

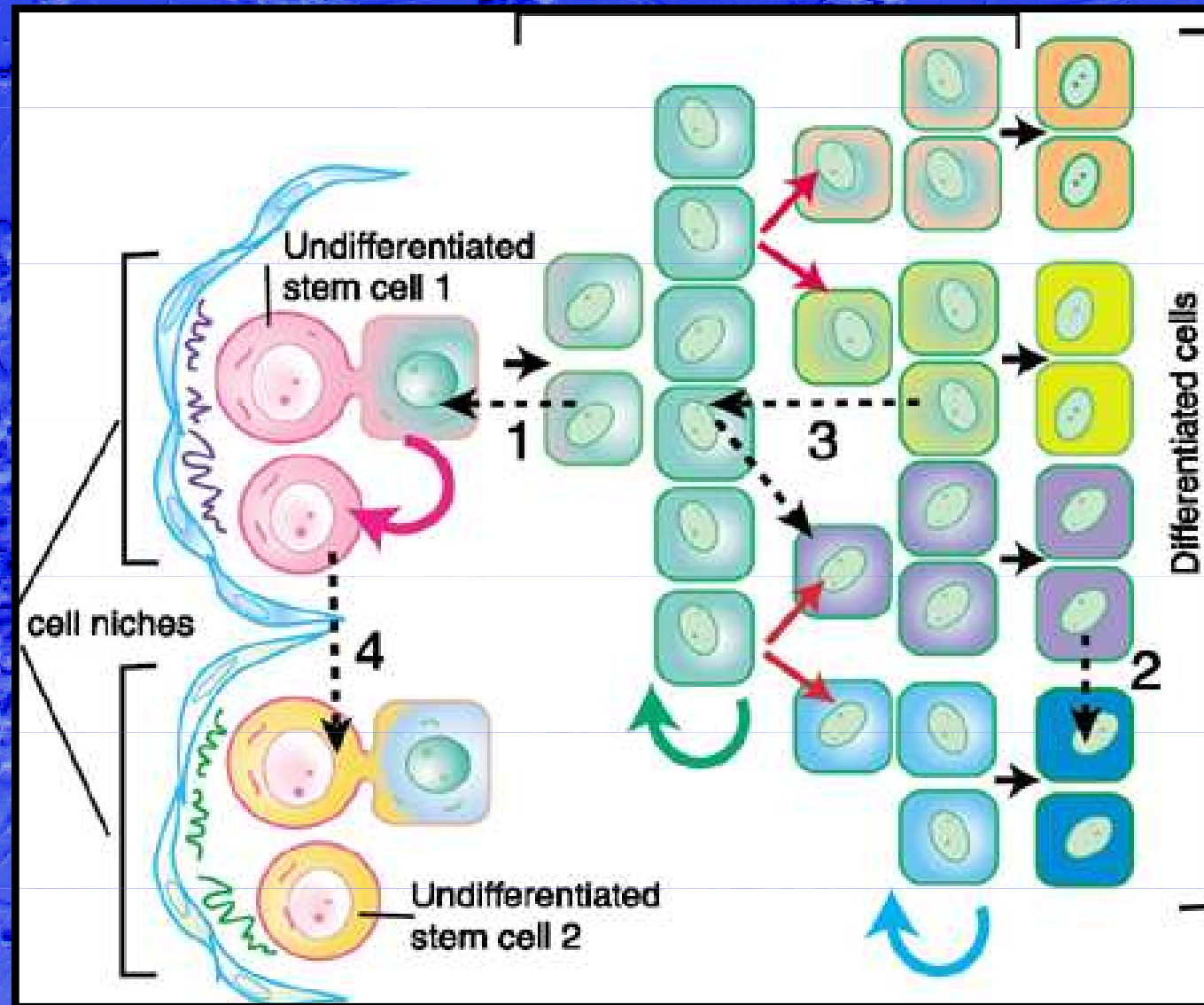


Úvod do studia biologie kmenových buněk

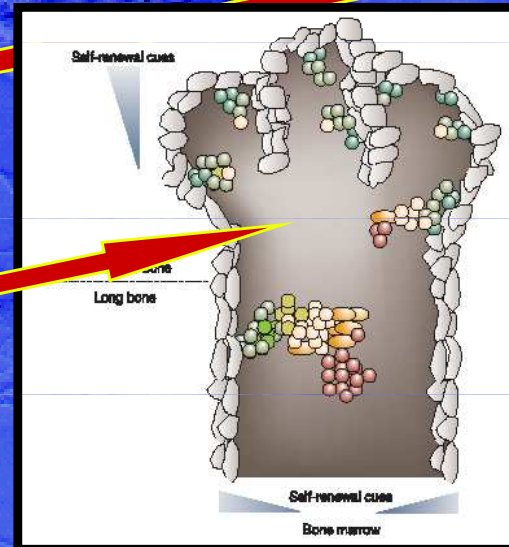
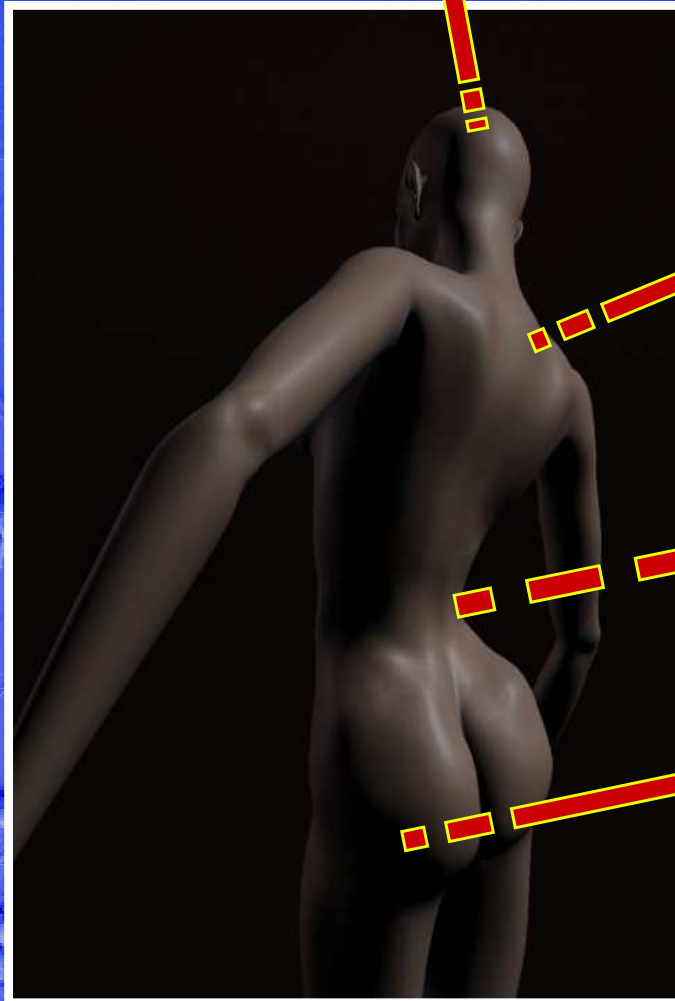
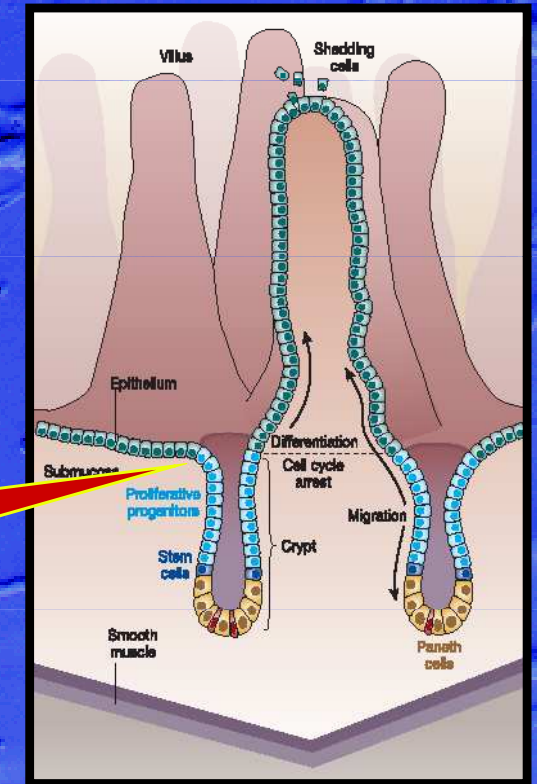
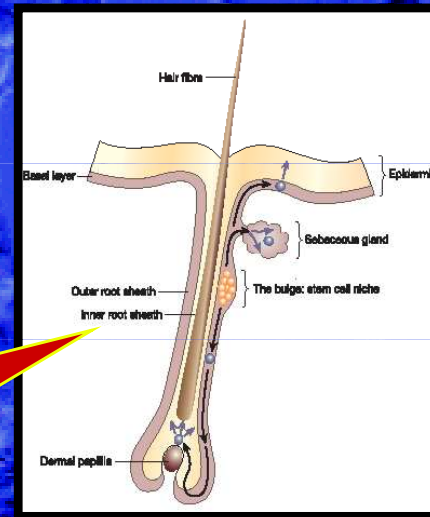
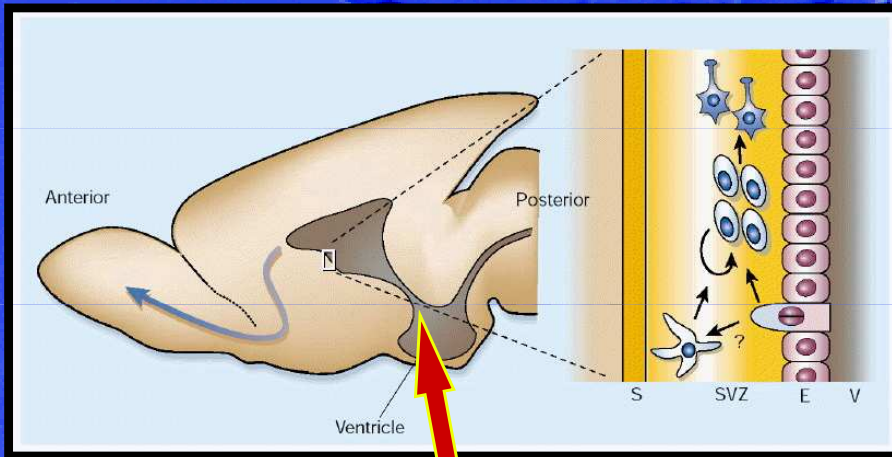
Jiří Pacherník
e-mail: jipa@sci.muni.cz
tel: 532 146 223

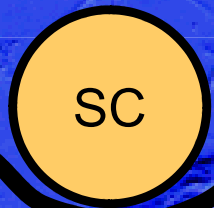
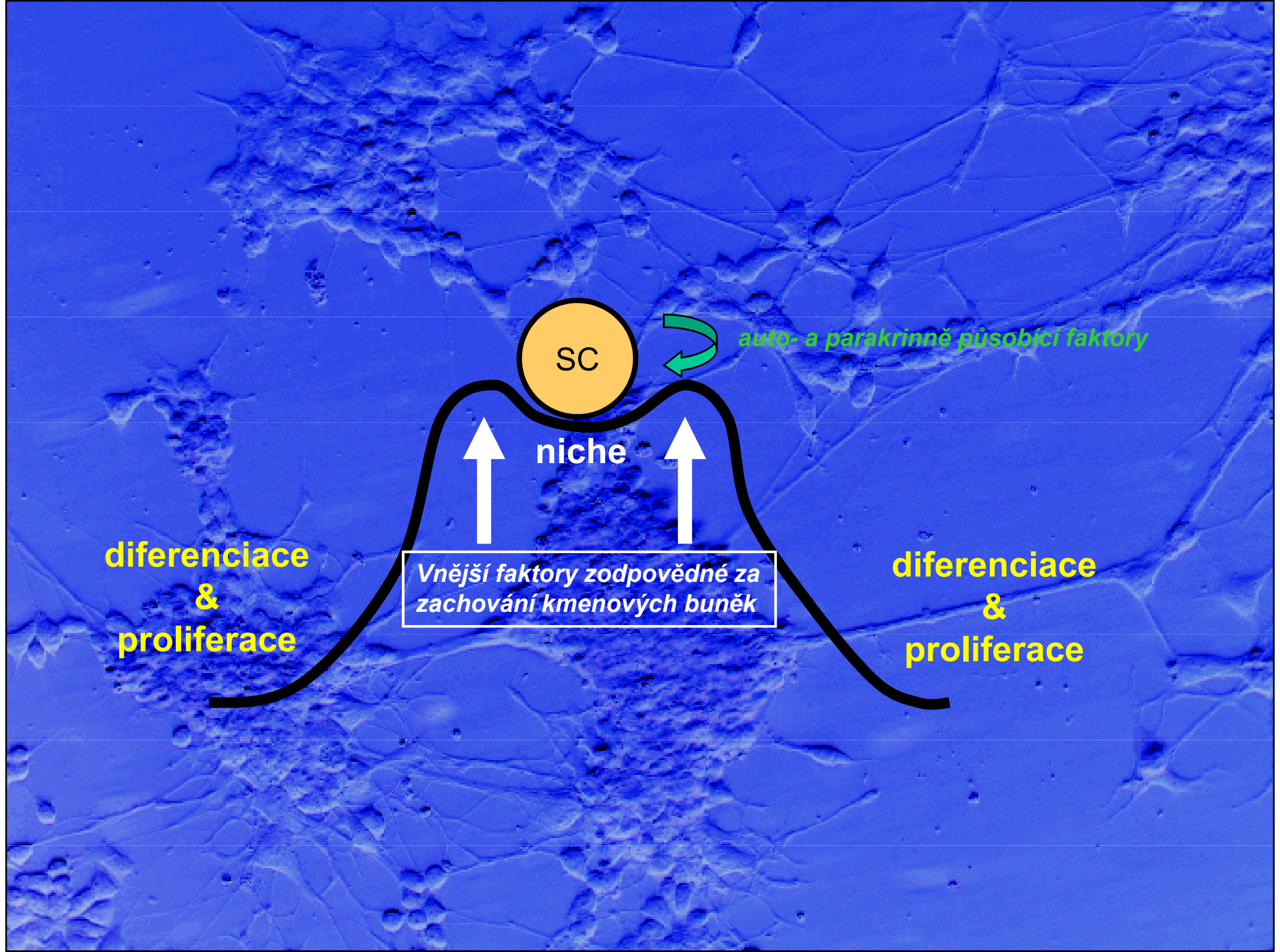
Co jsou kmenové buňky?

- buňky schopné vlastní obnovy (sebeobnova)
- buňky schopné dávat vznik jiným typům buněk (schopnost diferenciacce / rozrůzňování)



Kmenové buňky v dospělém organismu





auto- a parakrinně působící faktory

niche



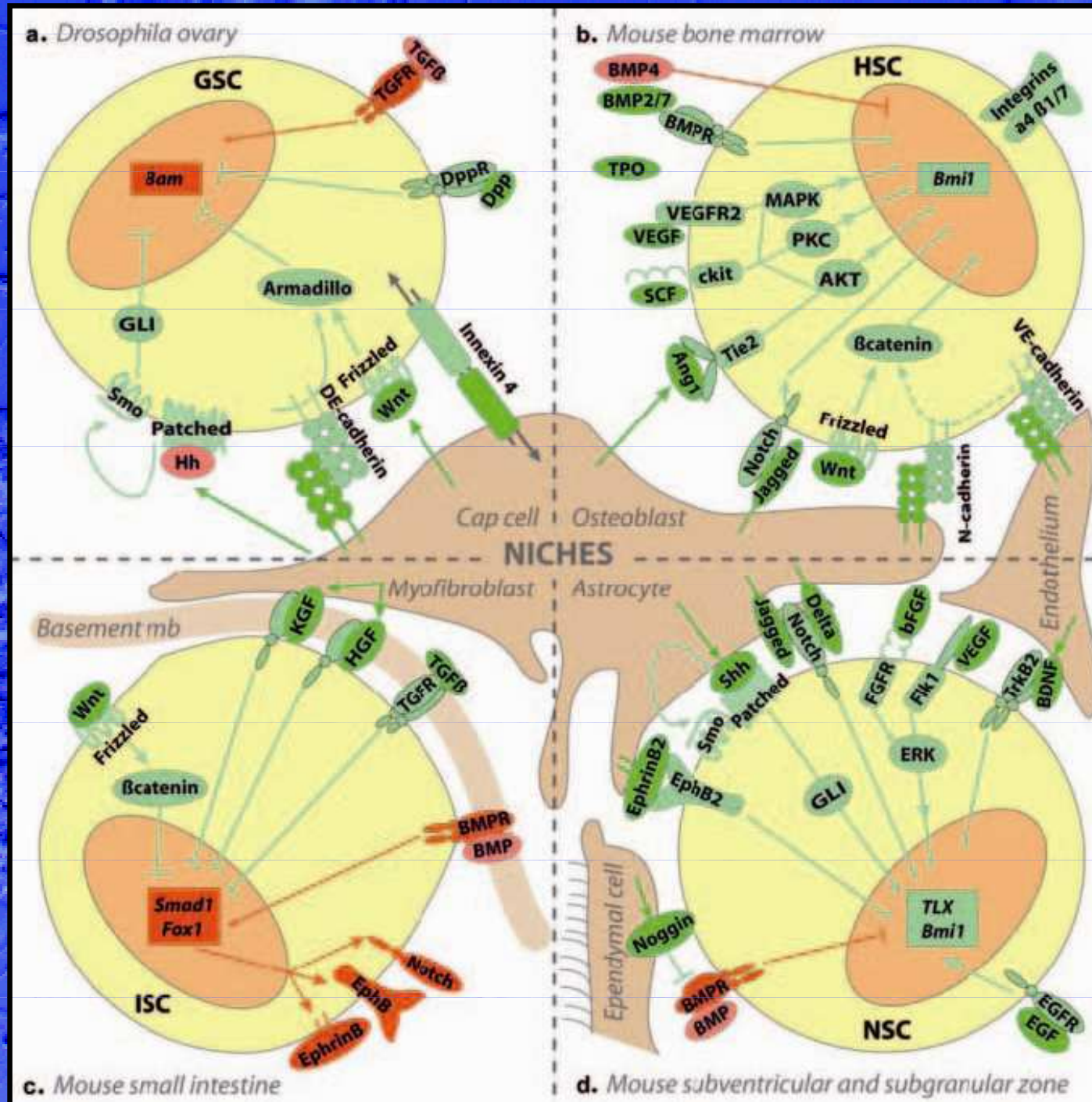
Vnější faktory zodpovědné za zachování kmenových buněk

**diferenciace
&
proliferace**

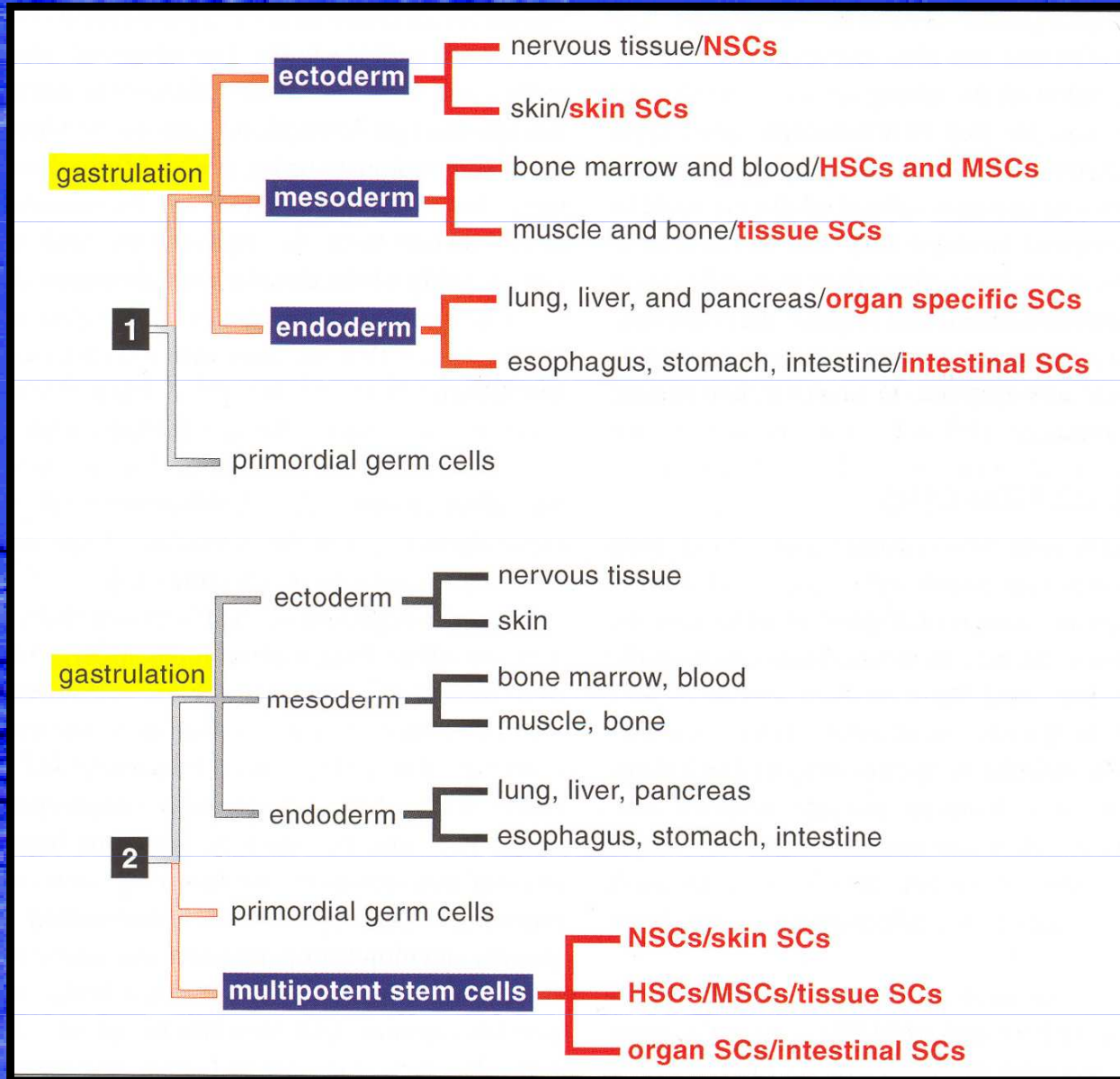
**diferenciace
&
proliferace**

Niche

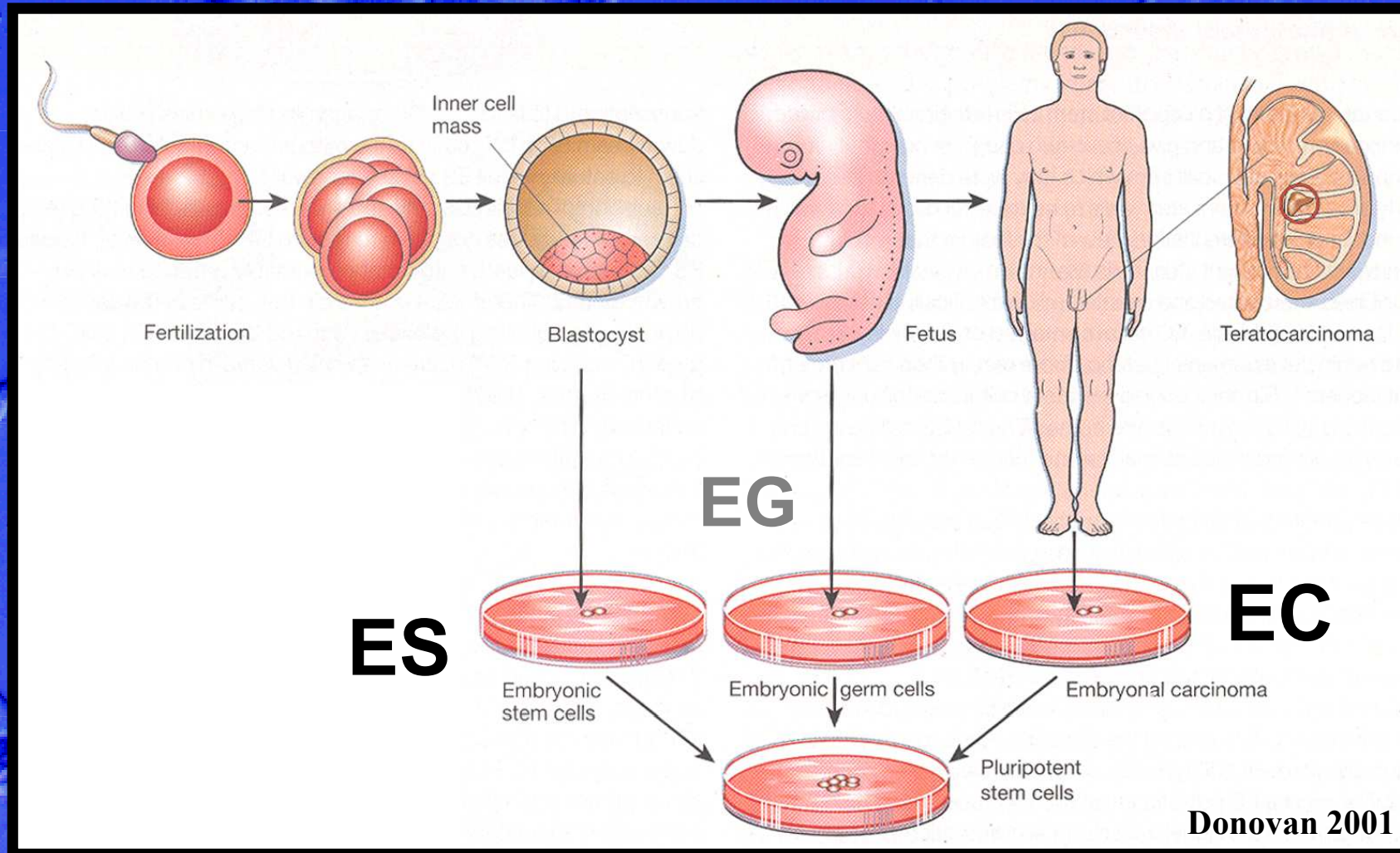
(Naveiras, 2006)



Původ kmenových buněk

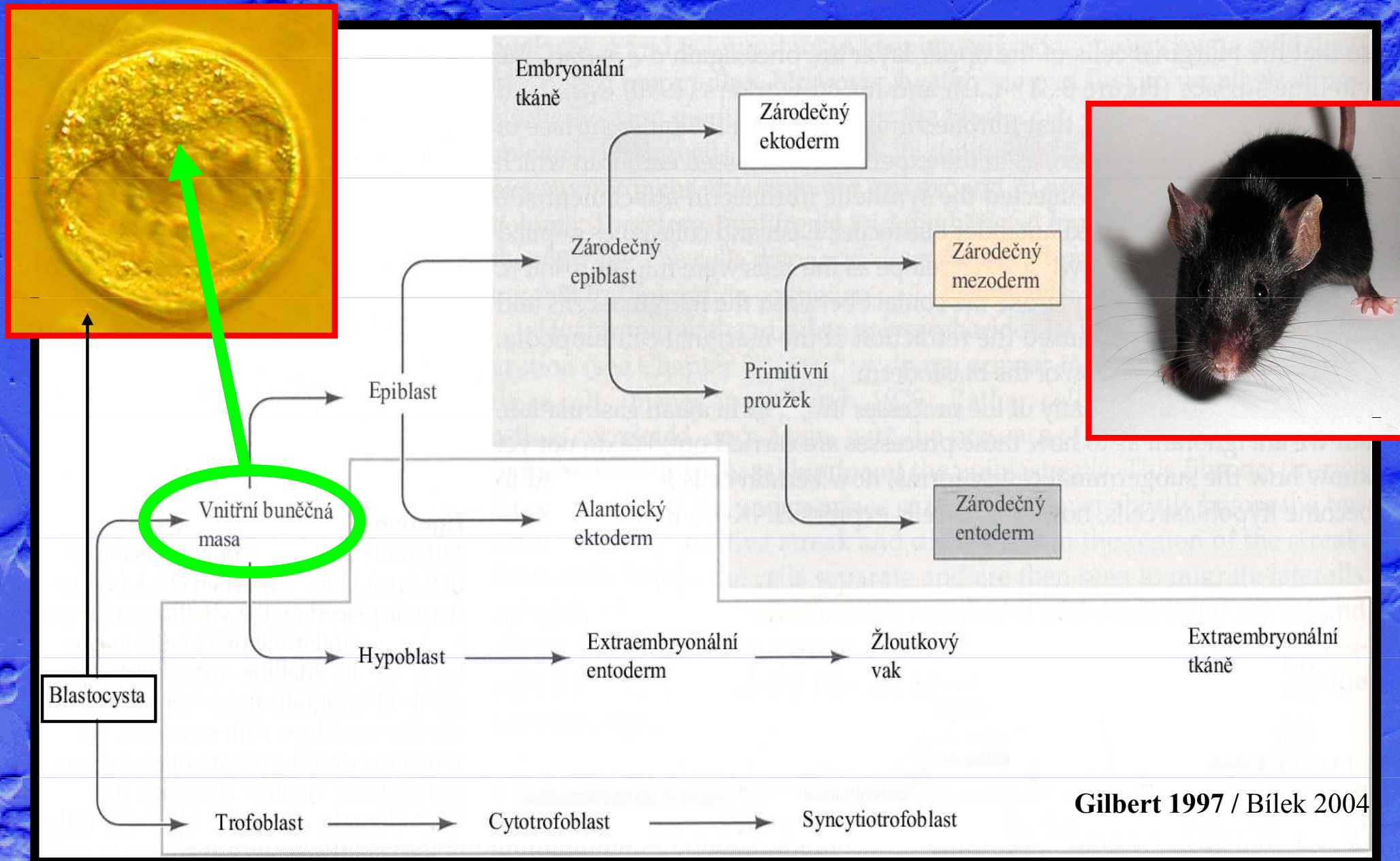


Pluripotentní embryonální kmenové buňky



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

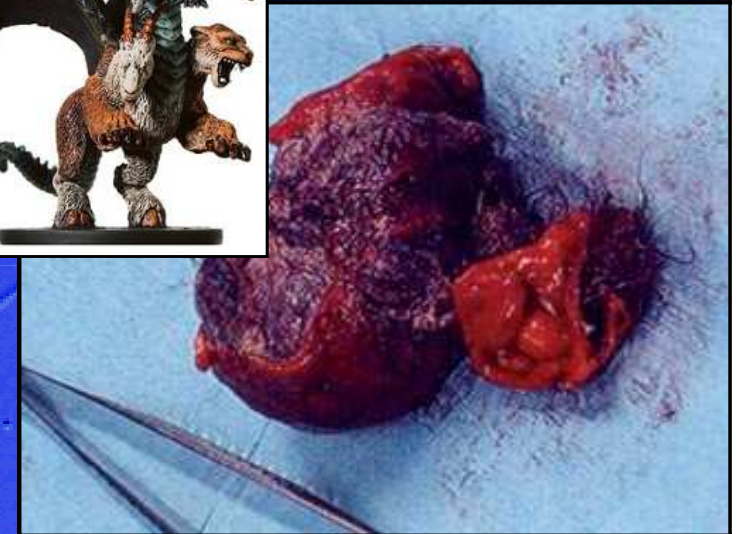
Diferenciační potenciál ES buněk odvozených z vnitřní buněčné masy



Verifikace kmenových buněk sebeobnova x schopnost diferenciaci

Embryonální kmenové buňky

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

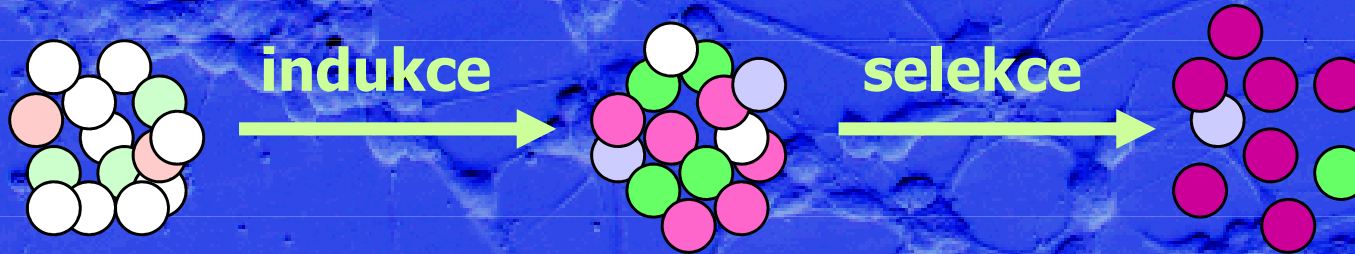


Somatické kmenové buňky

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

Diferenciace ES / EC buněk *in vitro*

kultivace

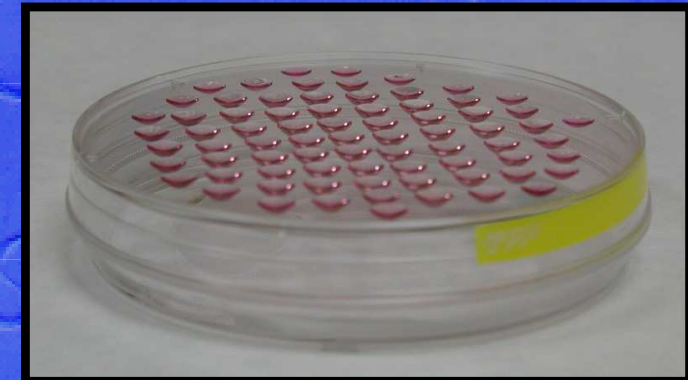
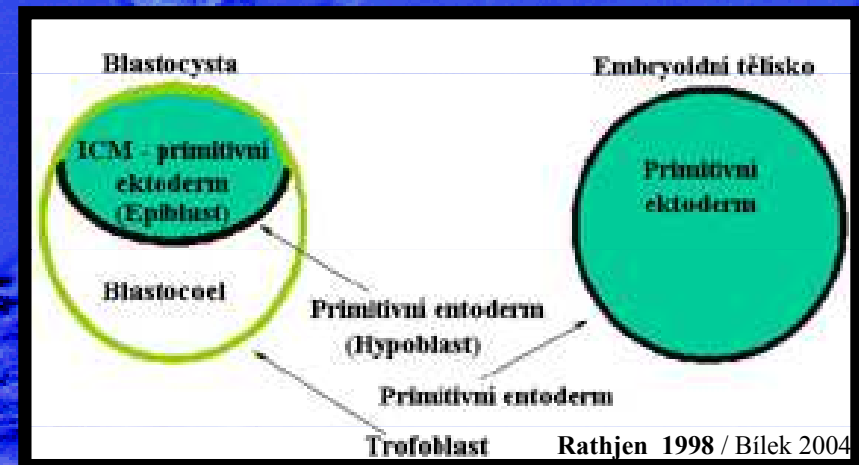


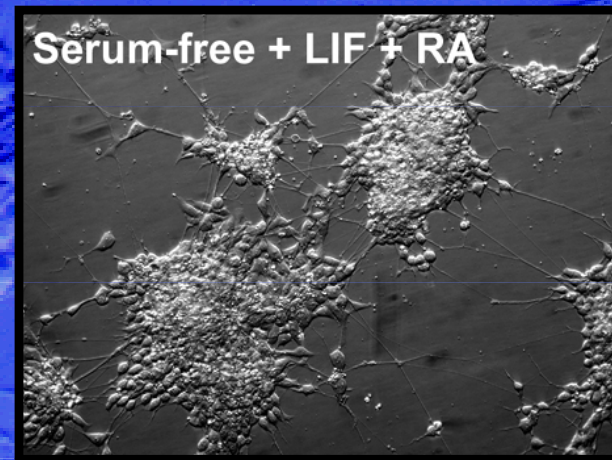
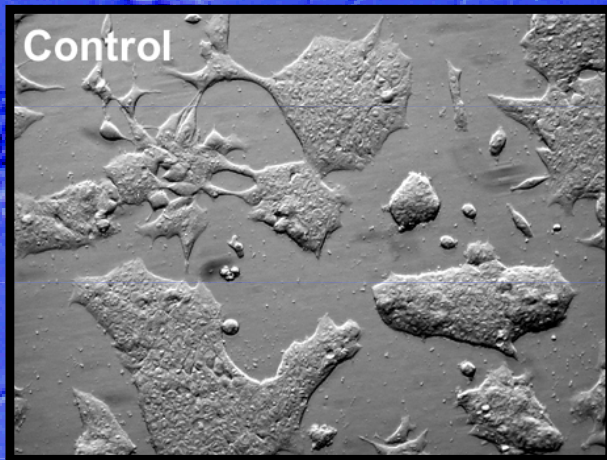
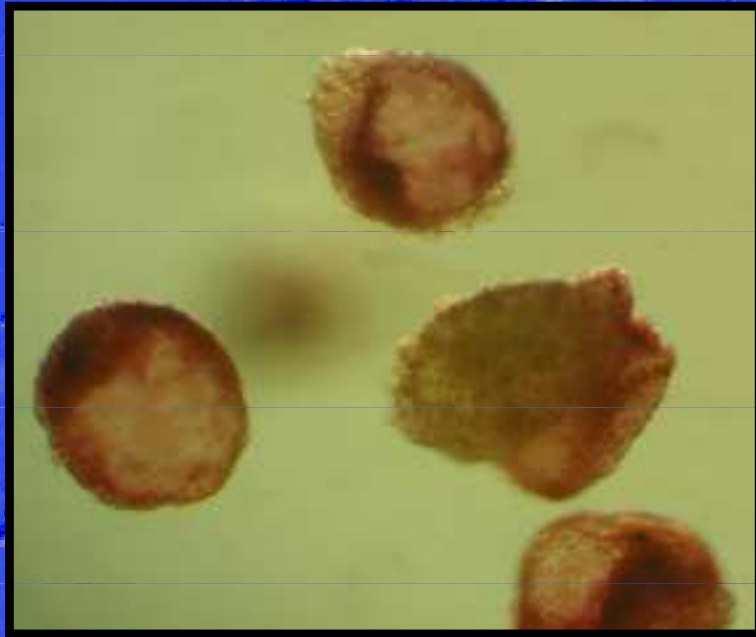
a) Embryoidní tělíska (Embryoid bodies - EB)

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

b) V monovrstvě

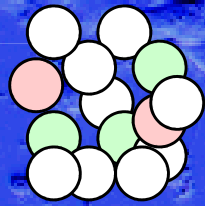
- + lépe definované podmínky
- malá výtěžnost
- silně závislé na genotypu (myš)





Model pro studium vzniku a zachování somatických kmenových buněk

kultivace

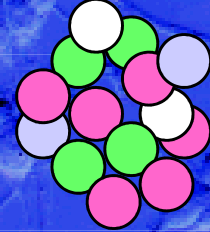


ES buňky

indukce



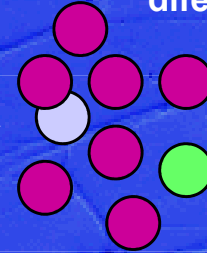
progenitory



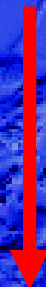
selekcce



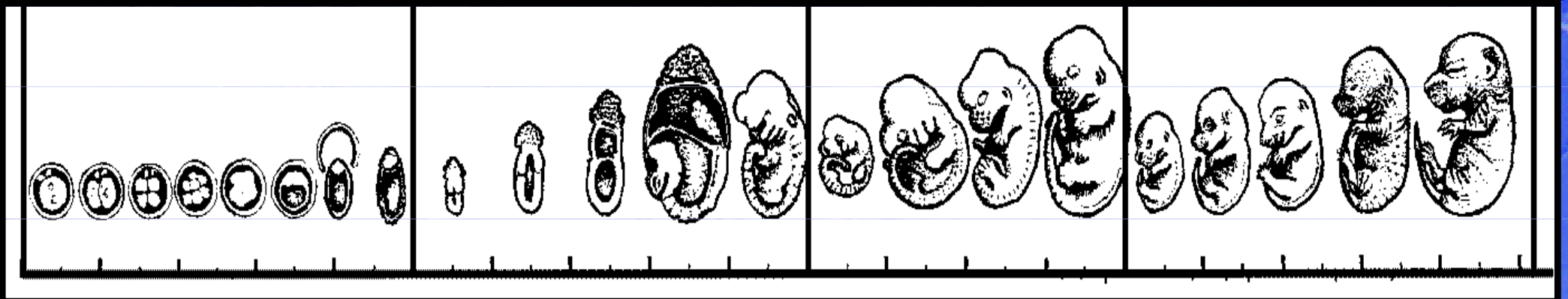
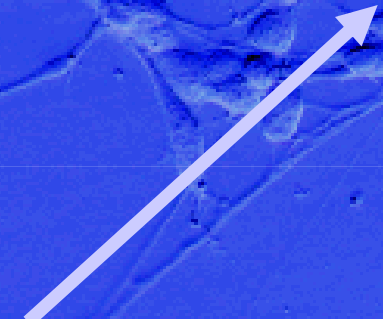
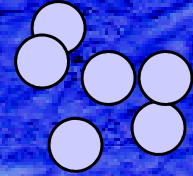
diferencované buňky



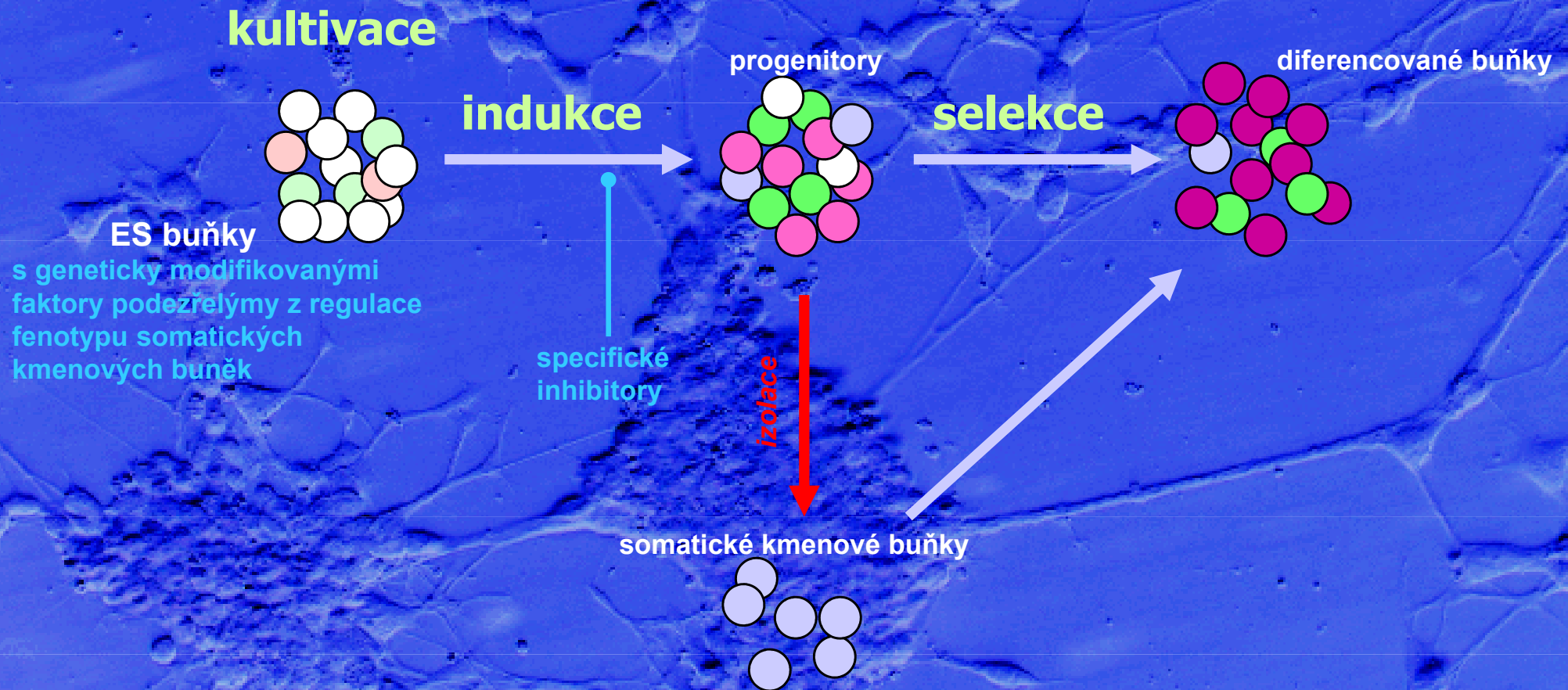
izolace



somatické kmenové buňky

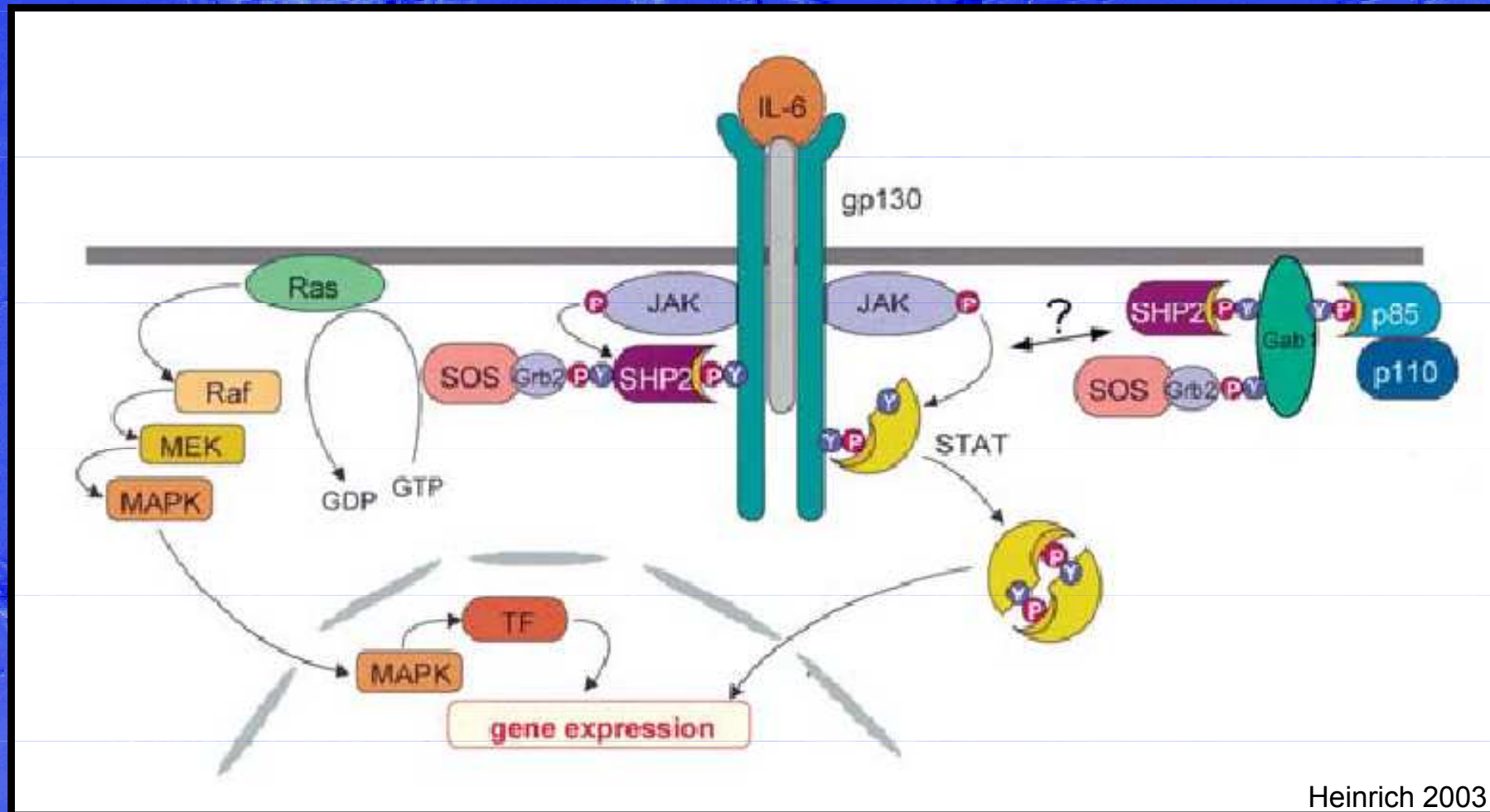


Model pro studium vzniku a zachování somatických kmenových buněk v našich experimentech



- četnost vzniklých somatických kmenových buněk
- jejich vlastnosti (fenotyp a potenciál pro další diferenciaci)

Příklad signální kaskády cytokinů na dráze transdukce signálu interleukinu-6 (IL-6)



Heinrich 2003

JAK – Janusova kináza (tyrosin kináza)

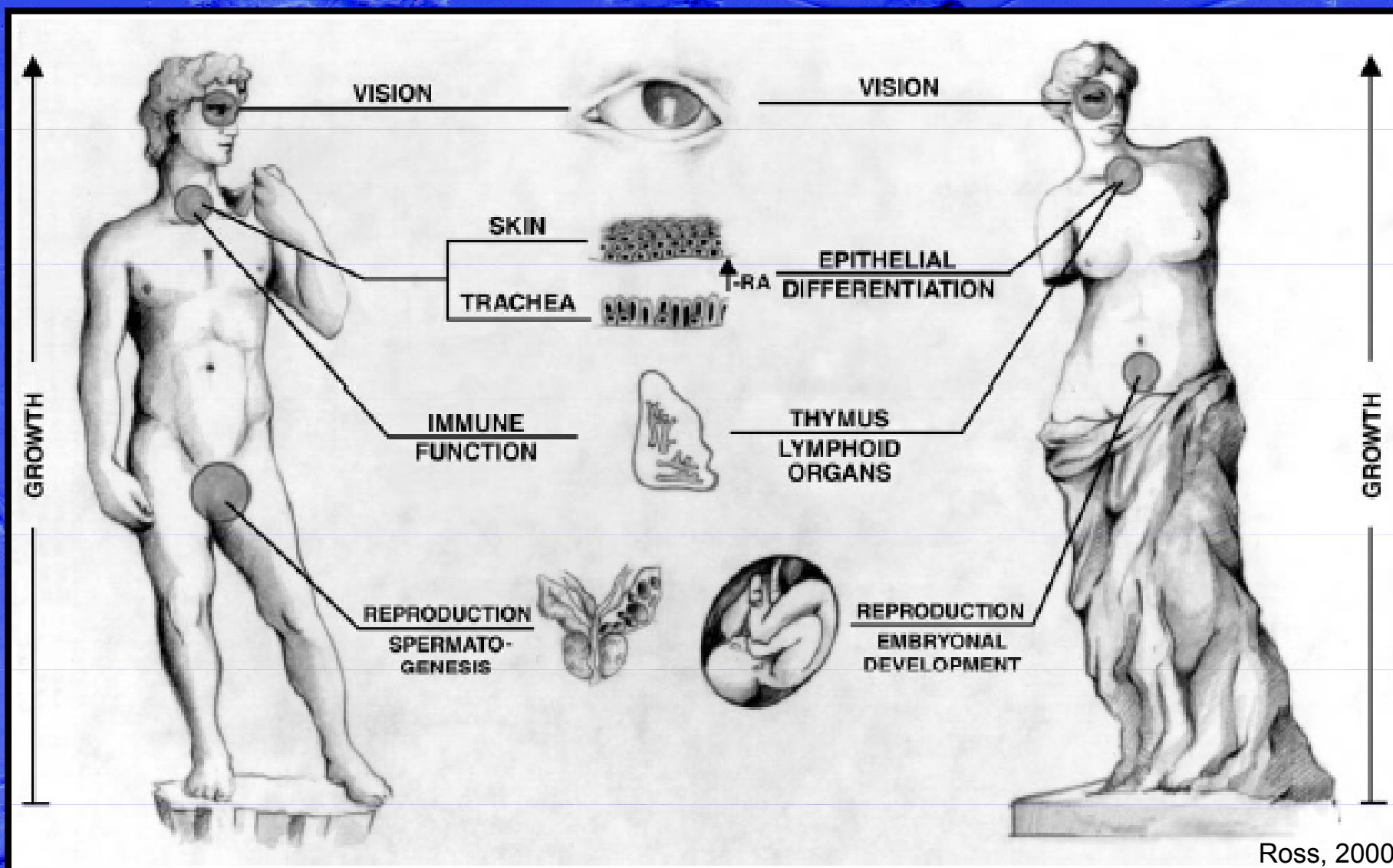
STAT – transduktor signálu a aktivátor transkripce

(signal transducer and activator of transcription)

Výběr nejvýznamnějších oblastí vyžadujících metabolismus retinolu/vit.A

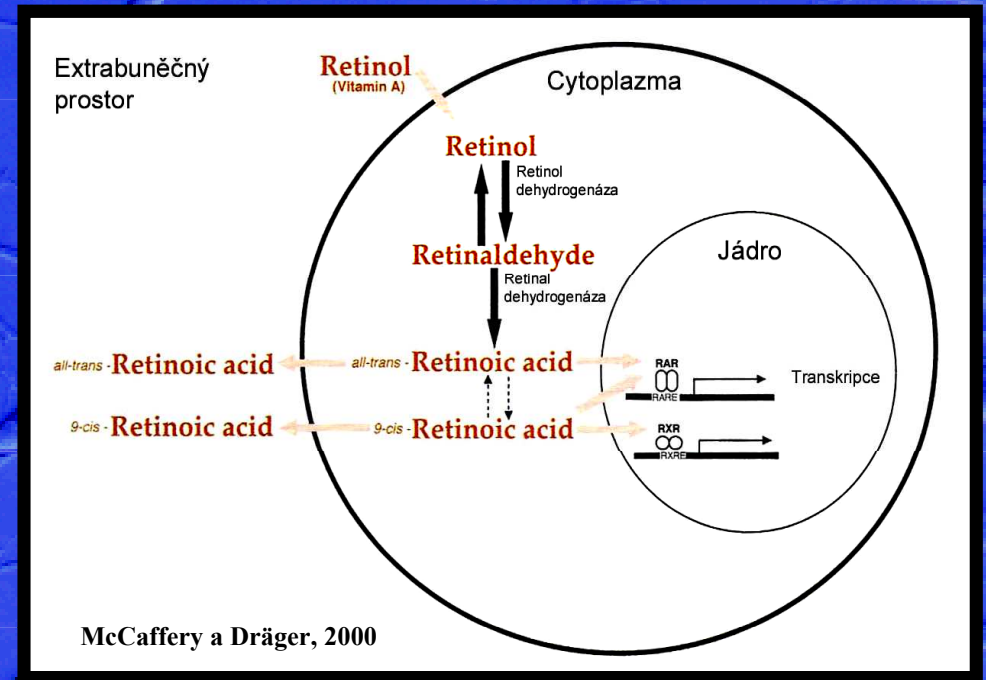
A) fotorecepce

B) růst a vývoj organismu



Kyselina retinová - RA

- velmi silný induktor
- pleiotropní působení



ES / EC + EB + RA

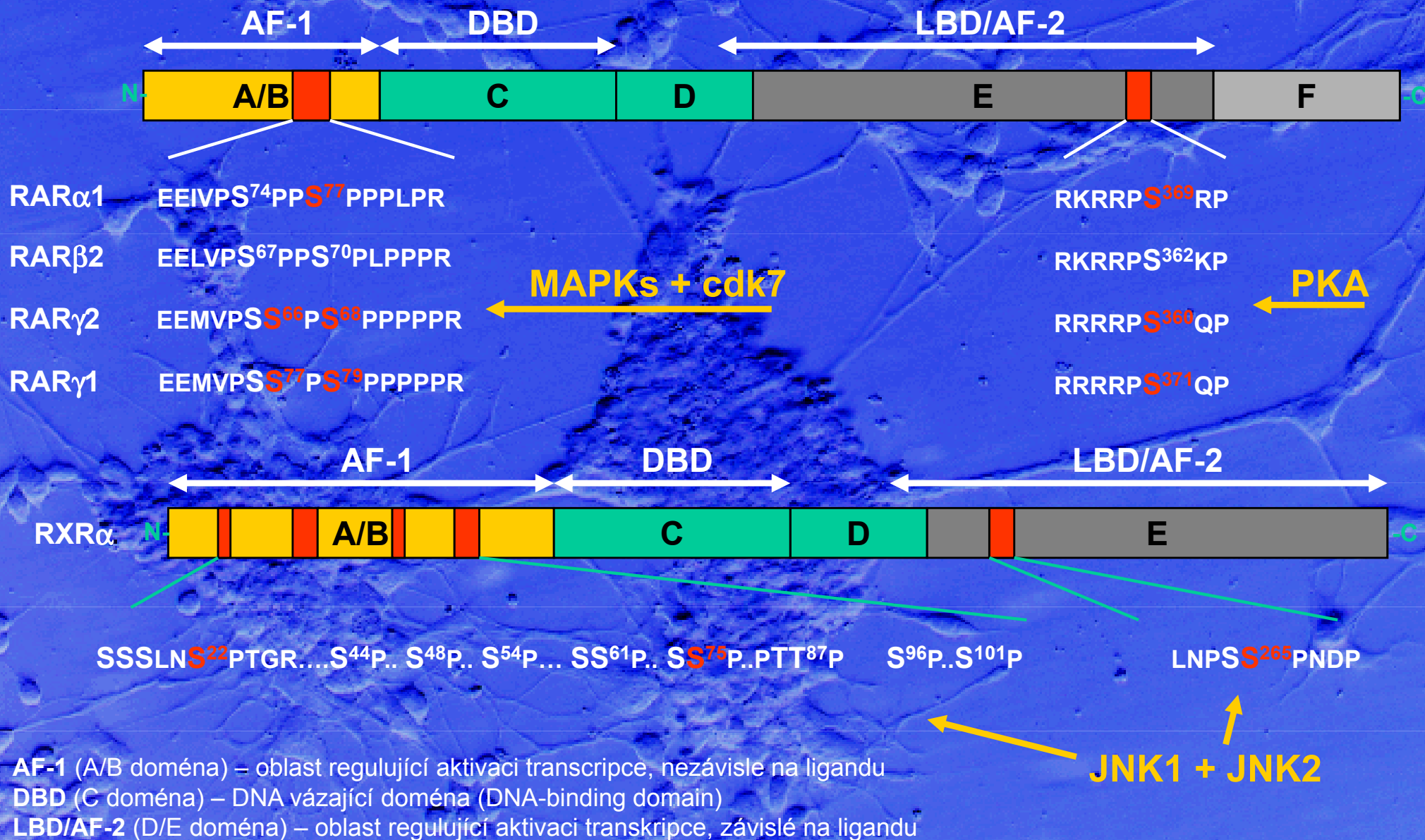
- buňky neurální
- buňky kosterní svaloviny a adipocyty
- buňky srdeční a hladké svaloviny

↑
nM RA

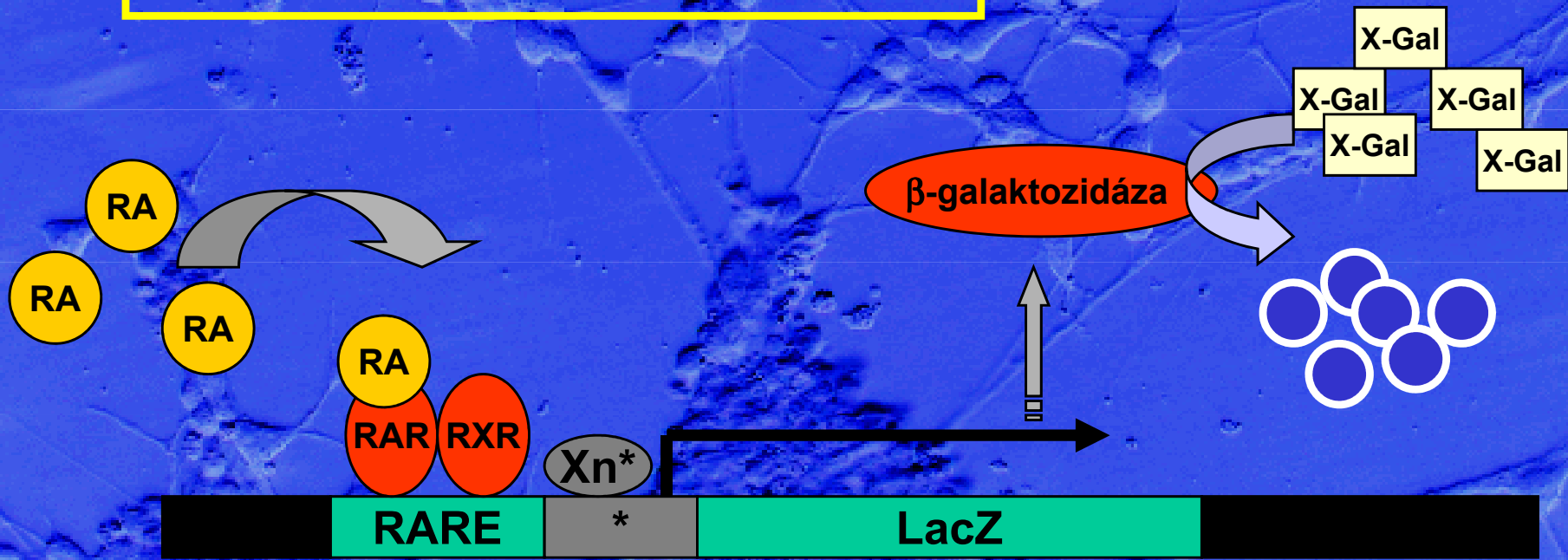
ES / EC + monovrstva + RA

- 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)**

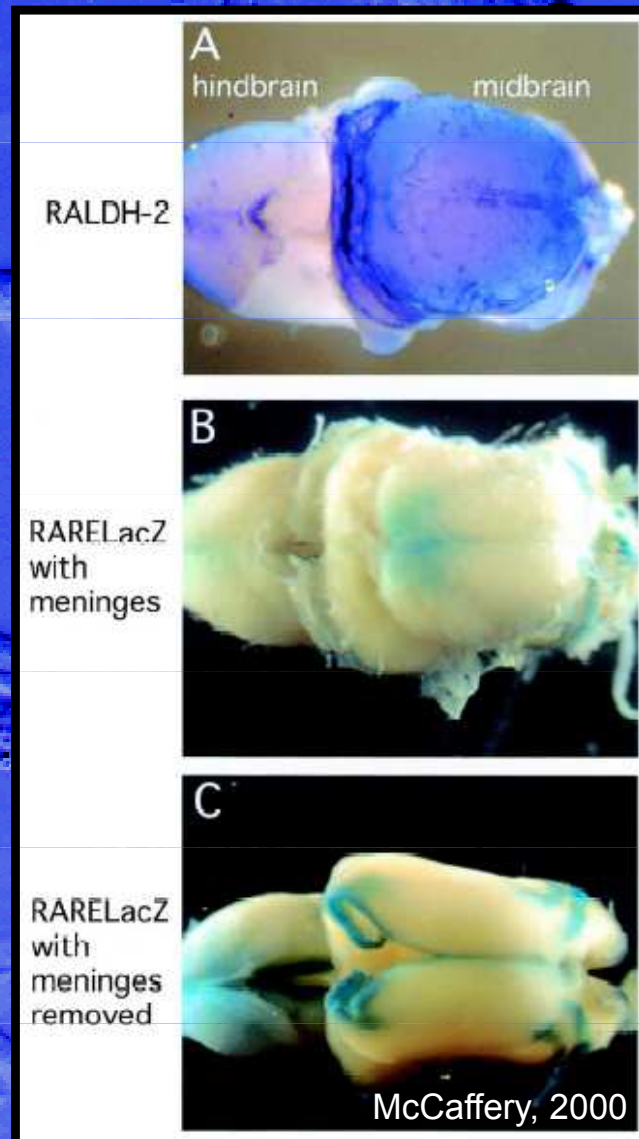


*další faktory/sekvence nezbytné pro funkci promotoru

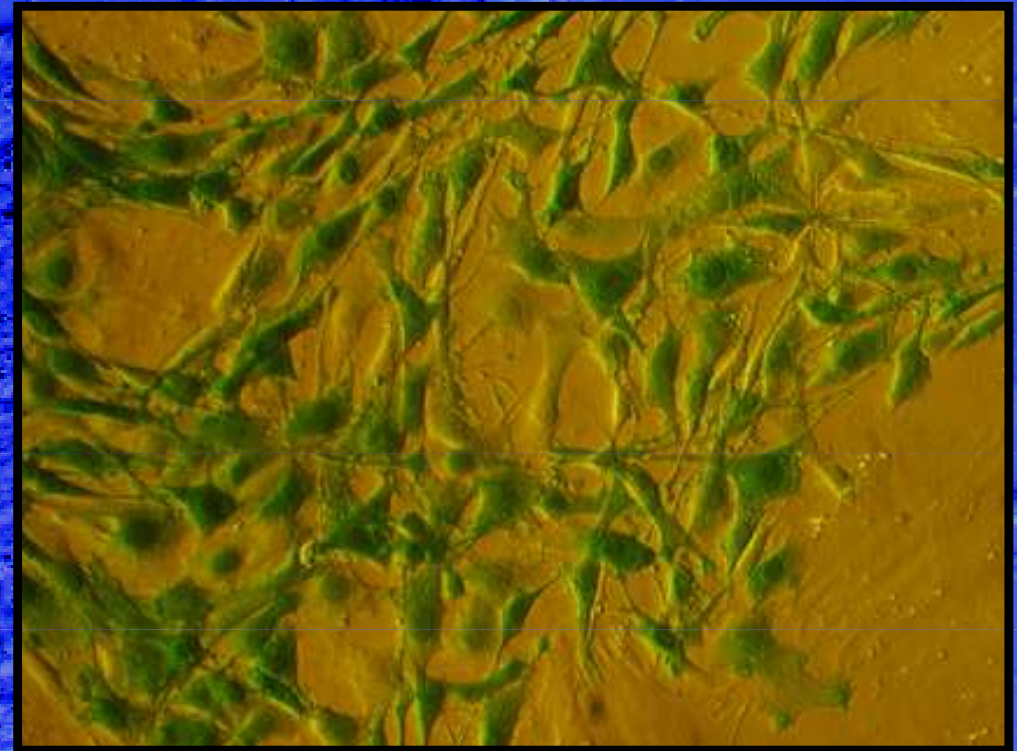
Exprese a aktivita RALDH-2 v mozku myšního embrya (16 dpc)

A) In situ hybridizace mRNA RALDH-2

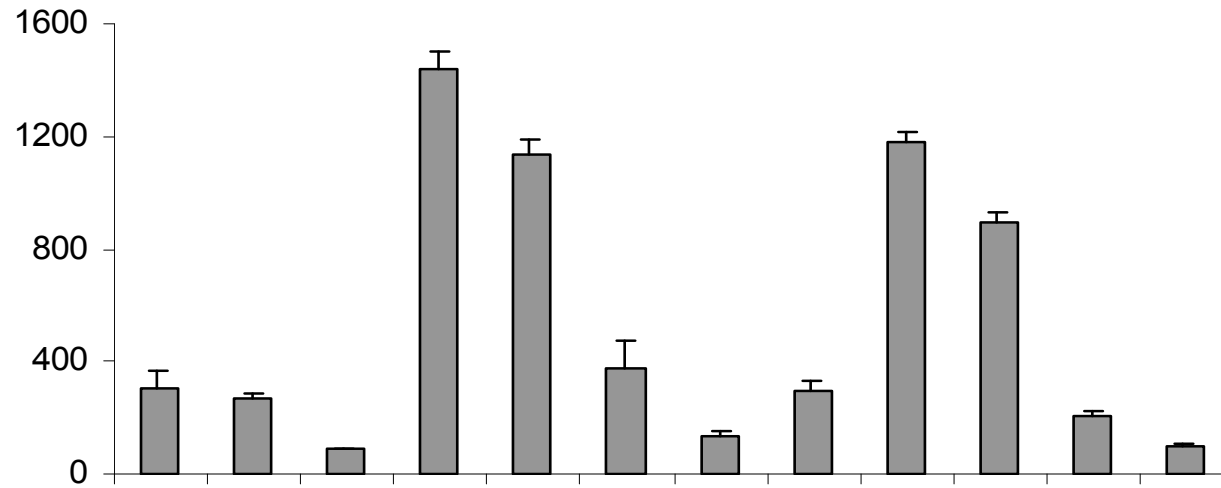
B + C) RARE aktivita (RARE-LacZ reporter)



Detekce buněk exprimujících indukovanou β -galaktosidázu

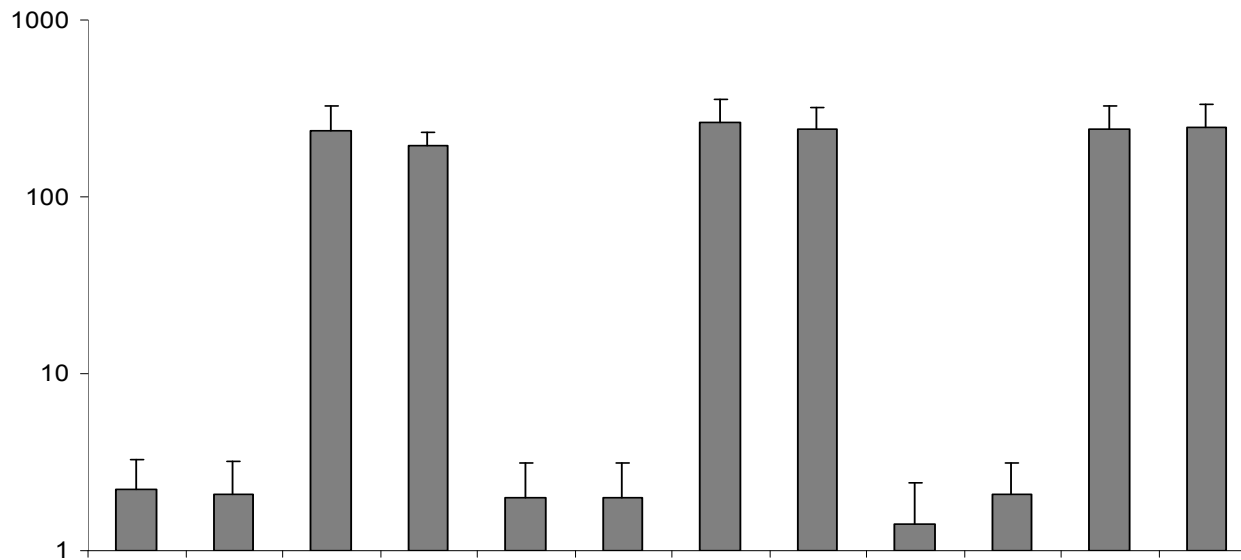


Relative Luciferase activity



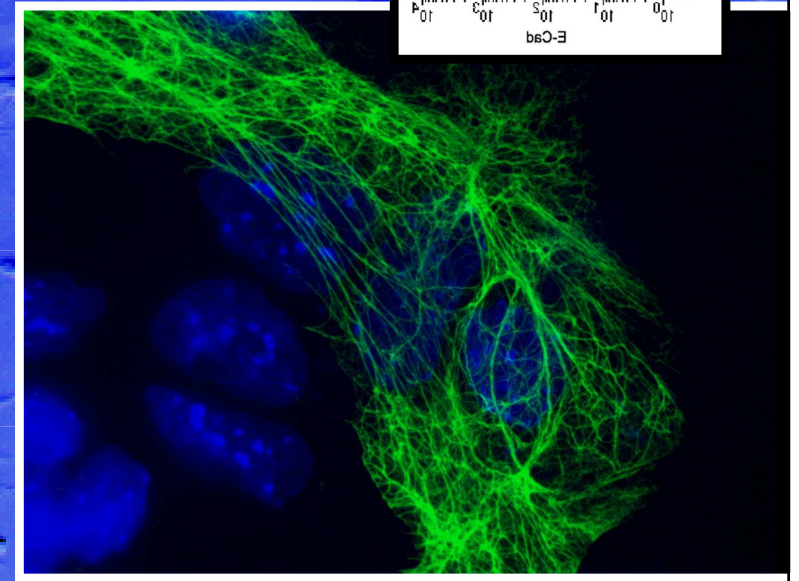
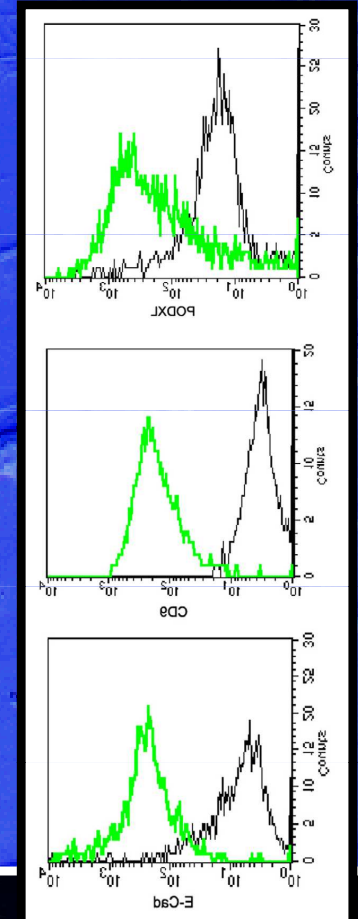
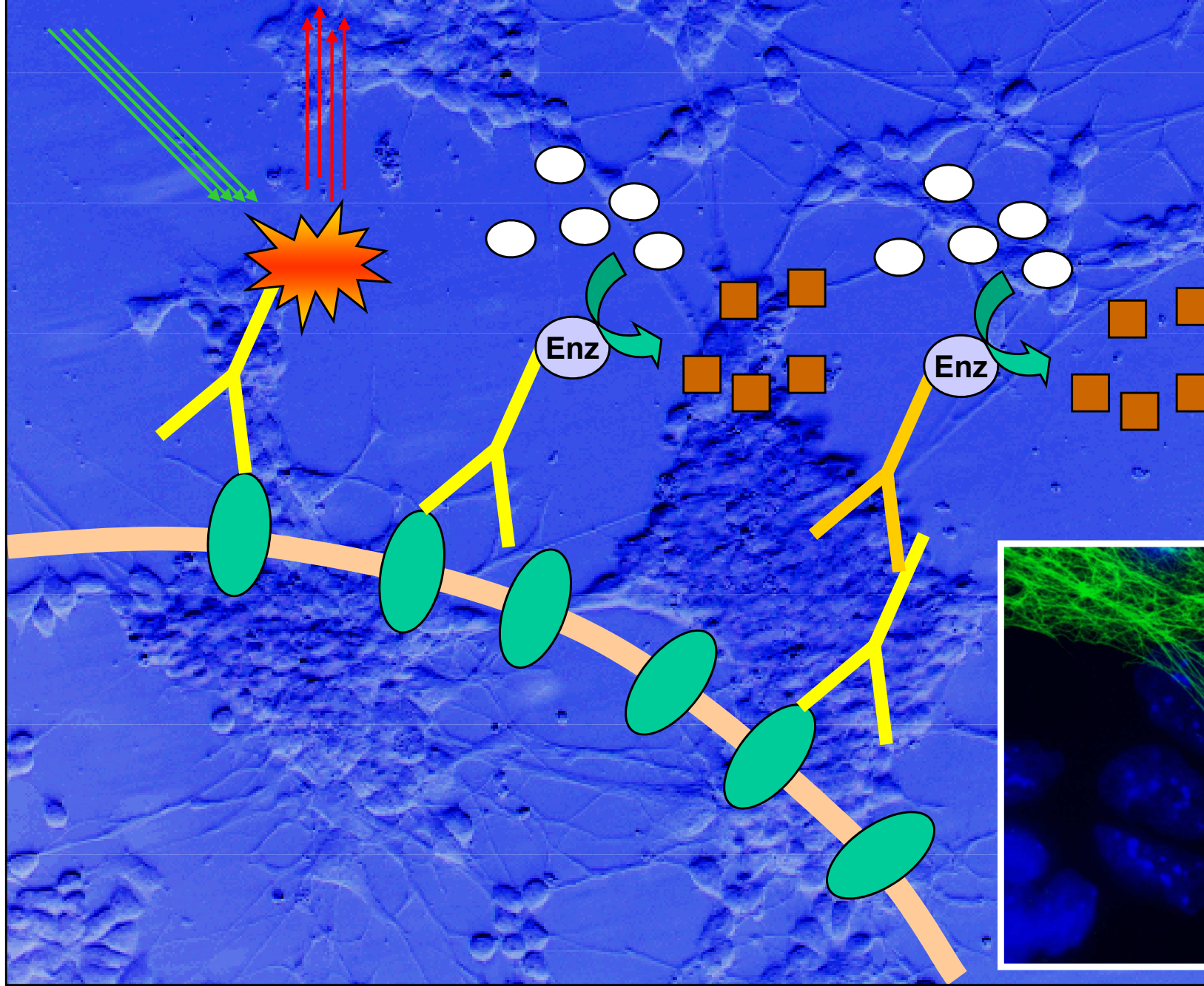
AG490 (μM)	-	2.5	22.5	-	2.5	7.5	22.5	-	-	2.5	7.5	22.5
LIF	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
RA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Relative luciferase activity

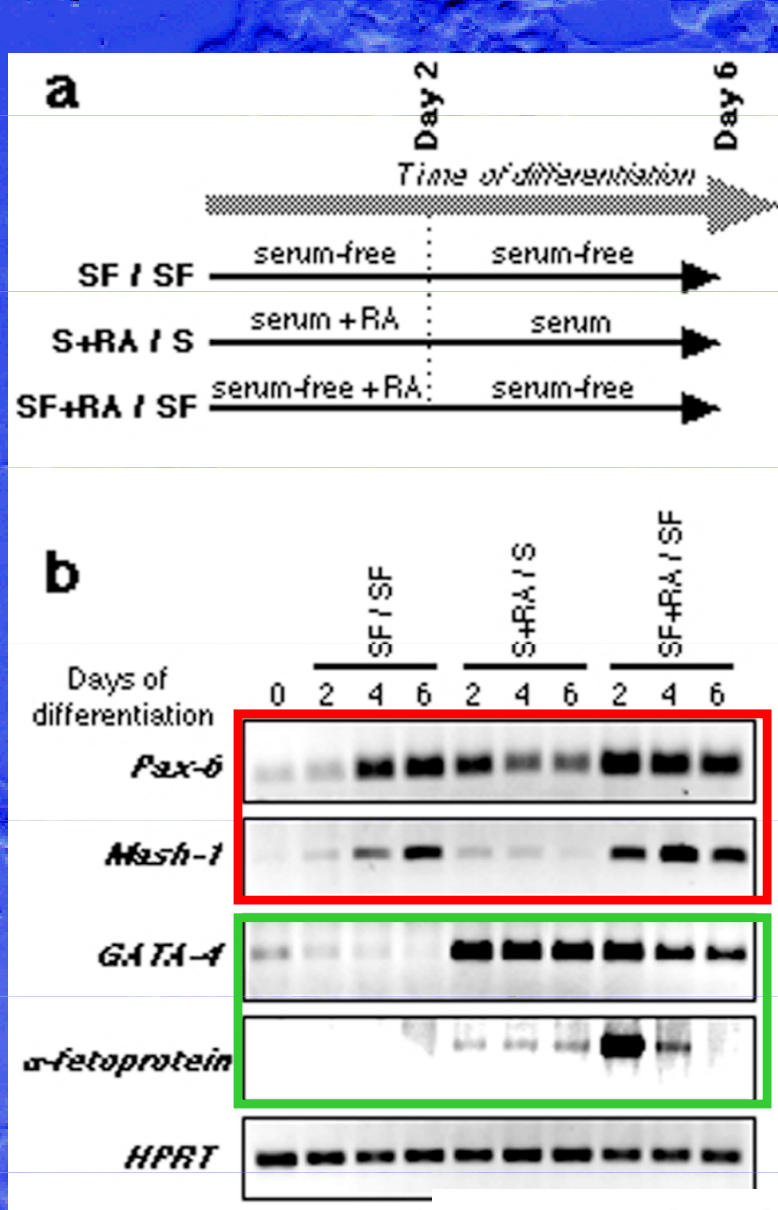


RA	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
LIF	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
AG490 (5 μM)	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UO126 (5 μM)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

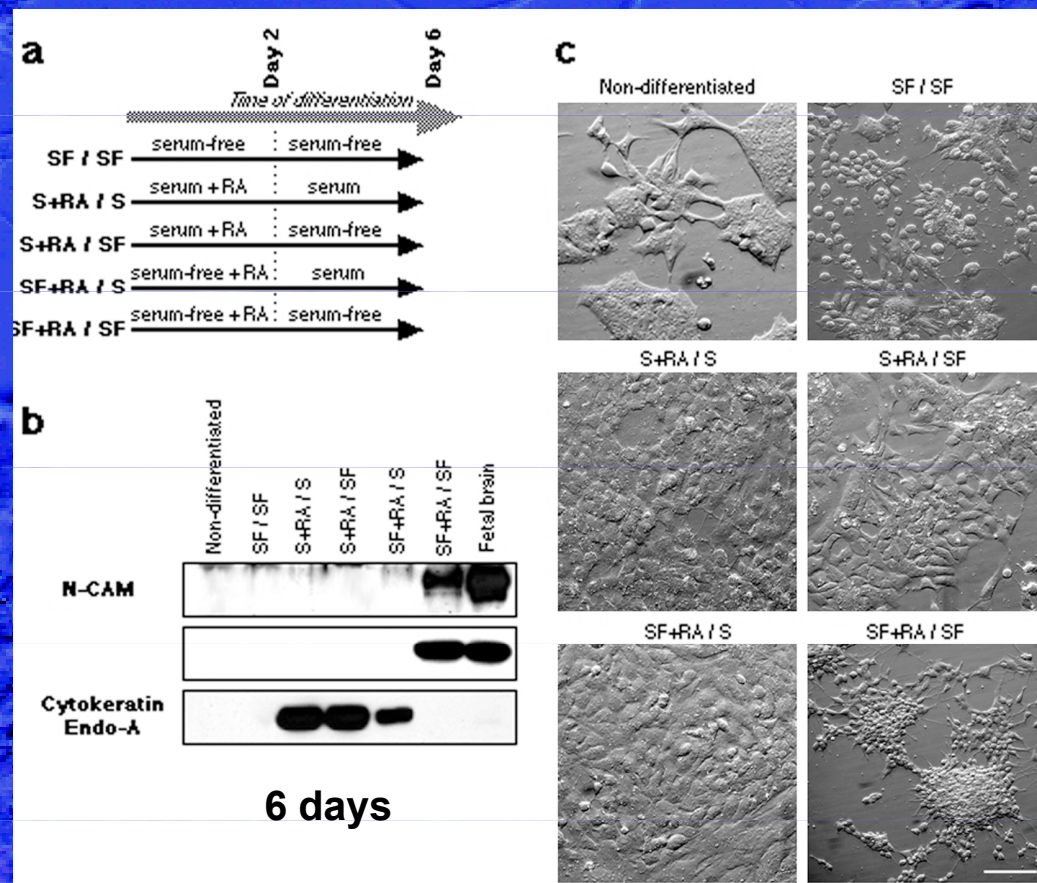
Schematický princip imunodetekce



Účinek séra na RA indukovanou neurální diferenciací

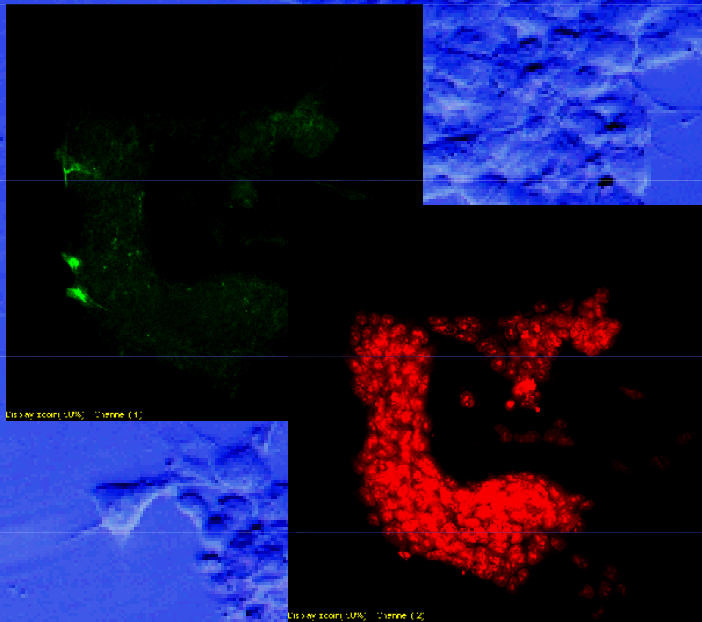


- neuroektoderm
- entoderm



RT-PCR analýza exprese
liniově specifických genů

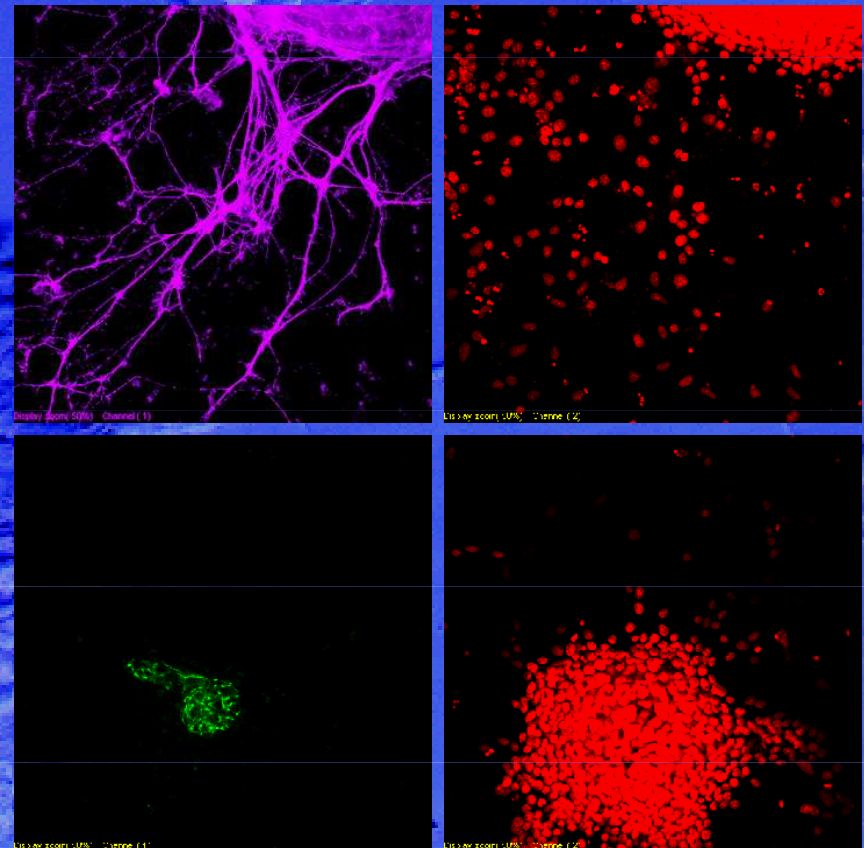
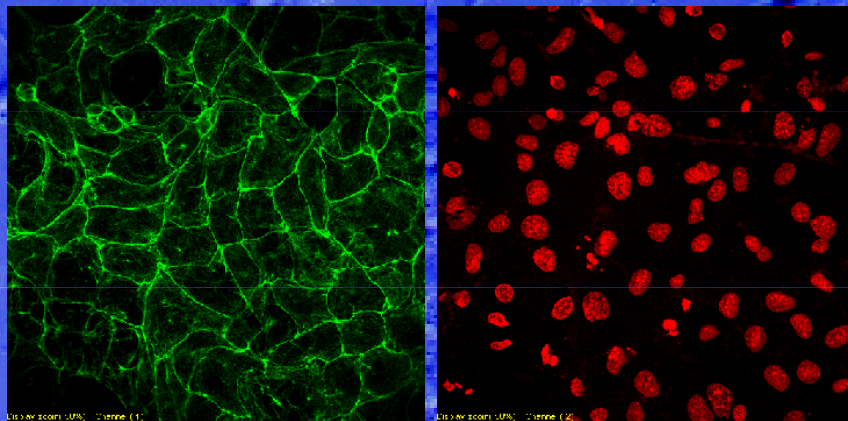
Nediferencované buňky EC P19

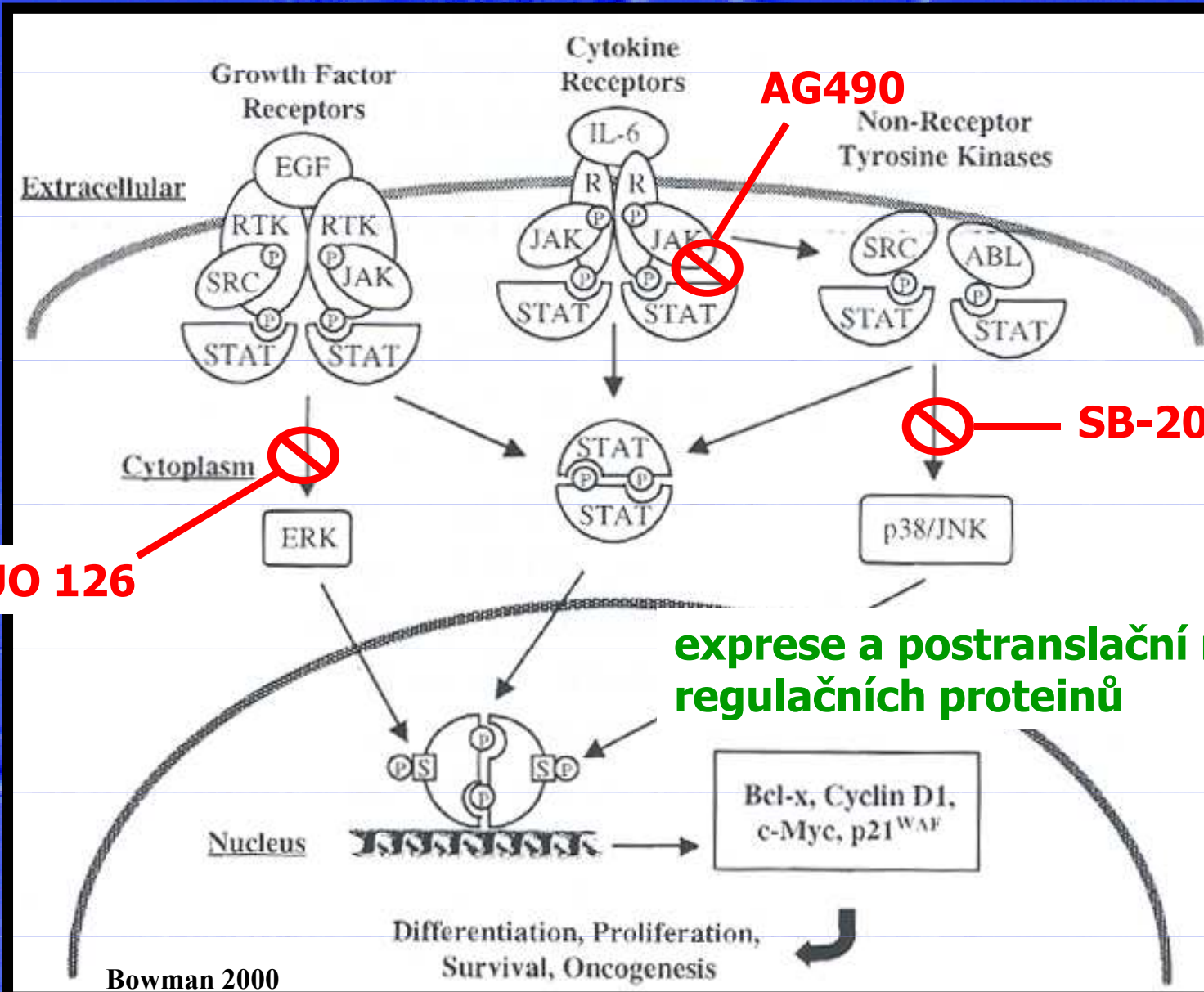


- ◆ **buněčná jádra**
- ◆ **cytokeratin EndoA pozitivní buňky – entoderm**
- ◆ **N-CAM pozitivní buňky - neurony**

Diferencované buňky EC P19 monovrstva + RA - sérum

Diferencovane buňky EC P19 monovrstva + RA + sérum





AG490

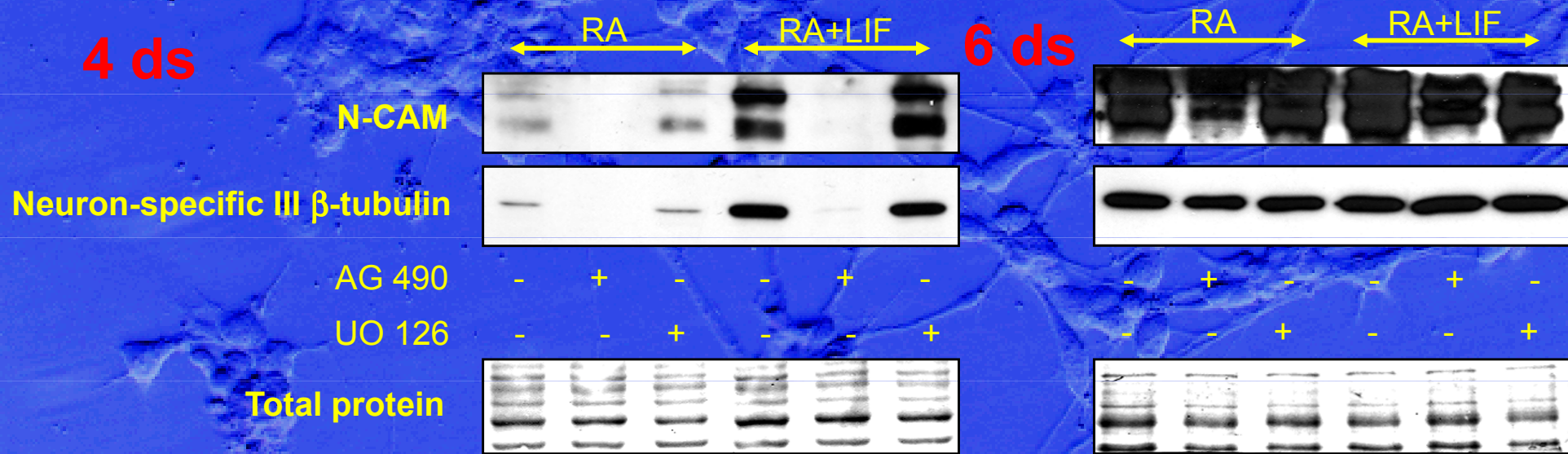
SB-202190

UO 126

exprese a postranlační 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)

