

## **METAPLASIE (- TRANSDIFERENCIACE?!)**

- metaplasie** – přeměna kmenové nebo progenitorové buňky jednoho typu tkáně v progenitor tkáně jiné
- transdiferenciace** – přeměna buňky jednoho typu na buňku typu jiného bez průchodu buněčným cyklem
- transdeterminace** – metaplasie v průběhu embryogeneze

Rawlins & Hogan (2006) Development 133, 2455-2465

### **Potenciální možnosti:**

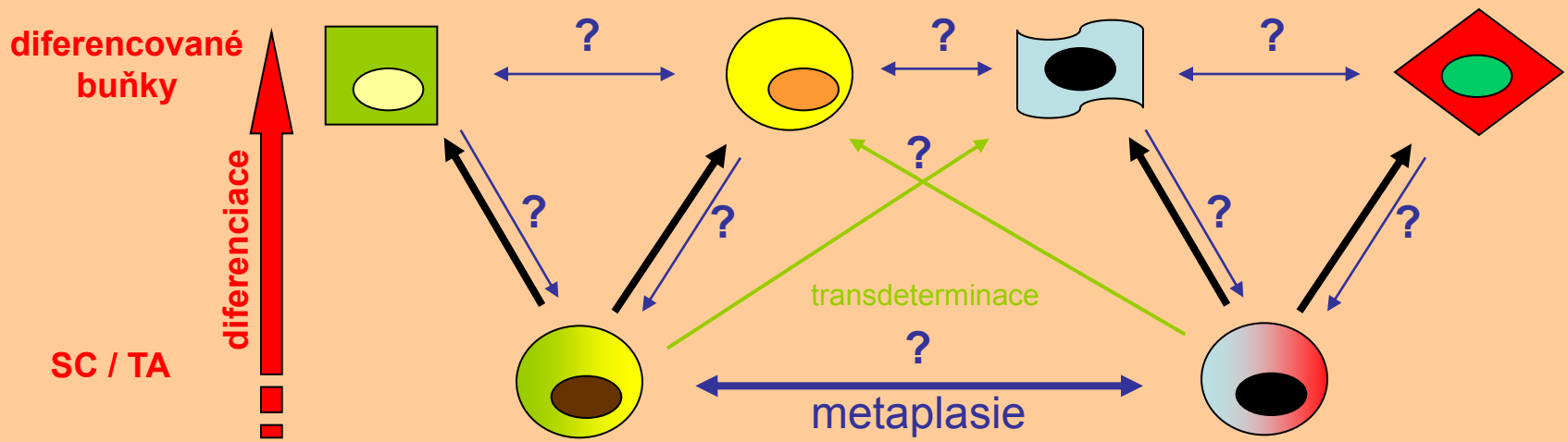
- 1) Přímá přeměna fenotypu buňky jednoho typu v buňku typu jiného**
  - s proliferací (metaplasie)
  - bez proliferace (pravá transdiferenciace)
  
- 2) Prvně směrem zpět v diferenciační řadě a následně diferenciace do jiné diferenciační řady (rediferenciace a následně diferenciace).**

Za pozorované jevy zřejmě ale odpovídají zbytkové populace progenitorů.

  - s proliferací
  - bez proliferace (silně nepravděpodobné)

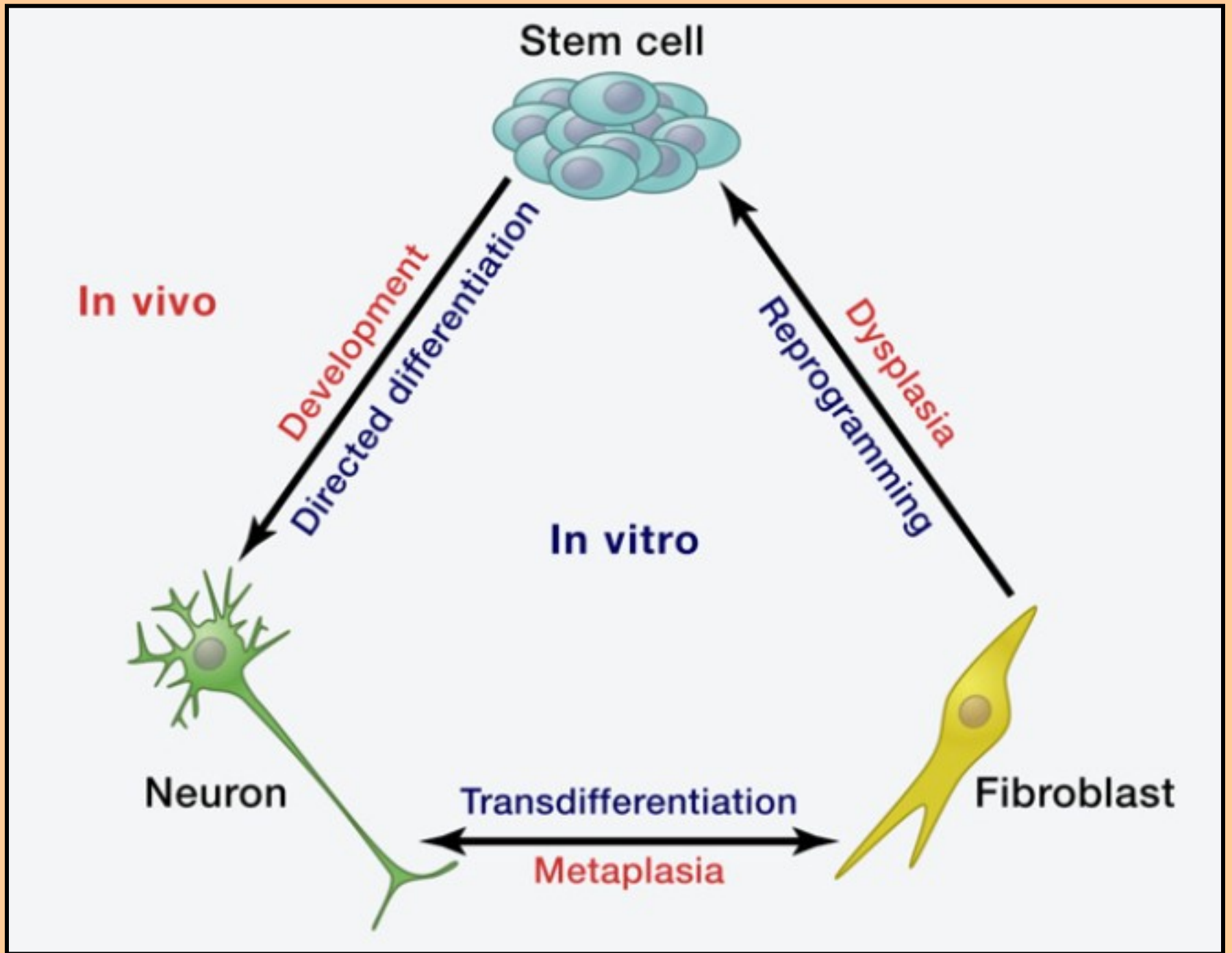
### **Přístupy:**

- a) **Vnějšími faktory**
- b) **Exogenní expresí vhodných genů**
- c) **Přeprogramováním jádra cytoplasmou jiné buňky**  
(sem patří i terapeutické klonování)
- d) **Kombinací výše zmíněných postupů**



- změny v metylaci DNA / metylačním paternu (CpG a CpA oblasti)  
tyto modifikace jsou relativně obtížně změnitelné
- změny v metylaci / acetylaci / fosforylaci histonů
- telomery / telomerázy
- změny v PcG proteinech

=> transkripce jiných genů = jiný fenotyp



## A. Vnějšími faktory (cytokiny, vnější podmínky)

- původně mála a často sporná účinnost
- závislé na buněčném typu, často jen u SCs a TA buněk
- pokud je to možné, tak se většinou jedná o malou změnu / krok  
(Inení úplně jasné, jestli je potřeba rediferenciace!)
- uplatnitelnost *in vitro* spíše s některou z dalších metod a zejména pro zachování získaného fenotypu re- / transdeterminovaných buněk

*(- v současné době obrovská progrese a většina výše uvedeného neplatí?)*

### Příklady:

- exokrinní buňky pankreatu -> hepatocyty
- epitel hlitanu -> střevní epitel (po poškození žaludečnými kyselinami, tzv. Barrettova metaplasie)
- progenitory glií ???
- pigmentové buňky oka (iris) -> buňky rohovky (u čolka)
- některé kultivační experimenty ukazují, že různé progenitory / SCs mohou nabývat fenotypu jiné diferenciační řady, např SCs / TA epidermis x nervová tkáň

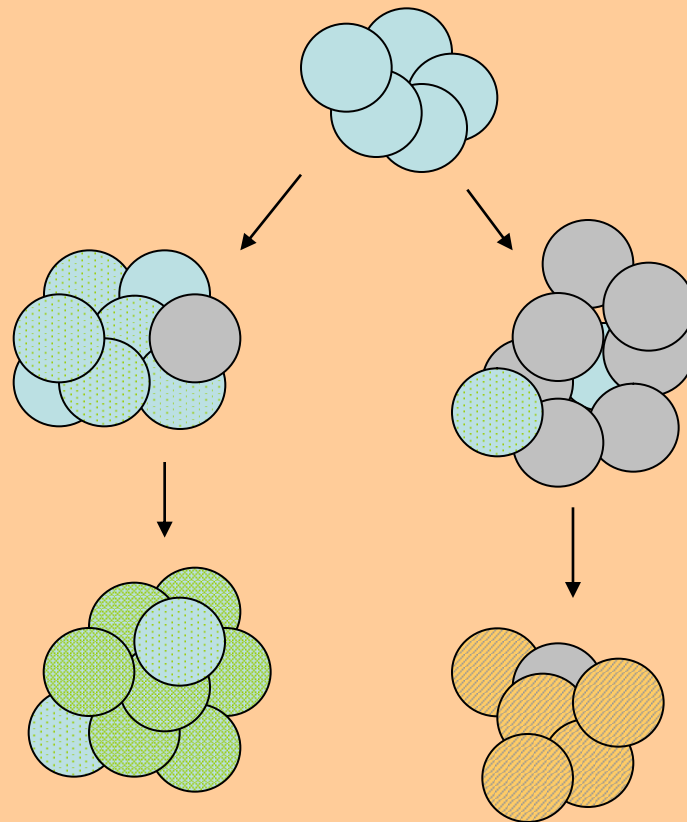
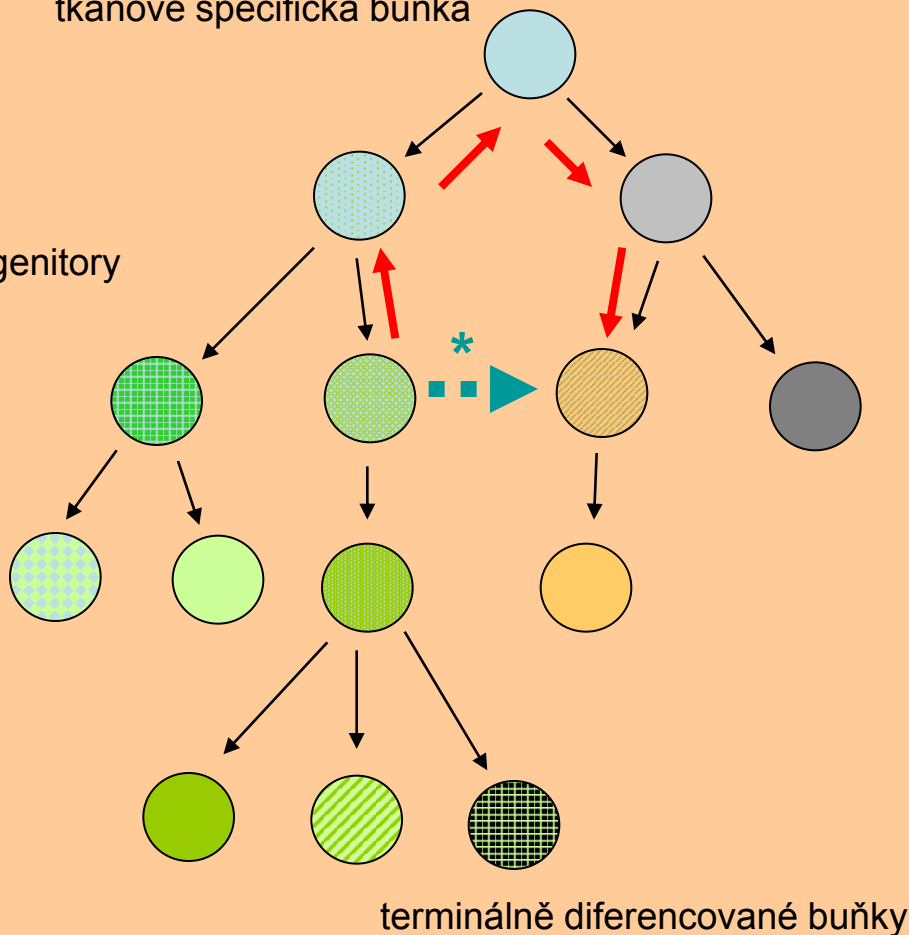
# Pleopotence\* x reprogramování

(změna v determinaci)

multipotentní  
tkáňově specifická buňka

persistující progenitory

progenitory



## B. Ektopická/exogenní exprese vhodných genů

- výrazně účinnější než působení vnějších faktorů
- „vhodné“ geny jsou zejména cytoplasmatické pro-onkogeny / onkogeny a transkripční faktory
- epigenetická paměť buněk (zejména metylace DNA), ale nedovoluje úplnou změnu, je potřeba několikateré dělení buněk, pokud je daná změna vůbec možná, vlastní fenotyp se ale mění velice rychle

### Příklady:

- nadbytečná exprese **Ras** a **c-Myc** indukuje částečnou rediferenciaci a transformaci
- exprese **Pdx1** (marker  $\beta$ -buněk pankreatu) navozuje částečný fenotyp  $\beta$ -buněk u hepatocytu a střevních epiteliálních buněk
- exogenní exprese **c-Myc**, **Klf4**, **Oct4** a **Sox2** navozuje fenotyp ESCs => **iPSCs** u embryonálních fibroblastů (myš), ale i další buňky
- transdeterminace **Pax** a **Hox** geny (např. Pax-6 a oči)

# iPS buňky – indukované pluripotentní buňky

(Hochedlinger & Plath 2009)

## Developmental potential

### Totipotent

Zygote

### Pluripotent

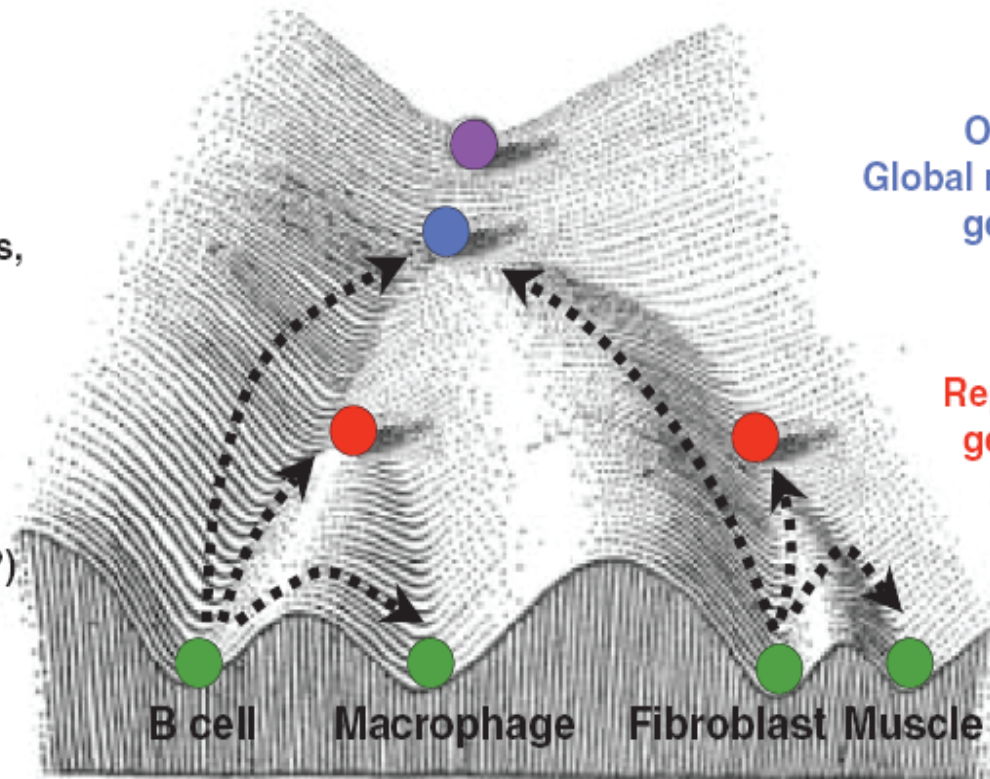
ICM/ES cells, EG cells,  
EC cells, mGS cells  
iPS cells

### Multipotent

Adult stem cells  
(partially  
reprogrammed cells?)

### Unipotent

Differentiated cell  
types



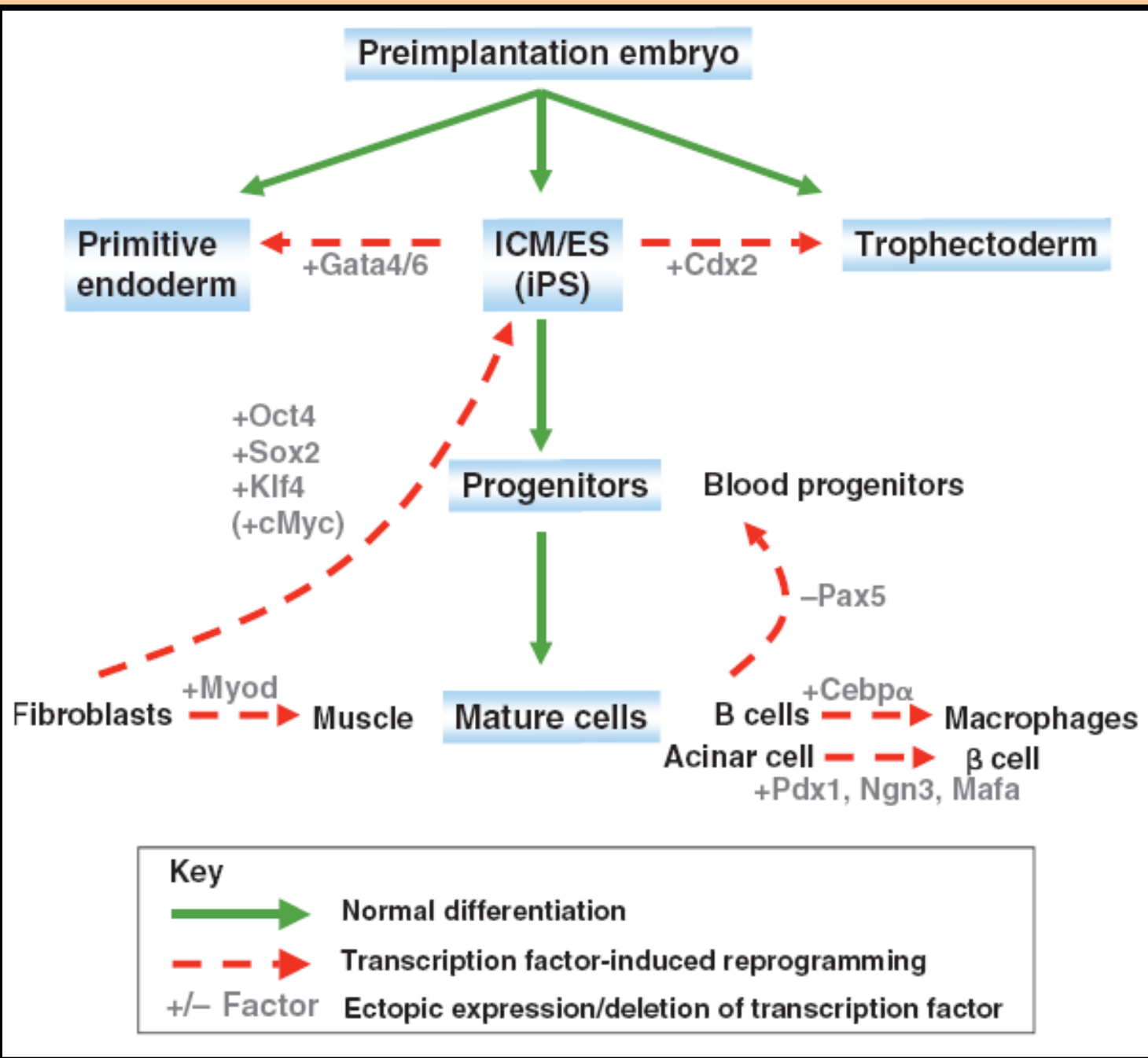
## Epigenetic status

Global DNA demethylation

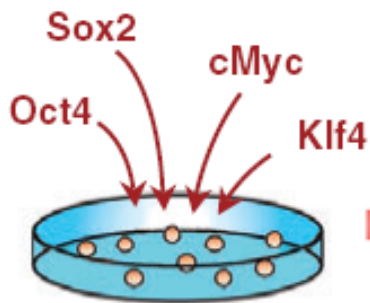
Only active X chromosomes;  
Global repression of differentiation  
genes by Polycomb proteins;  
Promoter hypomethylation

X inactivation;  
Repression of lineage-specific  
genes by Polycomb proteins;  
Promoter hypermethylation

X inactivation;  
Derepression of  
Polycomb silenced  
lineage genes;  
Promoter hypermethylation



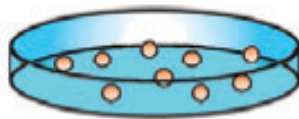




**Somatic cells**

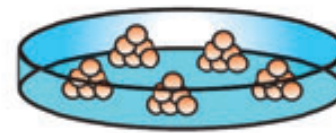
- Somatic markers silenced
- Activation of SSEA1

**Intermediate cells**  
(transient population)



- Silencing of retroviral transgenes
- Activation of pluripotency genes
- Activation of telomerase
- Reactivation of silent X chromosome in female cells
- Teratomas and germline chimeras

**iPS cells**



- Knockdown of lineage genes
- Inhibition of DNA methylation

**Partially reprogrammed cells**  
(stable cell lines)

- Viral transgenes on
- Proliferation genes activated
- Pluripotency genes silent
- Aberrant expression of lineage genes
- Teratomas, but no adult chimeras



?



Endogenní  
transkripční faktory



daný/původní fenotyp buňky



Exogenní(ektopické)  
transkripční faktory



požadovaný fenotyp buňky



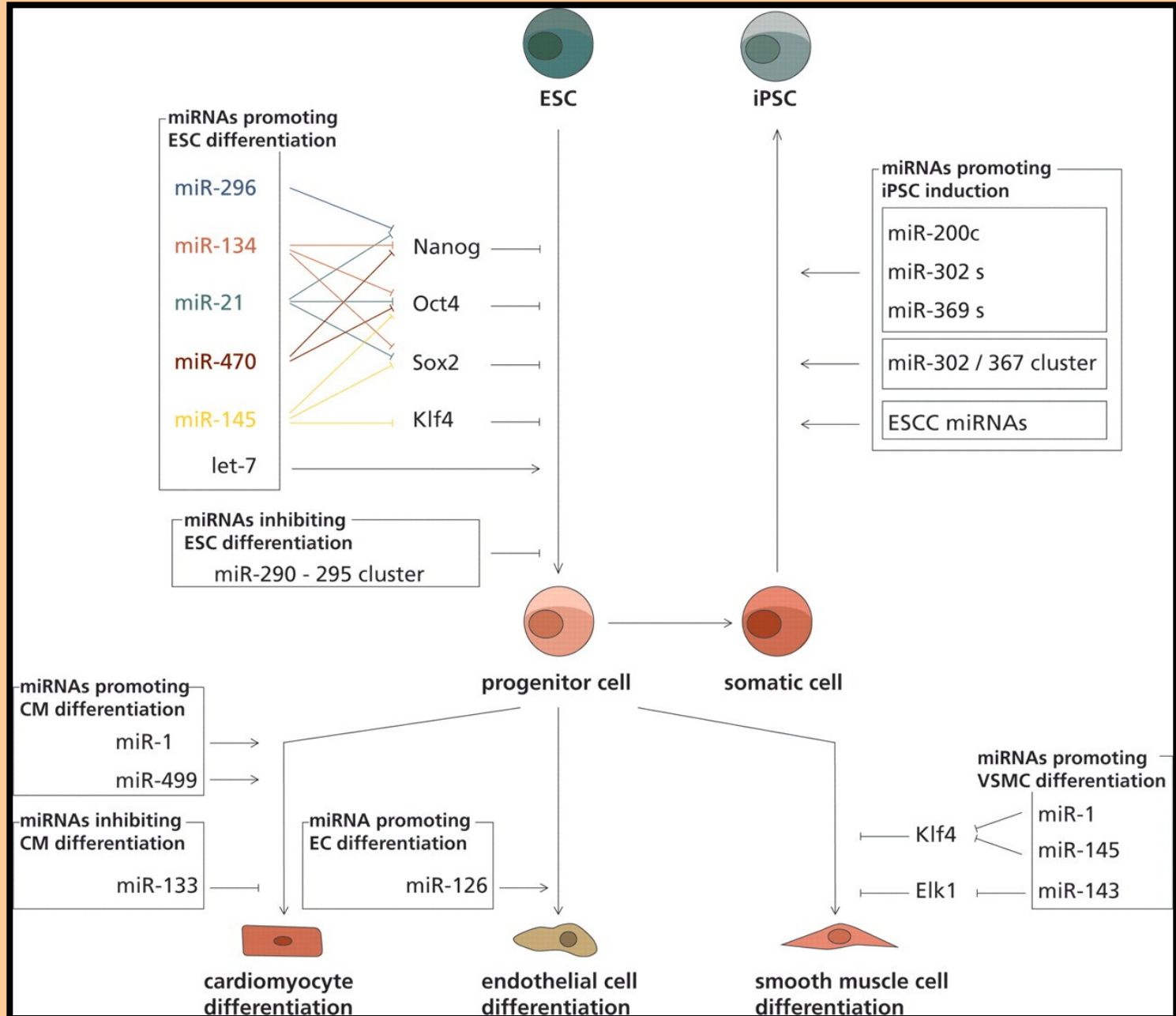
Endogenně regulovaný  
výsledný fenotyp buňky

**Exogenně dodané transkripční faktory nebývají dostatečně pevně fixovány v genomu**

**- poškození genomu (vlastní vnesení exogenní informace)**

**- destabilizace fenotypu, částečné reprogramování, reverze fenotypu, nežádoucí transformace**

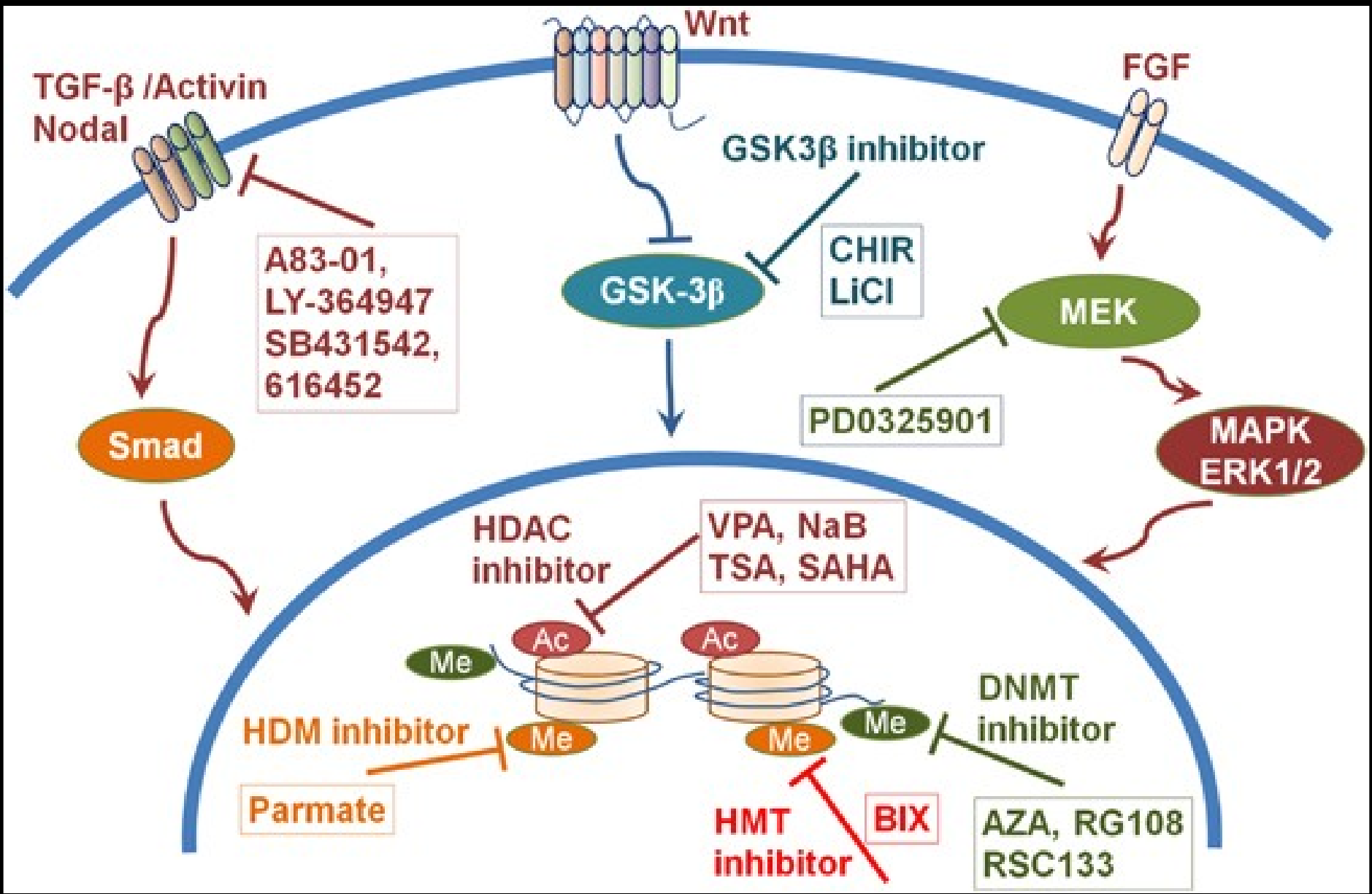
# miRNA jako regulátor fenotypu buněk



## Příklady reprogramování prostřednictvím exogenní exprese příslušných genů

Cell origin	Derived cell type	References
<b>Examples of reprogramming</b>		
Fibroblasts	iPS cells	
Oct4, Sox2, Klf4, c-MYC		Takahashi <sup>13</sup>
Oct4, Sox2 + valproic acid		Huangfu, <sup>80</sup>
Oct4, Sox2, c-MYC + kenpaullone		Lyssiotis <sup>83</sup>
Oct4, Klf4 + CHIR99021 (MEFs)		Li <sup>82</sup>
<b>Examples of transdifferentiation and direct reprogramming</b>		
Fibroblasts	Muscle	
MyoD		Davis <sup>34</sup>
Pancreatic (exocrine)	Pancreatic (beta cells)	
Ngn3, Pdx1, Mafa		Zhou <sup>44</sup>
Fibroblasts	Neurons	
Ascl1, Brn2, Myt1l		Vierbuchen <sup>26</sup>
Fibroblasts	Cardiomyocytes	
Gata4, Mef2c, Tbx5		Ieda <sup>27</sup>
Gata4, Mef2c, Tbx5, Hand2		Song <sup>45</sup>
Gata4, Mef2c, Tbx5, VEGF		Mathison <sup>49</sup>
Mef2c, Myocardin, and Tbx5		Protze <sup>46</sup>
Fibroblasts	Cardiomyocytes	
Myocardin, miR-1, miR-133, GHMT		Nam <sup>29</sup>
Fibroblasts	Endothelial cells	
Oct4, Sox2, Klf4, c-MYC (4-day partial reprogramming)		Margariti <sup>55</sup>
Oct4, Sox2, Klf4, c-MYC (Short reprogramming)		Li <sup>62</sup>
Amniotic	Endothelial cells	
ETV2, FLII, ERG1		Ginsberg <sup>64</sup>

# Reprogramování prostřednictvím malých molekul, chemických inhibitorů



# Reprogramování prostřednictvím malých molekul, chemických inhibitorů

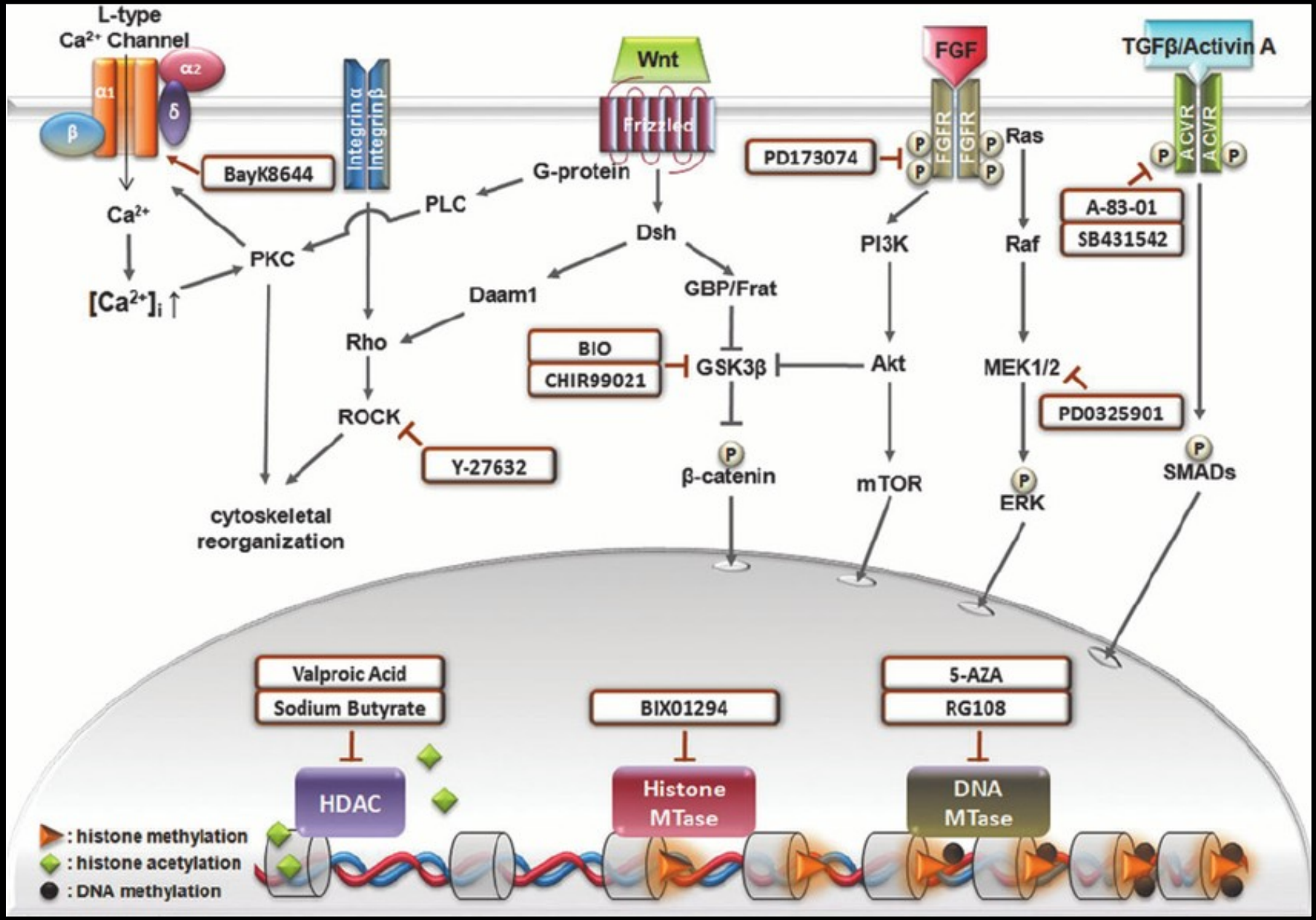
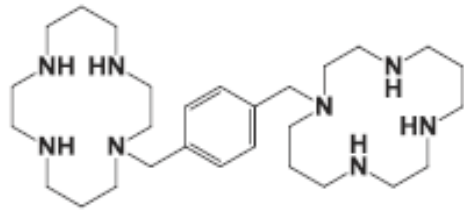


TABLE 2: Small molecule compounds that might replace Yamanaka factors.

Replacement for TF	Name concentration	Concentration	Host cell species	Function or target	Reference
Oct4, Nanog	SAHA-PIP delta	100 nM	Mouse	<i>Histone deacetylase inhibitor</i>	Pandian et al. (2014) [65]
Sox2 (with BIX) or Oct4	RG108	0.04–500 $\mu$ M	Mouse	DMNT inhibitor	Shi et al. (2008) [32, 33, 72]
Oct4	BIX	0.5–2 $\mu$ M	Mouse	G9a HMTase inhibitor	Shi et al. (2008) [32, 33, 72]
Sox2	CHIR	3–10 $\mu$ M	Mouse, human	GSK-3 $\beta$ inhibitor that activates Wnt signalling pathway	Li et al. (2011) [73]
Klf4	Kenpaullone	5 $\mu$ M	Mouse	GSK-3/CDKs inhibitor	Lyssiotis et al. (2009) [42]
Sox2	616452 (E-616452, Repsox)	1 $\mu$ M	Mouse, human	TGF- $\beta$ inhibitor (ALK inhibitor II)	Ichida et al. (2009) [63]
Sox2	LY-364947	1 $\mu$ M	Mouse	TGF- $\beta$ inhibitor	Staerk et al. (2011) [74]
Sox2, Klf4 (with A-83-01)	AMI-5	5 $\mu$ M	Mouse	Protein arginine methyltransferase inhibitor	Yuan et al. (2011) [64]
Sox2	Dasatinib	0.5 $\mu$ M	Mouse	Src family tyrosine kinase inhibitor	Staerk et al. (2011) [74]
Sox2	iPYrazine (iPY)	10 $\mu$ M	Mouse	Src family tyrosine kinase inhibitor	Staerk et al. (2011) [74]
Sox2	PPI	10 $\mu$ M	Mouse	Src family tyrosine kinase inhibitor	Staerk et al. (2011) [74]
Oct 4 with FSK and 2-Me-5HT	D4476	5 $\mu$ M	Mouse	CKI inhibitor	Hou et al. (2013) [27]
Sox2	BayK	2 $\mu$ M	Mouse	An L-channel calcium agonist	Shi et al. (2008) [32, 33, 72]
Oct4, when used with 2-Me-5HT, and D4476	FSK	10–50 $\mu$ M	Mouse	cAMP agonist	Hou et al. (2013) [27]
Oct4 with FSK and D4476	2-Me-5HT	5 $\mu$ M	Mouse	5-HT3 agonist	Hou et al. (2013) [27]
Sox2, Klf4, and C-Myc	Oxysterol	0.5–1 $\mu$ M	Mouse	Sonic hedgehog signaling	Moon et al. (2011) [75]
Sox2, Klf4, and C-Myc	Purmorphamine	0.5–1 $\mu$ M	Mouse	Sonic hedgehog signaling	Moon et al. (2011) [75]
Sox2, Klf4, and C-Myc	Shh	500 ng/mL	Mouse	Sonic hedgehog signaling	Moon et al. (2011) [75]

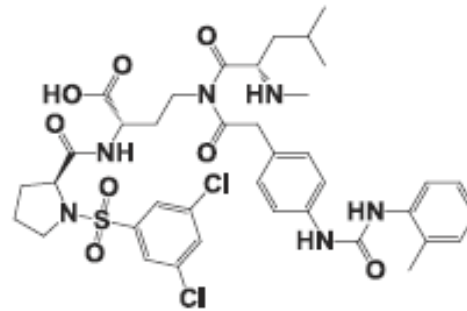
Note: small molecules can substitute for certain TFs and/or improve reprogramming efficiency by epigenetic modifications or signaling pathway regulation. BayK, Bay K8644; BIX, BIX-01294; CHIR, CHIR99021; CKI, casein kinase I; DNMT, DNA methyltransferase; DNP, 2,4-dinitrophenol; DZNep, 3-deazaneplanocin; FSK, forskolin; HDAC, histone deacetylase; G9a HMTase, G9a histone methyltransferase; IP3K, inositol triphosphate 3-kinase; PDK1, phosphoinositide dependent kinase 1; SAHA, suberoylanilide hydroxamic acid; TF, transcription factor; TSA, trichostatin A; VPA, valproic acid; 2-Me-5HT, 2-methyl-5-hydroxytryptamine; 5-aza-CR, AZA, 5-azacytidine; 8-Br-cAMP, 8-bromoadenosine cyclic monophosphate.



AMD3100

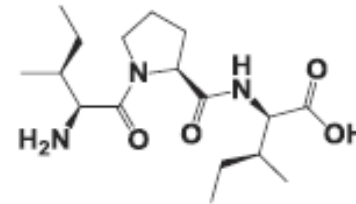
CXCR4 inhibitor

**Mobilize HSCs into the peripheral circulation**



BIO5192

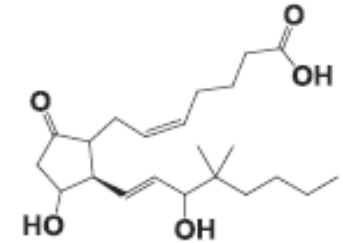
VLA-4 inhibitor



Diprotin A

DPP4 inhibitor

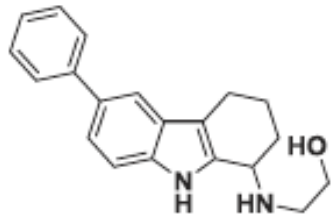
**Enhances HSPC homing  
and self-renewal**



dmPGE2

Stable PGE2 analog

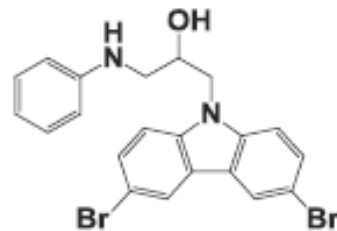
**Enhances HSC engraftment  
*in vivo***



CASIN

Cdc42 inhibitor

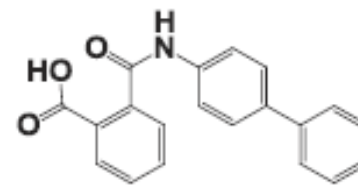
**Rejuvenates aged HSC  
functions**



P7C3

Target unknown

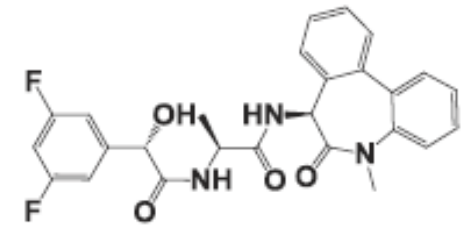
**Enhances neurogenesis  
*in vivo***



Kartogenin

Blocking Filamin A/CBF $\beta$  interaction

**Induces chondrogenesis**



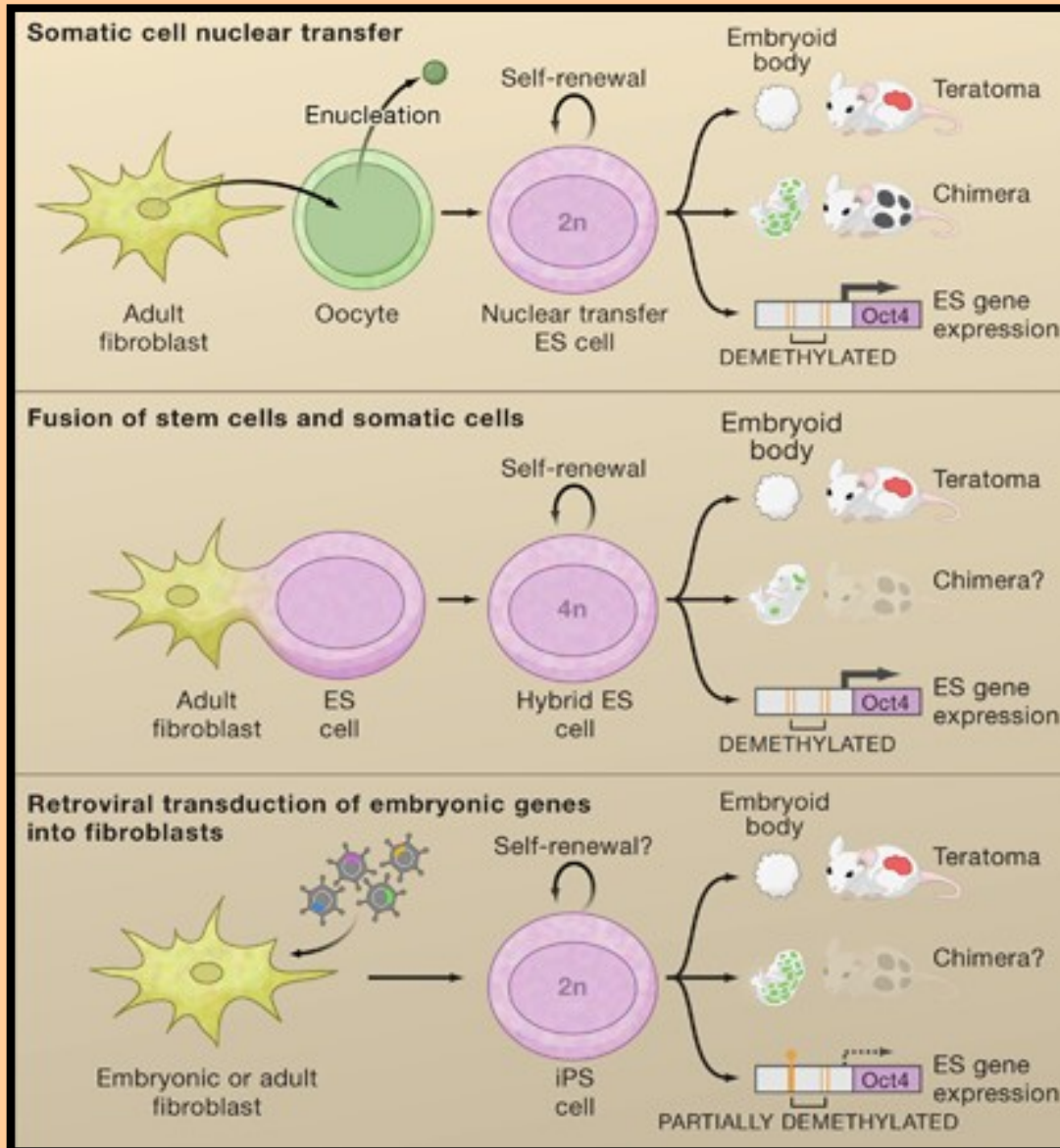
LY411575

$\gamma$ -secretase inhibitor

**Induces supporting cells  
into hair cells**



## C. Přeprogramováním jádra cytoplasmou jiné buňky



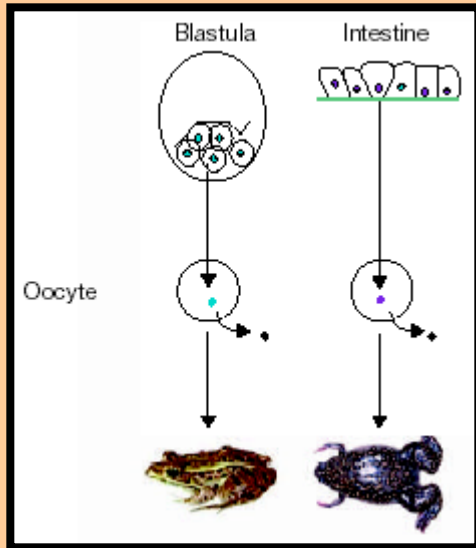
- závislost na momentálním stavu buňky
- velice účinné, ale přenos jádra málo úspěšný u savců
- fúze buněk je ale relativně běžná

**buněčná fúze** – spojení cytoplasmy a jader dvou buněk za vzniku buňky jediné

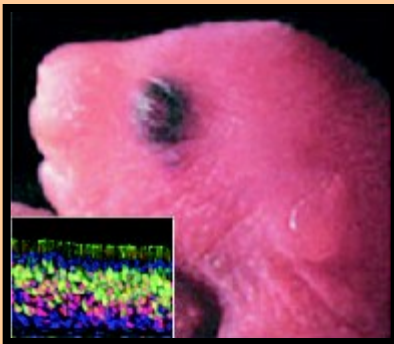
**heterokaryon** – produkt fúze buněk jasně odlišitelnými dvěma nebo i více jádry

**hybridní buňka** – vznikne když heterokaryon projde mitózou za vzniku buňky s jedním jádrem ale s více jak 2n DNA (nemusí obsahovat kompletní jadernou DNA původních buněk)

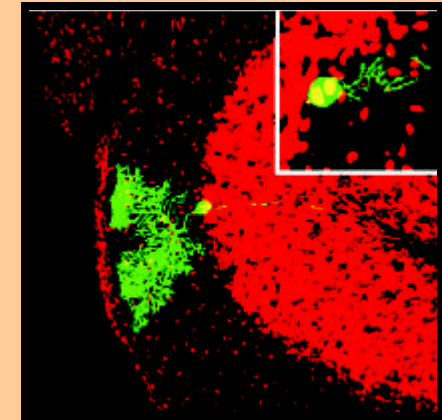
Úplné reprogramování terminálně diferencované buňky cytoplasmou oocyty u žab (ale i savci).



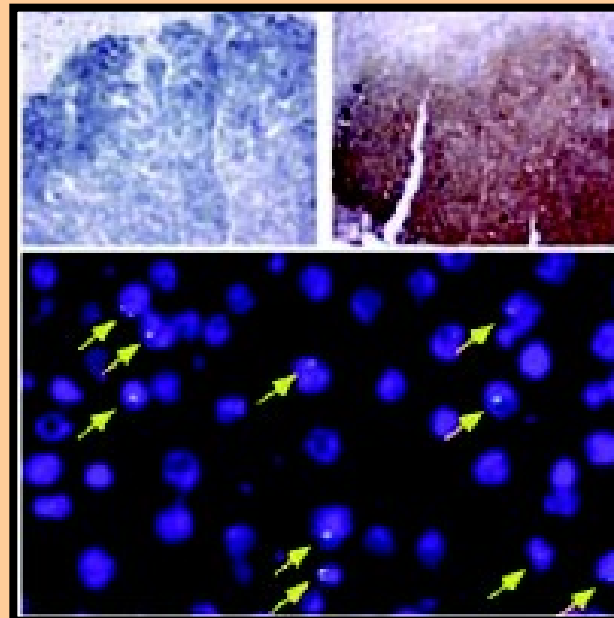
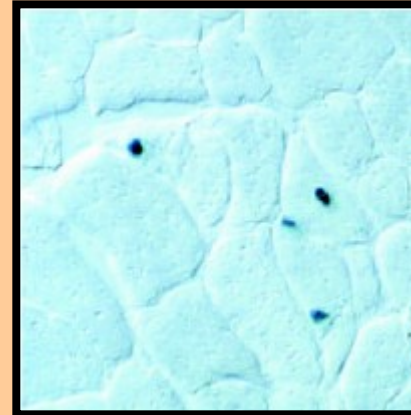
Myš klonovaná z jádra čichového nervu



Heterokaryon Purkiňova neuronu v mozečku a GFP<sup>+</sup>-BMSSC





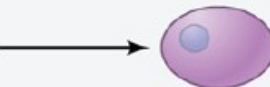





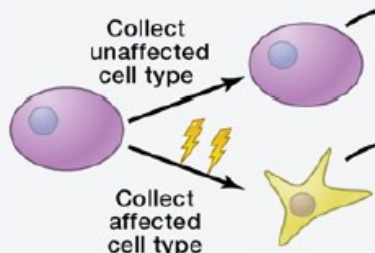
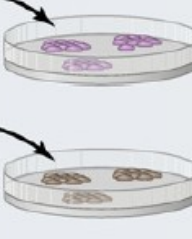

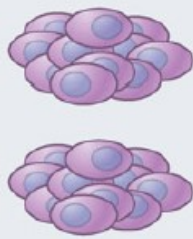
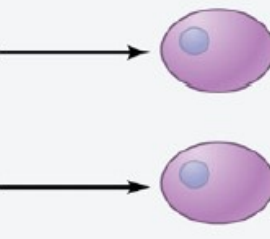




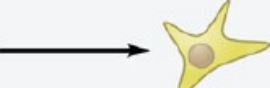




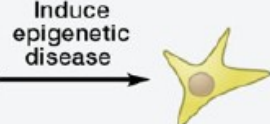


BMSSCs exprimující  $\beta$ -galaktosidázu pod kontrolou svalově specifického promotoru

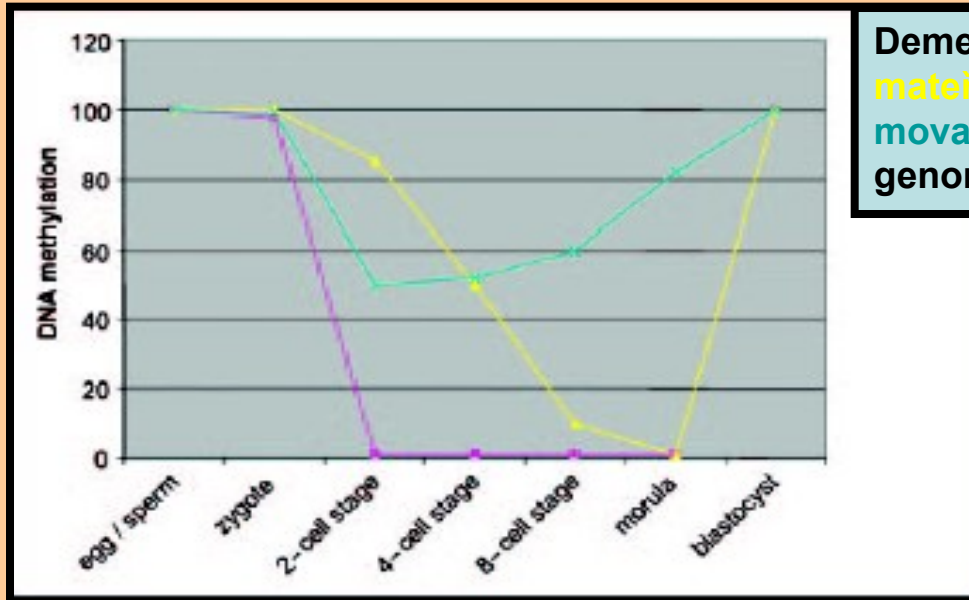


Regenerace samičích Fah<sup>-/-</sup> letálních jater (FAH – fumarylacetoacetate hydroláza) transplantací samčích HSCs  
Detekce Y chromozomu v játrech po transplantaci (dole) a FAH aktivity vpravo nahoře.

# Využití

Patient-specific disease models	Donor's cell	Uniform environmental conditions	Reset epigenome	iPS cells predisposed to disease?	Directed differentiation to target cell type	Useful disease-specific phenotype for modeling?
Healthy control						Control
Genetic disease						Yes
Environmental or epigenetic disease						No
Induced-disease models						Yes
Epigenetic, any donor						Yes

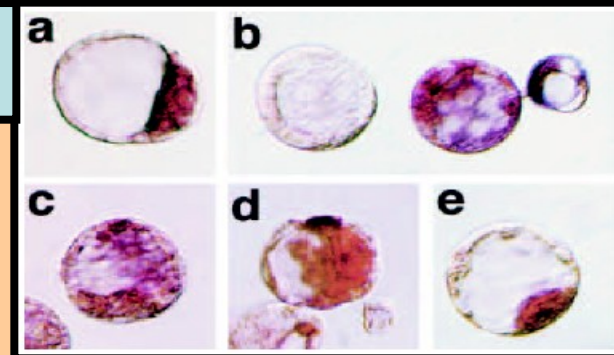
# Reprogramování jádra, metylace DNA a chyby v embryogenezi



Demethylace **otcovského**, **mateřského** a **reprogramovaného** (jaderný přenos) genomu

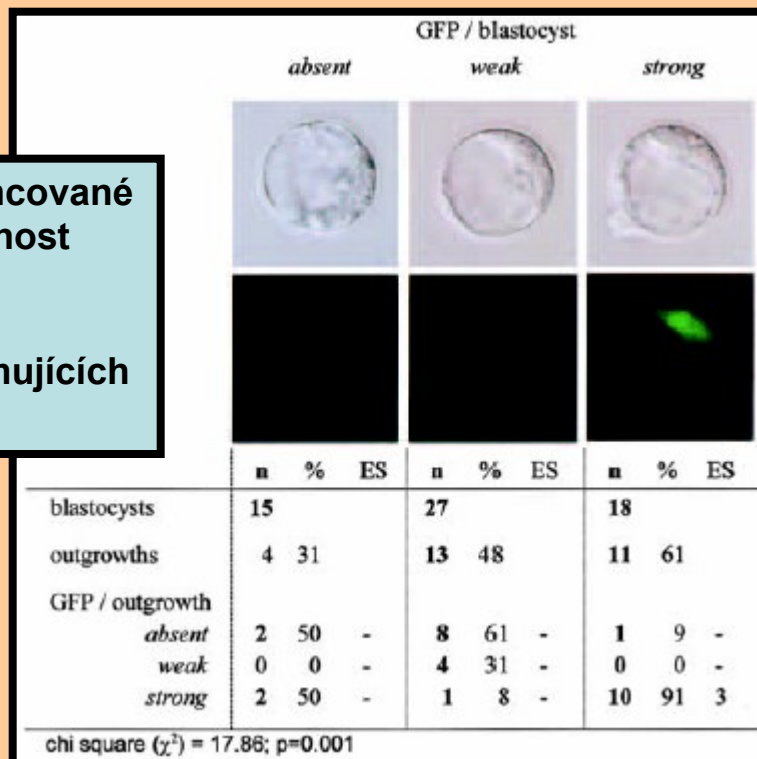
Blastocyst type	n	Oct4 mRNA n (%)		
		ICM restricted	ICM and TE	not detected
Cumulus cell clone	53 <sup>d</sup>	18 (34.0) <sup>a</sup>	29 (54.7) <sup>a</sup>	6 (11.3) <sup>a</sup>
IVF	30	23 (76.7) <sup>b</sup>	4 (13.3) <sup>b</sup>	3 (10) <sup>a</sup>
ICSI	80	60 (75.0) <sup>b</sup>	9 (11.3) <sup>b</sup>	11 (13.8) <sup>a,b</sup>
In vivo fertilized	75	70 (93.3) <sup>c</sup>	3 (4.0) <sup>b</sup>	2 (2.7) <sup>a,c</sup>

Analýza exprese Oct4 mRNA u klonovaných a kontrolních blastocyst (*in situ* hybridizace).



Účinek reprogramování jádra diferencované buňky na expresi Oct4-GFP a schopnost růstu ICM.

Vývoj klonů a IVF/ICSI embryí exprimujících GFP *in vitro*.



Nucleus donor	Reconstructed oocytes n	Two-cell stage n (%)	Morulae (% of 2 cells)	Blastocysts n (% of 2 cells)	GFP fluorescent blastocysts n (%)	Replicates n
Wild-type nuclei						
Cumulus cell	1065	852 (80) <sup>a</sup>	30	85 (10) <sup>a</sup>	NA	20
Oct4-GFP nuclei						
Cumulus cell	2513	1935 (77) <sup>a,b</sup>	30	165 (9) <sup>a</sup>	135 (82) <sup>a</sup>	39
Germ cell	603	500 (83) <sup>a,c</sup>	81	278 (56) <sup>b</sup>	272 (98) <sup>b</sup>	15
IVF	895 <sup>e</sup>	665 (74) <sup>d</sup>	91	490 (74) <sup>c</sup>	485 (99) <sup>b</sup>	12
ICSI	1135 <sup>f</sup>	806 (71) <sup>d</sup>	86	440 (55) <sup>b</sup>	395 (90) <sup>c</sup>	18

IVF, in vitro fertilized; ICSI, intracytoplasmic sperm injection; GFP, Green Fluorescent Protein; NA, not applicable.

Comparison of proportions (%) based on Student *t* test (two tails); superscripts a-d indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) between the values within the same column.

<sup>e</sup>Inseminated.

<sup>f</sup>Survived sperm injection.