

Jak a proč změnit identitu buňky

Identita každé tělní buňky je postupně dotvářena složitým ontogenetickým vývojem příslušné tkáně v rámci orgánu a celého jedince, jehož je součástí. Díky tomu se organismus savců skládá z několika stovek různých, vzájemně spolupracujících buněčných typů lišících se vlastnostmi a schopnostmi. Taková živoucí mozaika podléhá procesům stárnutí, úrazům nebo onemocněním, jejichž působení se následně negativně projevuje snížením funkce nebo případnou ztrátou konkrétních buněk. Se zvyšujícím se věkem dožití, změnou životního stylu apod. čelí současné generace lidí nárůstu některých civilizačních chorob, mezi známé patří kardiiovaskulární onemocnění (např. infarkty). Velkým a stále častějším problémem mohou být autoimunitní onemocnění jako třeba diabetes 1. typu. K nim ale dramaticky přibývá výskyt nádorových onemocnění a také neurodegenerativních onemocnění, jako jsou Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba. Jestliže nemohou být patologické procesy a změny v organismu kompenzovány např. tvorbou nových funkčních buněk z vlastních kmenových populací nebo intervencí v podobě transplantace orgánu či konkrétních buněk, čelí dotčený jedinec trvalým a často i život ohrožujícím komplikacím. Nejen v případě uvedených onemocnění jsou dnes pro terapeutické a výzkumné účely masivně využívány postupy cíleného přeprogramování buněk, které budou tématem našeho článku.

Na identitě záleží

Transplantace orgánů jsou všeobecně známy, stejně jako nedostatek vhodných dárců. Podání buněk formou transplantace do místa postižení, kam se následně integrují a zajistí chybějící fyziologické funkce tkáně, je postup známý jako buněčná terapie. I v tomto případě je třeba zajistit dostatečné množství transplantovatelných, organismu vlastních (autologních) nebo případně dárcovských (allogenních) buněk. Na rozdíl od orgánů dokážeme některé buněčné typy pěstovat *in vitro*, a tím částečně eliminovat nedostatek dárcovských buněk. Pro většinu buněk lidského těla ale platí, že jejich dostupnost a možnosti rozmnožení *in vitro* nejsou dostatečné. Kde tedy vzít buňky, které by nahradily chybějící a současně by byly co nejvíce identické s požadovaným typem? Překonat tyto problémy buněčné terapie lze pomocí reprogramovaných buněk, kterým byla cíleně změněna identita. Využití jakéhokoli zdroje buněk v terapii včetně reprogramovaných

vyžaduje detailní pochopení řídicích mechanismů z oblasti ontogeneze, diferenciaci a patogeneze. Teprve po důkladných, dodejme i rozsáhlých, studiích *in vitro* a *in vivo* může být dosaženo požadovaného a dlouhodobého efektu buněčné terapie.

Zdroje buněk s definovanou identitou

Po dlouhou dobu byly a stále jsou základním zdrojem některých buněčných populací tkáně plodů nebo dospělých jedinců. V praxi se již dlouho využívají ne-transformované kmenové populace buněk izolovaných z dospělého jedince při transplantacích kostní dřeně, kůže apod. Izolace jednotlivých buněčných typů ostatních tkání s sebou ale zpravidla nese problémy s reprodukovatelností, efektivitou přípravy buněk a s jejich následnou adaptací na kultivační podmínky *in vitro* a na transplantaci. Počet a kvalita čerstvě izolovaných buněk mohou kolísat s každou izolací. Díky stálým a jednotným vlastnostem některých zavedených buněčných linií lze

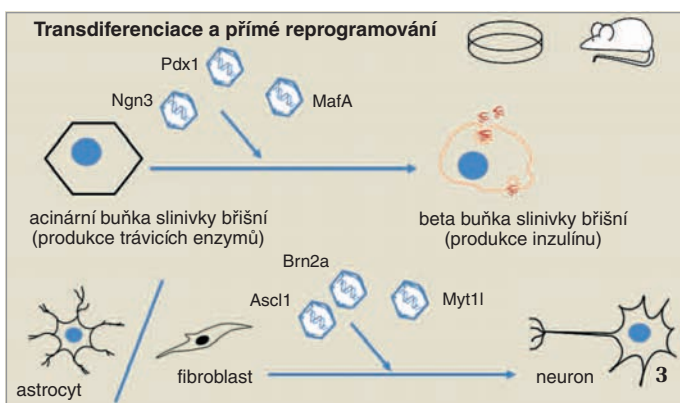
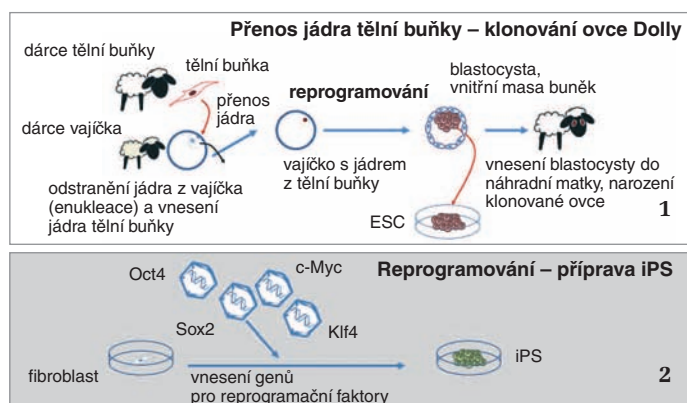
dosáhnout vyšší reprodukovatelnosti výsledků a výrazného zjednodušení experimentálního schématu. Na druhou stranu je použití limitováno jejich omezeným diferenciací potenciálem a případnou nádorovou transformací, a proto nejsou jednoznačně vhodné pro terapeutické účely.

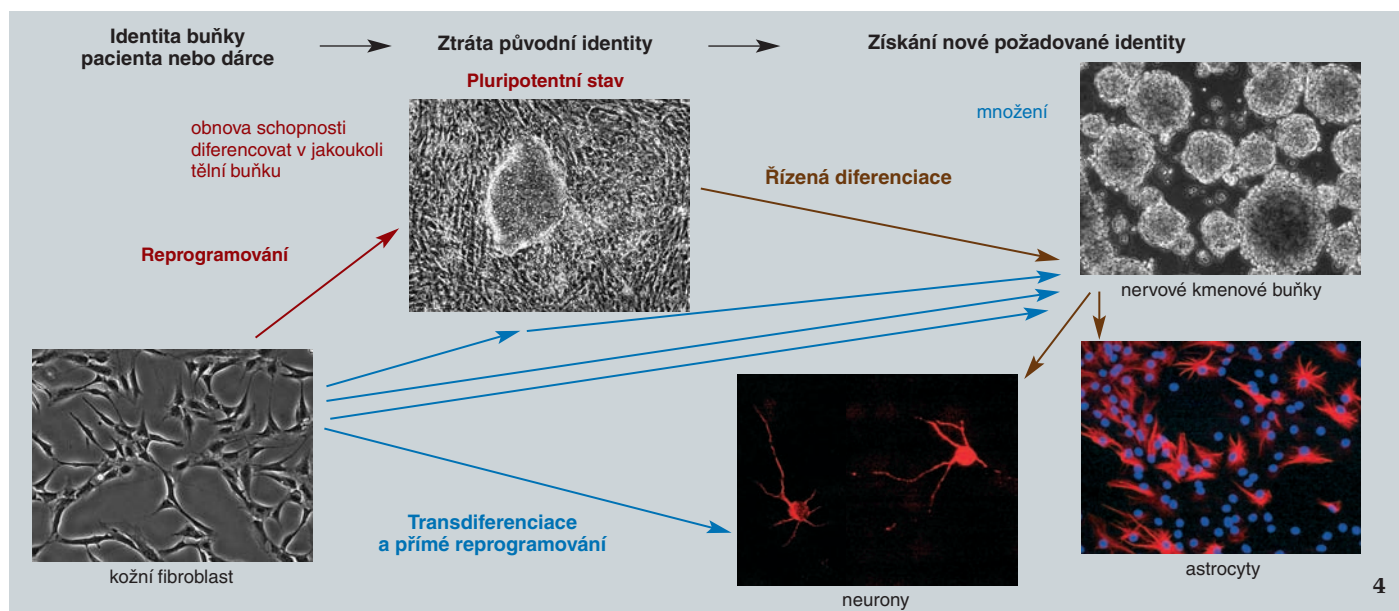
Univerzální a do jisté míry původní a dlouhodobě udržitelný zdroj představují embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells, ESC). Tyto buňky s pluripotentními vlastnostmi *in vivo* a za vhodných podmínek *in vitro* mohou dát vzniknout všem buněčným typům přítomným v organismu. Kromě přípravy transgenických organismů nalézájí uplatnění v získávání nejširšího spektra kmenových, progenitorových (dělicí se plně nediferencované buňky s vymezeným diferenciací potenciálem) a konečně i terminálně diferencovaných buněk. Do současné doby byly vyvinuty stovky protokolů, pomocí nichž se *in vitro* připravuje celá škála buněk, následně úspěšně aplikovaných v transplantacích studiích. K vytvoření ESC linie jsou využívána časná embrya ve stadiu moruly (shluk buněk po dělení oplodněného vajíčka) nebo blastocysty (mnohobuněčný útvar již vyplněný dutinou), což je silně limitujícím faktorem s ohledem na dostupnost embryí a etické důvody s tím spojené. Navíc při jejich eventuálním klinickém uplatnění vždy půjde o allogenní transplantaci s nutností zajistit maximální imunologickou shodu a s potřebou následné imunosuprese potenciálního příjemce.

Reprogramování buněk

Reprogramováním se rozumí člověkem navozená změna charakteru a vlastností buňky, která neodpovídá jejímu původu

1 až 3 Při klonování ovce Dolly došlo v raných vývojových stádiích embrya k reprogramování jádra tělní buňky do pluripotentního stavu a k následnému vytvoření všech buněk a tkání organismu (obr. 1). Rané embryo – blastocysta může sloužit k přípravě pluripotentních embryonálních kmenových buněk (ESC). Indukované pluripotentní buňky (iPS) jsou vytvořeny zcela mimo prostředí embrya a celý proces se odehrává na kultivační misce *in vitro* (2). Transdiferenciaci a přímé reprogramování vede k přímé přeměně jednoho buněčného typu v druhý (3). Oba postupy lze provádět jak *in vitro*, tak *in vivo* v příslušných tkáních zvířat. Ascl1, Brn2a, c-Myc, Klf4, MafA, Myt11, Ngn3, Oct4, Pdx1, Sox2 – reprogramační faktory (přehled viz webová stránka Živy)





a přirozené funkci v organismu. Nedávný objev a popis indukovaných pluripotentních buněk (iPS, viz Takahashi a Yamanak 2006) a následný překotný vývoj v reprogramování buněk zpřístupnily nový, téměř nevyčerpatelný zdroj jak kmenových, tak progenitorových nebo již plně diferencovaných buněk. Počátky studia reprogramování buňky lze vysledovat až k přenosům somatických jader do oplozeného vajíčka u obojživelníka. U savců bylo obdobného reprogramování jádra tělní buňky (blíže viz Živa 2005, 5: 194–197) dosaženo teprve v r. 1996, kdy se tímto způsobem narodila ovce – klon Dolly (obr. 1). Ještě dříve byly genetikou manipulací transdiferencované fetální myši fibroblasty do svalových buněk poté, co jim byl dodán aktivní gen MyoD.

V současné době existuje několik technologií, které shodně využívají metody a postupy molekulární genetiky a tkáňového inženýrství k přípravě reprogramovaných transplantovatelných buněk. Zmíněné metody přípravy iPS a transdiferenciace jsou doplněny a v mnoha případech zcela nahrazeny přímým reprogramováním. Přes značnou podobnost jsou však mezi nimi rozdíly, které musíme vést v patrnosti při řešení konkrétních aplikací. Jednotlivé technologie si přiblížíme detailněji.

● Indukované pluripotentní buňky (iPS)

Tělní buňky, u nichž byly záměrně vyvolány vlastnosti a schopnosti raného embrya, nazýváme indukovanými pluripotentními buňkami. Pro experimentální účely je použití technologie přípravy iPS dostupnější a eticky mnohem přijatelnější než příprava ESC. Tento alternativní zdroj pochází z tělních buněk plodu nebo jedince, nikoli však embrya. Nejčastěji využívanou buňkou je kožní fibroblast, reprogramovaný a převedený do pluripotentního stavu pomocí molekulárněgenetických metod. S následným provedením specifických diferencičních protokolů, velmi podobných těm pro diferenciaci ESC, lze získat i obtížně dostupné buňky – nervové buňky centrální nervové soustavy, světločivné buňky apod. Se značným rozšířením iPS je spojen nárůst počtu zdokonalených nebo nově vytvořených postupů, jimiž se enormně rozšířilo spektrum výsledných buněčných typů.

Indukované pluripotentní kmenové buňky byly poprvé vytvořeny reprogramováním po vnesení čtyř genů kódujících reprogramační faktory do somatických buněk – kožních fibroblastů (obr. 2). K přenosu genů a k jejich začlenění do hostitelského genomu sloužily upravené retrovirové částice. Pluripotentní stav byl tímto způsobem vyvolán uměle a s postupným zdokonalováním této technologie lze v současnosti snížit počet vnášených genů až na jediný. Celý proces není dosud dokonale prozkoumán, ale bývá rozdělován na dvě fáze. V první fázi, kdy jsou aktivní vnesené reprogramační faktory, dochází k zásadním změnám regulace genů buňky včetně zapínání vlastních genů zajišťujících pluripotenci. Tato fáze je nestabilní a buňky mají silnou tendenci návratu zpět do somatických specializovaných buněk. Při zajištění optimálních a setrvalých podmínek reprogramování může proběhnout druhá fáze, při níž se pluripotentní stav stabilizuje. V této fázi zaznamenáváme stále změny v modifikacích DNA, např. metylacích, a také změny struktury chromatinu, které se projevují jako aktivace chromozomu X. Konečným produktem reprogramování je pak stabilní pluripotentní iPS linie velice podobná svými schopnostmi ESC linii. Společným znakem ESC a iPS jako pluripotentních buněk je také schopnost tvořit teratomy (nádory pocházející z buněk embryonální tkáně), jež vyplývá z jejich primitivního nediferencovaného charakteru.

Efektivita přeměny původních buněk na iPS je nízká, mezi 0,01–5 %, ve specifických případech však dosahuje až 20 %. Způsob navození pluripotentního stavu v buňce navíc přináší problémy ve formě změn její genetické informace. Buňky během reprogramování procházejí intenzivním dělením spojeným s celkovou změnou modifikace a struktury chromatinu, při které může dojít k poškození a mutacím DNA. Pluripotentní stav je přirozeně nestabilní a bez optimálních podmínek k jeho udržení iPS buňky spontánně přecházejí do nahodilých buněčných typů. K dosažení určitého buněčného typu je třeba pravidla vysoce sofistikovaného postupu. Ten se může skládat z několika navazujících kroků a vyžaduje i několik desítek dnů

4 Průběh a výsledek reprogramování vazivové buňky (fibroblastu) závisí na zvoleném postupu. Po reprogramování do iPS získáme trvalý a obnovitelný zdroj pluripotentních buněk. iPS ale musí následně podstoupit řízenou diferenciaci k tomu, aby z nich mohly vzniknout specializované buňky. V průběhu transdiferenciace a přímého reprogramování se mění identita zdrojových buněk přímo podle použitých liniových genů a diferenciálních protokolů. Z důvodu získání dostatečného množství požadovaných buněk je ale během reprogramování někdy výhodné nejprve získat dělicí se kmenové buňky, které po dostatečném namnožení projdou finální diferenciací. Všechny orig. a snímky: I. Lišková a J. Klíma

řízené diferenciace pluripotentní buňky. Schéma na obr. 4 ukazuje přípravu iPS, následovanou nervovými kmenovými buňkami a konečnými zralými a diferencovanými nervovými buňkami. Jakákoli odchylka od protokolu se samozřejmě projeví na požadované kvalitě buněk.

● Transdiferenciace

O něco jednodušším postupem reprogramování je přeměna jednoho specializovaného buněčného typu v odlišný typ. Poté mluvíme o transdiferenciaci. Během zmíněného procesu buňky neprocházejí pluripotentním stavem (obr. 4). *In vitro* se využívá obdobný metodický postup reprogramování jako u iPS. Rozdíl spočívá v tom, že se vnášejí nebo jinak ovlivňují geny zodpovědné za specifitu dané linie. Např. linie hematopoetických krevních buněk potřebuje k udržení své identity jiné liniové geny než buňky svalové anebo nervové. Významná empiricky doložená výhoda tohoto postupu spočívá ve velice nízkém riziku tvorby teratomů i jiných nádorů. Pokud navíc pro reprogramování využijeme četnou populaci zdrojových buněk, transdiferencované buňky není potřeba kultivovat a rozmnožovat *in vitro* tak dlouhou dobu jako např. iPS. Tím se opět významně snižuje riziko hromadění mutací s potenciálně negativním dopadem. Nevýhodou transdiferenciace je ome-

zené spektrum reprogramovaných buněčných linií, kdy se úspěšně přeměny zpravidla dosahuje mezi linií podobnými buněčnými typy. Jako příklad lze uvést reprogramování acinárních buněk slinivky břišní (produkujících trávicí enzymy) na beta buňky produkující inzulín (obr. 3).

● Přímé reprogramování

Určitý přechod mezi iPS a transdiferenčníci tvoří postupy přímého reprogramování. (Pozn.: Transdiferenciace a přímé reprogramování nejsou vždy striktně rozlišovány a v literatuře se pro oba postupy často užívá termín přímé reprogramování.) Rovnou tak vznikají i buněčné typy, které vývojově pocházejí z jiného zárodečného listu (obr. 4). Taková zásadní přeměna se obejde bez reprogramování přes pluripotentní stav. Některé protokoly i přesto vystavují somatickou buňku vlivu pluripotentních genů, ale pouze po krátkou dobu. Během této přechodné fáze se buňka stává ještě plastičtější a získává schopnost proměny v širší škálu buněčných typů. Vyvolání pluripotentního přechodného stavu se pravděpodobně shoduje s první fází přípravy iPS. Podstatné je, že zde chybí fáze stabilizace pluripotentního stavu, což se při následné transplantaci pozitivně projevuje vyloučením tvorby teratomů zbylými nediferencovanými pluripotentními buňkami. Účinnost přímého reprogramování a určení identity můžeme cíleně ovlivnit vnášením specifických, např. liniových genů a použitím diferenciacních protokolů. V některých případech se uvádí úspěšnost reprogramování až u 20–50 % původního počtu buněk. K nevýhodám lze přičíst jejich ne zcela identickou aktivitu genů ve srovnání s přirozeně vzniklými buňkami. Navíc pokud reprogramovací protokol vede ke vzniku nedělicích se prekurzorů nebo přímo diferencovaných buněk, není možné dostatečné množství buněk vytvořit jinak než reprogramováním těch hojně dostupných zdrojových. Obecně je patrná snaha přímým reprogramováním připravit nejprve kmenové populace nebo progenitorové populace, které si udržují vysoký proliferační potenciál. Po dostatečném rozmnožení reprogramované kmenové buněčné populace se dají tyto buňky na základě potřeby diferencovat i do několika různých typů. Jako příklad lze uvést nervové kmenové

buňky, které mohou být následně specifikovány do více typů nervových buněk včetně neuronů (obr. 4). Obecně označujeme reprogramované buňky v jakémkoli stavu diferenciaci také jako indukované buňky.

Nové trendy

Snaha vyhnout se trvalému vnášení genetické informace v jakékoli podobě je preferovaný postup, který může výrazně omezit nezamýšlené genetické změny v reprogramované buňce. Proto byly vyvinuty postupy vnášení genů reprogramačních faktorů, které neumožňují jejich začlenění do genomu, nebo případně dochází k jejich odstranění po dosažení reprogramování. Lze také do buněk vnášet mRNA molekuly nebo přímo proteiny. Tyto postupy nejsou nijak triviální a výzkum směřuje k nalezení jiných, stejně účinných molekul, jejichž použití by bylo metodicky jednodušší, lépe definovatelné a reprodukovatelné. Tzv. malé chemické sloučeniny, definované organické molekuly, dnes již dokáží zcela nahradit použití některých transkripčních faktorů. Výrazně zvyšují účinnost reprogramování a také zkracují dobu přípravy indukovaných buněk.

Využití reprogramovaných buněk

Velkého uplatnění se dočkalo reprogramování při přípravě lidských buněčných modelů celé škály onemocnění (viz tab. 1). V případě těch neurodegenerativních patří k nejčastěji zmiňovaným Alzheimerova, Huntingtonova a Parkinsonova choroba. Spektrum neurodegenerativních onemocnění a jejich modelace je ale mnohem širší.

Reprogramováním připravené kmenové nebo přímo diferencované populace indukovaných buněk poté slouží k *in vitro* modelování, studiu mechanismů podílejících se na vývoji onemocnění a vyhledávání účinných látek a postupů vedoucích k odstranění příčin nebo projevů onemocnění. Buněčný model nespočívá jen v přípravě buněk, které navenek vykazují některé typické znaky, jako jsou např. elektrofyziologická aktivita neuronu, kontrakce svalových buněk nebo produkce inzulínu indukovanými beta buňkami. Buněčný model musí co nejdříve rekapitulovat průběh a projevy onemocnění. Zvýšenou citlivost specifických neuronů na konkrétní stimuly a jejich selektivní smrt, jak

probíhá u Huntingtonovy a Parkinsonovy choroby, musejí vykazovat také indukované neurony. Podobně by měly reprogramované buňky vytvářet a ukládat nefyziologické a toxické formy proteinů. Skutečnost, že lze reprogramováním a následnou specifickou diferenciací vytvořit jiné typy buněk, než jsou ty z cílového orgánu, je velkou výhodou. Mnohá onemocnění se projevují systémově a zasaženy bývají mnohdy i další orgány. Zde můžeme opět zmínit Huntingtonovu chorobu s jejími projevy nejen v centrální nervové soustavě, ale i v srdeční tkáni, slinivce břišní a na sítnici oka (viz Živa 2014, 6: 252–265).

Reprogramování v podmínkách *in vitro* představuje pouze začátek mnoha fascinujících experimentů a potenciálních klinických aplikací. Již nyní máme k dispozici experimentální modely reprogramování buněk přímo v živém organismu. Aplikací upravených virových konstruktů nesoucích reprogramační faktory je možné lokálně, v místě potřeby, změnit nastavení rezidentní buňky. Odpadá tak nutnost hledat dárcovské buňky, jejich příprava *in vitro* a transplantační zákrok. Experimentálně vyvolaná konverze pomocných nervových buněk astrocytů do neuronů přímo v myším mozku demonstruje nejen skrytou plasticitu somatických buněk *in vivo*, ale i současné možnosti řízeného přeprogramování. Podobně byly na myším modelu *in vivo* reprogramovány acinární buňky slinivky do beta buněk. Velmi zajímavá je také *in vivo* přeměna fibroblastů srdeční tkáně do indukovaných kardiomyocytů.

Shrnutí

Dosavadní zkušenosti s reprogramovanými buňkami potvrzují možnost efektivní přípravy buněčných populací, které lze následně *in vitro* množit a získat tak dostatek materiálu pro transplantační a výzkumné účely. Současně si tyto buňky zachovávají potřebnou plasticitu ve smyslu schopnosti být cíleně diferencovány do požadovaného typu. Otevírá se také (zatím jen hypotetická) možnost přípravy libovolných autologních buněk pro každého pacienta z jeho nepatrné biopsie, např. kůže. Navíc v případě nutnosti se tyto buňky stávají vhodnými adepty na úpravu nefunkčních nebo poškozených genů v rámci genové terapie (např. Živa 2015, 3: 101–104). Bezpečnost z hlediska nežádoucí tvorby nádorů po implantaci buněk příjemci zůstává u přímého reprogramování a transdiferenciace nesrovnatelně vyšší než při použití pluripotentních kmenových buněk anebo stabilních buněčných linií. K nevýhodám patří stále náročná a déle trávající příprava, kterou nelze provádět ve větším měřítku. I přes slibné výsledky implantačních studií neznáme detailně případné dlouhodobé změny ve funkci transplantovaných buněk a nejsou vyloučeny negativní dopady, např. nádorové bujení a autoimunitní reakce v delším časovém horizontu.

Článek vznikl s podporou Národního programu udržitelnosti I, č. LO1609 (MŠMT) a ExAM Experimental Animal Models, č. CZ.1.05./2.1.00/03.0124 (MŠMT).

Použitá literatura a vysvětlení zkratk pro obr. 2–3 jsou uvedeny na webu Živy.

Tab. 1 Vybraná onemocnění, pro která byly reprogramováním vytvořeny stabilní pluripotentní linie buněk. Z nich jsou poté připravovány požadované buněčné typy, na nichž můžeme zrekapitulovat a modelovat mechanismus a projevy daného onemocnění. V některých případech lze přímo reprogramovat zdrojové buňky.

Nemoc	Zdrojová buňka	Reprogramování	Výsledný buněčný typ pro modelování nemoci
Alzheimerova choroba	fibroblast – pacient	iPS	neuron
Huntingtonova choroba	fibroblast – pacient	iPS	neuron
Frontotemporální demence	fibroblast – pacient	iPS	neuron
Cystická fibróza	fibroblast – pacient	iPS	plicní epitel
Cukrovka 1. typu	fibroblast – pacient	iPS	endokrinní beta buňka
Duchennova muskulární dystrofie	fibroblast – pacient	iPS	svalová buňka
Retinitis pigmentosa	fibroblast – pacient	iPS	fotoreceptory – tyčinky
Neuropatická bolest	fibroblast	přímé reprogramování	nocireceptor – receptor bolesti
Idiosynkrastická reakce – lékové poškození jater	monocyt	reprogramování	hepatocyt