



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Od fyziologie k medicíně

Aktuální výzkum kmenových buněk: ze zkumavky k terapeutickému využití

Tomáš Bárta, Dáša Doležalová, Aleš Hampel,
Zuzana Holubcová, Josef Jaroš, Vladimír Vinarský

Projekt „Od fyziologie k medicíně“ CZ.1.07/2.3.00/09.0219 je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

**Ústav fyziologie
Veterinární
a farmaceutická
univerzita Brno**

**Biologický ústav
Lékařská fakulta
Masarykova univerzita
Brno**

**Ústav experimentální
medicíny AV ČR, v.v.i.**

**Vydala Veterinární
a farmaceutická univerzita Brno
2010**

ISBN 978-80-7305-097-9

1. vydání, neprodejné



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Od fyziologie k medicíně

Aktuální výzkum kmenových buněk: ze zkumavky k terapeutickému využití

Mgr. Tomáš Bárta

Mgr. Dáša Doležalová

Doc. MVDr. Aleš Hampl, CSc.*

PharmDr. Zuzana Holubcová

Ing. Josef Jaroš, Ph.D.

Mgr. Vladimír Vinarský

*autor pro korespondenci: ahampl@med.muni.cz

Vydala Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

ISBN 978-80-7305-097-9



PANEL 1: VĚDA - VÝZKUM - VZDĚLÁVÁNÍ - MEZINÁRODNÍ UPLATNĚNÍ



Aktuální
vědecké
poznatky
na úrovni
Nobelových cen
(věda)

Prezentace
vlastního
výzkumu
(vzdělávání)

Mezinárodní
možnosti
(mezinárodní
uplatnění)

Aktuální
výzkum
v oblasti
fyziologie
(výzkum)

PANEL 2: VĚDA - VÝZKUM - PRAXE

Fyziologie-
patofyziologie-
medicína
(humánní
medicína)

Fyziologie-
patofyziologie-
medicína
(diagnostika)

Studentská
odborná
konference

Fyziologie-
patofyziologie-
medicína
(veterinární
medicína)



**OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ - INTEGRACE
VĚDY, VÝZKUMU, ODBORNÉHO VZDĚLÁVÁNÍ
A PRAXE**

CZ.1.07/2.3.00/09.0219

Projekt je určen pro:

- 1) **Akademické pracovníky VŠ** (školitele VŠ studentů na úrovni bakalářské, magisterské a doktorské)
- 2) **Studenty VŠ** (zpracovávající odbornou práci na úrovni bakalářské, magisterské nebo doktorské)
- 3) **Studenty a pedagogy SŠ** (s aktivním zapojením v SOČ)

Projekt nabízí:

- 1) Odborné vzdělávání formou **diskusních seminářů** se zaměřením na témata oceněná Nobelovými cenami za Fyziologii a medicínu
- 2) **Exkurze** na pracoviště vědy a výzkumu, aktivní **zapojení do experimentů**
- 3) Získání zkušeností s **atraktivní prezentací vlastních výsledků na odborných akcích** (konferencích)
- 4) Seznámení s možnostmi **mezinárodních kontaktů a uplatnění na světovém vědecko-výzkumném fóru**
- 5) Tištěné a interaktivní **publikace**

<http://cit.vfu.cz/fyziolmed>

Projekt je financován Evropským strukturálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

PANEL 1: VĚDA-VÝZKUM-VZDĚLÁVÁNÍ-MEZINÁRODNÍ UPLATNĚNÍ

TÉMA 2: AKTUÁLNÍ VÝZKUM KMENOVÝCH BUNĚK: ZE ZKUMAVKY K TERAPEUTICKÉMU VYUŽITÍ

REGION: BRNO

TERMÍNY:

18. března 2010

23. března 2010

27. března 2010

31. března 2010

Místo konání: Univerzitní kampus Masarykovy univerzity, Brno

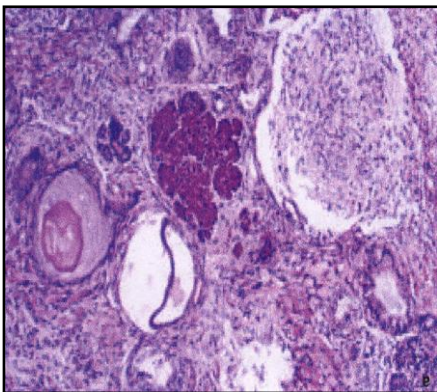


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Kmenové buňky: co jsou, kde jsou a na co jsou.

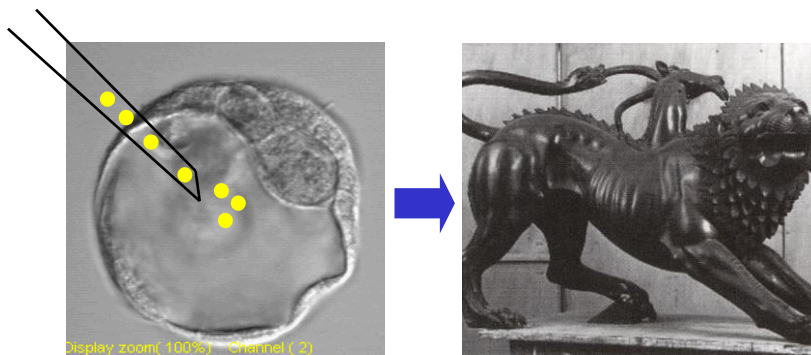
Dospělé mnohobuněčné organismy, včetně člověka, jsou tvořeny stovkami typů buněk specializovaných pro různé funkce. Fotoreceptory sítnice zachycují světelný signál a předávají jej k dalšímu zpracování buňkám mozku, buňky srdečního svalu se smršťují a uvolňují a zajišťují tak nasávání a vypuzovací funkci tohoto orgánu, spermie spolu s vajíčky umožňují vznik nových jedinců procesem oplození a podobně. Toto jsou jen čtyři příklady z nepřeberného množství buněčných typů fungujících v lidském těle; již z nich je však dobře zřejmé, že buňky specializované pro různé funkce se mezi sebou velmi zásadně liší. Tato strukturální a funkční různorodost mezi buňkami evokuje velmi závažnou otázku – kdy a jakými procesy vlastně vzniká. Jisté je, že na začátku vývoje organismu, v zárodku v jeho časném vývojovém stádiu, tato buněčná různorodost neexistuje. Naopak, iniciační vývojová stádia organismu jsou typická přítomností buněk, které jsou v zásadě všechny stejné. Jinými slovy, buňky časného zárodku jsou schopné dát postupným vývojem, procesem rozrůžňování či diferenciací, vznik jakémukoli specializovanému buněčnému typu dospělého organismu – tyto buňky embrya jsou takzvaně toti- či alespoň **pluripotentní**.

Nejen buňky časného embrya však mohou být pluripotentní. V roce 1954 byl v USA vytvořen kmen myši nazvaný 129, jehož



samci trpěli ve vysoké frekvenci výskytem nádorů varlat, takzvaných teratokarcinomů. Teratokarcinomy jsou nádory, které jsou tvořeny mnoha různými buněčnými typy (obrázek vlevo). Zajímavé je, že mezi těmito buňkami nádoru byly nalezeny také „naivní“ nediferencované buňky, které měly schopnost diferencovat se

do různých specializovaných buněčných typů, podobně jako buňky časného zárodku – byly tedy také pluripotentní. Tato vlastnost je nejlépe experimentálně dokumentována jejich schopností účastnit se normálního vývoje myši po jejich vpravení (injikování) do časného myšního zárodku. Takto vzniklý jedinec je potom chimérou (obrázek níže).



Na obrázku vlevo: myší embryo ve stádiu blastocysty, do jehož dutiny jsou mikroinjekčně vpravovány pluripotentní buňky teratokarcinomu (zobrazeny žlutě).

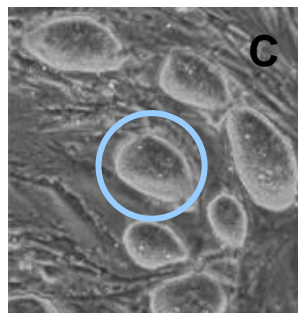
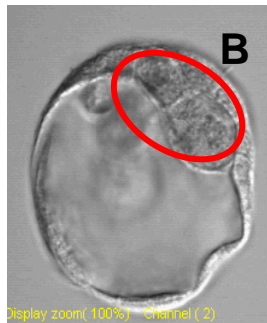
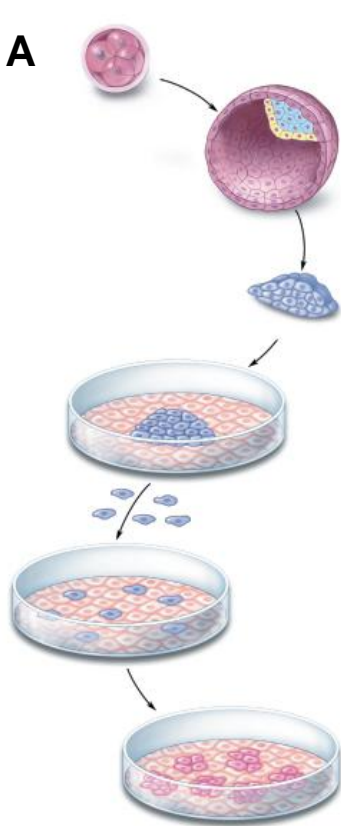
Na obrázku vpravo: chiméra symbolizovaná bájnou bytostí se lví hlavou a dračím ocasem.

Na pluripotentních buňkách teratokarcinomů je však kromě samotné pluripotence zajímavá ještě jedna vlastnost, která byla odhalena jejich dlouhodobou kultivací v *in vitro* podmínkách (v Petriho misce). Touto vlastností je schopnost udržovat si pluripotenci v podstatě neomezeně dlouho. Jinými slovy, opakovaným dělením buňky svoji pluripotenci neztrácí. Tato skutečnost je definována jako **schopnost sebeobnovy** – kdy každým dělením vzniknou dvě identické pluripotentní buňky.

Buňky teratokarcinomů jsou pluripotentní a sebeobnovující se, avšak jsou stále buňkami nádorovými, které nesou nějakou genetickou poruchu. Zásadní krok od nádorových pluripotentních

buněk k pluripotentním buňkám zcela normálním učinili až Gail Martinová s Martinem Evansem, kterým se v roce 1981 podařilo přimět buňky zdravého časného myšního embrya ve stádiu blastocysty žít a dělit se v podmínkách *in vitro*. Takto získané buňky (buněčné linie) byly pro svůj původ v myším embryu (v jeho části zvané embryoblast, ze které se vyvine celý jedinec kromě plodových obalů) a pro svoji schopnost sebeobnovy a pluripotenci nazvány **myší embryonální kmenové (EK) buňky**. Nutno zdůraznit, že embryonální KB nejsou již „skutečnými“ buňkami embrya, jsou sice buňkami derivovanými z embryoblastu myšního embrya, ale jsou současně produktem kultivace *in vitro*, jejíž unikátní podmínky zajišťují jejich sebeobnovu a pluripotenci. Tyto podmínky sestávají zejména z vrstvy podpůrných buněk (myších embryonálních fibroblastů) a růstového faktoru označovaného jako LIF (leukemický inhibiční faktor).

Obrázek na následující straně: A) Schéma ustavení linie myších EK buněk. Modře je znázorněn embryoblast, jeho vyjmutí a přenesení do Petriho misky na vrstvu podpůrných fibroblastů (znázorněny růžově). Kolonie myších EK buněk jsou ve finálním stavu znázorněny tmavě růžově. B) Mikroskopický obraz myší blastocysty s embryoblastem označeným červenou elipsou. C) Mikroskopický obraz myších EK buněk rostoucích na vrstvě podpůrných fibroblastů. V modrém kroužku je zvýrazněna jedna kolonie (skupina desítek až stovek) myších EK buněk. Obrázky B) a C) mají odlišná měřítka.



Myší EK buňky se díky svým vlastnostem, časově zcela neomezené propagovatelnosti v podmínkách *in vitro* a schopnosti diferencovat se jak *in vivo* tak také *in vitro* do různých buněčných typů dospělého organismu, staly nenahraditelným modelovým systémem pro studium plejády aspektů normálního vývoje mnohobuněčného organismu. Tento význam si dochovaly dodnes. Existence myších EK buněk v kombinaci s možností jejich genetické modifikace a schopnosti přispívat ke vzniku chimér (viz výše) umožnila tvorbu geneticky modifikovaných myší. Tyto jsou dodnes

jedním ze základních a nenahraditelných nástrojů ke studiu funkce savčích genů. Za vývoj technologie přípravy geneticky modifikovaných myši pomocí myších EK buněk a metody takzvané homologní rekombinace obdrželi v roce 2007 badatelé Martin Evans, Mario Capecchi a Oliver Smithies Nobelovu cenu za Fyziologii a Medicínu.



Sir Martin Evans



Mario R. Capecchi



Oliver Smithies

EK buňky ustavené z myši byly, přes rozsáhlé pokusy s mnoha jinými živočišnými druhy, po dlouhou dobu jedinými EK buňkami, které se podařilo ustavit. V roce 1998 však přišel zcela



zásadní průlom díky týmu badatelů, vedenému američanem Dr. Jamesem Thompsonem (obrázek vlevo). Ten, ve spolupráci s kolegy z Izraele dokázal poprvé v dějinách biologické vědy ustavit linie EK buněk ze zárodků (blastocyst) člověka (níže titul vědecké publikace popisující tento objev). Stojí za uvedení, že postup ustavení linie lidských EK buněk je principiálně shodný s postupem vyvinutým v roce 1981 pro ustavení linií EK buněk z embrya myši. Jediným skutečně zásadním rozdílem je růstový faktor, který lidské EK buňky v kultuře vyžadují. Tím je bazický fibroblastový růstový faktor (FGF2) namísto LIF, který, jak je uvedeno výše, vyžadují EK buňky myši.

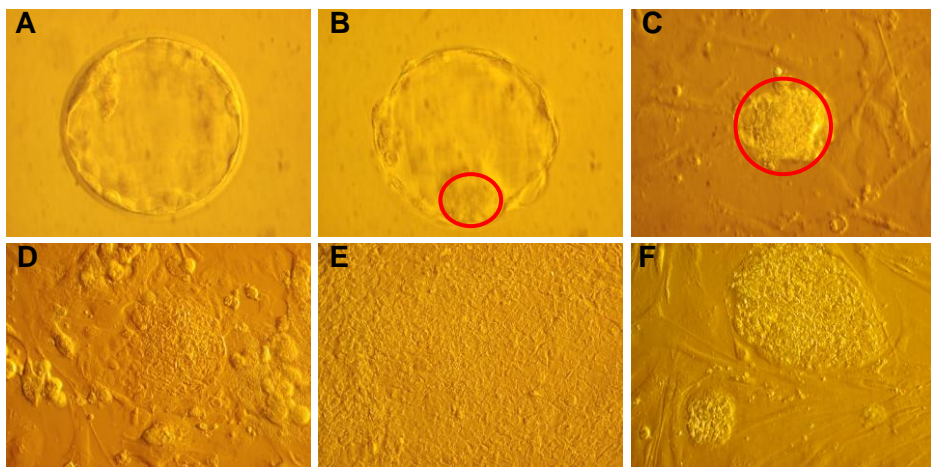
www.sciencemag.org SCIENCE VOL 282 6 NOVEMBER 1998

REPORTS

Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts

**James A. Thomson,* Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro,
Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall,
Jeffrey M. Jones**

Skutečnost, že svět získal první **linie lidských EK buněk** rozpoutala nezměrný zájem o studium tohoto buněčného typu. Důvodem byly samozřejmě znalosti o diferenciačním potenciálu KB buněk, získané léty práce s myšimi EK buňkami, slibující zejména užití lidských EK buněk v klinické medicíně v podobě různých druhů buněčné terapie. Mnoho laboratoří ve vyspělých zemích světa proto okamžitě napřelo své síly na získání nových linií lidských EK buněk a pustilo se s obrovským úsilím do studia jejich biologických vlastností. Stojí za zmínku, že ani Česká Republika nezůstala v tomto biomedicínském tažení opodál a díky práci badatelů Hampla a Dvořáka získala první linie lidských EK buněk na jaře roku 2003.



Obrázek ukazující jednotlivé kroky ustavení linie lidských EK buněk. A) Lidská blastocysta se *zona pellucida*. B) Lidská blastocysta po odstranění *zona pellucida*. Embryoblast označen červeně. C) Embryoblast (červeně) po převedení do kultury na vrstvu podpurných fibroblastů. D) Rozrůstající se buňky embryoblastu. E) Populace lidských EK buněk zabírající celé zorné pole. F) Dvě kolonie lidských EK buněk po pasáži.

Přestože kmenové buňky odvozené z buněk embrya daly hlavní impuls ke studiu kmenových buněk, nejsou jedinými existujícími kmenovými buňkami. Pluripotence, jedna z charakteristik kmenových buněk, je vlastností, kterou musí mít buňky časného embrya, aby mohly dát procesem postupného rozrůžňování (diferenciace) vznik všem specializovaným buněčným typům dospělého organismu. Většina specializovaných buněk dospělého organismu však kontinuálně podléhá postupnému opotřebení či dokonce rychlé ztrátě v případě zranění a tyto buňky musí mít možnost být nahrazovány. Zdrojem pro náhradu těchto specializovaných buněk jsou sebeobnovující se buňky skryté po celý život ve tkáních a orgánech, takzvané **tkáňové či orgánové kmenové buňky** (anglicky se jim říká adult stem cells, čili dospělé kmenové buňky). Tyto buňky jsou ve tkáních ve velmi malých počtech a většinou jsou „ukryty“ ve speciálních místech, takzvaných nikách, a jejich odhalení není tedy vůbec snadnou záležitostí. Svoje kmenové buňky ukryté v kostní dřeni mají buňky krve, kmenové buňky mají buňky svalů, kmenové buňky mají buňky mozku a tento



výčet kmenových buněk dospělého organismu nelze dnes uzavřít. Jedním z relativně dobře popsanych typů orgánových KB jsou například kmenové buňky zajišťující trvalou obnovu epitelu tenkého střeva, které jsou ukryty hluboko v kryptách střevní sliznice.

Histologický řez kryptou tenkého střeva. Hnědě jsou zbarvena jádra buněk, šipkami jsou označeny buňky na dně krypty považované za kmenové buňky sliznice střeva. (Převzato z Barker et al., Genes & Development, 2008, 22:1856-1864).

Čím nám mohou být kmenové buňky prospěšné?

Lidské kmenové buňky (KB) jsou terapeutickým příslibem budoucnosti díky své schopnosti dát vzniknout všem buněčným typům, které nacházíme v lidském organismu. Lze si proto představit situaci, kdy bude pacientům s degenerující, poškozenou či chybějící tkání možné nabídnout uměle vypěstovanou funkční náhradu z KB, či buňky které ji po implantaci znovu vytvoří. Při použití autologních (vlastních) KB pacienta je navíc vyloučeno riziko odvrhnutí štěpu a nutnost potlačení imunitního systému jako v případě dnes používaných allogenických (cizích) transplantátů dárce. Získáním indukovaných KB z pacientů je možné zkoumat i molekulární podstatu vrozených a degenerativních onemocnění.

Možnost terapie za použití KB je v současné době zkoumána na zvířecích modelech, u některých lidských onemocnění a poruch již probíhají klinické testy.

Možnosti terapie kmenovými buňkami

- regenerace tkáně poškozené při zranění nebo nemoci - kmenové buňky hrají roli stimulatoru růstu ostatních buněk
- znovuosídlení poškozené nebo odumřelé tkáně buňkami přímo vzniklými z kmenových buněk
- odstranění zbytkové populace nemocných buněk tkáně pomocí implantace zdravých kmenových buněk

Postup terapie založené na použití kmenových buněk

- získání dostatečného množství kmenových buněk
- zmnožení kmenových buněk v *in vitro* kultuře (v Petriho miskách) a jejich diferenciaci do požadovaného buněčného typu
- implantace správně diferencovaných zdravých buněk

Typy kmenových buněk využitelné v terapii

- tkáňové/orgánové kmenové buňky pacienta, nebo dárce
- embryonální kmenové buňky
- indukované pluripotentní kmenové buňky

Tkáňové KB existují v různých orgánech v tzv. nikách kmenových buněk. Jsou schopny se diferencovat do buněčných typů dané tkáně, ale možnost jejich diferenciaci do všech buněčných typů nebyly jednoznačně prokázány. Po většinu času se nedělí a zůstávají v klidovém stavu. V případě poškození orgánu dojde k aktivaci kmenové buňky okolními buňkami. Kmenová buňka se začne dělit a produkovat rychle se dělící progenitory, jejichž dalším dělením na více specializované buňky dojde k opravě poškozené tkáně. Izolace tkáňových KB je omezena z důvodu jejich malého počtu v tkáni. Výjimku tvoří mesenchymální a krvetvorné KB, které je možno izolovat z kostní dřeně nebo periferní krve ve větším množství.

Embryonální KB získané z časné blastocysty jsou dobře dostupné (kolem 400 linií), mohou být v *in vitro* kultuře propagovány a množeny neomezenou dobu, přičemž si stále udržují schopnost diferencovat do všech buněčných typů. Jejich nevýhodou je riziko imunitní reakce způsobené rozdílností genetického vybavení mezi dárce a příjemcem, genomová nestabilita způsobená dlouhodobou kultivací a eticky kontroverzní původ.

Indukované pluripotentní KB jsou buňky pocházející z diferencovaných buněčných typů, které byly "přeprogramovány" do pluripotentního stavu dočasným zapnutím několika transkripčních faktorů typických pro kmenové buňky. Indukované KB byly vytvořeny např. z dobře dostupných kožních fibroblastů. Vzhledem k tomu, že je v tomto případě léčený pacient zároveň dárce buněk (autologní transplantace), nehrozí riziko imunitní odpovědi.

Současné terapeutické aplikace kmenových buněk:

Tkáňové kmenové buňky:

Nejstarší a i v současnosti nejčastější formou izolace tkáňových KB je izolace krvetvorných KB a mesenchymálních KB z kostní dřene, periferní krve. Pozorování klonogenní kapacity buněk kostní dřene se datuje do šedesátých let minulého století, transplantace kostní dřene probíhají již 40 let.

Krvetvorné KB jsou schopny diferencovat se do buněk krevní řady a jejich transplantace je využívána k léčbě vrozených i získaných onemocnění krve. Transplantaci předchází úplné či částečné odstranění původních krvetvorných buněk, aby nedošlo k imunitní reakci.

Mesenchymální KB jsou schopné vytvořit všechny buňky mesenchymální linie jako např. buňky chrupavky, kosti, šlachy, kůže či tukové tkáně. Mesenchymální kmenové buňky vytvořené z kostní dřene mohou být po implantaci v příhodném nosiči (např. kolagenová struktura) použity k zacelení zlomenin, jejichž části k sobě nedoléhají. Uplatnění nacházejí i při léčbě nadměrně opotřebované chrupavky. Transplantovaná chrupavka dárce zbavená všech původních buněk je osídlena mesenchymálními kmenovými buňkami pacienta, které se po transplantaci přemění na chondrocyty a propojí transplantát s poškozenou chrupavkou.

Rovněž v případě regenerace srdečního svalu po infarktu myokardu bylo pozorováno výrazné zlepšení po injekci autologních mesenchymálních KB (dobře zpracováno v Strauer a kol., 2008, Cell Proliferation).

Embryonální kmenové buňky

Terapie založené na lidských embryonálních KB nebyly na rozdíl od mesenchymálních kmenových buněk v lidské medicíně dosud terapeuticky použity. Výzkum zaměřený na schopnost embryonálních KB a jejich diferencujících se derivátů obnovit porušené funkce nervové soustavy v zvířecích modelech ukázal překvapivé zjištění. Ačkoliv došlo k vyléčení poranění mozku po

implantanci embryonálních KB, jen malá část implantovaných KB se přeměnila na neurony, většinou tvořily podpůrné buňky (astrocyty a gliové buňky). Zda se dají výsledky ze zvířecích modelů přenést i do oblasti humánní medicíny se brzy dozvíme, neboť na počátku roku 2009 schválila FDA firmě Geron spuštění první fáze klinických testů, které využívají lidských embryonálních KB diferencovaných do oligodendrocytů u pacientů s porušenou míchou.

Indukované pluripotentní kmenové buňky

Vzhledem k novosti technologie indukovaných pluripotentních KB (myší indukované KB 2006, lidské indukované KB 2007) je jejich terapeutické využití otázkou budoucnosti. Indukované pluripotentní KB disponují obrovským terapeutickým potenciálem z důvodu možnosti tvorby pluripotentních KB z tkáně pacienta. Další významnou výhodou přístupu indukované pluripotence je eticky bezproblémová příprava indukovaných pluripotentních KB. Možnost získání indukovaných KB z buněk pacienta s vrozenou vadou a jejich diferenciací do postiženého buněčného typu (např. neuronů u Huntingtonovy chorei) otevírá možnost zkoumání molekulárních jevů v podmínkách *in vitro*, kterých není možno dosáhnout jiným způsobem.

Jak lze lidské embryonální kmenové buňky přimět k vytvoření funkčních buněk našeho těla?

Lidé na celém světě již dlouhá léta přemýšlejí o náhradách poškozené lidské tkáně či dokonce orgánu (například močového měchýře na obrázku) za tkáň zcela novou, zdravou a zejména funkční. Příslibem pro tyto aplikace byly (a stále ještě jsou) lidské embryonální kmenové buňky (KB). Jejich unikátní biologické vlastnosti a zejména diferenciací potenciál (schopnost vytvořit jakoukoliv buňku lidského těla) využívají vědci nejen při zkoumání procesů uplatňujících se ve vývoji lidského organismu, ale také pro již zmíněnou možnost užití v tzv. regenerativní medicíně. Prozatím jsou jejich praktické aplikace stále ještě omezené, některé světové laboratoře však již diferencované lidské embryonální KB aplikují nemocným pacientům v prvních klinických studiích.



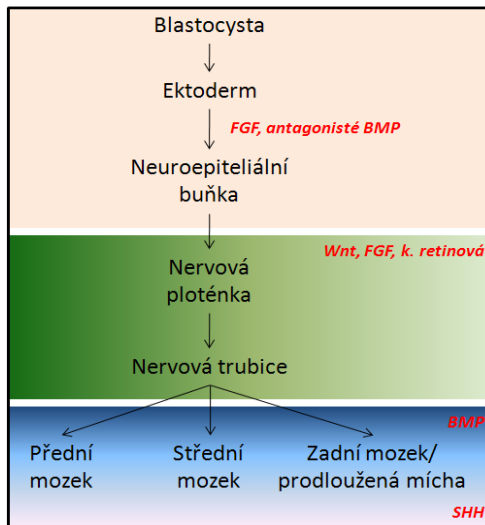
A jak je vlastně možné přimět nediferencovanou lidskou embryonální KB k tomu, aby vytvořila neuron, který se poškodil v míše pacienta připoutaného na invalidní vozík? Nebo v buňku chrupavky, která se časem opotřebuje v koleni a způsobuje pacientům bolesti? Odpověď je na první pohled velmi jednoduchá – zjistit, jak vývoj tohoto buněčného typu funguje přirozeně v těle živých organismů (*in vivo*) a napodobit tyto přirozené podmínky ve zkumavce (*in vitro*).

Z vývojové biologie víme, že tvorba nových specializovaných buněk je postupný proces, který vždy zahrnuje několik přechodových (prekurzorových) stadií, kdy je buňka tzv. multipotentní – může kupříkladu vytvořit kteroukoliv buňku nervového systému, ale již nemůže dát vznik buňkám chrupavky nebo jaterním buňkám.

Rovněž víme, že na specifikaci jednotlivých buněčných typů se podílí vždy dva typy molekul:

- 1) „rozpuštěné“, které jsou vylučovány jinými buňkami z okolí (jsou jimi tzv. **růstové faktory** a **morfogeny** (př. fibroblastový růstový faktor FGF, kyselina retinová apod. – viz zjednodušené schéma vývoje nervového systému) a
- 2) molekuly „nerozpuštěné“, nacházející se fixně v okolí buňky (těmi jsou **povrchové molekuly sousedících buněk** a také **složky mezibuněčné hmoty**).

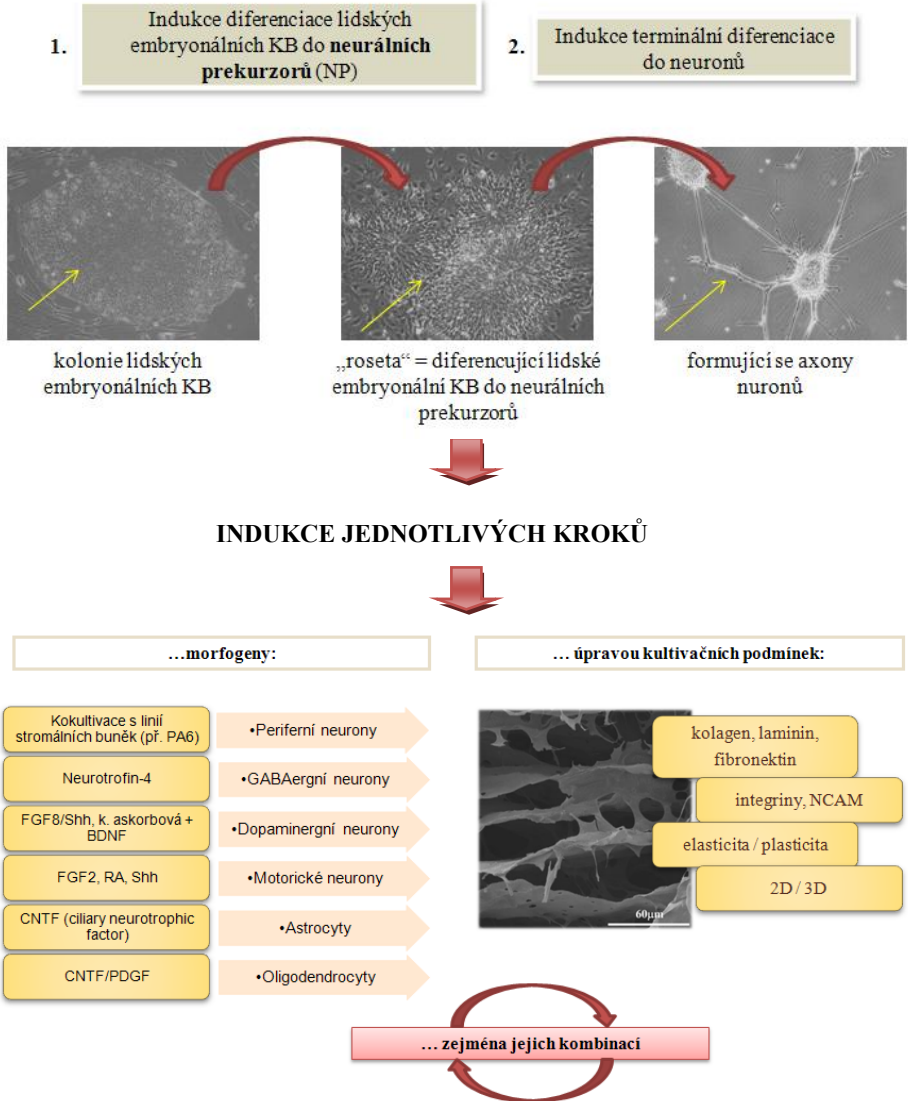
Jak ale všechny tyto faktory spolupracují, které konkrétně to jsou a v jakém pořadí na buňky působí, zatím pro většinu diferenciálních procesů zcela objasněno není.



Současné přístupy k diferenciaci lidských embryonálních KB do specializovaných buněčných typů se tedy pokouší kombinovat jednotlivé znalosti o vývoji *in vivo* a uvést je do *in vitro* systému v minimálně dvou krocích:

1. Indukce diferenciaci lidských embryonálních KB do prekurzorů daného buněčného typu ovlivněním růstovými faktory a/nebo povrchem kultivační misky

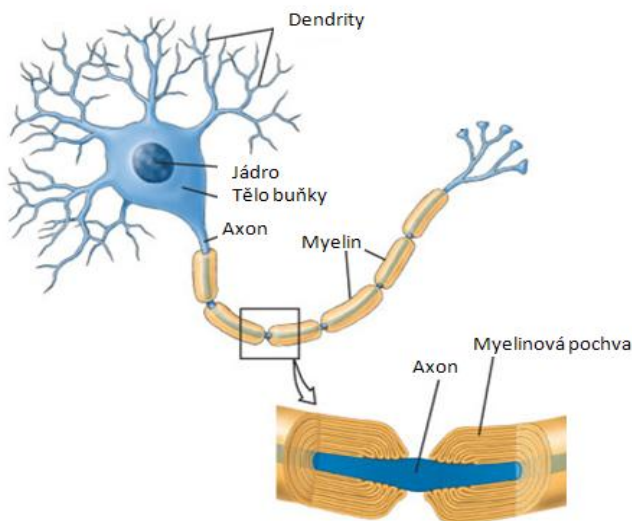
2. Indukci diferenciace prekurzorů do specifického terminálního buněčného stadia opět ovlivněním morfogeny, růstovými faktory a/nebo povrchem kultivačního prostředí



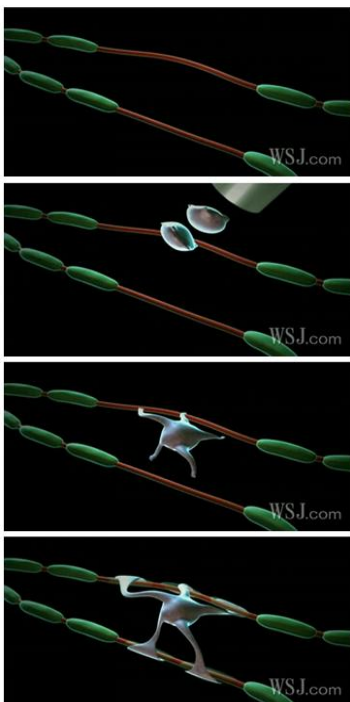
Výzkum neurodiferenciace u lidských embryonálních KB

Jednou z možných aplikací lidských embryonálních KB v regenerativní medicíně je jejich využití při opravě poškození nervového systému člověka. Potenciál léčby v této oblasti je poměrně široký, počínajíc nahrazením odumřelých neuronů při neurodegenerativním onemocnění (například Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba) až po nahrazení poškozených nervů po přerušení míchy (léčba doživotní paralýzy jedince). V této oblasti se již mnoho let experimentuje na laboratorních zvířatech a výsledky ve většině případů prokazují zlepšení stavu postižených zvířat po aplikaci embryonálních KB do místa poškozených neuronů nebo přerušené míchy.

První klinický výzkum na lidech byl započat jen před několika



měsíci v USA. Skupina vědců pod vedením Hanse Kiersteda vymyslela postup, jak efektivně diferencovat embryonální kmenové buňky do podpůrných buněk neuronů (glií), které produkují myelin. Myelin je potřebný pro vedení vzruchu podél axonů. Buňky, které o tzv. myelinovou pochvu přišli v důsledku poranění míšních nervů, již vzruchy nemohou vést a živočich tak zůstane paralyzován. Pokud

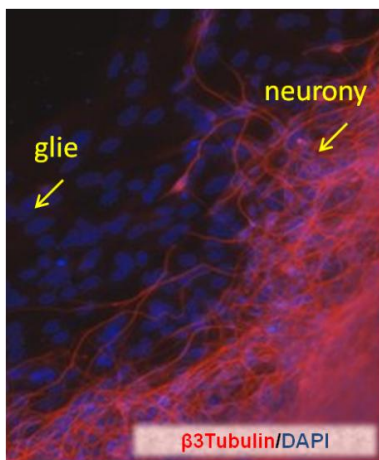


jsou gliové buňky (diferencované z myších embryonálních KB) podány myším do 10 dnů po poranění míšních nervů, vedení vzruchu se za čas obnoví a myši se tak mohou opět pohybovat.

Biotechnologická firma Geron (USA; www.wsj.com) se rozhodla tento postup aplikovat na lidský organizmus a v listopadu loňského roku (2009) jí bylo umožněno výzkum započít. Výsledky prozatím nejsou k dispozici, zůstává proto věřit, že léčba bude úspěšná.

Postupy, jakými je možno lidské embryonální KB diferencovat do neurálních prekursorů a dále do terminálně diferencovaných stádií jsou v různých laboratořích různé (a také více či méně úspěšné). Hlavním problémem však zůstává „čistota“

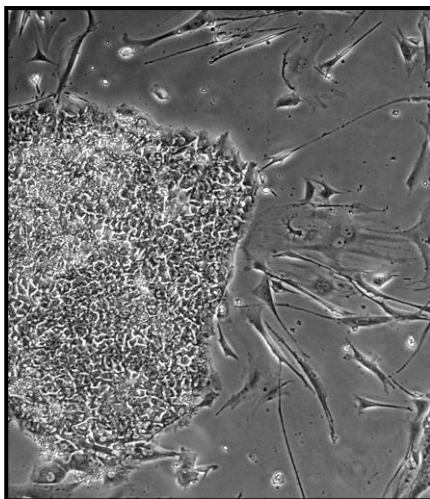
výsledné populace neuronů nebo glií. Pro případné klinické aplikace je nezbytné, aby výsledná populace buněk byla 100% homogenní (obsahovala jenom ten buněčný typ, který bude člověku injikován do těla). Jakákoliv nediferencovaná embryonální kmenová buňka by totiž mohla způsobit v lidském těle tvorbu nádoru.



Limitace využití lidských embryonálních KB v buněčné terapii

Potencionální využití lidských embryonálních KB v buněčné terapii je limitováno řadou faktorů. 1) lidské embryonální KB jsou kultivovány *in vitro* při nevhodných podmínkách; 2) během *in vitro* kultivace akumulují změny ve svém genomu; 3) při transplantaci hrozí odmítnutí štěpu imunitním systémem příjemce; 4) musí být zaručena diferencovanost opravdu všech buněk, které se do pacientova těla vpravují.

1) Lidské embryonální KB jsou kultivovány v přítomnosti komponent zvířecího původu, které mohou být zdrojem imunogenních látek (tj. látek, které v pacientově těle vyvolávají imunitní reakci), retrovirových či houbových infekcí, které mohou být nebezpečné pro pacienta. Mezi komponenty zvířecího původu patří především vrstva podpurných buněk (myší embryonální fibroblasty), na kterých lidské embryonální KB rostou. Tato vrstva podpurných



buněk produkuje do média růstové faktory a složky mimobuněčné hmoty, které jsou klíčové pro růst lidských embryonálních KB (Na obrázku kolonie lidských embryonálních KB. V jejím okolí jsou vidět individuální podpurné myší embryonální fibroblasty). Další důležitou složkou kultivačního systému lidských embryonálních KB, která však obsahuje komponenty zvířecího původu, je náhražka séra. Cílem výzkumu mnoha vědeckých skupin je proto vyvinout kultivační systémy, které neobsahují složky zvířecího původu.

2) Při použití lidských embryonálních KB v buněčné terapii je nutná jejich dlouhodobá *in vitro* kultivace. Během této dlouhodobé kultivace lidské embryonální KB akumulují změny v genomu.

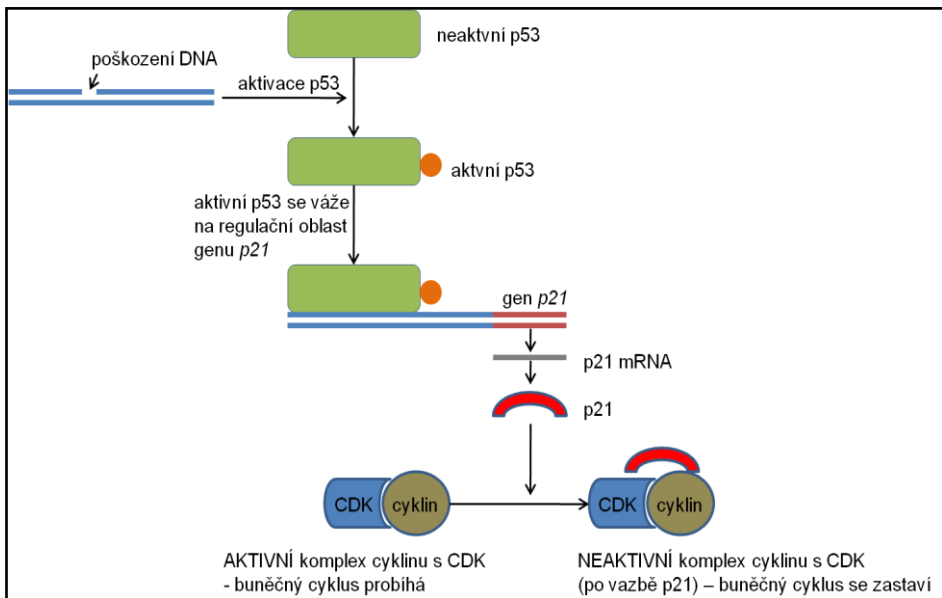
Podobné změny jsou běžně nacházeny v nádorových buňkách. Proto je použití těchto buněk nesoucích změny v genomu nebezpečné.

Zdrojem genetických abnormalit mohou být i) již výše zmíněné nevhodné kultivační podmínky, ii) absence klíčových komponent signálních drah monitorující poškození DNA (tzv. kontrolní body buněčného cyklu) nebo iii) poruchy funkce dělicího vřeténka (centrozomální abnormality).

Udržování stability genomu u eukaryotických buněk zajišťuje komplexní síť kontrolních bodů, které jsou strategicky umístěny v průběhu buněčného cyklu. Pokud je DNA poškozena nebo nejsou dokončeny klíčové procesy dané fáze buněčného cyklu, aktivují se tyto kontrolní body, což vede k pozastavení průchodu buněčným cyklem. Iniciační signál pro aktivaci kontrolního bodu je prezentován specifickou změnou struktury DNA nebo interakcí DNA-protein. Tento signál je pak přenášen na efektorové molekuly, které zastavují buněčný cyklus nebo indukují apoptózu (programovaná/řízená buněčná smrt).

Klíčovou molekulou signálních drah monitorujících poškození DNA je protein p53. Při poškození DNA nebo při indukci stresu se tento protein prostřednictvím dalších molekul modifikuje (fosforylace, acetylace, ubikvitinace). Na základě modifikací proteinu p53 pak buňka rozhoduje, zda zastaví svou progresi buněčným cyklem a opraví DNA. Pokud je však poškození DNA natolik robustní, že buňka nedokáže poškození opravit, aktivují se komponenty apoptických drah a buňka zahyne řízenou buněčnou smrtí.

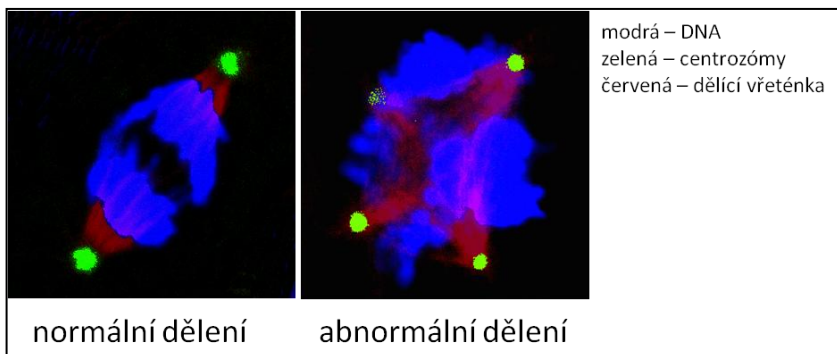
Zastavení buněčného cyklu při poškození DNA prostřednictvím proteinu p53 probíhá tak, že se p53 váže na DNA v místě regulační oblasti, kde se nachází gen pro protein p21. Vazbou proteinu p53 na DNA se spustí exprese proteinu p21, který svou vazbou inhibuje aktivitu molekul zodpovědných za progresi buněčným cyklem (CDK/cyklin - viz obrázek) a buněčný cyklus se zastavuje.



Studium reakce lidských embryonálních KB na poškození DNA ukázaly, že ačkoliv protein p53 je po poškození DNA správně modifikován, nedokáže však spustit expresi proteinu p21, který je zodpovědný za zastavení buněčného cyklu. Pokud buňka nedokáže po poškození DNA zastavit průchod buněčným cyklem, může se toto poškození přenést do další generace buněk. Neschopnost lidských embryonálních KB syntetizovat protein p21 po poškození DNA může přispívat k nestabilitě genomu.

Další příčinou genetické nestability lidských embryonálních KB mohou být poruchy funkce dělicího vřeténka. Významnou součástí dělicího vřeténka je centrozóm. Centrozóm je útvar v cytoplazmě buněk, který má za úkol organizovat dělicí vřeténka během buněčného dělení, a proto je zodpovědný za rovnoměrné rozdělení genetického materiálu. Za normálních okolností má buňka při dělení centrozómy dva - každý v opačném pólu buňky. Pokud má

buňka centrozómů více, dochází k nerovnoměrnému rozdělení genetického materiálu (aberantní dělení) a tedy ke genetické nestabilitě (viz obrázek).



Lidské embryonální KB mají zvýšené procento aberantních dělení v *in vitro* kultuře, které mohou být potenciální příčinou akumulace genetických změn v genomu.

3) Lidské somatické buňky nesou na svém povrchu soubor molekul MHC (major histocompatibility complex). Tyto molekuly jsou u každého člověka jedinečné. Molekuly MHC, které nejsou organismu vlastní, jsou rozpoznány imunitním systémem. Při transplantaci diferencovaných buněk z lidských embryonálních KB, může proto dojít k odmítnutí štěpu imunitním systémem pacienta.

4) Při transplantaci buněk diferencovaných z lidských embryonálních KB musí být zaručeno, že opravdu všechny buňky jsou diferencovány do požadované buněčné linie. Pokud by při transplantaci zůstala určitá část populace buněk nediferencována, mohlo by dojít ke tvorbě nádoru (teratomu - viz obrázek). Pro bezpečné použití lidských embryonálních KB v buněčné terapii musí být všechny tyto limity eliminovány.

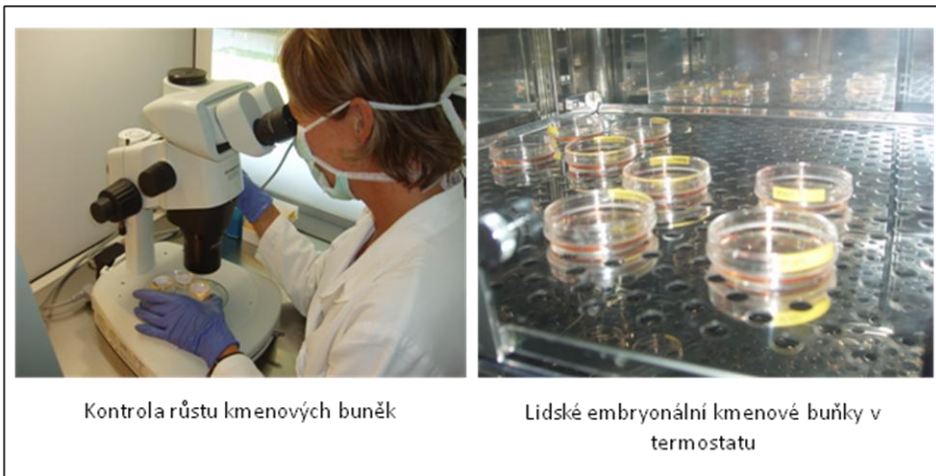


Zdroj: www.wikipedia.org

Praktická část

Kultivace lidských embryonálních kmenových buněk

Lidské embryonální kmenové buňky jsou buněčným typem, který vyžaduje omezitelnou manipulaci v průběhu kultivace.



Standardní kultivace lidských embryonálních kmenových buněk

Lidské embryonální KB jsou kultivovány v adherentních podmínkách spolu s mitoticky inaktivovanými myšími embryonálními fibroblasty, které poskytují lidským embryonálním KB nejen dosud ne dokonale poznané růstové faktory, ale také mechanickou oporu.

Pasážování probíhá v intervalu 4-8 dní metodou:

- a) použití enzymu, který rozruší adhezi kolonie na podkladu tak, že je možné je sfoukat pipetou a poté lehce rozsuspendovat na kousky;
- b) manuálního rozřezání kolonií pomocí skleněného škrábátka na čtverečky a jejich následným uvolnění od podkladu;

Kousky kolonií jsou sazeny na čerstvou vrstvu mitoticky inaktivovaných myších embryonálních fibroblastů. Po přisednutí dochází k odtlačování myších embryonálních fibroblastů a lidské embryonální KB tvoří malé a kompaktní kolonie, které dorůstají velikosti stovek až tisíce buněk (100-500 kolonií na Petriho misce o průměru 6cm).

V případě nasazení suspenze jednotlivých buněk nejsou lidské embryonální KB schopny tvořit kolonie a odumírají. Morfologicky špatné kolonie jsou odstraňovány škrabátkem. Ke kultivaci lidských embryonálních KB mohou být použity i jiné podpůrné buňky (např. lidské embryonální předkožkové fibroblasty).

V průběhu kultivace je použito médium s náhražkou séra a přísadkou růstového faktoru FGF2. Růstový faktor FGF2 je nutný k udržení pluripotence. Kultivace lidských EKB bez FGF2 ústí v ztrátu pluripotenčních markerů a morfologické změny spojené s diferenciací.

Kultivace lidských embryonálních kmenových buněk bez vrstvy podpůrných buněk

Kultivace v podmínkách bez podpůrných buněk vyžaduje ošetření kultivačního povrchu např. Matrigelem (BD Matrigel™) z důvodu zlepšení adheze a úpravu média k nahrazení vlivu podpůrných buněk. Při použití chemicky definovaného média mTeSR[®] 1 (Stem Cell Technologies), nebo standardního média, které bylo kondicionováno po dobu 24h myšími embryonálními fibroblasty, poté přefiltrováno a znovu obohaceno o L-glutamin a růstový faktor FGF2 tvoří lidské EKB kolonie morfologicky identické jako při standardní kultivaci.

Kultivace lidských embryonálních kmenových buněk v monovrstvě

Po adaptaci na podmínky bez vrstvy podpůrných buněk po dobu 1-2 pasáží jsou lidské EKB trypsinem rozvolněny na suspenzi jednotlivých buněk a sazeny na povrch ošetřený Matrigelem v hustotě $20-100 \times 10^4$ buněk/cm². Buňky monovrstvy dosahují 100% konfluence za 2-5 dní po pasáží.

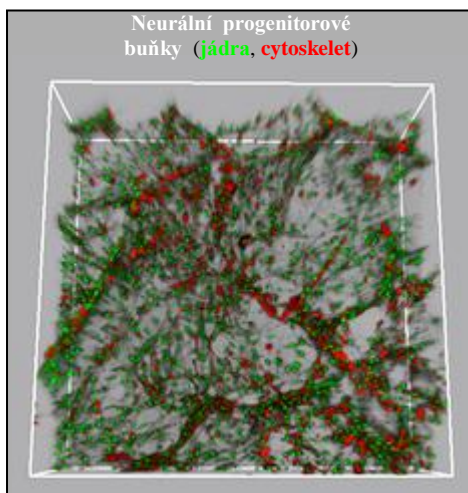
Složení média pro kultivaci lidských embryonálních KB		
složka	koncentrace	výrobce
DMEM/F12	80%	Invitrogen
KO serum replacement	15%	Invitrogen
L-glutamin	1%	Invitrogen
neesenciální aminokyseliny	1%	Invitrogen
2-Merkaptoethanol	0,1mM	Sigma
penicilin streptomycin	0,5%	Invitrogen
FGF2	10ng/mL	PeptoTech

Jak se tváří kmenové buňky v okulárech konfokálního mikroskopu?

Lidské tělo je tvořeno buňkami a tzv. mezibuněčnou hmotou (extracelulární matrix). Tato hmota se skládá ze strukturálních a signálních molekul (bílkoviny, polysacharidy), tedy poskytuje mechanickou stabilitu a podílí se na funkci jednotlivých tkání a orgánů. Při onemocněních či nehodách může vzniknout poškození některých tkání, jejichž léčbu či výměnu bude možné realizovat pomocí tkáňových náhrad (např. léčba jater, chrupavek, či poraněné míchy). Předpokládá se využití kombinace kmenových buněk a materiálů, které by mimikovali mezibuněčnou hmotu v živém organismu. Tyto biomateriály mohou být přírodního či syntetického původu a jsou obvykle ve formě třírozměrných struktur (nanovlákná, hydrogely, porézní konstrukty). Stávají se tak nosičem buněk a zároveň prostředím, které ovlivňuje jejich chování (migraci, diferenciaci, proliferaci) a které mohou buňky sami přetvářet.

Tyto struktury je však nemožné prohlédnout běžným světelným mikroskopem, s výhodou je tedy využíván konfokální mikroskop. Konfokální mikroskopie představuje metodu zobrazení, která výrazným způsobem rozšířila možnosti pozorování. Pomocí této techniky je možné detailně studovat morfologii či distribuci buněk v tkáňových kulturách či materiálech.

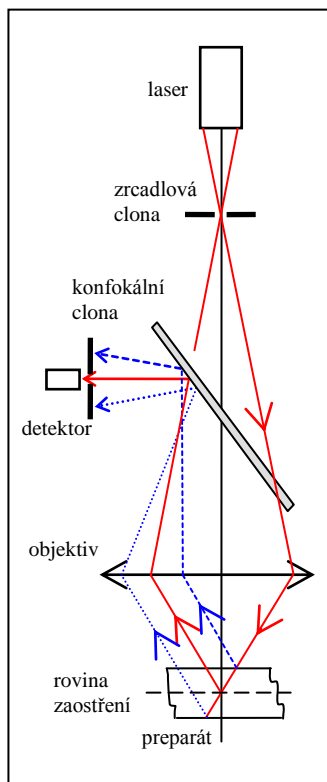
Klasická mikroskopie předpokládá pozorování preparátů o “nekonečně“ malé tloušťce, jelikož při prohlížení silných vzorků, je obraz nepřiznivě zkreslen obrazem z rovin, na které není zaostřeno.



Laserový skenovací konfokální mikroskop (LSCM) využívá laserového paprsku, který je zaostřen do zvolené roviny a vytváří tak optický řez preparátem. Struktury, které se nacházejí nad a pod rovinou fokuse se pak nepromítají do výsledného obrazu. Konfokální – znamená, že v optické cestě jsou vytvořena dvě „společná“ ohniska na dvou clonách. První (zrcadlovou) clonou je vytvářeno osvětlení preparátu co nejmenším bodem světla a druhá (konfokální) clona zajišťuje odstínění zvolené roviny od ostatních, nezaostřených. Tak je dosažen ostrý, vysoce kontrastní obraz s velkým rozlišením.



Jednotlivé bílkoviny a struktury buněk lze zvýraznit imunofluorescenčním značením pomocí fluorescenční značky (fluorochromu). Při propagaci a diferenciaci populace kmenových buněk je pak studována jejich odezva na kultivační podmínky. Příkladem jsou obrázky imunofluorescenčně značených proteinů v lidských embryonálních kmenových buňkách, které jsou vytvářeny během jejich dělení (obrázek dole uprostřed) či spontánní diferenciaci (viz obrázky vlevo a vpravo dole). Získaný obraz je zaznamenán počítačem a postupnou změnou zaostření je získávána série obrazů z několika rovin.

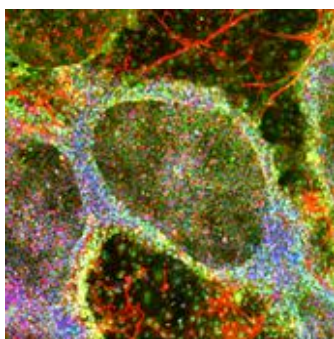


Hlavní a zásadní výhodou konfokální mikroskopie je pak možnost prostorové rekonstrukce pozorovaných preparátů, která se vytvoří z několika desítek až stovek optických řezů jedním objektem (viz 3D obrazová rekonstrukce expanze a distribuce neurálních progenitorových buněk v kolagenových strukturách).

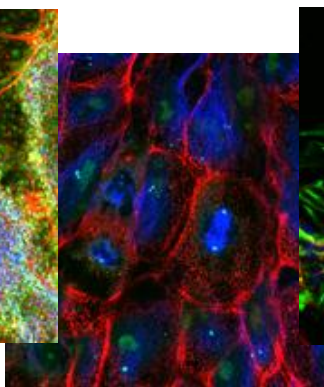
Praktický příklad: Snímání buněčné kultury konfokální mikroskopii

Pomůcky: fluorescenčně značené preparáty s kmenovými buňkami

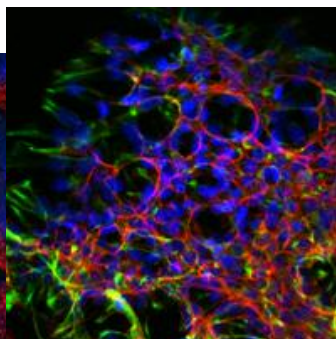
- 1) Umístění preparátu do stolku LSCM, zaostření , nastavení cílového místa
- 2) Volba vhodného zvětšení a tloušťky zaostřené roviny
- 3) Nastavení citlivosti detektorů pro každý fluorochrom
- 4) Stanovení spodní a horní roviny skenovaného objemu a počtu optických řezů
- 5) Spuštění skenování
- 6) Skládání nasnímaných obrazů, vytvoření prostorové rekonstrukce pozorovaných preparátů



Spontánní diferenciacie EKB



Mitóza EKB – mikrotubuly,
mikrofilamenta, centrozomy



Spontánní diferenciacie EKB
(detail)

Praktický příklad: Pozorování abnormálních mitóz v lidských embryonálních kmenových buňkách.

Přespočetné centrozomy - akcelerační genomické instability v kulturách lidských embryonálních kmenových buněk

Praktickému uplatnění lidských embryonálních kmenových buněk v regenerativní medicíně se staví do cesty skutečnost, že během *in vitro* kultivace tyto buňky hromadí „spontánní“ mutace, jejichž výsledkem může být nádorová transformace. Genetickou nestabilitu buněk řady maligních nádorů provází výskyt centrozomálních abnormalit. Centrozom představuje mikrotubuly organizující centrum živočišných buněk a vykazuje dominantní vliv na sestavování mitotického vřeténka. Před vstupem do mitózy dochází ke zdvojení centrozomu, což zaručuje striktní bipolaritu buněčného dělení. Numerické aberace centrozomu mají za následek nerovnoměrné rozdělení genetického materiálu do dceřiných buněk a mohou tak významně přispívat ke vzniku aneuploidie. Přespočtené centrozomy se frekventně vyskytují také u lidských embryonálních kmenových buněk kultivovaných *in vitro*. Jimi iniciovaná asymetrická mitotická dělení představují rizikový faktor zvyšující chromozomální nestabilitu kultury.

Cíl: Vizualizace multicentrosomálních mitóz (více než 2 centrozomy v buňce) pomocí fluorescenčního barvení chromatinu a imunodetekce centrozomálního proteinu pericentrinu a mikrotubulárního proteinu α -tubulinu.

Pomůcky a reagenty:

- Adherentní lidské embryonální kmenové buňky kultivované na miskách vhodných pro zobrazování ve vysokém rozlišení pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu.
- Reagenty pro fixaci – vychlazený 95%ní etanol s 1 % kyseliny octové; 90%ní, 70%ní, 50%ní etanol, destilovaná voda

- PBS fosfátový pufr (pH 7,4), detergenty Tween -20, Triton 100, bovinní sérový albumin (BSA).
- Protilátky: primární králičí protilátka proti pericentrinu, Alexa Fluor 488 konjugovaná sekundární protikráličí protilátka z kozího séra, červeným fluoroforem Dy547 primárně konjugovaná protilátka proti α -tubulinu
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) – interkalační fluorescenční barvivo.
- Montovací medium Mowiol 40-88.
- Fluorescenční mikroskop vybavený příslušným filtrem pro detekci fluorescence.

Postup:

Fixace kultivovaných buněk

1. Buňky fixujeme přímo na speciálních kultivačních miskách, před vlastní fixací rychle opláchneme PBS. Aplikujeme fixační činidlo, v případě etanolicke fixace jde o vychlazenou směs 95%ního etanolu a 1%ní kyseliny octové. Necháme fixovat 30 minut na ledu.
2. Poté buňky převedeme do vodného prostředí krátkými (10 minut) oplachy v 90%ním, 70%ním a 50%ním etanolu a následně rychlým oplachem ve vodě.
3. 3x promýt PBS, každý oplach nejméně 5 minut.

Blokování nespecifické vazby a permeabilizace

Fixované buňky inkubujeme nejprve 15 minut v 0,1%ním roztoku Triton 100, a pak 1 hodinu 0,05% roztoku Tween-20. Detergenty zajistí snadnější přístup protilátky k cílovým epitopům. Současná přítomnost 1%ního bovinního sérového albuminu (1% BSA) omezí nespecifickou vazbu protilátky.

Aplikace primární protilátky

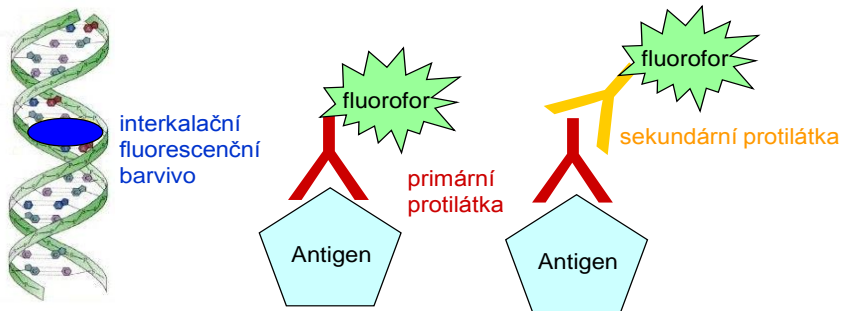
1. Aplikujeme primární protilátku v patřičném zředění. K nepřímé detekci centrozomu použijeme králičí

polyklonální protilátku proti centrozomálnímu proteinu pericentrinu. Inkubujeme přes noc při 4°C (v ledničce).

2. Následující den 3x promyjeme PBS, každý oplach nejméně 5 minut.

Aplikace sekundární protilátky

1. Kozí protilátku proti králičím proteinům konjugovanou se zeleným fluoroforem rozředíme v PBS, do nějž jsme přidali Tween 20 (0,05 %). Inkubujeme 1 hodinu v temnu na pokojové teplotě.
2. V případě současného značení mikrotubulů dělicího vřeténka přidáme k protikráličí sekundární protilátce primární protilátku proti α -tubulinu, která je přímo značená červenou fluorescenční značkou.
3. 3x promyjeme PBS s přidavkem Tweenu-20 (0,05 %), každý oplach nejméně 5 minut. Udržujeme v temnu!



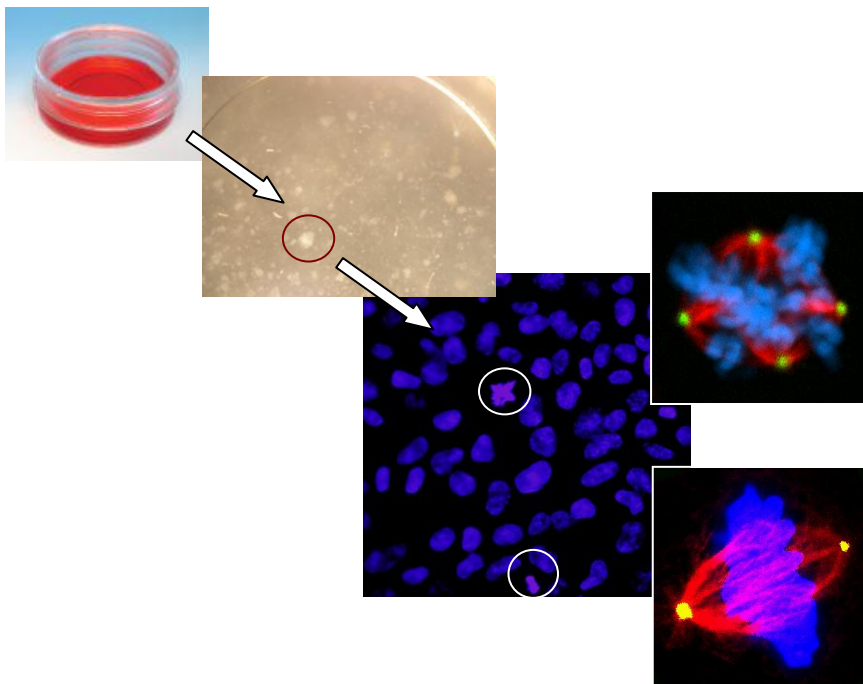
Barvení chromatinu

1. Pro zviditelnění jaderného materiálu (chromatinu) použijeme interkalační barvivo DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) vykazující modrou fluorescenci. Rozředíme zásobní roztok (1mg/ml) 1:1000 v PBS a inkubujeme 5 minut v temnu za pokojové teploty.

2. 5x promyjeme PBS (pH 7,4) s přídavkem Tweenu-20 (0,05 %), každý oplach 10 minut. Po celou dobu udržujeme v temnu!

Vyhodnocení

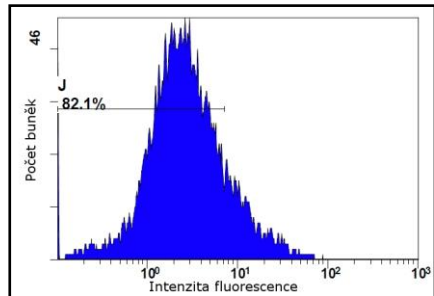
1. Fixované a obarvené buňky montujeme do Mowiolu 40-88 a přilepíme krycím sklíčkem. Necháme do druhého dne polymerovat.
2. Pozorujeme pod fluorescenčním mikroskopem. Kolonie vyhledáme při zvětšení 100x, jednotlivé mitózy pozorujeme při 1000x zvětšení.
3. Výsledky fotograficky zdokumentujeme.



Průtoková cytometrie

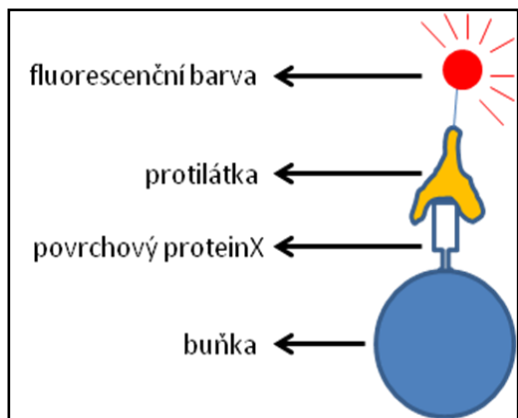
Průtoková cytometrie je metoda, která dokáže měřit vlastnosti proudících částic - v našem případě buněk.

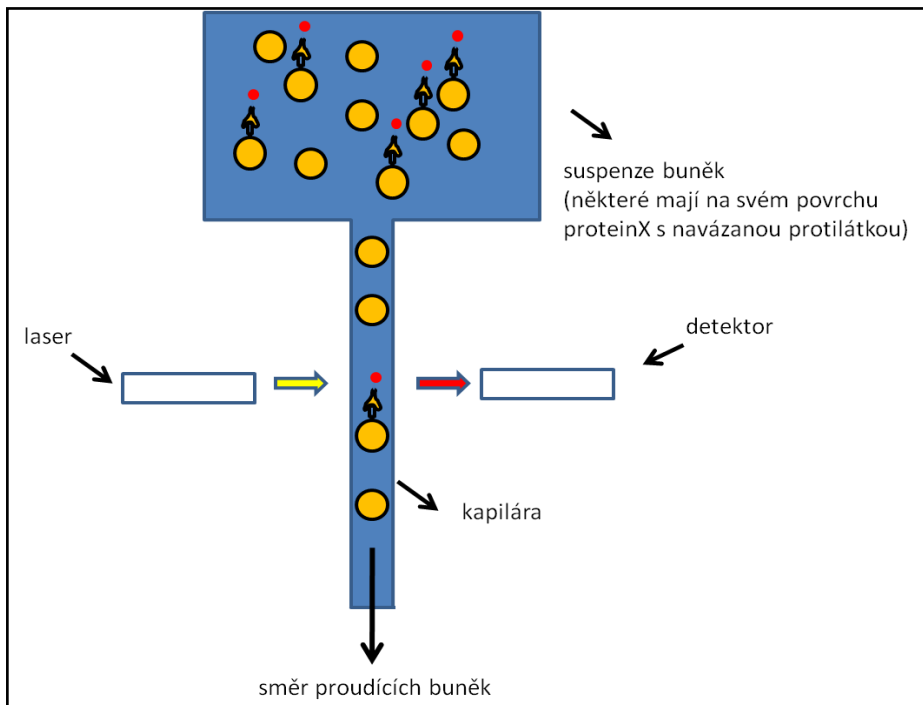
Principem je průchod jednotlivých buněk tenkou skleněnou kapilárou. Při průchodu buněk kapilárou je každá buňka ozářena laserem. Pokud je buňka označena fluorescenční barvou, tato fluorescenční barva dokáže emitovat světelný signál, který je měřen detektory. Na základě intenzity signálu (tedy množství fluorescenční barvy) můžeme určit vlastnosti buněk. Výstupem může být histogram, kde na ose X je intenzita fluorescence a na ose Y počet buněk.



Příklad: ve zkumavce je suspenze buněk, některé na svém povrchu nesou specifický protein (říkejme mu proteinX). My potřebujeme vědět, kolik procent buněk v suspenzi má na svém povrchu tento proteinX. Do buněčné suspenze přidáme protilátku s navázanou fluorescenční barvou. Tato značená protilátka se specificky váže na povrchový proteinX, tím se fluorescenčně označí všechny buňky, které mají na svém povrchu tento proteinX. Následně suspenzi buněk změříme na průtokovém cytometru. Jak

jednotlivé buňky procházejí kapilárou, jsou ozářeny laserem. Pokud má buňka na svém povrchu proteinX a na něm navázanou protilátku, dojde k emitaci světla, které je měřeno detektorem. Takto můžeme stanovit procento buněk v populaci nesoucích na svém povrchu proteinX a tím charakterizovat celou buněčnou populaci.





Stanovení exprese povrchových markerů lidských embryonálních KB metodou průtokové cytometrie

Lidské embryonální KB mají na svém povrchu molekuly (markery), které jsou charakteristické jen pro pluripotentní buňky. Ztráta těchto povrchových markerů může znamenat diferenciaci pluripotentních buněk. Stanovení přítomnosti jednotlivých molekul na povrchu buněk může napovědět, co se právě odehrává v populaci buněk.

Zjednodušený postup:

- 1) suspenzi lidských embryonálních KB v promývacím pufru naředíme na koncentraci $5 \times 10^6/\text{ml}$

- 2) k 100 μ l buněčné suspenze přidáme 100 μ l primární protilátky v ředění 1:10 a inkubujeme na ledu po dobu 30 minut
- 3) 2x propláchneme buňky promývacím pufrem (po každém promytí stočit 800 ot./min po dobu 5 min)
- 4) k sedimentu přidat 100 μ l sekundární protilátky (konjugována s FITC - zelená fluorescenční barva) v ředění 1:100 a inkubovat 30 minut na ledu
- 5) 2x propláchneme buňky promývacím pufrem (po každém promytí stočit 800 ot./min po dobu 5 min)
- 6) přidat 200 μ l propidiumiodidu v koncentraci 10 μ g/ml (propidiumiodid slouží k obarvení mrtvých buněk - mrtvé a tudíž propidiumiodidem obarvené buňky do experimentu nebudeme zahrnovat)
- 7) měřit na průtokovém cytometru

Způsoby poznání biologie buněk na úrovni exprese jejich genu



↓ transkripce



↓ translace



Centrální dogma molekulární biologie (Crick, 1957) říká, že buněčná DNA je kromě replikace sebe sama schopna tzv. genové exprese, na jejímž konci je vytvoření funkčního proteinu. Termín genová exprese („vyjádření“) tedy jednoduše říká, které geny jsou v buňkách „aktivní“ – které jsou přepisovány do mRNA a tvoří pak následně proteiny. Exprese genů probíhá v každém živém organismu a zahrnuje dva hlavní děje: transkripci a translaci. Transkripce je přepis genetické informace z molekuly DNA do RNA, přičemž DNA slouží jako matrice pro syntézu RNA. Translace je pak překlad genetické informace z RNA do sekvence proteinu. Metody zaměřující se na analýzu genové exprese na úrovni RNA se zabývají zejména studiem transkripce DNA do mRNA a následnou analýzou jejího množství.

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Podstatou polymerázové řetězové reakce (PCR) je cyklicky probíhající enzymatická syntéza nových řetězců DNA za pomoci enzymu. PCR byla objevena v roce 1985 Kary B. Mullisem, který za ni v roce 1993 dostal Nobelovu cenu. Od roku 1985 vzniklo mnoho desítek modifikací PCR, jednu z nich představuje PCR v reálném čase (Real-time PCR nebo také kvantitativní PCR). Principem této metody je detekce fluorescence, která je přímo úměrná počtu cDNA (tedy počtu mRNA) molekul v reakci. To znamená, že čím více mRNA buňka exprimuje (tvoří), tím více fluorescence je vyzářeno. Tuto fluorescenci pak možno přesně kvantifikovat. Nedílnou součástí PCR v reálném čase je přístroj (termocycler), který je schopen fluorescenci v průběhu celé reakce

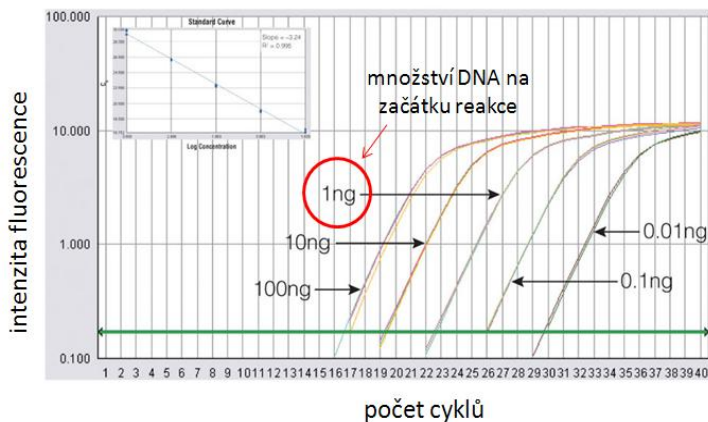
odečítat a zaznamenávat. Je tedy možné zjistit, jak se liší genová exprese např. u buněk před a po indukci diference, nebo u pacientů před a po léčbě.

Postup při přípravě vzorku:

- 1) izolace RNA z buněk
- 2) přepis mRNA do „complementary“DNA – cDNA
- 3) příprava reakční směsi pro PCR v reálném čase
- 4) průběh PCR v thermocycler-u
- 5) analýza výsledků



Výstup z PCR v reálném čase:



DNA Microarrays

Další metodou, kterou lze využít k analýze (nejen) genové exprese patří DNA čipy (neboli microarrays). Představují „vysokokapacitní“ vědecký nástroj fungující na principu **komplementarity nukleových kyselin**. Každá nukleová kyselina (označena specifickou barvičkou) je schopna párovat se s vysokou pravděpodobností jen určitou (komplementární) sekvencí



dalších nukleotidů. Jednotlivé komplementární sekvence ke každé mRNA jsou na čipu umístěny těsně u sebe – na tzv. spotu. Proto tam, kde se na čipu bude nacházet komplementární sekvence k dané mRNA, bude toto místo fluorescenčně svítit určitou barvou.

Tam, kde se komplementární sekvence k mRNA nenachází, zůstane místo prázdné (černé). Platí také, že čím více mRNA v buňce je, tím víc se jí na spot naváže a tím intenzivnější bude svit konkrétní barvičky.

Jako příklad uvažujme gen, který je zodpovědný za proces tvorby neuronu (př. transkripční faktor *Pax6*). V nediferencovaných lidských KB se *Pax6* bude exprimovat málo (buňky ho nepotřebují, proto neprobíhá jeho transkripce), naproti tomu v diferencovaných neuronech se *Pax6* bude exprimovat hodně (neurony ho pro svou funkci nevyhnutně potřebují). Když tedy specificky označíme RNA izolovanou z nediferencovaných KB zeleně a RNA izolovanou z neuronů červeně, místo na čipu, které je specifické pro *Pax6* bude svítit červeně, neboť se tady s větší pravděpodobností navázalo více mRNA značené červeně – tj. mRNA z neuronů. Naproti místa, které budou na čipu svítit zeleně, reprezentují geny potřebné pro udržení nediferencovaného stavu lidských embryonálních KB (př. Oct4, Nanog, Sox2 a jiné).

Postup:

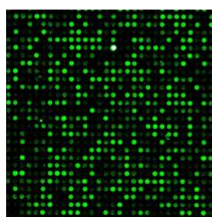
1. Izolace RNA
2. Přepis do cDNA a barvení

RNA z
nediferencovaných
lidských
embryonálních KB
– barveno zeleně

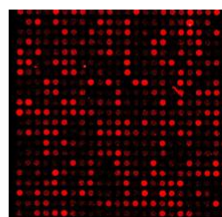


RNA z neurálních
prekurzorů
– barveno červeně

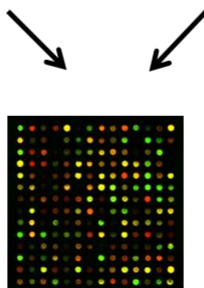
3. Smíchání vzorků v poměru 1:1
4. Nanesení (hybridizace) na čip
5. Skenování čipu



Skenování zeleně
svítících spotů

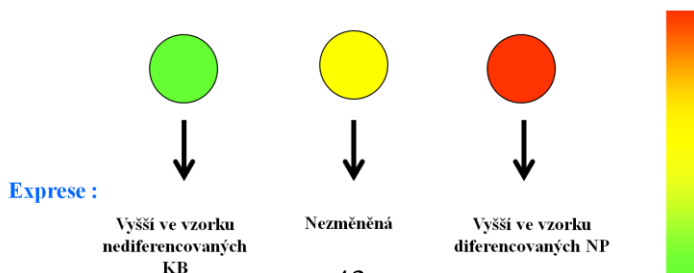


Skenování červeně
svítících spotů



Fúze obrazů

Analýza obrazu:



OBSAH

<u>KMENOVÉ BUŇKY: CO JSOU, KDE JSOU A NA CO JSOU.</u>	5
<u>ČÍM NÁM MOHOU BÝT KMENOVÉ BUŇKY PROSPĚŠNÉ?</u>	13
MOŽNOSTI TERAPIE KMENOVÝMI BUŇKAMI	13
POSTUP TERAPIE ZALOŽENÉ NA POUŽITÍ KMENOVÝCH BUNĚK	13
TYPY KMENOVÝCH BUNĚK VYUŽITELNÉ V TERAPII	14
SOUČASNÉ TERAPEUTICKÉ APLIKACE KMENOVÝCH BUNĚK:	15
<u>JAK LZE LIDSKÉ EMBRYONÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY PŘIMĚT K VYTVOŘENÍ FUNKČNÍCH BUNĚK NAŠEHO TĚLA?</u>	17
VÝZKUM NEURODIFERENCIACE U LIDSKÝCH EMBRYONÁLNÍCH KB	20
<u>LIMITACE VYUŽITÍ LIDSKÝCH EMBRYONÁLNÍCH KB V BUNĚČNÉ TERAPII</u>	22
<u>PRAKTICKÁ ČÁST</u>	26
<u>KULTIVACE LIDSKÝCH EMBRYONÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK</u>	27
STANDARDNÍ KULTIVACE LIDSKÝCH EMBRYONÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK	27
KULTIVACE LIDSKÝCH EMBRYONÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK BEZ VRSTVY PODPŮRNÝCH BUNĚK	28
KULTIVACE LIDSKÝCH EMBRYONÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK V MONOVRSTVĚ	29
<u>JAK SE TVÁŘÍ KMENOVÉ BUŇKY V OKULÁRECH KONFOKÁLNÍHO MIKROSKOPU?</u>	30
PRAKTICKÝ PŘÍKLAD: SNÍMÁNÍ BUNĚČNÉ KULTURY KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIÍ	32

PRAKTICKÝ PŘÍKLAD: POZOROVÁNÍ ABNORMÁLNÍCH MITÓZ V LIDSKÝCH EMBRYONÁLNÍCH KMENOVÝCH BUŇKÁCH.	33
<u>PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE</u>	<u>37</u>
STANOVENÍ EXPRESE POVRCHOVÝCH MARKERŮ LIDSKÝCH EMBRYONÁLNÍCH KB METODOU PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE	38
<u>ZPŮSOBY POZNÁNÍ BIOLOGIE BUNĚK NA ÚROVNI EXPRESE JEJICH GENU</u>	<u>40</u>
POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE V REÁLNÉM ČASE	40
DNA MICROARRAYS	42

University of Sheffield **Peter Andrews**
 Stem Cell Sciences UK Ltd **Tim Allsopp**
 University of Basel **Yves Barde**
 Hebrew University of Jerusalem **Nissim Benvenisty**
 University of Turku **Riitta Lahesmaa**
 University of Bonn **Oliver Brüstle**
 University of Milan **Elena Cattaneo**
 University of Oxford **Tariq Enver**
 Spanish National Cancer Research Centre **Manel Esteller**
 Axordia Ltd **Jim Walsh**
 Masaryk University Brno **Petr Dvořák / Aleš Hampl**
 Lund University **Göran Hermerén**
 Karolinska Institute Stockholm **Outi Hovatta**
 Netherlands Cancer Institute **Maarten van Lohuizen**
 University of Helsinki **Timo Otonkoski / Timo Tuuri**
 Stem Cell Technologies Ltd Jerusalem **Danny Kitsberg**
 University of Edinburgh **Andrew Smith**
 University of Technology Dresden **Francis Stewart / Konstantinos Anastasiadis**
 University of Cambridge **Austin Smith**
 University of London **Meng Li**



“Embryonic stem cells know how to make every single cell type of the body organism. All secrets are there, we just have to discover them.”

Professor Elena Cattaneo (Principal Investigator at the University of Milan)

Coordinator:

Professor Peter W. Andrews
 University of Sheffield, England

Deputy-Coordinator:

Professor Austin Smith
 University of Cambridge, England

Project Office

C227 Alfred Denny Building
 Western Bank
 Sheffield, S10 2TN
 UK
 Fax: +44 871 263 6949

info@estools.eu
www.estools.eu

Andrew Smith
 ESTOOLS Project Manager
 Tel: +44 114 222 1083
asmith@estools.eu

Sébastien Duprat
 ESTOOLS Training Manager
 Tel: +44 114 222 6095
sduprat@estools.eu

Michelle Baxter
 ESTOOLS Administration Officer
 Tel: +44 114 222 2313
mbaxter@estools.eu

Advances with Human Embryonic Stem Cells

estools