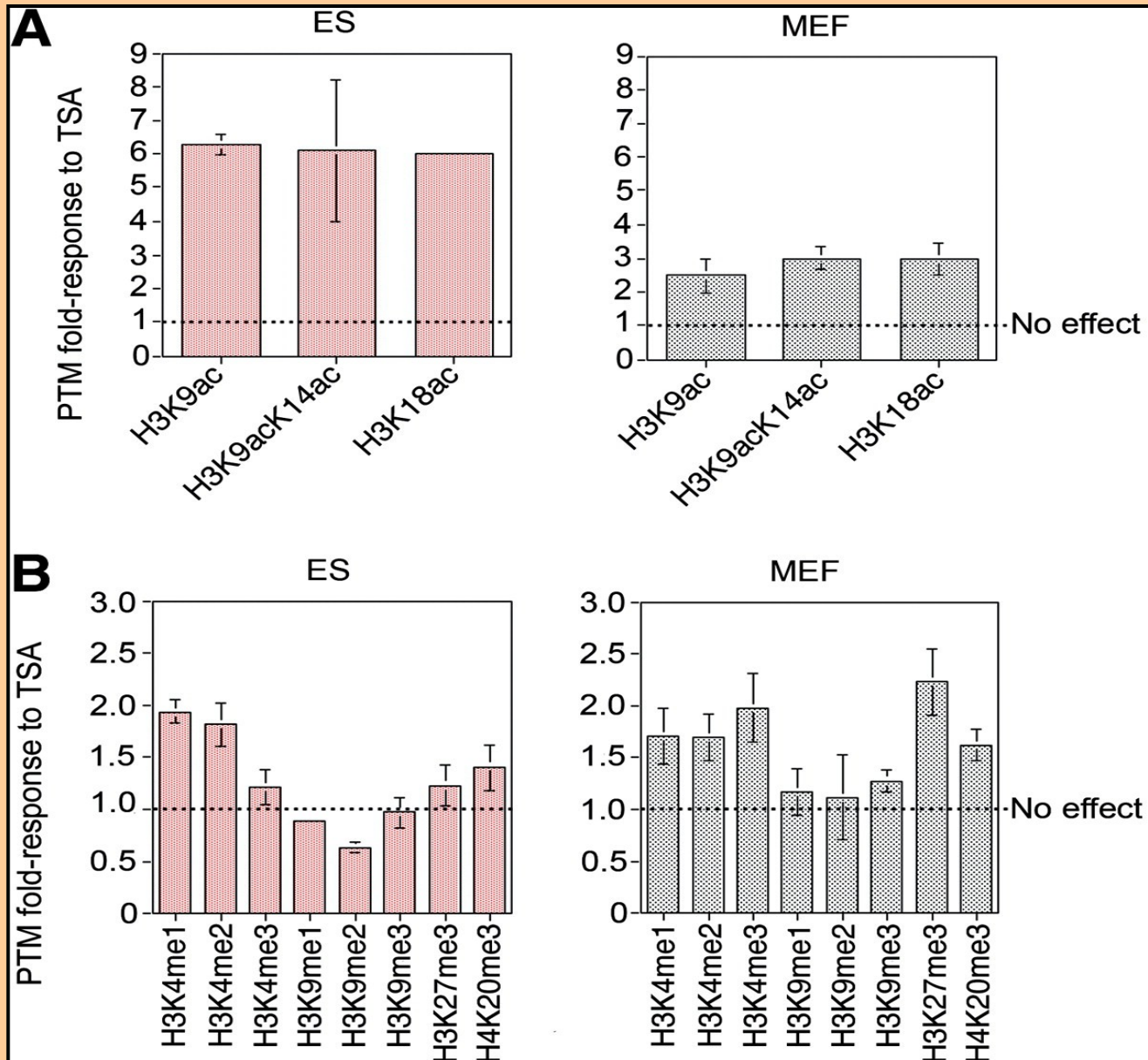
# Modifikace histonů – regulace transkripce



# Profil postranslačních modifikací (lysinových zbytků) histonů H3 a H4 u ES (J1, V6.5), EC a MEF buněk



# Změny histonových modifikací po působení TSA\* u ES a MEF buněk



\*TSA – Trichostatin: inhibitor deacetyláz

# Polycomb group (PcG) x Trithorax group (trxG) proteins

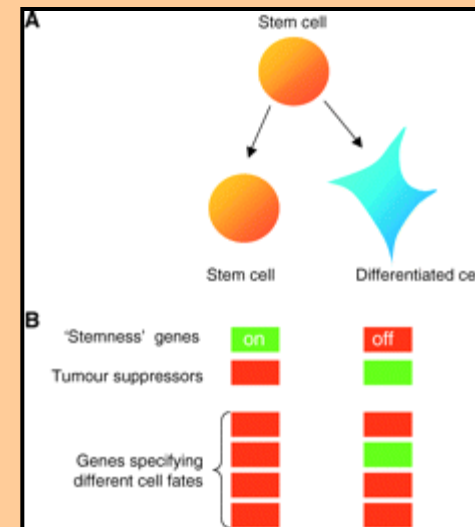
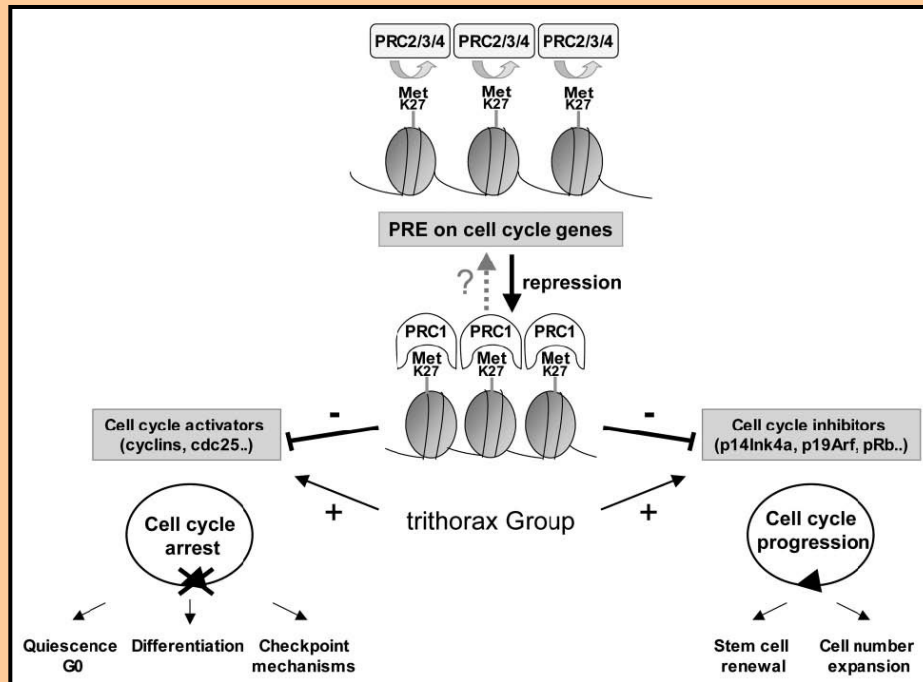
PcG jsou odpovědné za inaktivaci transkripce cílových oblastí  
 trxG jsou odpovědné za aktivaci transkripce cílových oblastí

- obecně patří mezi skupinu proteinů modifikujících chromatin
- regulují zejména transkripci homeotických genů – význam v ontogenezi
- jsou odpovědné za epigenetickou paměť genomu
- rozpoznávají specifické a vzájemně málo homologní skvence DNA

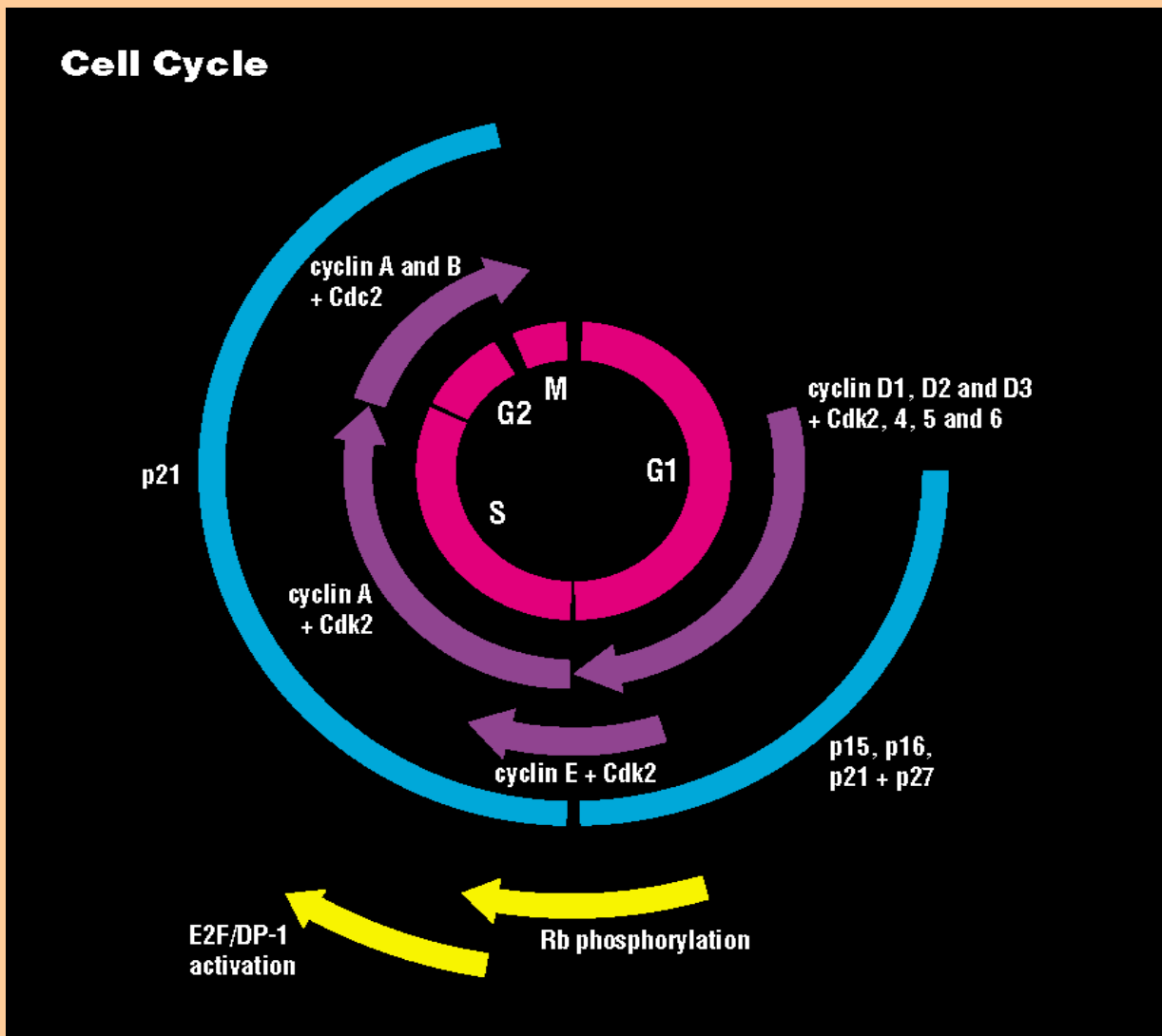
PRE – PcG responsive element

TRE – trxG response element

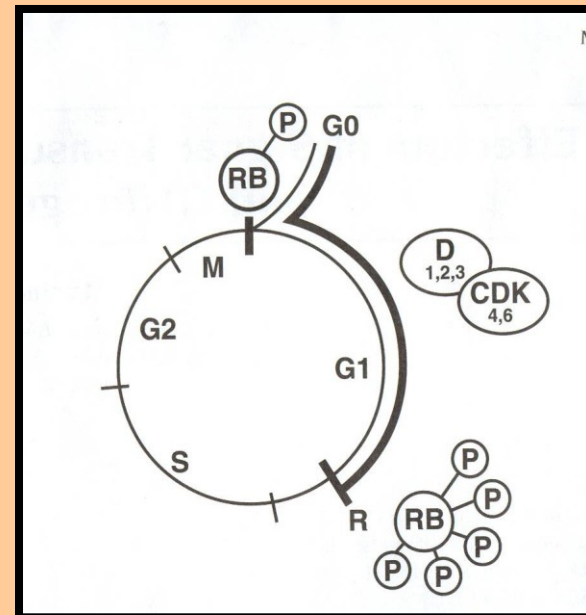
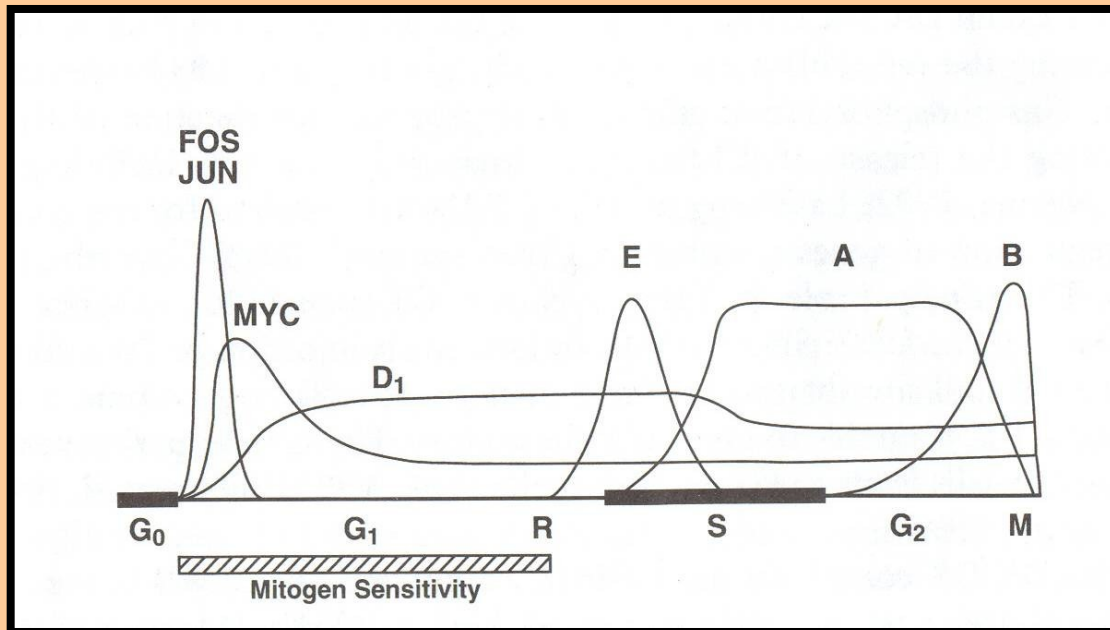
- jedná se o proteinové komplexy se základní jednotnou strukturou (PcG 4 základní skupiny komplexů), specifita těchto komplexů k daným PRE/TRE je dána dalšími asociujícími specifickými podjednotkami



# Proliferace ES buněk



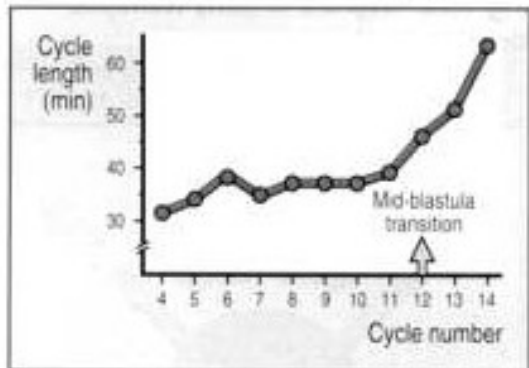
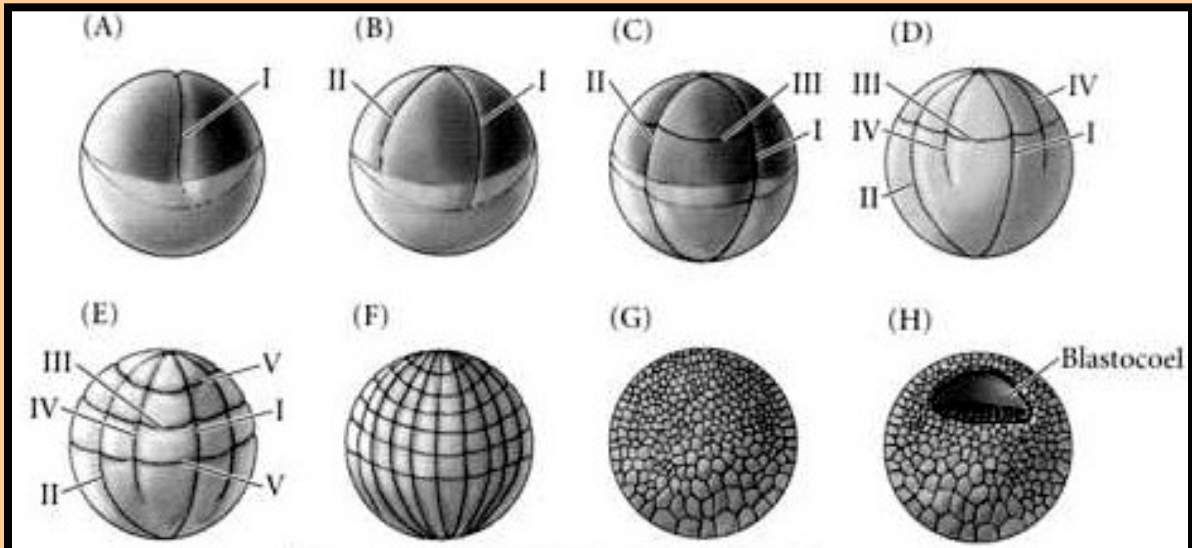
S laskavým nedovolením z katalogu Santa Cruz Biotechnology, Inc.



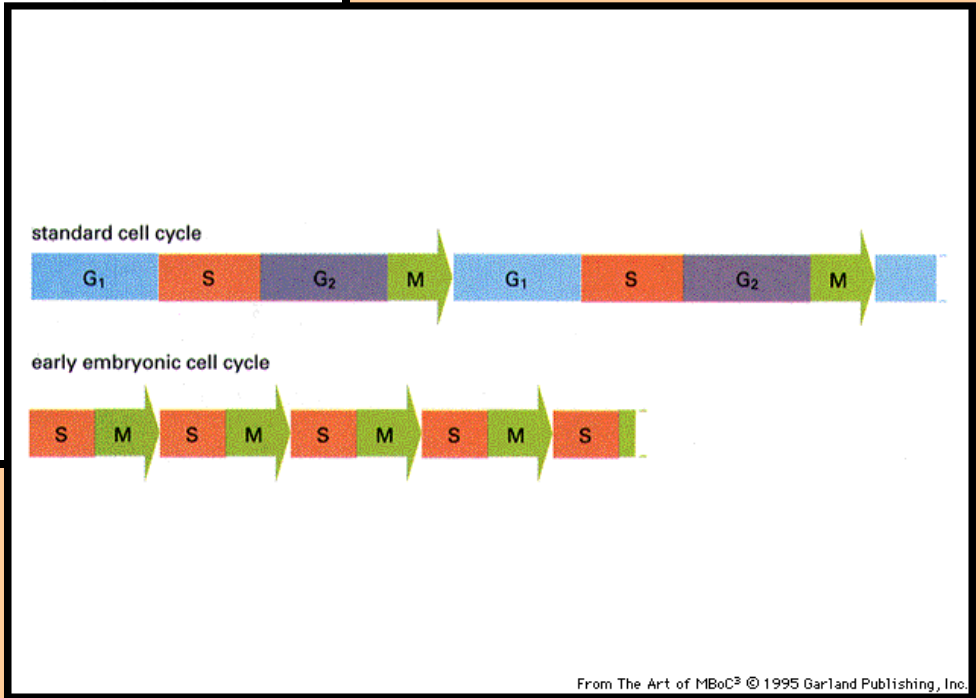
- ES buňky relativně intenzivně proliferují (podobné nádorovým buňkám)
- G<sub>1</sub> fáze buněčného cyklu je krátká (u mES ~ 1.5 h), zdá se, že chybí G<sub>1</sub>-checkpoint\*
- velké procento buněk je v S fázi buněčného cyklu (mES > 60%, hES > 50%)
- doubling time mES ~ 12h, hES ~ 24h
- specifická charakteristika regulace buněčného cyklu (odolnost k p16, nízká hladina cyklinů D, vysoká hladina cyklinu E, není potřeba proteinů rodiny Rb)
- inhibice proliferace (suboptimální podmínky) vede k diferenciaci a apoptóze, diferenciaci a apoptóza ES buněk, však nemusí vést ke snížení proliferace jako takové

\*tzv. kontrolní bod R, o průchodu tímto bodem rozhodují zejména mechanismy rozpoznávající integritu/neporušenost genomu, buňky s poškozenou DNA jsou za normálních okolností v tomto bodě zastaveny. Porucha tohoto kontrolního mechanismu je typická pro nádorové buňky.

# Rozdílné proporce v jednotlivých fázích cyklu u časných embryonálních buněk



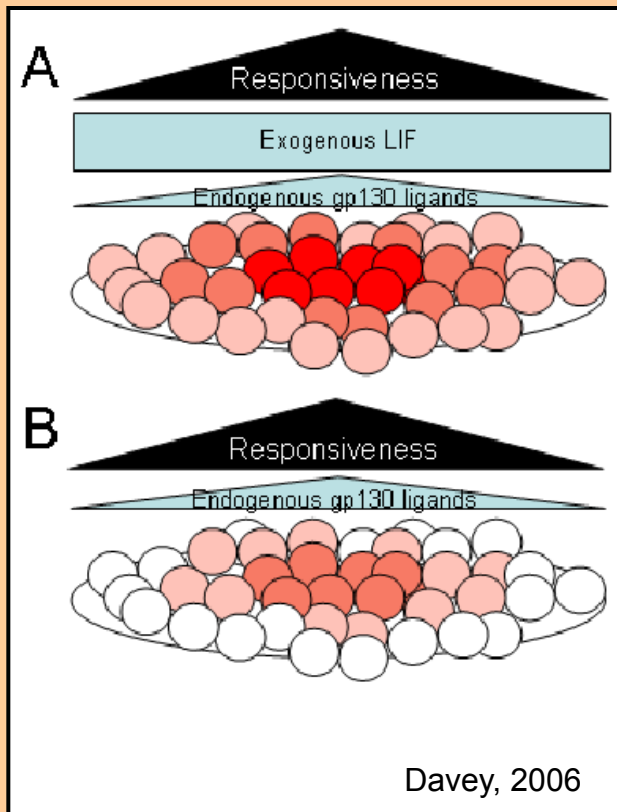
Timing of the cell cycle during cleavage in *Xenopus*.





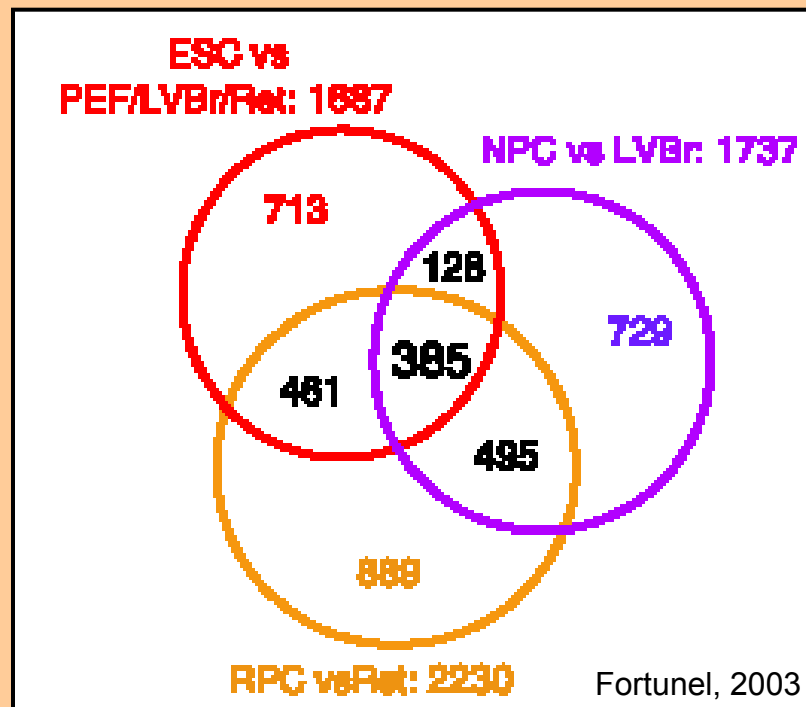
Jak vypadá správná ES buňka?  
Jsou všechny ES buňky v kultuře stejné?

LIF -> STAT3 aktivita u mES buněk



↓ pokračování

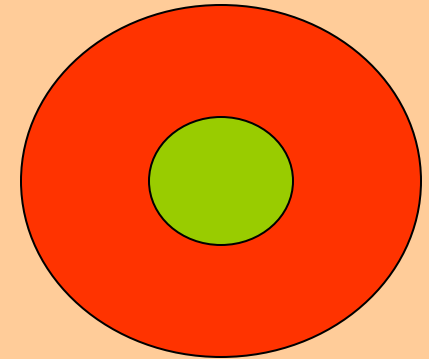
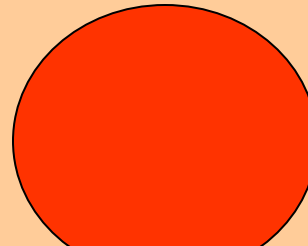
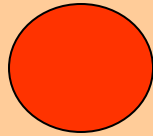
Microarray analýza exprese „stemness“ genů



↓ pokračování

**Model narůstající heterogenity v rostoucí kolonii ES buněk  
za dodržení známých optimálních kultivačních podmínek**

Myší ES



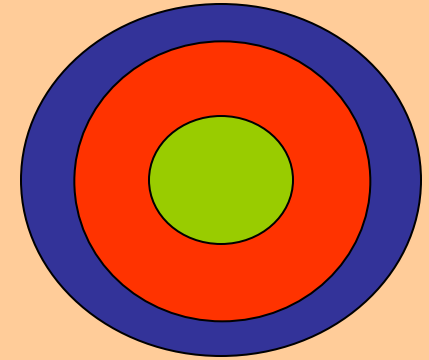
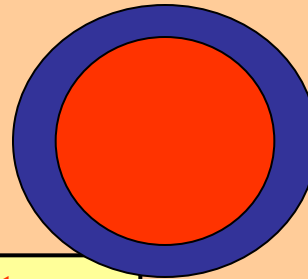
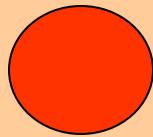
30<\*

50<\*

100<\*

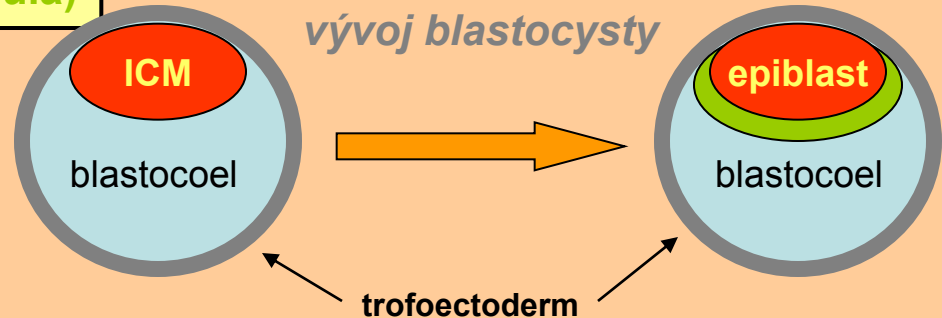
růst kolonie ES buněk

Lidské ES



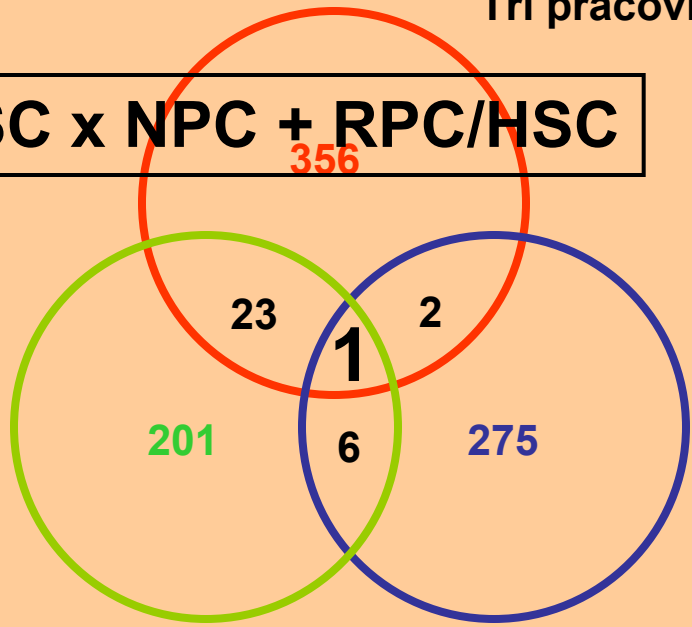
**Buňky odpovídající buňkám ICM/epiblastu**  
**Časného neuroektodermu**  
**Buňky primitivního entodermu**  
**(morphologicky navíc tvoří také malá granula)**

\*orientační počet buněk v kolonii

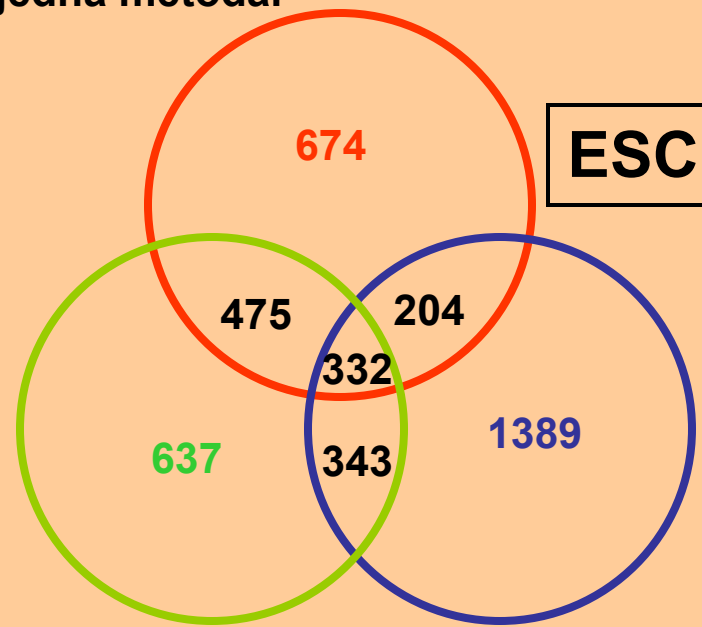


Variabilita v analýze transkripčního profilu u ES buněk (ESC), neurálních progenitorů (NPC), progenitorů retiny (RPC) a hematopoetických kmenových buněk (HSC) u myši.  
 Tři pracovní skupiny, jedna metoda.

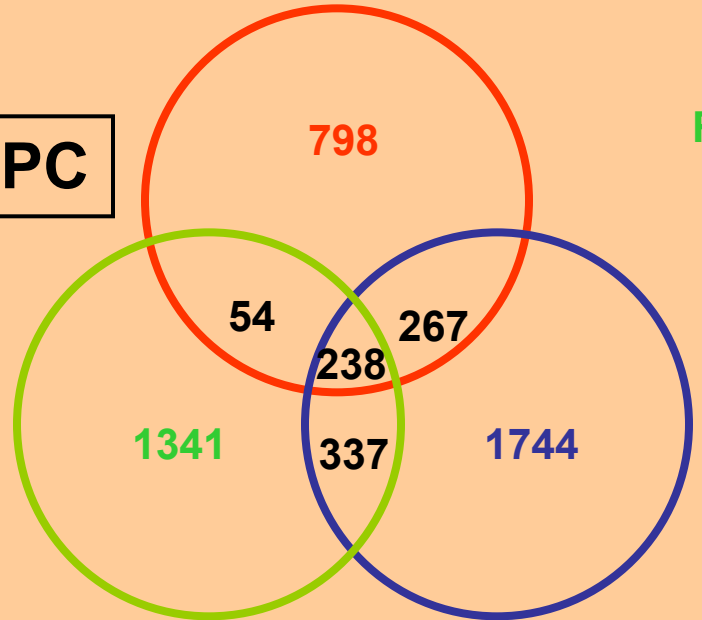
**ESC x NPC + RPC/HSC**



**ESC**

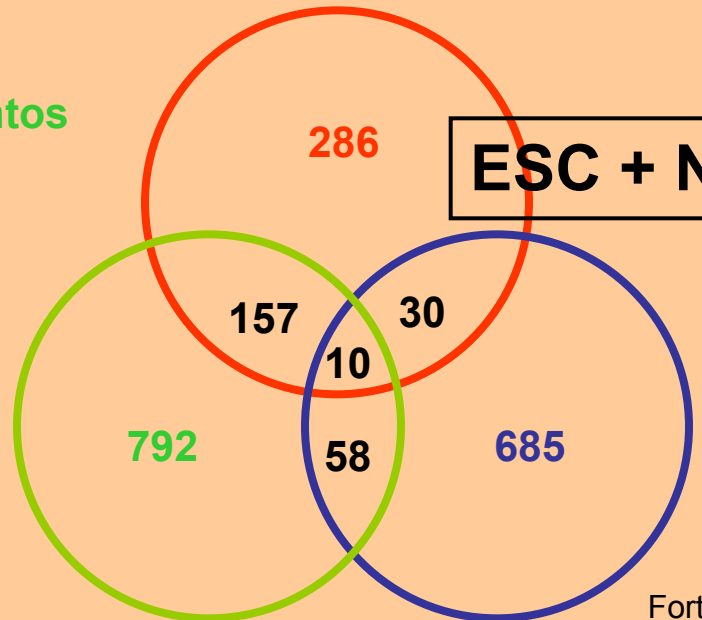


**NPC**

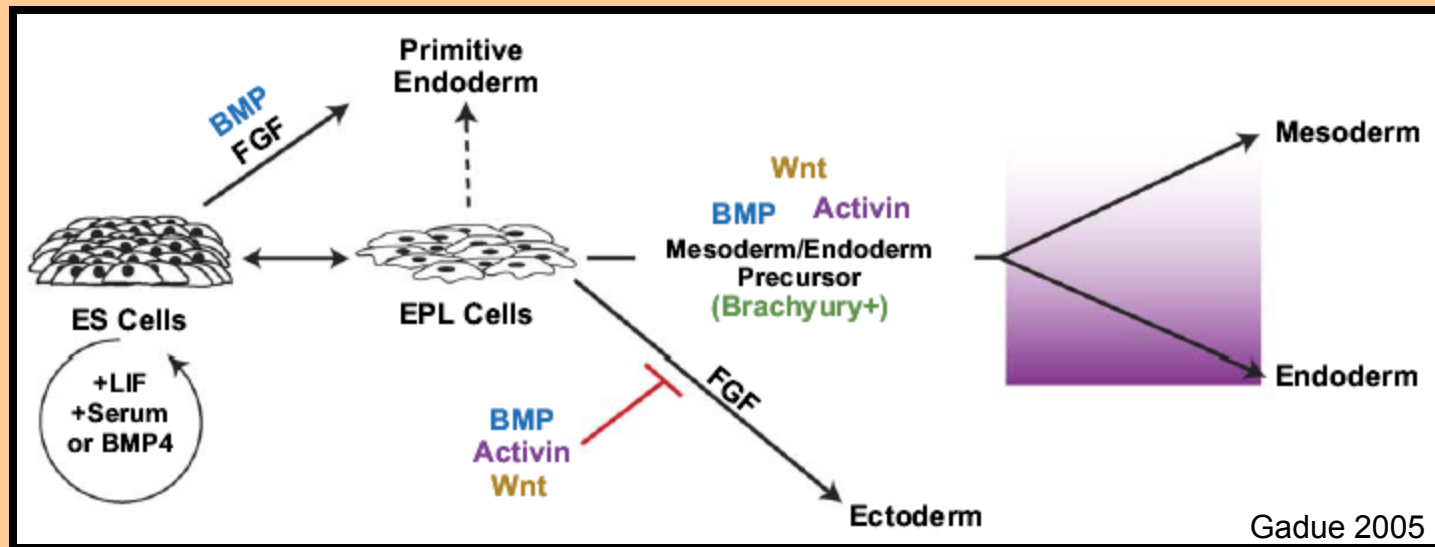
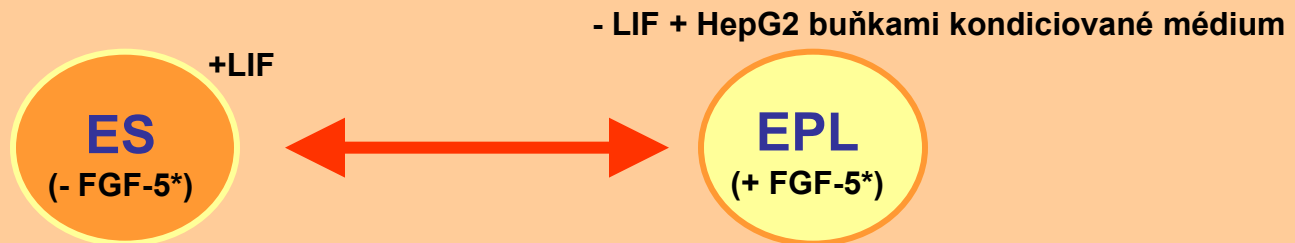


Fortunel  
 Ramalho-Santos  
 Ivanova

**ESC + NPC**



mES je možno reverzibilně převést na buňky připomínající buňky primitivního ektodermu tzv. EPL (early-primitive ectoderm-like) buňky. Tyto buňky již nemají podobně jako buňky primitivního ektodermu schopnost tvořit buňky parietálního entodermu. Také některé jejich další schopnosti diferencovat, jsou oproti ES buňkám pozměněny (Pelton 2002) .



\*EPL buňky jsou podobně jako buňky primitivního ektodermu exprimují FGF-5 na rozdíl od ES buněk, které exprimují zejména FGF-4 (platí pro myš)

# VYUŽITÍ ES BUNĚK

## 1. Biologický a biomedicínský výzkum

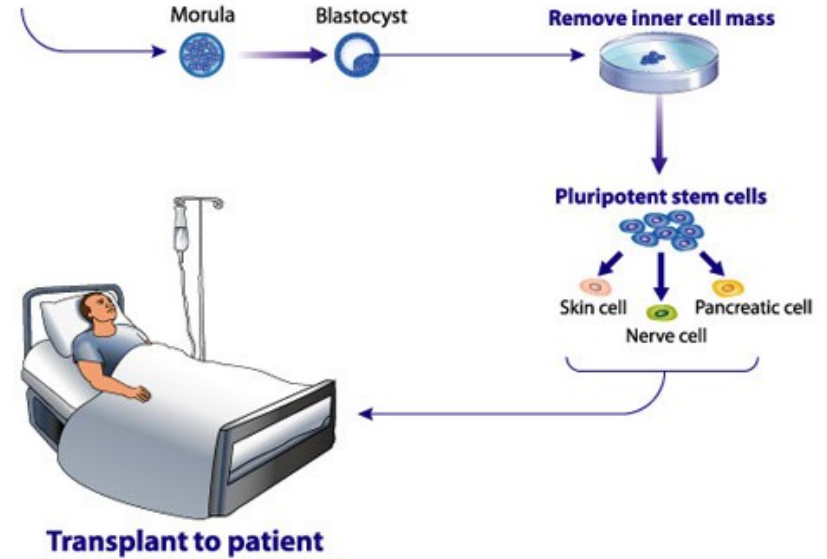
- Příprava geneticky modifikovaných organismů
- Studium mechanismů časně embryogeneze / diferenciace
- Studium mechanismů kancerogeneze
- Studium embryotoxicity
- Testování farmak

## 2. Lékařství

- Buněčné a tkáňové terapie
- Příprava biologicky aktivních preparátů
- Nosiče biologicky aktivních látek (*pathotaxe*)

# ES buňky v buněčné terapii

## In vitro fertilization



by [Cell Imaging Core](#) of the Center for Reproductive Sciences.

## SCNT

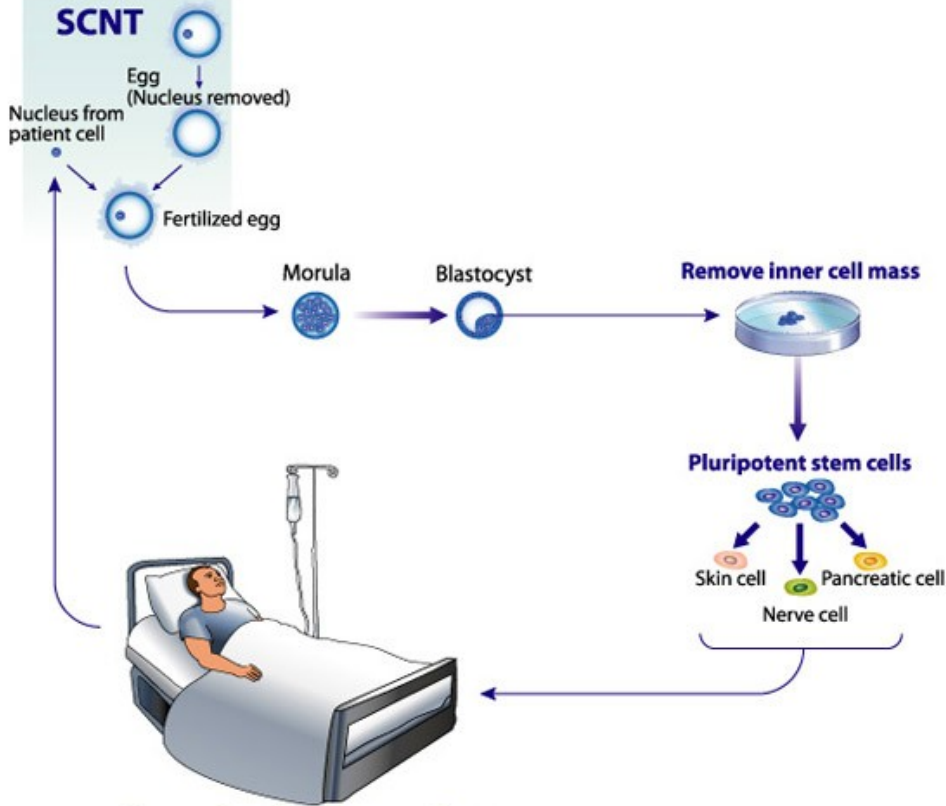


Illustration by [Cell Imaging Core](#) of the Center for Reproductive Sciences.

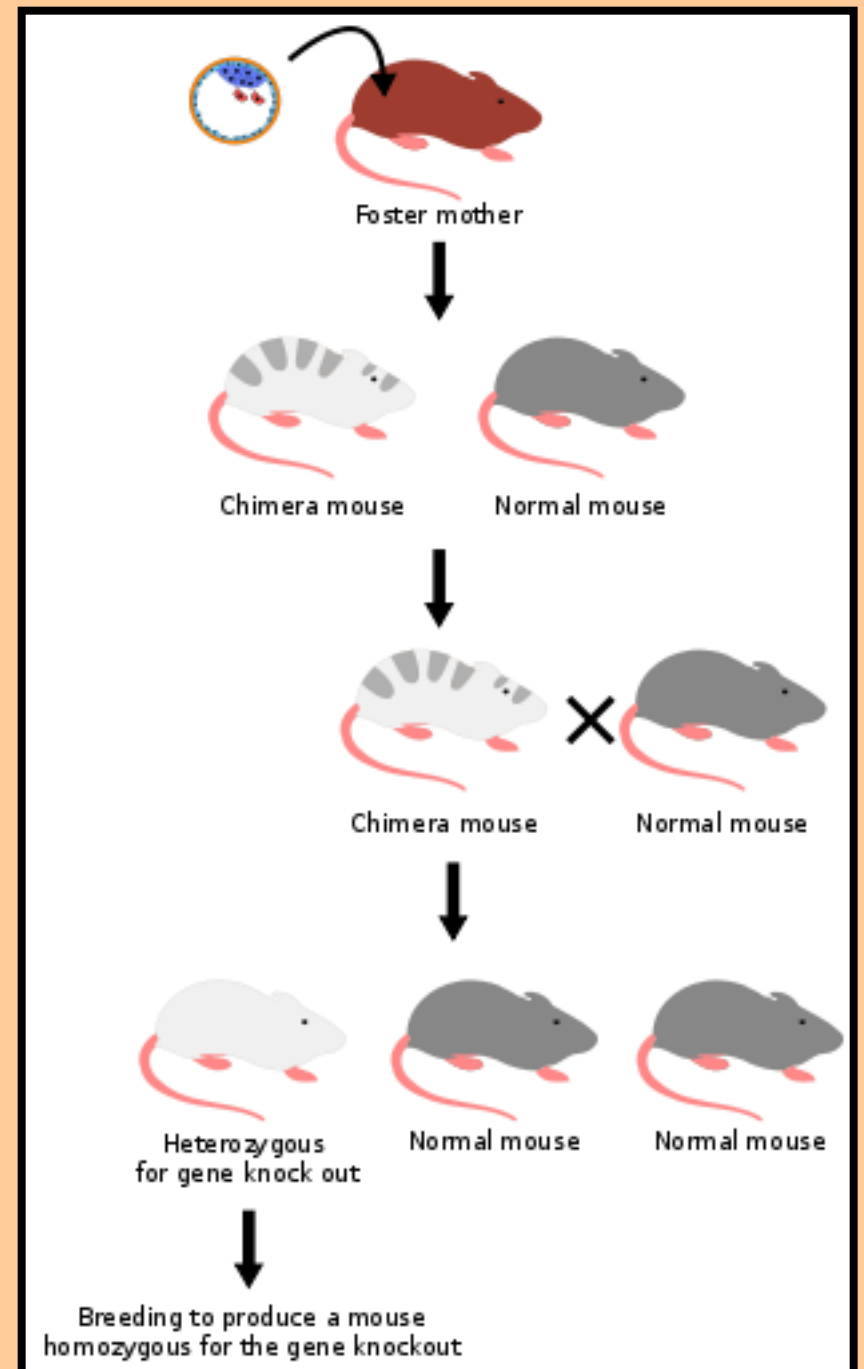
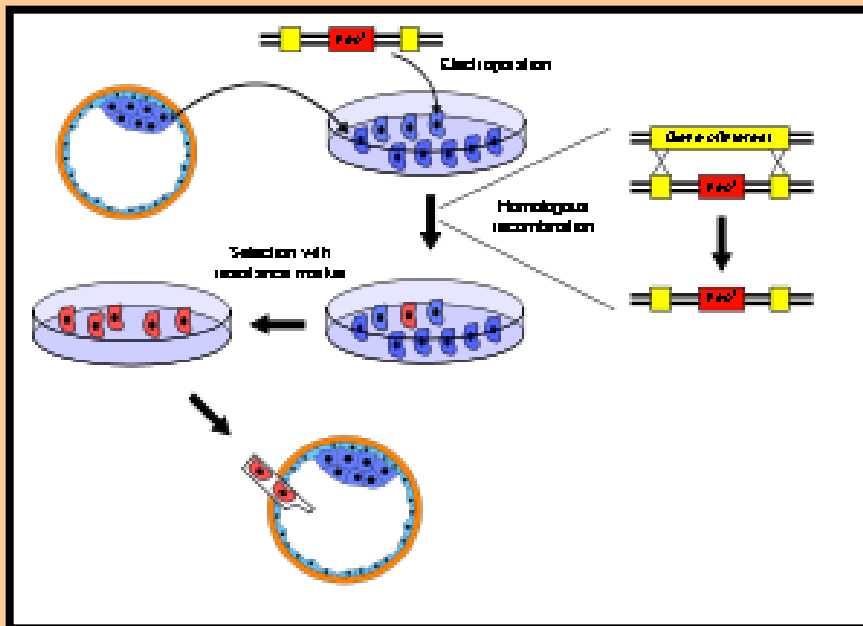
## Příprava geneticky modifikovaných organismů - GMO

Pro vytvoření linie GMO je potřeba, aby požadovaná genetická modifikace byla obsažena i v pohlavních buňkách. Tuto modifikaci je tedy potřeba provést na buňkách toti- nebo pluripotentních.

- Náhodným nebo cíleným(?) vložením požadované DNA do zygoty
- **Náhodným nebo cíleným vložením požadované DNA do ES buněk**

- **Díky prakticky neomezené možnosti kultivace ES buněk, lze mít prováděnou genetickou modifikace plně pod kontrolou, a také ji můžeme velice přesně naplánovat!!!**
- **ES buňky jsou pluripotentní, po zpětné injikaci do blastocysty a vložení této blastocysty do dělohy pseudo-pregnantní myši, blastocysta pokračuje ve vývoji a vzniklý jedinec je chimérou buněk původní ICM a injikovaných ES na úrovni všech tkání, tedy i zárodečné.**

# Příprava KO myši





## Diferenciace ES buněk

### a) *In vivo*

- teratomy: injekce suspenze ES buněk do vaskularizované tkáně imunitně tolerantního zvířete, popřípadě do zvířete s farmakologicky potlačenou imunitní odpovědí
- chiméry: injekce ES buněk do blastocysty, navrácení takové blastocysty do pseudo-pregnantní myši = vznik chimerického jedince

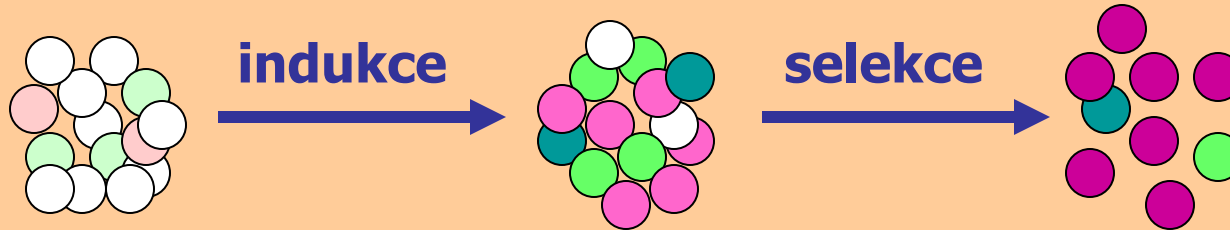
### b) *In vitro*

- metodiky korespondující s ontogenezí
- metodiky získané empiricky (kopírující ontogenezi?)

Musí buňka diferencující z ES buňky vždy kopírovat ontogenezi aby dosáhla určitého stavu?

## In vitro diferenciace ES buněk

### kultivace

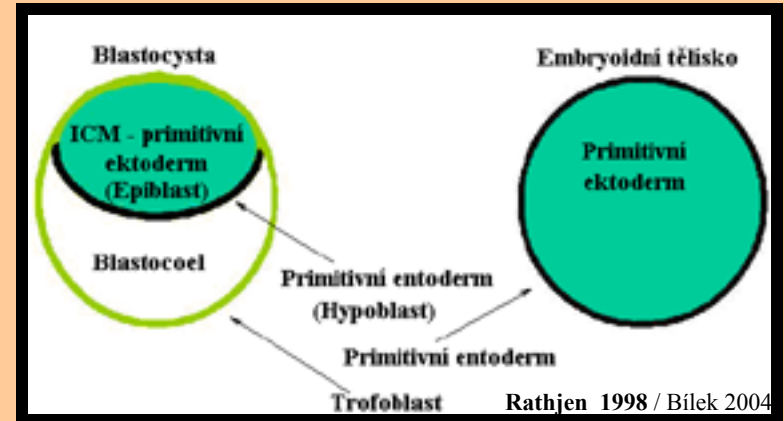


### a) Embryoidní tělíska (Embryoid bodies - EB)

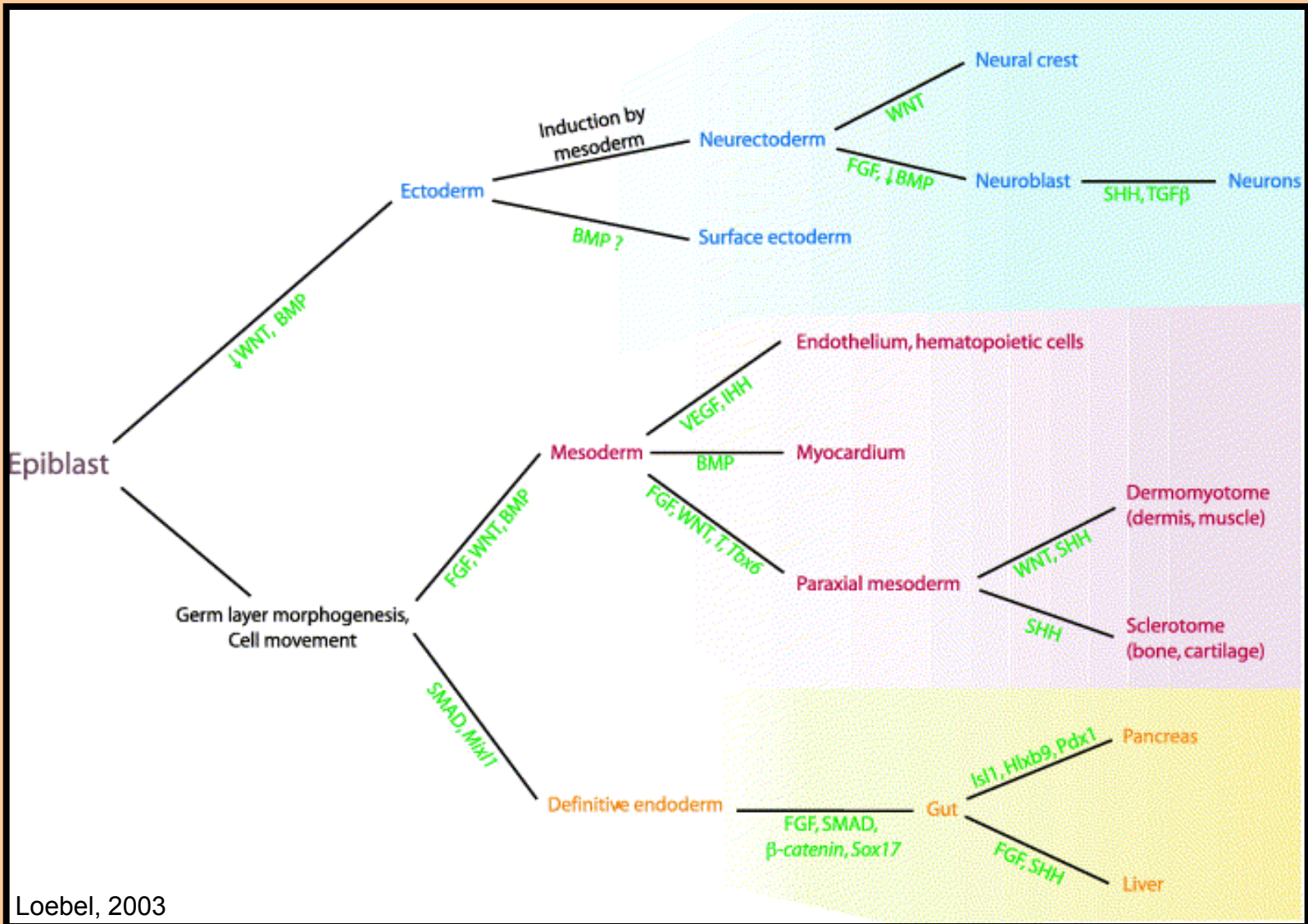
- EB)
- + *jednoduché, více buněčných typů*
- + *tolerující genotyp*
- *špatně definované podmínky*

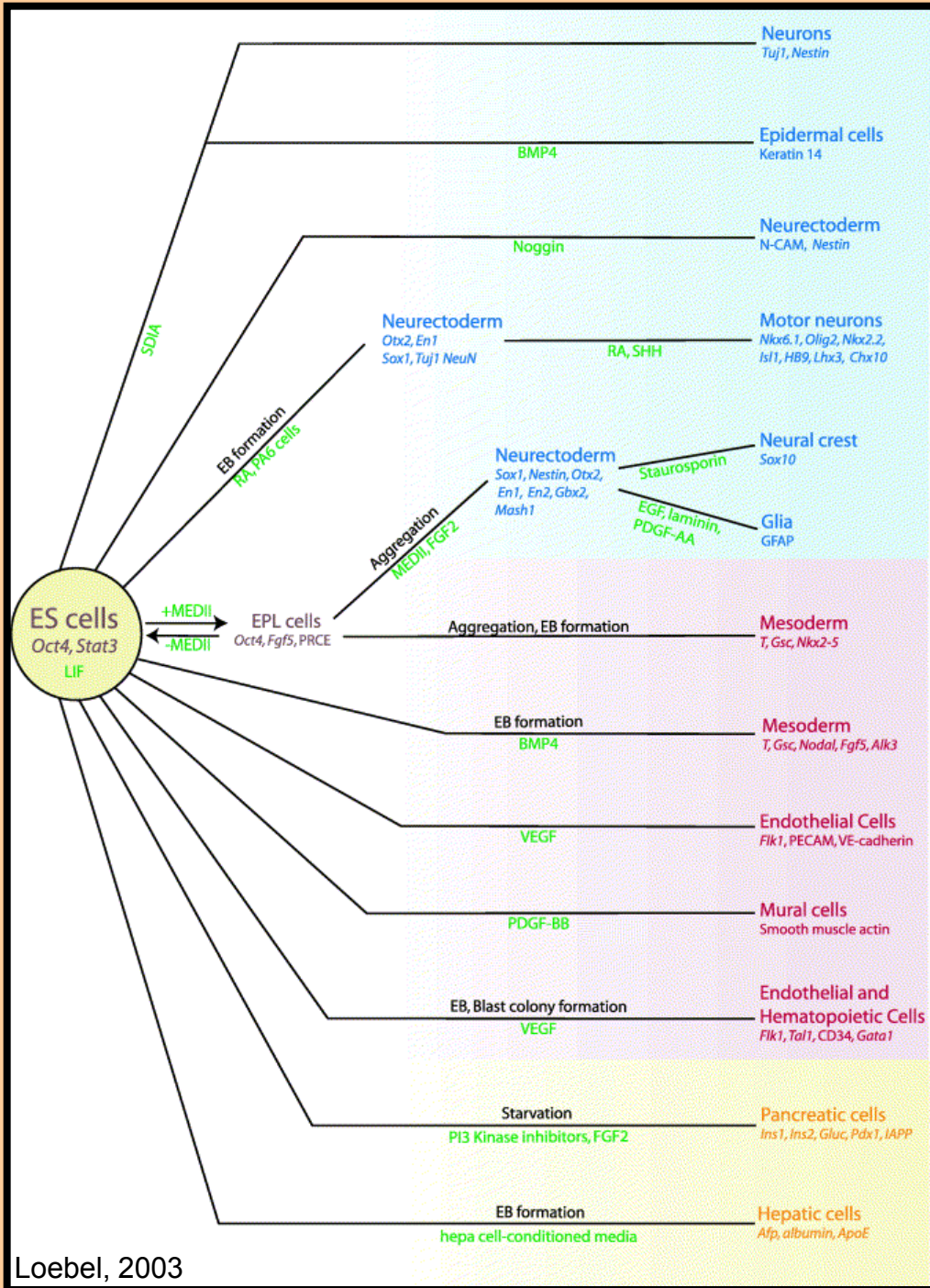
### b) V monovrstvě

- + *dobře definované podmínky*
- *malá výtěžnost*
- *silně závislé na genotypu*

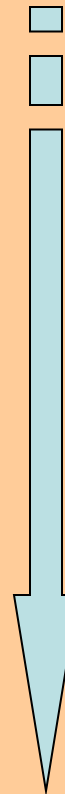


# Úloha specifických růstových faktorů v ontogenezi myši

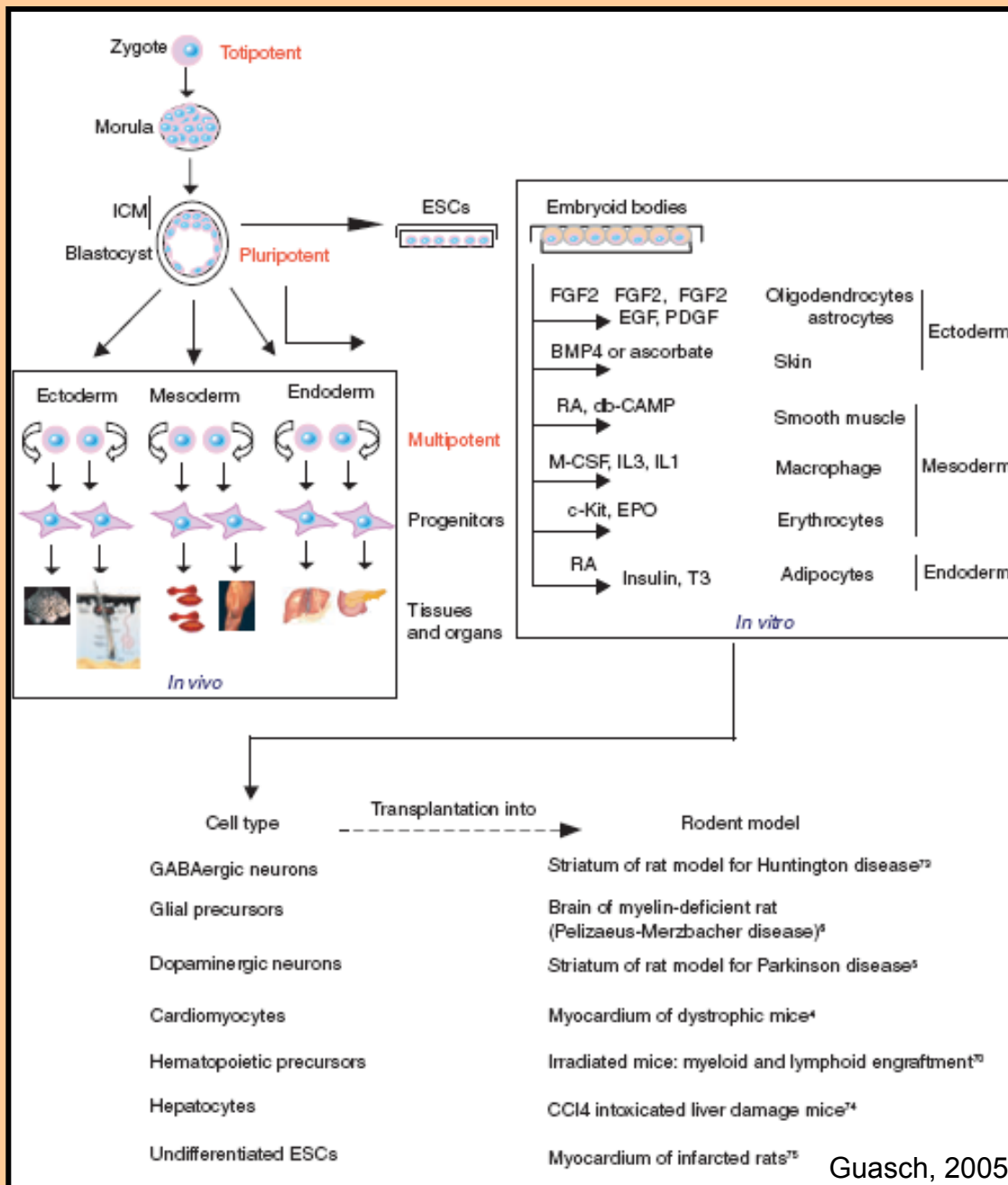




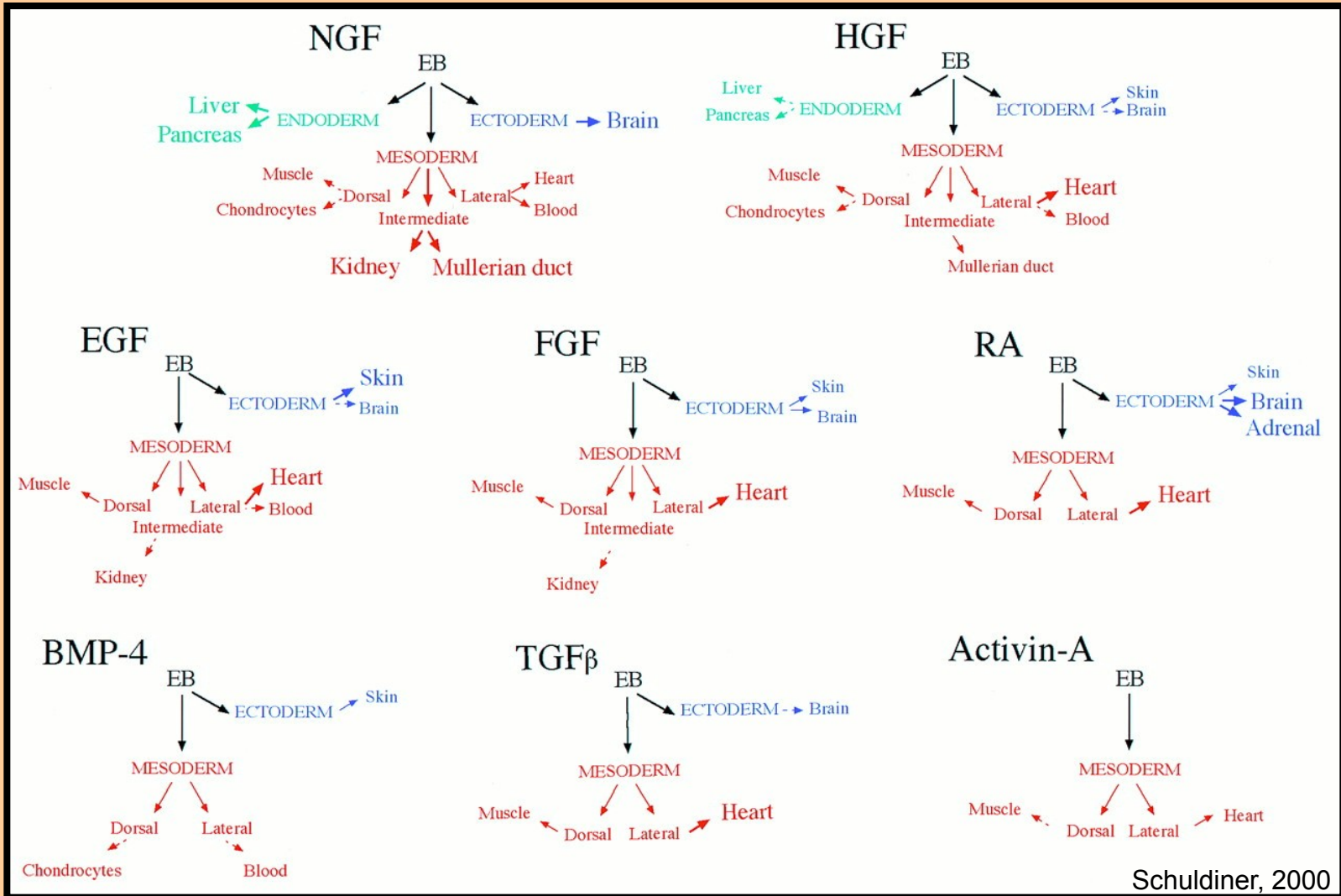
**Příklady diferenciaci myších ES buněk kombinací typu jejich kultivace a specifických růstových faktorů s porovnáním úlohy těchto faktorů v myší ontogenezi**



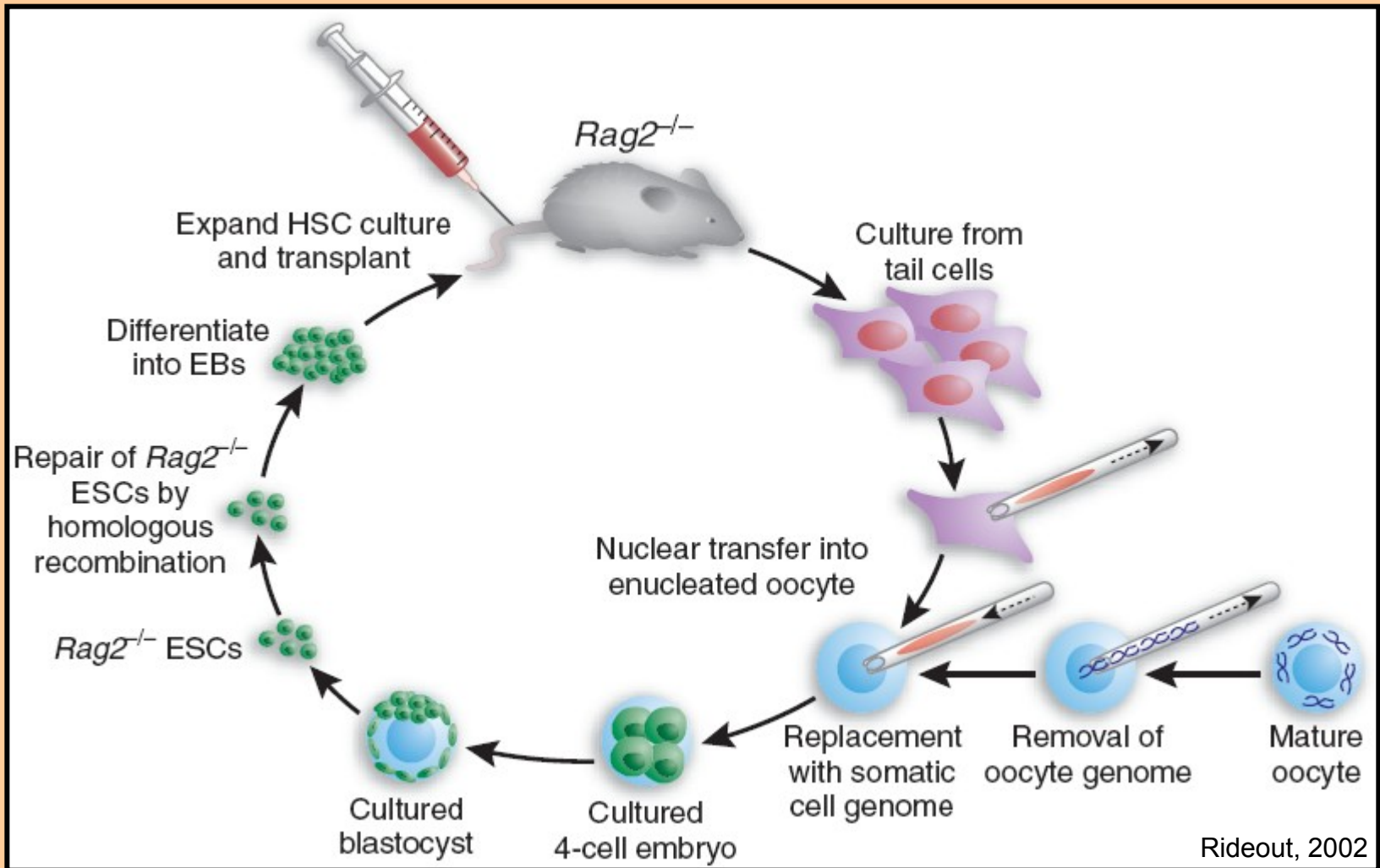
**pokračování**



# Příklad účinků jednotlivých specifických růstových faktorů na indukci diferenciace u lidských ES buněk v kombinaci s tvorbou embryoidních tělísek



**Model regenerace poškozené hematopoesy v důsledku  $Rag2^{-/-}$  mutace s použitím ES buněk, genetických manipulací a jaderného reprogramování**



## SOUČASNÉ PROBLÉMY S VYUŽITÍM ES BUNĚK V TERAPII

- hES se nedaří dlouhodobě kultivovat beze změn v genotypu / fenotypu
- dlouhodobá kultivace za suboptimálních podmínek vede k dosud neznámým, epigenetickým změnám snižujícím schopnost pluripotence (ireverzibilními i pro cytoplasmu zygoty, Amano 2006)
- dosud není spolehlivě vyřešen potenciaální vznik teratomů
- biologie a diferenciační potenciál ES buněk nejsou dosud dobře prozkoumány
- kultivace ES buněk je stále závislá na nedefinovaných faktorech
- etika získávání nových lidských ES linií
- finance, přes velice atraktivní potenciál, který v sobě ES buňky mají, není jisté, jestli současná společnost bude mít dost prostředků na jejich využití např. v buněčné terapii



## Chromosomální stabilita a ES buňky

Draper, 2004; Hanson, 2005

- dlouhodobá kultivace ES buněk vede k selekci odolnějších klonů a subpopulací
- menší rezpozivnost na vnější signály, rychlejší proliferace, menší nároky na kultivaci, klíčové znaky často zachovány (Oct-4, Nanog, příslušné SSEA,...)
- u myši snížena schopnost tvorby chimér a zřejměna germline u těchto chimér
- často spojeno s genetickou manipulací (knock-out, -in ES linie)
  
- nestabilita chromosómů, polyploidie, trizomie, zlomy a přeskupování genů  
=> adaptace na *in vitro* podmínky
  
- **hES**, primární je trizomie chromozomu 12 nebo 17, vzácněji chromosomu 14 a 20
- často dochází i ke zdvojení dlouhého raménka chromosomu 17 a k translokaci této kopie na dlouhé raménko chromosomu 6 => posílení exprese genů na chromosomu 17 (Survivin – proti apoptóse, STAT3 – self-renewal mES a nadbytek u většiny nádorů, GRB2 a 7 (growth factor receptor bound protein, viz. signální transdukce))
- na chromosomu 12 je lokalizován *nanog* (Nanog)
- časté i změny malých oblastí na chromosomech 1, 8, 18 a 20
- u **mES** se jedná o změny zejména chromosomů 8 a 11  
(myší chromosom 11 je z části ekvivalentní k lidskému chromosomu 17)

## Apoptická kontrola nestability karyotypu a ES buňky

*Checkpoint-apoptosis.... of karyotypic instability. Mantel, 2007*

- u zdravých somatických buněk při poruchách mitotického aparátu během jejich dělení a tak vznikající chyby v mitóze vedou k jejich přechodu do senescentního stavu nebo k indukci apoptózy

- **ES buňky mají zvýšenou toleranci k poruchám mitózy**, menší citlivost tzv. SAC (SAC – spindle assembly checkpoint)

=> akumulace aneuploidních

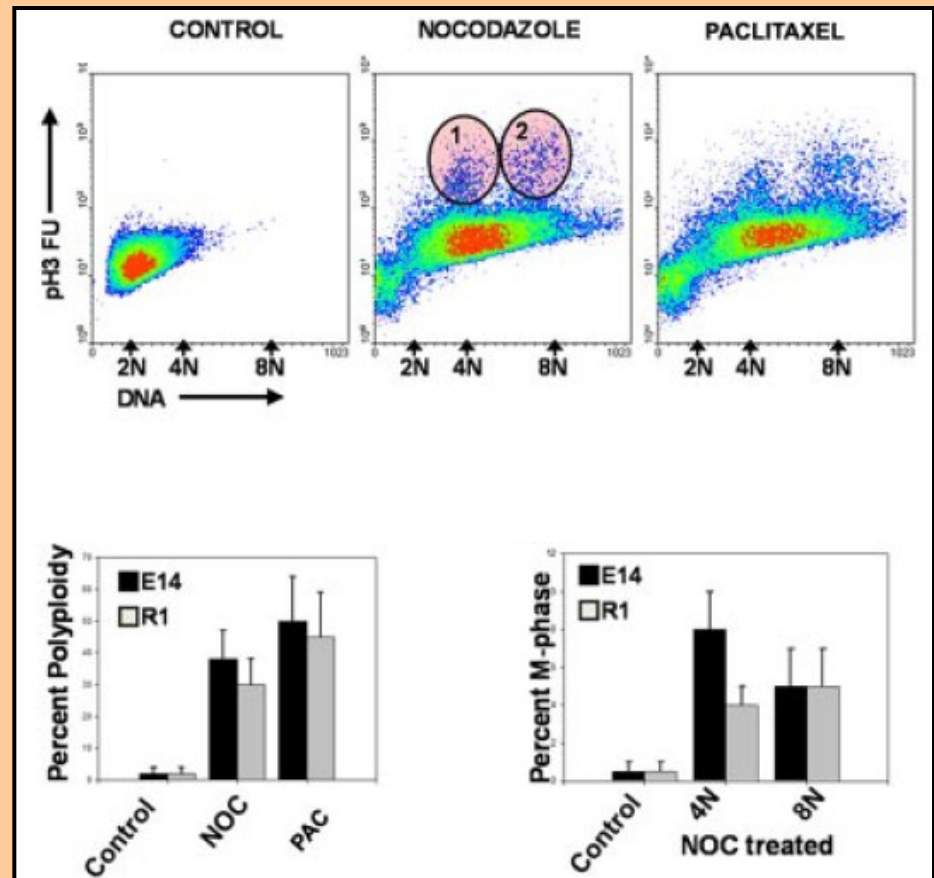
a polyploidních buněk v populaci

- indukci diferenciace lze tyto buňky částečně eliminovat (apoptóza)

- tetraploidní buňky (blastomery) mohou tvořit jen trofoblast

=> G<sub>1</sub> MTA/tetraploidy checkpoint

=> využití při tvorbě embryí plně ES původu



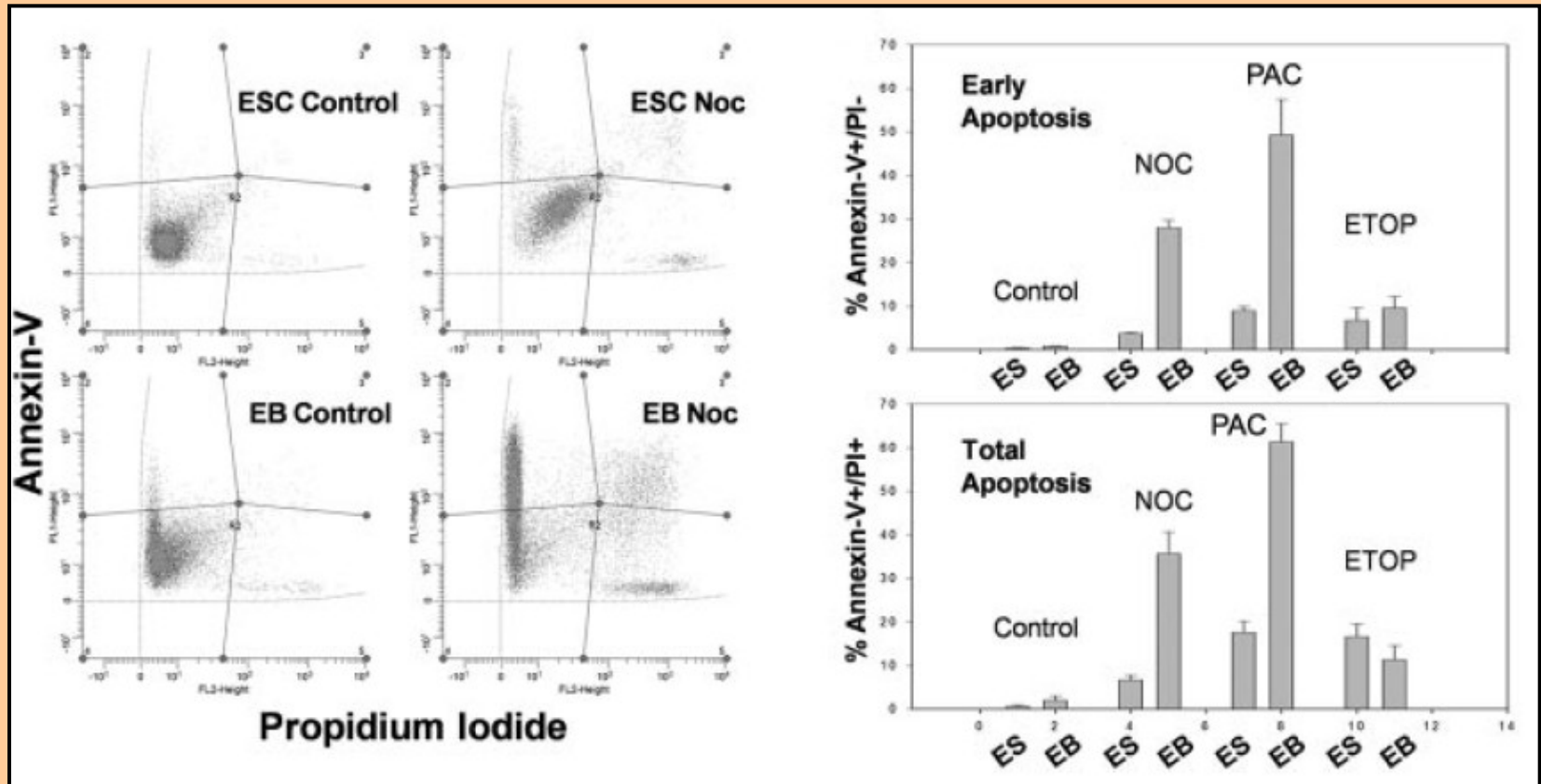
# Příklad nárůstu apoptózy s diferenciací a poškozeným mitotickým aparátem

ES – embryonální kmenové buňky

EB – ES diferencovanou formou embryoidních tělísek

Noc/NOC – nocodazol

PAC - paclitaxel



## Primordiální zárodečné buňky – PGC (primordial germ cell)

- PGC se u myši objevují již 6 dpc, pravděpodobně je jejich vznik indukovaný v průběhu gastrulace, a to vnějšími signály, zejména BMP (na rozdíl od žab, *Drosophily* a *C. elegans*).
- 6 – 7.5 dpc migrují vně vlastní embrya, později (8.5 dpc <) migrují podél zadního střeva embrya do vytvořené zárodečné lišty.
- PGC zanikají po usazení v zárodečné liště (10-13 dpc u myši), stávají se z nich zárodečné buňky. Prodělají ještě 2-3 mitózy a u samců vznikají prospermatogonie zastavené v G0/G1 fázi mitózy. U samic vstupují do meiotické profáze (obojí > 12.5 dpc).
- Podobně jako ICM a ES buňky mají vysokou hladinu alkalické fosfatázy (ale TNAP ne GCAP/TNAP), Oct4, Nanog, ..
- Významné jsou zdá se zejména *Stella* a *Fragilis*.
- PGC nejsou pluripotentní!
- PGC mají omezený počet dělení, u myši napočítáno kolem 1000 buněk, rozdíly v závislosti na imbretní linii

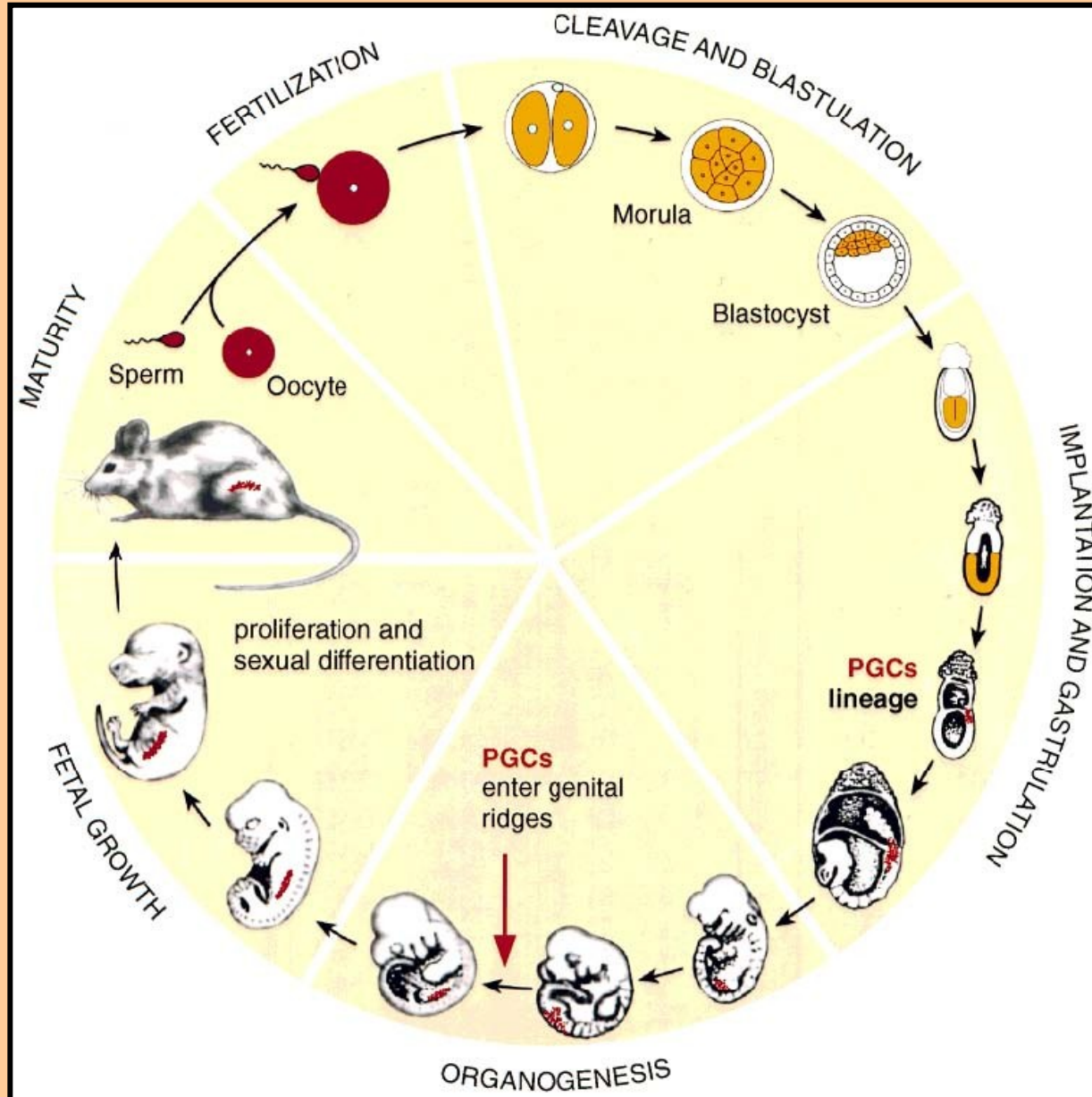
### Stella

Také u buněk ES a epiblastu, později jen u PGC, podílí se na udržení jejich fenotypu, po jejich usazení v zárodečné liště jeho exprese vymizí.

### Fragilis

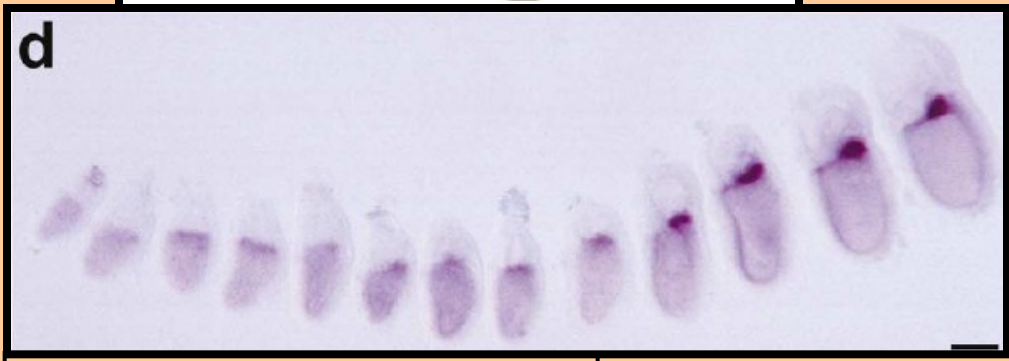
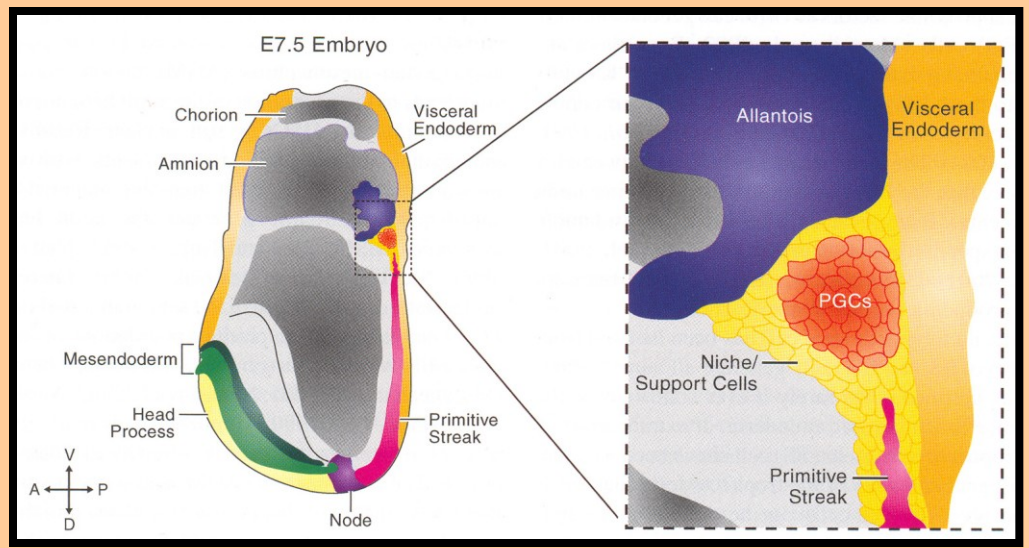
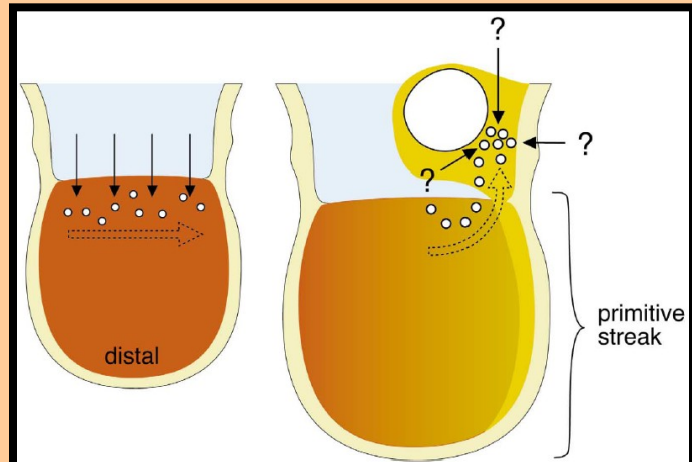
Z rodiny IFN indukovaných genů, je silně exprimován při formování PGC, s jejich migrací jeho exprese klesá.

# Cyklus zárodečných buněk u myši



# PGC

## primordiální zárodečné buňky

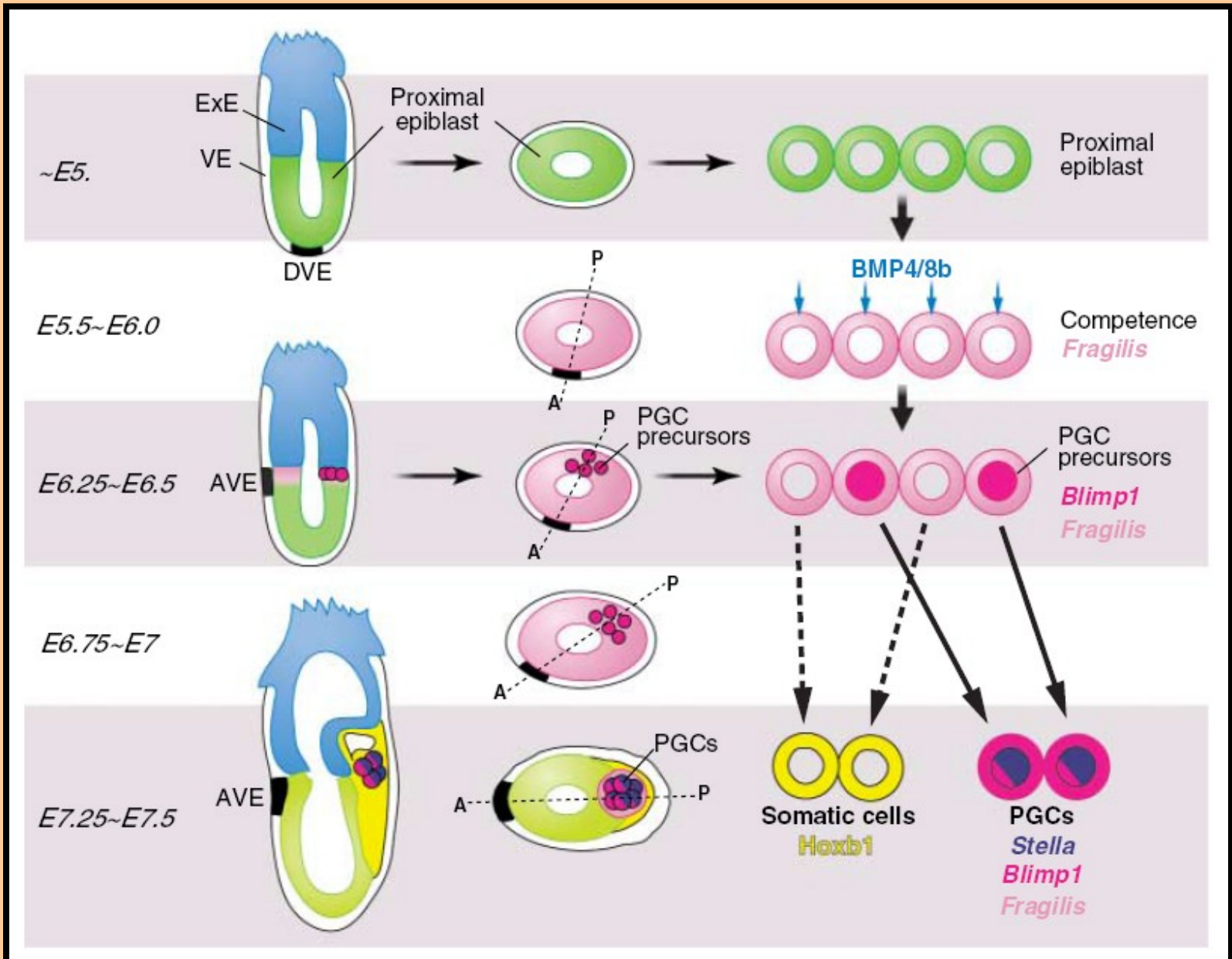


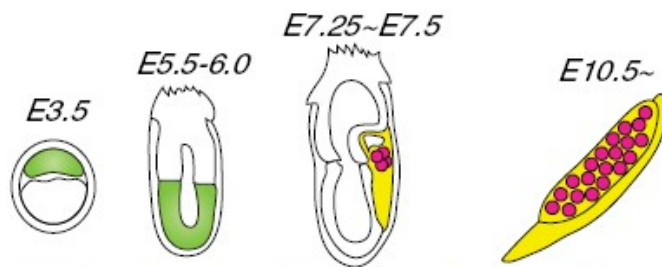
Expresse Fragilis mezi 6 – 7 dpc



Expresse Oct-4 v PGC usazených v zárodečné liště

# Mechanismus vzniku PGC



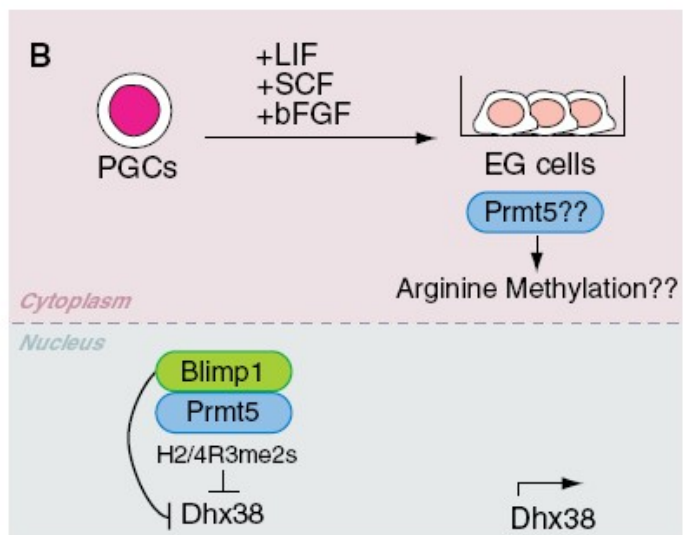
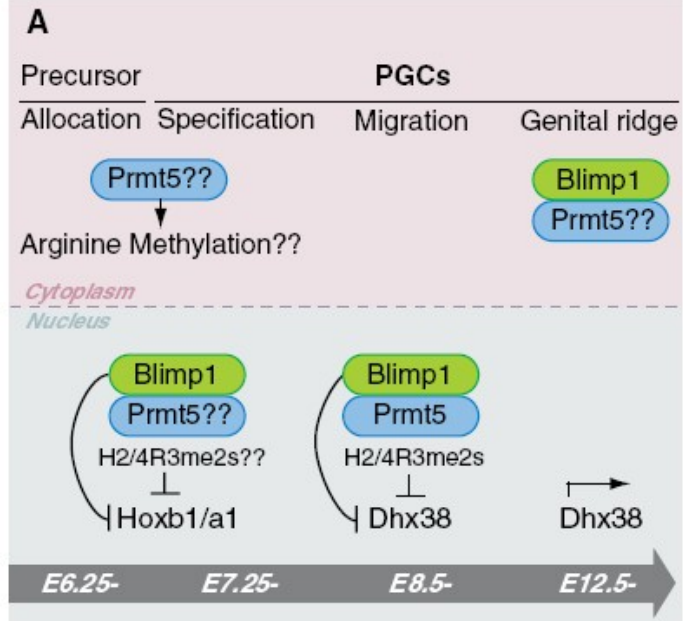


	E3.5	E5.5-6.0	E7.25-E7.5	E7.25-E7.5	E10.5-	E10.5-	
<b>Pluripotent</b>	<i>Oct4</i>	+	+	+	-	+	-
	<i>Sox2</i>	+	+/-	+	-	+	+/-
	<i>Nanog</i>	+	-	+	-	+	-
<b>Germ cell-enriched</b>	<i>Blimp1</i>	-	-	+	-	+	+/-
	<i>Stella</i>	+	-	+	-	+	-
	<i>Fragilis</i>	+	+/-	+	+/-	+	+/-
	<i>Nanos3</i>	-	-	+	-	+	-
	<i>Dnd</i>	-?	-?	+	+/-	+	+/-
	<i>Dazl</i>	+?	-?	-	-	+	-
	<i>Mvh</i>	-	-	-	-	+	-
<b>Somatic</b>	<i>Hoxa1</i>	-	-	-	+	-	+/-
	<i>Hoxb1</i>	-	-	-	+	-	+/-
	<i>T</i>	-	+/-	-	+	-	+/-

+/- The expression depends on cells, regions or tissues

? Data are preliminary

<b>Epigenetic</b>	H3K4me2/3	+++	+
	H3K9me2	+	+++
	H3K27me3	+++	+
	5meC	+	+++

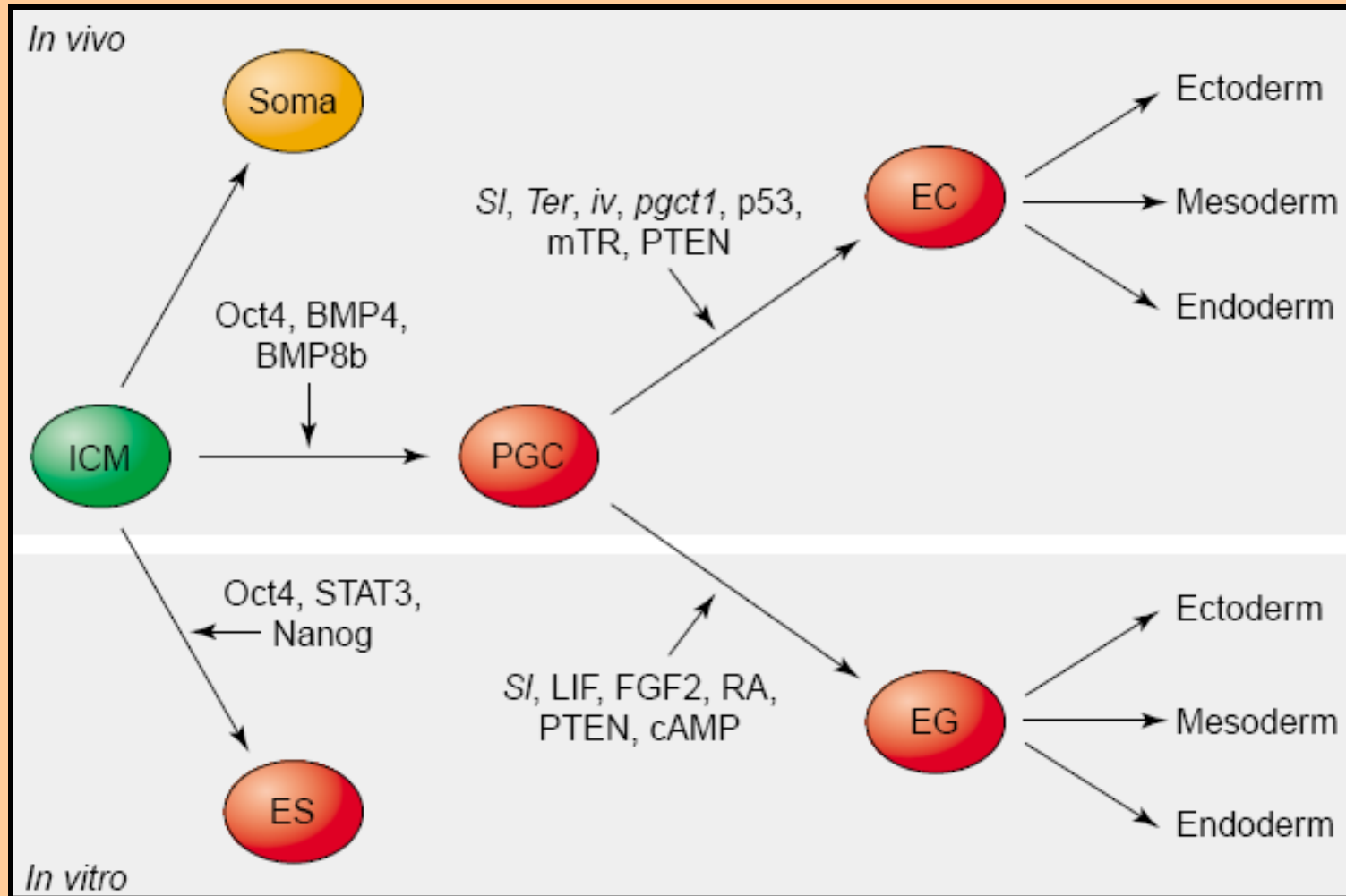




## Embryonální zárodečné buňky – EGC (Embryonic germ cells)

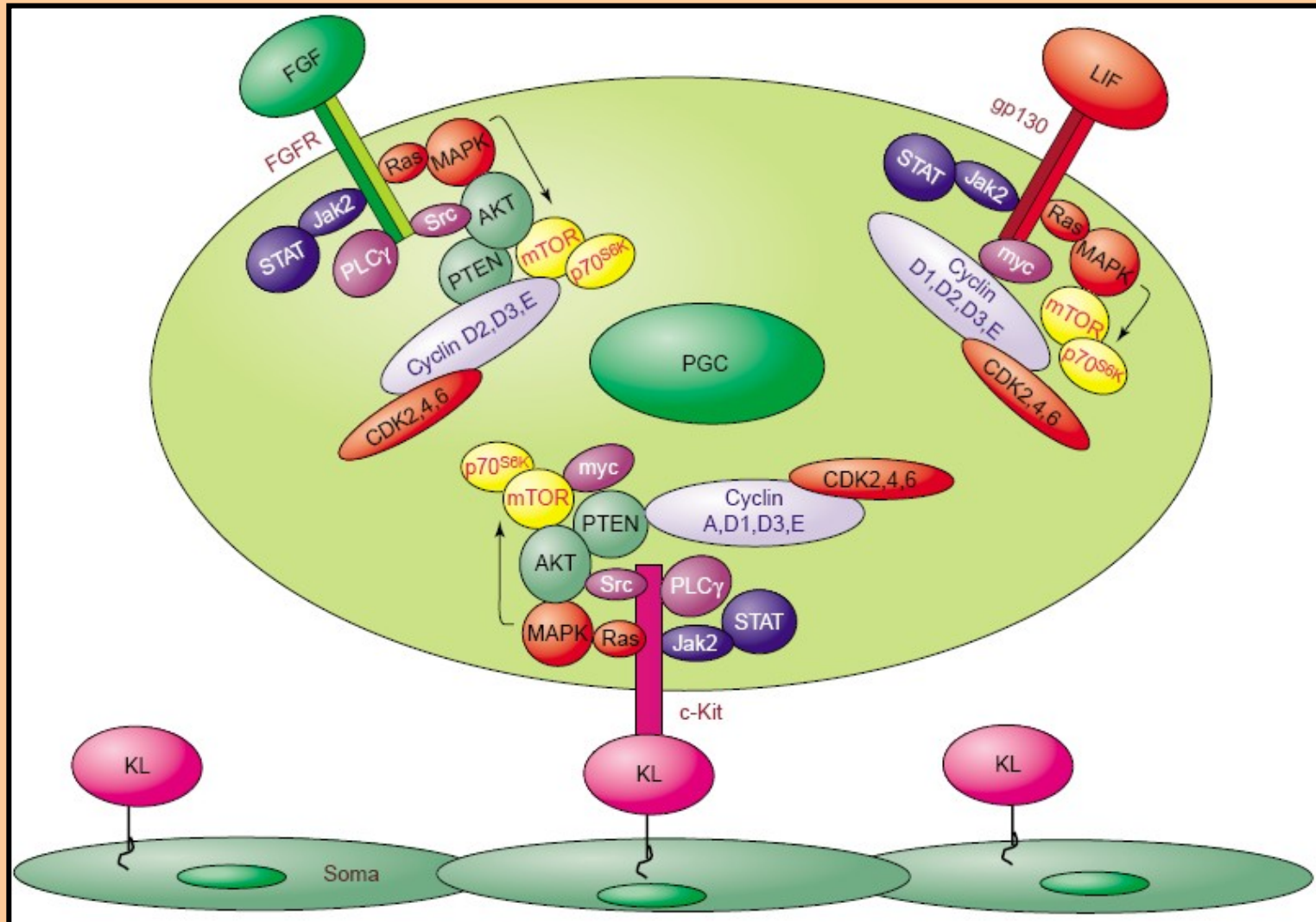
- EGC jsou odvozeny z primordiálních zárodečných buněk (PGC – primordial germ cell).
- Podobně jako ES buňky je lze expandovat *in vitro*, a jsou pluripotentní, jak dokazuje jejich schopnost diferencovat do buněk všech tří zárodečných listů jak *in vitro* (EB), tak *in vivo* (chiméry a teratomy).
- Z epigenetického pohledu (DNA metylace) jsou však více podobné PGC než ES buňkám
- Rozdíly v metylaci DNA se týkají zejména imprintovaných genů v závislosti na pohlaví, u EGC izolovaných z pozdějších embryonálních stádií se tento rozdíl zmenšuje. Tyto „imprinting-free“ PGC, však již netvoří zdravé chimerické jedince.
- U myší lze EGC izolovat z PGC mezi 8.5 – 12.5 dpc, později to již nelze
- PGC a následně EGC lze izolovat *in vitro* z ES buněk (lidských i myších)
- m/hEGC jsou závislé na LIF, během časně kultivace i na FGF2 a Stem cell faktoru (SCF) (+ feeder & FCS/SR).
- Exprimují podobné markery jako ES buňky, lidské EGC jsou fenotypem více podobné mES než hES (morfologie + exprese SSEA-1!; u hES se SSEA-1 exprimuje až s jejich diferenciací)

# Vztahy mezi pluripotentními buňkami a některé klíčové regulační komponenty těchto buněk

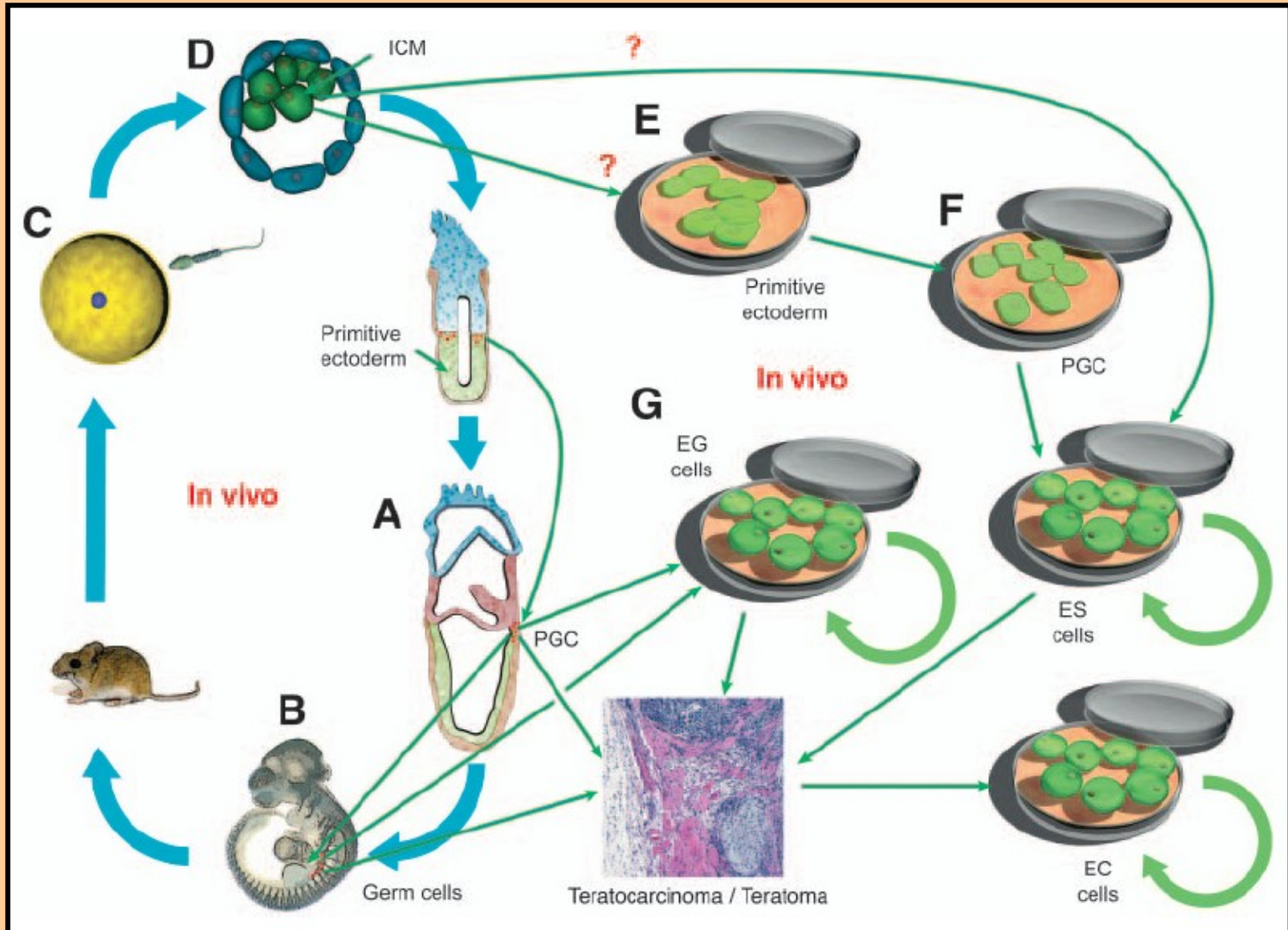


*Sl* – Steel locus, *Ter* – Teratoma locus, *pgct1* – primordial germ cell tumor susceptibility locus, PTEN – Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, mTR (mTOR) - serine-threonine kinase mammalian target of rapamycin

# Schema předpokládaného zapojení FGF, LIF a KL (c-Kit ligand = Steel factor (SF)/ stem cell factor (SCF) v regulaci sel-renewal EG buněk



# Není původ ES buněk v PGC ???



## Není původ ES buněk v PGC ???

Gene	Species	ES	EGC	LGC	ICM	PE
<i>Pou5f1</i> (Pesce and Scholer, 2001)	M	+	+	+	+	+
<i>Nanog</i> (Chambers et al., 2003)	M	+	+	+	+	+
<i>Dppa3</i> (Saitou et al., 2002)	M	+	+	+	+	+
<i>Ifitm3</i> (Saitou et al., 2002)	M	+	+	+	+	+
<i>Kit</i> (Horie et al., 1991)	M	+	+	+	-	N/D
<i>DAZL</i> (Clark et al., 2004)	H	+	+	+	-	N/D
<i>Ddx4</i> (Toyooka et al., 2003)	M	-	-	+	-	-
<i>Akp2</i> (Chiquoine, 1954)	M	+	+	+	+	+
<i>Zfp42</i> (Rogers et al., 1991)	M	+	N/D	N/D	+	-
<i>Fgf5</i> (Haub and Goldfarb, 1991; Hebert et al., 1991)	M	-	N/D	N/D	-	+
<i>Gbx1</i> (Chapman et al., 1997)	M	+	N/D	N/D	+	-

Zwaka, 2005

M- myš; H –člověk; N/D – netestováno; ES – embryonální kmenové buňky; EGC – časné primordiální zárodečné buňky (!); LGC – pozdní primordiální zárodečné buňky; ICM – vnitřní buněčná masa; PE – primitivní ecdoderm/epiblast

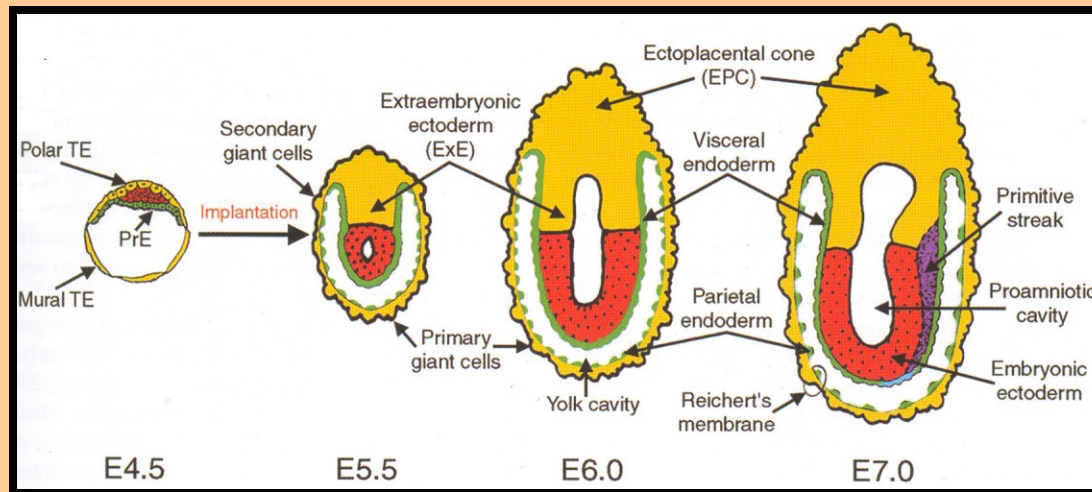
## **Kmenové buňky teratomu / teratokarcinomu - ECC Embryonální nádorové buňky (Embryonal carcinoma cells)**

- Izolované rozkultivováním a klonální selekcí buněk teratomu / teratokarcinomu
- Lidské spontálně, myší indukované transplantací časných embryonálních buněk do dobře vyživované tkáně (varlata, ledviná kapsa, břišní dutina,...), musí být imunotolerance
- Podobné vlastnosti jako ES buňky, ale méně závislé na specifických růstových faktorech (+)
- Tvoří také chiméry, ale nedokonalé, většinou hynou v průběhu embryogeneze (-)
- Většinou snížená schopnost pluripotence jak *in vivo*, tak *in vitro* (-)
- Obecně nestabilní genotyp a časté aneuploidie (-)
- Modelové studie genetické nestability a diferenciací, vzniku teratomů
- Levnější alternativa k ES buňkám, lepší stabilita v experimentálních systémech jak ES (+)

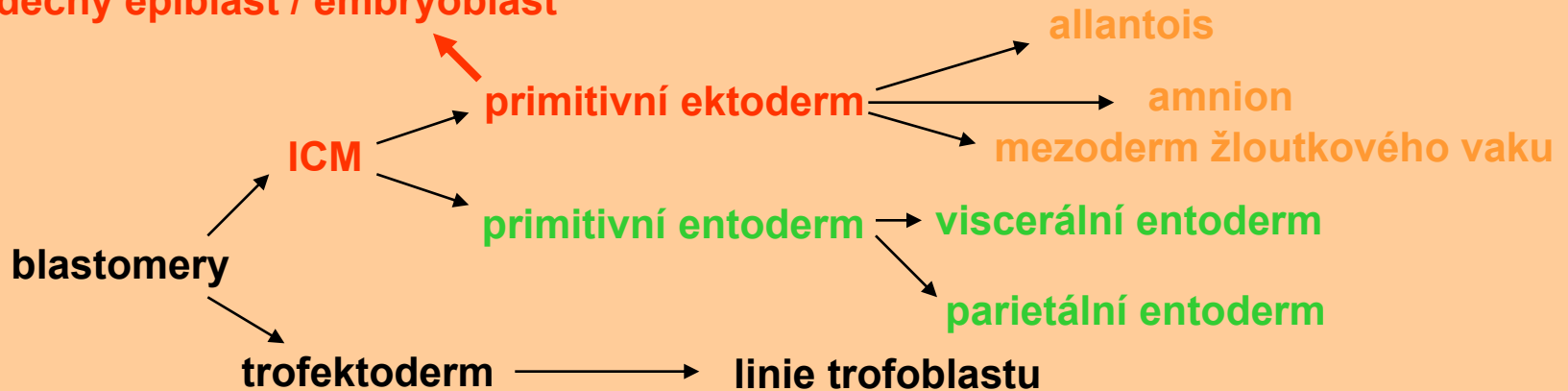
# Kmenové buňky extraembryonálních tkání

**A) Kmenové buňky trofektodermu (trofoblastu)**  
FGF-dependent (FGF4, FGFR2); *Cdx2*, *Eomes*, *Errβ*

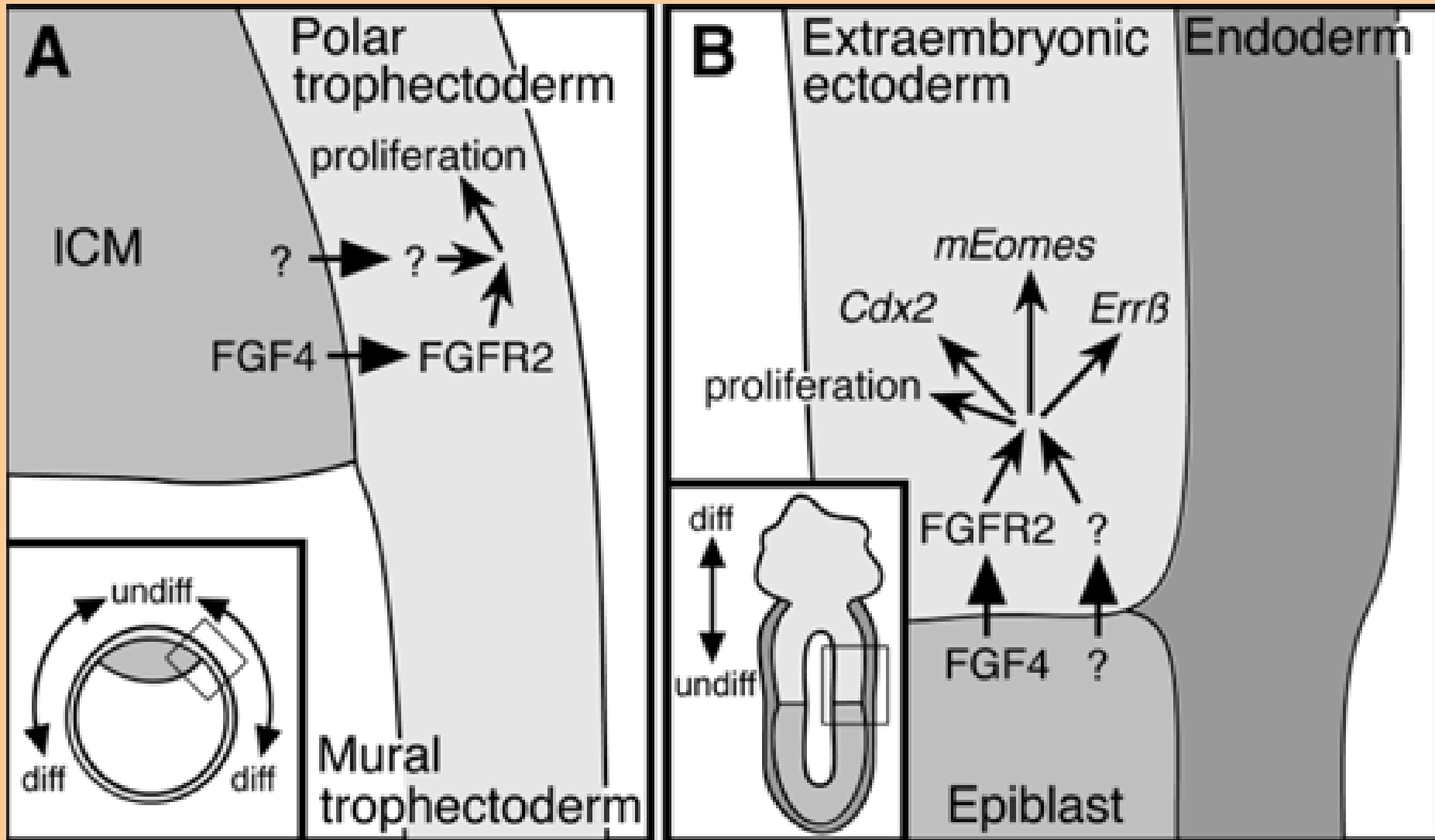
**B) Kmenové buňky primitivního entodermu (hypoblastu)**  
 XEN – buňky extraembryonálního entodermu



**zárodečný epiblast / embryoblast**

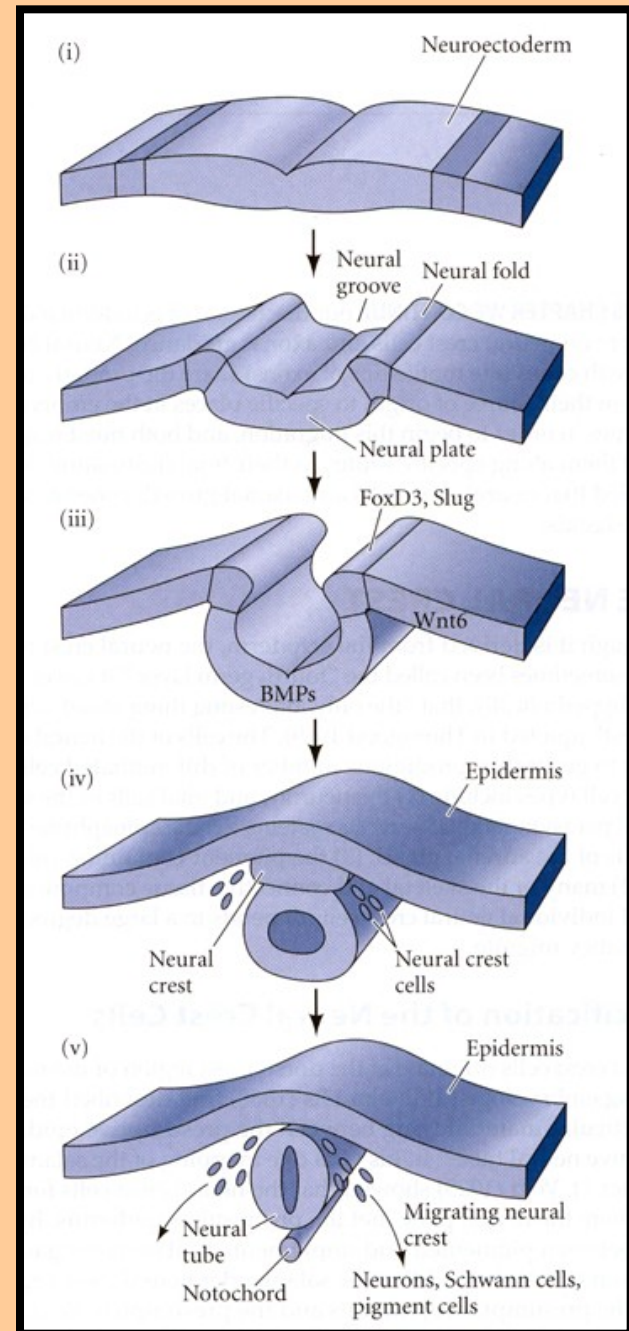
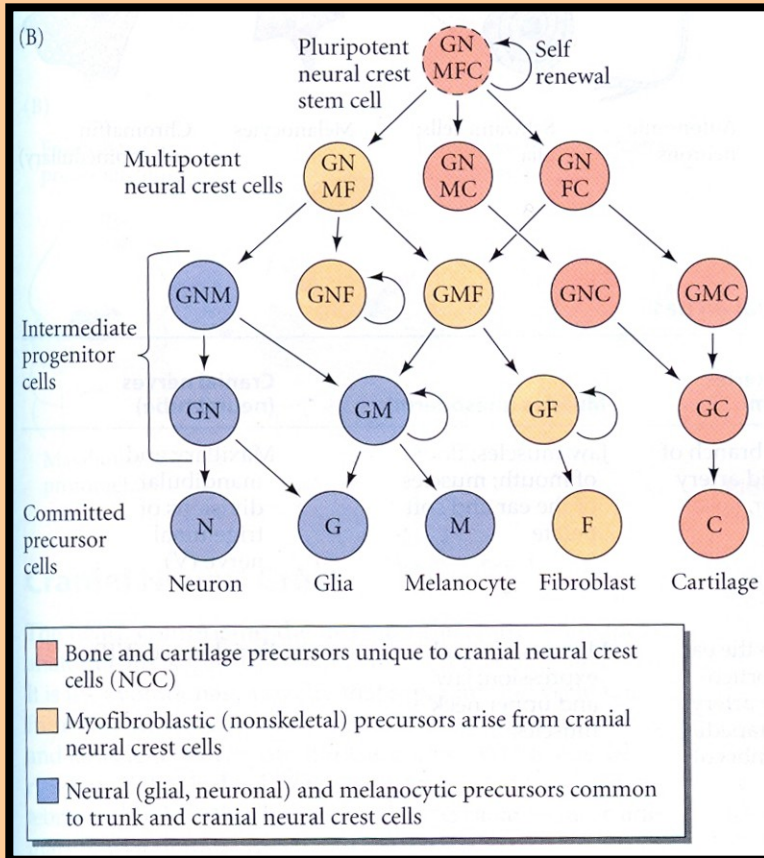


# Regulace kmenových buněk trofoblastu signály z epiblastu





# Neurální lišta a kmenové buňky neurální lišty



# Experiment potvrzující pluripotenci buněk neurální lišty

