

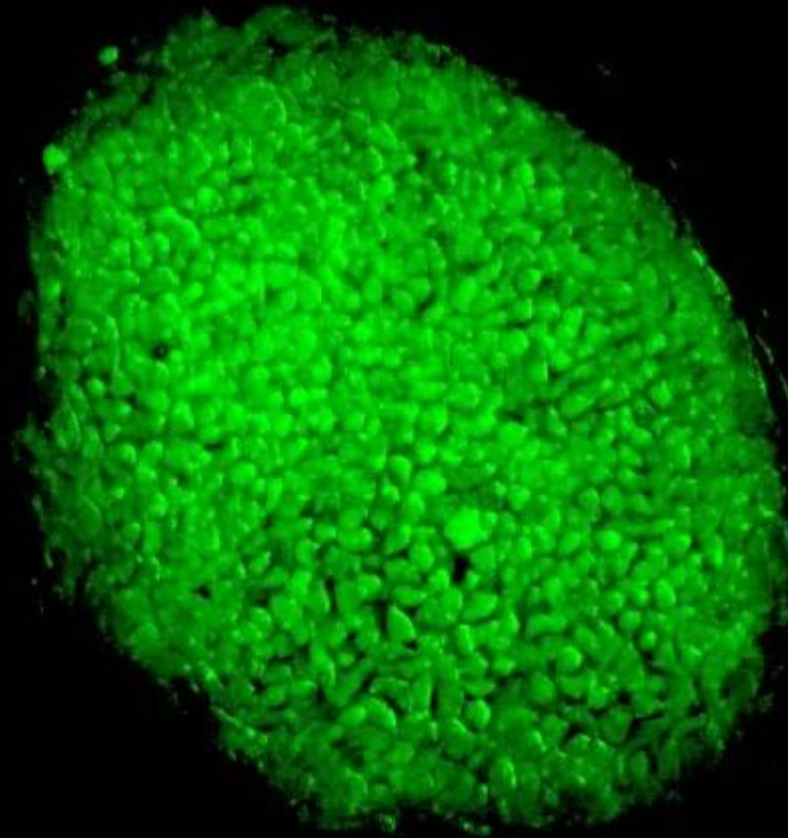
**Přednáška v rámci cyklu
přednášek pro střední školy**

1. 12. 2010

www.lf1.cuni.cz

Není buňka jako buňka (některá je kmenová)

Význam a výzkum kmenových buněk

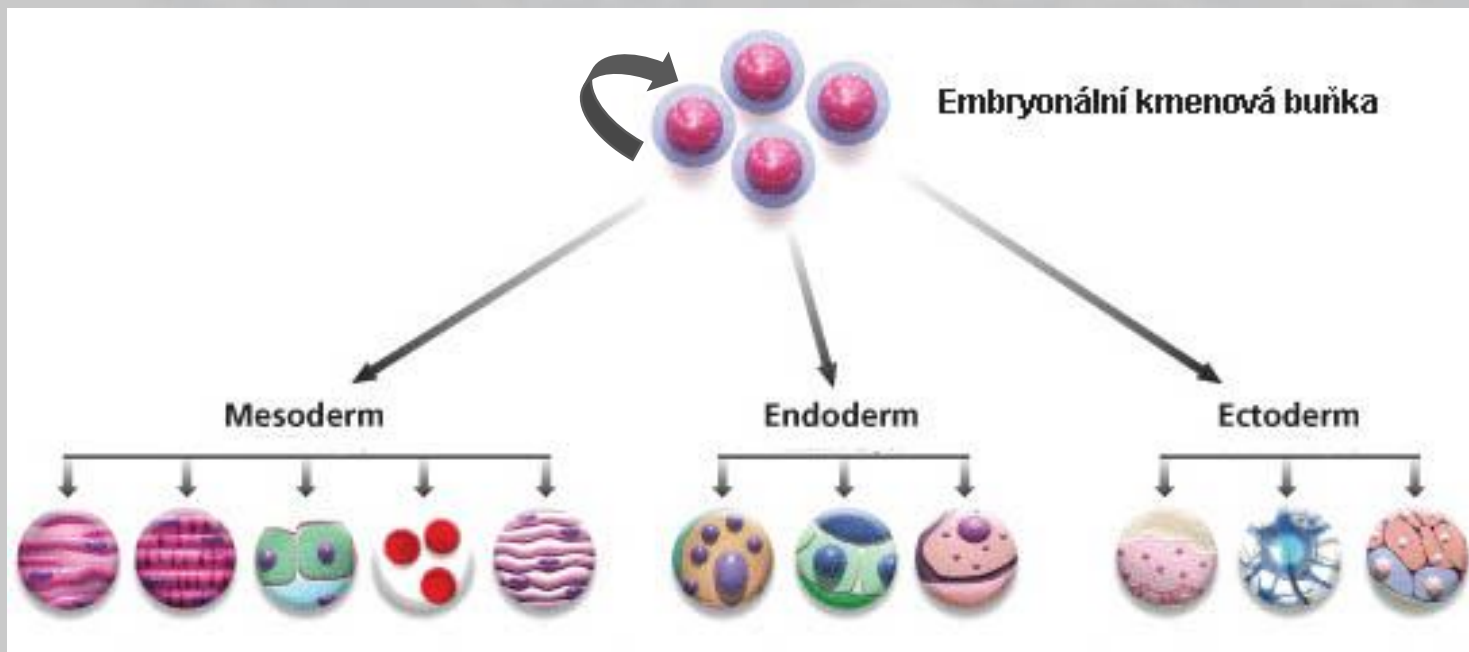


Eliška Krejčí

Anatomický ústav 1.LF UK

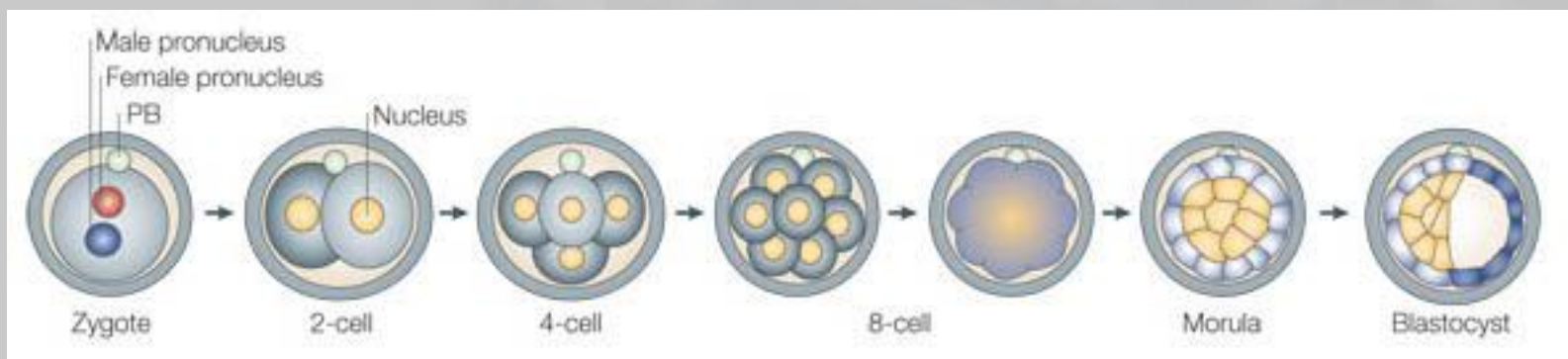
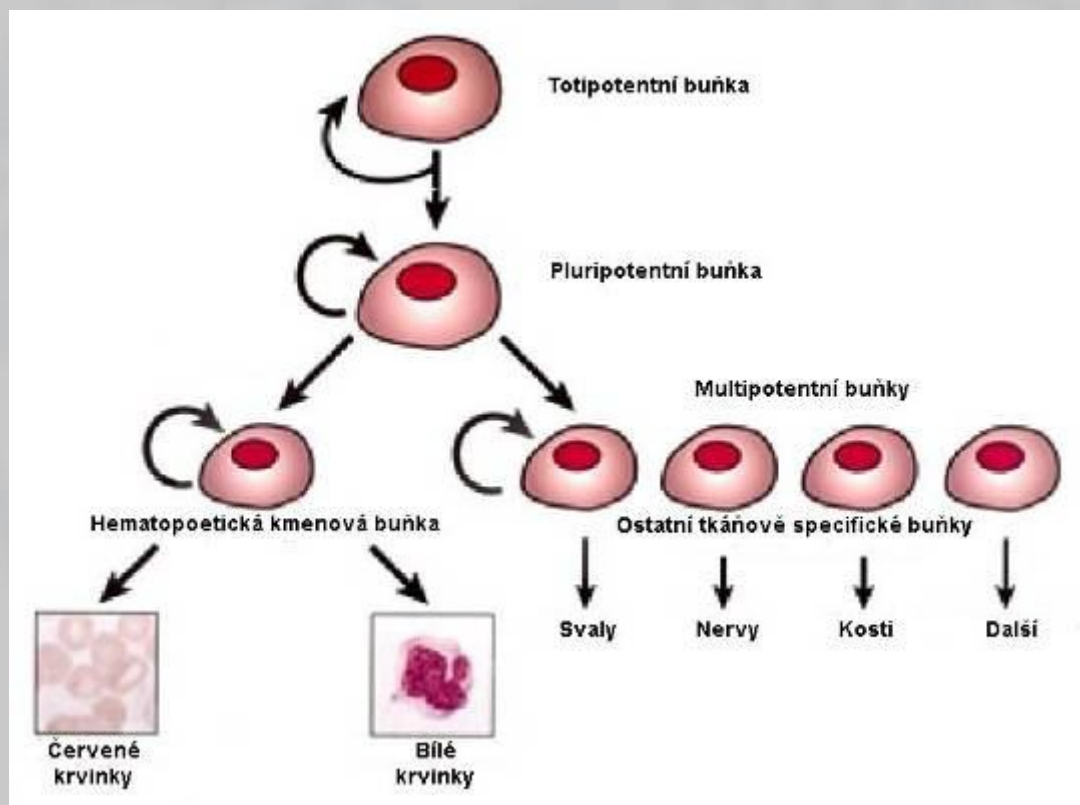
Není buňka jako buňka...

- Kmenové buňky jsou primární nediferencované buňky, které mají schopnost jednak **sebeobnovy** jednak přeměny (**diferenciace**) na „jakýkoliv“ jiný typ buněk.
- Tato schopnost kmenových buněk za běžných okolností umožňuje tělu vytvářet nové buňky, a opravovat tak poškozené nebo opotřebované části tkání a orgánů.



Typy kmenových buněk

- Z hlediska diferenciačního potenciálu



Typy kmenových buněk

- Z hlediska původu
 - Embryonální kmenové buňky (ESCs) – pluripotentní
(schopné vytvořit jakýkoliv z 230 buněčných typů)
 - po injekci do tetraploidní blastocysty jsou schopné vytvořit celé embryo
 - buňky embryoblastu
 - poprvé izolovány v r. 1981 (lidské 1998)
 - Fetální kmenové buňky - multipotentní
 - Dospělé kmenové buňky – multi- či unipotentní
tkáňově specifické

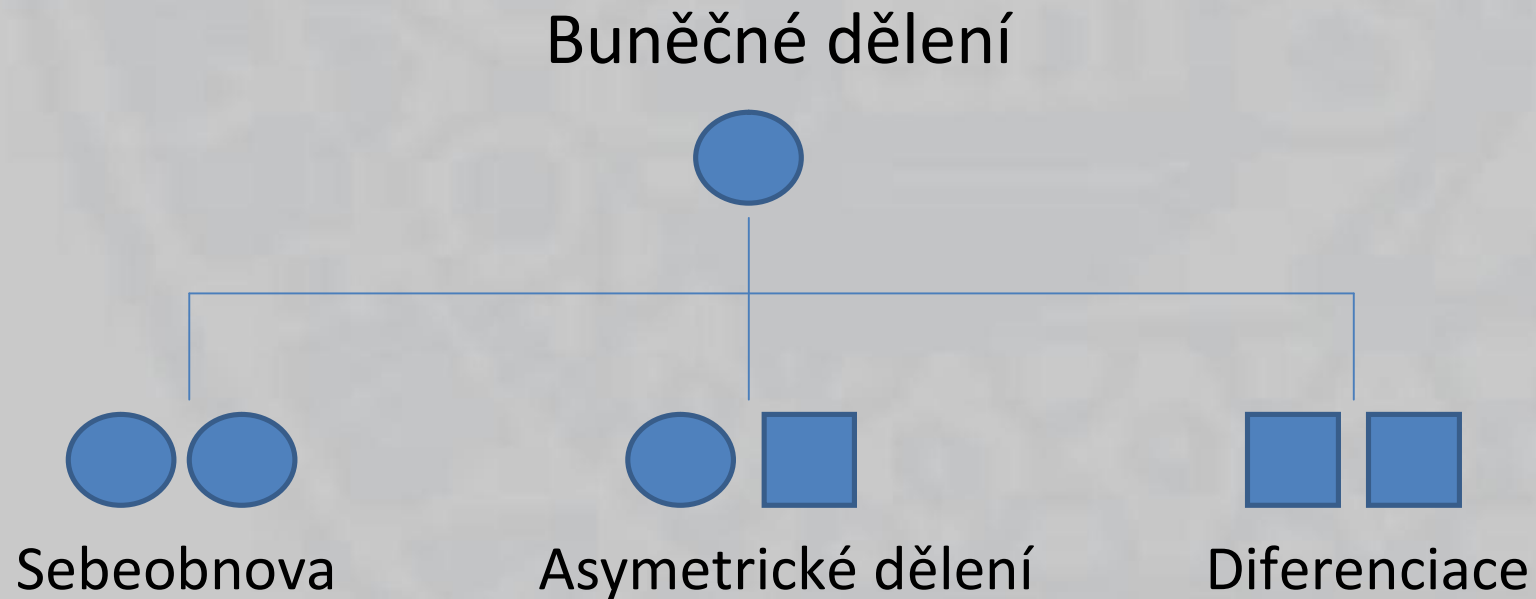
Není buňka jako buňka...

- Čím se somatické a kmenové buňky liší?
 - Každá buňka nese cca. 20 tisíc stejných genů ve dvou kopiích
 - Je každý z těchto genů aktivní?

Není buňka jako buňka...

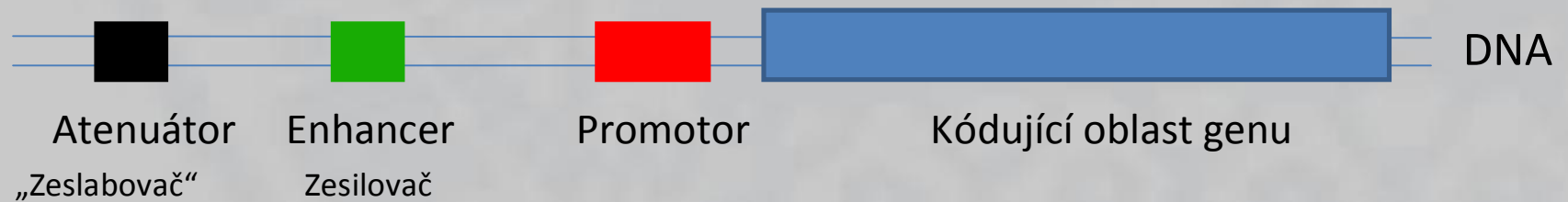
- Čím se somatické a kmenové buňky liší?
 - Každá buňka nese cca. 20 tisíc stejných genů ve dvou kopiích
 - Je každý z těchto genů aktivní?
 - NE – každá buňka exprimuje 8 – 10 tisíc genů
 - Jednotlivé buňky se tedy liší kombinací proteinů a jejich koncentrací
 - Housekeeping geny – zajišťují základní metabolické a strukturální funkce (ve všech buňkách)
 - Specifické geny – zajišťují specifické funkce (markery)

- Jak je zajišťována rozdílná genová exprese?



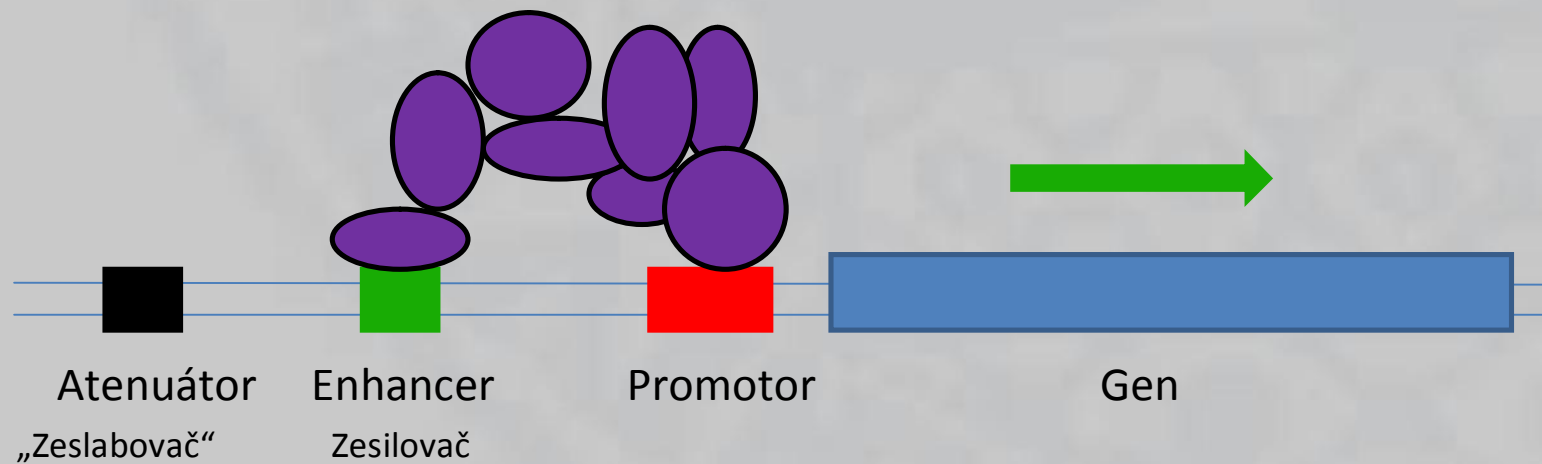
Poměr jednotlivých typů dělení ovlivňuje prostředí, ve kterém se buňky nacházejí

Regulace transkripce

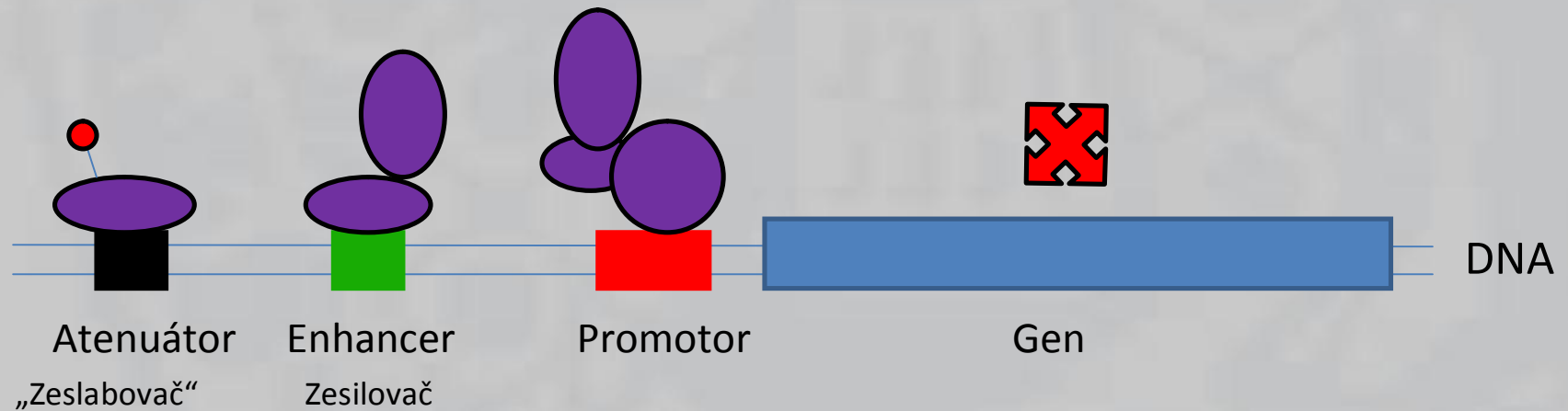


- Pozitivní
- Negativní

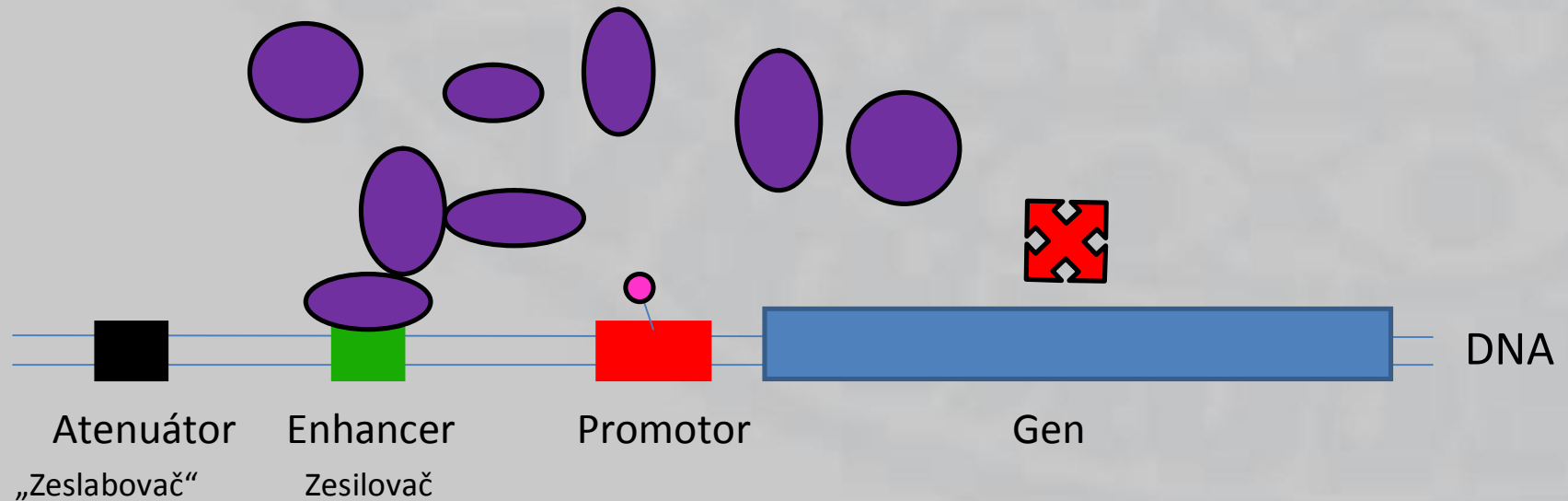
Pozitivní regulace transkripce



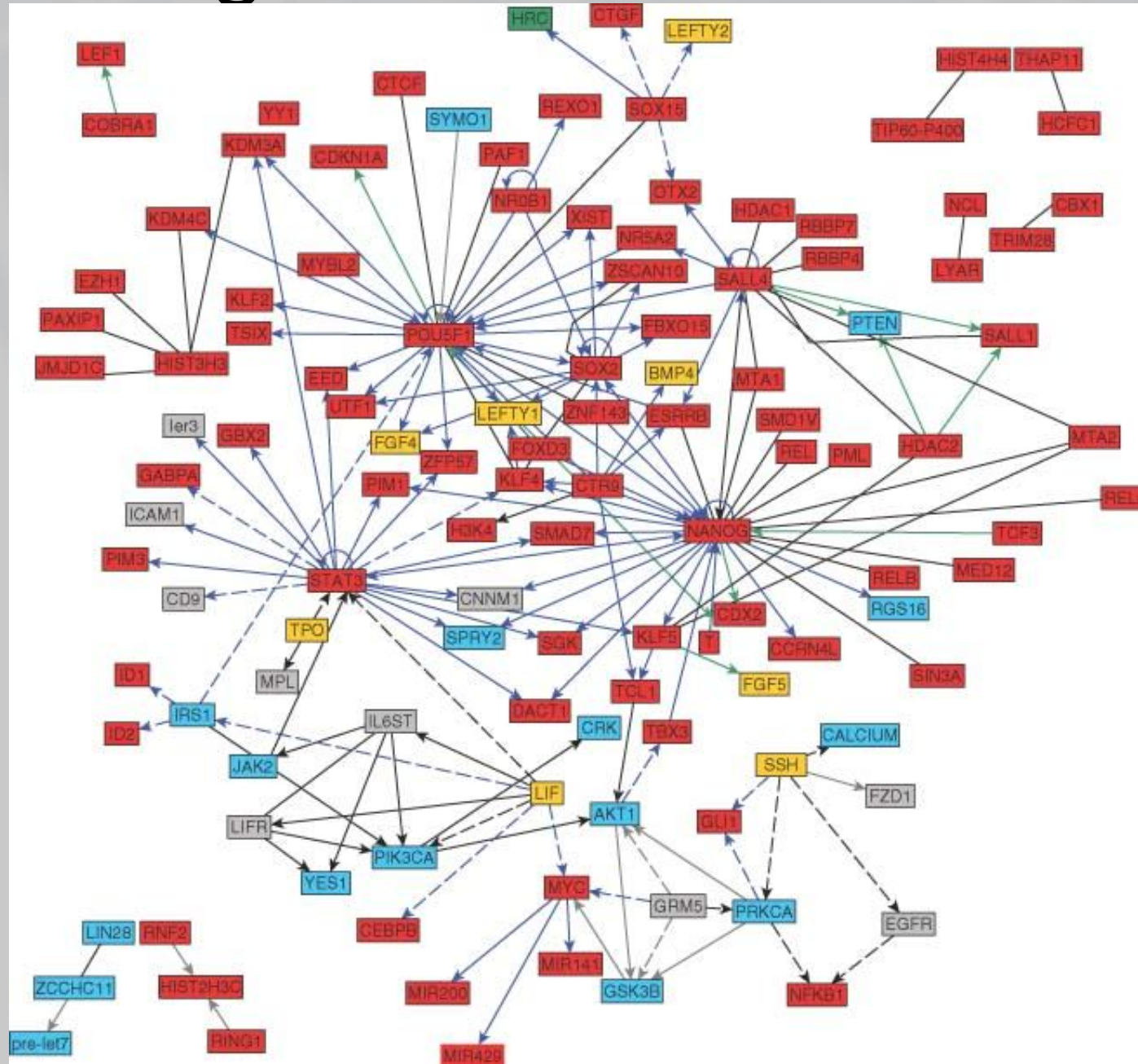
Negativní regulace transkripce



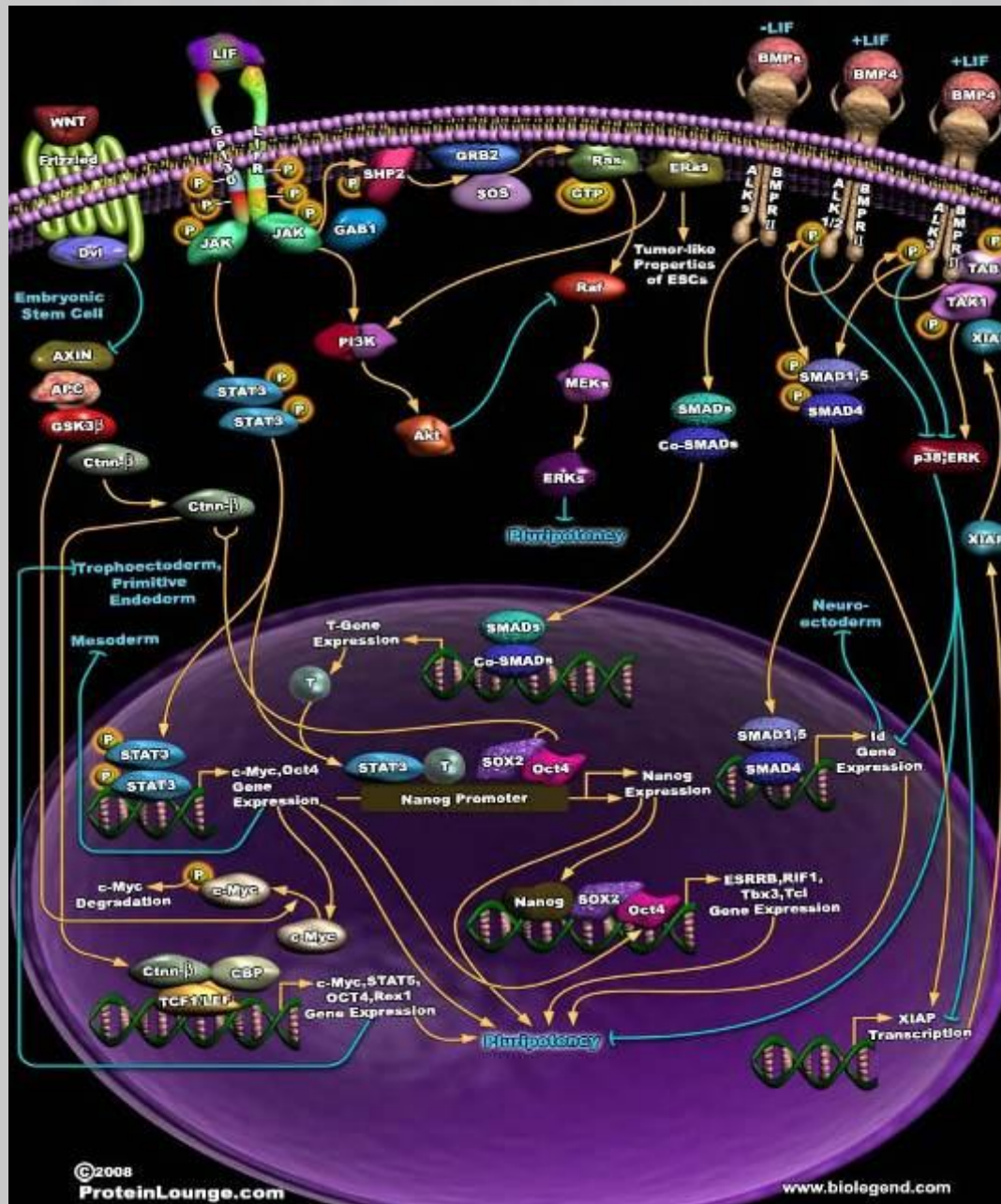
Epigenetická regulace - genomický imprinting



Signalizační síť v ESCs



Signální transdukce



Vliv prostředí
X
Vlastní buněčná
„výbava“
(kompetence)

Není buňka jako buňka...

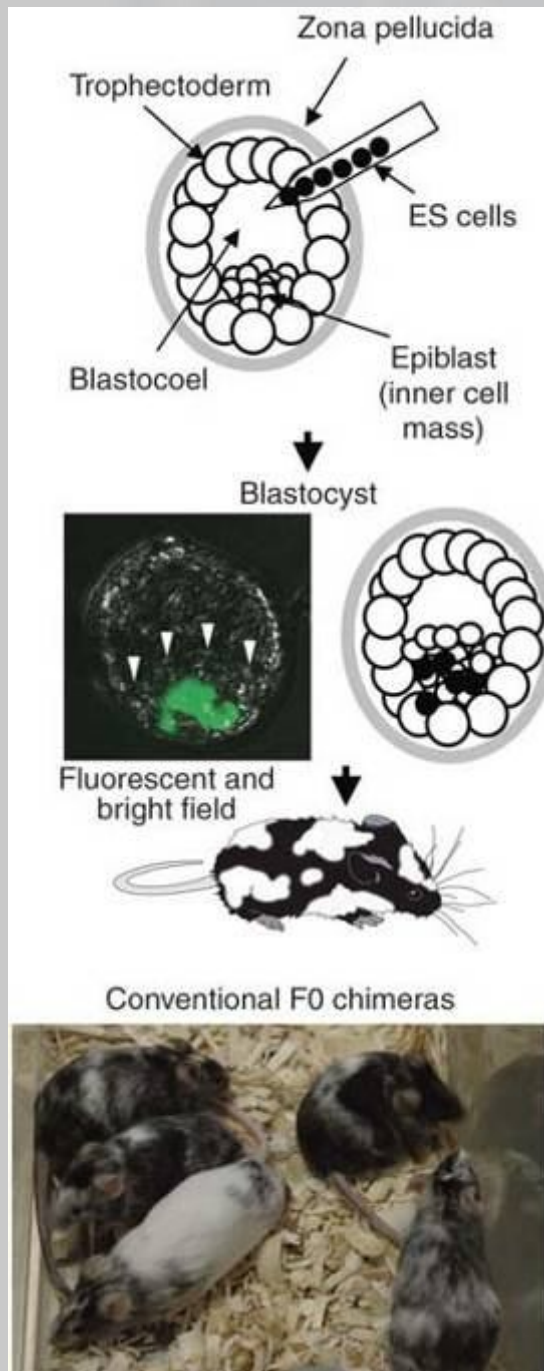
- Co musí být splněno, aby měla konkrétní buňka vlastnosti buněk kmenových?
- Musí se vyskytovat ve „vhodném“ prostředí (uvnitř organismu, vhodné kultivační podmínky)
- Musí exprimovat určitou sadu genů
 - Musí mít určitý methylační status (genomický imprinting)

Není buňka jako buňka...

- Co musí být splněno, aby měla konkrétní buňka vlastnosti **pluripotentních** kmenových buněk?
 - Musí se vyskytovat ve „vhodném“ prostředí
 - Musí exprimovat určitou sadu genů
 - Musí mít určitý methylační status (genomický imprinting)
- Musí být schopná vytvořit i buňky zárodečné linie po injekci do blastocysty

Tvorba chimér

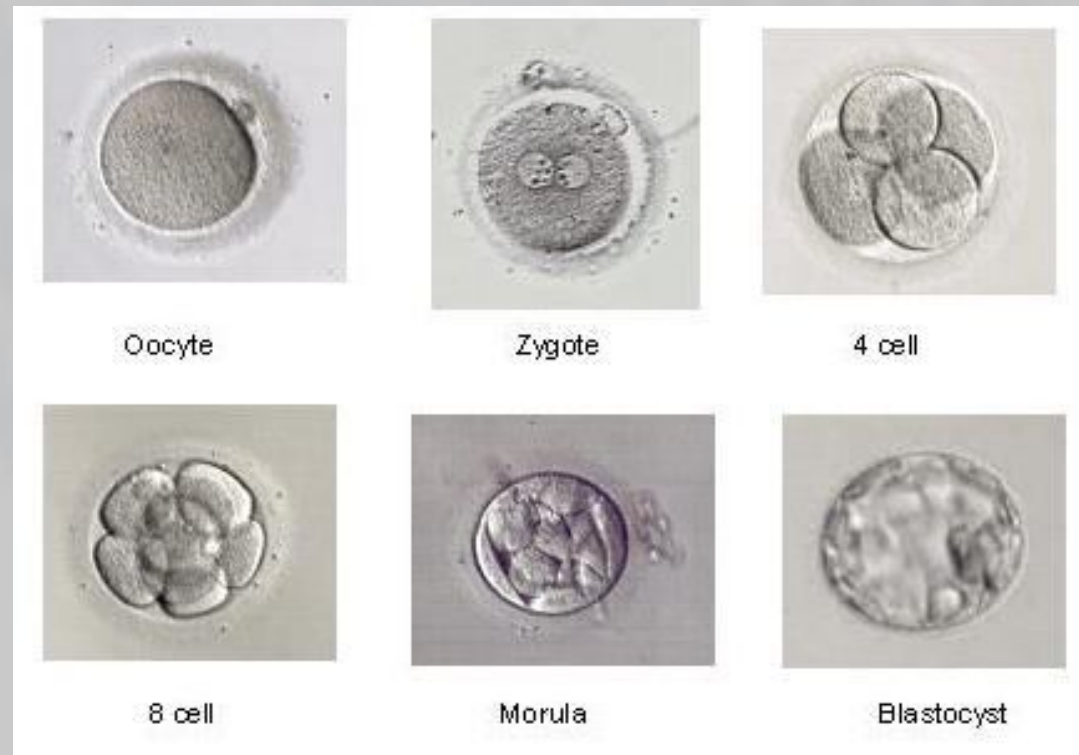
- Chiméra je jedinec, který je tvořen buňkami s různým genetickým materiálem
- Jestliže se „cizí“ buňka stane zárodečnou buňkou, vytvoří se nová linie a všichni potomci ponesou „cizí“ genetickou informaci
 - Důkaz dokonalého reprogramování genomu („správný pluripotentní“ imprinting)
- Princip tvorby transgenních kmenů



Jak získat pluripotentní buňky?

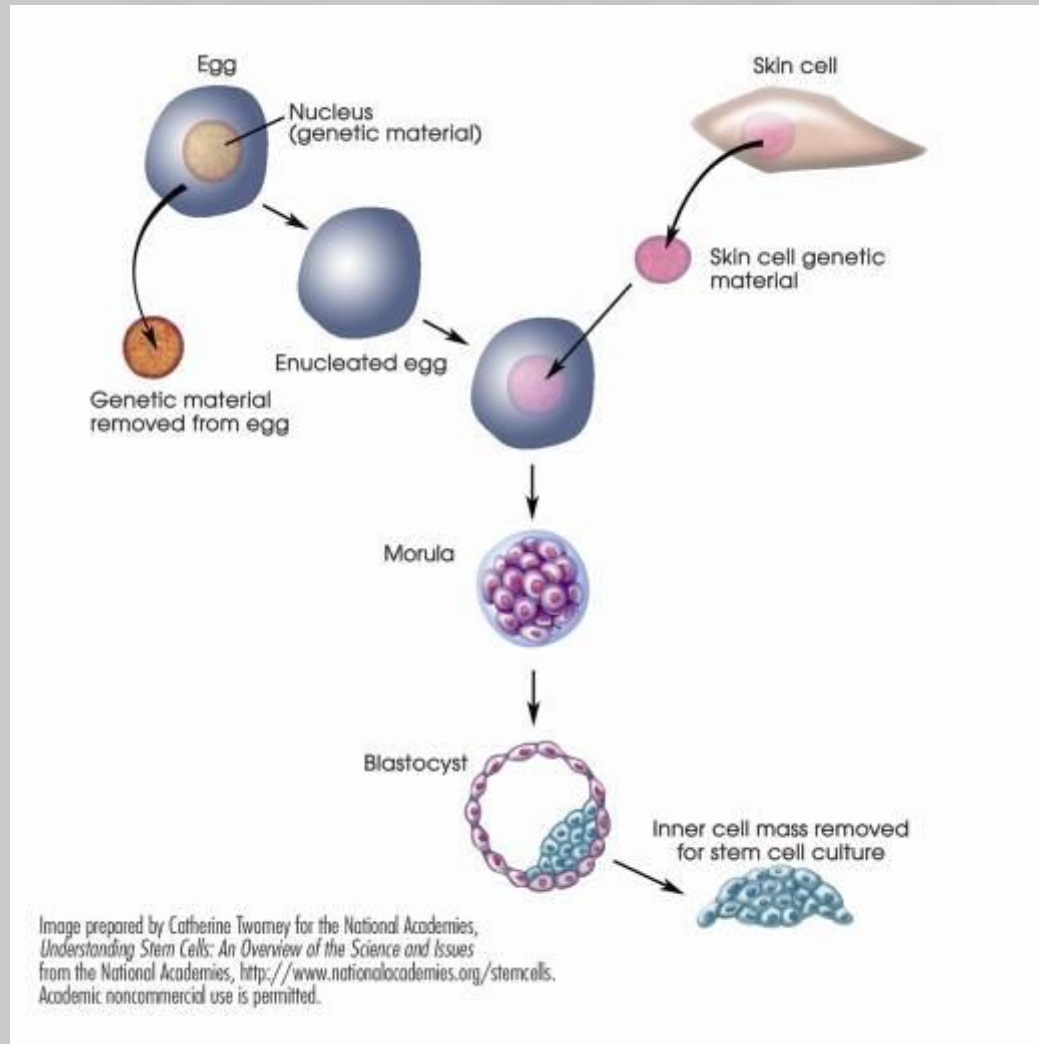
- Z časných zygot až po blastocystu – ESCs
- Přenosem jádra – NT-ESCs
- Indukcí pluripotence – indukované pluripotentní kmenové buňky (**i**nduced **P**luripotent **S**tem cells - iPS)

Izolace pluripotentních buněk z blastocysty



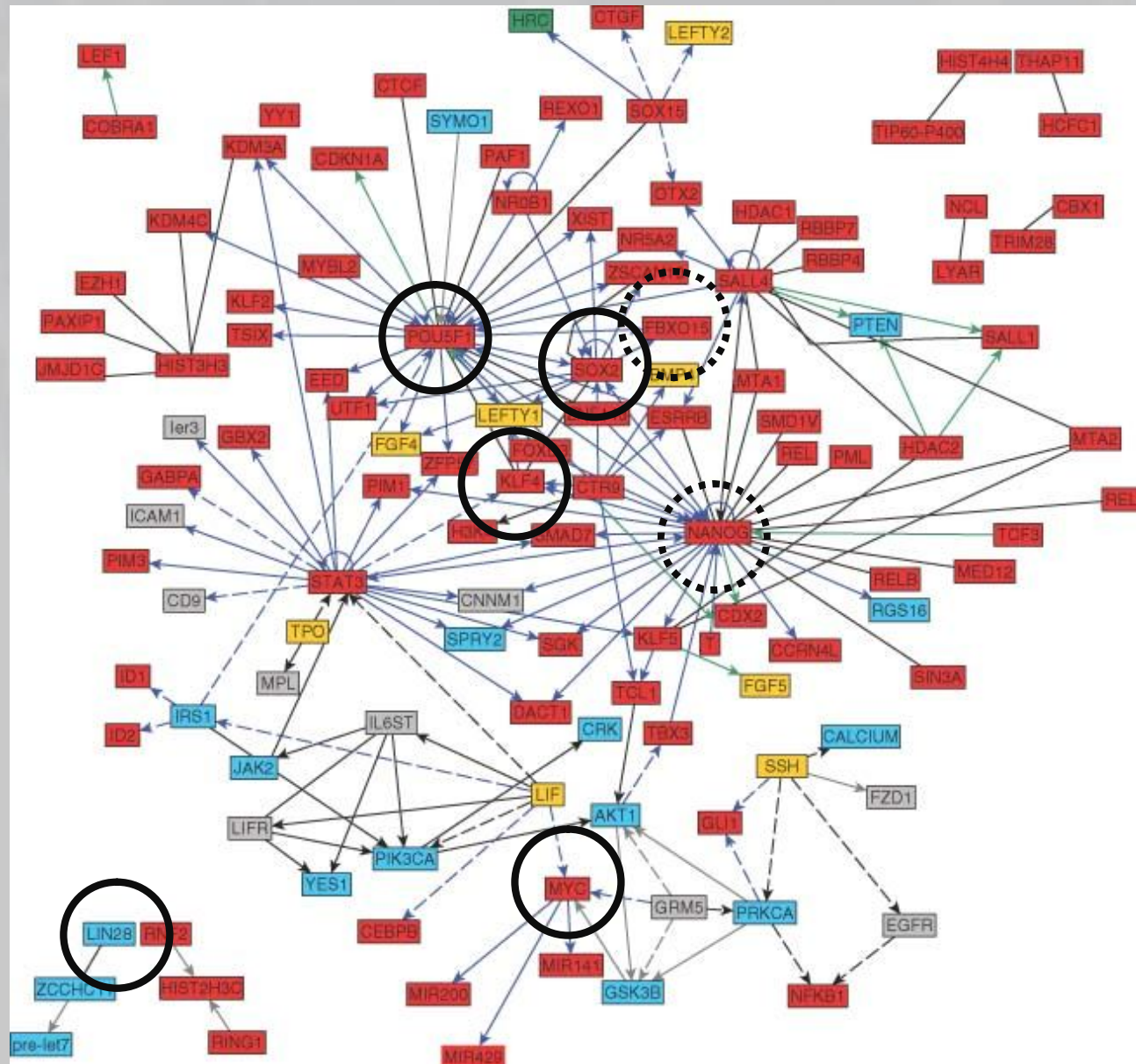
- Vystává etický problém – při izolaci buněk blastocysty dochází k „usmrcení“ embrya
- V řadě zemí je výzkum a využití ESCs zakázáno
- V případě transplantace se jedná o allogení transplantaci

Přenos jader



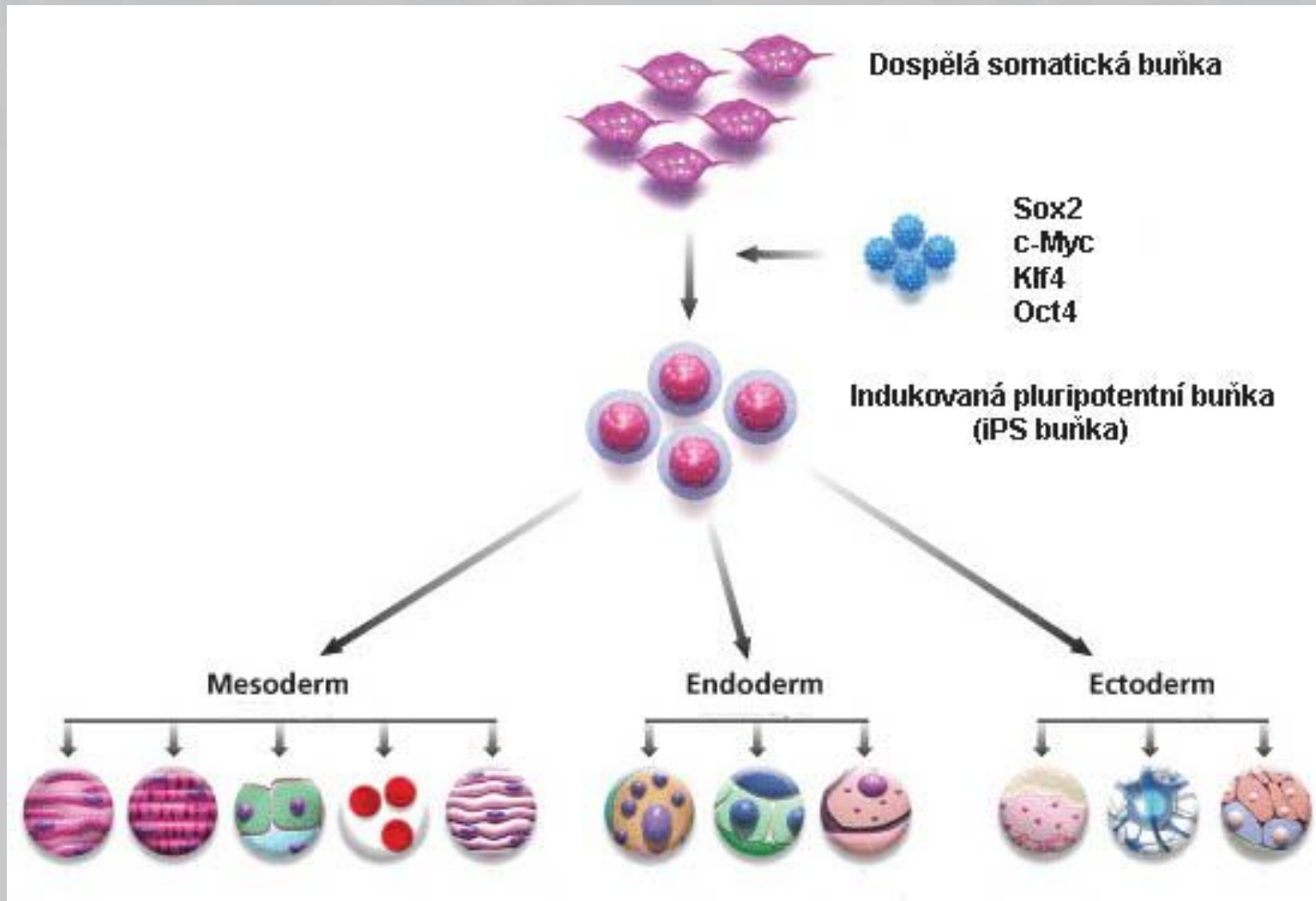
- Princip klonování zvířat (u nich však dochází k určitým vývojovým abnormalitám)
- NT-ESCs jsou transkripčně a funkčně neodlišitelné od ESC (pravděpodobně v důsledku selekce dokonale reprogramovaných buněk)
- V případě použití se jedná o vlastní buňky (autologní transplantace)

Indukce pluripotence



Indukované pluripotentní buňky

- Poprvé připraveny z myších buněk r. 2006



Rizika spojená s použitím KB

- Důležitou vlastností KB je schopnost sebeobnovy (proliferace)
 - při transplantaci tedy hrozí riziko, že KB budou budou pokračovat v nekontrolované proliferaci a budou vytvářet nádory
- Buňky se nemusí diferencovat žádoucím směrem



je vhodné buňky částečně diferencovat do podoby příslušných progenitorů

- Při allogení transplantaci hrozí odmítnutí buněk imunitním systémem příjemce

Nádorové KB

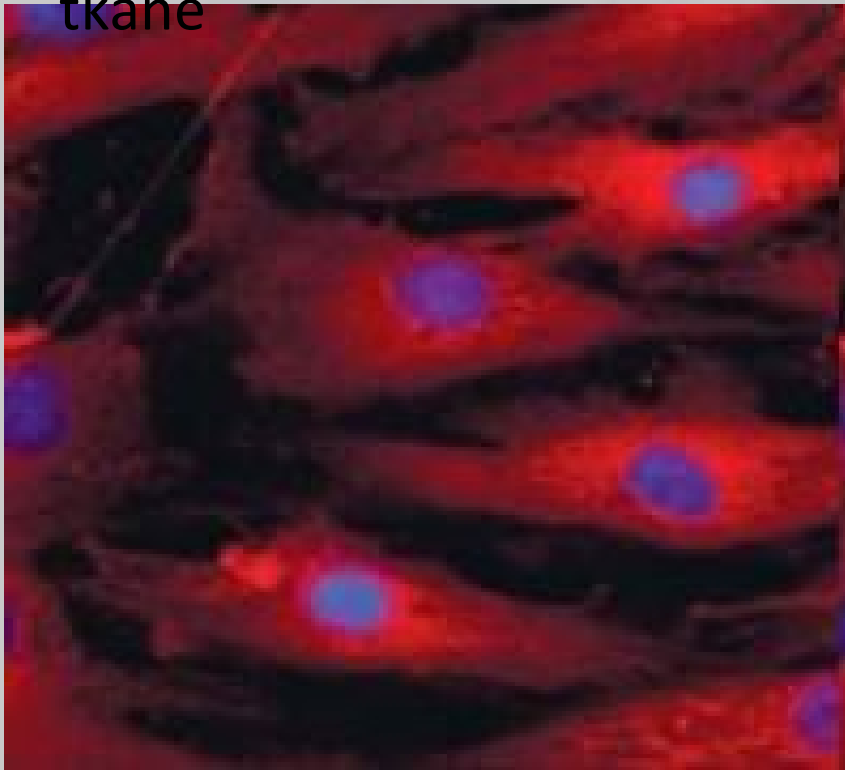
- Při nádorové transformaci dochází k dediferenciaci buněk – buňky získávají některé vlastnosti kmenových buněk
- Např. buňky melanomu svým transkripčním profilem připomínají spíše KB neurální lišty než diferencované melanocyty (z nichž jsou derivovány)
- Významnou úlohu hraje prostředí – nádorové kmenové buňky si upravují okolní prostředí sekrecí některých faktorů
 - Jsou-li v tomto prostředí, nekontrolovaně se množí
 - Jestliže se přenesou do embrya, jsou schopné zapojit se do normálního vývoje

Využití kmenových buněk

- Transplantace kostní dřeně = transplantace hemopoetických KB
 - ročně se provede až 50 tis. transplantací
 - alogenní transplantace
 - od roku 1960
 - používá se pro léčbu asi 50 různých onemocnění, zejména onkogenních
- Pupečnicková krev – rovněž odběr hemopoetických KB i pro možnou autologní transplantaci

Mesenchymové kmenové buňky

- Vznikají v kostní dřeni, ale mohou být izolovány např. z tukové tkáně



- Diferenciace do chondrocytů, hladkých svalových buněk, osteocytů, adipocytů
- Po transplantaci se nemusí přímo stát součástí regenerované struktury, ale produkují trofické faktory, které zlepšují regeneraci
- Transplantace diabetickým pacientům – záchrana končetin před amputací (zlepšení prokrvení)
- Využití při léčbě popálenin a špatně se hojících ran

Transplantace buněk do míšních lézí

- Při poraněních páteře dojde k poruše axonů nervů a následkem toho k ochrnutí
- V místě poranění se vytvoří akutní zánět
- Po určité době dojde k vytvoření tzv. gliové jizvy, která zabrání regenerace jednotlivých axonů
- Zralé neurální buňky jsou navíc terminálně diferencované a ztratily schopnost proliferace



trvalé poškození

- Proběhla řada experimentů, kdy byly do postižené oblasti u nově vytvořených lézí transplantovány kmenové buňky (poměrně dobré výsledky u zvířat)

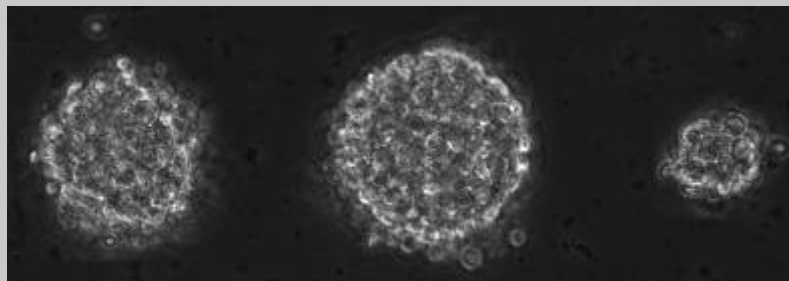
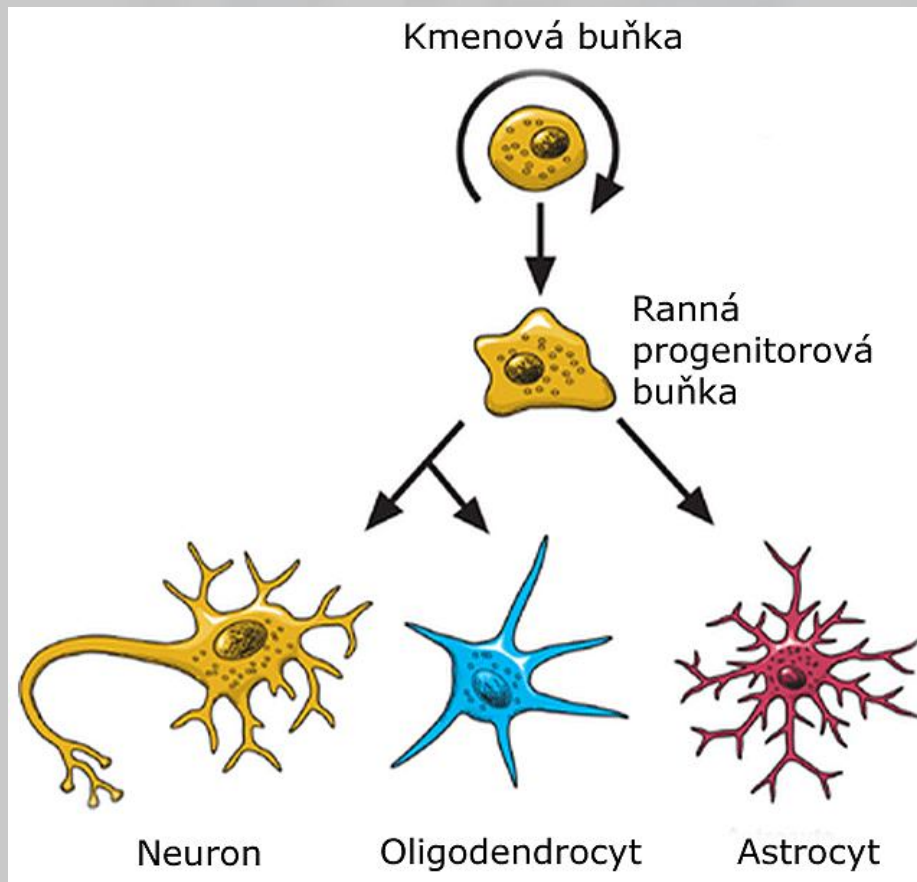
Transplantace ESCs do míšních lézí

- V roce 2009 americký úřad pro potraviny a léky povolil první klinice v USA (Geron – www.geron.com) klinické testy první fáze (testy bezpečnosti) s ESCs při léčbě poranění páteře
 - V říjnu tohoto roku byly 10 pacientům transplantovány progenitory oligodendrocytů derivované z ESCs
 - Transplantace 7 – 14 od úrazu
 - Předpokládá se, že transplantované buňky budou jednak produkcí růstových faktorů podporovat regeneraci neuronů a současně budou vytvářet myelinové pochvy rostoucích axonů

Transplantace při ischemické spastické paraplegii

- Materiál od Dr. Petr Vodičky z ÚŽFG Akademie Věd
- Dočasná okluze aorty, nutná u některých srdečních operací (např. náhrada aneurysma aorty)
- Může vést k ischemické degeneraci spinálních neuronů a následné ztrátě motorických funkcí
- Na krysím modelu balónkové okluze aorty bylo prokázáno, že transplantace krysích či lidských neuronálních prekursorů vede k postupnému zmenšení spasticity a zlepšení pohyblivosti
- Ve spolupráci s Neuralstem Inc. (www.neuralstem.com) v současnosti testujeme jejich linii lidských míšních progenitorů na prasečím modelu
- Plánujeme i využití prasečích NKB a iPS buněk

Neurální kmenové buňky



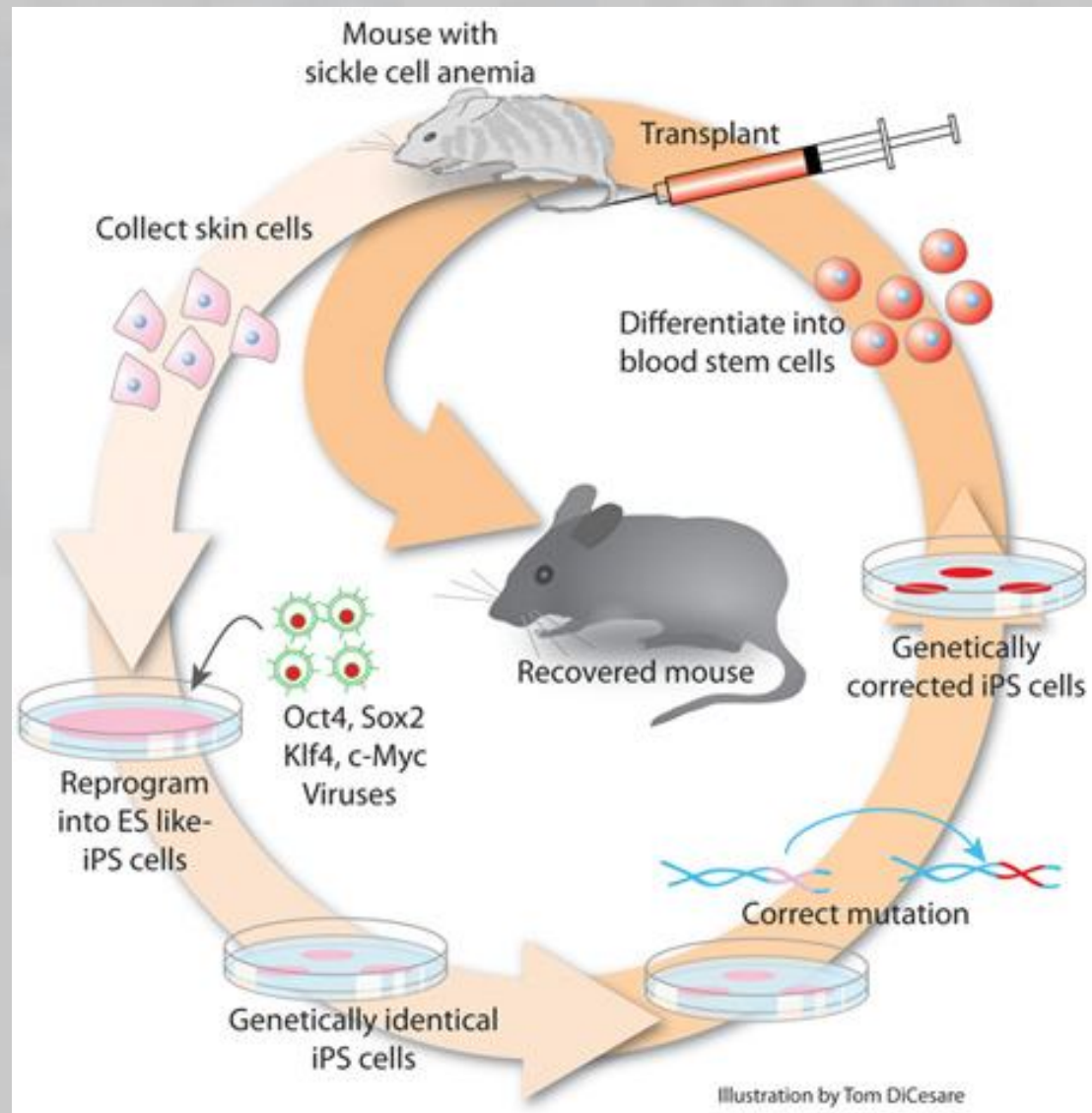
- Vyskytují se ve fetálním i dospělém (v subventrikulární zóně) mozku
- Předpokládá se, že transplantované buňky budou produkovat trofické faktory, které budou podporovat přeživší neurony

Další využití

- Neuralstem – léčba amyotrofické laterální sklerózy (1. fáze klinických testů)
 - léčba chronických poranění míchy, Alzheimerovy choroby, mrtvice, schizofrenie (plánovaná 1.fáze klinických testů)
- Léčba Parkinsonovy choroby, Huntingtonovy choroby
- Použití epidermových progenitorů pro přípravu kožních štěpů

Využití iPS buněk

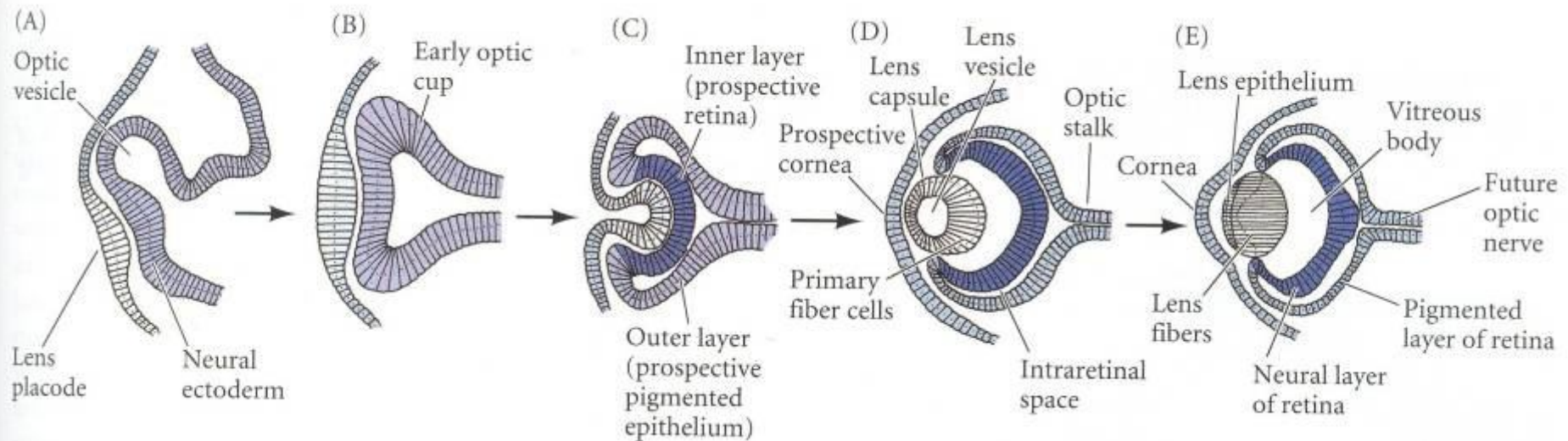
- Léčba poruchy krvetvorby



Je možné vytvoření nového orgánu?

Je možné vytvoření nového orgánu?

Vývoj oka – reciproké indukční interakce

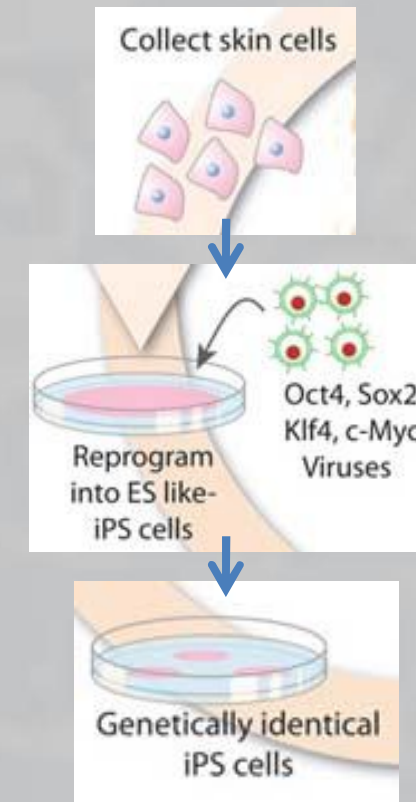


Vytvoření krysí ledviny v myši



Sall1 KO myš

- Nemá vyvinuté
ledviny



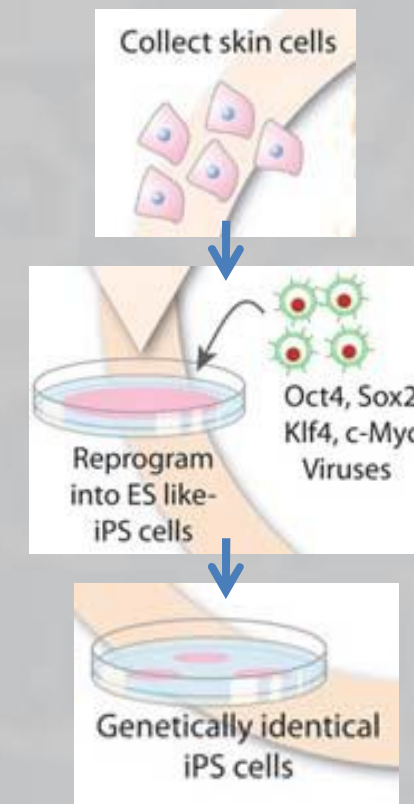
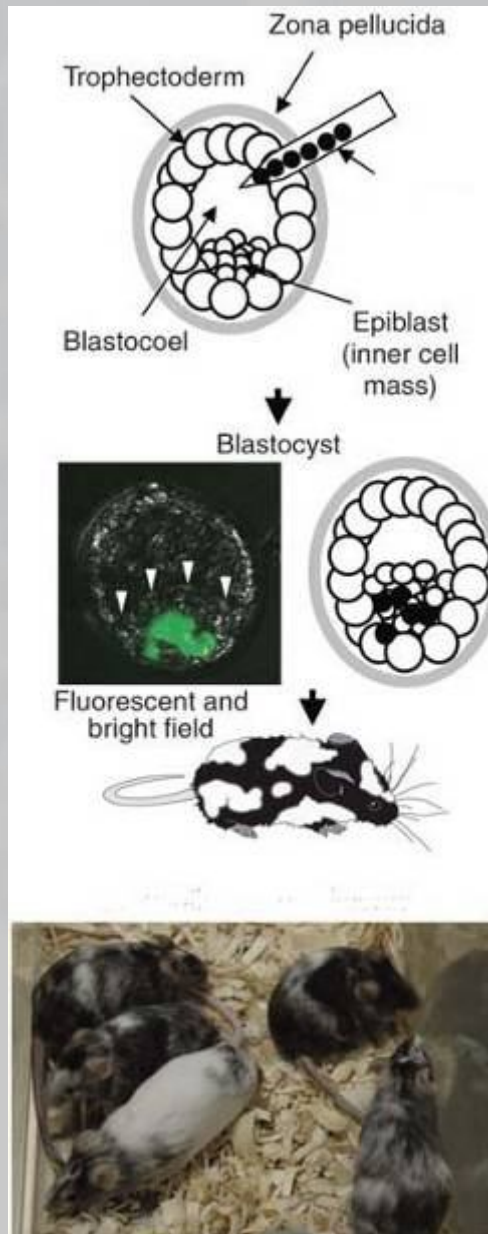
Vytvoření krysí ledviny v myši



Sall1 KO myš

- Nemá vyvinuté ledviny

Chimerická myš se
zdravými ledvinami



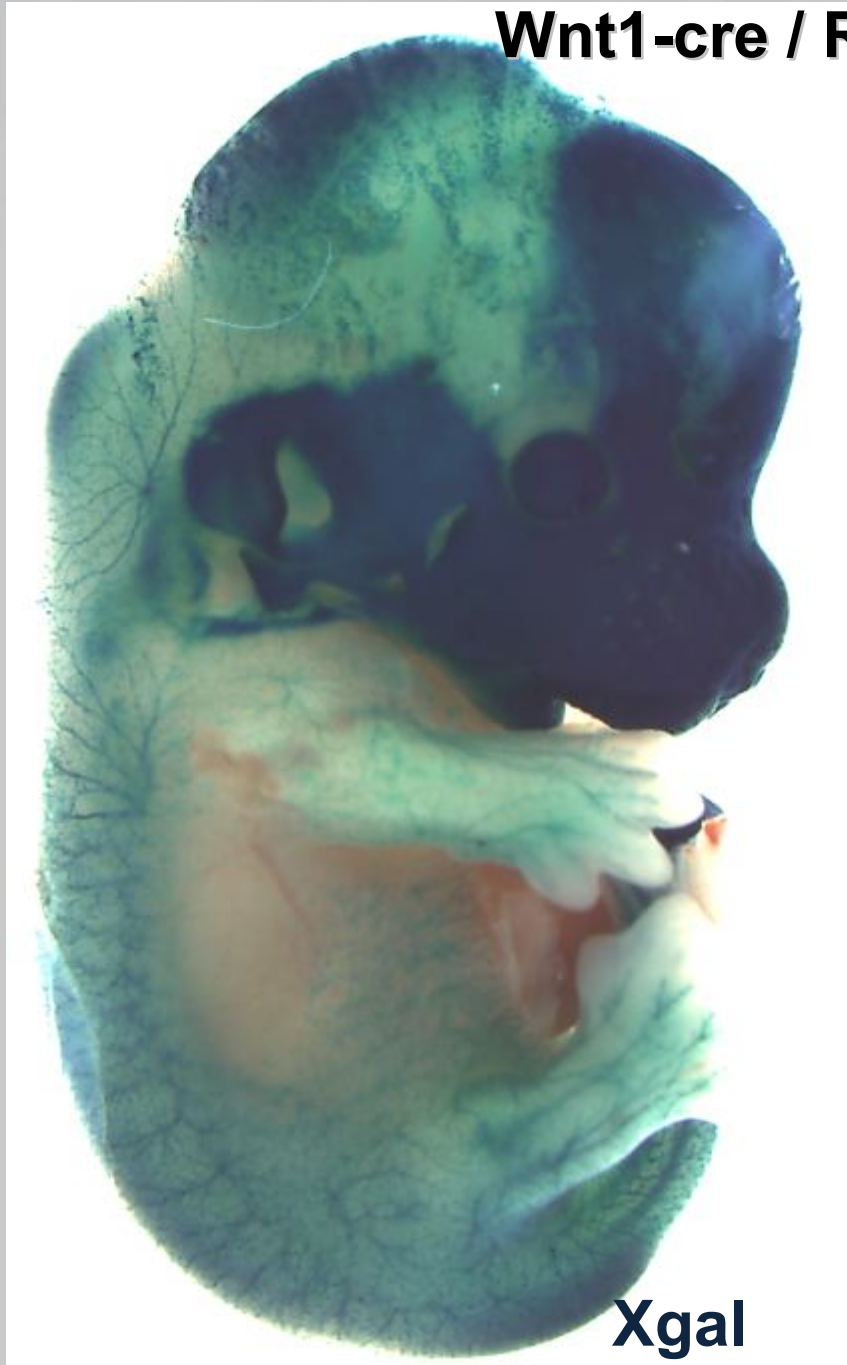
Praktický příklad základního výzkumu kmenových buněk

Kmenové buňky neurální lišty izolované z vlasového folikulu

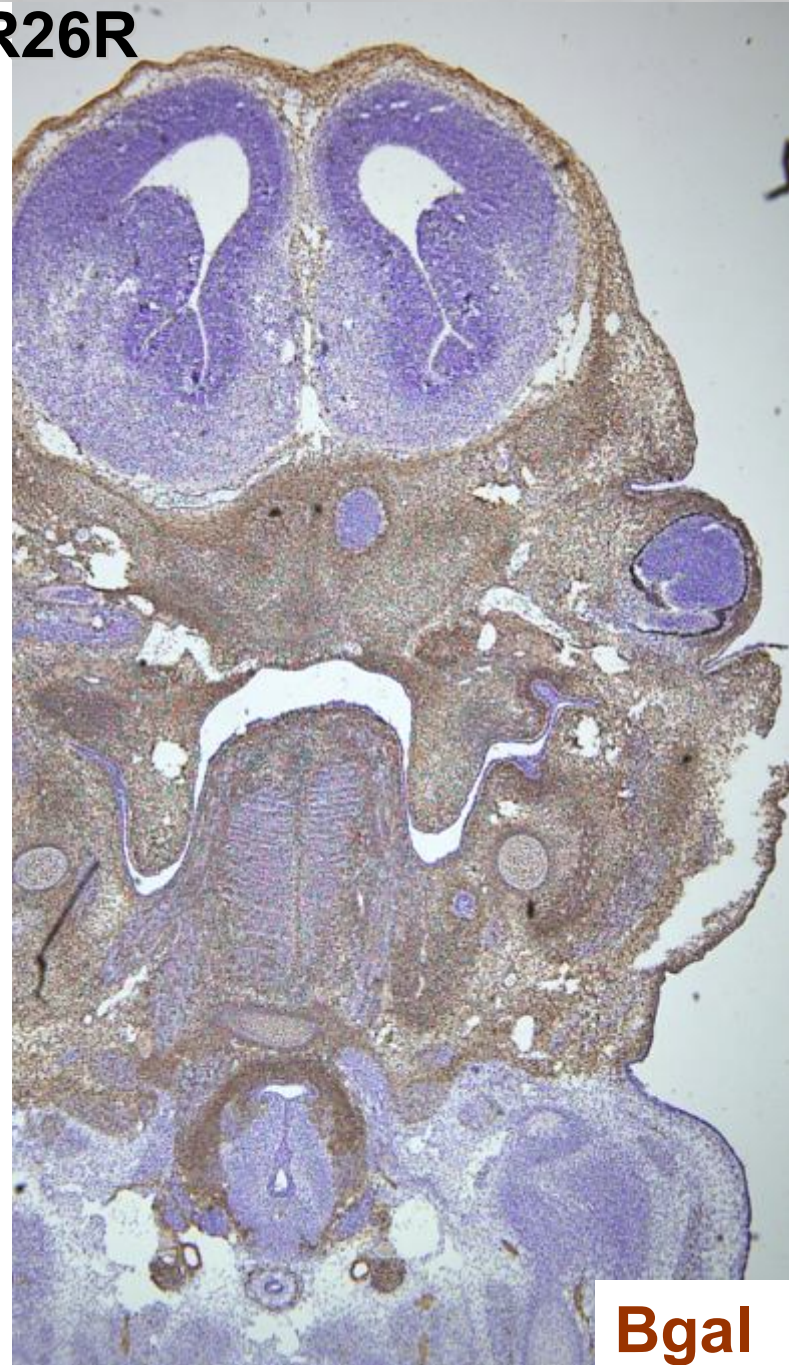
Neurální lišta (NL)

- Embryonální přechodná struktura
- Představuje 4. zárodečnou vrstvu
- Vysktuje se pouze u obratlovců, kterým umožnila vývoj hlavy
- Poruchy vývoje NL jsou příčinou řady vrozených vad

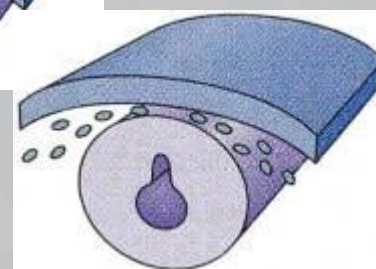
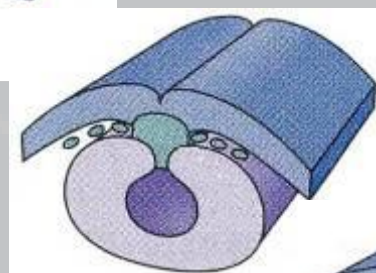
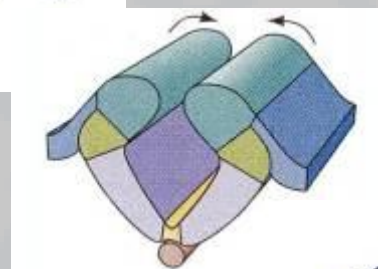
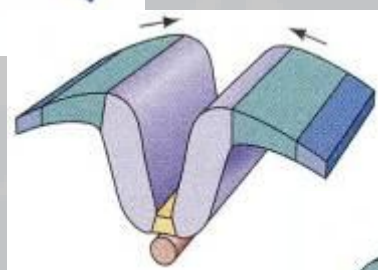
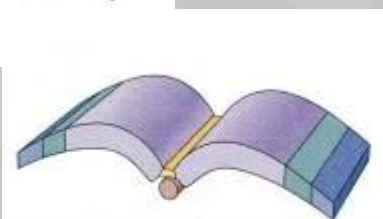
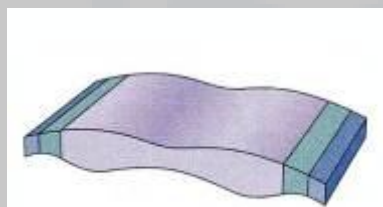
Wnt1-cre / R26R



Xgal



Bgal



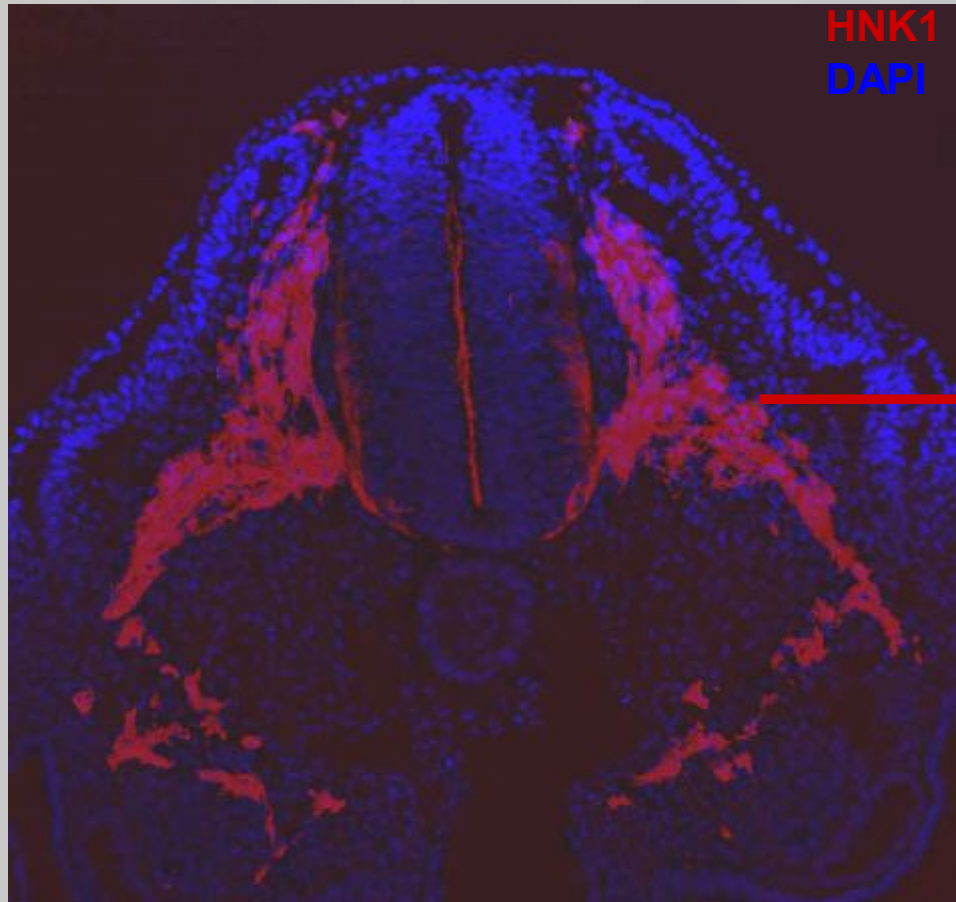
Neurální ploténka

Neurální lišta

Epidermis

Neurulace

Buňky NL mají široký diferenciační potenciál



Neurony a glie periferního nervového systému

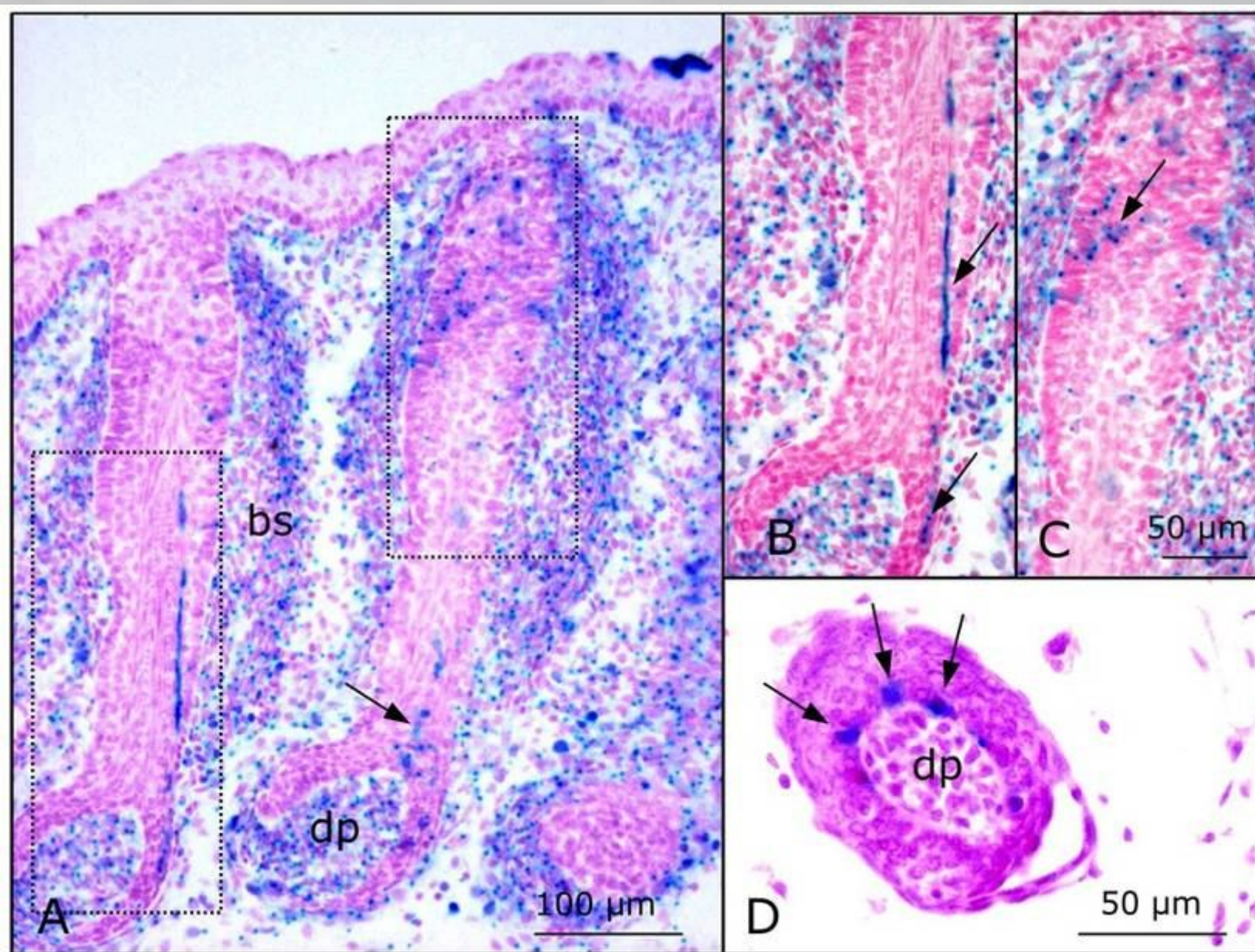
Ektomesenchym hlavy a krku
chrupavka a kost, endotel a stroma
rohovky, zubní papila, dermis, hladká
svalovina, tuková a pojivová tkáň

Melanocyty

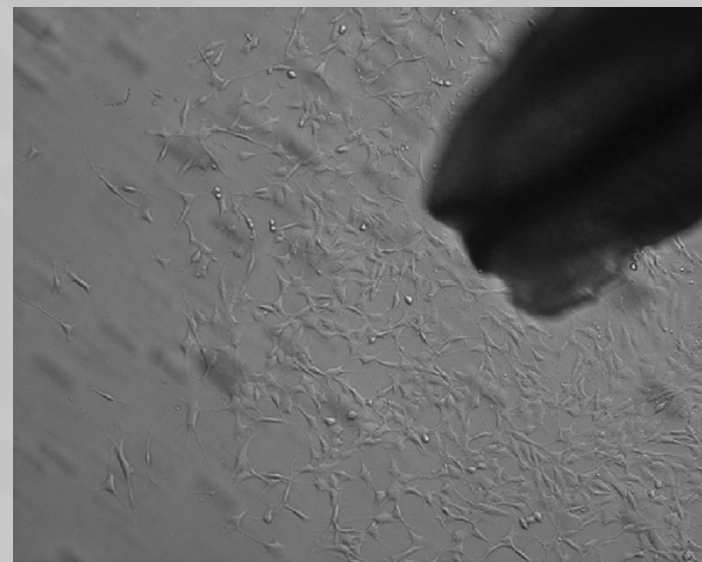
Merkelovy buňky

Endokrinní buňky

Buňky NL jsou přítomny ve vlasovém folikulu



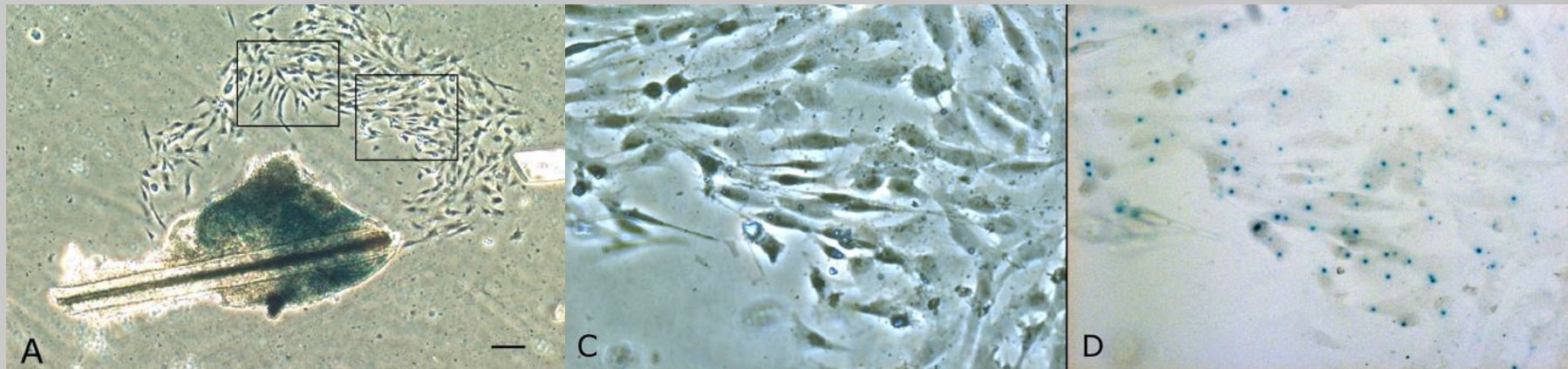
Izolace myších kmenových buněk neurální lišty



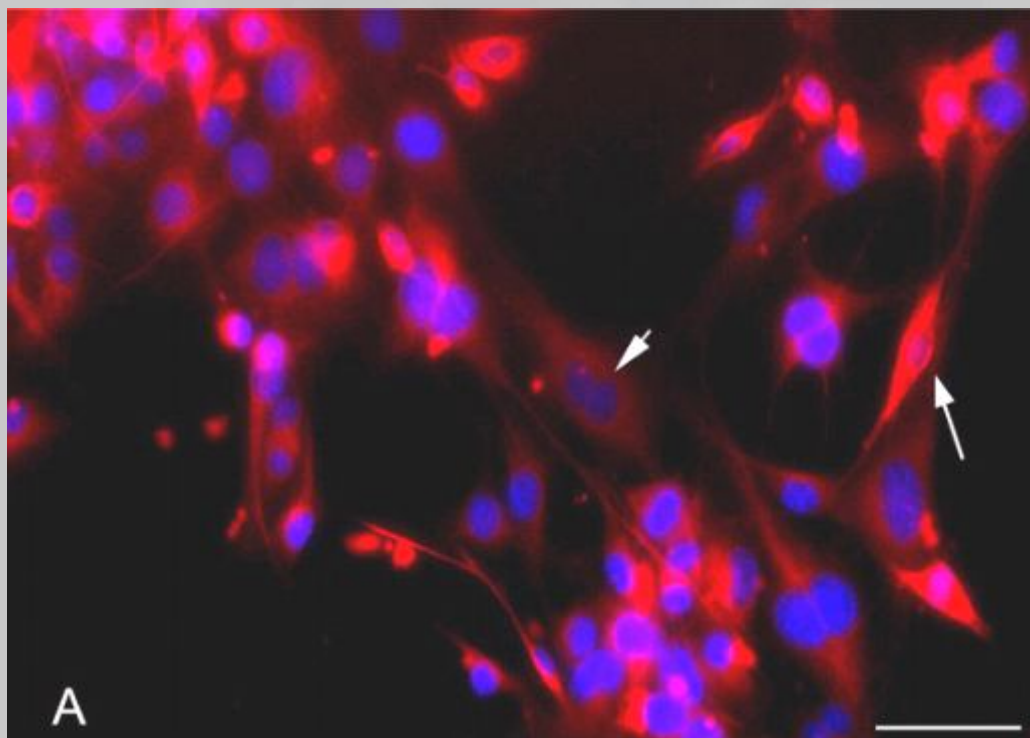
Disekce oblasti bulge z folikulu hmatového chlupu



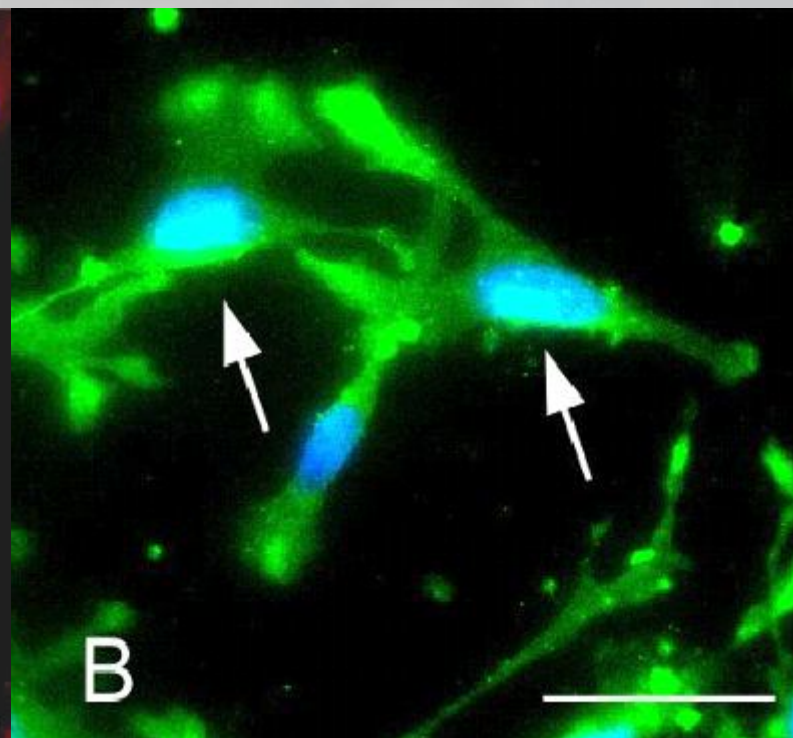
Xgal+ buňky NL emigrují 4 dny po přenesení do tkáňové kultury



Buňky NL po emigraci z vlasového folikulu exprimují geny charakteristické pro NL

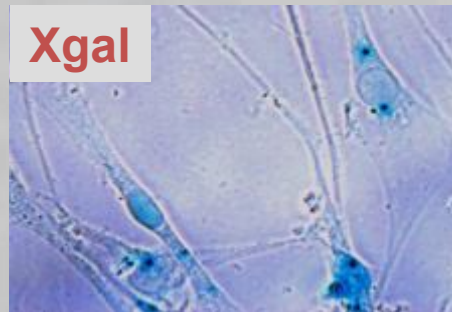


Anti-nestin + DAPI

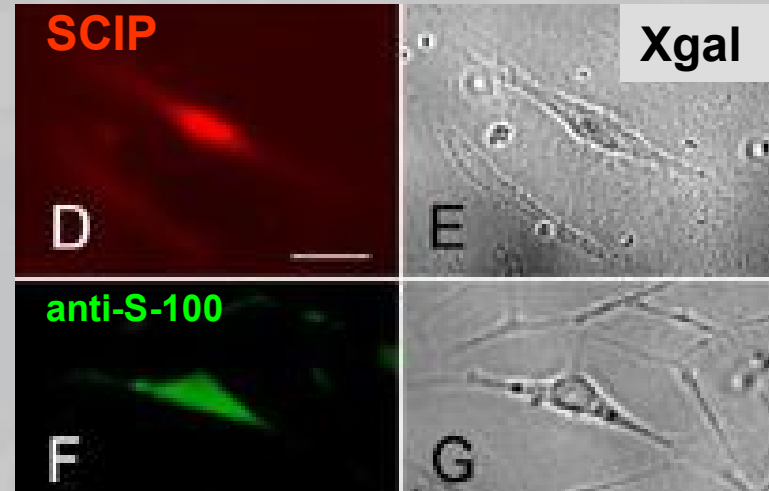


Anti-Sox10 + DAPI

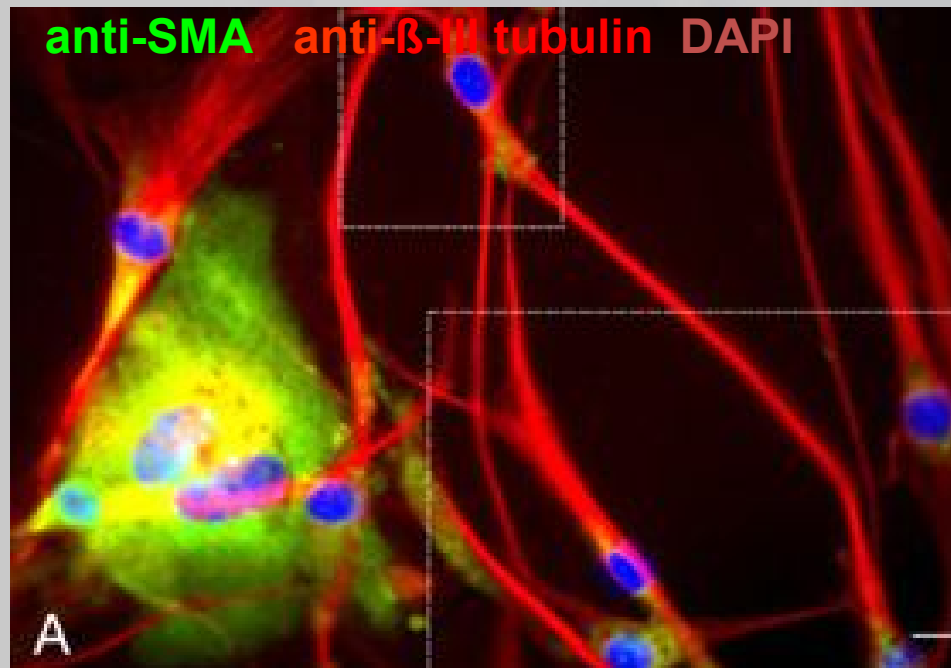
Buňky NL po izolaci z vlasového folikulu jsou multipotentní



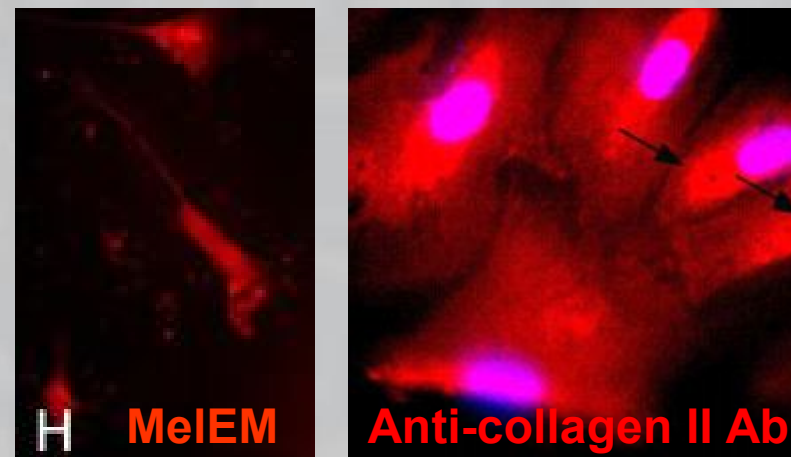
Schwannovy buňky



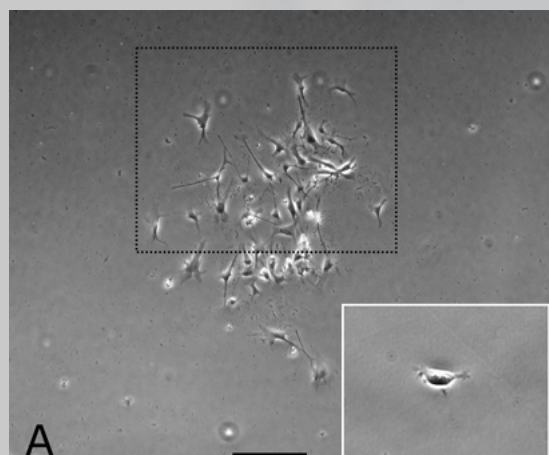
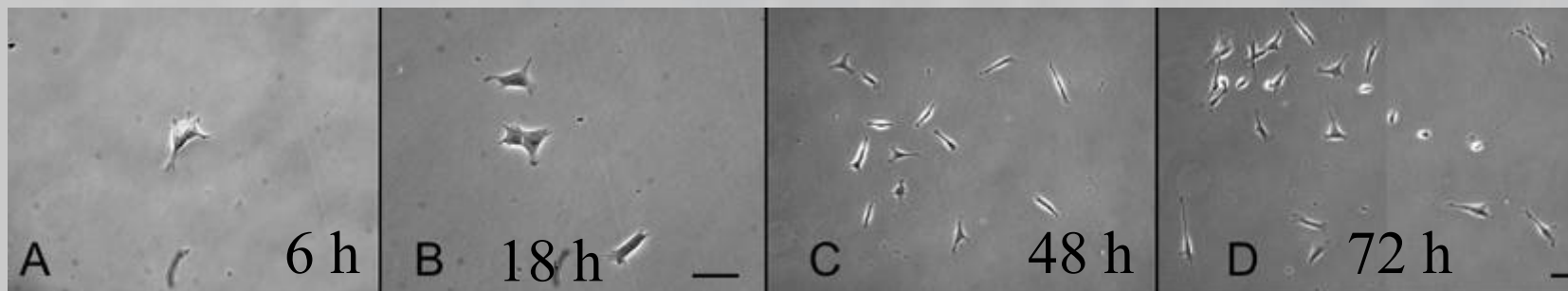
Hladké svalové buňky Neurony



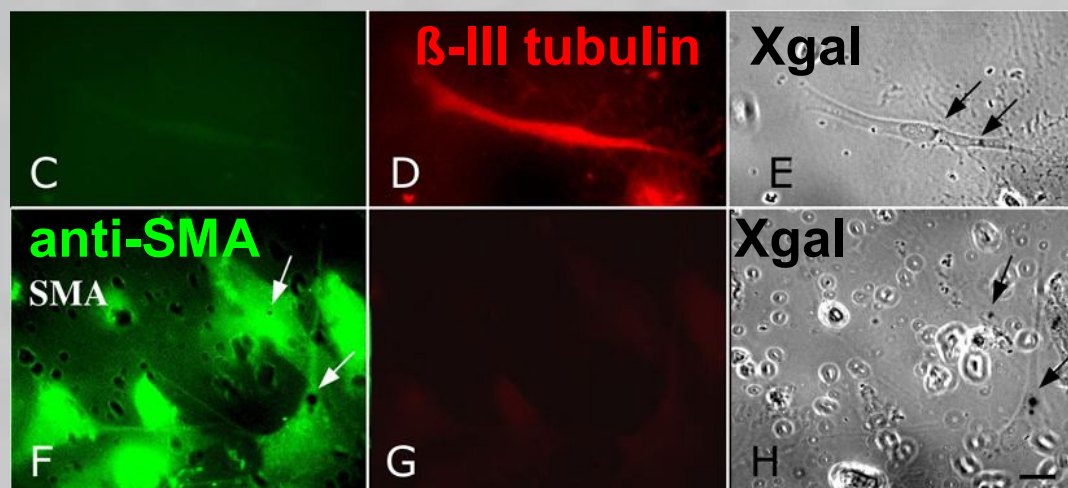
Melanocyty Chondrocyty



Buňky NL izolované z vlasového folikulu mají schopnost sebeobnovy (klonální analýza)

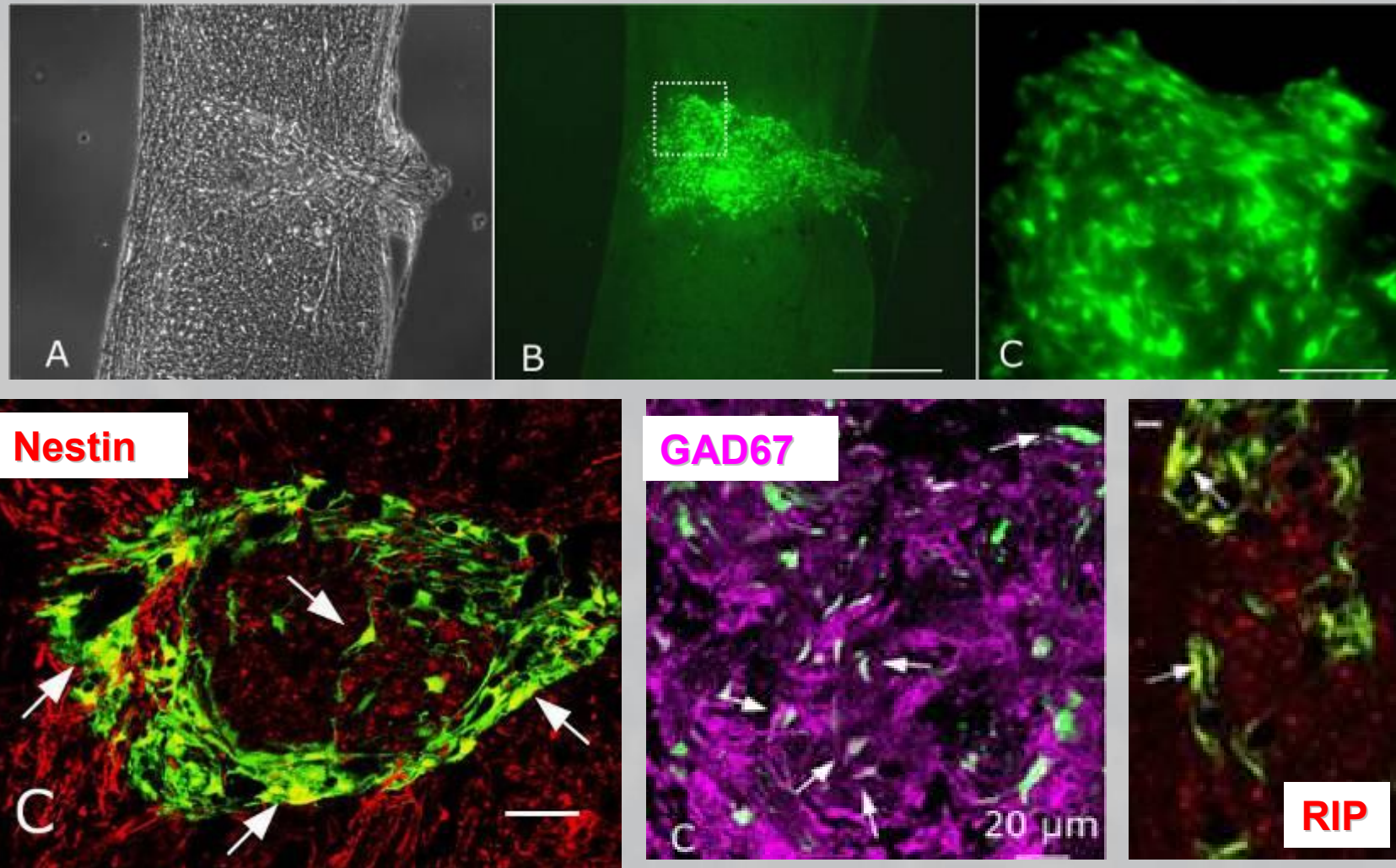


5-denní klon



Buňky sekundárního klonu po 2 týdnech

Buňky NL byly transplantovány do akutních míšních lézí

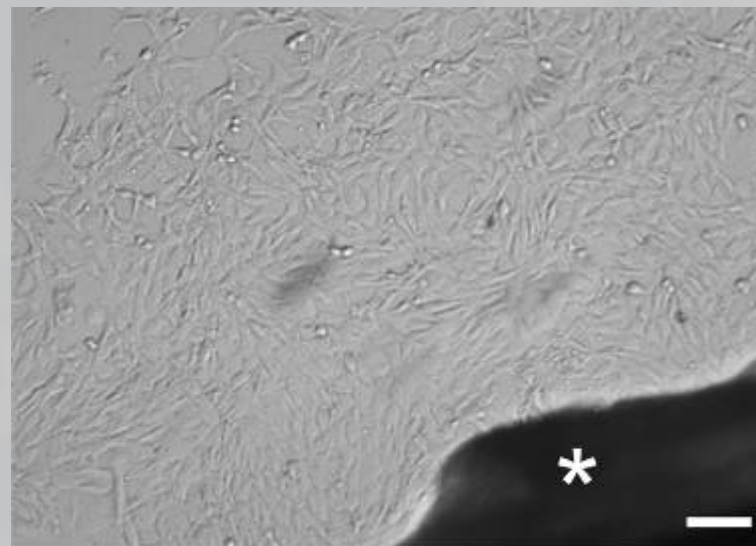
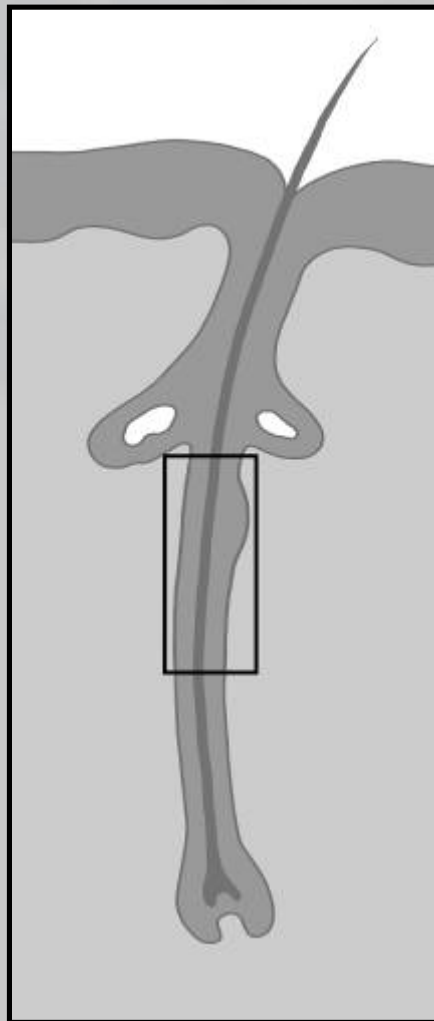


Transplantované buňky v lézi přežívají, zapojují se do tkáně, nemigrují a neproliferují (netvoří nádor)

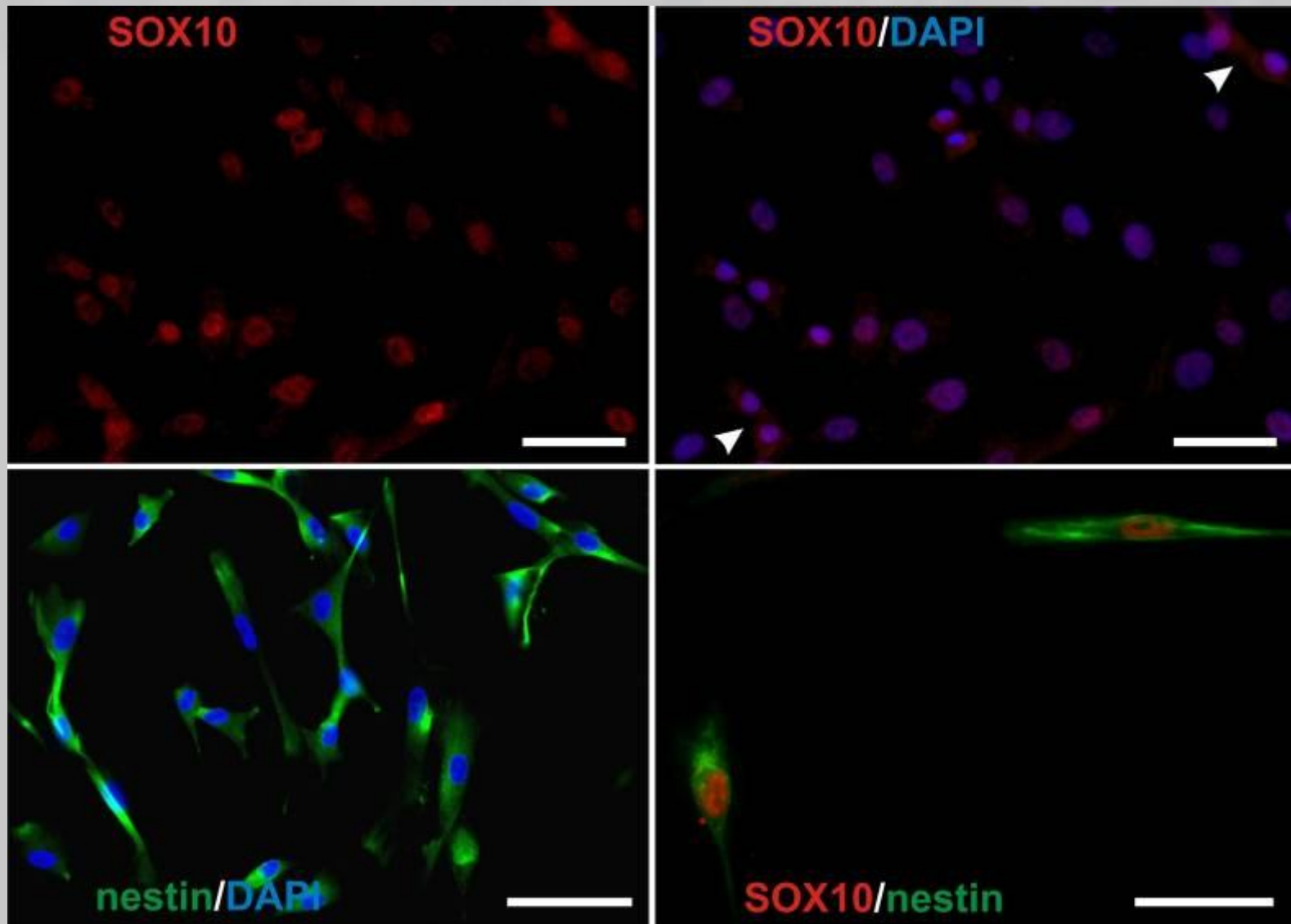
Exprimují markery GABAergních neuronů (GAD67) a oligodendrocytů (RIP) -podpora regenerace (růstové faktory, myelinizace regenerujících axonů)

Izolace lidských buněk NL z vlasových folikulů

Zdroj tkáně: kožní biopsie z různých částí těla



Exprese genů charakteristických pro NL



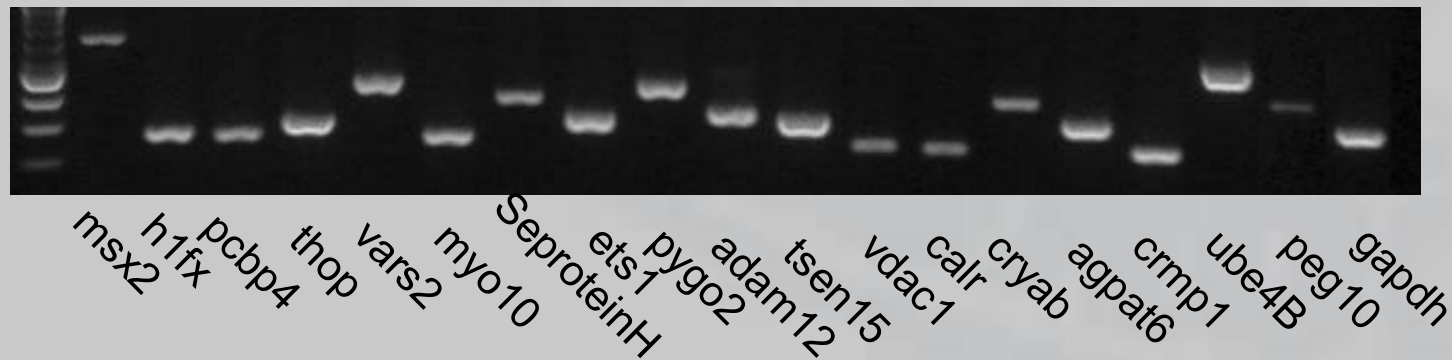
Analýza transkriptomu

Pomocí microarray analýzy lze zjistit všechny exprimované geny

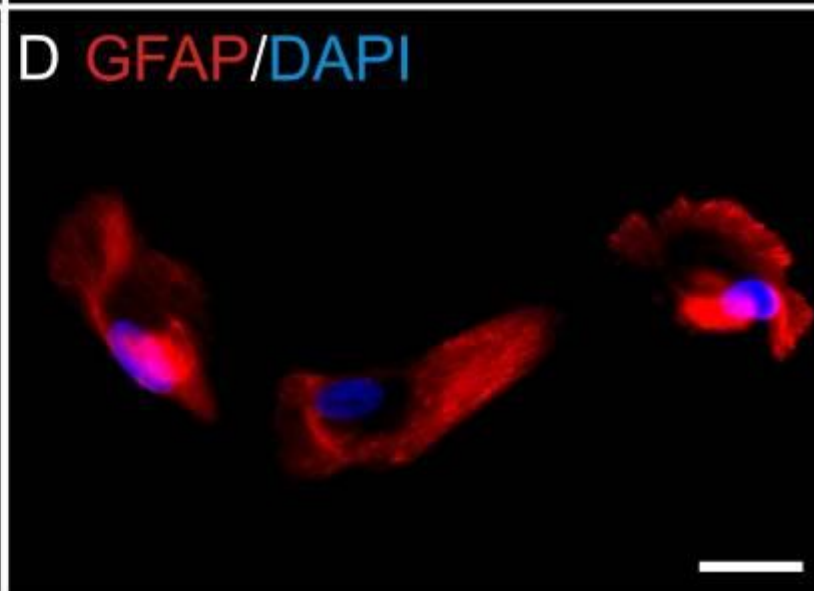
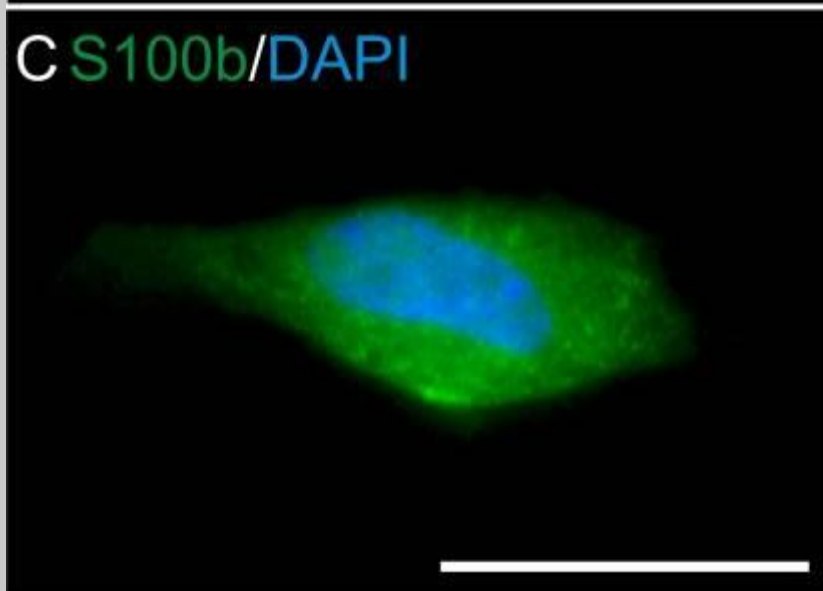
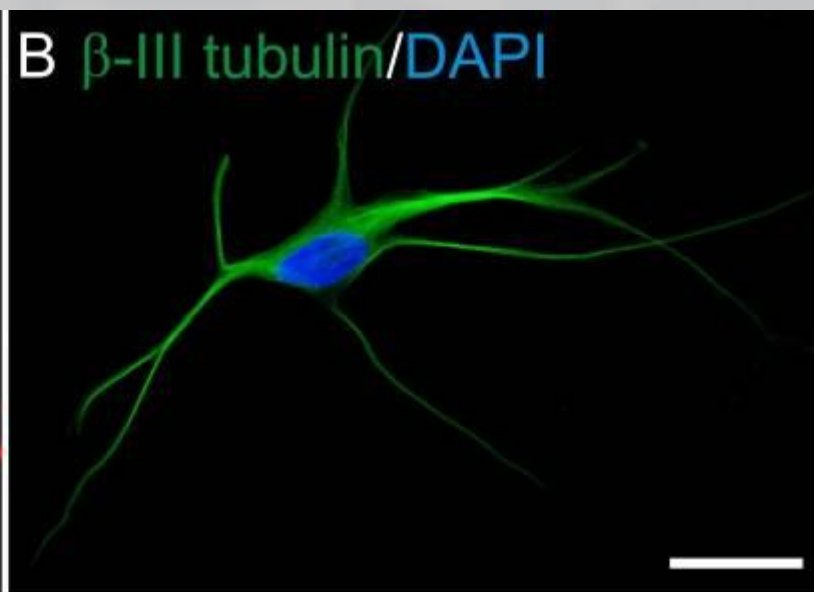
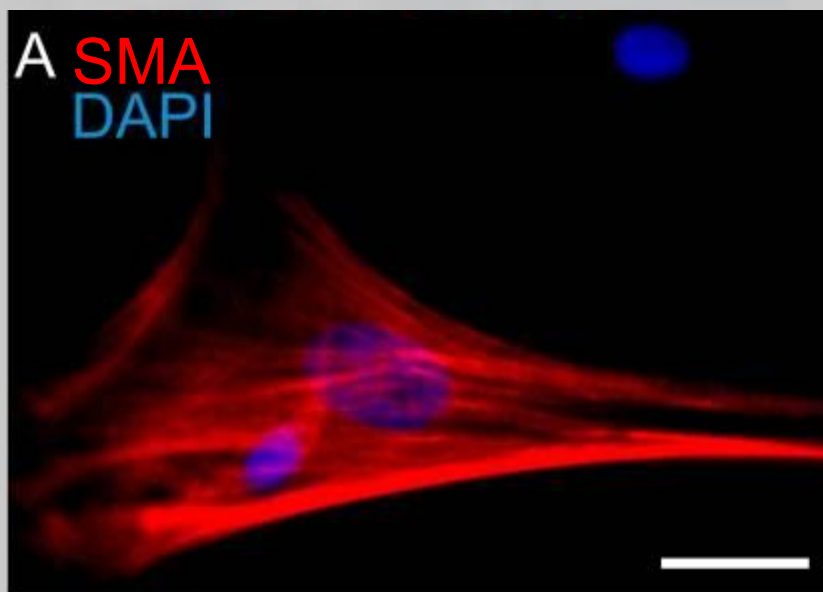
Naše buňky exprimují cca. 90% genů přítomných v myších buňkách z vlasového folikulu a genů, jejichž exprese je zahájena po indukci NL v embryu

Geny molekulárního podpisu buněk NL z vlasového folikulu

Potvrzení pomocí RT-PCR

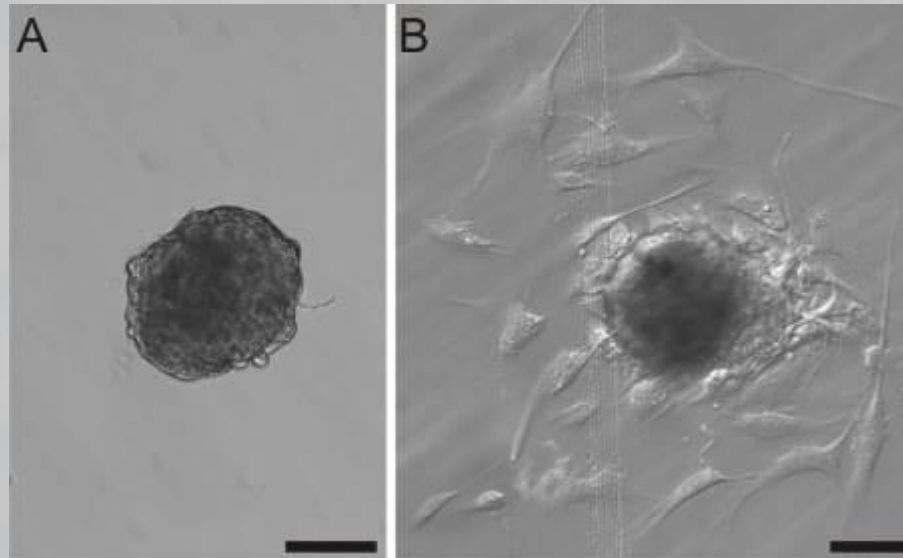


Diferenciace do derivátů NL

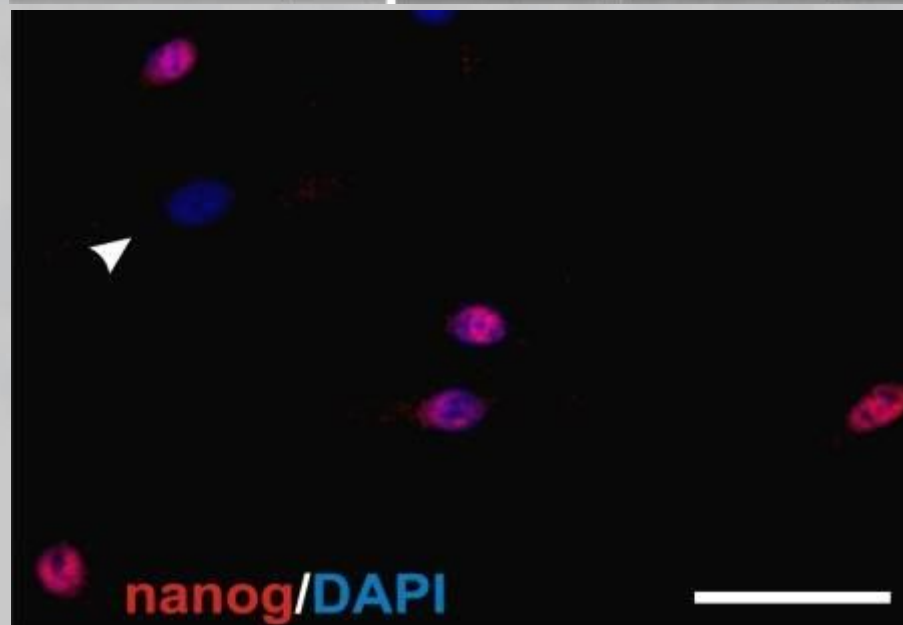


Průkaz „kmenového“ charakteru

- Schopnost klonálního růstu



- Exprese genů charakteristických pro kmenové buňky



Exprese genů použitých pro indukci pluripotence v dospělých somatických buňkách

- Pro reprogramování byly použity 4 transkripční faktory - POU5F1 (OCT3/4), SOX2, c-MYC and KLF4
- Následná selekce byla provedena v závislosti na promotorové aktivitě *FBXO15* a *NANOG*
 - Všechny tyto geny jsou exprimovány v lidských EPI-NCSCs (microarray)

Potvrzení pomocí RT-PCR



Závěr

- Lidské vlasové folikuly mohou sloužit jako zdroj kmenových buněk NL
- Tyto buňky exprimují markery NL, myších EPI-NCSCs i kmenových buněk obecně
- Lidské EPI-NCSCs jsou schopné sebeobnovy a diferenciací v některé deriváty NL



Vzhledem k unikátním vlastnostem a snadné dostupnosti zdrojové tkáně by mohly být lidské kmenové buňky NL vhodným kandidátem pro buněčnou terapii a regenerativní medicínu



Děkuji za pozornost