

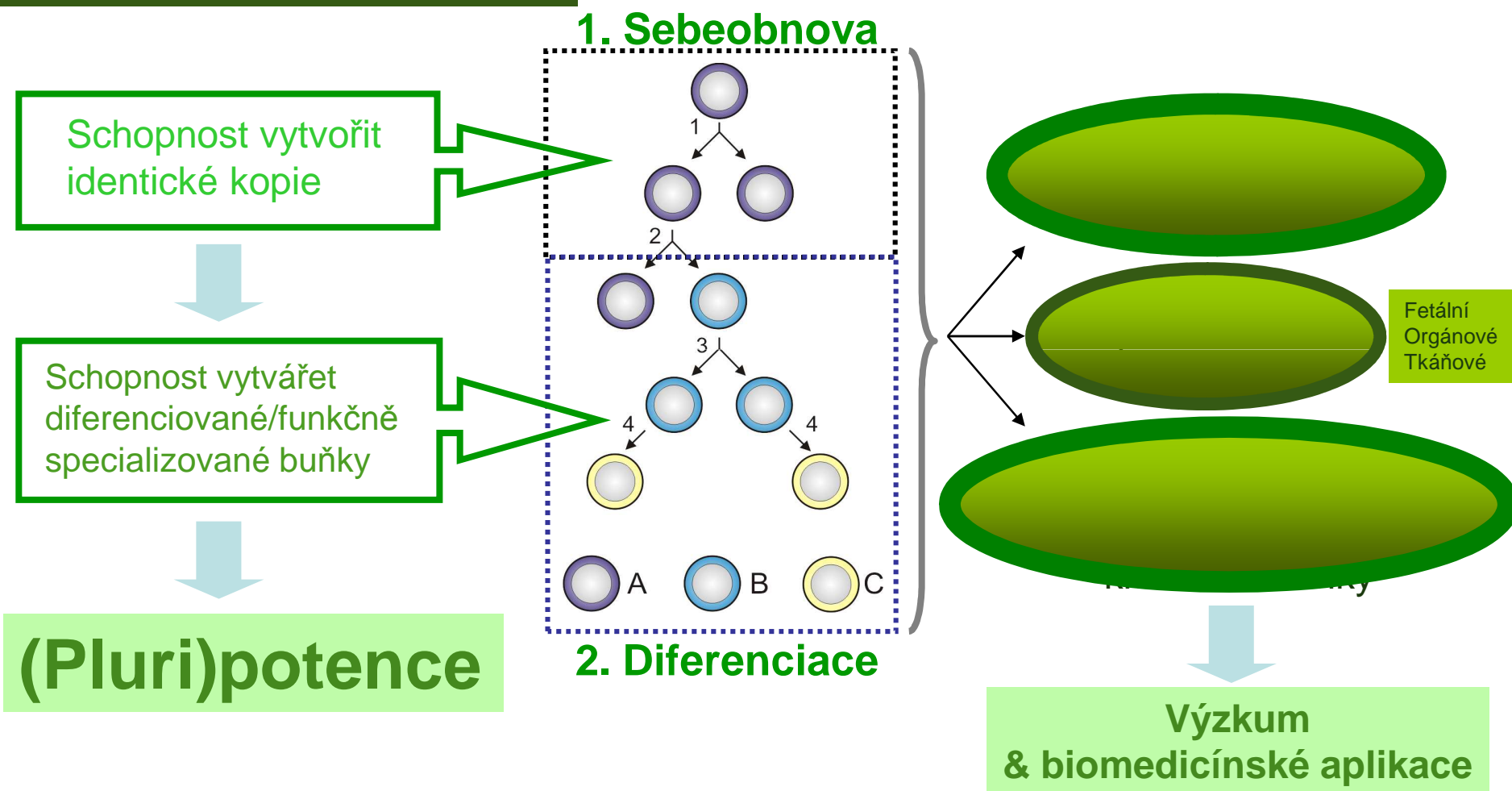
Co víme o kmenových buňkách?



Vyjmenujte nejméně tři zásadní rozdíly mezi embryonálními kmenovými buňkami a tzv. dospělými kmenovými buňkami. □

Kmenové buňky: Kriteria a definice

Buňky, které mají dvě základní vlastnosti::

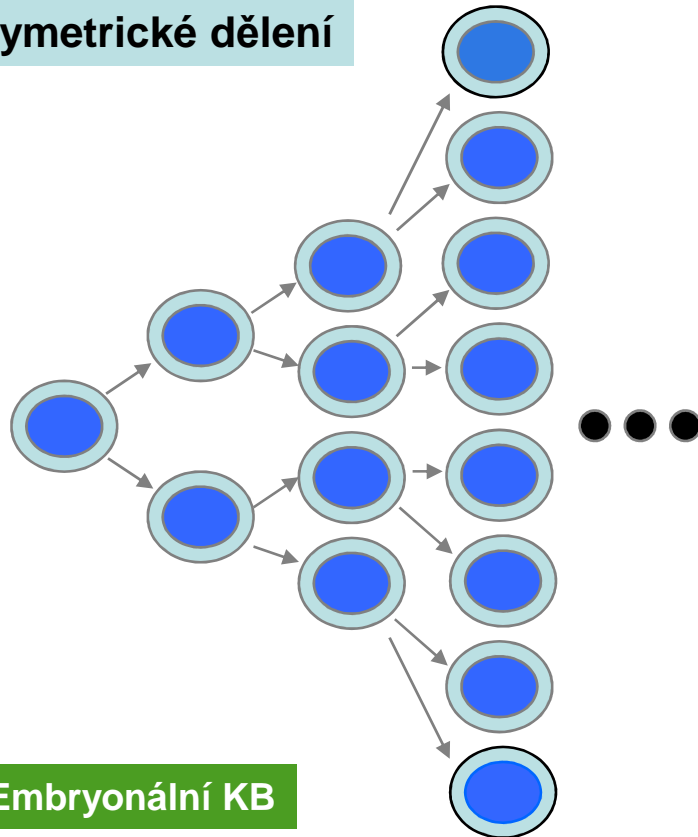


(Pluri)potentní kmenové buňky regenerují tkáně a orgány a jsou množitelné *in vitro*

Mechanismus sebeobnovy kmenových buněk (KB)

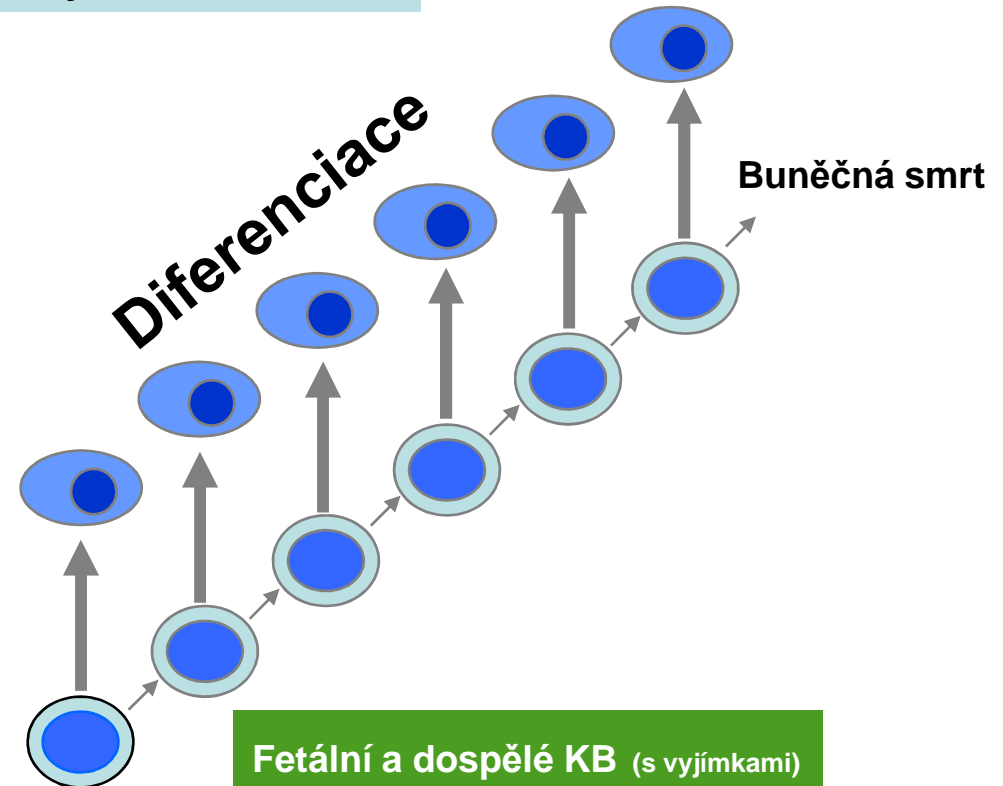
Sebeobnova = tzv. self-renewal; nejdůležitější vlastnost kmenových buněk; schopnost vytvořit identické dceřiné buňky

Symetrické dělení



Embryonální KB

Asymetrické dělení

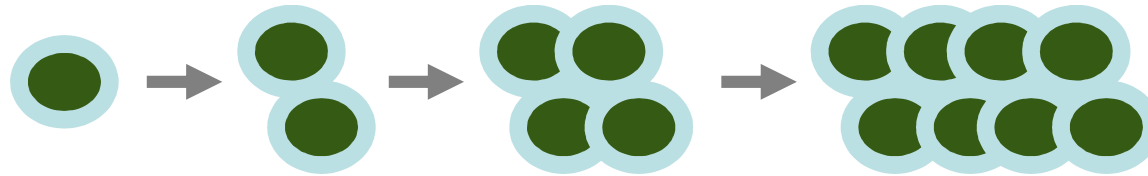


Fetální a dospělé KB (s výjimkami)

Kombinace obou mechanismů = neurální KB !!!

Kapacita KB replikovat se *in vivo* a *in vitro*

Replikační kapacita = počet zdvojení populace



IN VIVO

Embryonální KB
Dospělé KB

-v podmínkách *in vivo* neexistují !!!
-pravděpodobně po celý život (s výjimkami)

IN VITRO

Embryonální KB
Neurální KB
Dospělé KB

-neomezená
-neomezená (?)
-několik dělení

Pro srovnání



Somatické buňky
Transformované (nádorové) buňky

-??? nebo 0-50x
-neomezená

Diferenciační kapacita KB

totipotence → pluripotence → multipotence → oligopotence → unipotence

zygota

Embryonální KB

Hematopoetické KB

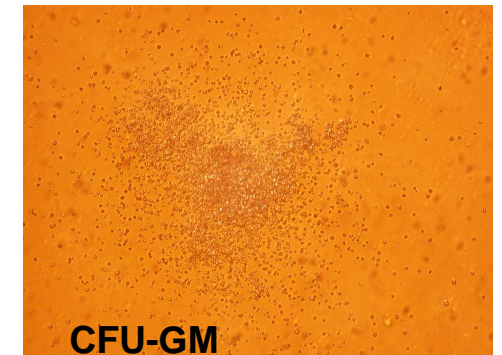
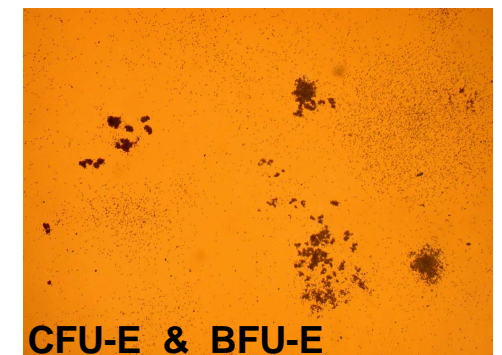
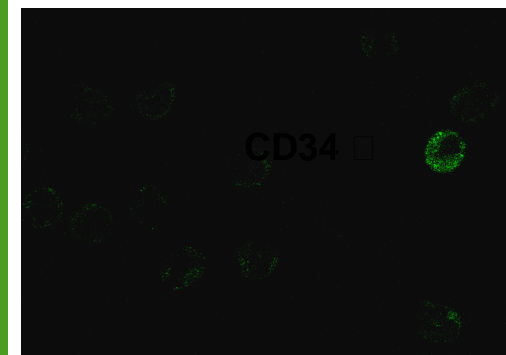
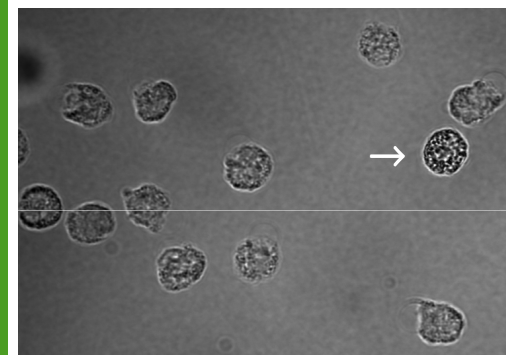
Gastrointestinální KB

KB prostaty

Nediferencované KB

Kolonie mnoha tisíc buněk

Neurony



Příklady

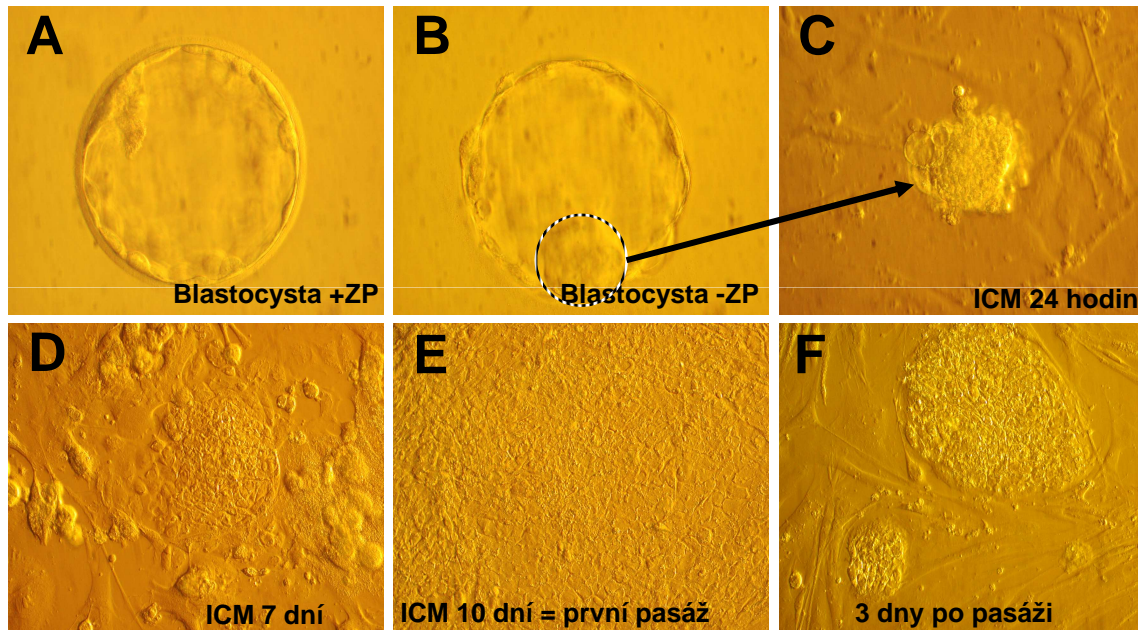
Linie KB - neomezený zdroj pluripotentních buněk

(“Dostupnost” kmenových buněk pro manipulace *in vitro*)

Příklady dospělých KB

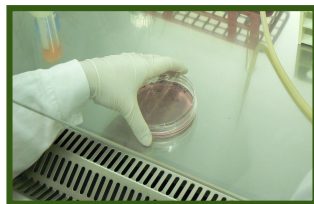
Embryonální KB

Hematopoetické KB



- „niche“ KB
- mobilizace KB
- buněčné třídění

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



Schopnost růst a replikovat se *in vitro*

Buněčná linie !!!

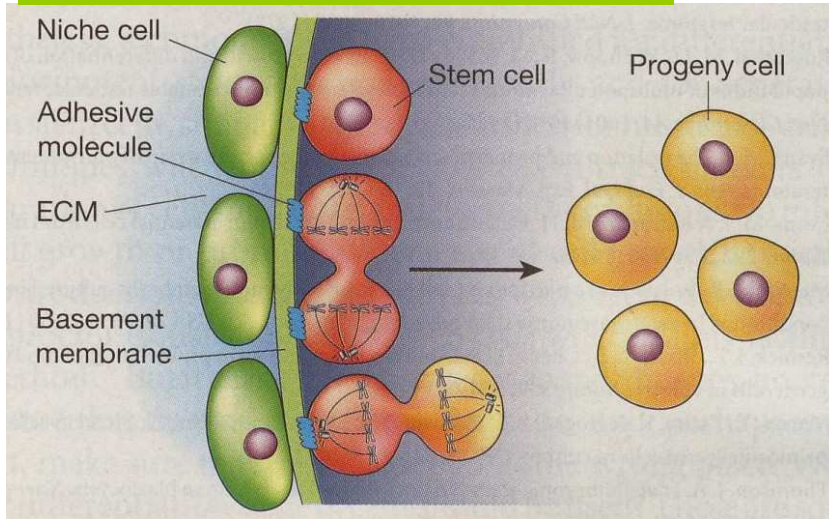
X

Buněčná subpopulace !!!

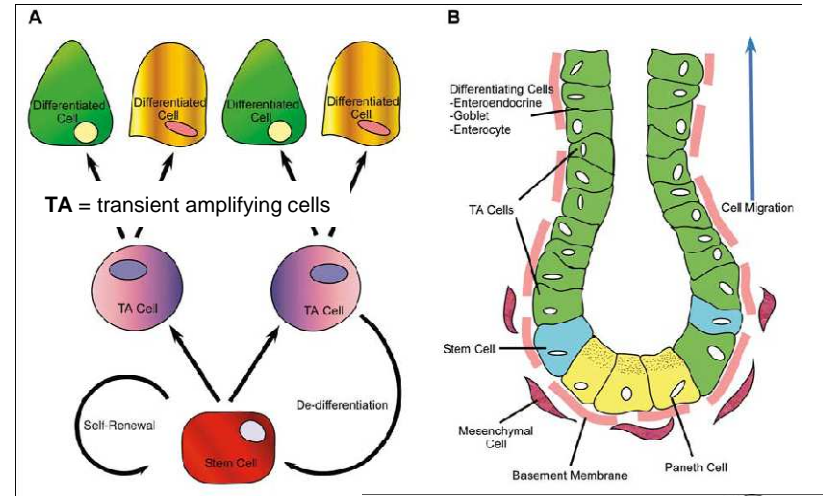
Budeme mít dostatek buněk pro terapeutické aplikace ?

Dospělé KB a jejich „niche“

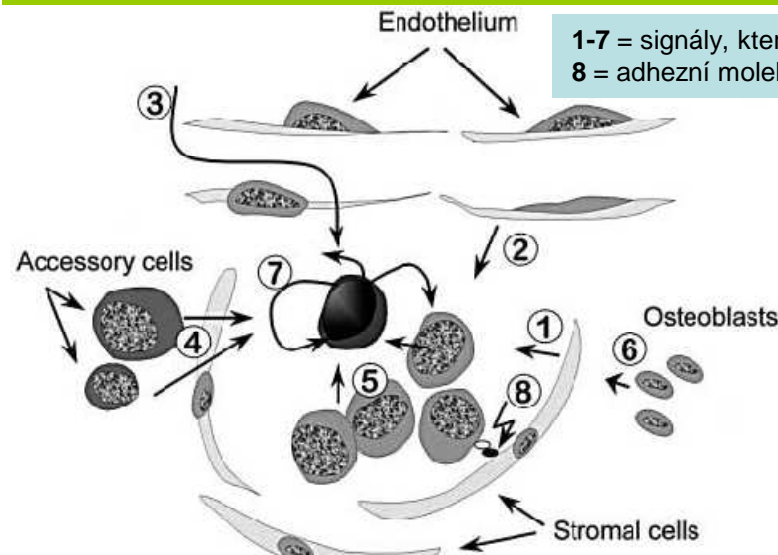
Obecná struktura a funkce „niche“



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

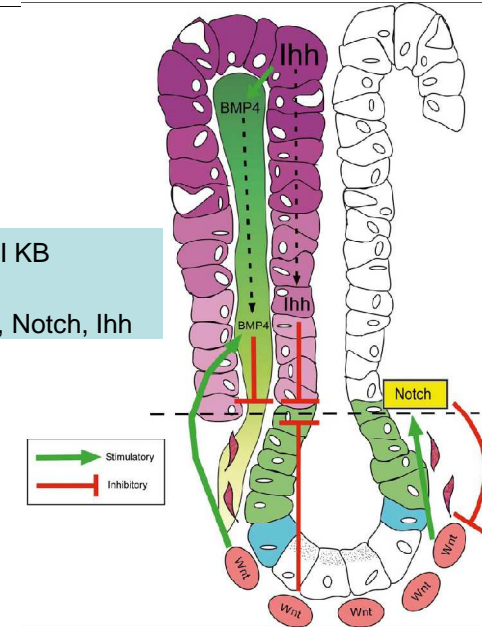


Hematopoietické KB jsou v kostní dřeni



1-7 = signály, které určují prostředí „niche“
8 = adhezní molekuly podporují přežívání KB

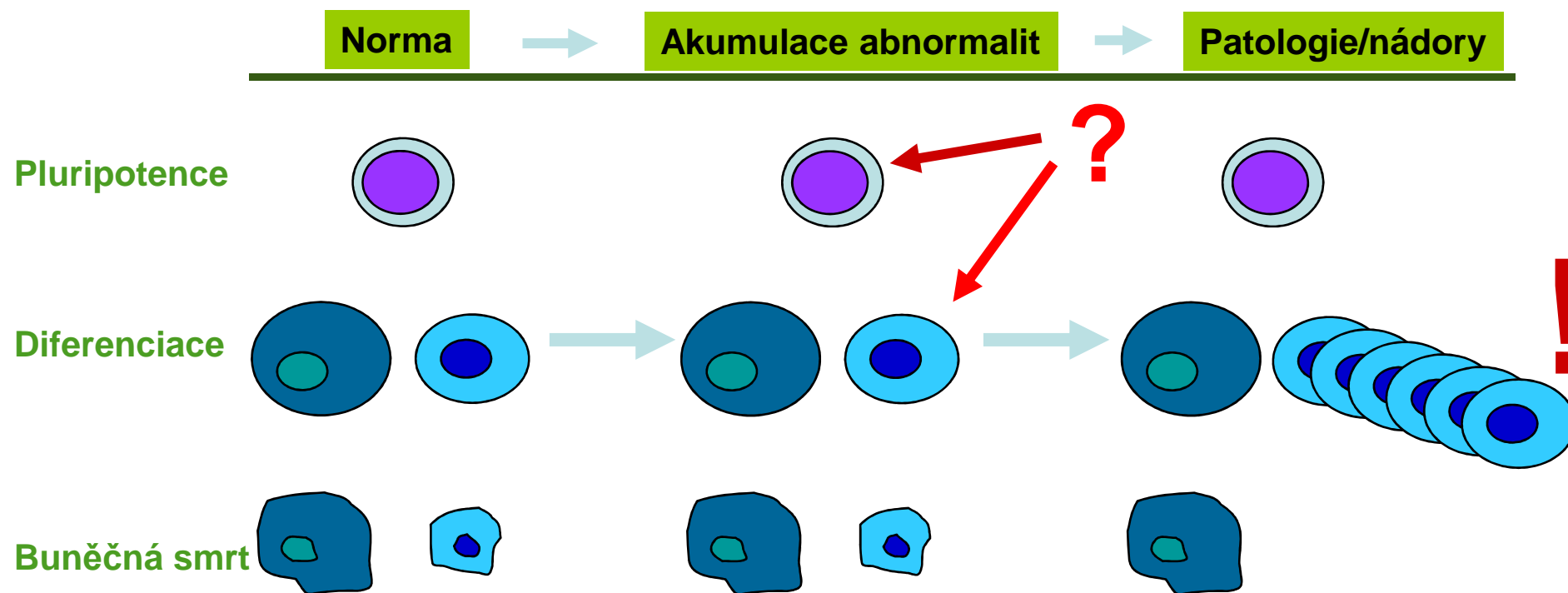
Signály, které definují „niche“ GI KB a regulují jejich proliferaci a diferenciaci - např. Wnt, BMP, Notch, Ihh



“Niche” je charakterizováno přítomností několika typů podpůrných buněk a mnoha signálními molekulami, které společně vytvářejí podmínky pro přežívání, případně diferenciaci KB

Proč je znalost biologie kmenových buněk mimořádně důležitá pro současnou medicínu?

- ❖ možnost manipulace s KB v podmínkách *in vitro*, kombinovaná s možností řídit jejich diferenciaci a množení, je nezbytná pro vývoj nových tzv. buněčných terapií !!!
- ❖ pochopení mechanismů, které řídí diferenciaci a množení normálních KB představuje s velkou pravděpodobností klíč k pochopení vzniku mnoha nádorových onemocnění !!!



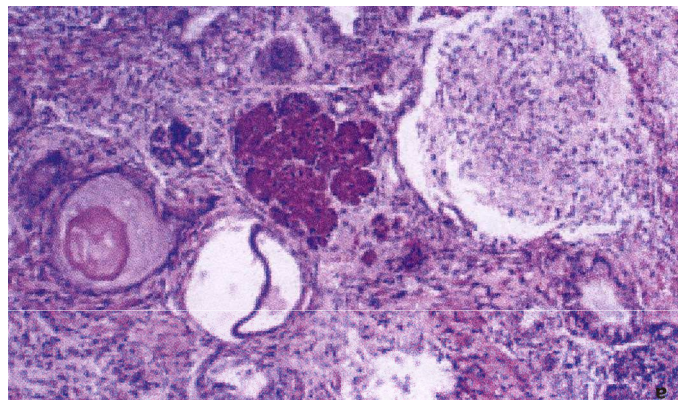
Historie objevů kmenových buněk (KB)

Od Prometha k...



- „Omnis cellula e cellula“ -Rudolf Virchow 1855
- Primitivní KB v krvi -1917
- „Kolonie-formující“ buňky v kostní dřeni -1961
- Embryonální karcinomové buňky -1974
- Myší embryonální KB -1981
- Dospělé KB ~1980 →
- Embryonální KB z lidských blastocyst -1998
- Indukované pluripotentní KB (tzv. iPS cells) - 2006

Kde můžeme nalézt počátky výzkumu embryonálních KB?

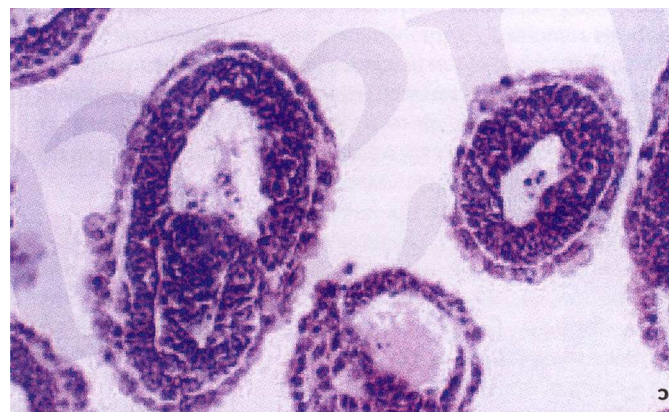


**Na začátku byly nádory
(teratomy/teratokarcinomy)**

**1954 – kmen myší 129 → přirozený vývoj
testikulárních teratokarcinomů
(Stevens & Little)**

Klíčový objev

**1964- teratokarcinomy obsahují
málo
početnou populaci buněk, které mají
kapacitu diferencovat do mnoha
buněčných typů
(Kleinsmith & Pierce)**



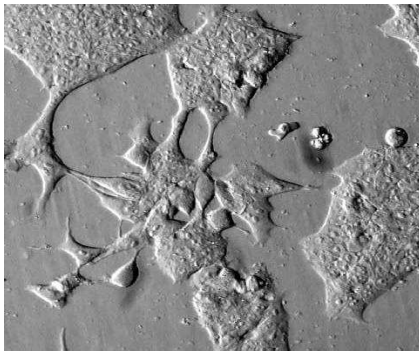
PLURIPOTENCE



Gail
Martin

Martin
Evans

Buňky získané z teratokarcinomů a udržované *in vitro* ukázaly další zajímavou vlastnost



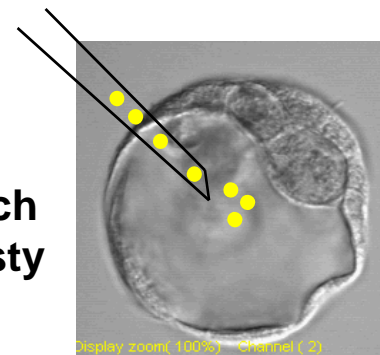
**Kontinuální proliferace bez
ztráty kapacity diferencovat - pluripotence**

1974 – buňky z teratokarcinomů jsou pluripotentní
i po dlouhodobém množení *in vitro*
(Gail Martin & Martin Evans)

→ **SEBEOBNOVA (SELF-RENEWAL)**

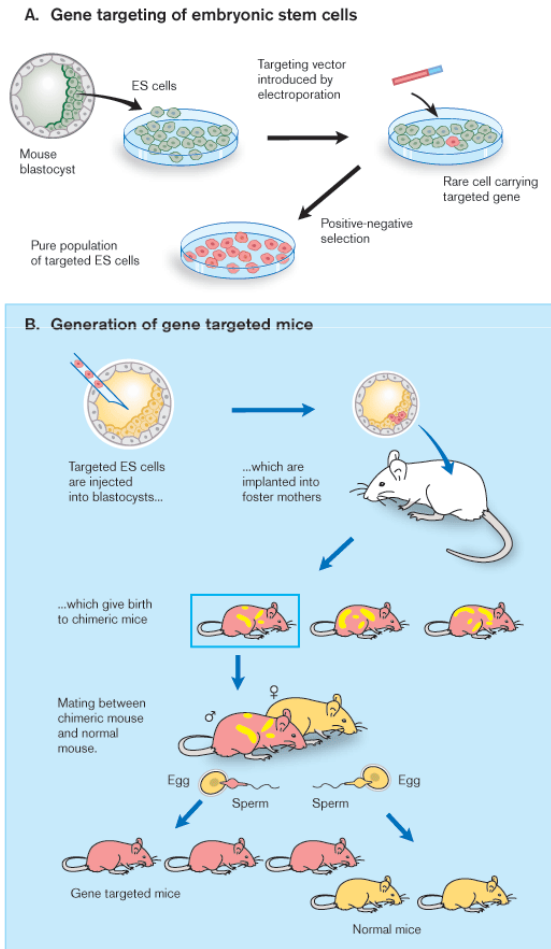
Jiný důkaz pro pluripotenci

1974 – po injekci teratokarcinomových
buněk do embrya ve stádiu blastocysty
vznikají chiméry
(Martin & Evans)



Nobelova cena za fyziologii a medicínu 2007

Vývoj technologií, které vedou k vytvoření tzv. knockout myši pomocí embryonálních KB, tj. možnost získání geneticky modifikovaných živých zvířat s požadovanými mutacemi ve všech buňkách



Sir Martin Evans



Mario R. Capecchi



Oliver Smithies



Lidské embryonální KB

(Thompson et al, 1998)

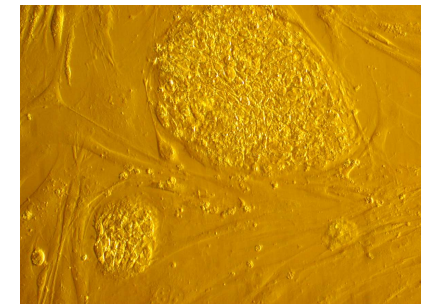
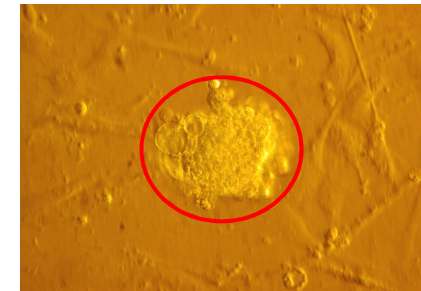
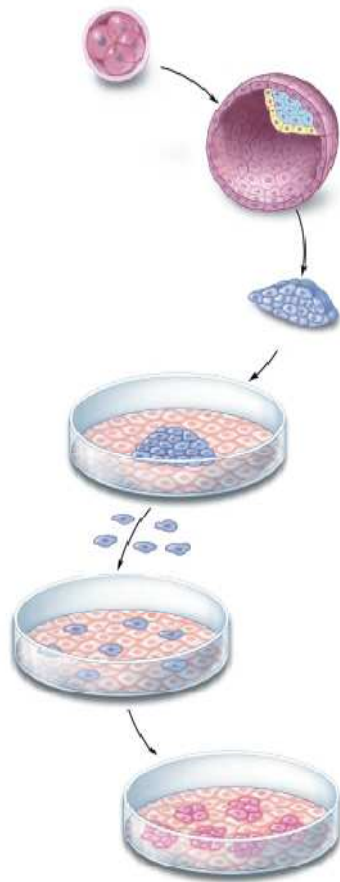
Zásadní krok k buněčným terapiím

Časné embryo ve stádiu blastocysty

Izolovaná vnitřní buněčná masa (epiblast)

Izolovaný epiblast po přenosu do
in vitro podmínek (+ výživná vrstva buněk + FGF2)

Kultivace a pasážování buněk pomocí enzymatické
nebo mechanické disagregace
kolonií (po neomezenou dobu)



Technologie získání lidských embryonálních KB

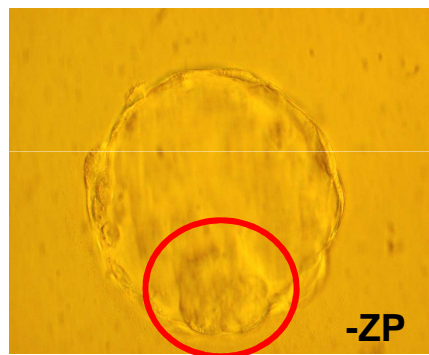


Časné embryo – blastocysta

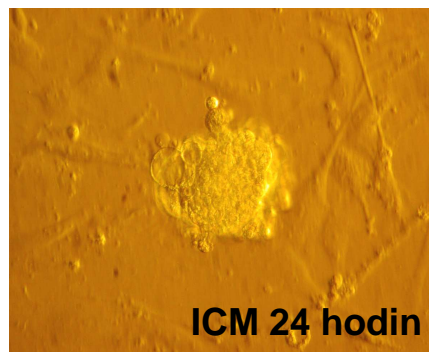
(člověk 4-5 dní /myš 3.5 dne)

- Darované pro výzkumné účely – informovaný souhlas
- Bez finanční kompenzace

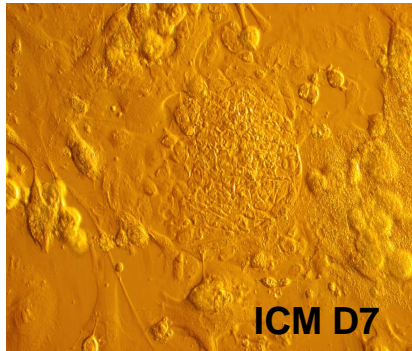
Blastocysta = trofektoderm + **ICM (epiblast)**



- Odstranění zona pellucida (pomocí enzymu pronázy)
- Izolace ICM technikou „imunochirurgie“
- Přenos ICM na podpůrnou vrstvu fibroblastů (CF-1)



- Kultivace v definovaných médiích (DMEM/F-12 s KO-SR + FGF-2)
- Pravděpodobné uchycení a růst ICM

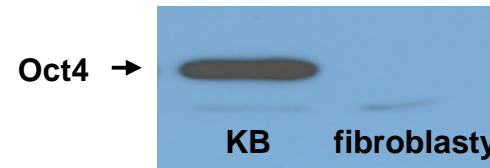
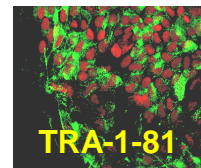
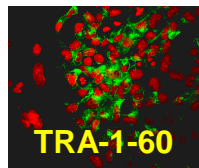
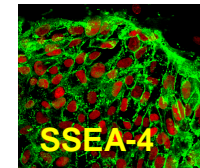
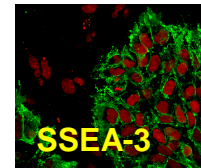
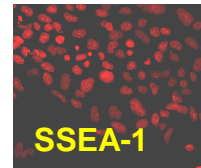
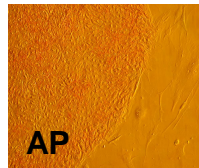
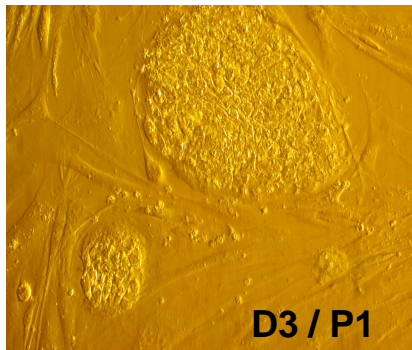


První známky růstu budoucích embryonálních KB



Několik prvních pasáží je kritických – mechanická disagregace

Detailní charakterizace linií KB je nezbytná

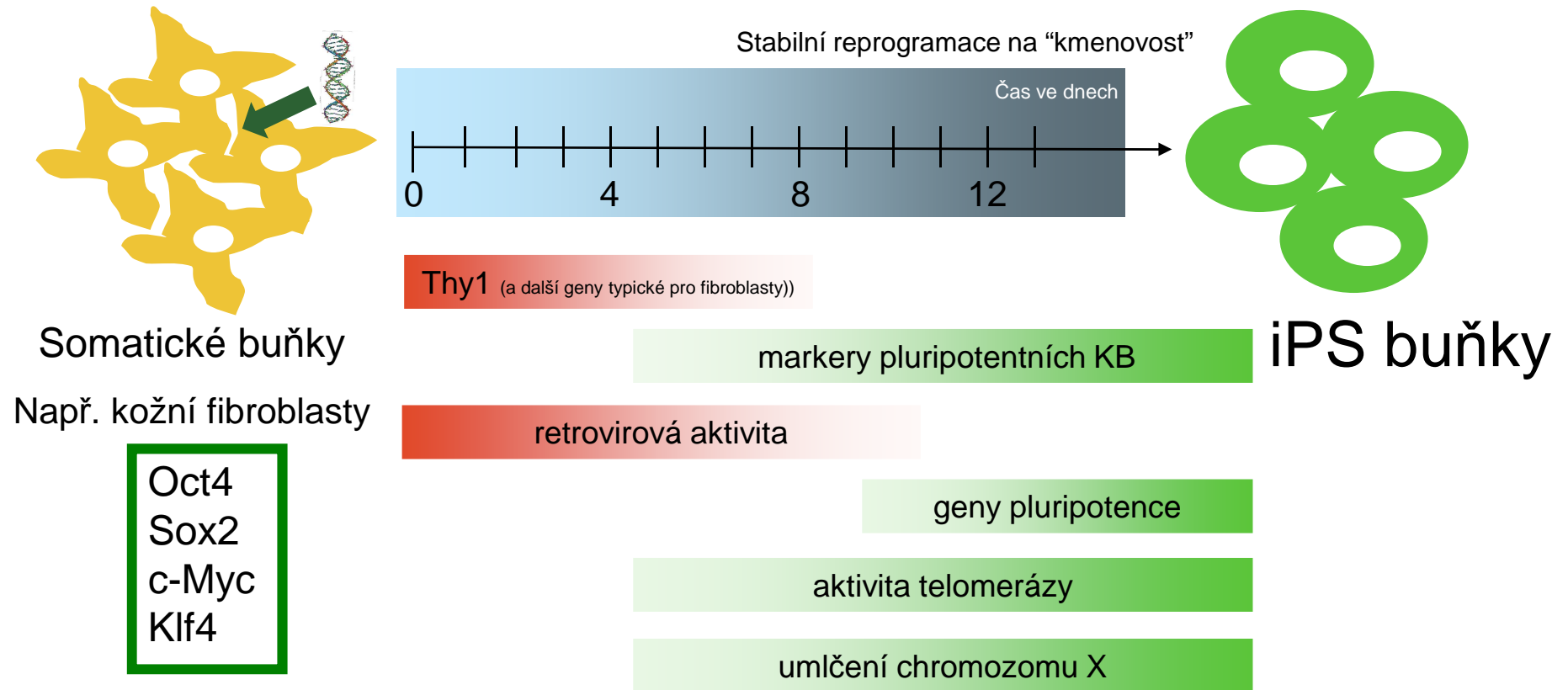


Indukované pluripotentní KB (Yamanaka 2006)

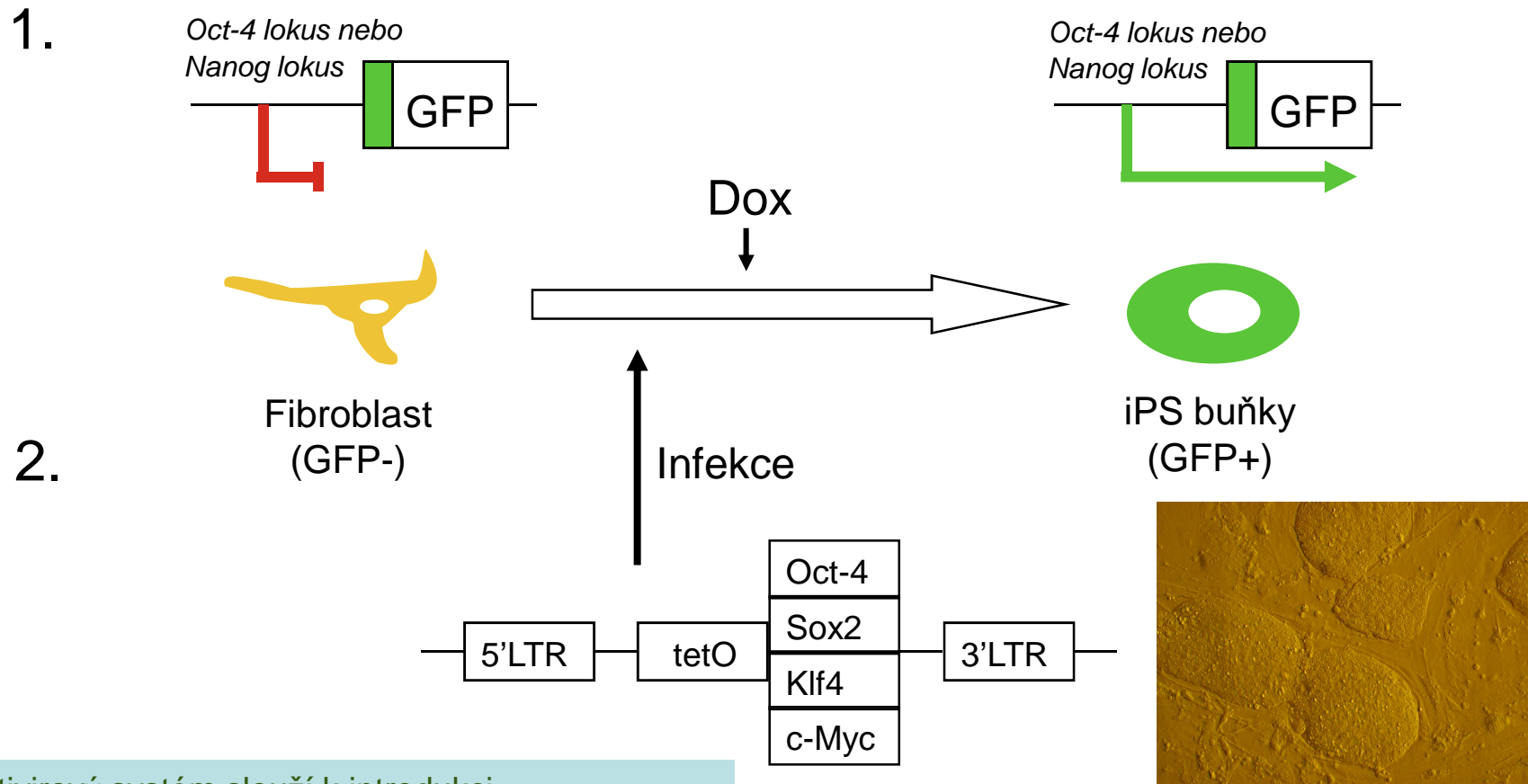


Alternativní zdroj pluripotence - **Indukované pluripotentní KB (iPS cells)**
- KB vytvořené ze somatických tj. diferencovaných buněk pomocí genetické metody

Kinetika reprogramace fibroblastů do pluripotentních KB - *relativně krátká cesta zpět*



Technologie derivace indukovaných pluripotentních KB pomocí indukovatelného lentivirového systému - dvoukrokový proces

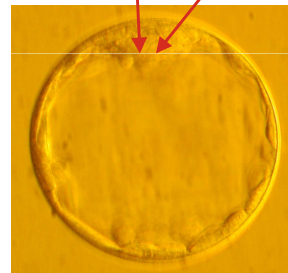
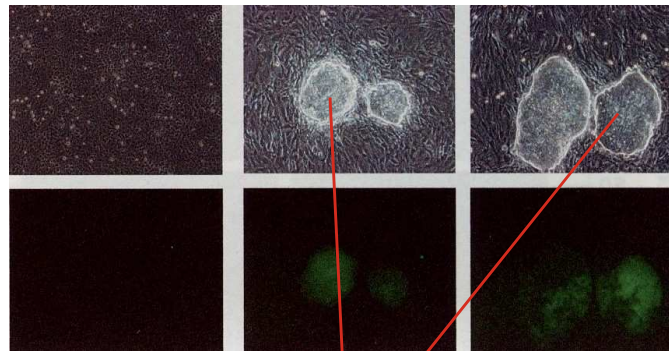


- Lentivirový systém slouží k introdukci genetické informace (TF) do diferencovaných buněk
- Transkripční faktory reprogramují diferencované buňky na „kmenovost“ se všemi vlastnostmi

GFP = Green Fluorescent Protein

“iPS cells make germ line chimeras”

Oct-4 GFP
fibroblasty Oct-4 GFP
iPS buňky Nanog GFP
iPS buňky



Tzv. injekční chiméry
(bílá a hnědá srst)



Nanog GFP iPS chiméra



Oct-4 GFP iPS chiméra

Použití KB: “From bench to bedside”

Téma pro výzkum

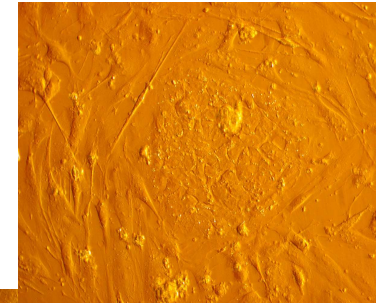
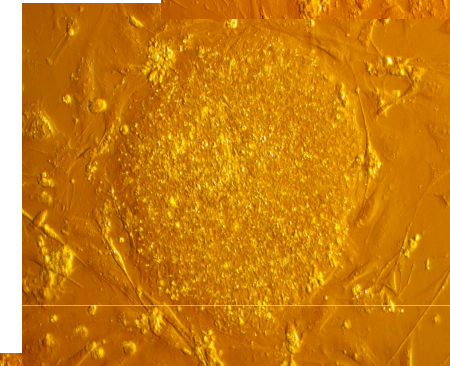
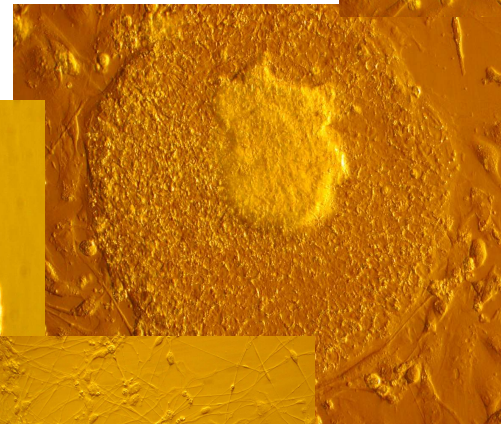
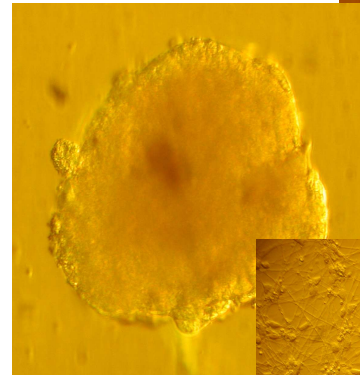
- Mechanismus sebeobnovy KB
- Mechanismus diferenciacce a zastavení diferenciacce - nádorové paradigma
- Mechanismus dělení buněk a regulací buněčného cyklu
- Vznik genomických abnormalit se vztahem k nádorům
- Mechanismus časného vývoje člověka

Budoucnost biomedicíny

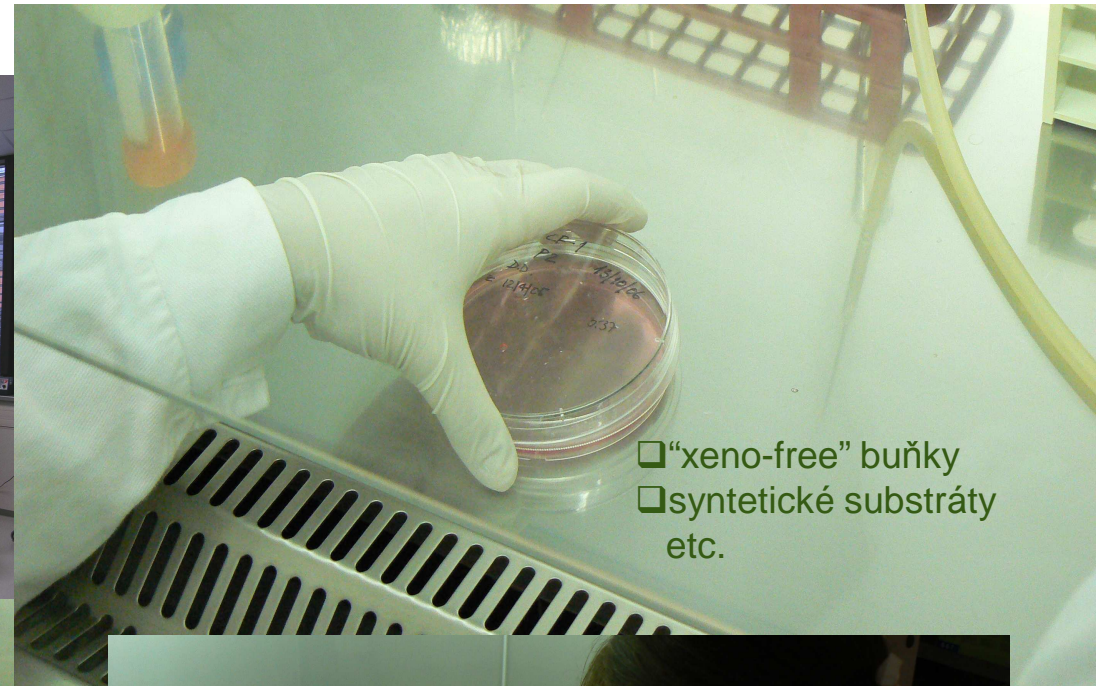
- Buněčná terapie
- Modely nemocí
- Vývoj léčiv
- Testování toxicity

Současné pokroky v diferenciaci lidských embryonálních KB - biologické modely a aplikace

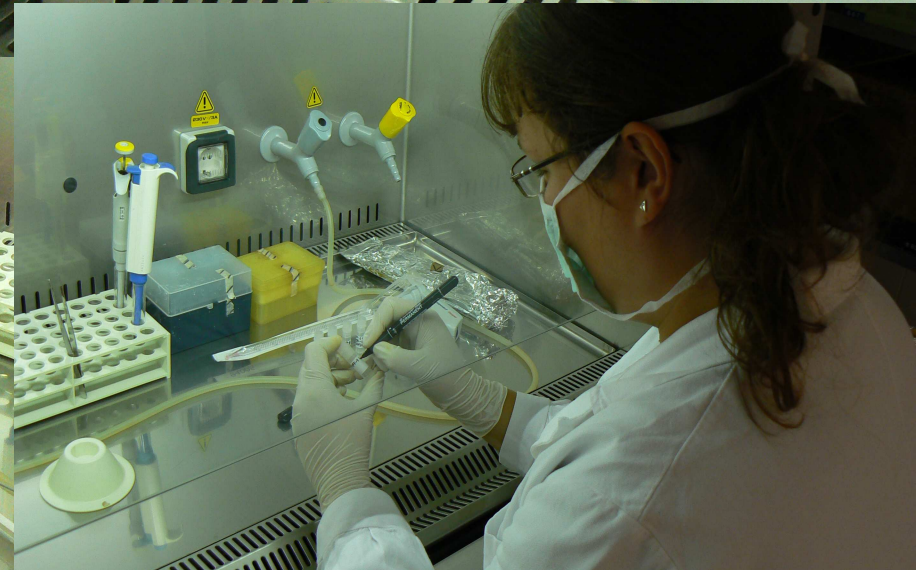
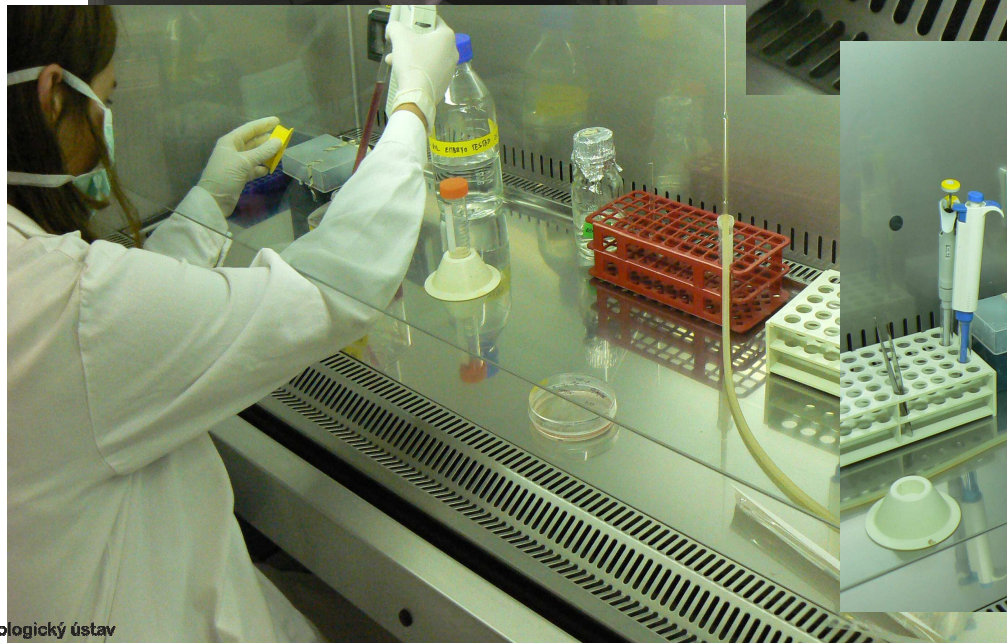
- Neurony, astrocyty, oligodendrocyty
- Kardiomyocyty
- Insulin-produkující pankreatické buňky
- Krevní buňky
- Imunokompetentní buňky
- Endoteliální buňky
- Buňky trofoblastu
- Respiratorní buňky
- Osteoblasty
- Hepatocyty
- Melanocyty
- Buňky prostaty
- Zárůdečné buňky



Good Manufacturing Practices (GMP) a „clinical grade“ buňky



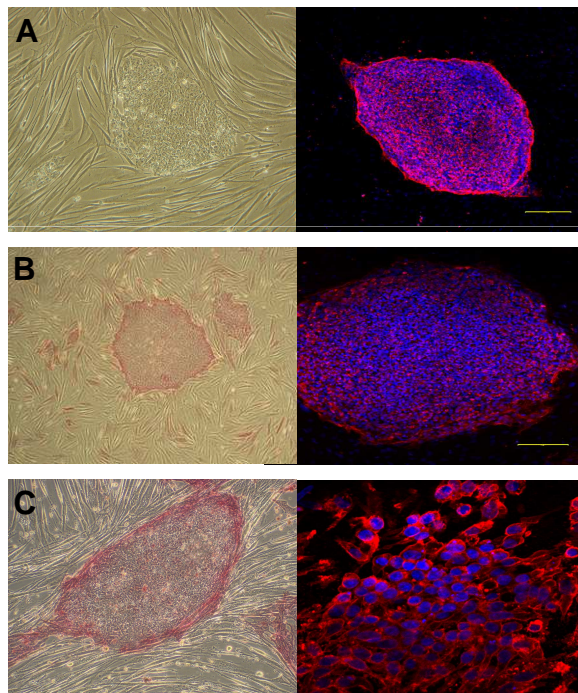
- ❑ “xeno-free” buňky
- ❑ syntetické substráty etc.



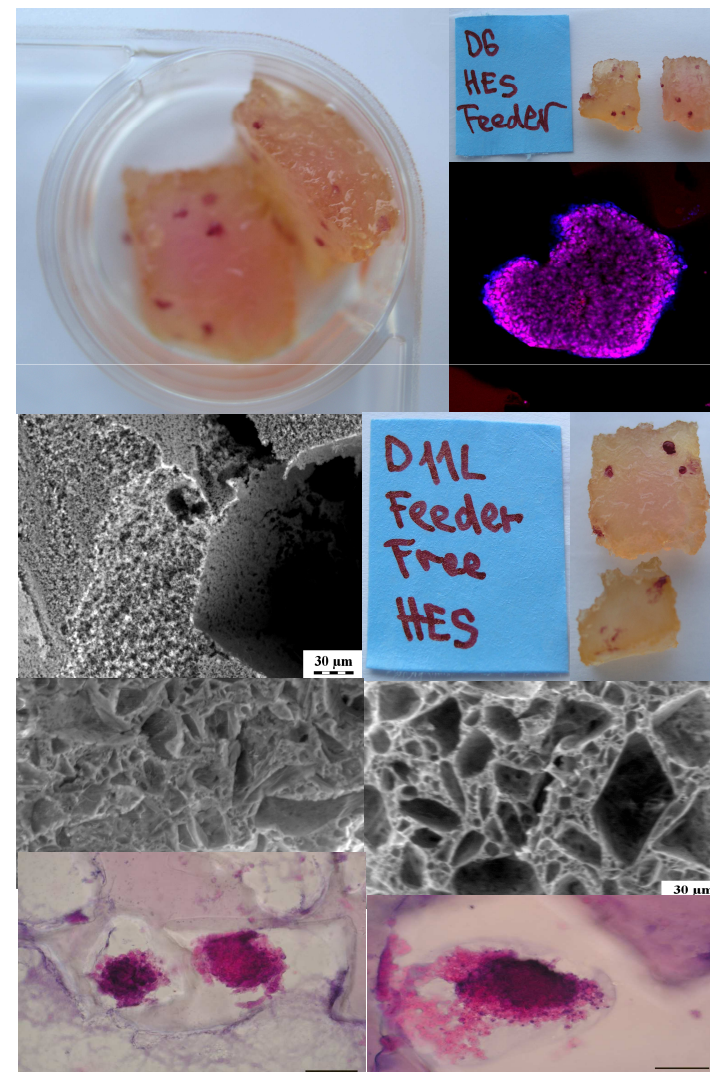
Definované “xeno-free” kultivační podmínky - vývoj pro budoucí buněčné terapie

Humanizované kultivační podmínky

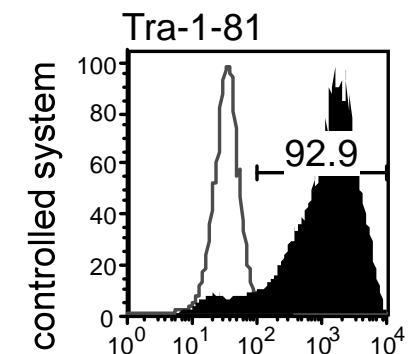
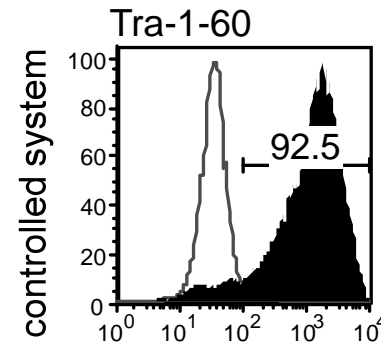
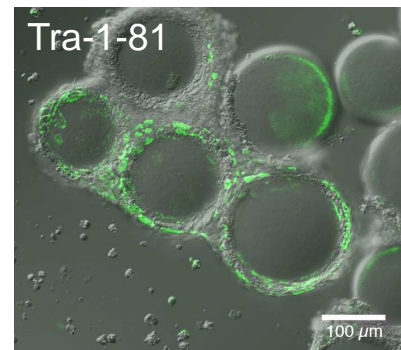
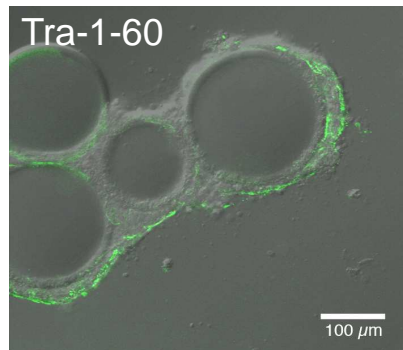
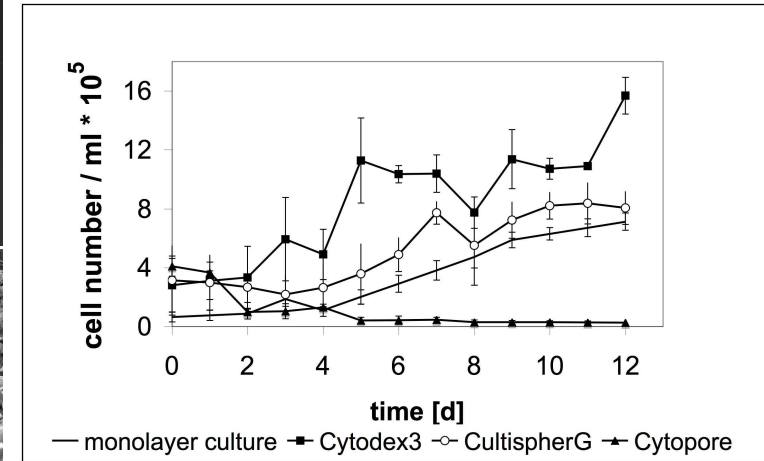
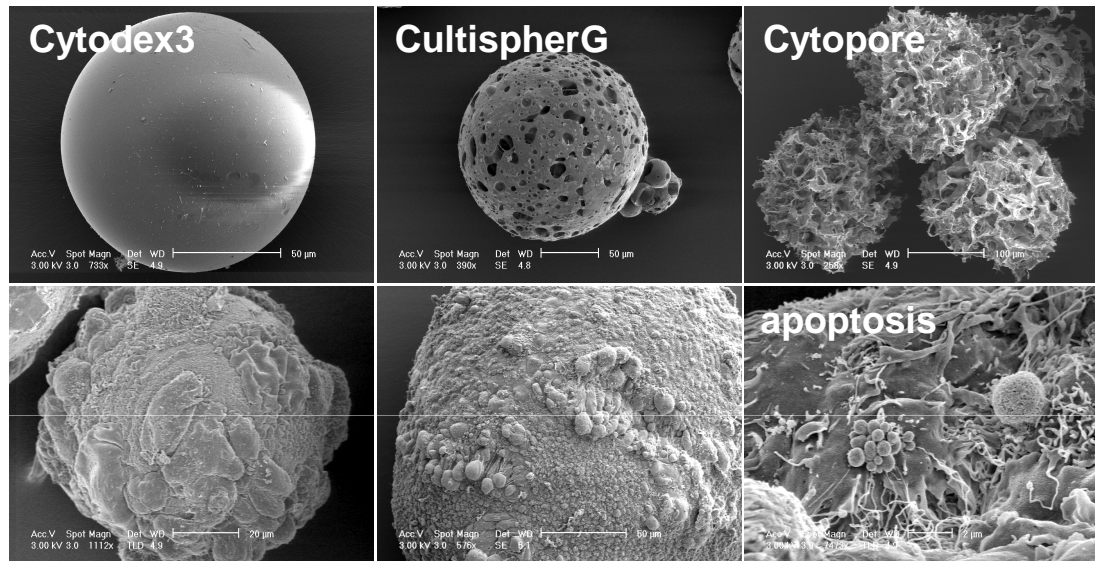
- Lidské substráty/fibroblasty (A, B)
- Chemicky definované média (C)



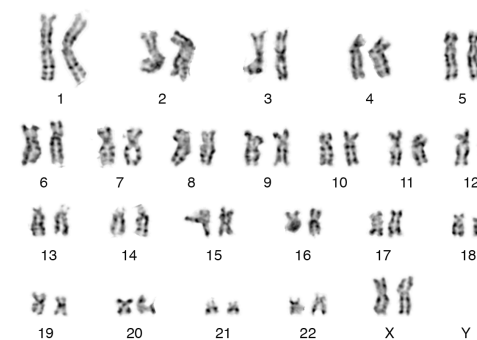
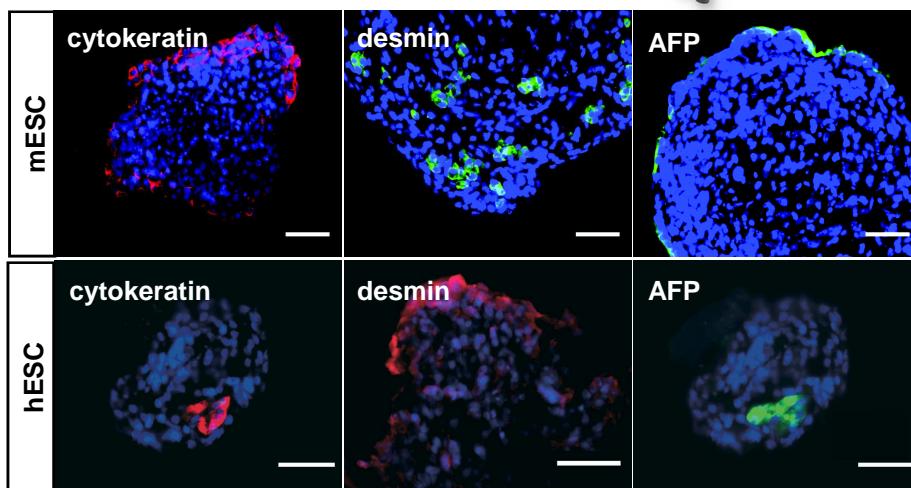
Hydrogely mohou sloužit jako nosiče nebo matrice pro kmenové buňky a jejich diferencované deriváty



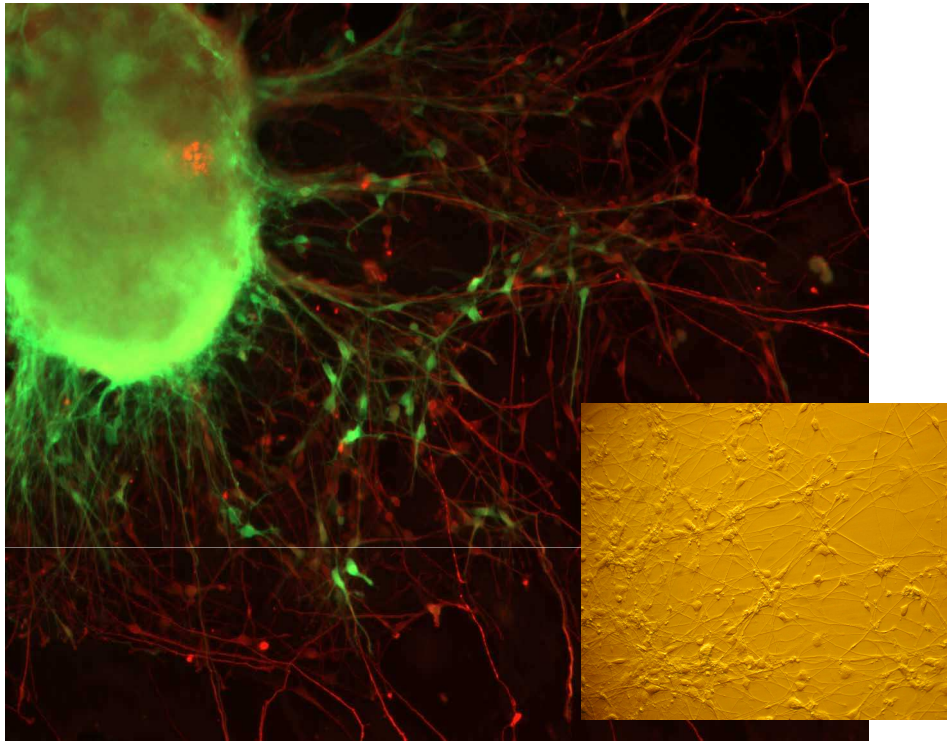
Kultivace lidských embryonálních KB na korpuskulárních mikronosičích v suspenzi - možná cesta efektivní propagace?



Cell^{host} systém pro automatizovanou kultivaci lidských embryonálních KB

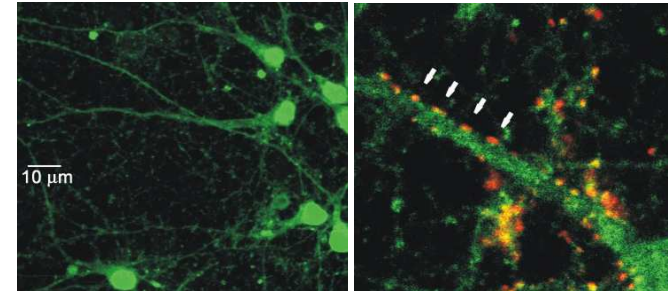


Vývoj terapeutických protokolů s lidskými embryonálními KB

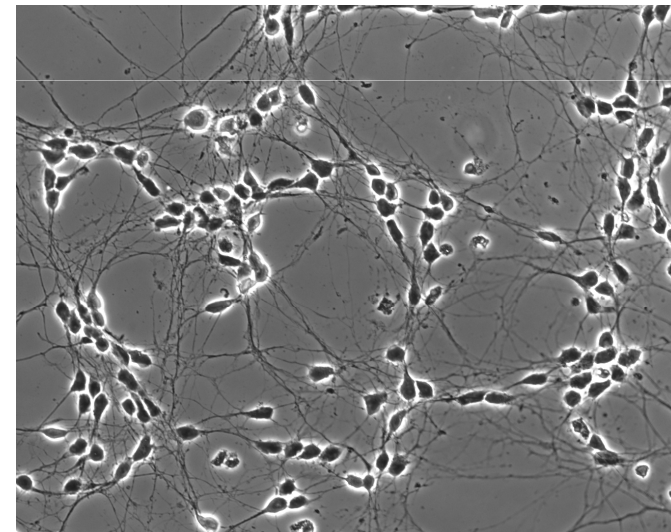


Příklad 1: Transplantace dopaminergních neuronů do krysích mozků (model Parkinsonovi nemoci)

- integrace neuronů do poškozené tkáně
- produkce dopaminu
- znovuobnovení funkcí
- vývoj nádorů (?) !!!



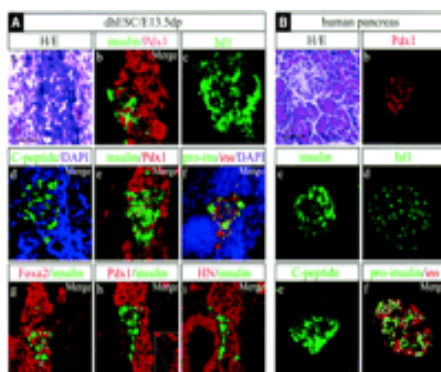
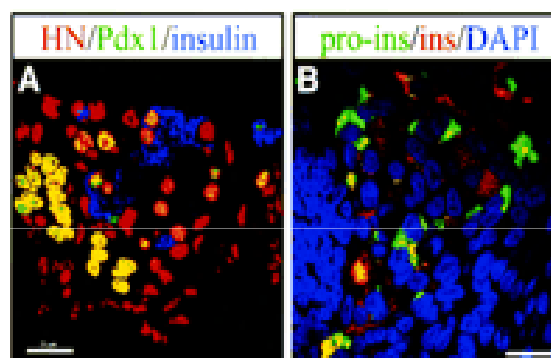
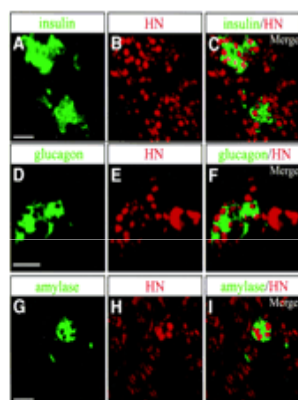
Neurony získané diferenciací lidských embryonálních KB vytvářejí normální synaptické spoje.



Problematické je získání 100% populace neuronů pro terapeutické aplikace. Stejný problém existuje i v jiných případech cílených diferenciací.

Vývoj terapeutických protokolů s lidskými embryonálními KB

Příklad 2: Transplantace pankreatických a endokrinních progenitorů u myších modelů



-integrace progenitorů do tkáně

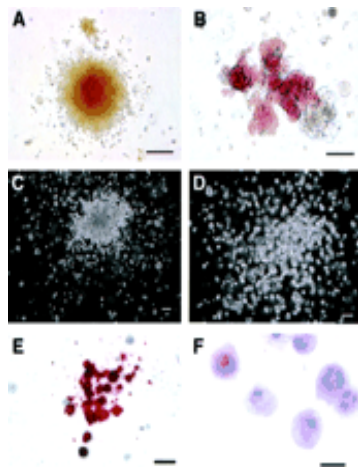
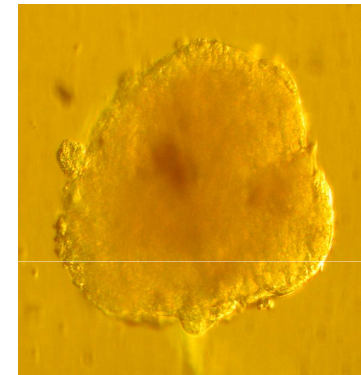
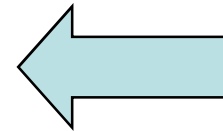
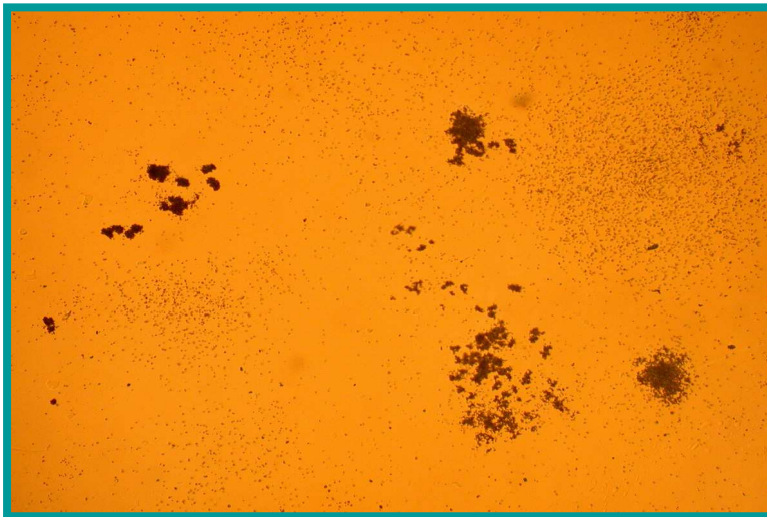
-přeměna na sekreční β eta buňky

-syntéza pro-inzulinu a C peptidu

-nutnost současné transplantace „instruktivních“ buněk !!!

Vývoj terapeutických protokolů s lidskými embryonálními KB

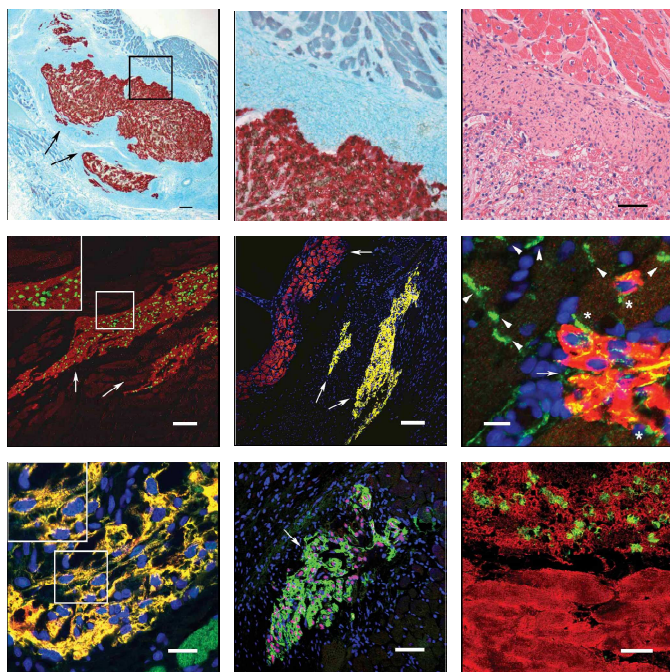
Příklad 3: Dlouhodobá hematopoetická repopulace u ozářených myší a ovcí



- nízká účinnost diferenciace *in vitro*
- CD34+ a CD45+ buňky osídlují kostní dřeň
- CD34+ a CD45+ buňky dlouhodobě přežívají a množí se v kostní dřeni
- jednou transplantované hematopoetické buňky mohou být opakovaně transplantovány
- hlavní bariéru tvoří NK buňky příjemce !!!

Vývoj terapeutických protokolů s lidskými embryonálními KB

Příklad 4: Transplantace kardiomyocytů do krysího srdce s infarktem myokardu

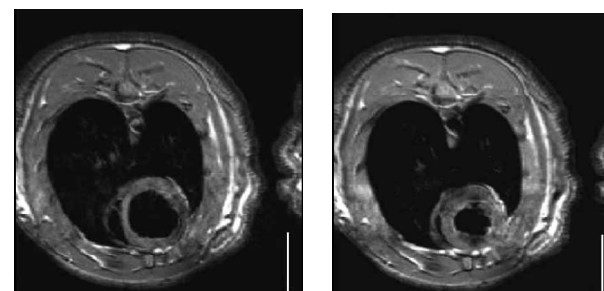
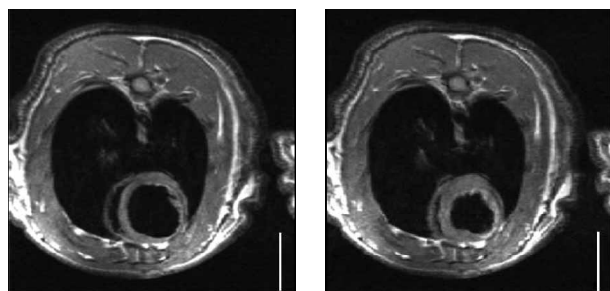


- "tepající" kardiomyocyty mohou být derivovány z lidských embryonálních kmenových buněk ve velkých množstvích

- buňky se dobře zabudovávají do ischemické tkáně a obnovují kontrakce srdečního svalu

- buňky reagují na vnější stimuly stejně jako původní "zdravé" buňky

- problém vazivové, tzv. ischemické jizvy?



Definice I.

- **Embryonální KB** jsou buňky embryonálního původu se schopností sebeobnovy, multiliniové diferenciaci *in vitro* a *in vivo*, klonogenní kapacitou, normálním karyotypem, dostatečnou proliferační kapacitou *in vitro* v definovaných podmínkách a schopností hlubokého zamrazení a rozmrazení bez výrazné ztráty životaschopnosti. Kombinace těchto vlastností je nazývána “kmenovostí” (stemness).

Definice II.

- **Dospělé KP** jsou buňky s klonálním potenciálem, které jsou za fyziologických podmínek přítomné v různých orgánech a tkáních, sebeobnovují se, a průběžně, nebo když dostanou vnější signál, začínají diferencovat a vytvářejí funkčně specializované buňky potřebné k regeneraci orgánů a tkání.

Definice III.

- **Indukované pluripotentní buňky** (tzv. induced pluripotent stem cells; iPS cells) jsou buňky vytvořené z dospělých diferencovaných buněk (tj. somatických buněk) pomocí „jednoduché“ metody - geny kódující několik (2-4) transkripčních faktorů jsou klonovány do virového vektoru a jednoduchým přidáním takových vektorů do *in vitro* kultury somatických buněk (např. fibroblastů) dojde za určitých podmínek k „reprogramaci“ buněk do pluripotentního embryonálního stavu.

Co víme o kmenových buňkách?

