

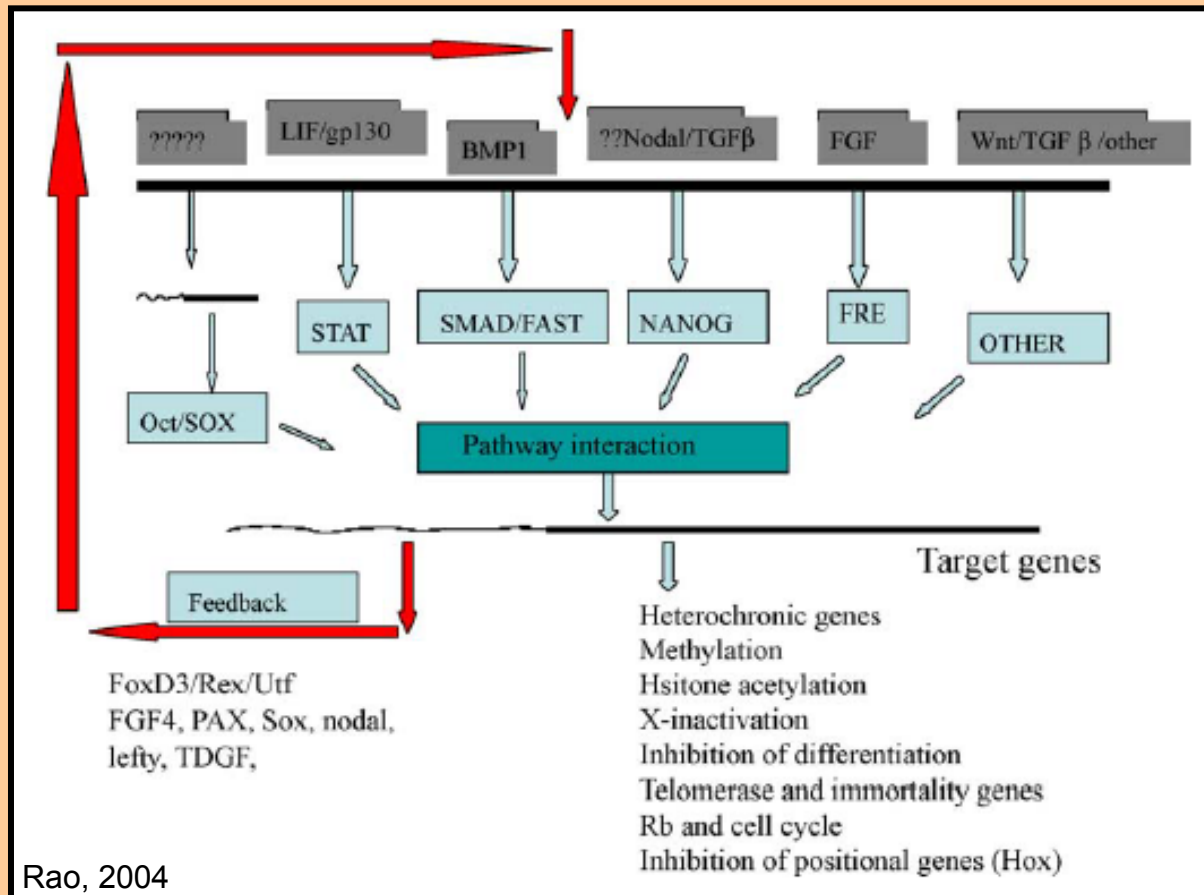
# ES BUŇKY

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

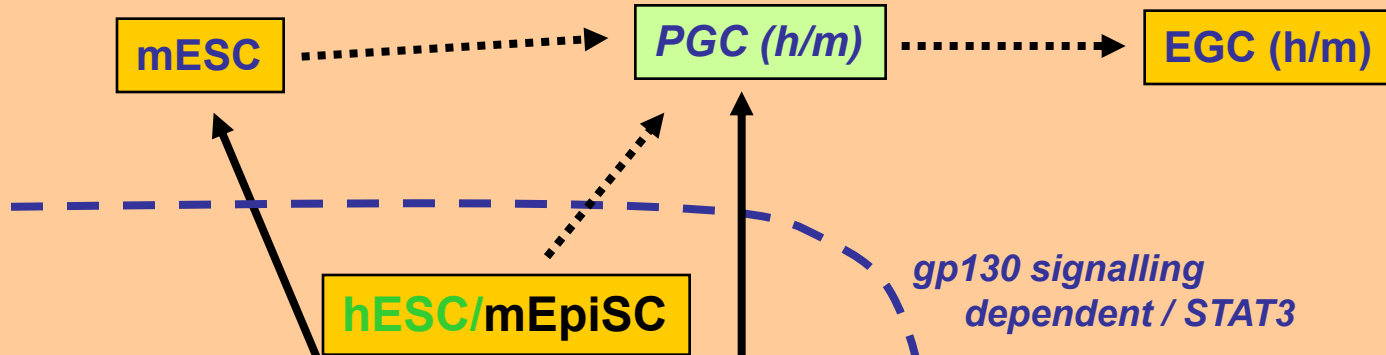
x

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

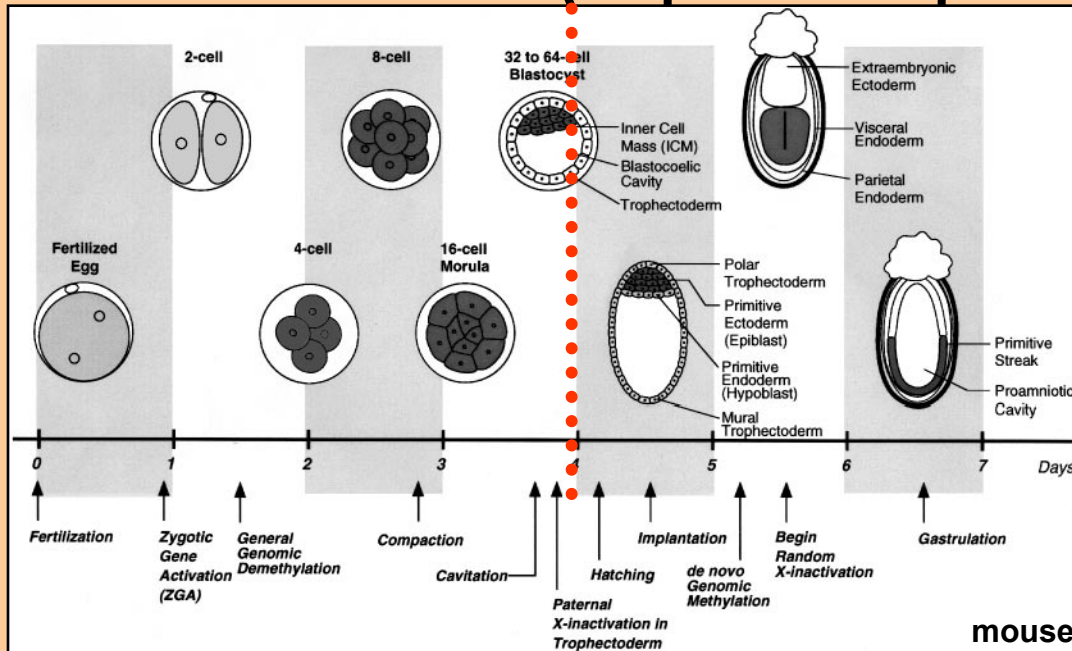
Toto rozdělení je pravděpodobně dáno možností některých živočišných druhů mít skrytou březost ve stádiu blastocysty (embryonální diapauza).



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



embryonální diapauza (myš / lasicoviti)



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	+	+



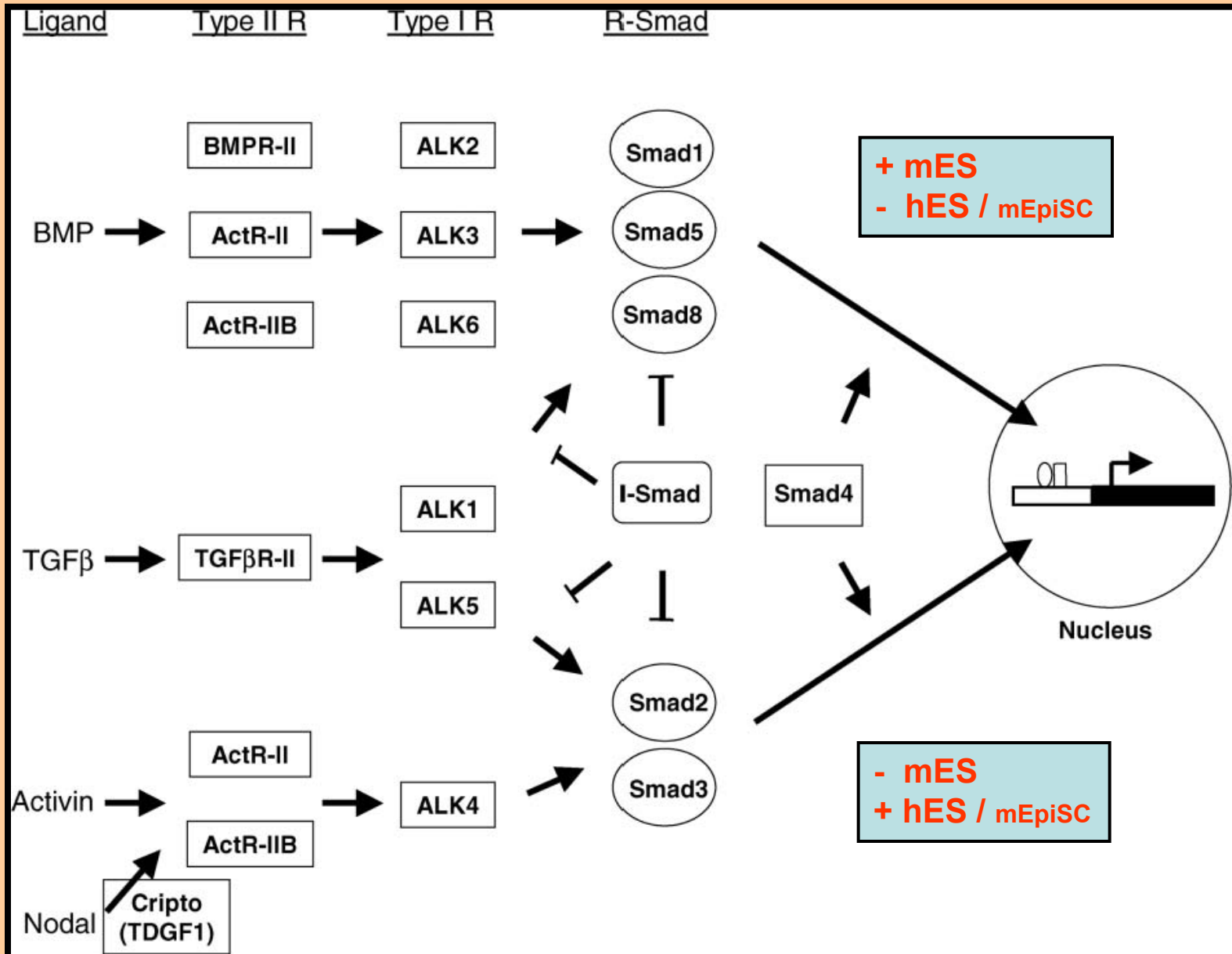
Table 1 | **The best-characterized ESC markers\***

Undifferentiated state marker	Mouse	Human
<b>Cell-surface and nuclear antigens</b>		
SSEA1 <sup>‡</sup>	+	–
SSEA3/4 <sup>‡</sup>	–	+
TRA1–60/81 <sup>§</sup>	–	+
TRA2-54	–	+
GCTM-2 <sup>§</sup>	–	+
TG343 <sup>§</sup>	?	+
TG30 <sup>l</sup>	?	+
CD9 <sup>l</sup>	+	+
CD133/prominin	+	+
OCT4	+	+
NANOG	+	+
SOX2	+	+
<b>Enzymatic activities</b>		
AP	+	+
Telomerase	+	+
<b>In vitro culture requirements</b>		
Feeder-cell dependent	+	+
LIF dependent	+	–
FGF4	+	–
<b>Growth characteristics</b>		
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

<sup>‡</sup>Glykolipidy, <sup>§</sup> Keratan chondroitin sulfát proteoglycan, <sup>l</sup>Tetraspannin 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)

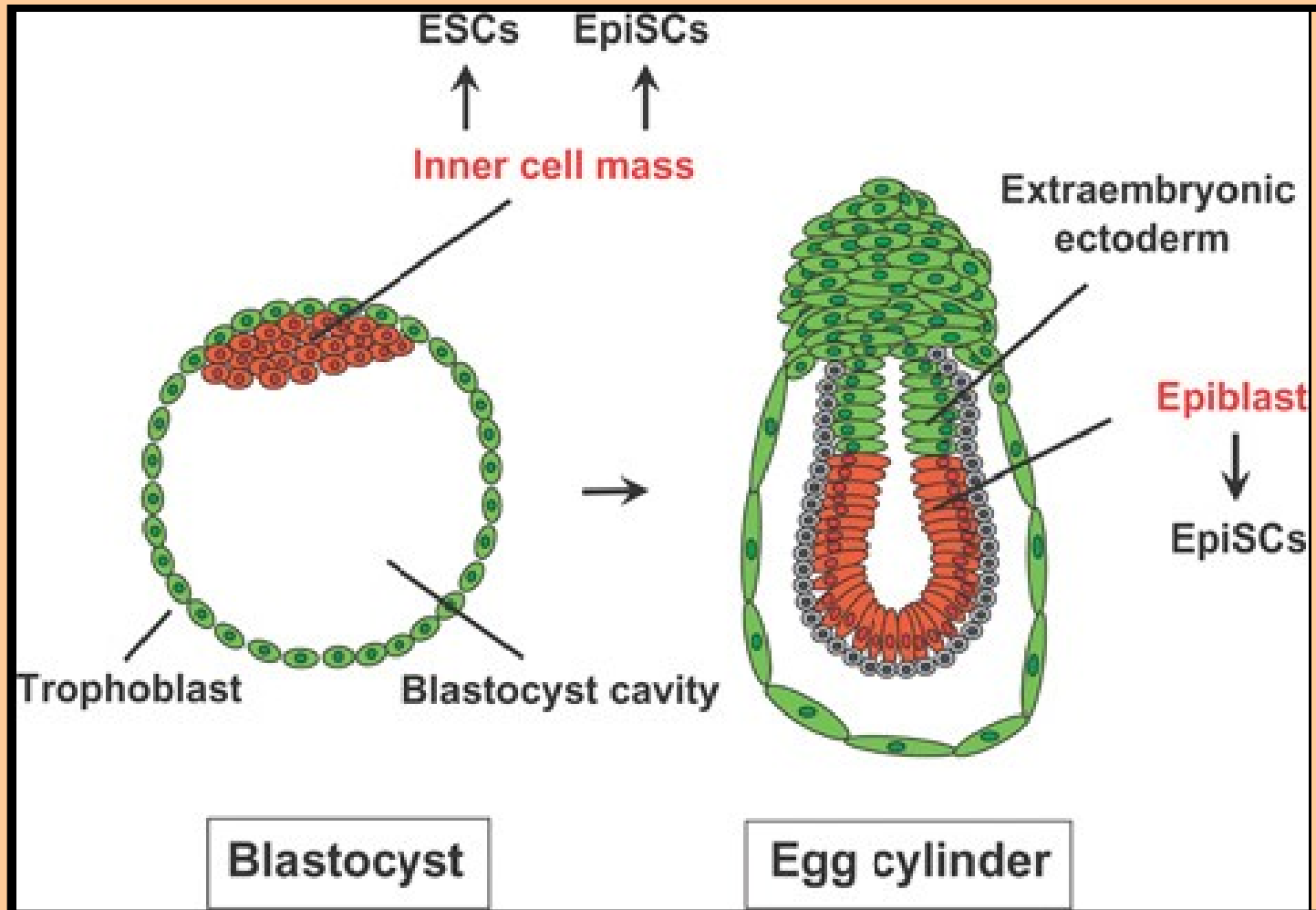


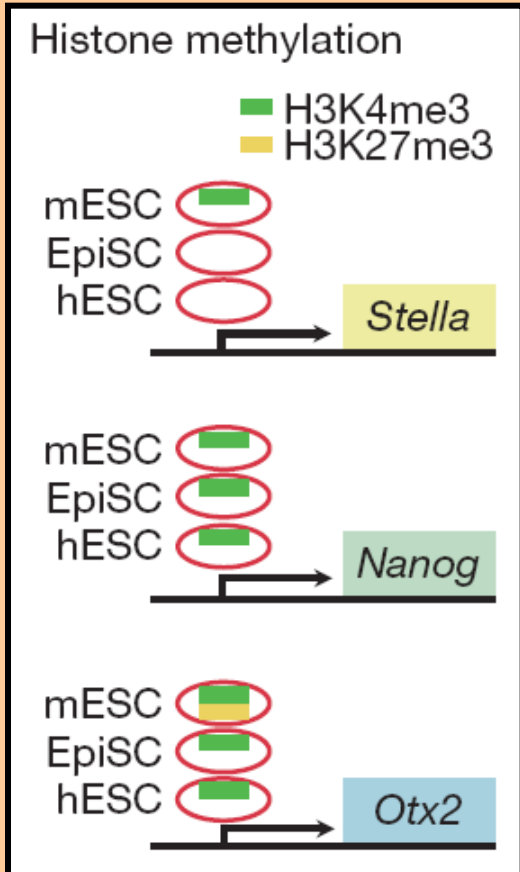
# Signální dráha TGFbeta / BMPs u ES buněk



# Kmenové buňky epiblastu – EpiSC (Epiblast stem cell)

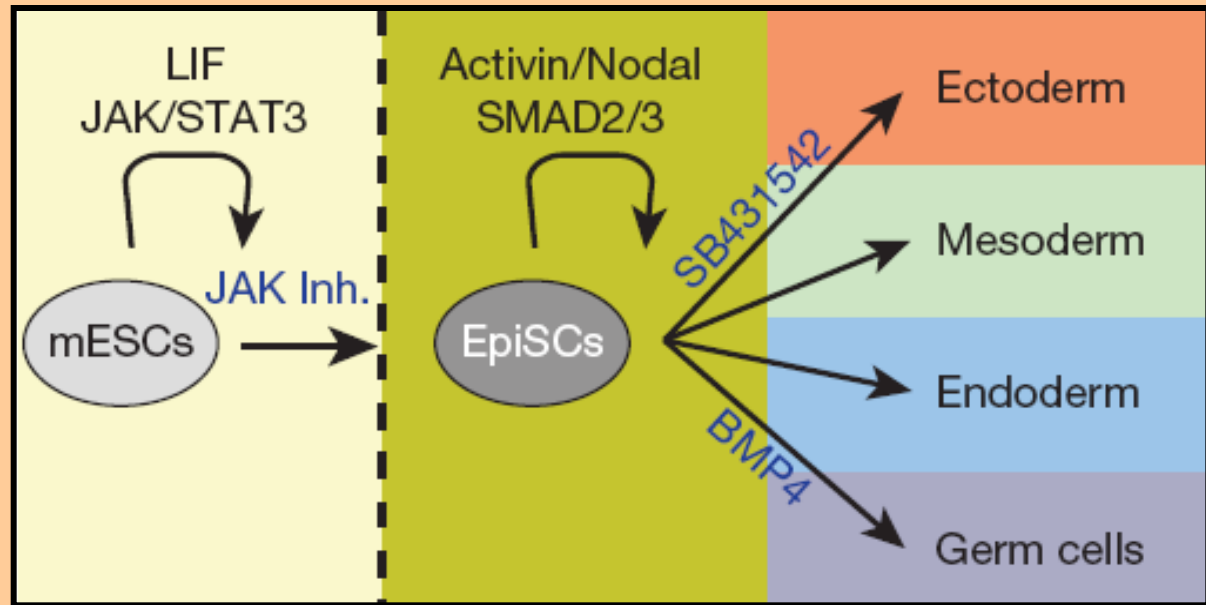
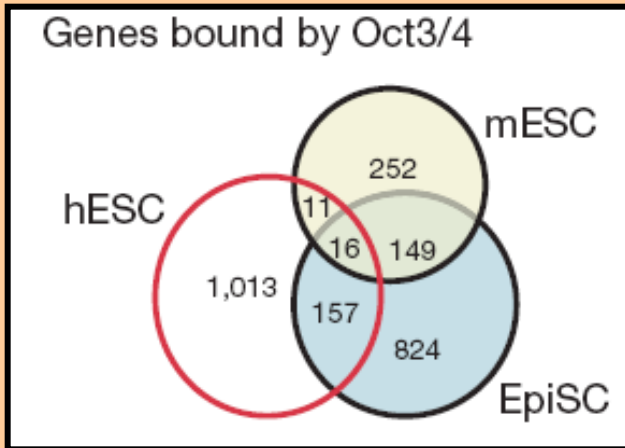
Brons, 2007 & Tesar, 2007

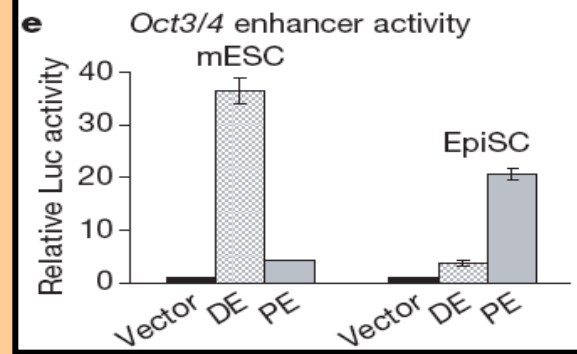
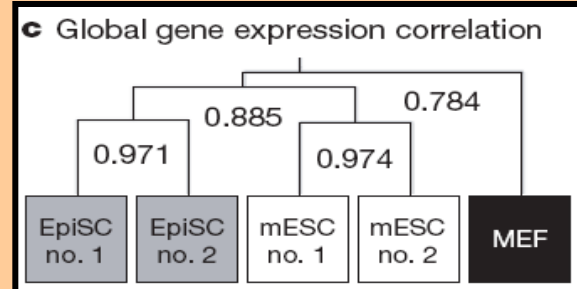
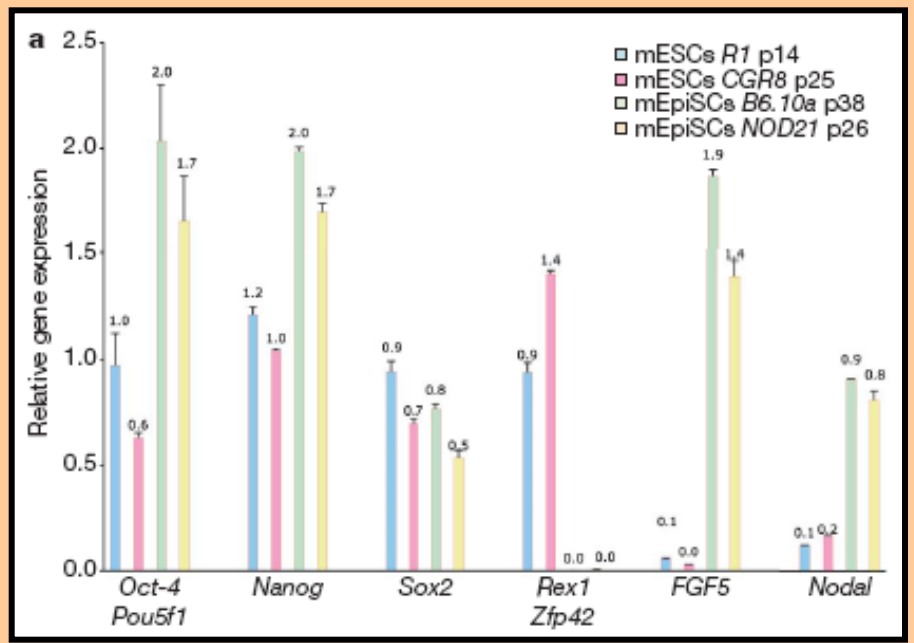
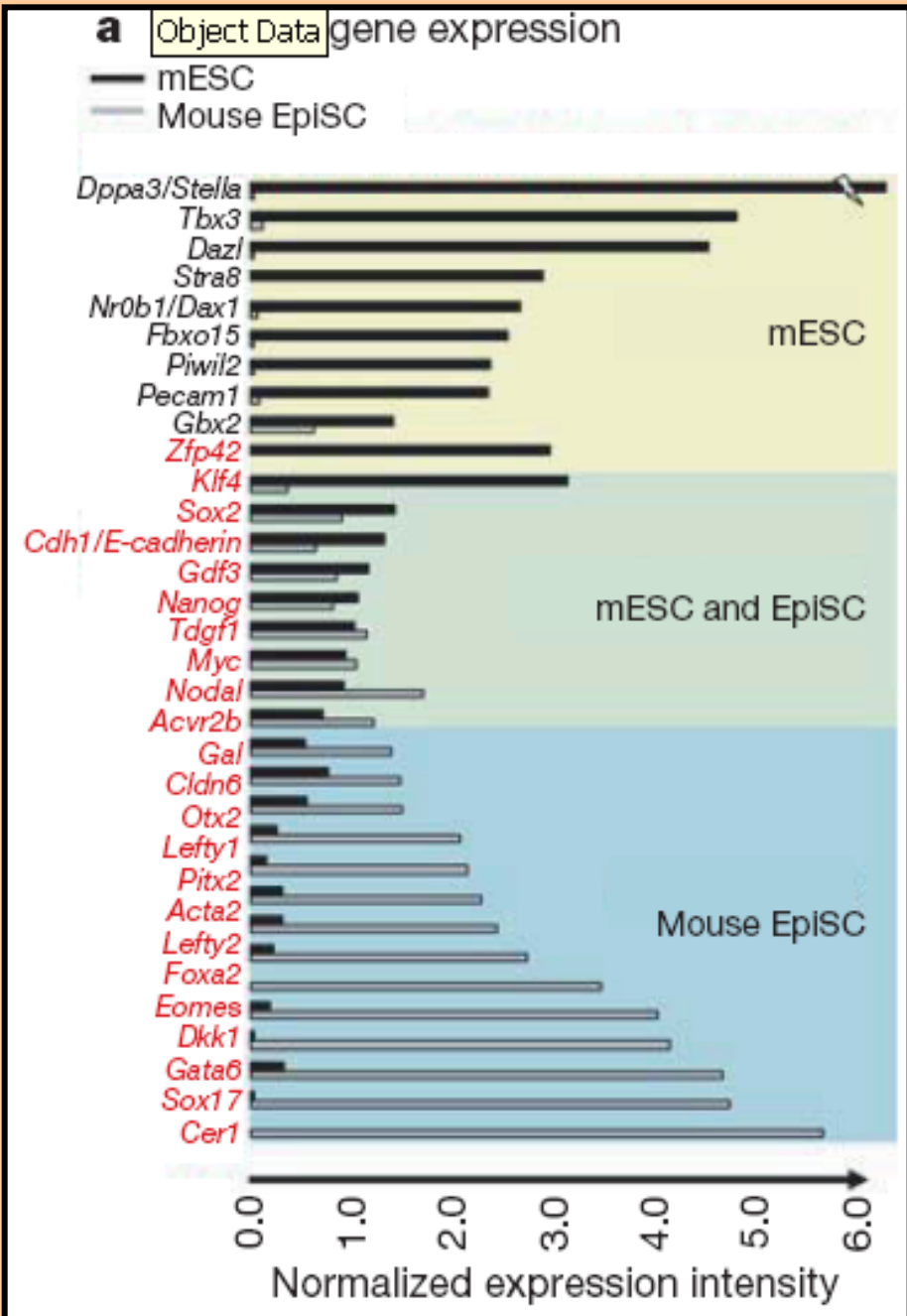




## EpiSC

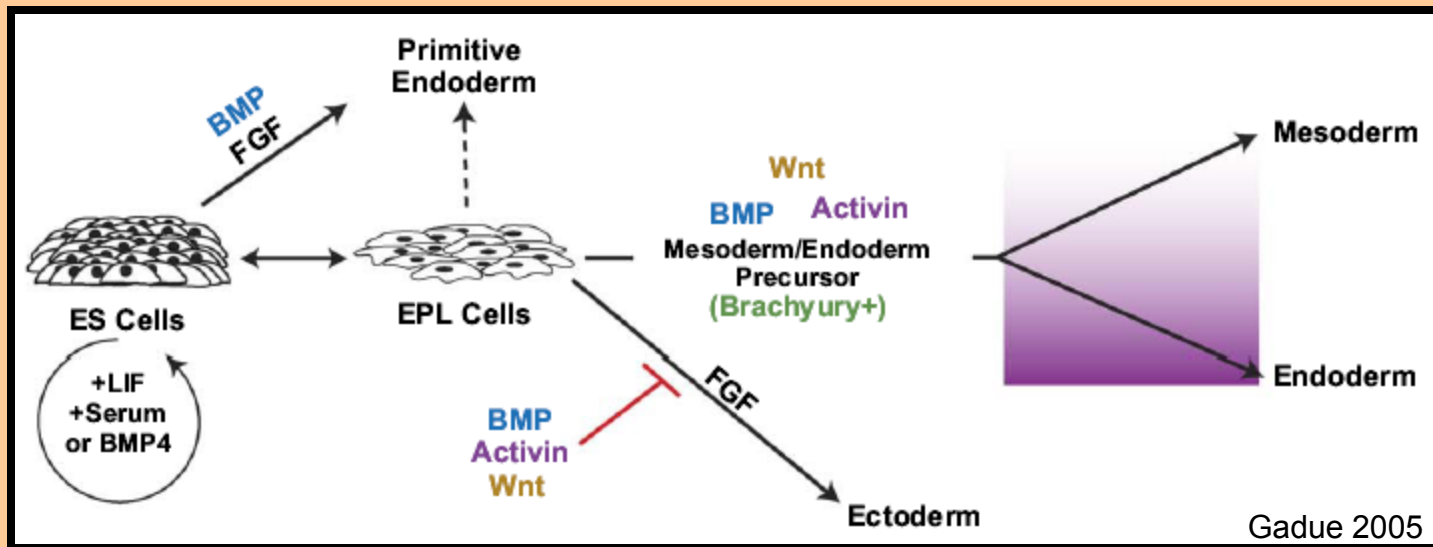
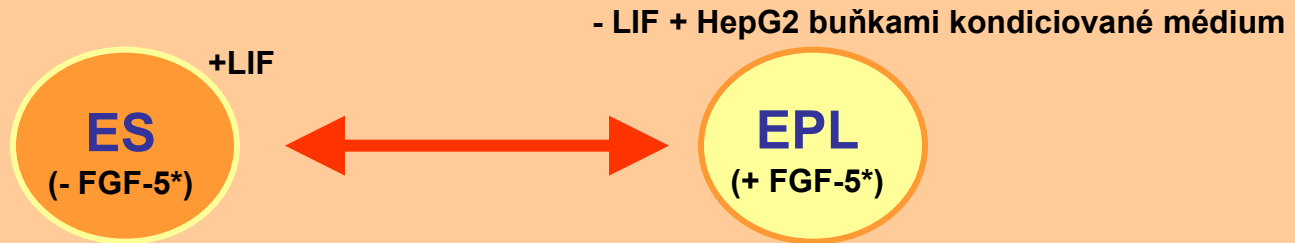
- neintegrují se do moruly a blastocysty => rozdíl s mES
- netvoří kompletní chiméry
- nebyla detekována aktivní alkalická fosfatáza (AP)  
(mES, hES, EC, EG, PGC, mají aktivní AP)
- EpiSC částečně vysvětlují rozdíly mezi mES a hES







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) .

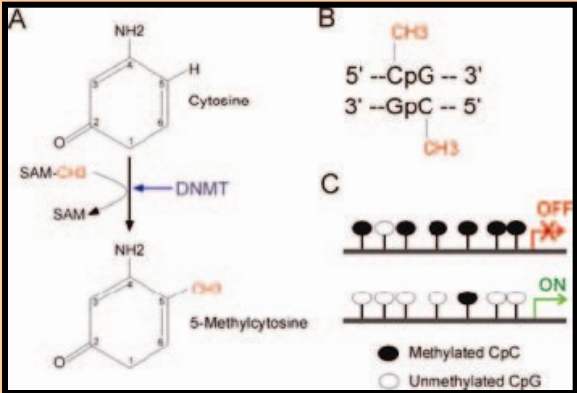
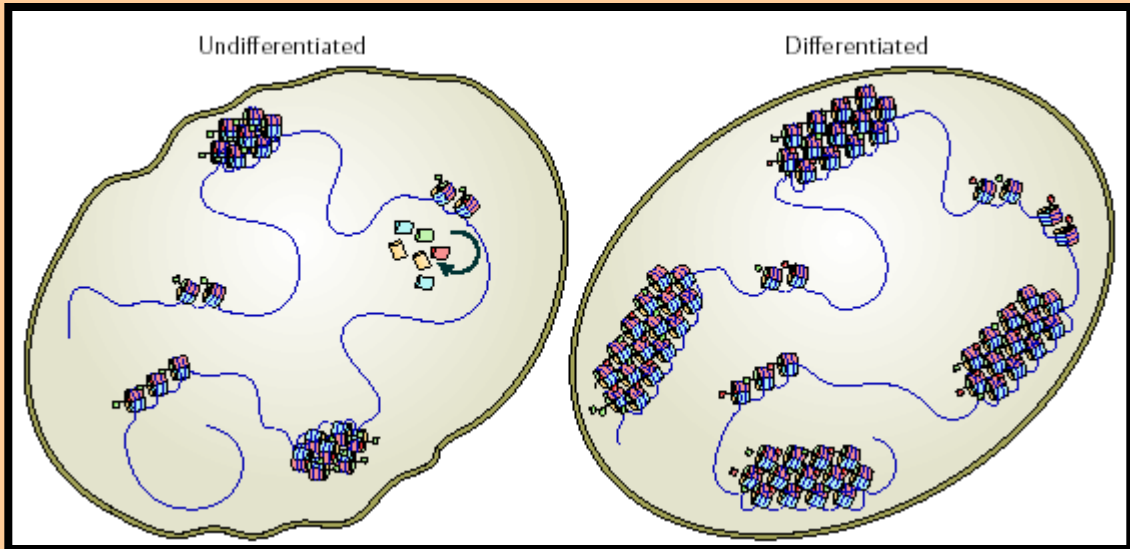
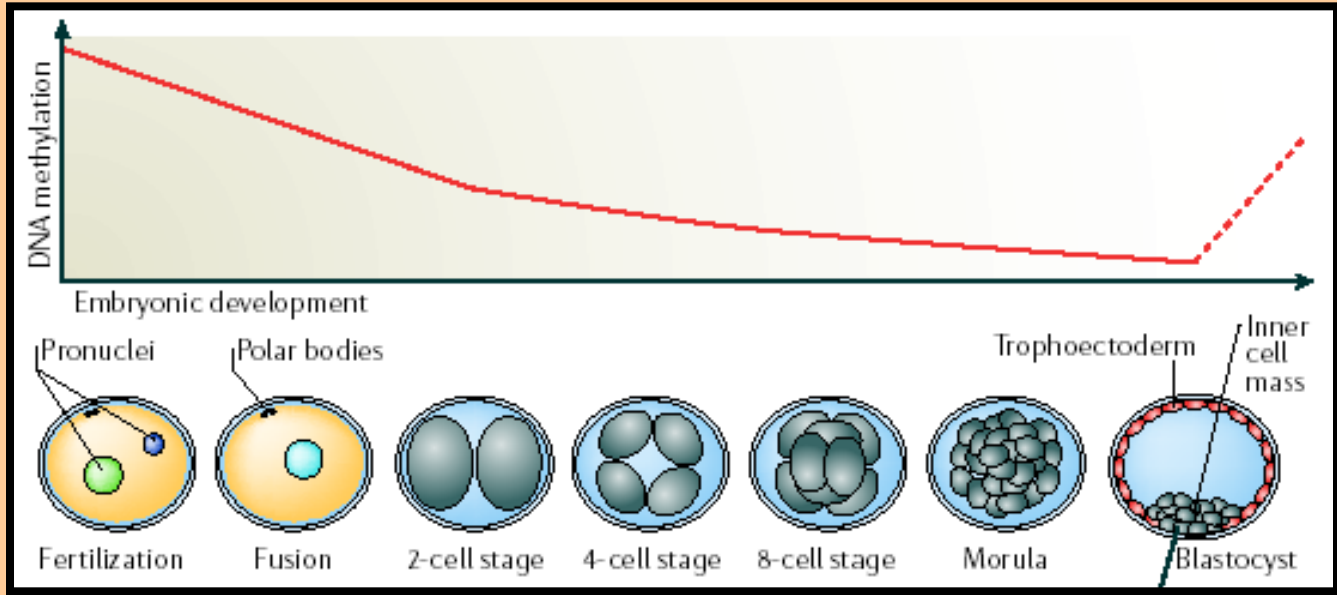


\*EPL buňky jsou podobně jako buňky primitivního ektodermu exprimují FGF-5 na rozdíl od ES buněk, které exprimují zejména FGF-4 (platí pro myš)

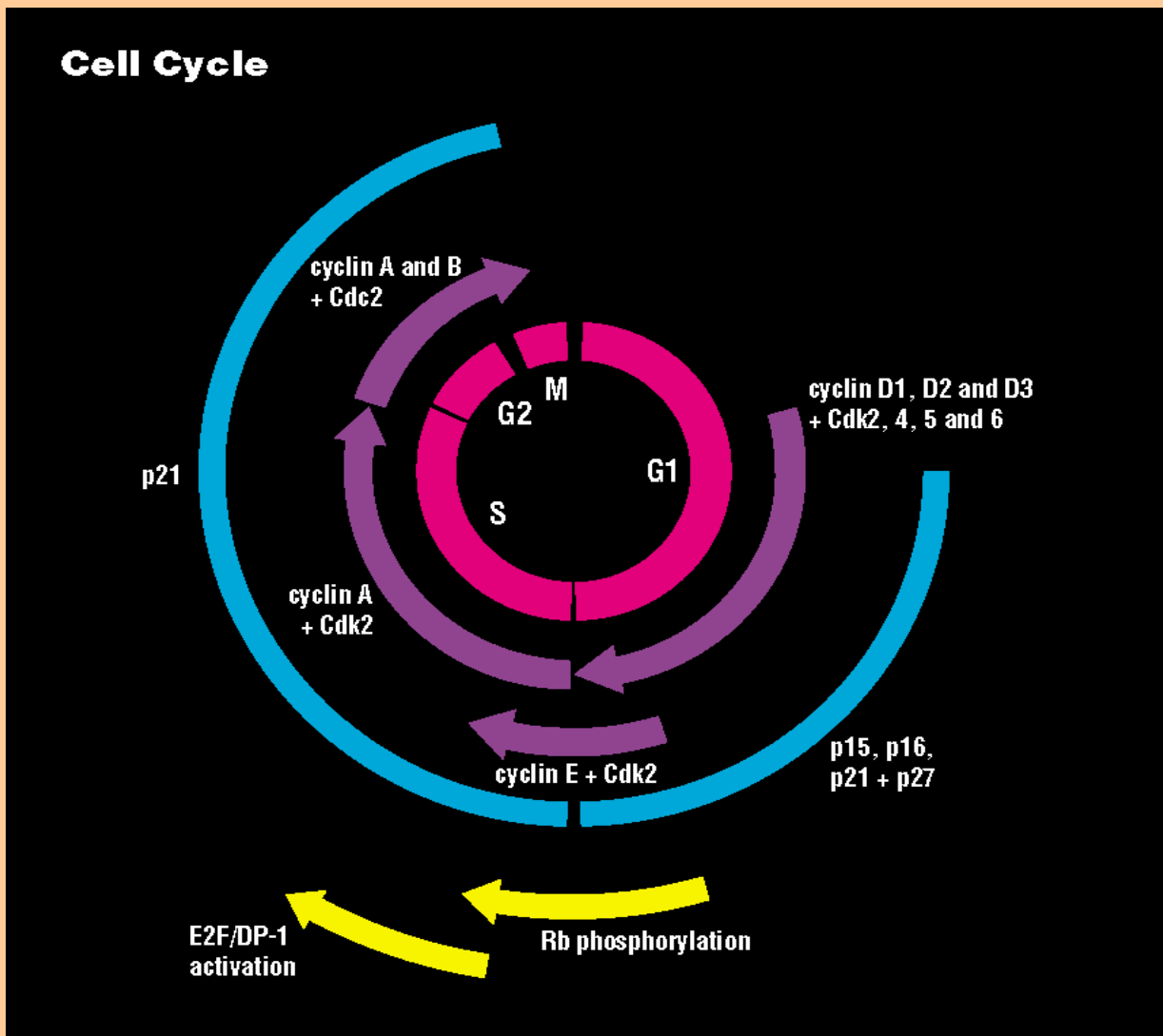


# Epigenetika ES buněk

## Metylace DNA a kondenzace chromatinu u ES buněk

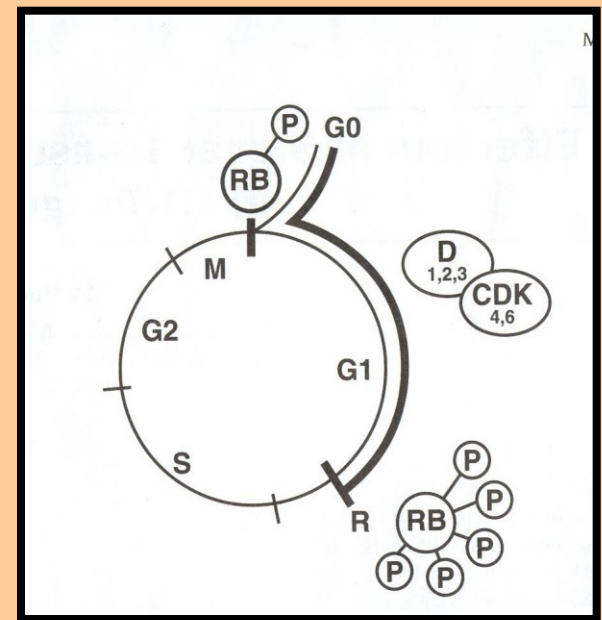
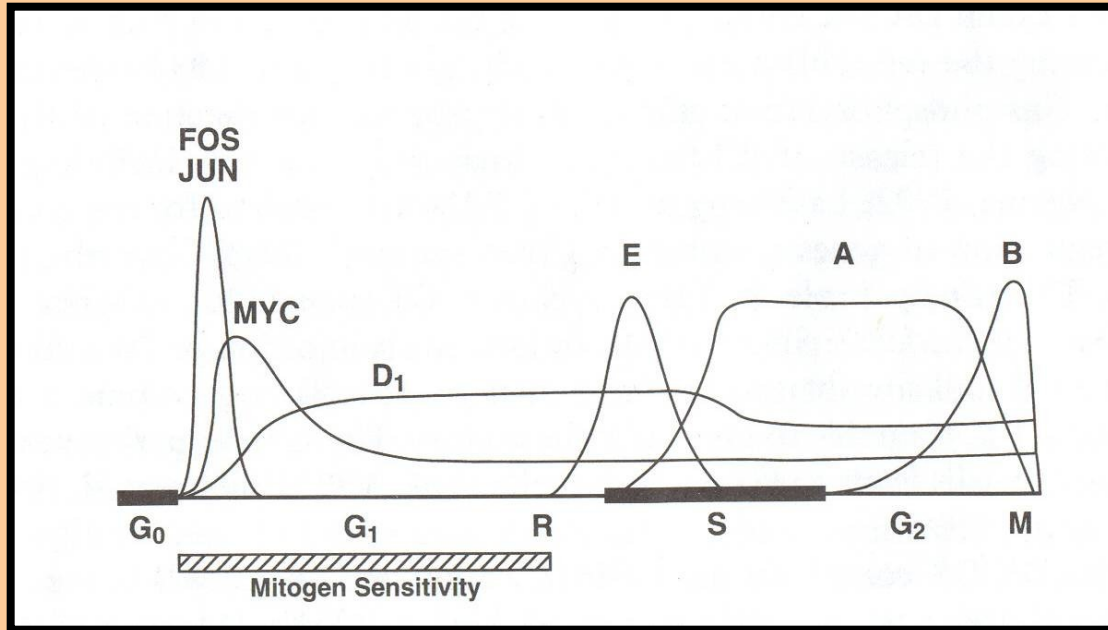


# Proliferace ES buněk



S laskavým nedovolením z katalogu Santa Cruz Biotechnology, Inc.



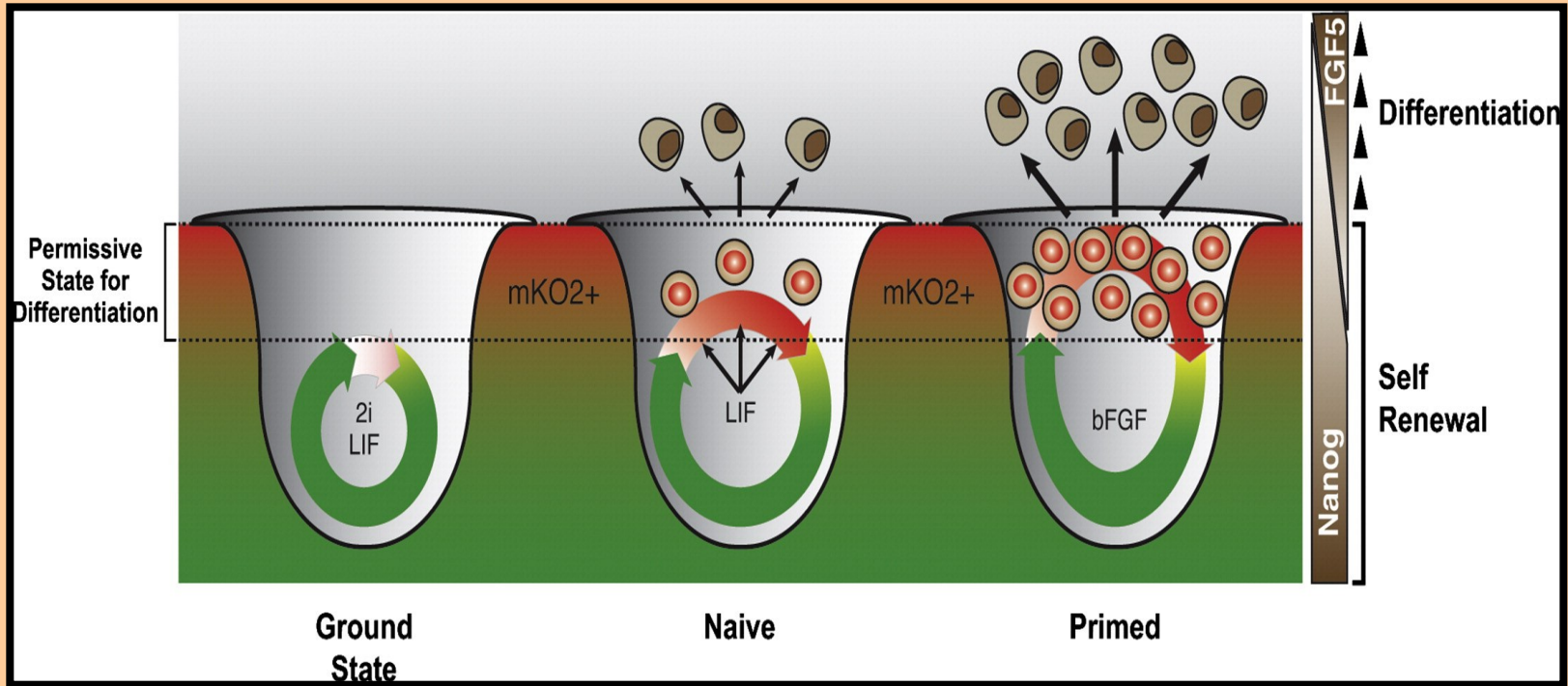


- ES buňky relativně intenzivně proliferují (podobné nádorovým buňkám)
- G<sub>1</sub> fáze buněčného cyklu je krátká (u mES ~ 1.5 h), zdá se, že chybí G<sub>1</sub>-checkpoint\*
- velké procento buněk je v S fázi buněčného cyklu (mES > 60%, hES > 50%)
- doubling time mES ~ 10-12h, hES ~ 18-20h
- specifická charakteristika regulace buněčného cyklu (odolnost k p16, nízká hladina cyklinů D, vysoká hladina cyklinu E, není potřeba proteinů rodiny Rb)
- inhibice proliferace, prodloužení G<sub>1</sub> 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.



# Zpomalení proliferace a prodloužení G1 fáze vede k diferenciaci ES buněk



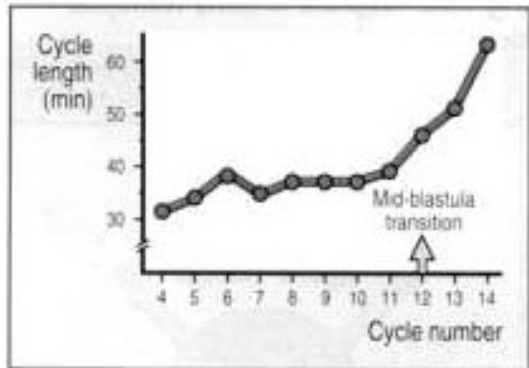
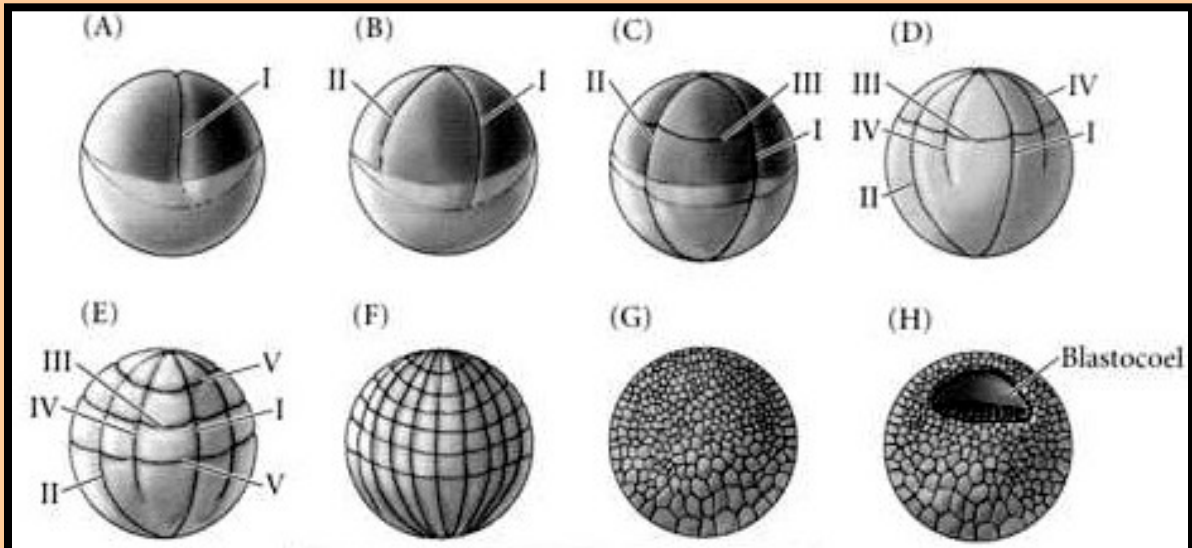
[A short G1 phase is an intrinsic determinant of naïve embryonic stem cell pluripotency.](#)

Coronado D, Godet M, Bourillot PY, Tapponnier Y, Bernat A, Petit M, Afanassieff M, Markossian S, Malashicheva A, Iacone R, Anastassiadis K, **Savatier P.**

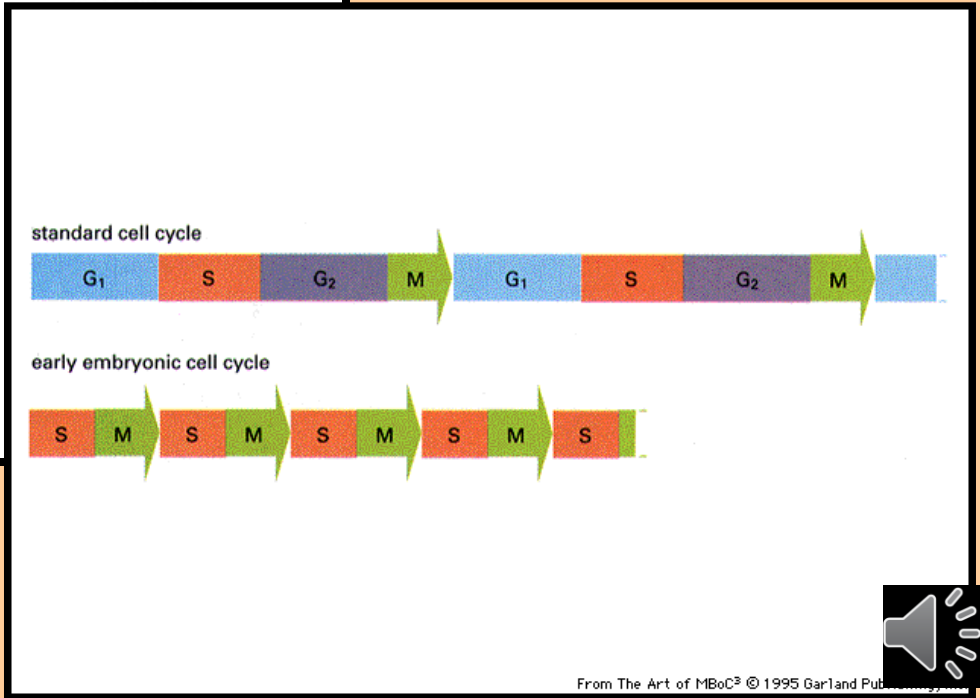
Stem Cell Res. 2013 Jan;10(1):118-31



# Rozdílné proporce v jednotlivých fázích cyklu u časných embryonálních buněk



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



## 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 mitóze 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

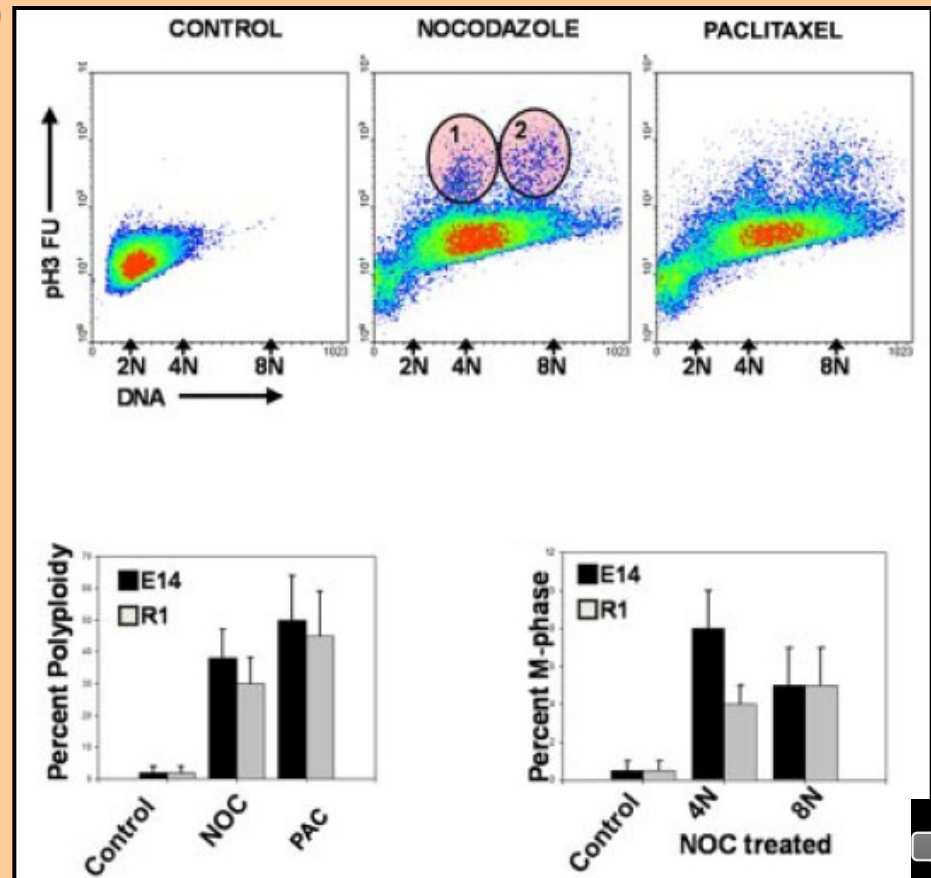
a polyploidních buněk v populaci

- indukci diferenciaci lze tyto buňky částečně eliminovat (apoptósa)

- tetraploidní buňky (blastomery) mohou tvořit jen trofoblast

=>  $G_1$  MTA/tetraploidy checkpoint

=> využití při tvorbě embryí plně ES původu



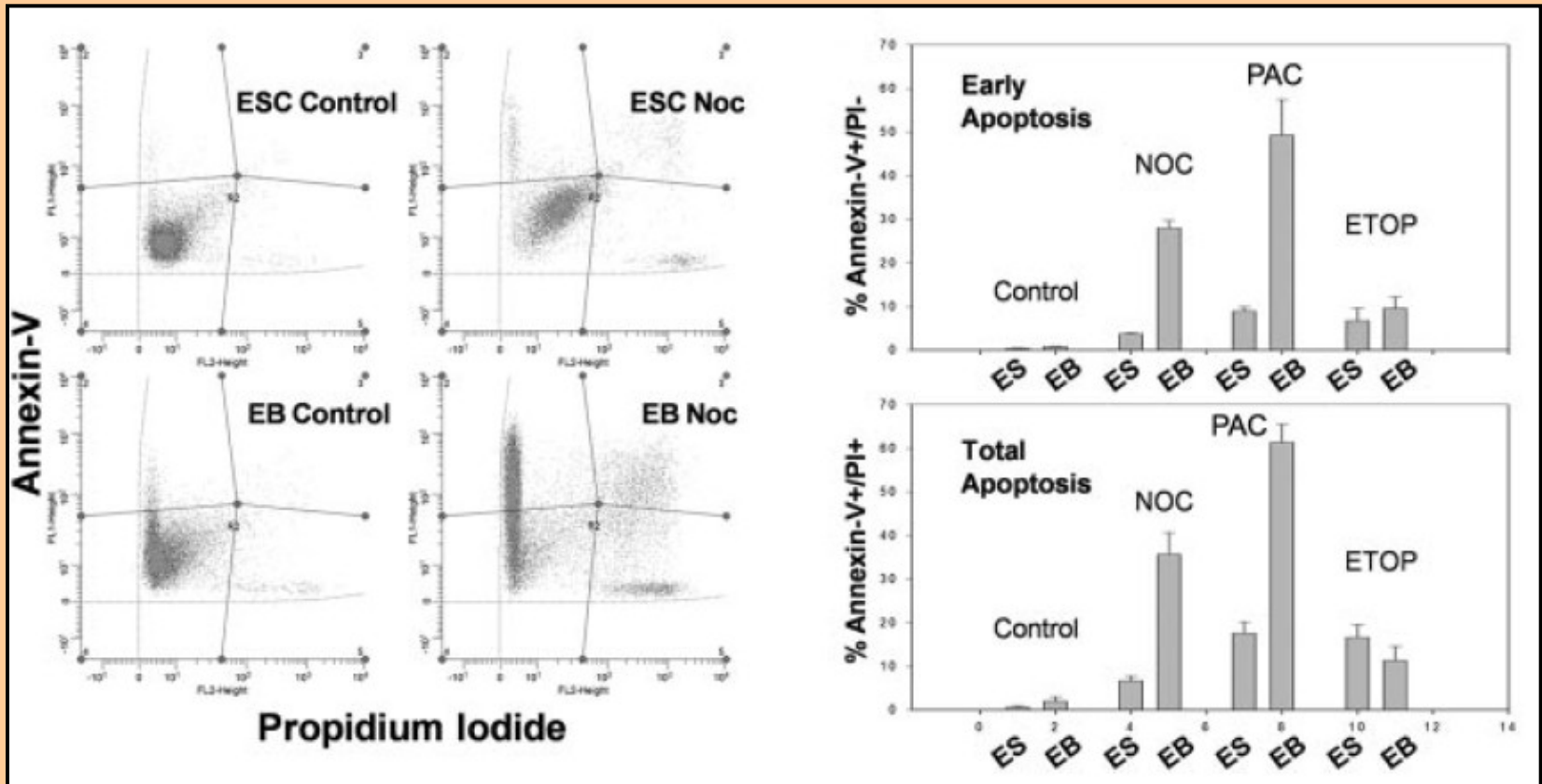
# Příklad nárůstu apoptózy s diferenciací a poškozeným mitotickým aparátem

ES - embryonální kmenové buňky

EB - ES diferencovanou formou embryoidních tělísek

Noc/NOC - nocodazol

PAC - paclitaxel





## Chromosomální stabilita a ES buňky

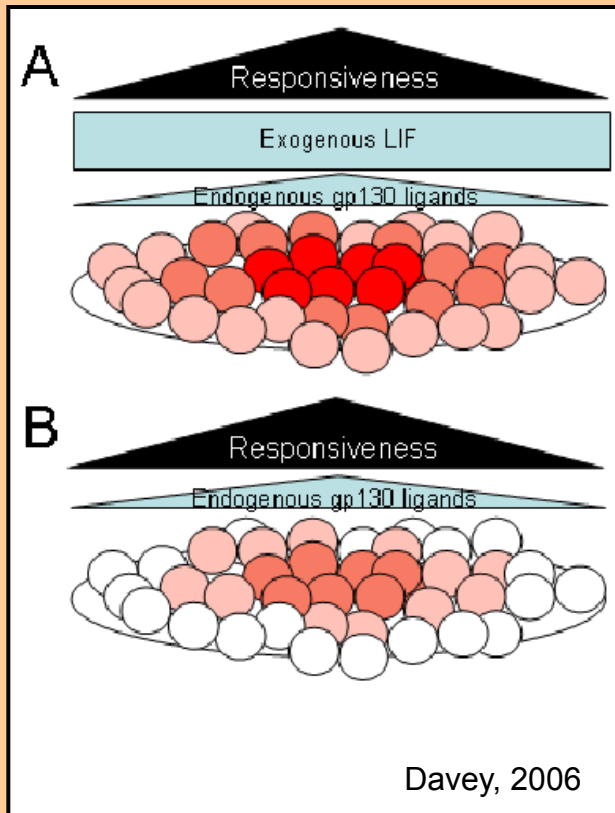
Draper, 2004; Hanson, 2005

- 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 apoptóze, 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)



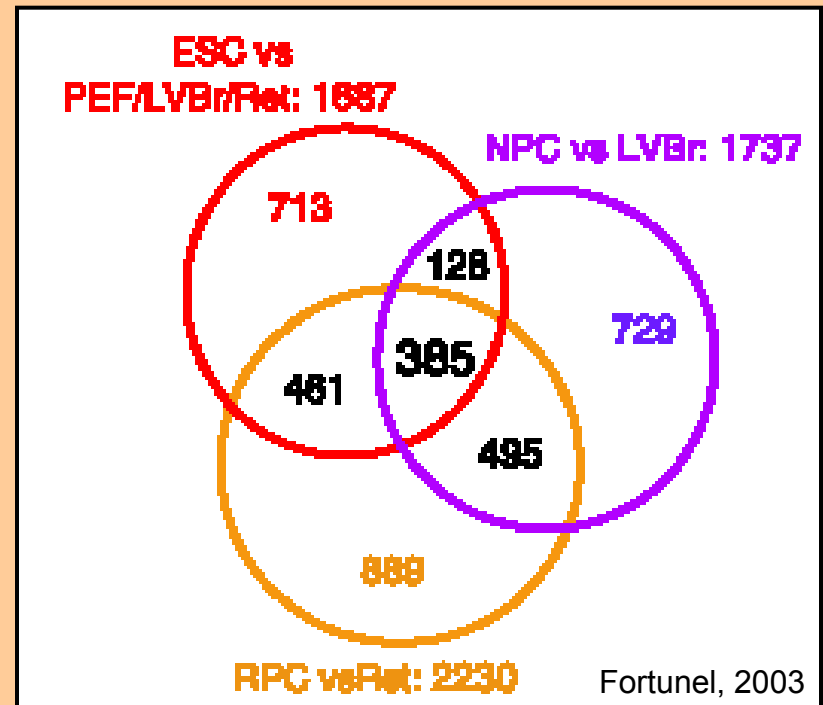
Jak vypadá správná ES buňka?  
Jsou všechny ES buňky v kultuře stejné?

LIF -> STAT3 aktivita u mES buněk



↓ pokračování

Microarray analýza exprese „stemness“ genů

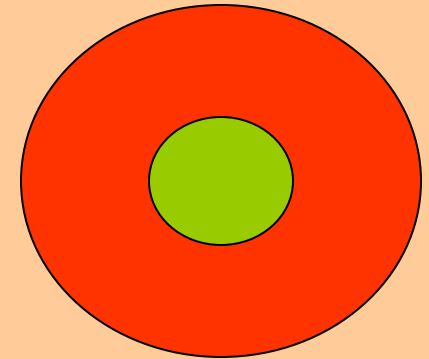
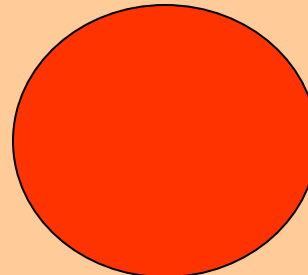
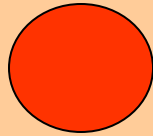


↓ pokračování



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

Myší ES



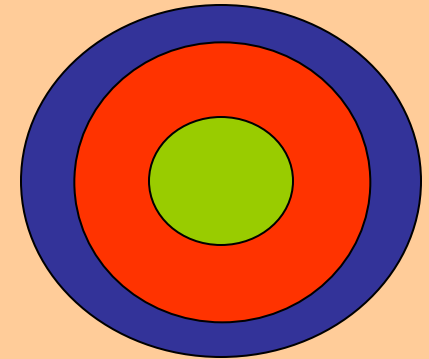
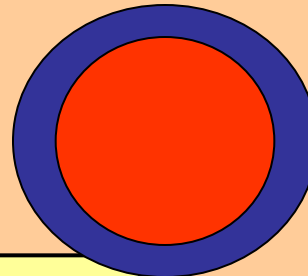
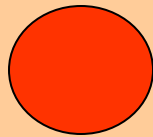
30<\*

50<\*

100<\*

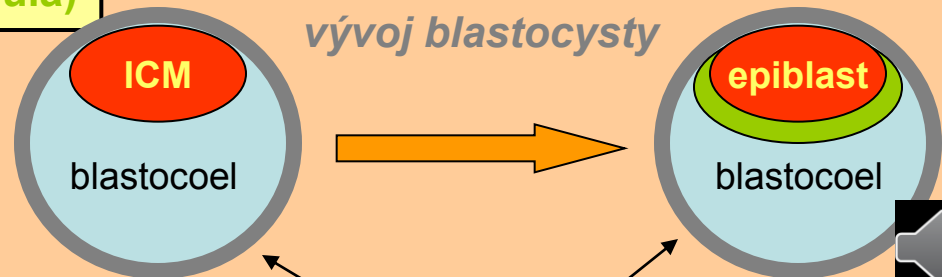
růst kolonie ES buněk

Lidské ES



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

\*orientační počet buněk v kolonii



*vývoj blastocysty*

ICM

blastocoel

epiblast

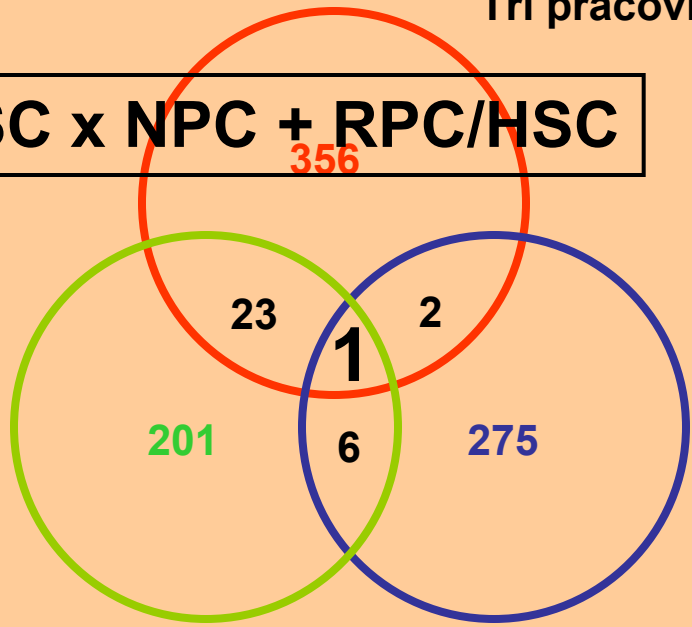
blastocoel

trofoectoderm

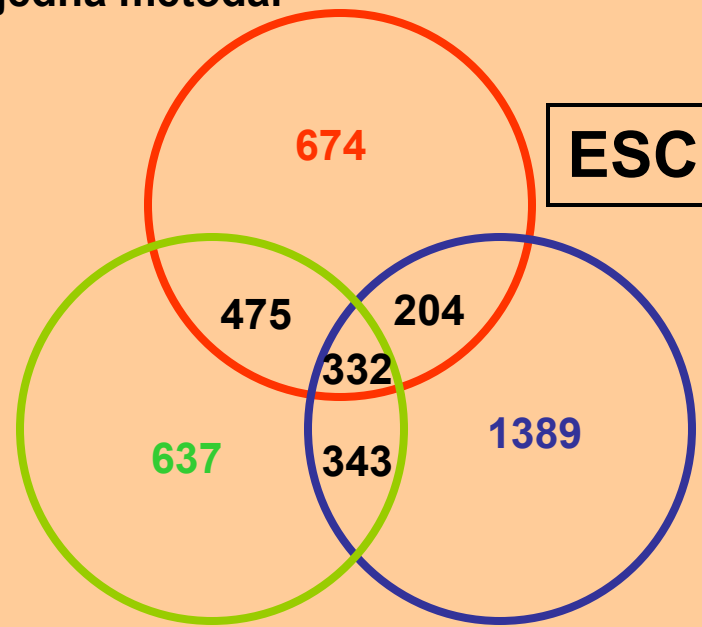


Variabilita v analýze transkripčního profilu u ES buněk (ESC), neurálních progenitorů (NPC), progenitorů retiny (RPC) a hematopoetických kmenových buněk (HSC) u myši.  
 Tři pracovní skupiny, jedna metoda.

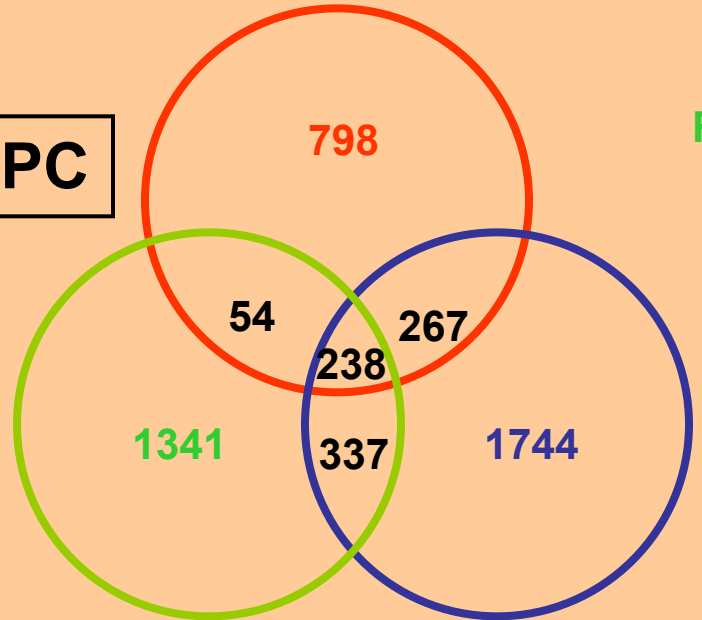
**ESC x NPC + RPC/HSC**



**ESC**

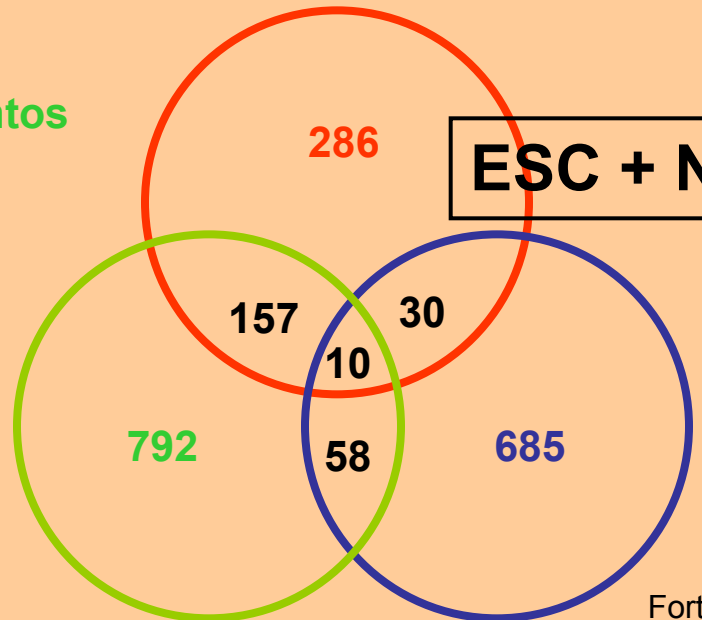


**NPC**



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



# 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

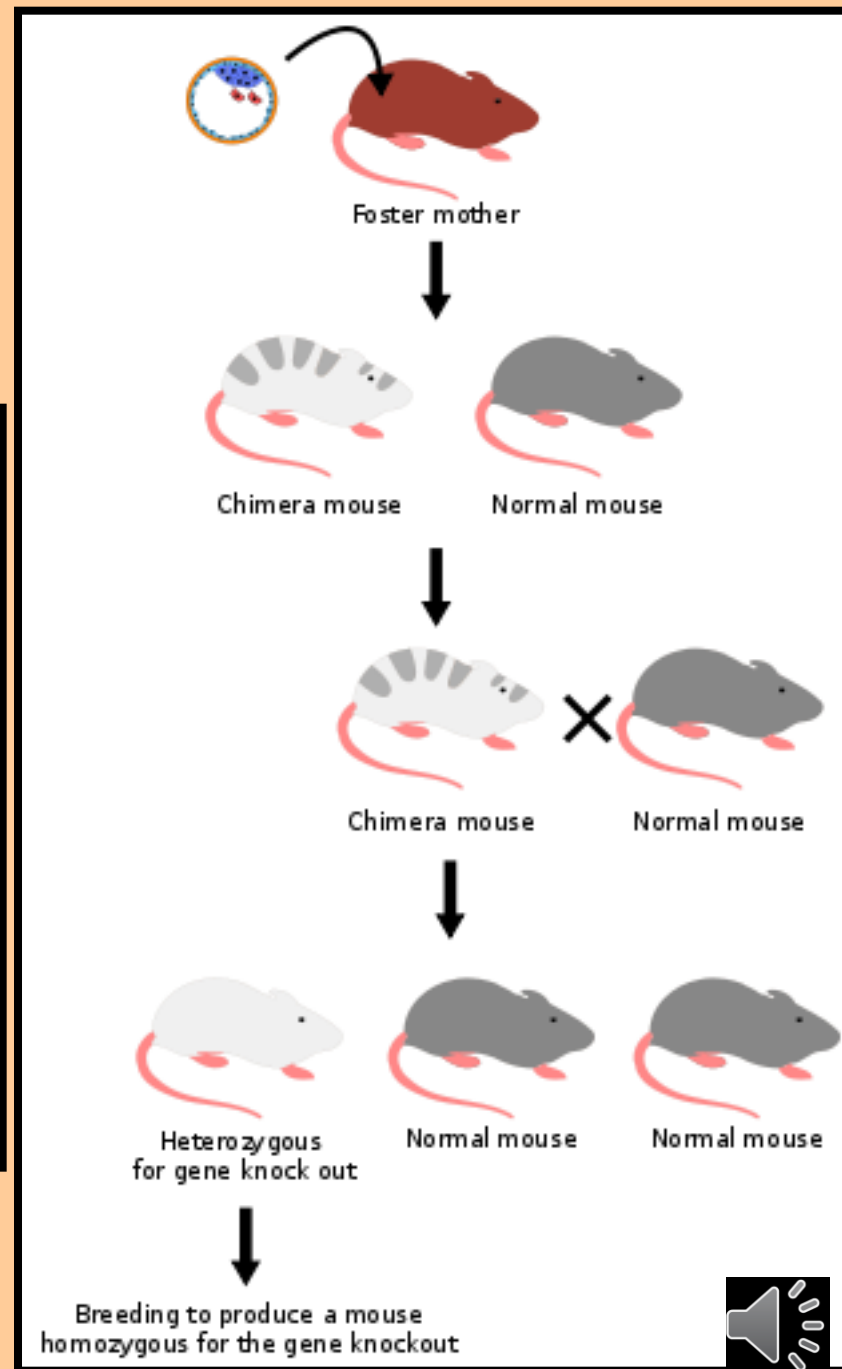
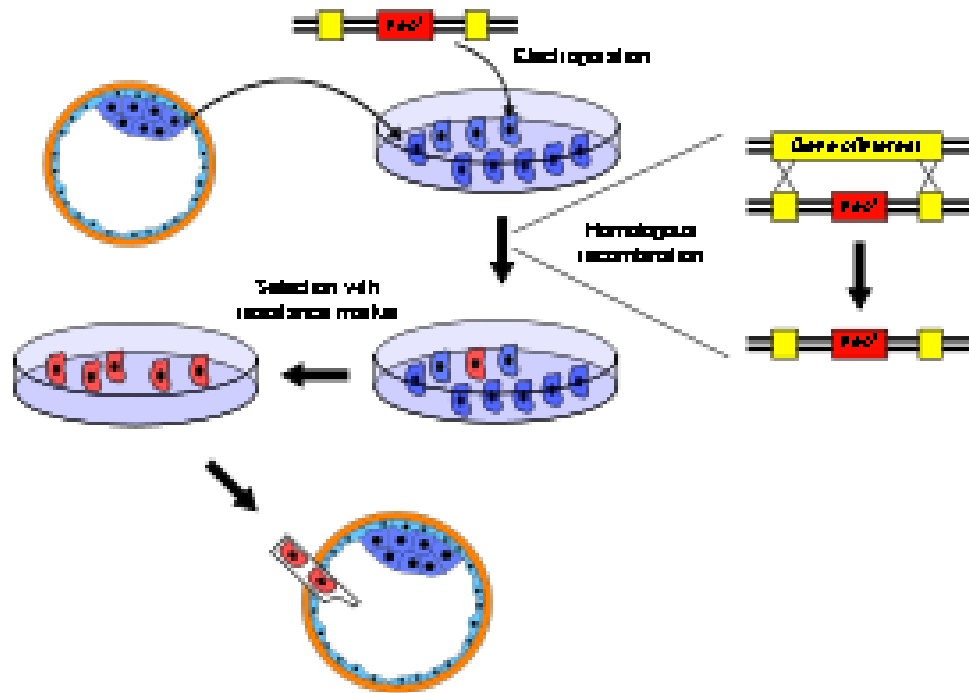
Pro vytvoření linie *GMO* je potřeba, aby požadovaná genetická modifikace byla obsažena i v pohlavních buňkách. Tuto modifikaci je tedy potřeba provést na buňkách toti- nebo pluripotentních.

- 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/I myši





# ES buňky v buněčné terapii

## In vitro fertilization

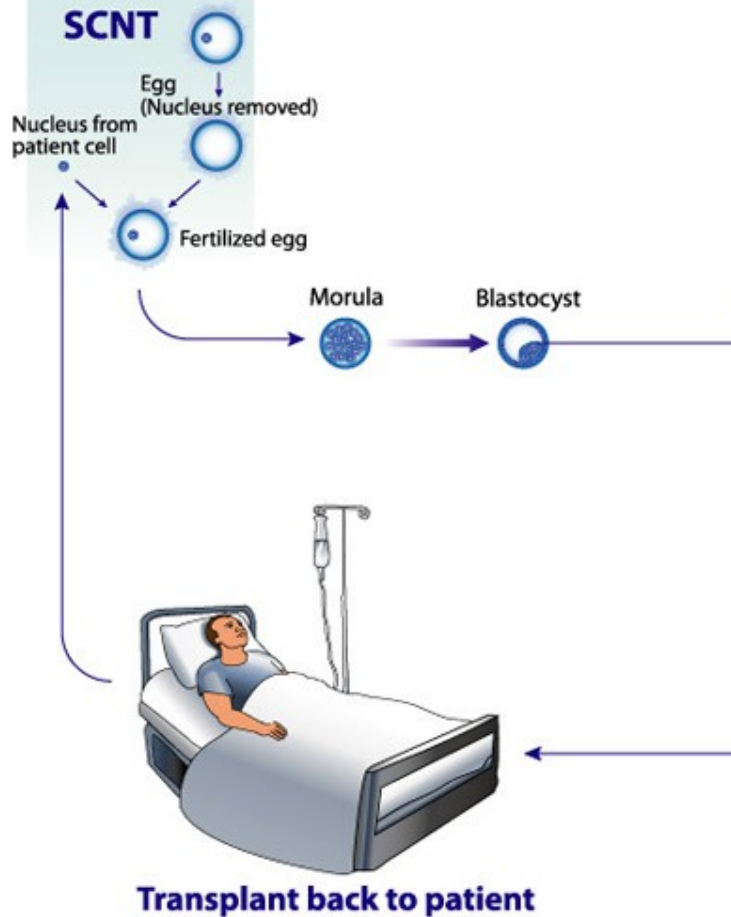
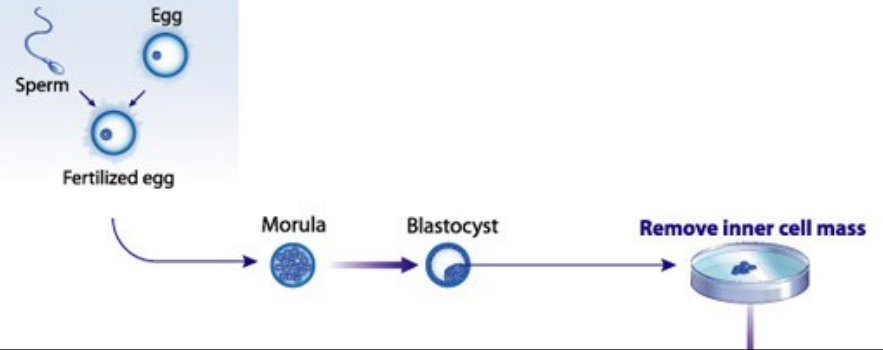
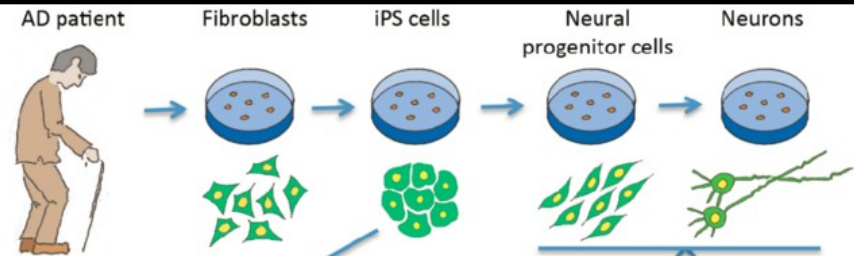
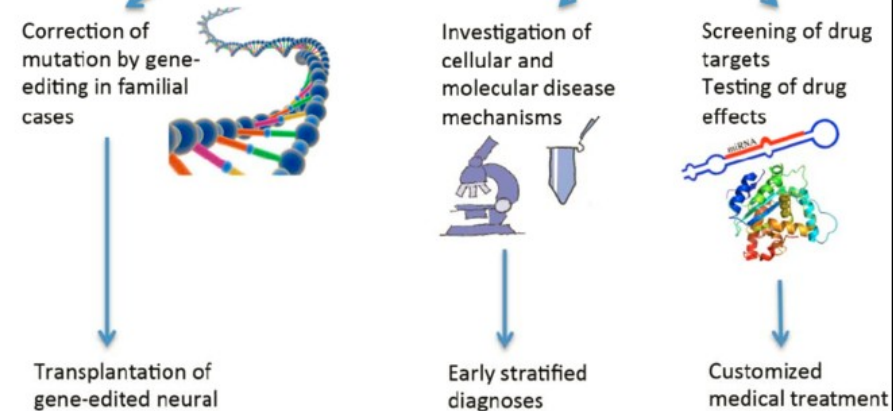


Illustration by [Cell Imaging Core](#) of the Center for Reproductive Science

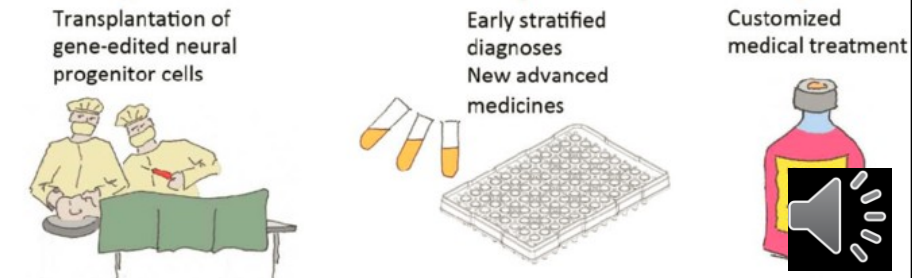
**A**  
Derivation of patient material



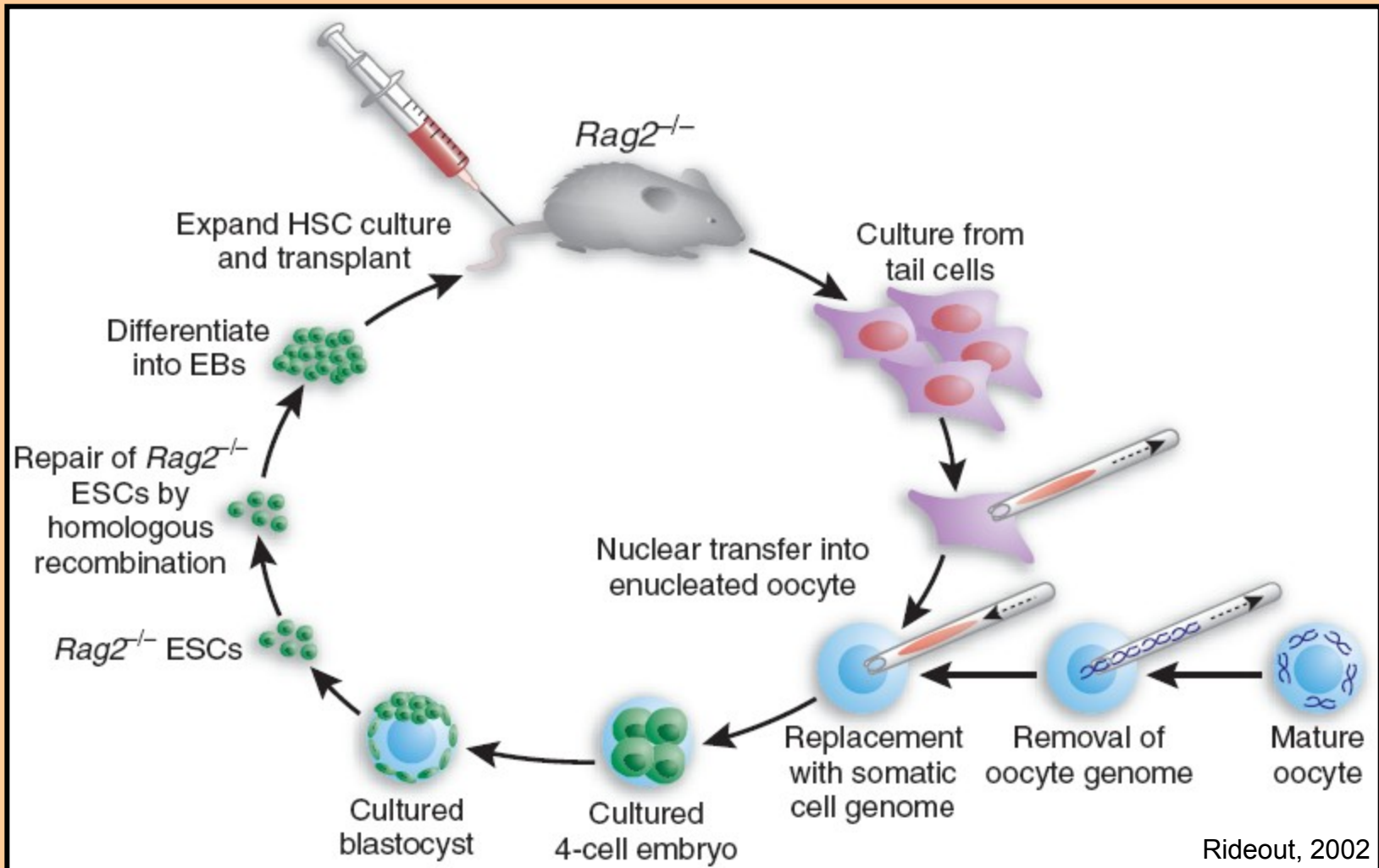
**B**  
Molecular and cellular technologies



**C**  
Benefits for the patients



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



## 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*

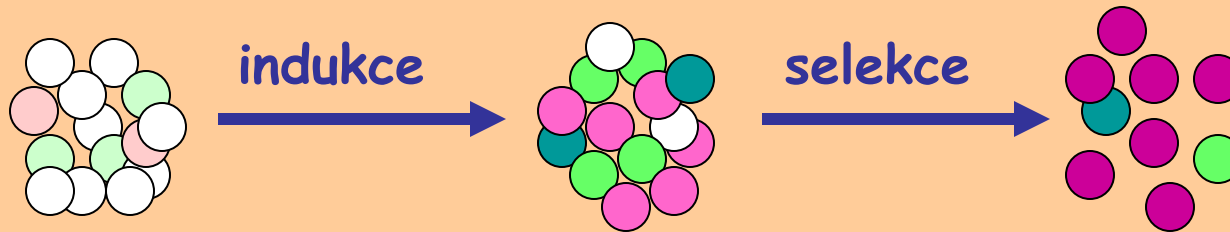
- metodiky korespondující s ontogenezí
- metodiky získané empiricky (kopírující ontogenezi?)

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



## In vitro diferenciace ES buněk

kultivace

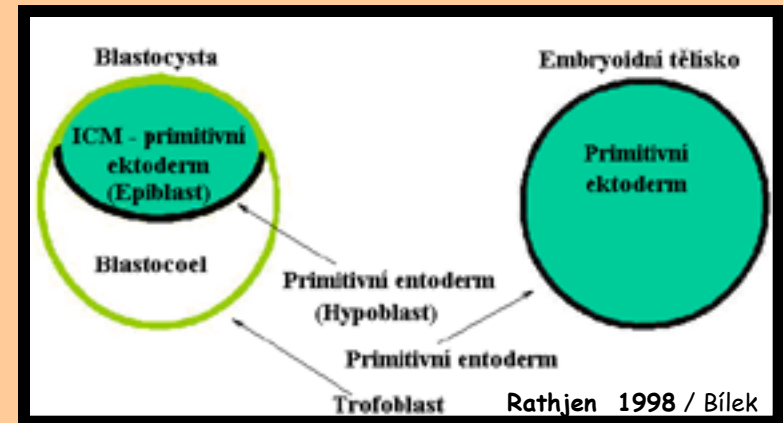


### a) Embryoidní tělíska (Embryoid bodies - EB)

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

### b) V monovrstvě

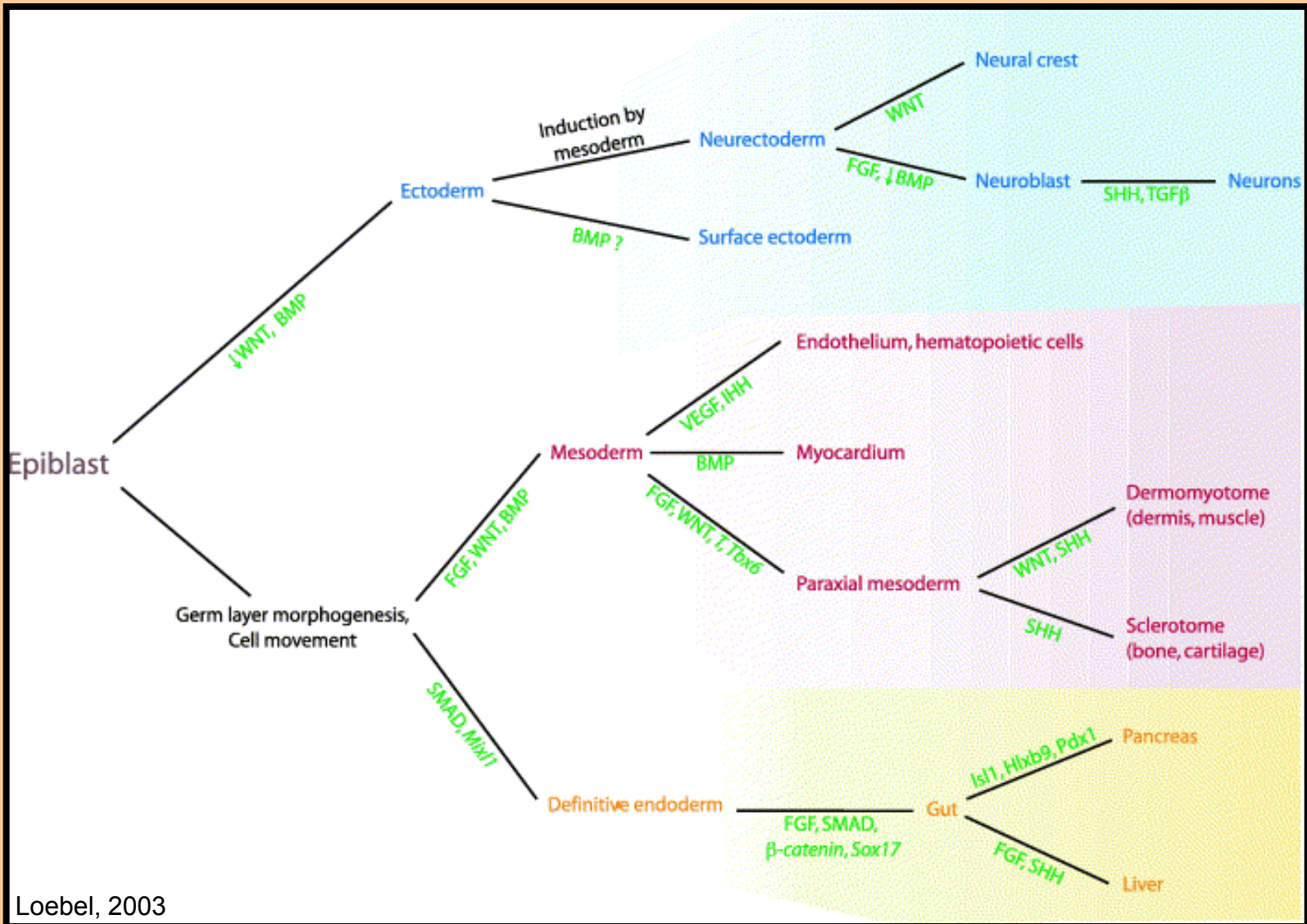
- + dobře definované podmínky
- malá efektivita (většinou)
- může být silně závislé na genotypu

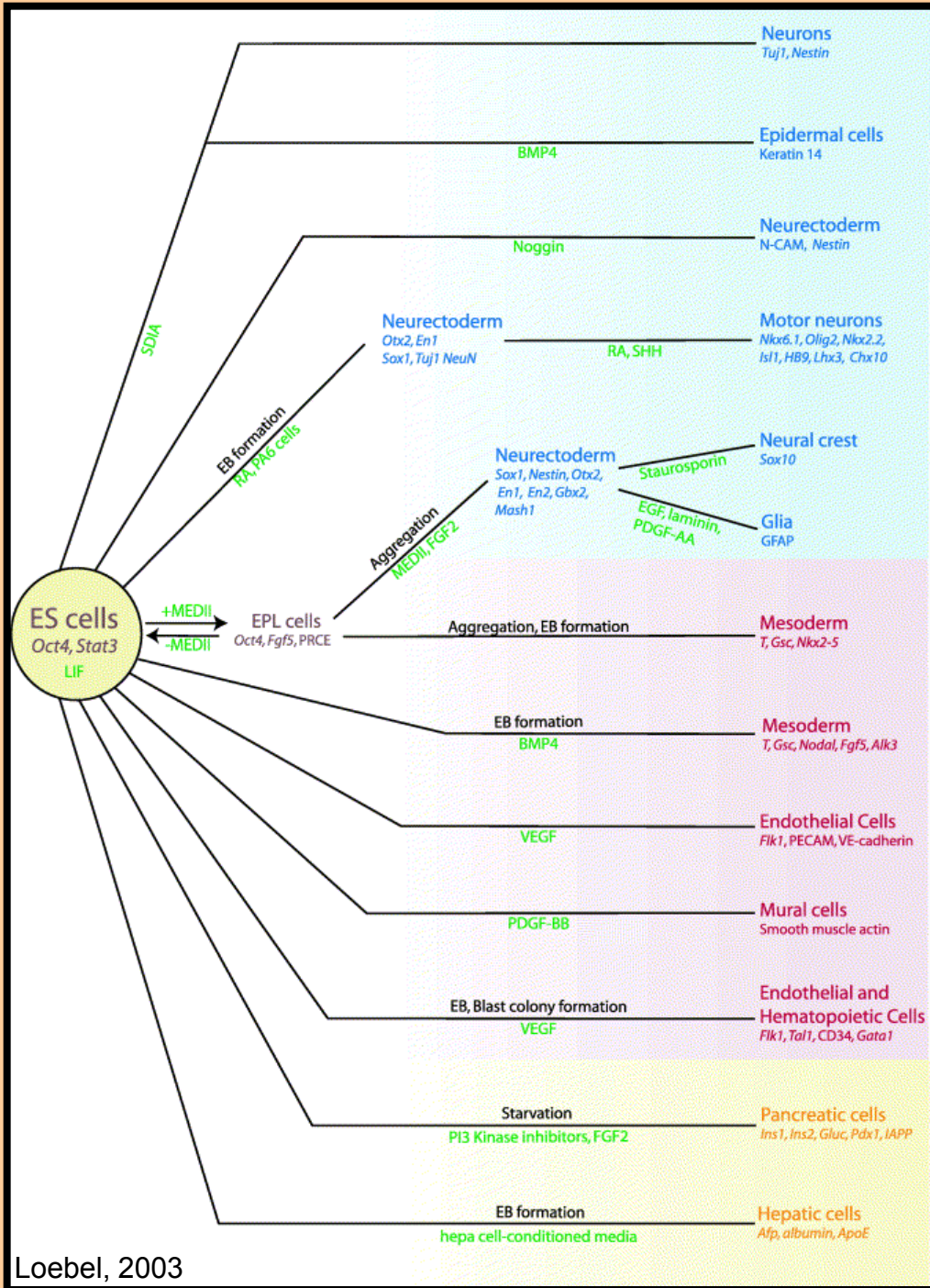


Rathjen 1998 / Bílek  
2004

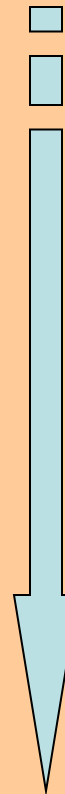


# Úloha specifických růstových faktorů v ontogenezi myši



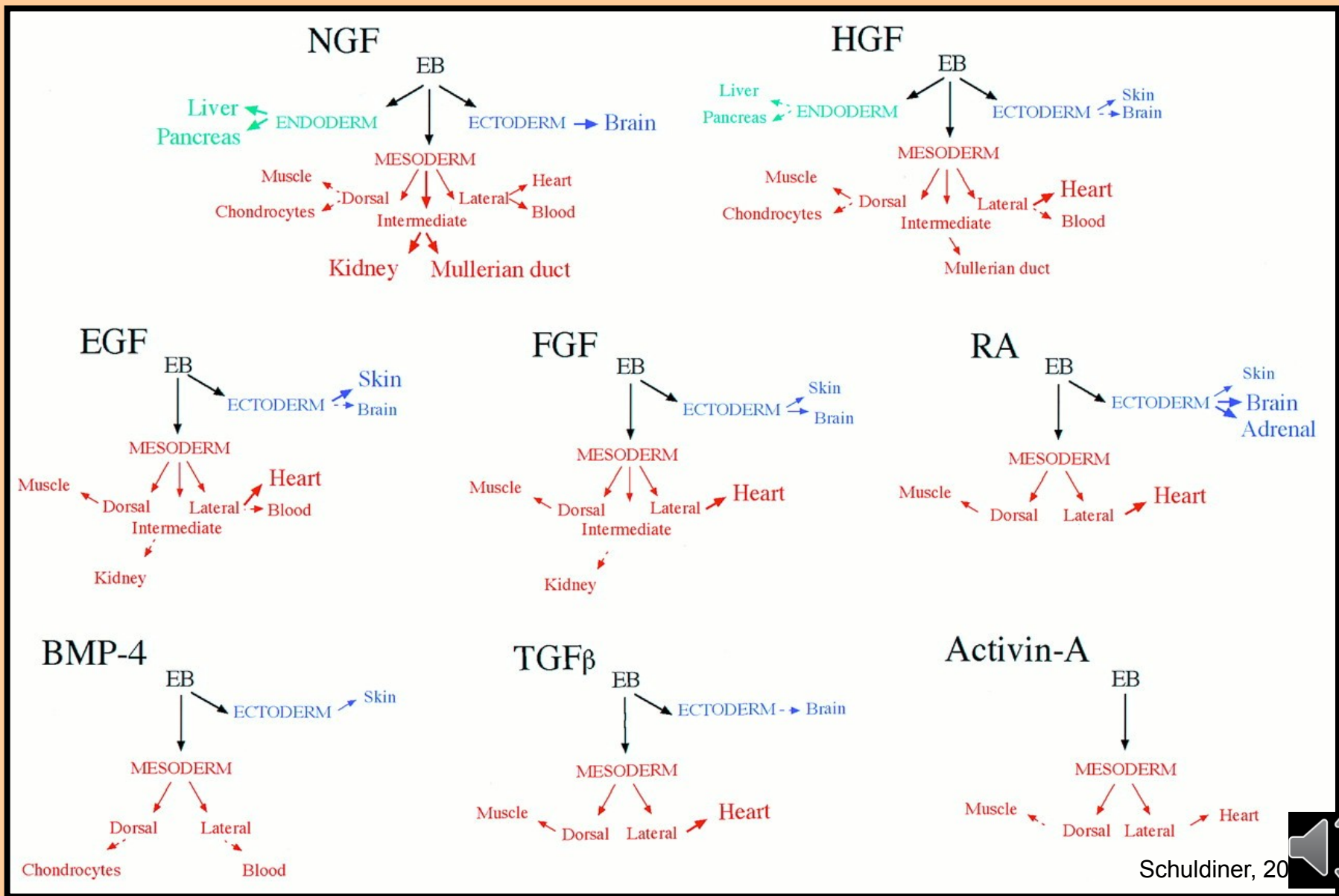


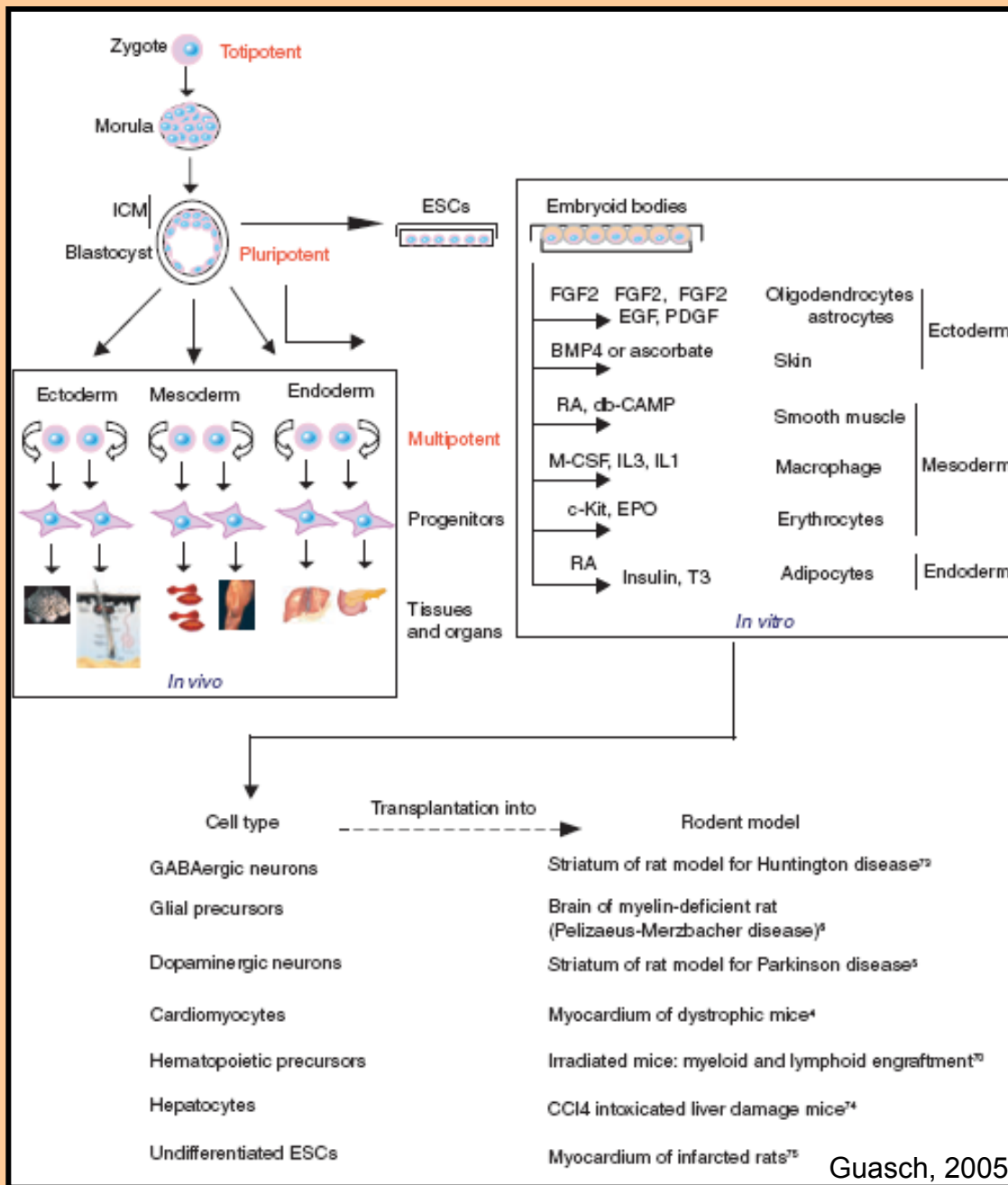
**Příklady diferenciaci myších ES buněk kombinací typu jejich kultivace a specifických růstových faktorů s porovnáním úlohy těchto faktorů v myší ontogenezi**



**pokračování**

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

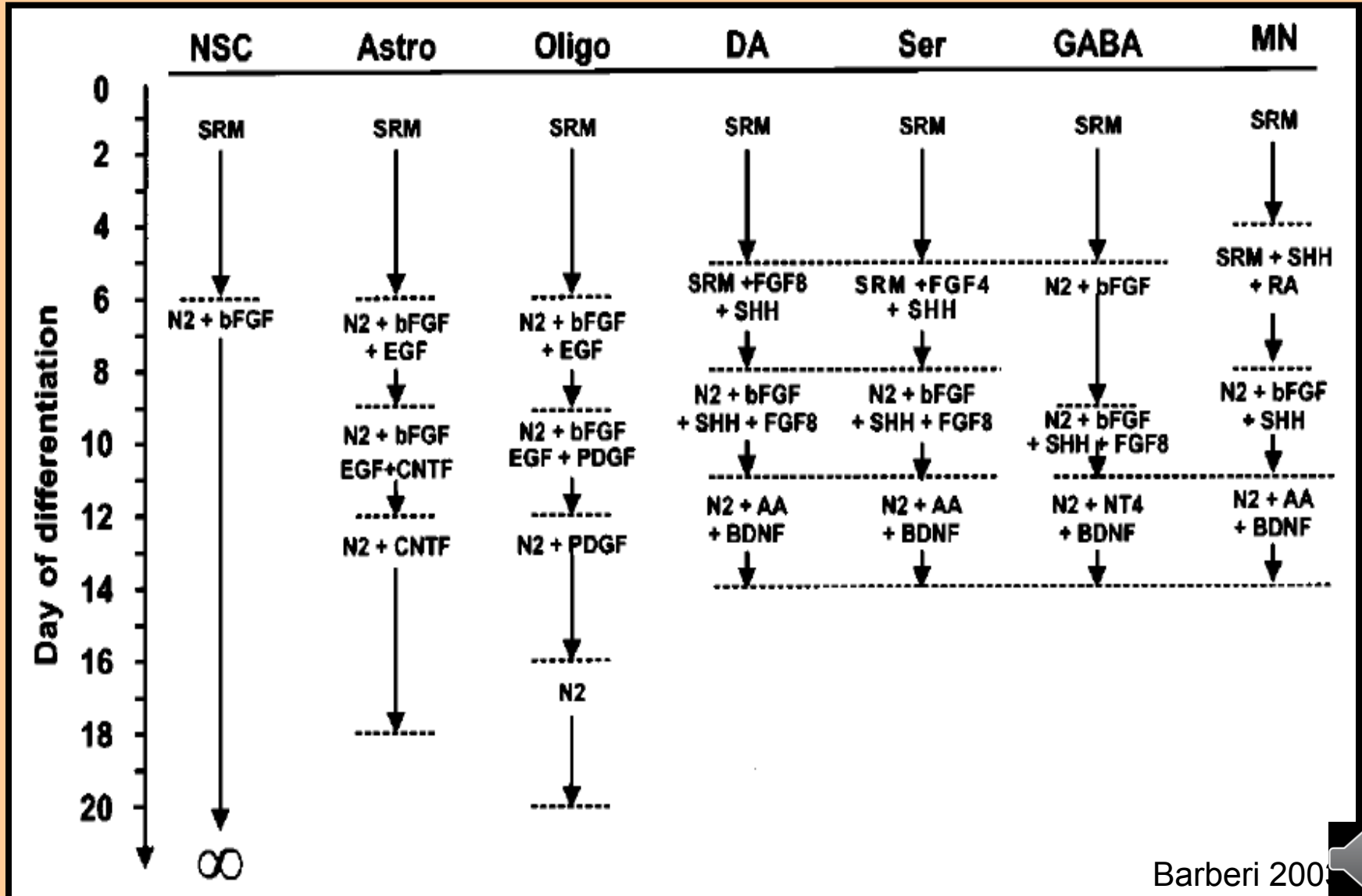




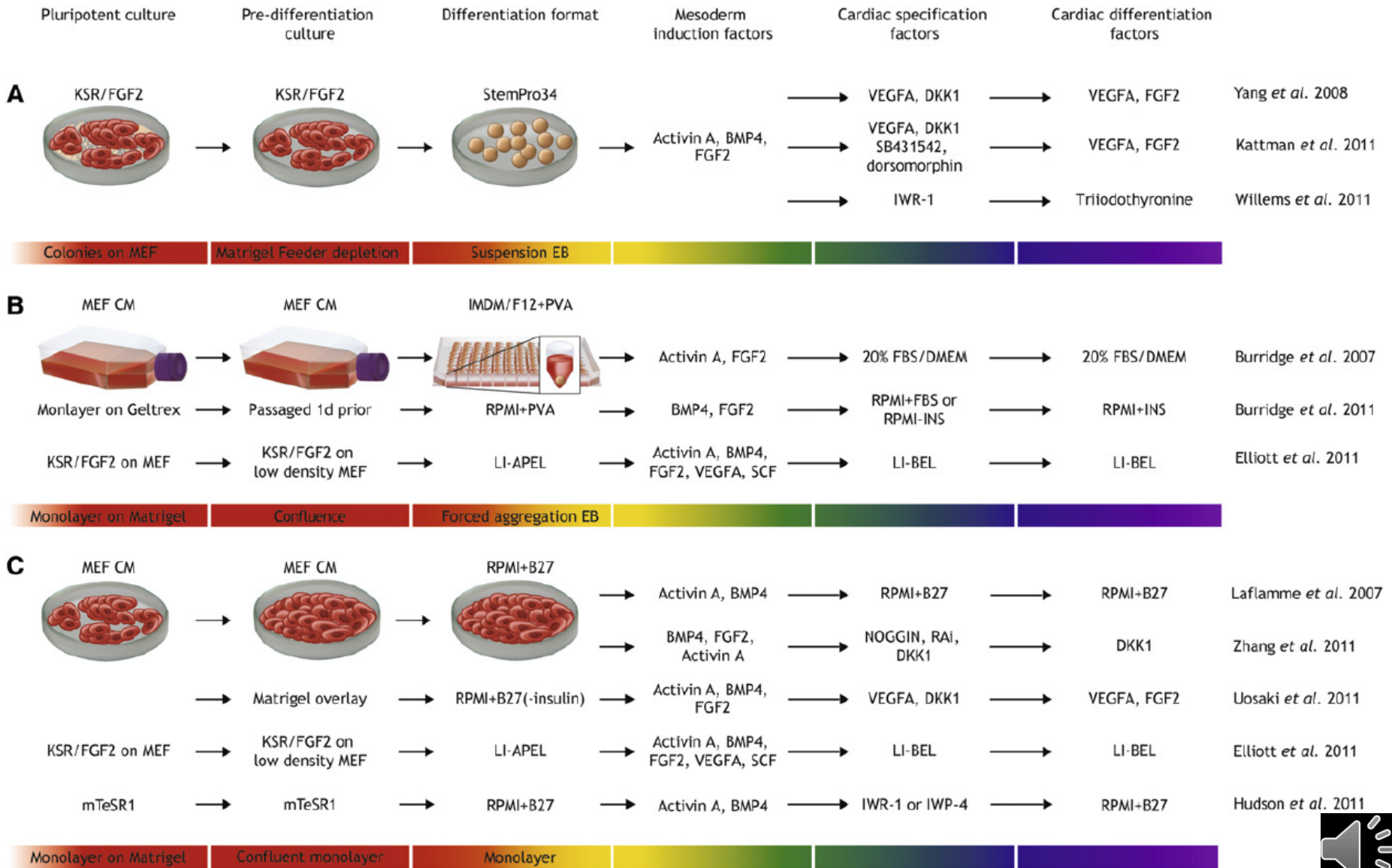


# Příklad diferenciace ES buněk do různých typů neurálních buněk

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



# Příklady diferenciacie lidských pluripotentních buněk do kardiomyocytů



# 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 potenciaální vznik teratomů
- biologie a diferenciační potenciál ES buněk nejsou dosud dobře prozkoumány
- kultivace ES buněk je stále závislá na nedefinovaných faktorech

Částečně vyřešeno za využití iPSC:

- vliv pohlaví, inaktivace X chromosomu x aktivace genů na Y chromosomu (variabilita v odpovědi na stimuly diferenciace, stabilitu vlastností..)
- etika získávání nových lidských ES linií (různé státy, různé pohledy na věc)
- 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

