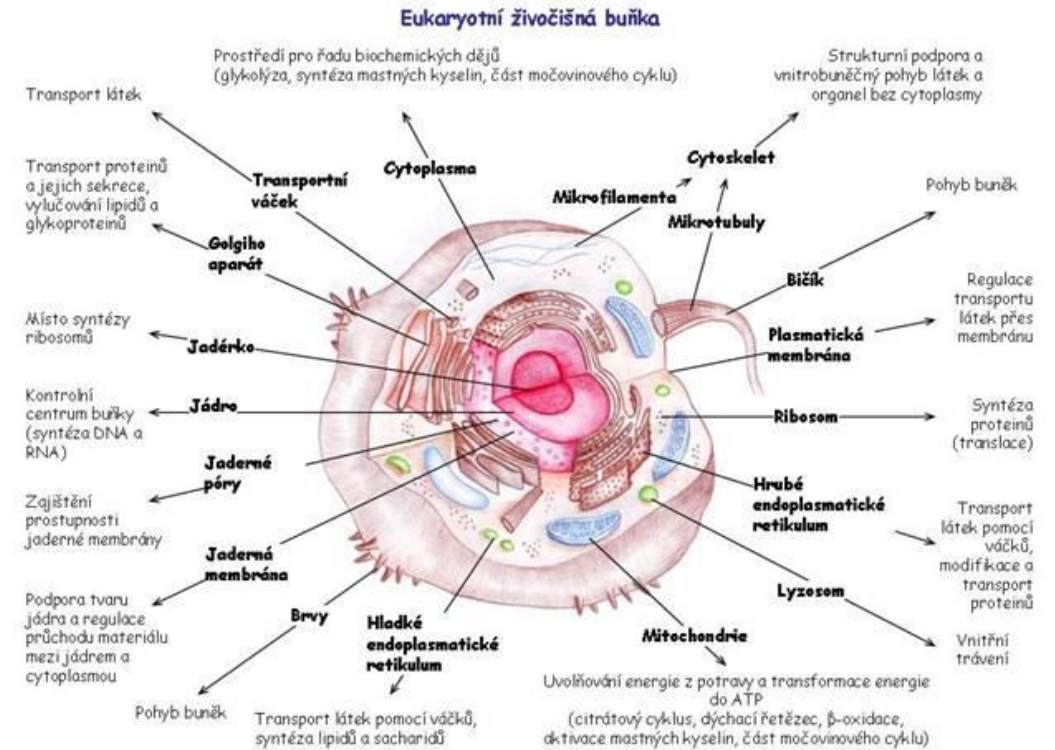


MUNI
MED

buňka × tkáň × orgán

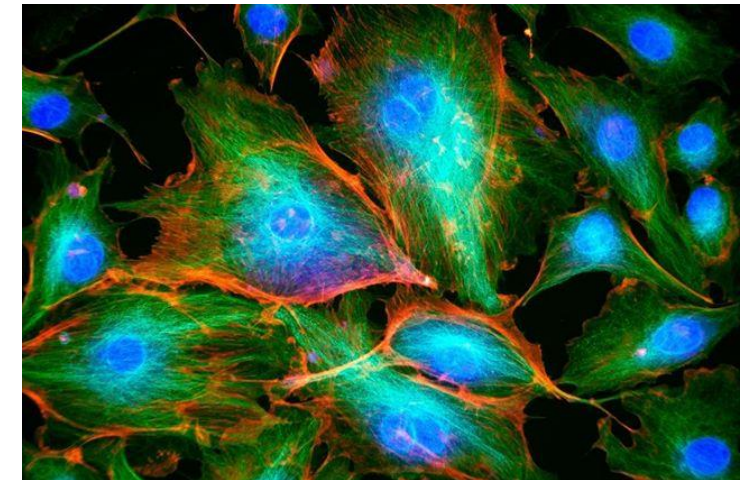
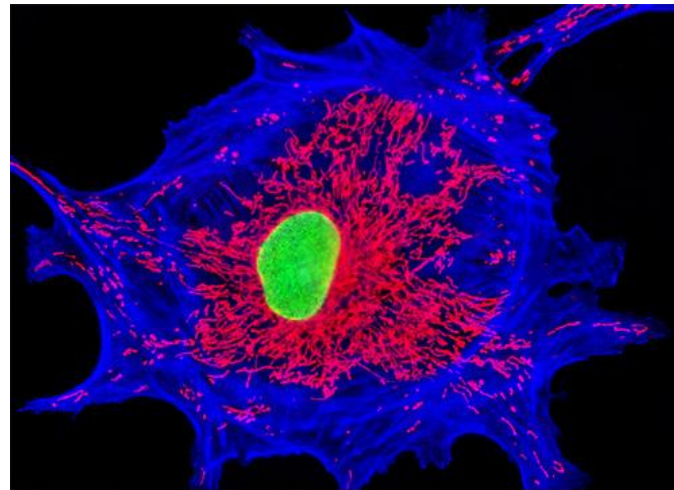
Stavba buňky

- lidské tělo je složeno z $\sim 35 \times 10^{12}$ (bilionů) buněk
- všechny buňky jsou odvozeny od jediné (oplozené vajíčko)



části buňky

- plasmatická membrána
- jádro
- mitochondrie
- endoplazmatické retikulum, ribozomy, Golgiho komplex
- cytoskelet



Buňka

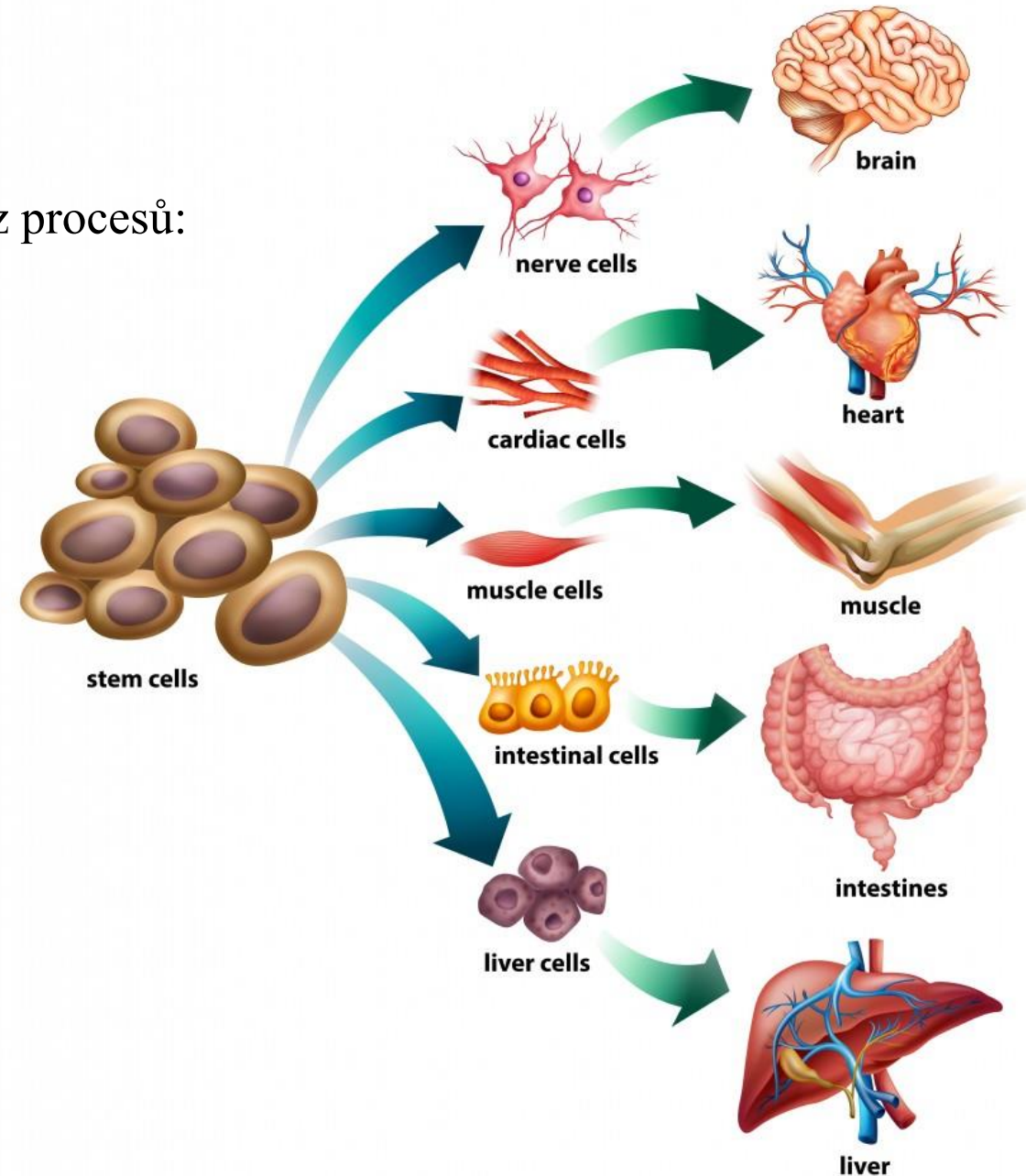
vývoj organismu se stává (na základě genetické informace) z procesů:

- proliferace
 - mitóza
 - meióza
- diferenciace
- zánik buněk
 - apoptóza (organizovaný zánik)
 - nekróza (neorganizovaný zánik)

nutnou podmínkou existence a fungování mnohobuněčného organismu je mezibuněčná komunikace

- se sousedními buňkami (parakrinní)
- s mezibuněčnou hmotou
- se vzdálenými buňkami (endokrinní)
- sama se sebou (autokrinní)

Various Potential Application of Stem Cells



Reprodukce buněk

- základní znak života
- nové buňky vznikají pouze dělením existujících buněk
- život každé buňky probíhá v **reprodukčních cyklech**:
 - **růst** (zdvojení všech buněčných struktur)
 - **dělení** (rozdělení genetického materiálu na dvě identické sady)
- reprodukce buněk zakódována v jejich genetické informaci – **tendence se neomezeně množit (reprodukovat)**
- **nutná regulace množení** pro udržení integrity organismu jako celku

Cíle reprodukce

- **reprodukce individua** – tvorba gamet při meióze
- **ontogenetický vývoj** – embryogeneze
- **udržení buněčné homeostázy** – regenerace poškozených a opotřebovaných buněk
- v organismu asi 10^{13} buněk, řada se jich stále obnovuje
(erytrocytů vzniká asi $2,5 \times 10^6$ za sekundu)
- porucha regulace vede k nekontrolovanému množení \Rightarrow **nádorový zvrát**

Buněčný cyklus

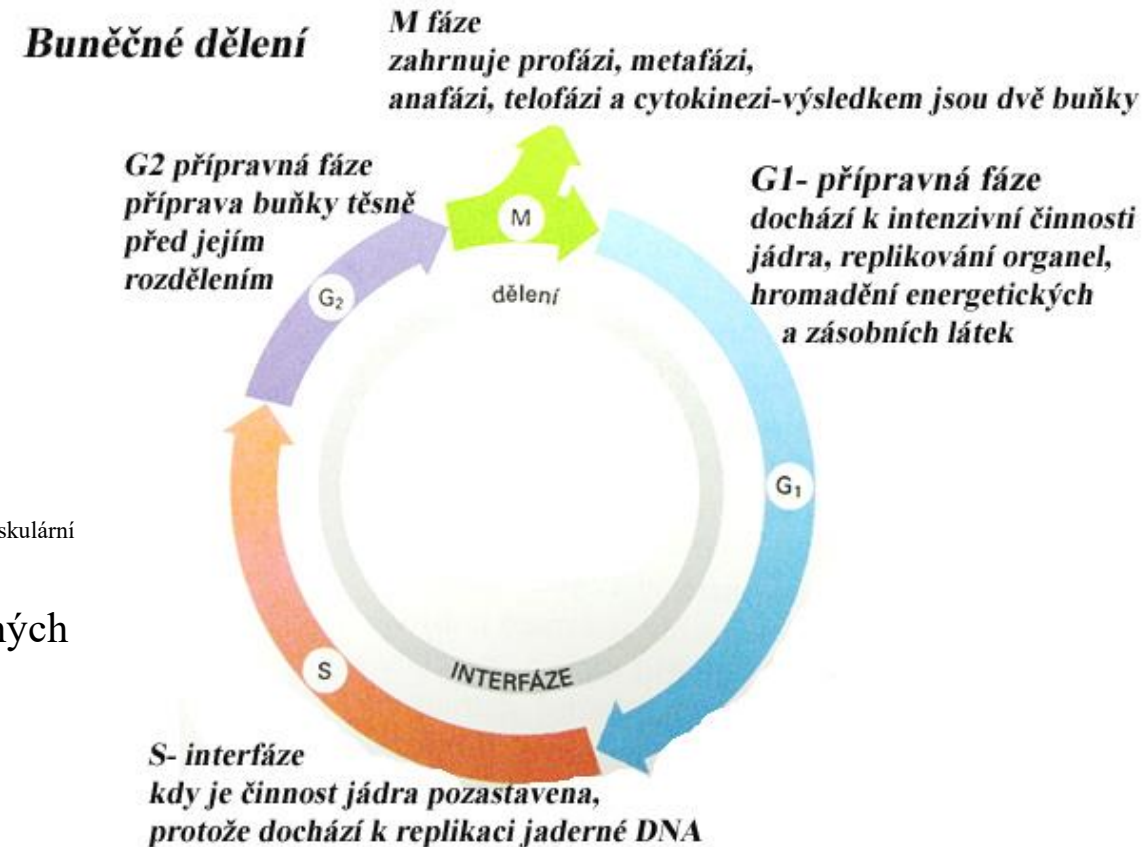
- je sled vzájemně koordinovaných událostí, které vedou k růstu a rozdělení buňky na 2 buňky dceřiné
- buněčný cyklus se dělí na:
 - **interfázi** (90 % buněčného cyklu), rozeznáváme G₁, S a G₂ fázi
 - **mitotickou fázi** (mitóza, M fáze)
- **generační doba buňky** = časový údaj o délce jednoho buněčného cyklu
 - **interfáze** je **variabilní** – především délka G₁ fáze
 - G₁ (gap) 30-40 %
 - S (synthesis) 30-50 %
 - G₂ (gap) 10-20 %
 - M (mitosis) 10 %

Buněčný cyklus

- buňky vyztálých (diferencovaných) tkání – neprobíhá buněčný cyklus, nachází se v klidové fázi (G0), buňky jsou plně **diferencovány** a každá plní specifické funkce
- diferencované buňky mohou pod vlivem mitogenních faktorů (růstových faktorů) opět vstoupit do buněčného cyklu a znovu se množit
- v jiných tkáních jsou přítomny **kmenové buňky** a populace nezralých mitoticky aktivních buněk, které zajišťují náhradu za odumřelé diferencované buňky (kůže)
- v G1 fázi se rozhoduje o tom, zda buňka vůbec vstoupí do dalšího cyklu (restrikční bod); to se stane pouze vlivem mitogenních faktorů; jinak buňka vyřazena z cyklu a vstupuje do G0 fáze, v níž buď pod vlivem diferenciačních faktorů vyztává, nebo apoptózou zaniká

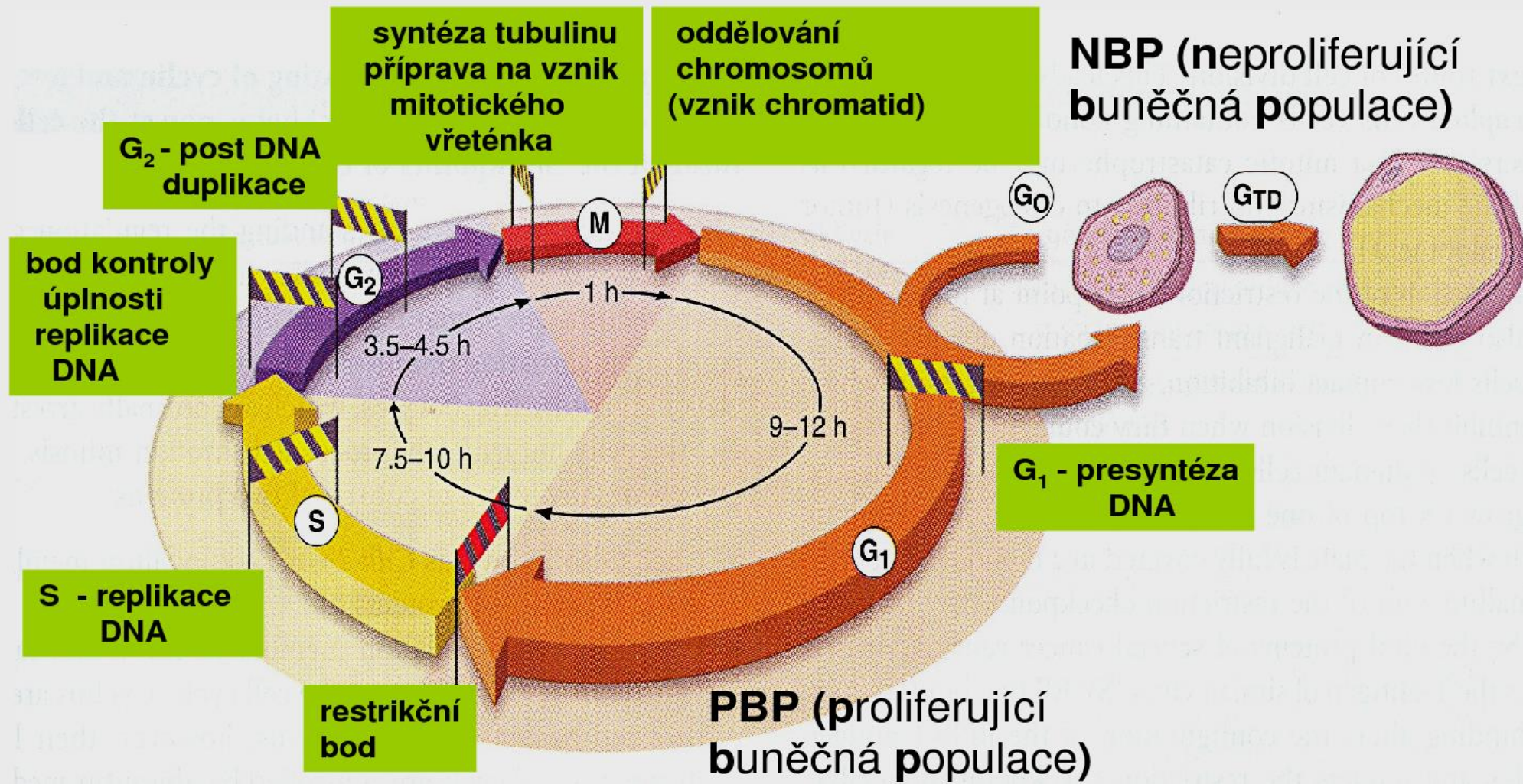
Regulace buněčného cyklu

- na rozdíl od jednobuněčných org. (kde dělení závisí na přísunu živin) je dělní u mnohobuněčného organismu vysoce regulovaný proces
 - podle potřeb organismu
 - růst
 - náhrada za ztracené buňky
 - nutné živiny + signály!
 - některé buňky v organismu se nedělí
 - jsou ve fázi G0 (následuje po G1)
- regulace cyklu
 - signály k dělní – růstové faktory
 - EGF(epidermální RF), TGF β (transformující RF beta), PDGF (destičkový RF), VEGF (vaskulární endotelový RF), bFGF (základní fibroblastový RF), ...
 - prostřednictvím vazby na receptor vedou k aktivaci/deaktivaci různých proteinů v buňce
 - cykliny
 - cyklin-dependentní kinázy
 - transkripční faktory
 - kontrolní body cyklu



SCHEMA BUNĚČNÉHO CYKLU

Restrikční uzlové body (branky) - pokračování umožňují
CYKLINY a CYKLIN-dependentní kinázy (CDK)



Regulační proteiny buněčného cyklu

(proto)onkogeny

– (1) cykliny

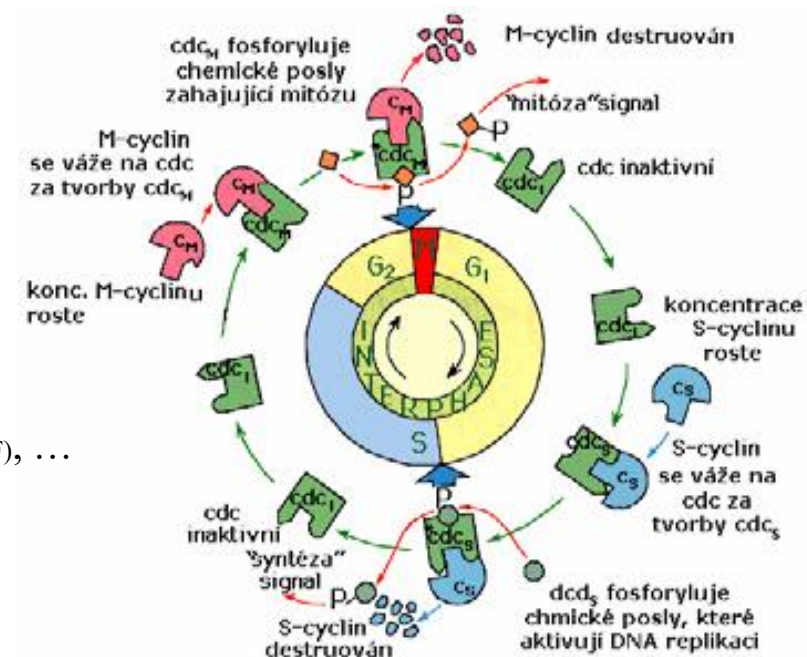
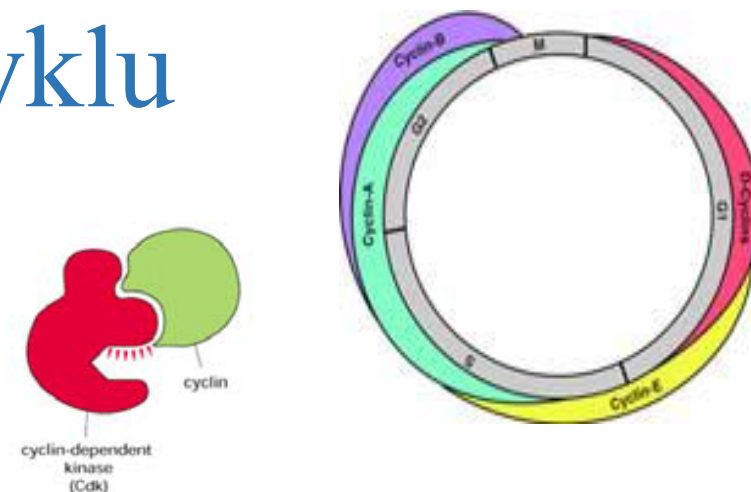
- 8 typů – A, B, C, D, E, F, G, H
- specifické pro jednotlivé fáze cyklu

– (2) cdk (cyklin dependentní kinasy, cyclin-dependent kinases)

- 9 typů: cdk-1 až cdk-9
- pouze komplex cdk s cyklinem je aktivní
- fosforylují seriny a threoniny cílových proteinů a aktivují je » např. Rb-protein
- součástí komplexů cyklin/cdk jsou inhibitory cdk (např. p21), teprve jejich proteolýza umožňuje aktivitu komplexu
- zatímco hladina cdk zůstává během cyklu v podstatě konstantní, exprese cyklinů se liší

– (3) růstové faktory (GF – growth factor) a jejich receptory

- GF působí ve velmi malých koncentracích, většinou parakrinně
- např. TGF- β (transformující RF), PDGF (destičkový RF), EGF (epidermální RF), VEGF (vaskulární endotelový RF), ...



Regulační proteiny buněčného cyklu

supresorové geny

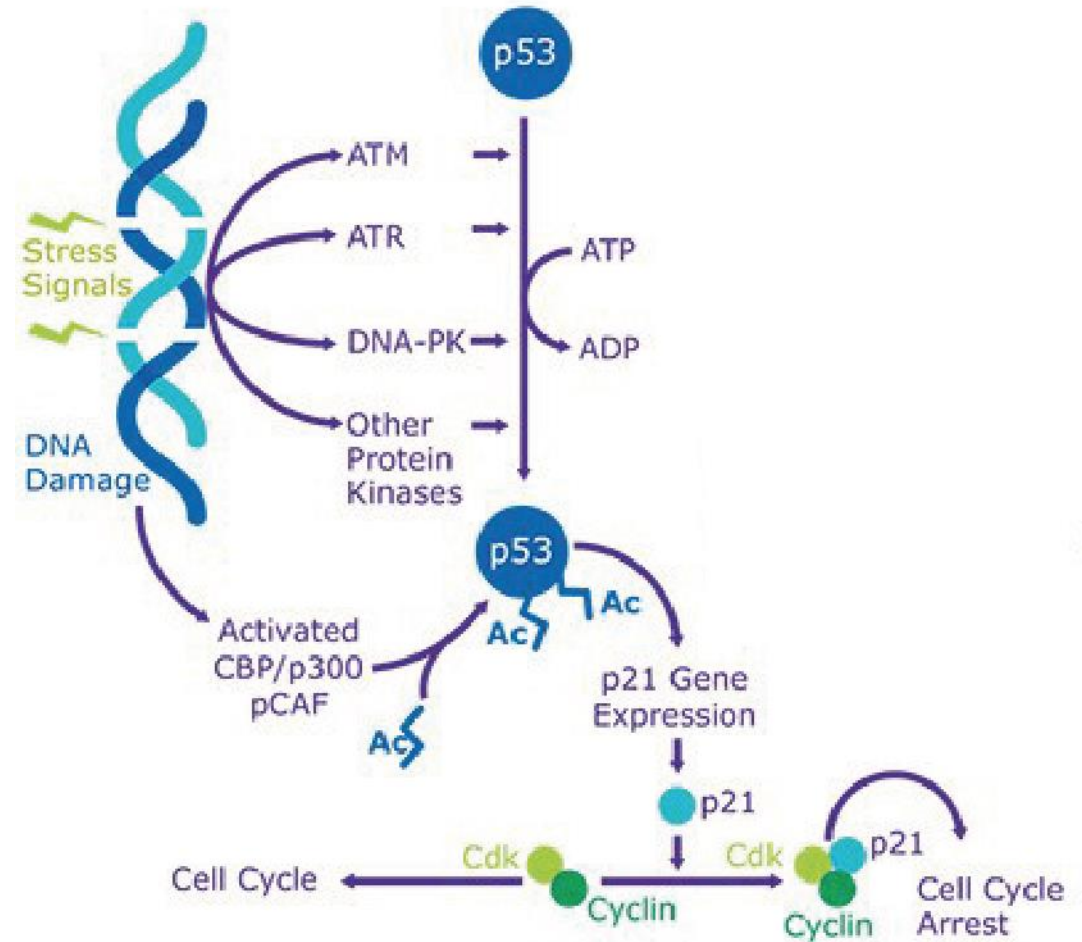
- kódují inhibiční proteiny zastavující buněčný cyklus
- velmi důležité jsou proteiny Rb a p53
- **(1) Rb protein** (ch. 13q14)
 - mutace Rb (nejčastěji mikrolece) vedou ke vzniku retinoblastomu (nádor sítnice)
- **(2) p53 protein** (ch. 17p13)
 - „strážce genomu“ – kontrola cyklu v G1 a G2 kontrolních bodech
 - při poškození DNA se zvyšuje exprese p53
 - funguje jako **transkripční faktor**
- mutace v supresorových genech jsou podkladem dědičných typů rakovin
- často názvy podle typu nádoru, který vzniká při jejich mutaci, např.
 - Rb (retinoblastom)
 - WT (Wilmsův tumor)
 - NF1 a NF2 (neurofibromatóza)
 - APC (adenomatózní polypóza coli)
 - VHL (von Hippel-Lindau syndrom)

Protein p53

při poškození DNA se aktivuje p53, který dále zprostředkuje:

- expresi inhibitorů b. cyklu (p21) → dočasné **zastavení b. cyklu** v G1/S kontrolním bodě, které umožní reparaci DNA
- zvyšuje expresi GADD 45 (Growth Arrest and DNA Damage) → **excizní reparace DNA**
- pokud není oprava úspěšná, zvyšuje expresi Bax → **apoptóza**

mutace p53 jsou přítomny cca u 50 % všech nádorů!!!



Dělení buněk

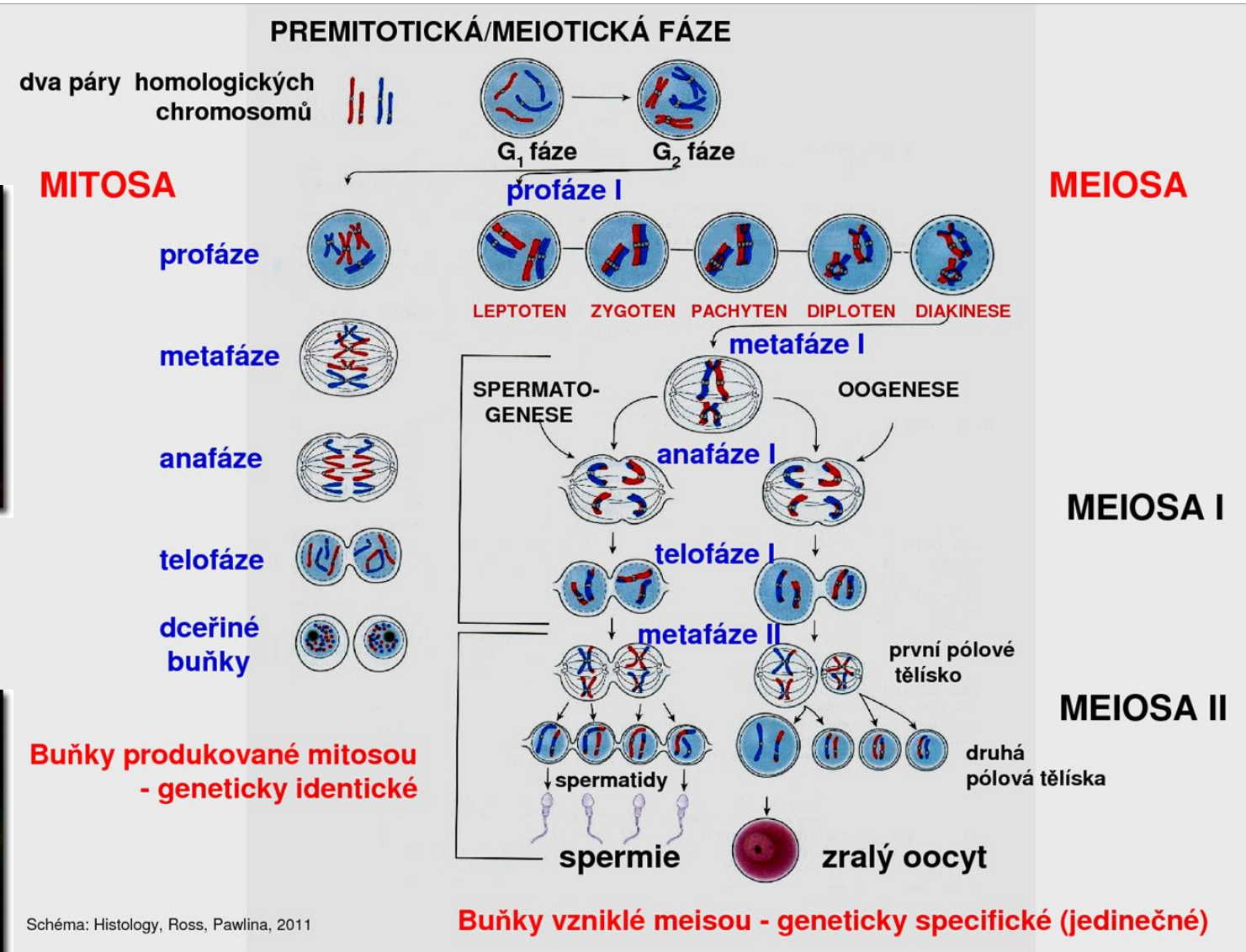
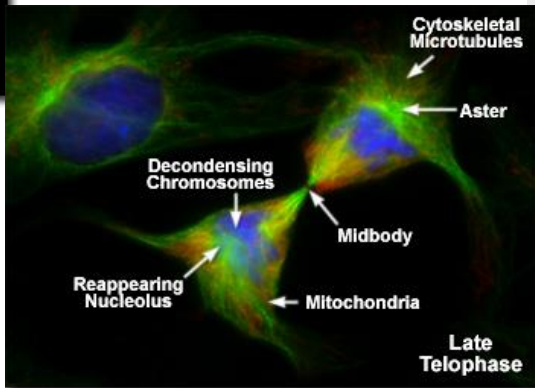
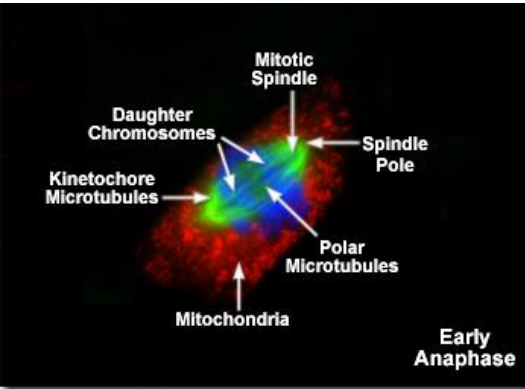
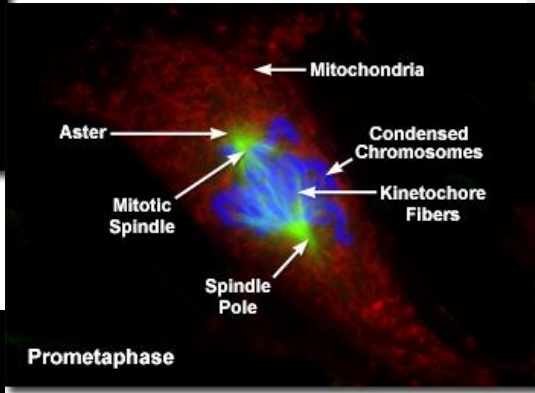
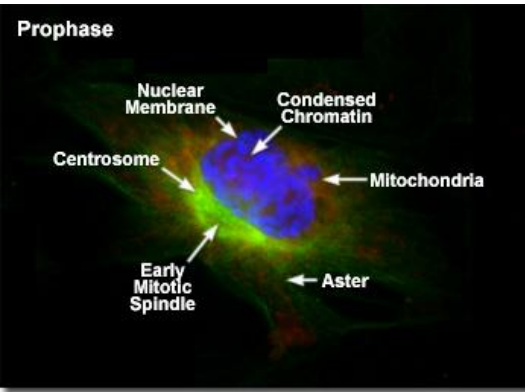


Schéma: Histology, Ross, Pawlina, 2011

Dělení buněk a jeho poruchy

- **Mitóza**

2 dceřiné buňky s diploidním počtem chromozomů

- **Meióza**

2 dceřiné buňky s haploidním počtem chromozomů

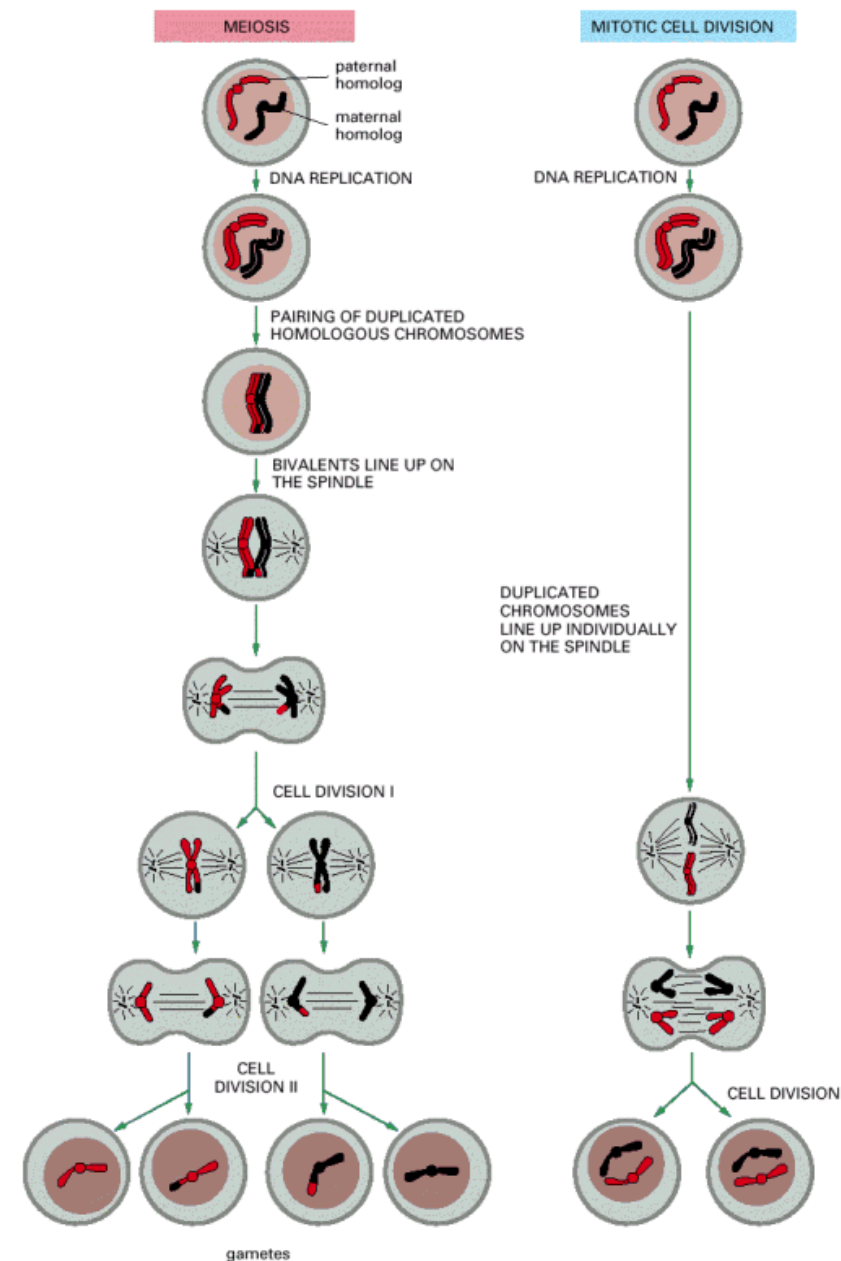
- vznik pohlavních buněk (spermie, vajíčko)

- **Poruchy**

– porucha rozdělení sesterských chromozomů = **aneuploidie** (změna počtu chromozomů v sadě)

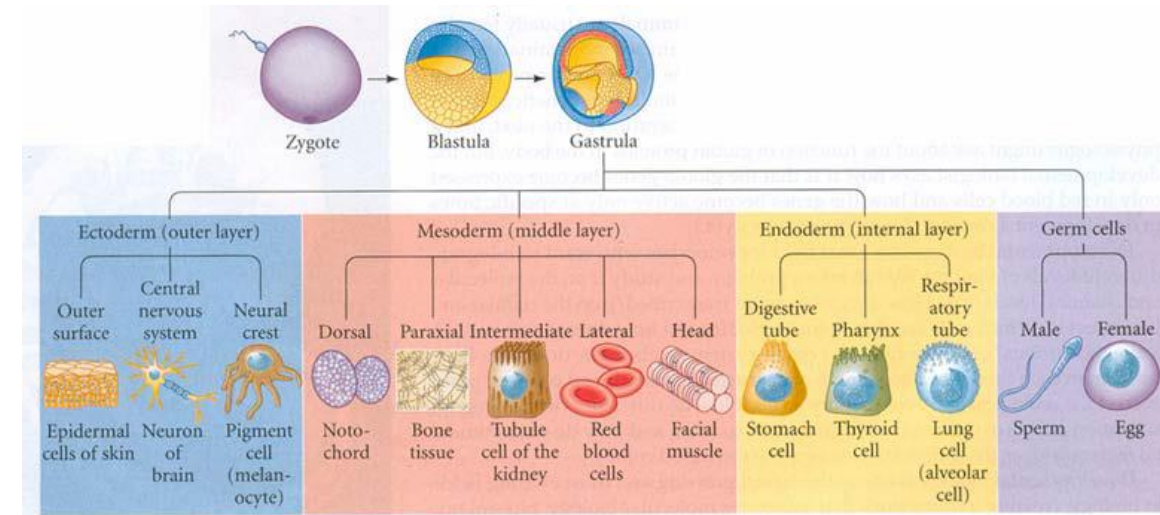
- monosomie
- trisomie (autosomů i gonosomů)
- Downův sy. (47, XX/XY + 21)
- Edwardsův sy. (47, XX/XY +18)
- Patauův sy. (47, XX/XY +13)
- Turnerův sy. (45, X0)
- Klinefelterův sy. (47, XXY)

– porucha rozdělení celých sad = **polyploidie** u člověka neslučitelné se životem

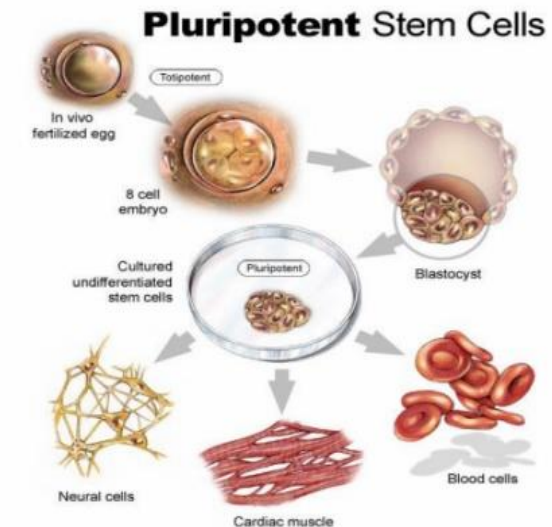


Diferenciace a její poruchy

- diferenciace = vyžívání k určitým úkolům na základě stimulace mimobuněčnými faktory (růst. faktory, cytokiny)
 - změna **genové exprese**
 - změna struktury
 - změna funkce
- pluripotentní kmenová buňka (PKB)
 - schopnost diferencovat se v jakoukoliv buňku daného orgánového systému (tj. “zásoba”)
 - funkčně plnohodnotná náhrada = **regenerace**
rychlá - pokožka, střevní epitel, krvetvorná tkáň, děložní sliznice
 - pokud není možnost – náhrada vazivem nebo glí = **reparace**



What is cell differentiation?



Transport iontů a nízkomol. látek přes membránu

• Pasivní

• prostá difuze

- nízkomolekulární látky bez náboje
 - O_2 , CO_2 , NO , voda (osmotický tlak), močovina, etanol
- nevyžaduje energii, rozhodující je koncentrační gradient

• facilitovaná (usnadněná) difuze

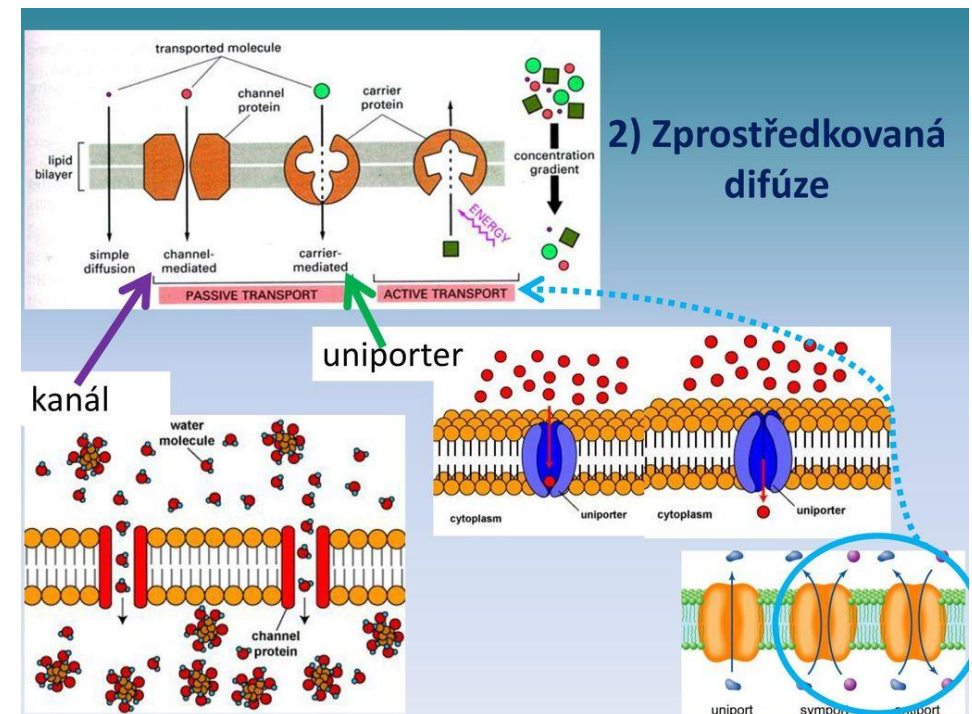
- uniport
 - podle koncentračního gradientu, nevyžaduje energii
 - nutné specifické nosiče (= saturovatelnost) » glukóza a jiné cukry
- symport/antiport
 - přenos látek proti koncentračnímu gradientu → energii dodává gradient Na^+ » glukóza, aminokyseliny, Ca^{2+}

• iontové kanály

- buněčná membrána je prakticky nepropustná pro ionty
- tok podle elektrochemického gradientu
- vrátkování („gating“)
 - elektrické
 - ligandem
 - mechanické
 - změny koncentrace Ca^{2+} a H^+ („gap junctions“)
- podmiňují membránový potenciál

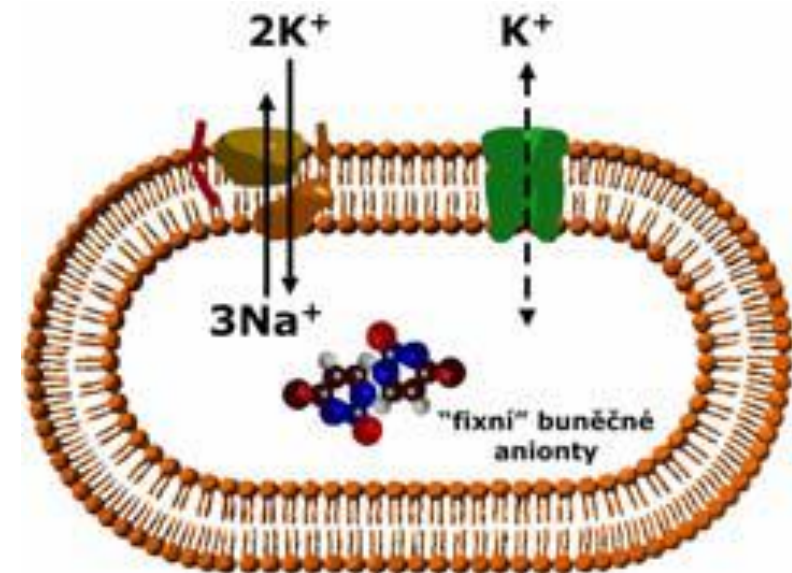
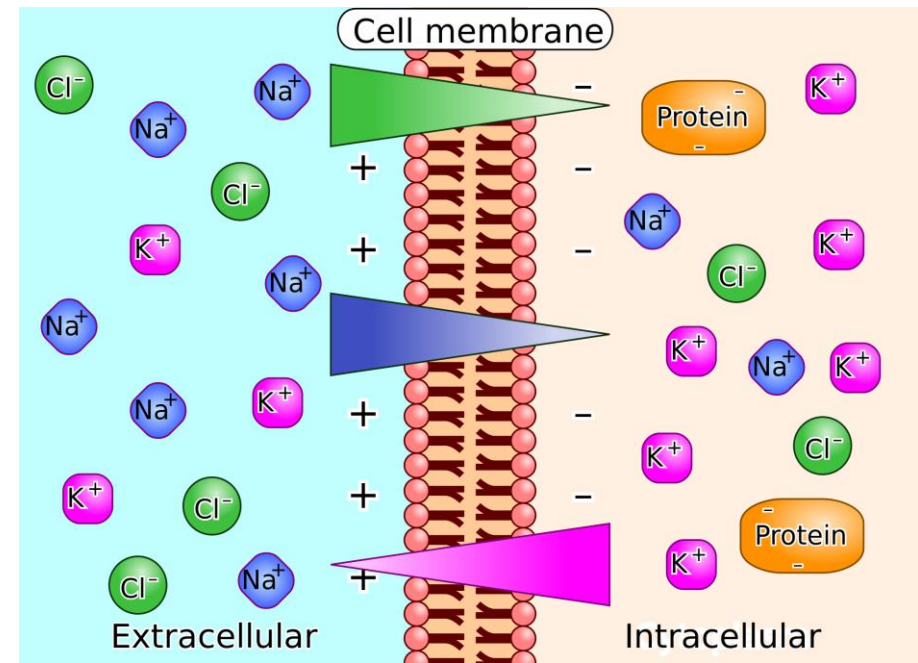
• Aktivní = pumpy

- energie z ATP
- nutný k udržení membránového
- napětí a buněčného objemu, vytváří Na^+ gradient pro symporty a antiporty
 - Na^+/K^+ -ATPasa
 - Ca^{2+} -ATPasa
 - H^+ -ATPasa



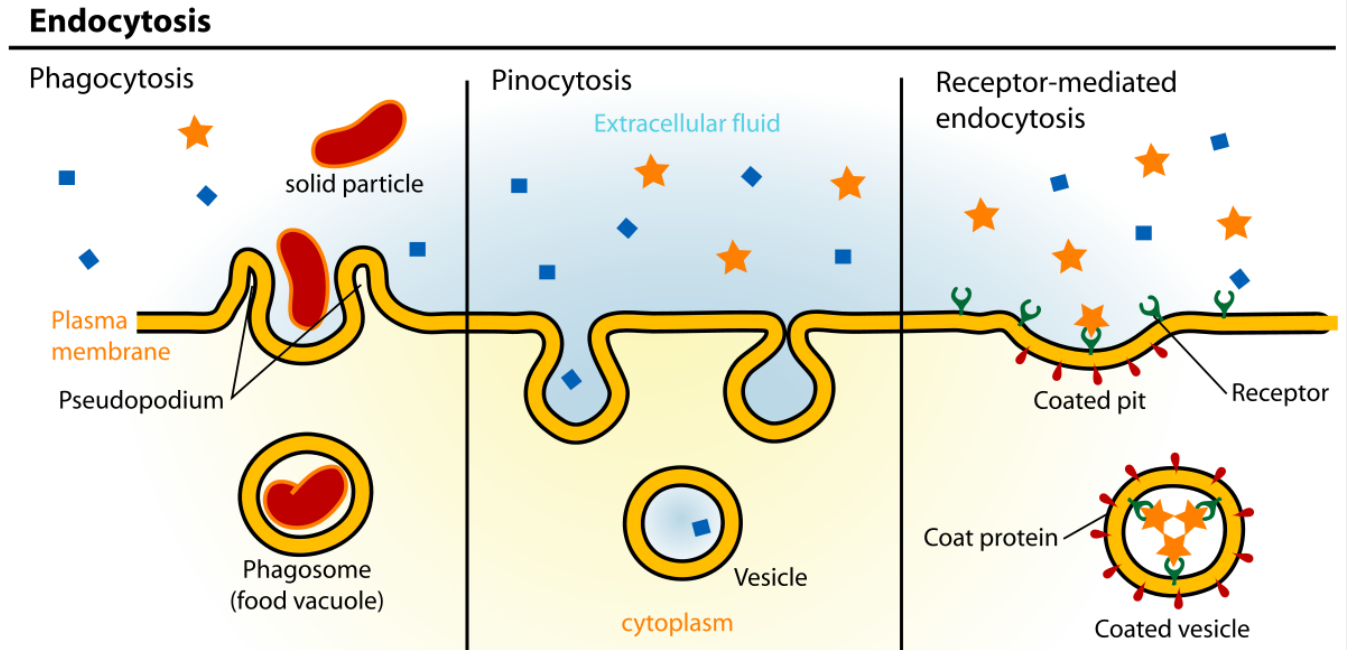
Membránový potenciál

- způsoben rozdílem nábojů na obou stranách membrány
- určen 4 hlavními ionty
 - Na^+ , K^+ , Cl^- , organické anionty
 - uvnitř buňky záporný náboj jako výsledek
 - existence “fixních” intracelulárních aniontů - buněčné proteiny
 - činností elektrogenní Na^+/K^+ ATPasy
 - přesun kationtů v poměru
 - 3Na ven : 2K dovnitř
 - nutný pro excitabilitu tkání



Transport vysokomolekulárních látek přes membránu

- sekrece/pohlčení proteinů
 - endo-/exocytóza
 - specializované proteiny
 - za účasti Ca^{2+}
 - pinocytóza
 - ve vodné fázi
 - fagocytóza
 - pomocí receptorů ve specializovaných buňkách



Typy buněčné komunikace

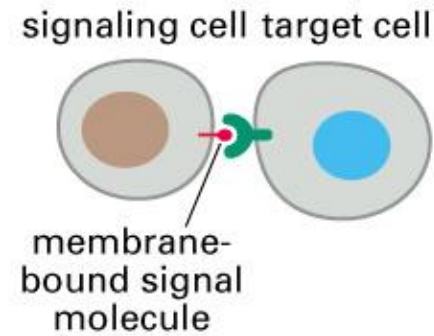
Přímým kontaktem

- spojovacími komplexy (nexy)
- kontaktem molekul na površích buněk (embryonální indukce a imunitní systém)

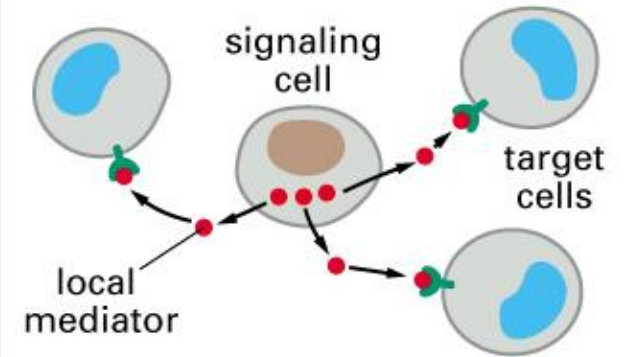
Prostřednictvím vylučovaných molekul

- **parakrynní** - chem. mediátory ovlivňují b. pouze v nejbližším okolí
- **autokrynní** - b. vysílající signály pro b stejného typu mohou přijímat své vlastní signály
- **synaptická** přenos neurotransmitérů v synapsích, v podstatě parakrynní
- **vzdálená - hormonální (endokrynní)** – hormony do krve, specifická, relativně pomalá

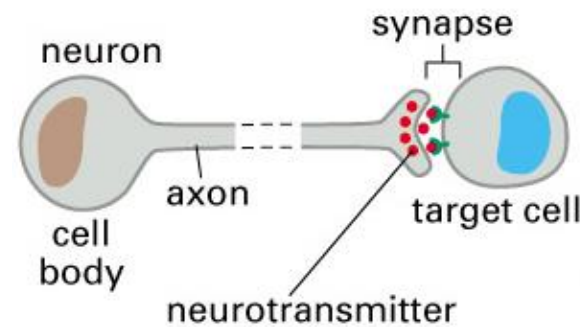
(A) CONTACT-DEPENDENT



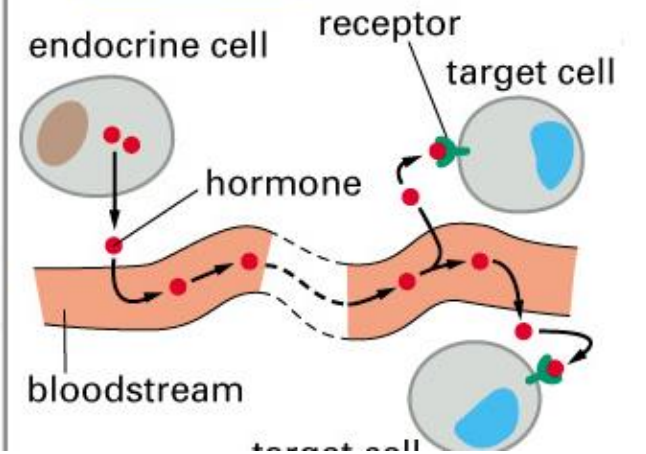
(B) PARACRINE



(C) SYNAPTIC

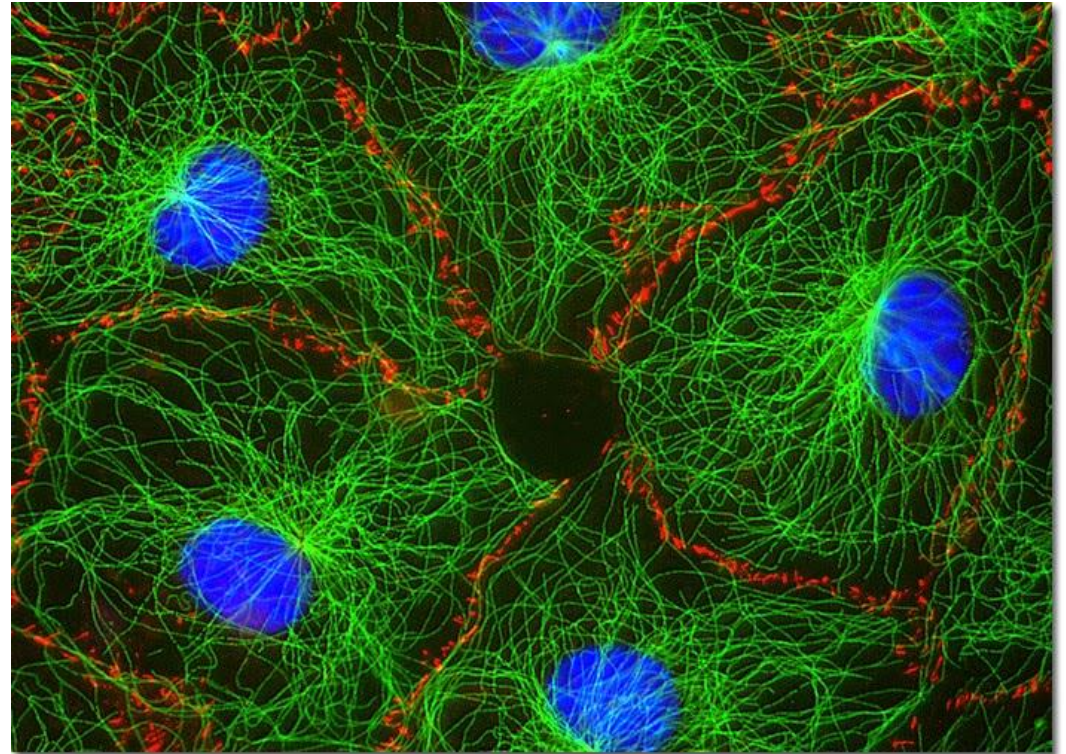


(D) ENDOCRINE

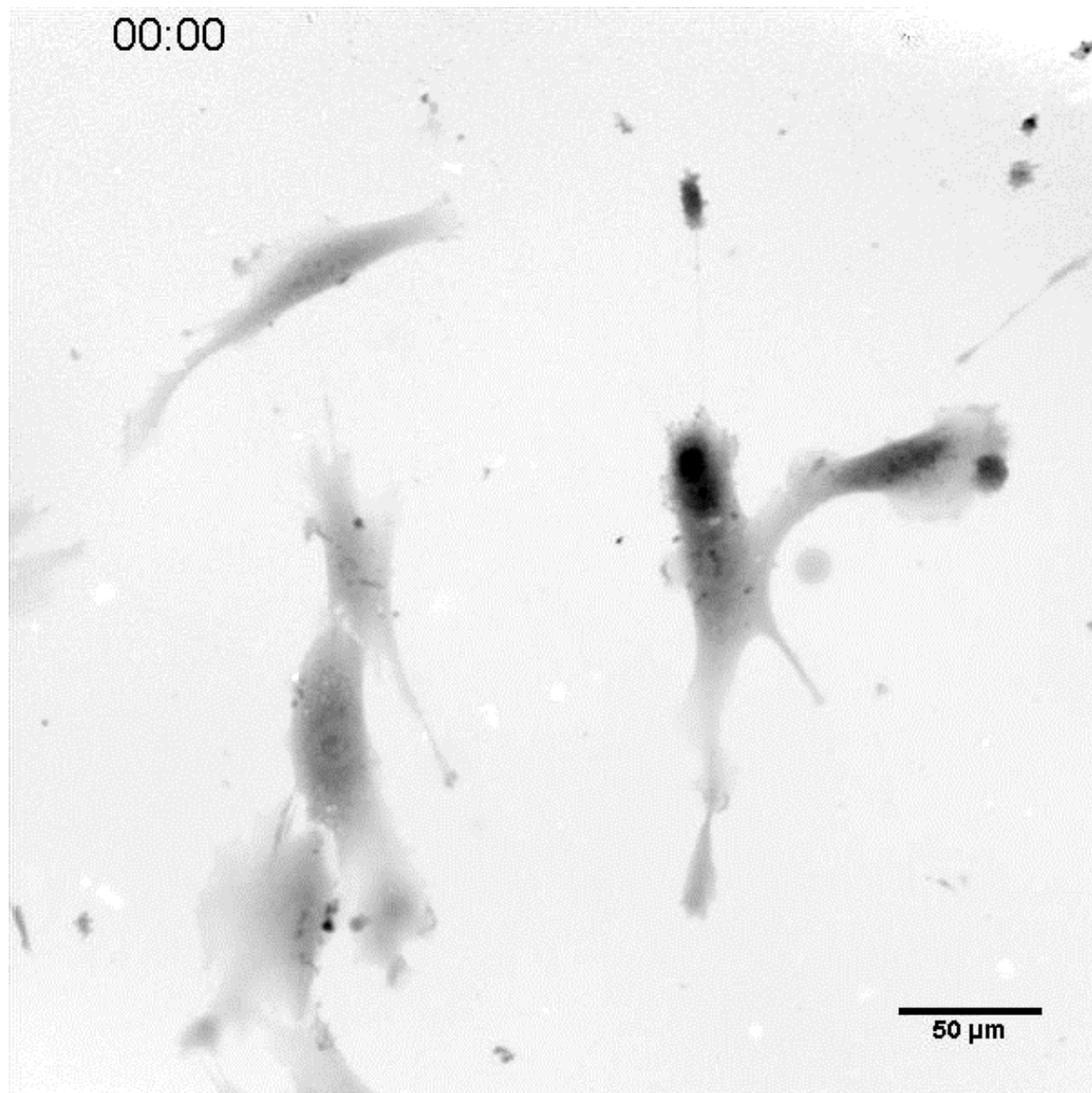


Mezibuněčná komunikace

- komunikace buněk se sousedními, vzdálenými buňkami a s mezibuněčnou hmotou prostřednictvím:
 - adhezivních proteinů:
 - **integriny** (α - a β -podjednotky)
 - spojení epitelových buněk k bazální membráně
 - **adheziny**
 - podobné imunoglobulinům (CD4, CD8, TCR)
 - ICAM (InterCellular Adhesion Molecule)
 - VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule)
 - PECAM (Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule)
 - NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule)
 - **selektiny** (ligandy pro integriny)
 - E-selektin - endotel
 - L-selektin - leukocyty
 - P-selektin - destičky
 - **kadheriny** (Ca^{2+} -dependentní transmembránové molekuly)
 - prostřednictvím kateninů vázány k cytoskeletu
 - membránových a nitrobuněčných receptorů pro cirkulující ligandy
 - neurotransmitery
 - hormony
 - transmembránové
 - intracelulární
 - cytokiny
 - růstové faktory
 - mezibuněčných spojů („tight/gap junctions“)



00:00



50 μm

Apoptóza - programovaná buněčná smrt

- fyziologický proces umírání buňky, které indukují různé podněty (vývoj organismu, stárnutí, poškození, atd.)
- destrukci buňky zajišťují kaspázy
- výsledkem je rychlá fragmentace a fagocytóza buňky
- podmínka udržování homeostáze

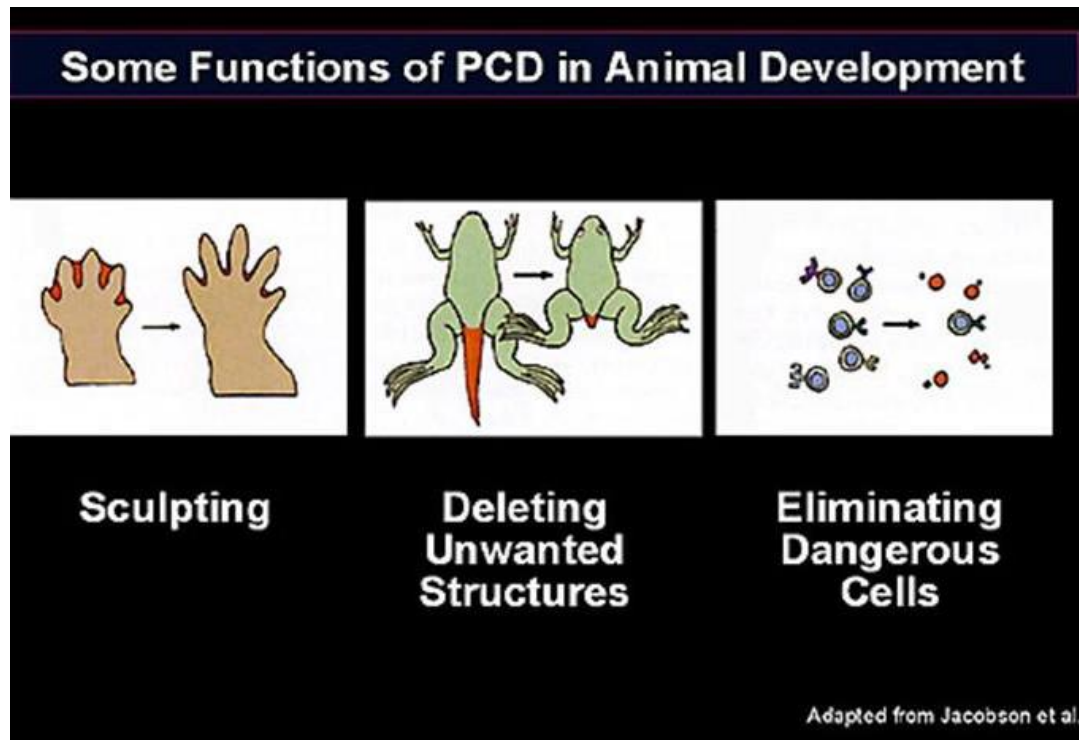
Proč?

- stresové podněty z okolního prostředí
- poškození DNA
- vývojové procesy
- reakce na viry/patogeny

Význam apoptózy

- kontrola nadměrné proliferace: koordinační role při formování orgánů a tkání eliminace přestárých buněk
- eliminace poškozených nebo geneticky aberantních buněk (reakce na silné, neopravitelné poškození genomové DNA, extrémní kyslíková deprivace, významná signální nerovnováha, apod.)

Apoptóza a formování tkání



Apoptózou jsou během morfogeneze odstraňovány nežádoucí buňky – tvorba funkčních tkání a orgánů

Geneticky pozmeněné myši, které postrádají klíčové složky apoptotického aparátu vykazují typické vývojové poruchy: nadbytek neuronů v mozku, obličejové abnormality, poruchy formování prstů, atd.

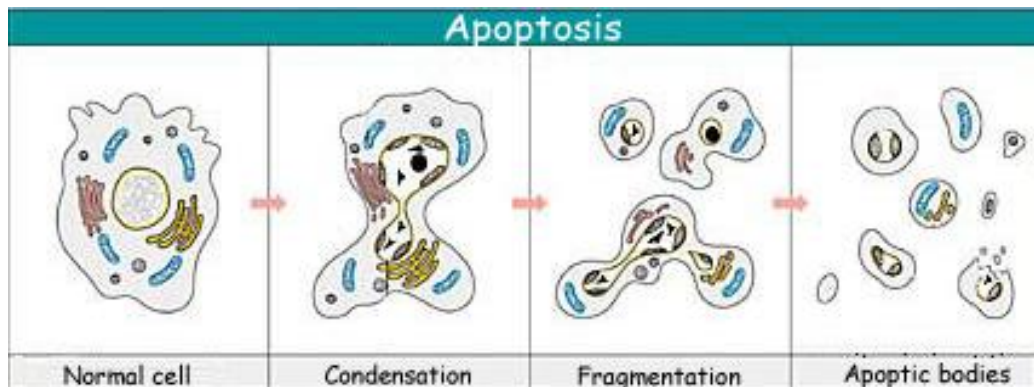
Apoptóza a fyziologie tkání

- Tenké střevo: epiteliální buňky jsou apoptózou průběžně eliminovány po 4-5denní pouti ze spodních částí krypt do výběžků střeva
- Tvorba erytrocytů: více než 95 % erytroblastů je odstraněno apoptózou v kostní dřeni. Blokování apoptózy nastává v případě nedostatku kyslíku (nízký tlak kyslíku, anémie, krvácení) díky zvýšené produkci erythropoietinu

Apoptóza versus nekróza

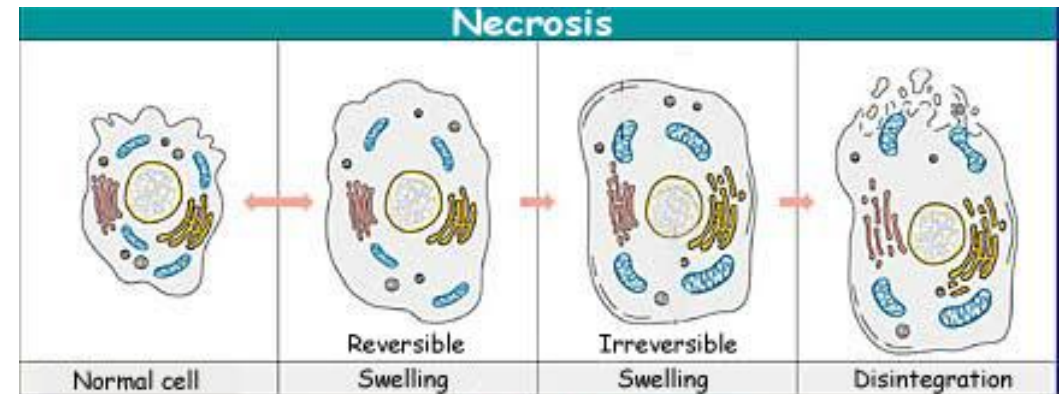
Apoptóza:

- programovaný proces
- kondenzace chromatinu - fragmentace jádra
- odbourání cytoskeletu („scvrknutí“ buňky)
- fragmentace chromozomální DNA (180 bp)
- mitochondrie zůstávají intaktní
- buněčná membrána se vychlipuje
- umírající buňka je fagocytována sousedními buňkami



Nekróza:

- smrt buňky obvykle vyvolaná zraněním
- bobtnání organel
- poškození mitochondrií
- celková dezintegrace buňky
- uvolnění nitrobuněčných komponent
- vznik zánětu



Kinetika buněčných změn během apoptózy

Přesná koordinace

1. tvorba vychlípenin plazmatické membrány (povrch buňky „vaří“)
2. jádro se zahušťuje a fragmentuje (stádium „pyknózy“)
3. chromozomální DNA se štěpí na krátké segmenty
4. během hodiny se apoptotická buňka rozpadá na malé části (**apoptotická tělíška**), která jsou pohlcena sousedními buňkami nebo makrofágy fagocytózou

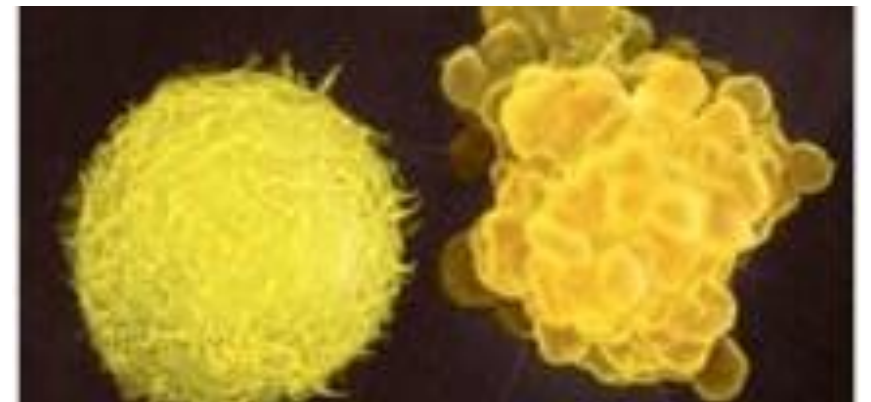
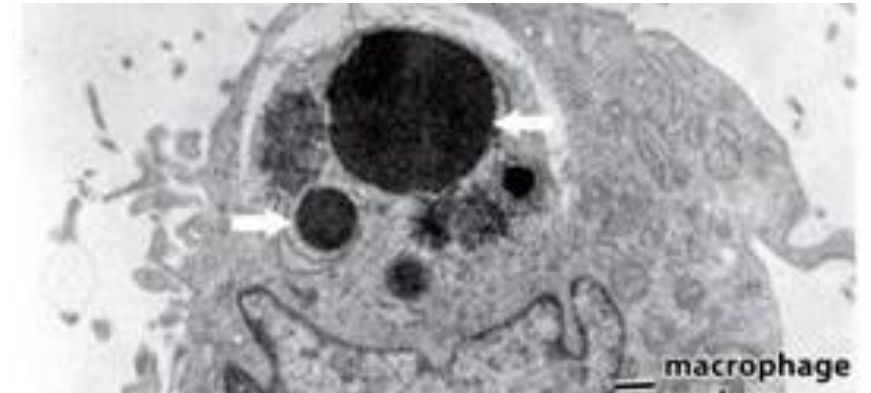
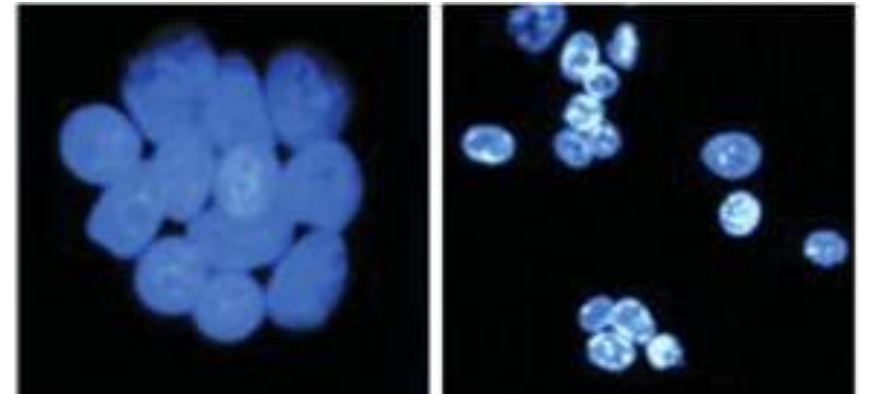
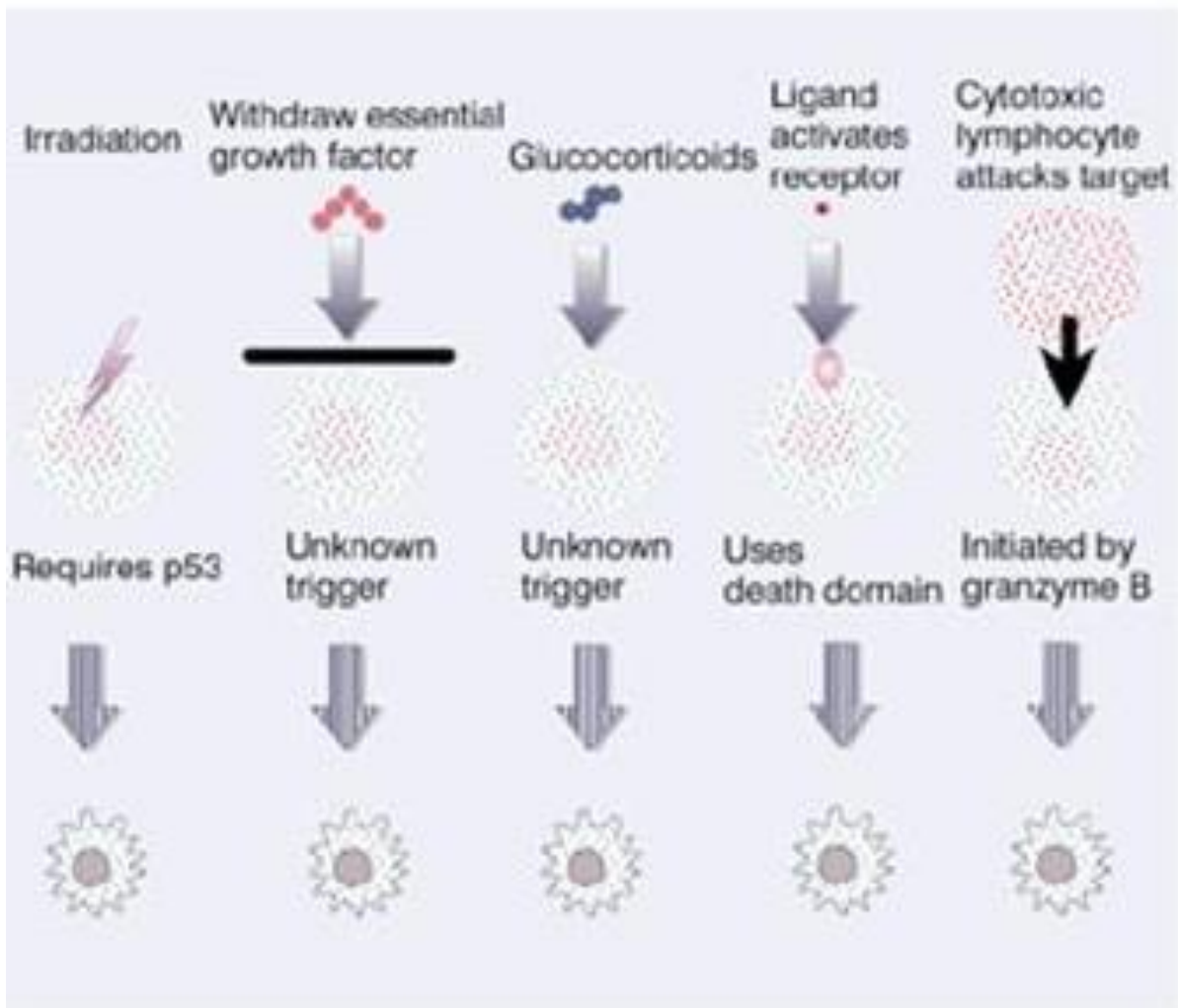


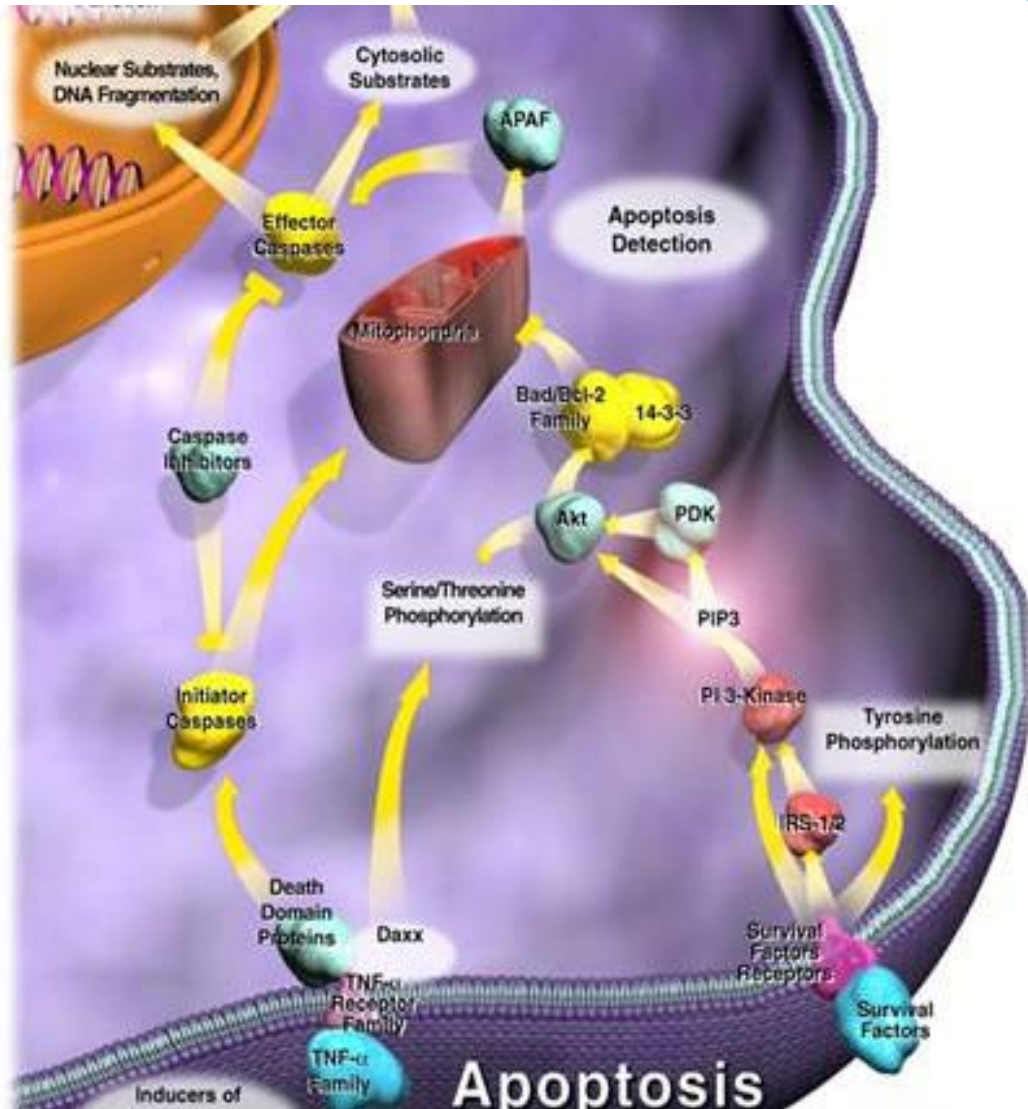
Figure 27.36 Apoptosis is triggered by a variety of pathways.



Pro-apoptické stimuly (signály smrti)

- UV a ionizující záření
- nedostatek růstových faktorů
- glukokortikoidy
- specifické ligandy (Fas, TNF = tumor necrosis factor)
- cytotoxické lymfocyty atakující své cíle
- exprese některých onkogenů a nádorových supresorů (p53, Rb)

Dvě hlavní nitrobuněčné dráhy indukující apoptózu

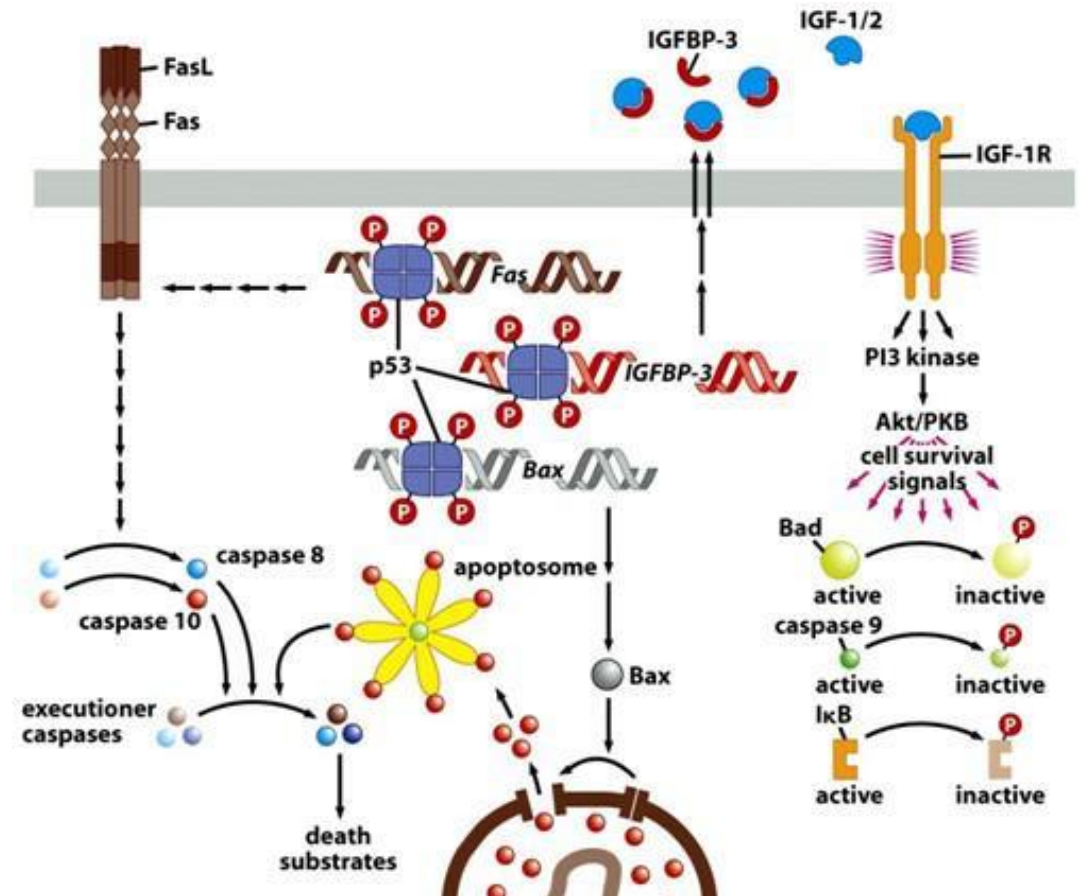


- dráha **nezávislá na p53** aktivovaná mimobuněčnými ligandy (Fas nebo TNF α) nebo ztrátou ukotvení k podkladu (tento typ apoptózy se nazývá anoikis)
- dráha **závislá na p53** aktivovaná stresovými faktory (např. kamptotecin, UV záření)

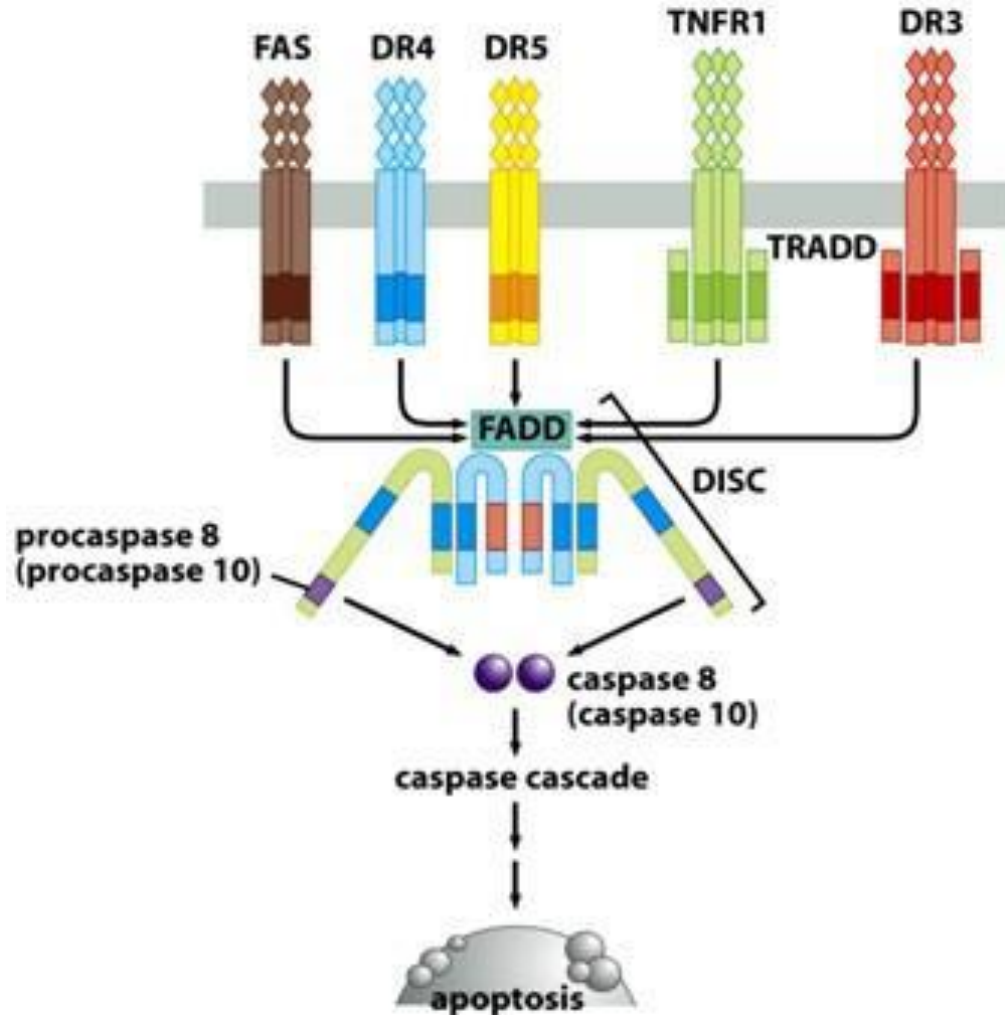
Apoptózu spouštějí dvě signální dráhy: vnitřní a vnější

Vnitřní dráha je závislá na p53

- poškození DNA, nedostatek růstových faktorů a další podněty mohou indukovat apoptózu zprostředkovanou p53
- p53 se podílí na:
 - aktivaci exprese bax, který kóduje pro-apoptotický protein uvolňující cytochrom c z mitochondrií a zajišťuje tak aktivaci kaspáz 9 a 3
 - aktivaci exprese genu kódujícího Fas receptor, tím zvyšuje citlivost buňky k FasL
 - aktivaci exprese genu pro IGF-binding protein 3 a jeho uvolnění do mimobuněčného prostoru, kde vychytává IGF-1 a IGF-2 (anti-apoptotické ligandy)
 - inaktivaci anti-apoptotického faktoru Smac/DIABLO 1.



Vnější dráha je závislá na povrchových receptorech smrti



- receptory smrti jsou transmembránové proteiny schopné vyvolat apoptózu
- receptory jsou závislé na vnějších ligandech
- napojují se na vnitřní (kaspázovou) signalizaci
- stejné projevy jako u vnitřní dráhy

Nádorové buňky se neřídí regulačními signály pro buněčnou smrt

- zdravé buňky mohou žít jen za přítomnosti růstových faktorů, jinak odumírají apoptózou × nádorové buňky přežívají i bez růstových faktorů
- zdravé buňky s poškozenou DNA odumírají apoptózou × nádorové buňky přežívají i s poškozenou DNA
- rezistence k apoptóze je jedním z důvodů prodloužené životaschopnosti nádorových buněk

Apoptóza a nádory

- zvýšená exprese bcl-2 zaznamenána u různých pevných nádorů, leukémií i lymfomů
- zvýšená exprese bcl-2 je nepříznivý faktor: zvýšená odolnost na chemoterapii
- terapie zaměřené na ovlivnění apoptózy se mohou uplatnit při léčbě některých nádorových i nenádorových chorob



Nádory (tumory)

Nádor je patologický stav (nemoc) v důsledku porušené kontroly buněčného dělení

– příčinou porušené regulace je genetická změna nejčastěji 1 somatické (ale i germinativní) buňky

– buňky vycházející z patologického klonu se nekontrolovaně množí (různě rychle) a posléze event. šíří i na další sekundární místa (metastázy)

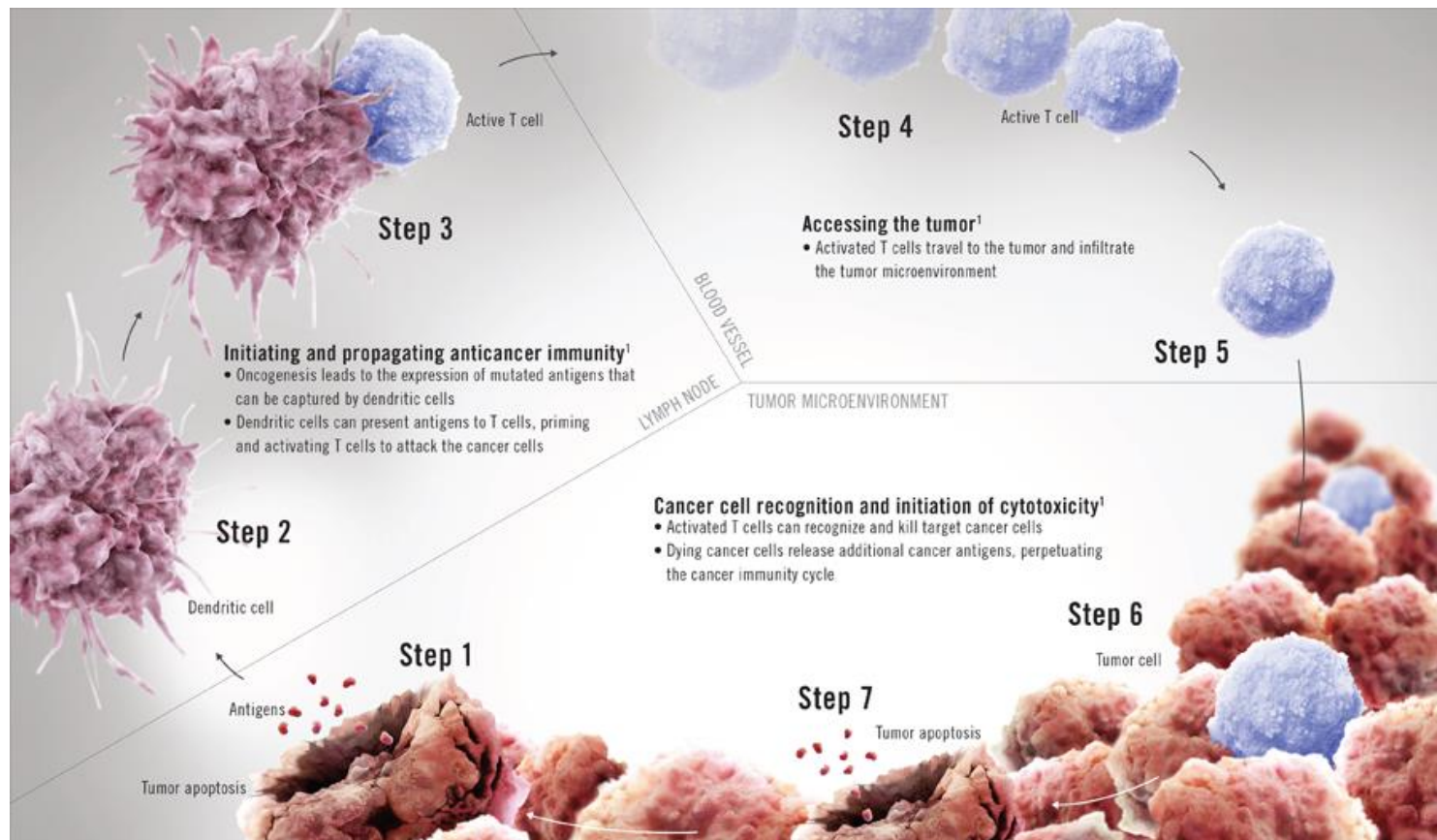
- podle rychlosti proliferace rozlišujeme nádory
 - **benigní** – většinou rostou jen v místě vzniku, nejsou agresivní, zachovávají si diferenciaci
 - **maligní** – rostou rychle, invazivně a šíří se na další místa, nediferencované

Nádory (tumory)

Všechny nádory jsou důsledkem genetické poruchy, a to klíčových genů kontroly buněčného cyklu

- **(proto)onkogenů** – normálně podporují dělení a růst buněk, pokud mutovány dělení je nekontrolované
 - **supresorových genů** – normálně kontrolovaně potlačují dělení, pokud mutovány, umožňují nekontrolované dělení
 - **DNA reparačních genů** – normálně opravují DNA opravitelné změny, pokud mutovány neopravená změna může být přenesena do dceřiných bb.
- pouze některé jsou ovšem zároveň dědičné (tzv. familiární) = mutace v germinativní buňce
- většina nádorů jsou náhodné, tzv. sporadické = mutace v somatické buňce

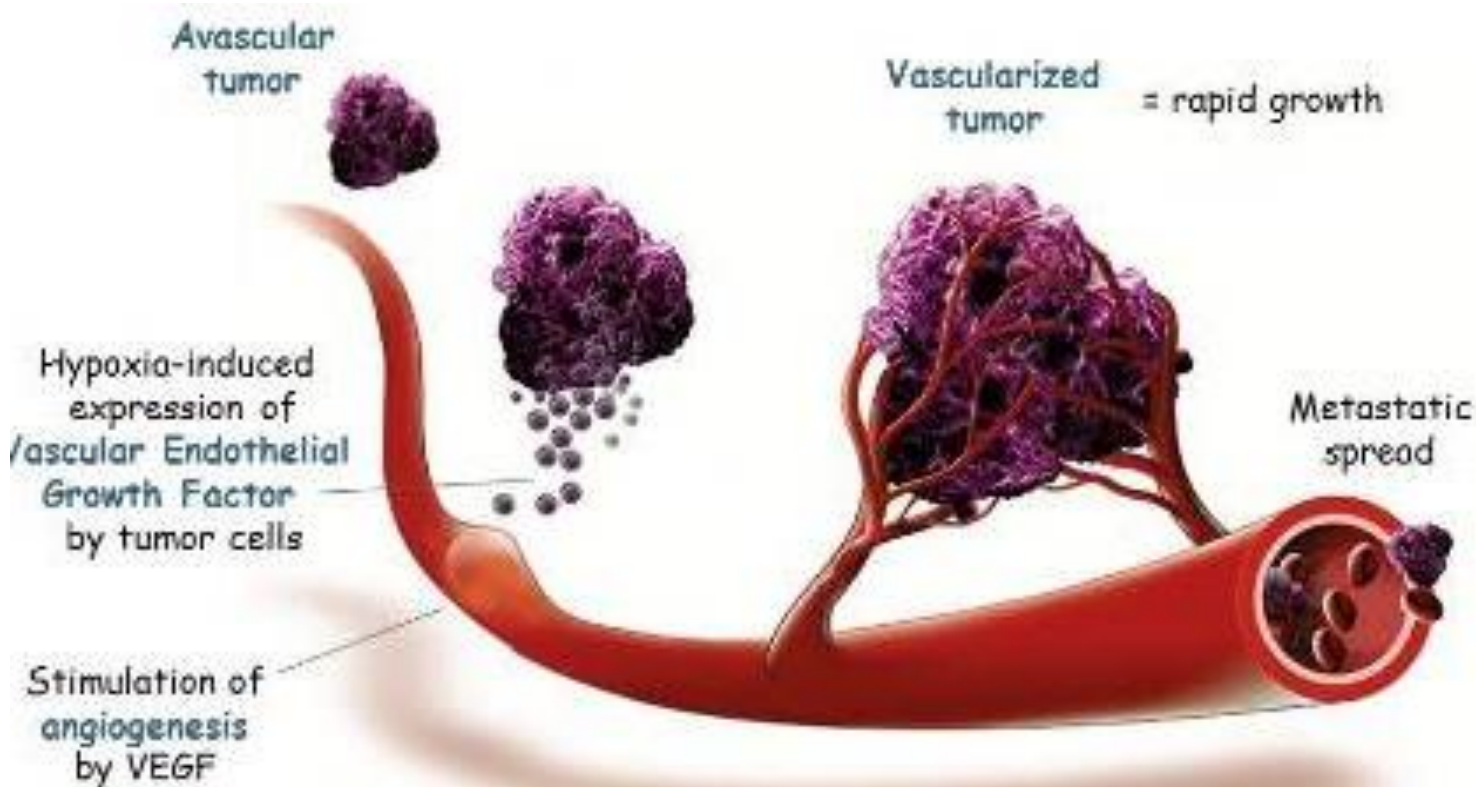
Imunitní systém vs. nádory



- nádorové bb. mají některé imunologické odlišnosti
 - změny přirozených povrchových antigenů (např. ztráta MHC)
 - unikají imunitnímu rozeznání a likvidaci
 - exprese nových (tzv. onkofetálních) antigenů
 - diagnostické markery (např. CEA, α -fetoprotein aj.)
- v protinádorové imunitě se uplatňují cytotoxické mechanismy
 - CD8⁺ T-lymfocyty
 - NK bb

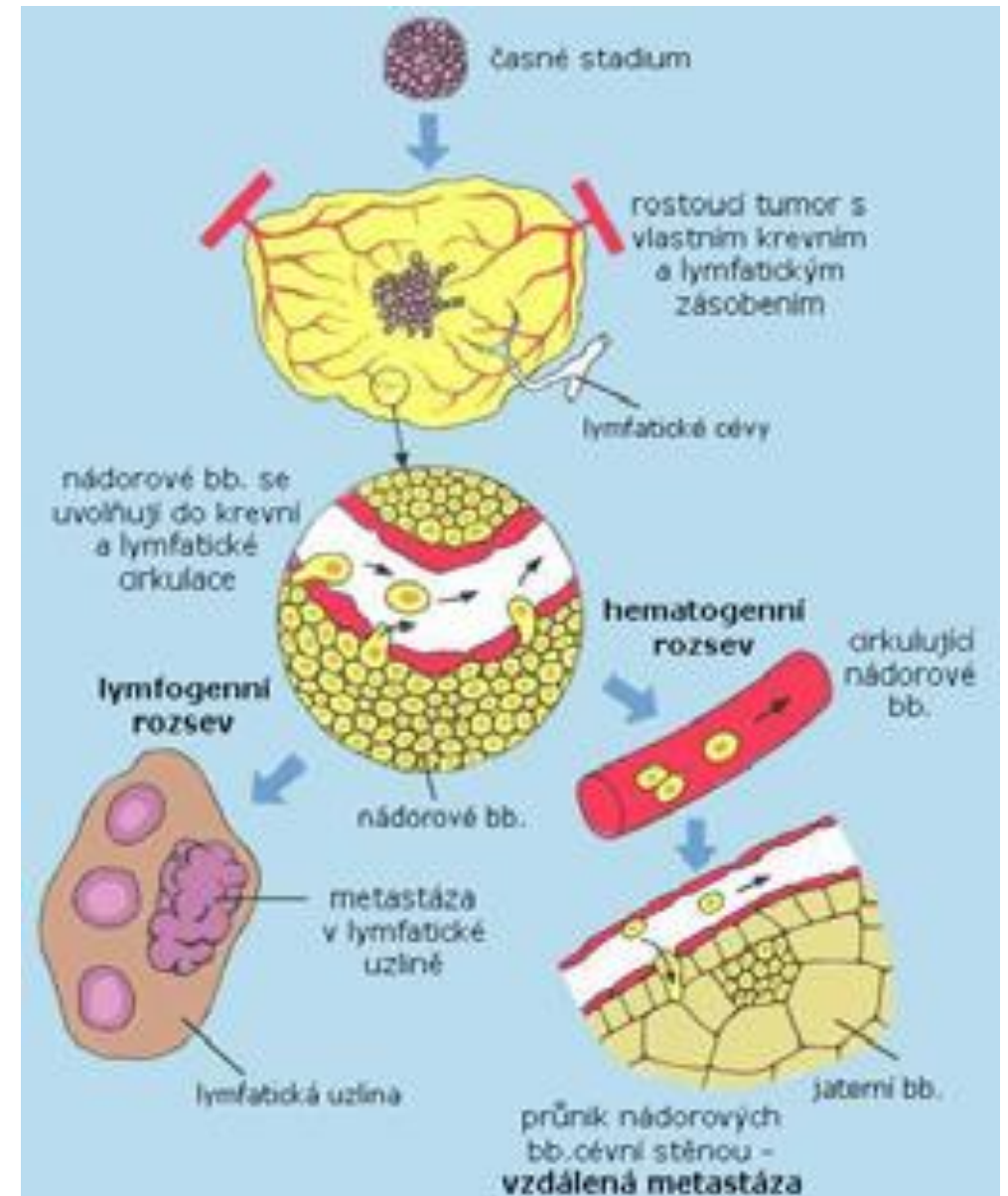
Růst tumoru - angiogeneze

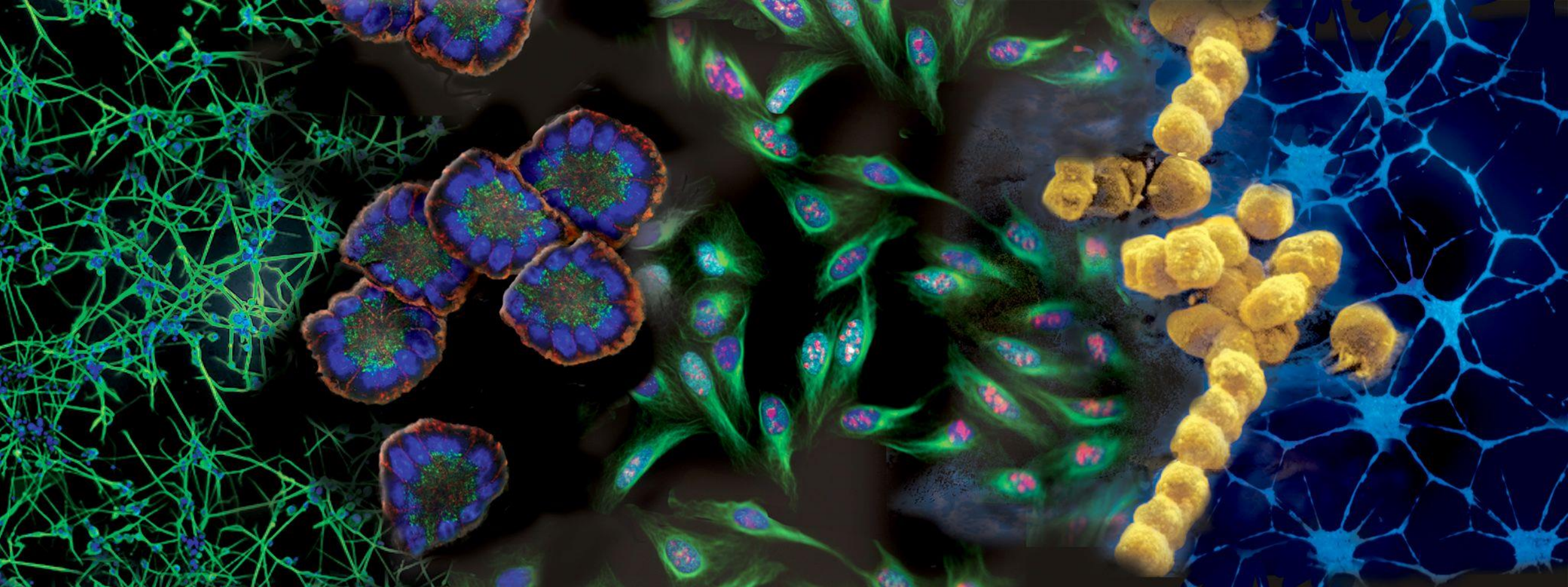
- nádoru obecně převaha proliferace nad zánikem buněk
- **potřeba energie** (kyslík a substráty)
 - buněčná masa velikosti okolo 1mm³ (cca 1×10⁶ buněk) není bez vaskularizace schopna dále růst (proliferace je v rovnováze s apoptózou)
 - v odpovědi na **hypoxii** je produkován hypoxiainducible factor-1 (HIF-1), který po translokaci do jádra ovlivňuje transkripci řady genů, mimo jiné vascular endothelial growth factor (VEGF)
 - tento stimuluje novotvorbu cév (**angiogeneze**) nutných pro další růst nádoru produkce proteolytických enzymů nádor. bb. (matrix metalloproteináz) degraduje extracelulární matrix a umožňuje “pučení” nových cév z existujících
 - proliferace a migrace endotelií je dále potencována angiogenními faktory secernovanými nádorem (např. VEGF, basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor-β (TGF-β), and platelet-derived growth factor (PDGF))
 - novotvořené cévy tumoru umožňují jeho invazi do kr. řečiště a event. vzdálené **metastazování**
- **hormonální stimulace**
 - růst některých tumorů je výrazně potencován hormony (nejč. pohlavními)
 - Ca. prsu, dělohy, vaječníků, prostaty



Metastazování

- vytváření dceřiných nádorů vzdálených od primárního ložiska
 - krví
 - často po směru toku
 - např. z GIT do jater
 - např. venózní krví do plic
 - např. z plic tepennou krví do kostí a mozku
 - lymfou
 - nejprve nejbližší lymf. uzliny, poté vzdálenější





Děkuji za pozornost