

Amyloidoza pęcherzyków nasiennych (SVA)

SVA jest chorobą starszych mężczyzn (od 52. do 73. roku życia) z akumulacją amyloidu w tkance podnabłonkowej pęcherzyków nasiennych. Dość częste są krwawienia i hemospermia. Zazwyczaj jest asymptomatyczna.

Amyloid zawiera N-terminalne peptydy głównego białka produkowanego przez pęcherzyki nasienne – semenogeliny (Semgl.p), czasem zawiera laktoferynę.

Białko PSA.p (*prostate specific antigen*) proteaza przecina semenogelinę na mniejsze białka, które pełnią specyficzne funkcje.

Proteinoza pęcherzyków płucnych (PAP)

Pierwotna proteinoza pęcherzyków płucnych (wrodzona) jest spowodowana defektem metabolizmu makrofagów pęcherzykowych w przemianach surfaktantu (zwykle defekt polega na mutacjach i upośledzeniu funkcji wspólnego łańcucha β dla receptorów GM-CSF, II13, i II5).

Wtórna PAP (nabyta) może być niekiedy związana z przewlekłym zatruciem glinem, tytanem, pyłem cementowym lub celulozowym, z przewlekłymi infekcjami wirusem HIV, *Pneumocystis jiroveci*, z pewnymi toksynami (insektycydami), lekami (busulfan, chlorkambucyl, immunosupresanty). W nabytych PAP są często obecne autoprzeciwciała anty-GM-CSF.

Białka wiążące surfaktant, jak: SftpA1.p/SpA.p, SftpB.p/SpB.p lub SftpC.p/SpC.p) i lipidy, są zwykle obecne w płynie pęcherzyków.

Częstość PAP w Stanach Zjednoczonych to ok. 1:100 000 (częściej u mężczyzn).

Objawy PAP: duszność, zmęczenie, gorączka, kaszel z lepłą plwociną, czasem sinica.

W 10% przypadków ulega spontanicznej remisji, a 5-letnie przeżycie przekracza 80%. Najczęstsze powikłania to infekcje bakteryjne: *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*.

Amyloidoza zasadowej keratyny typu II (LA)

W przebiegu LA (*lichen amyloidosis*) keratyna typu II zawiera grupy sulfhydrylowe i jest gromadzona w regionie międzyłopatkowym. W innych regionach najczęściej nie ma amyloidu.

Objawy: grudki liszajowate z czerwono-brązową pigmentacją. Bardzo silny świąd poprzedza zwykle inne objawy. Choroba jest najczęstsza u Chińczyków (mężczyzn).

Niekiedy LA towarzyszy zespołowi mnogich nowotworów endokrynnych typu MEN2A (jako **zespół Sipple**). Najczęstszymi nowotworami są rak rdzeniasty tarczycy i *feochromocytoma*.

Wrodzona dystrofia zrębu rogówki (HLCD)

HLCD jest często skutkiem mutacji zmiany sensu w genie TGFBI/BIGH3 (*TGFb induced* – locus 5q31). Gen ten koduje białko keratoepiteliny.

W HLCD typ IIIA fragment C-terminalny białka keratoepiteliny tworzy złogi amyloidu. Transformujący czynnik wzrostu β 1 (TGF β 1.p) aktywuje ekspresję genu TGFBI. Różne mutacje genu są przyczyną powstawania różnych typów dystrofii rogówki. Dla HLCD typ IIIA jest to najczęściej heterozygotyczna tranzycja T – C w kodonie 540 eksonu 12 (F540S).

W typie I HLCD w złogach amyloidowych często jest obecna gelsolina.

Objawy HLCD typ IIIA:

- zmętnienia w rogówce zaczynają się w jej centralnej części na powierzchni zrębu,
- upośledzenie widzenia,
- owrzodzenia rogówki,

HLCD jest chorobą dziedziczną autosomalnie dominująco. Początek choroby następuje zwykle w 1. dekadzie życia z powolną progresją.

F. RÓŻNICOWANIE

Różnicowanie jest procesem prowadzącym do przekształcenia komórek mniej wyspecjalizowanych, zdolnych do większej liczby podziałów mitotycznych w komórki bardziej wyspecjalizowane strukturalnie i funkcjonalnie, ale o mniejszej zdolności do podziałów.

Komórki wyspecjalizowane, w pełni funkcjonalne, które jednak całkowicie utraciły zdolność do podziału mitotycznego, są nazywane **komórkami terminalnie zróżnicowanymi**.

Różnicowanie zachodzi w czasie embriogenezy, ale także jest obecne w wielu tkankach organizmów dorosłych. Podstawą molekularną procesu różnicowania są zmiany ekspresji genów charakterystycznych dla typów specjalizacji komórek.

1. RÓŻNICOWANIE EMBRIONALNE

Komórka jajowa i plemnik są komórkami bardzo wysoko zróżnicowanymi i wyspecjalizowanymi. Ich połączenie powoduje odróżnicowanie i tworzenie

diploidalnej zygoty – najmniej zróżnicowanej komórki organizmu.

Zygota i pierwsze komórki pochodzące z jej podziałów są **komórkami totipotencjalnymi**, które mogą różnicować do wszystkich typów komórek organizmu i w sprzyjających warunkach mogą odtworzyć cały organizm. Ich istnienie wyjaśnia powstawanie bliźniąt jednojajowych.

U myszy tylko zygota i komórki dwukomórkowego embrionu (2C embrion) są rzeczywiście totipotencjalne. U owiec, bydła lub świń komórki nawet 4C lub 8C embrionu są totipotencjalne.

Po utworzeniu blastocysty komórki wężła zarodkowego (*inner cell mass* – **ICM**) zachowują zdolność różnicowania do wszystkich komórek somatycznych (z wyjątkiem trofoektodermi) i nabywają wielkiej zdolności do samoodnowy – w hodowli *in vitro* tworzą nieśmiertelne linie komórek embrionalnych stem (**ESC**).

Komórki ESC po przeszczepie do tkanek zróżnicowanych organizmu dorosłego tworzą guzy – potworkiaki (*teratocarcinoma*).

W tkankach płodu znajdują się także komórki stem płodowe (**FSC**) i komórki zróżnicowane tkanek płodowych (też komórki krańcowo zróżnicowane jak na przykład komórki łożyska). Podobnie w organizmie dorosłym znajdują się komórki stem organizmu dorosłego (**ASC**) i komórki zróżnicowane tkanek organizmu dorosłego. Komórki zróżnicowane przez transfekcję genów „stanu macierzystości” (stemness) mogą nabyć własności komórek indukowanych stem (**iPSC**).

a. Komórki totipotencjalne

Komórki totipotencjalne powstają z połączenia gamet (wysoce zróżnicowanych komórek – plemników i oocytów). Gamety powstają w **gametogenezie** (spermatogenezie i oogenezie).

W gametogenezie powstaje specyficzne dla płci epigenetyczne piętno komórek, na które składa się metylacja DNA, modyfikacje histonów i synteza regulatorowych RNA (mikroRNA, endogennych siRNA i piRNA).

SPERMATOGENEZA

Pierwszymi prekursorami plemników są pierwotne komórki płciowe (*primordial germ cells* – **PGC**), we wczesnej embriogenezie. Kolejnymi prekursorami są: spermatogonie (zdolne do efektywnej samoodnowy), spermatocyty (podlegające dwóm podziałom mejozy), haploidalne spermatydy oraz zdolne do zapłodnienia i poruszania się plemniki.

We wczesnej spermatogenezie histony chromatyny ulegają wymianie na białka **TNP** (*transition nuclear proteins*), a następnie na protaminy. Jądro plemnika staje się silnie upakowane (jego średnica jest około 13 razy mniejsza od średnicy jądra oocyty). U człowieka od 10% do 12% nukleosomów plemnika zachowuje jednak obecność histonów.

W spermatogenezie izoformy histonów typowe dla jąder komórek somatycznych zastępują specyficzne izoformy. W spermatydach pojawiają się izoformy: H1LS1, TH2A, TH2B, ssH2B i H3t. Podczas wymiany histonów na białka TNP syntetyzowana jest izoforma H2A.B.bd, a w czasie włączania białek protamin – izoforma H1T2.

Duże znaczenie ma izoforma histonu H3.3, kodowana przez geny H3F3A i H3F3B. Mutanty genu H3F3A (u myszy) mają defekt płodności, a mutanty genu H3F3B są małe i giną po urodzeniu.

Poważną rolę w spermatogenezie odgrywają odpowiednie miRNA. Delecje genów DROSHA i DICER powodują zahamowanie spermatogenezy aż do powstania azoospermii.

Także piRNA i białka wiążące te RNA są konieczne w prawidłowej spermatogenezie. Są one niezbędne do wyciszenia elementów ruchomych i wielu endogennych retrowirusów. Szczególne znaczenie mają białka Miwi.p (ich mutacje są też powodem bezpłodności), Miwi2.p i Mili.p.

Oogeneza

W życiu płodowym oocyty są zatrzymane w profazie mejozy I aż do wieku dojrzewania samicy. W odpowiedzi na wzrost gonadotropin oocyty kończą mejozę i usuwają pierwsze ciało kierunkowe. Inicjowany jest drugi podział mejozy, który ulega zatrzymaniu w metafazie (wtórny oocyt, zdolny do zapłodnienia).

De novo metylacja DNA ma znaczenie dla regulacji transkrypcji genów ulegających imprintingowi genetycznemu.

Metylacja histonu H3K4me2/me3 jest znacząco obniżona, co hamuje inicjację transkrypcji (komórki gamet są inertne transkrypcyjnie).

Wprowadzenie izoformy histonu H3.3 jest niezbędnym warunkiem dla reprogramowania genomu oocyty. Równie ważna jest stała obecność białkowego chaperonu Hira.p.

Rola mikroRNA w oogenezie jest mniejsza niż w spermatogenezie, ale defekt genu DICER jest przyczyną nieprawidłowości w mejozie I. W procesie regulacji oogenezy znaczenie ma endogenne siRNA.

ZAPŁODNIENIE

Połączenie haploidalnego plemnika z haploidalną komórką jajową tworzy diploidalną komórkę – zygotę. Zapłodnienie obejmuje cztery główne procesy:

1. Wiązanie plemnika z komórką jajową. Ważną rolę w tej interakcji komórek odgrywają białka błony komórkowej plemnika (Izumo1.p) i receptor tego białka znajdujący się na powierzchni komórki jajowej (Izumo1R.p/Juno.p). Po zapłodnieniu białko Izumo1R.p jest usuwane z błony komórki jajowej, co zapobiega przyłączeniu kolejnego plemnika.
2. Wniknięcie plemnika do cytoplazmy komórki jajowej. Tworzy się zygota, która zawiera jądro komórki jajowej (pronukleus żeński) i jądro plemnika (pronukleus męski). W tym czasie następuje zakończenie mejozy II i usunięcie drugiego ciała kierunkowego.
3. Reprogramowanie chromatyny pronukleusów (zwłaszcza męskiego pronukleusa). Reprogramowanie obejmuje:
 - Rozluźnienie struktury chromatyny męskiego pronukleusa, który staje się równy wielkości pronukleusa żeńskiego. W tym procesie ważną rolę odgrywają białka typu NPM (nukleoplazmina). Npm2.p jest stale obecna w cytoplazmie oocyty, a jej brak powoduje zahamowanie rozwoju embrionów preimplantacyjnych. W późnych pronukleusach i w embrionach dwukomórkowych białko Npm2.p wiąże heterochromatynę centromerową, tworząc kolistą strukturę zwaną **NPB** (*nucleolar precursor body*). Istnienie NPB jest w jakiś sposób związane ze stanem totipotencjalności komórek.
 - Wymianę protamin w męskim pronukleusie na histony. Jest to najbardziej dramatyczny proces reprogramowania w całej embriogenezie. Szczególną rolę odgrywają izoformy histonu H3 (H3.3), a także histony H2AX i H2A.Z. Histon H3.3 jest główną izoformą H3 we wczesnym pronukleusie męskim (ale jest usuwany z chromatyny pronukleusa żeńskiego). Do stadium C4 embrionu wiąże zarówno euchromatynę, jak i heterochromatynę. Jest ważny w rozluźnieniu struktury chromatyny (antagonizuje histon H1) i w powstawaniu heterochromatyny pericentromerowej. Histon H2AX jest ważnym składnikiem chromatyny komórek totipotencjalnych. Histon H2A.Z jest ważną izoformą komórki jajowej, a jego ilość po zapłodnieniu spada bardzo szybko. Chaperonem wymiany protamin na histony jest białko Hira.p (*histone cell cycle regulator*, ma

też znaczenie w tworzeniu „ognisk” senescencji SAHF). Także białka Atrx.p (ATPaza i helikaza remodelująca, odgrywa rolę w metylacji DNA) i Daxx.p (*death domain associated protein*, regulator apoptozy i represor transkrypcji) odgrywają rolę w wymianie.

- Asymetryczne modyfikacje histonów obu pronukleusów. Męski pronukleus zawiera histon H3.3, którego jest bardzo mało w pronukleusie żeńskim. Wczesne męskie pronukleusy nie mają metylacji H3K4me2 i H3K4me3, H3K27me1/me2/me3, a także H3K9me1/me2/me3. H3K4me3, H3K9me2 i H3K27me3 zaczynają powstawać w późnym męskim pronukleusie, ale są mniej nasilone w porównaniu z pronukleusem żeńskim. H3K27me3 wiąże kompleks polycomb PRC1 hamujący transkrypcję.

Transkrypcja DNA w żeńskim pronukleusie jest hamowana przez bardzo silną metylację H3K9me3 i H3K9me2. Histon H3K9me2 przyłącza białko matczyne Dppa3.p/Pgc7.p/Stella.p (*developmental pluripotency associated protein 3*, represor transkrypcji).

Acetylacja H3K27ac zaczyna się we wczesnym stadium męskiego pronukleusa o wiele wcześniej niż w pronukleusie żeńskim.

- Asymetryczną demetylację DNA pronukleusa męskiego. DNA plemnika i komórki jajowej są wysoko metylowane. W zygocie już w kilka godzin po zapłodnieniu zaczyna się czynna demetylacja DNA pronukleusa męskiego. Ta demetylacja zależy od aktywacji białka Tat3.p (*ten eleven translocation family 3*) enzymu przeprowadzającego konwersję 5-metylocytozyny (5mC) w 5-hydroksymetylocytozynę (5hmC), która zamieniana jest z kolei na 5-formylocytozynę (5fC) i 5-karboksycytozynę (5caC). 5caC jest usuwana przez glikozylazę tyminy DNA (Tdg.p), enzym korygujący niedopasowania sekwencji DNA.

Pronukleus żeński nie ulega demetylacji. Silna metylacja H3K9me2 wiąże matczyne białko Dppa3.p/Pgc7.p/Stella.p (*developmental pluripotency associated 3*), który hamuje Tet3.p i chroni DNA przed demetylacją.

4. Aktywację genomu embrionu (**EGA**). Przez cały okres istnienia zygoty (u myszy około 24 godzin) genom matczyne i ojcowski nie są ze sobą połączone. Po inicjacji syntezy DNA (w fazie G2 cyklu zygoty) następuje aktywacja ekspresji około 500 genów, których identyfikacja jest trudna ze względu na dużą ilość RNA matczynego w cytoplazmie zygoty.

We wczesnej zygocie następuje silne obniżenie ekspresji retrotranspozonu IAP (mysz) i aktywacja ekspresji elementu ruchomego LINE1. Blokowanie ekspresji LINE1 powoduje blok różnicowania embrionu w stadium 4C lub 8C. Także w tym okresie następują duże zmiany ekspresji endogennych siRNA i piRNA. Druga fala ekspresji genomu embrionu następuje w stadium 2C u myszy lub w stadium C4 – C8 u człowieka.

Ekspresja sekwencji LINE1 jest kontynuowana, a ponadto aktywacji ulega endogenncy myszy re-trowirus MuERV-L i wiele genów, które posiadają w promotorach sekwencję LTR tego wirusa. Ekspresja MuERV-L zależy także od braku represorów transkrypcji Trim28.p/Kap1.p, białek wiążących DNA, jak Zfp42.p/Rex1.p i Rybp.p, demetylaz histonu H3K4me2 (Kdm1A.p/Lsd1.p), metylaz H3K9me2, jak Ehmt2.p/Kat1C.p i Ehmt1.p/Glp.p, demetylasy DNA Tet3.p i białek CBX/HP1. W stadium C2 embrionu myszy stwierdzono też ekspresję białek Zscan4.p. Stabilizują one genom i regulują wydłużanie telomerów. Ekspresja genów embrionu w tym okresie nie została zbyt dobrze poznana.

METABOLIZM ENERGETYCZNY

Komórki czerpią energię z reakcji utleniania glukozy, aminokwasów i acetylo-koenzymu A (AcCoA). Większość substratów (poza AcCoA) pochodzi z zewnątrz komórek.

Substraty te są utleniane w dwóch głównych procesach: w glikolizie beztlenowej (**AnGli**) i w cyklu kwasów trójkarboksylowych (**TCA** – cykl Krebsa) połączonym z oksydacyjną fosforylacją w mitochondriach (**OxPhos**). Glikoliza beztlenowa jest procesem bardzo szybko przebiegającym, ale bardzo mało wydajnym (wytwarza jedynie 2 cząsteczki ATP), podczas gdy OxPhos przebiega wolno, ale jest bardzo efektywny (wytwarza do 36 cząsteczek ATP). Dodatkowo w związanym z AnGli cyklem pentozowym wytwarzane są metabolity do syntez kwasów nukleinowych jak nukleotydy, a TCA może zwiększać poziom glukozy (glukoneogeneza) i kwasów tłuszczowych (lipogeneza) (**rys. 41**).

Metabolizm energetyczny komórek zależy:

- od proliferacji komórek,
- od ich samoodnowy i wzrostu masy,
- od konieczności syntez kwasów nukleinowych, białek, lipidów i węglowodanów (istnienie substancji zapasowych, dostępność glukozy, aminokwasów, tlenu w środowisku),

- od ilości i aktywności mitochondriów,

Komórki totipotencjalne (zygota i komórki 2C embrionu) nie mają zdolności do samoodnowy, nie są komórkami szybko proliferującymi, a nieliczne podziały w pierwszym tygodniu życia nie zwiększają masy zarodka. Komórka jajowa ma nagromadzone znaczne ilości białek, kwasów nukleinowych i całych organelli, jak na przykład mitochondria.

Ponadto komórki totipotencjalne wykorzystują też swoje rezerwy przez autofagię. W ośmiokomórkowym embrionie globalne rezerwy białka są obniżone o około 25% w porównaniu z zygotą.

Glikoliza beztlenowa jest kontrolowana przez aktywność heksokinazy i fosfofruktokinazy i jest mało wydajna. Glukoza nie jest źródłem energii, a nawet hamuje rozwój wczesnego embrionu.

Jedynym źródłem energii i węgla dla zygoty (tak samo jak dla oocytów i spermatocytów) są pirogroniany syntetyzowane przez komórki Sertoliego i przez komórki pęcherzyka Graafa. Zużycie tlenu jest niskie, a mitochondria małe i niedojrzałe.

Poziom ATP i NADH jest wysoki i hamuje aktywność Pfk1.p (fosfofruktokinazy). Spadek ilości ATP zwiększa glikolizę w blastocyscie. Źródłem węgla są także dwuwęglany (**rys. 42**).

FAKTORY TOTIPOTENCJALNOŚCI

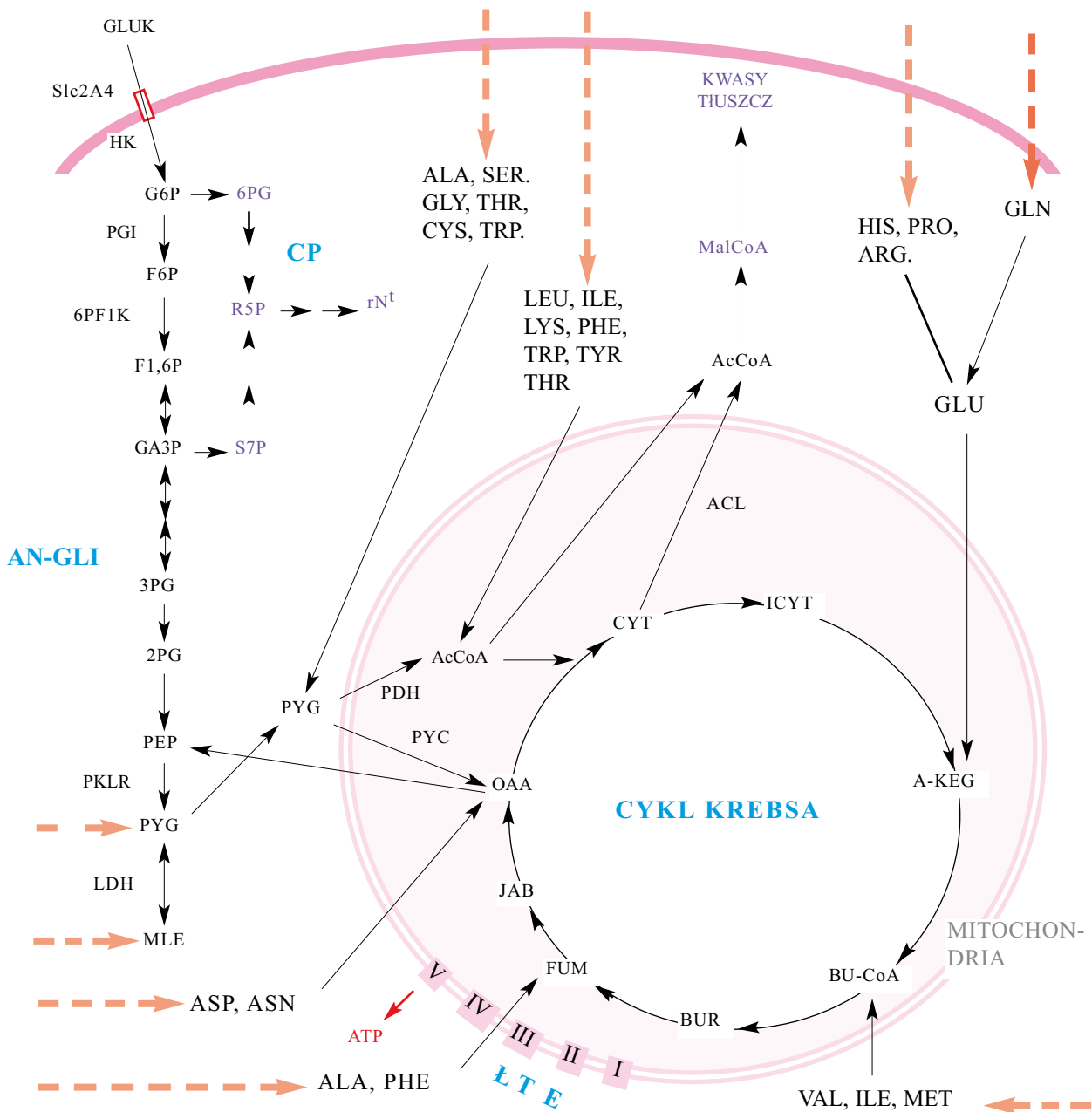
Nie wiemy, co powoduje stan totipotencjalności komórek. Wiadomo, że remodelowanie chromatyny, zwłaszcza jądra plemnika, jest zjawiskiem unikalnym. Polega ono na wymianie protamin na histony, co wymaga obecności chaperonów, jak nukleoplazminy (u myszy głównie Npm1.p i Npm3.p). Wbudowywane są specyficzne izoformy histonów, jak H3.3, co wymaga obecności specyficznych chaperonów jak Hira.p, który ma także znaczenie w tworzeniu ognisk SAHF w stanie senescencji.

Innymi chaperonami są białka Atrx.p (helikaza i ATPaza z rodziny białek SWI/SNF, regulator metylacji DNA) i białko Daxx.p (represor transkrypcji i regulator procesu apoptozy).

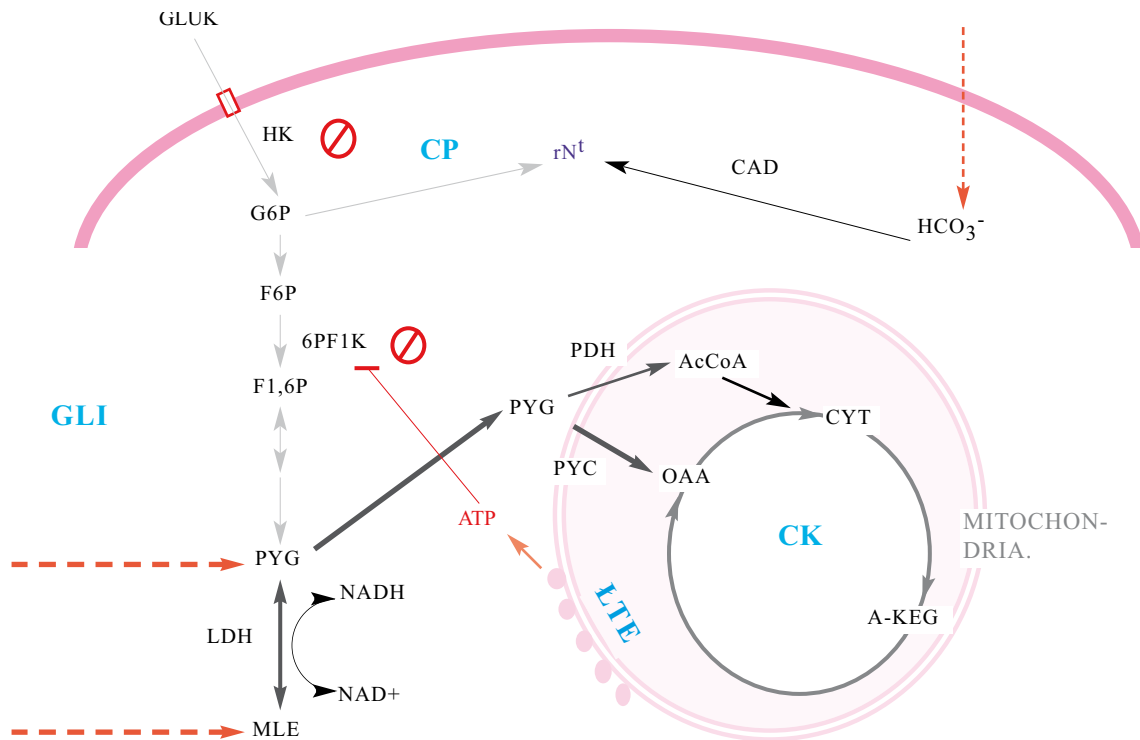
Także izoforma H2AX jest głównym wariantem histonu H2A w totipotencjalnych komórkach.

Być może znaczenie posiada silna asymetria metylacji DNA i modyfikacji histonów między genomem ojcowskim i matczynym.

Interesującym zjawiskiem są specyficzne struktury obserwowane w jądrach komórek totipotencjalnych – centromerowa chromatyna jest rozmieszczona na obwodzie tak zwanych „ciałek prekursorowych jąder” (NPB).



Rys. 41. Wytwarzanie energii w komórkach. (AN-GLI) – beztlenowa glikoliza, (CP) – cykl pentozowy, (ŁTE) – łańcuch transportu elektronów, (AcCoA) – acetylo-koenzym A, (A-KEG) – α-ketoglutaran, (ACL) – ATP zależna liaza cytrynianu, (BU-CoA) – bursztynylokoenzym A, (BUR) – bursztynian, (CYT) – cytrynian, (F1,6P) – 1,6 dwufosfofruktoza, (F6P) – fruktozo-6P, (FUM) – fumaran, (G6P) – glukozo-6P, (GA3P) – gliceroaldehydo-3P, (GLUK) – glukoza, (GLN) – glutamina, (GLU) – glutaminian, (HK) – heksokinaza, (ICYT) – izocytrynian, (JAB) – jabłczan, (LDH) – dehydrogenaza mleczanowa, (MLE) – mleczan, (MalCoA) – malonylo-koenzym A, (OAA) – szczawiooctan, (PDH) – kompleks dehydrogenaza pirogronianu, (PEP) – fosfoenolopirogronian, (6PF1K) – 6 P-fruktokinaza, (3PG/2PG) – 3-P/2-P glicerol, (PGI) – fosfoglukoizomeraza, (6PGI) – 6P-glukonian, (PKLR) – kinaza pirogronianu, (PYC) – karboksykinaza pirogronianu, (PYG) – pirogronian, (R5P) – rybozo-5P, (rN^t) – rybonukleotydy, (S7P) – sedoheptulozo-7P. Zaznaczono miejsce włączenia aminokwasów do cyklu Krebsa. Przerwane strzałki oznaczają wymianę substratów z mikrośrodowiskiem.



Rys. 42. Metabolizm energetyczny totipotencjalnych komórek stem. (GLI) – glikoliza beztlenowa, (CP) – cykl pentozowy, (CK) – cykl Krebsa, (LTE) – łańcuch transportu elektronów. (AcCoA) – acetylokoenzym A, (A-KEG) – α -ketoglutaran, (CAD) – syntetaza karbamoilofosforanu 2, (CYT) – cytrynian, (F6P) – fruktozo-6P, (F1,6P) – 1,6 dwufosfofruktoza, (G6P) – glukoza-6P, (GLUK) – glukoza, (HK) – heksokinaza, (LDH) – dehydrogenaza mleczanowa, (MLE) – mleczan, (PYC) – karboksylaza pirogronianowa, (PYG) – pirogronian, (6PF1K) – 6 fosfofruktokinaza 1, (rNt) – rybonukleotydy. Przerywane strzałki oznaczają wymianę substratów z mikrośrodowiskiem.

Po zapłodnieniu obserwowane są unikalne zmiany w profilu ekspresji mRNA (jak *ZSCAN4* mRNA stabilizujący telomery i cały genom), endogennych siRNA, piRNA i miRNA, a także ekspresja endogennych retrowirusowych RNA, zwłaszcza MuERV-L (myszy) i LINE1. Znaczenie tej ekspresji dla totipotencji komórek nie jest wyjaśnione.

b. Komórki pluripotencjalne

Blastomery 4-komórkowego embrionu myszy (4C), a u dużych ssaków blastomery stadium 8C i 16C tracą swoją totipotencjalność.

Charakterystycznym produktem białkowym blastomerów stadium 2C u myszy jest *Zscan4.p/Znf494.p*. Białko stabilizuje telomery i kariotyp, chroni komórki przed senescencją i aktywuje ekspresję genów wczesnego embrionu.

W stadium 2C obserwuje się też wysoką ekspresję endogennych retrowirusów myszy MuERV-L, a tak-

że genów posiadających w promotorach sekwencje LTR tego retrowirusa.

U myszy już w stadium 4C embrionu blastomery wykazują pewne zróżnicowanie. Komórki z wysokim poziomem metylacji histonu H3R26me, dużą globalną transkrypcją RNA, a także wykazujące niską ekspresję *Pou5f1.p/Oct4.p* są uwarunkowane do różnicowania w kierunku węzła zarodkowego (ICM). Blastomery stadium 4C wykazują też różnice w poziomie ekspresji genu *PRDM14*.

W okresie od 4C do 32C (moruli) myszy obserwowana jest zmiana totipotencjalności komórek na ich pluripotencjalność. Oznacza to utratę ich zdolności różnicowania do pozaembrionalnych tkanek (głównie trofoblastu).

Pierwsze zmiany ekspresji genów inicjujące różnicowanie mogą być zaobserwowane w C16 moruli (odpowiada to okresowi E3.0 – E3.25 embrionu myszy).

Aktywowany jest wówczas szlak transmisji sygnałów, który mógłby odpowiadać szlakowi HIPPO

u *D. melanogaster*. U ssaków inicjuje go aktywacja białka transmembranowego Crb3.p (Crumbs 3.p), które tworzy kompleks z białkami połączeń międzykomórkowych ścisłych: Patj.p, Mmp5.p, białkiem Amot.p i merliną (Nf2.p). Białka te stymulują kinazy typu Hippo – Stk4.p/Mst1.p i Stk3.p/Mst2.p. Kinazy Stk3.p/ Stk4.p tworzą kompleksy z białkami Sav.p i Mob1A/B.p, które są supresorami nowotworzenia.

Kinazy Stk3/4.p stymulują kinazy Lats1/2.p (*large tumor suppressor kinases*). Są to kinazy typu serynowo-treoninowego, które hamują aktywność efektorów szlaku HIPPO – czynników transkrypcji Yap1.p (*Yer. associated protein*) i taffazyny Taz.p.

W obecności białek TEAD wiążących enhancery stymulowane są liczne geny proliferacji, różnicowania i apoptozy. Brak hamowania tych czynników przez szlak HIPPO w komórkach somatycznych może prowadzić nawet do powstawania i progresji nowotworów.

U ssaków szlak Crumbs3.p – Stk3/4.p aktywuje kinazę Lats1.p tylko w kilku komórkach zlokalizowanych we wnętrzu moruli, natomiast hamuje aktywność Lats1.p w komórkach zewnętrznych regionów moruli. Aktywowana kinaza Lats1.p hamuje ekspresję genu CDX2 i aktywuje SOX2 w komórkach wnętrza moruli (które są progenitorami ICM). Odwrotny skutek ma zahamowanie Lats1.p w komórkach zewnętrznych moruli (które są progenitorami trofoektodermy – TE).

Sox2.p (*SRY box containing 2*) jest białkiem z rodziny HMG, jest jednym z głównych regulatorów w przedimplantacyjnej embriogenezie. Sox2.p promuje ekspresję genów pluripotencji (ale sama pluripotencja pojawia się dopiero w komórkach węzła zarodkowego). Ekspresja jest ograniczona do progenitorów ICM, a ograniczenie zależy od sygnalizacji HIPPO, a nie od czynnika Cdx2.p.

Białko Sox2.p jest konieczne do tworzenia komórek ICM i do powstawania blastocysty (podobnie jak białko Tead4.p). Odgrywa też ważną rolę w reprogramowaniu komórek iPSC.

Cdx2.p i Gata3.p ulegają ekspresji w TE pod wpływem czynników Yap.p, Wwtr1.p i Tead4.p. Czynniki te hamują jednocześnie ekspresję Sox2.p w TE. Aktywność kinazy Lats1.p w TE jest niska.

Cdx2.p jest białkiem homeoboksu z rodziny CAU-DAL, jest regulatorem ekspresji genów TE i genów endodermy. Hamuje ekspresję genów POU5F1/OCT4 i NANOG w TE (dopiero w okresie blastocysty).

We wczesnej blastocysty (E3.25 – E3.50, co odpowiada embrionowi C32 – C64) białko Sox2.p jest obecne w komórkach ICM, czynniki Pou5f1.p/Oct4.p i białko Nanog.p są obecne zarówno w ICM, jak i w TE, a biał-

ko Gata3.p i Eomes.p (eomesodermina) są tylko w trofoektodermie.

W blastocysty okresu E3.50 – E3.75 (odpowiada to embrionowi C64 – C128) Cdx2.p w TE hamuje ekspresję genów POU5F1 i NANOG. W komórkach EPI (epiblastu) czynniki Sox2.p, Pou5f1.p/Oct4.p i Nanog.p aktywują ekspresję czynnika Fgf4.p, który stymuluje w komórkach sąsiednich (PE – prymitywnej endodermy lub hipoblastu) kinazy typu MAPK.

MAP-kinazy hamują ekspresję genów Sox2.p i Nanog.p, a stymulują ekspresję genów hipoblastu – PE. W okresie (E3.50 – E3.75) w ICM blastocysty znajdują się zarówno komórki epiblastu EPI, jak i prymitywnej endodermy PE.

W blastocysty następuje silna aktywacja ekspresji endogennych sekwencji LINE1, ERV1 i sekwencji endogennych cząstek IAP.

W późnej blastocysty komórki epiblastu (których markerami są Sox2.p, Pou5f1.p/Oct4.p, Nanog.p i Pecam1.p/CD31) odróżniają się od komórek PE z ekspresją czynników Gata6.p, Gata4.p, Sox17.p, Sox7.p i Pdgfra.p.

Komórki ICM i komórki EPI stają się pluripotentne. Komórki te hodowane *in vitro* w odpowiednich warunkach tworzą nieśmiertelne linie komórek embrionalnych stem (ESC) lub komórek epiblastycznych stem (EpiSC). Mogą one różnicować do komórek wszystkich trzech listków zarodkowych.

Tworzenie blastocysty zostało przedstawione na rys. 43.

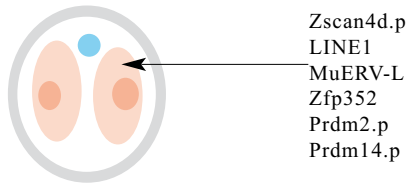
KOMÓRKI ESC I EPI-SC

Komórki embrionalne stem pochodzą z węzła zarodkowego (**embrioblastu**) ze stadium blastocysty zarodka. Komórki te hodowane *in vitro* tworzą nieśmiertelne linie komórkowe o wielkiej zdolności samoodnowy i zdolne do różnicowania do komórek wszystkich trzech listków zarodkowych płodu (poza komórkami trofoektodermy).

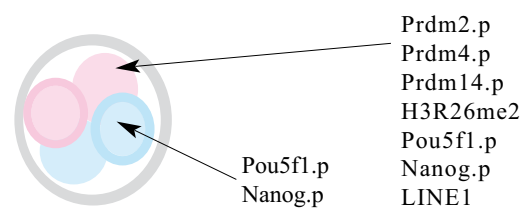
Embrion ludzki w stadium blastocysty zawiera do 100 komórek **trofoektodermy** i od 10 do 20 komórek wewnętrznie zlokalizowanego węzła zarodkowego (**embrioblastu**). W okresie późniejszym embrioblast zawiera komórki **epiblastu** i prymitywnej endodermy (**hipoblastu**).

Komórki epiblastu też tworzą *in vitro* linie komórek epiblastycznych stem (**EpiSC**), które różnią się nieco od komórek stem embrionalnych (**ESC**). Dodatkowo komórki stem wytworzone z blastocysty przedimplantacyjnej nieuważanej – **ABSE** (*avasular blastocyst stage embryo*) różnią się od komórek stem wypro-

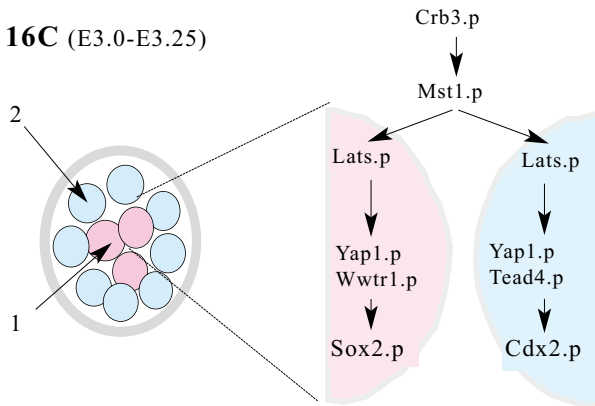
2C



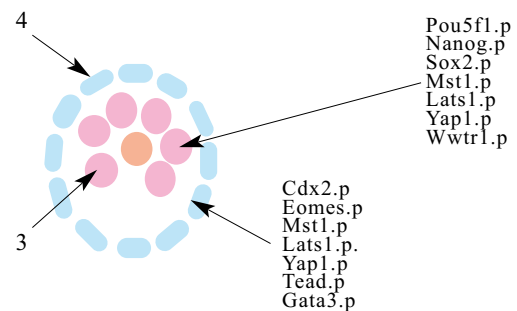
4C



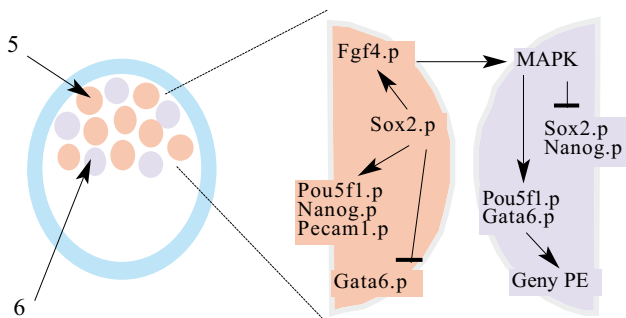
16C (E3.0-E3.25)



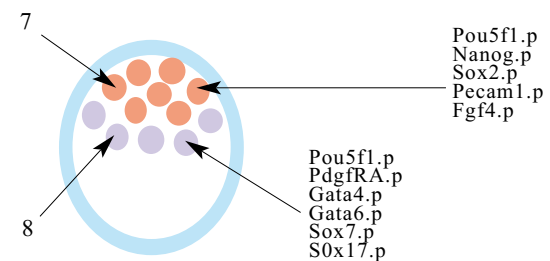
32C (E3.25-E3.50)



64C (E3.50-E3.75)



>E3.75



Rys. 43. Różnicowanie przedimplantacyjnego embrionu myszy. (2C) – stadium dwukomórkowe, (4C) – stadium czterekomórkowe, (16C) – stadium moruli, (1) – komórki prekursorzy ICM (węzła zarodkowego), (2) – komórki prekursorzy TE (trofoektodermi). (32C) – stadium wczesnej blastocysty, (3) – komórki ICM, (4) – komórki TE, (64C) – stadium blastocysty, (5) – komórki prekursorzy epiblastu (EPI), (6) – komórki prekursorzy PE (prymitywnej endodermy, hipoblastu). (> E3.75) – stadium późnej blastocysty, (7) – komórki epiblastu, (8) – komórki PE. Zaznaczono regulację ekspresji czynników różnicowania szlakami MST/HIPPO i FGF4 oraz ekspresję pewnych białek w różnych typach komórek.

wadzonych z blastocysty po jej implantacji **VBSE** (*vascular blastocyst stage embryo*).

Istnieją też znaczne różnice własności komórek ESC mysich (mESC) i ludzkich (hESC). Ludzkie komórki są podobne raczej do mysich komórek epiblastycznych stem **mEpiSC**. Komórki te mają ekspresję białek pluripotencjalności, ale też białek specyficznych,

jak: Mgm1.p/Dkk1.p (egzonukleaza mitochondrialna), Fgf5.p (onkogenne białko), T.p/Brachyury.p (czynnik różnicowania komórek mezodermy), Sox17.p (regulator transkrypcji) i białko Cer1.p/Cerberus.p (antagonista białek BMP).

Komórki mEpiSC mają także inną morfologię od komórek mESC i odmienny stan epigenetyczny chro-

matyny (na przykład mają aktywowany chromosom X w żeńskich komórkach). Przeszczepione do tkanek dorosłych myszy SCID tworzą potworniki złożone z komórek trzech listków zarodkowych, ale po przeszczepieniu do blastocysty nie mogą wbudować się do węzła zarodkowego.

Komórki ESC mają znacznie skrócony cykl życiowy (który trwa od 15 do 16 godzin, w tym faza G1 od 2,3 do 3 godzin). Praktycznie nie istnieją punkty kontrolne fazy G1 i fazy S. Ekspresja inhibitorów CDK (białek Cdkn2B.p/p15, Cdkn2A.p/p16, Cdkn2D.p/p19, Cdkn1A.p/p21 i Cdkn1B.p/p27) jest bardzo niska, podobnie jak białek pRb1 i E2F6.p. Szlak inhibicji p53 – p21 nie jest aktywny.

Komórki ESC mają „otwartą” chromatynę i relatywny brak heterochromatyny, metylacja sekwencji CpG jest niska. Regiony genów różnicowania mają histony znakowane biwalentnie. Specyficzna dla komórek ESC jest wysoka ekspresja genów „stanu stem”, jak na przykład: POU5F1/OCT4, SOX2, NANOG, KLF4, PHC1, UTF1, DPPA2/4/5 oraz genów LIN28 i H19.

Gen POU5F1 koduje faktor pluripotencjalności – białko Oct4.p. Białko to hamuje ekspresję genu TP53 i aktywność białka p53 (przez stymulację ekspresji deacetylazy Sirt1.p). Acetylacja p53 w lizynach 120, 164, 320, 270, 373, 381 i 396 przez acetylotransferazy Crebbp.p/Cbp1 i Kat5.p/Tip60.p stabilizuje i zwiększa jego aktywność. W komórkach embrionalnych stem białko p53 aktywuje:

- Różnicowanie i obniża ich pluripotencjalność.
- Blok cyklu komórkowego (przez stymulację Sfn.p/14-3-3σ.p). Synteza mRNA *CDKN1A* jest stymulowana, ale translację białka hamują mikroRNA (jak *miR-302* i *miR-319*).
- Apoptozę komórek (przez stymulację Bbc3.p/Puma.p i Pmaip.p/Noxa.p). Apoptoza w komórkach ESC zachodzi głównie w fazie S cyklu.

Samo białko Pou5F1.p/Oct4.p wchodzi w liczne kompleksy regulujące transkrypcję razem z kompleksem „Mediator” i białkami:

- Tcf3.p/E2A.p (aktywuje samoodnowę).
- NFκB (aktywuje proliferację, odpowiedź na stres i przeżycie komórek).
- Crebbp.p/Cbp.p (hamuje neurogenezę).
- p53 (reguluje ekspresję białka Nanog.p).
- Pax.p.

Gen NANOG koduje ważny faktor pluripotencjalności komórek embrionalnych stem.

Gen KLF4 koduje faktor transkrypcji z rodziny białek KRUPPEL i odgrywa ważną rolę w procesie reprogramowania komórek somatycznych do komórek typu iPSC.

Gen PHC1 koduje białko typu Polycomb.p – (*Polyhomeotic homolog 1*).

Gen UTF1 (*undifferentiated embryonic stem cell transcription factor 1*) odgrywa rolę w różnicowaniu komórek embrionalnych stem.

Białka Dppa2.p i Dppa4.p (*developmental pluripotency associated proteins*) mają domenę SAP i przyłączają się do sekwencji DNA wiążących matriks jądrową.

Gen LIN28 koduje białko wiążące RNA, w tym mi-RNA z rodziny *MirLET7*.

Białko FbxO5.p jest homologiem białka Emil.p *Xenopus* (*early mitotic inhibitor protein*). W komórkach ESC częściowo zastępuje kompleks APC/C (*anaphase promoting complex – cyclosome*) przy przejściu komórek z telofazy w anafazę.

Białka HnRNP-A2.p i HnRNP-B1.p regulują proces przejścia z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego (wobec niskiego poziomu p53 i Cdkn1A.p/p21).

Komórki ludzkie hESC i mysie mEpiSC mają za główne źródło energii glikolizę. Posiadają one wiele mitochondriów, ale mają bardzo małą ekspresję oksydazy cytochromowej c (Cox.p).

Komórki mysie mESC (nazywane naiwnymi komórkami pluripotencjalnymi) są biwalentne i mogą korzystać z glikolizy lub z oksydatywnej fosforylacji (OXPHOS) w zależności od poziomu faktora hipoksji Hif1α.p. Metabolizm energetyczny wczesnych komórek mESC przedstawiony został na **rys. 44**.

Mysie wczesne ESC produkują ATP głównie w procesie glikolizy. Cykl Krebsa funkcjonuje i metabolizuje głównie pirogronian, ale wykorzystywany jest zasadniczo do produkcji kwasów tłuszczowych i aminokwasów.

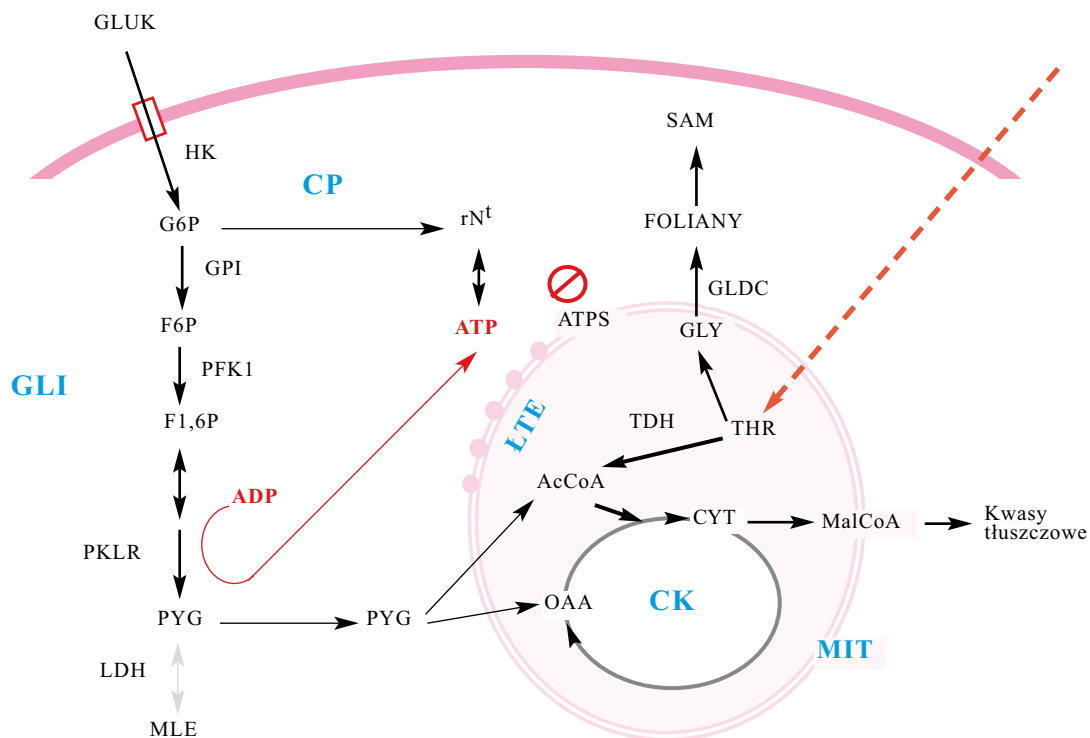
Łańcuch transportu elektronów (LTE) funkcjonuje, ale produkuje mało ATP z powodu bardzo niskiej aktywności syntetazy ATP. LTE służy głównie do utleniania NADH do NAD⁺.

We wczesnych blastocystach myszy rośnie zużycie glukozy i tlenu, ale funkcjonalne mitochondria znajdują się głównie w komórkach trofoektodermi.

Metabolizm pirogronianu podwyższa znacznie poziom AcCoA i acetylację histonów. Jest to konieczne dla zachowania pluripotencjalności.

Unikalny jest także metabolizm aminokwasów tych komórek. Są one absolutnie zależne od treoniny (a w mniejszym stopniu od metioniny i cysteiny). Ekspresja dehydrogenazy treoniny (Tdh.p, która metabolizuje treoninę do glicyny i AcCoA) jest wysoka. Ludzkie hESC, które odpowiadają mysim mEpiSC, metabolizują raczej metioninę, a nie treoninę.

Glicyna jest metabolizowana przez dekarboksylazę glicyny (Gldc.p) do jednowęglowych fragmentów



Rys. 44. Metabolizm energetyczny wczesnych komórek mESC. (GLI) – glikoliza, (CK) – cykl Krebsa, (CP) – cykl pentozowy, (LTE) – łańcuch transportu elektronów, (MIT) – mitochondrium. (Ac-CoA) – acetylo-koenzym A, (ATPS) kompleks syntetazy ATP, (CYT) – cytrynian, (F6P) – fruktozo-6 fosforan, (F1,6P) – fruktozo-1,6 dwufosforan, (G6P) – glukozo-6 fosforan, (GLDC) – dekarboksylaza glicyny, (GLUK) – glukoza, (GLY) – glicyna, (GPI) – izomeraza glukozo-6 fosforanu, (HK) – hekso-kinaza, (LDH) – dehydrogenaza mleczanowa, (MalCoA) – malonylo-koenzym A, (MLE) – mleczan, (OAA) – szczawiooctan, (PFK1) – fosfofruktokinaza 1, (PKLR) – kinaza pirogronianu, (PYG) – pirogronian, (rN^t) – rybonukleotydy, (SAM) – S-adenozylometionina, (TDH) – dehydrogenaza treoninowa, (THR) – treonina. Przerywane strzałki oznaczają wymianę substratów z mikrośrodowiskiem.

i do produkcji 5-metylo-tetrahydro-folianu. Aktywuje to S-adenozylometioninę do metylacji H3K4me3 w otwartej chromatynie komórek ESC.

N-acetylowanie O-glukozaminy (O-Glc N-Ac) przez transferazę (Ogt.p) ma znaczenie w stabilizacji stanu stem komórek. Zwłaszcza N-acetylowanie O-Glc i białka Tet1/2.p zwiększa demetylację DNA, a taka sama modyfikacja białka Myc.p zwiększa samoodnowę i stabilizuje stan stem.

Różnicujące się komórki ESC (ludzkie hESC i mysie mEpiSC) modyfikują swój metabolizm. Maleje nieco aktywność glikolizy, ulega też redukcji metabolizm treoniny, glicyny i metioniny.

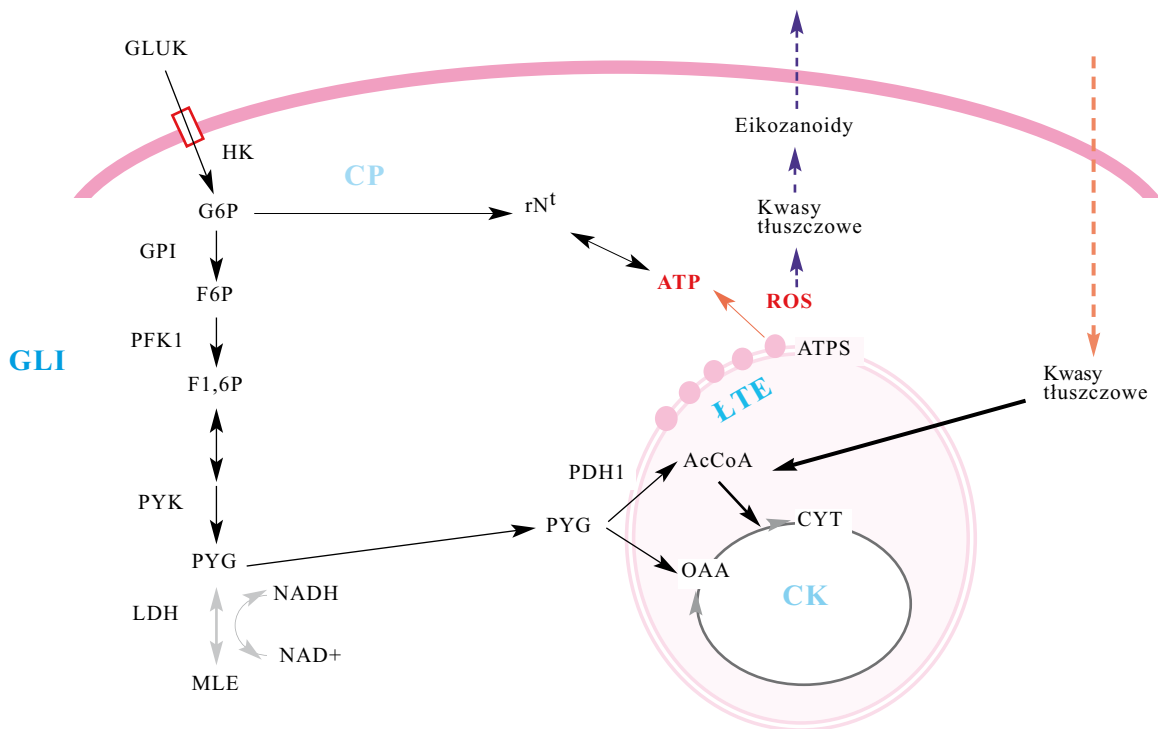
Komórki ludzkie hESC i mysie mEpiSC mają za główne źródło energii glikolizę. Posiadają one wiele mitochondriów, ale te mitochondria mają małą ekspresję oksydazy cytochromowej c (Cox.p).

Glikoliza zwiększa poziom NAD⁺ i aktywuje białko Sirt1.p, które deacetyluje H4K16Ac. Jednak całkowita aktywność LdhA.p w komórkach hESC jest mała.

Oksydacyjna fosforylacja mitochondrialna zaczyna zużywać pirogroniany i kwasy tłuszczowe do produkcji ATP. Wzrasta też aktywność ATP-syntazy w łańcuchu transportu elektronów.

ESC są wzbogacone w nienasycone kwasy tłuszczowe. Ich utlenianie zwiększa poziom ROS i powoduje tworzenie aktywnych biologicznie eikozanoidów. (prostaglandyn, prostacyklin, leukotrienów, tromboksanów). Farmakologiczna inhibicja enzymów koniecznych do tworzenia eikozanoidów jest przyczyną utraty pluripotencji komórek ESC.

Metabolizm energetyczny komórek EpiSC i hESC przedstawiony został na rys. 45.



Rys. 45. Metabolizm energetyczny różnicujących się komórek mEpiSC. (GLI) – glikoliza, (CK) – cykl Krebsa, (CP) – cykl pentozowy, (LTE) – łańcuch transportu elektronów, (AcCoA) – acetylo-koenzym A, (ATPS) kompleks syntetazy ATP, (CYT) – cytrynian, (F6P) – fruktozo-6 fosforan, (F1,6P) – fruktozo-1,6 dwufosforan, (G6P) – glukoza-6 fosforan, (GLUK) – glukoza, (GPI) – izomeraza glukozy-6 fosforanu, (HK) – heksokinaza, (LDH) – dehydrogenaza mleczanowa, (MLE) – mleczan, (OAA) – szczawiooctan. (PDH1) – dehydrogenaza pirogonianu, (PFK1) – fosfofruktokinaza 1, (PYG) – pirogonian, (PYK) – kinaza pirogonianu, (rN^t) – rybonukleotydy, (ROS) – reaktywne formy tlenu. Przerwane strzałki oznaczają wymianę substratów między komórkami a mikrośrodowiskiem.

ROLA lncRNA I ELEMENTÓW RUCHOMYCH GENOMU (TE) W ESC

Elementy ruchome stanowią około 40% genomu. Kodują one liczne białka odgrywające rolę w regulacjach epigenetycznych i procesie transkrypcji. We wczesnej embriogenezie jest obserwowana demetylacja DNA i przejściowy wzrost ekspresji elementów ruchomych TE (*transposable elements*).

Elementy ruchome genomu zawierają w sobie transpozony (stanowią do 3% genomu) i retrotranspozony (sekwencje LINE – stanowią około 18%, sekwencje SINE – do 11%, a zawierające sekwencje LTR – endogenne retrowirusy, stanowią około 8% genomu).

TE odgrywają ważną rolę we wczesnej embriogenezie. W oocytach myszy około 13% całkowitego mRNA stanowią transkrypty retrowirusowe, a ok. 3%

transkrypty sekwencji SINE. W 2C embrionie znajdują się kompletne cząstki retrowirusowe (także w ludzkich embrionach są cząstki wirusów HERV-K). Ta ekspresja retrowirusów jest specyficzna dla stadium embriogenezy:

- zygota, embriony 2C i 4C ekspresja LTR14B,
- embrion 8C ekspresja LTR7B,
- blastocysta ekspresja LTR7Y.

Po zahamowaniu ekspresji MuERV-L rozwój embrionu zatrzymuje się na stadium 4C.

W komórkach hESC *HERV-H* RNA wiąże liczne koaktywatory, jak Crebbp.p/Cbp.p, Med6.p i Med12.p, Pou5f1.p/Oct4.p i Cdk8.p. Ekspresja *HERV-H* jest też konieczna dla pluripotencji.

W komórkach hESC jest obserwowana ekspresja HERV-K. Białko retrowirusa HERV-K – Rec.p wiąże mRNA kodujące ważne receptory, jak *FGFR1*, *FGFR3*,

GDF3, *F2D7* i regulatory epigenetyczne – *Dnmt1*.p, *Chd4*.p, *Lin28A*.p.

Ekspresja MuERV-L retrowirusa obserwowana jest w małej subpopulacji komórek ESC myszy. Te komórki są podobne do komórek 2C embrionu, ale trudno jest wykazać ich totipotencjalność. Brak aktywności kompleksu CAF1, który inkorporuje histony H3 i H4, zwiększa ilość komórek z ekspresją MuERV-L.

We wczesnym embrionie zachodzi dramatyczna demetylacja DNA. Warunkuje to uzyskanie totipotencjalności, ale prowadzi do globalnej derepresji genów i aktywacji elementów ruchomych genomu. W tym też okresie ulegają aktywacji mechanizmy represyjne inne niż metylacja DNA:

- **Trim28.p**/Kap1.p tworzy represję przez przyłączenie licznych metylotransferaz histonów, jak: *Eset*.p/*Setd1*.p, *Suv39H1*.p, *Ehmt2*.p/*G9a*.p, białek CBX/*HP1*, kompleksów: CoREST (*Co repressor for element 1 silencing transcription*), *PRC1*/2, NuRD, acetylaz histonów (*Crebbp*.p), deacetylaz histonów, demetylaz histonów, jak: (*Kdm1A*.p), białek wiążących RNA, jak: *Npm1*.p, *Stauf1*.p, *HnRnpC*.p i *SnRPD1*.p oraz koregulatorów transkrypcji, jak *Tada2A*.p. Białka Trim28.p wiążą białka z palcami cynkowymi rozpoznające sekwencje TE, jak: *Yyl*.p, *Rex1*.p/*Zfp42*.p, *Zfp91*.p i *Zfp235*.p (blokujące ekspresję sekwencji LINE i SINE).
- **Apobec3B.p** – deaminaza cytydyny edytuje RNA i blokuje ekspresję sekwencji LINE.
- **Rybp.p** białko wiążące *Ring1*.p, *Yyl*.p i *Cbx2*.p wiąże też kompleksy *PRC1*/2. Jest represorem transkrypcji zwłaszcza endogennych retrowirusów MuMLV.
- **Histony H3.3** odgrywają rolę w represji IAP.
- **Hells.p** helikaza heterochromatyny konieczna do przeżycia embrionu z demetylowanym DNA.
- **Dicer1.p** dsRNA rybonukleaza i RNA helikaza pełni ważną rolę w dojrzewaniu małych RNA regulujących ekspresję genów. Deficyt *Dicer1*.p we wczesnym embrionie zwiększa ekspresję wirusa MuERV-L [w 2C embrionie i IAP (w 6C embrionie i w blastocystie)]. ESC *Dicer1*^{-/-} wykazują wysoką ekspresję sekwencji LINE1 i IAP.
- **iRNA i piRNA** powodują supresję TE w embrionach (a także w organizmach dorosłych)

LncRNA (długie niekodujące RNA) zawierają wiele sekwencji TE, jak na przykład miRNA, ale pewnych klas TE nigdy nie ma w sekwencjach lncRNA.

Sekwencje kodujące białka w lncRNA są oceniane na 0,3% genomu, sekwencje kodujące antysensowne

RNA na 0,2%, pseudogeny na 0,4%, a mikroRNA na 0,01% genomu.

Pewne lncRNA są ważne dla funkcji ESC:

- *LINC-ROR* odgrywa rolę w reprogramowaniu iPSC i w stabilizacji ESC. Ekspresja jest aktywowana przez *Pou5f1*.p/*Oct4*.p, *Sox2*.p i *Nanog*.p, a sam RNA *LINC-ROR* blokuje miRNA hamujące syntezę tych czynników stanu stem.
- LINC-ROR* blokuje ekspresję p53 w stresie genotoksycznym, co powoduje zahamowanie apoptozy i brak bloku cyklu komórkowego.
- *LINC ES3* jest konieczny do utrzymania stanu pluripotencjalności komórek ESC.
- *lncRNAp21/TRPcor1* myszy hamuje reprogramowanie komórek somatycznych do iPSC.

Pewne lncRNA wiążą modyfikatory chromatyny, głównie metylotransferazy histonów H3K27 i H3K9. Te metylotransferazy są także odpowiedzialne za blokowanie ekspresji elementów ruchomych. Do lncRNA wiążących metylotransferazy należą:

- *lncRNAp.21* wiąże *Setd1*.p (metylotransferazę histonu H3K9) i *Dnmt1*.p (metylotransferazę DNA). *lncRNAp.21* tworzy kompleks z hnRNP-K, który blokuje ekspresję elementów ruchomych w komórkach embrionalnych stem.
- lncRNA *HOTAIR* wiąże represyjny kompleks białek polycomb (*PRC2*). Zawiera on metylotransferazę H3K27me3 (*Ezh2*.p/*Kmt6*.p). Metylacja H3K27me3 blokuje ekspresję licznych genów (jak na przykład genów HOX).

TOTIPOTENCJALNE KOMÓRKI ESC

Komórki ESC w hodowli *in vitro* cechuje zdolność do nieskończonej samoodnowy. Mała frakcja komórek ESC w hodowli (tylko poniżej 0,5%) cechuje się małą ekspresją genów pluripotencjalności, jak: *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG*, ale znaczną ekspresją genów typowych dla komórek 2C totipotencjalnego embrionu (jak ekspresja endogenego wirusa MuERV-L).

Te komórki mają silnie acetylowane histony, zwiększoną metylację H3K4me2, wysoką aktywność chromatyny i brak aktywności kompleksu CAF1. Kompleks ma znaczenie w inkorporacji histonów H3 i H4 do nukleosomów.

W przedimplantacyjnym embrionie komórki ESC wykazujące cechy totipotencjalności są inkorporowane do tkanek embrionalnych i pozaembrionalnych (gdy prawidłowe ESC są inkorporowane tylko do tkanek embrionalnych). Obecność komórek totipotencjalnych ESC jest konieczna do nieskończonej samoodnowy komórek ESC w hodowli *in vitro* i chroni je przed różni-

cowaniem do komórek mezodermy i do prymitywnej ektodermy.

Dla utrzymania stabilności telomerów i dla stabilizacji genomu komórek ESC podobnych do komórek 2C embrionu ma znaczenie ekspresja białka Zscan4.p i ekspresja endogennego wirusa Mu-ERV-L. Ekspresja ta zależy od obniżenia ekspresji białek: Trim28.p/Kap1.p, Kdm1A.p/Lsd1.p, Ehmt1.p/Glp.p i Ehmt2.p/G9a.p, a także białek Rybp.p, Zfp42.p/Rex1.p, demetylaz DNA i białek TET.

2. RÓŻNICOWANIE POZAEMBRIONALNE

Organizm dojrzały w życiu pozaembrionalnym składa się z wielu komórek krańcowo zróżnicowanych, z komórek zróżnicowanych, ale zdolnych jeszcze do pewnej liczby podziałów, z komórek, które do wykonywania swojej funkcji wymagają dalszego różnicowania i z komórek stem organizmu dorosłego – ASC (*adult stem cells*).

a. Komórki ASC

Komórki ASC są wysoce specyficznymi komórkami znajdującymi się w tkankach dojrzałych i w pełni wyspecjalizowanych. Te komórki są zdolne do podziałów i różnicowania na jeden typ komórek krańcowo zróżnicowanych (komórki stem monopotentjalne) lub na wiele typów zróżnicowanych komórek (komórki stem multipotentjalne).

Najlepiej dotychczas poznanymi komórkami multipotentjalnymi są hematopoetyczne komórki stem (Hem-ASC) i one zostaną dla przykładu opisane.

Hem-ASC mają wszystkie cechy komórek typu ASC:

- Mogą różnicować do wszystkich typów komórek systemu hematopoetycznego.
- Mają wysoką zdolność do samoodnowy przez asymetryczne podziały komórkowe.
- Są głównie komórkami spoczynkowymi (70% mysich Hem-ASC znajduje się w fazie G₀, a 30% tych komórek dzieli się co 145-193 dni). Zachowanie równowagi między stanem spoczynkowym a proliferacją jest zasadnicze dla funkcjonowania komórek Hem-ASC.
- Mogą odtwarzać układ hematopoezy po jego zniszczeniu (repopulacja układu). Liczba kolejnych repopulacji jest jednak ograniczona.
- Liczba Hem-ASC w szpiku oceniana jest tylko na 0,005% do 0,05% komórek jądrzastych szpiku.

Liczba uwarunkowanych progenitorów (*committed progenitor cells* – CPP) jest oceniana na 0,1% komórek jądrzastych szpiku.

Komórki Hem-ASC w szpiku znajdują się stale w „niszach” komórek stem. Termin „nisza” został wprowadzony po raz pierwszy przez Raya Schofielda w roku 1978. Opisane są trzy typy nisz komórkowych:

- Nisze osteoblastyczne związane z endosteum, zawierające osteoblasty, osteoklasty, komórki SNO (*spindle shaped, N-cadherin⁺, CD45⁻ osteoblastic cells*), osteomakrofagi (OMAC) i mezenchymalne komórki stem (Mes-ASC).
- Nisze retikularne zawierają liczne komórki siateczkowo-śródbłonkowe – CAR – (*CXCL12 abundant reticular cells*), limfocyty B i NK, plazmocyty i plazmocytoidalne komórki dendrytyczne).
- Nisze naczyniowe (normooksygeniczne), które zawierają między innymi komórki śródbłonka zatok żylnych.

Komórki Hem-ASC nie stanowią jednolitej populacji. Najogólniej dzielone są na subpopulacje krótko żyjących (ST Hem-ASC) i długo żyjących komórek (LT Hem-ASC).

Komórki ST Hem-ASC (lub MPP – multipotentjalne progenitory) mają skróconą zdolność repopulacji, ich markerem jest CD34⁺.

Komórki LT Hem-ASC mają wielką zdolność do długoczasowej repopulacji. Są komórkami typu SP (*side population* – zawierają aktywne faktory odporności wielolekowej: AbcG2.p lub Mdr1.p).

Markerami komórek LT-Hem-ASC są Kit.p⁺ i Scal⁺ (mysz), CD150⁺, CD48⁻, FLK⁻, CD34⁻, Lin⁻ (markery różnicowania).

Jedną z najbardziej charakterystycznych własności komórek LT Hem-ASC jest stałe utrzymywanie stanu spoczynkowego. To w tej subpopulacji 70% komórek jest w fazie G₀ cyklu, a 30% dzieli się co 145 do 195 dni. Czynnikiem odpowiedzialnym za utrzymanie stanu spoczynkowego jest prawdopodobnie oddziaływanie komórek niszy, ale komórki stem znajdujące się we krwi obwodowej zachowują także przez długi czas cechy LT Hem-ASC.

Mobilizacja komórek LT Hem-ASC do wyjścia z niszy zależy od obecności faktora Csf3.p/G-Csf.p i od stresu komórkowego na przykład w chemioterapii (ale stres komórkowy zwiększa poziom Csf3.p/G-Csf.p).

Csf3.p działa przez aktywację makrofagów i osteomakrofagów (OMAC), przez hamowanie komórek SNO, CAR i Mes-ASC. Csf3.p może aktywować proteazy, które degradują receptory SDF1 i VCAM-1 (CXCR4 i VLA4), a także fibronektynę.