



Reprogramování buněk jako nový nástroj pro biomedicínské aplikace

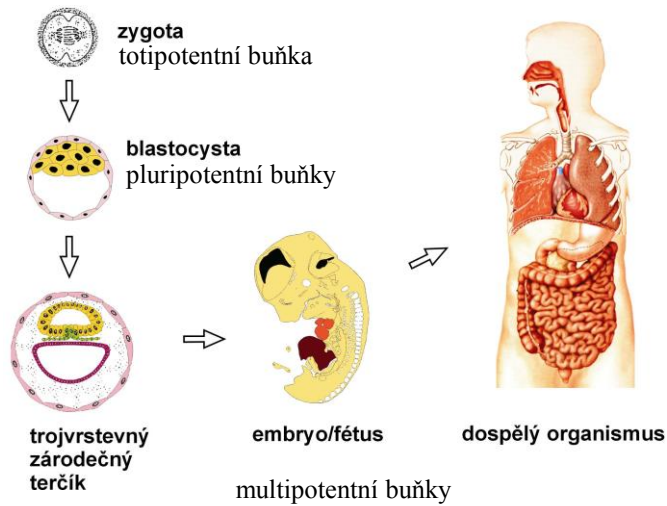
prof. MUDr. Jaroslav Mokrý, Ph.D.



Reprogramování buněk jako nový nástroj pro biomedicínské aplikace

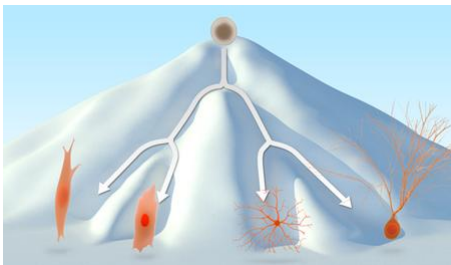
- Předpoklady pro normální vývoj organismu
- Přenos jader somatických buněk
- Fúze buněk
- Plasticita kmenových buněk
- Chemické reprogramování – iPS buňky
- Transdiferenciace
- Klinické aplikace
- Reprogramování buněk a nádory

NORMÁLNÍ VÝVOJ ORGANISMU



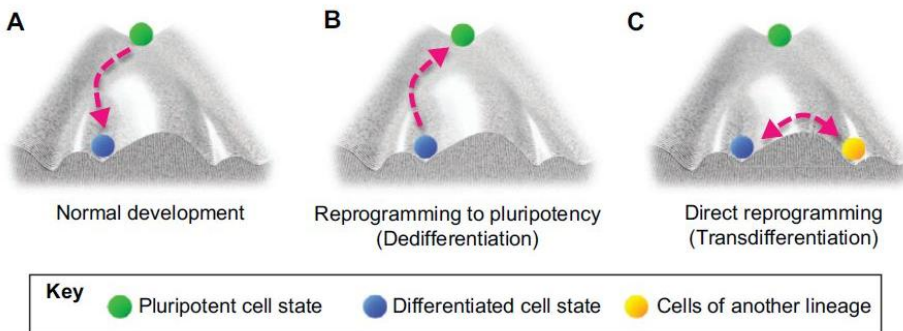
Filip, Mokřý, Hruška:
„Kmenová buňka,
biologie, medicína a filosofie“,
Praha, nakl. Galén, 2006

Diferenciace je jednosměrná.
Osud zadaných buněk byl považován za nezvratný.
Hierarchické uspořádání jednotlivých generací KB



Waddington 1957: **Epigenetická krajina**
Waddington, C. H. (1957). *The Strategy of the Genes*. London: George Allen and Unwin.

- „inescapable valleys represent fate determination = stable states“

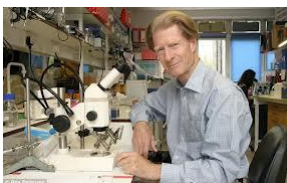
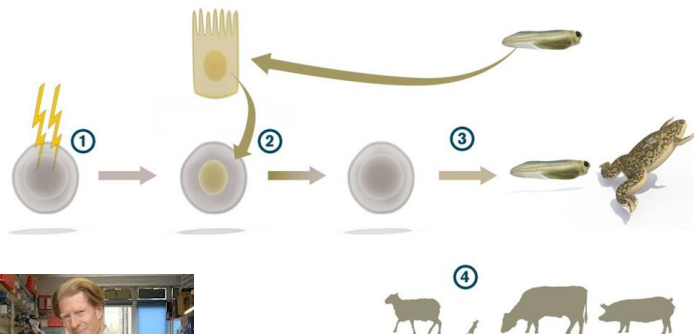


Robert Briggs and Thomas J. King (May 1952). "Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs". *Proc Natl Acad Sci U S A*. **38** (5): 455–463. (Jehlou – aspirace prvojádra – přenos – vývoj až po neurulaci).

Gurdon, J. B.; Elsdale, T. R.; Fischberg, M. (1958). "Sexually Mature Individuals of *Xenopus laevis* from the Transplantation of Single Somatic Nuclei". *Nature* **182** (4627): 64–65.

Gurdon, J. B. (1962). "The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles". *Journal of embryology and experimental morphology* **10**: 622–640.

PŘENOS JADER SOMATICKÝCH BUNĚK



Diferencované bb:

B Lymfocyty: Wabl, M. R.; Brun, R. B.; Du Pasquier, L. (1975).

"Lymphocytes of the toad *Xenopus laevis* have the gene set for promoting tadpole development". *Science* **190** (4221): 1310–1312.

Keratinocyty: Gurdon JB et al. *J. Embryol Exp Morphol* 1975, 34, 93–110



REPRODUKČNÍ KLONOVÁNÍ

– vytvoření nového jedince (např. ovce Dolly) technologií přenosu jádra somatické buňky (SCNT, *somatic cell nucleus transfer*) do enukleovaného vajíčka, který je geneticky identický s dárcem DNA somatické buňky. Zkoušeno u živočichů vč. savců.

Prvním zvířetem úspěšně klonovaným z dospělé somatické buňky pomocí SCNT v Roslinově Institutu v Edinburgu se stala ovečka

Dolly (jediná z 277 jehňat dožila dospělosti) - trpěla onemocněním plic a artritidou; zemřela na Ca plic způsobený retrovirem JSRV; buňky Dolly měly kratší telomery. Nebylo tedy zaručeno, že vytvořený klon byl plnohodnotný.



TERAPEUTICKÉ KLONOVÁNÍ

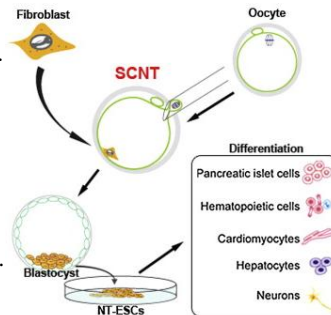
vytvoření embrya, z jehož blastocysty se izolují hES buňky, které budou histokompatibilní s tkání pacienta (dárce somatické buňky) a které se využijí pro buněčnou terapii.

Obr. SCNT. Při manipulaci se vajíčko fixuje pomocí větší mikropipety, zatímco jemnější pipetou se odstraní jádro.



Terapeutické klonování je povoleno např. v UK. Literární odkazy uvedené níže demonstrují dosažení úspěšných postupů na primátech:

- *Cibelli et al. Somatic cell nuclear transfer in humans: Pronuclear and early embryonic development. J. Regen. Med. 2001, 2, 25-31.*
- *Byrne et al. Producing primate ES cells by SCNT. Nature 2007, 450, 497-502.*
- *Tachinaba et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. Cell 2013, 153, 1228-1238.*
1,25 mM kofein proti předčasné aktivaci oocytu při odstranění vřeténka



FÚZE BUNĚK

Fyziologická buněčná fúze: syncytium

Arteficiální buněčná fúze:

- Elektrická (vf ~ 1 – plazmalema a cytoplazma, jádra později – heterokaryon)
- Polyetylén glykol (dehydratační agens; fúze plazmalemy i vnitřních membrán; toxické, polykaryonta; nejčastěji užívaná i pro buněčné hybridy a klonování přenosem jader)
- Sendai virus (respirační virus myši)

Homotypická buněčná fúze: fúze stejných buněk



Heterotypická buněčná fúze: buňky různého typu



Zjistit vliv cytoplazmy na buněčné jádro

Některé hybridy byly **pluripotentní**:

Miller RA, Ruddle FH. Pluripotent **teratocarcinoma-thymus** somatic cell hybrids. *Cell* 1976, 9, 45-55.

Hybridy – polyploidní, ale tvořící teratomy.

mES + T lymfocyty (Tada et al. 2001)

mES + splenocyty (Matveeva et al. 1998)

mES + bb. kostní dřeně (Terada et al. 2002)

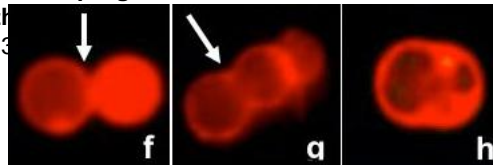
mES + neurální progenitory (Ying et al. 2002)

hES + fibroblasty → pluripotentní bb. (Cowan et al. 2005)

Výsledky dokládaly, že faktory zodpovědné za reaktivaci exprese embryonálních genů nejsou v cytoplazmě, ale v jádře – takové faktory by umožnily reprogramovat buňky.

Pedrazzoli F. et al. Cell fusion in tumor progression: the isolation of cell fusion products by physical methods. *Cancer Cell International* 2011, 11:32
doi:10.1186/1475-2867-11-32

PEG



PLASTICITA umožní zastupitelnost KB

Bjornson C. R. et al.: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283, 1999, 534-537.

NKB → myeloidní a lymfoidní bb.

NKB → kosterní sv. (Galli et al. 2000)

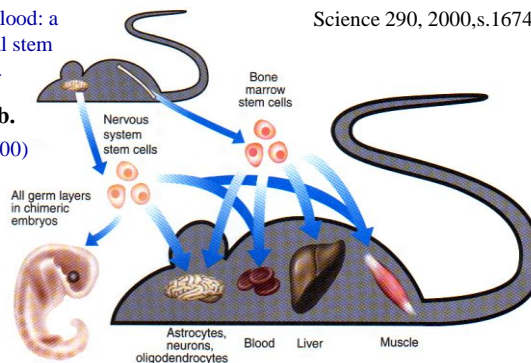
= neuro-myogenní konverze

NKB → TR do embrya

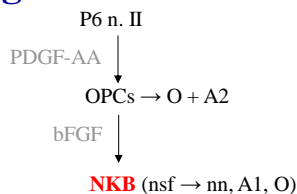
participace na téměř všech tkáních (Clarke et al. 2000)

NKB → endotel

(Wurmser et al. 2004)

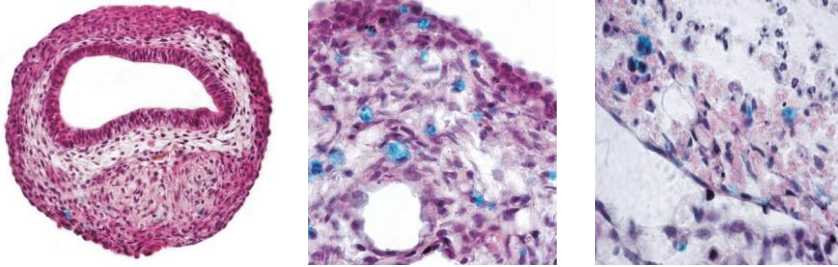


Progenitorové buňky lze stimulovat k produkci KB



Kondo T. and Raff M.: Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 289, 2000, 1754-1757.

CHIMÉRICKÁ EMBRYOIDNÍ TĚLÍSKA

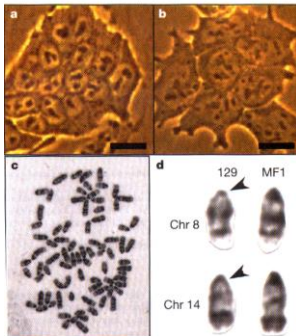


Princip: NKB značená endogenním markerem (např. lacZ genem nebo GFP) se kultivují společně s ES buňkami metodou visící kapky. Výsledná embryoidní tělíska jsou tvořena oběma populacemi buněk. Zadané NKB jsou přeprogramovány k produkci non-neurálních buněčných typů. Chimérická embryoidní tělíska tak slouží jako nástroj pro reprogramování tkáňově specifických kmenových buněk in vitro (Mokrý et al. 2003). Potomstvo zadaných KB se identifikuje podle endogenního markeru.

lacZ gen kóduje bakteriální β -galaktosidázu, jejíž enzymatickou aktivitou lze prokázat reakcí s X-Gal substrátem za vzniku charakteristického modrozeleného zbarvení.

Pokud se ke vnesení lacZ genu použije transfekce, zůstává část buněk neoznačena a výsledek je pak podhodnocen. Pokud se použijí buňky izolované z transgenních zvířat (ROSA26 myši), je označeno 100% buněk.

MECHANISMUS PLASTICITY KB

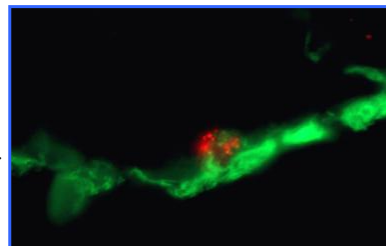


- Buněčná fúze? (Ying et al. 2002) Fúzí dvou odlišných buněk vznikne hybrid vykazující vlastnosti obou výchozích buněk. Výsledná b. je abnormální a polyploidní.

Fyziologicky: syncytium.

Frekvence buněčné fúze je nízká.

Experimenty s chimérickými ET (NKB značené GFP, ES značené pomocí sondy Mitotracker) fúzi buněk neprokázaly (Karbanová 2004).
 ⇒ Podstatou plasticity by mohlo být reprogramování zadaných buněk.



„CHEMICKÉ“ REPROGRAMOVÁNÍ

24 Genes			
Ecat	Gdf3	Sox2	Ecat8
Dppa5	Sox15	Rex1	cMyc
Fbx15	Dppa4	Utf1	Oct4
Nanog	Dppa2	Tcl1	Stat3
Eras	Fthl17	Dppa3	B-catenin
Dnmt31	Sall4	Klf4	Grb2

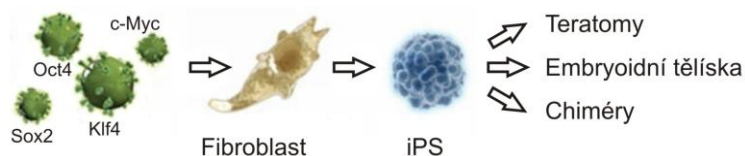
OSKM

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006, 126, 663-373.

Retrovirus; Fbx15 selekce (Fbx 15 v časném embryu, ale nikoli ve fibroblastech) –

INDUKOVANÉ PLURIPOTENTNÍ KB (iPS)

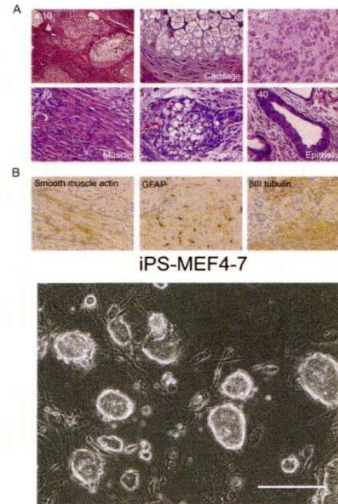
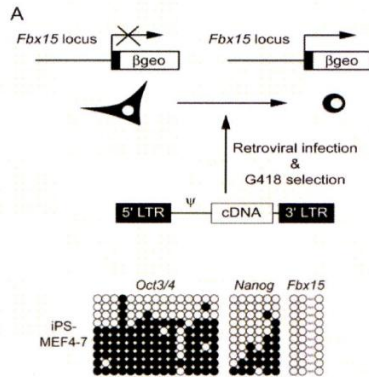
Vnesením vhodných pluripotentních transkripčních faktorů lze somatickou buňku reprogramovat v nediferencovanou kmenovou buňku ~ ES, tzv. **indukované pluripotentní kmenové buňky** (*induced pluripotent stem cells- iPS*). Ke vnesení genů transkripčních faktorů Oct4, Sox2, c-Myc a Klf4 byly poprvé použity retroviry (*Takahashi a Yamanaka. Cell 2006, 126, 663-676*). K získání iPS buněk nejsou zapotřebí ani vajíčka, ani embrya! iPS jsou histokompatibilní s dárcem, pluripotentní, tvoří teratomy a mají normální karyotyp.



Reprogramování je pomalé – ES-like buňky se objeví po cca 20 dnech.
Wernig et al. Nature 2007: 20% myší generovaných z iPS mělo nádory – nutno vyvarovat se c-Myc a retrovirů

Mouse iPS Cells – Yamanaka, 2006

mRNA Reprogramming Course | 2011



Takahashi K, Yamanaka S. Cell. 2006 Aug 25;126(4):663-76

- No live chimeras
- Endogenous *Oct4* and *Nanog* promoters methylated
- **Conclusion: incomplete reprogramming**

21

STEMGENT

20% chimérických myší generovaných z iPS buněk mělo nádory, byl postup modifikován (vyvarovat se onkogenu c-Myc a retrovirů). Např. Yu et al. (*Science* 2007, 318, 1917-1920) použil pro přípravu hiPS buněk faktory *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* a *Lin28* a lentivirové vektory. Další modifikace: přenos aktivních proteinů nebo mRNA - reprogramování pak nezasahuje přímo do genomu = bezpečnější.

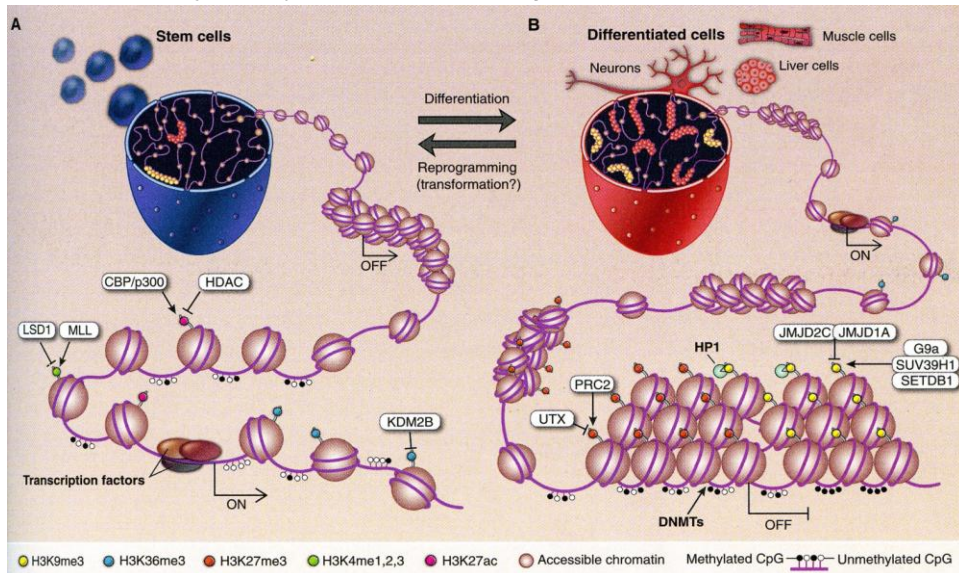
Poslední novinkou v oblasti reprogramování je možnost přímé konverze diferencované buňky v jinou buňku (tedy transdiferenciace).



Nositelé Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu v r. 2012. Sir J. B. Gurdon doložil možnost reprogramovat buňku přenesením jádra somatické buňky do oocyty. Prof. S. Yamanaka generoval první iPS buňky.

ALTERACE STRUKTURY CHROMATINU

Účinek TF je odvislý od CRs (chromatin regulators) ~ přístup k cílové DNA

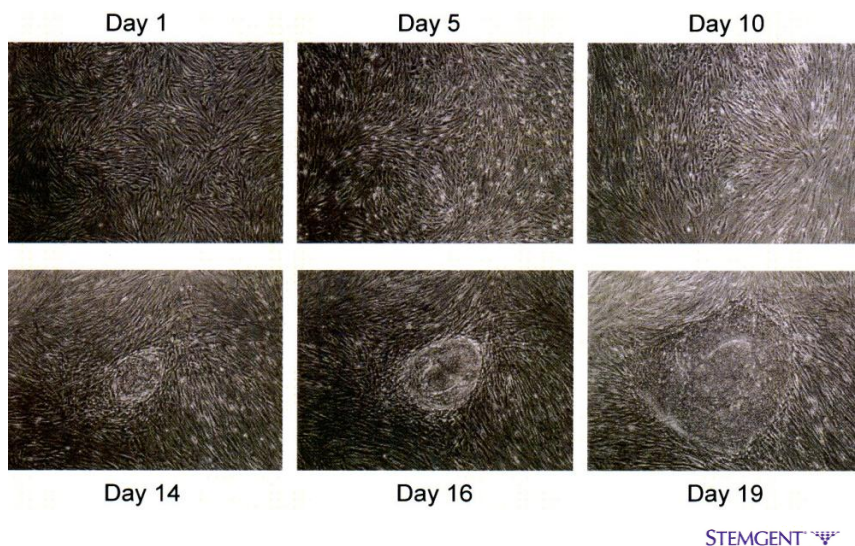


Science 2013, 339, 1567-

REPROGRAMOVÁNÍ BUNĚK

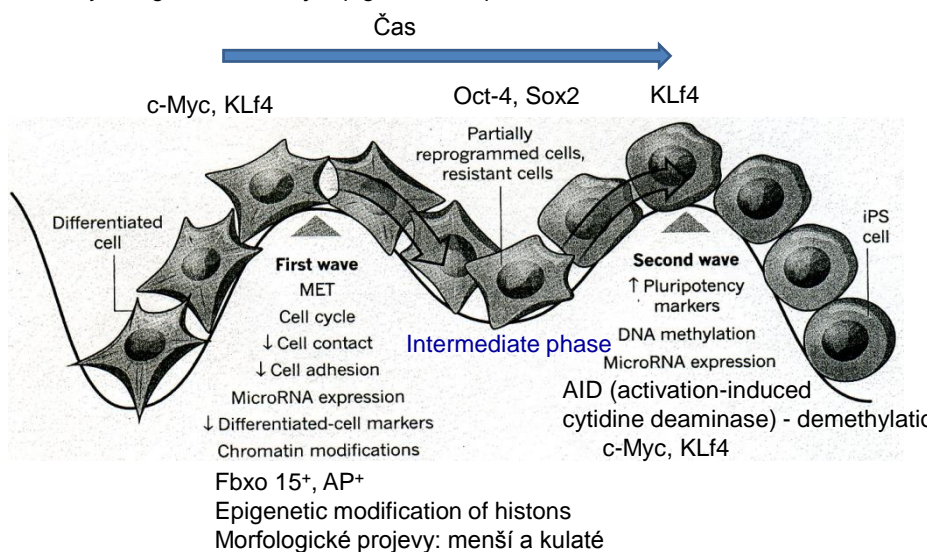
- Klasický protokol pro iPS buňky využívá transfekci pomocí 4 transkripčních faktorů – tzv. 4F iPS.
- Pokud se k transfekci využije buňka, např. KB, která některé tyto faktory exprimuje, lze ji reprogramovat pomocí menšího počtu faktorů: 3F, 2F nebo 1F iPS (Wernig et al. 2008; Kim et al. 2008, 2009).
- K reprogramování není nezbytné přímo modifikovat genetickou informaci výchozí buňky – lze využít:
 - Rekombinantní proteiny transkr. faktorů → piPS (Zhou et al. 2009)
 - microRNAs (Miyoshi et al. 2011)
- Pozn.: Fyziologická mezibuněčná komunikace zahrnuje: *Cx43, prominosomy, uropody*

mRNA reprogramování



MECHANISMUS REPROGRAMOVÁNÍ

Heterochromatin se potlačí demethylací histonu H3 na Lys9.
Demethylace genů odstraňuje epigenetickou paměť.

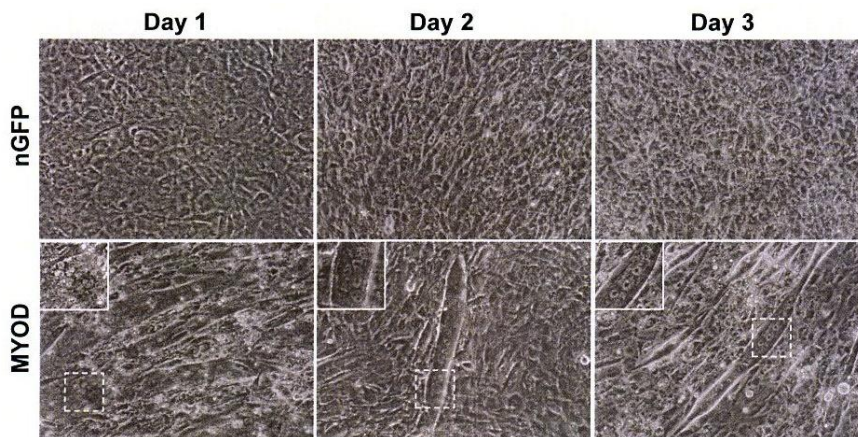


REPROGRAMOVÁNÍ BUNĚK

- transfekce (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) → **4F** iPS **iPS: 9x ↑ telomerázové aktivity**
(Takahashi, Yamanaka, Cell 2006)
- Oct4, Sox2, Klf4 → **3F** iPS (Wernig et al. Cell Stem Cell 2008)
- Oct4+ Klf4+ → **2F** iPS (Kim et al. Nature 2008)
- Sox2+ cMyc+ Klf4+ NSCs (transfekce Oct4) → **1F** iPS (Kim et al. Cell 2009)
- *piggyBac* transpozice → iPS (Woltjen et al. Nature 2009)
- profily metylace histonů = *epigenetic signature of SCs*
- microRNAs
- Rekombinantní proteiny → piPS (Zhou et al. Cell Stem Cell 2009)
- mezibuněčná komunikace: Cx43, prominosomy, uropody (Gillette et al. 2008)

TRANSDIFERENCIACE

Přímé reprogramování
Master regulator MyoD



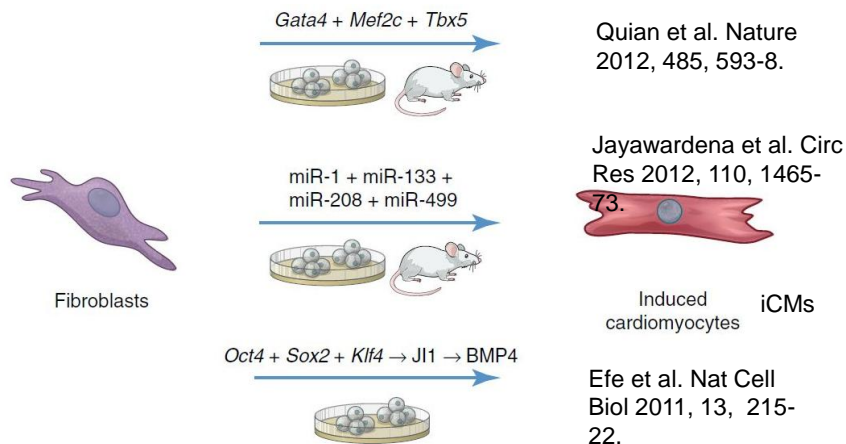
STEMGENT™

PŘÍMÁ KONVERZE DIFERENCOVANÝCH BUNĚK = TRANSDIFERENCIACE

Fibroblast	\xrightarrow{MyoD}	Myoblast	Davis et al. Cell, 51, 1987, 987-1000
Ly progenitor	$\xrightarrow{IL2+GMSFRs}$	Myeloidní progenitor	Kondo et al., Nature 407, 2000, 383-6
B-lymfocyt	$\xrightarrow{Cebpa/PU.1}$	Makrofág	Xie et al., Cell 117, 2004, 663-676
Fibroblast	\xrightarrow{Cebpa}	Makrofág	Feng et al., PNAS 105, 2008, 6057-62
B-lymfocyt	$\xrightarrow{-Pax5}$	Lymfoidní progenitor	Cobaleda et al., Nature 449, 2007, 473-7
Ex. pankreas	$\xrightarrow{Neurog3+Pdx1+Mafa}$	β -buňky	Zhou et al., Nature 455, 2008, 627-32
Fibroblast	$\xrightarrow{Ascl1+Brn2+Myt1l}$	Neuron (iN)	Vierbuchen et al. Nature 463, 2010, 1035-41
„Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors“			
			Qian et al. Nature 485, 2012, 593-598
Fibroblast	$\xrightarrow{Gata4+Mef2c+Tbx5}$	Kardiomyocyt	Inagawa et al. Circ Res 111, 2012, 1147-56

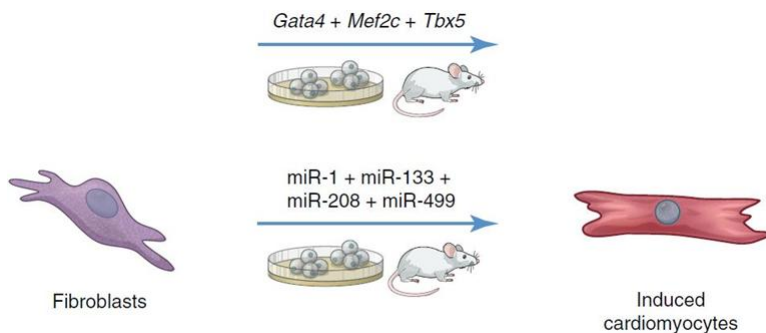
INDUKOVANÉ KARDIOMYOCYTY

In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes.
Gata4, Mef2c and Tbx5 (GMT)



TRENDS in Molecular Medicine

IN VIVO REPROGRAMOVÁNÍ



IM

Funkční iCMs:

organizace sarkomer, oscilace Ca^{2+} , mechanické kontrakce
< velikost infarktu, > funkce (echokardiografie a MRI).

BUNĚČNÁ TERAPIE SRPKOVITÉ ANÉMIE iPS BUŇKAMI

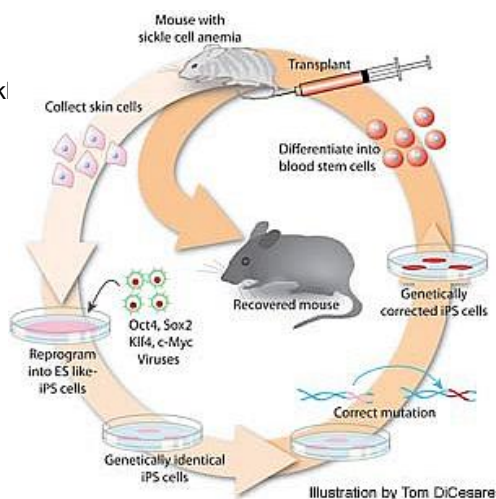
iPS z autologní kůže

Hanna et al. Science 2007:
„iPS can ameliorate symptoms of sickle cell anemia“

schopnost napravit defekt
3 TR myši přežily až 20 T,
neoštetěné umíraly před 7. T

Korekce lidské alely mutovaného
genu pro Hb.

K redukcí rizika Tu kvůli c-Myc,
byly kopie c-Myc copies
odstraněny z iPS buněk.



KLINICKÉ APLIKACE REPROGRAMOVÁNÍ

Tvorba základů orgánů, např. **jater** (Takabe et al. Nature 2013, 499, 481-4).
 hiPS → entodermové buňky a jejich interakcí s endotelem a stromatem → 3D organoidy

Imunogenicita iPS? Okita et al. Circ Res 2011, 109, 720-721.
 Zhao et al. Nature 2011, 474, 212-215.

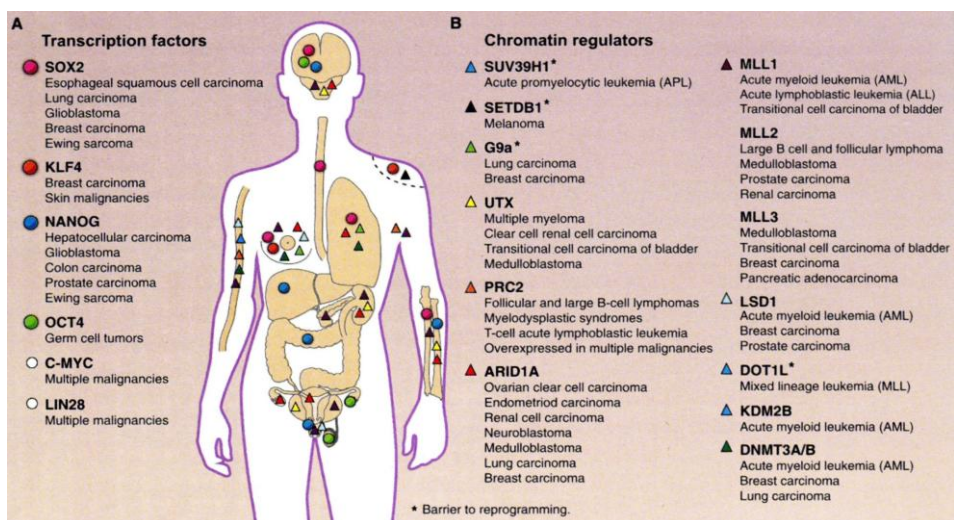
iPS od **pacientů** s onemocněním:

Amyotrofická laterální skleróza
 Rettův syndrom
 Míšní svalová atrofie
 Familiální hypercholesterolemie
 Glycogen storage disease type 1A
 α 1-antitrypsin deficiency

Srdeční on.: Timothy syndrome
 LEOPARD syndrome
 Type1 and 2 long QT syndrome

Schizofrenie
 Parkinsonova choroba

GENY ZODPOVĚDNÉ ZA REPROGRAMOVÁNÍ I NÁDORY



Science 2013, 339, 1567-7

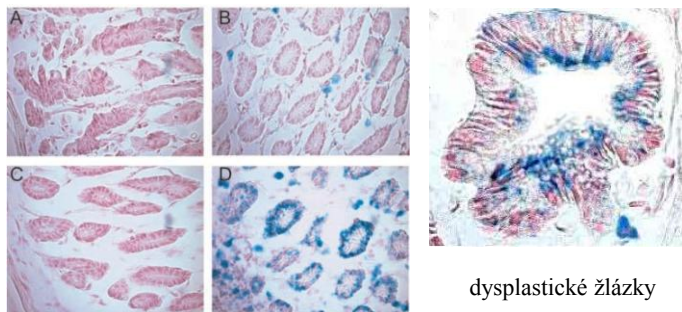
SKUTEČNÝ PŮVOD NÁDORŮ

- Aractingi S et al., **Skin** carcinoma arising from donor cells in a kidney transplant recipient. *Cancer Res.* 2005, 65:1755-60.
- Passegue, E., et al. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 (Suppl 1): 11842-11849, 2003.
- Jamieson, C.H., et al. **Granulocyte-macrophage progenitors** as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *NEJM.* 351: 657-667, 2004.
- Krivtsov, AV et al., Transformation from **committed progenitor** to leukemia stem cells initiated by MLL-AF-9. *Nature* 442, 818-822, 2006.
- McCormack MP, et al. The Lmo2 oncogene initiates leukemia in mice by inducing **thymocyte** self-renewal. *Science* 327, 879-883, 2010.
- Houghton J et al., **Gastric** cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science.* 2004, 306: 1568-71.

Houghton J et al., **Gastric** cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science.* 2004, 306: 1568-71.

Chronická infekce C57Bl/6 myši *Helicobacter felis* → gastritis → zánět → aktivace imunity → myofibroblasty → dysplazie → metaplasie → Tu

Epitelový karcinom může vzniknout přeměnou buněk z kostní dřevě.



dysplastické žlázy