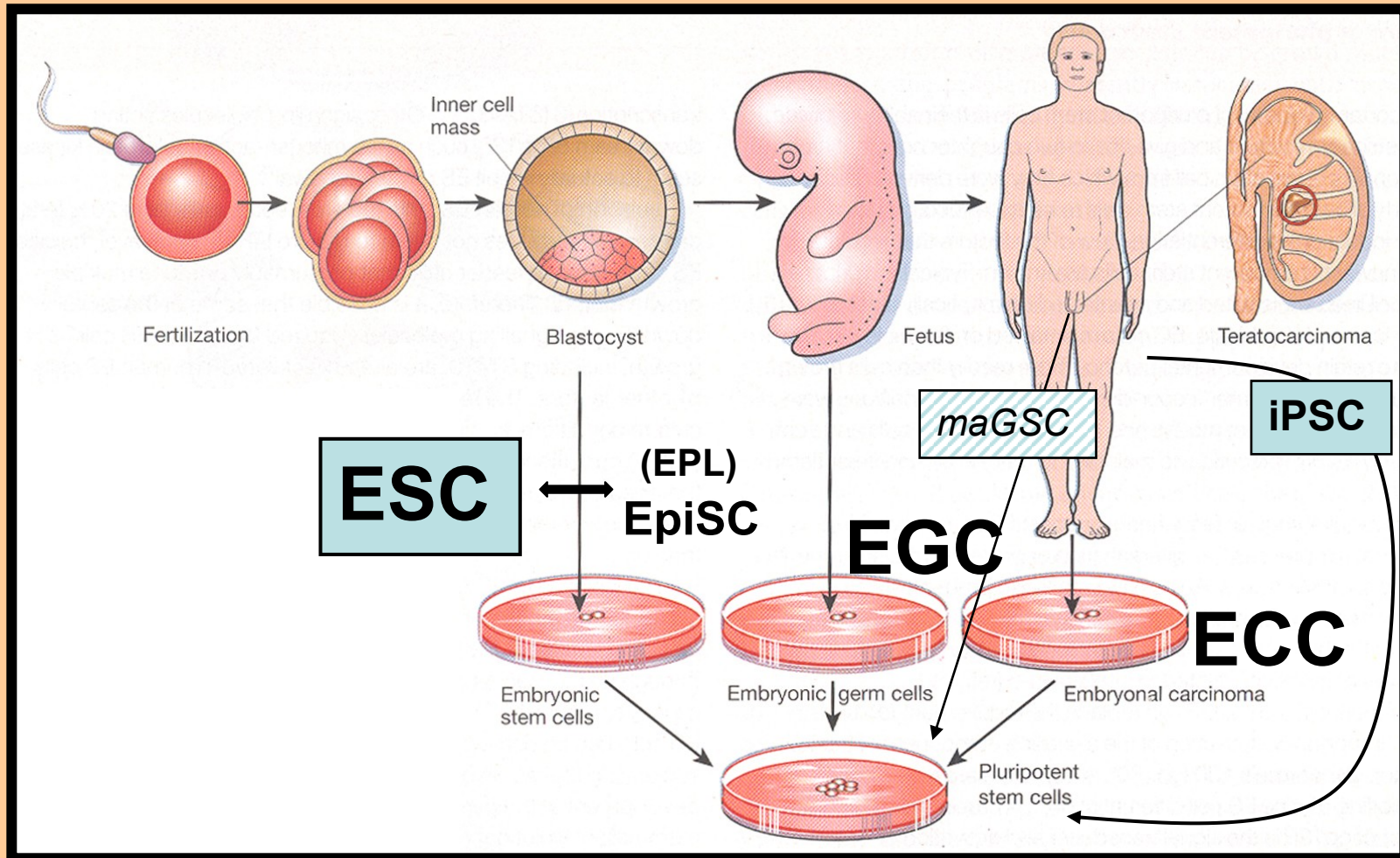


# Pluripotentní, odvozené kmenové buňky



**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**

**Indukované pluripotentní kmenové buňky (Induced pluripotent stem cell – iPSC)**

**(Multipotentní dospělé zárodečné kmenové buňky – maGSC)**



# Embryonální kmenové buňky (Embryonic stem cell) ESC

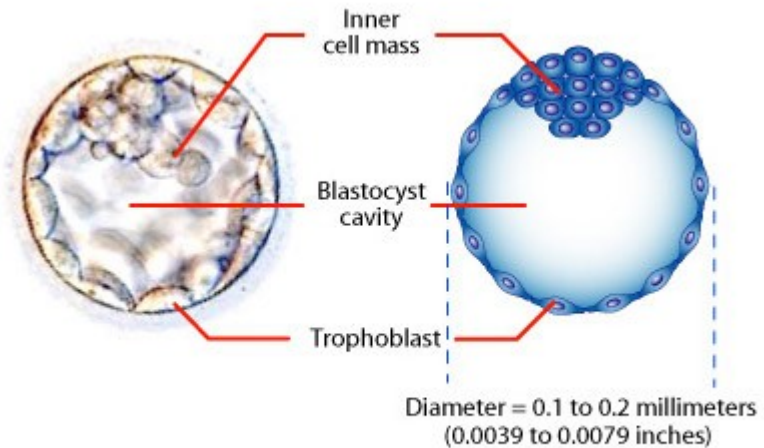
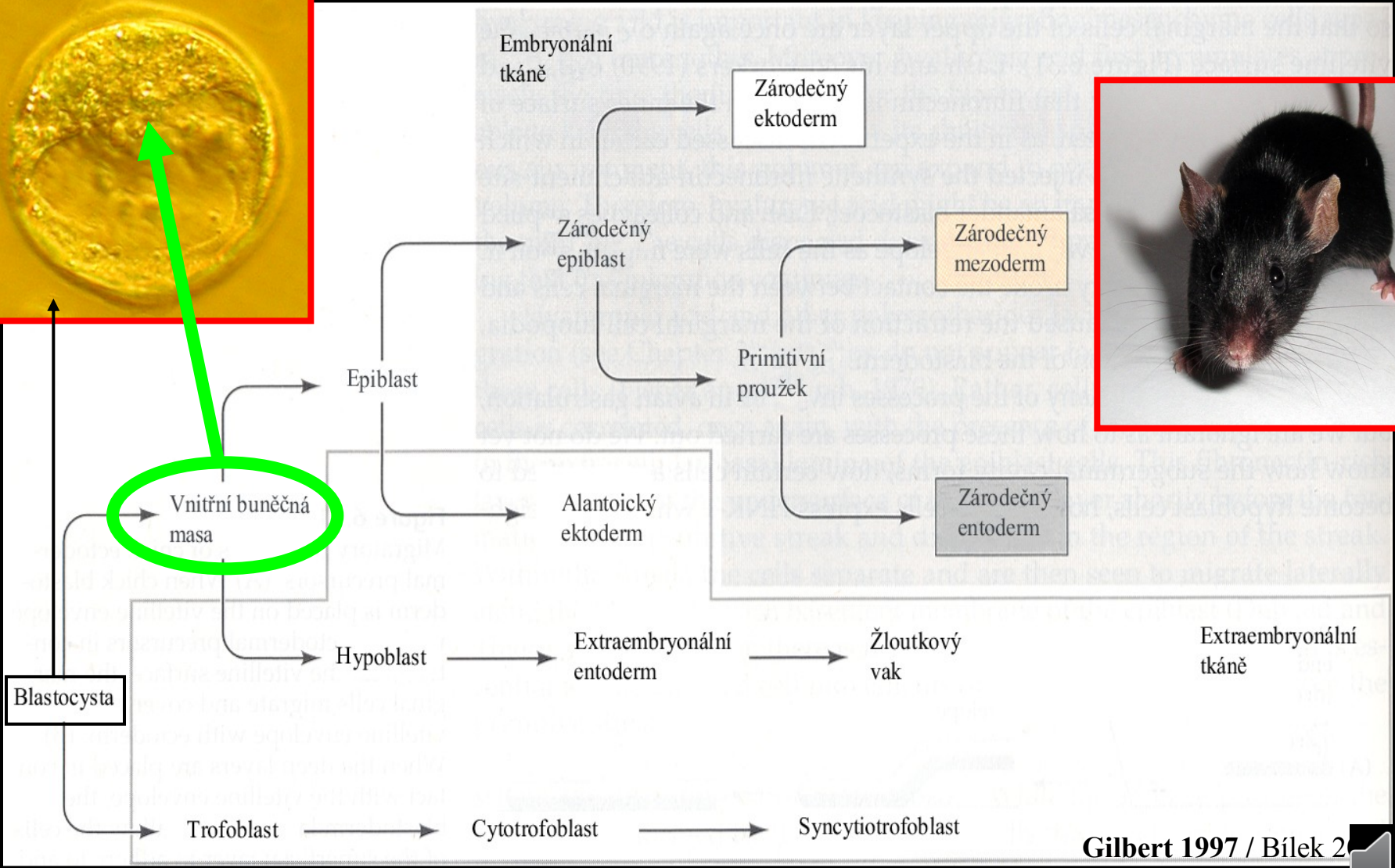
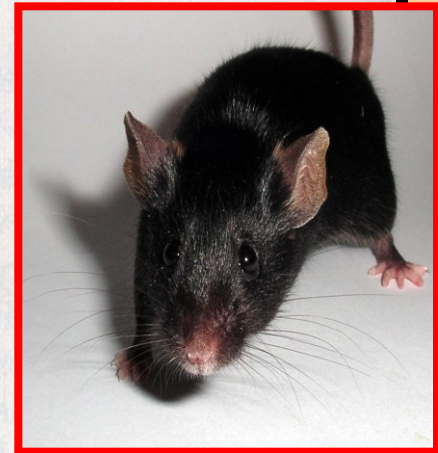


Illustration by [Cell Imaging Core](#) of the Center for Reproductive Sciences.

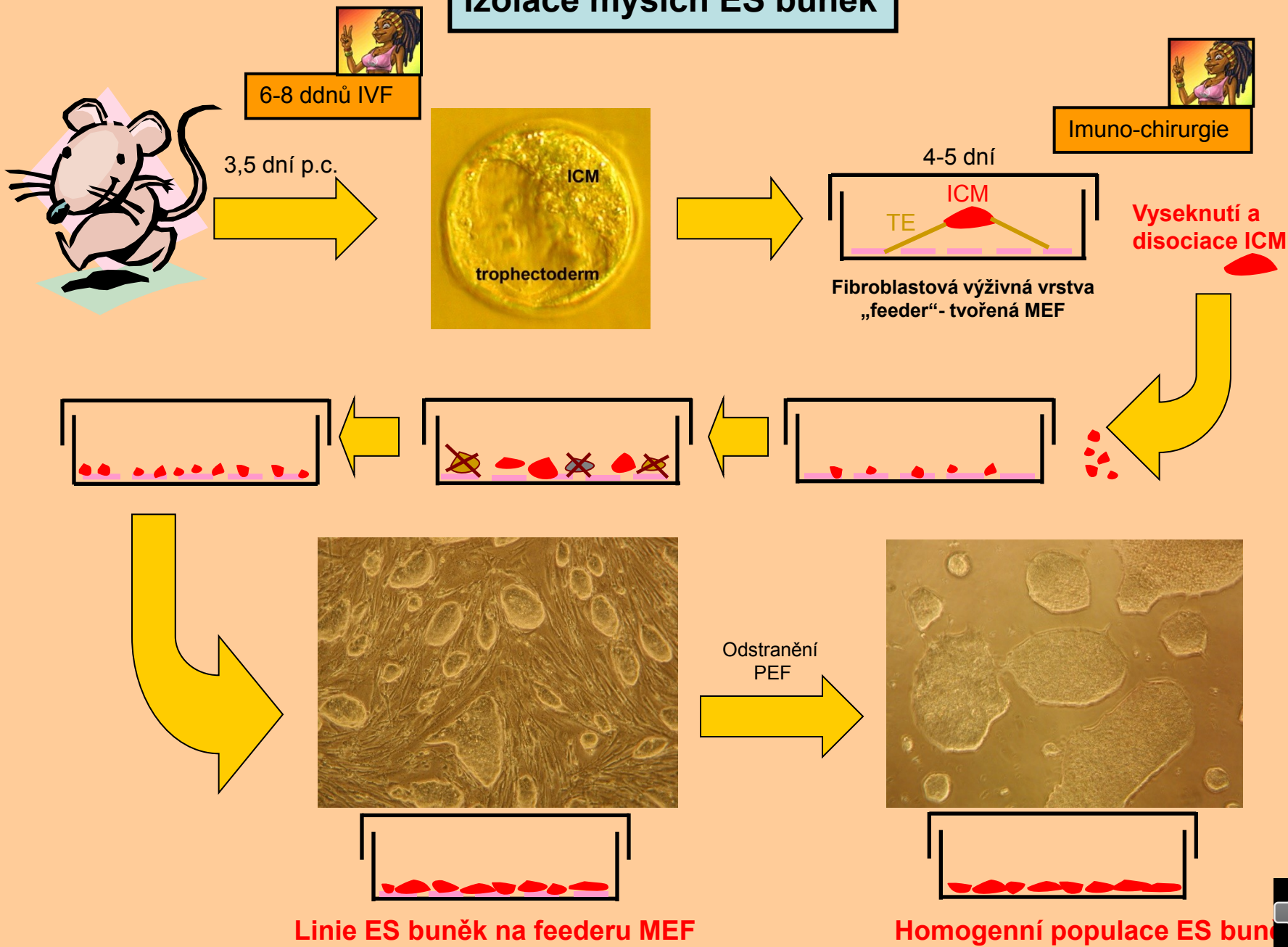
- jsou odvozené z vnitřní buněčné masy blastocysty
- fenotypem odpovídají přibližně buňkám vnitřní buněčné masy (mESC, ICM – inner cell mass) nebo epiblastu (hESC, EpiSC)
- jsou pluripotentní
- přirozeně neexistují, pouze *in vitro*
- jsou nesmrtelné
- mají schopnost si udržet stabilní genotyp (!?)
-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



# Ontogeneze a diferenciační potenciál buněk vnitřní buněčné masy



# Izolace myších 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

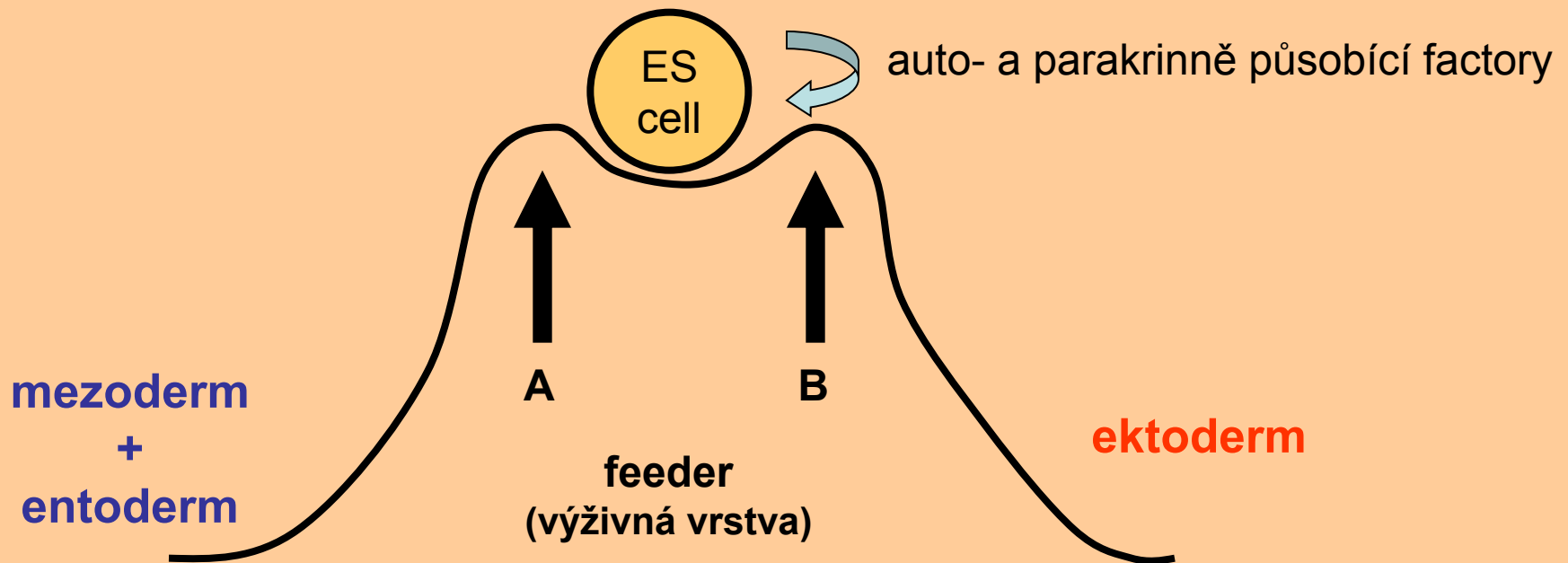
Organismus je směsí geneticky odlišných buněk / tkání / orgánů

**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!**

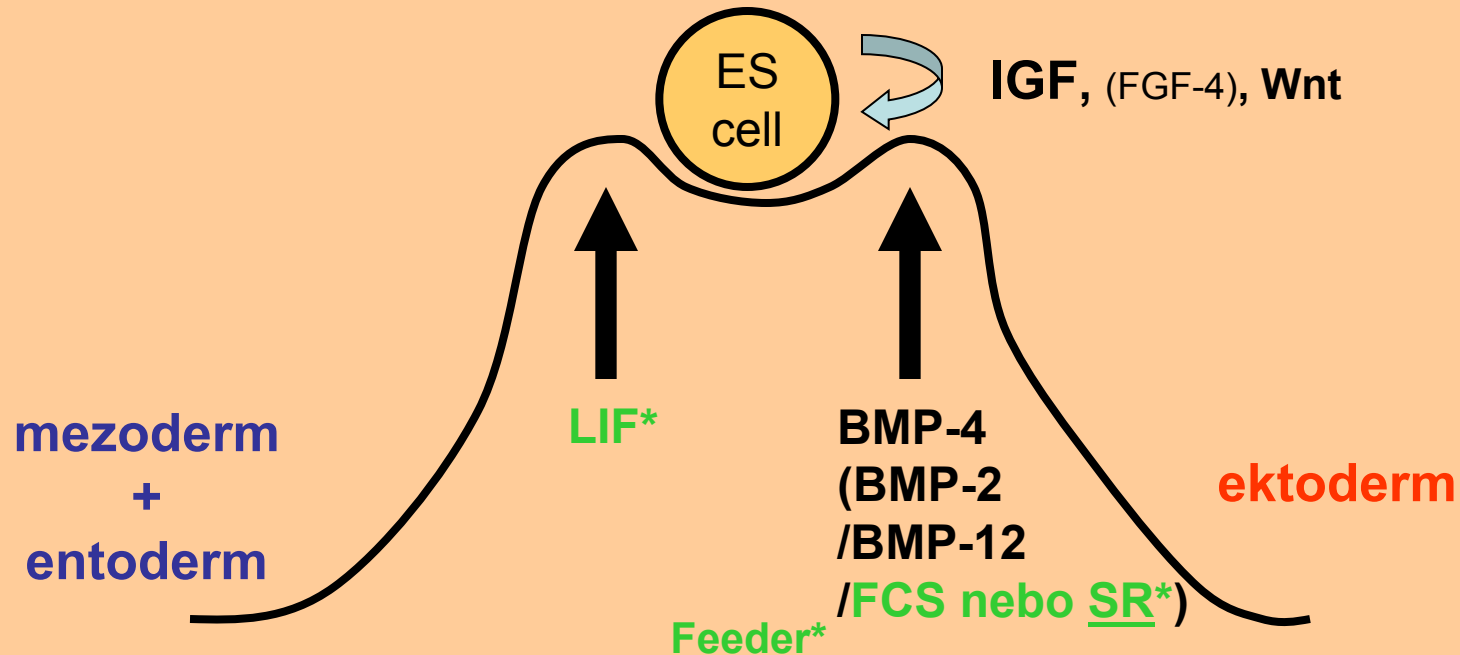


## Obecný model inhibice diferenciacie ES buněk

- 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



# 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

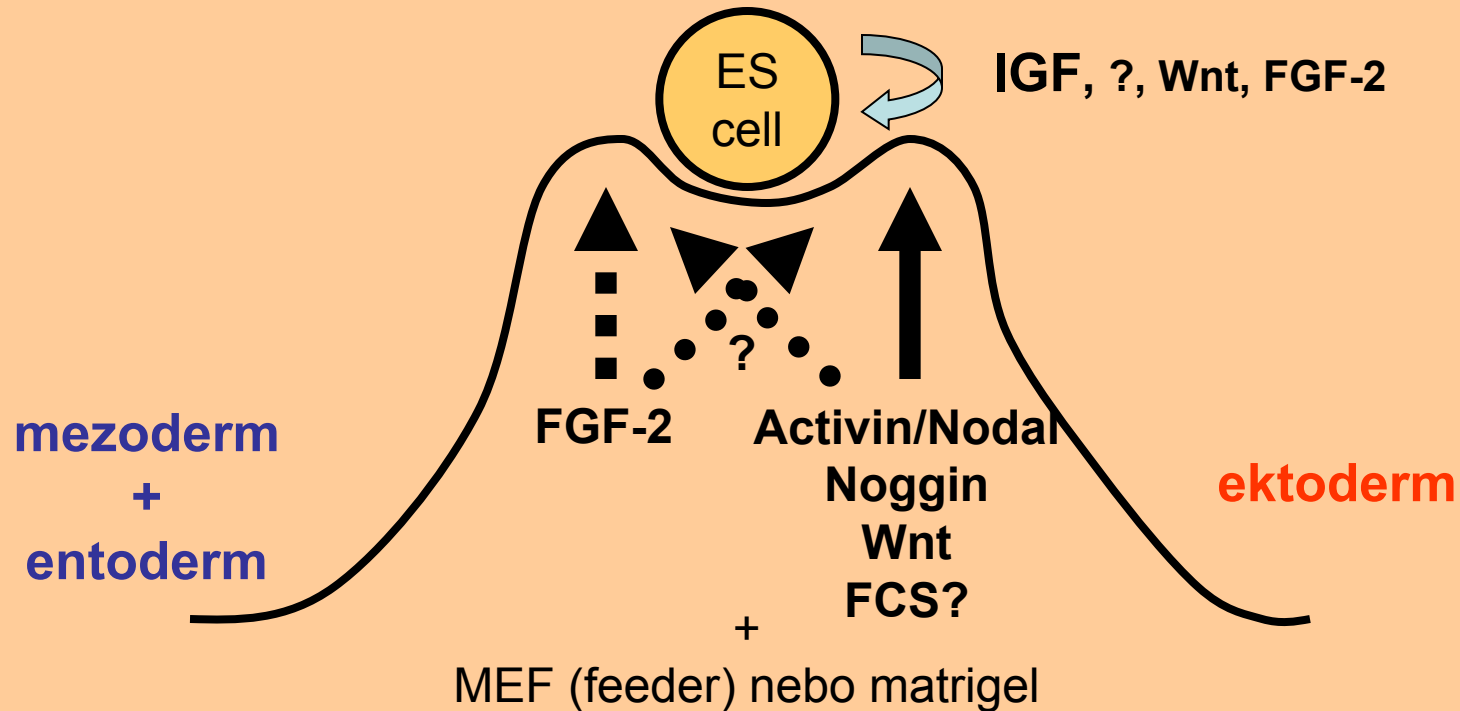
- výživná vrstva = zdroj růstových faktorů (cytokiny, ECM, ..) a vhodný podklad
- nejčastěji se používají myší embryonální fibroblasty (13d p.c., MEF (PEF))
- bez „feederu“ z MEF = definované podmínky, ale horší ES buňky
- tendence používat druhově identické MEF = snížení rizika přenosu virů, ...
- MEF 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).





## 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)

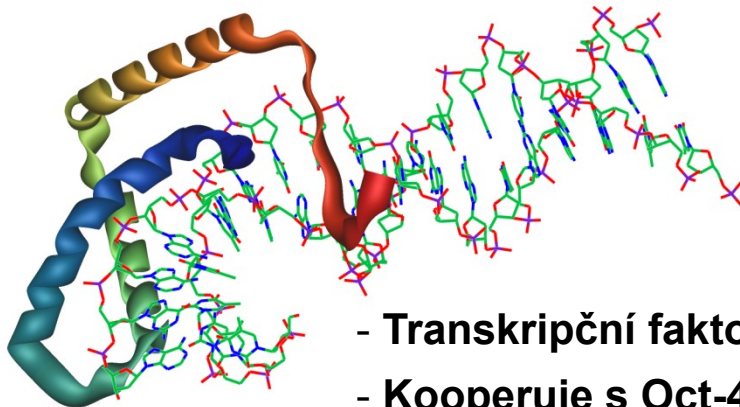
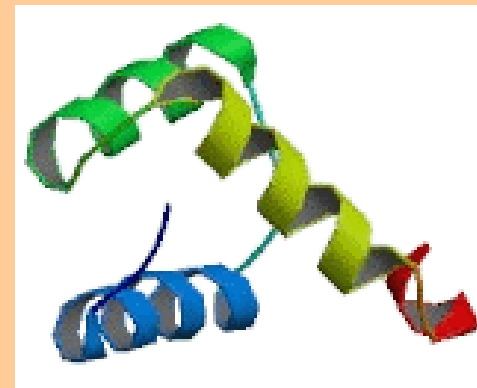
### **Oct-4 (Oct-3/4, Oct-3, *Pou5f1* – master of pluripotency)**

- transkripční faktor, homeoprotein
- exprimuje se již u 2/4 (myš – aktivace transkripce) buněčného embrya
- ve stádiu moruly 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)
- (nebyl nalezen u kuřat)
- reguluje expresi FGF-4 (Oct-4/Sox-2), PDGF $\alpha$ , ....
- 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 i u M $\Phi$



## Nanog

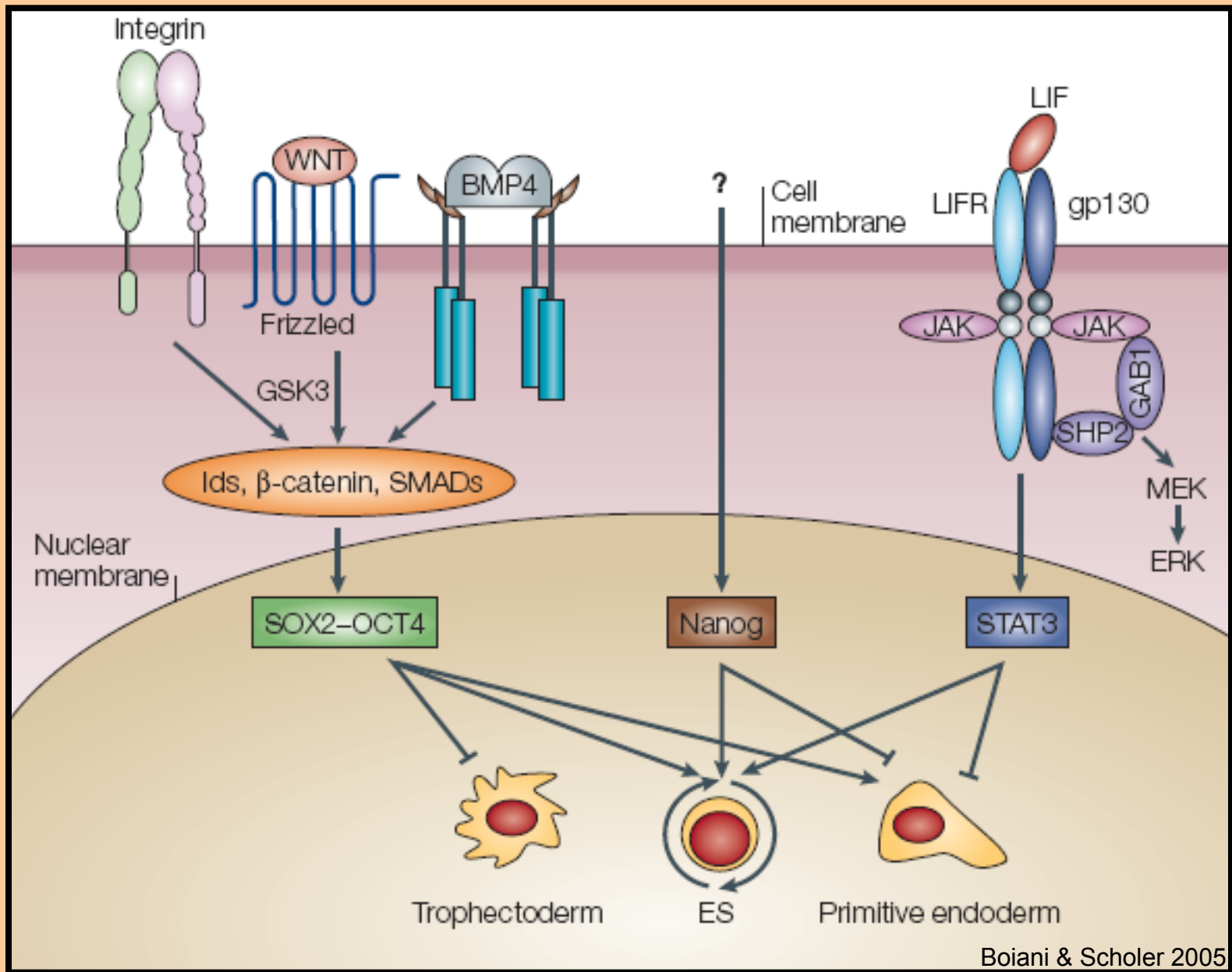
- transkripční faktor, homeoprotein
- jeho exprese vede k udržení vysoké hladiny Oct-4
- objevuje se již ve vnitřních buňkách moruly
- později se zdá být nezbytný zejména pro specifikaci PGC!
- (výskyt i u některých progresivních nádorů (?!))



## 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





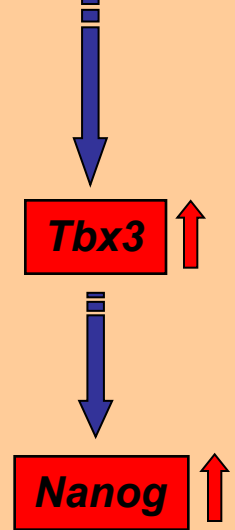
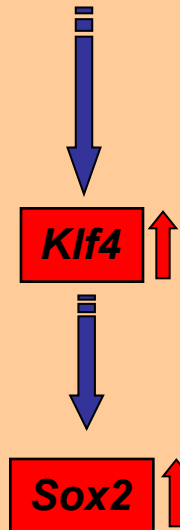
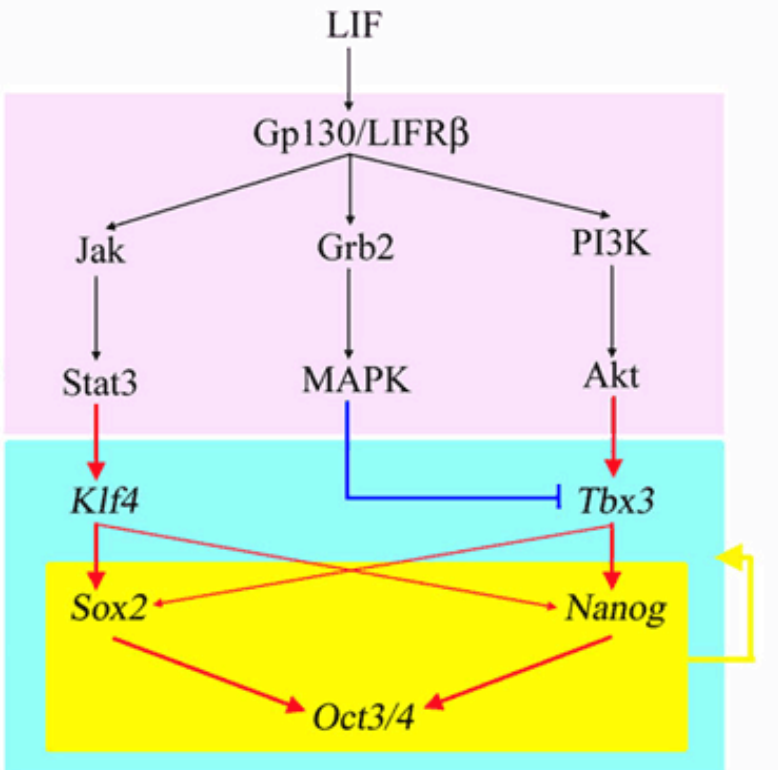
# Potencionální mechanismus účinků LIF u mES buněk

LIF/gp130/LIFR

Jak2/STAT3

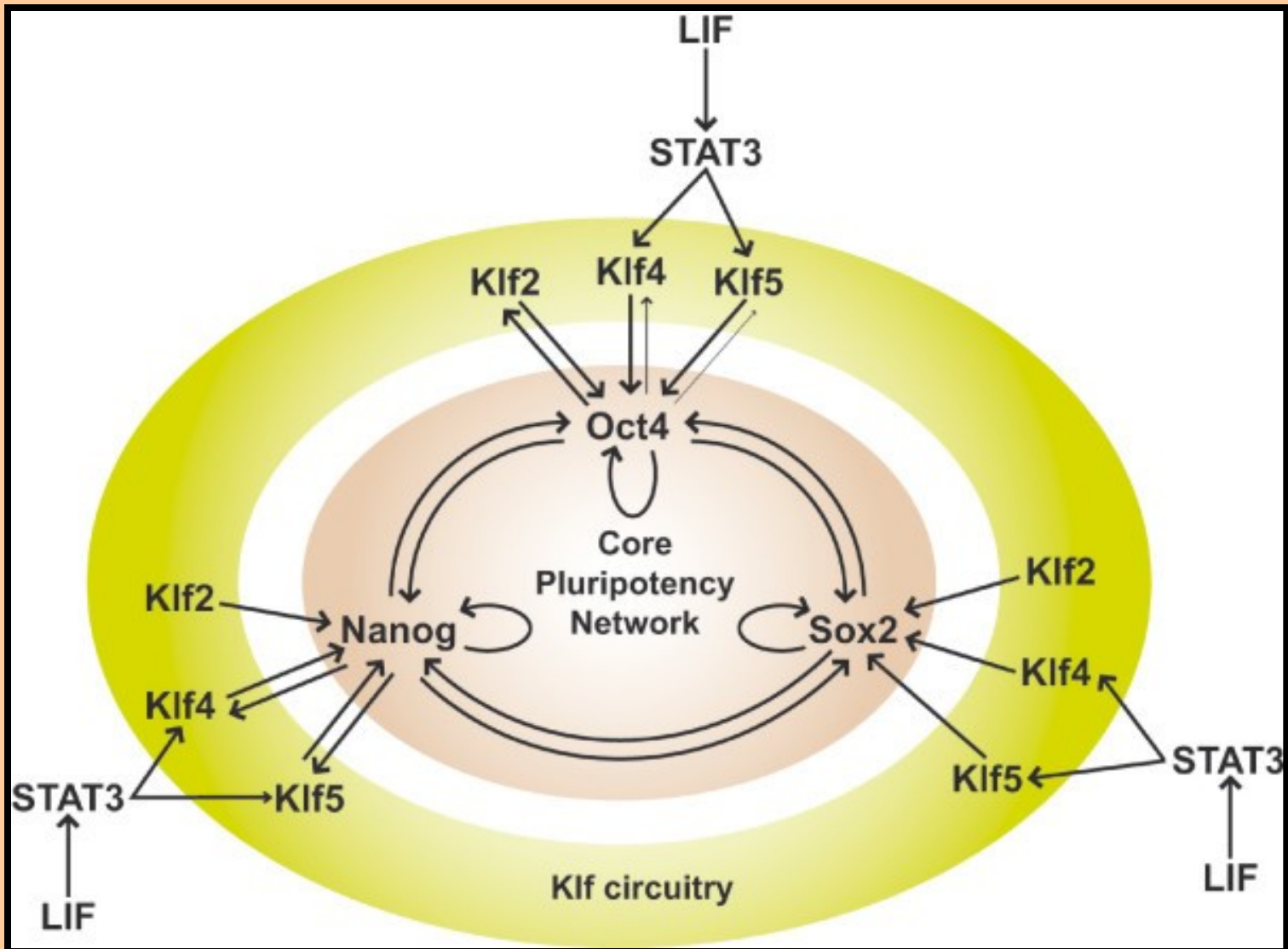
PI3K/Akt + Erk

Transcription factors Signal transduction



Niwa 2009





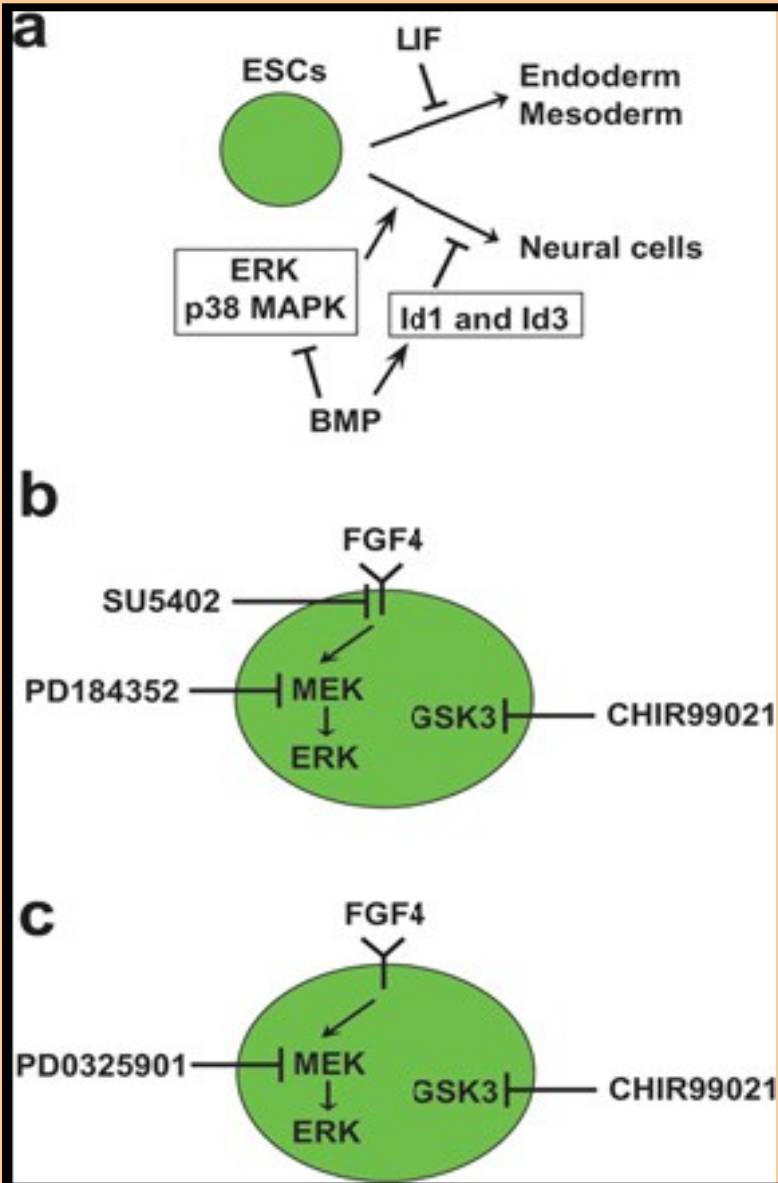
[Krüppel-like transcription factors and control of pluripotency.](#)

Bourillot PY, Savatier P.  
 BMC Biol. 2010 Sep 27;8:125



# 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

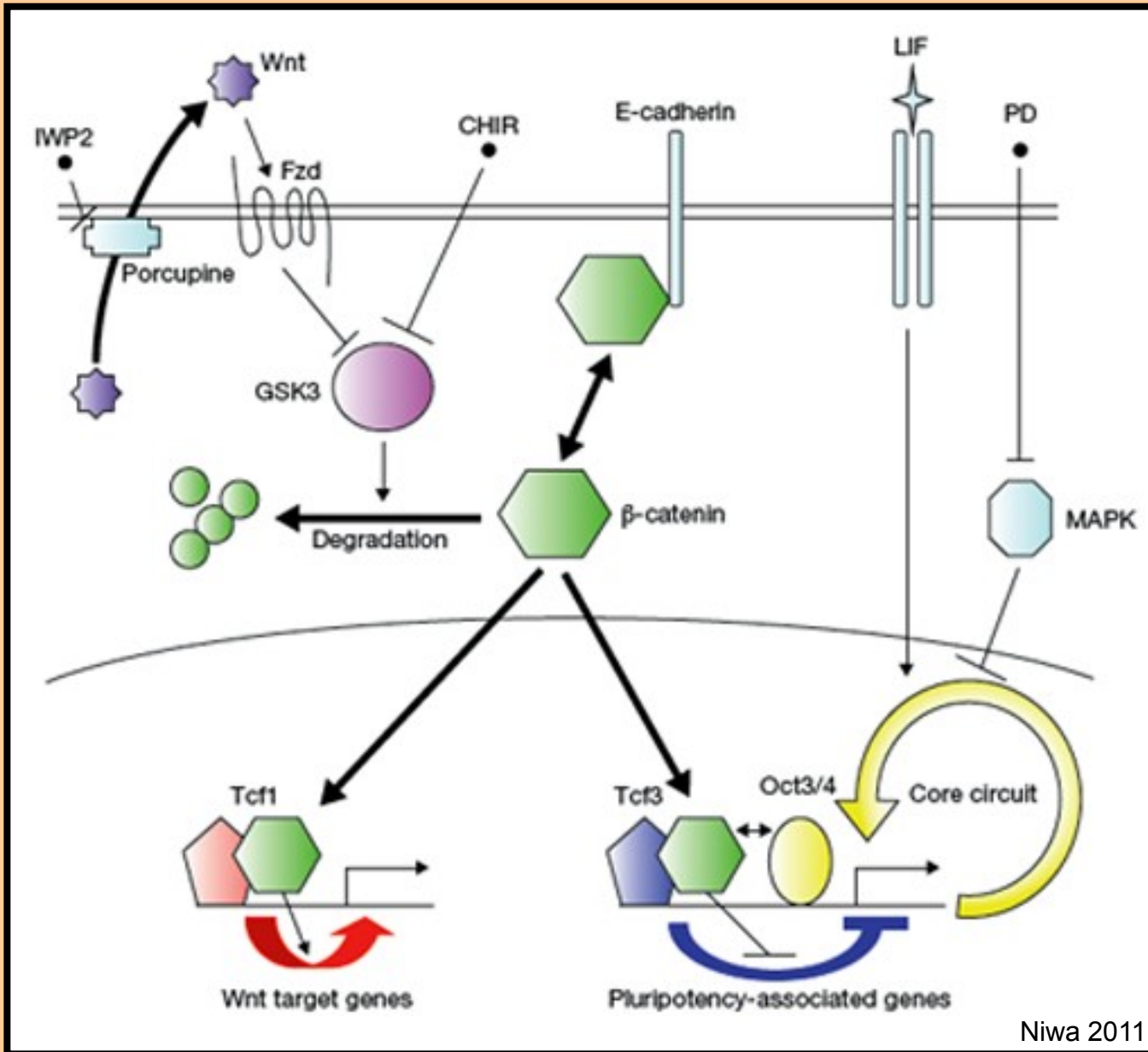
(inhibice Erk signalizace)

CHIR99021

(inhibice GSK3, aktivace Wnt signalizace)



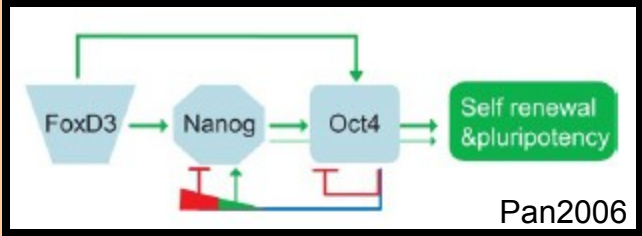
# Wnt a mES



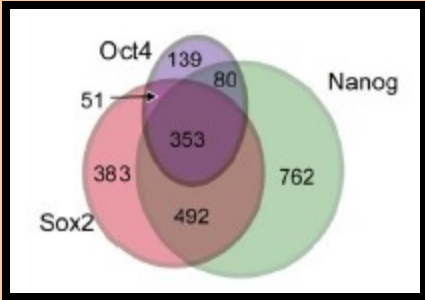


# Regulace transkripce faktory Oct-4, Nanog a Sox-2

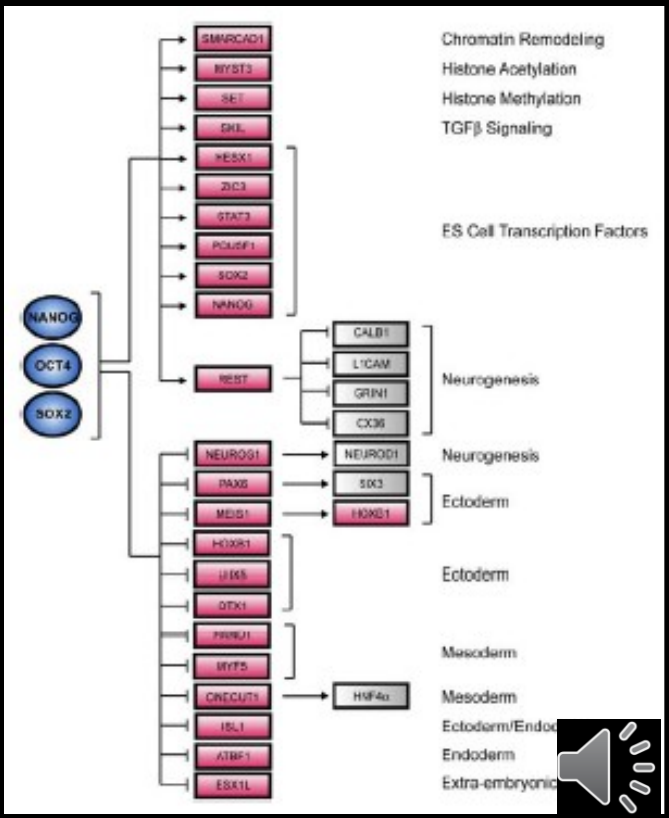
Předpokládaný model vzájemné regulace exprese FoxD3, Nanog a Oct-4 u mES. FOxD3 není exprimován u hES.



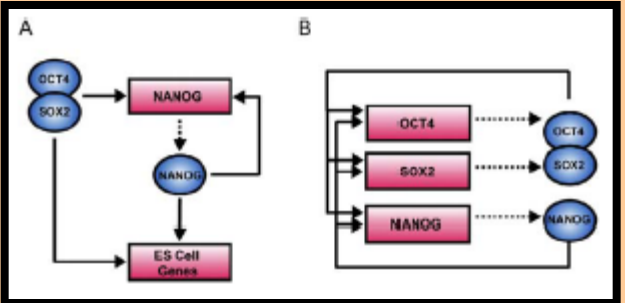
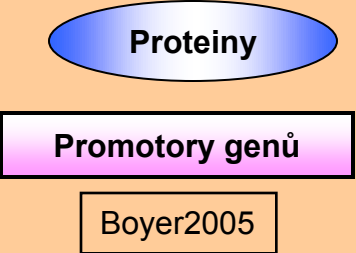
Vzájemná regulace Oct-4 a Nanog není dosud plně objasněna. Je však již jasné, že Oct-4 řídí transkripci Nanog přímou vazbou v jeho promotoru (společně se Sox-2), jak u mES tak hES. Pro self-renewal ES buněk je klíčové zachovat rovnováhu v hladinách Oct-4 a Nanog (viz. níže).



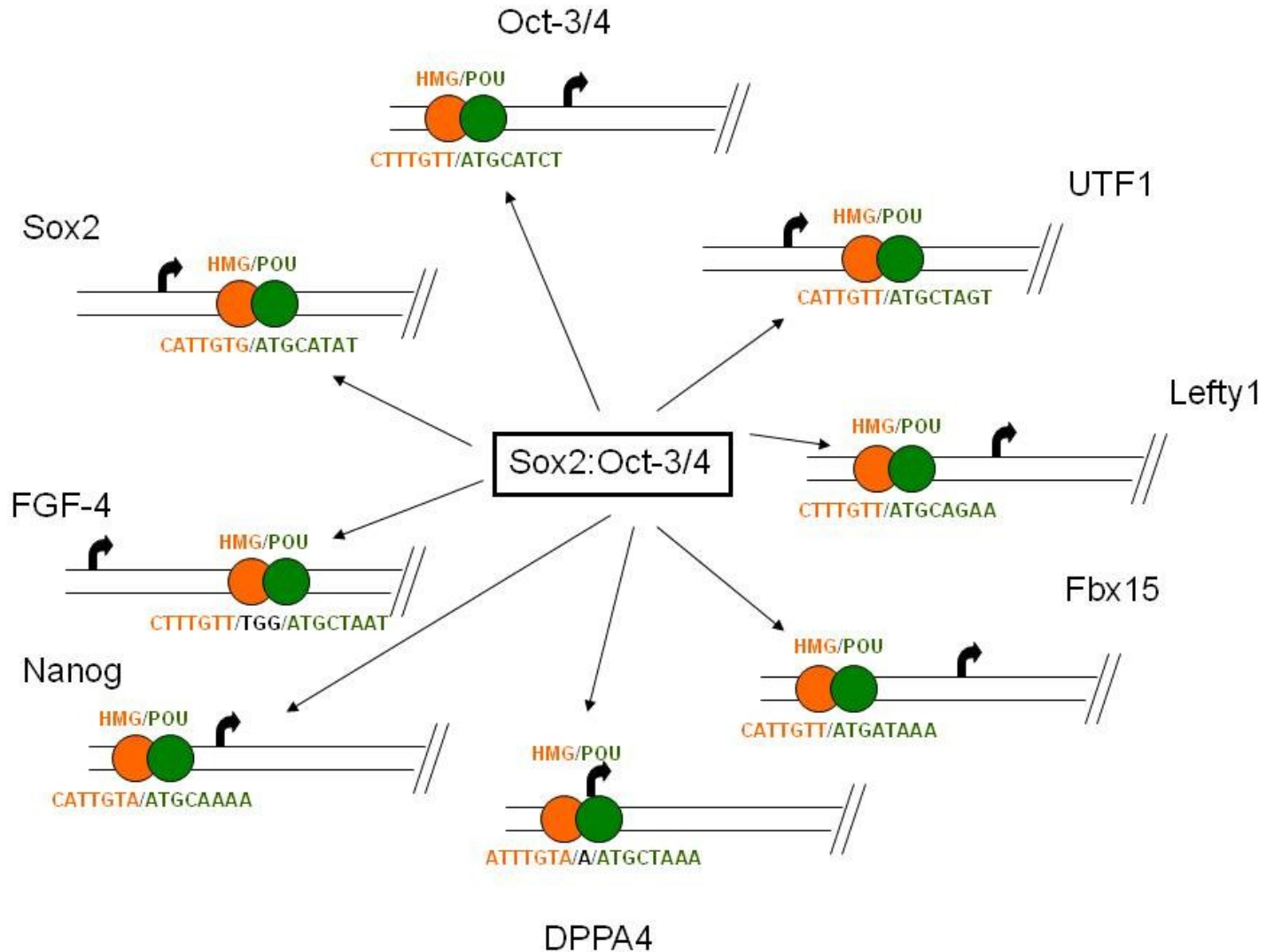
Promotorové sekvence rozpoznávané Oct-4, Nanog a Sox-2 u hES.



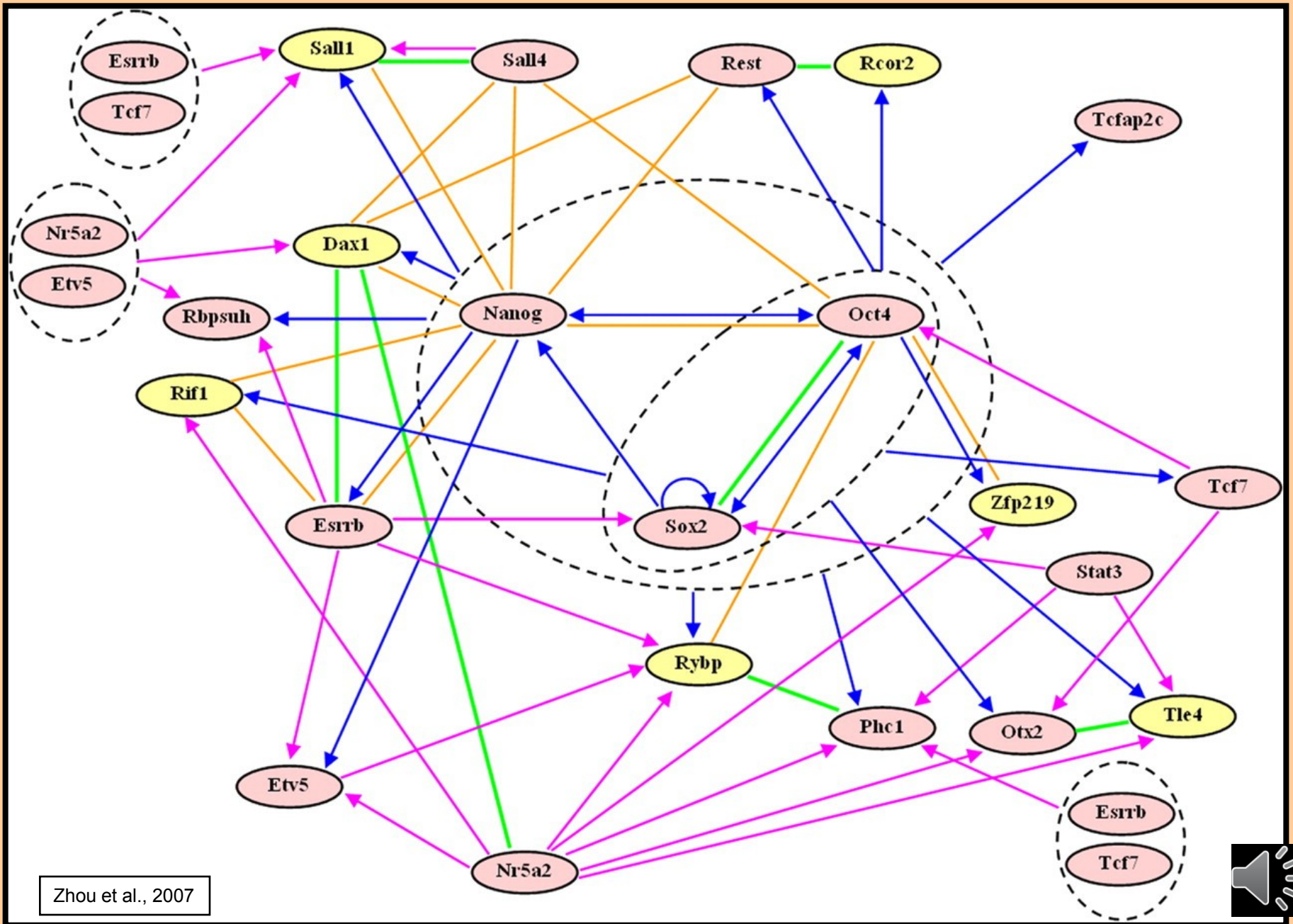
Model vzájemné regulace Oct-4, Nanog a Sox-2 a některými řízenými geny u hES.



# 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

