

# HEMATOPOÉZA - HEMATOPOETICKÉ KMENOVÉ BUŇKY

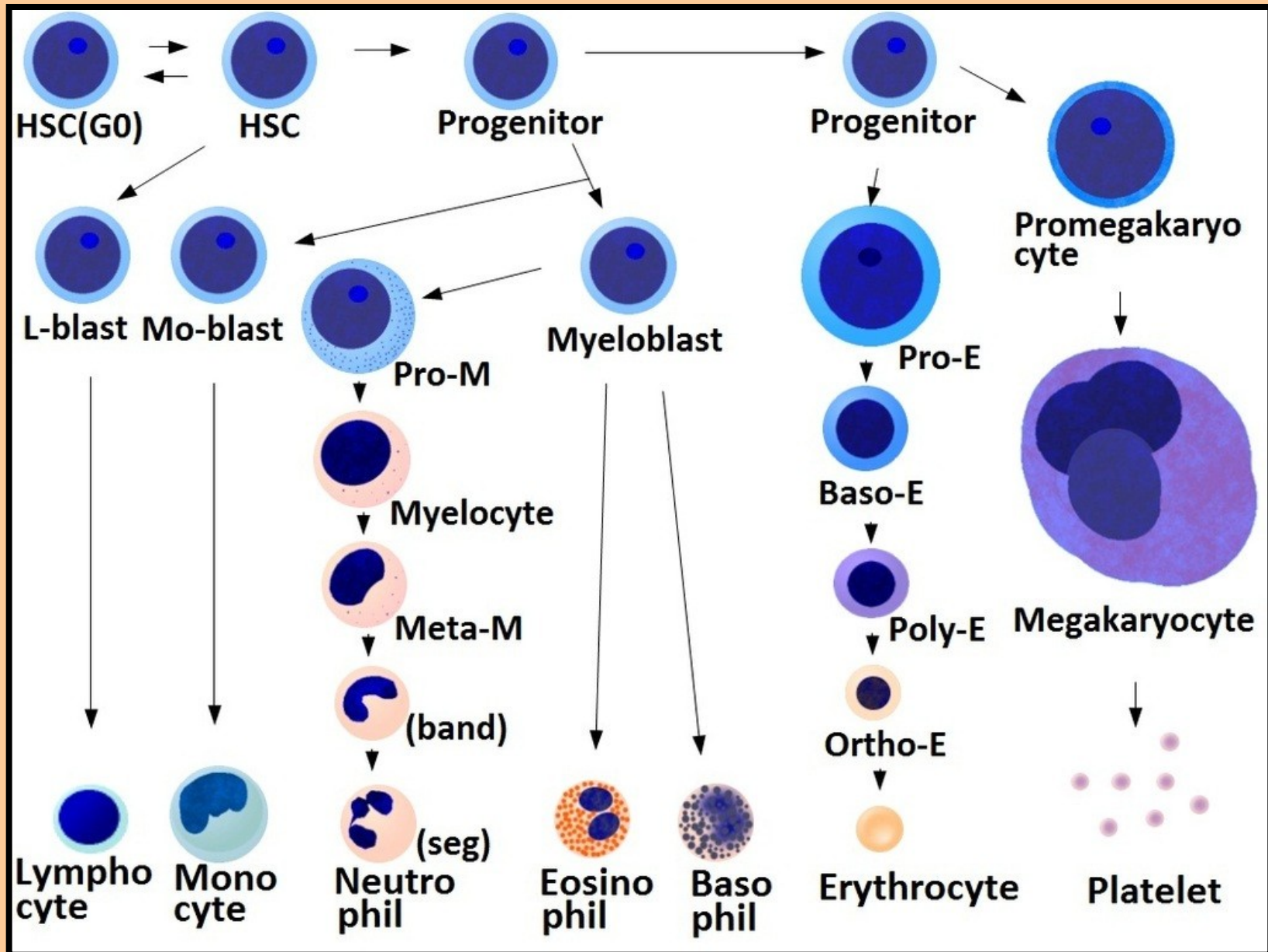
## - HSC (hematopoietic stem cells)

- Hematopoéza je v současné době zřejmě nejlépe prostudovaná diferenciační dráha s nejdokonalejším fenotypovým rozlišením jednotlivých buněčných stádií buněk založeno na tzv. CD (cluster determinants) antigeny.
- Jednotlivé diferenciační dráhy jsou často majoritně závislé na jediném cytokinu (kolonie stimulujícím faktoru - CSF; např. G-CSF, faktor stimulující tvorbu zejména granulocytů)
- V průběhu ontogeneze je hematopoéza realizována jedinečným způsobem (časově a prostorově, viz. níže), což dobře umožňuje i studium rozdílů mezi embryonálními a adultními somatickými kmenovými buňkami. Každopádně již v průběhu embryonálního vývoje vznikají jisté typy populací ve smyslu „fakultativních kmenových buněk“ (některé tkáňové makrofágy, mikroglie, různé typy lymfocytů).
- HSC vzniklé ve žloutkovém váčku také migrují do oblasti AGM a do jater, kde dávají vznik adultním HSC (Samokhvalov, 2007)

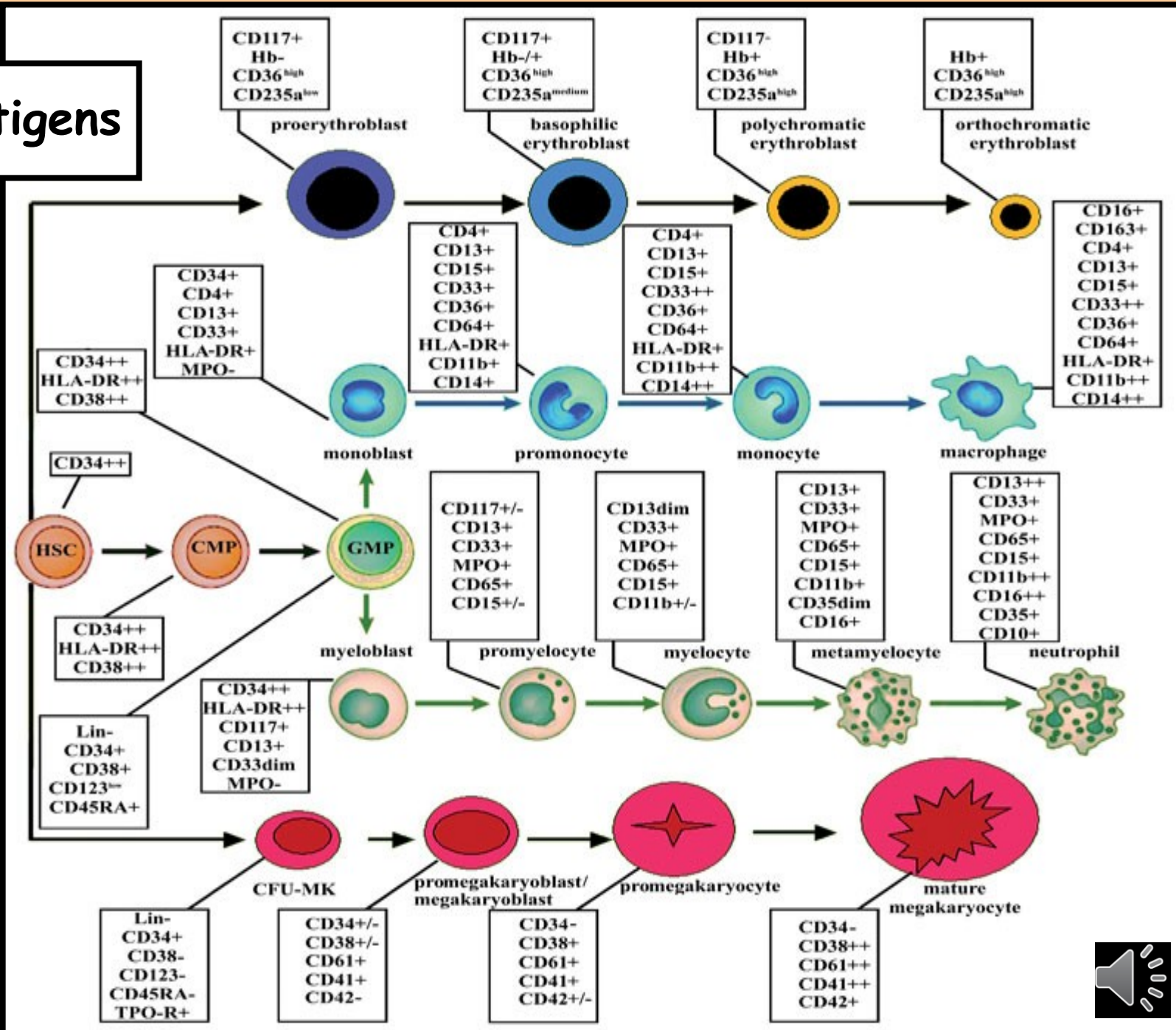


# Hematopoetické kmenové buňky – HSCs (hematopoietic stem cells)

(Hematopoéza)



# CD antigens



Rozlišujeme: **LT-HSC** (long-term HSC) - schopné opakovaně kompletní obnovy hematopoézy (*vyžadují osteoblasty*), **Kostní dřeň** - **<0.01% buněk**  
~ 98 % v  $G_0$  fázi buněčného cyklu

**ST-HSC** (short-term HSC) - schopné jen krátkodobé obnovy hematopoézy (*vyžadují endotelie - vaskulární niche*) ~ 1- 3%  
**proliferujících**

*(aktuální X potencionální (proliferující) kmenová buňka)*

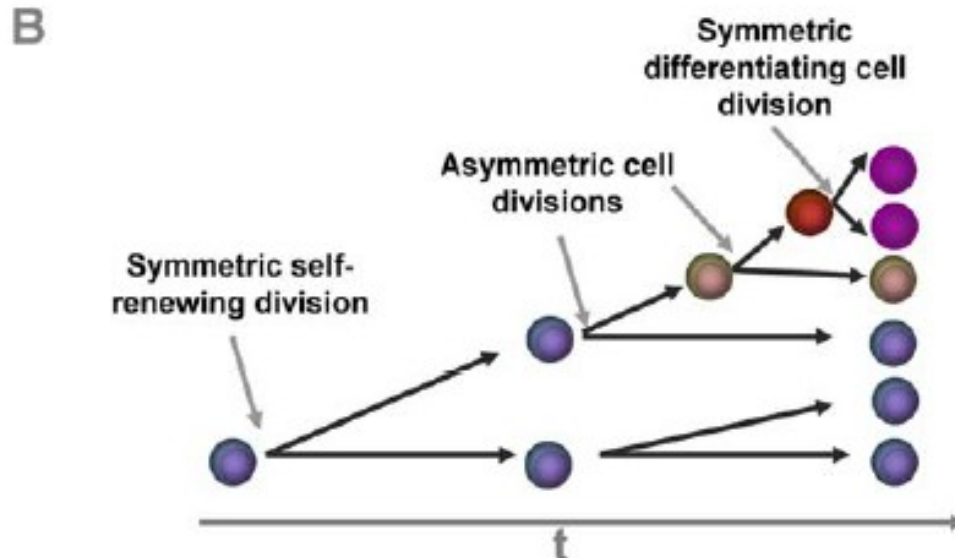
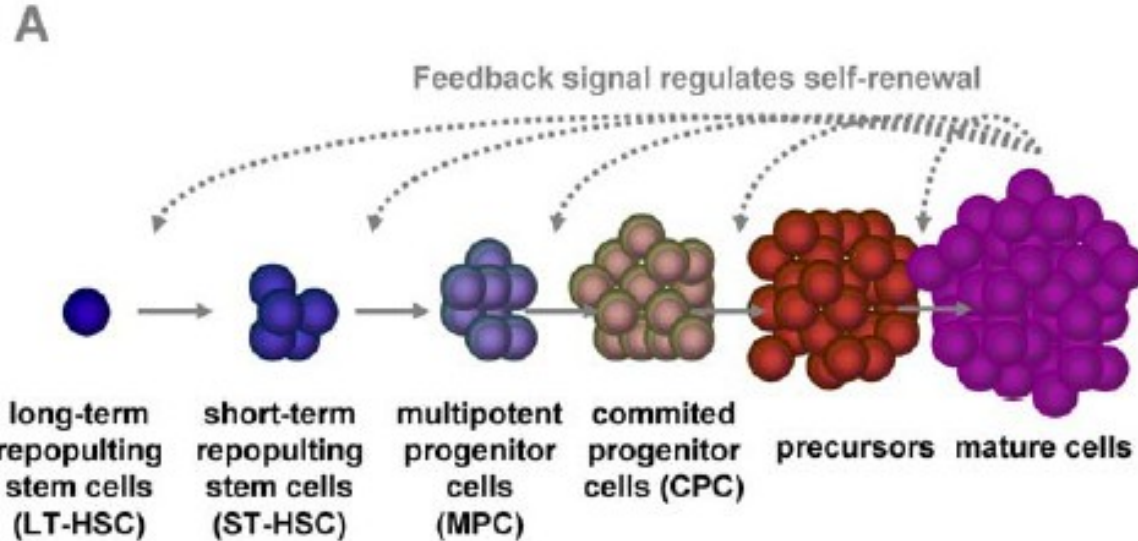
Harrison et al. (1979): transplantoval myším opakovaně identický štěp HSC déle jak 8 let

- > výrazné překročení délky života myši!!!

- > **OPRAVDOVÉ ADULTNÍ KMENOVÉ BUŇKY!**



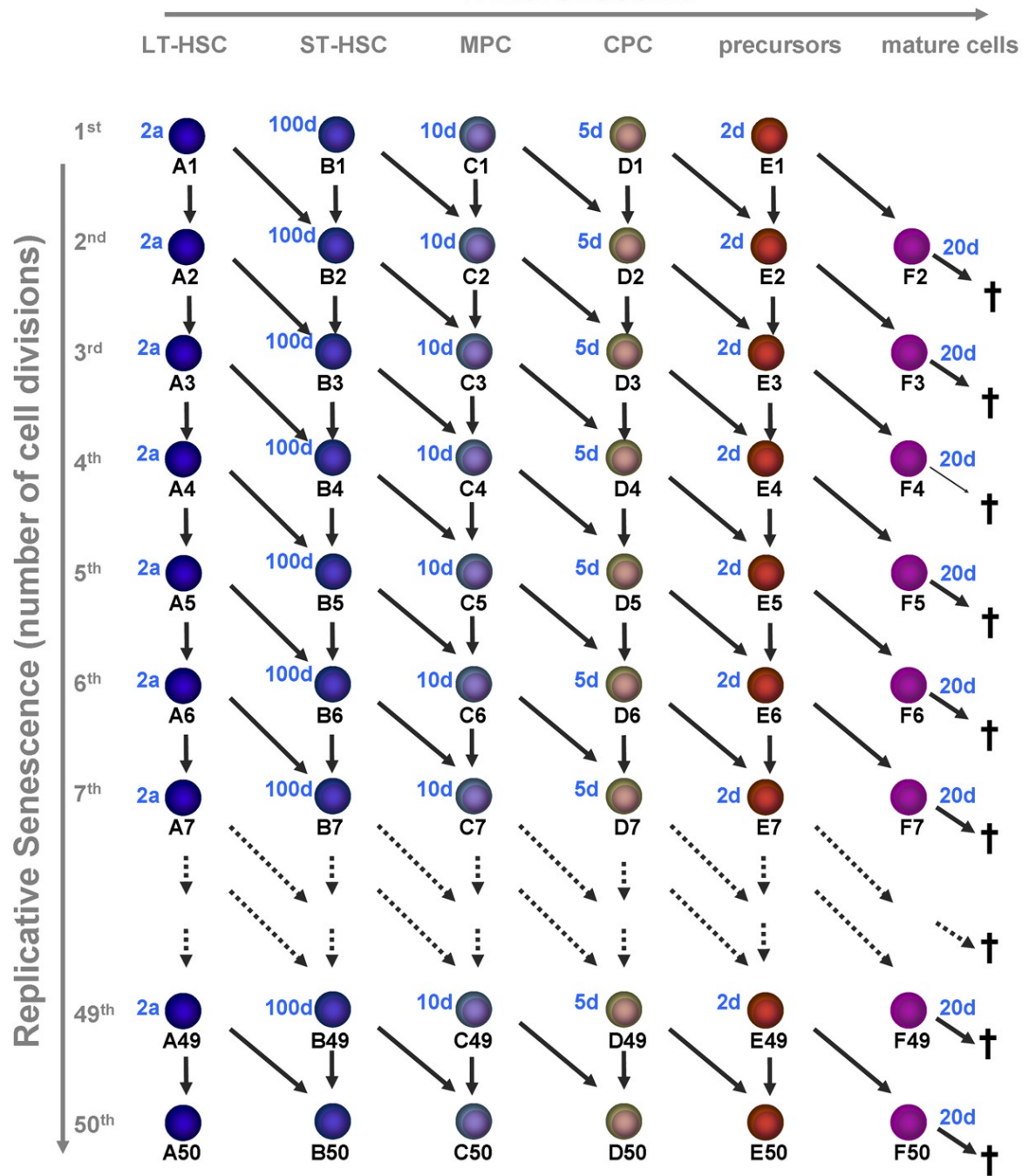
# Dělení hematopoietických buněk



**M**nožství potomků reguluje intenzitu dělení mateřských buněk, hlavní úloha růstových faktorů.



# Differentiation

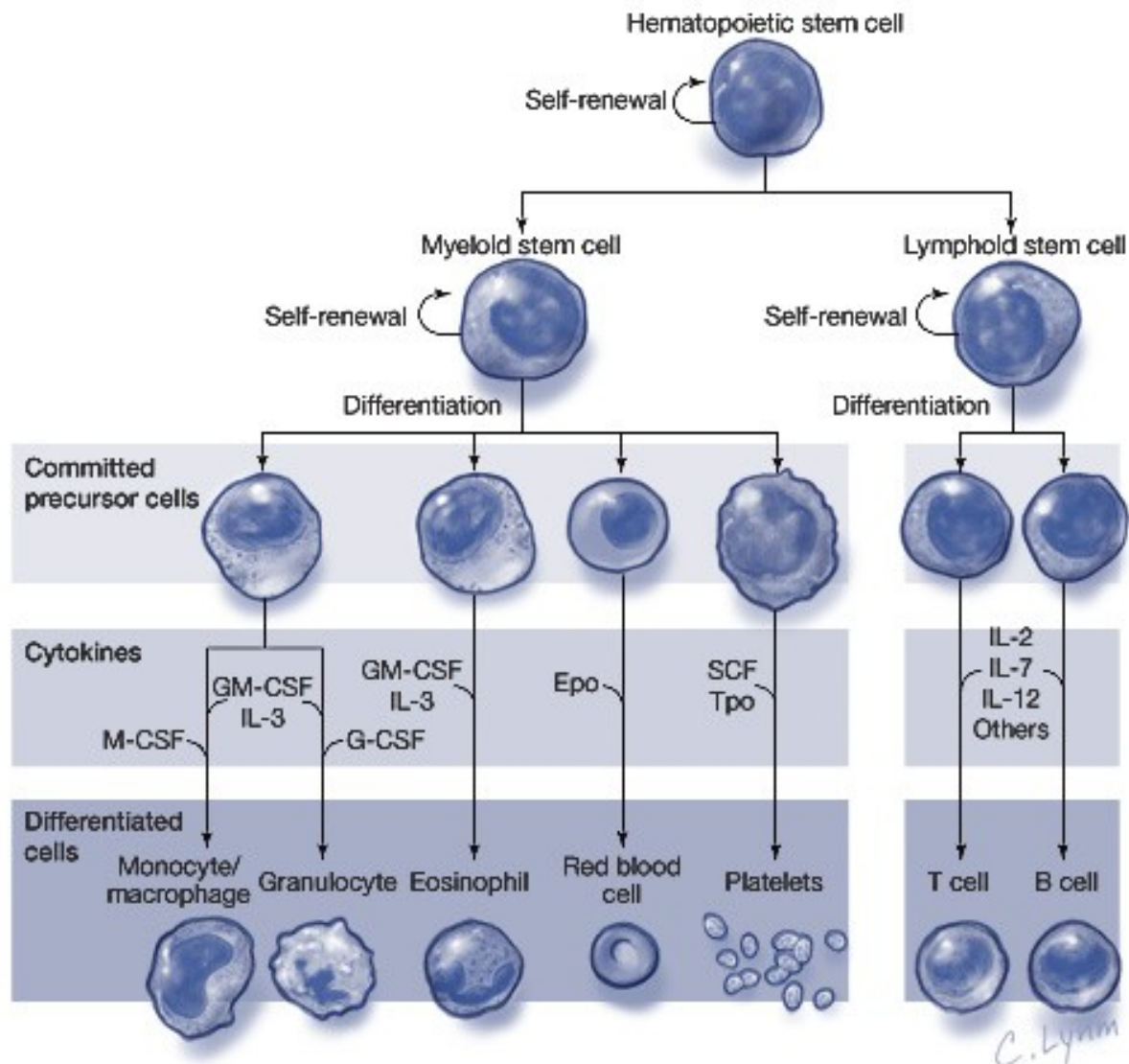


Doba existence buněk  
v jednotlivých  
vývojových stádiích  
hematopoézy

(Rychlost dělení není ukázána!)



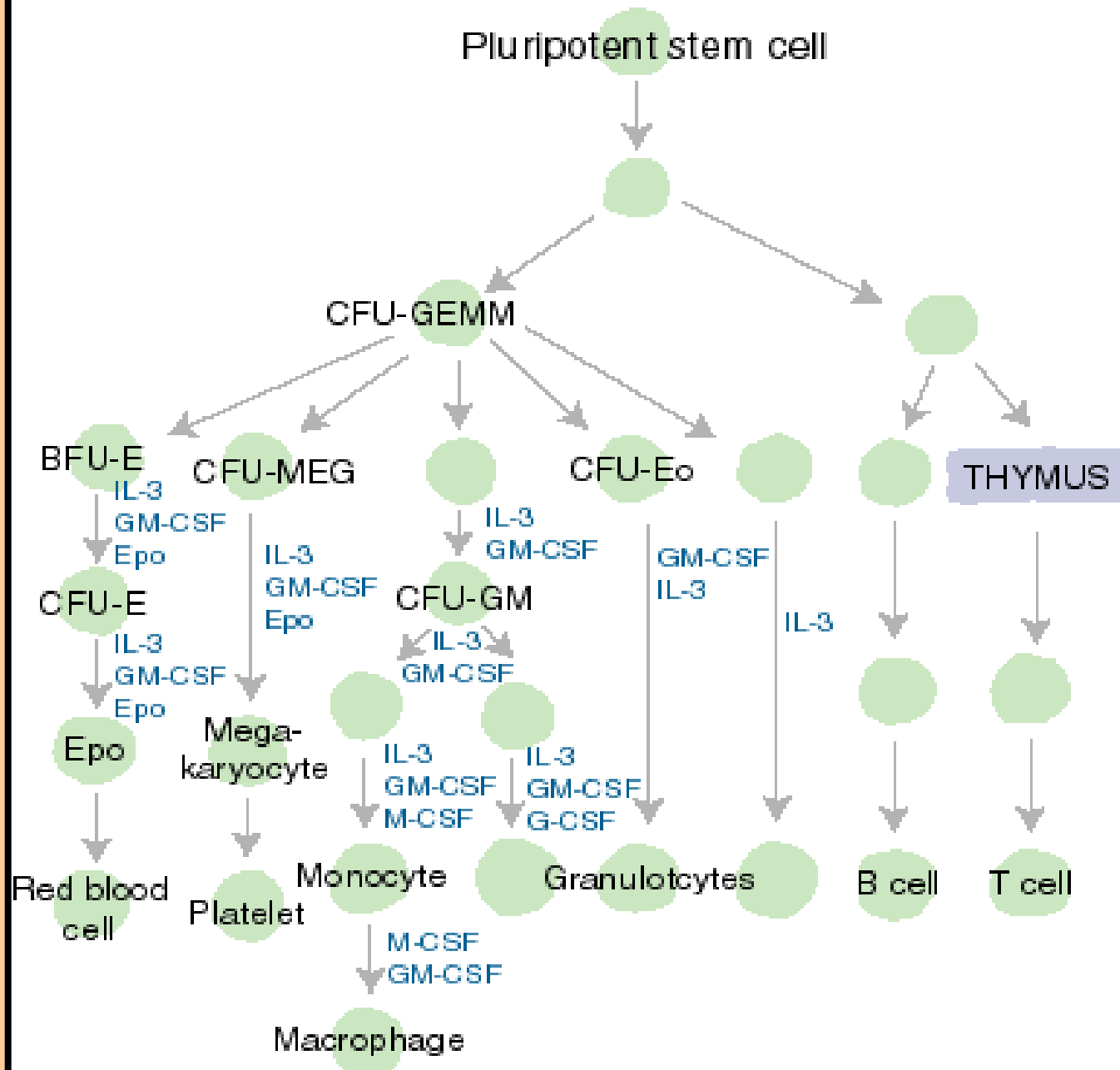
# Hematopoietic Stem Cell Differentiation



IL=interleukin  
 GM-CSF=granulocyte/macrophage colony-stimulating factor  
 G-CSF=granulocyte colony-stimulating factor  
 M-CSF=monocyte colony-stimulating factor  
 Epo=erythropoietin  
 SCF=stem cell factor  
 Tpo=thrombopoietin



# Hematopoiesis



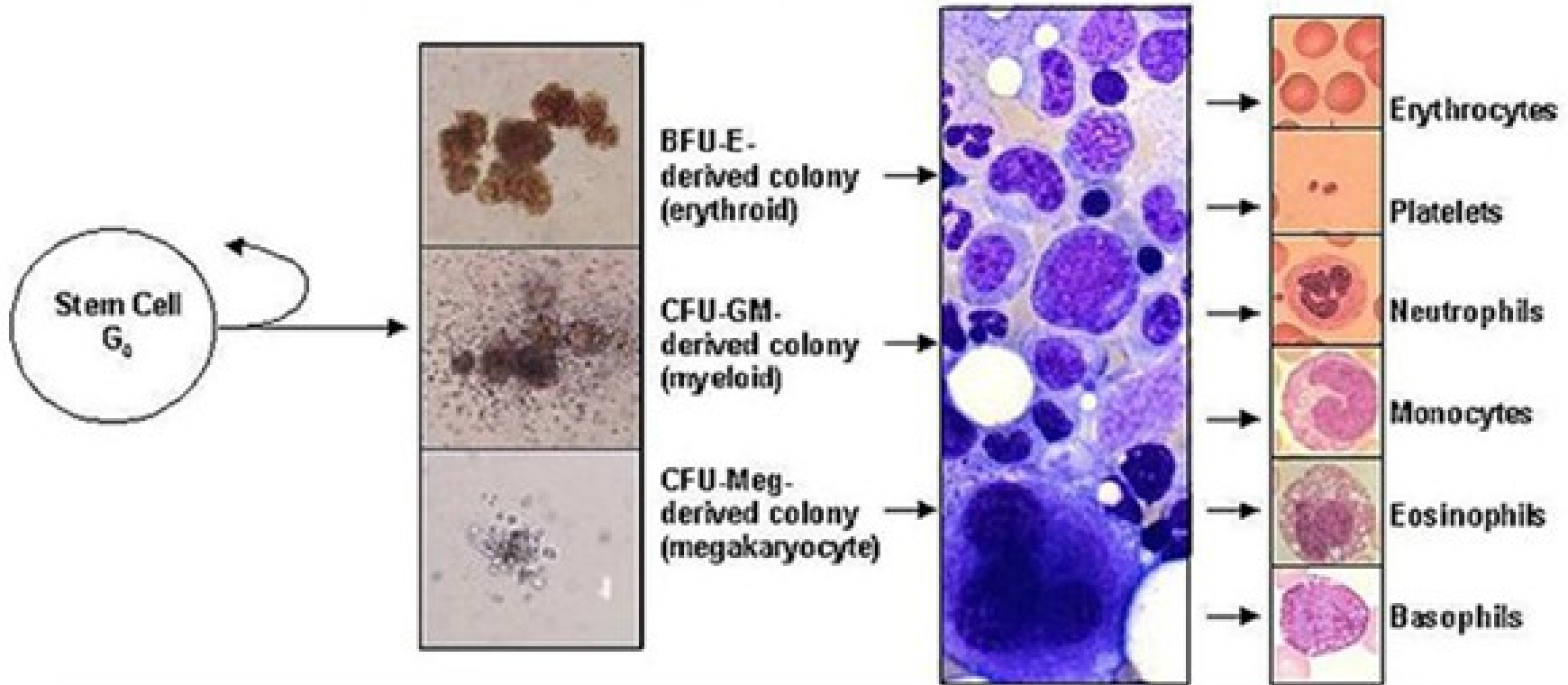


*pomalou se dělicí buňky  
velký jádro-plasmový poměr*

*rychle se dělicí buňky  
velký jádro-plasmový poměr  
tvorba specifických kolonií*

*ukončení proliferace  
stále velký jádro plasmový poměr  
velké rozdíly ve velikosti*

*nedělicí se  
terminálně diferencované buňky  
cytoplasma převažuje nad jádrem*



**Stem  
cell**

**Progenitor  
cells**

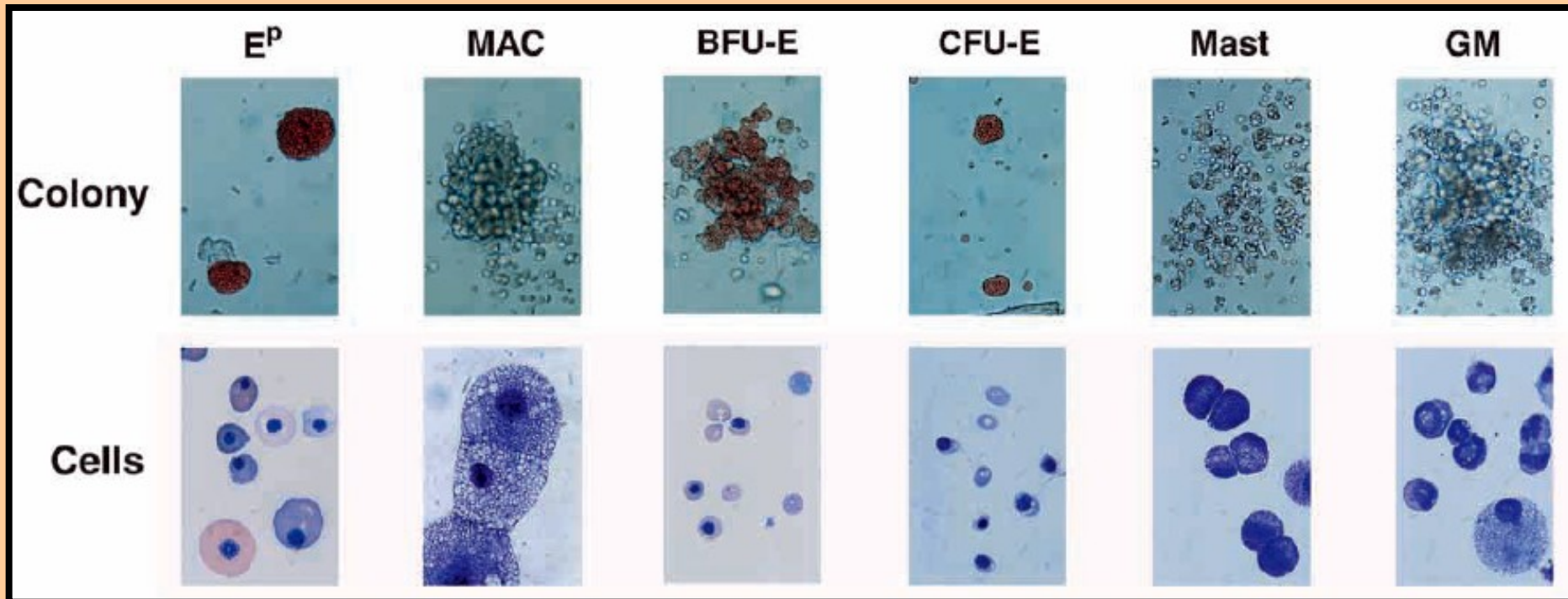
**Precursor  
cells**

**Mature  
cells**



# Příklad kolonií hematopoézy v *in vitro* experimentu

Palis 1999



Ep - primitivní erytropoéza, MAC - primitivní makrofágy,  
BFU-E - (Burst-forming unit eryteroidní) z fetálních jater,  
GM - granulocytární-makrofágová kolonie

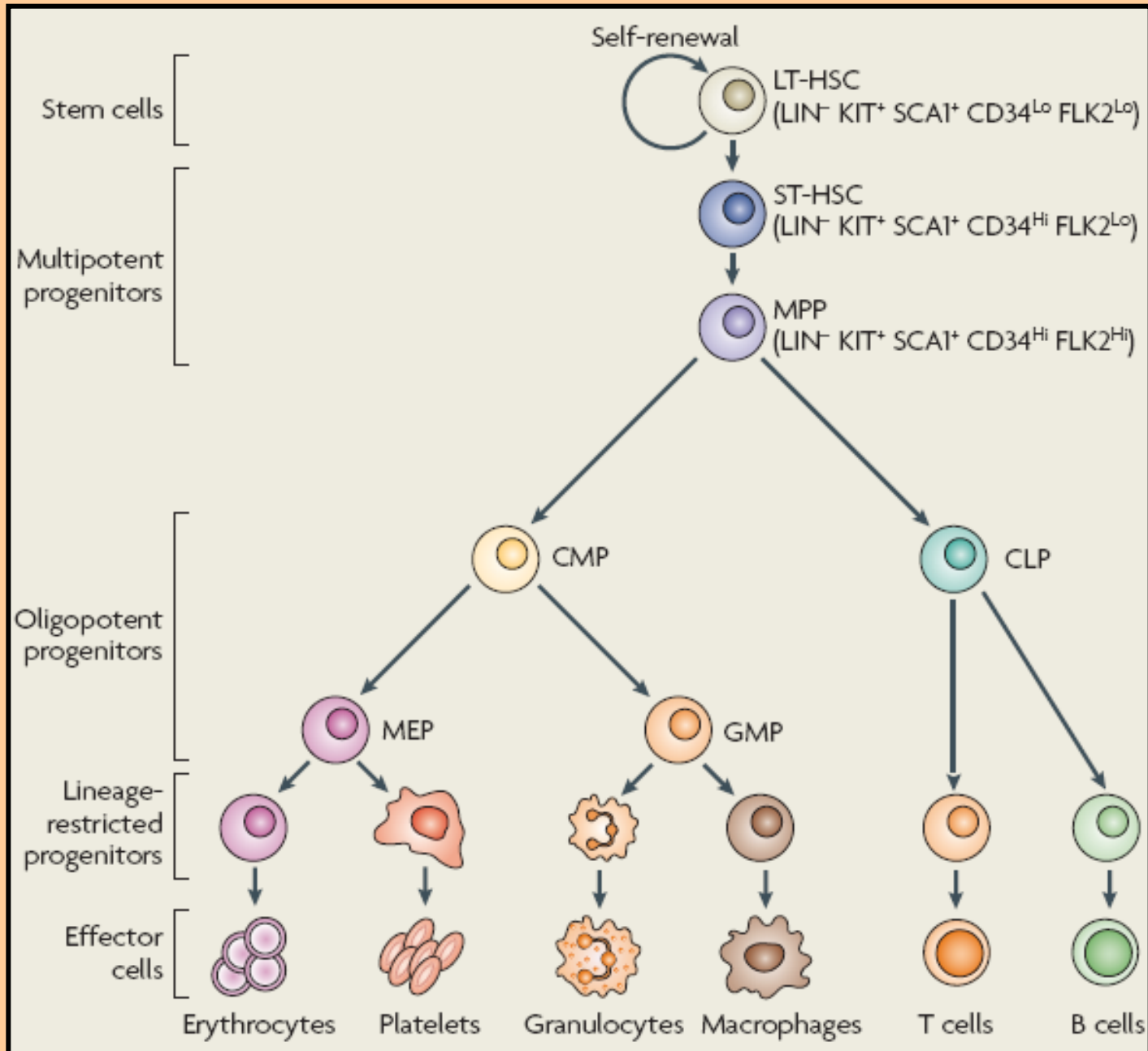


## Fenotyp HSC (mouse)

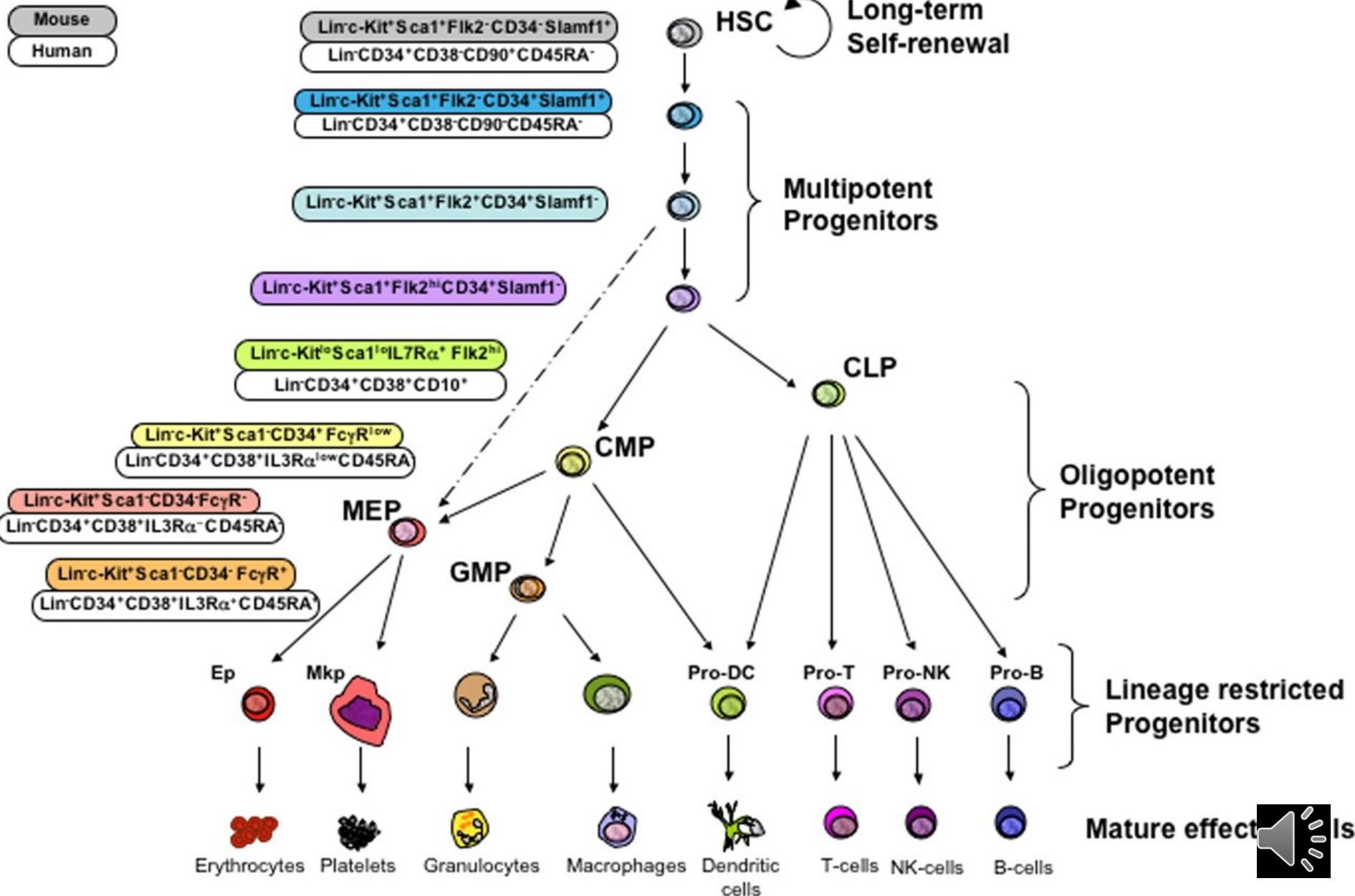
<i>antigen</i>	HSC	Myeloid SC	Lymphoid SC
CD10 (CALLA)	-	-	+
CD33 (Sialoadhesin)	-	+	-
CD34 (L-selectinR)	+ (-)	+	+
CD38 (ecto-ADP-ribosyl cyclase)	-	-	+
<b>CD90 (Thy1)</b>	+	-	+
<b>CD110 (Trombopoietin receptor)</b>	+	+	-
<b>CD111 (Nectin1)</b>	-	+	-
<b>CD112 (Nectin2)</b>	-	+	-
<b>CD117 (c-Kit, SCFR)</b>	+	+	+
CD123 ( $\alpha$ řetězec IL-3R)	+	+	-
CD124 (IL-4R/IL-13R)	-	-	+
CD127 ( $\alpha$ řetězec IL-7R)	-	-	+
CDw131 ( $\beta$ řetězec IL-3R/IL-5/GM-CSF)	-	+	-
<b>CD133 (Ac133)</b>	-	+	-
<b>CD135 (Flt3/Flk2)</b>	+	-	-
<b>CD173 (krevní skupina H typ 2)</b>	-	+	-
<b>CD174 (Lewis Y)</b>	-	+	-
CD176 (Thomson-Friedrenreich antigen)	-	+	-
CD227 (MUC-1)	-	+	-
CD228 (Melanotrensferin)	-	+	+
<u>CD243 (MDR-1)</u>	+	-	-



# Schema hematopoézy a fenotyp aktuálních a potencionálních HSC - mouse



# Hematopoietic Hierarchy



# Critical transcription factors for blood development

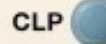
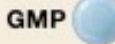
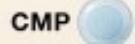
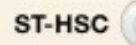
Pluripotent stem cells

Runx-1  
Scl/tal-1  
Lmo-2  
Mll  
Tel  
Bmi-1  
Gfi-1  
GATA-2

**Stem cell class**  
Required for production, survival, or self-renewal of HSCs



Multipotent progenitors



Committed precursors

GATA-1  
GATA-2  
FOG-1

GATA-2

GATA-1

PU.1

C/EBP $\alpha$

E2A  
EBF  
Pax-5  
Bcl11a (Evi9)

Ikaros  
PU.1

Notch

TCF-1

GATA-3

GATA-1  
FOG-1  
Gfi-1b  
EKLF

GATA-1  
Gfi-1b

GATA-1

C/EBP $\epsilon$

Gfi-1

XBP-1

Mature cells

RBC

Megakaryocyte

Mast cell

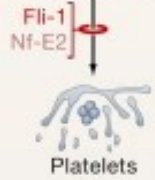
Eosinophil

Neutrophil

Monocyte/  
Macrophage

B lymphocyte

T lymphocyte



Fli-1  
Nf-E2



**Extrinsic a intrinsic faktory regulující sebeobnovu adultních HSC (Akala & Clarke 2006)**  
**významnou úlohu hraje hypoxie a HIF! HSC mají vysokou hladinu HIF nezávisle na hypoxii!**  
**- úloha cytokinů SCF, IL-x?**

Bmi1 - polycomb group protein

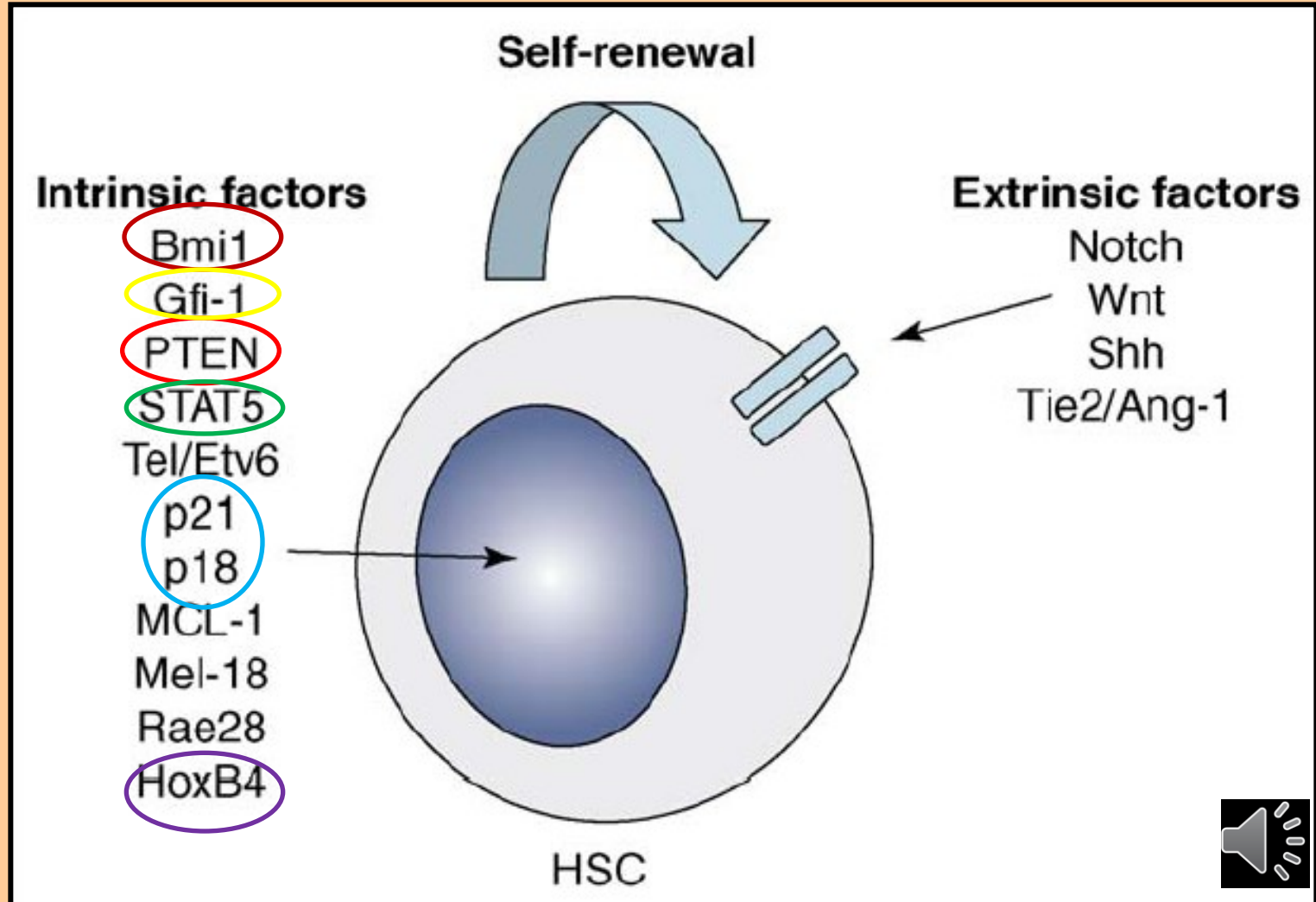
Gfi-1 - transkripční faktor/represor

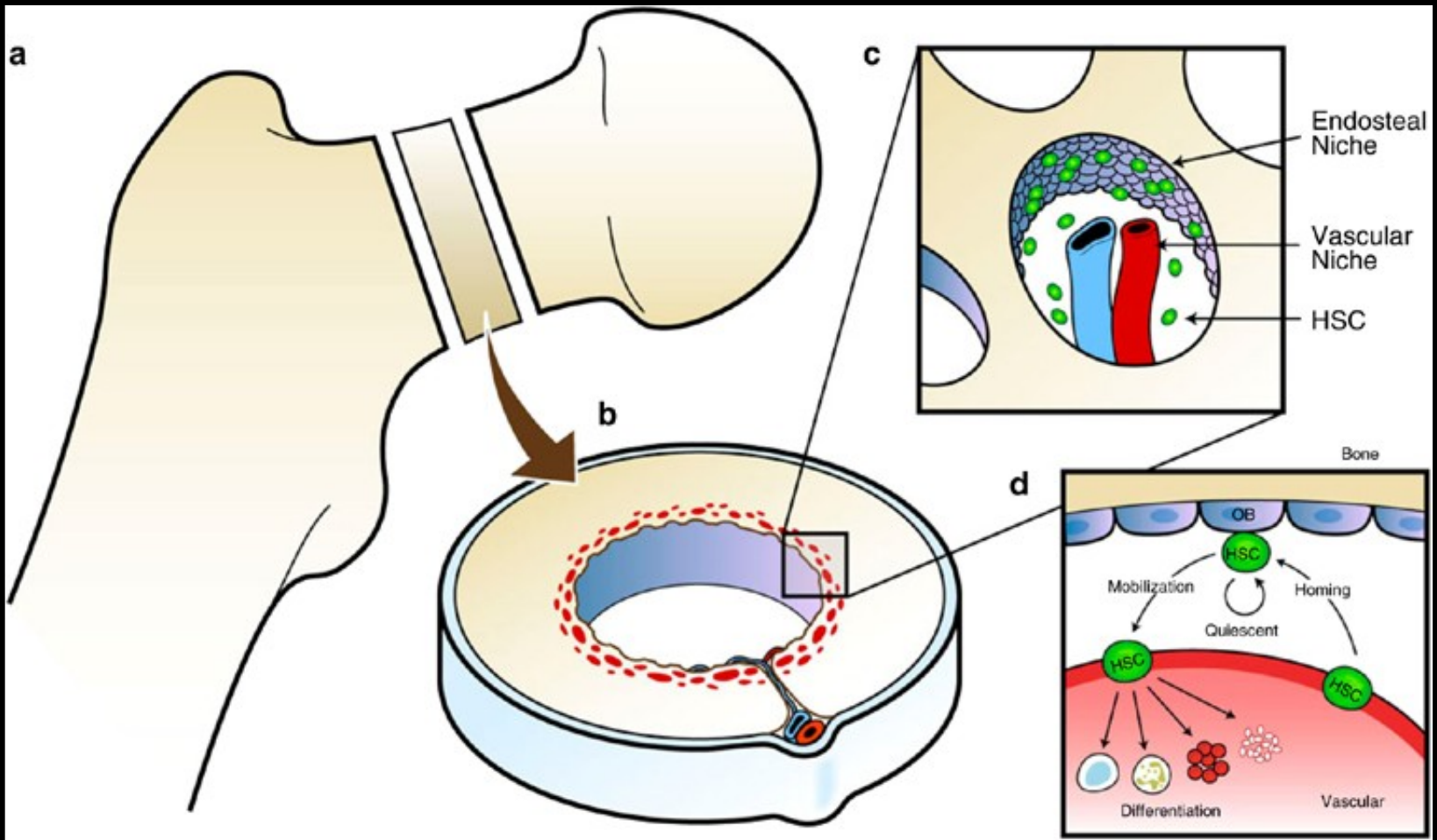
PTEN - inhibitor PI3k/Akt

p18, p21 - inhibitory cdk

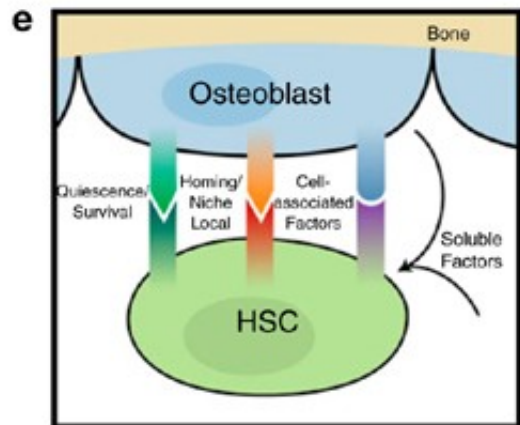
STAT5 - signalizace cytokinů

HoxB4 - transkripční faktor specifikuující linii hematopoézy

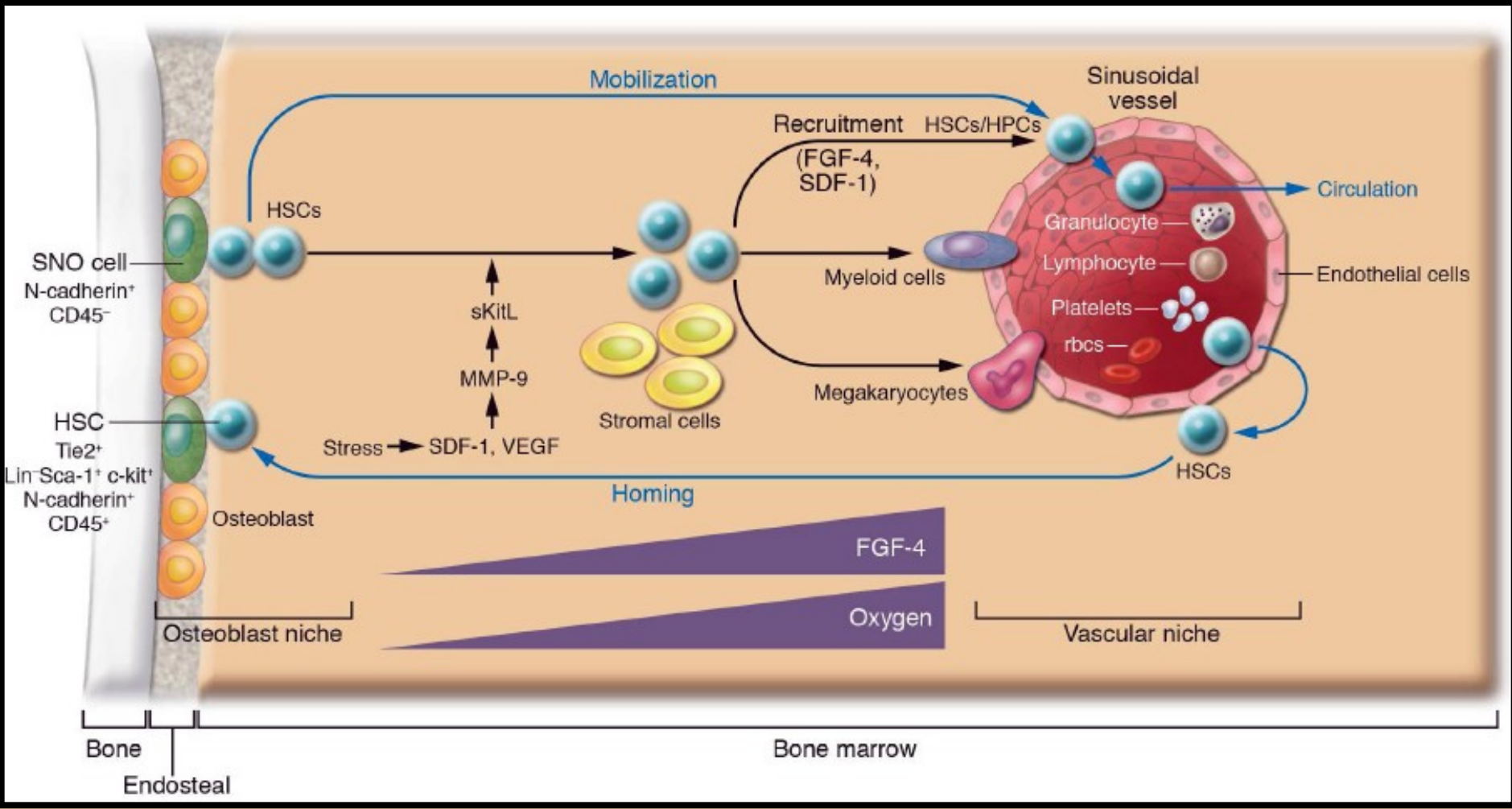




**HSC niche**







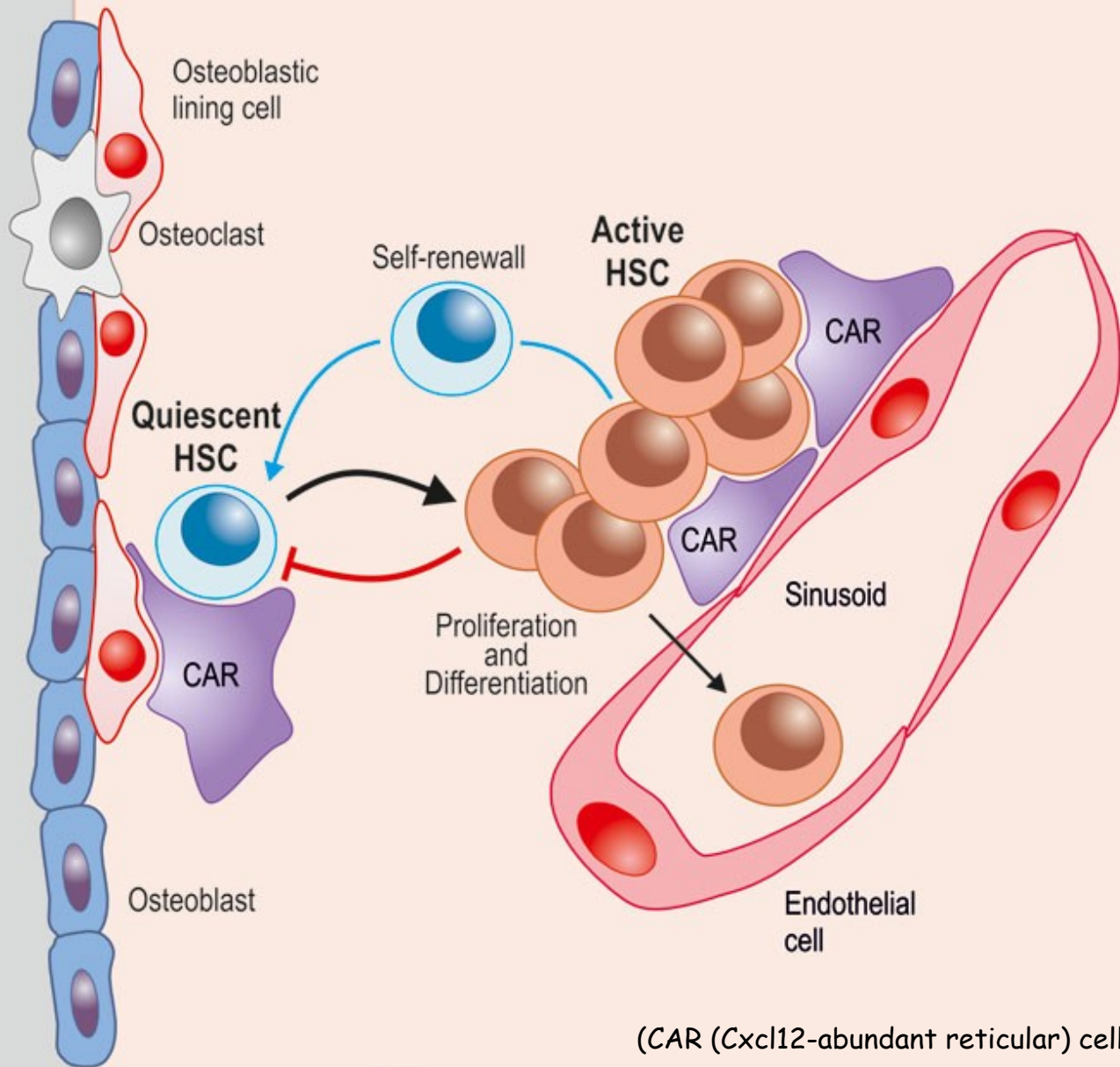
Mobilizace HSC (přechod HSC do periferní krve) - působením G-CSF, SCF, IL-3, TPO

G-CSF - granulocyte colony-stimulating factor, SCF - stem/steel cell factor, IL-3 - interleukin 3, TPO - trombopoetin



# Osteoblastic Niche

# Vascular Niche



(CAR (Cxcl12-abundant reticular) cells)

# Endosteum Zone

# Central Marrow Zone

stromal cell-derived factor 1 (SDF1), also known as C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12),  
chemokine protein that in humans is encoded by the CXCL12 gene

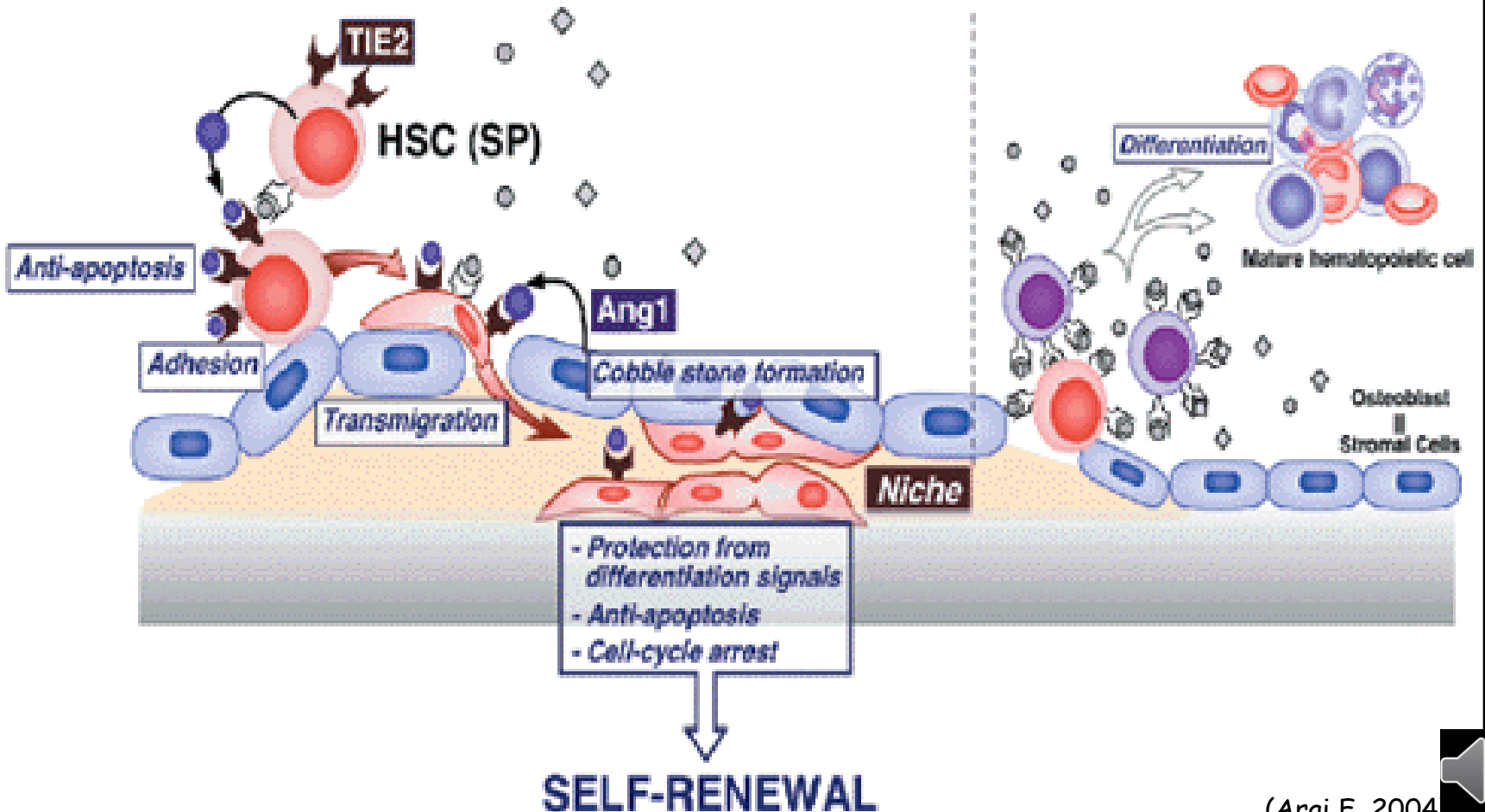


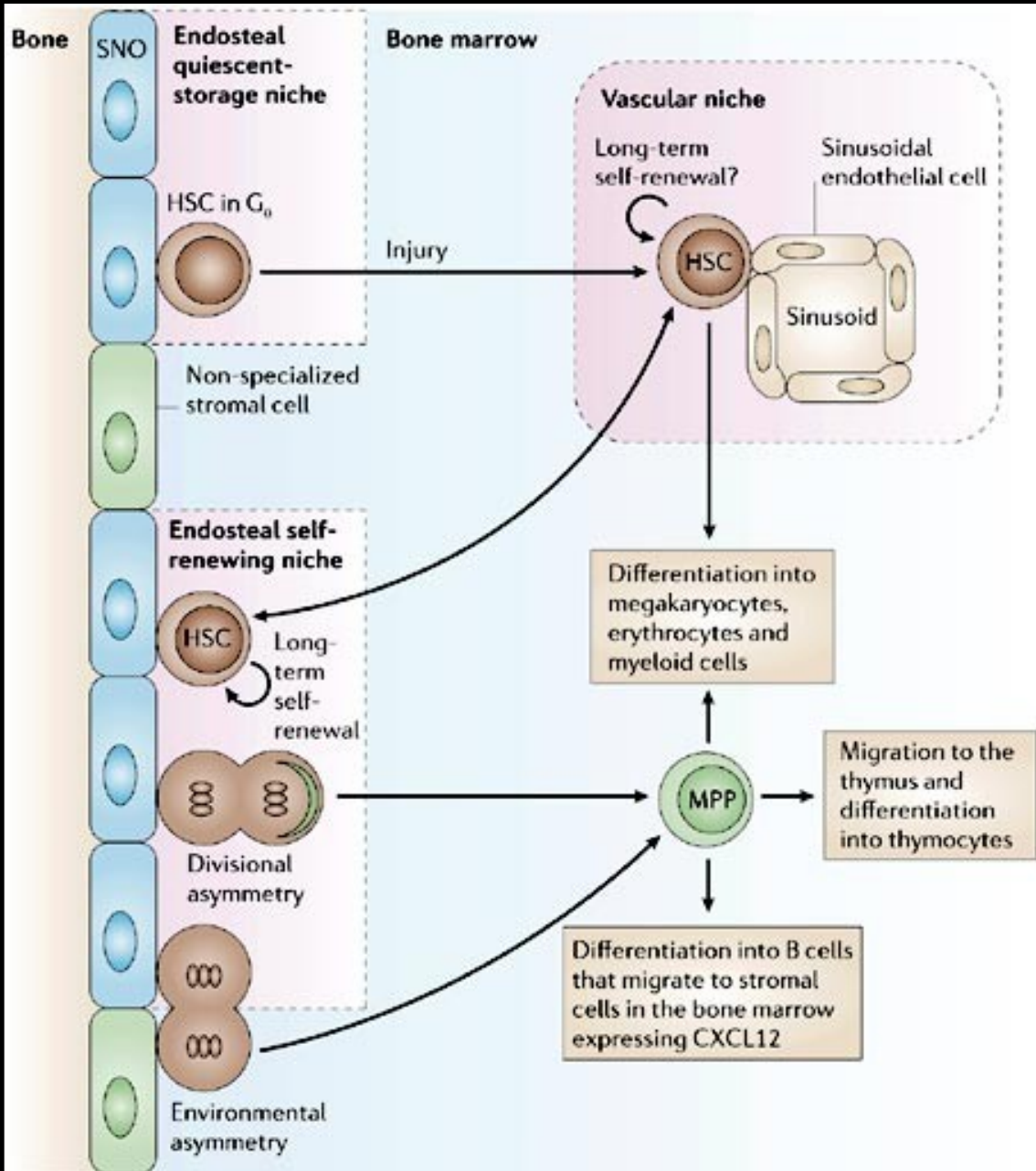
# Model významu angiopoetinu v regulaci sebeobnovy HSC

Ang - angiopoetin

Tie2 - receptor angiopoetinu

## Ang1/Tie2 Maintains the "Stemness" (Model)





## Změna niche

- ztráta kmenovosti = diferenciace
- změna statusu
  - quiescence x proliferace



# Reaktivní kyslíkové metabolity (ROS - reactive oxygen species) regulují aktivitu HSC

- zvýšení produkce ROS vede k indukci proliferace a opuštění niche

=> úbytek HSC

=> zvýšení intenzity hematopoiézy

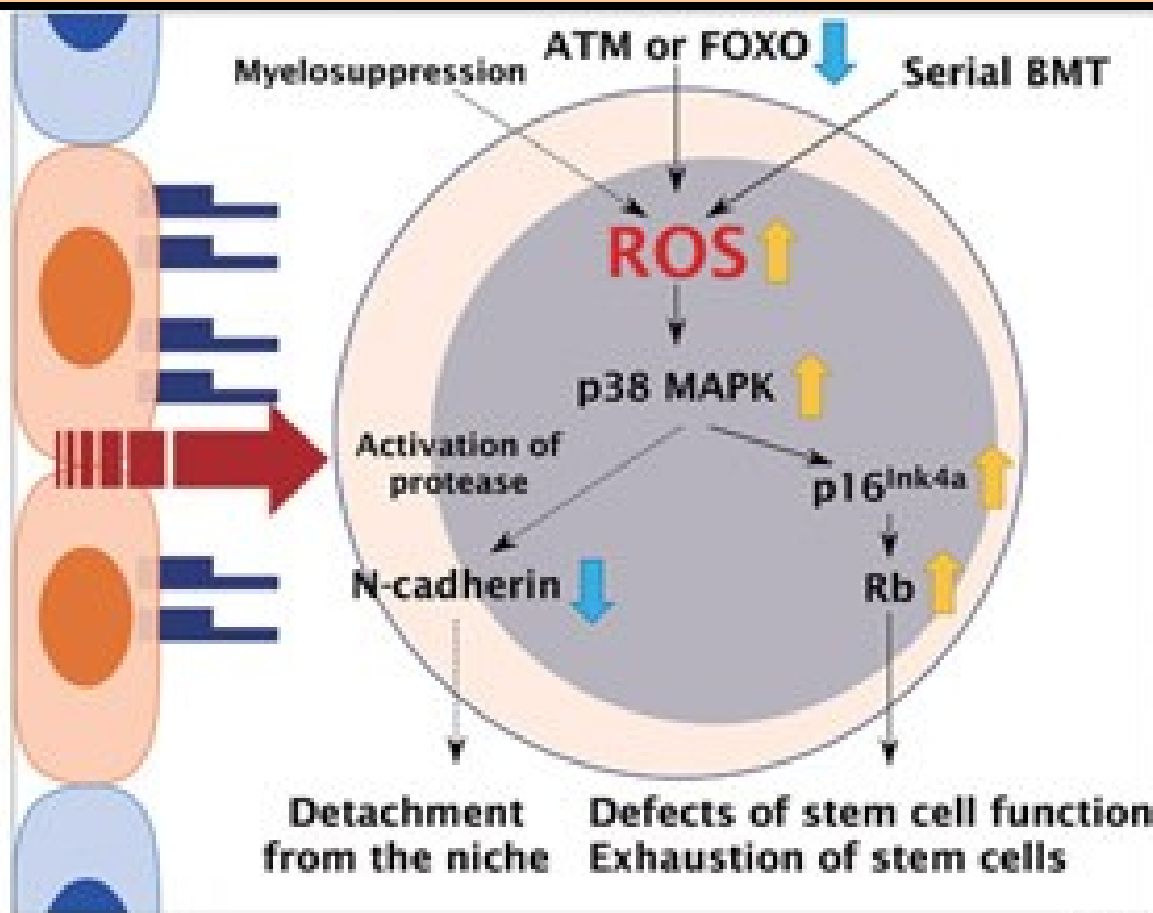
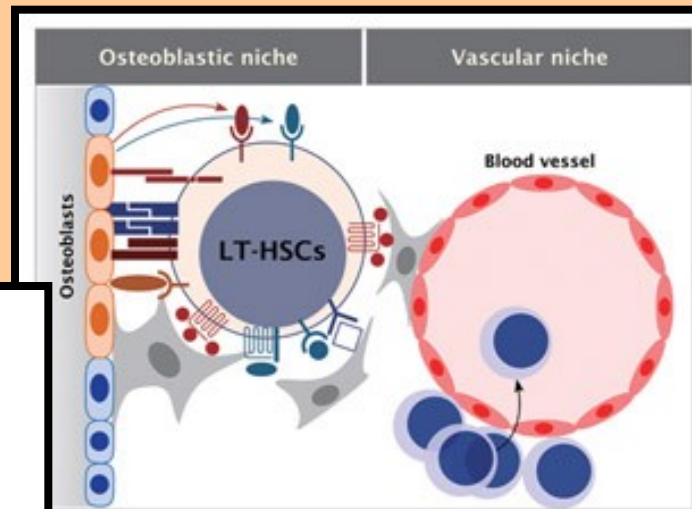
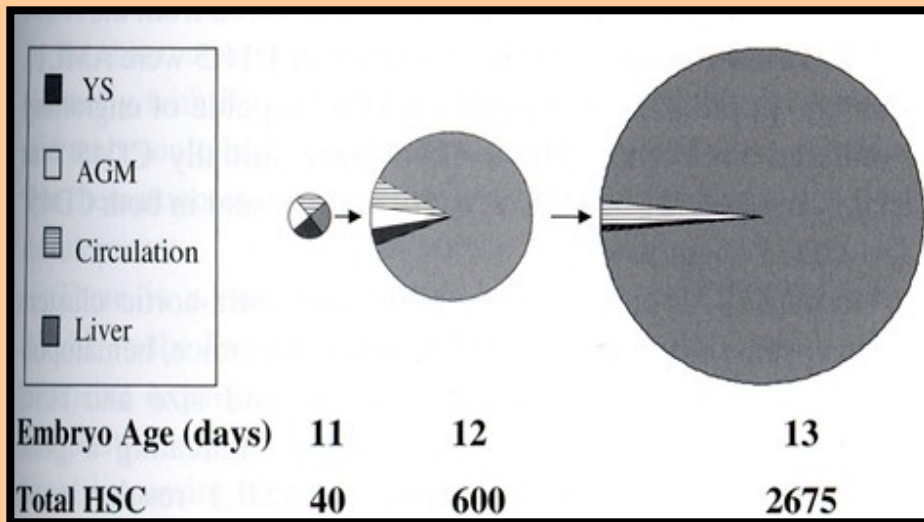


Figure 2



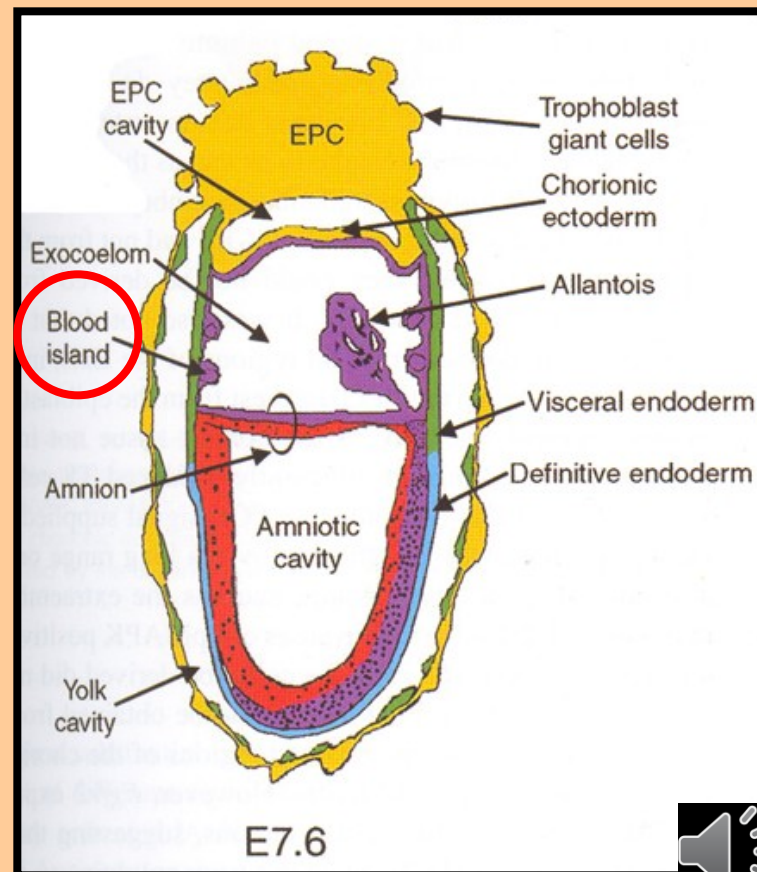
# Původ HSC

Podíl jednotlivých tkání na celkovém objemu hematopoézy mezi 11 - 13 dpc u myši

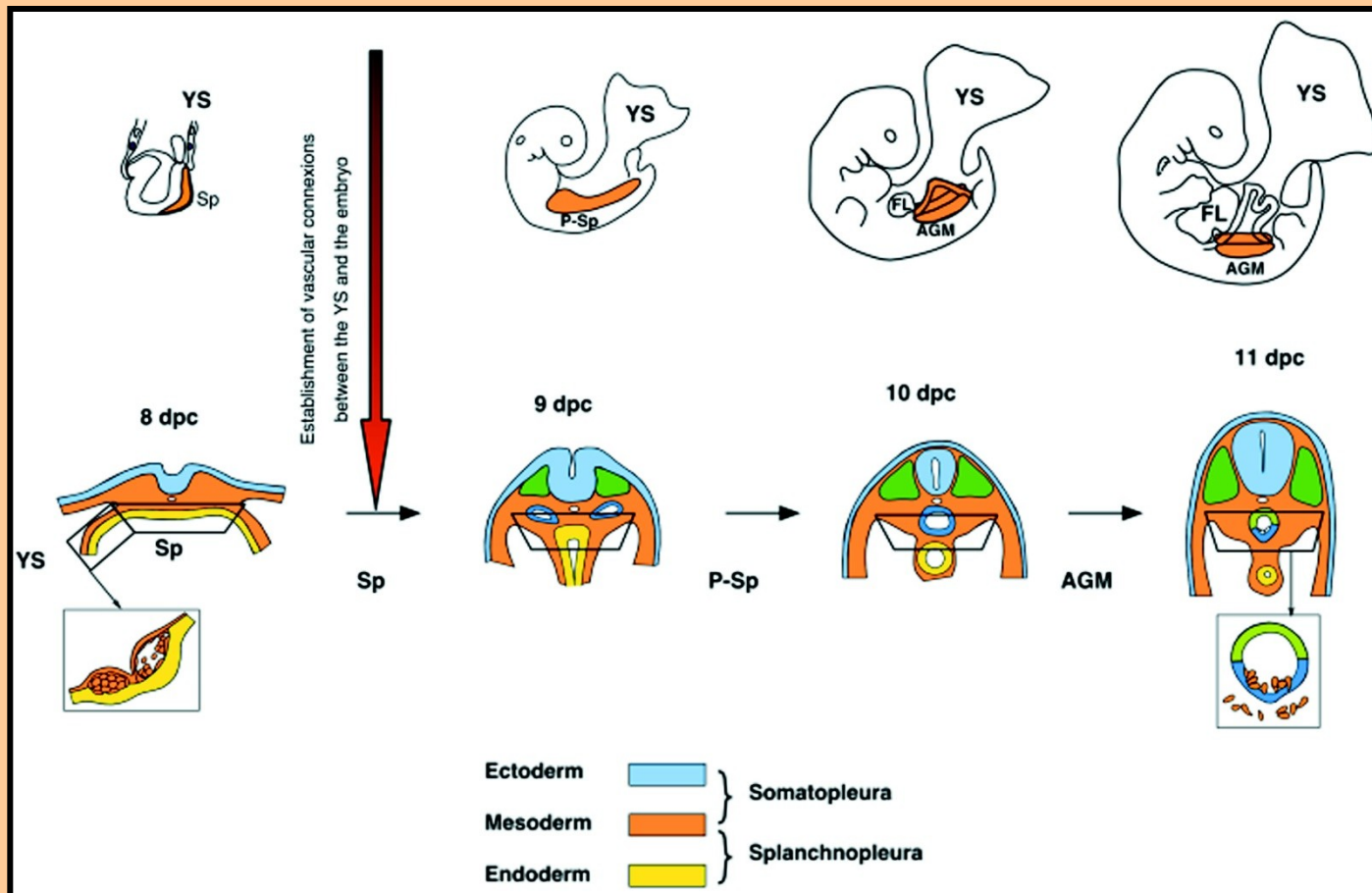


**Pozn. Slezina je osídlena HSCs a hematopoetickými progenitory pravděpodobně z jater, protože v době objevení se hematopoézy ve slezině, v žloutkovém vaku a v aortě už hematopoéza neprobíhá a kostní dřeň dosud není vyvinuta.**

Místo vzniku krevních ostrůvků (blood island) v průběhu embryogeneze u myši



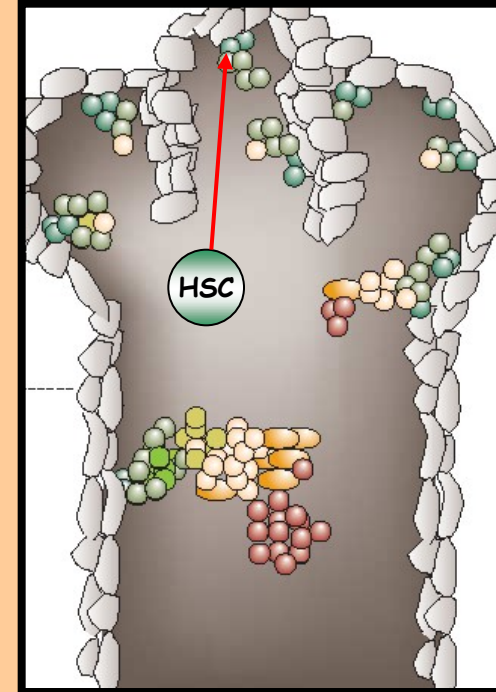
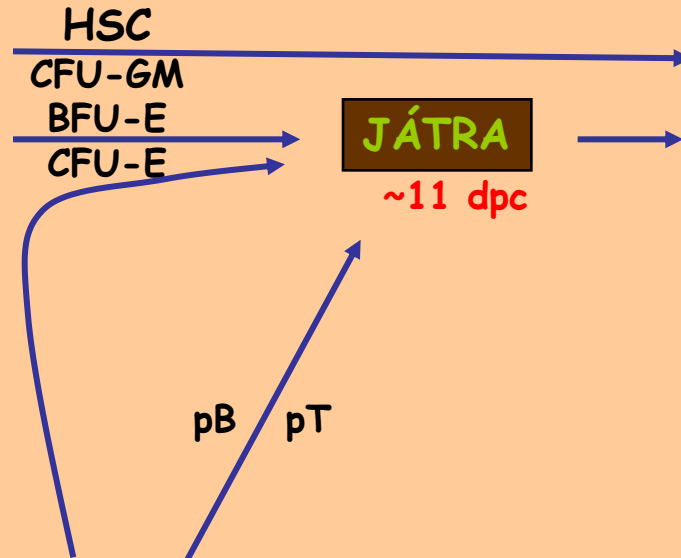
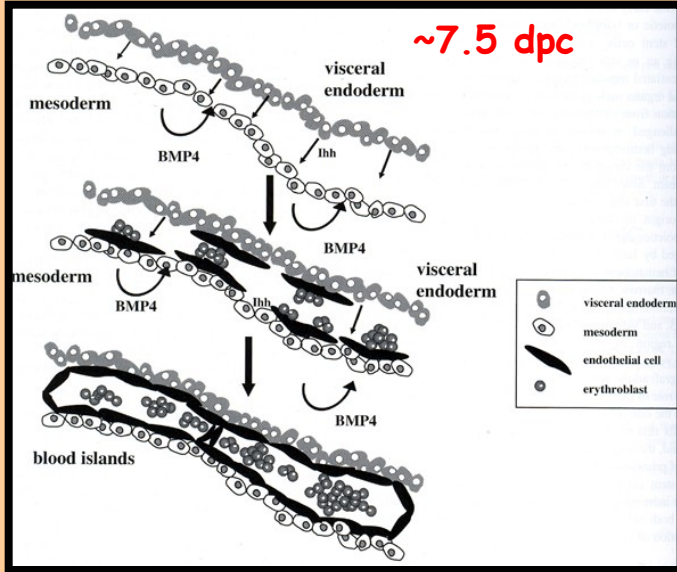
# Schema vývoje AGM (aorta-gonads-mesonephros) - začátek fetální hematopoézy



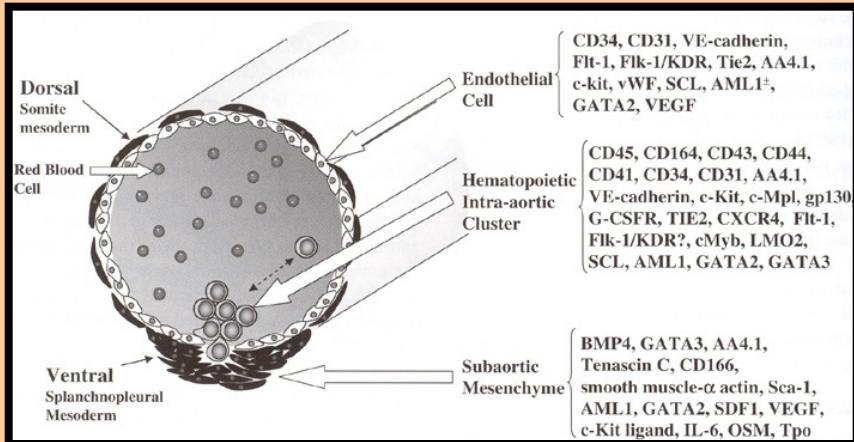
# MOUSE

## Lokalizace, změna „niche“ u hematopoézy v průběhu ontogeneze

Vznik krevních ostrůvků ve vznikajícím žloutkovém vaku mezi mezodermem a buňkami viscerálního entodermu



Hematopoéza v endotelu aorty (AGM), **~10.5 dpc**



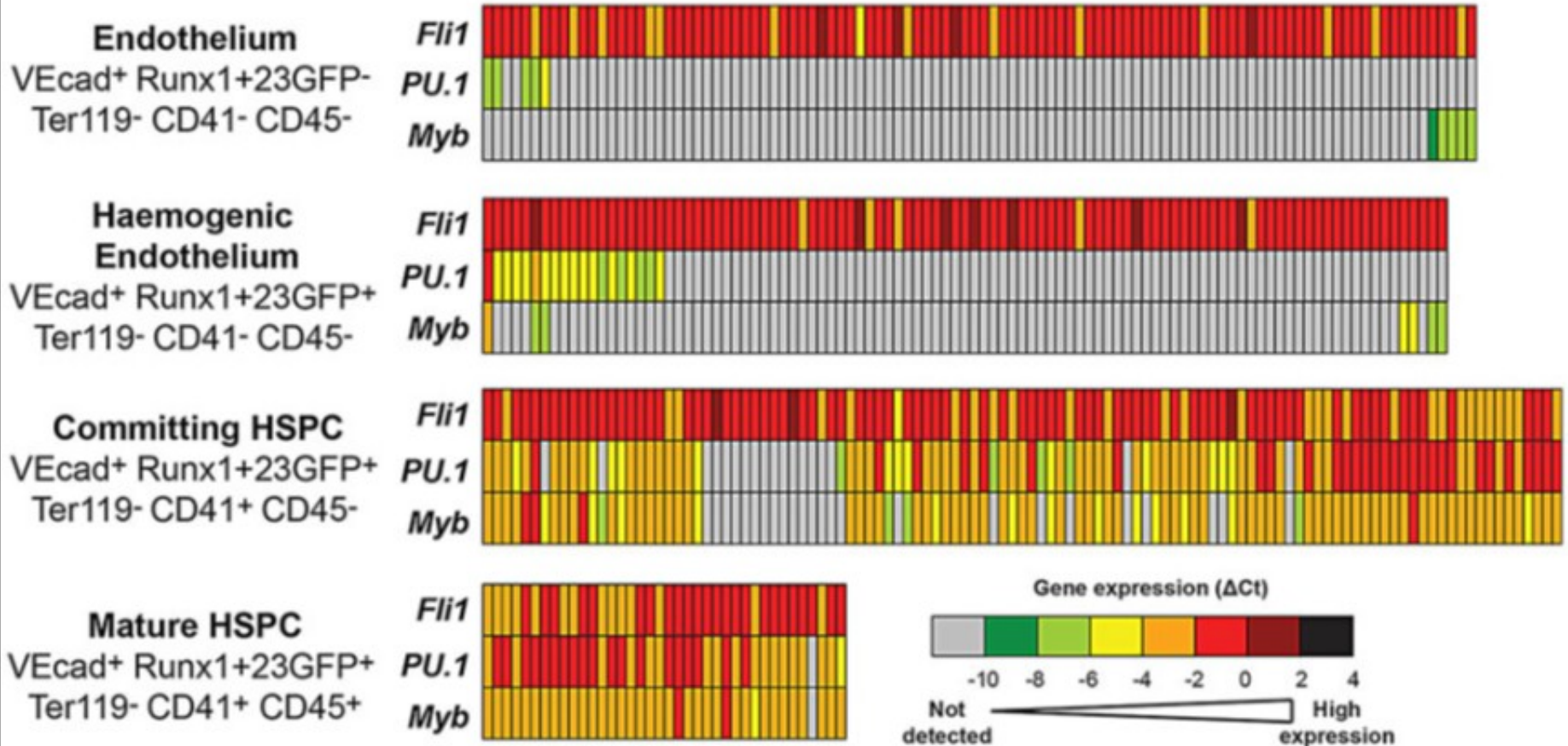
pT, pB - lymfocytární progenitory  
CFU-GM - myeloidní progenitory  
BFU-E, CFU-E - erythroidní proge



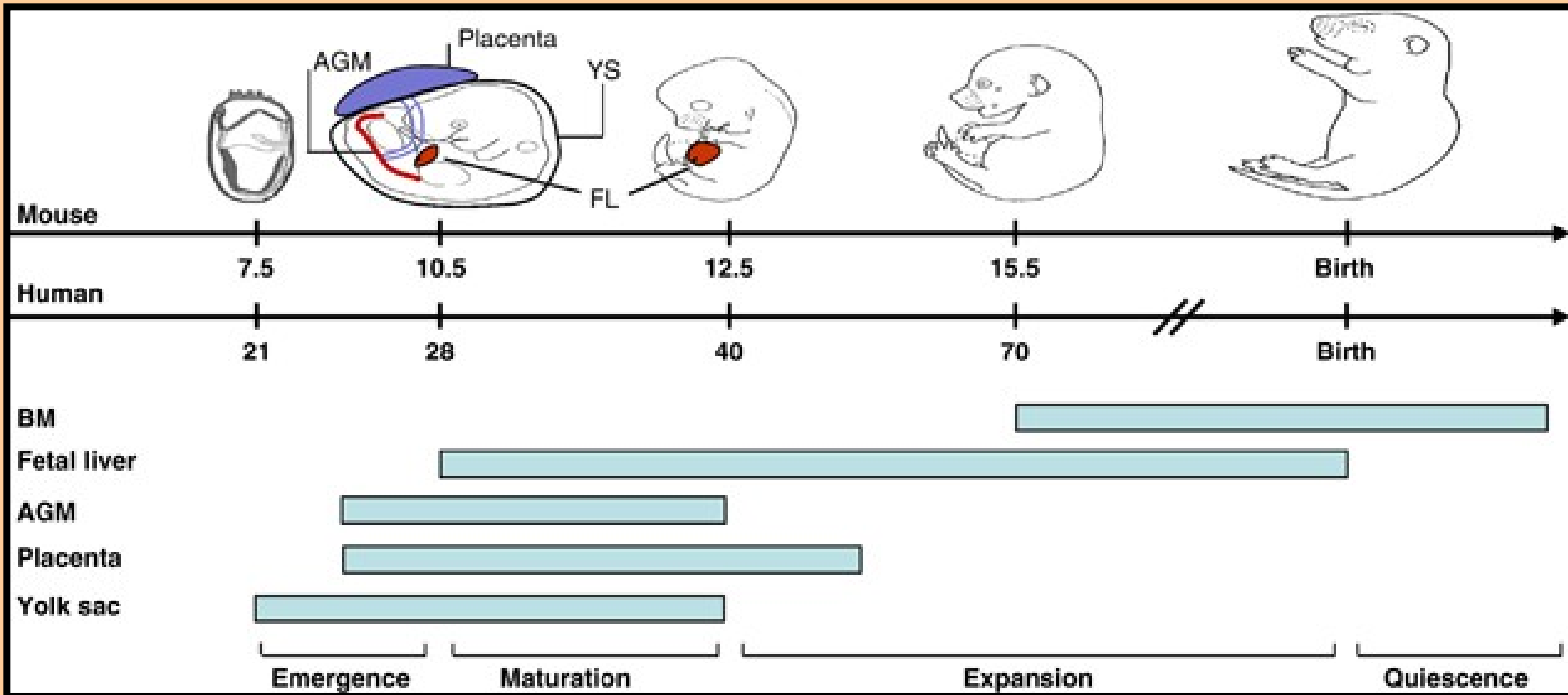


Ukázka heterogenity ve fenotypu jednotlivých buněk na základě exprese klíčových transkripčních faktorů zapojených v regulaci hematopoézy jako jsou *Fli1*, *PU.1* a *Myb*.

**A** Runx1+23GFP transgenic embryos  
E10.5 AGM/VUA region



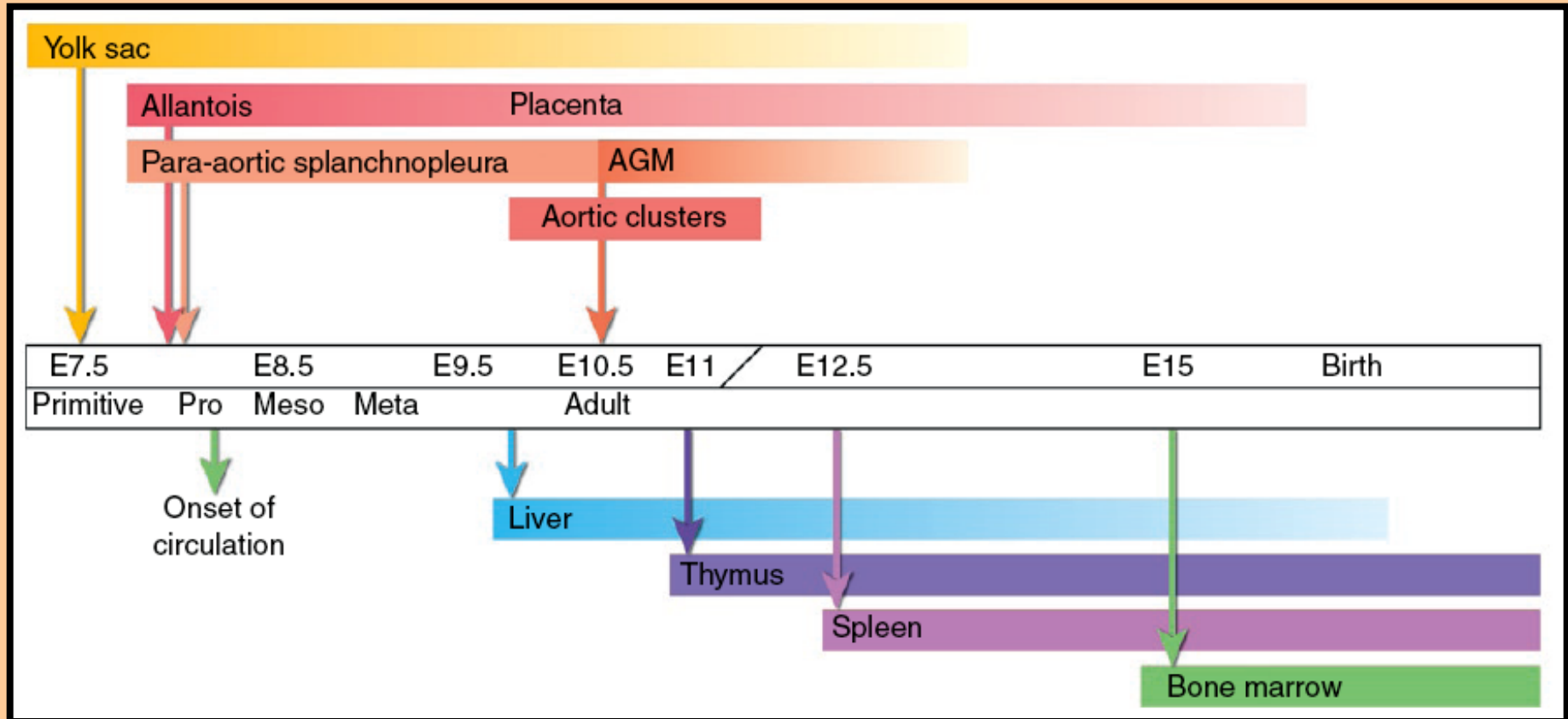
# Transkripční faktor RUNX1 a vývoj HSC



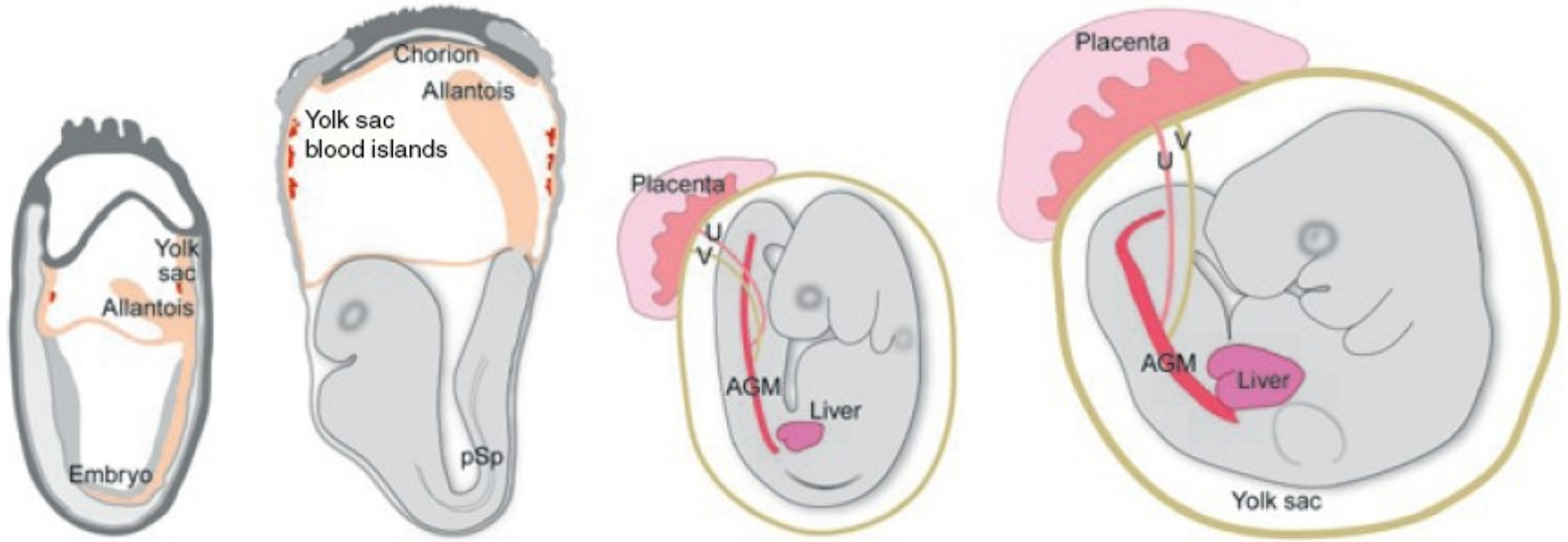
- Knockout pro RUNX1 u myši způsobuje embryonální letalitu E12,5. Embrya postrádají hematopoézu ve fetálních játrech.
- RUNX1 důležitý pro vznik HSC z hematogenního endotelia



# Embryonální hematopoéza (mouse)



# Embryonální hematopoéza (mouse)



Hemangioblast

Hemogenic endothelium

Primitive

Pro-definitive

Meso-definitive

Meta-definitive

Adult-definitive

Myeloid

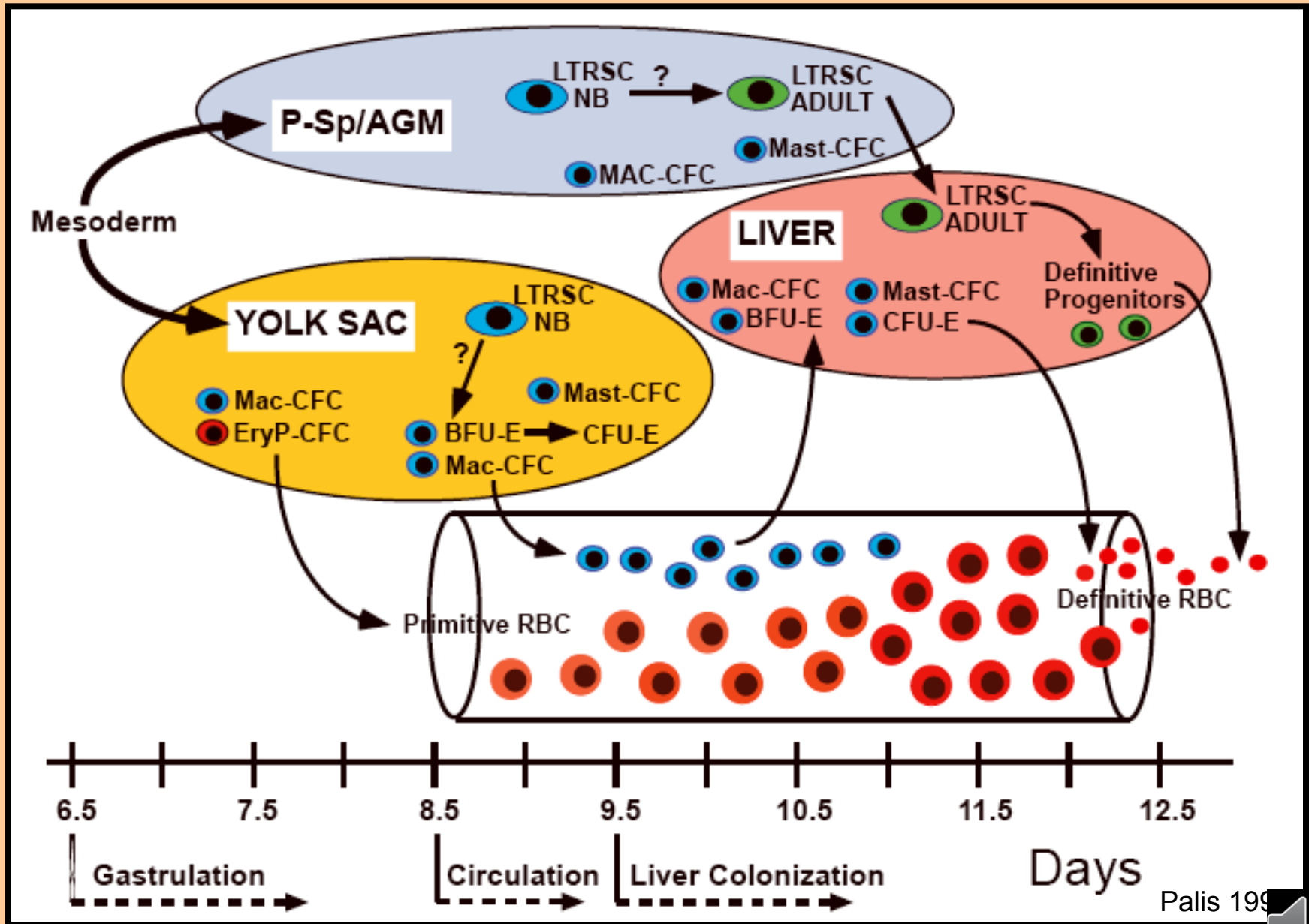
Lymphoid-myeloid

CFU-S  
Neonatal HSCs

HSCs



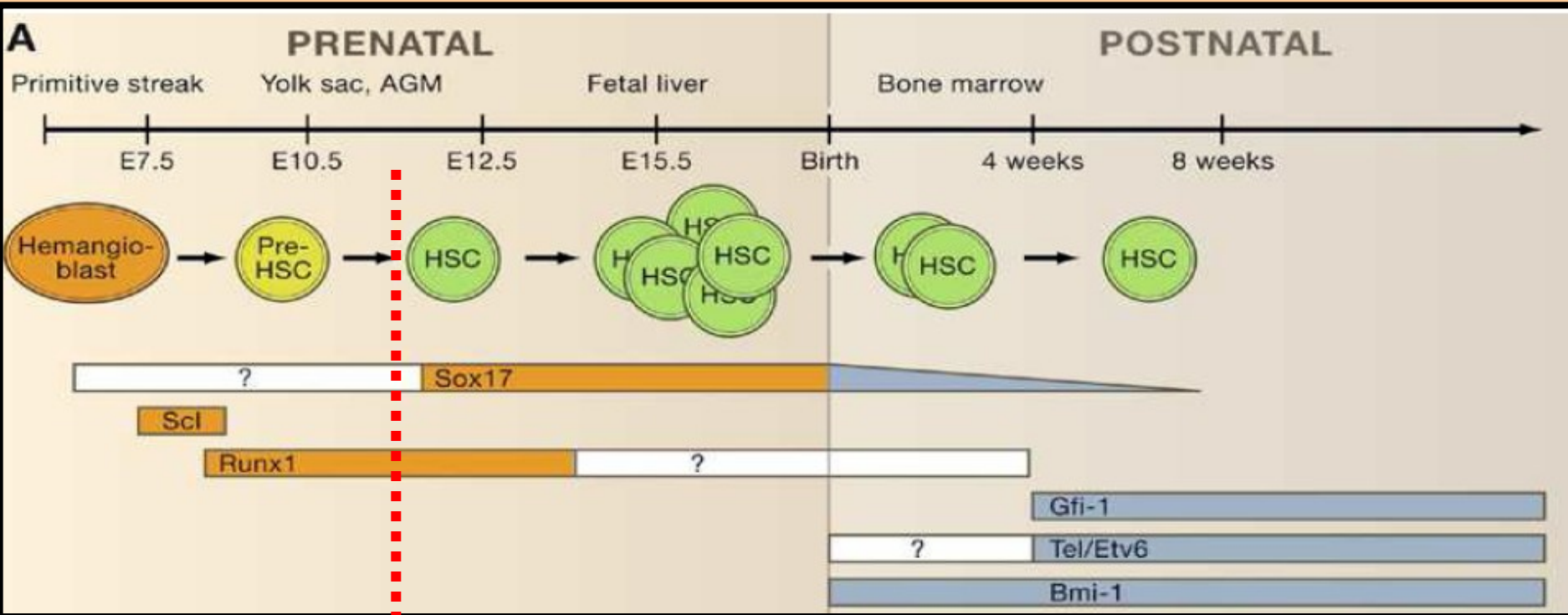
# Embryonální x adultní HSC (mouse)



# Rozdíly mezi embryonálními a adultními HSC

*Intenzivně proliferující HSC*

*pomalou proliferující / quiescentní HSC*



Obnova embryonální hematopoézy

Obnova adultní hematopoézy



	Developmental time	Site	Functional activity
Primitive	E7.5	Yolk sac <sup>a</sup>	Primitive erythroid
	E7.5–E8 (0–4sp)	Yolk sac <sup>b</sup>	Primitive erythroid
Pro-definitive	E7.5–E8 (EHF–2sp)	Allantois <sup>a</sup>	Erythroid-myeloid progenitor
	E7.5–E8 (0–7sp)	Allantois <sup>a</sup>	Erythroid-myeloid progenitor
	E8.25	Yolk sac <sup>a</sup>	Erythroid-myeloid progenitor
	E8.25	Yolk sac <sup>b</sup>	Erythroid-myeloid progenitor
	E9.5	Yolk sac <sup>b</sup>	Erythroid-myeloid progenitor
	E9.0	Placenta	Erythroid-myeloid progenitor
Meso-definitive	E7.5–E8 (0–8sp)	pSp <sup>a</sup>	Erythroid-myeloid-lymphoid progenitor
	E7.5–E8 (0–5sp)	pSp <sup>a</sup>	Multipotent low-level repopulating progenitor
Meta-definitive	E9.0	Yolk sac <sup>c</sup>	Neonatal repopulating HSC
	E9.0	AGM <sup>c</sup>	Neonatal repopulating HSC
	E9.0	Yolk sac <sup>c</sup>	CFU-S
	E9.0	AGM <sup>c,d</sup>	CFU-S
Adult-definitive	E10.5	AGM <sup>d,e</sup>	Adult repopulating HSC
	E10.5	Umbilical and vitelline vessels <sup>d</sup>	Adult repopulating HSC
	E10.5–E11	Placenta	Adult repopulating HSC



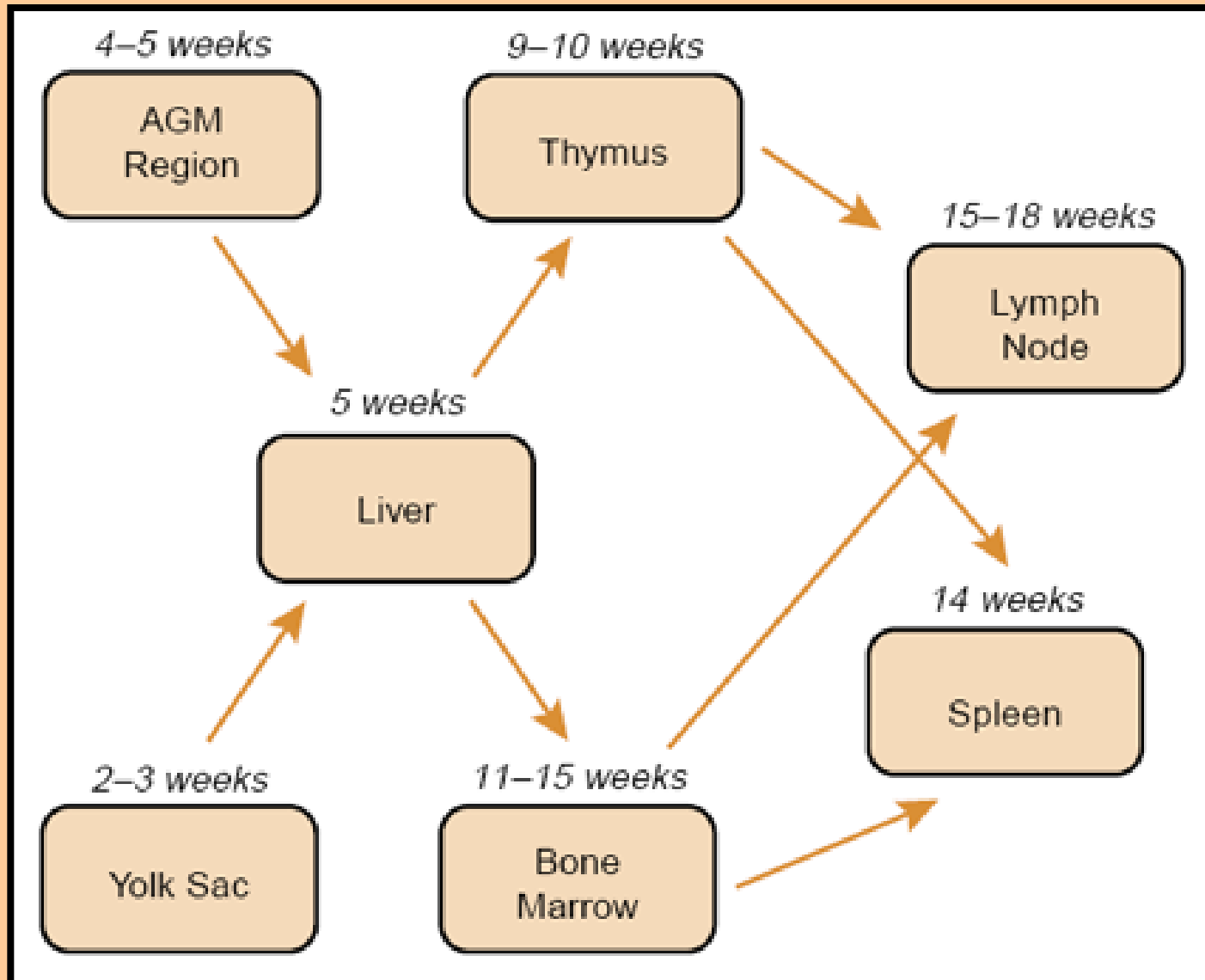
## Chronologie hematopoézy u člověka a myši

hematopoéza/ <i>lymfopoéza</i> (dny)	člověk	myš
embryonální vývoj (dny)	~270	~21
žloutkový vak	18	7.5
dorsální aorta	27	9.5
<i>thymus</i>	40	11
játra	42	11
slezina	48	13
kostní dřeň	77	15
cirkulace krevních buněk	24	8.5





# Časování cest lidských HSC



# Intenzita hematopoézy v průběhu embryogeneze u člověka

