

## **Somatické kmenové buňky – SSCs (Somatic stem cells)**

- Podílejí se na regeneraci tkání, orgánů a homeostázi obecně
- Mnohé jsou minimálně multipotentní
- Kromě profesionálních SSC, existuje i množství fakultativních typů
- Případná pluripotence nebyla dosud prokázána

**Jak vypadají, jaké mají vlastnosti a schopnosti ?**

**Mají adultní SSCs stejný potenciál jako embryonální SSCs?**

**Jsou všechny stejné, podobné, tkáňově specifické ?**

**Lze je kultivovat *in vitro* ?**

**Kde se nacházejí?**

**Jsou nesmrtelné?**

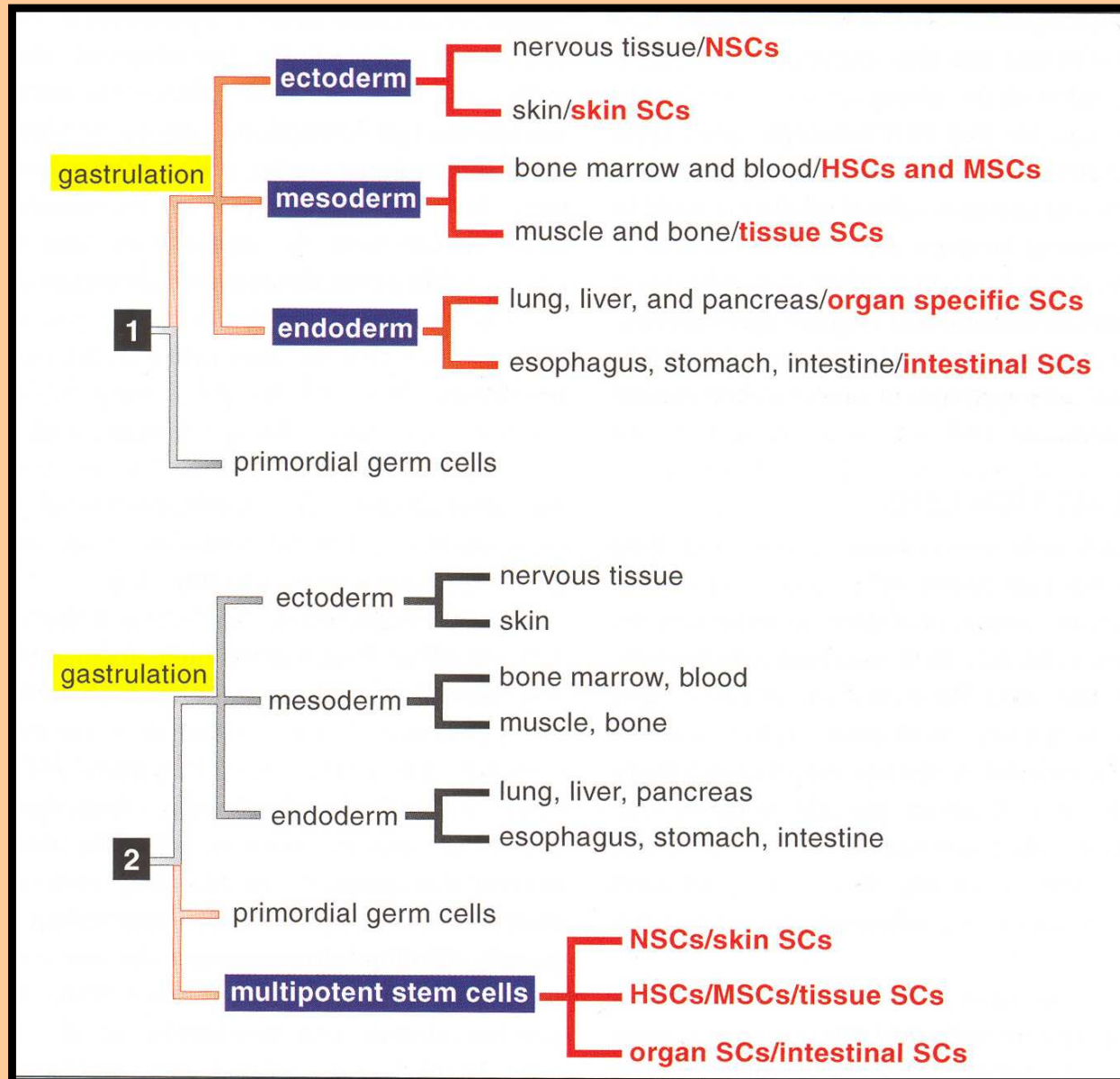
**„Existují?“**

## ADULTNÍ x EMBRYONÁLNÍ somatické kmenové buňky

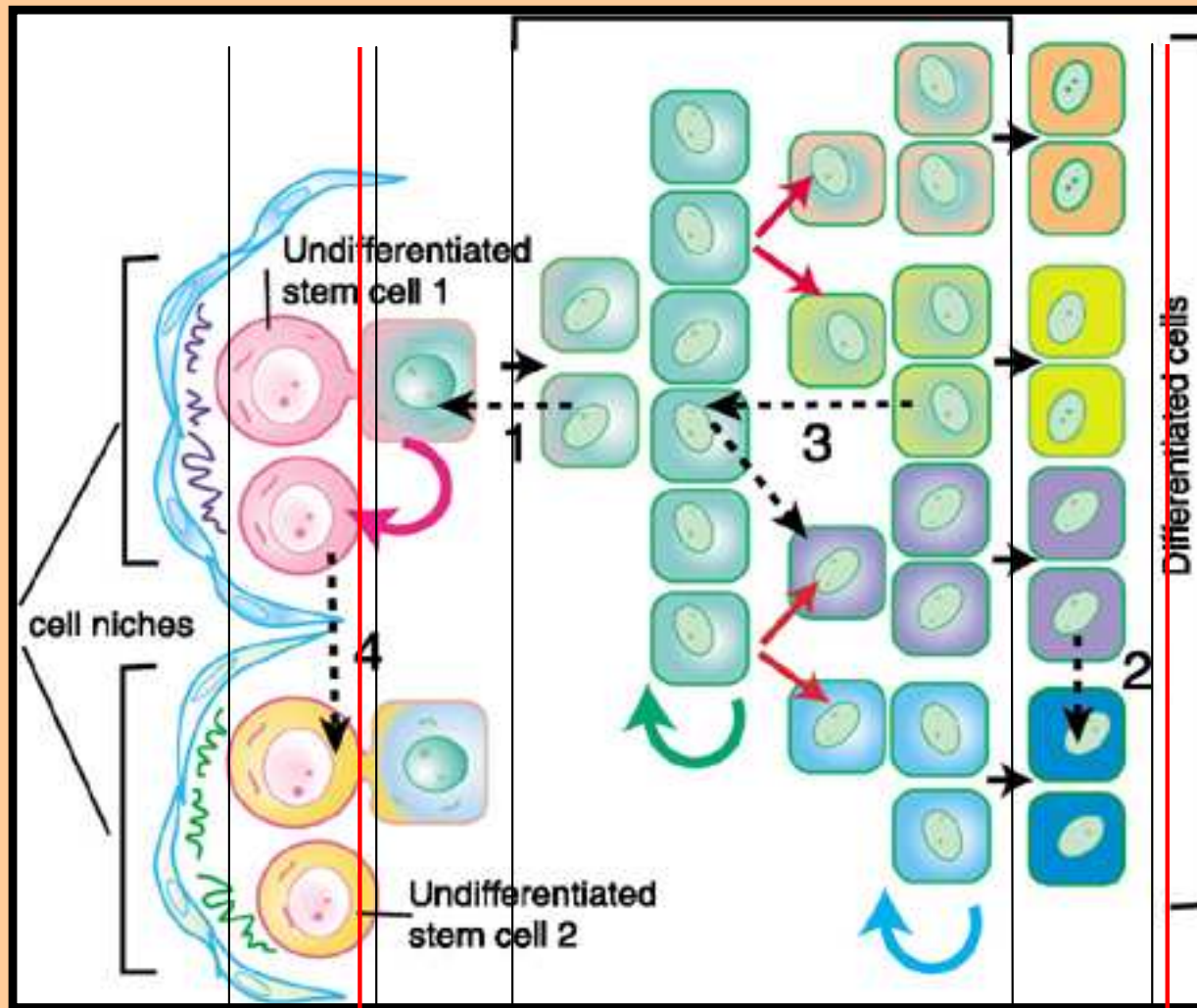
### Embryonální somatické kmenové buňky

- Během embryogeneze dávají vznik tkáním a orgánům
- Případná pluripotence nebyla dosud prokázána
- Během časně embryogeneze se intenzivně dělí, později již méně (???)
- Lze je izolovat a množit *in vitro* (zatím pouze po omezenou dobu)
- Pravděpodobně jsou schopné transdiferenciace (?)
- Tvoří solidní nádory (možná i teratomy?!?) po injikaci do imunitně tolerantního organismu (všechny ??)
- Ačkoliv jsou v mnoha ohledech podobné somatickým kmenovým buňkám z dospělého organismu (mnohé znaky, podmínky kultivace a izolace), zdá se, že stejné nejsou.

# Původ SSC



# Biologie SSC



kmenové buňky  
(aktuální)

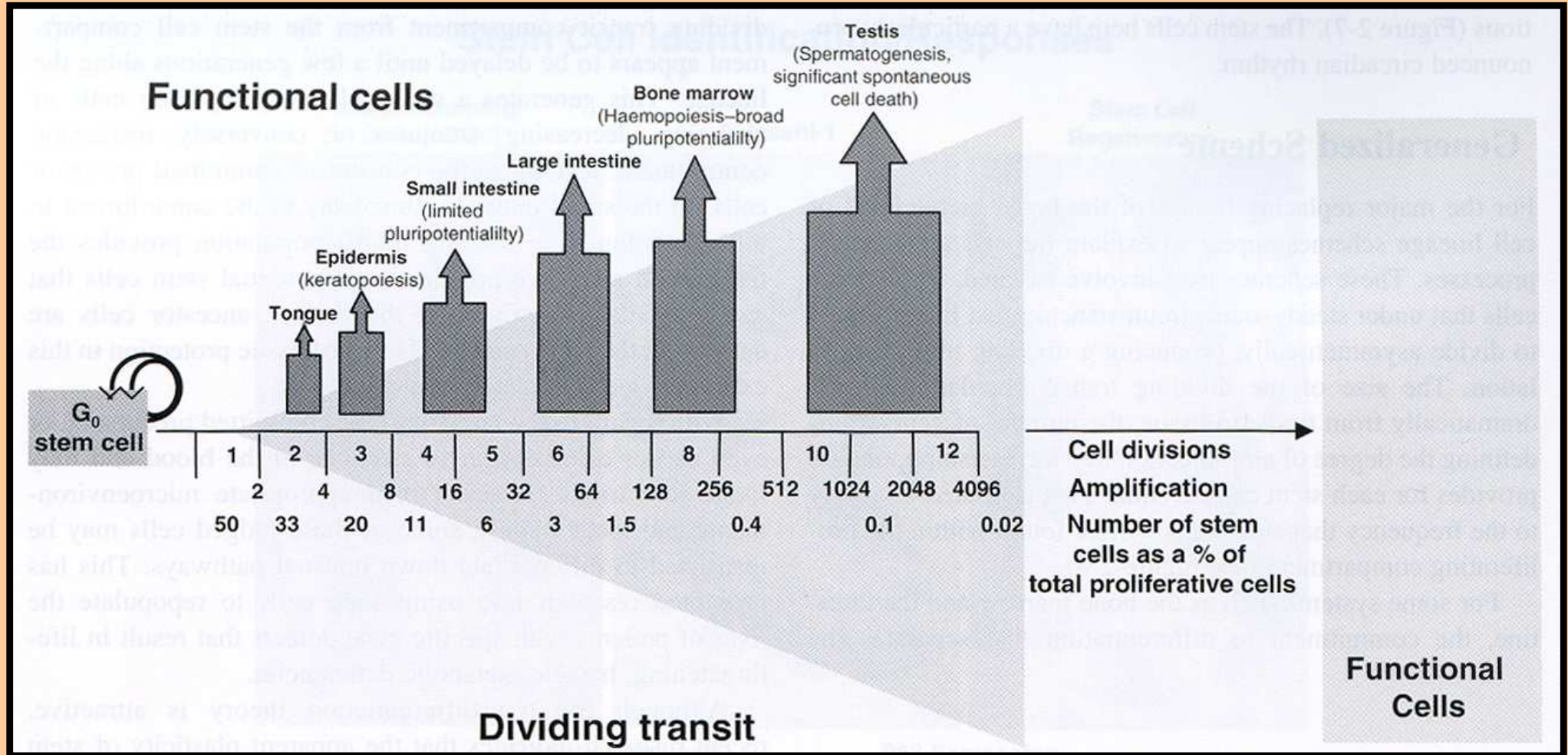
potenciální  
kmenové buňky

přechodně se dělicí  
progenitory

funkční  
terminálně  
diferencované buňky

přechodně se dělicí buňky

# Odhad generačních cyklů od kmenové buňky po funkční / terminálně diferencovanou buňku pro různé typy tkání u myši



## NICHE a jak být profesionální kmenovou buňkou

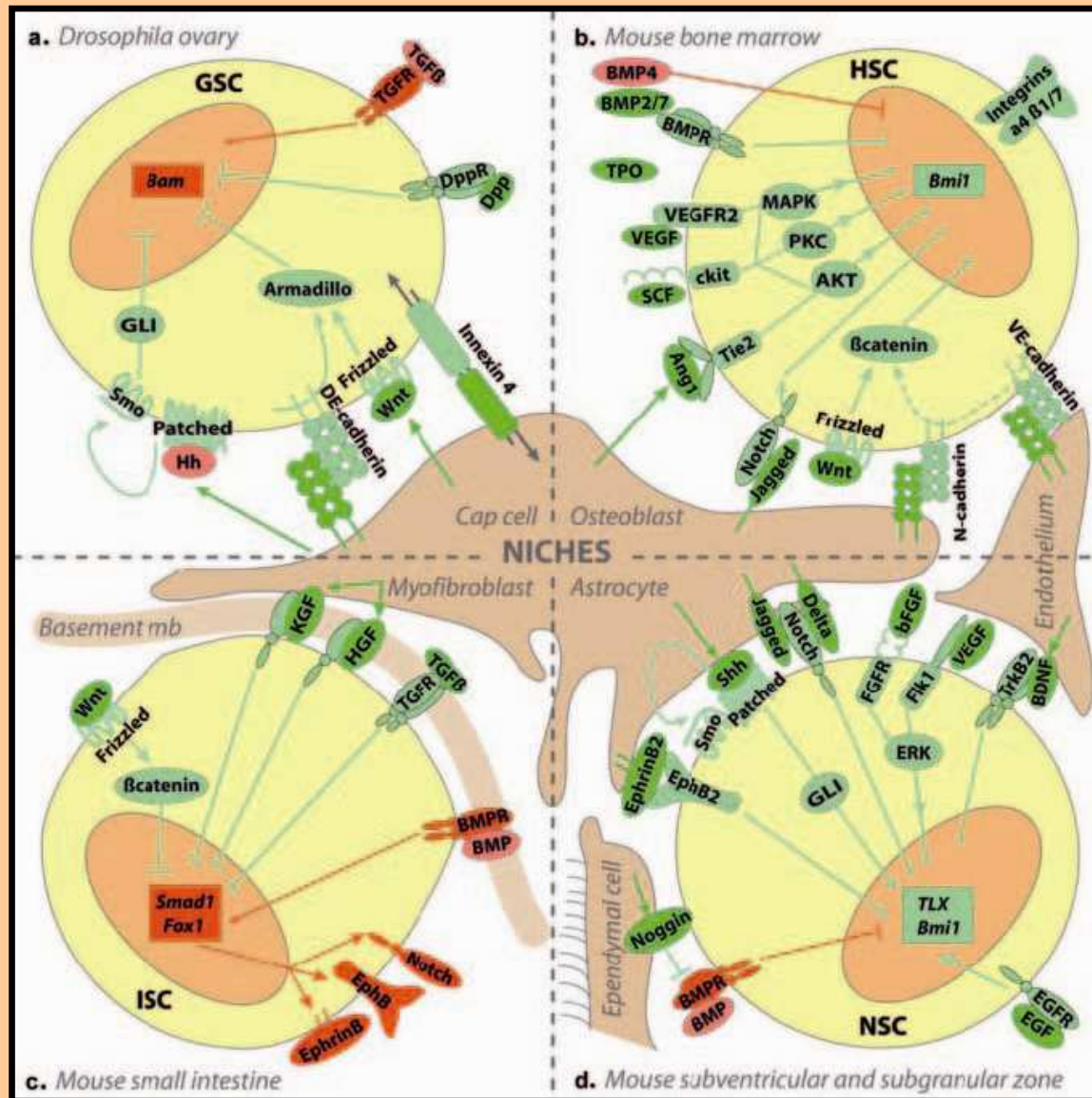
Stejně jako je v současnosti obtížné fyzicky uchopit jednotlivou SSC je velice těžké poznat, jak vypadá a jaké vlastnosti má prostředí, kde se SSCs nachází = niche. Profesionální SSCs mají tzv. nezralý fenotyp, tj. připomínají buňky značně časných vývojových stádií (z hlediska vývoje organismu / ontogeneze). Předpokládá se, že v závislosti na potřebách organismu buď vůbec neproliferují nebo jen pomalu. Intenzivnější proliferace se předpokládá v odpověď na poranění dané tkáně případně její jinou nedostatečnost. Tato proliferace, v odpověď na poranění, je *in vivo* u některých tkání, např. nervové, značně nedostatečná a tkáň má tak velice malou schopnost regenerace, na rozdíl např. od epitelů.

Pro mES je „niche“ feeder + LIF + nedefinované faktory séra (BMP není plně dostatečné z dlouhodobého hlediska). Je to jediný „dokonalý“ niche který umíme navodit v *in vitro* podmínkách, paradoxně u kmenových buněk, které přirozeně neexistují. *In vitro*, však při vhodné manipulaci a za dodržení výše uvedených podmínek mES představují nejhomogenější a ve vlastnostech i nejstálejší populaci kmenových buněk (2007 :o)). Zánik niche = zánik/diferenciace kmenové buňky. Opačný proces, navození niche (kdyby jsme ho znali) kolem progenitoru nebo terminálně diferencované buňky nevede ke vzniku buňky kmenové (analogicky k pokusům s ES a dalšími o SSCs „obohacenými“ populacemi SSCs. Je to pravděpodobně v důsledku ireverzibilně (z pohledu možností extracelulárního působení) změněných regulací „intrinsic“ faktorů, které si SSCs zachovávají z časných vývojových stádií ontogeneze. Toto dokazují i pokusy s exogeními expresemi takových faktorů v různých populacích dělicích se buněk (viz. reprogramování buněk).

# Co v NICHE najdeme?

růstové faktory, proteiny extracelulární matrix, povrchy buněk / buněčný kontakt, hypoxie, nedostatek živin?

Podobně jako se zdají být SSCs tkánově/orgánově specifické, budou specifické i jejich „niche“.



## Jak očekáváme, že profesionální SSCs vypadají

- Měly by exprimovat „stemness“ geny (které to ale jsou?), analogické geny s ES buňkami nebývají tak silně exprimovány, jak to známe právě u ES buněk, pravděpodobně tu hraje svou roli pluripotence ES buněk oproti multipotenci SSCs, kdy tzv. „stemness“ geny ES buněk jsou spíše geny exprimované pluripotentními buňkami obecně.
- Předpokládáme, že mají vysokou hladinu inhibitorů cyklin-dependentních kináz ( $p21^{waf1/cip1}$ ,  $p15^{INK4B}$ ,  $p16^{INK4A}$ ,  $p18^{INK4C}$ ) => pomalá proliferace / semi-quiescence.
- Z „extrinsic“ faktorů se předpokládá významná úloha drah  $TGF\beta$  rodiny, Wnt, Notch, a gp130, v souvislosti s vlastnostmi „niche“ pak také signalizace přes kadheriny a buněčné adhezivní molekuly (CAM – cell adhesion molecule) v jejichž signalizaci jsou MAPKs,  $\beta$ -catenin,  $NF\kappa B$ ,...
- Jsou obecně odolné k toxinům (MDR - multidrug resistance proteins, ATP pumpy), ale i k tvrdému záření (paprsky X,  $\gamma$ -záření).



## SSC „mezodermálního“ původu

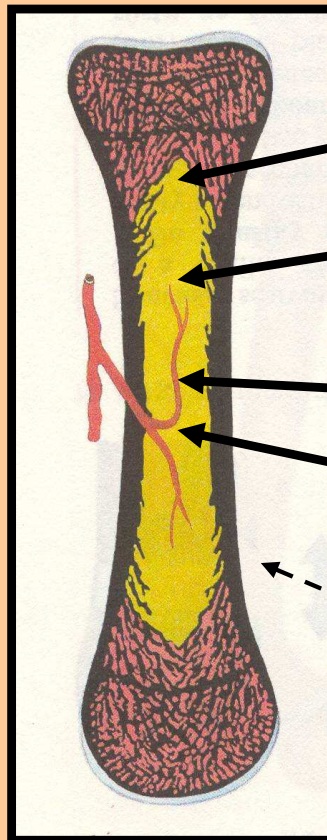
**Mezenchymální kmenové buňky  
(MSCs - mesenchymal stem cells)**

**Hematopoetické kmenové buňky  
(HSCs - hematopoietic stem cells)**

buňky tkání mezodermálního původu,  
snad i krevní elementy, asi ne buňky ledvin, +

krevní elementy, +

**Zdrojem adultních SSC mezodermálního původu je zejména kostní dřeň**



**HSCs** (krev, ? jaterní buňky, kardiomyocyty, ...?)

**BMSSCs** (chrupavka, kost, stroma kostní dřeně, vazivo,  
?svaly, nervy,...?)

**MAPCs** (??? pluripotent ???)

**Endoteliální kmenové buňky**

Něco dalšího ?

## Adultní multipotentní progenitorové buňky – MAPCs (multipotent adult progenitor cells)

- „Jejich existence je velice kontroverzní“
- propagátorkou je Catherine M. Verfaillie (Jiang, 2002)

- MAPCs byly poprvé izolovány z kostní dřeně, později i z mozku a svalů
- na rozdíl od ostatních SSC jsou to proliferující buňky s vysokou aktivitou telomerázy
- v kultuře lidských a krysích MAPCs nebyly nalezeny aneuploidie, u myši ano (u myši časté i pro jiné buňky včetně ES???)
- v kultuře *in vitro* vyžadují „nízkou“ denzitu (m, r 500-1000 b./cm<sup>2</sup>; h 1500-3000 b./cm<sup>2</sup>)
- velmi náročná kultivace (fibronectin, EGF, PDGF, LIF, velké objemy pro obdržení dostatečného množství buněk pro analýzu)
- *in vitro* dávají vznik řadě typů buněk včetně neurálních, čistota diferencované kultury 70-80%
- *in vivo*, po injekci do blastocysty tvoří chiméry (schopné narození ) s chimerismem 1-40%, avšak schopnost tvořit zárodečné buňky nebo celé embryo (injekce do tetraploidního trofektodermu) nebyla prokázána
- netvoří teratomy
  
- není jasná jejich existence *in vivo*
- není známý specifický marker

## Fenotyp MAPCs

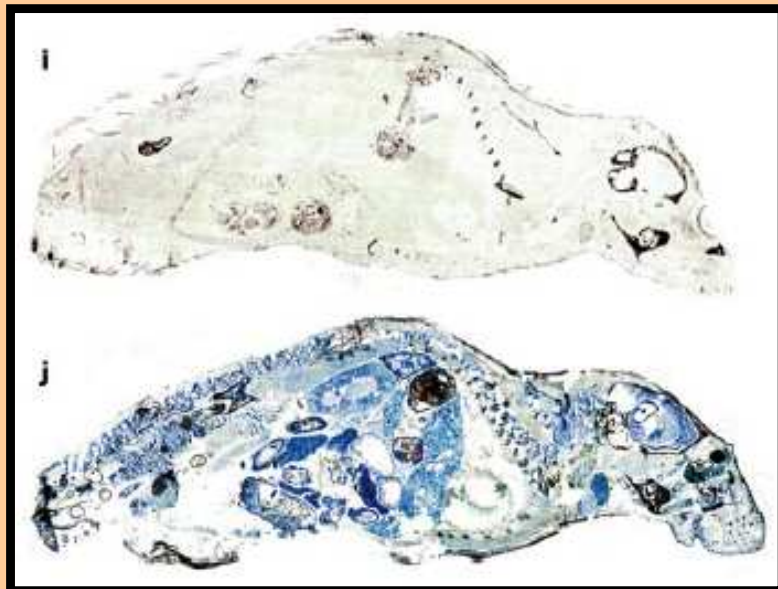
antigen	exprese	blízke SC
<b>MHC-I</b>	-	MSC +++
<b>CD44</b> (H-CAM)	+/-	různé buňky
<b>CD105</b> (endoglin)	-	MSC +++
<b>CD34</b> (L-selectinR)	-	HSC +++
<b>CD45</b> (tyr. fosfatáza)	-	HSC +++
<b>cKit</b> (CD117, SCFR)	-	HSC +++
<b>Thy1</b> (CD90/CDw90)	+	HSC +++
<b>AC133<sub>h</sub> / Sca1*<sub>m</sub></b>	+	HSC +++
<b>SSEA1</b>	+ <sub>m</sub>	mES +++
<b>Oct4</b>	+ <sub>m</sub>	m+hES +++
<b>Rex1</b>	+ <sub>m</sub>	mES +++

negativní „-“, ne vždy negativní „+/-“, slabá „+“, mírná „++“, silná „+++“

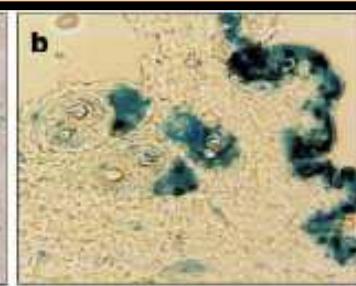
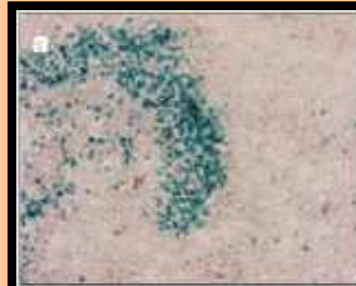
\*Sca1 – stem cell antigen, GPI (glykosylfosfoinositolovou) kotvou vázaný protein v cytoplasmatické membráně zejména „velice časných“ progenitorů

40% chimerismus u myši s ROSA26\* MAPCs

Stanovení  $\beta$ -galaktosidázové aktivity na sagitárním řezu u normální myši (i) a chimerické myši s ROSA26-MAPCs (j).

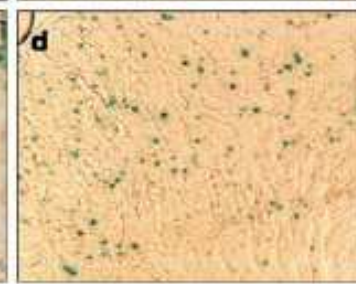
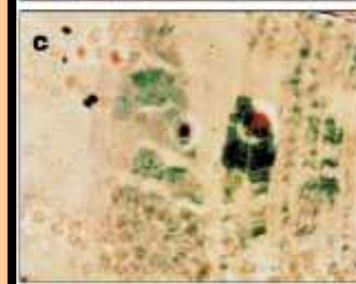


mozek



kůže

koster. sval.



srdce

játra



tenké střevo

ledviny

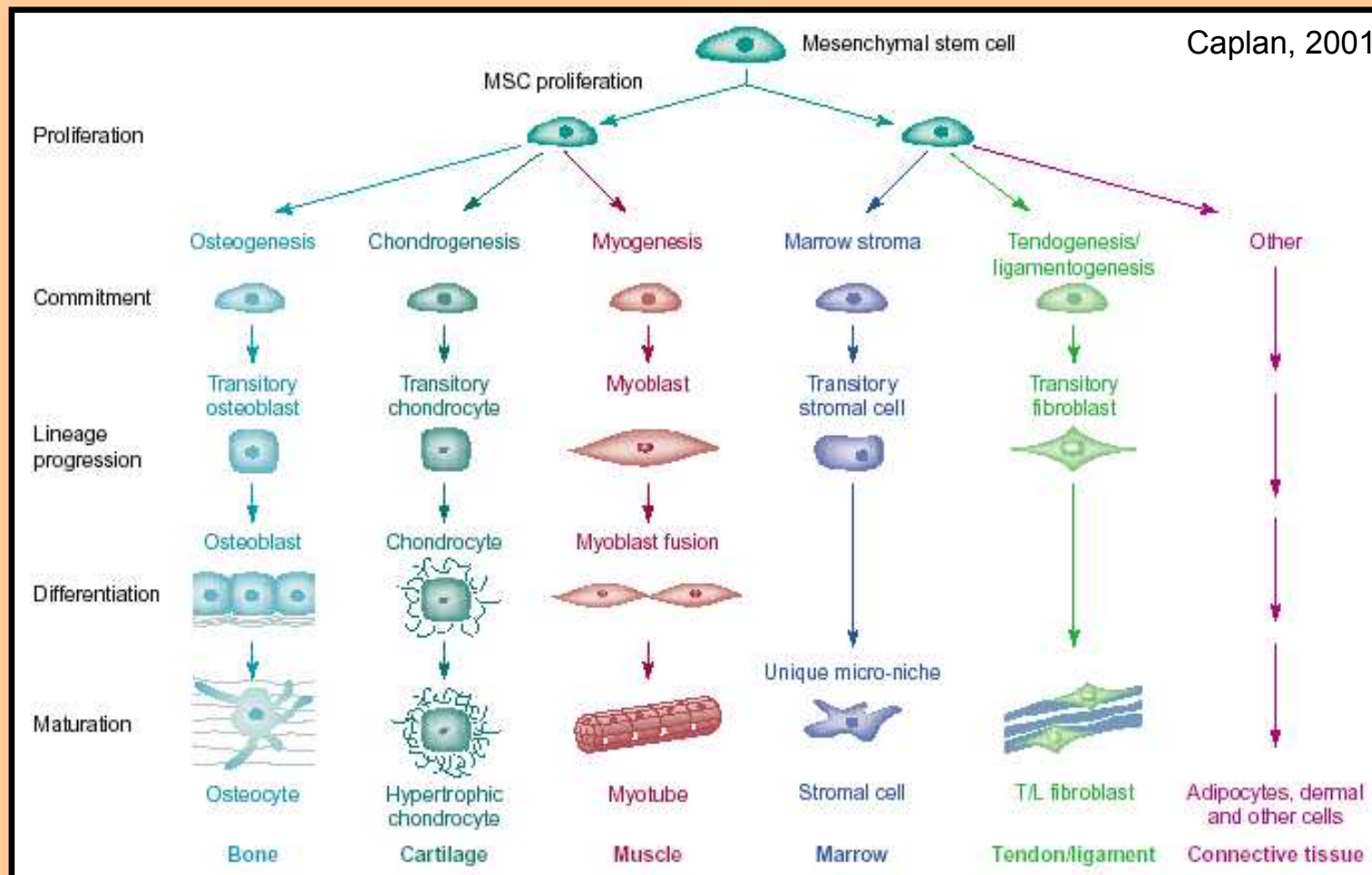


slezina

\* ROSA26 myši exprimují ve všech buňkách  $\beta$ -galaktosidázu (transgení myši - GMO)

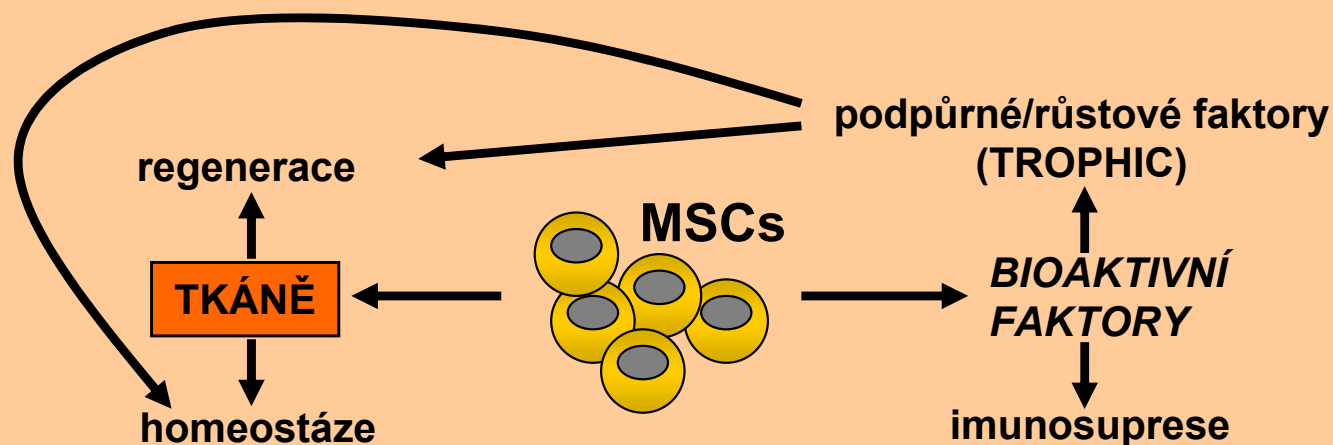
# Mezenchymální kmenové buňky – MSCs (mesenchymal stem cells)

Kmenové buňky kostní dřeně – **BMSSCs** (bone marrow stroma stem cells)  
 Kmenové buňky svalové tkáně, chrupavky, kosti, ....

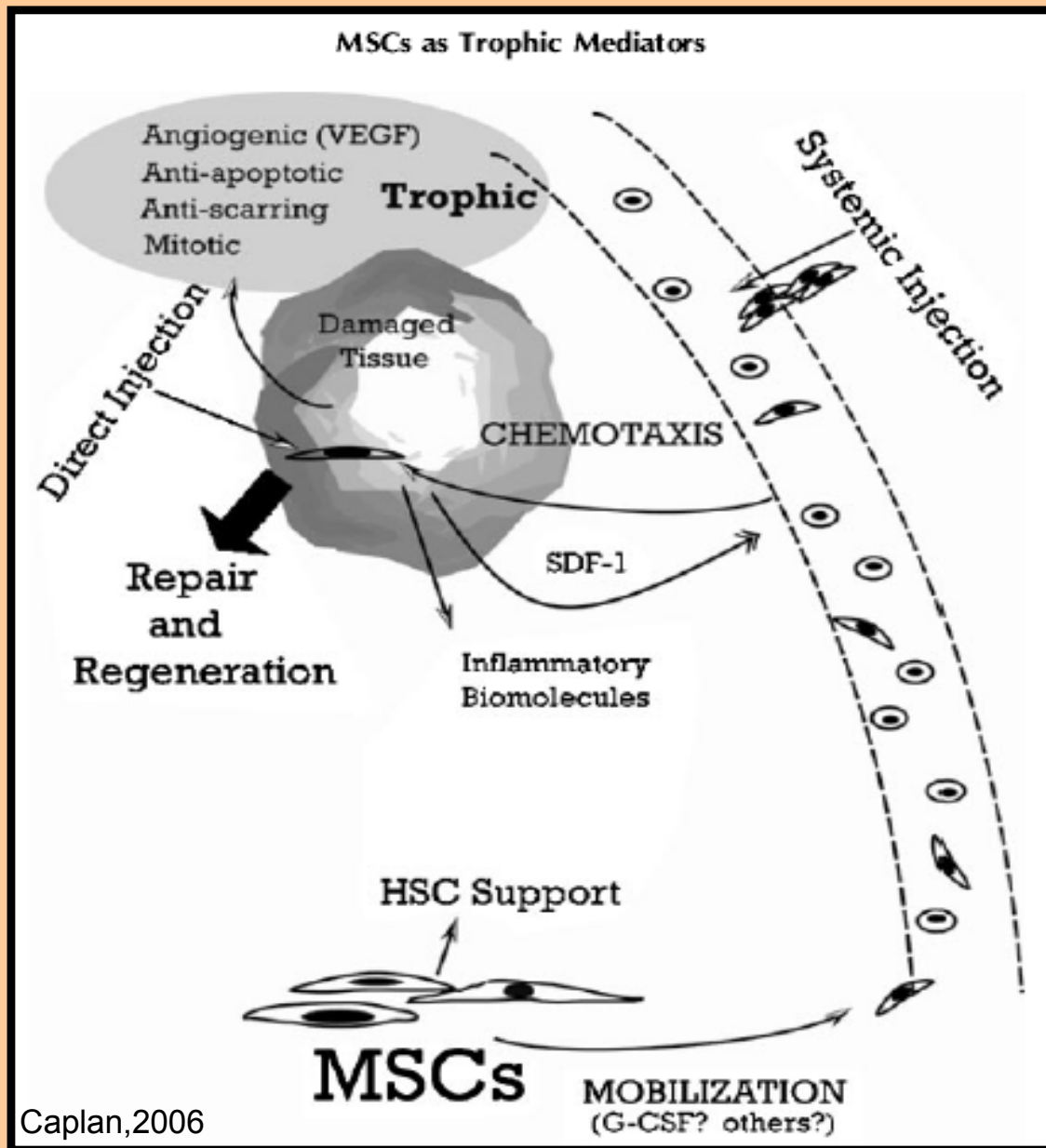


- MSC lze izolovat z mezenchymálních tkání (kostní dřeň, svaly, dermis, tuková tkáň, chrupavky, kosti, ale i z krevního oběhu (zde se někdy označují jako pericyty), zejména však z kostní dřeně.
- Přesný fenotyp není znám, pracuje se se směsnou populací buněk, která po indukci příslušnými kombinacemi růstových faktorů je schopna dát vznik buňkám dané tkáně.
- Na rozdíl od MAPCs exprimují proteiny MHC-1, a byly připraveny protilátky (SH2, SH3 a SH4) se zvýšenou afinitou k MSCs.
- S věkem jich v organismu ubývá.
- Jsou komerčně dostupné, jejich aplikace v medicíně je ve fázi klinických zkoušek.
- Přes velkou snahu mnoha týmů, pluripotence nebo transdiferenciace v buňky jiného zárodečného listu nebyla dosud potvrzena.

### Mechanismus zapojení MSCs v regulaci homeostáze



## Mechanismu nepřímého zapojení MSCs (a jejich derivátů?) do procesů regenerace jako lokálního zdroje růstových faktorů



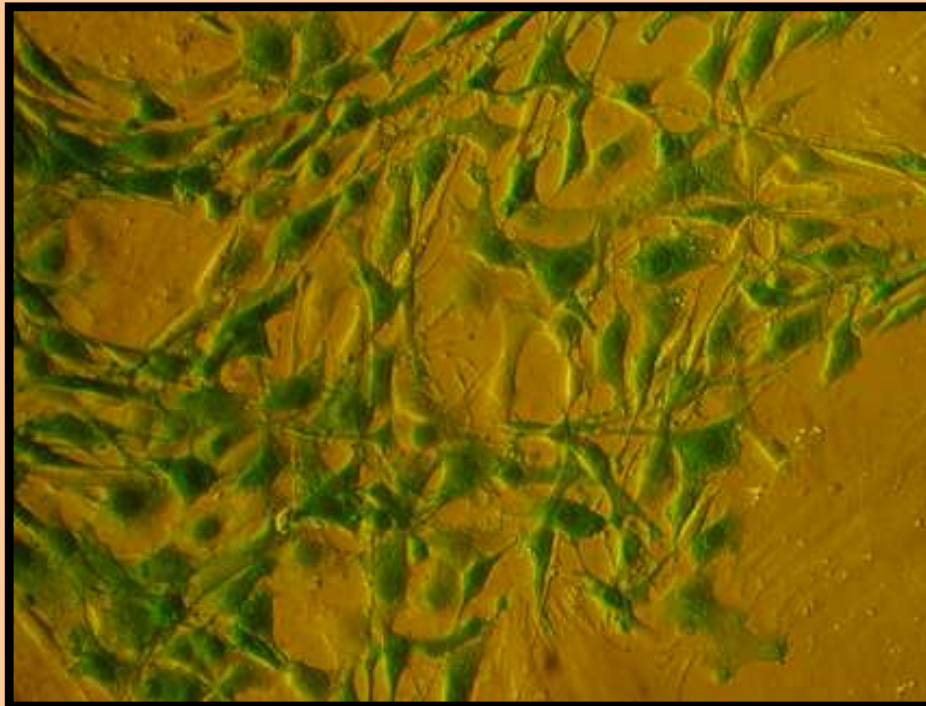
Caplan, 2006

MSCs se aplikují v případě

- infarkt myokardu
- reparace tkáně menisku
- Crohnova nemoc (imunosuprese)

## Kmenové buňky stroma kostní dřeně – **BMSSCs** (bone marrow stroma stem cells)

- nejasný fenotyp, ale snadno získatelné ve směsných populacích z kostní dřeně, jako buňky adherující na plastik pro tkáňové kultury (na rozdíl od buněk hematopoetických řad)
- fibroblastům podobné buňky (a) větší, fibroblastům podobné a b) menší, zřejmě progenitory)
- MAPCs jsou někdy označovány jako podskupina (subset) BMSSCs (pluri- x multipotentní??), celkově se ale překrývají s MSCs, obecně je možné, že rozdíly mezi typy jsou dány spíše selekcí, způsobem izolace a nasměrováním k některé diferenciací dráze, než skutečnými rozdíly *in vivo*.
- v závislosti na kultivačních podmínkách velmi rychle mění morfolologii, což pravděpodobně vedlo k podezření na jejich pluri-/multipotentní schopnosti (zejména vznik neurálních b.)



Stromální buňky kostní dřeně potkana



## Populace vedlejších buněk (SP - side population) = **SP buňky**

- izolovány z různých tkání jako buňky schopné intenzivně vylučovat DNA vázající fluorochrom Hoechst 33342, díky tzv. proteinu rezistence k farmakům = **Abcg2** (BCRP – breast cancer resistance protein; rodina „multidrug resistance transporter proteins“-MDR; obecně ABC (ATP binding cassette) transportery)
- později prokázán fenotyp **Sca1<sup>+</sup>/lin<sup>+</sup>**), byly izolovány z mnoha typů tkání i z nádorových (mléčné žlázy, plíce, svaly, srdce, játra, mozek, kůže a to jak u myši, potkana i člověka)
- Jsou detekovatelné i v některých nádorových buněčných liniích (C6 – gliom; IMR-32, JF – neuroblastom; a různých gastrointestinálních nádorových liniích)

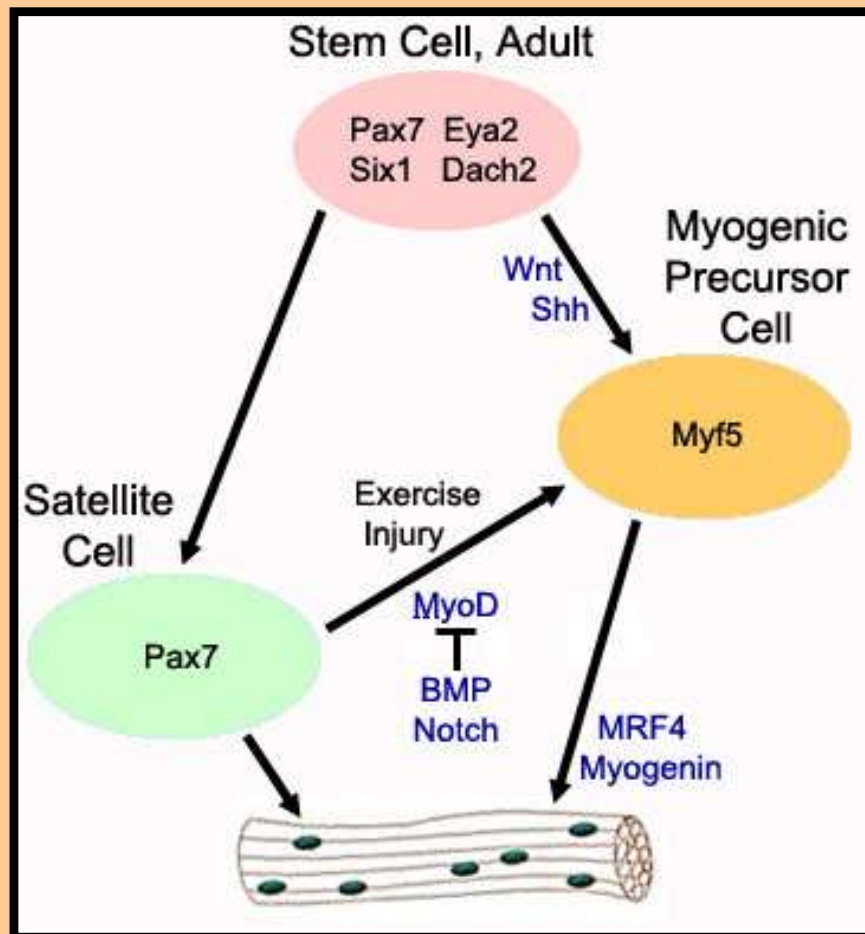
**Přes výše uvedené společné znaky SP buněk,  
jsou tyto buňky tkáňově specifické (???)**

- SP svalů mají myogení (**Sca1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>**) a hematopoetický potenciál (**Sca1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>**)
- Hematopoetické SP jsou **Sca1<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>**
- SP kůže jsou **Sca1<sup>+</sup>/K14<sup>+</sup>/K19<sup>+</sup>**
- SP z mozku, ale i pankreatu (!) jsou **Sca1<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup>**
- .....

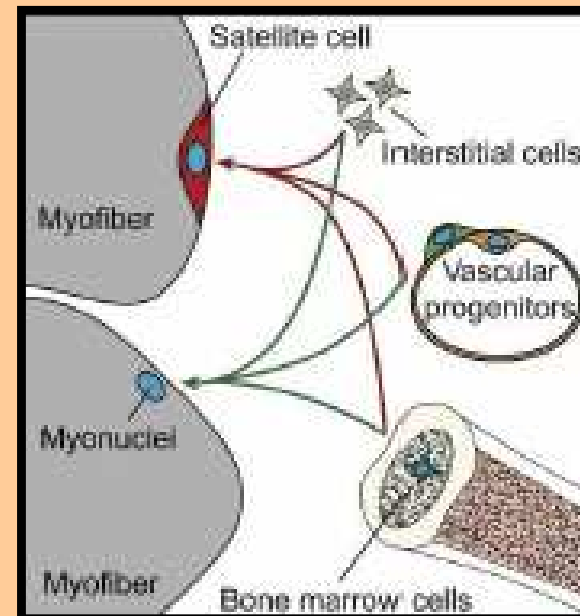
V současné době nejsou plně objasněny vztahy/hierarchie mezi **MSCs – MAPCs – BMSSCs – SP** a dalšími somatickými kmenovými buňkami. Je možné, že mnohé pozorované rozdíly jsou dány postupy izolace daných buněk, jejich kultivací *in vitro* nebo případně i dalšími nedostatky v přípravě vzorků apod.

## Svalové SC – kmenové buňky kosterní svaloviny = MuSC

- v embryogenezi *somity* → *myotom* → myocyt → svalové vlákno
- v dospělosti MuSC → satelitní buňky → myocyt → svalové vlákno  
(kostní dřeň) (povrch svalového vlákna)
- MuSC nejsou přesně definované, náleží zřejmě k užšímu výběru MSC
- *in vivo* je sval regenerován satelitními buňkami, majícími vlastnosti SC
- satelitní buňky se u myši objevují 17.5 dpc., s nástupem tvorby sekundárních svalových fibril (13 dpc. objevení primárních sv. fibril)

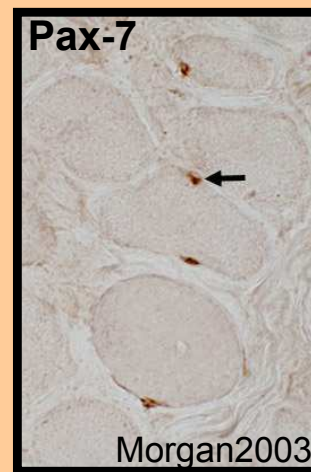


### Původ satelitních buněk

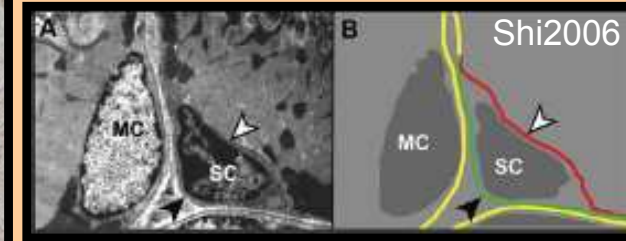


Dále byly izolovány z adultního kosterního svalu buňky CD34+/Sca1+ jako kmenové buňky odvozené ze svalu (**MDSC** – muscle derived stem cells)

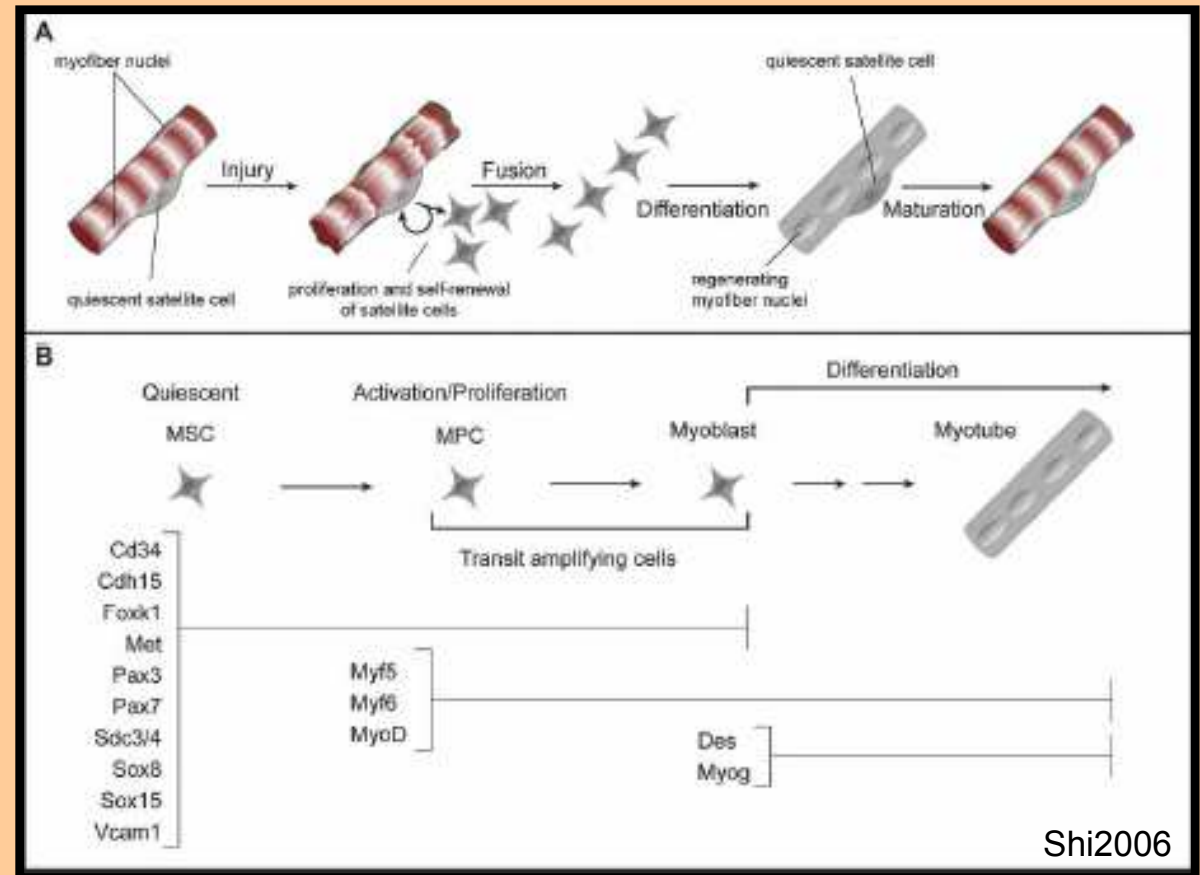
# Satelitní buňky kosterní svaloviny a jejich úloha v regeneraci svalu



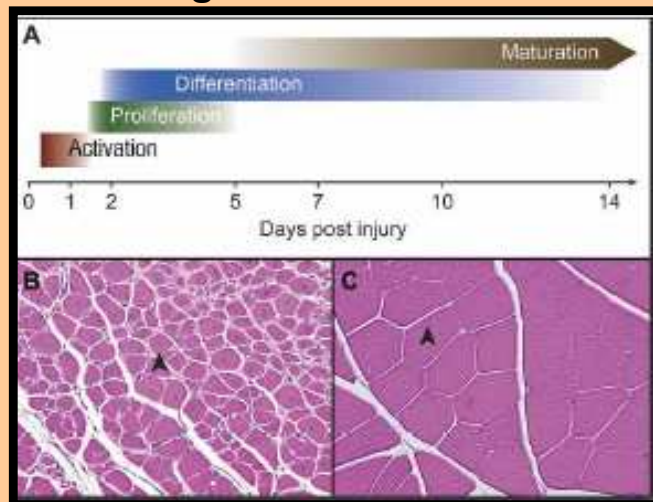
sarkolema □  
bazální membrána ■



**Mechanismus regenerace svalového vlákna  
MuSC/satelitními buňkami (MSC)**  
MPC – myogení progenitor



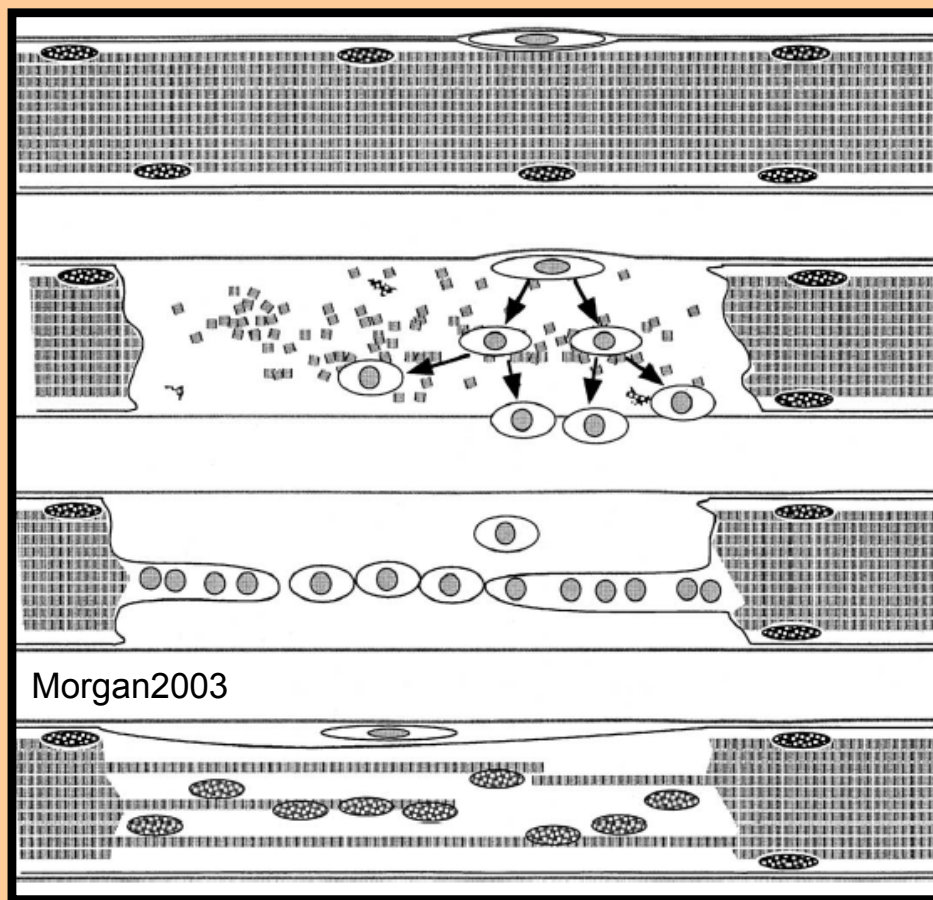
## Dynamika regenerace kosterního svalu



Shi2006

marker	Satelitní buňky spící, časné? (quiescentní)	Satelitní buňky spící (quiescentní)	Satelitní buňky aktivované
Pax-7	+	+	+++
cMet (HGFR)	+	+	+
m-cadherin	-	+	+
CD34 (L-selectinR)	-	+	+
Myf-5	-	+	+
MyoD*	-	-	+

\* Overexpresse MyoD u fibroblastů je diferencuje do myogéních buněk



### Mechanismus regenerace svalového vlákna satelitními buňkami.

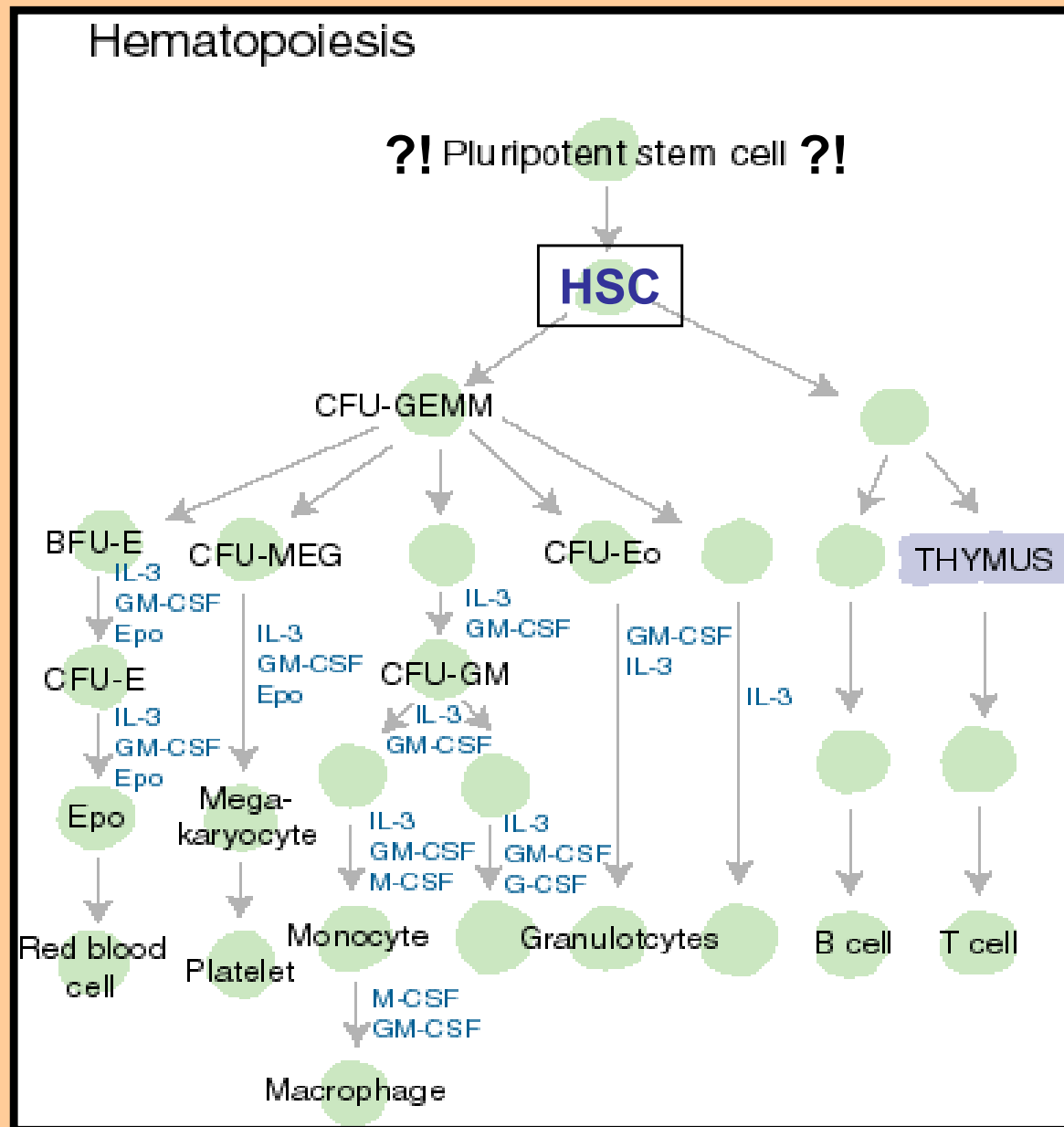
← Aktivace satelitních buněk (IGF 1,2, HGF,..)

← Fúze satelitních buněk

← Regenerace svalového vlákna

# Hematopoetické kmenové buňky – HSCs (hematopoietic stem cells)

Hematopoéza + ?



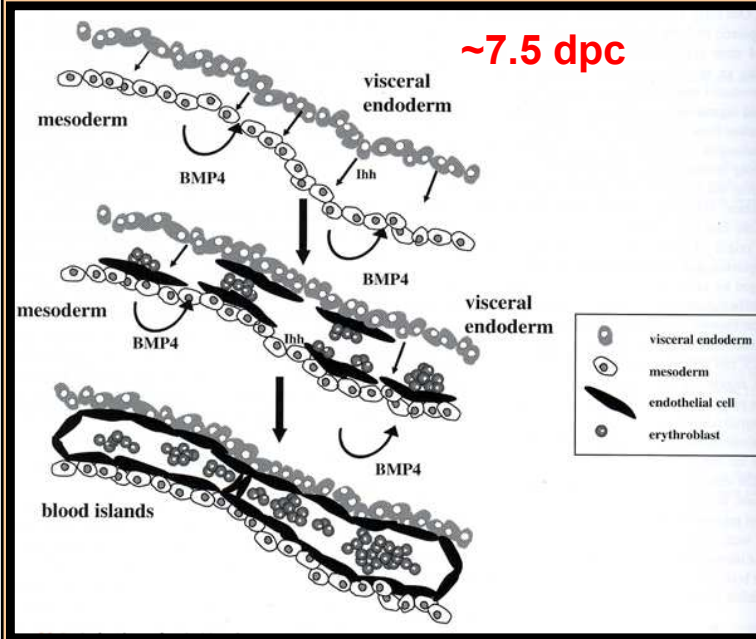
## HEMATOPOÉZA

- Hematopoéza je v současné době zřejmě nejlépe prostudovaná diferenciační dráha s nejdokonalejším fenotypovým rozlišením jednotlivých buněčných stádií buněk tzv. **CD (cluster determinants) antigeny**.
- **Jednotlivé diferenciační dráhy jsou často majoritně závislé na jediném cytokinu (kolonie stimulujícím faktoru – CSF; např. G-CSF, faktor stimulující tvorbu zejména granulocytů)**
- **V průběhu ontogeneze je hematopoéza realizována jedinečným způsobem (časoprostorově, viz. níže), což dobře umožňuje i studium rozdílů mezi embryonálními a adultními somatickými kmenovými buňkami. Každopádně v průběhu embryonálního vývoje vznikají jisté typy populací T-lymfocytů, které zůstávají po celý život jedince, ale v dospělosti již nevznikají. Druhou možností, vedle možnosti odlišnosti embryonálních a adultních HSCs je schopnost těchto buněk osidlovat odlišné „niche“.**
- **HSC vzniklé ve žloutkovém váčku také migrují do oblasti AGM a do jater, kde dávají vznik adultním HSC (Samokhvalov, 2007)**
- Harrison et al. (1979): transplantoval myším opakovaně identický štěp HSC déle jak 8 let  
- > výrazné překročení délky života myši!!!

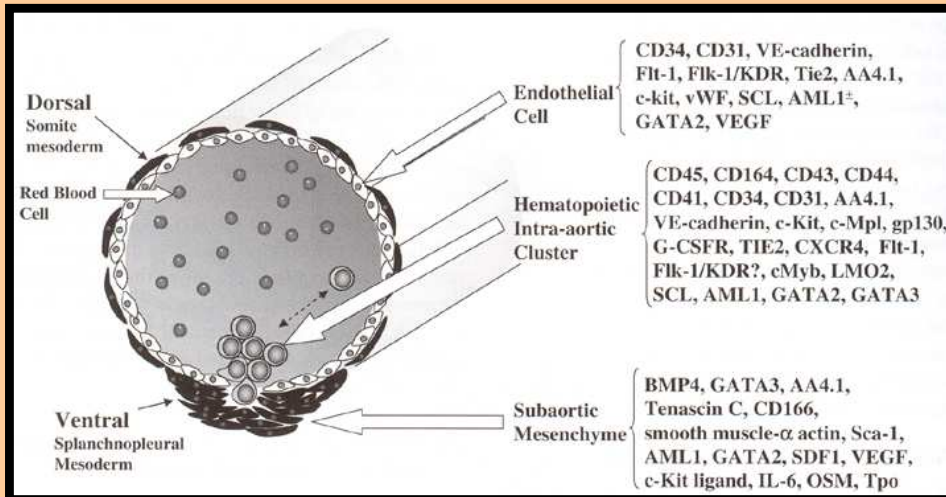
# MOUSE

## Lokalizace, změna „niche“ u hematopoézy v průběhu ontogeneze

Vznik krevních ostrůvků ve vznikajícím žloutkovém vaku mezi mezodermem a buňkami viscerálního entodermu



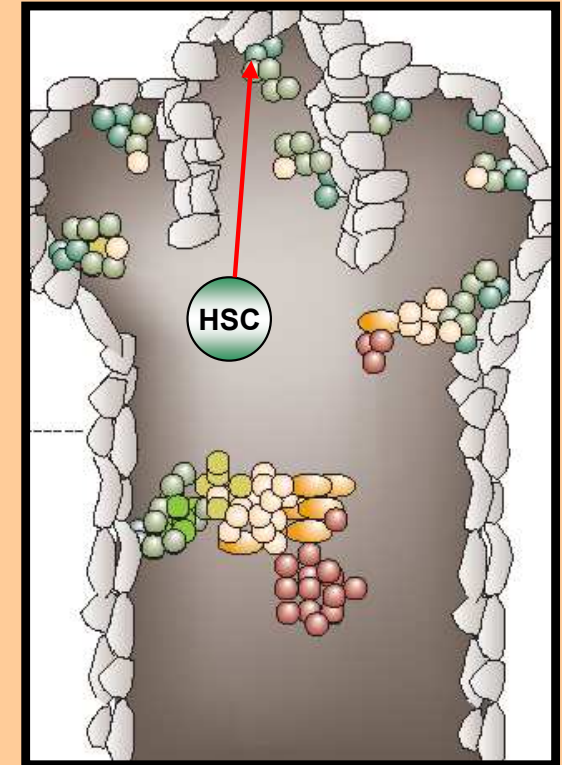
Hematopoéza v endotelu aorty (AGM), **~10.5 dpc**



HSC  
CFU-GM  
BFU-E  
CFU-E

**JÁTRA**

**~11 dpc**

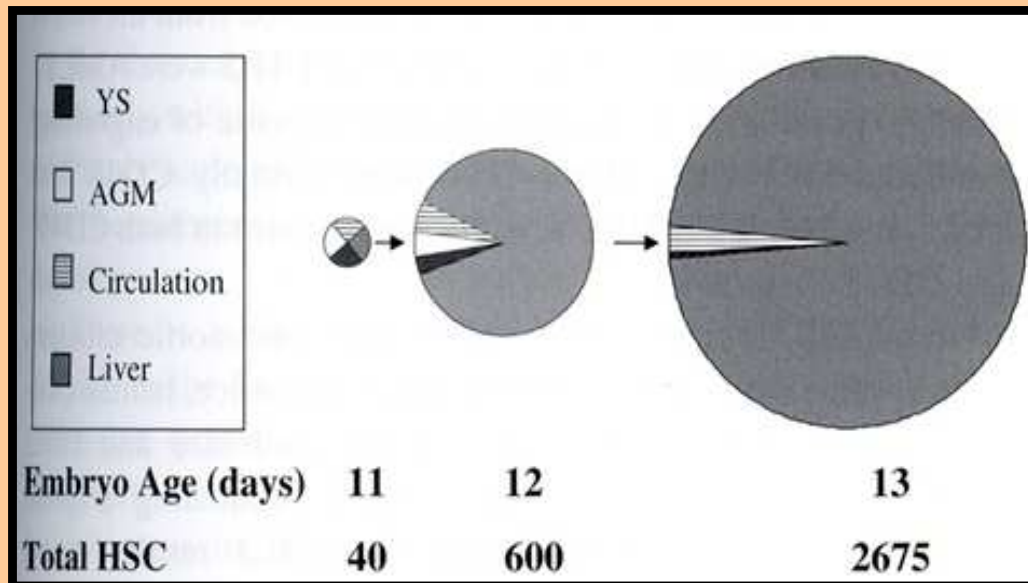


**Kostní dřeň, ~15 dpc**  
S vývojem kostní dřeně se HSCs usazují v jejím stroma.

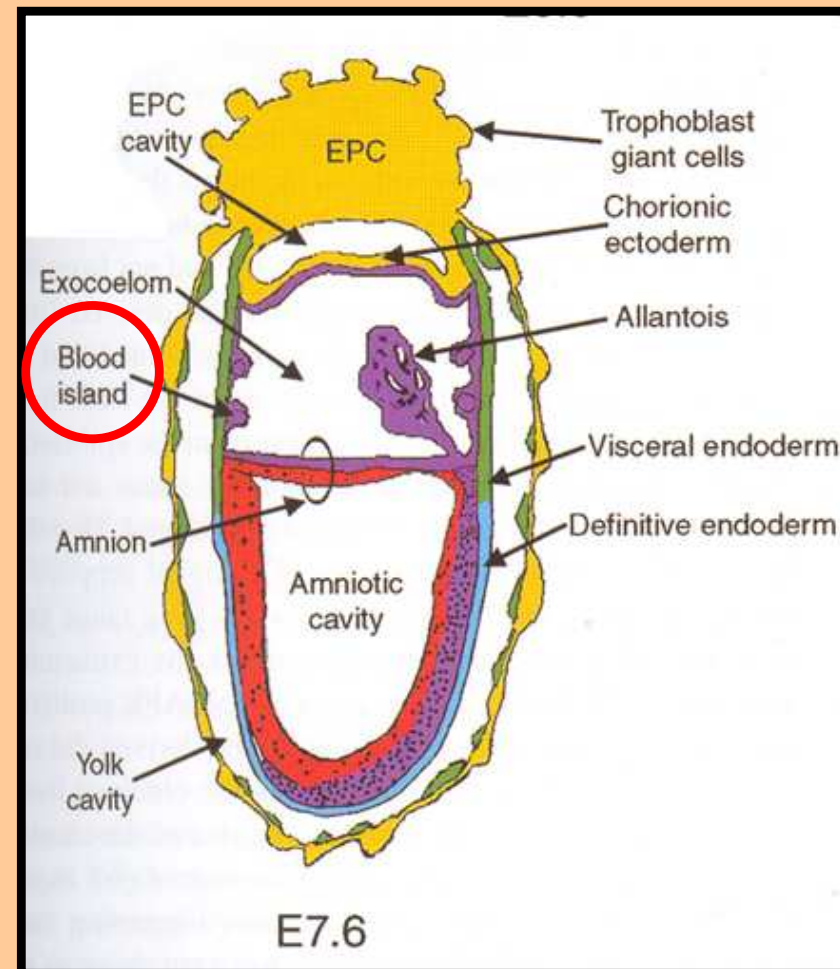
**THYMUS**

pT, pB – lymfocytární progenitory  
CFU-GM – myeloidní progenitory  
BFU-E, CFU-E – erythroidní progenitory

## Podíl jednotlivých tkání na celkovém objemu hematopoézy mezi 11 – 13 dpc u myši



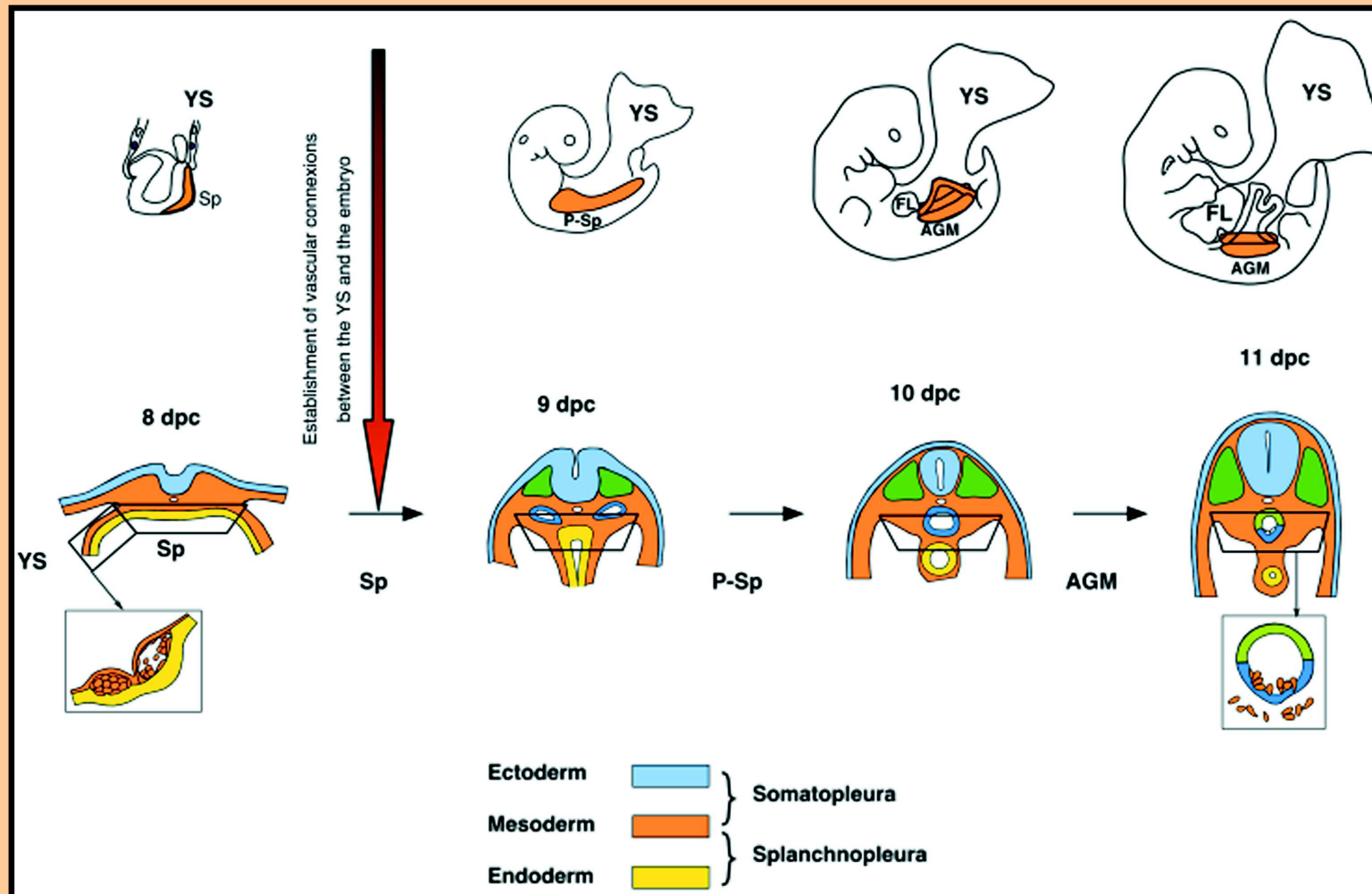
## Místo vzniku krevních ostrůvků (blood island) v průběhu embryogeneze u myši



**Pozn. Slezina je osídlena HSCs a hematopoetickými progenitory pravděpodobně z jater, protože v době objevení se hematopoézy ve slezině, v žloutkovém vaku a v aortě už hematopoéza neprobíhá a kostní dřeň dosud není vyvinuta.**



# Schema vývoje AGM (aorta-gonads-mesonephros) - začátek fetální hematopoézy



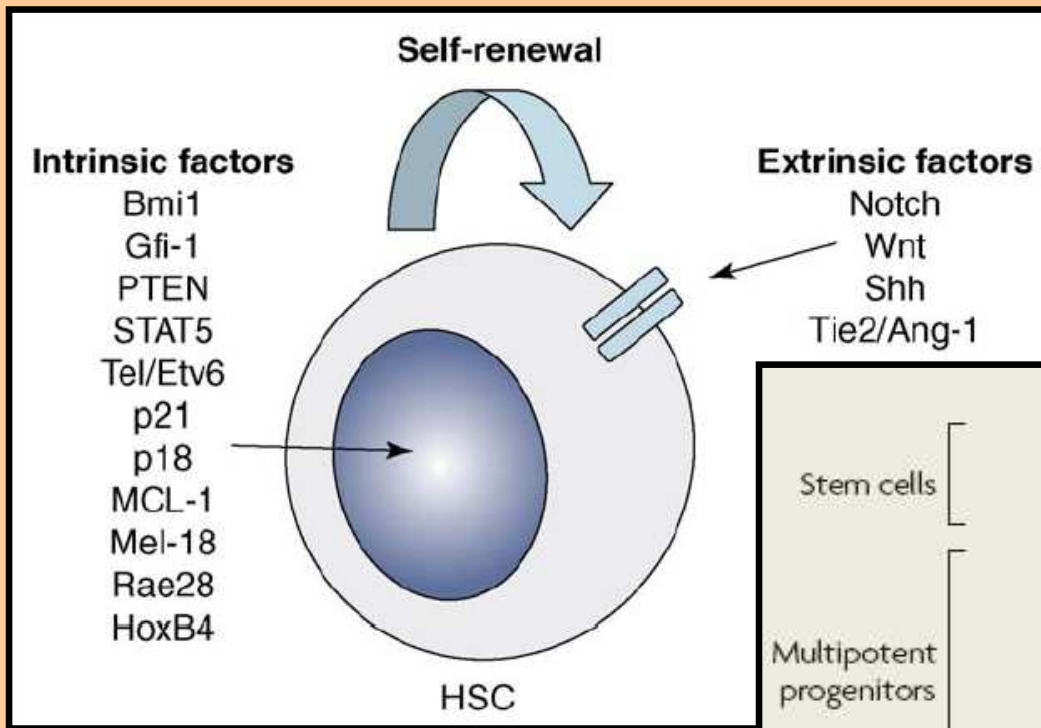
## Chronologie hematopoézy u člověka a myši

<b>hematopoéza/lymfopoéza (dny)</b>	<b>člověk</b>	<b>myš</b>
embryonální vývoj (dny)	~270	~21
<b>žloutkový vak</b>	18	7.5
<b>dorsální aorta</b>	27	9.5
<i>thymus</i>	40	11
<b>játra</b>	42	11
<b>slezina</b>	48	13
<b>kostní dřeň</b>	77	15
<b>cirkulace krevních buněk</b>	24	8.5

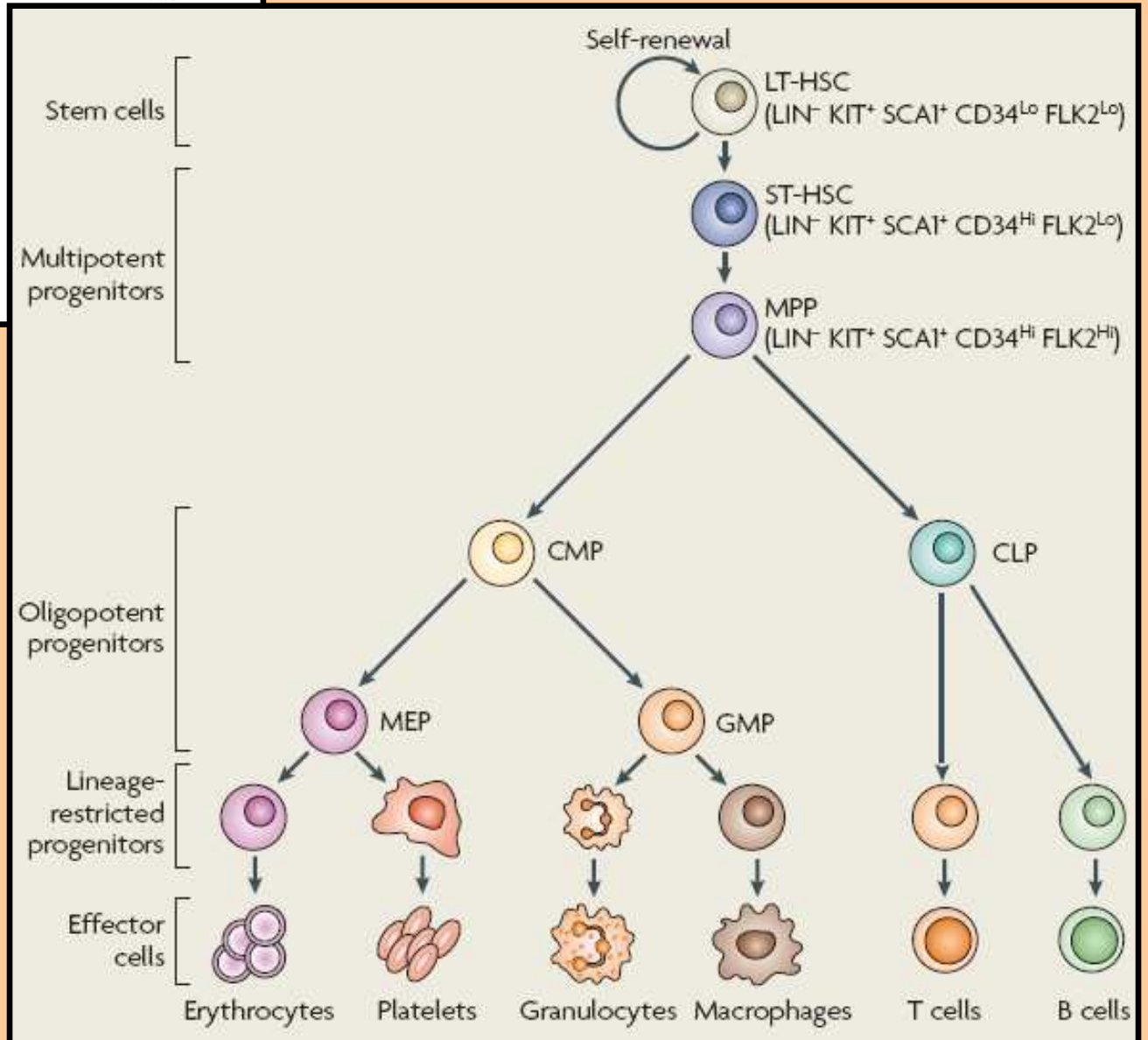
## Fenotyp HSC

<i>antigen</i>	HSC	Myeloid SC	Lymphoid SC
CD10 (CALLA)	-	-	+
CD33 (Sialoadhesin)	-	+	-
CD34 (L-selectinR)	-	+	+
CD38 (ecto-ADP-ribosyl cyclase)	-	-	+
<b>CD90 (Thy1)</b>	+	-	+
<b>CD110 (Trombopoietin receptor)</b>	+	+	-
<b>CD111 (Nectin1)</b>	-	+	-
<b>CD112 (Nectin2)</b>	-	+	-
<b>CD117 (c-Kit, SCFR)</b>	+	+	+
CD123 ( $\alpha$ řetězec IL-3R)	+	+	-
CD124 (IL-4R/IL-13R)	-	-	+
CD127 ( $\alpha$ řetězec IL-7R)	-	-	+
CDw131 ( $\beta$ řetězec IL-3R/IL-5/GM-CSF)	-	+	-
<b>CD133 (Ac133)</b>	-	+	-
<b>CD135 (Flt3/Flk2)</b>	+	-	-
<b>CD173 (krevní skupina H typ 2)</b>	-	+	-
<b>CD174 (Lewis Y)</b>	-	+	-
CD176 (Thomson-Friedenreich antigen)	-	+	-
CD227 (MUC-1)	-	+	-
CD228 (Melanotransferrin)	-	+	+
<u>CD243 (MDR-1)</u>	+	-	-

**Extrinsic a intrinsic faktory regulující sebeobnovu adultních HSC (Okala, 2006)**



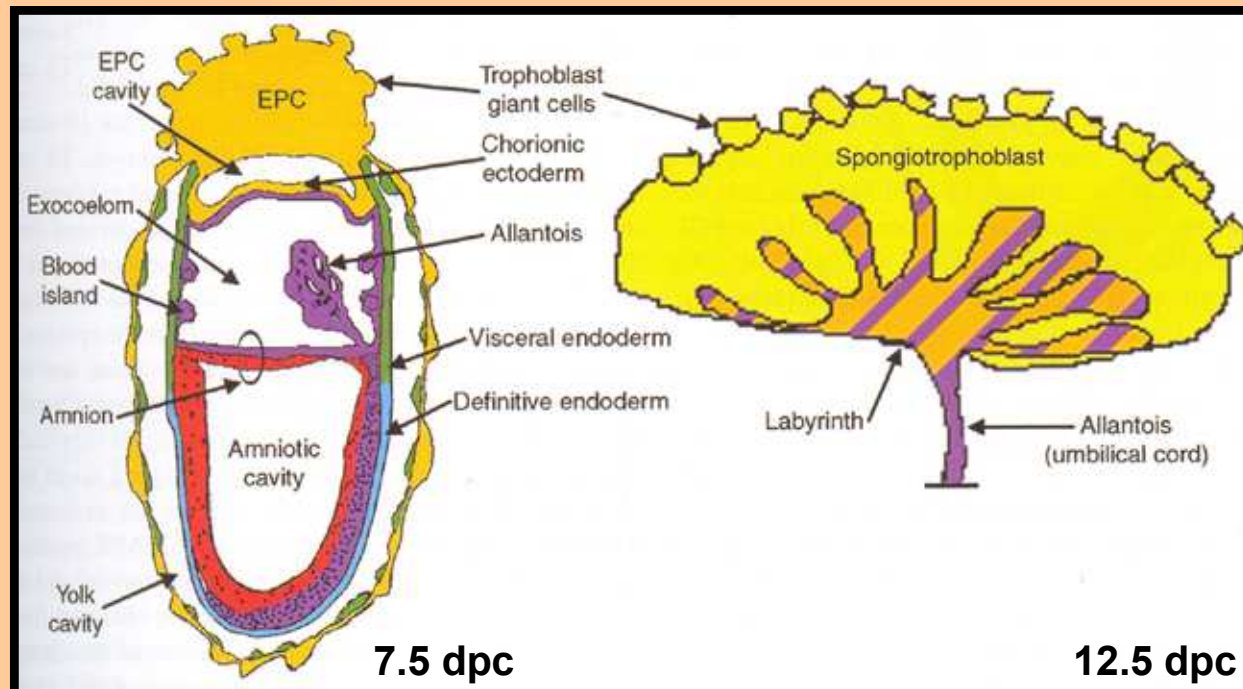
**Schema hematopoézy a fenotyp aktuálních a potencionálních HSC**



## Kmenové buňky v pupečnickové krvi (v allantois)

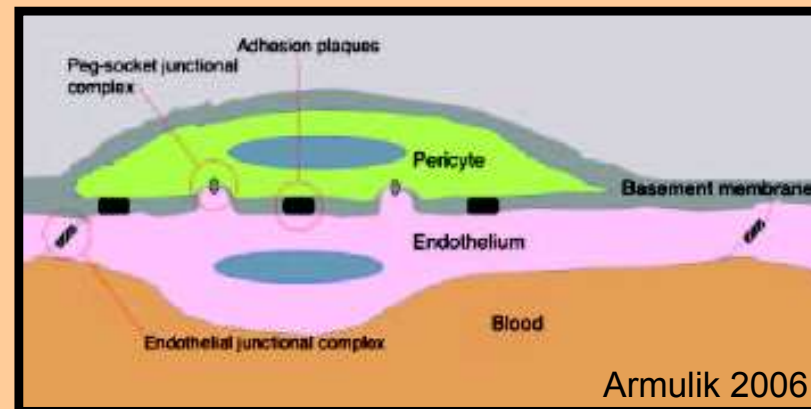
Pupečnicková krev obsahuje hematopoetické progenitory existující, jako pozůstatek extraembryonálních krevních ostrůvků a endotelie. Díky tomu, jsou tyto buňky geneticky shodné a fenotypově velice blízké vlastním krevním buňkám embrya a je možné je tak snadno použít jako transplantační štěp pro z tohoto embrya vzniklého jedince. Jejich množství lze navíc navýšit indukci jejich proliferace koktejlem pro-hematopoetických cytokinů.

V současnosti bylo publikováno, že pupečnicková krev může být také zdrojem mesenchymálních buněk, snad podobné MSCs i s jejich potencií. Tyto výsledky je však třeba ještě důkladně ověřit.



## Endotel

- jednovrstevný dlaždicovitý epitel tvořený endotelovými buňkami adherovanými k bazální membráně
- tvoří výstelku cév případně cévy samotné (mikrokapiláry)
- v případě cév jsou z druhé strany bazální membrány buňky hladké svaloviny a podle typu orgánu také množství pericytů (viz. mesenchym), pericyty jsou i v mikrokapilárách
- endotel je prostupný pro pericyty, monocyty/makrofágy, leukocyty a lymfocyty
- endotel je také významným zdrojem mnoha růstových faktorů, díky tomu hraje významnou úlohu v homeostázi dané tkáně
- obnova endotelu probíhá z endotelových progenitorů (kmenových buněk?), které jsou vmezeřeny mezi endoteliemi, případně plavou v krevním řečišti.
- některé práce ukazují na společného předchůdce endotelií a HSCs (CD31<sup>+/-</sup> – PECAM1 (Platelet endothelia cell adhesion molecule 1), CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>) případně také na schopnost vzájemné transdiferenciace těchto dvou buněčných populací. Adultní progenitory pro hematopoézu a endotelie byly izolovány z krve a kostní dřeně s fenotypem CD34<sup>+</sup>, Flk-1<sup>+</sup>, AC133. Podobně bylo prokázán společný progenitor v průběhu embryogeneze pro endotelie a buňky hladké svaloviny. Jestli takový progenitor existuje i v dospělosti není dosud známo.



## **Srdec, srdeční sval a jeho regenerace**

**Kardiomyocyty + Endotelie + specializované svalové buňky Hisova svazku a Purkyňových vláken + SP apod.?? + vazivo (fibroblasty)?**

**Srdeční sval může mohutnět zejména hypertrofií svých buněk, ne jejich namnožením, a tak možnosti autonomní regenerace po poškození jako je infarkt myokardu, ischemie apod., jsou značně omezené. Proto jsme se domnívali, že myokard neobsahuje zásobu progenitorů k reparaci. Navíc se výraznější dělení kardiomyocytů zastaví časně po narození, stanou se senescentními a jejich počet se během života již za normálních okolností zásadně nezvětšuje.**

**Některé recentní práce však ukazují, že i u srdce můžeme předpokládat jisté regenerační schopnosti, a to buď díky zbytkovým progenitorům nebo schopnosti (některých?) kardiomyocytů proliferovat v odpověď na poškození.**

**Byla také prokázána schopnost regenerace srdce cirkulujícími progenitory, jak ukazují sex-mix transplantace srdce. Analýza distribuce X chromosomu ukázala, že se pravděpodobně nejedná o fúzi buněk, ale o diferenciaci progenitorů (SCs ?), přesto jiné práce prokázali jen fúzi mezi buňkami.**

**- využití transplantátů např v podobě kardiomyocytů získaných z ES buněk je zdá se komplikovanou jinou synchronizací tepu.**

**Tyto regenerující buňky jsou pravděpodobně SP a c-kit+ buňky kostní drěně (MSCs?)<sup>1)</sup>, i po injekci, se přednostně usazují např. v místě ohraničujícím infarkt<sup>2)</sup>. Mechanismus regenerace srdečního svalu nemusí však být spojen přímo s diferenciací těchto zde se akumulujících buněk, ale může být vyvolaný také růstovými faktory, které tyto buňky produkují (viz. MSCs) a tak stimulují buď samotné kardiomyocyty, nebo a to spíše endotelové buňky vystylající místní cévy. Endotel snad sám o sobě má regenerační schopnosti pro některé tkáně<sup>3)</sup>. Není však dosud jasné zda tento regenerační (transdiferenční ?) potenciál mají samotné endotelie nebo další typy buněk nacházející se v přímém kontaktu s endotelem (SP buňky, MSCs?, fibroblasty).**

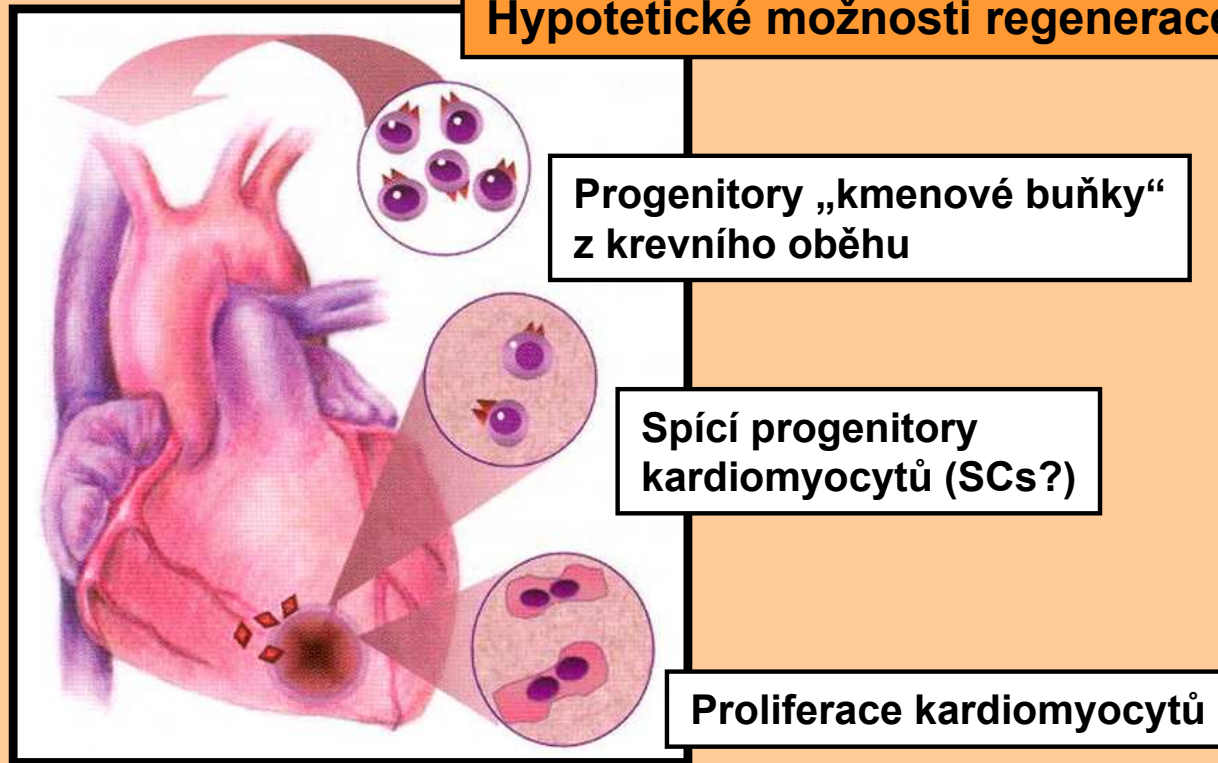
**1) MSCs, SP buňky, BMSSCs, MAPCs, se "v malém množství vyskytují i v krevním řečišti. V návaznosti na poškození organismu, podle některých teorií, se počty těchto buněk v krvi zvětšují.**

**2) „Signál poškozené tkáně“. Cirkulující (i např MSCs / BMSSCs) progenitorové a kmenové buňky mají tendence (zřejmě podobně jako buňky imunitního systému) akumulovat se v poškozené tkáni. Podstata tohoto signálu není přesně známa. Zřejmě je však podobného charakteru jako známe z imunitních reakcí a z procesů regenerace (chemoatraktanty – chemotaxe, pathotaxe)**

**3) Je podezření, že endotel může dávat vznik hematopoetickým progenitorům (viz. např. hematopoéza v stěně dorsální aorty (AGM) embrya a extraembryonální prvotní krevní ostrůvky průběhu embryonálního vývoje atd..**

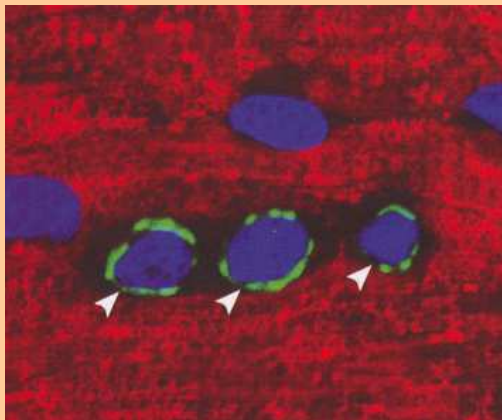


## Hypotetické možnosti regenerace srdečního svalu

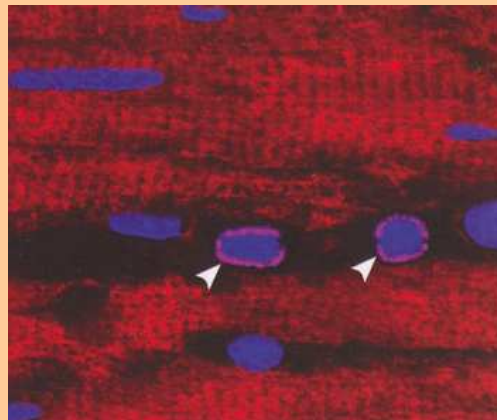


### *Detekce buněk v srdeční svalovině exprimujících*

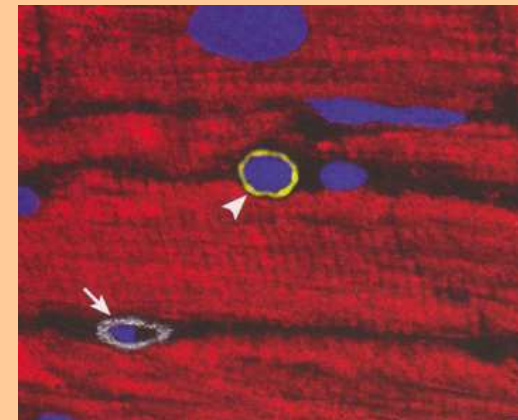
c-kit (zelená)



MDR1 (růžovo-fialová)

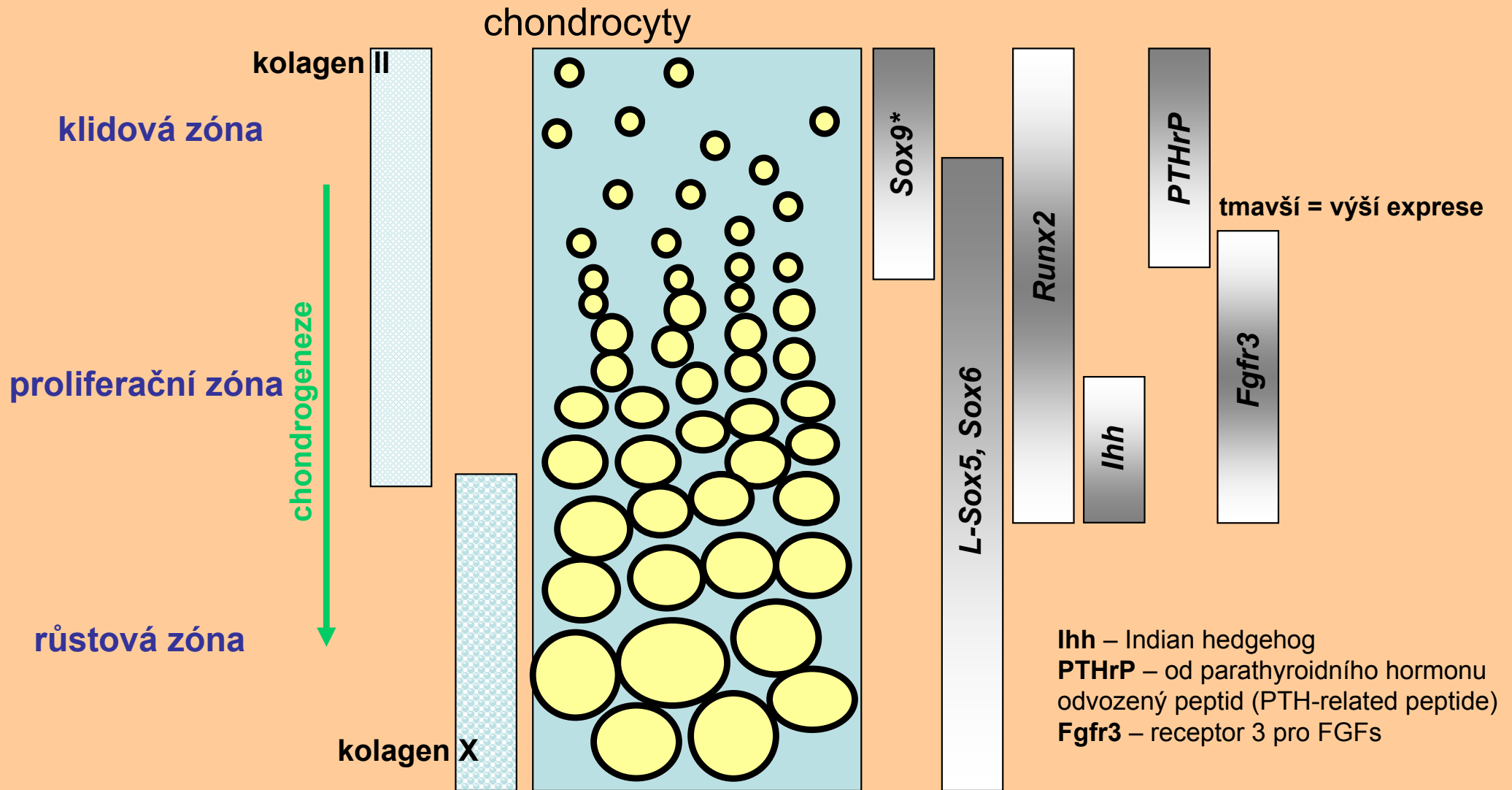


Sca1 (žlutá)  
von Willebrandův faktor (bílá)





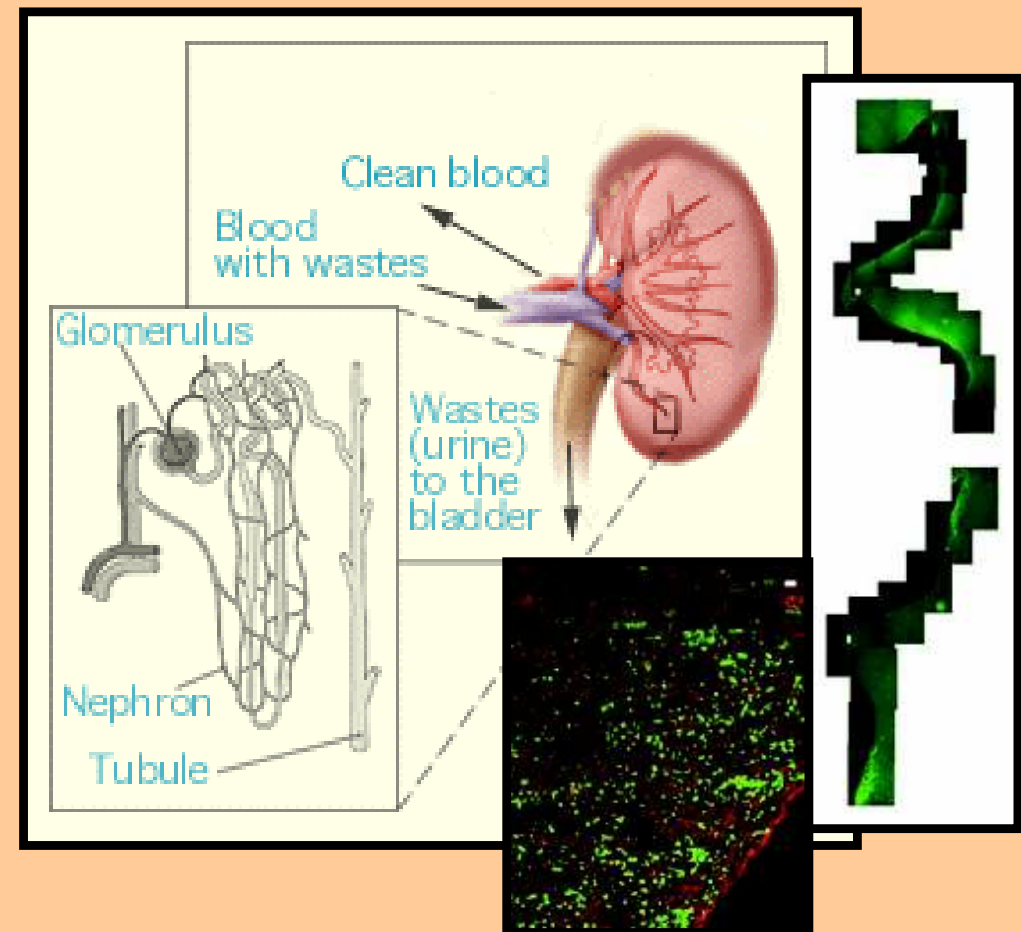
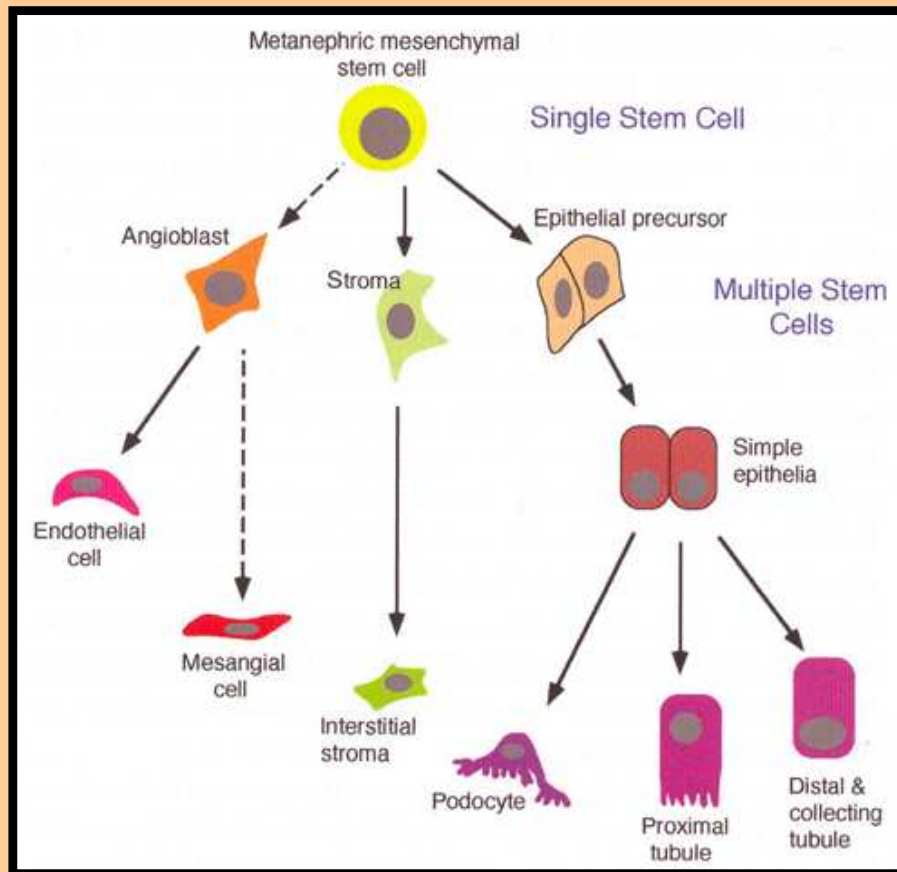
# fenotyp chondrocytů v průběhu jejich diferenciaci



\* Sox9 aktivuje expresi kolagenů typu II, IX, XI  
Sox9 -/-, nevznikají chondrocyty

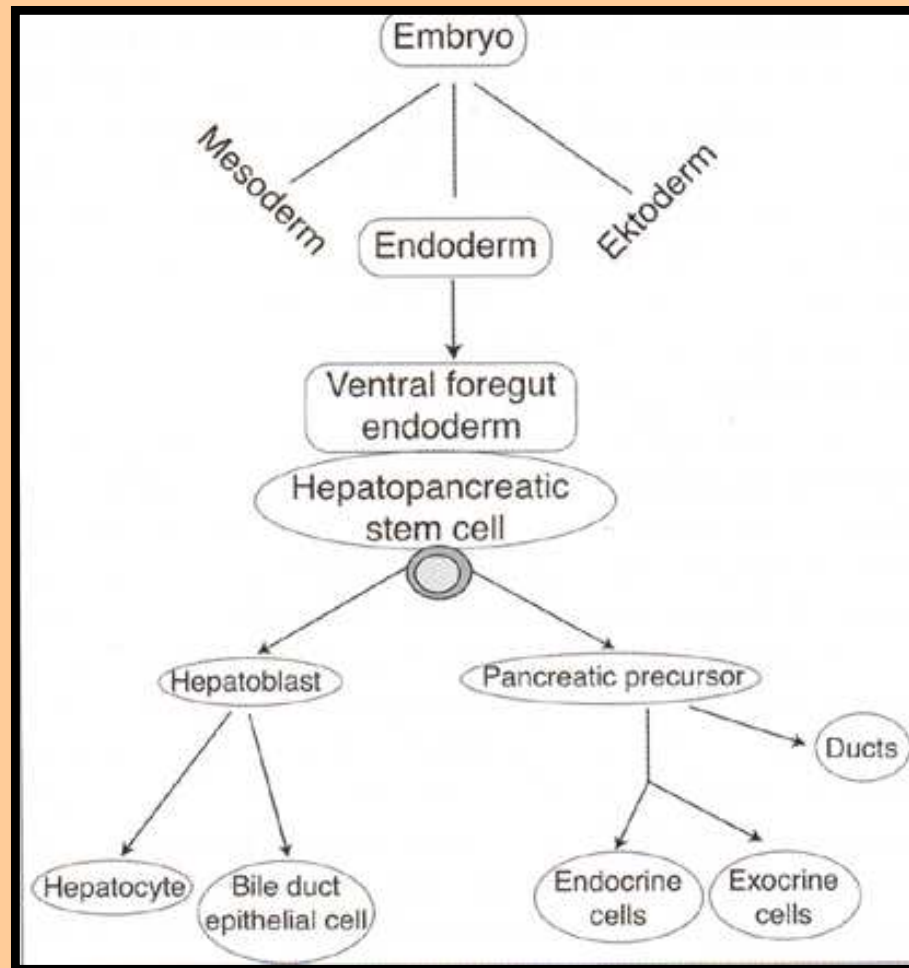
# Ledviny

- velice malá schopnost regenerace
- složitý vývoj, různá regulace a odlišné typy buněk mezi pronefros, mesonefros a metanefros
- multipotentní buňky, kultivovatelné *in vitro* a integrující se v různých oblastech ledviny objeveny ve stěně renálních papil (Oliver 2004)
- klíčové geny pro vznik ledvin: **lim1** (homeoboxový gen); transkripční faktory **Pax2, Pax8**
- geny klíčové pro regulární vývoj ledvin: **Wnt4, BMP7**; transkripční faktor **FoxD1, pod-1; PDFG/PDGFR**



## SSC „entodermálního“ původu

### Játra a pankreas



Během embryogeneze vznikají játra a pankreat ze společného progenitoru/kmenové buňky. Přítomnost takové buňky v dospělém organismu, však nebyly dosud prokázána.

## Játra

### a) vlastní jaterní buňky

hepatocyty (albumin), oválné buňky (vlastní jaterní kmenové buňky, c-kit, SCF, Thy1 albumin / CK19), epiteliální buňky žlučovodu (CK19), hvězdčité buňky

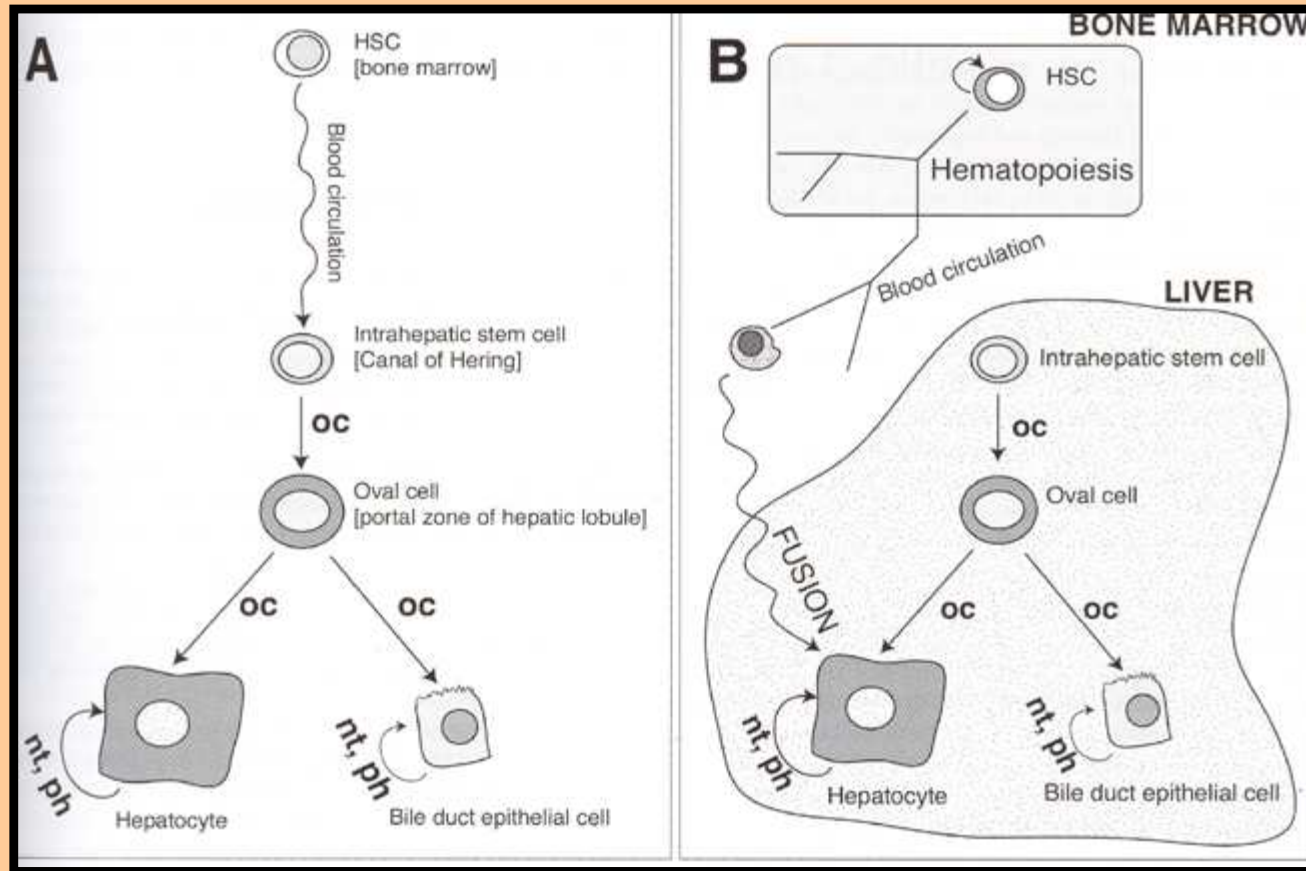
### b) další typy buněk v játrech

endotelie, krevní elementy, Kupferovy buňky, SP buňky,...

Jaterní tkáň běžně regeneruje proliferací vlastních hepatocytů (hepatotektomie), případně proliferací a diferenciací oválných buněk (otravy, poškození chemikáliemi). Jednotlivé typy buněk jsou preferovány podle typu poškození. Hlavní proliferaci indukující faktor je HGF (hepatocyte growth factor), na celkové regulaci regenerace se pak podílejí i IL-6 (interleukin 6), TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), TGF $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ), EGF (epidermal growth factor  $\alpha$ )

- regenerace jater HSCs: c-kit $^{+++}$ , Thy $^{+/-}$ , Lin $^{-}$ , Sca1 $^{+}$  (fenotyp KTLS) z kostní dřeně tvoří po transplantaci do jaterní tkáně, zdá se funkční hepatocyty
- regenerace jater MAPCs a BMSSCs: MAPCs se usazují v játrech (chiméry i transplatace) a i *in vitro* dávají vznik hepatocytů (?!). BMSSCs, se usazují v játrech, ale zdá se, že zejména fúzí s tamními hepatocyty (časté karyotypy při sex-mix transplantacích jsou XXXY a XXXXY). Plná funkčnost těchto MAPCs a BMSSCs derivátů však zatím nebyla prokázána.

## Model zapojení se HSCs / hematopoetických progenitorů v regeneraci jater

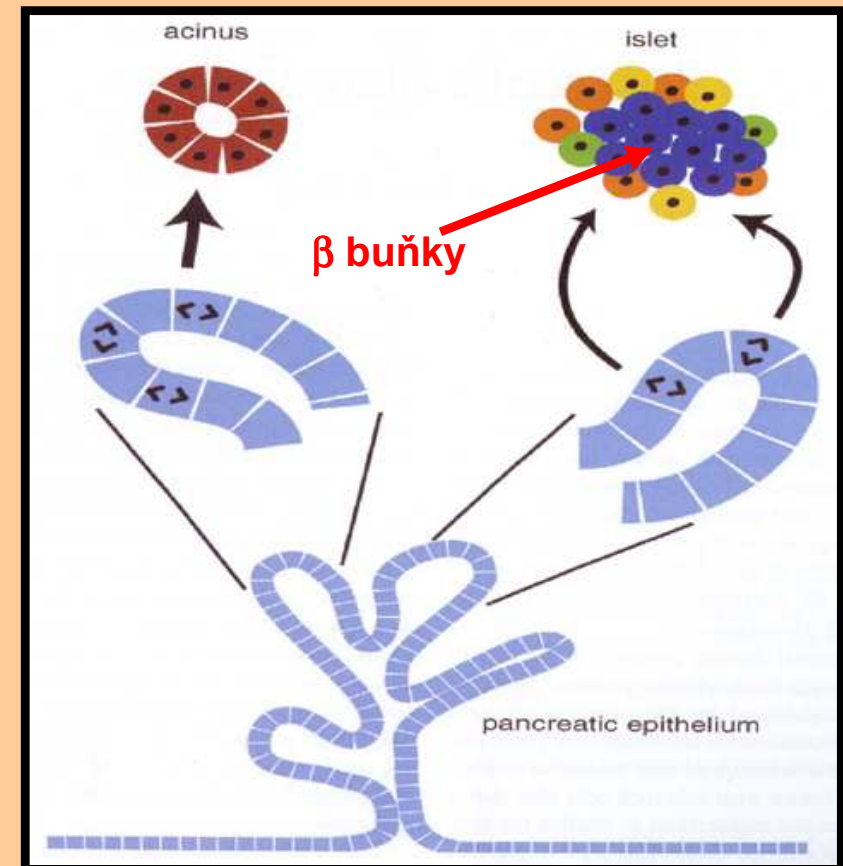


oc – regenerace z oválných buněk  
 nt – normální obnova jaterní tkáně  
 pt – obnova jaterní tkáně po odstranění její části

## Pankreas

- a) exokrinní buňky (trávicí enzymy) a epiteliální buňky tvořící kanálky pro odvod těchto enzymů do dvanáctníku
- b) endokrinní buňky  $\alpha$  (glukagon),  $\beta$  (insulin),  $\delta$  (somatostatin) a pp-buňky (pankreatický polypeptid)

- prekurzor pankreatu (embryonální SC) exprimuje transkripční faktor „*pdx1*“
- poslední studie ukazují, že  $\beta$  buňky se neobnovují z kmenových buněk, ale svou vlastní pomalou proliferací. Exprimují insulin, *Pax6*, *HNF3 $\beta$* ,..
- endokrinní buňky mají velice podobný vývojový program jako buňky neurální (NeuroD, *is11*, *Nkx2.2*, *Nkx6.2*,...) rozdíl je zejména v insulinu a *pdx1*
- epiteliální buňky kanálků se sebeobnovují podobně také exokrinní buňky acinů
- SCs pankreatu nebyly dosud objeveny
- diferenciace BMSSCs (?) do  $\beta$  buněk byla jednou prokázána, ale nezopakována
- buňky pankreatu mohou tvořit hepatocyty u člověka spontánně (*in vivo*), u potkana to lze navodit experimentálně, opačně to nefunguje, avšak exogenní exprese *pdx1* v hepatocytech z nich dělá buňky exprimující insulin a znaky exokrinních buněk, podobné i u buněk embryonálního epitelu střeva





## Kmenové buňky střevního epitelu

**STŘEVNÍ EPITEL** (u hlodavců se kompletně obmění ~ po 4 dnech)

**pohárkové buňky** – hlen

**Panethovy buňky** – bakteriocidní faktory (lysozym, defensiny +  $\text{TNF}\alpha$ )

**epiteliální buňky (apikální mikrovili)** – resorpce

**Neuro / enteroendokrinní buňky** – peptid. hormony

**M-buňky** – přenos antigenu k lymfocytům Peyerových plátů

**kmenové buňky střevního epitelu**

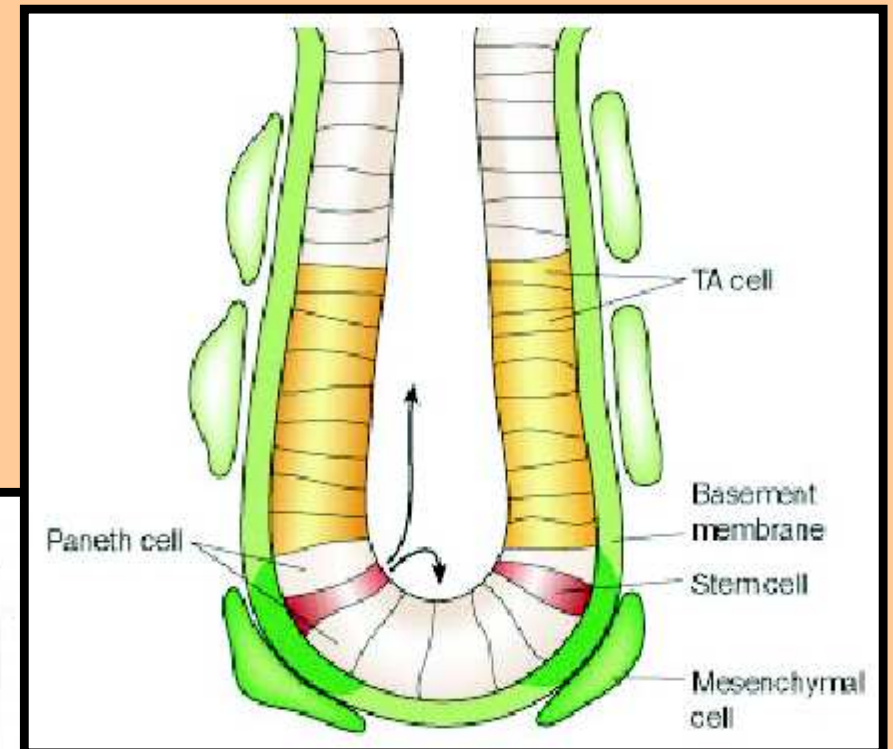
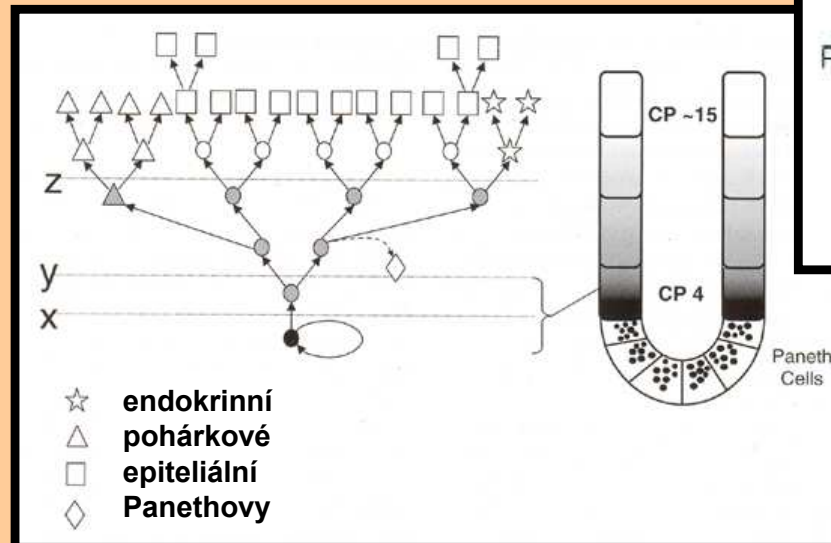
**mesenchymální buňky „lamina propria“**

**fibroblasty, fibrocyty, endotelie, buňky hladké svaloviny, a střevní subepiteliální myofibroblasty**

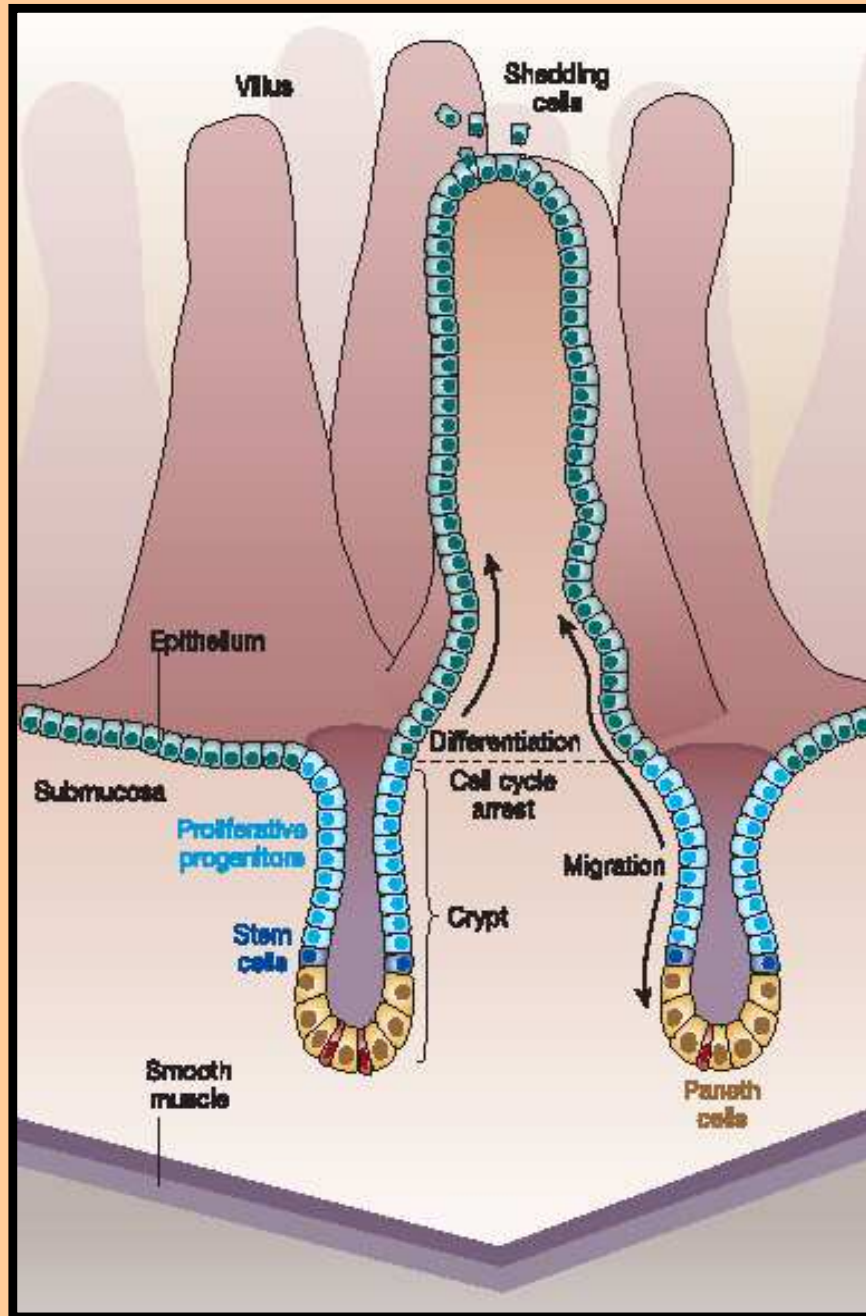
**- ISEMF (intestinal subepithelial myofibroblast)**

**kteří produkují růstové faktory regulující proliferaci a diferenciaci epiteliálních buněk**

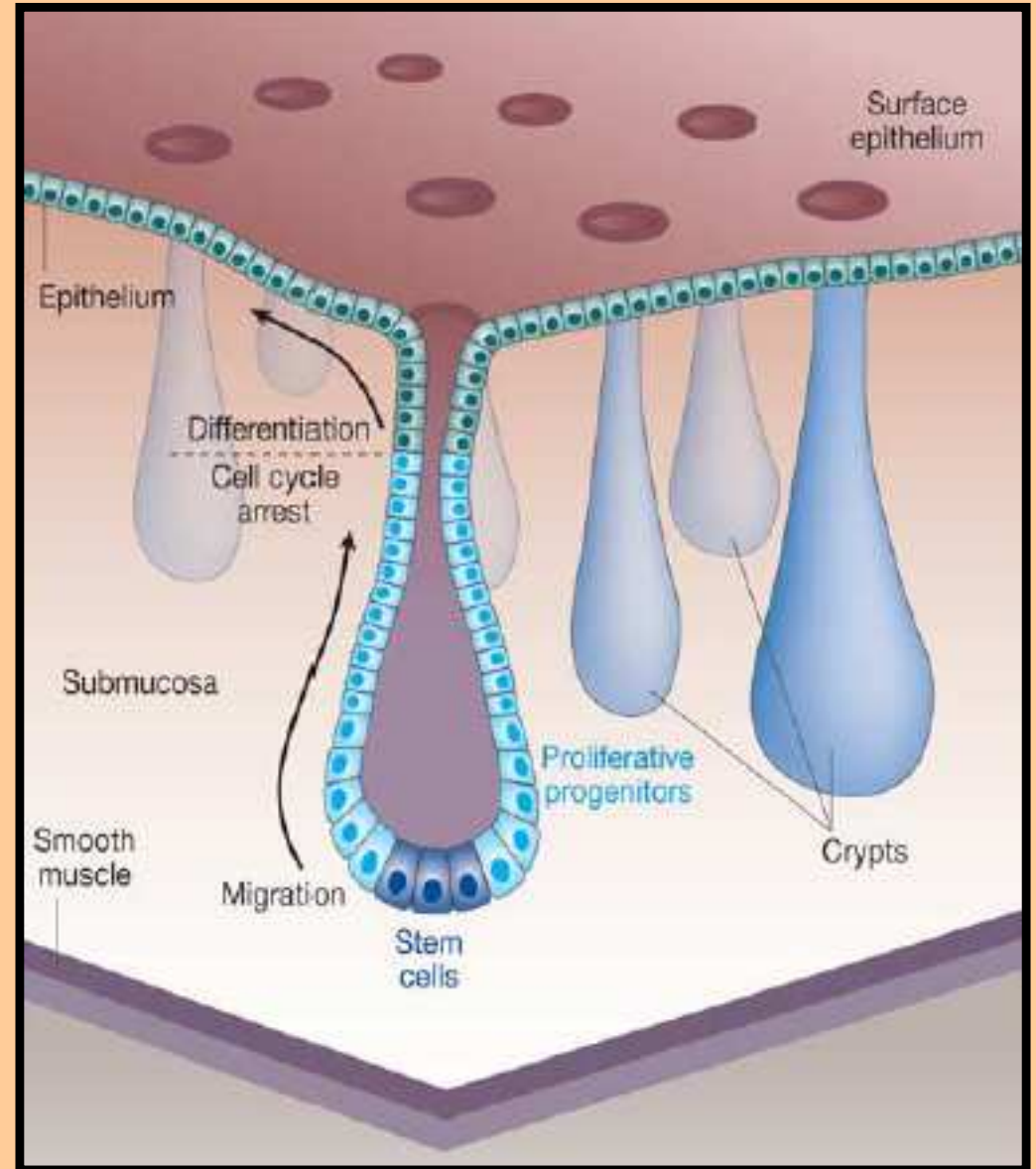
**(HGF, KGF,  $\text{TGF}\beta_2$ )**



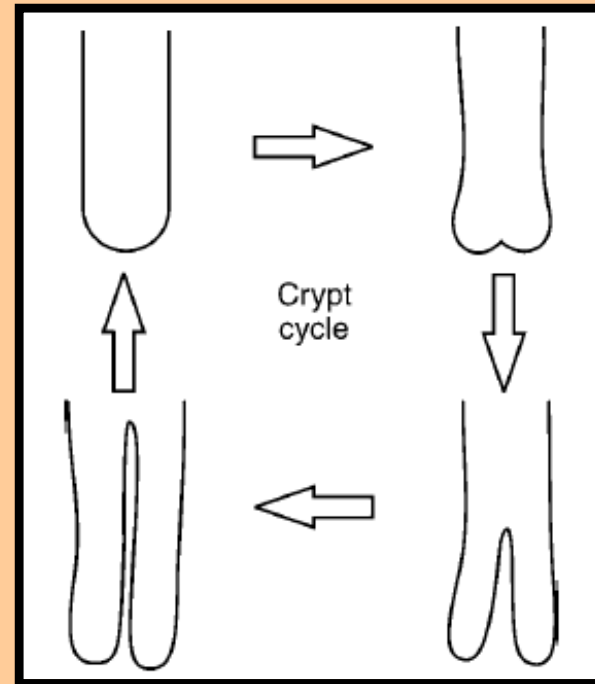
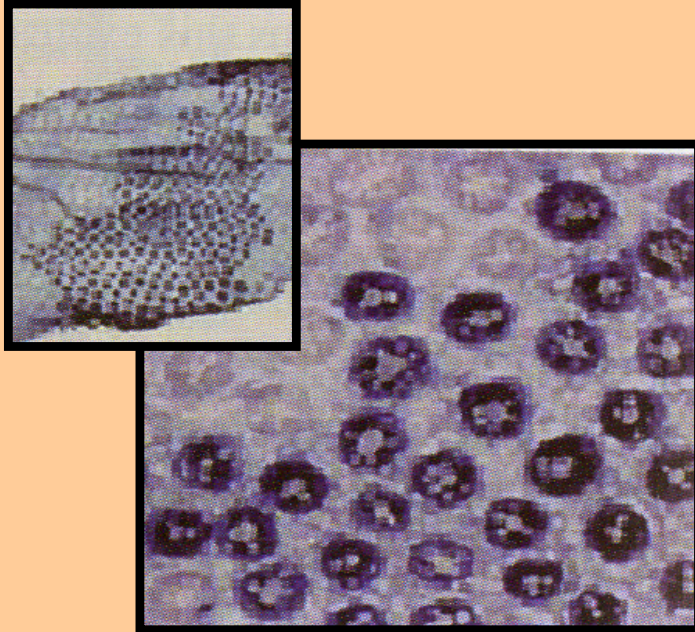
# tenké střevo



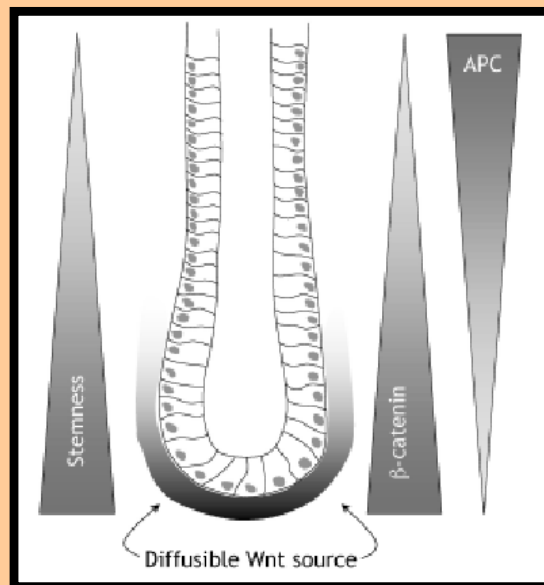
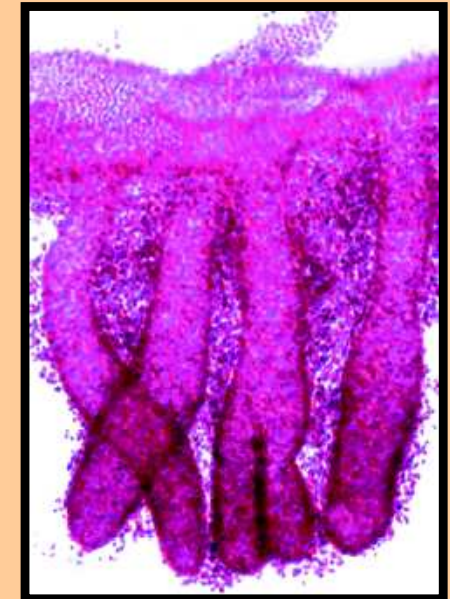
# tlusté střevo



**Předpokládá se, že všechny buňky každé střevní krypty jsou potomky jediné kmenové buňky**  
(klonální studie s chimérami)



**Jednotlivé krypty se pak množí dělením**  
(dané velikostí krypty)



**Nejklíčovějších faktory regulující diferenciaci střevního epitelu jsou Wnt, BMP a Notch. V případě tlustého střeva také gradient NaBt, produkovaného bakteriemi v jeho lumen.**  
APC – adenomatous polyposis coli

Pozn. MSCs/BMSSCs se mohou integrovat do střevního epitelu, ale neplní zde funkci epiteliálních buněk. Integrují se i do lamina propria, tvoří ISEMFs a produkcí růstových faktorů podporují proliferaci střevního epitelu (viz. MSCs)

# Plíce

## PLICNÍ EPITEL

(u hlodavců se kompletně obmění ~ po 100 dnech)

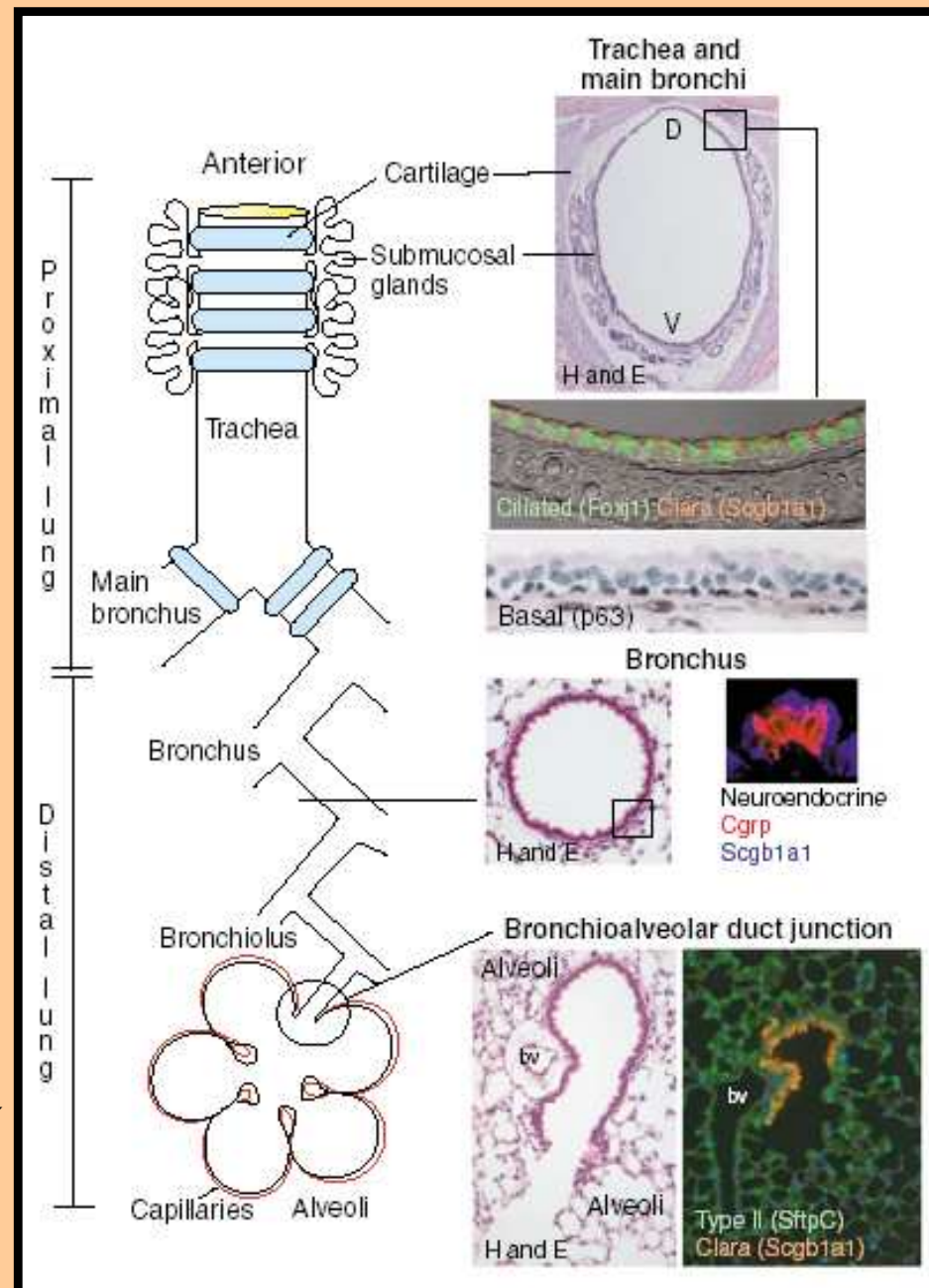
### *Proximální část plic*

(trachea a velké průdušnice/bronchy)

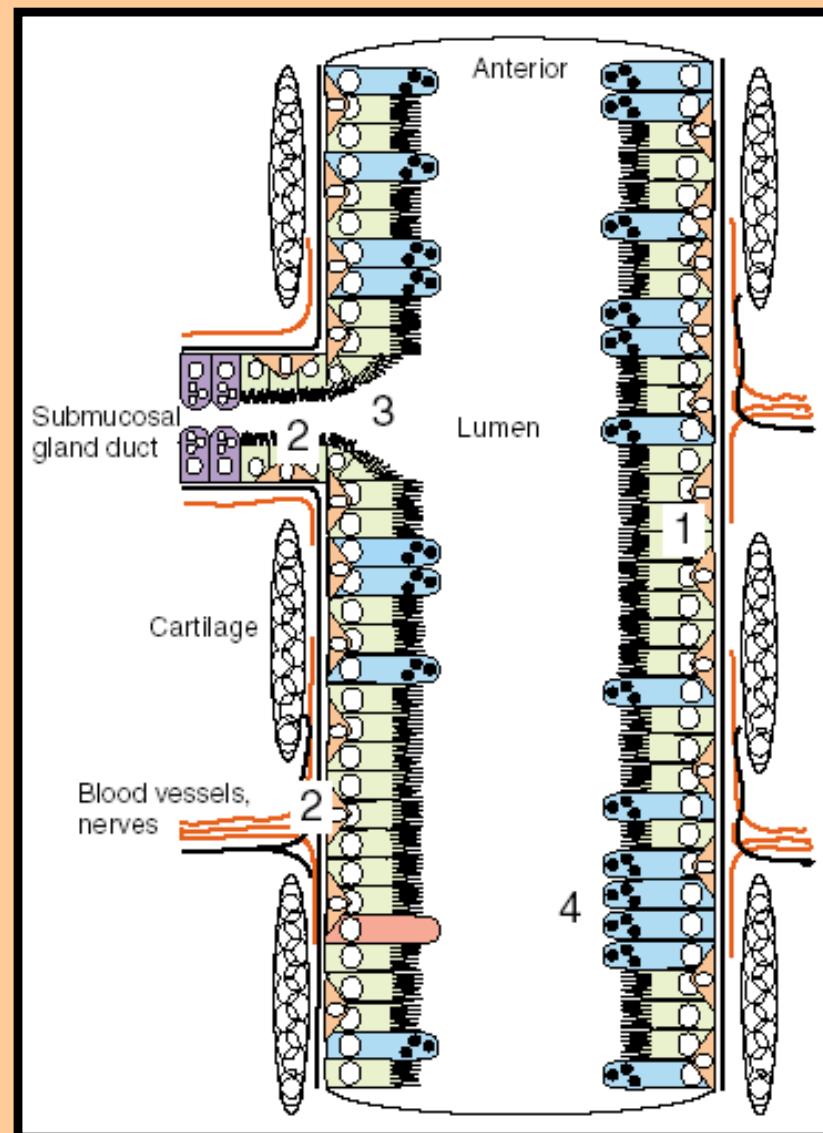
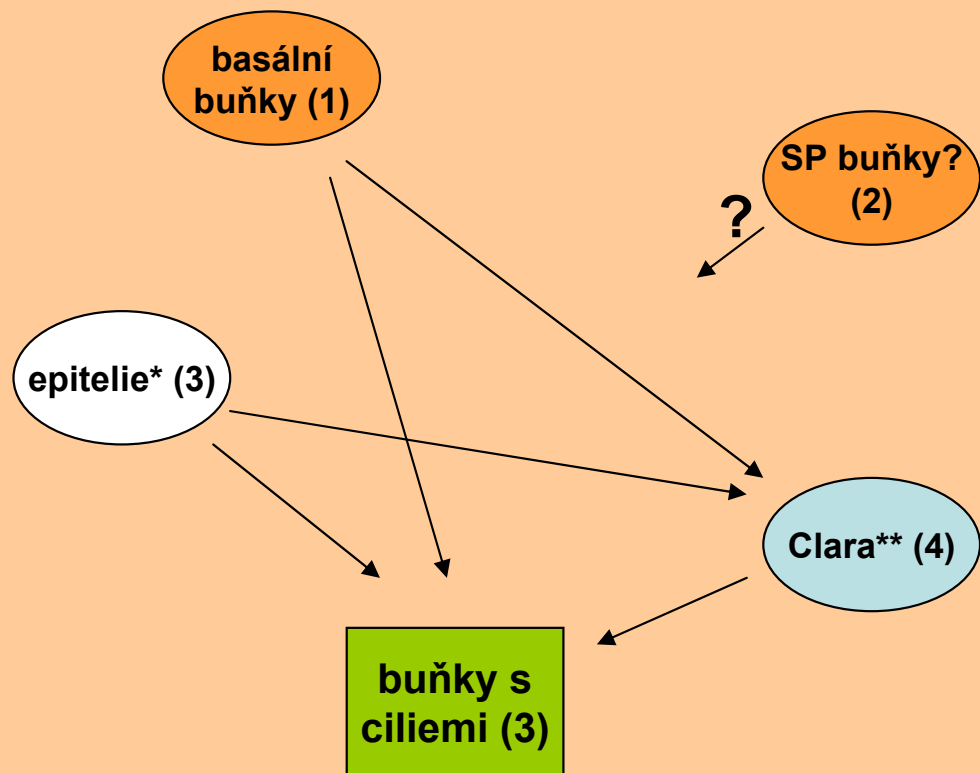
- epiteliální buňky s ciliemi (Foxj1+)
- Clara a buňky podobné Clara buňkám (Scgb1a1 – sekretoglobin+)
- bazální buňky (p63+)
- neuroendokrinní buňky

### *Distální část plic* (průdušky, průdušinky a alveoli)

- epiteliální buňky s ciliemi (Foxj1+)
- Clara buňky (Scgb1a1+)
- varianta Clara buněk - Clara<sup>v</sup>
- neuroendokrinní buňky, tvořící neuroendokrinní tělíška (NEBs, exprimují od calcitoninu odvozený peptid – Cgrp+)
- buňky typu I a II v alveolech. Typ II produkuje proteinové surfaktanty, typ I těsně přiléhá ke kapilárám
- bronchoalveolární kmenové buňky (BASCs)



## Opravné mechanismy v proximální části plic

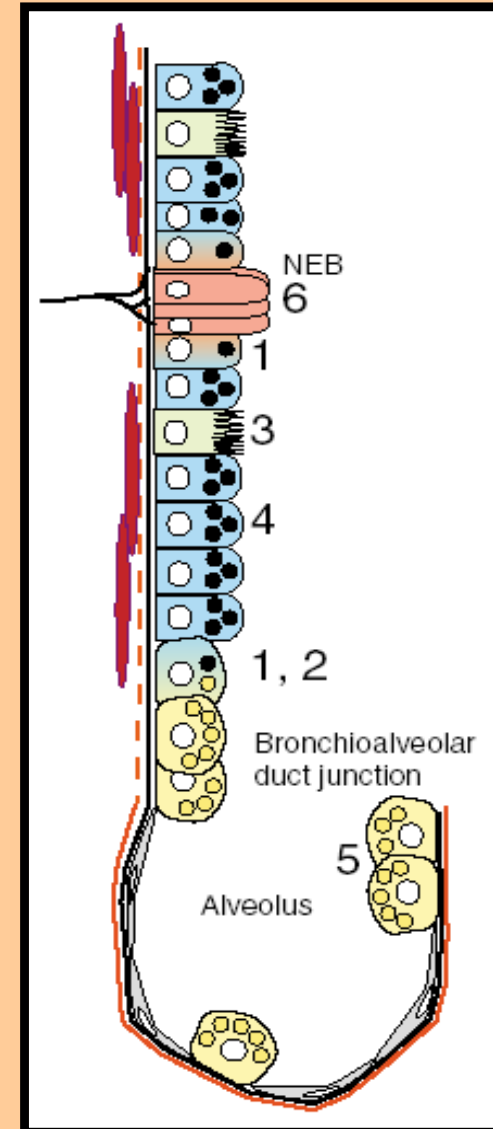
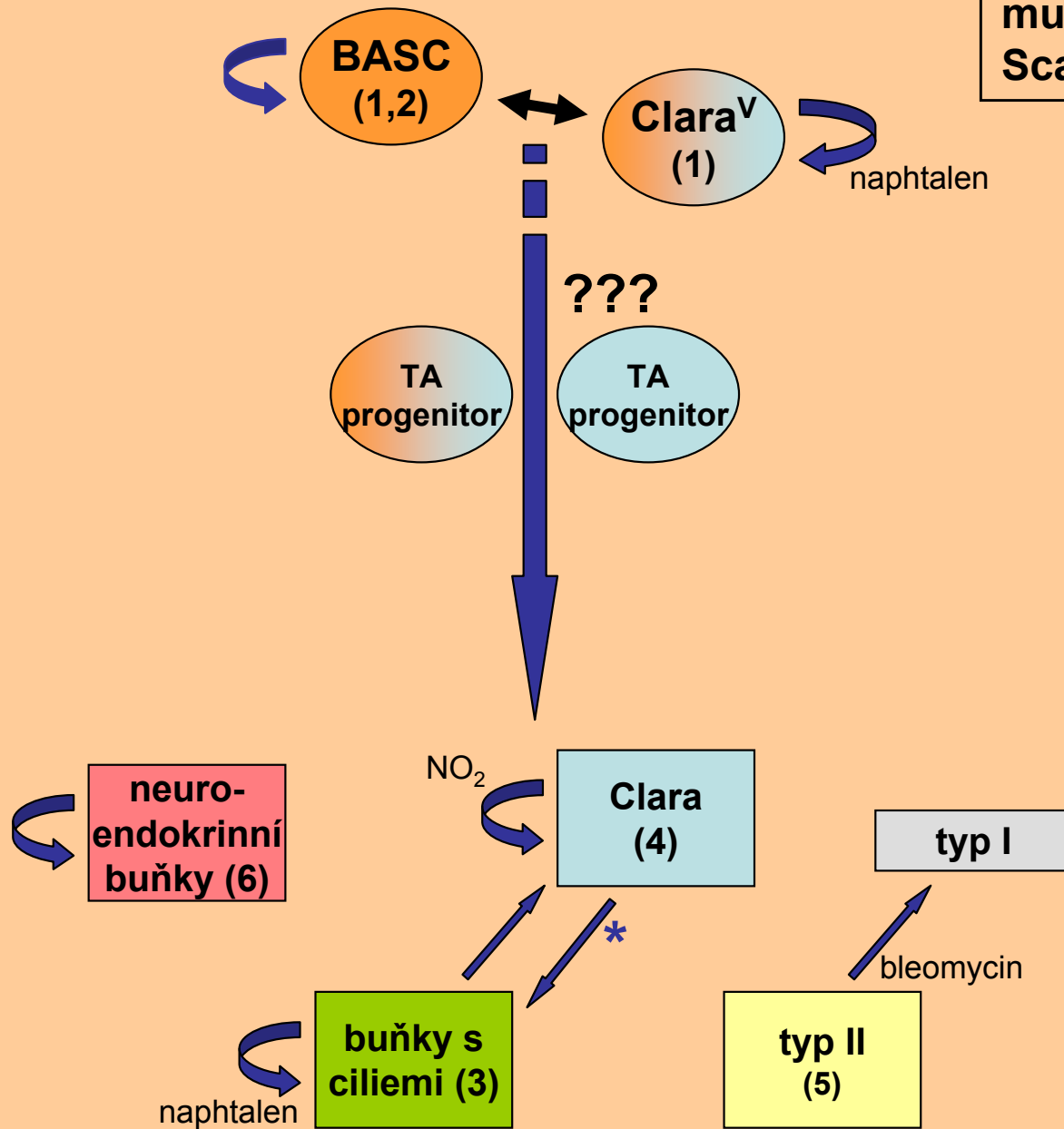


\* epiteliální buňky submukózních žlaz, mohou regenerovat epitel průdušnic

\*\* nahrazují buňky s ciliemi po poškození oxidanty

# Opravné mechanismy v distální části plic

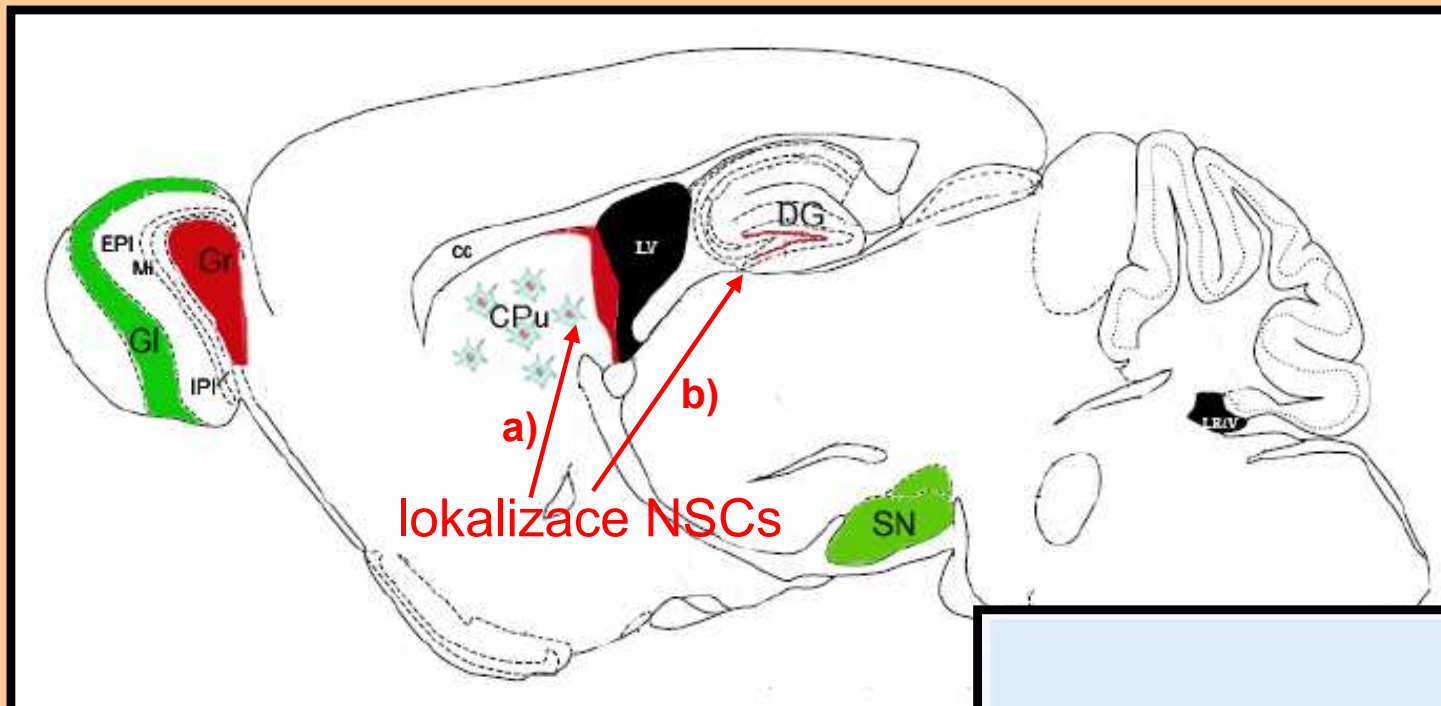
multipotentí BASCs mají fenotyp  $Sca1^+$ ,  $CD34^+$ ,  $CD45^-$ ,  $Sftpc/Scgb1a1^+$



\*umí to všechny Clara buňky ?!

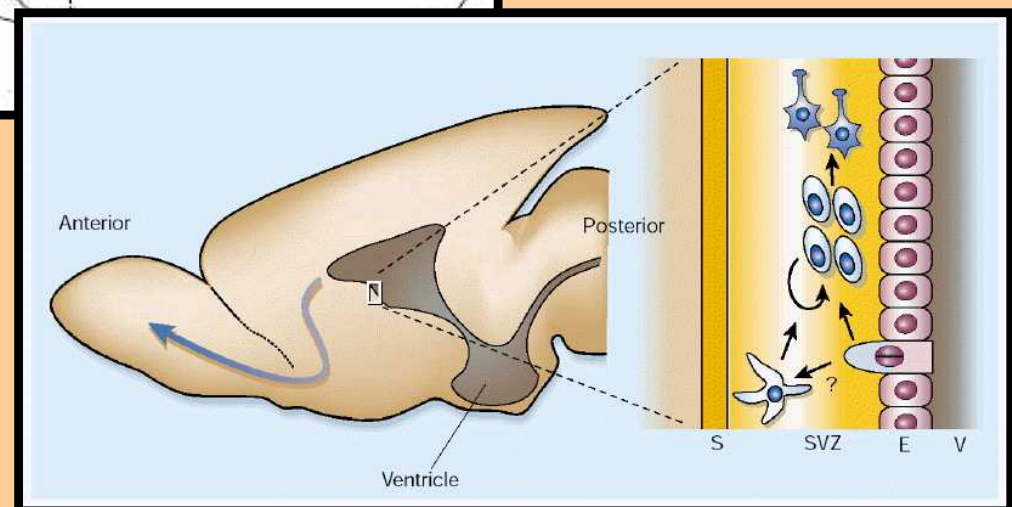
# SSC „ektodermálního“ původu

## Neurální kmenové buňky – NSCs (Neural stem cells)



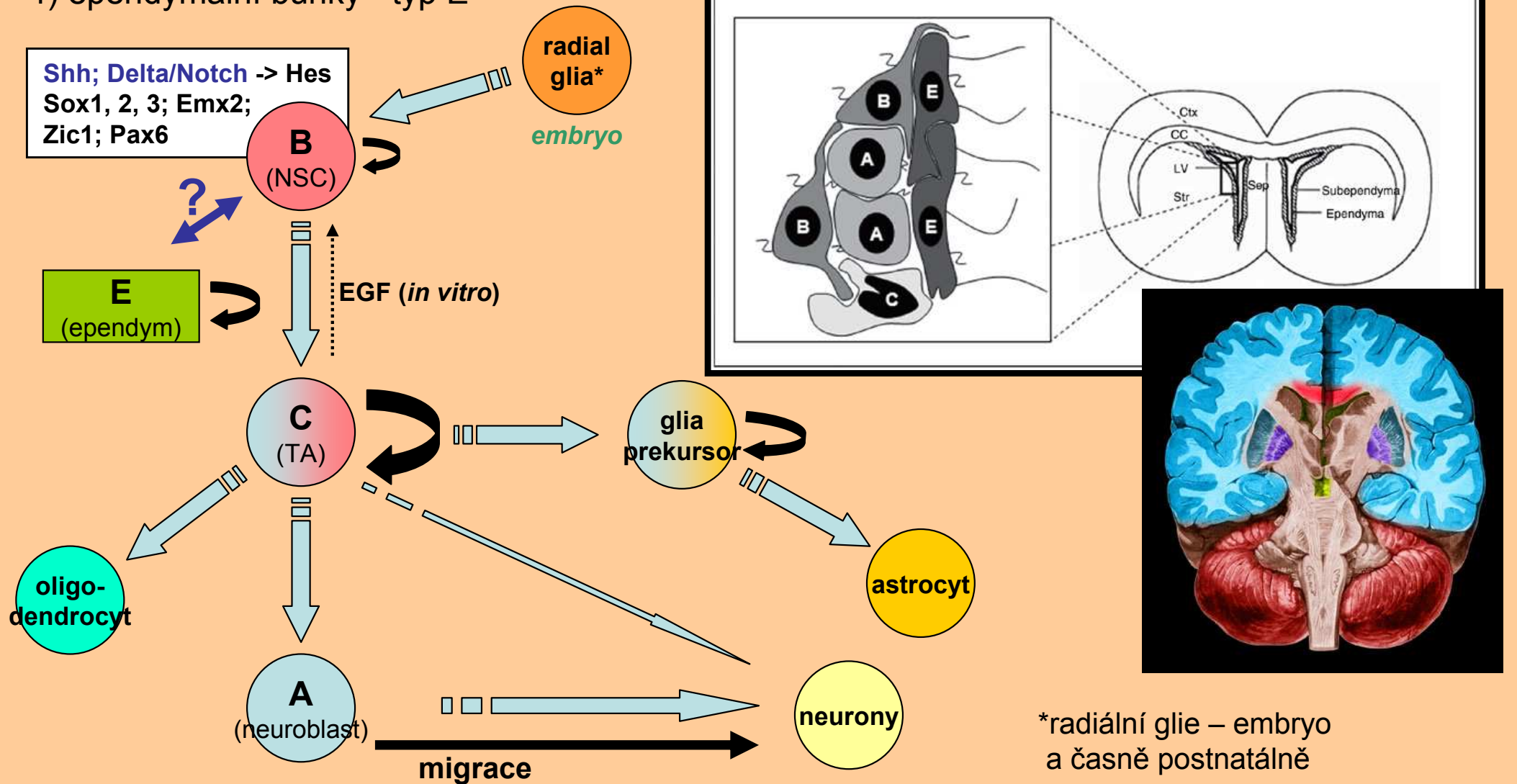
- a) subventrikulární zóna (SVZ), postranní komory
- b) subgranulární vrstva DG

GI – glomerulární vrstva  
Gr – granulární vrstva  
EPI – vnější plexiformní vrstva  
Mi – vrstva mitral buněk  
IPL – vnitřní plexiformní vrstva  
cc - corpus callosum  
LV - lateral ventricle  
CPu - caudate putamen (striatum)  
DG - dentate gyrus  
SN - substantia nigra



# Oblast s NSCs obsahuje čtyři typy buněk

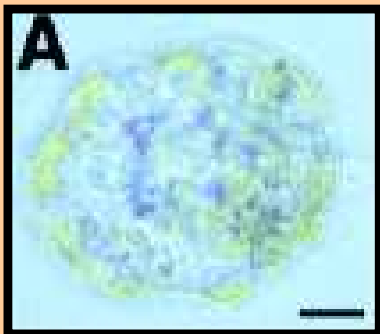
- 1) pomalu proliferující, astrocytům podobné (GFAP<sup>+</sup>/nestin<sup>+</sup>/SSEA1<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>) buňky - typ B = NSCs
- 2) intenzivně proliferující buňky vzniklé z buněk B - typ C (TA progenitory, přechodně/transientně se dělící progenitory)
- 3) z buněk typu C vznikají buňky A = neuroblasty
- 4) ependymální buňky - typ E



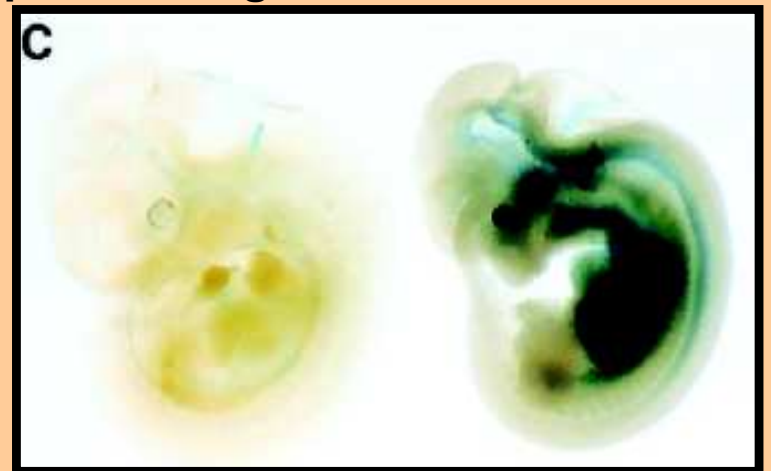


## Další charakterizace NSCs

- NSCs jsou široce multipotentní a experimenty s chimérami ukázaly, že NSCs dávají vznik buňkám všech tří zárodečných listů (netvoří pohlavní buňky, nebylo prokázáno)
- u chimér se také NSCs nepodílí na hematopoéze i přesto, že v případě likvidace hematopoézy zářením, injikované NSCs ji obnoví (obojí děláno s myši ROSA26)
- na druhou stranu není jasné, zda NSCs tvoří všechny typy nervů a glií
- neurální multipotentní progenitory byly izolovány i z retiny, optického nervu, hypothalamu, čichových laloků, čichového epitelu, a míchy
- tyto směsné populace nejsou schopné dlouhodobé proliferace *in vitro* tak jako NSCs a také si zachovávají některé epigenetické znaky podle místa původu
- po poškození mozku je možno neurogenezi detekovat i v striatu, neokortexu nebo v místech kortiko-spinálních motoneuronů
- NSCs s věkem ubývá, podobně jako ostatní adultní SSCs, každopádně je lze izolovat z mozkové tkáně i několik hodin (4-6h) po diagnóze klinické smrti
- *in vitro* se NSCs kultivují v podobě tzv. „neurosféry“ ve speciálních médiích určených pro expanzi neurálních progenitorů, bez séra, ale s nadbytkem FGF2 a EGF
- „neurosféry“ jsou plovoucí útvary s navýšeným množstvím neurálních progenitorů a NSCs, lze v nich detekovat již i množství zralejších typů nervů i glií
- i neurální progenitory (TA) lze dlouhodobě kultivovat

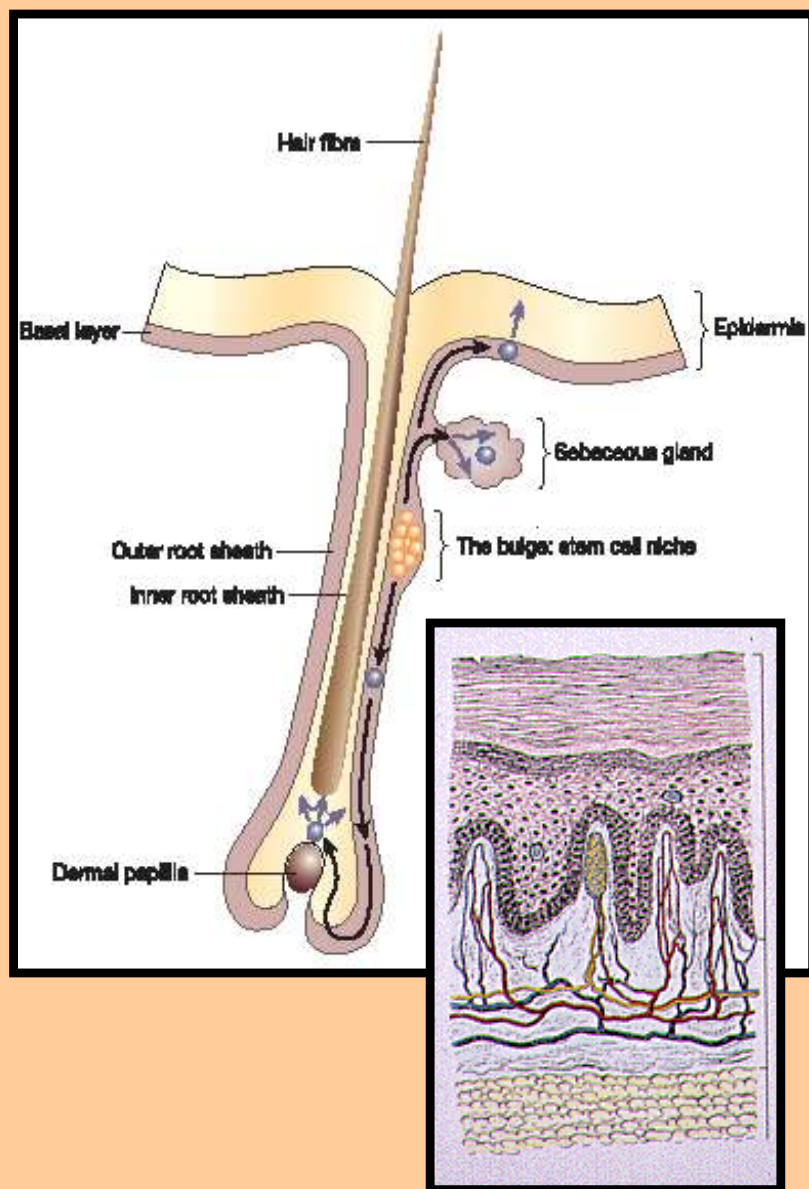


← Chimerická blastocysta vytvořená po smíchání blastomer normální a ROSA26 myši a myší embrya (11 dpc) normální a s ROSA26 chimerické myši.



## Epiteliální kožní kmenové buňky – ESSCs (Epithelial skin stem cells)

**Kůže** – dermis (mesoderm -> mesenchym) + **epidermis (ektoderm)**



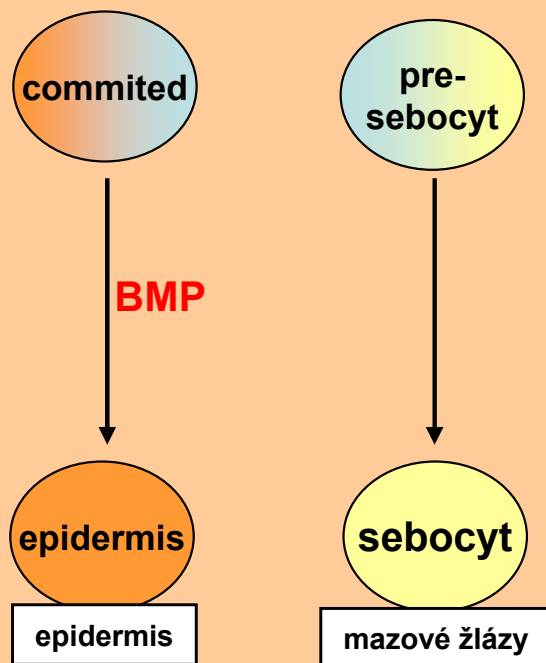
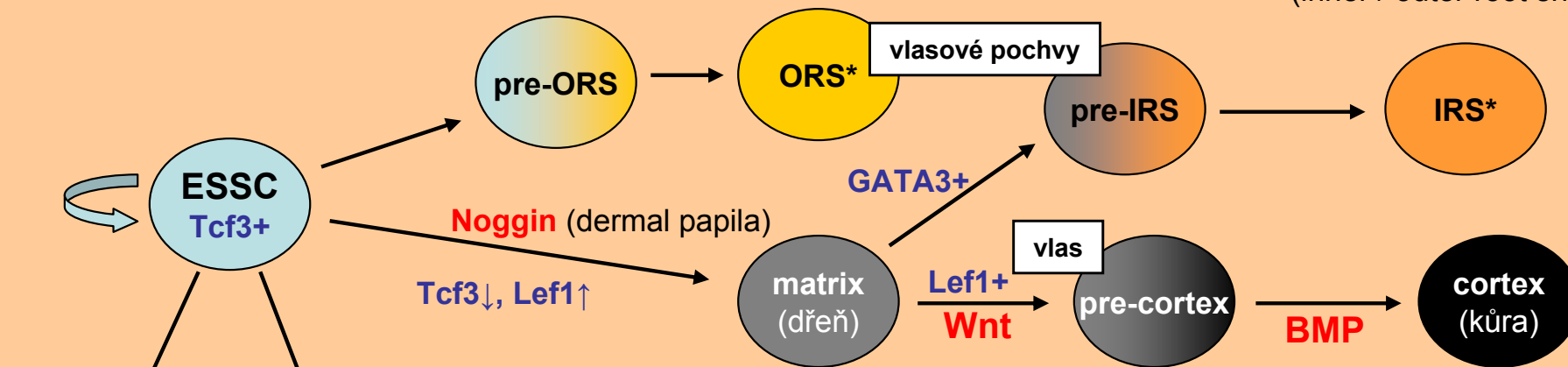
ESSCs ( $\text{Integrin } \alpha 6^+ / \text{CD71}^- / \text{K15}^+ / \text{K19}^+ / \text{CD34}^+$ )<sup>1</sup> jsou lokalizovány ve výduťi po straně vlasové pochvy. Odtud v případě potřeby migrují jak do bazální vrstvy krycí epidermis, tak k základu vlasu k dermální papile<sup>2</sup>. V základně vlasu, u dermální papily, ESSCs vytváří „sekundární“ populaci kmenových buněk, odpovědných za růst vlasu. V basální vrstvě epidermis dávají vznik aktivně se dělícím keratinocytům, exprimujícím keratiny K5 a K14. Po jejich přechodu do „stratum spinosum“ se tyto keratinocyty přestanou dělit a nastupují proces terminální diferenciace kdy keratiny K5/K14 jsou nahrazeny keratiny K1 a K10. Poté dochází k syntéze bariérových proteinů jako je involucrin, loricrin, ..., zplošťování buněk a jejich odumírání.

<sup>1</sup> CD71 – receptor pro transferin

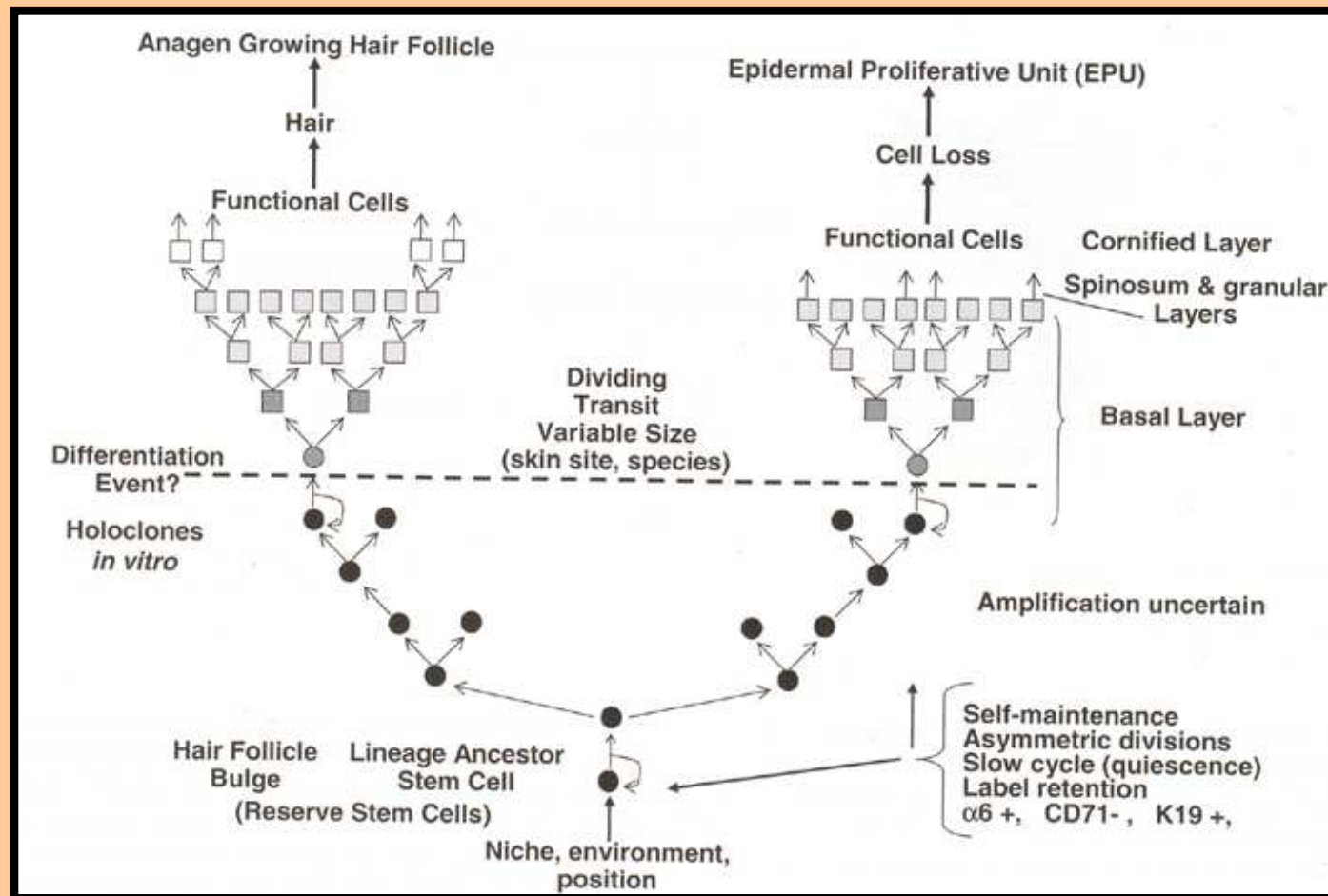
<sup>2</sup> dermální papila je shluk mesenchymálních buněk regulující růst chlupu

# Specializace a signalizace v epidemis

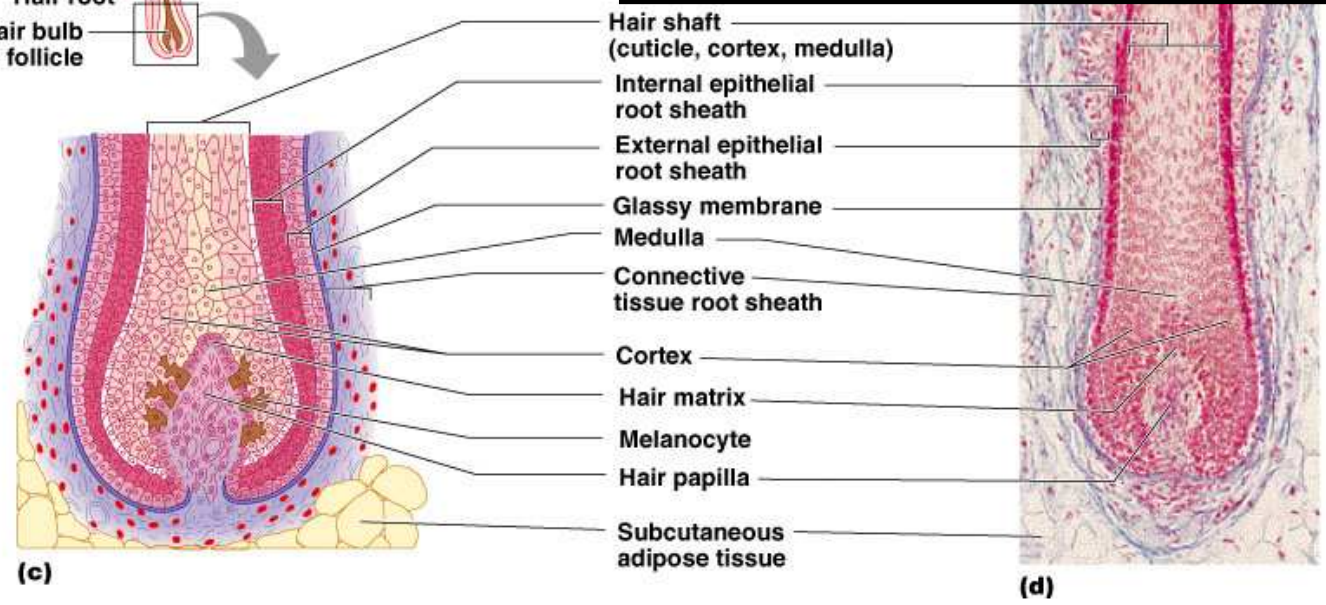
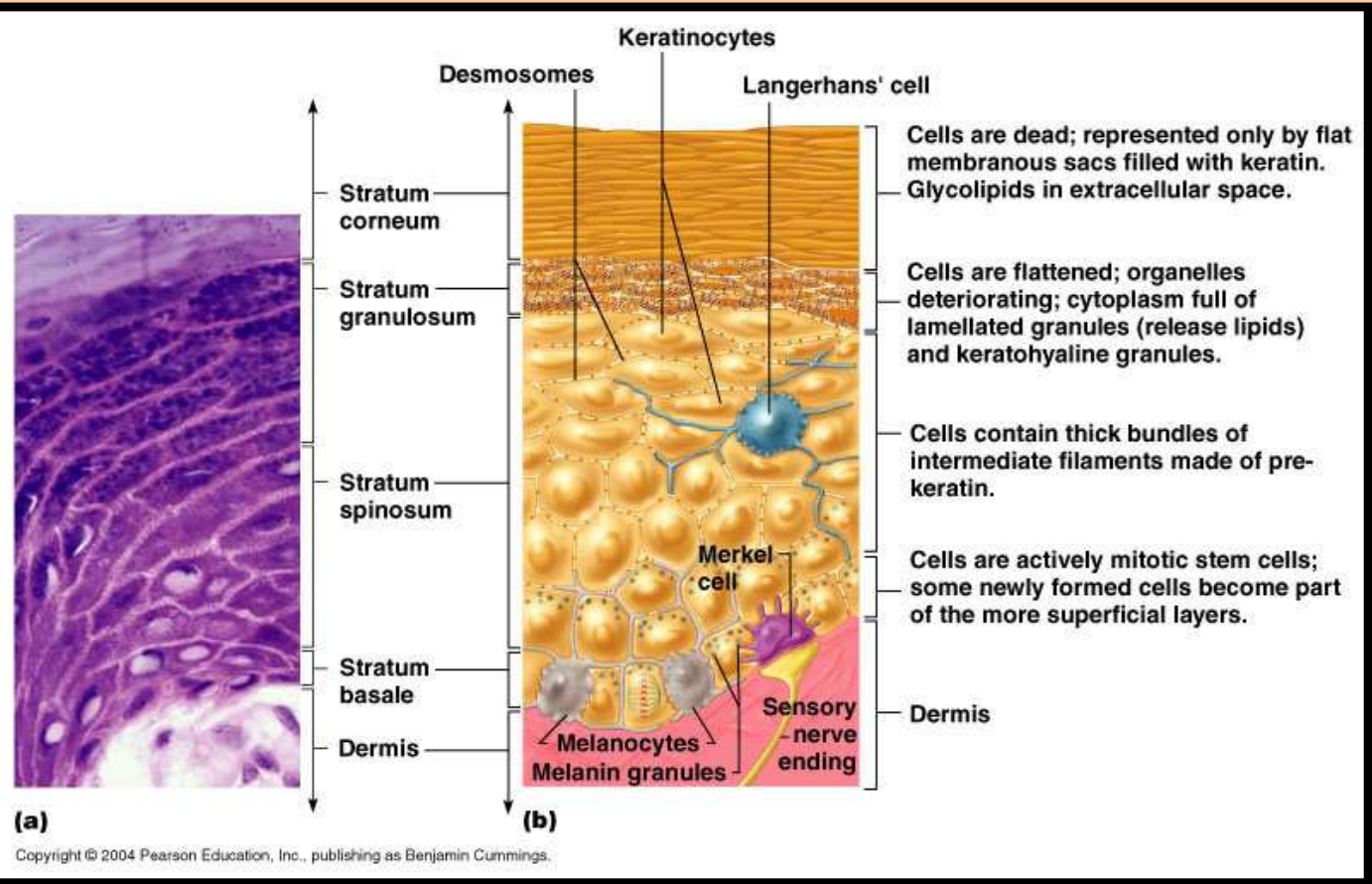
\*IRS – vnitřní vlasová pochva  
 ORS – vnější vlasová pochva  
 (inner / outer root sheath)



cytokiny  
 transkripční faktory



# Morfologie epidermis a vlasové cibulky



Poznámka.  
**Epiteliální kmenové buňky podobné ESSCs byly také nalezeny v oční rohovce. Tyto buňky jsou zde pravděpodobně pouze bipotentní, avšak po jejich přenosu do epidermis, se chovají jako ESSCs a jsou multipotentní!**

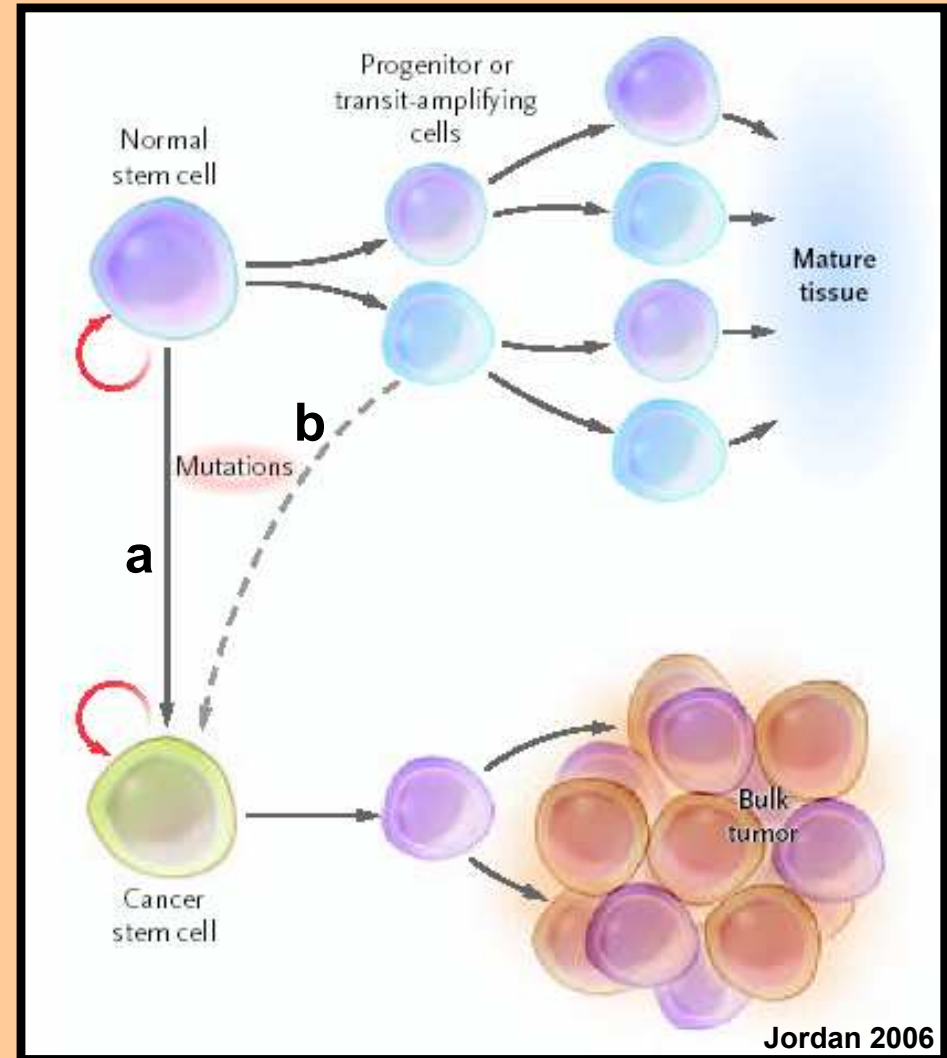
# Nádorové kmenové buňky - CSCs (Cancer stem cells)

## Původ CSCs

- a) somatické kmenové buňky
- b) TA buňky (progenitory)\*

Podstatou je akumulace chyb v regulaci diferenciaci, proliferace a apoptózy. Tyto chyby mohou být jak na základě poškození/změn DNA (genů – mutace, translokace,..), tak na úrovni epigenetických mechanismů, případně kombinací obou.

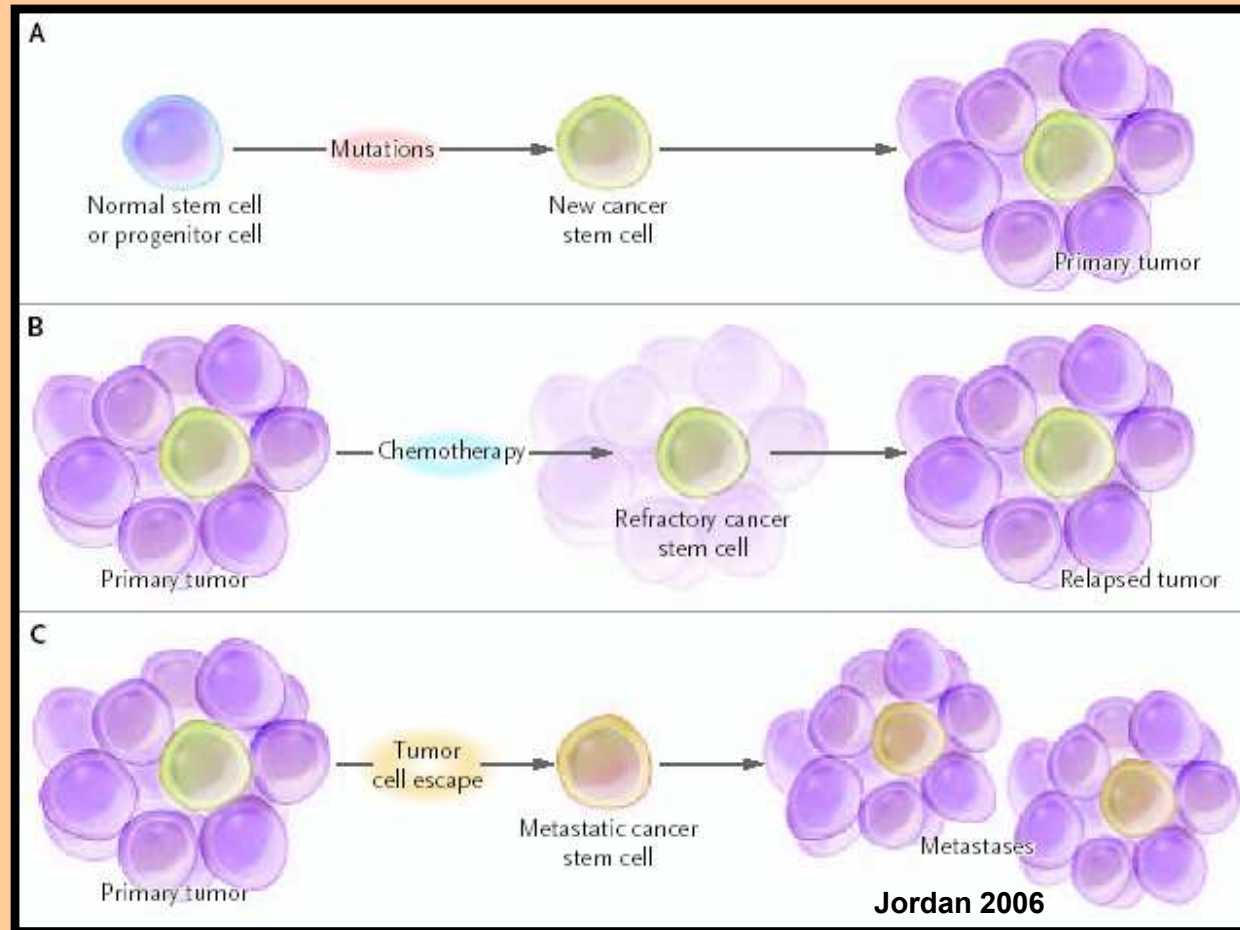
=> chybná odpověď na vnější signály (růstové faktory, proteiny ECM, buňky)



\* Lze i experimentálně navodit zvýšením exprese oncogenů, např *ras* + *myc*.

## Kmenové buňky nádorů jsou zodpovědné za návrat (relaps) onemocnění a metastáze

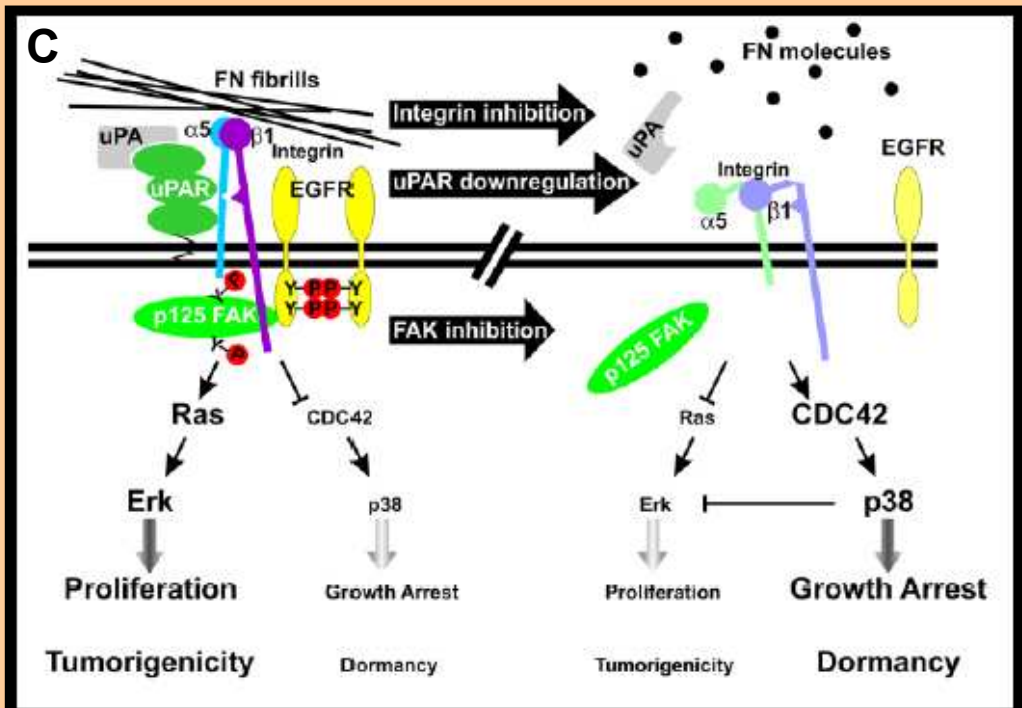
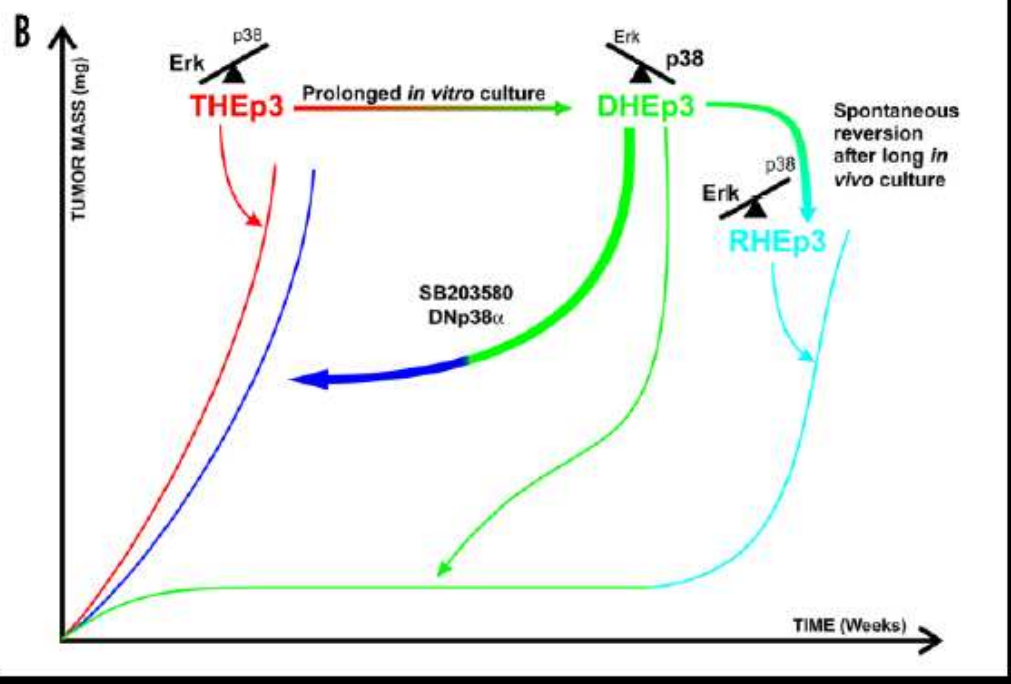
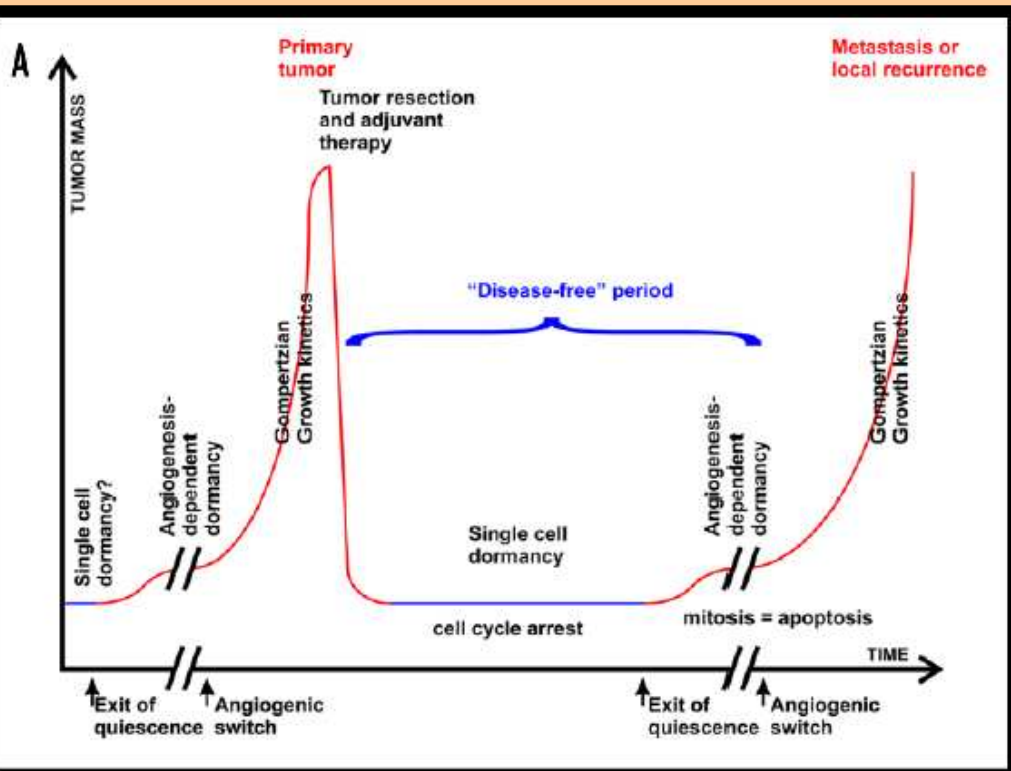
CSCs podobně jako jiné SSC -> rezistence na toxické faktory (MDR proteiny)  
-> pomalá proliferace



- mají všechny nádory benigní/maligní/metastázující CSC?
- ne všechny buňky izolované z nádorů jsou schopny dát nádorům vzniknout
- *in vitro* jsou nádorové linie s SP buňkami (jejich SC ???) i bez SP buněk!
- SSCs jsou pro danou tkáň prakticky stejné, u CSCs to ale neplatí (rozdíly ve fenotypu i genotypu) = mnohé nádory i CSCs mají jedinečné vlastnosti!

# Model regulace tumorogeneze přesmykem aktivity MAPK Erk a p38

Ranganathan 2006

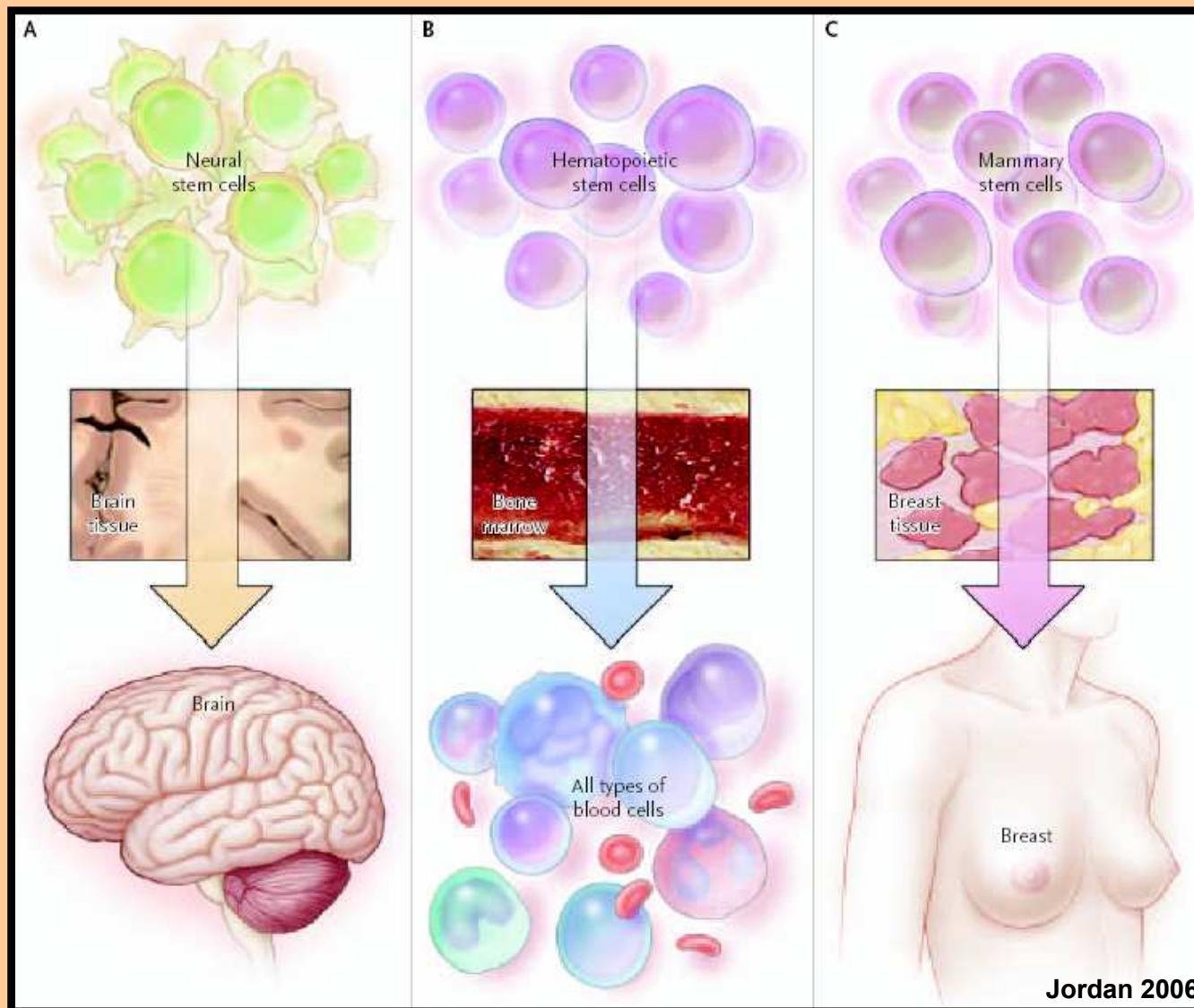


A – znázornění progrese nádoru u pacienta

B – proliferace x dormance (quiescence) nádorových buněk v závislosti na aktivitě MAPK Erk a p38

C – mechanismus aktivace Erk a p38

**Dobře prokázané CSCs jsou u nádorů původu  
neurálního hematopoetického prsního**





## Hematopoetické CSCs

chronická myeloidní leukemie (**CML**)  
akutní myeloidní leukemie (**AML**)  
akutní lymfoblastická leukemie (**ALL**)

**CSCs byly jasně prokázány u AML a CML, a jsou s vysokou pravděpodobností i u ALL. Díky tomu, je u těchto onemocnění onemocnění nedostatečné působení běžných antiproliferativních farmak.**

**AML - IL3-R<sup>+</sup> (není u normálních HSCs), CD33<sup>+</sup> (IgSF, sialoadhesin)**

**- CD33 se zdá být vhodným pro rozpoznání AML CSCs (imunoterapie), navíc byl prokázán u některých dalších leukemických CSCs.**

**- vysoká aktivita NF- $\kappa$ B a PI3K u AML SCs, ale ne u HSCs, farmakologická inhibice NF- $\kappa$ B a PI3K nebo mTOR (target of rapamycin; substrát PI3K) snižuje proliferaci AML SCs, ale ne HSCs (=>CSCs specifická terapie)**

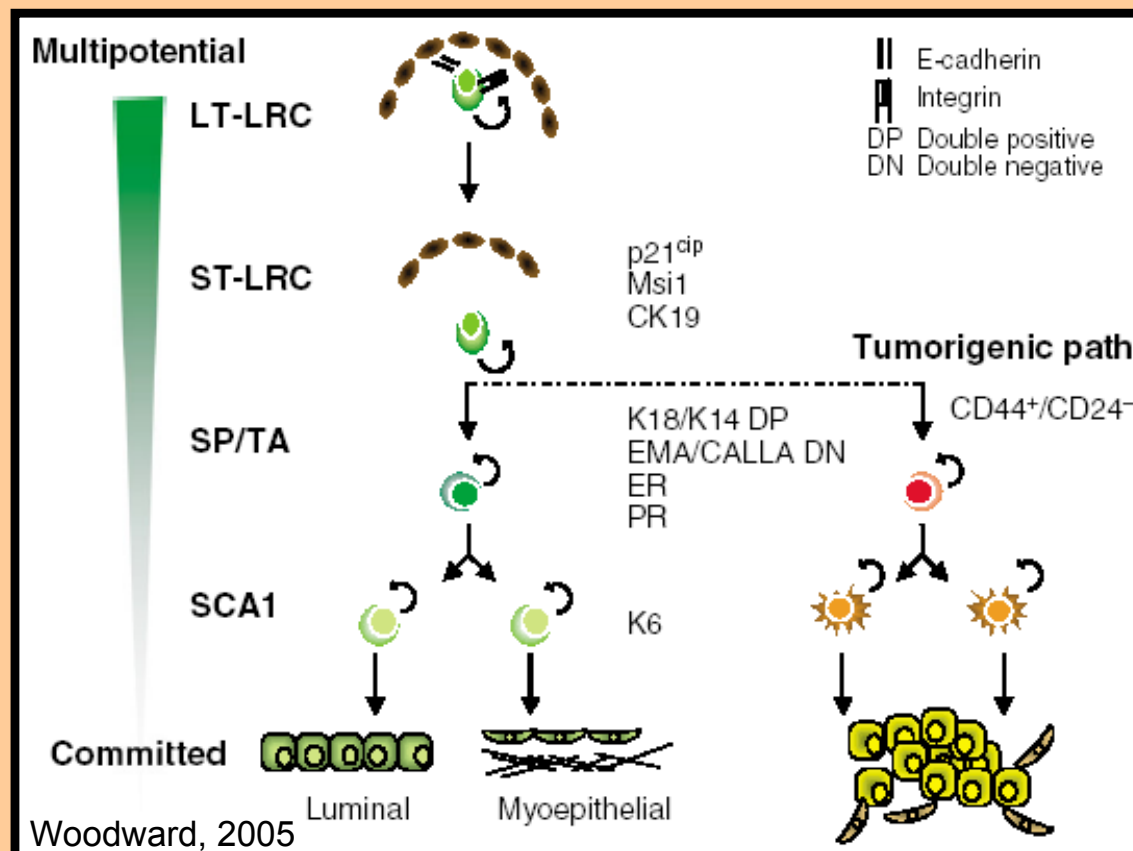
**CML - charakteristický fúzní gen BCR-ABL (=> nadbytek ABL kinázy), inhibitory ABL (imatinib mesylate, dasatinib) potlačují leukemii, ale ne její SCs, => vysazení vede k obnově onemocnění**

## Neurální CSC - NCSC

- neurální CSCs se připravují a vytvářejí/rostou podobně jako NSCs sférické plovoucí útvary (= neurosféry)
- neurosféry mohou být rozsuspendovány na jednotlivé buňky, z nichž některé jsou multipotentní a jsou schopné vytvořit novou neurosféru, případně dávat vznik všem známým skupinám neurálních buněk (neurony + glie, stejné pro NSC i NCSC)
- NSCs i NCSCs exprimují povrchový antigen CD133 (AC133), u některých gliomů bylo prokázáno, že pouze CD133<sup>+</sup> buňky izolované z těchto nádorů jsou schopné tyto nádory po transplantaci vyvolávat, kdežto ostatní buňky ze stejného nádoru ne, a to ani v případě aplikace o 10<sup>4</sup> vyšší koncentrace buněk
- u NCSCs je také dobře prokázán vznik jak z NSCs, tak z neurálních prekurzorů (TA buněk, pro které jsou známy dlouhodobé kultivační podmínky pro růst *in vitro*)

## SC a CSC mléčných žláz – MaSC a MaCSC (Mammary CSC)

- **MaSCs** → SP populace **Sca1<sup>+</sup>** a liniově negativních (B220<sup>-</sup>, Gr-1<sup>-</sup>, Mac-1<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD5<sup>-</sup> a CD8<sup>-</sup>) buněk tvořících „mammosféry“ (podobně jako neurosféry obsahují jak SCs, tak množství progenitorů a diferencovanějších typů buněk)
- kmenové buňky mléčných žláz jsou schopné dát vznik prsní tkáni po transplantaci do vhodného prostředí
- z metastázujiících prsních nádorů byly izolovány buňky **CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>**, schopné tyto nádory vyvolávat po následné transplantaci, oproti 100 násobnému množství ostatních buněk izolovaných z takového nádoru
- pravděpodobně ne všechny **CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>** mají potenciál CSC
- **CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>** buňky nejsou také pravděpodobně odvozeny od MaSCs ale od TA



LT-LRC (long term label retaining cell)  
 ST-LRC (short term LRC)  
 ER – receptor pro estrogen  
 PR – receptor pro progesteron  
 CD24 – povrchový protein s GPI kotvou  
 CD44 (H-CAM)

## **METAPLASIE (- TRANSDIFERENCIACE?!)**

- metaplasie** – přeměna kmenové nebo progenitorové buňky jednoho typu tkáně v progenitor tkáně jiné
- transdiferenciace** – přeměna buňky jednoho typu na buňku typu jiného bez průchodu buněčným cyklem
- transdeterminace** – metaplasie v průběhu embryogeneze

Rawlins & Hogan (2006) Development 133, 2455-2465

### **Potenciální možnosti:**

#### **1) Přímá přeměna fenotypu buňky jednoho typu v buňku typu jiného**

- s proliferací (metaplasie)
- bez proliferace (pravá transdiferenciace)

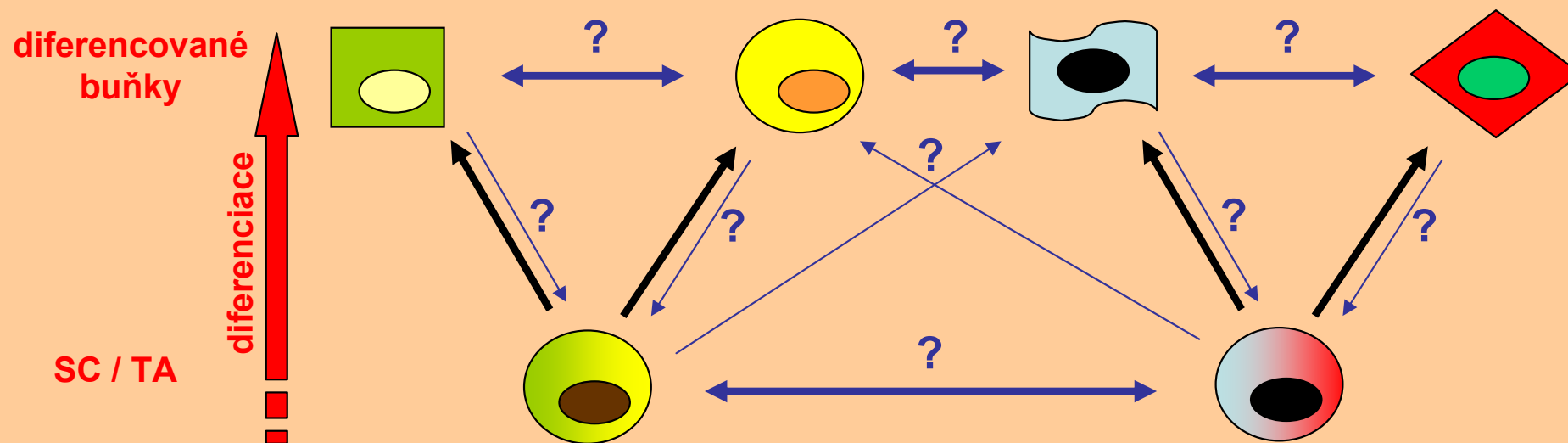
#### **2) Prvně směrem zpět v diferenciací řadě a následně diferenciací do jiné diferenciací řady (rediferenciace a následně diferenciací).**

Za pozorované jevy zřejmě ale odpovídají zbytkové populace progenitorů.

- s proliferací
- bez proliferace (silně nepravděpodobná existence)

### **Přístupy:**

- Vnějšími faktory**
- Exogenní expresí vhodných genů**
- Přeprogramováním jádra cytoplasmou jiné buňky**  
(sem patří i terapeutické klonování)
- Kombinací výše zmíněných postupů**



- změny v metylaci DNA / metylačním paternu (CpG a CpA oblasti)  
tyto modifikace jsou relativně obtížně změnitelné
- změny v metylaci / acetylaci / fosforylaci histonů
- telomery / telomerázy
- změny v PcG proteinech

=> transkripce jiných genů = jiný fenotyp

## **A. vnějšími faktory**

- **málá a často sporná účinnost**
- **závislé na buněčném typu, často jen u SCs a TA buněk**
- **pokud je to možné, tak se většinou jedná o malou změnu / krok**  
(!není úplně jasné, jestli je potřeba rediferenciace!)
- **uplatnitelnost *in vitro* spíše s některou z dalších metod a zejména pro zachování získaného fenotypu re- / transdiferencovaných buněk**

### **Příklady:**

- **exokrinní buňky pankreatu -> hepatocyty**
- **epitel hltanu -> střevní epitel** (po poškození žaludečními kyselinami, tzv. Barrettova metaplasie)
- **progenitory glií ???**
- **pigmentové buňky oka (iris) -> buňky rohovky** (u čolka)
- **některé kultivační experimenty ukazují, že různé progenitory / SCs mohou nabývat fenotypu jiní diferenciacní řady,**  
např SCs / TA epidermis x nervová tkáň
- **B-lymfocyty mohou tvořit makrofágy**

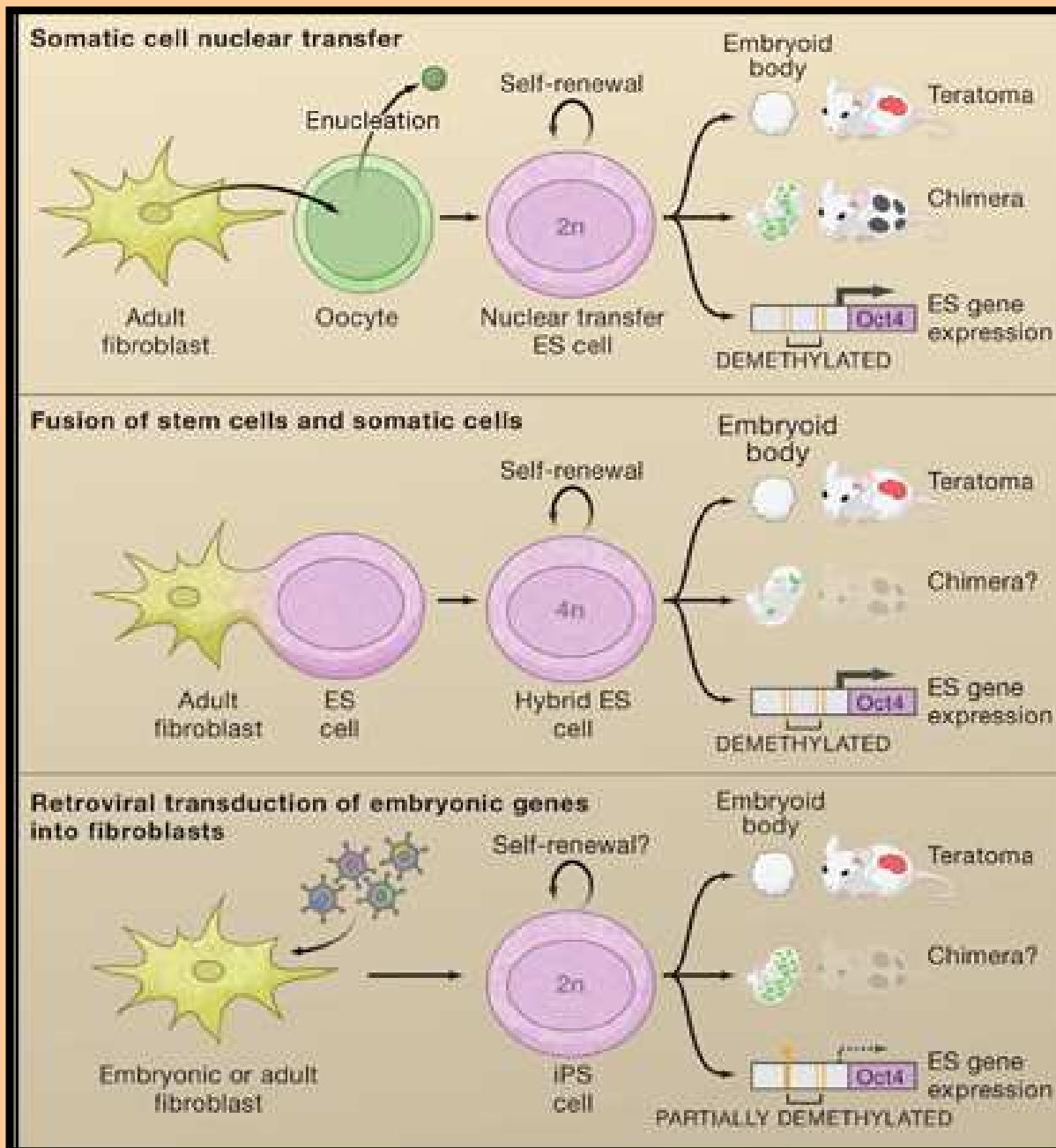
## **B. exogenní exprese vhodných genů**

- výrazně účinnější než působení vnějších faktorů
- „vhodné“ geny jsou zejména cytoplasmatické pro-onkogeny / onkogeny a transkripční faktory
- epigenetická paměť buněk (zejména metylace DNA), ale zřejmě nedovoluje úplnou změnu

### **Příklady:**

- nadbytečná exprese Ras a Myc indukuje částečnou rediferenciaci a transformaci
- exprese Pdx1 (marker  $\beta$ -buněk pankreatu) navozuje částečný fenotyp  $\beta$ -buněk u hepatocytu a střevních epiteliálních buněk
- exogení exprese c-Myc, Klf4, Oct4 a Sox2 navozuje fenotyp ESCs u embryonálních fibroblastů (myš)

## C. Přeprogramováním jádra cytoplasmou jiné buňky



- závislost na momentálním stavu buňky
- velice účinné, ale přenos jádra málo úspěšný u savců
- fúze buněk je ale relativně běžná

**buněčná fúze** – spojení cytoplasmy a jader dvou buněk za vzniku buňky jediné

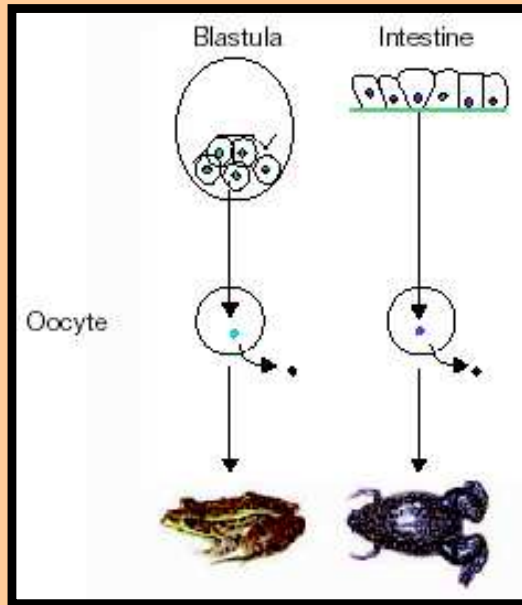
**heterokaryon** – produkt fúze buněk jasně odlišitelnými dvěma nebo i více jádry

**hybridní buňka** – vznikne když heterokaryon projde mitózou za vzniku buňky s jedním jádrem ale s více jak  $2n$  DNA (nemusí obsahovat kompletní jadernou DNA původních buněk)

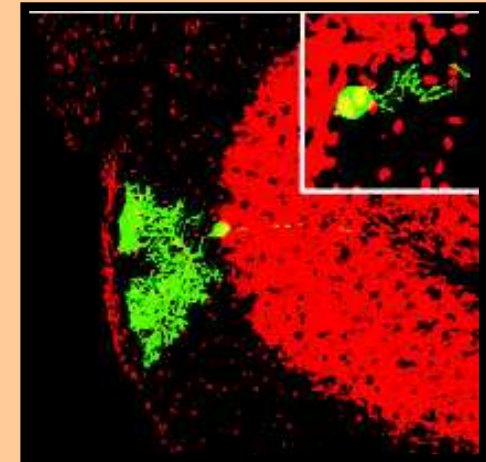
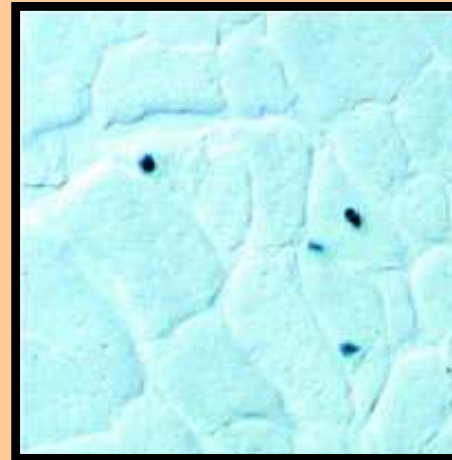


## Heterokaryon Purkiňova neuronu v mozečku a GFP<sup>+</sup>-BMSSC

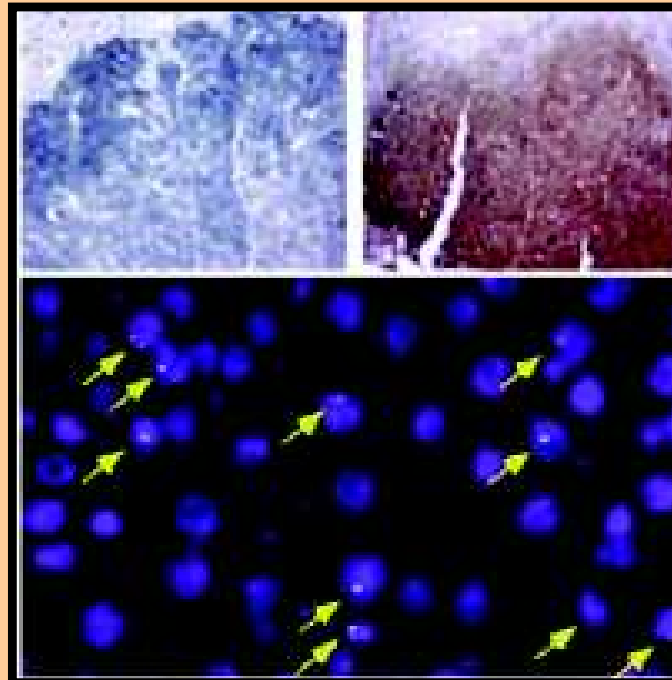
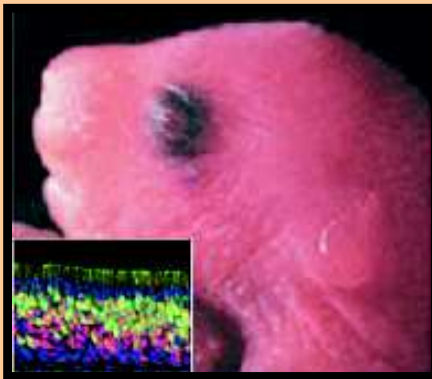
Úplné reprogramování terminálně diferencované buňky cytoplasmou oocyty u žab (ale i savci).



BMSSCs exprimující  $\beta$ -galaktosidázu pod kontrolou svalově specifického promotoru



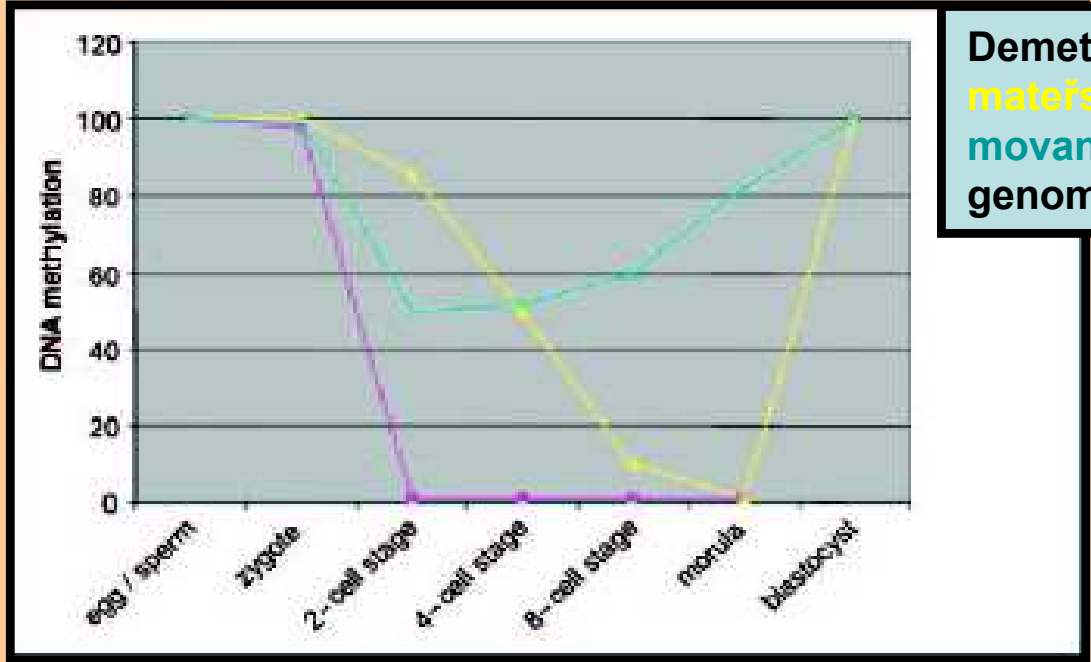
Myš klonovaná z jadra čichového nervu



Regenerace samičích Fah<sup>-/-</sup> letálních jater (FAH – fumarylacetoacetate hydroláza) transplantací samčích HSCs

Detekce Y chromozomu v játrech po transplantaci (dole) a FAH aktivity vpravo nahoře.

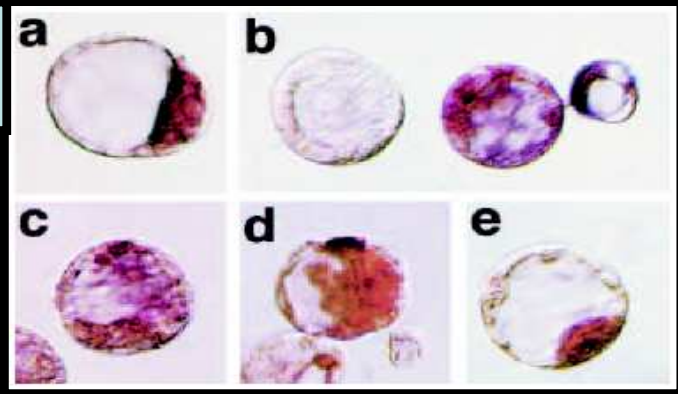
# Reprogramování jádra, methylace DNA a chyby v embryogenezi



Demethylace **otcovského**, **mateřského** a **reprogramovaného** (jaderný přenos) genomu

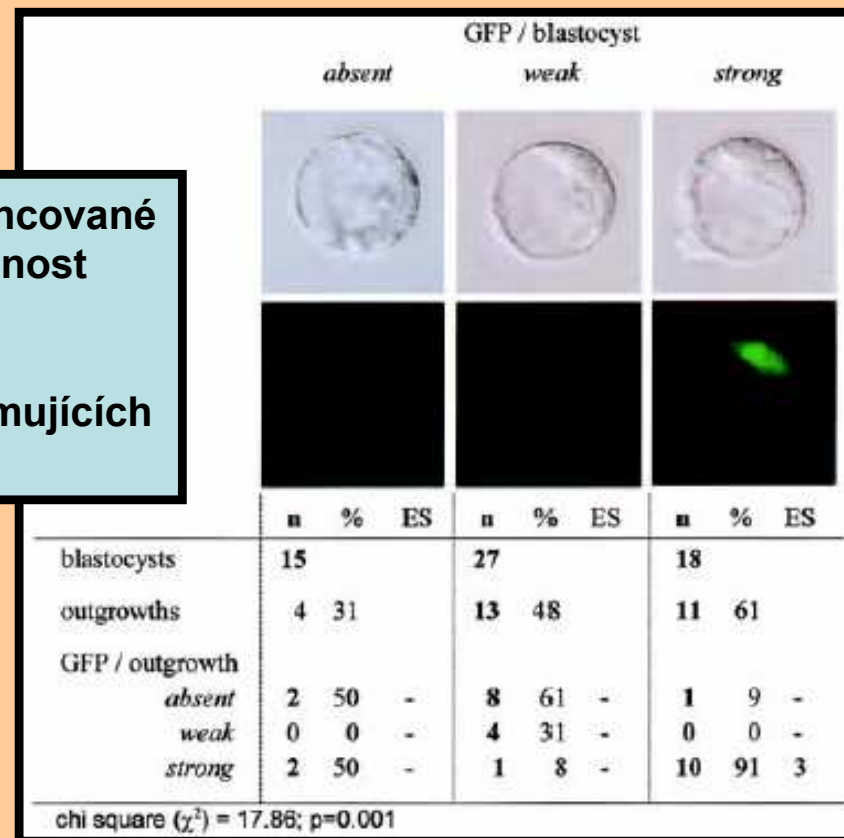
Blastocyst type	n	Oct4 mRNA n (%)		
		ICM restricted	ICM and TE	not detected
Cumulus cell clone	53 <sup>d</sup>	18 (34.0) <sup>a</sup>	29 (54.7) <sup>a</sup>	6 (11.3) <sup>a</sup>
IVF	30	23 (76.7) <sup>b</sup>	4 (13.3) <sup>b</sup>	3 (10) <sup>a</sup>
ICSI	80	60 (75.0) <sup>b</sup>	9 (11.3) <sup>b</sup>	11 (13.8) <sup>a,b</sup>
In vivo fertilized	75	70 (93.3) <sup>c</sup>	3 (4.0) <sup>b</sup>	2 (2.7) <sup>a,c</sup>

Analýza exprese Oct4 mRNA u klonovaných a kontrolních blastocyst (*in situ* hybridizace).



Účinek reprogramování jádra diferencované buňky na expresi Oct4-GFP a schopnost růstu ICM.

Vývoj klonů a IVF/ICSI embryí exprimujících GFP *in vitro*.



Nucleus donor	Reconstructed oocytes n	Two-cell stage n (%)	Morulae (% of 2 cells)	Blastocysts n (% of 2 cells)	GFP fluorescent blastocysts n (%)	Replicates n
Wild-type nuclei						
Cumulus cell	1065	852 (80) <sup>a</sup>	30	85 (10) <sup>a</sup>	NA	20
Oct4-GFP nuclei						
Cumulus cell	2513	1935 (77) <sup>a,b</sup>	30	165 (9) <sup>a</sup>	135 (82) <sup>a</sup>	39
Germ cell	603	500 (83) <sup>a,c</sup>	81	278 (56) <sup>b</sup>	272 (98) <sup>b</sup>	15
IVF	895 <sup>a</sup>	665 (74) <sup>d</sup>	91	490 (74) <sup>c</sup>	485 (99) <sup>b</sup>	12
ICSI	1135 <sup>f</sup>	806 (71) <sup>d</sup>	86	440 (55) <sup>b</sup>	395 (90) <sup>c</sup>	18

IVF, in vitro fertilized; ICSI, intracytoplasmic sperm injection; GFP, Green Fluorescent Protein; NA, not applicable.

Comparison of proportions (%) based on Student *t* test (two tails); superscripts a-d indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) between the values within the same column.

<sup>a</sup>Inseminated.

<sup>f</sup>Survived sperm injection.