

„VÝVOJOVÁ BIOLOGIE“

I. Úvod do vývojové biologie

II. Základní principy a mechanismy vývojové biologie

III. Kmenové buňky

IV. Růstové faktory a signální transdukce

Kmenové buňky: definice a kritéria

1. Co je to kmenová buňka?

Buňka, která má a) schopnost replikace v původní podobě beze změny svých vlastností (fenotypu) - „SELF-RENEWAL“
b) trvalou nebo dlouhodobou KAPACITU DIFERENCOVAT do různých buněčných typů

Dle původu jsou kmenové buňky označovány jako

- a) embryonální
 - b) fetální
 - c) dospělé (orgánové, tkáňové)
- } transientní populace

Dle diferenciační kapacity existují kmenové buňky

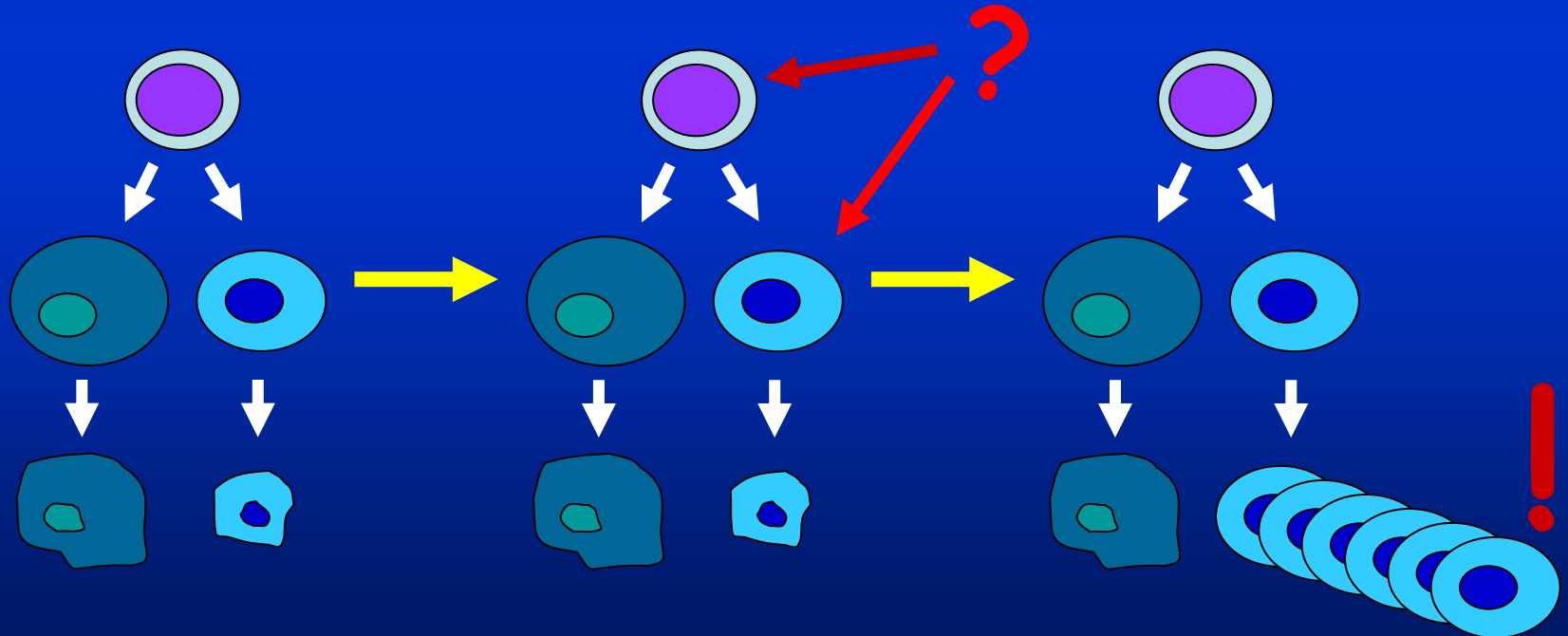
- a) totipotentní
- b) pluripotentní
- c) multipotentní
- d) oligopotentní
- e) unipotentní

U dospělých jsou KB zdrojem obnovy všech orgánů a tkání!!!

2. Proč je znalost biologie KB tak důležitá pro medicínu?

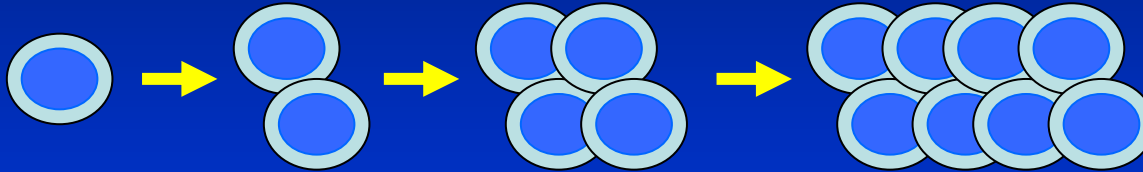
- pochopení mechanismů řídících proliferaci a diferenciaci KB je klíčem k léčbě nádorových onemocnění !!!
- možnost manipulovat s KB *in vitro*, případně řídit/kontrolovat jejich proliferaci a diferenciaci je základním předpokladem buněčných terapií !!!

norma → kumulace abnormalit → nádor



3. Replikační kapacita KB *in vivo* a *in vitro*

Replikační kapacita = počet zdvojení populace KB



IN VIVO

Dospělé KB -s výjimkami po celou dobu života

IN VITRO

Embryonální KB

-neomezeně

Neurální KB

-neomezeně

Ostatní dospělé KB

-několikrát

Pro srovnání →

Somatické buňky

20-50x

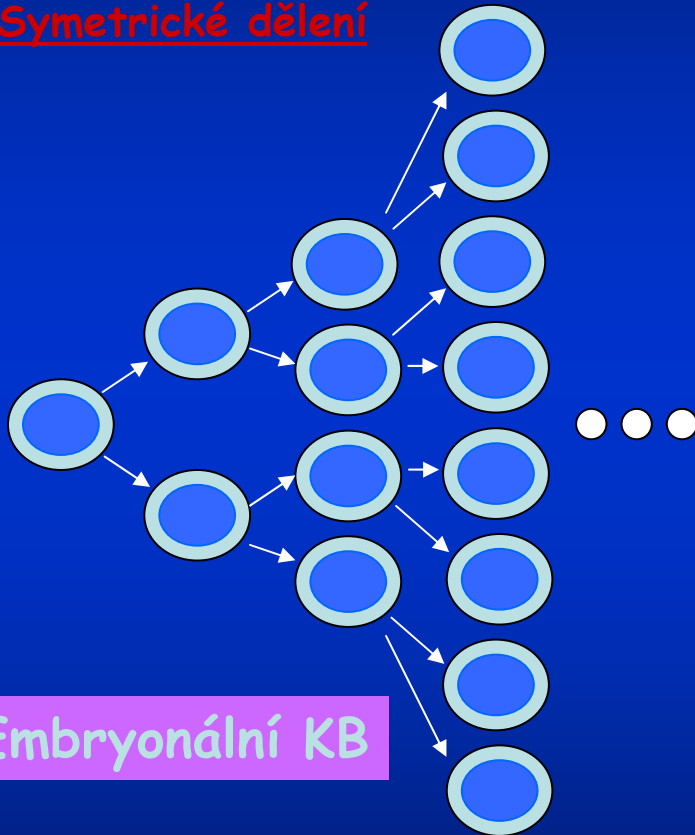
Transformované buňky

neomezeně

3. Klonalita KB - „self-renewal“

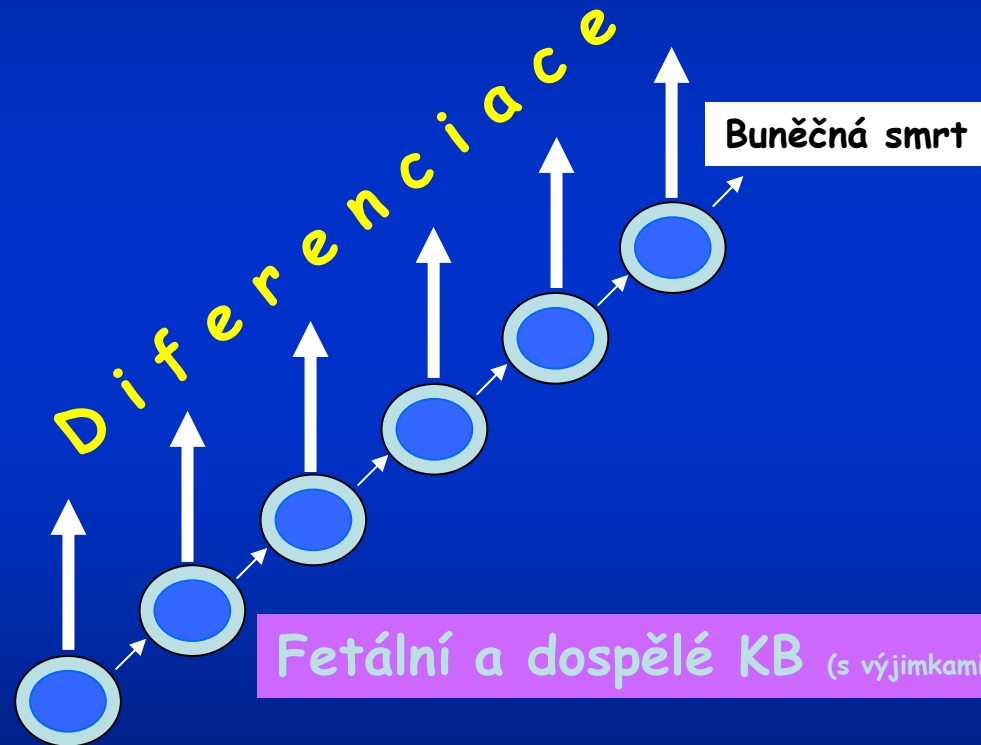
Klonalita KB = nejdůležitější vlastnost KB; schopnost dávat vznik identickým dceřinným KB

Symetrické dělení



Embryonální KB

Asymetrické dělení



Fetální a dospělé KB (s výjimkami)

Kombinace - např. neurální KB se dělí symetricky i asymetricky

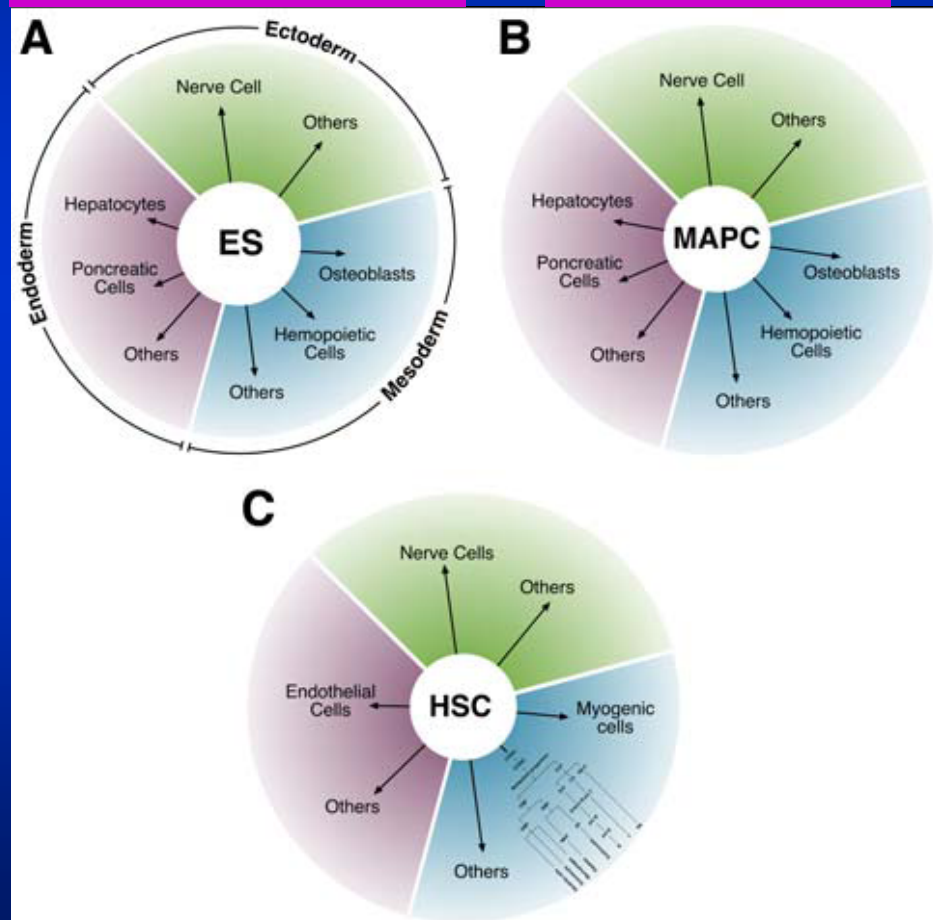
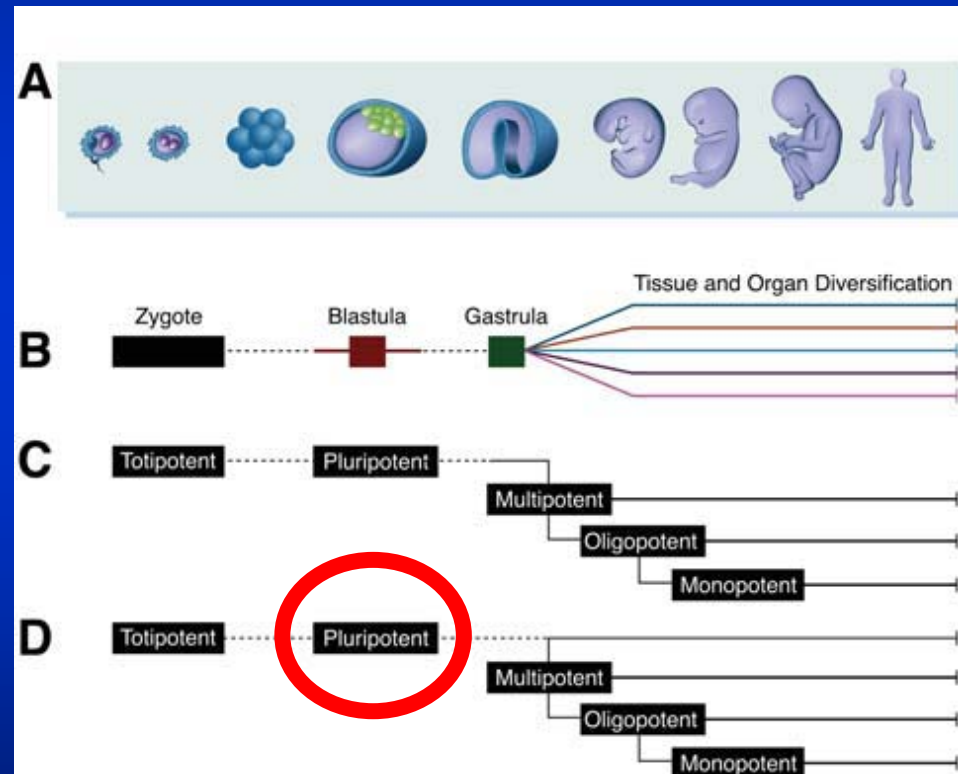
4. Diferenciační kapacita KB - teorie

Diferenciační kapacita různých typů KB klesá během vývoje

ES = embryonální KB
MAPC = multipotentní dospělé progenitorové buňky
HSC = hematopoetické KB

Embryonální KB jsou pluripotentní

MAPC jsou multipotentní

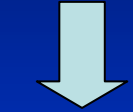


HSC jsou multipotentní

Nové objevy však ukazují na něco jiného !!!

4. Diferenciační kapacita KB - praxe

totipotence → pluripotence → multipotence → oligopotence → unipotence



zygota



embryonální KB



hematopoetické KB

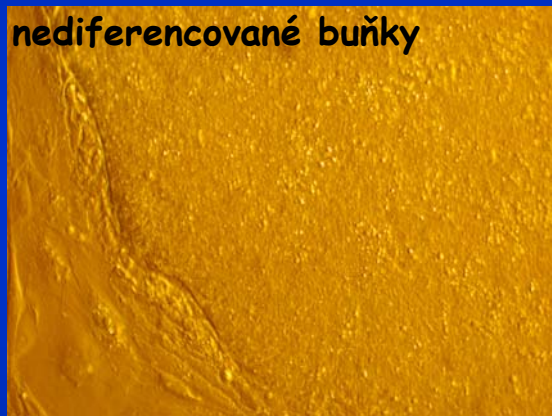


gastrointestinální KB

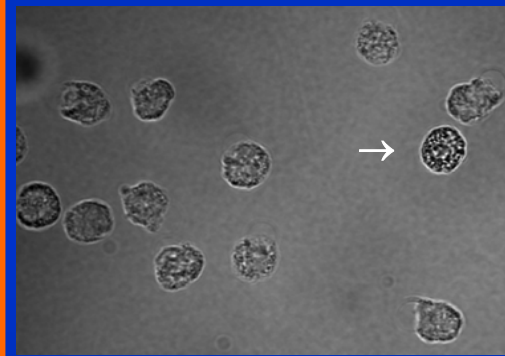


KB prostaty

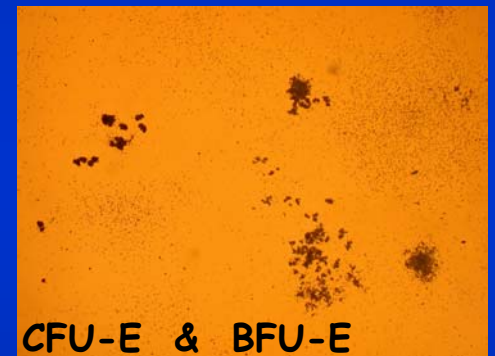
nediferencované buňky



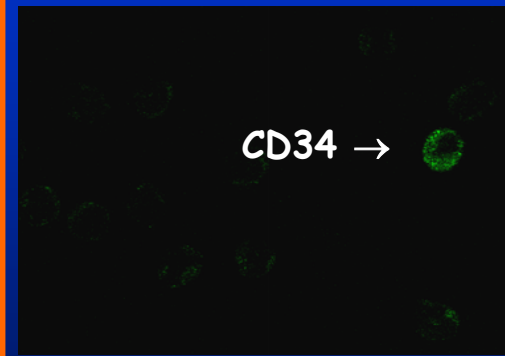
neurony



CFU-E & BFU-E



CD34 →



CFU-GM



Původ a derivace kmenových buněk

1. Historie embryonálních a hematopoetických KB

1855 Virchow

1917 Pappenheim

1950-75 kolektiv

1961 kolektiv

1970 kolektiv

1981 kolektiv

1980-X kolektiv

1998 kolektiv

„omnis cellula e cellula“

KB v krvi

přenosy jader a rozdílná reprogramační kapacita

in vitro Colony-Forming Assay (CFA)

embryonální karcinomové buňky (EC buňky)

myší embryonální KB (mES buňky)

různé dospělé KB

lidské embryonální KB (hES buňky)

Czech stem-cell work heightens calls for EU ruling

Alison Abbott

Czech scientists say they have derived three human embryonic stem-cell lines from spare embryos stored at an *in vitro* fertilization clinic in Brno.

This makes the Czech Republic the first of the eastern European countries poised to join the European Union (EU) to move into this controversial research area.

It also adds to pressure on the EU to decide whether to fund research on newly derived stem-cell lines. This research is

allowed under strict ethical supervision in some EU countries, such as Britain and Sweden, but is banned in others, including Germany and Italy. Last week the Spanish government changed sides and approved a proposed law to allow the production of cell lines from spare embryos for research.

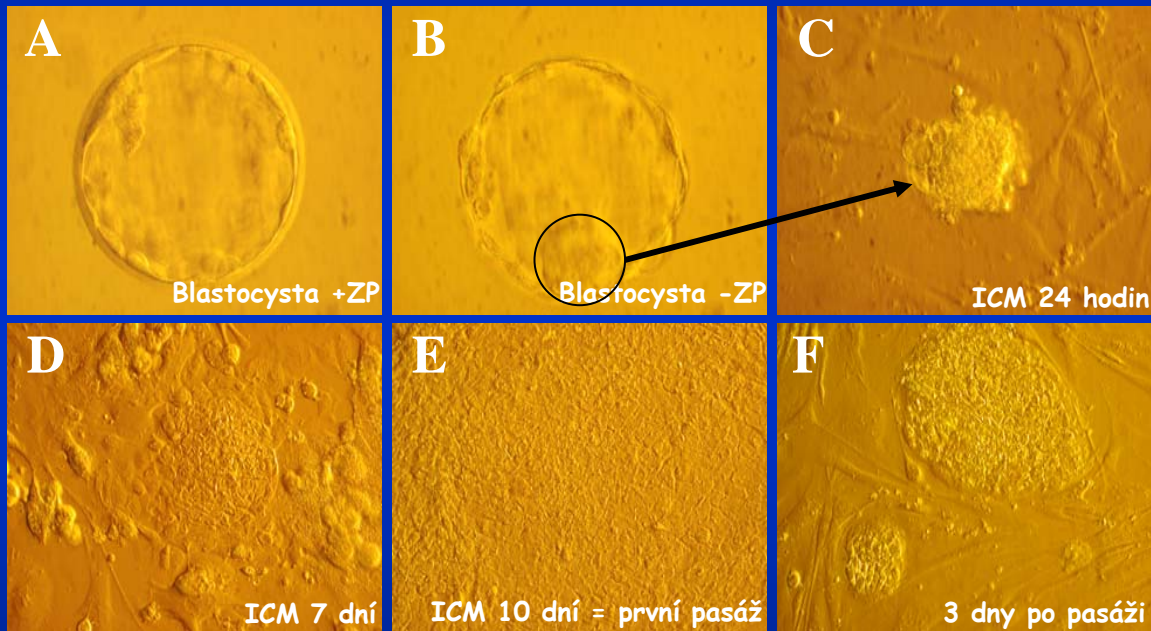
The Czech Republic has no law controlling human embryonic stem-cell research. But Eva Syková, head of the Centre for Cell Therapy and Tissue Repair at Charles University in Prague, who developed the three cell lines

together with colleagues at the Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, says they are working to high ethical standards. They received informed consent from donor couples undergoing *in vitro* fertilization, she points out.

The scientists are now characterizing the lines, and plan to study the cells' potential to develop into differentiated cells such as neurons, which they believe could have therapeutic potential. They presented their results at a meeting in Prague last month. ■

2. Izolace/derivace KB

Embryonální KB



Buněčná linie!!!

×

Hematopoetické KB

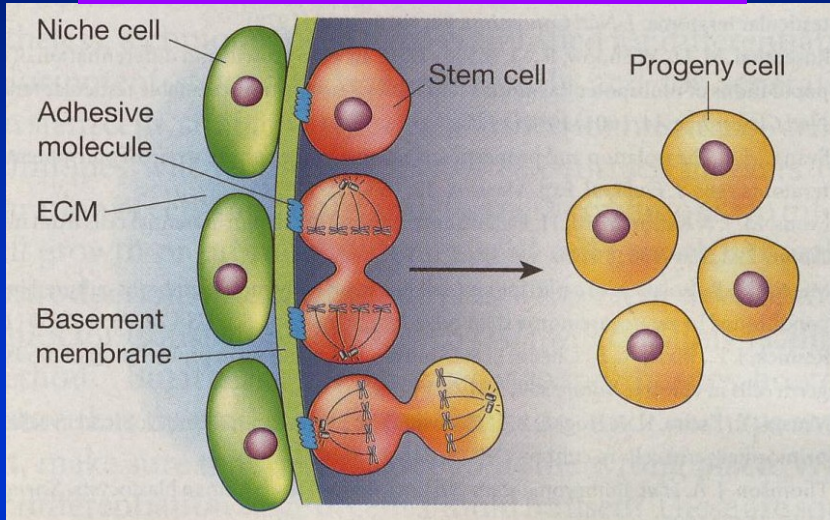
- „niche“ (hnízdo) KB
- mobilizace KB
- buněčné třídění

CD34+
CD133+
c-kit+
HLA-DR-
CD38-
CD71-
CD45-

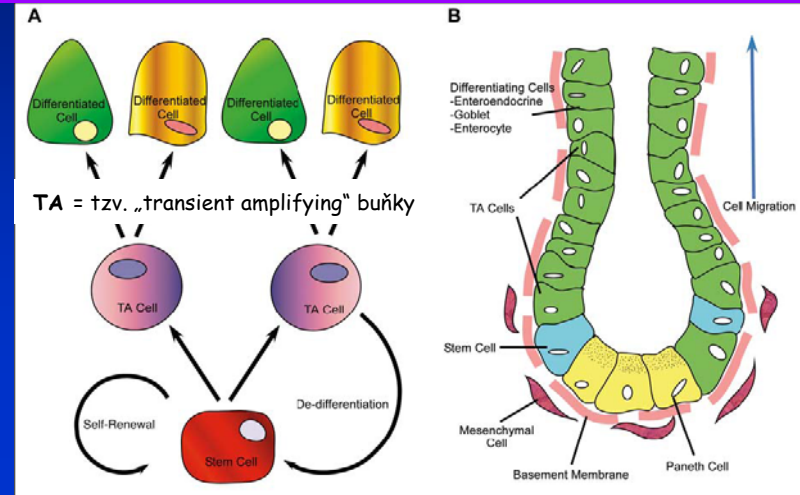
Buněčná subpopulace!!!

Dospělé KB a jejich „niche“

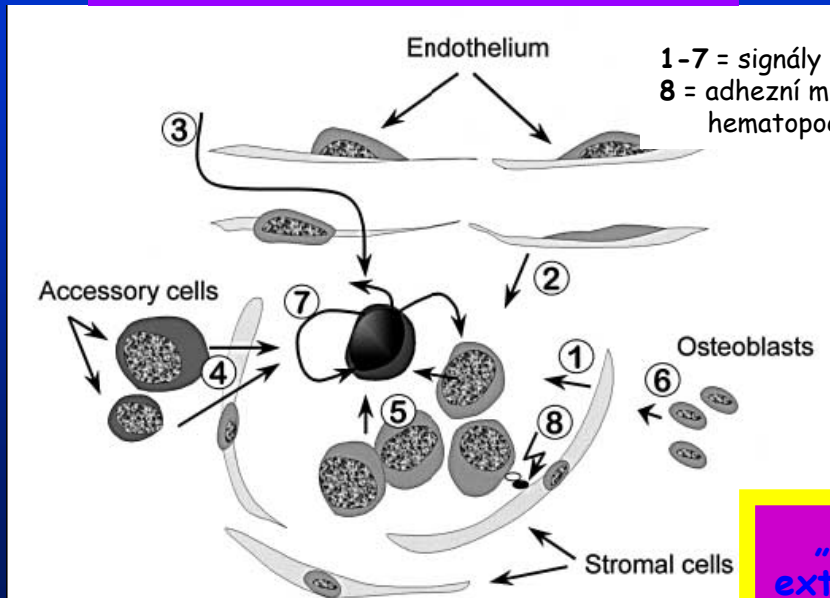
Obecná struktura a funkce „niche“



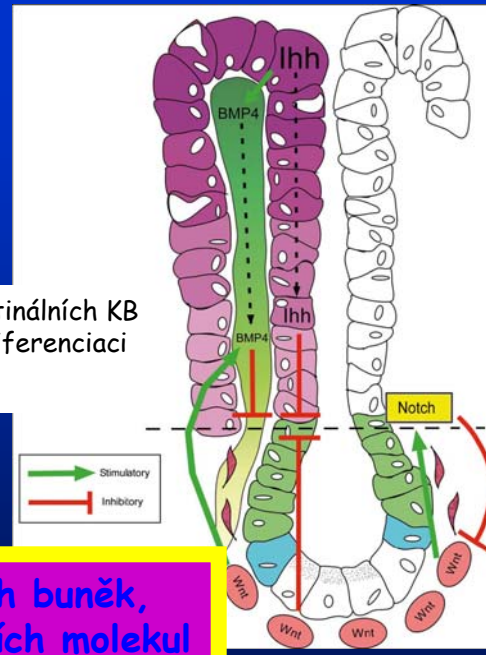
Hierarchie KB v jejich „niche“ (epiteliální KB GI)



Hematopoetické KB v kostní dřeni



Signály definující „niche“ intestinálních KB a regulují jejich proliferaci a diferenciaci
- Wnt, BMP, Notch, Ihh



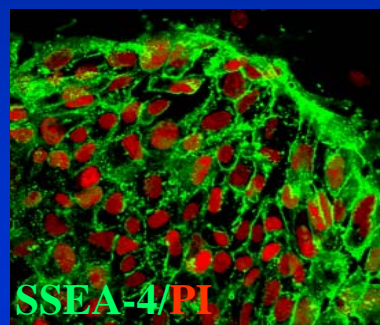
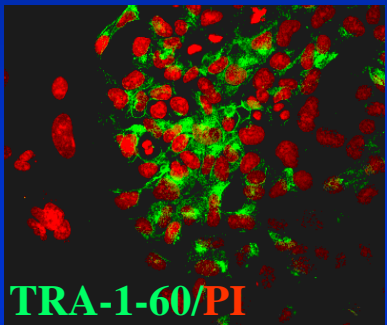
„Niche“ je soubor podpůrných buněk, extracelulární matrix a signálních molekul

Charakterizace KB - příklad 1

Růstové charakteristiky, morfologie a systém proteinových, cukerných a genových markerů definují typ/stav KB

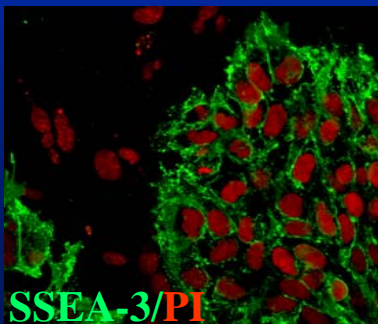
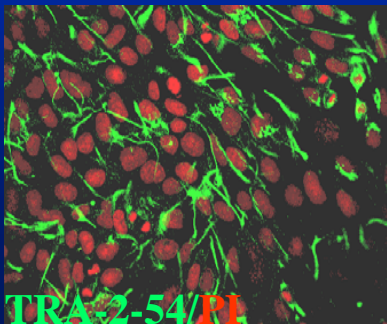
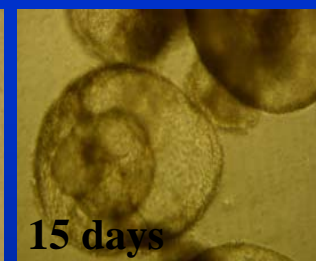
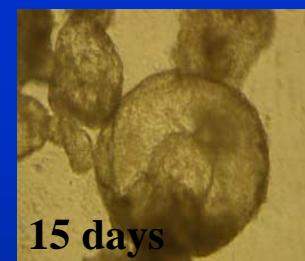
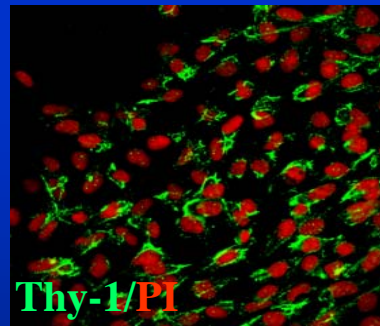
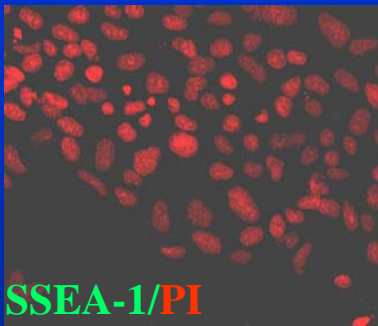
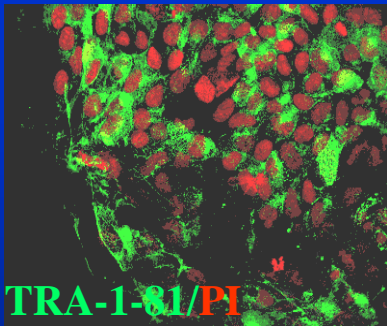
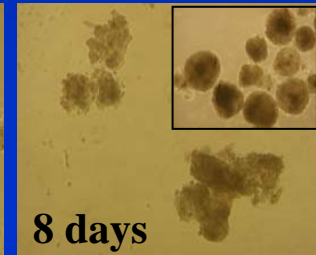
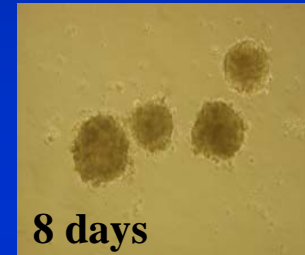
Nediferencované lidské embryonální KB

Diferencované lidské embryonální KB



Linie CCTL12

Linie CCTL14

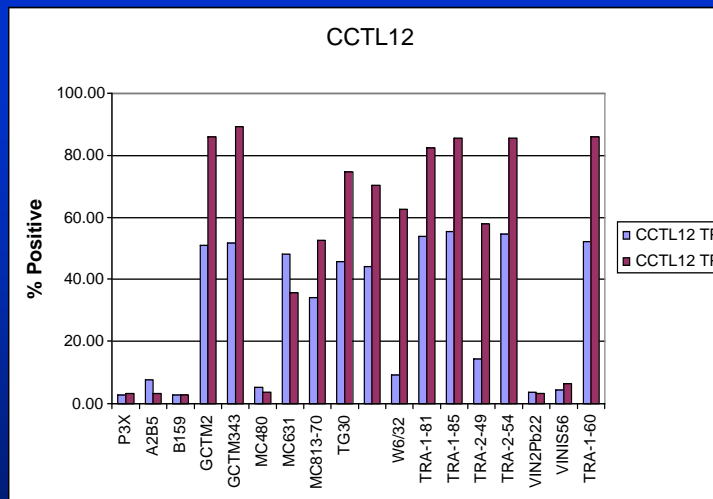
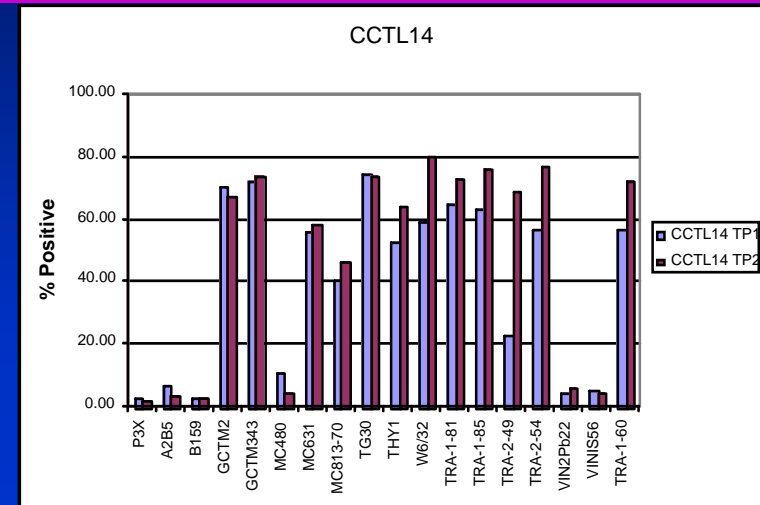
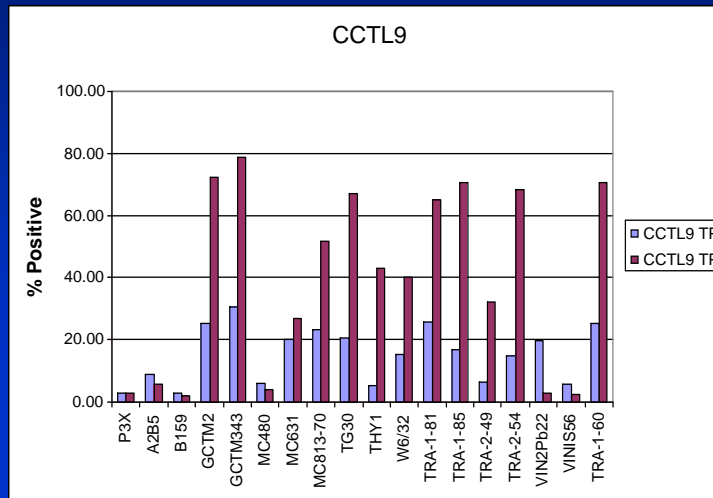


CCTL9 MEFs



Charakterizace KB - příklad 2

Průtoková cytometrie a membránové markery lidských embryonálních KB

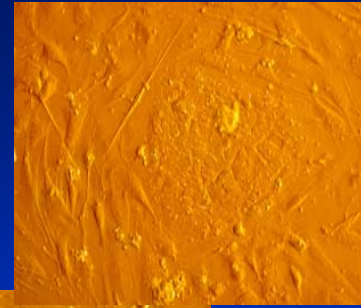
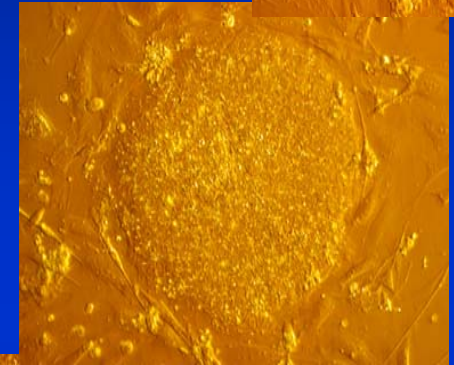
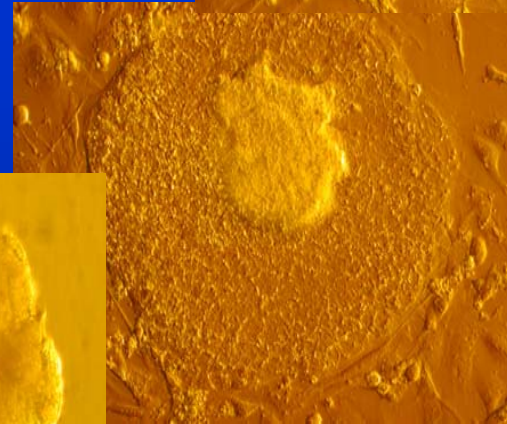
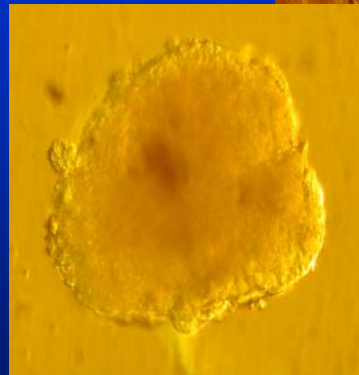


Antibody	Code	Antigen	Comment
A2B5	01	GT3	Ganglioside glycolipid
B159	02	NCAM	
GCTM2	03	GCTM2	Keratan Sulphate related*
GCTM343	04	GCTM343	Keratan Sulphate related*
MC480	05	SSEA1	
MC631	06	SSEA4	
MC813-70	07	SSEA4	
TG30	08	CD9	
Thy-1	09	THY1	
W6/32	10	HLA-A,-B,-C	
TRA-1-81	11	TRA-1-81	Keratan Sulphate related*
TRA-1-85	12	Ok(a)	
TRA-2-49	13	L-ALP	
TRA-2-54	14	L-ALP	
VIN2Pb22	15	GD2	Ganglioside glycolipid
VINIS56	16	GD3	Ganglioside glycolipid
TRA-1-60	17	TRA-1-60	Keratan Sulphate related*
P3X	control		

* GCTM2, GCTM343, TRA-1-81 and TRA-1-60 recognise a family of related high molecular weight glycoproteins, carrying keratan sulphate.

In vitro diferenciace lidských embryonálních KB - současné pokroky

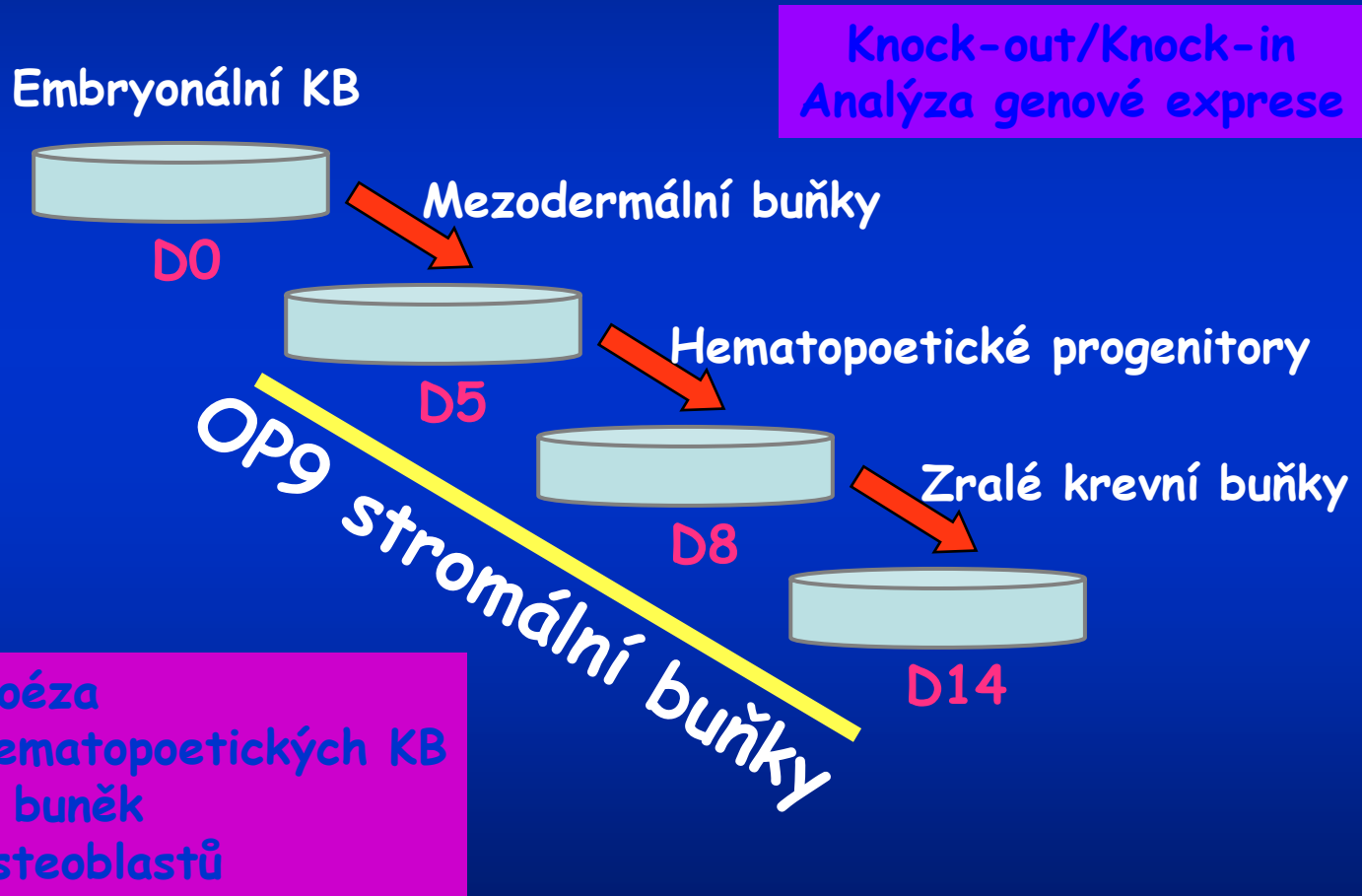
- Neurony, astrocyty, oligodendrocyty
- Kardiomyocyty
- Endoteliální buňky
- Pankreatické β buňky
- CD34+ hematopoetické progenitorové buňky
- Antigen-prezentující buňky a NK buňky
- Buňky plicního epitelu
- Osteoblasty
- Hepatocyty
- Melanocyty
- Buňky prostaty



Vývoj účinných diferenciačních protokolů

Příklad:

In vitro diferenciace hematopoetických buněk



Hematopoetické progenitory pro transplantace???

Použití lidských embryonálních KB

- Studium vývoje člověka na buněčné a molekulární úrovni
- Nádorová biologie - nádorové KB
- Tvorba modelů různých onemocnění
- Studium „genových cílů“ pro nová léčiva
- Testování léčiv, teratogenních a toxických sloučenin
- Studium mechanismů regenerace tkání
- Buněčná terapie

Vývoj pro buněčnou terapii

Krok 1

důkladná charakterizace a srovnání všech existujících linií lidských embryonálních KB !!!

1st ISCI meeting, August 4-6, 2005, Bar Harbor, Maine, USA

a mnoho dalších úkolů...

COMMENTARY

collaboration and funding support for stem cell research (Table 1). The International Stem Cell Initiative grew out of a meeting held under the auspices of the Forum in London in May 2003. The meeting brought together experts in hES cell research from around the world to plan an international collaborative effort to establish a set of standards for the characterization of hES cell lines.

The group decided to begin with what was envisioned to be a relatively simple project, namely, to collect as many hES cell lines as possible and carry out a basic set of characterization studies on them under defined conditions. The exercise, which is supported by funding from the Forum members, is being conducted with the cooperation of the UK Stem Cell Bank as a central hub for collection and distribution of materials. Forum members were invited to nominate laboratories to submit their hES cell lines to the Initiative. Prospective participating laboratories were asked to certify that their hES cell lines had been derived following generally accepted ethical guidelines and to agree that all information generated by the Initiative would be placed in the public domain. Seventeen laboratories from 11 Forum member countries agreed to participate and are contributing a total of 75 hES cell lines to the study (Fig. 1). These laboratories are carrying out surface-antigen expression analyses on their own cells and preparing nucleic acids and other samples for study by several other central reference laboratories.

Characterization studies

The studies include flow cytometric analysis of the expression of 17 surface antigens, quantitative RT-PCR analysis of the transcript levels of ~100 genes characteristic of pluripotent stem cells and their early differentiated derivatives, and an examination of how the expression

pattern of these ~100 genes changes in response to a simple differentiation protocol involving embryoid body formation. The antigens chosen are those commonly used by many groups to define hES cells. They include markers such as SSEA3, SSEA4, THY1 and the antigens defined by antibodies TRA-1-60 and GCTM2, all of which have been previously reported to be characteristically expressed by undifferentiated hES cells. To ensure standardization, agreement was reached with the owners of all the key hybridomas that define these marker antigens to deposit them in an archive at the National Institute of Biological Standards and Control in the UK, the home of the UK Stem Cell Bank and a WHO Reference Laboratory.

The gene expression studies are focused on molecules that are widely reported to be good markers of human pluripotent stem cells, including some whose functions are likely essential to maintenance of pluripotentiality, such as *POU5F1* (also known as *OCT4*), *NANOG*, *SOX2*, *ZFP42* (also known as *REX1*), *UTF1*, *GDF3*, *FOXD3*, *TERT*, *FGF4*, and others, such as *LIFR* and *LRPPRC* (also known as *GPI30*), whose role in maintaining pluripotentiality is more controversial. Also included in the analysis are genes whose expression marks particular differentiation lineages, for example, *T* (also known as *BRACHYURY*; meso-derm), *MYF5* and *MYO1* (muscle markers), *GATA4* (endoderm), *DAT* (hepatocytes), and *INS* (pancreatic beta cells).

Additional studies are aimed at assessment of the epigenetic status of the cell lines (expression

of imprinted genes), examination of spatial patterns of marker expression in growing colonies by immunostaining *in situ*, and histological evaluation of teratomas formed by the cell lines. In addition, each line will be subjected to DNA fingerprinting, to provide definitive markers for identifying each line in future studies, and to microbiological analysis that will include a screen for possible endogenous retrovirus expression. Karyotyping will not be performed, but participants will be asked to provide karyotype data for each of their lines. Likewise, although the Initiative will not examine xenograft tumor production, participating laboratories have been invited to submit histological slides of any xenografts that they have produced from their lines for review by a histopathologist with expertise in this area.

The first examination of the preliminary dataset will take place at a two-day meeting of the Initiative participants at the Jackson Laboratory, in Bar Harbor, Maine, in August 2005. The entire analysis should be completed by the end of 2005. All the data will be placed in the public domain and will be available from the Forum website.

Goals of the Initiative

What are the expected outcomes of this first phase of the Initiative? Most researchers anticipate that expression of canonical cell-surface markers and pluripotency genes will be fairly consistent across the panel of cell lines, but in fact an exercise on this scale may turn up outliers with highly informative properties.

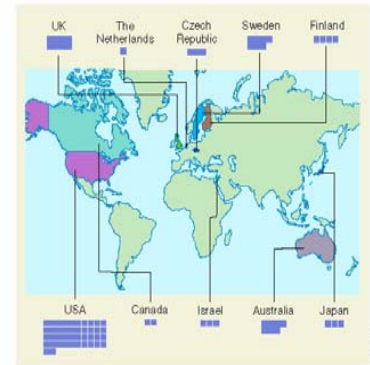


Figure 1 Countries of origin of hES cell lines in the Initiative. Blocks indicate number of hES cell lines contributed by each country

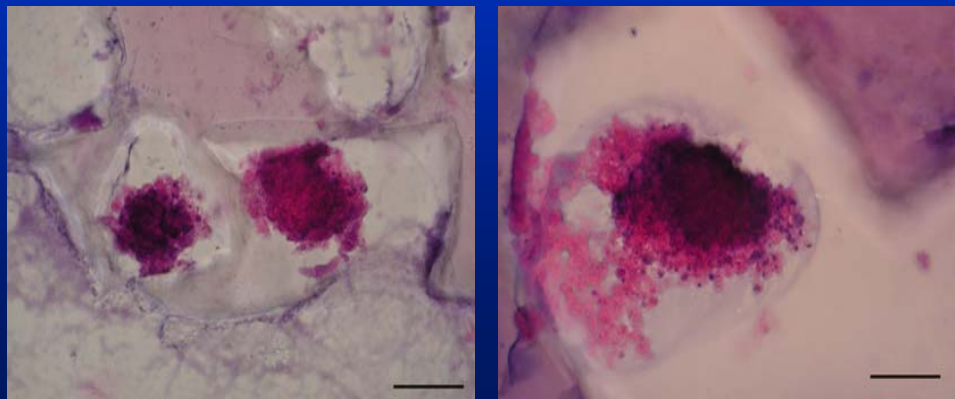
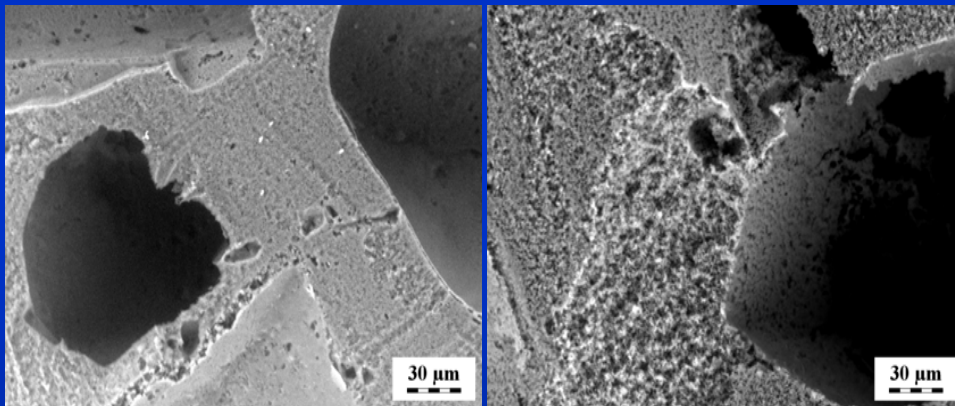
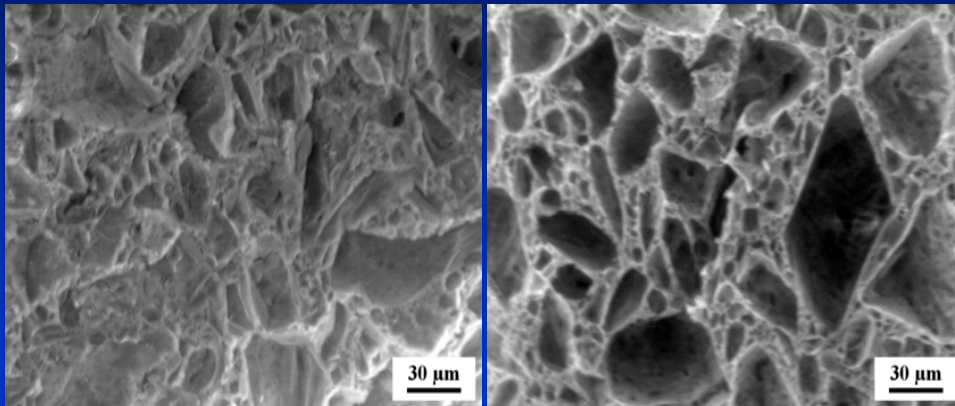
Table 1 Members of the International Stem Cell Forum

Countries	
Australia ^a	Japan ^a
Canada ^a	Netherlands ^a
Czech Republic ^a	Singapore ^a
Denmark	Sweden ^a
France	Switzerland
Germany	UK ^a
Finland ^a	USA ^a
Israel ^a	

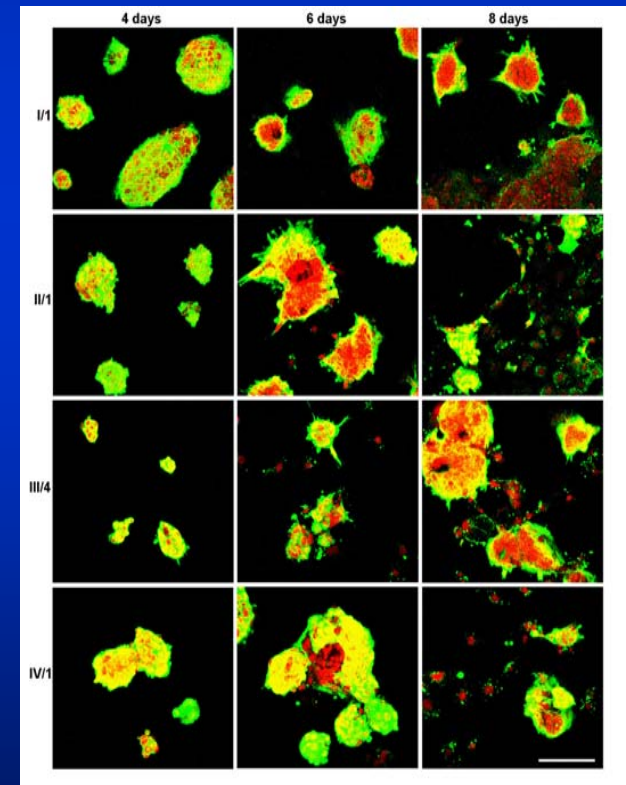
International member
 Juvenile Diabetes Research Foundation
^aIncluded in the Initiative are 75 hES cell lines derived in 17 laboratories from these Forum members.

© 2005 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/naturebiotechnology>

Např. vývoj nových kultivačních systémů pro KB



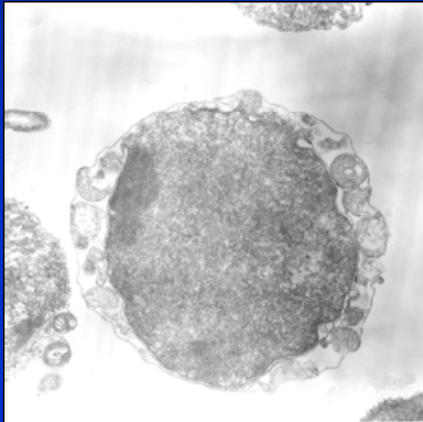
Funkční hydrogely jako nosiče embryonálních KB a prostředí pro jejich diferenciaci



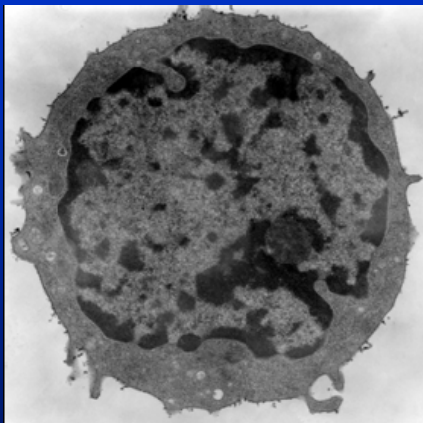
Nové objevy v oblasti KB

2006 - populace velmi malých buněk v kostní dřeni, které se podobají embryonálním KB

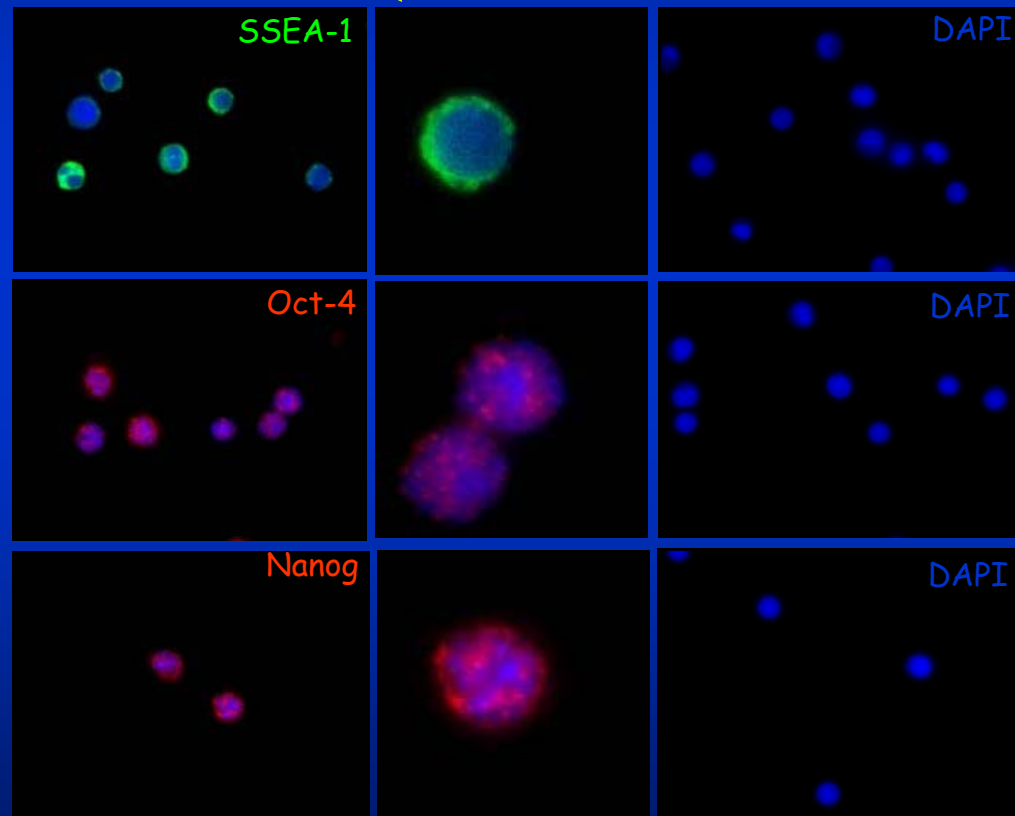
a které mají morfolologii a markery nediferencovaných KB



Sca-1⁺ lin⁻ CD45⁻ buňky jsou asi 2-4 μ m velké

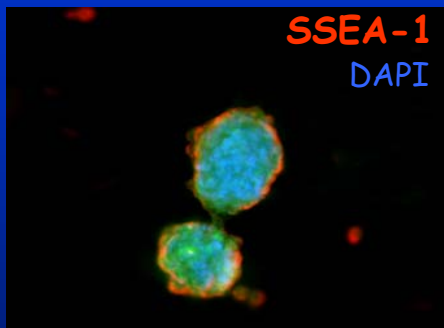
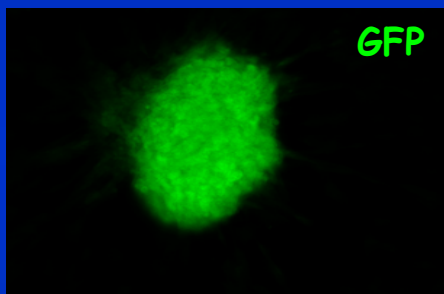
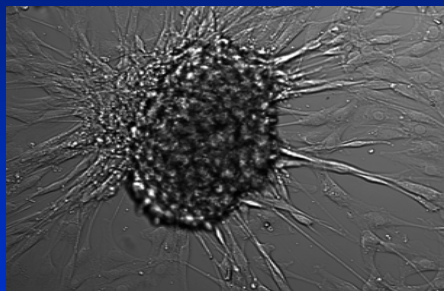


Sca-1⁺ lin⁻ CD45⁺ hematopoetické buňky jsou asi 8-10 μ m velké

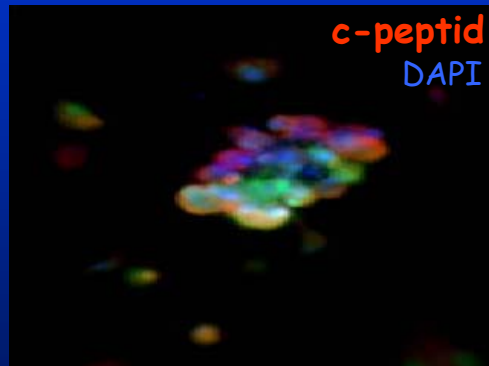
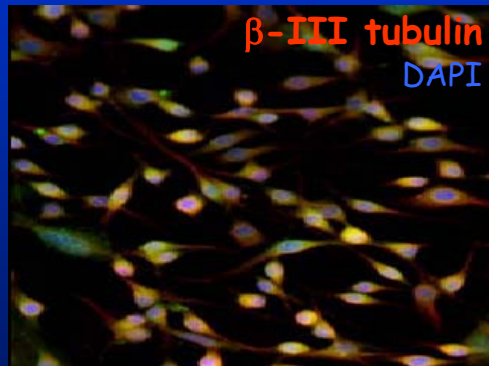
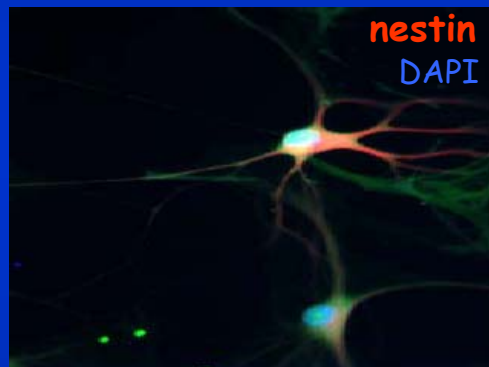
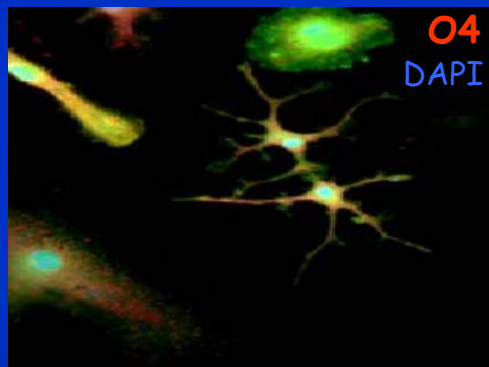
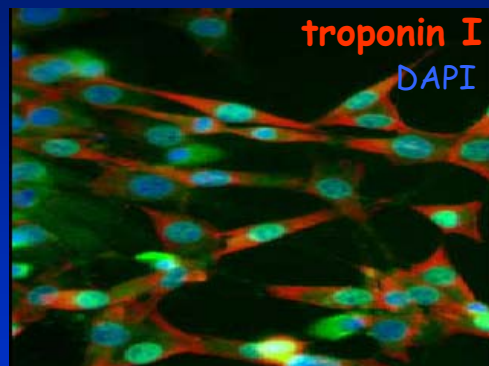
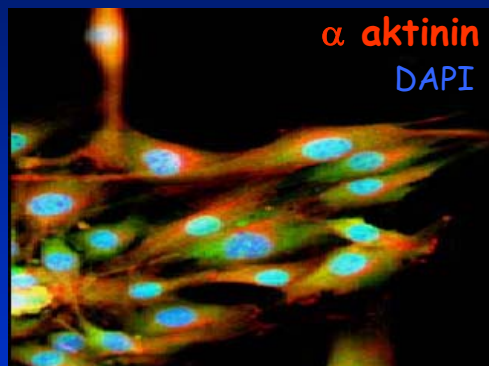


Ratajczak a kol., 2006

a diferencující *in vitro* do kardiomyocytů, neurálních a pankreatických buněk



neurosféry ???
embryoidní tělíska ???



multiliniová diferenciacie !!!

Ratajczak a kol., 2006

Základní terminologie v oblasti KB:

- Totipotence - schopnost diferencovat do jakéhokoliv buněčného typu, včetně zárodečných buněk a trofoblastu; absolutní „univerzálnost“ (oplozené jednobuněčné embryo - zygota)
- Pluripotence - schopnost diferencovat do mnoha buněčných typů s výjimkou trofoblastu (?) (embryonální kmenové buňky)
- Multipotence - schopnost diferencovat do mnoha buněčných typů v rámci jedné tkáně nebo orgánu (např. hematopoetické KB)
- Oligopotence - schopnost produkovat více než jeden typ zralých buněk (např. myeloidní progenitory)
- Progenitorové buňky - termín často zaměňovaný s termínem KB; označuje buňky vzniklé z KB, které mohou pouze diferencovat ale nemají schopnost „self-renewal“
- Buněčná linie - buňky které mohou být udržovány a množeny *in vitro* a jsou imortalizované (nesmrtelné) nebo vykazují neomezeně dlouhou životaschopnost (nádorové linie, embryonální KB)
- Plasticita - termín používaný pro vyjádření schopnost KB vytvářet specializované buňky různých tkání a orgánů
- Transdiferenciace - schopnost určitých buněk jednoho orgánu nebo tkáně, včetně KB nebo progenitorů diferencovat do buněk typických pro jiné orgány nebo tkáně (např. hematopoetické KB - kardiomyocyty nebo hepatocyty)
- Knock-out - technika molekulární genetiky sloužící pro inaktivaci (umlčení) genu, většinou homologní rekombinací
- Knock-in - technika molekulární genetiky sloužící pro vložení genu do buňky

Prezentace přednášky bude přístupná na:

<https://is.muni.cz>

Studijní materiály

Biologie - přednášky (jaro 2006)