

A microscopic image of cells, likely stem cells, showing a dense cluster of small, rounded cells in the center, surrounded by larger, more elongated cells. The background is a solid blue color.

Úvod do studia biologie kmenových buněk

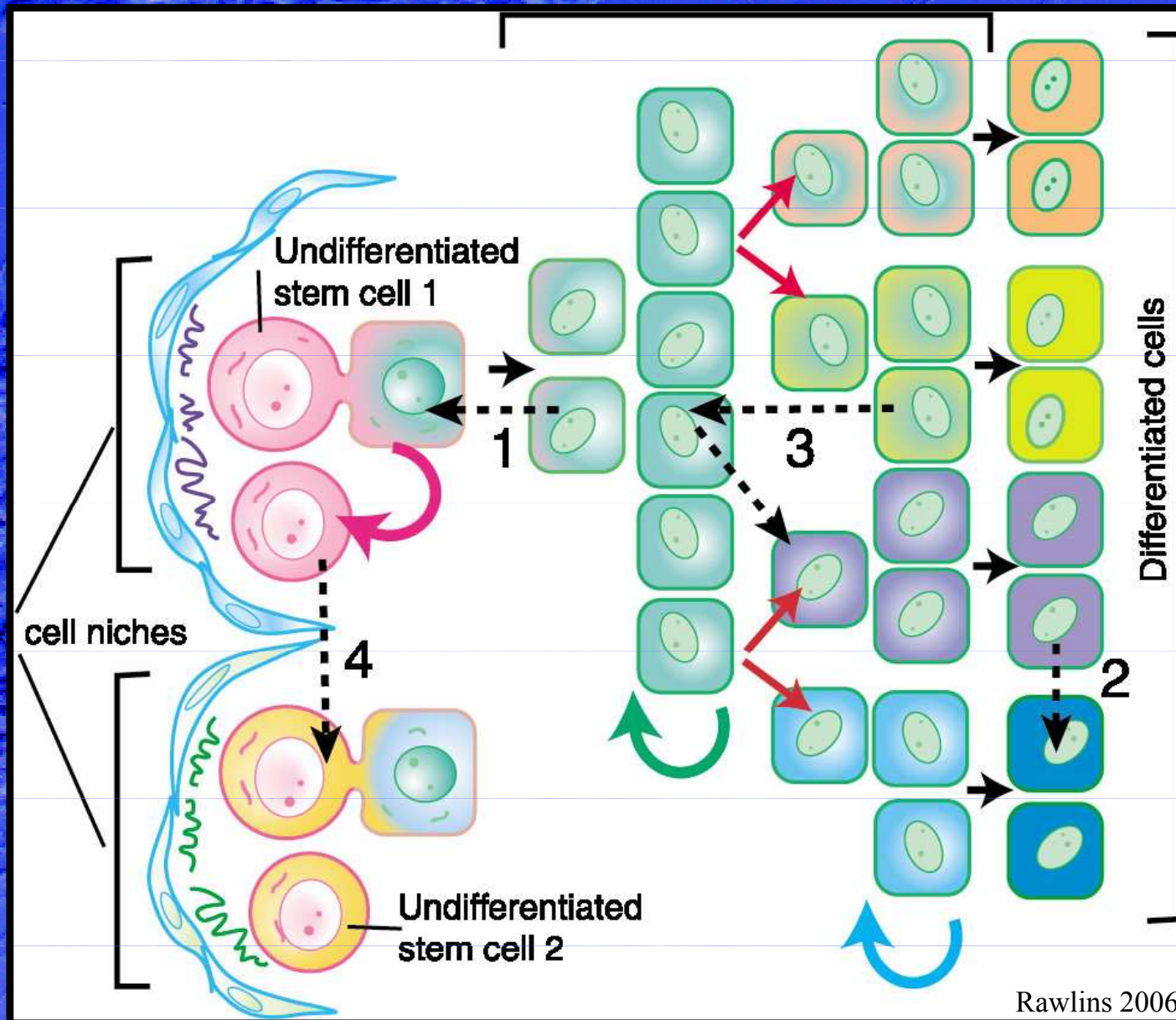
Laboratoř tkáňových kultur ÚEB, PŘF MU

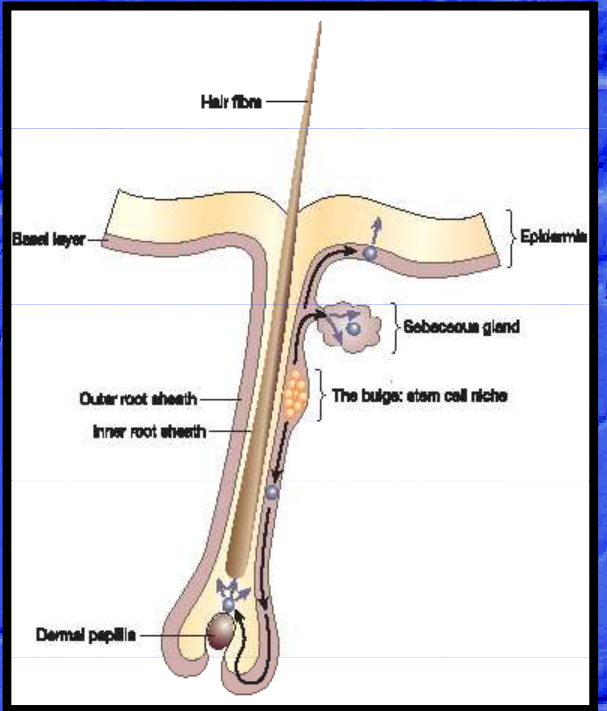
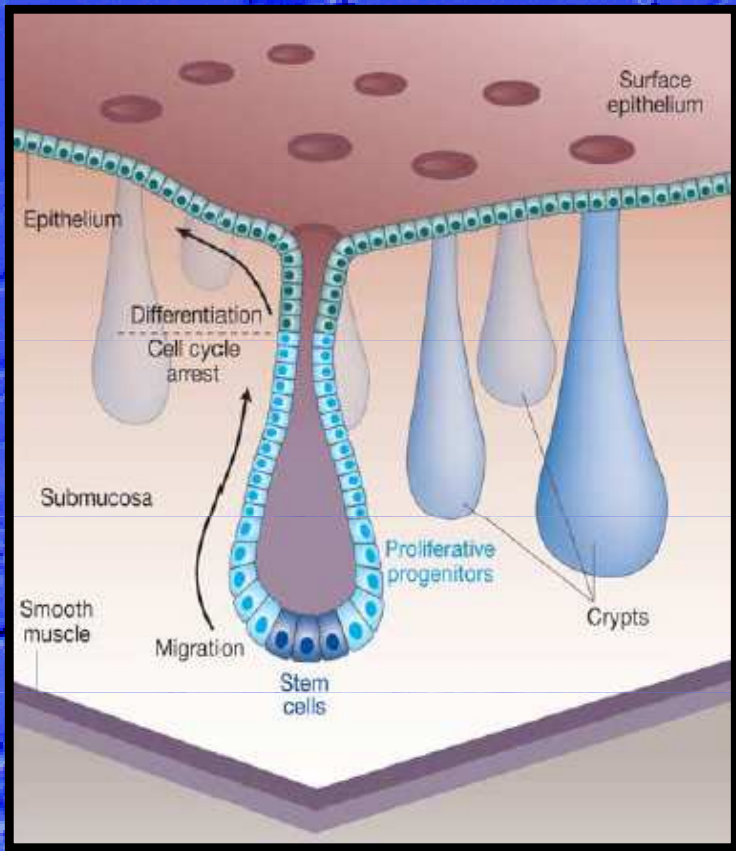
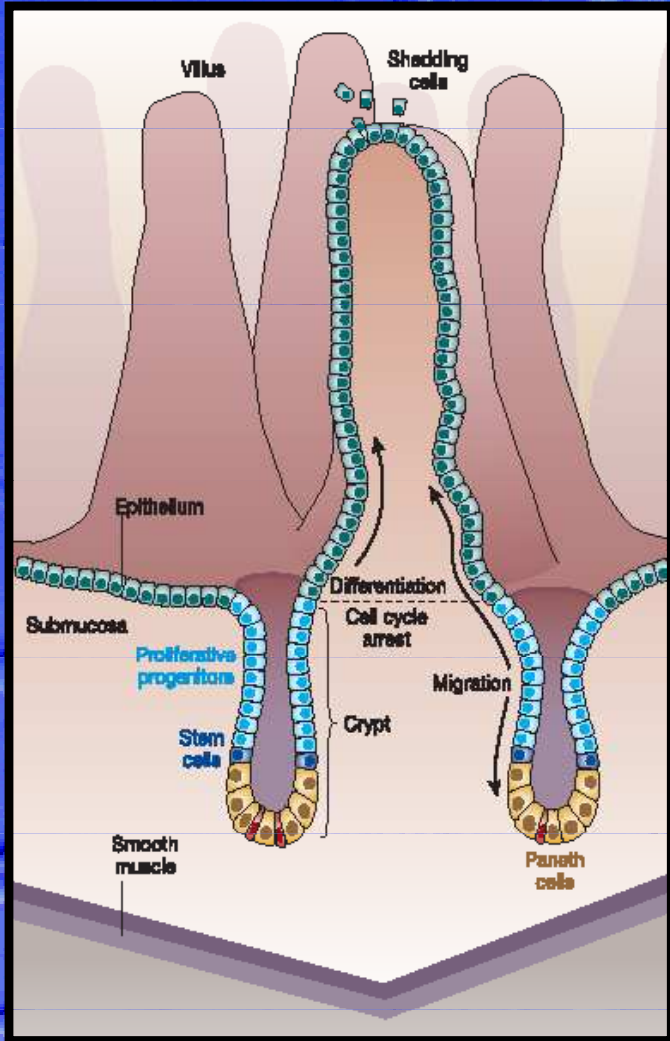
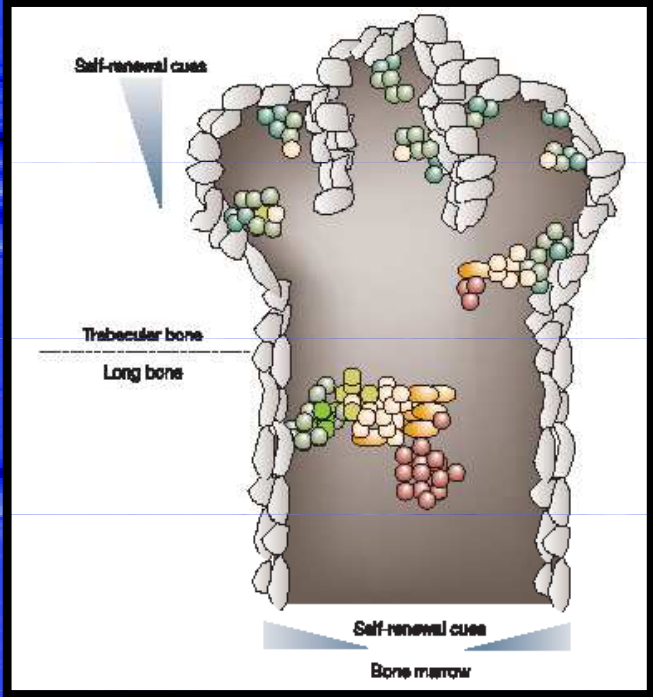
Jiří Pacherník

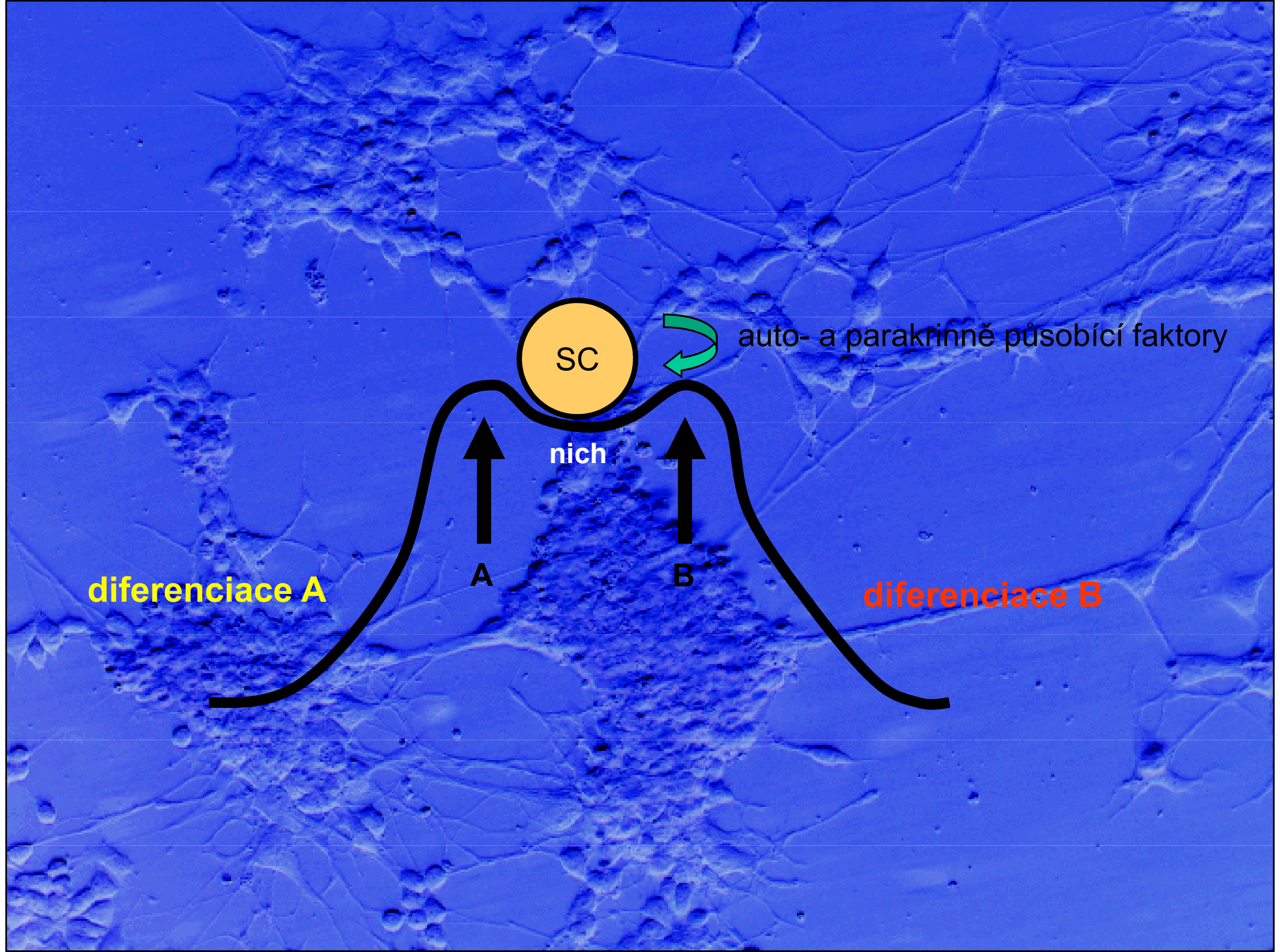
e-mail: jipa@sci.muni.cz

tel: 532 146 223

Somatic stem cells







SC

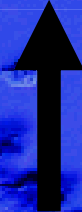


auto- a parakrinně působící faktory

nich



A

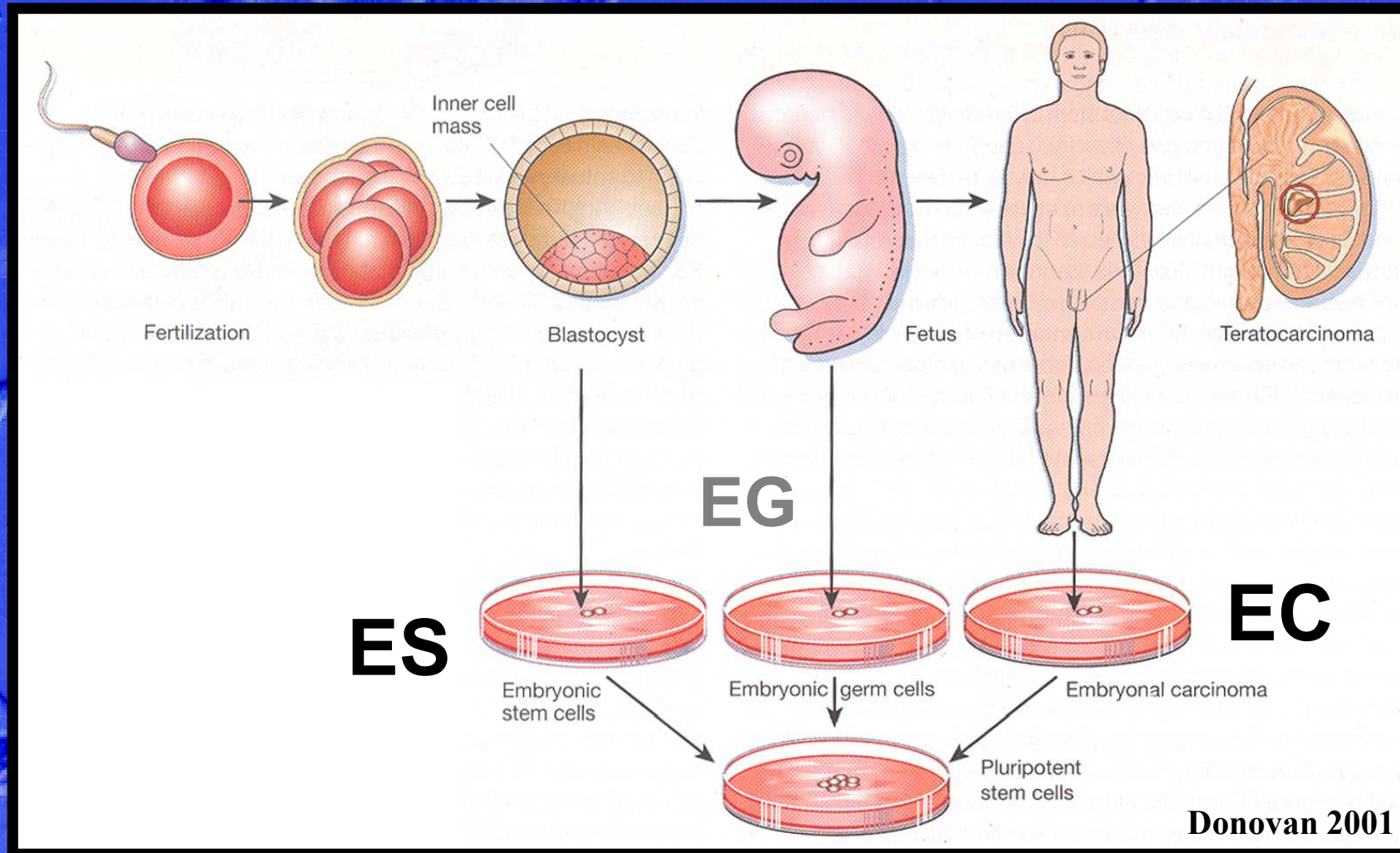


B

diferenciace A

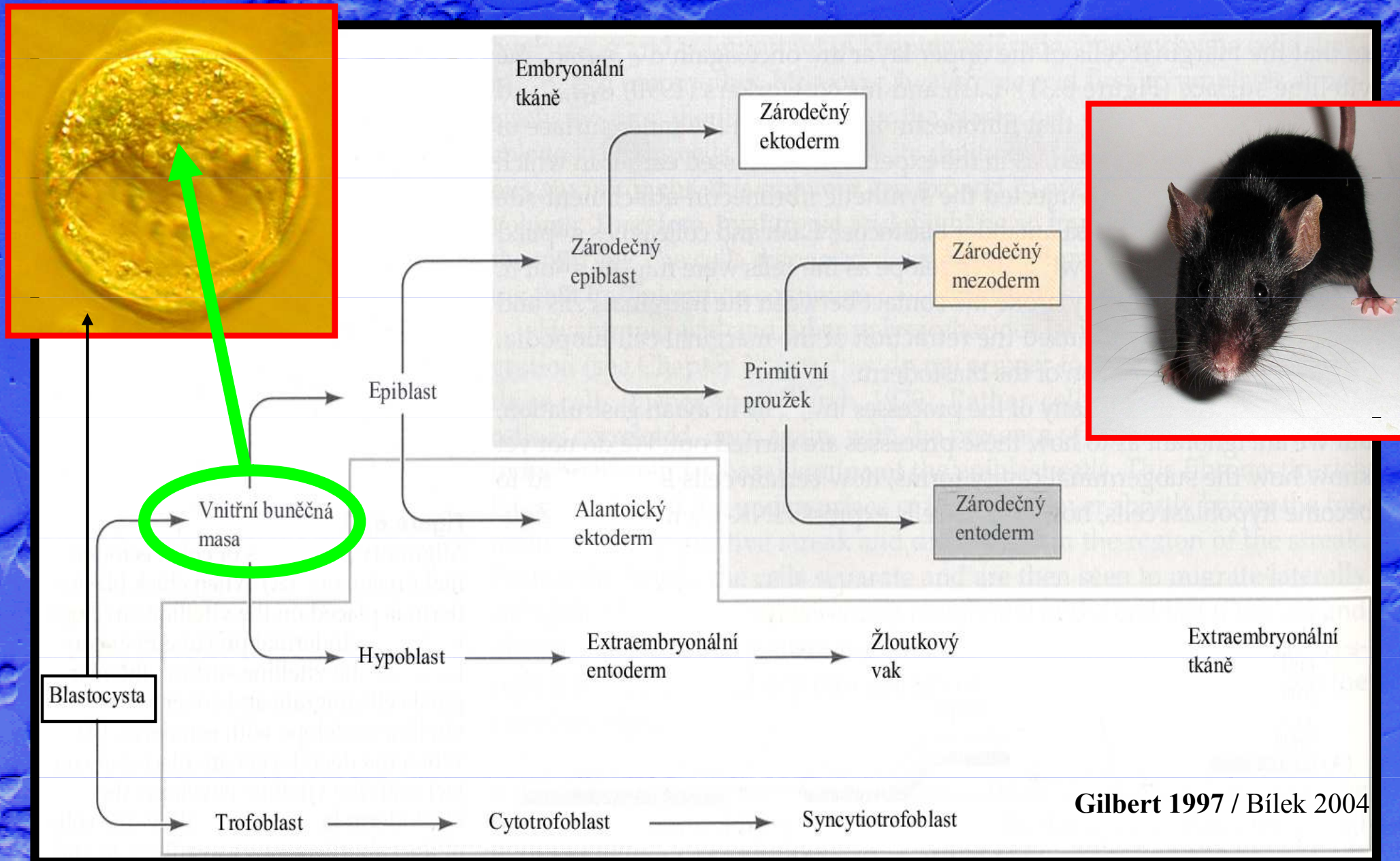
diferenciace B

Pluripotentní embryonální kmenové buňky



- Embryonální kmenové buňky (Embryonic stem cells – ES)
- Embryonální zárodečné buňky (Embryonic germ cells – EG)
- Embryonální nádorové buňky (Embryonal carcinoma cells – EC)

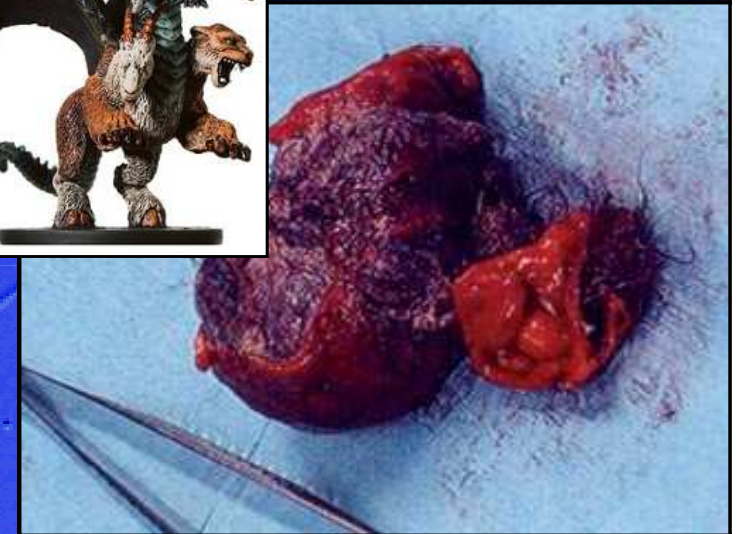
Diferenciační potenciál ES buněk odvozených z vnitřní buněčné masy



Verifikace kmenových buněk sebeobnova x schopnost diferenciacie

Embryonální kmenové buňky

- specifické znaky/markery a vlastnosti
- diferenciacie in vitro
- diferenciacie in vivo - chiméry
 - teratomy

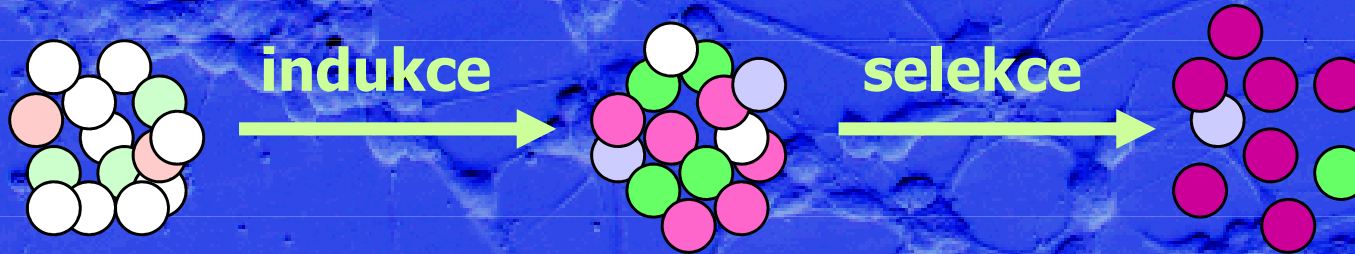


Somatické kmenové buňky

- specifické znaky/markery a vlastnosti
- sebeobnova – opakované transplantace
- diferenciacie in vitro
- diferenciacie in vivo

Diferenciace ES / EC buněk *in vitro*

kultivace

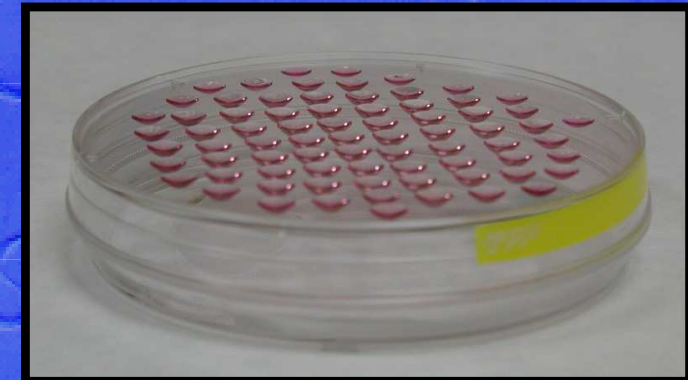
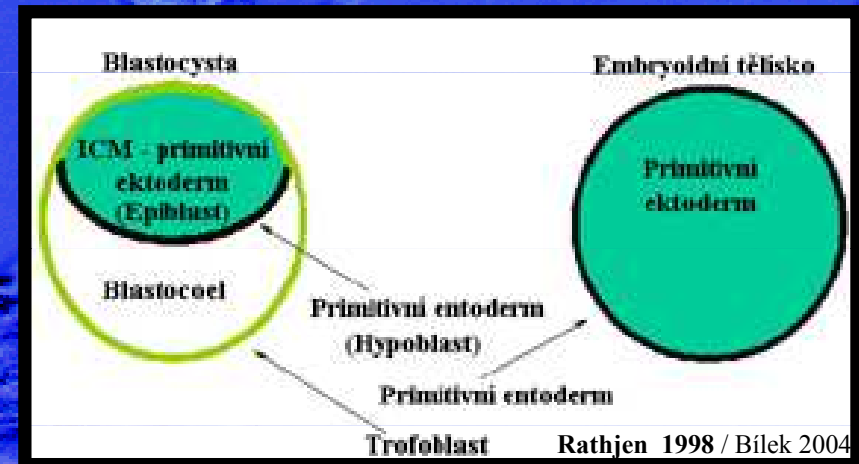


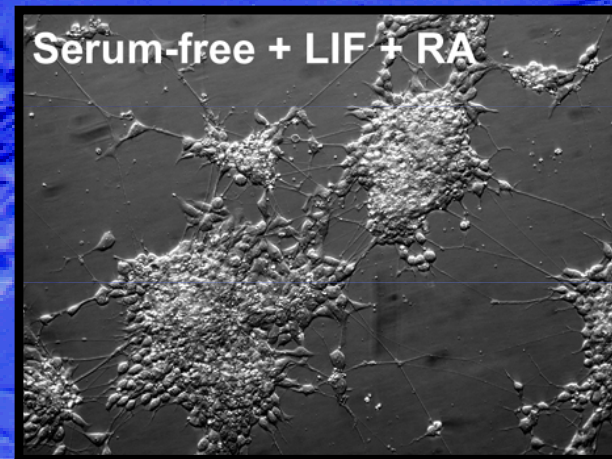
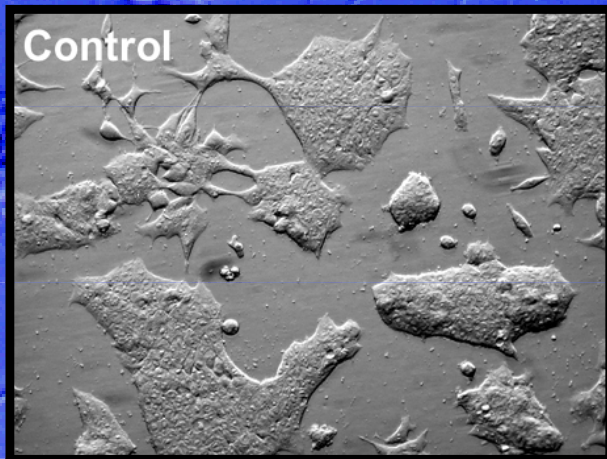
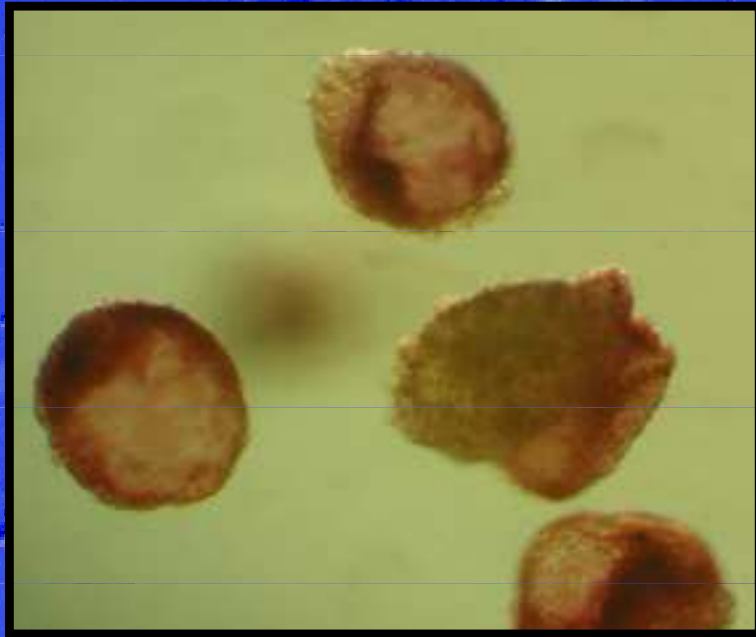
a) Embryoidní tělíska (Embryoid bodies - EB)

- EB)
- + jednoduché, více buněčných typů
- + tolerující genotyp
- špatně definované podmínky

b) V monovrstvě

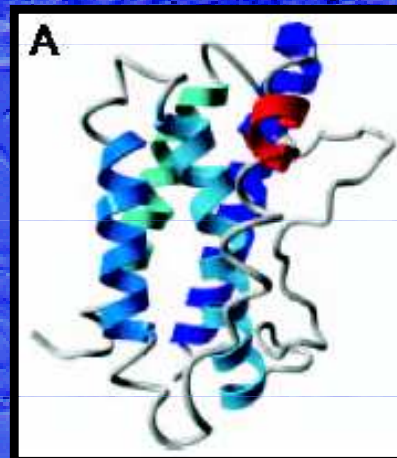
- + lépe definované podmínky
- malá výtěžnost
- silně závislé na genotypu (myš)





Leukemie inhibující faktor - LIF

- blokuje spontánní i indukovanou diferenciaci embryonálních pluripotentních buněk
- významný regulátor hemopoezy, **NEUROGENEZE**, kardiogeneze ...
- člen IL-6 rodiny (IL-6, IL-11, **LIF**, oncostatin M/OSM, ciliary neurotrophic factor/CNTF, cardiotrophin-1/CT-1, cardiotrophin-like cytokine/CLC)
- pleiotropní působení



Gp130 / IL-6 cytokiny (ligandy)

IL-6 – interleukin-6
IL-11 – interleukin-11
LIF – leukemia inhibitory factor
CT-1 – cardiotrophin-1
CNTF – ciliary neurotrophic factor
OSM – oncostatin M
CLC – cardiotrophin-like cytokine

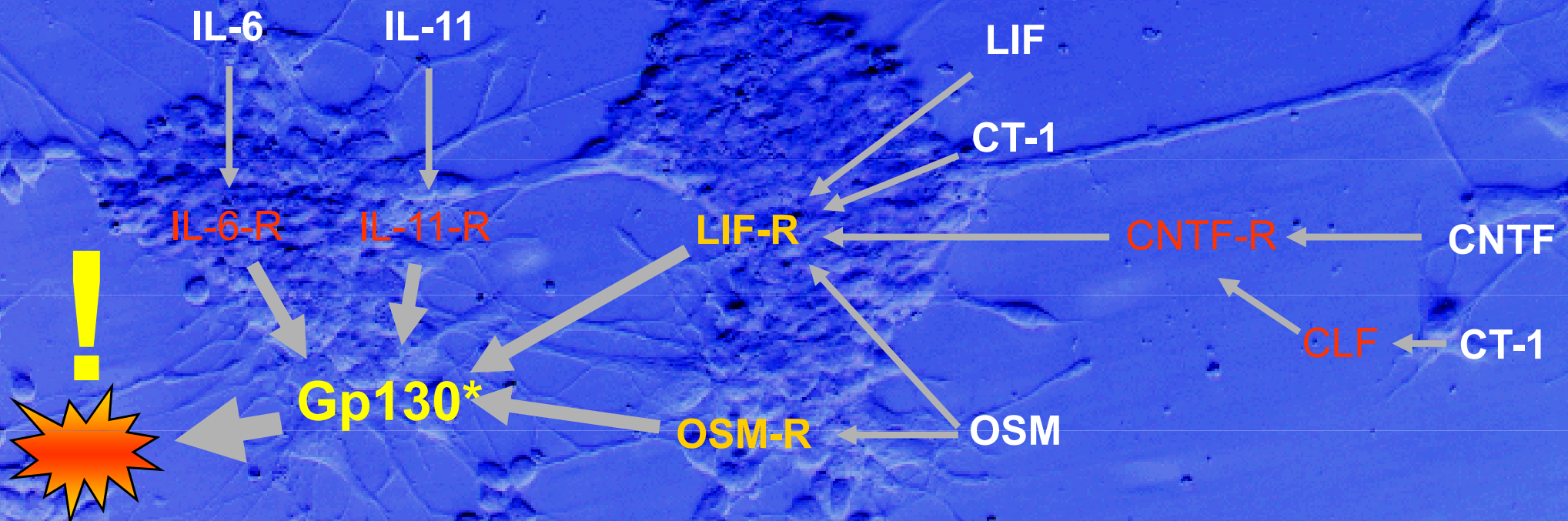
Specifické receptory
silně afinitní ke svým ligandům

IL-6-R
IL-11-R
CNTF-R
CLF
OSM-R
LIF-R

Nesignalizující
receptory

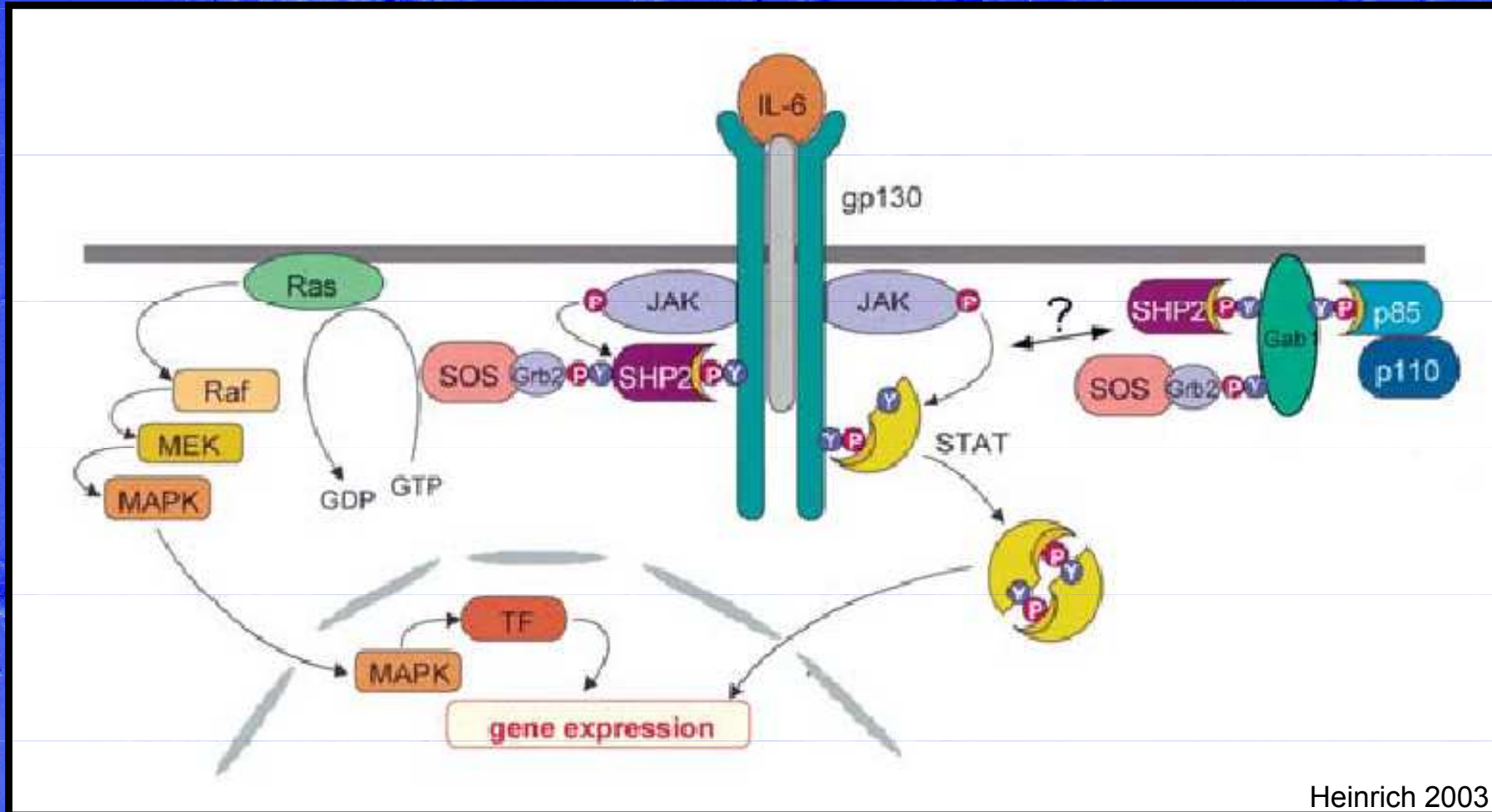
Signalizující
receptory

Po navázání ligandu na specifický receptor se tento komplex váže s vysokou afinitou na receptor gp130 a spouští transdukci signálu



*gp130 samotný má k ligandům velice nízkou afinitu, tím je zabráněno aktivaci gp130 samotným ligandem!

Komplex ligand / vysoce afinitní receptor / gp130 spouští několik paralelních drah transdukce signálu, hlavní / fyziologicky nejvýznamnější se zdá dráha JAK -> STAT.



JAK – Janusova kináza (tyrosin kináza)

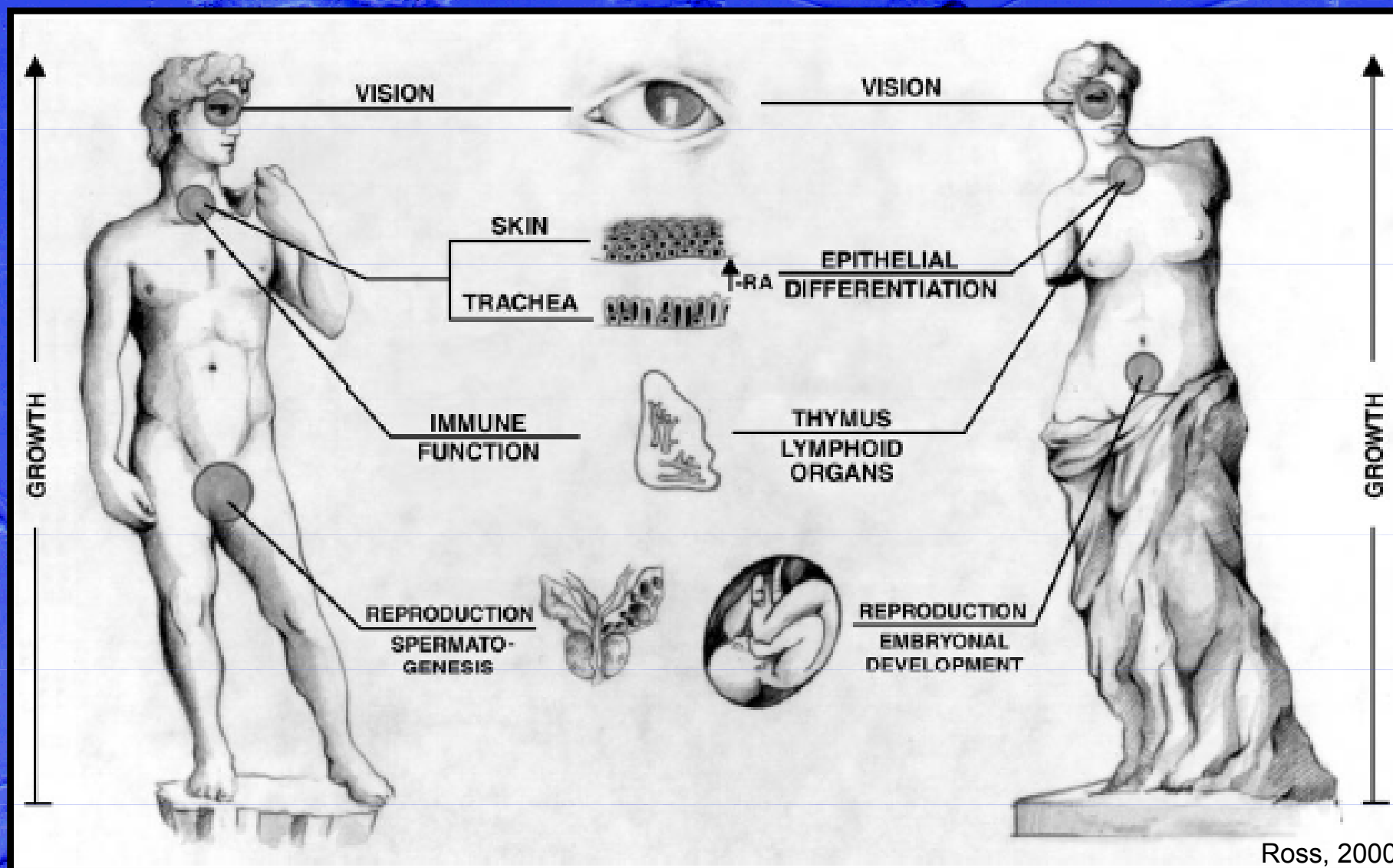
STAT – transduktor signálu a aktivátor transkripce

(signal transducer and activator of transcription)

Výběr nejvýznamnějších oblastí vyžadujících metabolismus retinolu/vit.A

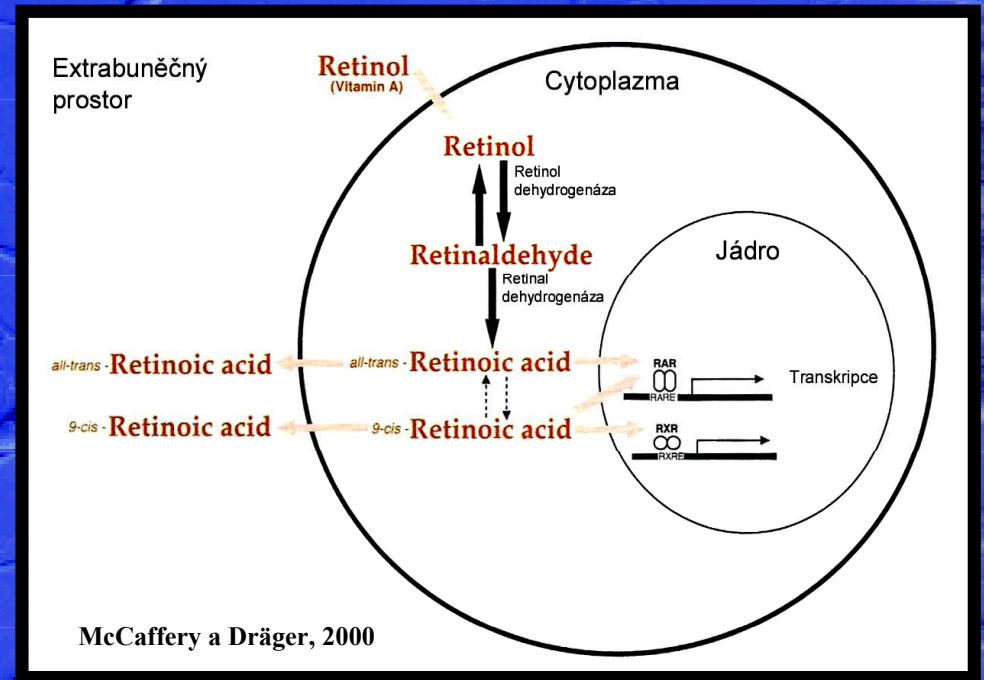
A) fotorecepce

B) růst a vývoj organismu



Kyselina retinová - RA

- velmi silný induktor
- pleiotropní působení



ES / EC + EB + RA

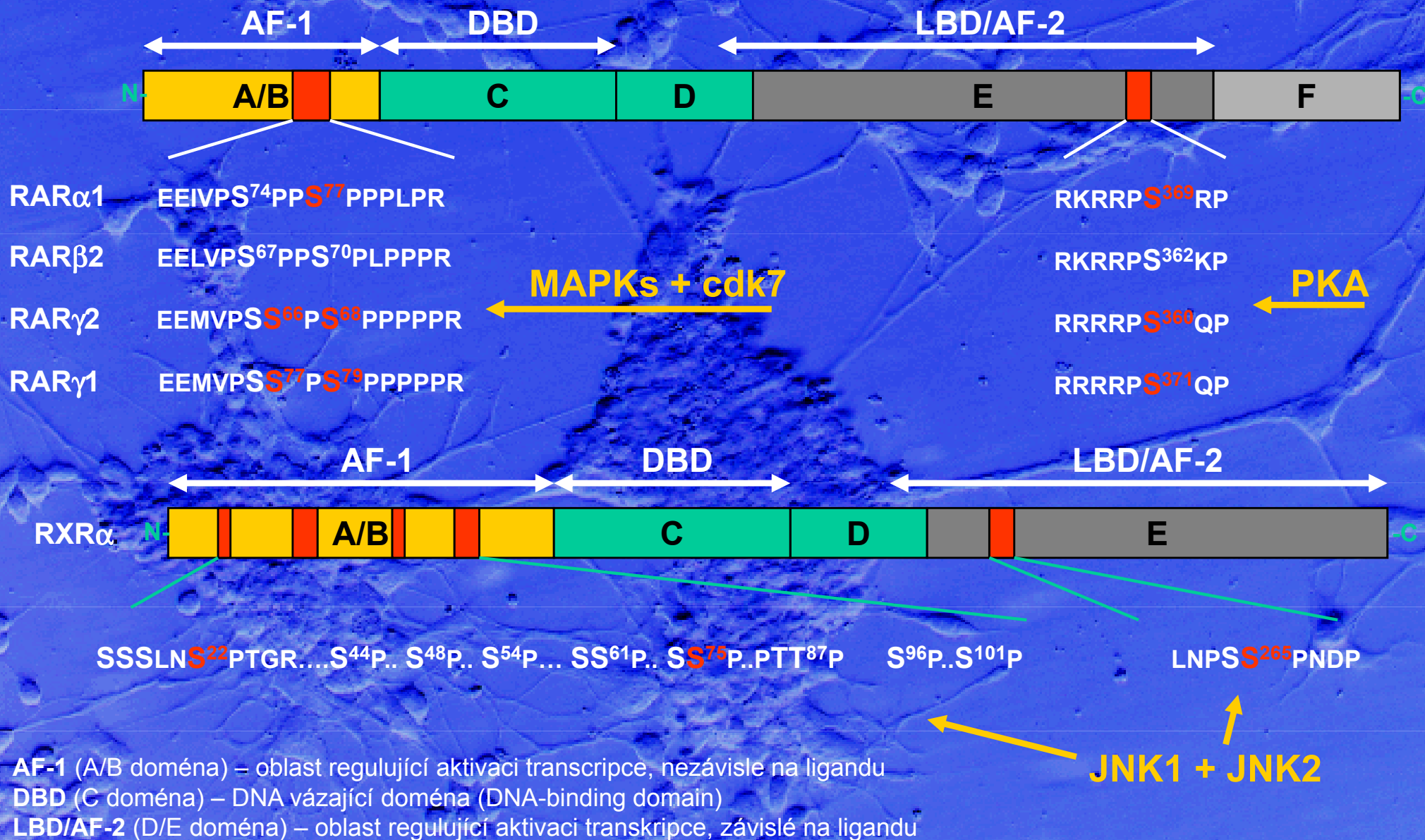
- buňky neurální
- buňky kosterní svaloviny a adipocyty
- buňky srdeční a hladké svaloviny

↑
nM RA

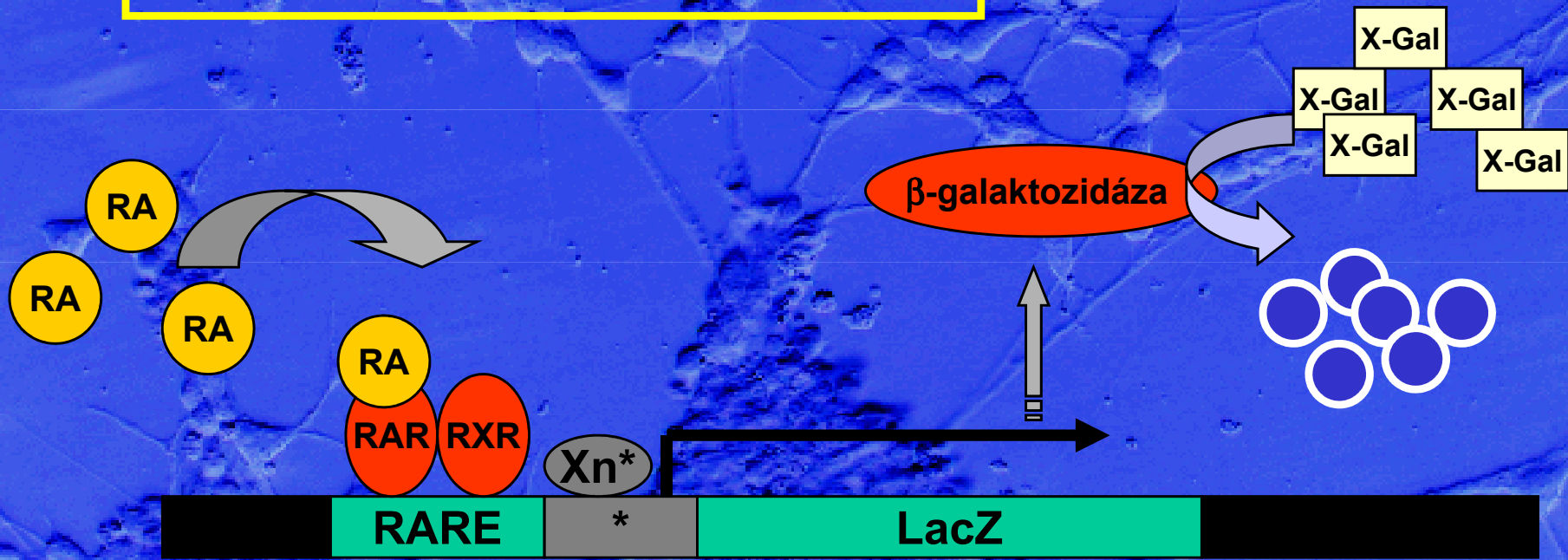
ES / EC + monovrstva + RA

- buňky primitivního entodermu
- neurální buňky (motoneurony?)

Serinové a threoninové zbytky fosforylované (■) u RAR/RXR receptorů, ukázány jsou i potencionálně fosforylovatelné (čísla)



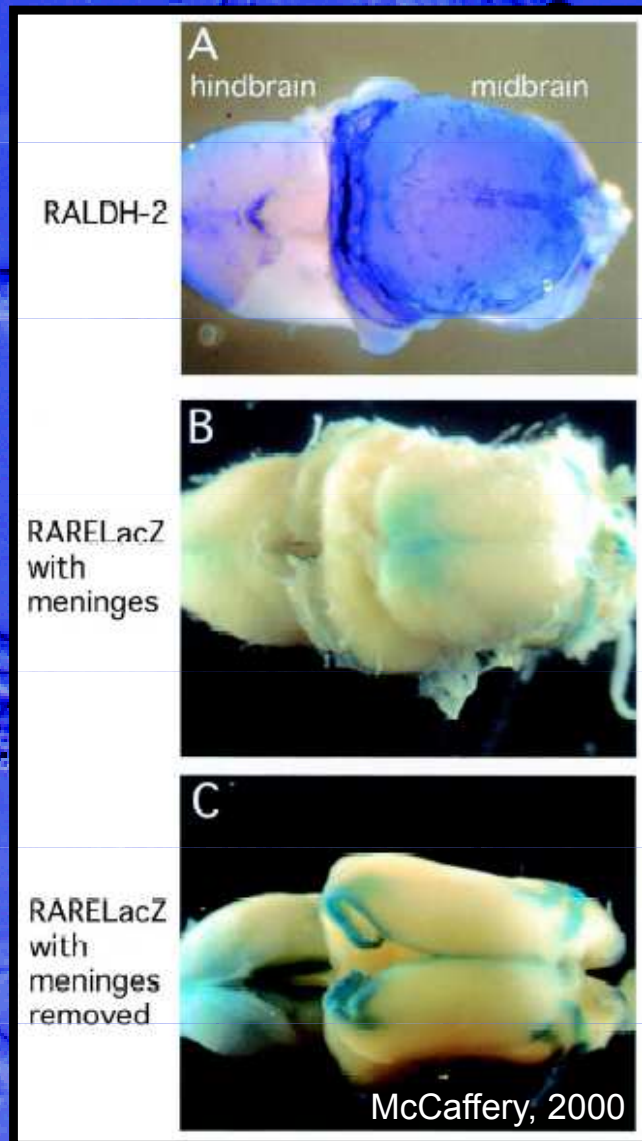
**System pro detekci RA v buňkách/tkáních
(RARE-LacZ reportér)**



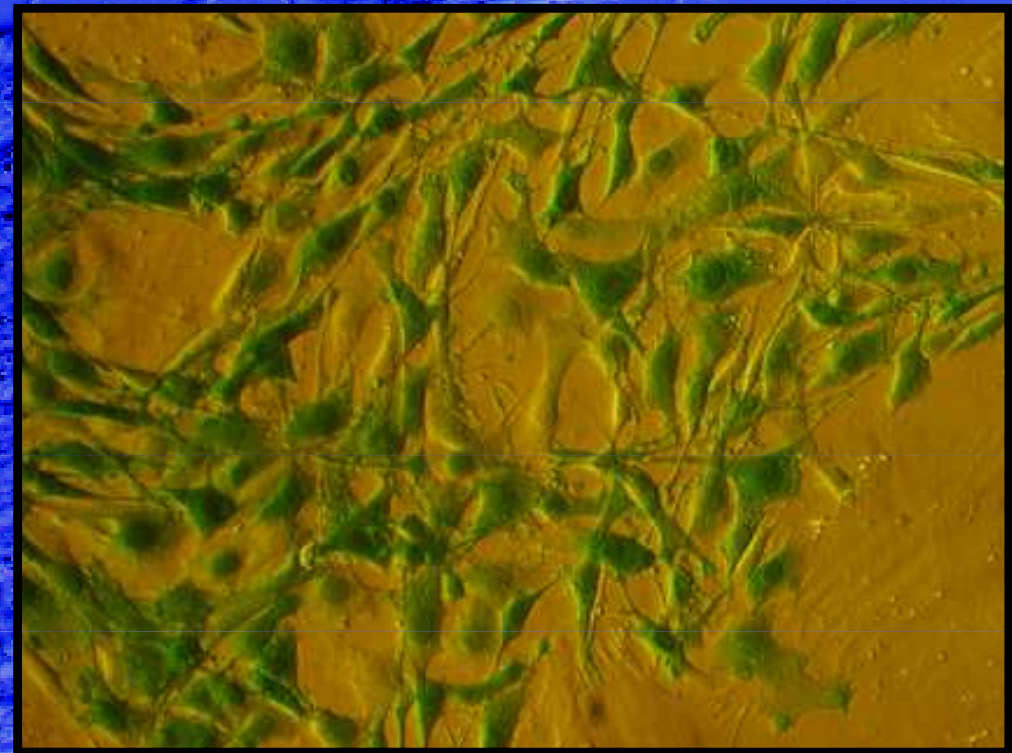
*další faktory/sekvence nezbytné pro funkci promotoru

Exprese a aktivita RALDH-2 v mozku myšního embrya (16 dpc)

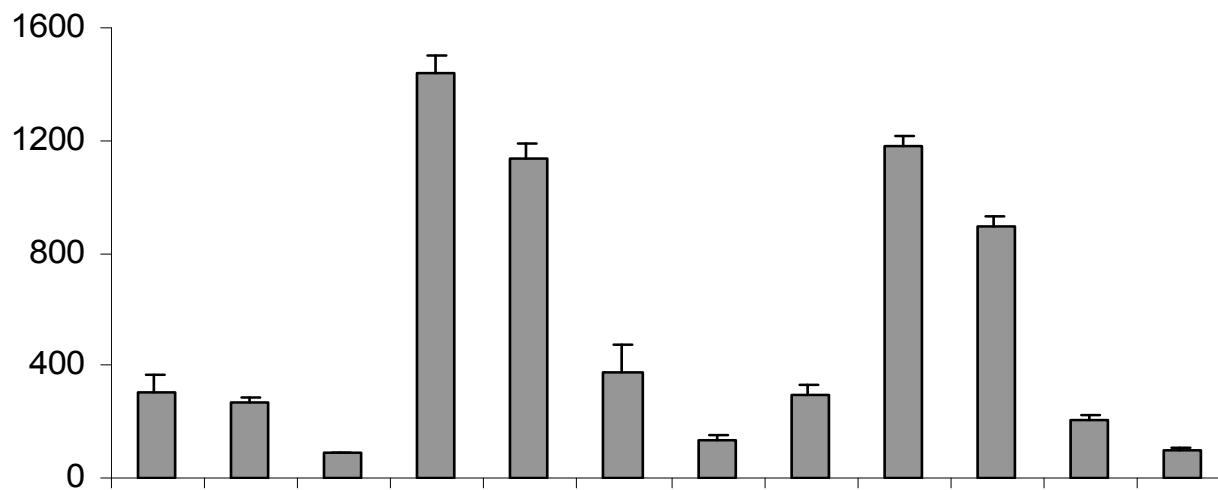
A) In situ hybridizace mRNA RALDH-2
B + C) RARE aktivita (RARE-LacZ reporter)



Detekce buněk exprimujících indukovanou β -galaktosidázu

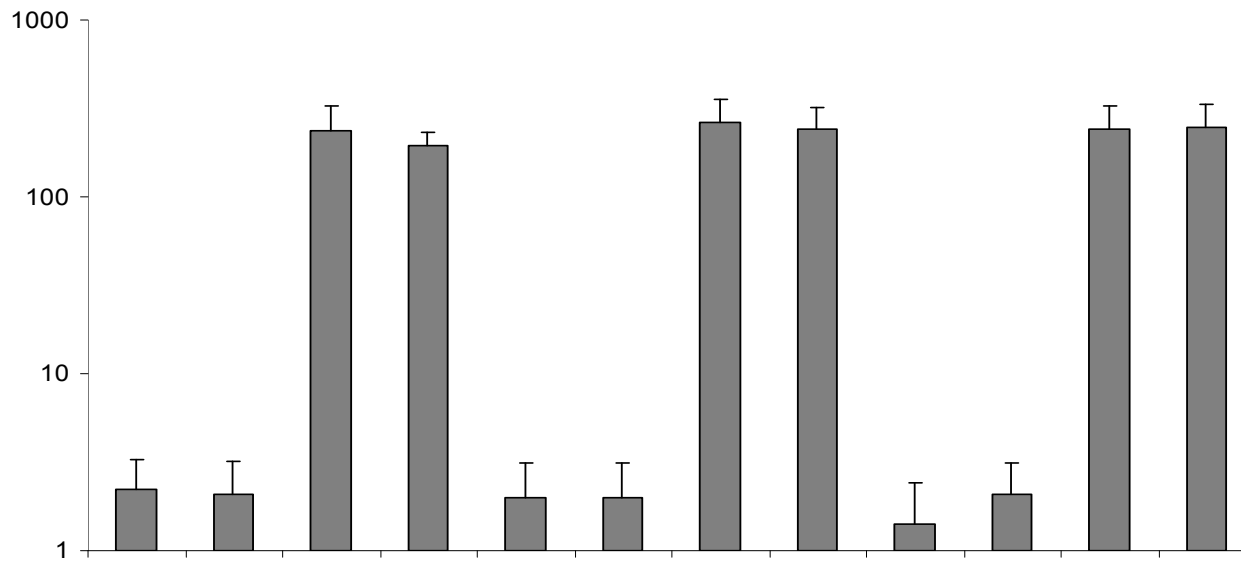


Relative Luciferase activity



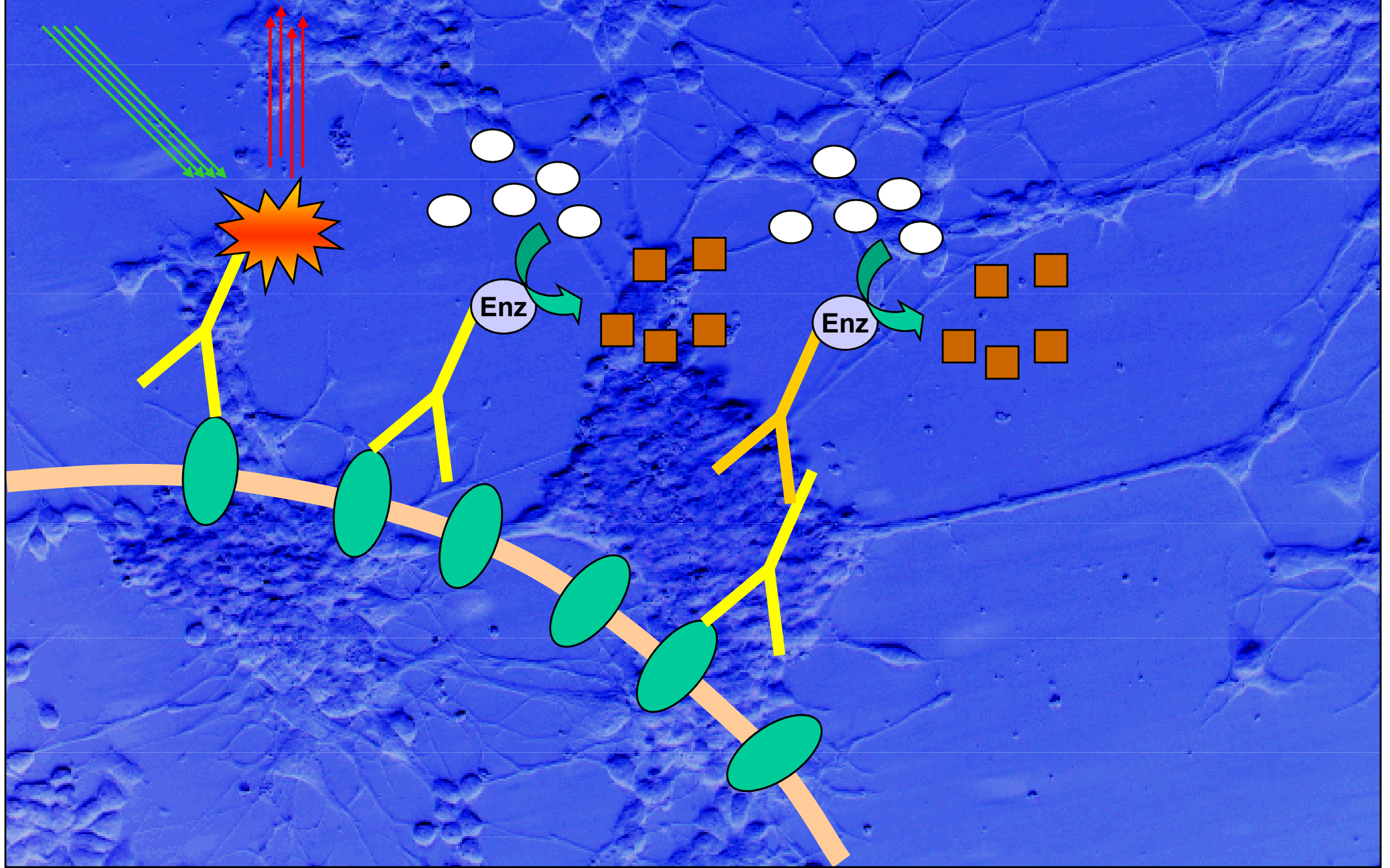
AG490 (μM)	-	2.5	22.5	-	2.5	7.5	22.5	-	-	2.5	7.5	22.5
LIF	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
RA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Relative luciferase activity

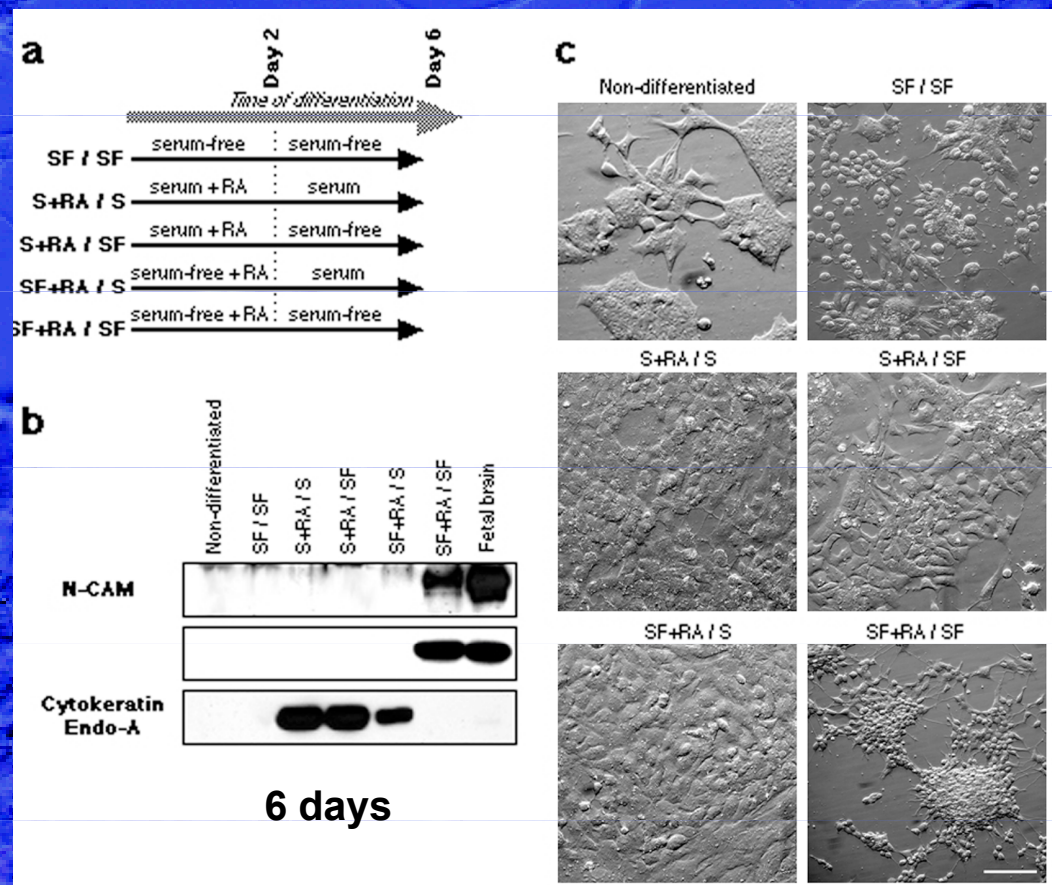
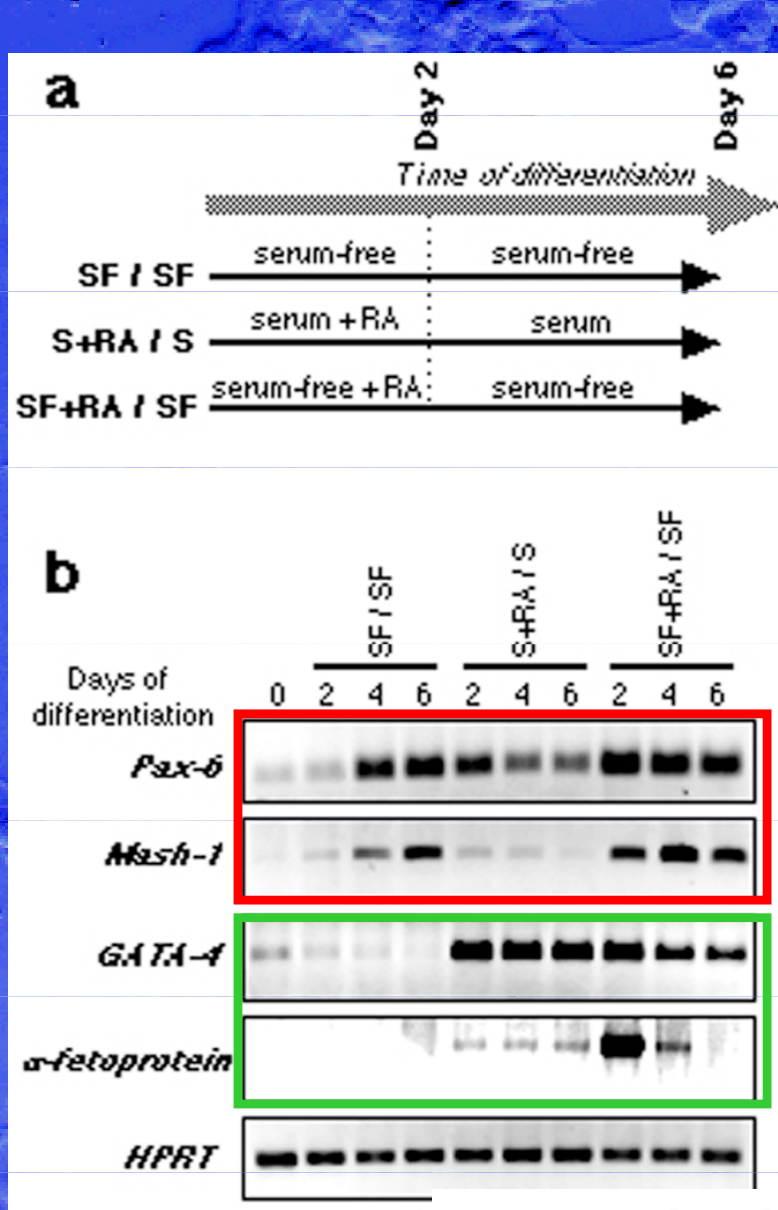


RA	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
LIF	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
AG490 (5 μM)	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UO126 (5 μM)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Schematický princip imunodetekce



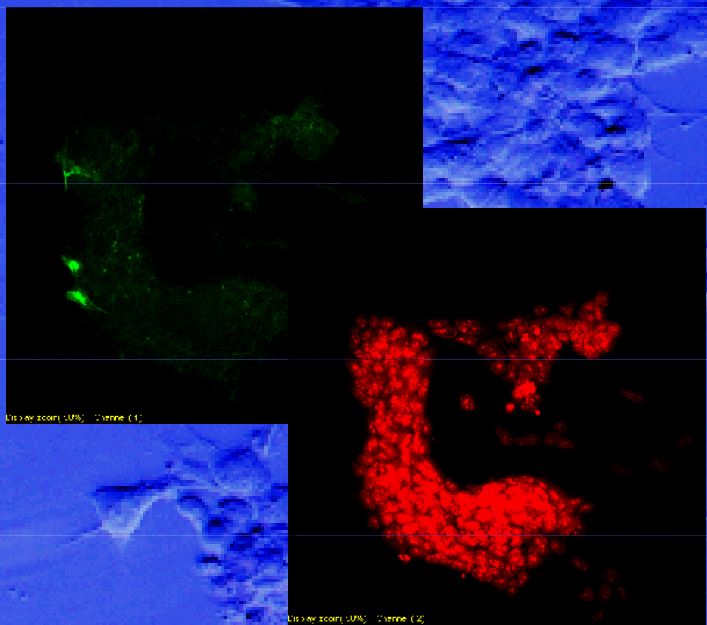
Účinek séra na RA indukovanou neurální diferenciací



RT-PCR analýza exprese liniově specifických genů

- neuroektoderm
- entoderm

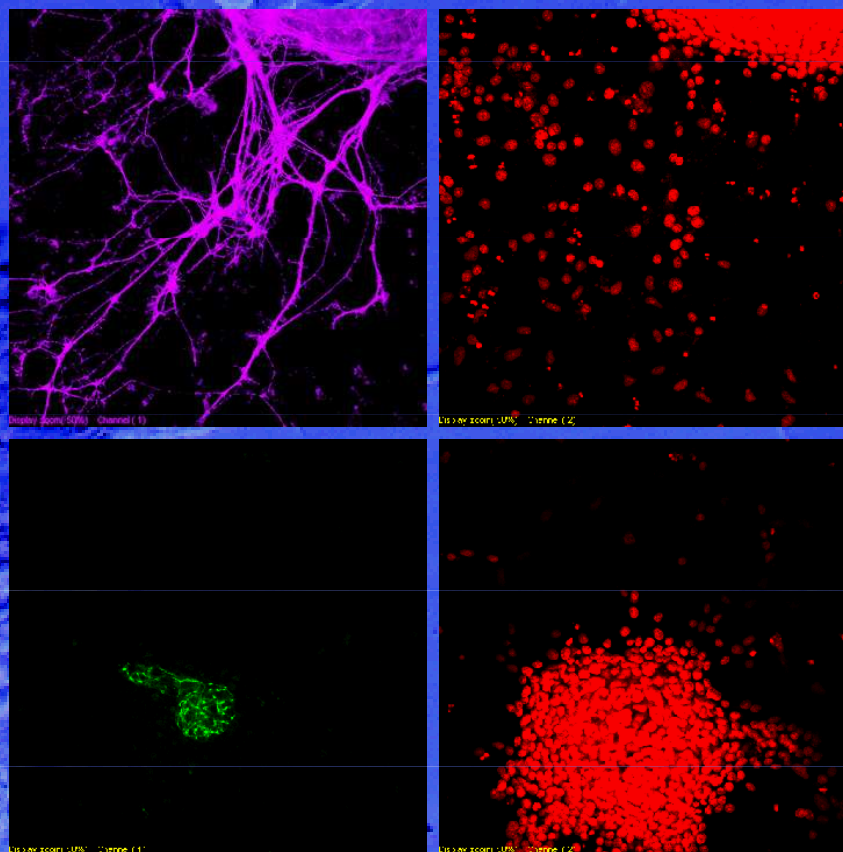
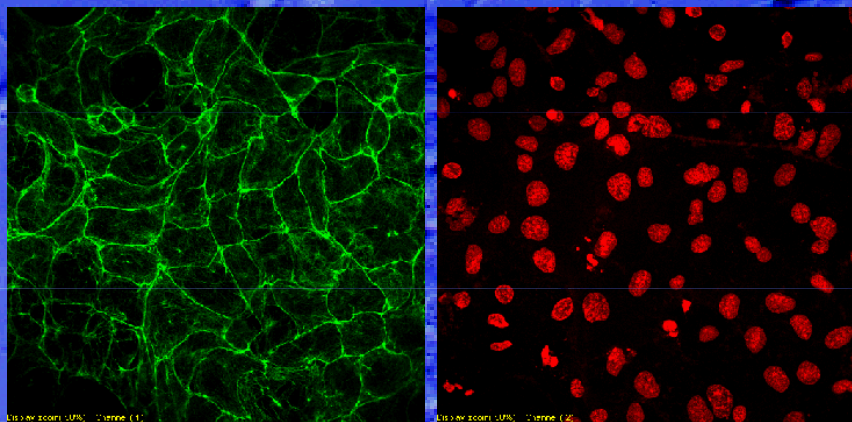
Nediferencované buňky EC P19

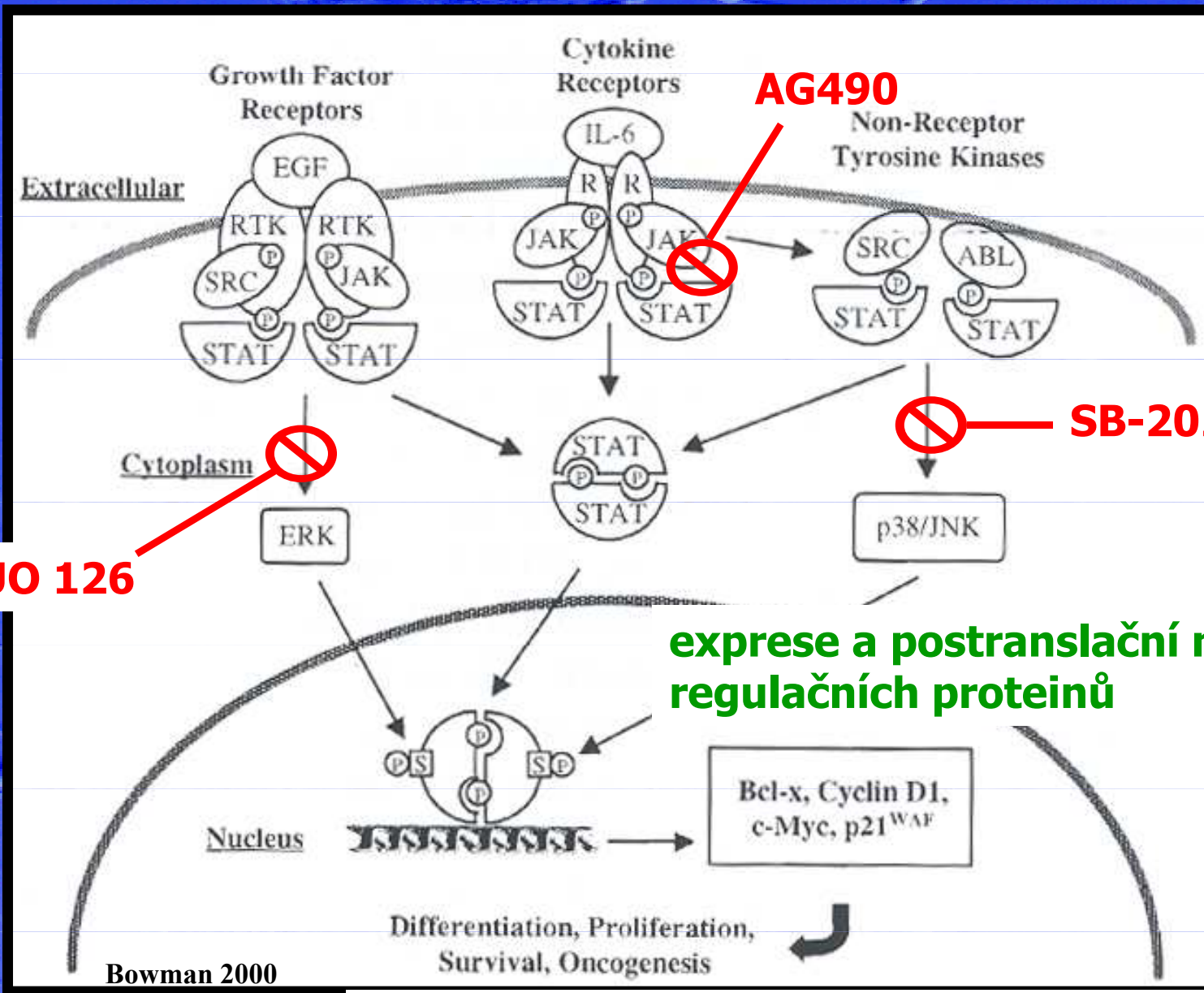


- ◆ **buněčná jádra**
- ◆ **cytokeratin EndoA pozitivní buňky – entoderm**
- ◆ **N-CAM pozitivní buňky - neurony**

Diferencované buňky EC P19 monovrstva + RA - sérum

Diferencovane buňky EC P19 monovrstva + RA + sérum





UO 126

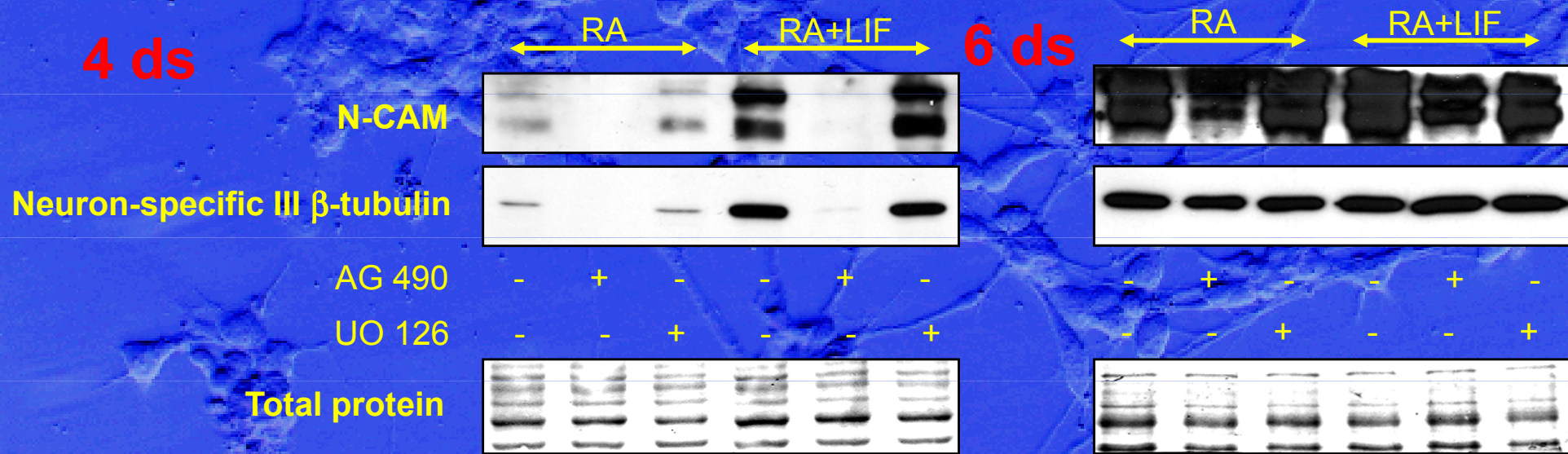
AG490

SB-202190

exprese a postranslační modifikace regulačních proteinů

**transkripční aktivita Stat-3 (reporter pAPRE-luc)
transkripční aktivita AP-1 (reporter p3TP-Lux)
transkripční aktivita RAR/RXR (reporter pRAREβ2-luc)**

Detekce stupně diferenciaci EC buněk indukovaných neurálním směrem (specifické protilátky)



Detekce fosforylace (postranlační modifikace) Erk kinázy (specifické protilátky)

