

# Buňky s velkým potenciálem

## 1. Historie indukované pluripotence a metody přípravy iPS buněk

Indukované pluripotentní buňky (iPSC, induced Pluripotent Stem Cells) jsou nespecializované (nediferencované) buňky, které jsou schopny neomezeného dělení. Za pomoci specifických transkripčních faktorů (Oct4, Sox2, Klf4 a c-Myc) vnesených do buňky se jakákoli plně diferencovaná somatická buňka dospělého těla savců může přeměnit na buňku indukovanou pluripotentní. Tento proces návratu ve vývoji buňky od plně specializované zpět na nediferencovanou nazýváme reprogramování. Díky němu jsou iPSC molekulárně i funkčně velmi podobné embryonálním kmenovým buňkám (ESC, Embryonic Stem Cells). Stejně jako ESC mají schopnost dát vzniknout všem třem zárodečným vrstvám – ektodermu, mezodermu a endodermu. Tím by odpadla kontroverzní otázka využití lidských embryí pro tvorbu kmenových buněk v lékařství. Po přidání specifických faktorů do kulturního média mohou iPSC vytvářet všechny typy buněk, kterých u člověka existuje něco kolem 200. Velkou výhodou v praktickém využití iPSC je snadná dostupnost pro reprogramování, dají se izolovat přímo z krve nebo kůže člověka. Vytvoření těchto buněk „na míru“ pro každého pacienta umožní autologní transplantaci (transplantaci vlastních buněk) a vyhnout se problémům s hledáním vhodného dárce se shodnými imunologickými parametry. S ohledem na uvedené vlastnosti by iPSC mohly mít v budoucnu významné zastoupení v regenerativní medicíně jako náhrada buněk a tkání. Využitím reprogramovaných buněk u různých typů onemocnění a jejich přípravou rozdílnými technikami reprogramování se již zabýval článek J. Klímy (Živa 2016, 1: 7–9).

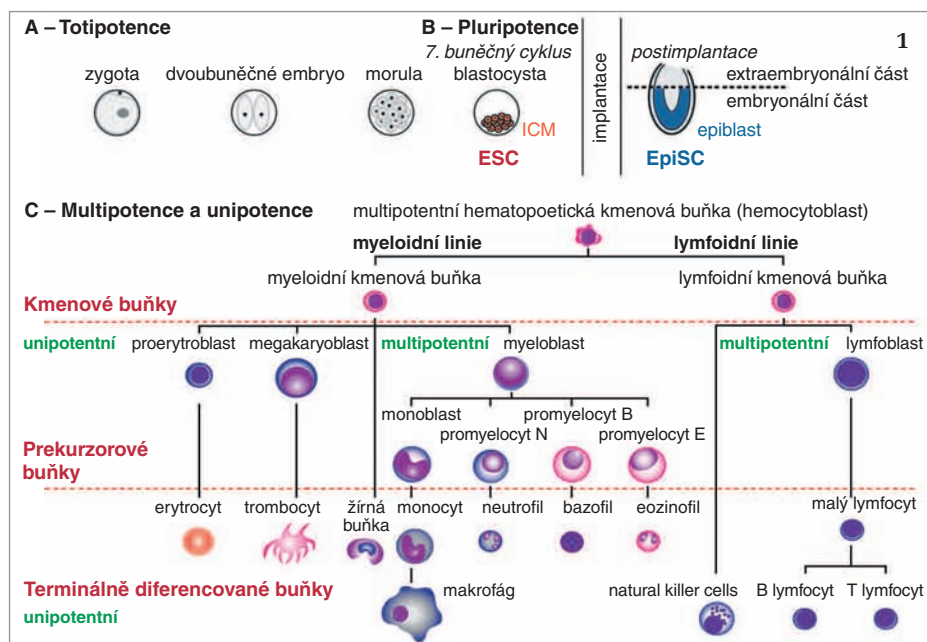
**Buňky z hlediska vývojového potenciálu**  
Organismus mnohobuněčných živočichů se skládá z velkého počtu různých typů buněk, jež se navzájem liší tvarem, funkcí, ale i svým původem a dalším vývojovým potenciálem. Většinu buněk dospělého mnohobuněčného živočicha tvoří terminálně

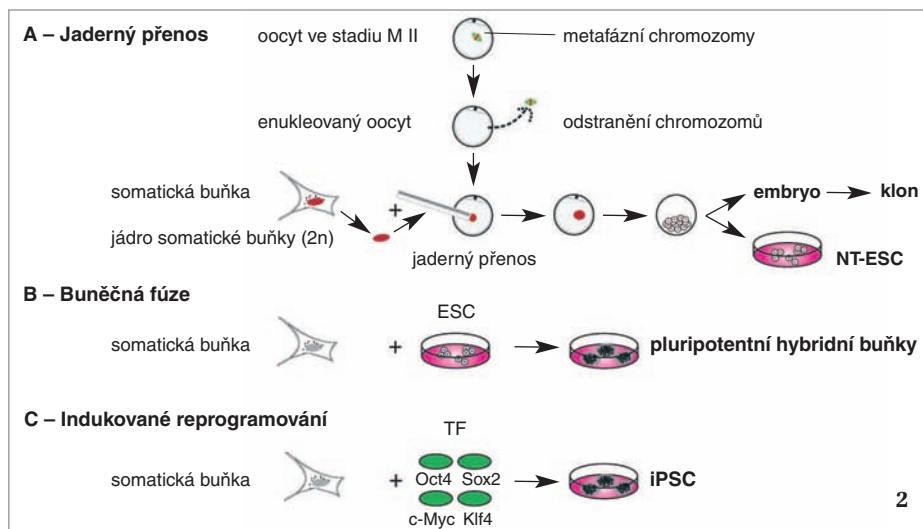
diferencované buňky, které plní konkrétní specializovanou funkci, a i když jsou někdy schopné se dělit, nevznikají z nich už buňky jiného typu. Krevní buňky, neuro-ny, kožní nebo svalové buňky představují jen několik příkladů z mnoha. Buňky, které ještě neprošly terminální diferenciací,

se označují jako buňky kmenové nebo prekurzory. Rozdíl spočívá v tom, že kmenové buňky jsou schopny sebeobnovy a expanze (zmnožení buněčné populace), zatímco prekurzory nemají schopnost sebeobnovy a mohou dát vzniknout jen diferencovanějším buňkám, než jsou samy, nebo buňkám terminálně diferencovaným (obr. 1C).

Nediferencované buňky dělíme podle vývojového potenciálu na totipotentní, pluri-, multi- a unipotentní. Totipotentní buňkou je zygota a blastomery raného embrya, z nichž může vzniknout embryo a extraembryonální tkáň. V průběhu raného vývoje embrya buňky začínají postupně ztrácet totipotenci a stávají se pluripotentními (obr. 1A). Pluripotence znamená schopnost diferencovat do mnoha buněčných typů všech tří výše uvedených zárodečných vrstev embrya. U myši k tomu dochází v průběhu pátého buněčného cyklu. Během 7. buněčného cyklu můžeme v myši blastocystě identifikovat skupinu plně pluripotentních buněk, z nichž později vznikají všechny tkáně organismu. Tato skupina se označuje jako embryoblast nebo vnitřní masa buněk (ICM, Inner Cell Mass) a právě z ní jsou odvozeny embryonální kmenové buňky. ESC mají schopnost dát vznik všem třem zárodečným vrstvám a částečně přispívají k extraembryonální tkáni, tedy např.

1 Vývojový potenciál buněk. Totipotence (A) znamená schopnost vytvořit všechny buněčné typy organismu, ale také extraembryonální tkáň – např. embryonálních obalů nebo části placenty. U savců je totipotentní pouze zygota (oplozené vajíčko) a blastomery během několika prvních buněčných dělení. Pluripotencí (B) nazýváme schopnost diferencovat v buňky všech tří zárodečných vrstev (ektodermu, mezodermu a endodermu). Ve stadiu blastocysty již embryo není totipotentní, ale ve vnitřní mase buněk (ICM, Inner Cell Mass; značené oranžově) se nacházejí pluripotentní buňky, z nichž později vzniknou všechny tkáně vlastního embrya. Z buněk ICM byly kultivací *in vitro* odvozeny embryonální kmenové buňky (ESC, Embryonic Stem Cells). Z epiblastu, specifické části embrya po implantaci (modře značené) byly podobně odvozeny pluripotentní epiblastové kmenové buňky (EpiSC, Epiblast Stem Cells). Příklad multipotence a unipotence (C). Z multipotentní hematopoetické kmenové buňky během procesu křetvorby (hematopoézy) vznikají dvě linie, myeloidní a lymfoidní. Z myeloidních a lymfoidních kmenových buněk jsou dále odvozeny prekurzorové buňky, z těch vznikají pouze diferencovanější buňky, další prekurzory nebo terminálně diferencované buňky. Prekurzorové buňky mohou být multipotentní a unipotentní. Multipotentní buňky přispívají k několika typům terminálně diferencovaných buněk. Jde o myeloblast – multipotentní prekurzor, z něhož vycházejí různé druhy bílých krvinek – monocyt, neutrofilní, bazofilní a eozinofilní granulocyty, a lymfoblast, jako prekurzor T a B lymfocytů. Unipotentní prekurzory vytvářejí vždy pouze jeden buněčný typ – proerytoblast je předchůdcem červených krvinek (erytrocytů) a megakaryoblast krevních destiček (trombocytů).





2 Reprogramování buněk. Metoda jaderného přenosu (A) – z oocyty ve stadiu metafáze II (M II) jsou odstraněny metafázní chromozomy (proces enukleace) a naopak vneseno jádro z terminálně diferencované buňky (unipotentní). Vzniklé embryo můžeme nechat dále vyvíjet *in vitro* do stadia blastocysty a z její ICM kultivovat NT-ESC (NT – Nuclear Transfer; embryonální kmenové buňky po jaderném přenosu). Také lze přenést vzniklé embryo do dělohy náhradní matky a nechat narodit klon. Při buněčné fúzi (B) po spojení somatických buněk s buňkami embryonálními vznikne pluripotentní hybridní linie. Indukované reprogramování (C) znamená, že somatická buňka je reprogramována pomocí vnesení transkripčních faktorů (TF) za vzniku indukovaných pluripotentních buněk (iPSC).

embryonálním obalům a částečně placentě. Pluripotence byla potvrzena i u několika dalších typů kmenových buněk. Epiblastové kmenové buňky (EpiSC, Epiblast Stem Cells) jsou odvozené z buněk epiblastu – jedné ze dvou buněčných vrstev, která diferencuje z ICM po implantaci embrya (viz obr. 1B). Pluripotentní jsou také některé kmenové buňky reprodukčních orgánů, např. primordiální zárodečné buňky a postnatální spermatogoniální kmenové buňky (MaGSC – Multipotent adult Germ-line Stem Cells, ES-like buňky).

V pozdějších stádiích embryonálního vývoje se některé buňky stávají multipotentními a jiné unipotentními (např. hematopoetické kmenové buňky, obr. 1C).

Přísná regulace buněčného osudu je pro mnohobuněčné organismy důležitá a její poruchy mohou vést k velmi vážným následkům, např. ke zhoubnému bujení. Dlouhou dobu proto převládá názor, že vývoj od buněk kmenových k diferencovaným je nevratný. Z terminálně diferencované buňky může vzejít jen další buňka stejného typu, z multipotentní kmenové buňky krvetvorby nemůže např. nikdy vzniknout neuron. Během experimentů *in vitro* však byly postupně nalezeny podmínky pro epigenetické reprogramování i plně diferencovaných buněk zpět ve vývojové potenci.

### Metody reprogramování buněk

Reprogramování buněk lze provést několika způsoby. Jde o jaderný přenos (klonování),

buněčnou fúzi a navozenou – indukovanou pluripotenci. V 50. letech 20. stol. se rozvinula metoda jaderného přenosu, pomocí které je jádro z buňky embrya a později i z plně diferencované (unipotentní) buňky přeneseno do enukleovaného oocyty (oocyt, z něhož bylo odstraněno jádro nebo chromozomy, obr. 2A).

První pokus, který provedli Robert Briggs a Thomas J. King (1952) z Institute for Cancer Research and Lankenau Research Institute ve Filadelfii (USA), se týkal jádra pozdní blastuly, přeneseného do enukleovaného žabího oocyty. Embryo se dále dělilo a vyvinulo se do stadia pulce. V r. 1962 Sir John B. Gurdon uskutečnil první jaderný přenos plně diferencované buňky epitelu tenkého střeva drápatky vodní (*Xenopus laevis*) do enukleovaného oocyty. I zde následoval vývoj až do stadia pulce. Velký úspěch zaznamenali vědci z Roslin Institute univerzity v Edinburgu, kde se po přenosu jader embryonální buněčné linie narodila jehňata Megan a Morag – první savčí klony (Campbell a kol. 1996). Rok na to na stejném pracovišti vytvořili první savčí klon z jádra dospělé buňky, ovci Dolly, když do enukleovaného oocyty přenesli jádro plně diferencované buňky mléčné žlázy (Wilmut a kol. 1997). Postup přenosu jádra buňky dospělého organismu (SCNT, Somatic Cell Nuclear Transfer) do oocyty byl postupně úspěšně využit ke klonování dalších savců – skotu, prasete, kočky, psa nebo myši. Embryo vzniklé v podmínkách *in vitro* můžeme nechat vyvíjet do stadia blastocysty a z její ICM kultivovat embryonální kmenové buňky po jaderném přenosu (NT-ESC). NT-ESC mohou sloužit ke studiu vývojové potence, k charakterizaci mezi ESC a NT-ESC na molekulární úrovni a hodnocení na základě funkčních vlastností.

Mezi další reprogramovací techniky patří buněčná fúze, během níž dochází ke spojení somatické buňky s buňkami embryonálními. Vznikne hybridní linie, která nese všechny znaky pluripotence (obr. 2B).

### Indukovaná pluripotence

Velký zlom ve výzkumu reprogramování nastal v r. 2006, kdy v japonském Kjótu K. Takahashi a S. Yamanaka vytvořili první indukované pluripotentní buňky (iPSC). Plně diferencované fibroblasty z dospělých myši byly reprogramovány pomocí ektopické exprese čtyř transkripčních fak-

torů (TF; exprese genů, které se v dané tkáni normálně neprojevují), které byly vneseny do buňky pomocí retrovirových vektorů (dále v textu). Ektopické transkripční faktory (OSKM – kód odpovídající počátečním písmenům názvů TF uvedených dále v tab. 1) v průběhu reprogramování umlčují geny spojené s diferenciací a postupně dochází k aktivaci genů vedoucích k pluripotenci. Během tohoto procesu musí somatická buňka projít výraznými transkripčními a epigenetickými změnami (např. Živa 2014, 6: 269–270) na mnoha úrovních, které zahrnují histonové modifikace (acetylace, metylace, ubikvitinace a fosforylace histonů – bílkovin tvořících komplexy s DNA v chromatinu), metylaci DNA a další změny chromatinu. Důležitou roli zastává i genová regulace pomocí RNA nekódujících proteiny: microRNA (miRNA) a dlouhých nekódujících RNA (long non-coding RNA, lncRNA). Reprogramování trvá přibližně 14 dnů.

Plně diferencovaná buňka se nakonec stává pluripotentní, morfologicky i funkčně podobnou embryonálním kmenovým buňkám (obr. 2C). První iPSC byly podobné jako ESC schopné sebeobnovy a přispívaly do všech tří zárodečných vrstev. Tento objev vzbudil obrovský zájem a najednou se mnoho laboratoří pokoušelo vytvořit iPSC. Postupně se začaly hledat účinnější a bezpečnější metody reprogramování. Původní metodika Shinya Yamanaky zahrnuje použití transkripčních faktorů, které mohou působit jako onkogeny a spouštět tvorbu nádorů. Navíc byly TF vneseny do buněk pomocí integrujících virových vektorů (viz dále), což může vést k přerušení důležité genetické informace, opět s rizikem vzniku zhoubného bujení nebo jiné vážné poruchy. Mnoho vylepšení původní metodiky zahrnuje doručení TF takovým způsobem, jenž nevede k integraci do genomu a náhradě onkogenních transkripčních faktorů (Živa 2016, 1: 7–9).

### Tvorba iPSC

Pokud chceme vytvořit iPSC, musíme si nejprve ujasnit několik náležitostí. Je nutné vybrat ektopické transkripční faktory nebo jejich náhradu, a stanovit metodu, která TF doručí na místo. Zda chceme účinnější virové vektory, které se integrují do genomu, nebo raději použijeme metodu bez integrace i za cenu nižší účinnosti. Důležitý je výběr typu buněk, které budeme reprogramovat, protože určité buněčné typy exprimují některé z TF i v diferencovaném stavu. Podle typu použitých buněk se pak definují počáteční podmínky kultivace. Dále se musíme rozhodnout, jak ověříme úspěšné reprogramování buněk (obr. 5).

### Transkripční faktory

Šest transkripčních faktorů (OSKMNL – počáteční písmena názvů TF, viz tab. 1) hraje významnou roli během embryogeneze a jejich ektopická exprese umožňuje reprogramování somatických buněk do iPSC (obr. 5A). Popis funkce jednotlivých faktorů je uveden rovněž v tab. 1.

Souhrnně lze říct, že Oct4, Nanog a Sox2 jsou klíčové faktory požadované pro raný embryonální vývoj, identitu ESC, sebeobnovu a udržení pluripotence, zatímco Klf4 a c-Myc jsou obecněji regulátory

buněčného růstu s onkogenním potenciálem. Při reprogramování lidských somatických buněk proto byly nahrazeny faktory Lin28 a Nanog.

Výběr ektopických transkripčních faktorů pro reprogramování úzce souvisí s typem buněk, které chceme změnit. Např. nervové progenitorové buňky exprimují ve větším množství endogenní Sox2 a c-Myc, proto se povedlo vytvořit iPSC z nervových buněk jen pomocí kombinace dvou exogenních faktorů Oct4/Klf4 nebo c-Myc/Oct4. Důležité pro účinnost reprogramování je i určité množství TF. Bylo prokázáno, že nejlepších výsledků s transkripčními faktory (OSKM) se dosahuje při stejném zastoupení všech TF nebo při trojnásobném podílu Oct4 oproti ostatním TF.

### Metody doručení transkripčních faktorů do buněk

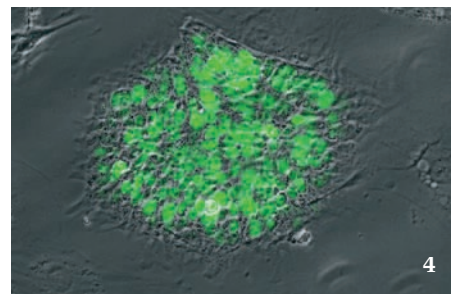
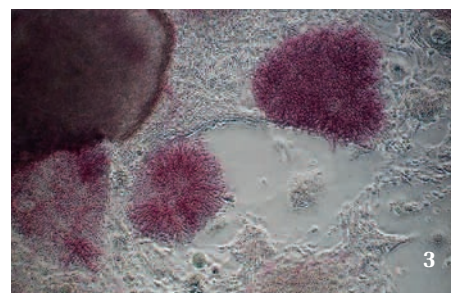
Ektopické TF se do buňky mohou dostat různými způsoby. Mezi nejčastěji používané patří RNA virové vektory odvozené od čeledi *Retroviridae*, konkrétně retrovirový a lentivirový vektor (o retrovirech a jejich využití např. Živa 2015, 3: 101–106; 2007, 5: 236–237 a 2006, 1: 6–8). Retroviry nesou dvě kopie jednořetězcové (single stranded) ssRNA+, které v cytoplazmě podstoupí reverzní transkripci (RNA na komplementární cDNA) a po vniknutí do jádra se virová DNA pomocí enzymu integráry začlení do hostitelského genomu. Retrovirové vektory se integrují pouze do dělicích se buněk a ve větším rozsahu se začleňují na specifická místa v blízkosti startu transkripce RNA (promotorové oblasti). Lentivirové vektory se integrují i do nedělicích se buněk, proto často slouží k transdukcii (vnesení cizorodé genetické

informace do buňky pomocí viru nebo umělého virového vektoru) buněk, jako jsou např. neurocyty, svalové buňky nebo makrofágy. Retrovirovým vektorem byly vytvořeny první iPSC. Následně se podařilo vytvořit pomocí TF (OSKM) a retrovirového vektoru lidské (human) iPSC z kožních fibroblastů. Další lidské hiPSC byly reprogramovány kombinací TF (Oct4, Sox2, Lin28 a Nanog) a lentivirového vektoru. Retrovirové a lentivirové vektory mají oproti jiným metodám vysokou účinnost. Jejich nevýhodou je, že se stanou součástí genomu a mohou zvýšit riziko tvorby nádorů vlivem spontánní reaktivace virové transgeneze. Kvůli tomuto potenciálnímu riziku se hledaly další způsoby vnesení transkripčních faktorů do buněk. Jde o metody, kdy buď dochází k integraci do genomu s možností následného odstranění vložené sekvence (odstranitelné vektory), nebo se TF do genomu neintegrují vůbec. Výsledkem jsou iPSC bez trvalé genetické modifikace. Metody k jejich přípravě můžeme rozdělit do tří skupin (obr. 5B):

#### ● Odstranitelné vektory

Mezi integrující vektory, které lze následně z genomu odstranit, můžeme zařadit CRE/loxP systém a transpozony. CRE/loxP systém odstraňuje transgenetické sekvence z genomu pomocí Cre rekombinázy. Po odstranění se mohou vyskytnout inzertní mutace a zbytková exprese transgenů. Pomocí CRE/loxP systému byly reprogramovány myši a lidské fibroblasty za použití kombinovaného expresního vektoru kódujícího TF OSKM a ten byl posléze z vytvořených iPSC kompletně vyjmut.

Transpozony fungují na specifickém mechanismu „vystřížení a vložení“. Mají vy-



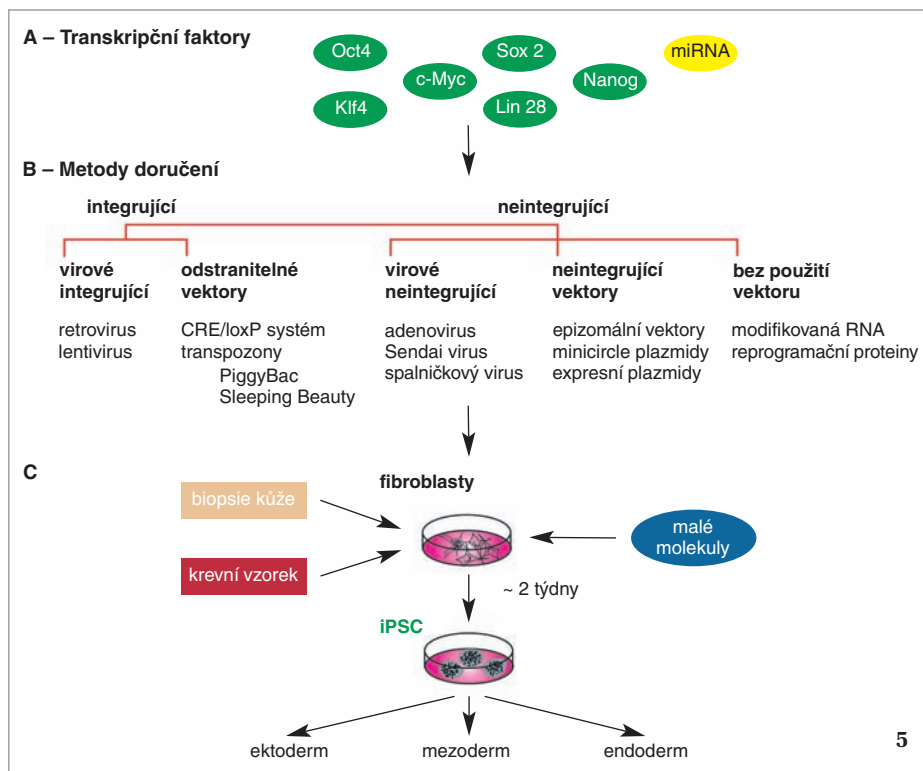
**3** Kolonie iPSC se vyznačují přítomností enzymu alkalická fosfatáza a barví se červeně. Diferencované buňky, z nichž jsou iPSC odvozeny, tento enzym neexprimují a zůstávají bez zabarvení.

**4** Kolonie prasečích iPSC odvozených reprogramováním transkripčními faktory Oct4 (exprese zeleně), Klf4 a c-Myc (viz tab. 1). Foto P. Vodička (obr. 3 a 4)

sokou účinnost a velkou kapacitu. Do této skupiny patří PiggyBac a Sleeping Beauty transpozony. PiggyBac se začleňuje do cílových míst s TTA nuleotidovou sekvencí na chromozomu. Vložení i vystřížení je provedeno enzymem transpozázou, která rozpozná specifickou obrácenou repetitiv-

**Tab. 1** Transkripční faktory (TF) zastávající důležitou úlohu během embryogeneze. Jejich exprese v tkáni, kde se normálně neprojevují, umožňuje reprogramování somatických buněk do indukovaných pluripotentních buněk (iPSC).

Zkratka	Název proteinu (TF)	Přirozená exprese a funkce	Úloha při reprogramování
Oct4 (O)	Octamer-binding transcription factor 4, nazývaný také Pou5f1 (Pou domain, class 5, transcription factor 1)	Neoplozené oocyty, embryonální kmenové buňky (ESC) a primordiální buňky; exprimuje se během maternálního (oocytárního) vývoje.	Význam pro vývoj a udržení pluripotence v podmínkách <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> . Embrya bez Oct4 se vyvinou do stadia blastocysty, ale buňky vnitřní masy buněk (ICM) ztrácejí schopnost pluripotence.
Sox2 (S)	SRY (Sex 39 determining region Y)-box 2 containing gene	Pracuje společně s Oct4 – regulují důležité geny zahrnuté v sebeobnově a udržení pluripotence.	Spolu s Oct 4 a Nanog je podstatný pro zachování pluripotence embryonálních kmenových buněk.
Klf4 (K)	Krüppel-like factor 4	Regulátor mnoha buněčných dějů, má významnou úlohu v kontrole genetické stability.	Pro reprogramování a ustanovení iPSC je kritická přímá interakce s Oct4 a Sox2. Reprogramováním myších fibroblastů pomocí OSK vzniknou iPSC funkčně i morfologicky nerozeznatelné od reprogramování pomocí OSKM, ale proces je značně pomalejší. Jeho vnesením do buněk však hrozí riziko vzniku nádorů (představuje onkogen).
c-Myc (M)	homolog virového onkogenu ptačí myelocytomatózy (avian myelocytomatosis viral oncogene homolog)	Buněčný regulátor růstu a proliferace.	Několik dní na začátku reprogramování výrazně zlepšuje růst buněk a urychluje proces, zároveň je důležitý pro normální průběh metylace histonů. Patří také mezi onkogeny.
Lin28 (L)		Selektivně se váže k pre-let-7 miRNA a inhibuje její expresi v embryonálních buňkách.	Blokováním let-7 miRNA jako jednoho z důležitých regulátorů diferenciace kmenových buněk pomáhá udržet buňky v nediferencovaném stavu.
Nanog (N)		Přítomen v raném embryu ve stadiu kompaktní moruly (kulovitého shluku buněk před vznikem blastocysty), a v buňkách ICM. Po implantaci embrya se množství mRNA Nanogu snižuje. U člověka a myši je v pluripotentních buněčných liniích, během diferenciace jeho množství výrazně klesá a chybí v diferencovaných buňkách.	Nezbytný pro udržení pluripotence v ESC. Zvýšená tvorba Nanog umožňuje sebeobnovu ESC bez závislosti na vnějším dodání růstových faktorů LIF (Leukemia Inhibitory Factor) a BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) do kultivačního média. LIF a BMP4 jsou cytokiny běžně používané ke kultivaci ES buněk v nediferencovaném stavu. Buňky bez faktoru Nanog mohou překonat reprogramovací blok díky přítomnosti vitamínu C.



5 Tvorba indukovaných pluripotentních buněk. K reprogramování somatických buněk (A) se používají specifické transkripční faktory Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog a Lin28 (OSKMNL – tab. 1) a malé nekódující RNA (microRNA – miRNA) důležité pro epigenetickou regulaci buněčného genomu (blíže v textu). Geny pro transkripční faktory a miRNA mohou být doručeny do buněk několika způsoby (B). Metody doručení dělíme na integrující a neintegrující do hostitelského genomu. Do první skupiny patří integrující virové vektory a metody, které geny vkládají, ale následně je lze z genomu vystříhnout. Do metod neintegrujících náleží viry a vektory, které se nepotřebují začlenit do hostitelského genomu, a reprogramování s využitím mediátorové RNA (mRNA) a proteinů. Somatické buňky lze snadno získat z krevního vzorku nebo biopsi kůže (C). Fibroblasty z biopsi kůže jsou epigeneticky reprogramovány TF a miRNA. Reprogramování můžeme podpořit přidáním malých molekul (např. vitamínem C nebo inhibitorem GSK3-beta kinázy) do kultivačního média. Celý proces trvá přibližně dva týdny a vznikají iPSC se schopností přispívat do všech zárodečných tkání (ektoderm, mezoderm a endoderm) a jsou tedy pluripotentní stejně jako embryonální kmenové buňky. Orig.: K. Vodičková Kepková

ni sekvenci na koncích transpozónů (ITR, Inverted Terminal Repeat), umožní pohyb jakékoli sekvence mezi ITR a integrací do TTAA specifických míst. Mezi ITR jsou vloženy transkripční faktory, jež chceme dostat do genomu. Po reprogramování můžeme v buňce znovu exprimovat transpozázou a TF jsou z genomu vystříženy bez inzerce nebo stop mutace v hostitelském genomu. Sleeping Beauty (SB) transpozázou se jako enzym váže na IR/DR (Inverted Repeat/Direct Repeat) místa a vkládá transpozónovou sekvenci do TA míst v genomu.

I Sleeping Beauty transpozázou umožňují vystřížení vloženého transpozónu, ale TA místo zůstane v sekvenci zdvojené (značka transpozice). Pomocí SB byly vytvořeny prasečí iPSC z primárních fibroblastů Oct4-EGFP transgenických prasat.

#### ● Neintegrující virové vektory

Tyto vektory jsou odvozeny z virů, které pro svou normální funkci nepotřebují začlenění do genomu hostitelské buňky (např. adenovirus, Sendai virus a virus spalniček). Adenovirový vektor byl použit k reprogramování buněk kůže a jater myši s velmi malou účinností. Adenovirus má však dsDNA (dvouřetězcovou – double stranded DNA) genom, a tak může přece jen integrovat vlastní geny do buněčné DNA, i když s velmi nízkou frekvencí. Další dva virové vektory pocházejí z RNA virů. Výhodu přináší jejich replikace v cytoplazmě, bez rizika začlenění do genomu. Sendai RNA virový vektor může být vylepšen teplotně senzitivní mutací pro snazší odstranění virového materiálu z buňky. Tato metoda posloužila k vytvoření lidských iPSC z fibroblastů a CD34<sup>+</sup> krevních buněk (přítomnost proteinu CD34 je znakem některých somatických kmenových buněk). Možné se jeví i uplatnění spalničkového viru jako vektoru. Spalničkový vektor s Oct4 dohromady s lentivirovým vektorem, který nesl TF (SKM), vedl k úspěšnému jadernému reprogramování. Použitý spalničkový vektor byl odvozený od běžného vakcinačního kmene. Vzhledem k proočkování populace se jeví jako potenciálně vhodný pro reprogramování lidských buněk (Driscoll a kol. 2015) bez rizika úniku modifikovaného viru do běžné populace.

#### ● Ostatní neintegrující vektory

Mezi neintegrující vektory patří také epizomální a minicircle plazmidy („miniaturní kruhové vektory“). Epizomální plazmidy obsahují geny *oriP* a *EBNA1* z viru Epstein-Barrové (lidský herpesvirus způ-

sobující mimo jiné infekční mononukleózu). Tyto geny umožňují plazmidu udržet se v buňce potřebnou dobu bez začlenění do jejího genomu. I tak se ale vektor postupně během dělení buňky vyředí, až se úplně ztratí. Pomocí epizomálních vektorů s TF byly vytvořeny iPSC bez exogenních genů. Minicircle vektory představují plazmidy minimální velikosti, nesoucí jen sekvenci vlastních TF bez bakteriální či virové DNA přítomné ve většině vektorů používaných v genomovém inženýrství. To zvyšuje účinnost jejich doručení do buňky a dobu přežití a exprese v buňce během reprogramování. Myši iPSC vytvořené pomocí plazmidů z velké části prokazují, že nedošlo k plazmidové integraci do genomu, ale jejich účinnost zůstává nižší než u retrovirové transdukcce.

#### ● Reprogramování bez použití vektorů

Nejbezpečnější metodou doručení transkripčních faktorů je obejít stadium integrace do DNA a dodat je ve formě mediátorové RNA (mRNA, RNA kódující protein) nebo proteinu. Tímto způsobem se zcela vyloučí riziko jejich trvalého začlenění do genomu. Problém při využití mRNA znamená její velmi krátká životnost v buňce, nedostatečná k plnému reprogramování. Reprogramování se zdařilo pomocí synteticky modifikované a stabilizované mRNA. Aby mRNA mohla proniknout do buňky, je nutná elektroporace (vytvoření pórů v membráně působením elektrického pulzu) nebo použití komplexu RNA s kationty lipidů pro dosažení endocytózy. Savčí buňky se také brání vnesení cizorodé RNA, která bývá často znakem virové infekce, aktivací interferonové dráhy. Interferonovou signalizaci lze snížit úpravou mRNA. Vlastní efektor tvoří při reprogramování transkripční faktory ve formě proteinů, ale doručit dostatečné množství proteinu do každé buňky je mnohem složitější než vnesení nukleové kyseliny, ať už DNA, nebo RNA. Po přímém reprogramování doručeními proteiny (OSKM) byly vytvořeny lidské iPSC z fibroblastů. Dalším zlepšením této metody se stala fúze reprogramačních proteinů s buněčným penetrujícím peptidem (CPP, Cell Penetrating Peptide), který usnadní navázaným molekulám transport přes buněčnou membránu pomocí endocytózy.

Tyto systémy eliminují dvě rizika – nepotřebují virus a nehrozí u nich integrace do genomu. Proto se mohou jevit jako bezpečný zdroj pro vytvoření specifických iPSC pro konkrétní pacienty.

#### miRNA

Jako náhradu ektopických TF lze použít i microRNA (miRNA). Tyto krátké molekuly RNA nekódují žádný protein, ale přímo regulují expresi jiných genů (viz Živa 2008, 6: 243–246). Molekula miR302/367 ovlivňuje pluripotentní TF Oct4/Sox2 a má schopnost přímo reprogramovat somatické buňky do pluripotentního stavu bez přítomnosti transkripčních faktorů u myši a člověka. Linie miR302/367-iPSC se vyznačují podobnou charakteristikou na morfologické úrovni a expresí pluripotentních znaků jako klasické iPSC. Z hlediska funkční charakteristiky jsou schopné tvořit nádory (teratomy) a přispívají k tvorbě chimér a zárodečných linií.

Pomocí přímé transfekce miRNA byly vytvořeny iPSC z lidských a myších mezenchymových buněk tukové tkáně (ACS, Adipose Stromal Cell) a fibroblastů bez vektorů a genomové integrace.

### Malé molekuly

Transkripční faktory (jeden i více) mohou být nahrazeny malými molekulami, jak se obecně označuje skupina nízkomolekulárních látek inhibujících nebo aktivujících specifické signální dráhy. Část z nich hraje důležitou úlohu v udržení sebeobnovy a pluripotence, jiné mohou navodit diferenciaci (obr. 5C). Malé molekuly jsou cíleně zaměřené na dráhy, které regulují epigenetické reprogramační změny a buněčné procesy, mohou zesílit účinnost reprogramování nebo i plně nahradit některý z transkripčních faktorů. Při testování 16 malých molekul samostatně nebo v kombinaci na myších krevních progenitorech a myších embryonálních fibroblastech (MEF buňkách) během reprogramování pomocí čtyř TF (OSKM) bylo dosaženo nejlepších vý-

sledků za kombinace vitamínu C s inhibítorem kinázy GSK3-beta (Ascorbic acid + GSK3-beta inhibitor – AGI). Docházelo k rychlému, zvýšenému a synchronnímu formování iPSC. Myší iPSC byly také úspěšně vytvořeny za přítomnosti pouze jednoho faktoru Oct4 a směsi čtyř malých molekul (blíže Li a kol. 2011).

### Závěrem

Kmenové buňky přinášejí velkou naději pro regenerativní medicínu a buněčnou terapii. Indukované pluripotentní buňky lze vytvořit na míru každému pacientovi a vyhnout se tak transplantaci cizorodých buněk – jejich široký diferenciální potenciál umožňuje nahrazení mnoha buněčných typů. Pro úspěšné využití buněk k terapeutickým účelům ale musíme překonat ještě mnoho problémů. V tomto dílu jsme si pouze stručně popsali historii výzkumu indukované pluripotence a metody přípravy iPSC. K zaručení bezpečnosti buněk pro pacienta je nezbytné zajistit jejich plné reprogramování, zároveň se však vyhnout

trvalé genetické modifikaci, která by mohla vést k tvorbě nádoru. Jak bylo popsáno výše, účinnost reprogramování lze zařídit kombinací ektopických genů, využitím malých molekul nebo miRNA. Nové metody doručení reprogramačních faktorů dávají možnost vyhnout se trvalé modifikaci genomu a rizikům jejich dlouhodobé ektopické exprese.

Pro potvrzení, zda proběhlo reprogramování z unipotentního do pluripotentního stavu správně, je třeba buňky dále charakterizovat. Na charakterizaci iPSC a jejich praktické uplatnění nejen v základním výzkumu, ale i v oblasti aplikované farmakologie, a na možné využití v regenerativní medicíně se zaměříme v příštím dílu.

*Výzkum financuje Národní program udržitelnosti (Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy, č. LO1609) a Program interní podpory projektů mezinárodní spolupráce Akademie věd ČR (č. M200450971).*

Použitá literatura uvedena na webu Živy.

Pavel Pecháček

## Ultrafialový svět rostlin III. Neviditelná pestrost květů – evoluce a význam UV znaků

V druhé části seriálu (Živa 2016, 3: 107–110) jsme se zaměřili na různorodost v ultrafialové podobě některých našich nejnámějších druhů rostlin. Tím jsme však možnosti UV vzorů zdaleka nevyčerpali, jak ukazují zástupci dalších čeledí, vyobrazení v tomto článku. Třetím dílem seriál končí, pokusím se tedy na závěr zhodnotit, co nám UV fotografie rostlin ukazují a jak bychom mohli získané informace využít v budoucím výzkumu. Ultrafialové vzory na květech rostlin totiž nemusejí být důležité pouze ve vztahu k opylovačům, ale i z hlediska ochrany před škodlivými účinky UV záření.

Následující čeledi navazují na minulý díl, který jsme ukončili mákovitými (*Papaveraceae*). Fotografované rostliny byly sbírány od dubna do června 2015, a to v blízkém okolí Prahy, protože bylo nutné využít co nejčerstvější květy. V článku se pak zaměřuji na představení zcela běžných druhů krytosemenných rostlin, které byly na daných lokalitách k dispozici.

### ● Brukvovité (*Brassicaceae*)

Jediným zástupcem v tomto přehledu je barborka obecná (*Barbarea vulgaris*, viz obr. 1 a 2). Ačkoli jsou její květy na fotografii poměrně malé, na první pohled vidíme, že korunní lístky intenzivně odrážejí ultrafialové světlo. Zdá se navíc, že podobně jako některé květy popsané v minulém dílu má prostřední část koruny UV-ab-

sorpční, což dává vzniknout typickému kontrastu, který jinak ve viditelné oblasti spektra chybí. Na základě jediného druhu nelze dělat obecné závěry, přesto snímek barborky napovídá, že čeleď brukvovitých si do budoucna zaslouží pozornost.

### ● Třezalkovité (*Hypericaceae*)

Podobný vzor jako v předchozích čeledích najdeme také u třezalky tečkové (*Hypericum perforatum*) – nápadně UV-reflektantní korunní lístky a oblast generativních orgánů, která světlo těchto vlnových délek naopak pohlcuje. Květy třezalky jsou zajímavé tím, že obsahují dva typy pigmentů zodpovědných za absorpci ultrafialového světla, přičemž jeden z nich by mohl mít zároveň ochrannou funkci. K tomuto fenoménu se později ještě vrátíme.

### ● Slézovité (*Malvaceae*)

Koruna obou fotografovaných zástupců čeledi vykazuje určitou míru UV reflektance. Co bychom u slézu přehlíženého (*Malva neglecta*) viděli pouze v náznaku, je mnohem nápadnější na květu slézu lesního (*M. sylvestris*, obr. 3 a 4), který odráží UV paprsky poměrně intenzivně. Žilnatina patrná i ve viditelném světle tyto paprsky naopak pohlcuje. Kresba květu v UV světle se tím sice neodlišuje od té viditelné, je ale bezpochyby kontrastnější a pro opylující hmyz tak zřejmě i nápadnější.

### ● Kakostovité (*Geraniaceae*)

Květ kakostu smrdutého (*Geranium robertianum*) zajímavý vzor neukázal a UV světlo spíše pohlcoval, než odrážel.

### ● Miříkovité (*Apiaceae*)

Jediný zástupce v mém výběru – kerblík lesní (*Anthriscus sylvestris*, obr. 5 a 6) – rovněž nepřinesl velké překvapení, jeho bílé květy byly výrazně UV-absorpční.

### ● Toješťovité (*Apocynaceae*)

Brčál menší (*Vinca minor*, obr. 7–9), běžně pěstovaný pod názvem barvínek menší, nenesl žádný charakteristický UV vzor a jeho koruna, podobně jako např. u kakostu, odráží jen menší část ultrafialového světla. Zajímavé však je, že spodní strana brčálu se na UV fotografii jeví zřetelně světlejší, odráží více světla než vrchní část květu, podobně jako růže šípková (*Rosa canina*) představená v minulém dílu.

### ● Svlačcovité (*Convolvulaceae*)

Čeď zastupoval jen opletník plotní (*Calyptegia sepium*), jehož bílé květy byly v ultrafialovém světle výrazně UV-absorpční, a to z vnější i vnitřní strany.

### ● Hluchavkovité (*Lamiaceae*)

Tato čeď se ukázala jako velmi zajímavá. Na obr. 13 a 14 nahoře uprostřed vidíme (zleva doprava) květ hluchavky bílé (*Lamium album*), pitulníku žlutého (*Galeobdolon luteum*) a h. nachové (*L. purpureum*).