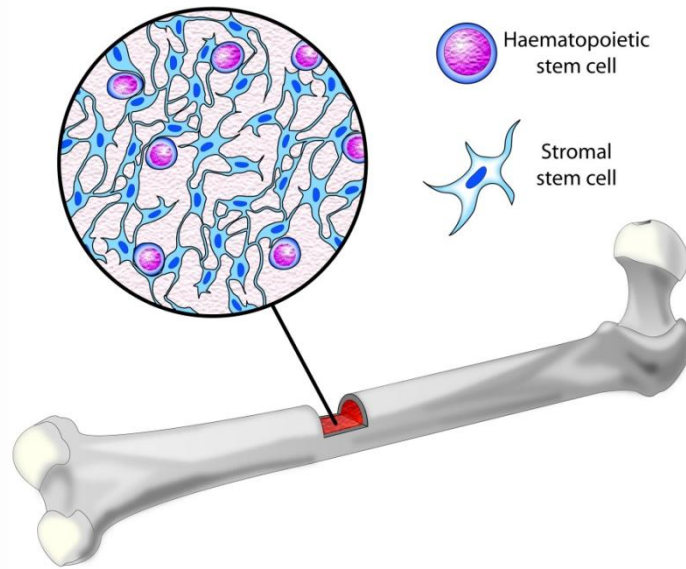
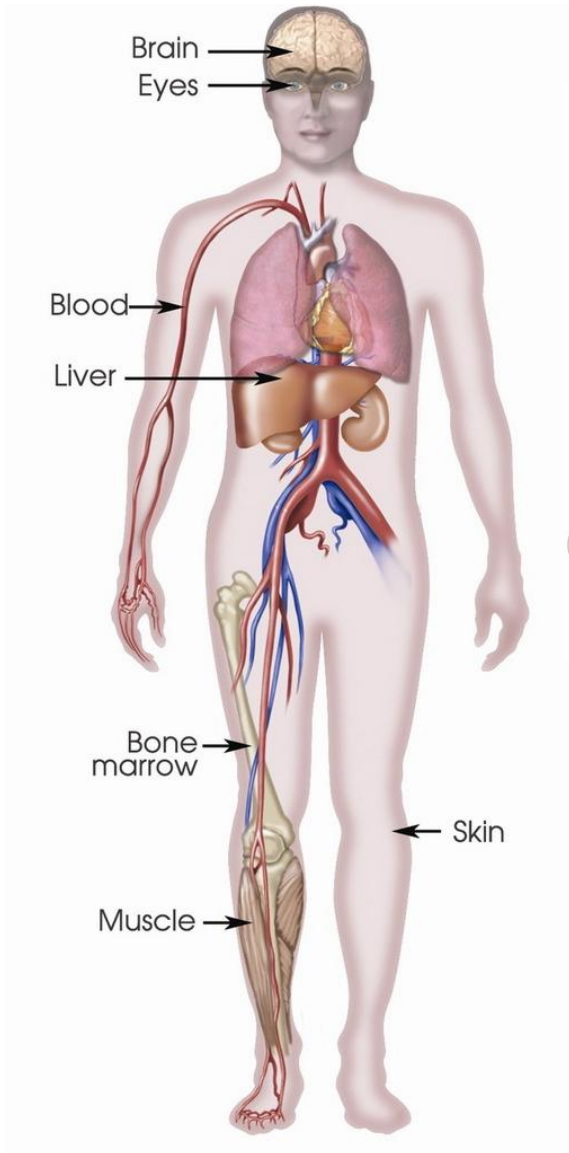


Κυτταροκαλλιέργειες βλαστικών  
κυττάρων από ενήλικους ιστούς  
(Adult Stem Cells, ASC)

# Ενήλικα (σωματικά) βλαστικά κύτταρα ή αρχέγονα/στελεχιαία κύτταρα ενηλίκων ιστών



απομονώνονται από συγκεκριμένους ιστούς πολυδύναμα (περιορισμένοι κυτταρικοί τύποι) δυνατότητα πλαστικότητας σε μικρό βαθμό δύσκολη καλλιέργεια (απομόνωση μικρών αριθμών και περιορισμένος χρόνος ζωής σε καλλιέργεια)

# Adult Stem Cells

## Bone Marrow



Marrow  
Bone  
Cartilage  
Tendon  
Muscle  
Fat  
Liver  
Brain/Nerve  
Blood cells  
Heart

## Brain



Brain  
Nerves  
Blood cells  
Muscle

## Pancreas

## Liver

## Heart

## Lung

## Cornea

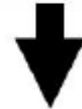
## Retina

## Skeletal Muscle



Skeletal muscle  
Smooth muscle  
Bone  
Cartilage  
Fat  
Heart

## Stem Cells from Fat



Bone  
Cartilage  
Muscle

## Hair Follicle



Skin Brain  
Smooth Muscle Fat

## Peripheral Blood



Bone Marrow  
Blood cells  
Nerves

## CORD BLOOD

## Placenta

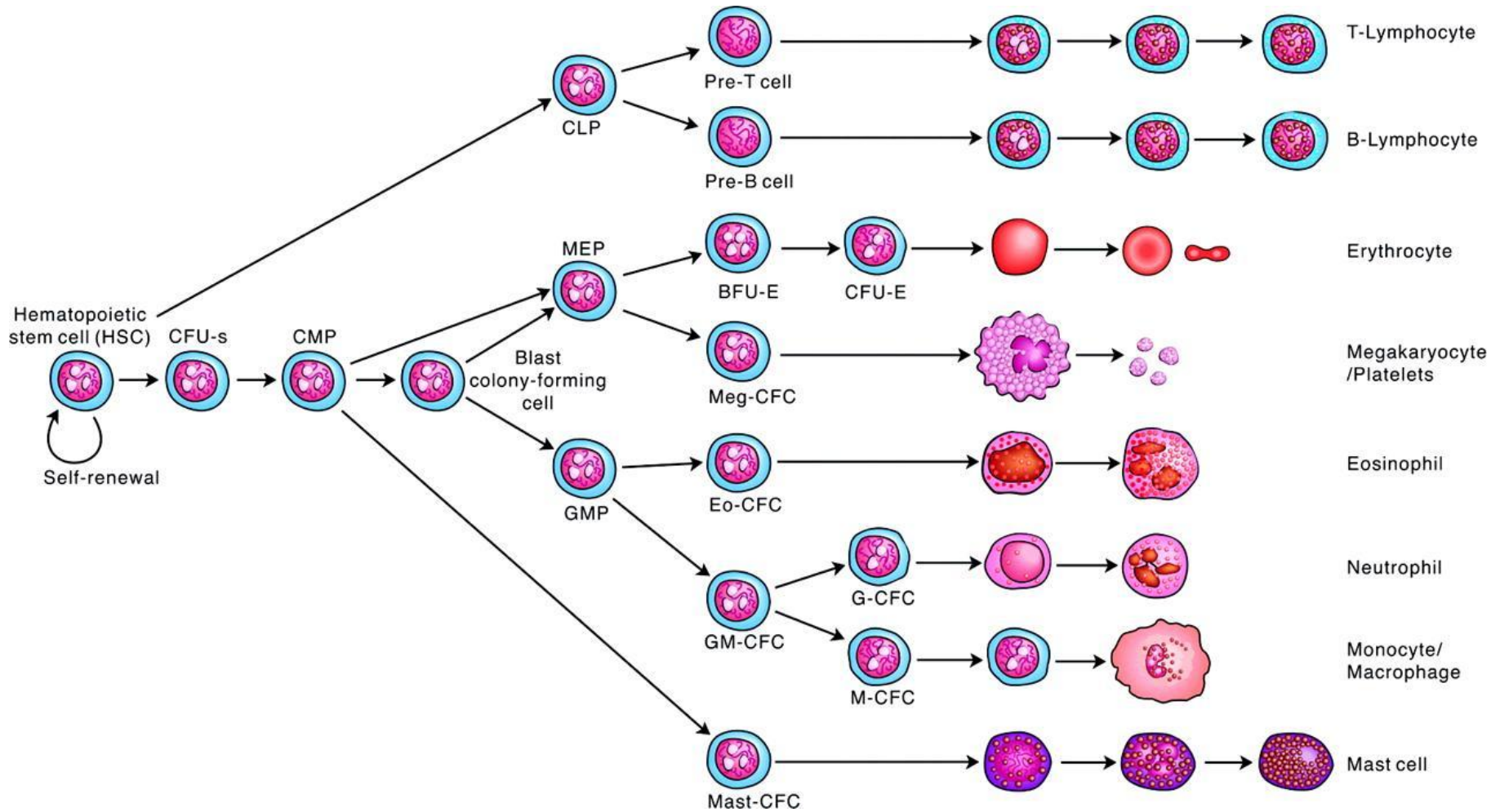


Bone Nerve  
Cartilage Muscle Tendon  
Bone Marrow Blood vessel

# Κυτταροκαλλιέργειες ενηλίκων βλαστικών κυττάρων

- Αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (Hematopoietic Stem Cell, HSC)
- Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Mesenchymal Stem Cell, MSC)
- Νευρικά βλαστικά κύτταρα (Neural Stem Cell, NSC)
- Μυϊκά βλαστικά κύτταρα (Muscle-Derived Stem Cell, MDSC)

# Hematopoietic stem cell (HSC)

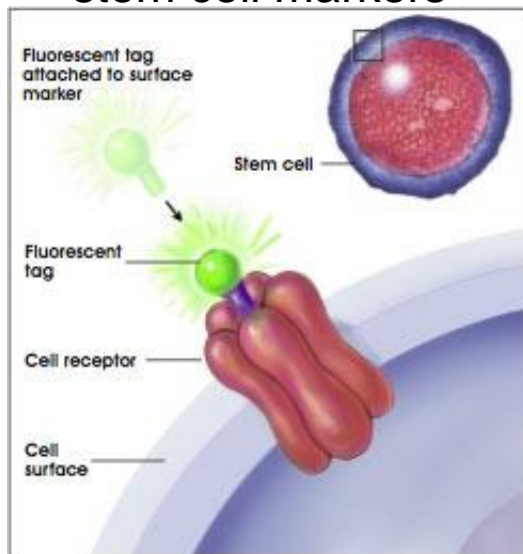


# Πηγές αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (HSC)

- Ηπαρ εμβρύων
- Σπλήνας εμβρύων
- Ομφαλοπλακουντιακό αίμα (Umbilical Cord blood)
- Μυελός οστών
- Περιφερικό αίμα  
μετά από επίδραση G-CSF/GM-CSF

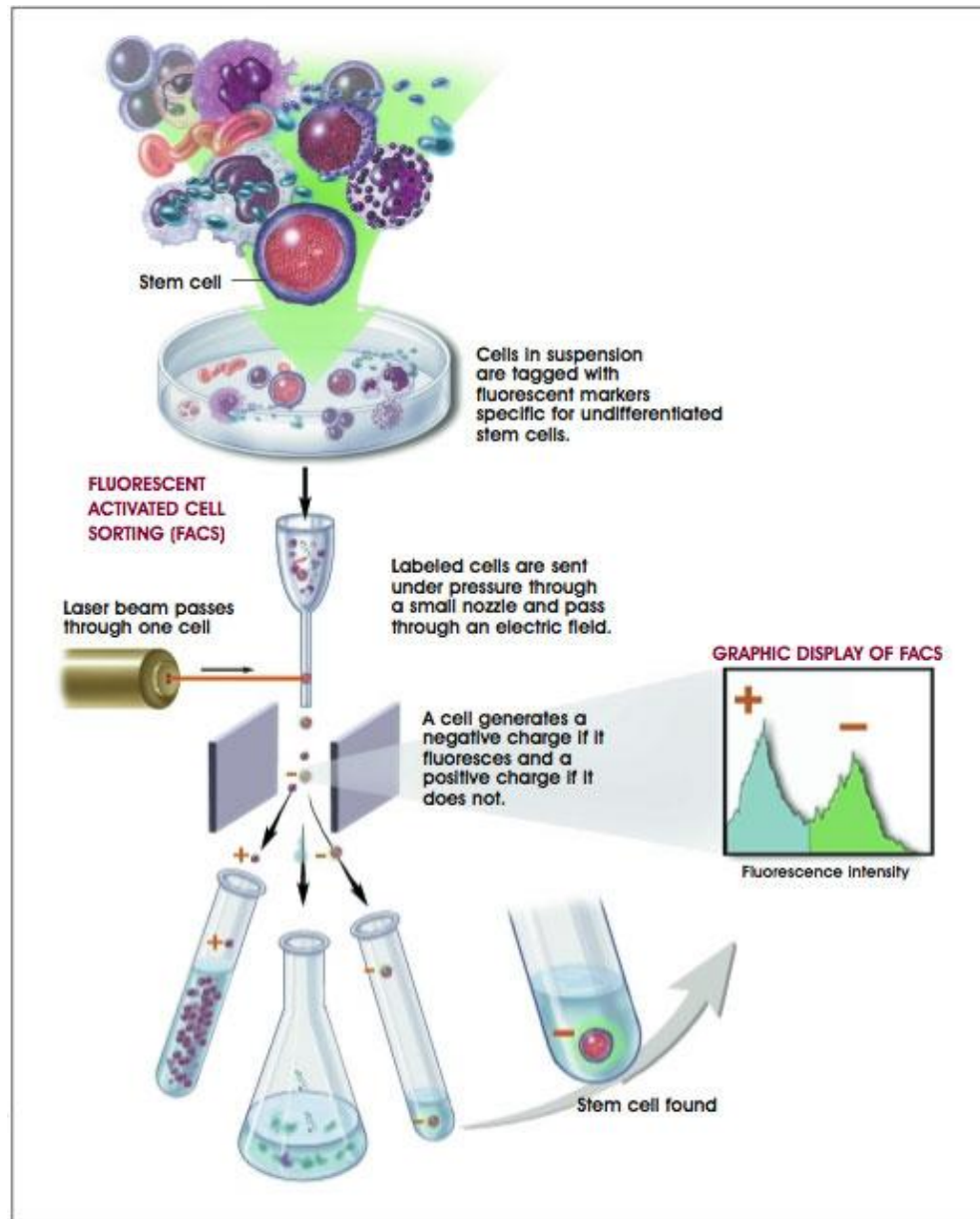
# Ταυτοποίηση και απομόνωση βλαστικών κυττάρων που βασίζεται στην έκφραση πρωτεϊνών-μαρτύρων

## stem cell markers



Π.χ. Stem cell antigen-1 (Sca-1)

συνήθως συνδυασμός πρωτεϊνών  
{ Thy1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, lin<sup>-</sup> }



# Μέθοδοι επιλογής HSC

## mHSC (murine HSC)

Spangrude et al, 1988	c-kit+/ Thy1.1+/ lin-/ Sca1+
Wolf et al, 1993	Rho low, Hoechst low
Jones et al, 1996	ALDH bright
Osawa et al, 1996	Single CD34-
Goodell et al, 1996	SP (Side Population)
Lanzkron et al, 1998	PKH+

## hHSC (human HSC)

Baum et al, 1992	lin-/ Thy1.1+/ CD34+/ CD133+/c-kit+ CD38-/ CD33-/ HLA-Dr low
------------------	--



# Ιεραρχία κυττάρων αίματος

CD34 ?  
critical HSC  
marker

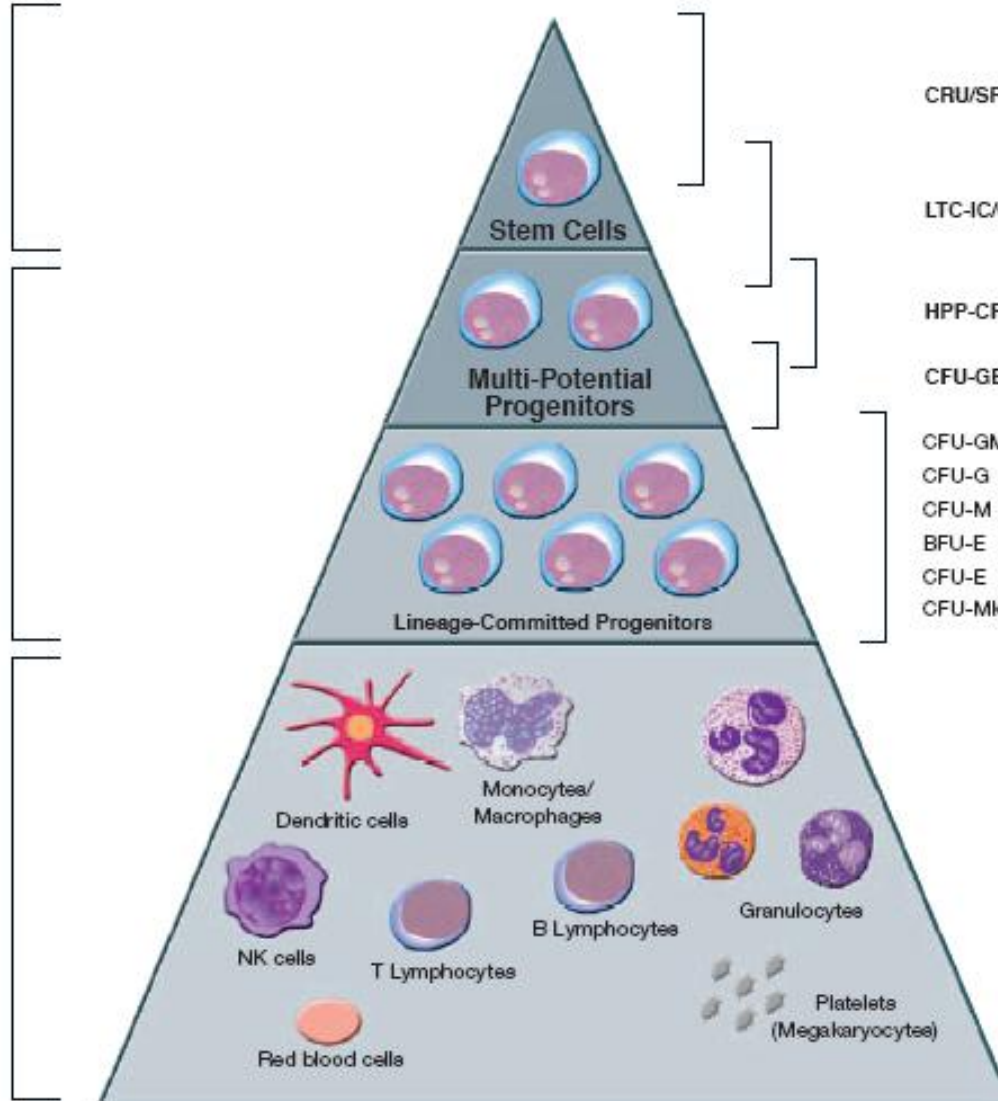
## PHENOTYPE

Lin<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup>  
CD38<sup>-</sup> CD33<sup>-</sup>  
HLA-DR<sup>low</sup>  
Thy1<sup>+</sup> c-Kit<sup>+</sup>  
CD133<sup>+</sup>

Lin<sup>+/-</sup> CD34<sup>+</sup>  
CD38<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup>  
HLA-DR<sup>high</sup>  
Thy1<sup>low</sup>

Lin<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>

lin (lineage markers)  
B220 (B-cells)  
CD4, CD8 (T-cells)  
Gr-1 (granulocytes)  
Mac-1 (myelomonocytic cells)



## ASSAYS

CRU/SRC Competitive Repopulating Unit  
SCID mouse Repopulating Cell

LTC-IC/CAFC Long Term Culture Initiating Cells

HPP-CFC High Proliferative Potential  
Colony-Forming Cells

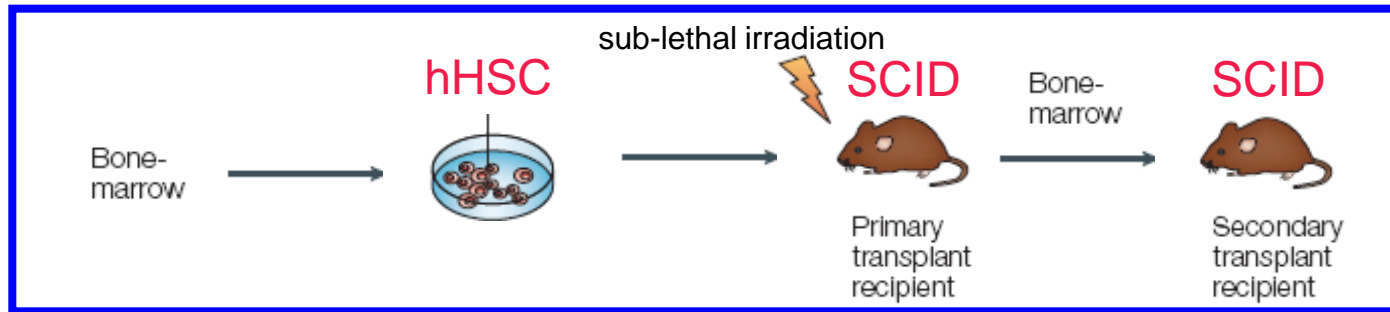
CFU-GEMM

CFU-GM  
CFU-G  
CFU-M  
BFU-E  
CFU-E  
CFU-Mk

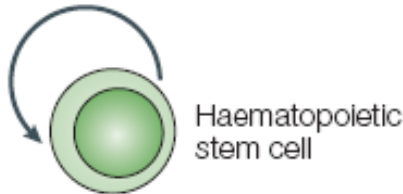
Morphological Stains  
Immunophenotyping  
Functional tests  
of mature cells

# Λειτουργικός χαρακτηρισμός HSC *in vivo*

- ❖ human HSC: ένεση σε ποντίκια NOD/SCID μετά από μερική ή καθόλου ακτινοβολία → μελέτη της μακροχρόνιας ικανότητας των hHSC για διαφοροποίηση σε όλα τα κύτταρα του αίματος και αυτοανανέωση με δεύτερη μεταμόσχευση (secondary transplant)



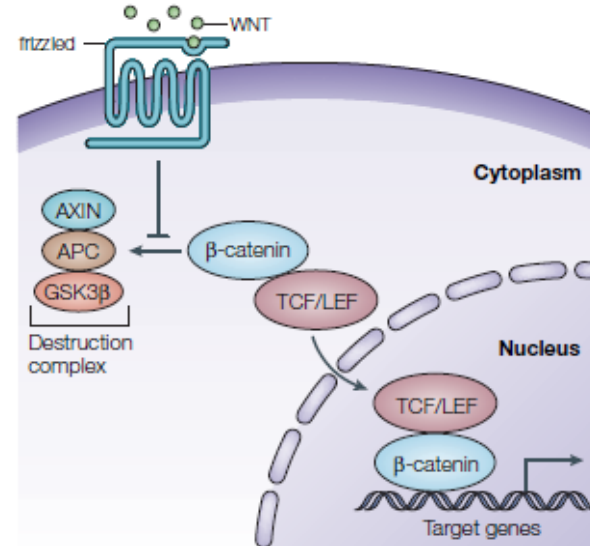
# Καλλιέργεια HSC



Haematopoietic stem cell

## Self-renewal

- HOXB4
- Notch-1
- GATA2
- MPL
- WNT proteins
- Sonic hedgehog
- AML1
- STAT5
- p18
- p21



Χρήση αιμοποιητικών κυτοκινών με σκοπό τη διέγερση της αυτοανανέωσης

Η μακροχρόνια καλλιέργεια των HSC απαιτεί την παρουσία κυττάρων feeder

**Παρουσία ορού:** Iscove modified Dulbecco's medium (IMDM), 12.5% FCS, 12.5% HS, L-glutamine, folic acid, myoinositol, heparin, 2-mercaptoethanol, penicillin/streptomycin

**Απουσία ορού:** IMDM, L-glutamine, folic acid, inositol, heparin, 2-mercaptoethanol, bovine insulin, lecithin, cholesterol, human transferrin, BSA, hydrocortisone, penicillin/streptomycin

# *In vitro* δοκιμές για την ταυτοποίηση HSC και πρόγονων διαφοροποιημένων κυττάρων

## **Long term culture (LTC) assays**

Μακροχρόνια δοκιμή → κύτταρα HSC (LTC-IC)

Τα κύτταρα μεγαλώνουν πάνω σε στρώμα κυττάρων feeder (κύτταρα που μοιάζουν με το περιβάλλον στρώμα του μυελού των οστών) και τους παρέχουν τα βασικά διεγερτικά και ανασταλτικά σήματα για την ρύθμιση της ανάπτυξης τους

Θρεπτικό μέσο: IMDM με ορό χωρίς επιπλέον κυτοκίνες

## **Colony-forming cell/unit assays**

Σύντομος χρόνος δοκιμής → πρόδρομοι διαφοροποιημένων κυττάρων

Τα κύτταρα μεγαλώνουν απουσία κυττάρων feeder πάνω σε ημι-στερεό υλικό (methylcellulose, κολλαγόνο, άγαρ) με θρεπτικό μέσο ενισχυμένο με κυτοκίνες, που είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των πρόγονων κυττάρων (πχ. SCF, IL-3, GM-CSF, G-CSF, EPO)

# Colony-forming cell/unit assays (CFC, CFU)

## STEP 1 Prepare Cells

Process human cells by:

- ammonium chloride lysis
- density gradient separation
- CD34<sup>+</sup> cell enrichment with StemSep™, RosetteSep™ or FACSoring

Wash cells (e.g. in Iscove's MDM + 2% FBS), then count and adjust cell concentration.



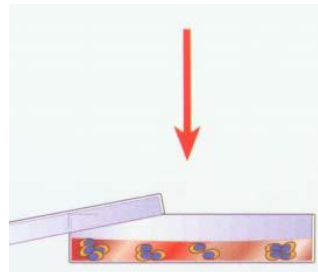
## STEP 2 Add Cells to MethoCult™

Add cells to MethoCult™ and vortex.



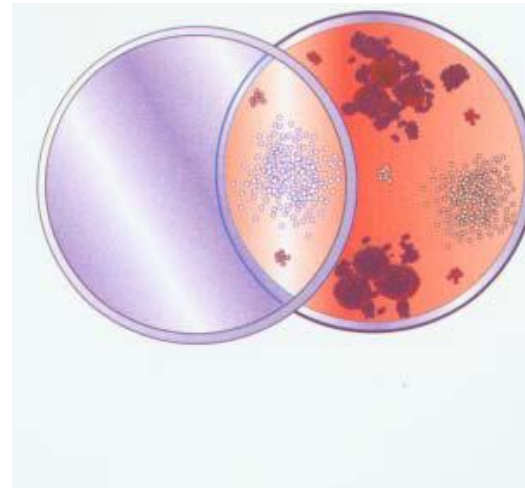
## STEP 3 Plate & Incubate

Incubate human cells for 14-16 days, murine cells for 7-14 days, in humidified incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.



## STEP 4 Count Colonies

Count and evaluate colony types using inverted microscope and gridded scoring dishes. Alternatively, individual colonies may be plucked for routine staining, PCR, or cytogenetic analysis.



## Methocult

Methylcellulose με κυτοκίνες

Stem cell factor (100 ng/ml)

IL-3 (10 ng/ml)

GM-CSF (10 ng/ml)

G-CSF (10 ng/ml)

erythropoietin (3U/ml)

# Σχηματισμός αποικιών από ανθρώπινα αιμοποιητικά κύτταρα (CFU)

## CFU-E (Colony forming unit-erythroid)

αποικία που περιέχει 8-200 ερυθροβλάστες

## BFU-E (Burst forming unit-erythroid)

συμπλέγματα αποικιών με > 200 ερυθροβλάστες

## CFU-GM (Colony forming unit-granulocyte, macrophage)

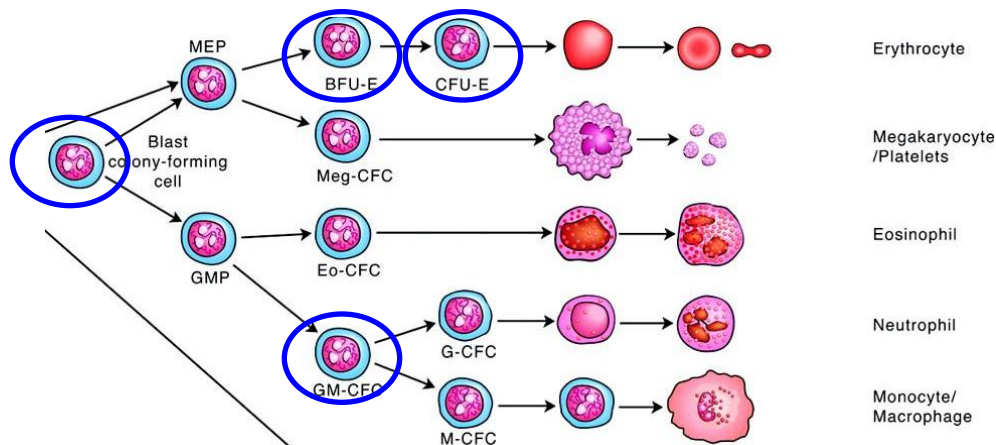
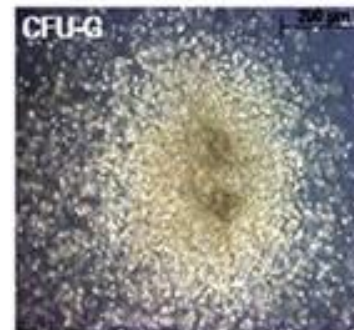
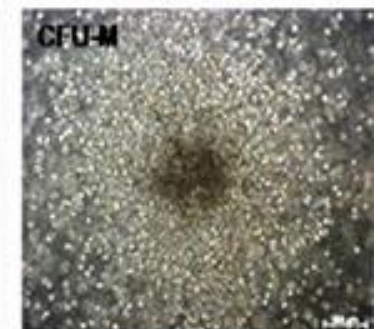
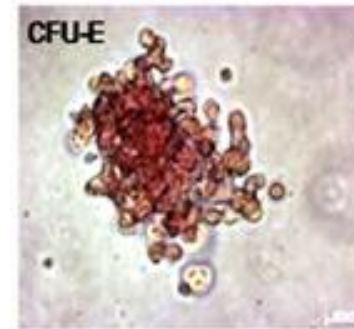
αποικία με >40 κοκκιοκύτταρα και μακροφάγα

CFU-G περιέχει 40 ή περισσότερα κοκκιοκύτταρα,

CFU-M περιέχει 40 ή περισσότερα μακροφάγα

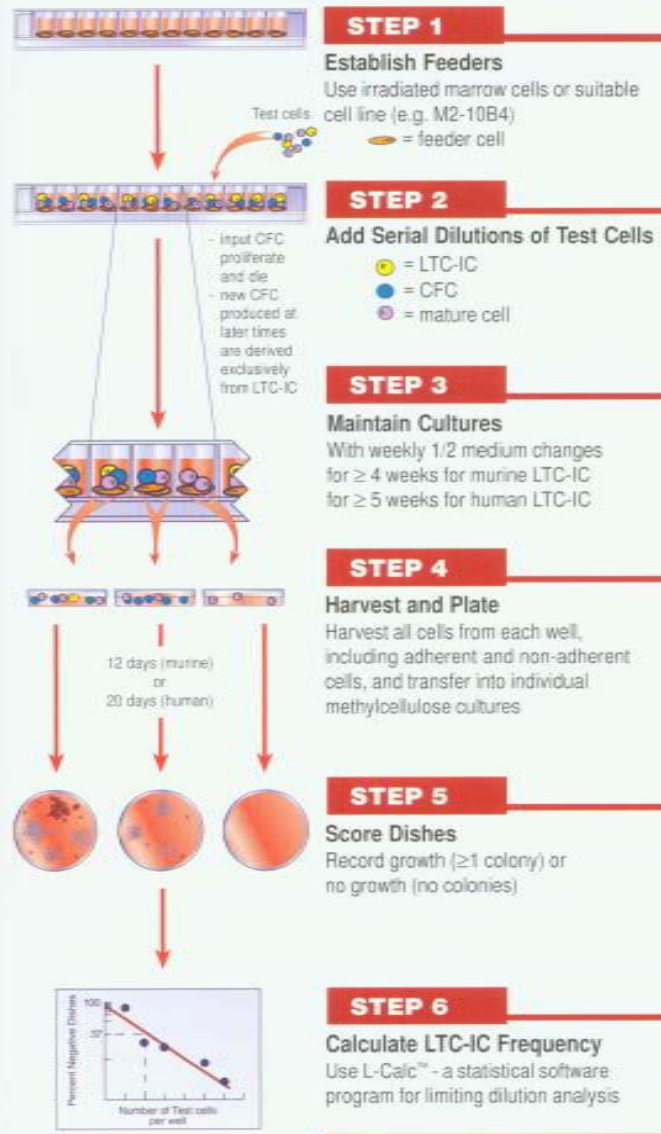
## CFU-GEMM (Colony forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte)

περιέχει ερυθροβλάστες και 20 ή περισσότερα κοκκιοκύτταρα, μακροφάγα και μεγακαρυοκύτταρα



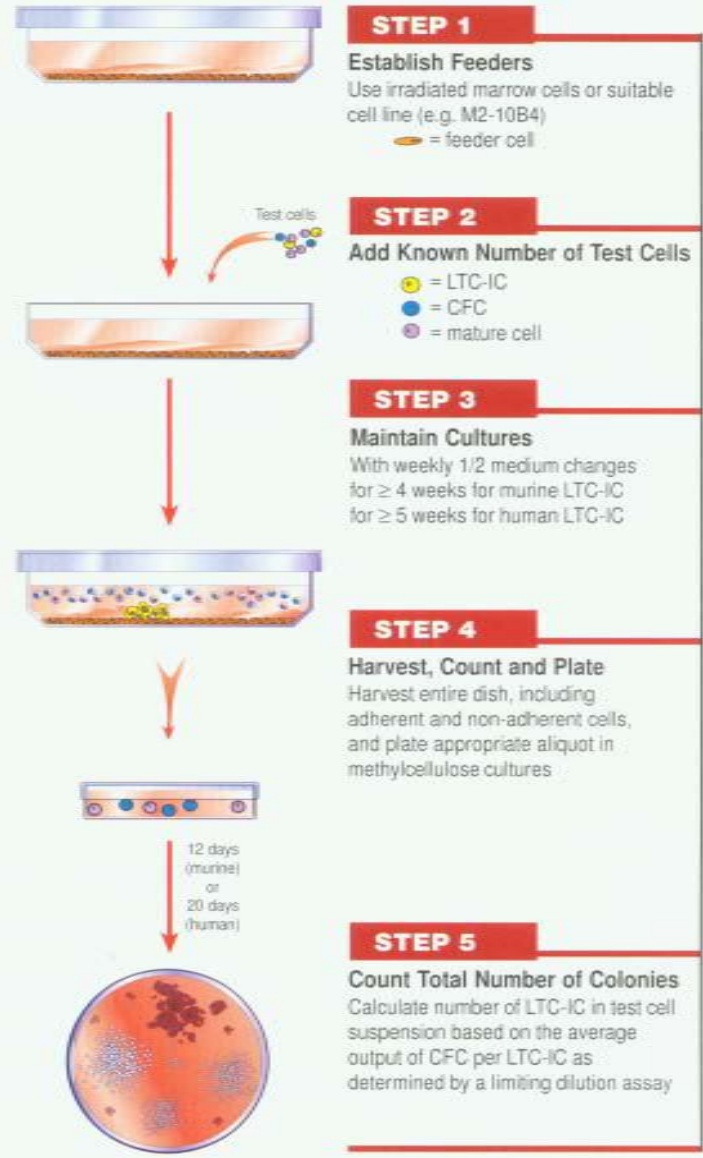
# Δοκιμή LTC για την ταυτοποίηση long-term culture-initiating cells (LTC-IC)

Figure 1: Limiting Dilution LTC-IC Assay



IMDM με ορό,  
χωρίς κυτοκίνες

Figure 2: Bulk Culture LTC-IC Assay

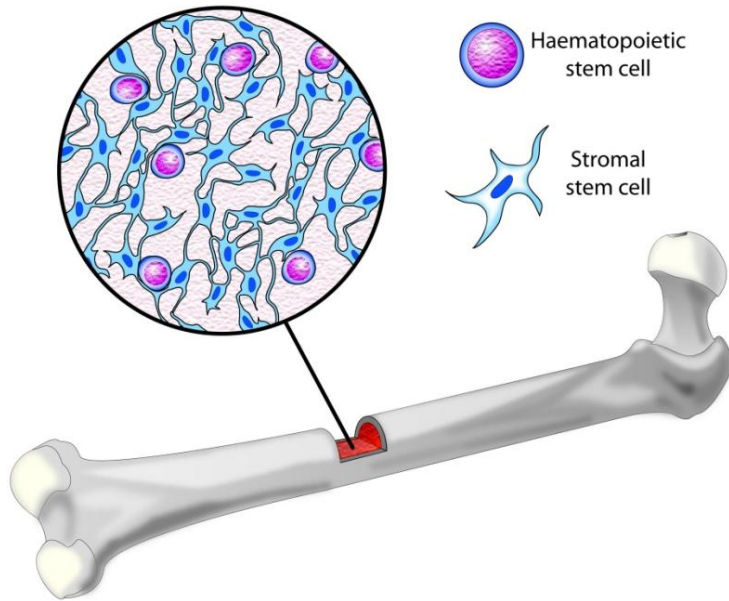


# Εφαρμογές της καλλιέργειας HSC

- ❖ Ταυτοποίηση παραγόντων που ρυθμίζουν (διεγερτικά ή ανασταλτικά) την αιμοποίηση
- ❖ Μελέτες διαφορών μεταξύ κανονικών και καρκινικών κυττάρων (σύγκριση καλλιέργειας LTC από ασθενείς με CML με υγιή άτομα)
- ❖ Μελέτες επίδρασης νέων φαρμάκων
- ❖ Εκτίμηση του δυναμικού πολλαπλασιασμού δειγμάτων από μυελό οστών και περιφερικό αίμα που θα χρησιμοποιηθούν για **μεταμόσχευση**
- ❖ Εκτίμηση του δυναμικού πολλαπλασιασμού δειγμάτων μετά από *ex vivo* χειρισμούς, όπως κρυοσυντήρηση, πριν από **μεταμόσχευση**
- ❖ Γονιδιακή θεραπεία (διευκόλυνση της μεταφοράς λειτουργικών γονιδίων μέσω ιών σε κύτταρα και επέκταση των επιμολυσμένων κυττάρων)



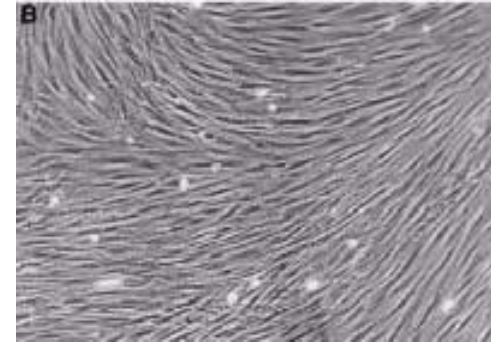
# Mesenchymal Stem Cell (MSC)



Μη αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα  
μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα  
*multipotent marrow stromal cells*



καλλιέργεια BM - 7 ημέρες



καλλιέργεια BM - 21 ημέρες

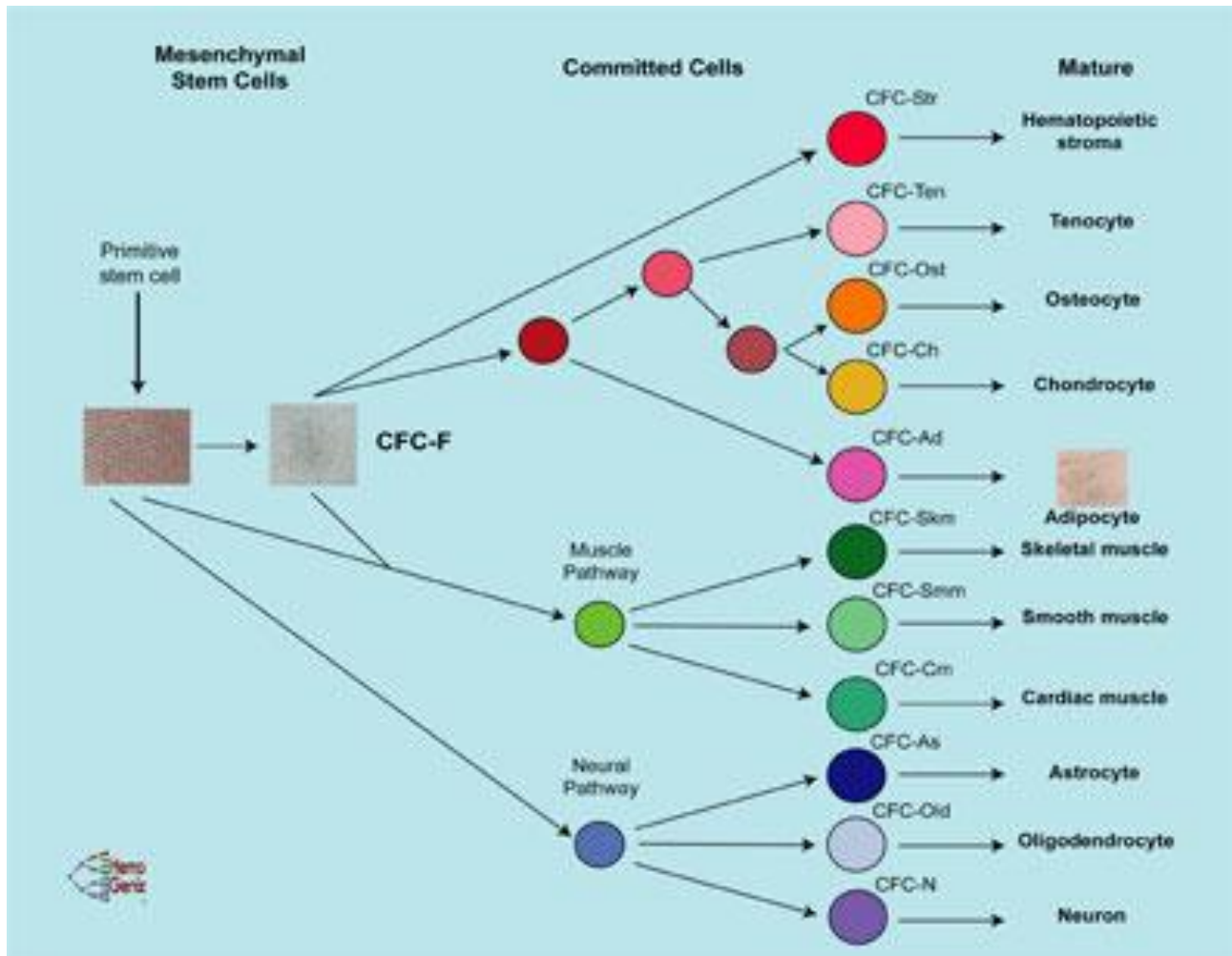
Τα MSC είναι ένας ετερογενής πληθυσμός κυττάρων που προσκολλώνται σε πλαστικό πιάτο καλλιέργειας και μοιάζουν πολύ με ινοβλάστες

## Λειτουργία MSC

*in vivo*: υποστήριξη της ανάπτυξης των HSC

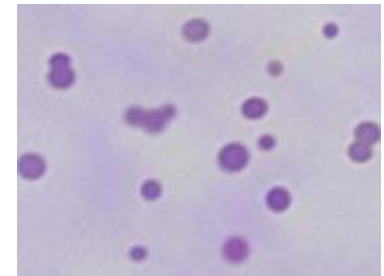
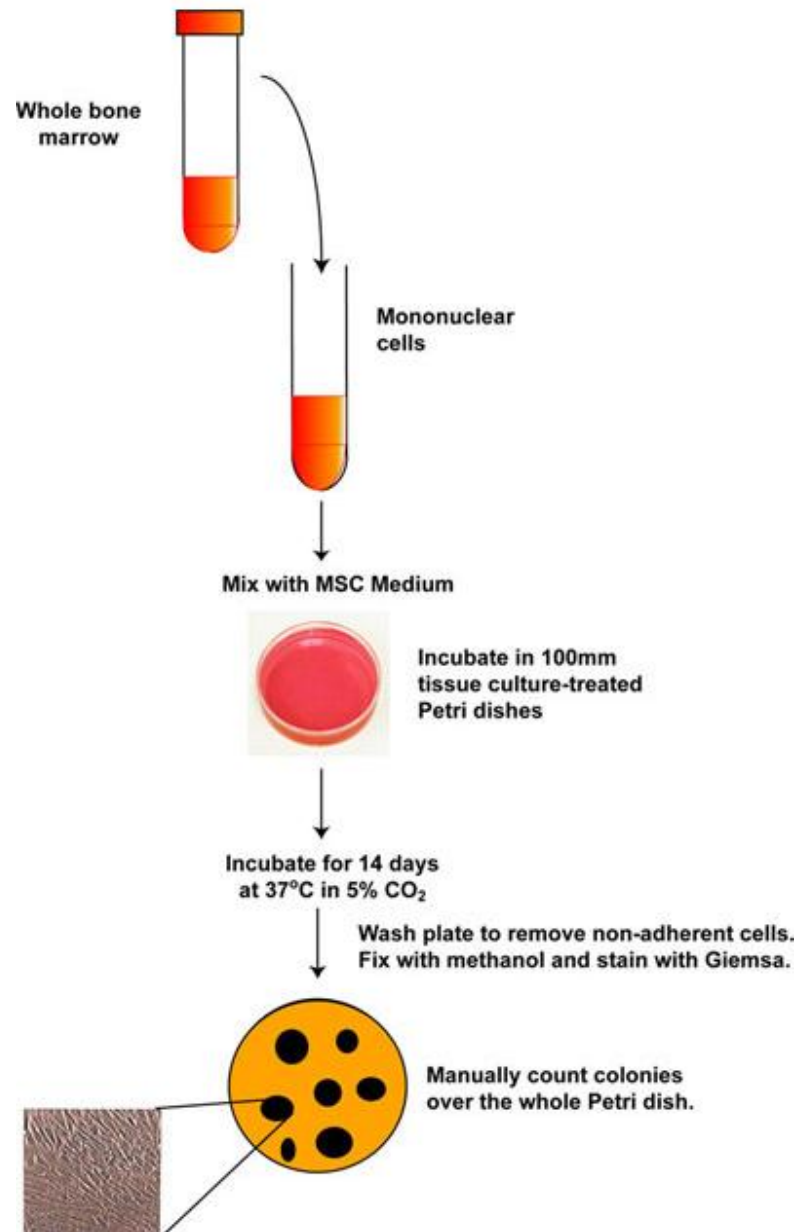
*in vitro*: χρήση ως κύτταρα feeder για την ανάπτυξη των HSC (π.χ. δοκιμή LTC)

# Mesenchymal Stem Cell



συχνότητα human MSC: 1/100.000 κύτταρα μυελού οστών

# Δοκιμή CFU-F για τον *in vitro* χαρακτηρισμό των MSC



Απομόνωση MSC αρχικά από μυελό οστών και μετέπειτα από ποικιλία ιστών, όπως αίμα ομφάλιου λώρου, περιφερικό αίμα, λιπώδη ιστό, πνεύμονες, σκελετικούς μύες

Υπάρχει ποικιλομορφία σχετικά με τον φαινότυπο των MSC (διάφοροι ιστοί προέλευσης, διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας, π.χ. διαφορές σε θρεπτικά υλικά καλλιέργειας, διαφορές σε πυκνότητα κυττάρων και τις συνθήκες οξυγόνου)

Mesenchymal Stem Cells (Pittenger)

Mesodermal Progenitor Cells (MPC) (Verfaillie)

Marrow Isolated Adult Multilineage Inducible (D'Ippolito)

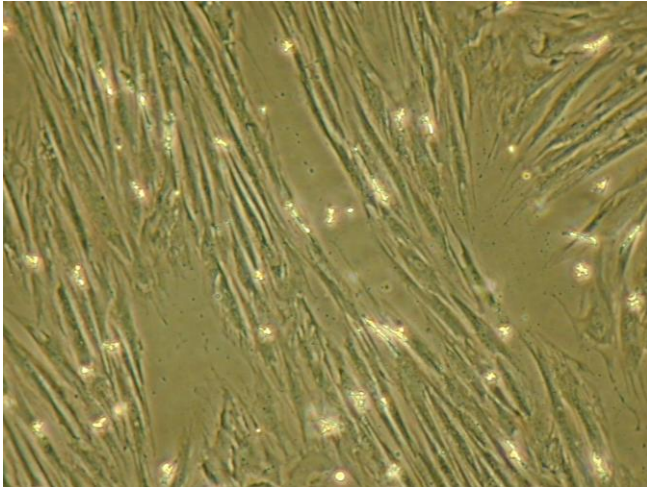
❖ Τα MSC δεν εκφράζουν αιμοποιητικούς μάρτυρες (CD45, CD34, CD11b, CD14)

❖ Τα MSC συνήθως εκφράζουν CD105, CD73, CD29, CD44, CD90, CD71, CD106, CD166, STRO-1, GD2, CD146

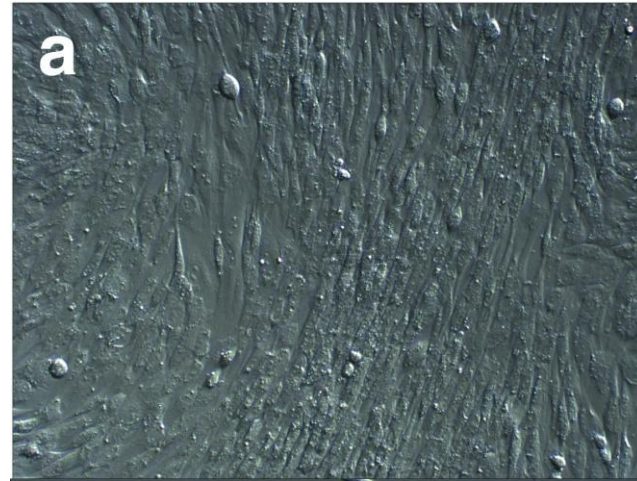
MARKER	MESENCHYMAL STEM CELLS	MPC	MIAMI CELLS
CD4	-ve	nd	nd
CD9	+ve	nd	nd
CD10	+ve	-ve	+ve
CD11a	-ve	nd	nd
CD13	+ve	+ve	nd
CD14	-ve	nd	nd
CD15	-ve	nd	nd
CD18	-ve	nd	nd
CD25	-ve	nd	nd
CD29	+ve	nd	+ve
CD31	-ve	-ve	nd
CD34	-ve	-ve	-ve
CD36	nd	-ve	-ve
CD38	nd	-ve	nd
CD44	+ve	+ve (low)	+ve
CD45	-ve	-ve	-ve
CD49a	+ve	nd	nd
CD49b	+ve	+ve	nd
CD49c	+ve	nd	nd
CD49d	-ve	nd	nd
CD49e	+ve	nd	+ve
CD50	-ve	-ve	nd
CD51	+ve	nd	nd
CD54	+ve	nd	-ve
CD56	nd	nd	-ve
CD58	+ve	nd	nd
CD61	+ve	nd	nd
CD62e	-ve	-ve	nd
CD62L	+ve	nd	nd
CD62p	-ve	nd	nd
CD63	nd	nd	+ve
CD71	+ve	nd	nd
CD73 (SH3 and SH4)	+ve	nd	nd
CD81	nd	nd	+ve
CD90	+ve	+ve (low)	+ve
CD102	+ve	nd	nd
CD103	nd	nd	+ve
CD104	+ve	nd	nd
CD105 (SH2)	+ve	nd	nd
CD106	+ve	-ve	nd
CD109	nd	nd	-ve
CD113	nd	nd	nd
CD117	-ve	-ve	-ve
CD119	+ve	nd	nd
CD120a	+ve	nd	nd
CD120b	+ve	nd	nd
CD121	+ve	nd	nd
CD122	nd	nd	+ve
CD123	+ve	nd	nd
CD124	+ve	nd	nd
CD126	+ve	nd	nd
CD127	+ve	nd	nd
CD140a	+ve	nd	nd
CD164	nd	nd	+ve
CD166	+ve	nd	nd
HLA class I	+ve	-ve	-ve
HLA-DR	-ve	-ve	-ve
LINGFR	+ve	nd	nd
H1PT2	nd	-ve	nd
Beta 2 microglobulin	nd	+ve (low)	nd
KDR	nd	+ve (low)	+ve (low)
Flt1	nd	+ve (low)	+ve (low)
Fibroblast surface antigen	nd	-ve	nd

nd = not described; +ve = positive; -ve = negative

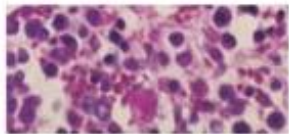
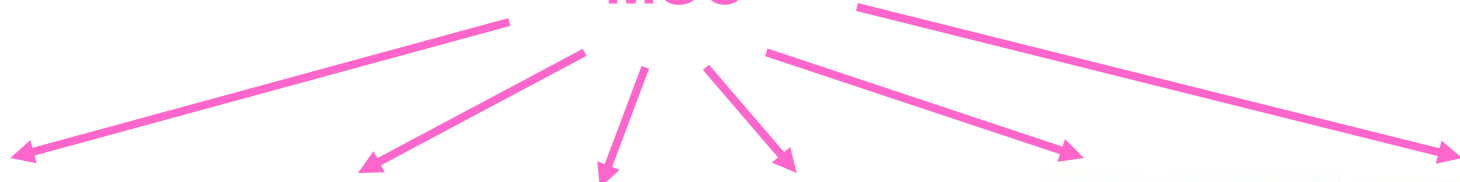
hMSC από μυελό οστών



hMSC από ομφαλοπλακουντιακό αίμα



MSC



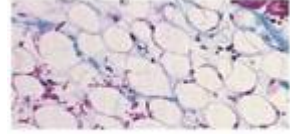
Marrow stroma



Muscle



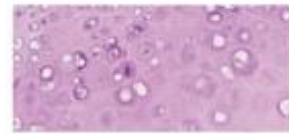
Bone



Adipose



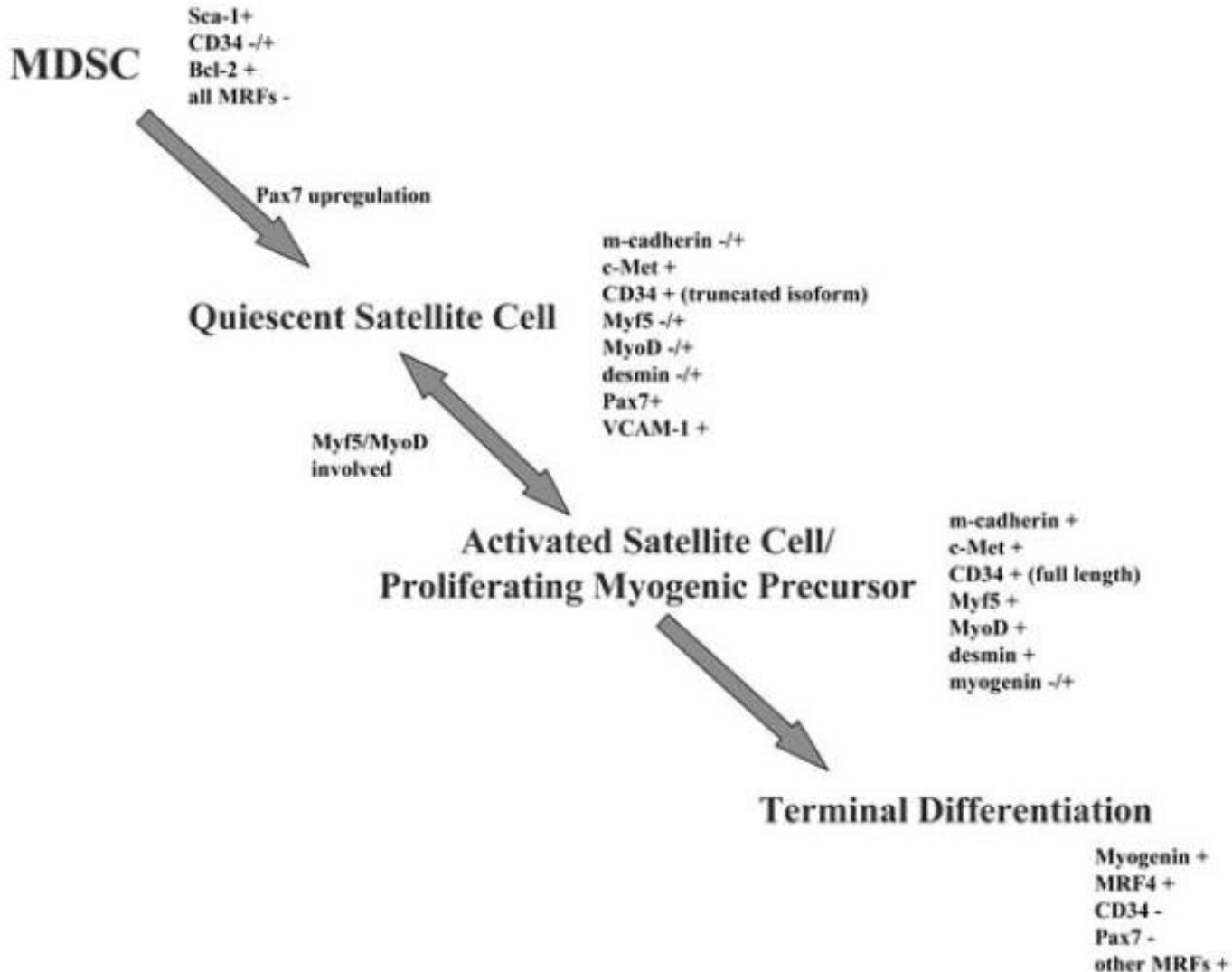
Tendon



Cartilage

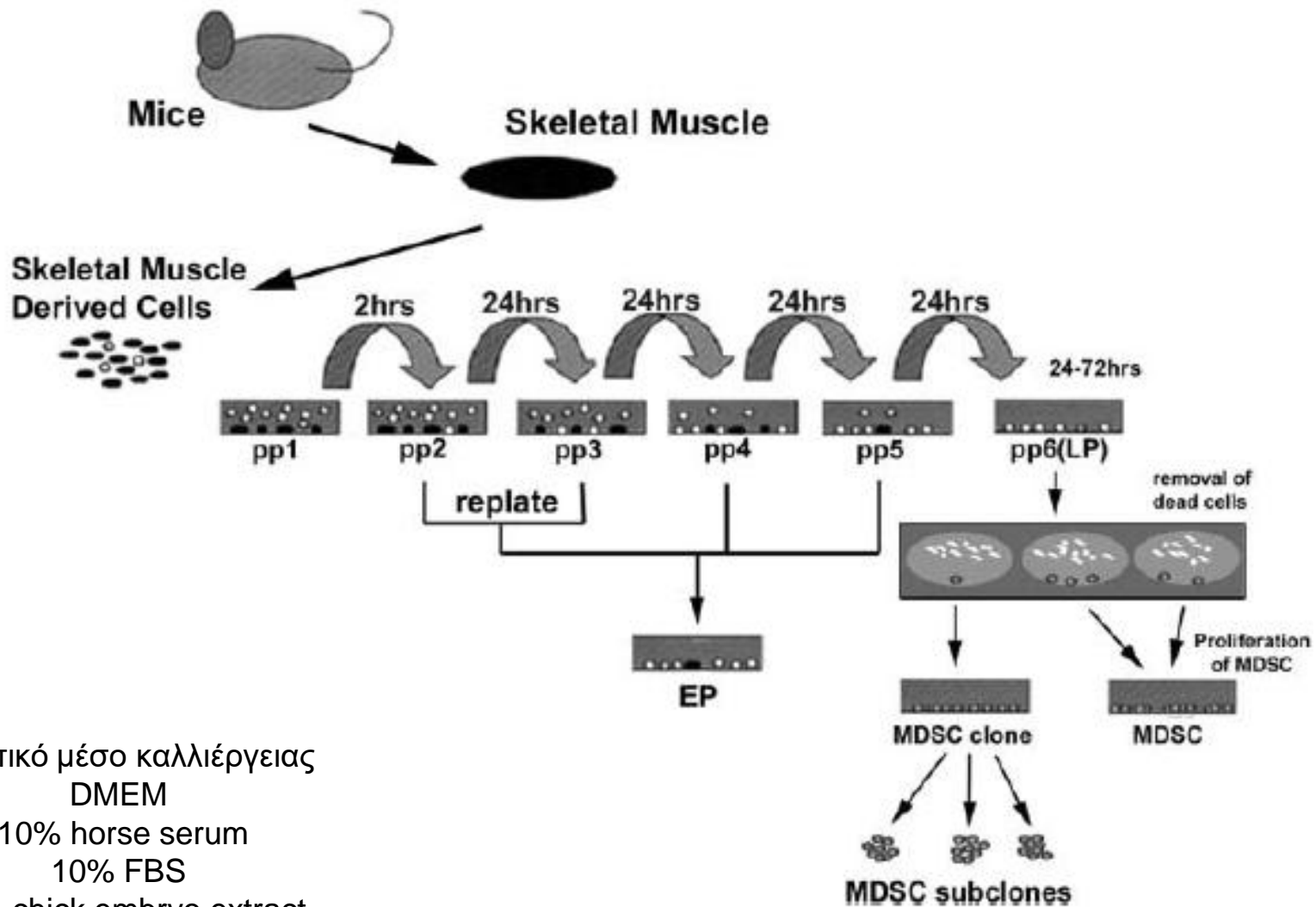
# Ιεραρχία κυττάρων σκελετικού μυός

Muscle-Derived  
Stem Cells



MRFs: Myogenic Regulatory Factors

# Απομόνωση Muscle-Derived Stem Cells (MDSC) με την τεχνική του preplating



θρεπτικό μέσο καλλιέργειας  
DMEM  
10% horse serum  
10% FBS  
0.5% chick embryo extract  
αντιβιοτικά

# Χαρακτηρισμός κυττάρων που απομονώνονται με την τεχνική του preplating

Table 1. The phenotypes of EP, LP, and long-time proliferating cells (MDSC) investigated by immunocytochemistry, flow cytometry, and RT-PCR

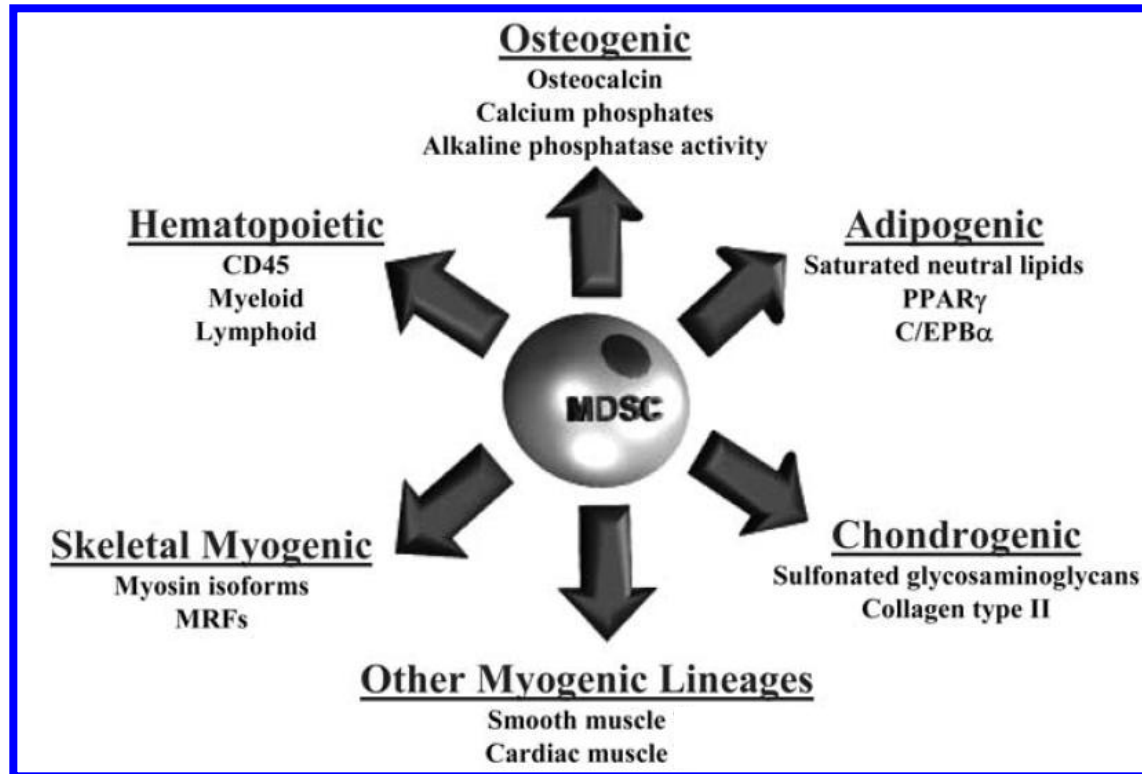
Markers	EPq		EPa		LP		MDSC	
	Imm	Imm	Flow	RT	Imm	Imm	Flow	RT
CD34	-	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+
Sca-1	-	+/-	+/-	ND	+/-	+	+/-	ND
c-Kit	ND	ND	-	ND	-	-	-	ND
CD45	ND	ND	-	ND	ND	ND	-	ND
Desmin	+	+	ND	ND	+/-	-/+	ND	ND
Bc12	-	-	ND	+	ND	+	ND	+
MNF	ND	+	ND	+	ND	+	ND	+
MyoD	-/+	-/+	ND	+	+/-	ND	ND	+
Myogenin	+/-	+/-	ND	+	+/-	ND	ND	ND
m-cadherin	+/-	+	ND	ND	-/+	-	ND	ND

EP and LP cells were dissociated from the hindlimb muscle of normal newborn mice and separated by their adhesion characteristics (see Materials and methods for details). Two populations of EP cells were used here: the EP cells after 3 d of culturing (EPq, relatively quiescent) and the EP cells after 5 d of culturing (EPa, activated). The LP cells took 5–7 d to attach to flasks and were cultured for an additional 4 d. MDSC were isolated from a small population of long-time proliferating cells derived from the LP cells. In immunocytochemistry and flow cytometry, +, >95% of the cells were positive; +/-, 40–80% of the cells were positive; -/+, 10–30% of the cells were positive; -, <5% of the cells were positive. Flow, flow cytometry; Imm, immunocytochemistry; RT, RT-PCR.



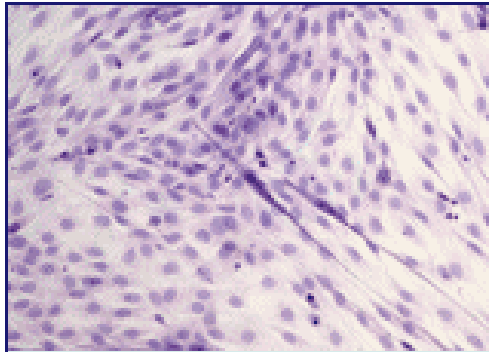
# Απομόνωση Muscle-Derived Stem Cells

<i>Investigator(s)</i>	<i>Isolation technique</i>	<i>Cell phenotype</i>
Gussoni <i>et al</i> <sup>26</sup> (1999)	FACS (Hoechst 33342 exclusion)	Sca-1+, CD34+/-, c-kit-, CD45-
Jackson <i>et al</i> <sup>27</sup> (1999)	Brief culturing (1-24 h adhesion) followed by FACS (Hoechst 33342 exclusion)	Sca-1+, c-kit+
Lee <i>et al</i> <sup>22</sup> (2000)	Preplate (variable cell adhesion)	Sca-1+, CD34-, c-kit-, CD45-, desmin+
Torrente <i>et al</i> <sup>39</sup> (2001)	Preplate (variable cell adhesion)	Sca-1+, CD34+, desmin-



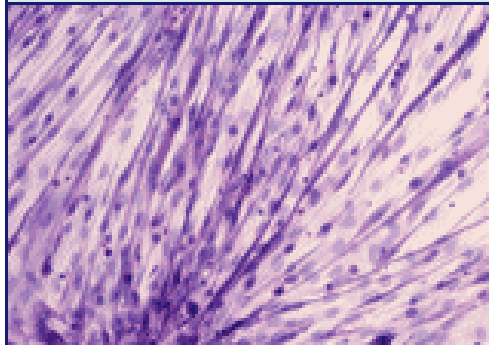
*in vitro* δοκιμές  
*in vivo* (ΠΟΝΤΪΚΙΑ)

# Μελέτες διαφοροποίησης των MDSC σε καλλιέργεια



A

Πολλαπλασιασμός μυϊκών κυττάρων ώστε να καλύψουν το πιάτο καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο πολλαπλασιασμού πλούσιο σε ορό (12-20%)

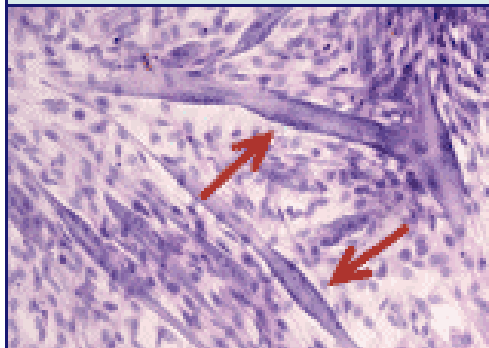


B

Φάση διαφοροποίησης σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης με μικρή περιεκτικότητα σε ορό (2%)

A. 3<sup>η</sup> μέρα διαφοροποίησης → μικροί μυοσωλήνες

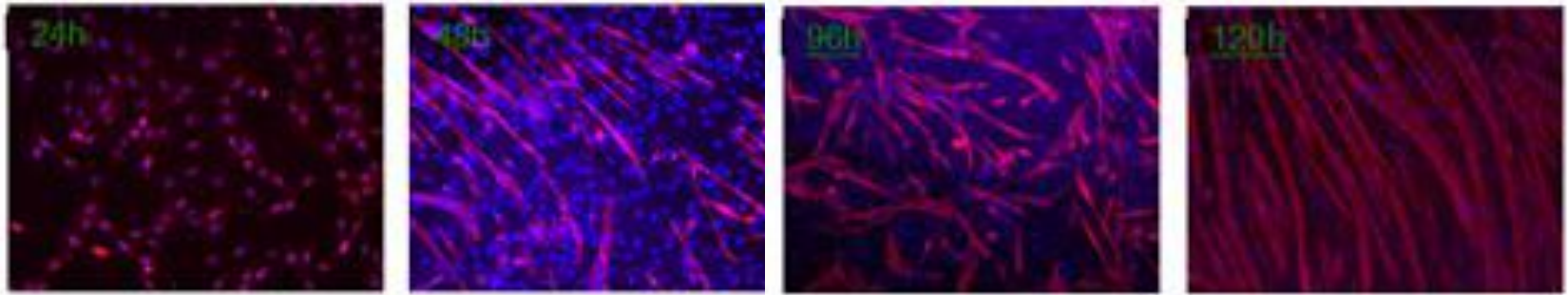
B. 7<sup>η</sup> μέρα διαφοροποίησης → αύξηση αριθμού και μεγέθους μυοσωλήνων



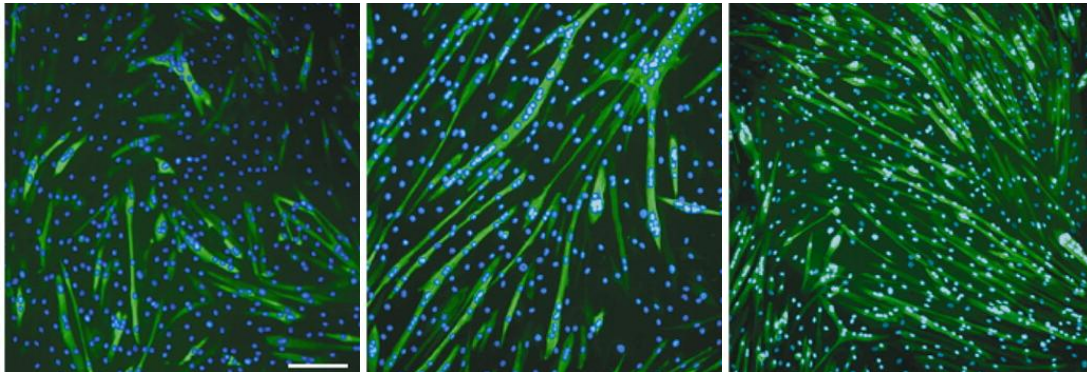
C

Γ. 2<sup>η</sup> εβδομάδα διαφοροποίησης → μεγάλοι πολυπύρρηνοι μυοσωλήνες με δυνατότητα αυθόρμητης σύσπασης

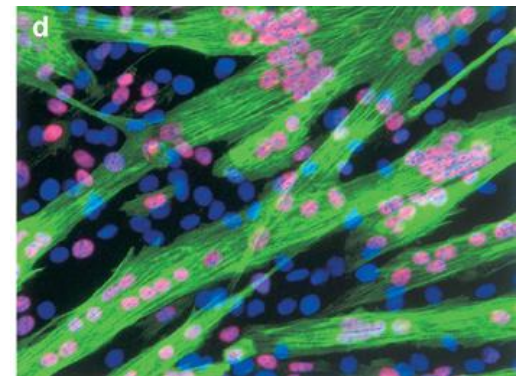
# Διαφοροποίηση μυϊκών κυττάρων σε καλλιέργεια



βαριά αλυσίδα μυοσίνης, DAPI



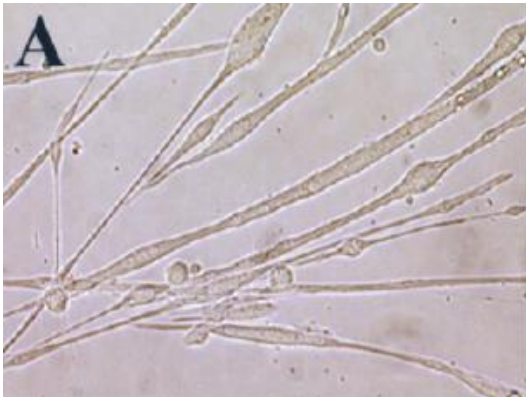
ακτινίνη, DAPI



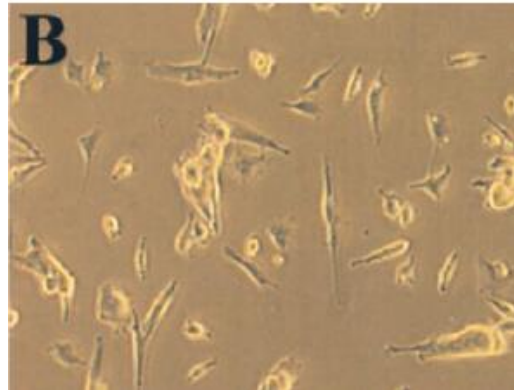
MyoD, ακτινίνη, DAPI

# Διαφοροποίηση MDSC σε οστεοβλάστες

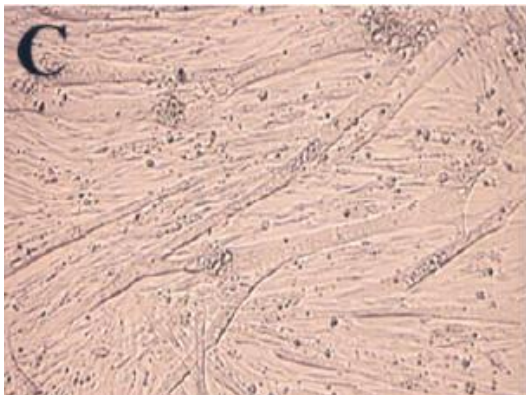
MDSC σε θρεπτικό  
απουσία rhBMP-2



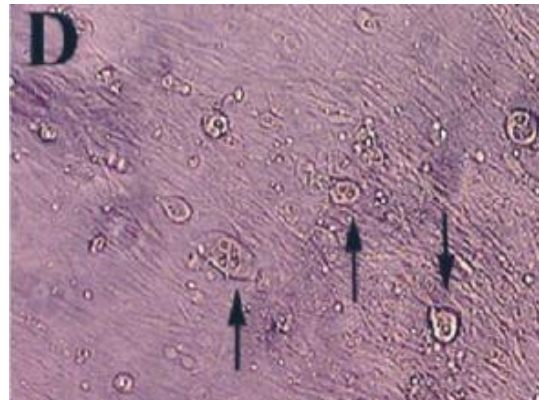
MDSC σε θρεπτικό  
+200 ng/ml rhBMP-2



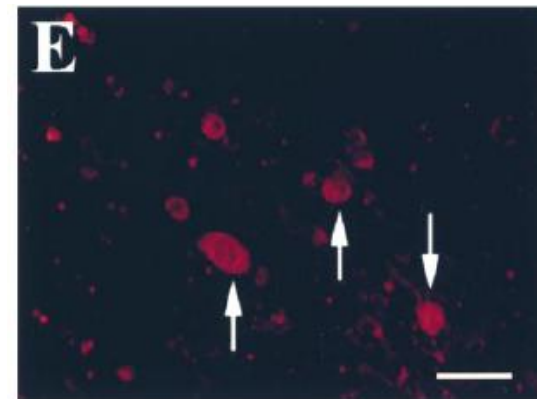
MDSC σε θρεπτικό  
απουσία rhBMP-2



MDSC σε θρεπτικό  
+200 ng/ml rhBMP-2



έκφραση οστεοκαλσίνης

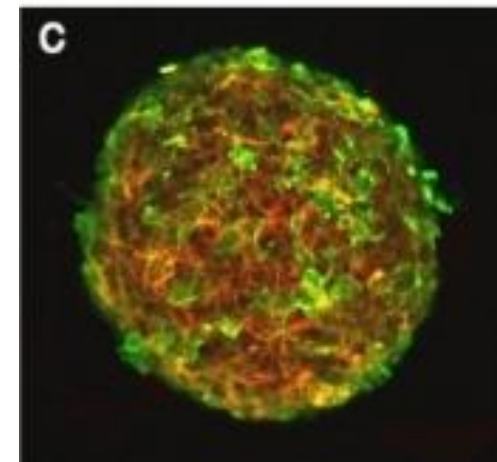
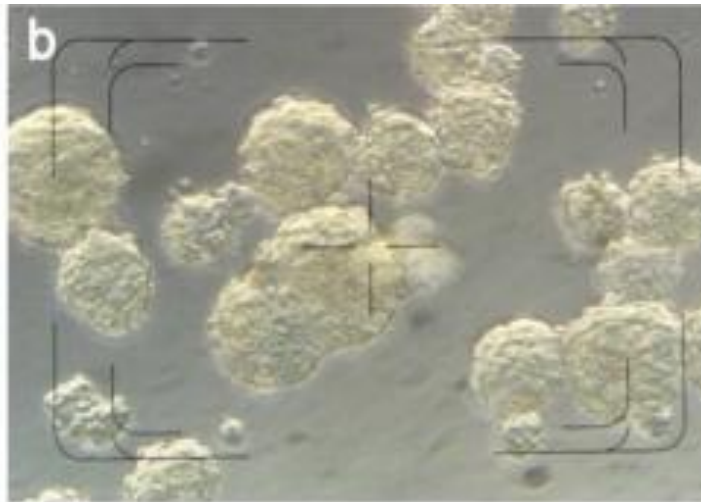
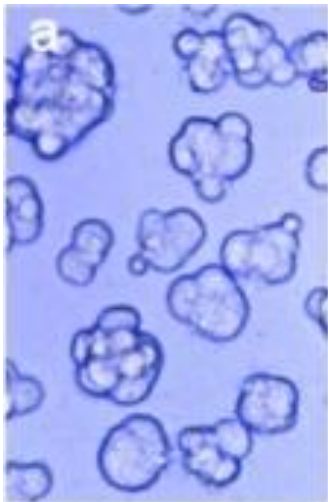


# Νευρικά Βλαστικά κύτταρα από ποντίκι (mNSC)

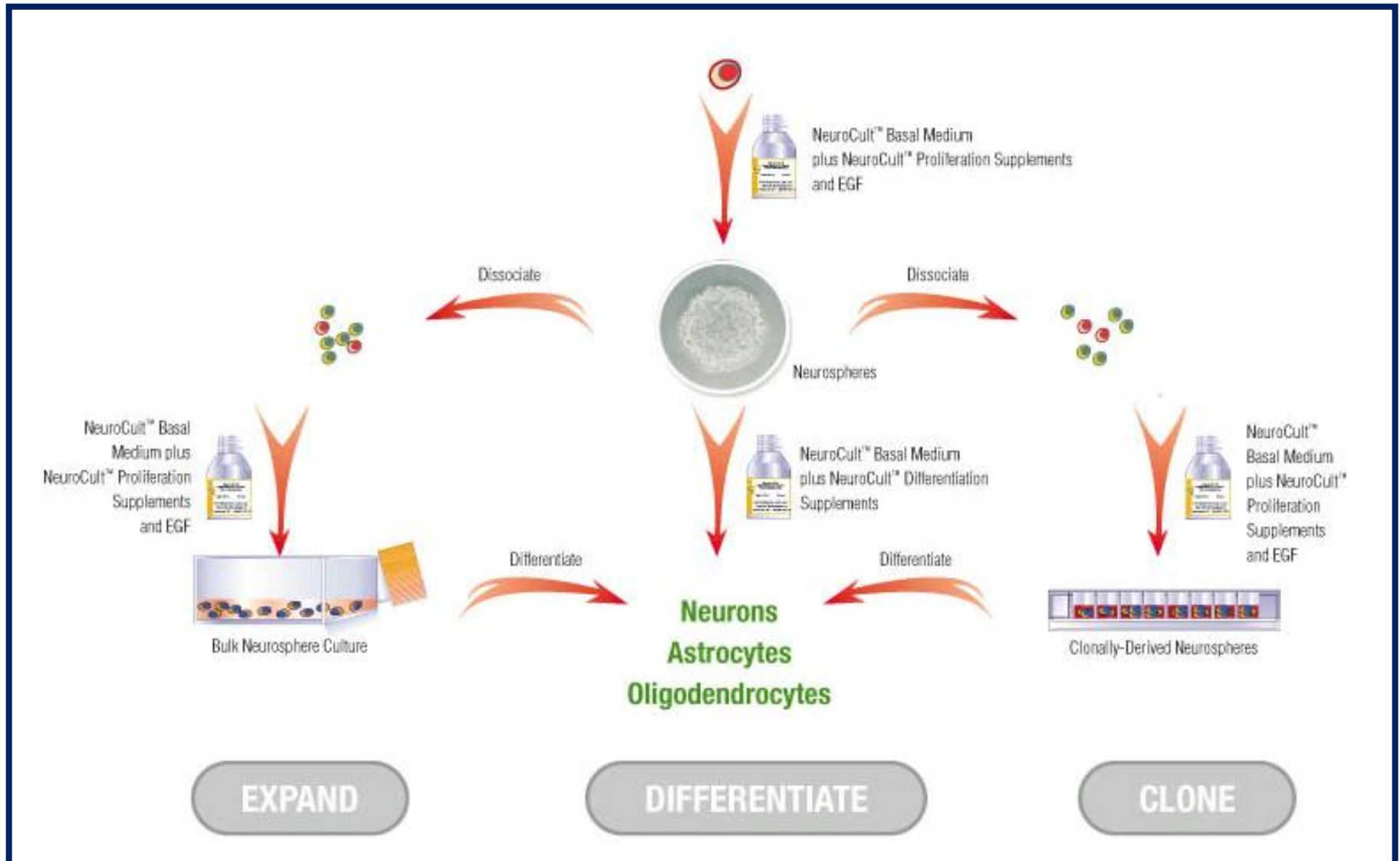
- Ενζυμική αποδιάταξη ιστού (εγκεφάλου) σε ζώα 1 εβδομάδας- 2 μηνών
- Καλλιέργεια μονοκυττάρων σε SFM θρεπτικό υλικό
- Δημιουργία νευροσφαιρών (neurospheres) → πάγωμα, ανακαλλιέργεια, διαφοροποίηση

Serum Free Media (SFM 100mL)	
DMEM/F12	94.3 ml
30% Glucose	2.0 ml
1M Heps Buffer	0.5 ml
Progesterone (1000x)	0.1 ml
Putrescine (100x)	1.0 ml
B27 Growth Supplement	2.0 ml
EGF	20 $\mu$ l
FGF	20 $\mu$ l
ITSS	100 $\mu$ l
Heparin	7.32 $\mu$ l

υποδοχέας EGF, nestin



# Καλλιέργεια, πολλαπλασιασμός, κλωνοποίηση και διαφοροποίηση mNSC



# Διαφοροποίηση mNSC σε καλλιέργεια

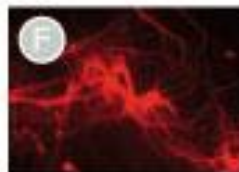
διαθέσιμες παγωμένες  
νευρόσφαιρες για αγορά



NeuroCult™ Basal Medium  
plus NeuroCult™ Differentiation  
Supplements

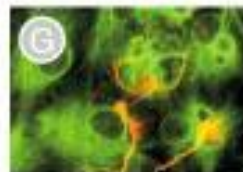


C: νευρώνες  
D: αστροκύτταρα  
E: ολιγοδενδροκύτταρα



Neurons

β-τουμπουλίνη



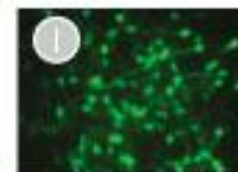
Astrocytes and Neurons

GFAP, MAP2



Oligodendrocytes

πρωτεΐνη O4



GABA-ergic Neuron

GABA

# Νευρικά Βλαστικά κύτταρα από άνθρωπο (hNSC)

Άγνωστη η ακριβής τοπολογία των hNSC: απομόνωση από διάφορες περιοχές εγκεφάλου εμβρύων και ενηλίκων (ιππόκαμπος, SVZ, φλοιός, αμυγδαλή) καθώς και από νωτιαίο μυελό εμβρύων (όχι ενηλίκων)

Η *in vitro* ανάπτυξη των hNSC διαφέρει από τα mNSC π.χ. ακόμη και στα καλύτερα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας τα hNSC έχουν μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης, με το ρυθμό διπλασιασμού να φθάνει τις 5-12 μέρες συγκριτικά με 1-2 μέρες των mNSC

Καλλιέργεια hNSC που προέρχονται από εγκέφαλο εμβρύων έχει φθάσει μέχρι και σε δεκαπλάσιο αριθμό

θρεπτικό μέσο: DMEM/F12, glucose, human insulin, human transferrin, putrescine, selenium chloride, glutamine, sodium bicarbonate, progesterone, HEPES, heparin, hEGF, hbFGF, hLIF

Ίδιες συνθήκες καλλιέργειας για τα ενήλικα hNSC δεν είναι τόσο επιτυχείς όσο τα εμβρυακά hNSC



# Καλλιέργεια και διαφοροποίηση hNSC

Τα διαθέσιμα παγωμένα hNSC που υπάρχουν στην αγορά προέρχονται από hESC

