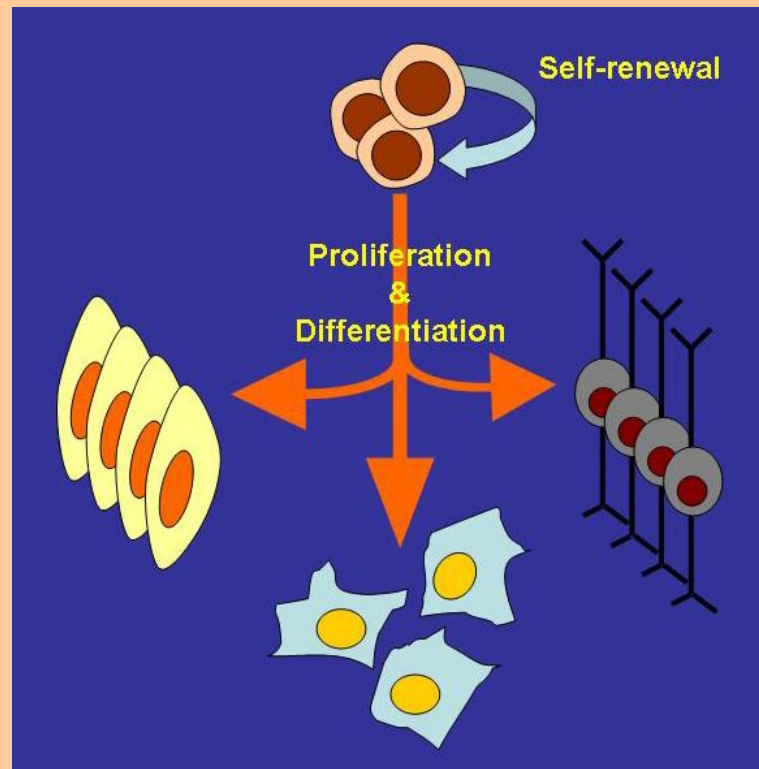


# Fyziologie kmenových buněk



**Jiří Pacherník**

E-mail: [jipa@sci.muni.cz](mailto:jipa@sci.muni.cz)

Tel: 532 146 223 / 116

# KMENOVÉ BUŇKY

- zdroj buněk dané tkáně / orgánu
- primární buňky pro danou strukturu

## Schopnost

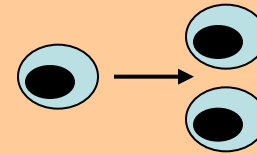
- dávat vznik dalším typům buněk (schopnost diferencovat)
- sebeobnovy (selfrenewal)

=> kmenovost (stemness)

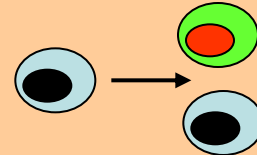
# Dělení buněk a jejich sebeobnova

## Dělení buněk (proliferace)

**Symetricky** – vznikají dvě identické buňky



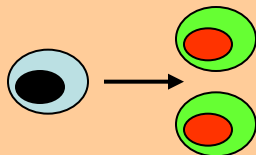
**Asymetricky** – jedna si zachovává původní fenotyp, druhá je již jiná



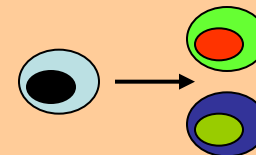
## *Diferenciační dělení*

– obě nově vzniklé buňky mají i nový fenotyp, jsou dalším stupněm v dané diferenciační linii

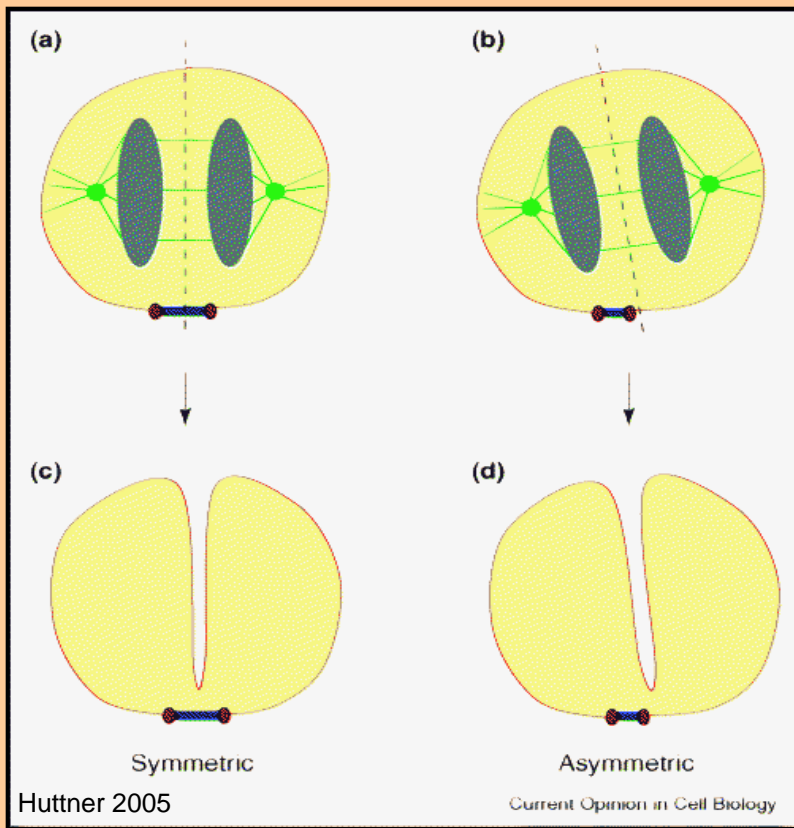
*diferenciační dělení symetrické*



*diferenciační dělení asymetrické*



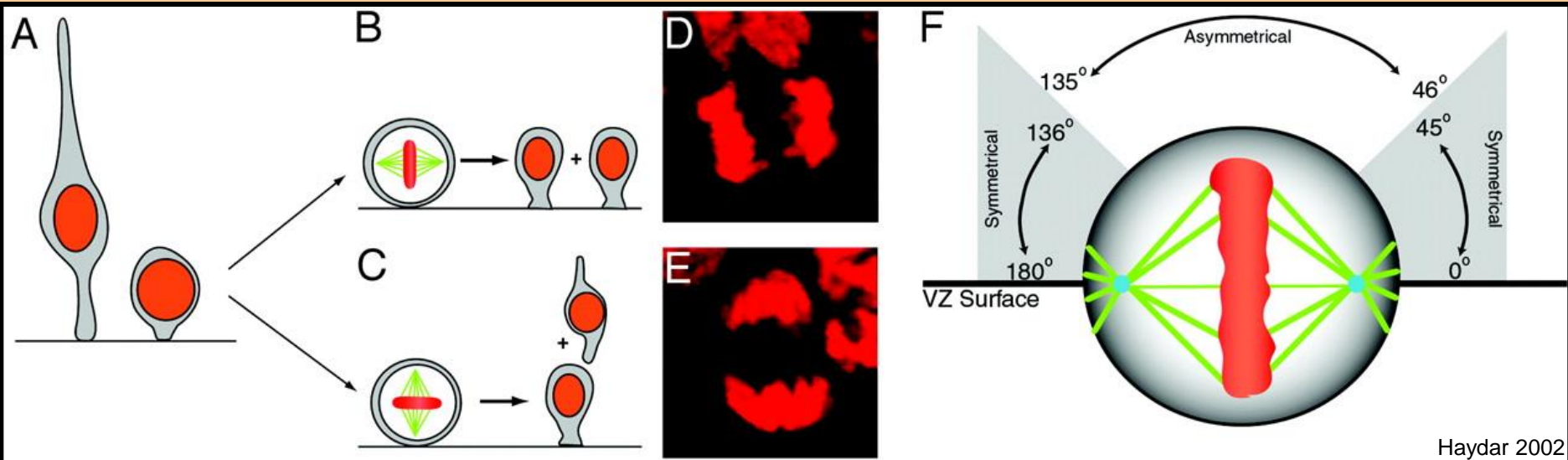
# ASYMETRICKÉ DĚLENÍ BUNĚK



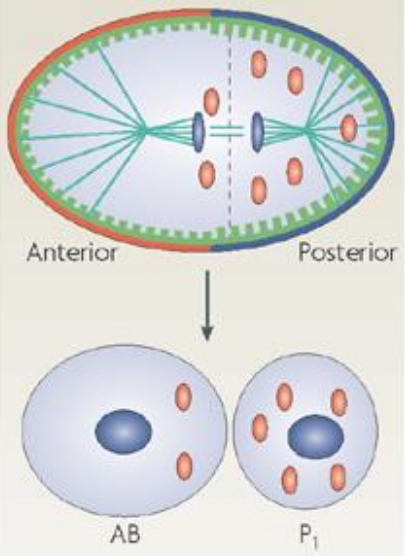
## O symetrii dělení rozhoduje

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

**=> souvislost s niche**

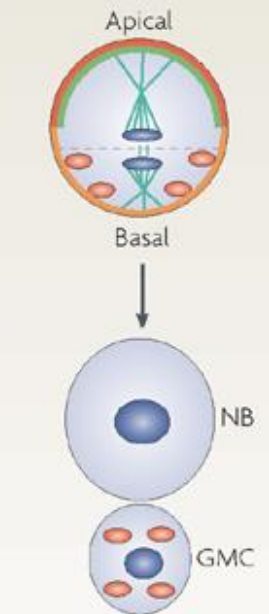


**a** *C. elegans*  
(one-cell stage)



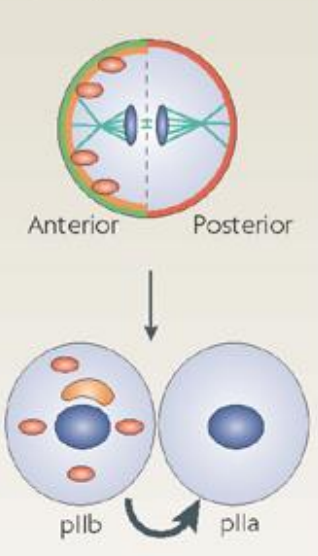
- PAR-3/PAR-6/PKC-3
- PAR-2, PAR-1
- LIN-5/G<sub>α</sub>
- GPR-1/2
- PIE-1
- Microtubules
- DNA

**b** *D. melanogaster*  
(neuroblast)

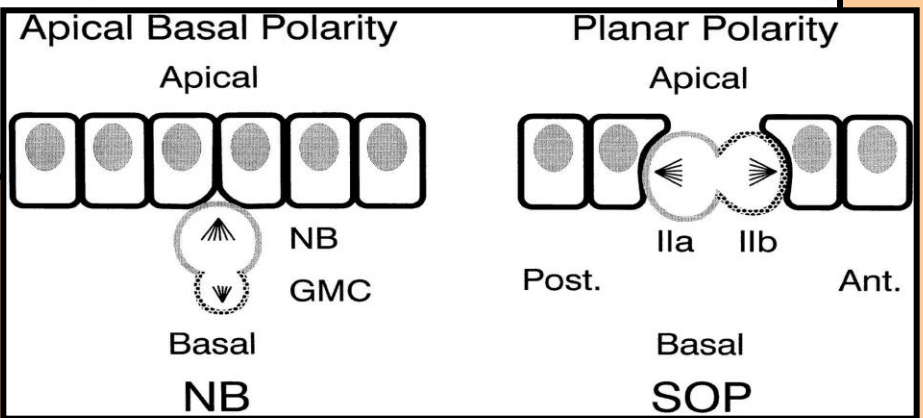


- PAR3/PAR6/aPKC
- Mud/Pins-Loxo/G<sub>αi</sub>
- Mira, Pon
- Brat, Numb, Prospero
- Microtubules
- DNA

**c** *D. melanogaster*  
(SOP)



- PAR3/PAR6/aPKC
- Mud/Pins-Loxo/G<sub>αi</sub>
- Pon
- Numb, Neuralized
- Recycling endosome
- Microtubules
- DNA

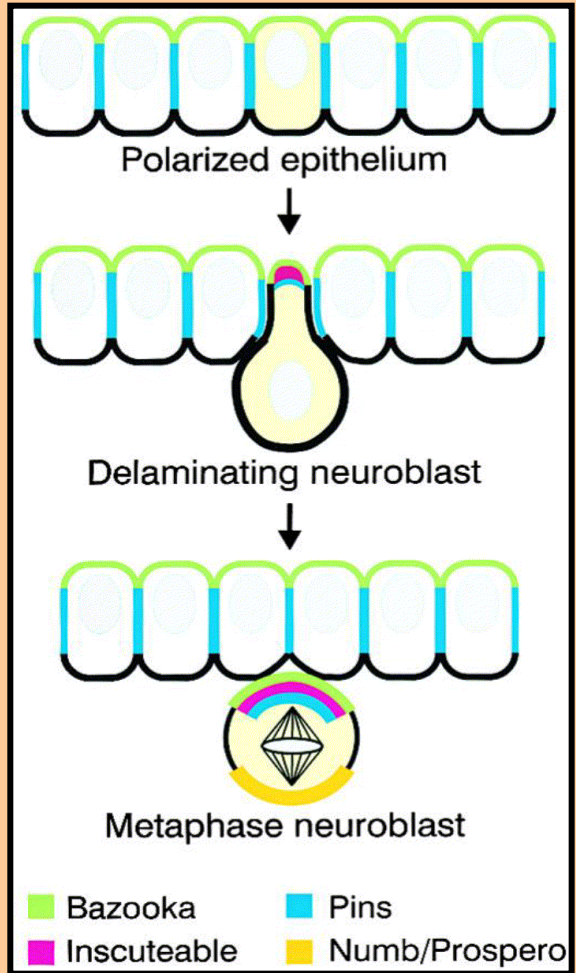


Příklady mechanismů regulujících symetrii buněčného dělení na modelových orgaismech

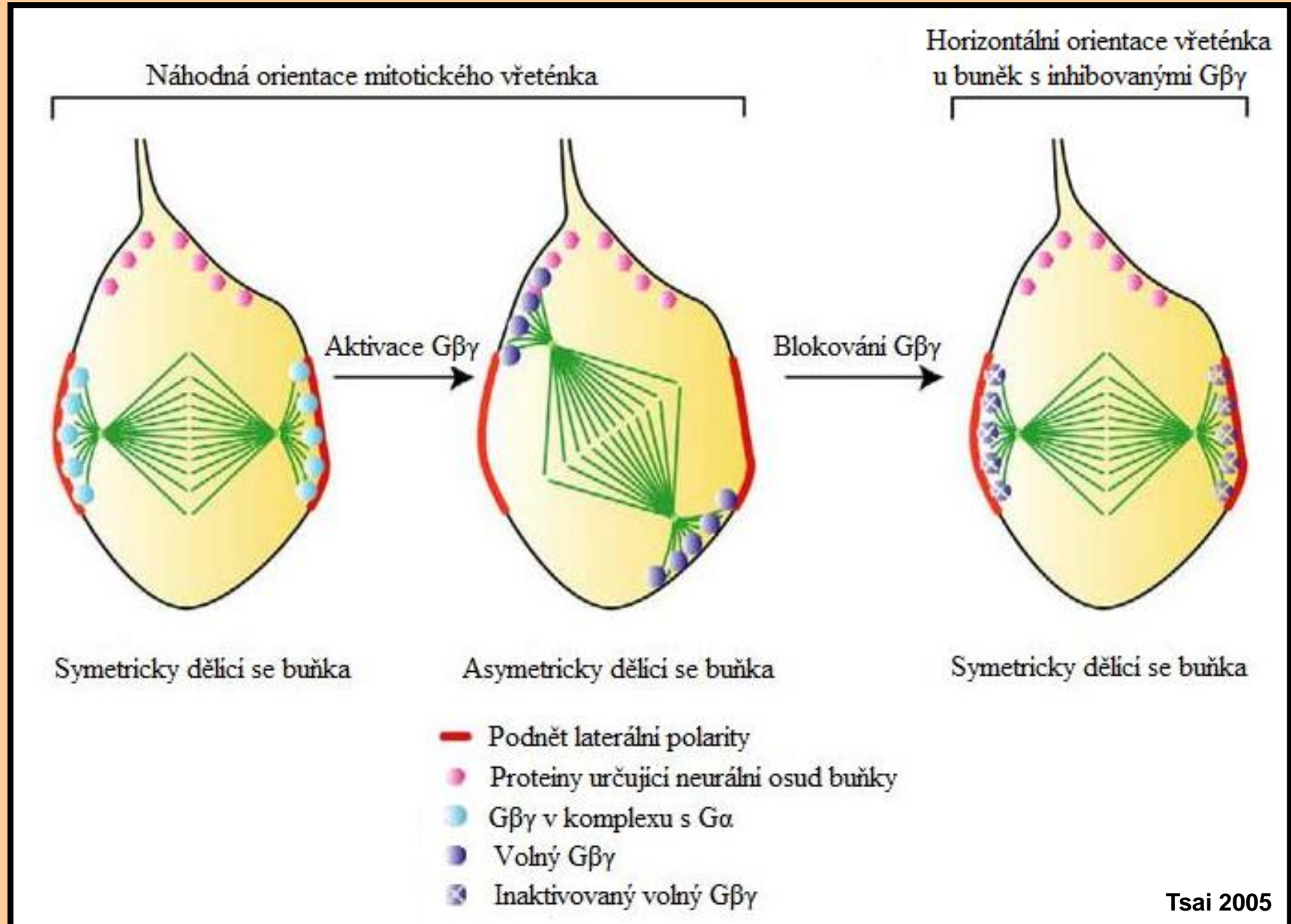
**NB** – neuroblast

**SOP** – sensory organ progenitor

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

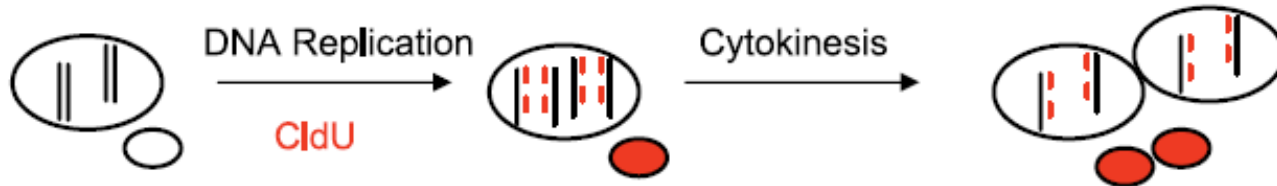


# Úloha (trimerických) G-proteinů v regulaci polohy dělicího vřeténka

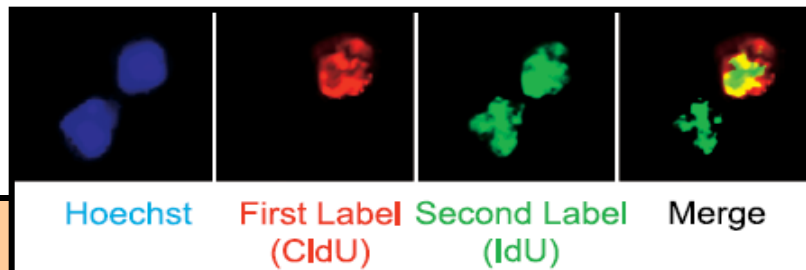
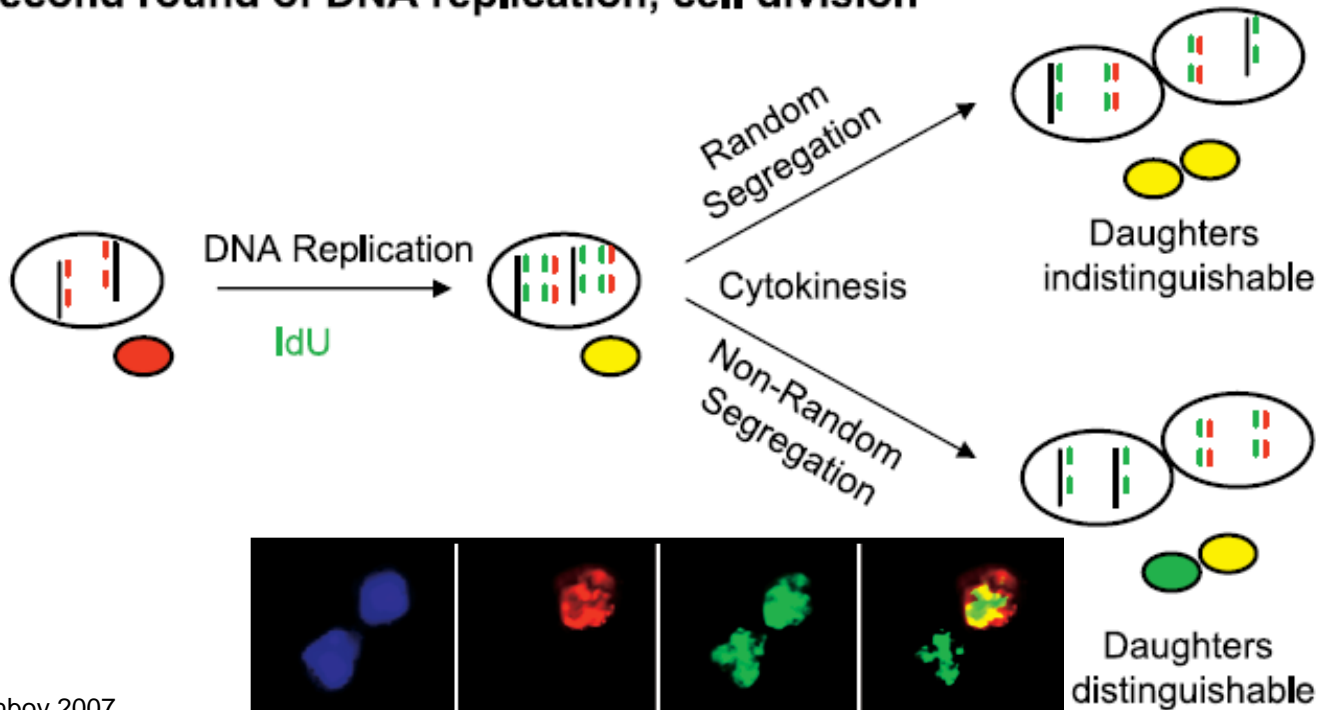


# Dělení genomu u progenitorů/kmenových buněk při asymetrickém dělení

## First round of DNA replication, cell division



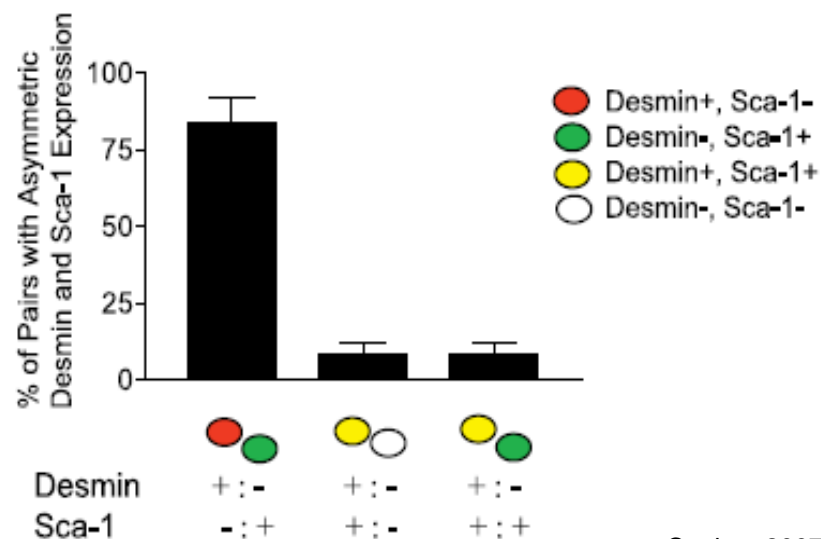
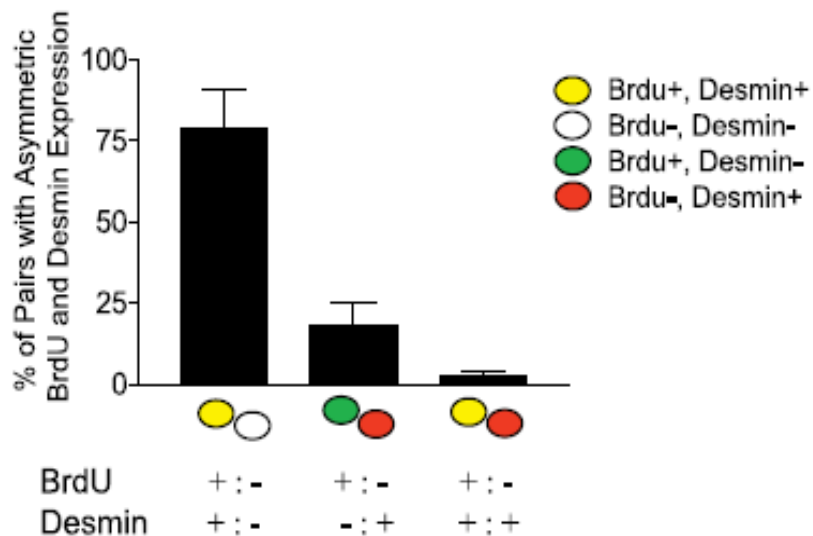
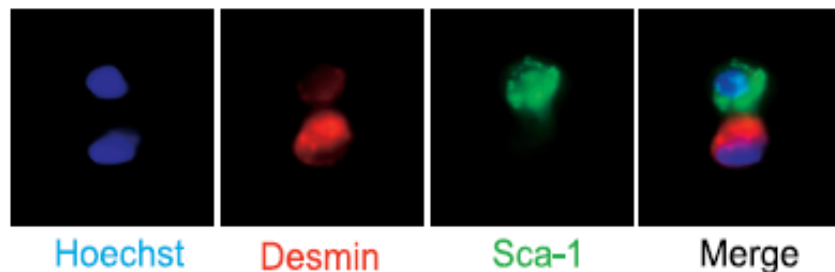
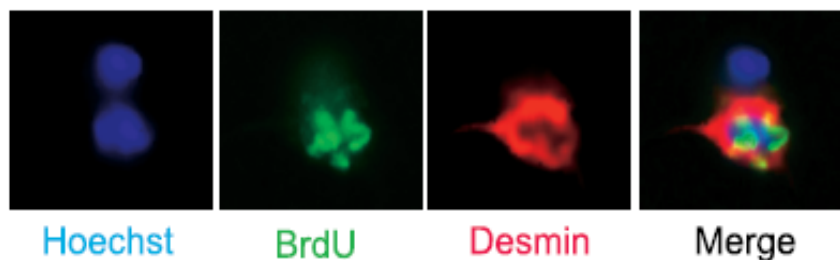
## Second round of DNA replication, cell division



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

Sca-1 – znak kmenové buňky koserní svaloviny

Desmin – protein charakterizující myoblast (časný progenitor svalové buňky)

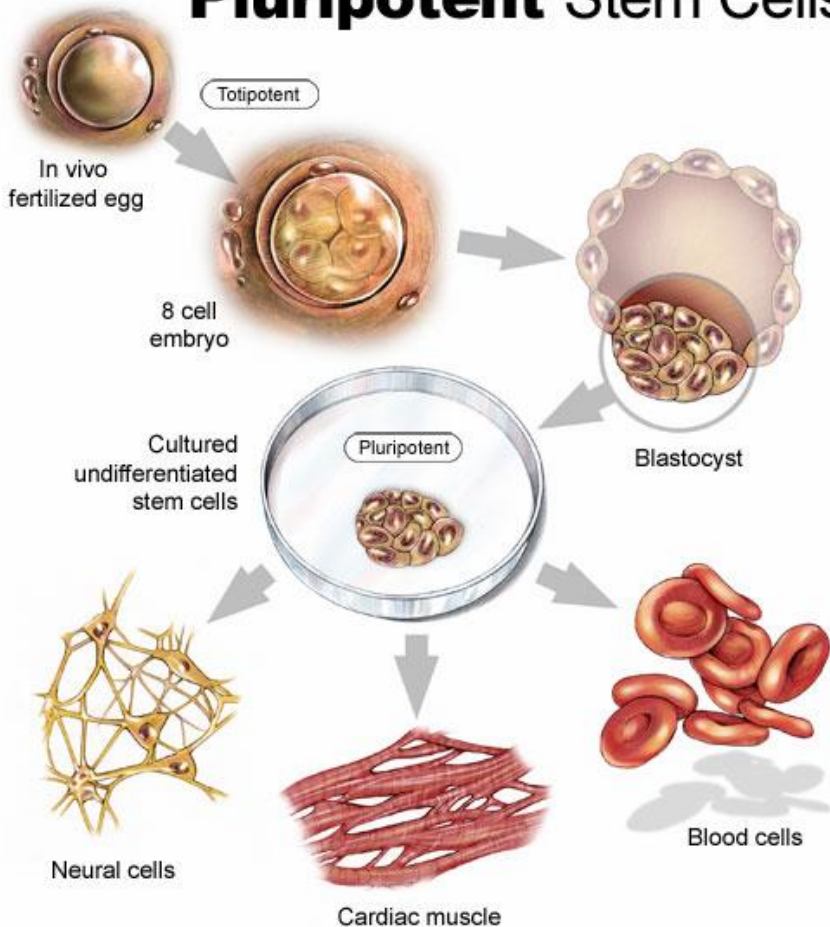




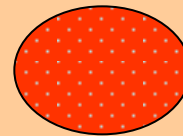
# Diferenciace (rozdružování) buněk

- Buňky mění svůj fenotyp v na základě změny exprese svého genotypu v důsledku vnějších signálů.
- Regulace diferenciace je často provázána s proliferací (epigenetické změny v jádře během mitotického cyklu?).

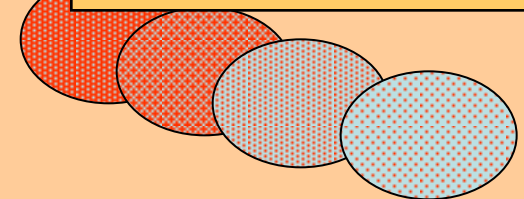
## Pluripotent Stem Cells



**Kmenová buňka  
aktuální <-> potencionální**

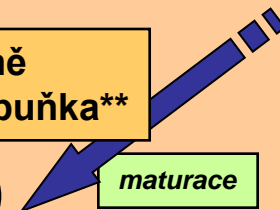
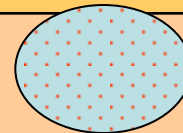


**Přechodně/transientně  
se dělicí buňky (Progenitory)\***



\* Často proliferují a mají schopnost krátkodobé sebeobnovy.

**Terminálně  
diferencovaná buňka\*\***

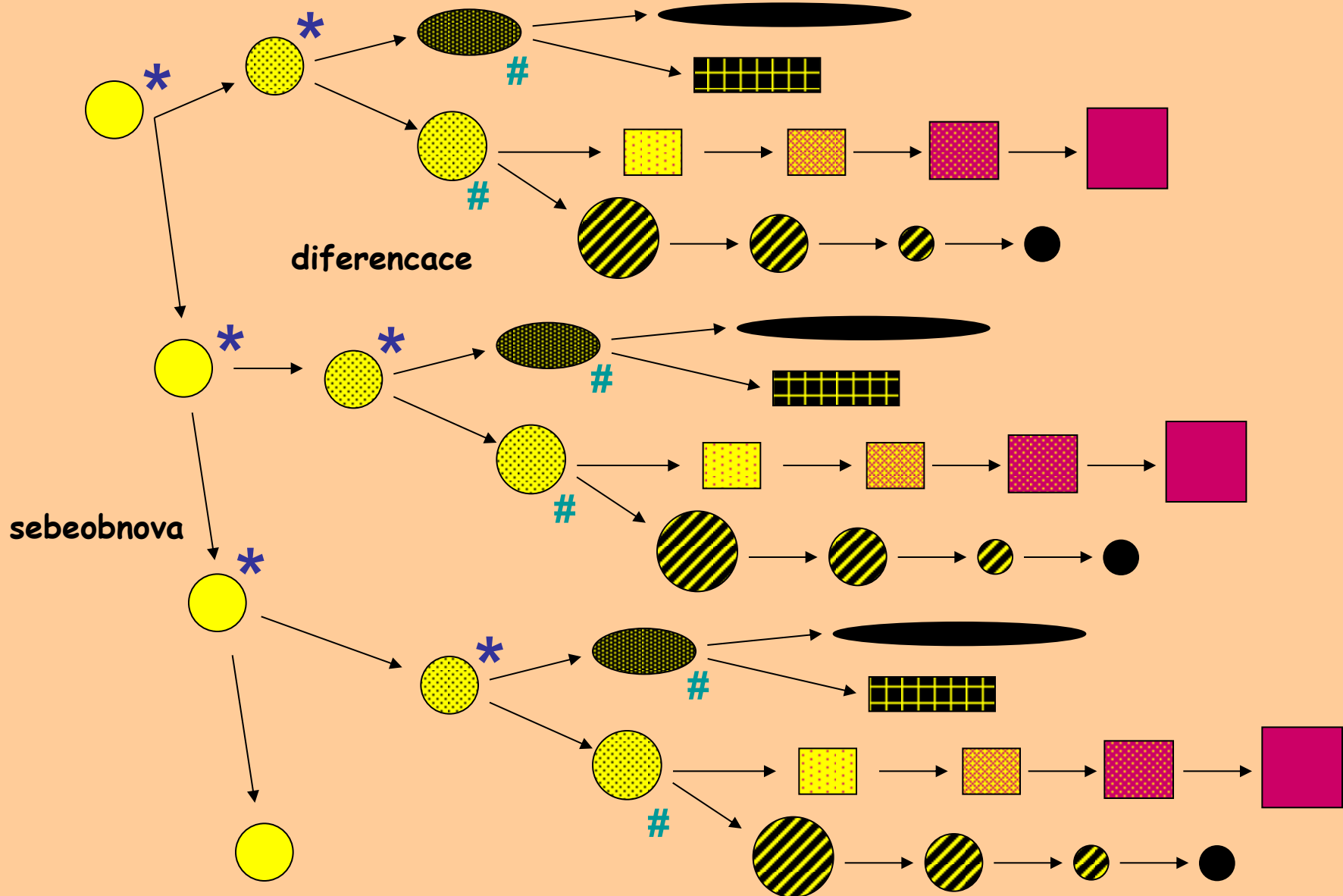


\*\* Post-mitotické buňky = už se nikdy nedělí.  
Ne všechny terminálně diferencované buňky jsou post-mitotické.

# Diferenciace buněk

\* sebeobnovující asymetrické dělení

# diferenciační asymetrické dělení



## Diferenciace buněk

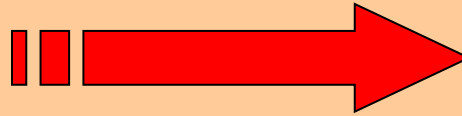
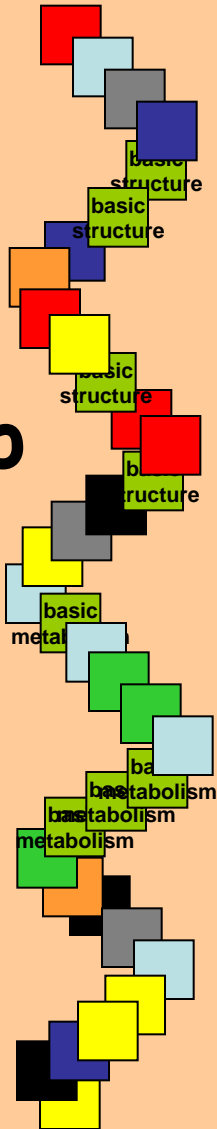
přestavba genomu / chromatinu → exprese jiného paternu genů → jiná morfologie, jiné funkce a potenciál

**Determinace** – předurčení pro danou diferenciační linii / dráhu

### geny a jejich produkty

- „*housekeeping*“ (metabolismus, transkripce / translace, základy cytoskeletu)
- *všeobecně abundantní* (transkripce/translace, cytoskelet, komponenty signálních drah)
- *specifické* (enzymy, specifické transkripční faktory, cytoskelet – komponenty intermediálních filament, s cytoskeletem asociované proteiny)

genotyp



fenotyp

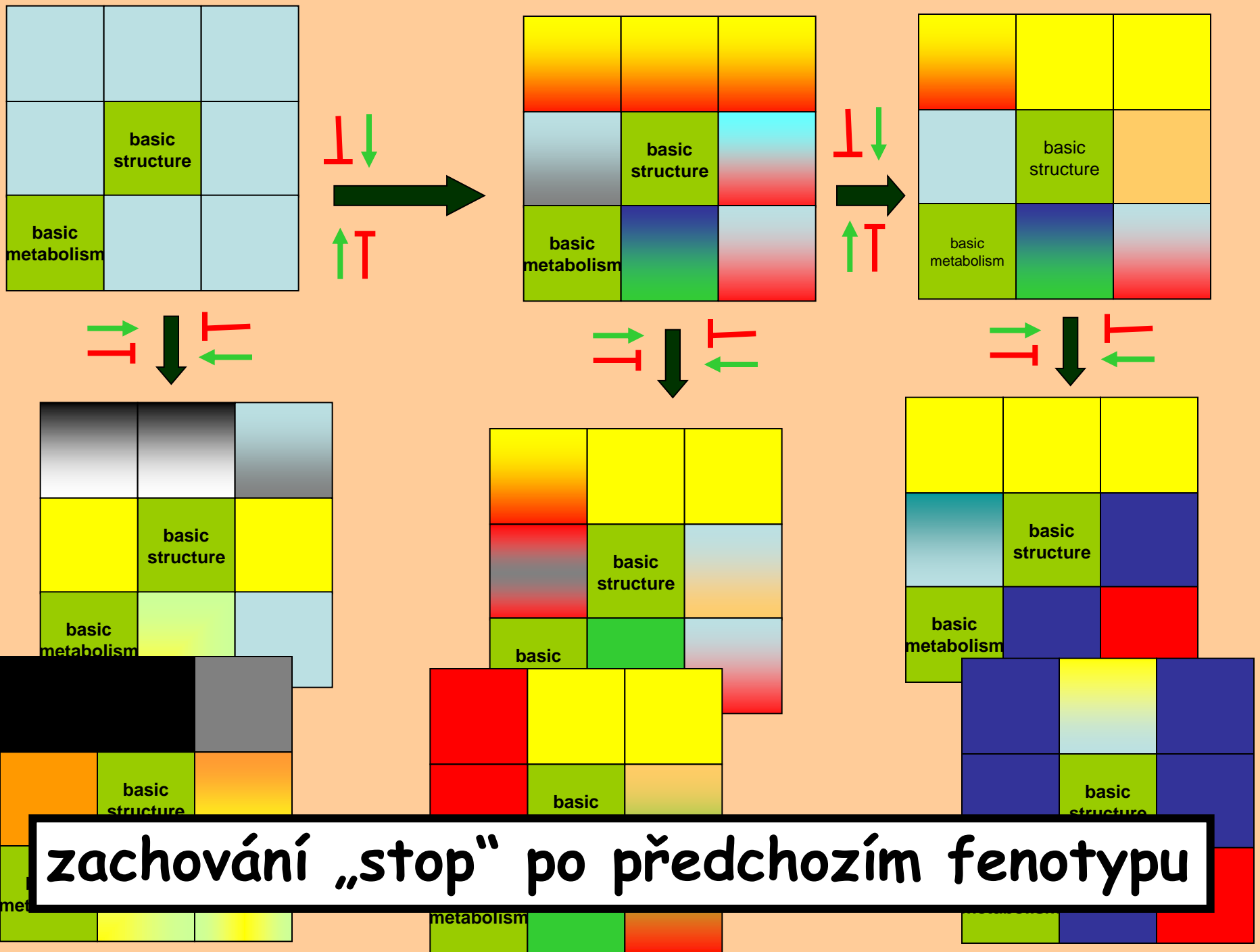
	basic structure	
basic metabolism		

nezralá / naivní buňka

dle skupin genů,  
které jsou exprimovány /

	basic structure	
basic metabolism		

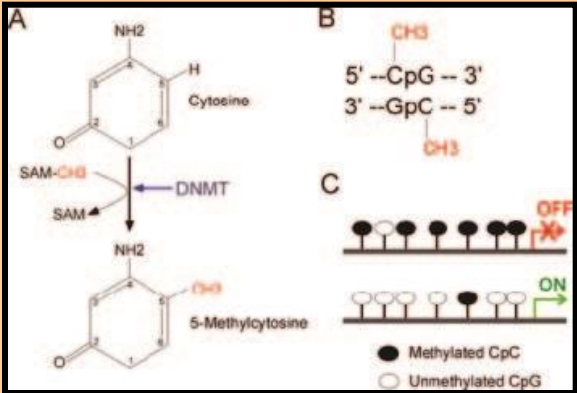
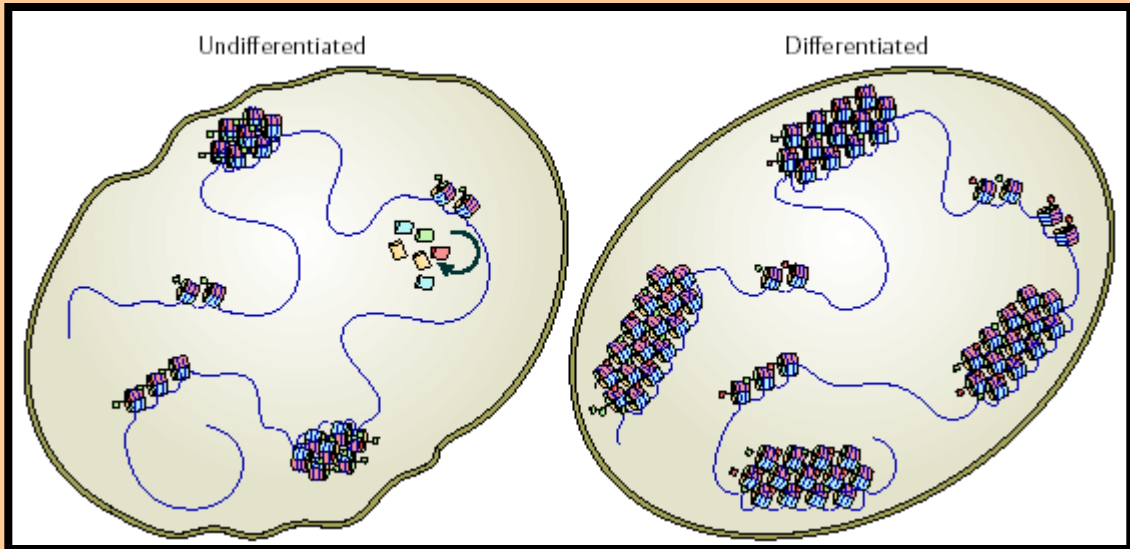
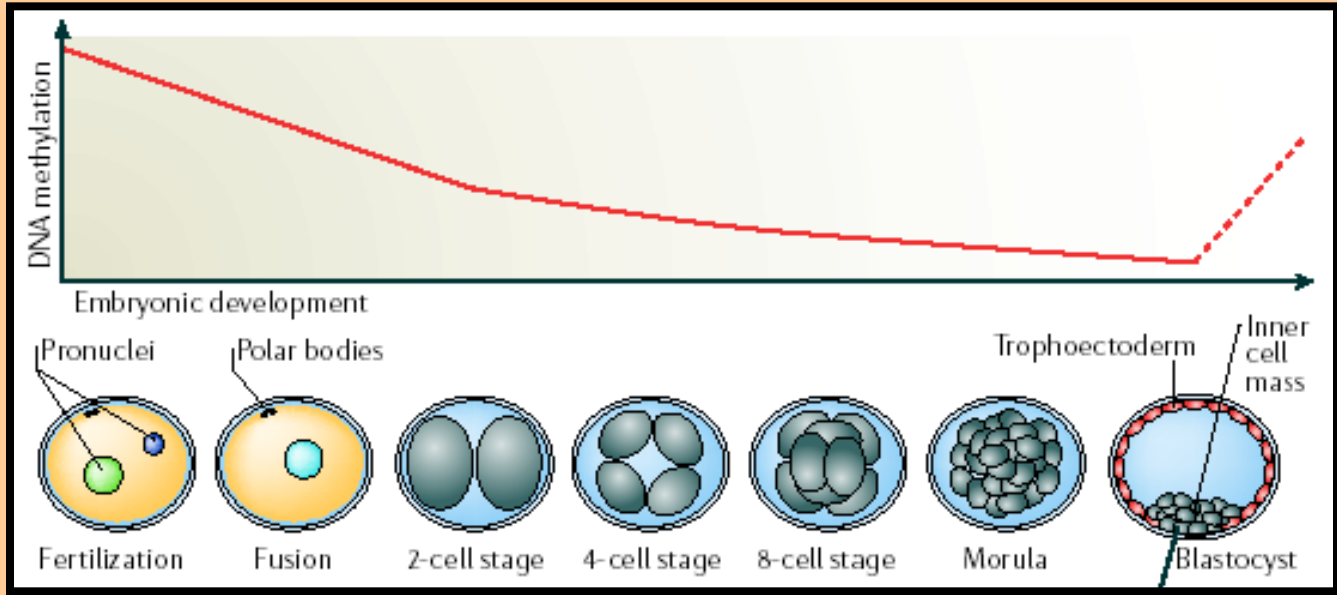
specializovaná / diferencovaná /  
zralá buňka



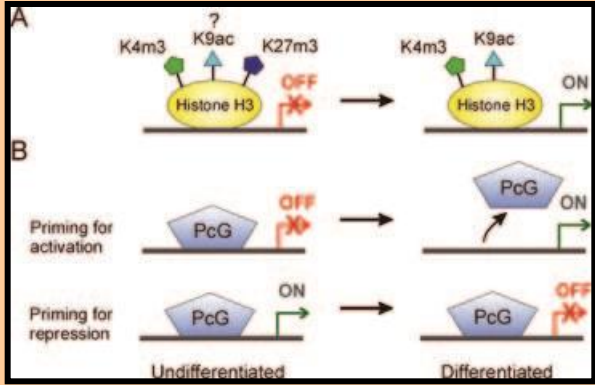
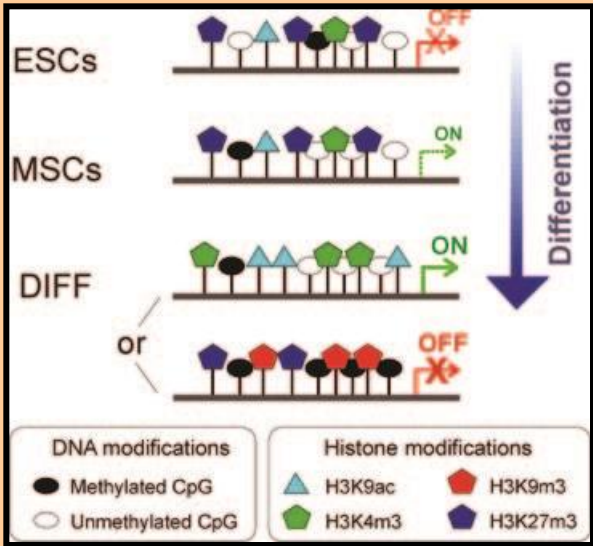
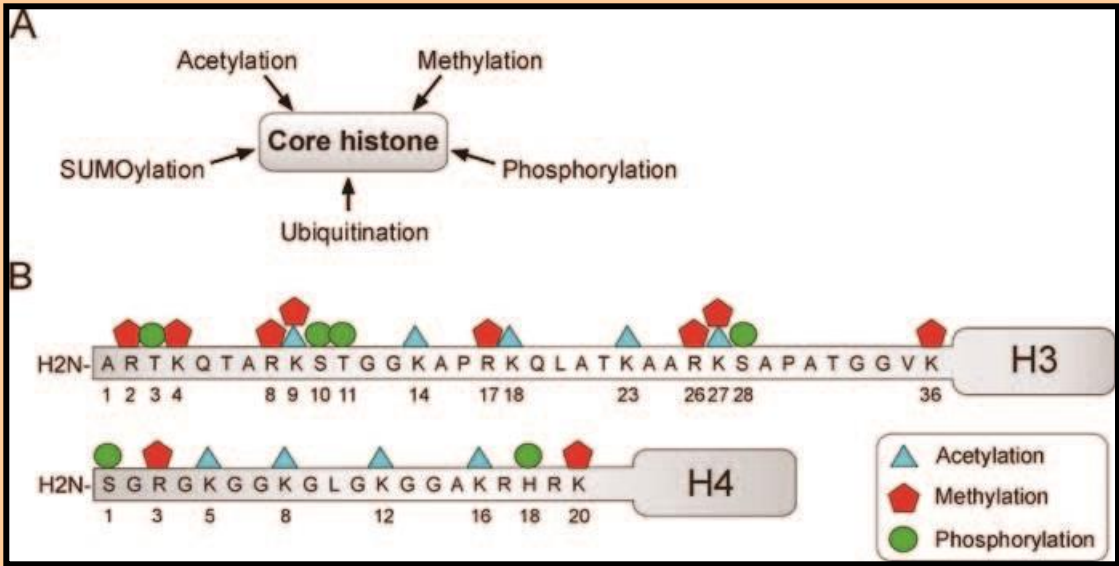
zachování „stop“ po předchozím fenotypu

# Epigenetika

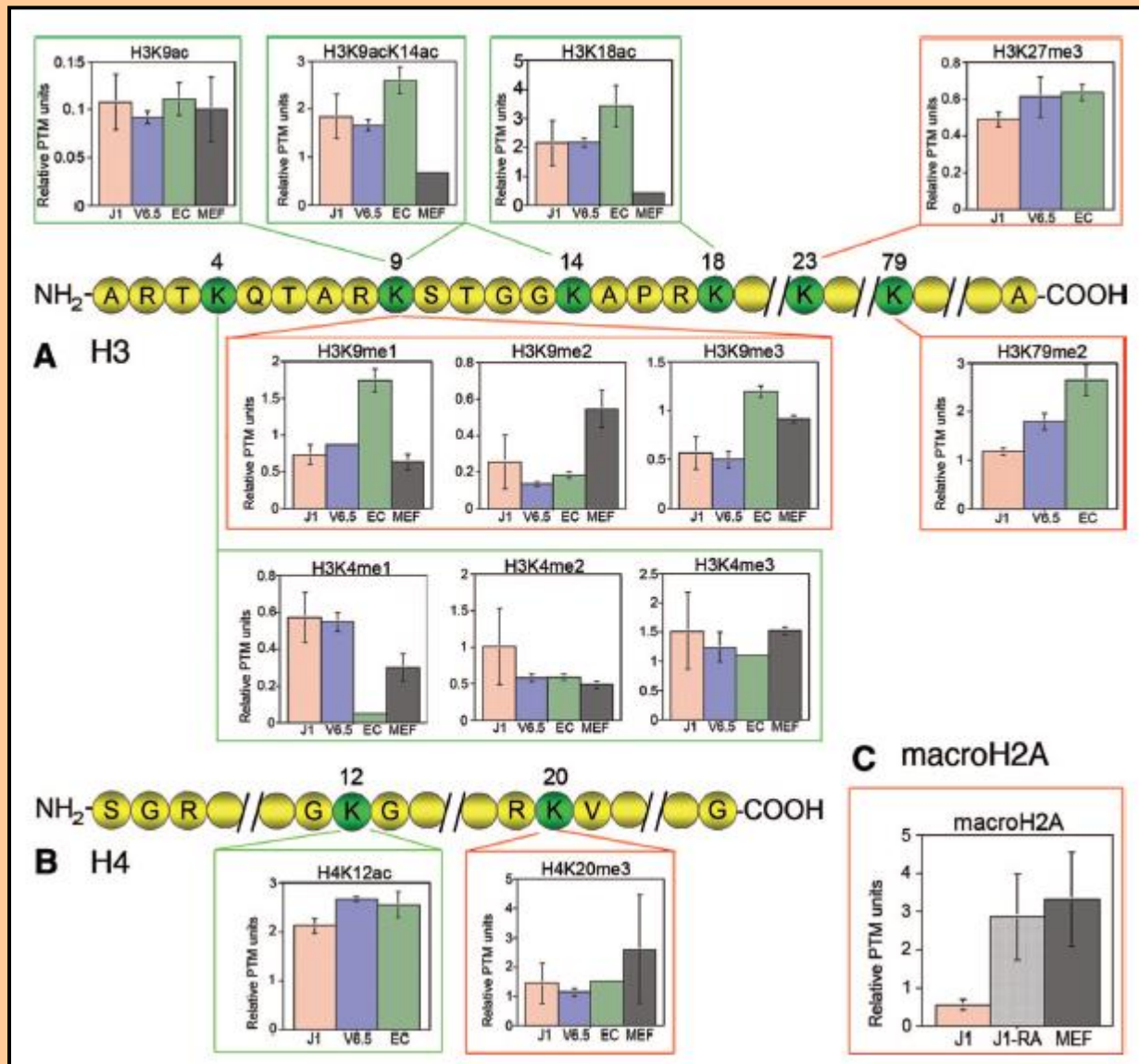
Metylace DNA a kondenzace chromatinu během časného vývoje



# Modifikace histonů – regulace transkripce

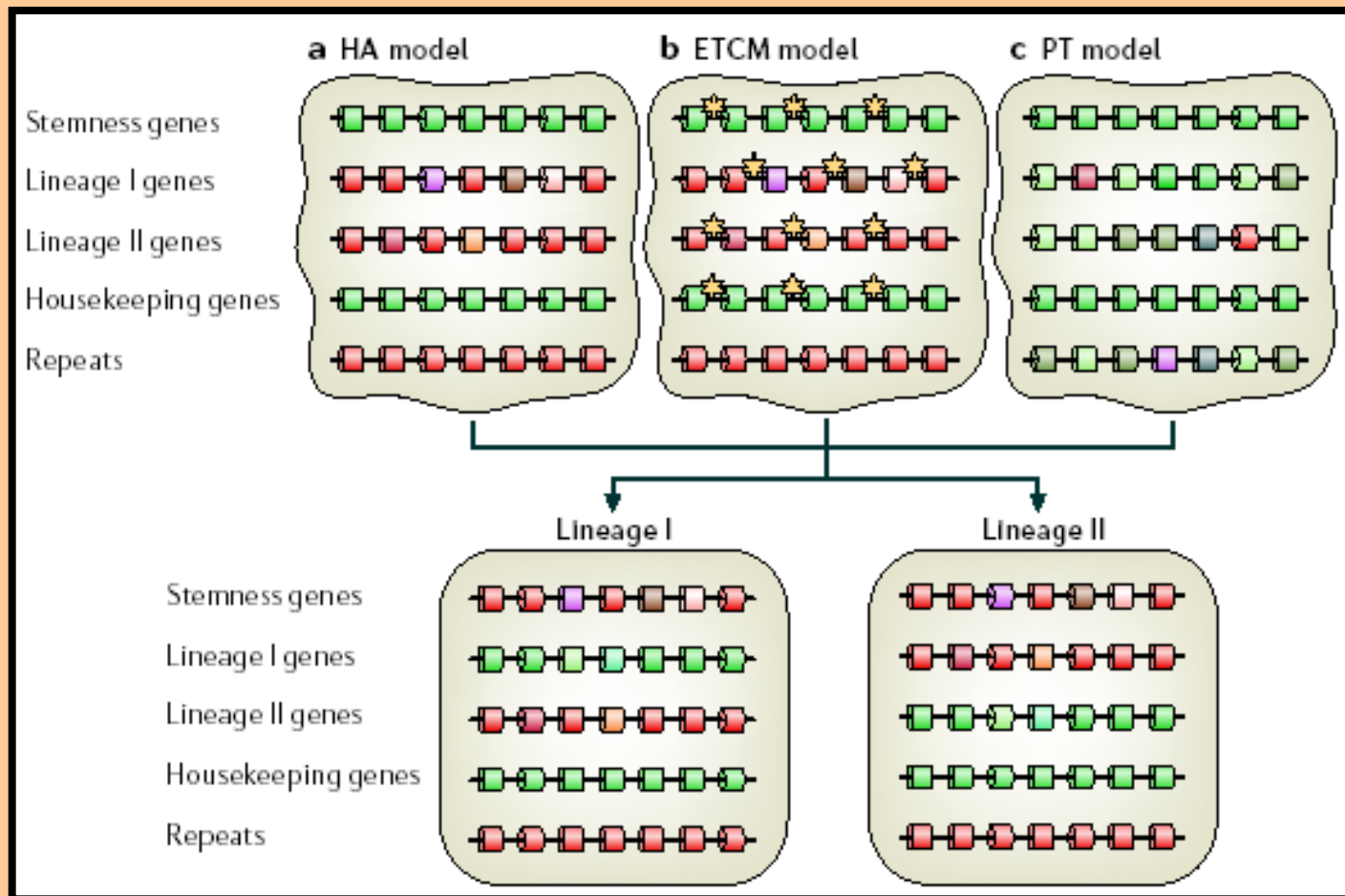


# Profil postranslačních modifikací (lysinových zbytků) histonů H3 a H4 u ES (J1, V6.5), EC a MEF buněk





# Model změn transkripčního profilu v průběhu indukce diferenciace (kmenových) 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

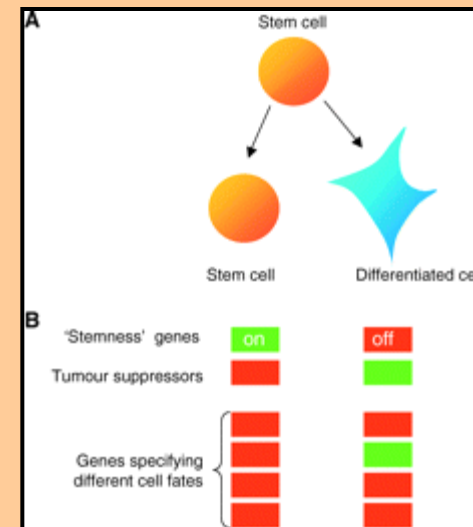
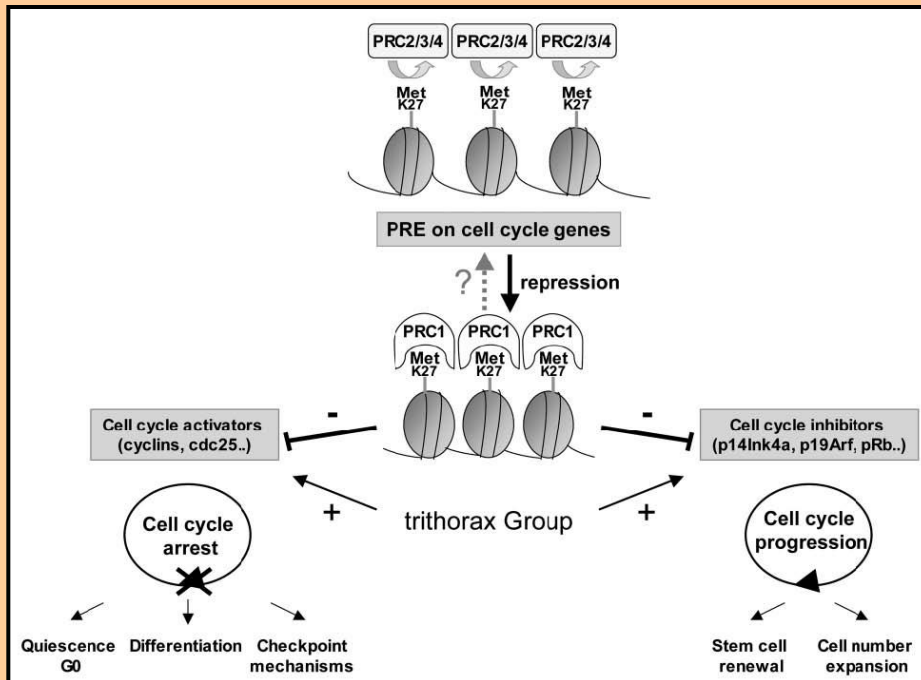
PcG jsou odpovědné za inaktivaci transkripce cílových oblastí  
 trxG jsou odpovědné za aktivaci transkripce cílových oblastí

- 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



## Z hlediska schopnosti tvořit další buněčné typy se buňky dělí na:

**Totipotentní** – mohou z nich vznikat všechny buňky daného živočišného druhu

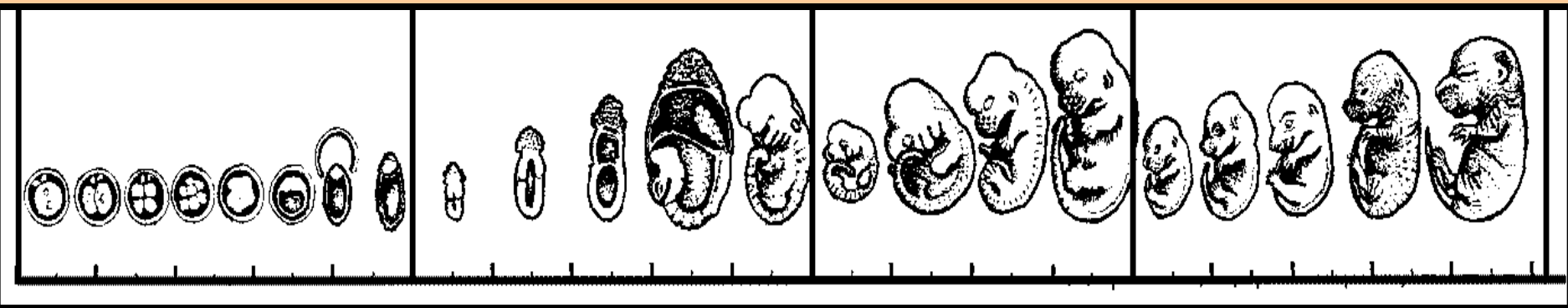
**Pluripotentní** – mohou dát vznik všem buňkám budoucího jedince (všechny tři zárodečné listy)

**Multipotentní** – může z nich vznikat větší počet buněčných typů dané buněčné řady

(**Oligopotentní** – podobné jako multipotentní, ale méně typů)

**Unipotentní** – dávají vznik jen dvěma typům buněk

**Nullipotentní** – mohou se pouze dělit, nemění fenotyp



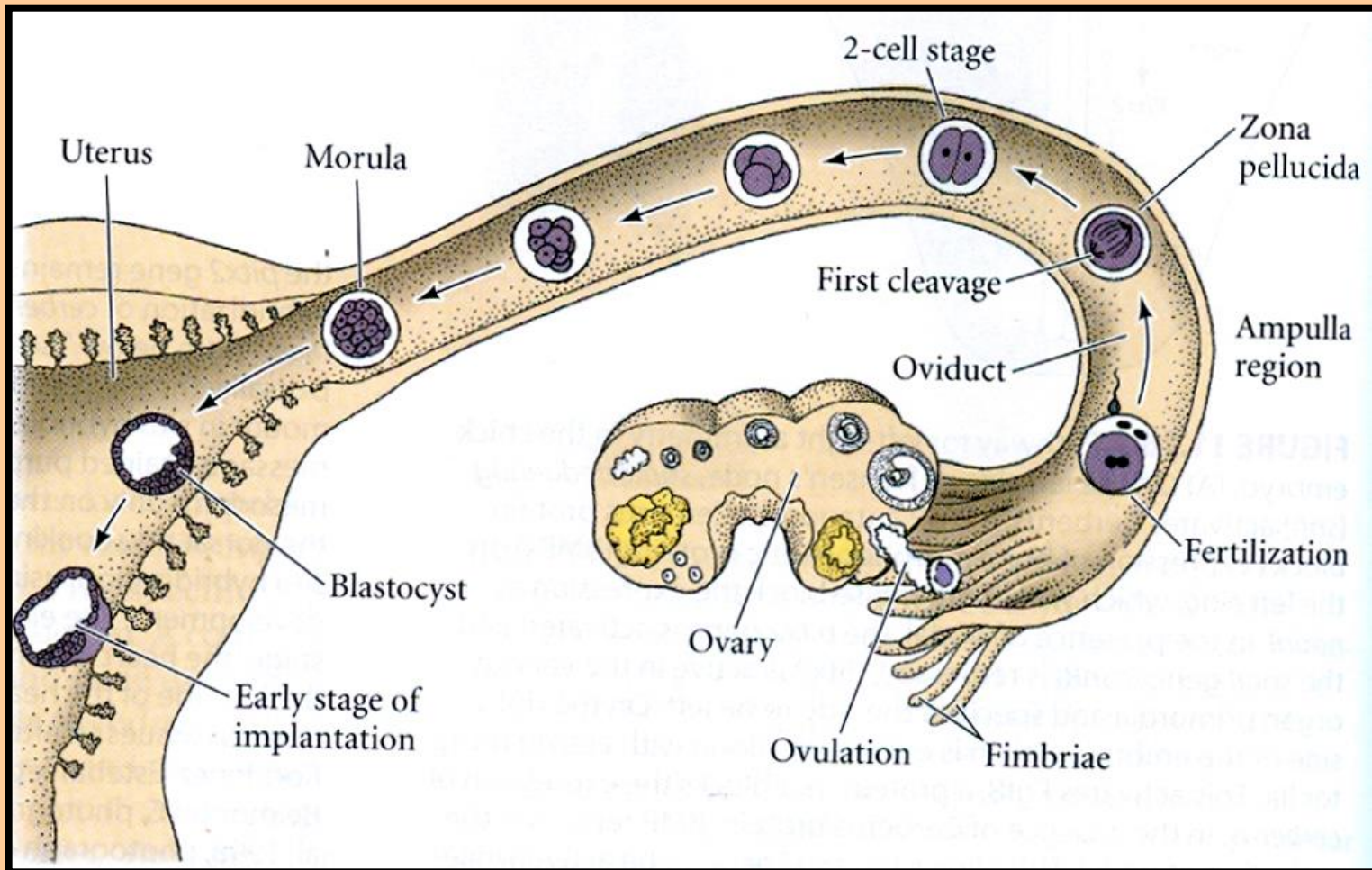
**totipotentní  
buňky**



**pluripotentní, multipotentní, ....  
buňky**

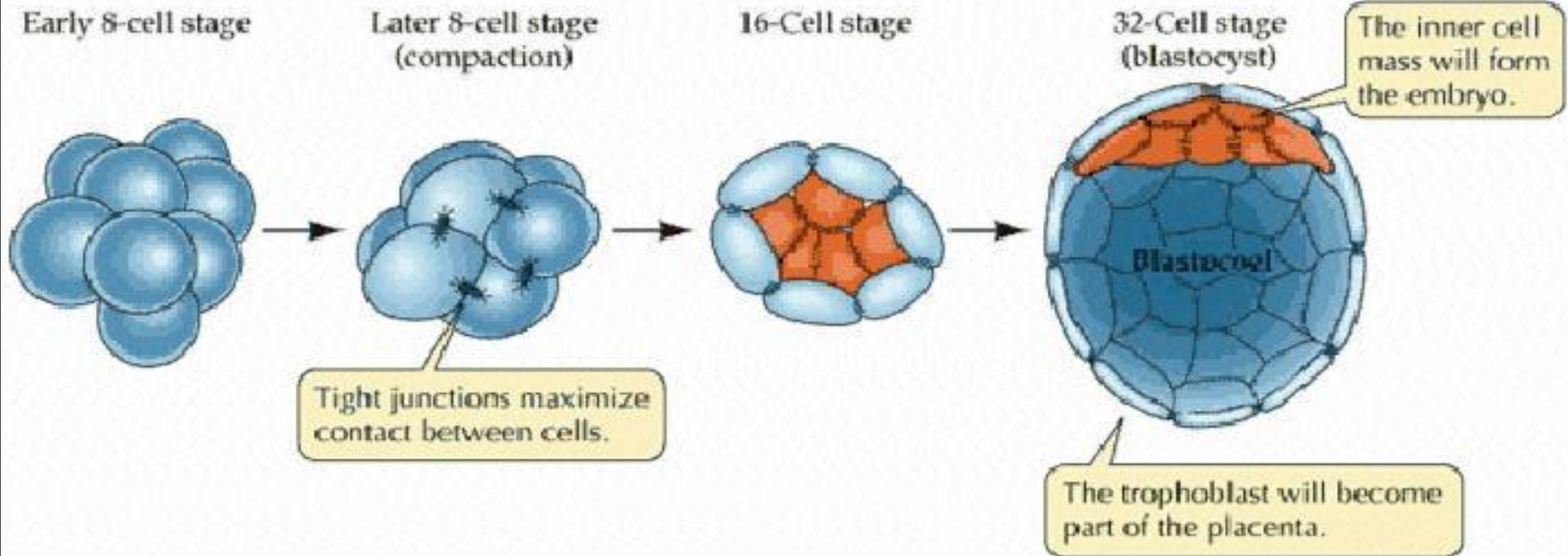
# Totipotentní buňky

- 1- až 8-buněčné embryo (= Embryonální nesespecifikované - pouze savci)
- Omezené možnosti dělení (neprobíhá transkripce; myš 2/4 b., člověk 8 b.)
- Existují pouze přechodně

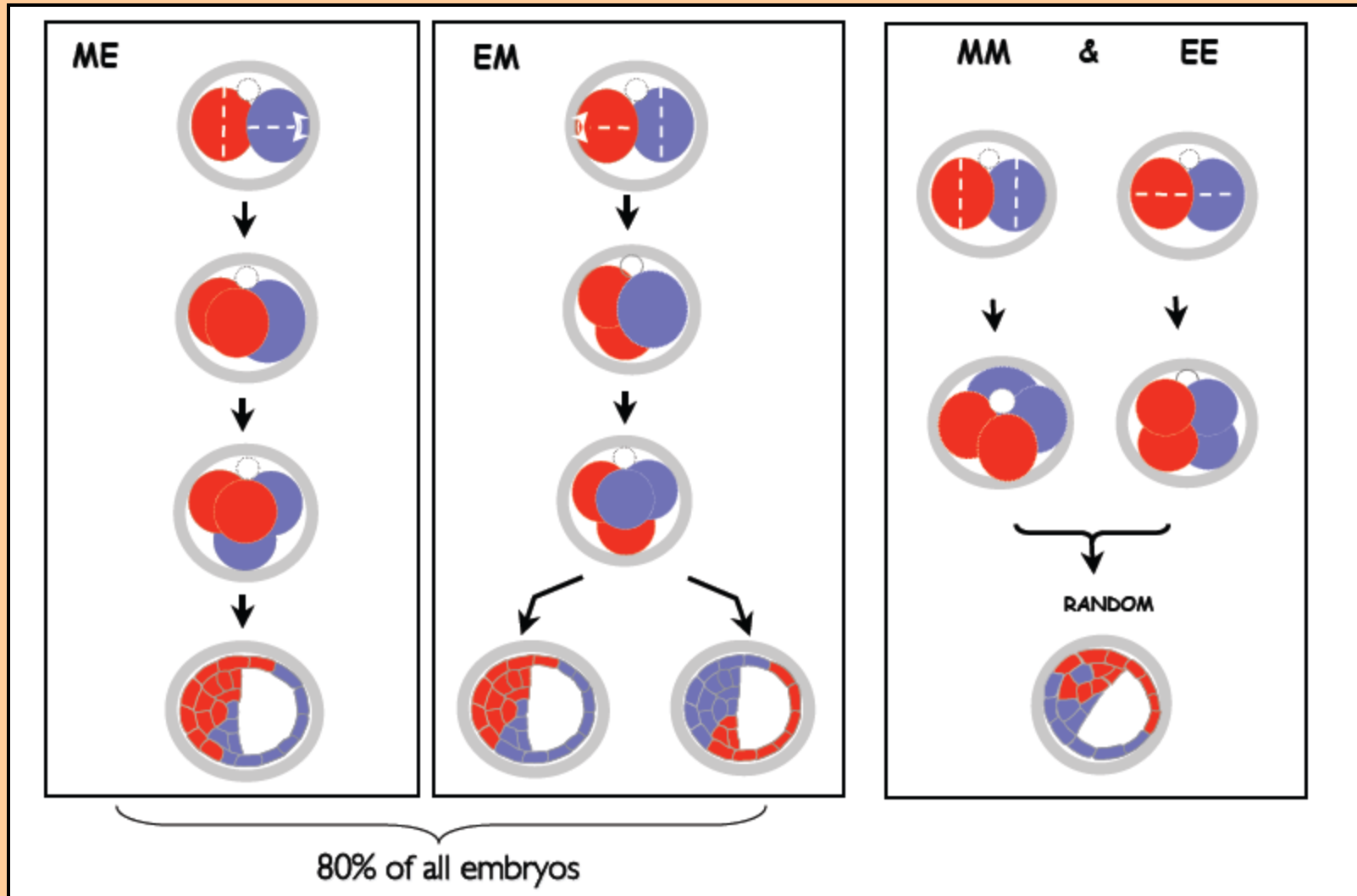


## Ztráta totipotence v průběhu časně embryogeneze

- vznik nerovnoměrných podmínek pro růst buněk
- tento proces je ireverzibilní

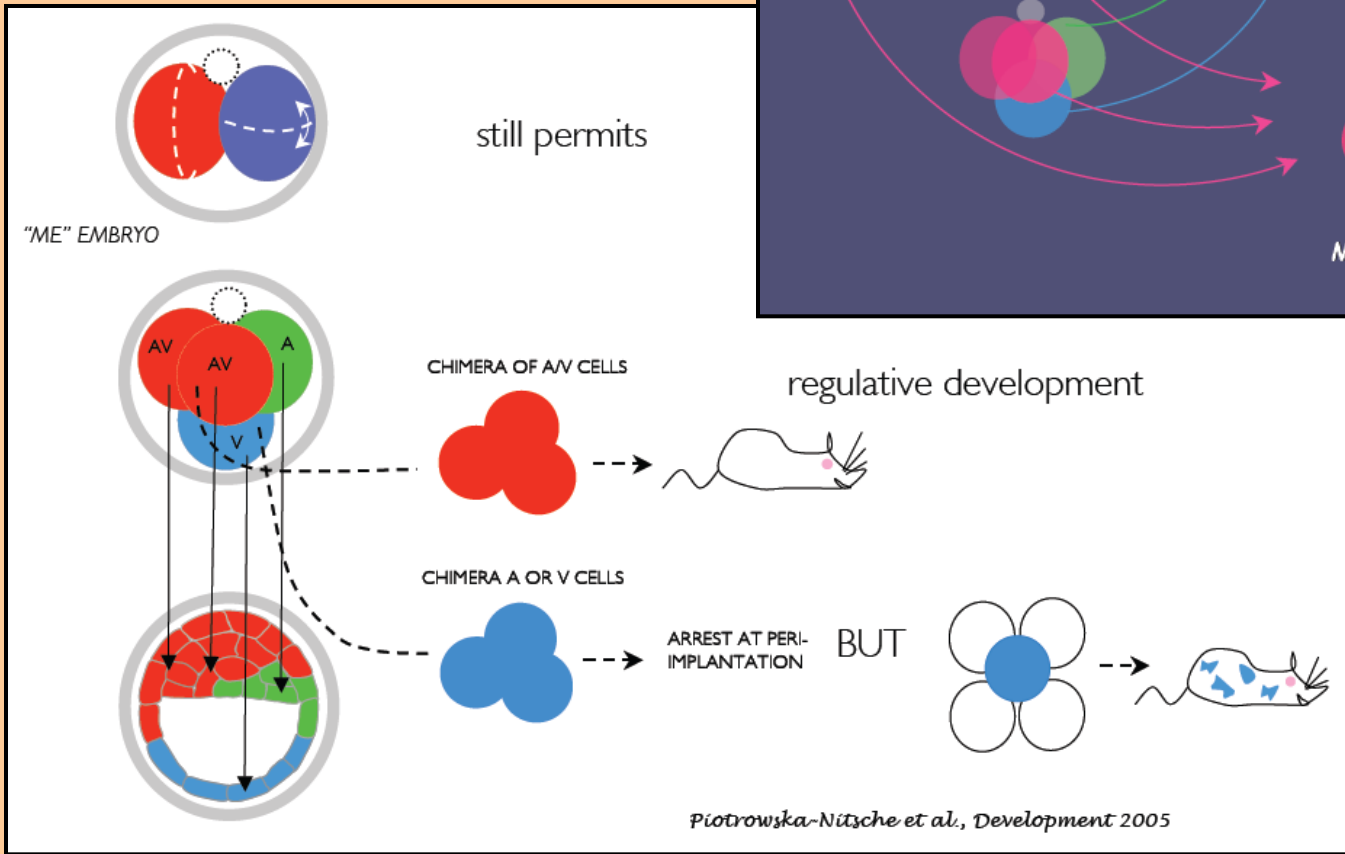
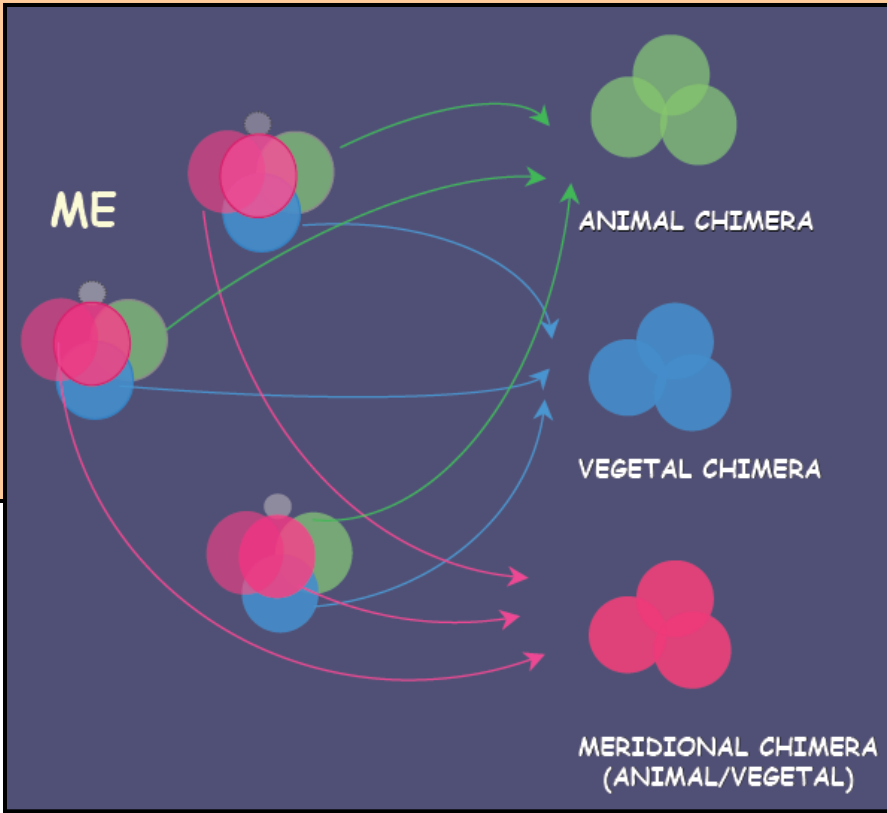


**Dělení buněk 2-buněčného embrya, určení polaritu a její vliv na další osud blastomer**  
Magdalena Zernicka-Goetz 2006



**M – meridiální / E - ekvatoriální**

**Orientace blastomer 4-buněčného embrya a její vliv na zachování absolutní totipotence těchto buněk**



# Pluripotentní buňky (savci)

## a) In vivo:

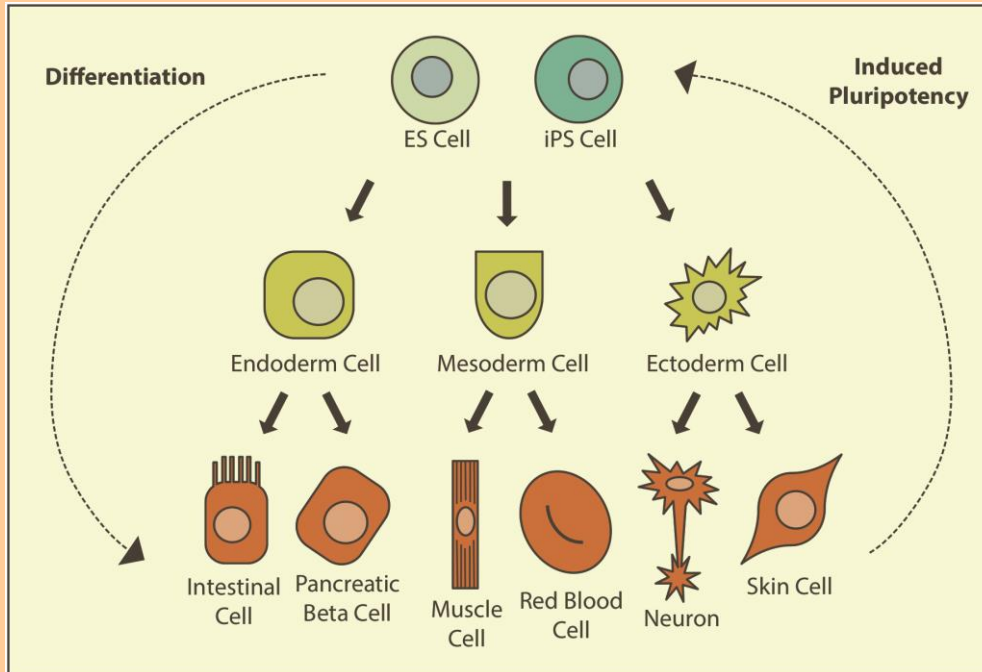
buňky vnitřní buněčné masy

buňky epiblastu / primitivního ektodermu

(buňky nerální lišty (4tý zárodečný list) - široce multipotentní)

kmenové buňky teratomů (?)

(! (somatické kmenové buňky?))



## b) In vitro:

embryonální kmenové buňky

embryonální zárodečné buňky

embryonální nádorové buňky  
(kmenové buňky teratomů)

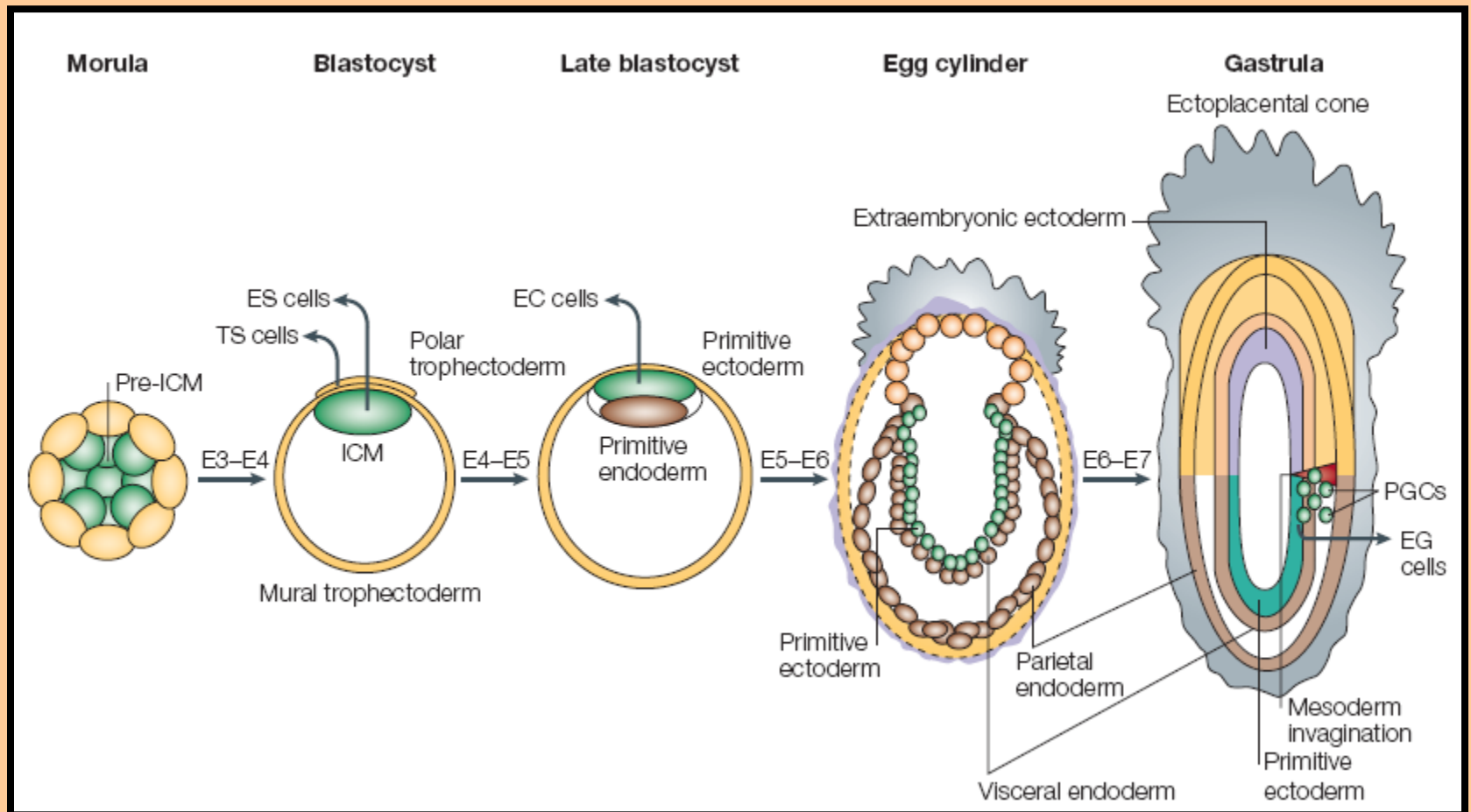
indukované pluripotentní kmeové buňky

(buňky nerální lišty (4tý zárodečný list) - široce multipotentní)

(spermatogoniální kmenové buňky)  
(z dospělých varlat)

(! (somatické kmenové buňky?))

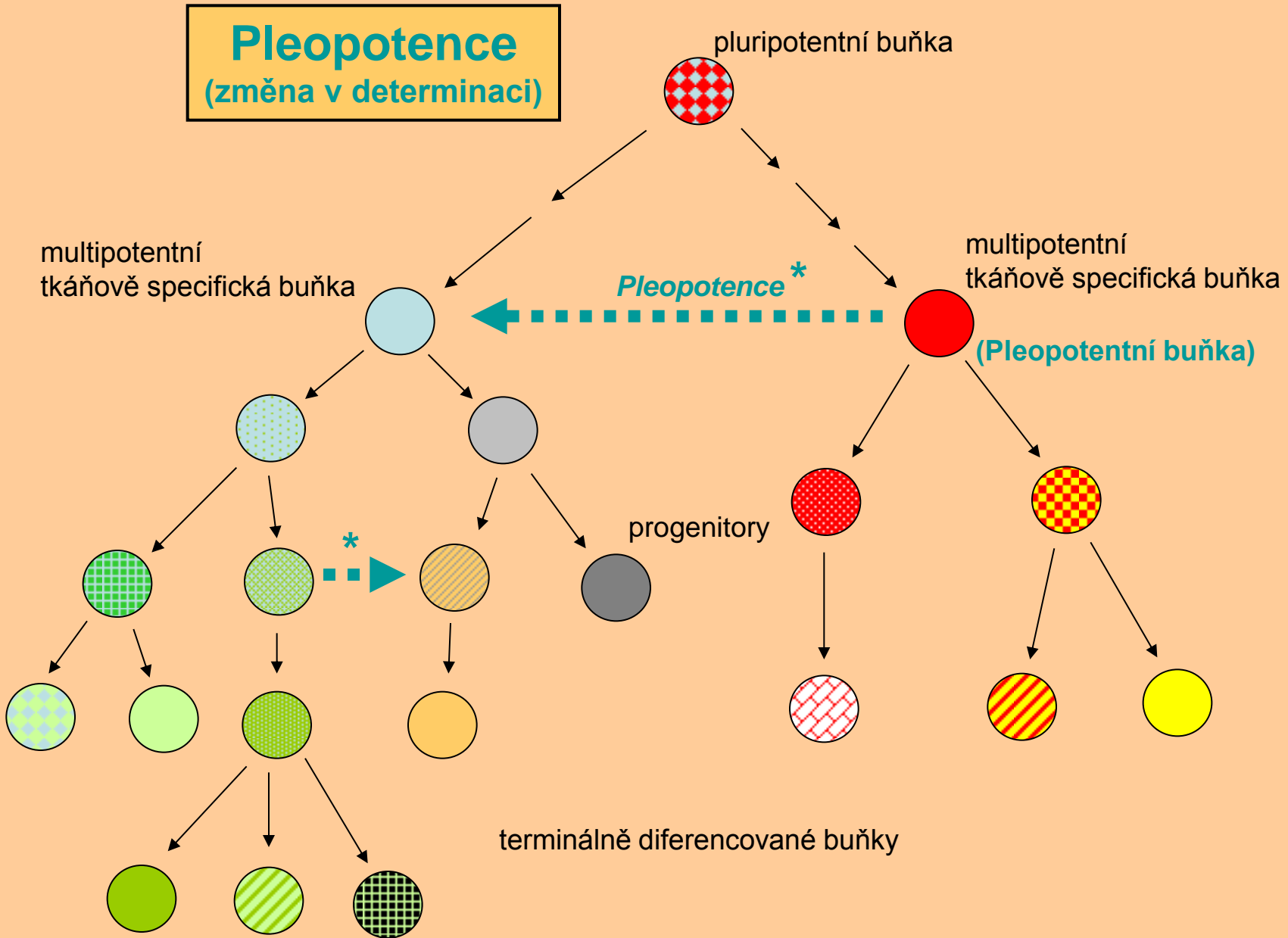




Boiani & Scholer 2005

**Kmenové buňky mohou být pluripotentní, multipotentní,...  
ale pluripotentní nebo multipotentní buňky nemusí být kmenové.**

# Pleopotence (změna v determinaci)



# REGULACE KMENOVÝCH BUNĚK

Existence kmenových buněk je regulována

- a) vnitřními (intrinsic) faktory (vývojově specifické transkripční faktory a specifické kombinace drah transdukce signálů)
- b) vnějšími (extrinsic) faktory (v niche)

Kmenové buňky mohou existovat jen v příslušném „NICHE“

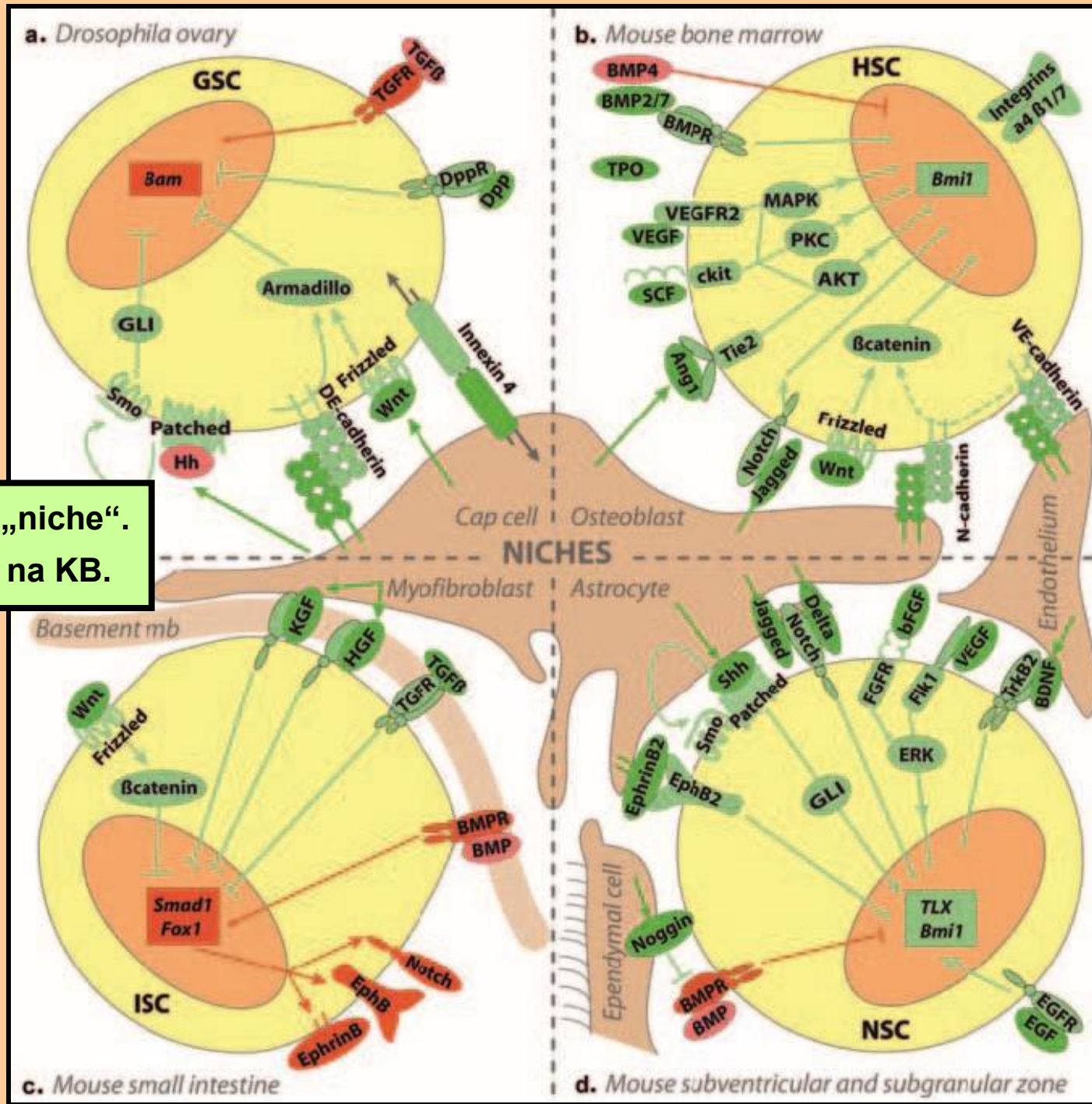
Co v NICHE najdeme?

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

Podobně jako se zdají být somatické SCs tkáňově/orgánově specifické, jsou specifické i jejich „niche“.

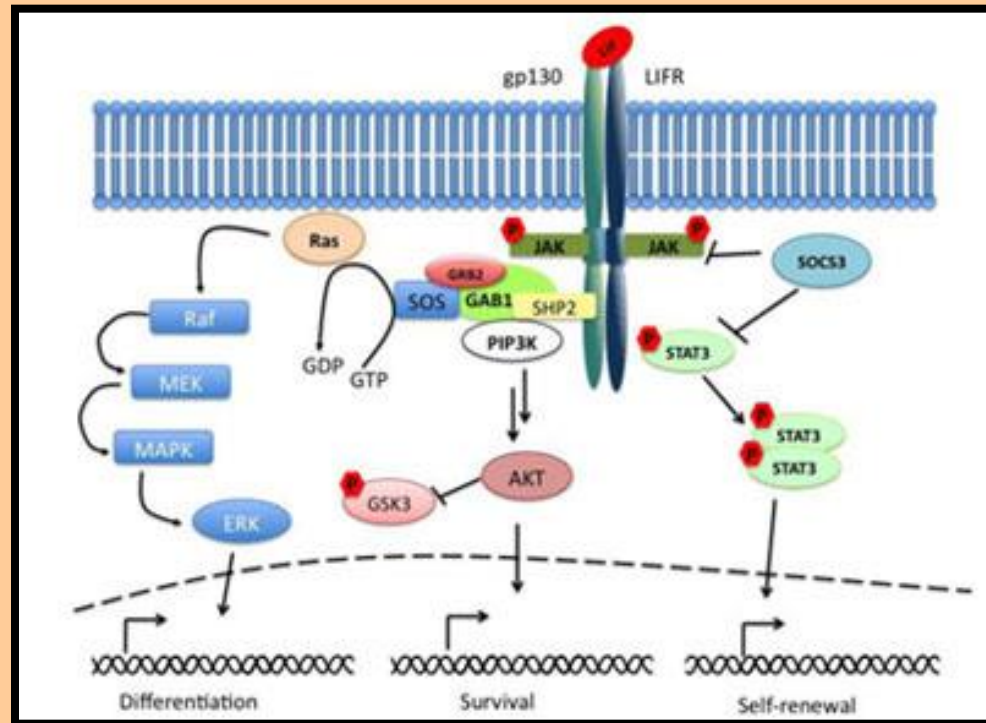
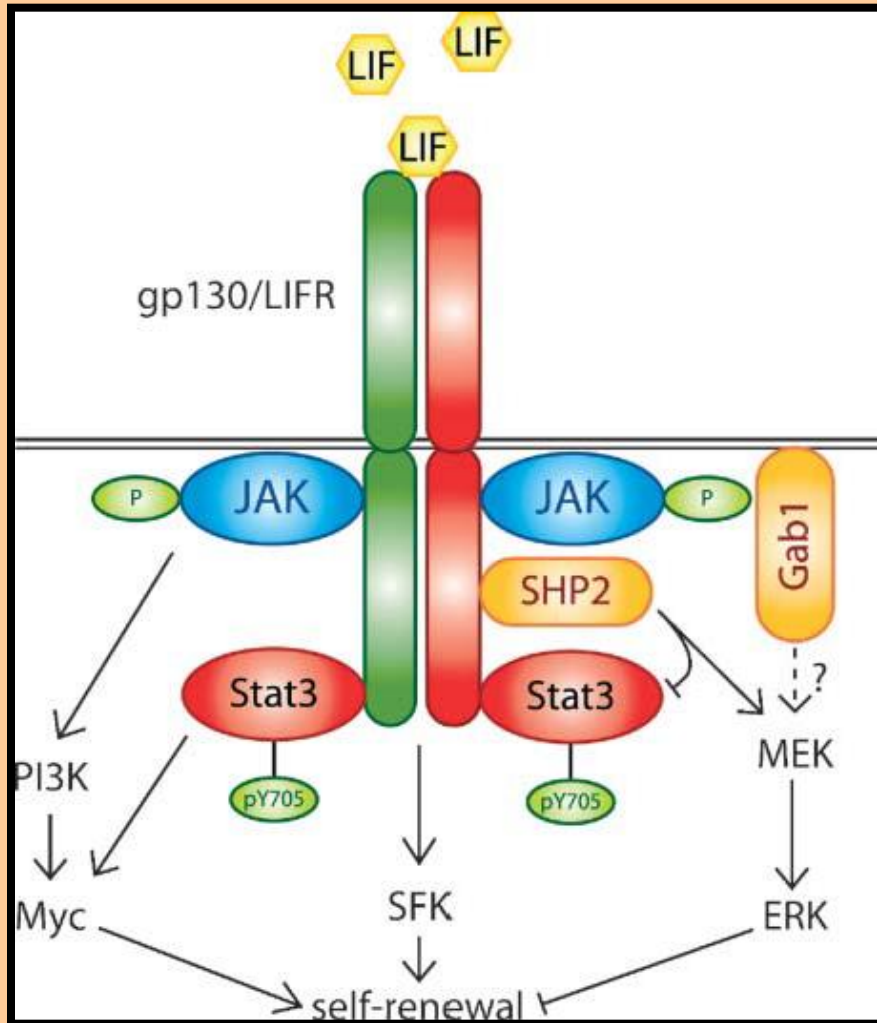
# NICHE

KB nemohou být bez „niche“.  
 „Niche“ KB je závislé na KB.



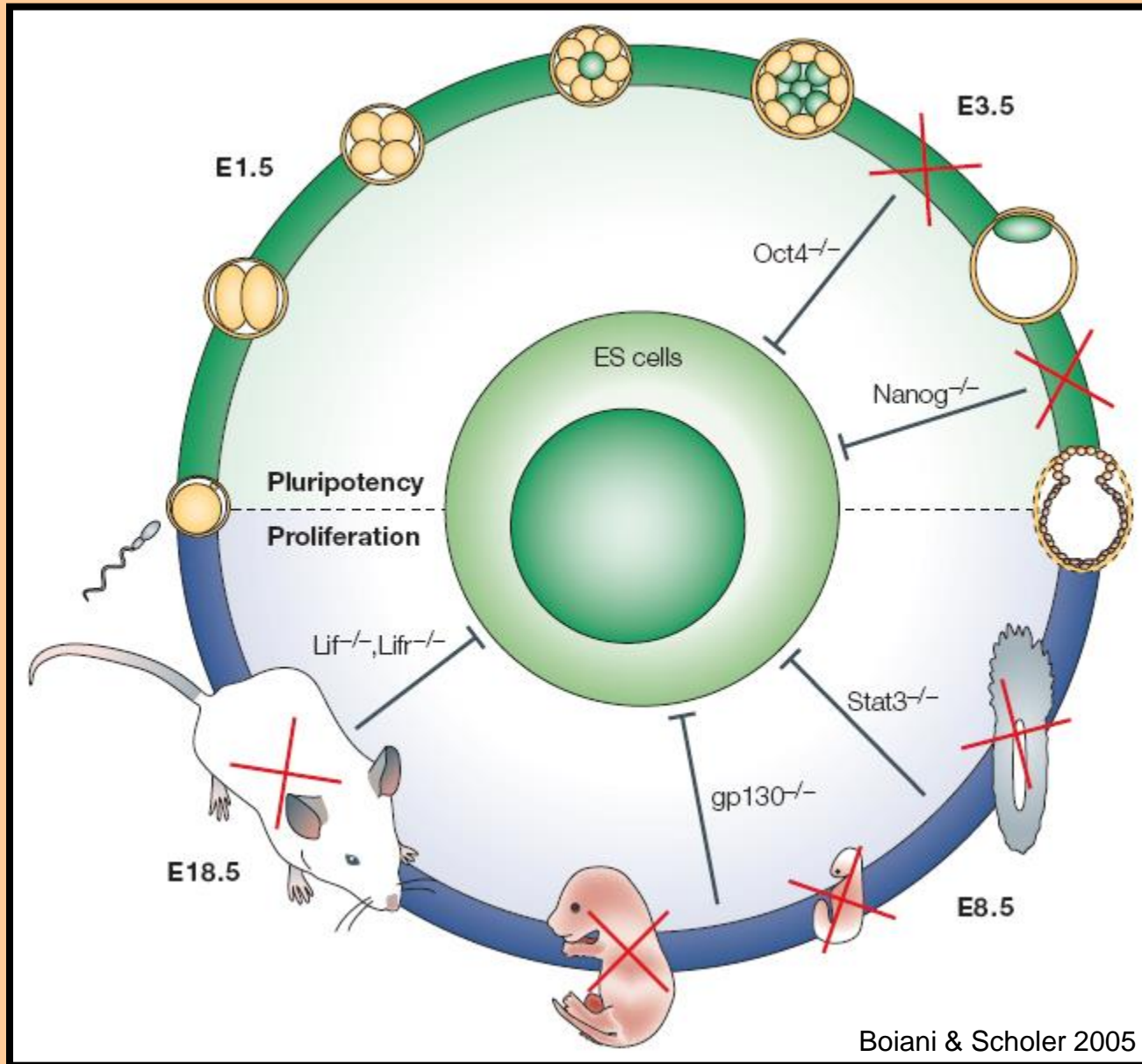
# Vybrané signální dráhy

## Signální dráha LIF (leukemii inhibující faktor) -> gp130 signalling

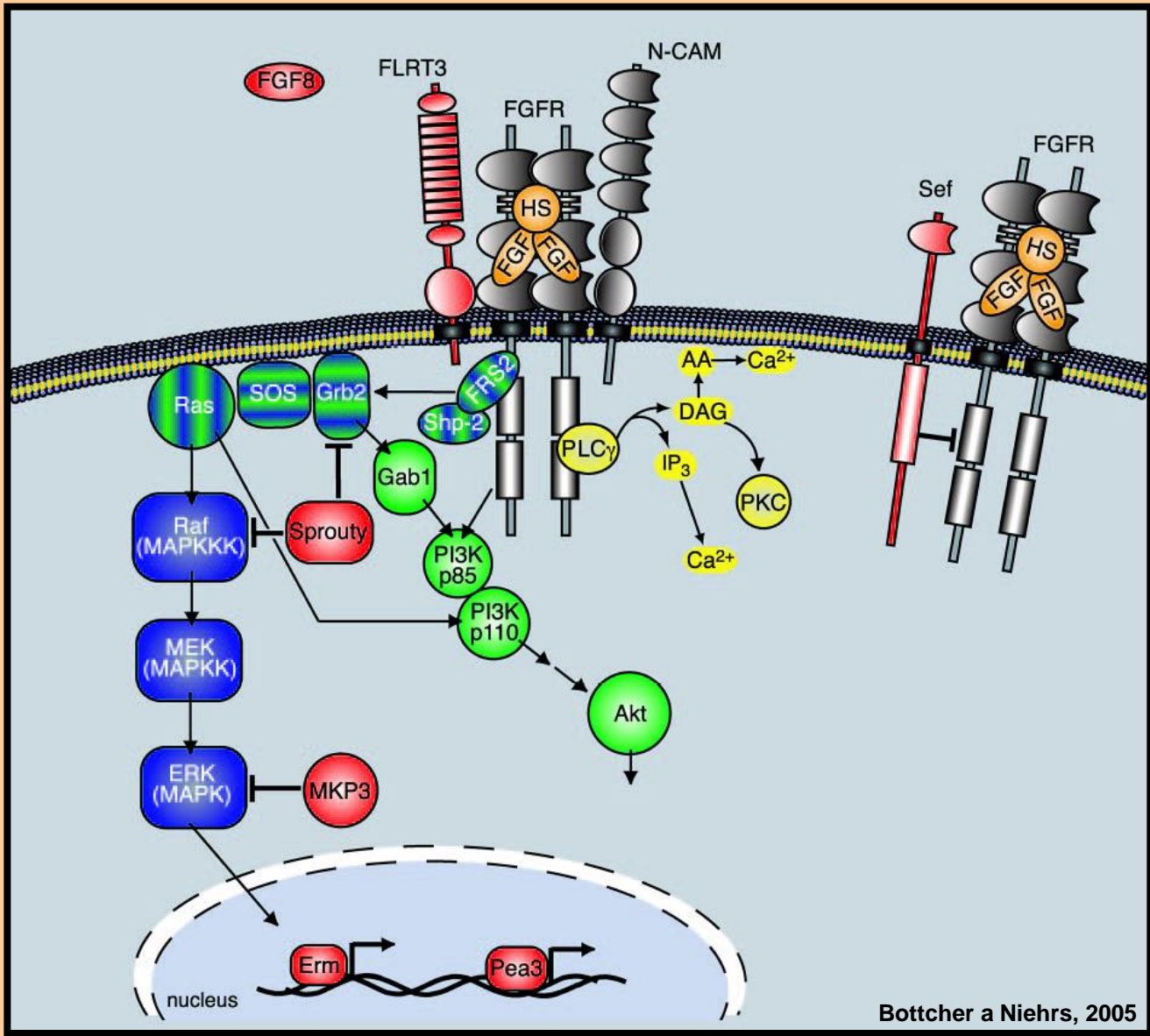


Evolučně se zdá, že tato dráha hraje důležitou úlohu v regulaci pluripotentních a snad i multipotentních buněk u živočichů obecně (prokázáno i u *Drosophily*)

# Význam gp130 signalizace v průběhu embryogeneze

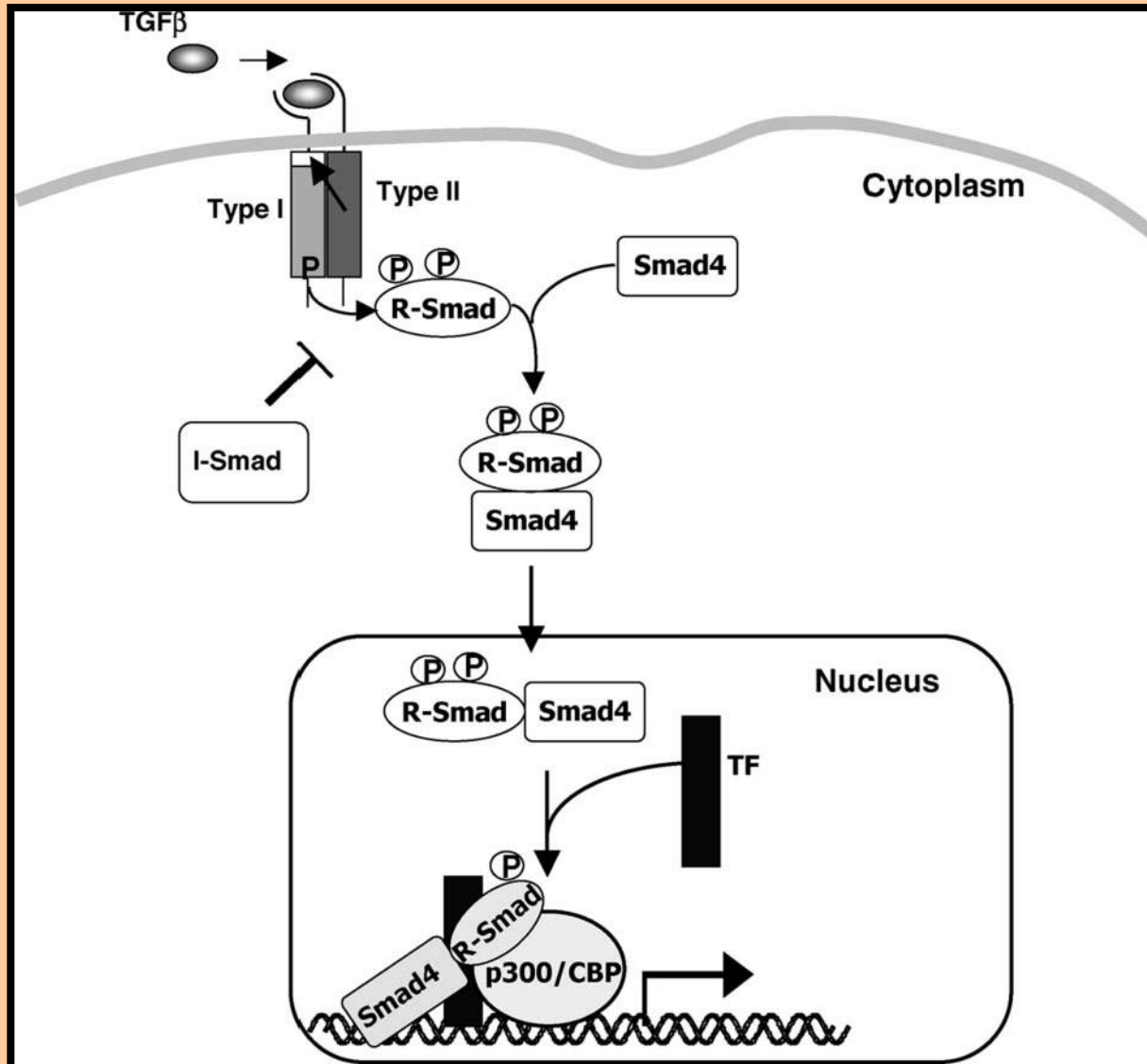


# Signální dráha FGFs (Fibroblastové růstové faktory)



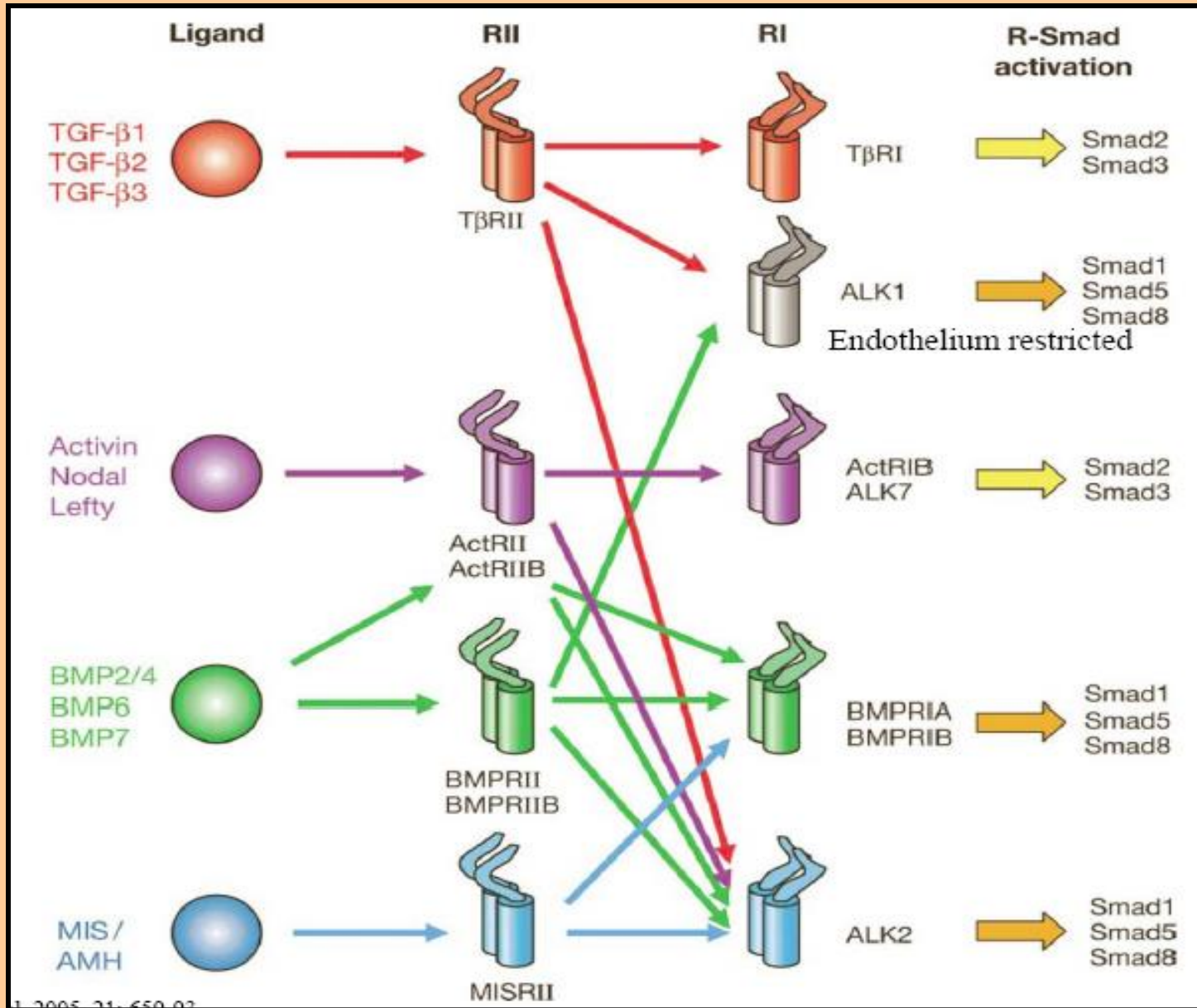
## Signální dráha TGF $\beta$ / BMPs

(Transformující růstový (*growth*) faktor  $\beta$   
kostní (*bone*) morfogenetické proteiny)

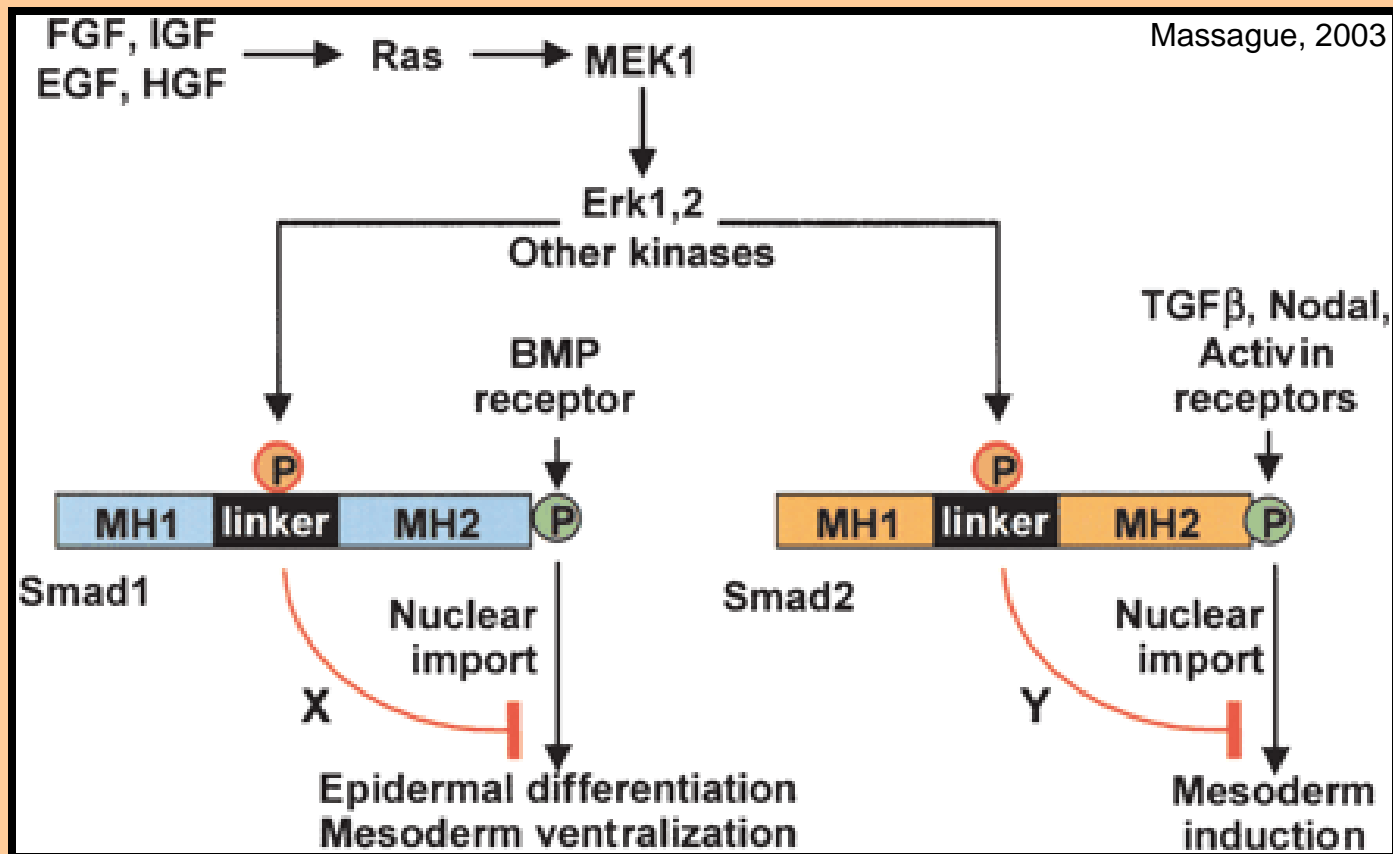




# Interakce v signálování rodiny TGFbeta

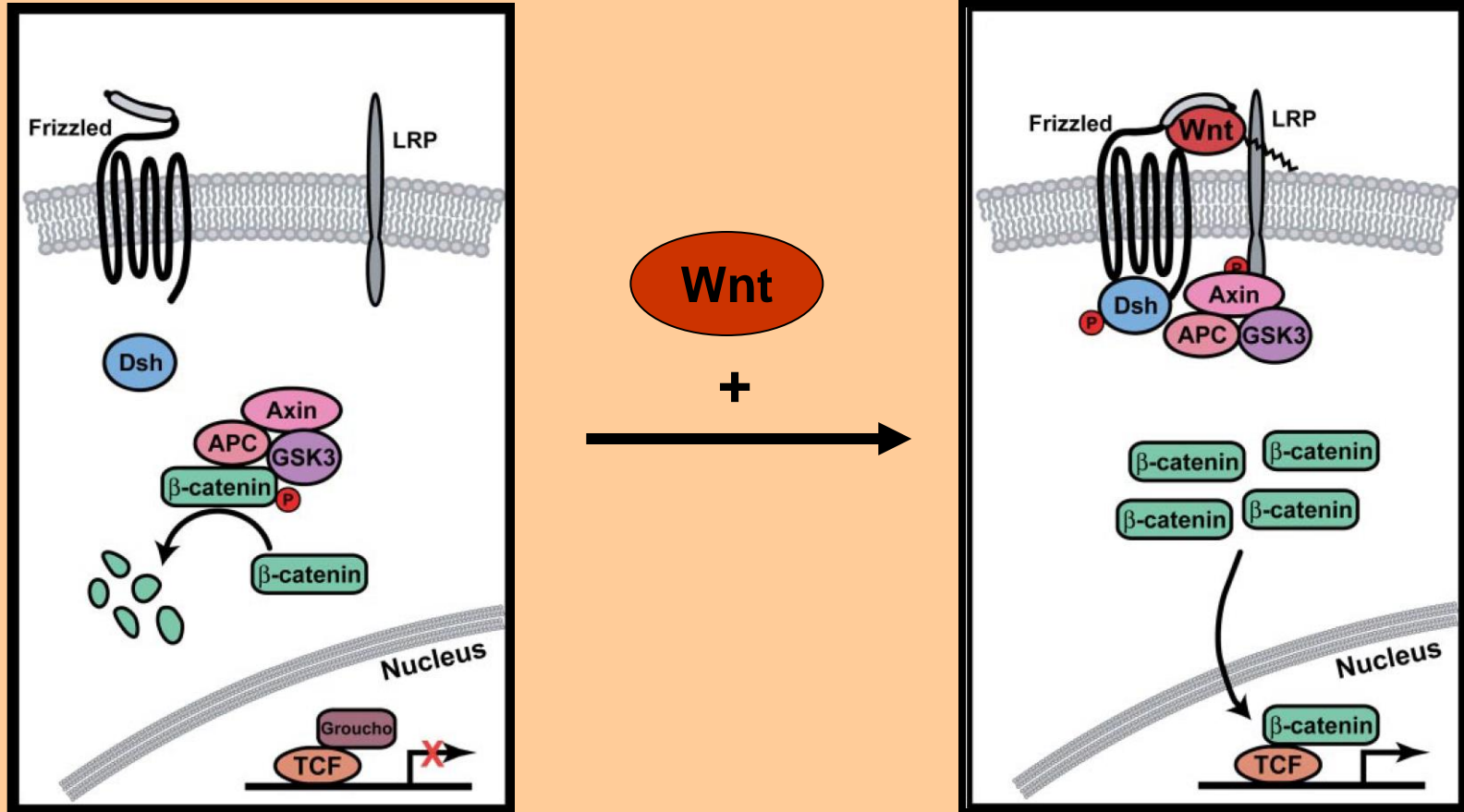


# INTERKCE FGF & TGF $\beta$ DRÁHY TRANSDUKCE SIGNÁLU

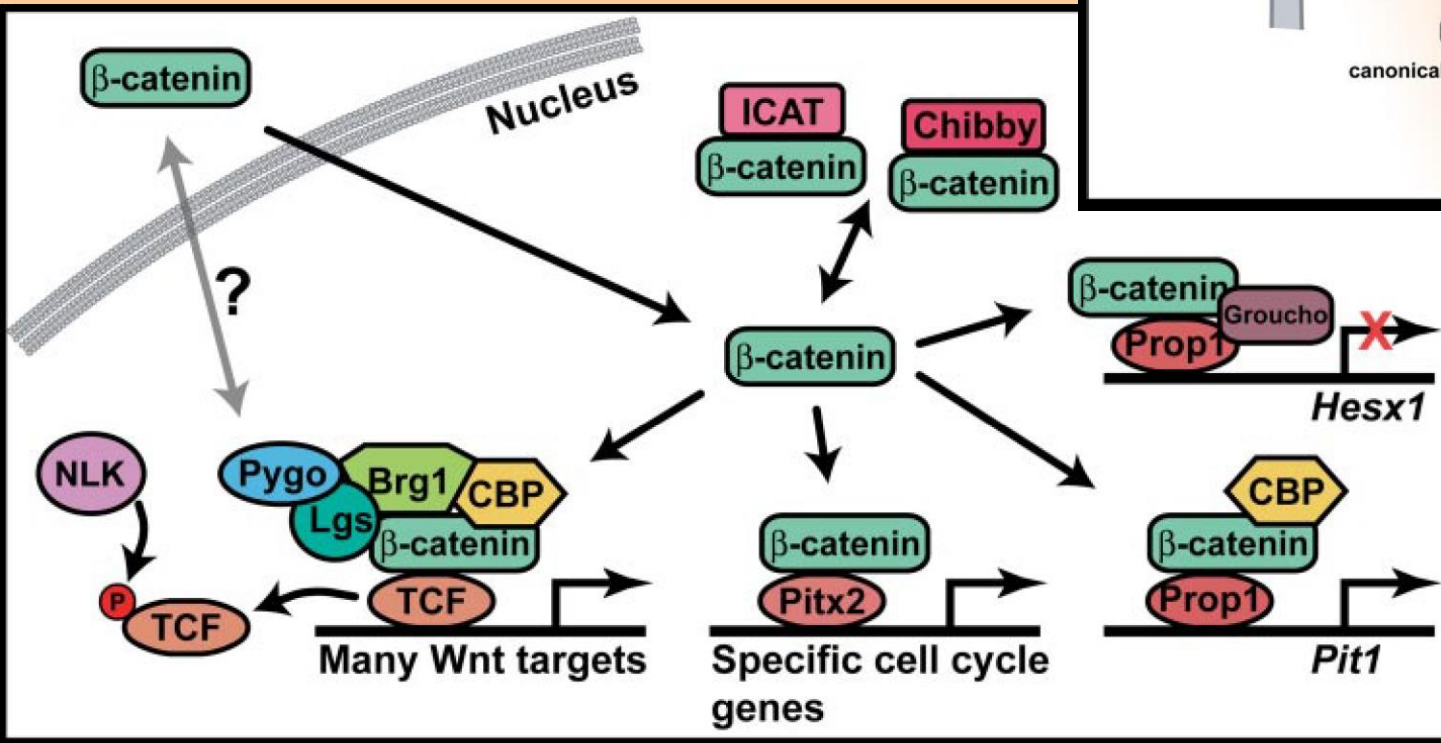
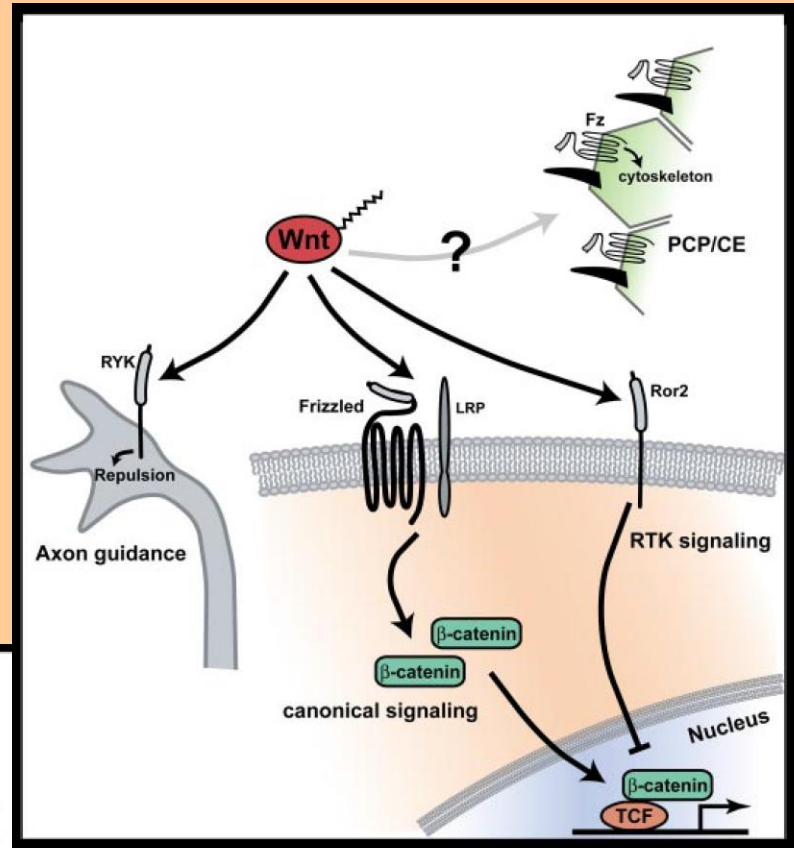


# Signální dráha Wnts

<http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>

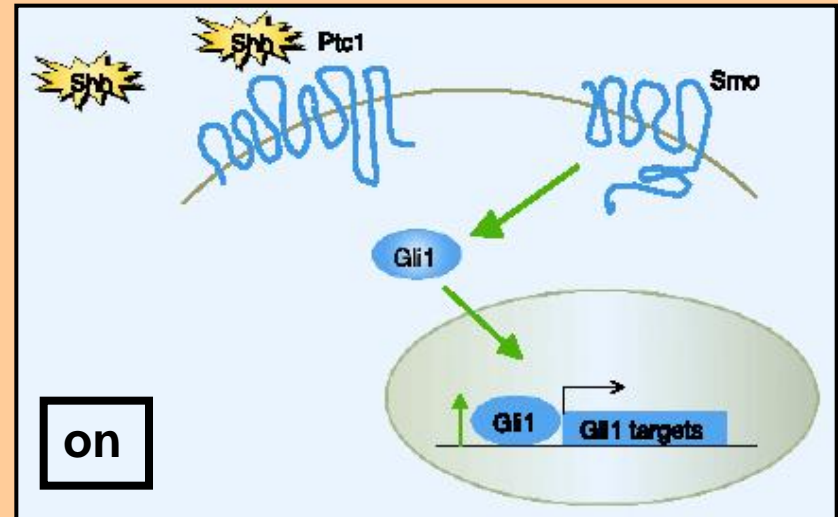
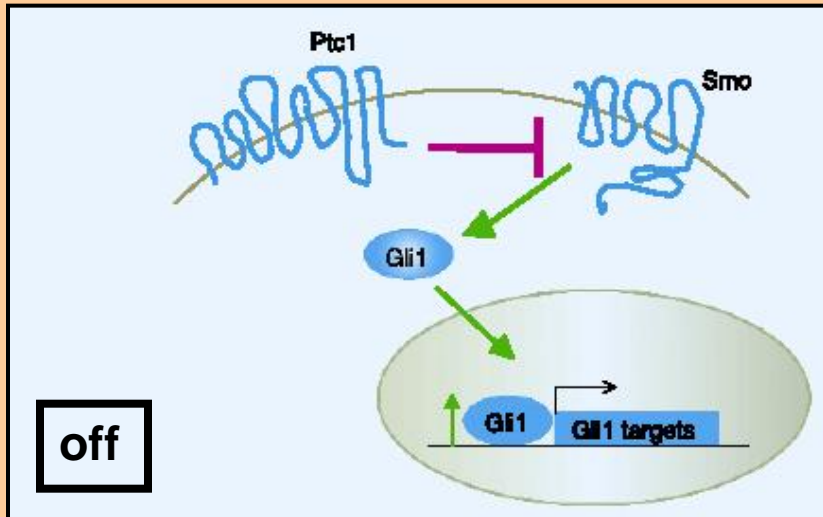


# Signální dráha Wnts

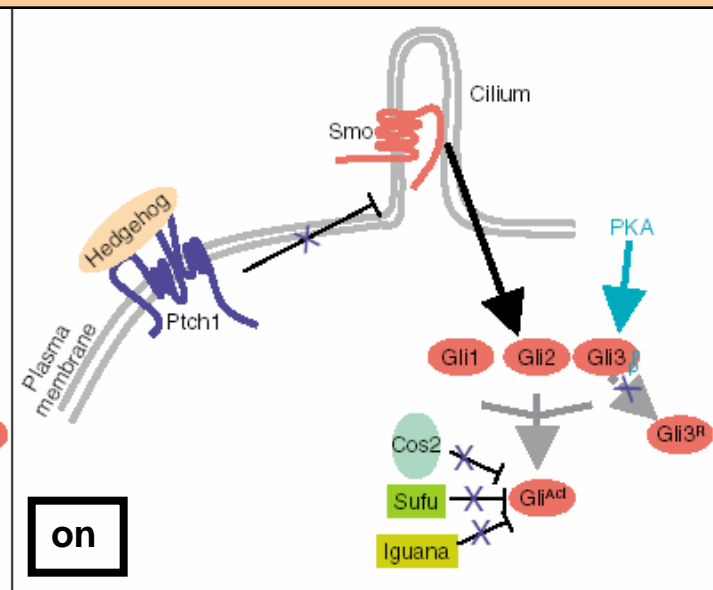
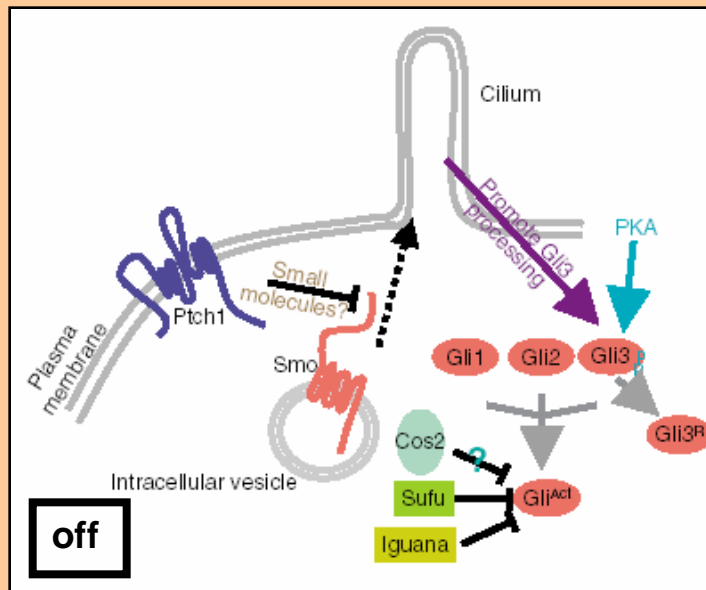


# Signální dráha Hedgehog

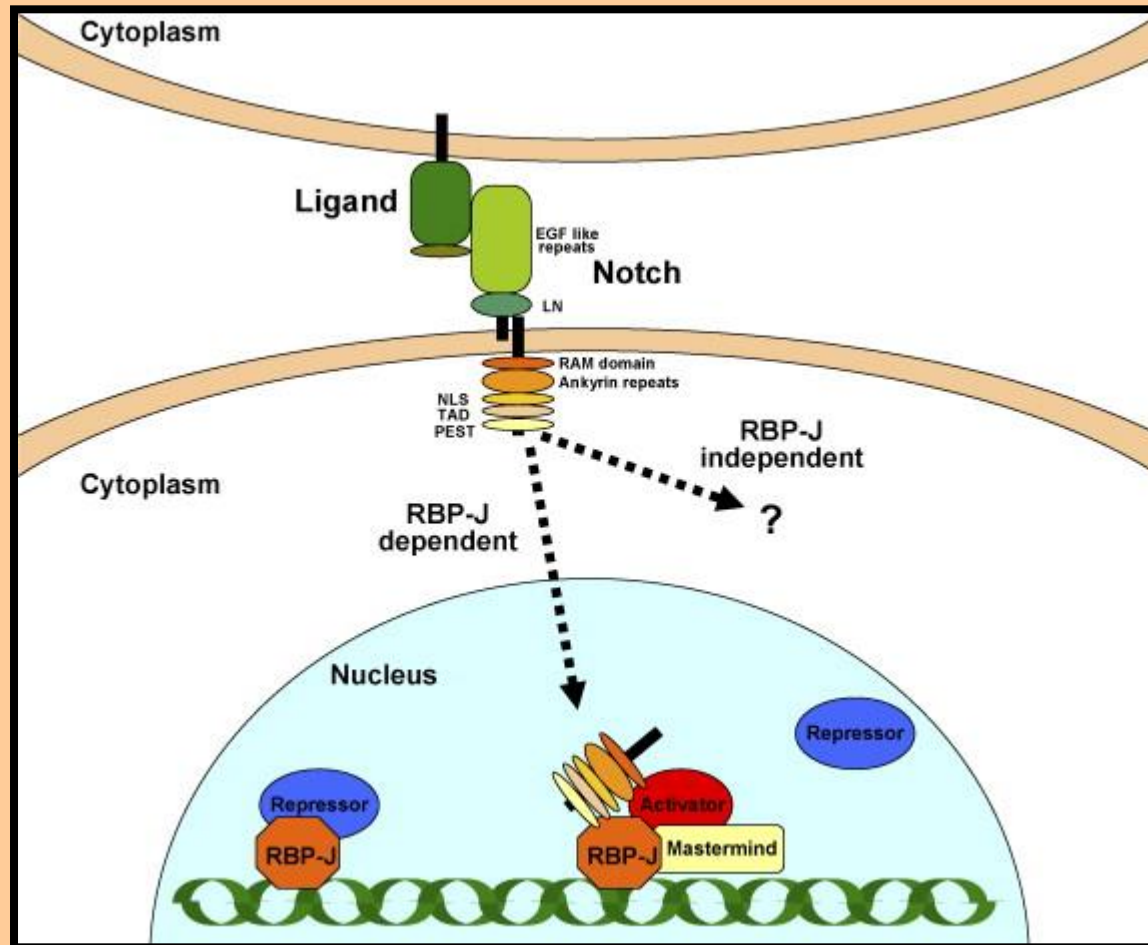
sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh)



*Ptc* – Patched      *Smo* - Smoothened

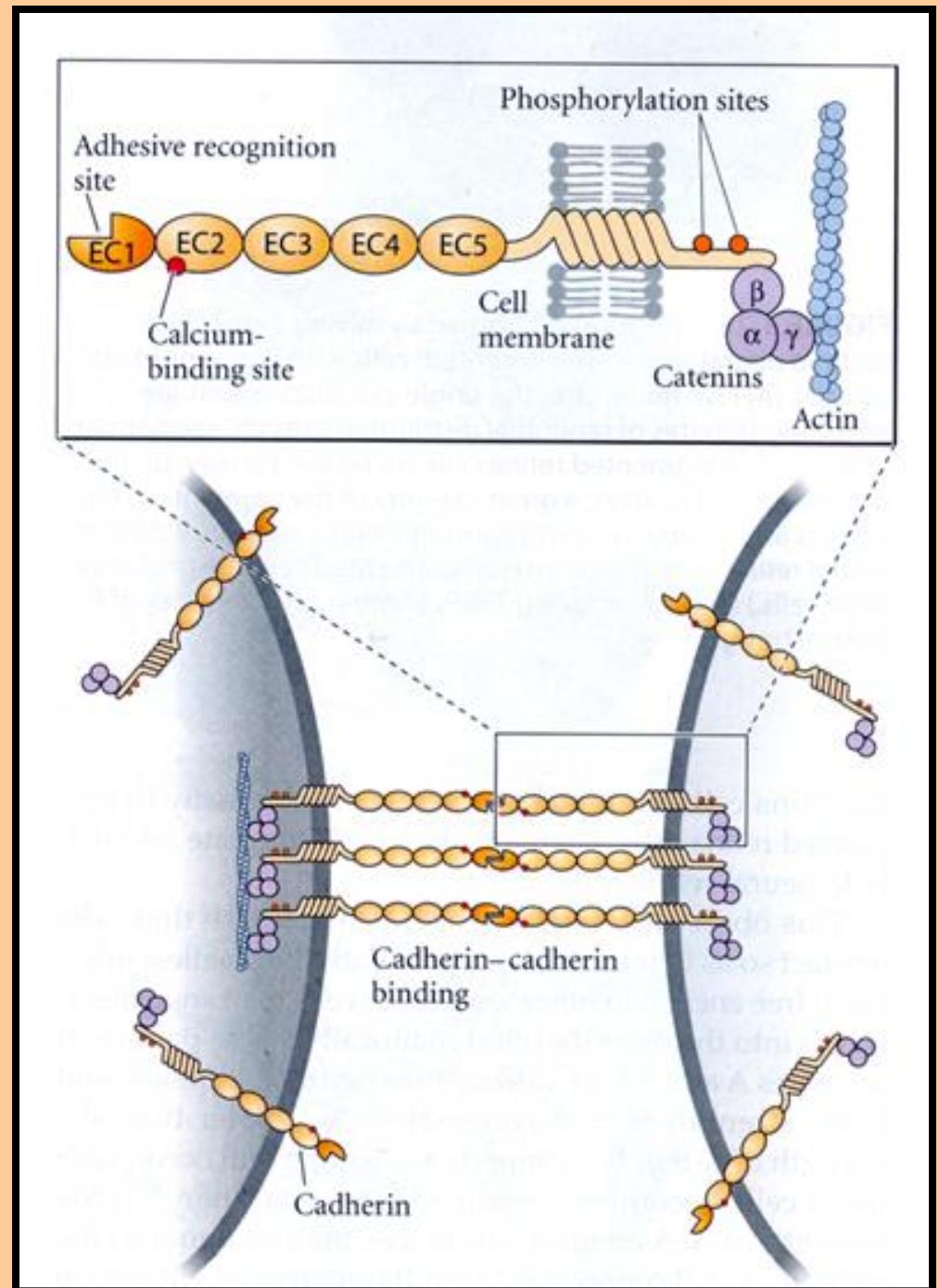


## Signální dráha Notch

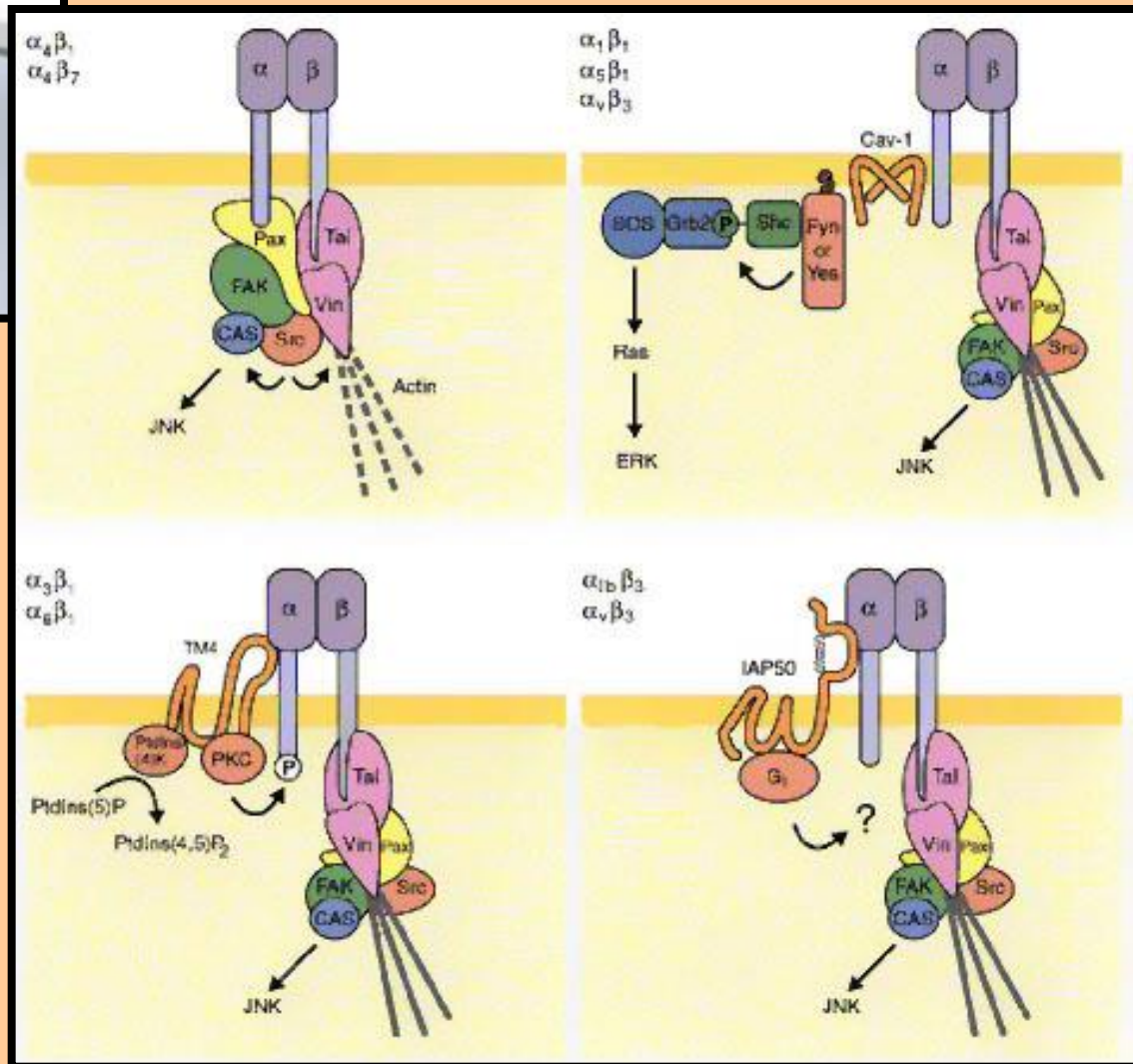
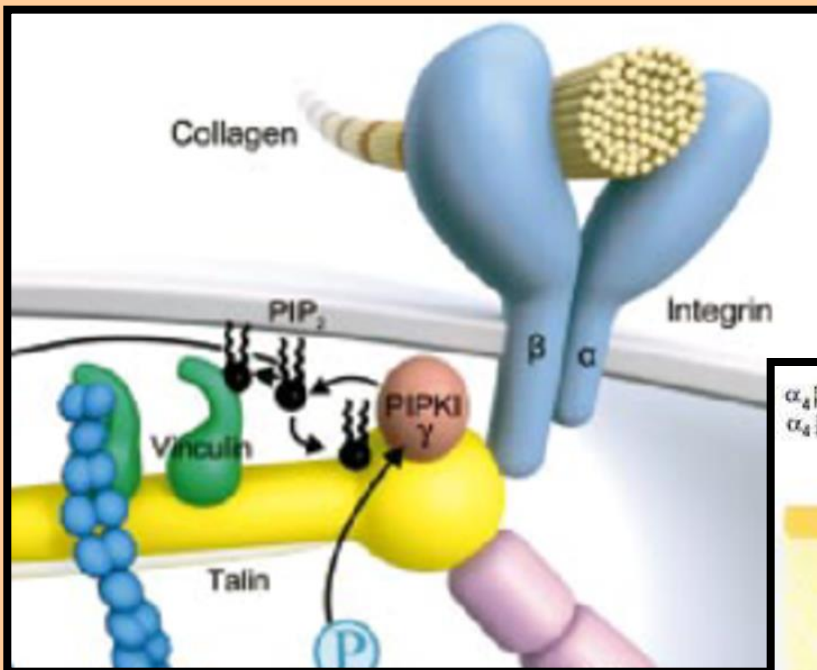


Signální transdukce Notch, po navázání ligandů (DSL rodina = Delta, Serrate, Lag-2; Jagged) dojde k odštěpení extracelulární části receptoru a následně i intracelulární (NICD – Notch intracellular domain), ta translokuje do jádra a v dimeru s CSL (= CBF1 – Cp binding factor 1) aktivuje transkripci.

# Kadheriny sprostředkovaná komunikace mezi buňkami

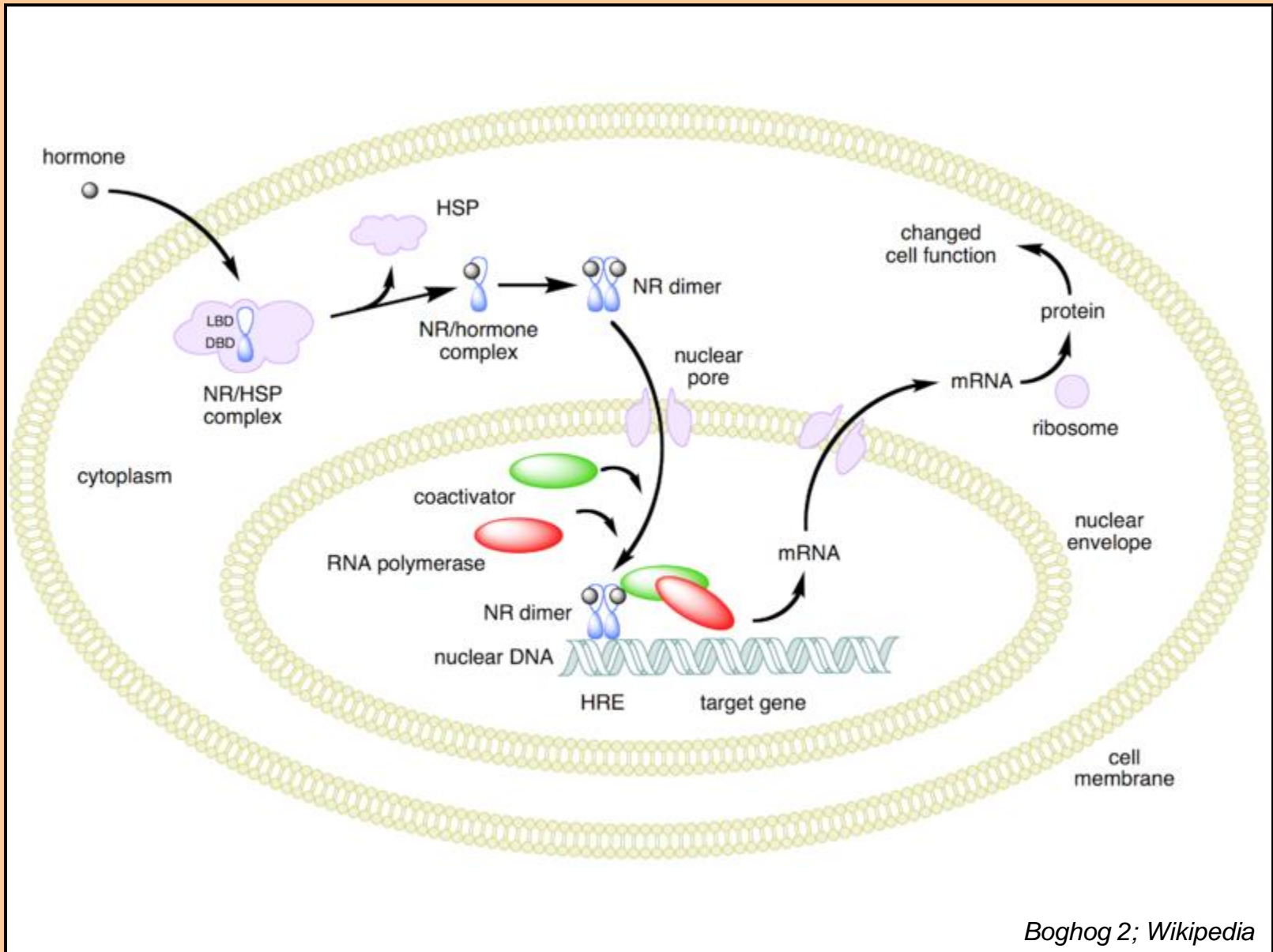


# Integriny, aktivace vazbou ECM, zprostředkovaná transdukce signálu

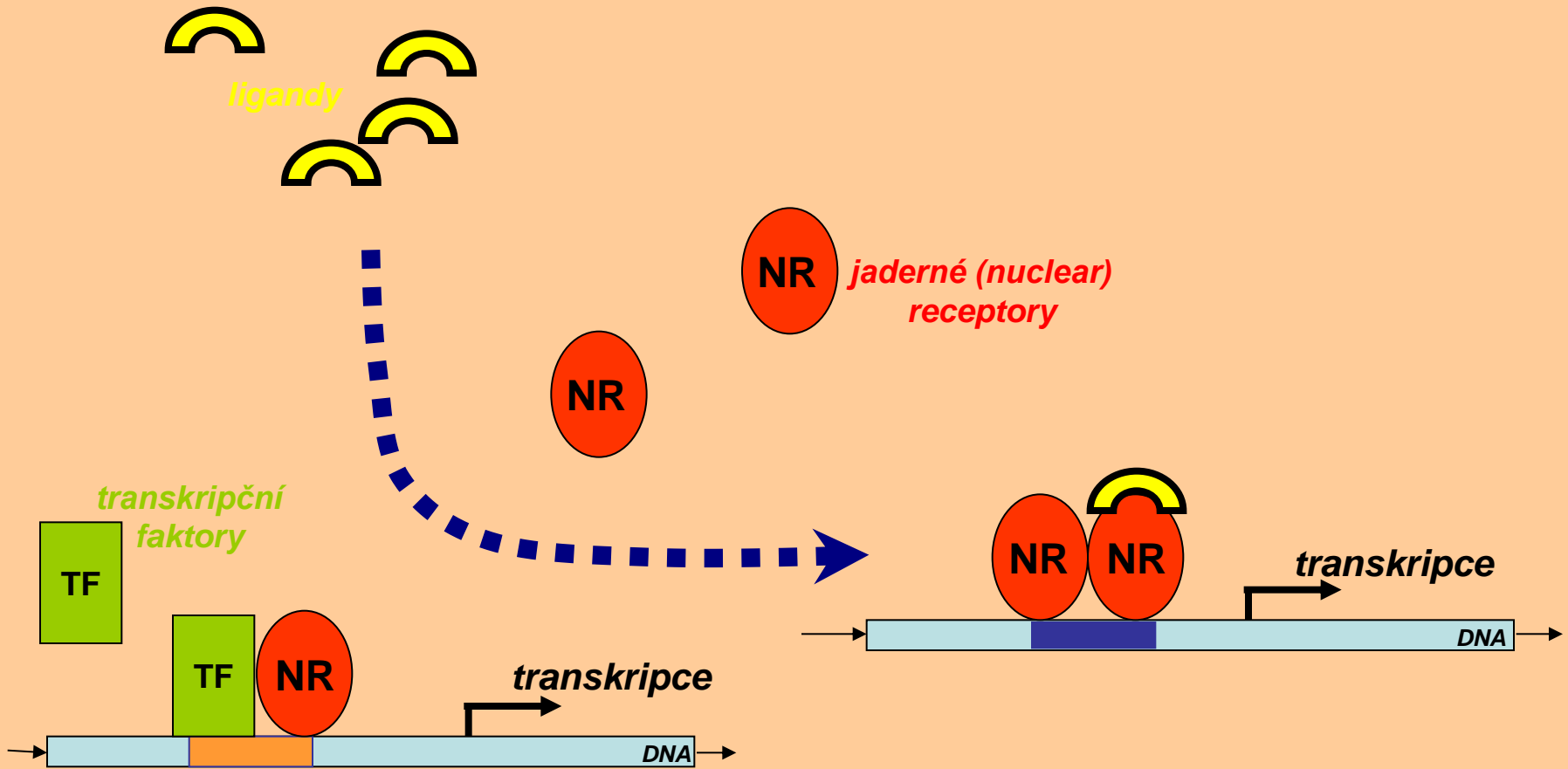




# Signální dráha jaderných receptorů obecně



# Signální dráha jaderných receptorů



sebeobnova x diferenciace  
?diferenciace x sebeobnova?

## HYPEROXIE x NORMOXIE x HYPOXIE x ANOXIE

**anoxie - 0% kyslíku**

**tkáňová hypoxie - 0-3% kyslíku**

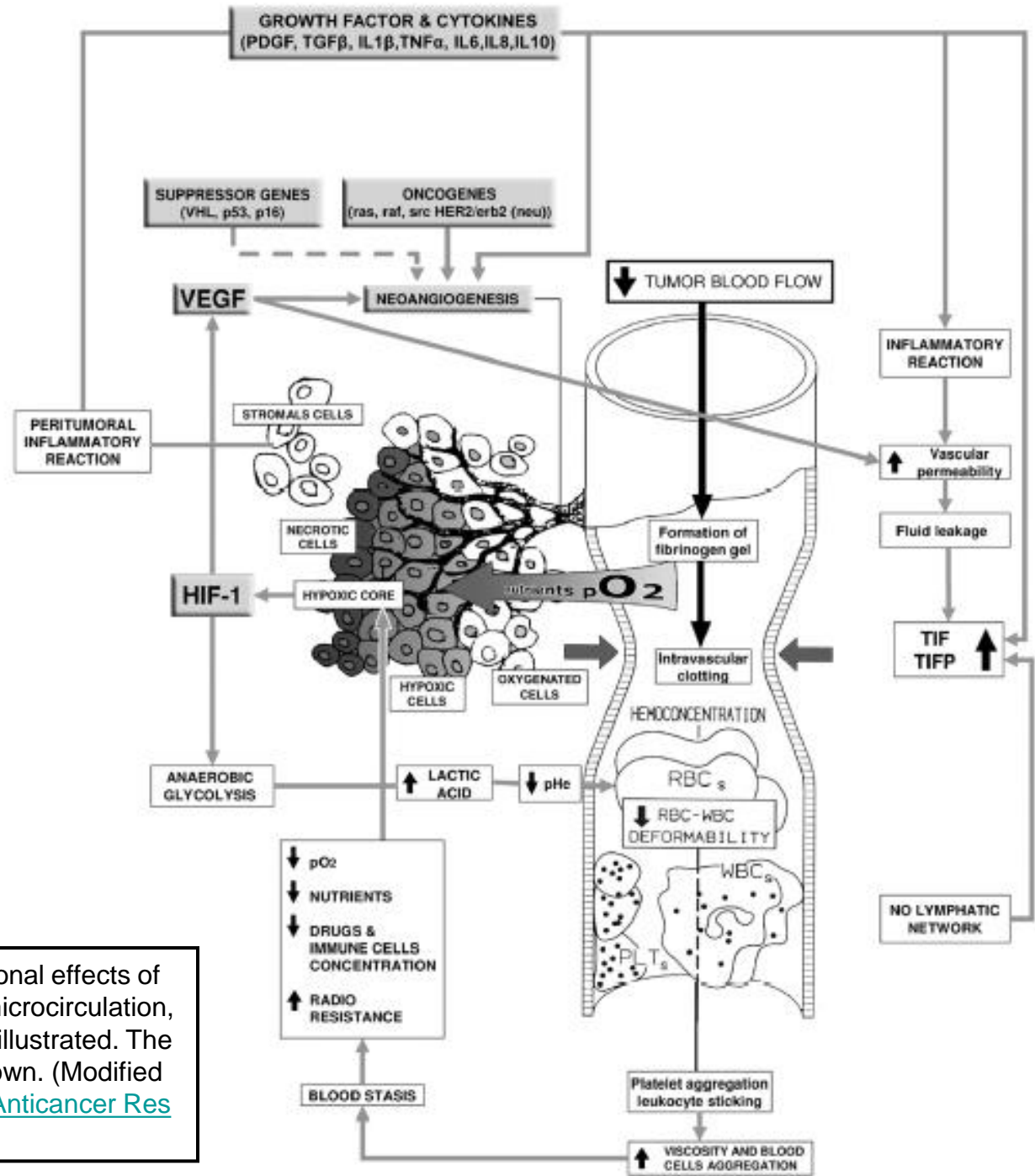
**tkáňová normoxie - 3-5% kyslíku**

**atmosféra - 21% kyslíku**

In the human organisms,  $O_2$  concentration varies significantly between the tissues: in the lung parenchyma and in circulation (McKinley and Butler, 1999; Saltzman et al., 2003; Johnson et al., 2005; Wild et al., 2005), as well as in well irrigated parenchymal organs (liver, kidneys, heart; Wolfle and Jungermann, 1985; Jungermann and Kietzmann, 1997; Roy et al., 2000; Welch et al., 2001; Mik et al., 2004) it is comprised between 14% and 4%. In other tissues, relatively less irrigated,  $O_2$  concentration is even lower: in the brain, it varies from 0.5% to 7% (Whalen et al., 1970; Nwaigwe et al., 2000; Hemphill et al., 2005) in the eye (retina, corpus vitreous), from 1 to 5% (Buerk et al., 1993; reviewed in Yu and Cringle, 2005), in the bone marrow, from 0% to 4% (Tondevoid et al., 1979; Chow et al., 2000).

# HYPOXIE

Embryogeneze  
Organogeneze  
Homeostáza  
Pathologie



In this figure the structural and functional effects of Hypoxia, HIF-1 and VEGF on tumor microcirculation, cancer metabolism and therapies are illustrated. The vicious circles that occur are also shown. (Modified with permission from: [Baronzio et al. Anticancer Res 1994; 14:1145-1154.](#))



# HIF - hypoxií indukovaný faktor

**HIF1b (ARNT) + HIF1a = HIF1 (obecná buněčná odpověď na hypoxii)**

- (-) exprese c-myc / cD1 => CC arrest
- stabilizace NICD (Notch) => sebeobnova
- (+) glykolýza (PDK, Glut1/3, LDHA, HK,...)
  - (+) MTC4 (eflux laktátu)
- (-) mitochondrie = (-) oxid. fosforylace (-) ROS
- .....

**+ HIF2a = HIF2 (částečně buněčně specifické, EPO)**

- podpora buněčného cyklu
- (+) exprese Oct4...

**+ HIF3a = HIF3 (...?..různé, buněčně specifické)**

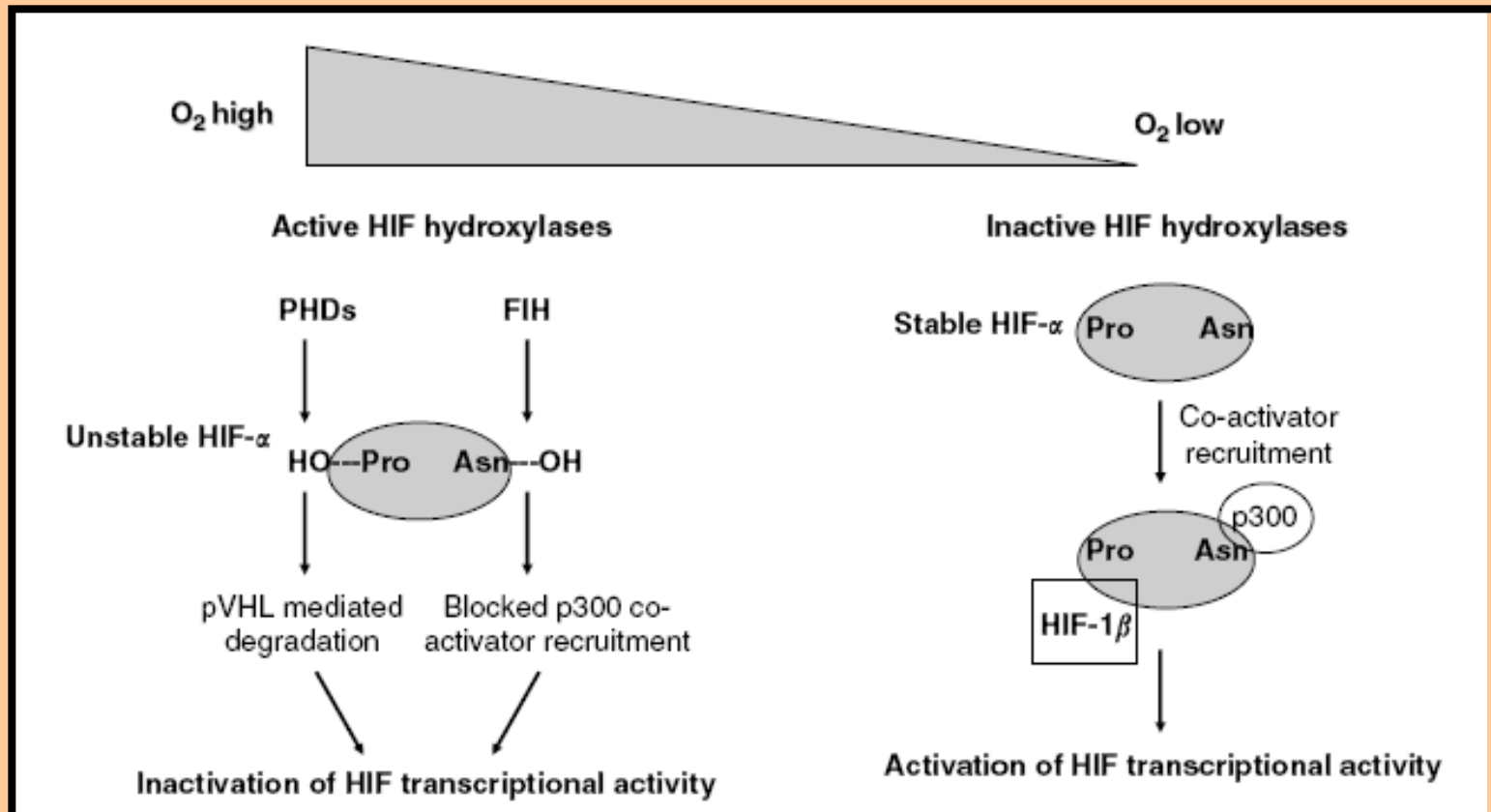
- ...

# Regulace HIF

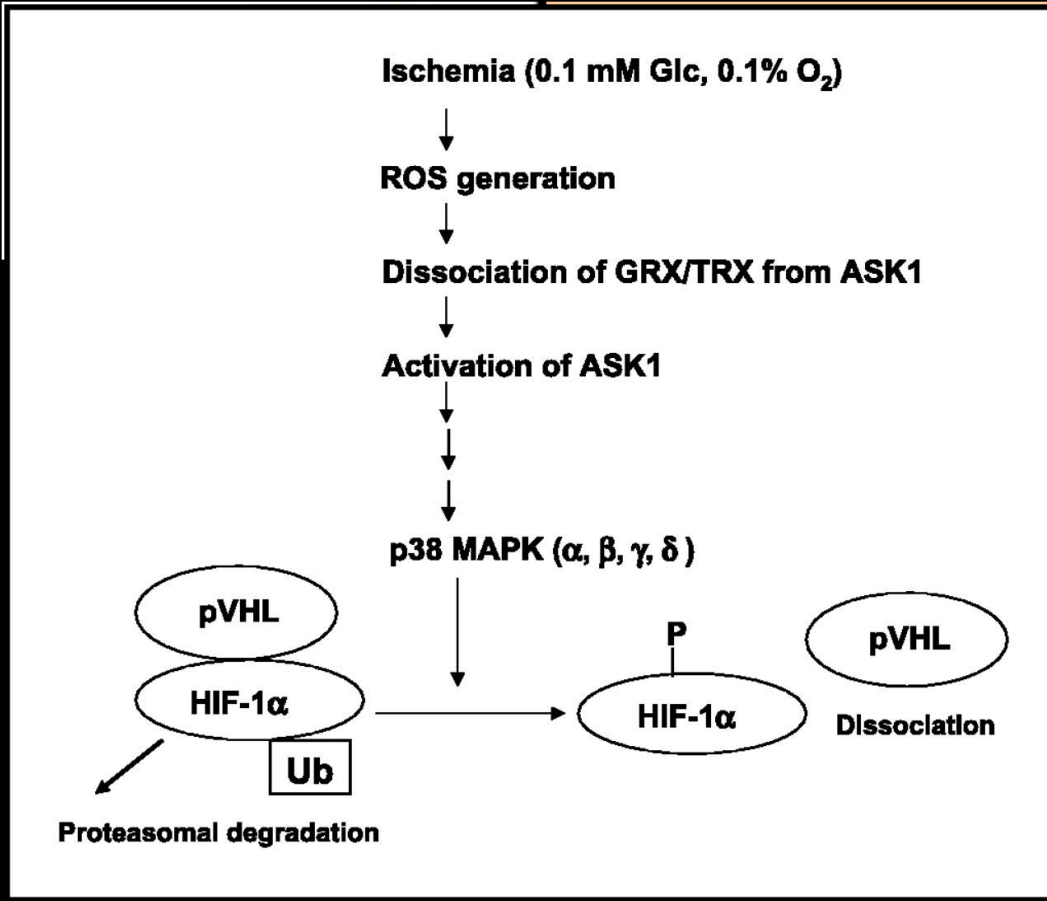
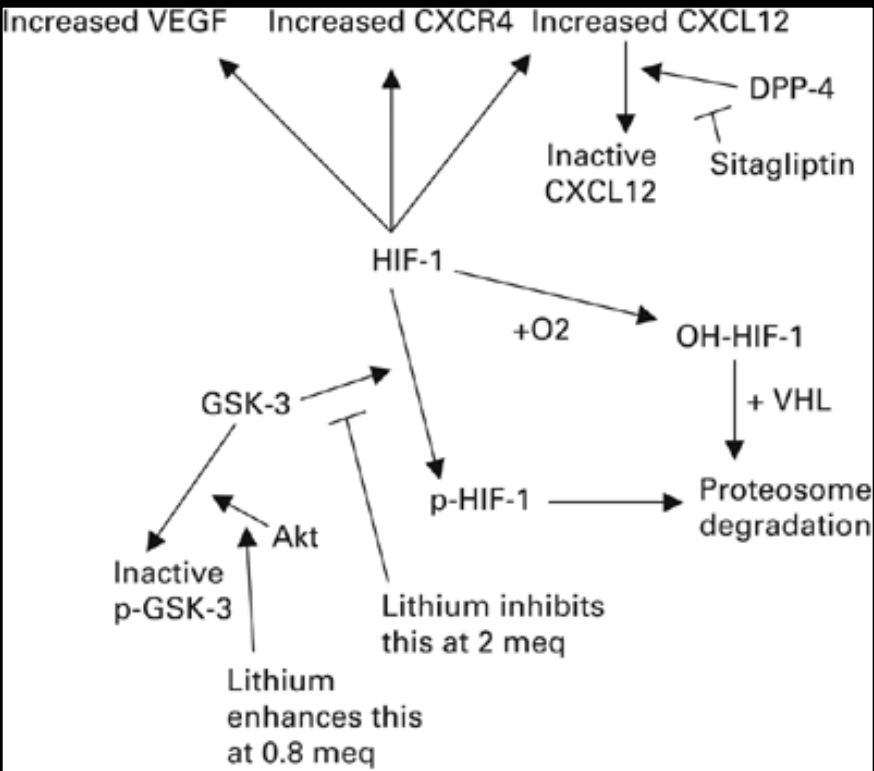
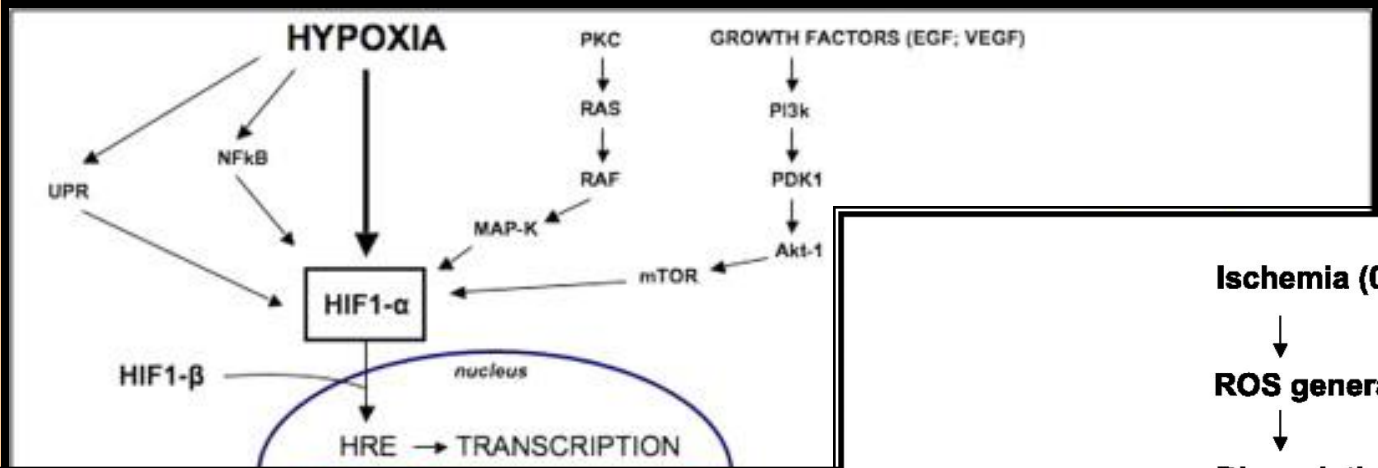
- všechny podjednotky HIF prakticky konstitutivní exprese
- regulace zejména degradací podjednotek HIF $\alpha$   
(- částečně i regulací transkripce)

## Degradace HIF v přítomnosti O<sub>2</sub>

- hydroxylace prolyl hydroxylásami PHD, FIH
- degradace v proteasomu zprostředkovaná pVHL faktorem



# Stabilita a transkripční aktivita HIF je také regulována dalšími postranlačnými modifikacemi včetně fosforylace





# Modifikace glykolýzy prostřednictvím HIF

- zvýšení exprese GLUT1,4
- zvýšení exprese enzymů glykolýzy
- inhibice přeměny pyruvátu na AcetylCoA

Glykolýza - substráty intermediální produkty => růst buněk  
 OxFos - energie => práce, produkce

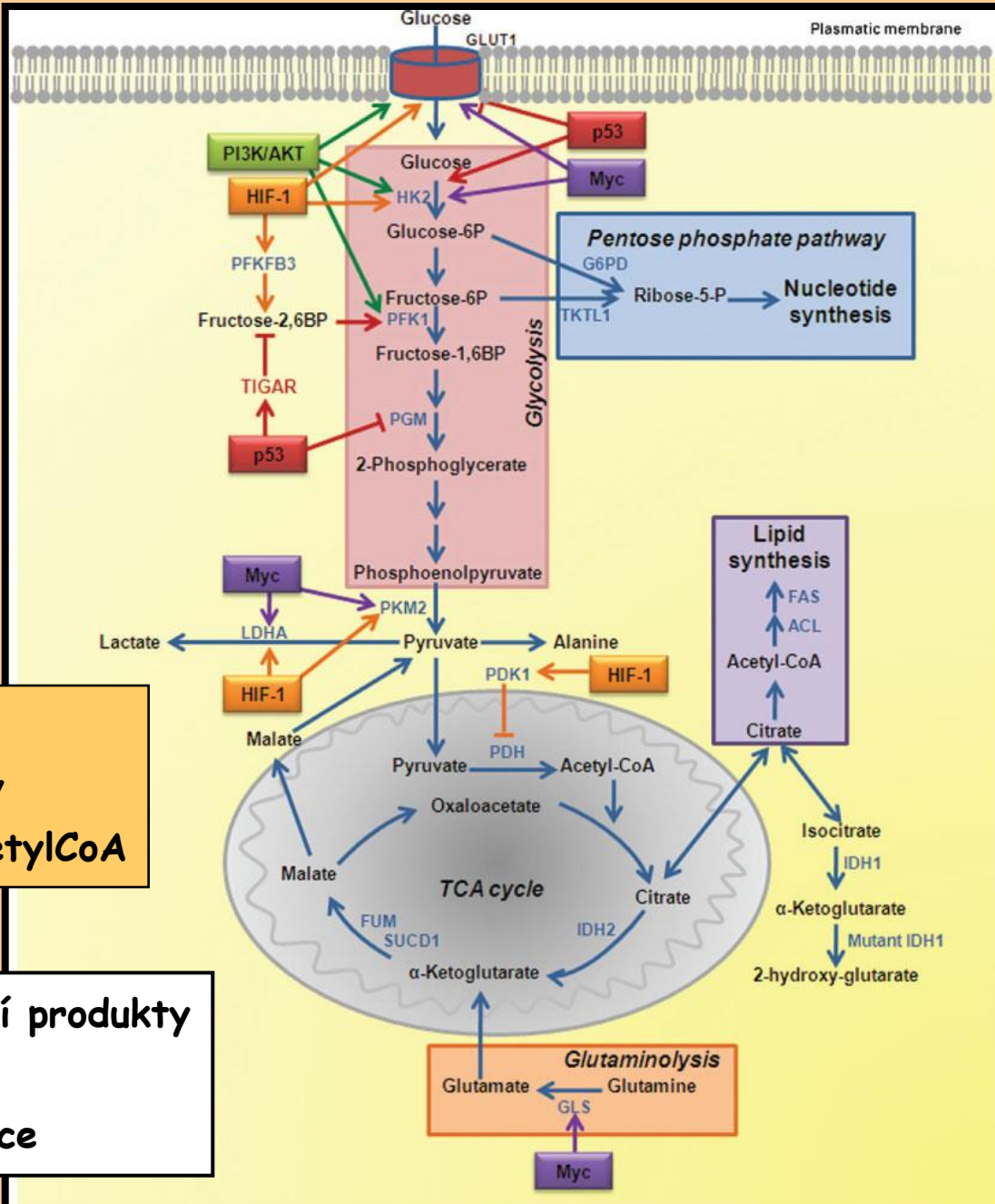
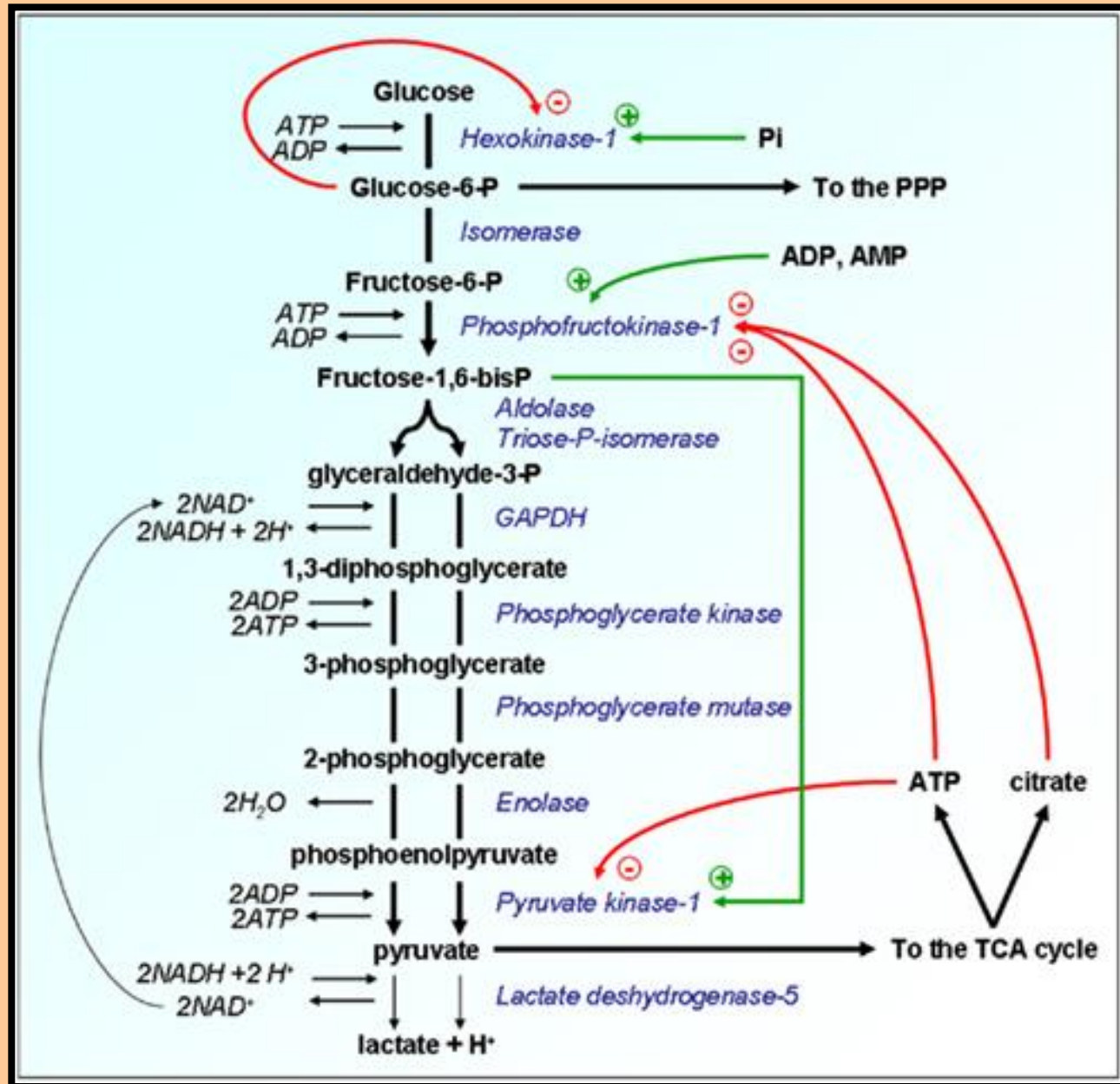


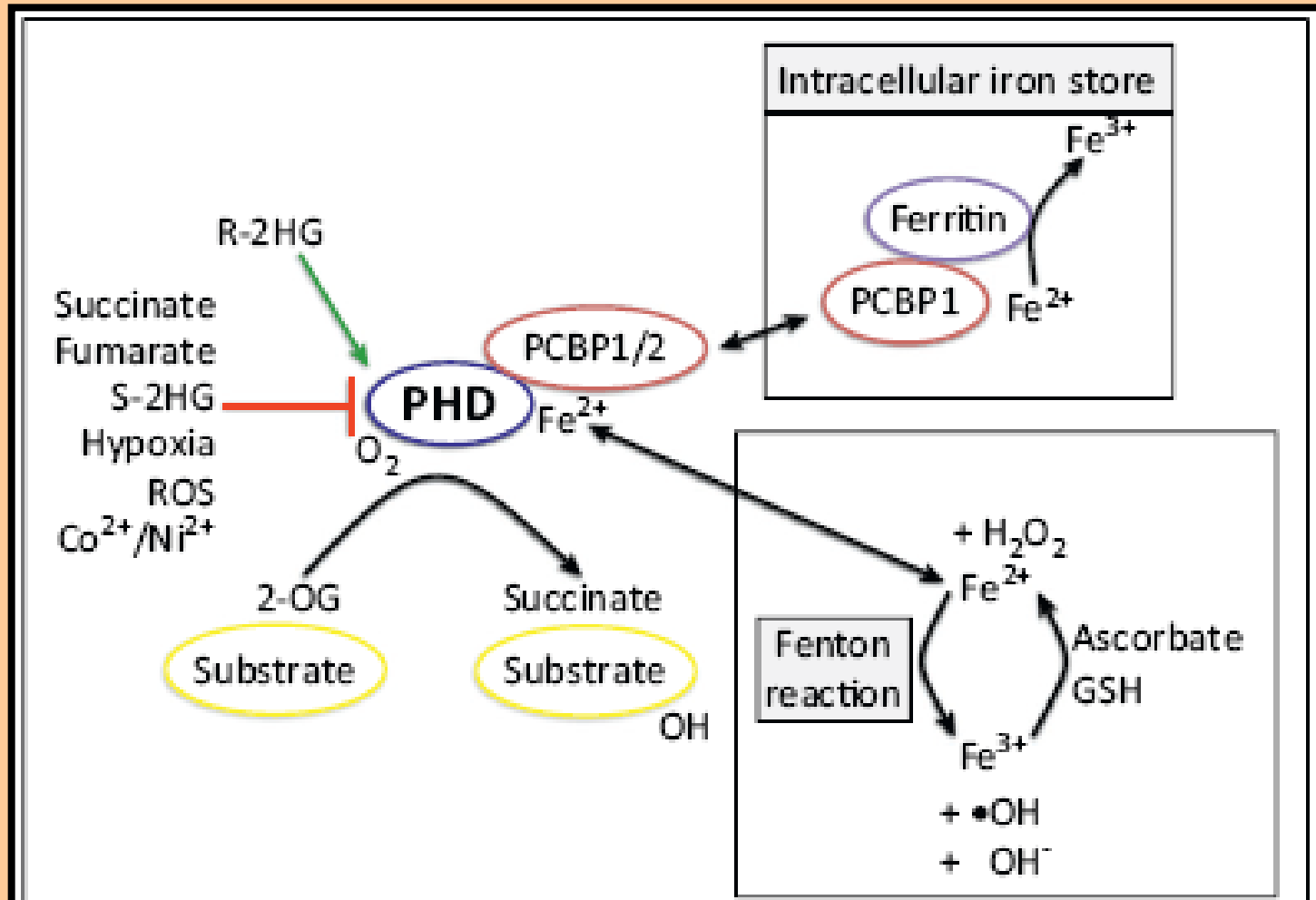
Figure 2 - Metabolic remodeling in cancer cells and regulation by signaling pathways involving oncogenes and tumor suppressor genes. The key enzymes of glycolysis, the TCA cycle, the pentose phosphate pathway, glutaminolysis, nucleotide, and lipid biosynthesis are shown as the regulation points by oncogenes and tumor suppressor genes.

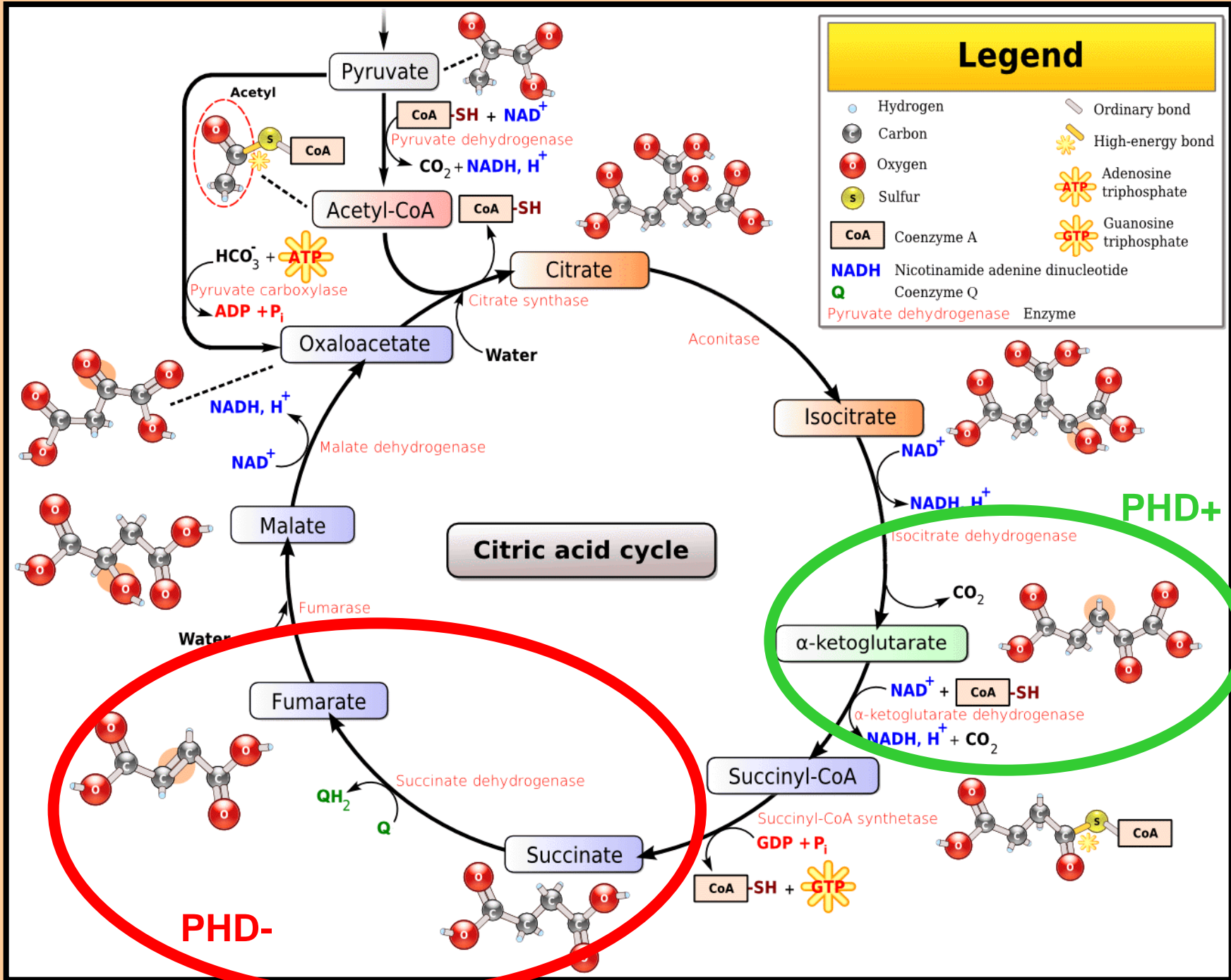
# Inhibice glykolýzy v důsledku oxidativní fosforylace



# Prolyl hydroxylásky ( PHD; + Asparagin hydroxylasy; + ?)

- sensory kyslíku a regulátory stabilizace HIF-Xalpfa
- kofaktory a-ketoglutarát (2-oxoglutarát),  $O_2$ ,  $Fe^{2+}$ , ...





# MITOCHONDRIE x HYPOXIE

Zralejší mitochondrie => víc ATP

=> víc ROS (reaktivní kyslíkové radikály)

=> poškození DNA

=> peroxidace lipidů, deregulace signálních drah

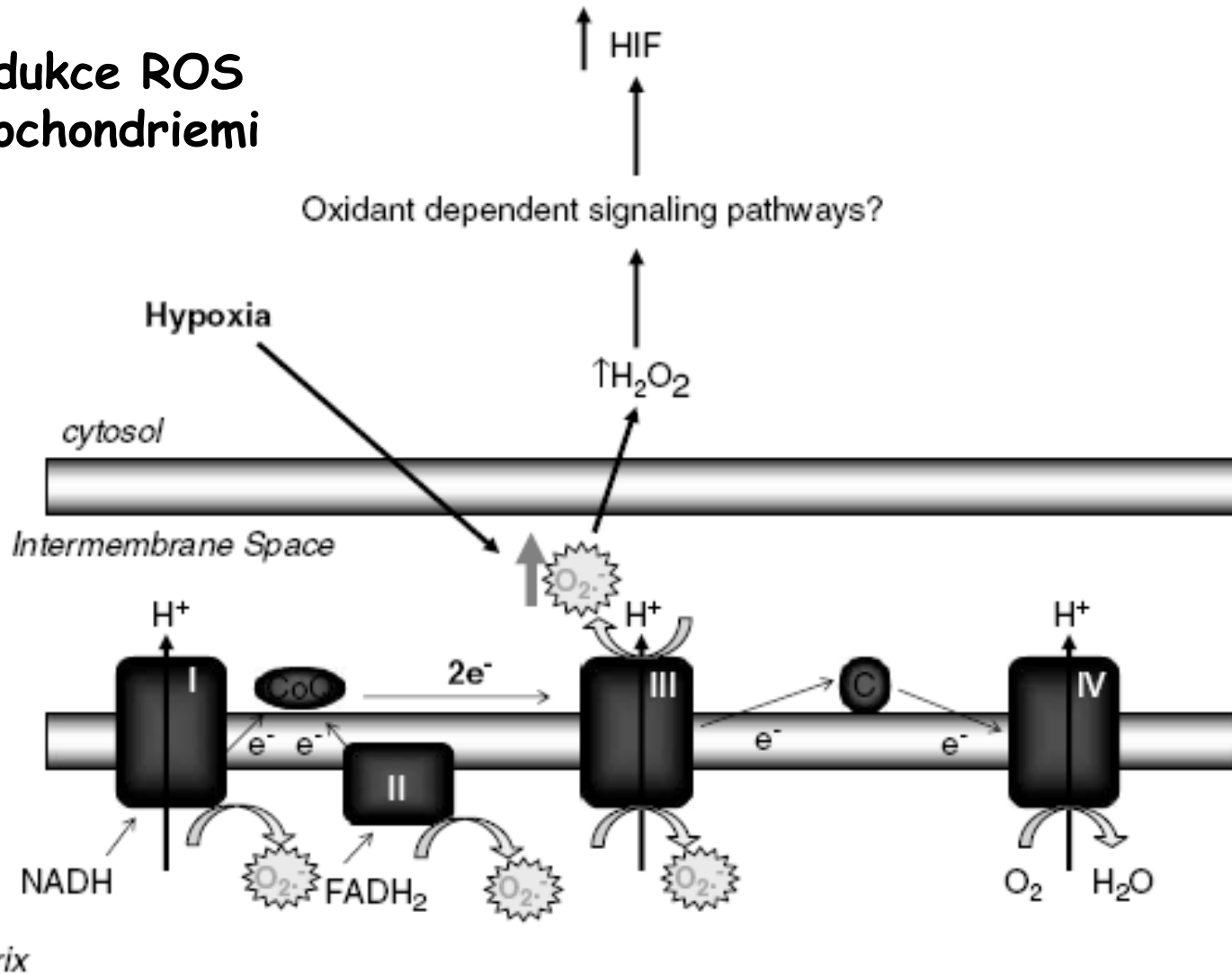
**HYPOXIE** => stresované mitochondrie (bez  $O_2$ (?) a Acetyl-CoA)

=> přechodně víc ROS (=> stabilizace HIF1 (?))

=> přechodně akumulace fumarátu a sukcinátu

(=> inhibice PHD => stabilizace HIF1)

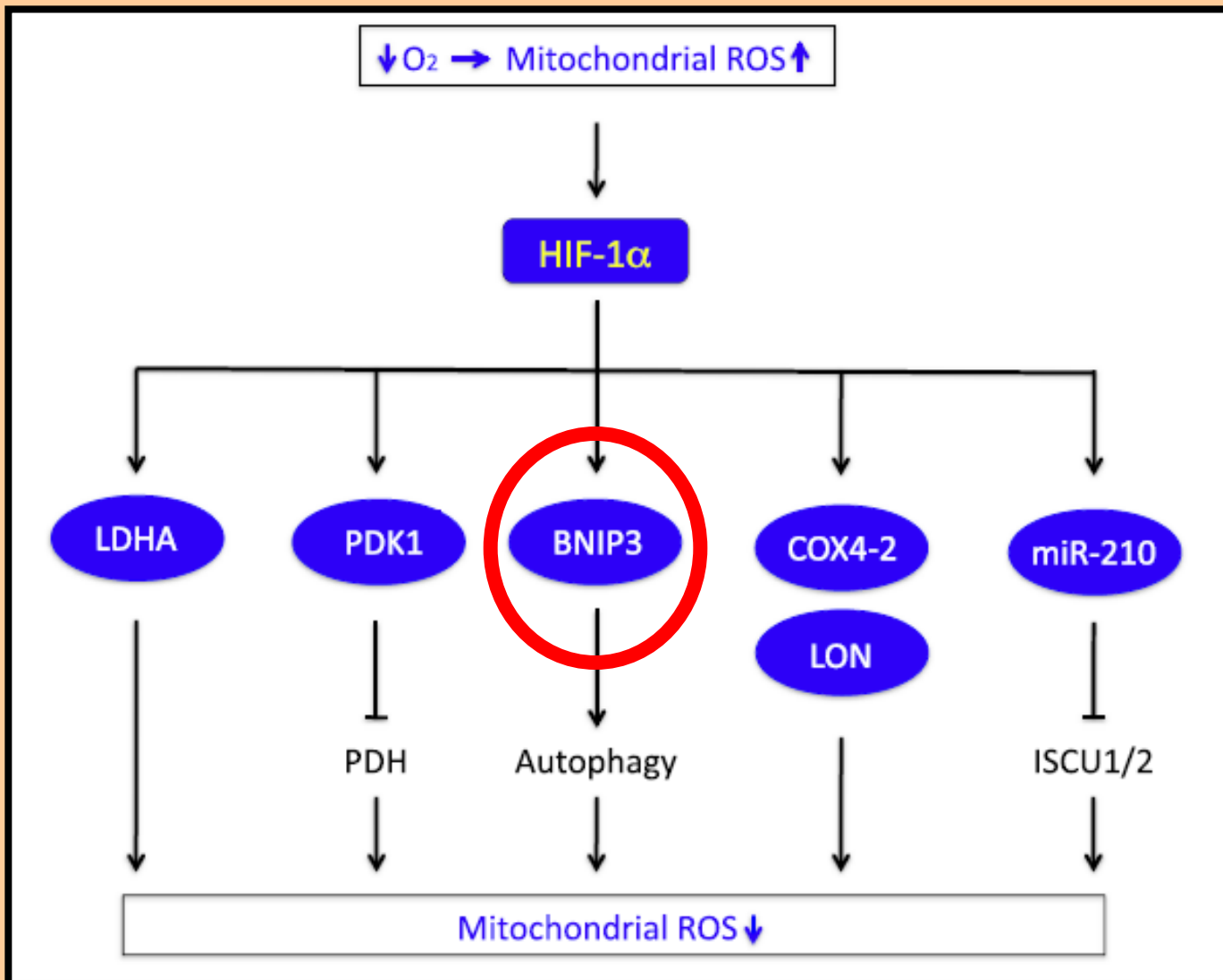
# Produkce ROS mitochondriemi

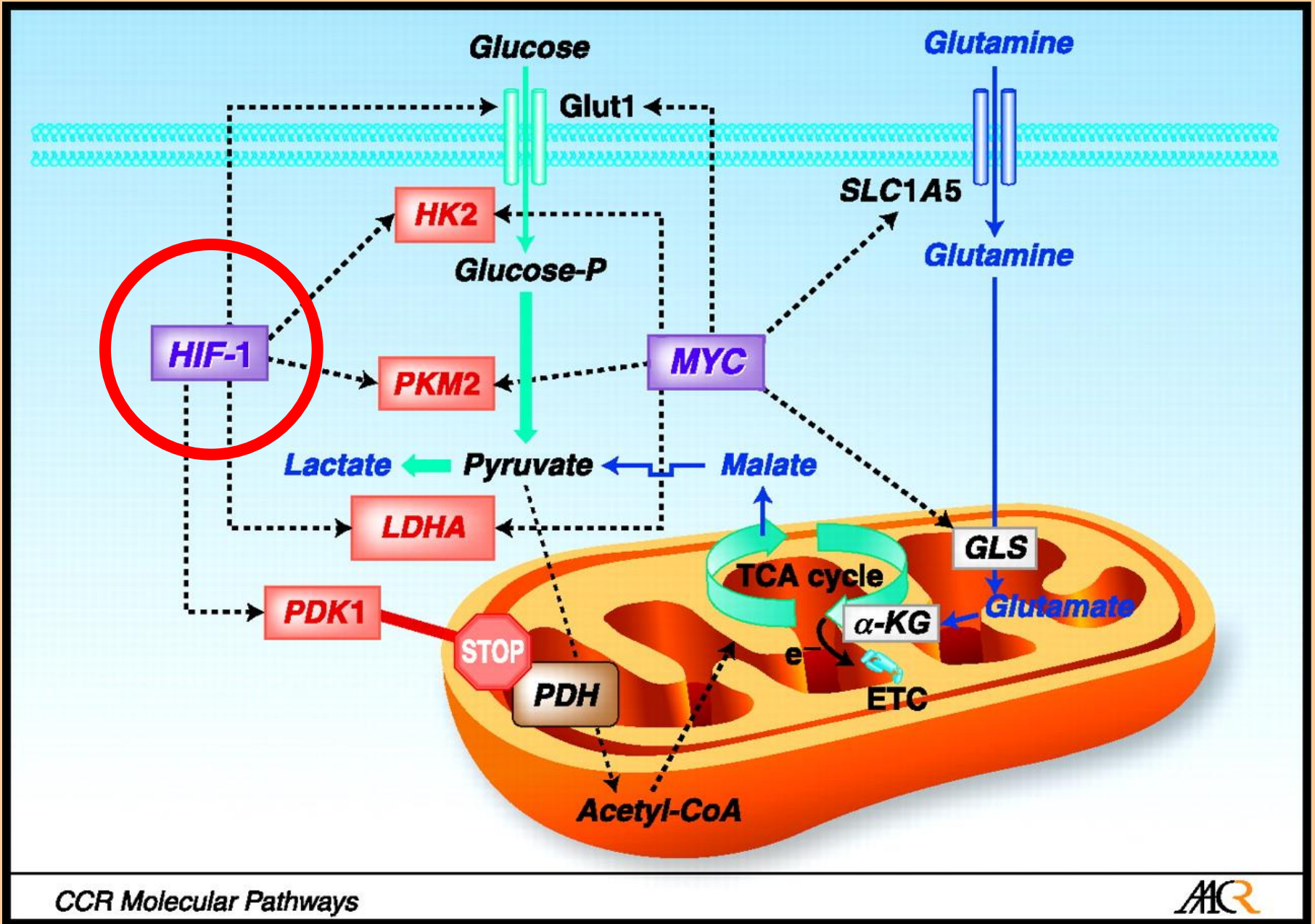


# HIF1 - indukuje autofagii mitochondrií

- potlačuje biogenezi mitochondrií
- potlačuje maturaci mitochondrií

=> snížení ROS







# FENOTYP KMENOVÝCH BUNĚK x HYPOXIE

## Kmenové buňky

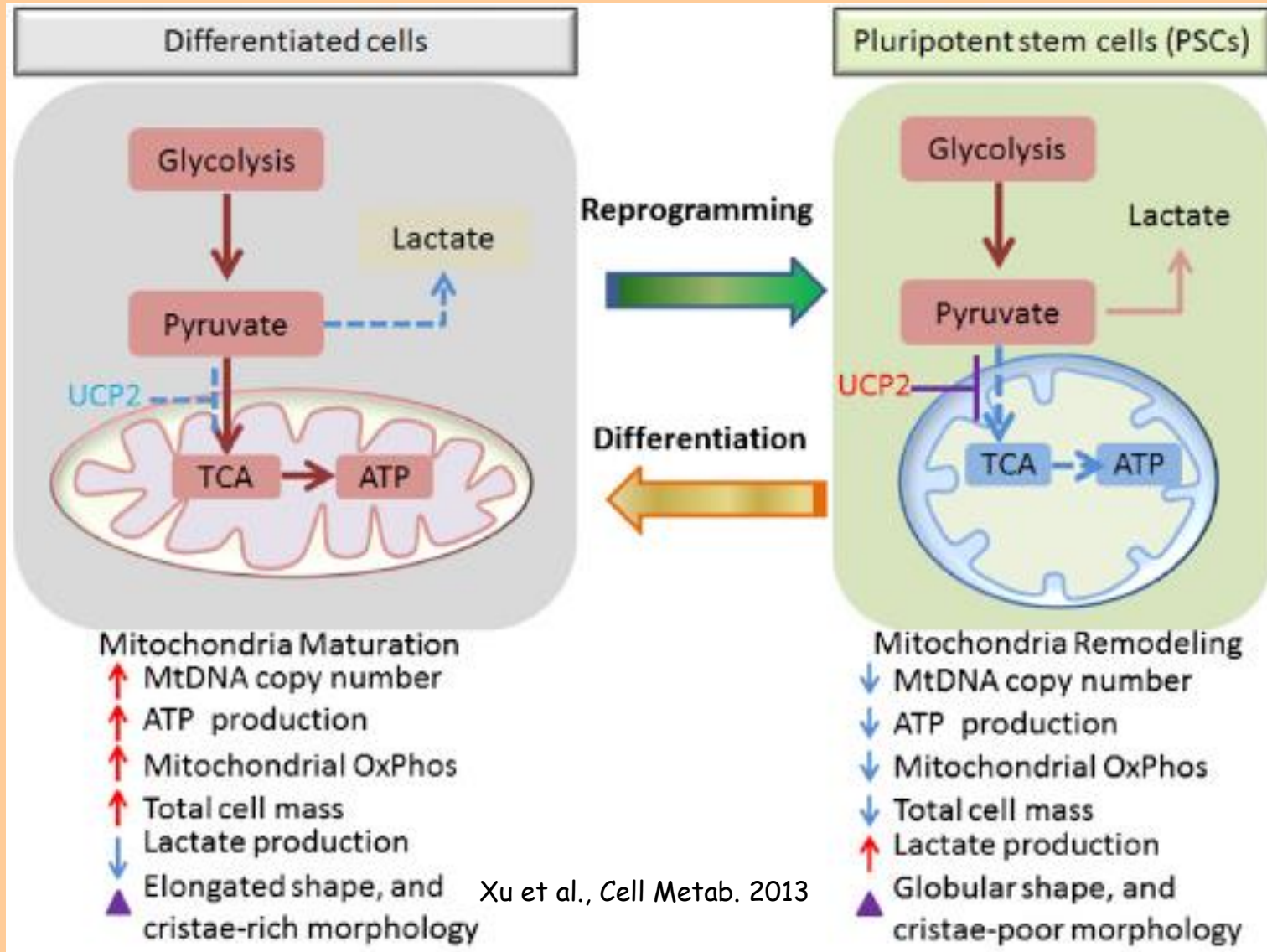
- některé (?) vysoká hladina HIF1, i v normoxii!!!
- některé (?) hypoxické niche
- Warburgův efekt = glykolýza nezávisle na dostupnosti O<sub>2</sub>  
(předpoklad růstu buněk nad energetickým ziskem  
=> intermediální metabolity pro výstavbu buněk)
- potlačená aktivita/zralost a počet mitochondrií  
=> málo ROS  
=> závislost na glykolýze
- hypoxie (3-5%) podporuje kmenovost
- hypoxie (3-5%) podporuje reprogramování na iPSC
- .....

# Hypoxie prostřednictvím HIF1

- potlačuje oxidativní fosforylaci inhibicí biogeneze a aktivity mitochondrií
  - => snížení produkce ROS => podpora kmenovosti
- podporuje glykolýzu
  - => nezávislost na mitochondriích a oxidativní fosforylaci
- stabilizuje NICD
  - => vyšší aktivita Notch ~ podpora kmenovosti
- farmakologické inhibitory PHD zvyšují pool quiescentních HSC a jejich regenerační potenciál po ozáření *in vivo* [Forristal et al., 2013 Blood]

čímž potlačuje diferenciaci a udržuje kmenovost

# Mitochondrie a kmenové buňky



**Inhibice maturace a funkce/aktivity mitochondrií (deplecí klíčových enzymů)  
= podpora kmenovosti (HSC)**

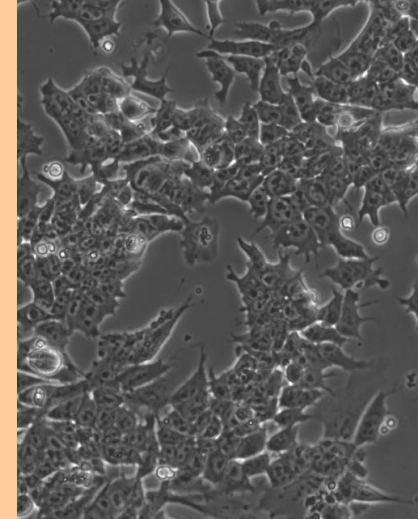
[Yu et al., 2013 Cell Stem Cell; Takubo et al., 2013 Cell Stem Cell]

# IDENTIFIKACE KMENOVÝCH BUNĚK

fenotyp x funkce

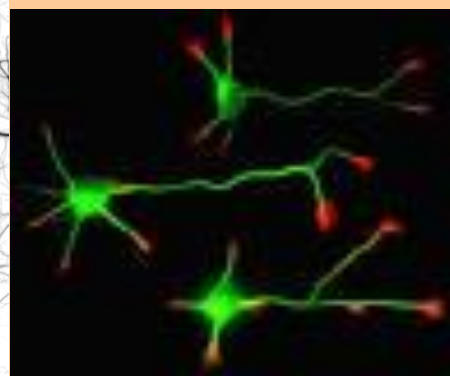
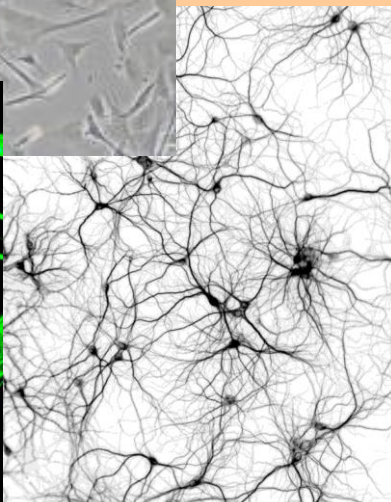
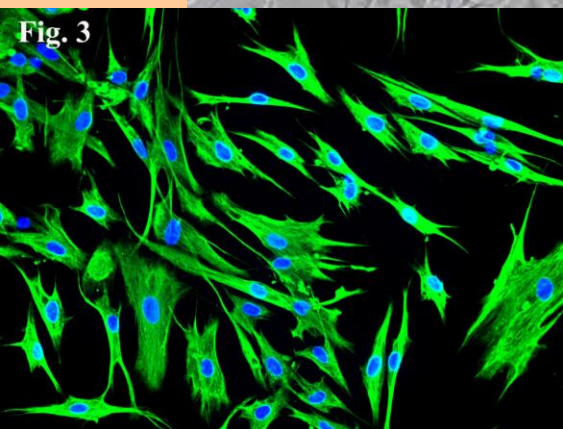
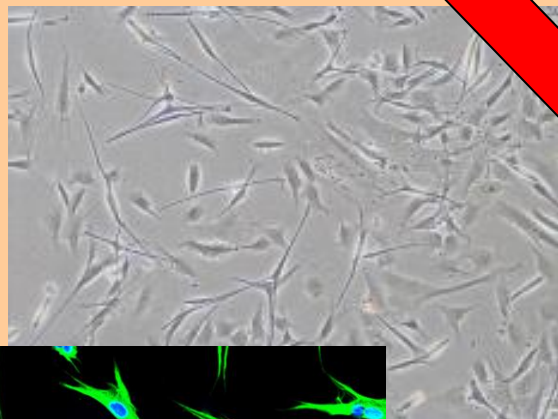
## Fenotyp

- Morfologie
- Exprese specifických genů (qRT-PCR)
- Exprese specifických proteinů (imuno metody)
- funkční testy (vedení vzruchu, stah, sekrece, fagocytóza,...)  
=> odpovídající fenotypy!!! ( Nejlépe odpovídající tkáně a buňky vzniklé přirozeně)



## Funkce

Kmenové buňky musí být schopny tvořit odpovídající potomky, odpovídající buněčné typy v rámci možností své potence (sebeobnova a diferenciace)



# KMENOVÉ BUŇKY

**Schopnost sebeobnovy** = self-renewal

**Schopnost dávat vznik jiným typům buněk** = pluripotence / multipotence / .....

=> **kmenovost = stemness**

- Společné znaky s embryonálními a nádorovými buňkami, nezralý fenotyp / relativně nediferencované (= dlouhé telomery / vysoká aktivita telomeráz, specifické proteinové markery, velké jádro / plasmový poměr,...)

= **VYHRAZENÉ (PROFESIONÁLNÍ) KMENOVÉ BUŇKY**

- Některé somatické, terminálně diferencované buňky si zachovávají schopnost sebeobnovy a v případě potřeby i multipotence, normálně jsou ale quiescentní (spící)

= **FAKULTATIVNÍ KMENOVÉ BUŇKY** (snad některé hepatocyty a buňky plicních epitelů)

- Některé diferencované buňky si také dlouhodobě zachovávají schopnost proliferace, sebeobnovování a podílejí se tak na udržení homeostáze v tkáni  
= **Sebeobnovující se diferencované buňky** (některé glie, některé lymfocyty,..)

## KMENOVÉ BUŇKY PRIMÁRNÍ = existují „in vivo“

- dávají vznik buňkám dané buněčné struktury / tkáně / orgánu / (organismu)
- relativně pomalá proliferace
- jsou nejčastěji multipotentní, snad některé i pluripotentní či unipotentní
- jsou základním zdrojem buněk pro regeneraci organismu a homeostázi
- mají schopnost sebeobnovy (**self-renewal**) = *in vivo* asymetrické dělení
- s věkem jich ubývá, ale pravděpodobně nikdy během života jedince úplně nevymizí

### *profesionální SC*

- v tkáni jsou lokalizovány ve specifické oblasti, „**niche**“ (koutek)
- mají společné znaky s embryonálními a nádorovými buňkami = dlouhé telomery, specifické proteinové markery, velký jádro / plasmový poměr,...
- ???

## Somatické kmenové buňky (embryonální a adultní)

**Buňky některých zárodečných linií (neurální lišta)  
a kmenové buňky trofoblastu**

## KMENOVÉ BUŇKY ODVOZENÉ/SEKUNDÁRNÍ = existují jen „in vitro“

- jsou připravené z populací pluripotentních embryonálních buněk, ze zárodečných buněk, nebo z progenitorů embryonálních a dospělých tkání
- relativně rychle proliferují
- některé jsou multipotentní (z embryonálních a dospělých tkání), některé pluripotentní (embryonální původ)
- mohou být zdrojem buněk pro regeneraci organismu
- mají schopnost sebeobnovy (**self-renewal**) = „asymetrické/symetrické“ dělení
- mají společné znaky s embryonálními a nádorovými buňkami = dlouhé telomery, specifické proteinové markery, velké jádro / plasmový poměr,...
- ???

### **Embryonální kmenové buňky**

-> odvozené z vnitřní buněčné masy  
(**Kmenové buňky epiblastu**)

### **Embryonální zárodečné buňky**

-> odvozené z primordiálních zárodečných buněk

### **Embryonální nádorové buňky**

-> odvozené z kmenových buněk teratomů

### **Somatické kmenové buňky odvozené**

-> odvozené ze somatických kmenových buněk