

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?

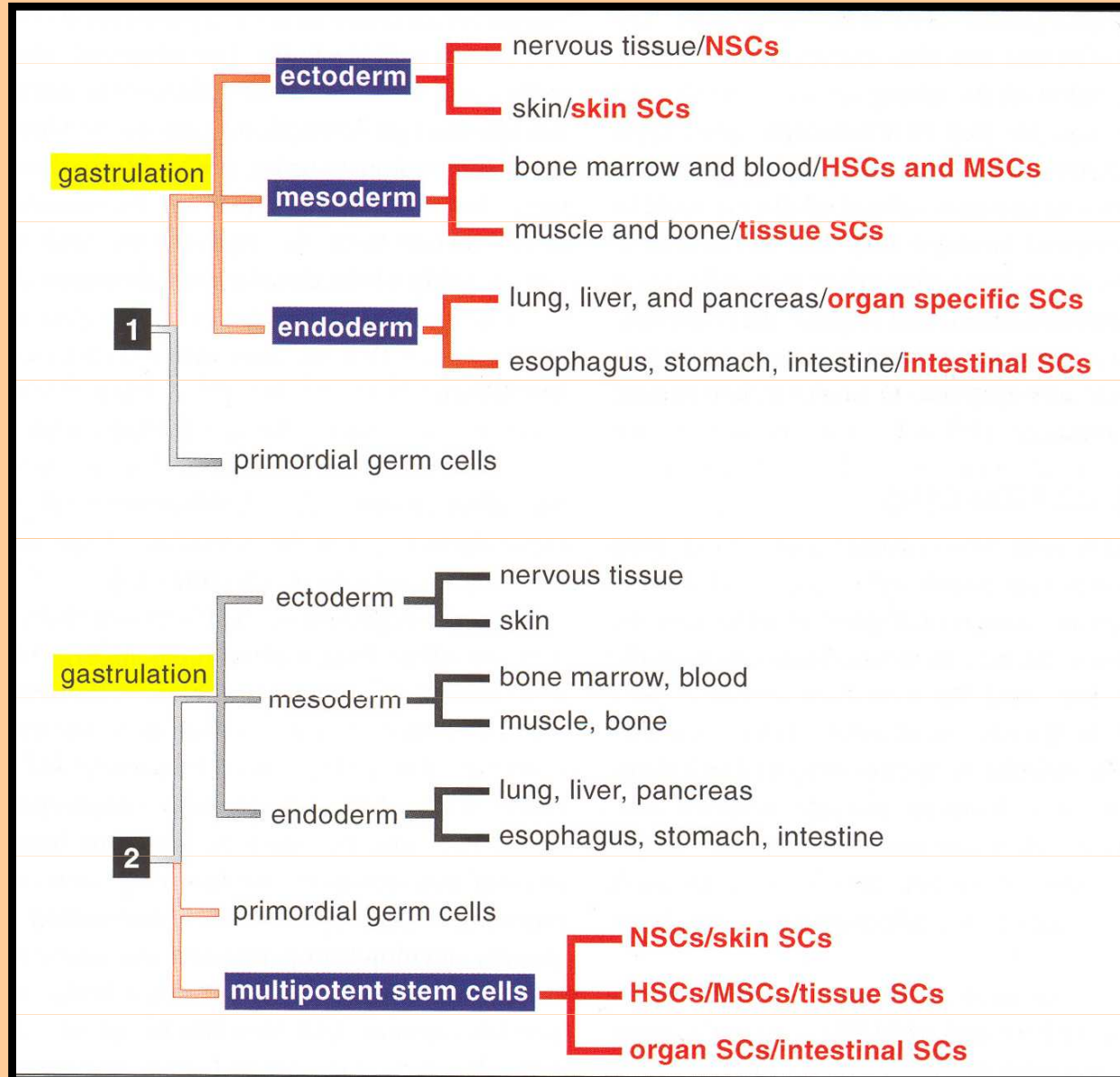
„Existují?“

ADULTNÍ x EMBRYONÁLNÍ somatické kmenové buňky

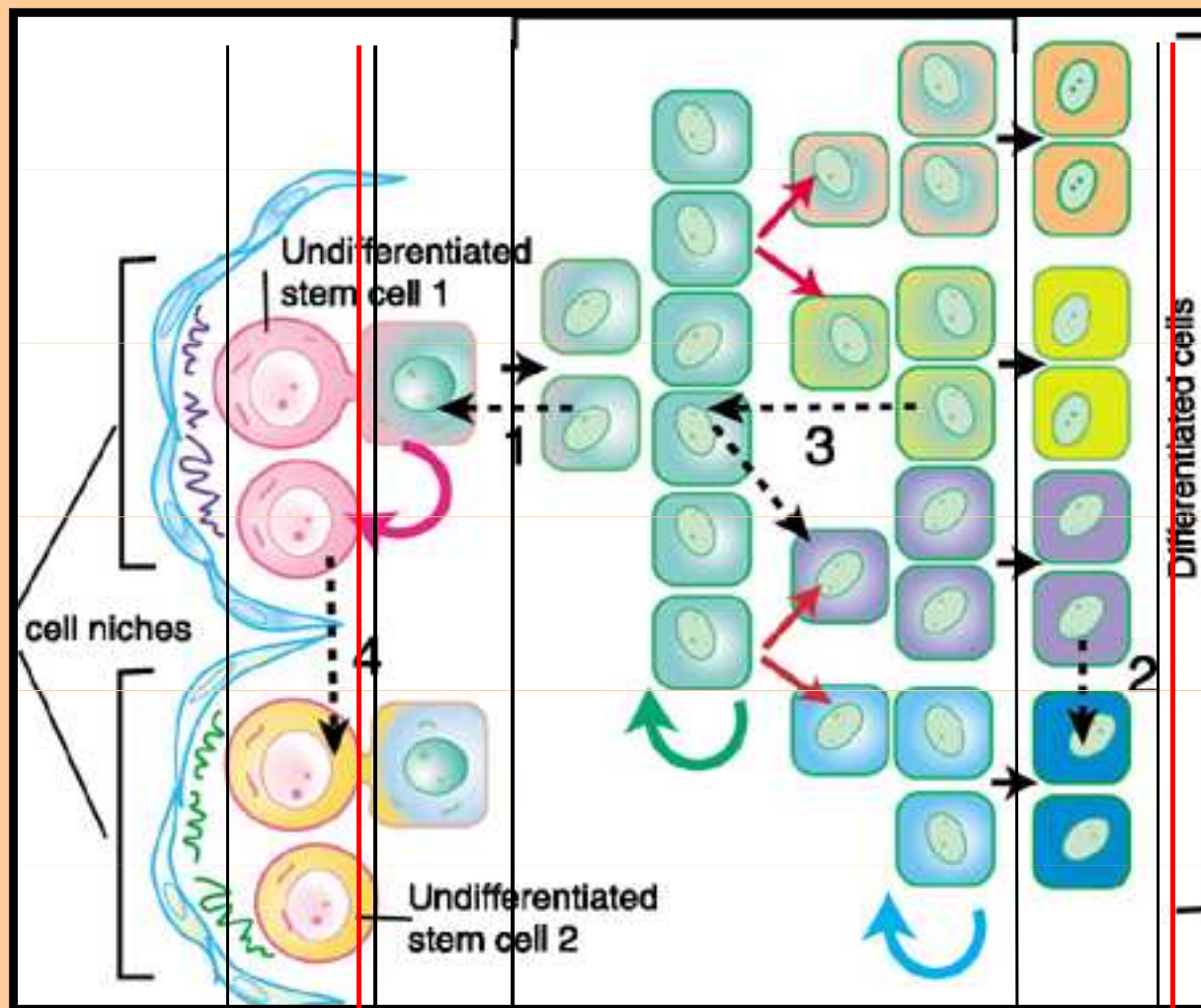
Embryonální somatické kmenové buňky

- 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), je již jasné, že stejné nejsou.

Původ SSC



Biologie SSC



kmenové buňky
(aktuální)

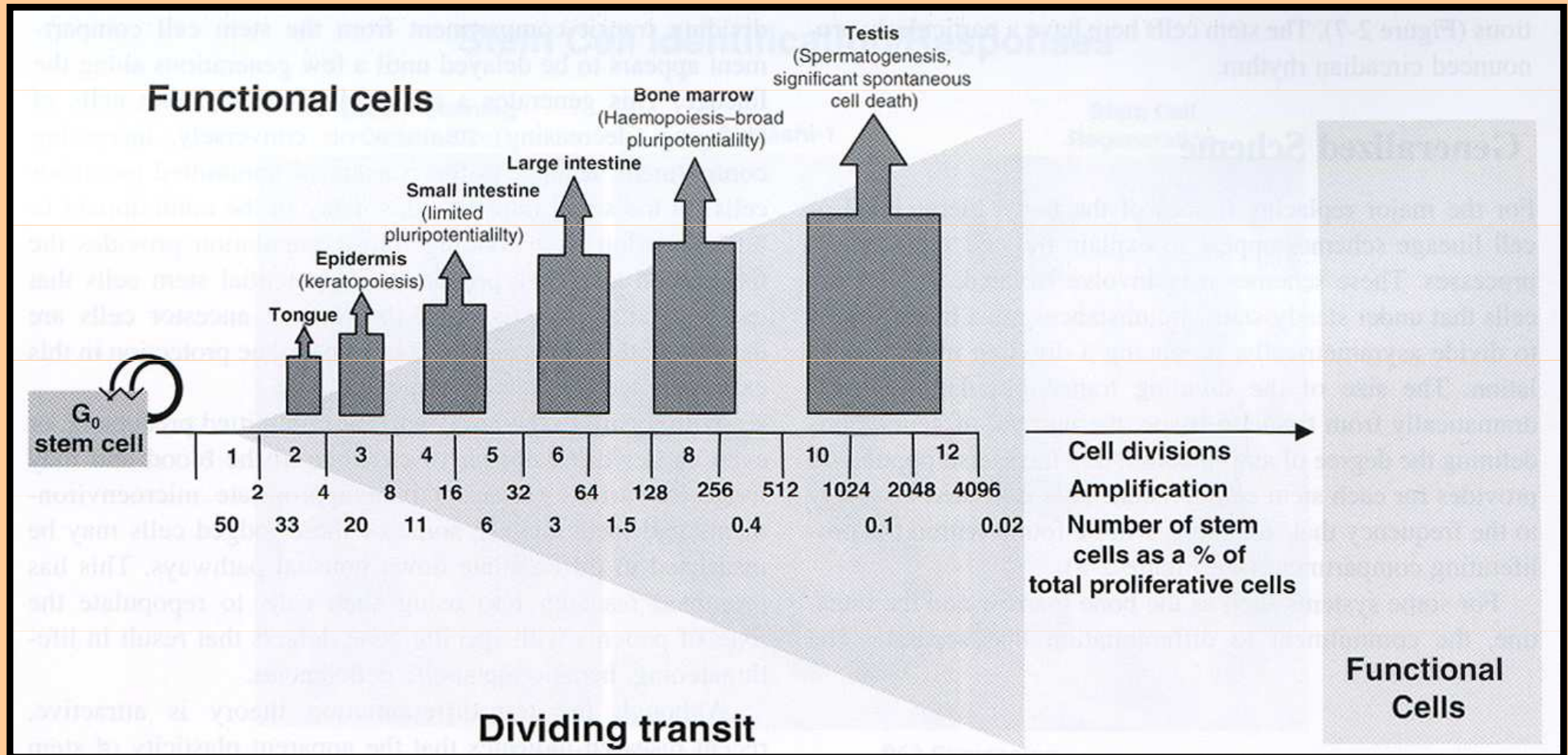
potenciální
kmenové buňky

přechodně se dělicí
progenitory

funkční
terminálně
diferencované buňky

přechodně se dělicí buňky – TA (transiently amplifying)

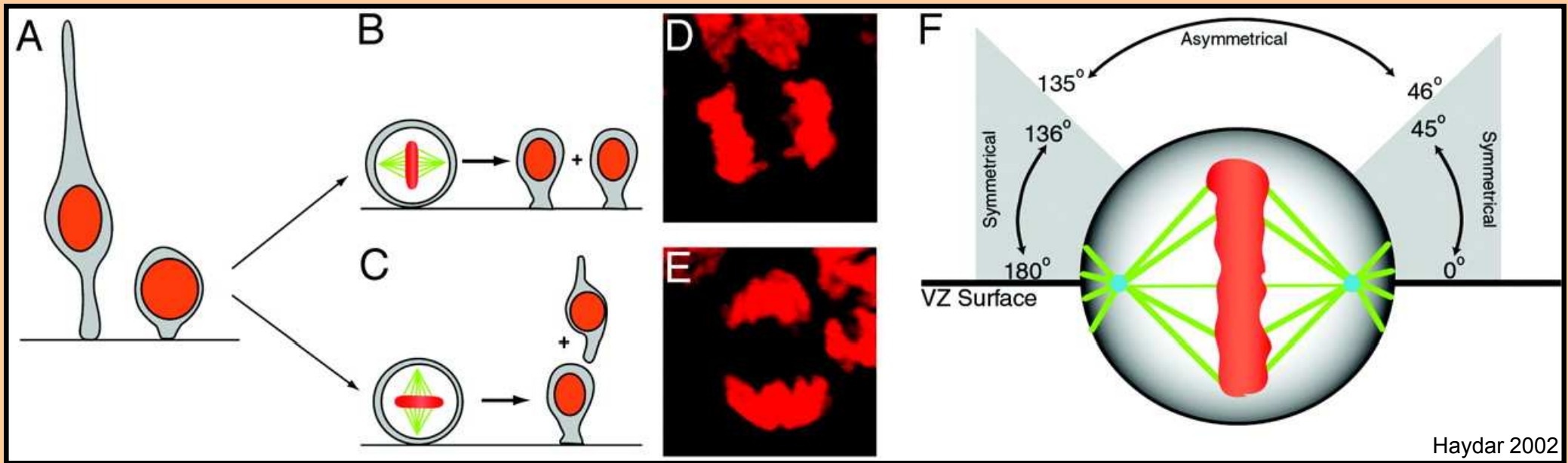
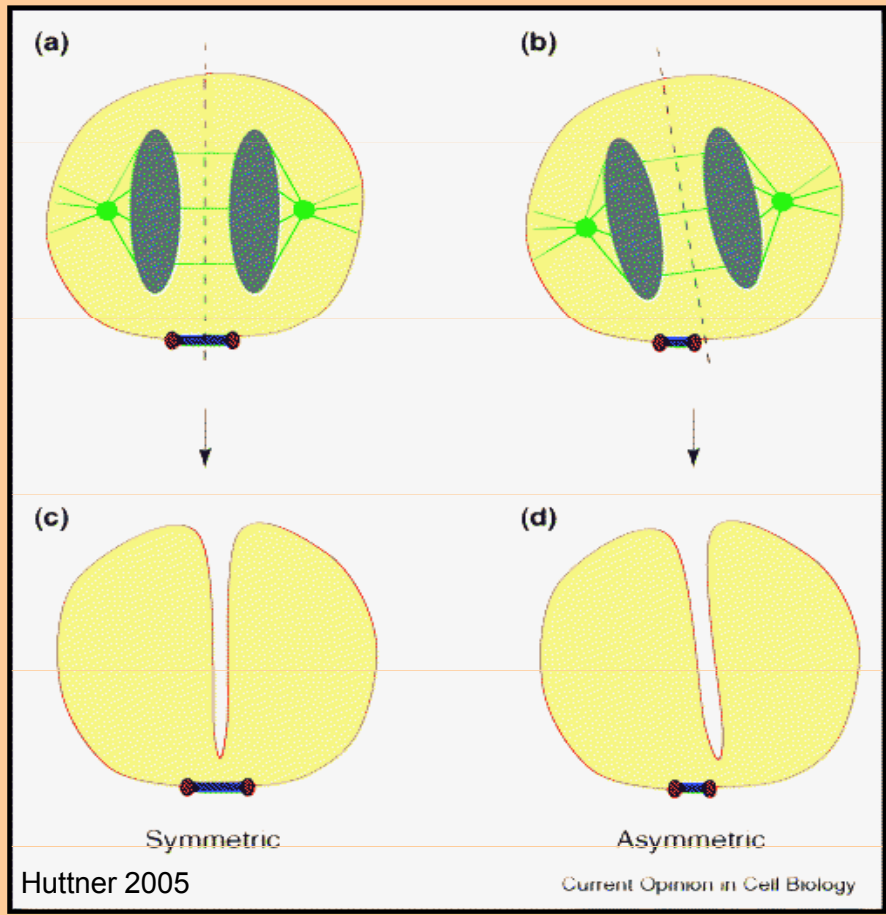
Odhad generačních cyklů od kmenové buňky po funkční / terminálně diferencovanou buňku pro různé typy tkání u myši



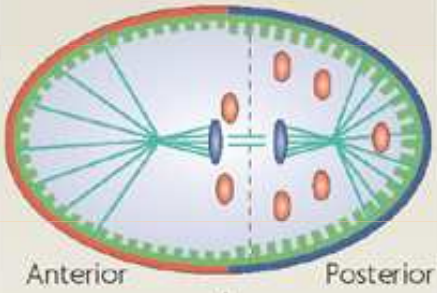
ASYMETRICKÉ DĚLENÍ BUNĚK

O symetrii dělení rozhoduje

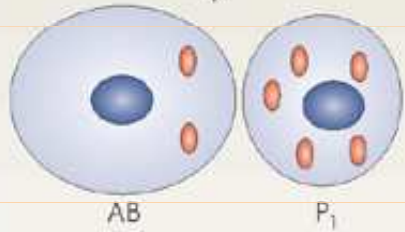
- orientace dělicího aparátu (vřeténka)
- polarizace buněk v tkáni
- gradienty v buňce
- ...



a *C. elegans*
(one-cell stage)



Anterior Posterior

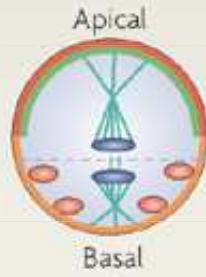


AB

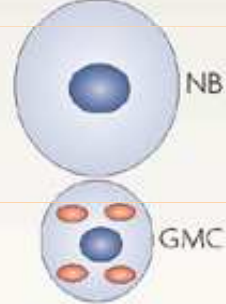
P₁

- PAR-3/PAR-6/PKC-3
- PAR-2, PAR-1
- LIN-5/G_α
- GPR-1/2
- PIE-1
- Microtubules
- DNA

b *D. melanogaster*
(neuroblast)



Apical Basal



NB

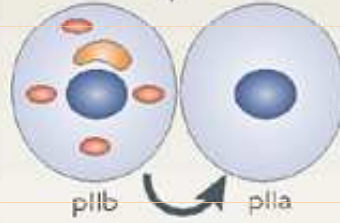
GMC

- PAR3/PAR6/aPKC
- Mud/Pins-Loco/G_α
- Mira, Pon
- Brat, Numb, Prospero
- Microtubules
- DNA

c *D. melanogaster*
(SOP)



Anterior Posterior



pIIb

pIIa

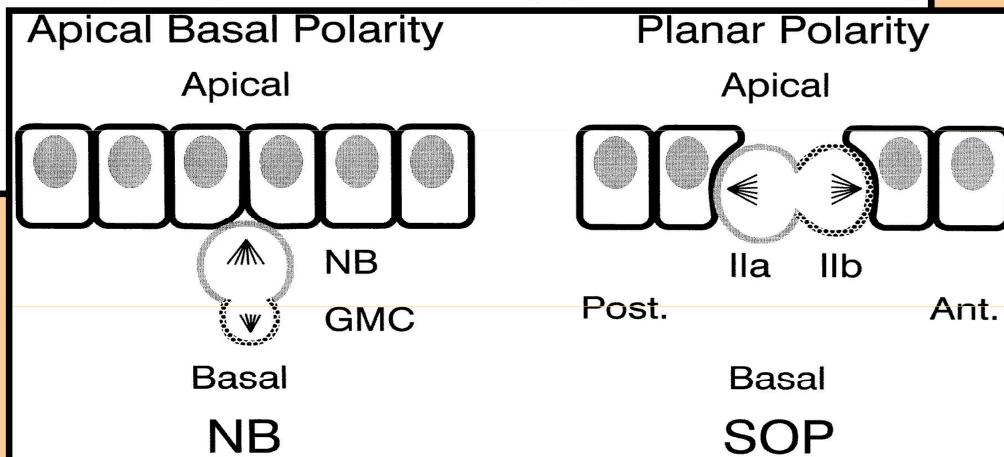
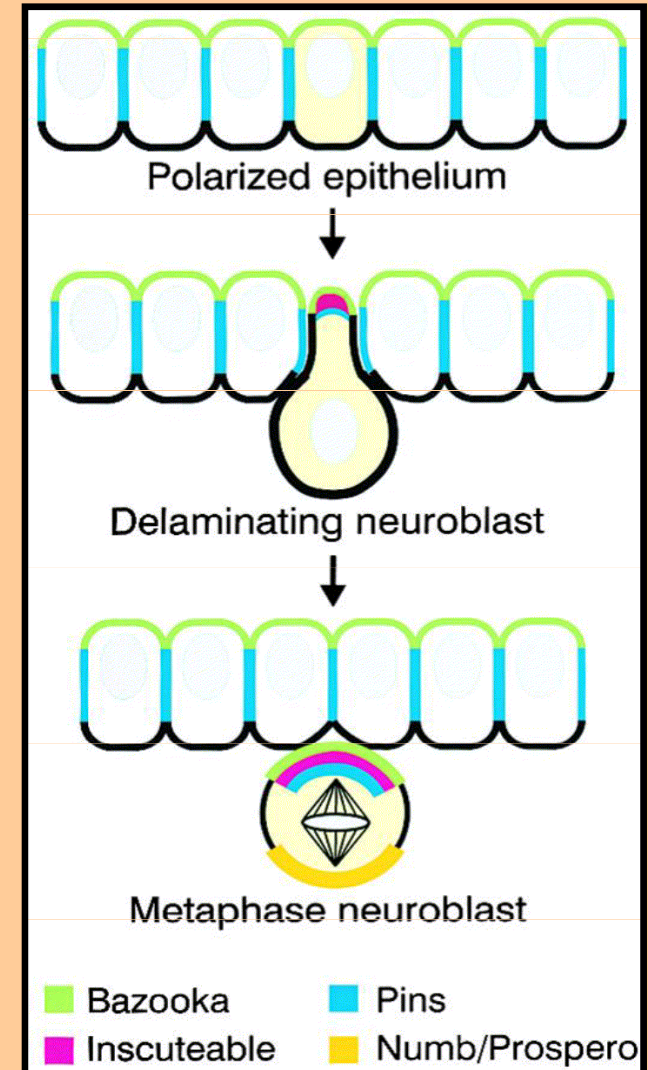
- PAR3/PAR6/aPKC
- Mud/Pins-Loco/G_α
- Pon
- Numb, Neuralized
- Recycling endosome
- Microtubules
- DNA

Příklady mechanismů regulujících symetrii buněčného dělení na modelových orgaismech

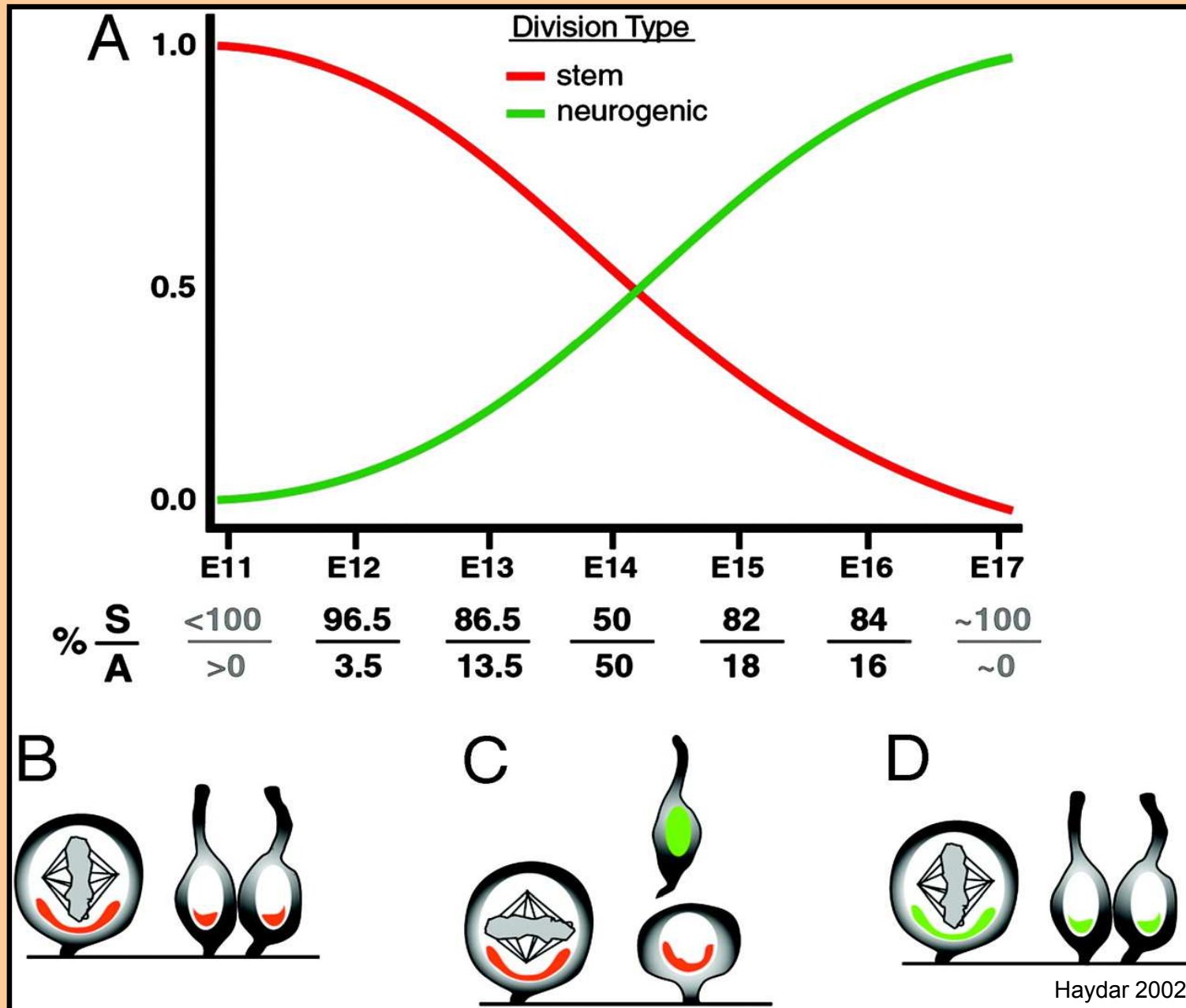
NB – neuroblast

SOP – sensory organ progenitor

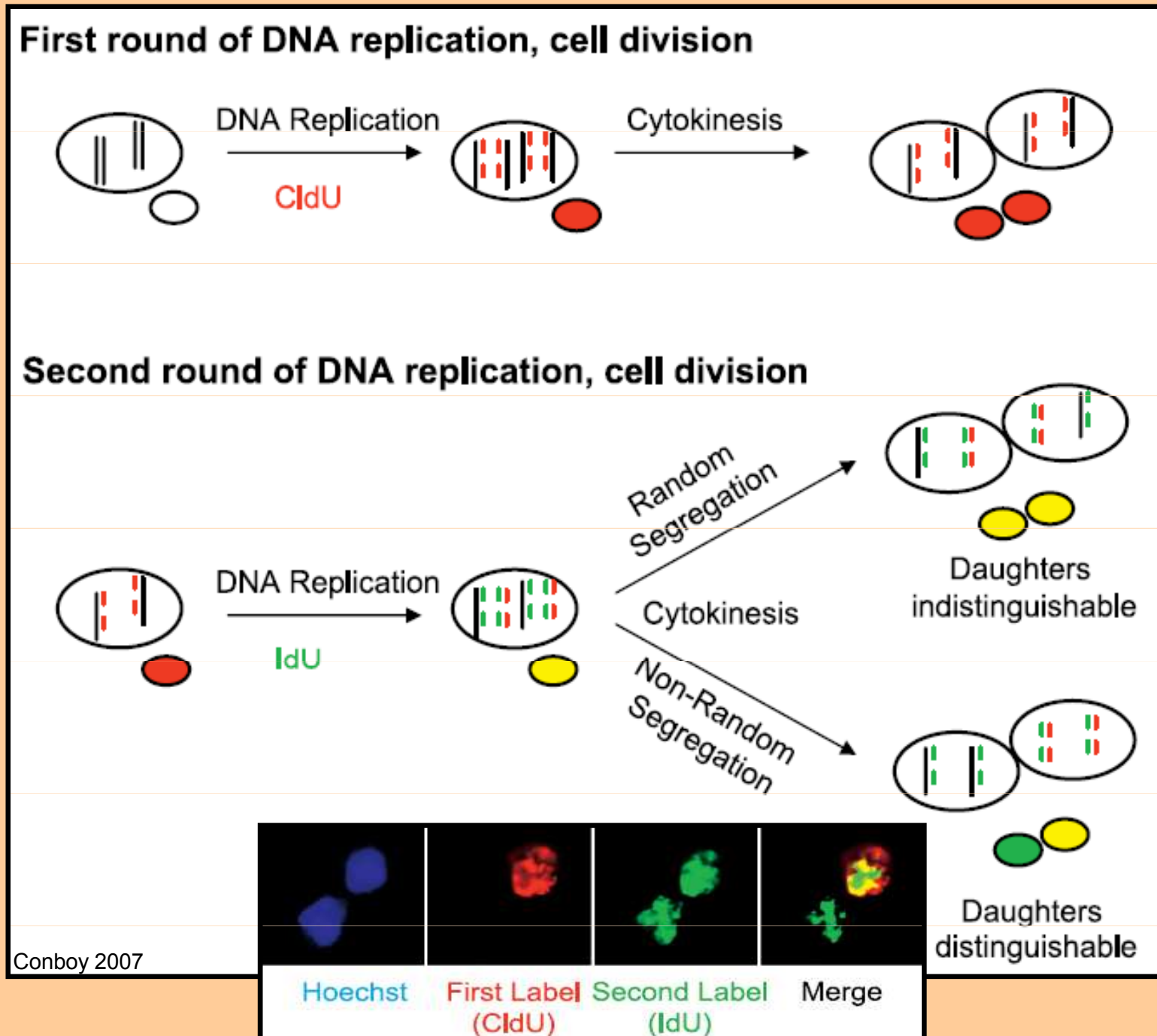
(Jan & Jan 2000; Robert Andrews & Julie Ahringer 2007)



Proporční změny v symetrii buněčného dělení mezi neurálními kmenovými buňkami (**stem**) a neurálními progenitory (**neurogenic**, transientně se dělicími buňkami – TA) v průběhu neurogeneze u myši



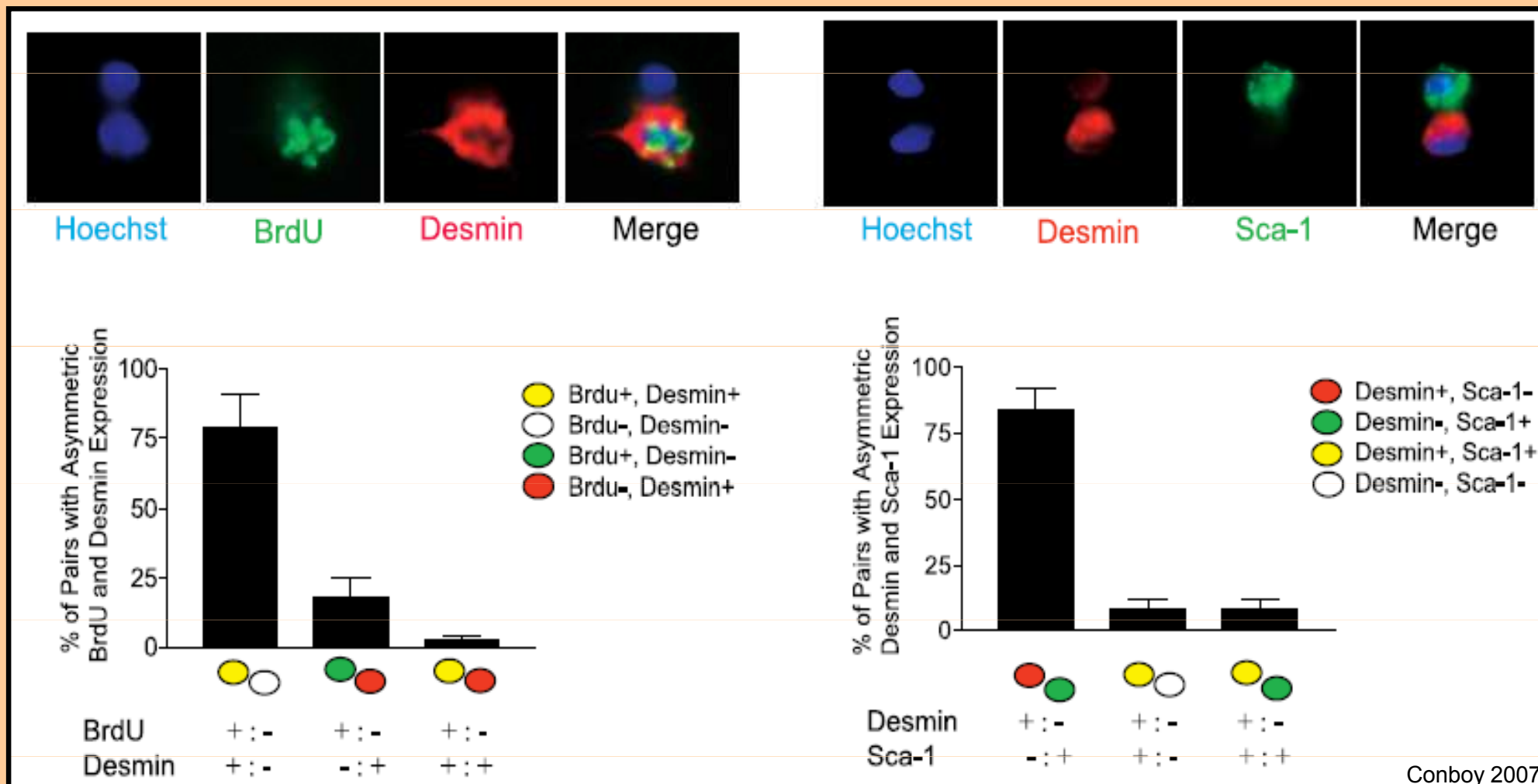
Dělení genomu u progenitorů/kmenových buněk při asymetrickém dělení



Četnost asymetricky a symetricky dělících se kmenových buněk kosterní svaloviny *in vitro* - potvrzení výše uvedené hypotézy

Sca-1 – znak kmenové buňky kosterní svaloviny

Desmin – protein charakterizující myoblast



NICHE a jak být profesionální kmenovou buňkou

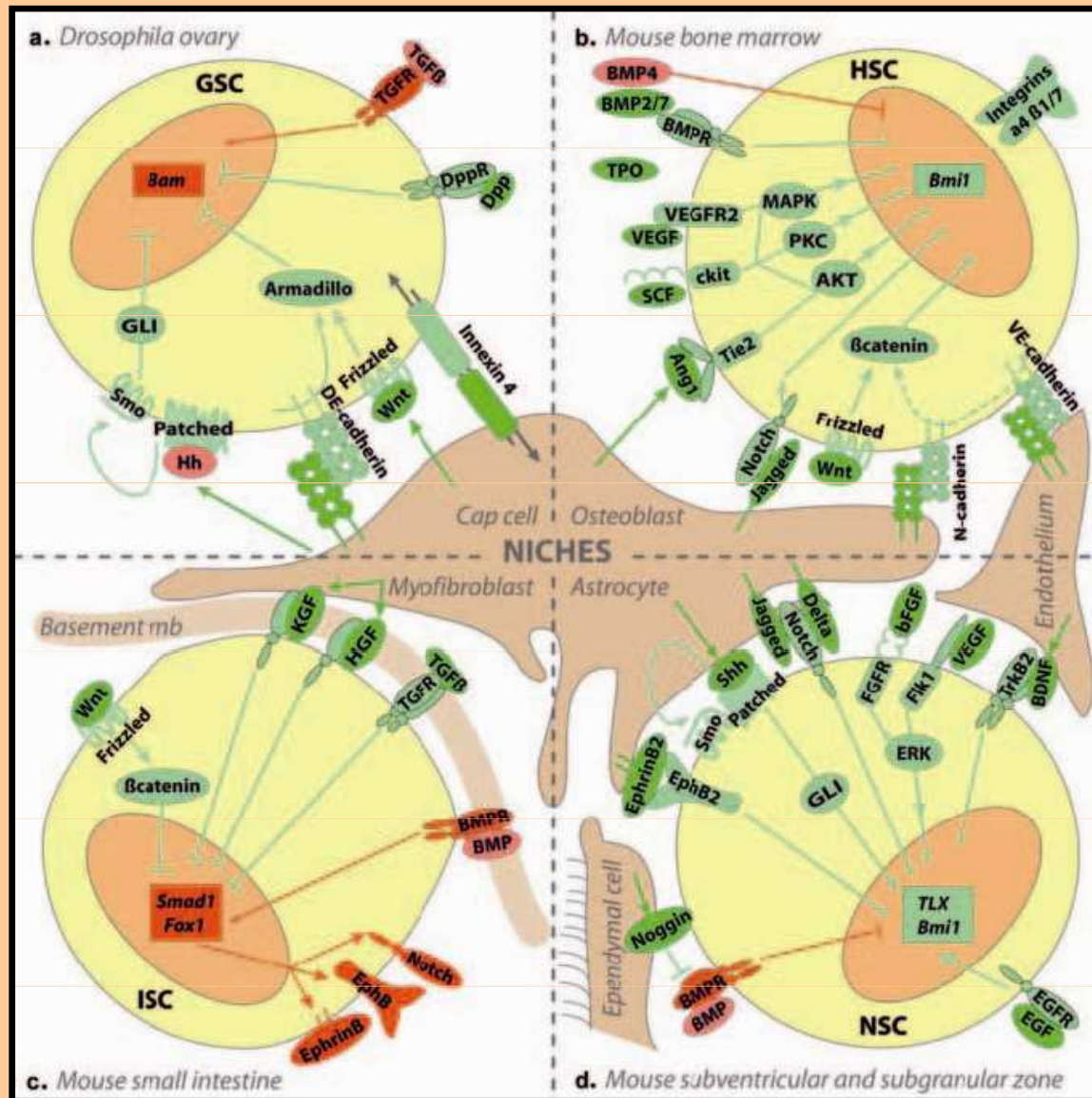
Stejně jako je v současnosti obtížné fyzicky uchopit jednotlivou SSC je velice těžké poznat, jak vypadá a jaké vlastnosti má prostředí, kde se SSCs nachází = niche. Profesionální SSCs mají tzv. nezralý fenotyp, tj. připomínají buňky značně časných vývojových stádií (z hlediska vývoje organismu / ontogeneze). 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. Toto je velký rozdíl k ES buňkám, které jsou také intenzivně proliferujícími, na rozdíl somatickým kmenovým buňkám v tkáních dospělého jedince.
- Z „extrinsic“ faktorů se předpokládá významná úloha drah TGFβ 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, β-catenin, NFκB,...
- Jsou obecně odolné k toxinům (MDR - multidrug resistance proteins, ATP pumpy), ale i k tvrdému záření (paprsky X, γ-záření).

SSC „mezodermálního“ původu

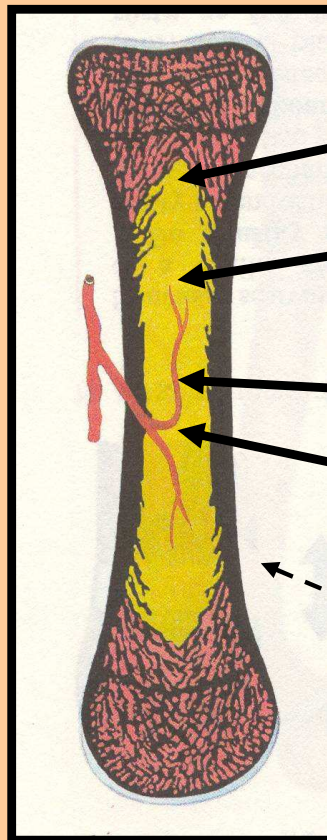
**Mezenchymální kmenové buňky
(MSCs - mesenchymal stem cells)**

**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./cm²; h 1500-3000 b./cm²)
- 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
MHC-I	-	MSC +++
CD44 (H-CAM)	+/-	různé buňky
CD105 (endoglin)	-	MSC +++
CD34 (L-selectinR)	-	HSC +++
CD45 (tyr. fosfatáza)	-	HSC +++
cKit (CD117, SCFR)	-	HSC +++
Thy1 (CD90/CDw90)	+	HSC +++
AC133_h / Sca1*_m	+	HSC +++
SSEA1	+ _m	mES +++
Oct4	+ _m	m+hES +++
Rex1	+ _m	mES +++

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

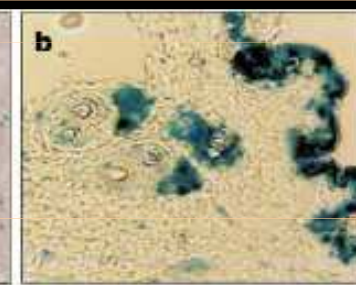
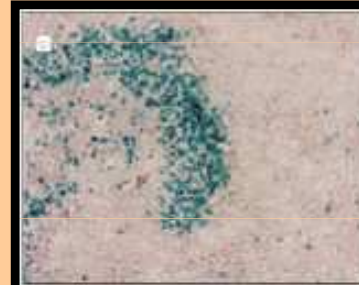
*Sca1 – stem cell antigen, GPI (glykosylfosfoinositolovou) kotvou vázaný protein v cytoplasmatické membráně zejména „velice časných“ progenitorů

40% chimerismus u myši s ROSA26* MAPCs

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

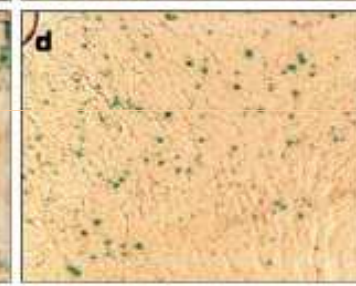
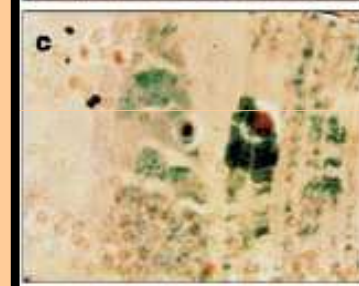


mozek



kůže

koster. sval.



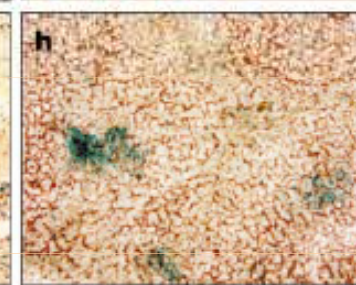
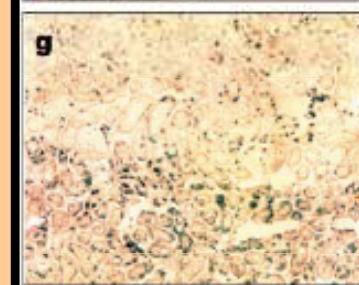
srdce

játra



tenké střevo

ledviny

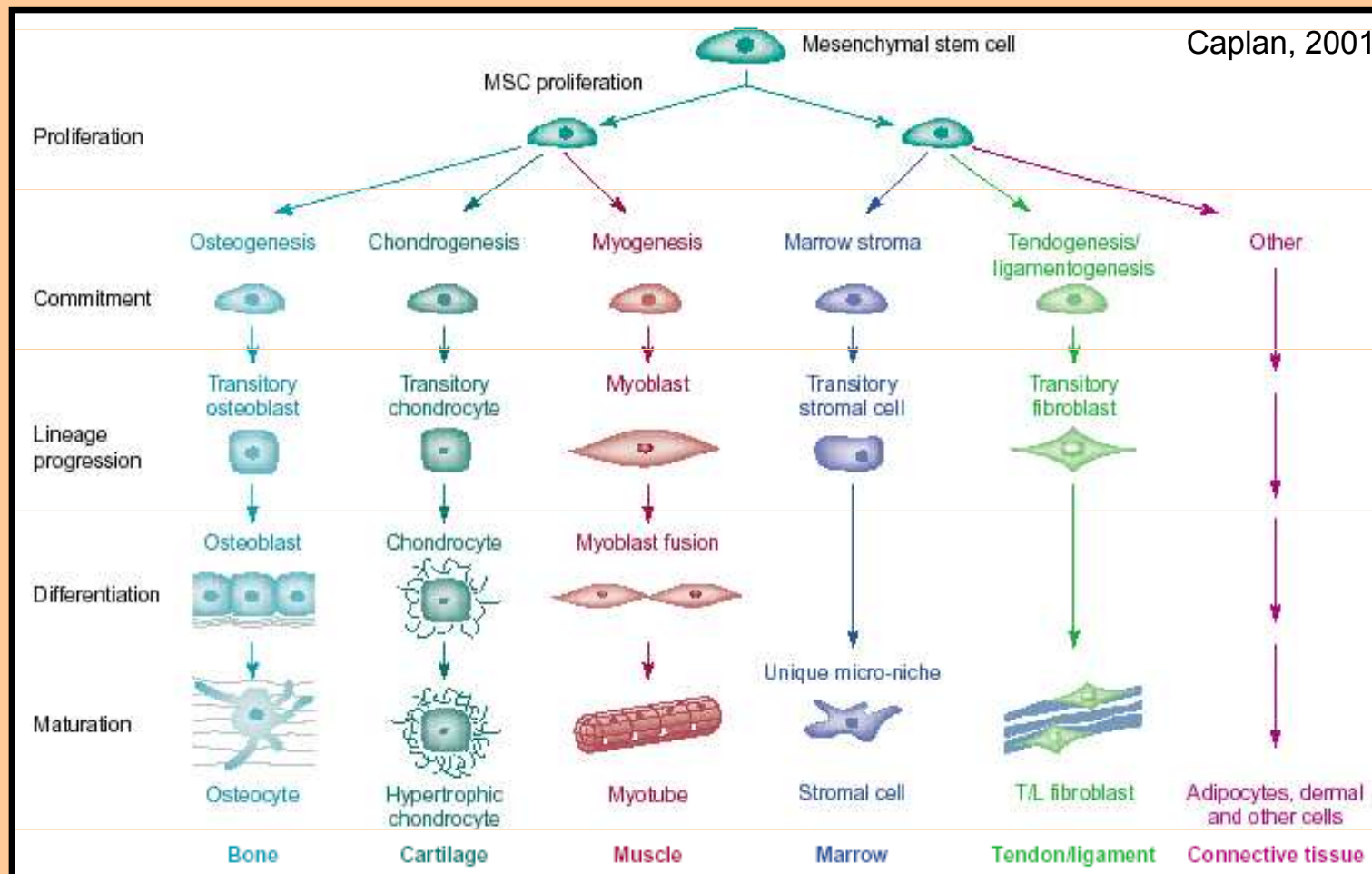


slezina

* ROSA26 myši exprimují ve všech buňkách β -galaktosidázu (transgení myši - GMO)

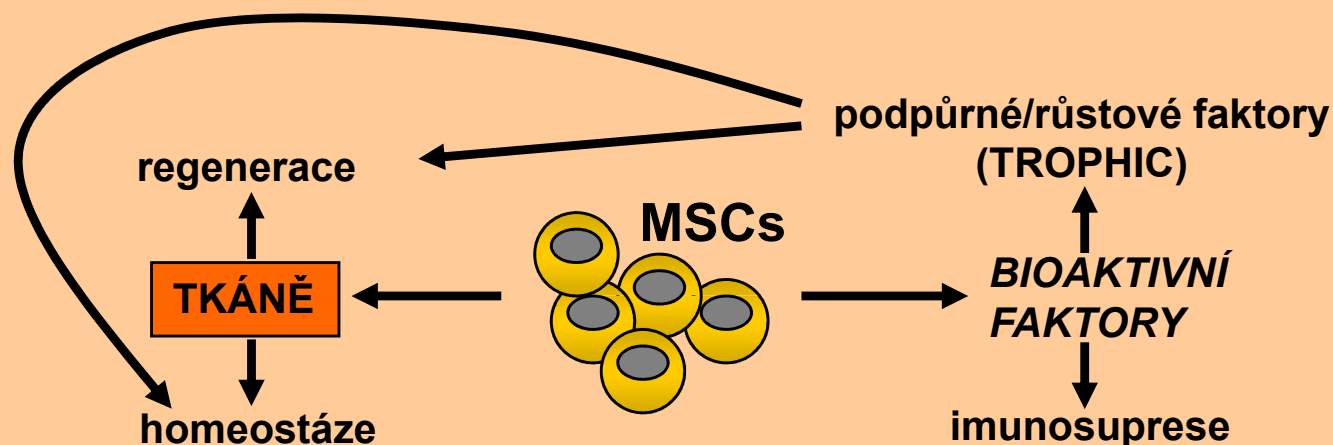
Mezenchymální kmenové buňky – MSCs (mesenchymal stem cells)

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

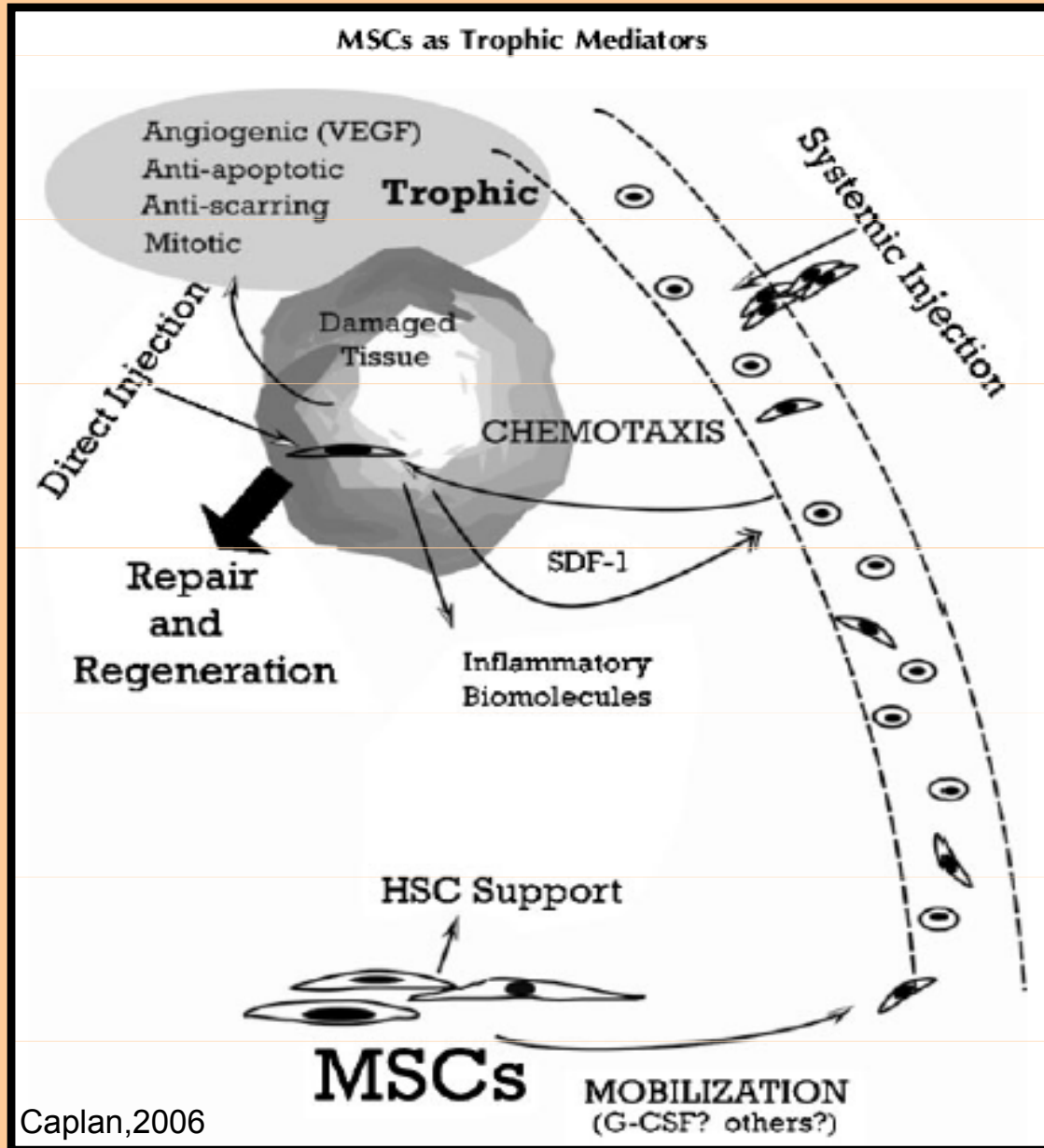


- MSC lze izolovat z mezenchymálních tkání (kostní dřeň, svaly, dermis, tuková tkáň, chrupavky, kosti, ale i z krevního oběhu (zde se někdy označují jako pericyty), zejména však z kostní dřeně).
- Přesný fenotyp není znám, pracuje se se směsnou populací buněk, která po indukci příslušnými kombinacemi 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



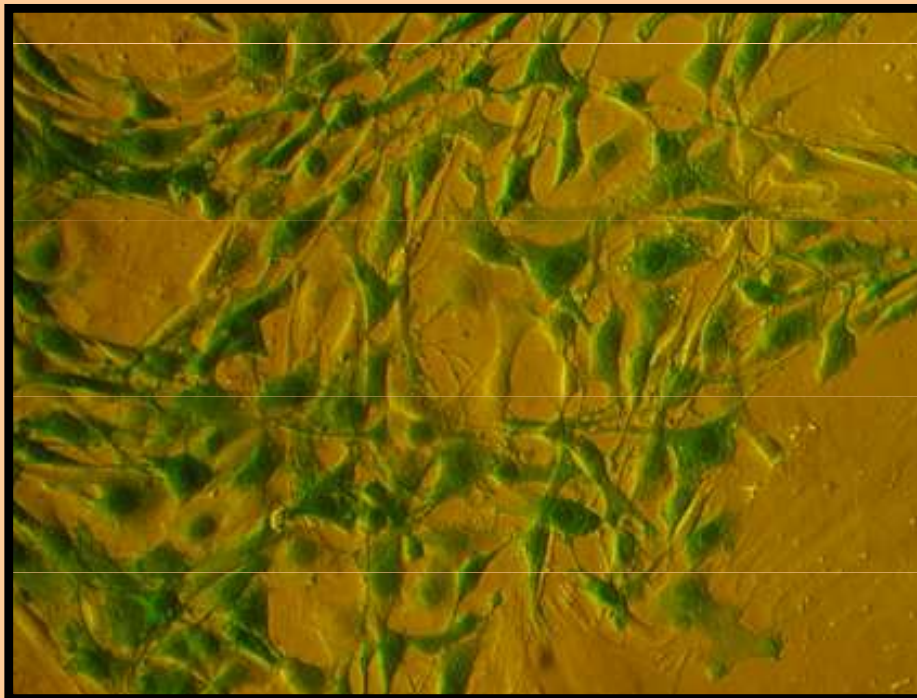
Caplan, 2006

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⁺/lin⁺**, byly izolovány z mnoha typů tkání i z nádorových (kostní dřeň, 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)

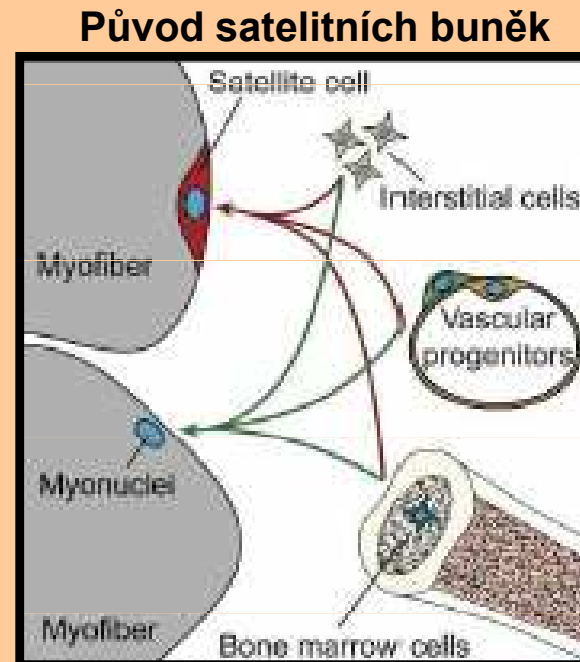
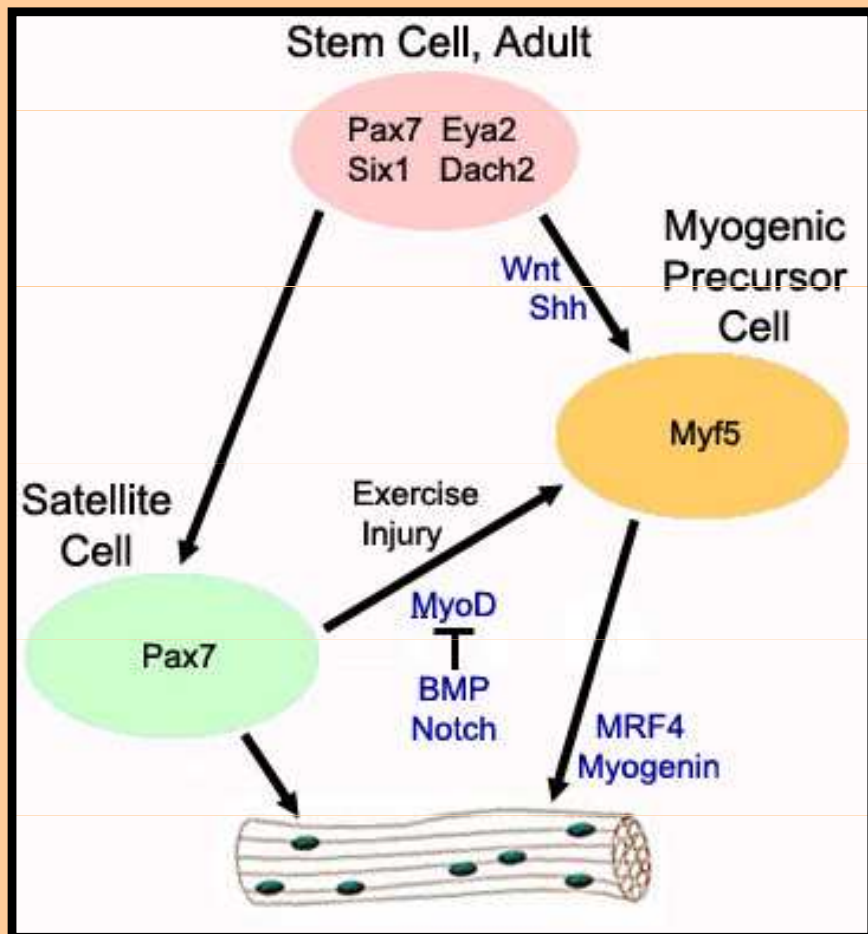
**Přes výše uvedené společné znaky SP buněk,
jsou tyto buňky tkáňově specifické (???)**

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

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.

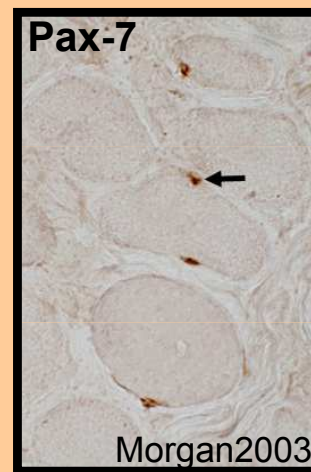
Svalové SC – kmenové buňky kosterní svaloviny = MuSC

- 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)

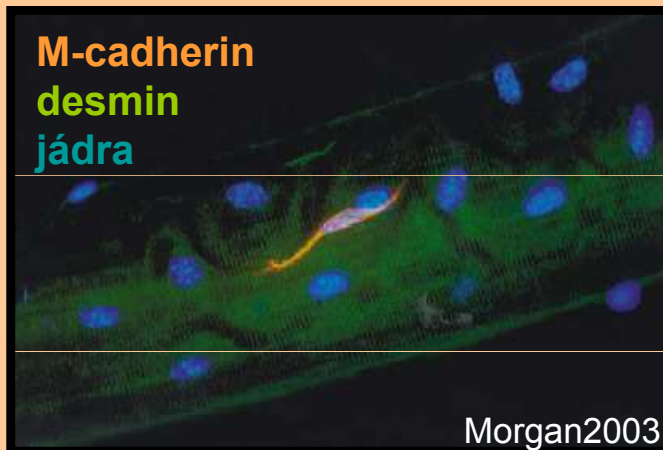
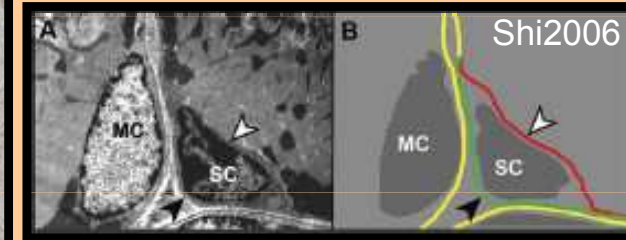


Dále byly izolovány z adultního kosterního svalu buňky CD34+/Sca1+ jako kmenové buňky odvozené ze svalu (**MDSC** – muscle derived stem cells)

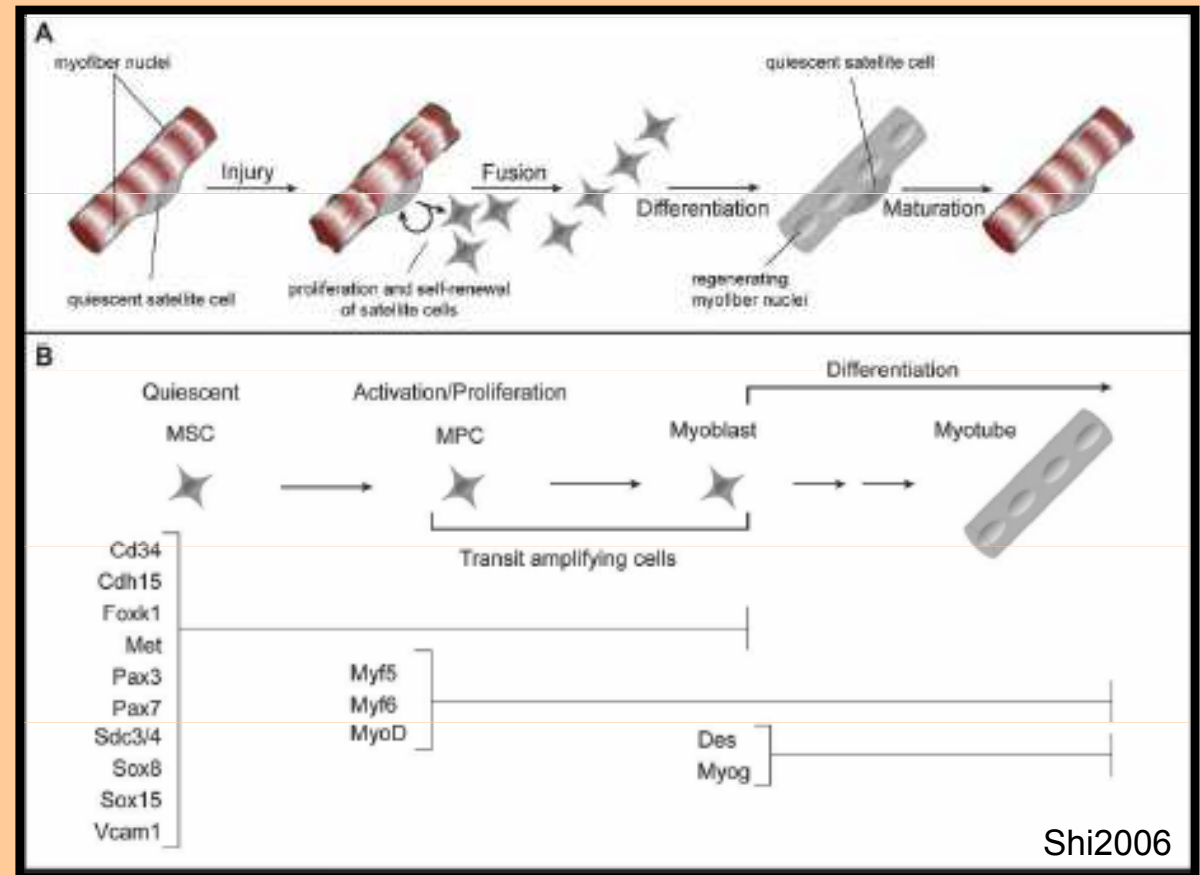
Satelitní buňky kosterní svaloviny a jejich úloha v regeneraci svalu



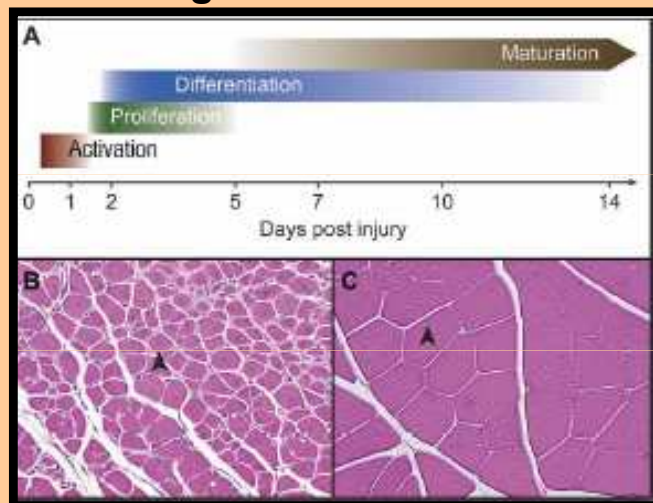
sarkolema □
bazální membrána ■



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



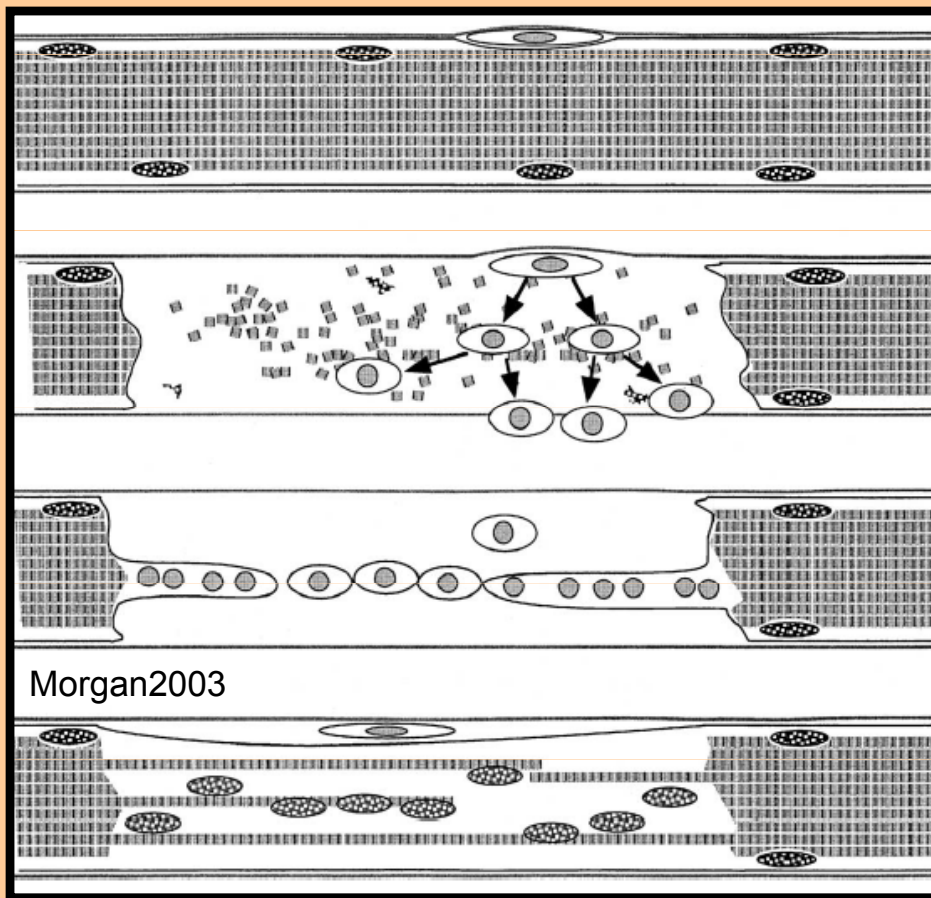
Dynamika regenerace kosterního svalu



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.

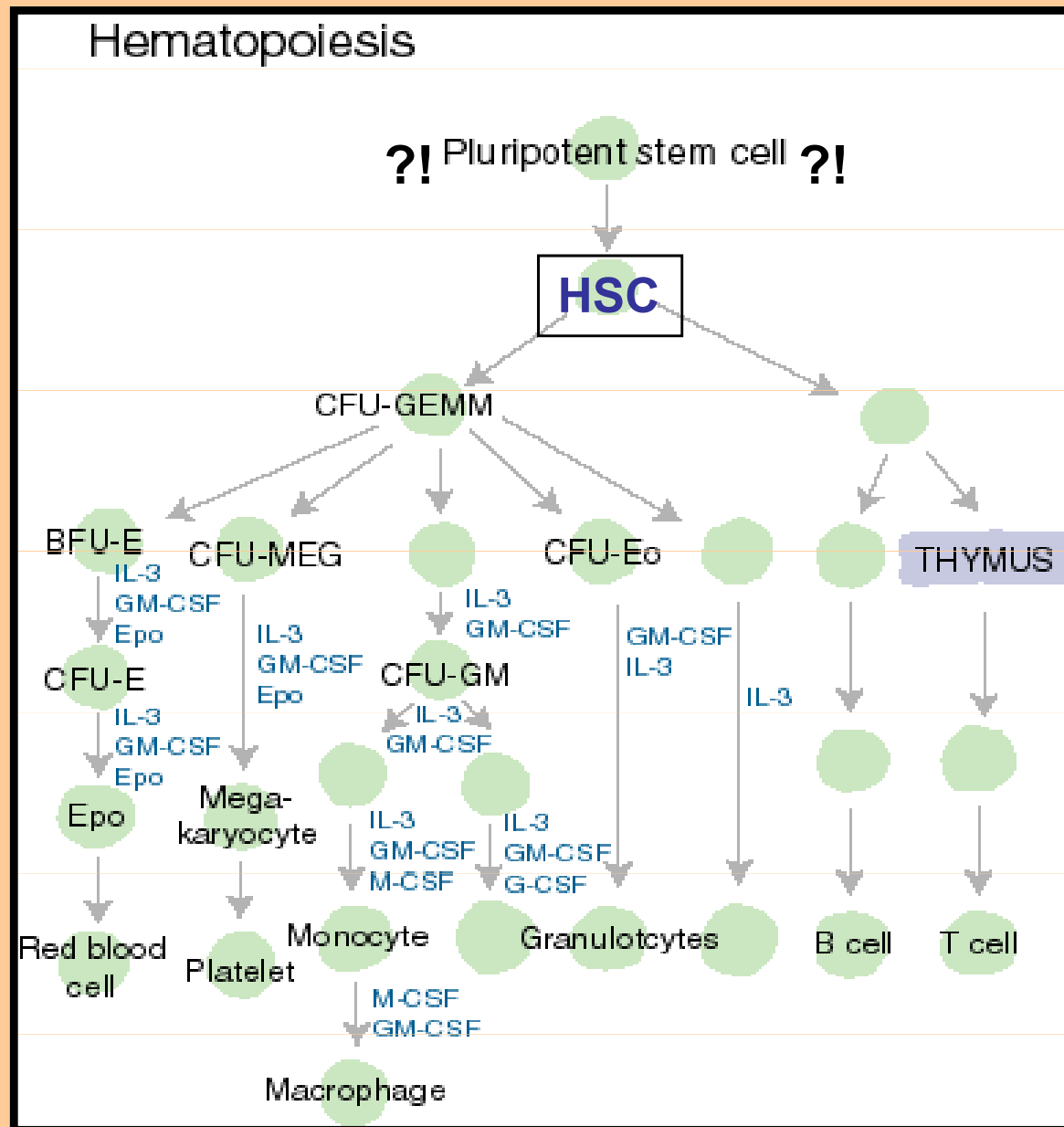
← Aktivace satelitních buněk (IGF 1,2, HGF,..)

← Fúze satelitních buněk

← Regenerace svalového vlákna

Hematopoetické kmenové buňky – HSCs (hematopoietic stem cells)

Hematopoéza + ?



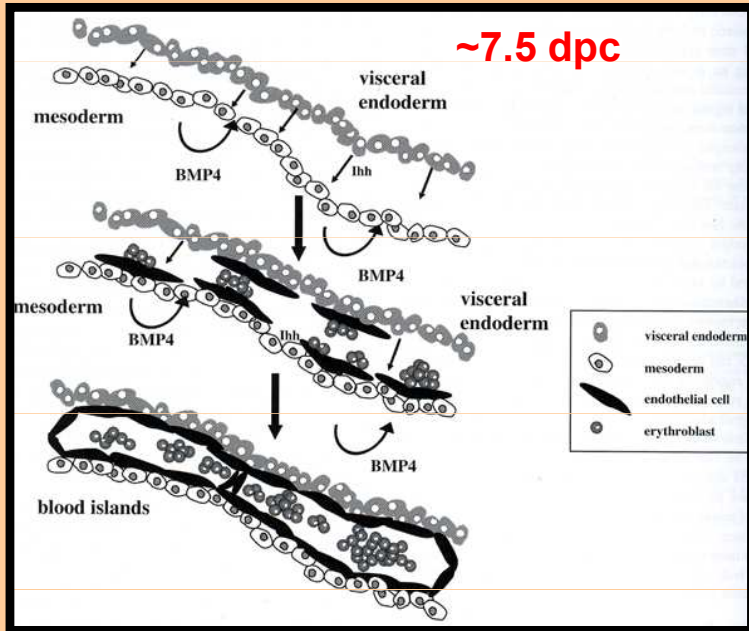
HEMATOPOÉZA

- 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)
- rozlišujeme: **LT-HSC** (long-term HSC) – schopné opakovaně kompletní obnovy hematopoézy
: **ST-HSC** (short-term HSC) – schopné jen krátkodobé obnovy hematopoézy
(aktuální X potencionální kmenové buňka)
- Harrison et al. (1979): transplantoval myším opakovaně identický štěp HSC déle jak 8 let
- > výrazné překročení délky života myši!!!

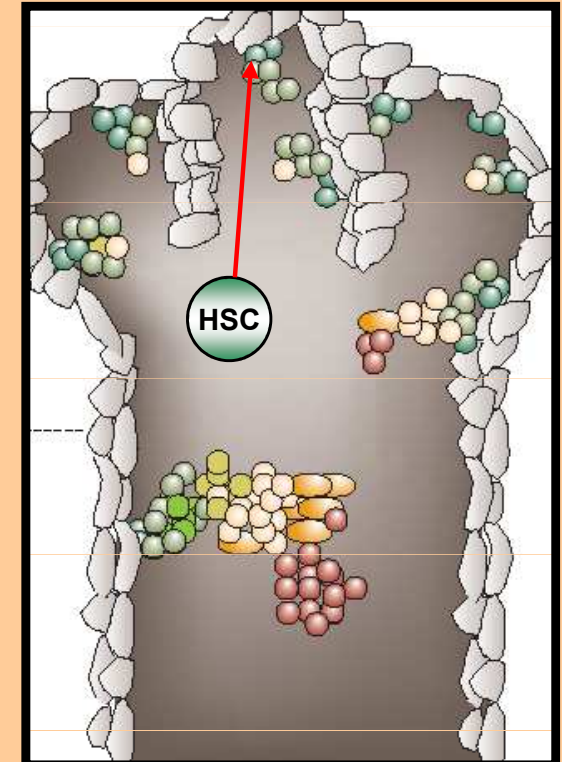
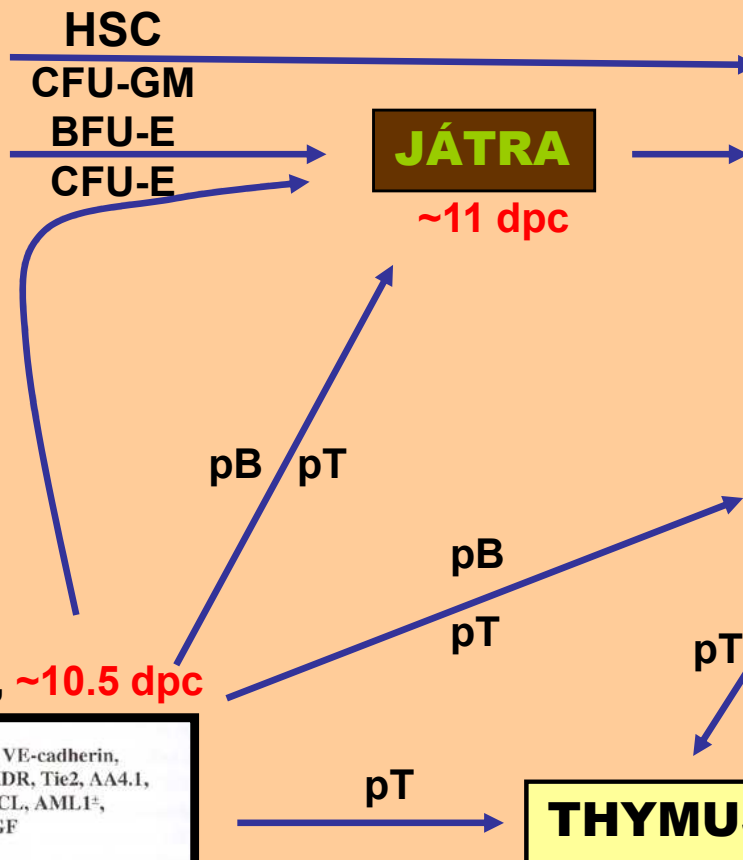
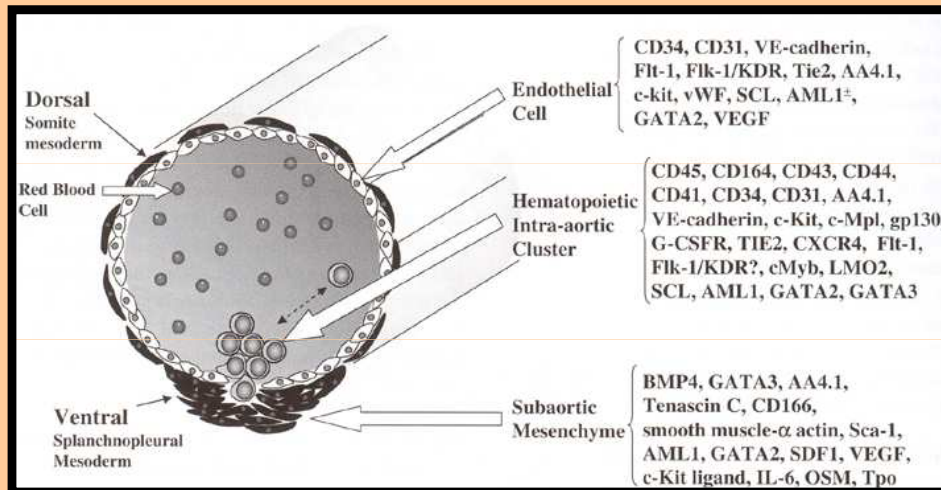
MOUSE

Lokalizace, změna „niche“ u hematopoézy v průběhu ontogeneze

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



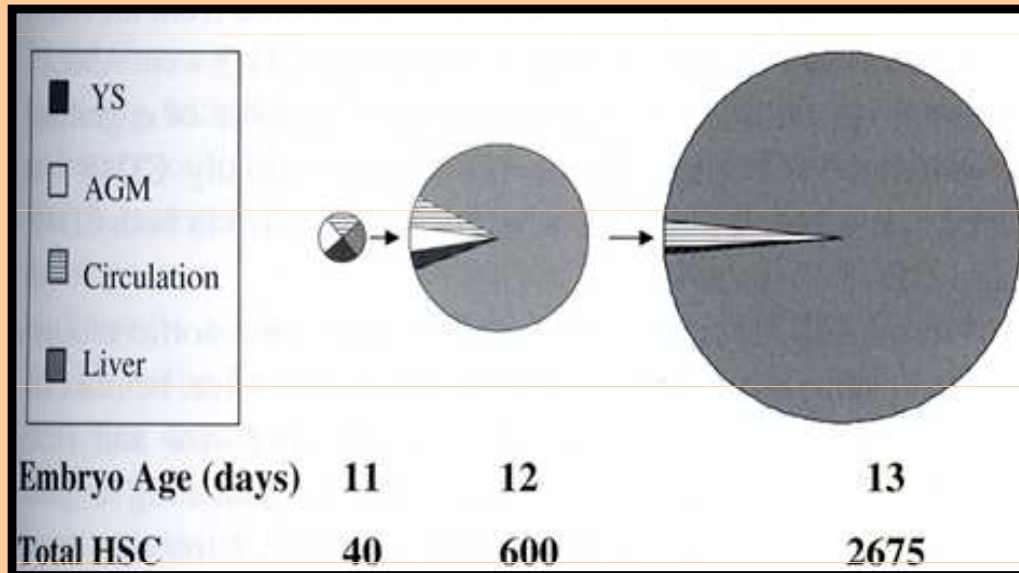
Hematopoéza v endotelu aorty (AGM), **~10.5 dpc**



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

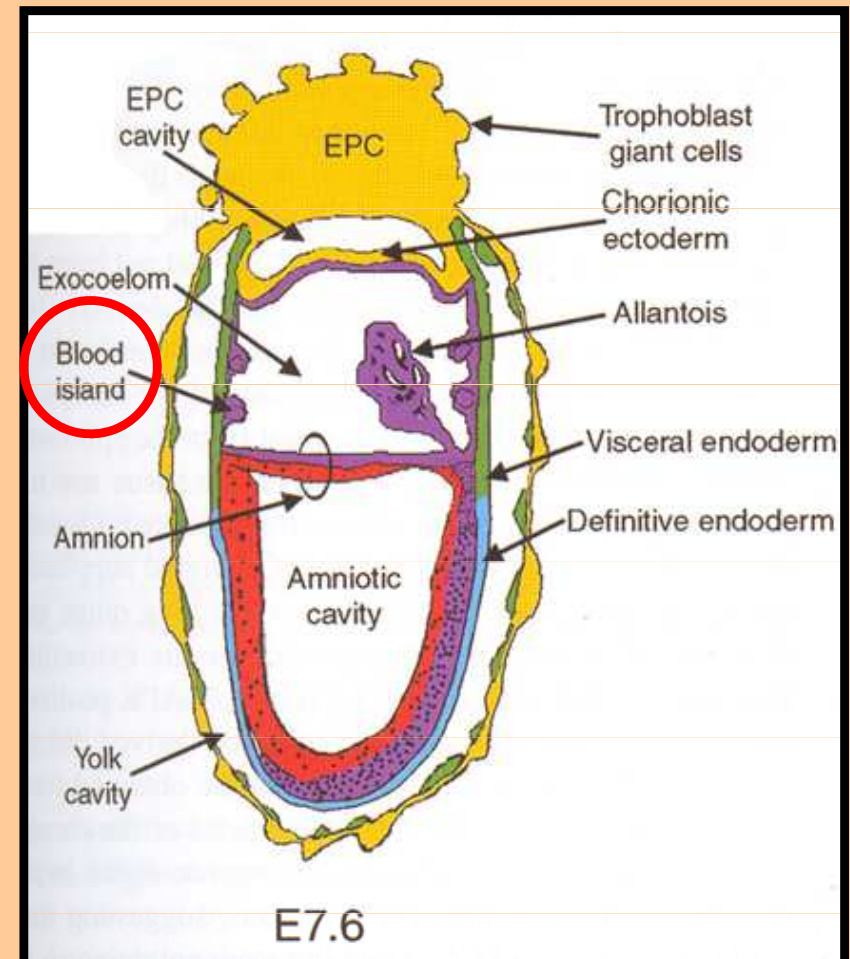
pT, pB – lymfocytární progenitory
CFU-GM – myeloidní progenitory
BFU-E, CFU-E – erythroidní progenitory

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

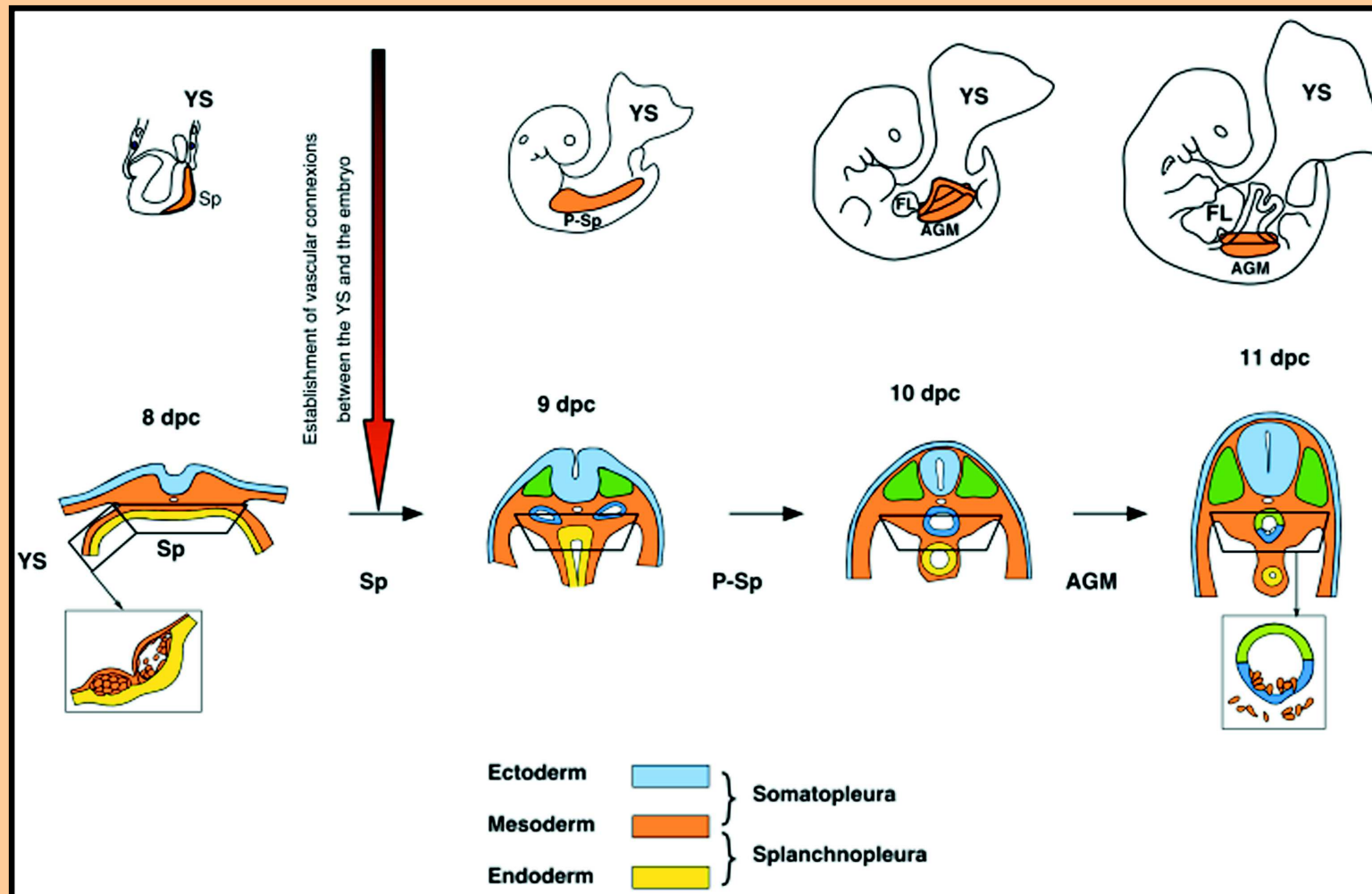


Pozn. Slezina je osídlena HSCs a hematopoetickými progenitory pravděpodobně z jater, protože v době objevení se hematopoézy ve slezině, v žloutkovém vaku a v aortě už hematopoéza neprobíhá a kostní dřeň dosud není vyvinuta.

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



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



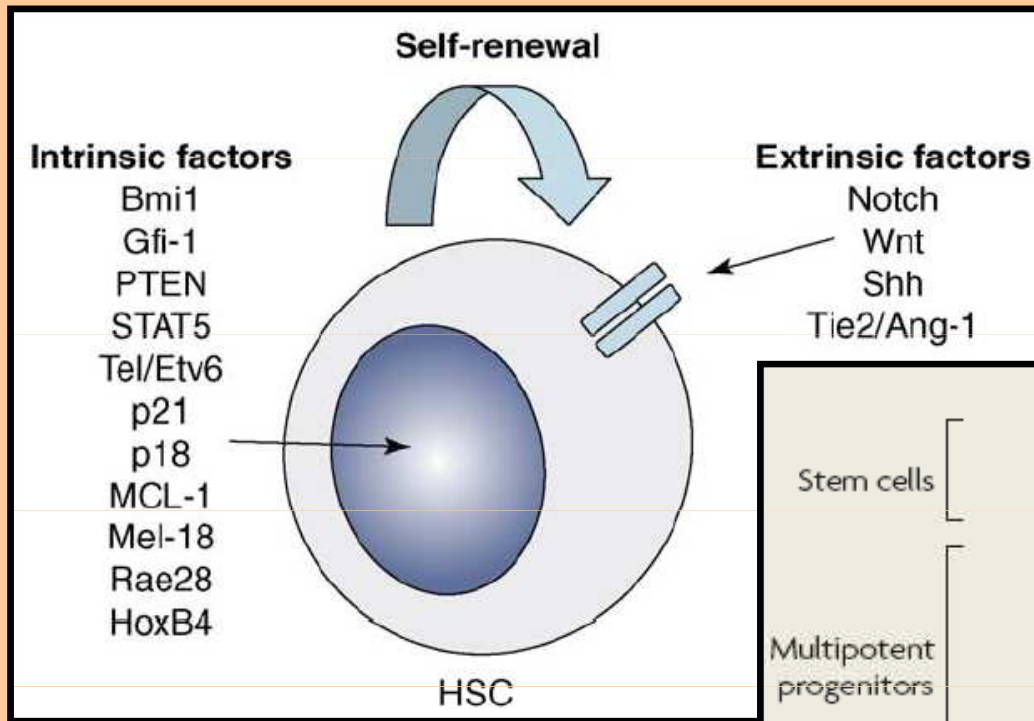
Chronologie hematopoézy u člověka a myši

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

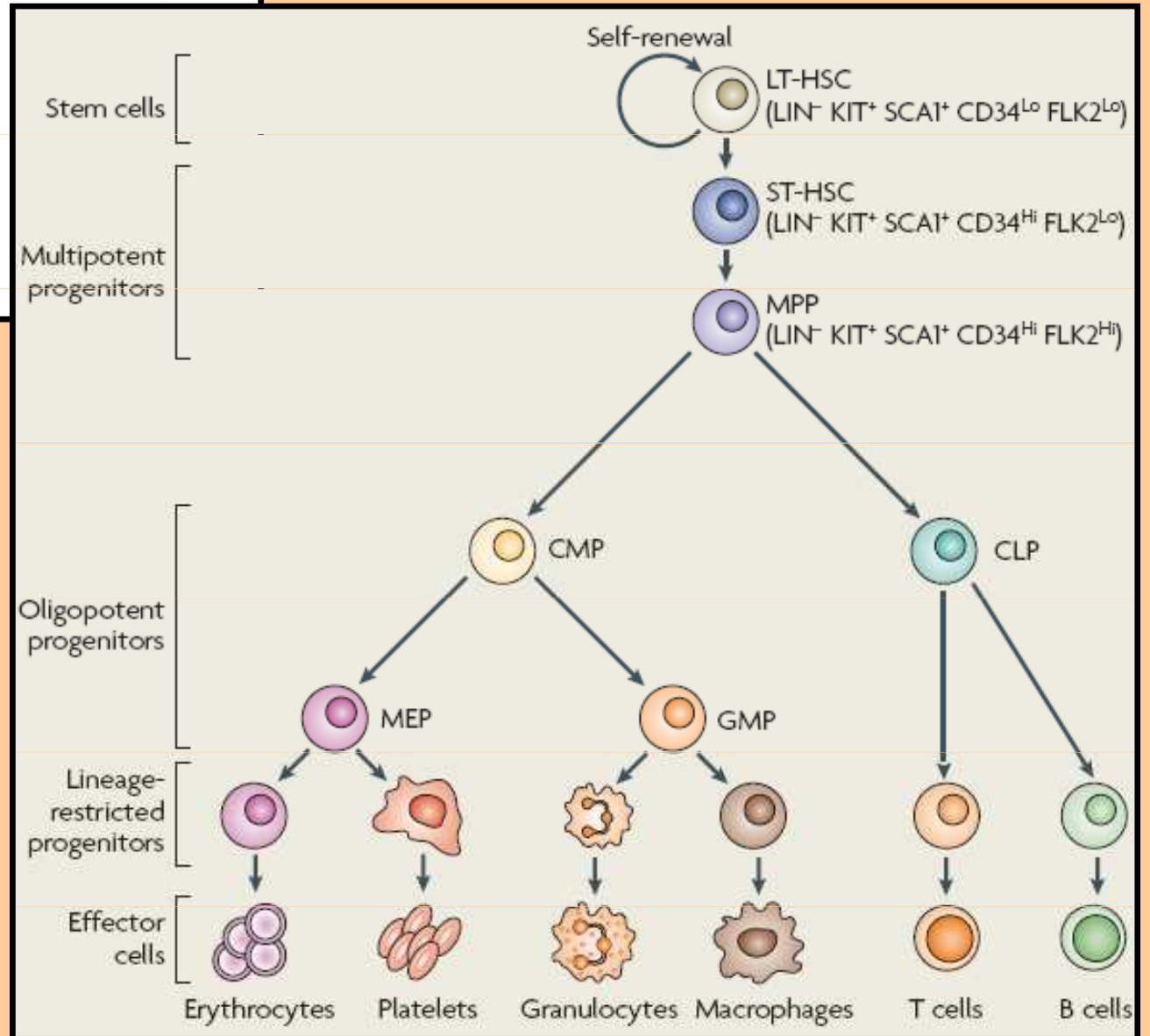
Fenotyp HSC

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

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



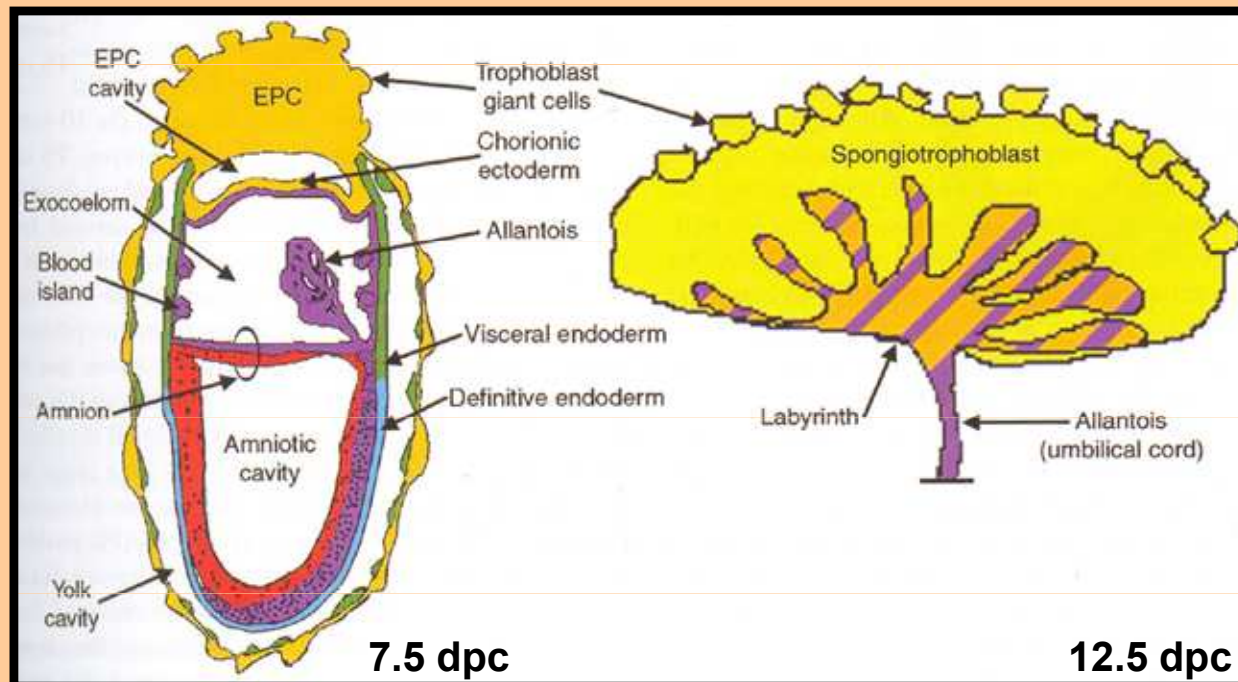
Schema hematopoézy a fenotyp aktuálních a potencionálních HSC



Kmenové buňky v pupečníkové krvi (v allantois)

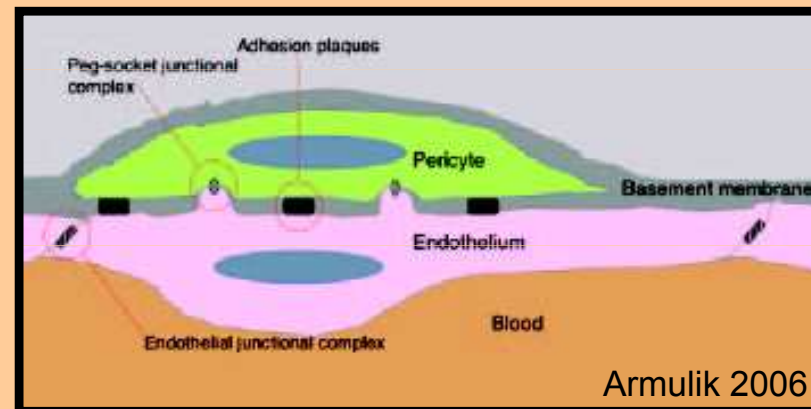
Pupečníková krev obsahuje hematopoetické progenitory existující, jako pozůstatek extraembryonálních krevních ostrůvků a endotelie. Díky tomu, jsou tyto buňky geneticky shodné a fenotypově velice blízké vlastním krevním buňkám embrya a je možné je tak snadno použít jako transplantační štěp pro z tohoto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

V současnosti bylo publikováno, že pupečníková 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^{+/-} – PECAM1 (Platelet endothelia cell adhesion molecule 1), CD34⁺, CD45⁺) 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⁺, Flk-1⁺, 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.



Srdce, 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 schopností (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.

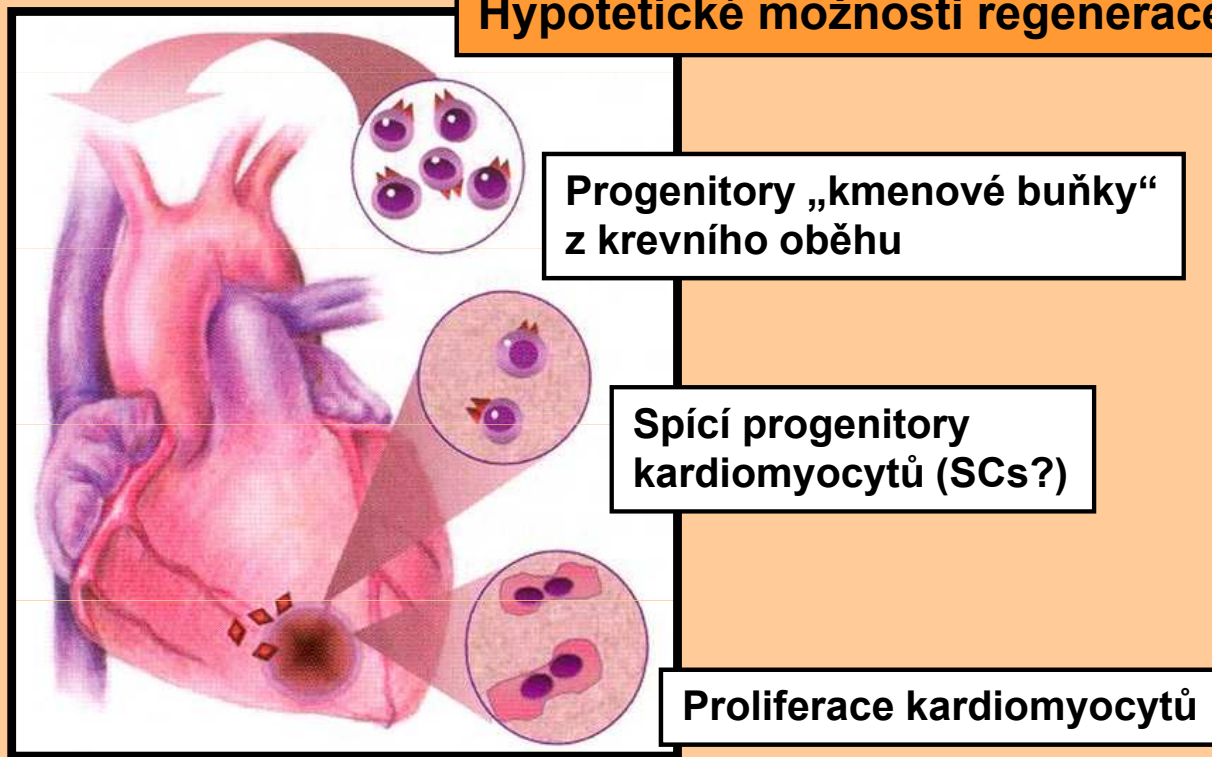
Tyto regenerující buňky jsou pravděpodobně SP a c-kit+ buňky kostní drěně (MSCs?)¹⁾, i po injekci, se přednostně usazují např. v místě ohraničujícím infarkt²⁾. Mechanismus regenerace srdečního svalu nemusí však být spojen přímo s diferenciací těchto zde se akumulujících buněk, ale může být vyvolaný také růstovými faktory, které tyto buňky produkují (viz. MSCs) a tak stimulují buď samotné kardiomyocyty, nebo a to spíše endotelové buňky vystýlající místní cévy. Endotel snad sám o sobě má regenerační schopnosti pro některé tkáně³⁾. 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)

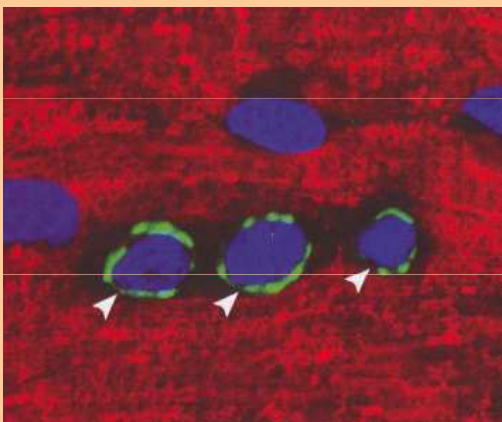
3) Je podezření, že endotel může dávat vznik hematopoetickým progenitorům (viz. např. hematopoéza v stěně dorsální aorty (AGM) embrya a extraembryonální prvotní krevní ostrůvky průběhu embryonálního vývoje atd..

Hypotetické možnosti regenerace srdečního svalu

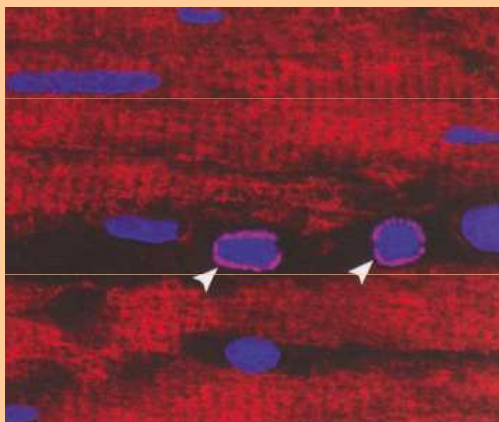


Detekce buněk v srdeční svalovině exprimujících

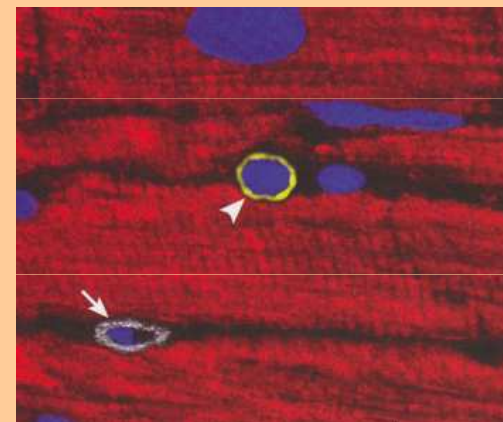
c-kit (zelená)



MDR1 (růžovo-fialová)

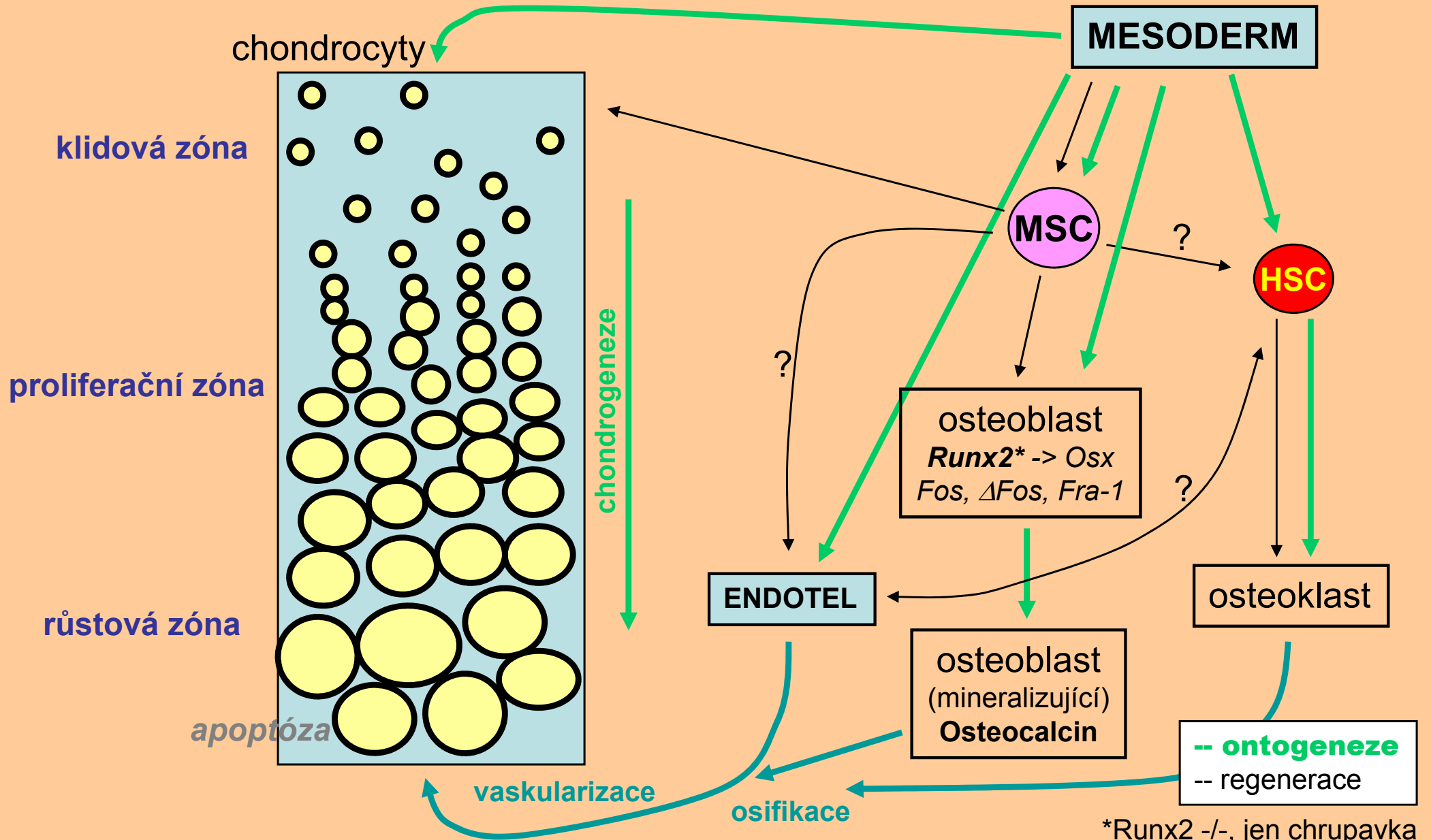


Sca1 (žlutá)
von Willebrandův faktor (bílá)

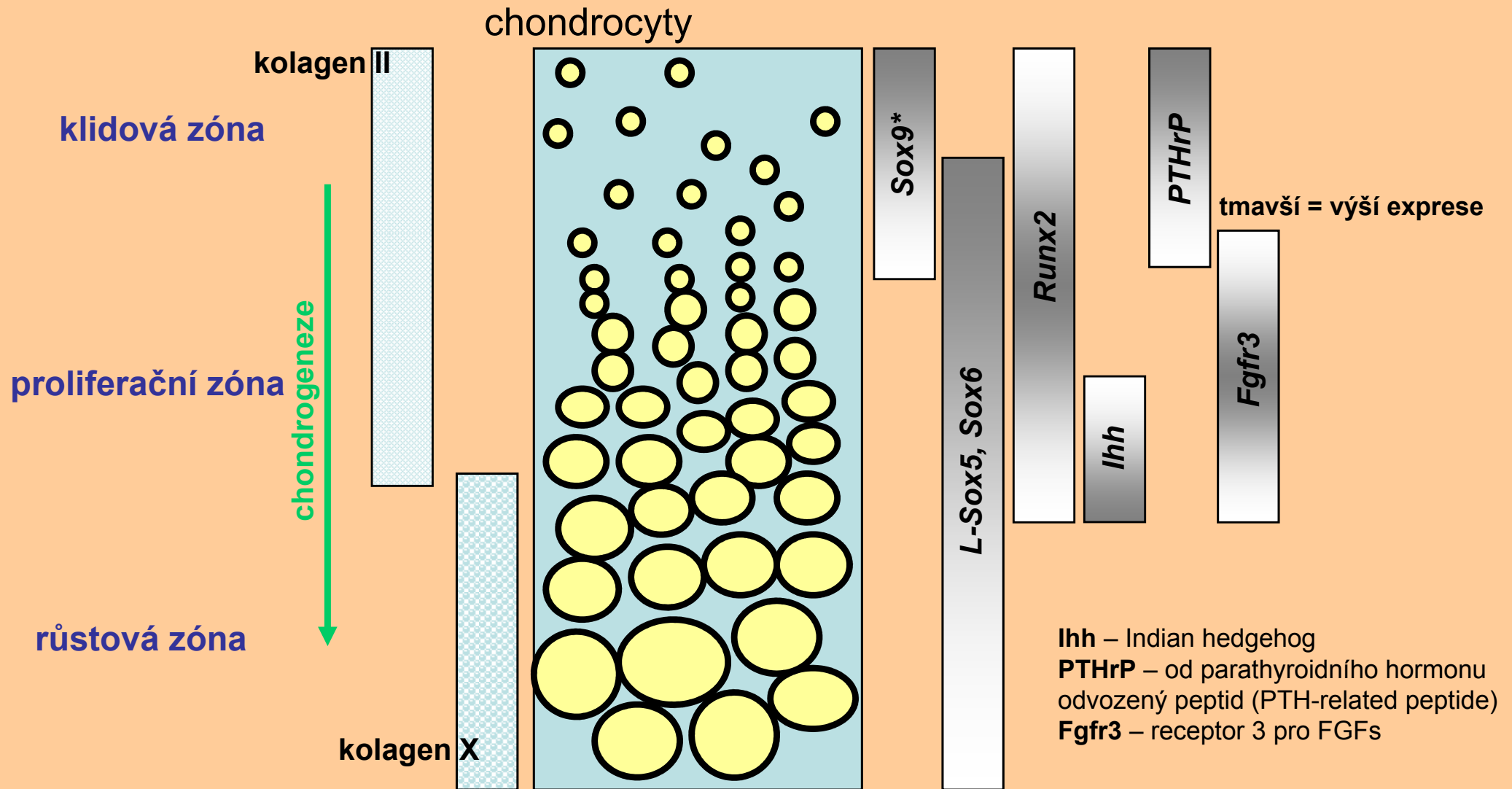


Kostra - skelet

chrupavka (chondrocyty) + kost (osteoblasty a osteoklasy)
- vývoj končí v pubertě



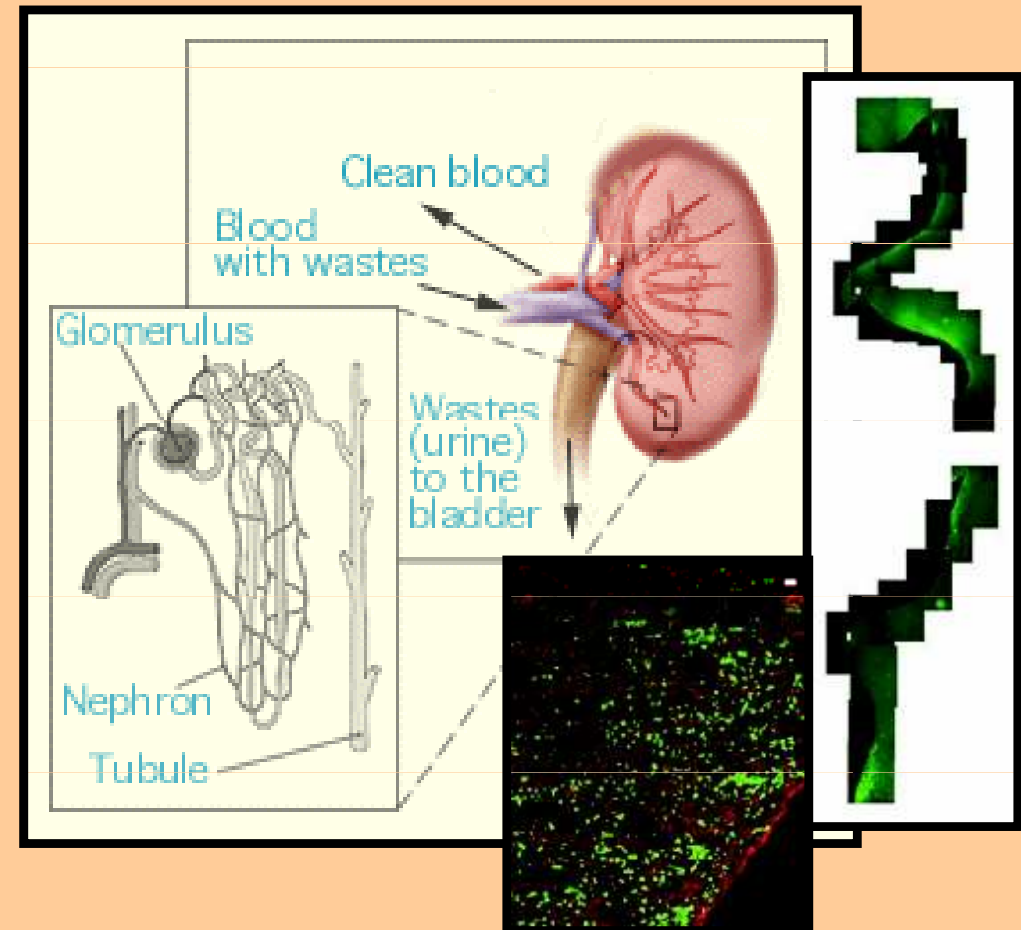
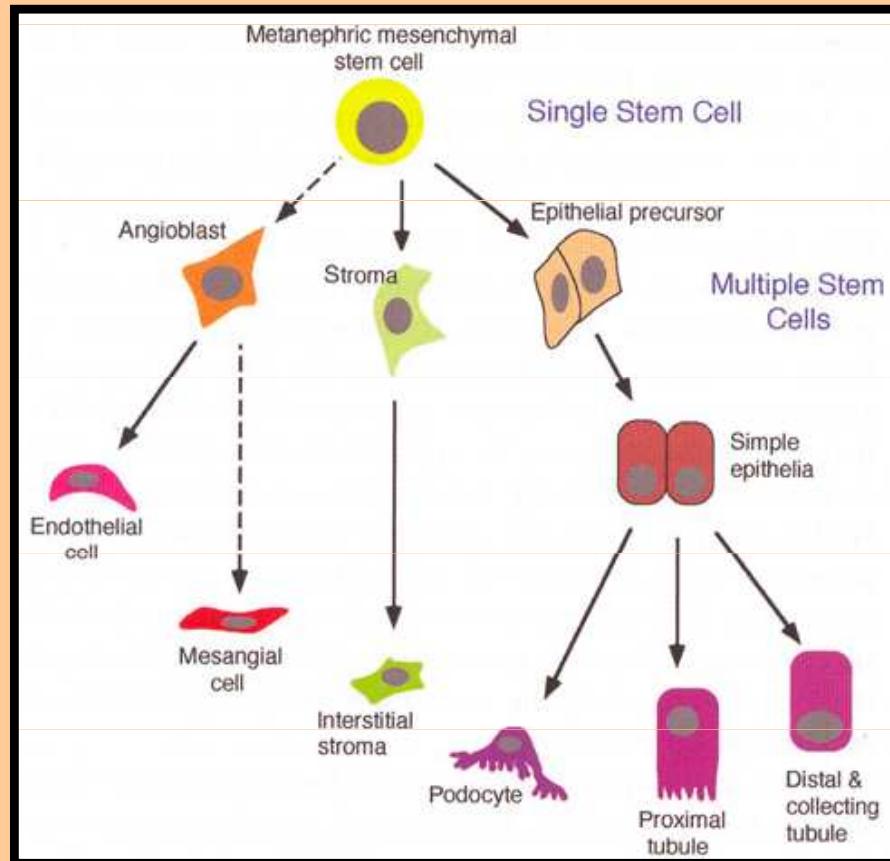
fenotyp chondrocytů v průběhu jejich diferenciaci



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

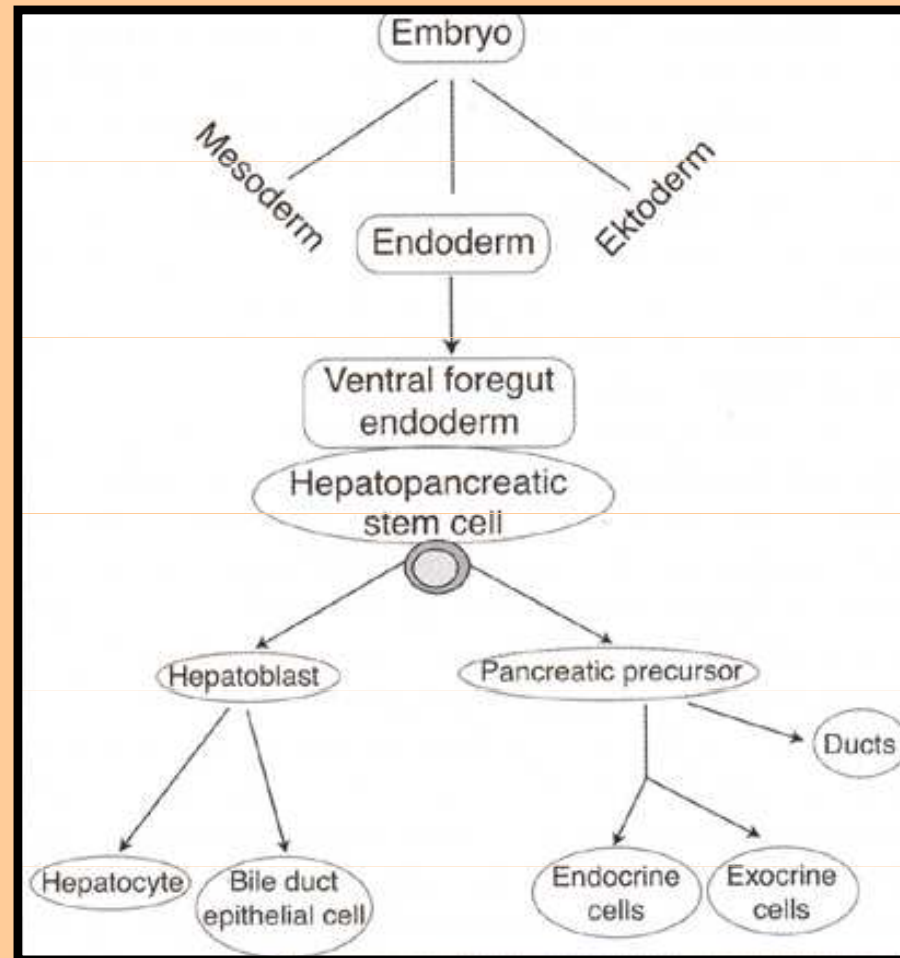
Ledviny

- 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

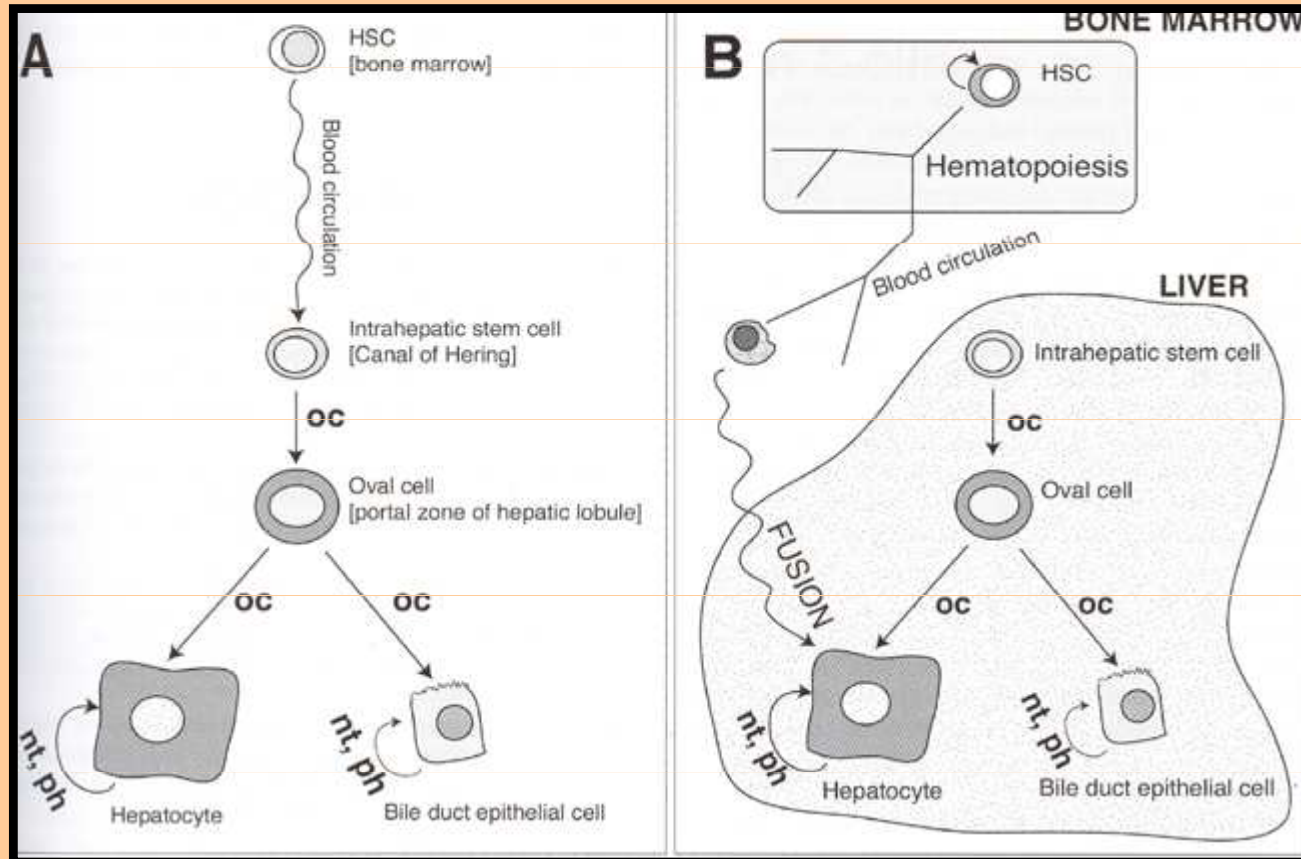
b) další typy buněk v játrech

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 α (tumor necrosis factor α), TGF α (transforming growth factor α), EGF (epidermal growth factor α)

- **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 transpalntace) 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

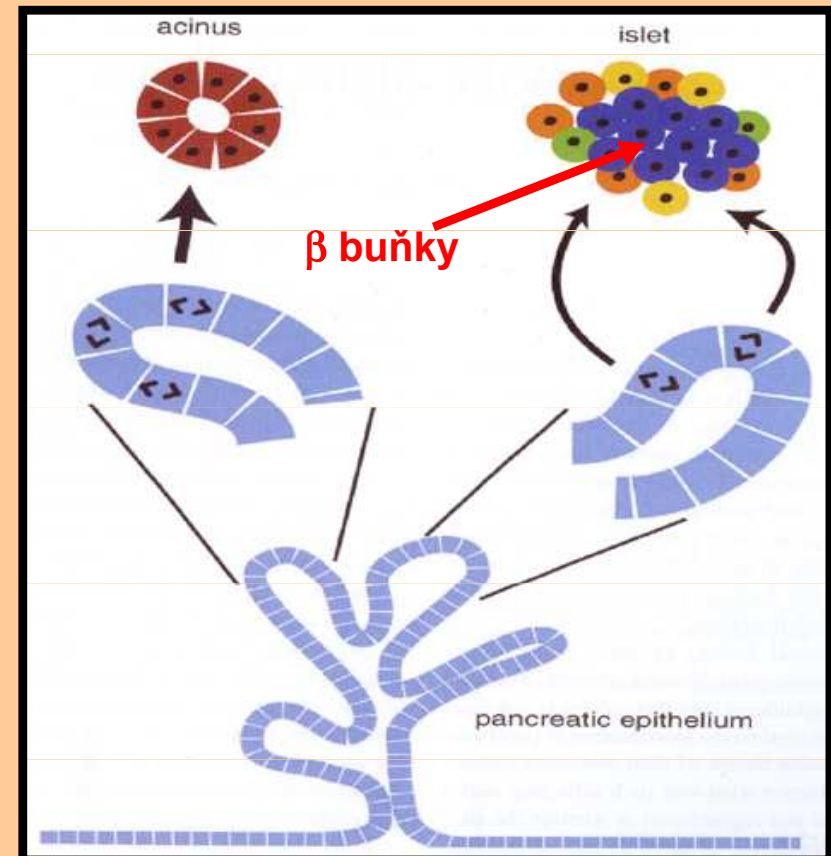


oc – regenerace z oválných buněk
 nt – normální obnova jaterní tkáně
 pt – obnova jaterní tkáně po odstranění její části

Pankreas

- a) exokrinní buňky (trávicí enzymy) a epiteliální buňky tvořící kanálky pro odvod těchto enzymů do dvanáctníku
- b) endokrinní buňky α (glukagon), β (insulin), δ (somatostatin) a pp-buňky (pankreatický polypeptid)

- prekurzor pankreatu (embryonální) exprimuje transkripční faktor „*pdx1*“
- poslední studie ukazují, že β buňky se neobnovují z kmenových buněk, ale svou vlastní pomalou proliferací. Exprimují insulin, *Pax6*, *HNF3 β* ,..
- 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 β 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

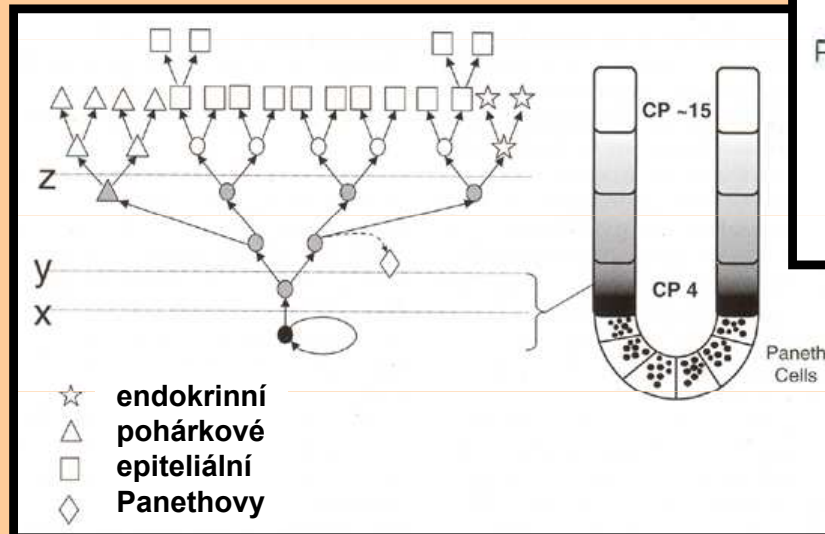
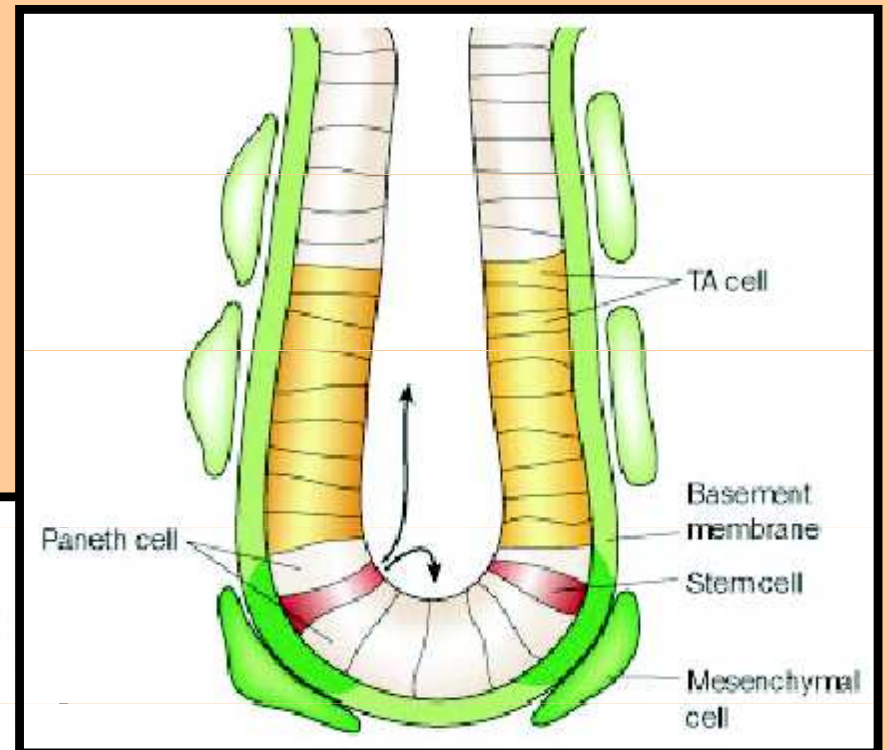
mesenchymální buňky „lamina propria“

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

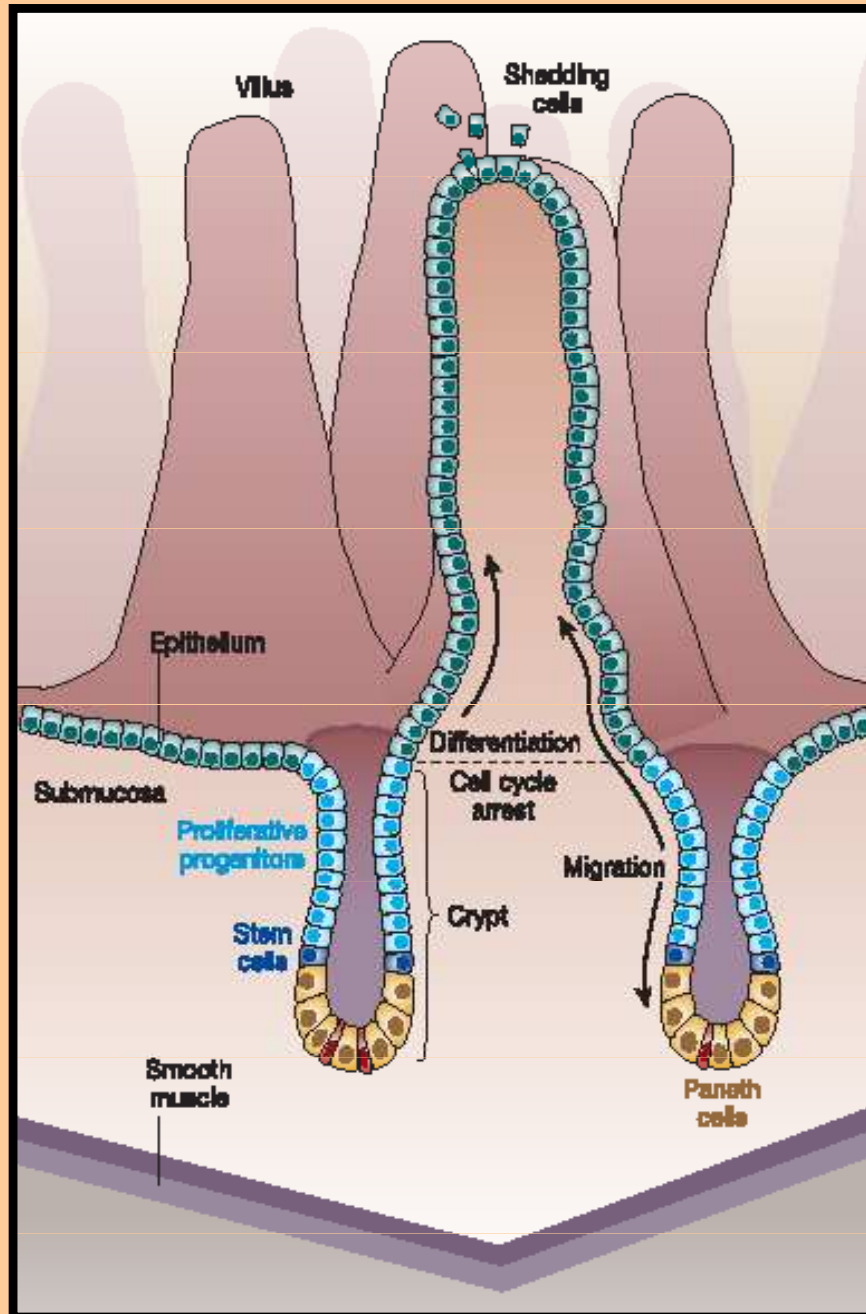
- ISEMF (intestinal subepithelial myofibroblast)

kteří produkují růstové faktory regulující proliferaci a diferenciaci epiteliálních buněk

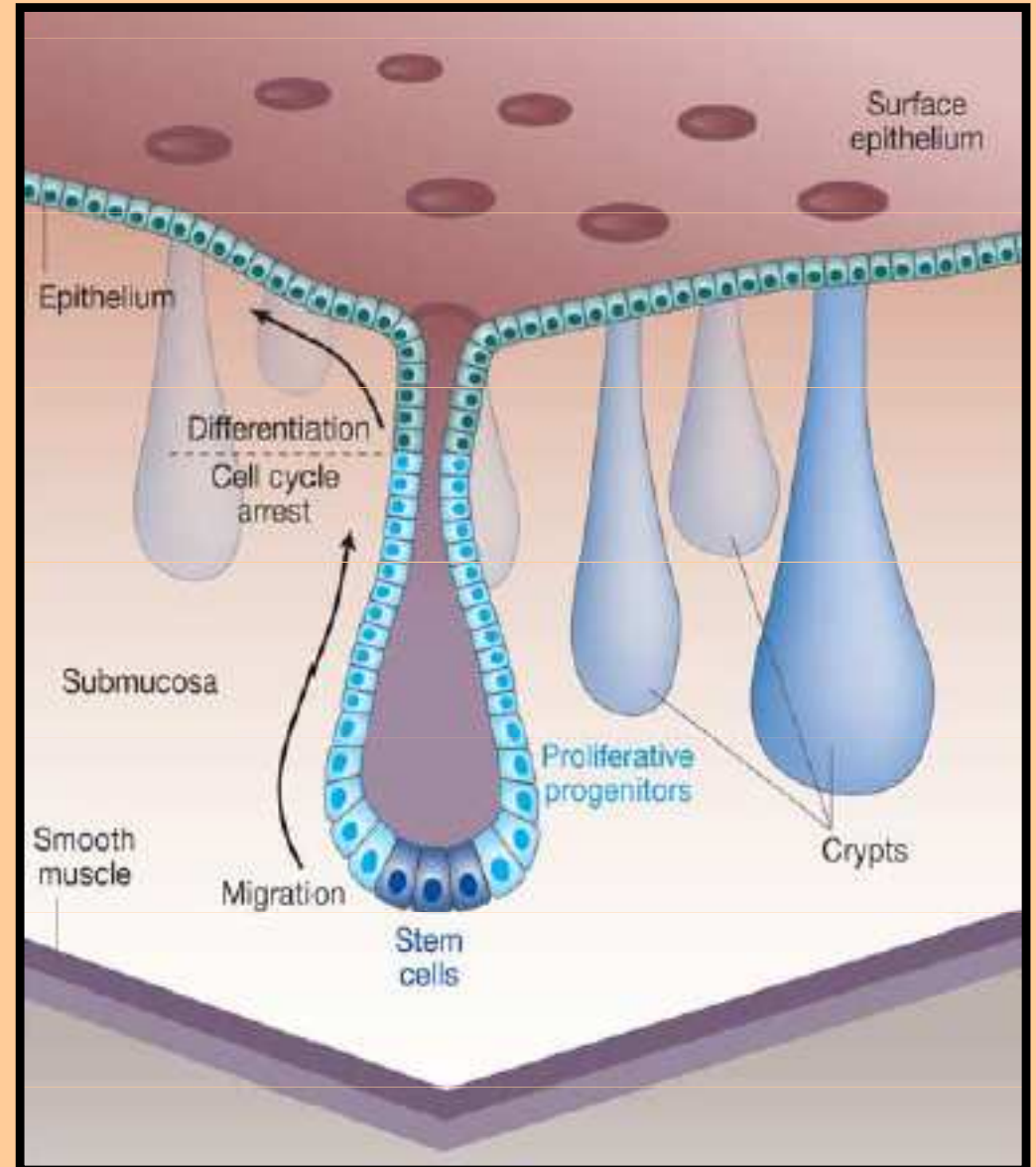
(HGF, KGF, $\text{TGF}\beta_2$)



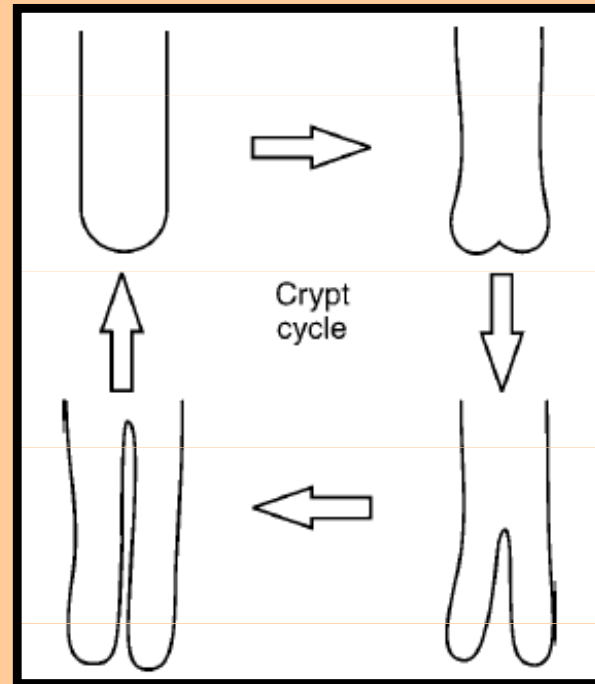
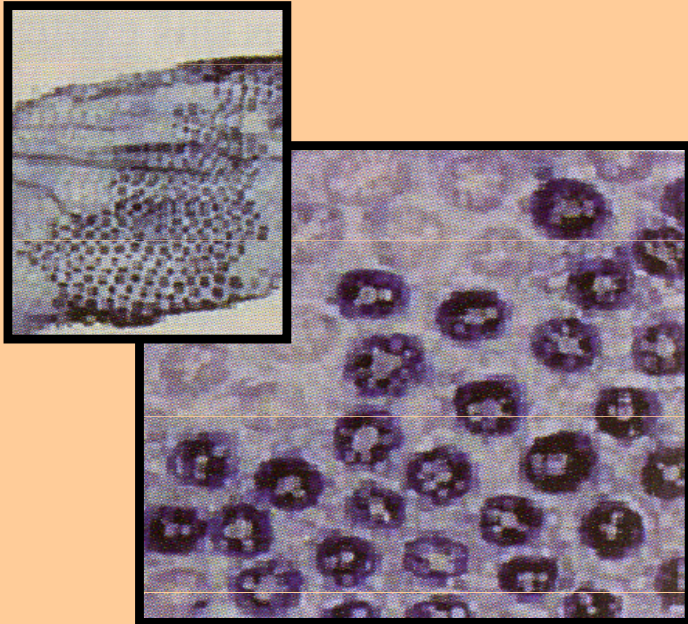
tenké střevo



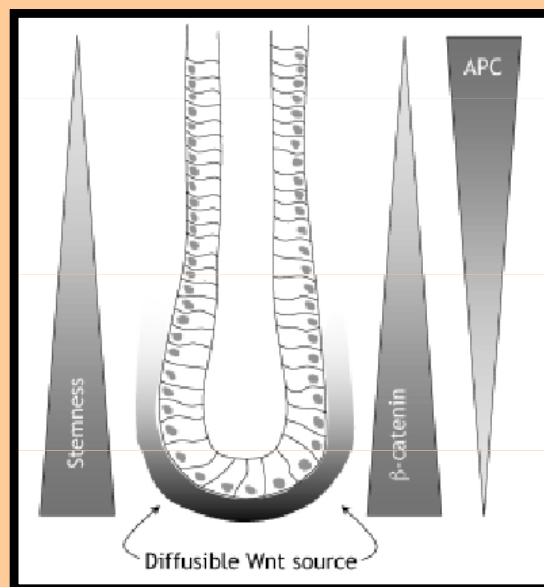
tlusté střevo



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)

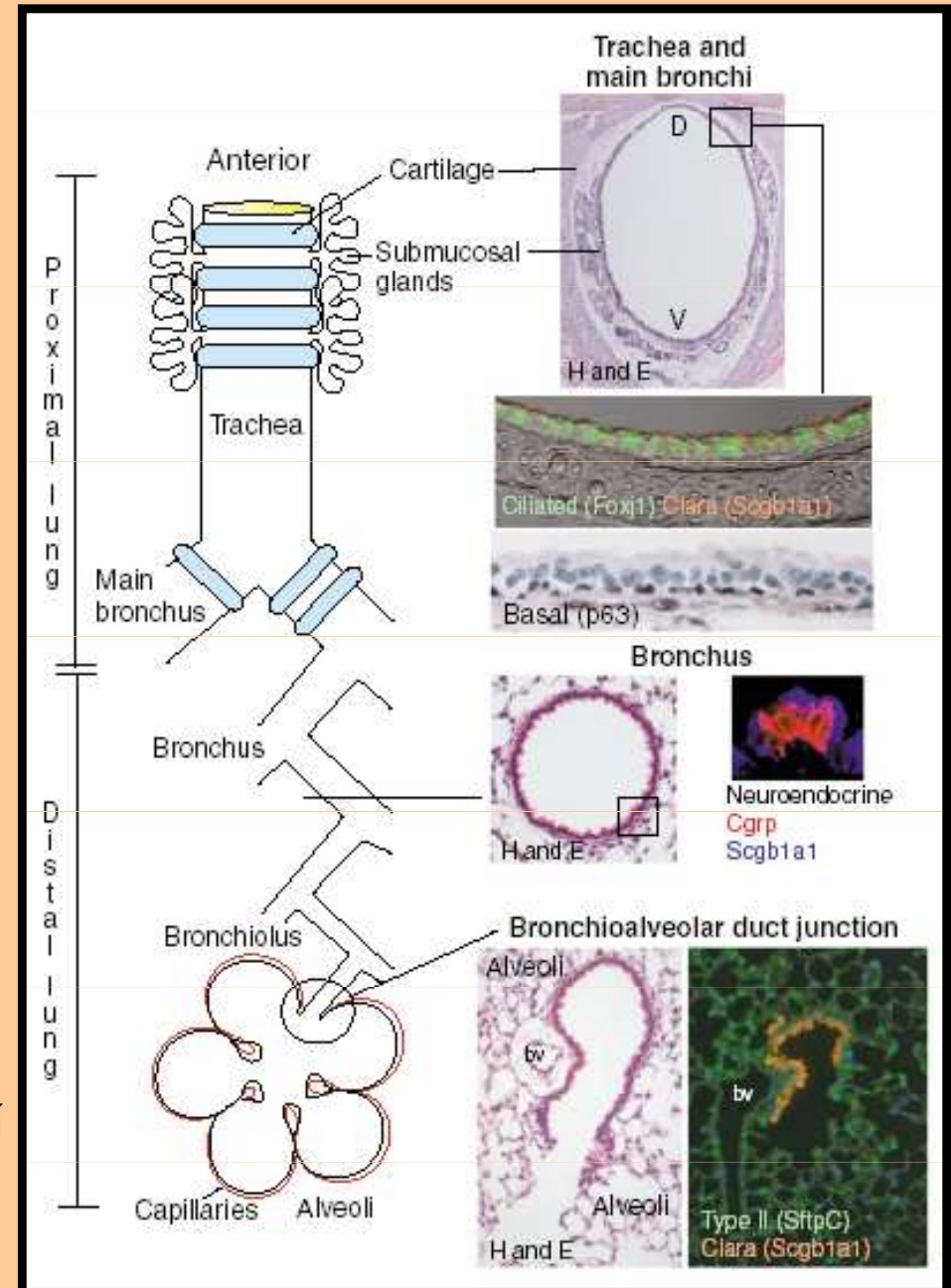
Proximální část plic

(trachea a velké průdušnice/bronchy)

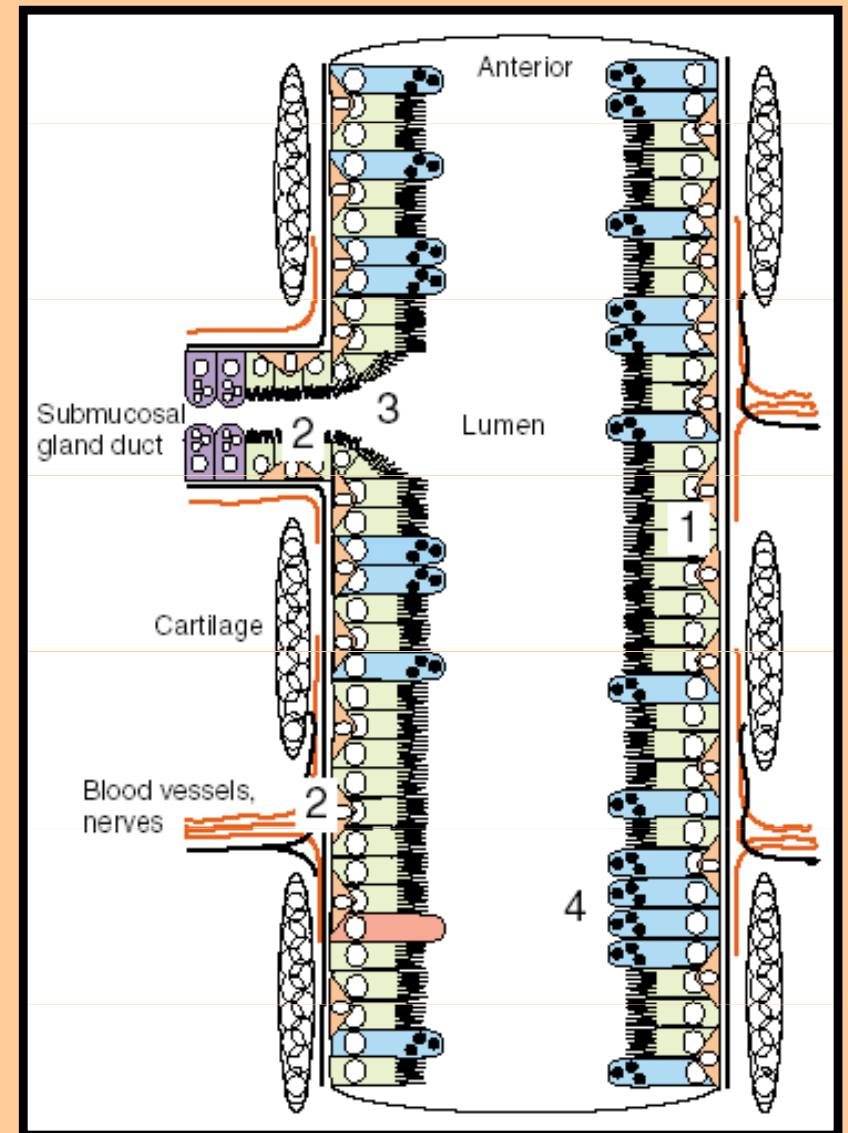
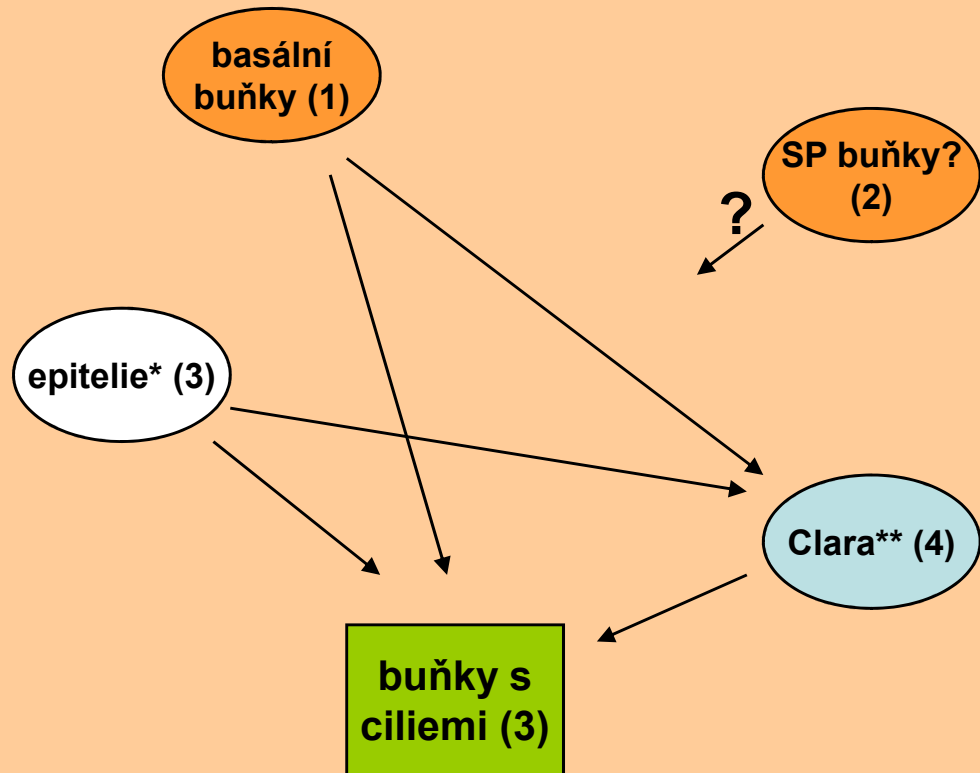
- epitelální buňky s ciliemi (Foxj1+)
- Clara a buňky podobné Clara buňkám (Scgb1a1 – sekretoglobin+)
- bazální buňky (p63+)
- neuroendokrinní buňky

Distální část plic (průdušky, průdušinky a alveoli)

- epitelální buňky s ciliemi (Foxj1+)
- Clara buňky (Scgb1a1+)
- varianta Clara buněk - Clara^v
- neuroendokrinní buňky, tvořící neuroendokrinní tělíska (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

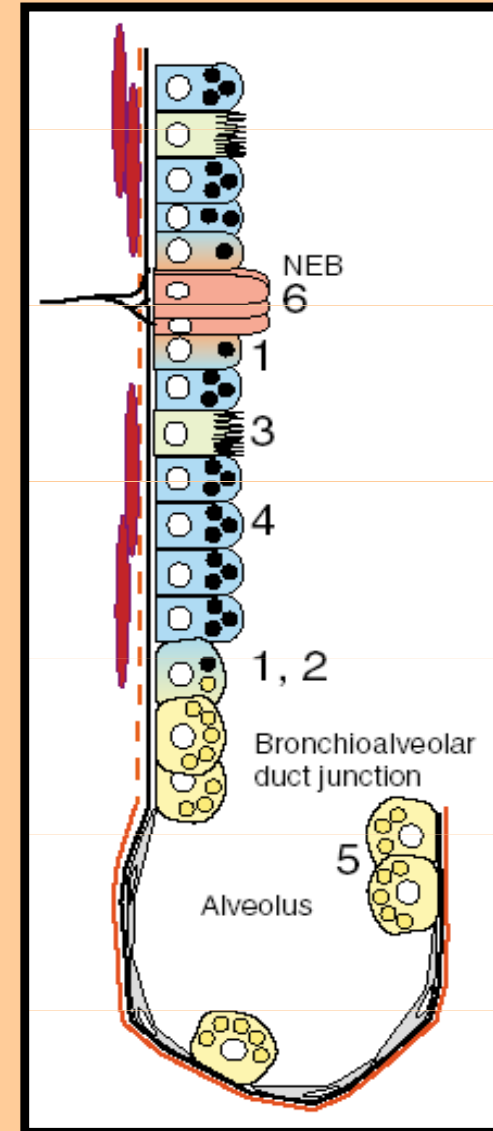
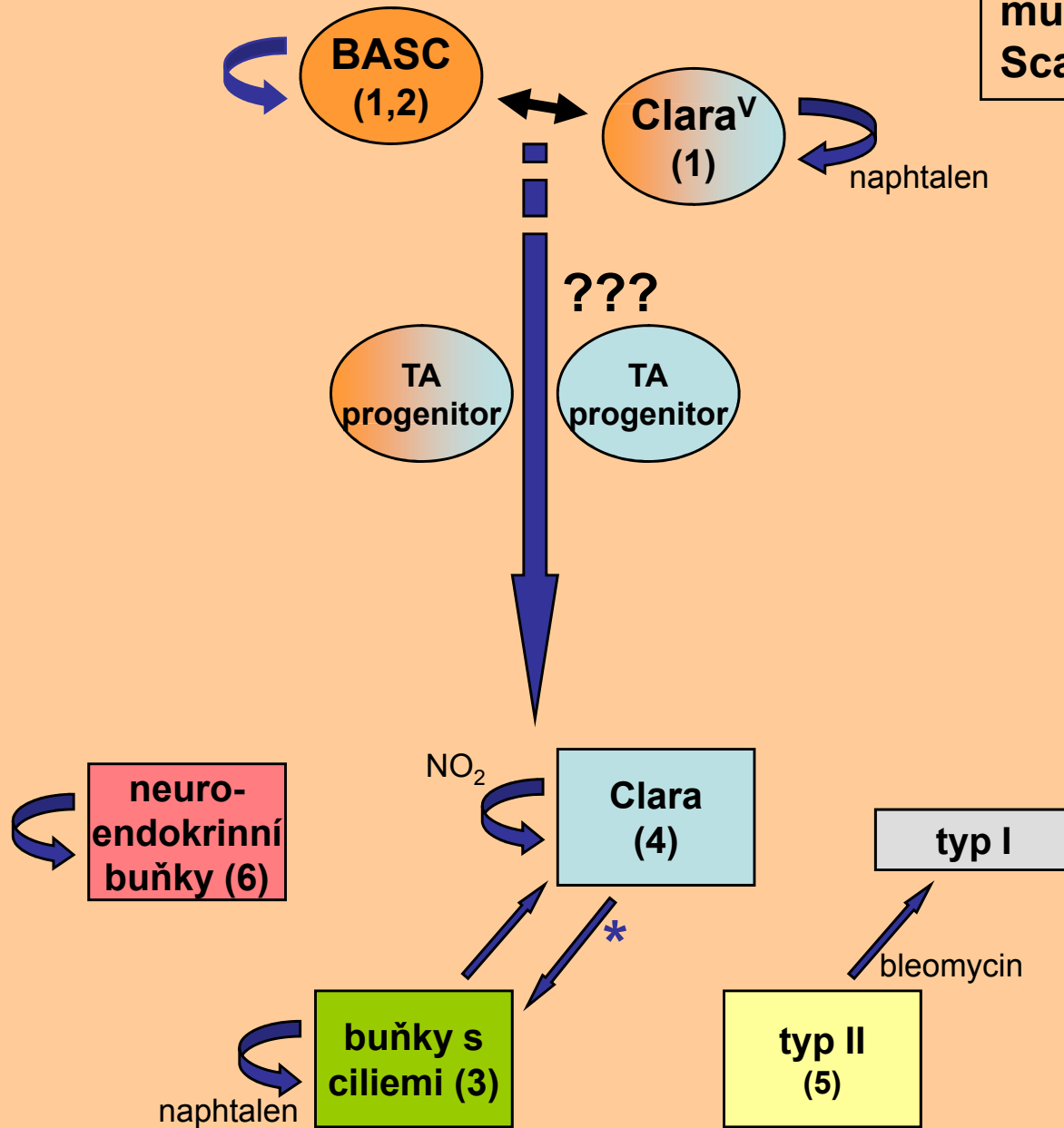


* epiteliální buňky submukózních žlaz, mohou regenerovat epitel průdušnic

** nahrazují buňky s ciliemi po poškození oxidanty

Opravné mechanismy v distální části plic

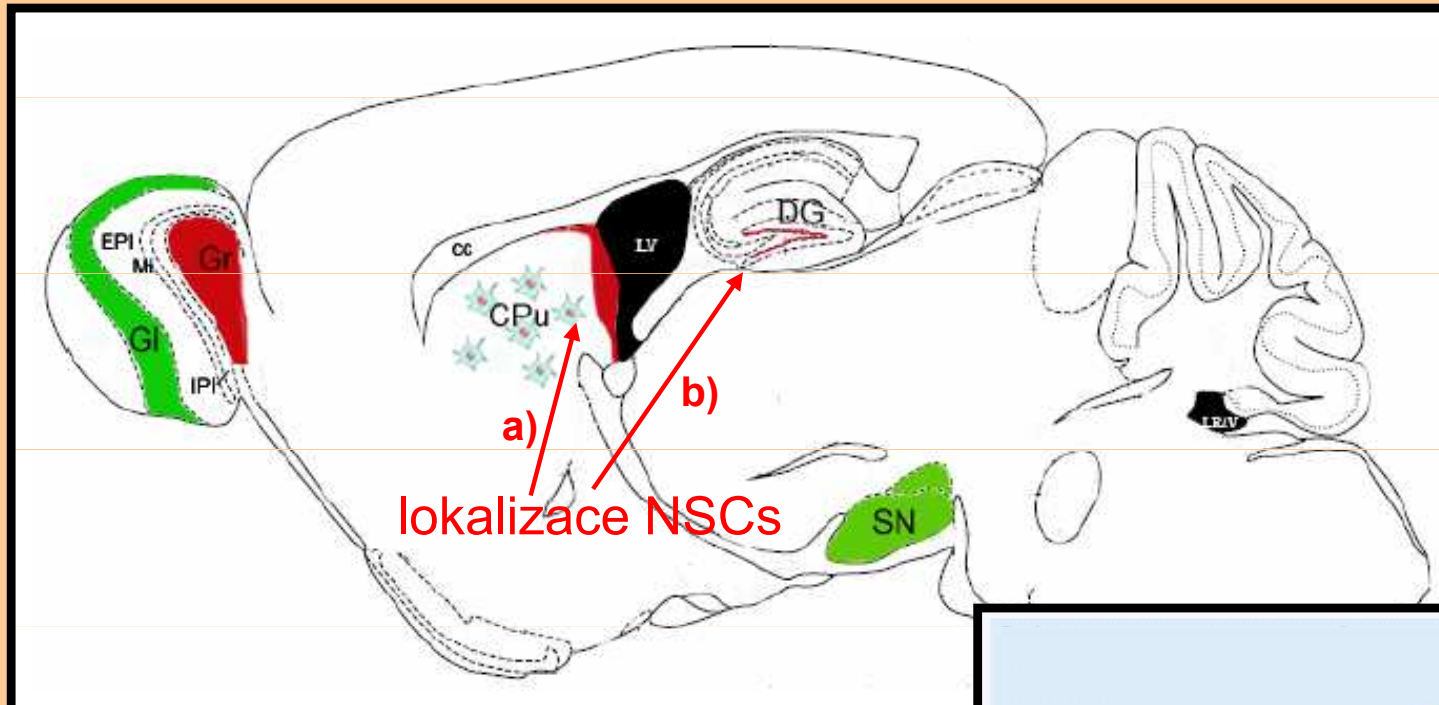
multipotentí BASCs mají fenotyp $Sca1^+$, $CD34^+$, $CD45^-$, $Sftpc/Scgb1a1^+$



*umí to všechny Clara buňky ?!

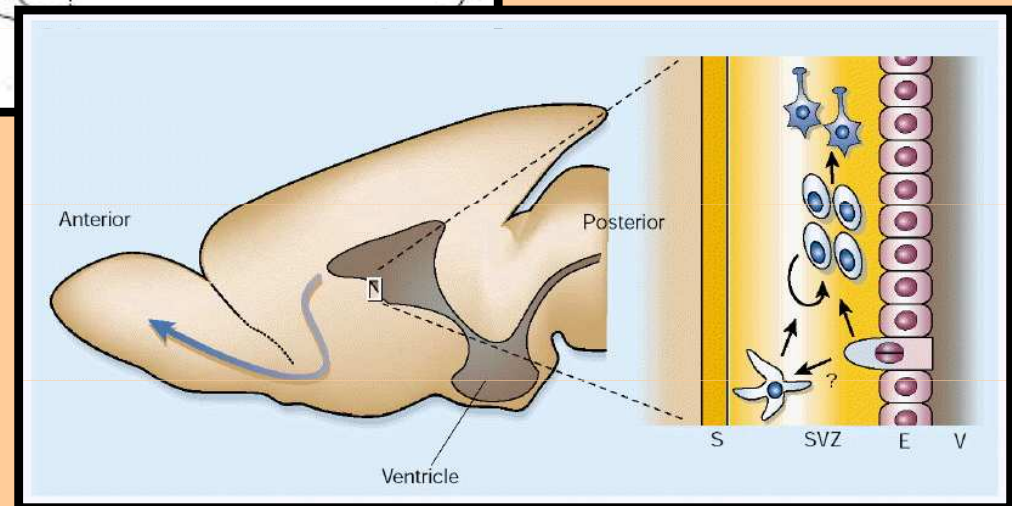
SSC „ektodermálního“ původu

Neurální kmenové buňky – NSCs (Neural stem cells)



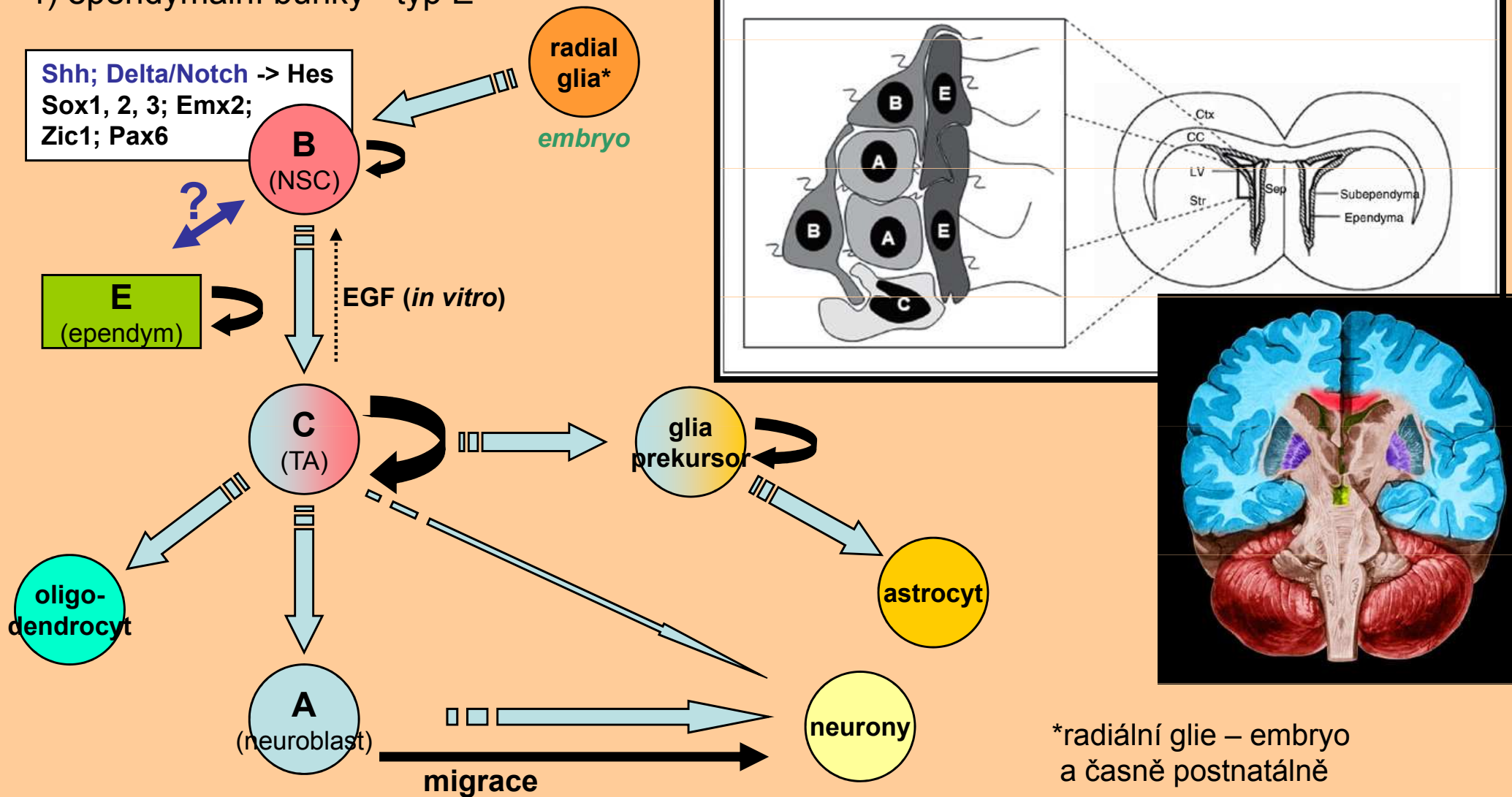
a) subventrikulární zóna (SVZ), postranní komory
b) subgranulární vrstva DG

Gl – 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



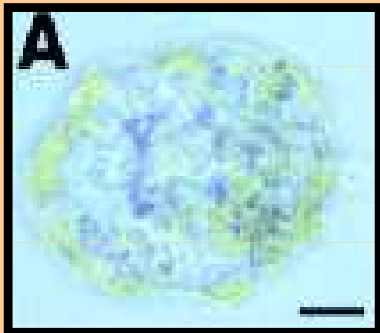
Oblast s NSCs obsahuje čtyři typy buněk

- 1) pomalu proliferující, astrocytům podobné (GFAP⁺/nestin⁺/SSEA1⁺/CD133⁺) buňky - typ B = NSCs
- 2) spící, případě potřeby 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

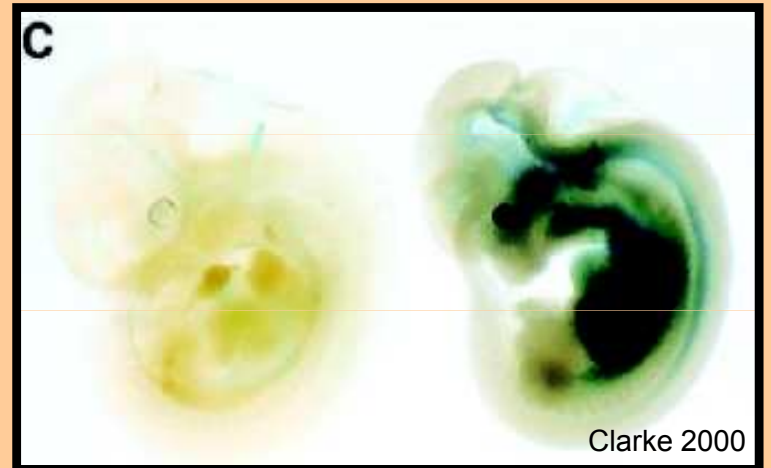


Další charakterizace NSCs

- 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. „neurosfér“ 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. →

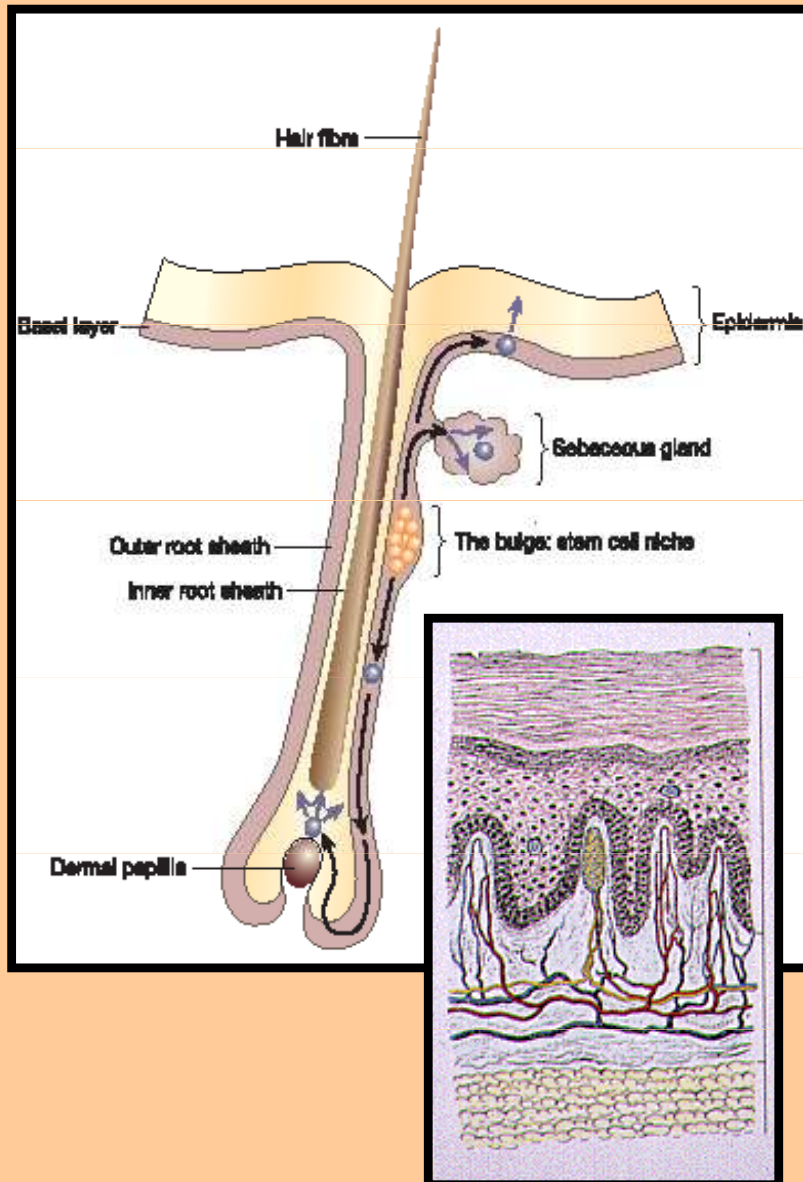


NSC jsou také schopny rekonstruovat hematopoézu (Bjornson 1999)

Clarke 2000

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

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



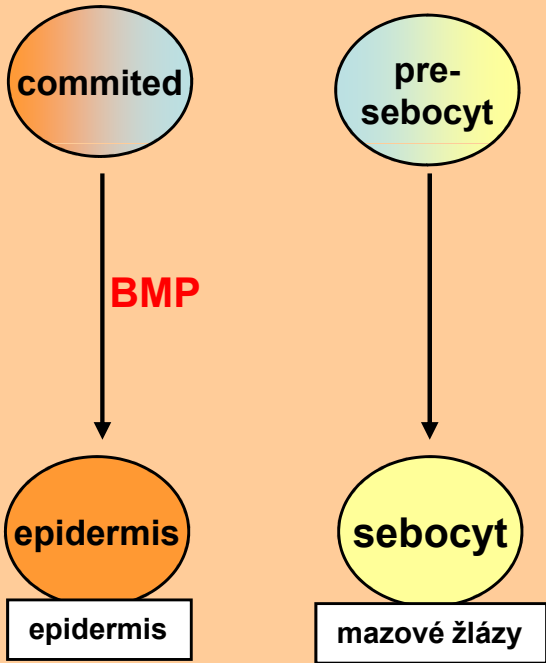
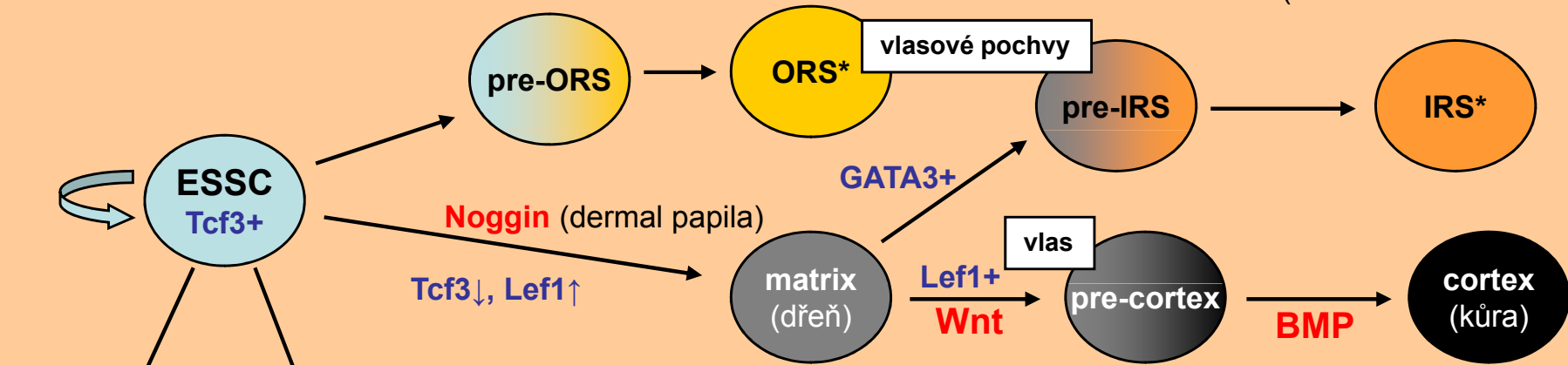
ESSCs ($\text{Integrin } \alpha 6^+ / \text{CD71}^- / \text{K15}^+ / \text{K19}^+ / \text{CD34}^+$)¹ jsou lokalizovány ve výduťi po straně vlasové pochvy. Odtud v případě potřeby migrují jak do bazální vrstvy krycí epidermis, tak k základu vlasu k dermální papile². V základně vlasu, u dermální papily, 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.

¹ CD71 – receptor pro transferin

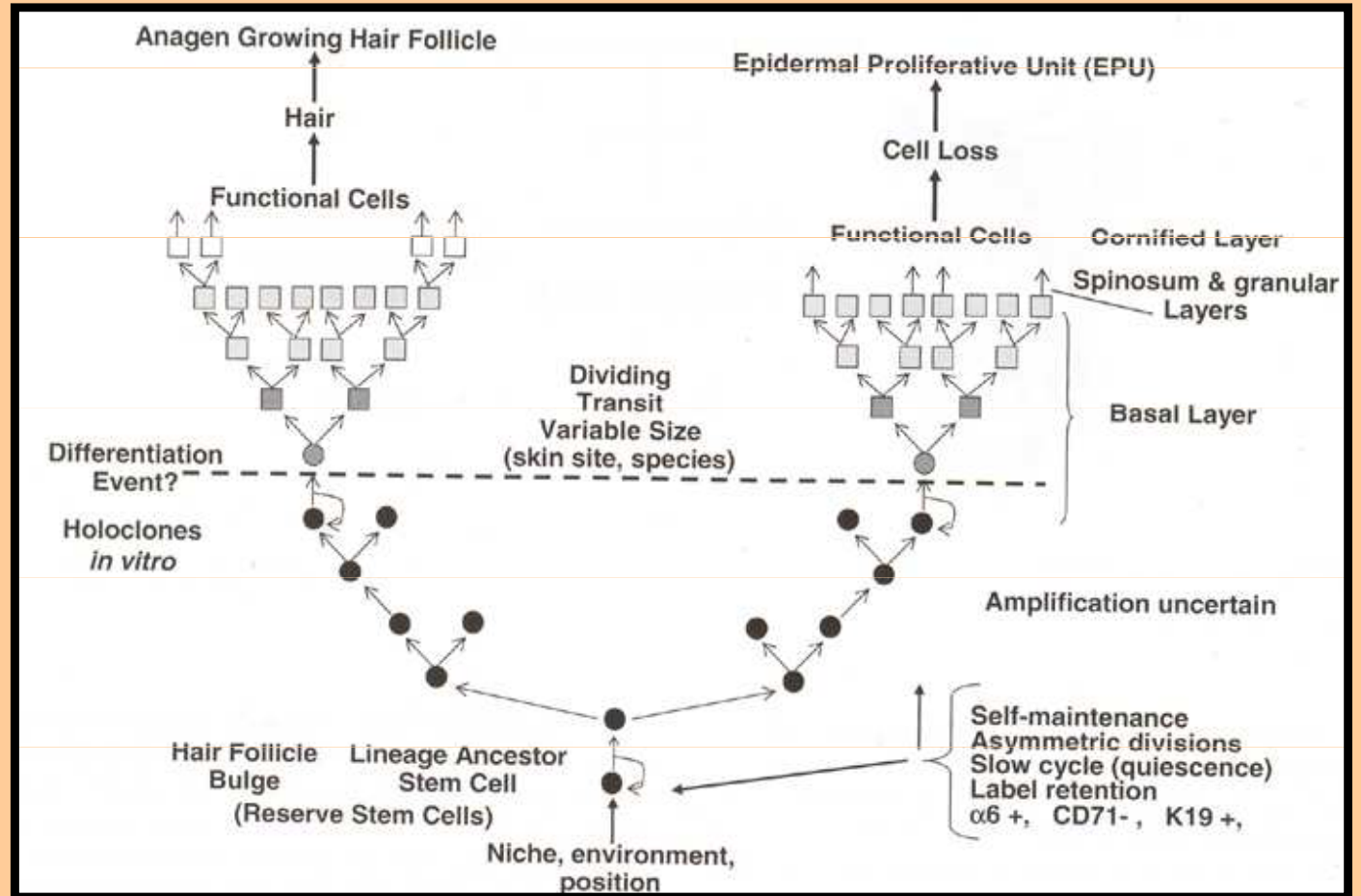
² dermální papila je shluk mesenchymálních buněk regulující růst chlupu

Specializace a signalizace v epidemis

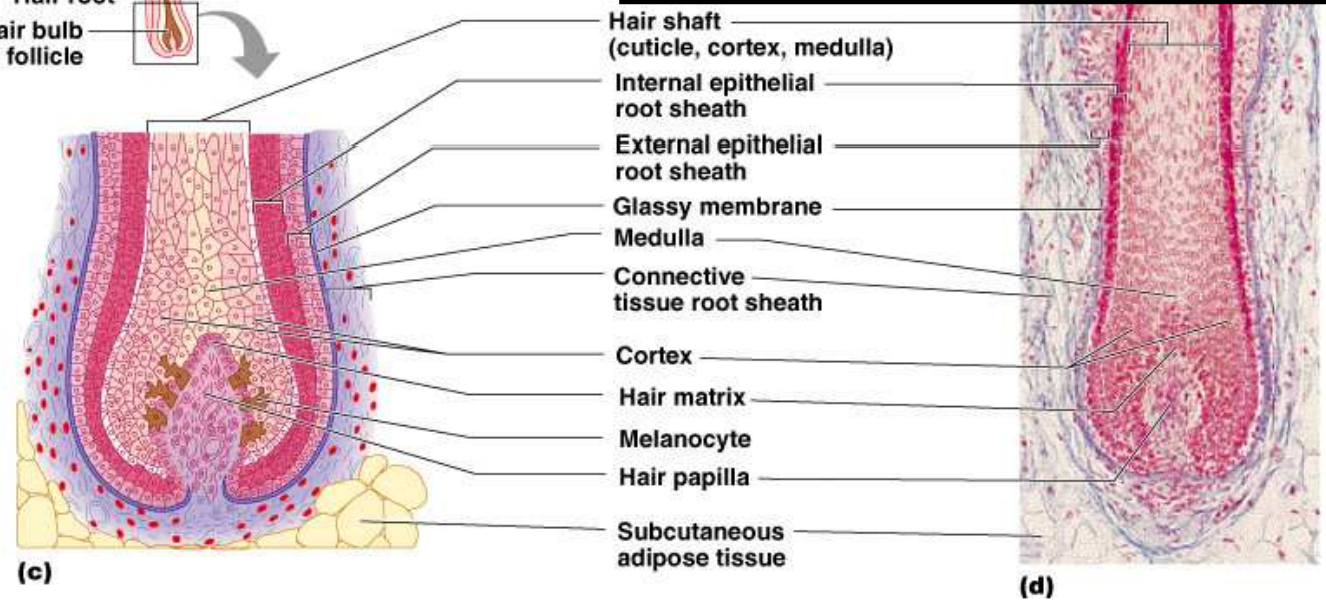
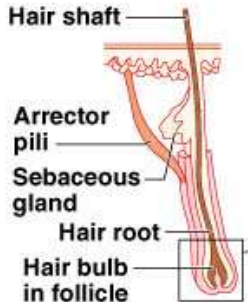
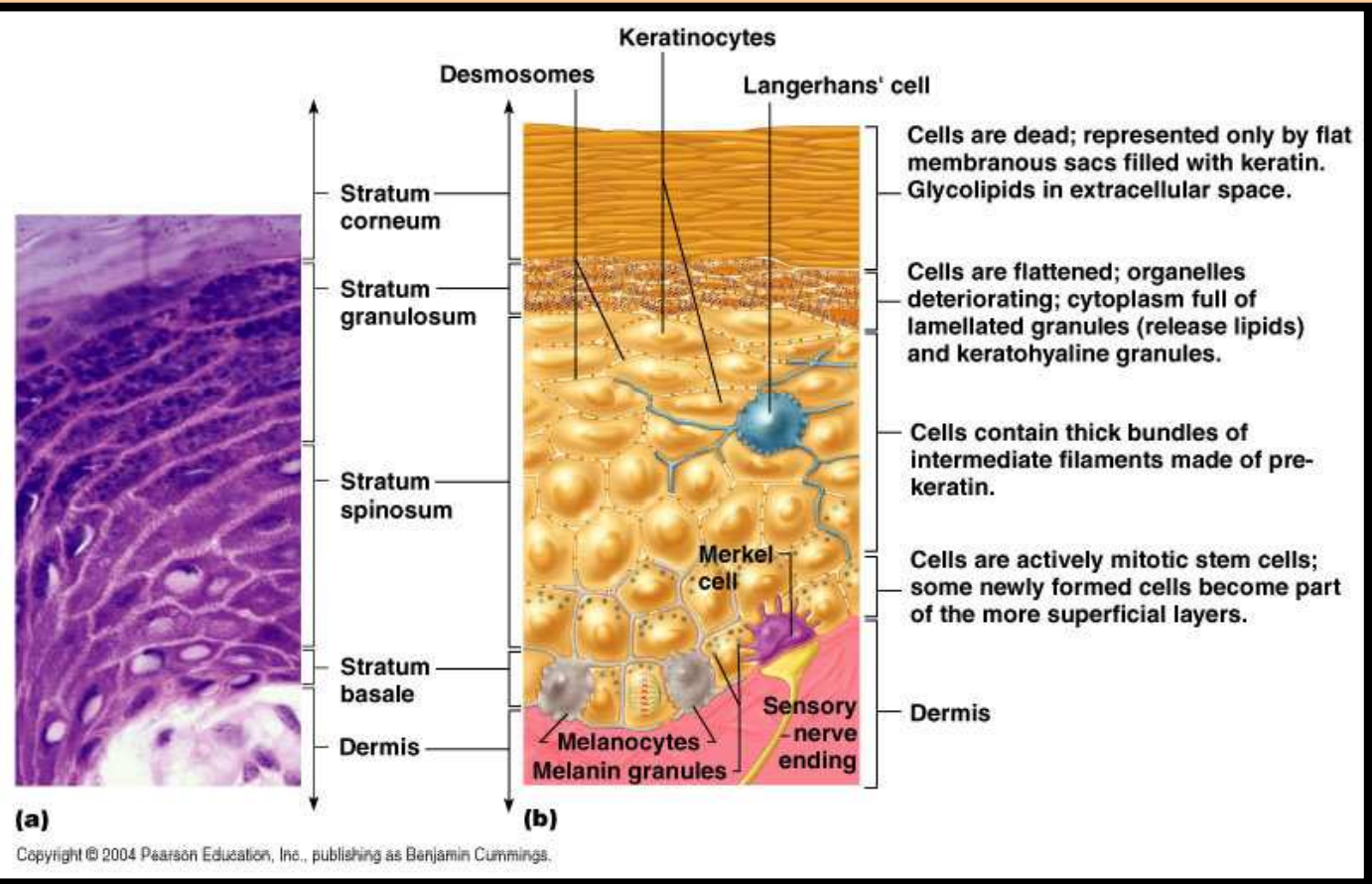
*IRS – vnitřní vlasová pochva
 ORS – vnější vlasová pochva
 (inner / outer root sheath)



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!

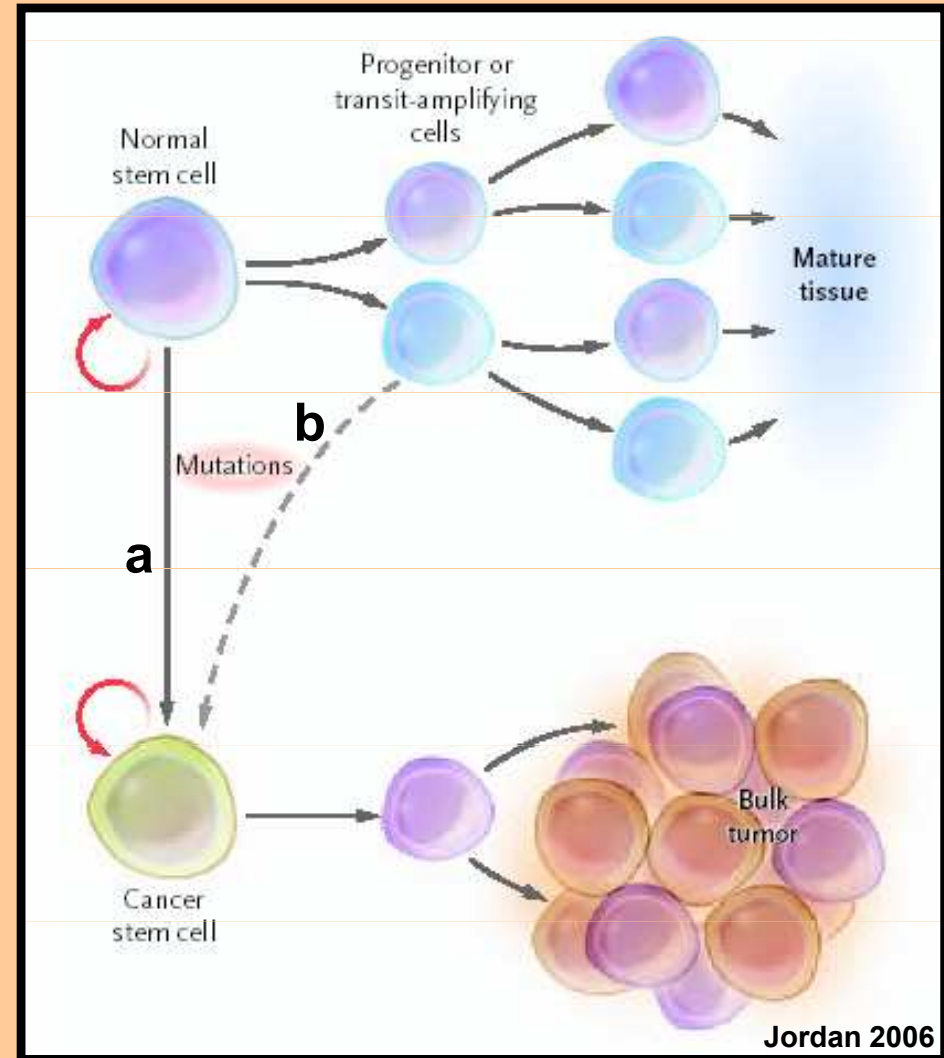
Nádorové kmenové buňky - CSCs (Cancer stem cells)

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.

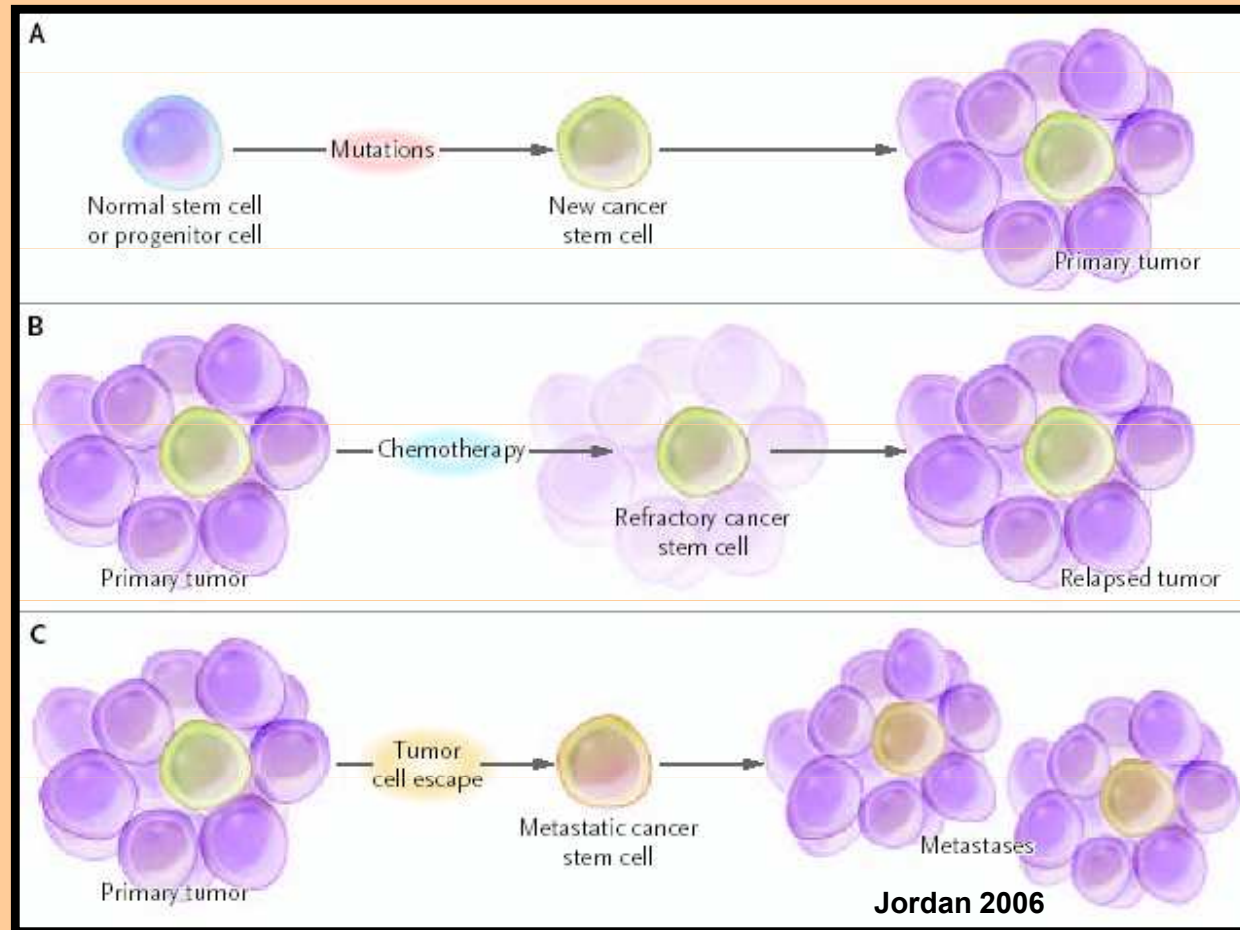
=> chybná odpověď na vnější signály (růstové faktory, proteiny ECM, buňky)



* 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 (=>self-renewal)



- 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!

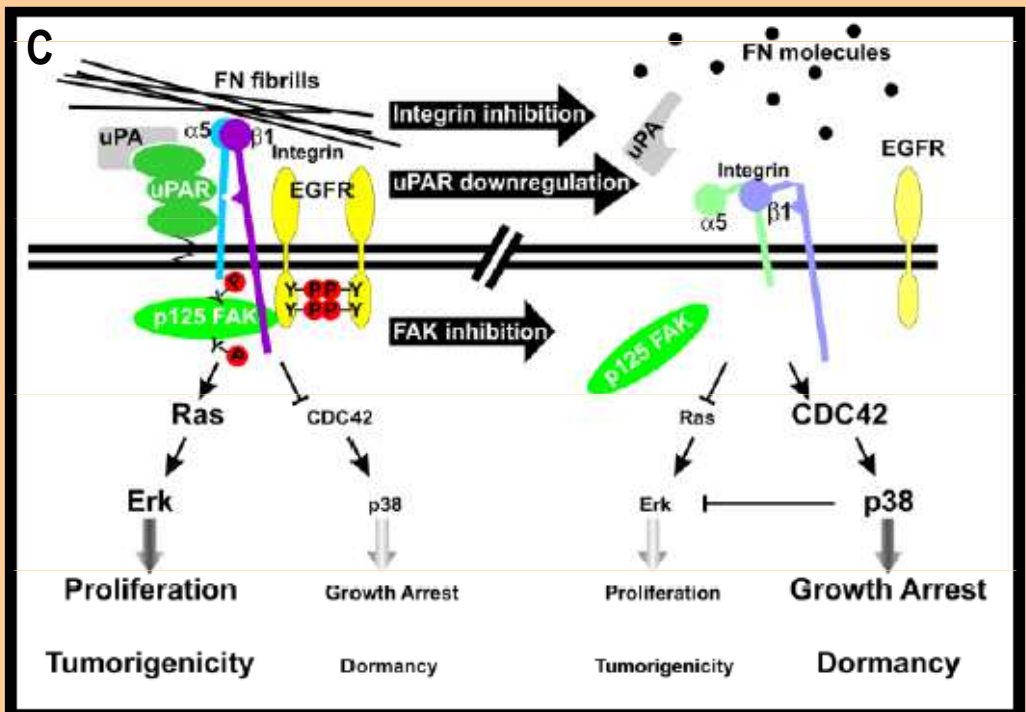
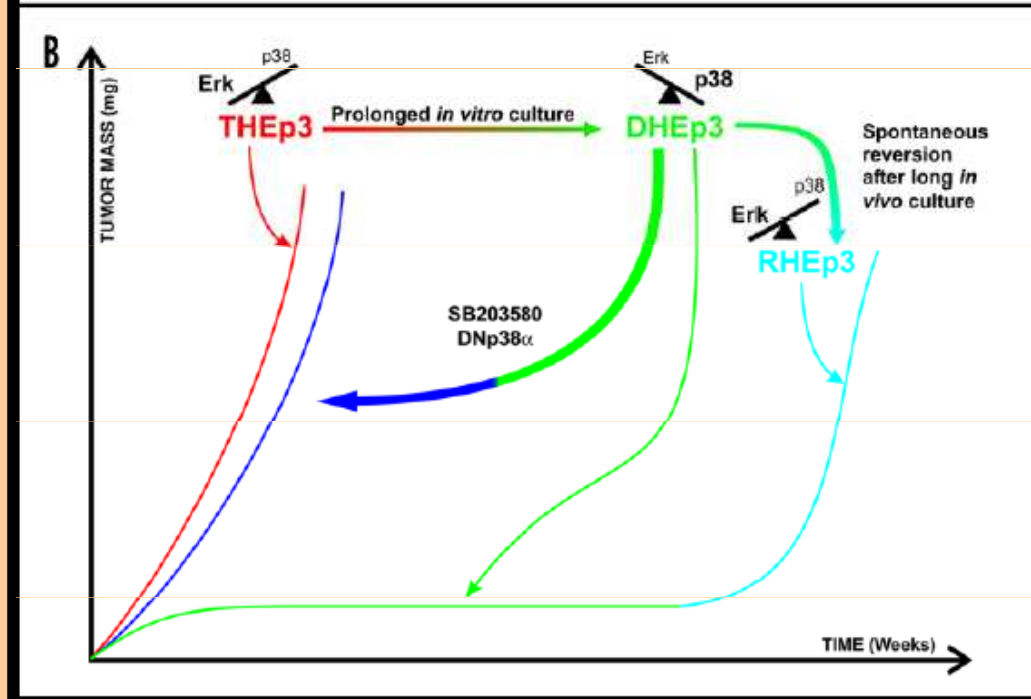
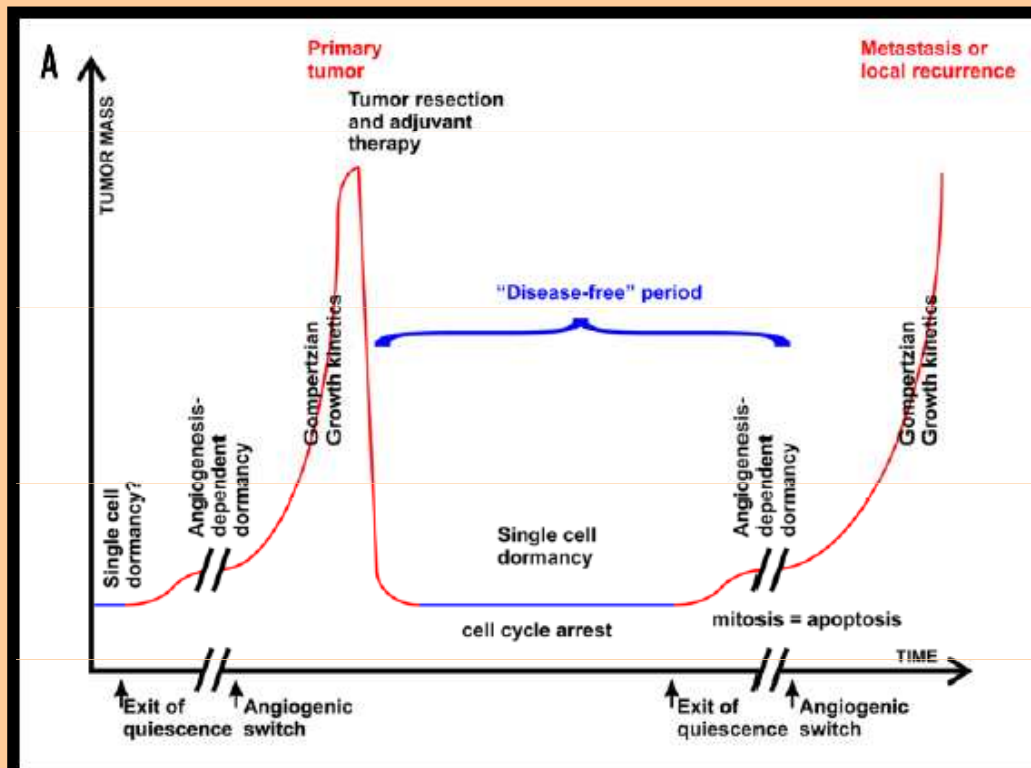
Model regulace tumorigeneze přesmykem aktivity MAPK Erk a p38

Ranganathan 2006

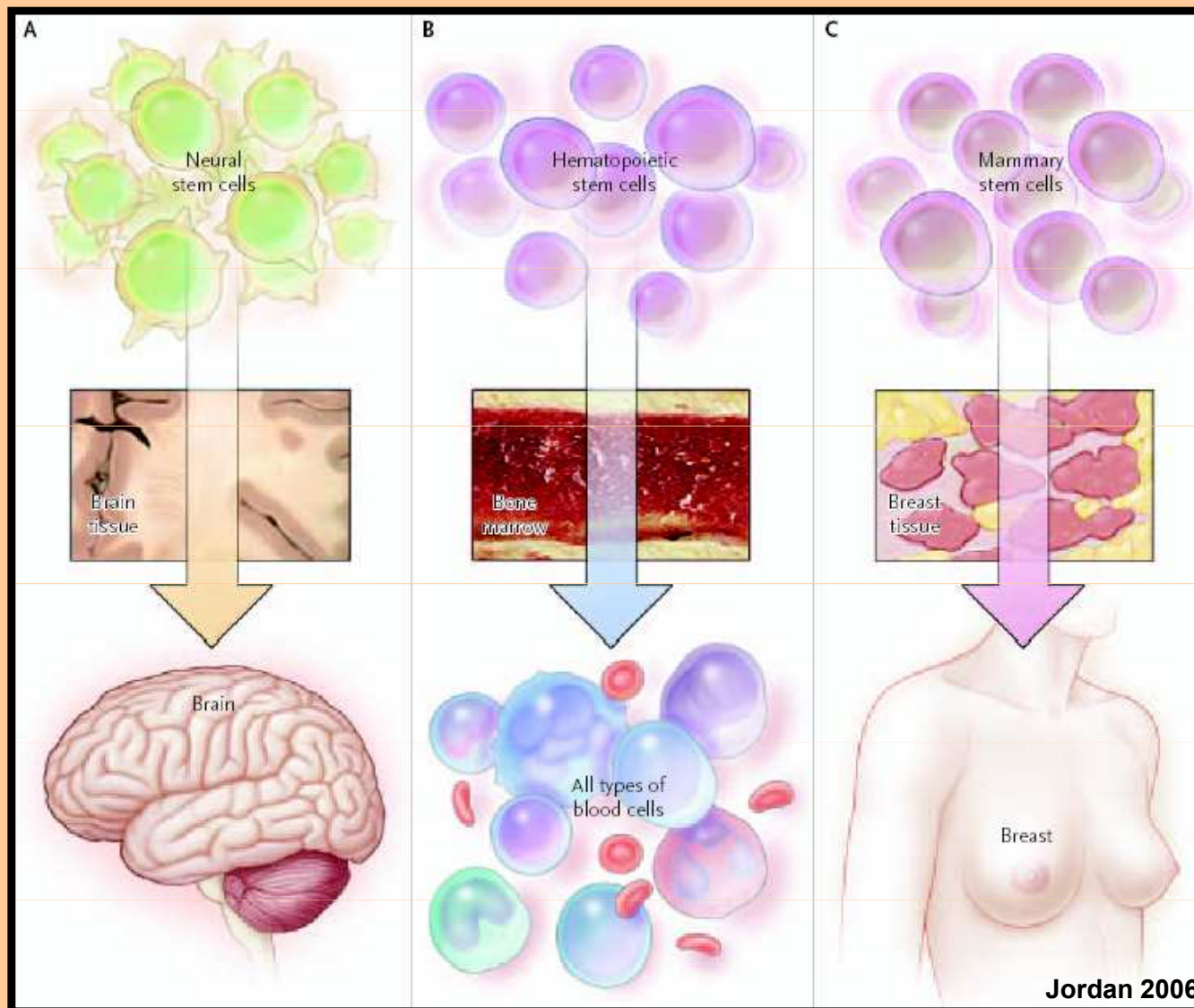
A – znázornění progresu nádoru u pacienta

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 nedostatečné působení běžných antiproliferativních farmak.

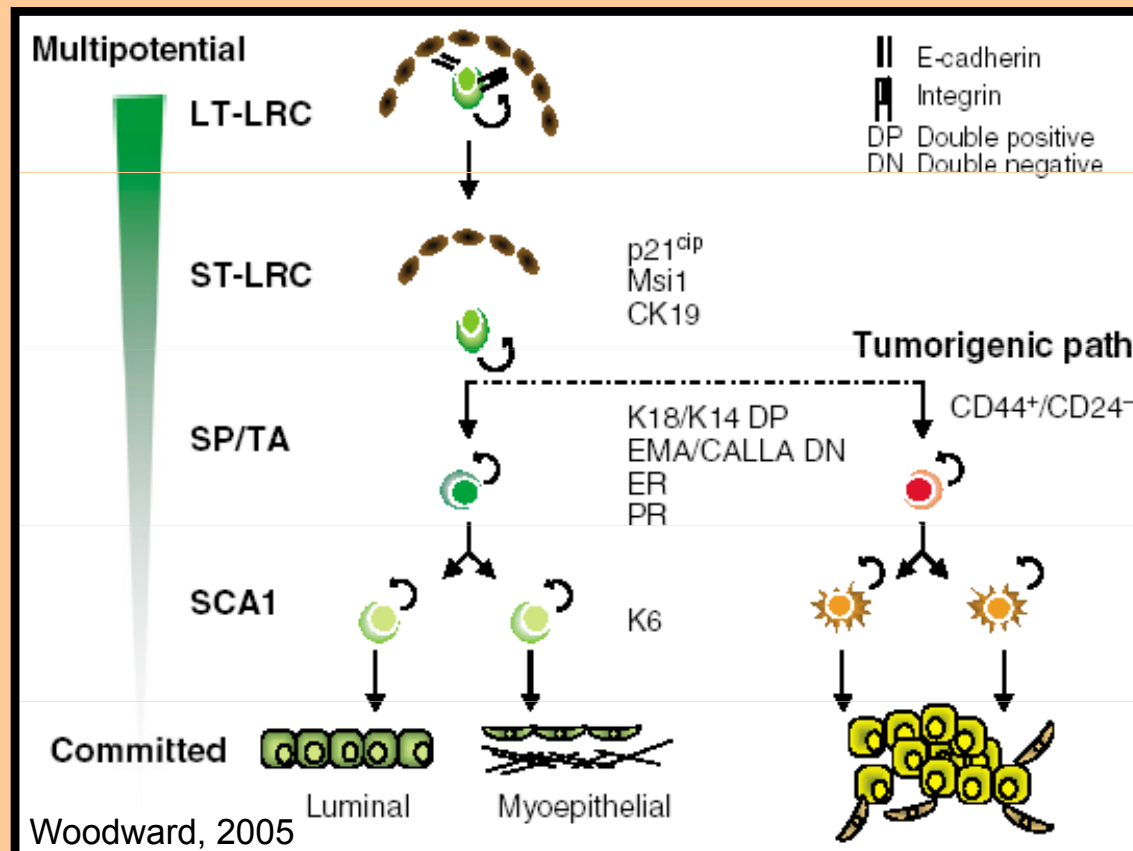
- AML - IL3-R⁺ (není u normálních HSCs), CD33⁺ (IgSF, sialoadhesin)**
- **CD33 se zdá být vhodným pro rozpoznání AML CSCs (imunoterapie), navíc byl prokázán u některých dalších leukemických CSCs.**
 - **vysoká aktivita NF- κ B a PI3K u AML SCs, ale ne u HSCs, farmakologická inhibice NF- κ B a PI3K nebo 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 (v kultuře) 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⁺ 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 10⁴ 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 žlaz – MaSC a MaCSC (Mammary CSC)

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

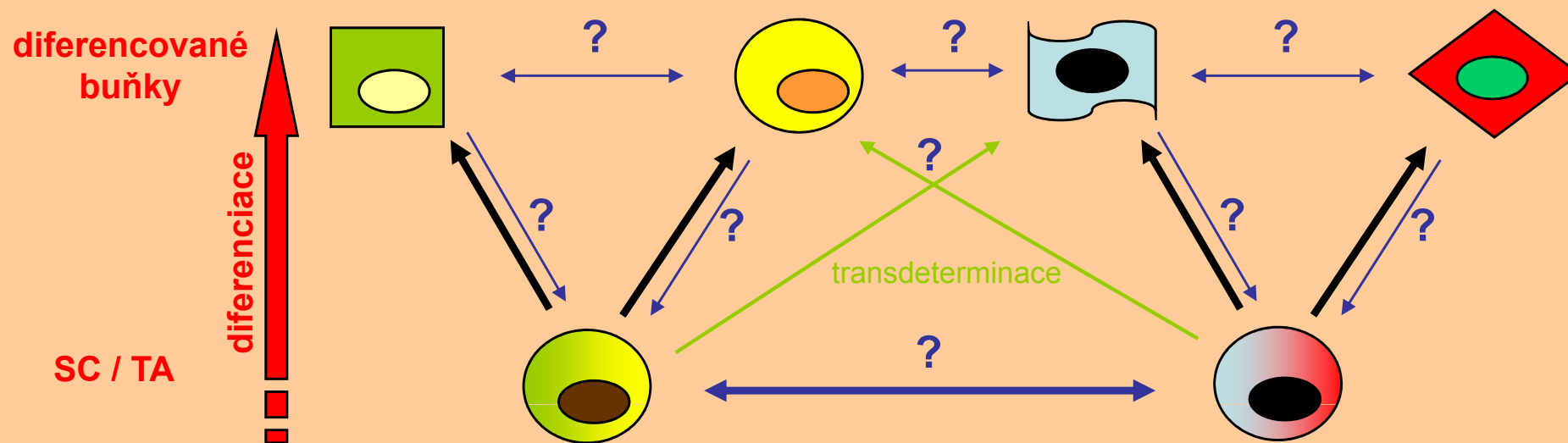
2) Prvně směrem zpět v diferenciační řadě a následně diferenciace do jiné diferenciační řady (rediferenciace a následně diferenciace).

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 hltnu -> 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**

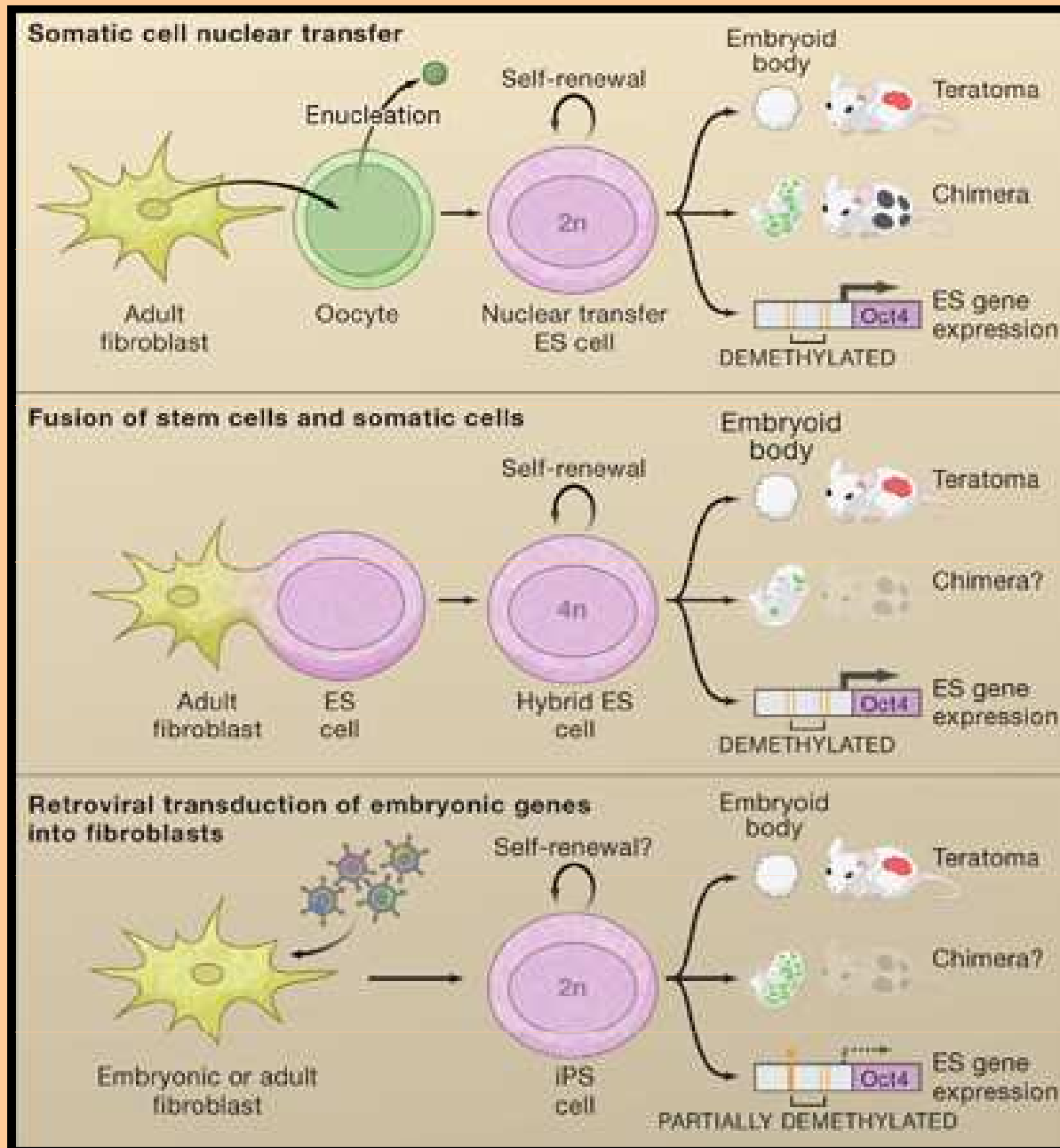
B. exogenní exprese vhodných genů

- 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 **c-Myc** indukuje částečnou rediferenciaci a transformaci
- exprese **Pdx1** (marker β -buněk pankreatu) navozuje částečný fenotyp β -buněk u hepatocytu a střevních epiteliálních buněk
- exogenní exprese **c-Myc**, **Klf4**, **Oct4** a **Sox2** navozuje fenotyp ESCs => iPSCs u embryonálních fibroblastů (myš)
- transdeterminace **Pax** a **Hox** geny (např. Pax-6 a oči)

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

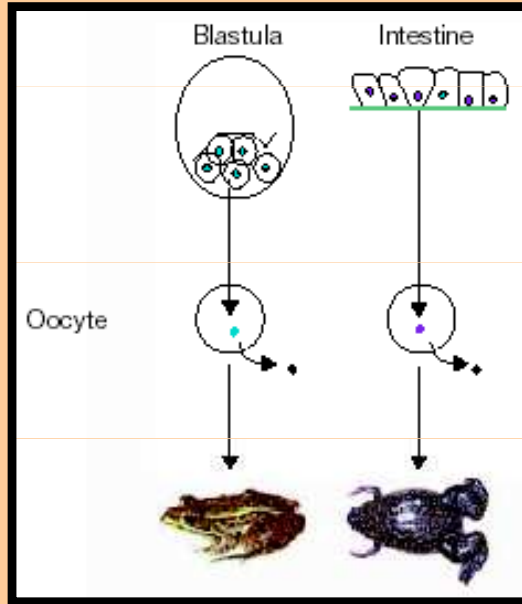
buněčná fúze – spojení cytoplasmy a jader dvou buněk za vzniku buňky jediné

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

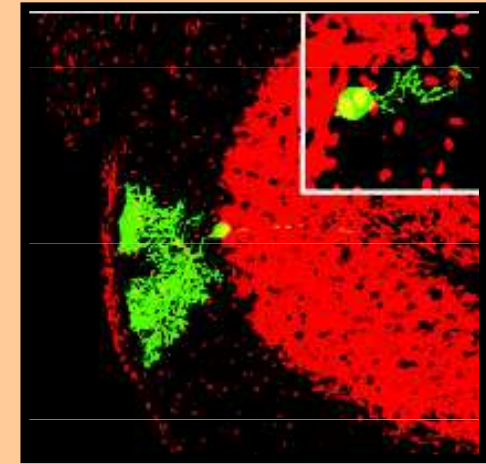
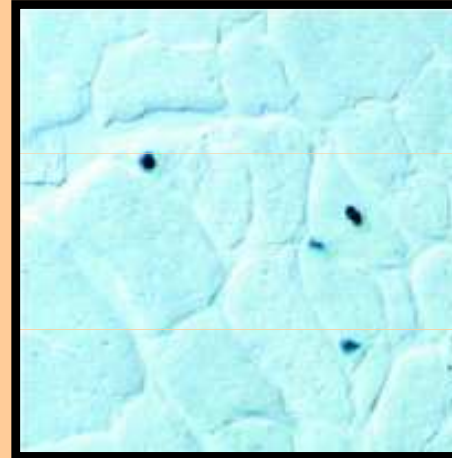
hybridní buňka – vznikne když heterokaryon projde mitózou za vzniku buňky s jedním jádrem ale s více jak 2n DNA (nemusí obsahovat kompletní jadernou DNA původních buněk)

Heterokaryon Purkiňova neuronu v mozečku a GFP⁺-BMSSC

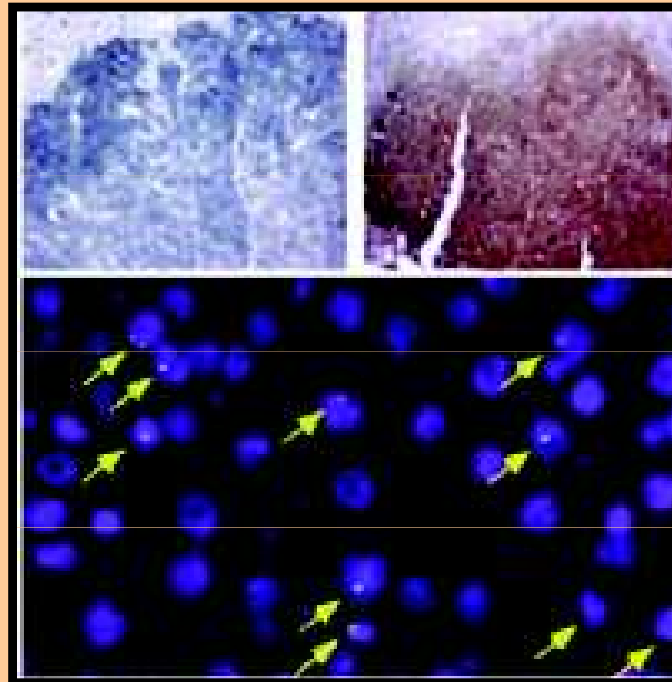
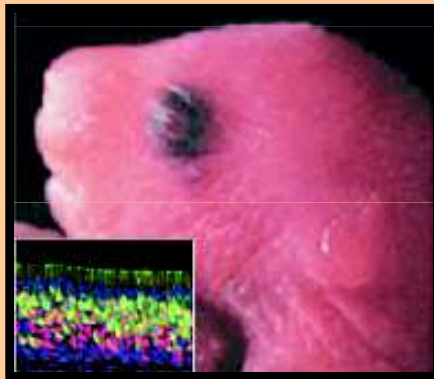
Úplné reprogramování terminálně diferencované buňky cytoplasmou oocyty u žab (ale i savci).



BMSSCs exprimující β -galaktosidázu pod kontrolou svalově specifického promotoru



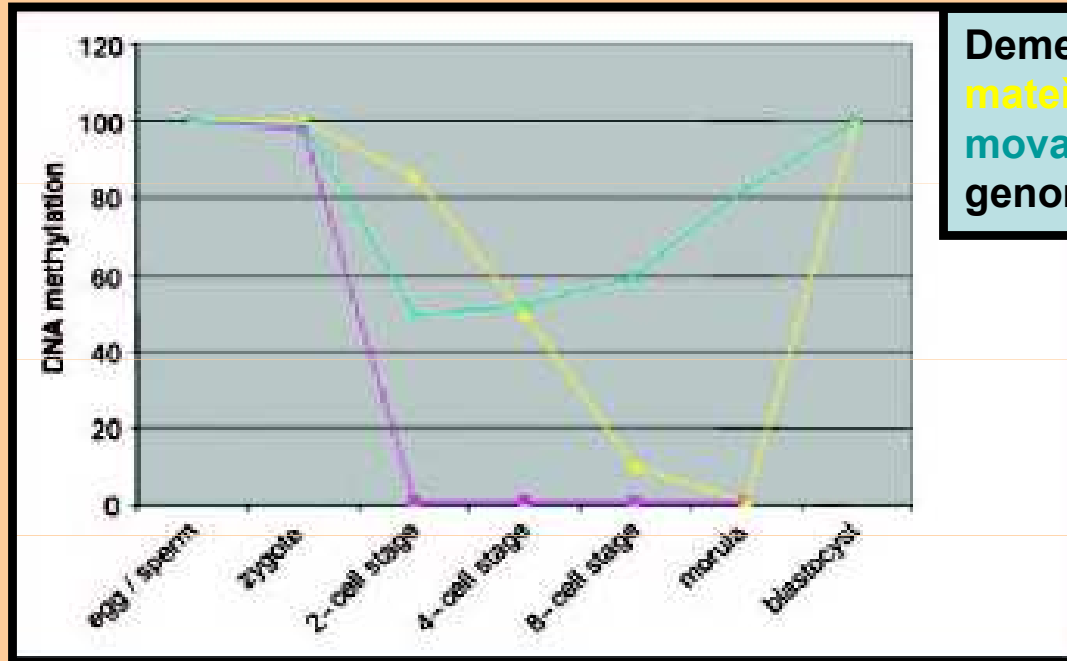
Myš klonovaná z jadra čichového nervu



Regenerace samičích Fah^{-/-} letálních jater (FAH – fumarylacetoacetate hydroláza) transplantací samčích HSCs

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

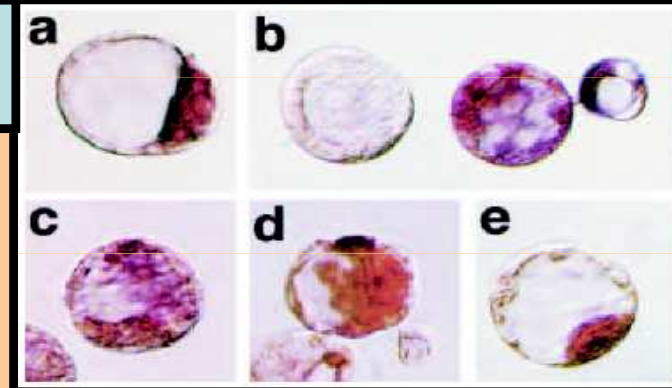
Reprogramování jádra, metylace DNA a chyby v embryogenezi



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

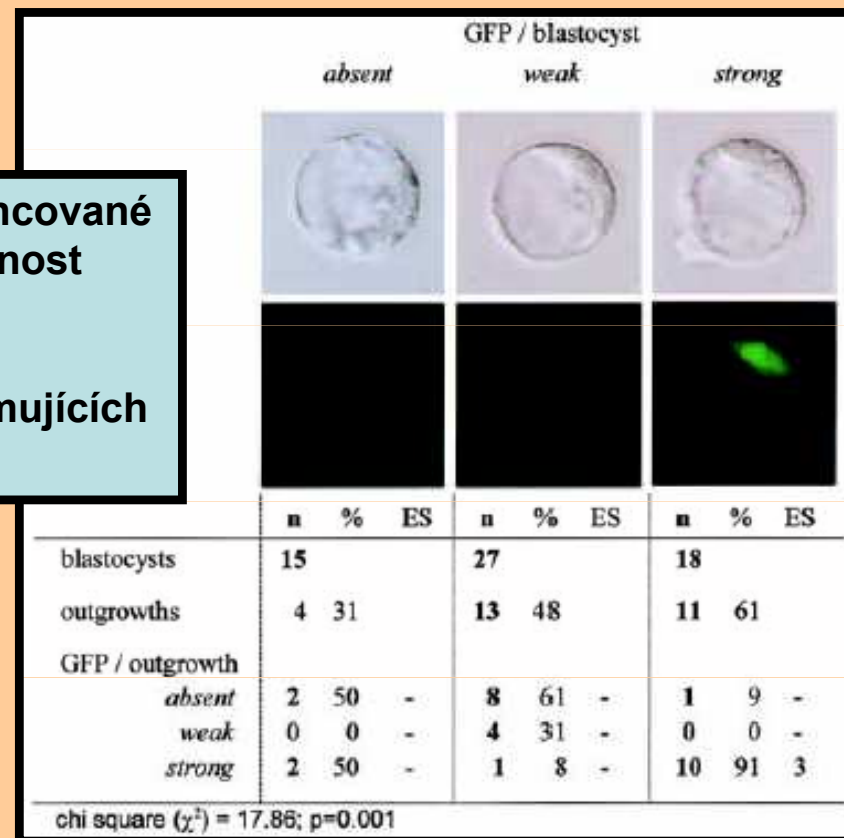
Blastocyst type	n	Oct4 mRNA n (%)		
		ICM restricted	ICM and TE	not detected
Cumulus cell clone	53 ^d	18 (34.0) ^a	29 (54.7) ^a	6 (11.3) ^a
IVF	30	23 (76.7) ^b	4 (13.3) ^b	3 (10) ^a
ICSI	80	60 (75.0) ^b	9 (11.3) ^b	11 (13.8) ^{a,b}
In vivo fertilized	75	70 (93.3) ^c	3 (4.0) ^b	2 (2.7) ^{a,c}

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) ^a	30	85 (10) ^a	NA	20
Oct4-GFP nuclei						
Cumulus cell	2513	1935 (77) ^{a,b}	30	165 (9) ^a	135 (82) ^a	39
Germ cell	603	500 (83) ^{a,c}	81	278 (56) ^b	272 (98) ^b	15
IVF	895 ^e	665 (74) ^d	91	490 (74) ^e	485 (99) ^b	12
ICSI	1135 ^f	806 (71) ^d	86	440 (55) ^b	395 (90) ^c	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.

^aInseminated.

^fSurvived sperm injection.