

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH ZDROJOV
1115856

BAKALÁRSKA PRÁCA

2010

LUCIA RYBANOVÁ

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH ZDROJOV

ANALÝZA VIABILITY ŽIVOČÍŠNYCH KMEŇOVÝCH BUNIEK

Bakalárska práca

Študijný program:

Všeobecné poľnohospodárstvo

Školiace pracovisko:

Katedra biochémie a biotechnológie, FBP SPU

Školiteľ:

doc. Ing. Peter Chrenek, DrSc.

NITRA 2010

LUCIA RYBANOVÁ

Čestné vyhlásenie

Podpísaná Lucia Rybanová vyhlasujem, že som bakalársku prácu na tému „Analýza viability živočíšnych kmeňových buniek“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre 7. mája 2010

Pod'akovanie

Dovoľujem si úprimne poďakovať svojmu školiteľovi doc. Ing. Petrovi Chrenekovi, DrSc. za odborné vedenie, cenné rady a praktické pripomienky, ktoré mi poskytol počas štúdia a pri vypracovávaní bakalárskej práce.

Zároveň chcem poďakovať predovšetkým svojim rodičom za ich neustálu pomoc, podporu a trpezlivosť, ktoré mi poskytli počas celého štúdia.

Bakalárska práca bola podporovaná z projektu APVV LPP-0119-09.

Abstrakt

Potenciál kmeňových buniek pre vývin, regeneráciu a obnovu tkanív poznali embryológovia a vývinoví biológovia už veľa rokov. Kmeňové bunky sú pôvodcom života organizmu. U zvierat a človeka vytvára jediná totipotentná kmeňová bunka, ktorou je oplozené vajíčko, celý organizmus obsahujúci množstvo špecializovaných typov buniek. Cieľom bakalárskej práce je súhrnne prezentovať súčasný pohľad na to, čo sú kmeňové bunky a na čo môžu slúžiť. Kmeňové bunky majú obrovský potenciál v oblastiach regeneratívnej medicíny a tkanivového inžinierstva pretože si zachovávajú schopnosť vytvárať každý typ bunky a tkaniva v tele. Cieľom intenzívneho výskumu kmeňových buniek je ich použitie u človeka. V posledných rokoch sa dosiahol obrovský pokrok v potenciálnom využití kmeňových buniek ako liečebných prostriedkov, ktoré môžu viesť k predĺženiu života so zmenšením bolesti a jeho vyššej kvalite. Kmeňové bunky môžu byť kľúčom k náhrade buniek stratených pri mnohých chorobách, akými sú Parkinsonova choroba, cukrovka, chronická choroba srdca, svalová dystrofia alebo porucha pečene, ako aj rakovina.

Kľúčové slová: kmeňové bunky, embryo, pluripotencia, homologická rekombinácia

Abstract

The potential of stem cells for development, regeneration and renewal of tissues has been well known by embryologists and developmental biologists for many years. The stem cells are the origin of organism's life. In animals and humans, one totipotent stem cell, the fertilized oocyte, generates a complex organism containing number of specialized cell types. The goal of bachelor work is to present in one resource the current understanding of what stem cells are and what they can do. Stem cells have huge potential in the fields of regenerative medicine and tissue engineering because they hold the capacity to produce every type of cell and tissue in the body. The goal of the intense research on stem cells is for human application. Tremendous progress has been made in the past few years in the potential use of stem cells as therapeutic agents, which may lead to prolonged life with less suffering and higher quality. Stem cells may be the key to replacing cells lost in many diseases such as Parkinson's disease, diabetes, chronic heart disease, muscular dystrophy or liver failure as well as cancer.

Keywords: stem cells, embryo, pluripotency, homologous recombination

Obsah

Obsah	6
Zoznam ilustrácií	7
Zoznam skratiek	8
Úvod	9
1 Prehľad literatúry	10
1.1 História	10
1.2 Charakteristika kmeňových buniek	11
1.2.1 Definícia kmeňových buniek, ich vlastnosti a rozdelenie	11
1.2.2 Metódy získavania (izolácie) kmeňových buniek.....	16
1.2.3 Identifikácia kmeňových buniek.....	18
1.2.4 Kmeňové bunky človeka.....	20
1.2.5 Kmeňové bunky myši	21
1.2.6 Kmeňové bunky králika	22
1.2.7 Kmeňové bunky ošípanej.....	23
1.2.8 Kmeňové bunky hovädzieho dobytku a oviec	23
1.2.9 Partenogenetické kmeňové bunky	23
1.2.10 Indukované pluripotentné bunky	24
1.3 Metódy genetickej modifikácie kmeňových buniek.....	24
1.3.1 Metódy genetickej modifikácie.....	24
1.3.2 Prenos génov do kmeňových buniek	25
2 Ciele práce.....	30
3 Materiál a metódy práce.....	31
4 Výsledky práce a diskusia	32
4.1 Význam kmeňových buniek	32
5 Záver.....	35
6 Zoznam použitej literatúry.....	36

Zoznam ilustrácií

Obr. 1	Cyklus života.	11
Obr. 2	Kolónie embryonálnych kmeňových buniek	14
Obr. 3	Schéma lipofekcie buniek v bunkovej kultúre.....	27
Obr. 4	Schéma elektroporácie embryonálnych kmeňových buniek.....	28
Obr. 5	Schéma magnetickej asistovanej transfekcie	29

Zoznam skratiek

ASC	dospelé kmeňové bunky
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EB	embryoidné teliesko
ECC	embryonálne karcinómové bunky
ESC	embryonálne kmeňové bunky
FGF	rastový faktor pre fibroblasty
ICM	vnútorná bunková masa
LIF	faktor inhibujúci leukémiu
LTR	dlhé koncové repetície
MATra	magnetická asistovaná transfekcia
MEF	embryonálne fibroblasty myší
MHC	hlavný histokompatibilný komplex
RNA	ribonukleová kyselina
SCID	ťažká kombinovaná imunodeficiencia

Úvod

Kmeňové bunky sú pôvodcami života. Už v roku 1858 zdôraznil významný nemecký lekár a otec modernej patológie Rudolf Virchow vo svojom výroku „*Omnis cellula e cellula*“, že každá bunka vzniká z inej bunky.

Prvotná kmeňová bunka, oplodnené vajíčko, vzniká splynutím samčej a samičej pohlavnej bunky, ktoré sú haploidnými potomkami zárodočných kmeňových buniek. Oplodnené vajíčko je *totipotentné*, tzn. že sa z neho postupne vytvárajú všetky tkanivá vyvíjajúceho sa embrya. Už počas vývoja embrya sa vytvárajú zárodočné kmeňové bunky, ktoré pretrvávajú aj u dospelého jedinca a umožňujú tak pokračovanie životného cyklu.

U dospelých jedincov sa tkanivá obnovujú proliferáciou špecializovaných kmeňových buniek. Tieto bunky sa neustále delia, pričom prispievajú k vytváraniu jednak nových kmeňových buniek a jednak buniek, u ktorých začína proces diferenciácie na špecializovaný typ buniek so špecifickou funkciou. Normálna obnova tkaniva sa uskutočňuje činnosťou diferencujúcich sa potomkov kmeňových buniek, tzv. prechodných deliacich sa buniek (*transit-amplifying cells*). Napr. zrelé krvné bunky vznikajú diferenciáciou z hematopoetických kmeňových buniek v kostnej dreni alebo výstelkové bunky gastrointestinálneho traktu sú utvárané z prechodných deliacich sa buniek pochádzajúcich z kmeňových buniek intestinálnych žliaz.

Už v 19. stor. vyslovili patológovia pri vysvetľovaní bunkového pôvodu rakoviny po prvýkrát hypotézu o prítomnosti kmeňových buniek, ako tzv. „embryonálnych zvyškov“. Neskoršie vedecké štúdie naznačili, že väčšina druhov rakoviny pochádza z kmeňových buniek alebo ich priamych potomkov, ktorými sú prechodné deliace sa bunky. Rakovina vzniká v dôsledku porušenia rovnováhy medzi intenzitou proliferácie buniek a intenzitou ich diferenciácie, resp. zániku.

Pochopenie mechanizmu kontroly proliferácie a diferenciácie kmeňových buniek a ich potomkov nie je kľúčovou úlohou iba pri liečbe rakoviny, ale taktiež pri rôznych druhoch bunkových transplantácií, či génovej terapii pri mnohých metabolických, degeneratívnych a imunologických chorobách.

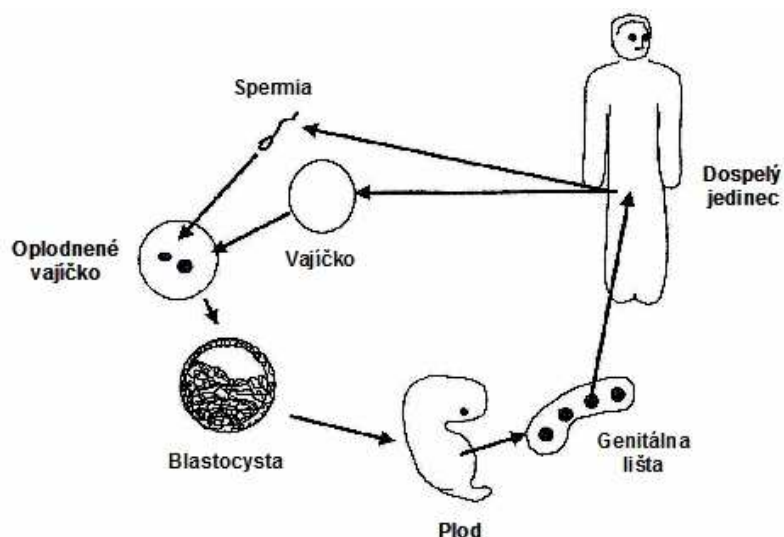
1 Prehľad literatúry

1.1 História

Podľa Leslieho Brainerda Areya, ktorého považujeme za otca modernej embryológie (AREY, 1974), sa pravdepodobne ako prvý pokúsil pochopiť pôvod života a počiatočný vývin človeka grécky filozof a polyhistor Aristoteles (384 – 322 pr. n. l.). Pripúšťal počiatočné etapy vývinu v maternici a podľa všetkého bol prvým, ktorý sa zamýšľal nad základným rozporom, či nové individuum bolo alebo nebolo vytvorené *de novo*, resp. či už bolo „predvytvorené“ v tele matky a zväčšené iba počas vývinu (AREY, 1974).

Aristotelova predstava spontánneho vzniku života bola všeobecne uznávaná viac ako dve tisícročia, až kým neprerástla do závažného sporu medzi biológmi 19. storočia. Hypotézu, že život nevznikol spontánne, ale presnejšie z už existujúceho života „*Omne vivum ex vivo*“, vyslovil v roku 1855 nemecký zoológ Franz von Leydig. Ešte v tom istom roku zovšeobecnil Rudolf Virchow túto hypotézu na postulát „*Omnis cellula e cellula*“, ktorý hovorí o tom, že všetky bunky v organizme sú odvodené z už existujúcich buniek, tzn. že aj všetky bunky ľudského tela pochádzajú z už existujúcej kmeňovej bunky, oplodneného vajíčka. Hypotéza spontánneho vzniku života nebola formálne vyvrátená až do roku 1864, kedy Louis Pasteur uskutočnil dôkladne kontrolované experimenty, ktoré nepreukázali rast mikroorganizmov v sterilizovanom bujóne (DEBRE, 1998).

V posledných rokoch je stále aktuálnejší problém predčasného ukončenia gravidity, s ktorým sa do popredia dostáva otázka, kde vlastne začína život. Podľa princípov odvodených od Leydiga, Virchowa a Pasteura, život ako ho poznáme ani nekončí ani nezačína, ale je nepretržitý (obr. 1) a dospelý človek je iba jednou etapou v cykle ľudského života.



Obr. 1 Cyklus života (SELL, 2004).

1.2 Charakteristika kmeňových buniek

1.2.1 Definícia kmeňových buniek, ich vlastnosti a rozdelenie

Na začiatku života stojí kmeňová bunka – pôvodca života organizmu. Je to samostatná bunka, z ktorej môžu postupne vznikáť nové bunky, ktoré ďalej diferencujú na ktorékoľvek špecializované bunky embryonálneho alebo dospelého tkaniva. Táto ich vlastnosť sa nazýva *totipotencia*. Prvotná kmeňová bunka, oploďnené vajíčko, sa päť alebo šesťkrát delí, pričom z nej vznikajú bunkové línie, ktoré vytvárajú rôzne diferencované orgány. Počas týchto počiatkových delení, si každá dcérska bunka udržiava svoju totipotentnosť. Embryonálne kmeňové bunky postupne cez sled delení a diferenciácií strácajú svoj potenciál a nadobúdajú diferencovanú funkciu. Tento proces je známy ako *determinácia*. Počas normálnej obnovy tkanív u dospelých orgánov vznikajú z tkanivových kmeňových buniek nové bunky, ktoré diferencujú do zrelých funkčných buniek príslušných tkanív. Okrem zárodočných buniek, ktoré si zachovávajú totipotentnosť, má väčšina kmeňových buniek v dospelých tkanivách znížený potenciál vytvárať bunky odlišných typov, tzn. že tieto bunky sú determinované. Predsa len však existujú dôkazy, že niektoré bunky si zachovávajú totipotentnosť aj v dospelých tkanivách, najmä v kostnej dreni (SELL, 2004).

O tom, ako sa vyvíja dospelý jedinec z primordiálnych kmeňových buniek, sme donedávna vedeli iba na základe klasických štúdií vo vývinovej anatómii (AREY, 1974). Po oplodnení podstupuje vajíčko procesy bunkových delení a bunkových migrácií, ktoré sú známe ako *brázdenie vajíčka* (rýhovanie). V tomto počiatocnom procese dostáva každá dcérska bunka celú chromozómovú výbavu pôvodnej bunky, pričom je úplne rovnaká ako bunka materská. Toto delenie buniek je známe ako *symetrické delenie* a je pritom v protiklade k vlastnostiam somatických kmeňových buniek, ktoré vykazujú *asymetrické delenie* (THRASHER, 1966; MEROK et SHERLEY, 2001).

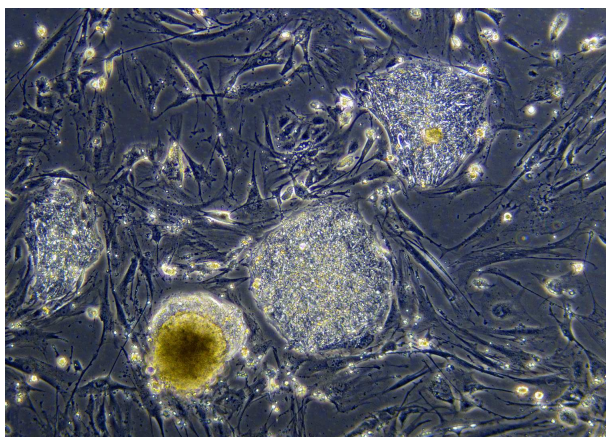
Dcérske bunky, nazývané *blastoméry*, držia spolu a vytvárajú zhluk buniek známy ako *morula*. Pri každom delení je síce veľkosť blastomér redukovaná, ale transplantačné štúdie naznačili, že každá embryonálna blastoméra má schopnosť vytvárať všetky diferencované typy buniek, čo je spôsobené tým, že je totipotentná. Ak sa napokon počet blastomér priblíži k 32 alebo 64 bunkám, v strednej časti ich zväčšujúceho sa zhluku sa objaví dutina a vzniká *blastocysta*. Jej vonkajšie bunky vytvárajú u cicavcov embryonálne membrány a placentu, zatiaľ čo *vnútorná masa buniek* blastocysty (inner cell mass, ICM), utvára embryo. V tejto etape už nie sú všetky bunky totipotentné, pretože vonkajšie bunky sa zúčastňujú na stavbe embryonálnych membránach alebo placenty. Postupne ako sa vnútorná bunková masa vyvíja, dcérske bunky začínajú nadobúdať navzájom odlišné vlastnosti a utvárajú špecifické oblasti, z ktorých sa nakoniec vytvoria odlišné zložky vyvíjajúceho sa embrya. Tento proces je známy ako gastrulácia. Počas gastrulácie dochádza k strate totipotencie buniek vnútornej bunkovej masy a blastula je preskupená invagináciou buniek z vonkajšej blastocysty za účelom vytvorenia vrstvitých „zárodočných“ zón známych ako ektoderm, mezoderm a endoderm. Koža, dermálne príslušenstvo, mozog a nervové tkanivo vznikajú z ektodermu, spojivové tkanivo, svalstvo, kosti a krvné cievy z mezodermu a gastrointestinálny trakt a vnútorné žľazové orgány z endodermu (AREY, 1974).

Proces straty potenciálu kmeňových buniek a nadobudnutia špecializovanej funkcie je známy ako *determinácia*. V tomto procese vznikajú z totipotentných kmeňových buniek blastoméry *pluripotentné bunky zárodočných vrstiev*. Tieto zase umožňujú vznik zakladateľským bunkám vyvíjajúcich sa orgánov. Tkanivová determinácia sa tak uskutočňuje prostredníctvom týchto buniek cez interakciu s ďalšími typmi buniek, napr. determinácia prvotných črevných buniek v pečeni (MATSUMOTO et al., 2001) alebo

pankreasu (LAMMERT et al., 2001) sa uskutočňuje v spojení s vyvíjajúcim sa endotelom krvných ciev. Ako sa bunky stávajú špecializovanými na tkanivá, ich potenciál sa stáva viac limitovaným až nakoniec diferencujú do konečných diferencovaných buniek.

Embryonálne kmeňové bunky

V optimálnych podmienkach sú bunky z vnútornej bunkovej masy (*inner cell mass*, ICM) preimplantačnej blastocysty schopné trvalej proliferácie (EVANS et KAUFMAN, 1981). Okrem toho môžu embryonálne kmeňové bunky (obr. 2) v indukovaných podmienkach podstúpiť determináciu a diferenciáciu na rôzne typy tkanív. Na rozdiel od nich má väčšina somatických progenitorových buniek po vytvorení zárodočných vrstiev limitovanú dĺžku života a spolu s utváraním konečných orgánov preukazuje znižujúci diferenciačný potenciál (MEROK et SHERLEY, 2001). COLE et al. (1966) dokázali izolovať embryonálne kmeňové bunky z preimplantačných blastocýst králikov s použitím vyživovacích vrstiev, pričom prerastené bunky diferencovali na krvné ostrovčeky, svaly, spojivové tkanivo, neuróny a makrofágy. GARDNER (1968) preukázal, že po injekcii embryonálnych kmeňových buniek do normálnej blastocysty boli bunky schopné súčasnej kolonizácie vo vyvíjajúcom sa embryu a mohli vytvárať chimerické indivíduum. Tým GARDNER (1968) v podstate preukázal aj to, že pred implantáciou, boli bunky vnútornej bunkovej masy pluripotentné. EDWARDS et al. (1980) dokázali získať ľudské oocyty po gonadotropínovej stimulácii, oplodniť ich *in vitro* a v týchto podmienkach ich nechali rásť do štádia blastocysty (EDWARDS et al., 1980; STEPTOE et al., 1980). Následný prenos *in vitro* oplodnených embryí do materníc infertilných pacientiek doplnený hormonálnou luteálnou podporou nakoniec viedol k úspešnej klinickej aplikácii *in vitro* fertilizácie.



Obr. 2 Kolónie embryonálnych kmeňových buniek

(<http://www.etopiamedia.net/emmn/pages/emmn70-5551212.html>)

Obrovský potenciál *in vivo* použitia embryonálnych kmeňových buniek pri liečbe sa preukázal v experimente, pri ktorom boli embryonálne kmeňové bunky injektované do letálne ožiareným myšiam, pričom došlo k obnove kmeňových buniek stratenej kostnej drene (HOLLANDS, 1987). V roku 1998 boli opísané ľudské embryonálne kmeňové bunky, ktoré mohli pri *in vitro* kultivácii diferencovať na bunky črevného epitelu, chrupky, kosti, svalu, neurónov a ďalších typov buniek (THOMSON et al., 1998; SHAMBLOTT et al., 1998). Možnosť kultivácie ľudských embryonálnych kmeňových buniek *in vitro*, možnosť produkcie ľudských embryonálnych bunkových línií (SCHULDINER et al., 2000) a pravdepodobnosť, že tieto bunky môžu priamo diferencovať na rôzne typy buniek (PITTENGER et al., 1999), má v súčasnej dobe obrovský význam vo výskume embryonálnych kmeňových buniek pre účely nahrádzania stratených alebo poškodených tkanivových buniek (DONOVAN et GEARHART, 2001). Pretože embryonálne kmeňové bunky umožňujú vznik zárodočných buniek, zárodočné bunky zase vznik vajíčka a spermii, vajíčko a spermie vznik oplodneného vajíčka a nakoniec oplodnené vajíčko vznik embryonálnych buniek (obr. 1), predpokladá sa, že žiadne diploidné bunky v tomto cykle neumožňujú vznik buniek dospelého individua.

Problém v použití embryonálnych kmeňových buniek pri nahrádzaní dospelého tkaniva spočíva v ich nízkej účinnosti a vyžaduje dlhý čas ich diferenciacie na dospelé funkčné bunky. Tento problém môže byť vyriešený buď použitím dospelých prekursorových buniek alebo riadením embryonálnych kmeňových buniek špecializovanou tkanivovou cestou. Embryonálne kmeňové bunky vyžadujú množstvo

signálov za účelom tvorby buniek vyššie diferencovaného typu. Sú nimi napr. špecializované kultivačné podmienky vrátane pôsobenia rastového faktora pre fibroblasty (*fibroblast growth factor*, FGF) (ZHANG et al., 2001) alebo kultiváciu s rastovým faktorom pre fibroblasty a ďalšími rastovými faktormi (REUBINOFF et al. 2001) umožňujúca tvorbu neurálnych prekurzorových buniek, ktoré môžu byť, aspoň u myší, inkorporované do vyvíjajúceho sa mozgu. Toto však vyžaduje presnú identifikáciu *in vitro* podmienok pre využitie diferenciačného potenciálu embryonálnych kmeňových buniek.

Embryonálne kmeňové bunky sa vyznačujú nasledovnými vlastnosťami (RYBAN, 2010):

- sú pluripotentné,
- možno ich kultivovať v podmienkach *in vitro* a udržiavať v dlhodobom pluripotentnom stave v presne definovaných podmienkach kultivácie,
- v podmienkach *in vitro* sú schopné diferencovať do všetkých typov tkanív vrátane pohlavných buniek,
- vnesením embryonálnych kmeňových buniek myší metódou mikroinjekcie do blastocysty alebo ich agregáciou s morulou sú schopné prenášať svoj genóm prostredníctvom chimerických myší na potomstvo (BRADLEY et al., 1984; BRADLEY, 1987),
- sú schopné stabilne prenášať diploidný počet chromozómov (PERA et al., 2000),
- všetky zámerné genetické zmeny uskutočnené v embryonálnych kmeňových bunkách je možné prostredníctvom chimerických myší preniesť na potomstvo (BABINET et COHEN-TANNOUDJI, 2001).

Zárodočné kmeňové bunky

Už v prvých etapách embryogenézy je predurčených niekoľko buniek, aby sa stali zárodočnými bunkami (MEACHEM et al., 2001). Tieto bunky migrujú do primitívnych gonád (genitálnej lišty) a v závislosti na prítomnosti dvoch X chromozómov (samica) alebo jedného X a jedného Y chromozómu (samec) diferencujú na samičie alebo samčie zárodočné bunkové prekurzory. Možu byť rozpoznávané expresiou transkripčného faktora Oct4 a alkalického fosfatázy (PESCE et SCHÖLER, 2000).

Štúdie začiatkom 70. rokov 20. stor. využívajúce transplantáciu zárodočných buniek jednoznačne preukázali totipotentnosť a tumorigénnosť zárodočných buniek. STEVENS (1970) transplantoval zárodočné bunky z genitálnej lišty 21-dňových plodov myší do semenníkov dospelých geneticky identických myší. Bunky z týchto transplantátov vytvárali teratokarcinómy. Teratokarcinómy sú nádory so zmiešanými typmi buniek a môžu obsahovať v podstate všetky bunkové elementy dospelých tkanív podobne ako aj placenta a žltkový vak. Rast nádoru pravdepodobne súvisí so stratou rastových obmedzení (PIERCE et al., 1978), ktoré za normálnych okolností súvisia s umiestnením vyvíjajúcich sa zárodočných buniek v normálnej blastocyste (SPRADING et al., 2001). Tumorové kmeňové bunky týchto transplantovateľných teratokarcinómov sú schopné diferencovať na normálne zrelé bunky (PIERCE et WALLACE, 1971) vrátane buniek mozgu, kosti, zubov, kostnej drene, očí, sekrečných žliaz, svalu, kože a čreva vyplývajúcich zo všetkých troch zárodočných vrstiev (KLEINSMITH et PIERCE, 1964). Počas normálneho vývoja je okolie blastocysty schopné kontrolovať úplnú diferenciaciu týchto tumorových buniek. Zavedenie transplantovateľných malígnych tumorových buniek do normálnych blastocýst môže viesť ku vzniku mozaikových myší s normálnymi fungujúcimi tkanivami, ktoré sú odvodené z tumorových buniek (MINTZ et ILLMENSEE, 1975). V uvedených štúdiách sa dokonca uvádza, že mozaikový samec myši bol schopný byť otcom normálnych potomkov. Tieto štúdie však nepoukázali iba na totipotentnosť zárodočných buniek a z nich odvodených teratokarcinómov, ale taktiež načrtli myšlienku, že diferenciačný potenciál totipotentných buniek, a v skutočnosti ich schopnosť vytvárať nádory, je kontrolovaný okolitými signálmi sprostredkovanými príslušnými tkanivami, ako predpokladal už v roku 1911 RIPPERT. Na rakovinu sa teda možno pozerat' buď ako na problém vývinovej biológie (PIERCE et al., 1978), problém kontroly progenitorových buniek súvisiaci s ich postavením (SPRADING et al., 2001) alebo na problém spojený s chemickými morfogénmi (GRUDON et BOURILLOT, 2001).

1.2.2 Metódy získavania (izolácie) kmeňových buniek

Izolácia a kultivácia embryonálnych kmeňových buniek je časovo náročná metóda. Embryá v skorom štádiu vývinu, z ktorých embryonálne kmeňové bunky pochádzajú, musia byť odobraté od samíc myší ešte pred ich uhniezdením v maternici a

prenesené do misky s kultivačnou kultúrou, kde sú dezintegrované na samostatné embryonálne kmeňové bunky. Embryonálne kmeňové bunky musia byť kultivované za špecifických podmienok, ktoré minimalizujú ich diferenciáciu, čiže proces, ktorý by normálne pokračoval u intaktného embrya (RYBAN, 2010).

Na získanie dostatočného množstva buniek potrebných k práci sa vyžaduje niekoľko cyklov (pasáží) zahŕňajúcich dezintegráciu a expanziu kolónií embryonálnych kmeňových buniek. V každom cykle sú bunky mikroskopicky kontrolované, aby sa zabezpečilo, že v kultúre budú kultivované iba nediferencované (pluripotentné) bunky. Udržiavanie embryonálnych kmeňových buniek v nediferencovanom stave je základnou požiadavkou umožňujúcou prenos navodenej genetickej mutácie prostredníctvom embryonálnych kmeňových buniek na potomstvo. Napriek tomu, že v embryu sú tieto bunky v pluripotentnom stave iba krátko, v podmienkach *in vitro* ich je možné udržiavať v pluripotentnom stave dlhodobo (RIPPON et BISHOP, 2004). Toto si vyžaduje dodržiavanie základných zásad kultivácie, akými sú (RYBAN, 2010):

- každodenná výmena média,
- kultivácia embryonálnych kmeňových buniek v prítomnosti LIF (faktora inhibujúceho leukémiu),
- súčasná kultivácia embryonálnych kmeňových buniek s inaktivovanými primárnymi embryonálnymi fibroblastami,
- uskutočnenie pasážovania ešte v priebehu exponenciálneho rastu embryonálnych kmeňových buniek,
- nízka pasáž buniek použitých na agregáciu s embryami (menšia ako 20 – 30), lebo inak je úspešnosť získania chimerických myší veľmi malá.

Embryonálne kmeňové bunky sa najčastejšie kultivujú na vrstve inaktivovaných buniek embryonálnych fibroblastov. Embryonálne fibroblasty majú jednak vyživovaciu funkciu a na druhej strane syntetizujú a uvoľňujú do kultivačného média faktor inhibujúci leukémiu LIF (*leukemia inhibitory factor*), od ktorého je závislé udržanie embryonálnych kmeňových buniek v nediferencovanom (pluripotentnom) stave (GALLI-TALIADOROS et al., 1995; WOBUS, 2001; RATHJEN et RATHJEN, 2001; ROSSANT, 2001; TOMPERS et LABOSKY, 2004; RIPPON et BISHOP, 2004; WILES, 1993). LIF je cytokín, ktorý zabraňuje diferenciácii embryonálnych kmeňových buniek a má podobný efekt aj na mnohé ďalšie typy buniek, takže by mohol mať dôležitú funkciu v regulácii normálnej diferenciácie. Niektoré línie embryonálnych

kmeňových buniek môžu byť kultivované aj bez prítomnosti embryonálnych fibroblastov, avšak v tomto prípade je veľmi dôležité pridať do kultivačného média rekombinantný LIF (ABBONDANZO et al., 1993; RYBAN, 2010).

1.2.3 Identifikácia kmeňových buniek

Markery embryonálnych kmeňových buniek myší

Doména POU transkripčného faktora Oct4 selektívne aktivovaná v nediferencovaných kmeňových bunkách bola identifikovaná ako doména viažúca sa k DNA (ROSNER et al., 1990; SCHÖLER et al., 1990). Oct4 transkripty sa obmedzujú na pluripotentné bunky embrya a pluripotentné bunky kultúry, pričom expresia Oct4 je rýchlo znížená pri ich diferenciácii, hoci nízka úroveň expresie Oct4 sa ešte môže vyskytnúť v ektoderme, resp. neuroektoderme v podmienkach *in vitro* aj *in vivo* (ROSNER et al., 1990; SCHÖLER et al., 1990; RATHJEN et al., 2002). Experimenty uskutočnené na génových knockoutoch u myší naznačili, že Oct4 má dôležitú funkciu pri založení pluripotentnej identity buniek (NICHOLS et al., 1998). Navyše experimentálna manipulácia s Oct4 v embryonálnych kmeňových bunkách poukázala na to, že jeho expresia je v istých medziach dôležitá pre udržovanie pluripotencie a jej porucha môže následkom diferenciácie ovplyvňovať výber konečného určenia bunky (NIWA et al., 2000). Preukázalo sa, že Oct4 reguluje expresiu génov Rex1 a Fgf4 exprimovaných vo vnútri pluripotentných bunkových línií; hoci funkčný význam týchto génov v udržovaní ich pluripotentného stavu, ak vôbec nejaký existuje, nie je jasný (BEN-SHUSHAN et al., 1998; NICHOLS et al., 1998; NIWA, 2001). Skutočnosť, že k expresii homológov génu Oct4 dochádza v pluripotentných bunkách rôznych druhov cicavcov vrátane človeka, poukázala na jeho konzervovanú expresiu a možnú funkciu v rámci tejto triedy (ABDEL-RAHMAN et al., 1995; VAN EIJK et al., 1999; REUBINOFF et al., 2000). Obmedzený expresný vzor Oct4 a jeho funkčná dôležitosť v podmienkach *in vitro* a *in vivo* (NICHOLS et al., 1998; NIWA et al., 2000), z neho robí silný marker pre pluripotentné bunky.

Medzi ďalšie markery, ktoré sú všeobecne exprimované v populáciách pluripotentných buniek myší *in vitro* a *in vivo*, patria SSEA-1 (*stage-specific mouse embryonic antigen 1*) (SOLTER et KNOWLES, 1978), telomeráza (ARMSTRONG et al., 2000) a alkalická fosfatáza (HAHNEL et al., 1990; PEASE et al., 1990).

Počas embryogenézy dochádza k diferenciácii buniek vnútornej bunkovej masy (ICM) na druhú populáciu pluripotentných buniek, čiže prvotný ektoderm. Zistilo sa, že markery génovej expresie, ako sú Rex1, CRTR-1 a Psc1 rozpoznávajú tieto dve populácie, poskytujú zdroj špecifických ESC/ICM markerov a umožňujú koreláciu génovej expresie embryonálnych kmeňových buniek a ich zakladateľských buniek vo vnútornej bunkovej mase (PELTON et al., 2002). Všetky tri uvedené markery sú exprimované pluripotentnými bunkami vnútornej bunkovej masy (ICM) a embryonálnymi kmeňovými bunkami, ale pred tvorbou prvotného ektodermu *in vivo* alebo pri tvorbe buniek podobných prvotnému ektodermu (*early primitive ectoderm-like*, EPL) *in vitro*, dochádza k zníženiu ich expresie (ROSNER et al., 1990; PELTON et al., 2002). Embryonálne kmeňové bunky a bunky podobné prvotnému ektodermu možno od pluripotentných buniek primordiálnej zárodočnej línie odlíšiť s použitím markera E-kadherín/uvomorulín, ktorého expresia je v pluripotentných bunkách pri založení zárodočnej línie znížená (SEFTON et al., 1992).

Markery embryonálnych kmeňových buniek človeka

Krátko po uskutočnení prvej izolácie embryonálnych kmeňových buniek z ľudských blastocýst došlo aj k identifikácii markerov exprimovaných v týchto pluripotentných embryonálnych kmeňových bunkách. Okrem expresie Oct4 (REUBINOFF et al., 2000) sa na identifikáciu ľudských embryonálnych kmeňových buniek použila aj skupina bunkových povrchových antigénov s obmedzenou expresiou, kde patria SSEA-4, TRA 1-60, GCTM-2, TRA 1-81 a SSEA-3 (THOMSON et al., 1998; REUBINOFF et al., 2000). Tieto antigény boli pôvodne identifikované na základe ich expresie v pluripotentných bunkových líniiach embryonálnych karcinómových buniek človeka alebo v bunkových líniiach embryonálnych kmeňových buniek iných primátov. Je zaujímavé, že marker SSEA-1, ktorý sa používa na identifikáciu embryonálnych kmeňových buniek myši, nereaguje s embryonálnymi kmeňovými bunkami človeka (THOMSON et al., 1998; REUBINOFF et al., 2000; KAUFMAN et al., 2001). V ľudských embryonálnych kmeňových bunkách dochádza tiež k expresii génov pre CD90, CD133 a CD117, ako aj ľudského telomerázového génu HTERT (XU et al., 2001). Značnou nevýhodou je skutočnosť, že okrem expresie génu Oct4 a niektorých predbežných dôkazov poukazujúcich na obmedzenú aktivitu myšieho promotora Rex1 v embryonálnych kmeňových bunkách človeka (EIGES et al., 2001),

dochádza k veľmi malému prekryvaniu sa génových markerov používaných na identifikáciu myších a ľudských embryonálnych kmeňových buniek. Toto zároveň znemožňuje otvorenie významnej diskusie v spojitosti s porovnávaním podobnosti medzi populáciami embryonálnych kmeňových buniek myší a človeka, resp. medzi ľudskými embryonálnymi kmeňovými bunkami a pluripotentnými bunkami embrya.

1.2.4 Kmeňové bunky človeka

Izolácia pluripotentných embryonálnych kmeňových buniek z ľudských blastocýst (THOMSON et al., 1998; REUBINOFF et al., 2000) môže potenciálne poskytnúť bližšiu charakteristiku embryonálneho vývoja človeka ako aj zdroj buniek pri liečbe poškodených tkanív a orgánov. Embryonálne kmeňové bunky človeka izoloval ako prvý James Thomson v roku 1998 z vnútornej bunkovej masy embrya (*inner cell mass*, ICM). Hoci etické obmedzenia zabraňujú formálnej ratifikácii ich využívania, embryonálne kmeňové bunky človeka sú v mnohých charakteristických znakoch podobné embryonálnym kmeňovým bunkám myší. Počas dlhodobej kultivácie sa môžu prakticky nekonečne rozmnožovať a diferencovať do všetkých línií zárodočných vrstiev, pričom si zachovávajú karyotyp a fenotypovú stabilitu. Ich bunky exprimujú genetické a funkčné markery charakteristické pre pluripotentné bunky a vykazujú široký diferenciačný potenciál, keď diferencovali ako teratokarcinómy pri ťažkej kombinovanej imunodeficiencii SCID (*severe combined immunodeficiency*) alebo v podmienkach *in vitro* (THOMSON et al., 1998; ITSKOVITZ-ELDOR et al., 2000; REUBINOFF et al., 2000).

Embryonálne kmeňové bunky človeka sa odlišujú od myších embryonálnych kmeňových buniek v niekoľkých detailoch. V porovnaní s embryonálnymi kmeňovými bunkami myší, ktoré majú zhustené vyklenuté kolónie, vytvárajú embryonálne kmeňové bunky človeka ploché kolónie so zreteľným ohraničením buniek. Kým embryonálne kmeňové bunky myší dokážu v špecifických podmienkach kultivácie efektívne pokračovať vo svojej homogénnosti, embryonálne kmeňové bunky človeka majú redukovanú stabilitu fenotypu a ich bunky v podmienkach *in vitro* ľahko diferencujú, čo vedie ku vzniku heterogénnych kolónií obsahujúcich pluripotentné aj diferencované bunky (PERA et al., 2000). Nakoniec i cytokínové požiadavky oboch typov embryonálnych kmeňových buniek sa navzájom odlišujú. Založenie línií ľudských

kmeňových buniek si vyžaduje spoločnú kultiváciu s embryonálnymi fibroblastami myší (*mouse embryonic fibroblast*, MEF), ale na rozdiel od myší, nemožno tieto bunky funkčne nahradiť s LIF (THOMSON et al., 1998; REUBINOFF et al., 2000).

Od ostatných ľudských kmeňových buniek sa embryonálne kmeňové bunky odlišujú svojim epigenetickým značením a diferenciačným potenciálom (GARGETT, 2007).

1.2.5 Kmeňové bunky myší

Prvú úspešnú izoláciu a kultiváciu *in vitro* pluripotentných embryonálnych kmeňových buniek získaných z embryí cicavcov (myší) oznámili v roku 1981 britskí vedci Martin Evans a Matthew Kaufman, nezávisle od americkej vedkyne Gail Martinovej. Išlo v podstate o dva podobné prístupy využívajúce spoločnú kultiváciu embryonálnych kmeňových buniek s vyživovacou vrstvou fibroblastov udržiavajúcou pluripotentné bunky z preimplantačných myších blastocýst v nediferencovanom stave. Na rozdiel od somatických buniek sa mohli v kultúre trvalo založiť a expandovať karyotypovo stabilné bunkové línie ako v podstate homogénne populácie buniek (PERA et al., 2000). Pluripotentný charakter týchto buniek bol pôvodne identifikovaný ich morfológickou podobnosťou s embryonálnymi karcinómovými bunkami a ich diferenciačnou schopnosťou *in vitro* ako embryoidných teliesok (*embryoid bodies*, EB) (EVANS et KAUFMAN, 1981), resp. *in vivo* ako teratokarcinómov (MARTIN, 1981). Túto skutočnosť neskôr potvrdilo aj zistenie, že embryonálne kmeňové bunky exprimujú množstvo pluripotentných bunkových markerov (ROSNER et al., 1990; ROGERS et al., 1991; PELTON et al., 2002) a po reintrodukcii do myšieho embrya sa môžu spolupodieľať na vytváraní všetkých tkanív embrya a dospelého jedinca (ROBERTSON et al., 1986; THOMAS et CAPECCHI, 1987).

Ako uvádza ANDREWS (2002), experimentom s embryonálnymi kmeňovými bunkami predchádzali experimenty s embryonálnymi karcinómovými bunkami (*embryonic carcinoma cells*, ECC) izolovanými z teratokarcinómu (KLEINSMITH et PIERCE, 1964, RYBAN, 2010).

Teratokarcinómom sú podobné nezhubné nádory teratómy, ktoré sa vyskytujú u rôznych druhov cicavcov a vtákov, najčastejšie v gonádach, ale boli nájdené aj na iných

miestach v organizme (HOOPER, 1992). Na vaječníku, sa vyskytujú v podobe benígnych ovariálnych cýst. Tieto vznikajú z partenogeneticky aktivovaných oocytov, ktoré sa začali vývíjať a neskôr sa stali neorganizovanými vytvorením masy embryonálneho tkaniva (STEVENS et VARNUM, 1974). Charakteristickou črtou teratómov je ich histologický obraz pozostávajúci z chaotického a rôznorodého štrukturálneho usporiadania diferencovaných tkanív, odvodených zo všetkých troch zárodočných vrstiev (HOOPER, 1992). Nádory podobné teratómom sa vyskytujú aj v semenníkoch, ale v tomto prípade sú spravidla vysoko malígne, a teda známe ako teratokarcinómy (DIXON et MOORE, 1952; MOSTOFI, 1973; ANDREWS, 2002). Prvá zmienka o tomto type nádorov pochádza z roku 1954, kedy Stevens a Little pozorovali vznik spontánnych testikulárnych teratómov a teratokarcinómov u samcov myší kmeňa 129 (STEVENS et LITTLE, 1954). Tieto nádory môžu byť indukované experimentálne u myší kmeňa 129 a v obmedzenom rozsahu aj u ďalších kmeňov myší (STEVENS et HUMMEL, 1957; STEVENS, 1967; STEVENS, 1970a). Použitím embryonálnych karcinómových buniek sa získali chimerické jedince, ktoré ale na rozdiel od jedincov pochádzajúcich z embryonálnych kmeňových buniek, neboli schopné prenášať genetickú informáciu na potomstvo (ANDREWS, 2002; RYBAN, 2010).

1.2.6 Kmeňové bunky králik

Už v roku 1966 dokázali izolovať COLE et al. (1966) embryonálne kmeňové bunky z preimplantačných blastocýst králikov s použitím vyživovacích vrstiev, pričom prerastené bunky diferencovali na krvné ostrovčeky, svaly, spojivové tkanivo, neuróny a makrofágy.

Kmeňové bunky králik možno považovať za malý alternatívny model pre embryonálne kmeňové bunky ľudí. Ich bunkové línie sú však menej stabilné, čo je spôsobené ich nižším rozmnožovacím potenciálom počas kultivácie, no aj napriek tomu existujú rôzne metódy ich stabilizácie.

Keďže blastocystu embrya králik obklopuje pevná *zona pellucida* a taktiež veľmi tenká vonkajšia mucinózna vrstva, je pri izolácii embryonálnych kmeňových buniek potrebné, aby za účelom ich úspešnej kultivácie nedošlo práve k výraznému poškodeniu blastocysty (HONDA et al., 2008).

1.2.7 Kmeňové bunky ošípanej

Nakoľko má ošípaná spolu s primátmi vysokú fyziologickú a morfológickú podobnosť človeku, stala sa vhodným cieľom pre mnohé vedecké experimenty. Kmeňové bunky ošípanej, získané *in vivo* z uhniedzďujúceho sa embrya vybratého z maternice donoriek, boli prvý raz izolované v roku 1990. Na ich izoláciu je k dispozícii dlhší časový horizont (BREVINI et al., 2007).

1.2.8 Kmeňové bunky hovädzieho dobytky a oviec

Hovädzí dobytok a ovce patria k najdôležitejším hospodárskym zvieratám. Rovnako aj tieto zvieratá nachádzajú svoje využitie v biotechnológiách, napr. pri klonovaní, tvorbe transgénnych bioreaktorov, či zdroji bioproduktov. V rámci týchto oblastí majú čoraz významnejšie postavenie aj kmeňové bunky.

1.2.9 Partenogenetické kmeňové bunky

Pod pojmom partenogéza rozumieme tvorbu embryí bez oplodnenia. Využíva sa pri nej iba genetický materiál samice a nové embryo teda vzniká bez prítomnosti samčej pohlavnej bunky.

Na základe tejto skutočnosti sa študijným materiálom pre partenogézu stali samičie pohlavné bunky (oocyty), ktoré môžu byť aktivované v podmienkach *in vivo*, resp. *in vitro* vplyvom rôznych faktorov (napr. aktiváciou tepelným alebo elektrickým šokom, anestézou, hypertonickými alebo hypotonickými podmienkami, enzymatickým vplyvom, atď.). Ako uvádza CHRENEK (2008), aktivované oocyty sa dokážu vyvíjať do štádia blastocysty. Následne sú prenesené do recipientky a ich vývoj už ďalej väčšinou nie je možný.

Bunky, ktoré sú odvodené z partenogenetických embryí, sú kmeňovými bunkami odvodenými zo zárodočnej línie. Takto získané kmeňové bunky obsahujú iba genetický materiál darcu a vyznačujú sa vysokým stupňom homozygotnosti. Nie sú

však úplné identické s darcom, pretože pri prvom meiotickom delení došlo k segregácii homologických chromozómov (RAO et CONDIC, 2008).

Prítomnosť partenogenetických kmeňových buniek bola opísaná u rôznych druhov živočíchov, napr. u myší, opíc, ale aj u človeka, pričom uvedené bunky mali niektoré vlastnosti typické pre embryonálne kmeňové bunky (RAO et CONDIC, 2008).

1.2.10 Indukované pluripotentné bunky

Indukované pluripotentné bunky sú diferencované bunky, ktoré boli navrátené do pluripotentného stavu. Tieto bunky sú charakteristické tým, že sú schopné opätovnej diferenciácie na akýkoľvek typ buniek v tele a podobajú sa tak v tomto smere embryonálnym kmeňovým bunkám.

Keďže sa získavajú reprogramovaním somatických buniek, ich využitie v budúcnosti predstavuje veľkú perspektívu pri získavaní kmeňových buniek bez použitia embrya. To zároveň umožní vyriešiť mnohé etické problémy spojené s používaním embryonálnych kmeňových buniek.

Indukované pluripotentné bunky vytvoril ako prvý japonský vedec Shinya Yamanaka, ktorý použil diferencované myšie fibroblasty a reprogramoval ich genómovú DNA tým, že do nej vložil štyri gény pre transkripčné faktory Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 kmeňových buniek (<http://www.tyzden.sk/casopis/2009/9/kmenove-bunky.html>).

1.3 Metódy genetickej modifikácie kmeňových buniek

1.3.1 Metódy genetickej modifikácie

Manipulácia s genómom na úrovni celého organizmu je súčasťou molekulárno-biologických postupov, ktoré umožňujú poznávať rôzne zákonitosti regulácie génovej expresie. Vo všeobecnosti ide o prenos genetickej informácie cudzieho pôvodu do organizmu. Cudzia genetická informácia pritom môže pochádzať z toho istého druhu, odlišných druhov, resp. môže byť umelo vytvorená v laboratórnych podmienkach.

Z hľadiska metodických postupov je v podstate celá oblasť manipulácie s genómom na úrovni celého organizmu viazaná väčšinou na prácu so skorými štádiami embryí, oocytmi a blastomérmi preimplantačných štádií embryí, pričom niektoré metodické postupy možno aplikovať aj na postimplantačných štádiách embryí a plodov.

Pri manipulácii s vajíčkami a preimplantačnými embryami sme obmedzení pomerne krátkym časovým úsekom, kedy sú vajíčka a skoré štádiá embryí dostupné pre manipulácie. Ide o časový úsek medzi vypudením vajíčka z vaječníkov a jeho uhniesdením v sliznici maternice, pričom tento časový úsek sa u jednotlivých druhov cicavcov odlišuje. Najväčší pokrok pri tvorbe transgénnych zvierat sa dosiahol najmä u malých laboratórnych zvierat.

Medzi základné postupy pri tvorbe transgénnych zvierat patria:

- mikroinjekcia DNA do prvojadier vajíčka,
- prenos DNA pomocou vírusových vektorov,
- prenos DNA do embryonálnych kmeňových buniek,
- mikrochirurgický prenos spermie do vajíčka.

Vytvorené transgénne zvieratá poskytujú nielen široké možnosti využitia v teoretickej, ale aj praktickej oblasti spoločenského života.

1.3.2 Prenos génov do kmeňových buniek

Ako uvádza CHRENEK (2008), embryonálne kmeňové bunky môžu byť geneticky upravené rôznymi spôsobmi, medzi ktoré patria napr. využitie retrovirusových vektorov, lipofekcia, elektroporácia alebo magnetická asistovaná transfekcia.

Retrovirusové vektory

Retrovirusové vektory patria medzi dobré prenášače DNA. Z hľadiska štruktúry pozostávajú zo sekvencie LTR (*long terminal repeat*), promótoru, sekvencie *encapsidation*, sekvencií kódujúcich reverznú transkriptázu, vírusové proteíny a obal retrovírusu.

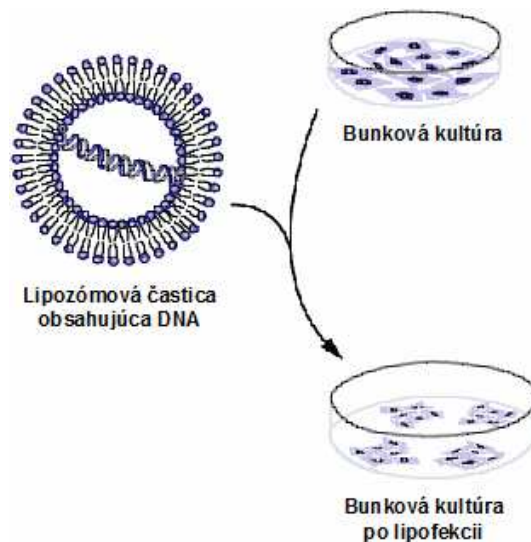
Vytvorená génová konštrukcia pozostáva okrem uvedených génov aj z cudzieho génu a sekvencie DNA, ktorá je identická so sekvenciou DNA v genóme hostiteľa. Po prenose cudzej DNA do hostiteľskej bunky dochádza na základe homologickej rekombinácie k jej zabudovaniu na určené miesto v genóme hostiteľa (CHRENEK, 2008).

Lipofekcia

Lipofekcia (lipozómová transfekcia) je metóda, ktorá sa používa na zavedenie genetického materiálu do bunky *in vitro* prostredníctvom lipozómov. Používa sa však aj *in vivo* na prenos DNA do zvierat s použitím priamej alebo intravenózneho injekcie.

Lipozómy sú syntetickými analógmi fosfolipidovej dvojvrstvy bunkovej membrány. Tieto častice obsahujú množstvo fyzikálnych charakteristík fosfolipidov, vrátane prítomných hydrofóbných a hydrofilných oblastí každej molekuly, ktorá sa vo vodnom prostredí podieľa na tvorbe sféroidných lipozómových častíc. V prítomnosti DNA alebo RNA sú lipozómy schopné s nimi interagovať, utvoriť okolo nich púzdro a vytvoriť tak pre nukleové kyseliny účinný distribučný systém.

Elektrický náboj lipozómu, jeho zloženie a štruktúra definujú afinitu celého komplexu pre bunkovú membránu. V špecifických podmienkach je lipozómový komplex schopný interagovať s bunkovou membránou, ktorá mu umožní jeho pohltenie endocytózou a neskoršie uvoľnenie do cytoplazmy bunky. Úspešné použitie lipozómových častíc na prenos exogénnych nukleových kyselín do špecifických biologických systémov závisí na niekoľkých faktoroch vrátane typu použitého lipidu, elektrického náboja, veľkosti lipozómovej častice a metódy jej prípravy.



Obr. 3 Schéma lipofekcie buniek v bunkovej kultúre

(<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture15/Lecture15.html>).

Elektroporácia

Elektroporácia (elektropermeabilizácia) je metóda využívajúca vplyv aplikovaného vonkajšieho elektrického poľa na zvýšenie priepustnosti (permeability) plazmatickej membrány bunky. Zvyčajne sa v molekulárnej biológii využíva na ľahší prienik nových makromolekulových látok, ako napr. molekulových sond, rôznych medikamentov alebo molekúl cudzej DNA, do vnútra bunky (NEUMANN et al., 1982).

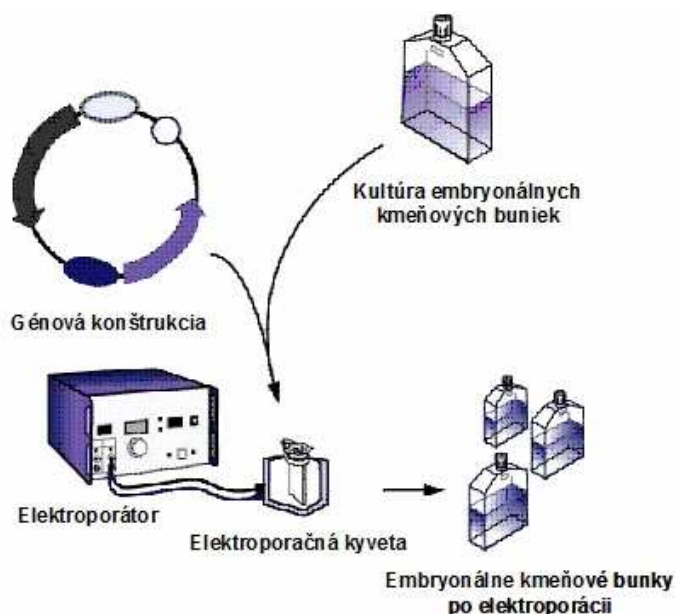
V molekulárnej biológii sa elektroporácia často využíva na transformáciu baktérií, kvasiniek a rastlinných protoplastov. Táto metóda je približne 10-krát účinnejšia ako chemická transformácia (NEUMANN et al., 1982; SUGAR et NEUMANN, 1984).

Elektroporácia má vysokú účinnosť aj pri zavádzaní cudzích génov do buniek tkanivových kultúr, najmä pokiaľ ide o bunky cicavcov. Využíva sa napr. pri tvorbe knockoutových myší, ako aj pri liečbe nádorov, či génovej terapii. Proces, pri ktorom je do eukaryotickej bunky zavedená (introdukovaná) cudzia DNA sa nazýva *transfekcia*.

Elektroporácia sa uskutočňuje v prístrojoch nazývaných elektroporátory, ktoré vytvárajú elektromagnetické pole v roztoku s bunkami. Suspenzia buniek je napipetovaná do sklenej alebo plastovej kyvety, ktorá obsahuje dve hliníkové elektródy umiestnené na oboch jej stranách. Úspešnosť elektroporácie v mnohom závisí aj od čistoty roztoku obsahujúceho plazmidovú DNA (génovú konštrukciu), najmä pokiaľ ide o obsah solí.

V procese elektroporácie dochádza vplyvom vonkajšieho elektrického poľa k otvoreniu množstva veľmi malých pórov v plazmatickej membráne bunky. Pri elektroporácii je dôležité dbať na dôslednú kontrolu intenzity elektrického poľa, ako aj dĺžku trvania expozície, počas ktorej sú bunky vystavené elektrickým impulzom. Póry v plazmatickej membráne bunky po krátkom čase opäť samé uzavrujú.

U buniek, ktoré sú často vystavené vplyvu elektrického poľa alebo expozícii silnejším poľom na dlhší čas, sa môže spustiť proces apoptózy alebo nekrózy, výsledkom ktorých je smrť bunky. Toto však môže byť užitočné pri likvidácii nádorových buniek.



Obr. 4 Schéma elektroporácie embryonálnych kmeňových buniek

(<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture15/Lecture15.html>).

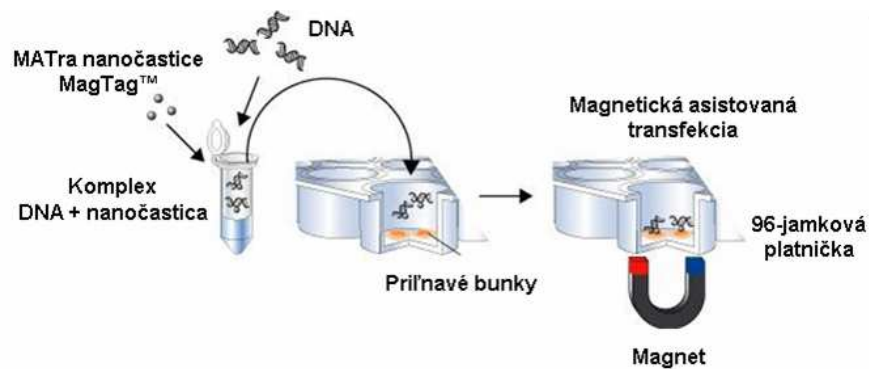
Magnetická asistovaná transfekcia

Magnetická asistovaná transfekcia (MATra) je novou, rýchlou a vysoko účinnou metódou prenosu cudzieho genetického materiálu do cieľových buniek. Uvedená metóda je vhodná pre všetky typy nukleových kyselín (napr. plazmidovú DNA, oligonukleotidy, siRNA).

Pri použití tejto metódy sa v prvom kroku spájajú nukleové kyseliny s magnetickými nanočasticami, ktoré sú pokryté špecifickými biologickými polymérmi. Následne dochádza vplyvom magnetickej, resp. elektromagnetickej sily k prieniku

magnetických nanočastíc s naviazanými nukleovými kyselinami cez plazmatickú membránu do vnútra cieľovej bunky, čo vedie k veľmi účinnej transfekcii bunky.

Výhoda tejto metódy spočíva v tom, že počas celého procesu nedochádza k porušeniu plazmatickej membrány bunky ani jej chromozómov v porovnaní s inými metódami transfekcie (napr. elektroporacia) (<http://magnet-assisted-transfection.com>).



Obr. 5 Schéma magnetickéj asistovanej transfekcie

(http://www.iba-go.com/images/nev/matra_schema_quer.jpg).

2 Ciele práce

Hlavným cieľom predloženej bakalárskej práce bolo na základe dostupnej odbornej literatúry charakterizovať živočíšne kmeňové bunky, popísať základné metódy ich genetickej modifikácie, ako aj ich význam pre prax.

3 Materiál a metódy práce

Predloženú bakalársku prácu sme vypracovali vo forme kompilačnej práce. Pri jej vypracovaní sme použili dostupnú odbornú literatúru v knižnej a elektornickej podobe, ktorú sme čerpali najmä z medzinárodnej internetovej databázy PubMed *U. S. National Library of Medicine* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>), ako aj iných internetových zdrojov.

Zoznam použitej literatúry uvádzame v samostatnej kapitole 6.

4 Výsledky práce a diskusia

4.1 Význam kmeňových buniek

Kmeňové bunky majú široké možnosti perspektívneho využitia v rôznych oblastiach spoločenského života, najmä pokiaľ ide o základný a aplikovaný výskum v oblasti medicíny.

Embryonálne kmeňové bunky (*embryonic stem cells*, ESC) možno vo všeobecnosti použiť ako základ pre vývoj nových metód génového inžinierstva. S využitím homologickej rekombinácie, môžu byť gény z embryonálnych kmeňových buniek odstránené, vymenené alebo do nich vložené. Dospelé kmeňové bunky (*adult stem cells*, ASC) sú často nepohyblivé a sú veľmi vnímavé na introdukciiu terapeutických transgénov do ich chromozómovej DNA, napr. s použitím retrovírusových vektorov, ktoré infikujú iba deliace sa bunky. Vírusové vektory, akými sú lentivírusy a adenovírusy síce môžu infikovať aj nedeliace sa bunky, ale nie sú úplne vyhovujúce, pretože majú nízku účinnosť transdukcie. Navyše manipulácia s embryonálnymi kmeňovými bunkami *in vitro* môže zmeniť niektoré z ich najdôležitejších vlastností, akými sú prispôsobivosť, samoobnova a vytváranie štepov. Ak sa pomocou génového inžinierstva podarí u embryonálnych kmeňových buniek prekonať tieto technologické problémy, môžu sa stať prospešnejšími ako dospelé kmeňové bunky.

Ľudské embryonálne kmeňové bunky by mohli predstavovať veľmi silný nástroj zabráňujúci vzniku nežiadúcich imunitných reakcií. Potenciálnemu imunologickému odmietnutiu ľudských derivátov embryonálnych kmeňových buniek by sa mohlo zabrániť pomocou génového inžinierstva embryonálnych kmeňových buniek exprimujúcich MHC (*major histocompatibility complex*) antigény transplantované príjemcom alebo vytvorením rozrastajúcej sa banky embryonálnych kmeňových buniek s odlišnými génmi MHC, prípadne vytvorením univerzálnej embryonálnej kmeňovej bunky, ktorá by mohla byť kompatibilná so všetkými pacientami (SELL, 2004).

Nakoľko embryonálne kmeňové bunky môžu spôsobovať aj vznik teratómov, javí sa ako vhodnejšia alternatíva použitie odvodených diferencovaných a geneticky modifikovaných embryonálnych kmeňových buniek. Pretože embryonálne kmeňové

bunky možno expandovať, vytvárať z nich veľké populácie diferencovaných buniek, ako aj uchovávať ich, môžu byť v prípade potreby poskytnuté pacientovi. Dokonca ak aj nie sú použité priamo ako bunkové vektory pre génovú terapiu, môžu embryonálne kmeňové bunky stále predstavovať vhodný systém pre testovanie a hodnotenie účinnosti nových vírusových a nevírusových vektorov a taktiež pre testovanie množstva terapeutických látok vytvorených po ich diferenciácii v kultúre.

Väčšina klinických experimentov vyvíjaných pre *ex vivo* génovú terapiu sa doteraz uskutočnila s použitím hematopoetických kmeňových buniek. Tieto bunky sa použili v niekoľkých experimentoch počas posledných rokov na liečbu chorôb, akými sú napr. rakovina a AIDS. Hematopoetické kmeňové bunky boli zvolené za najvhodnejšie z niekoľkých dôvodov. Vo všeobecnosti sú ľahko izolovateľné, keďže sa pohybujú v krvnom obehú alebo sa nachádzajú v kostnej dreni dospelých, resp. v pupočníkovej krvi novorodencov. Navyše sú ľahko manipulovateľné *ex vivo* a môžu byť navrátené pacientom jednoduchou injekciou. Hematopoetické kmeňové bunky môžu tiež migrovať a obývať množstvo strategických miest v tele, ako napr. kostnú dreň, pečeň, slezinu, či lymfatické uzliny, kde môže byť ich distribúcia veľmi dôležitá (SELL, 2004).

Aj keď sa v *ex vivo* génovej terapii dominantne používajú hematopoetické kmeňové bunky, skúmajú sa aj ďalšie typy kmeňových buniek, medzi ktoré patria napr. bunky utvárajúce svaly (myoblasty), kosti (osteoblasty) a nervové kmeňové bunky. Tieto bunky majú výhodnú vlastnosť, že sa po zväčšení môžu stať neoddeliteľnou časťou tela. Následne sú schopné vytvárať terapeutické látky nielen na presnom mieste ich integrácie, ale taktiež tieto látky nepriamo distribuovať cez krv a nervovú sústavu za účelom liečby chorôb. Distribúcia terapeutík na základe kmeňových buniek a využitie tkanivovo-špecifických génových promótorov alebo promótorov obmedzujúcich nádory na miestach metastáz môže spôsobiť ústup rakoviny.

Hoci je naplánovaných veľa ďalších klinických experimentov využívajúcich génovú terapiu, na zdokonalenie kontroly dôležitých mechanizmov, akými sú modulácia proliferácie, diferenciácie a tkanivového zamerania kmeňových buniek, bude určite potrebný ďalší výskum. Okrem toho môže génové inžinierstvo prostredníctvom genetickej a epigenetickej úpravy využiť aj silu prispôsobivosti kmeňových buniek. Dôležité bude uskutočniť väčší pokrok aj pri kontrole a zabezpečení génového „silencing“ mechanizmu, aby terapeutický transgén introdukovaný do buniek nebol

v priebehu času prerušený, resp. zastavený. Dôležitým faktorom bude aj množstvo distribuovaného génového produktu, ktoré bude rozhodujúce a bude sa meniť s vekom, genetickým pôvodom a stavom choroby (SELL, 2004).

5 Záver

Hoci je z hľadiska ľudskej fantázie veľmi nepravdepodobné, že kmeňové bunky prispievajú k nesmrteľnosti, dosiahol sa v posledných rokoch obrovský pokrok v ich potenciálnom využití ako terapeutických prostriedkov, čo môže viesť k predĺženiu života pacientov so zmiernením bolesti a jeho vyššej kvalite. Mimoriadne pokroky sa dosiahli najmä smerom k liečbe rôznych chorôb. Kmeňové bunky môžu byť kľúčom k náhrade buniek stratených pri mnohých ťažkých chorobách, akými sú napr. Parkinsonova choroba, cukrovka, chronická choroba srdca, svalová dystrofia, poruchy obličiek a pečene, ako aj rakovina. Pre väčšinu z týchto ťažkých chorôb skracujúcich život človeka neexistuje zatiaľ žiadna účinná liečba. Jedným z cieľov je preto nájsť cestu k náhrade prirodzených fyziologických procesov organizmu, ktoré sa v priebehu týchto chorôb stratili. Aj napriek súčasným výhodám v transplantácii tkanív a orgánov sa stretávame s nedostatkom orgánov od darcov. Vzhľadom na rastúci záujem o transplantácie je nepravdepodobné, že z hľadiska existujúcej stratégie darcovsta orgánov bude v tomto smere vyhovené každému. Neurologické choroby, akými sú poranenie miechy, skleróza multiplex, Parkinsonova choroba a Alzheimerova choroba patria medzi choroby, pri ktorých je predstava nahradenia poškodených a nefunkčných buniek praktickým cieľom. Dôsledne kontrolovaná diferenciácia dospelých a embryonálnych kmeňových buniek na vysoko špecializované bunky plniace rôzne fyziologické funkcie, akými sú napr. bunky pankreatických ostrovčekov, by mohli v budúcnosti umožniť liečbu chronických chorôb, akou je v tomto prípade cukrovka. Súčasný výskum v oblasti problematiky kmeňových buniek sa zameriava najmä na kontrolu procesu diferenciácie kmeňových buniek na špecializované bunky, ako aj na ich vývoj a proliferáciu. Za účelom bezpečného využívania kmeňových buniek alebo ich diferencovaných potomkov v medicíne bude potrebné vyvinúť vhodné metódy ich purifikácie, kontroly apoptózy, ako aj nevyhnutnosti potlačenia reakcií imunitného systému organizmu v spojitosti s bunkami darcov.

Záverom možno konštatovať, že pred samotnou aplikáciou liečby pomocou kmeňových buniek, stojí pred základným výskumom ešte množstvo rôznych cieľov, ktoré je nevyhnutné realizovať. Avšak výskum v tejto dôležitej oblasti bude pre ľudstvo určite obrovským prínosom.

6 Zoznam použitej literatúry

- ABDEL-RAHMAN, B. – FIDDLER, M. – RAPPOLEE, D. – PERGAMENT, E. 1995. Expression of transcription regulating genes in human preimplantation embryos. In *Hum. Reprod.*, 1995, 10 (10), s. 2787-2792.
- ANDREWS, P., W. 2002. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. In *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2002, 357 (1420), s. 405-417.
- AREY, L., B. 1974. *Developmental Anatomy: A Textbook and Laboratory Manual of Embryology*. 7th ed. W. B. Saunders, 1974, Philadelphia.
- ARMSTRONG, L. – LAKO, M. – LINCOLN, J. – CAIRNS, P., M. – HOLE, N. 2000. mTert expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells. In *Mech. Dev.*, 2000, 97 (1-2), s. 109-116.
- BABINET, C. – COHEN-TANNOUDJI, M. 2001. Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: an amazingly versatile tool for the study of mammalian biology. In *An. Acad. Bras. Cienc.*, 2001, 73 (3), s. 365-383. Erratum In *An. Acad. Bras. Cienc.*, 2001, 73 (4), s. 577-580.
- BEN-SHUSHAN, E. – THOMPSON, J., R. – GUDAS, L., J. – BERGMAN, Y. 1998. Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. In *Mol. Cell Biol.*, 1998, 18 (4), s. 1866-1878.
- BRADLEY, A. 1987. Production and analysis of chimeric mice. In ROBERTSON, E., J. *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach*. IRL Press, Oxford, 1987, s. 113-151.
- BRADLEY, A. – EVANS, M., J. – KAUFMAN, M., H. – ROBERTSON, E., J. 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. In *Nature*, 1984, 309 (5965), s. 255-256.
- BREVINI, T., A. – ANTONINI, S. – CILLO, F. – CRESTAN, M. – GANDOLFI, F. 2007. Porcine embryonic stem cells: Facts, challenges and hopes. In *Theriogenology*, 2007, 68 Suppl 1, s. 206-213.

-
- COLE, R., J. – EDWARDS, R., G. – PAUL, J. 1966. Cytodifferentiation and embryogenesis in cell colonies and tissue cultures derived from ova and blastocysts of the rabbit. In *Dev. Biol.*, 1966, 13 (3), s. 385-407.
- DEBRE, P. 1998. Louis Pasteur (translated by Elborg Forster). Johns Hopkins University Press, 1998, Baltimore, s. 148-176.
- DIXON, F., J. – MOORE, R., A. 1952. Tumors of the testicle. In *Acta Unio Int. Contra Cancrum*, 1952, 8 (2), s. 310-315.
- DONOVAN, P., J. – GEARHART, J. 2001. The end of the beginning for pluripotent stem cells. In *Nature*, 2001, 414 (6859), s. 92-97.
- EDWARDS, R., G. – STEPTOE, P., C. – PURDY, J., M. 1980. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. In *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1980, 87 (9), s. 737-756.
- EIGES, R. – SCHULDINER, M. – DRUKKER, M. – YANUKA, O. – ITSKOVITZ-ELDOR, J. – BENVENISTY, N. 2001. Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells. In *Curr. Biol.*, 2001, 11 (7), s. 514-518.
- EVANS, M., J. – KAUFMAN, M., H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. In *Nature*, 1981, 292 (5819), s. 154-156.
- GARDNER, R., L. 1968. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. In *Nature*, 1968, 220 (5167), s. 596-597.
- GARGETT, C., E. 2007. Review article: stem cells in human reproduction. In *Reprod. Sci.*, 2007, 14 (5), s. 405-424.
- GURDON, J., B. – BOURILLOT, P., Y. 2001. Morphogen gradient interpretation. In *Nature*, 2001, 413 (6858), s. 797-803.
- HAHNEL, A., C. – RAPPOLEE, D., A. – MILLAN, J., L. – MANES, T. – ZIOMEK, C., A. – THEODOSIOU, N., G. – WERB, Z. – PEDERSEN, R., A. – SCHULTZ, G., A. 1990. In *Development*, 1990, 110 (2), s. 555-564.
- HOLLANDS, P. 1988. Differentiation of embryonic haemopoietic stem cells from mouse blastocysts grown in vitro. In *Development*, 1988, 102 (1), s. 135-141.
- HONDA, A. – HIROSE, M. – INOUE, K. – OGONUKI, N. – MIKI, H. – SHIMOZAWA, N. – HATORI, M. – SHIMIZU, N. – MURATA, T. – HIROSE, M. – KATAYAMA, K. – WAKISAKA, N. – MIYOSHI, H. – YOKOYAMA, K.,
-

-
- K. – SANKAI, T. – OGURA, A. 2008. Stable embryonic stem cell lines in rabbits: potential small animal models for human research. In *Reprod. Biomed. Online*, 2008, 17 (5), s. 706-715.
- HOOPER, M., L. 1992. Embryonal carcinoma and embryonal stem cells. In *Embryonal stem cells. Harwood academic publishers*, 1992, s. 5-23.
- CHRENEK, P. 2008. Genetické manipulácie s embryami. Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu, 2008, Nitra, 98 s., ISBN 978-80-88872-79-5
- ITSKOVITZ-ELDOR, J. – SCHULDINER, M. – KARSENTI, D. – EDEN, A. – YANUKA, O. – AMIT, M. – SOREQ, H. – BENVENISTY, N. 2000. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. In *Mol. Med.*, 2000, 6 (2), s. 88-95.
- KAUFMAN, D., S. – HANSON, E., T. – LEWIS, R., L. – AUERBACH, R. – THOMSON, J., A. 2001. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98 (19), s. 10716-10721.
- KLEINSMITH, L., J. – PIERCE, G., B. 1964. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. In *Cancer Res.*, 1964, 24, s. 1544-1551.
- LAMMERT, E. – CLEAVER, O. – MELTON, D. 2001. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. In *Science*, 2001, 294 (5542), s. 564-567.
- MARTIN, G., R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78 (12), s. 7634-7638.
- MATSUMOTO, K. – YOSHITOMI, H. – ROSSANT, J. – ZARET, K., S. 2001. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. In *Science*, 2001, 294 (5542), s. 559-563.
- MEACHEM, S. – VON SCHÖNFELDT, V. – SCHLATT, S. 2001. Spermatogonia: stem cells with a great perspective. In *Reproduction*, 2001, 121 (6), s. 825-834.
- MEROK, J., R. – SHERLEY, J., L. 2001. Breaching the kinetic barrier to in vitro somatic stem cell propagation. In *J. Biomed. Biotechnol.*, 2001, 1 (1), s. 25-27.

-
- MINTZ, B. – ILLMENSEE, K. 1975. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, 72 (9), s. 3585-3589.
- MOSTOFI, F., K. 1973. Proceedings: Testicular tumors. Epidemiologic, etiologic, and pathologic features. In *Cancer*, 1973, 32 (5), s. 1186-1201.
- NEUMANN, E. – SCHAEFER-RIDDER, M. – WANG, Y. – HOFSCHEIDER, P., H. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. In *EMBO J.*, 1982, 1 (7), s. 841-845.
- NICHOLS, J. – ZEVNIK, B. – ANASTASSIADIS, K. – NIWA, H. – KLEWENEBENIUS, D. – CHAMBERS, I. – SCHÖLER, H. – SMITH, A. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. In *Cell*, 1998, 95 (3), s. 379-391.
- NIWA, H. 2001. Molecular mechanisms to maintain stem cell renewal of ES cells. In *Cell Struct. Funct.*, 2001, 26, s. 137-148.
- NIWA, H. – BURDON, T. – CHAMBERS, I. – SMITH, A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. In *Genes Dev.*, 1998, 12 (13), s. 2048-2060.
- NIWA, H. – MIYAZAKI, J. – SMITH, A., G. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. In *Nat. Genet.*, 2000, 24 (4), s. 372-376.
- PEASE, S. – BRAGHETTA, P. – GEARING, D. – GRAIL, D. – WILLIAMS, R., L. 1990. Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). In *Dev. Biol.*, 1990, 141 (2), s. 344-352.
- PELTON, T., A. – SHARMA, S. – SCHULZ, T., C. – RATHJEN, J. – RATHJEN, P., D. 2002. Transient pluripotent cell populations during primitive ectoderm formation: correlation of in vivo and in vitro pluripotent cell development. In *J. Cell Sci.*, 2002, 115, s. 329-339.
- PERA, M., F. – REUBINOFF, B. – TROUNSON, A. 2000. Human embryonic stem cells. In *J. Cell Sci.*, 2000, 113, s. 5-10.
- PESCE, M. – SCHÖLER, H., R. 2000. Oct-4: control of totipotency and germline determination. In *Mol. Reprod. Dev.*, 2000, 55 (4), s. 452-457.
-

-
- PIERCE, G., B. – WALLACE, C. 1971. Differentiation of malignant to benign cells. In *Cancer Res.*, 1971, 31 (2), s. 127-134.
- PIERCE, G. B. – SHIKES, R. – FINK, L., M. 1978. Cancer: a problem of developmental biology. Prentice Hall, Engelwood Cliffs, 1978, NJ, s. 1-242.
- PITTENGER, M., F. – MACKAY, A., M. – BECK, S., C. – JAISWAL, R., K. – DOUGLAS, R. – MOSCA, J., D. – MOORMAN, M., A. – SIMONETTI, D., W. – CRAIG, S. – MARSHAK, D., R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. In *Science*, 1999, 284 (5411), s. 143-147.
- RAO, M. – CONDIC, M., L. 2008. Alternative sources of pluripotent stem cells: scientific solutions to an ethical dilemma. In *Stem Cells Dev.*, 2008, 17 (1), s. 1-10.
- RATHJEN, J. – HAINES, B., P. – HUDSON, K., M. – NESCI, A. – DUNN, S. – RATHJEN, P., D. 2002. Directed differentiation of pluripotent cells to neural lineages: homogeneous formation and differentiation of a neuroectoderm population. In *Development*, 2002, 129 (11), s. 2649-2661.
- REUBINOFF, B., E. – PERA, M., F. – FONG, C., Y. – TROUNSON, A. – BONGSO, A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. In *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18 (4), s. 399-404.
- REUBINOFF, B., E. – ITSYKSON, P. – TURETSKY, T. – PERA, M., F. – REINHARTZ, E. – ITZIK, A. – BEN-HUR, T. 2001. Neural progenitors from human embryonic stem cells. In *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19 (12), s. 1134-1140.
- RIPPERT, V. 1911. Über ein myosarcoma striocellulare des nierenbeckens und des ureters. *Geschwulstlehre*, Bonn, 1904. *Das carcinom des menschen*, 1911, Bonn.
- ROBERTSON, E. – BRADLEY, A. – KUEHN, M. – EVANS, M. 1986. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. In *Nature*, 1986, 323 (6087), s. 445-448.
- ROGERS, M., B. – HOSLER, B., A. – GUDAS, L., J. 1991. Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. In *Development*, 1991, 113 (3), s. 815-824.
- ROSNER, M., H. – VIGANO, M., A. – OZATO, K. – TIMMONS, P., M. – POIRIER, F. – RIGBY, P., W. – STAUDT, L., M. 1990. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. In *Nature*, 1990, 345 (6277), s. 686-692.
-

-
- RYBAN, L. 2010. Štúdium funkcie génu ISG12 v restenóze tvorbou knockoutových myší. Dizertačná práca, Nitra, FPV UKF, 2010, 99 s.
- SELL, S. 2004. Stem Cells Handbook. 1. vyd. Humana Press, New Jersey, 2004, 509 s. ISBN 1-58829-113-8.
- SEFTON, M. – JOHNSON, M., H. – CLAYTON, L. 1992. Synthesis and phosphorylation of uvomorulin during mouse early development. In *Development*, 1992, 115 (1), s. 313-318.
- SCHÖLER, H., R. – DRESSLER, G., R. – BALLING, R. – ROHDEWOHL, H. – GRUSS P. 1990. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. In *EMBO J.*, 1990, 9 (7), s. 2185-2195.
- SCHULDINER, M. – YANUKA, O. – ITSKOVITZ-ELDOR, J. – MELTON, D., A. – BENVENISTY, N. 2000. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97 (21), s. 11307-11312.
- SHAMBLOTT, M., J. – AXELMAN, J. – WANG, S. – BUGG, E., M. – LITTLEFIELD, J., W. – DONOVAN, P., J. – BLUMENTHAL, P., D. – HUGGINS, G., R. – GEARHART, J., D. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95 (23), s. 13726-13731.
- SOLTER, D. – KNOWLES, B., B. 1978. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75 (11), s. 5565-5569.
- SPRADLING, A. – DRUMMOND-BARBOSA, D. – KAI, T. 2001. Stem cells find their niche. In *Nature*, 2001, 414 (6859), s. 98-104.
- STEPTOE, P., C. – EDWARDS, R., G. – PURDY, J., M. 1980. Clinical aspects of pregnancies established with cleaving embryos grown in vitro. In *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 1980, 87 (9), s. 757-768.
- STEVENS, L., C. 1967. The biology of teratomas. In *Adv. Morphog.*, 1967, 6, s. 1-31.
- STEVENS, L., C. 1970. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. In *Dev. Biol.*, 1970, 21 (3), s. 364-382.

-
- STEVENS, L., C. 1970a. Experimental production of testicular teratomas in mice of strains 129, A/He, and their F1 hybrids. In *J. Natl. Cancer Inst.*, 1970, 44 (4), s. 923-929.
- STEVENS, L., C. – LITTLE, C., C. 1954. Spontaneous testicular taratomas in an inbred strain of mice. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1954, 40, s. 1080-1087.
- STEVENS, L., C. – HUMMEL, K., P. 1957. A description of spontaneous congenital testicular teratomas in strain 129 mice. In *J. Natl. Cancer Inst.*, 1957, 18 (5), s. 719-747.
- STEVENS, L., C. – VARNUM, D., S. 1974. The development of teratomas from parthenogenetically activated ovarian mouse eggs. In *Dev. Biol.*, 1974, 37 (2), s. 369-380.
- SUGAR, I., P. – NEUMANN, E. 1984. Stochastic model for electric field-induced membrane pores. Electroporation. In *Biophys. Chem.*, 1984, 19 (3), s. 211-225.
- THOMAS, K., R. – CAPECCHI, M., R. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. In *Cell*, 1987, 51 (3), s. 503-512.
- THOMSON, J., A. – ITSKOVITZ-ELDOR, J. – SHAPIRO, S., S. – WAKNITZ, M., A. – SWIERGIEL, J., J. – MARSHALL, V., S. – JONES, J., M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. In *Science*, 1998, 282 (5391), s. 1145-1147.
- THRASHER, J., D. 1966. Analysis of renewing epithelial cell populations. In *Methods in Cell Physiology*, vol. 2 (Prescott, D. M., ed.), Academic, 1966, New York, s. 323-357.
- VAN EIJK, M., J. – VAN ROOIJEN, M., A. – MODINA, S. – SCESI, L. – FOLKERS, G. – VAN TOL, H., T. – BEVERS, M., M. – FISHER, S., R. – LEWIN, H., A. – RAKACOLLI, D. – GALLI, C. – DE VAUREIX, C. – TROUNSON, A., O. – MUMMERY, C., L. – GANDOLFI, F. 1999. Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. In *Biol. Reprod.*, 1999, 60 (5), s. 1093-1103.
- XU, C. – INOKUMA, M., S. – DENHAM, J. – GOLDS, K. – KUNDU, P. – GOLD, J., D. – CARPENTER, M., K. 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. In *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19 (10), s. 971-974.

ZHANG, S., C. – WERNIG, M. – DUNCAN, I., D. – BRÜSTLE, O. - THOMSON, J.,
A. 2001. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human
embryonic stem cells. In *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19 (12), s. 1129-1133.

<http://www.etopiamedia.net/emmn/pages/emmn70-5551212.html>

<http://www.tyzden.sk/casopis/2009/9/kmenove-bunky.html>

<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture15/Lecture15.html>

http://www.iba-go.com/images/nev/matra_schema_quer.jpg

<http://magnet-assisted-transfection.com>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>