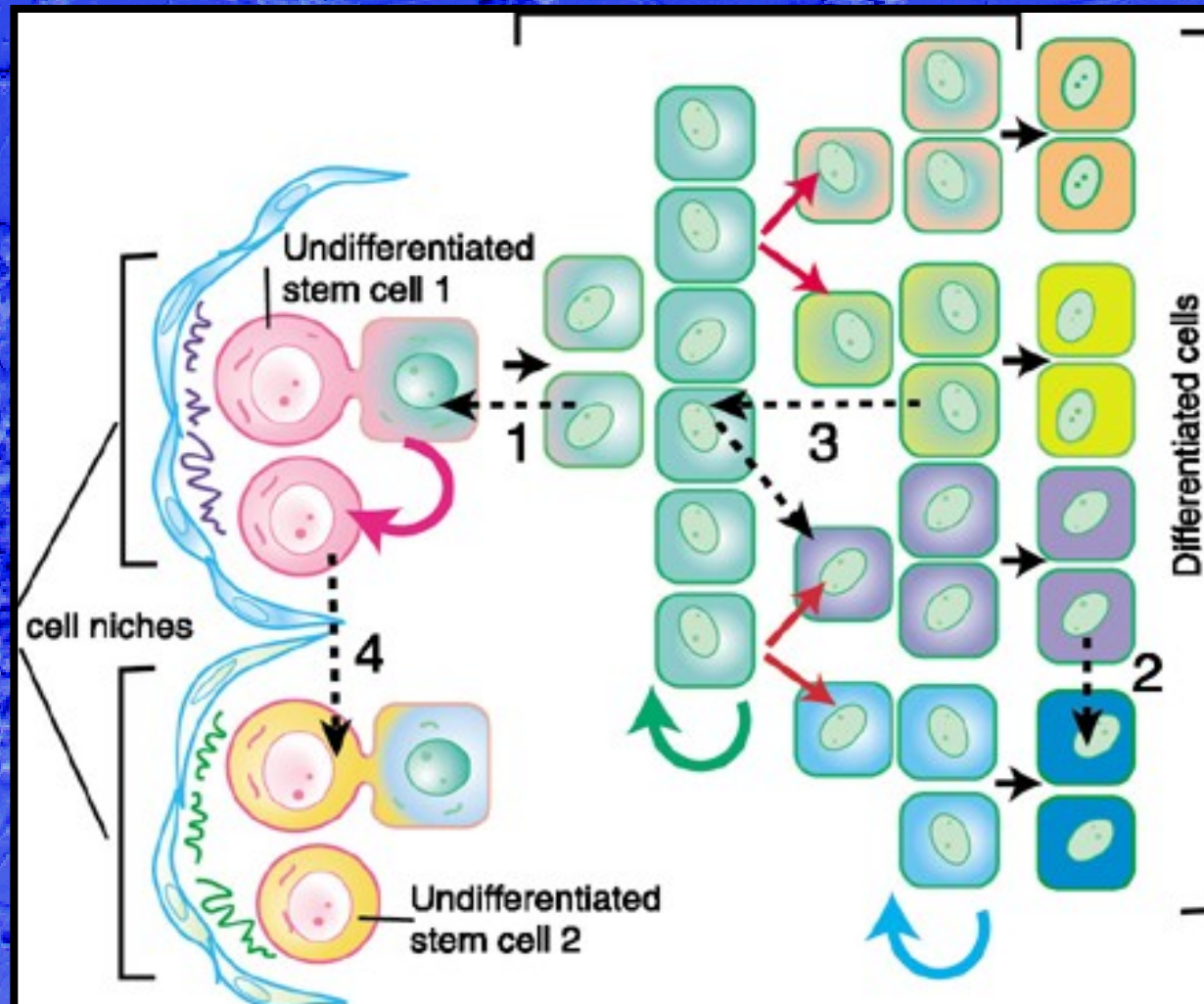


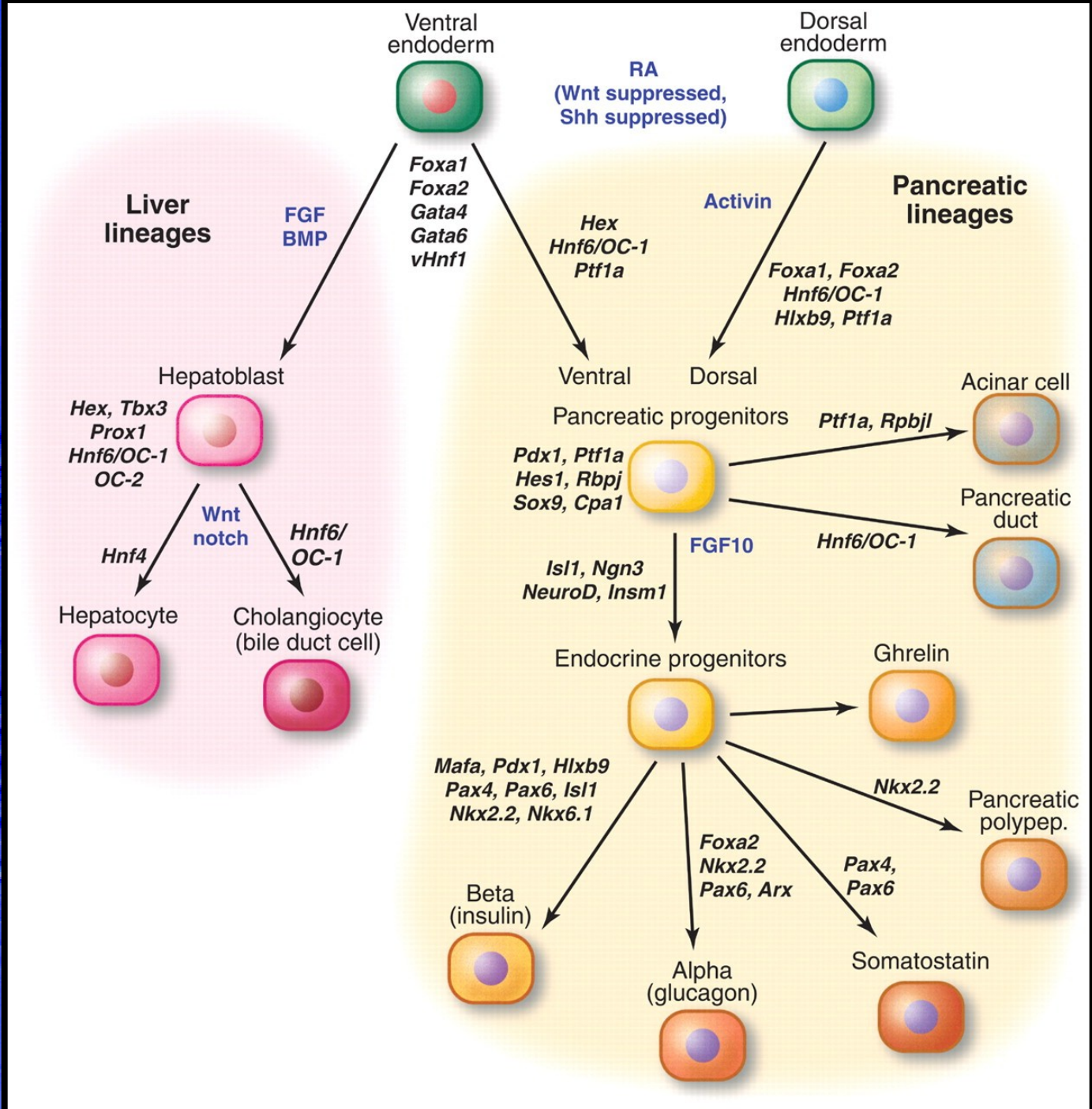
Úvod do studia biologie kmenových buněk

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

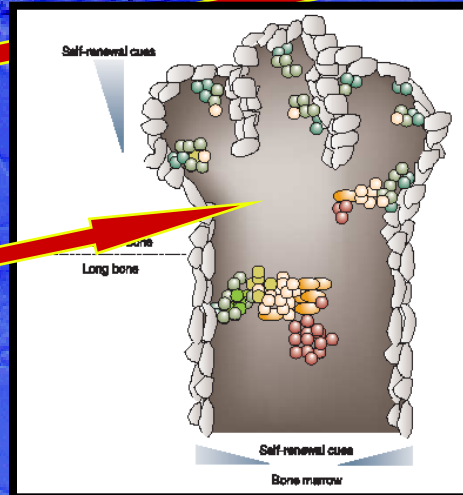
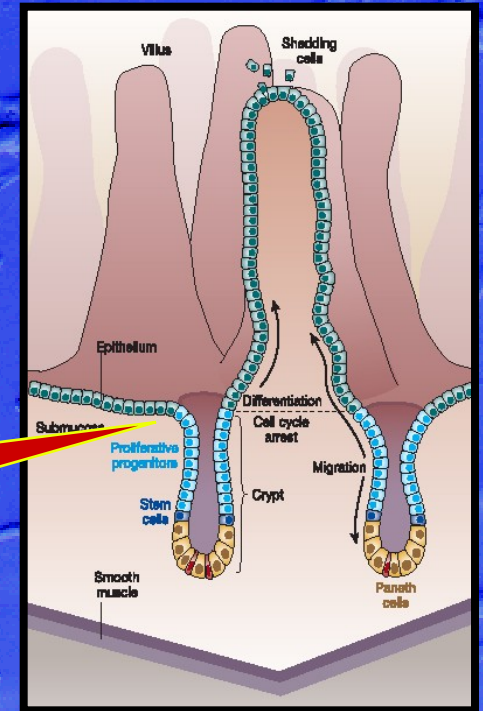
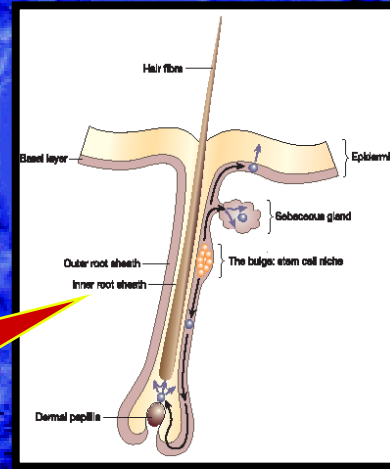
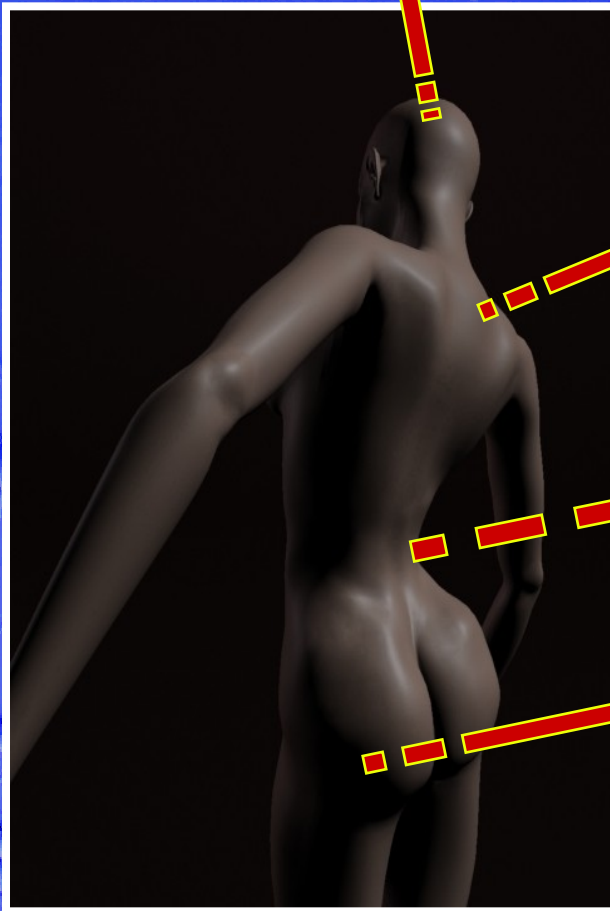
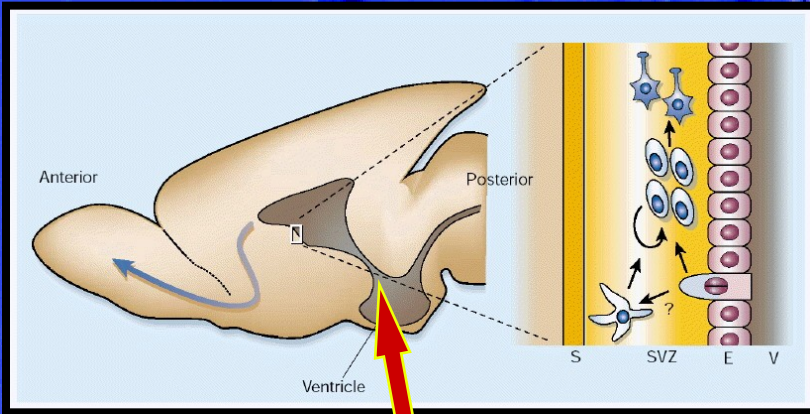
Co jsou kmenové buňky?

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

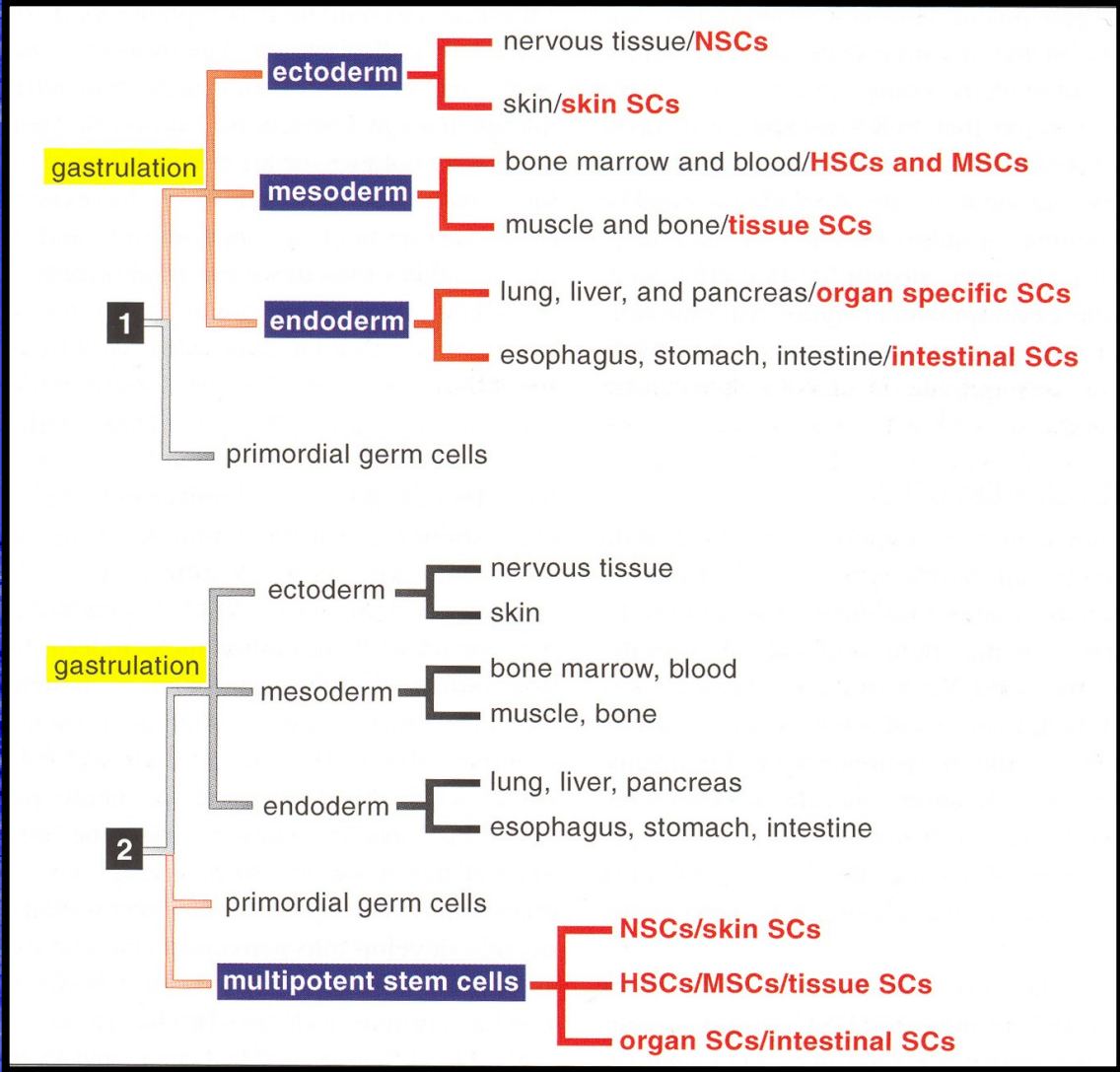


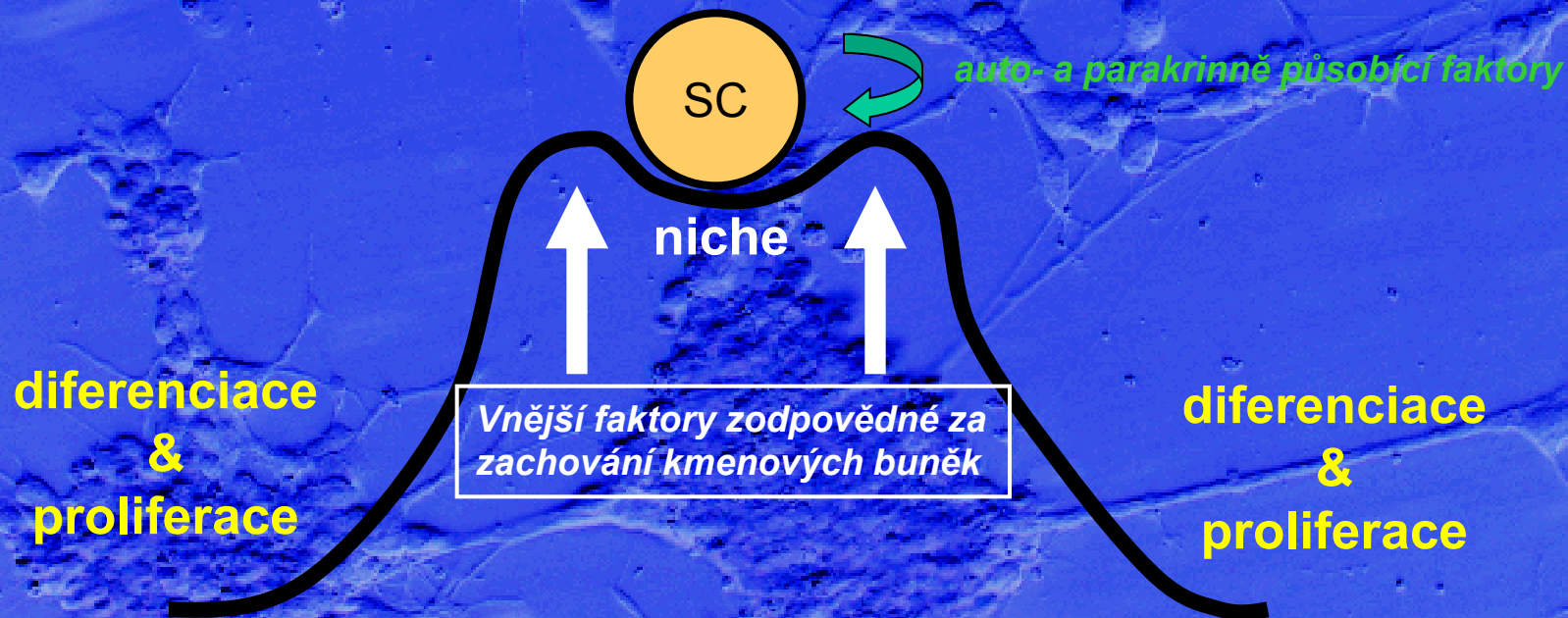


Kmenové buňky v dospělém organismu



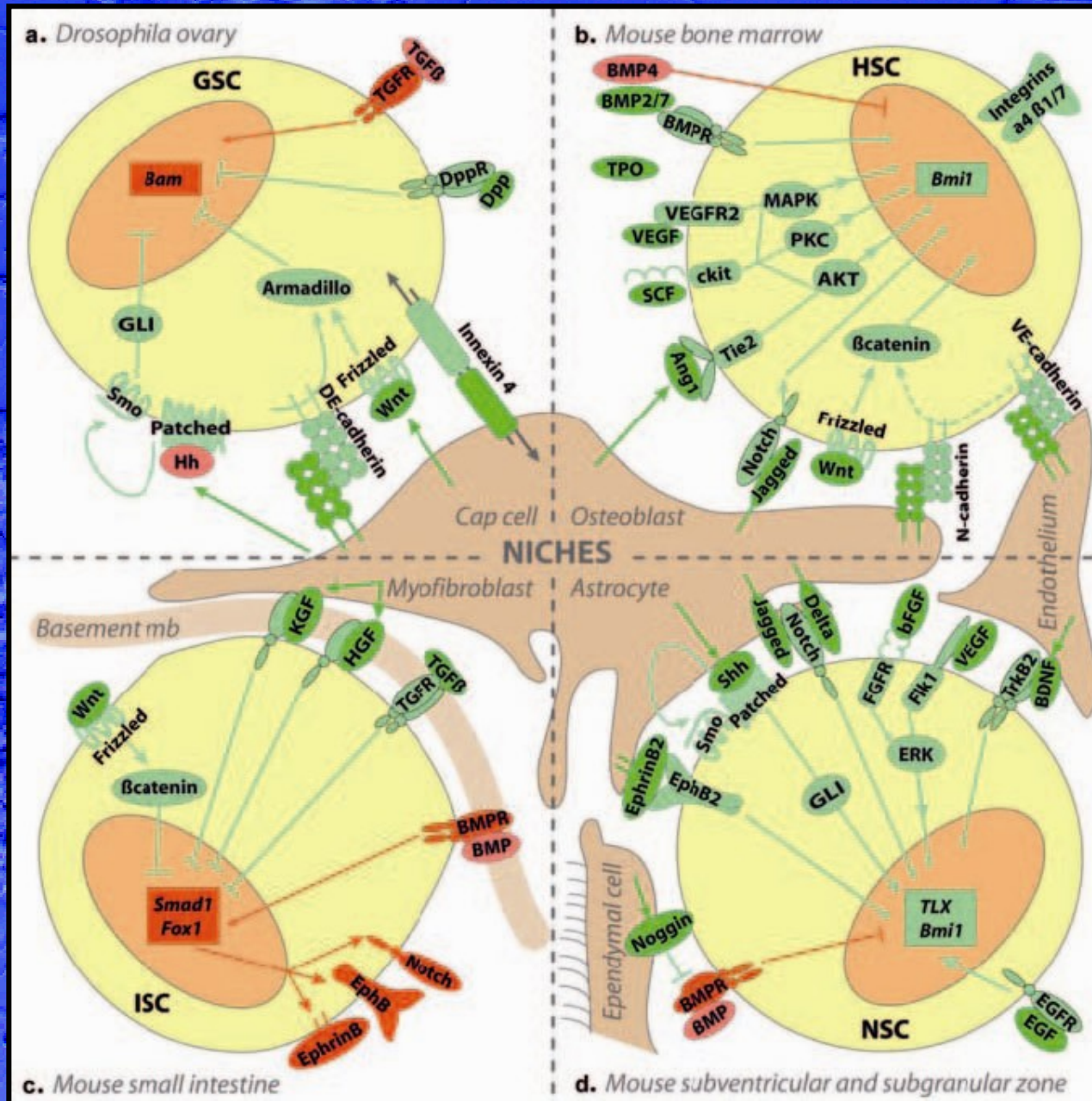
Původ kmenových buněk



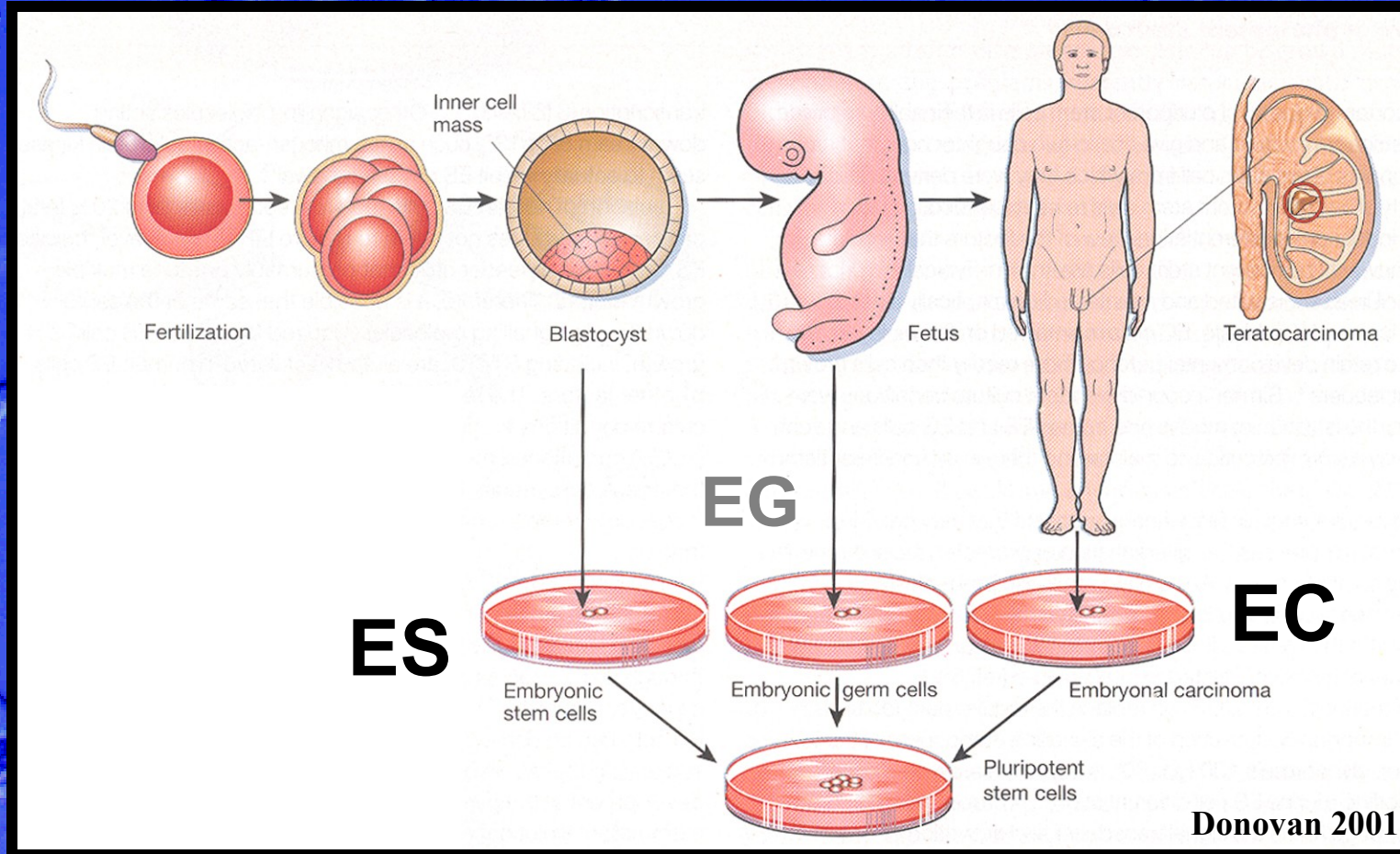


Niche

(Naveiras, 2006)



Pluripotentní embryonální kmenové buňky



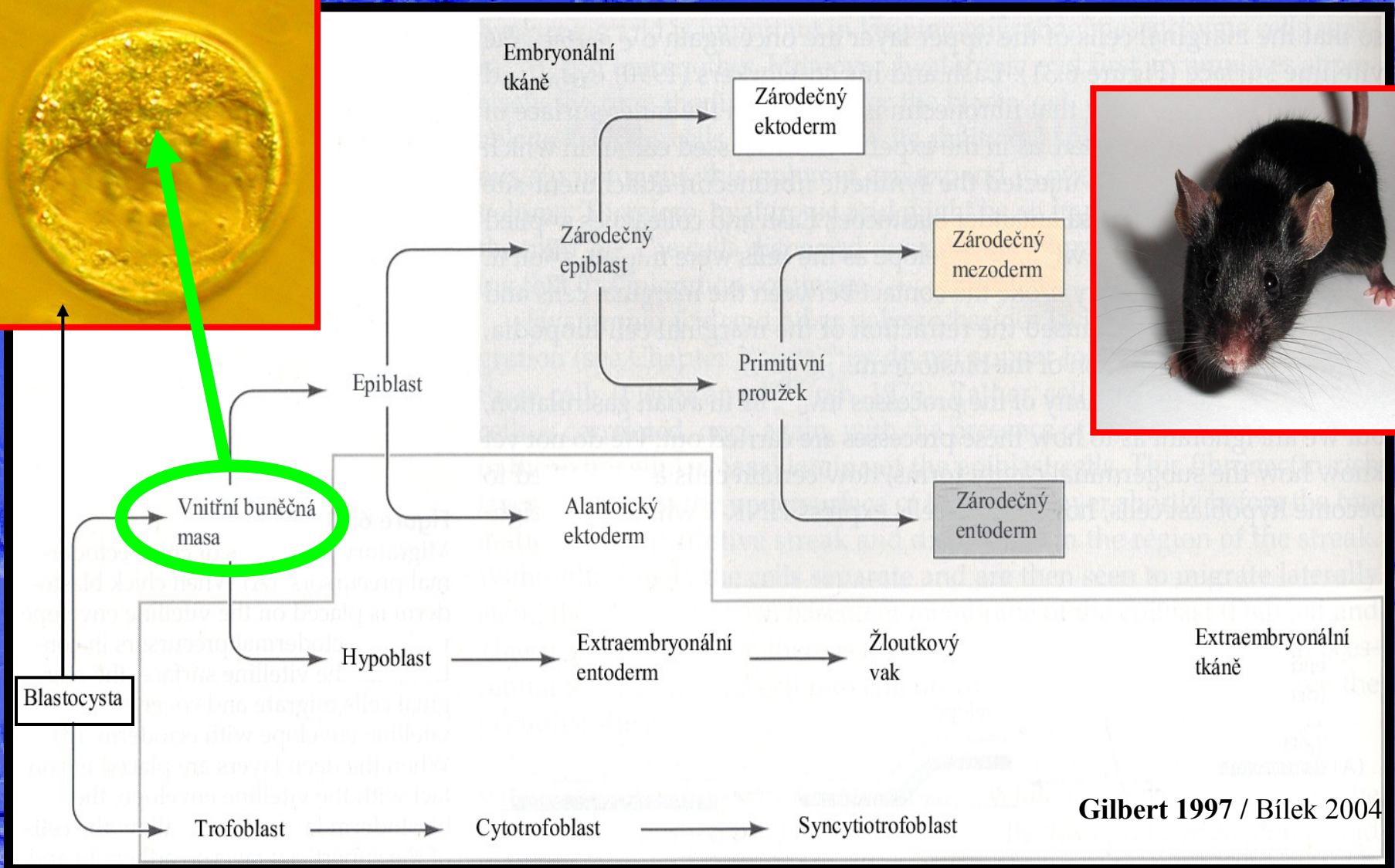
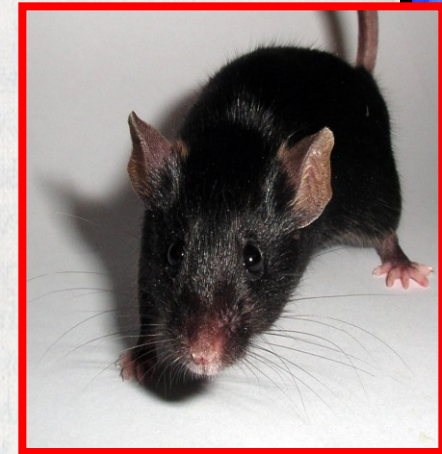
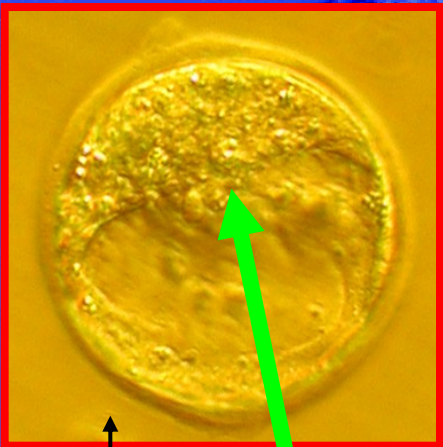
Donovan 2001

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

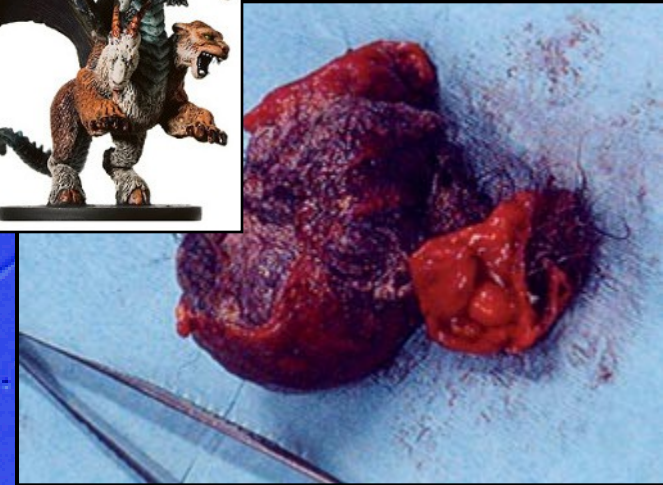


Verifikace kmenových buněk

sebeobnova x schopnost diferenciaci

Embryonální kmenové buňky

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

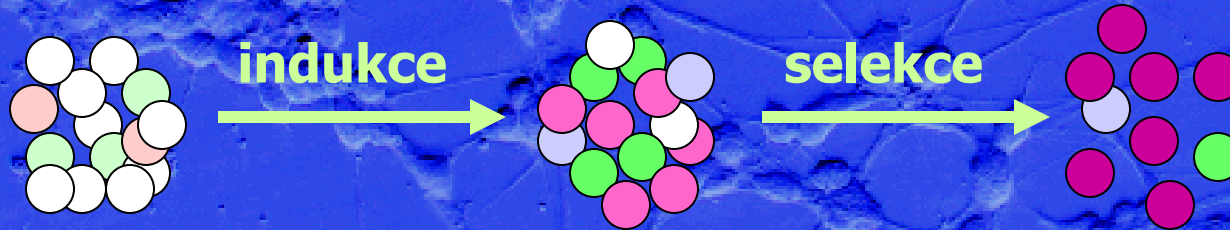


Somatické kmenové buňky

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

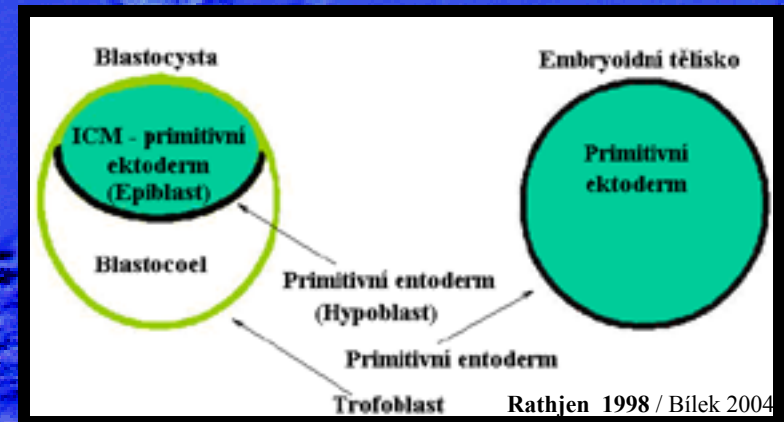
Diferenciace ES / EC buněk *in vitro*

kultivace



a) Embryoidní tělíska (Embryoid bodies - EB)

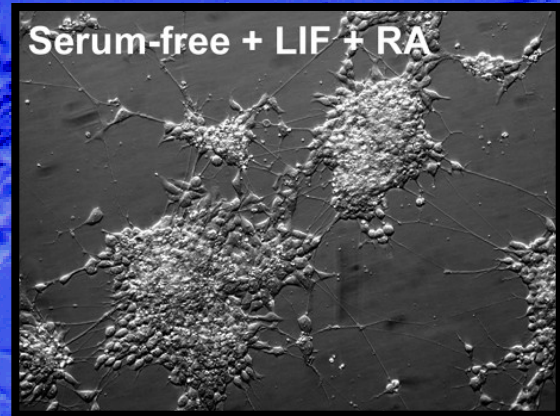
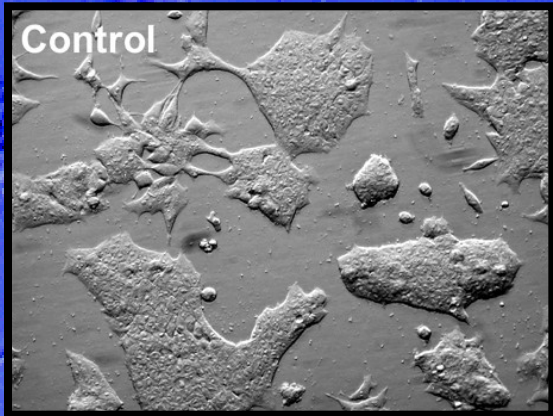
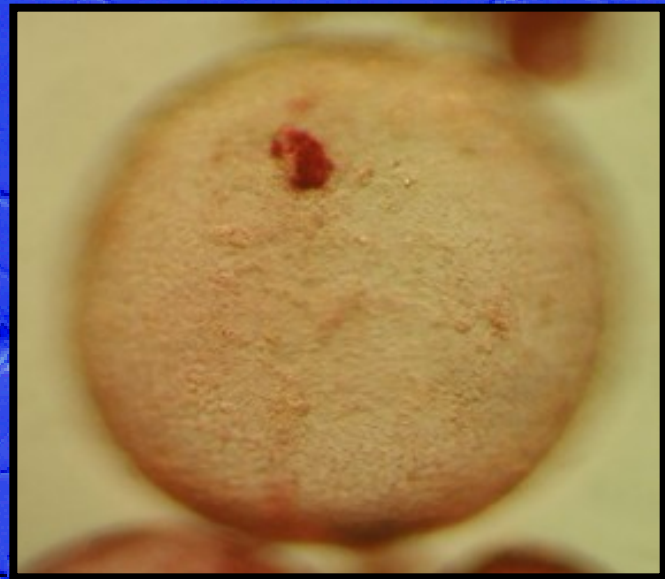
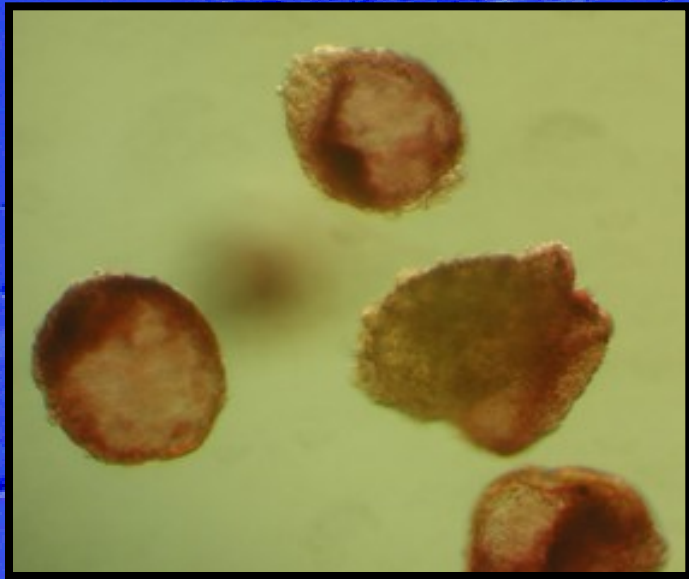
- EB)
- + jednoduché, více buněčných typů
- + tolerující genotyp
- špatně definované podmínky



b) V monovrstvě

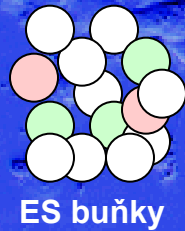
- + lépe definované podmínky
- malá výtěžnost
- silně závislé na genotypu (myš)



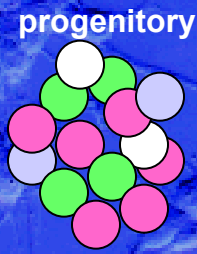


Model pro studium vzniku a zachování somatických kmenových buněk

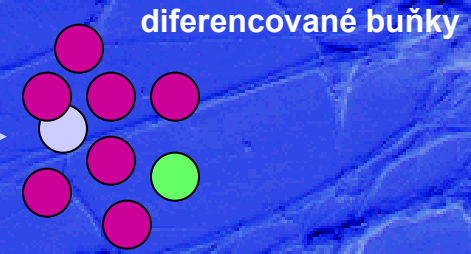
kultivace



indukce

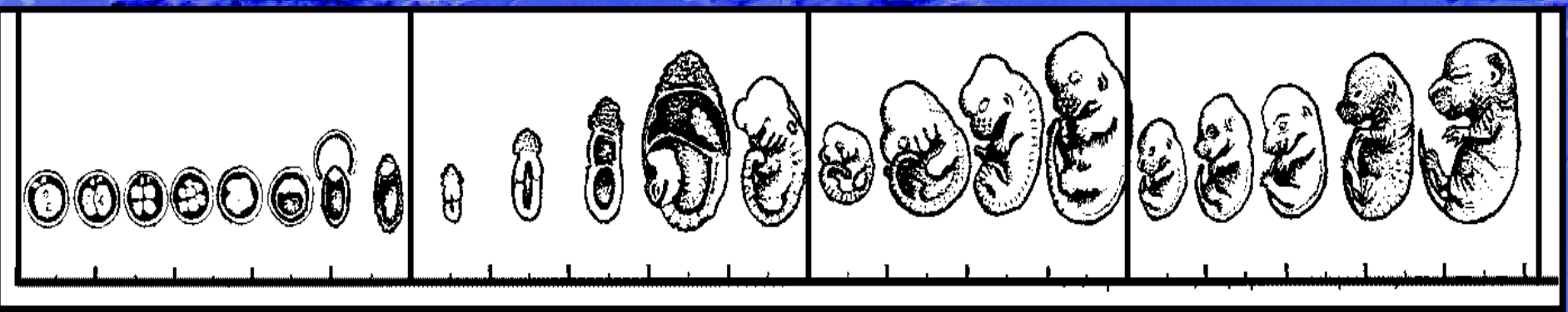
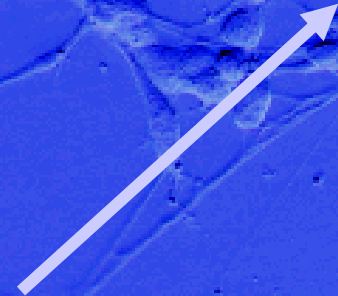
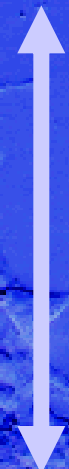
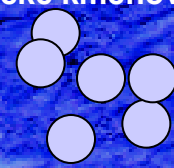


selekcce

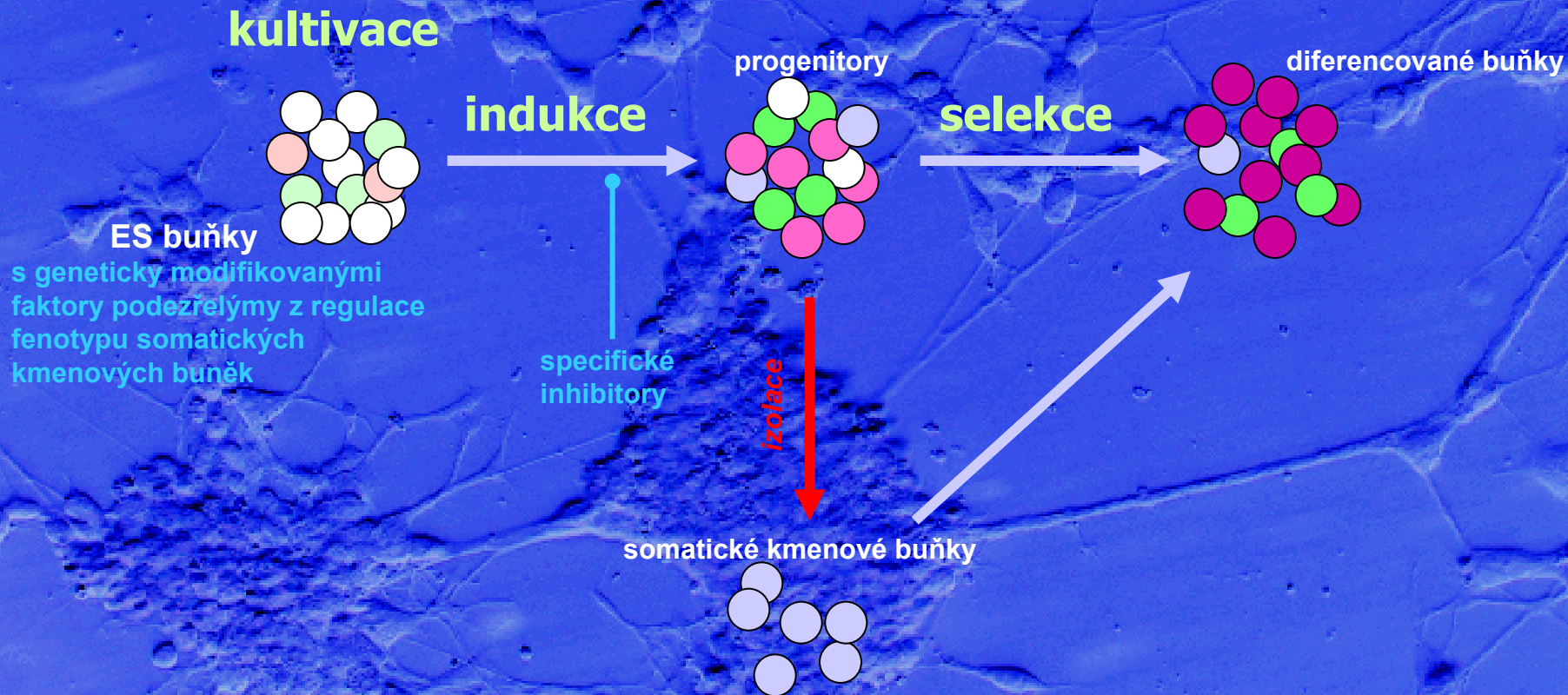


izolace

somatické kmenové buňky

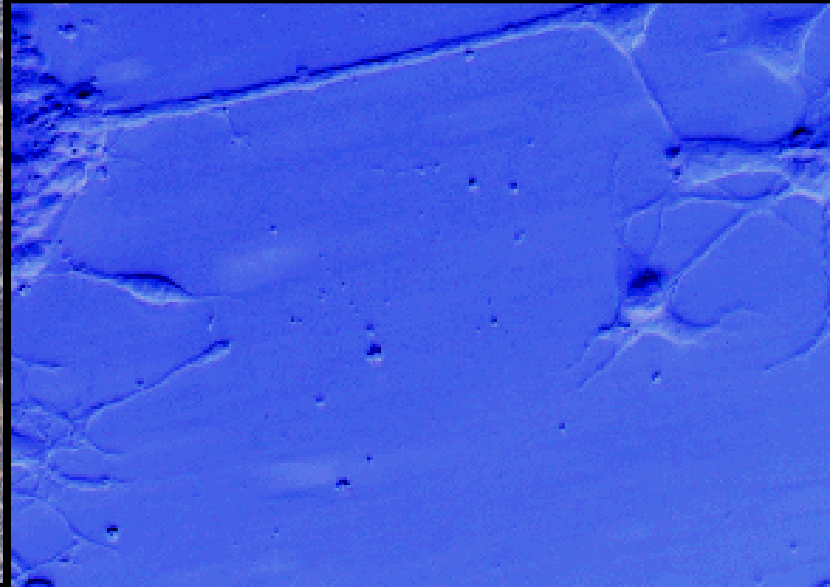
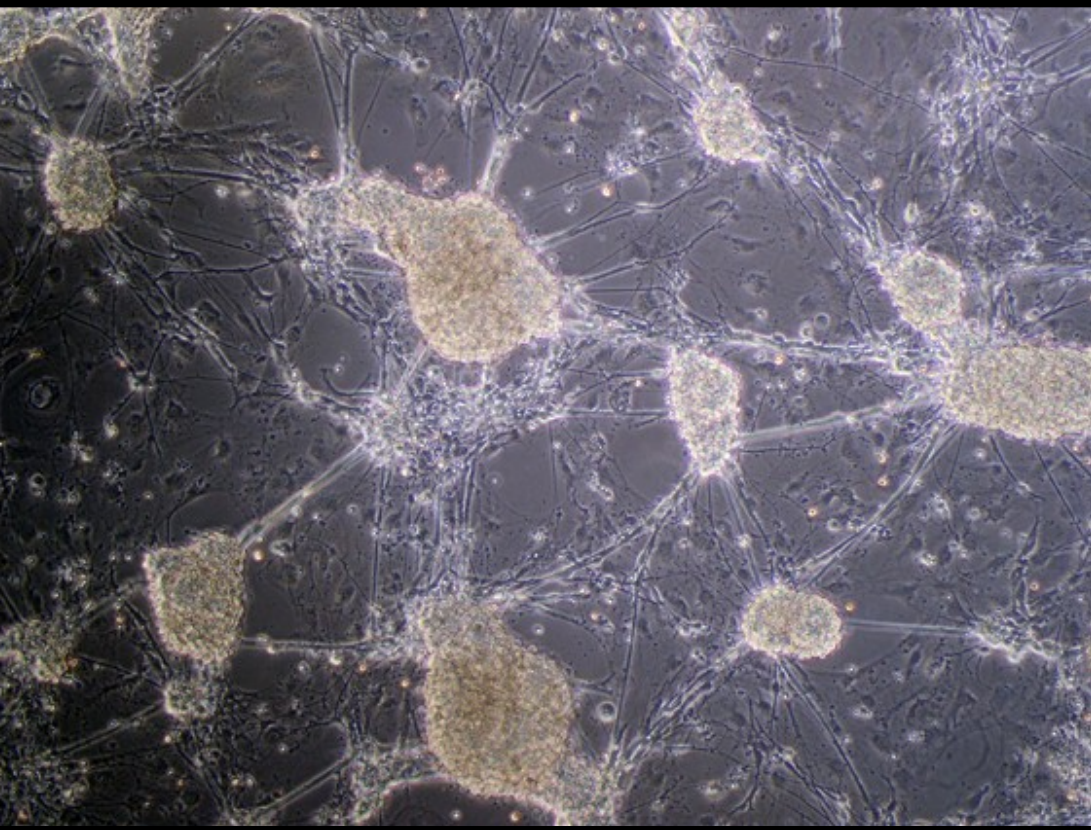
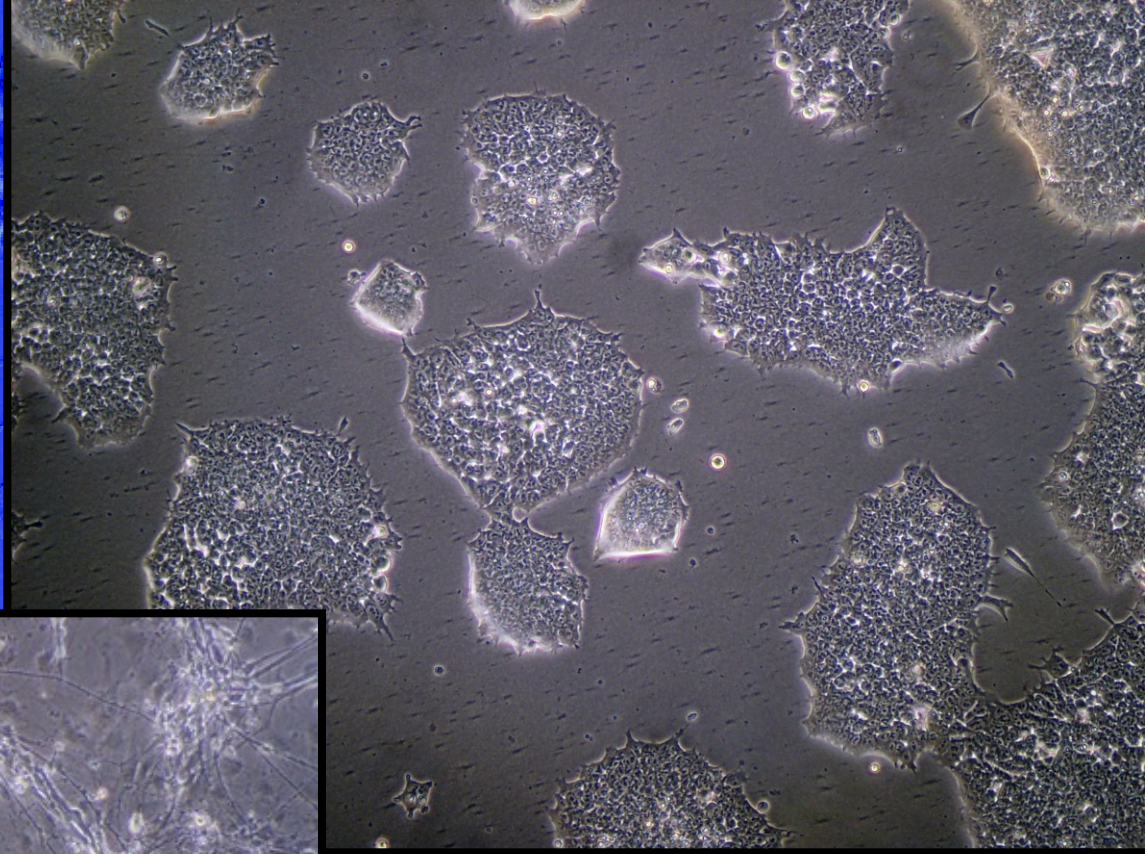


Model pro studium vzniku a zachování somatických kmenových buněk v našich experimentech

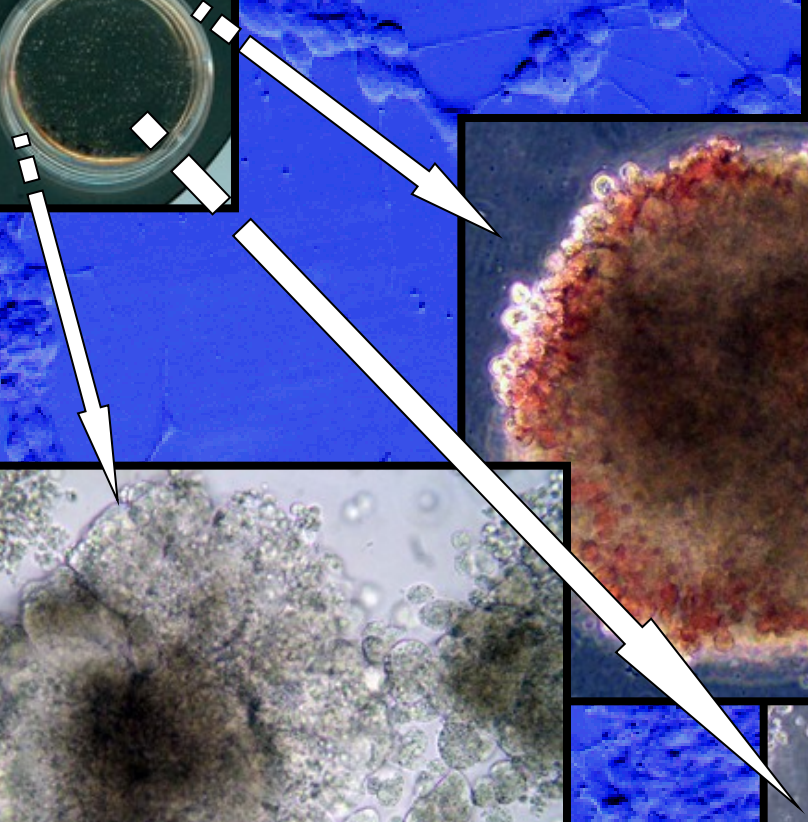
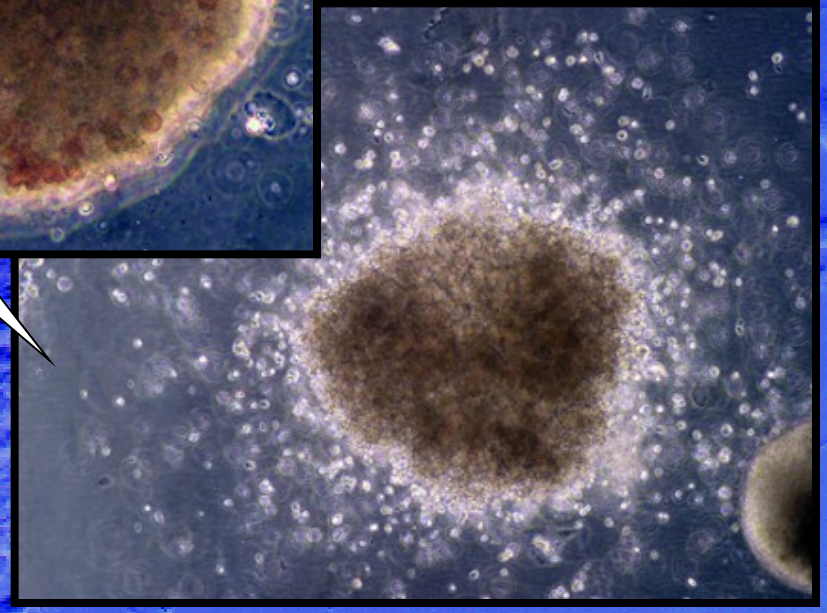
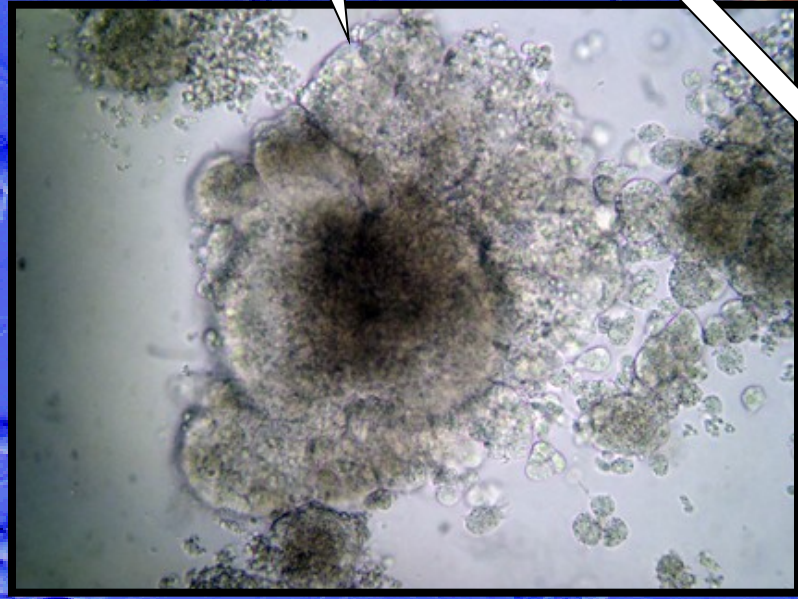
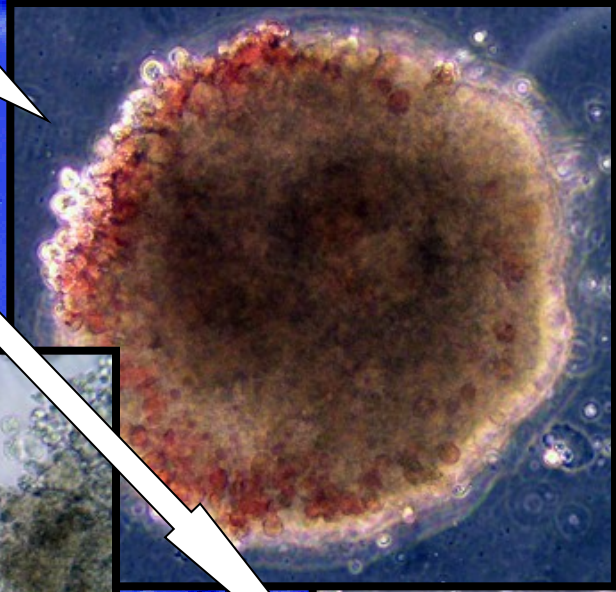
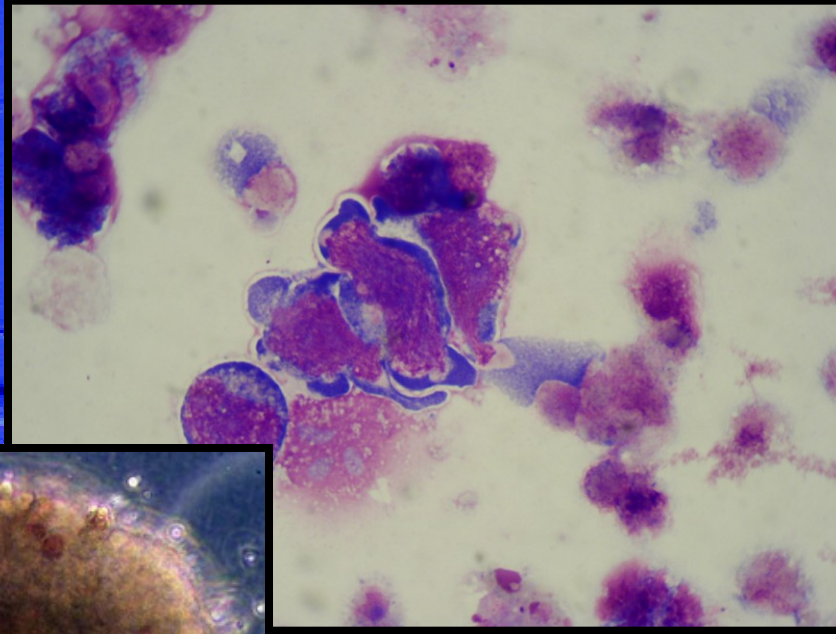
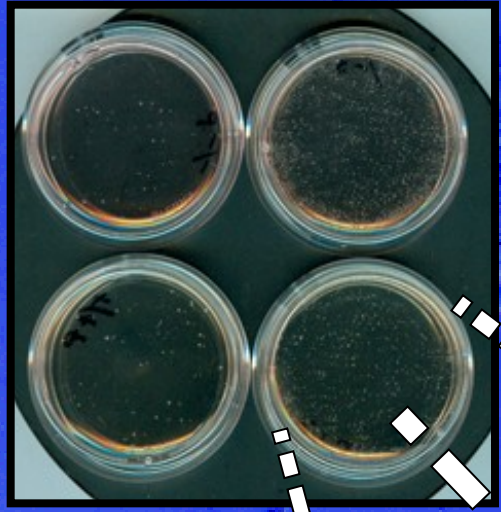


- četnost vzniklých somatických kmenových buněk
- jejich vlastnosti (fenotyp a potenciál pro další diferenciaci)

Neurogeneze



Hematopoéza

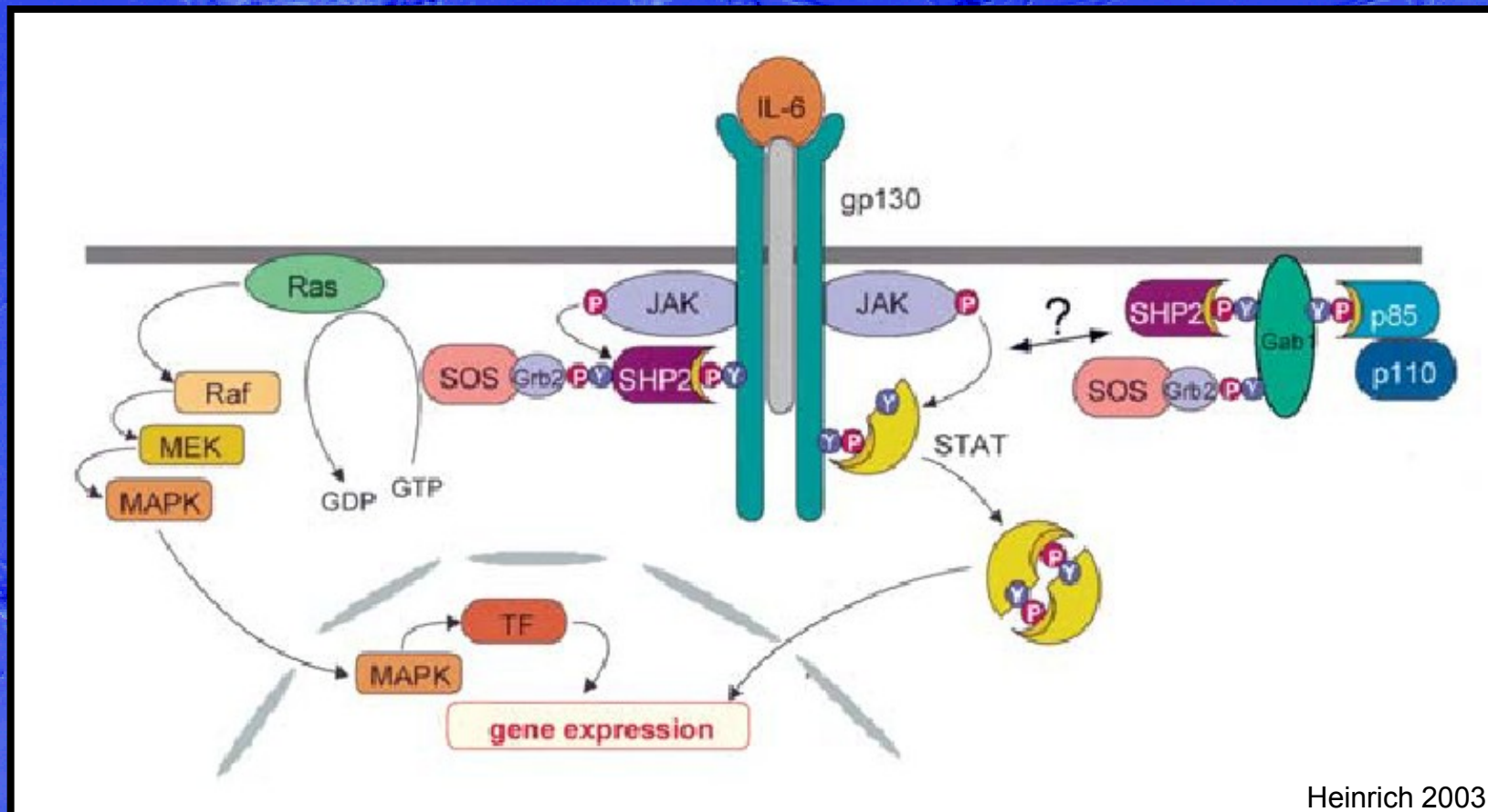


Laboratoř





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

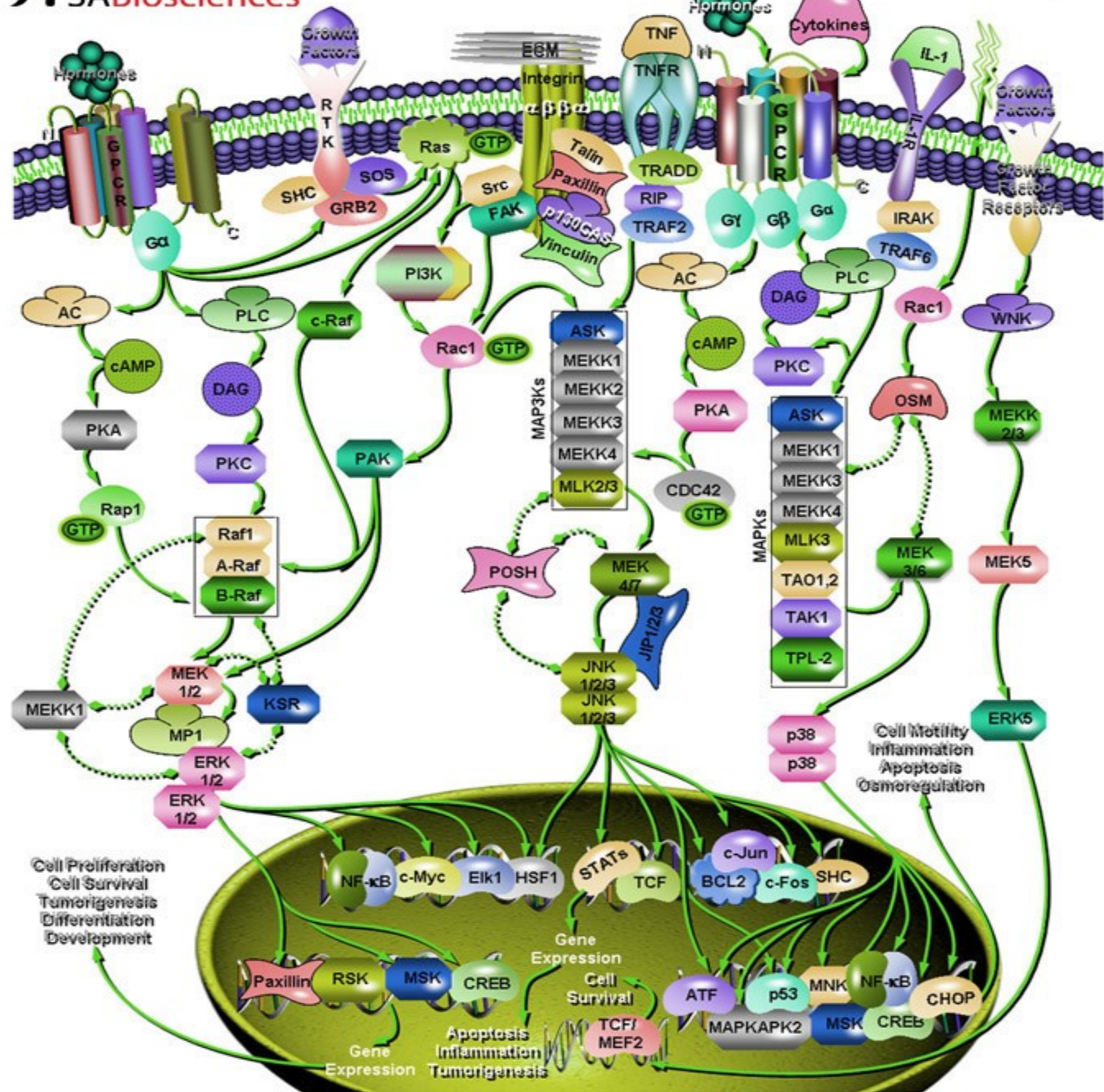


Heinrich 2003

JAK – Janusova kináza (tyrosin kináza)

STAT – transduktor signálu a aktivátor transkripce

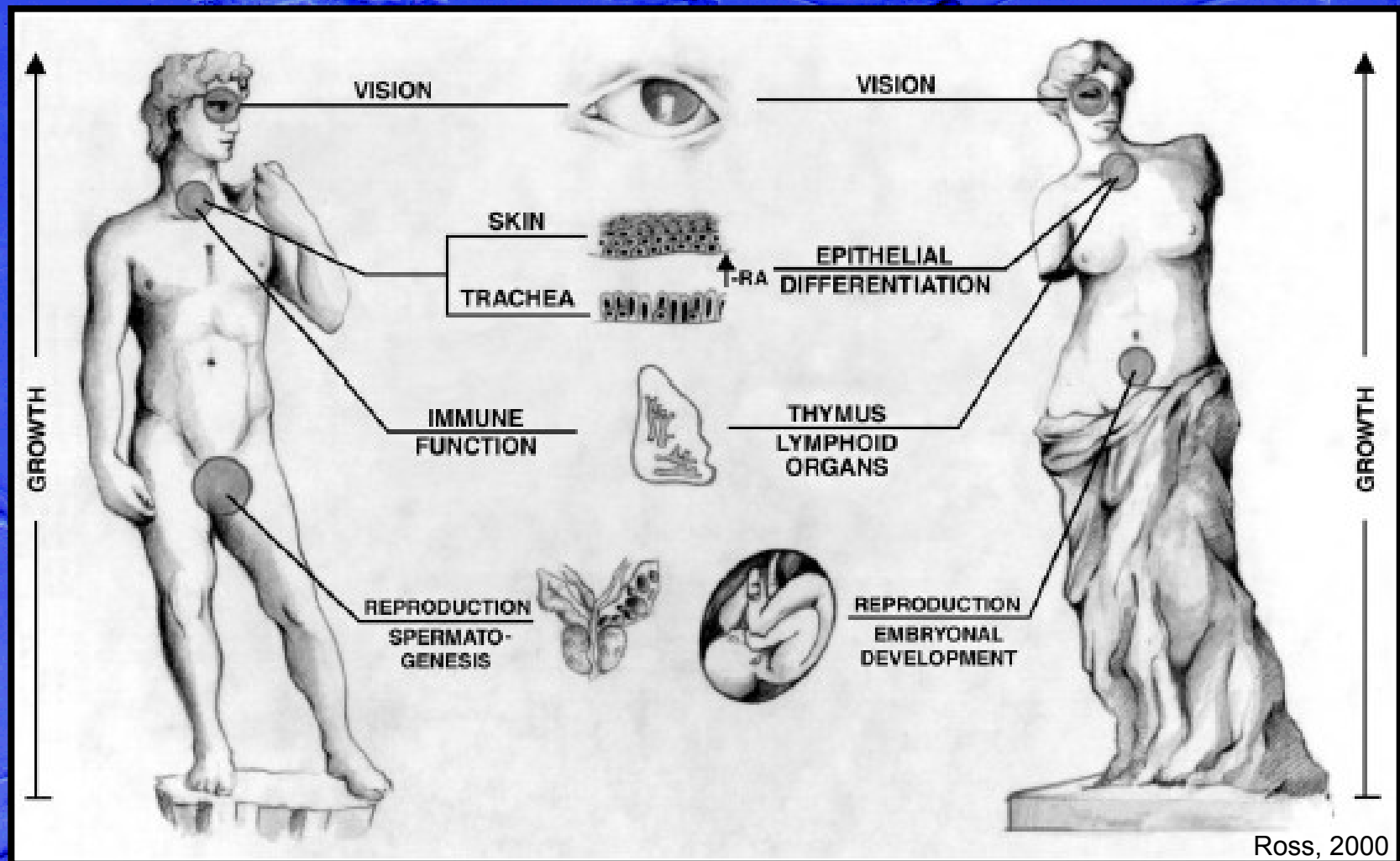
(signal transducer and activator of transcription)



Výběr nejvýznamnějších oblastí vyžadujících metabolismus retinolu/vit.A

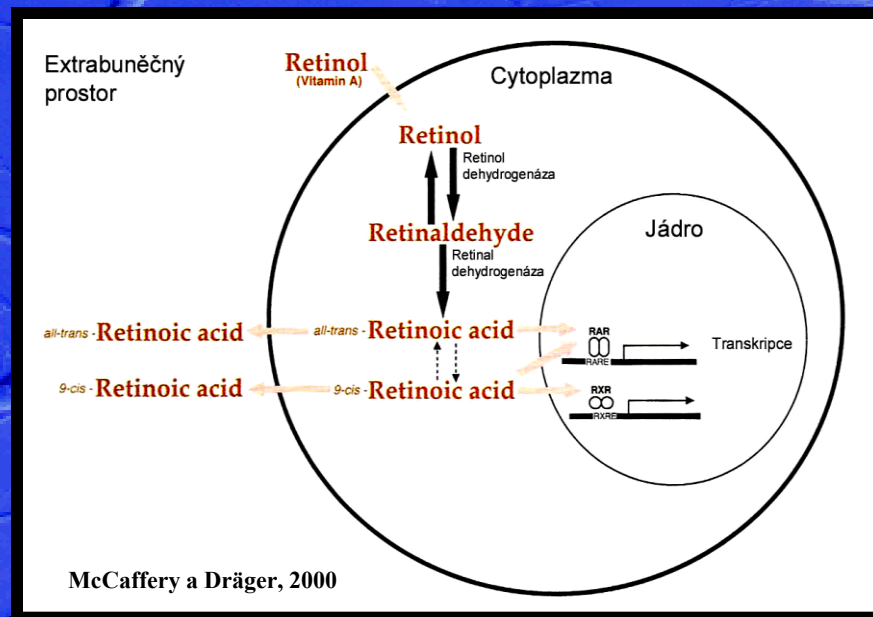
A) fotorecepce

B) růst a vývoj organismu



Kyselina retinová - RA

- velmi silný induktor
- pleiotropní působení



ES / EC + EB + RA

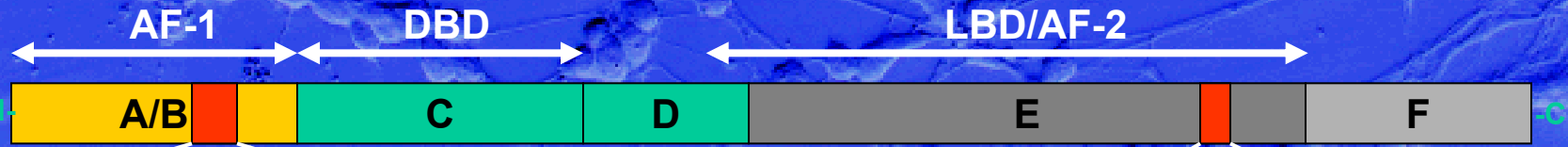
- buňky neurální
- buňky kosterní svaloviny a adipocyty
- buňky srdeční a hladké svaloviny

↑
nM RA

ES / EC + monovrstva + RA

- buňky primitivního entodermu
- neurální buňky (motoneurony?)

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



RAR α 1 EEIVPS⁷⁴PP**S⁷⁷**PPPLPR

RKRRP**S³⁶⁹**RP

RAR β 2 EELVPS⁶⁷PPS⁷⁰PLPPPR

RKRRP**S³⁶²**KP

RAR γ 2 EEMVPS**S⁸⁶**P**S⁸⁹**PPPPPR

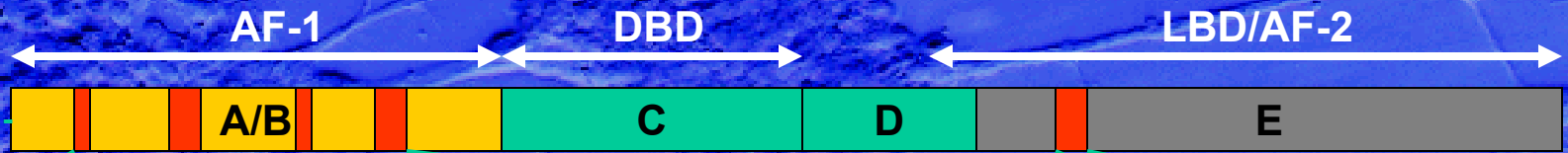
MAPKs + cdk7

RRRRP**S³⁶⁰**QP

PKA

RAR γ 1 EEMVPS**S⁷⁷**P**S⁷⁹**PPPPPR

RRRRP**S³⁷¹**QP



SSSLN**S²²**PTGR...S⁴⁴P.. S⁴⁸P.. S⁵⁴P... SS⁶¹P.. **S⁷⁵**P..PTT⁸⁷P S⁹⁶P..S¹⁰¹P

LNP**S²⁶⁸**PNDP

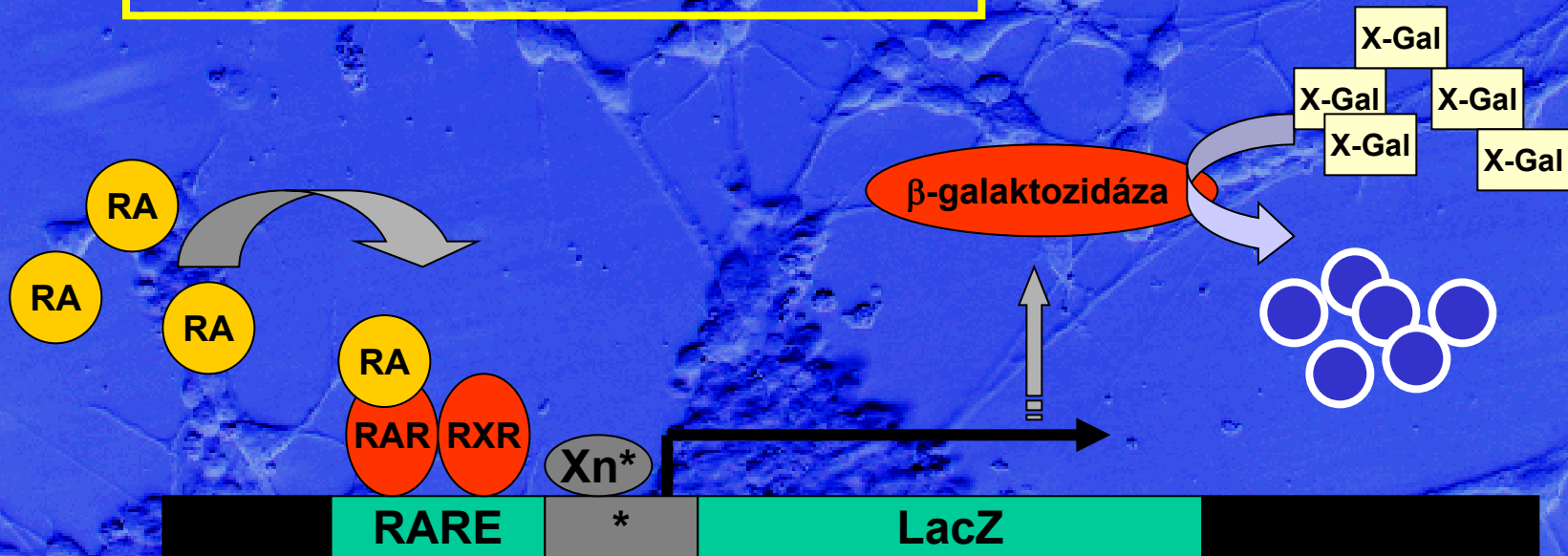
JNK1 + JNK2

AF-1 (A/B doména) – oblast regulující aktivaci transkripce, nezávisle na ligandu

DBD (C doména) – DNA vázající doména (DNA-binding domain)

LBD/AF-2 (D/E doména) – oblast regulující aktivaci transkripce, závislé na ligandu

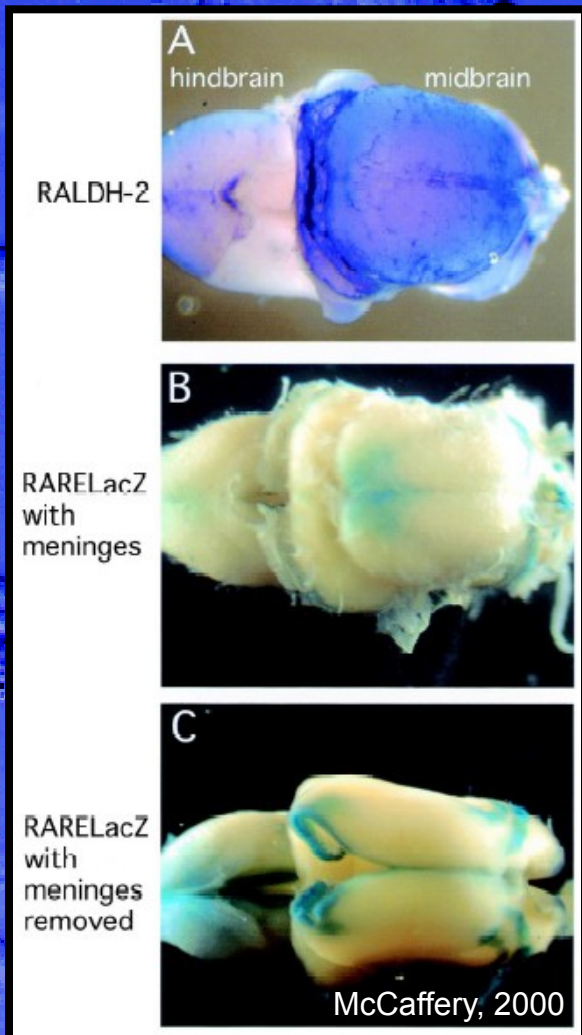
**System pro detekci RA v buňkách/tkáních
(RARE-LacZ reportér)**



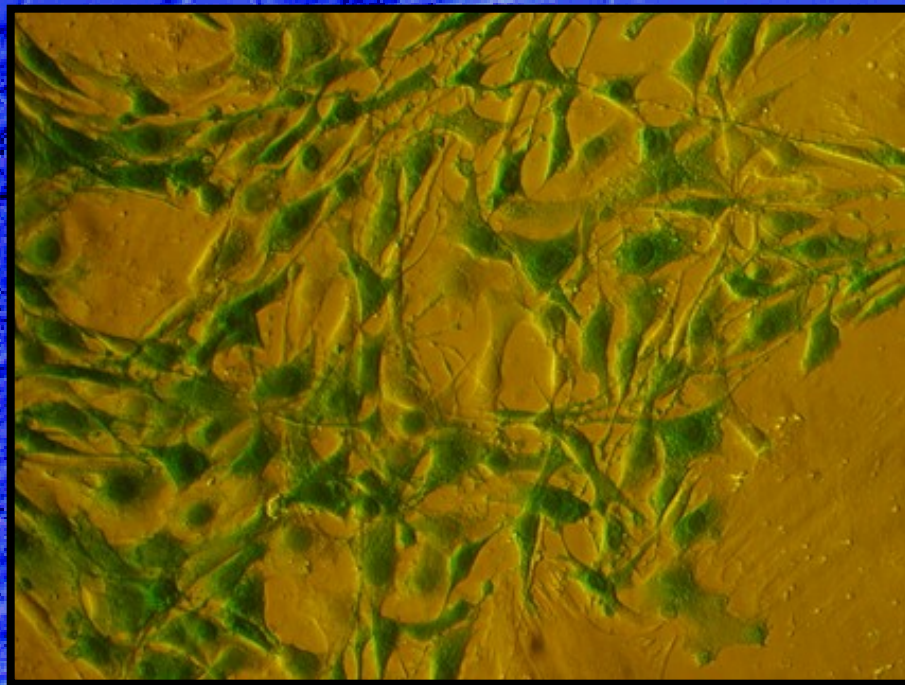
*další faktory/sekvence nezbytné pro funkci promotoru

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

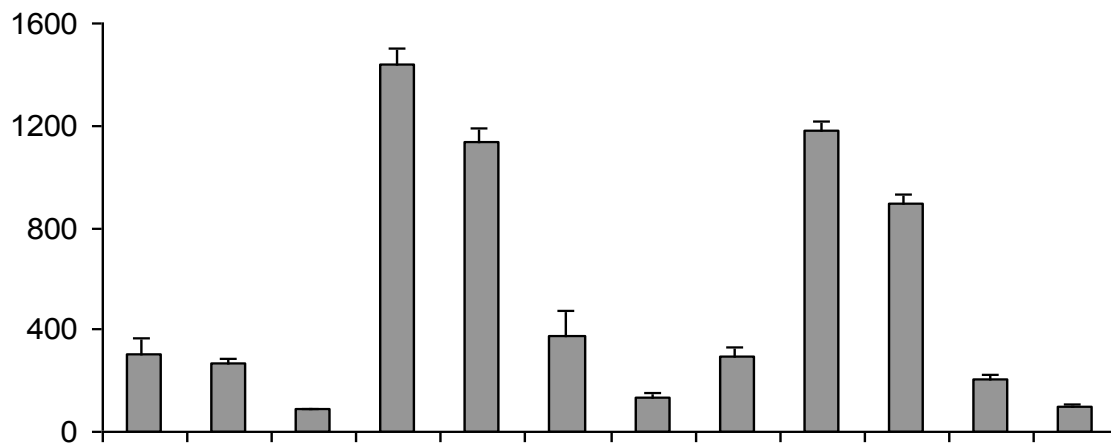
- A) In situ hybridizace mRNA RALDH-2
- B + C) RARE aktivita (RARE-LacZ reporter)



Detekce buněk exprimujících indukovanou β -galaktosidázu

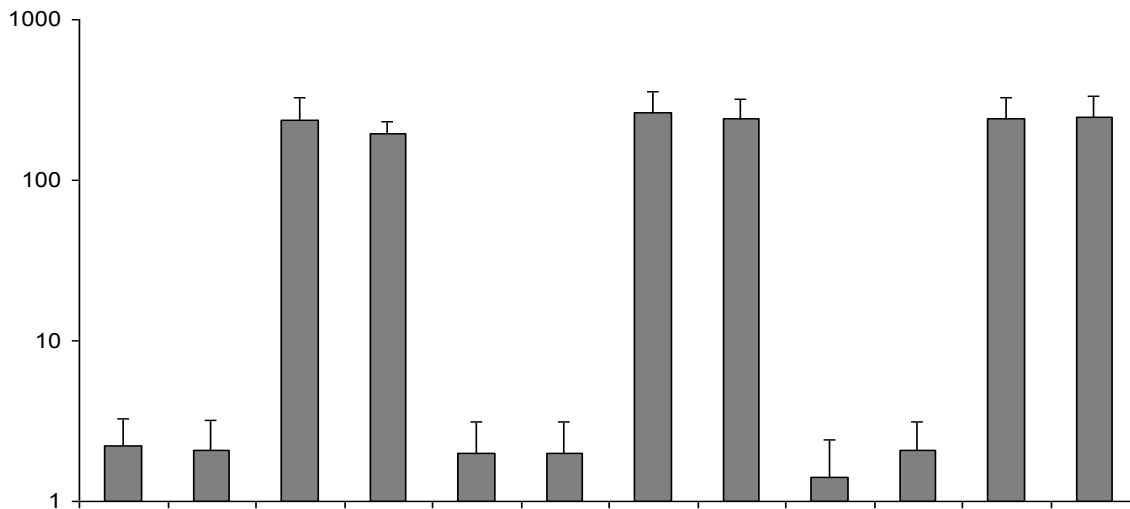


Relative luciferase activity



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

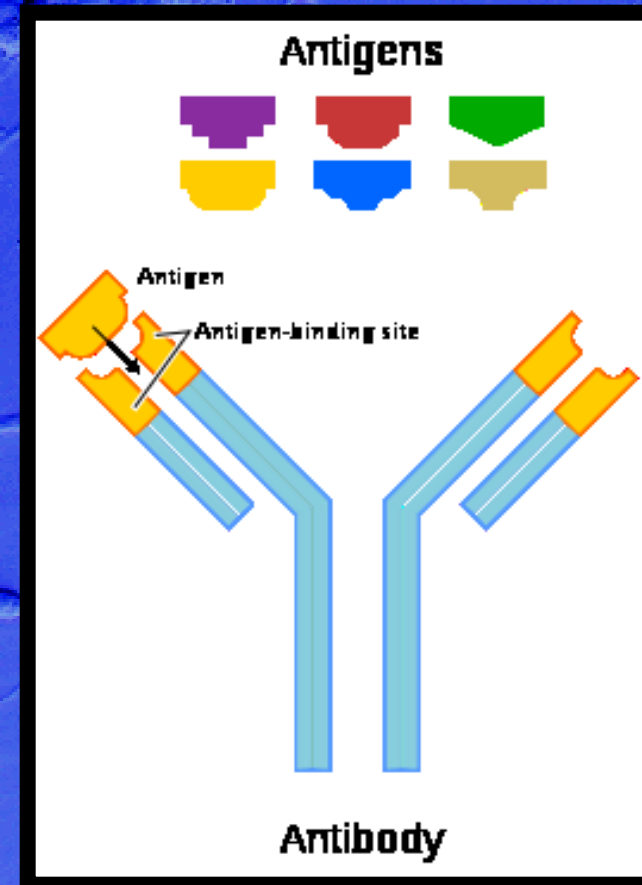
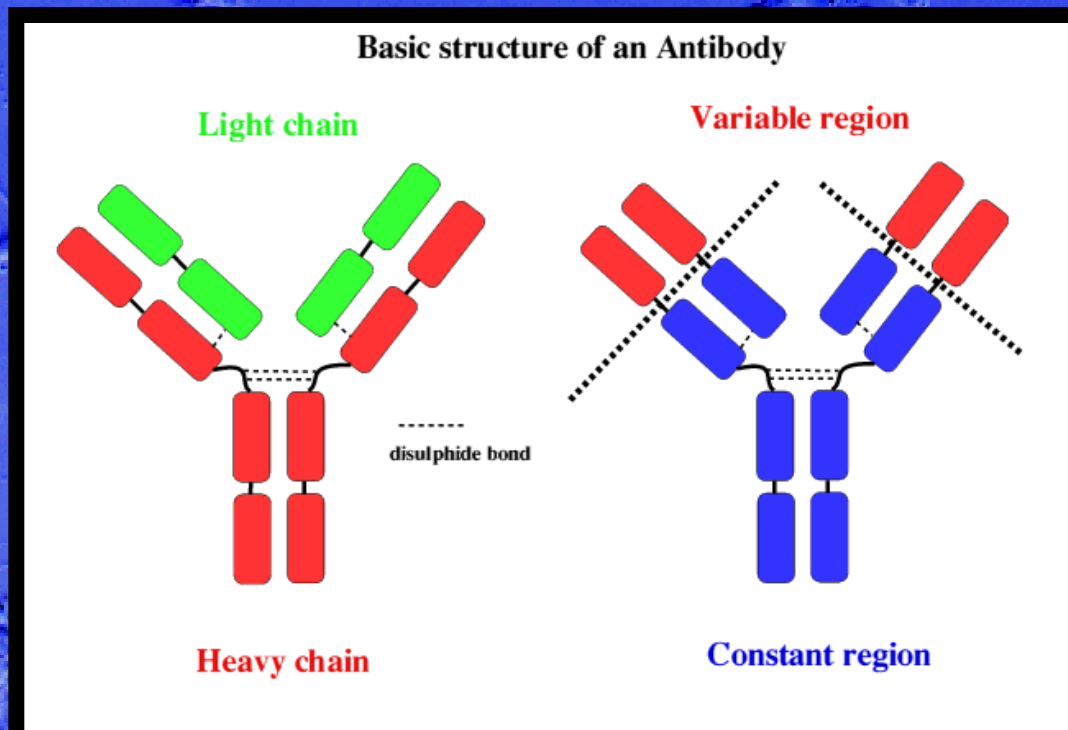
Relative luciferase activity



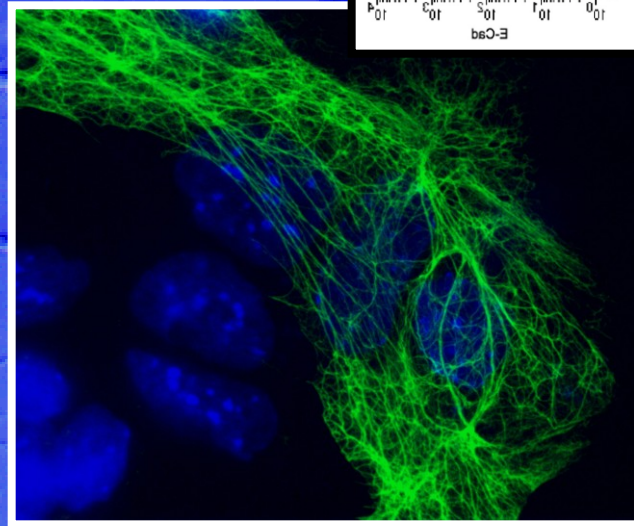
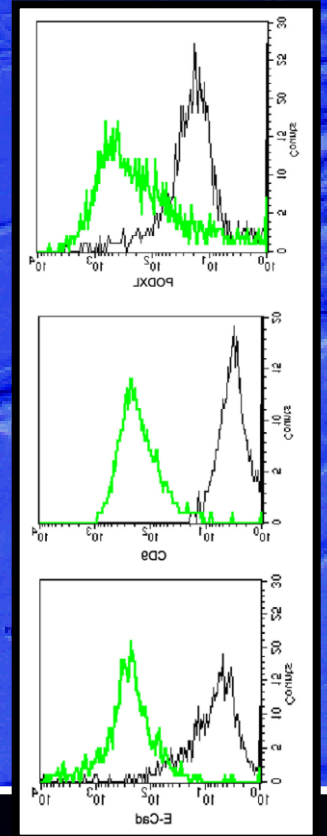
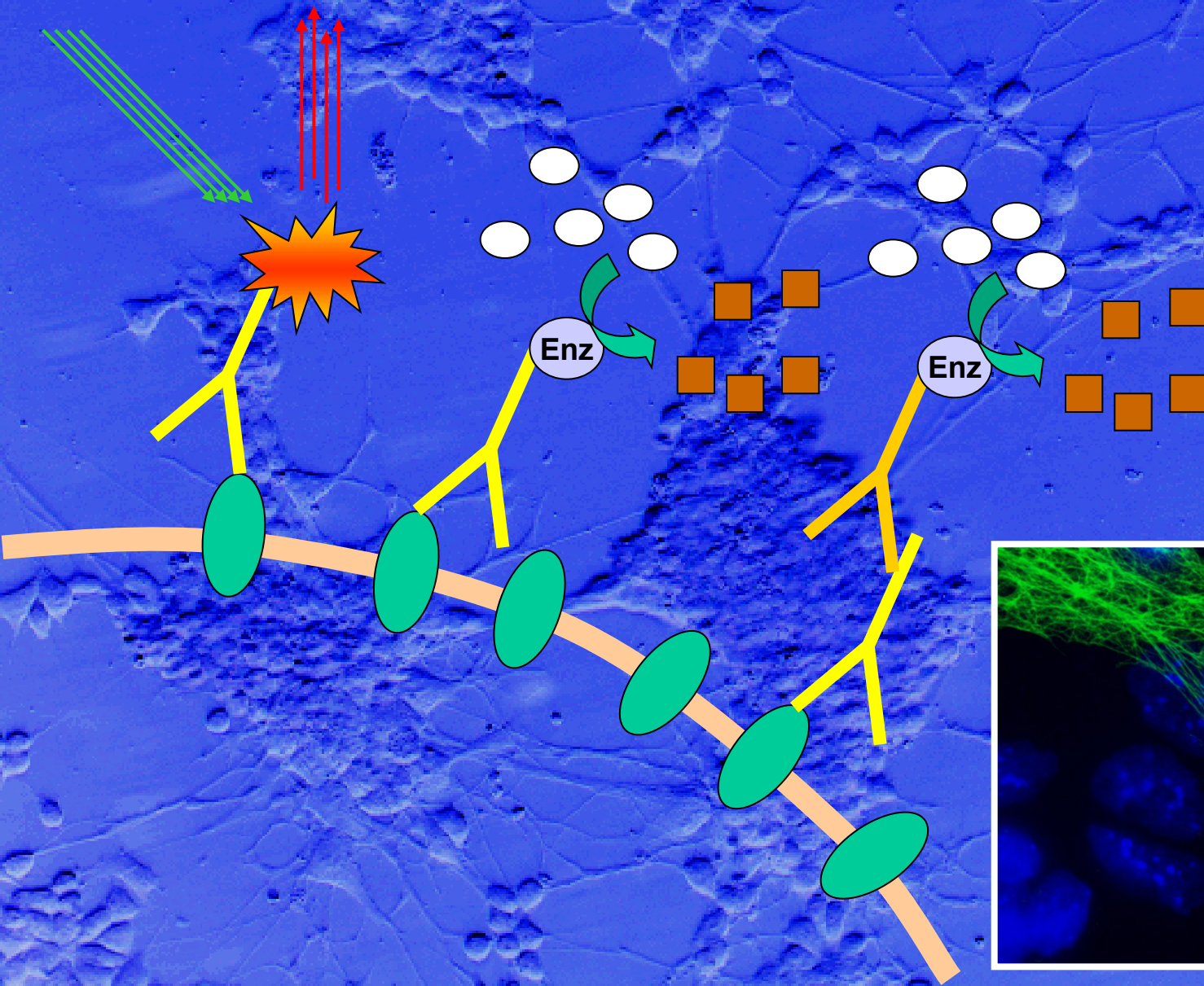
RA	LIF	AG490 (5 μM)	UO126 (5 μM)
-	-	-	-
-	+	-	-
+	-	-	-
+	+	-	-
-	-	+	-
-	+	+	-
+	-	+	-
+	+	+	-
-	-	-	+
-	+	-	+
+	-	-	+
+	+	-	+

Protilátky - Ab = antibody

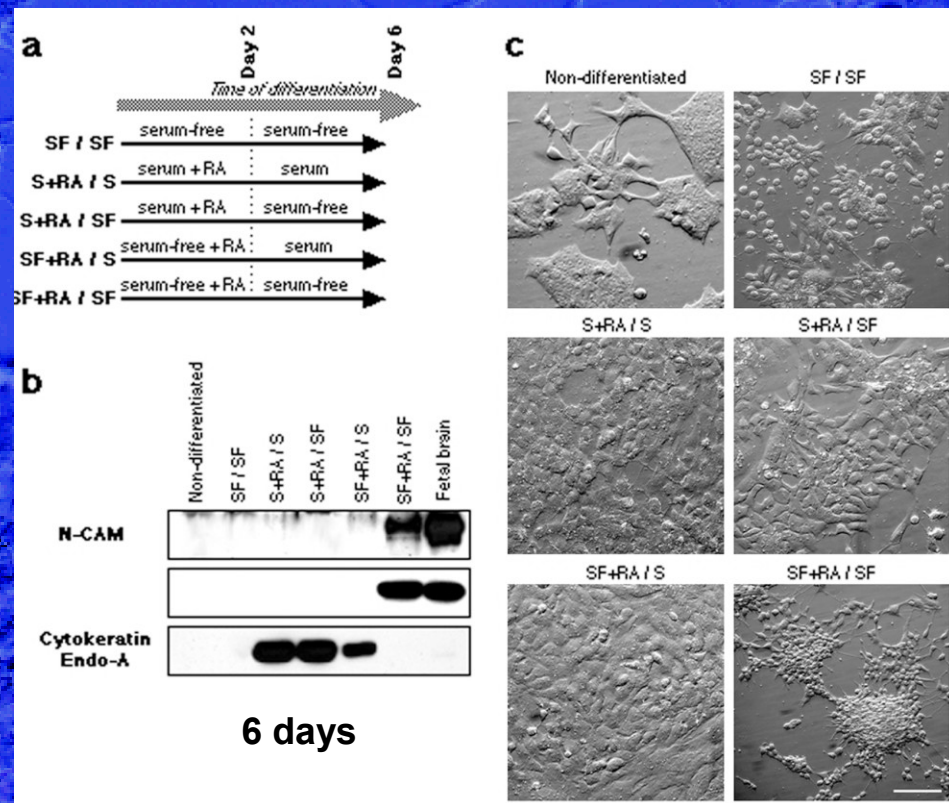
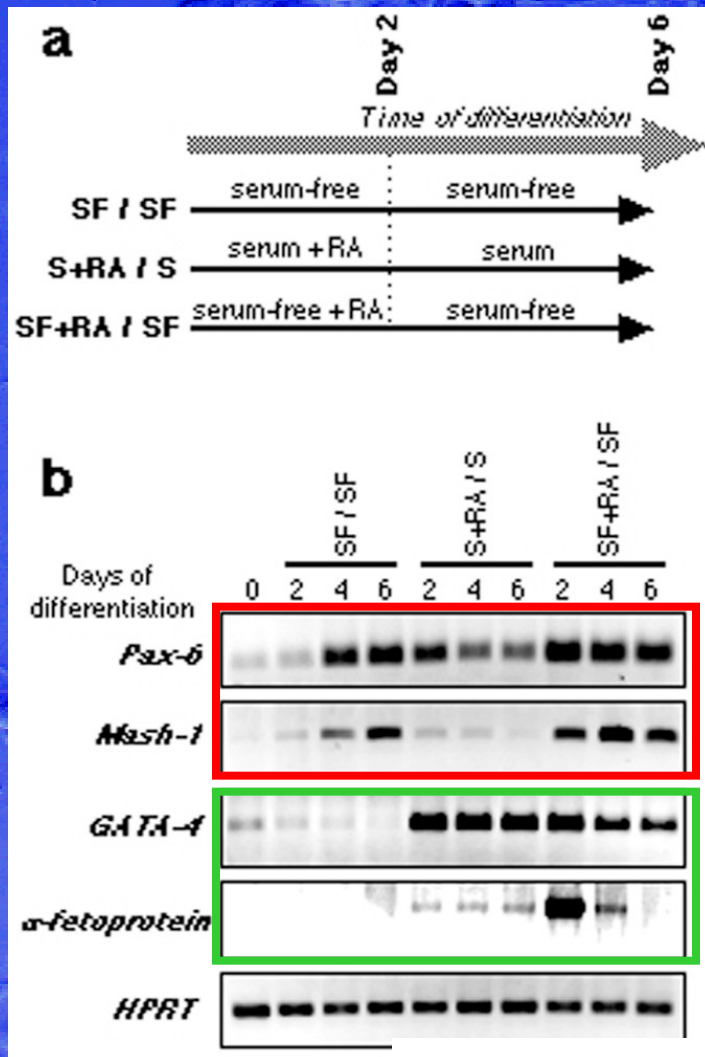
- produkt B-lymfocytů/plasmatických buněk
- rozpoznání cizorodého materiálu - antigenu
=> regulace imunitních/obránných reakcí
- detekce antigenů ve výzkumu
- monoklonální x polyklonální
(jeden nebo více klonů produkujících buněk)
- primární x sekundární x terciální ...



Schematický princip imunodetekce



Účinek séra na RA indukovanou neurální diferenciací

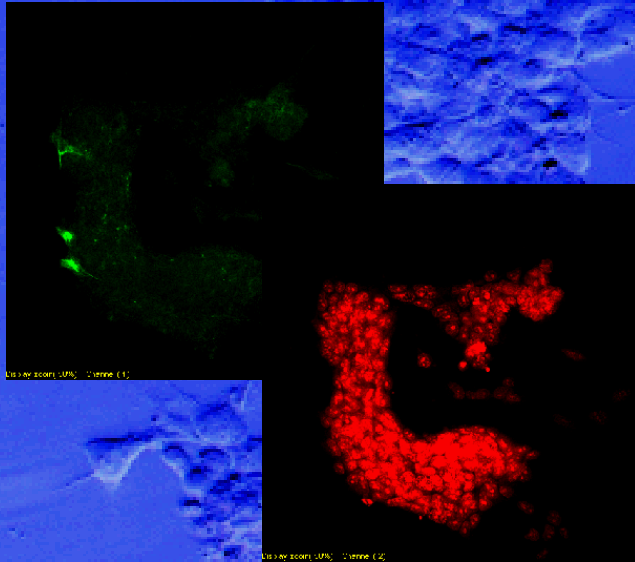


RT-PCR analýza exprese liniově specifických genů

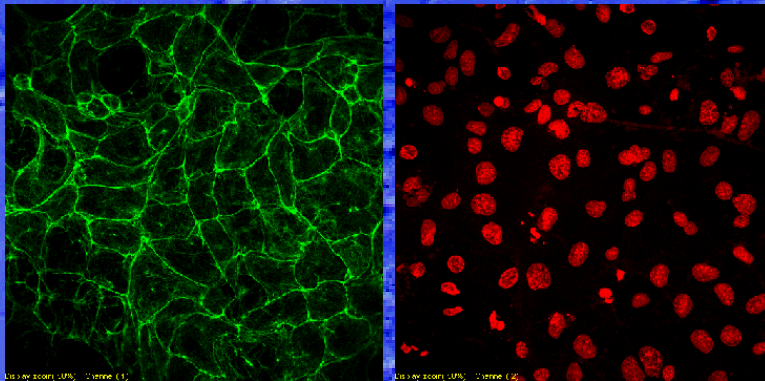
- neuroektoderm
- entoderm

Nediferencované buňky EC P19

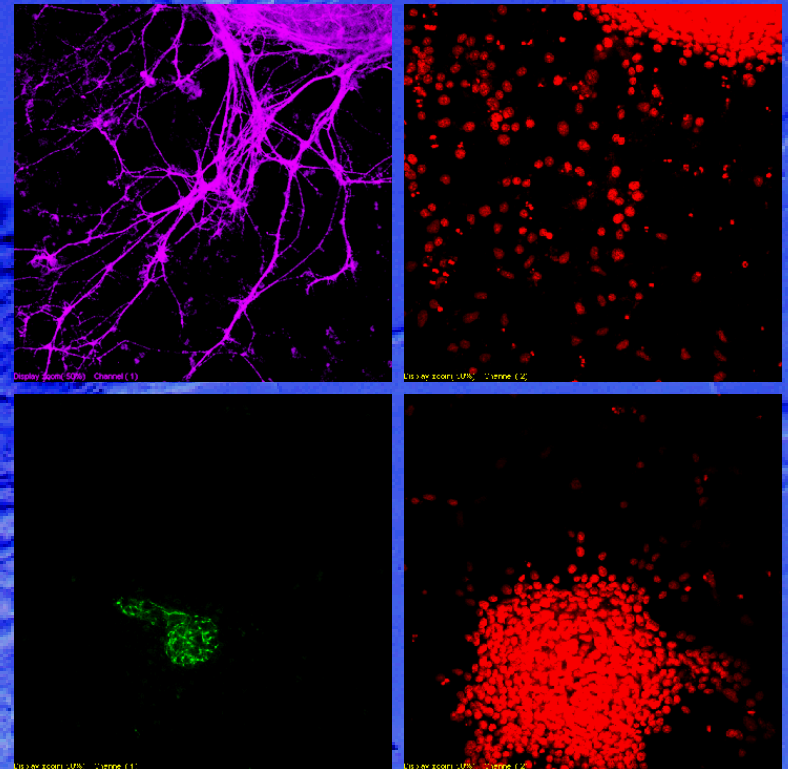
- ◆ **buněčná jádra**
- ◆ **cytokeratin EndoA pozitivní buňky – entoderm**
- ◆ **N-CAM pozitivní buňky - neurony**



Diferencované buňky EC P19 monovrstva + RA + sérum

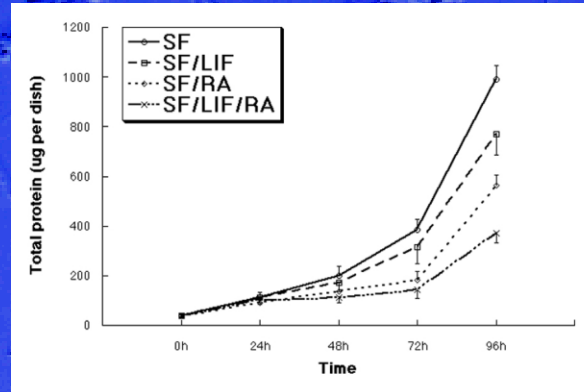


Diferencované buňky EC P19 monovrstva + RA - sérum

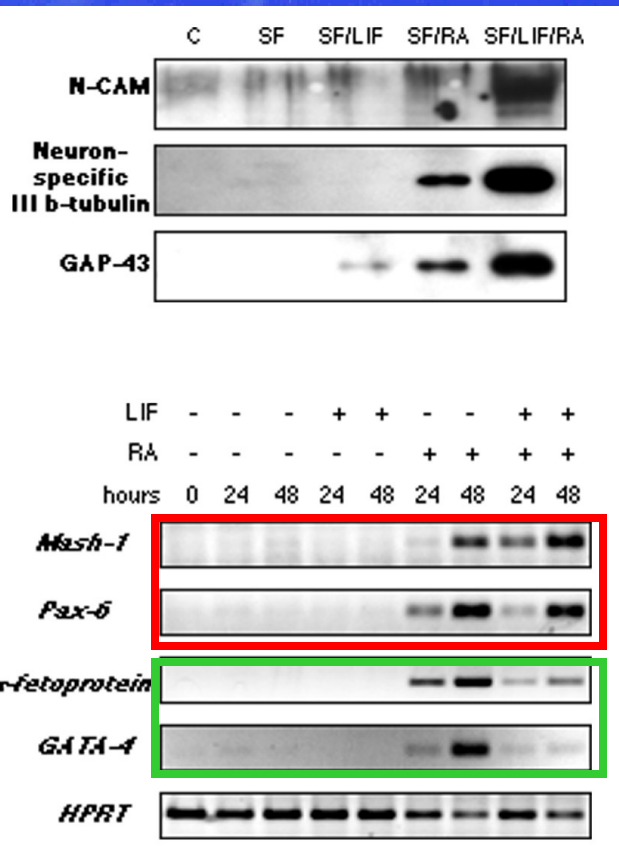


Leukemie inhibující faktor (LIF) posiluje RA indukovanou neurální diferenciaci EC buněk linie P19

Proliferace

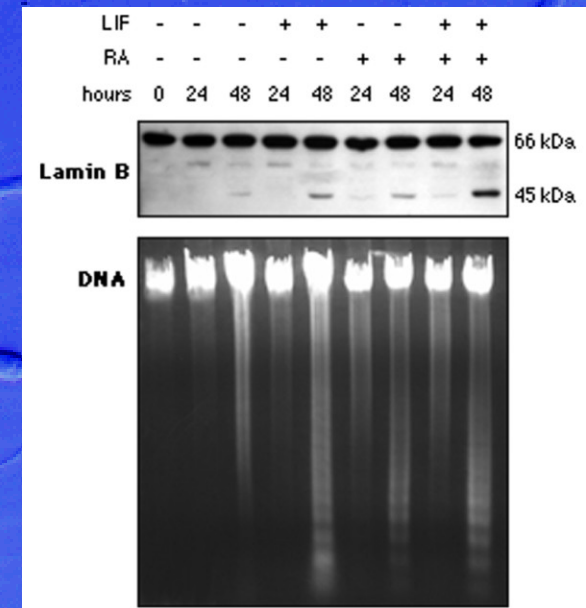


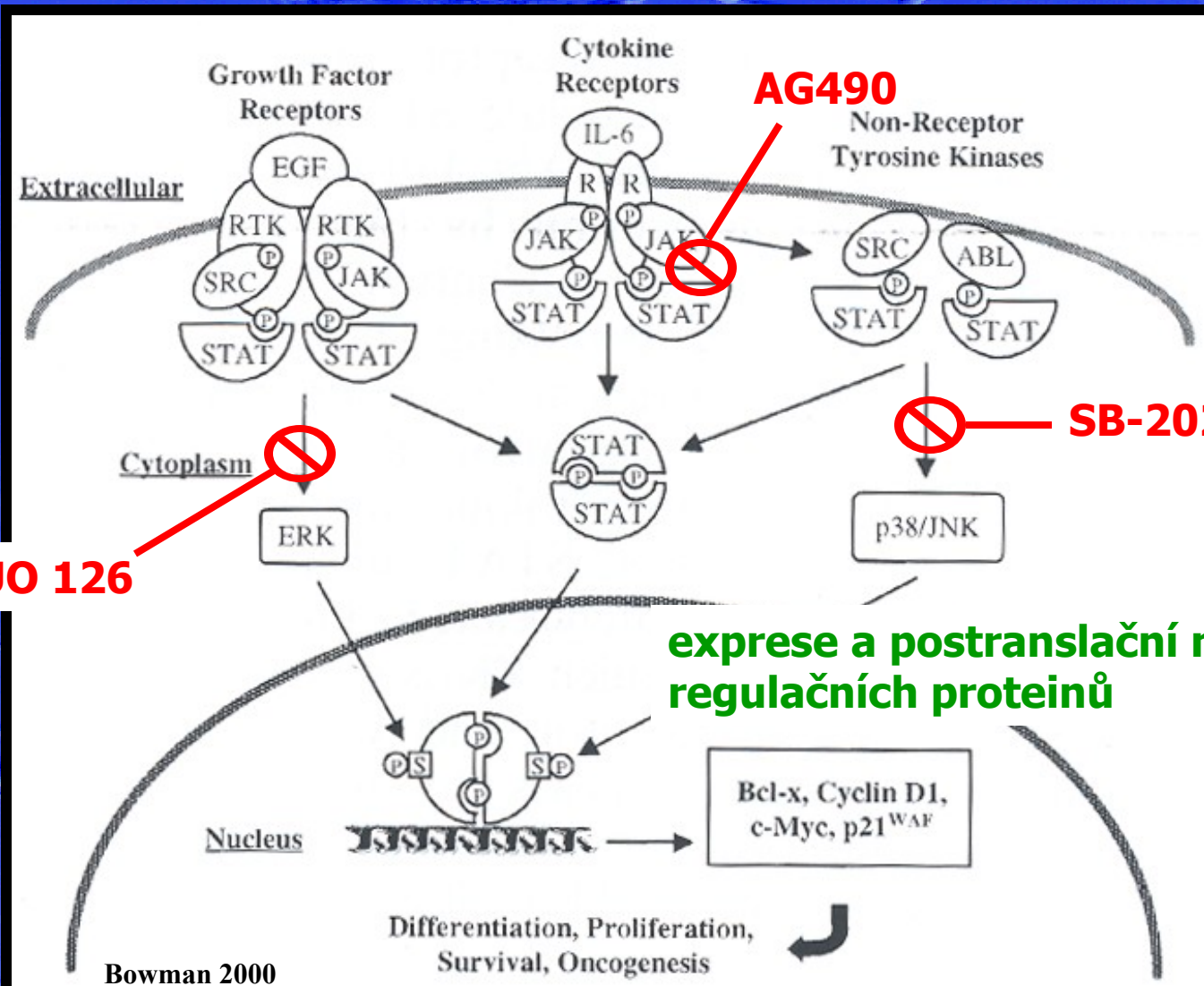
Diferenciace



- neuroektoderm
- entoderm

Apoptóza





UO 126

AG490

SB-202190

expresse a postranslační modifikace regulačních proteinů

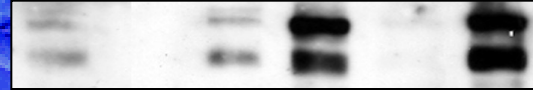
**transkripční aktivita Stat-3 (reporter pAPRE-luc)
transkripční aktivita AP-1 (reporter p3TP-Lux)
transkripční aktivita RAR/RXR (reporter pRAREβ2-luc)**

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

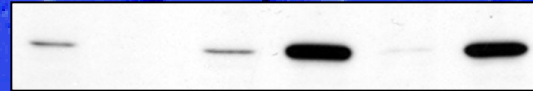
4 ds

← RA → ← RA+LIF →

N-CAM



Neuron-specific III β -tubulin



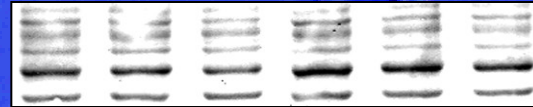
AG 490

- + - - + -

UO 126

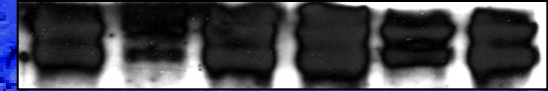
- - + - - +

Total protein



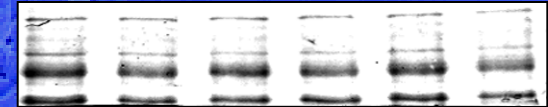
6 ds

← RA → ← RA+LIF →



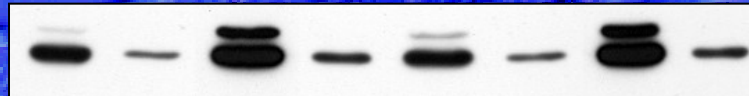
- + - - + -

- - + - - +

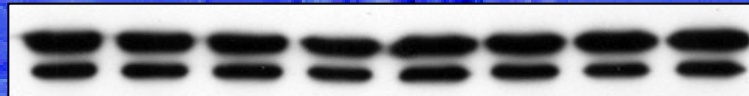


Detekce fosforylace (posttranslační modifikace) Erk kinázy (specifické protilátky)

P-Erk



Erk



UO126

- + - + - + - +

LIF

- - + + - - + +

RA

- - - - + + + +