

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)

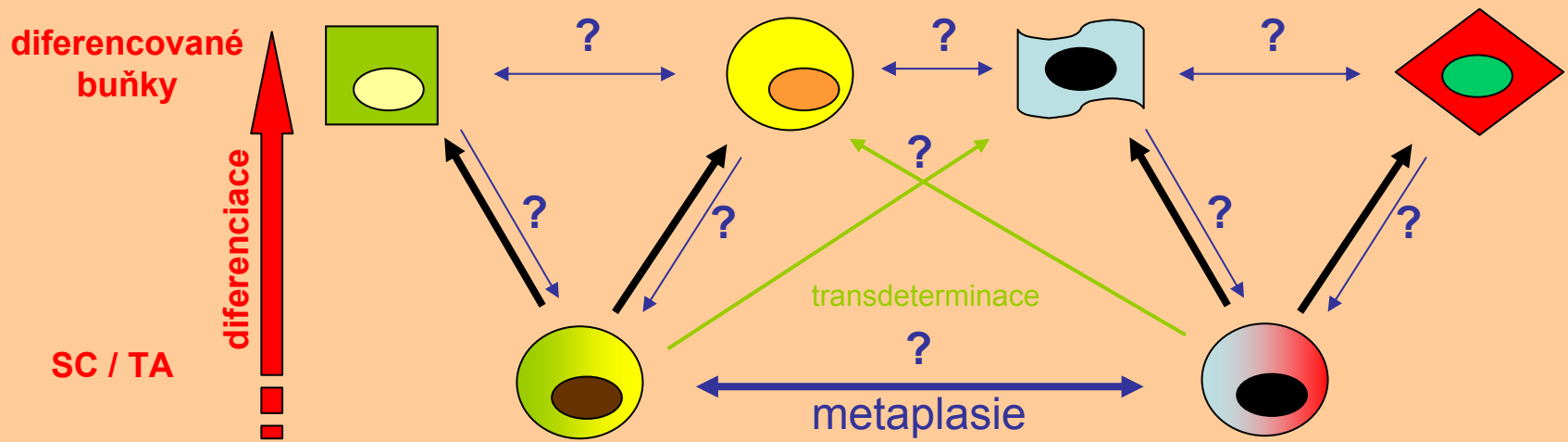
- 2) Prvně směrem zpět v diferenciací řadě a následně diferenciací do jiné diferenciací řady (rediferenciací a následně diferenciací).**

Za pozorované jevy zřejmě ale odpovídají zbytkové populace progenitorů.

 - s proliferací
 - bez proliferace (silně nepravděpodobné)

Přístupy:

- a) **Vnějšími faktory**
- b) **Exogenní expresí vhodných genů**
- c) **Přeprogramováním jádra cytoplasmou jiné buňky**
(sem patří i terapeutické klonování)
- d) **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- / transdeterminovaných buněk**

Příklady:

- **exokrinní buňky pankreatu -> hepatocyty**
- **epitel hltanu -> střevní epitel (po poškození žaludečnými 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 jiné diferenciační řady, např SCs / TA epidermis x nervová tkáň**
- **B-lymfocyty mohou tvořit makrofágy**

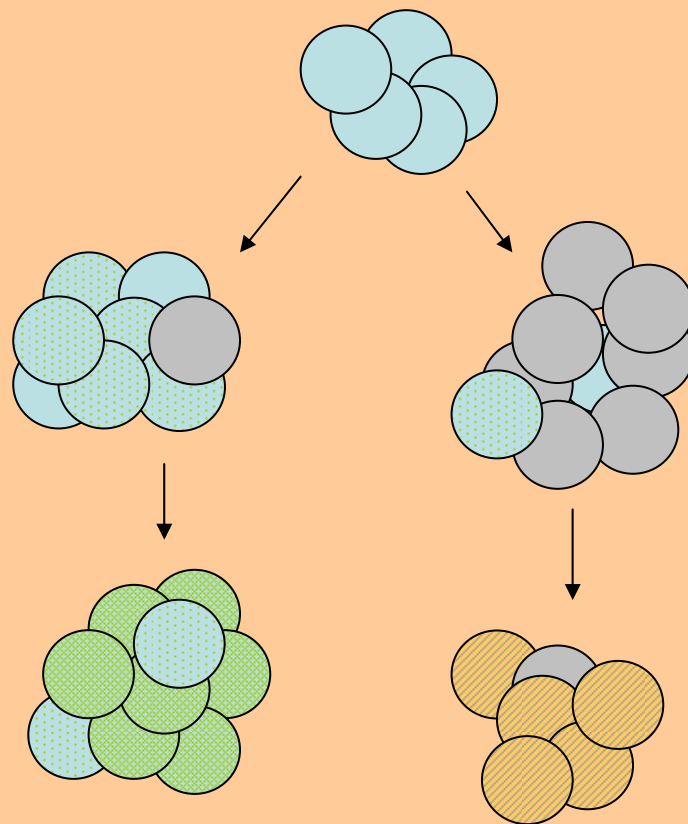
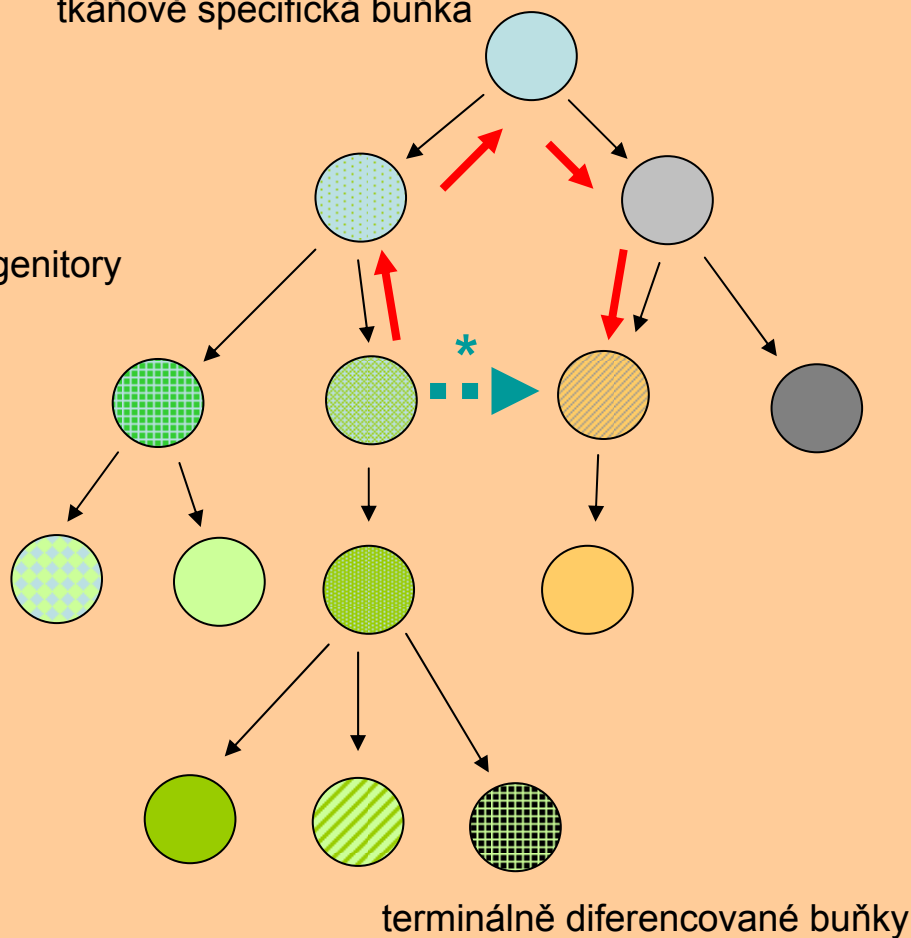
Pleopotence* x reprogramování

(změna v determinaci)

multipotentní
tkáňově specifická buňka

persistující progenitory

progenitory



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 nedovoluje úplnou změnu, je potřeba několikateré dělení buněk, pokud je daná změna vůbec možná, vlastní fenotyp se ale mění velice rychle

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), ale i další buňky
- transdeterminace Pax a Hox geny (např. Pax-6 a oči)

iPS buňky – indukované pluripotentní buňky

(Hochedlinger & Plath 2009)

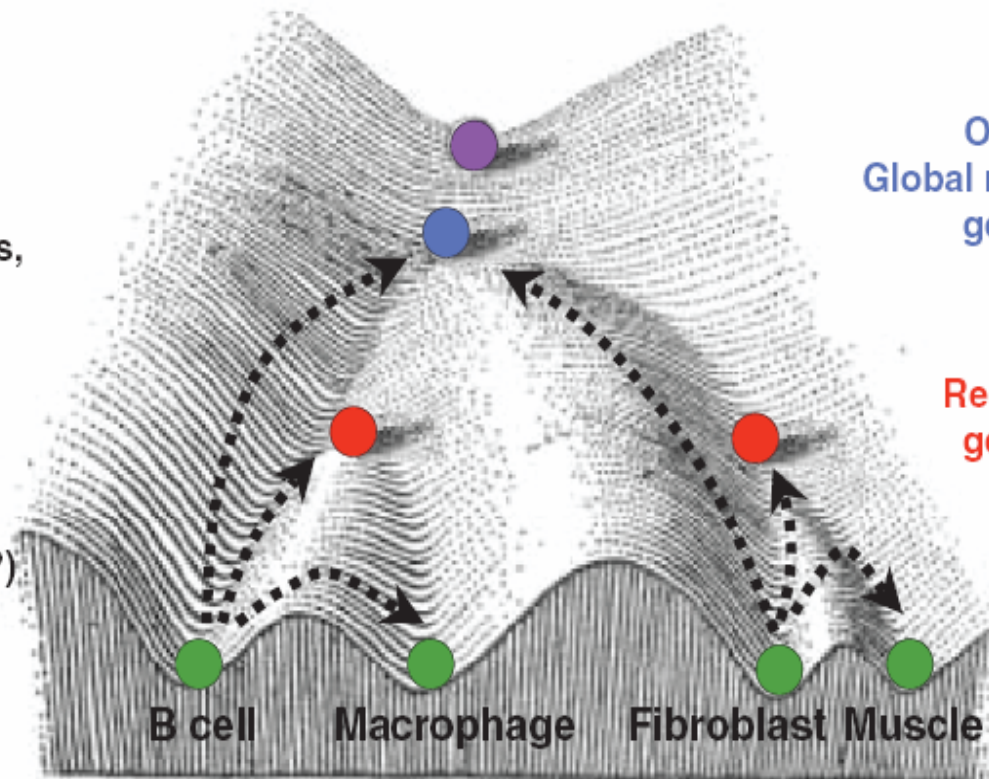
Developmental potential

Totipotent
Zygote

Pluripotent
ICM/ES cells, EG cells,
EC cells, mGS cells
iPS cells

Multipotent
Adult stem cells
(partially
reprogrammed cells?)

Unipotent
Differentiated cell
types



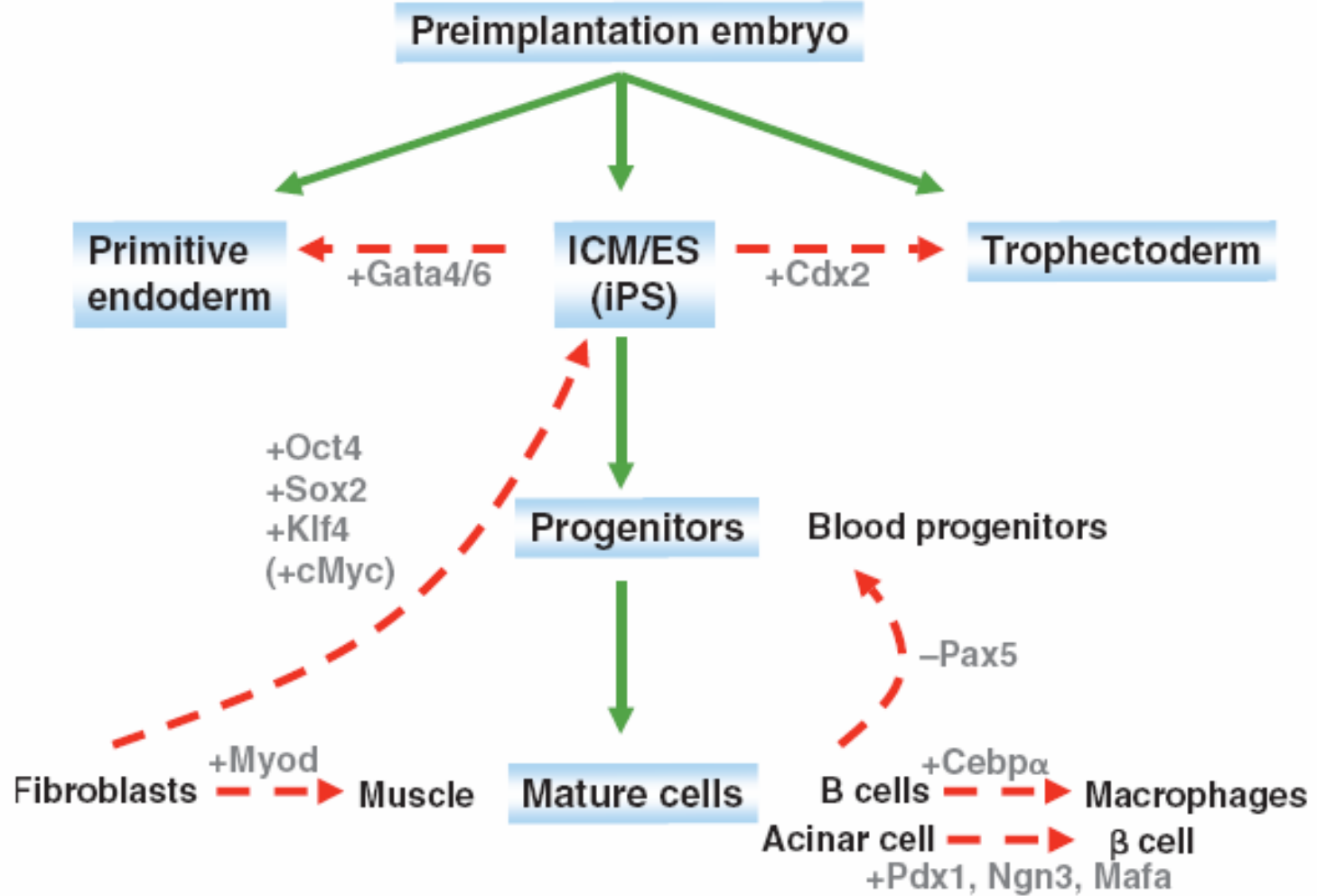
Epigenetic status

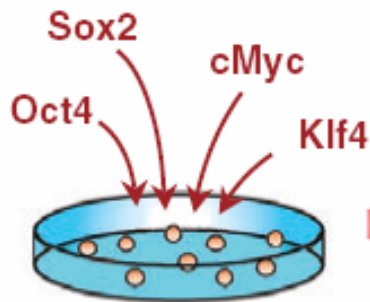
Global DNA demethylation

**Only active X chromosomes;
Global repression of differentiation
genes by Polycomb proteins;
Promoter hypomethylation**

**X inactivation;
Repression of lineage-specific
genes by Polycomb proteins;
Promoter hypermethylation**

**X inactivation;
Derepression of
Polycomb silenced
lineage genes;
Promoter hypermethylation**

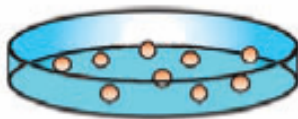




Somatic cells

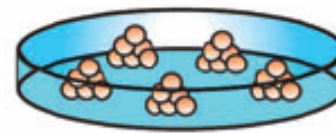
- Somatic markers silenced
- Activation of SSEA1

Intermediate cells
(transient population)



- Silencing of retroviral transgenes
- Activation of pluripotency genes
- Activation of telomerase
- Reactivation of silent X chromosome in female cells
- Teratomas and germline chimeras

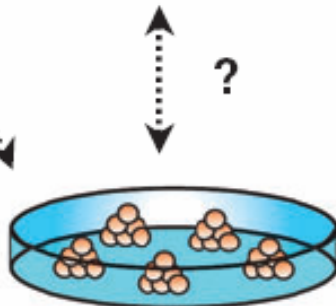
iPS cells



- Knockdown of lineage genes
- Inhibition of DNA methylation

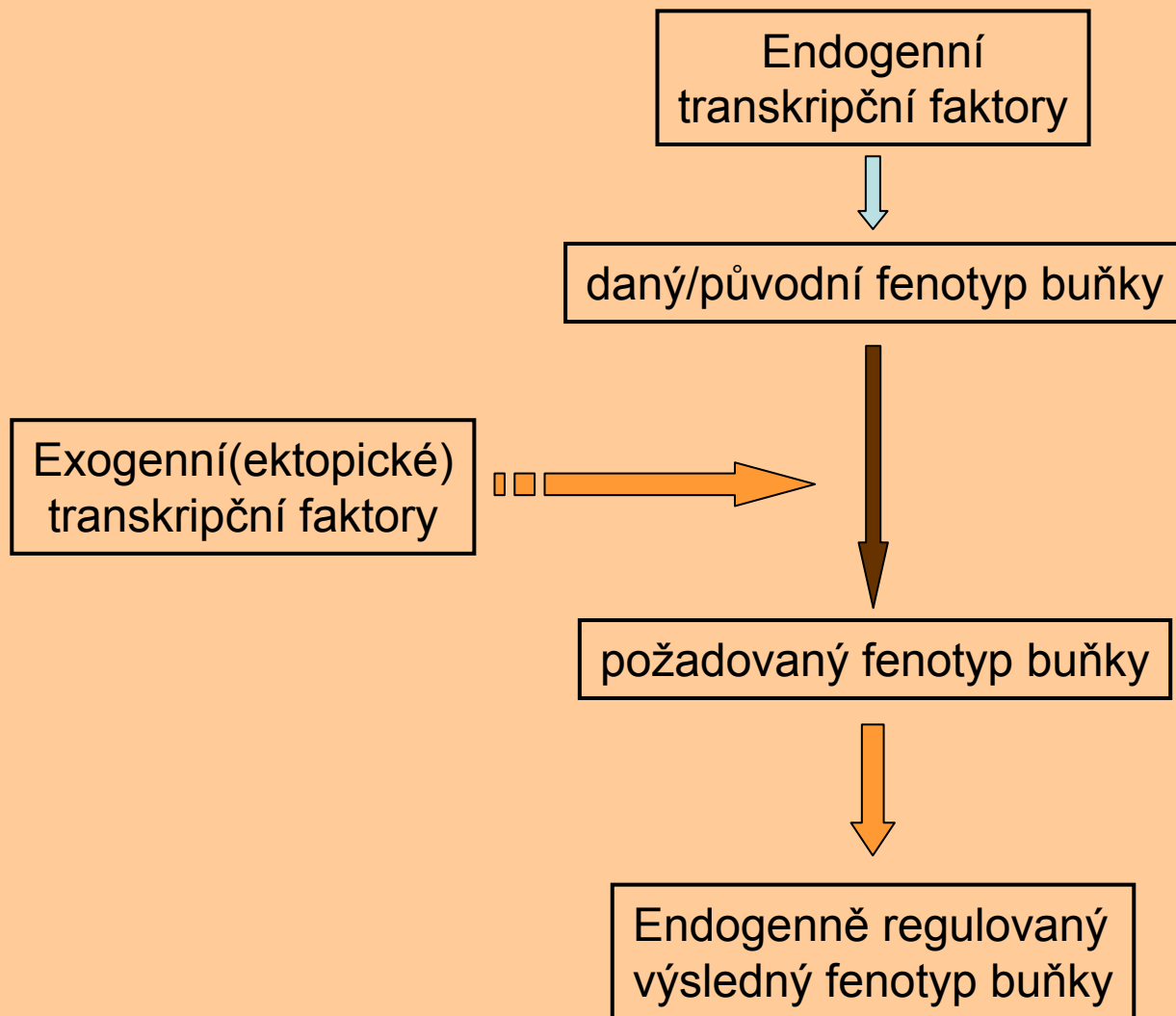
Partially reprogrammed cells
(stable cell lines)

- Viral transgenes on
- Proliferation genes activated
- Pluripotency genes silent
- Aberrant expression of lineage genes
- Teratomas, but no adult chimeras



?

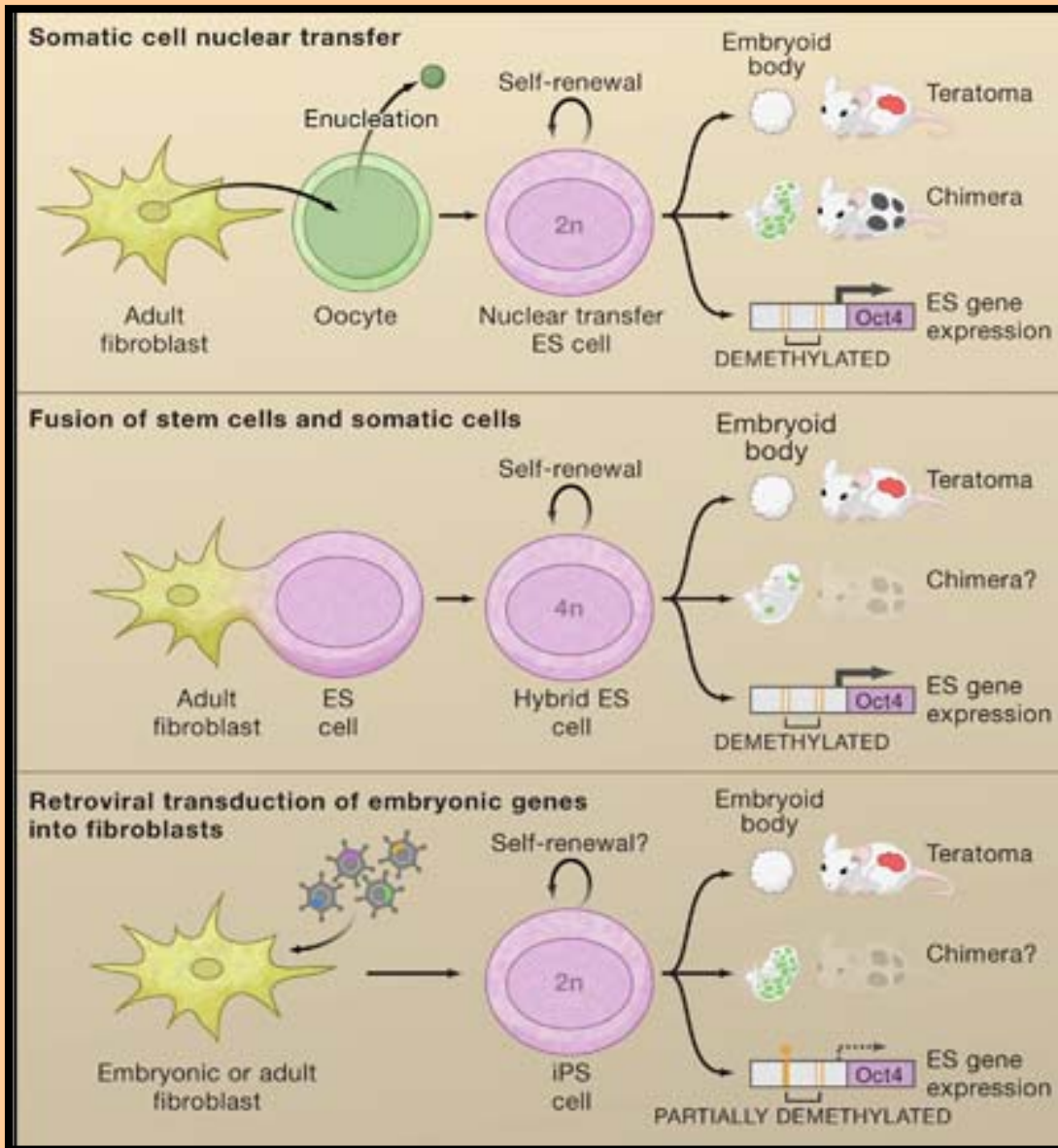




Exogenně dodané transkripční faktory nebývají dostatečně pevně fixovány v genomu

- poškození genomu (vlastní vnesení exogenní informace)
- destabilizace fenotypu, částečné reprogramování, reverze fenotypu, nežádoucí transformace

C. Přeprogramováním jádra cytoplasmou jiné buňky



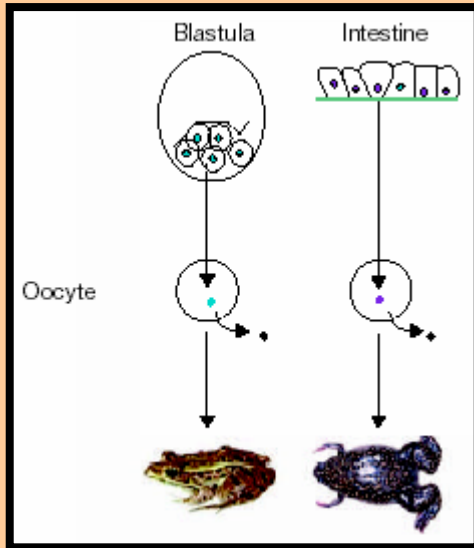
- závislost na momentálním stavu buňky
- velice účinné, ale přenos jádra málo úspěšný u savců
- fúze buněk je ale relativně běžná

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

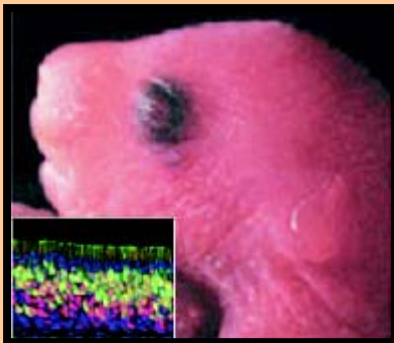
heterokaryon – produkt fúze buněk jasně odlišitelnými dvěma nebo i více jádry

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)

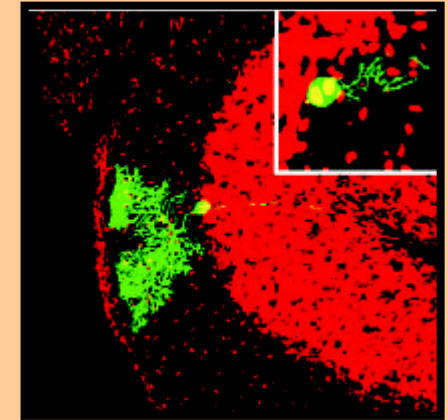
Úplné reprogramování terminálně diferencované buňky cytoplasmou oocyty u žab (ale i savci).



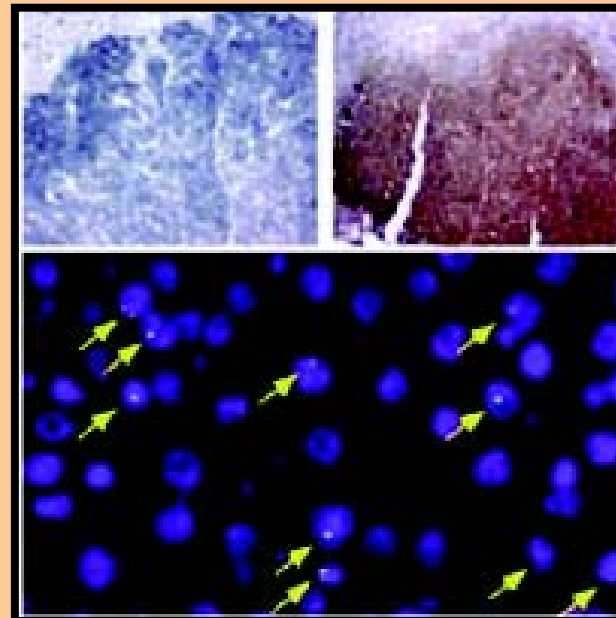
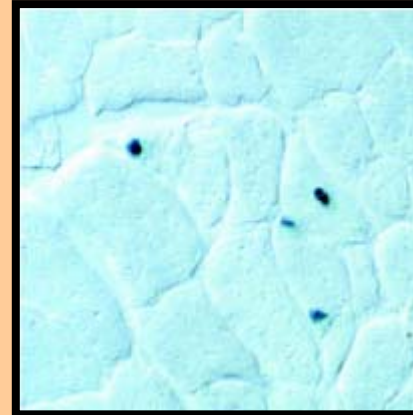
Myš klonovaná z jádra čichového nervu



Heterokaryon Purkiňova neuronu v mozečku a GFP⁺-BMSSC

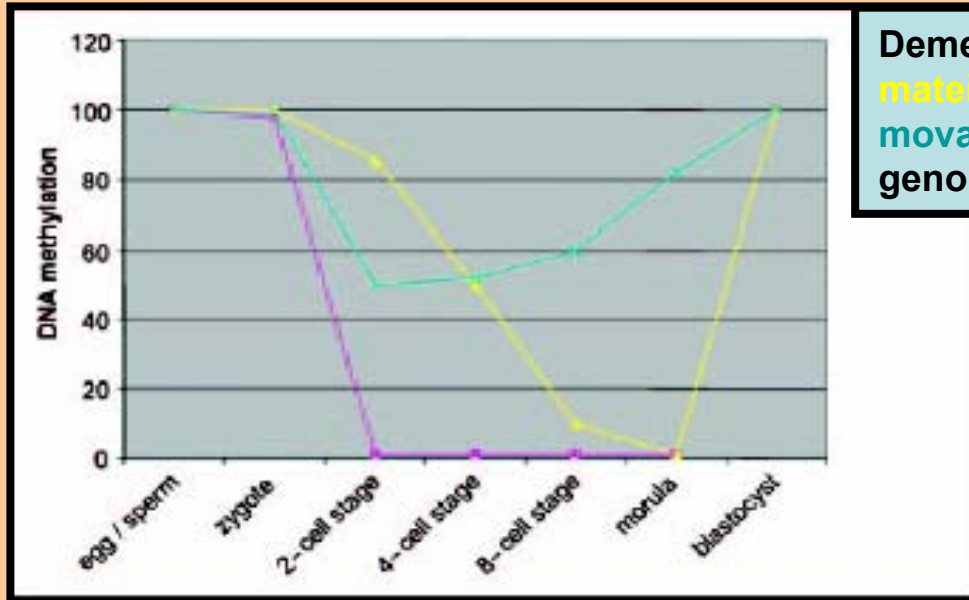


BMSSCs exprimující β -galaktosidázu pod kontrolou svalově specifického promotoru



Regenerace samičích Fah ^{-/-} letálních jater (FAH – fumarylacetoacetate hydroláza) transplantací samičích HSCs
Detekce Y chromozomu v játrech po transplantaci (dole) a FAH aktivity vpravo nahoře.

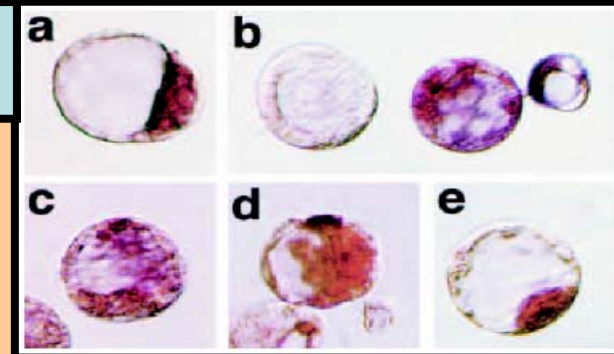
Reprogramování jádra, metylace DNA a chyby v embryogenezi



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

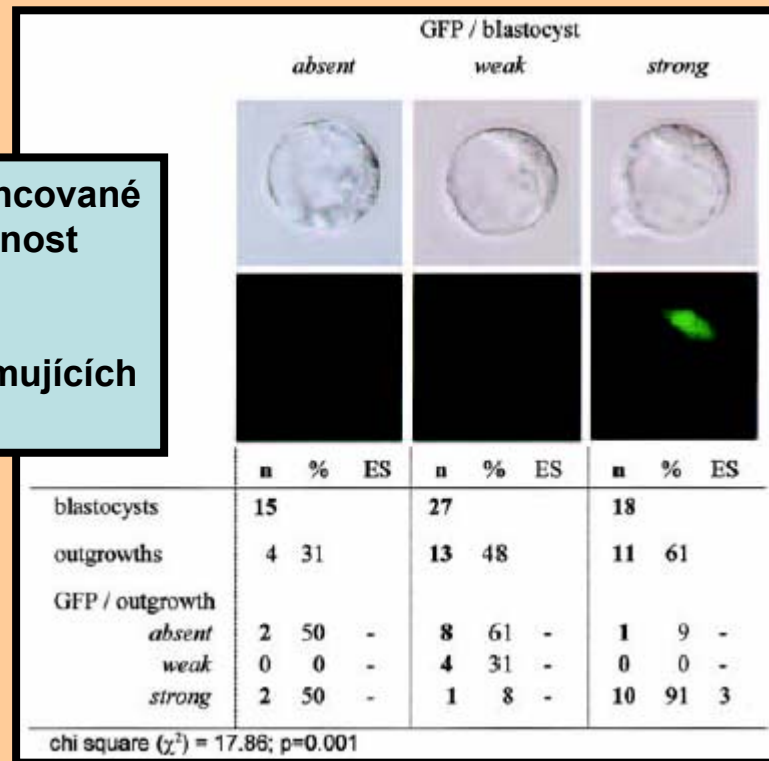
| Blastocyst type | n | Oct4 mRNA n (%) | | |
|--------------------|-----------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
| | | ICM restricted | ICM and TE | not detected |
| Cumulus cell clone | 53 ^d | 18 (34.0) ^a | 29 (54.7) ^a | 6 (11.3) ^a |
| IVF | 30 | 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) ^c | 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.

^eInseminated.

^fSurvived sperm injection.