

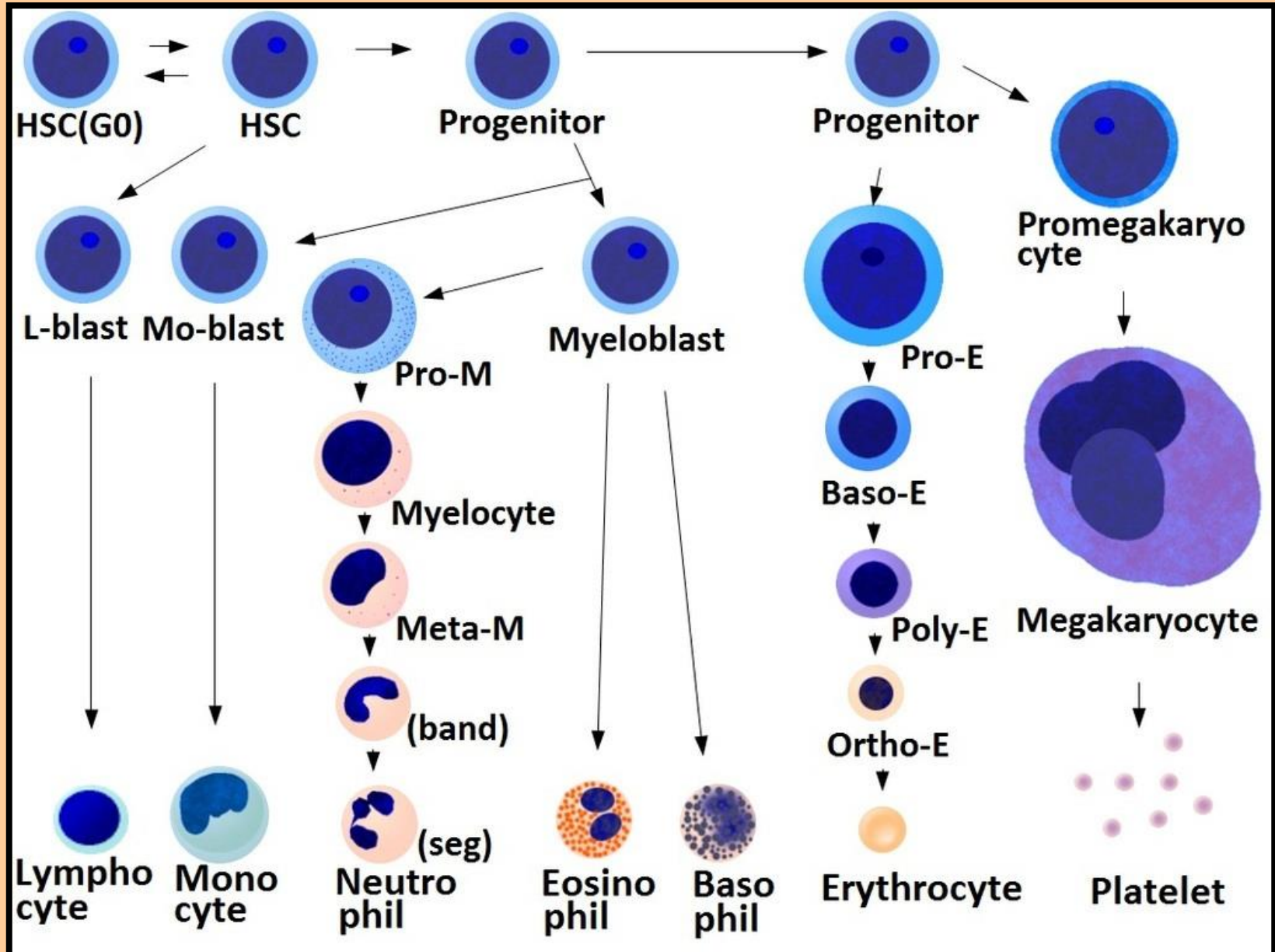
HEMATOPOÉZA - HEMATOPOETICKÉ KMENOVÉ BUŇKY

- HSC (hematopoietic stem cells)

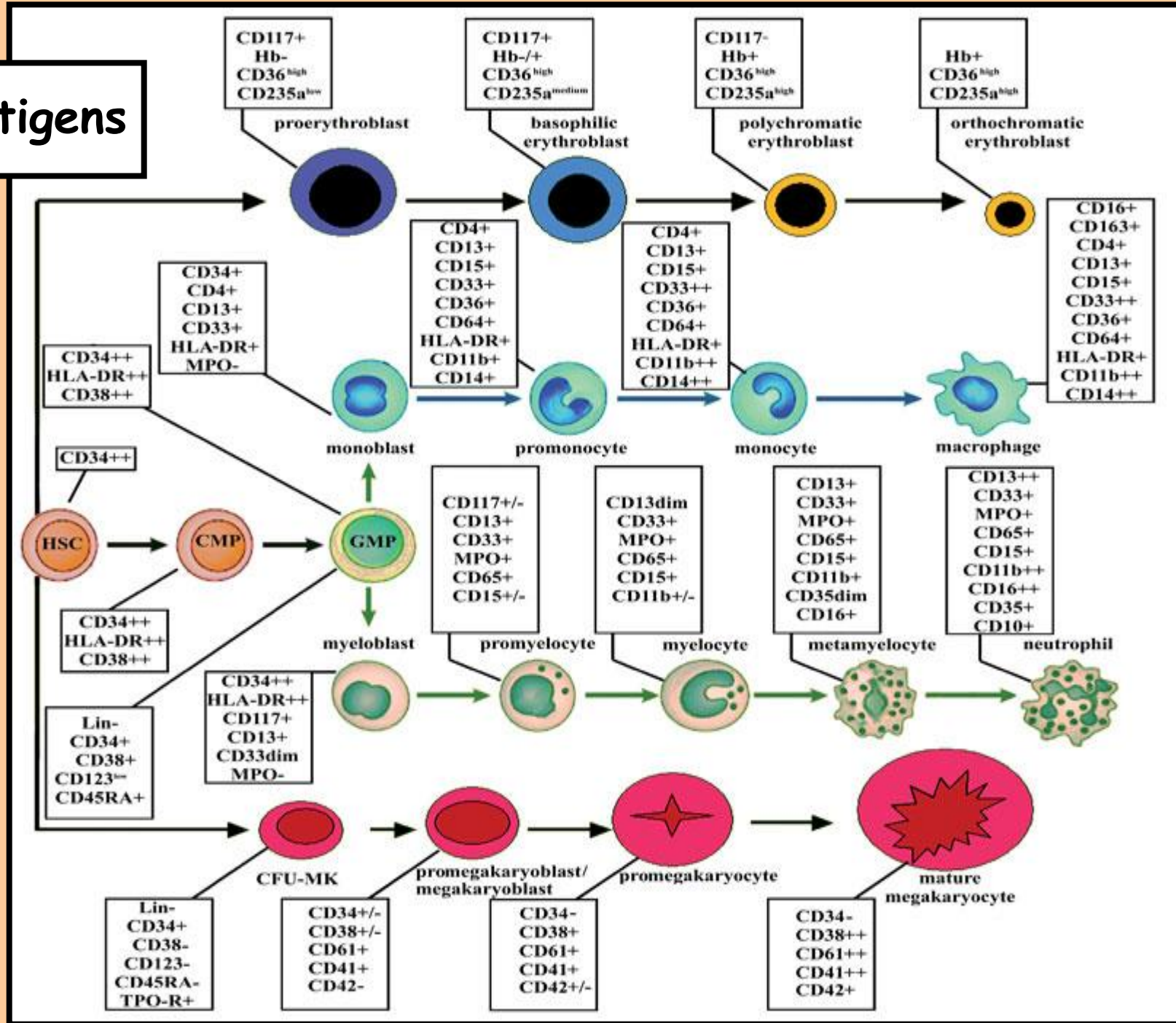
- Hematopoéza je v současné době zřejmě nejlépe prostudovaná diferenciační dráha s nejdokonalejším fenotypovým rozlišením jednotlivých buněčných stádií buněk založeno na tzv. CD (cluster determinants) antigeny.
- Jednotlivé diferenciační dráhy jsou často majoritně závislé na jediném cytokinu (kolonie stimulujícím faktoru - CSF; např. G-CSF, faktor stimulující tvorbu zejména granulocytů)
- V průběhu ontogeneze je hematopoéza realizována jedinečným způsobem (časově a prostorově, viz. níže), což dobře umožňuje i studium rozdílů mezi embryonálními a adultními somatickými kmenovými buňkami. Každopádně již v průběhu embryonálního vývoje vznikají jisté typy populací ve smyslu „fakultativních kmenových buněk“ (některé tkáňové makrofágy, mikroglie, různé typy lymfocytů).
- HSC vzniklé ve žloutkovém vaku také migrují do oblasti AGM a do jater, kde dávají vznik adultním HSC (Samokhvalov, 2007)

Hematopoetické kmenové buňky – HSCs (hematopoietic stem cells)

(Hematopoéza)



CD antigens



Rozlišujeme: **LT-HSC** (long-term HSC) - schopné opakovaně kompletní obnovy hematopoézy (*vyžadují osteoblasty*), **Kostní dřeň** - **<0.01% buněk**
~ **98 % v G₀ fázi buněčného cyklu**

ST-HSC (short-term HSC) - schopné jen krátkodobé obnovy hematopoézy (*vyžadují endotelie - vaskulární niche*) ~ **1- 3% proliferujících**

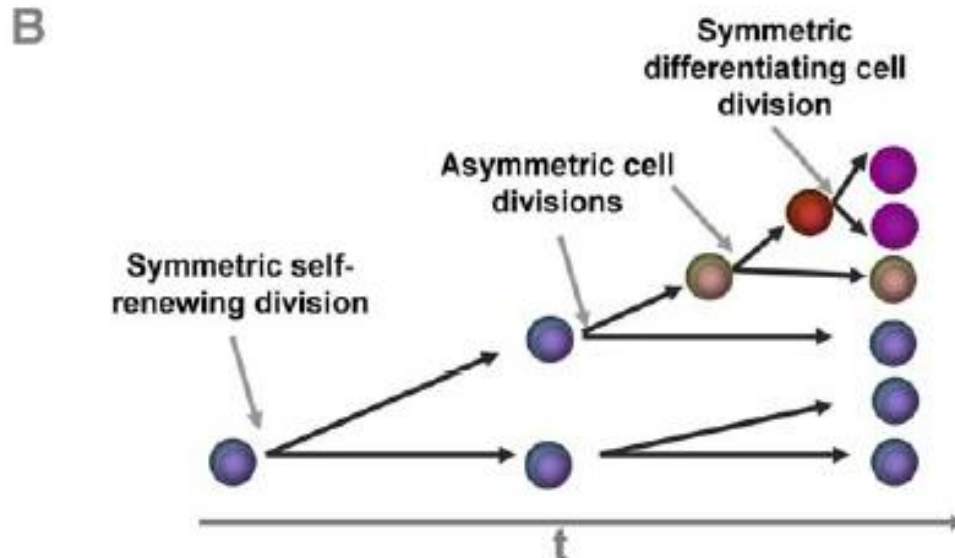
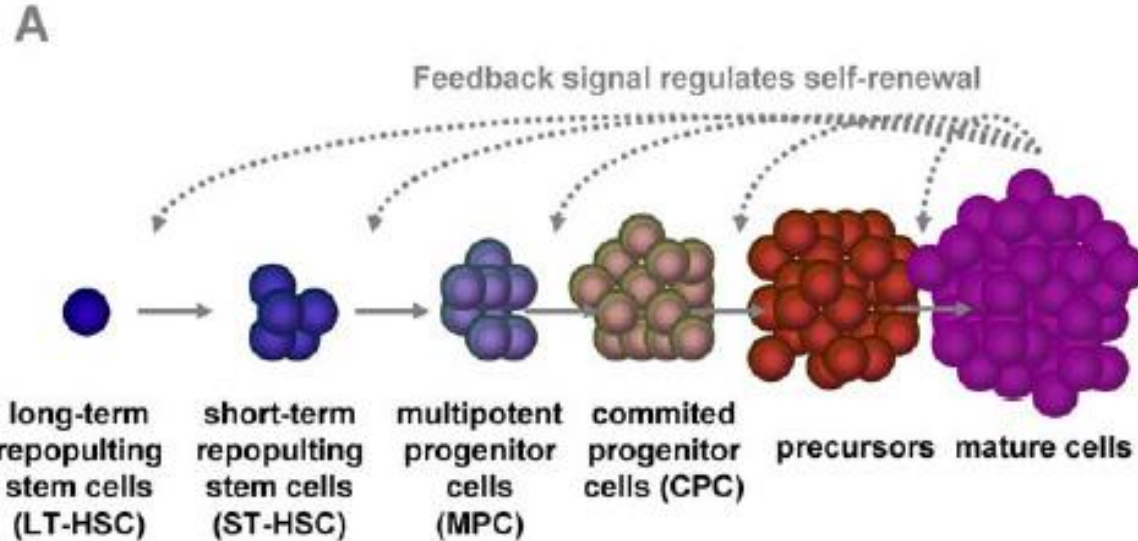
(aktuální X potencionální (proliferující) kmenová buňka)

Harrison et al. (1979): transplantoval myším opakovaně identický štěp HSC déle jak 8 let

- > výrazné překročení délky života myši!!!

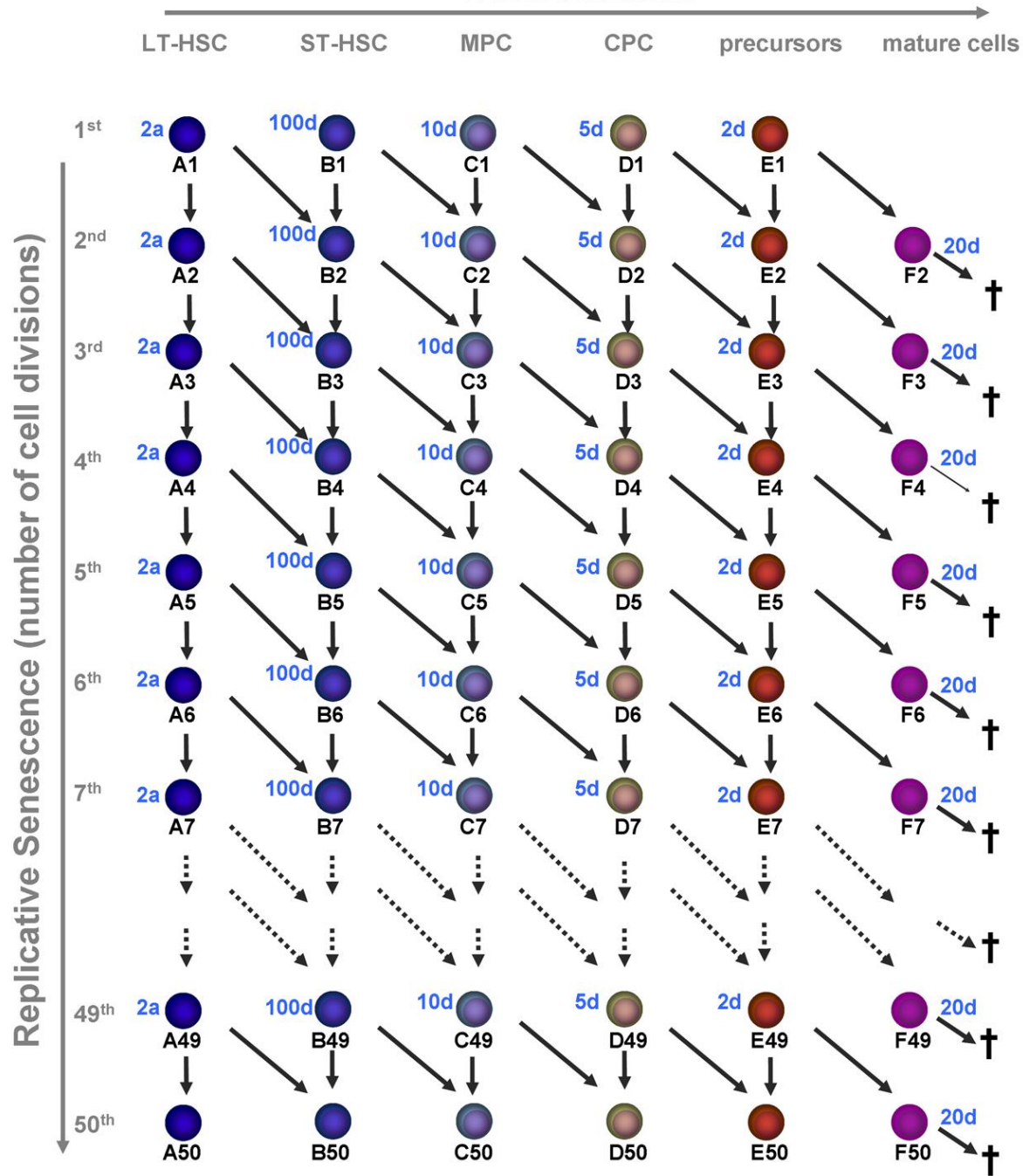
- > **OPRAVDOVÉ ADULTNÍ KMENOVÉ BUŇKY!**

Dělení hematopoietických buněk



Množství potomků reguluje intenzitu dělení mateřských buněk, hlavní úloha růstových faktorů.

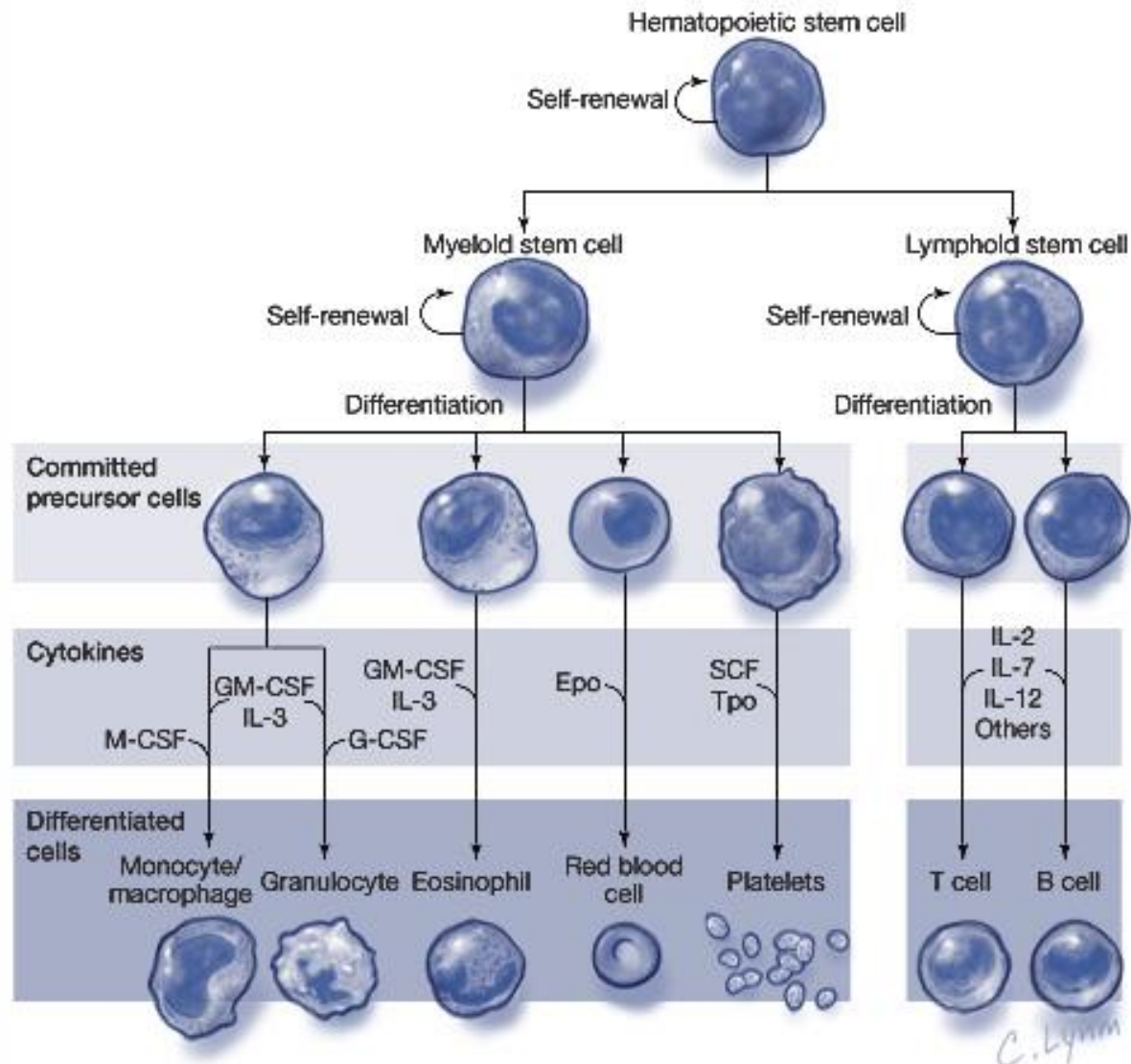
Differentiation



Doba existence buněk
v jednotlivých
vývojových stádiích
hematopoézy

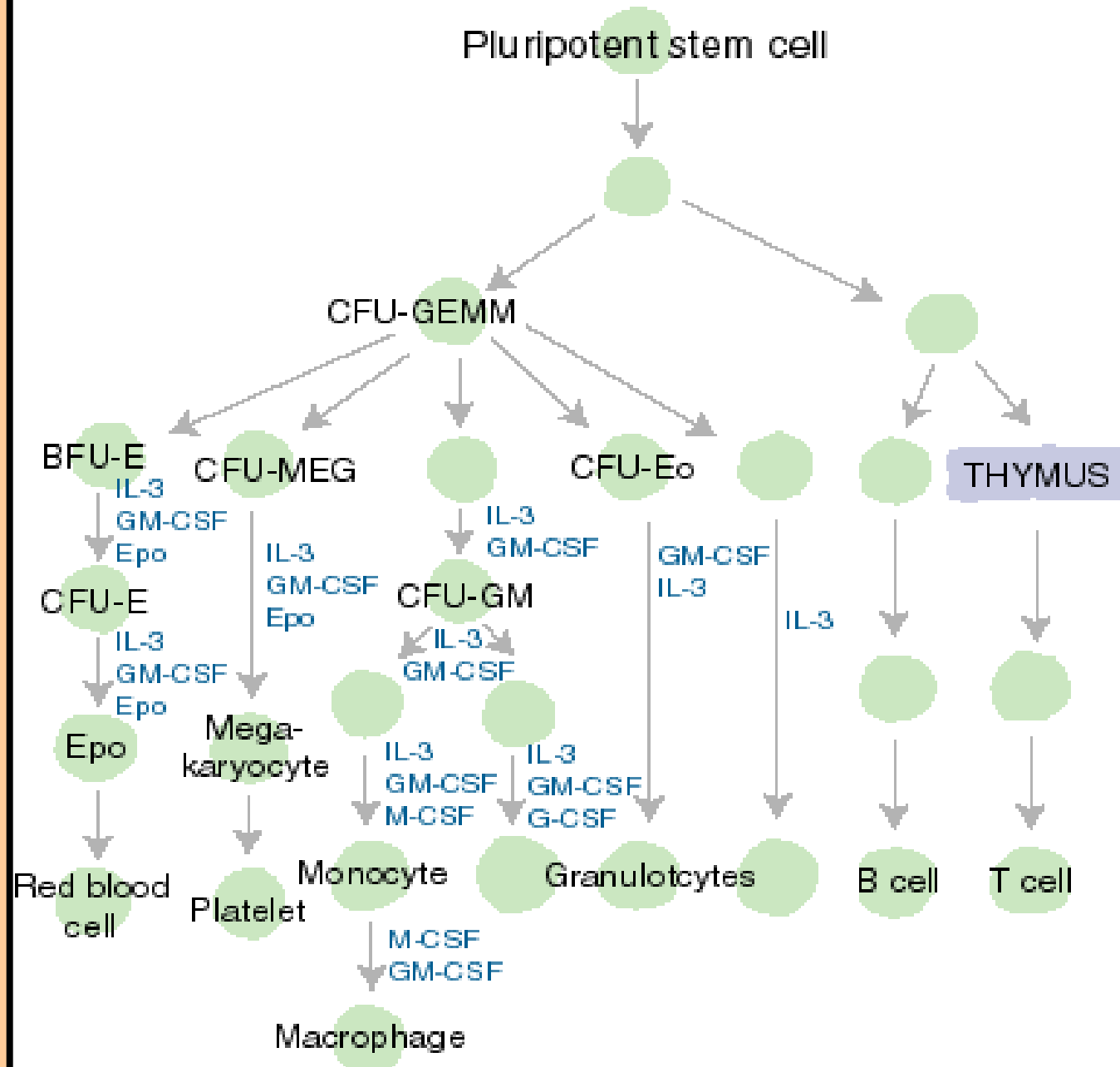
(Rychlost dělení není ukázána!)

Hematopoietic Stem Cell Differentiation



IL=interleukin
 GM-CSF=granulocyte/macrophage colony-stimulating factor
 G-CSF=granulocyte colony-stimulating factor
 M-CSF=monocyte colony-stimulating factor
 Epo=erythropoietin
 SCF=stem cell factor
 Tpo=thrombopoietin

Hematopoiesis

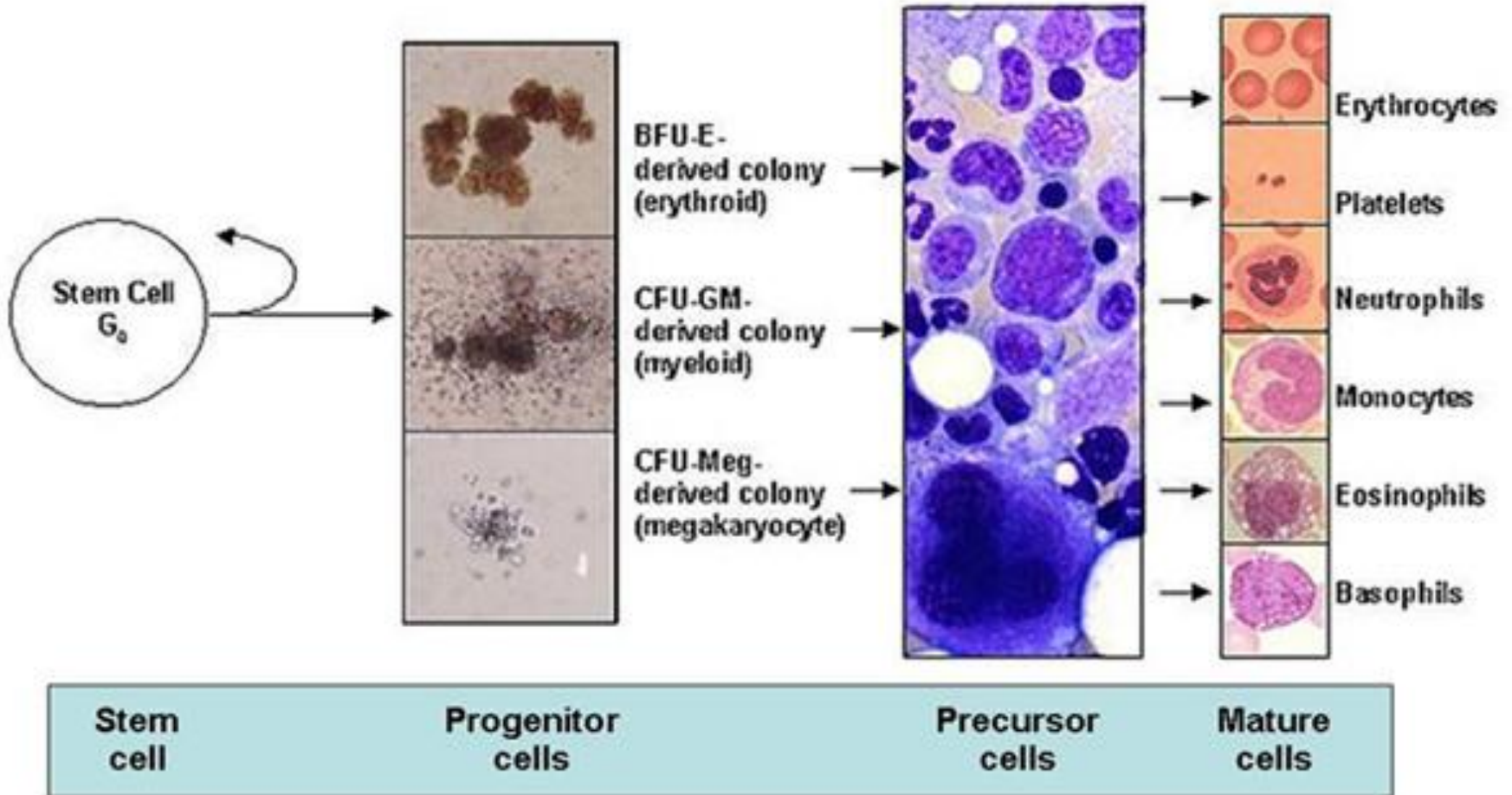


*pomalou se dělicí buňky
velký jádro-plasmový poměr*

*rychle se dělicí buňky
velký jádro-plasmový poměr
tvorba specifických kolonií*

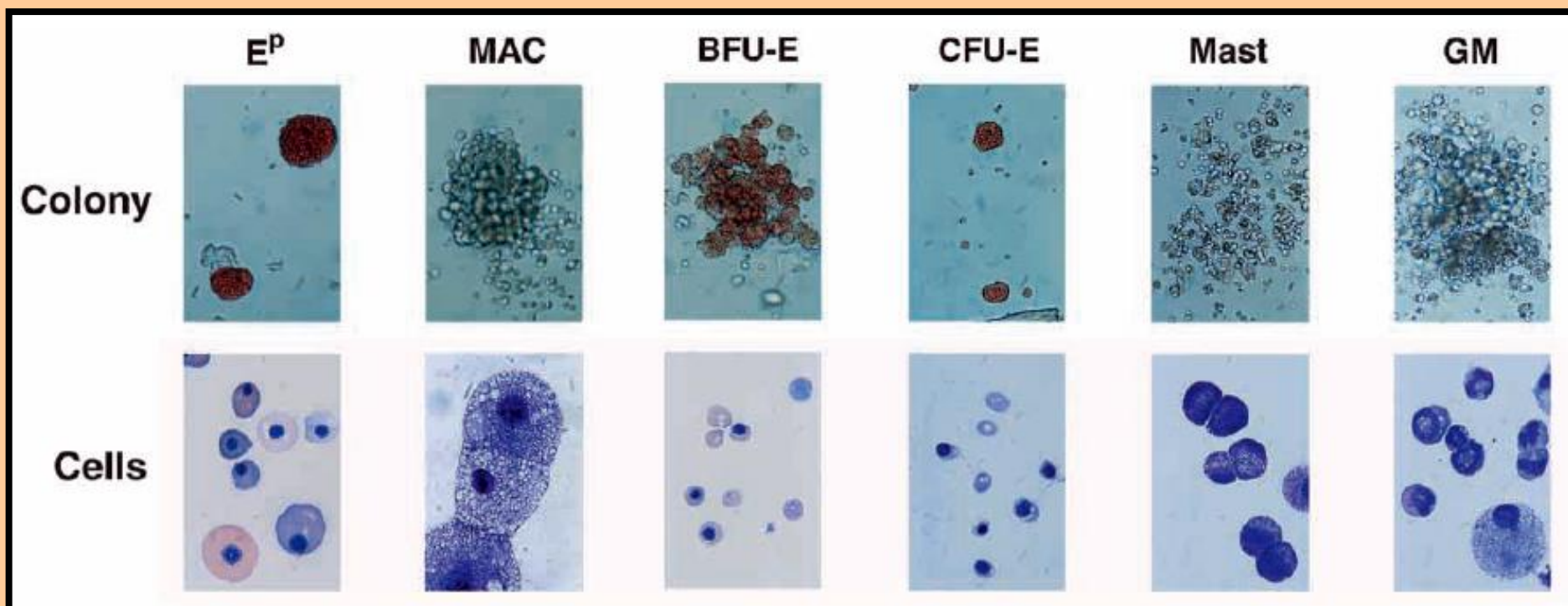
*ukončení proliferace
stále velký jádro plasmový poměr
velké rozdíly ve velikosti*

*nedělicí se
terminálně diferencované buňky
cytoplasma převáží nad jádrem*



Příklad kolonií hematopoézy v *in vitro* experimentu

Palis 1999

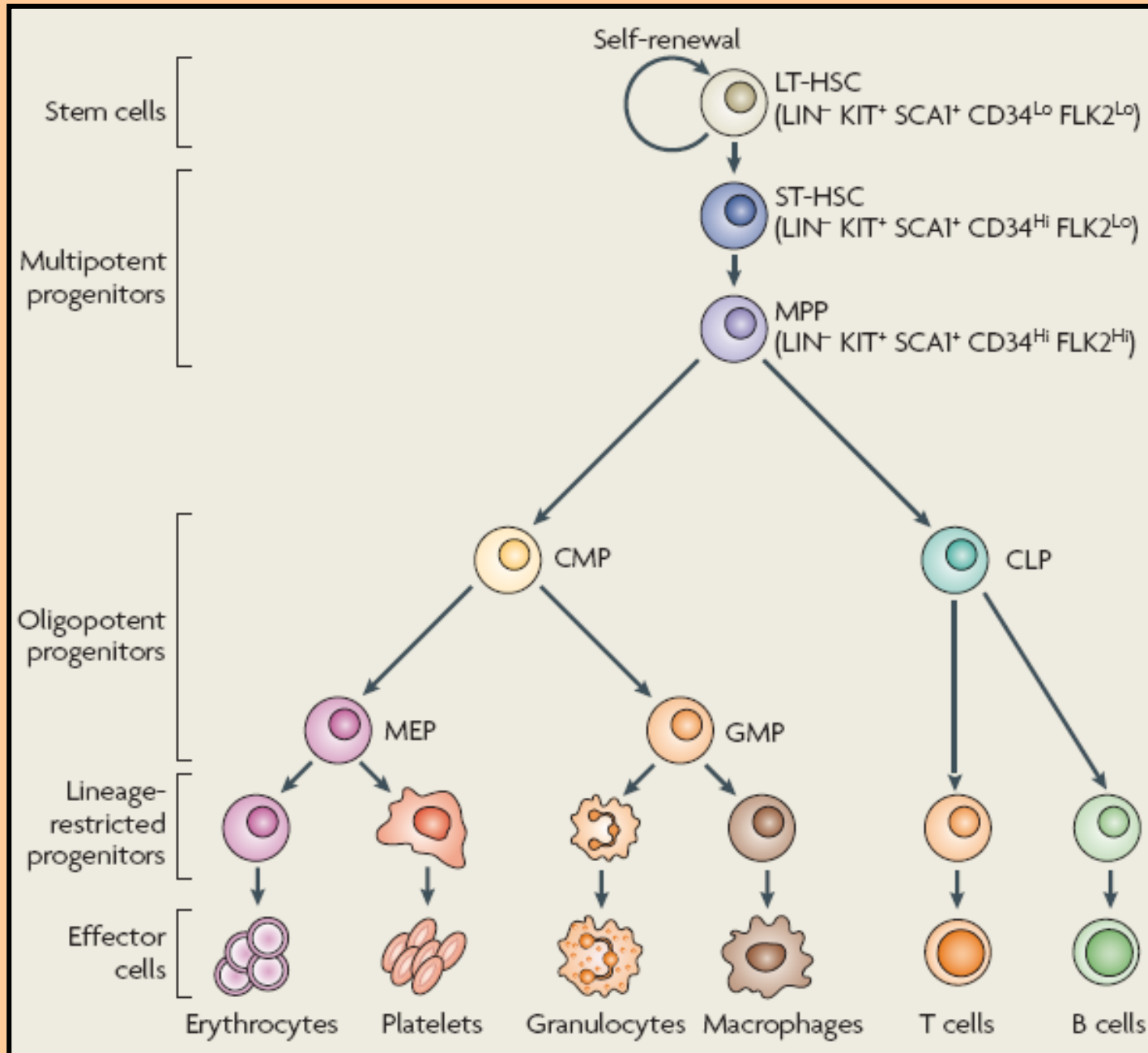


Ep - primitivní erytropoéza, MAC - primitivní makrofágy,
BFU-E - (Burst-forming unit eryteroidní) z fetálních jater,
GM - granulocytární-makrofágová kolonie

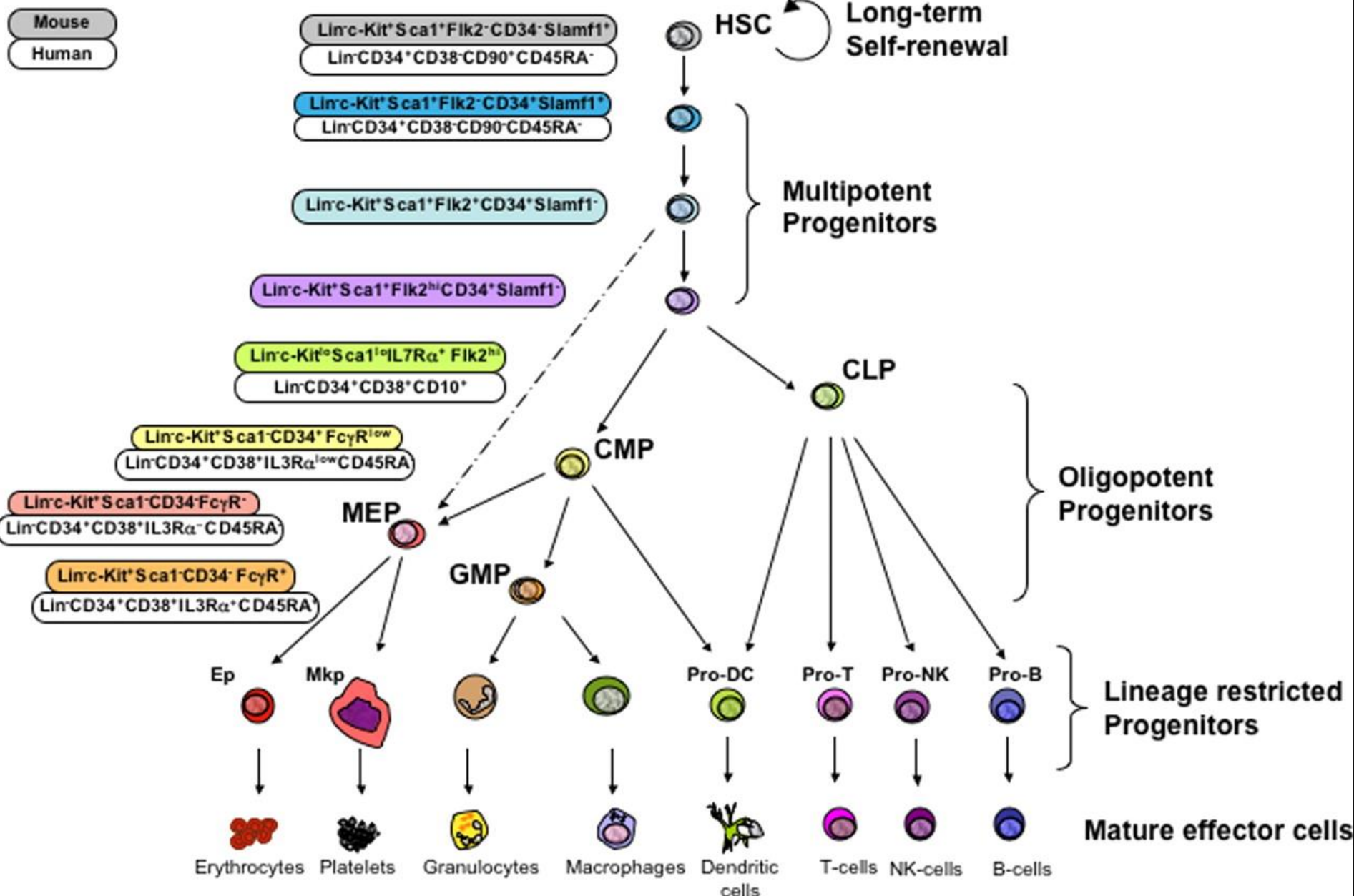
Fenotyp HSC (mouse)

<i>antigen</i>	HSC	Myeloid SC	Lymphoid SC
CD10 (CALLA)	-	-	+
CD33 (Sialoadhesin)	-	+	-
CD34 (L-selectinR)	+ (-)	+	+
CD38 (ecto-ADP-ribosyl cyclase)	-	-	+
CD90 (Thy1)	+	-	+
CD110 (Trombopoietin receptor)	+	+	-
CD111 (Nectin1)	-	+	-
CD112 (Nectin2)	-	+	-
CD117 (c-Kit, SCFR)	+	+	+
CD123 (α řetězec IL-3R)	+	+	-
CD124 (IL-4R/IL-13R)	-	-	+
CD127 (α řetězec IL-7R)	-	-	+
CDw131 (β řetězec IL-3R/IL-5/GM-CSF)	-	+	-
CD133 (Ac133)	-	+	-
CD135 (Flt3/Flk2)	+	-	-
CD173 (krevní skupina H typ 2)	-	+	-
CD174 (Lewis Y)	-	+	-
CD176 (Thomson-Friedenreich antigen)	-	+	-
CD227 (MUC-1)	-	+	-
CD228 (Melanotransferrin)	-	+	+
<u>CD243 (MDR-1)</u>	+	-	-

Schema hematopoézy a fenotyp aktuálních a potencionálních HSC - mouse



Hematopoietic Hierarchy



Critical transcription factors for blood development

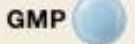
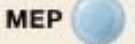
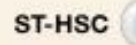
Pluripotent stem cells

Runx-1
Scf/tal-1
Lmo-2
Mll
Tel
Bmi-1
Gfi-1
GATA-2

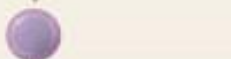
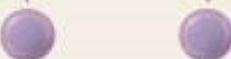
Stem cell class
Required for production, survival, or self-renewal of HSCs



Multipotent progenitors



Committed precursors



Mature cells

RBC

Megakaryocyte

Mast cell

Eosinophil

Neutrophil

Monocyte/Macrophage

B lymphocyte

T lymphocyte

GATA-1
FOG-1
Gfi-1b
EKLF

Fli-1
Nf-E2



GATA-1
GATA-2
FOG-1

GATA-1
Gfi-1b

GATA-2

GATA-1

GATA-1

C/EBP ϵ

PU.1

Gfi-1

C/EBP ϵ

E2A
EBF
Pax-5
Bcl11a (Evi9)

XBP-1

Ikaros
PU.1
Notch
TCF-1
GATA-3

Extrinsic a intrinsic faktory regulující sebeobnovu adultních HSC (Akala & Clarke 2006)
významnou úlohu hraje hypoxie a HIF! HSC mají vysokou hladinu HIF nezávisle na hypoxii!
- úloha cytokinů SCF, IL-x?

Bmi1 - polycomb group protein

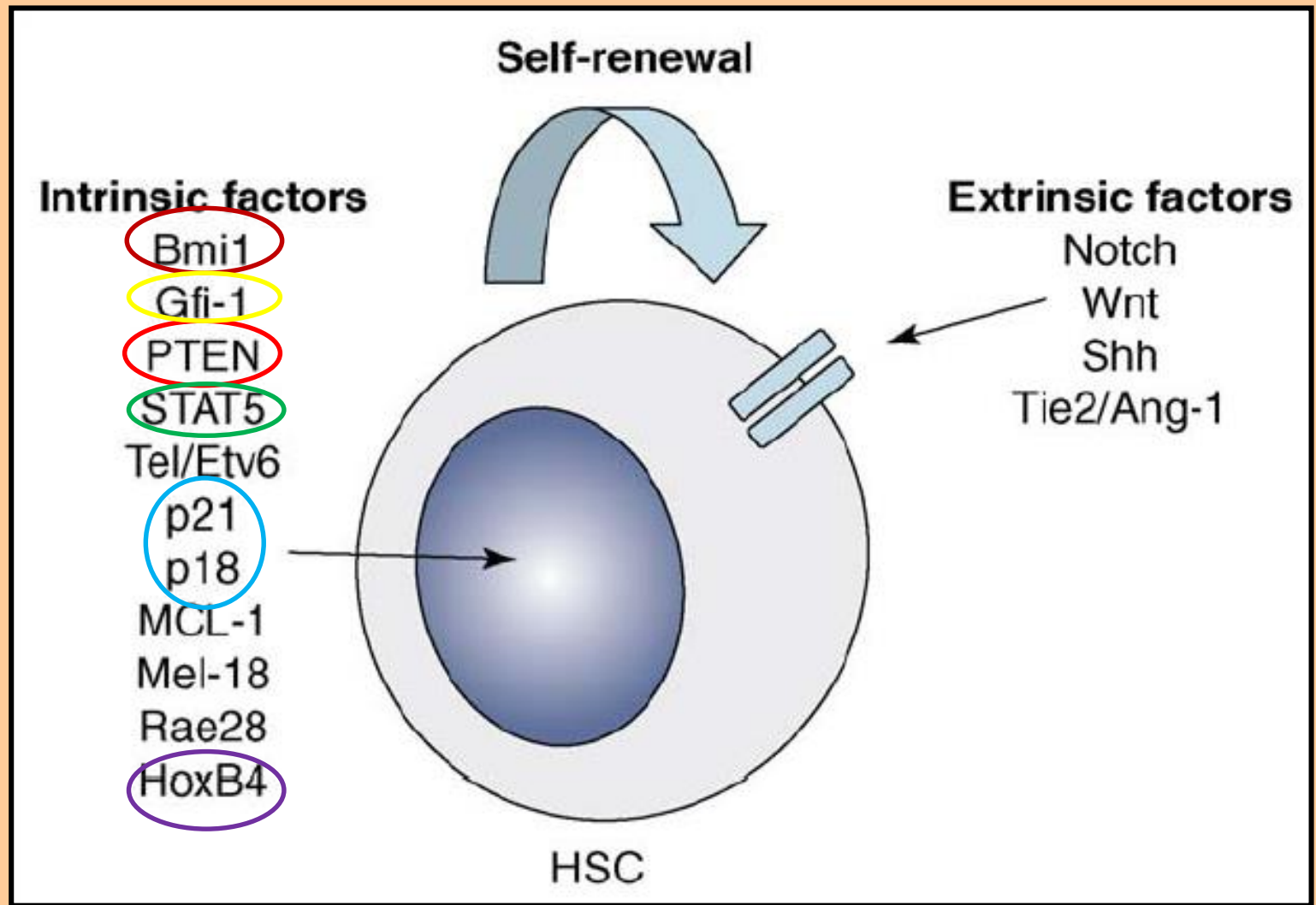
Gfi-1 - transkripční faktor/represor

PTEN - inhibitor PI3k/Akt

p18, p21 - inhibitory cdk

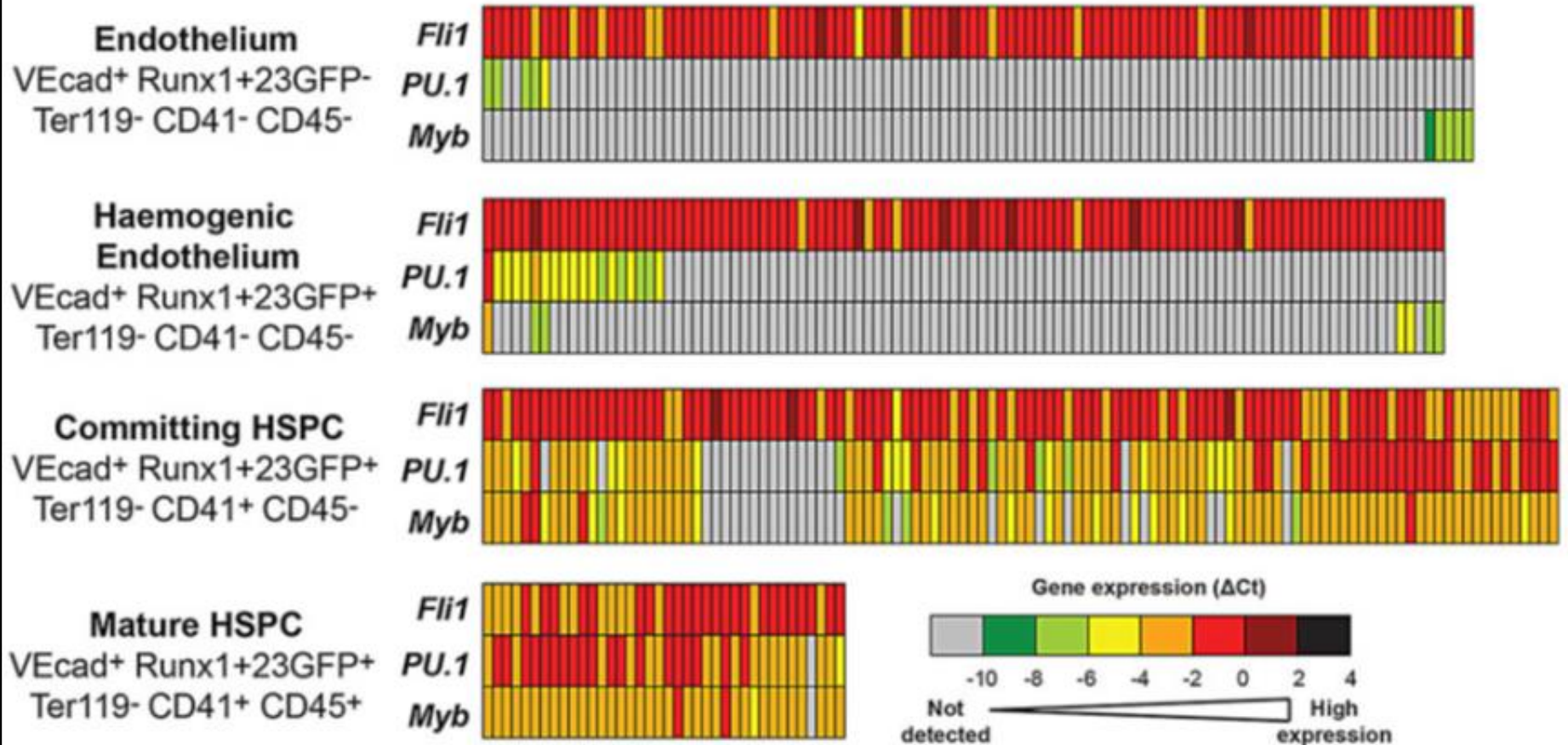
STAT5 - signalizace cytokinů

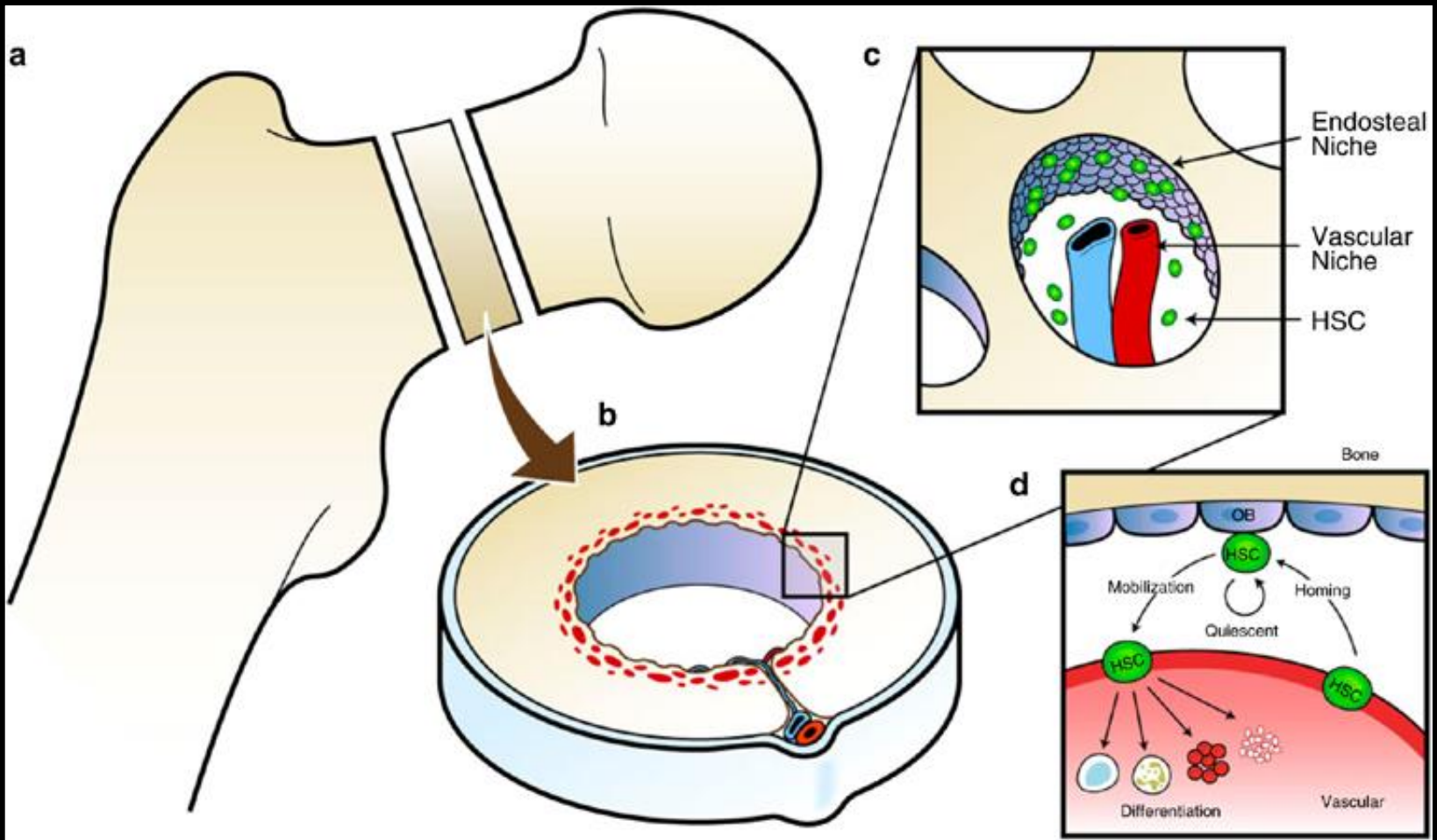
HoxB4 - transkripční faktor specifikuující linii hematopoézy



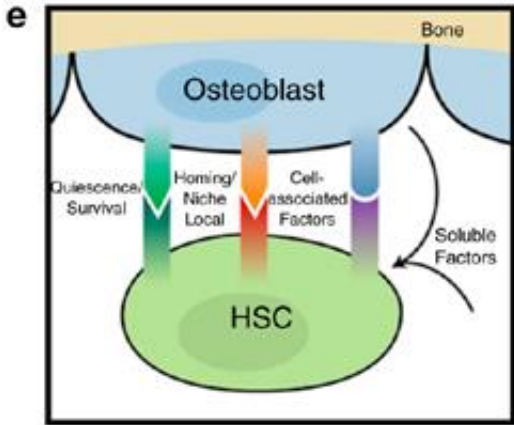
Ukázka heterogenity ve fenotypu jednotlivých buněk na základě exprese klíčových transkripčních faktorů zapojených v regulaci hematopoézy jako jsou *Fli1*, *PU.1* a *Myb*.

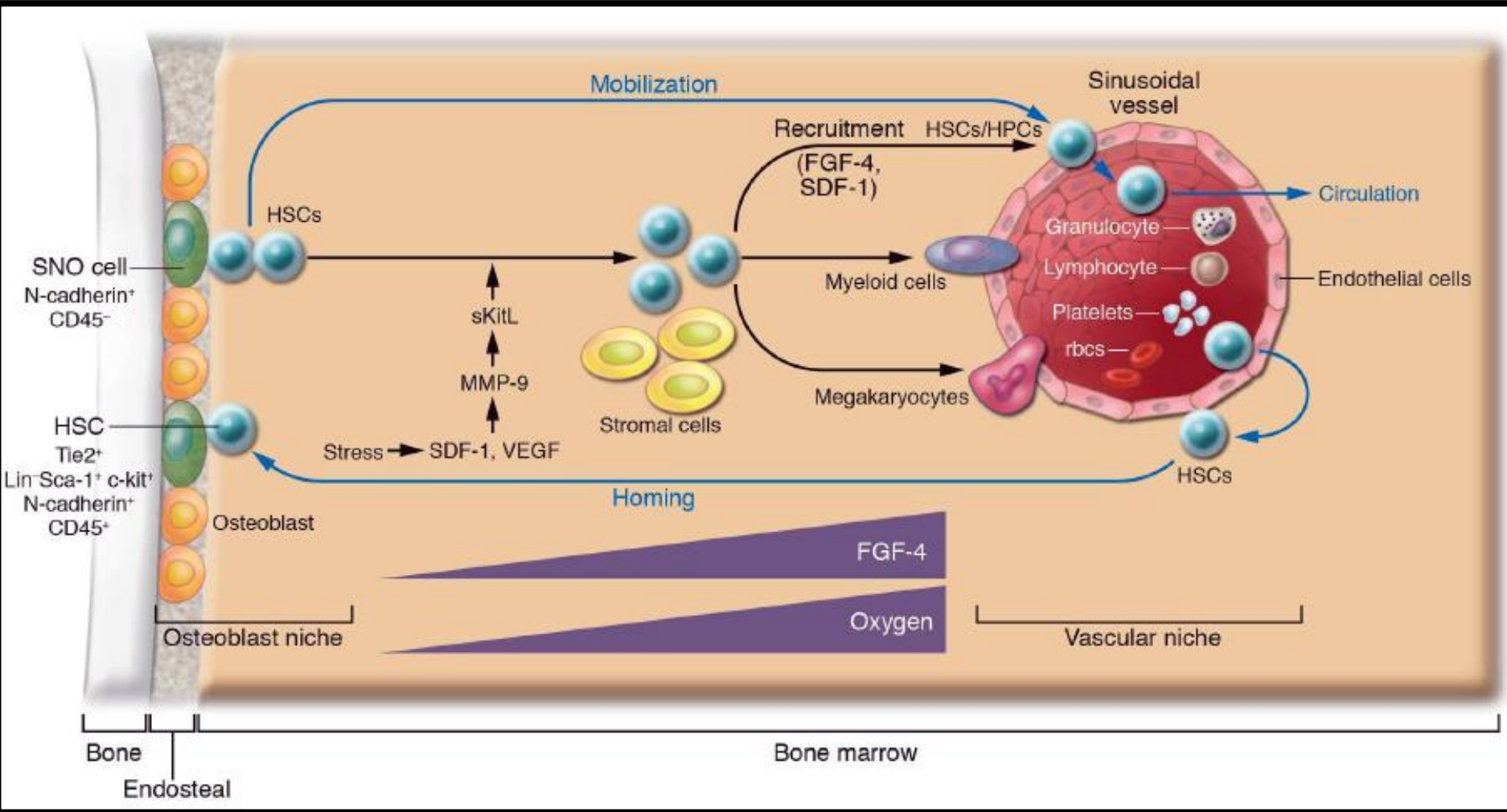
A Runx1+23GFP transgenic embryos
E10.5 AGM/VUA region





HSC niche



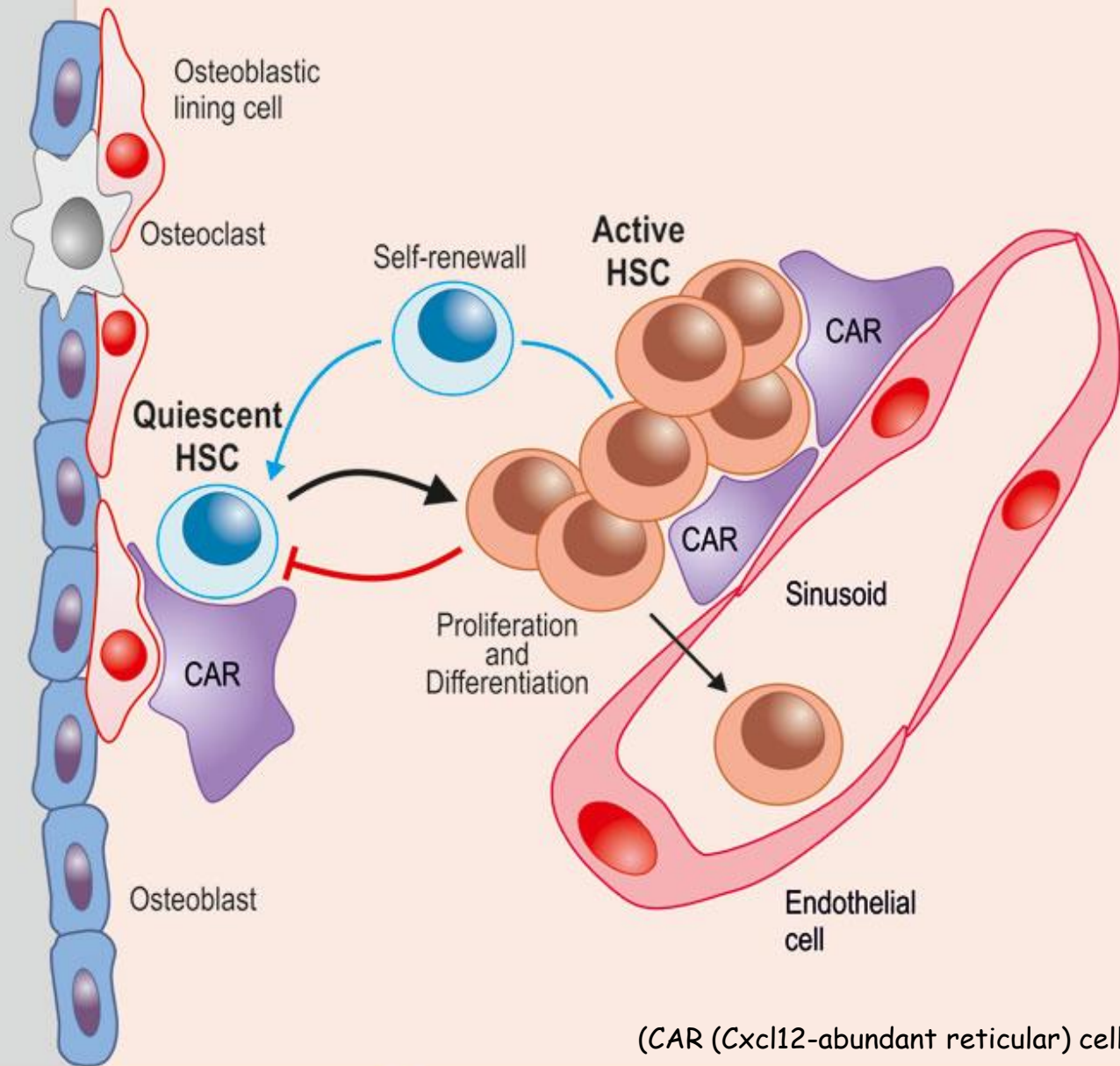


Mobilizace HSC (přechod HSC do periferní krve) - působením G-CSF, SCF, IL-3, TPO

G-CSF - granulocyte colony-stimulating factor, SCF - stem/steel cell factor, IL-3 - interleukin 3, TPO - trombopoetin

Osteoblastic Niche

Vascular Niche

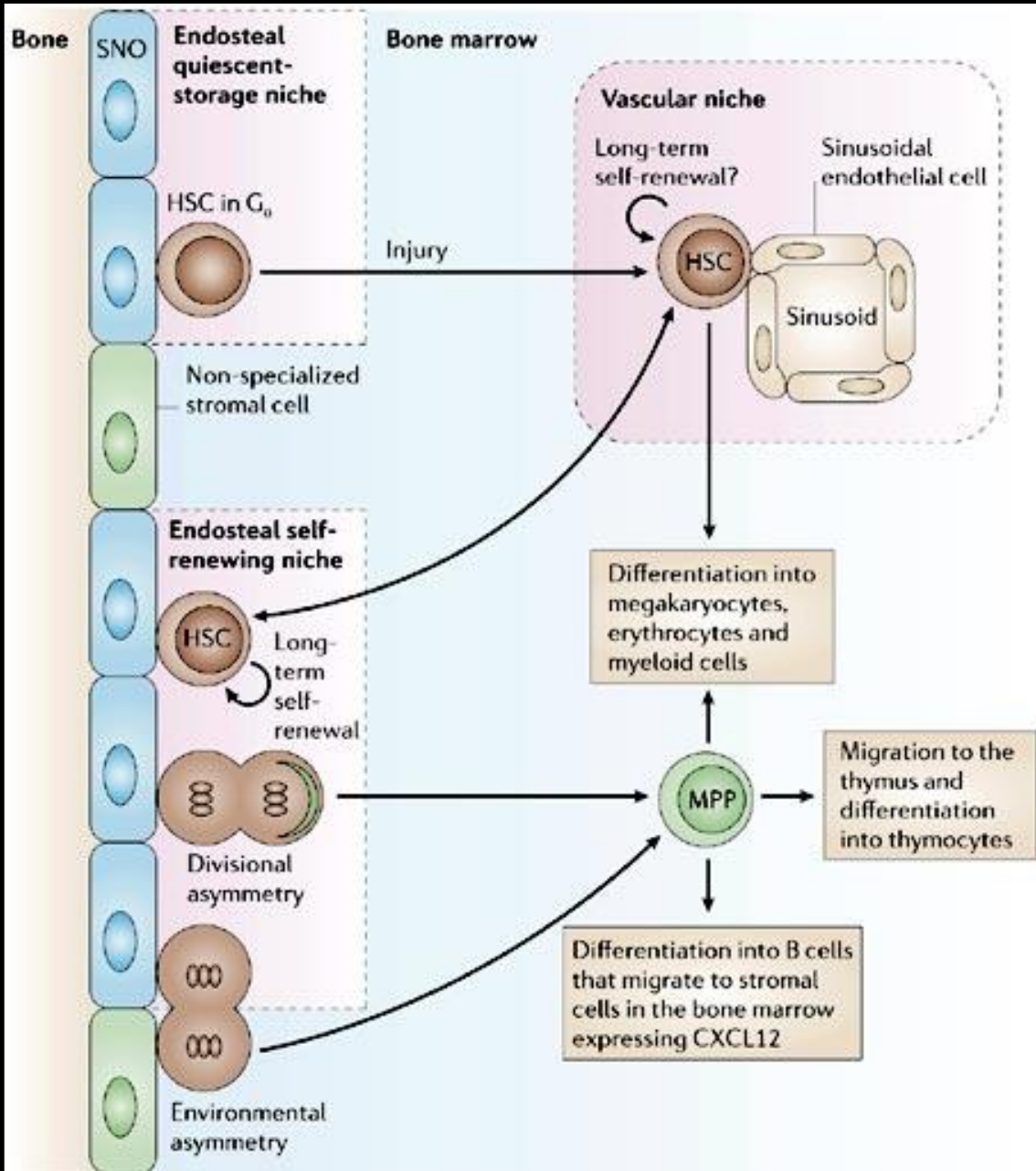


(CAR (Cxcl12-abundant reticular) cells)

Endosteum Zone

Central Marrow Zone

The stromal cell-derived factor 1 (SDF1), also known as C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12), is a chemokine protein that in humans is encoded by the CXCL12 gene



Změna niche

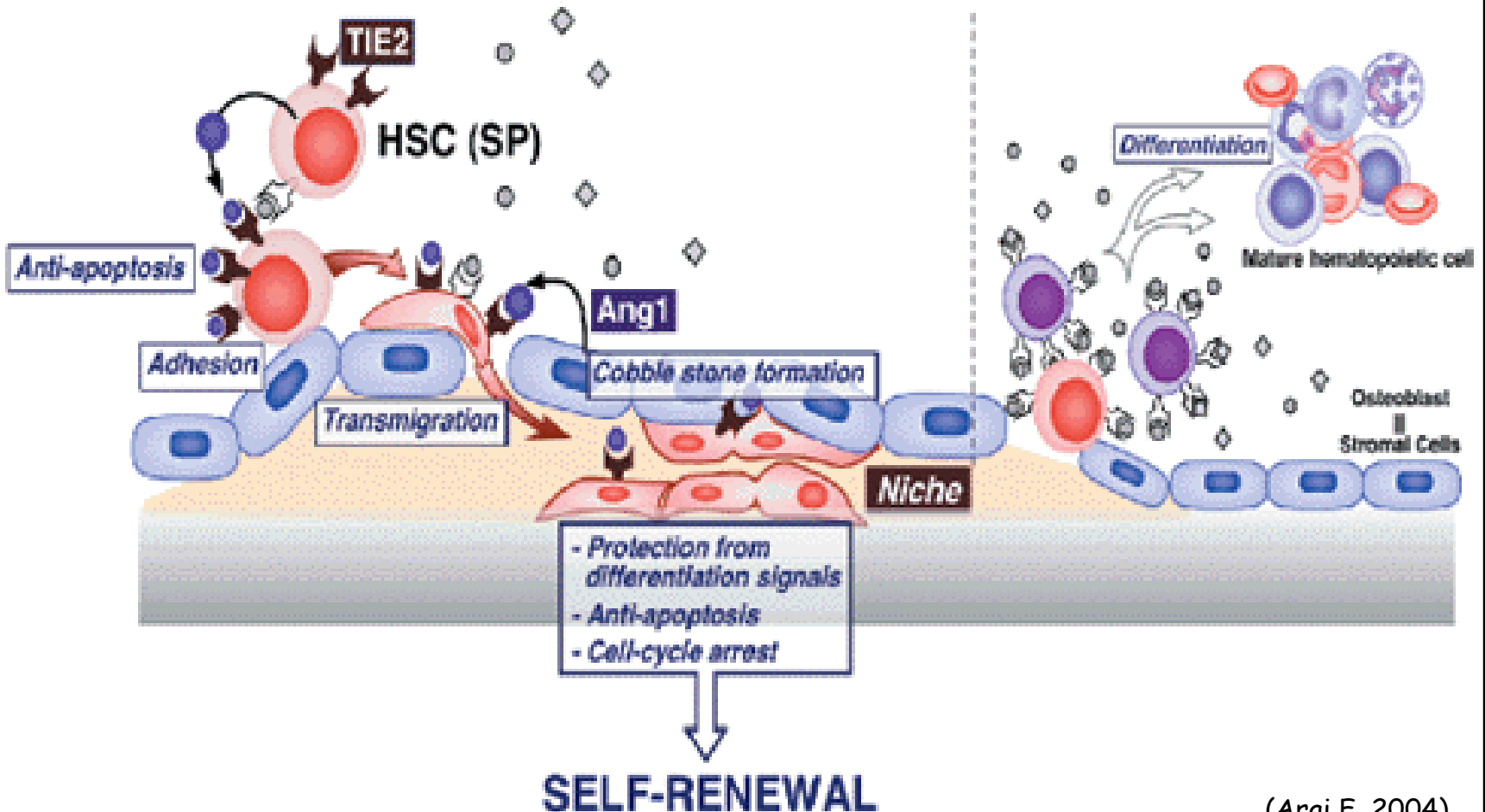
- ztráta kmenovosti = diferenciace
- změna statusu
- quiescence x proliferace

Model významu angiopoetinu v regulaci sebeobnovy HSC

Ang - angiopoetin

Tie2 - receptor angiopoetinu

Ang1/Tie2 Maintains the "Stemness" (Model)

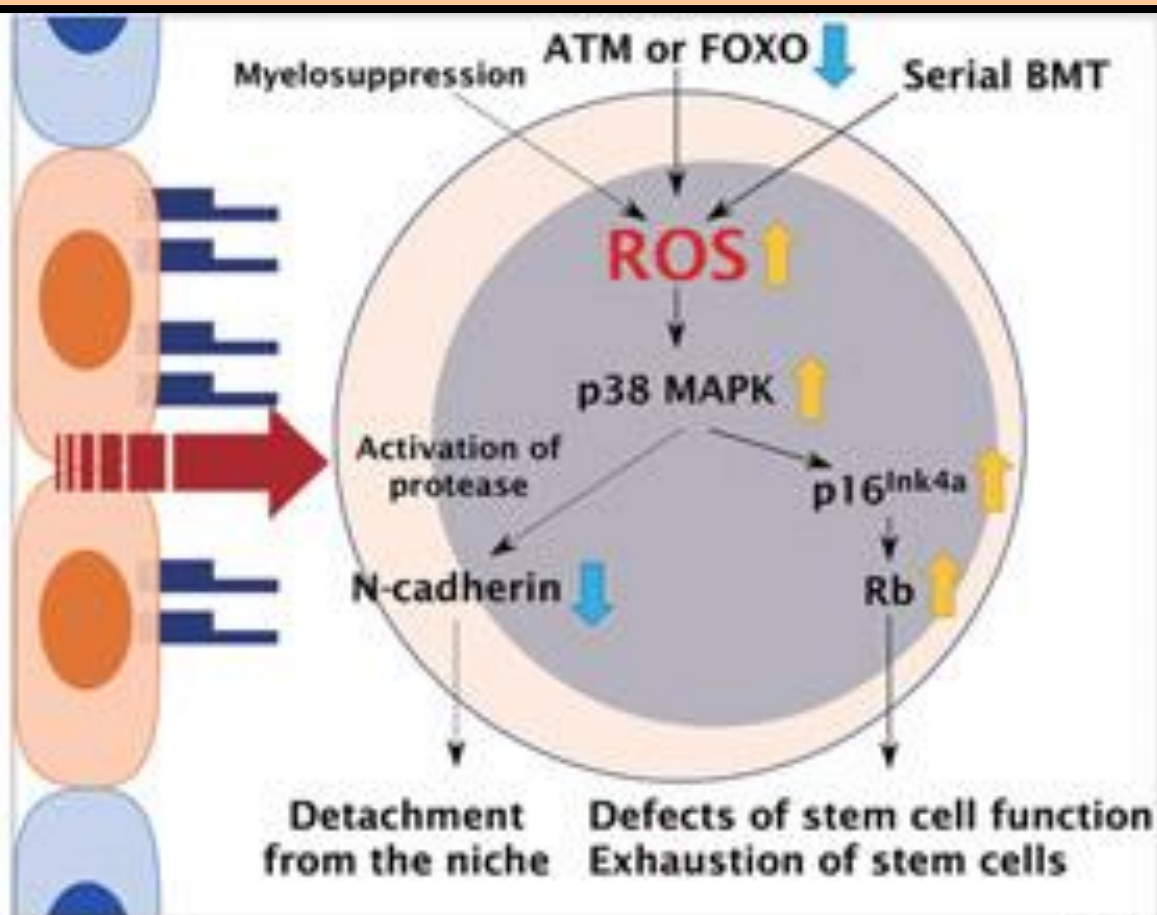
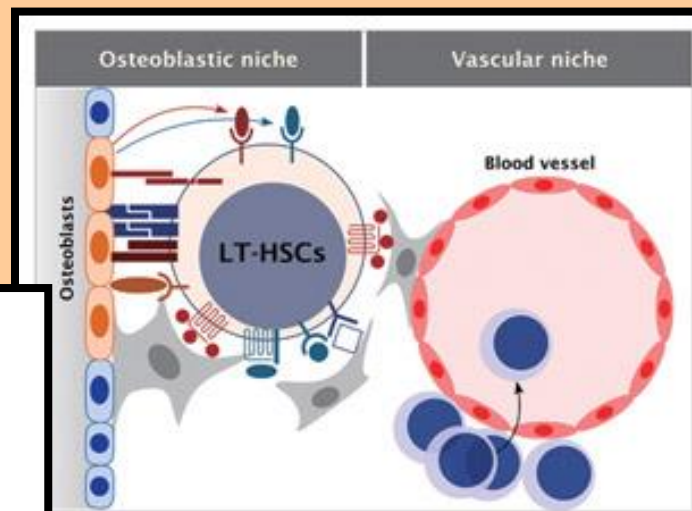


Reaktivní kyslíkové metabolity (ROS - reactive oxygen species) regulují aktivitu HSC

- zvýšení produkce ROS vede k indukci proliferace a opuštění niche

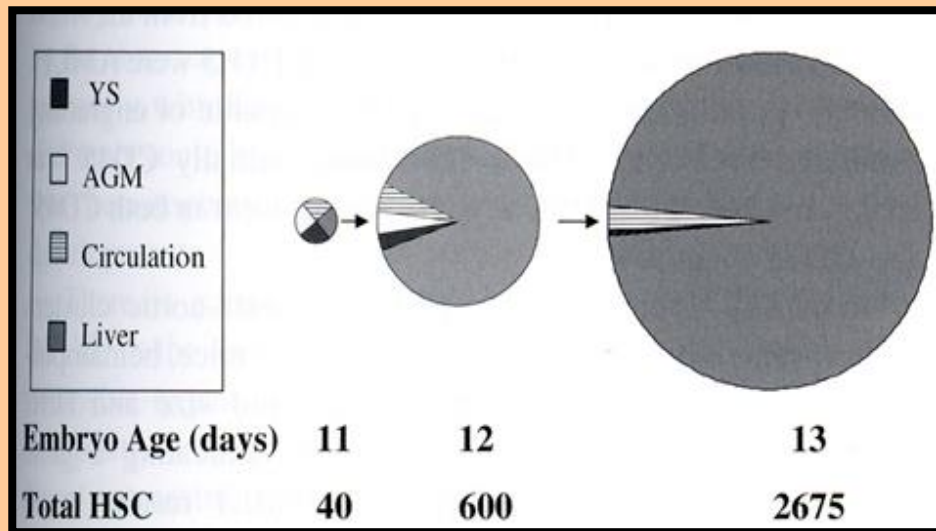
=> úbytek HSC

=> zvýšení intenzity hematopoiezy



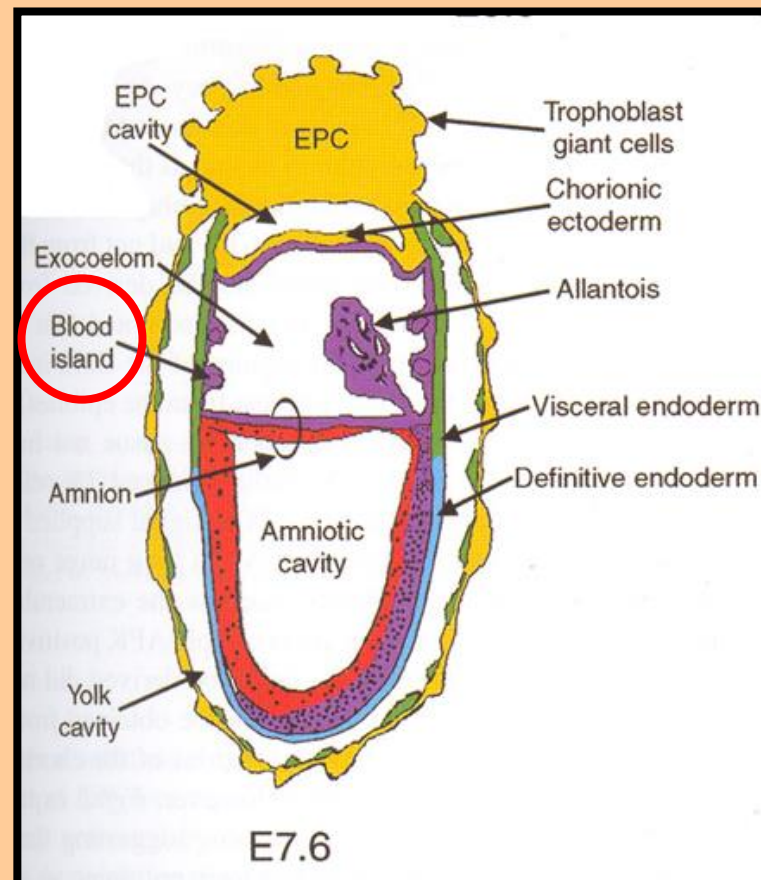
Původ HSC

Podíl jednotlivých tkání na celkovém objemu hematopoézy mezi 11 - 13 dpc u myši

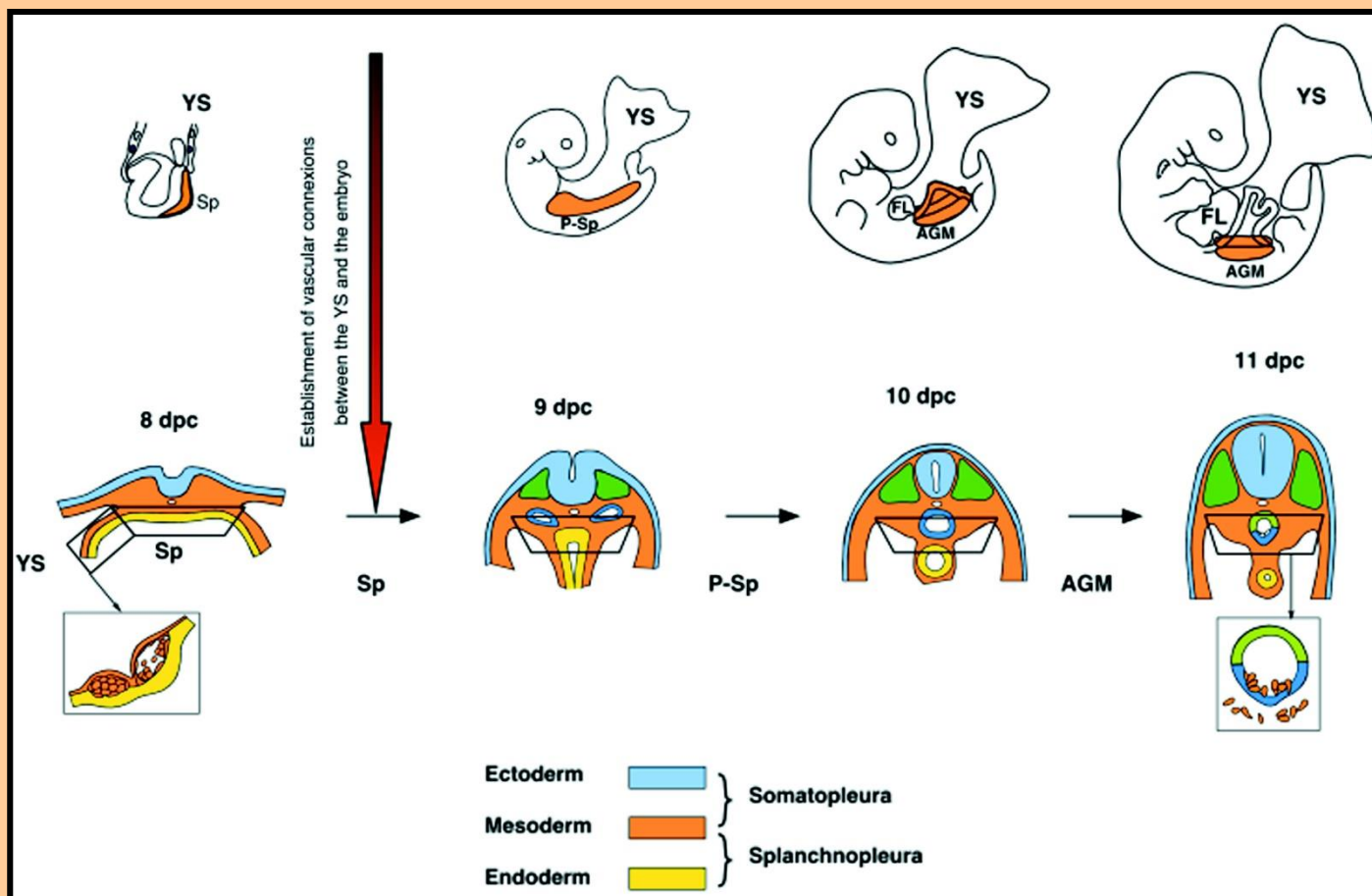


Pozn. Slezina je osídlena HSCs a hematopoetickými progenitory pravděpodobně z jater, protože v době objevení se hematopoézy ve slezině, v žloutkovém vaku a v aortě už hematopoéza neprobíhá a kostní dřeň dosud není vyvinuta.

Místo vzniku krevních ostrůvků (blood island) v průběhu embryogeneze u myši



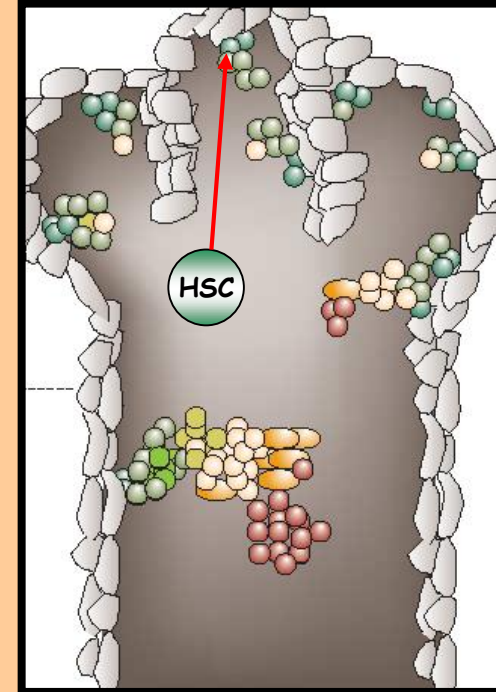
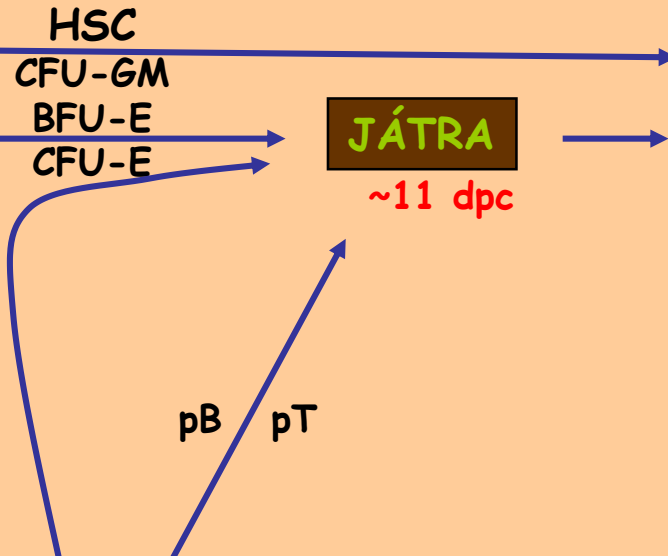
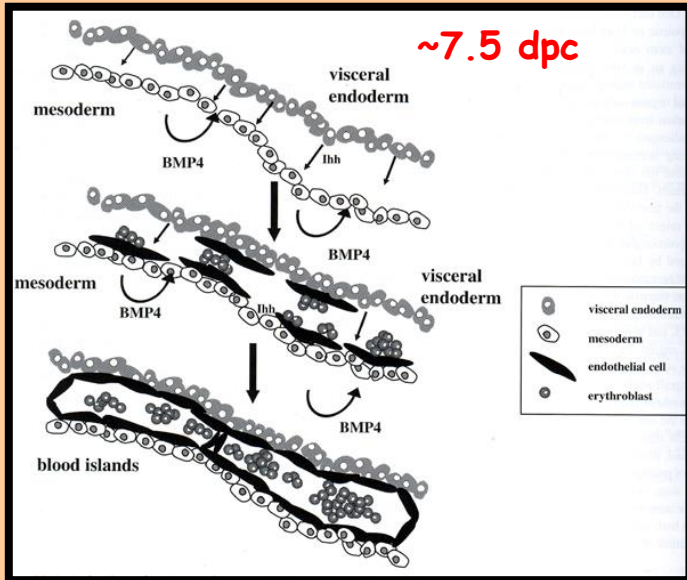
Schema vývoje AGM (aorta-gonads-mesonephros) - začátek fetální hematopoézy



MOUSE

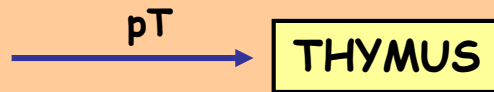
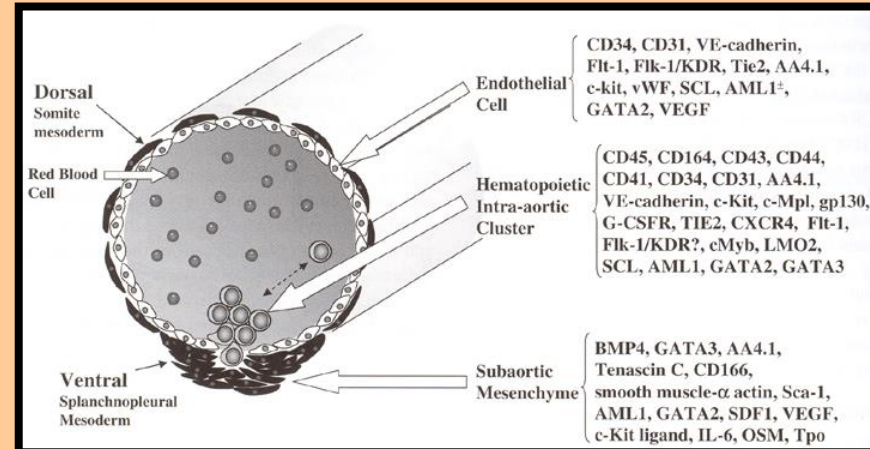
Lokalizace, změna „niche“ u hematopoézy v průběhu ontogeneze

Vznik krevních ostrůvků ve vznikajícím žloutkovém vaku mezi mezodermem a buňkami viscerálního entodermu



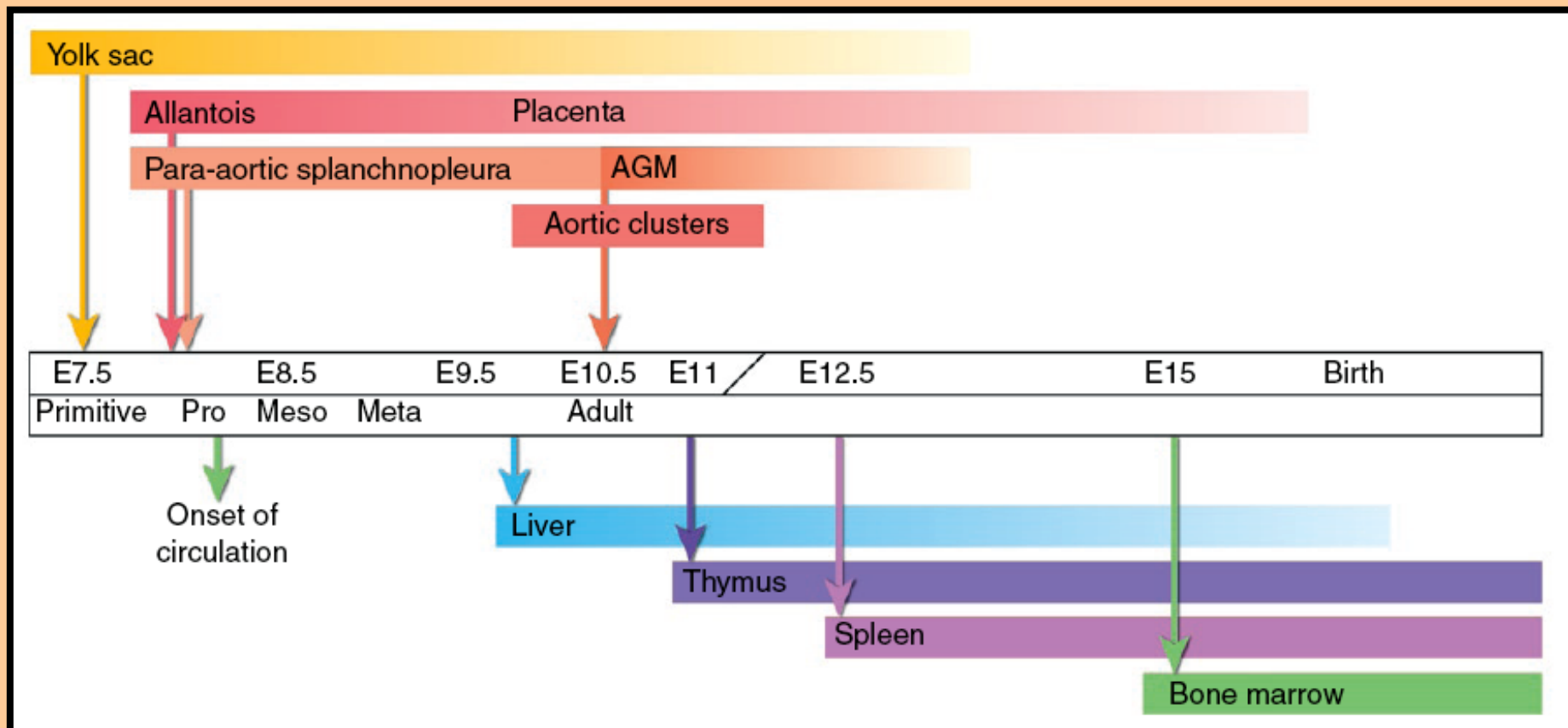
Kostní dřeň, ~15 dpc
S vývojem kostní dřeně se HSCs usazují v jejím stroma.

Hematopoéza v endotelu aorty (AGM), ~10.5 dpc

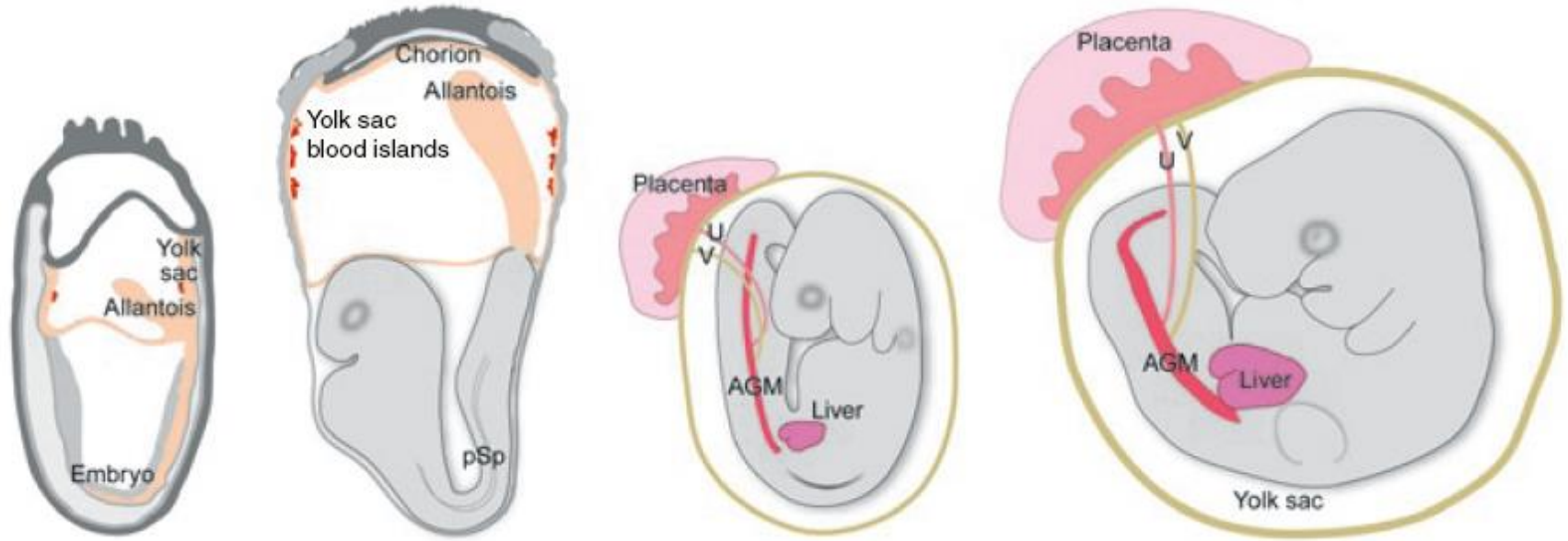


pT, pB - lymfocytární progenitory
CFU-GM - myeloidní progenitory
BFU-E, CFU-E - erythroidní progenitory

Embryonální hematopoéza (mouse)



Embryonální hematopoéza (mouse)



Hemangioblast

Hemogenic endothelium

Primitive

Pro-definitive

Meso-definitive

Meta-definitive

Adult-definitive

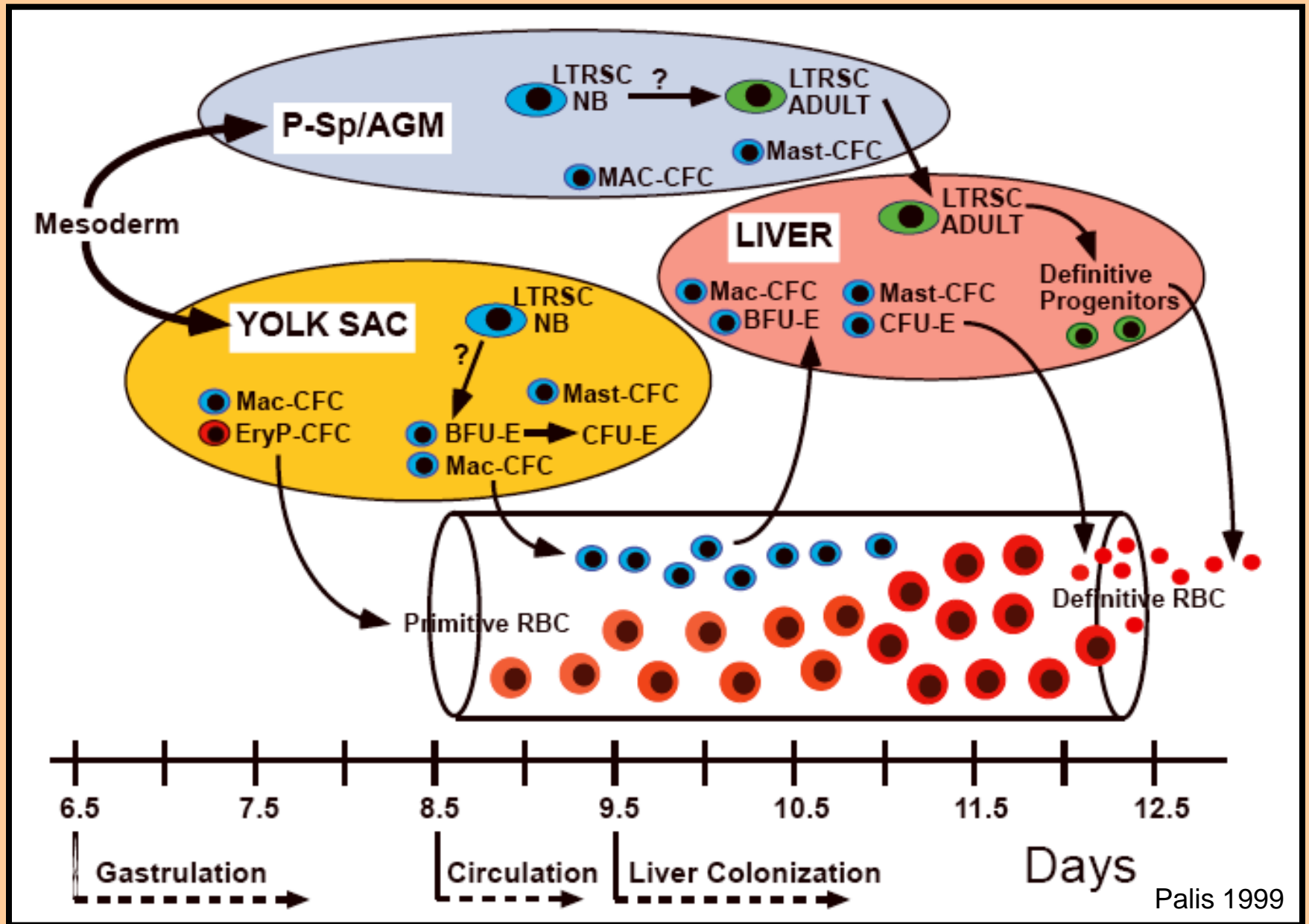
Myeloid

Lymphoid-myeloid

CFU-S
Neonatal HSCs

HSCs

Embryonální x adultní HSC (mouse)



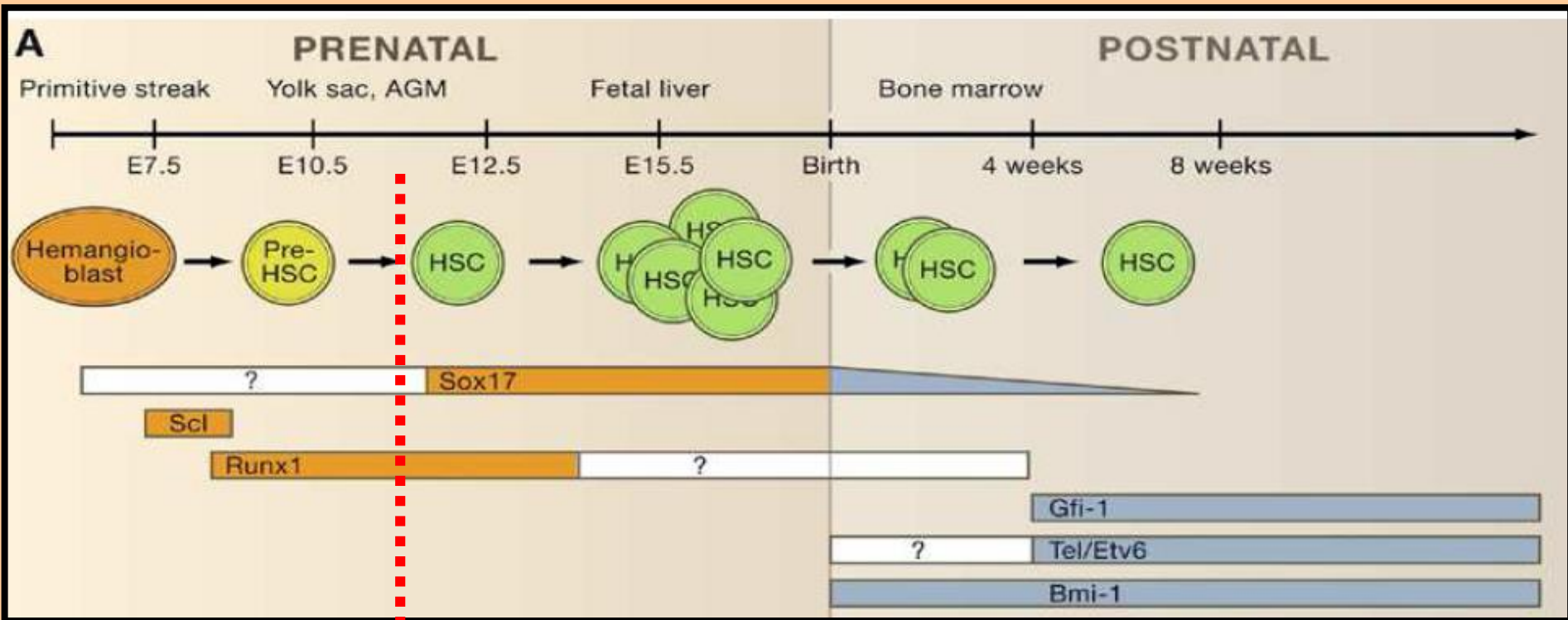
CFC - colony-forming cell (progenitor), CFU - colony-forming unit

	Developmental time	Site	Functional activity
Primitive	E7.5	Yolk sac ^a	Primitive erythroid
	E7.5–E8 (0–4sp)	Yolk sac ^b	Primitive erythroid
Pro-definitive	E7.5–E8 (EHF–2sp)	Allantois ^a	Erythroid-myeloid progenitor
	E7.5–E8 (0–7sp)	Allantois ^a	Erythroid-myeloid progenitor
	E8.25	Yolk sac ^a	Erythroid-myeloid progenitor
	E8.25	Yolk sac ^b	Erythroid-myeloid progenitor
	E9.5	Yolk sac ^b	Erythroid-myeloid progenitor
	E9.0	Placenta	Erythroid-myeloid progenitor
Meso-definitive	E7.5–E8 (0–8sp)	pSp ^a	Erythroid-myeloid-lymphoid progenitor
	E7.5–E8 (0–5sp)	pSp ^a	Multipotent low-level repopulating progenitor
Meta-definitive	E9.0	Yolk sac ^c	Neonatal repopulating HSC
	E9.0	AGM ^c	Neonatal repopulating HSC
	E9.0	Yolk sac ^c	CFU-S
	E9.0	AGM ^{c,d}	CFU-S
Adult-definitive	E10.5	AGM ^{d,e}	Adult repopulating HSC
	E10.5	Umbilical and vitelline vessels ^d	Adult repopulating HSC
	E10.5–E11	Placenta	Adult repopulating HSC

Rozdíly mezi embryonálními a adultními HSC

Intenzivně proliferující HSC

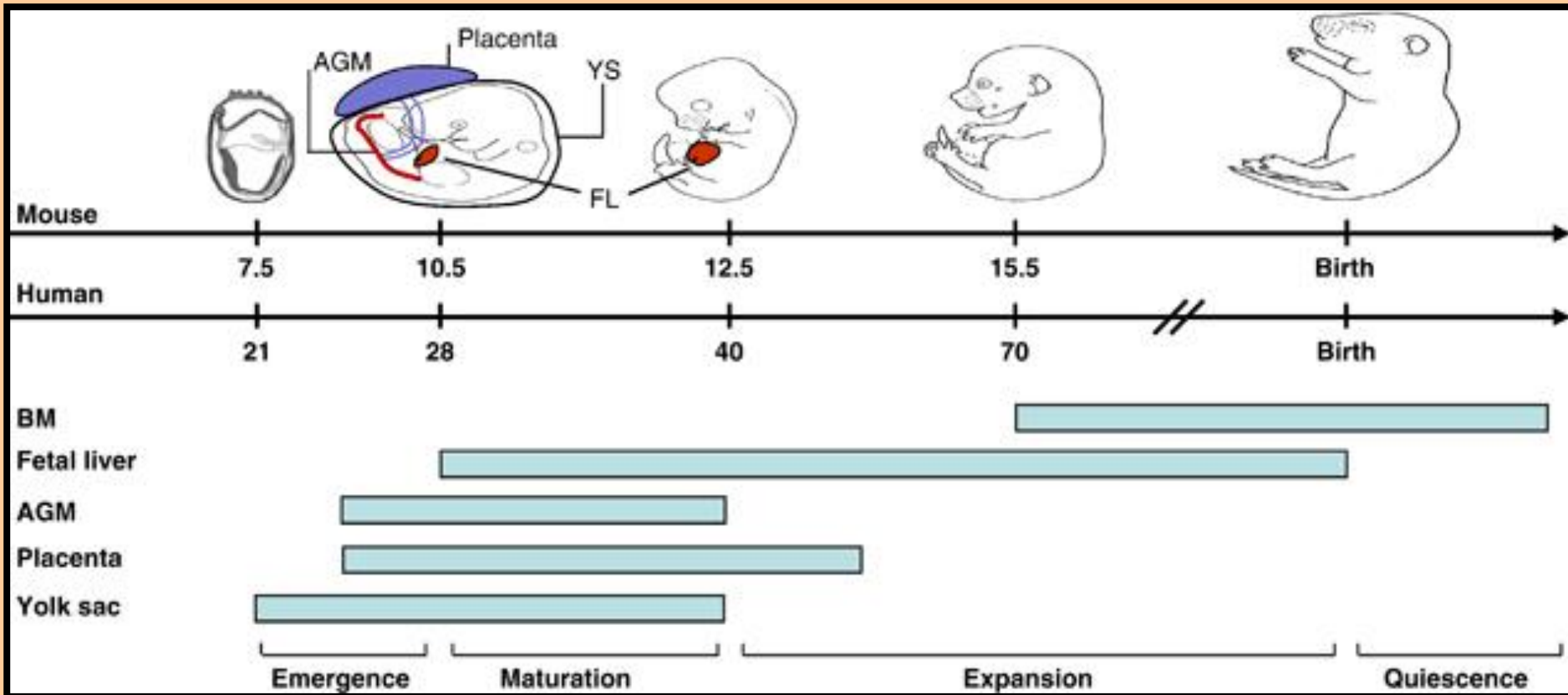
pomalou proliferující / quiescentní HSC



Obnova embryonální hematopoézy

Obnova adultní hematopoézy

Transkripční faktor RUNX1 a vývoj HSC

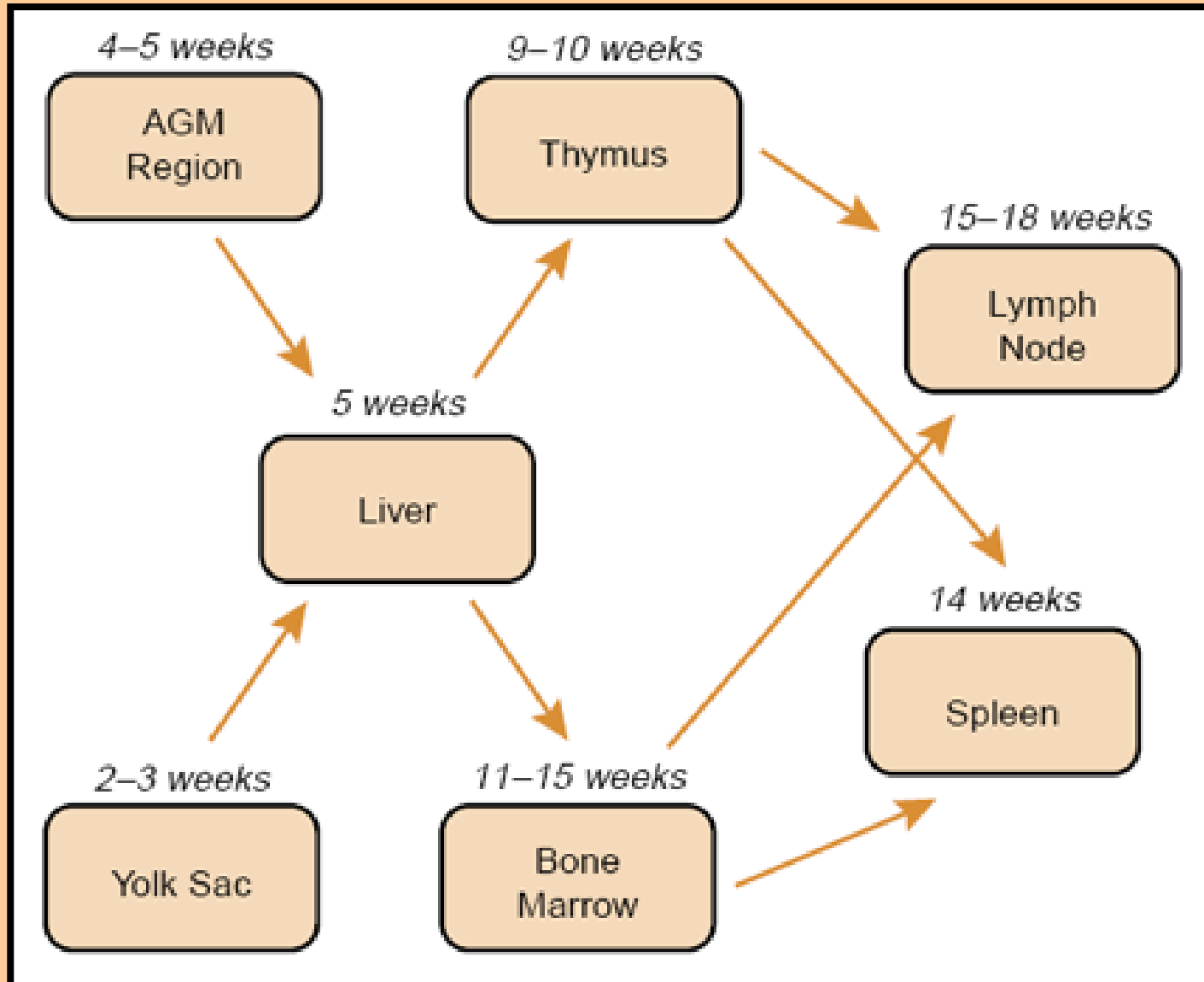


- Knockout pro RUNX1 u myši způsobuje embryonální letalitu E12,5. Embrya postrádají hematopoézu ve fetálních játrech.
- RUNX1 důležitý pro vznik HSC z hematogenního endotelia

Chronologie hematopoézy u člověka a myši

hematopoéza/ <i>lymfopoéza</i> (dny)	člověk	myš
embryonální vývoj (dny)	~270	~21
žloutkový vak	18	7.5
dorsální aorta	27	9.5
<i>thymus</i>	40	11
játra	42	11
slezina	48	13
kostní dřeň	77	15
cirkulace krevních buněk	24	8.5

Časování cest lidských HSC



Intenzita hematopoézy v průběhu embryogeneze u člověka

