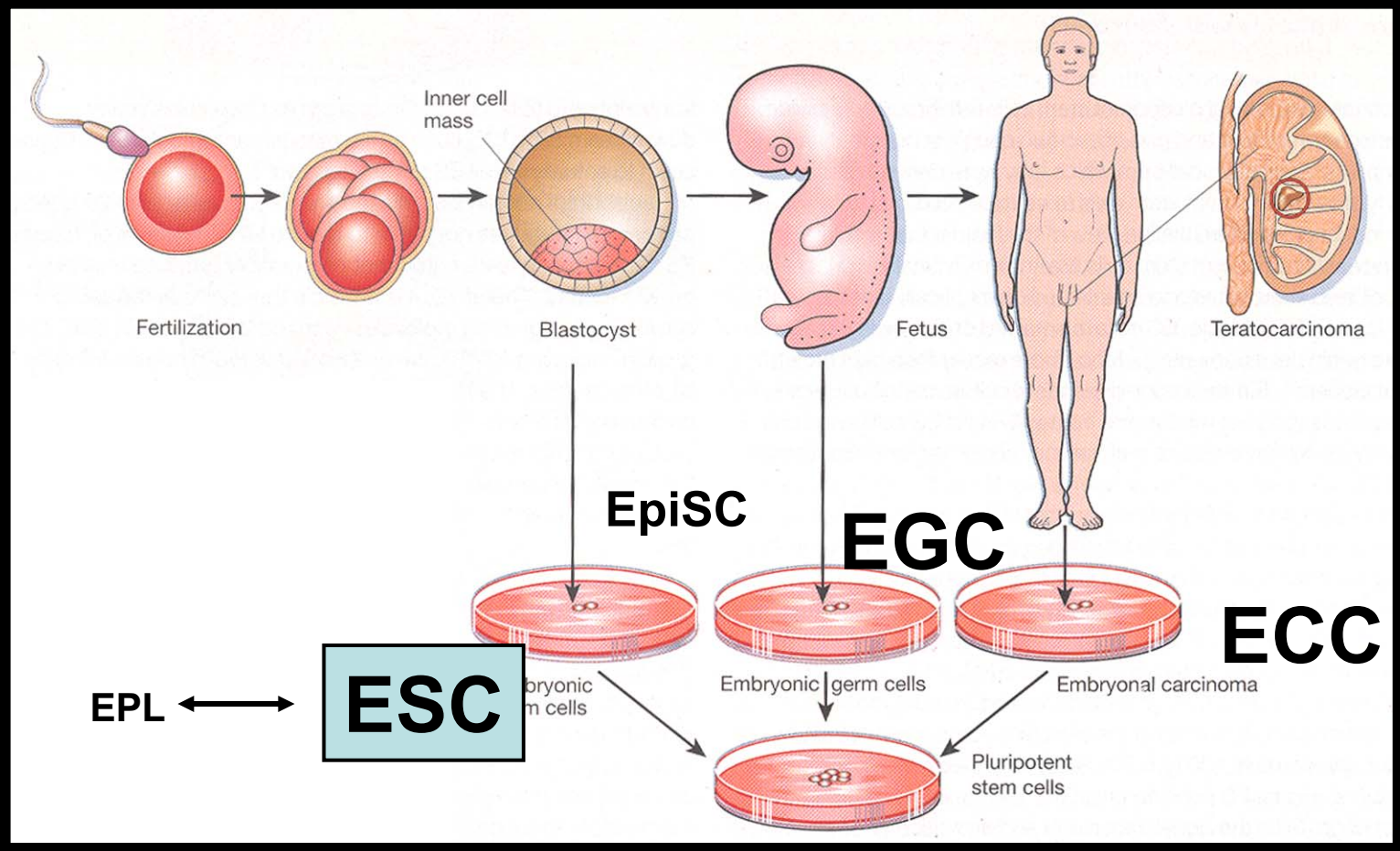


Pluripotentní, odvozené kmenové buňky



Embryonální kmenové buňky (Embryonic stem cell – ESC)

Embryonální zárodečné buňky (Embryonic germ cell – EGC)

Embryonální nádorové buňky (Embryonal carcinoma cell – ECC)

Kmenové buňky epiblastu (Epiblast stem cell – EpiSC)

Early-primitive ectoderm-like - EPL

Embryonální kmenové buňky (Embryonic stem cell) ESC

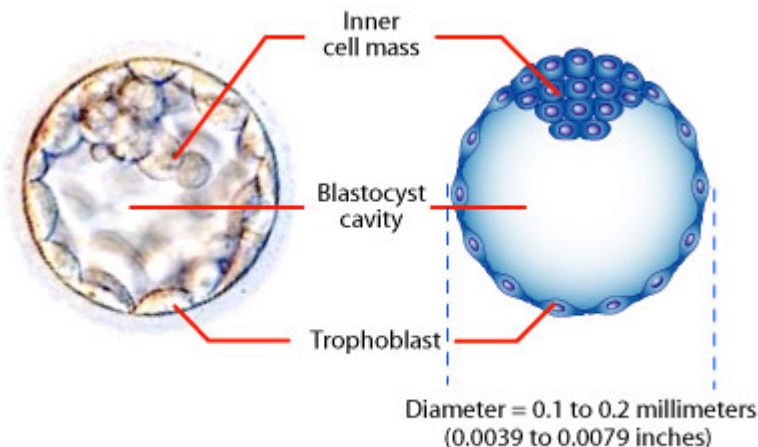
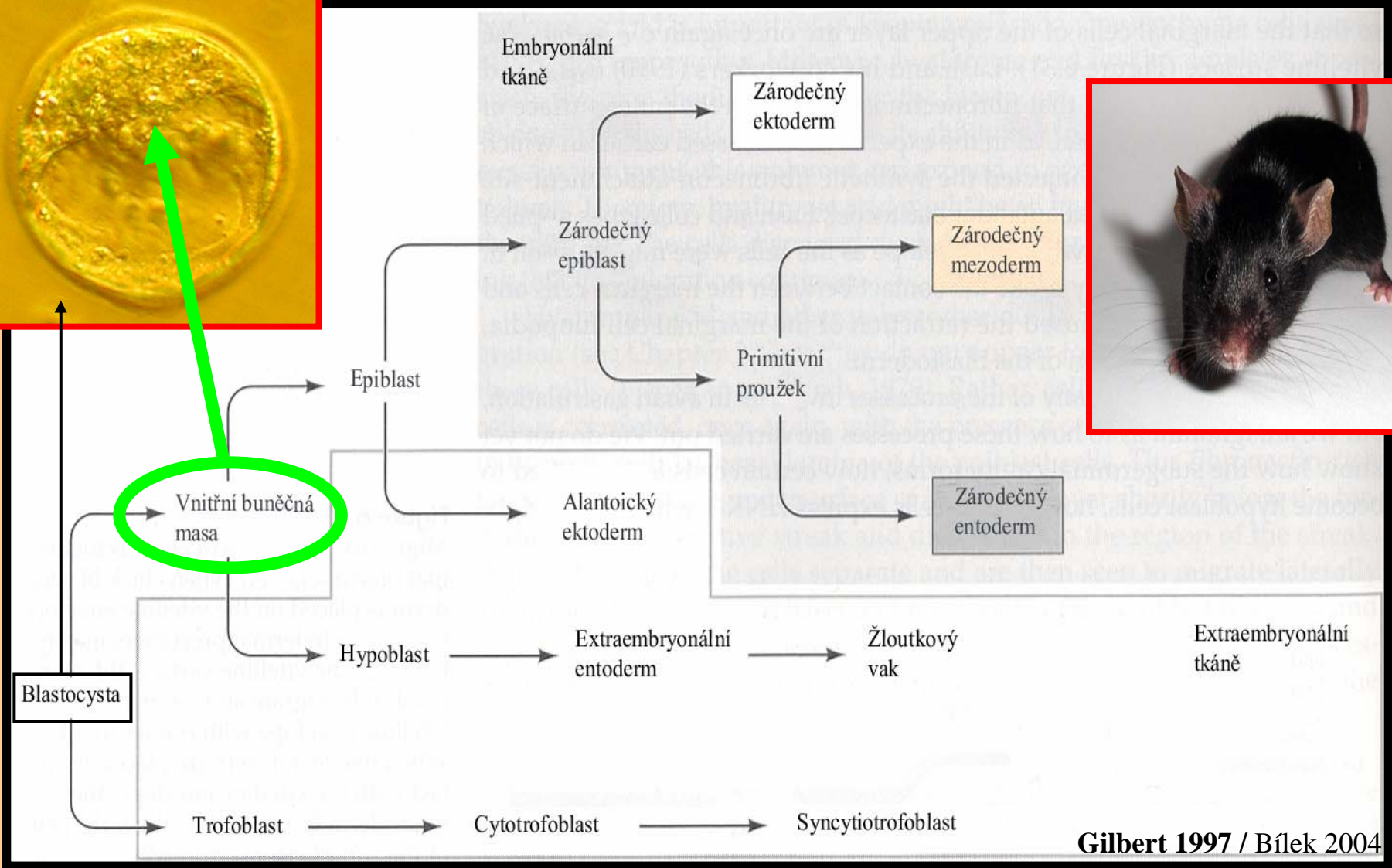


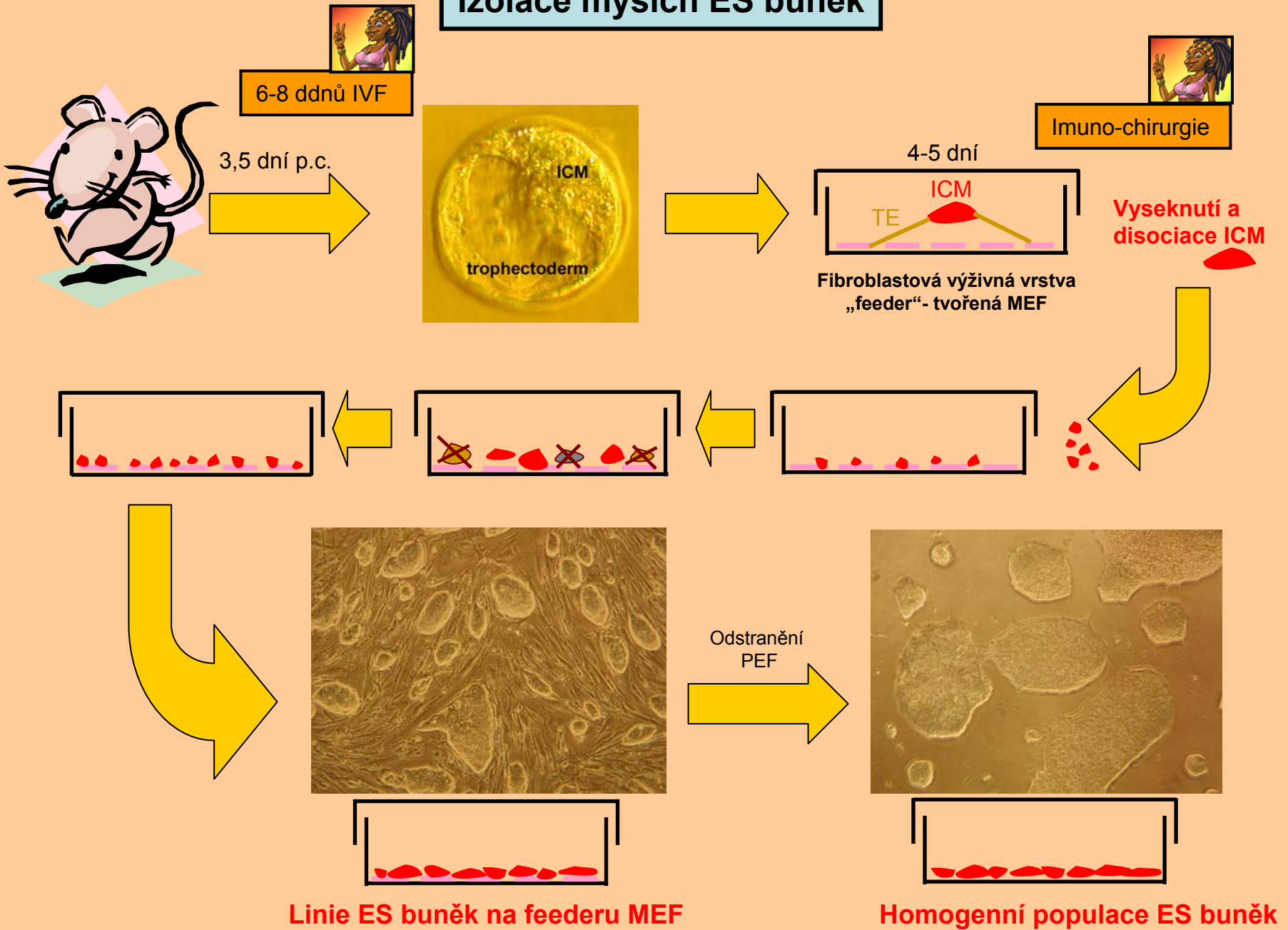
Illustration by [Cell Imaging Core](#) of the Center for Reproductive Sciences.

- jsou odvozené z vnitřní buněčné masy blastocysty
- fenotypem odpovídají přibližně buňkám vnitřní buněčné masy (mESC, ICM – inner cell mass) nebo epiblastu (hESC, EpiSC)
- jsou pluripotentní
- přirozeně neexistují, pouze *in vitro*
- jsou nesmrtelné
- mají schopnost si udržet stabilní genotyp (!?)
- po injikaci do imunitně tolerantního organismu tvoří teratomy (důkaz pluripotence)
- po injikaci do blastocysty mají schopnost tvořit kompletní chiméry (známo jen u mESC, důkaz pluripotence)

Ontogeneze a diferenciační potenciál buněk vnitřní buněčné masy



Izolace myších ES buněk



Linie ES buněk na feederu MEF

Homogenní populace ES buněk

TERATOM

Nádor, který obsahuje buňky více jak jednoho zárodečného listu, většinou všech tří. Tyto buňky mohou být fenotypu od časných stádií až po terminálně diferencované

Teratomy jsou typické nádory původem ze zárodečných buněk (ovariální a testikulární teratomy). Teratomy jsou jak benigní, tak maligní (teratokarcinom)

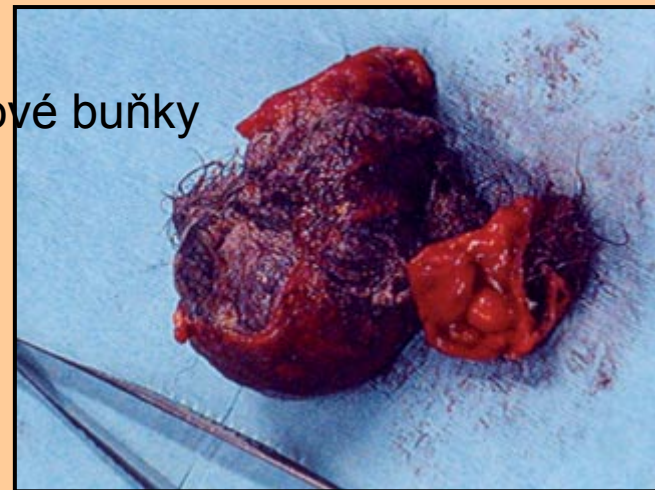
Kmenové buňky teratokarcinomu = embryonální nádorové buňky
(Embryonal carcinoma (EC) cells)



CHIMÉRA

Organismus je směsí geneticky odlišných buněk / tkání / orgánů

Chimeričtí jedinci vzniklí injikací ES buněk (dárce) do blastocysty (příjemce) jsou směsí geneticky odlišných buněk na úrovni všech tkání, a tak také vytváří pohlavní buňky s genotypem jak dárce, tak příjemce!



Růst a kultivace ES buněk

PROLIFERACE – DIFERENCIACE - APOTÓSA

Existence a charakter ES buněk je udržován kombinací účinků vnějších (**extrinsic**) a vnitřních (**intrinsic**) faktorů. Vnější faktory si ES buňky částečně syntetizují samy, ale ve větší míře musí být dodávány. Významným zdrojem těchto faktorů je výživná vrstva na které se ES buňky kultivují = **FEEDER**. Vnitřní faktory si ES buňky nesou jako pozůstatek svého embryonálního původu.

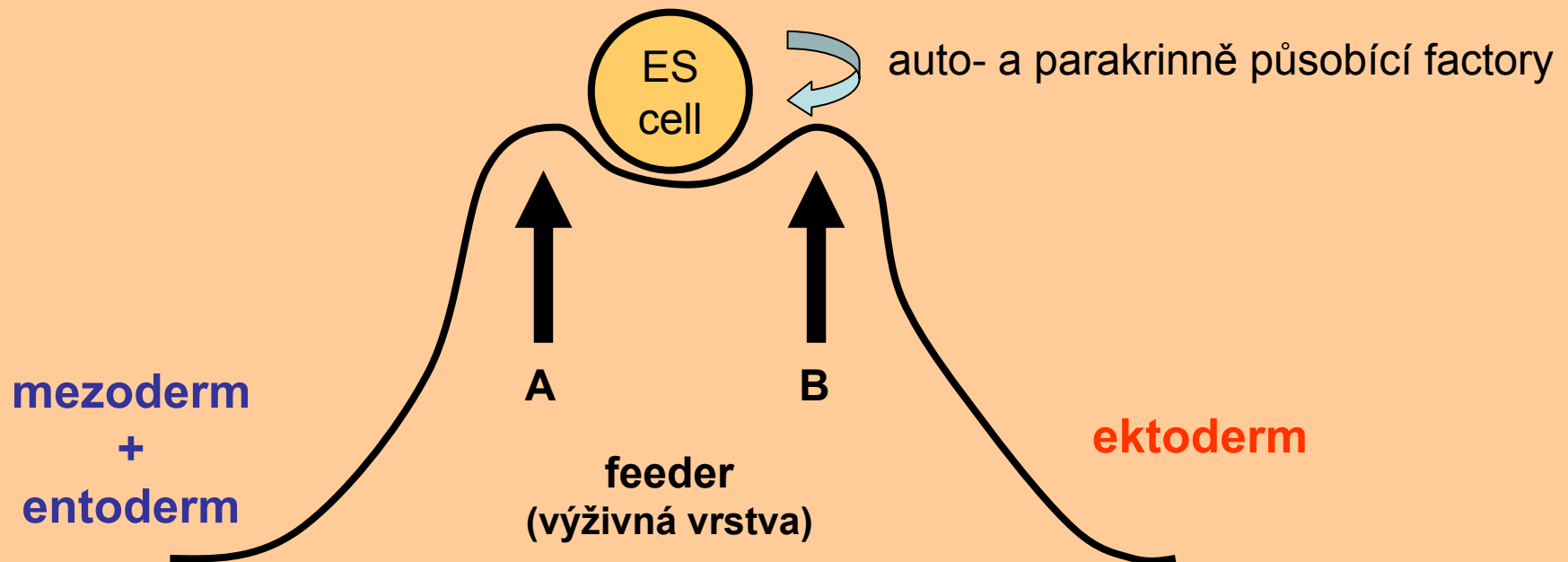
FEEDER

- výživná vrstva = zdroj růstových faktorů (cytokiny, ECM, ..) a vhodný podklad
- nejčastěji se používají myší embryonální fibroblasty (13d p.c., MEF (PEF))
- bez „feederu“ z MEF = definované podmínky, ale horší ES buňky
- tendence používat druhově identické MEF = snížení rizika přenosu virů, ...
- MEF lze nahradit i jinými typy fibroblastů případně jinými buňkami
- MEF lze částečně nahradit komponenty ECM, specifickými cytokiny a přísadami, matrigelem, ..., obecně definovanějšími preparáty

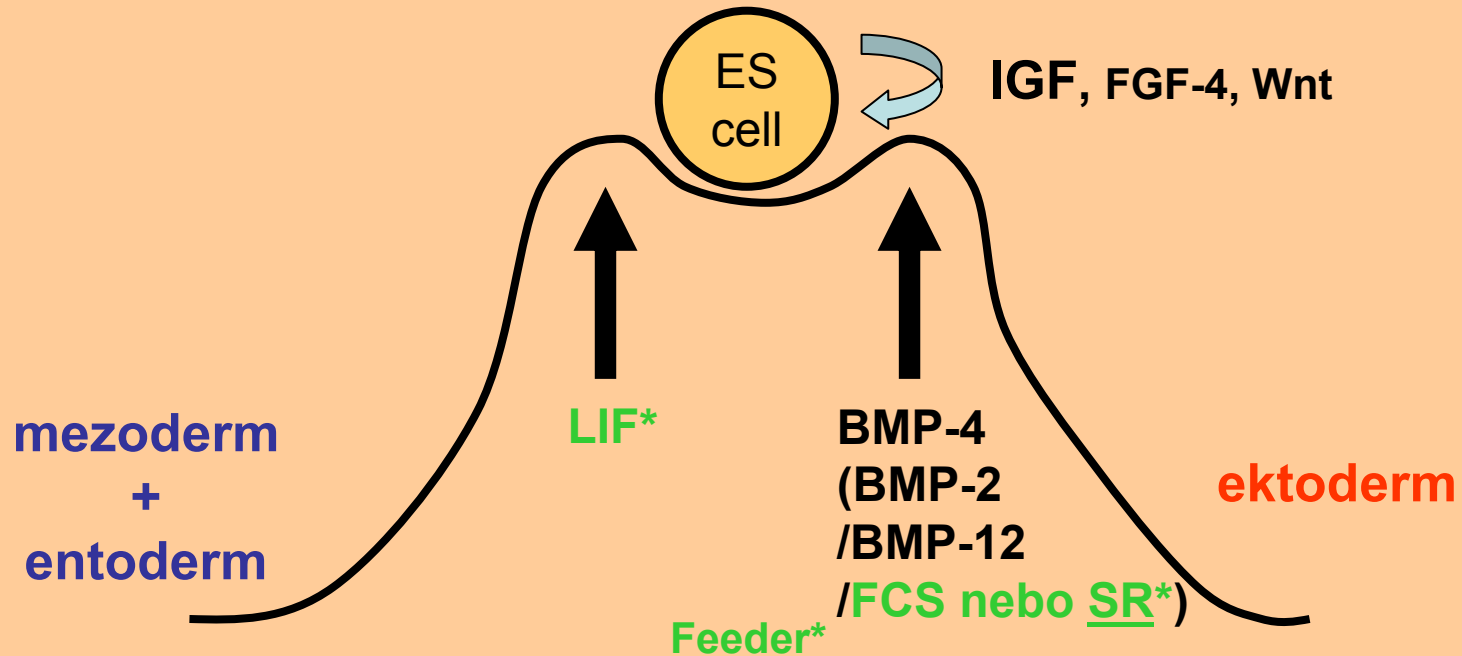
Důležitou komponentou kultivačního média pro ES jsou také nedefinované faktory séra, které lze nahradit dodáváním specifických růstových faktorů. Často se také používá tzv. Serum-replacement = lépe definovaná náhražka séra (patentované složení).

Obecný model inhibice diferenciacie ES buněk

- ES buňky spontáně diferencují, v kultuře je třeba této diferenciaci zabránit
- diferenciacie je často spojená s apoptózou
- vhodnými kultivačními podmínkami, lze diferenciaci inhibovat
- faktory inhibující diferenciaci ES buněk se částečně liší u různých druhů, ale existují výjimky i v rámci jednoho druhu!



Model inhibice diferenciace myších ES buněk



- existují i linie mES buněk nezávislé na LIF
- zdá se, že z LIF závislé linie, lze vyselektovat LIF nezávislou (!?)
- mES buňky pěstované bez „feederu“ ztrácí schopnost tvořit chiméry *in vivo*
- některé linie nelze bez „feederu“ pěstovat vůbec

⇒ vlastnosti mES buněk jsou ovlivněny genotypem imbredního kmene myší z kterého byly izolovány!

LIF – leukemia inhibitory factor

BMP-2,4,12 bone morphogenetic protein 2,4,12

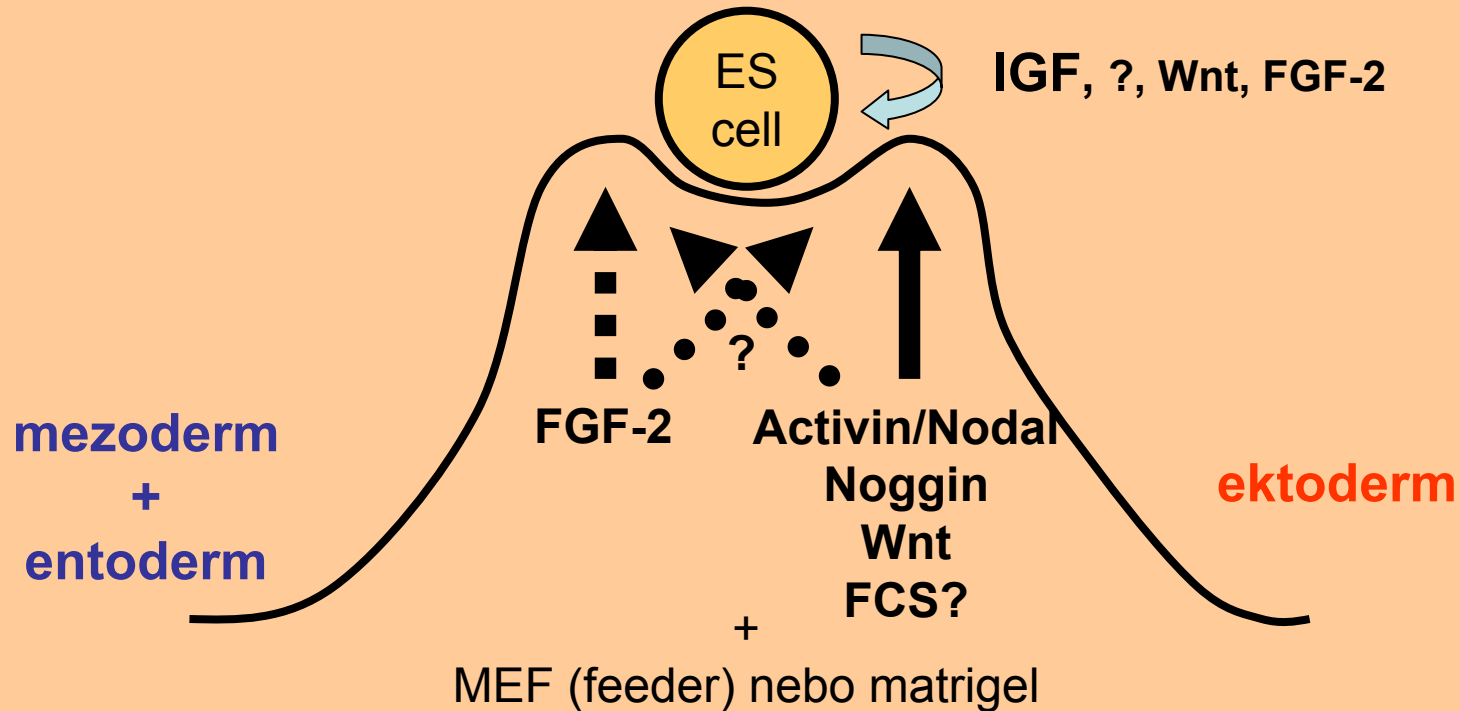
FCS – fetal calf serum

FGF-4 – fibroblast growth factor

SR – serum replacement

*ABSOLUTNÍ OPTIMUM

Model inhibice diferenciace lidských ES buněk



FCS – obsahuje jak diferenciaci indukující, tak diferenciaci inhibující faktory. Kvalitu FCS také ovlivňuje titr protilátek a složek kplementu. FCS se liší mezi jednotlivými šaržemi = je třeba je testovat. Lépe je používat náhrady FCS se sníženou koncentrací negativně působících látek na kultivaci ES buněk, např. Serum-Replacement (fy. Invitrogene-Gibco)

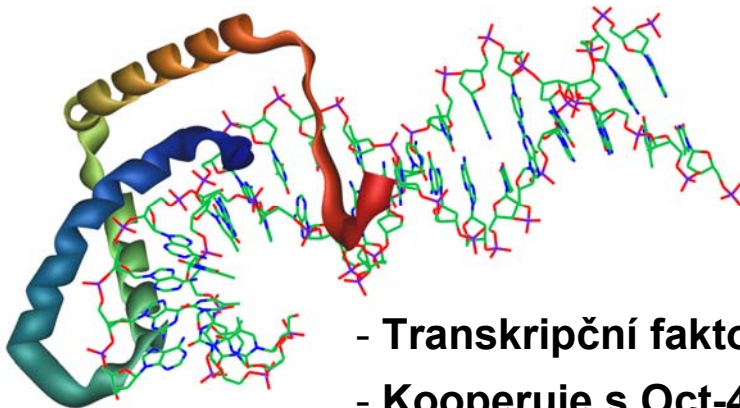
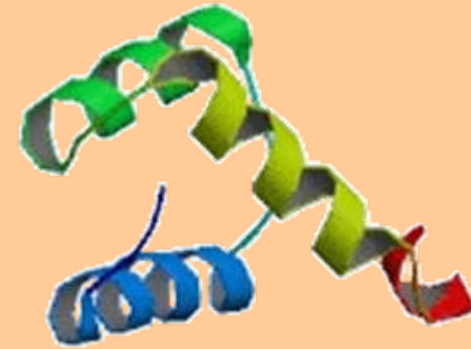
Základní vnitřní faktory charakterizující / regulující ES buňky (pluripotentní embryonální buňky)

Oct-4 (Oct-3/4, Oct-3, *Pou5f1* – master of pluripotency)

- transkripční faktor, homeoprotein
- exprimuje se již u 2/4 (myš – aktivace transkripce) buněčného embrya
- ve stádiu blastuly je jeho exprese výrazně zvýšena
- ve stádiu blastocysty je pouze v buňkách ICM
- později jeho exprese vymizí, zachovává se pouze v PGC (a později v zárodečných buňkách), nízká exprese se předpokládá i v somatických kmenových buňkách ?!?
- nebyl nalezen u kuřat
- reguluje expresi FGF-4 (Oct-4/Sox-2), PDGF α ,
- v průběhu diferenciaci za snížení jeho exprese odpovídá GCNF(germ cell nuclear factor, RA (retinoic acid),...
- v primitivním ektodermu je exprese Oct-4 podporována LRH-1 (liver receptor homologue 1)
- speciální varianta vzniklá alternativním sestřihem, se ale exprimuje u M Φ

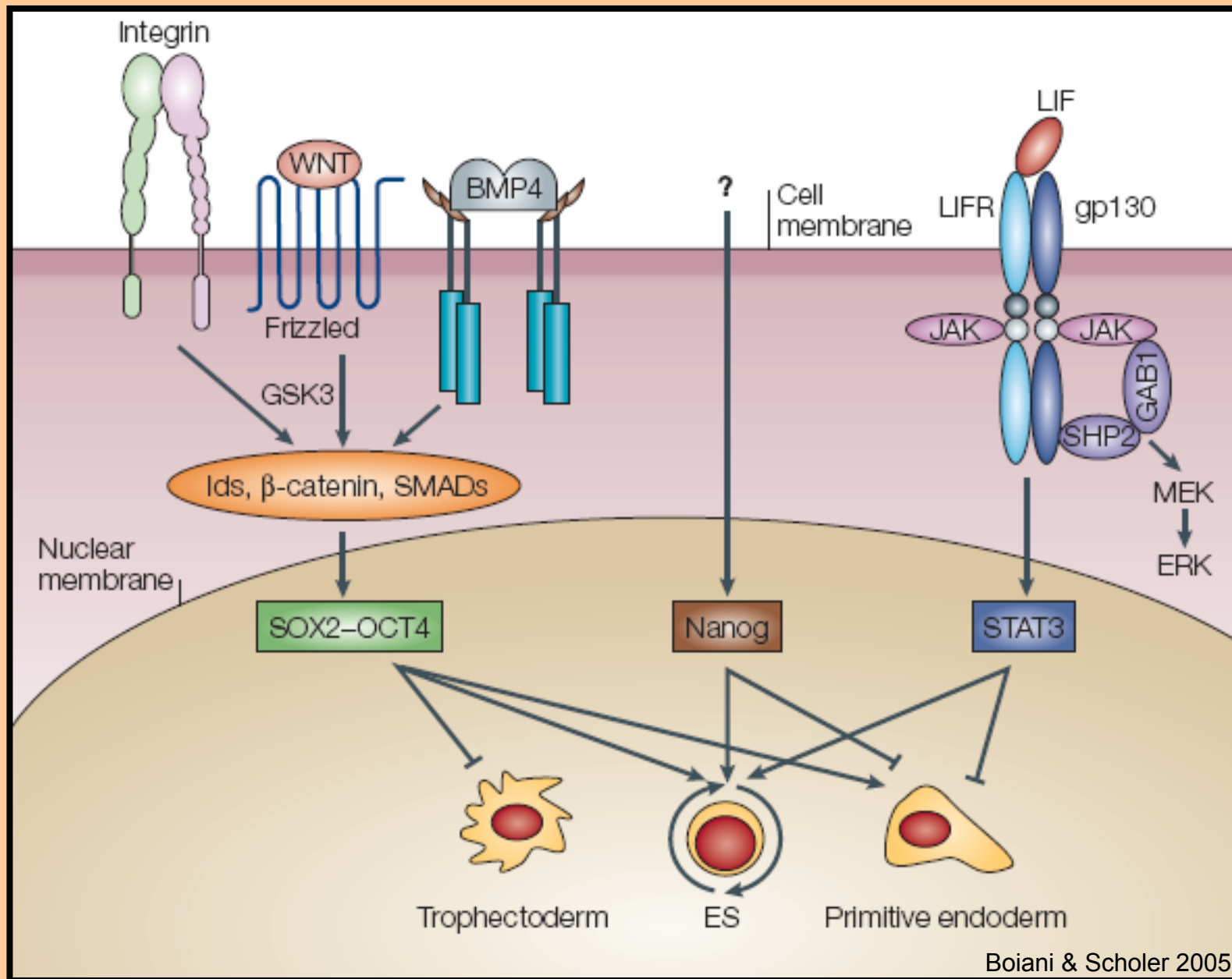
Nanog

- transkripční faktor, homeoprotein
- jeho exprese vede k udržení vysoké hladiny Oct-4
- objevuje se již ve vnitřních buňkách moruly
- později se zdá být nezbytný zejména pro specifikaci PGC

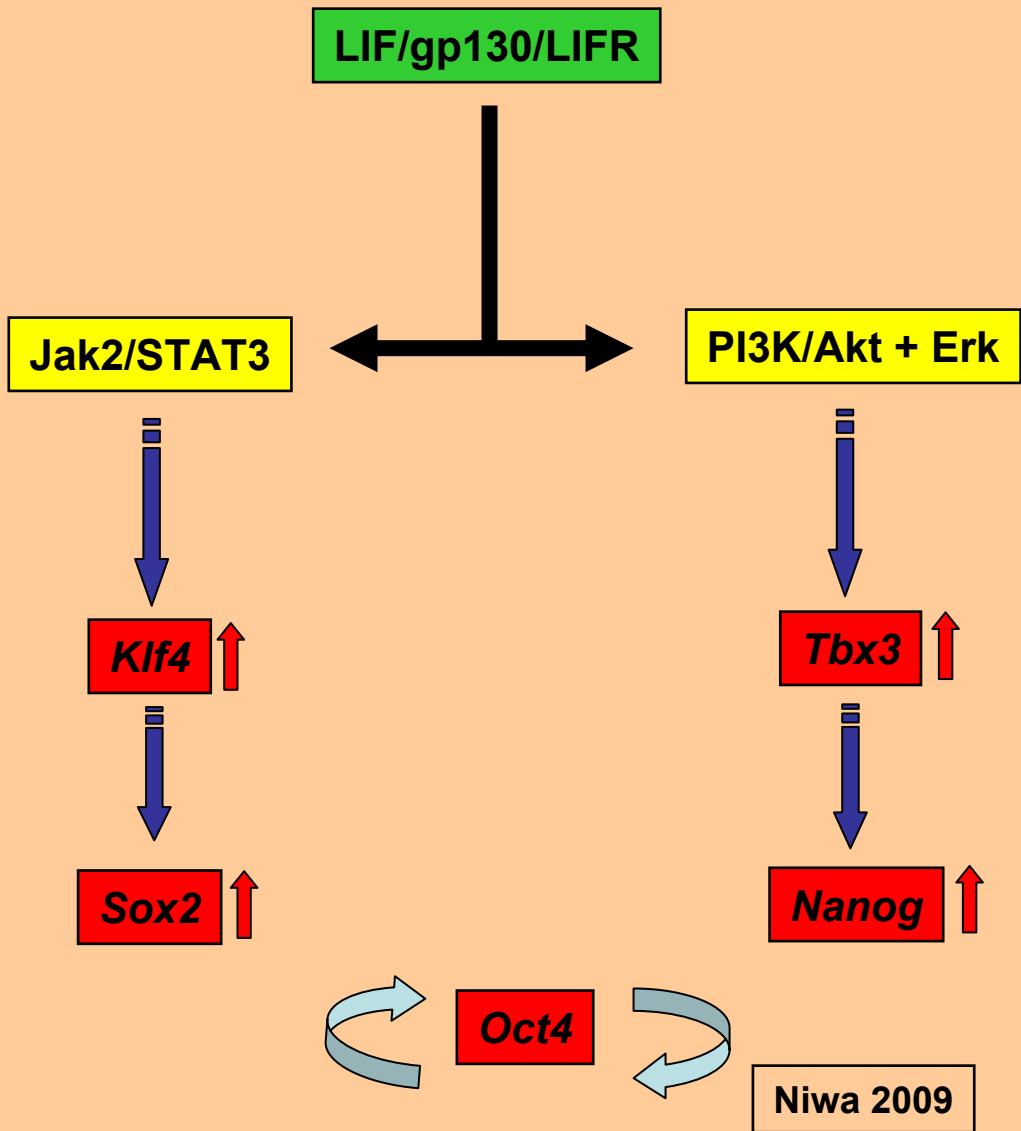


Sox-2

- Transkripční faktor Sry-rodiny (sex-determining region Y protein)
- Kooperuje s Oct-4 na vlastní expresi
- V průběhu indukce neurální diferenciace se jeho exprese zvyšuje

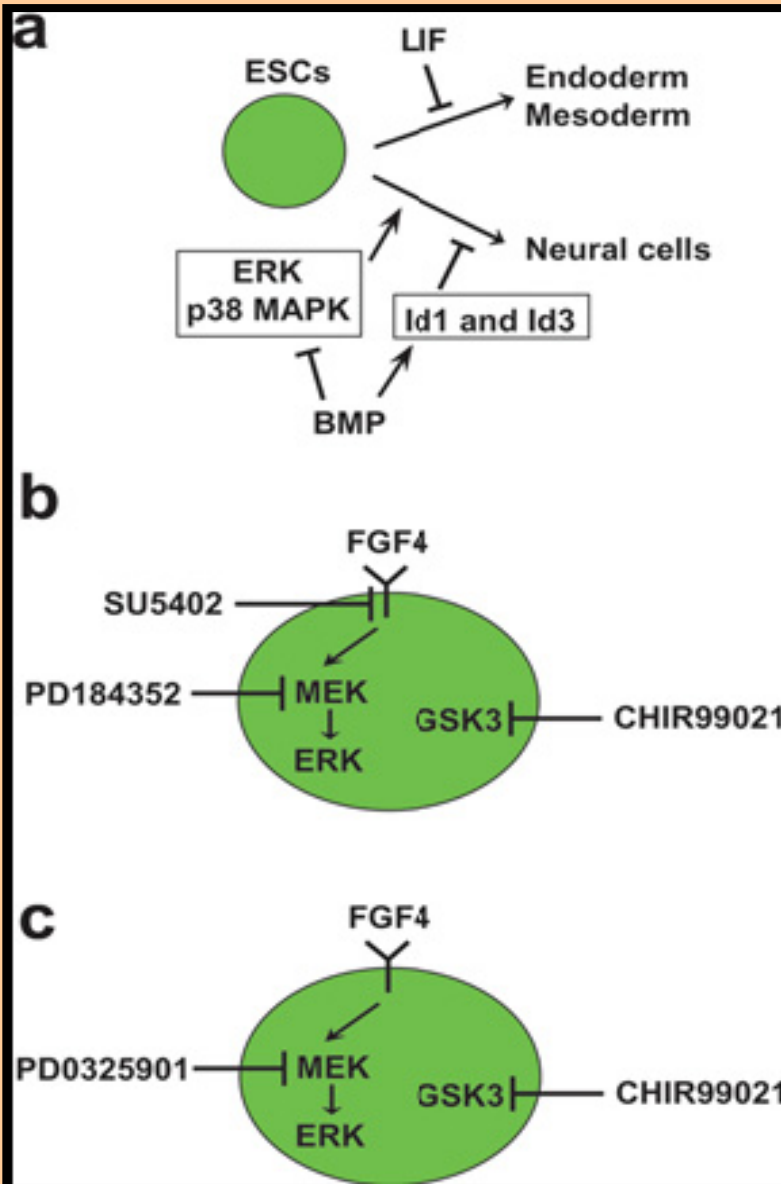


Potencionální mechanismus účinků LIF u mES buněk



Alternativní kultivace mES protocol 2i/LIF, 3i/LIF

(A. Smith laboratory)



a) standard protocol

b) 3i/LIF protocol

c) 2i/LIF protocol

LIF

(indukce STAT3)

SU5402

(inhibice FGF-R)

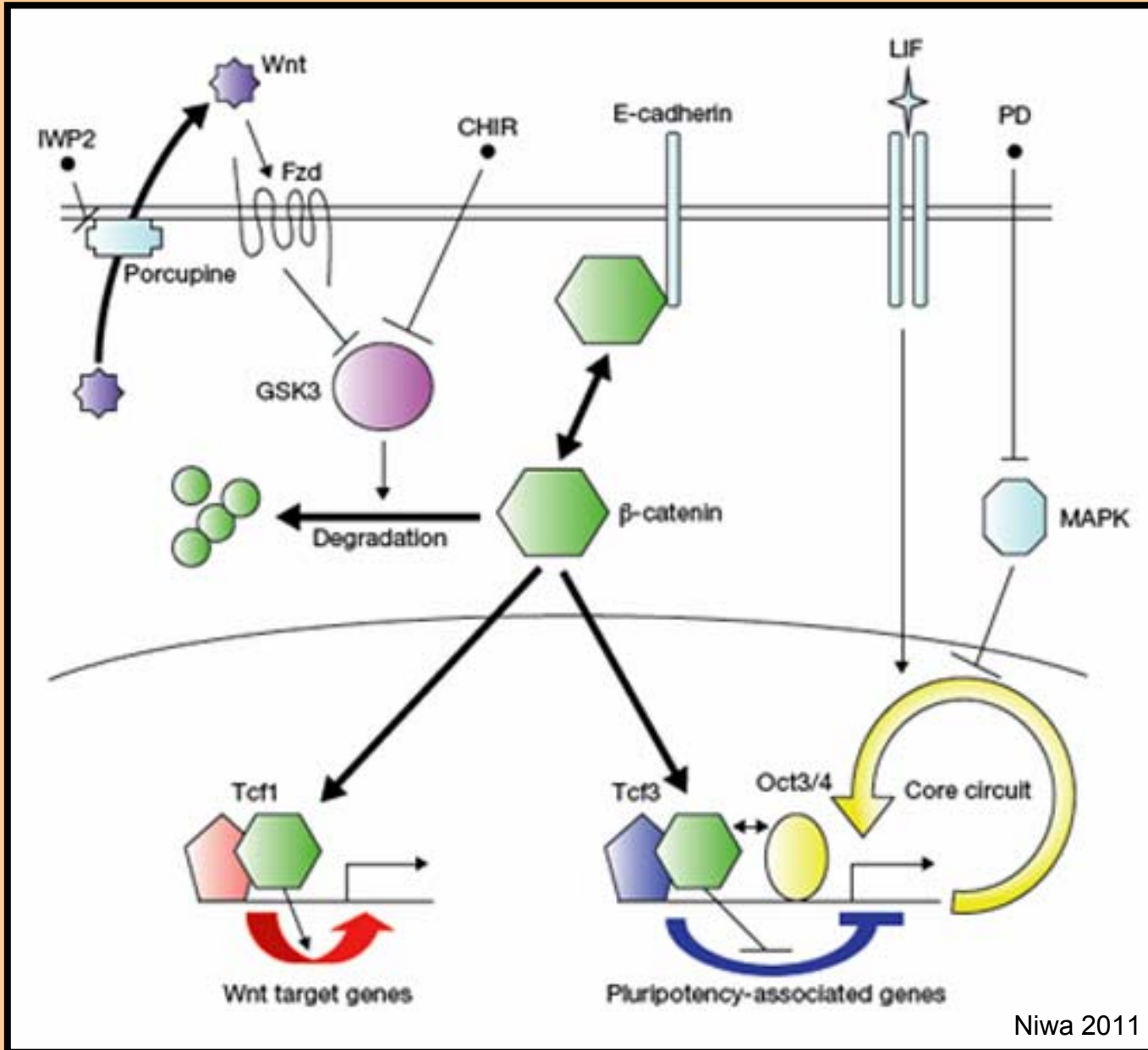
PD0325901 / PD184352

(inhibice Erk signalizace)

CHIR99021

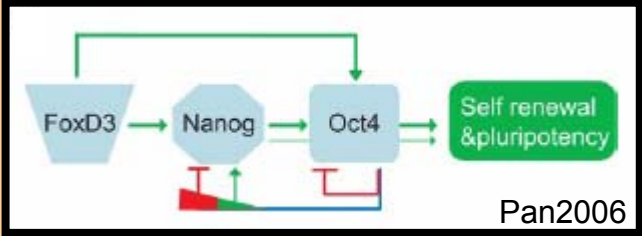
(inhibice GSK3, Wnt signalizace)

Wnt a mES

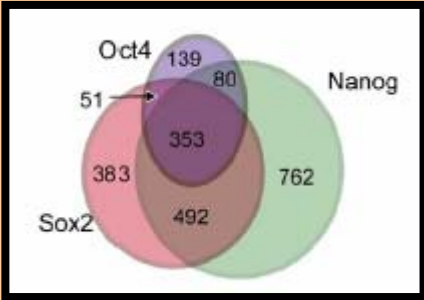


Regulace transkripce faktory Oct-4, Nanog a Sox-2

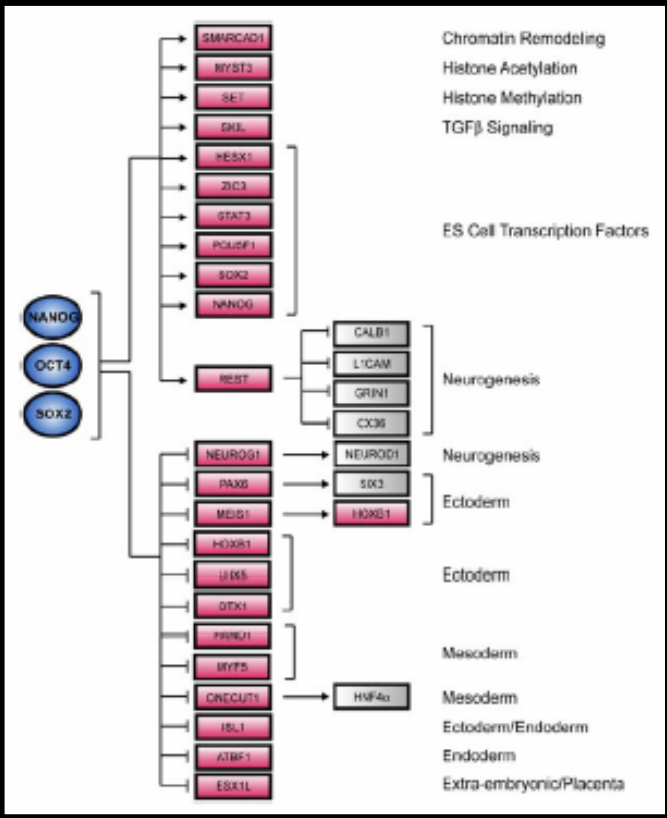
Předpokládaný model vzájemné regulace exprese FoxD3, Nanog a Oct-4 u mES. FOxD3 není exprimován u hES.



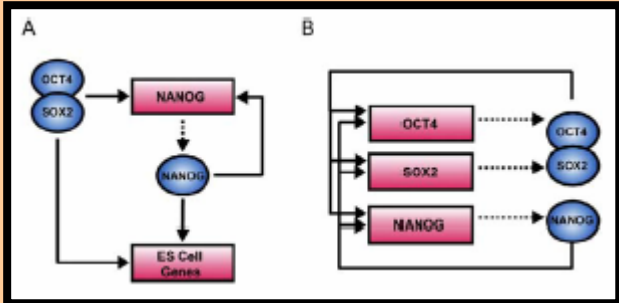
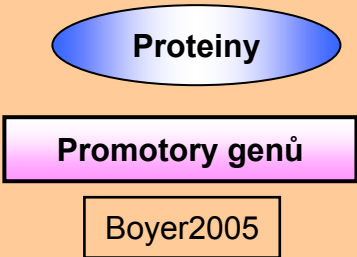
Vzájemná regulace Oct-4 a Nanog není dosud plně objasněna. Je však již jasné, že Oct-4 řídí transkripci Nanog přímou vazbou v jeho promotoru (společně se Sox-2), jak u mES tak hES. Pro self-renewal ES buněk je klíčové zachovat rovnováhu v hladinách Oct-4 a Nanog (viz. výše).



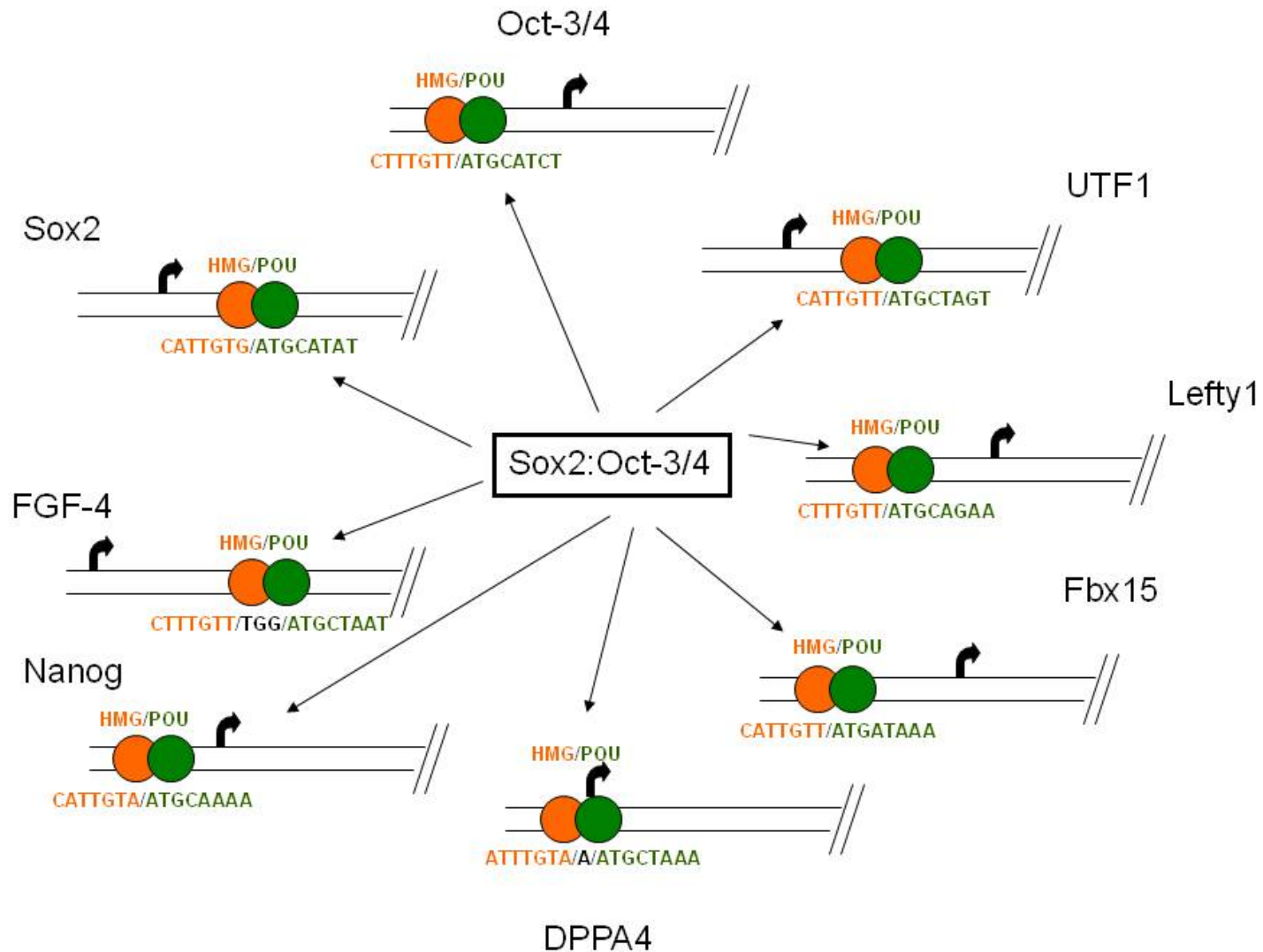
Promotorové sekvence rozpoznávané Oct-4, Nanog a Sox-2 u hES.



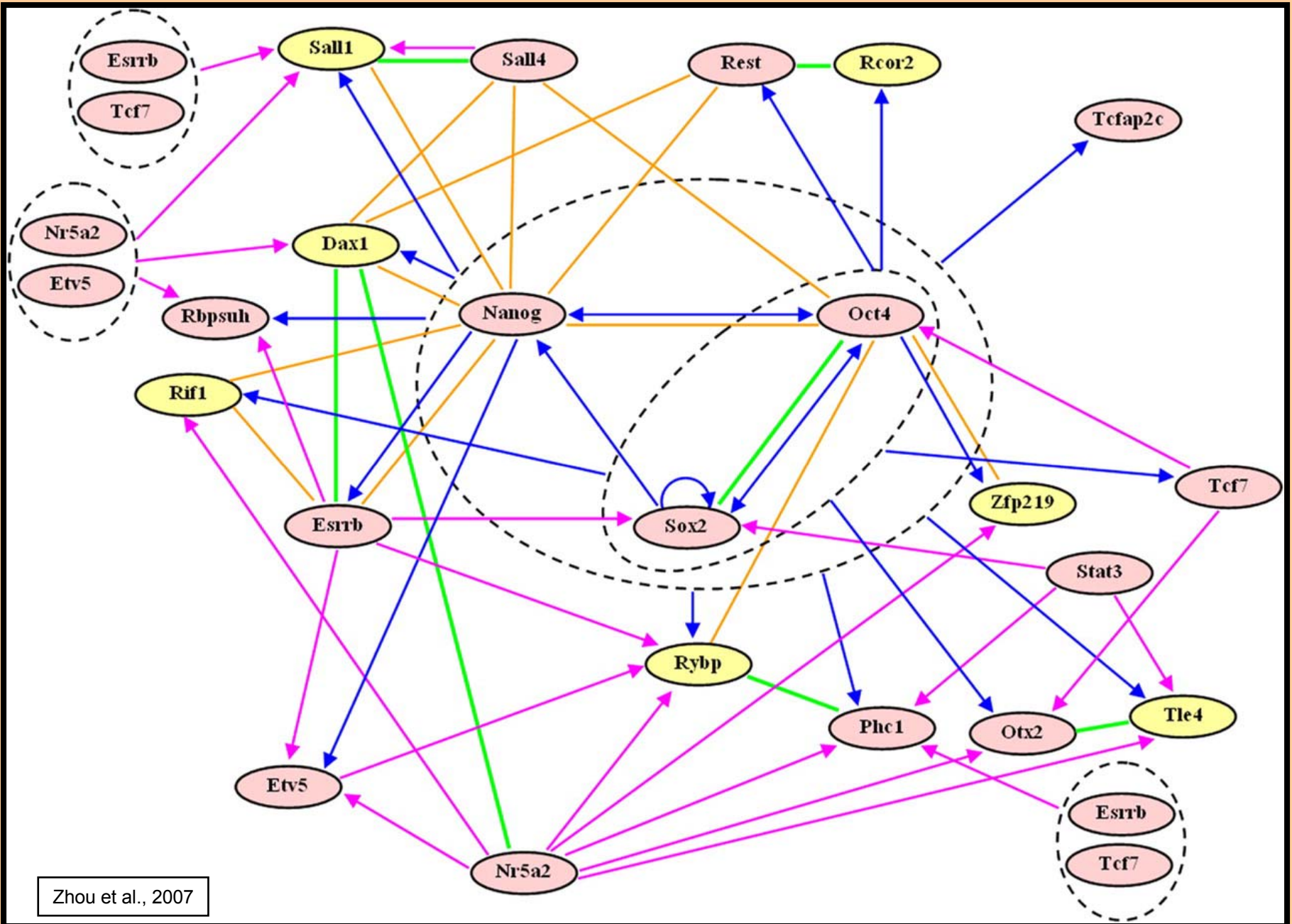
Model vzájemné regulace Oct-4, Nanog a Sox-2 a některými řízenými geny u hES.



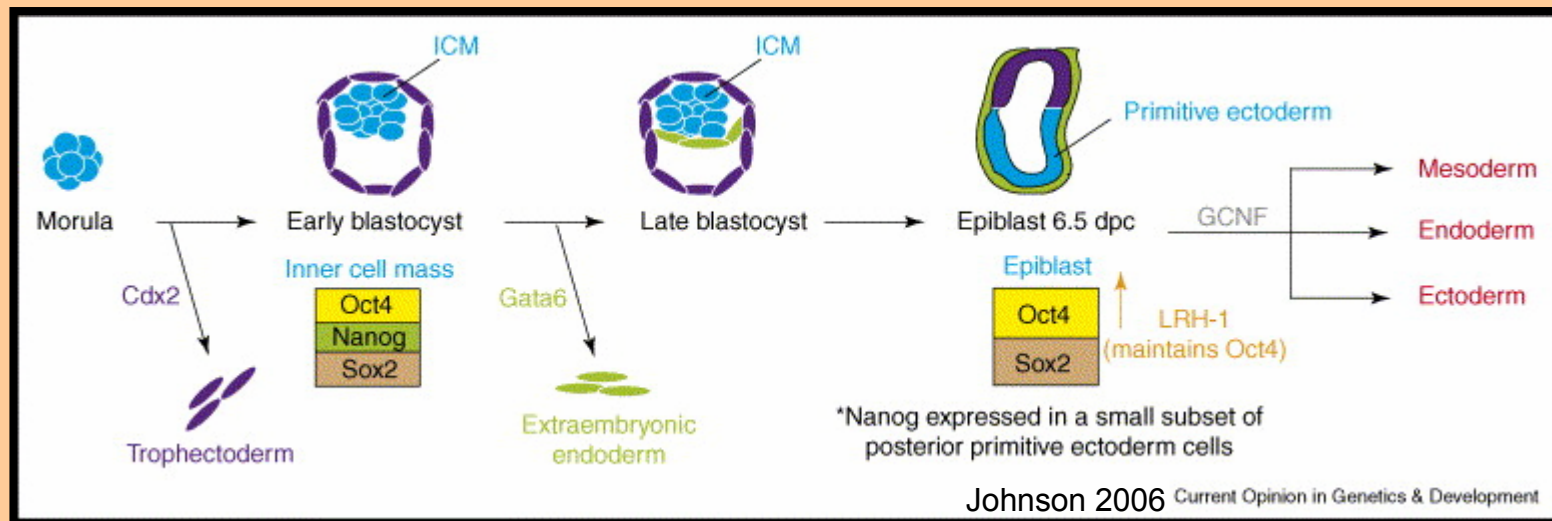
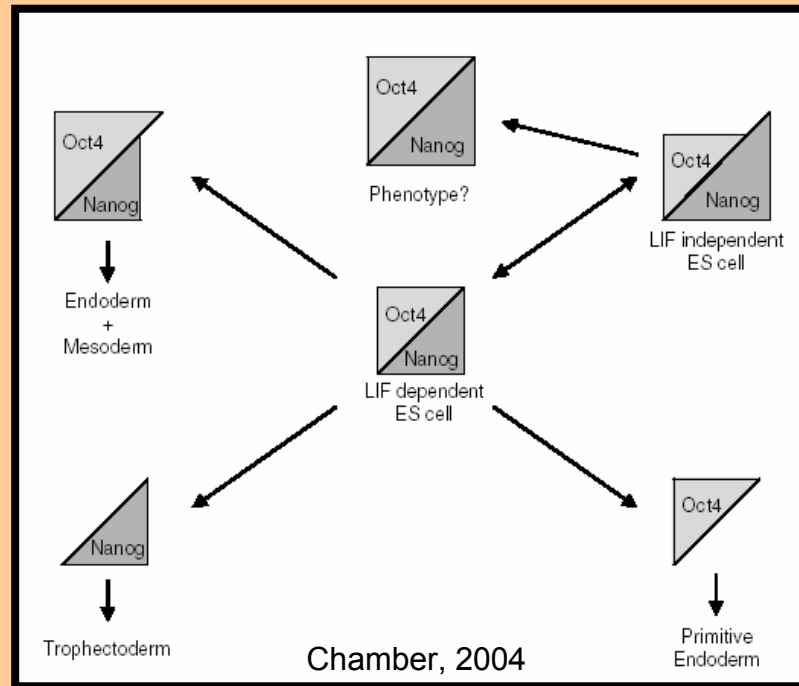
Příklady vývojově významných genů pod kontrolou heterodimeru Oct4/Sox2



Oct4/Sox2/Nanog zprostředkované regulace u mES buněk



Ztráta pluripotence u ES buněk v důsledku deregulace rovnováhy mezi hladinou Oct-4 a Nanog



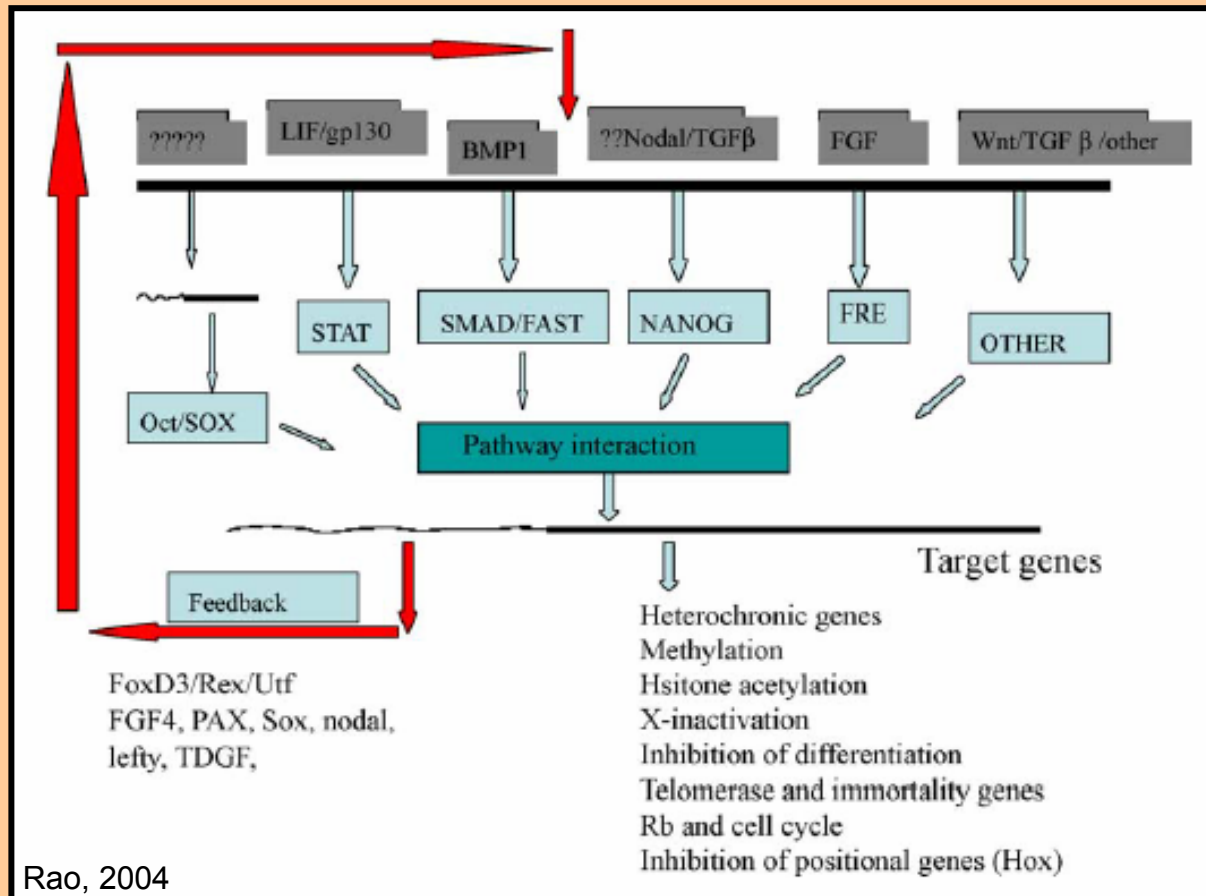
ES BUŇKY

a) myší ES (mES)
(LIF / gp130* / STAT3 dependent)

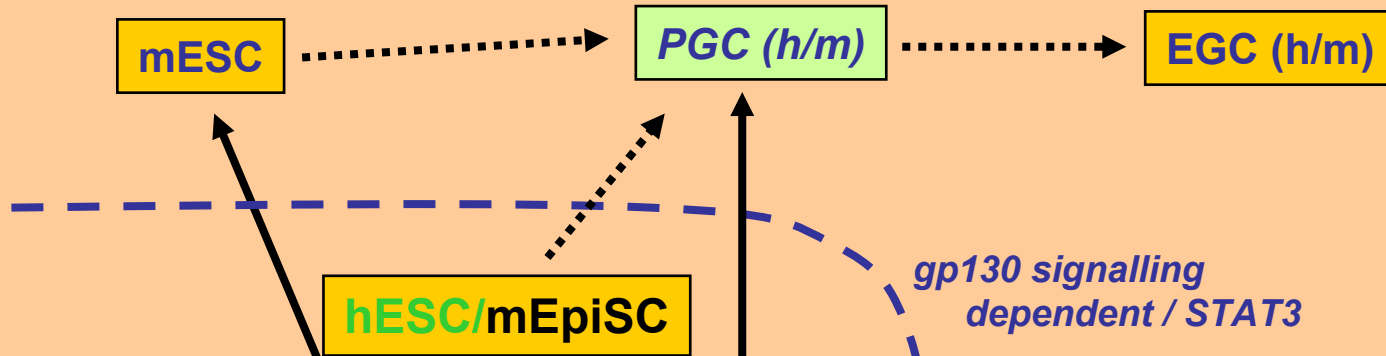
x

b) lidské ES (hES)
(LIF / gp130* / STAT3 independent)

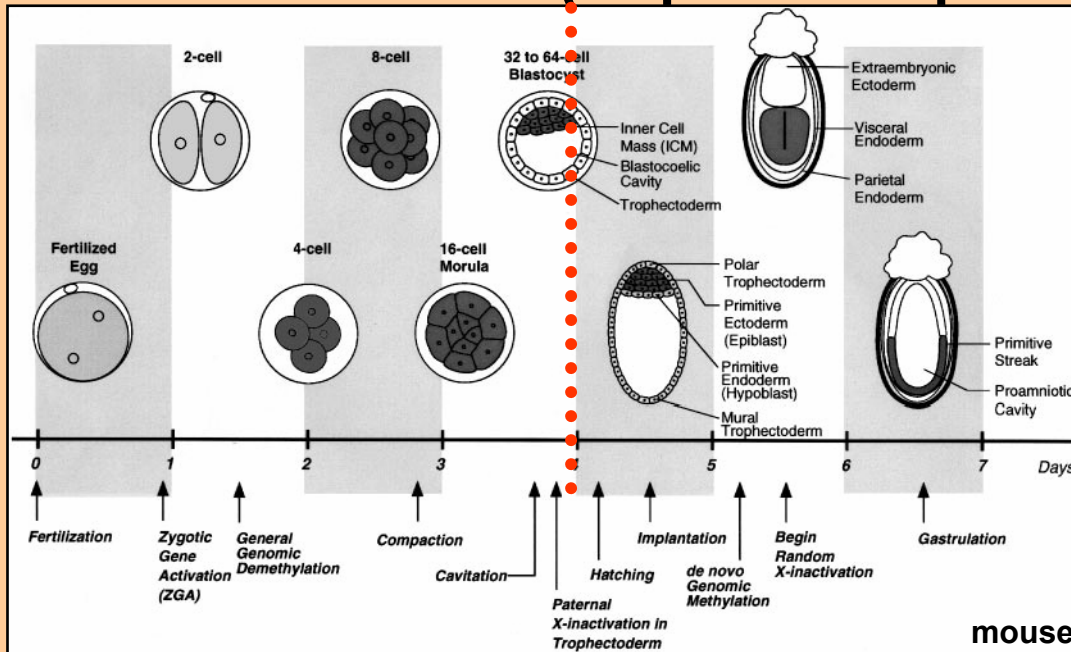
Toto rozdělení je pravděpodobně dáno možností některých živočišných druhů mít skrytou březost ve stádiu blastocysty (embryonální diapauza).



Signální dráha gp130 -> STAT3 ve vztahu k pluripotentním buňkám u člověka a myši



embryonální diapauza (myš / lasicoviti)



somtické SC ??

pluripotent

multipotent a méně

Současné studie však ukazují, že za regulaci diapauzy je odpovědná zejména matka => u každé blastocysty lze navodit diapauzu !?
(G.E. Ptak et al., PLOS One 2012)

Některé charakteristické znaky myších a lidských ES buněk

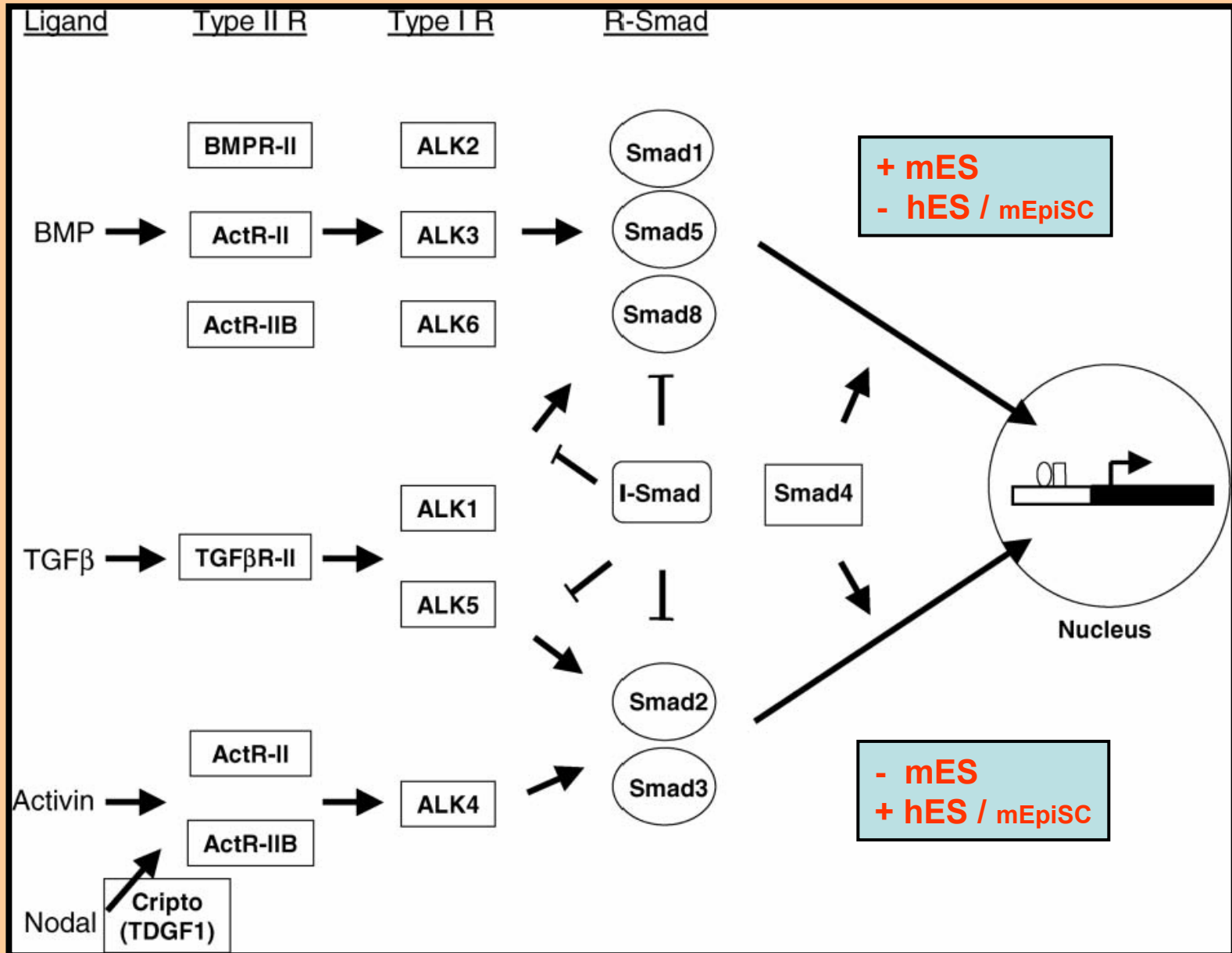
	Mouse ES	Human ES
Alkaline Phosphatase	+	+
SSEA-1	+	-
SSEA-3	-	+
SSEA-4	-	+
TRA-1-60	-	+
TRA-1-81	-	+
OCT 3/4	+	+
SOX 2	+	+
<u>REX 1</u>	+	+
TERT	+	+
<u>FGF4</u>	+	+
UTF-1	+	+
<u>FOXD3</u>	+	-
CX45	+	+
CX43	+	+
BCRP-1	+	+
<u>LIFR</u>	+	+
gp130	+	+
STAT3	+	+
Nanog	+	+

Table 1 | **The best-characterized ESC markers***

Undifferentiated state marker	Mouse	Human
Cell-surface and nuclear antigens		
SSEA1 [‡]	+	–
SSEA3/4 [‡]	–	+
TRA1–60/81 [§]	–	+
TRA2-54	–	+
GCTM-2 [§]	–	+
TG343 [§]	?	+
TG30 ^l	?	+
CD9 ^l	+	+
CD133/prominin	+	+
OCT4	+	+
NANOG	+	+
SOX2	+	+
Enzymatic activities		
AP	+	+
Telomerase	+	+
In vitro culture requirements		
Feeder-cell dependent	+	+
LIF dependent	+	–
FGF4	+	–
Growth characteristics		
Ability to form trophoblast	–	+
Teratoma formation <i>in vivo</i>	+	+
Growth characteristics <i>in vitro</i>	Form tight, rounded, multi-layer clumps; can form EBs	Form flat, loose aggregates; can form EBs
Ability to form germ cells <i>in vitro</i>	+	NR

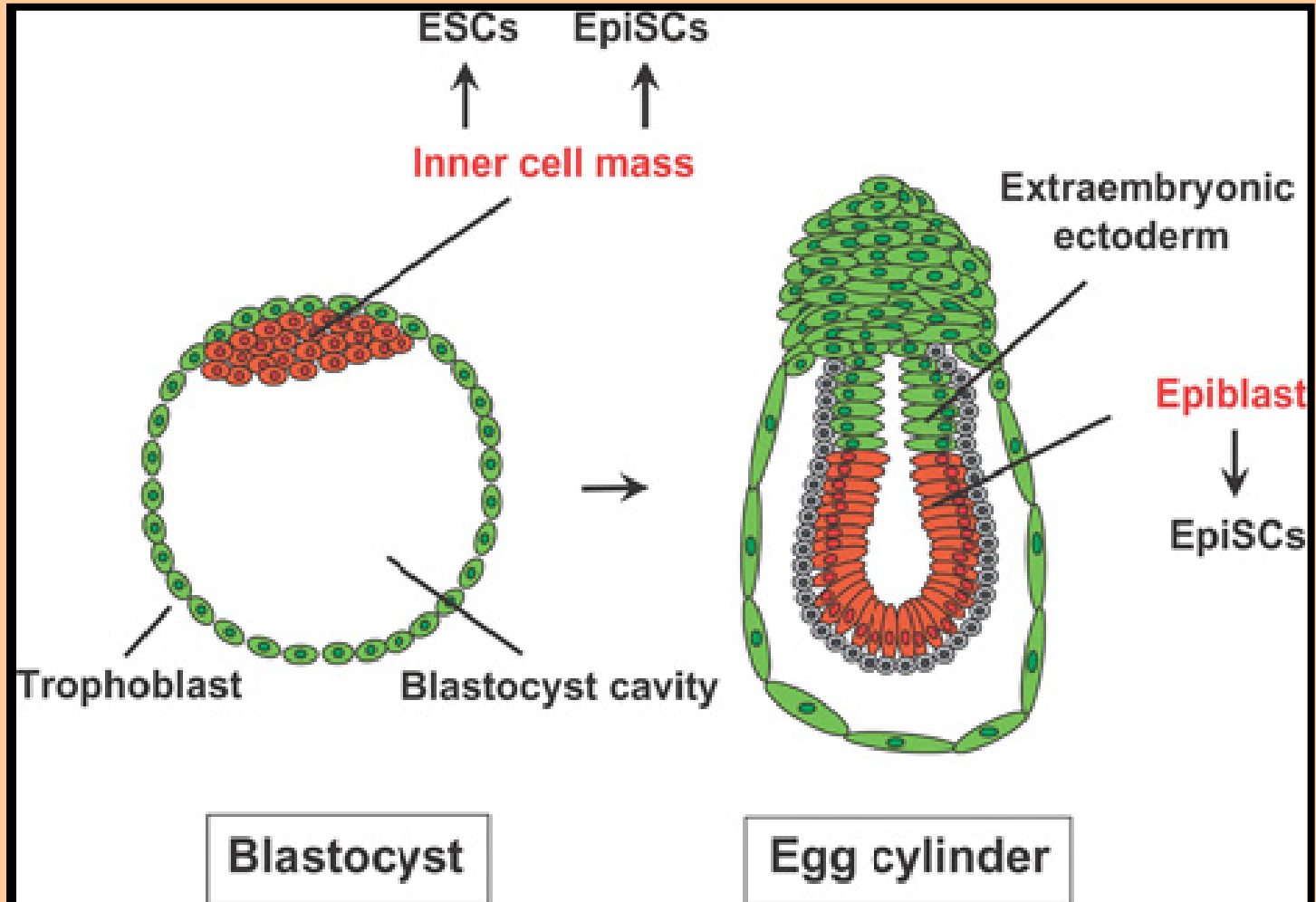
[‡]Glykolipidy, [§] Keratan chondroitin sulfát proteoglycan, ^lTetraspannin transmembránové proteiny, AP – alkalická fosfatáza, EB – embryoidní tělísko, ESC – embryonální kmenové buňky, SSEA – vývojově specifický embryonální antigen (stage-specific embryonic antigen), TRA – antigen odmítnutí nádoru (tumor-rejection antigen), NR – nestudováno (not reported)

Signální dráha TGFbeta / BMPs u ES buněk



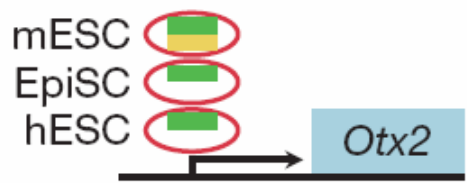
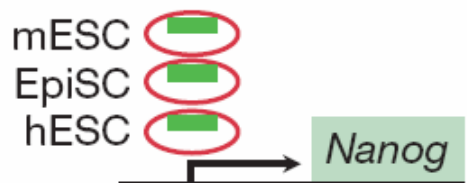
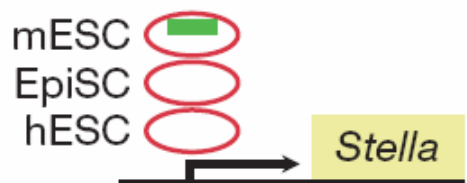
Kmenové buňky epiblastu – EpiSC (Epiblast stem cell)

Brons, 2007 & Tesar, 2007



Histone methylation

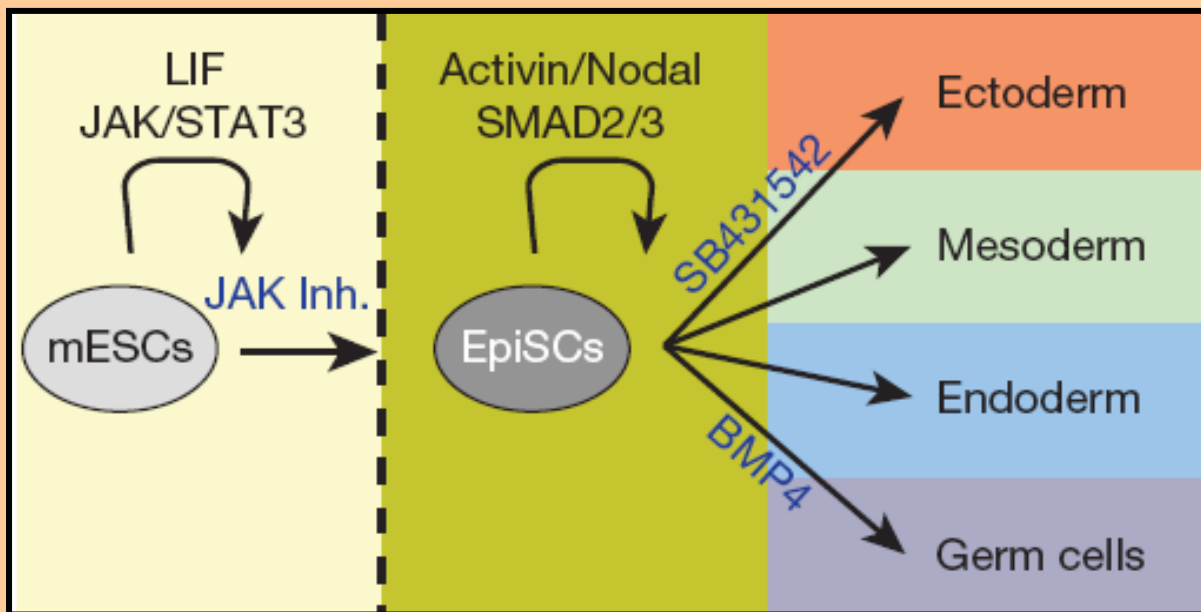
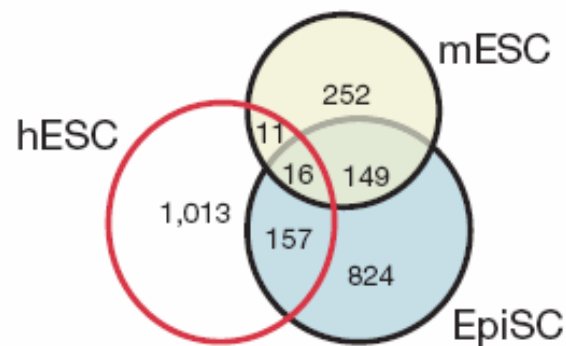
■ H3K4me3
■ H3K27me3



EpiSC

- neintegrují se do moruly a blastocysty => rozdíl s mES
- netvoří kompletní chiméry
- nebyla detekována aktivní alkalická fosfatáza (AP)
(mES, hES, EC, EG, PGC, mají aktivní AP)
- EpiSC částečně vysvětlují rozdíly mezi mES a hES

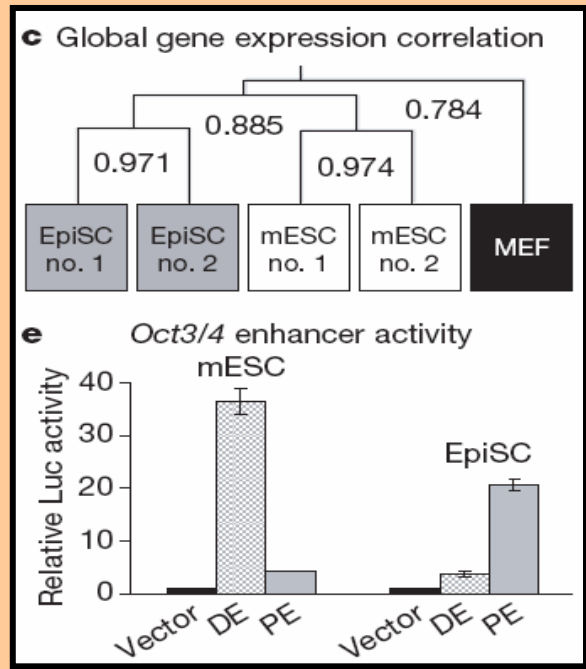
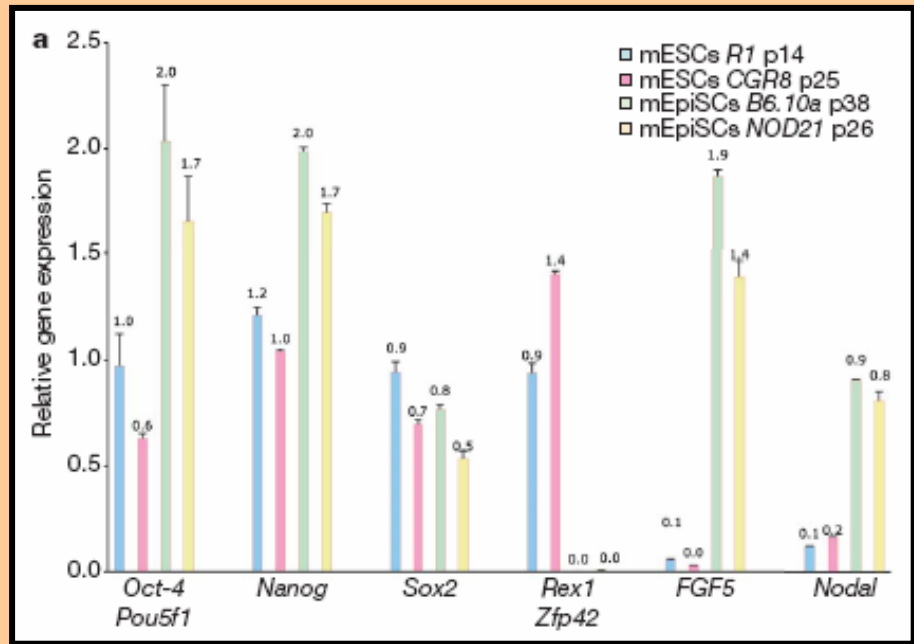
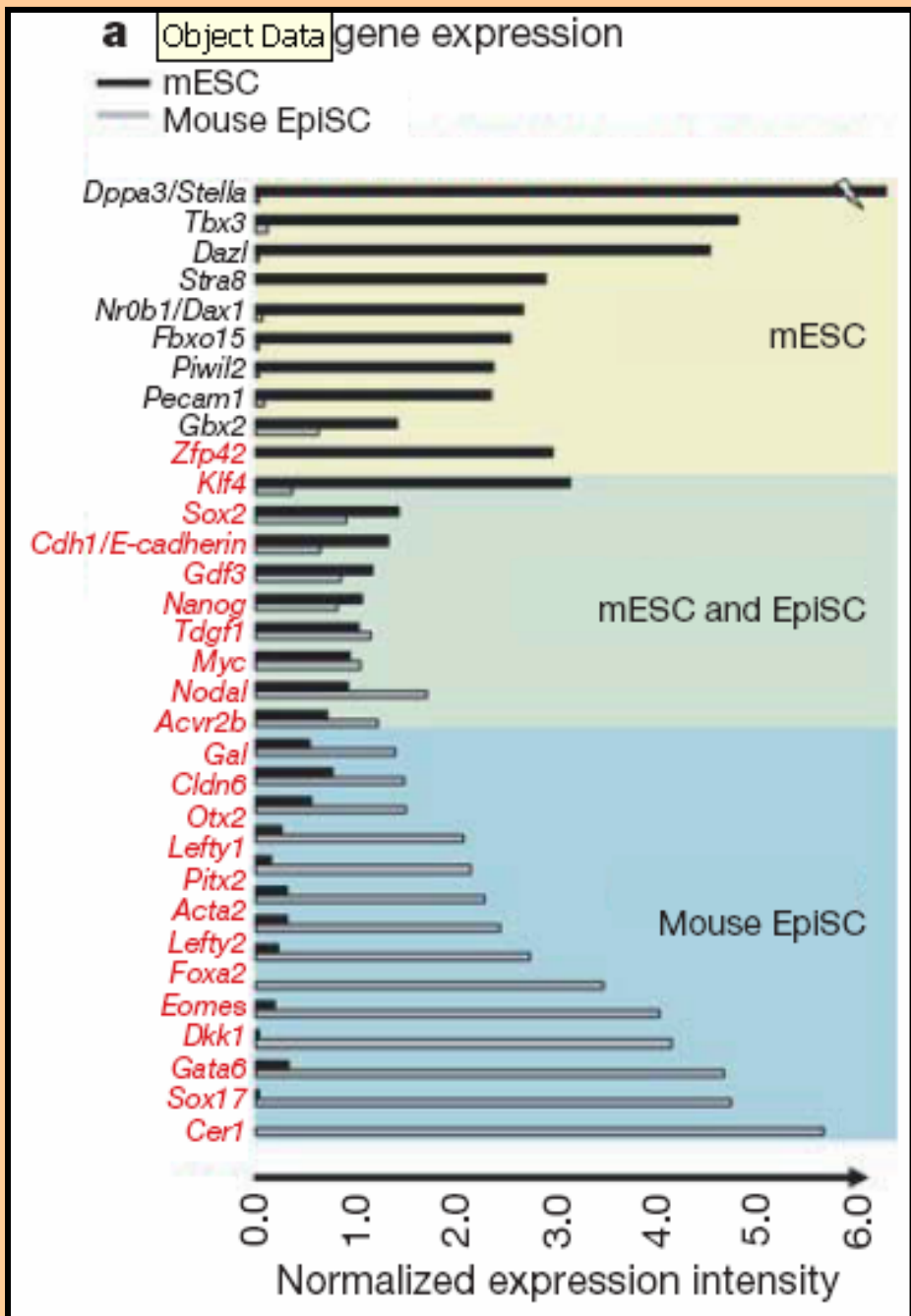
Genes bound by Oct3/4



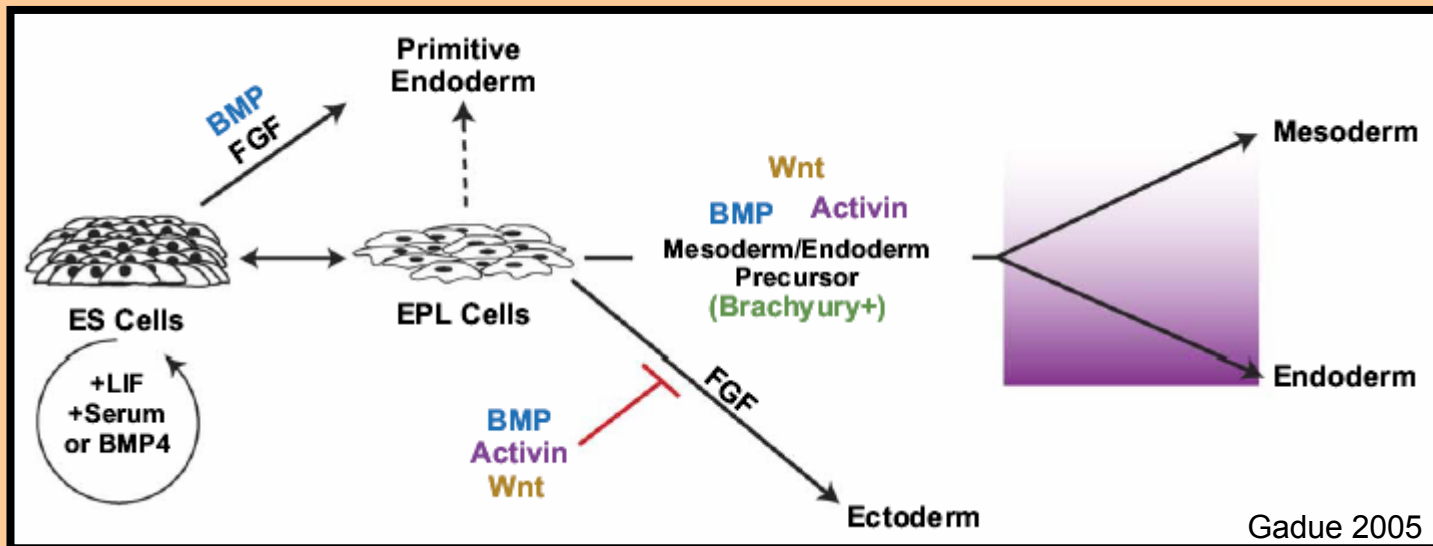
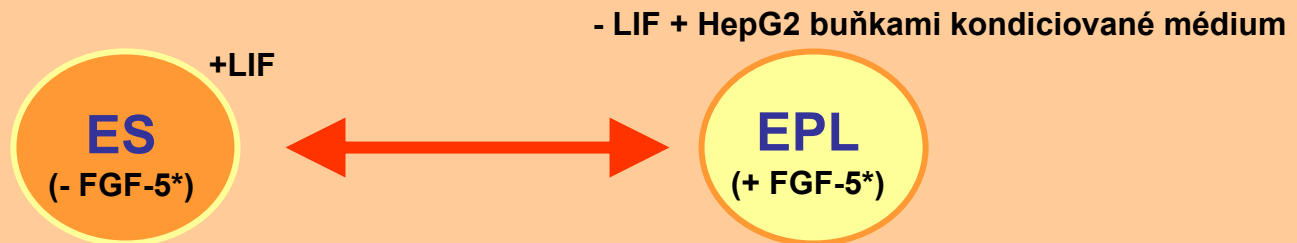
Kmenové buňky epiblastu – EpiSC (Epiblast stem cell)

Brons, 2007 & Tesar, 2007

Kmenové buňky epiblastu – EpiSC (Epiblast stem cell)
 Brons, 2007 & Tesar, 2007



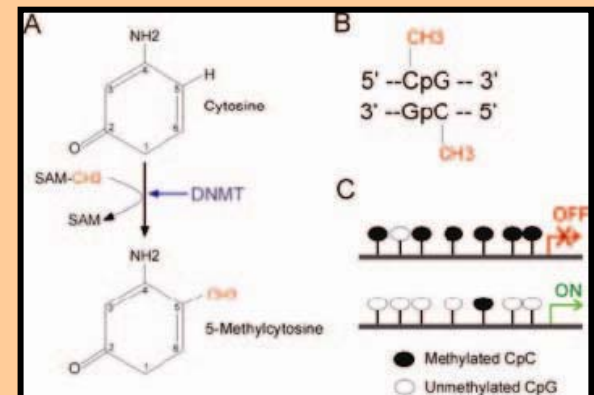
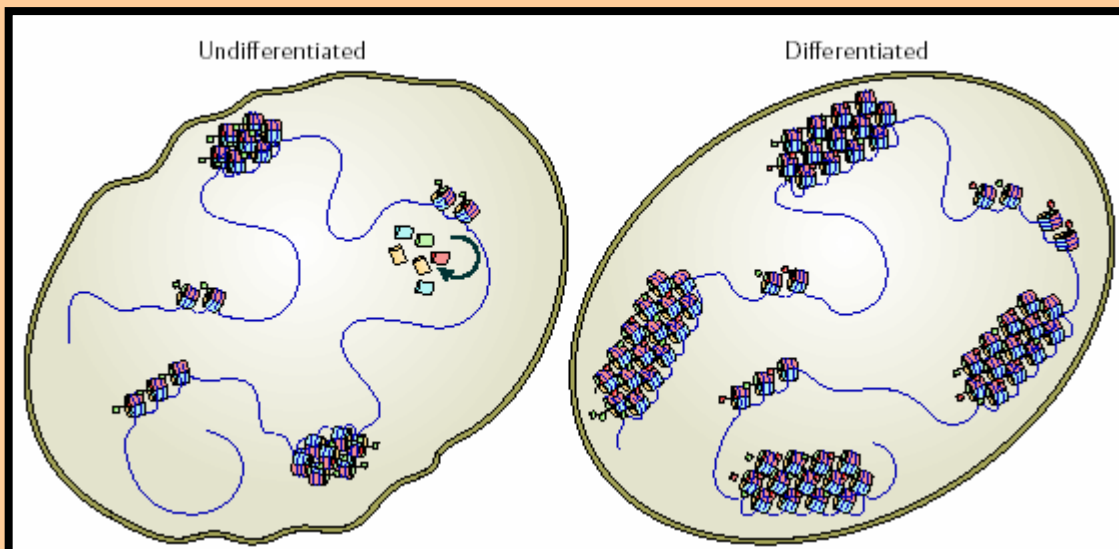
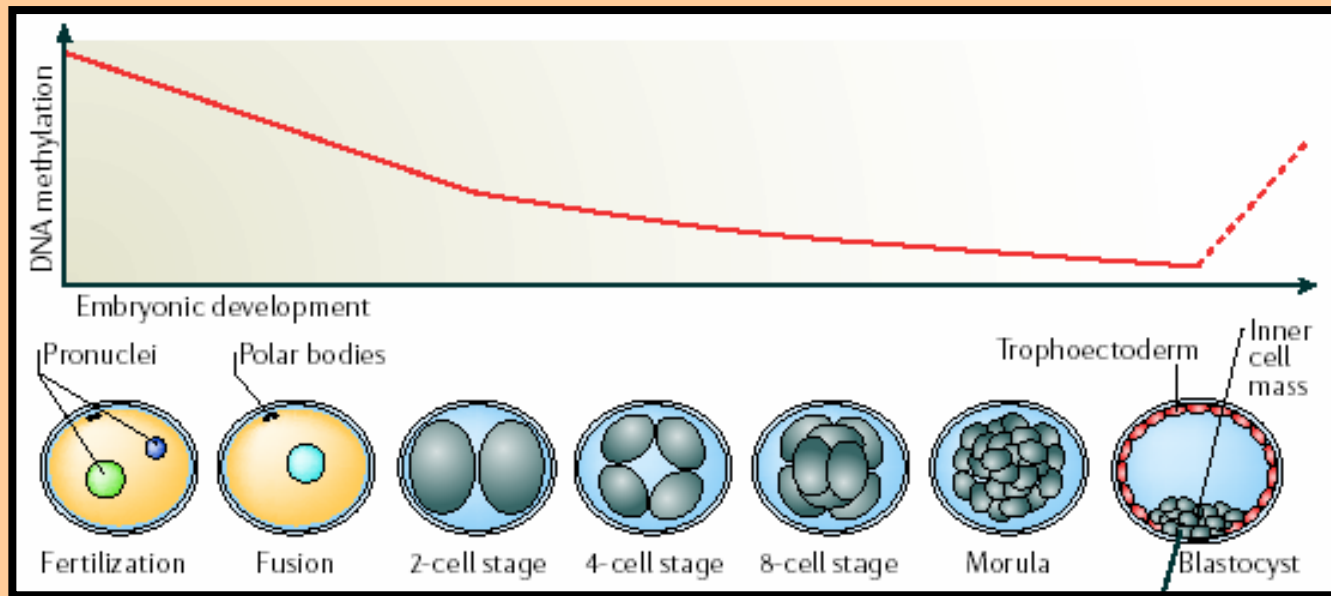
mES je možno reverzibilně převést na buňky připomínající buňky primitivního ektodermu tzv. EPL (early-primitive ectoderm-like) buňky. Tyto buňky již nemají podobně jako buňky primitivního ektodermu schopnost tvořit buňky parietálního entodermu. Také některé jejich další schopnosti diferencovat, jsou oproti ES buňkám pozměněny (Pelton 2002) .



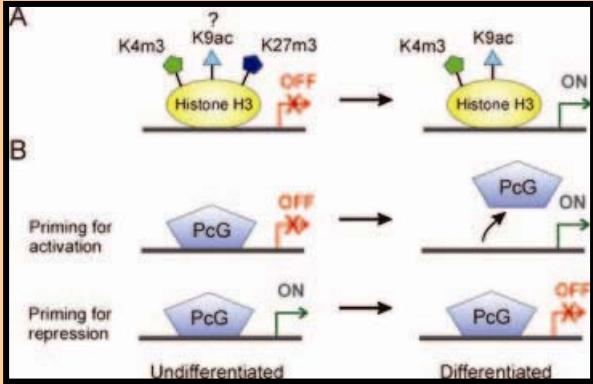
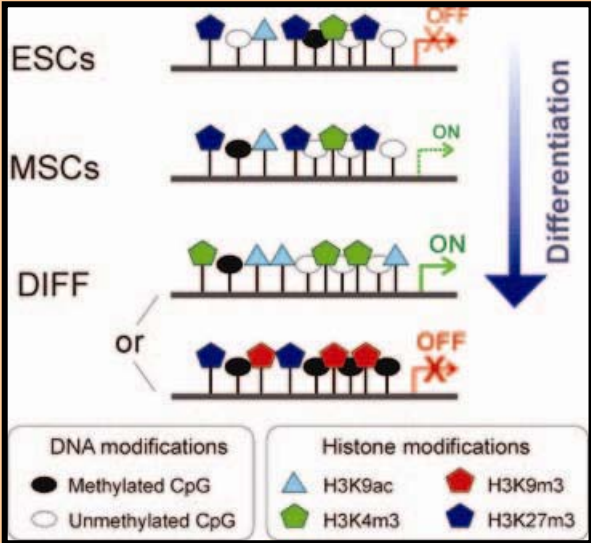
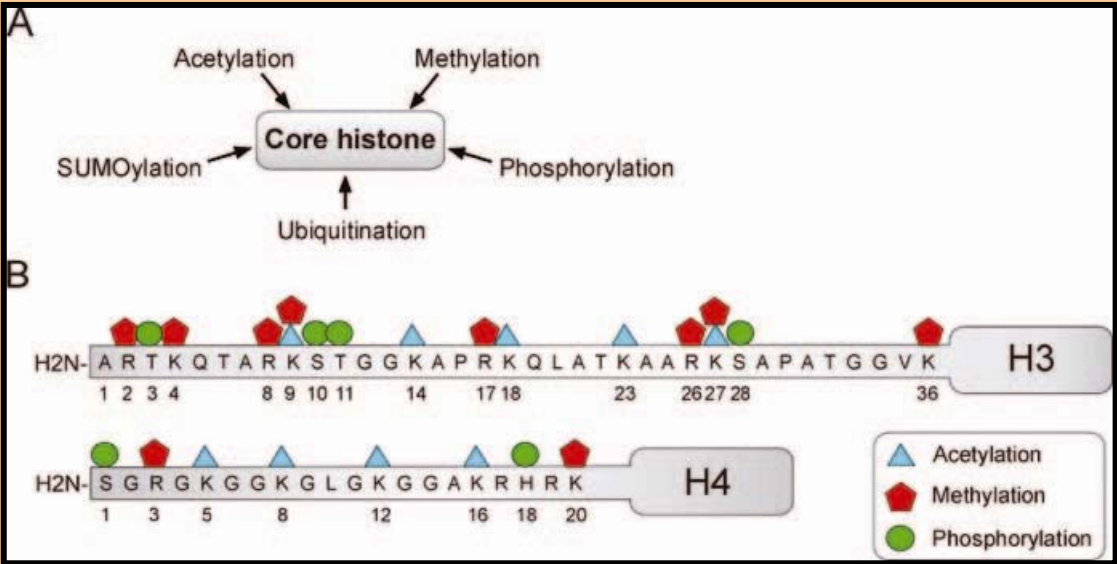
*EPL buňky jsou podobně jako buňky primitivního ektodermu exprimují FGF-5 na rozdíl od ES buněk, které exprimují zejména FGF-4 (platí pro myš)

Epigenetika ES buněk

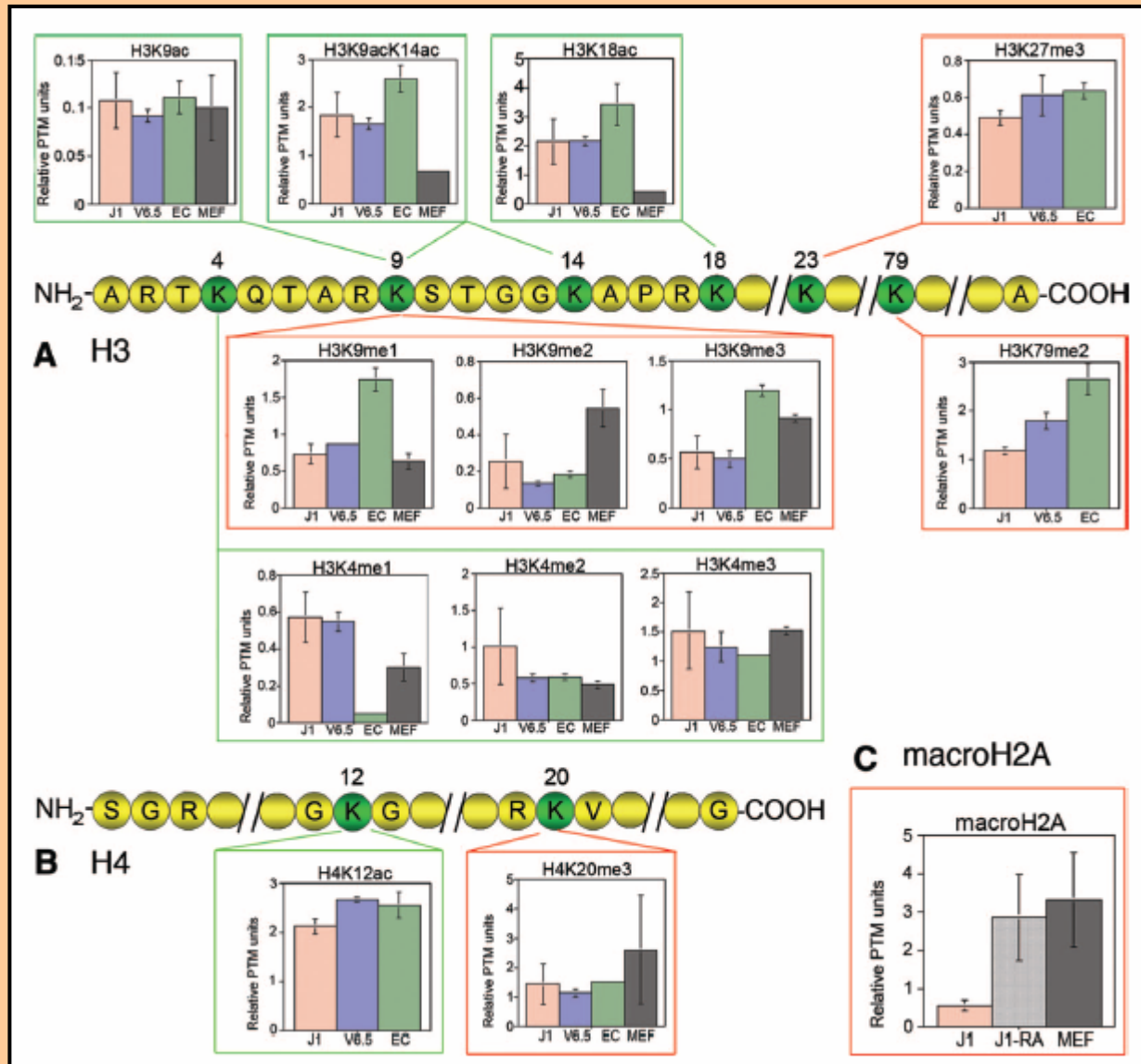
Metylace DNA a kondenzace chromatinu u ES buněk



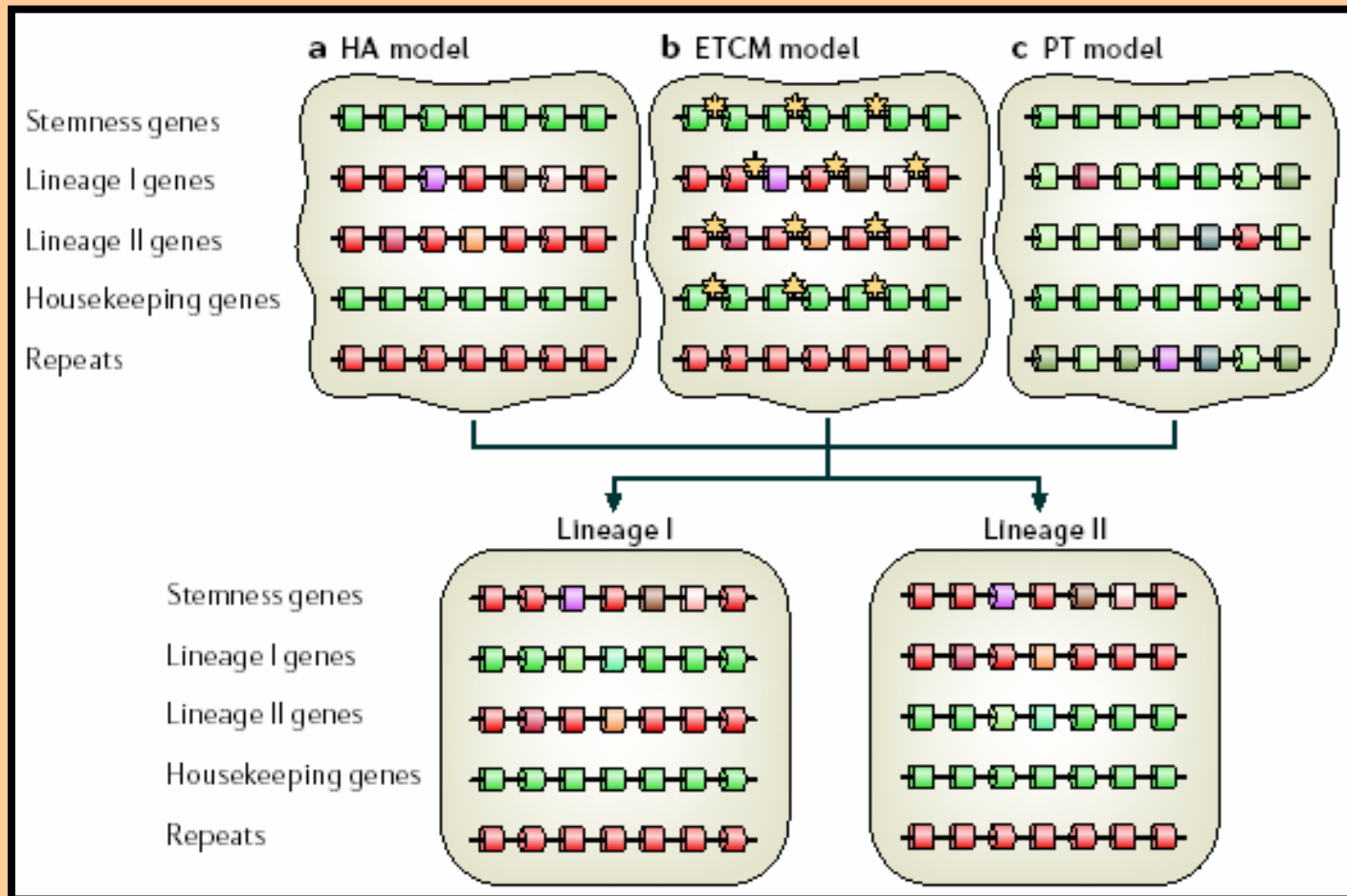
Modifikace histonů – regulace transkripce



Profil postranslačních modifikací (lysinových zbytků) histonů H3 a H4 u ES (J1, V6.5), EC a MEF buněk



Model změn transkripčního profilu v průběhu indukce diferenciace ES buněk



HA – model postupné (hierarchické) aktivace (hierarchical activation) → metylace DNA

ETCM – model povolené/umožněné transkripce (early transcription competence marks)
→ modifikace histonů

PT – model promiskuitní transkripce (promiscuous transcription)

→ kombinace transkripčních faktorů a transdukce signálu

Polycomb group (PcG) x Trithorax group (trxG) proteins

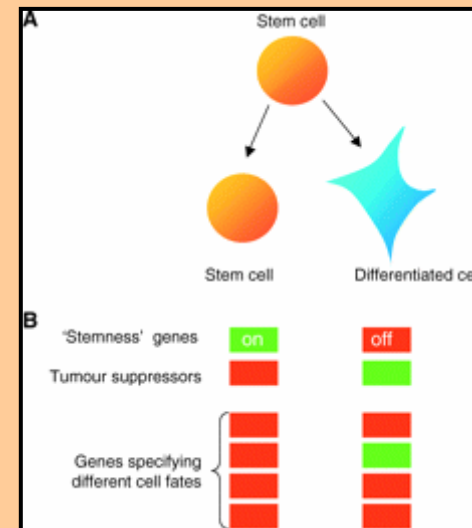
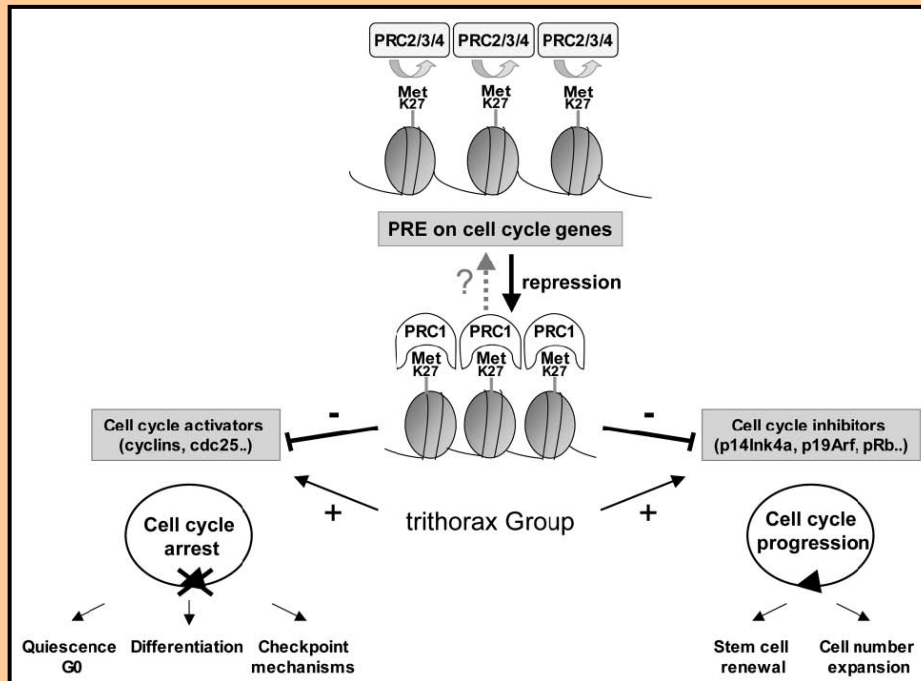
PcG jsou odpovědné za inaktivaci transkripce cílových oblastí
 trxG jsou odpovědné za aktivaci transkripce cílových oblastí

- obecně patří mezi skupinu proteinů modifikujících chromatin
- regulují zejména transkripci homeotických genů – význam v ontogenezi
- jsou odpovědné za epigenetickou paměť genomu
- rozpoznávají specifické a vzájemně málo homologní skvence DNA

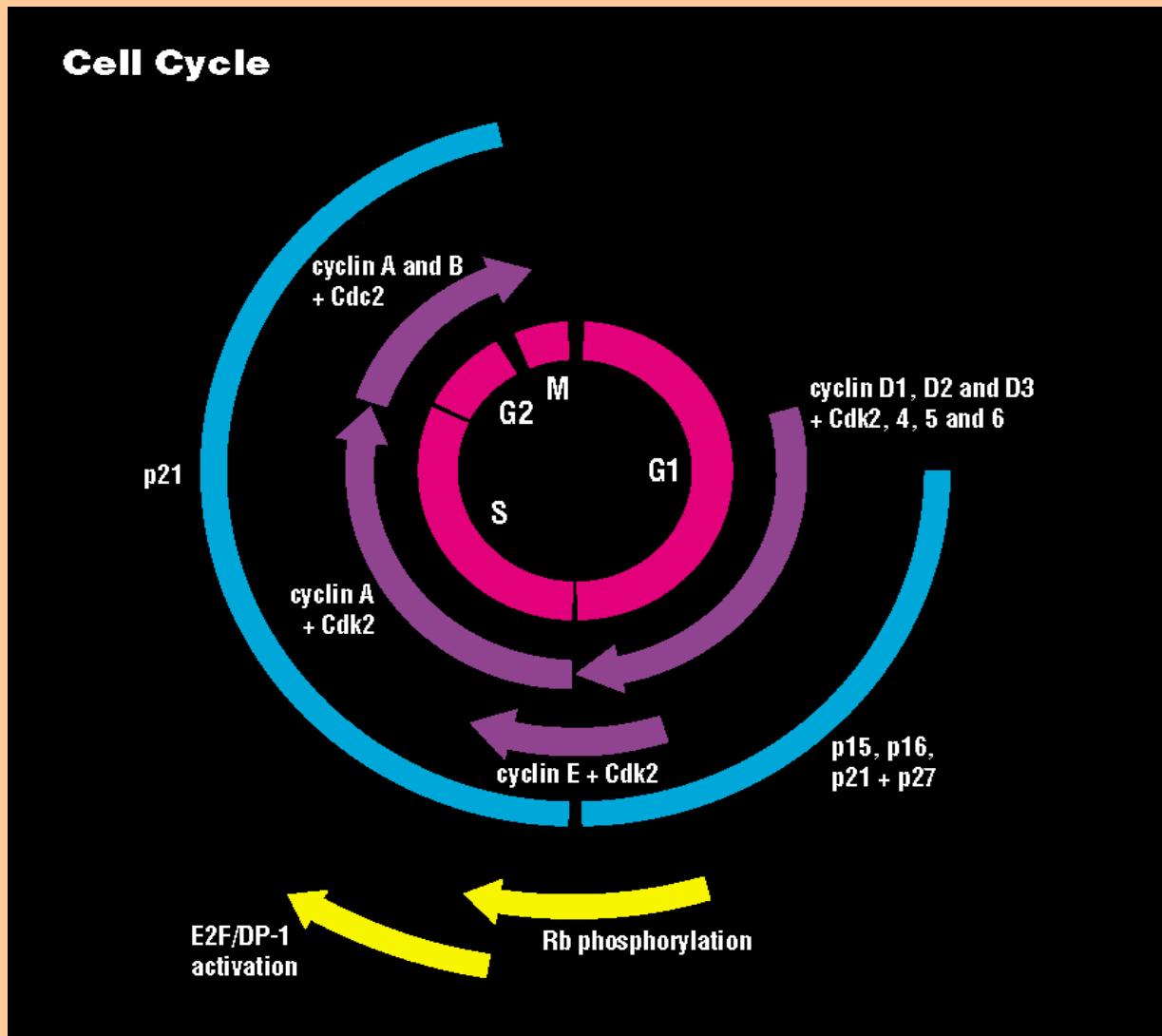
PRE – PcG responsive element

TRE – trxG response element

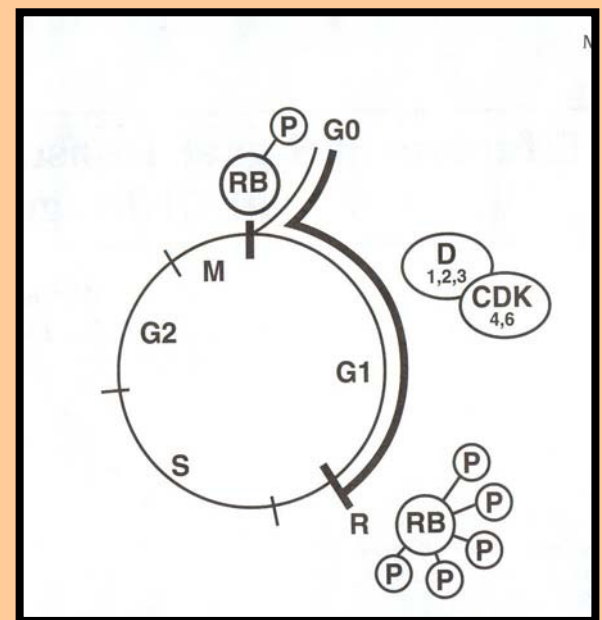
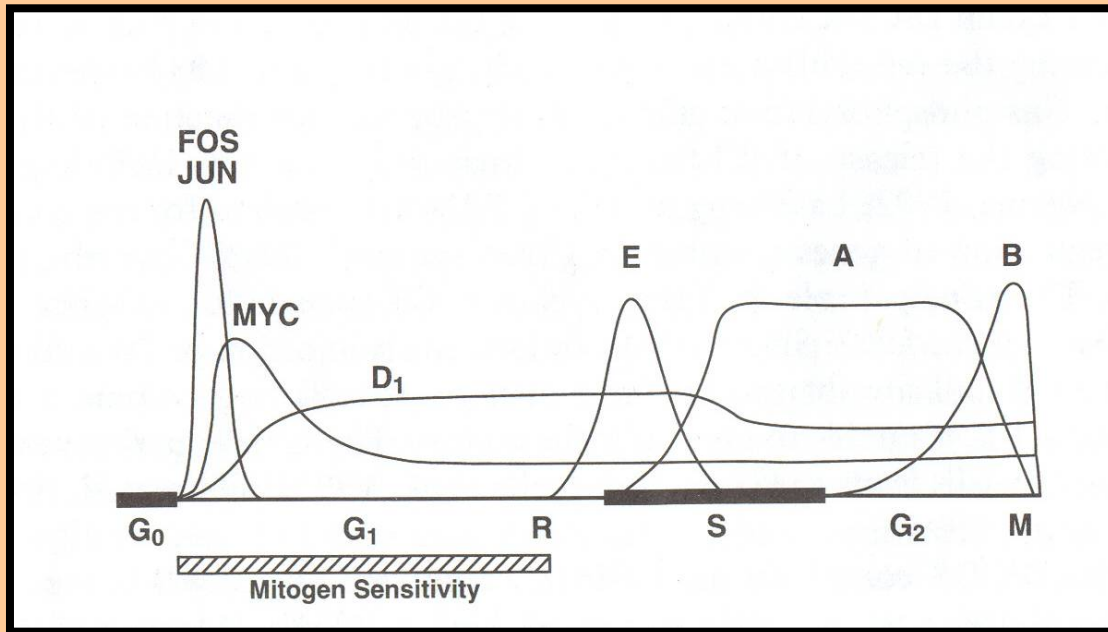
- jedná se o proteinové komplexy se základní jednotnou strukturou (PcG 4 základní skupiny komplexů), specifita těchto komplexů k daným PRE/TRE je dána dalšími asociujícími specifickými podjednotkami



Proliferace ES buněk



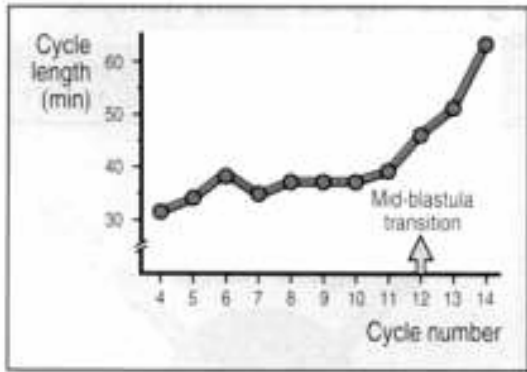
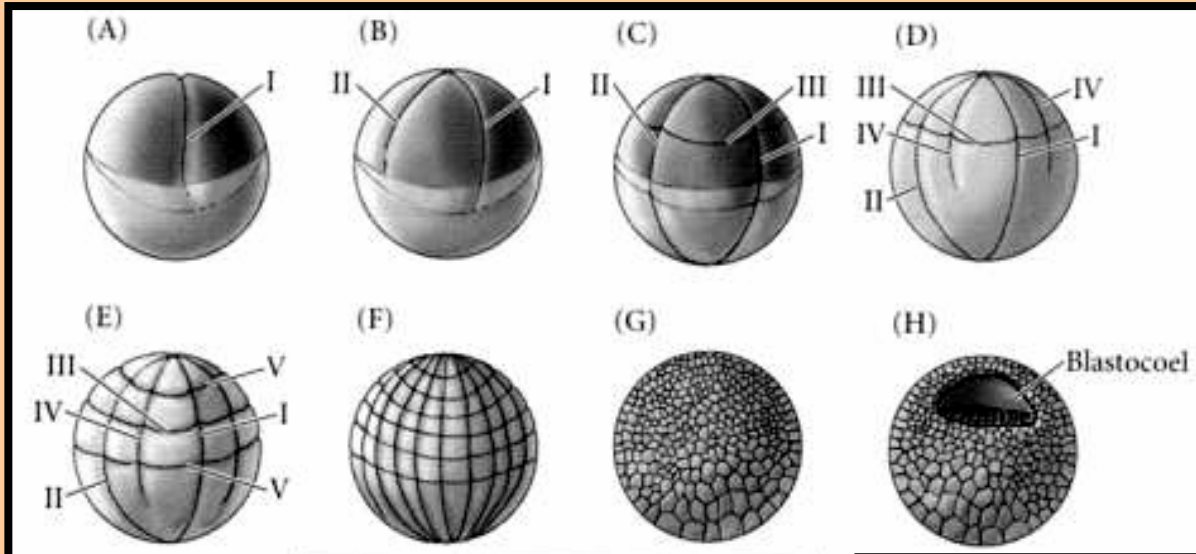
S laskavým nedovolením z katalogu Santa Cruz Biotechnology, Inc.



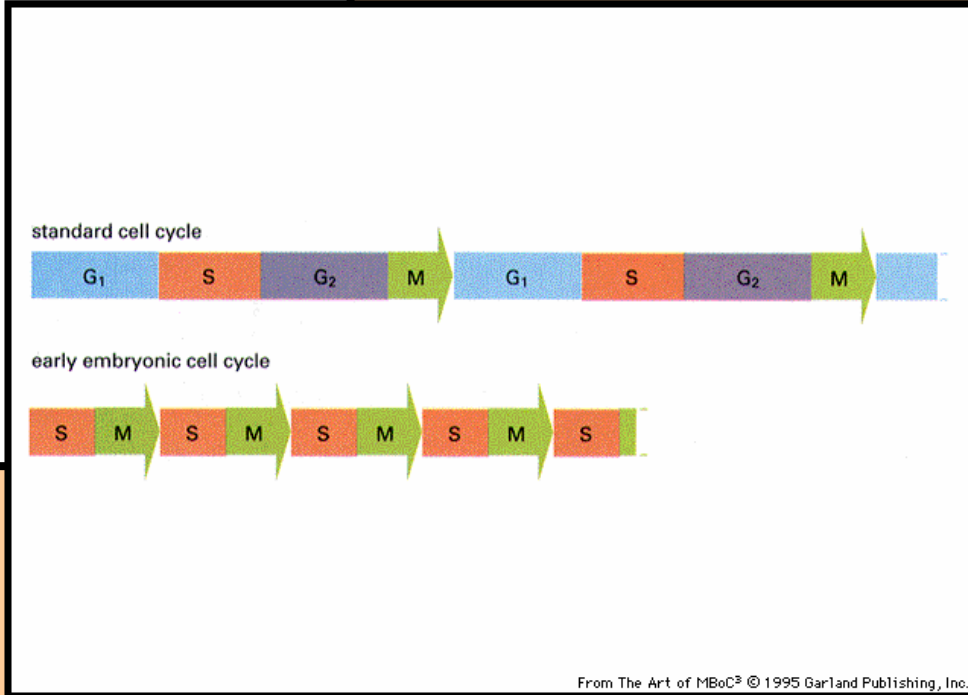
- ES buňky relativně intenzivně proliferují (podobné nádorovým buňkám)
- G₁ fáze buněčného cyklu je krátká (u mES ~ 1.5 h), zdá se, že chybí G₁-checkpoint*
- velké procento buněk je v S fázi buněčného cyklu (mES > 60%, hES > 50%)
- doubling time mES ~ 10-12h, hES ~ 18-20h
- specifická charakteristika regulace buněčného cyklu (odolnost k p16, nízká hladina cyklinů D, vysoká hladina cyklinu E, není potřeba proteinů rodiny Rb)
- inhibice proliferace, prodloužení G₁ fáze (suboptimální podmínky) vede k diferenciaci a apoptóze, diferenciaci a apoptóza ES buněk, však nemusí vést ke snížení proliferace jako takové

*tzv. kontrolní bod R, o průchodu tímto bodem rozhodují zejména mechanismy rozpoznávající integritu/neporušenost genomu, buňky s poškozenou DNA jsou za normálních okolností v tomto bodě zastaveny. Porucha tohoto kontrolního mechanismu je typická pro nádorové buňky.

Rozdílné proporce v jednotlivých fázích cyklu u časných embryonálních buněk

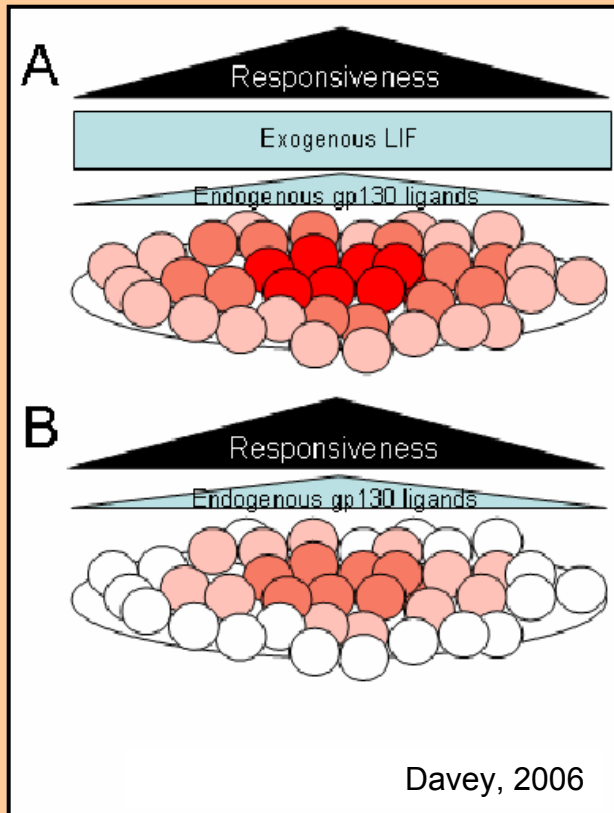


Timing of the cell cycle during cleavage in *Xenopus*.



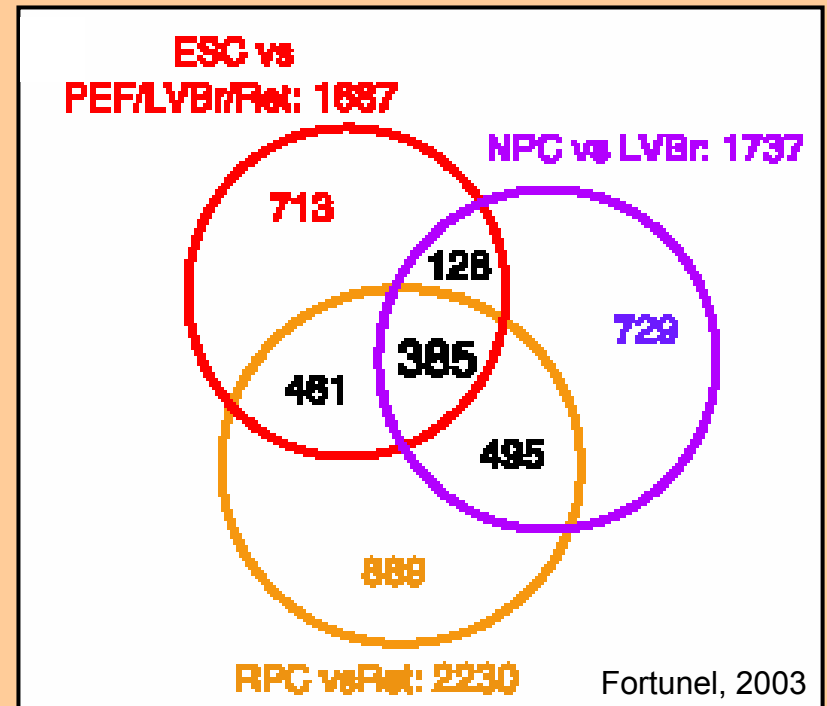
Jak vypadá správná ES buňka?
Jsou všechny ES buňky v kultuře stejné?

LIF -> STAT3 aktivita u mES buněk



↓ pokračování

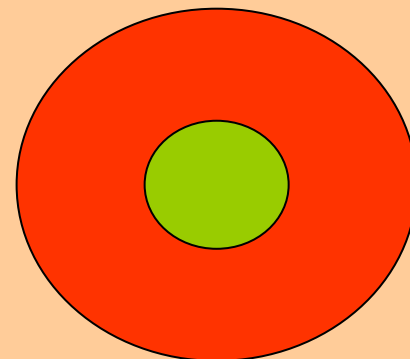
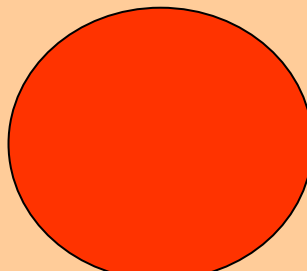
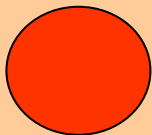
Microarray analýza exprese „stemness“ genů



↓ ↓ pokračování

**Model narůstající heterogenity v rostoucí kolonii ES buněk
za dodržení známých optimálních kultivačních podmínek**

Myší ES



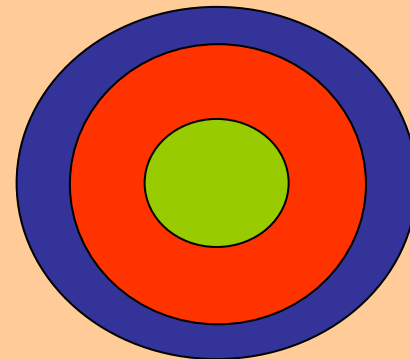
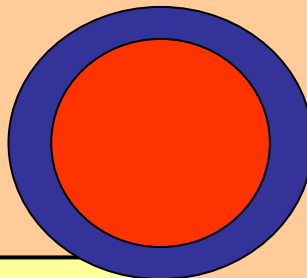
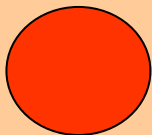
30<*

50<*

100<*

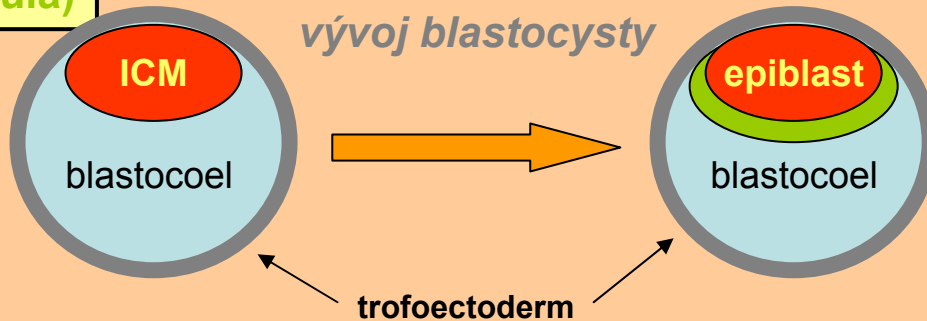
růst kolonie ES buněk

Lidské ES



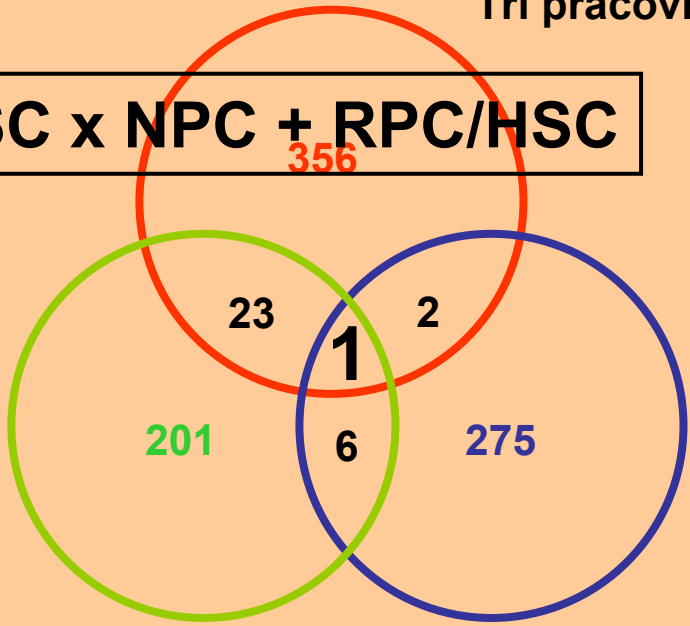
Buňky odpovídající buňkám ICM/epiblastu
Časného neuroektodermu
Buňky primitivního entodermu
(morphologicky navíc tvoří také malá granula)

*orientační počet buněk v kolonii

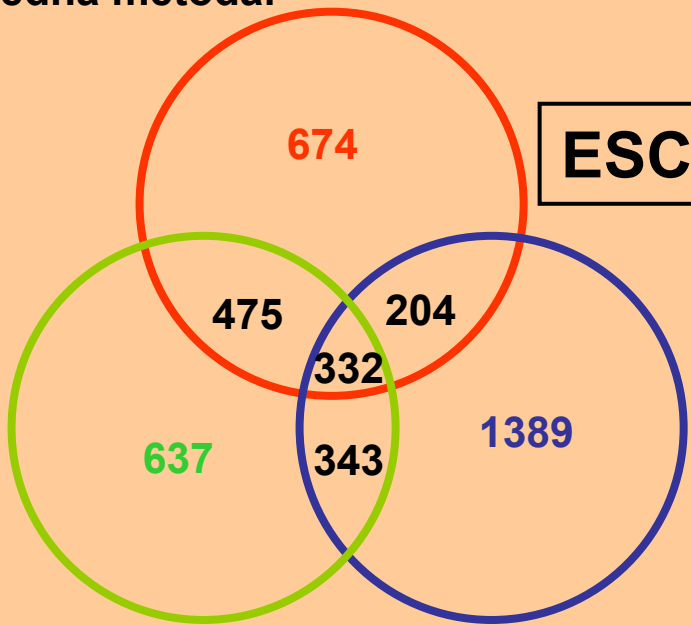


Variabilita v analýze transkripčního profilu u ES buněk (ESC), neurálních progenitorů (NPC), progenitorů retiny (RPC) a hematopoetických kmenových buněk (HSC) u myši.
 Tři pracovní skupiny, jedna metoda.

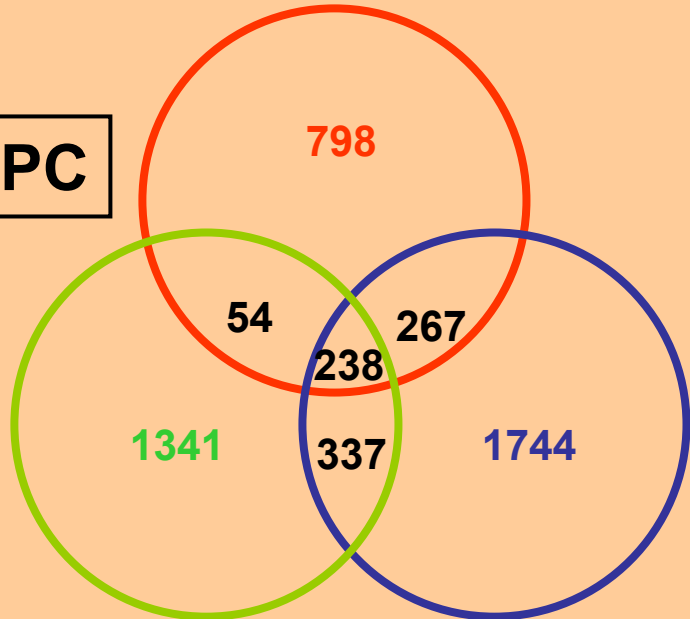
ESC x NPC + RPC/HSC



ESC

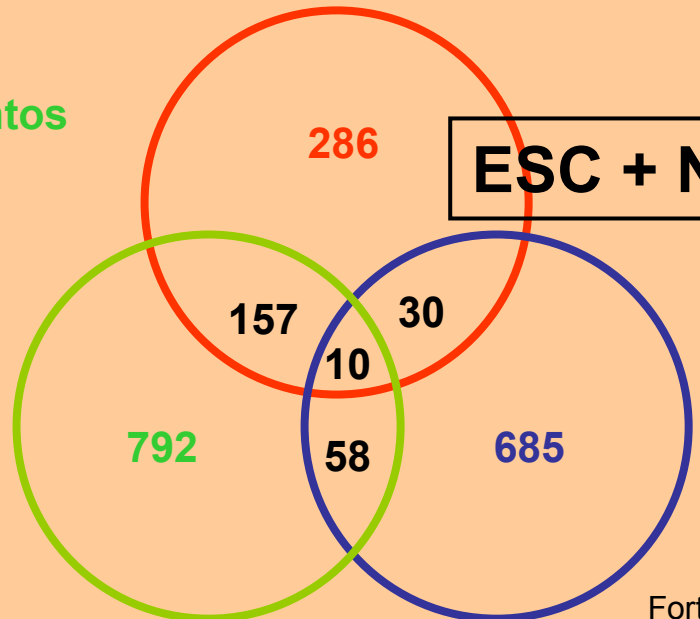


NPC



Fortunel
 Ramalho-Santos
 Ivanova

ESC + NPC



Existují geny kmenovosti, tzv. „stemness geny“ ?

Vývojově specifické geny
=> potenciál buněk

+

Příslušné signální dráhy, specifický patern jejich aktivit
=> regulace diferenciacce, proliferace, sebeobnovy

Chromosomální stabilita a ES buňky

Draper, 2004; Hanson, 2005

- dlouhodobá kultivace ES buněk vede k selekci odolnějších klonů a subpopulací
- menší rezpozivnost na vnější signály, rychlejší proliferace, menší nároky na kultivaci, klíčové znaky často zachovány (Oct-4, Nanog, příslušné SSEA,...)
- u myši snížena schopnost tvorby chimér a zřejměna germline u těchto chimér
- často spojeno s genetickou manipulací (knock-out, -in ES linie)

- nestabilita chromosómů, polyploidie, trizomie, zlomy a přeskupování genů
=> adaptace na *in vitro* podmínky

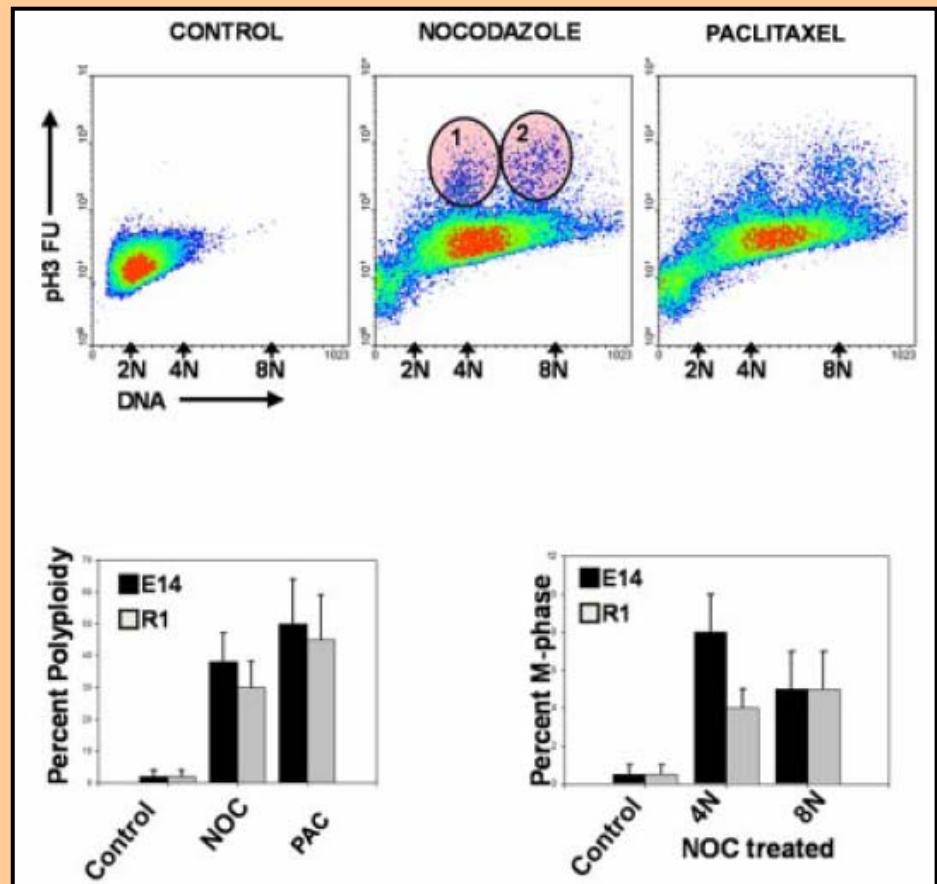
- **hES**, primární je trizomie chromozomu 12 nebo 17, vzácněji chromosomu 14 a 20
- často dochází i ke zdvojení dlouhého raménka chromosomu 17 a k translokaci této kopie na dlouhé raménko chromosomu 6 => posílení exprese genů na chromosomu 17 (Survivin – proti apoptóse, STAT3 – self-renewal mES a nadbytek u většiny nádorů, GRB2 a 7 (growth factor receptor bound protein, viz. signální transdukce))
- na chromosomu 12 je lokalizován *nanog* (Nanog)
- časté i změny malých oblastí na chromosomech 1, 8, 18 a 20
- u **mES** se jedná o změny zejména chromosomů 8 a 11
(myší chromosom 11 je z části ekvivalentní k lidskému chromosomu 17)

Apoptická kontrola nestability karyotypu a ES buňky

Checkpoint-apoptosis.... of karyotypic instability. Mantel, 2007

- u zdravých somatických buněk při poruchách mitotického aparátu během jejich dělení a tak vznikající chyby v mitóse vedou k jejich přechodu do senescentního stavu nebo k indukci apoptósy
- **ES buňky mají zvýšenou toleranci k poruchám mitózy**, menší citlivost tzv. SAC (SAC – spindle assembly checkpoint)
- => akumulace aneuploidních a polyploidních buněk v populaci
- indukci diferenciace lze tyto buňky částečně eliminovat (apoptósa)

- tetraploidní buňky (blastomery) mohou tvořit jen trofoblast
- => G₁ MTA/tetraploidity checkpoint
- => využití při tvorbě embryí plně ES původu



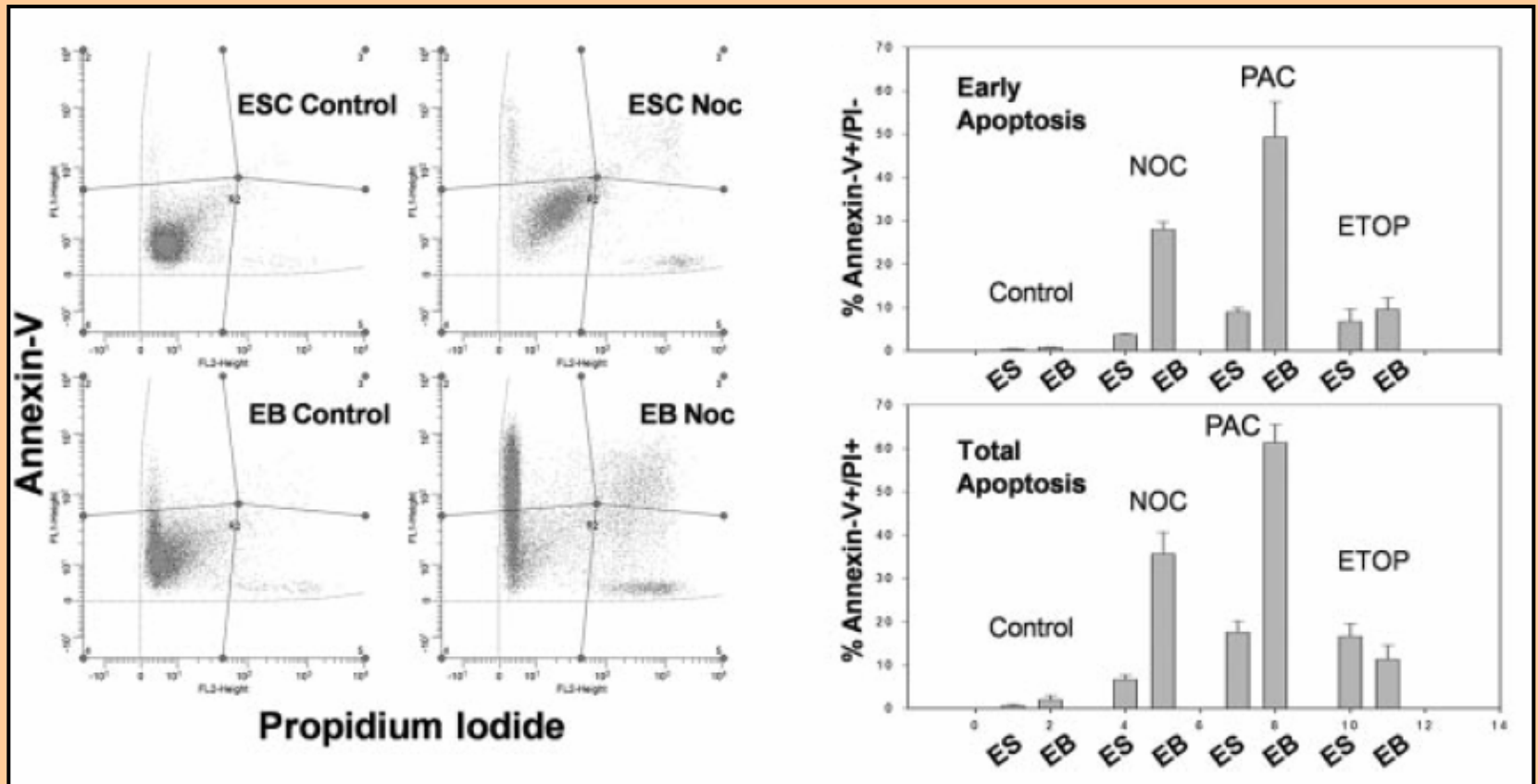
Příklad nárůstu apoptózy s diferenciací a poškozeným mitotickým aparátem

ES – embryonální kmenové buňky

EB – ES diferencovanou formou embryoidních tělísek

Noc/NOC – nocodazol

PAC - paclitaxel



VYUŽITÍ ES BUNĚK

1. Biologický a biomedicínský výzkum

- Příprava geneticky modifikovaných organismů
- Studium mechanismů časně embryogeneze / diferenciace
- Studium mechanismů kancerogeneze
- Studium embryotoxicity
- Testování farmak

2. Lékařství

- Buněčné a tkáňové terapie
- Příprava biologicky aktivních preparátů
- Nosiče biologicky aktivních látek (*pathotaxe*)

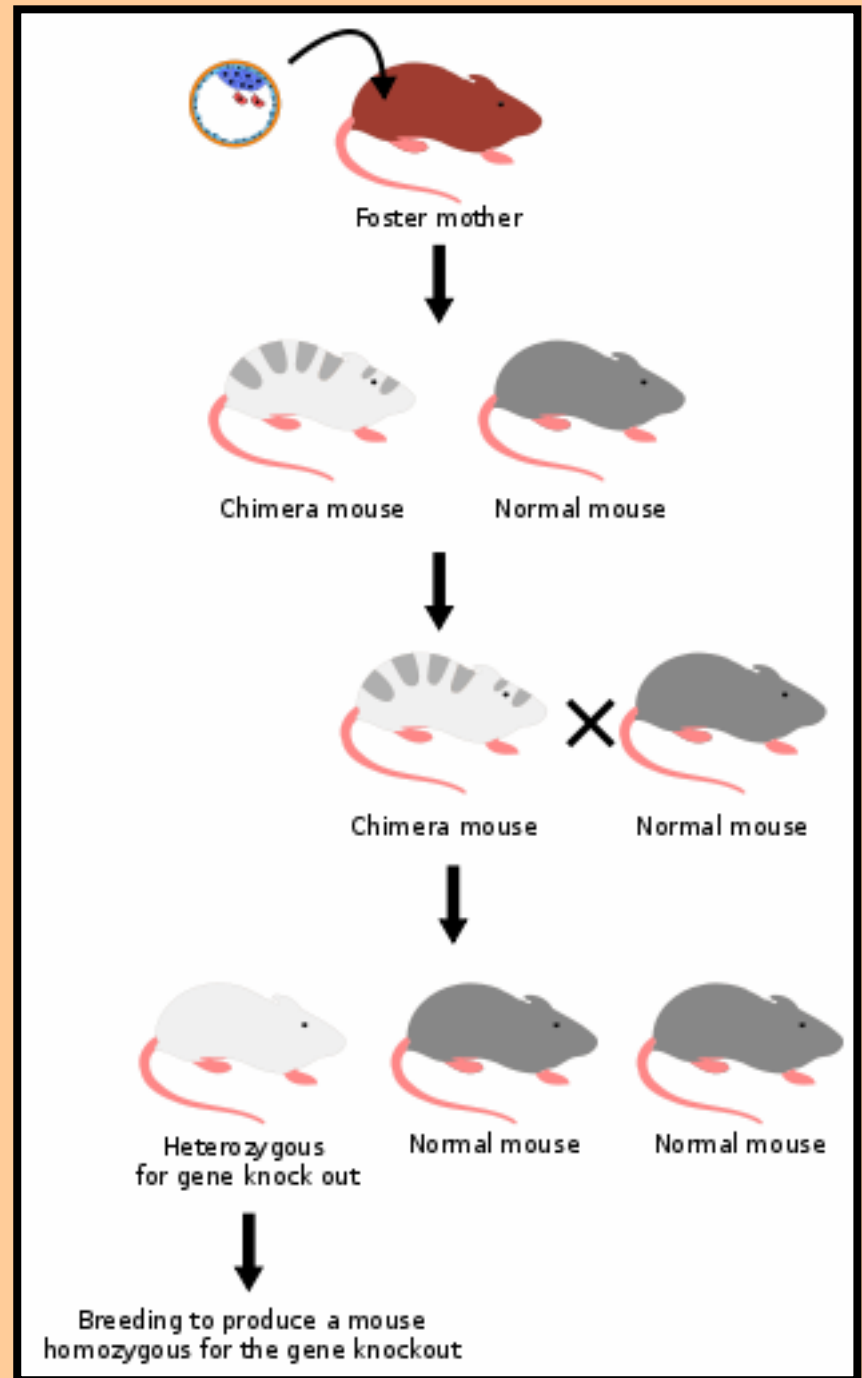
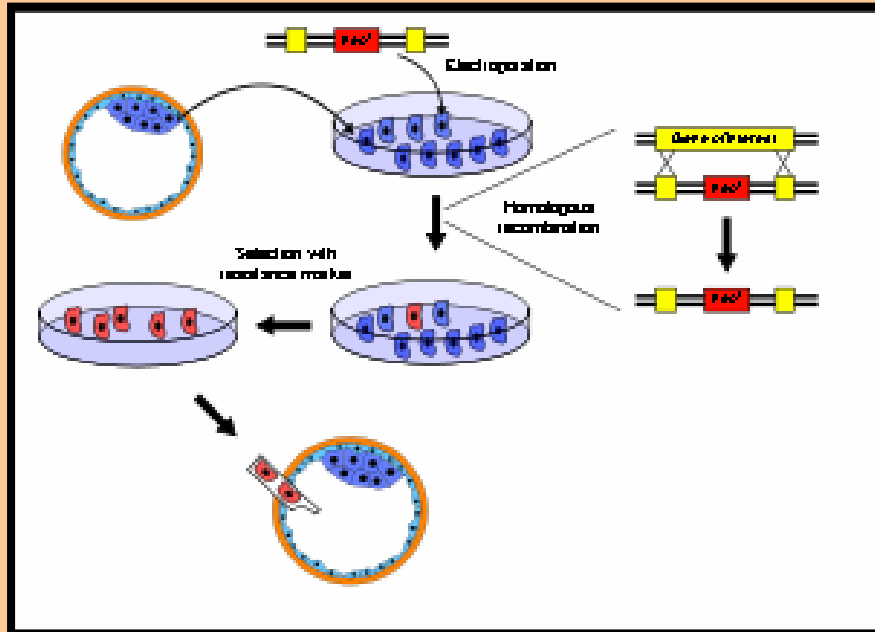
Příprava geneticky modifikovaných organismů - GMO

Pro vytvoření linie GMO je potřeba, aby požadovaná genetická modifikace byly obsažena i v pohlavních buňkách. Tuto modifikaci je tedy potřeba provést na buňkách toti- nebo pluripotentních.

- Náhodným nebo cíleným(?) vložením požadované DNA do zygoty
- **Náhodným nebo cíleným vložením požadované DNA do ES buněk**

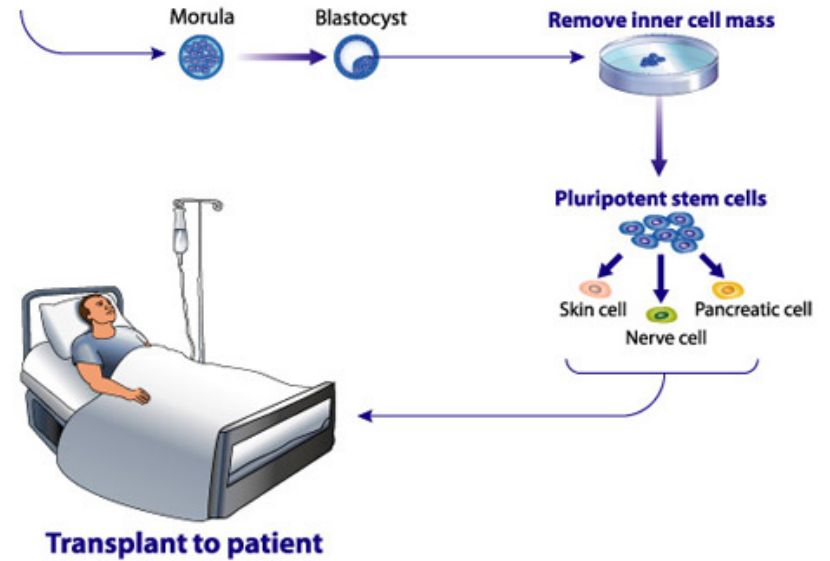
- **Díky prakticky neomezené možnosti kultivace ES buněk, lze mít prováděnou genetickou modifikace plně pod kontrolou, a také ji můžeme velice přesně naplánovat!!!**
- **ES buňky jsou pluripotentní, po zpětné injikaci do blastocysty a vložení této blastocysty do dělohy pseudo-pregnantní myši, blastocysta pokračuje ve vývoji a vzniklý jedinec je chimérou buněk původní ICM a injikovaných ES na úrovni všech tkání, tedy i zárodečné.**

Příprava KO myši



ES buňky v buněčné terapii

In vitro fertilization



by [Cell Imaging Core](#) of the Center for Reproductive Sciences.

SCNT

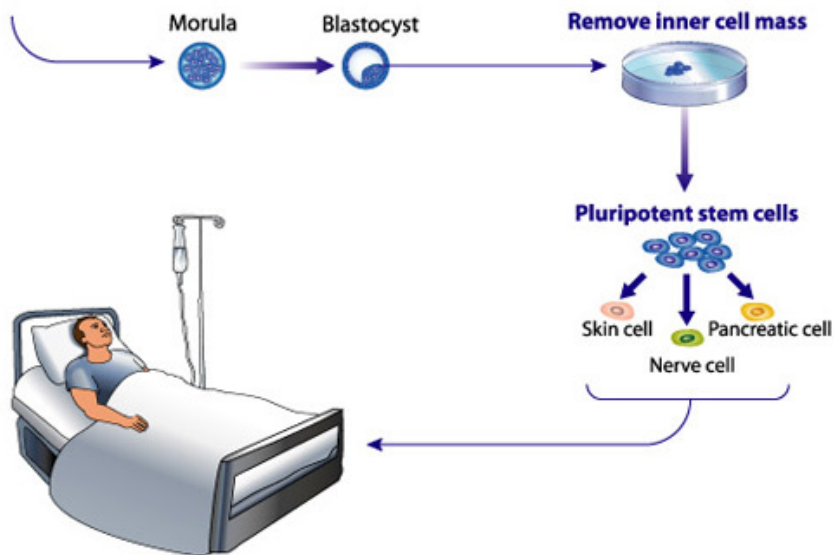
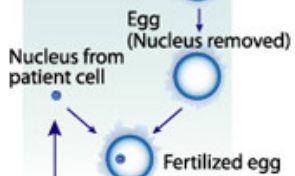


Illustration by [Cell Imaging Core](#) of the Center for Reproductive Sciences.

Diferenciace ES buněk

a) *In vivo*

- teratomy: injekce suspenze ES buněk do vaskularizované tkáně imunitně tolerantního zvířete, popřípadě do zvířete s farmakologicky potlačenou imunitní odpovědí
- chiméry: injekce ES buněk do blastocysty, navrácení takové blastocysty do pseudo-pregnantní myši = vznik chimerického jedince

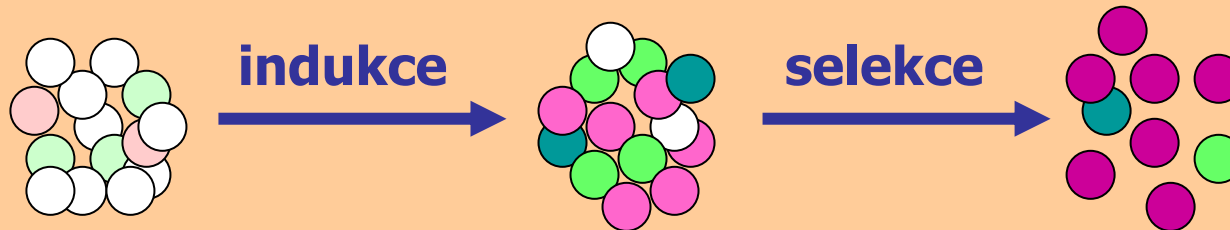
b) *In vitro*

- metodiky korespondující s ontogenezí
- metodiky získané empiricky (kopírující ontogenezi?)

Musí buňka diferencující z ES buňky vždy kopírovat ontogenezi aby dosáhla určitého stavu?

In vitro diferenciace ES buněk

kultivace

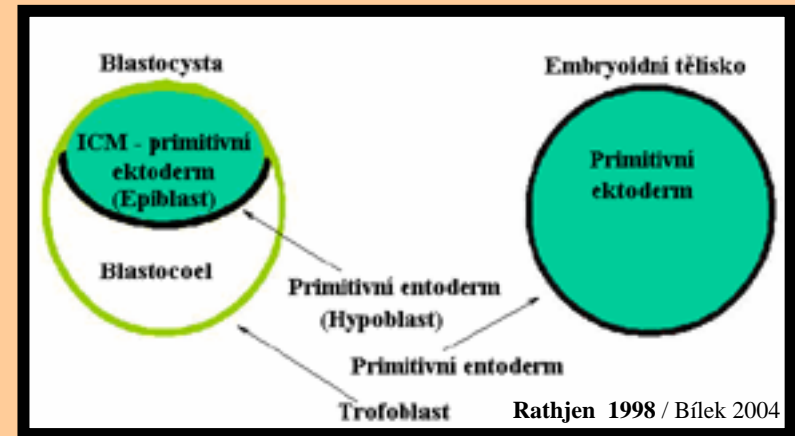


a) Embryoidní tělíska (Embryoid bodies - EB)

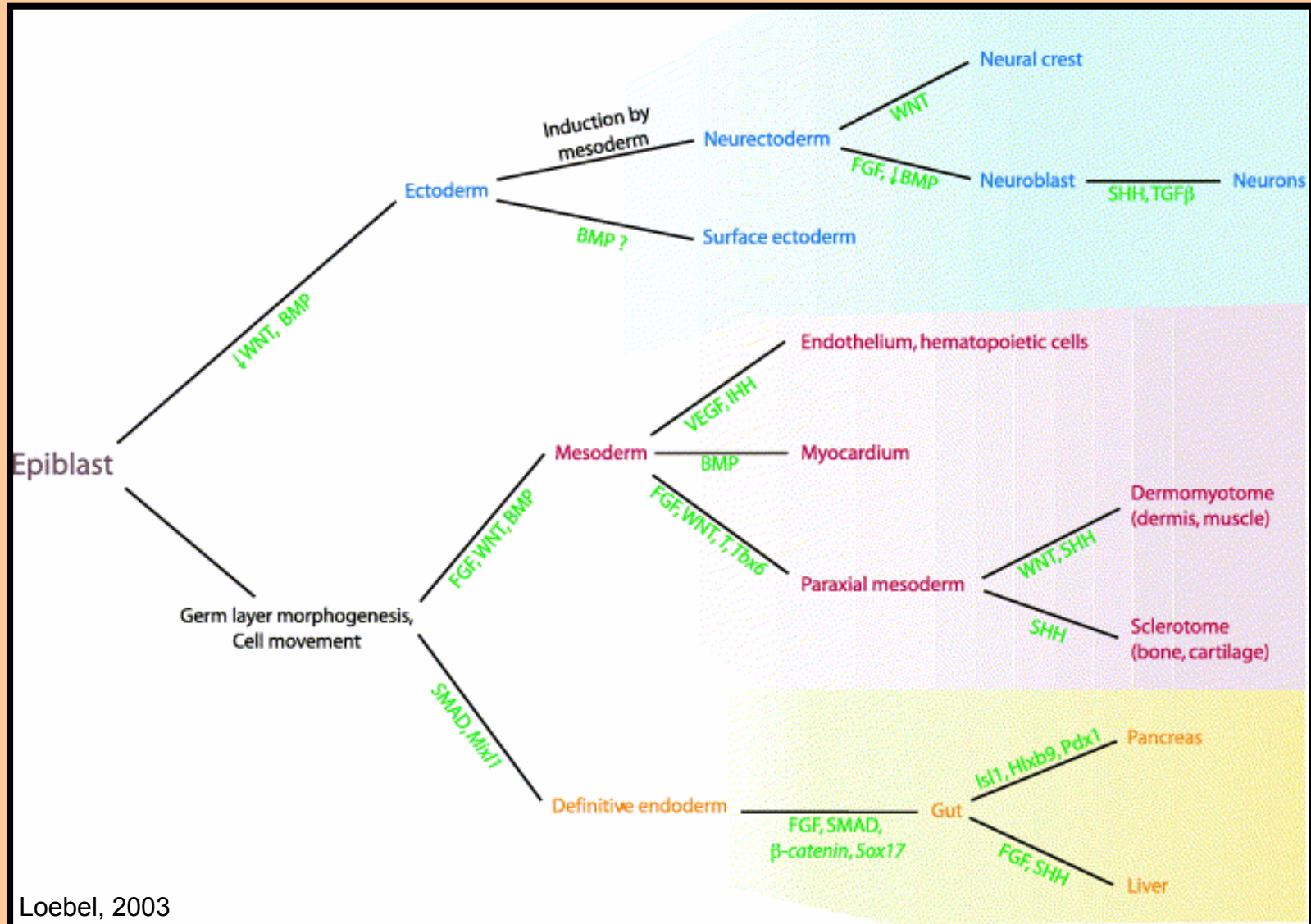
- EB)
- + *jednoduché, více buněčných typů*
- + *tolerující genotyp*
- *špatně definované podmínky*

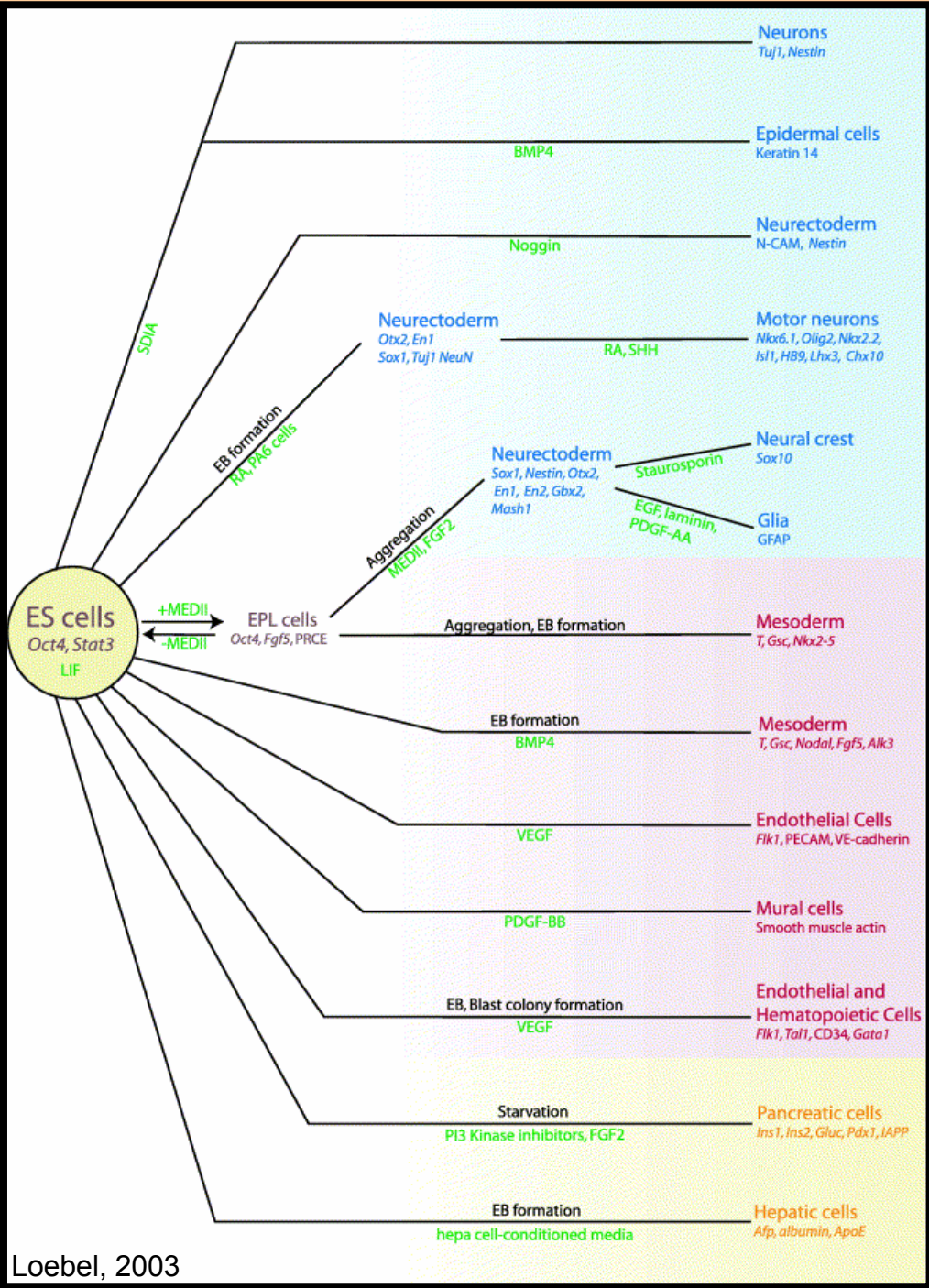
b) V monovrstvě

- + *dobře definované podmínky*
- *malá výtěžnost*
- *silně závislé na genotypu*

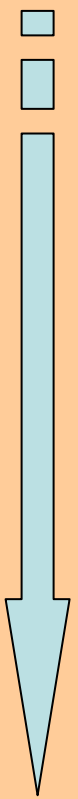


Úloha specifických růstových faktorů v ontogenezi myši

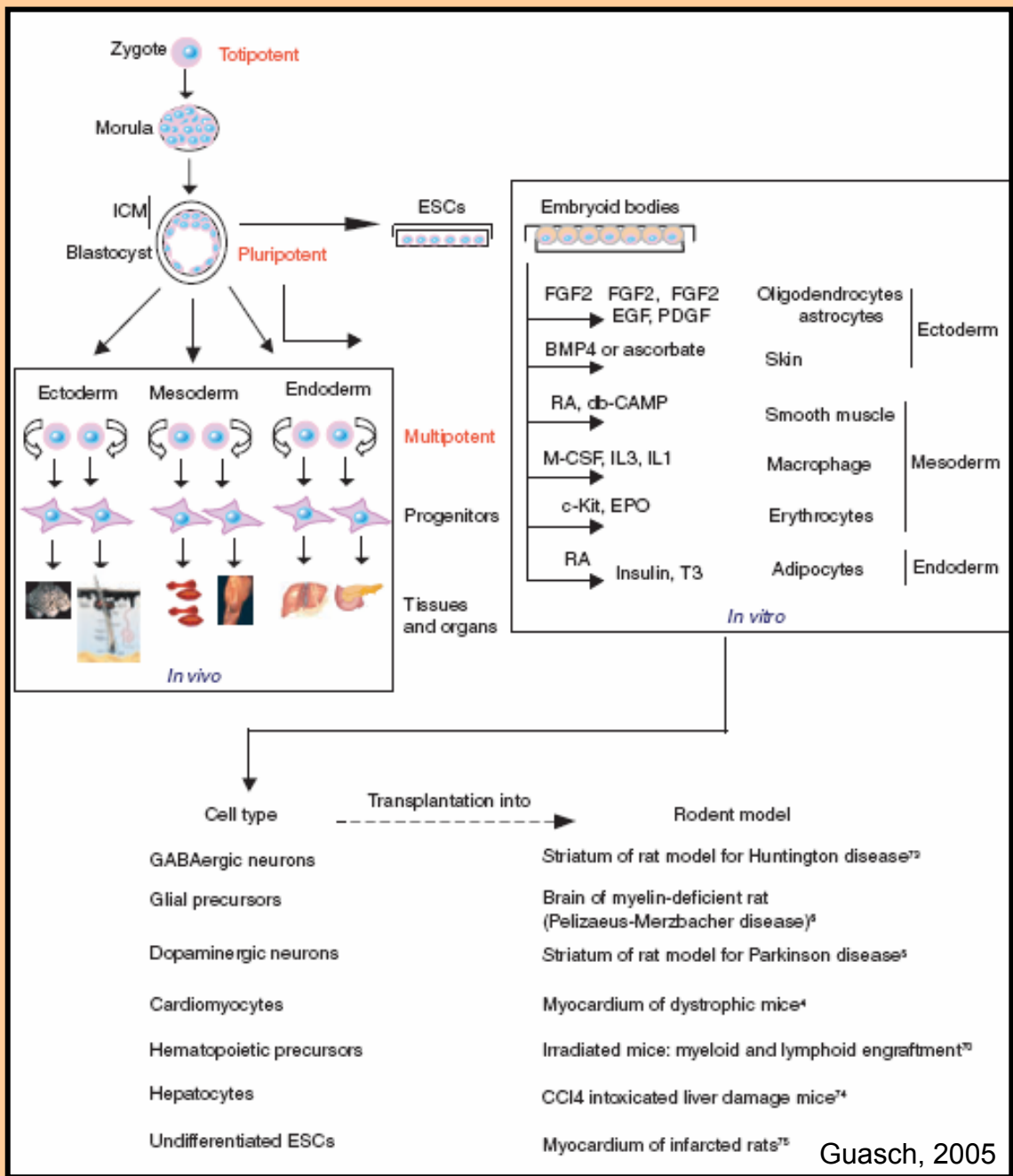




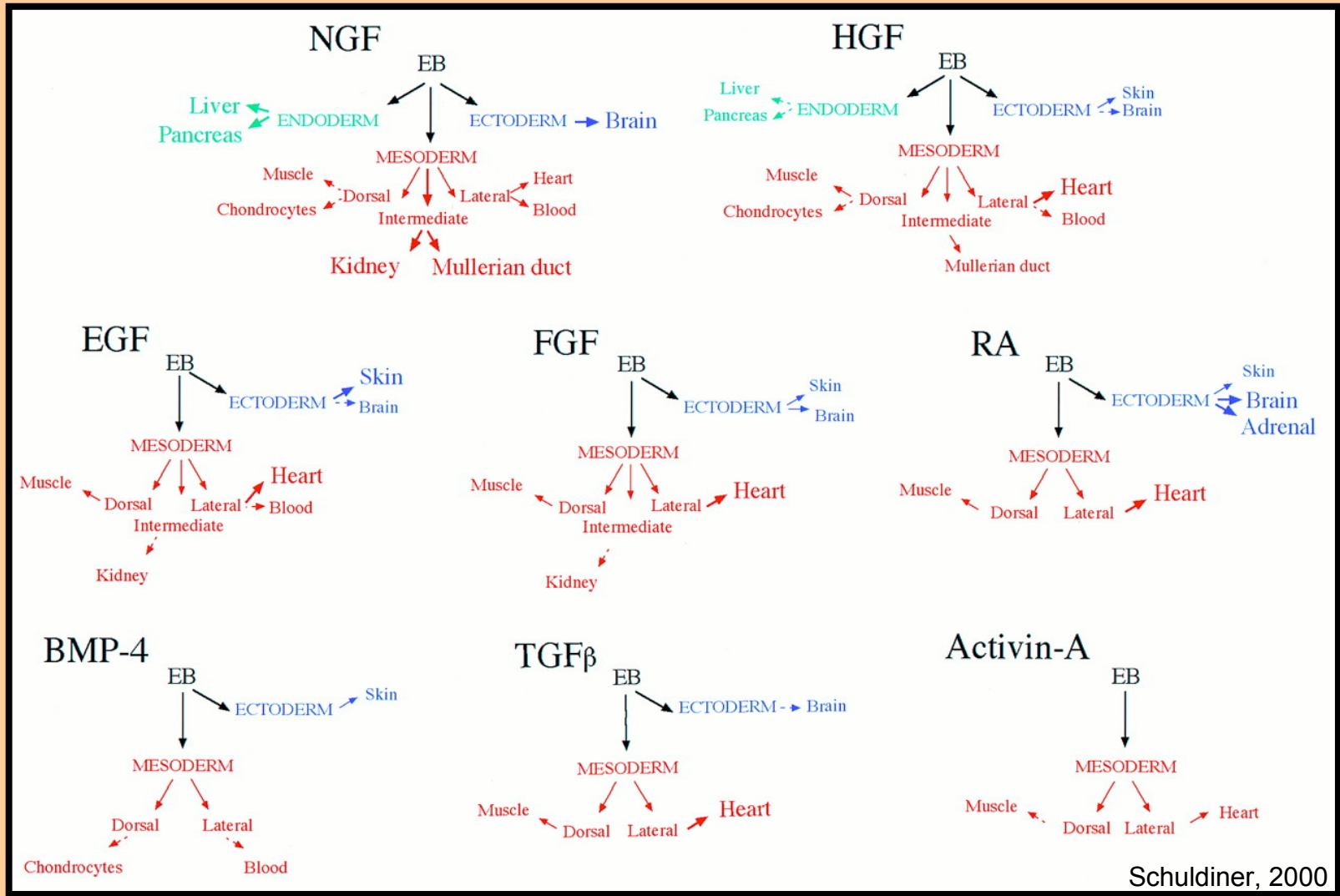
Příklady diferenciaci myších ES buněk kombinací typu jejich kultivace a specifických růstových faktorů s porovnáním úlohy těchto faktorů v myší ontogenezi



pokračování

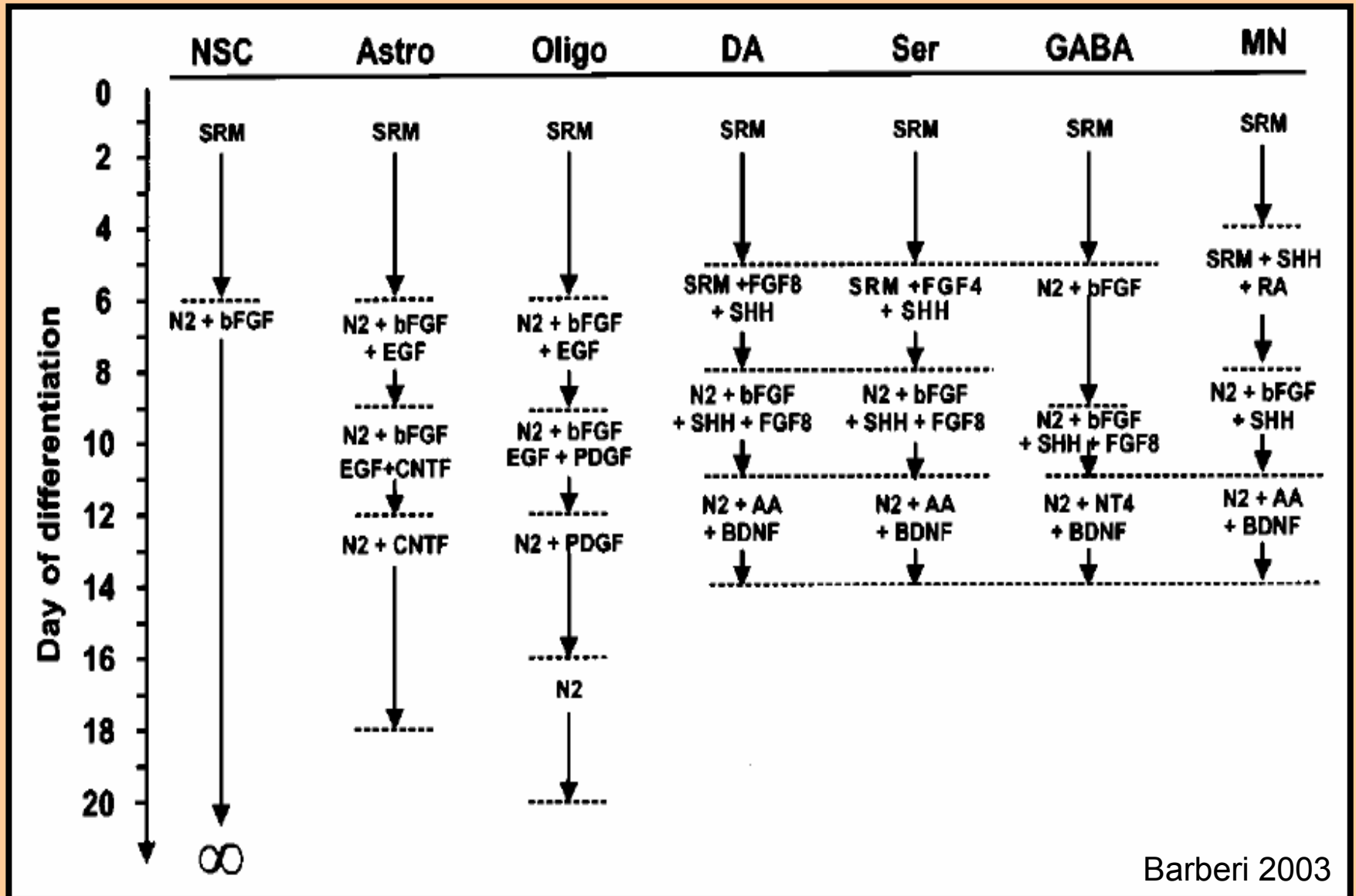


Příklad účinků jednotlivých specifických růstových faktorů na indukci diferenciace u lidských ES buněk v kombinaci s tvorbou embryoidních tělísek

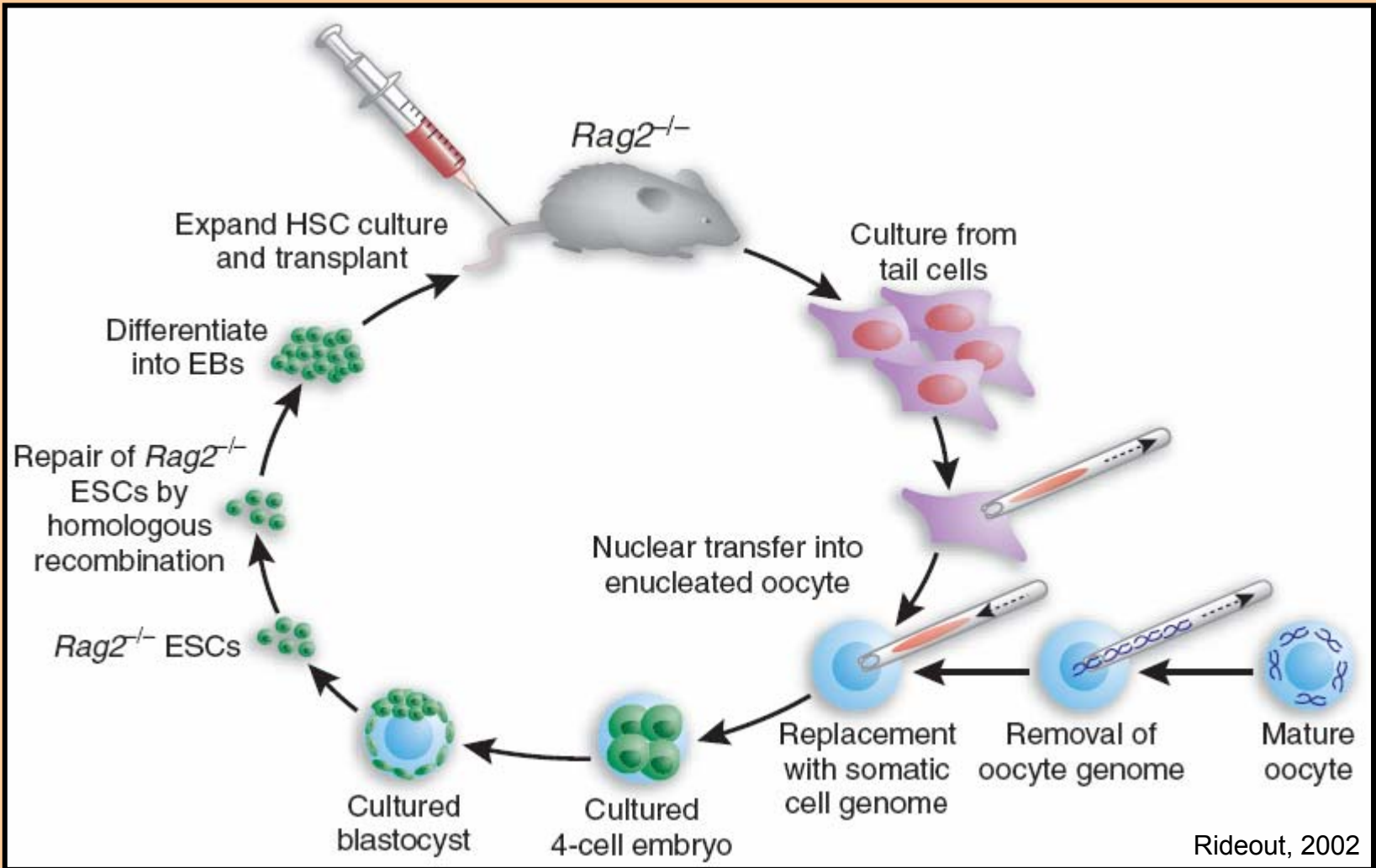


Příklad diferenciace ES buněk do různých typů neurálních buněk

NSC – neural stem cell, DA/Ser/GABA – dopaminergní/serotonergní/gabanergní neurony,
MN - motoneurony



Model regenerace poškozené hematopoesy v důsledku $Rag2^{-/-}$ mutace s použitím ES buněk, genetických manipulací a jaderného reprogramování



SOUČASNÉ PROBLÉMY S VYUŽITÍM ES BUNĚK V TERAPII



- hES se nedaří dlouhodobě kultivovat beze změn v genotypu / fenotypu
- dlouhodobá kultivace za sub-optimálních podmínek vede k dosud neznámým, epigenetickým změnám snižujícím schopnost pluripotence (ireverzibilními i pro cytoplasmu zygoty, Amano 2006)
- dosud není spolehlivě vyřešen potencionální vznik teratomů
- biologie a diferenciační potenciál ES buněk nejsou dosud dobře prozkoumány
- kultivace ES buněk je stále závislá na nedefinovaných faktorech
- etika získávání nových lidských ES linií
- finance, přes velice atraktivní potenciál, který v sobě ES buňky mají, není jisté, jestli současná společnost bude mít dost prostředků na jejich využití např. v buněčné terapii

Primordiální zárodečné buňky – PGC (primordial germ cell)

- PGC se u myši objevují již 6 dpc, pravděpodobně je jejich vznik indukovaný v průběhu gastrulace, a to vnějšími signály, zejména BMP (na rozdíl od žab, *Drosophily* a *C. elegans*).
- 6 – 7.5 dpc migrují vně vlastní embrya, později (8.5 dpc <) migrují podél zadního střeva embrya do vytvořené zárodečné lišty.
- PGC zanikají po usazení v zárodečné liště (10-13 dpc u myši), stávají se z nich zárodečné buňky. Prodělají ještě 2-3 mitózy a u samců vznikají prospermatogonie zastavené v G0/G1 fázi mitózy. U samic vstupují do meiotické profáze (obojí > 12.5 dpc).
- Podobně jako ICM a ES buňky mají vysokou hladinu alkalické fosfatázy (ale TNAP ne GCAP/TNAP), Oct4, Nanog, ..
- Významné jsou zdá se zejména *Stella* a *Fragilis*.
- PGC nejsou pluripotentní!
- PGC mají omezený počet dělení, u myši napočítáno kolem 1000 buněk, rozdíly v závislosti na imbrední lini

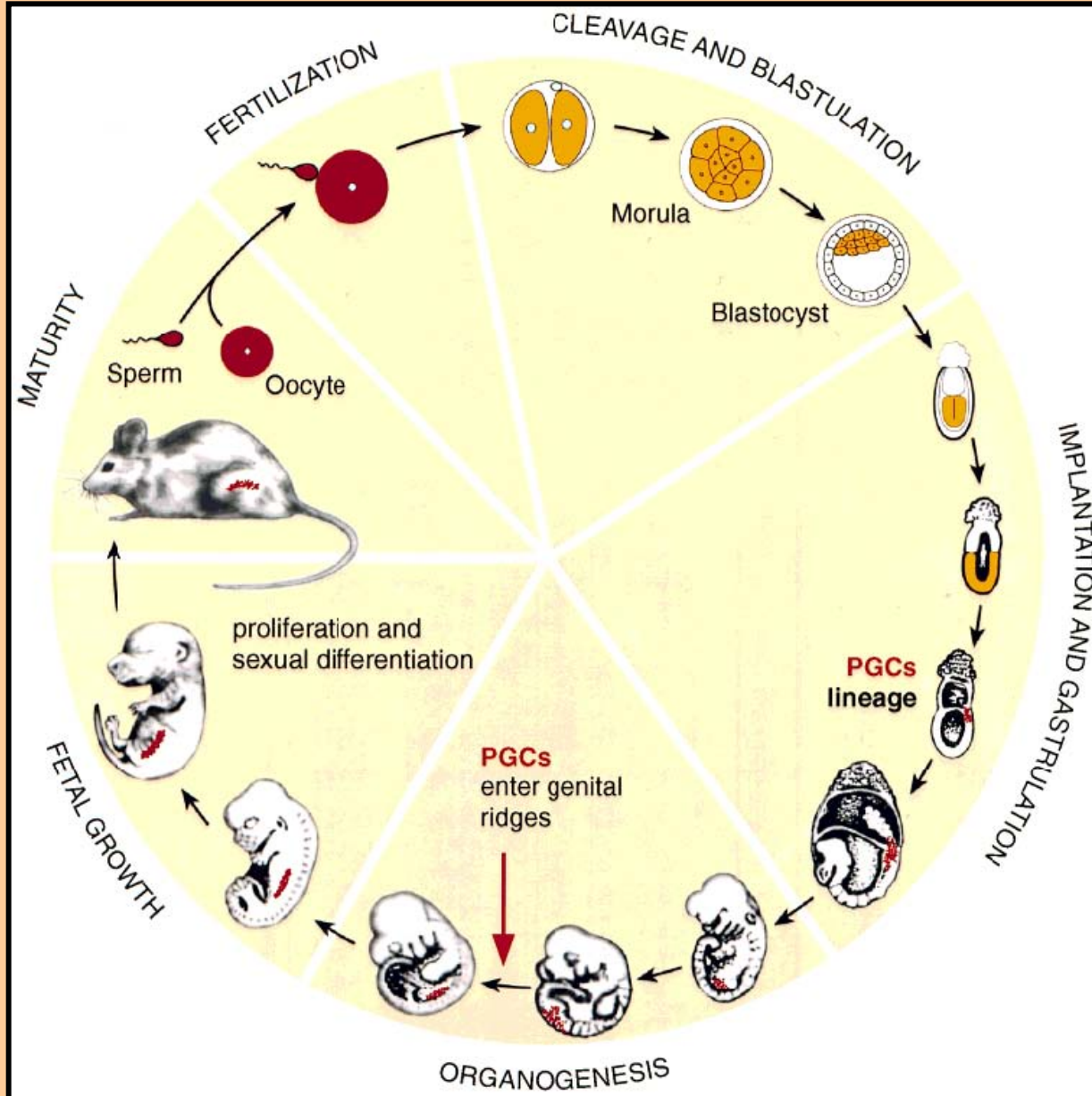
Stella

Také u buněk ES a epiblastu, později jen u PGC, podílí se na udržení jejich fenotypu, po jejich usazení v zárodečné liště jeho exprese vymizí.

Fragilis

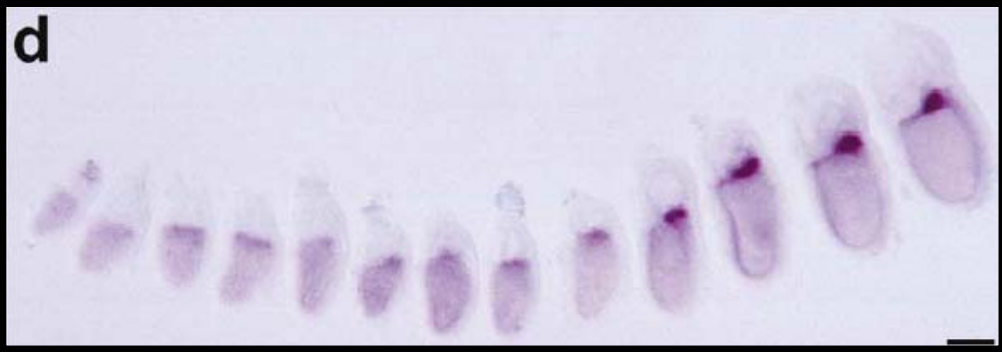
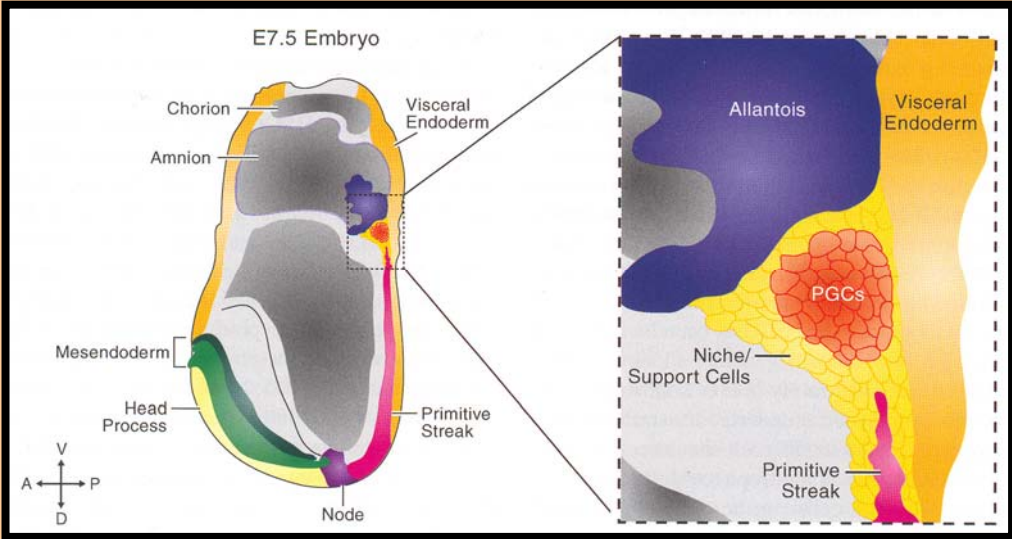
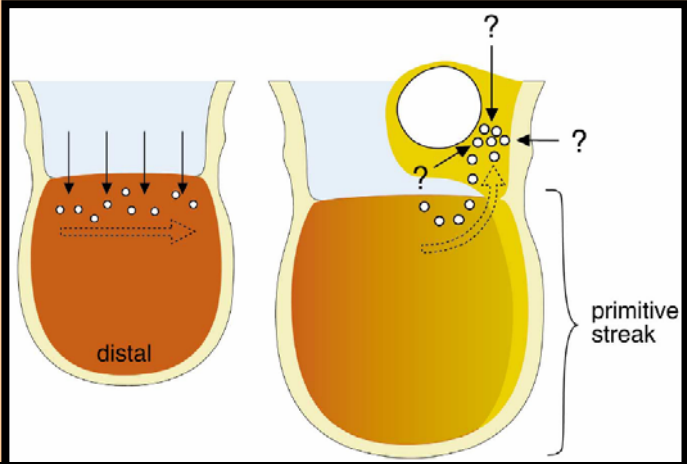
Z rodiny IFN indukovaných genů, je silně exprimován při formování PGC, s jejich migrací jeho exprese klesá.

Cyklus zárodečných buněk u myši



PGC

primordiální zárodečné buňky

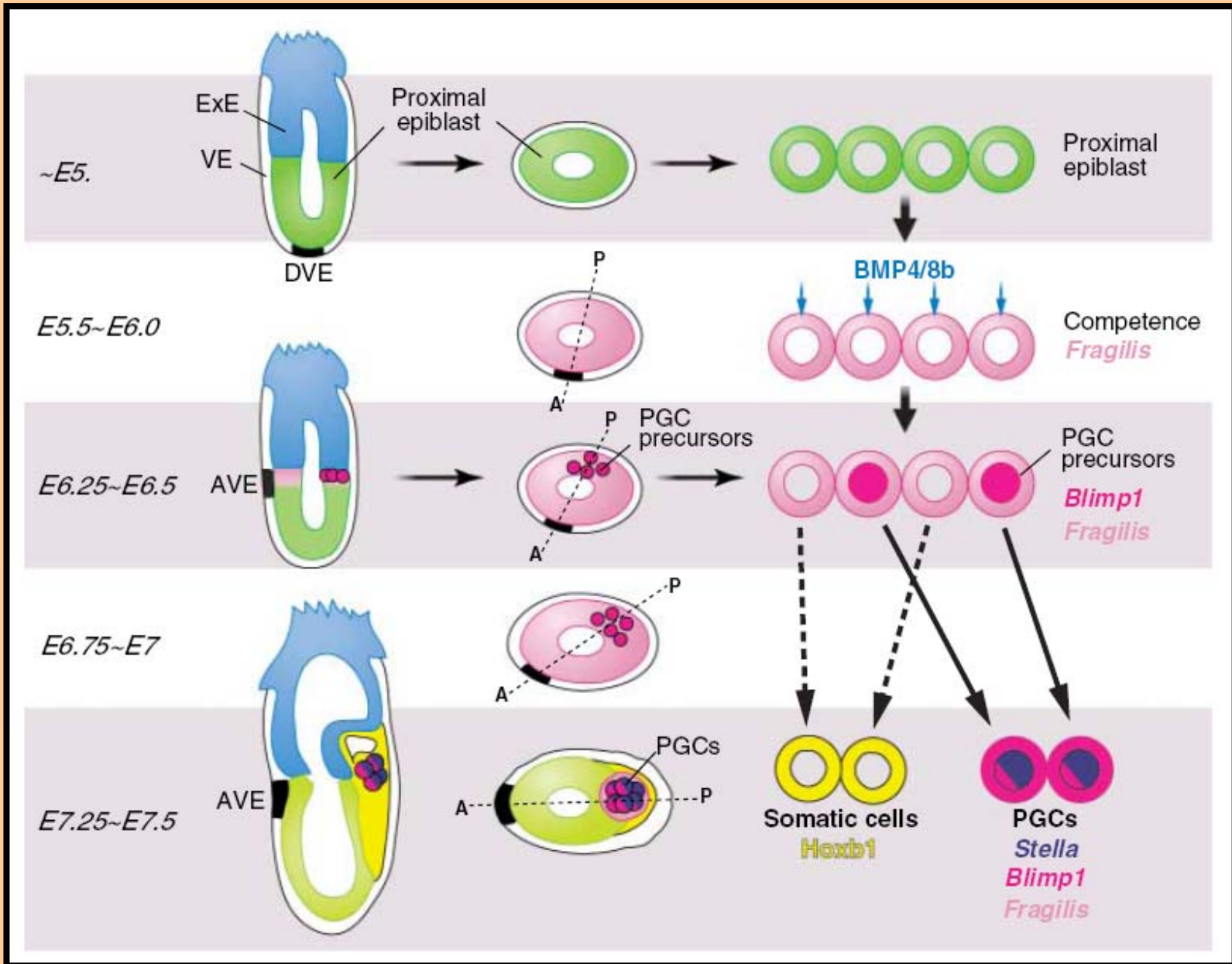


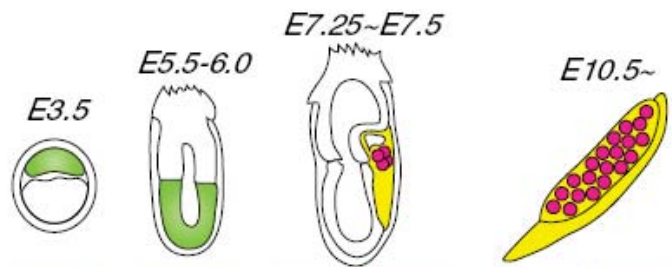
Expresse Fragilis mezi 6 – 7 dpc



Expresse Oct-4 v PGC usazených v zárodečné liště

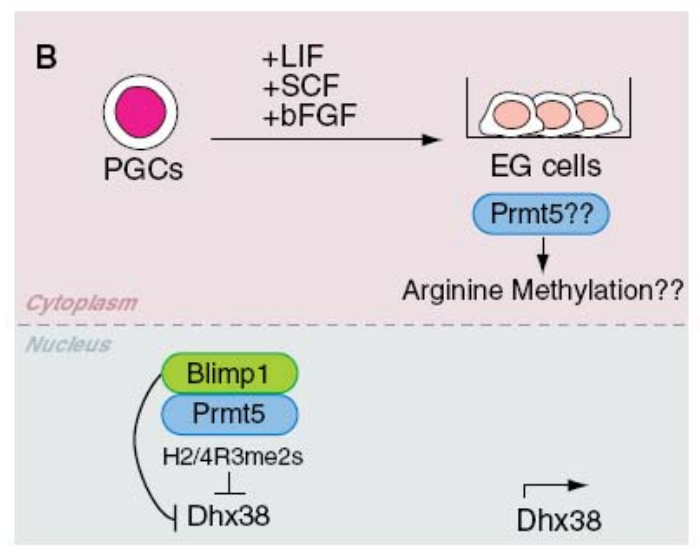
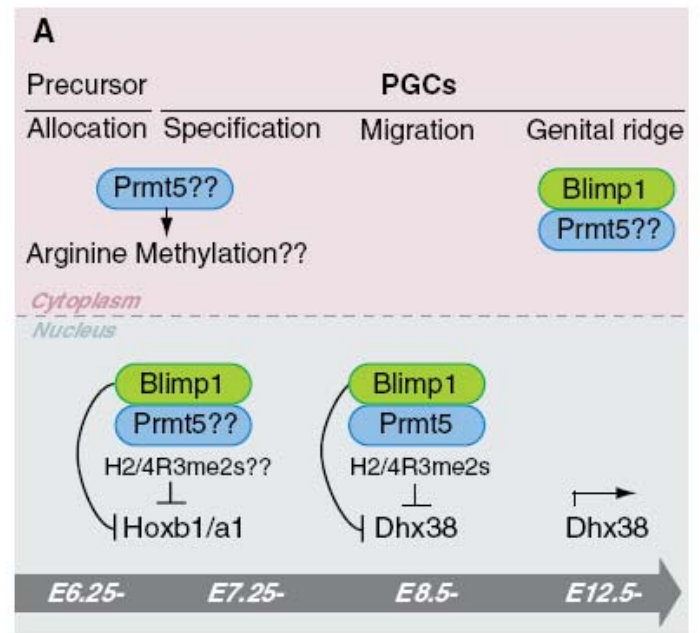
Mechanismus vzniku PGC





	E3.5	E5.5-6.0	E7.25-E7.5	E7.25-E7.5	E7.25-E7.5	E10.5-	E10.5-
Pluripotent	<i>Oct4</i>	+	+	+	-	+	-
	<i>Sox2</i>	+	+/-	+	-	+	+/-
	<i>Nanog</i>	+	-	+	-	+	-
Germ cell-enriched	<i>Blimp1</i>	-	-	+	-	+	+/-
	<i>Stella</i>	+	-	+	-	+	-
	<i>Fragilis</i>	+	+/-	+	+/-	+	+/-
	<i>Nanos3</i>	-	-	+	-	+	-
	<i>Dnd</i>	-?	-?	+	+/-	+	+/-
	<i>Dazl</i>	+?	-?	-	-	+	-
	<i>Mvh</i>	-	-	-	-	+	-
Somatic	<i>Hoxa1</i>	-	-	-	+	-	+/-
	<i>Hoxb1</i>	-	-	-	+	-	+/-
	<i>T</i>	-	+/-	-	+	-	+/-
Epigenetic	H3K4me2/3					+++	+
	H3K9me2					+	+++
	H3K27me3					+++	+
	5meC					+	+++

+/- The expression depends on cells, regions or tissues
 ? Data are preliminary



Embryonální zárodečné buňky – EGC (Embryonic germ cells)

- EGC jsou odvozeny z primordiálních zárodečných buněk (PGC – primordial germ cell).
- Podobně jako ES buňky je lze expandovat *in vitro*, a jsou pluripotentní, jak dokazuje jejich schopnost diferencovat do buněk všech tří zárodečných listů jak *in vitro* (EB), tak *in vivo* (chiméry a teratomy).
- Z epigenetického pohledu (DNA metylace) jsou však více podobné PGC než ES buňkám
- Rozdíly v metylaci DNA se týkají zejména imprintovaných genů v závislosti na pohlaví, u EGC izolovaných z pozdějších embryonálních stádií se tento rozdíl zmenšuje. Tyto „imprinting-free“ PGC, však již netvoří zdravé chimerické jedince.
- U myší lze EGC izolovat z PGC mezi 8.5 – 12.5 dpc, později to již nelze
- PGC a následně EGC lze izolovat *in vitro* z ES buněk (lidských i myších)
- m/hEGC jsou závislé na LIF, během časně kultivace i na FGF2 a Stem cell faktoru (SCF) (+ feeder & FCS/SR).
- Exprimují podobné markery jako ES buňky, lidské EGC jsou fenotypem více podobné mES než hES (morfologie + exprese SSEA-1!; u hES se SSEA-1 exprimuje až s jejich diferenciací)

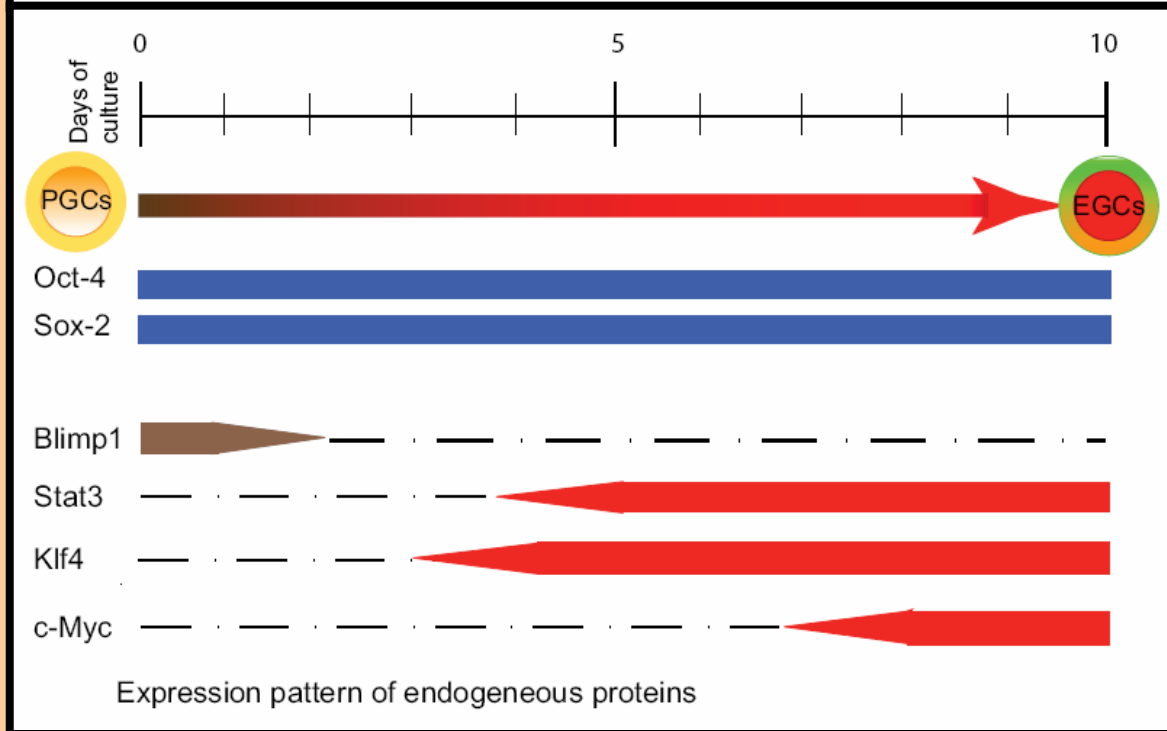
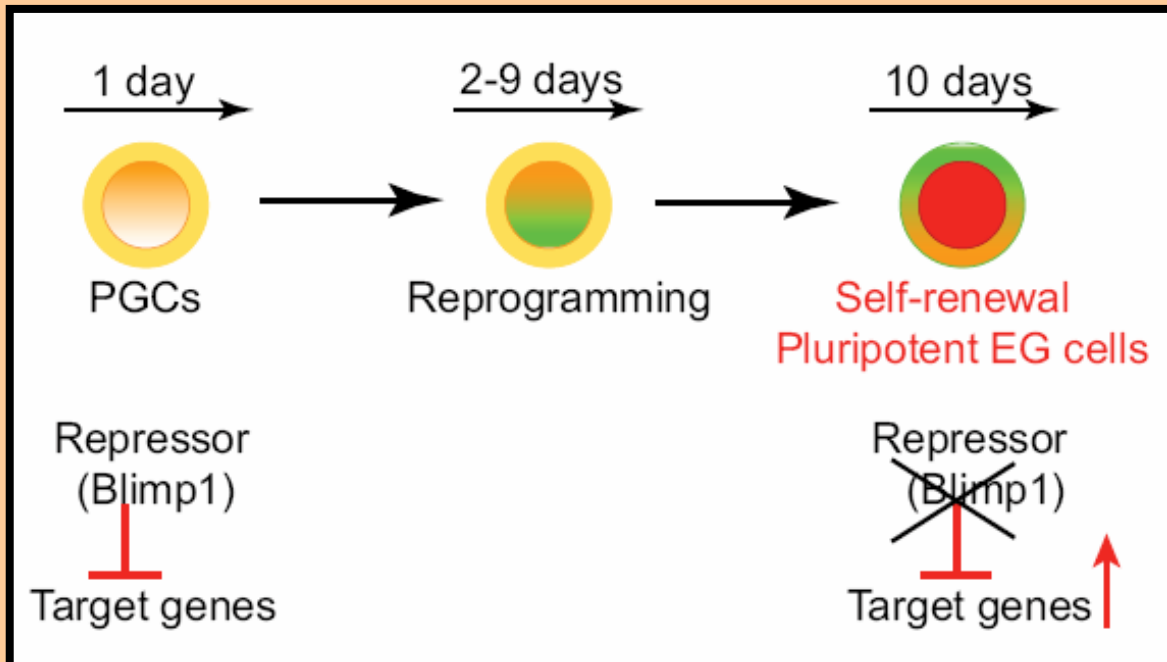
Vznik EGC z PGC

Gene	8.5 dpc PGCs				EG cells			
	5	7	14	20	1	2	3	6
Group I								
Oct-4	+	+	+	+	+	+	+	+
Sox-2	+	+	+	+	+	+	+	+
nanog	+	+	+	+	+	+	+	+
Dppa5(Esg-1)	+	+	+	+	+	+	+	+
Sall4	+	+	+	+	+	+	+	+
mRif1	+	+	+	+	+	+	+	+
E-cadherin	+	+	+	+	+	+	+	+
TNAP	+	+	+	+	+	+	+	+
Rex1 (Zfp42)	+	+	+	+	+	+	+	+
Utf1	+	+	+	+	+	+	+	+
Dppa3 (Stella)	+	+	+	+	+	+	+	+
Sox15	+	+	+	+	+	+	+	+
Grb2	-	+	+	+	+	+	+	+
β -catenin	-	+	+	+	+	+	+	+

Gene	8.5 dpc PGCs				EG cells			
	5	7	14	20	1	2	3	6
Group II								
<i>c-Myc</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Stat-3</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Klf-4</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
Dnmt3L	-	-	-	-	+	+	+	+
ERas	-	-	-	-	+	+	+	+
Fthl-17	-	-	-	-	+	+	+	+
Dppa2	-	-	-	-	+	+	+	+
Dppa4	+	-	-	-	+	+	+	+
Ecat1	-	-	-	-	+	+	+	+
Ecat8	-	+	+	-	+	+	+	+
Gdf3	+	+	+	+	+	-	-	-
Fbxo15	-	+	-	+	+	+	+	+
Tcl1	-	+	-	-	+	+	+	+

Group I – genes in this group were expressed in both PGCs and EG cells.
 Group II – genes were expressed differentially in PGCs and EG cells, and shown as as positive (+) and negative (-).
 E8.5 PGCs samples tested for expression are referred to as. 5. 7. 14. 20.

(Durcova-Hills 2008)



Porovnání transkriptomů mES, mPGC a některých tkání

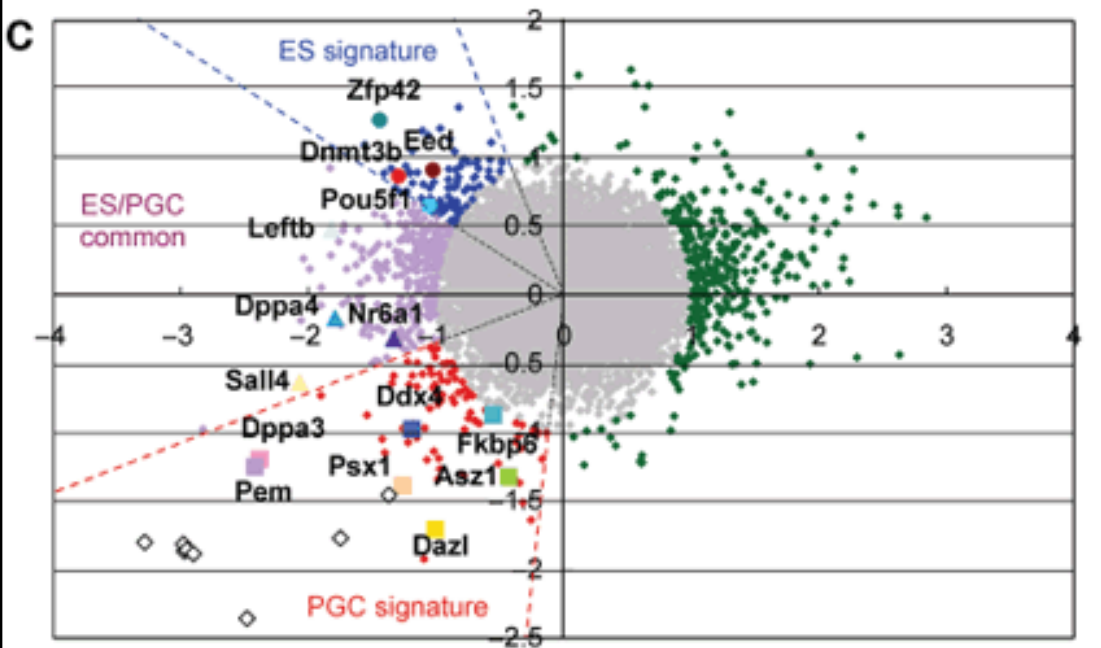
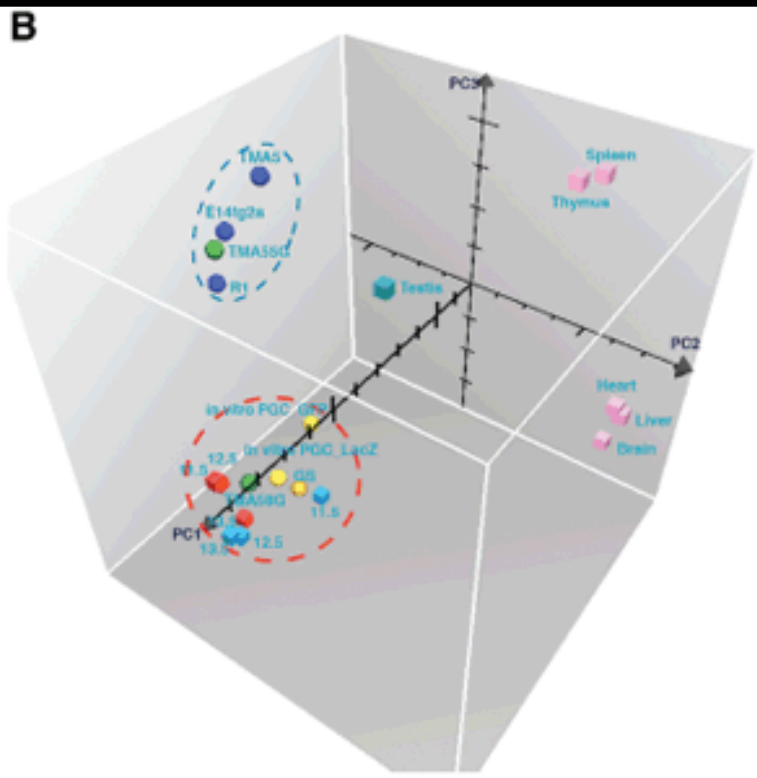
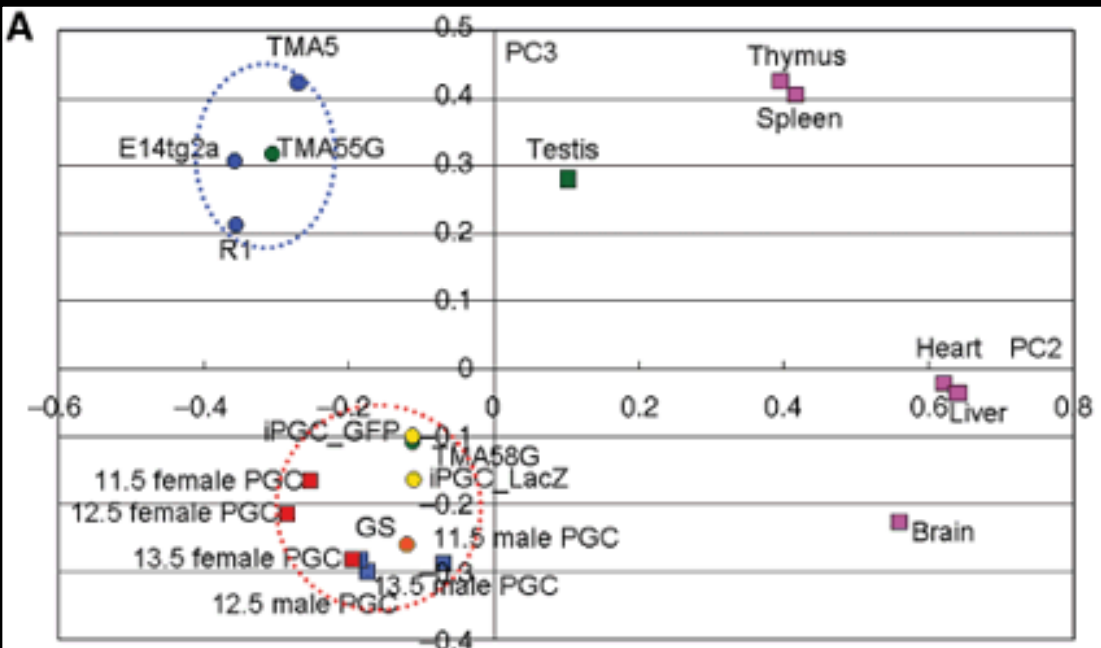
(Mise et al., 2008)

Table 1 Pairwise comparisons of gene expression profiles

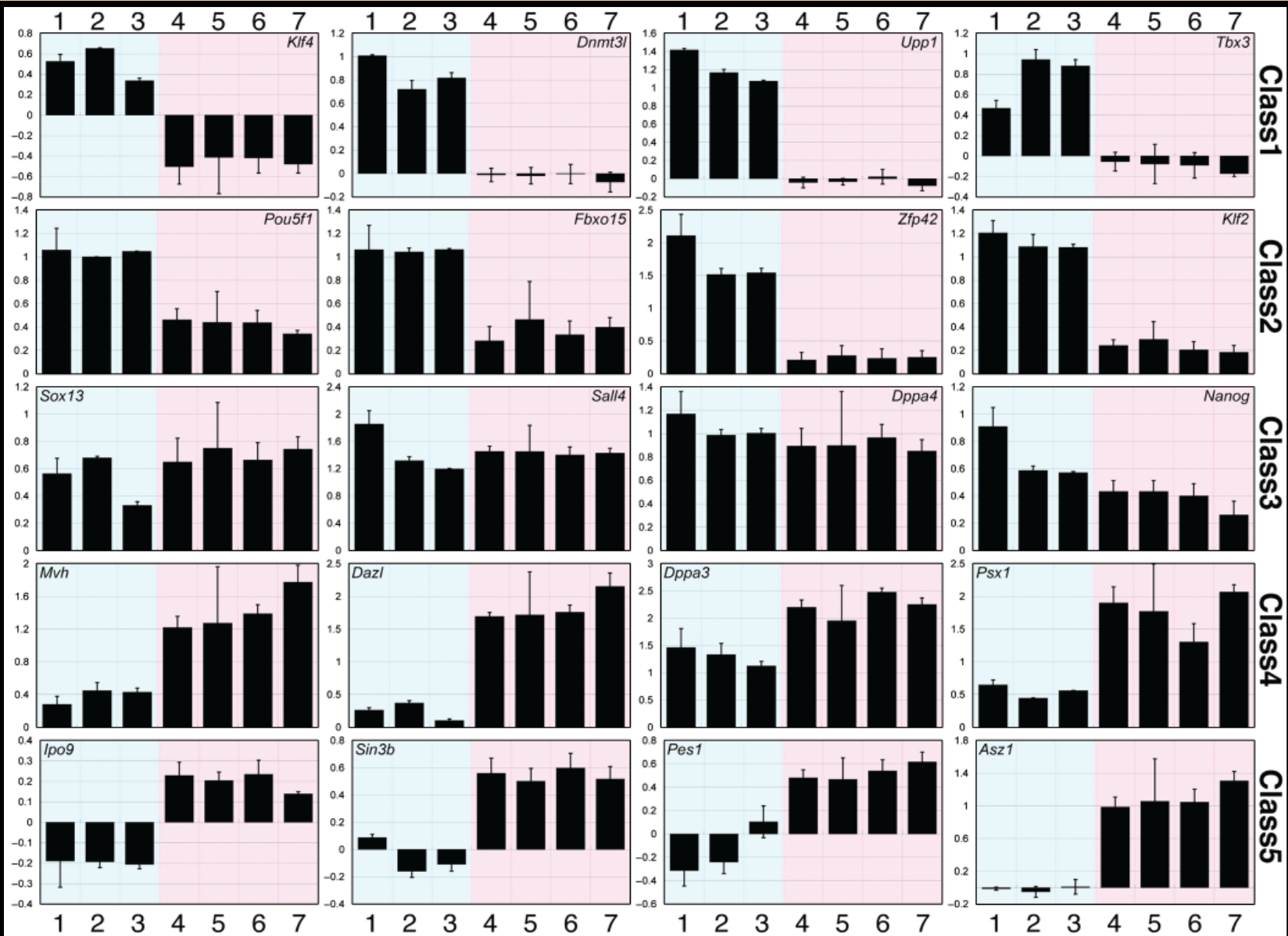
	R1	E14tg2a	TMA5	TMA55G	TMA58G	<i>in vitro</i> PGC_LacZ	<i>in vitro</i> PGC_GFP	11.5 male PGC	11.5 female PGC	12.5 male PGC	12.5 female PGC	13.5 male PGC	13.5 female PGC	GS	Testis	Heart	Brain	Liver	Spleen	Thymus
R1		0.878	0.709	0.742	0.684	0.651	0.639	0.515	0.662	0.613	0.654	0.629	0.591	0.533	0.454	0.150	0.203	0.203	0.213	0.278
E14tg2a	0.878		0.715	0.754	0.643	0.572	0.615	0.439	0.619	0.561	0.634	0.582	0.562	0.489	0.459	0.109	0.201	0.183	0.238	0.309
TMA5	0.709	0.715		0.867	0.598	0.520	0.460	0.424	0.612	0.492	0.547	0.525	0.489	0.431	0.606	0.274	0.135	0.179	0.201	0.300
TMA55G	0.742	0.754	0.867		0.672	0.614	0.555	0.517	0.696	0.604	0.649	0.627	0.598	0.505	0.602	0.287	0.155	0.193	0.218	0.297
TMA58G	0.684	0.643	0.598	0.672		0.874	0.652	0.645	0.745	0.800	0.708	0.794	0.733	0.664	0.505	0.396	0.304	0.401	0.294	0.320
<i>in vitro</i> PGC_LacZ	0.651	0.572	0.520	0.614	0.874		0.686	0.644	0.692	0.741	0.660	0.747	0.706	0.620	0.468	0.379	0.275	0.380	0.249	0.257
<i>in vitro</i> PGC_GFP	0.639	0.615	0.460	0.555	0.652	0.686		0.585	0.611	0.647	0.630	0.635	0.593	0.531	0.406	0.280	0.313	0.342	0.236	0.257
11.5 male PGC	0.515	0.439	0.424	0.517	0.645	0.644	0.585		0.760	0.724	0.700	0.758	0.714	0.623	0.419	0.319	0.350	0.311	0.245	0.300
11.5 female PGC	0.662	0.619	0.612	0.696	0.745	0.692	0.611	0.760		0.898	0.908	0.901	0.855	0.723	0.536	0.290	0.224	0.291	0.262	0.320
12.5 male PGC	0.613	0.561	0.492	0.604	0.800	0.741	0.647	0.724	0.898		0.909	0.950	0.881	0.755	0.501	0.344	0.270	0.341	0.289	0.297
12.5 female PGC	0.654	0.634	0.547	0.649	0.708	0.660	0.630	0.700	0.908	0.909		0.899	0.917	0.726	0.495	0.242	0.226	0.247	0.260	0.298
13.5 male PGC	0.629	0.582	0.525	0.627	0.794	0.747	0.635	0.758	0.901	0.950	0.899		0.900	0.797	0.519	0.339	0.281	0.334	0.289	0.315
13.5 female PGC	0.591	0.562	0.489	0.598	0.733	0.706	0.593	0.714	0.855	0.881	0.917	0.900		0.791	0.524	0.294	0.281	0.292	0.279	0.317
GS	0.533	0.489	0.431	0.505	0.664	0.620	0.531	0.623	0.723	0.755	0.726	0.797	0.791		0.500	0.282	0.288	0.307	0.264	0.303
Testis	0.454	0.459	0.606	0.602	0.505	0.468	0.406	0.419	0.536	0.501	0.495	0.519	0.524	0.500		0.453	0.299	0.356	0.333	0.381
Heart	0.150	0.109	0.274	0.287	0.396	0.379	0.280	0.319	0.290	0.344	0.242	0.339	0.294	0.282	0.453		0.437	0.568	0.333	0.347
Brain	0.203	0.201	0.135	0.155	0.304	0.275	0.313	0.350	0.224	0.270	0.226	0.281	0.281	0.288	0.299	0.437		0.434	0.260	0.343
Liver	0.203	0.183	0.179	0.193	0.401	0.380	0.342	0.311	0.291	0.341	0.247	0.334	0.292	0.307	0.356	0.568	0.434		0.411	0.409
Spleen	0.213	0.238	0.201	0.218	0.294	0.249	0.236	0.245	0.262	0.289	0.260	0.289	0.279	0.264	0.333	0.333	0.260	0.411		0.675
Thymus	0.278	0.309	0.300	0.297	0.320	0.257	0.257	0.300	0.320	0.297	0.298	0.315	0.317	0.303	0.381	0.347	0.343	0.409	0.675	

R1, E14tg2a, TMA5 – linie mES buněk
 TMA55G (male), TMA58G (female) – EGC
 GS – germ stem cell (derived from spermatogonia)

Analýza hlavních komponent expresních profilů

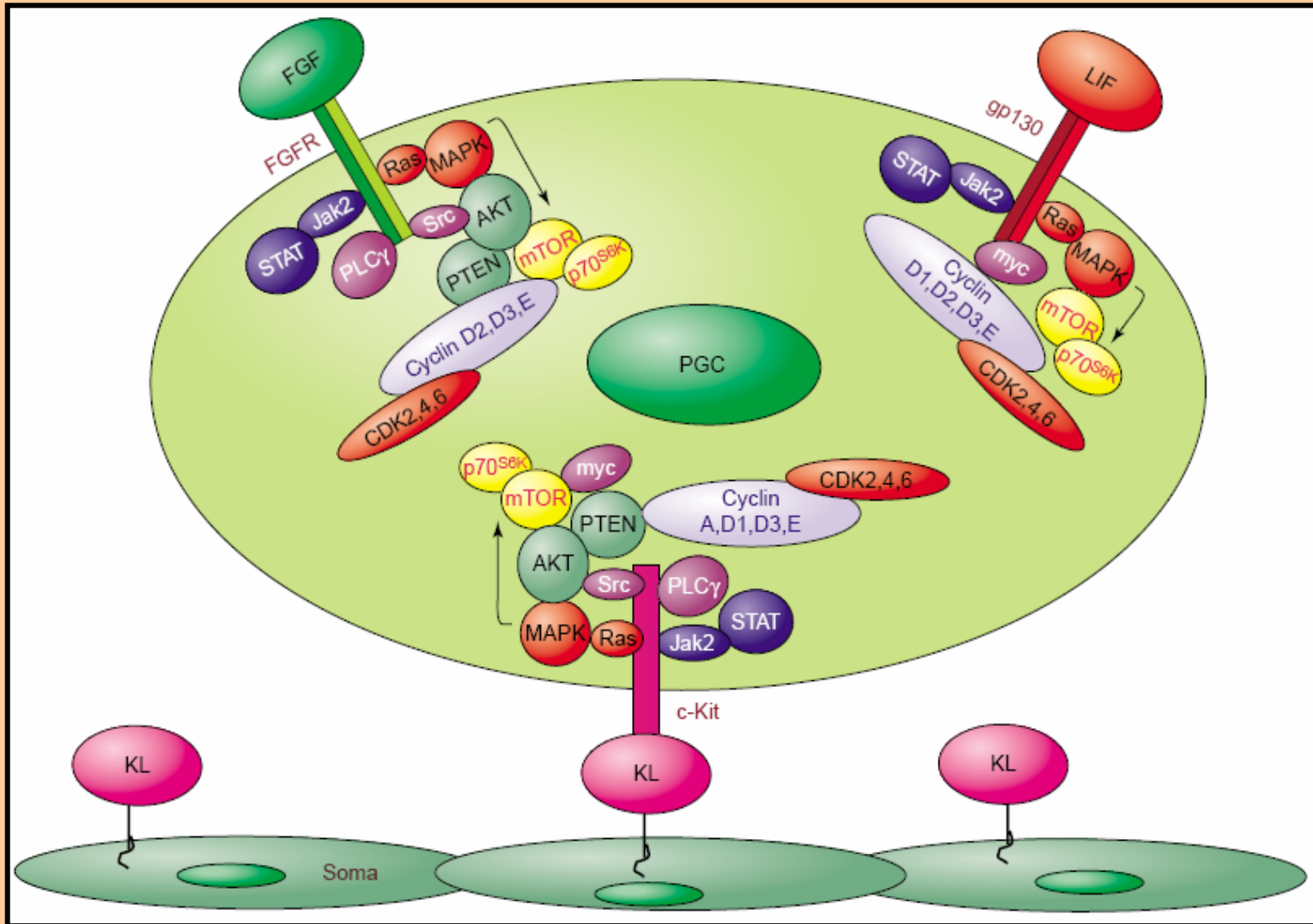


blue – ES specifický patern
 red – PGC specifický patern
 purple - ES/PGC specifický patern
 green – nevýznamné pro specifikaci ES/PGC

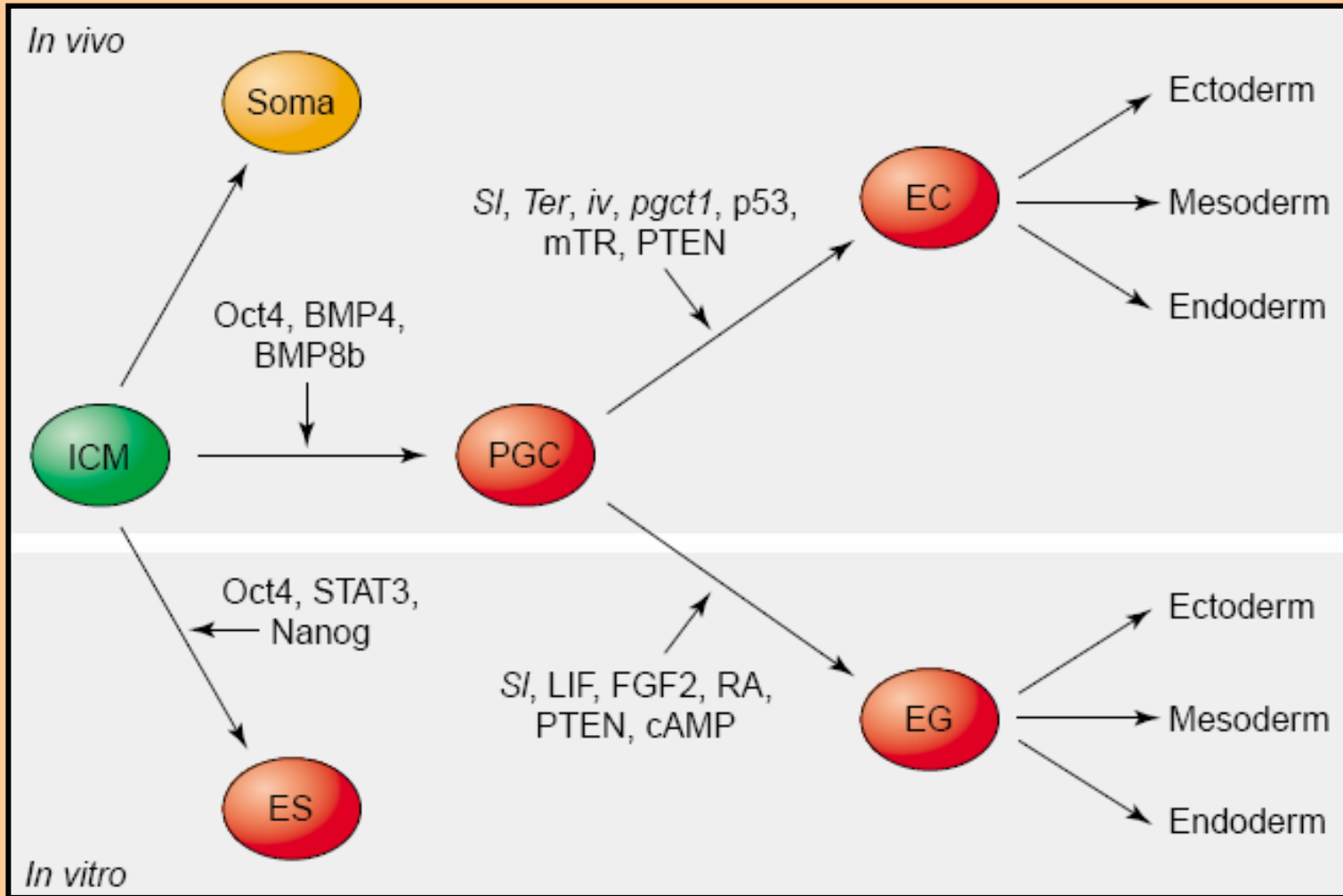


- | | |
|------------|--------------------|
| 1. R1 | 4. 12.5 male PGC |
| 2. E14tg2a | 5. 12.5 female PGC |
| 3. TMA5 | 6. 13.5 male PGC |
| | 7. 13.5 female PGC |

Schema předpokládaného zapojení FGF, LIF a KL (c-Kit ligand = Steel factor (SF)/ stem cell factor (SCF) v regulaci sel-renewal EG buněk

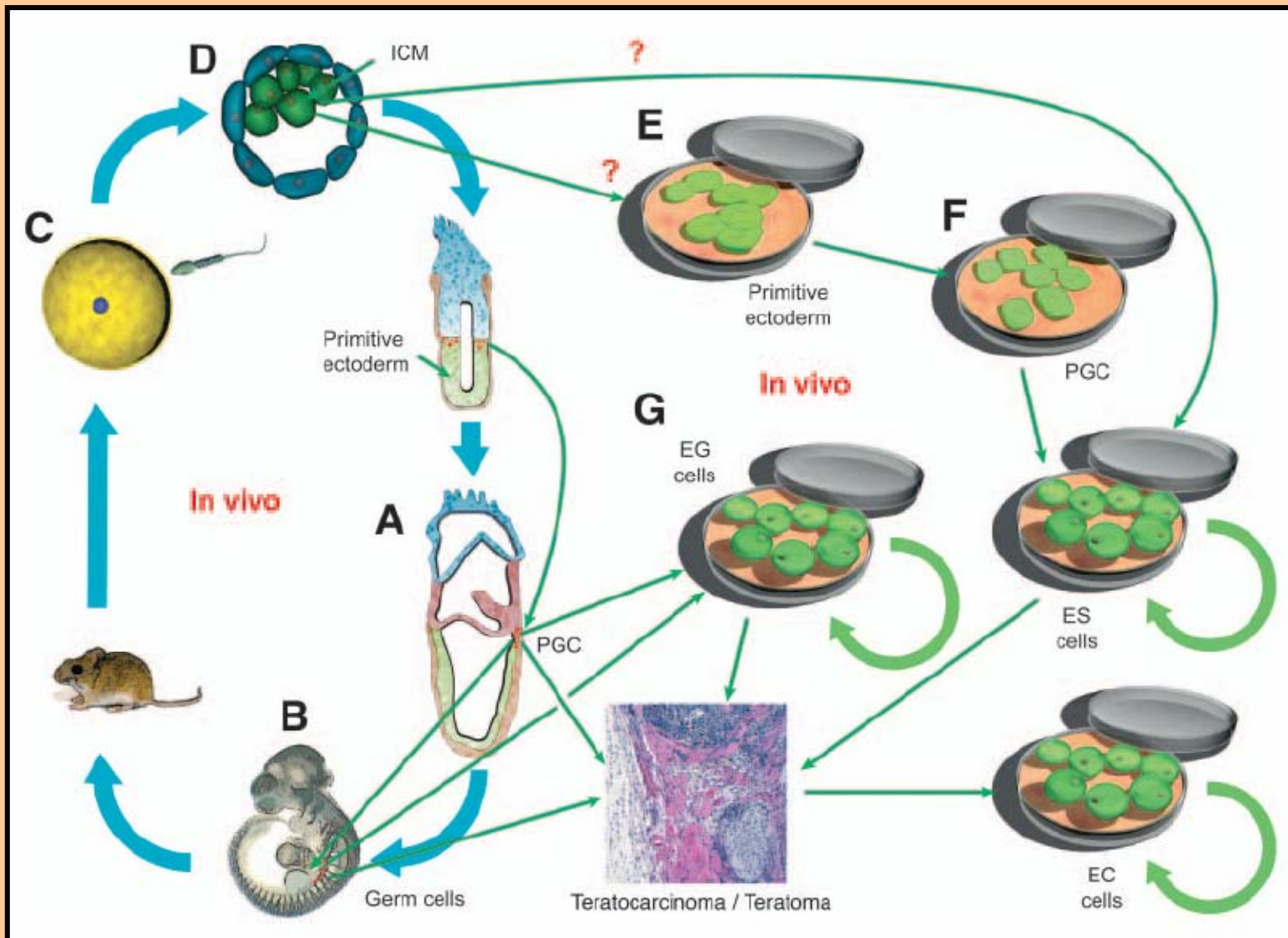


Vztahy mezi pluripotentními buňkami a některé klíčové regulační komponenty těchto buněk



Sl – Steel locus, *Ter* – Teratoma locus, *pgct1* – primordial germ cell tumor susceptibility locus, *PTEN* – Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, *mTR* (mTOR) - serine-threonine kinase mammalian target of rapamycin

Není původ ES buněk v PGC ???



Není původ ES buněk v PGC ???

Gene	Species	ES	EGC	LGC	ICM	PE
<i>Pou5f1</i> (Pesce and Scholer, 2001)	M	+	+	+	+	+
<i>Nanog</i> (Chambers et al., 2003)	M	+	+	+	+	+
<i>Dppa3</i> (Saitou et al., 2002)	M	+	+	+	+	+
<i>Ifitm3</i> (Saitou et al., 2002)	M	+	+	+	+	+
<i>Kit</i> (Horie et al., 1991)	M	+	+	+	-	N/D
<i>DAZL</i> (Clark et al., 2004)	H	+	+	+	-	N/D
<i>Ddx4</i> (Toyooka et al., 2003)	M	-	-	+	-	-
<i>Akp2</i> (Chiquoine, 1954)	M	+	+	+	+	+
<i>Zfp42</i> (Rogers et al., 1991)	M	+	N/D	N/D	+	-
<i>Fgf5</i> (Haub and Goldfarb, 1991; Hebert et al., 1991)	M	-	N/D	N/D	-	+
<i>Gbx1</i> (Chapman et al., 1997)	M	+	N/D	N/D	+	-

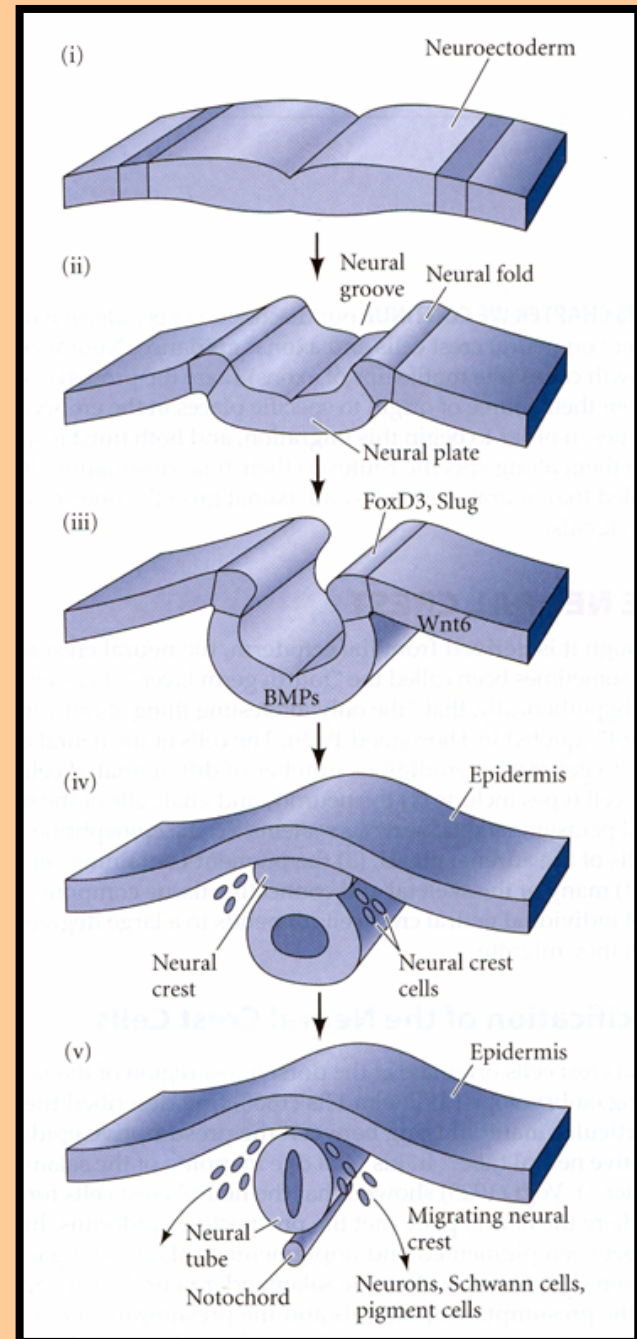
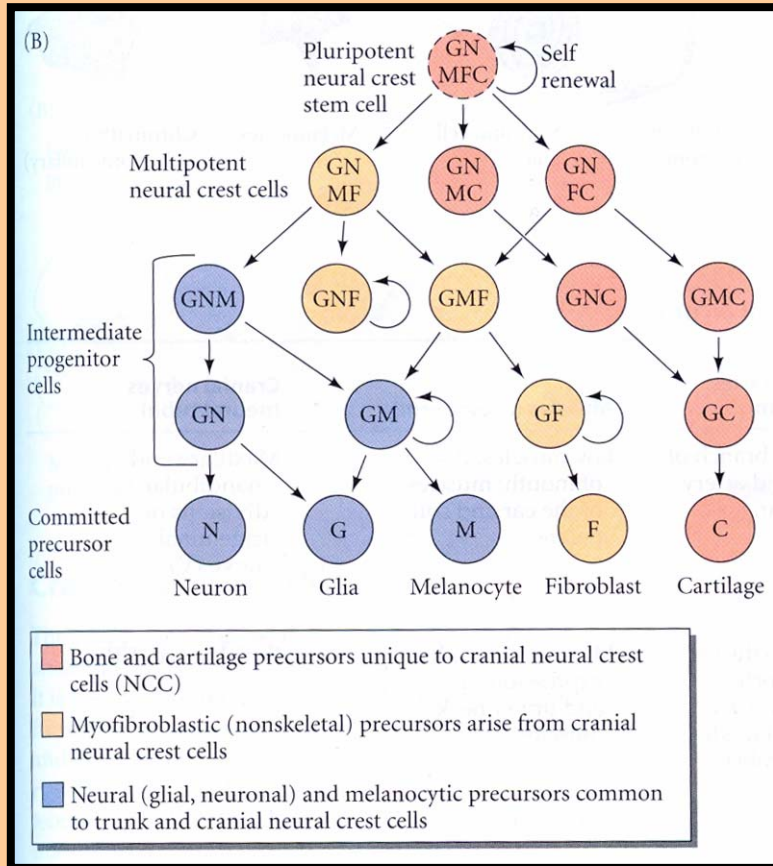
Zwaka, 2005

M- myš; H – člověk; N/D – netestováno; ES – embryonální kmenové buňky; EGC – časné primordiální zárodečné buňky (!); LGC – pozdní primordiální zárodečné buňky; ICM – vnitřní buněčná masa; PE – primitivní ecdoderm/epiblast

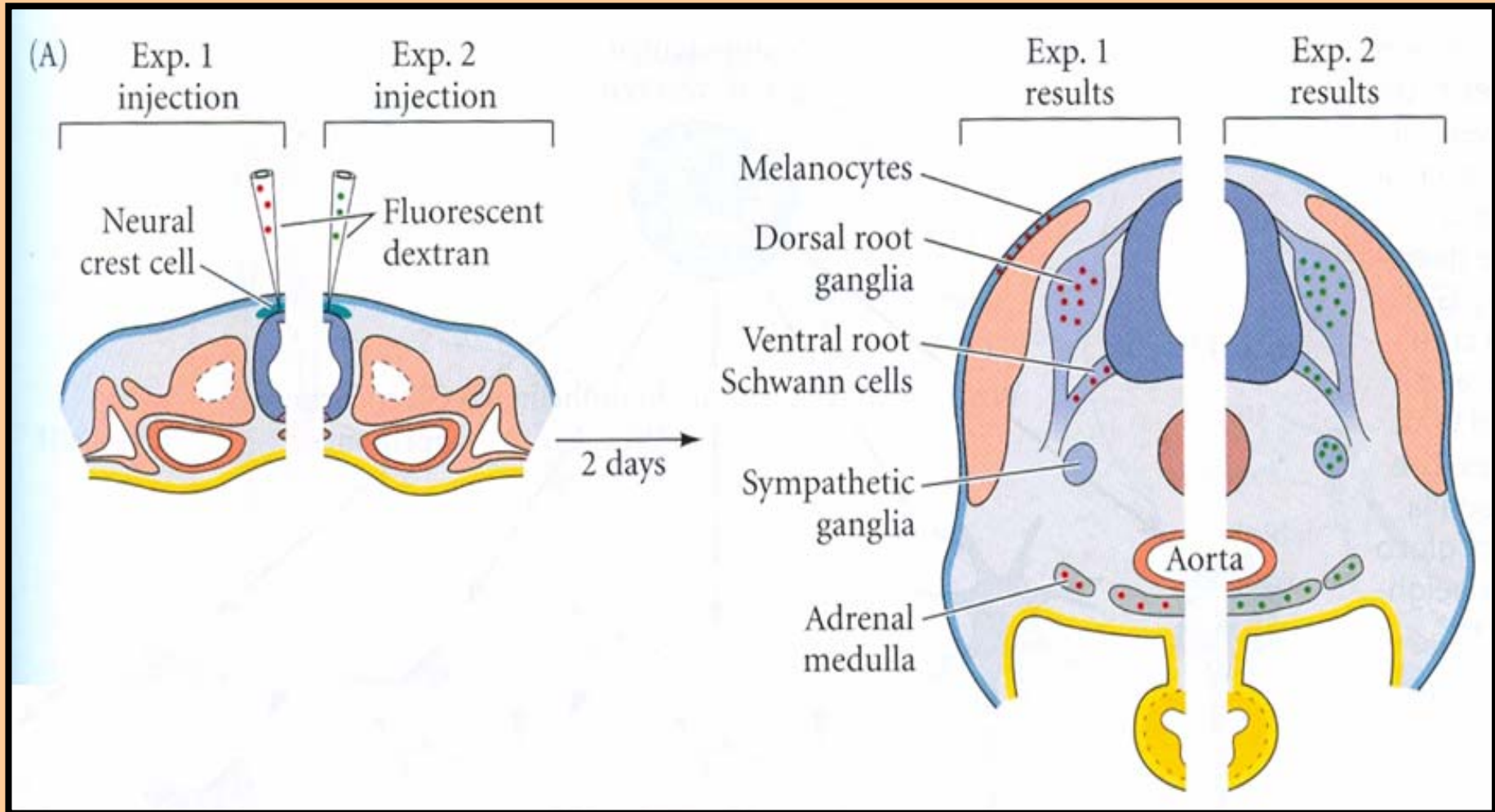
Kmenové buňky teratomu / teratokarcinomu - ECC Embryonální nádorové buňky (Embryonal carcinoma cells)

- Izolované rozkultivováním a klonální selekcí buněk teratomu / teratokarcinomu
- Lidské spontánně, myší indukované transplantací časných embryonálních buněk do dobře vyživované tkáně (varlata, ledviná kapsa, břišní dutina,...), musí být imunotolerance
- Podobné vlastnosti jako ES buňky, ale méně závislé na specifických růstových faktorech (+)
- Tvoří také chiméry, ale nedokonalé, většinou hynou v průběhu embryogeneze (-)
- Většinou snížená schopnost pluripotence jak *in vivo*, tak *in vitro* (-)
- Obecně nestabilní genotyp a časté aneuploidie (-)
- Modelové studie genetické nestability a diferenciaci, vzniku teratomů
- Levnější alternativa k ES buňkám, lepší stabilita v experimentálních systémech jak ES (+)

Neurální lišta a kmenové buňky neurální lišty



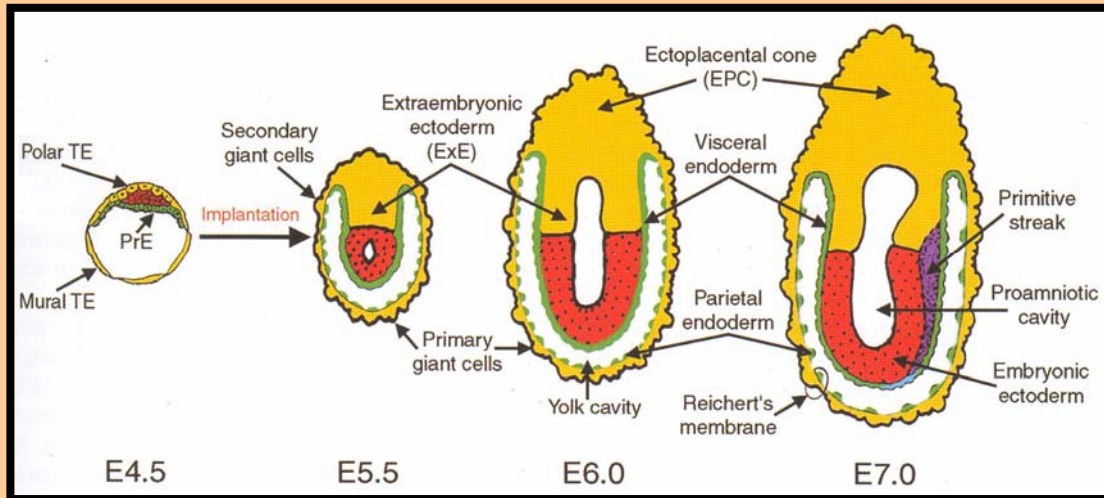
Experiment potvrzující pluripotenci buněk neurální lišty



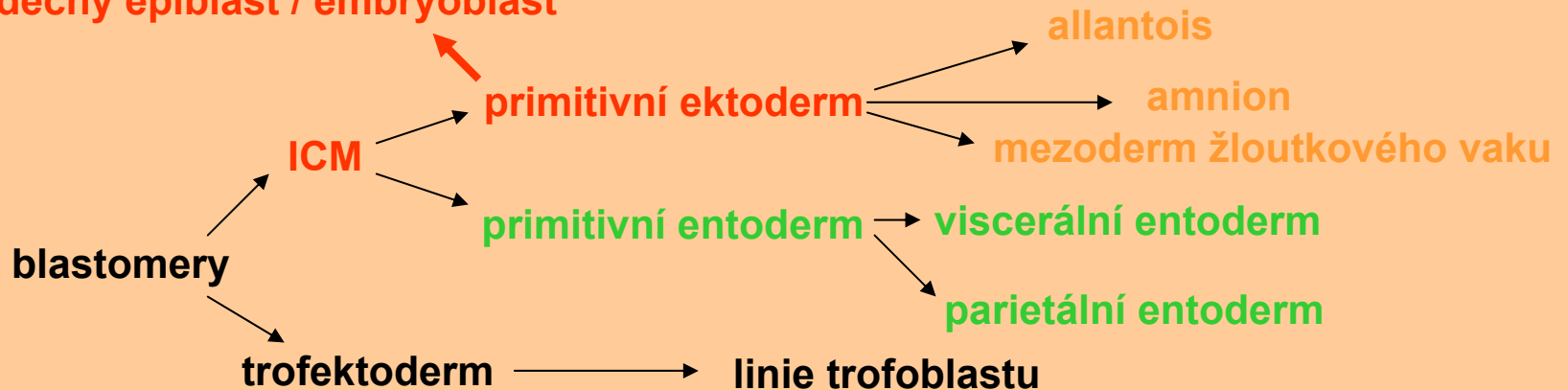
Kmenové buňky extraembryonálních tkání

A) Kmenové buňky trofektodermu (trofoblastu)
FGF-dependent (FGF4, FGFR2); *Cdx2, Eomes, Errβ*

B) Kmenové buňky primitivního entodermu (hypoblastu)
 XEN – buňky extraembryonálního entodermu



zárodečný epiblast / embryoblast



Regulace kmenových buněk trofoblastu signály z epiblastu

