

Buňky s velkým potenciálem

2. Charakterizace indukovaných pluripotentních buněk

Většina buněk dospělého organismu je vysoce funkčně specializovaná a má jen omezenou schopnost dělení. V r. 2006 objevená metoda přípravy indukovaných pluripotentních buněk (iPSC, induced Pluripotent Stem Cells) umožňuje tyto specializované buňky vrátit zpět ve vývoji a připravit z nich buňky podobné buňkám raného embrya. Získané buňky jsou pluripotentní, tedy mají schopnost diferencovat do mnoha různých buněčných typů (podrobněji v první části článku v Živě 2016, 4: 150–154). Reprogramování tělních (somatických) buněk v buňky indukované pluripotentní je složitý proces. Buňky by po reprogramování měly splňovat charakteristické znaky pluripotence, zejména být schopny neomezené sebeobnovy a diferencovat do všech tří zárodečných vrstev – ektodermu, mezodermu a endodermu. K ověření úspěšnosti reprogramování a potvrzení identity a kvality vytvořených iPS buněk lze využít škálu biologických metod od jednoho hodnocení morfologie po charakterizaci změn na epigenetické, genové a bílkovinné (proteinové) úrovni. Dalším a zároveň nejpřísnějším hlediskem je hodnocení funkční pluripotence. Funkční charakteristika zahrnuje *in vitro* diferenciaci iPS buněk a potvrzení přítomnosti buněk všech tří zárodečných vrstev a *in vivo* hodnocení pluripotence, tedy sledování vzniku buněk všech tří zárodečných listů po přenosu iPS buněk do živého organismu.

Naivní a nakročené pluripotentní buňky
 Jak embryonální kmenové buňky, tak s nimi srovnatelné iPS buňky se mohou nacházet ve dvou různých stavech z hlediska plu-

ripotence. Jeden stav je označován jako naivní pluripotence neboli „základní stav“ (ground state pluripotency), a druhým je „nakročená“ pluripotence (primed pluripo-

tency). Oba tyto stavy se vyznačují charakteristickými vlastnostmi a požadavky na kultivační média.

Myší embryonální kmenové buňky (Embryonic Stem Cells, ESC), které jsou odvozené z vnitřní buněčné masy (Inner Cell Mass, ICM) embrya ve stadiu blastocysty, se nacházejí ve stavu naivní pluripotence. Naivní buňky jsou kultivovány v médiu obsahujícím cytokin leukemický inhibiční faktor (LIF), nebo v médiu s inhibitory GSK3 a MEK kináz (tzv. 2i médium, tedy dvouinhibitorové). Z epigenetického hlediska se vyznačují nízkou úrovní metylace DNA a u buněk samičího pohlaví jsou aktivní oba chromozomy X (XaXa). Exprimují transkripční faktory specifické pro naivní stav (viz obr. 1). Tyto buňky mají schopnost přispívat k tvorbě chimér – organismů složených z buněk různého genetického původu (bliže v kapitole Chimérické myši).

Nakročené pluripotentní buňky jsou náchylnější k diferenciaci a na myším modelu odpovídají postimplantačnímu epiblastu, jde o tzv. epiblastové kmenové buňky (Epiblast Stem Cells, EpiSC). EpiSC jsou kultivovány v médiu s fibroblastovým růstovým faktorem (FGF) a aktivinem (růstovým faktorem, který se mimo jiné podílí na regulaci rozmnožování, hojení ran a vývoji mnoha orgánů). Vyznačují se vysokou úrovní metylace DNA a v samičích buňkách se nachází jeden aktivovaný a jeden inaktivovaný chromozom X (XaXi). Aktivně exprimují geny spojené s EpiSC (obr. 1). Na rozdíl od naivních buněk k tvorbě chimér přispívají velice omezeně nebo vůbec (vnesené buňky se funkčně nezačlení do vyvíjejícího se embrya a postupně zaniknou). Lidské ESC a ESC hospodářských zvířat odpovídají svými vlastnostmi nakročeným buňkám, i když jsou odvozeny z ICM blastocysty. Stejně tak lidské iPS (human, hiPS) buňky mají vlastnosti nakročených buněk. Nakročené iPS buňky člověka a některých hospodářských zvířat jsme schopni změnit v buňky s vlastnostmi podobnými naivním pluripotentním buňkám, a to změnou média na 2i médium s LIF a forskolinem, aktivátorem adenylát cyklázy – enzymu produkujícího v buňce cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), který pak slouží jako signál aktivující další buněčné děje.

Tvar buněk

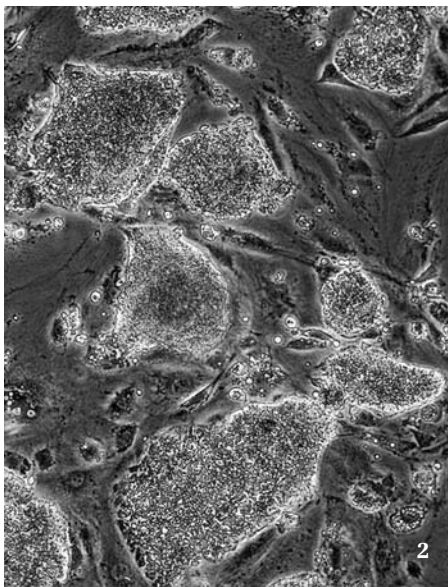
Během kultivace lze buňky hodnotit na základě jejich morfologie, tvorby kolonií a mitotické aktivity (rychlosti buněčného dělení). Morfologie iPS buněk je podobná ESC příslušného druhu. Kolonie myších iPS (mouse, miPS) buněk mají kruhový, lehce vypouklý tvar, buňky v rámci kolonie k sobě těsně přiléhají, mají velké jádro a malé množství cytoplazmy. Také u hiPS buněk vznikají těsné kolonie, buňky obsahují velké jádro a malé množství cytoplazmy, ale celé kolonie jsou ploché a s ostrými výběžky. Prasečí iPS buňky

1 Naivní a nakročené pluripotentní buňky. Pluripotentní kmenové buňky (embryonální – ESC a indukované – iPSC) se mohou vyskytovat v jednom ze dvou blízkých, ale ne identických stavů pluripotence. Srovnání metody odvození a charakteristické vlastnosti obou typů. Vysvětlení zkratk a podrobnosti u textu

	Naivní buňky (ground state)	Nakročené buňky (primed state) ¹
Myš	7. buněčný cyklus blastocysta ICM ESC	postimplantace extraembryonální část embryonální část epiblast EpiSC
Člověk a hospodářská zvířata	naivní buňky podobné myším ESC (naive ES-like)	7. buněčný cyklus blastocysta ICM ESC změna média
Odvození buněk	ICM	EpiSC
Kultivační médium	LIF/2i inhibitory/forskolin	FGF/aktivin
DNA metylace	nízká úroveň	vysoká úroveň
Samičí chromozomy	XaXa (oba aktivní)	XaXi (jeden inaktivní)
Transkripční faktory	Stella, Piwi2, Stra8, Dazl, Esrrb, Tbx3, Gbx2	Cer1, Gata6, Sox17, Dkk1, Foxa2
Tvorba chimér	ano	omezeně nebo vůbec
Morfologie buněk	kruhový tvar, velké jádro, malé množství cytoplazmy	kolonie těsné, ploché s ostrými konci, velké jádro, malé množství cytoplazmy

2 Kolonie prasečích iPS buněk kultivovaná na podpůrných myších fibroblastech

3 Funkční hodnocení pluripotence. Buňky je možné přímo diferencovat *in vitro* do různých buněčných populací (A). Schopnost tvořit teratomy (B): iPSC jsou injikovány imunodeficientním myším (tedy s potlačeným imunitním systémem) do podkoží na hřbetu. Za 3–8 týdnů se spontánně začnou tvořit teratomy – nádory složené ze směsi nediferencovaných a diferencovaných buněk. K prokázání pluripotence testovaných buněk musí být v teratomu nalezeny tkáně všech tří zárodečných listů – ektodermu, mezodermu a endodermu. Schopnost tvorby chimérických myší (C): iPS buňky jsou injikovány do myší blastocysty a blastocysta je přenesena do náhradní matky (P – parentální generace). Poté se hodnotí přispění do jednotlivých tkání potomků (F₁ – filiaální generace). Pokud se vnesené buňky začlenily do zárodečné linie, v následující F₂ generaci nalezneme myši geneticky identické s vnesenými buňkami. Tetraploidní komplementace (D). Dvoubuněčné embryo se pomocí elektrofúze spojí a vznikne jednobuněčné embryo, které má zdvojnásobenou dědičnou informaci – ze dvou sad chromozomu 2n (diploidní) se stanou čtyři sady chromozomů 4n (tetraploidní). Takto upravené embryo se může vyvinout do stadia blastocysty, kde k němu injikujeme iPSC, které jsou diploidní. Diploidní iPS buňky založí nový vyvíjející se plod a z tetraploidních buněk se stanou extraembryonální tkáně. Orig. K. Vodičková Kepková (obr. 1 a 3)



iPS buněk a ESC vyskytují rozdíly. Pokud si iPS buňky zachovávají část epigenetických značek původních tělních buněk použitých k reprogramování, mluvíme o epigenetické paměti. Např. iPSC buňky odvozené ze svalových buněk srdce (kardiomyocytů) mají vyšší schopnost spontánně diferencovat opět do kardiomyocytů než např. iPS buňky odvozené z kožních buněk. Dalším příkladem jsou iPSC z pankreatických beta buněk, které snadněji diferencují do buněk produkujících inzulín. Během reprogramování ale může dojít i k náhodné epigenetické chybě, kdy výsledné epigenetické znaky neodpovídají ani původním buňkám, ani ESC. Proto je důležitou součástí charakterizace linií iPSC před jejich využitím i analýza epigenetických změn. Bisulfitovou sekvenací se dá identifikovat metylace cytozinu v DNA, zejména v oblasti promotorů genů spojených s pluripotentí. Ošetření izolované DNA hydrogenosířičitanem (anglicky bisulfite) totiž změní cytozin na uracyl. Pokud je ale cytozin metylován, je proti změně chráněn. Když pak takto ošetřenou DNA sekvenujeme, víme, že každý cytozin ve výsledné sekvenci byl původně metylován. Epigenetické značky na histonech lze zjistit např. metodou chromatinové imunoprecipitace (vysrážení na základě reakce antigen-protilátka). Pomocí protilátky proti modifikovanému histonu se přitom ze vzorku „vychy-

tá“ daný histon včetně úseku DNA, na který se váže. Sekvenací získané DNA určíme, s jakým genem je konkrétní modifikace histonu spojena.

Telomerázová aktivita a délka telomer

Konce chromozomů se při buněčném dělení nedokážou dokonale replikovat a po každé by tak buňka přišla o část genetické informace. Proto jsou konce chromozomů chráněny přítomností speciální struktury – telomery (podrobněji viz Živa 2002, 6: 245–248; 2017, 2: 53–57 a na str. 101–107 tohoto čísla). Telomery tělních buněk se při buněčném dělení zkracují, proto mají tyto buňky limitovaný počet dělení. V pluripotentních buňkách je aktivní enzym telomeráza, který telomery prodlužuje, a zajišťuje tak schopnost neomezené sebeobnovy. Aktivace telomerázy tedy představuje další důležitý znak úspěšného reprogramování. Indukované pluripotentní buňky s dlouhými telomery vytvářejí chiméry s vyšší účinností. Aktivní telomeráza je ale také typická pro buňky nádorové! Mohlo by se zdát, že aktivita telomerázy by byla pro buňky výhodná a bránila by stárnutí organismu, ale limitovaná životnost tělních buněk slouží zároveň jako pojistka proti neomezenému dělení typickému pro nádory.

Molekulární charakteristika a karyotyp

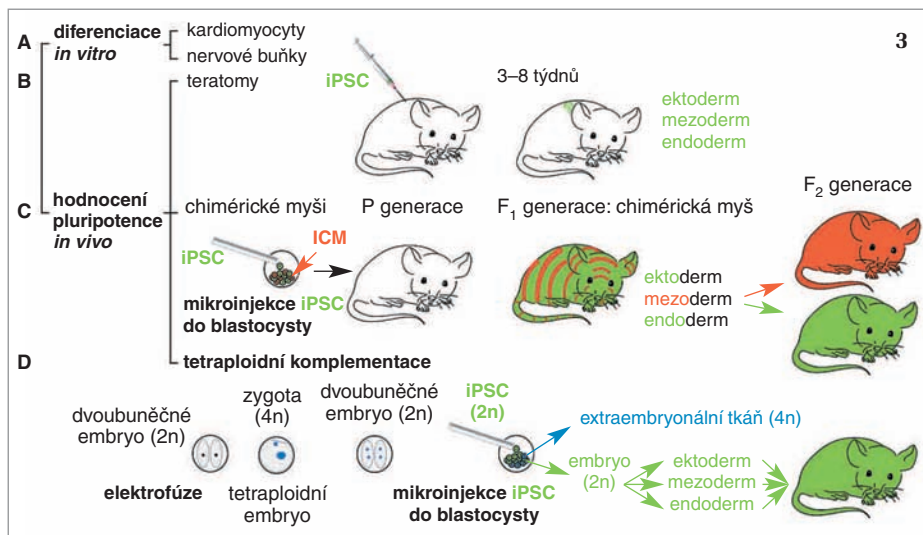
Jak bylo zmíněno výše, naivní i nakročené pluripotentní buňky se vyznačují expresí charakteristických genů. Potvrzení exprese vybraných genů se provádí metodou kvantitativní reverzní transkripce – polymerázové řetězové reakce (qRT-PCR), nebo lze pomocí metody mikročipů a sekvenování transkriptomu určit expresi celého genomu. Na úrovni proteinů se využívá zejména metoda imunohistochemie nebo western blotu, kdy je přítomnost daných proteinů ověřena pomocí specifických protilátek. I tyto metody slouží pro ověření správného průběhu reprogramování buněk a charakterizaci pluripotence. Jak metoda qRT-PCR, tak mikročipy potvrdily, že hiPS buňky jsou velmi podobné, ale ne úplně identické k ESC, a exprimují mnoho znaků nediferencovaných buněk. Molekulárními metodami musíme také potvrdit umlčení ektopických (vnesených do buňky) transkripčních faktorů (TF) použitých k reprogramování (Oct-4, Sox2, Klf4, c-Myc, případně Lin28 a Nanog, blíže viz první díl

jsou na obr. 2 a v prvním dílu na obr. 4 (Živa 2016, 4 a také na webové stránce Živy).

Pro rychlé ověření pluripotence lze použít barvení kolonií buněk na přítomnost alkalické fosfatázy (AP) – enzymu, který je pro iPS buňky a ESC typický. Klasické barvení na alkalickou fosfatázu označí nediferencované buňky (iPSC, ESC) do červena. Nevýhodou je, že tato metoda buňky usmrtí. Byly proto vyvinuty netoxické fluorescenční substráty, které umožňují stanovit aktivitu fosfatázy v živých buňkách. Barvení lze díky tomu využít v krátké době po reprogramování pro selekci úspěšně reprogramovaných buněk.

Epigenetika

Kromě vlastní genetické informace zakódované v posloupnosti nukleotidů v DNA existuje ještě epigenetická informace, která ovlivňuje, jak se geny projevují (o epigenetice viz např. Živa 2014, 6: 269–270). Příkladem epigenetické informace je metylace DNA (báze cytozin) a metylace či acetylace histonů – proteinů, kolem nichž je DNA sbalena. Většina tělních buněk obsahuje stejnou genetickou informaci jako embryo nebo iPS buňky a ESC, ale epigenetická regulace určuje, které geny budou v buňkách aktivní, a tak rozhoduje o jejich fenotypu. Protože ze zygoty vznikají všechny buňky organismu, musejí se tyto epigenetické znaky během embryogeneze „resetovat“ (navrátit do původního stavu). Obdobně musí k tomuto epigenetickému resetu dojít během reprogramování tělních buněk do iPSC. Ne vždy ale proběhne dokonale, a tak se někdy mezi epigenetickými značkami



článku) a aktivaci stejných faktorů ve vlastním genomu buňky. Tento přechod z exprese ektopických transkripčních faktorů na TF vlastní buňce znamená jeden ze znaků úspěšně ukončeného reprogramování.

Molekulárními metodami můžeme také ověřit schopnost diferenciace do všech tří zárodečných vrstev, a to identifikací aktivity genů typických pro jednotlivé vrstvy.

Před jakýmkoli praktickým použitím iPS buněk je rovněž důležité stanovit jejich karyotyp. Udává přesný počet, tvar a velikost chromozomů v jádře buňky, specifický pro daný druh. Normální buňky mají dvě kopie každého chromozomu kromě pohlavních. U buněk kultivovaných *in vitro* často dochází k výskytu aneuploidií i polyploidií, kdy se ztratí, nebo naopak zmnoží jednotlivé chromozomy, někdy se zmnoží i celé chromozomové sady. Změnou počtu chromozomů dochází ke genomové nestabilitě, proto musí být stanoven karyotyp a lze využít pouze buňky se správnou sadou chromozomů. Příkladem u člověka je Downův syndrom, kdy místo dvou chromozomů 21 jsou tři (trizomie chromozomu 21).

Funkční hodnocení pluripotence

Charakterizace iPS buněk z hlediska jejich diferenciálního potenciálu je nejpřísnějším hodnocením pluripotence. Buňky lze diferencovat v kultivačních podmínkách *in vitro* nebo *in vivo*.

● Embryoidní tělíska (*in vitro*)

Schopnost iPS buněk a ESC diferencovat do všech tří zárodečných vrstev, a tedy jejich pluripotenci lze v podmínkách *in vitro* nejsnadněji ověřit pomocí tvorby embryoidních tělísek. Kolonie buněk se místo na podpůrnou vrstvu myších fibroblastů vysadí na povrch, který zabrání jejich přichycení. Navíc se původní médium, které je udržovalo v nediferencovaném stavu (LIF pro miPSC, FGF a aktiviny pro hiPSC) vymění za médium obsahující krevní sérum, jež vyvolává diferenciaci. Přibližně po týdenní kultivaci v těchto podmínkách se buňky shluknou do kulatých mnohobuněčných útvarů, připomínajících časné stadium embryonálního vývoje. Proto se těmto útvarům říká embryoidní tělíska. Diferenciace buněk v embryoidním tělísku do jednotlivých zárodečných vrstev se hodnotí výše popsanými molekulárními metodami – např. se pomocí qRT-PCR stanoví exprese znaků ektodermu (neurofilament 68kD), mezodermu (β -globin) a endodermu (α -fetoprotein). V diferenciaci buněk lze také pokračovat. Embryoidní tělíska se přenesou na misky potažené želatinou a dále se kultivují. Z tělísek po přisednutí na kultivační povrch migrují buňky do okolí. Na takto pěstovaných buňkách lze hodnotit morfologii a opět přispění do tří zárodečných vrstev, např. imunocytochemickým barvením.

● Cílená diferenciace iPS buněk (*in vitro*)

Diferenciace buněk v rámci embryoidních tělísek je necílená a probíhá víceméně náhodně. Proto se hodí pouze pro ověření diferenciálního potenciálu buněk. Postupně tak bylo vyvinuto mnoho protokolů pro cílenou diferenciaci iPS buněk do konkrétní požadované populace. Často jde o poměrně komplikované metody, kde se buňky postupně kultivují v médiích doplněných

o různé růstové faktory. Relativně snadná je diferenciace iPS buněk do kardiomyocytů. Už po dvou týdnech kultivace lze pozorovat shluky buněk, které spontánně bijí (www.youtube.com/watch?v=p-nOVDDA-vUo, obr. 3A). Také do prekurzorů nervových buněk jsme schopni diferencovat iPS buňky poměrně jednoduše a rychle, zhruba během dvou týdnů. Vytvoření dospělých neuronů požadovaného typu ale naopak patří k nejnáročnějším diferenciálním protokolům a trvá několik měsíců.

● Tvorba teratomů (*in vivo*)

Jednoduchým *in vivo* testem pluripotence iPS buněk je tvorba teratomu. Buňky se injikují do podkoží na stranu hrbetu imunodeficientním myším (s potlačeným imunitním systémem). Během tří týdnů až dvou měsíců se v místě vpichu začnou spontánně tvořit teratomy. Jako teratomy označujeme nádory, které obsahují směs nediferencovaných buněk a tkání všech tří zárodečných vrstev. Nádory jsou chirurgicky odnаты a fixovány v 4% paraformaldehydu. Následně se vzorky zalijí do parafínu a je na nich provedena histologická analýza barvením hematoxylinem a eozinem, případně imunohistochemický test pro specifické znaky. Na základě histologické analýzy by měly být prokázány tkáně všech tří zárodečných vrstev a neměla by se zde vyskytovat tkáň trofoblastu, vnější vrstvy buněk obklopující embryo ve stadiu blastocysty (slouží k výživě, vzniká z něj placenta; obr. 3B).

● Chimérické myši (*in vivo*)

Zda jsou iPS buňky schopny přispívat k normálnímu vývoji všech tkání, lze hodnotit na základě schopnosti tvorby chimérických myší. Za pomoci mikromanipulační techniky se injikuje malé množství pluripotentních buněk (10 až 20) do raného embrya ve stadiu moruly nebo blastocysty. Pokud byly buňky předem fluorescenčně značeny, můžeme identifikovat jejich přispění do formující se blastocysty pod mikroskopem. Blastocysty obsahující iPS buňky se pak přenesou do dělohy náhradní matky a ve stanoveném stadiu je možné buď izolovat plody a pozorovat je pod fluorescenčním mikroskopem, nebo nechat myši z přenesených embryí narodit a studovat je jako dospělé. Protože vnesené buňky

v chimérickém organismu většinou přispějí jen do několika tkání, je pro potvrzení diferenciálního potenciálu iPS buněk potřeba hodnotit větší počet zvířat. Pokud se vnesené buňky začlení do zárodečné linie, odpovídá potomstvo geneticky vneseným iPS buňkám a ne původní blastocystě (obr. 3C). Chiméry se dají vytvářet i mezidruhově, např. přenosem krysích iPSC (rat, riPSC) do myší blastocysty. Takto se podařilo vytvořit živou myš s krysími buňkami ve varleti, a tedy s krysí zárodečnou linií.

● Tetraploidní komplementace (*in vivo*)

Tato metoda patří mezi nejpřísnější testy prokázání pluripotence iPS buněk. Poskytuje důkaz, že jsou iPS buňky stejně kompetentní jako ESC. Buňky normálního diploidního embrya v dvoubuněčném stadiu se pomocí elektrofúze spojí a vzniká jednobuněčné tetraploidní embryo, schopné normálního vývoje do stadia blastocysty. Jeho plný vývoj u savců není možný. Ve stadiu blastocysty se do embrya aplikují mikroinjekcí normální diploidní iPS buňky. Tetraploidní buňky původní blastocysty mohou vytvořit extraembryonální tkáň (u nich polyploidie nevedí), ale vlastní embryo je složeno výhradně z vnesených diploidních iPS buněk. U myšího modelu se úspěšnost tetraploidní komplementace končící narozením mláďat pohybuje kolem 1–3,5 %, ve většině případů však s krátkou dobou přežití (obr. 3D).

Závěrečný díl věnujeme možností praktického využití iPS buněk v medicíně.

Výzkum financuje Národní program udržitelnosti Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (č. LO1609).

4 Embryoidní tělíska připravená z prasečích iPS buněk. Buňky jsou ve formě jednobuněčné suspenze umístěny na neadhezivní umělé hmotě a vytvoří plovoucí kulovité shluky (šipky), v rámci nichž spontánně diferencují.

5 Embryoidní tělíska po 14 dnech v plovoucí kultuře vysazená na kultivační povrch, kde dochází k další neřízené diferenciaci. V levém dolním rohu oblast původního tělíška, z níž vyrůstají diferencující buňky, včetně nervových (dlouhá vlákna – viz šipky). Snímky P. Vodičky

