

REPROGRAMOVÁNÍ, 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).

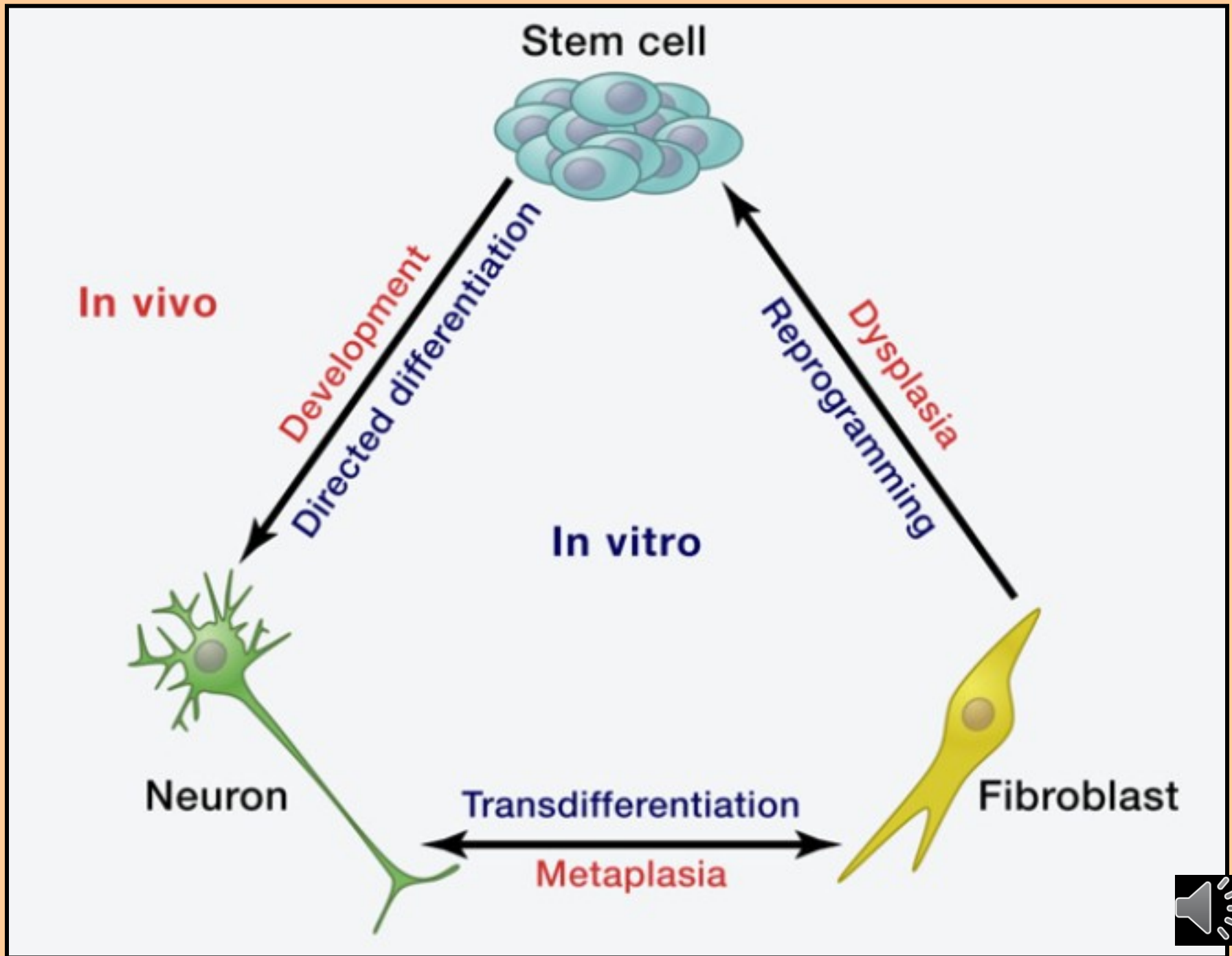
Za pozorované jevy zřejmě ale odpovídají zbytkové populace progenitorů.

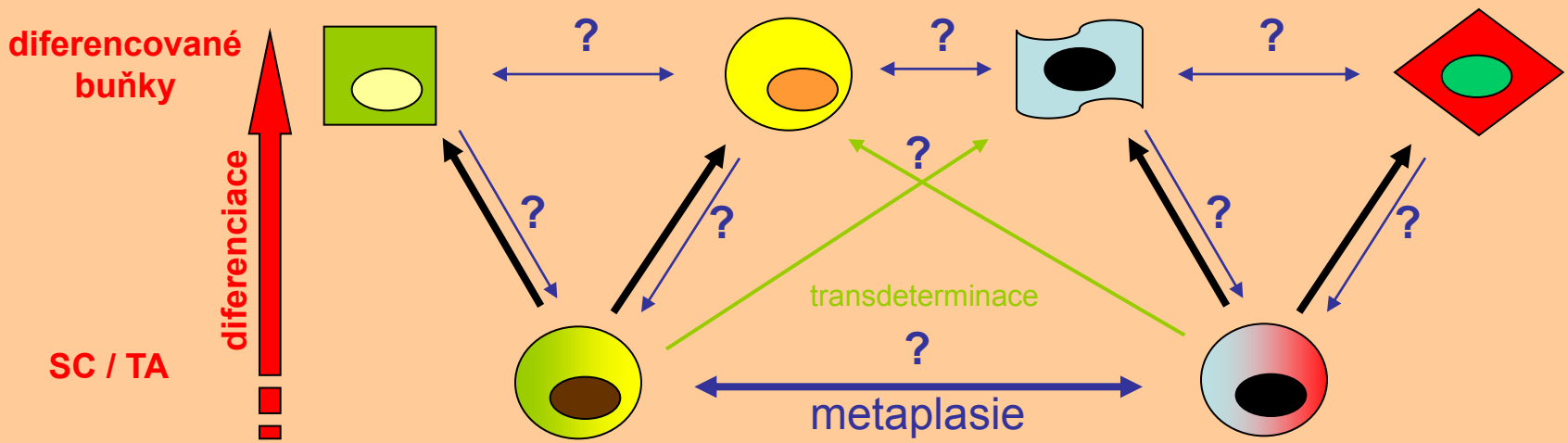
- s proliferací
- bez proliferace (silně nepravděpodobné)

Přístupy:

- Vnějšími faktory
- Exogenní expresí vhodných genů
- Přeprogramováním jádra cytoplasmou jiné buňky (sem patří i terapeutické klonování)
- 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 (cytokiny, vnější podmínky)

- původně mála 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
(Inení úplně jasné, jestli je potřeba rediferenciace!)
- uplatnitelnost *in vitro* spíše s některou z dalších metod a zejména pro zachování získaného fenotypu re- / transdeterminovaných buněk

(- v současné době obrovská progrese a většina výše uvedeného neplatí?)

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



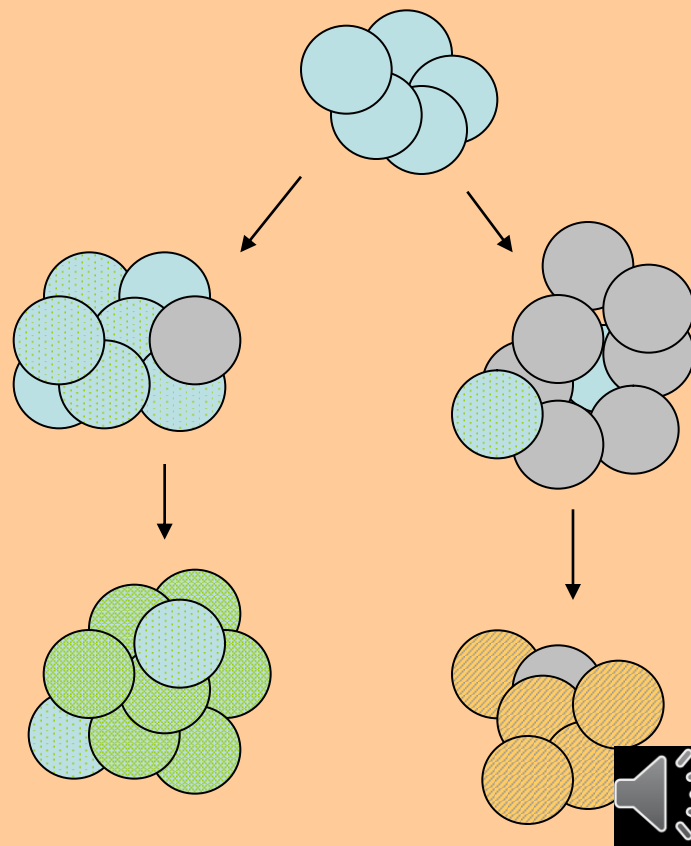
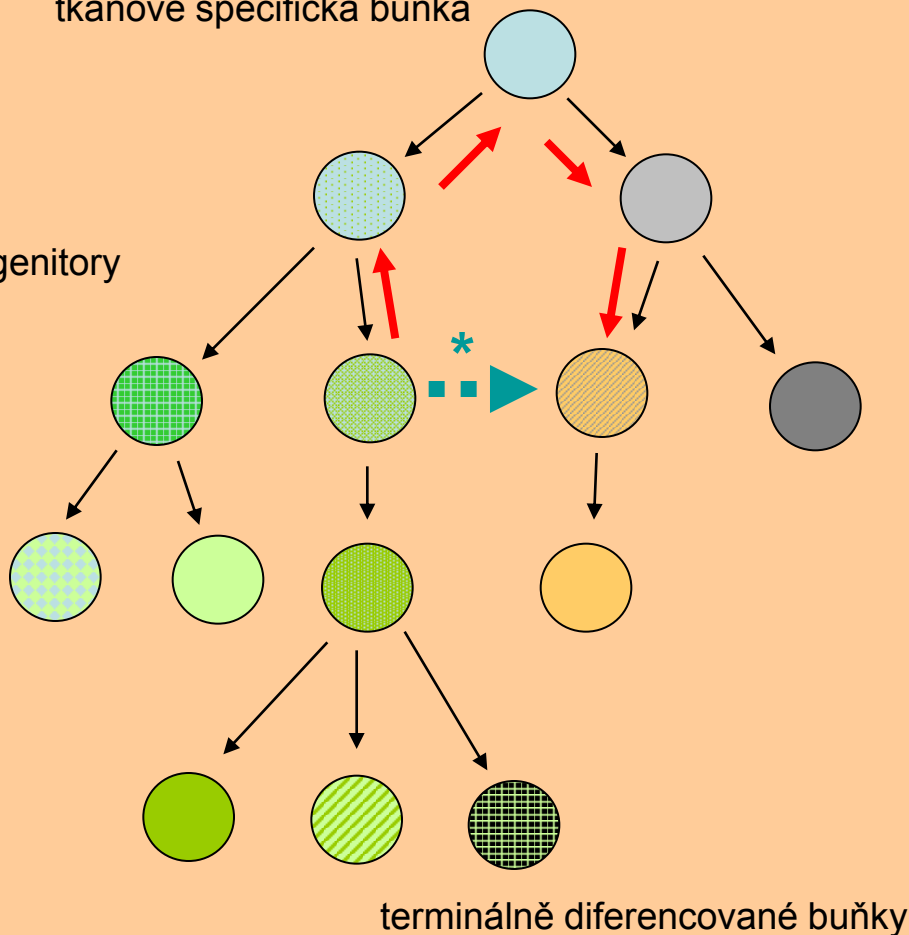
Pleopotence* x reprogramování

(změna v determinaci)

multipotentní
tkáňově specifická buňka

persistující progenitory

progenitory



B. Ektopická/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

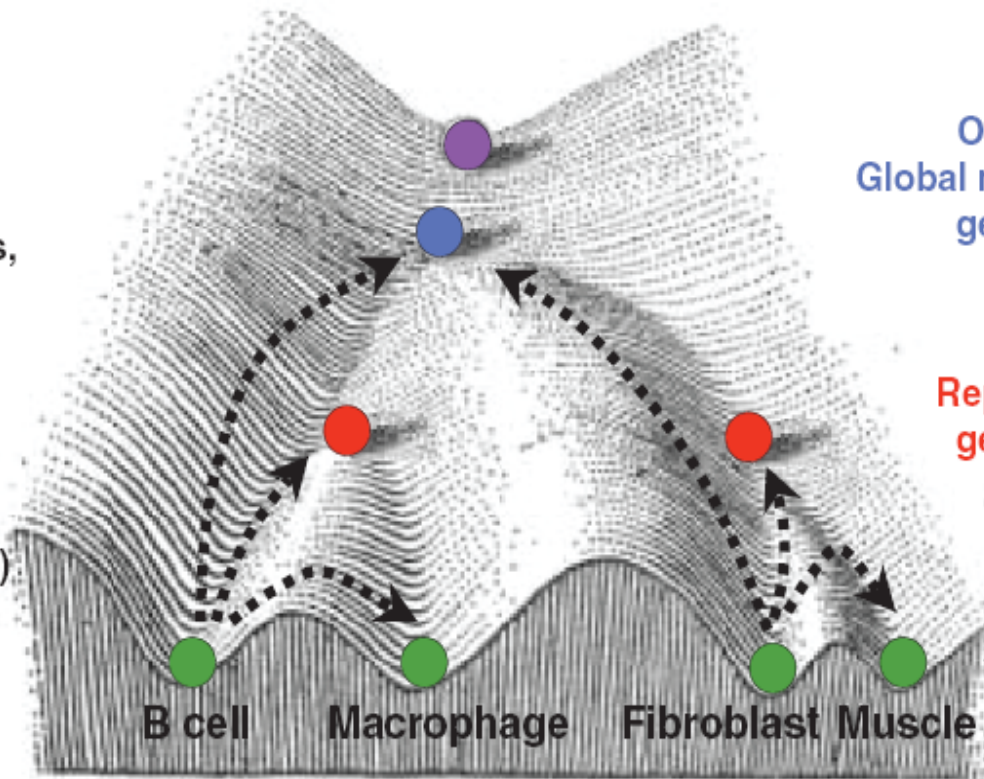
ICM/ES cells, EG cells,
EC cells, mGS cells
iPS cells

Multipotent

Adult stem cells
(partially
reprogrammed cells?)

Unipotent

Differentiated cell
types



Epigenetic status

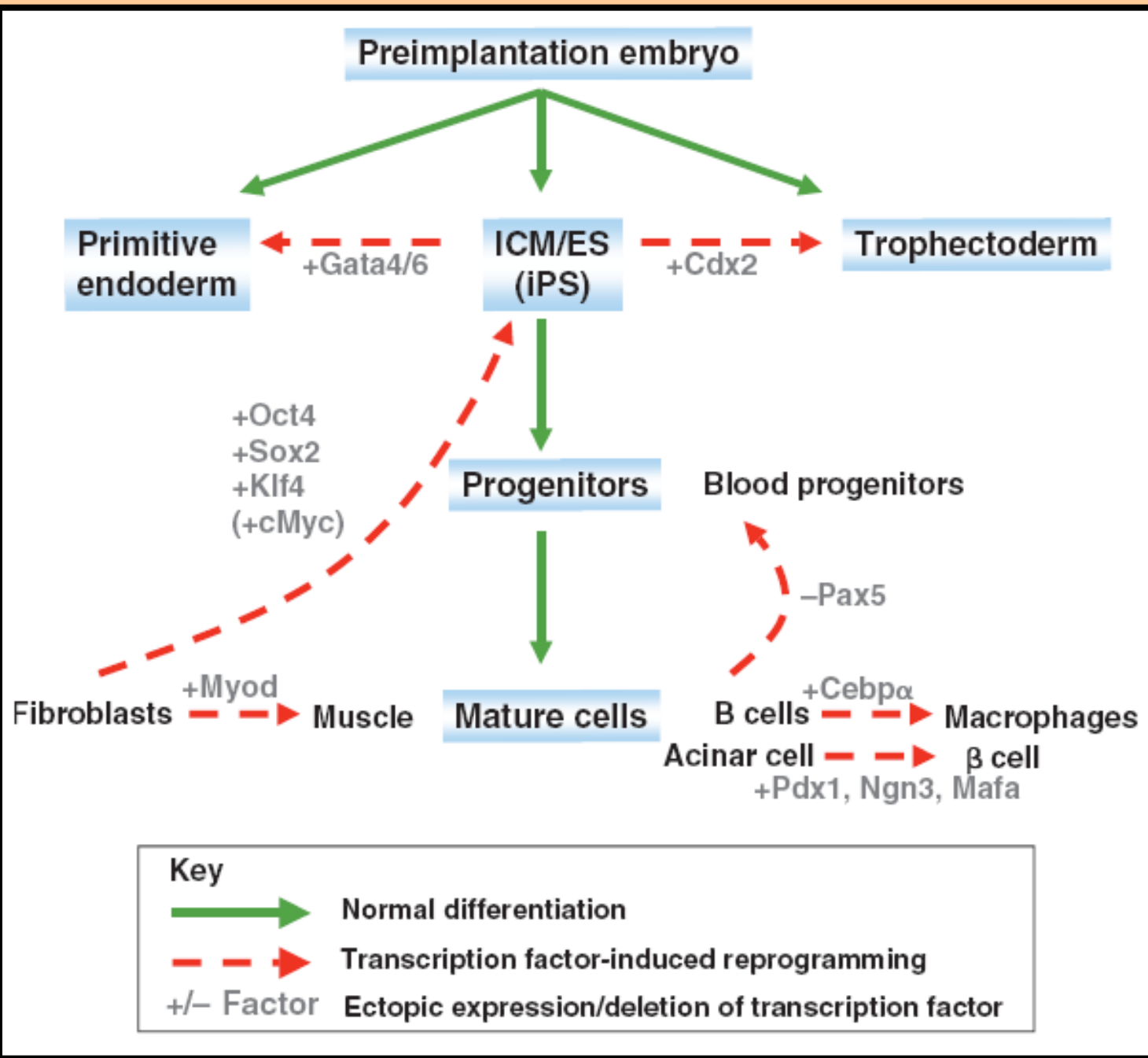
Global DNA demethylation

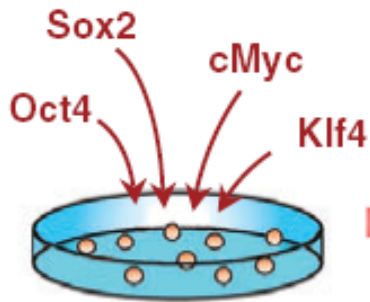
Only active X chromosomes;
Global repression of differentiation
genes by Polycomb proteins;
Promoter hypomethylation

X inactivation;
Repression of lineage-specific
genes by Polycomb proteins;
Promoter hypermethylation

X inactivation;
Derepression of
Polycomb silenced
lineage genes;
Promoter hypermethylation



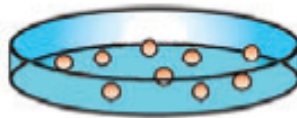




Somatic cells

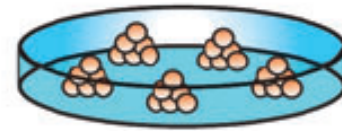
- Somatic markers silenced
- Activation of SSEA1

Intermediate cells
(transient population)



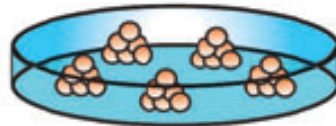
- Silencing of retroviral transgenes
- Activation of pluripotency genes
- Activation of telomerase
- Reactivation of silent X chromosome in female cells
- Teratomas and germline chimeras

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



Endogenní
transkripční faktory



daný/původní fenotyp buňky



Exogenní(ektopické)
transkripční faktory



požadovaný fenotyp buňky



Endogenně regulovaný
výsledný fenotyp buňky

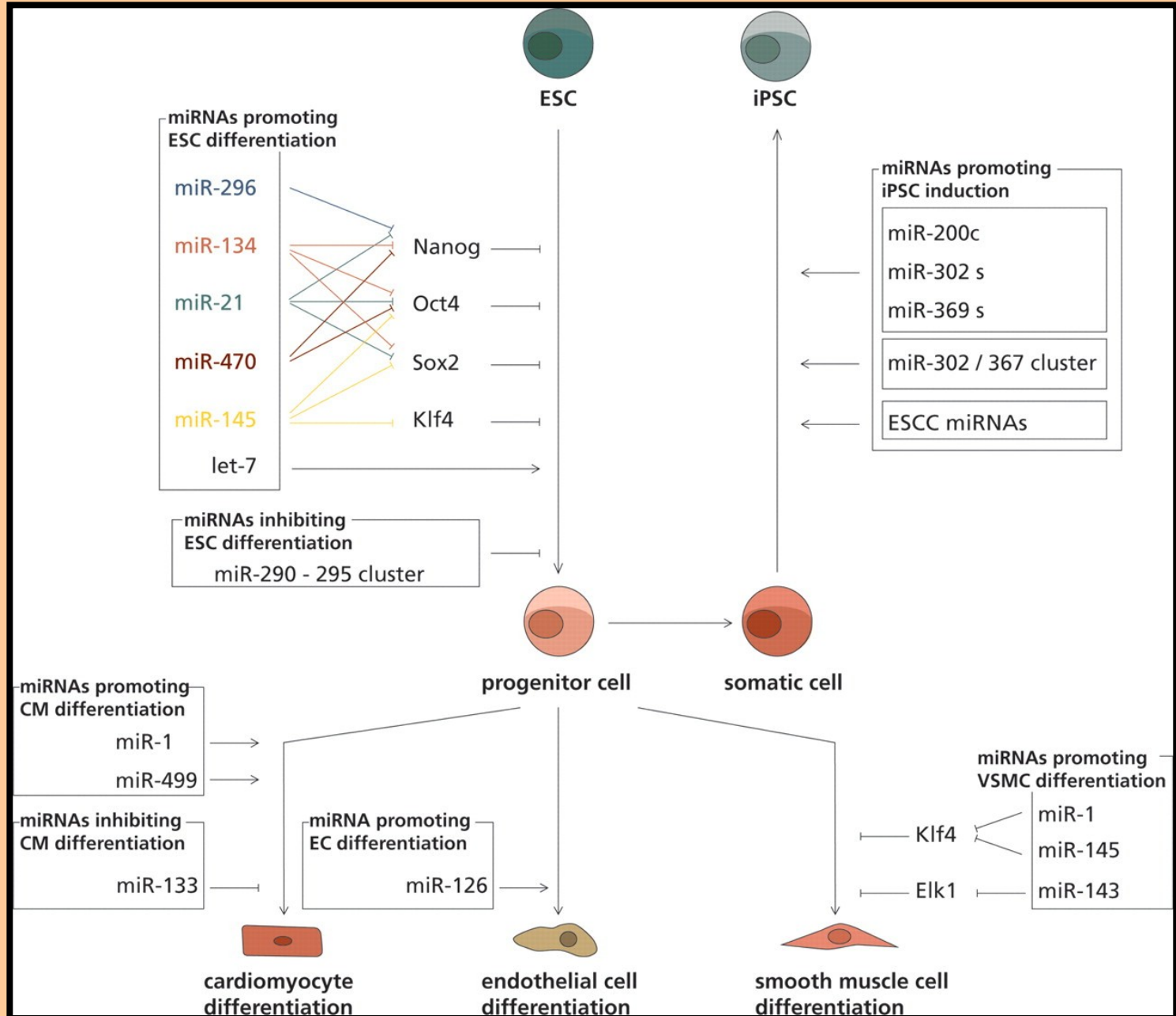
Exogenně dodané transkripční faktory nebývají dostatečně pevně fixovány v genomu

- poškození genomu (vlastní vnesení exogenní informace)

- destabilizace fenotypu, částečné reprogramování, reverze fenotypu, nežádoucí transformace



miRNA jako regulátor fenotypu buněk

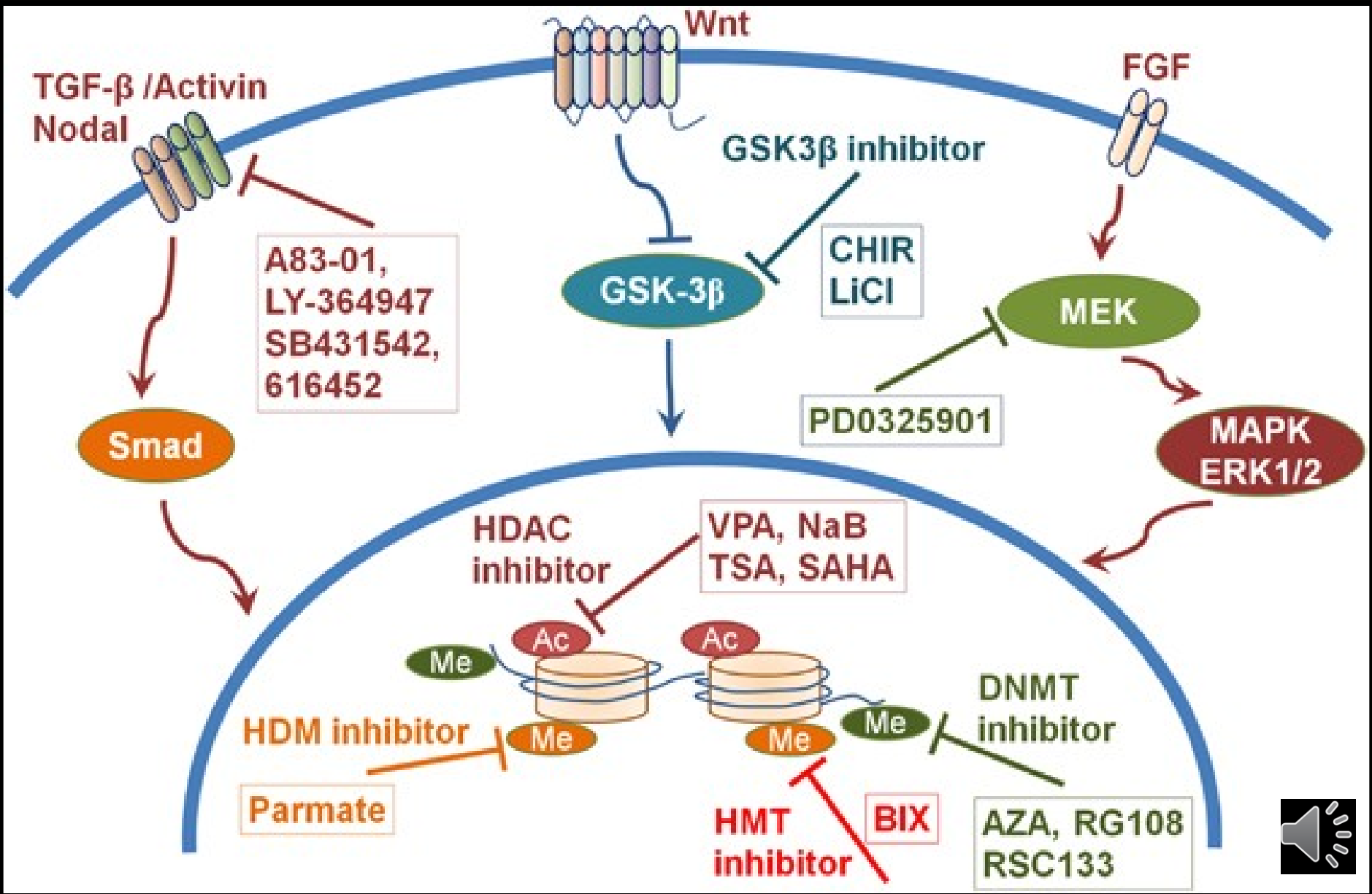


Příklady reprogramování prostřednictvím exogenní exprese příslušných genů

| Cell origin | Derived cell type | References |
|--|----------------------------|--------------------------|
| Examples of reprogramming | | |
| Fibroblasts | iPS cells | |
| Oct4, Sox2, Klf4, c-MYC | | Takahashi ¹³ |
| Oct4, Sox2 + valproic acid | | Huangfu, ⁸⁰ |
| Oct4, Sox2, c-MYC + kenpaullone | | Lyssiotis ⁸³ |
| Oct4, Klf4 + CHIR99021 (MEFs) | | Li ⁸² |
| Examples of transdifferentiation and direct reprogramming | | |
| Fibroblasts | Muscle | |
| MyoD | | Davis ³⁴ |
| Pancreatic (exocrine) | Pancreatic (beta cells) | |
| Ngn3, Pdx1, Mafa | | Zhou ⁴⁴ |
| Fibroblasts | Neurons | |
| Ascl1, Brn2, Myt1l | | Vierbuchen ²⁶ |
| Fibroblasts | Cardiomyocytes | |
| Gata4, Mef2c, Tbx5 | | Ieda ²⁷ |
| Gata4, Mef2c, Tbx5, Hand2 | | Song ⁴⁵ |
| Gata4, Mef2c, Tbx5, VEGF | | Mathison ⁴⁹ |
| Mef2c, Myocardin, and Tbx5 | | Protze ⁴⁶ |
| Fibroblasts | Cardiomyocytes | |
| Myocardin, miR-1, miR-133, GHMT | | Nam ²⁹ |
| Fibroblasts | Endothelial cells | |
| Oct4, Sox2, Klf4, c-MYC (4-day partial reprogramming) | | Margariti ⁵⁵ |
| Oct4, Sox2, Klf4, c-MYC (Short reprogramming) | | Li ⁶² |
| Amniotic | Endothelial cells | |
| ETV2, FLII, ERG1 | | Ginsberg ⁶⁴ |



Reprogramování prostřednictvím malých molekul, chemických inhibitorů



Reprogramování prostřednictvím malých molekul, chemických inhibitorů

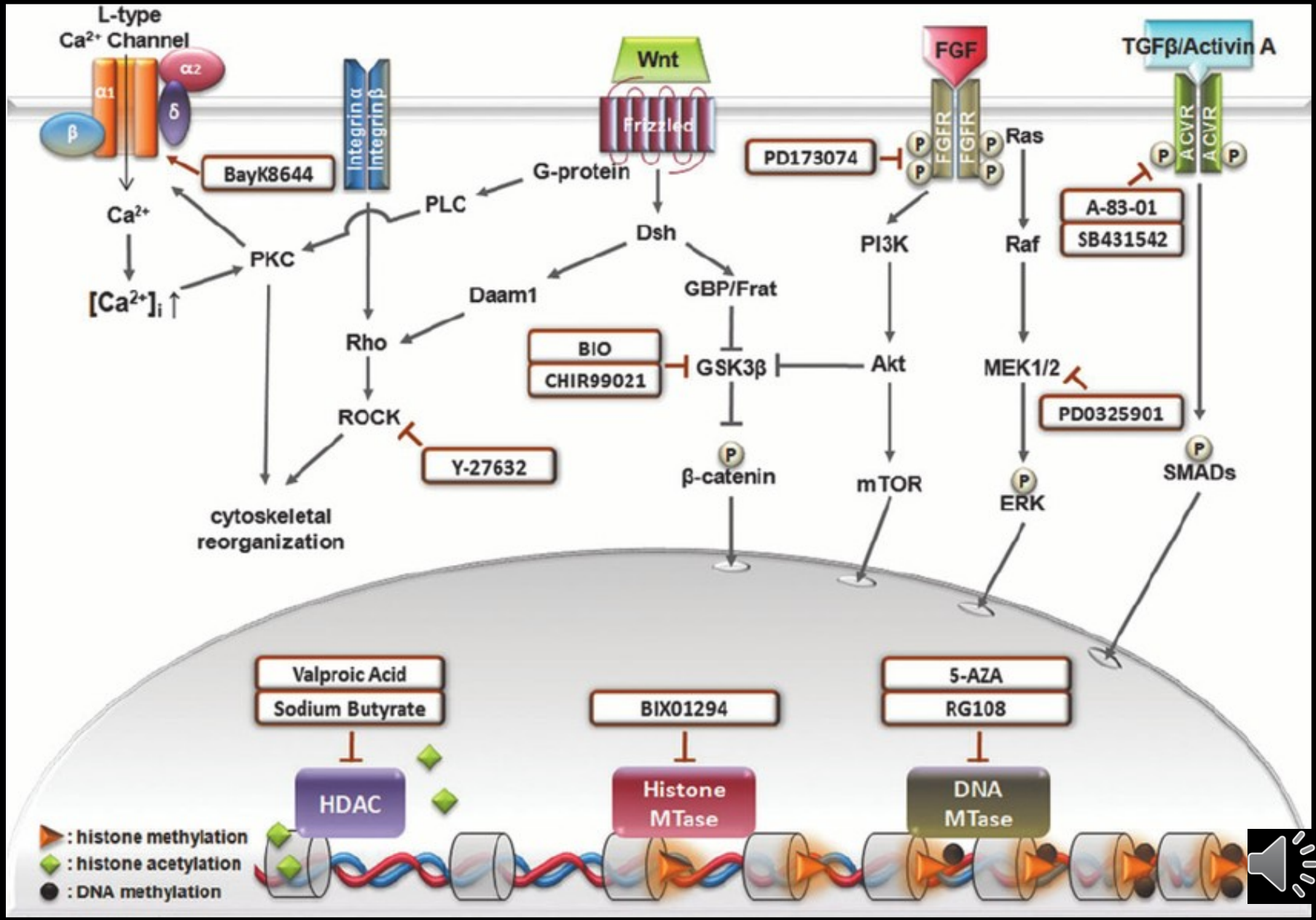
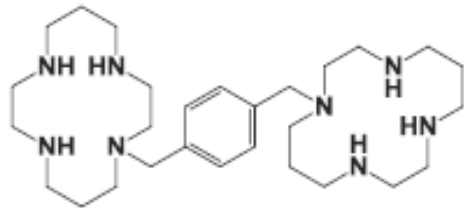


TABLE 2: Small molecule compounds that might replace Yamanaka factors.

| Replacement for TF | Name concentration | Concentration | Host cell species | Function or target | Reference |
|--|---------------------------|------------------|-------------------|---|--------------------------------|
| Oct4, Nanog | SAHA-PIP delta | 100 nM | Mouse | <i>Histone deacetylase inhibitor</i> | Pandian et al. (2014) [65] |
| Sox2 (with BIX) or Oct4 | RG108 | 0.04–500 μ M | Mouse | DMNT inhibitor | Shi et al. (2008) [32, 33, 72] |
| Oct4 | BIX | 0.5–2 μ M | Mouse | G9a HMTase inhibitor | Shi et al. (2008) [32, 33, 72] |
| Sox2 | CHIR | 3–10 μ M | Mouse, human | GSK-3 β inhibitor that activates Wnt signalling pathway | Li et al. (2011) [73] |
| Klf4 | Kenpaullone | 5 μ M | Mouse | GSK-3/CDKs inhibitor | Lyssiotis et al. (2009) [42] |
| Sox2 | 616452 (E-616452, Repsox) | 1 μ M | Mouse, human | TGF- β inhibitor (ALK inhibitor II) | Ichida et al. (2009) [63] |
| Sox2 | LY-364947 | 1 μ M | Mouse | TGF- β inhibitor | Staerk et al. (2011) [74] |
| Sox2, Klf4 (with A-83-01) | AMI-5 | 5 μ M | Mouse | Protein arginine methyltransferase inhibitor | Yuan et al. (2011) [64] |
| Sox2 | Dasatinib | 0.5 μ M | Mouse | Src family tyrosine kinase inhibitor | Staerk et al. (2011) [74] |
| Sox2 | iPYrazine (iPY) | 10 μ M | Mouse | Src family tyrosine kinase inhibitor | Staerk et al. (2011) [74] |
| Sox2 | PPI | 10 μ M | Mouse | Src family tyrosine kinase inhibitor | Staerk et al. (2011) [74] |
| Oct 4 with FSK and 2-Me-5HT | D4476 | 5 μ M | Mouse | CKI inhibitor | Hou et al. (2013) [27] |
| Sox2 | BayK | 2 μ M | Mouse | An L-channel calcium agonist | Shi et al. (2008) [32, 33, 72] |
| Oct4, when used with 2-Me-5HT, and D4476 | FSK | 10–50 μ M | Mouse | cAMP agonist | Hou et al. (2013) [27] |
| Oct4 with FSK and D4476 | 2-Me-5HT | 5 μ M | Mouse | 5-HT3 agonist | Hou et al. (2013) [27] |
| Sox2, Klf4, and C-Myc | Oxysterol | 0.5–1 μ M | Mouse | Sonic hedgehog signaling | Moon et al. (2011) [75] |
| Sox2, Klf4, and C-Myc | Purmorphamine | 0.5–1 μ M | Mouse | Sonic hedgehog signaling | Moon et al. (2011) [75] |
| Sox2, Klf4, and C-Myc | Shh | 500 ng/mL | Mouse | Sonic hedgehog signaling | Moon et al. (2011) [75] |

Note: small molecules can substitute for certain TFs and/or improve reprogramming efficiency by epigenetic modifications or signaling pathway regulation. BayK, Bay K8644; BIX, BIX-01294; CHIR, CHIR99021; CKI, casein kinase I; DNMT, DNA methyltransferase; DNP, 2,4-dinitrophenol; DZNep, 3-deazaneplanocin; FSK, forskolin; HDAC, histone deacetylase; G9a HMTase, G9a histone methyltransferase; IP3K, inositol triphosphate 3-kinase; PDK1, phosphoinositide dependent kinase 1; SAHA, suberoylanilide hydroxamic acid; TF, transcription factor; TSA, trichostatin A; VPA, valproic acid; 2-Me-5HT, 2-methyl-5-hydroxytryptamine; 5-aza-CR, AZA, 5-azacytidine; 8-Br-cAMP, 8-bromoadenosine cyclic monophosphate.

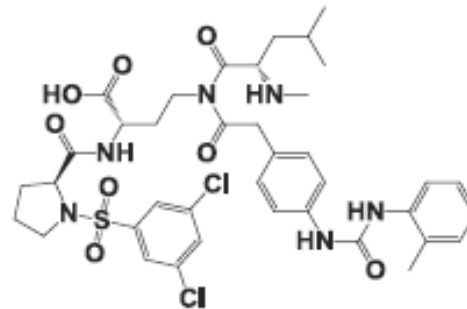




AMD3100

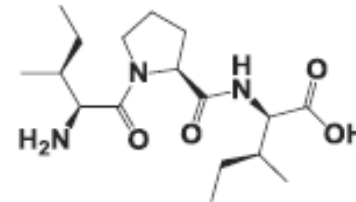
CXCR4 inhibitor

Mobilize HSCs into the peripheral circulation



BIO5192

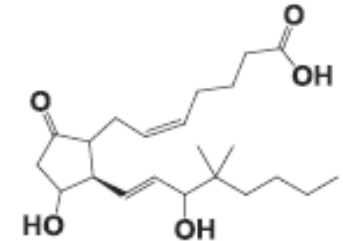
VLA-4 inhibitor



Diprotin A

DPP4 inhibitor

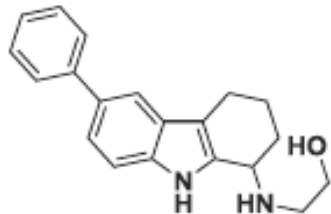
**Enhances HSPC homing
and self-renewal**



dmPGE2

Stable PGE2 analog

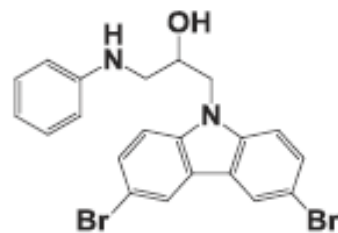
**Enhances HSC engraftment
*in vivo***



CASIN

Cdc42 inhibitor

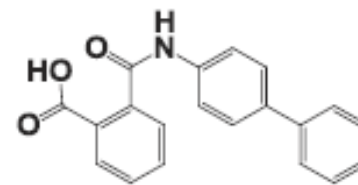
**Rejuvenates aged HSC
functions**



P7C3

Target unknown

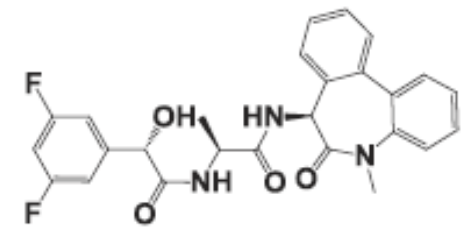
**Enhances neurogenesis
*in vivo***



Kartogenin

Blocking Filamin A/CBF β interaction

Induces chondrogenesis



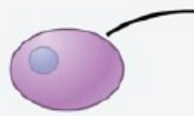
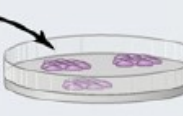




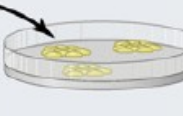



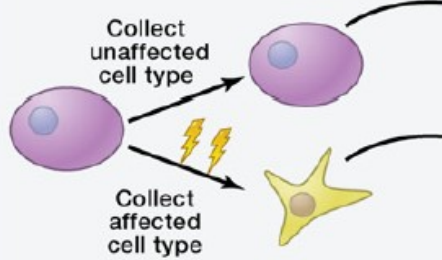
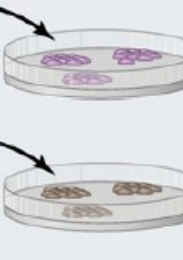



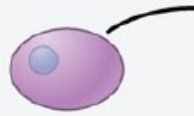
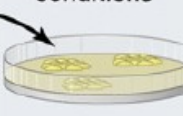



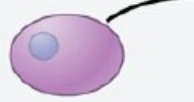
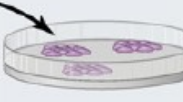




LY411575

γ -secretase inhibitor

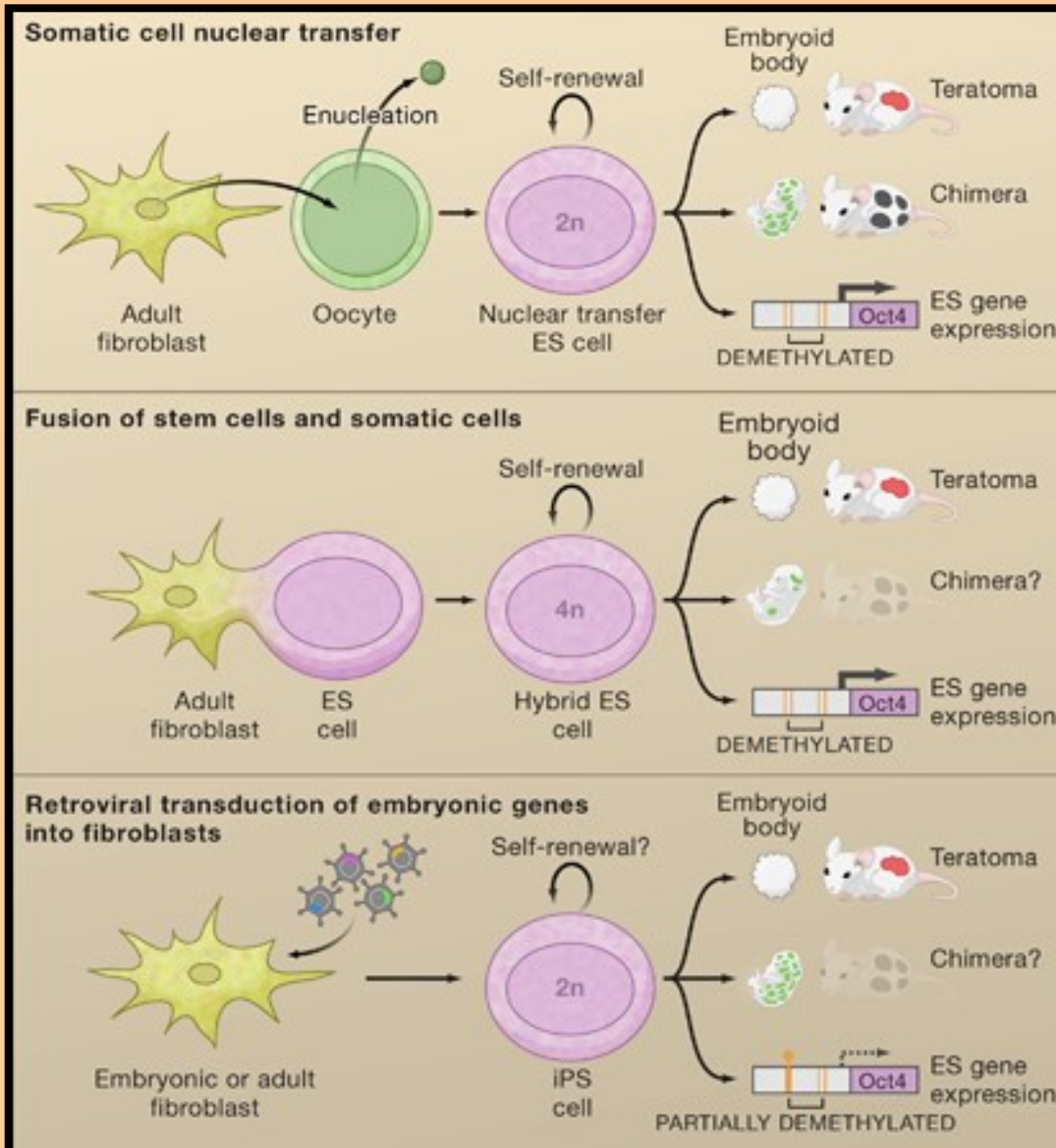
**Induces supporting cells
into hair cells**



Využití iPSC pro studium nemocí atd.

| Patient-specific disease models | Donor's cell | Uniform environmental conditions | Reset epigenome | iPS cells predisposed to disease? | Directed differentiation to target cell type | Useful disease-specific phenotype for modeling? |
|-------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| Healthy control |  |  |  |  |  | Control |
| Genetic disease |  |  |  |  |  | Yes |
| Environmental or epigenetic disease |  |  |  |  |  | No |
| Induced-disease models |  |  |  |  |  | Yes |
| Epigenetic, any donor |  |  |  |  |  |  |

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

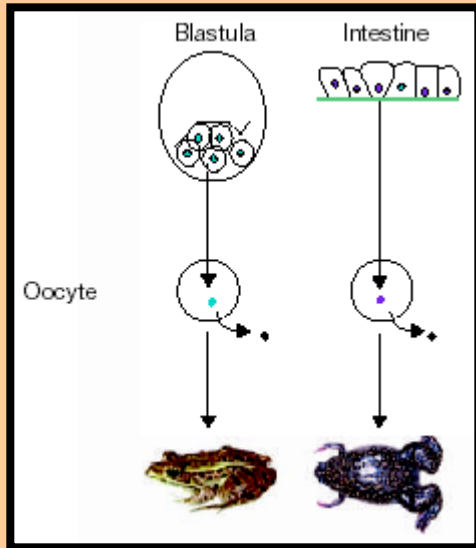
buněčná fúze – spojení cytoplasmy a jader dvou buněk za vzniku buňky jedině

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

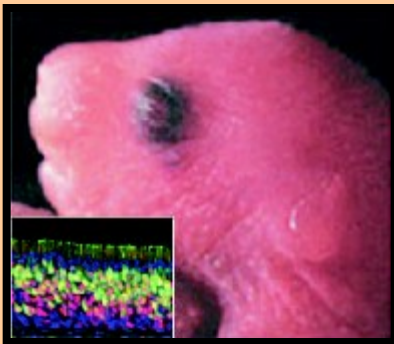
hybridní buňka – vznikne když heterokaryon projde mitózou za vzniku buňky s jedním jádrem ale s více jak 2n DNA (nemusí obsahovat kompletní jadernou DNA původních buněk)



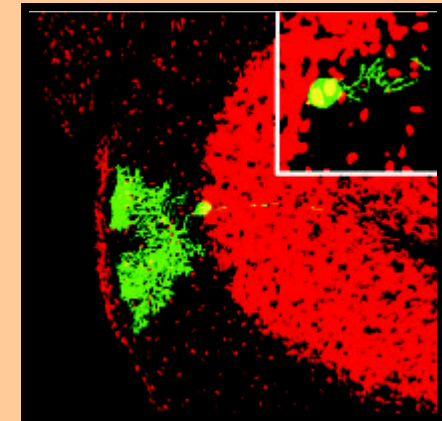
Úplné reprogramování terminálně diferencované buňky cytoplasmou oocyty u žab (ale i savci).



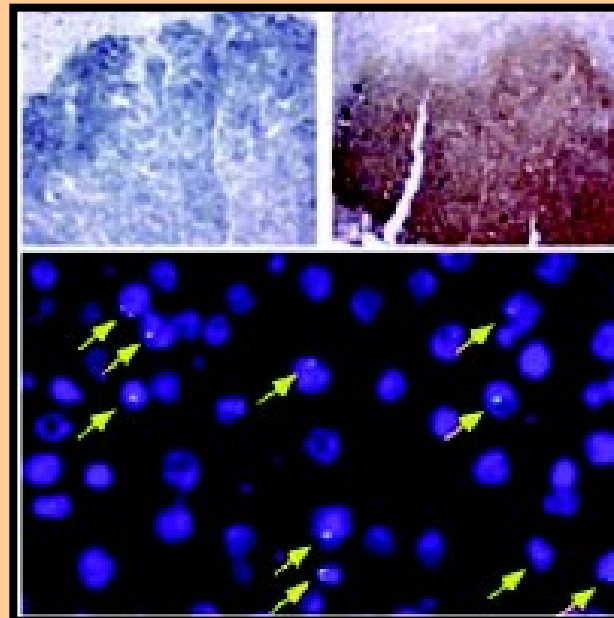
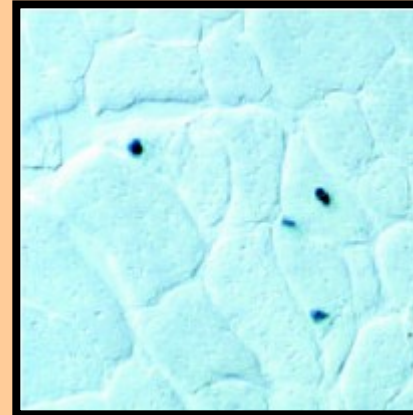
Myš klonovaná z jádra čichového nervu



Heterokaryon Purkiňova neuronu v mozečku a GFP⁺-BMSSC



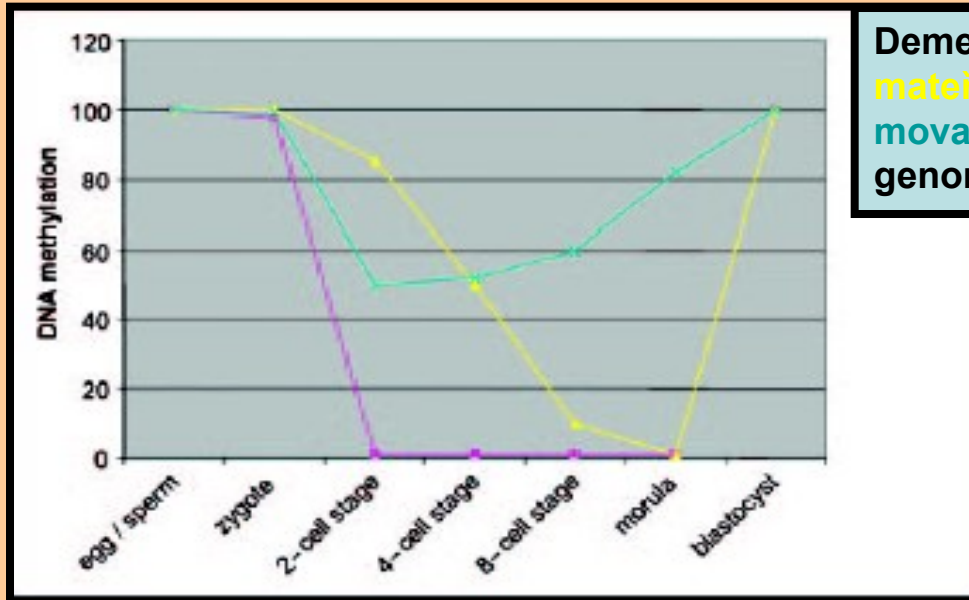
BMSSCs exprimující β -galaktosidázu pod kontrolou svalově specifického promotoru



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



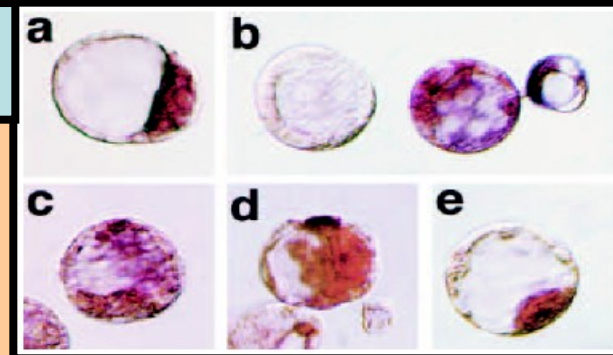
Reprogramování jádra, metylace DNA a chyby v embryogenezi



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

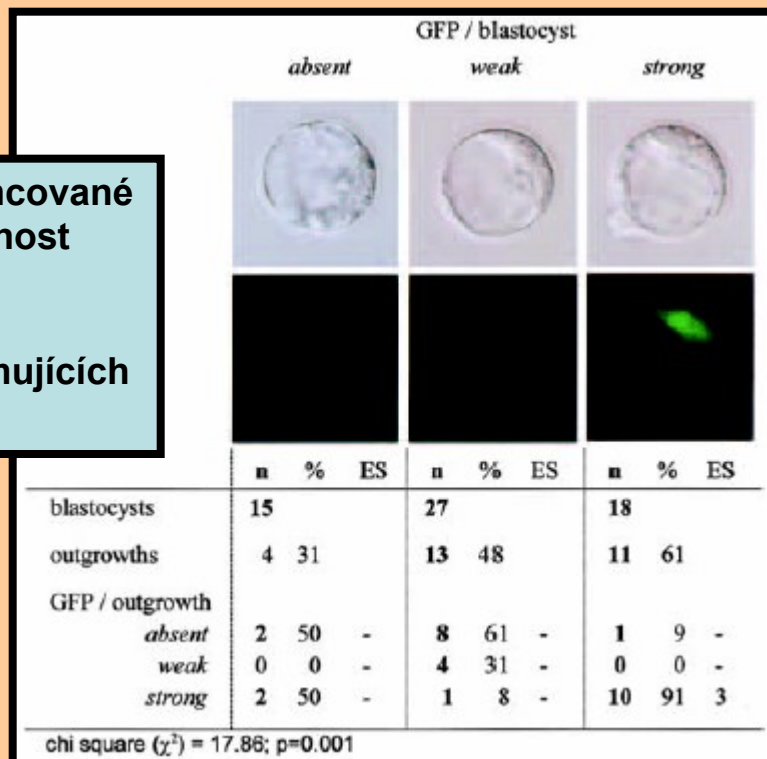
| Blastocyst type | n | Oct4 mRNA n (%) | | |
|--------------------|-----------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
| | | ICM restricted | ICM and TE | not detected |
| Cumulus cell clone | 53 ^d | 18 (34.0) ^a | 29 (54.7) ^a | 6 (11.3) ^a |
| IVF | 30 | 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.

