

METAPLASIE (- TRANSDIFERENCIACE?!)

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

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

Potenciální možnosti:

- 1) Přímá přeměna fenotypu buňky jednoho typu v buňku typu jiného**
 - s proliferací (metaplasie)
 - bez proliferace (pravá transdiferenciace)

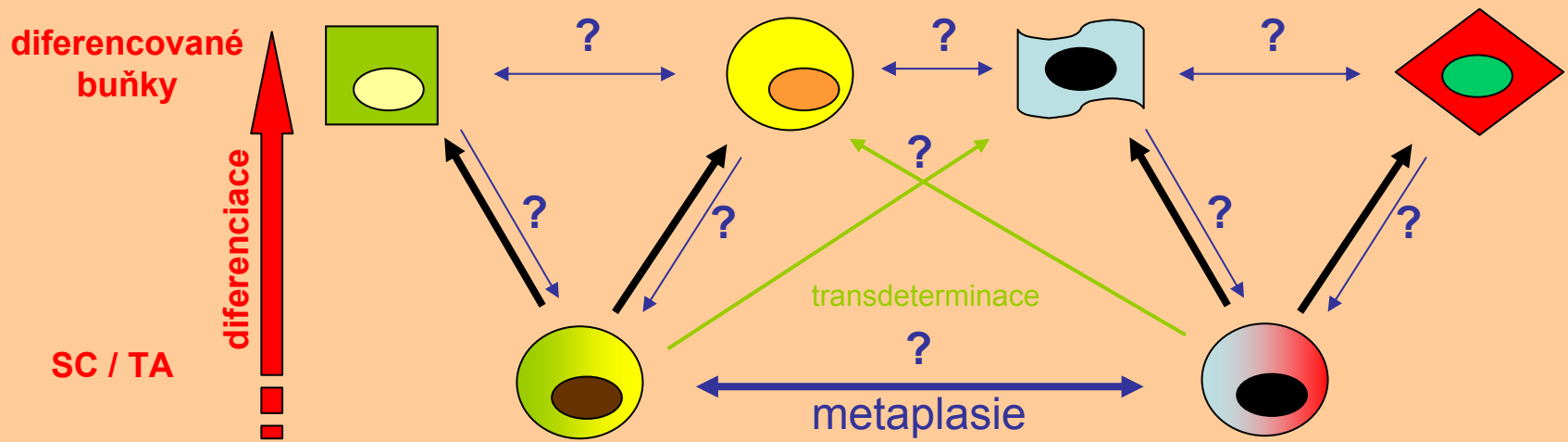
- 2) Prvně směrem zpět v diferenciací řadě a následně diferenciací do jiné diferenciací řady (rediferenciace a následně diferenciací).**

Za pozorované jevy zřejmě ale odpovídají zbytkové populace progenitorů.

 - s proliferací
 - bez proliferace (silně 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**

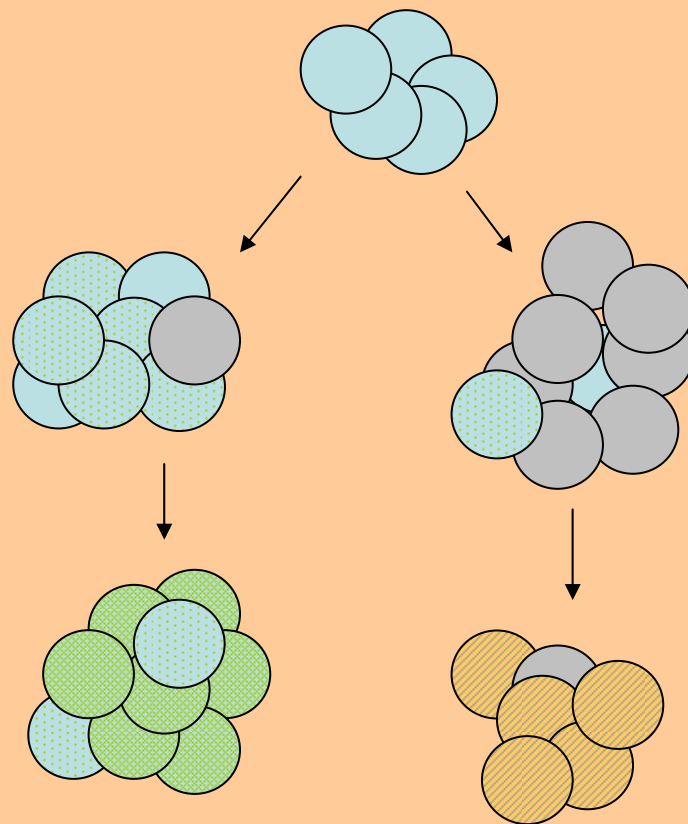
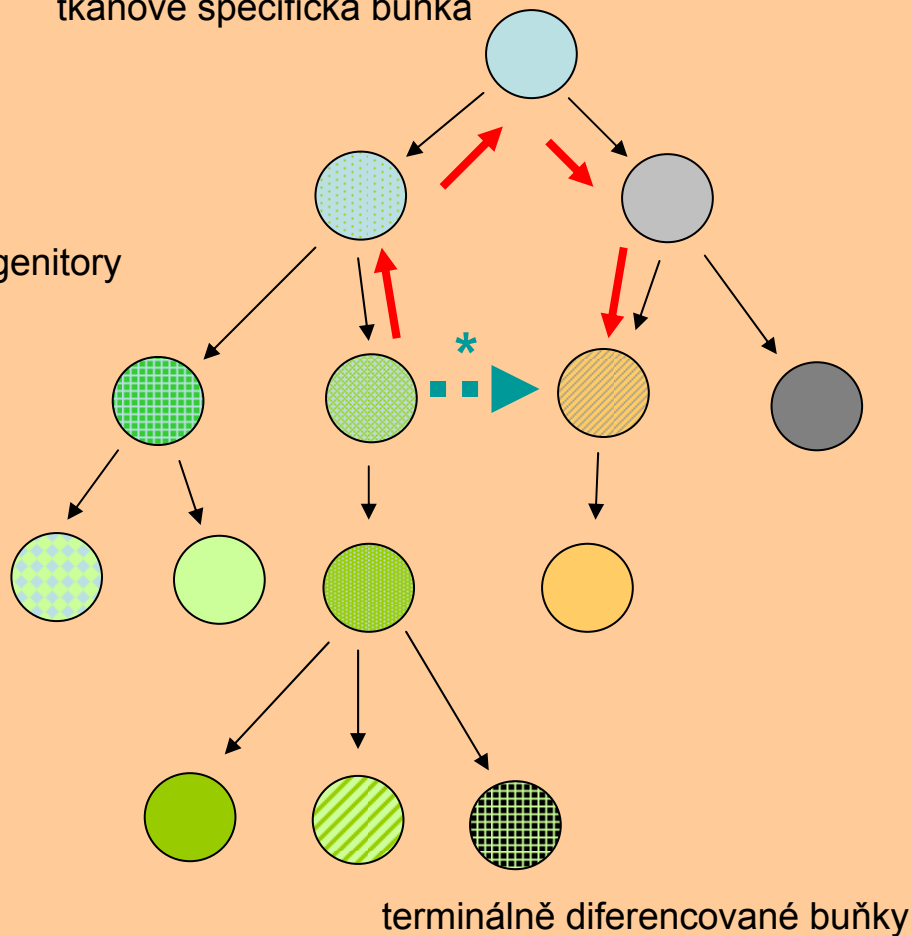
Pleopotence* x reprogramování

(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)

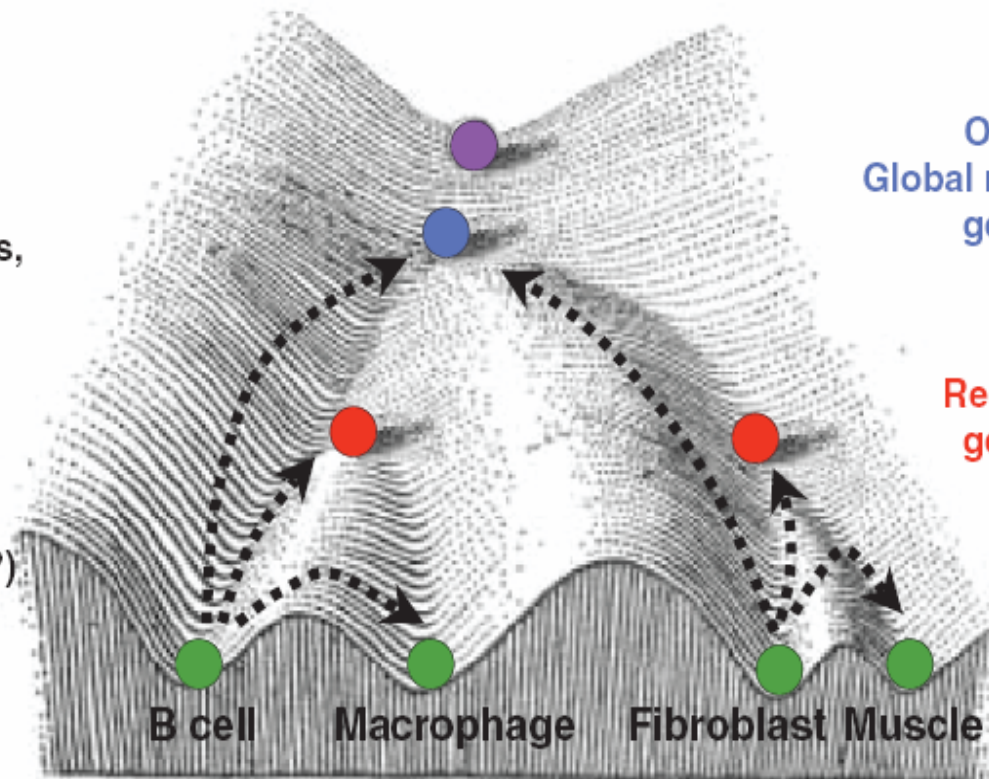
Developmental potential

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



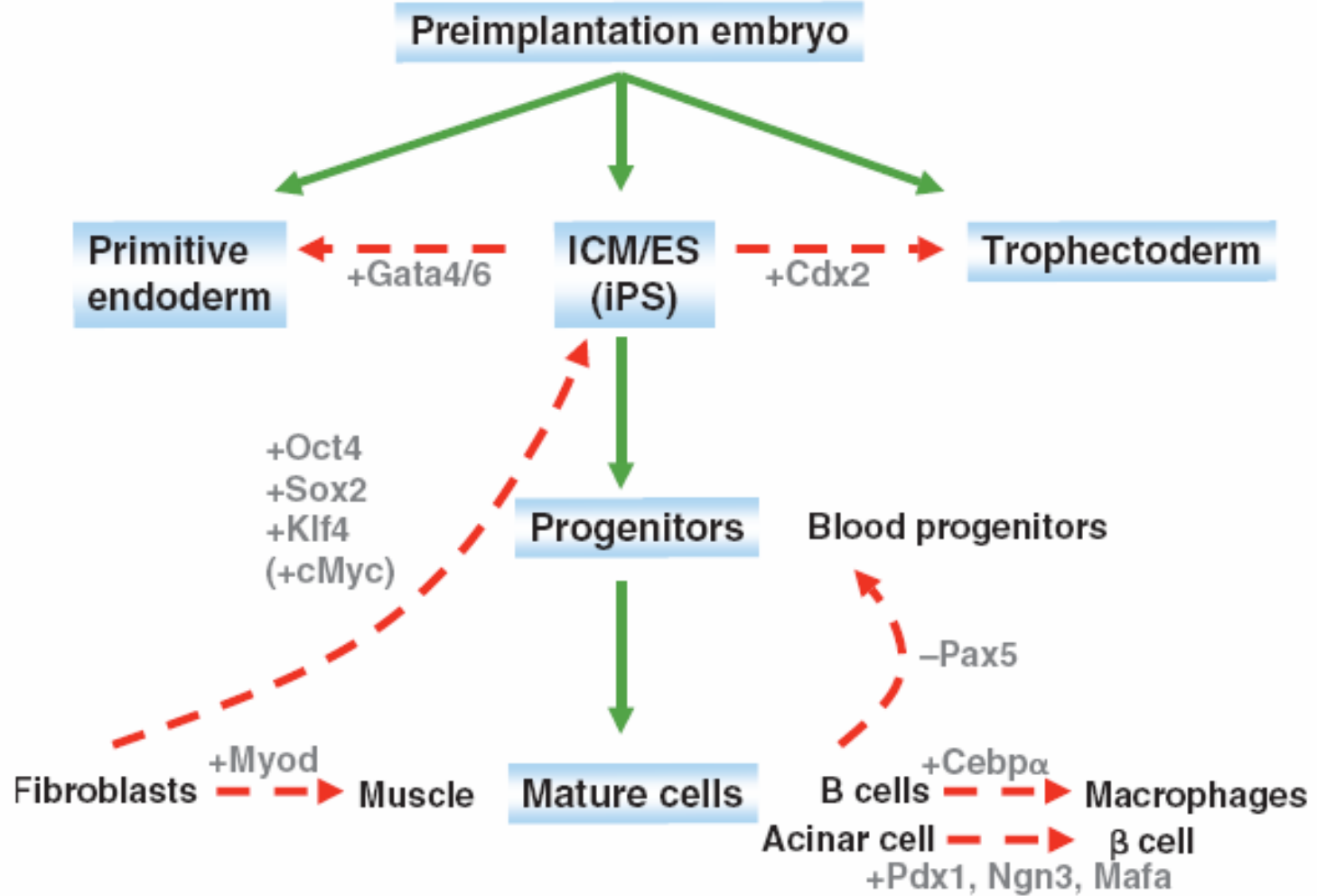
Epigenetic status

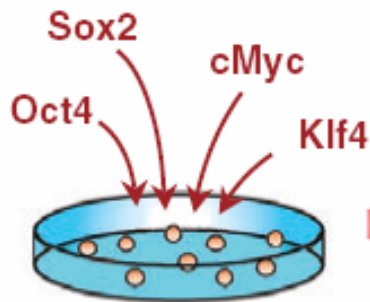
Global DNA demethylation

**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**

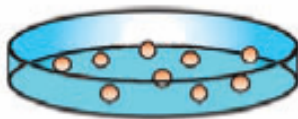




Somatic cells

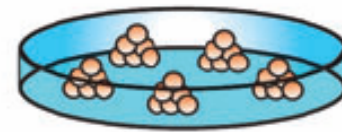
- Somatic markers silenced
- Activation of SSEA1

Intermediate cells
(transient population)



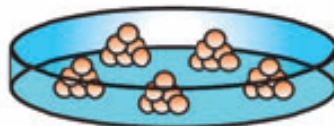
- Silencing of retroviral transgenes
- Activation of pluripotency genes
- Activation of telomerase
- Reactivation of silent X chromosome in female cells
- Teratomas and germline chimeras

iPS cells

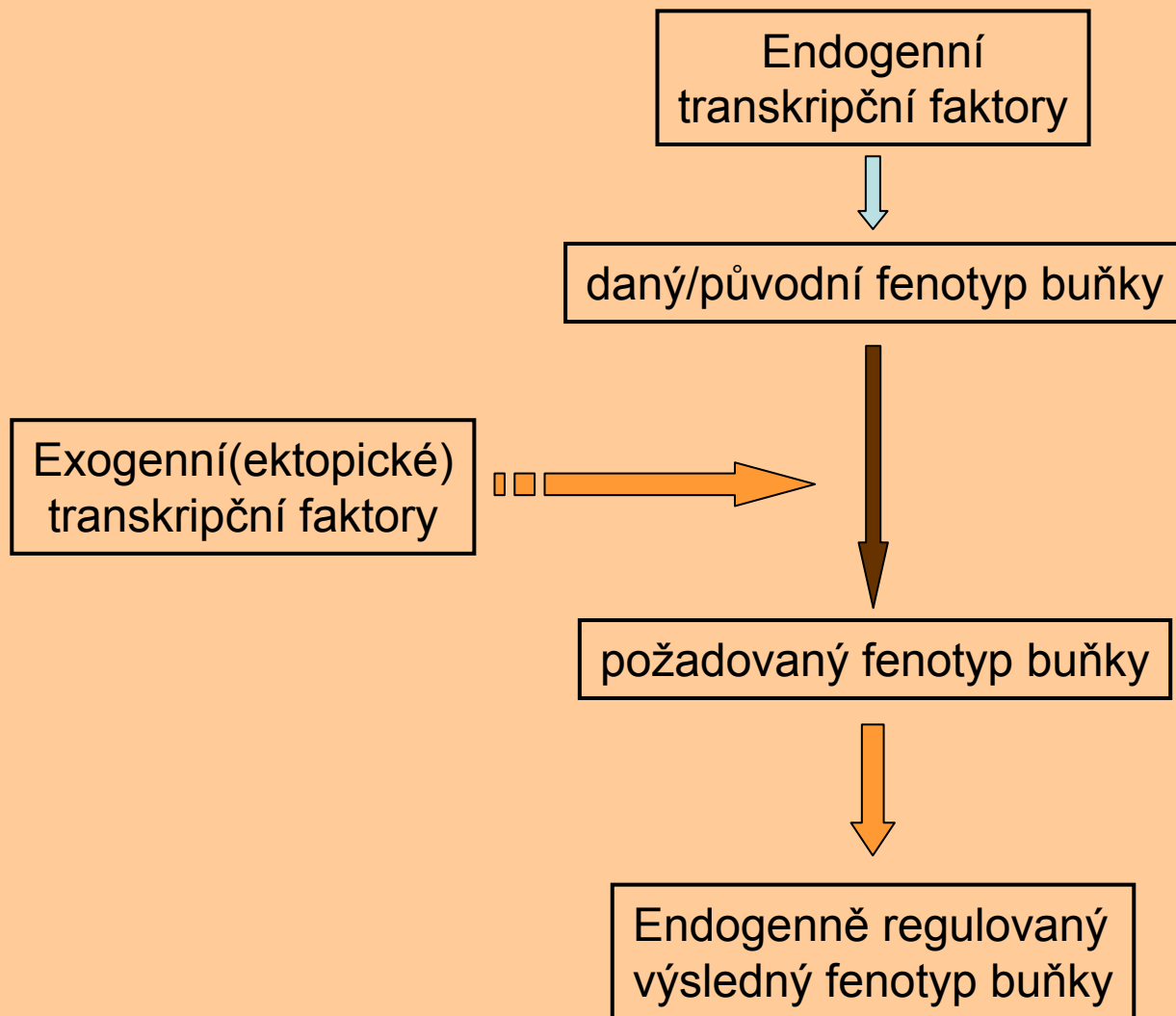


- Knockdown of lineage genes
- Inhibition of DNA methylation

Partially reprogrammed cells
(stable cell lines)



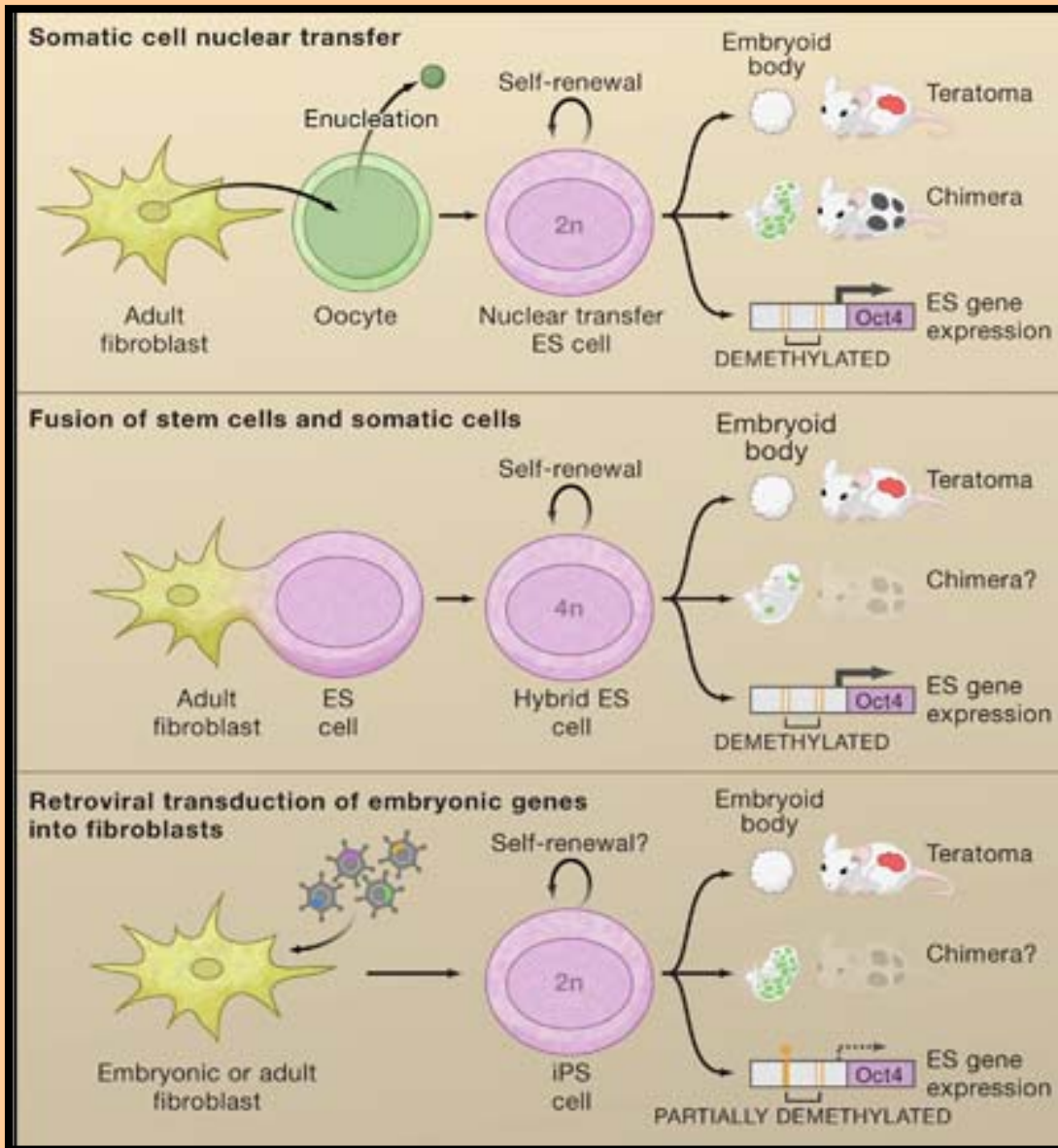
- Viral transgenes on
- Proliferation genes activated
- Pluripotency genes silent
- Aberrant expression of lineage genes
- Teratomas, but no adult chimeras



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

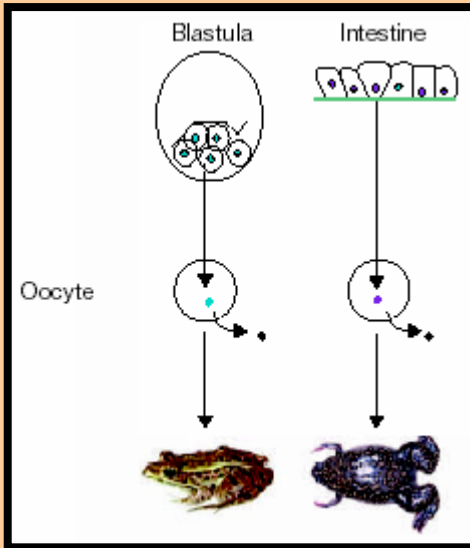
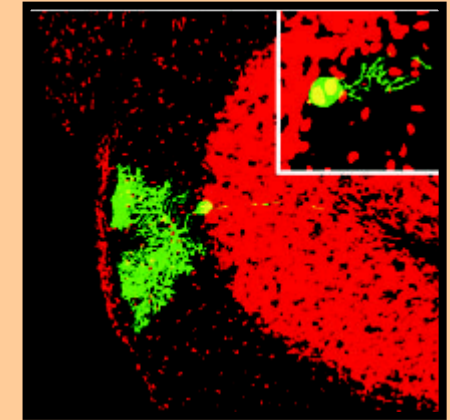
buněčná fúze – spojení cytoplasmy a jader dvou buněk za vzniku buňky jediné

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

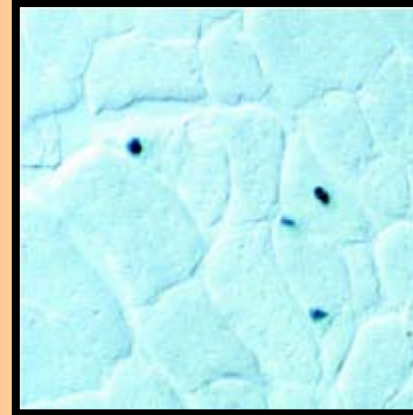
hybridní buňka – vznikne když heterokaryon projde mitózou za vzniku buňky s jedním jádrem ale s více jak 2n DNA (nemusí obsahovat kompletní jadernou DNA původních buněk)

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

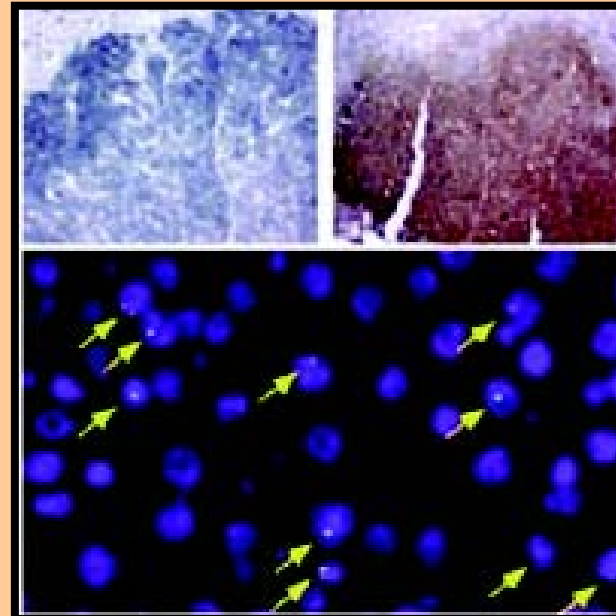
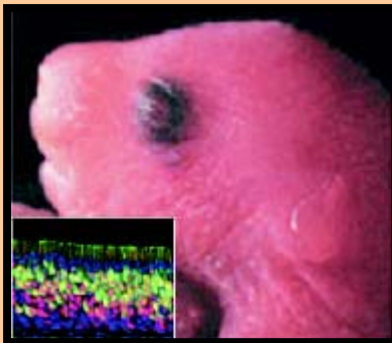
Heterokaryon Purkiňova neuronu v mozečku a GFP⁺-BMSSC



BMSSCs exprimující β -galaktosidázu pod kontrolou svalově specifického promotoru

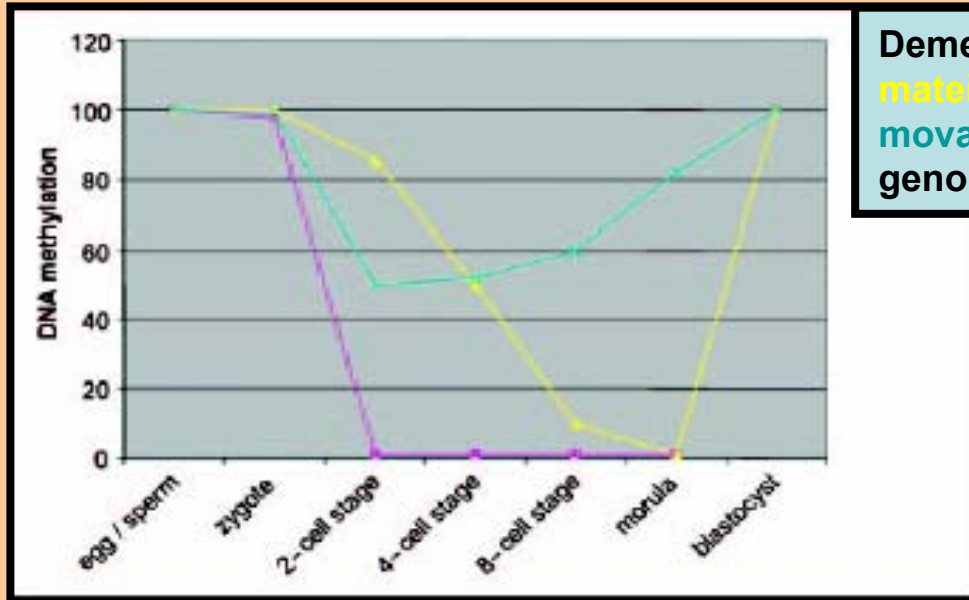


Myš klonovaná z jádra čichového nervu



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

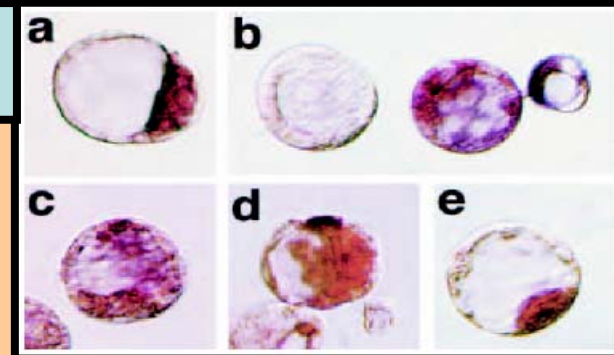
Reprogramování jádra, metylace DNA a chyby v embryogenezi



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

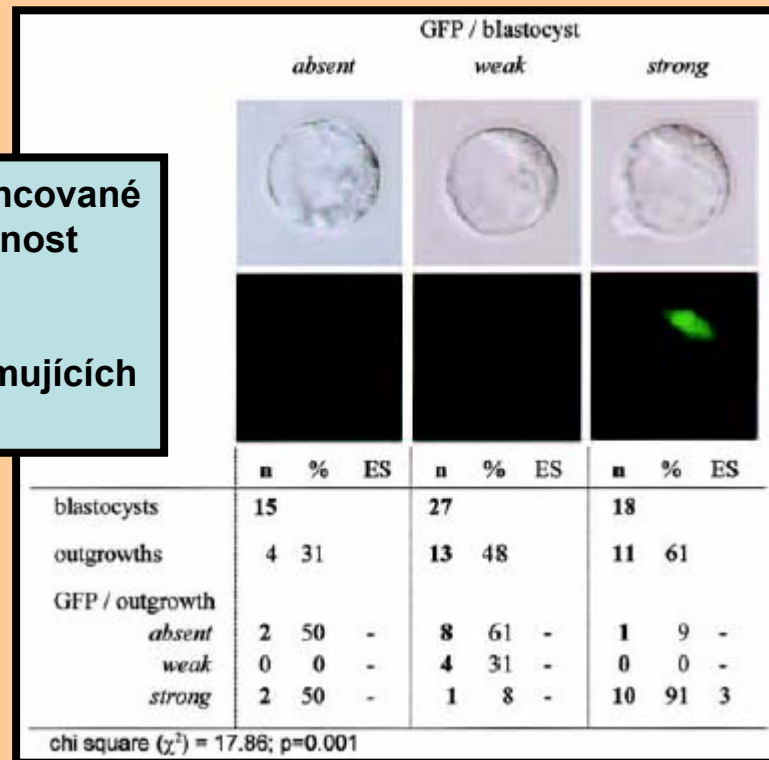
Blastocyst type	n	Oct4 mRNA n (%)		
		ICM restricted	ICM and TE	not detected
Cumulus cell clone	53 ^d	18 (34.0) ^a	29 (54.7) ^a	6 (11.3) ^a
IVF	30	23 (76.7) ^b	4 (13.3) ^b	3 (10) ^a
ICSI	80	60 (75.0) ^b	9 (11.3) ^b	11 (13.8) ^{a,b}
In vivo fertilized	75	70 (93.3) ^c	3 (4.0) ^b	2 (2.7) ^{a,c}

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.