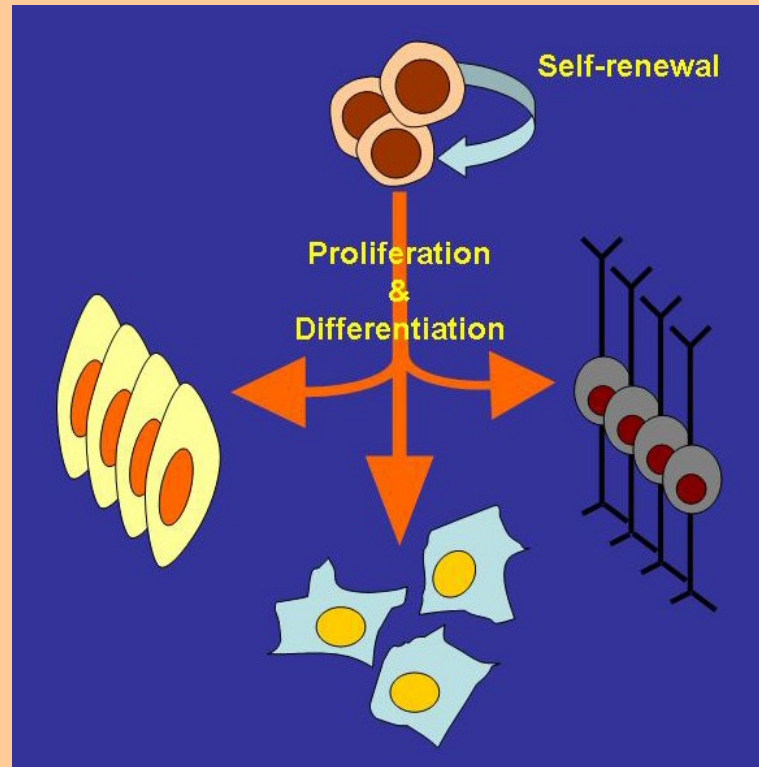


Biologie kmenových buněk



Jiří Pacherník

E-mail: 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)

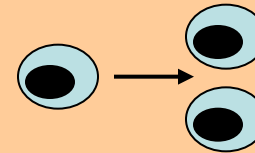
⇒ kmenovost (stemness)

(U mnohobuněčných organismů absolutně klíčové pro zachování homeostáze na buněčné a tkáňové úrovni)

Dělení buněk a jejich sebeobnova

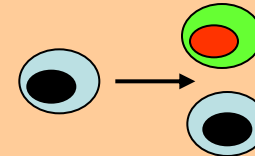
Sebeobnovující dělení (proliferační)

Symetricky – vznikají dvě identické buňky



sebeobnova

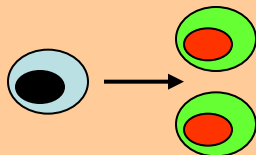
Asymetricky – jedna si zachovává původní fenotyp, druhá je již jiná



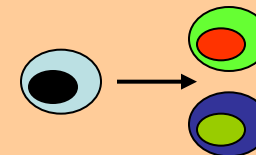
Diferenciační dělení

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

diferenciační dělení symetrické

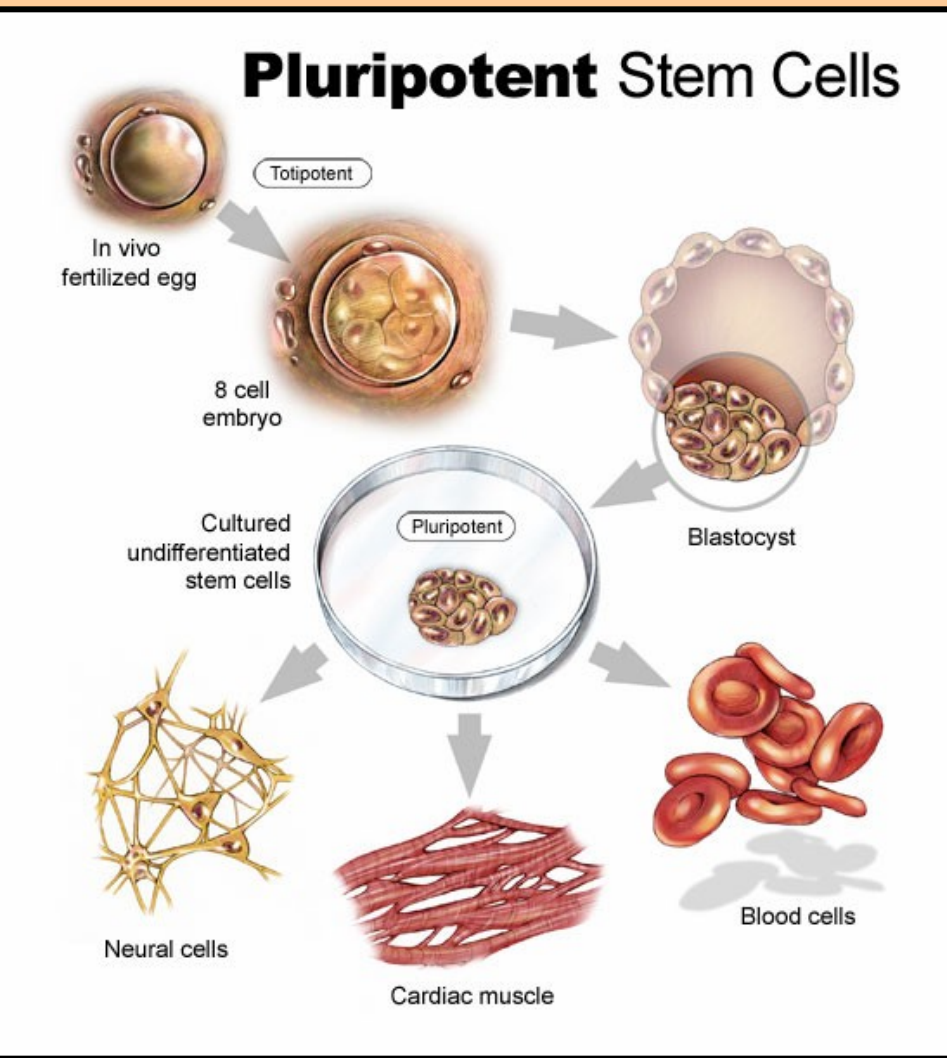


diferenciační dělení asymetrické

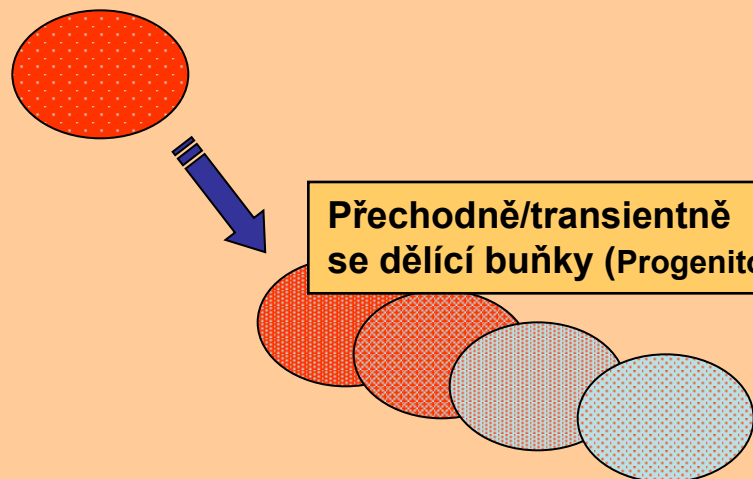


Diferenciace (rozdružování) buněk

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

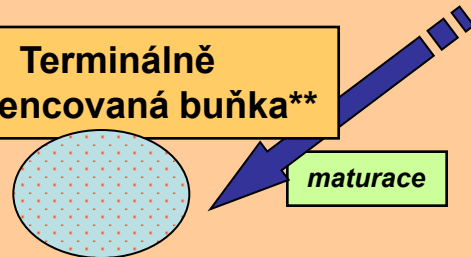


**Kmenová buňka
aktuální <-> potencionální**



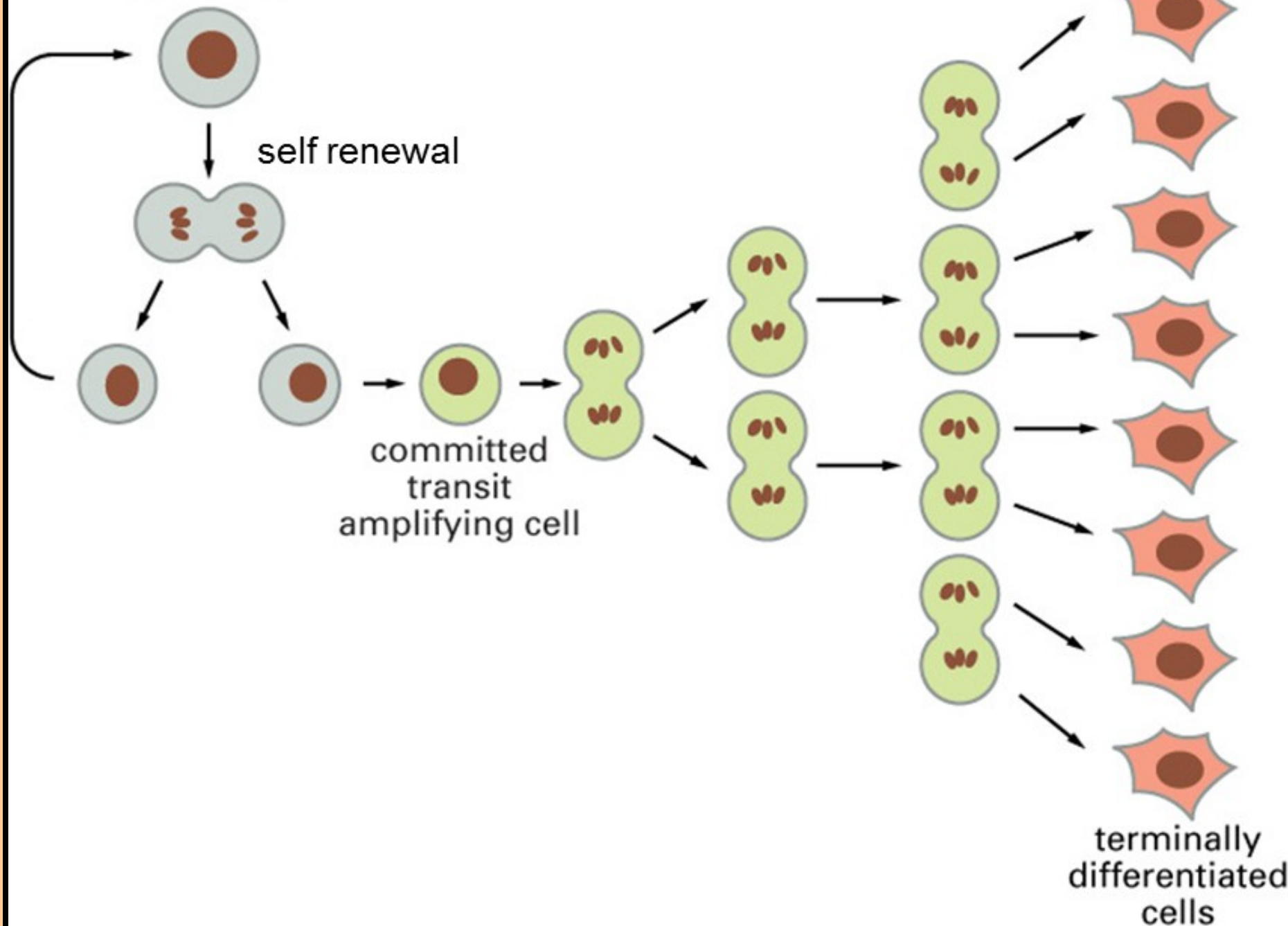
* Často proliferují a mají schopnost krátkodobé sebeobnovy.

**Terminálně
diferencovaná buňka****



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

stem cell



self renewal

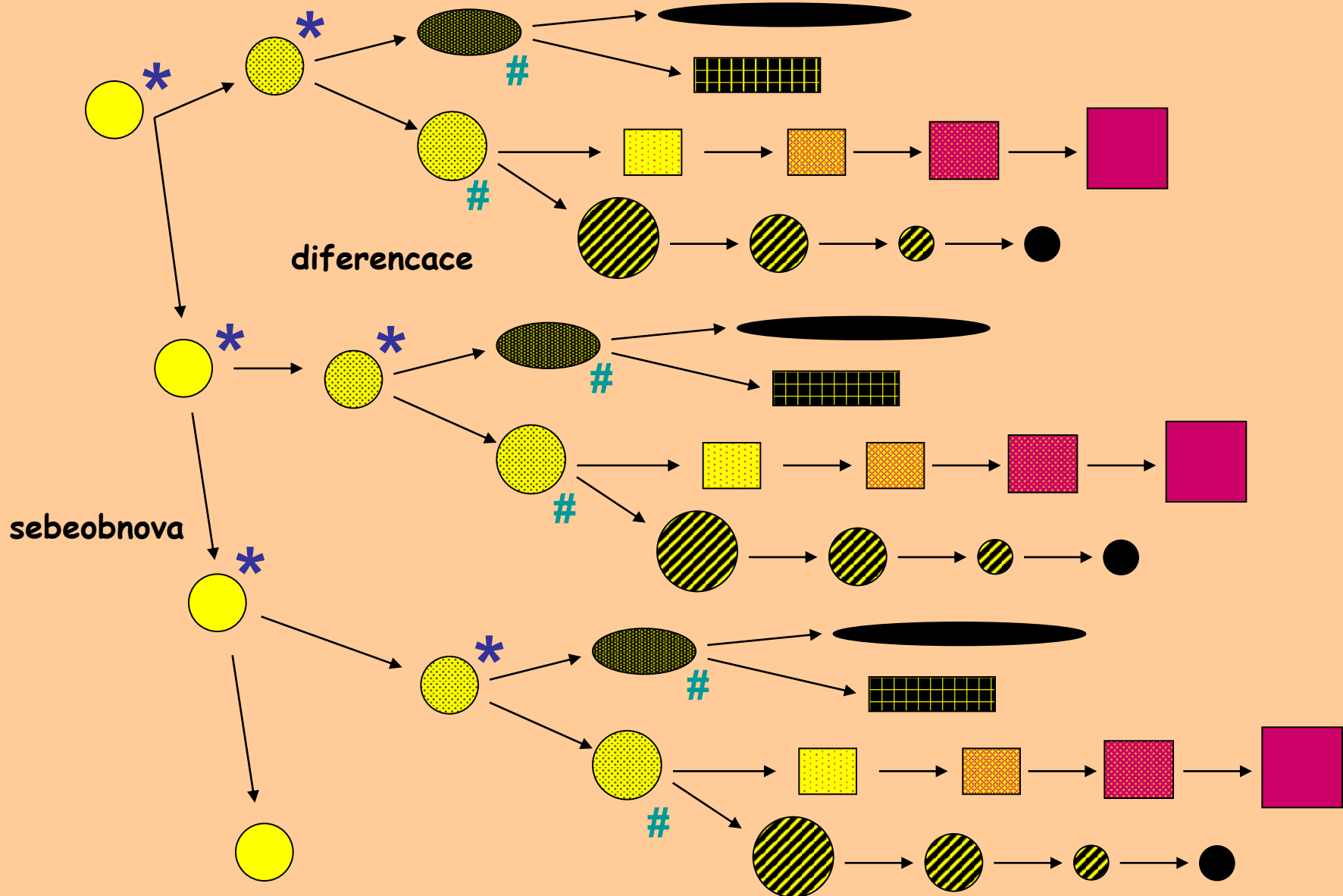
committed
transit
amplifying cell

terminally
differentiated
cells

Diferenciace buněk

* sebeobnovující asymetrické dělení

diferenciační asymetrické dělení



Diferenciace a fenotyp buněk

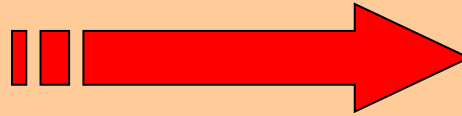
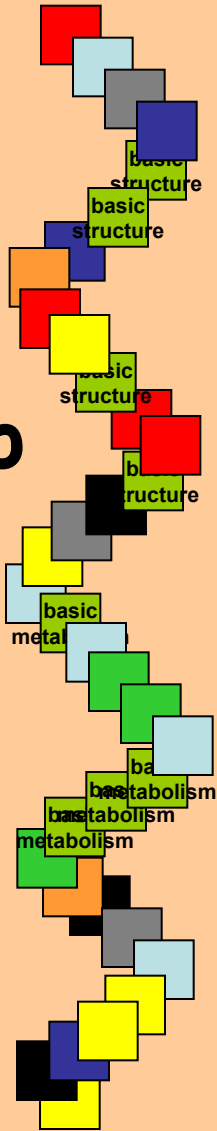
přestavba genomu / chromatinu → exprese jiného paternu genů → jiná morfologie, jiné funkce a potenciál

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

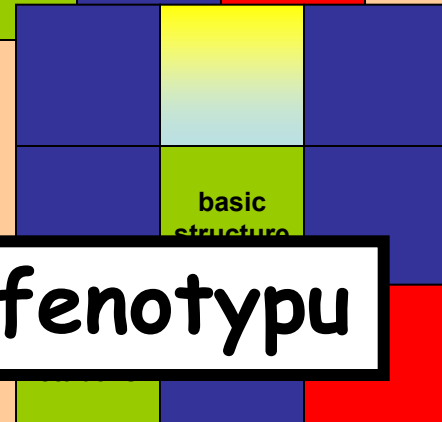
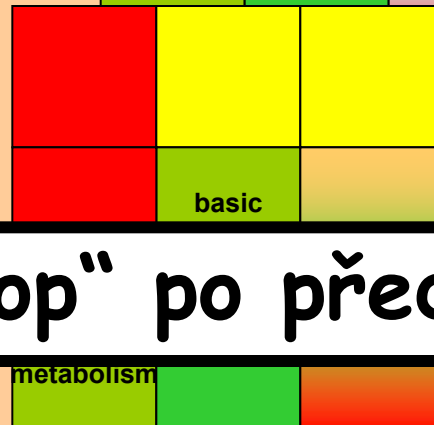
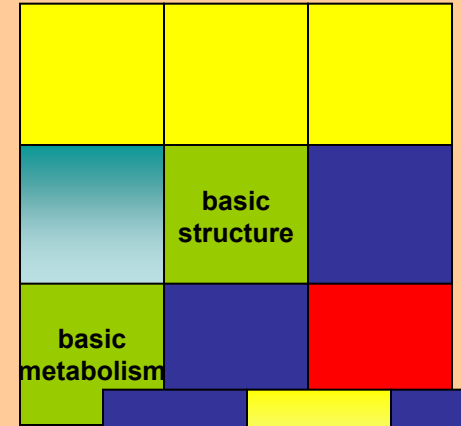
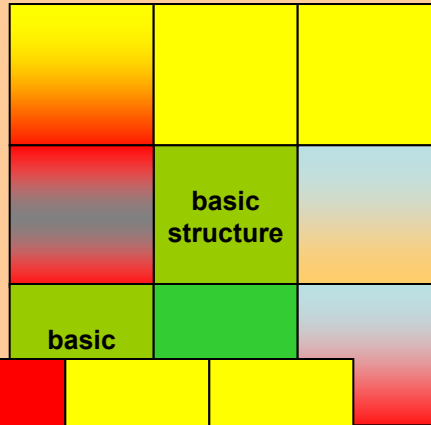
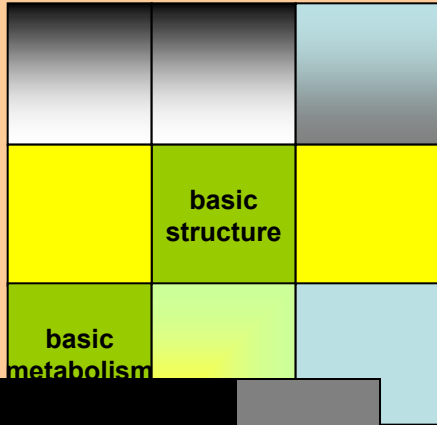
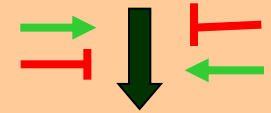
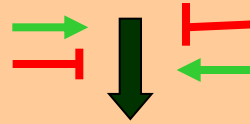
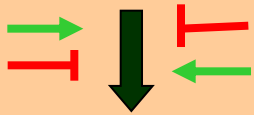
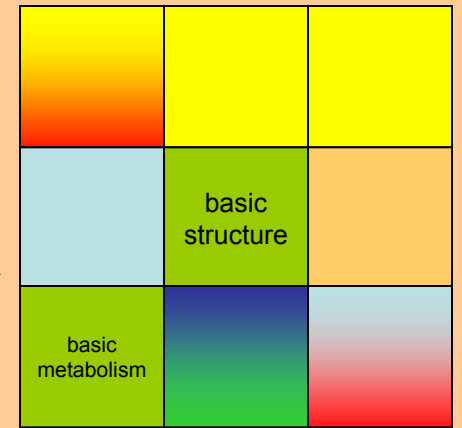
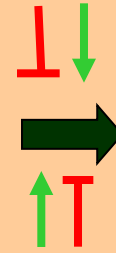
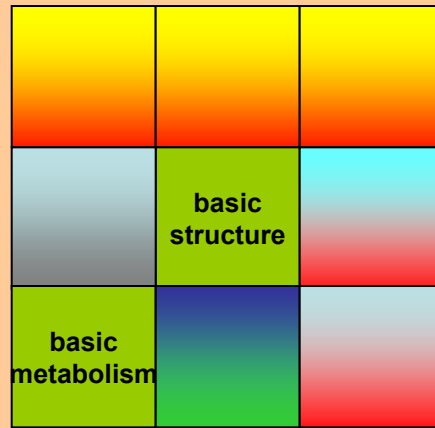
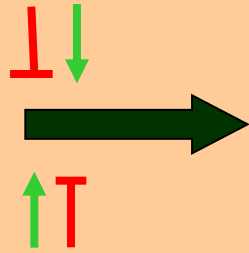
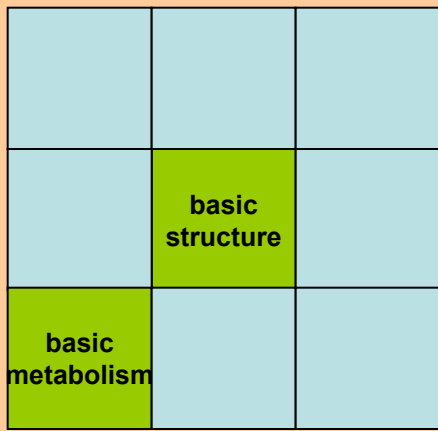
	basic structure	
basic metabolism		

nezralá / naivní buňka

dle skupin genů,
které jsou exprimovány /
(Liniově specifické geny)

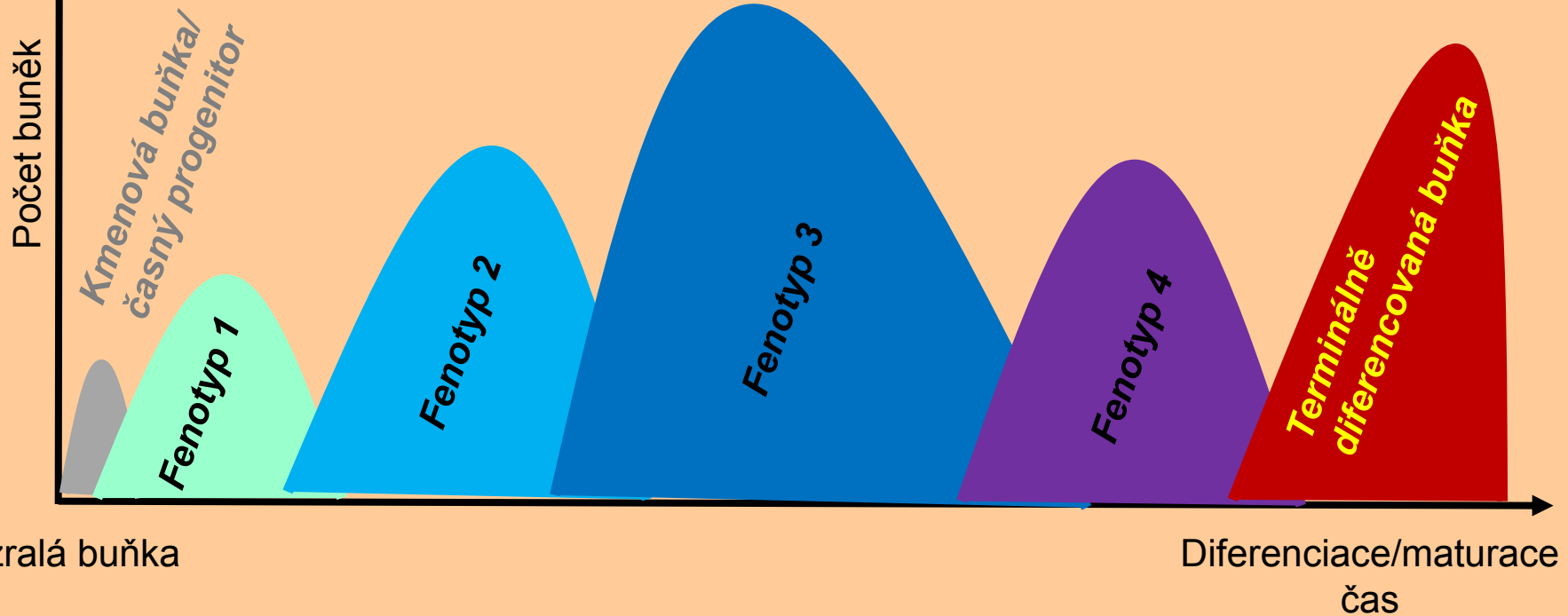
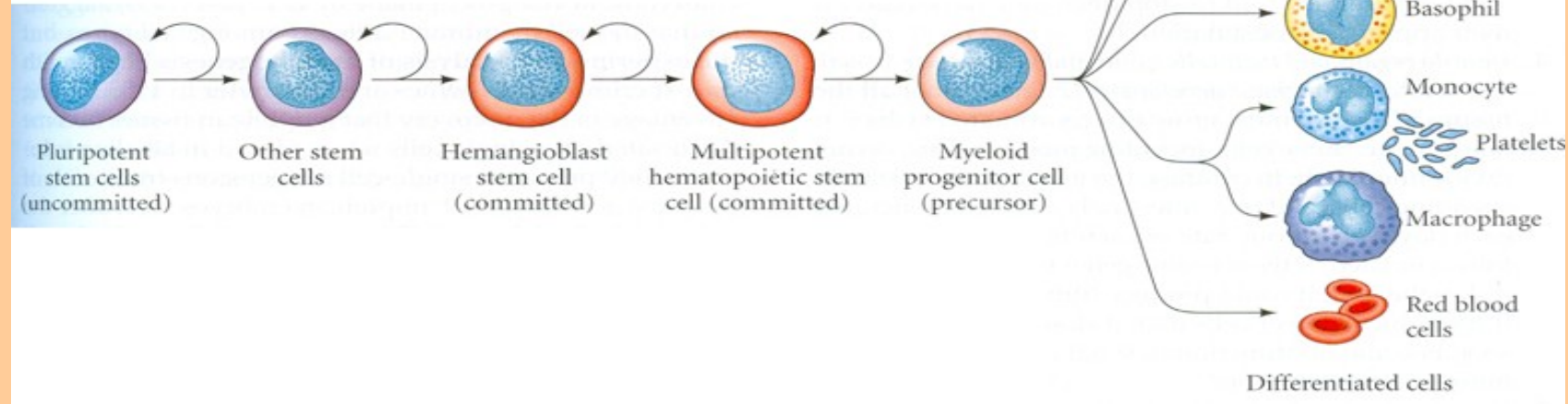
	basic structure	
basic metabolism		

specializovaná / diferencovaná /
zralá buňka



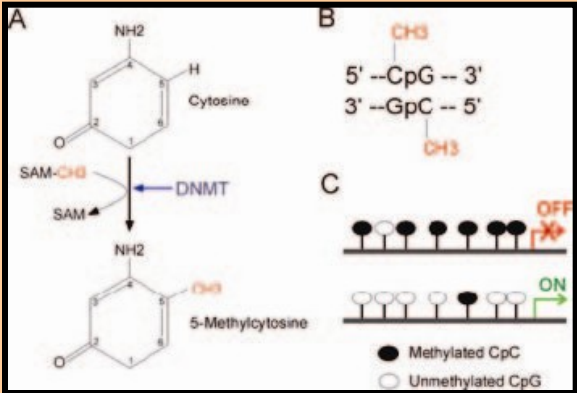
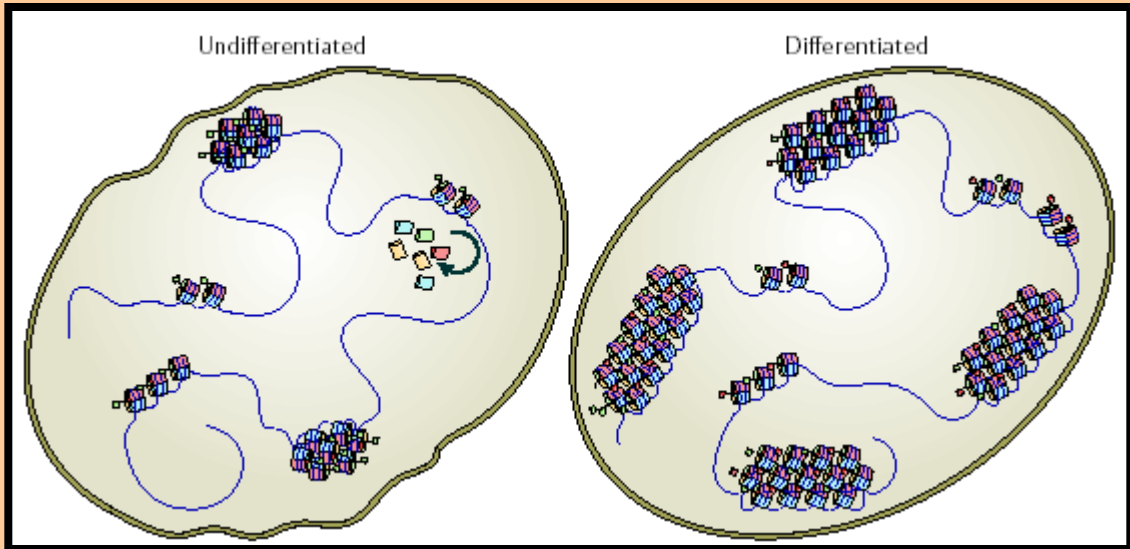
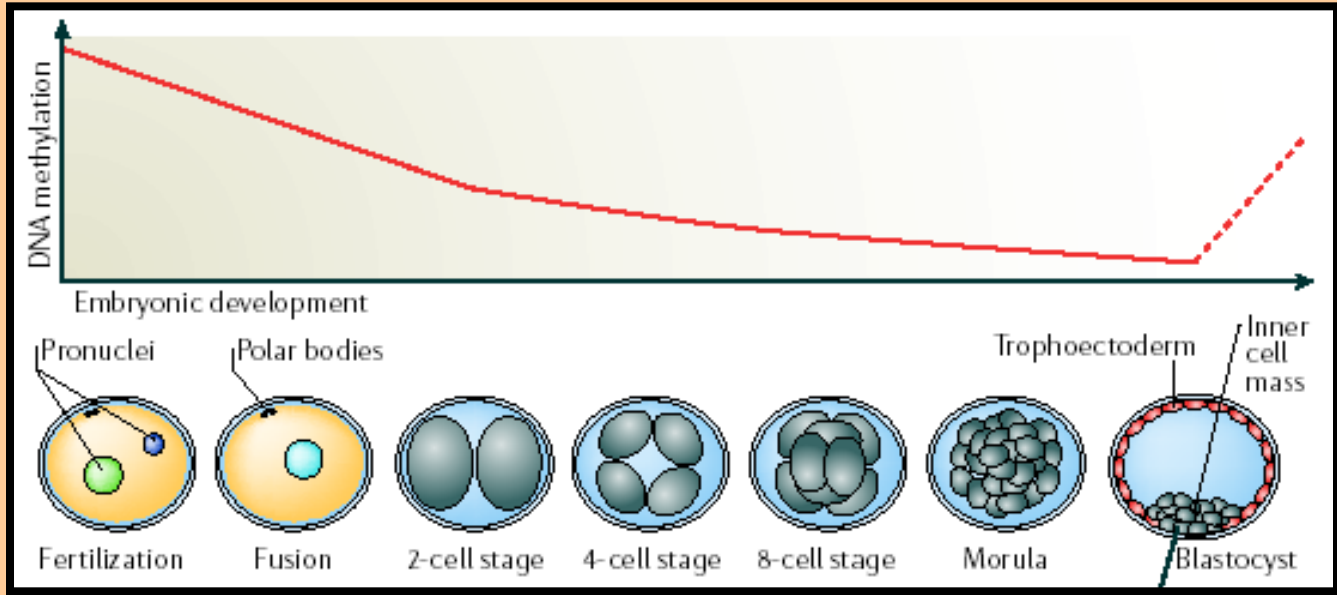
zachování „stop“ po předchozím fenotypu

Diferenciace neprobíhá synchronně

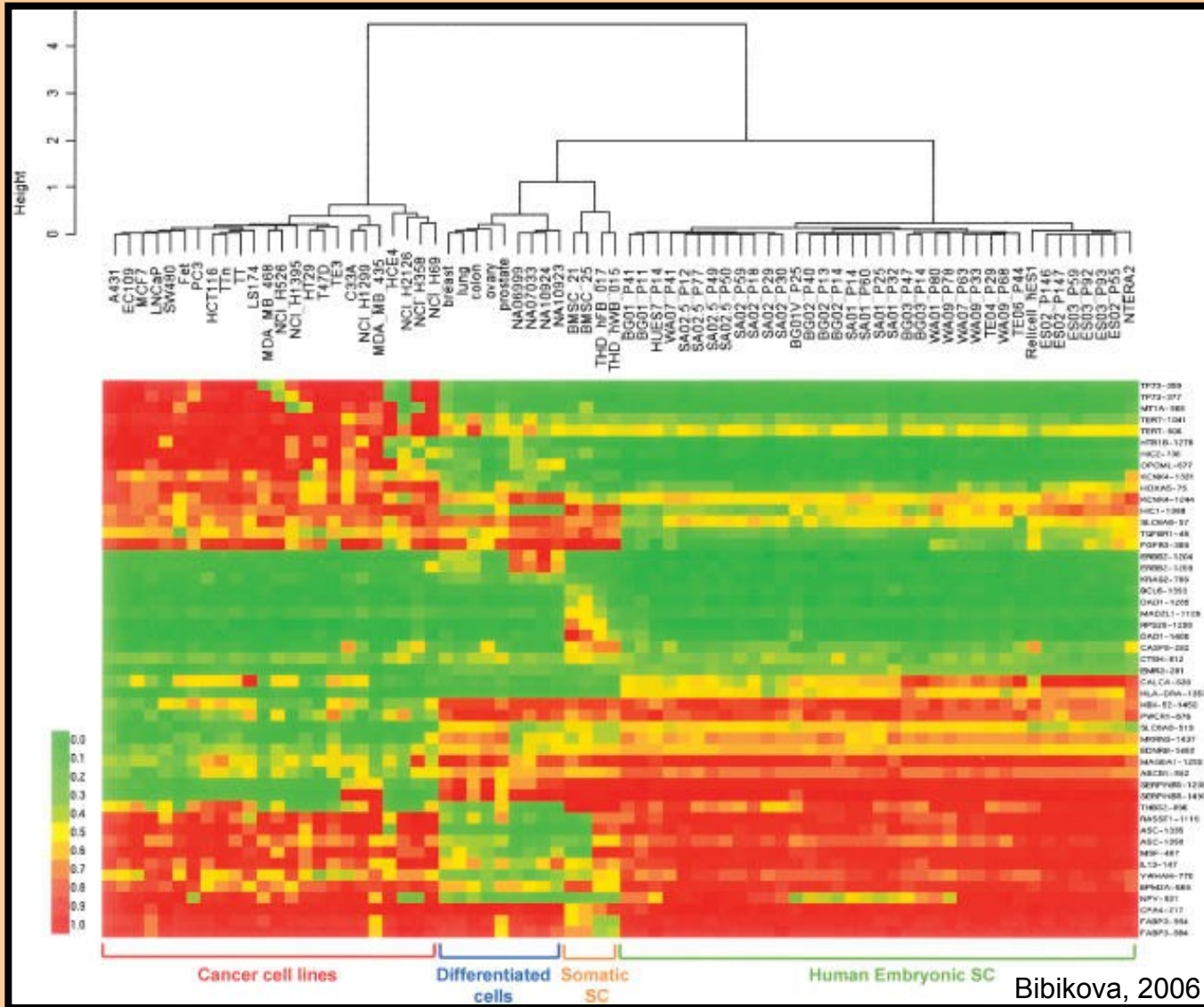


Epigenetika

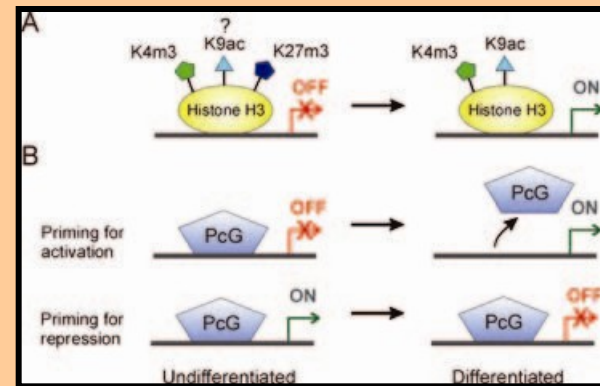
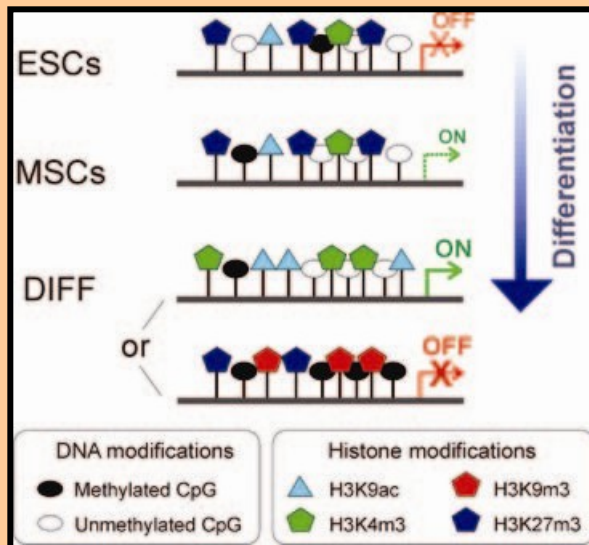
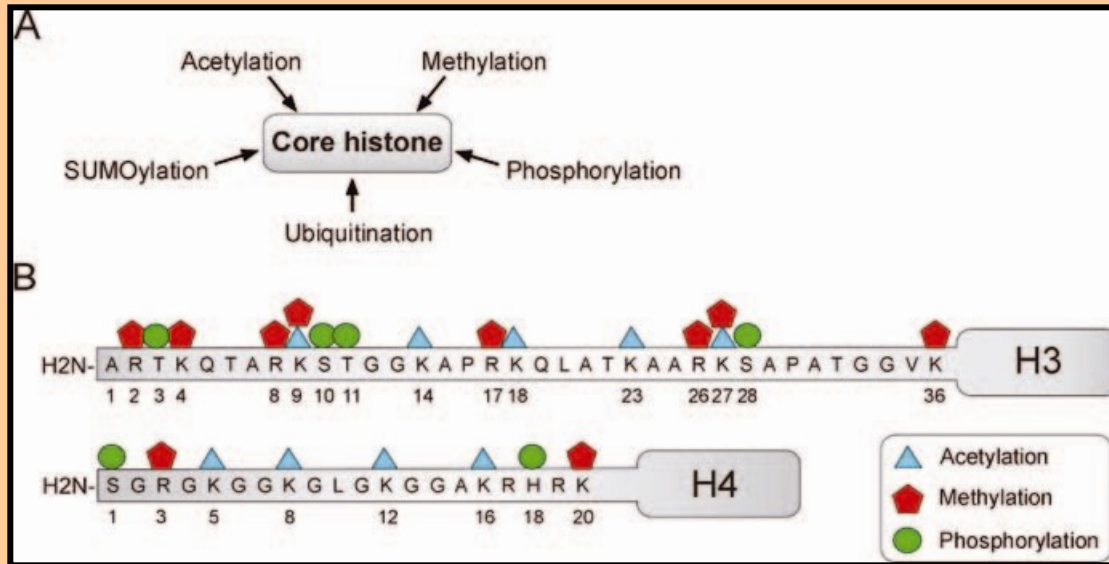
Metylace DNA a kondenzace chromatinu během časného vývoje



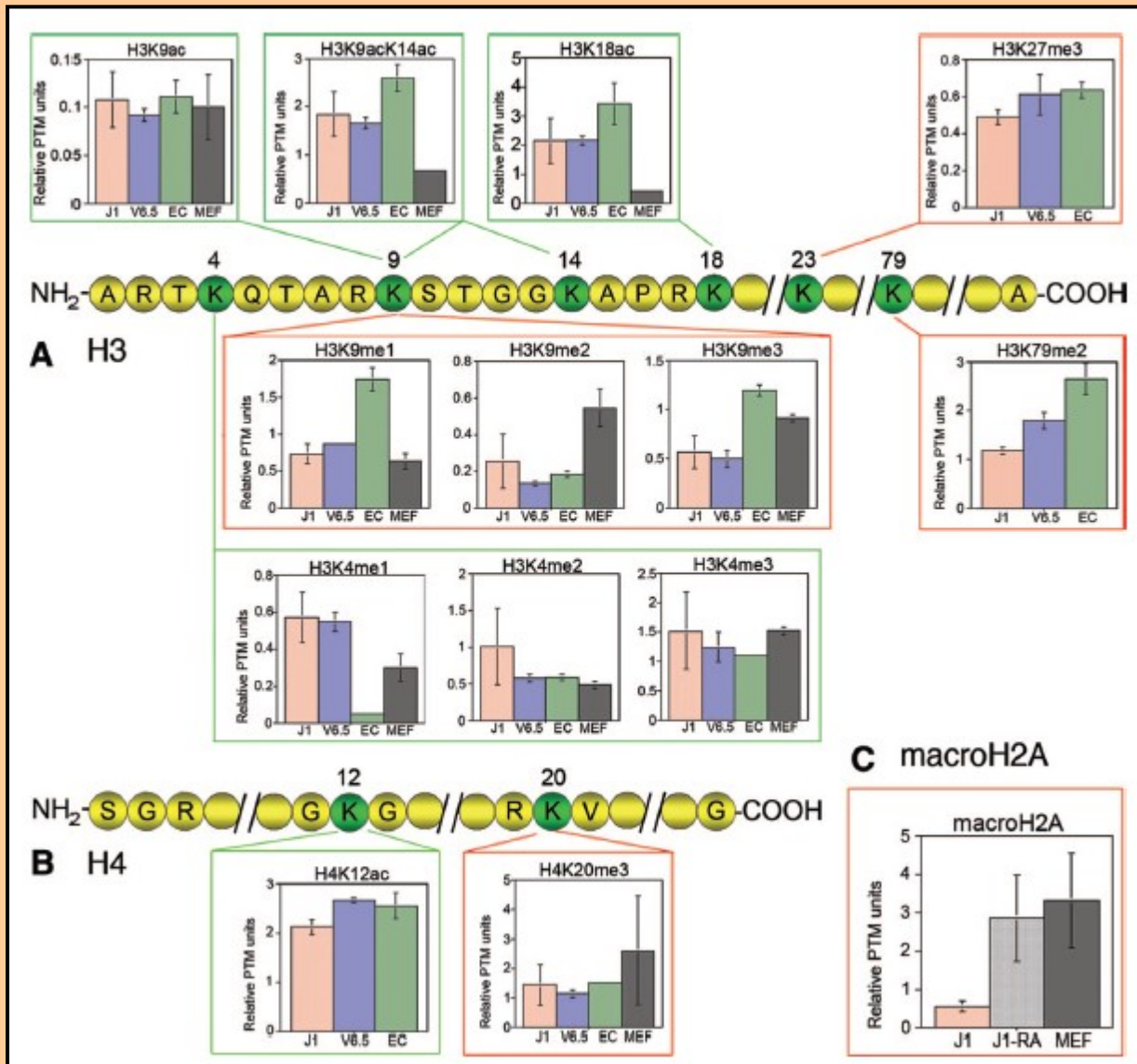
Profil metylace DNA u různých typů buněk (40 genů, 49 CpG míst)



Modifikace histonů – regulace transkripce



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



Polycomb group (PcG) x Trithorax group (trxG) proteins

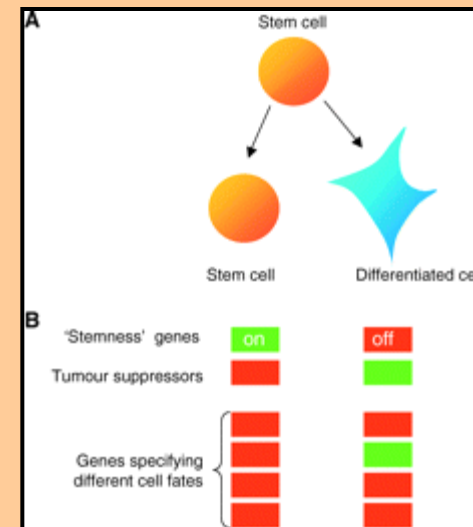
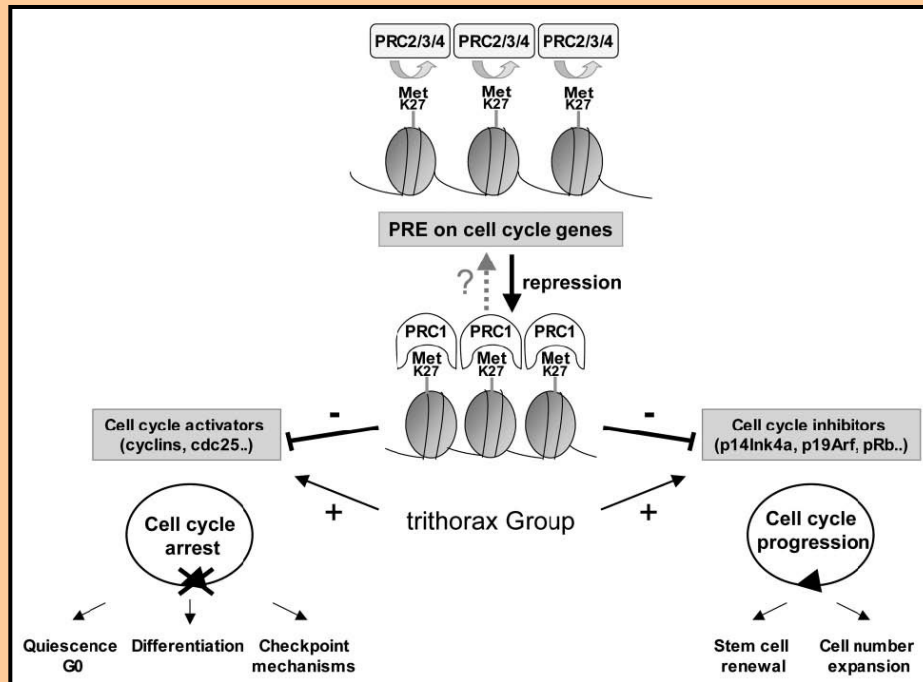
PcG jsou odpovědné za inaktivaci transkripce cílových oblastí
 trxG jsou odpovědné za aktivaci transkripce cílových oblastí

- 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

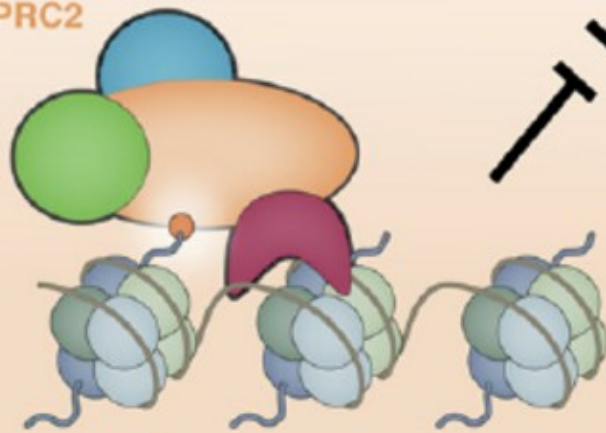
PRE – PcG responsive element

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



PRC2



SILENCING

H2B

H3

H2A

H4

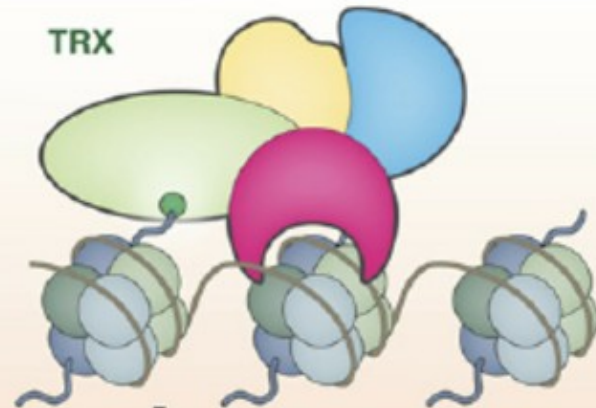
N-terminal tail

H3K27me3

H3K4me3

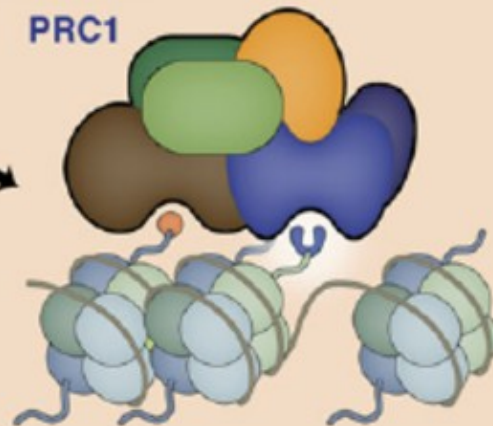
H2Aub1

TRX

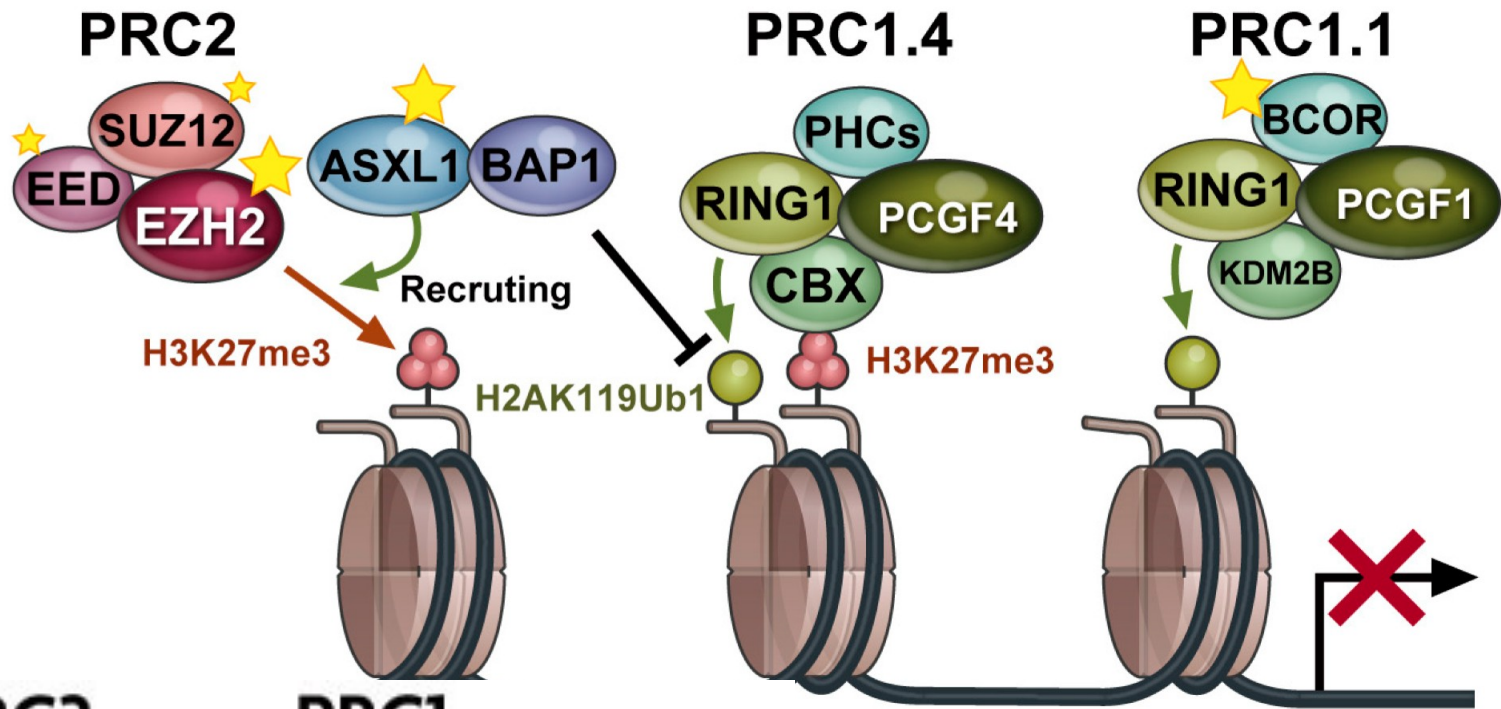


TRANSCRIPTION

PRC1

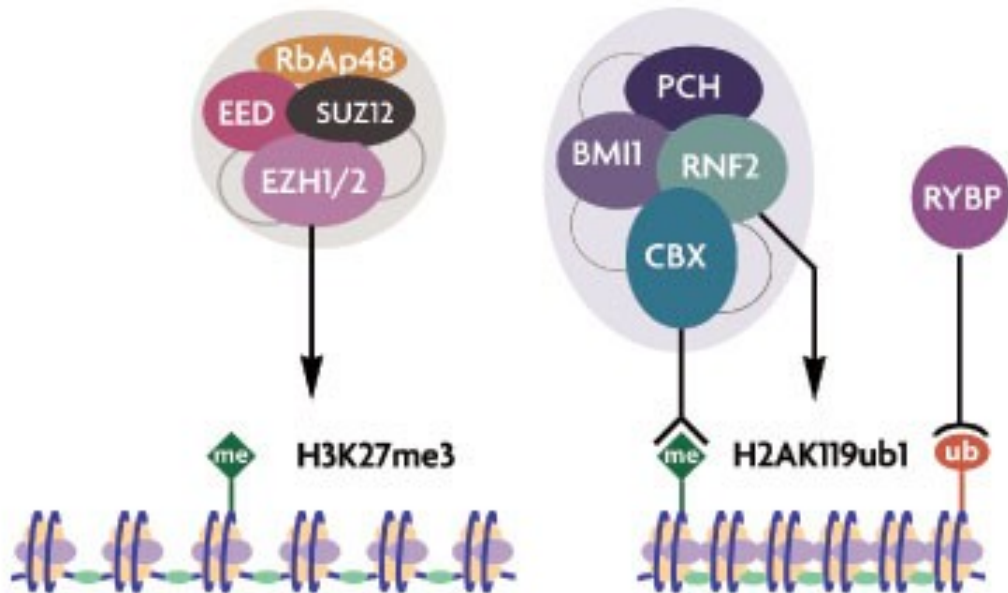


STABLE REPRESSION



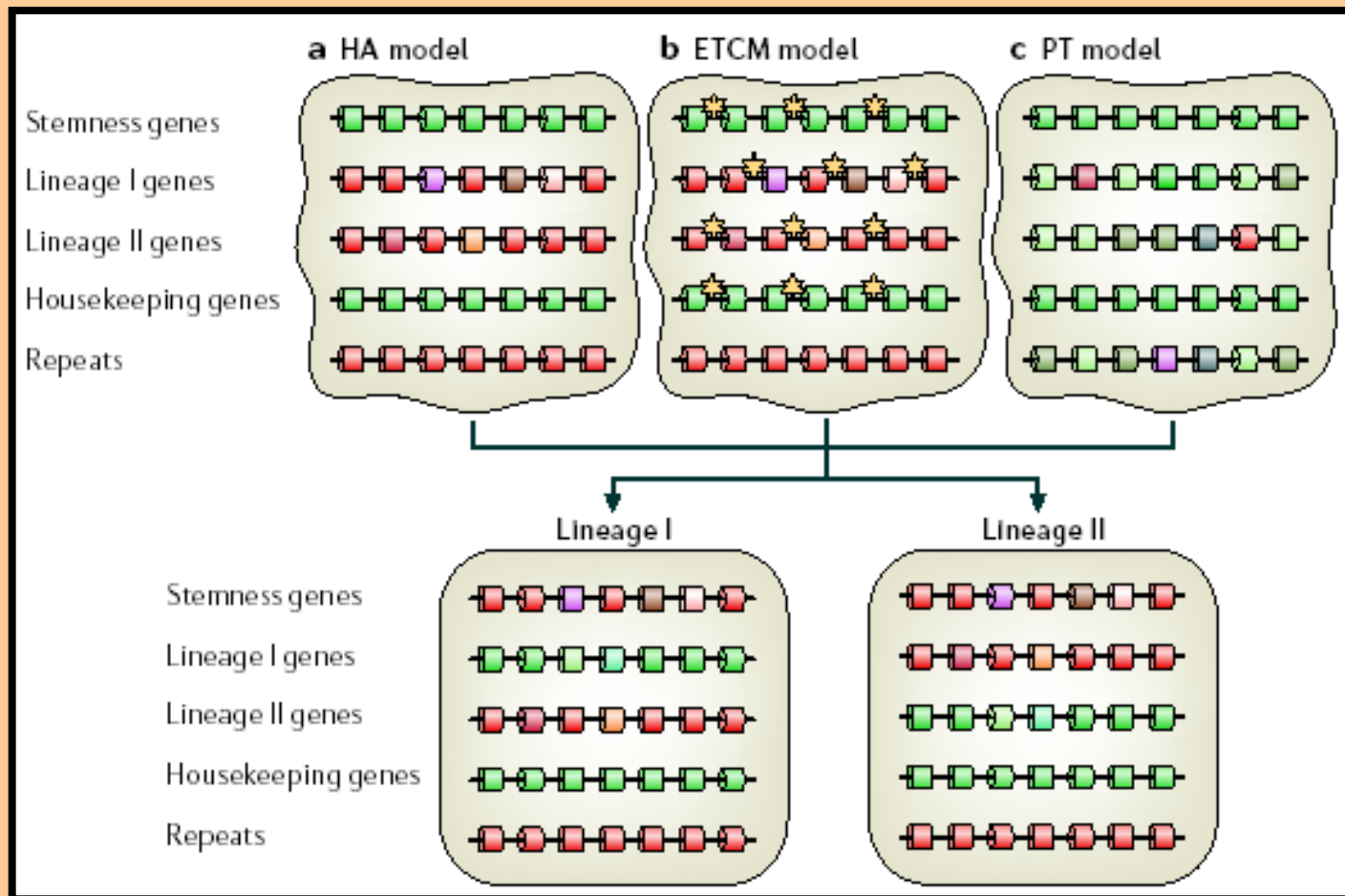
PRC2

PRC1



EZH2 – Histon Lyzin methyltransferása
 CBX – protein rozpoznávající H3K27me3
 RING1 – E3 ubiquitin protein ligase,
 transkripční represor.

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

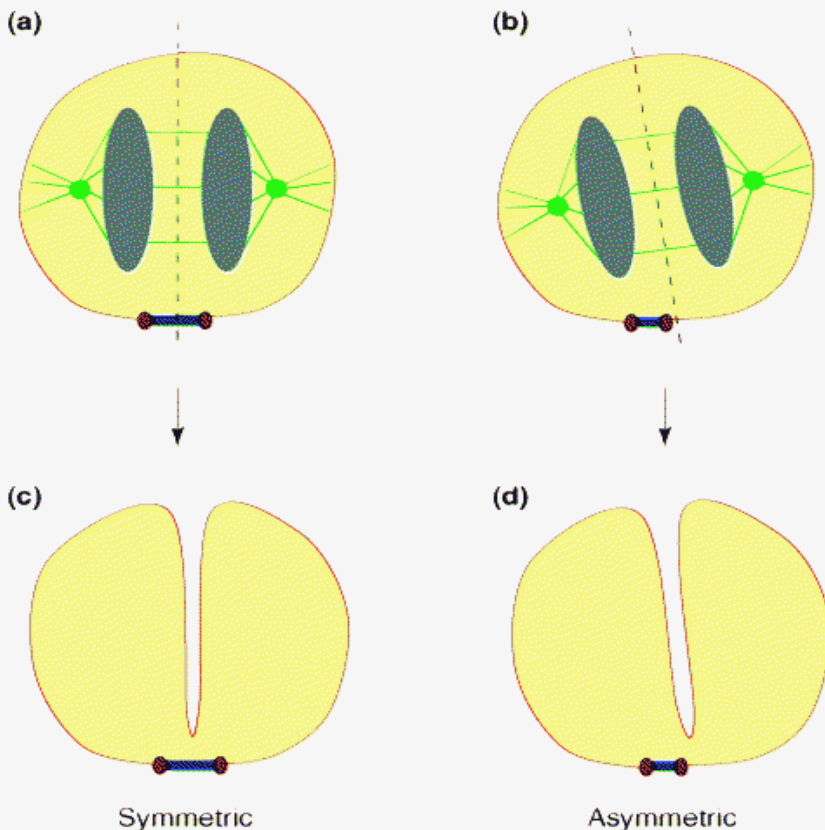
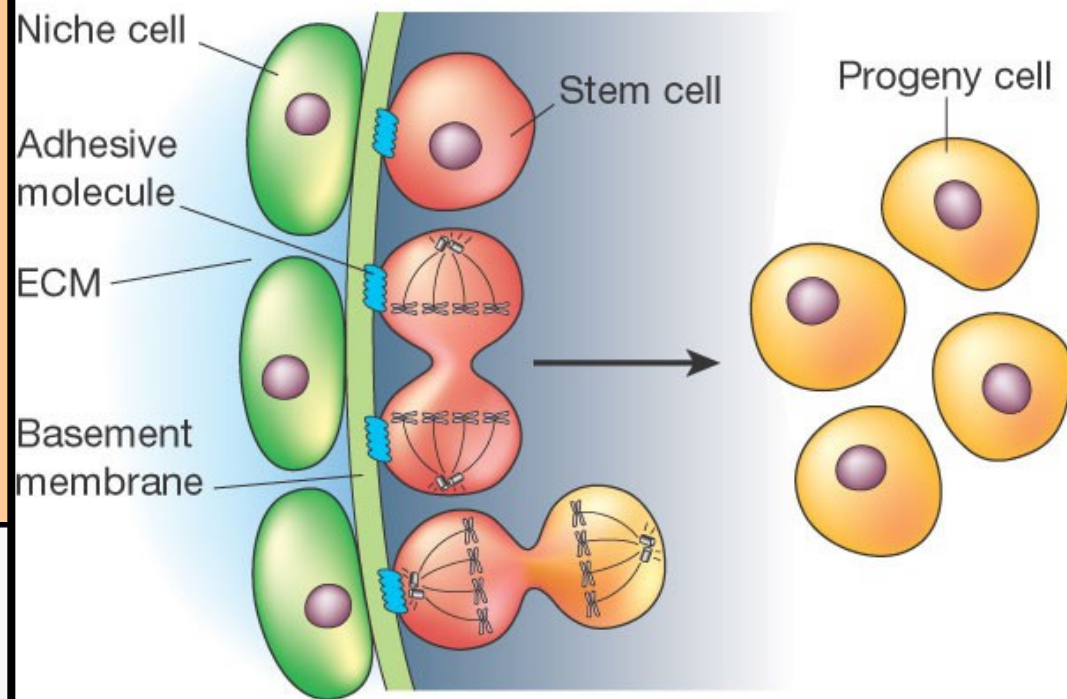


HA – model postupné (hierarchické) aktivace (hierarchical activation) → metylace DNA

ETCM – model povolené/umožněné transkripce (early transcription competence marks)
→ modifikace histonů

PT – model promiskuitní transkripce (promiscuous transcription)
→ kombinace transkripčních faktorů a transdukce signálu

SYMETRIE DĚLENÍ BUNĚK



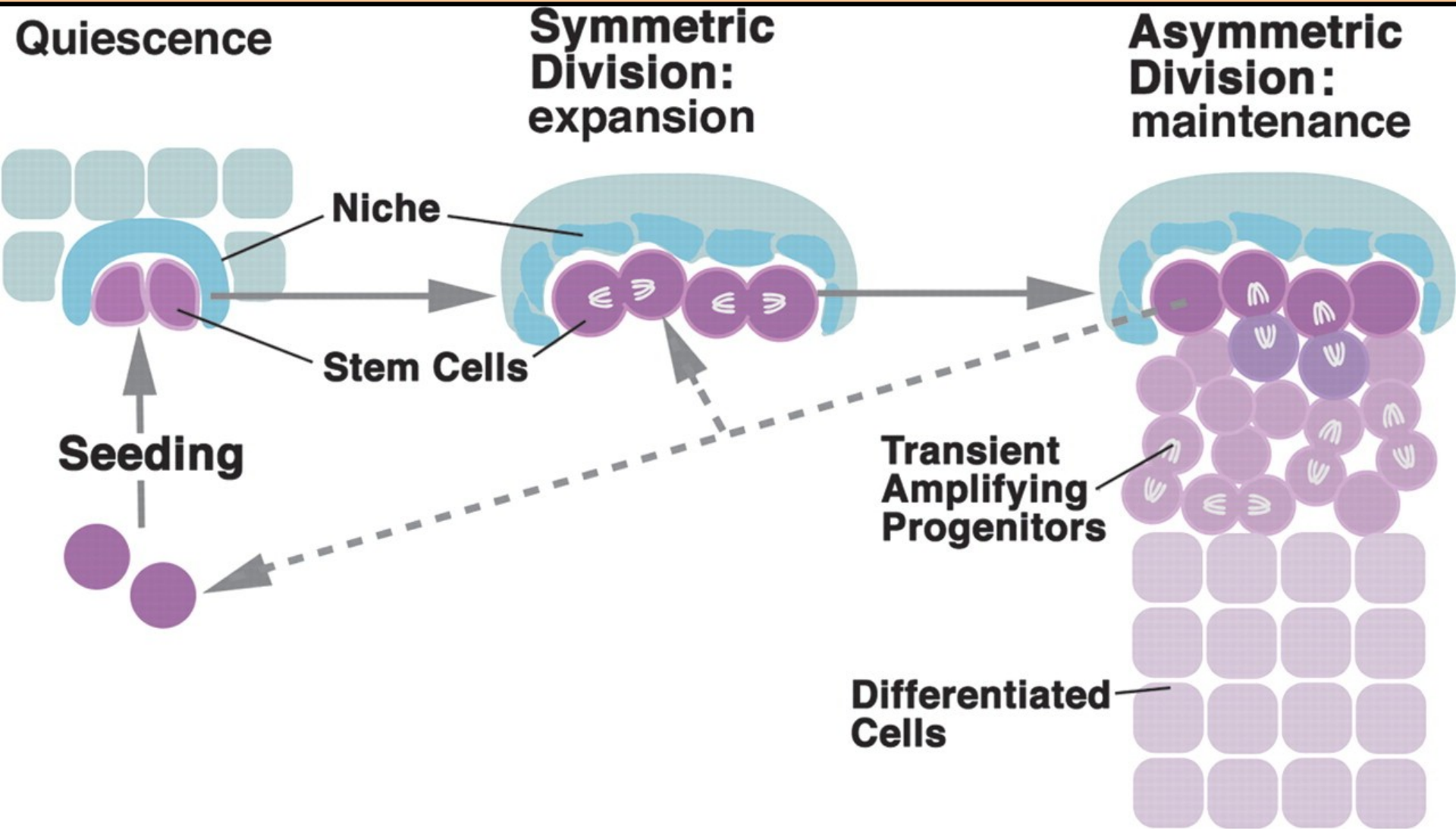
Current Opinion in Cell Biology

O symetrii dělení rozhoduje

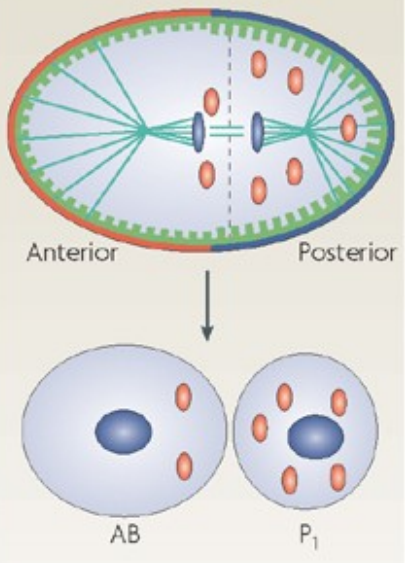
- orientace dělicího aparátu (vřeténka)
- polarizace buněk v tkáni
- gradienty v buňce a jejím okolí
- ...

=> souvislost s niche

Asymetrické x symetrické dělení v niche kmenových buněk

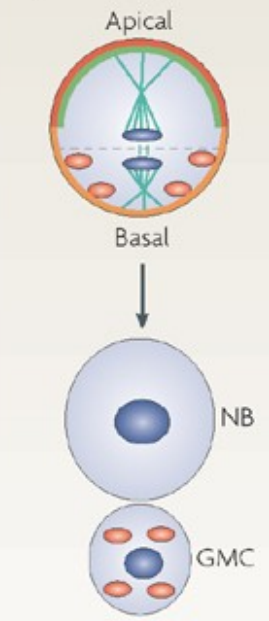


a *C. elegans*
(one-cell stage)



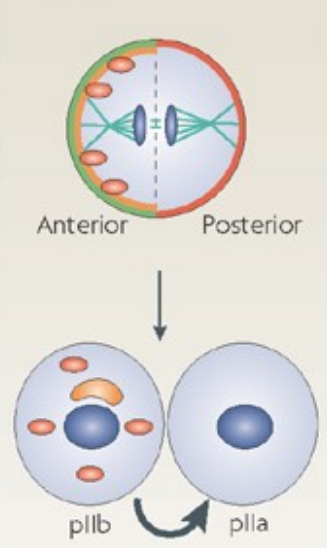
- PAR-3/PAR-6/PKC-3
- PAR-2, PAR-1
- LIN-5/G_α
- GPR-1/2
- PIE-1
- Microtubules
- DNA

b *D. melanogaster*
(neuroblast)

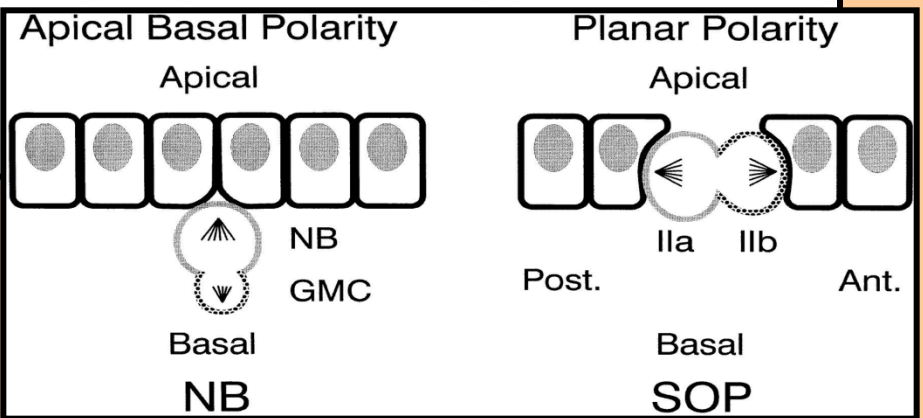


- PAR3/PAR6/aPKC
- Mud/Pins-Loxo/G_{αi}
- Mira, Pon
- Brat, Numb, Prospero
- Microtubules
- DNA

c *D. melanogaster*
(SOP)



- PAR3/PAR6/aPKC
- Mud/Pins-Loxo/G_{αi}
- Pon
- Numb, Neuralized
- Recycling endosome
- Microtubules
- DNA

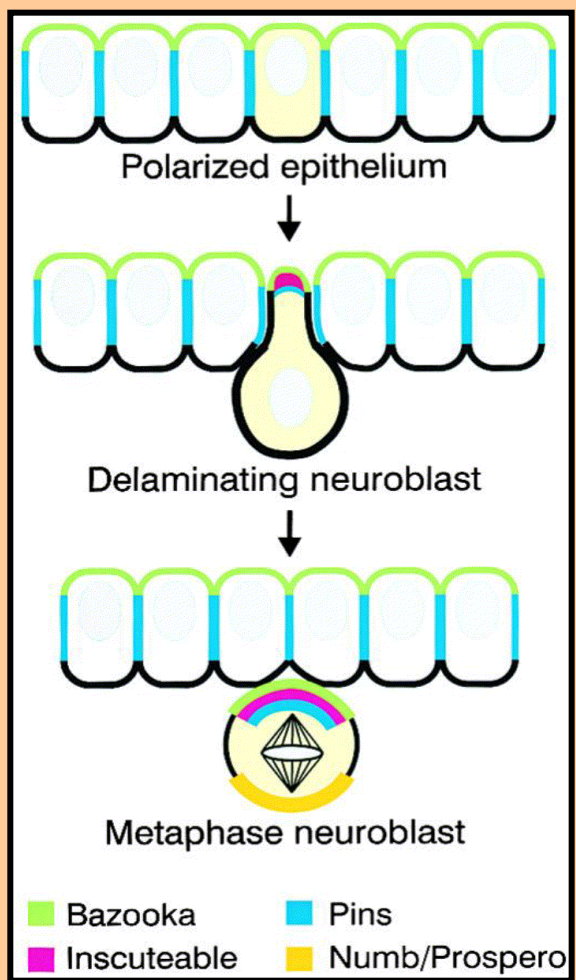


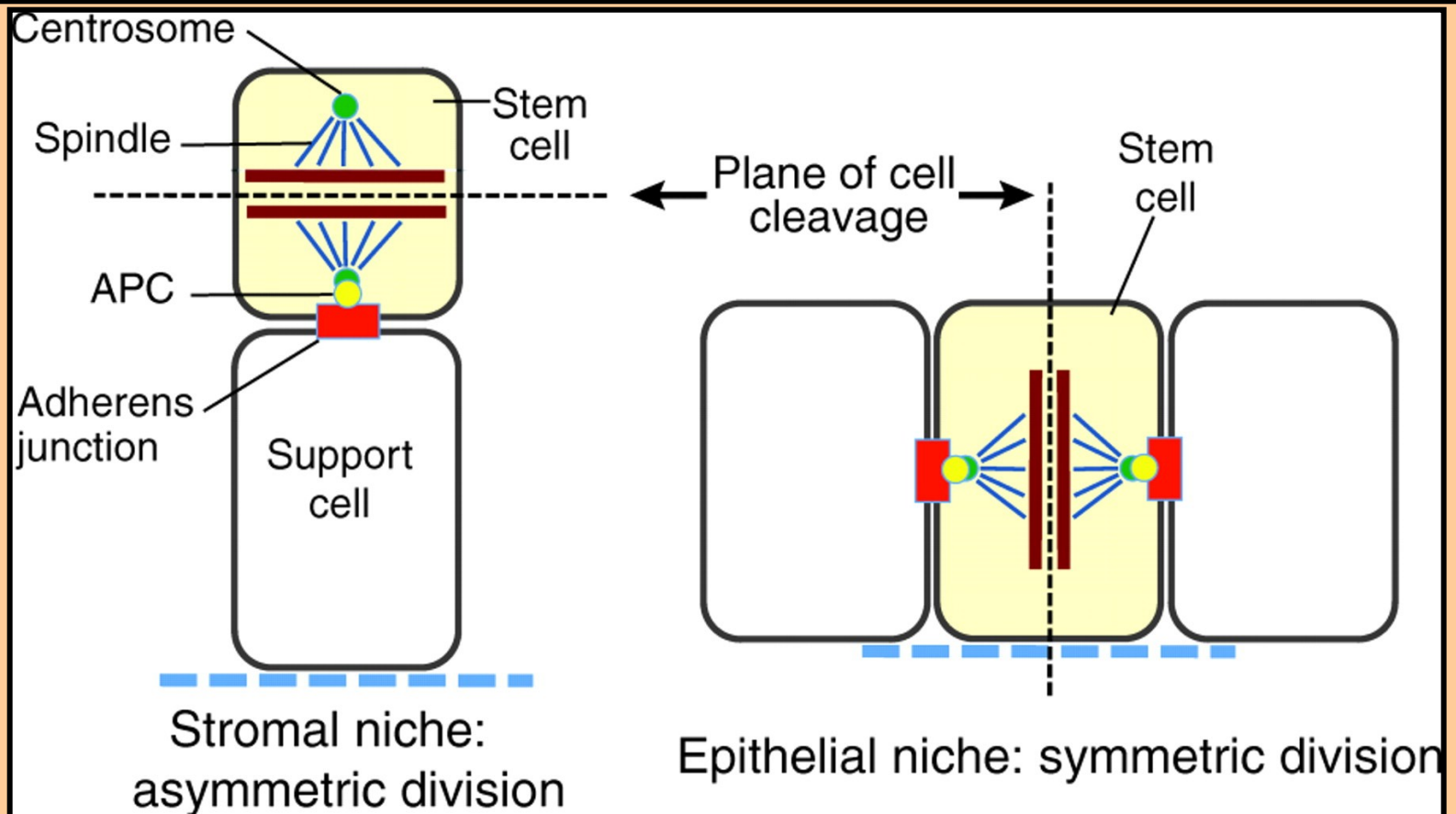
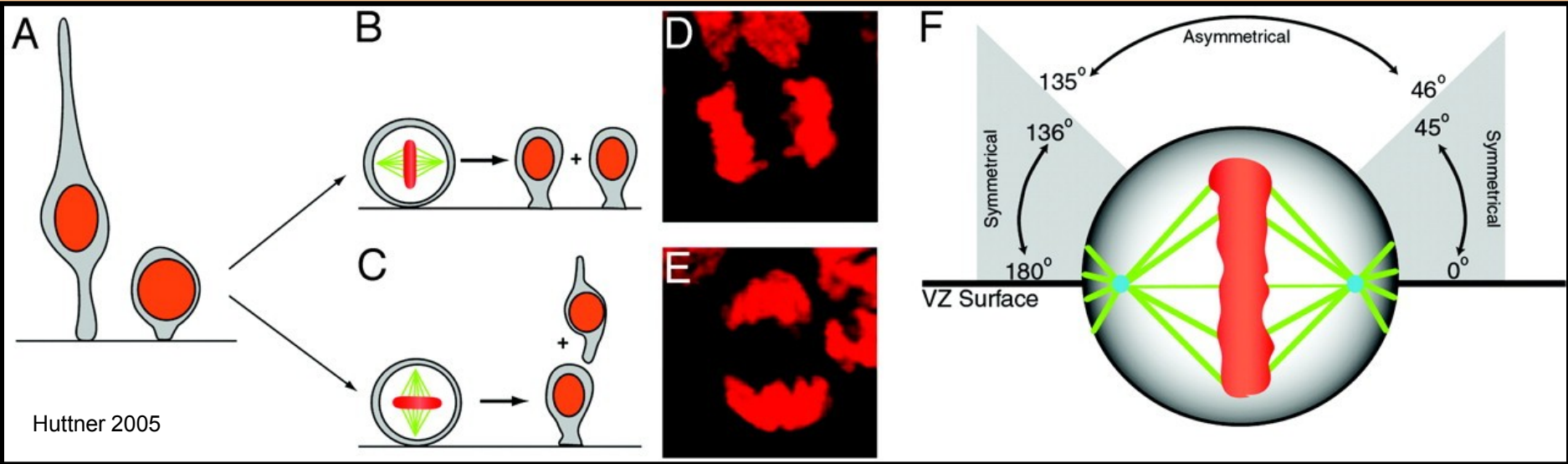
Příklady mechanismů regulujících symetrii buněčného dělení na modelových orgaismech

NB – neuroblast

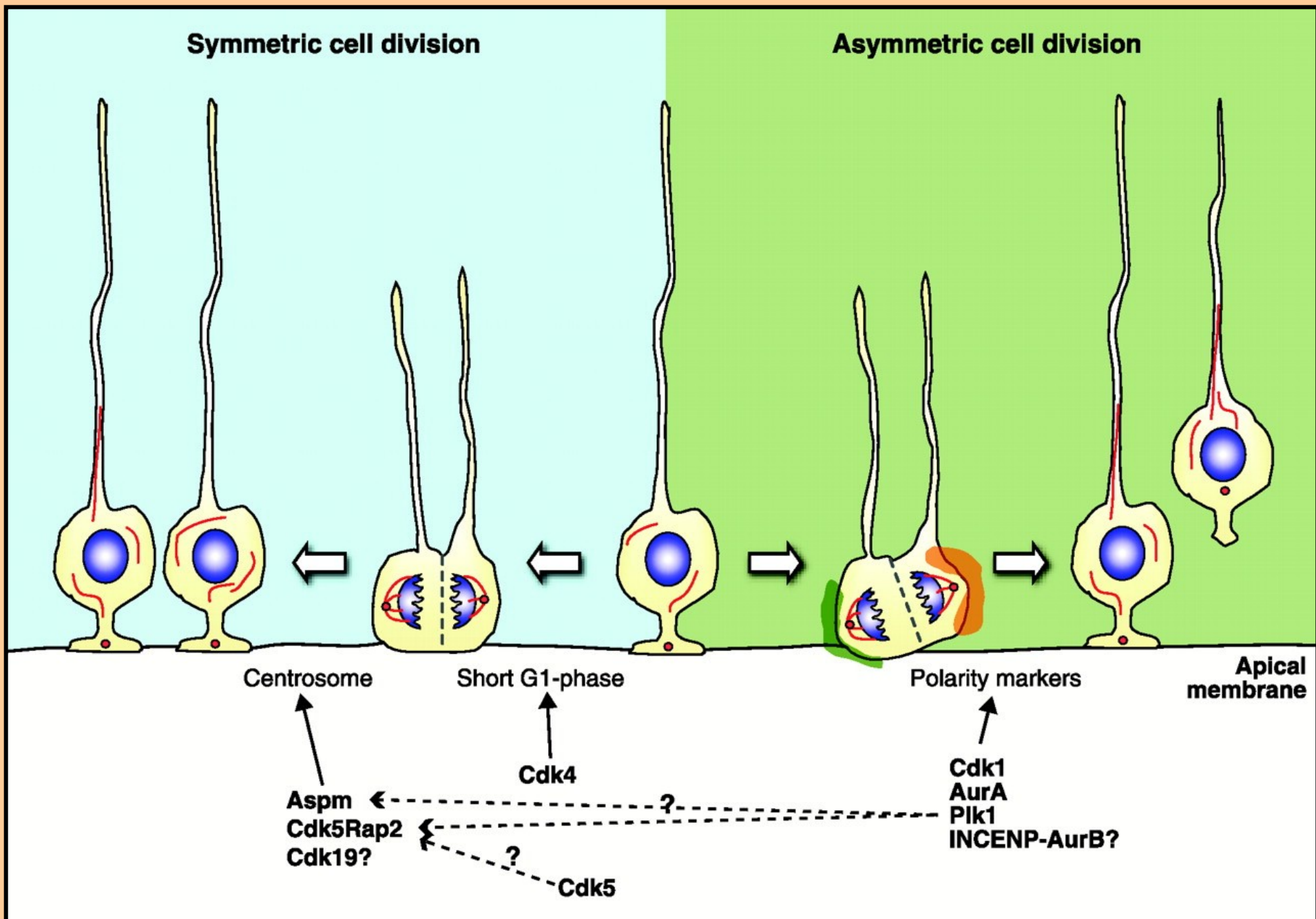
SOP – sensory organ progenitor

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

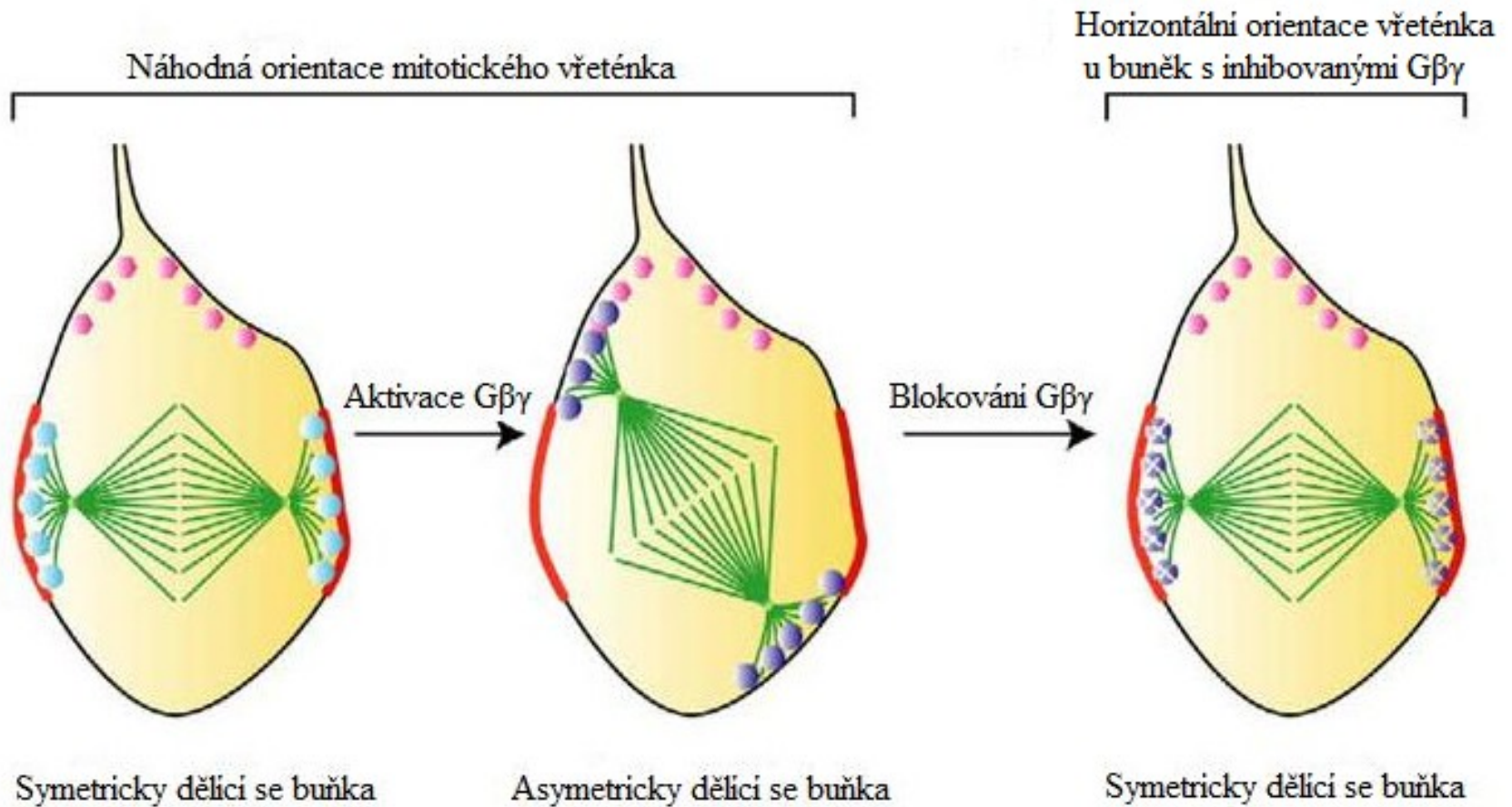




Symetrické a asymetrické dělení buněk v centrálním nervovém systému savců



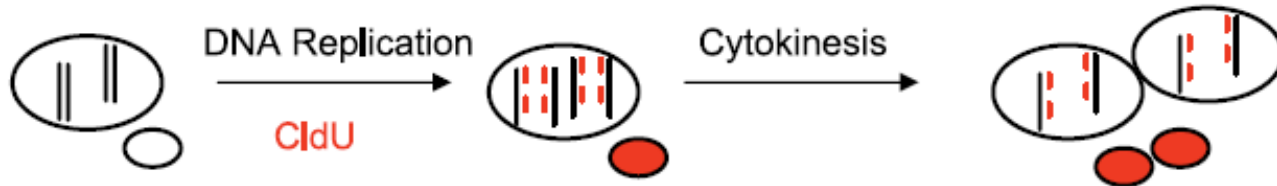
Úloha (trimerických) G-proteinů v regulaci polohy dělicího vřeténka



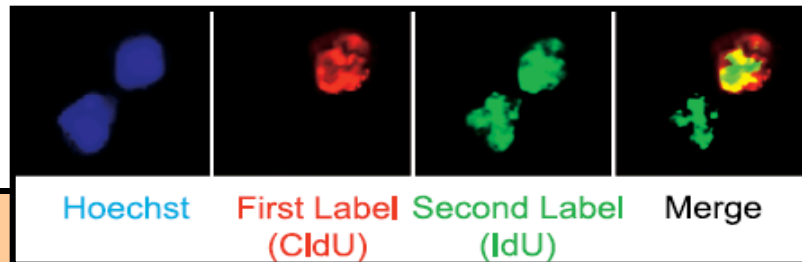
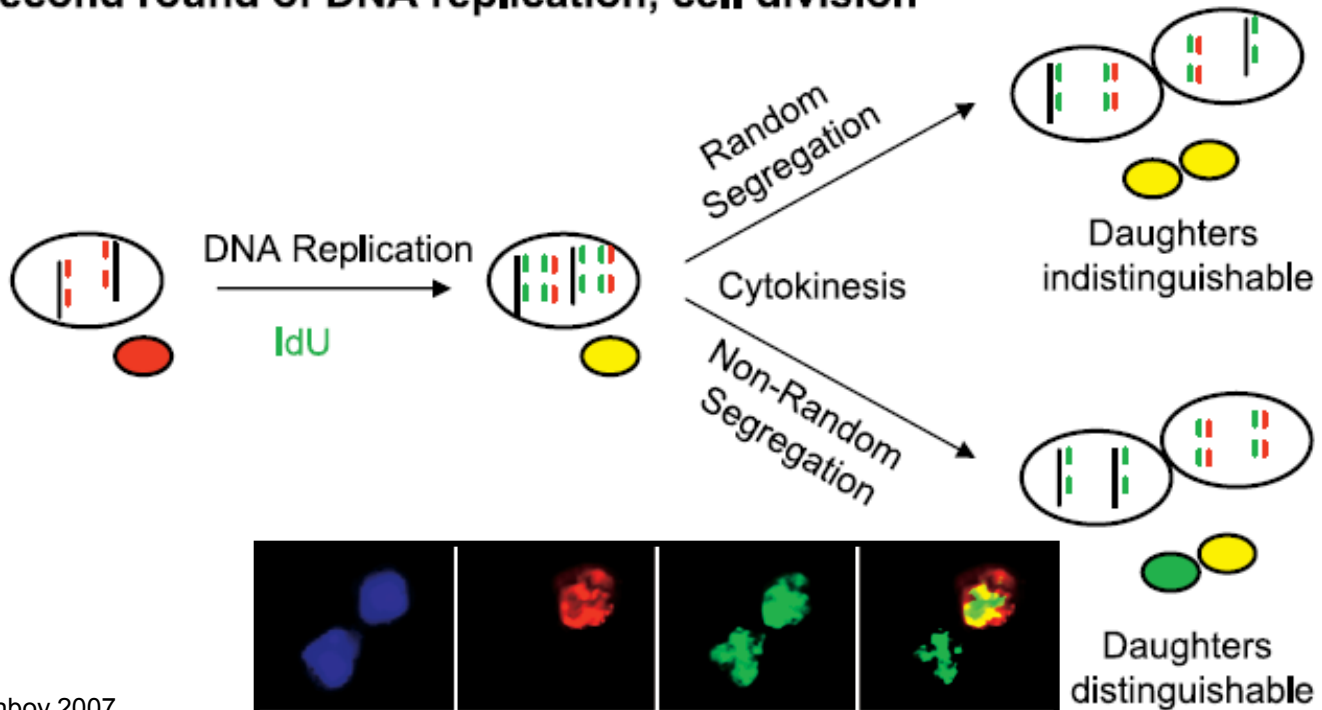
- Podnět laterální polarity
- Proteiny určující neurální osud buňky
- G $\beta\gamma$ v komplexu s G α
- Volný G $\beta\gamma$
- ⊗ Inaktivovaný volný G $\beta\gamma$

Dělení genomu u progenitorů/kmenových buněk při asymetrickém dělení

First round of DNA replication, cell division



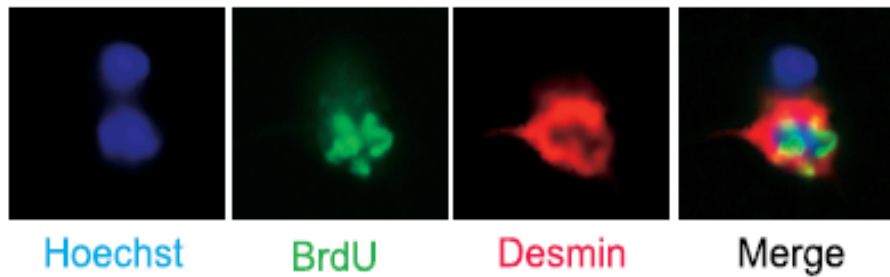
Second round of DNA replication, cell division



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)

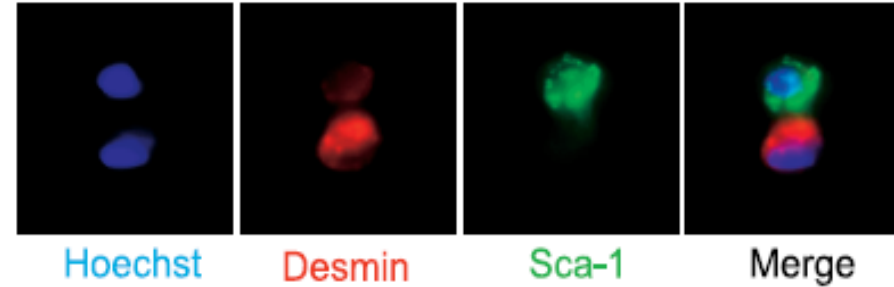


Hoechst

BrdU

Desmin

Merge

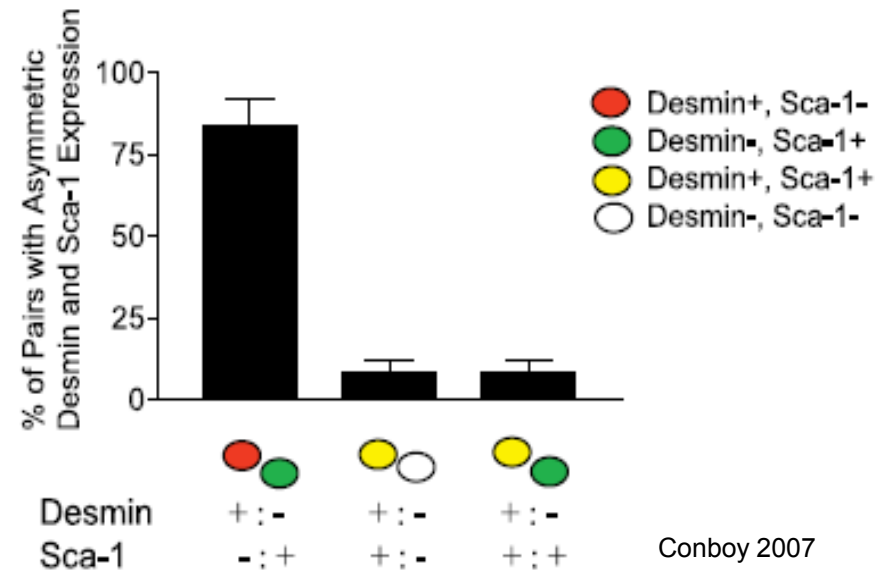
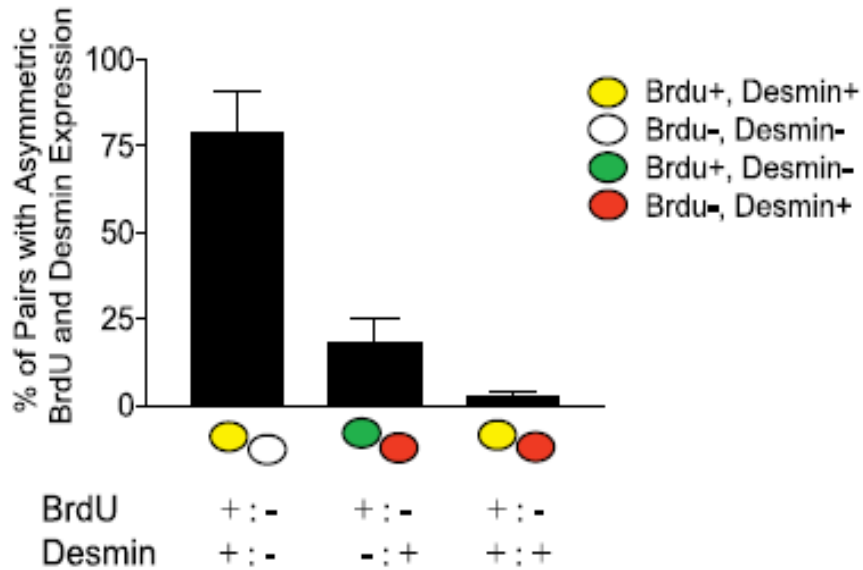


Hoechst

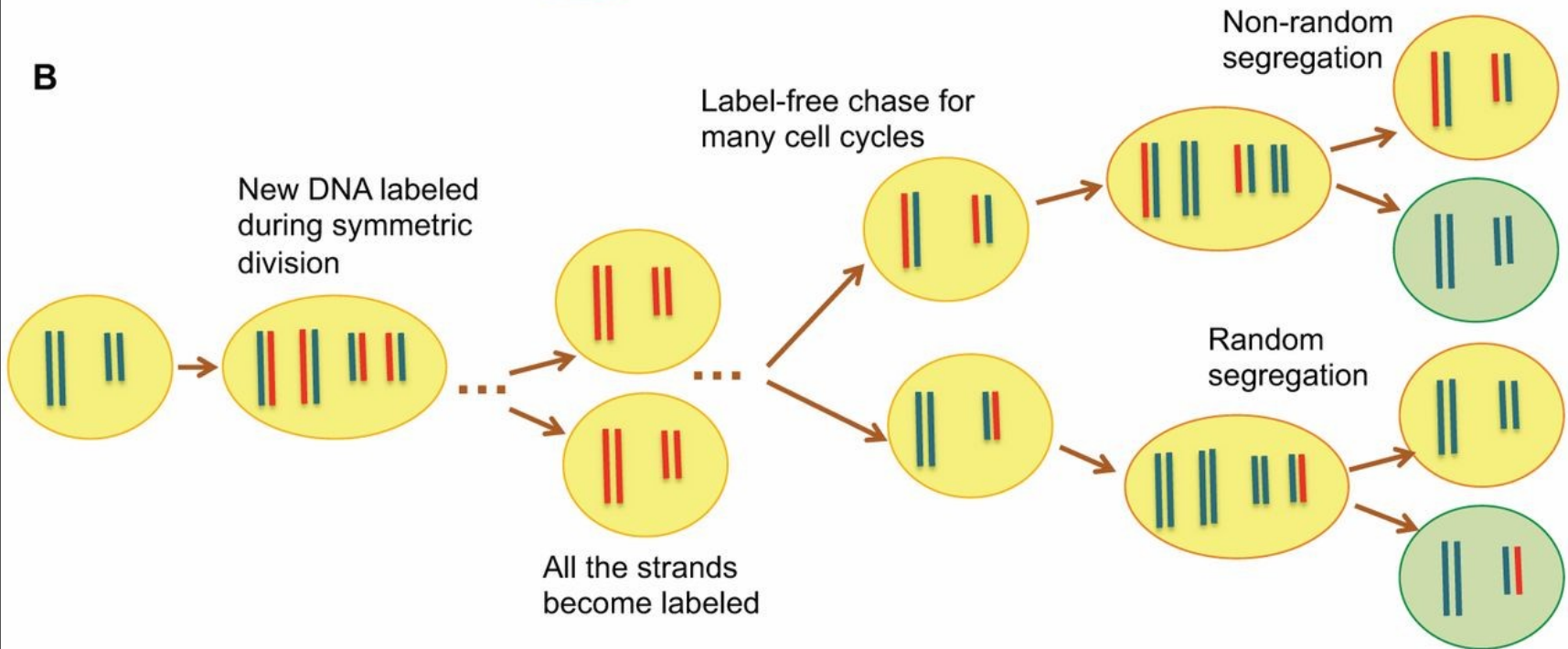
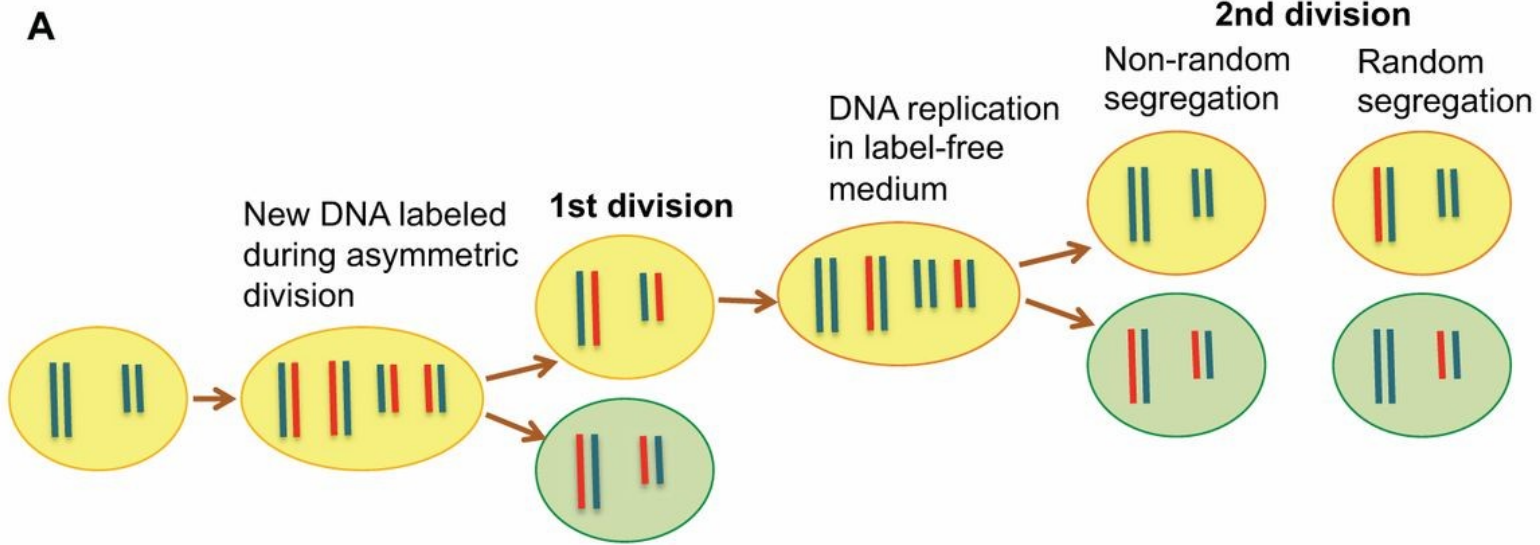
Desmin

Sca-1

Merge



Conboy 2007



Key

Unlabeled chromosome

Labeled chromosome



Differentiated cell



Stem cell

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“

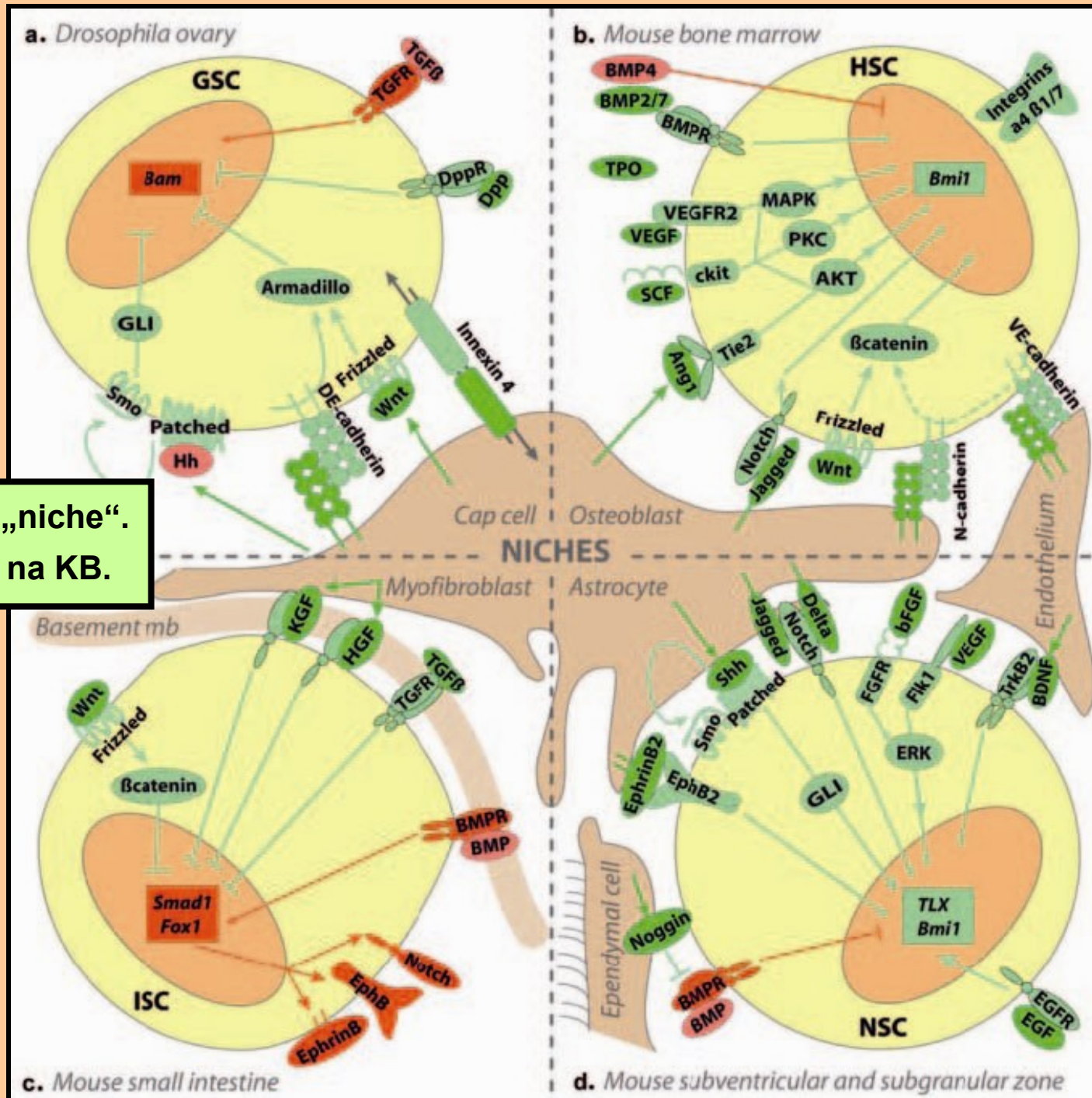
Co v NICHE najdeme?

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“.

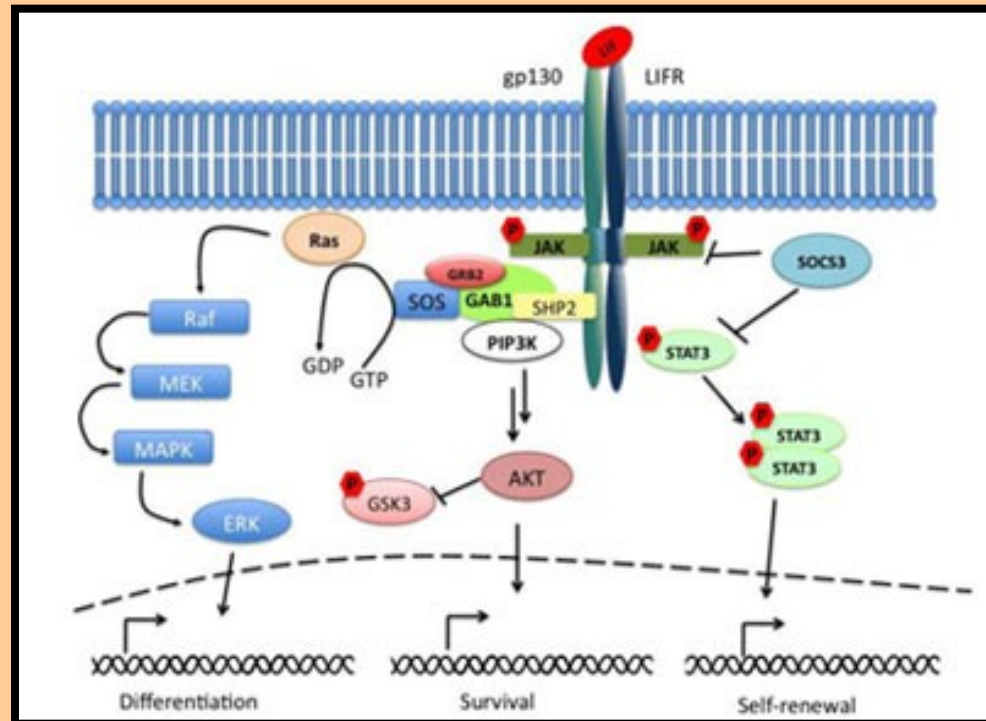
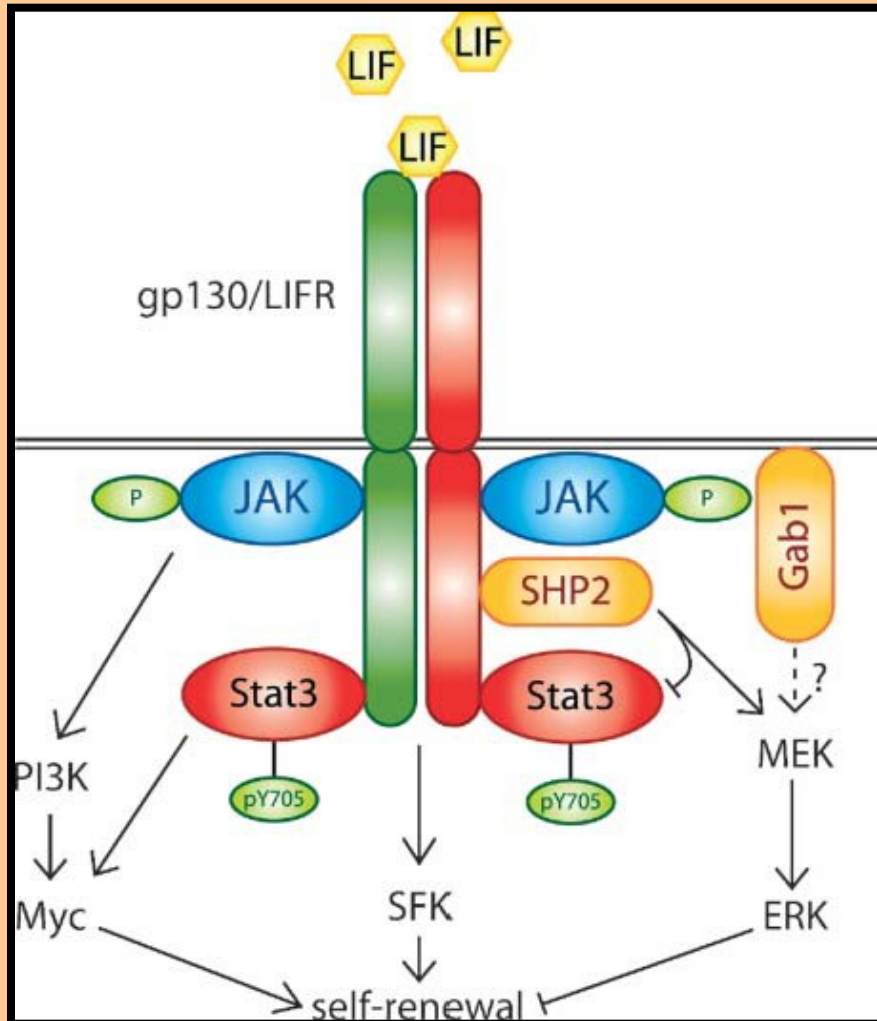
NICHE

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



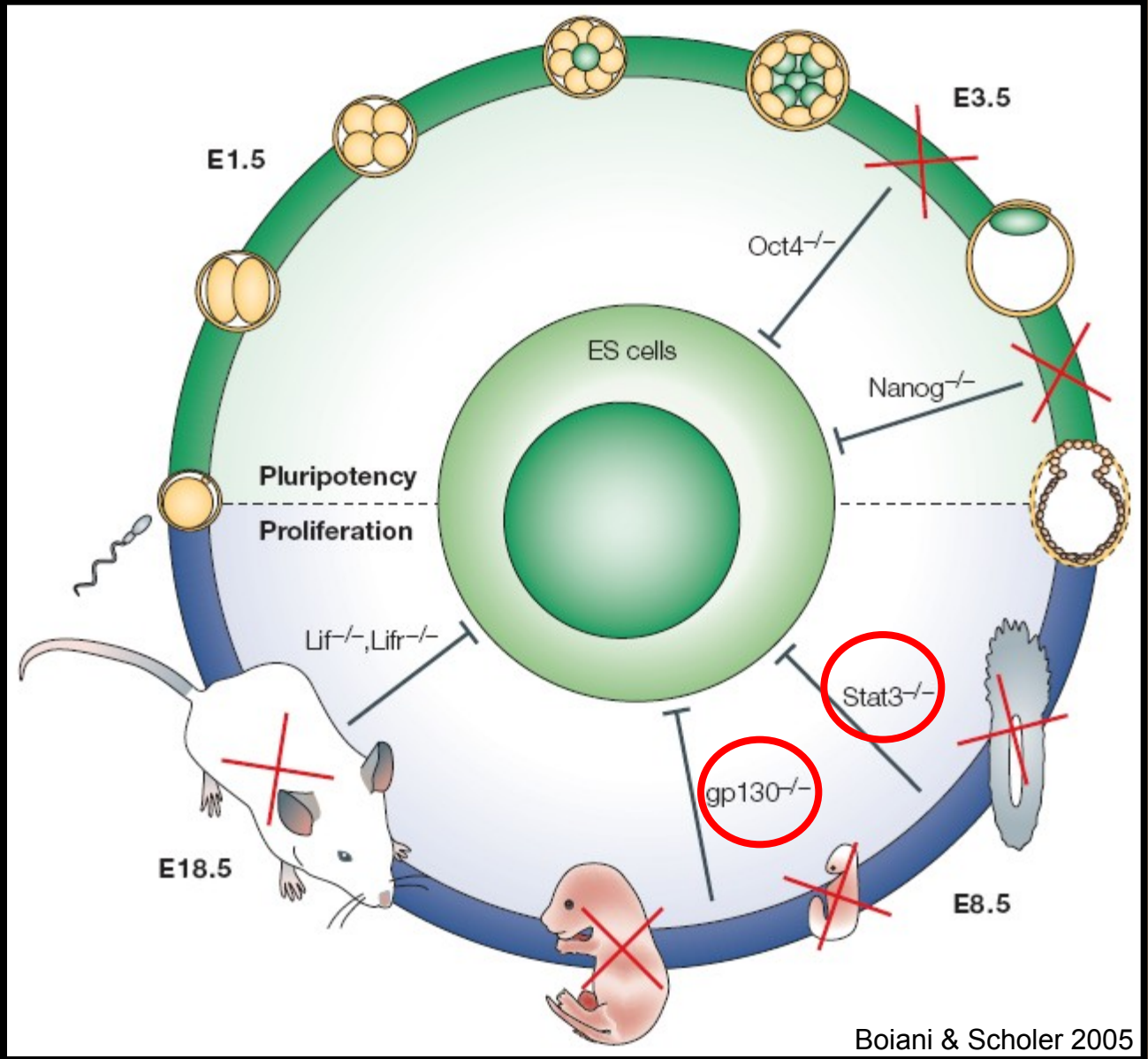
Vybrané signální dráhy

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

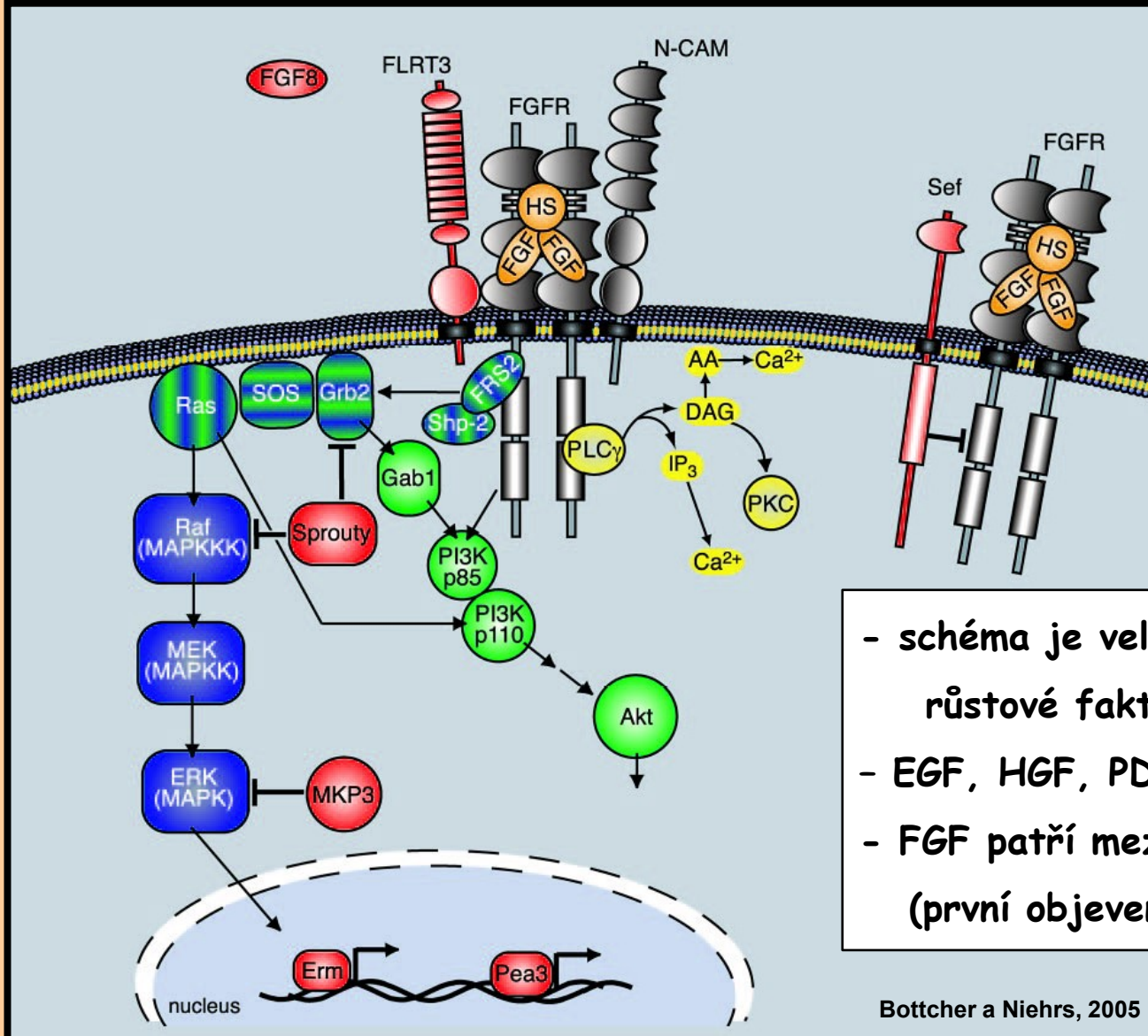


Evolučně se zdá, že tato dráha hraje důležitou úlohu v regulaci pluripotentních a snad i multipotentních buněk u živočichů obecně (prokázáno i u *Drosophily*)

Význam gp130 signalizace v průběhu embryogeneze



Signální dráha FGFs (Fibroblastové růstové faktory)



- schéma je velmi podobné i pro další růstové faktory
- EGF, HGF, PDGF, IGF, TGF α ,...
- FGF patří mezi významné morfogeny (první objevené, proteinové)

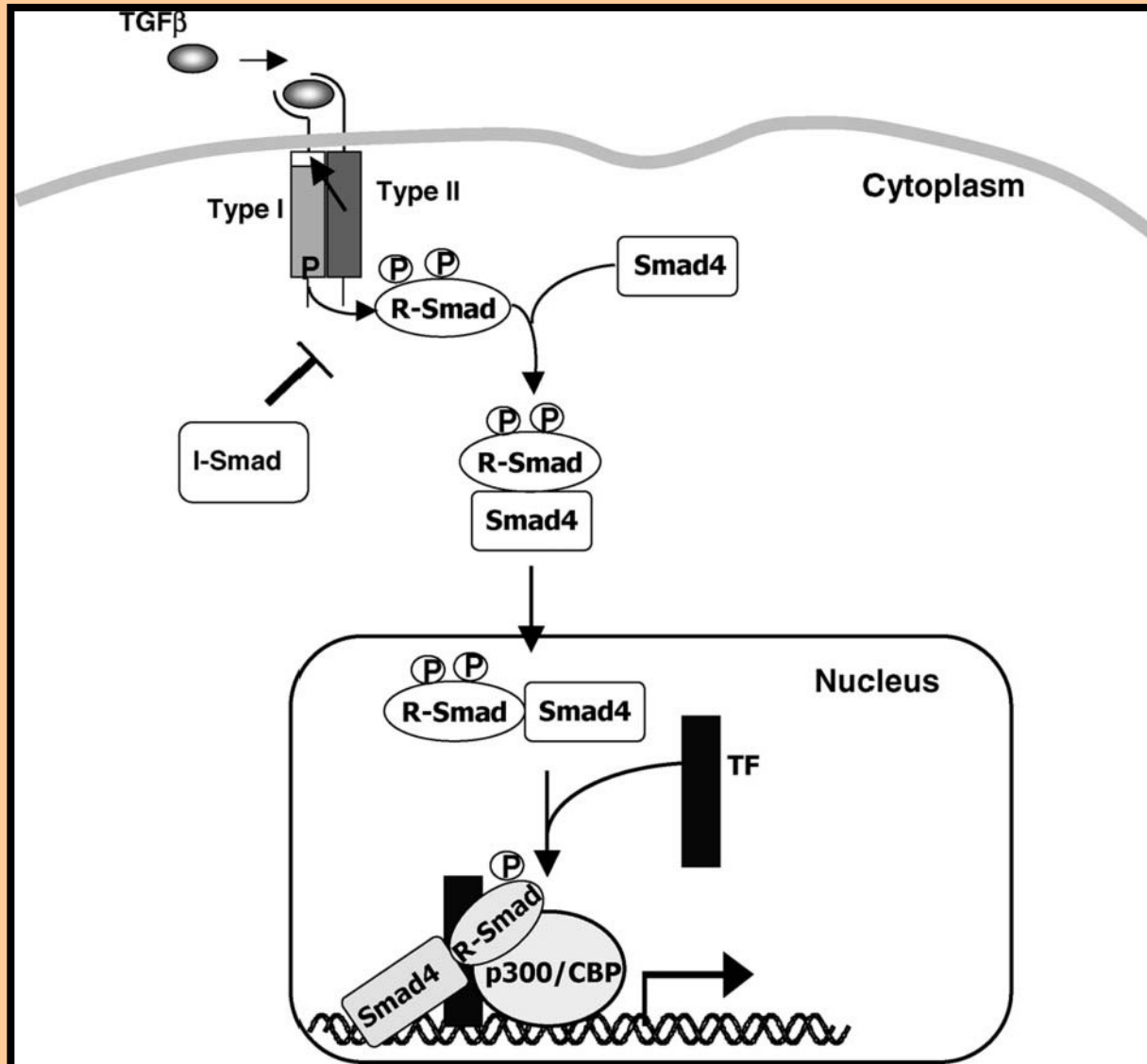
FGF knockout mice

Gene	Survival of null mutant*	Phenotype
<i>Fgf1</i>	Viable	None identified
<i>Fgf2</i>	Viable	Mild cardiovascular, skeletal, neuronal
<i>Fgf3</i>	Viable	Mild inner ear, skeletal (tail)
<i>Fgf4</i>	Lethal, E4-5	Inner cell mass proliferation
<i>Fgf5</i>	Viable	Long hair, angora mutation
<i>Fgf6</i>	Viable	Subtle, muscle regeneration
<i>Fgf7</i>	Viable	Hair follicle growth, ureteric bud growth
<i>Fgf8</i>	Lethal, E7	Gastrulation defect, CNS development, limb development
<i>Fgf9</i>	Lethal, P0	Lung mesenchyme, XY sex reversal
<i>Fgf10</i>	Lethal, P0	Development of multiple organs, including limb, lung, thymus, pituitary
<i>Fgf12</i> (<i>Fhf1</i>)	Viable	Neuromuscular phenotype
<i>Fgf14</i> (<i>Fhf4</i>)	Viable	Neurological phenotypes
<i>Fgf15</i>	Lethal, E9.5	Not clear
<i>Fgf17</i>	Viable	Cerebellar development
<i>Fgf18</i>	Lethal, P0	Skeletal development

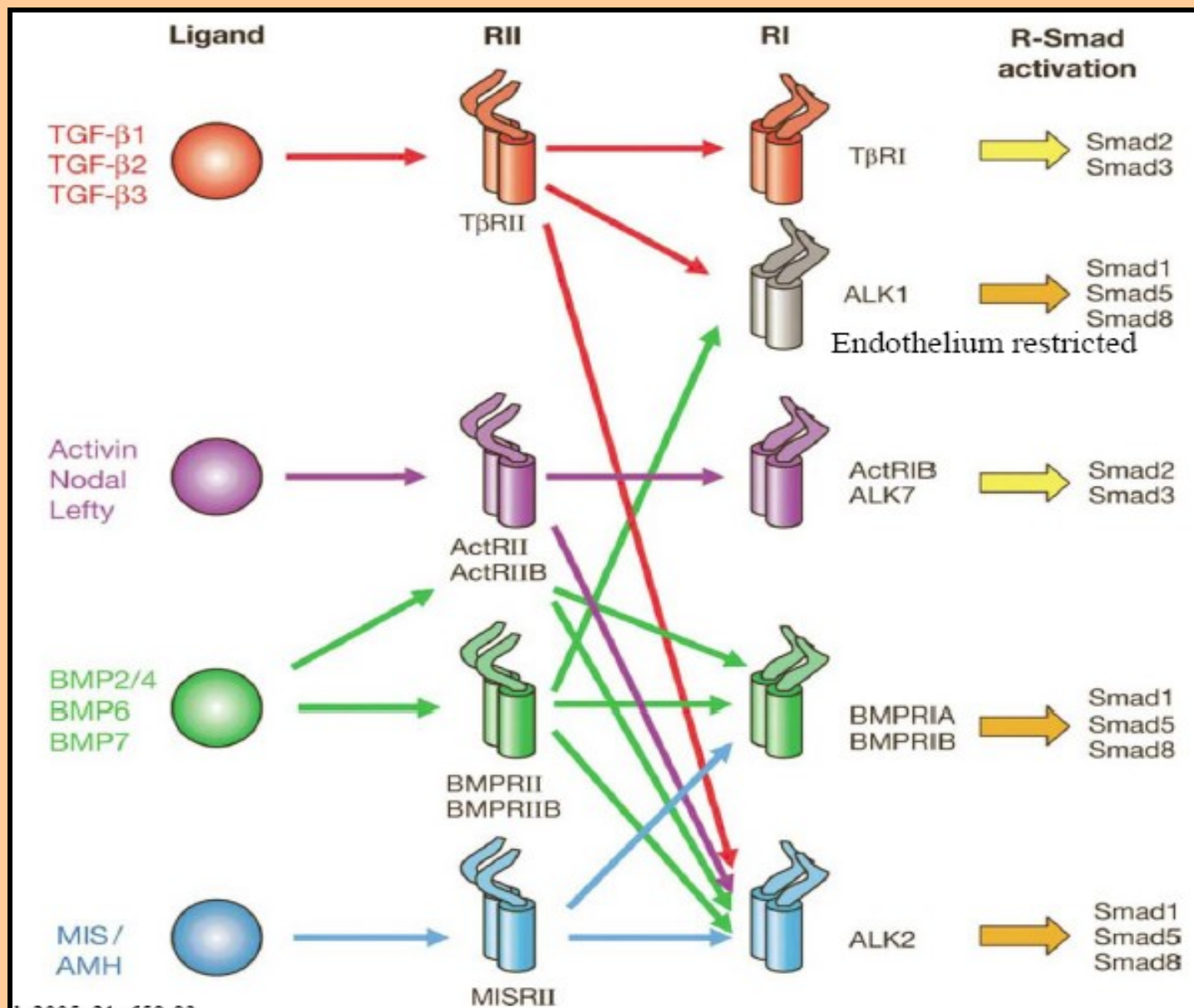
*E, embryonic day; P, postnatal day.

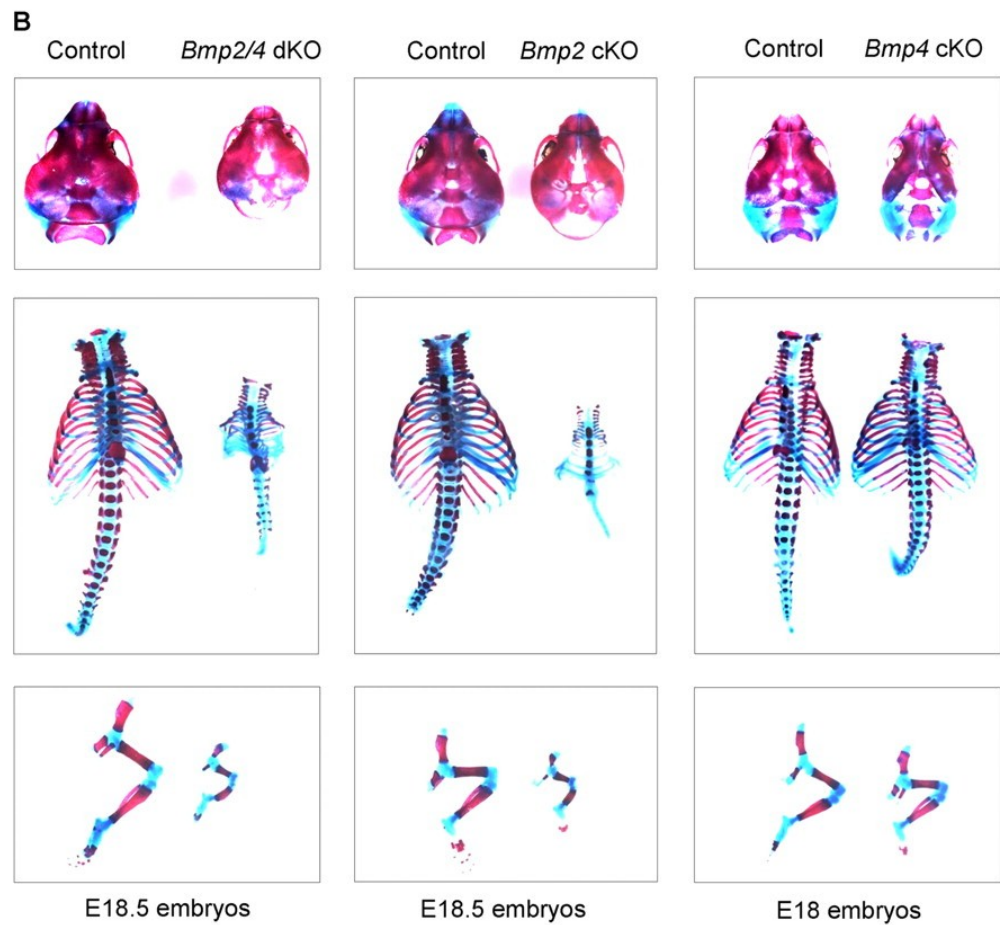
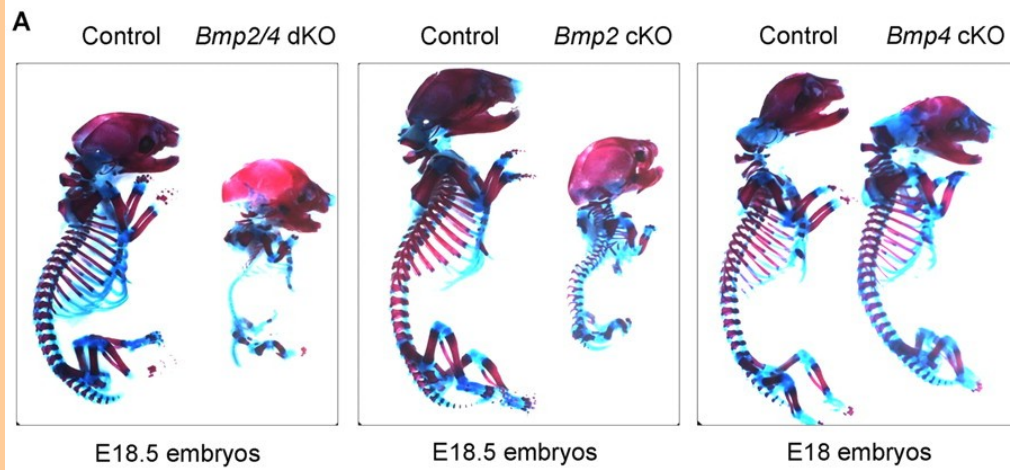
Signální dráha TGF β / BMPs

(Transformující růstový (*growth*) faktor β
kostní (*bone*) morfogenetické proteiny)

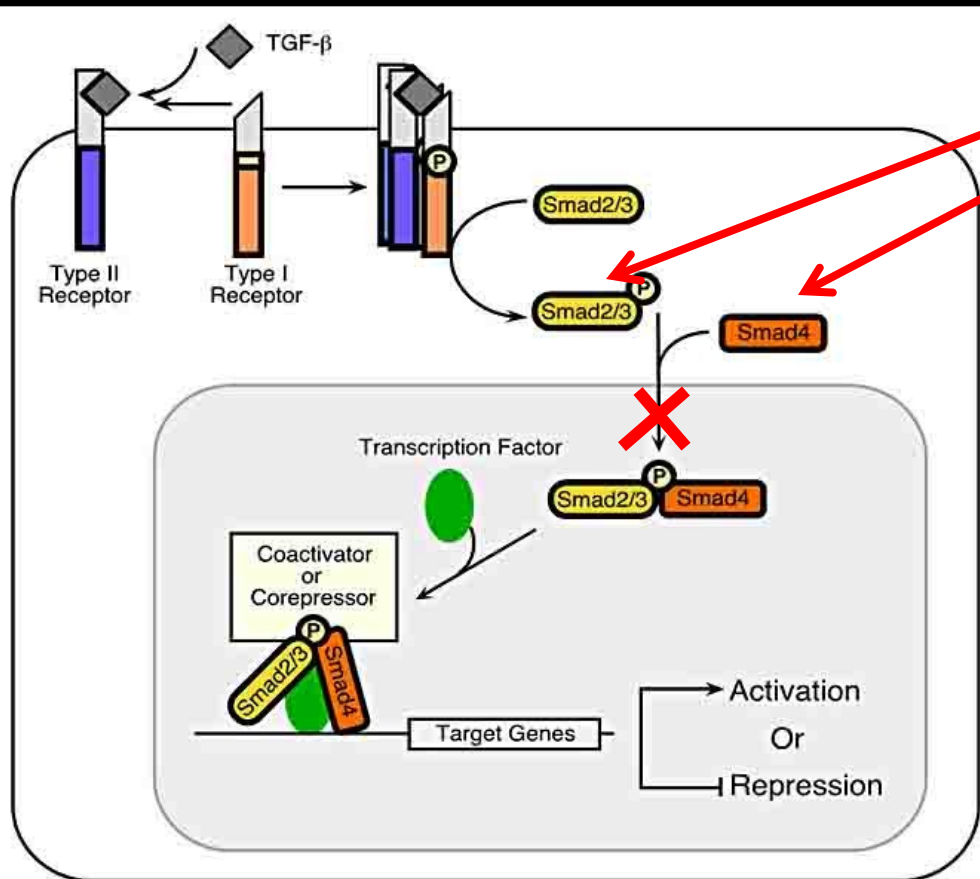
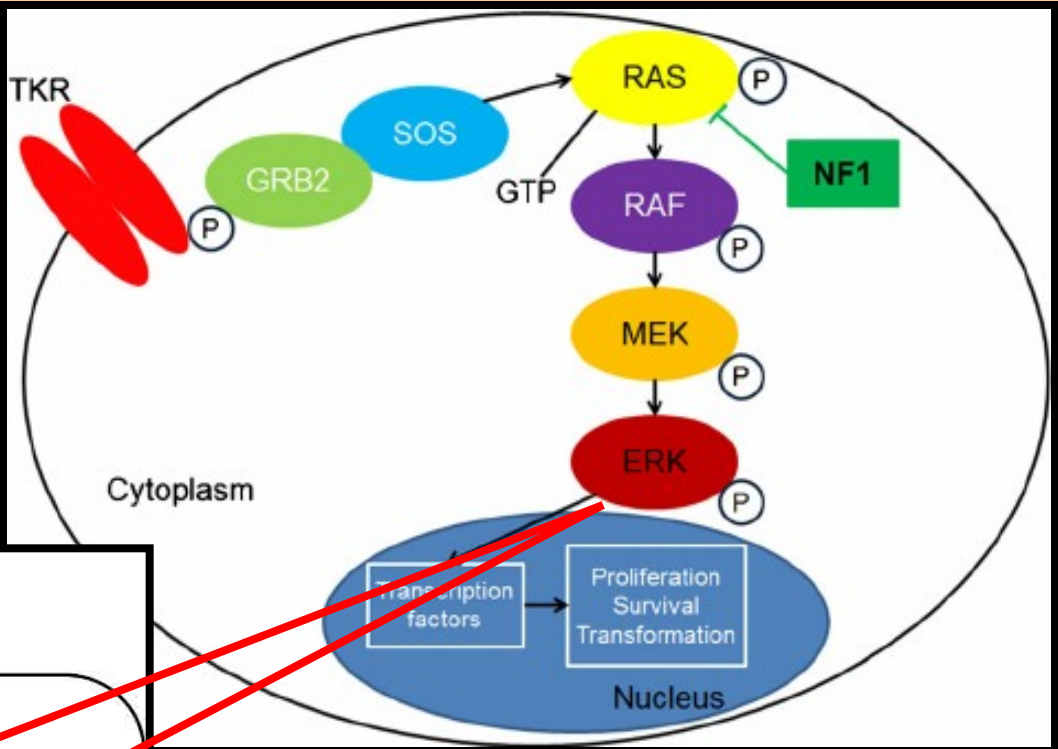


Interakce v signálování rodiny TGFbeta

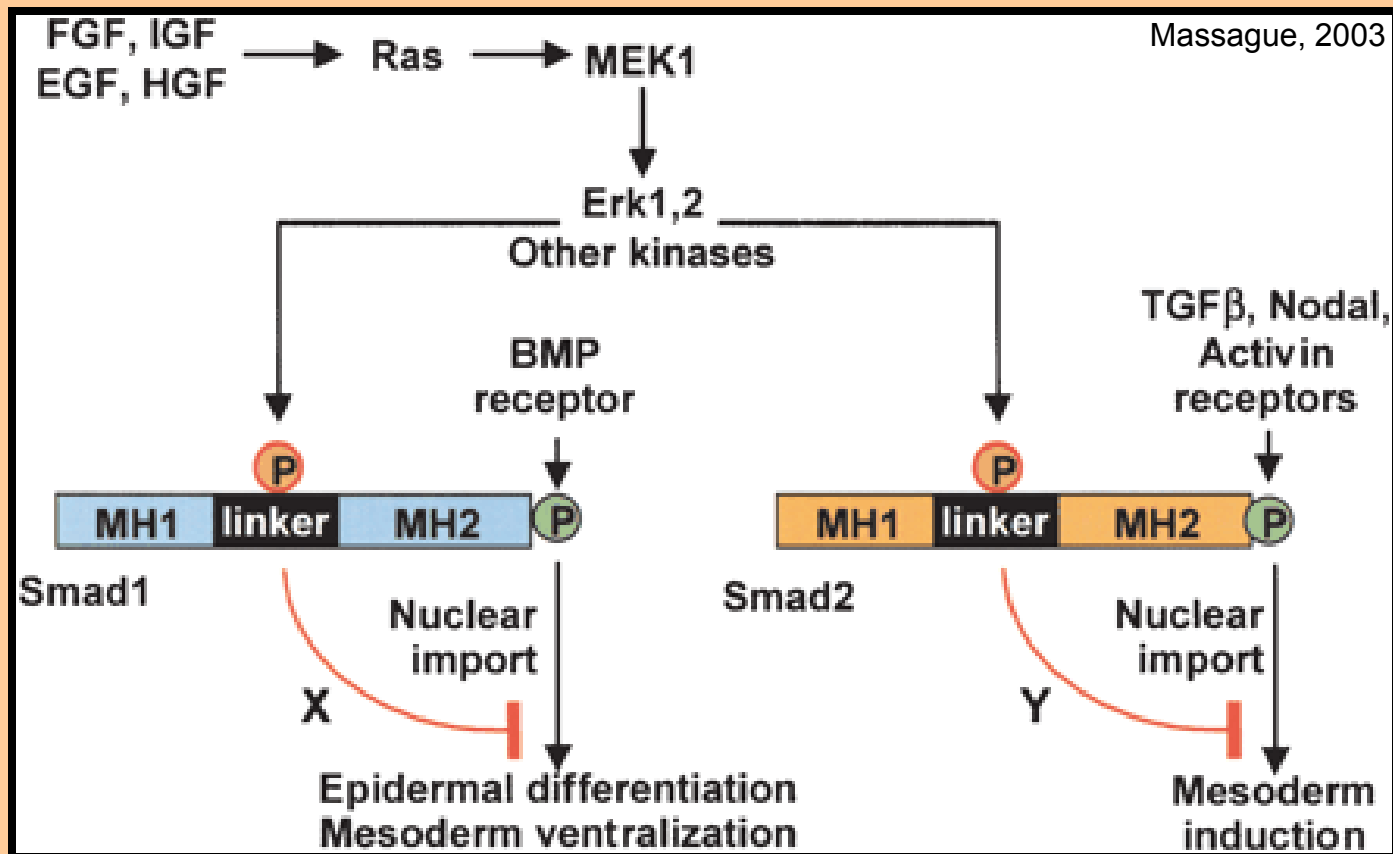




Interakce mezi signálními drahami TGFbeta signalizace x FGF / EGF signalizace

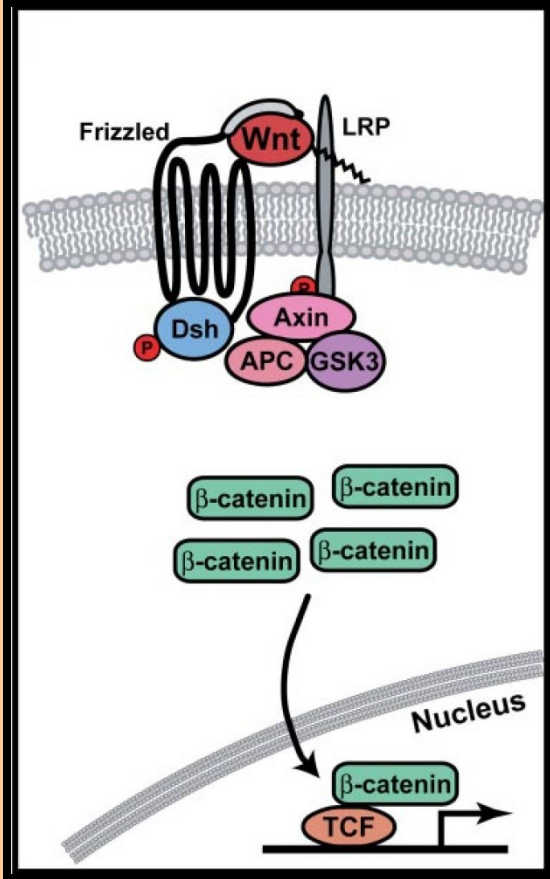
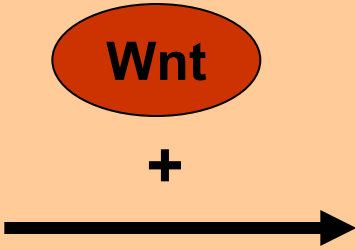
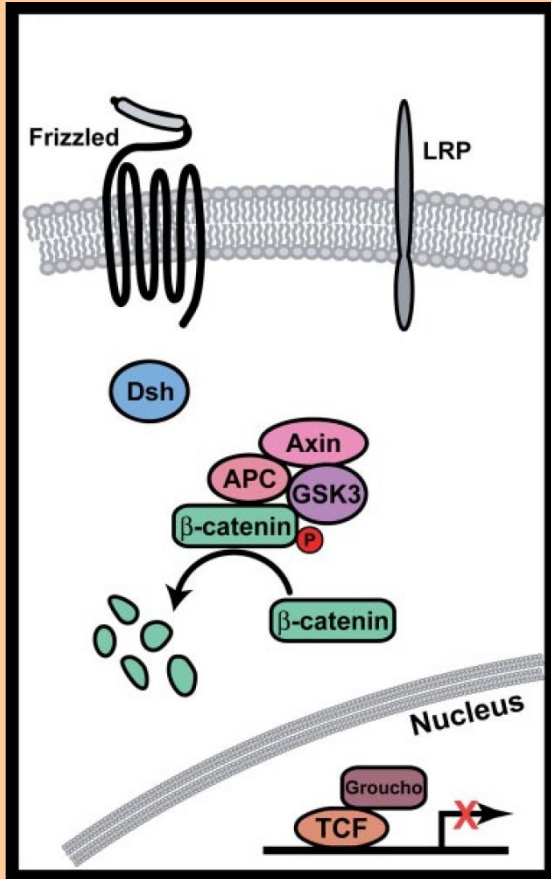


INTERKCE FGF & TGF β DRÁHY TRANSDUKCE SIGNÁLU

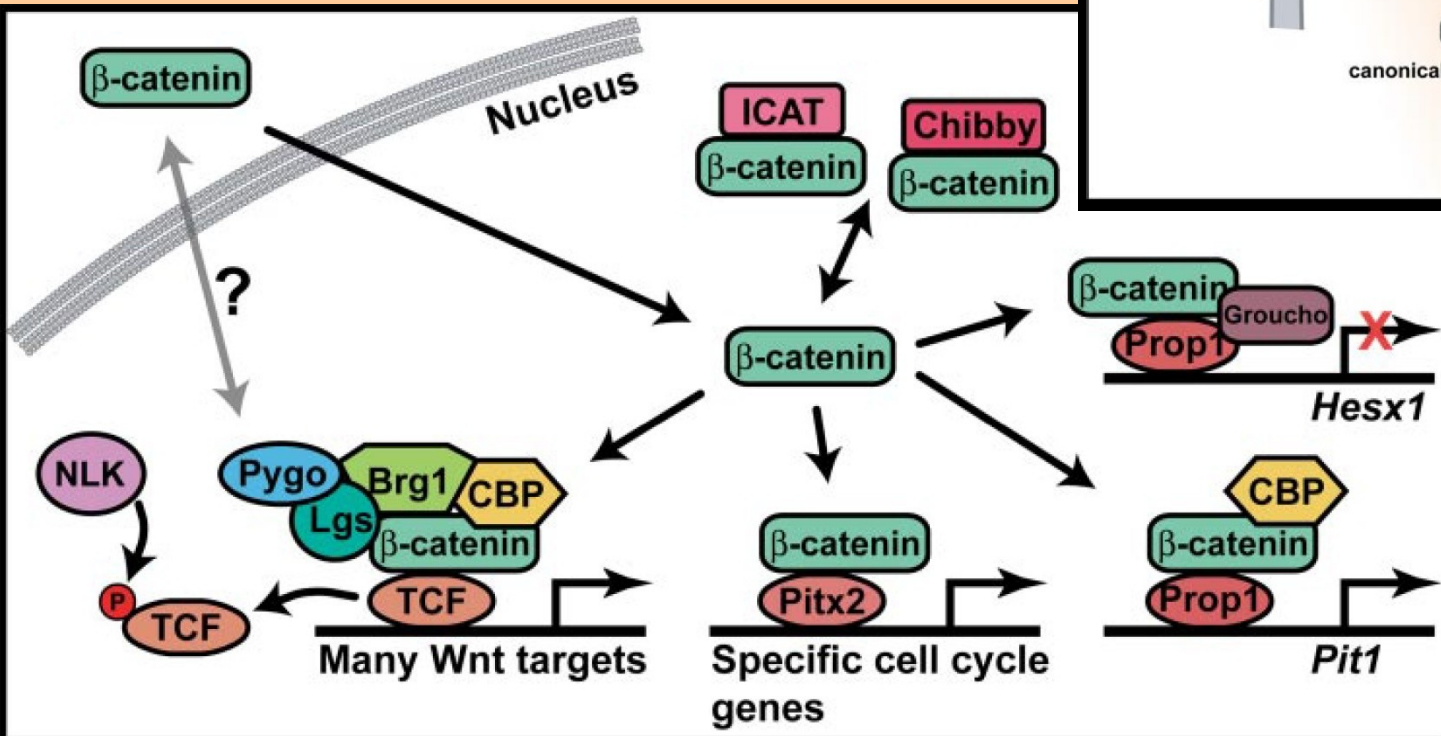
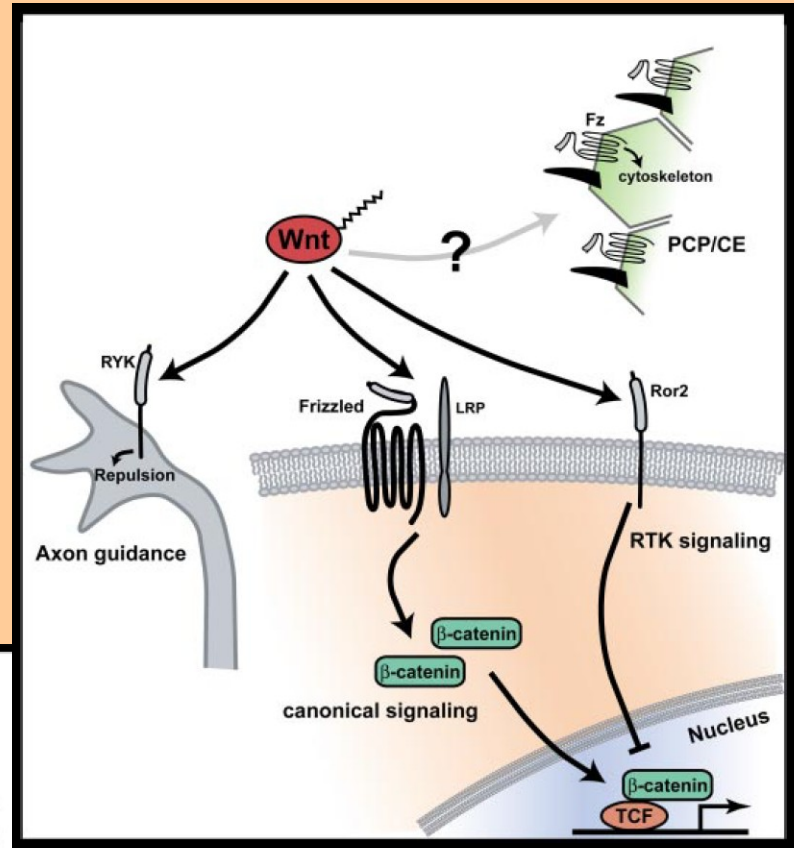


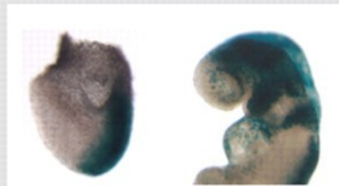
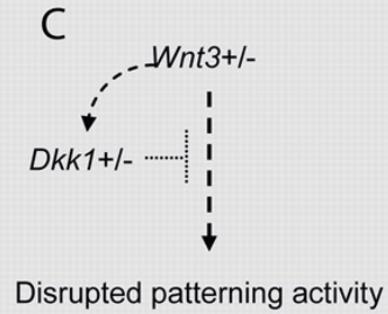
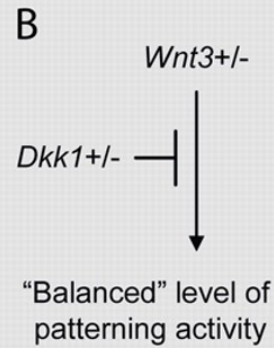
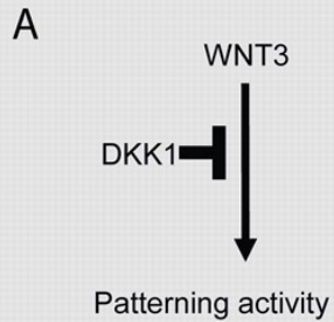
Signální dráha Wnts

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

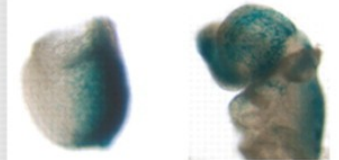


Signální dráha Wnts

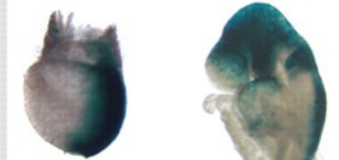




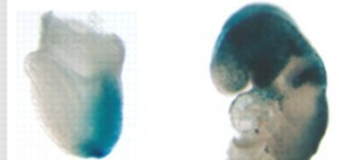
Wildtype: Normal head morphogenesis



Dkk1-/-; Wnt3+/+: Loss of anterior (head) structures



Dkk1+/-; Wnt3+/-: Head and/or trunk defects in 70% of embryos

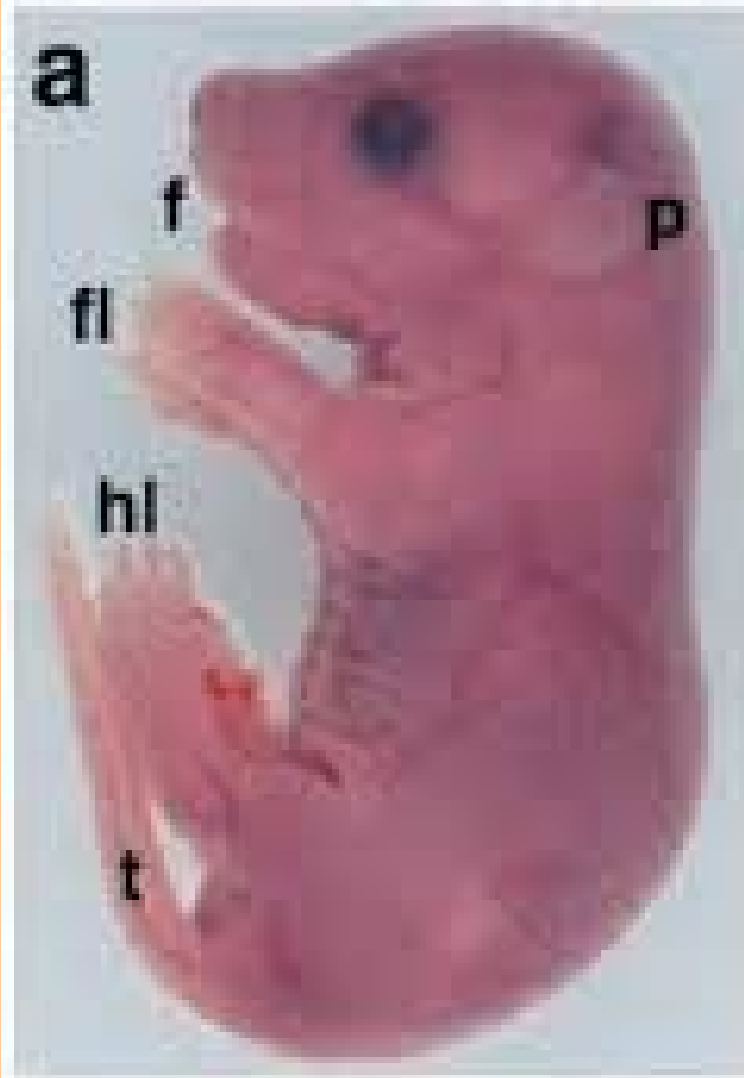


Dkk1-/-; Wnt3+/-: Partial rescue of head defects in 54% of embryos

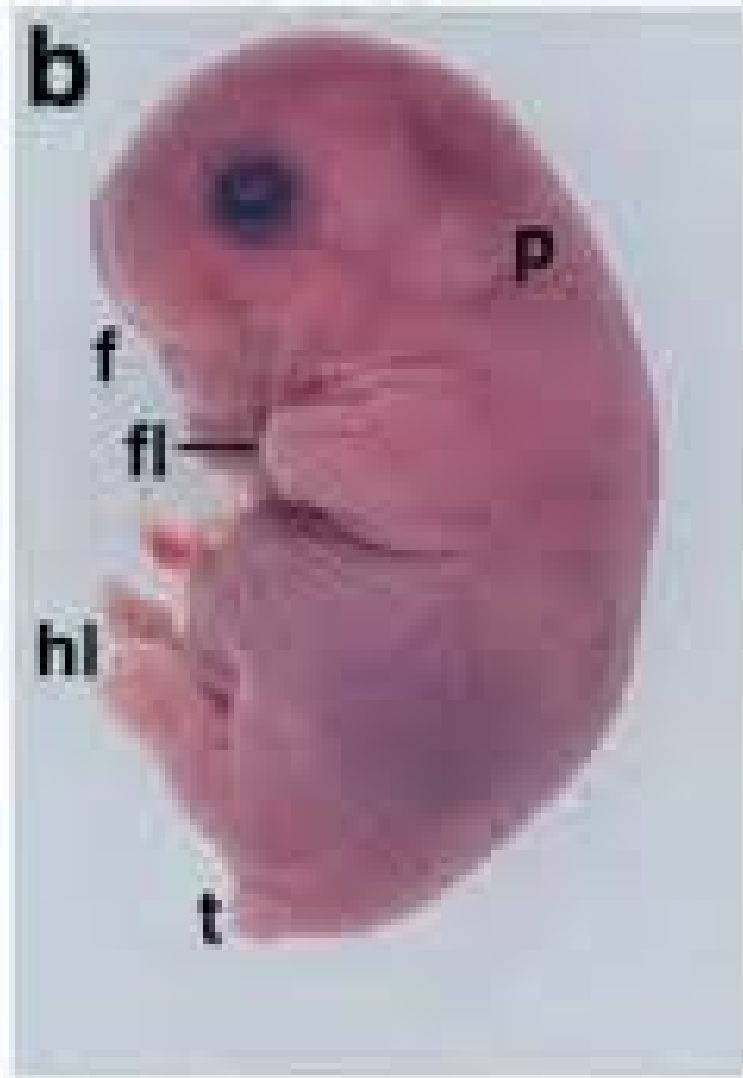


Dkk1+/+; Wnt3-/-: Failure to undergo gastrulation

Wnt5a^{wt}

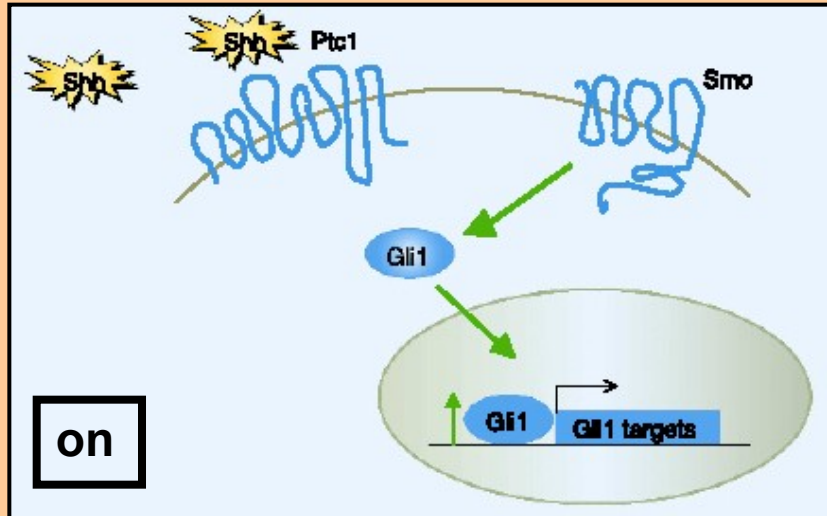
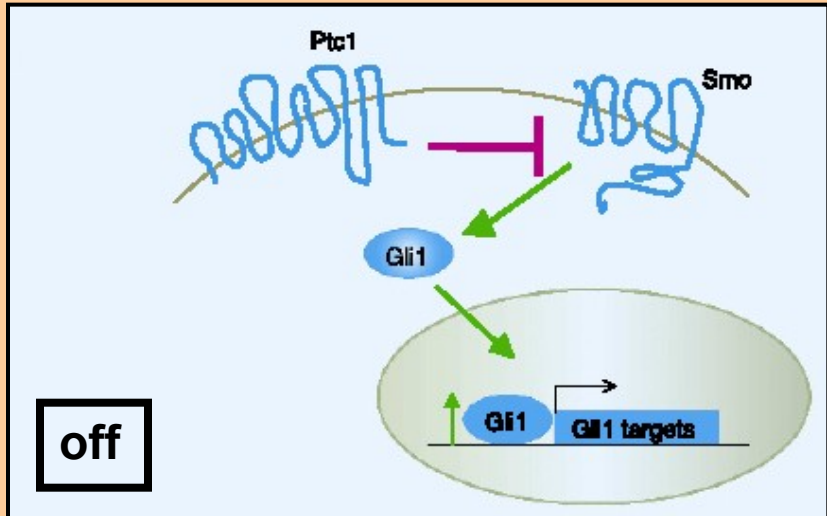


Wnt5a^{-/-}

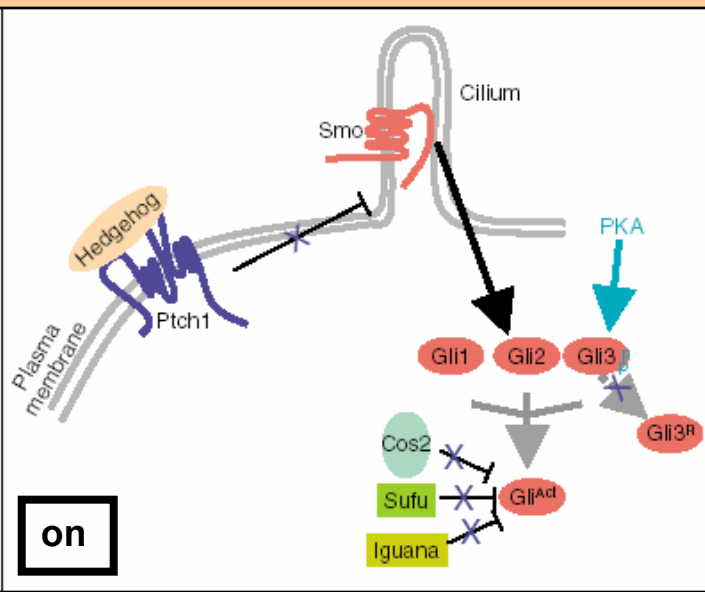
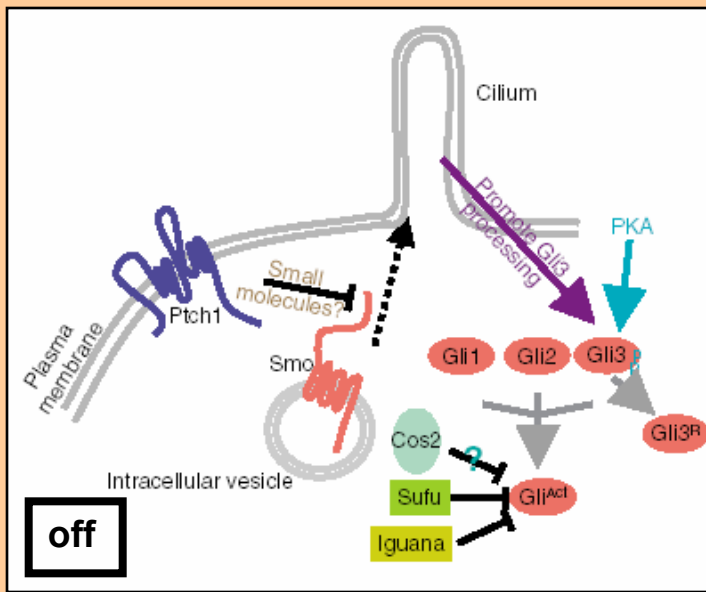


Signální dráha Hedgehog

sonic hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh)



Ptc – Patched *Smo* - Smoothened



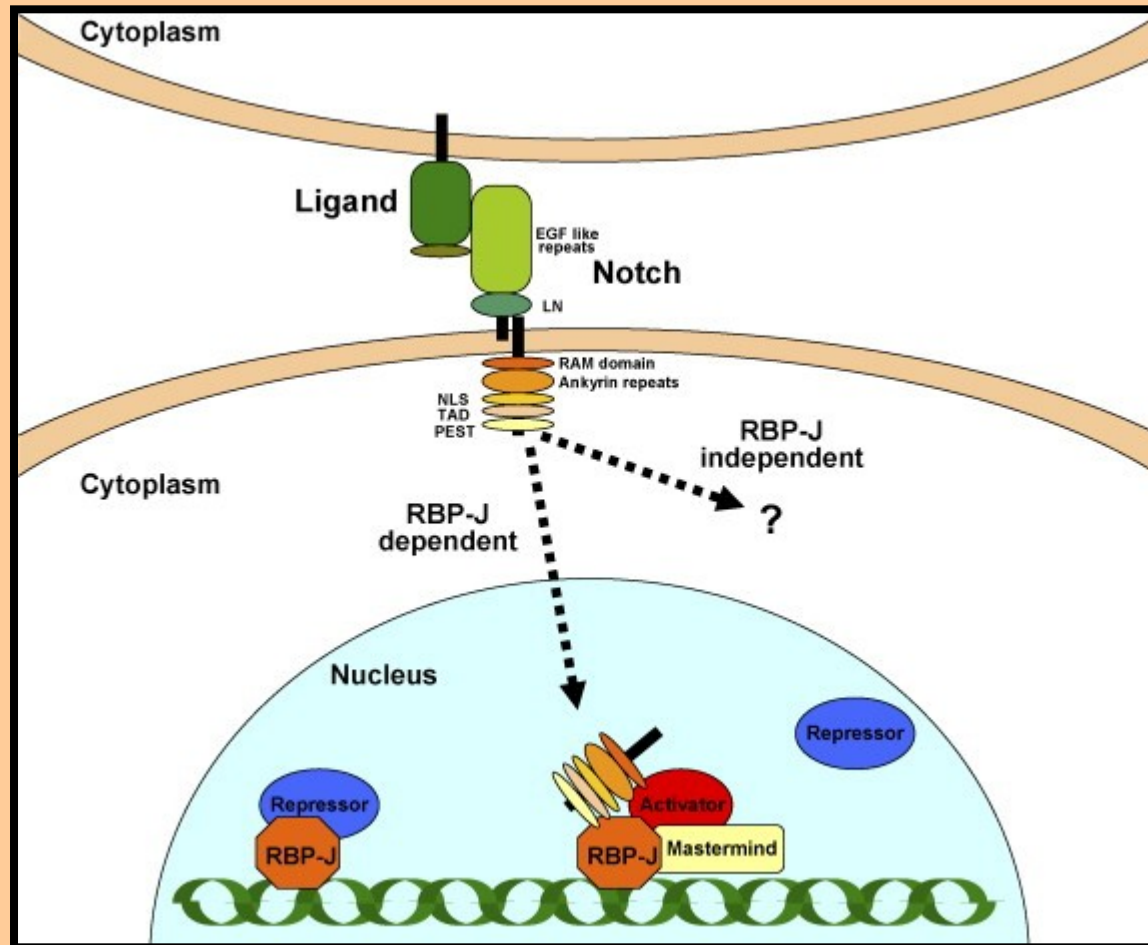
Wild-type



Shh^{-/-}

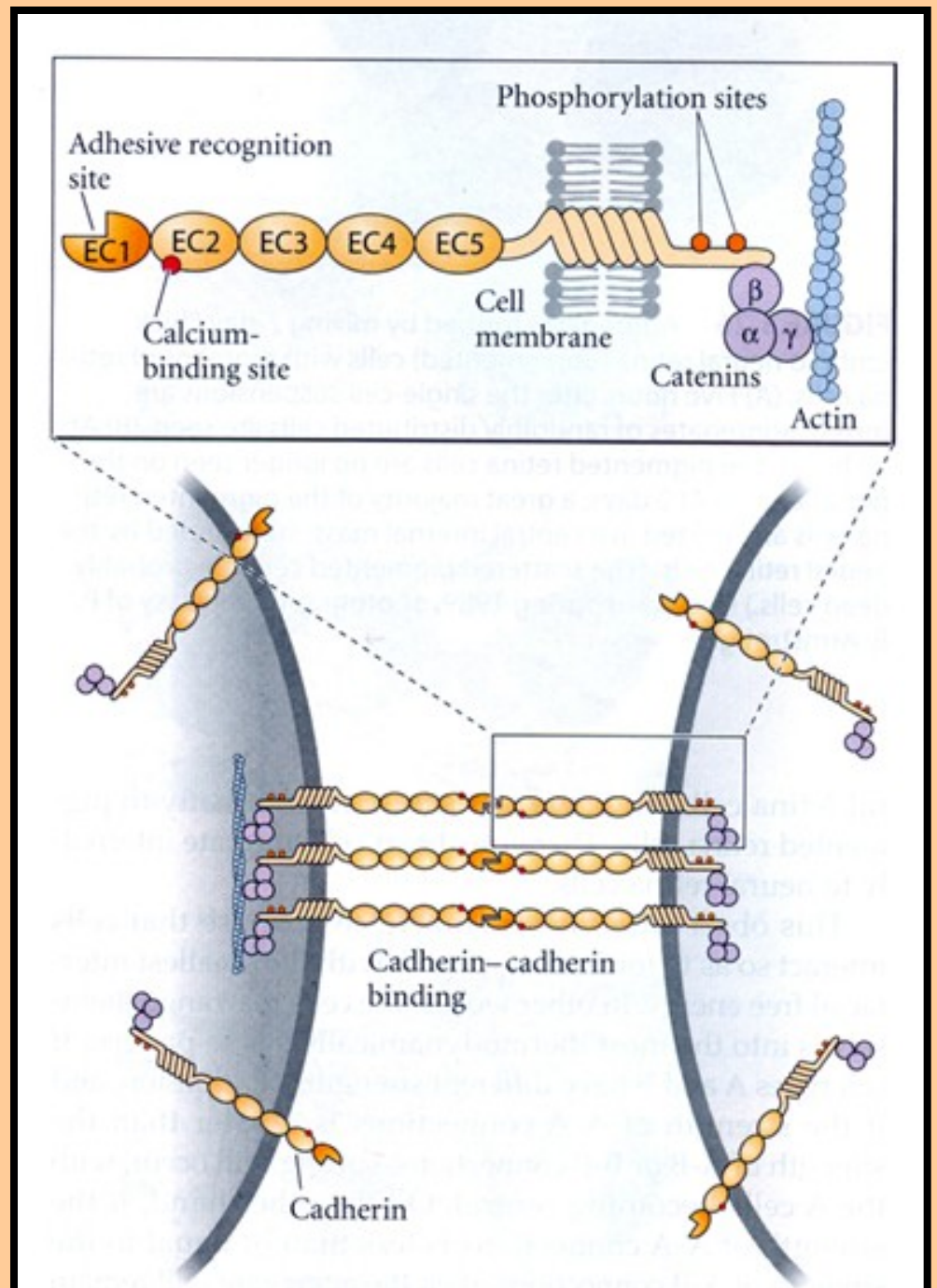


Signální dráha Notch

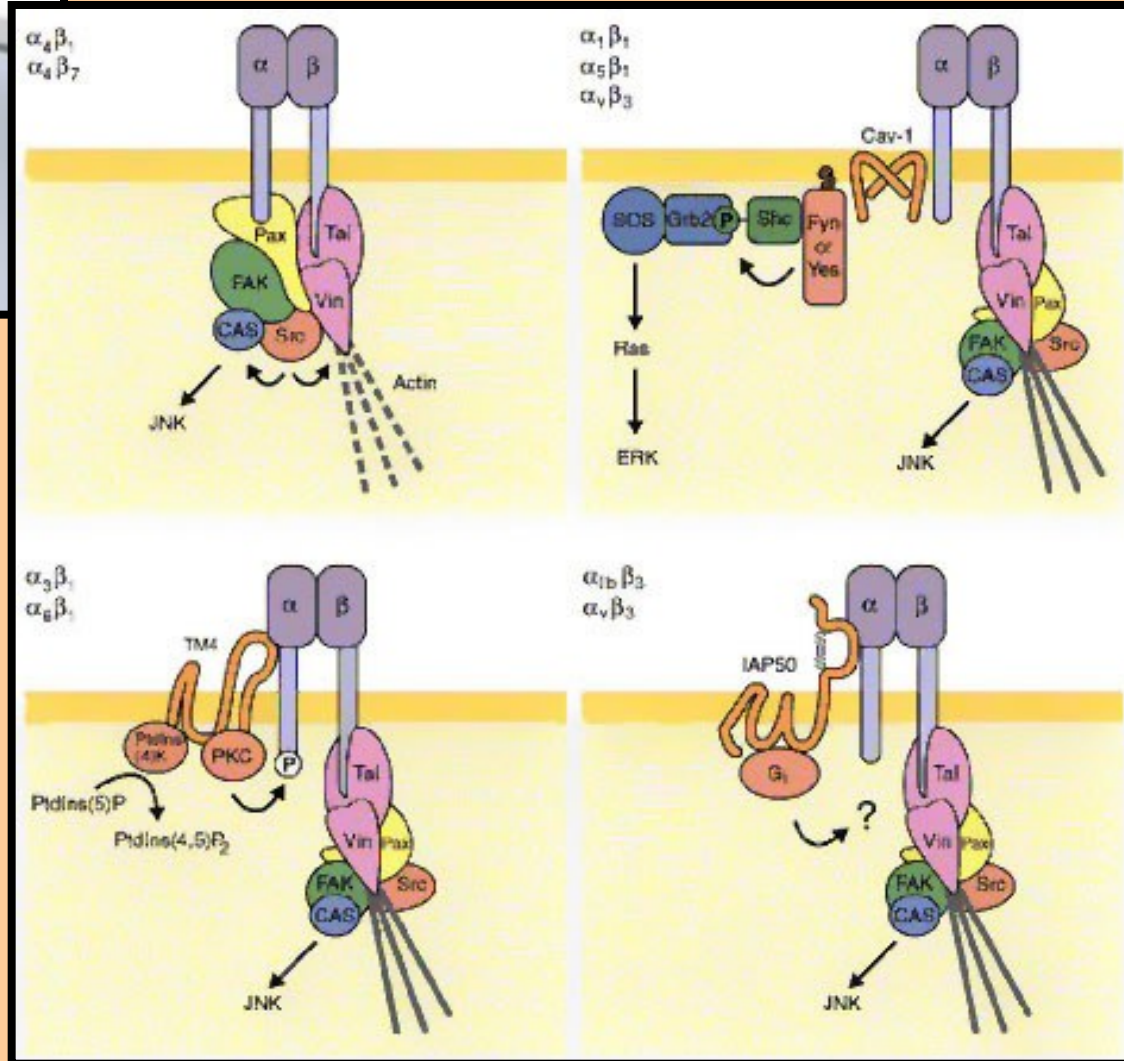
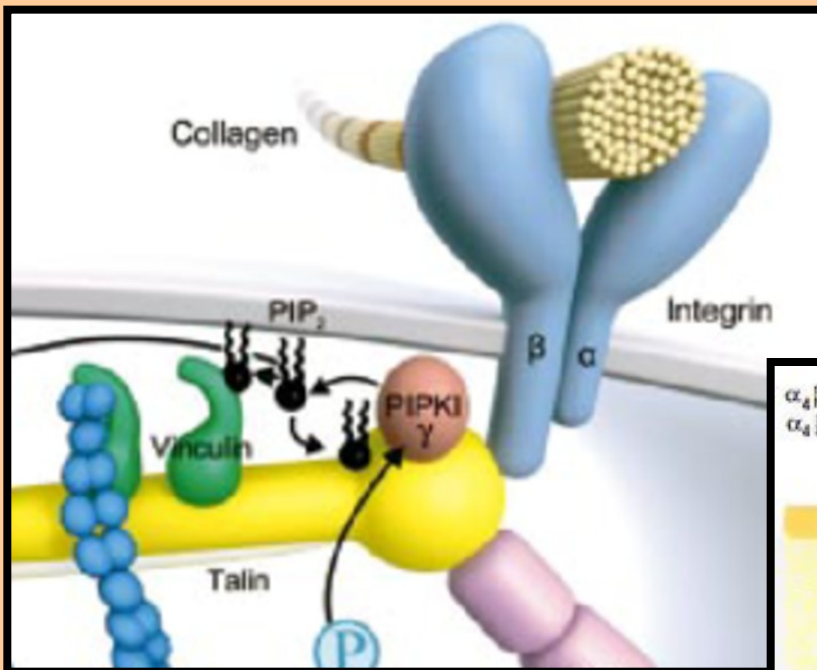


Signální transdukce Notch, po navázání ligandů (DSL rodina = Delta, Serrate, Lag-2; Jagged) dojde k odštěpení extracelulární části receptoru a následně i intracelulární (NICD – Notch intracellular domain), ta translokuje do jádra a v dimeru s CSL (= CBF1 – Cp binding factor 1) aktivuje transkripci.

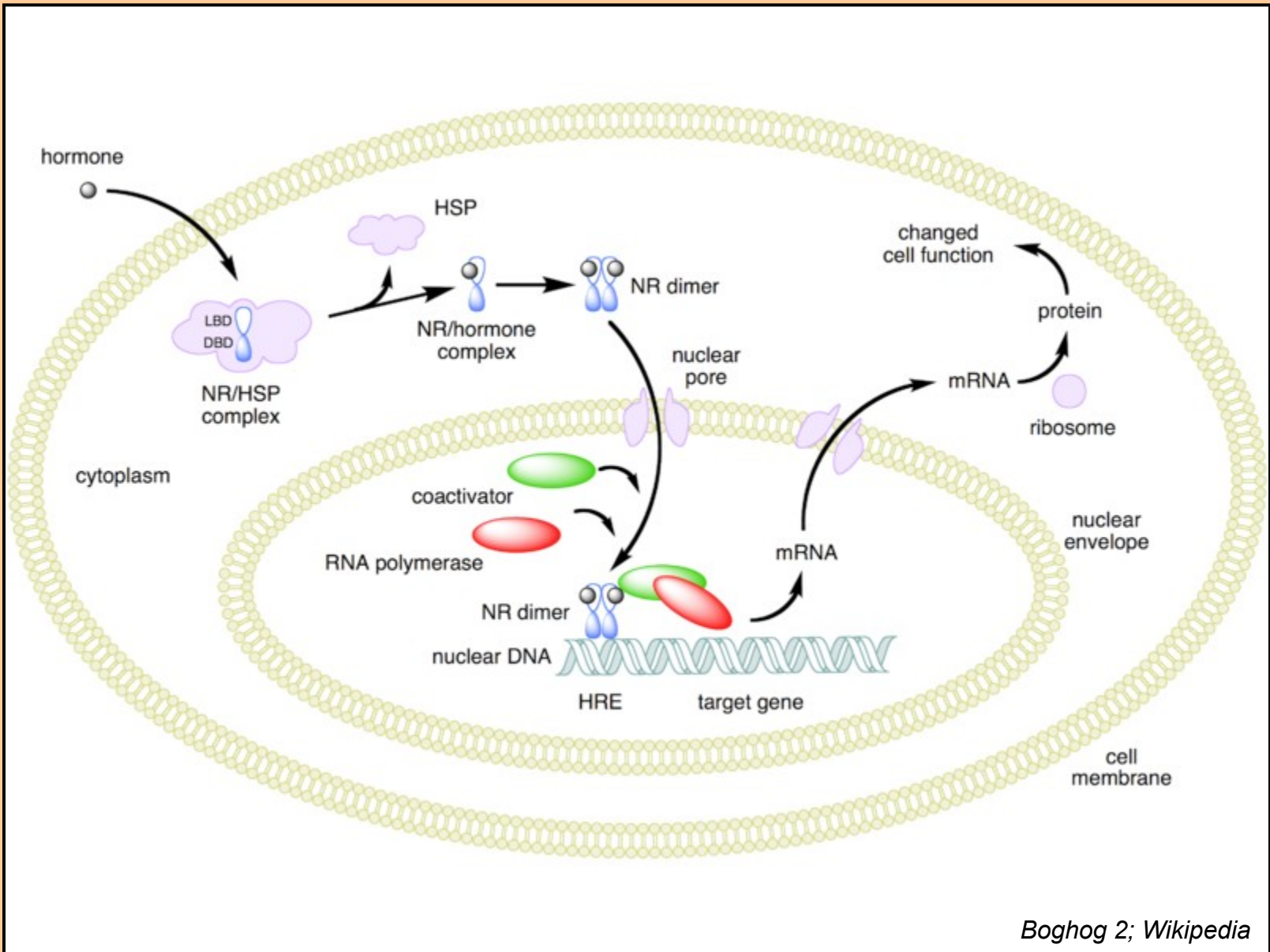
Kadheriny sprostředkovaná komunikace mezi buňkami



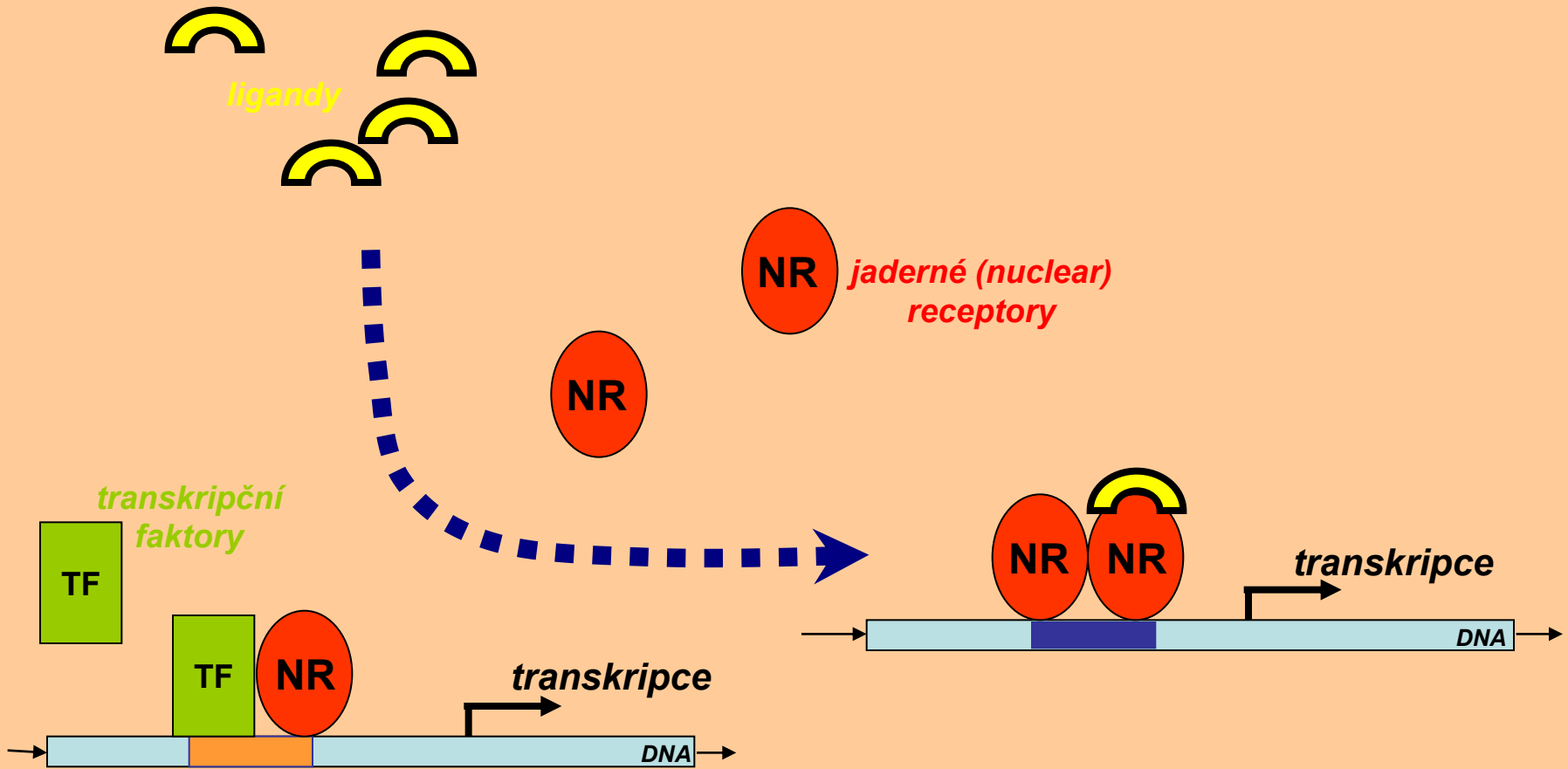
Integriny, aktivace vazbou ECM, zprostředkovaná transdukce signálu



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

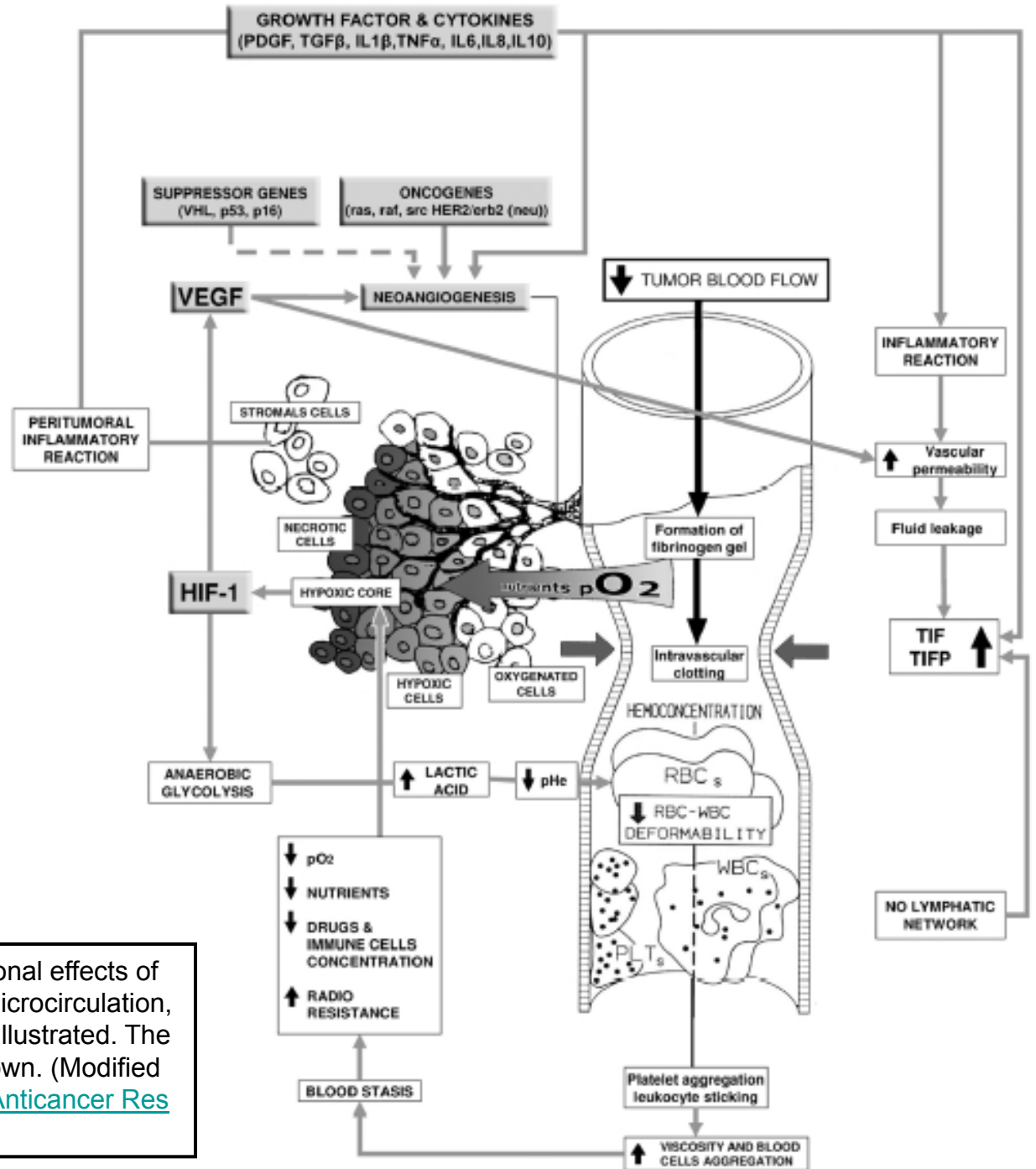


Kučera J.

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% (Tondevold et al., 1979; Chow et al., 2000).

HYPOXIE

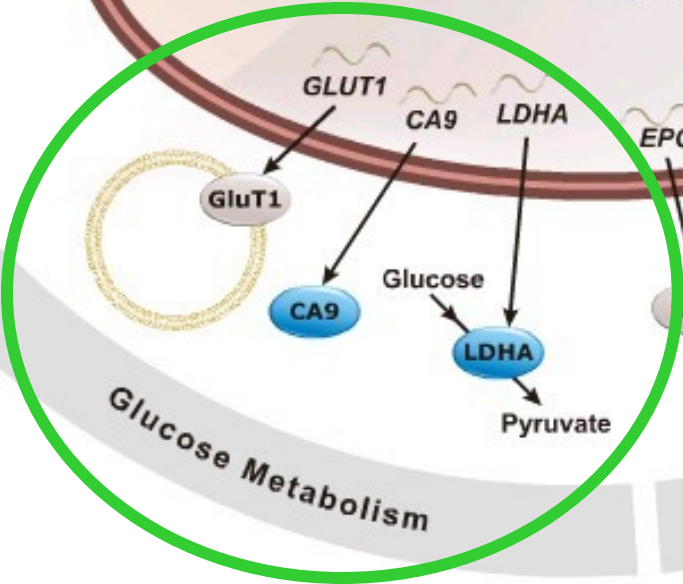
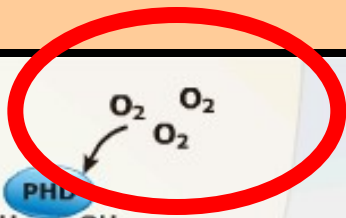
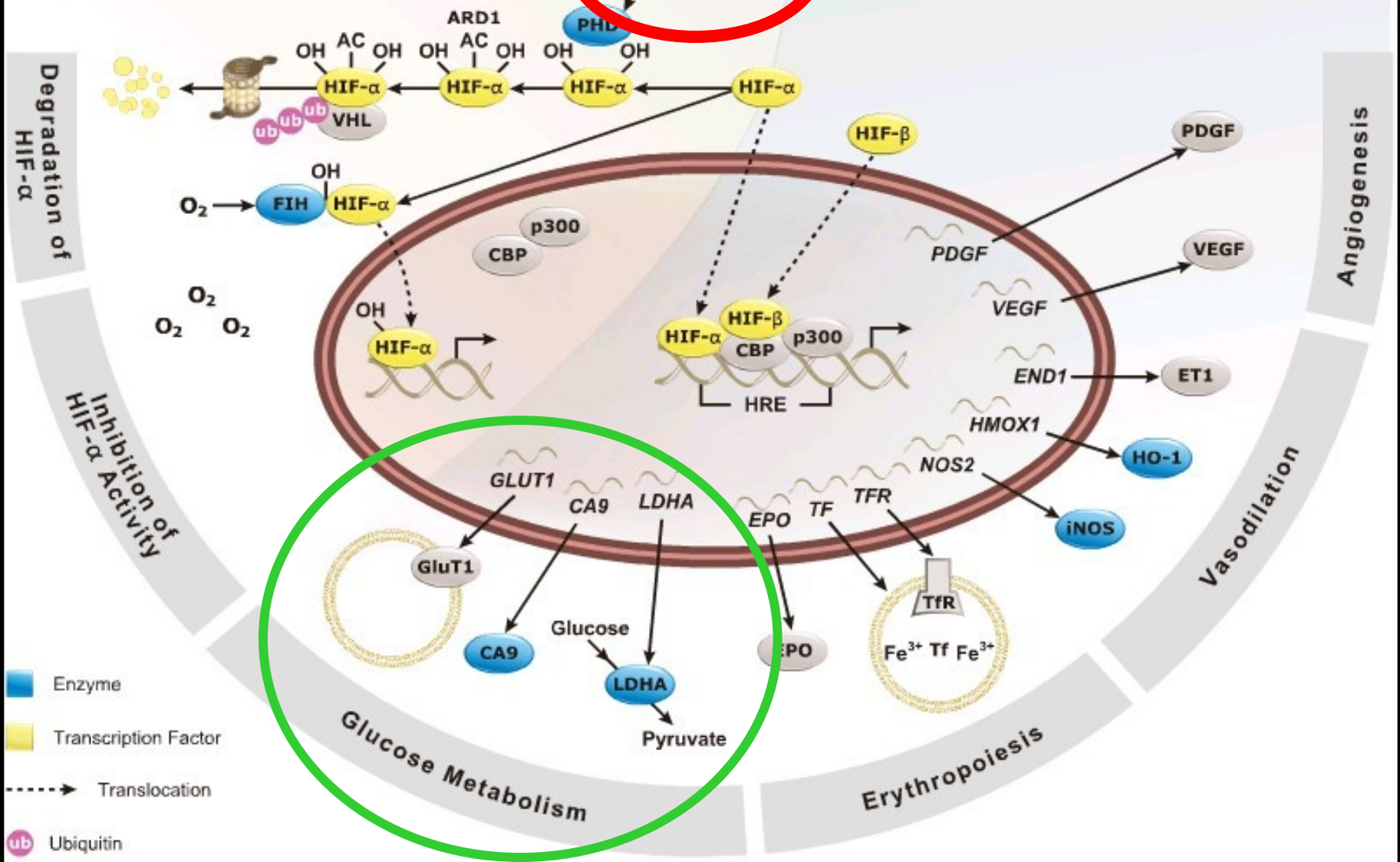
Embryogeneze
Organogeneze
Homeostáza
Pathologie



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.](#))

Normoxia

Hypoxia



HIF - hypoxií indukovaný faktor

HIF1 β (ARNT) + **HIF1 α** = **HIF1** (obecná buněčná odpověď na hypoxii)

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

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

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

+ **HIF3 α** = **HIF3** (kompetuje s HIF α , buněčně specifické)

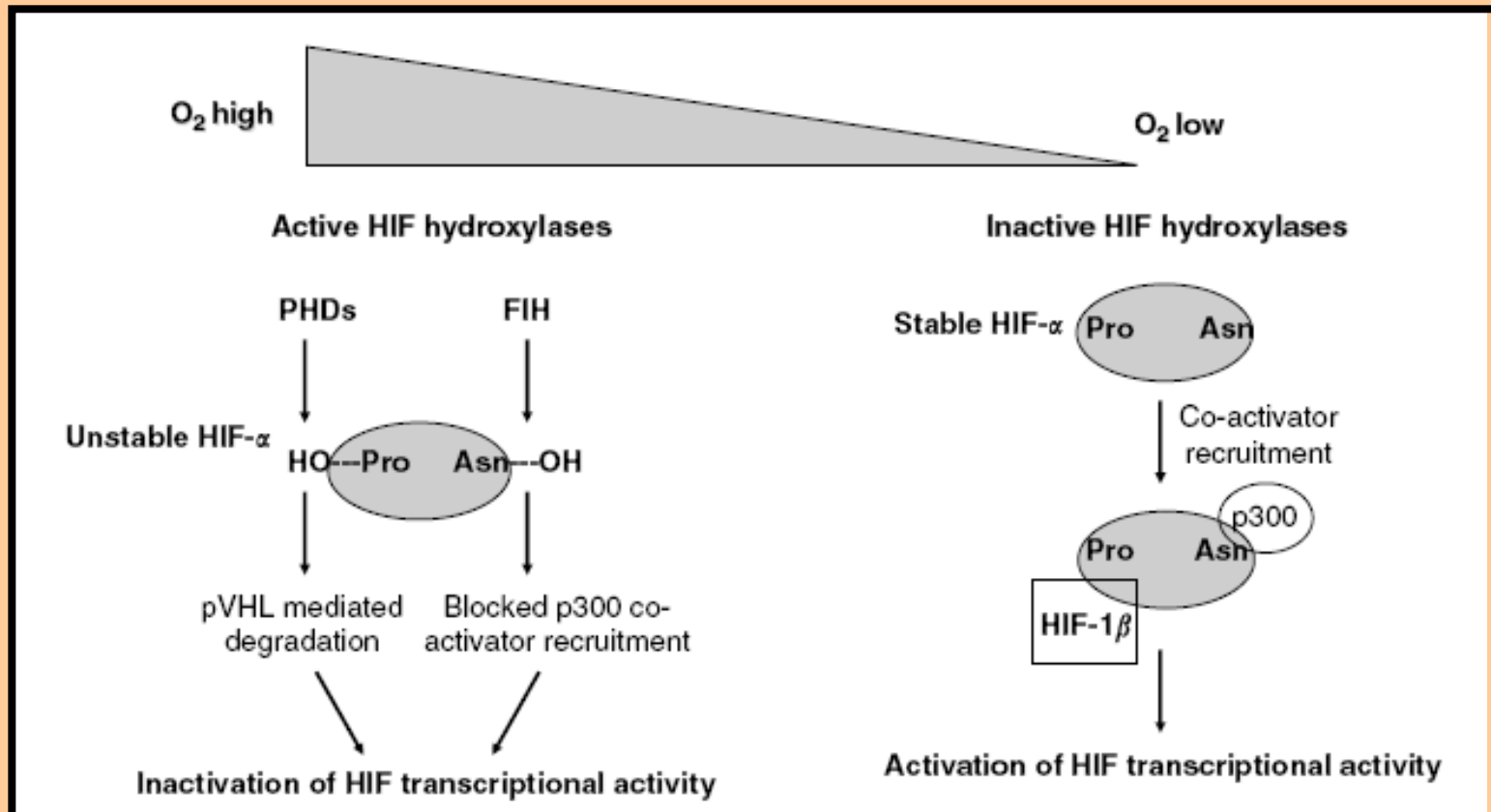
- inhibitor akce HIF (?)

Regulace HIF

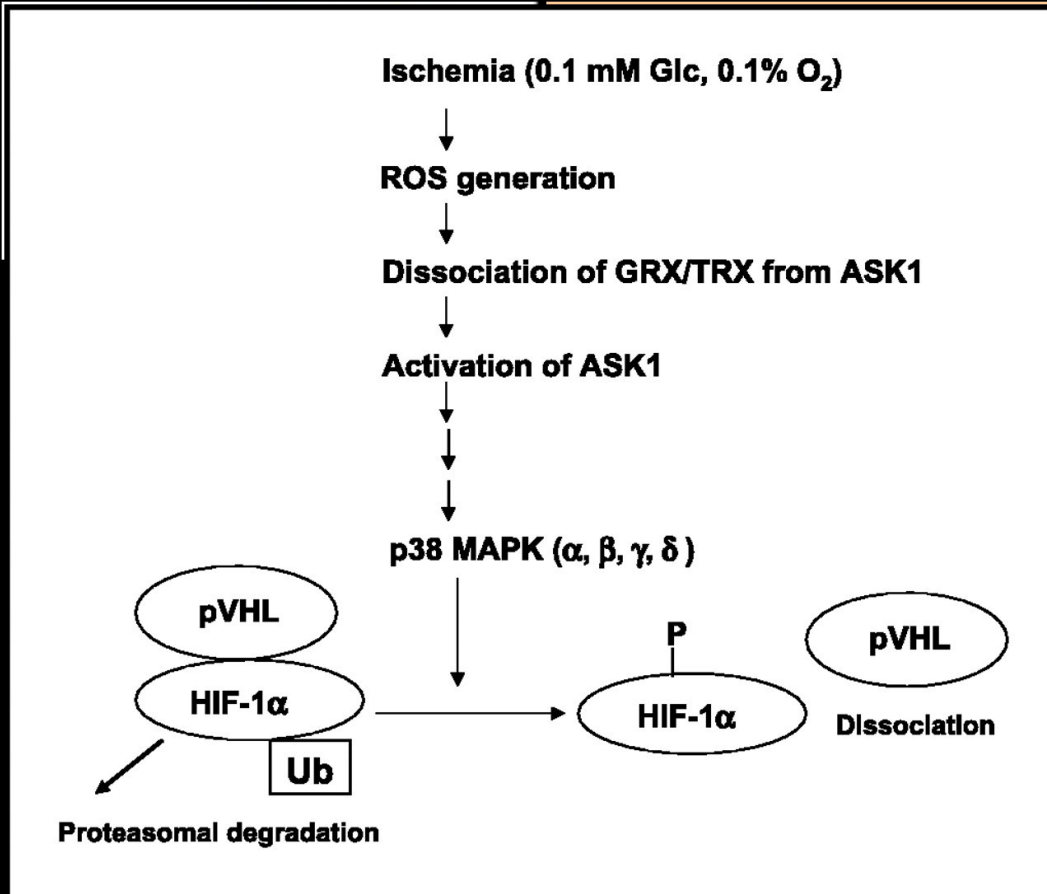
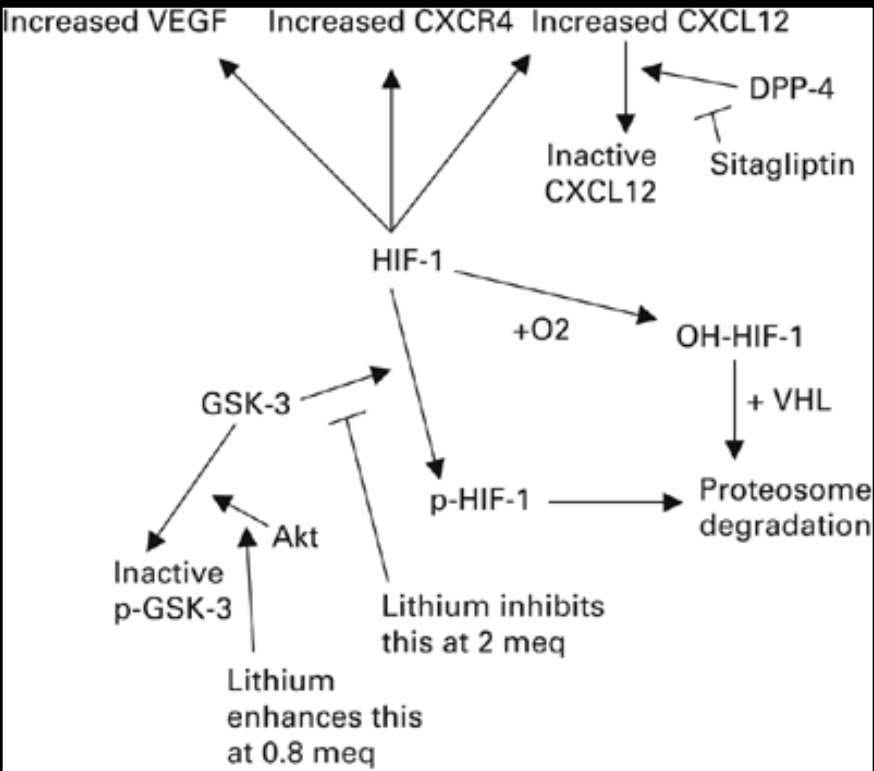
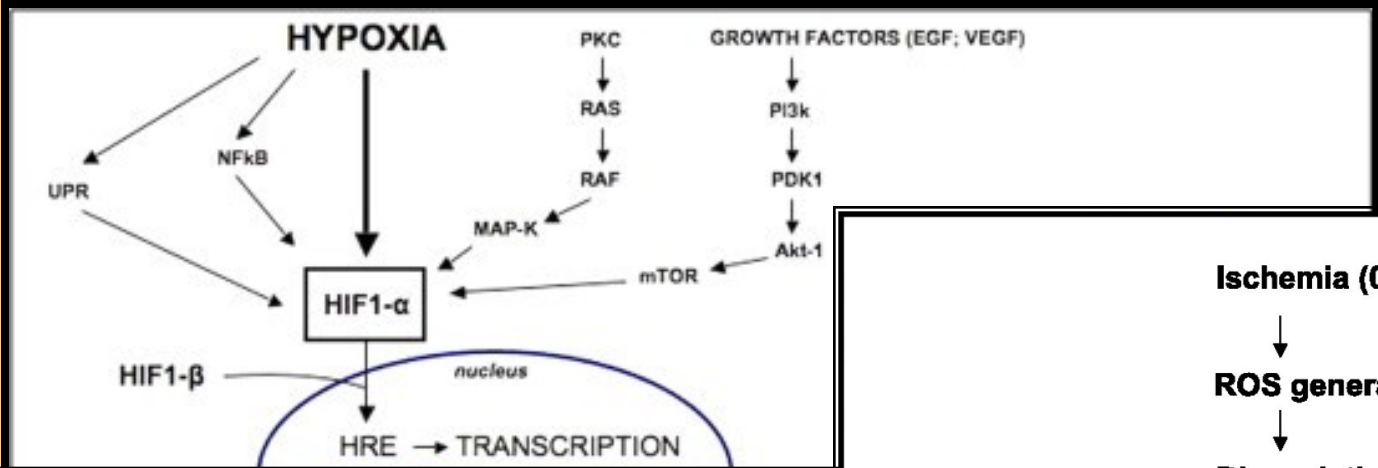
- všechny podjednotky HIF prakticky konstitutivní exprese
- regulace zejména degradací podjednotek HIF α
(- částečně i regulací transkripce)

Degradace HIF v přítomnosti O₂

- 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

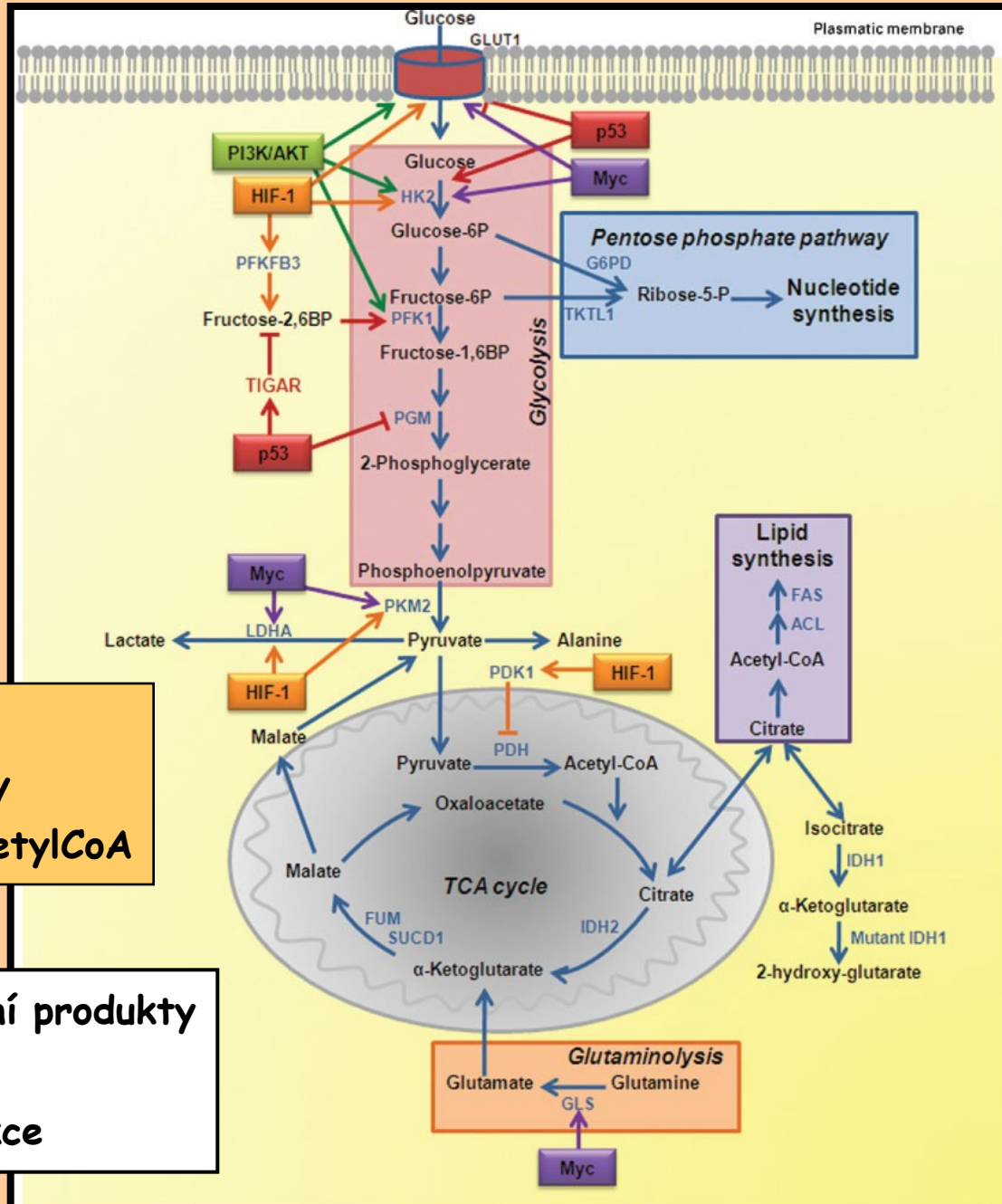
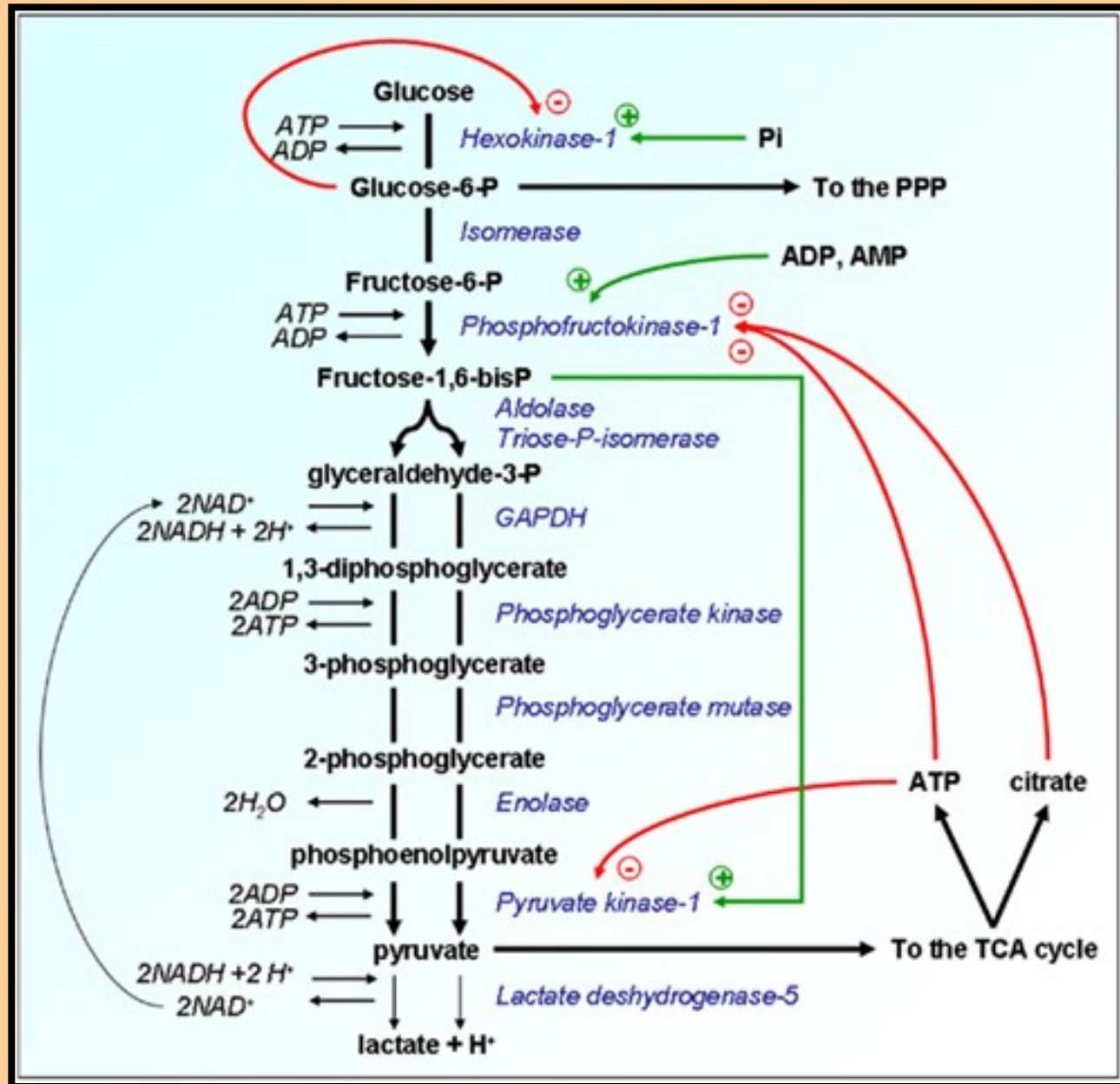


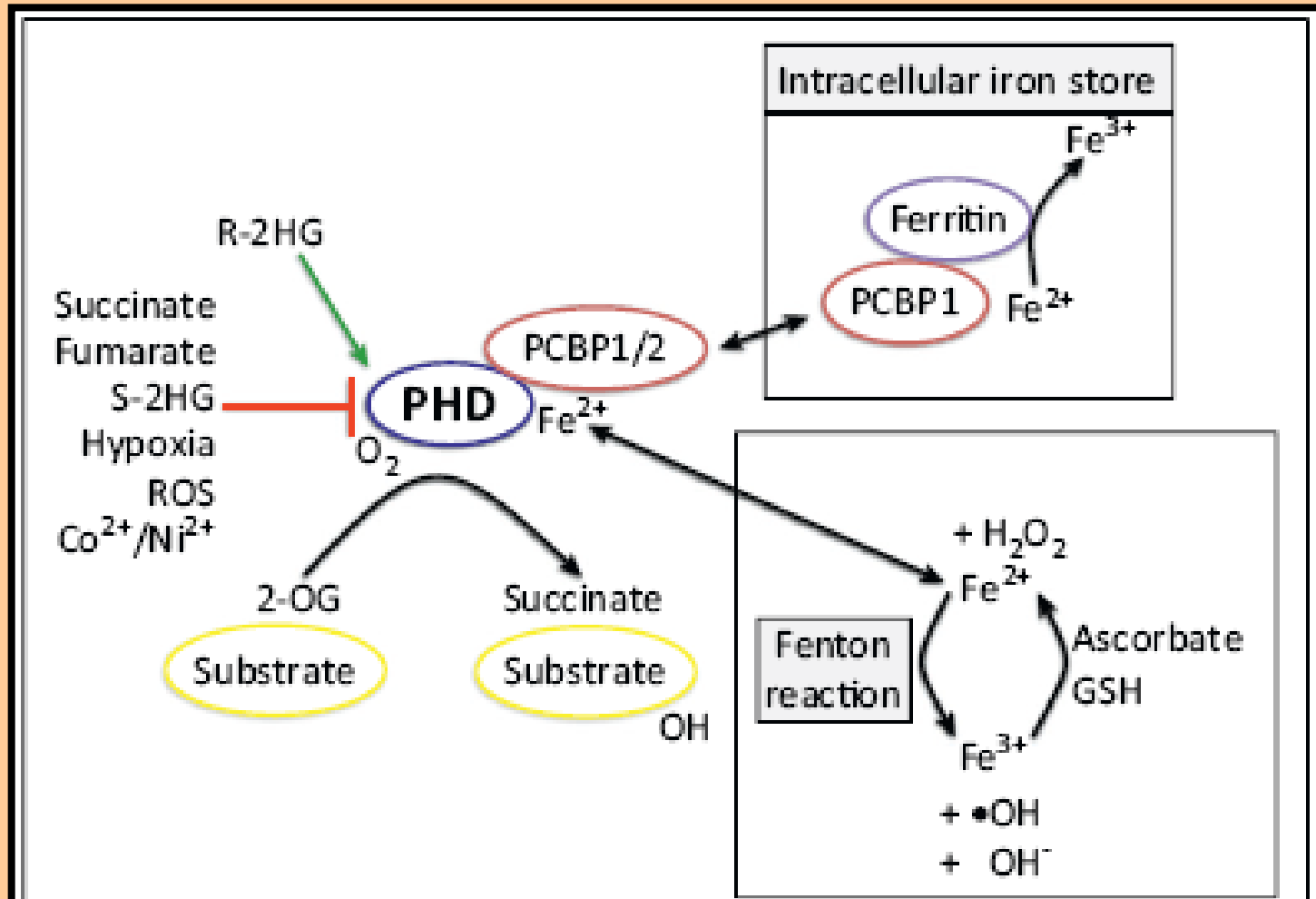
Figure 2 - Metabolic remodeling in cancer cells and regulation by signaling pathways involving oncogenes and tumor suppressor genes. The key enzymes of glycolysis, the TCA cycle, the pentose phosphate pathway, glutaminolysis, nucleotide, and lipid biosynthesis are shown as the regulation points by oncogenes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

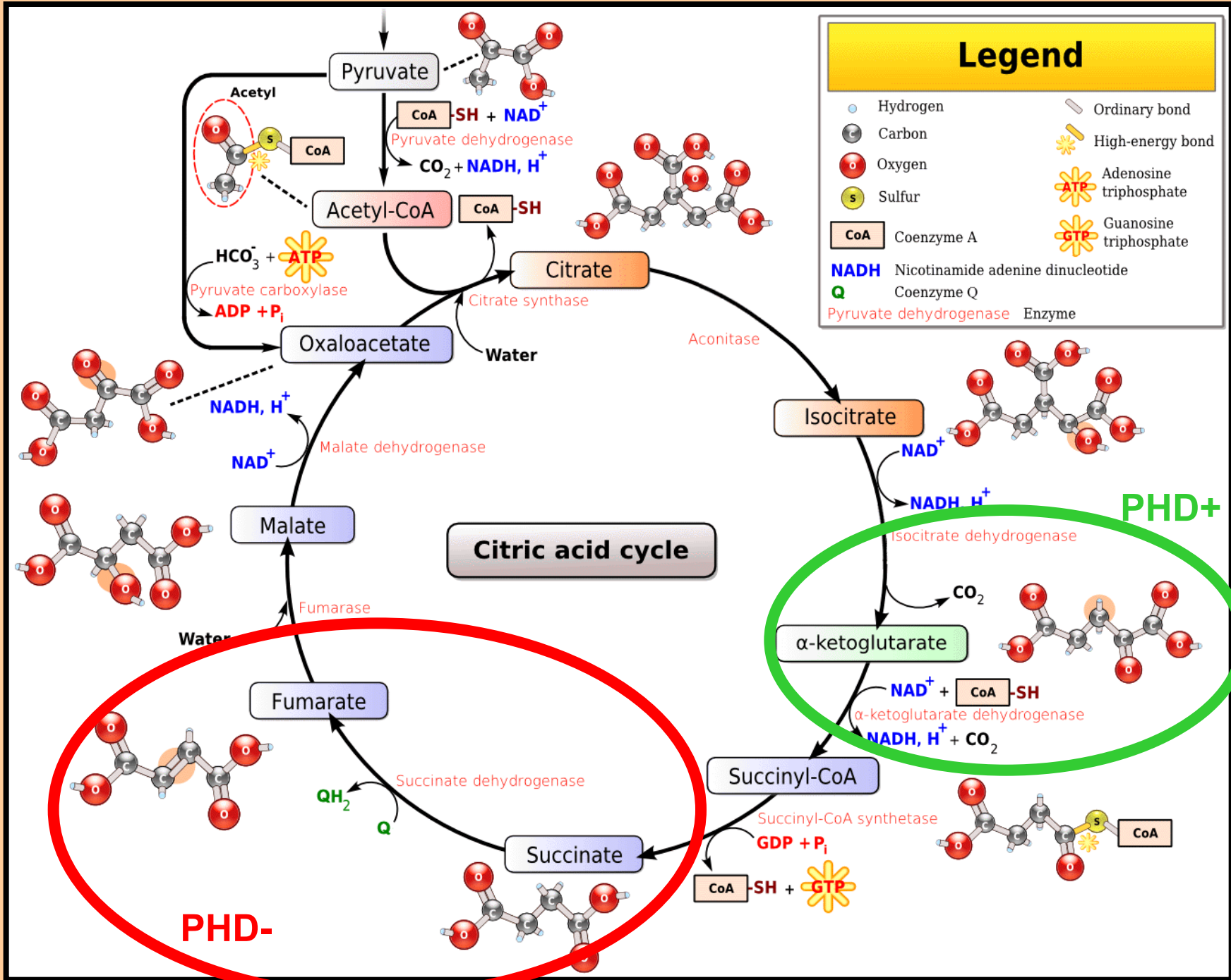
Inhibice glykolýzy v důsledku oxidativní fosforylace



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

- sensory kyslíku a regulátory stabilizace HIF-1 α
- kofaktory a-ketoglutarát (2-oxoglutarát), O₂, Fe²⁺, ...





Příklady dalších partnerů a substrátů PHD

Activating transcription factor 4	ATF4	PHD1/3	Binding	Negative regulation of transcription factor activity
Human precursor RNA processing 19	hPRP19	PHD3	Binding	Inhibition of cell death
Paired box gene 2	Pax2	PHD3	Hydroxylation (?)	Negative regulation of transcription factor activity
Sprouty homolog 2	Spry2	PHD1/2/3	Hydroxylation	Negative regulation of Sprouty 2-mediated inhibition of FGF-induced ERK1/2 activation ^a
TCP-1 ring complex ^a	TRiC	PHD3	Binding	Protein folding (?); activity (?)
Osteosarcoma amplified 9	OS-9	PHD2/3	Binding	Enhanced hydroxylase activity
A-kinase (PRKA) anchor protein 12	AKAP12	PHD2	Binding (?)	Enhanced association of HIF-1 α and PHD2
Mitogen-activated protein kinase organizer 1	Morg1	PHD3	Binding	Enhanced hydroxylase activity
Inhibitor of growth protein 4	ING4	PHD2	Binding	Enhanced hydroxylase activity
Iron-only hydrogenase-like protein 1	IOP1	PHD2	Binding (?)	Enhanced hydroxylase activity (?)
Melanoma antigen gene protein-A11	MAGE-11	PHD2	Binding	Decreased hydroxylase activity
Cerebellar degeneration-related protein 2	Cdr2	PHD1	Binding	Enhanced repression of HIF
Myogenin	Myogenin	PHD3	Hydroxylation	Stabilization of myogenin protein
Kinesin-like protein 1B β	KIF1B β	PHD3	Hydroxylation (?)	Induction of apoptosis
Large subunit of RNA polymerase II	Rbp1	PHD1/2	Hydroxylation	Activation of Rbp1 and tumor growth promotion
β (2)-Adrenergic receptor	β (2)AR	PHD3	Hydroxylation	Regulation of receptor degradation
Human homolog of the <i>Caenorhabditis elegans</i> biological clock protein CLK-2	HCLK2	PHD3	Hydroxylation	Promotes DNA damage response
Cysteine synthase like-1	CYSL-1	EGL-9	Binding	Inhibition of Egl-9 in hypoxia
Phospho-diesterase 4D	PDE4D	PHD2	Binding; hydroxylation	Regulation of intracellular cAMP levels

MITOCHONDRIE x HYPOXIE

Zralejší mitochondrie => víc ATP

=> víc ROS (reaktivní kyslíkové radikály)

=> poškození DNA

=> peroxidace lipidů, deregulace signálních drah

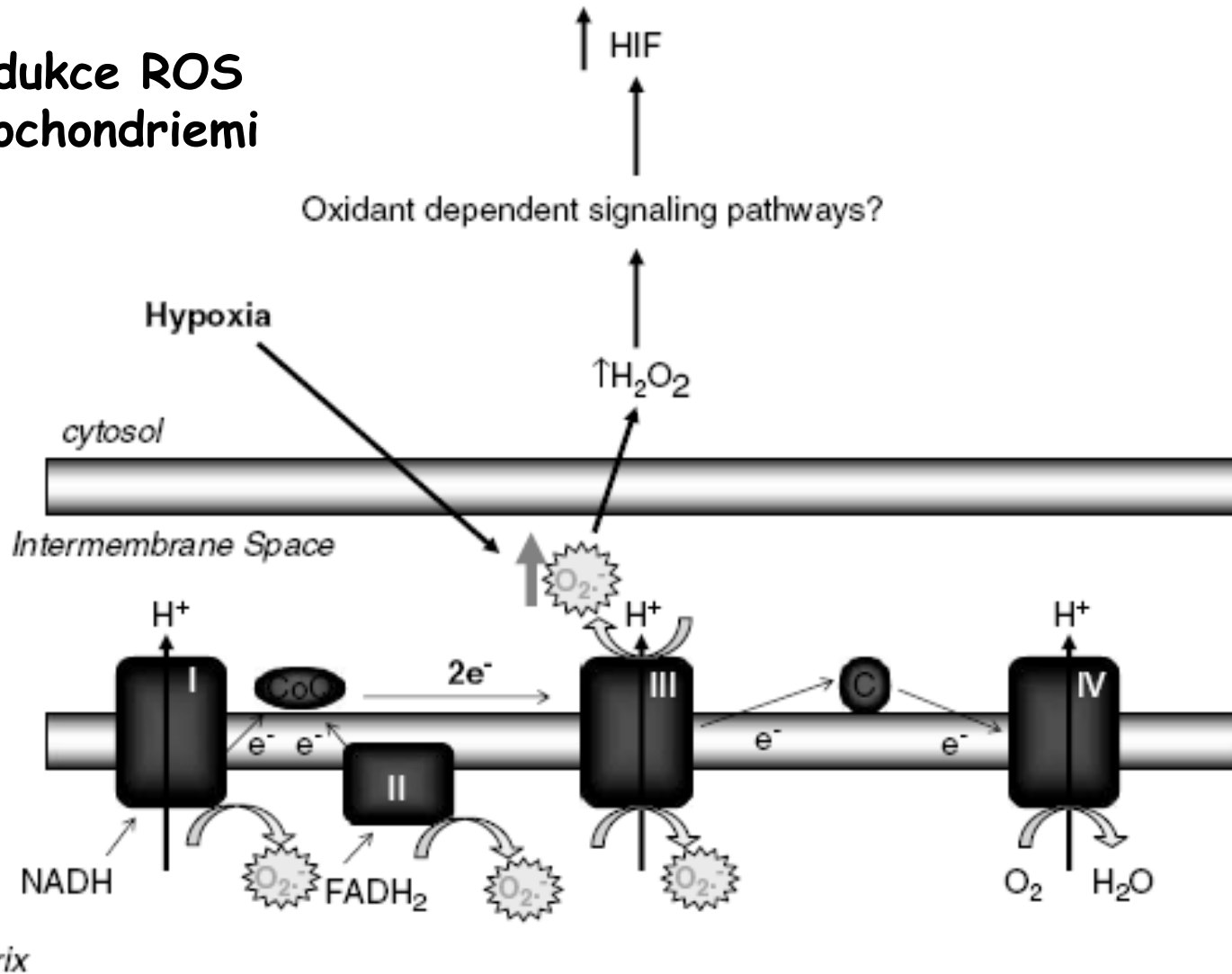
HYPOXIE => stresované mitochondrie (bez O_2 (?) a Acetyl-CoA)

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

=> přechodně akumulace fumarátu a sukcinátu

(=> inhibice PHD => stabilizace HIF1)

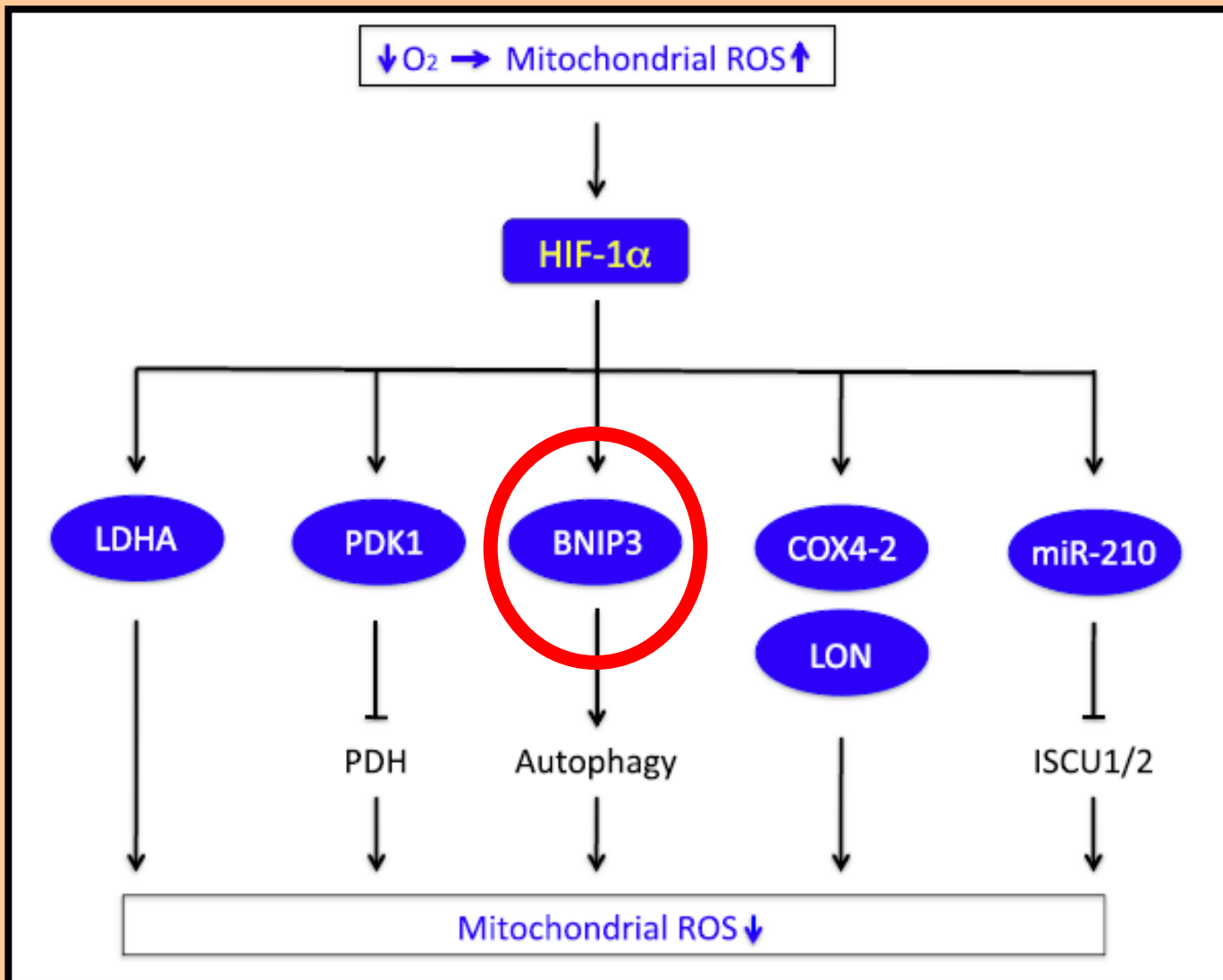
Produkce ROS mitochondriemi

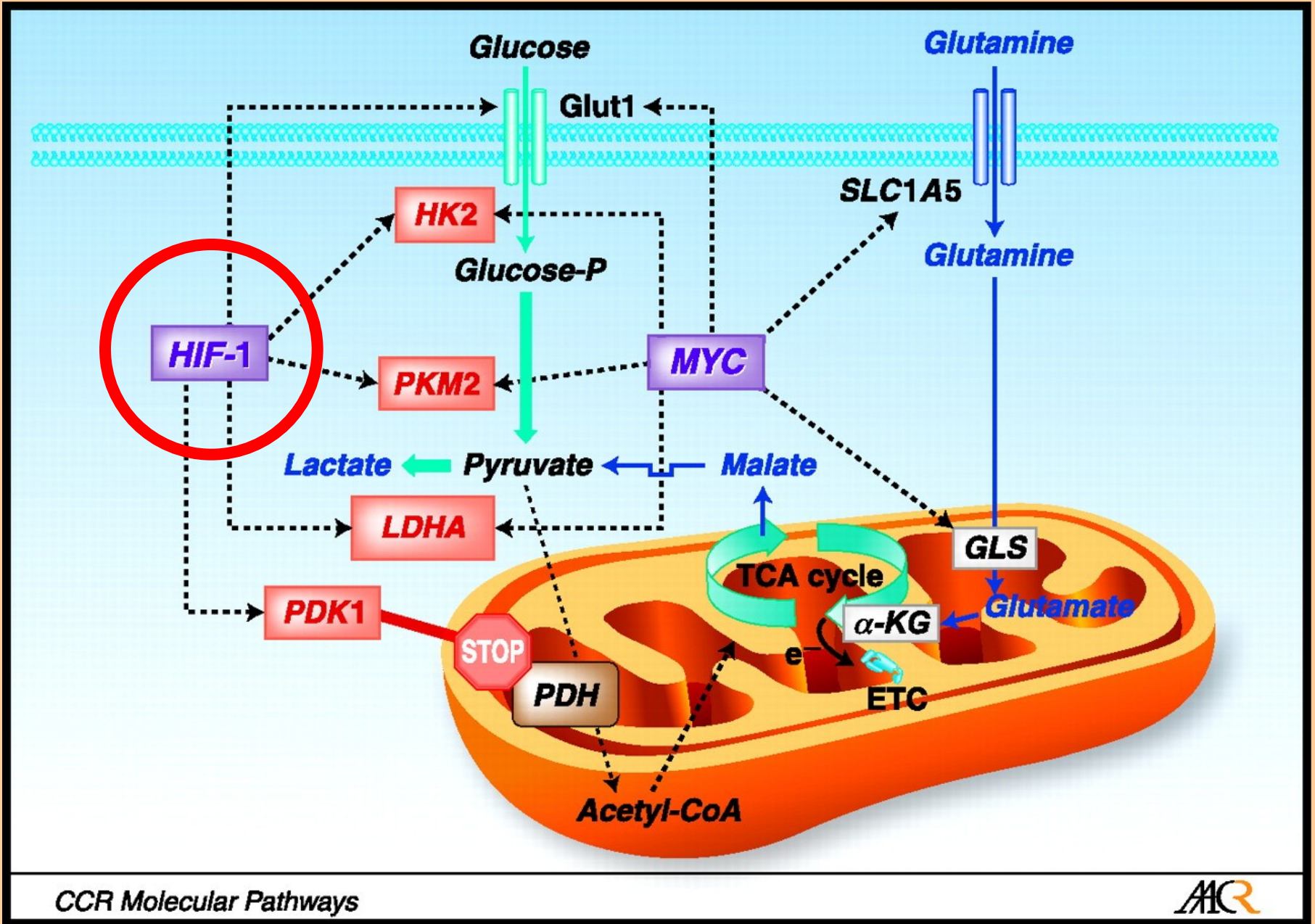


HIF1 - indukuje autofagii mitochondrií

- potlačuje biogenezi mitochondrií
- potlačuje maturaci mitochondrií

=> snížení ROS





FENOTYP KMENOVÝCH BUNĚK x HYPOXIE

Kmenové buňky

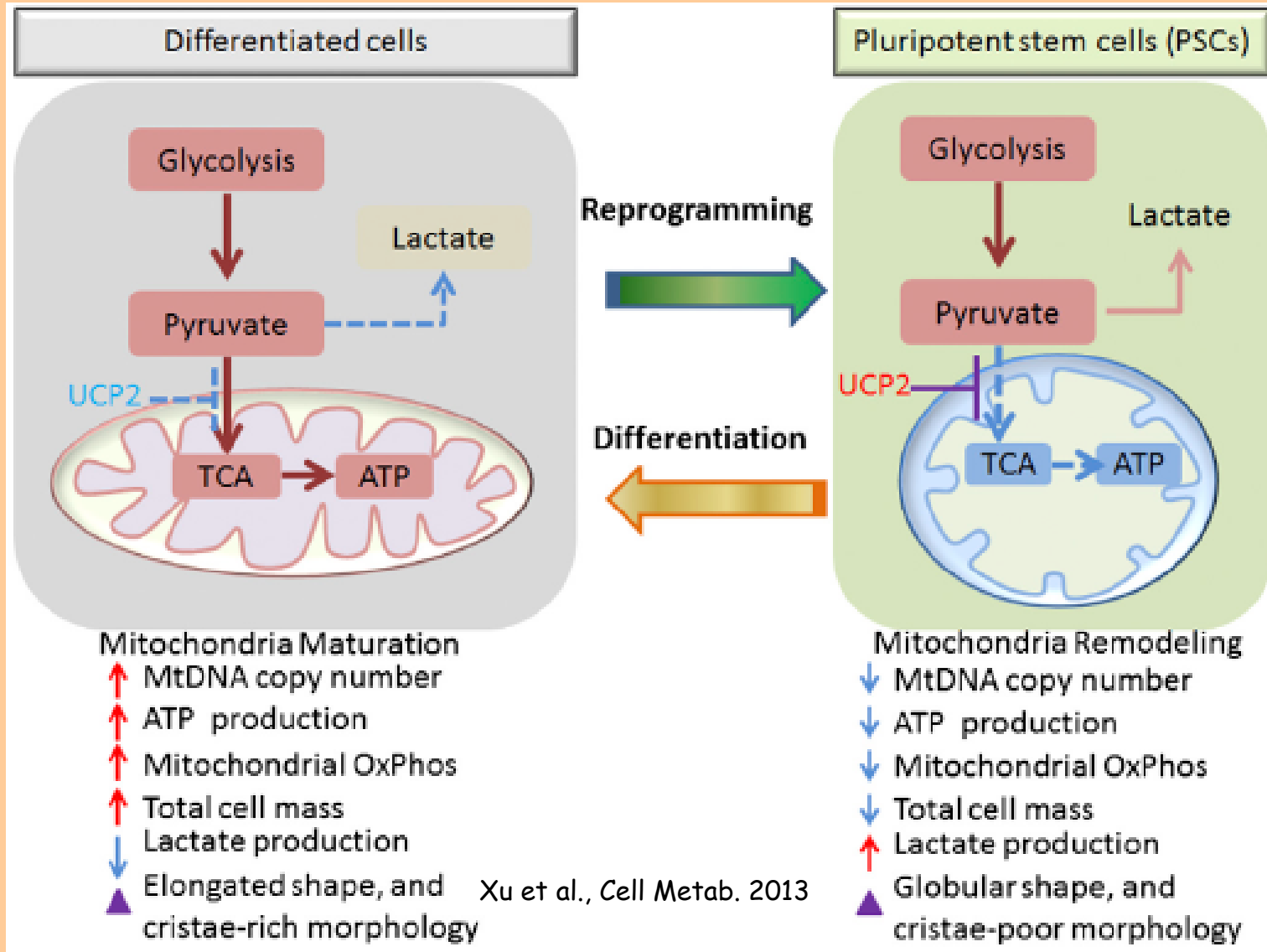
- některé (?) vysoká hladina HIF1, i v normoxii!!!
- některé (?) hypoxické niche
- Warburgův efekt = glykolýza nezávisle na dostupnosti O_2
(předpoklad růstu buněk nad energetickým ziskem
=> intermediální metabolity pro výstavbu buněk)
- potlačená aktivita/zralost a počet mitochondrií
=> málo ROS
=> závislost na glykolýze
- hypoxie (1-(3)-5%) podporuje kmenovost
- hypoxie (1-(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, β -catenin (?)
 - => vyšší aktivita Notch ~ podpora kmenovosti
 - => vyšší aktivita „Wnt“ signalizace ~ podpora kmenovosti (?)
- farmakologické inhibitory PHD zvyšují pool quiescentních HSC a jejich regenerační potenciál po ozáření *in vivo* [Fornistal et al., 2013 Blood]

čímž potlačuje diferenciaci a udržuje kmenovost

Mitochondrie a kmenové buňky

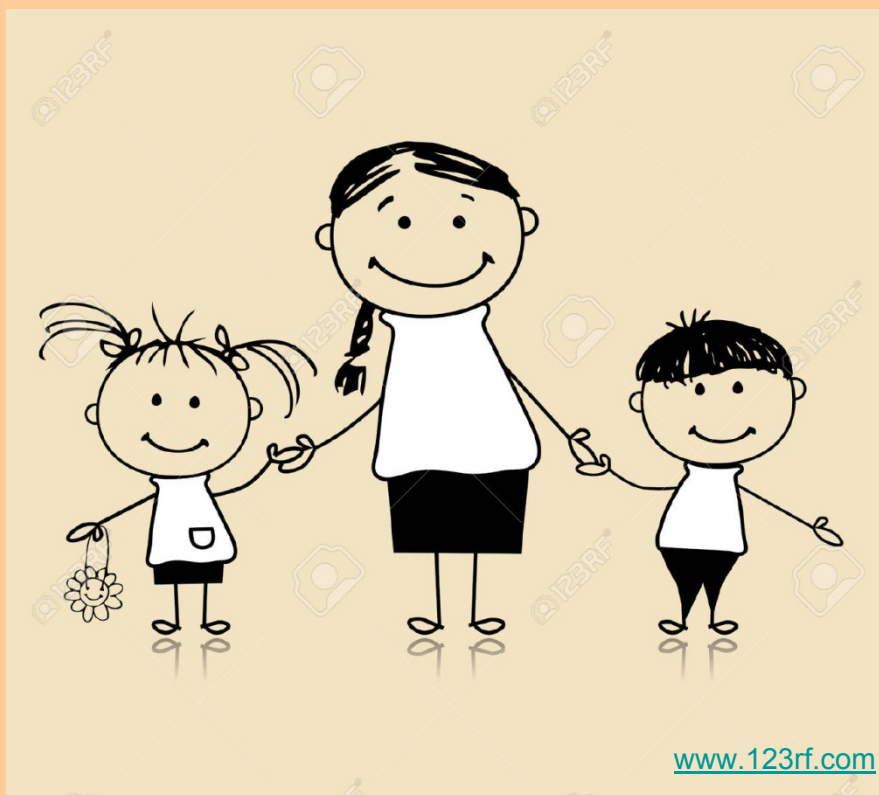


**Inhibice maturace a funkce/aktivity mitochondrií (deplecí klíčových enzymů)
= podpora kmenovosti (HSC)**

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

DIFERENCIAČNÍ POTENCIÁL BUNĚK

Jaké typy buněk mohou vznikat z buňky mateřské



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

Totipotentní – mohou z nich vznikat všechny buňky daného živočišného druhu

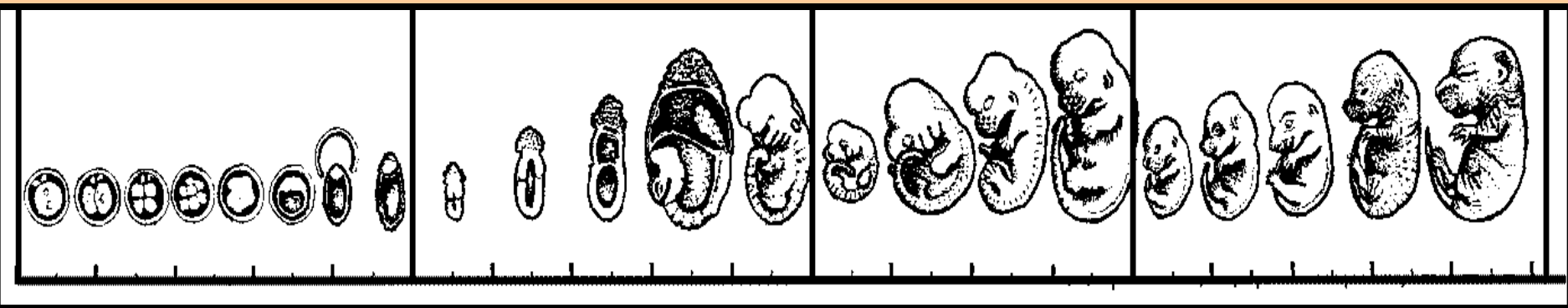
Pluripotentní – mohou dát vznik všem buňkám budoucího jedince (všechny tři zárodečné listy)

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



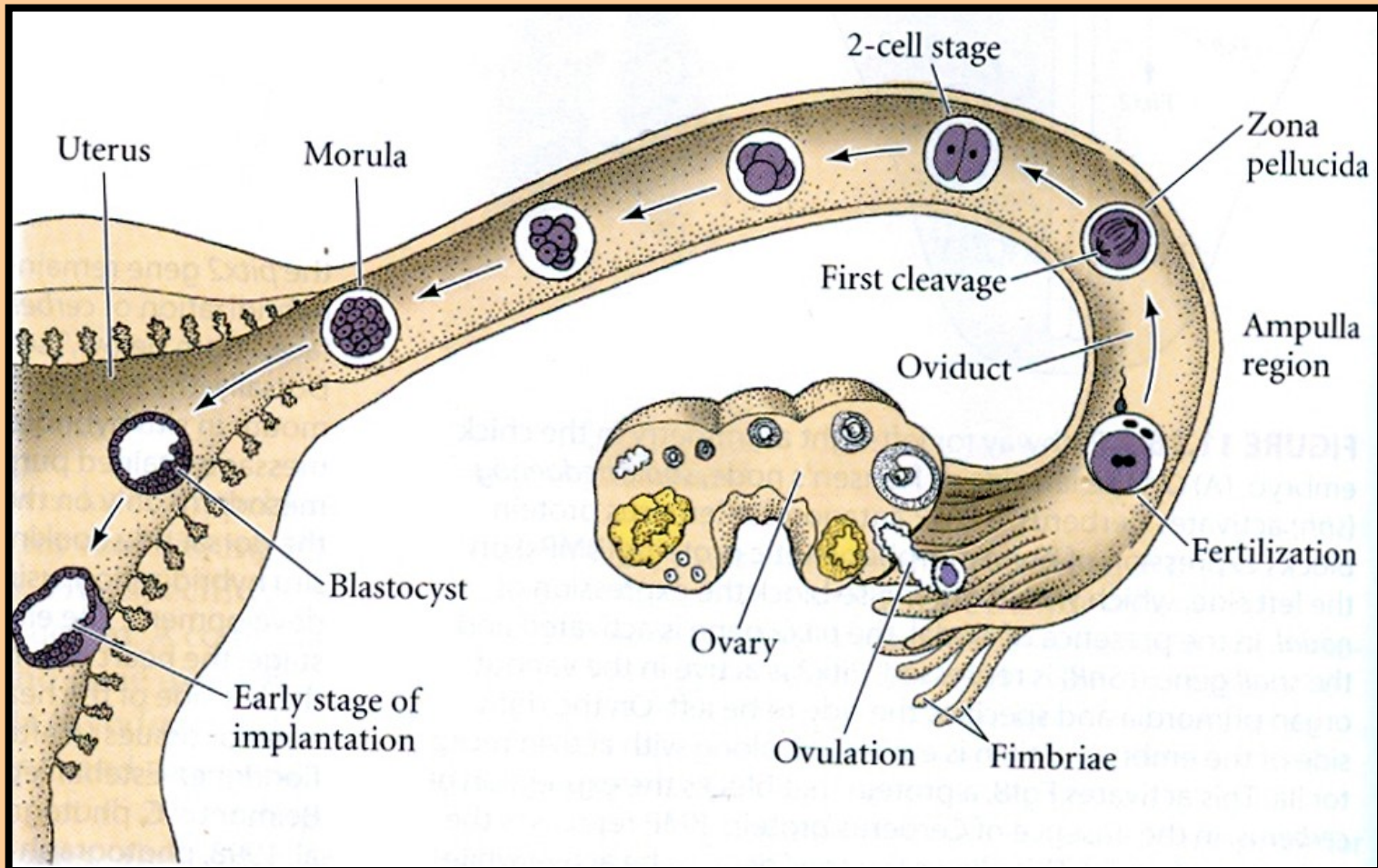
**totipotentní
buňky**



**pluripotentní, multipotentní,
buňky**

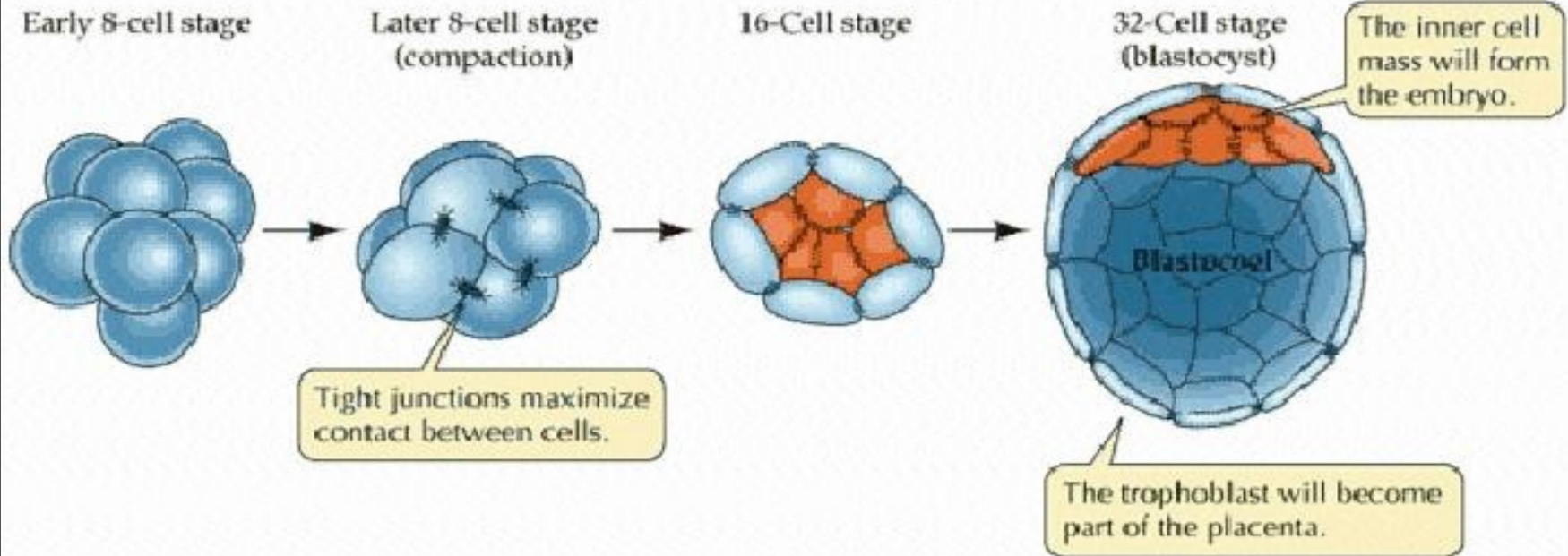
Totipotentní buňky

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

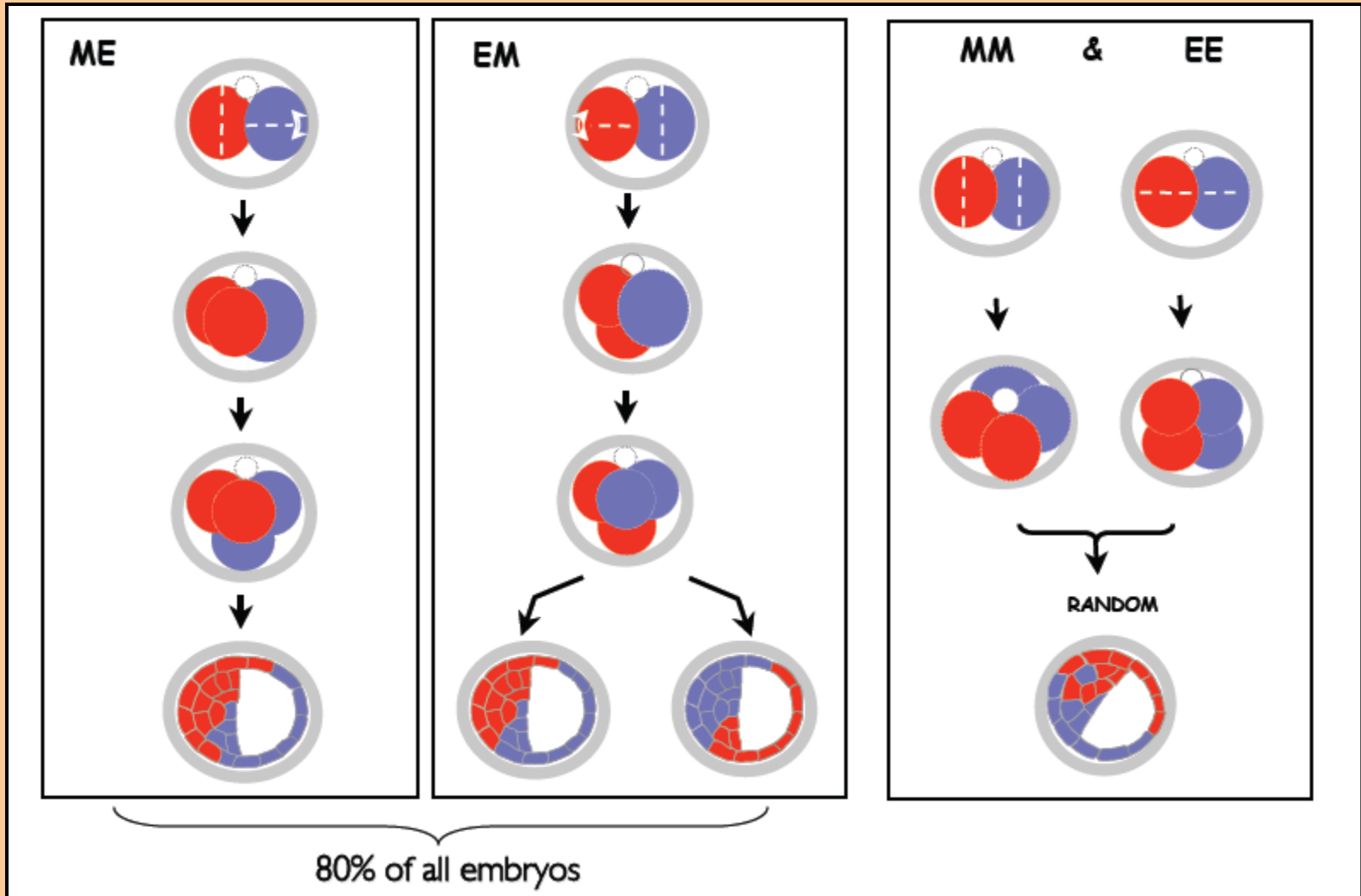


Ztráta totipotence v průběhu časně embryogeneze

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

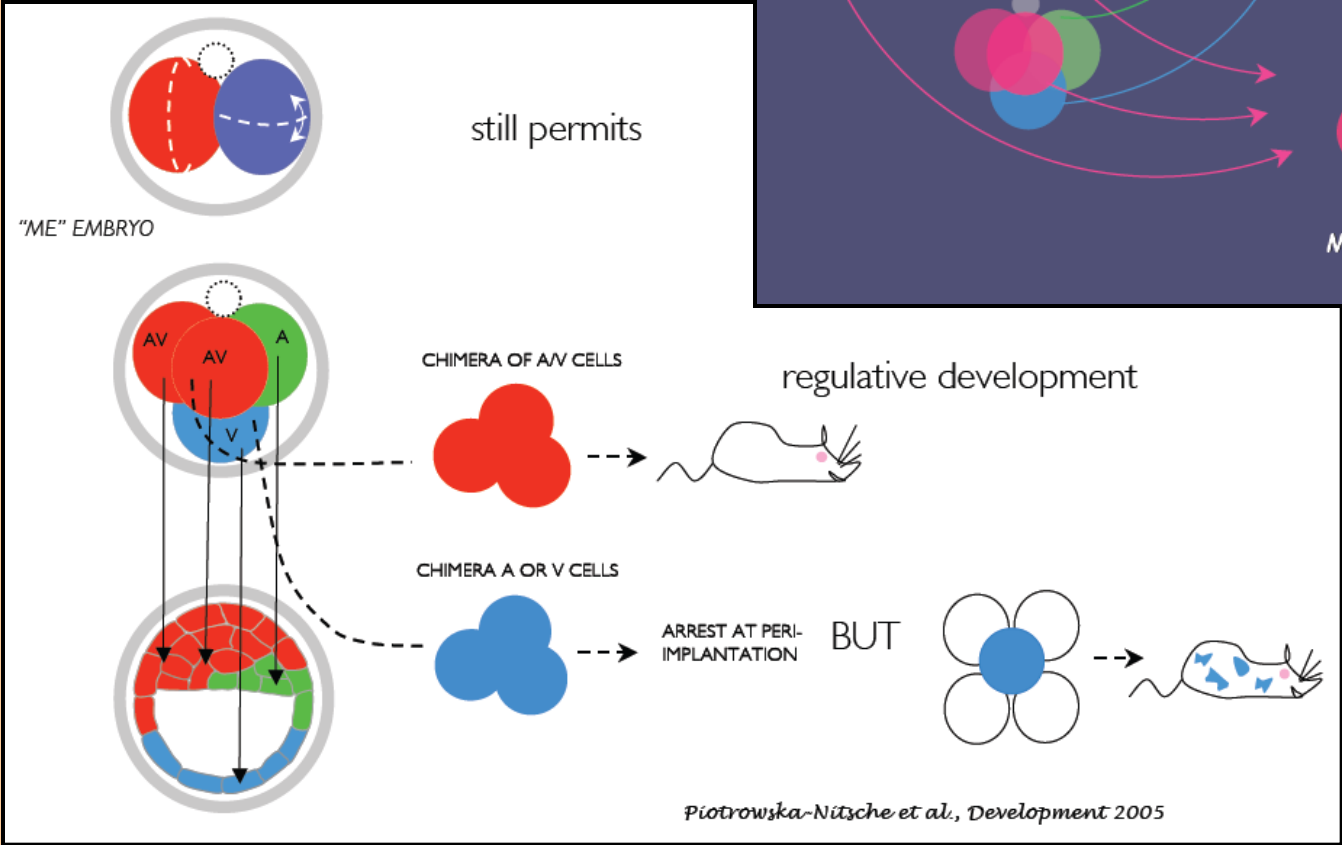
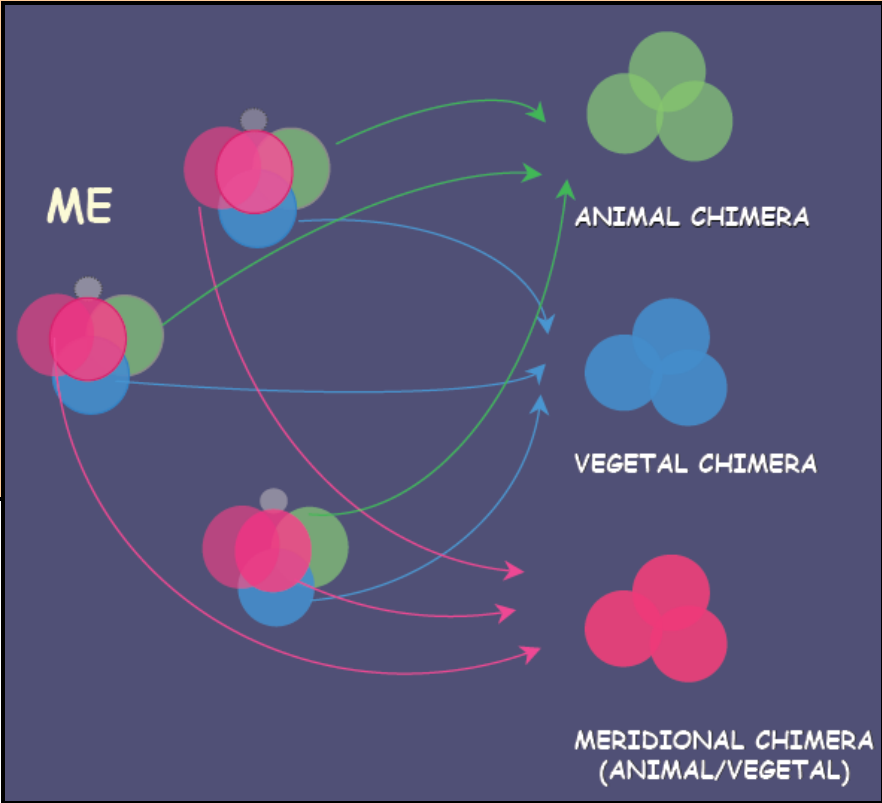


Dělení buněk 2-buněčného embrya, určení polaritu a její vliv na další osud blastomer
Magdalena Zernicka-Goetz 2006



M – meridiální / E - ekvatoriální

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



Pluripotentní buňky (savci)

a) In vivo:

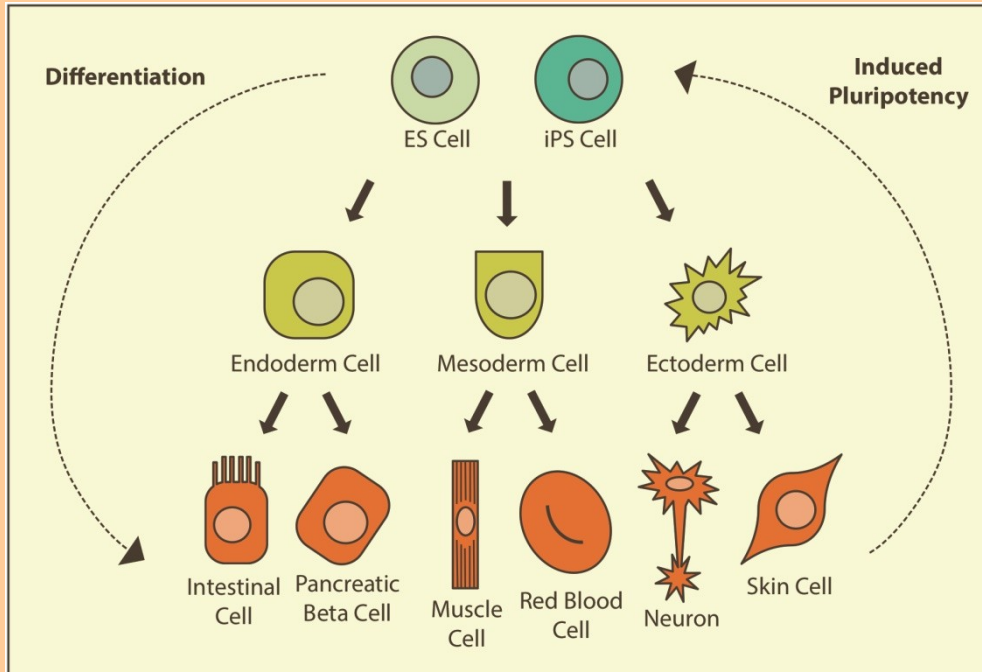
buňky vnitřní buněčné masy /embryoblastu

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

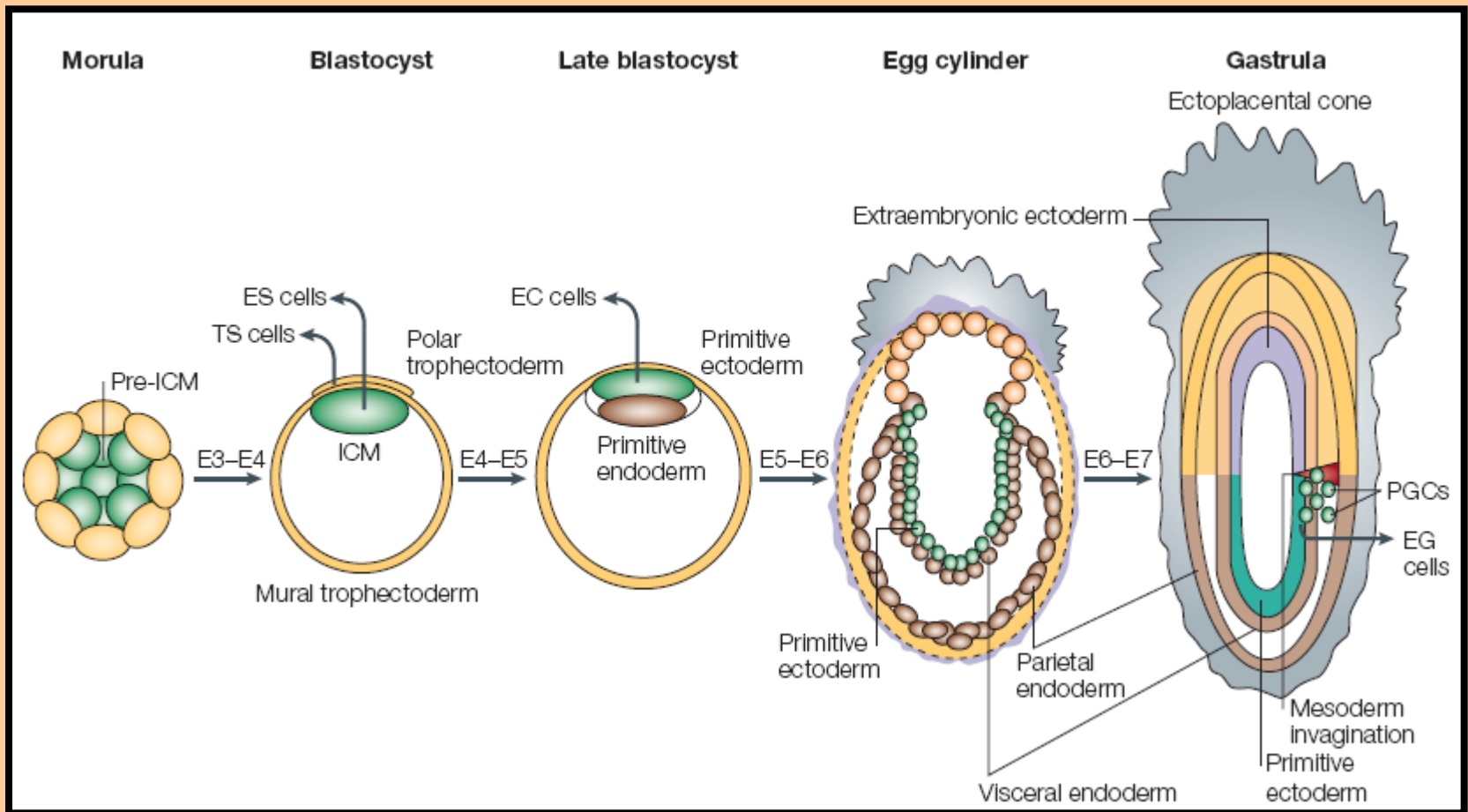
embryonální nádorové buňky
(kmenové buňky teratomů)

indukované pluripotentní kmeové buňky

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

(spermatogoniální kmenové buňky)
(z dospělých varlat)

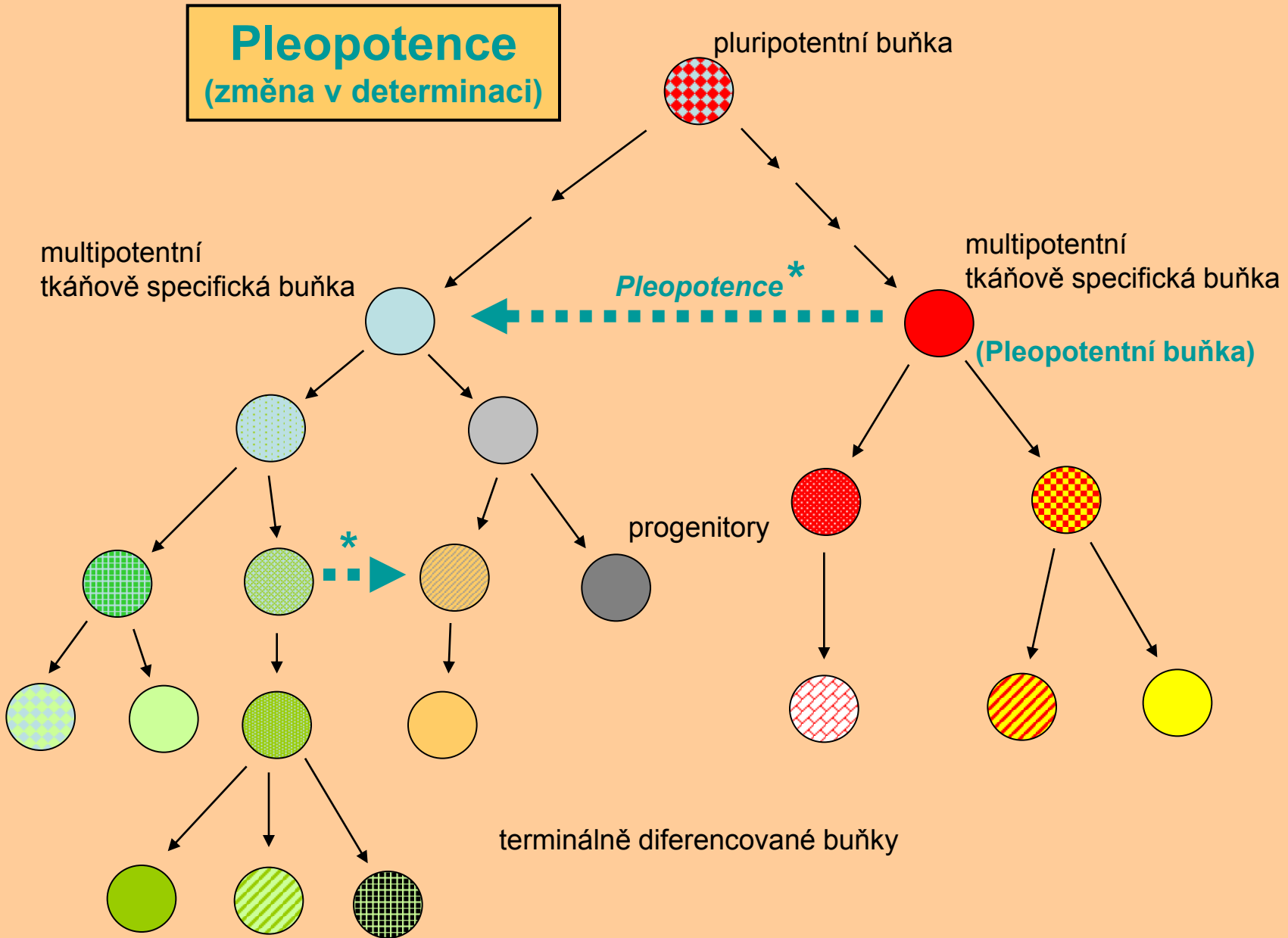
(! (somatické kmenové buňky?))



Boiani & Scholer 2005

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

Pleopotence (změna v determinaci)



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, velký 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, mikroglie, tkáňové makrofágy, 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, velké 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, genetickými manipulacemi a speciálními kondicemi i ze somatických buněk
- 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, velký jádro / plasmový poměr,...
- Problémy s jejich udržením - stabilita genotypu/fenotypu
- ???

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

Indukované kmenové buňky (pluripotentní (iPSC) x somatické)

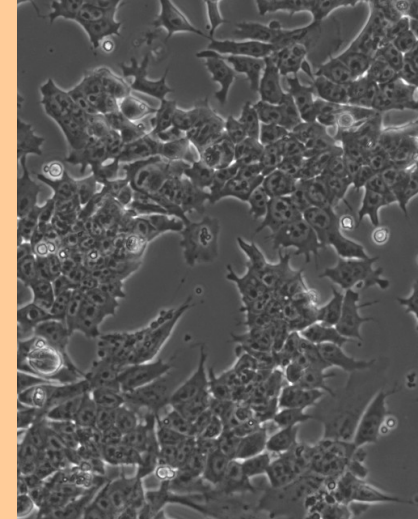
-> připravené ze somatických buněk genetickými manipulacemi a speciálními podmínkami

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)

