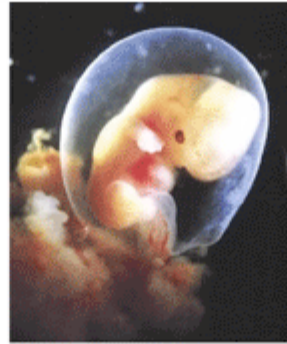
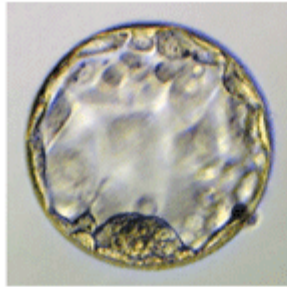


# Indukovaná pluripotence

Petr Vodička

Liběchov  
16/11/2016



Zygota  
Totipotentní

Blastocysta

Embryo, 6 týdnů

Dítě

Dospělý

Embryonální zárodečné  
buňky (EG)  
(primordiální zárodečné buňky)  
Pluripotentní

Pupečnickové  
kmenové buňky  
Pluri- nebo  
Multipotentní

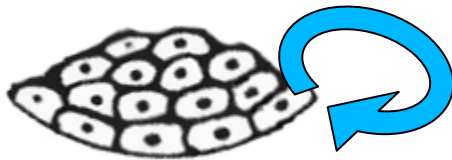
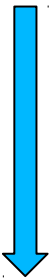
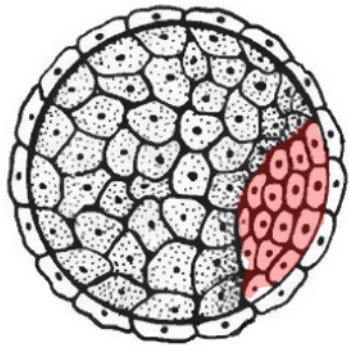
Buňky embryonálních  
karcinomů (EC)  
Pluripotentní

Embryonální kmenové  
buňky (ES)  
Pluripotentní

Fétální tkáňově specifické  
kmenové buňky  
Pluri- nebo  
Multipotentní

Dospělé tkáňově specifické  
kmenové buňky  
Pluri- nebo  
Multipotentní

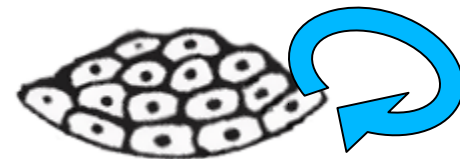
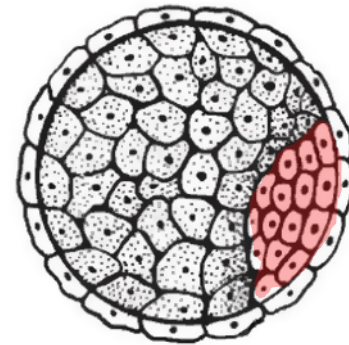
# Myší ES



LIF + FBS



# Lidské ES



bFGF + SR

Feeder = vrstva podpůrných buněk  
Myší embryonální fibroblasty, SNL, STO

Feeder

# Myší ES

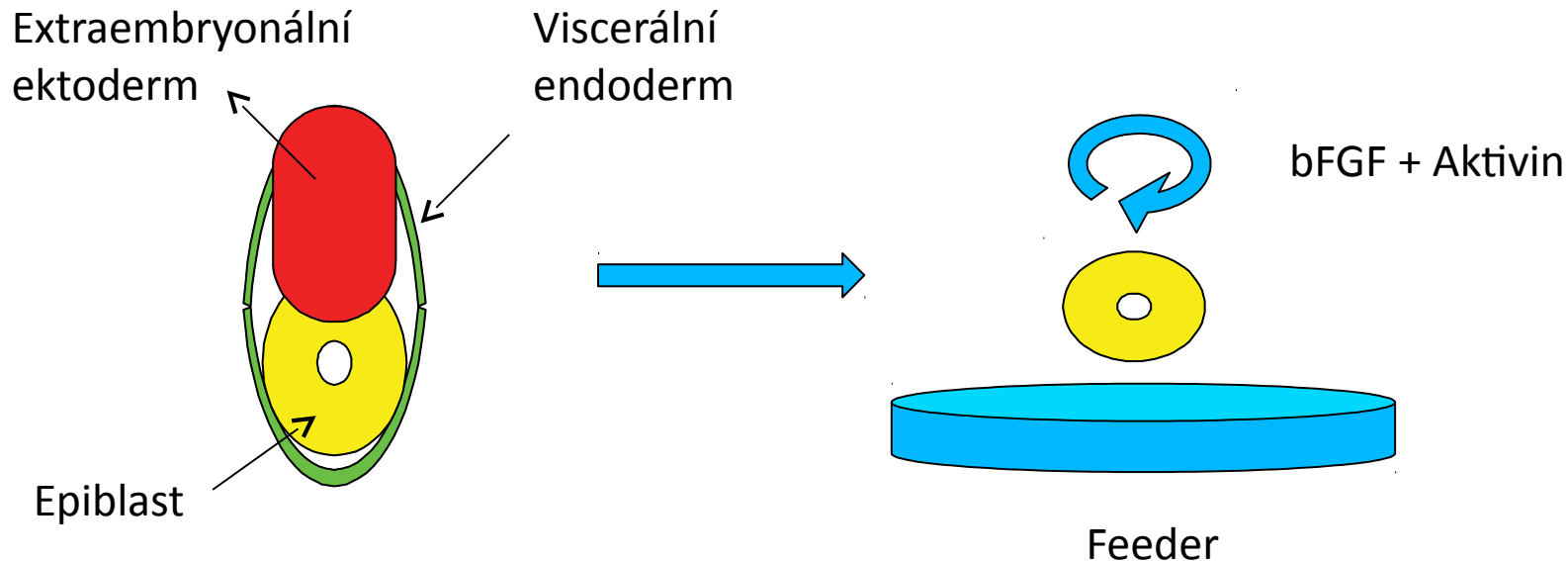
- Embryonální diapauza
  - Odložená implantace embrya do děložní sliznice
  - Vývoj embrya je zastaven ve stádiu blastocysty dokud nedojde k implantaci
  - Tento stav je udržován (u myši) LIF-STAT3 signální dráhou
- ekvivalent buněk ICM z blastocysty v dormantním stavu během diapauzy
  - LIF + BMP4

# Lidské ES

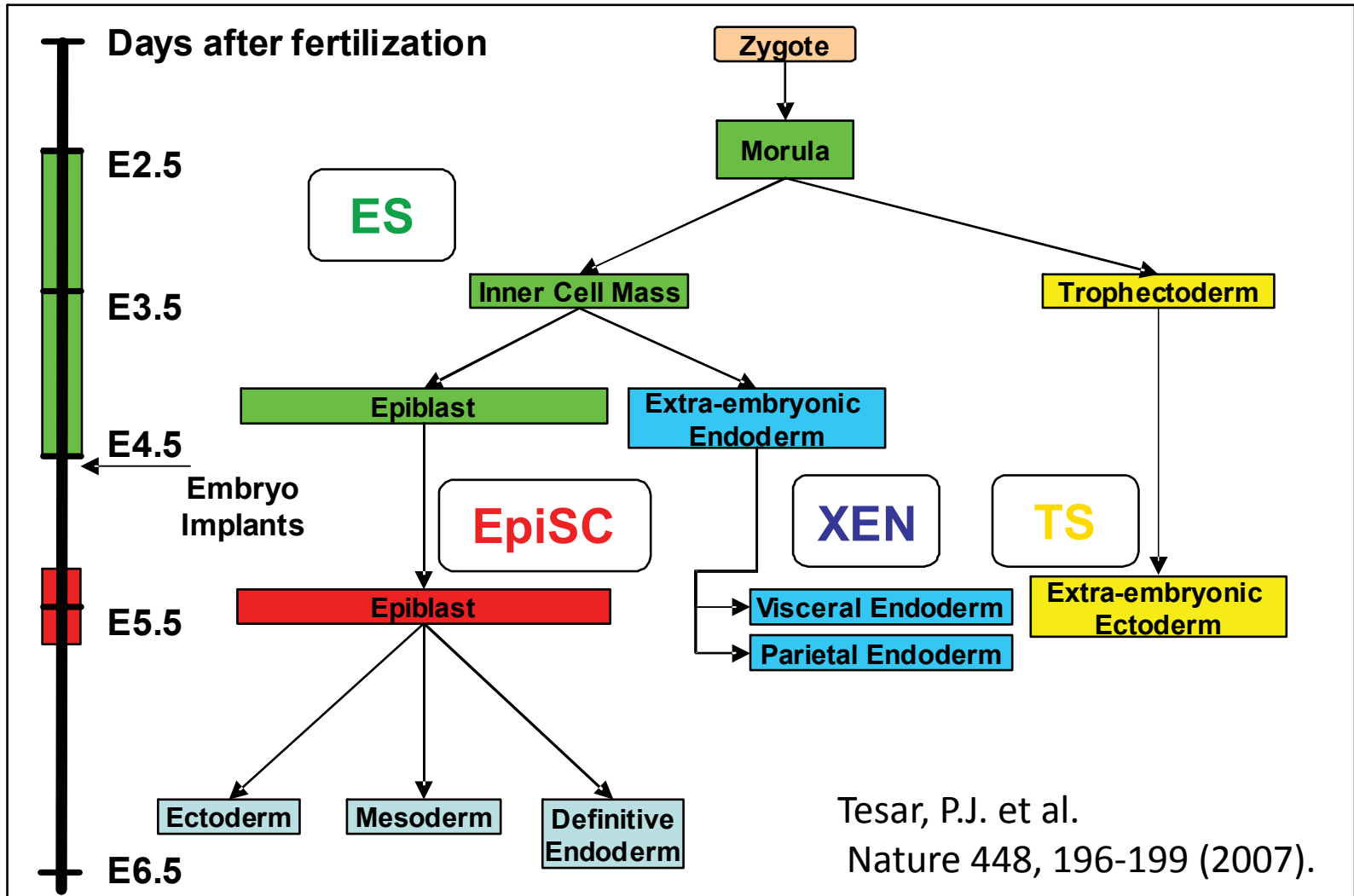
- Také odvozeny z ICM blastocysty
  - BMP signalizace indukuje diferenciaci v trofektoderm, naopak **Noggin** podporuje sebeobnovu blokováním BMP signalizace z média
  - **bFGF** signalizace a SR místo FBS pro omezení diferenciaci
  - **Aktin/TGF- $\beta$ 1** – SMAD2/3 – důležité pro udržení sebeobnovy a pluripotence

# EpiSC

- Buňky pozdního epiblastu z postimplantačního myšního embrya je možno kultivovat jako pluripotentní buňky v podmínkách obdobných lidským ES buňkám v Aktivinu a bFGF

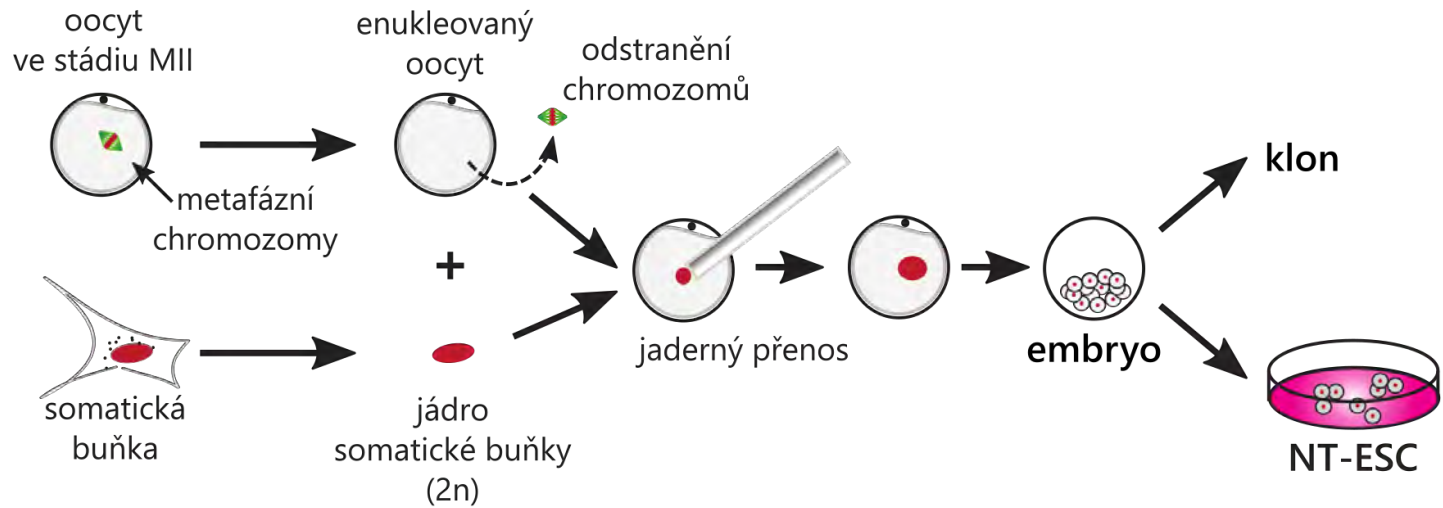


# Pluripotentní buňky z myšího embrya

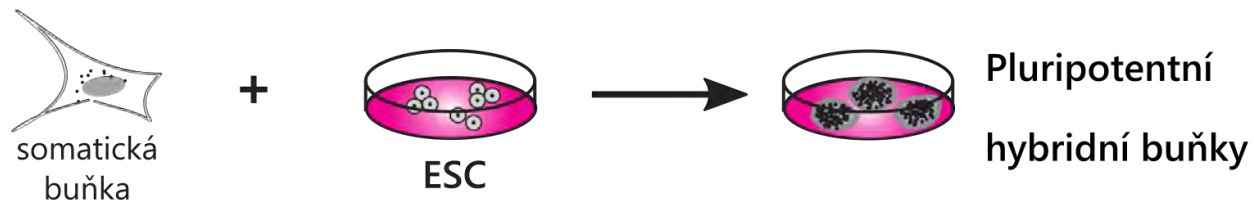


# Metody reprogramace buněk

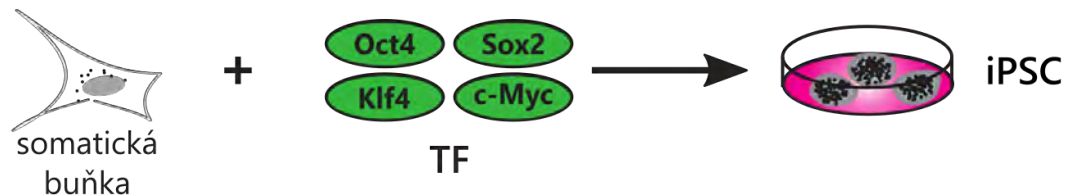
## Jaderný přenos



## Buněčná fúze



## Indukovaná pluripotence



# iPS buňky

## Koncept indukované pluripotence

- 2006 Shinya Yamanaca a Masayo Takahashi:
- Exogenní exprese pouze 4 transkripčních faktorů

Oct3/4 Sox2 Klf4 c-Myc

dostačuje k reprogramování somatických buněk do pluripotentního stavu podobného ES-buňkám

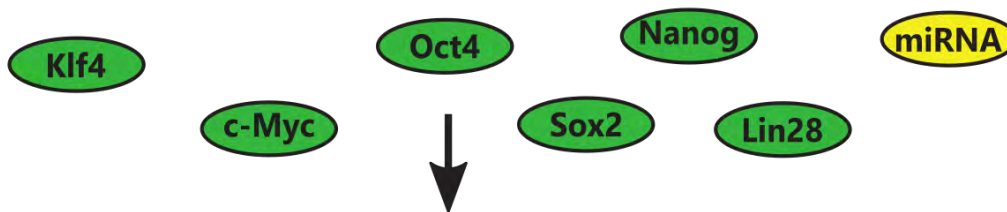
( alternativní kombinace: Oct3/4 Sox2 Lin28 Nanog)

=> Otevírá možnost vytvořit všechny potřebné druhy buněk pro buněčné terapie

Odpadá nutnost zničit pro izolaci buněk embryo či fetus  
Autologní buňky imunologicky kompatibilní s příjemcem



# REPROGRAMAČNÍ FAKTORY



## METODY DORUČENÍ

### INTEGRUJÍCÍ

### NEINTEGRUJÍCÍ

#### VIROVÉ INTEGRUJÍCÍ

#### ODSTRANITELNÉ VEKTORY

#### VIROVÉ NEINTEGRUJÍCÍ

#### NEINTEGRUJÍCÍ VEKTORY

#### BEZ POUŽITÍ VEKTORU

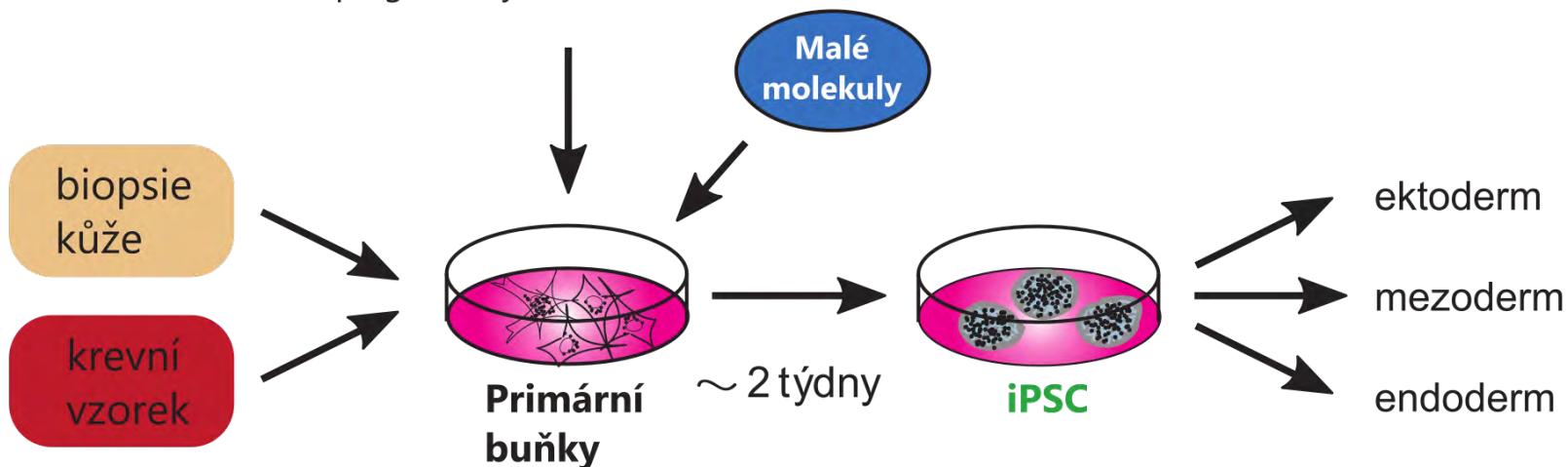
Retrovirus  
Lentivirus

CRE/loxP systém  
Transpozony:  
PiggyBac  
Sleeping Beauty

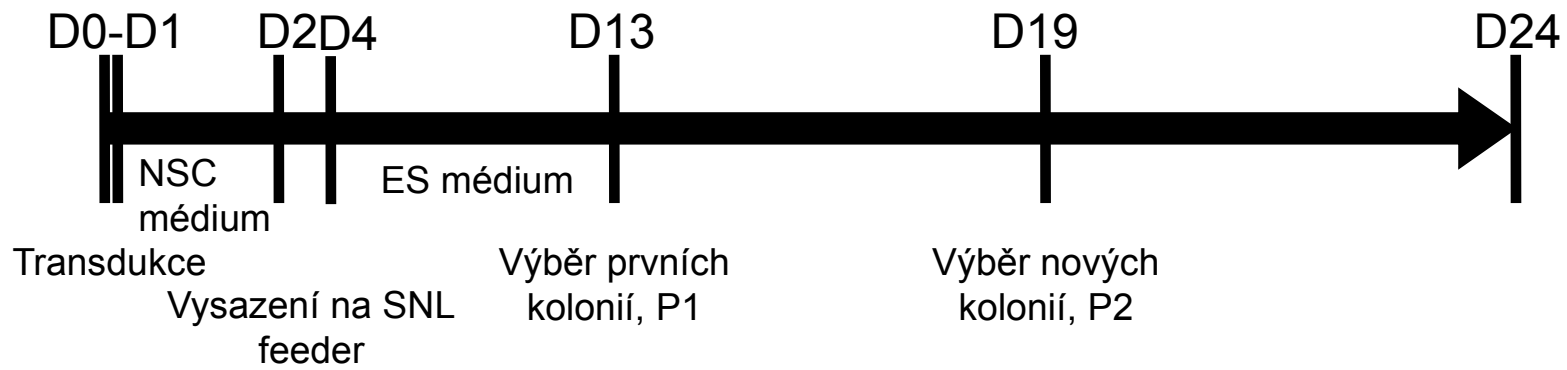
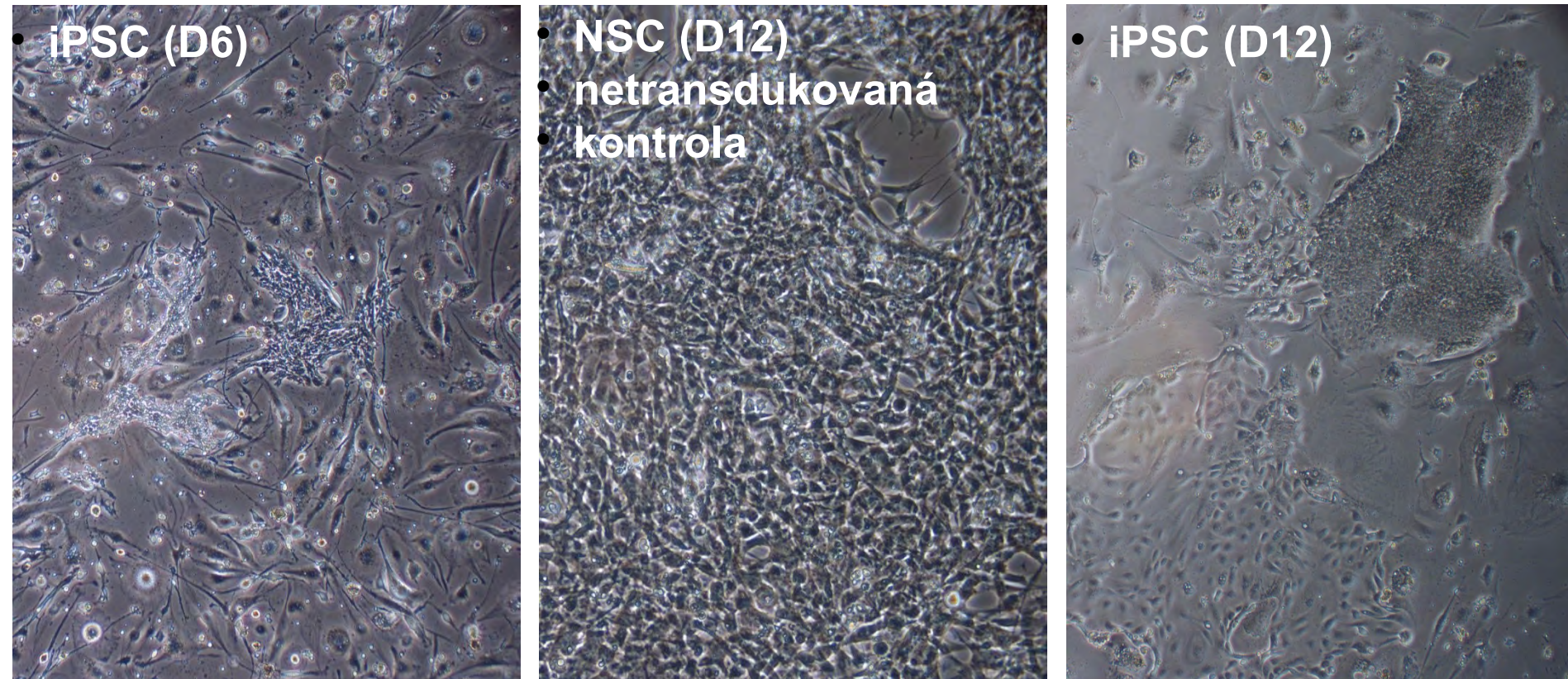
Adenovirus  
Sendai virus  
Spalničkový virus

Episomální vektory  
Minicircle  
Expresní plasmidy

Modifikovaná RNA  
Reprogramační  
proteiny

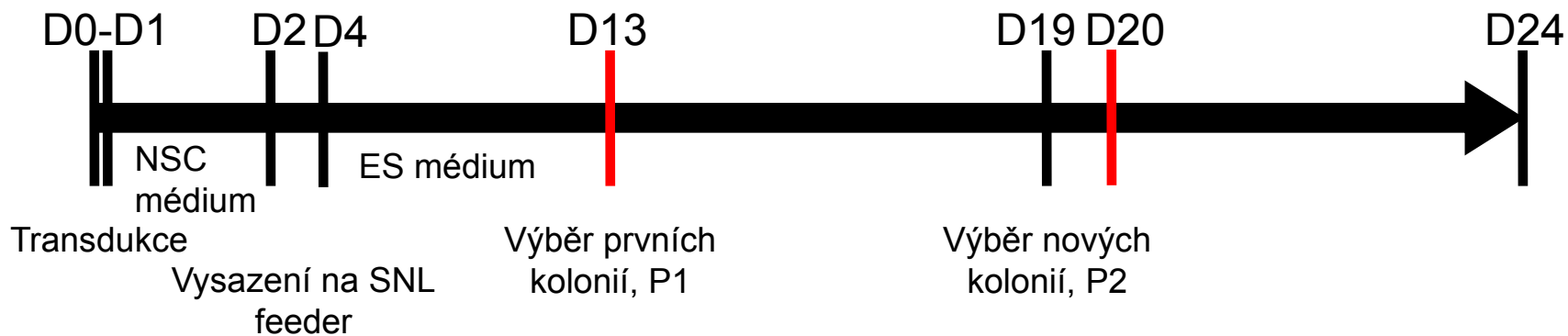
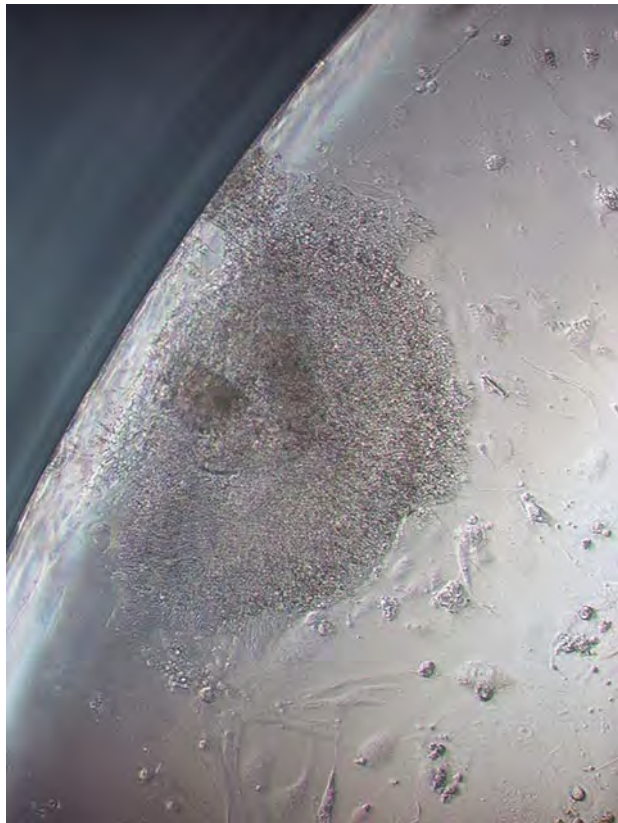


# Příklad reprogramace prasečích NSC pomocí retrovirů s transkripčními faktory

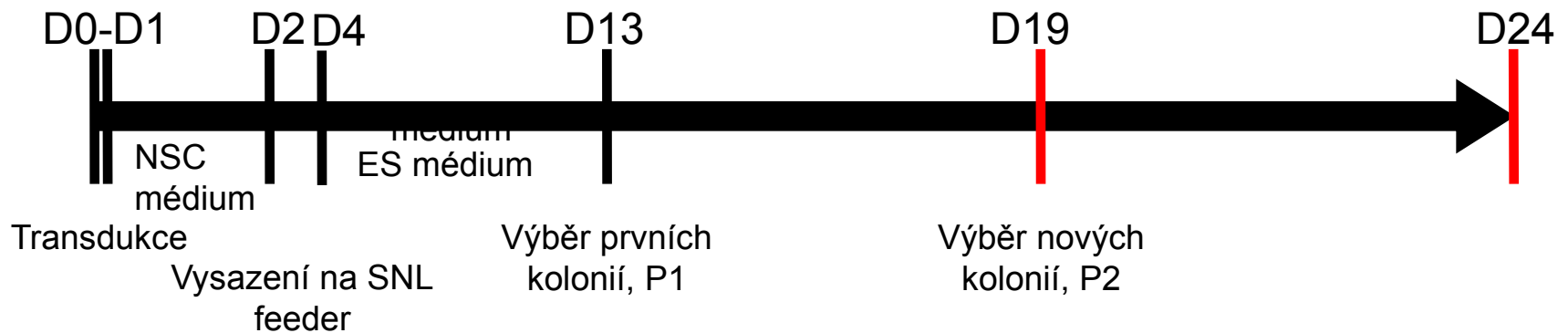
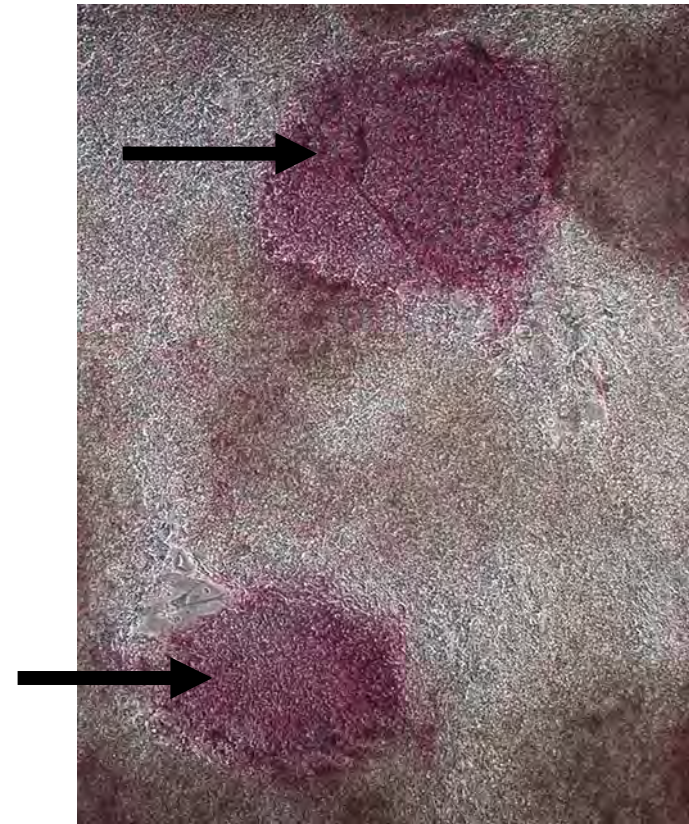
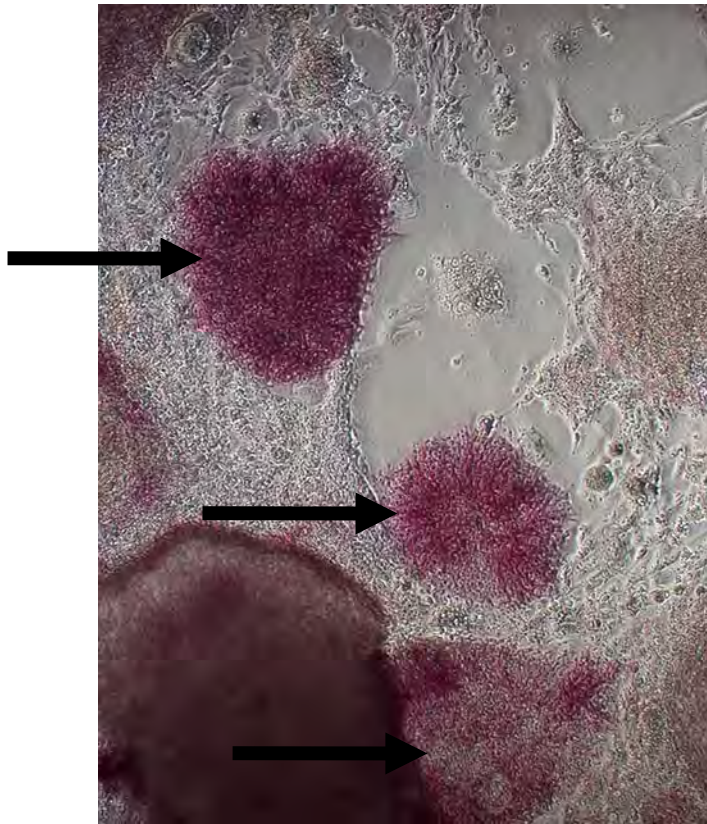




# Izolované kolonie iPS buněk na čerstvých feederech

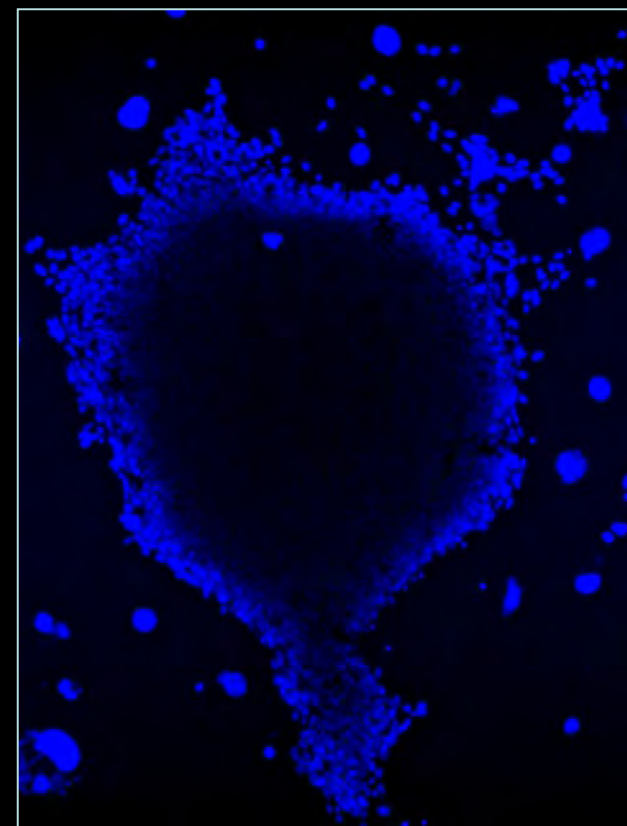
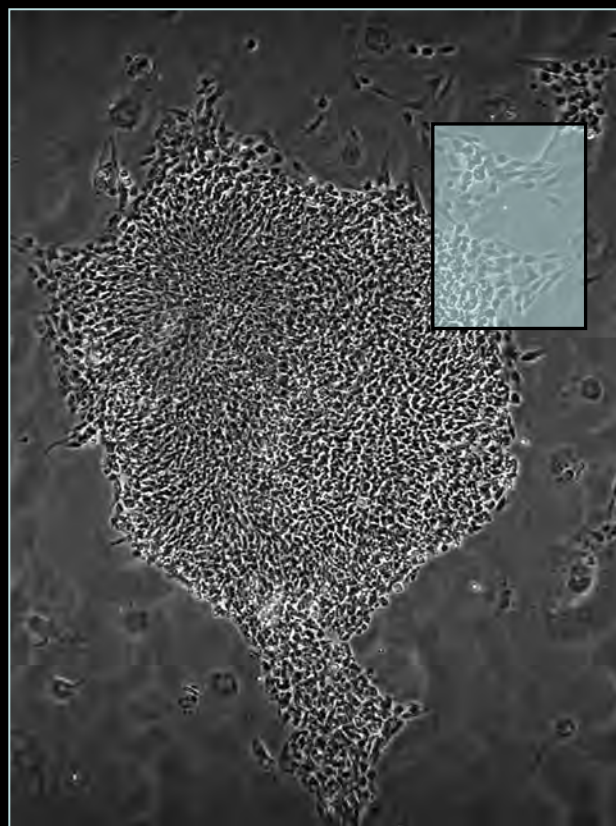
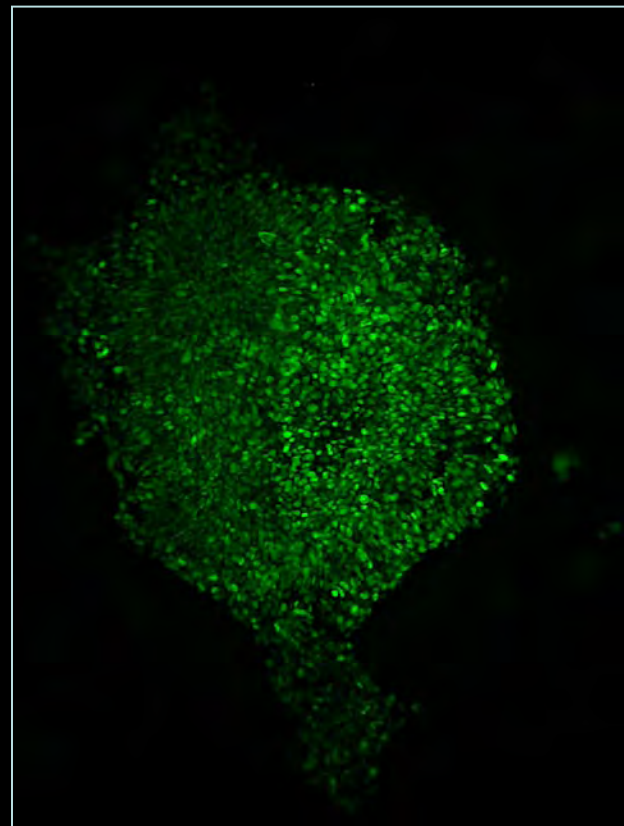


# AP barvení, buňky z druhé pasáže

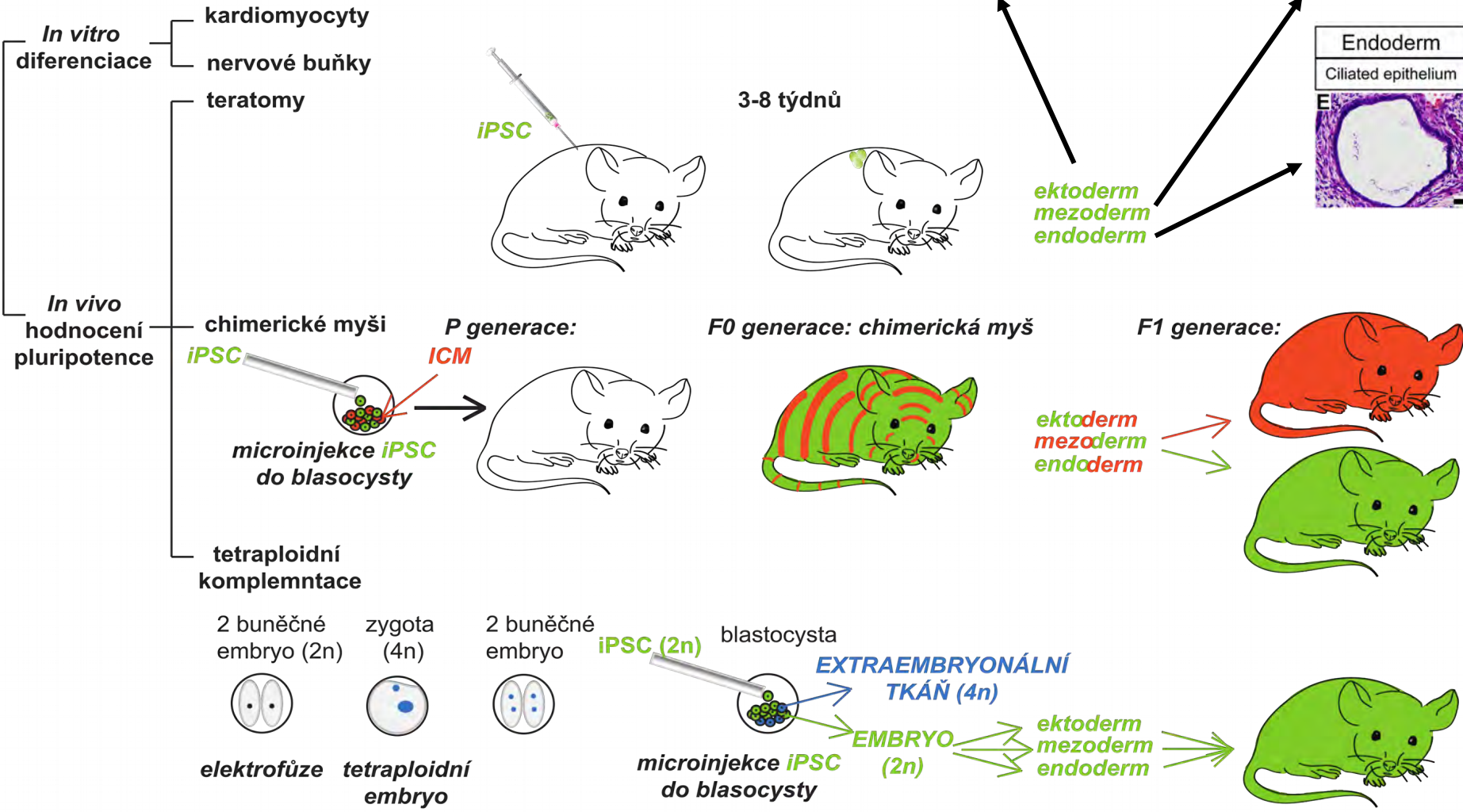




# Expresa Oct4 v kolonii iPS buněk

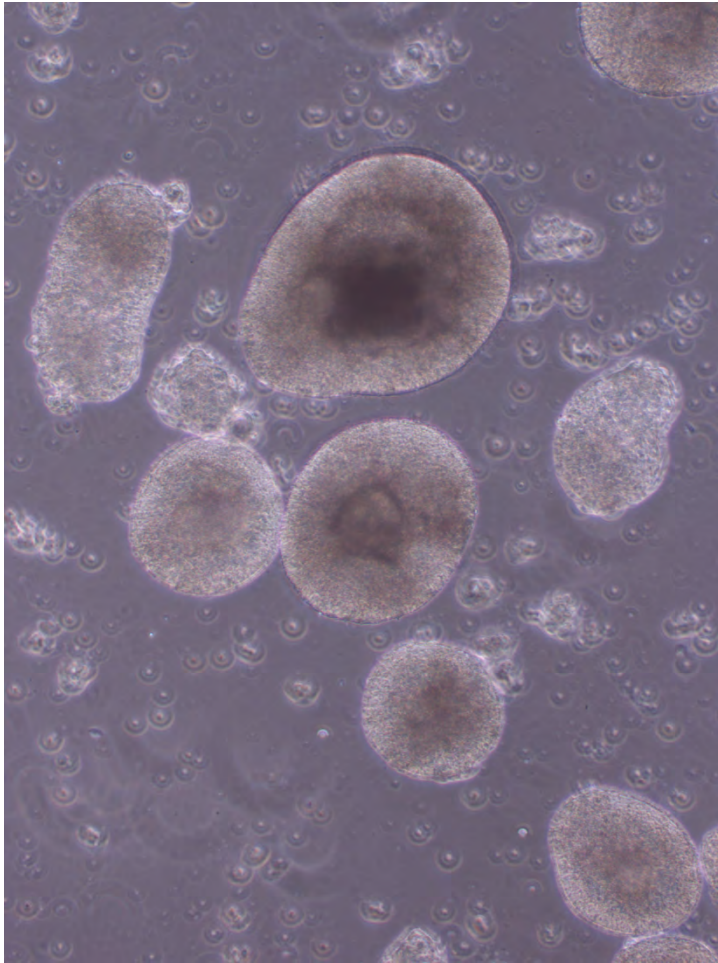


# Funkční charakteristika iPSC





# Embryoidní tělíska – spontánní diferenciace buněk



7 dní in vitro v suspenzní kultuře



+5 dní na gelatinu

# Aplikace iPS buněk

- Všude tam, kde se dosud využívaly ES buňky
  - Modely lidských onemocnění
  - Testování léčiv
  - Vývoj buněčných terapií s využitím alogenních buněk
- Významné výhody oproti ES buňkám
  - Odpadá nutnost zničení lidského embrya
  - Možnost přípravy autologních buněk na míru pro konkrétního pacienta
  - Příprava modelů vzácných chorob (genetických a potenciálně i sporadických)
  - Příprava isogenních linií nesoucích mutaci a následnou opravu, např. pomocí CRISPR/Cas9



# Aplikace iPS buněk

- Zajímavé aplikace v základním výzkumu
  - Studování vlastního mechanismu pluripotence a diferenciace
  - Přímá přeměna buněčných typů
  - Studium mechanismu stárnutí buněk
    - => koncept epigenetického věku buňky
- Aplikace v potenciálních terapiích
  - Zatím převládá opatrnost – první klinické zkoušky v Japonsku zastaveny
    - Byla testována léčba AMD pomocí RPE buněk z autologních iPS
    - Přechod na alogenní buňky po pozorování mutace v onkogenu u iPS buněk druhého pacienta (zjištěno před transplantací)

# iN buňky – Přímá reprogramace v neurony

- Myší fibroblasty transdukované

**Ascl1, Brn2** (alt. název Pou3f2) a **Myt1L**

Až 19.5% buněk konvertováno ve funkční neurony

Převážně excitatorní neurony

=> Ne jen vytvoření **nediferencovaných iPS** buněk  
ale i **přímé reprogramování** jednoho terminálně  
diferencovaného buněčného typu v jiný

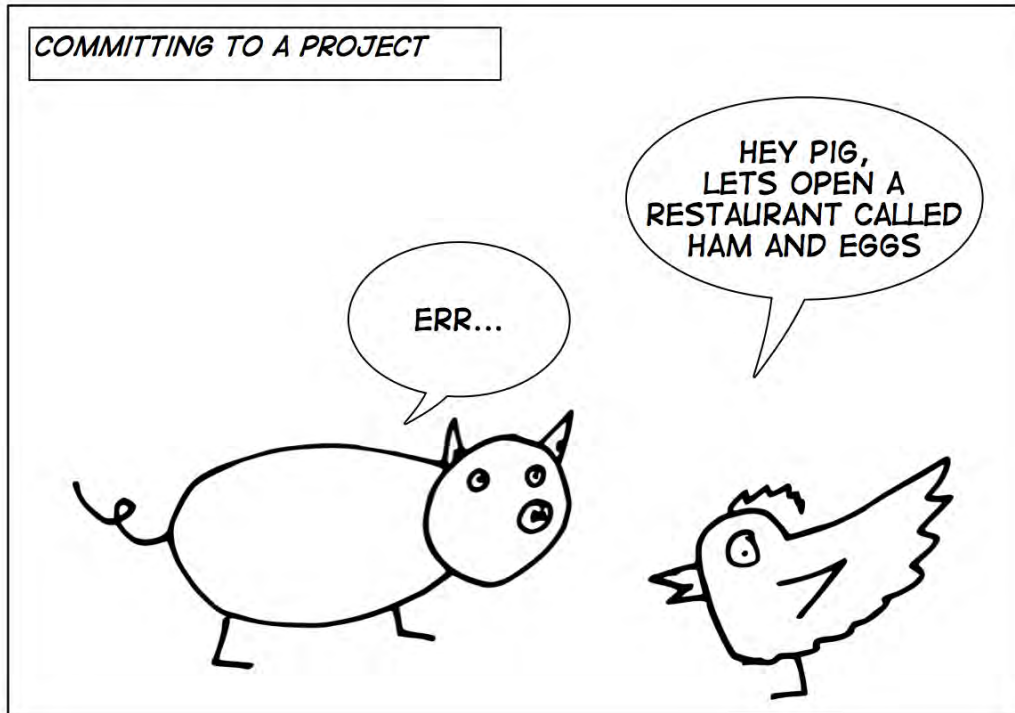
# iN buňky – Přímá reprogramace v neurony

- Lidské fibroblasty přímo přeměněny v DARPP32 pozitivní neurony striata
  - Směs transkripčních faktorů a miRNA

=> model HD = specifický typ neuronů

Obecně metody přímé reprogramace bez mezistupně pluripotentních buněk mohou být rychlejší a bezpečnější

# Hledáme diplomanty a postgraduální studenty



Studium Huntingtonovy choroby pomocí proteomických metod na modelu lidských iPS buněk a transgenním miniprasečím modelu

**Kontakt:**

**Laboratoř aplikovaných proteomových analýz**

Petr Vodička, PhD

[vodicka@iapg.cas.cz](mailto:vodicka@iapg.cas.cz)

+420 608 606 655