

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Eliška Svobodová**

Charakterizace prasečích indukovaných pluripotentních kmenových buněk

Characterisation of the porcine induced pluripotent stem cells

(Bakalářská práce)

Školitel: Mgr. Petr Vodička, Ph.D.

Praha 2011

Děkuji mému školiteli Petru Vodičkovi za cenné rady při psaní této práce a za jeho čas věnovaný posláním školitele. Ráda bych také poděkovala Kateřině Vodičkové Kepkové za cenné rady při práci v laboratoři.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3. 5. 2011

## Obsah:

1. Abstrakt .....	2
2. Abstract .....	2
3. Úvod .....	2
4. Embryonální kmenové buňky .....	2
4.1. Vlastnosti ESCs.....	3
4.2. Centrální regulační okruh pluripotence ESCs .....	4
4.3. MESCs a hESCs - naivní a připravená pluripotence .....	6
4.4. Odlišnosti mESCs a hESCs .....	7
4.4. Odhalování podstaty naivní pluripotence .....	8
4.5.1. Objev EpiSCs pomáhá objasnit podstatu naivní pluripotence .....	9
4.5.2. Naivní a připravená pluripotence – kompetice adhezních systémů? .....	11
5. IPS technologie .....	12
5.1. Cesta k iPS.....	12
5.2. První iPSCs a reprogramační faktory .....	13
5.3. Metody tvorby iPSCs .....	15
5.4. Epigenetika iPSCs.....	16
5.5. Zdroje tkání pro tvorbu iPSCs .....	17
5.6. Kultivace iPSCs.....	18
5.7. Aplikace iPSCs a jejich bezpečnost .....	18
6. Prasečí (indukované) pluripotentní kmenové buňky .....	19
6.1. Výchozí tkáň pro tvorbu piPSCs.....	21
6.2. Vektory použité pro reprogramaci piPSCs.....	22
6.3. Reprogramační faktory pro tvorbu piPSCs .....	23
6.4. Testované znaky piPSCs.....	23
6.5. Kultivace piPSCs.....	24
6.6. Diferenciace piPSCs .....	25
6.7. Naivní piPSCs .....	26
6.8. Prasečí epiblastové kmenové buňky .....	28
7. Závěr .....	28

## 1. Abstrakt

Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs) jsou pluripotentní buňky vytvořené reprogramací buněk somatických pomocí několika transkripčních faktorů v podmínkách kultivace embryonálních kmenových buněk (ESCs). Klasické faktory použité pro vytvoření prvních iPSCs jsou OCT4, SOX2, KLF4 a c-MYC. Takto vytvořené iPS buňky jsou svými vlastnostmi blízké ESCs. Technologie tvorby iPSCs může být využita k tvorbě iPS buněk z konkrétních pacientů a využita pro jejich léčbu tam, kde použití ESCs představuje etický a imunologický problém. Pro potřebu medicínských aplikací iPSCs je potřeba ověřit jejich dlouhodobou bezpečnost na vhodných zvířecích modelech.

**Klíčová slova:** indukované pluripotentní kmenové buňky, embryonální kmenové buňky, reprogramace, prase, modelový organismus, pluripotence

## 2. Abstract

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are the cells established by introducing several transcription factors into the somatic cells and culturing them in embryonal stem cell (ESCs) culture conditions. Factors used for the establishment of the first iPSCs are OCT3/4, SOX2, KLF4 and c-MYC. iPSCs created by these means resemble closely to the ESCs. iPS technology may be used to derive iPS cells of individual patients and apply these cells for their treatment in the cases where the use of ESCs represents an ethical and immunological problem. Therefore, it is important to establish an appropriate animal model for the longtime safety testing of iPSCs before acceding to their medicinal application.

**Key words:** induced pluripotent stem cell, embryonal stem cell, reprogramming, pig, model organism, pluripotency

### 3. Úvod

IPSCs jsou pluripotentní buňky vytvořené reprogramací ze somatických buněk. Poprvé byly vytvořeny v roce 2006 z myších fibroblastů, do kterých byly vneseny 4 reprogramační faktory - OCT3/4 (dále OCT4), SOX2, KLF4 a c-MYC (Takahashi & Yamanaka 2006). Později se podařilo stejným způsobem reprogramovat i somatické buňky člověka (Yu et al. 2007; Takahashi et al. 2007), primátů (rod: *Macaca*) (Liu et al. 2008), potkana (Liao et al. 2009) a prasete (Esteban et al. 2009; Ezashi et al. 2009; Wu et al. 2009). IPSCs jsou blízké ESCs svou morfologií, povrchovými i vnitrobuněčnými znaky, vysokou schopností proliferace a diferenciaci do tkání všech 3 zárodečných vrstev *in vitro* i *in vivo* (Takahashi & Yamanaka 2006; Yu et al. 2007). Díky těmto svým vlastnostem mohou být v medicínských aplikacích rovnocennou náhradou kontroverzních ESCs. Před jejich využitím k léčbě lidí je potřeba ověřit bezpečnost iPSCs na úrovni délky lidského života. K tomuto účelu se zdá být velmi vhodným modelem prase. Proto je vytvoření prasečích iPSCs (piPSCs) důležitým objevem a jejich důkladná charakterizace nezbytná k optimalizaci jejich kultivace a jejich budoucímu využití.

### 4. Embryonální kmenové buňky

V úvodu jsou zmíněny ESCs jako pluripotentní buňky, jejichž vlastností se snažíme dosáhnout při přípravě iPSCs. Je tedy důležité charakterizovat a co nejlépe poznat vlastnosti ESCs a jejich mechanismy regulace pluripotentního stavu k tomu, aby mohla vzniknout metoda reprogramace somatických buněk v buňky pluripotentní a iPSCs jako takové. ESCs slouží jako standard, vzor pro vytvoření iPSCs, a proto většina vlastností uvedených jako vlastnosti ESCs by měla platit i pro příslušné iPSCs. O nich samotných bude řeč později.

#### 4.1. Vlastnosti ESCs

ESCs jsou jedinečným typem kmenových buněk, které se nevyskytují v dospělém organismu. Jsou odvozovány z vnitřní buněčné masy (ICM) blastocysty - přechodně existujícího stadia v raném embryonálním vývoji. Nemají tedy svůj *in vivo* ekvivalent a existují pouze *in vitro* (Stewart et al. 2008). Mezi základní vlastnosti ESCs patří dlouhodobá schopnost sebeobnovy, tedy schopnost se symetricky dělit při zachování svého pluripotentního stavu, a schopnost diferencovat do tkání odvozených od všech tří zárodečných vrstev a do trofoblastu (pluripotence) (Evans & Kaufman 1981; Martin 1981a; Thomson et al. 1998). Díky tomu jsou ESCs užitečným modelem pro studium diferenciaci a stárnutí. ESCs se poprvé podařilo izolovat v roce 1981 z myší blastocysty (Evans & Kaufman 1981; Martin 1981a). K vytvoření prvních lidských ESCs (hESCs) došlo až v roce 1998 (Thomson et al. 1998), po předchozím odvození ESCs primátů (rod: *Macaca*) (Thomson et al. 1995).

Přestože se myší a lidské pluripotentní kmenové buňky v mnoha ohledech liší, základní vlastnosti pluripotence jsou sdíleny ESCs obou druhů. Na první pohled jsou myší ESCs (mESCs) i hESCs typické velkým jádrem v poměru k cytoplazmě a výrazným jadérkem – znaky vysoké metabolické aktivity a dělení buněk. mESCs i hESCs mají schopnost symetrického dělení, které zprostředkuje jejich sebeobnovu za současného zachování pluripotence. Obě tyto vlastnosti jsou u ESCs ověřovány několika způsoby. Na velký proliferační potenciál buněk ukazuje aktivní telomeráza, která zabraňuje zkracování konců telomer jejich doplňováním a předchází tak stárnutí buněk (Bodnar et al. 1998). Prakticky se pak buňky dlouhodobě kultivují a sleduje se, zda se známky stárnutí neobjevují a délka telomer zůstává zachována (Amit et al. 2000a).

Druhou vlastností, která musí být zachována, je schopnost diferenciaci ESCs do tkání všech tří zárodečných vrstev. Ověřuje se jednak schopnost diferenciaci *in vitro* v suspenzní kultuře ve formě embryoidních tělísek (EB) nebo v jednovrstevném uspořádání buněk – spontánně nebo za přidání chemických látek, které cíleně směřují diferenciaci (Doetschman et al. 1985). *In vivo* se pak schopnost diferenciaci ověřuje vstříknutím pluripotentních buněk do myší s oslabenou imunitou a sledováním vzniku teratomů, nádorů složených z velké škály diferencovaných tkání, které se vyskytují u embrya v časných fázích vývoje (Bulić-Jakus et al. 2006). Definitivním průkazem pluripotence mESCS je jejich

schopnost tvořit po injikaci do blastocysty chiméry, včetně schopnosti přispívat k zárodečným liniím v rámci chimér [(Robertson, 1986) *in* (Tam & Rossant 2003)] a schopnost vytvořit celého jedince, která se testuje metodou tetraploidní komplementace (Lin et al. 2010; Nagy et al. 1990). ESCs schopné přispívat k zárodečné linii chimérických myší mohou být úspěšně použity k vytvoření knock-in/knock-outovaných jedinců metodou homologní rekombinace s možností přenosu genetické změny na další generace. U myší se tato technologie využívá k vytváření geneticky pozměněných linií se specifickými vlastnostmi (Galli-Taliadoros et al. 1995). Schopnost přispívat k vývoji jedince se z etických důvodů samozřejmě netestovala u hESCs a konečným testem pluripotence je u nich tvorba teratomů (Thomson et al. 1998).

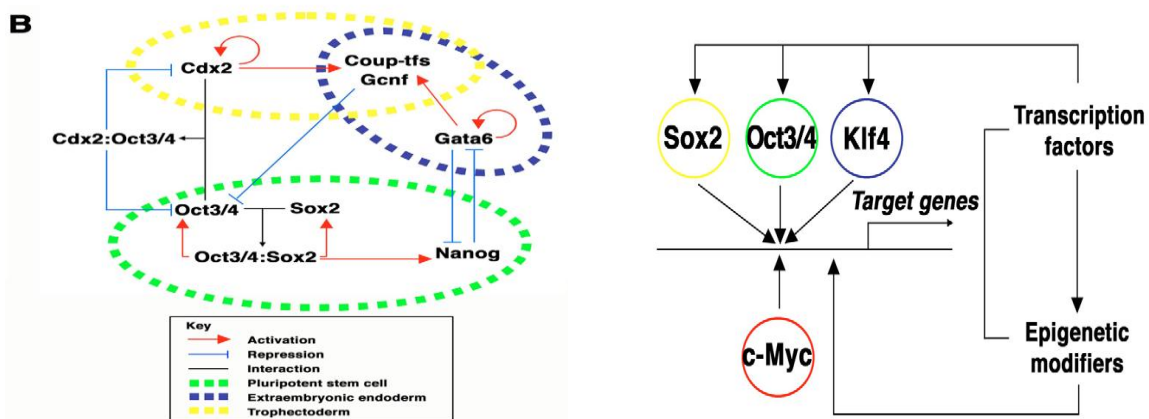
#### **4.2 Centrální regulační okruh pluripotence ESCs**

Sebeobnova a pluripotence ES buněk jsou řízeny centrálním regulačním okruhem, který je tvořen transkripčními faktory OCT4, SOX2 a NANOG (OSN) provázanými do autoregulační sítě (Boyer et al. 2005; Loh et al. 2006). Stabilní hladiny OSN v ESCs jsou udržovány díky pozitivním autoregulačním vazbám těchto faktorů i dalšími transkripčními faktory přes pozitivní a negativní zpětné vazby (Hitoshi & Niwa 2007). Přesná regulace hladiny přepisu je nezbytná zejména pro udržení stálé hladiny OCT4, jejíž vychýlení o více než 50 % oproti normálnímu stavu v ESCs vede k diferenciaci buněk - zvýšení hladiny OCT4 směřuje buňky k primitivnímu endodermu, její snížení vede k diferenciaci v trofoektoderm (Niwa et al. 2000). Autoregulační smyčka je schopná stabilně udržovat stav pluripotence (Boyer et al. 2005) a umožňuje rychlou odpověď na vnitřní nebo vnější stimuly s malým zpožděním (Rosenfeld et al. 2002).

Transkripční faktory OSN kooperují v nasedání na promotory desítek genů účastnících se udržování sebeobnovy a pluripotence včetně sebe samých. Tento regulační okruh je společný myším a lidským ESCs, liší se pouze některé cíle těchto transkripčních faktorů, které tuto síť rozšiřují a aktivují další geny podílející se na sebeobnově a pluripotenci nebo naopak reprimují ty zodpovědné za diferenciaci buněk. Kromě protein-kodujících genů jsou součástí regulační sítě i geny kodující miRNA, na jejichž promotory se váží OSN a regulují jejich přepis (Boyer et al. 2005). Část genů aktivovaná centrálními transkripčními faktory se spolu s nimi podílí také na remodelaci chromatinu a epigenetických modifikacích histonů,

kteří hrají důležitou roli v regulaci transkripce ESCs, a také přispívají k regulaci jejich sebeobnovy a diferenciaci (Kashyap et al. 2009).

OSN jsou specificky spojovány s uvedením buněk do pluripotentního stavu a jeho udržováním (Avilion et al. 2003; Chambers et al. 2003; Mitsui et al. 2003; Pesce & Schöler 2001). OCT4 a SOX2 jsou předávány maternálně v oocytu a později mohou aktivovat přepis NANOG (Rodda et al. 2005b; Avilion et al. 2003; Palmieri et al. 1994). OSN hrají důležitou roli v raném embryonálním vývoji a jsou přítomny v buňkách moruly a následně v ICM blastocysty a v epiblastu. V dalších liniích buněk diferencovaných z ICM se svou přítomností liší, ale jejich hladina klesá během dalšího vývoje a diferenciaci. Později je přepis OSN zachován v primordiálních zárodečných buňkách (Chambers et al. 2003; Pesce & Schöler 2001). Jsou zároveň přítomny v *in vitro* kultivovaných ESCs a mizí během jejich diferenciaci. OSN jsou tedy zodpovědné za regulaci a udržování pluripotence buněk *in vivo* i *in vitro* a tvoří jádro regulační smyčky, která je společná myším i lidským buňkám.



Obrázek 1 a 2: Centrální síť transkripčních faktorů řídících sebeobnovu a pluripotenci ESCs

OCT3/4, SOX2, KLF4 aktivují cílové geny vytvářející stabilní síť transkripčních faktorů navozujících a udržujících pluripotenci a aktivujících epigenetické změny, c-MYC může zvyšovat přístupnost cílových genů stimulací replikace DNA. Převzato z (Hitoshi & Niwa 2007).

Vysvětlivky: Activation – aktivace, repression – inhibice, pluripotent stem cell – pluripotentní kmenová buňka, extraembryonic endoderm – extraembryonální endoderm, treophectoderm- trofektoderm, target genes – cílové geny, transcription factors – transkripční faktory, epigenetic modifiers – epigenetické modifikátory.

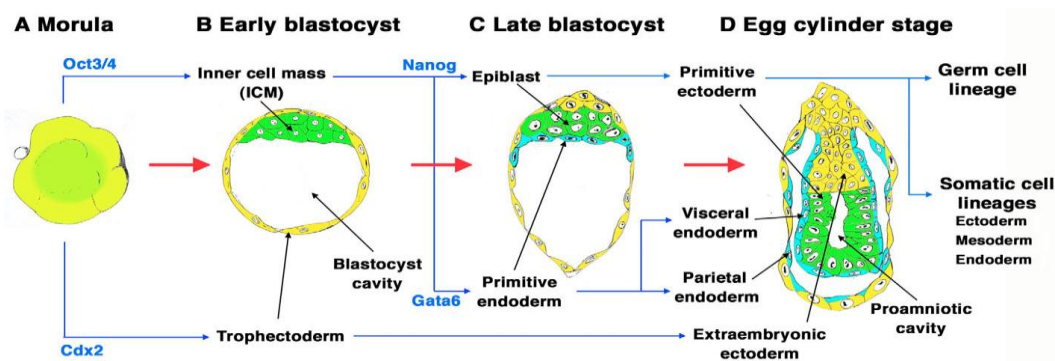


### 4.3. mESCs a hESCs - naivní a připravená pluripotence

Myší i lidské ESCs odvozené z ICM blastocysty jsou v obecném slova smyslu buňkami pluripotentními na základě vlastností popsaných výše, jejich pluripotence se ale v mnoha ohledech liší. Dříve byly tyto rozdíly připisovány mezidruhovým odlišnostem mezi myší a člověkem, objevy posledních let ale ukazují, že mezidruhové rozdíly nehrají v rozdílnosti mESCs a hESCs jedinou, a zřejmě ani nejdůležitější roli.

Zatímco výše popsaný centrální regulační okruh je všem ESCs společný, molekuly, které ho aktivují z vnějšku, se liší. Z tohoto pohledu můžeme vymezit mESCs a hESCs jako 2 typy pluripotence, které je možné z praktického hlediska rozlišovat. Platí, že mESCs mají tendenci tvořit pluripotentní buňky závislé na leukemickém inhibičním faktoru (LIF) a kostním morfogenetickém proteinu (BMP4), nazývané obecně jako LIF-závislé nebo také naivní (naive) ESCs (Ying et al. 2003). Tento pluripotentní stav se také nazývá základním (ground state) (Ying et al. 2008). Pluripotence typických hESCs naopak závisí na fibroblastovém růstovém faktoru 2 (FGF2) a Activin/Nodal signalizaci, jsou to tedy pluripotentní buňky FGF2-závislé nebo také připravené (primed) ESCs (Vallier et al. 2005; Nichols & Smith 2009).

Jako připravené pluripotentní buňky byly původně označeny myší EpiSCs (mEpiSCs), odvozené ze stadia pozdního epiblastu, aby se odlišily od pluripotentních buněk odvozených z ICM blastocysty – naivních mESCs. Stav připravené pluripotence je tak považován za více diferencovaný stav. Zároveň ale víme, že hESCs odvozené z blastocysty se svými vlastnostmi s mEpiSCs shodují (Brons et al. 2007). hESCs mají tedy tendenci *in vitro* udržovat tento vývojově pokročilejší stav připravené pluripotence. Možné příčiny těchto odlišností hESCs a mESCs budou diskutovány později, v následujícím odstavci se budu podrobněji věnovat charakteristikám těchto dvou typů pluripotence.



Obrázek 3: Raný zárodečný vývoj myši, převzato z (Hitoshi & Niwa 2007)

Vysvětlivky: *early blastocyst* – rané stadium blastocysty, *late blastocyst* – pozdní stadium blastocysty, *egg cylinder stage* – stadium vaječného cylindru, *primitive ectoderm* – primitivní ektoderm, *germ cell lineage* – zárodečná linie, *somatic cell lineages* - somatické buněčné linie, *blastocyst cavity* – dutina blastocysty, *primitive endoderm* – primitivní endoderm, *visceral endoderm* – viscerální endoderm, *parietal endoderm* – parietální endoderm, *extraembryonic ectoderm* – extraembryonální ektoderm, *proamniotic cavity* – dutina budoucího amnionu. Pro srovnání podrobnější popis a obrázek lidského zárodečného vývoje <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/appendixa.asp#figure4>.

#### 4.4. Odlišnosti mESCs a hESCs

HESCs a mESCs se vzájemně liší jak závislostí na různých vnějších faktorech pro udržení pluripotence, tak dalšími znaky. Rozdílná je jejich morfologie, některé povrchové a epigenetické znaky, rychlost množení nebo tendence ke spontánní diferenciaci.

Zatímco mESCs tvoří kompaktní kulaté kolonie, které je možné snadno disociovat a pasážovat jako jednotlivé buňky, a mají dobrou schopnost tvořit kolonie z těchto izolovaných buněk (klonogenicitu), kolonie hESCs jsou zploštělé a na disociaci reagují apoptozou, jejich klonogenicita je tedy značně omezená. Jsou také náchylnější ke spontánní diferenciaci a mají delší dobu zdvojení (Evans & Kaufman 1981; Martin 1981a; Thomson et al. 1998). Pluripotence hESCs je závislá na signalizaci zprostředkované FGF2 (bFGF) (Xu et al. 2005) a signálech předaných do buňky prostřednictvím TGFbeta a Aktivin/Nodal (James et al. 2005). Naopak rychle diferencují směrem k trofoblastu, pokud jsou vystaveny BMP4 (Xu et al. 2002). MESC jsou na rozdíl od hESCs závislé na LIF, který indukuje aktivaci přenašeče signálu a aktivátoru transkripce 3 (STAT3) (Hall, J. et al. 2009). Přidání BMP4 zabraňuje diferenciaci mESCs inhibicí signalizace vnějším signálem

regulovanou kinázou (ERK) a dalších diferenciačních signálů, diferencují naopak v přítomnosti FGF4, který tuto dráhu aktivuje (Ying et al. 2003; Kunath 2007).

V přítomnosti povrchových znaků existují také rozdíly. Sacharidový antigen SSEA-1, typický pro mESCs, není téměř přítomen na buňkách hESCs a naopak SSEA-3 a -4 se vyskytují převážně na površích hESCs spolu s TRA-1-60 a TRA-1-81 (Henderson et al. 2002). Rozdílný epigenetický stav ukazuje na odlišný vývojový původ hESCs a mESCs. Zatímco u samičích linií mESCs jsou oba X chromosomy aktivované, samičí linie hESCs mají jeden X chromosom alespoň částečně inaktivovaný (Silva et al. 2008). Analogický je vývoj inaktivace X během zárodečného vývoje savců, kdy v buňkách ICM jsou oba X chromosomy aktivní. Po oddělení a diferenciaci epiblastu v době zahníždění blastocysty dochází k náhodné inaktivaci X chromosomu v buňkách embrya (Clerc & Avner 2011).

Stav aktivace X chromosomu není jedinou charakteristickou epigenetickou značkou. Buňky ve stavu naivní a připravené pluripotence jsou rozlišitelné i na základě stavu metylace promotorů některých genů spojených s pluripotentním stavem nebo s konkrétním vývojovým stadiem. Například promotory genů typických pro stadium epiblastu jsou v hESCs hypometylovány, což značí jejich aktivní stav, zatímco v mESCs jsou hypermetylovány, což je znak neaktivního stavu. Změny metylace takových promotorů jsou mnohem přesnějším rozlišujícím kritériem mezi těmito pluripotentními stavy než transkripční aktivita těchto genů. Transkripce má tendenci k fluktuacím a není proto příliš spolehlivá pro rozlišení (Hayashi et al. 2008).

#### **4.4. Odhalování podstaty naivní pluripotence**

Přes množství nových poznatků, kterých bylo dosaženo v posledních několika letech, je naše znalost pluripotence a její regulace stále neúplná. Nejasný je dokonce i původ mESCs - naivních pluripotentních buněk, tedy buněk v základním stavu pluripotence, který byl definován již před třiceti lety. Přestože jsou odvozovány z ICM blastocysty, svými znaky a závislostí své pluripotence na transkripčních faktorech se od ICM odlišují (Ivanova et al. 2006). Naproti tomu vývojový původ hESCs byl vyjasněn díky odvození pluripotentních kmenových buněk z myšího pozdního epiblastu nazvaných EpiSCs, jejichž vlastnosti se nápadně shodovaly s vlastnostmi hESCs (Brons et al. 2007). Oba typy

pluripotentních kmenových buněk se svými vlastnostmi podobají buňkám epiblastu (Tesar et al. 2007).

#### **4.5.1. Objev EpiSCs pomáhá objasnit podstatu naivní pluripotence**

Další posun ve vymezení původu hESCs byl učiněn díky izolaci a analýze EpiSCs odvozených z myší blastocysty, stadia, ze kterého se běžně získávají naivní mESCs (Najm et al. 2011). Najm ukázal, že za kultivačních podmínek vhodných pro množení jak mESCs tak mEpiSCs mohou vznikat oba typy buněk. To naznačuje, že stav pluripotence kterého je dosaženo, není závislý tolik na stadiu, ze kterého jsou pluripotentní buňky odvozovány, ale spíše na kultivačních podmínkách. Buňky, které jsou izolovány ze stadia blastocysty, se nemusí v tomto stadiu zastavit, ale mohou se dále vyvíjet - v případě hESCs do stadia epiblastu, ve kterém jsou zastaveny kultivačními podmínkami, v případě mESCs v jiném stadiu, které zatím nebylo určeno. Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím stadium pluripotence buněk je genetické pozadí. Najm zdůrazňuje, že ne všechny kmeny myší jsou přístupné pro izolaci mESCs. Naopak, většina linií mESCs které dnes máme, pochází z tzv. kmene 129, který se ukázal vhodným pro odvození myších pluripotentních buněk v naivním stavu (Brook & Gardner 1997; Gardner & Brook 1997). Dodnes se nepodařilo najít další vhodný kmen pro odvození naivních mESCs standardní metodou.

Najm svůj pokus udělal právě na buňkách přístupného myšího kmene 129, proto dokázal odvodit oba typy pluripotentních buněk. Když testoval jiný myší kmen, známý jako nepřístupný pro izolaci mESCs, mESCs se mu izolovat za stejných podmínek opravdu nepodařilo, zatímco mEpiSCs ano, a to s podobnou účinností jako u kmene permisivního. Ukázal tak, že kmeny které nejsou vhodné pro izolaci mESCs, mohou přesto snadno dávat vznik mEpiSCs. Zdá se tedy, že u většiny kmenů myší existují genetické bariéry nebo chybí předpoklady pro vznik a udržení naivní pluripotence závislé na LIF, zatímco izolaci vývojově odvozenějších EpiSCs tyto genetické bariéry nelimitují.

Nedávno se podařilo vytvořit naivní mESCs a miPSCs z buněk NOD kmene myší, který byl považován za nepřístupný jejich tvorbě. Izolace mESCs i miPSCs a jejich udržování ve stavu naivní pluripotence vyžadovalo mimo kultivace v LIF/STAT3 stálou transgenní expresi c-MYC nebo KLF4, inhibici kinázy glykogen syntázy 3 (GSK3beta) (a CDK1/cyklin B) nebo přidání Wnt3a do média (Hanna et al. 2009). Podobně inhibice GSK3beta a ERK (2i)

usnadnily izolaci naivních ESCs z potkaních blastocyst. (Buehr et al. 2008; Hanna et al. 2010) učinili pokus o vytvoření naivních hESCs z běžně kultivovaných hESCs a také naivních hiPSCs z lidských fibroblastů. Opět se to podařilo jen díky vnější expresi několika genů – OCT4 a KLF4 nebo KLF2 a KLF4 a 2i/LIF podmínkám kultivace. Bez vnější exprese těchto genů v 2i/LIF podmínkách tyto hiPS buňky diferencovaly na rozdíl od miPSCs NOD myši, kterým inhibiční podmínky pro zachování naivního mESC fenotypu stačily (Hanna et al. 2009). Po srovnávací analýze ochoty buněk různých kmenů myši a buněk lidských tvořit pluripotentní buňky v naivním stavu se lidské buňky ukázaly jako nejméně přístupné přechodu do stavu naivní pluripotence (Hanna et al. 2010).

Můžeme říci, že přestože se díky odlišným kultivačním podmínkám a modifikacím buněk stav naivní pluripotence podařilo nastolit u různých kmenů myši i různých savčích druhů, přirozenou tendenci k vytváření tohoto pluripotentního stavu má jen 1 známý myši kmen, kmen 129, a mnohem rozšířenější je odvozenější stav pluripotence, který se blíží svým charakterem embryonálnímu stadiu pozdního epiblastu, tedy tzv. připravená pluripotence. Otázkou zůstává, co způsobuje nestabilitu naivního stavu pluripotence u většiny savců a co naopak umožňuje buňkám myšního kmene 129 stav naivní pluripotence navozovat a udržovat. Kandidátem na faktor umožňující vznik naivní pluripotence je KLF4, gen, který byl potřeba pro genetickou reprogramaci EpiSCs (z permisivního kmene 129) (Guo et al. 2009) do stavu naivní pluripotence a jehož transgenní exprese byla také potřeba pro navození a udržení naivního pluripotentního stavu u buněk izolovaných z ICM nepřístupných kmenů myši a člověka (Hanna et al. 2009, Hanna et al. 2010). Závěrem můžeme shrnout, že buňky jednotlivých druhů a poddruhů se liší svými genetickými předpoklady pro přirozenou tendenci udržovat naivní stav pluripotence. Čím menší tato jejich přirozená tendence je, tím více jim musíme k tomuto stavu pomoci vnější změnou. Jsme ale schopni naivního pluripotentního stavu dosáhnout u širokého spektra druhů.

#### 4.5.2. Naivní a připravená pluripotence – kompetice adhezních systémů?

Jiný pohled na provázanost stavů pluripotence přináší práce Xu et al. ukazuje, že odlišné využití adhezních systémů mESCs a hESCs pro udržení sebeobnovy buněk může vysvětlovat rozdíly v jejich morfologii, požadavcích na růstové faktory a citlivosti k enzymatické disociaci (Xu et al. 2010).

Přežívání hESCs a mESCs je dáno odlišnou regulací kompetice mezi 2 adhezními systémy. E-cadheriny zodpovědné za mezibuněčný kontakt (Eastham et al. 2007) převažují u mESCs, naopak u hESCs je převaha integrinů, které zajišťují adhezi buněk k extracelulární matrix (ECM) (Xu et al. 2001). E-cadheriny a integriny zprostředkovaný kontakt buněk je spouštěčem signalizace, díky které buňky přežívají. Důležité také je, že tyto dva systémy adheze jsou regulačně provázány. Zvýšení mezibuněčné adheze má za následek i zvýšení adheze buněk k podkladu a naopak. Rozdíl mezi mESCs a hESCs je viditelný při disociaci buněk trypsinem během pasážování. Jak mESCs, tak hESCs mezibuněčný kontakt i kontakt s ECM ztratí. mESCs ale dokážou kontakt rychleji obnovit díky syntéze nového stabilního E-cadherinu. Naopak nově syntetizovaný E-cadherin hESCs je nestabilní, nedokáže dostatečně rychle obnovit kontakt buněk a vede následně i k přerušení integrinové signalizace. Proto hESCs v reakci na tuto disociaci umírají.

Za nestabilitu nově syntetizovaného E-cadherinu hESCs je zodpovědná signalizace Rho-přidružené kinázy (ROCK), která se aktivuje ztrátou mezibuněčného kontaktu hESCs po disociaci (Watanabe et al. 2007) a která zároveň zprostředkovává vzájemnou regulaci E-cadherinové a integrinové adheze. U mESCs se zvýšení aktivity ROCK po disociaci buněk neprojevuje. Proto dokážou obnovit spojení rychleji a úspěšněji přežít. Důvodem proč je aktivita ROCK zvýšena u hESCs a nikoli u mESCs jsou zřejmě kultivační podmínky, tedy vnější faktory. V souladu s tím modifikace hESCs inhibitory MEK a p38, které stabilizují sebeobnovu mESCs, a kultivace hESCs v LIF snížila aktivaci ROCK a zvýšila stabilitu E-cadherinu a přežívání takto kultivovaných buněk po disociaci.

Odlišné kultivační podmínky ESCs tedy mohou být odrazem využívání různých systémů adheze. Buňky hESCs přirozeně využívají k adhezi a signalizaci sebeobnovy integriny, proto jsou pro ně nezbytné FGF2 a TGFbeta, které aktivují syntézu ECM a zvyšují i kontakt buněk s ní. Naopak pro mESCs využívající E-cadheriny a preferující mezibuněčnou adhezi je vhodný LIF, který tento typ adheze zprostředkovaně podporuje. Autoři naznačují, že to, co definuje

odlišné pluripotentní stavy mESCs a hESCs, může být právě využívání odlišných adhezních systémů. Je ale možné, že využívání různých systémů adheze je jen důsledkem odlišných vývojových stadií, kterým odpovídá pluripotentní stav mESCs a hESCs a je otázkou, jakou roli tento faktor v součinnosti ostatních faktorů ovlivňujících pluripotenci hraje.

Objasnění této otázky vyžaduje další analýzy, z této studie ale vyplývají praktické poznatky, které můžeme využít pro přiblížení hESCs naivnímu stavu, který je výhodnější pro práci s buňkami, umožňuje jejich disociaci během pasážování bez větších ztrát a je tak výhodnější pro jejich automatizovanou kultivaci ve velkém důležité pro jejich aplikace. Stav naivní pluripotence je také výhodnější pro genetické manipulace buněk (Xu et al. 2010).

## **5. IPS technologie**

IPS je technologie, která umožňuje vytvářet buňky podobné ESCs z diferencovaných somatických buněk (K. Takahashi & Yamanaka 2006). Popudem k jejímu vzniku byla jednak etická kontroverznost hESCs, k jejichž vzniku je potřeba zničení lidských zárodků, jednak možnost vytváření individualizovaných linií buněk, použitelných pro autologní transplantace bez rizika imunitní rejekce, a v kombinaci s použitím metody homologní rekombinace k vytváření modelů geneticky podmíněných nemocí a následně k jejich léčbě. HiPSCs linie z konkrétních jedinců by také byly užitečné k testování léčiv, lépe by odrážely genetickou variabilitu obyvatel a odpovědi na léčbu (Yu et al. 2007).

### **5.1. Cesta k iPS**

Indukovaná pluripotence není první metodou použitelnou k vytváření individuálně specifických linií pluripotentních buněk. Předcházely jí fúze somatické buňky s ESC a metoda přenosu somatického jádra do enukleovaného oocyty (SCNT) (Yamanaka & Blau 2010), které jsou ale částečně stále závislé na oocytech a zárodcích. Metoda SCNT je pro produkci hESCs náročnější než u jiných živočišných druhů, nehledě na vzácnost lidských oocytů. Proto je vhodné tyto metody využívat nadále pro vytváření specifických linií buněk zvířat, pro potřeby medicínských aplikací je nejvhodnější právě iPS technologie. Ta mohla být vytvořena a zavedena až s rostoucími znalostmi o podstatě pluripotence a identifikaci pro ni

důležitých transkripčních faktorů. U kandidátních genů majících souvislost s pluripotentním stavem pak byla testována schopnost stav pluripotence navodit (Takahashi & Yamanaka 2006; Yu et al. 2007). A to na základě předpokladu, že geny mající schopnost udržovat stav pluripotence ho dokážou i navodit.

## 5.2. První iPSCs a reprogramační faktory

Prozatím se podařilo vytvořit iPSCs myší (Takahashi & Yamanaka 2006), lidské (Yu et al. 2007), primátů (rod: *Macaca*) (Liu et al. 2008), potkaní (Liao et al. 2009) a prasečí (Esteban et al. 2009; Ezashi et al. 2009; Wu et al. 2009). iPSCs se vesměs podobají svými vlastnostmi a nároky na kultivaci svým vzorům v podobě ESCs. U prasečích iPSCs (piPSCs) si tím nemůžeme být jistí, protože ESCs linie prasat se zatím izolovat nepodařilo, zatím se ale zdají být nejpodobnější hiPSCs a hESCs.

Tabulka 1: ukazuje vlastnosti piPSCs v porovnání s vlastnostmi typických buněk ve stavu naivní a připravené pluripotence

	naivní pluripotence	připravená pluripotence	piPSCs
zdrojová tkáň	raný epiblast (ICM)	vaječný cylindr/embryonální disk	raný epiblast (ICM)
typ kmenových buněk	hlodavčí ESCs	primátů ESCs	?
morfologie	3D kompaktní	zploštělá	zploštělá
klonogenita	vysoká	nízká	nízká
odpověď na FGF	diferenciace	sebeobnova	sebeobnova
odpověď na LIF	sebeobnova	žádná	nemnoží se, apoptoza
stav XX chromosomů	oba aktivované	1 umlčený	?
(odpověď na 2i)	sebeobnova	diferenciace/smrt	?*
tvorba chimér	ano	ne (netestováno u primátů)	ano
tvorba teratomů	ano	ano	ano

\*při testování vlivu 2i/LIF reagovaly piPSCs shodně s hiPSCs změnou morfologie a rychlosti množení směrem k mESCs. Modifikováno na základě (Nichols & A. Smith 2009b).

První iPSCs byly tradičně vytvořeny na myším modelu (Takahashi & Yamanaka 2006) pomocí 4 reprogramačních faktorů – SOX2, KLF4, OCT4 a c-MYC (zkráceně SKOM), které byly vybrány jako nezbytné a zároveň postačující k navození pluripotence.

Hlavními a nezbytnými pro reprogramaci jsou transkripční faktory **OCT4** a **SOX2**, které jsou zároveň markery pluripotence a součástí centrálního regulačního okruhu spolu s NANOG (Boyer et al. 2005). Byly již vytvořeny iPS buňky z nervových kmenových buněk (NSCs), které



přirozeně exprimují vysoké hladiny SOX2, pouze s použitím OCT4. Tyto buňky exprimují v nižších hladinách i KLF4, c-MYC a další pluripotentní markery, jejichž hladiny OCT4 dokáže ovlivnit. Přesto takto připravené iPSCs vznikly pouze s nízkou efektivitou (Kim et al. 2009). Efektivitu procesu reprogramace zvyšují právě další používané faktory, které však nejsou pro samotný vznik kolonií iPSCs nezbytné.

Jedním z nich je **NANOG**. Yu (Yu et al. 2007), který použil k reprogramaci lidských buněk odlišnou kombinaci genů než Yamanaka, zahrnující NANOG, shledal, že významně zvyšuje efektivitu procesu, ale není nezbytný pro objevení se kolonií pluripotentních buněk. Tento efekt může být dán jeho schopností zvyšovat efektivitu množení hESCs (Darr et al. 2006) a tím rozšíření reprogramovaných buněk na úkor nereprogramovaných.

**C-MYC** zvyšuje efektivitu procesu reprogramace miPSCs a jeho role v udržování pluripotence a sebeobnovy je v regulaci buněčného cyklu a celkovém zvýšení metabolické aktivity. C-MYC hraje také roli v remodelaci chromatinu a udržování jeho otevřené struktury (Varlakhanova et al. 2010). Jeho zvýšená exprese u mESCs jim dává nezávislost na LIF (Cartwright 2005). Zvýšená hladina c-MYC ale zároveň přispívá k tvorbě nádorů (Adhikary & Eilers 2005), proto je bezpečnější se bez něj obejít při tvorbě hiPSCs (Yu et al. 2007), přestože je možné je vytvořit s jeho pomocí (Takahashi et al. 2007c).

**KLF4** a c-MYC kompenzují některé své účinky v ESCs a jejich nepřímé vzájemné ovlivňování se zřejmě podílí na udržení rovnováhy zachovávající jejich sebeobnovu (Takahashi & Yamanaka 2006). Další gen použitý pro reprogramaci hiPSCs, **Lin28**, opět pouze zvyšuje efektivitu procesu, navíc v menší míře než NANOG. 2 ze 4 analyzovaných linií hiPSCs ho vůbec neintegrovaly (Yu et al. 2007).

Tabulka 2: názvy reprogramačních faktorů a jejich funkce

gen	plný název	funkce
OCT4	oktamer-vázající transkripční faktor 4, obs. Homeodoménu	váže DNA, nezbytný pro pluripotenci
SOX2	HMG-box obs. Transkripční faktor z rodiny proteinů příbuzných se SRY	váže DNA, nezbytný pro pluripotenci
NANOG	transkripční faktor obsahující homeodoménu	váže DNA, indukovaný dalšími faktory, zvyšuje přežívání buněk
c-MYC	buněčný homolog genu izolovaného z viru ptačí myelocytomatosy	váže DNA, zvyšuje efektivitu reprogramace

gen	Plný název	funkce
KLF4	transkripční faktor homologický Kruppel proteinu drosophily	interaguje s c-MYC a zvyšuje efektivitu reprogramace
LIN28	LIN-28 homolog	váže mRNA, zvyšuje efektivitu reprogramace

*Modifikováno na základě (McDevitt & Palecek 2008).*

### 5.3. Metody tvorby iPSCs

Geny pro reprogramační transkripční faktory jsou do buněk vnášeny nejčastěji jako součást integrativních retrovirových nebo lentivirových vektorů, které zajistí jejich přepis začleněním do genomu buňky. Vektory se do genomu vkládají náhodně a v různém počtu kopií. Místo a počet jejich vložení ovlivní hladiny vnesených genů a kvalitu reprogramace. Selektce správně reprogramovaných buněk probíhá několika způsoby. Důležitá je selekce založená na aktivaci genů specificky přepisovaných v pluripotentních buňkách. Takahashi a Yamanaka použili k selekci reprogramovaných buněk promotor genu Fbx15, za který vložili gen pro rezistenci k antibiotiku. Tato selekce nevedla k plně reprogramovaným buňkám schopným přispívat k zárodečným liniím chimér (Takahashi & Yamanaka 2006). Spolehlivějším se ukázalo být použití promotorů genů NANOG nebo OCT4 v pozdějších studiích (Okita et al. 2007; Maherali et al. 2007). Dále se kolonie iPSCs vybírají na základě morfologie a díky tomu, že ve vhodném ESCs médiu reprogramované buňky přerostou buňky původní tkáně (Yu et al. 2007; Takahashi & Yamanaka 2006).

Výhodou vnášení integrativních vektorů je relativně vysoká účinnost reprogramace v porovnání s neintegrativními (Okita et al. 2010b; Okita et al. 2008), jejím problémem je naopak časté neumlčení vnesených genů (Hotta & Ellis 2008). Po navození stavu pluripotence a spuštění endogenních genů zodpovědných za její udržení by vnesené geny měly být umlčeny buněčnou antivirovou obranou prostřednictvím metylace jejich promotorů. U některých hiPSCs nedochází k úplnému umlčení transgenů a exogenní geny se stále přepisují. Takové buňky nejsou plně reprogramovány do stavu pluripotence a cizorodá exprese může být příčinou omezené schopnosti diferenciaci a možné nestability diferencovaného stavu, která v případě vnesení takových buněk do pacienta může způsobit spuštění rakovinného bujení. Schopnost umlčet transgeny může být ovlivněna mimo jiné místem jejich vložení do genomu (Yu et al. 2007). Větší efektivita v počtu správně reprogramovaných buněk schopných cílené diferenciaci se dá docílit zlepšeným designem

reprogramačních vektorů a chemickými látkami ovlivňujícími epigenetický stav chromatinu (Hotta & Ellis 2008).

Nejméně jedna práce ale ukázala, že neúplná metylace neumlčených promotorů nezabraňuje vzniku funkčních spontánně bijících kardiomyocytů a ani diferenciaci buněk v rámci teratomu u prasečích iPSCs (Montserrat et al. 2011). Naopak Yu pozoroval u 2 linií hiPSCs neschopnost diferenciaci do neurálních linií v rámci teratomů, která korelovala s expresí cizorodých OCT4 a NANOG. Mohlo jít o důsledek specifického místa včlenění vektoru, které umožnilo stálou vysokou expresi (Yu et al. 2007).

Důležitost umlčení promotorů pro diferenciaci a bezpečnost buněk je třeba ještě ověřit a zároveň se snažit optimalizovat metody, které nezahrnují integraci cizorodé DNA do reprogramované buňky. Začlenění cizorodé DNA do genomu je problematické z hlediska klinických aplikací, může způsobit přerušení genu (nádorového supresoru nebo jiného životně důležitého), alternativně se může v již diferencovaných buňkách aktivovat c-MYC, který je známým onkogenem (Adhikary & Eilers 2005). Proto se intenzivně zkouší nové metody, které integraci cizorodé DNA nezahrnují nebo u kterých je po úspěšné reprogramaci opět vystřihnuta. Možností je vnášení po reprogramaci vystřihnutelných vektorů s LoxP místy a genem pro rekombinázu (Chang et al. 2009), vnášení episomálních (neintegrativních) vektorů – například plazmidů (Yu et al. 2009), specifických mRNA, které mělo dokonce vyšší účinnost než vnášení virových vektorů (Warren et al. 2010), nebo přímo proteinů (Kim, D. et al. 2009). Optimalizace těchto metod je cestou k úspěšnému využití iPSCs v klinické praxi. Metoda vnášení integrativních vektorů je do budoucna vhodná pouze jako nástroj ke zkoumání procesu tvorby iPSCs, jejich vlastností a optimalizace modelů lidských nemocí, ale pro samotné klinické aplikace je z bezpečnostních důvodů nepoužitelná.

#### **5.4. Epigenetika iPSCs**

Důležitým faktorem pro úspěšnou reprogramaci buněk je jejich epigenetický stav, který reguluje transkripci genů (Djuric & Ellis 2010). Velká část buněk se zastaví v částečně reprogramovaném stavu kvůli neschopnosti dokončit přeměnu na epigenetické úrovni. Tento pre-iPS stav je charakteristický nekompletním umlčením některých liniově specifických genů a hypermetylací promotorů spojených s pluripotencí. Dovedení buněk do plně pluripotentního stavu je podpořeno přidáním inhibitorů metyltransferáz

a RNA zprostředkovanou inhibicí neumlčených genů na úrovni mRNA (Mikkelsen et al. 2008) nebo 2i/LIF inhibičními podmínkami (Silva et al. 2008). Na rozdíl od cílených inhibitorů jsou inhibitory metyltransferáz relativně nespecifickým prostředkem, který může mít nežádoucí účinky na buňky v různých fázích reprogramace, proto je třeba jejich použití správně uvážit.

Existuje několik epigenetických znaků, které ukazují na plně reprogramované buňky. Je jimi již zmíněná metylace transgenních promotorů, reaktivace X chromosomu u samičích linií buněk (u mESCs), snížená metylace heterochromatinu s výjimkou imprintovaných genů a transkripční stav tzv. bivalentních domén (Djuric & Ellis 2010), oblastí promotorů s epigenetickými značkami jak aktivačními, tak inhibičními, které se vyskytují u ESCs ve stavu připraveném k přepisu genů, ale ještě neaktivním. Analýza transkripčního stavu bivalentních domén iPSCs může být indikátorem kvality jejich reprogramace. Tato metoda je zvláště důležitá pro ověření kvality hiPSCs, které nemohou být testovány na základě tvorby chimér s příspěvkem k zárodečné linii. Boué ukázal, že linie iPSCs, u kterých nebyly přepisovány geny z promotorů s bivalentními doménami byly na základě dalších kritérií nejlépe reprogramovány (Boué et al. 2010).

### **5.5. Zdroje tkání pro tvorbu iPSCs**

Pro optimalizaci metody tvorby iPSCs je také důležitý výběr správné tkáně jako zdroje somatických buněk. Je známo, že různé typy diferencovaných buněk se reprogramují s rozdílnou efektivitou. Například NSC nebo tukové buňky jsou v tomto směru vhodnější než fibroblasty (Tat et al. 2010). Účinně lze reprogramovat i purifikované mesenchymální kmenové buňky (Niibe et al. 2011) a keratinocyty (Aasen & Belmonte 2010; Novak et al. 2010). Reprogramace keratinocytů je efektivnější a rychlejší než použití fibroblastů, navíc jejich získání je minimálně invazivní, jsou tedy vhodné pro klinické aplikace na rozdíl od NSC, které jsou také dobře přístupné reprogramaci, ale jejich odběr vyžaduje velký zásah do organismu. Obecně jsou pro reprogramaci vhodné méně diferencované buňky s velkým proliferačním potenciálem. Novak et al. vytvořili lidské iPSCs z keratinocytů pomocí odstranitelného vektoru s loxP místy a po jejich vystřížení byly iPSCs schopné diferencovat do plně funkčních kardiomyocytů. Takové buňky bez integrované cizorodé DNA již mohou sloužit pro modelování nemocí srdce a v budoucnu pro autologní transplantace.

## 5.6. Kultivace iPSCs

Pro klinické použití iPSCs jsou důležité rovněž definované kultivační podmínky bez použití zvířecích produktů, které by mohly být přeneseny do buněk pacientů a způsobit alergické reakce nebo přenos patogenů. Pro první odvozování hiPSCs byly použity MEFs nebo médium připravené za přítomnosti myších embryonálních fibroblastů (MEF-upravené médium) s přídavkem fetálního bovinního séra (FBS) (K. Takahashi, Tanabe, et al. 2007c). HiPSCs potřebují stejně jako hESC a na rozdíl od mESC pro svou existenci podpůrné buňky nebo komponenty ECM, zřejmě kvůli své závislosti na integrinové signalizaci.

Řešením bez použití cizorodých složek jsou autologní pomocné fibroblasty vznikající diferenciací přímo z hiPSCs, lidské podpůrné buňky z jiných tkání nebo nebuněčná matrix (matrigel, laminin, fibronectin, kolagen IV) (Stewart et al. 2008). Podařilo se nalézt i konkrétní faktory udržující hiPSCs v pluripotentním stavu a nedefinované médium tak mohlo být nahrazeno definovanou kombinací podpůrných faktorů rekombinantního, syntetického nebo lidského původu. Rutinně se dnes používá kombinace faktorů označovaná jako KO-SR (knockout - náhražka séra) s přidáním bFGF (Stewart et al. 2008; Akopian et al. 2010).

Všechny požadavky pro klinicky použitelné iPSCs se podařilo splnit skupině Yu et al. (Yu et al. 2011), která vytvořila iPSCs pomocí episomálních vektorů a kultivovala je v definovaném médiu a bez podpůrných buněk. Tento postup a jeho zefektivnění umožnilo použití chemických inhibitorů GSK3beta, MEK, ROCK a TGFbeta/Activin/nodal receptoru spolu s kultivací v LIF, které posouvají hiPSCs směrem k naivnímu stavu pluripotence, jehož výhodnost pro kultivaci iPSCs byla diskutována již dříve.

## 5.7. Aplikace iPSCs a jejich bezpečnost

Paralelně se zlepšováním metody reprogramace, její účinnosti a kultivačních podmínek samotných iPS buněk se vyvíjí i medicínské aplikace iPS technologie, jejichž bezpečnost jak v krátkodobém, tak v dlouhodobém horizontu je před klinickým využitím potřeba ověřit na zvířecích modelech (Sun et al. 2010).

Myš, pro svou velikost a nenáročnost chovu a také díky tomu, že je u ní úspěšně využíváno homologní rekombinace a vytváření geneticky definovaných kmenů, například

imunosuprimovaných, byla dosud nejvyužívanějším modelem v oblasti iPSCs a jejich aplikací (Tsuji et al. 2010e; Xu et al. 2009; Hanna et al. 2007). Stále je nejlepším modelem z hlediska zkoumání procesu reprogramace na buněčné úrovni, podstaty pluripotence a sebeobnovy. Pro ověření dlouhodobé bezpečnosti iPSCs pro autologní transplantace už je vhodná méně díky své odlišné fyziologii, velikosti a krátké délce života v porovnání s člověkem.

Vhodným modelem z tohoto pohledu se naopak ukazuje být prase, případně miniprase. Jeho fyziologie i velikost orgánů jsou srovnatelné s lidskými, jeho délka života 18-26 let (u miniprasete kolem patnácti let) je také pro tento účel dostačující. Výhodou miniprasete je jeho snadnější a úspornější chov. Naše dlouholeté zkušenosti s chovem prasat a fakt, že je pro člověka zdrojem potravy a odpadá tedy etický problém, (který se vyskytuje u dalšího vhodného kandidáta – primátů (rod: *Macaca*), jejichž chov by byl zároveň obtížnější) dělají z prasete ideálního kandidáta pro tento účel (Montserrat et al. 2011; Vodicka et al. 2005).

## **6. Prasečí (indukované) pluripotentní kmenové buňky**

Nedávné odvození prasečích iPSCs (Ezashi et al. 2009; Esteban et al. 2009; Wu et al. 2009; Telugu et al. 2010a; Montserrat et al. 2011) bylo důležitým krokem vpřed k aplikaci iPSCs pro medicínské účely. PiPSCs jsou o to cennější, že se dosud nepodařilo izolovat a dlouhodobě kultivovat prasečí ESCs. V tomto ohledu bylo učiněno několik neúspěšných pokusů, které nikdy nevedly k ESCs splňujícím všechna kritéria pluripotentních buněk (Vassiliev et al. 2010; Talbot & Blomberg 2008; Vackova et al. 2007; Gjørret & Maddox-Hyttel 2005). Důvody tohoto neúspěchu mohou být různé. Od nesprávně zvoleného embryonálního stadia pro odvození ESCs, nevyhovujících podmínek kultivace a pasážování, po kontaminaci rychleji rostoucími buňkami trofoektodermu blastocysty, ze které byly tyto buňky odvozeny (Hall, V. 2008). Důvodem mohou být i odlišnosti raného embryonálního vývoje prasete (Oestrup et al. 2009). Proto po vytvoření myších (K. Takahashi & Yamanaka 2006) a následně lidských iPSCs (Yu et al. 2007) se i výzkum prasečích pluripotentních kmenových buněk vydal touto cestou.

Mimoto, že mohou být piPSCs použity pro testování klinických aplikací, mohou být užitečné i pro budoucí úspěšné odvození a kultivaci vlastních (p)ESC, které slouží u ostatních

druhů jako standard pluripotentních kmenových buněk. Cestou k tomuto cíli je právě charakterizace piPSCs, detailní znalost podstaty jejich pluripotence, nalezení druhově specifických faktorů, které jsou nezbytné pro její udržení a následná optimalizace kultivačních podmínek piPSCs (Telugu et al. 2010b).

Wu et al., Ezashi et al. a Esteban et al. vytvořili piPSCs standardní metodou (Takahashi & Yamanaka 2006), která dala vznik piPSCs ve stavu připravené pluripotence - FGF2 závislých, nebo alespoň jim nejbližše. Později se jedna z nich (Telugu et al. 2010a) pokusila vytvořit i naivní piPSCs, které připravila vnesením sedmi faktorů (SKOM, Lin28, NANOG a T-antigen) do PFF (totožné použity i pro vytvoření připravených piPSCs (Ezashi et al. 2009)) a jejich kultivací v LIF-médiu obsahujícím specifické inhibitory MEK a GSK3beta - inhibitory drah spouštějících diferenciaci u hESCs, a tedy pravděpodobně i u piPSCs. Montserrat et al. vytvořili piPSCs pomocí vnesení jediného polycistronního plazmidového vektoru integrujícího se do genomu a exprimujícího SKOM a reportérový GFP. Tyto piPSCs byly svými vlastnostmi podobné hESCs, a tedy ve stavu připravené pluripotence.

Nyní budu porovnávat v první řadě piPSCs ve stavu připravené pluripotence, vlastnosti naivních piPSCs budou uváděny zvlášť nebo v porovnání s liniemi připravených piPSCs. Všechny skupiny vytvořily alespoň 1 linii piPSCs s normálním karyotypem schopnou diferenciaci ve formě EB i tvorby teratomů diferencujících do tkání všech tří zárodečných vrstev. Esteban et al. se dokonce podařilo vytvořit chimérická embrya, která dala vznik narozeným miniprasatům. Rozsah příspěvku piPSCs k jednotlivým tkáním ale nebyl komentován. Lišily se tkáně použité pro vytvoření piPSCs, kultivační podmínky a některé testované markery. Mezi skupinami nebyla úplná shoda v expresi testovaných markerů piPSCs.

Tabulka 3: porovnání vlastností pluripotentních buněk myši, člověka a prasete

linie buněk	kultivační podmínky	morfologie	citlivost na disociaci	TRA-1-60	TRA-1-81
myší ESC	LIF, BMP4	kulaté 3D	ne	ne	ne
lidské ESC	FGF2, Activin	zploštělé	ano	ano	ano
myší EpiSC	FGF2, Activin	zploštělé	ano	?	?
myší iPS buňky	LIF, BMP4	kulaté 3D	ne	ne	ne
lidské iPS buňky	FGF2, KOSR	zploštělé	ano	ano	ano
prasečí iPS buňky	FGF2, KOSR	zploštělé	ano	ano	ano
linie buněk	SSEA-1	SSEA-3	SSEA-4	tvorba teratomů	tvorba chimér
myší ESC	ano	ne	ne	všechny zár. Vrstvy	ano, S i G linie
lidské ESC	ne	ano	ano	všechny zár. Vrstvy	netestováno
myší EpiSC	?	?	?	všechny zár. Vrstvy	ano, pouze S
myší iPS buňky	ano	ne	ne	všechny zár. Vrstvy	ano, S i G linie
lidské iPS buňky	ne	ano	ano	všechny zár. Vrstvy	netestováno
prasečí iPS buňky	ano/ne	ano/ne	ano/ne	všechny zár. Vrstvy	ano, pouze S

Modifikováno na základě (Chou et al. 2008), tabulka popisuje vlastnosti linií buněk typických pro daný druh. Vysvětlivky: S (somatický), G (germinální, zárodečný).

### 6.1. Výchozí tkáň pro tvorbu piPSCs

Esteban et al. odvodili piPSCs z embryonálních fibroblastů miniprasete, Wu et al. použili jako výchozí tkáň primární ušní fibroblasty (PEFs) a buňky kostní dřeně (BMCs) plemene Danish landrace. BMCs i PEFs jsou buňkami vhodnými pro autologní transplantace, jejich odběr je relativně neinvazivní. Skupina Ezashi et al. použila k přípravě piPSCs fetální fibroblasty domácího prasete (PFFs), které jsou přístupnější reprogramaci, ale vyžadují obětování celého embrya, tudíž nepoužitelné pro autologní transplantace. A konečně Montserrat et al. (Montserrat et al. 2011) použili PEFs stejně jako Wu et al. Zatím bylo spektrum buněk použitých k vytvoření piPSCs relativně omezené, do budoucna bude potřeba širší analýza přístupnosti prasečích tkání k reprogramaci, viz předchozí pojednání o výchozích tkáních pro reprogramaci.



## 6.2. Vektory použité pro reprogramaci piPSCs

3 skupiny použily pro vytvoření piPS buněk metodu reprogramace pomocí integrativních virových vektorů. Lentivirových (Ezashi et al. 2009; Wu et al. 2009) nebo retrovirových (Esteban et al. 2009). Wu et al. použili lentivirové vektory s geny řízenými chemicky indukovatelným promotorem, které umožňují kontrolovat přepis genů a vypnout ho v momentě diferenciaci buněk. Tato skupina testovala také transdukcii retrovirovými částicemi, ale bez úspěchu. Došli k závěru, že transdukované PEF neexprimují retrovirový receptor a dále používali lentivirové vektory. Nejnovější práce (Montserrat et al. 2011) popsala metodu transfekce jediným plazmidovým polycistronním vektorem obsahujícím sekvence SKOM a reportéru GFP. Tento vektor se do genomu buněk také integroval, jeho výhodou je menší počet integrací a větší rychlost reprogramace v porovnání s retrovirovou transfekcí.

Integrativní vektory jsou dobrou volbou pro první pokusy o vytvoření piPSCs. Ideální pro situaci, kdy ještě zcela neznáme nároky a podstatu pluripotence piPSCs jsou chemicky indukovatelné vektory, které umožňují testovat různé kultivační podmínky. Pro preklinické modely nemocí pak ale bude potřeba přejít na jinou formu vnesení reprogramačních faktorů, která nebude zanechávat cizorodou DNA v piPSCs. V některých případech iPSCs neumlčené vnesené geny ovlivnily schopnost diferenciaci buněk (Yu et al. 2007), v jiných nikoli (Montserrat et al. 2011). Montserrat et al. ukázali jako první cílenou diferenciaci piPSCs a vytvořili funkční bijící kardiomyocyty přes stálou expresi vnesených transgenů. Pro ověření stability tohoto diferencovaného fenotypu by bylo potřeba další analýzy. Stále není jisté, jak velký mají aktivní transgeny na diferenciaci buněk a stabilitu diferencovaných produktů vliv. Pro klinickou praxi je ale třeba toto riziko eliminovat úplně.

Pokus o reprogramaci prasečích buněk episomálními plazmidovými vektory učinili Telugu et al., kteří se pokusili vytvořit naivní piPSCs. Jejich plazmidy měly dělení synchronní s buněčným a byly v buňkách udržovány na základě negativní selekce antibiotikem. Autoři studie předpokládali, že po zastavení tohoto selekčního tlaku se plazmidy z buněk po několika pasážích vyřadí. Plazmidy ale zůstaly v piPSCs bez ohledu na selekci nebo se dokonce integrovaly do genomu. To znamená, že buňky tyto plazmidy stále potřebovaly a nedošlo u nich k plné reprogramaci. V závěru autoři potvrdili, že nejlepším řešením je

v současnosti využití integrativních vektorů s chemicky indukovatelnou expresí genů, která umožňuje řízení systému.

### **6.3. Reprogramační faktory pro tvorbu piPSCs**

Všechny skupiny použily pro reprogramaci takzvanou kanonickou kombinaci faktorů zkráceně označovanou jako OSKM – OCT4, SOX2, KLF4 a c-MYC. Wu et al. testovali i kombinaci OSNL – OCT4, SOX2, NANOG a Lin28 a kombinaci všech 6ti reprogramujících faktorů OSKMNL. Vytvoření prasečích iPSCs se podařilo pomocí kombinace OSKM a kombinace 6ti reprogramačních faktorů. Druhá zmíněná varianta vedla k vytvoření lépe rostoucích buněk s větším počtem nediferencovaných kolonií. Efektivita indukce pluripotentního stavu byla přibližně stejná (Wu et al. 2009).

Vložené geny byly lidského nebo myšího původu. Výhodou jejich použití je, že je možné díky jejich rozdílným sekvencím odlišit endogenní expresi od exogenní a tak ověřit míru umlčení vnesených genů pomocí qPCR. Důvodem jejich použití je ale zřejmě nedostatečná znalost prasečího genomu, který by bylo potřeba do budoucna detailně anotovat. Tento nedostatek se projevuje i při ověřování celkového expresního stavu buněk na microarray, kdy i některé geny zásadní pro pluripotenci (NANOG, SOX2) nejsou na prasečím čipu representovány nebo anotovány a jejich exprese nemůže být zhodnocena (Ezashi et al. 2009). Nicméně myší a lidské geny jsou plně dostačující k reprogramaci prasečích buněk. Nebyl pozorován rozdíl mezi reprogramací lidskými a myšími faktory (Esteban et al. 2009).

### **6.4. Testované znaky piPSCs**

Vytvořené kolonie piPSCs vykazují morfologii specifickou pro kolonie ESCs tzn. kompaktní morfologii kolonií s buňkami majícími vysoký poměr jádra k cytoplazmě a nápadné jádérko. Typické markery pluripotence jako aktivita AP, TERT a exprese OCT4, NANOG, SOX2 a další se vyskytovaly u charakterizovaných linií ve všech pracech mimo Montserrat et al., kteří neuvádí expresi TERT, OCT4 a SOX2. Za nesrovnalosti v úrovních exprese mezi liniemi piPSCs byly zodpovědné neumlčené transgeny, jejichž úroveň exprese byla ověřena pomocí druhově specifických primerů. Exprese některých typických genů pro mESCs a hESCs nemohla být

ověřena kvůli nedostatečné anotaci prasečího genomu, celkově se ale piPSCs blížily expresi iPSCs i ESCs jiných druhů.

PiPSCs jsou charakteristické i přítomností řady znaků, jejichž složení se nejvíce blíží hESC. V přítomnosti těchto znaků u piPSCs se autoři neshodují. Nejvíce rozporuplná je exprese SSEA-1, -3 a -4. Oproti předpokladu že buňky piPSCs budou exprimovat shodně s hESC SSEA-3 a -4 vytvořili Ezashi et al. piPSCs SSEA 3 a 4 negativní a naopak SSEA-1, který je typickým znakem mESC, pozitivní. Navíc jejich piPSCs neexprimovaly ani TRA-1-60 a TRA-1-81. To vše se shoduje s expresí buněk ICM prasečí blastocysty sedmidenního zárodka a zároveň s expresí prasečích zárodečných buněk. Podařilo se jim tedy pravděpodobně vytvořit buňky bližší naivním piPSCs. Rychlost zdvojování a morfologie kolonií byla naopak u těchto buněk shodná s hESC. Buňky byly kultivovány v médiu s FGF2, typickém pro hESC. Bohužel Ezashi et al. netestovali podmínky kultivace mESC aby ověřili, zda budou piPSCs růst i v nich. Navíc se jim podařilo vytvořit jen jednu linii piPSCs s normálním karyotypem, kterou detailně testovali. Bude tedy potřeba ověřit expresi těchto markerů pluripotence u dalších linií buněk. Rozdíl může být dán i odlišným plemenem prasete. Různá plemena prasat se mohou podobně jako myši kmeny lišit svými předpoklady k tvorbě piPSCs naivních nebo připravených.

Práce Montserrat et al. se od prací z roku 2009 nejvíce liší. Uvedli jen několik testovaných znaků pluripotence testovaných pomocí imunofluorescence. Jejich piPSCs byly pozitivní pro (mimo výše uvedeného NANOG a aktivity AP) SSEA-4 a TRA-1-60. Autoři ale nezmínili testování genové exprese pomocí RT-PCR jako ostatní skupiny ani ověření globální úrovně genové exprese na microarrays. Tím plně neověřili, zda jsou jejich buňky opravdu plně reprogramovanými piPSCs, přestože jejich morfologie byla blízká hESC. Montserrat et al. také neuvedli, zda byly vytvořené buňky dlouhodobě kultivovány bez známek stárnutí. Není tedy jisté, zda se jim opravdu podařilo vytvořit piPSCs.

### **6.5. Kultivace piPSCs**

K tomu, aby si iPS buněčné linie svou pluripotenci zachovaly po dlouhou dobu, je potřeba specifických kultivačních podmínek. Nesprávné kultivační podmínky jsou jedním z možných důvodů, proč se nedaří izolovat a udržet linie prasečích ESCs. Právě proto je tak důležitá identifikace růstových faktorů a malých molekul, které pomáhají udržet pluripotentní

charakter buněk a následná optimalizace kultivačních podmínek piPSCs, která by mohla pomoci i k budoucímu úspěšnému vytvoření a udržení prasečích ESCs linií. Tento problém není stále plně dořešen.

Esteban et al. testovali 3 typy kultivačních podmínek. MESC-specifické s přidavkem LIF, hESCs specifické s přidavkem FGF2 a směs obou v poměru 1:1. Kolonie piPSCs se objevily zpočátku ve všech kultivačních podmínkách, v myších a kombinovaných ale po několika týdnech převládly buňky s nepravidelnými okraji lišící se od ESCs. Monserrat et al. kultivovali piPSCs ve směsi mESCs a hESCs média v poměru 1:1, ale protože nevedli, zda se jim podařilo dlouhodobě udržet fenotyp piPSCs, je pravděpodobnější, že tyto podmínky pro piPSCs dlouhodobě vhodné nejsou.

Pro piPSCs jsou v současné fázi vývoje kultivačních podmínek důležité vyživovací buňky. Wu et al., Esteban et al. a Ezashi et al. použili shodně MEFs, s proliferací zastavenou ozářením nebo ošetřené mitomycinem c, aby piPSCs nepřerůstaly. Bez nich piPSCs spontánně diferencují. Je to zřejmě dáno typem interakcí, mezi kterými pravděpodobně převládají integrinem zprostředkované interakce s ECM a MEFs oproti mezibuněčným, podobně jako u hESCs. Tento předpoklad ale zatím nebyl ověřen porovnáním exprese integrinů oproti E-cadherinu. Tyto poměry by se teoreticky mohly lišit u piPSCs Ezashi et al., které exprimovaly markery mESCs. Monserrat et al. testovali i kultivaci buněk na gelatinu, na kterém se jim podařilo buňky reprogramovat se stejnou účinností jako na ozářených MEFs. Další vývoj kultivace v obou podmínkách ale nerozváděli.

Pasážování buněk probíhalo u všech skupin mechanicky nebo za použití dispazy, na kterou zřejmě nejsou piPSCs citlivé tak jako na trypsin. Esteban et al. označili trypsinizaci buněk jako faktor spouštějící spontánní diferenciaci piPSCs podobně jako hESCs.

## **6.6. Diferenciace piPSCs**

Přestože celkově byla schopnost diferenciaci piPSCs srovnatelná s hESCs, všechny testované linie diferencovaly *in vitro* v EB i *in vivo* v teratomech do tkání všech tří zárodečných listů, schopnost piPSCs diferencovat do konkrétních linií za specifických podmínek byla testována pouze u Monserrat et al. Byly vytvořeny funkční kardiomyocyty i přes stálou transgenní expresi, ale vzhledem k nedostatečnému ověření vlastností pluripotence těchto buněk není jisté, zda se opravdu jednalo o diferenciaci piPSCs a ne jiných buněk, které se jim jen

vzdáleně blížily. Modely liniově specifické diferenciacie vytvořené na myším a lidském modelu by měly být u prasete a miniprasete ověřeny dalšími autory a případně pozměněny. Potřebné cytokiny se mohou mezidruhově lišit, stejně jako protilátky a další chemikálie používané při charakterizaci pluripotentních buněk.

### **6.7. Naivní piPSCs**

Důvodem pro vytvoření naivních piPSCs bylo jejich údajně snadnější přispívání k tvorbě chimér a jejich zárodečným liniím, jejich lepší klonální šíření a obecně manipulace s nimi. Podobně se objevily pokusy o vytvoření naivních hiPSCs (Hanna et al. 2010).

Esteban et al., kteří vytvořili připravené piPSCs, zkusili buňky s neumlčenými transgeny dovést do stavu plné reprogramace nejprve přidáním 5-Aza (5-Aza cytidinu - inhibitoru metyltransferáz) do kultivačního média. To ale nemělo vliv na morfologii piPS buněk. Úspěšnější bylo použití inhibitorů ERK a GSK3beta, které mělo za následek kompaktnější morfologii a rychlejší proliferaci piPSCs, ale nezměnilo hladiny přepisu testovaných znaků ESC. PiPSCs se tedy pomocí vnějších faktorů podařilo přiblížit stavu naivní pluripotence, ale nebylo ho dosaženo.

Úspěšně vytvořili naivní piPSCs Telugu et al. Pro jejich vznik byly použity mimo vnesených episomálních vektorů se sekvencemi SKOMNL a T-antigeny specifické kultivační podmínky 2i/LIF a přidání inhibitorů histon deacetyláz, které měly udržet vysokou úroveň aktivace genové exprese. Po pokusu o reprogramaci v těchto podmínkách vykazovaly buňky expresi SOX2, NANOG a slabou expresi OCT4, vysokou aktivitu telomerázy, krátký buněčný cyklus a toleranci k disociaci trypsinem, avšak velká část buněk nebyla schopna tvořit kompaktní 3D kolonie. Tvořily spíše rozvolněné granulární kolonie, což bylo interpretováno jako neschopnost buněk překlenout metylační bariéru pro dosažení plné pluripotence. Nedokončená demetylace promotorů genů spojených s pluripotencí zabraňuje vneseným transkripčním faktorům na ně nasedat a reprogramaci dokončit. Po přidání 5-Aza cytidinu, který dokázal zvýšit počet SSEA-1 pozitivních mESCs (Mikkelsen et al. 2008), kolonie změnilly tvar na mESCs-charakteristický a granulární kolonie zmizely. Takto reprogramované buňky exprimovaly vyšší hladiny OCT4, SSEA-1 a -4, ale nikoli SSEA-3.

Vzniklé buňky byly závislé na LIF. Pokud byl z média odebrán, buňky během dvou pasáží začaly diferencovat. Kromě toho vykazovaly všechny typické znaky pluripotentních buněk

(aktivní AP, TERT, endogenní geny pluripotence, krátký buněčný cyklus, tolerance k disociaci trypsinem, diferenciaci v EB i v teratomech do tkání tří zárodečných vrstev). Dříve zmíněné neumlčení a nevyředění episomálních vektorů v reprogramovaných buňkách se shoduje se situací při tvorbě naivních hiPSCs kde je exprese transgenů důležitá nejen pro reprogramaci, ale i pro udržení pluripotentního charakteru (Hanna et al. 2010). Tento jev ukazuje na nestabilitu naivního pluripotentního stavu piPSCs a tedy jejich větší tendenci k připravenému pluripotentnímu stavu. Navození naivního pluripotentního stavu je další dobrý experimentální prostředek pro zkoumání podstaty pluripotence buněk různých druhů a k jeho navození a udržení bude do budoucna nejvhodnější, stejně jako u připravených piPSCs, chemicky indukovatelný systém integrativních vektorů. I tato cesta může být užitečná pro vytvoření piPSCs použitelných pro modelování lidských nemocí a terapií *in vivo*.

Tabulka 4: Porovnání vlastností různých linií piPSCs

		Esteban (2009)	Wu (2009)	Ezashi (2009)	Telugu (2010)	Montserrat (2011)
reprogramační faktory		SKOM	SKOM	SKOM	SKOMNL, T-antigen (h)	SKOM
metoda reprogramace					episomální vektory	plazmidový polycistronický vektor
umlčení transgenů		ne	ne	ne	ne	ne
zdrojová tkáň		prasečí embryonální fibroblasty	primární ušní fibroblasty, BMC		primární fetální fibroblasty	prasečí fetální fibroblasty
povrchové znaky	SSEA-1	?	ne	ano	ano	?
	SSEA-3	?	ano	ne	ne	?
	SSEA-4	ano	ano	?	ano	ano
	TRA-1-60	?	ano	ne	?	ano
	TRA-1-81	?	ano	ne	?	?
znaky pluripotence (vnitřní)	OCT4	?	ano	ano	ano	?
	SOX2	ano	ano	ano	ano	?
	NANOG	ano	ano	ano	ano	ano
	LIN28	ano	ano	ano	?	?
	CDH1	?	ano	ano	?	?
	REX1	ano	ano	ano	?	?
tvorba embryoidních tělísek		?	ano	ano	?	ano
tvorba teratomů		ano	ano	ano	ano	ano
tvorba chimér		?	?	?	?	?

Modifikováno na základě (Roberts et al. 2009).

## 6.8. Prasečí epiblastové kmenové buňky

Nedávno byly také odvozené pEpiSCs z prasečího epiblastu (embryonálního disku) 10,5-12 dní starých embryí v médiu s bFGF a závislé na Activin/Nodal (Alberio et al. 2010). Je otázkou, jestli jsou pEpiSCs totožné s připravenými pESC podobně jako tomu je u lidských ESCs odvozených stejným způsobem (Tesar et al. 2007f) nebo se jedná o buňky odlišné. To by vneslo do situace kolem piPSCs další nejasnosti ohledně jejich vzniku, původu a podstaty pluripotence.

## 7. Závěr

Jak bylo již mnohokrát zmíněno, piPSCs, jejich vytvoření, charakterizace, kultivace a cílená diferenciace jsou důležité pro využití (mini)prasete jako modelového organismu pro preklinické modely lidských nemocí léčitelných pomocí iPS technologie. Ve všech aspektech práce s piPSCs jsme teprve na začátku. Neznáme stále s jistotou ani typické pluripotentní markery piPSCs a podstatu pluripotence piPSCs. Je potřeba rozsáhlých analýz týkajících se přístupnosti různých plemen a zdrojových tkání k reprogramaci prasečích buněk, stejně jako použitelnosti různých systémů reprogramace. Musíme identifikovat molekuly podporující navození a udržení pluripotentního stavu piPSCs. K tomuto účelu se zdá ideální chemicky indukovatelný systém integrativních vektorů. Zároveň je pro přesnější analýzu jak celkové exprese, tak exprese znaků pluripotence piPSCs potřeba dokončit anotaci prasečího genomu. Dále je třeba ověřit myši a lidské modely cílené diferenciace na prasečích buňkách a tyto modely upravit. Dalším cílem by mělo být ověření schopnosti piPSCs přispívat k zárodečným liniím chimér a tedy možností tvořit tímto způsobem transgenní linie prasat. Nadějným začátkem pro vytváření transgenních linií prasat je možnost použití piPSCs pro techniku homologní rekombinace díky jejich dlouhodobé proliferaci bez známek stárnutí, která byla většinou skupin potvrzena. Tato transgenní prasata mohou nést získané fenotypy nemocí, které na nich chceme modelovat, ale také vlastnosti výhodné pro chov. Po úspěšném vytvoření transgenních linií bude možné provádět samotné preklinické pokusy a testovat projevy nemoci, nové léky zmírňující průběh nemoci, a konečně samotnou léčebnou metodu opravy poškozeného genu v piPSCs, odvozených z transgenního zvířete,

následovanou autologní transplantací opravených a cíleně diferencovaných buněk, které by měly v ideálním případě nemoc vyléčit. Takto léčená zvířata bude potřeba dlouhodobě sledovat a pozorovat změny jejich zdravotního stavu a zároveň ověřit bezpečnost postupu v krátkodobém i dlouhodobém horizontu. Největším rizikem této léčebné metody jsou nestabilně diferencované buňky, které mohou zpětně dediferencovat a způsobit rakovinné bujení. Cílem, který souvisí s ostatními a zároveň pomůže s jejich naplněním je vytvoření linií pESCs splňujících všechna kritéria pluripotence. Takové buňky potvrdí správnost fenotypu piPSCs a budou standardem pro jejich tvorbu.



## 8. Použitá literatura

- Aasen, T. & Belmonte, J.C.I., 2010. Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 5(2), s.371-382.
- Adhikary, S. & Eilers, M., 2005. TraNSCRIPTIONAL regulation and transformation by Myc proteins. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(8), s.635-645.
- Akopian, V. et al., 2010. Comparison of defined culture systems for feeder cell free propagation of human embryonic stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 46(3-4), s.247-258.
- Alberio, R., Croxall, N. & Allegrucci, C., 2010. Pig epiblast stem cells depend on activin/nodal signaling for pluripotency and self-renewal. *Stem Cells and Development*, 19(10), s.1627-1636.
- Amit, M., Carpenter, M.K., et al., 2000. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental Biology*, 227(2), s.271-278.
- Avilion, A.A. et al., 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development*, 17(1), s.126-140.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., et al., 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5349), s.349-352.
- Boué, S. et al., 2010. Analysis of human and mouse reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. What is in the plate? *PloS One*, 5(9). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20862250> [Přístup březem 8, 2011].
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., et al., 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6), s.947-956.
- Brons, I.G.M. et al., 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, 448(7150), s.191-195.
- Brook, F A & Gardner, R L, 1997. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(11), s.5709-5712.
- Buehr, M. et al., 2008. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell*, 135(7), s.1287-1298.
- Bulić-Jakus, F. et al., 2006. Of mice and men: teratomas and teratocarcinomas. *Collegium Antropologicum*, 30(4), s.921-924.

- Cartwright, P., 2005. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*, 132, s.885-896.
- Clerc, P. & Avner, P., 2011. Perspective: New Lessons from Random X-Chromosome Inactivation in the Mouse. *Journal of Molecular Biology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21329697> [Přístup duben 27, 2011].
- Darr, H., Mayshar, Y. & Benvenisty, N., 2006. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development (Cambridge, England)*, 133(6), s.1193-1201.
- Djuric, U. & Ellis, J., 2010. Epigenetics of induced pluripotency, the seven-headed dragon. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(1), s.3.
- Eastham, A.M. et al., 2007. Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Research*, 67(23), s.11254-11262.
- Esteban, M.A., Xu, J., et al., 2009. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(26), s.17634-17640.
- Evans, M.J. & Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), s.154-156.
- Evans, M.J. & Kaufman, M., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, s.154-156.
- Ezashi, T. et al., 2009. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(27), s.10993-10998.
- Galli-Taliadoros, L.A. et al., 1995. Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice. *Journal of Immunological Methods*, 181(1), s.1-15.
- Gardner, R L & Brook, F A, 1997. Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells. *The International Journal of Developmental Biology*, 41(2), s.235-243.
- Gjørret, J.O. & Maddox-Hyttel, P., 2005. Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures. *Reproduction, Fertility, and Development*, 17(1-2), s.113-124.
- Guo, G. et al., 2009. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development (Cambridge, England)*, 136(7), s.1063-1069.
- Hall, J. et al., 2009. Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Krüppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*, 5(6), s.597-609.
- Hall, Vanessa, 2008. Porcine embryonic stem cells: a possible source for cell replacement therapy. *Stem Cell Reviews*, 4(4), s.275-282.

- Hanna, J. et al., 2010. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), s.9222-9227.
- Hanna, J. et al., 2009. Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESCs. *Cell Stem Cell*, 4(6), s.513-524.
- Hanna, J. et al., 2007. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5858), s.1920-1923.
- Hayashi, K. et al., 2008. Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. *Cell Stem Cell*, 3(4), s.391-401.
- Henderson, J.K. et al., 2002. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 20(4), s.329-337.
- Hotta, A. & Ellis, J., 2008. Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(4), s.940-948.
- Chambers, I. et al., 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(5), s.643-655.
- Chang, C.-W. et al., 2009. Polycistronic lentiviral vector for „hit and run“ reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 27(5), s.1042-1049.
- Chou, Y.-F. et al., 2008. The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells. *Cell*, 135(3), s.449-461.
- Ivanova, N. et al., 2006. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*, 442(7102), s.533-538.
- James, D. et al., 2005. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development (Cambridge, England)*, 132(6), s.1273-1282.
- Kashyap, V. et al., 2009. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells and Development*, 18(7), s.1093-1108.
- Kim, D. et al., 2009. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 4(6), s.472-476.
- Kim, J.B. et al., 2009. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 136(3), s.411-419.

- Kunath, T., 2007. FGF stimulation of the ERK1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development*, 134, s.2895-2902.
- Liao, J., Cui, C., Chen, S., et al., 2009. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell*, 4(1), s.11-15.
- Lin, C.-J. et al., 2010. Acceptance of embryonic stem cells by a wide developmental range of mouse tetraploid embryos. *Biology of Reproduction*, 83(2), s.177-184.
- Liu, H. et al., 2008. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 3(6), s.587-590.
- Loh, Y.-H. et al., 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics*, 38(4), s.431-440.
- Maherali, N. et al., 2007. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 1(1), s.55-70.
- Martin, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), s.7634-7638.
- McDevitt, T.C. & Palecek, S.P., 2008. Innovation in the culture and derivation of pluripotent human stem cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(5), s.527-533.
- Mikkelsen, T.S. et al., 2008. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 454(7200), s.49-55.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., et al., 2003a. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5), s.631-642.
- Montserrat, N. et al., 2011. Generation of Pig iPS Cells: A Model for Cell Therapy. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 4(2), s.121-130.
- Nagy, A. et al., 1990. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development (Cambridge, England)*, 110(3), s.815-821.
- Najm, F.J. et al., 2011. Isolation of Epiblast Stem Cells from Preimplantation Mouse Embryos. *Cell Stem Cell*, 8(3), s.318-325.
- Nichols, J. & Smith, A., 2009a. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*, 4(6), s.487-492.
- Nichols, J. & Smith, A., 2009b. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*, 4(6), s.487-492.
- Niibe, K. et al., 2011. Purified Mesenchymal Stem Cells Are an Efficient Source for iPS Cell Induction. *PloS One*, 6(3), s.e17610.

- Niwa, H, Miyazaki, J. & Smith, A.G., 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, 24(4), s.372-376.
- Niwa, Hitoshi, 2007. How is pluripotency determined and maintained? *Development (Cambridge, England)*, 134(4), s.635-646.
- Novak, A. et al., 2010. Enhanced reprogramming and cardiac differentiation of human keratinocytes derived from plucked hair follicles, using a single excisable lentivirus. *Cellular Reprogramming*, 12(6), s.665-678.
- Oestrup, O. et al., 2009. From zygote to implantation: morphological and molecular dynamics during embryo development in the pig. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 44 Suppl 3, s.39-49.
- Okita, K., Hong, H., et al., 2010b. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nature Protocols*, 5(3), s.418-428.
- Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S., 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448(7151), s.313-317.
- Okita, K. et al., 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5903), s.949-953.
- Palmieri, S.L. et al., 1994. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Developmental Biology*, 166(1), s.259-267.
- Pesce, M. & Schöler, H R, 2001. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 19(4), s.271-278.
- Roberts, R.M., Telugu, B.P.V.L. & Ezashi, T., 2009. Induced pluripotent stem cells from swine (*Sus scrofa*): why they may prove to be important. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(19), s.3078-3081.
- Rodda, D.J., Chew, J.-L., Lim, L.-H., Loh, Y.-H., Wang, B., Ng, H.-H. & Robson, P., 2005b. TraNSCriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(26), s.24731-24737.
- Rosenfeld, N., Elowitz, M.B. & Alon, U., 2002. Negative autoregulation speeds the response times of transcription networks. *Journal of Molecular Biology*, 323(5), s.785-793.
- Silva, J. et al., 2008. Promotion of Reprogramming to Ground State Pluripotency by Signal Inhibition. *PLoS Biol*, 6(10), s.e253.
- Silva, S.S. et al., 2008. X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(12), s.4820-4825.

- Stewart, M.H., Bendall, S.C. & Bhatia, M., 2008. Deconstructing human embryonic stem cell cultures: niche regulation of self-renewal and pluripotency. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 86(8), s.875-886.
- Sun, N., Longaker, M.T. & Wu, J.C., 2010. Human iPS cell-based therapy: considerations before clinical applications. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(5), s.880-885.
- Takahashi, K., Tanabe, K., et al., 2007c. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), s.861-872.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), s.663-676.
- Talbot, N.C. & Blomberg, L.A., 2008. The pursuit of ES cell lines of domesticated ungulates. *Stem Cell Reviews*, 4(3), s.235-254.
- Tam, P.P.L. & Rossant, Janet, 2003. Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development. *Development (Cambridge, England)*, 130(25), s.6155-6163.
- Tat, P.A. et al., 2010. The efficient generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult mouse adipose tissue-derived and neural stem cells. *Cell Transplantation*, 19(5), s.525-536.
- Telugu, B.P.V.L., Ezashi, T. & Roberts, R.M., 2010a. Porcine induced pluripotent stem cells analogous to naïve and primed embryonic stem cells of the mouse. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(11-12), s.1703-1711.
- Telugu, B.P.V.L., Ezashi, T. & Roberts, R.M., 2010b. The promise of stem cell research in pigs and other ungulate species. *Stem Cell Reviews*, 6(1), s.31-41.
- Tesar, P.J. et al., 2007. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, 448(7150), s.196-199.
- Thomson, J A et al., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), s.1145-1147.
- Thomson, J A et al., 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17), s.7844-7848.
- Tsuji, O. et al., 2010. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(28), s.12704-12709.
- Vackova, I., Ungrova, A. & Lopes, F., 2007. Putative embryonic stem cell lines from pig embryos. *The Journal of Reproduction and Development*, 53(6), s.1137-1149.
- Vallier, L., Alexander, M. & Pedersen, R.A., 2005. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 19), s.4495-4509.

- Varlakhanova, N.V. et al., 2010. myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 80(1), s.9-19.
- Vassiliev, I. et al., 2010. Development of culture conditions for the isolation of pluripotent porcine embryonal outgrowths from in vitro produced and in vivo derived embryos. *The Journal of Reproduction and Development*, 56(5), s.546-551.
- Vassiliev, I. et al., 2010. Development of culture conditions for the isolation of pluripotent porcine embryonal outgrowths from in vitro produced and in vivo derived embryos. *The Journal of Reproduction and Development*, 56(5), s.546-551.
- Vodicka, P. et al., 2005. The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1049, s.161-171.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, Hu, Lau, F., et al., 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7(5), s.618-630.
- Watanabe, K. et al., 2007. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 25(6), s.681-686.
- Wu, Z., Chen, Jijun, Ren, J., Bao, L., et al., 2009. Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *Journal of Molecular Cell Biology*, 1(1), s.46-54.
- Xu, C. et al., 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19(10), s.971-974.
- Xu, D. et al., 2009. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(3), s.808-813.
- Xu, R.-H., Chen, Xin, Li, D.S., Li, R., Addicks, G.C., Glennon, C., Zwaka, T.P., et al., 2002c. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nature Biotechnology*, 20(12), s.1261-1264.
- Xu, R.-H. et al., 2005. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nature Methods*, 2(3), s.185-190.
- Xu, Y., Zhu, X., Hahm, H.S., Wei, W., Hao, E., Hayek, A. & Ding, S., 2010. Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(18), s.8129-8134.
- Yamanaka, S. & Blau, H.M., 2010. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*, 465(7299), s.704-712.
- Ying, Q.L. et al., 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 115(3), s.281-292.

- Ying, Q.-L. et al., 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 453(7194), s.519-523.
- Yu, J. et al., 2009. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5928), s.797-801.
- Yu, J. et al., 2011. Efficient feeder-free episomal reprogramming with small molecules. *PloS One*, 6(3), s.e17557.
- Yu, J. et al., 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5858), s.1917-1920.