

Trnitá cesta

Klonování

(nejen) člověka

Petr Vaňhara, PhD
Ústav histologie a embryologie

LF MU

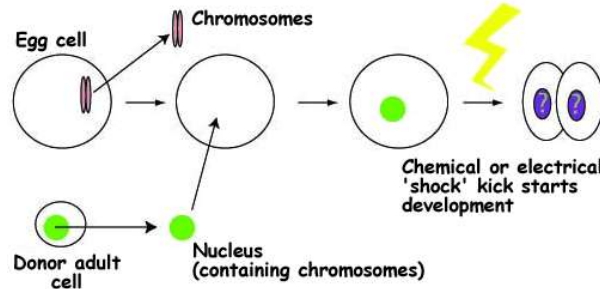




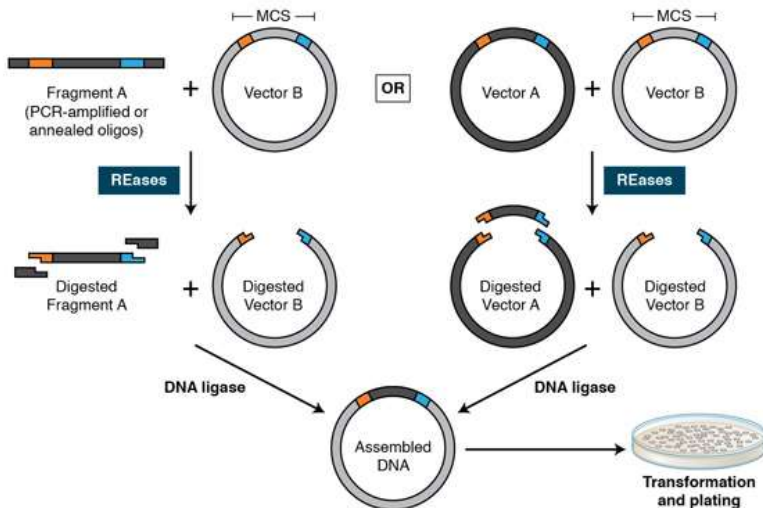
WIKIPEDIE
Otevřená encyklopedie

Klonování je podle běžné definice vytváření nového jedince **geneticky** identického (shodného) s předlohou.

- Molekulární
- Buněčné
- Terapeutické
- Reprodukční

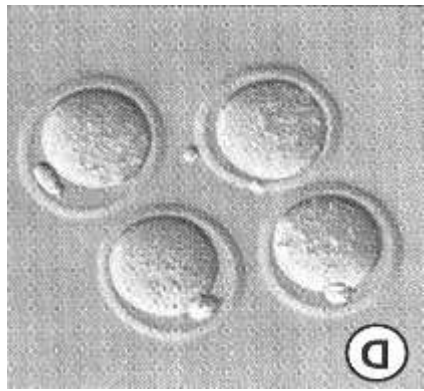


'I can't really imagine cloning taking off..'



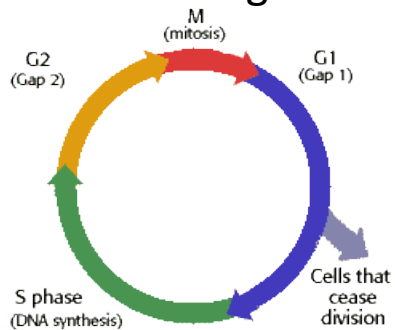
Oocyt

Obrovská, vysoce specializovaná , totipotentní buňka



Vajíčko schopné oplození a podpory embryonálního vývoje

S unikátní regulací buněčného cyklu



Zastavení meiózy v diplotene 1. meiotického dělení

Znovuzahájení meiózy

mitotické dělení

PGC & oogenie

G2/M zástava

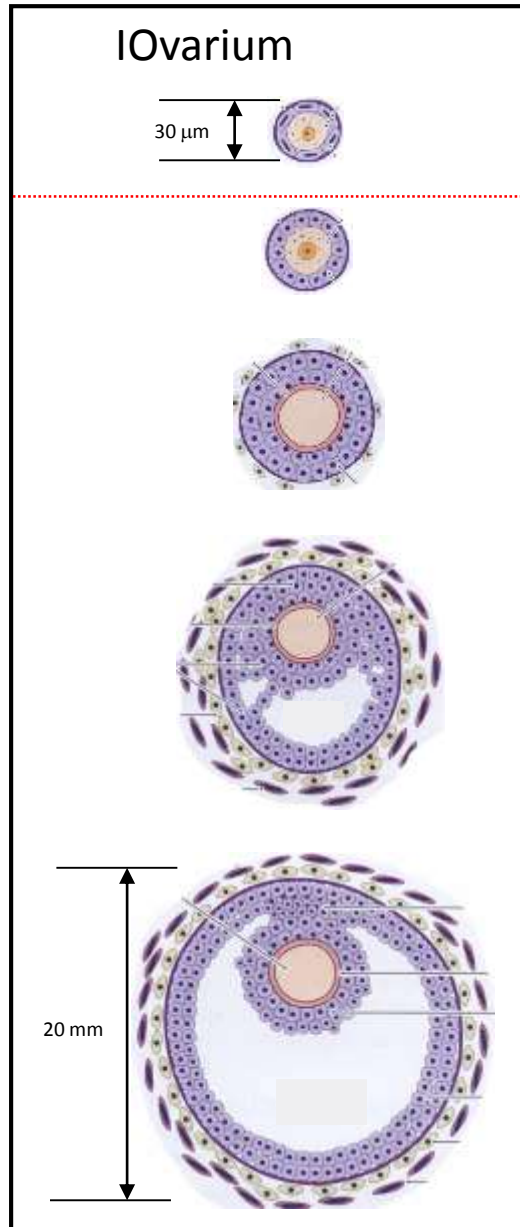
růst
(měsíce až rok)

MI MII

meiotické zrání
(hodiny)

Vývoj oocytu

Diplotene I.meiotického dělení



Primordiální folikul

Rekrutovaný folikul

Preantrální folikul
(časné stádium)

Antrální folikul
(střední velikost)

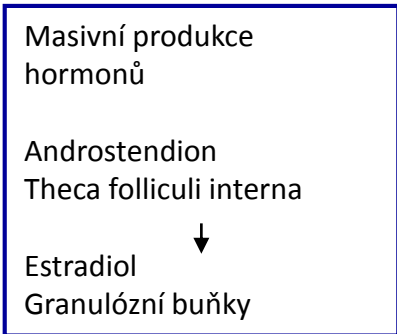


Preovulační fol.
(velký)



FSH-
independentní

Výběr **dominantního folikulu**
(nejcitlivější k FSH)



Růst oocyty

Pomalý, u člověka několikaměsíční proces

100x zvětšení objemu – akumulace organel a molekul dávajících vajíčku schopnost podporovat vývoj embrya až do okamžiku získání autonomie (asi 10^5 mitochondrií oocyty podporuje vývoj embrya až do stádia blastocysty)

Intenzivní transkripce - akumulace mRNA v dormantním stavu

Plně vyrostlý oocyt – ~2,5 ng RNA

Intenzivní translace – mnoho proteinů (velmi omezené znalosti)

Příklad: ZP1, ZP2, ZP3 – proteiny *zona pellucida*

Plně vyrostlý oocyt – ~120 ng proteinu

Transkriptom a proteom – podmiňují unikátní vlastnosti oocyty

Epigenetické změny odehrávající-se během růstu

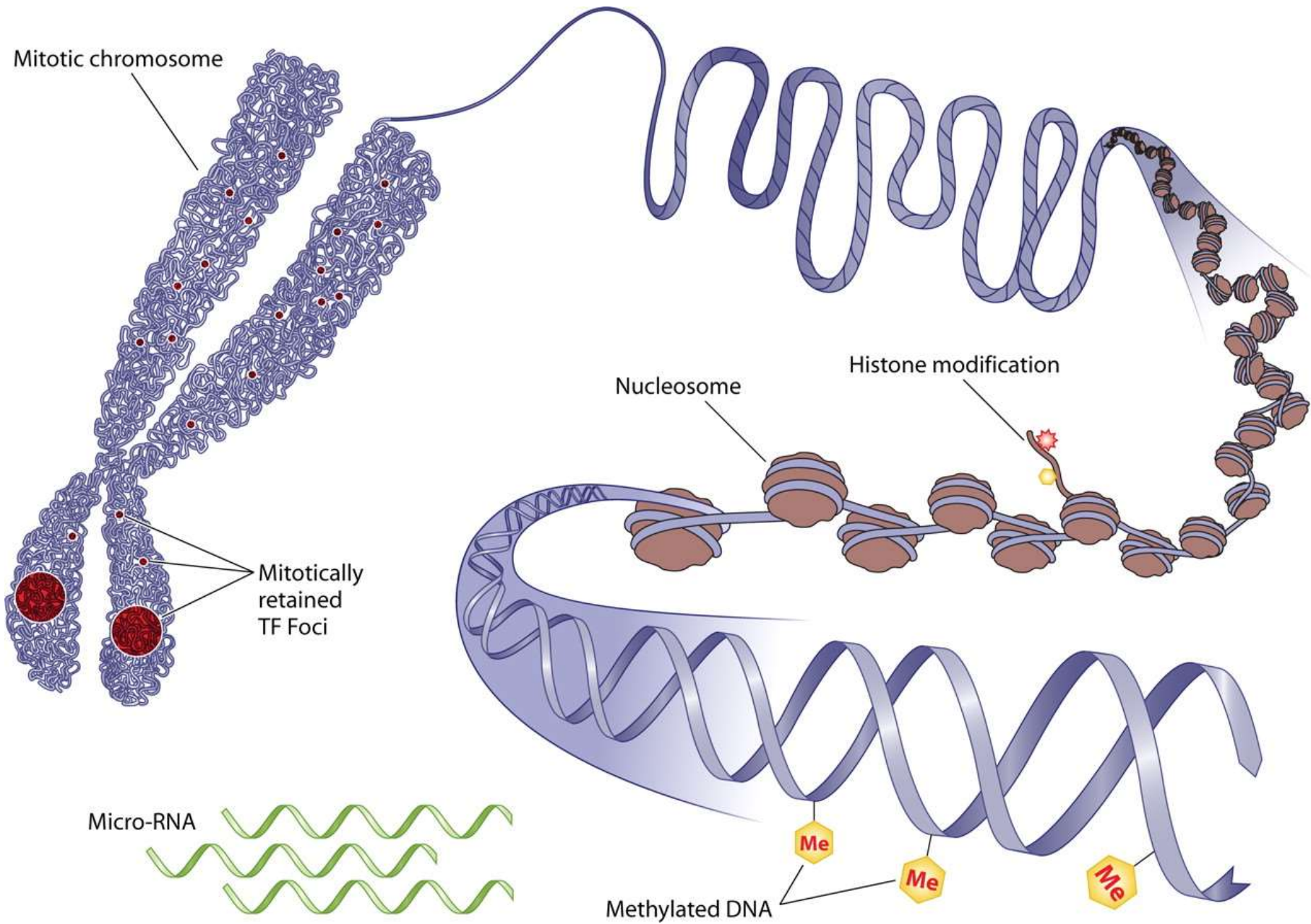
Reaktivace X chromozomu

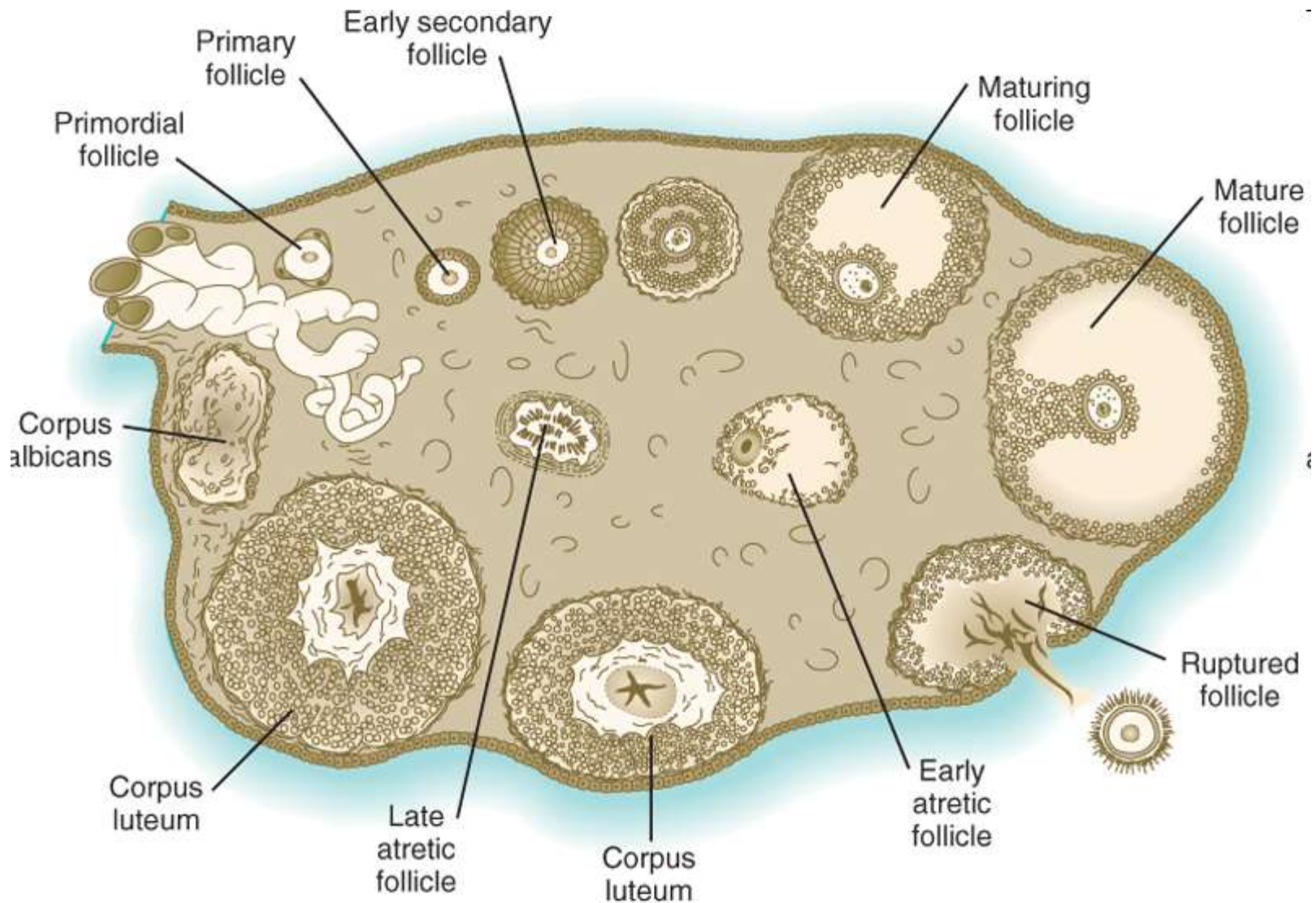
- somatické buňky – jeden X chromozom inaktivován hypermetylací cytozinů v molekule DNA
- rostoucí oocyt – oba X chromozomy aktivní (nutné pro vývoj oocytu – karyotyp 45, X0 má za následek abnormální vývoj ovária)

Genomický imprinting

- epigenetická modifikace autozomálních chromozomů vedoucí k monoalelické expresi genů - umožněna aktivitou enzymu DNA metyltransferázy &
- PGC jsou globálně demetylovány
- během růstu oocytu dochází k novému ustavení imprintingu (asi 40 genů)

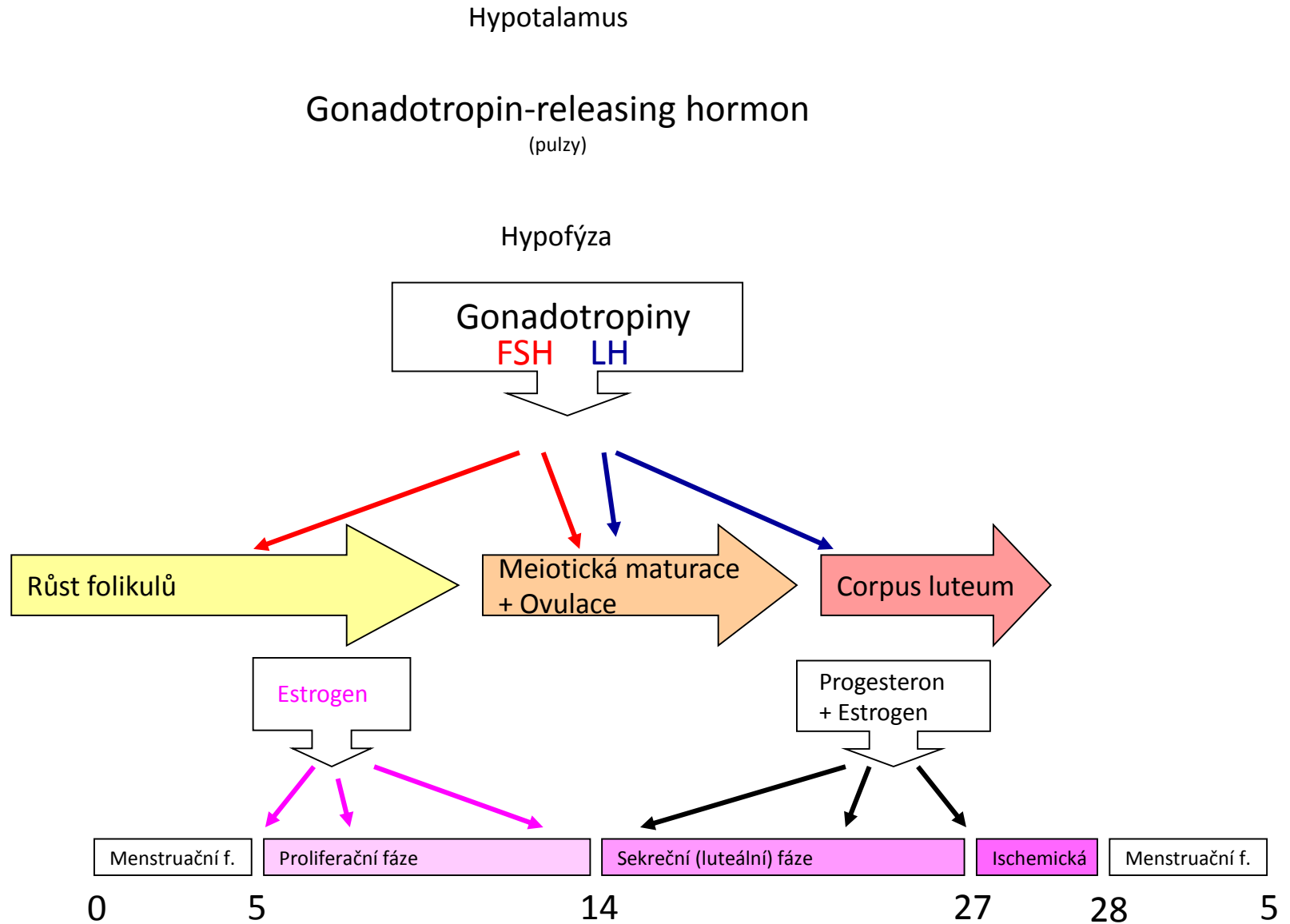
Abnormality v imprintingu mohou být důvodem spontánních abortů při asistované reprodukci (*in vitro* manipulace s gametami a embryi může vést k abnormalitám v imprintingu)



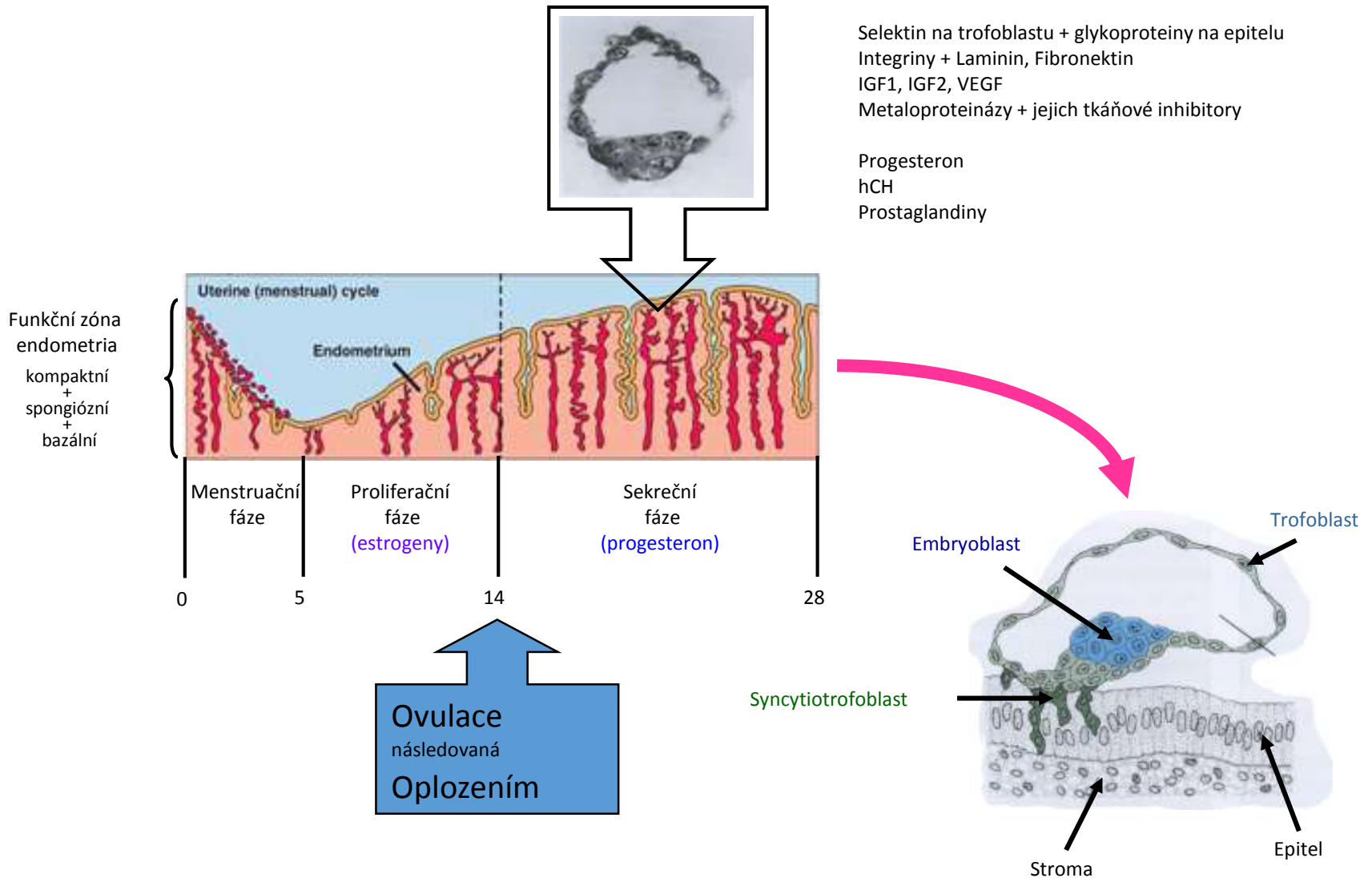


Carlson: Human Embryology and Developmental Biology, 4th Edition.
 Copyright © 2009 by Mosby, an imprint of Elsevier, Inc. All rights reserved.

Hormonální regulace ovariálního cyklu

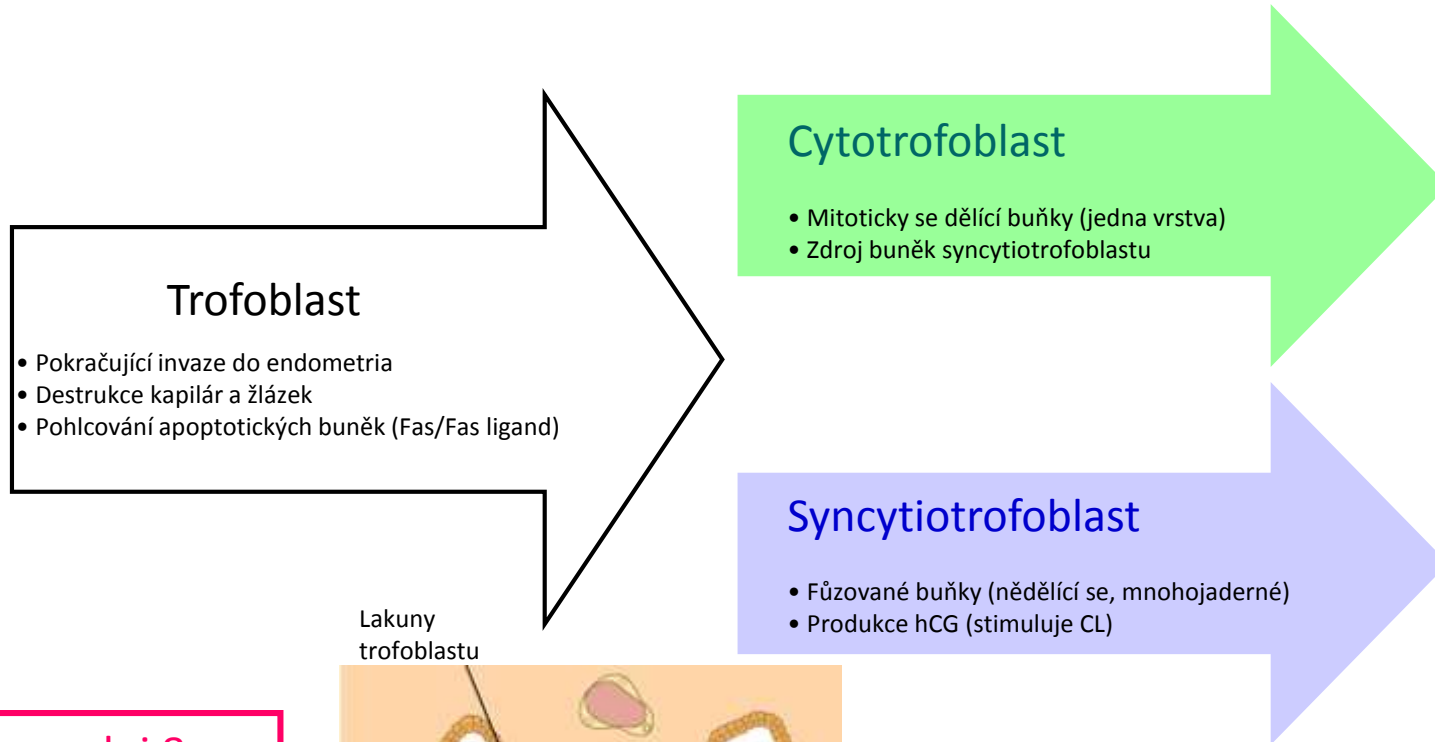


Implantace blastocysty

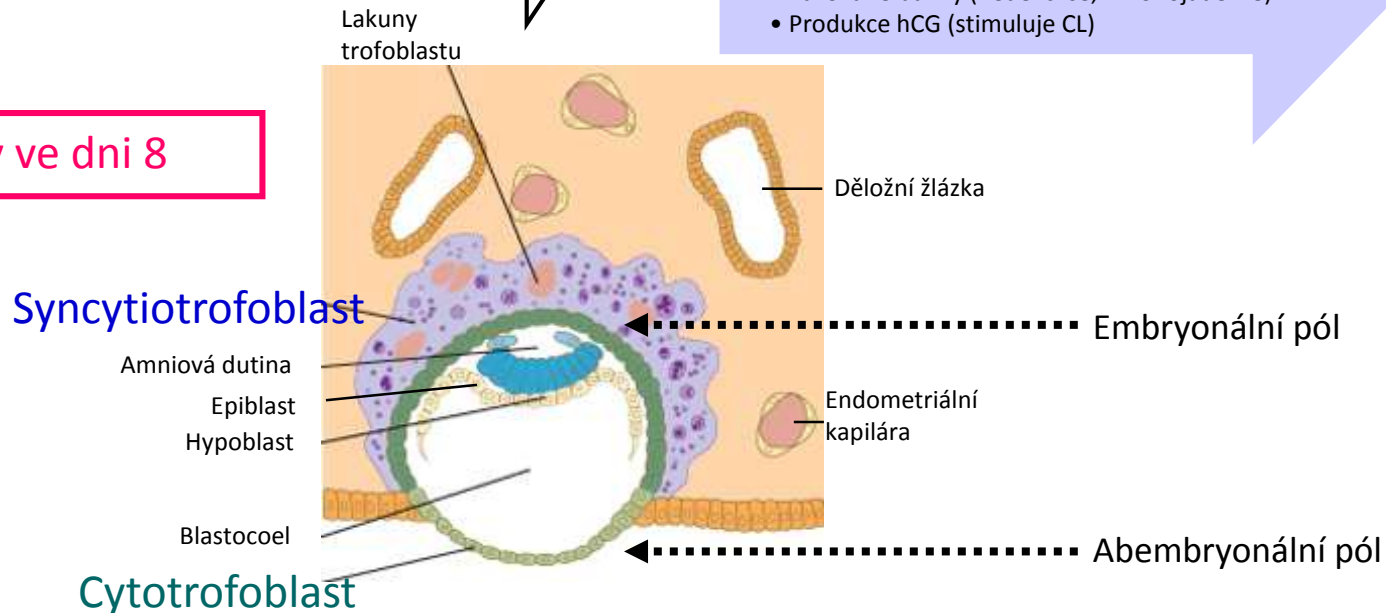


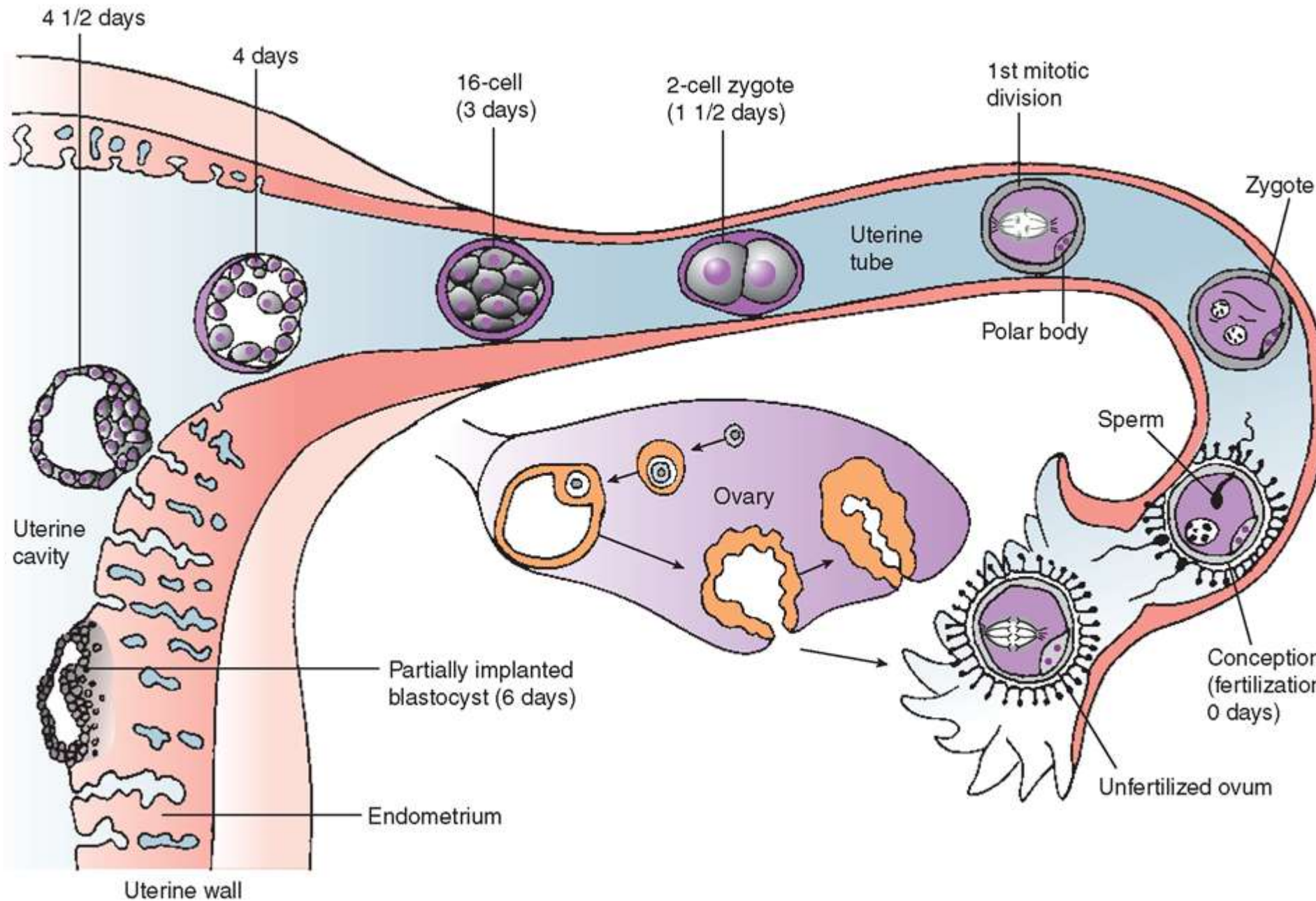
Časná embryogeneza – Druhý týden

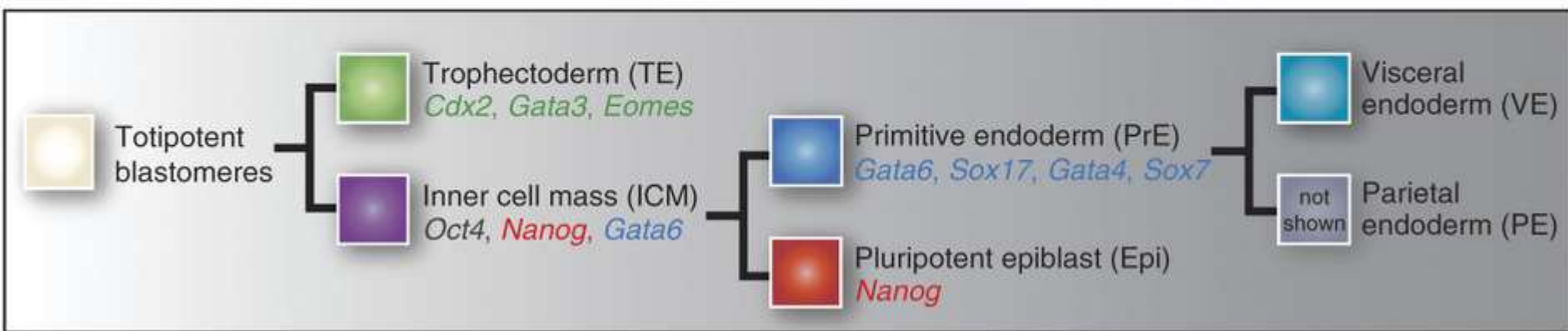
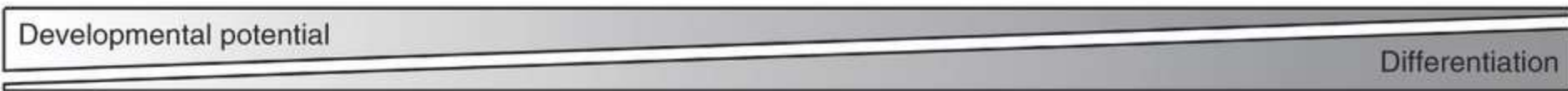
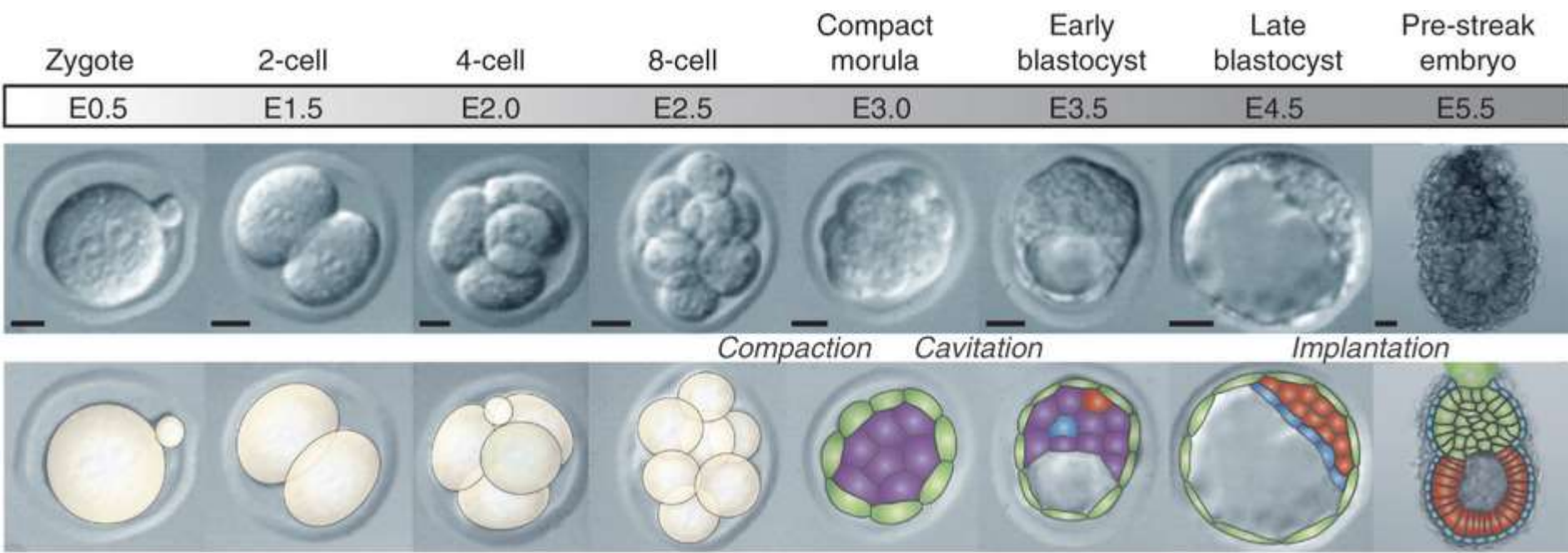
Ukončení implantace + Další embryonální vývoj



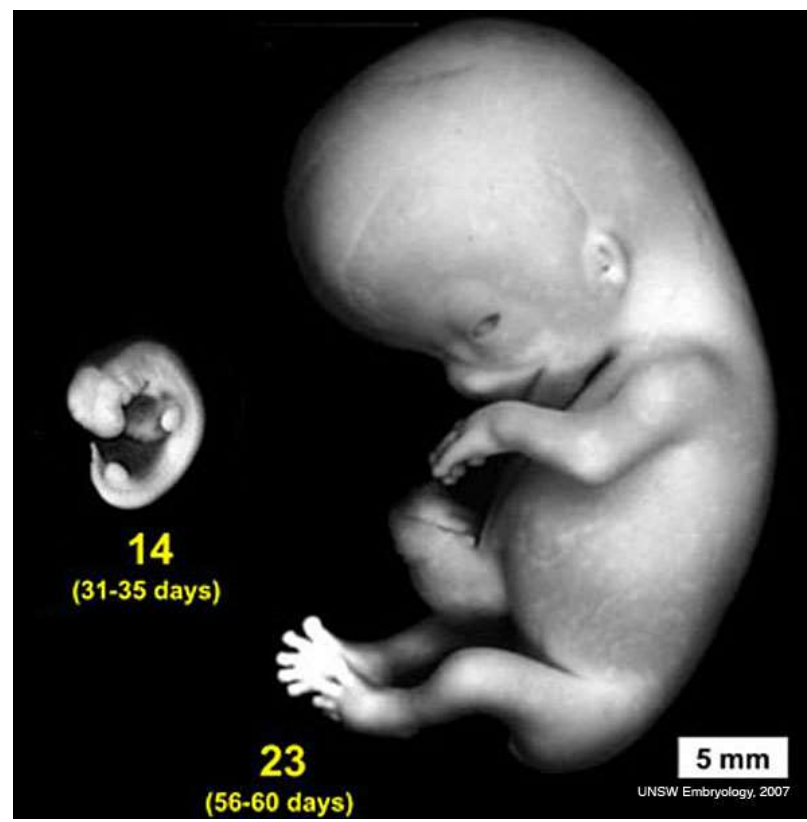
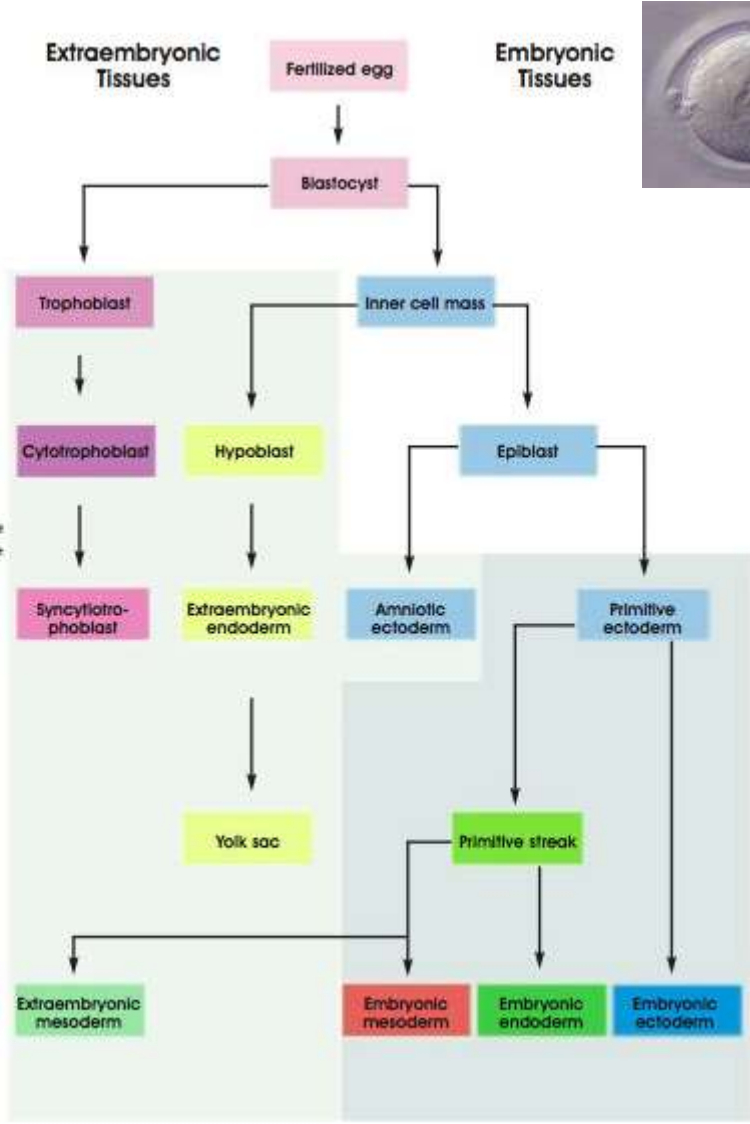
Stav ve dni 8



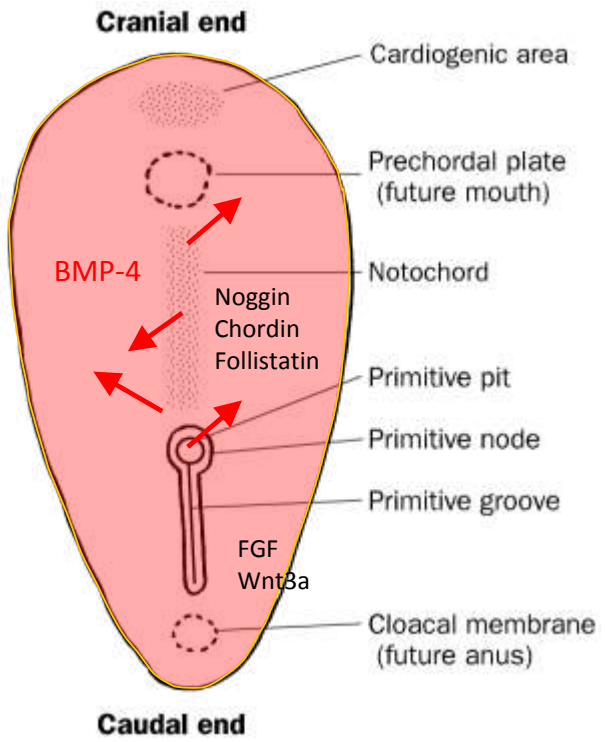
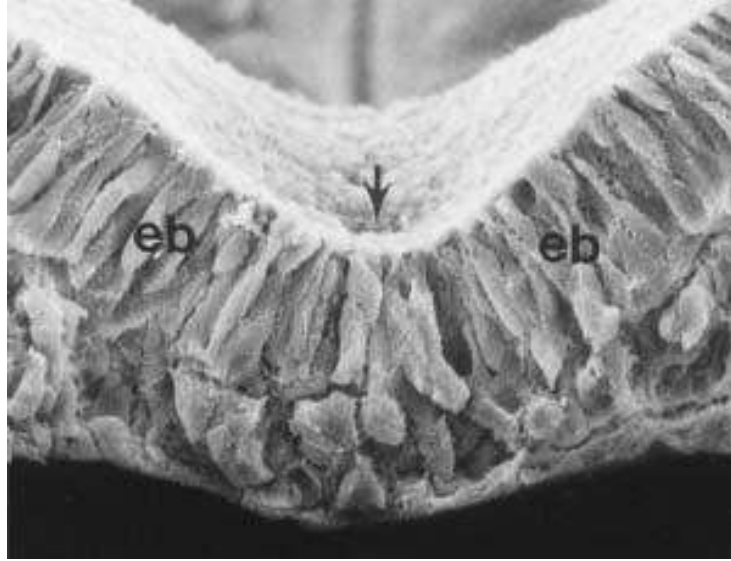
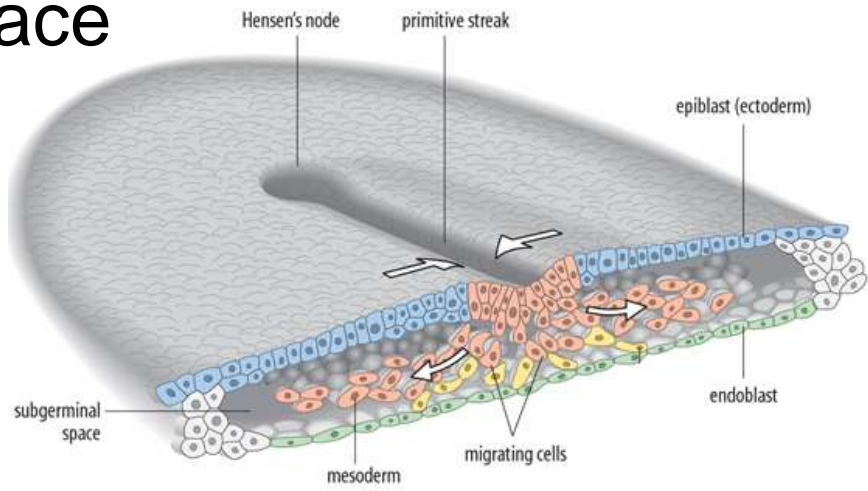




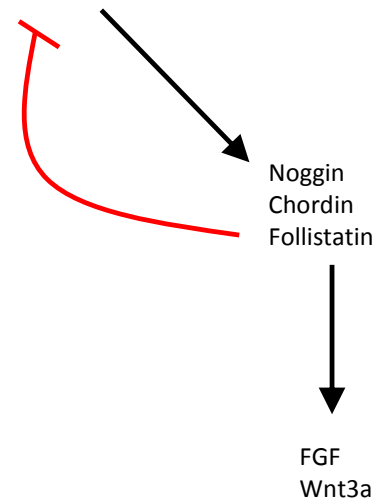
Organogeneze a vývoj tkání



■ Neurulace



BMP-4
v celém embryu, ventralizace endo- a mesodermu



- V budoucím notochordu, primitivní jamce, prechordálním mesodermu
- Inhibují BMP-4
- Neuralizace ektodermu a vývoj předního a středního mozku
- Kaudální neurální struktury – zadní mozek a mícha

KLONOVÁNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ EMBRYOLOGIE

Epigeneze nebo preformace?

William Harvey

ex ovo omnia

Antonie van Leeuwenhoek

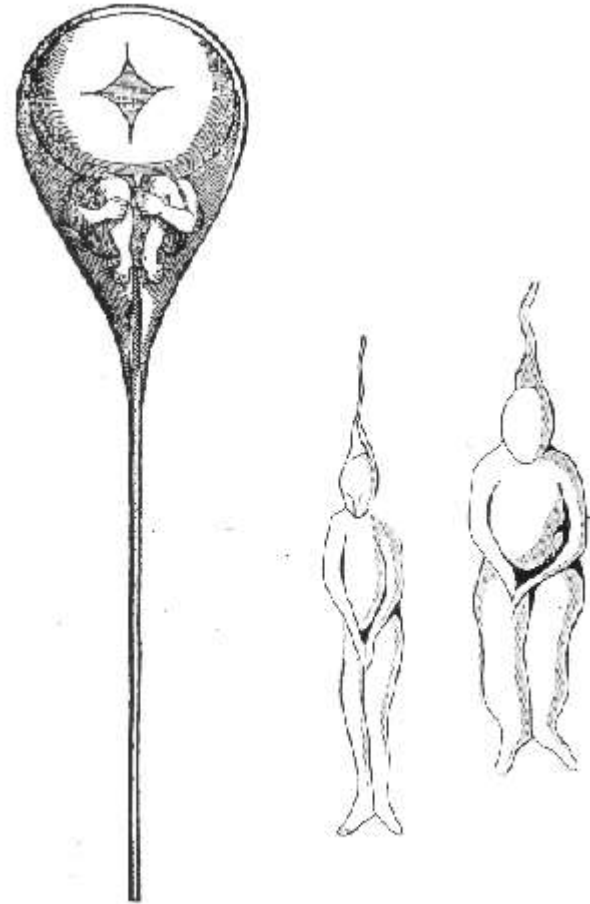
spermatozoa

Nicolaas Hartsoecker

homunculus

Nicolas Malebranche

embryos ad infinitum



Hans Adolf Edward Dreisch

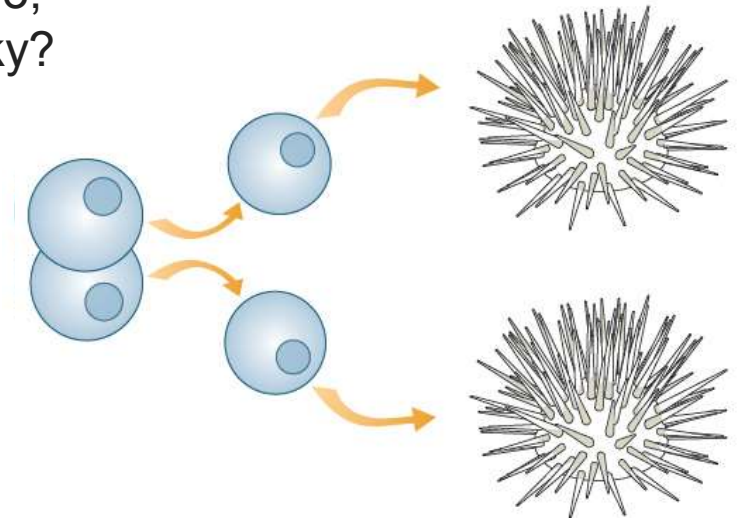
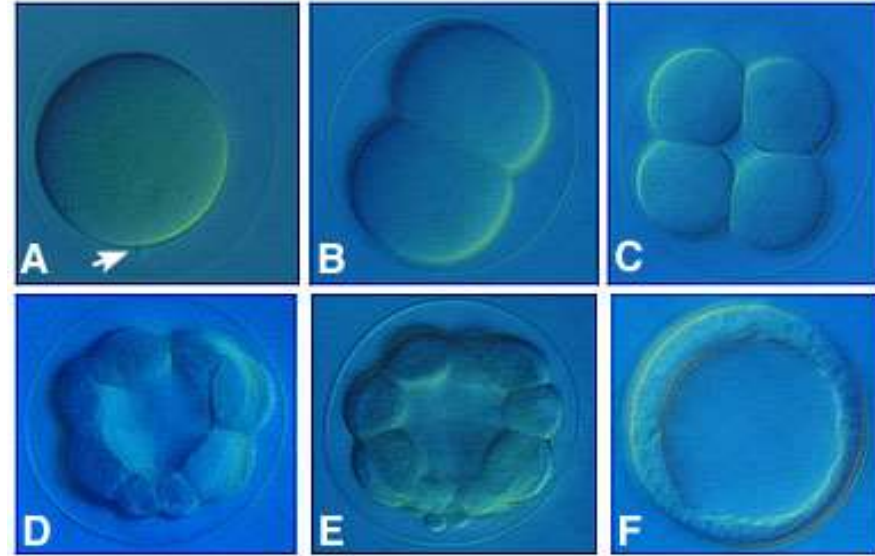
1885 – Každá z buněk raného embrya může dát vznik celému organismu



JEŽOVKA

Nenáročný organismus, velký oocyt i embrya
výborný model pro studium vývojové biologie

Hypotéza: vyvine se z disociovaných buněk raného,
dvoubuněčného embrya příslušná část těla ježovky?



Hans Spemann

1902 – Funguje to i obratlovců!



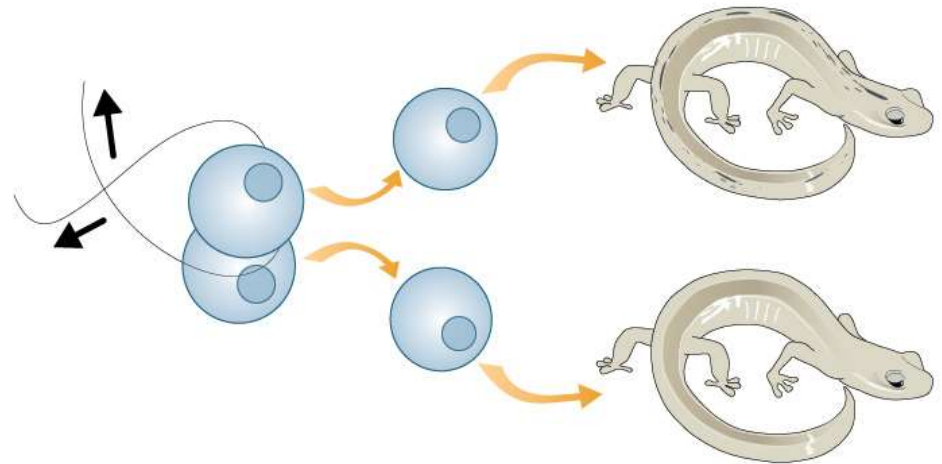
MLOK

Embrya mloků „drží“ mnohem více pohromadě než embrya ježovek.

Experiment: Blastomery mechanicky rozděleného dvoubuněčného embrya umožňují vývoj normální embryonální vývoj.

Ale rozdělení pozdějšího embrya, není zdaleka tak úspěšné.

Buňky rozdělených embryí se mohou vyvíjet pouze do určitého stádia embryogeneze



Hans Spemann

1928 – Embryonální vývoj kontroluje buněčné jádro

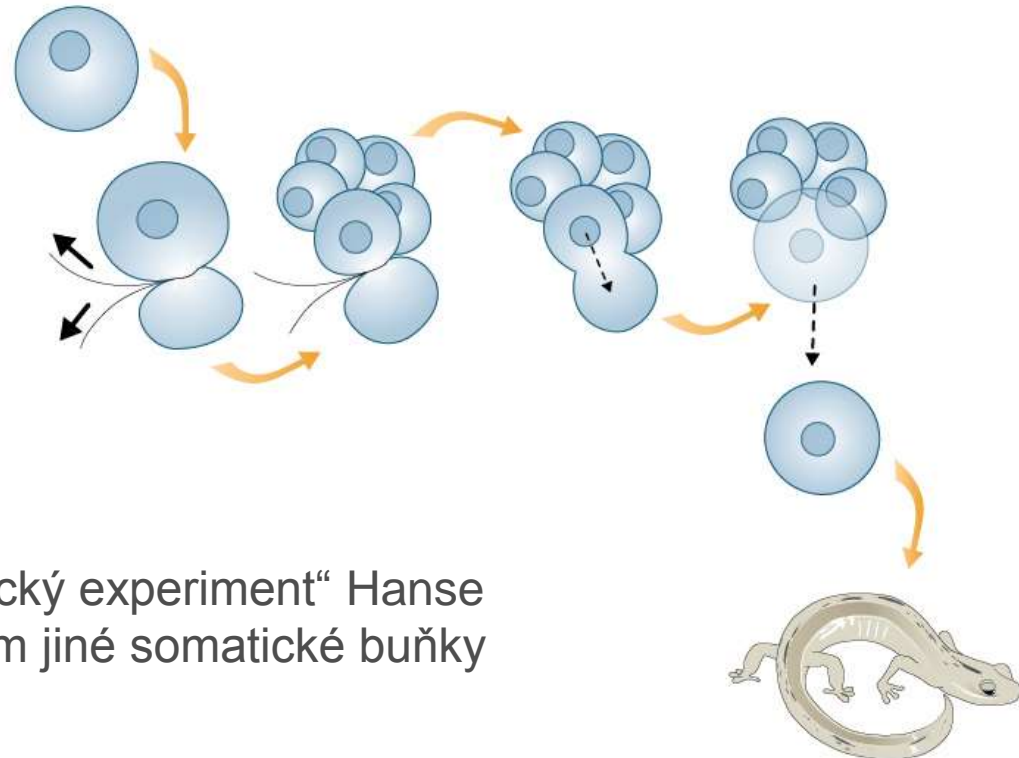


MLOK

Ligací oocyty dochází k vývoji pouze v oblasti s buněčným jádrem

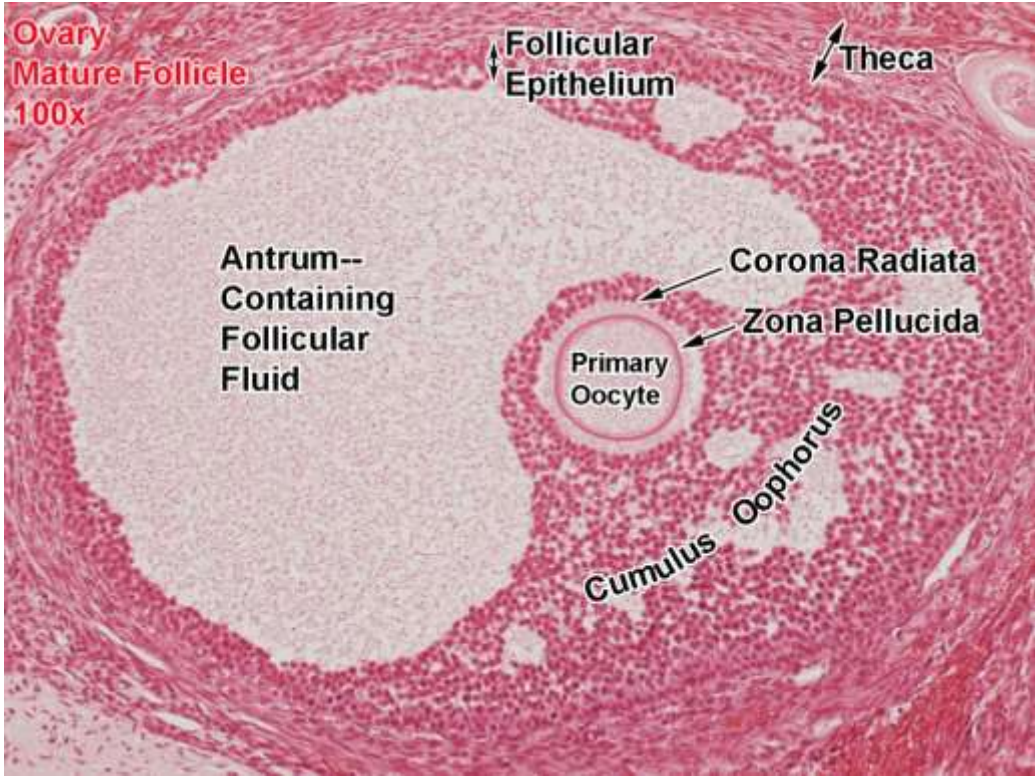
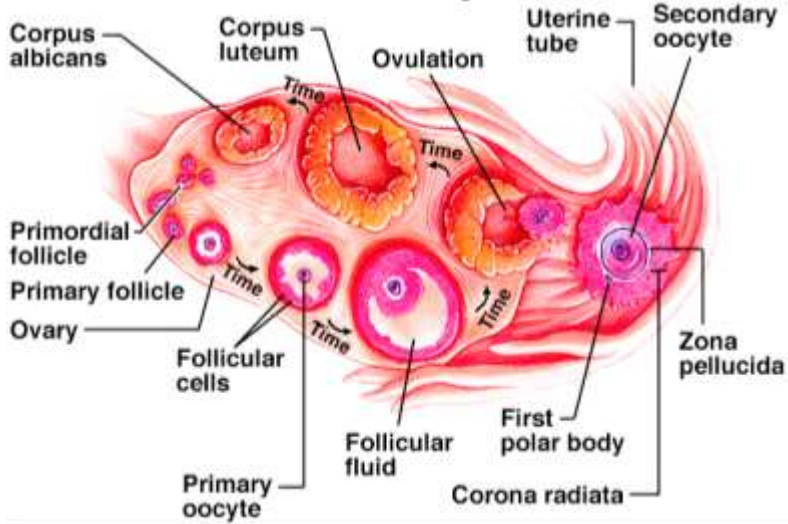
Návrat jádra do původní oocytární cytoplazmy a jeho odškrbení v 8-buněčném stádiu indukuje vývoj samostatného embrya

Jádra buněk do 8-buněčného stádia jsou vývojově totipotentní



1938 – první idea klonování: „fantastický experiment“ Hanse Spemanna náhrada jádra oocyty jádrem jiné somatické buňky a následný vývoj embrya

Mikromanipulace s oocytom



Robert Briggs a Thomas King
1952 – První úspěšný přenos jádra

TRANSPLANTATION OF LIVING NUCLEI FROM BLASTULA
CELLS INTO ENUCLEATED FROGS' EGGS*

BY ROBERT BRIGGS AND THOMAS J. KING

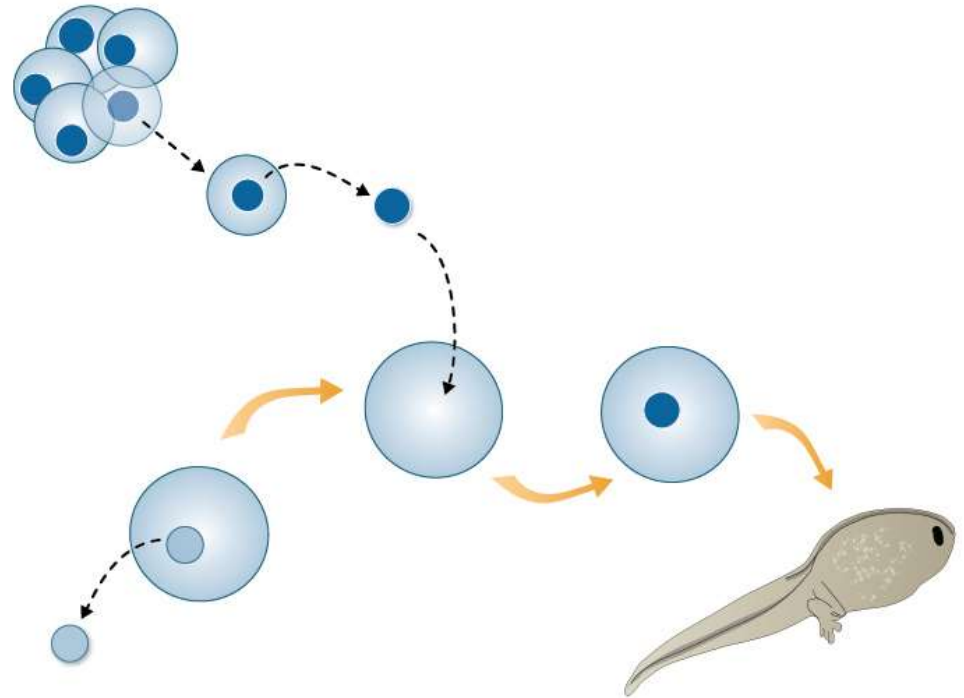
INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH AND LANCKENAU HOSPITAL RESEARCH INSTITUTE,
PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA

ŽÁBA (Skokan leopardí, *Rana pipiens*)



Přenos jádra z žabího embrya do
enukleovaného oocytu

V případě raných donorů, byla
úspěšnost normálního vývoje pulců
vysoká. Jádra starších donorů zdaleka
tak úspěšná nebyla – přežívající pulci s
výraznými vývojovými abnormalitami



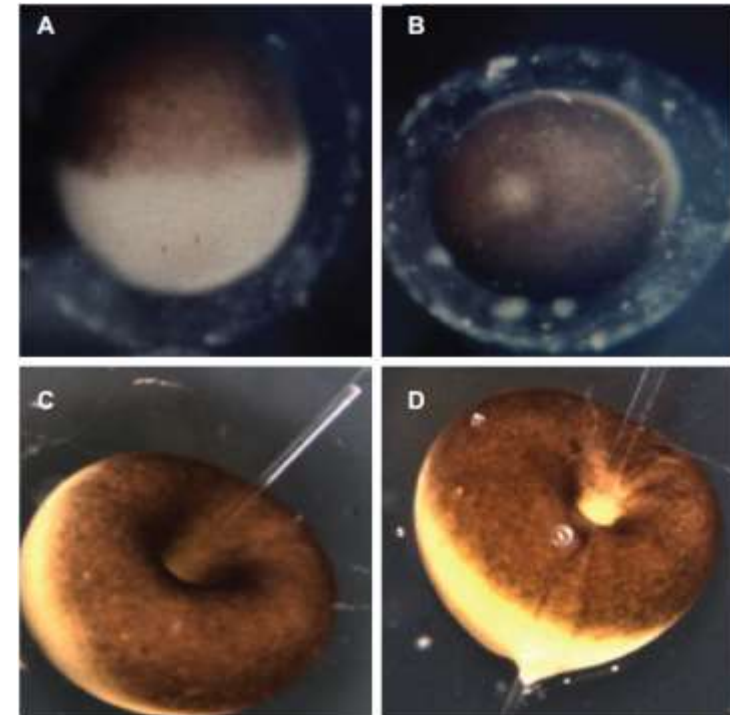
Endodermální jádro embrya ve stádiu embrya neumožňuje normální vývoj

1930 – nová laboratorní hvězda

Drápatka vodní (*Xenopus laevis*)



Vysoká citlivost na FSH a LH
Rezistence k chorobám
Snadný chov
Výborný embryologický model

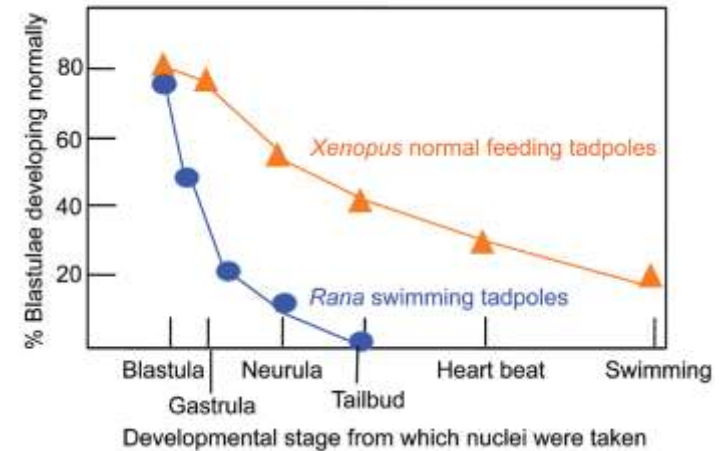
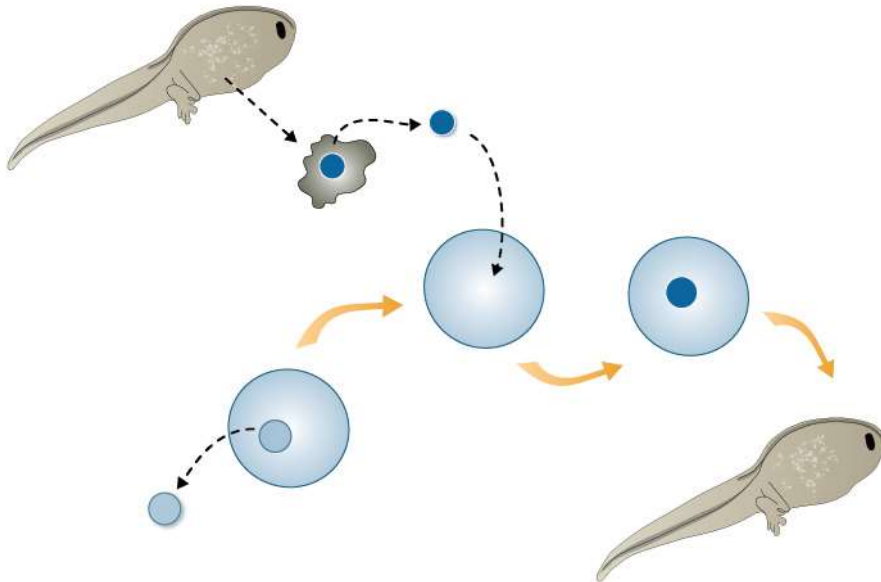


John Gurdon



1952 – První úspěšný přenos jádra somatické diferencované buňky

ŽÁBA (*Xenopus laevis*)



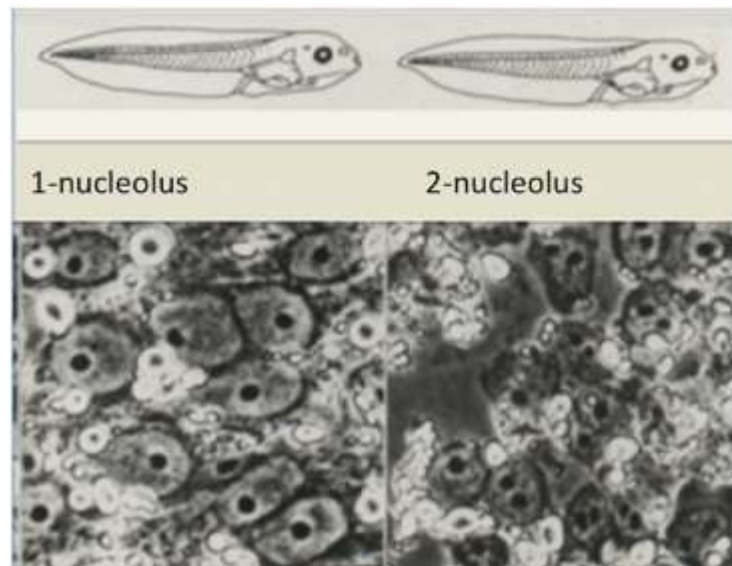
Samotná oocytární cytoplazma umožňuje preprogramování jádra pouze do určitého stádia vývoje

John Gurdon

1952 – První úspěšný přenos jádra somatické diferencované buňky

ŽÁBA (*Xenopus laevis*)

Jádro somatické determinuje fenotyp vyvíjejícího se zárodku

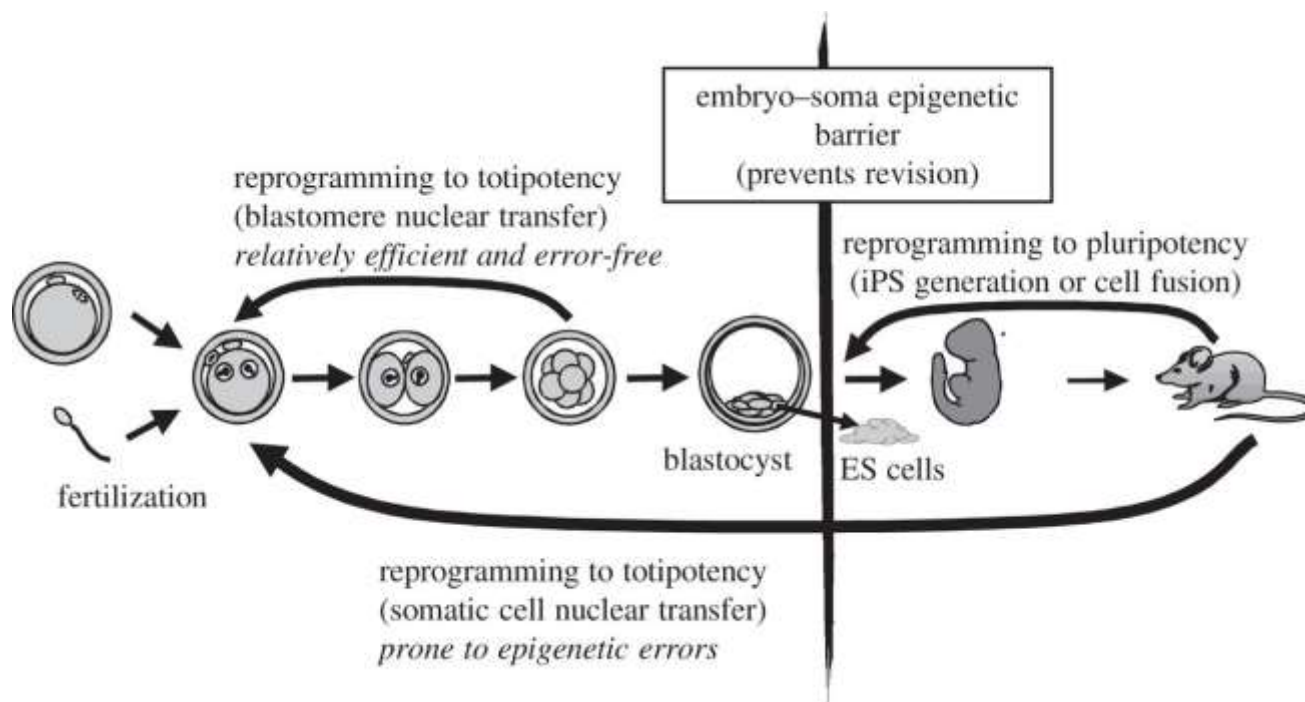


I diferencované, somatické buňky z plně vyvinutého organismu obsahují veškerou genetickou informaci nezbytnou k úspěšnému embryonálnímu vývoji

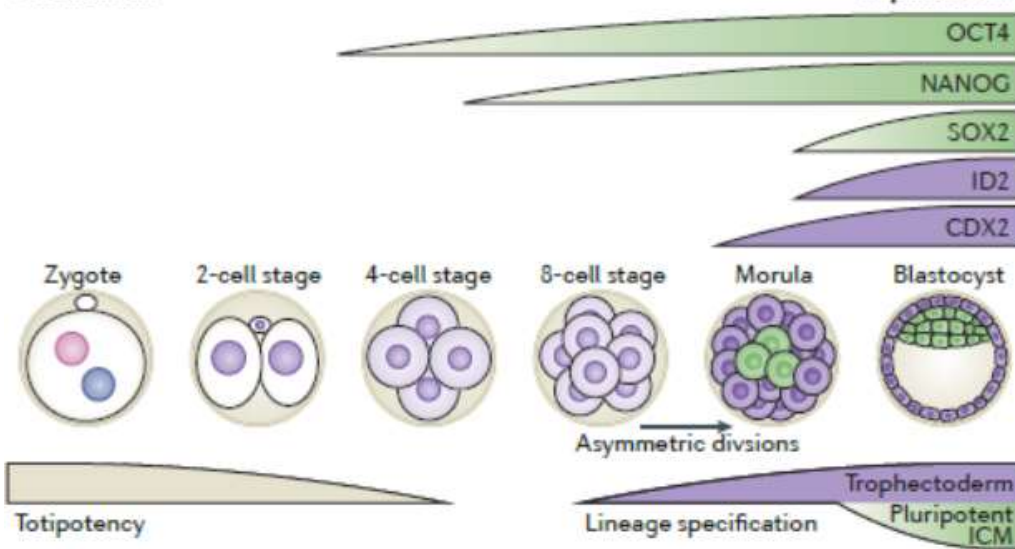


Pro správný embryonální vývoj jsou nezbytné geny exprimované pouze během rané embryogeneze

Oocytární cytoplazma umožňuje přeprogramování jádra pouze do určitého stádia vývoje



Fertilization

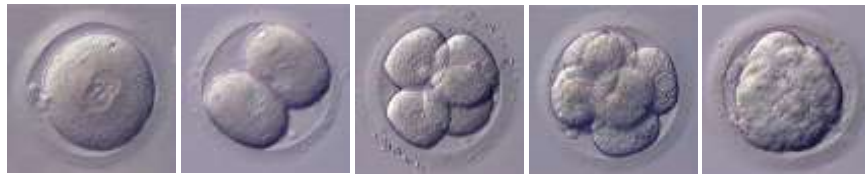


H3R26me2	Asymmetric
PRDM14	Asymmetric
H3.1/3.2	
H3.3	
H2A.Z	
mH2A	
H2A.X	
γH2A.X	
H4K20me3	
H3K64me3	
H3K9me3	
H3K27me3	
H3K4me3	
DNAme	
Histone mobility	
Chromocentre formation	

Kmenové buňky se liší ve schopnosti diferenciaci

Totipotence

- Všechny buňky těla včetně extraembryonálních tkání
- Zygota a raná stádia



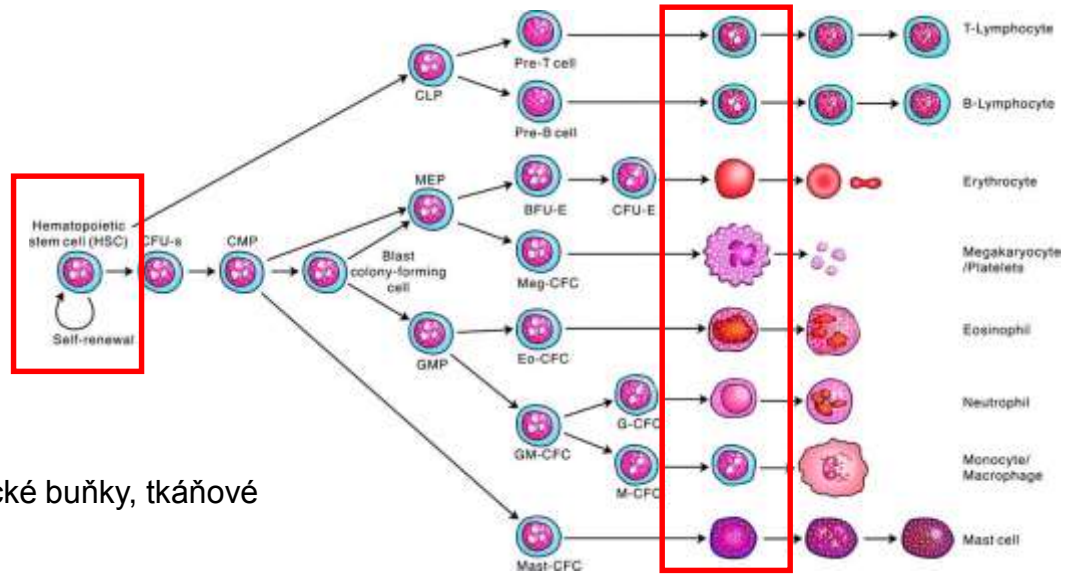
Pluripotence

- Všechny buňky těla s výjimkou trofoblastu
- Blastocysta – *Inner cell mass* - ICM (embryoblast)



Multipotence

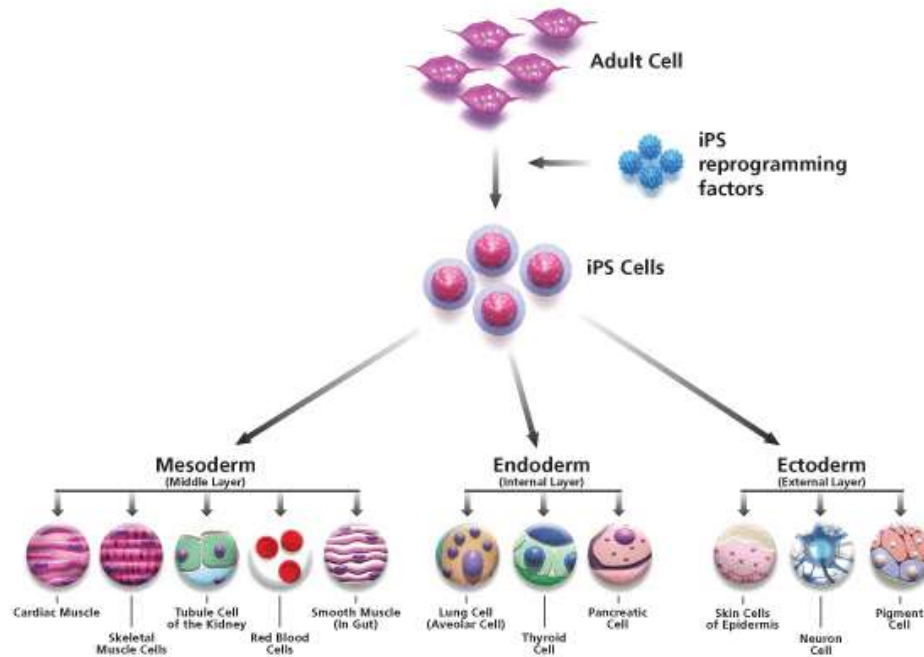
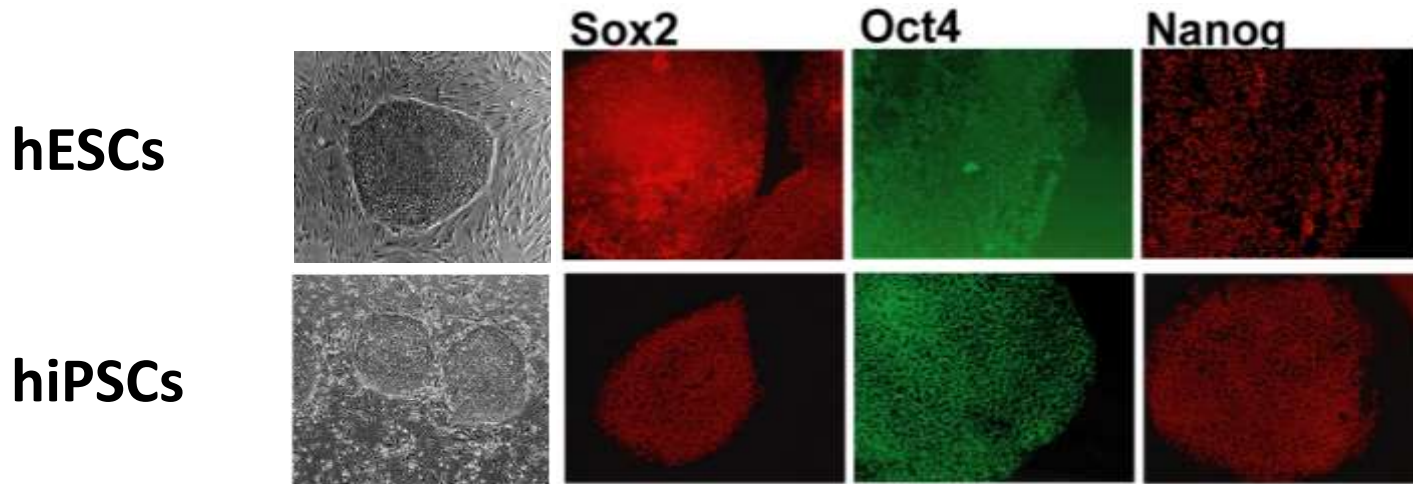
- Různé buněčné typy v rámci tkáně
- Mesenchymální SC, hematopoietické SC

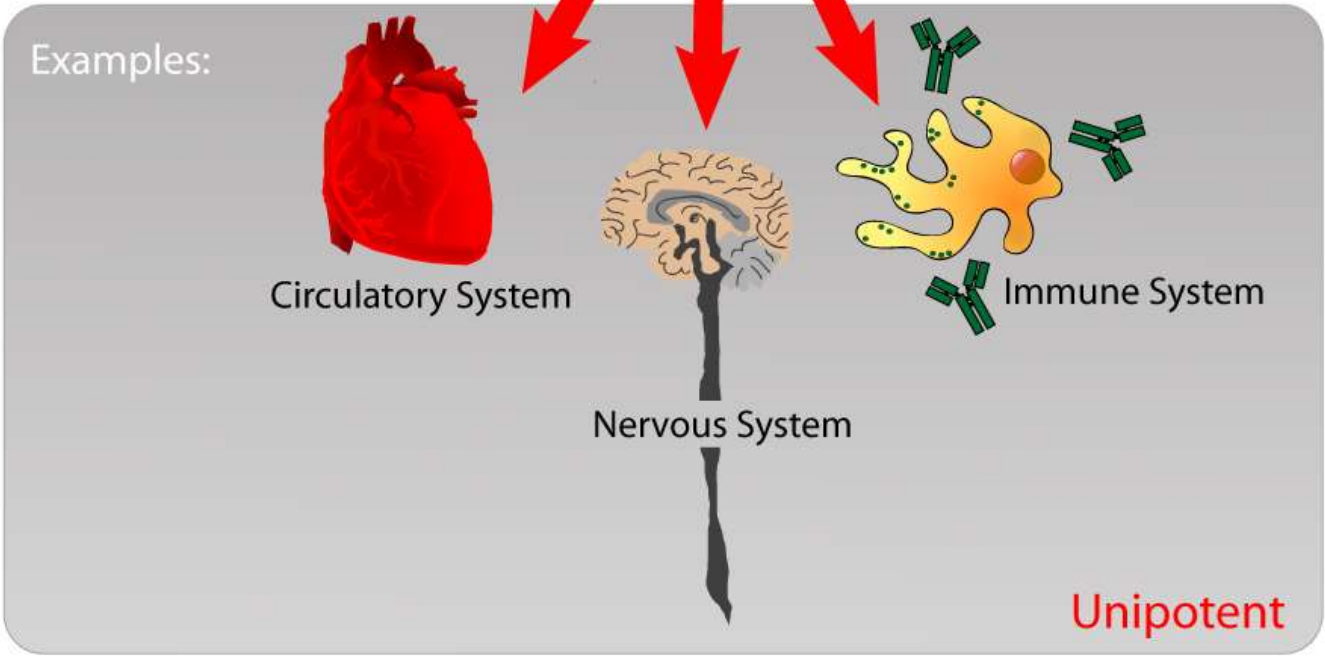
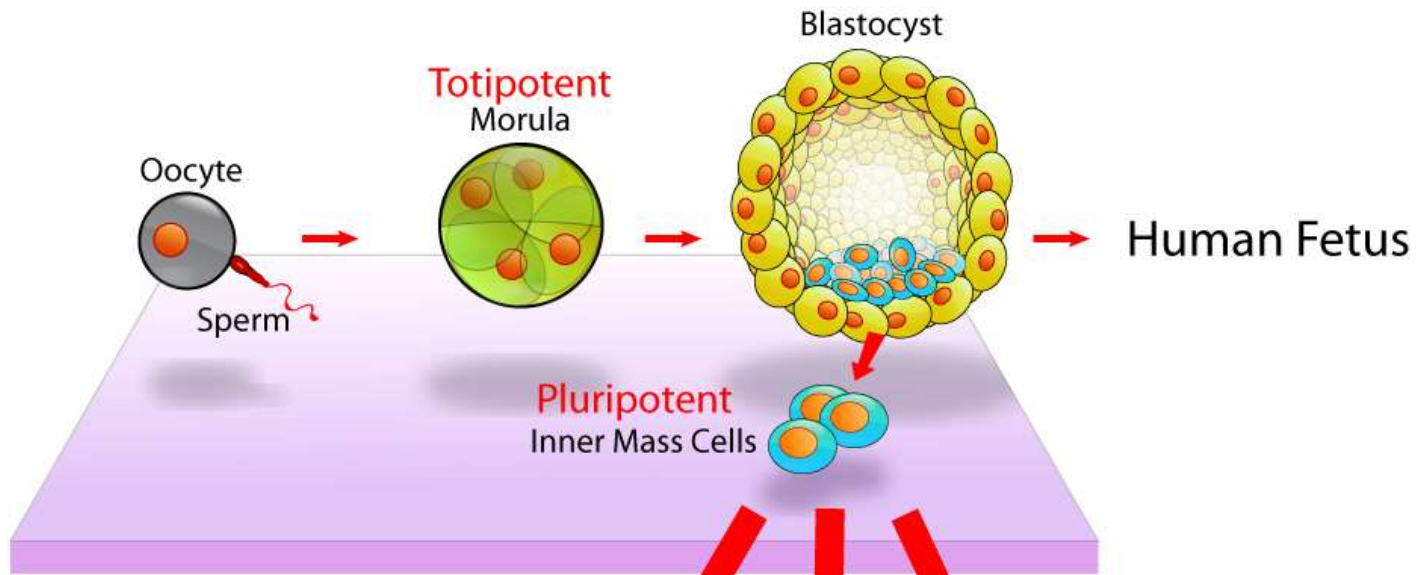


Oligo- a unipotence

- Jeden nebo několik buněčných typů – hematopoietické buňky, tkáňové prekurzory (obnova epitelů apod.)

- Indukované pluripotentní kmenové buňky mají vlastnosti embryonálních kmenových buněk



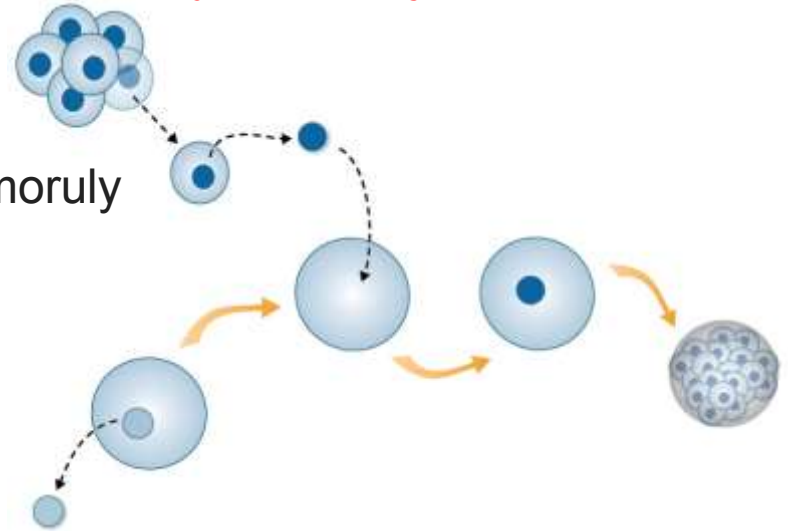


J. Derek Bromhall

1975 – První savčí embryo vytvořené přenosem embryonálního jádra

KRÁLÍK

přenos jádra a embryonální vývoj do stádia moruly
Bromhall v experimentu nepokračoval

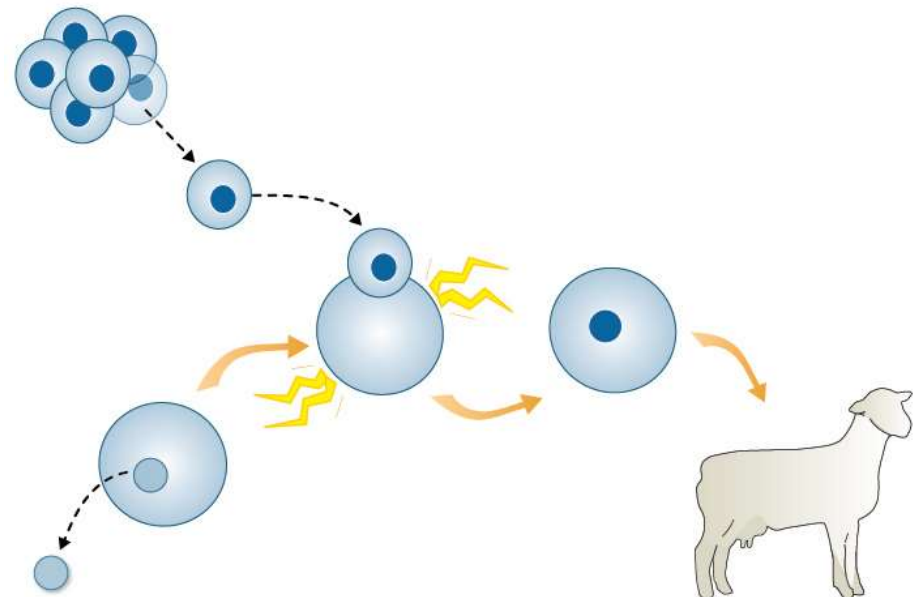


Steen Willadsen

1984 – První narozený savec vytvořený přenosem embryonálního jádra

OVCE

separace buněk z 8-buněčného embrya
fúze s enukleovaným oocytem
embryotransfer a narození tří jehňat

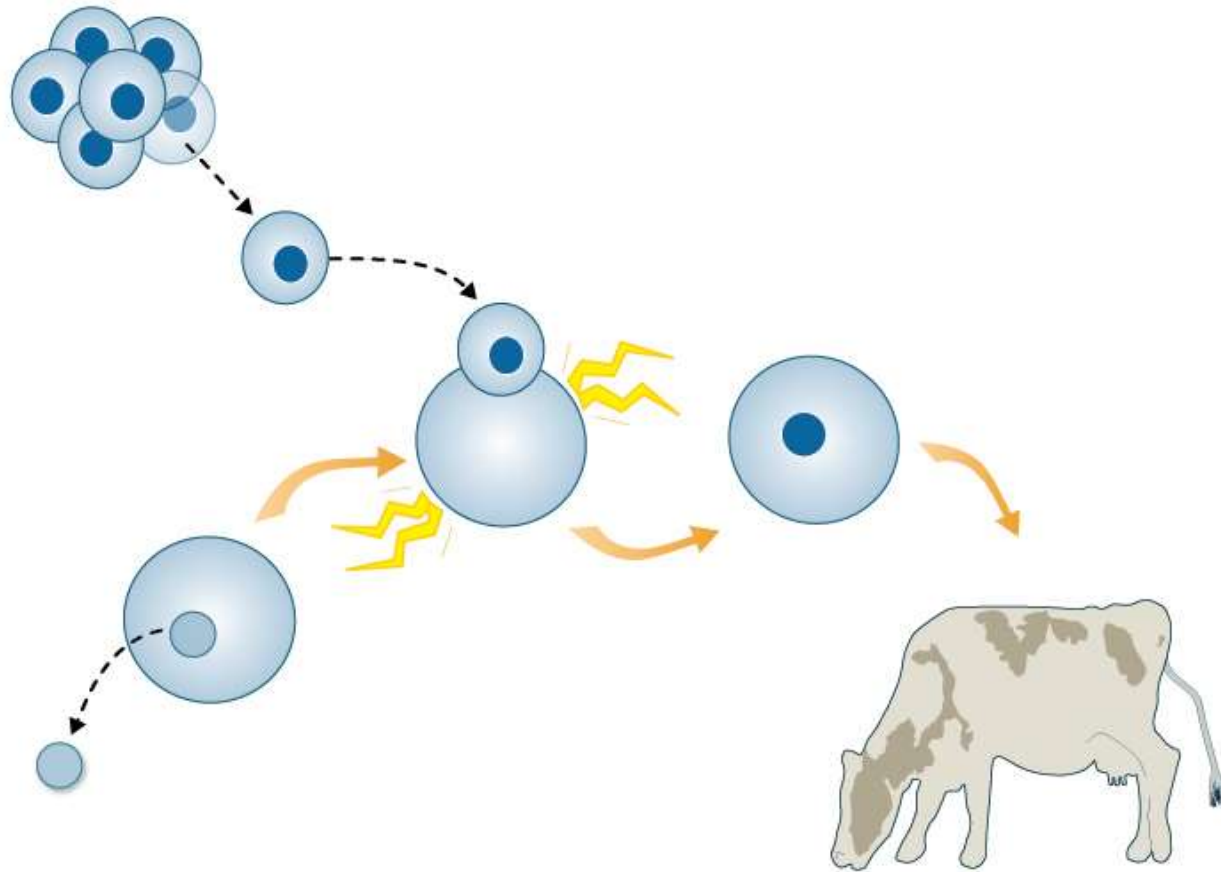


Neal First, Randal Prather, Willard Eyestone

1987 – Další úspěšné experimenty s přenosem embryonálních jader

KRÁVA

Wilandsenova technika přenosu embryonálních jader
telata „Fusion“ a „Copy“



použití somatických jader v savčím klonování považován stále za nemožné

Ian Wilmut a Keith Campbell

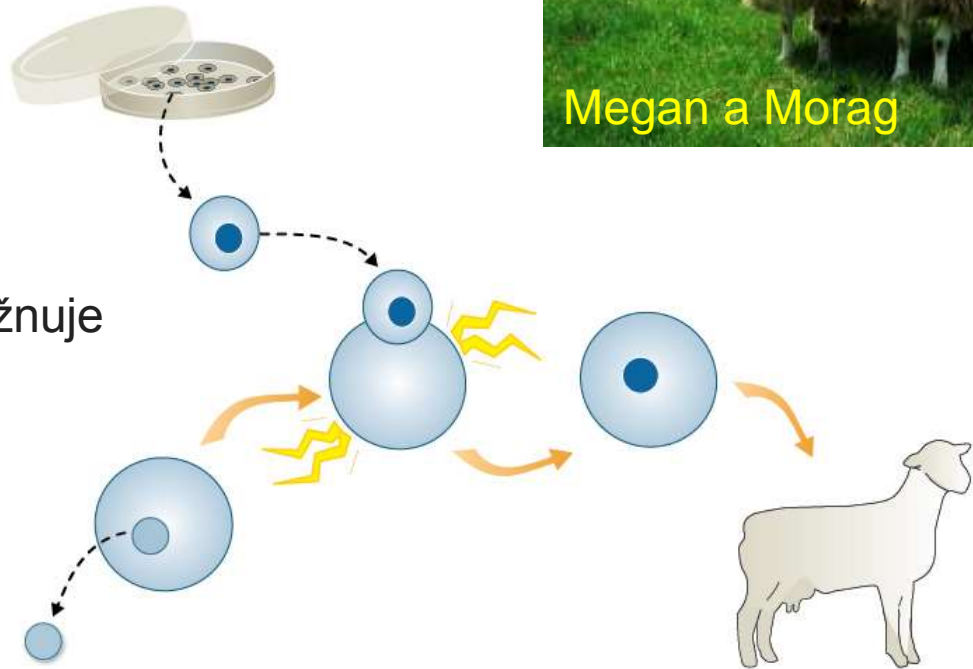
1996 – Přenos jader embryonálních buněk kultivovaných in vitro a vznik živoschopných zvířat

OVCE

zdroj jader - ovčí buňky kultivované in vitro 6-12 pasáží
indukce klidové G0 fáze absencí růstových faktorů v médiu



hypotéza: klidový stav buněk umožňuje efektivní reprogramování a vývoj



závěr: nejen totipotentní ale i diferencované nebo modifikované buňky mohou sloužit jako donory jader pro vznik zvířat se specifickým genotypem nebo dokonce jeho modifikací (produkce insulinu v mléku)

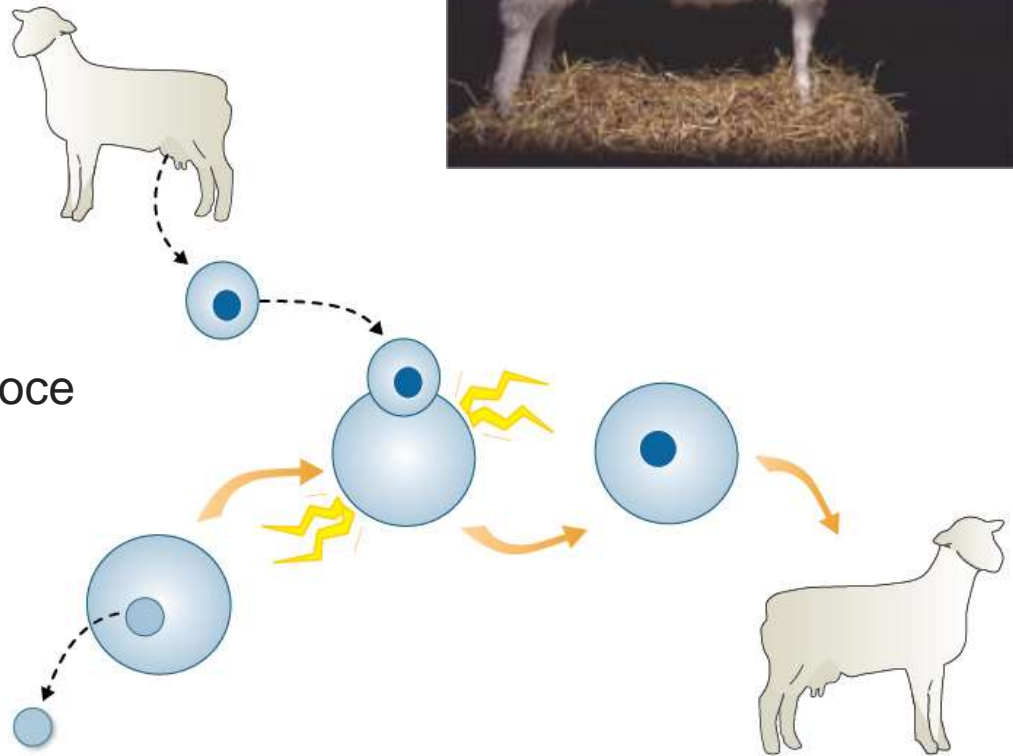
HELLO DOLLY!

Ian Wilmut a Keith Campbell

1996 – Průlomový experiment – úspěšný přenos jader somatických buněk

OVCE

přenos jádra vysoce diferencované somatické buňky, mammárního fibroblastu



nutné reprogramování epigeneticky vysoce modifikovaného chromatinu

433 oocytů

277 úspěšných fúzí

29 životaschopných embryí

1 Dolly

Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells

I. Wilmut, A. E. Schnieke*, J. McWhir, A. J. Kind* & K. H. S. Campbell

Roslin Institute (Edinburgh), Roslin, Midlothian EH25 9PS, UK

* PPL Therapeutics, Roslin, Midlothian EH25 9PP, UK



6LL3 „Dolly“

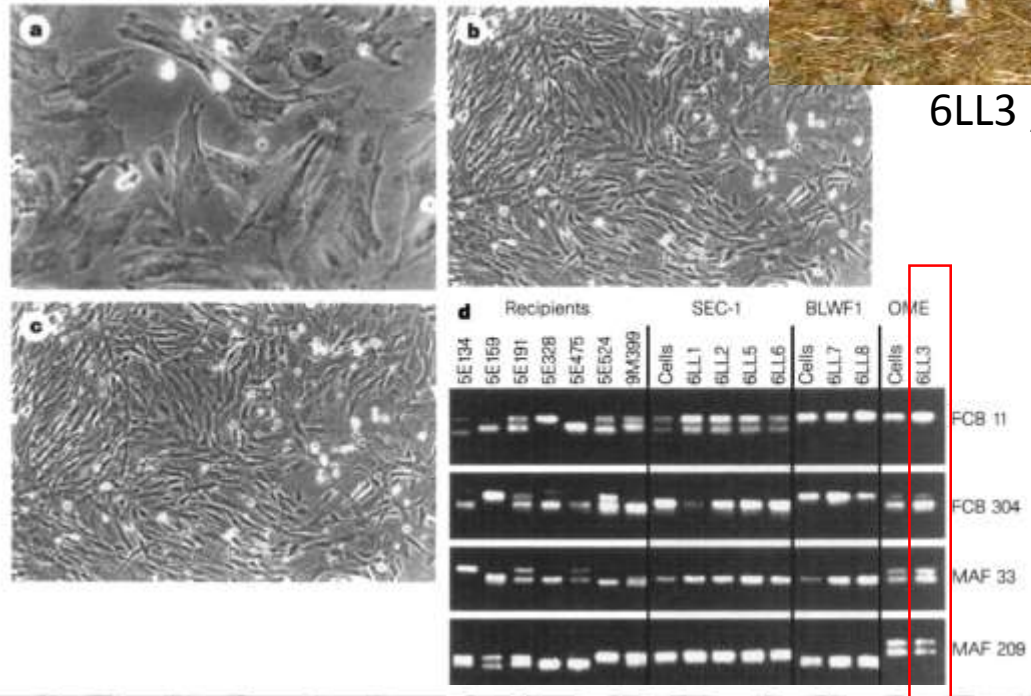


Table 1 Development of embryos reconstructed with three different cell types

Cell type	No. of fused couplets (%) ^a	No. recovered from oviduct (%)	No. cultured	No. of morula/blastocyst (%)	No. of morula or blastocysts transferred†	No. of pregnancies/ no. of recipients (%)	No. of live lambs (%)‡
Mammary epithelium	277 (63.8) ^a	247 (89.2)	-	29 (11.7) ^a	29	1/13 (7.7)	1 (3.4%)
Fetal fibroblast	172 (84.7) ^b	124 (86.7)	- 24	34 (27.4) ^b 13 (54.2) ^b	34 6	4/10 (40.0) 1/6 (16.6)	2 (5.9%) 1 (16.6%)§
Embryo-derived	385 (82.8) ^b	231 (85.3)	- 92	90 (39.0) ^b 36 (39.0) ^b	72 15	14/27 (51.8) 1/5 (20.0)	4 (5.6%) 0



Dolly a Bonny

Angelika Schnieke, Keith Campbell, Ian Wilmut

1997 – jaderný přenos genetiky modifikovaných buněk

OVCE

lidský Faktor IX

PDFF

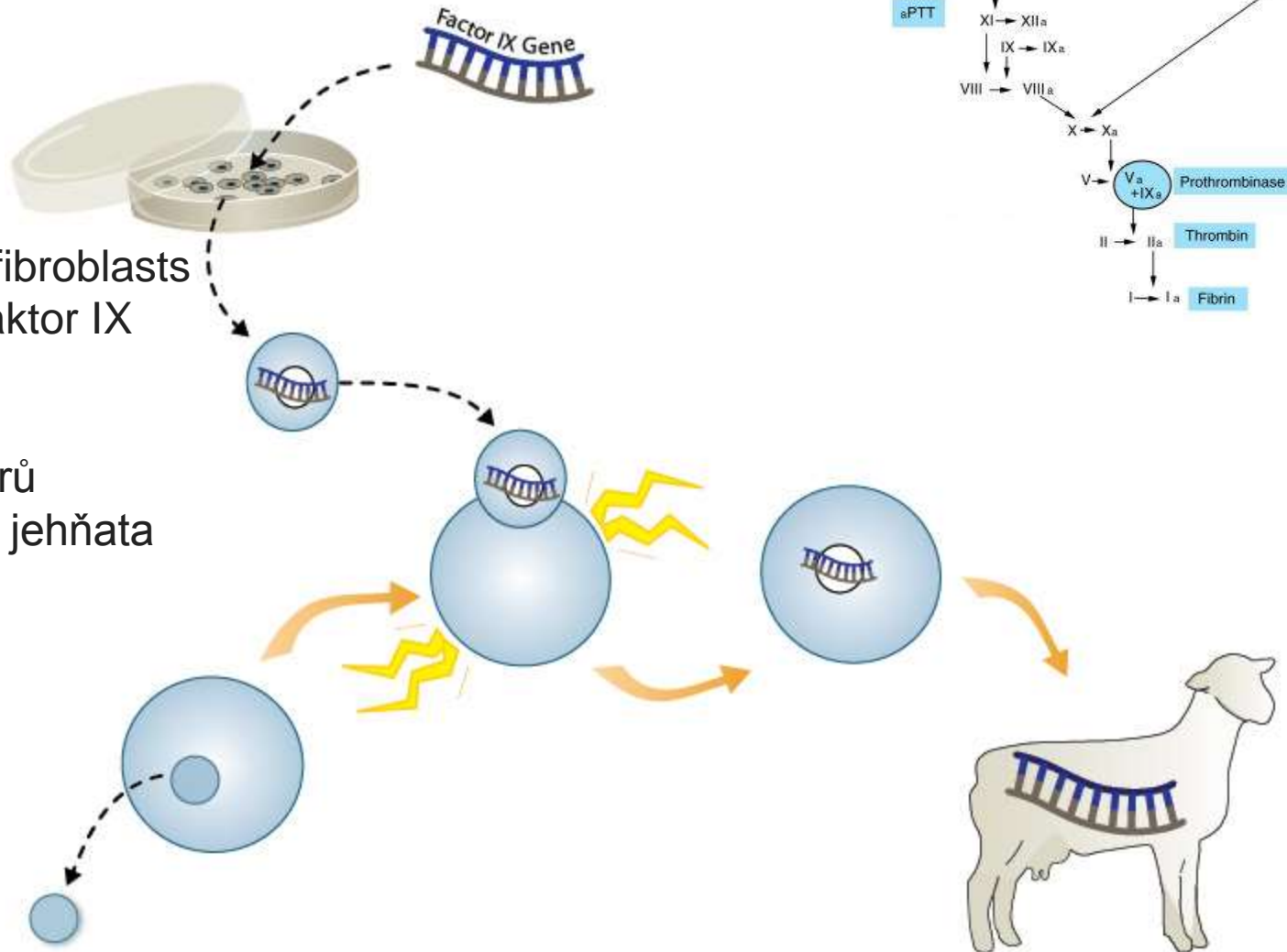
poll dorset fetal fibroblasts
lipofekce DNA faktor IX

82 embryí

5 embryotransferů

3 životaschopná jehňata

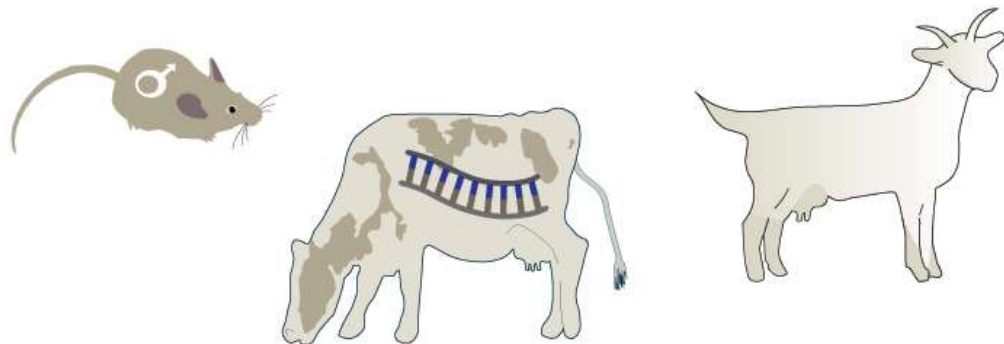
Polly



1998-99 – klonování různých savců

Myši, kozy, mufloni, gaur

plány na klonování ohrožených i
vyhynulých zvířat



Li Meng, John Ely, Richard Stouffer, Don Wolf

1997 – první primát po přenosu jader embryonálních buněk

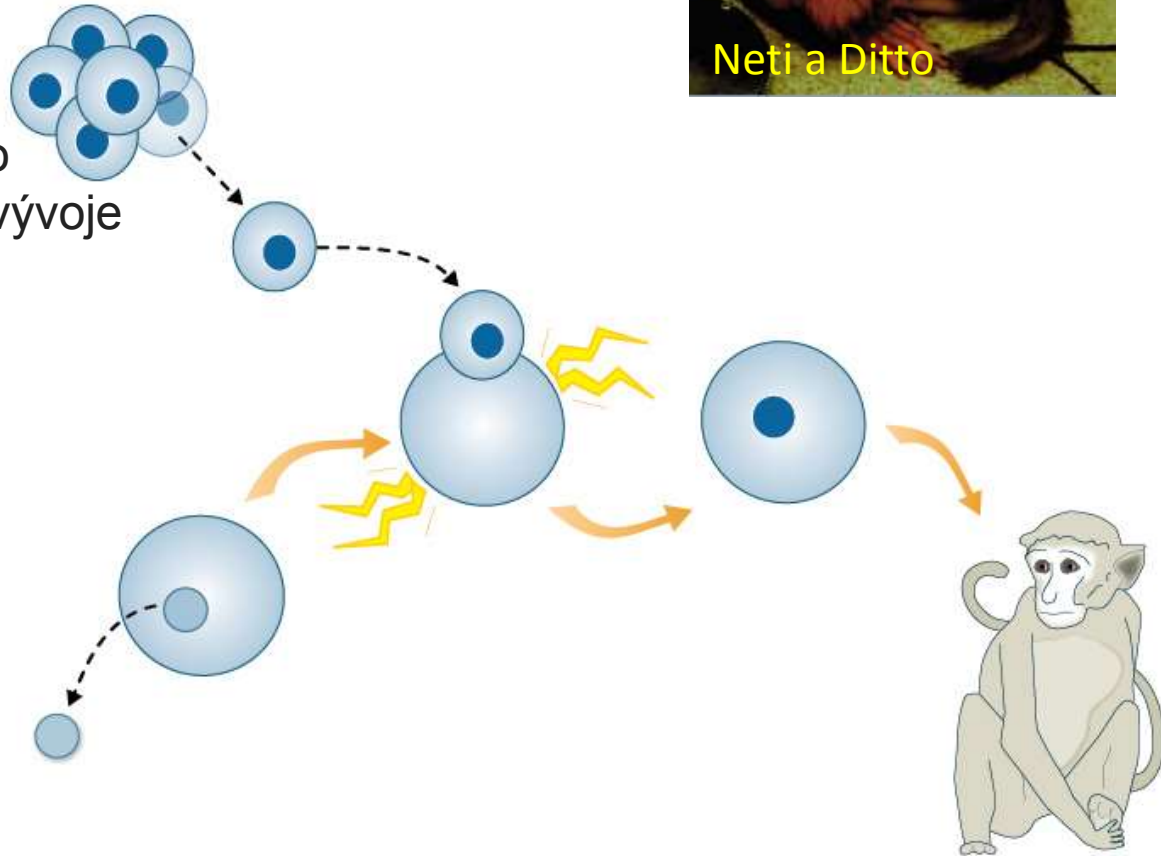
MAKAK RHESUS

subhumánní experimentální model

29 klonů, 2 životaschopní makakové

dosud jediní klonovaní primáti

neobyčejná obtížnost úspěšného
přenosu jader a embryonálního vývoje



Hwang Woo-Suk

2005 – první klonovaný pes

BRIEF COMMUNICATIONS

Dogs cloned from adult somatic cells

Two Afghan pups could help to unravel the genetics behind the assorted traits of other canine breeds.



Topsy



Hwang Woo-Suk

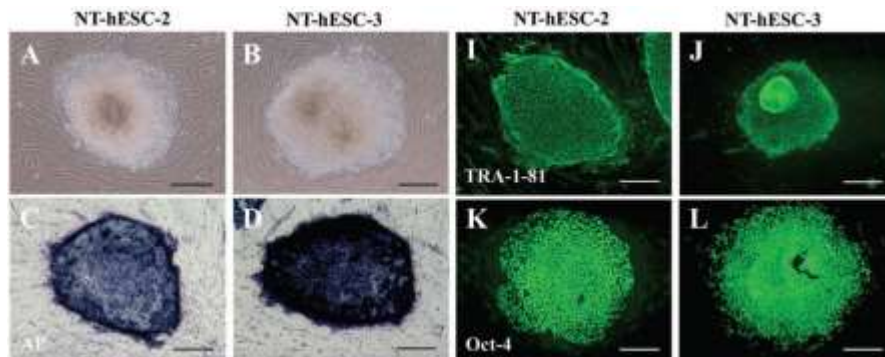
2005 – první klonovaná lidská embrya



Patient-Specific Embryonic Stem Cells Derived from Human SCNT Blastocysts

Woo Suk Hwang,^{1,2*} Sung Il Roh,³ Byeong Chun Lee,¹
Sung Keun Kang,¹ Dae Kee Kwon,¹ Sue Kim,¹ Sun Jong Kim,³
Sun Woo Park,¹ Hee Sun Kwon,¹ Chang Kyu Lee,² Jung Bok Lee,³
Jin Mee Kim,³ Curie Ahn,⁴ Sun Ha Paek,⁴ Sang Sik Chang,⁵
Jung Jin Koo,⁵ Hyun Soo Yoon,⁶ Jung Hye Hwang,⁶
Youn Young Hwang,⁶ Ye Soo Park,⁶ Sun Kyung Oh,⁴ Hee Sun Kim,⁴
Jong Hyuk Park,⁷ Shin Yong Moon,⁴ Gerald Schatten^{7*}

Patient-specific, immune-matched human embryonic stem cells (hESCs) are anticipated to be of great biomedical importance for studies of disease and development and to advance clinical deliberations regarding stem cell transplantation. Eleven hESC lines were established by somatic cell nuclear transfer (SCNT) of skin cells from patients with disease or injury into donated oocytes. These lines, nuclear transfer (NT)-hESCs, grown on human feeders from the same NT donor or from genetically unrelated individuals, were established at high rates, regardless of NT donor sex or age. NT-hESCs were pluripotent, chromosomally normal, and matched the NT patient's DNA. The major histocompatibility complex identity of each NT-hESC when compared to the patient's own showed immunological compatibility, which is important for eventual transplantation. With the generation of these NT-hESCs, evaluations of genetic and epigenetic stability can be made. Additional work remains to be done regarding the development of reliable directed differentiation and the elimination of remaining animal components. Before clinical use of these cells can occur, preclinical evidence is required to prove that transplantation of differentiated NT-hESCs can be safe, effective, and tolerated.



Hwang Woo-Suk

2004-2005 – podvod st This article has been retracted



Published Online May 19 2005
Science 17 June 2005:
Vol. 308 no. 5729 pp. 1777-1783
DOI: 10.1126/science.1112286

REPORT

Patient-Specific Embryonic Stem Cells Derived from Human SCNT Blastocysts

Woo Suk Hwang^{1,2,†}, Sung Il Roh³, Byeong Chun Lee¹, Sung Keun Kang¹, Dae Kee Kwon¹, Sue Kim¹, Sun Jong Kim³, Sun Woo Park¹, Hee Sun Kwon¹, Chang Kyu Lee², Jung Bok Lee³, Jin Mee Kim³, Curie Ahn⁴, Sun Ha Paek⁴, Sang Sik Chang⁵, Jung Jin Koo⁵, Hyun Soo Yoon⁶, Jung Hye Hwang⁶, Youn Young Hwang⁶, Ye Soo Park⁶, Sun Kyung Oh⁴, Hee Sun Kim⁴, Jong Hyuk Park⁷, Shin Yong Moon⁴, Gerald Schatten^{7,†}

Author Affiliations

[†] To whom correspondence should be addressed. E-mail: hwangws@snu.ac.kr (W.S.H.); gschatten@pdc.magee.edu (G.S.)

Únor 2004 Tým Dr. Hwang Woo-suk's zvěřejnil úspěšné vytvoření 30 klonovaných lidských embryí a hESCs

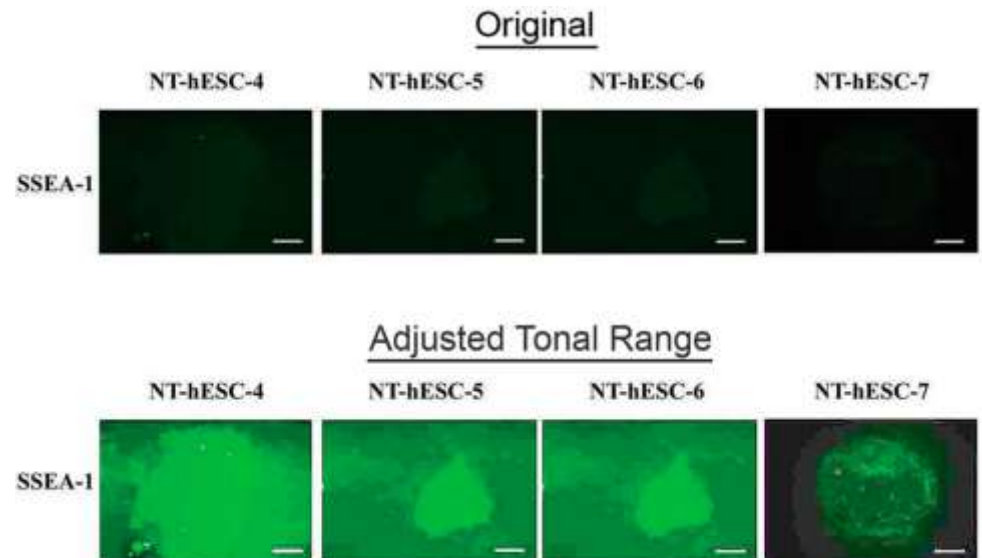
Květen 2005 buněčné linie kmenových buněk z kožních buněk 11 lidí

Listopad 2005 Hwang přiznává a omlouvá se za nedobrovolné odběry oocytů

15 prosince 2005 jeden z členů týmu udává, že výzkum z roku 2005 je manipulovaný

23 prosince 2005 Nezávislý akademický panel zjišťuje zásadní manipulaci s výsledky z května 2005

10 ledna 2006 Panel zjišťuje že i práce z roku 2004 je zfalšovaná

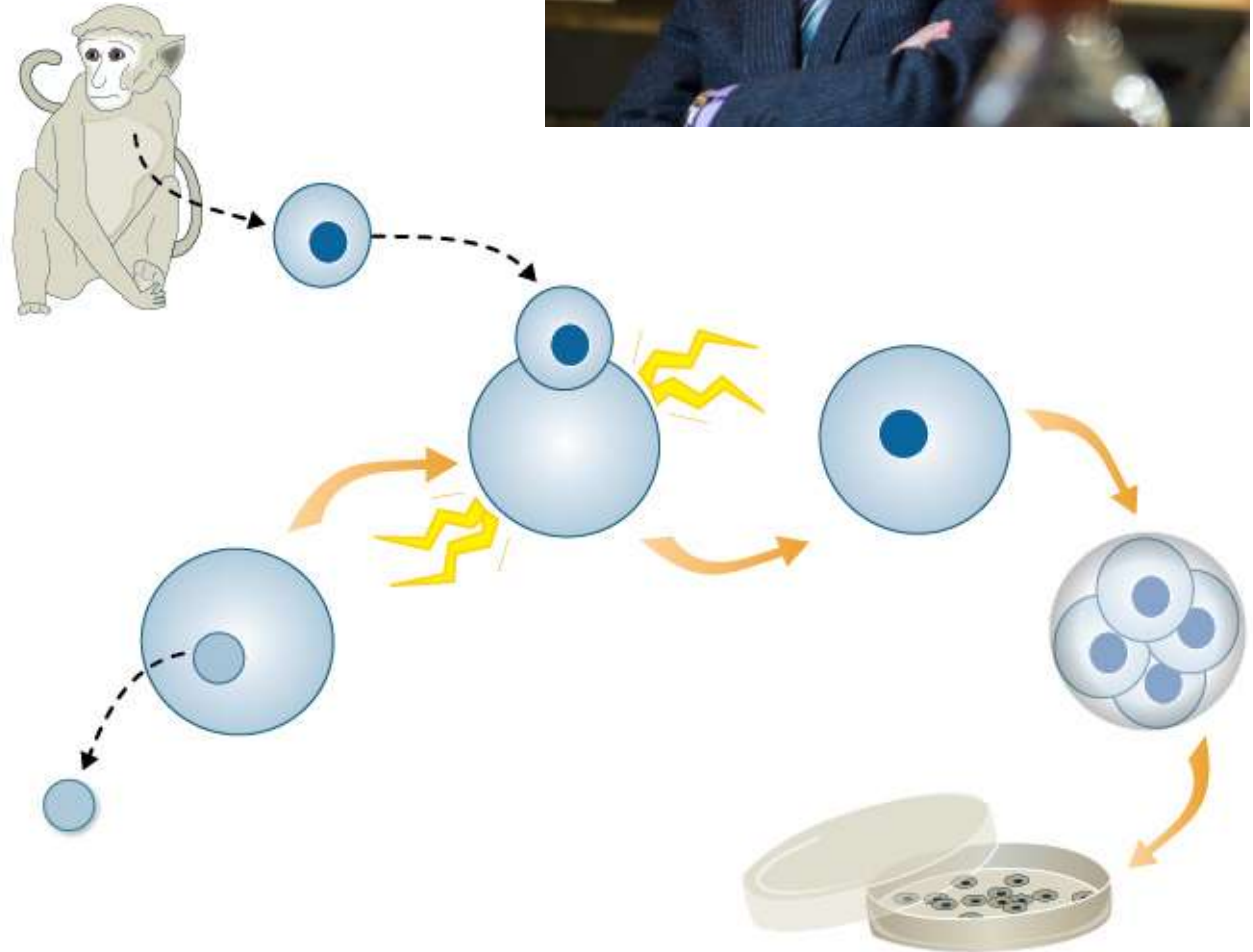
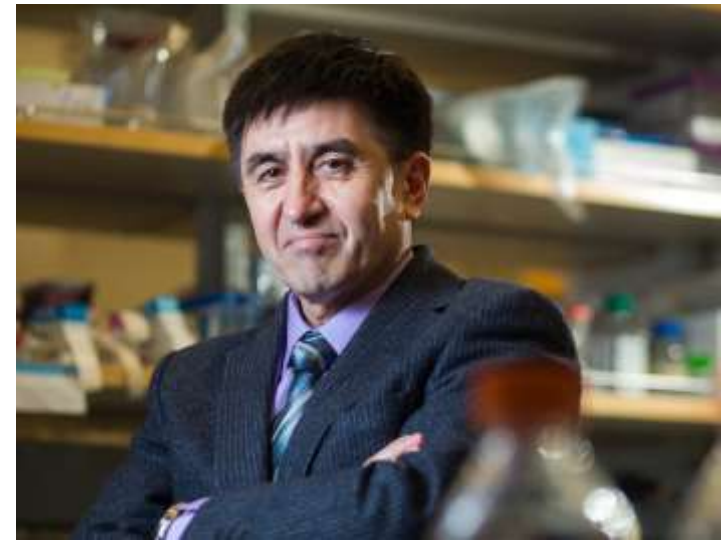


Shoukhrat Mitalipov

2007 – jaderný přenos somatických buněk primátů

MAKAK RHESUS

experimentální medicína



Shinya Yamanaka

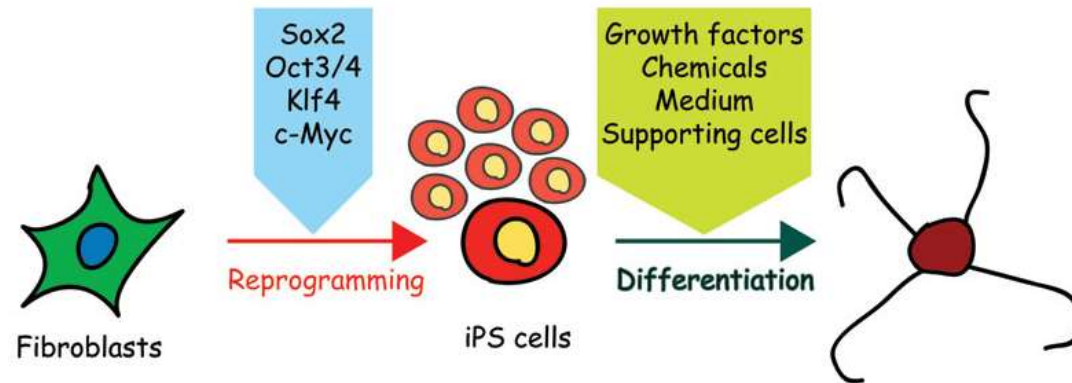
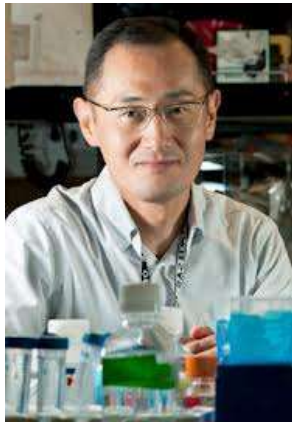
2006 – senzace století

Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSc)



Nobel prize 2012

- dospělá diferencovaná buňka (fibroblast) je dediferencovaná do pluripotentního stavu (reprogramována)
- Diferenciace do žádaného buněčného typu
- regenerativní medicína, buněčná a genová terapie



Cell

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

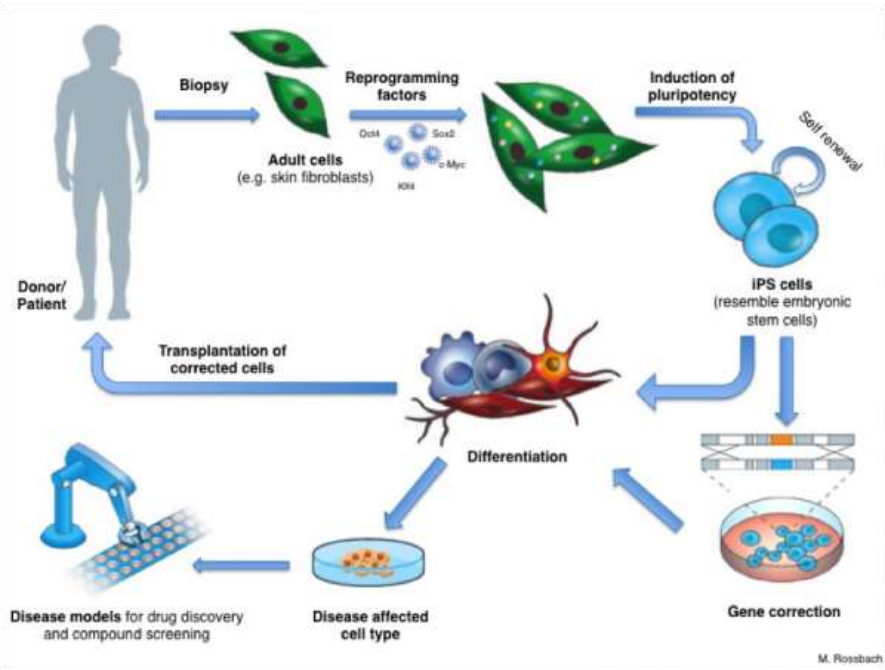
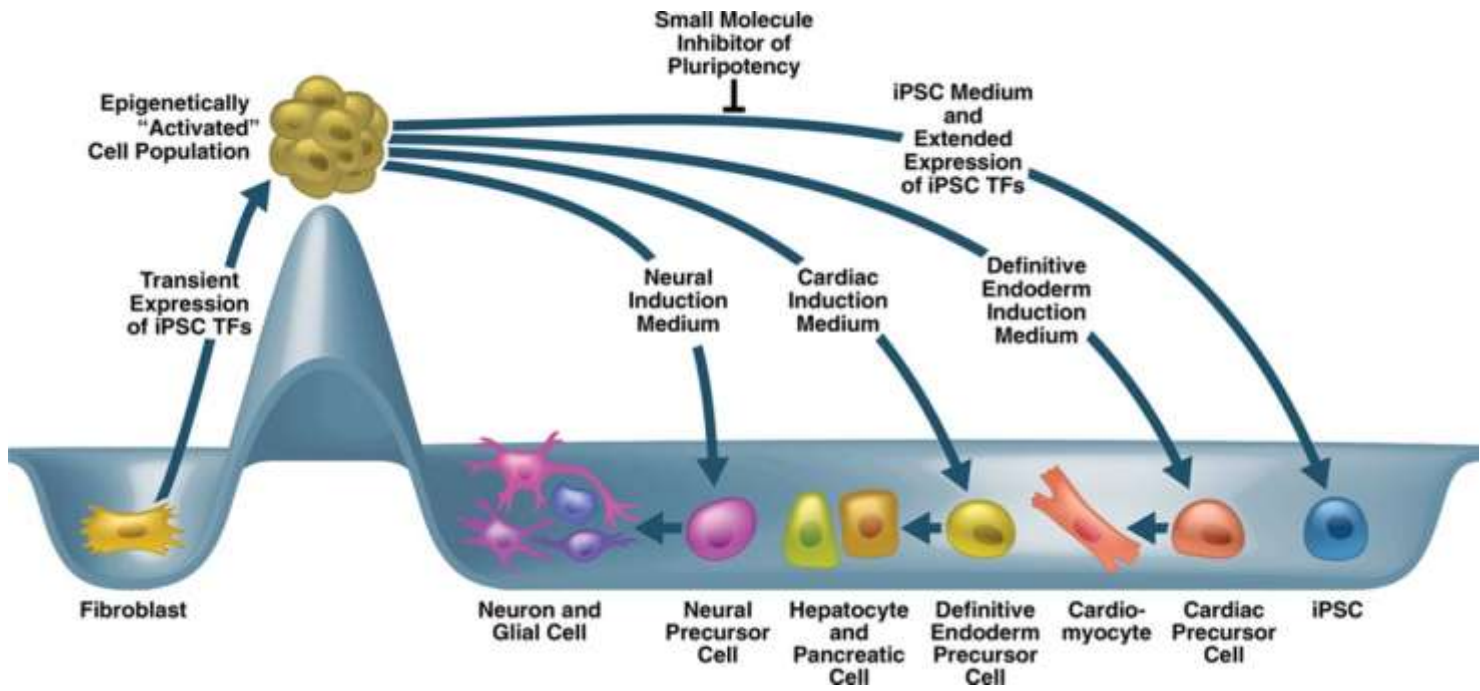
Kazutoshi Takahashi¹ and Shinya Yamanaka^{1,2,*}

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

²CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 302-0012, Japan

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

DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024



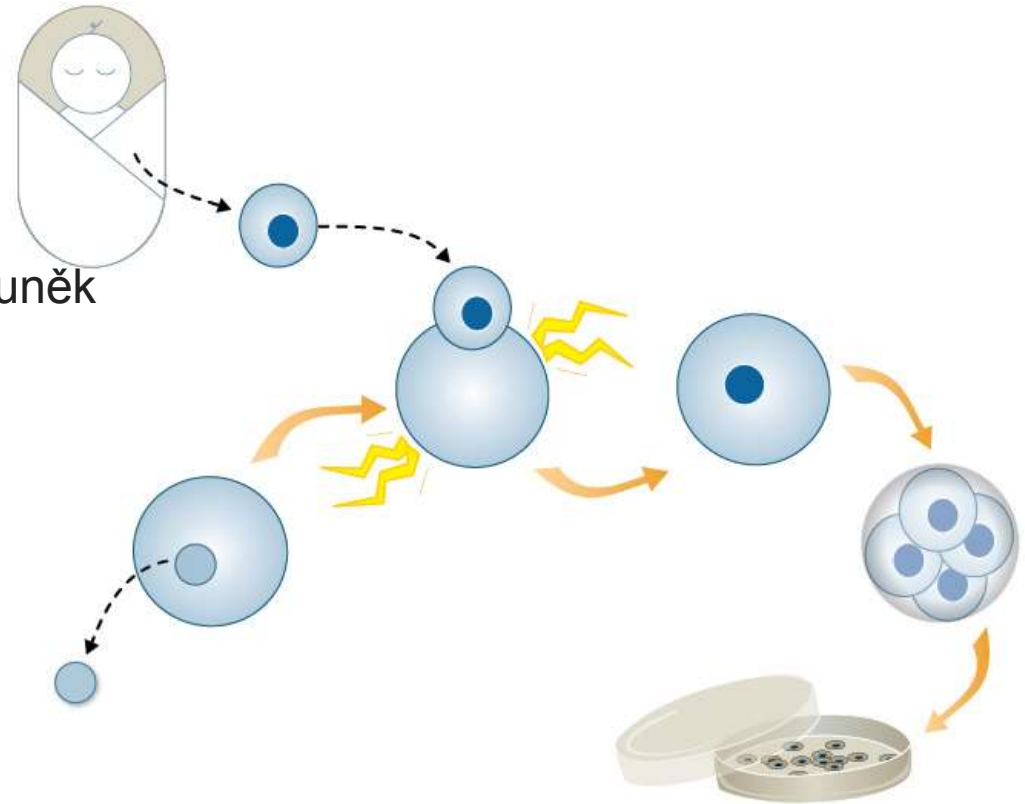
2013 – vytvoření lidských embryonálních kmenových buněk somatickým jaderným přenosem

ČLOVĚK

přenos jader somatických (kožních) buněk do enukleovaného oocytu

vznik linií hESCs

experimentální medicína, léčba mitochondriálních poruch



Haruko Obokata

2014 – nová senzace století

Stresem Indukované pluripotentní kmenové buňky (STAP)



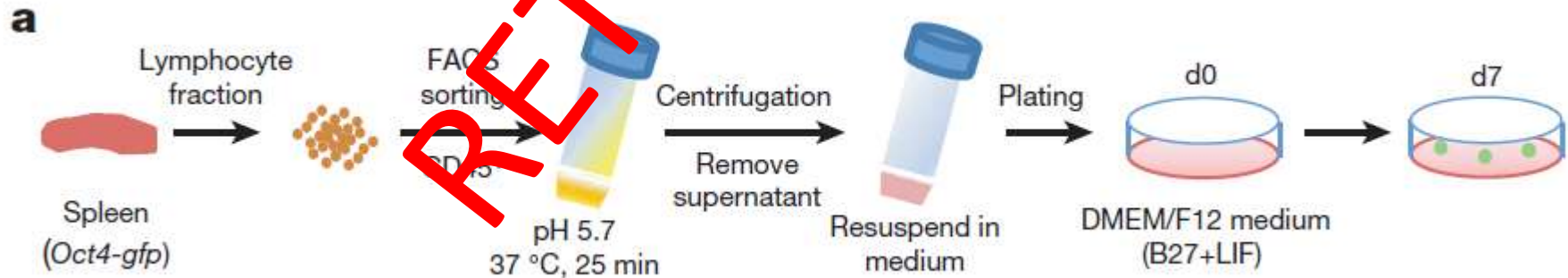
ARTICLE

doi:10.1038/nature12968

Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency

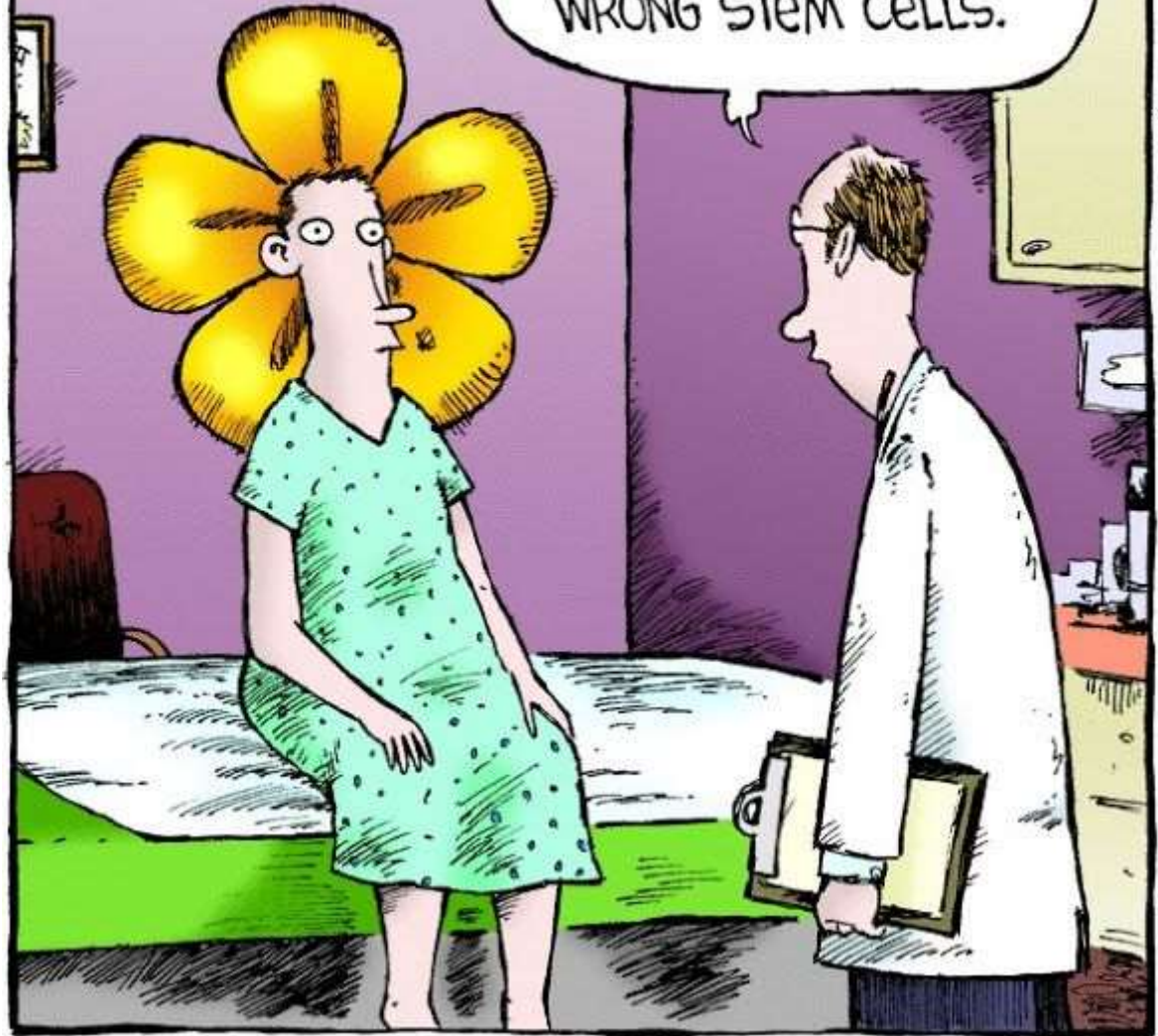
Haruko Obokata^{1,2,3}, Teruhiko Wakayama^{3†}, Yoshiki Sasai⁴, Koji Iijima¹, Martin P. Vacanti^{1,5}, Hitoshi Niwa⁶, Masayuki Yamato⁷ & Charles A. Vacanti¹

- indukce pluripotence v somatických buňkách je zústěněna vstavením buněk stresovému prostředí



DICT.™ CREATOR'S
SPEEDBUMP.COM
©2012 CAGW
5-16


I'M THINKING WE
INJECTED YOU WITH THE
WRONG STEM CELLS.




DALŠÍ INFORMACE

<http://www.isscr.org/>

<http://learn.genetics.utah.edu/content/cloning/clonezone/>
www.osel.cz a zejména prof. Jaroslav Petr



UNIVERSITY OF UTAH
HEALTH SCIENCES



Learn.Genetics
GENETIC SCIENCE LEARNING CENTER

The History of Cloning



MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



DEPARTMENT OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY
FACULTY OF MEDICINE - MASARYK UNIVERSITY



OSEL
Objective Source E-Learning



INTERNATIONAL SOCIETY
FOR STEM CELL RESEARCH

DĚKUJI ZA POZORNOST

Petr Vaňhara, PhD.

Ústav histologie a embryologie
LF MU

pvanhara@med.muni.cz

<http://www.med.muni.cz/histology>

