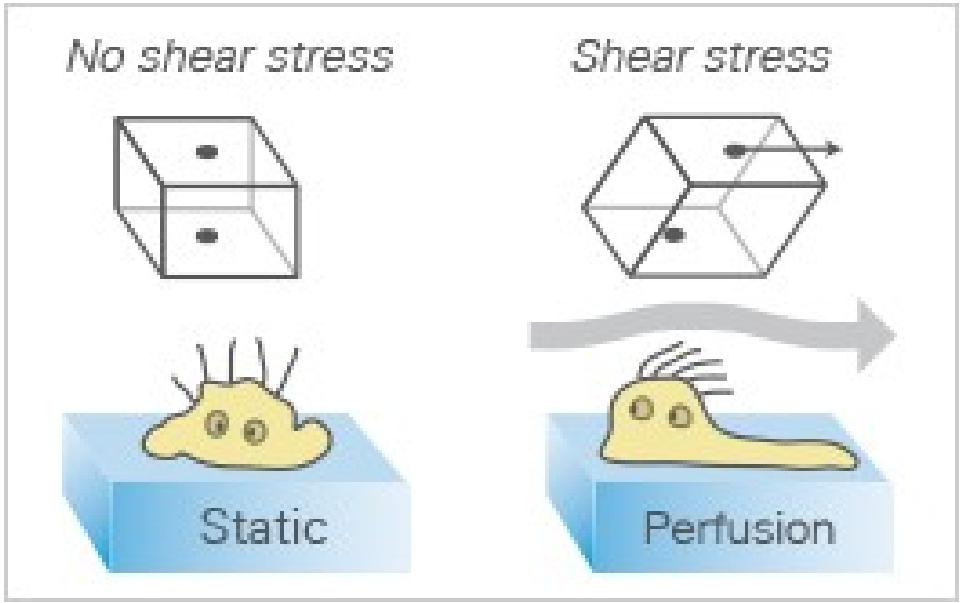
Vývojová biologie

Vliv fyzikálních jevů na vývoj

Tomáš Bárta
tbarta@med.muni.cz



Obsah přednášky

- Úvod
- Mechanosenzing: Cadheriny, Integriny, Hippo
- Smykové síly a vývoj srdce
- Mechanické síly a morfogeneze
- Bonus: Optogenetika
- Bonus: Organoidy
- Závěr

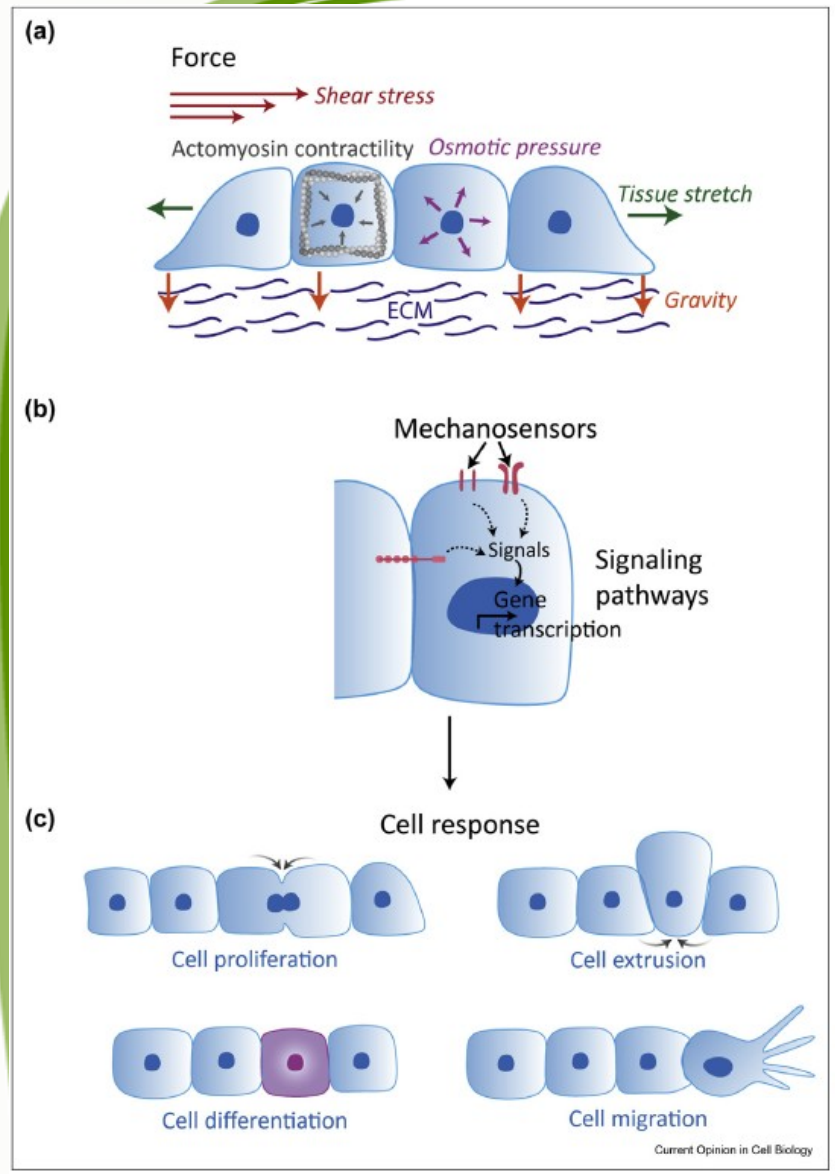
Mechanosensing v embryogenezi

- Mechanická síla je neviditelnou, ale všudypřítomnou součástí biologických systémů.
- Síly, jako je gravitace a osmotický tlak, stanovují fyzikální limity pro tělní plán. A zároveň, buňky embrya využívají tyto síly aby vytvořily složité tvary, které nacházíme v živočišné říši.
- Mechanické síly generované živými buňkami na molekulární úrovni mají velký dopad na embryogenezi.
- Přímým výsledkem působení síly je pohyb, k němuž dochází při separaci chromozomů, migraci buněk nebo skládání tkání.
- Méně přímým, ale stejně důležitým účinkem síly je aktivace mechanosenzitivní signalizace, která umožňuje buňkám zkoumat jejich mechanické okolí a komunikovat mezi sebou na krátké i dlouhé vzdálenosti => mechanické síly jsou způsobem komunikace

Mechanosensing v embryogenezi

- Schopnost buněk „vnímat“ mechanické signály a přetvářet je v biochemické signály.
- A jak/čím „vnímá“?
  - **Iontové kanály**
  - **Primární cilium**
  - **Integriny**
  - **Cadheriny**
  - **Cytoskelet Aktin/Myosin**
  - **Notch**
  - **Receptory růstových faktorů**

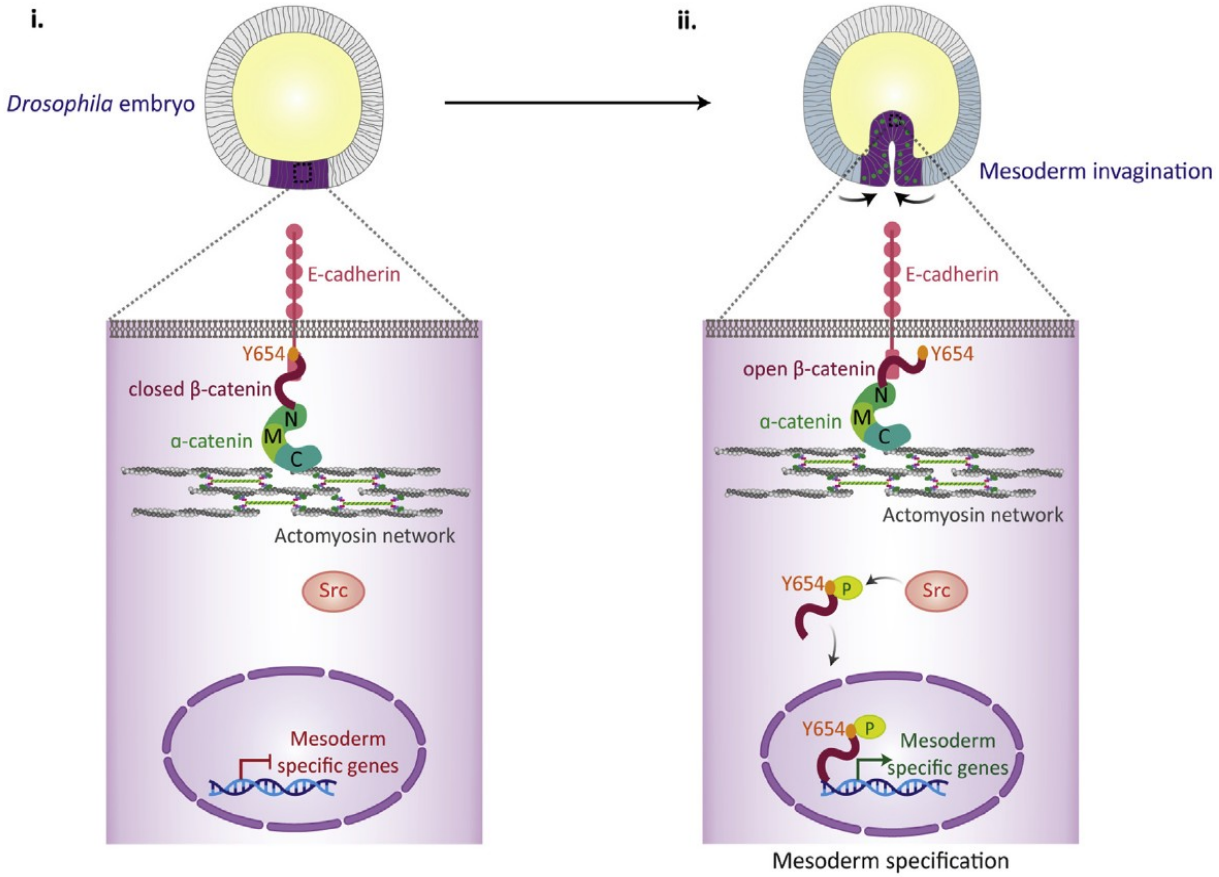
Mechano recepce v embryogenezi



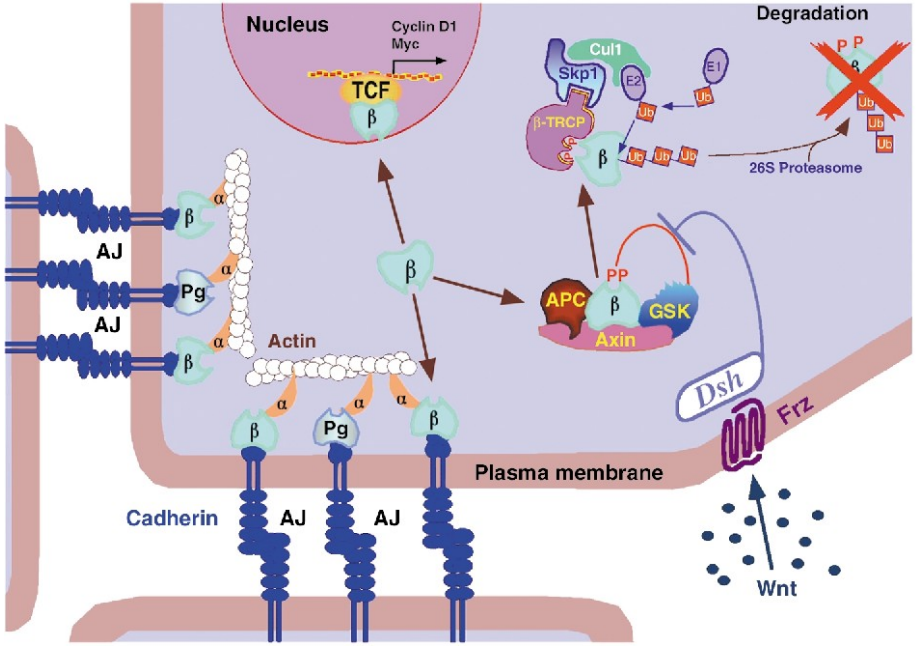
- Na buňku působí mnoho mechanických sil:
  - Vnitřní: osmotický tlak, kontraktility aktinu a myosinu
  - Vnější: smykové napětí, gravitace, natahování
- Síly jsou vnímány a interpretovány mechanosenzory (adhezivní molekuly, iontové kanály), které poté vedou ke změně genové exprese.
- To vede k reakci buňky -> změna morfologie buňky/tkáně

https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.08.007
Current Opinion in Cell Biology

Mechanosensing v embryogenezi – Cadherin/β-catenin - gastrulace a indukce mezodermu



Link na předchozí přednášku

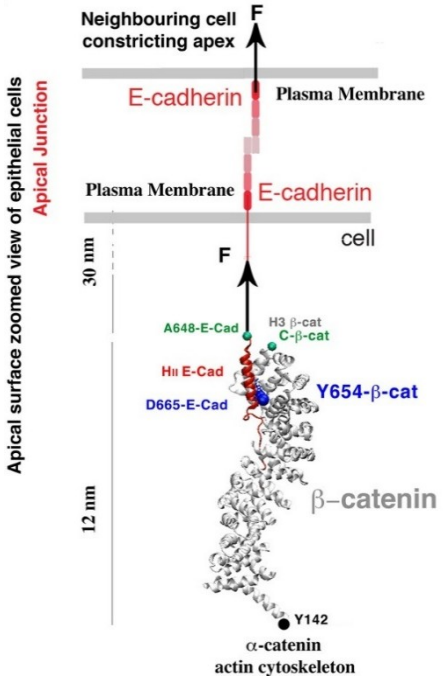


- V průběhu gastrulace dochází k pohybu buněk => působení mechanických sil.
- Tyto síly aktivují β-catenin dráhu, která přispívá ke specifikaci mezodermu tím, že aktivuje expresi genů, které specifikují mezoderm.

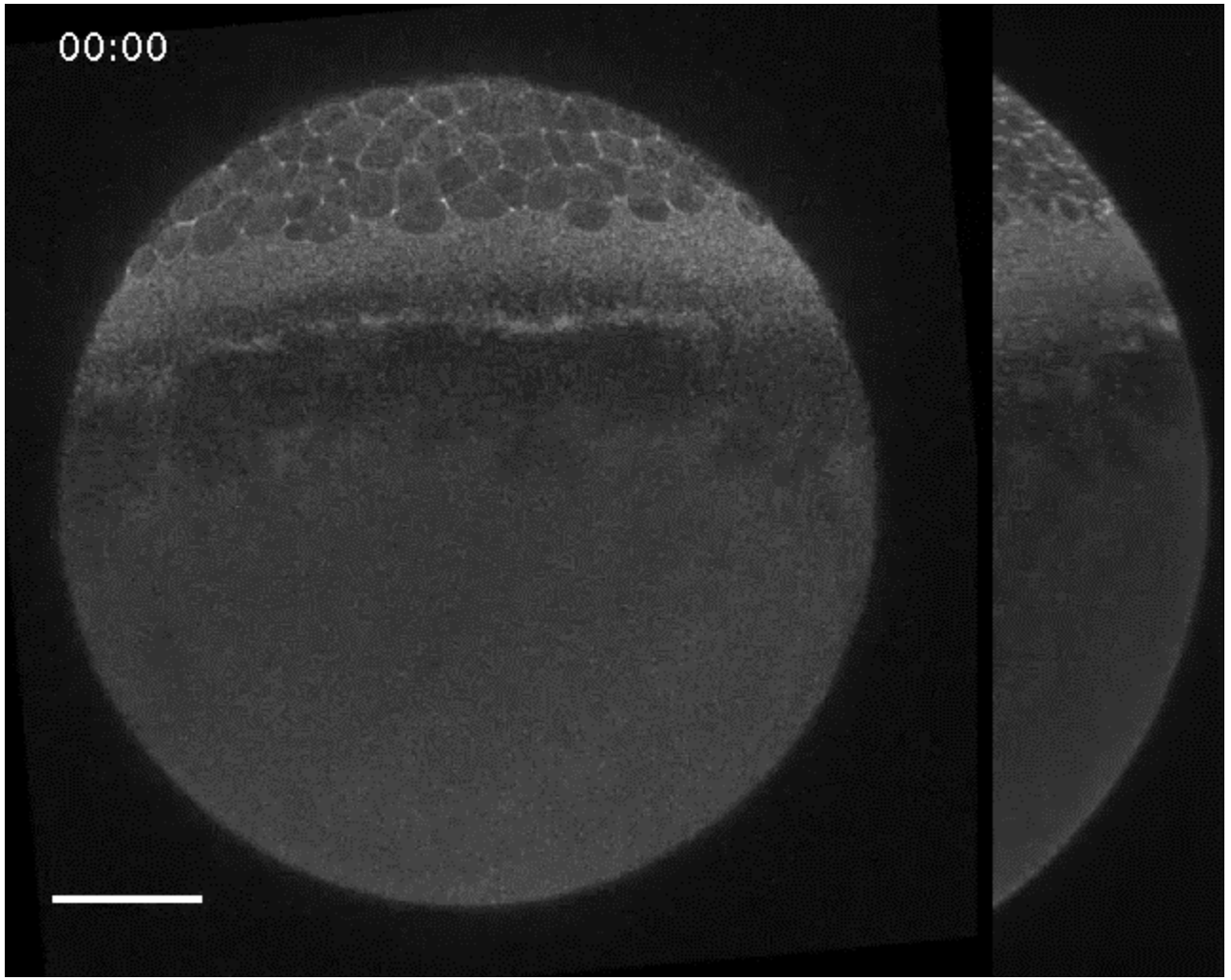
https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.08.007
Current Opinion in Cell Biology

Mechanosensing v embryogenezi – Cadherin/β-catenin - gastrulace a indukce mezodermu

- β-Catenin jako primární molekula v mechanorecepci
  - může být v jádře jako transkripční faktor (změna genové exprese)
  - také strukturální role v adherens junctions (link mezi E-cadherinem a cytoskeletem)
  - Cadherin-catenin-actin „osa“ je pod neustálým mechanickým tlakem nejen v důsledku vnitřní kontraktility aktinu. Externí mechanický stimul působí na mezibuněčné kontakty a zvyšuje tento tlak, což vede ke snímaní mechanického tlaku (1 nm).

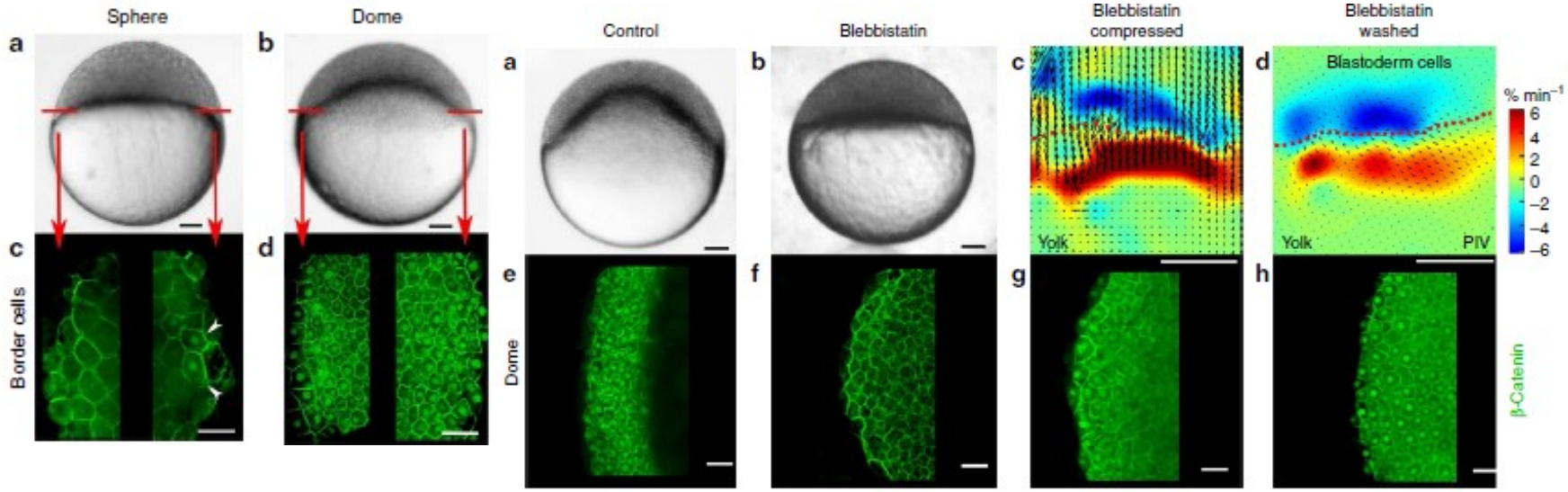


Mechanosensing v embryogenezi – Cadherin/β-catenin - gastrulace a indukce mezodermu



Mechanosensing v embryogenezi – Cadherin/β-catenin - gastrulace a indukce mezodermu

- Zablokování gastrulačních pohybů (genet., farmakol.) vede k inhibici mezodermálních genů – opětovným působením mechanických sil dochází k záchraně fenotypu a expresi mezoderm. genů
- Feedback pro signální dráhy.



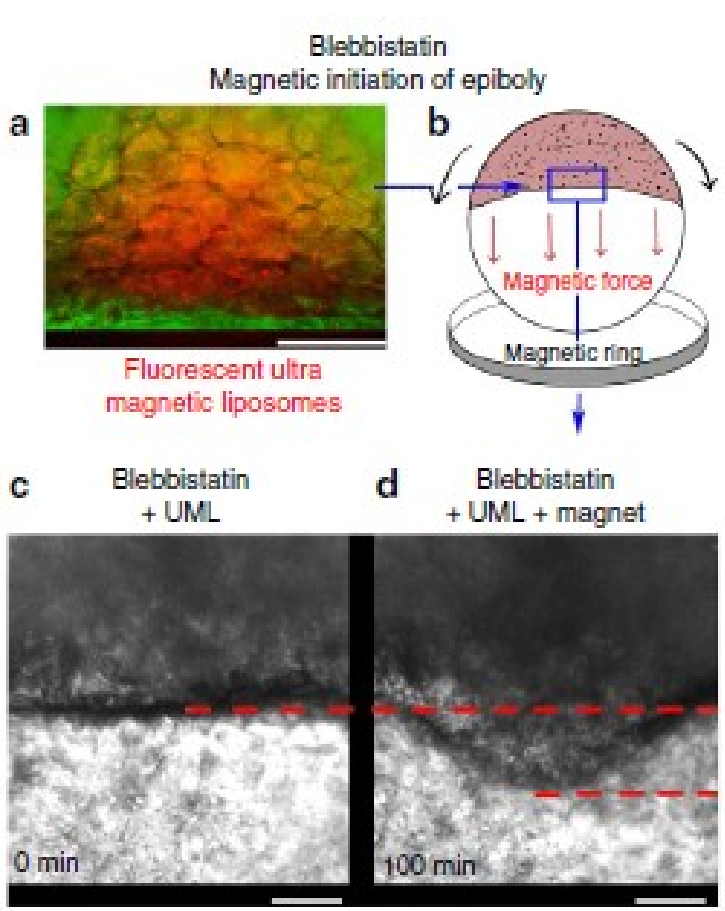
Blebbistatin = specific non-muscle myo-II inhibitor

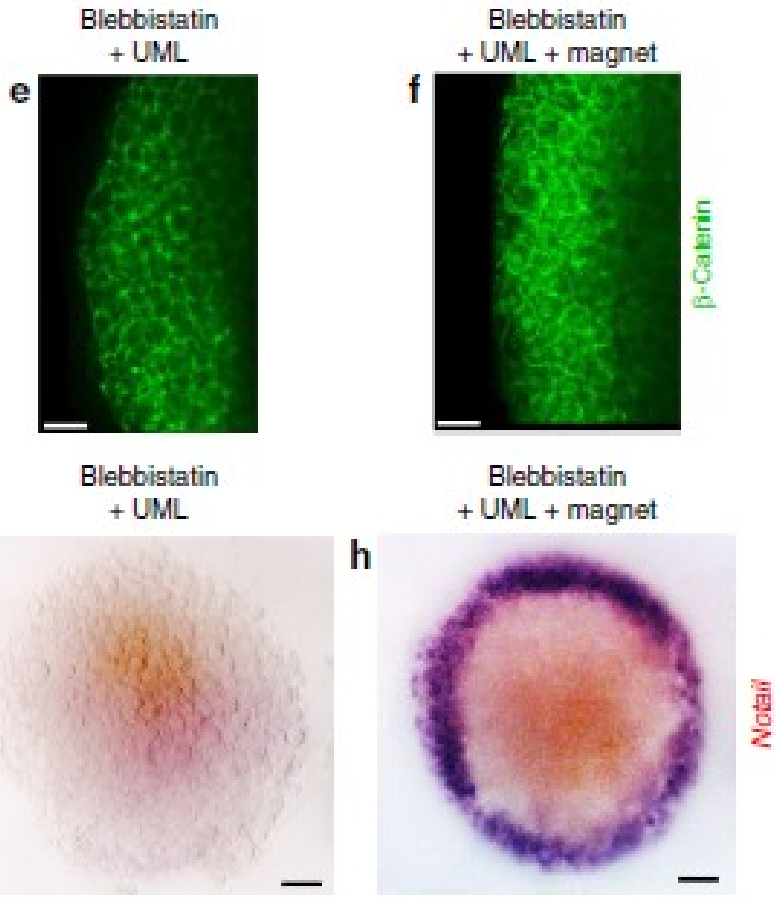
ARTICLE
Received 21 Jun 2013 | Accepted 24 Oct 2013 | Published 27 Nov 2013
DOI: 10.1038/ncomms3821 OPEN

Evolutionary conservation of early mesoderm specification by mechanotransduction in Bilateria

Thibaut Brunet[1,†,*], Adrien Bouclet[1,*], Padra Ahmadi[1], Démosthène Mitrossilis[1], Benjamin Driquez[1],

Mechanosensing v embryogenezi – Cadherin/β-catenin - gastrulace a indukce mezodermu



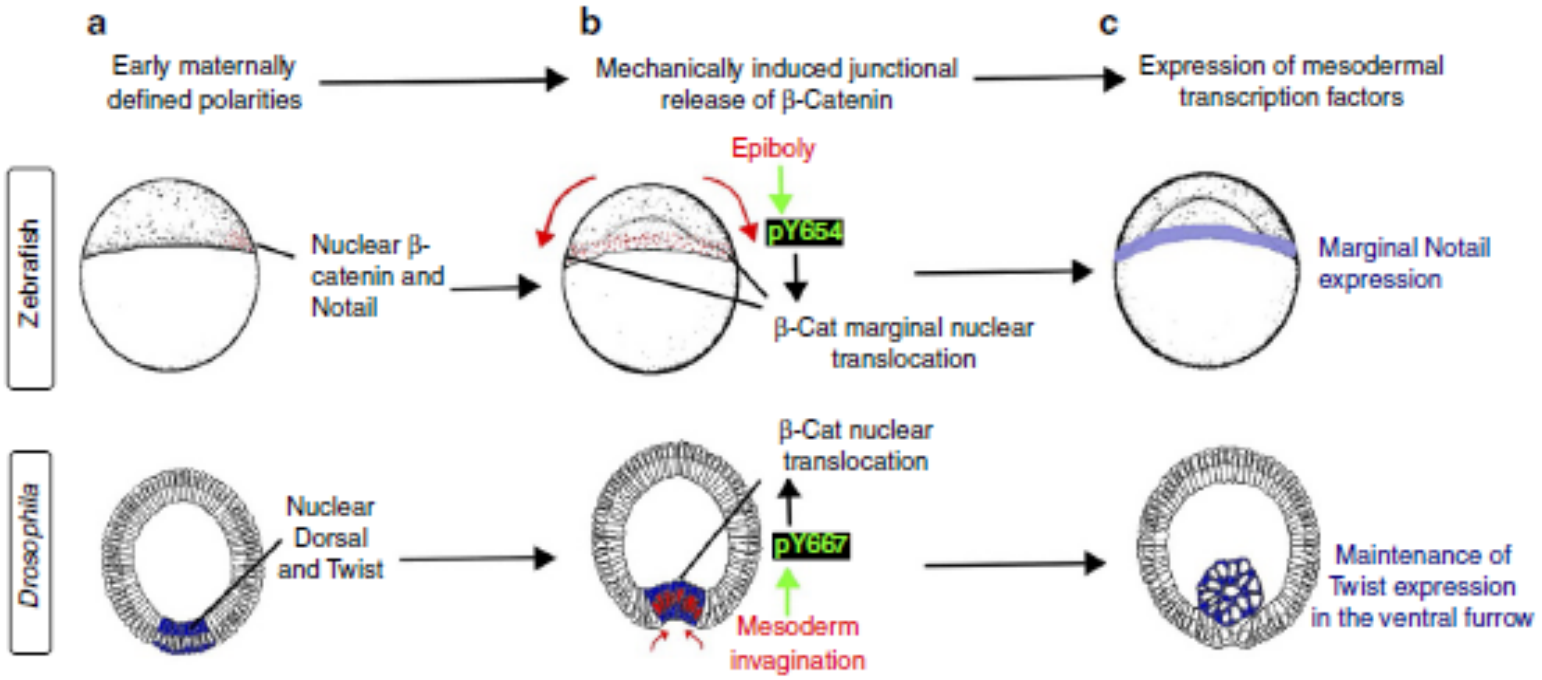


ARTICLE
Received 21 Jun 2013 | Accepted 24 Oct 2013 | Published 27 Nov 2013
DOI: 10.1038/ncomms3821 OPEN

Evolutionary conservation of early mesoderm specification by mechanotransduction in Bilateria

Thibaut Brunet[1,†,*], Adrien Bouclet[1,*], Padra Ahmadi[1], Démosthène Mitrossilis[1], Benjamin Driquez[1],

Mechanosensing v embryogenezi – Cadherin/β-catenin - gastrulace a indukce mezodermu



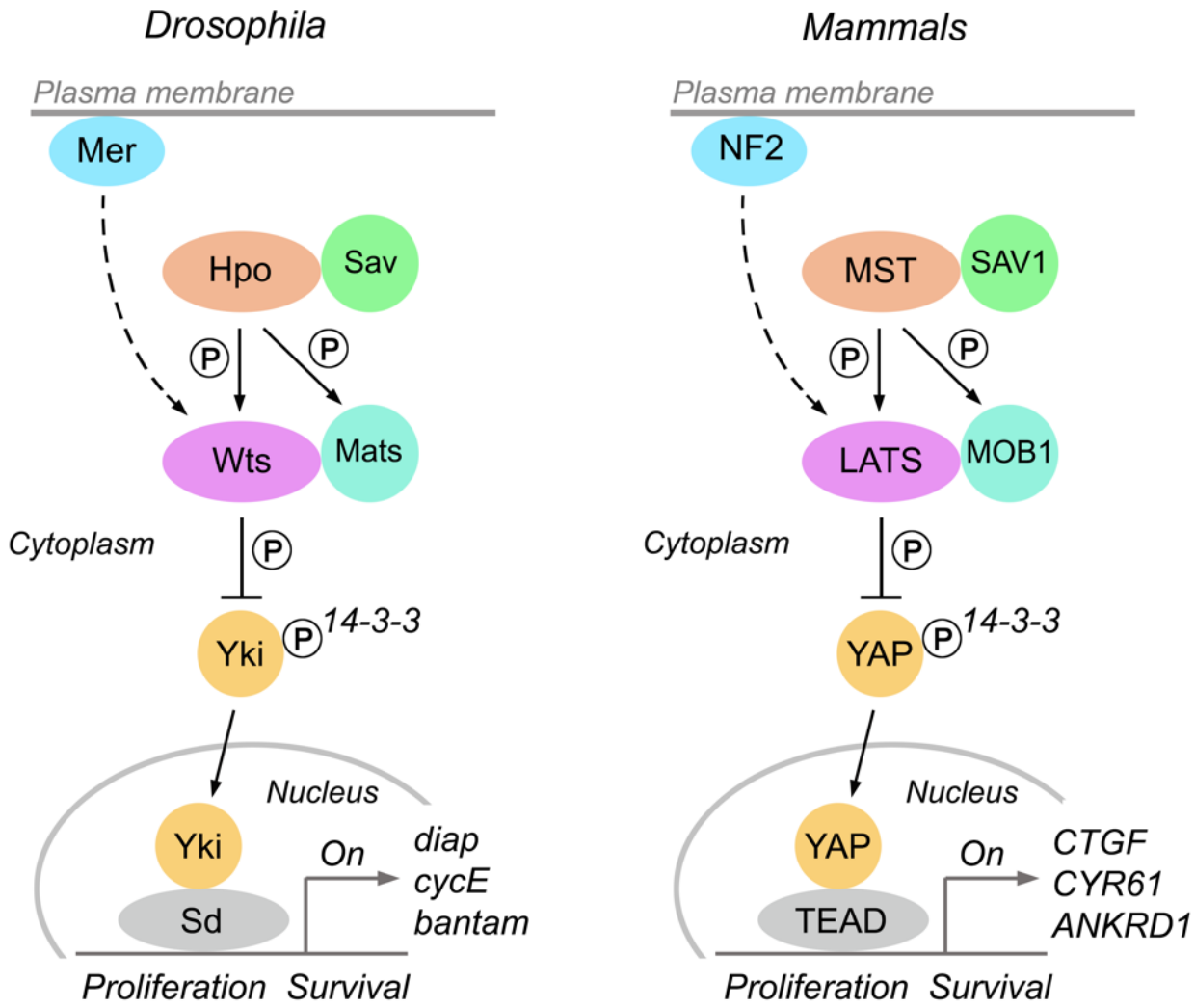
ARTICLE
Received 21 Jun 2013 | Accepted 24 Oct 2013 | Published 27 Nov 2013
DOI: 10.1038/ncomms3821 OPEN

Evolutionary conservation of early mesoderm specification by mechanotransduction in Bilateria

Thibaut Brunet[1,†,*], Adrien Bouclet[1,*], Padra Ahmadi[1], Démosthène Mitrossilis[1], Benjamin Driquez[1],

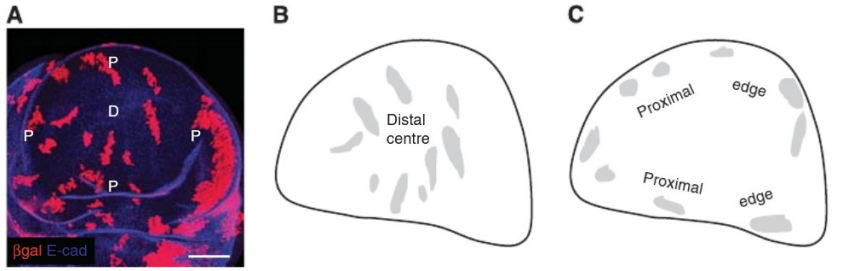
Mezibuněčný mechanosenzing a růst tkání - Hippo

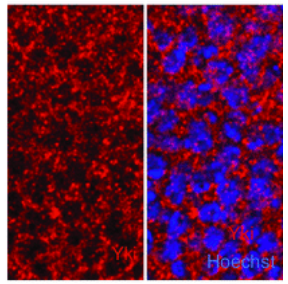
Hippo nejen v regulaci velikosti



Intercelulární tenze a růst tkání - Hippo

- Tuhost ECM, hustota buněk, tlak cytoskeletu ovlivňují lokalizaci YAP/Yki
- Mol. Mechanismus je nejasný

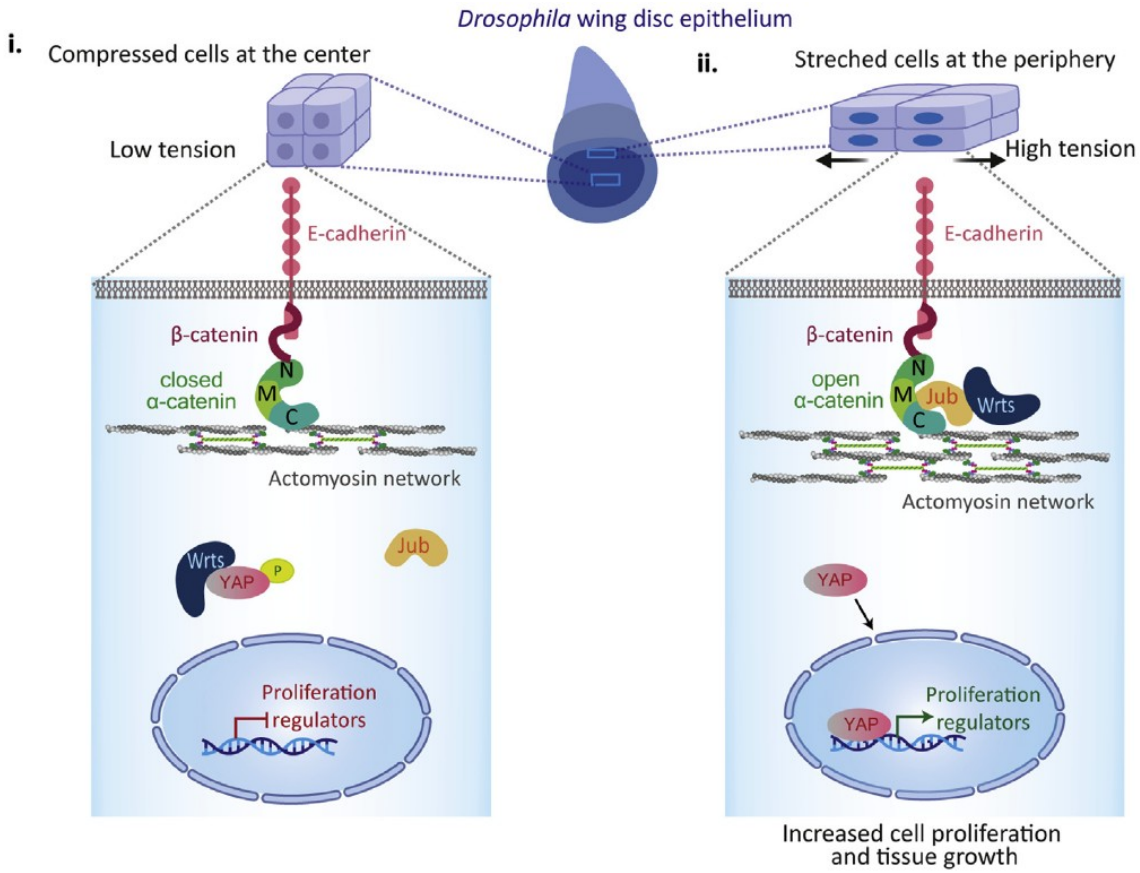




Differential proliferation rates generate patterns of mechanical tension that orient tissue growth

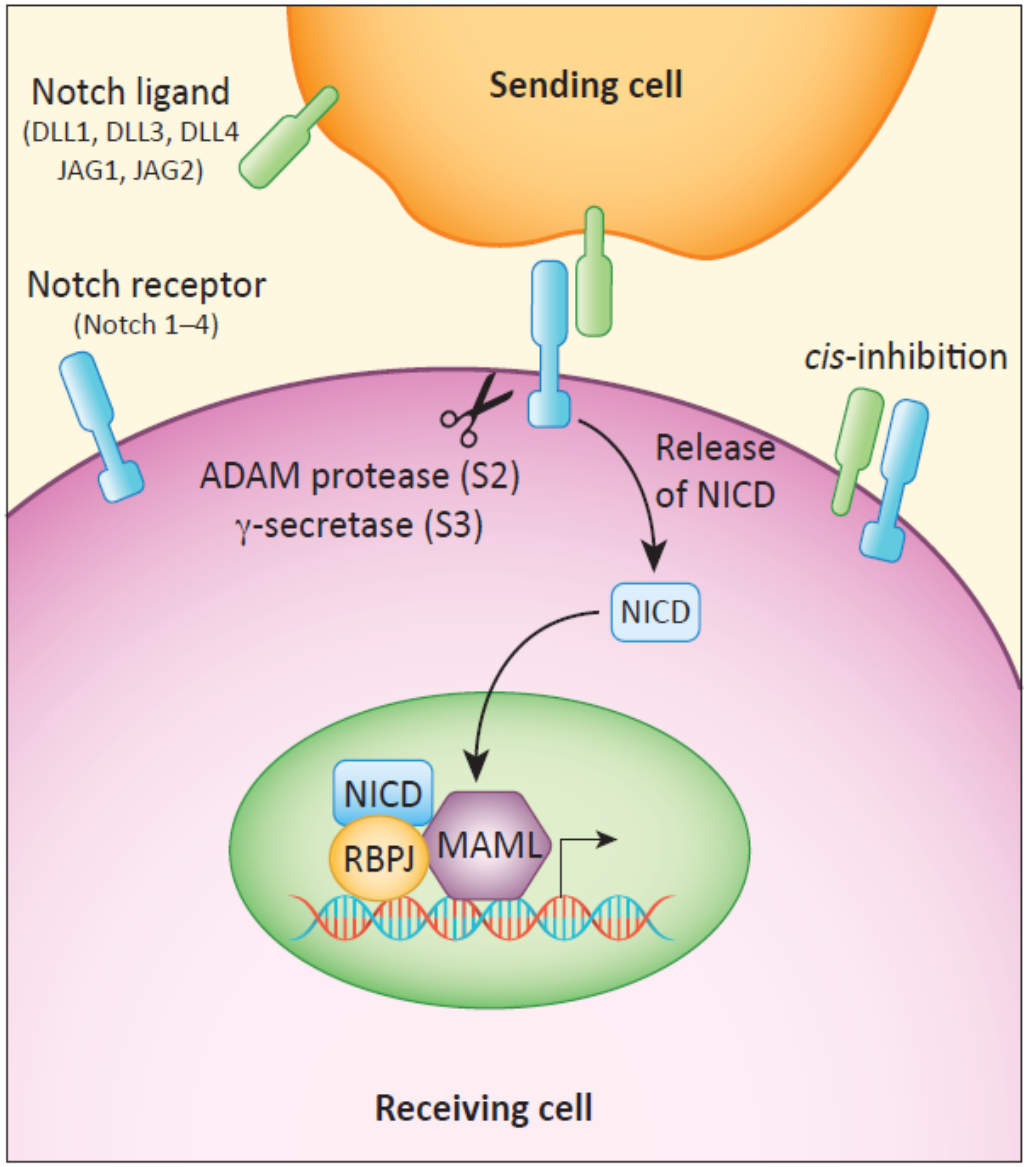
Yanlan Mao[1,5], Alexander L Tournier[2,5,*], Andreas Hoppe[3], Lennart Kester[1], Barry J Thompson[4] and Nicolas Tapon[1,*]

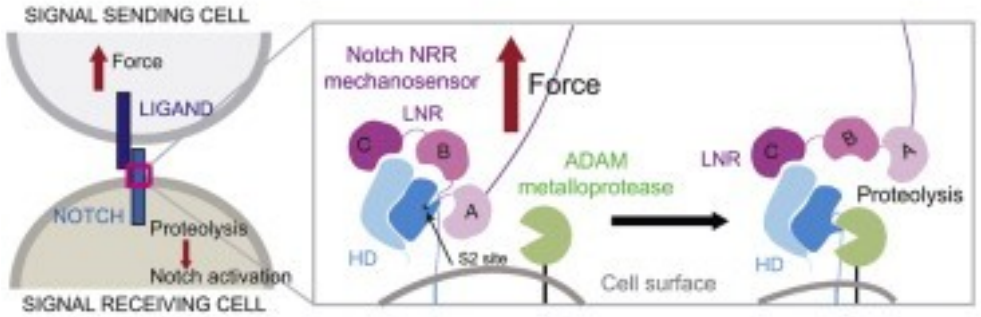
(Lecuit and Le Goff, 2007). I
development, the orientation
major influence on the shape a



https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.08.007
Current Opinion in Cell Biology

NOTCH

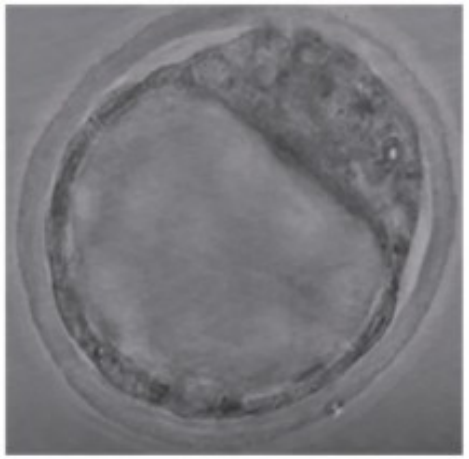

Notch ligand
(DLL1, DLL3, DLL4
JAG1, JAG2)
Sending cell
Notch receptor
(Notch 1–4)
cis-inhibition
ADAM protease (S2)
γ-secretase (S3)
Release
of NICD
NICD
NICD
RBPJ
MAML
Receiving cell


SIGNAL SENDING CELL
Force
LIGAND
NOTCH
Proteolysis
Notch activation
SIGNAL RECEIVING CELL
Notch NRR
mechanosensor
LNR
Force
ADAM
metalloprotease
S2 site
Cell surface
HD
Proteolysis

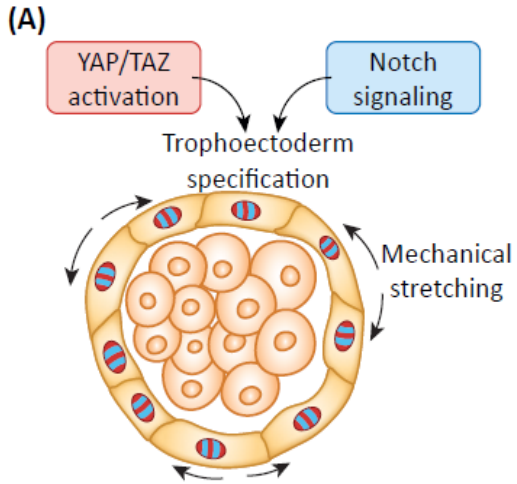
NOTCH

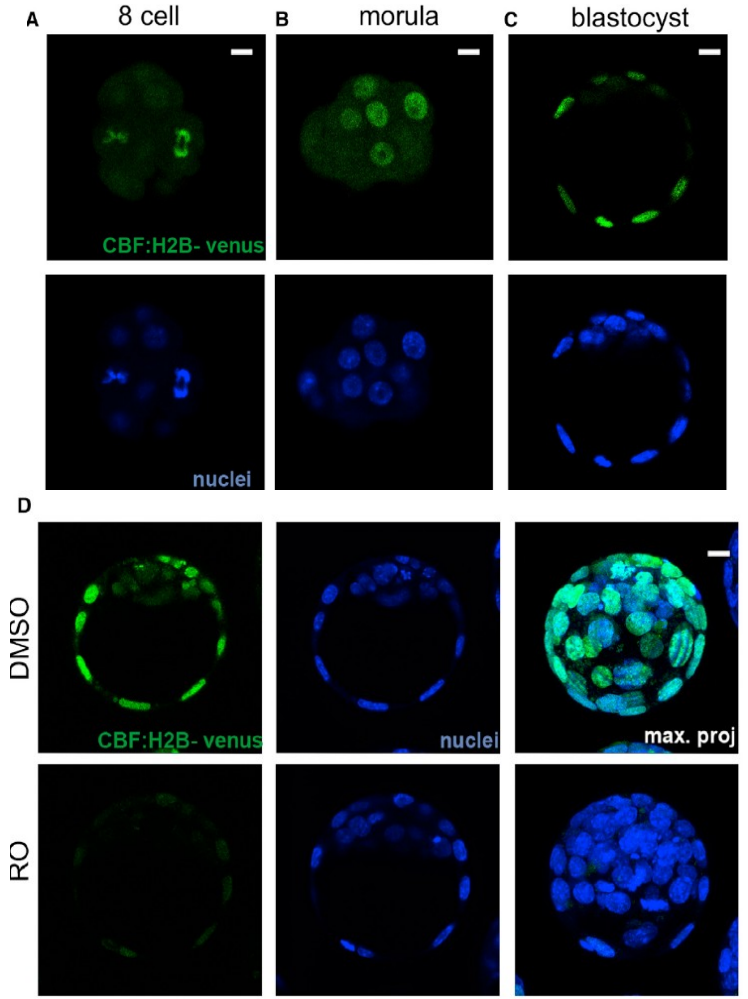
- Po oplození, savčí zygota během cca 4dní produkuje cca 100 buněk.
  - Embryoblast (ICM): Oct4, Nanog, Sox2
  - Trophectoderm (TE): CDX2
  - Tyto faktory determinují jednotlivé buněčné linie, jak ale jednotlivé linie vznikly?

- Pozice blastomer v embryu. Rozdílná polarita a adheze buněk.

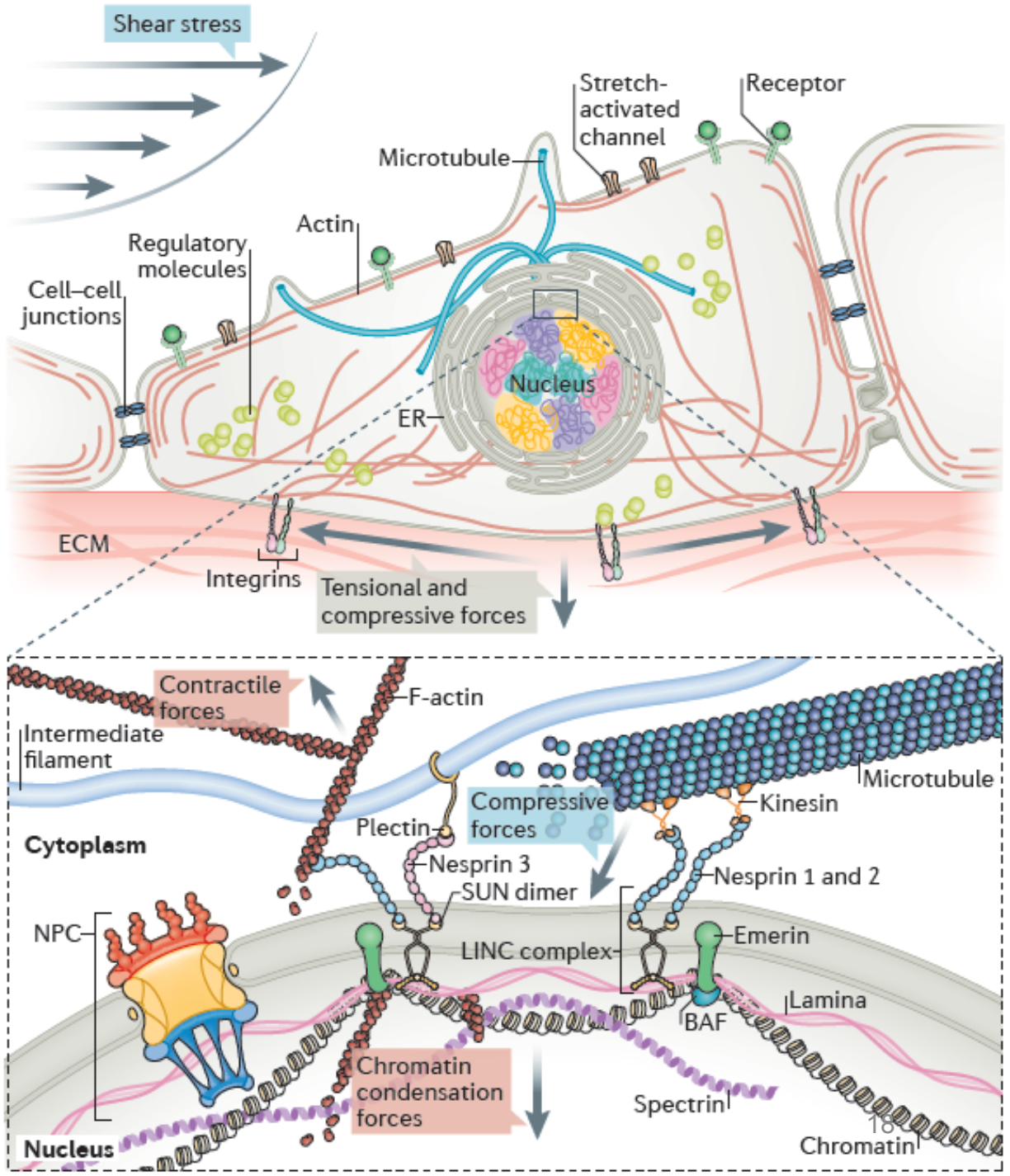


NOTCH


(A)
YAP/TAZ activation
Notch signaling
Trophoectoderm specification
Mechanical stretching


A
8 cell
B
morula
C
blastocyst
CBF:H2B- venus
nuclei
D
DMSO
RO
CBF:H2B- venus
nuclei
max. proj

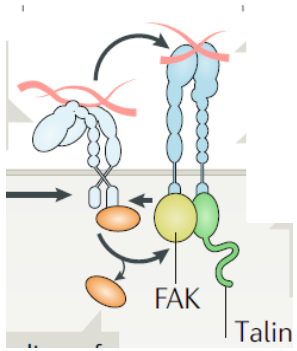
Integriny

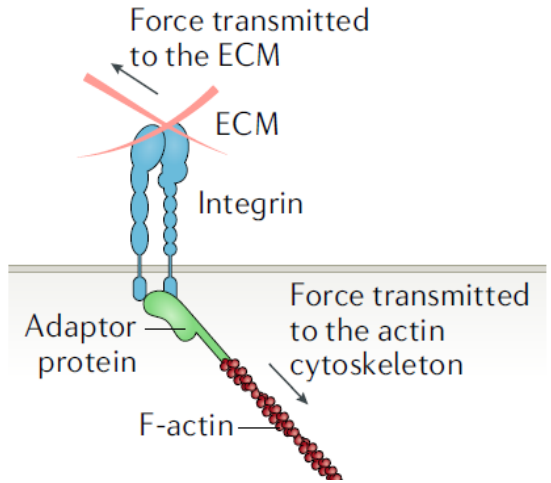


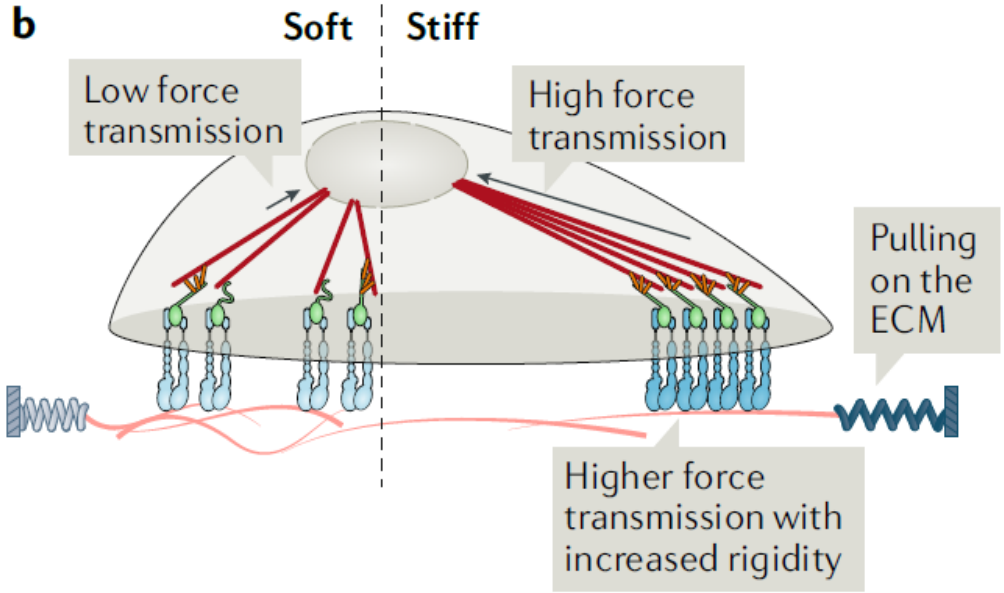
Regulation of genome organization and gene expression by nuclear mechanotransduction

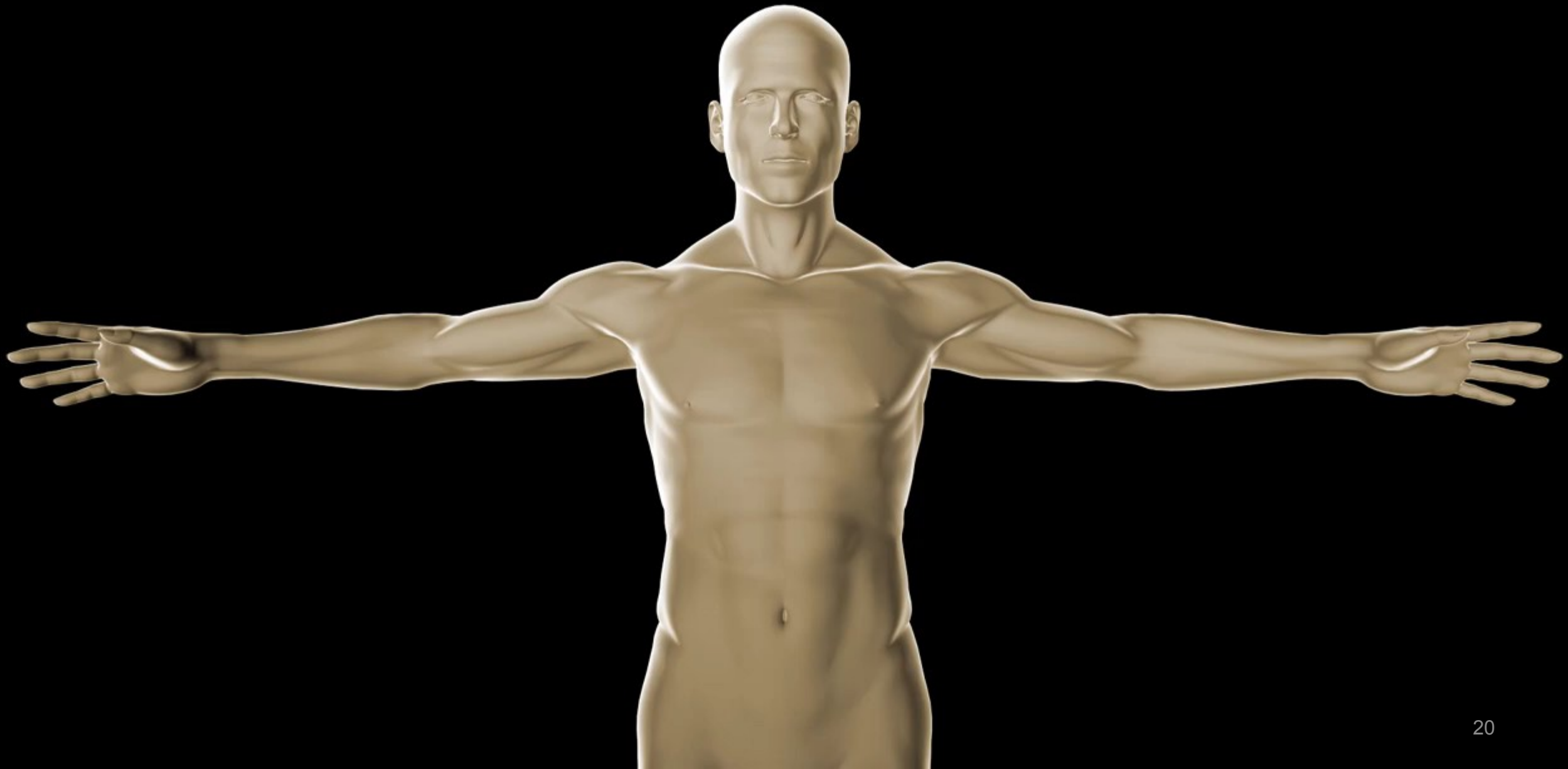
Caroline Uhler[1] and G. V. Shivashankar[2,3]

Integriny

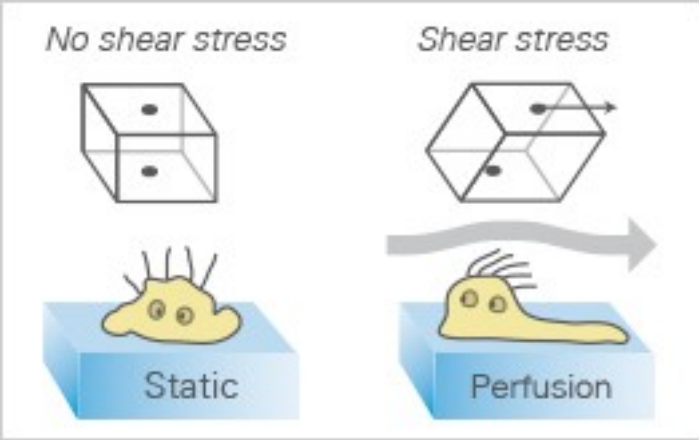

FAK
Talin


Force transmitted
to the ECM
ECM
Integrin
Adaptor
protein
Force transmitted
to the actin
cytoskeleton
F-actin


b
Soft
Stiff
Low force
transmission
High force
transmission
Pulling
on the
ECM
Higher force
transmission with
increased rigidity

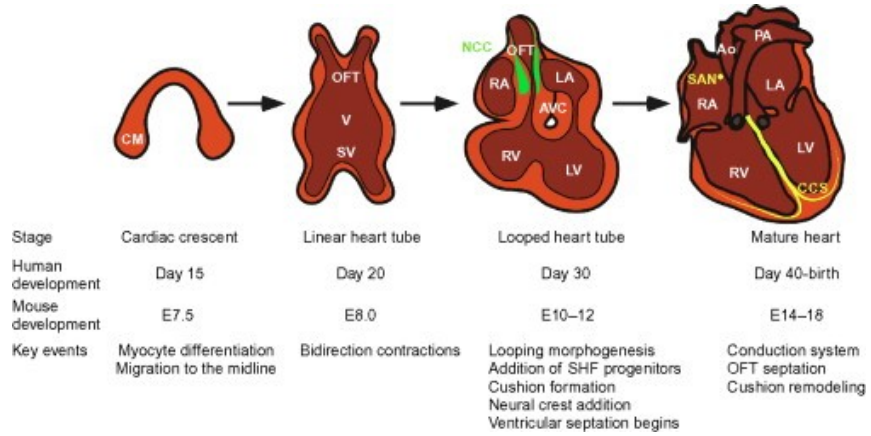


Smykové síly

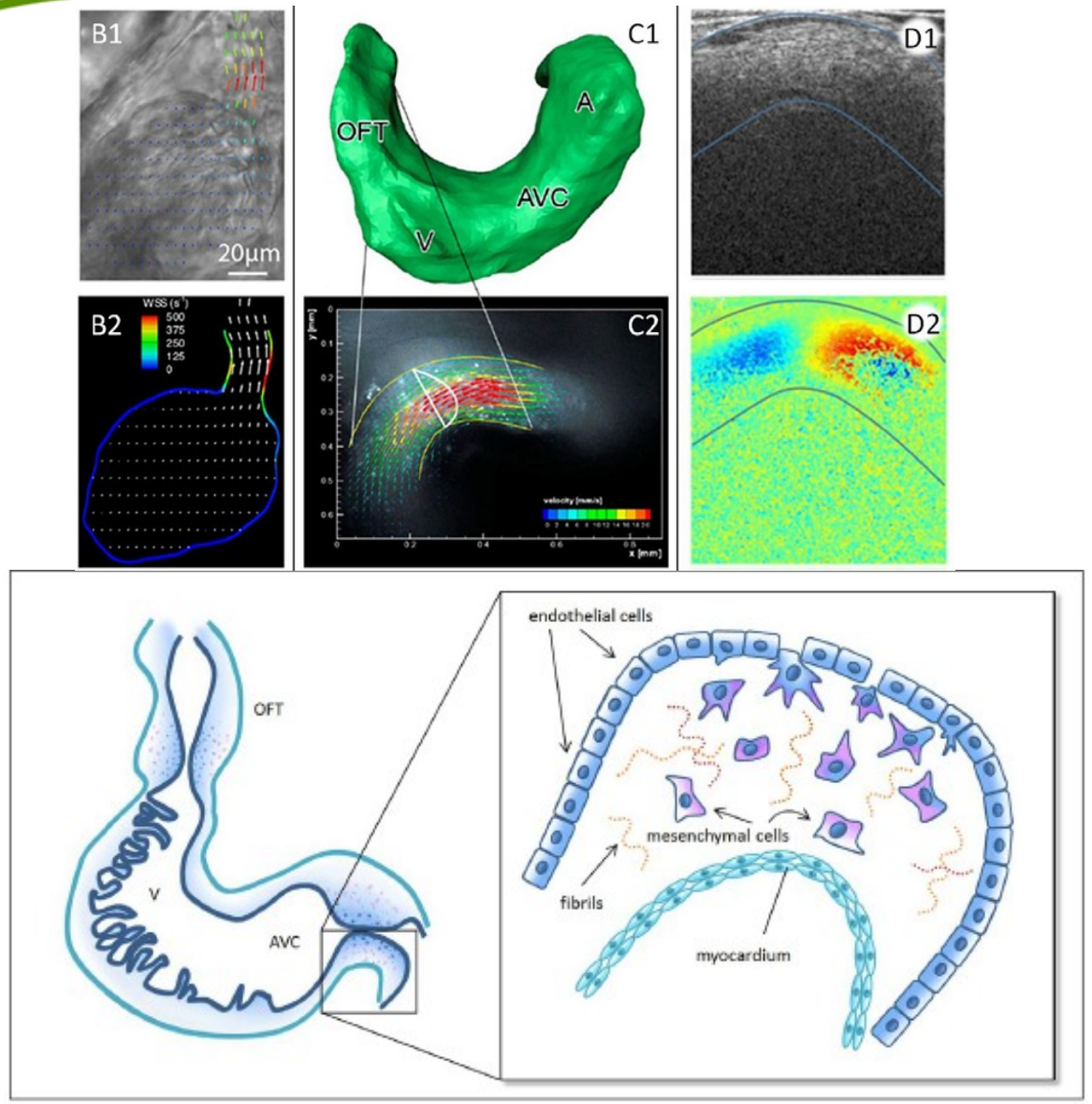


Smykové síly a vývoj srdce

- Srdce začíná svůj vývoj jako trubice a postupně se vyvíjí do podoby vícekomorového aparátu.
- V průběhu vývoje ale neustále čerpá krev.
- Tlak krve vyvíjí smykové síly na endoteliální buňky.
- Smykové síly jsou vnímány endoteliálními buňkami => má vliv na jejich uspořádání a fyziologii.



Smykové síly a vývoj srdce

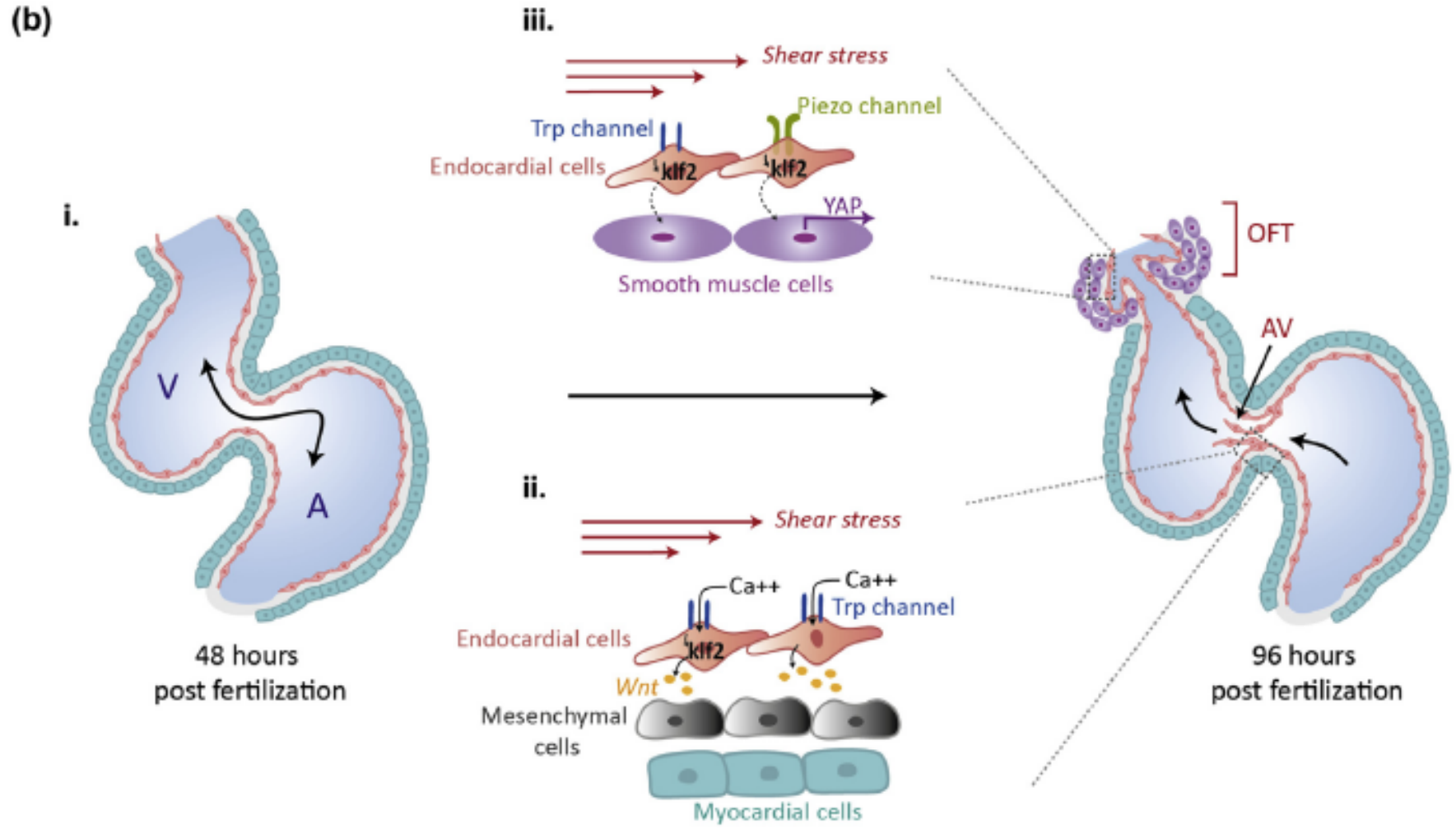


Influence of blood flow on cardiac development

Katherine Courchaine [1], Graham Rykiel [1], Sandra Rugonyi*

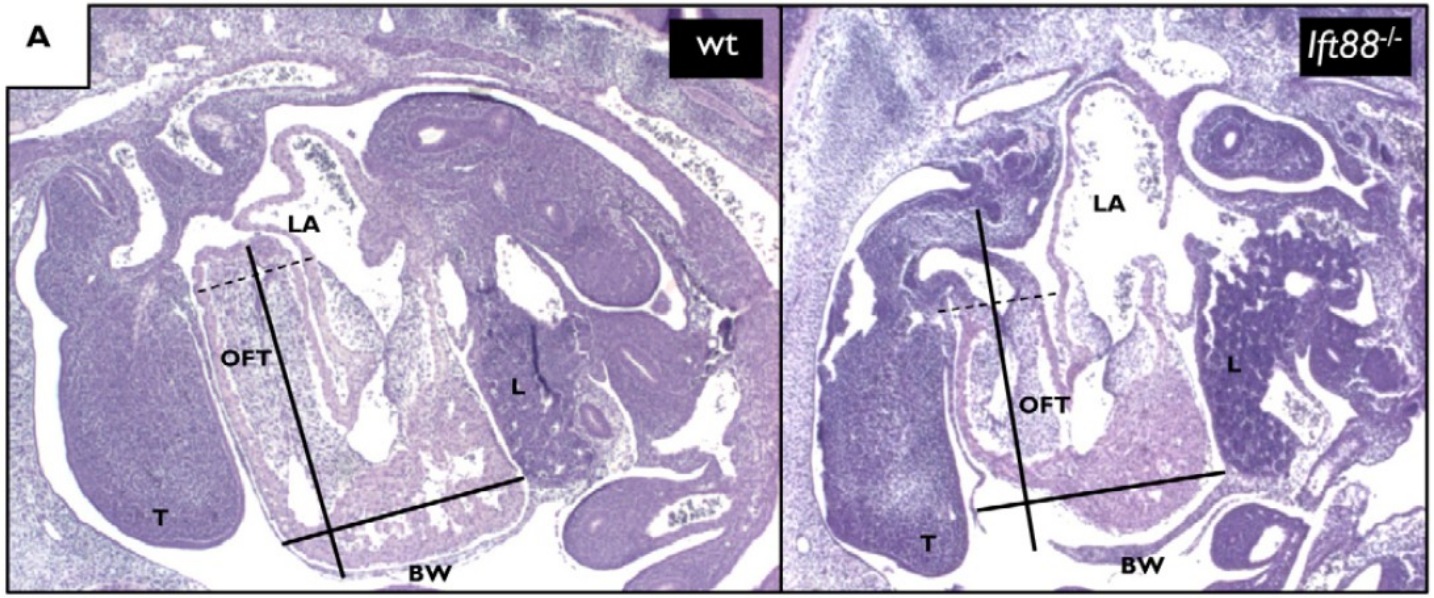
Biomedical Engineering, School of Medicine, Oregon Health & Science University, Portland OR, USA

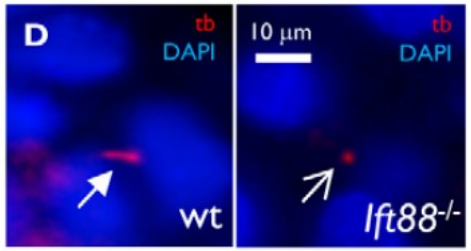
Smykové síly a vývoj srdce



Smykové síly a vývoj srdce

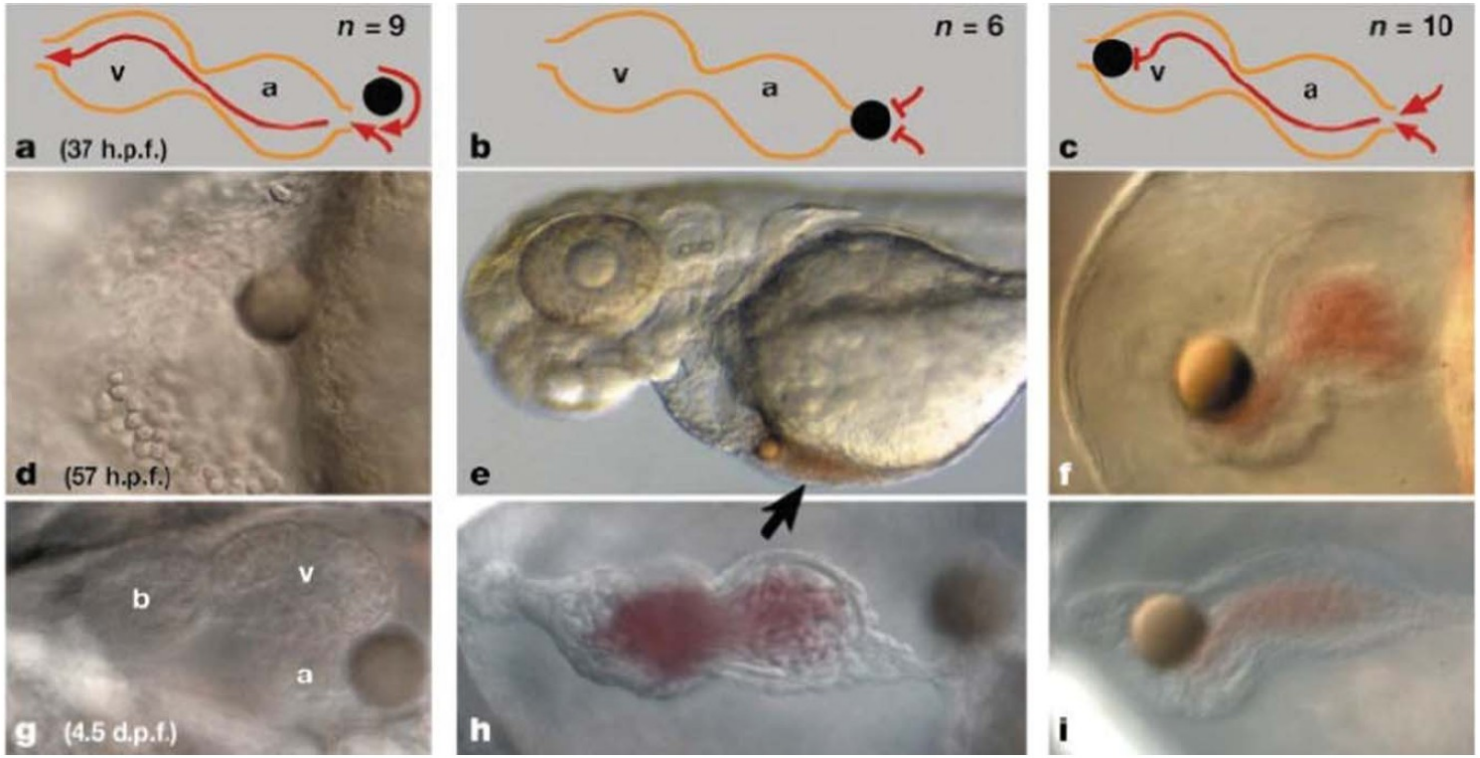
Porušení smykových sil (geneticky, chirurgicky, změna viskozity) vede k poruchám vývoje chlopní





Vývoj srdečních chlopní tedy závisí na vnímání smykových sil mechanosenzitivními kanály v endoteliálních buňkách, tím se určí správné místo pro vývoj chlopně a aktivaci příslušných genů.

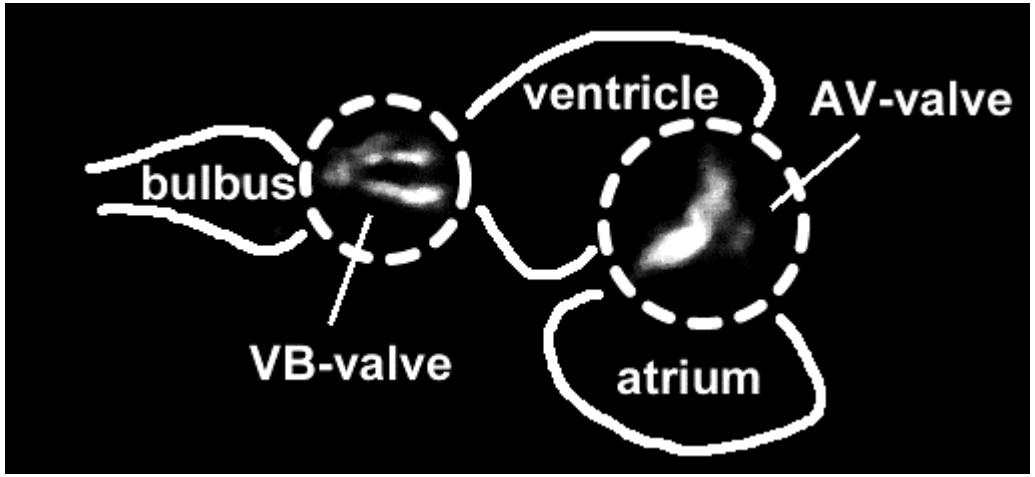
Smykové síly a vývoj srdce

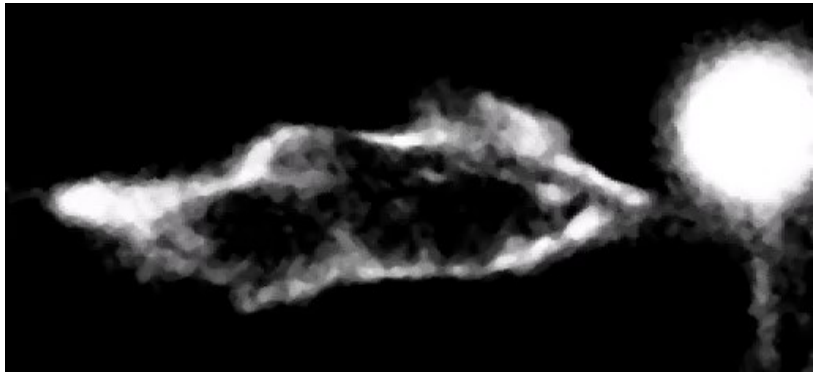


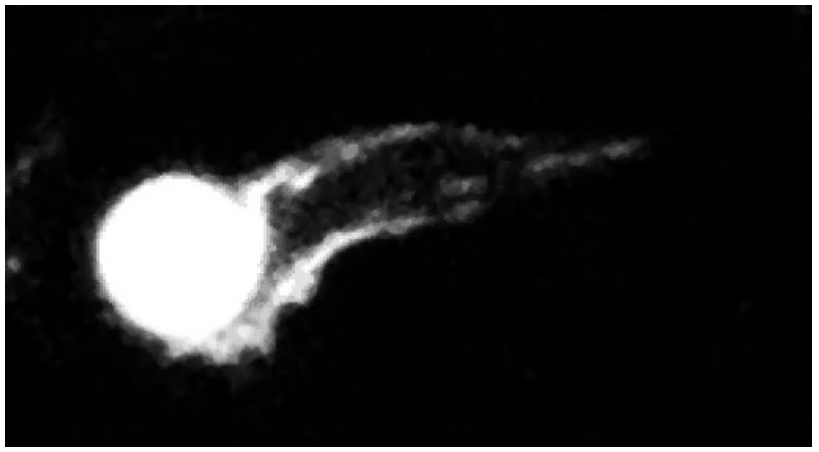
Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis

Jay R. Hove*†, Reinhard W. Köster†‡, Arian S. Forouhar*, Gabriel Acevedo-Bolton*, Scott E. Fraser‡ & Morteza Gharib*

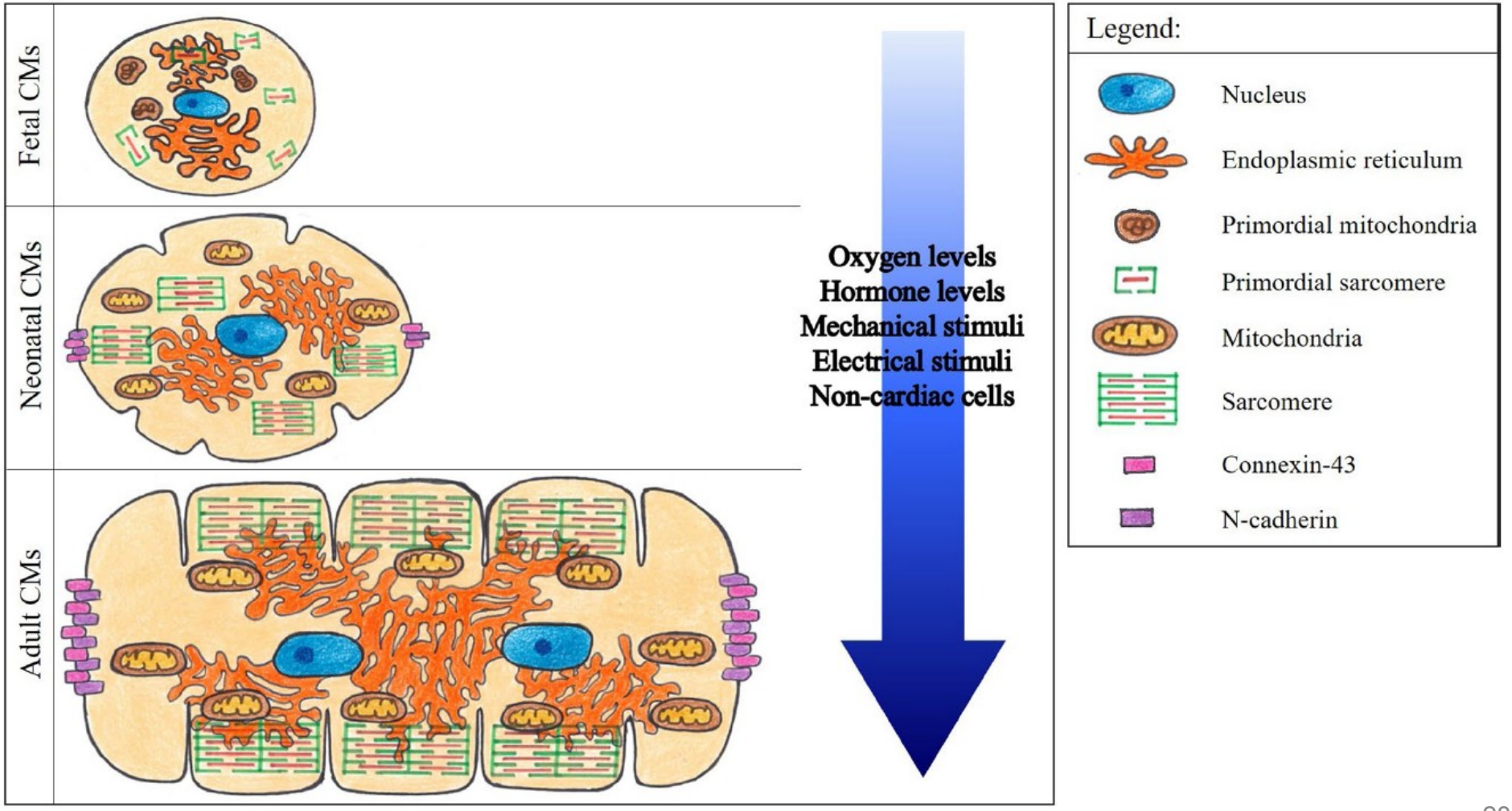
Smykové síly a vývoj srdce

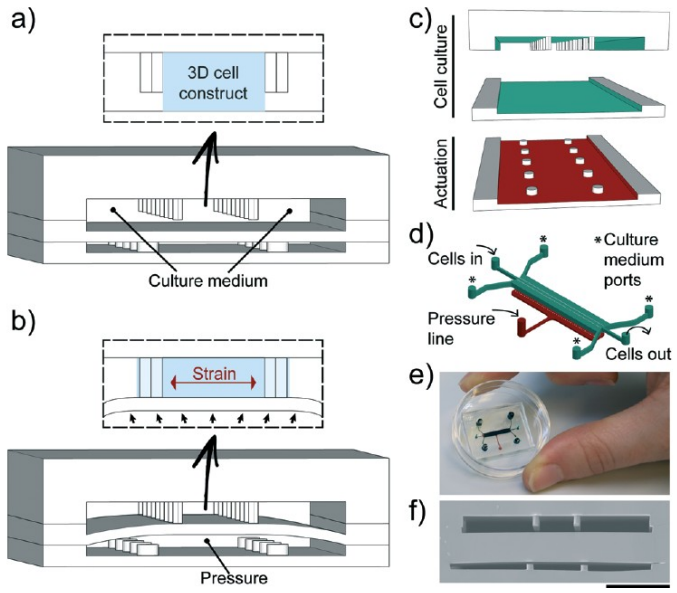


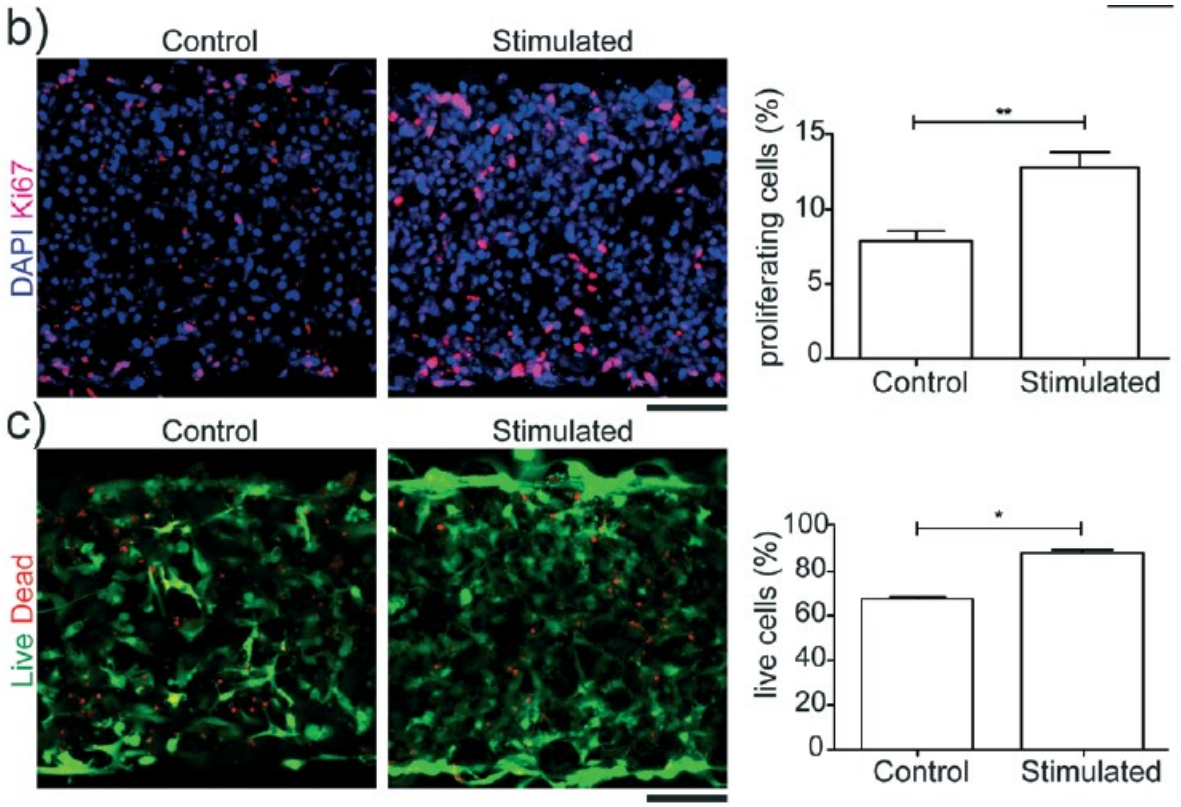




Food for thought







Beating heart on a chip: a novel microfluidic platform to generate functional 3D cardiac microtissues†‡

Anna Marsano,*[a] Chiara Conficconi,§[ab] Marta Lemme,§[ab] Paola Occhetta,[b] Emanuele Gaudiello,[a] Emiliano Votta,[b] Giulia Cerino,[a] Alberto Redaelli[b] and Marco Rasponi*[b]

Lab on a Chip

Video related to research article appearing in *Lab on a Chip*

Anna Marsano, Chiara Conficconi, Marta Lemme, Paola Occhetta, Emanuele Gaudiello, Emiliano Votta, Giulia Cerino, Alberto Redaelli and Marco Rasponi

"Beating heart on a chip: a novel microfluidic platform to generate functional 3D cardiac microtissues"

Read the article at
http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2015/LC/C5LC01356A

Mechanické síly a morfogeneze

- Během vývoje mechanické síly způsobují změny ve tvaru, velikosti, počtu i pozici buněk, což je doprovázeno změnou genové exprese => dopad na morfogenezi.
- všechny tyto buněčné procesy, které vedou ke změně tvaru tkáně, jsou určitou formou síly mezi jednotlivými buňkami, běžně zprostředkovanou adhezí mezi buňkami.

Tato síla je generována prostřednictvím:

- Aktinu
- Polymerizaci mirkotubulů
- Osmotickým tlakem
- Molekulárními motory - Myosin

Mechanické síly a morfogeneze

- Změny cytoskeletu jsou přenášeny na sousedící buňky a ECM prostřednictvím propojení cytoskeletu na adhezivní molekuly, které zajišťují interakci buňka-buňka, buňka-ECM (cadheriny, integriny).
- Aktin-myosin kontrakce a interakce zprostředkovaná cadheriny, jsou základní a evolučně konzervované mechanismy, které generují a přenášejí síly pro utváření morfogeneze (viz differential adhesion hypothesis/equlibrium state v předášce ECM a buněčná adheze – všechny síly v rovnováze, stav nejnižší energie).

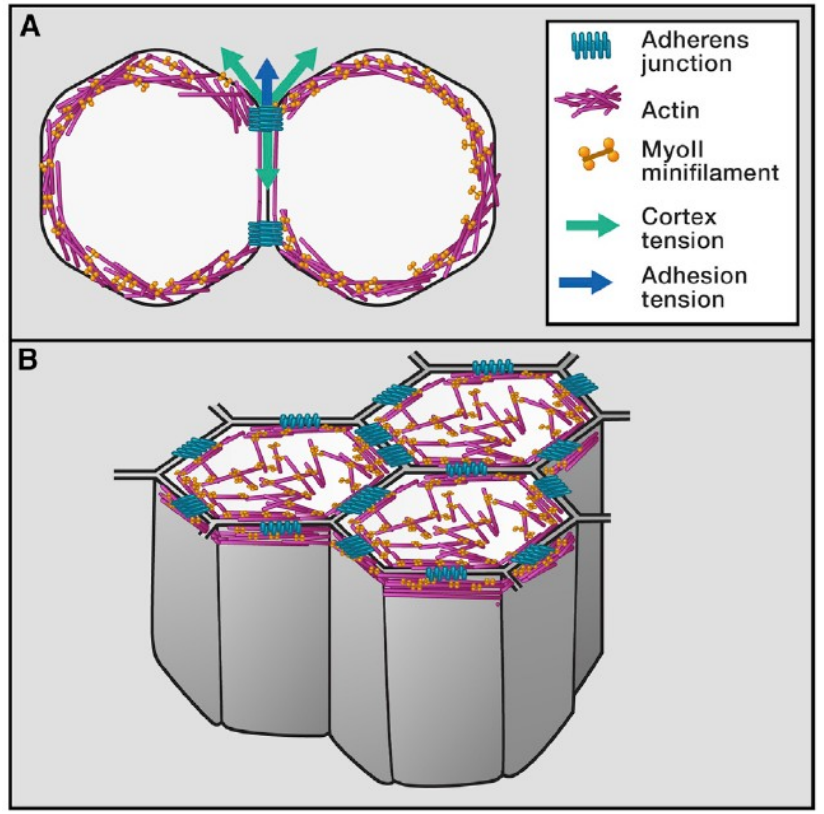
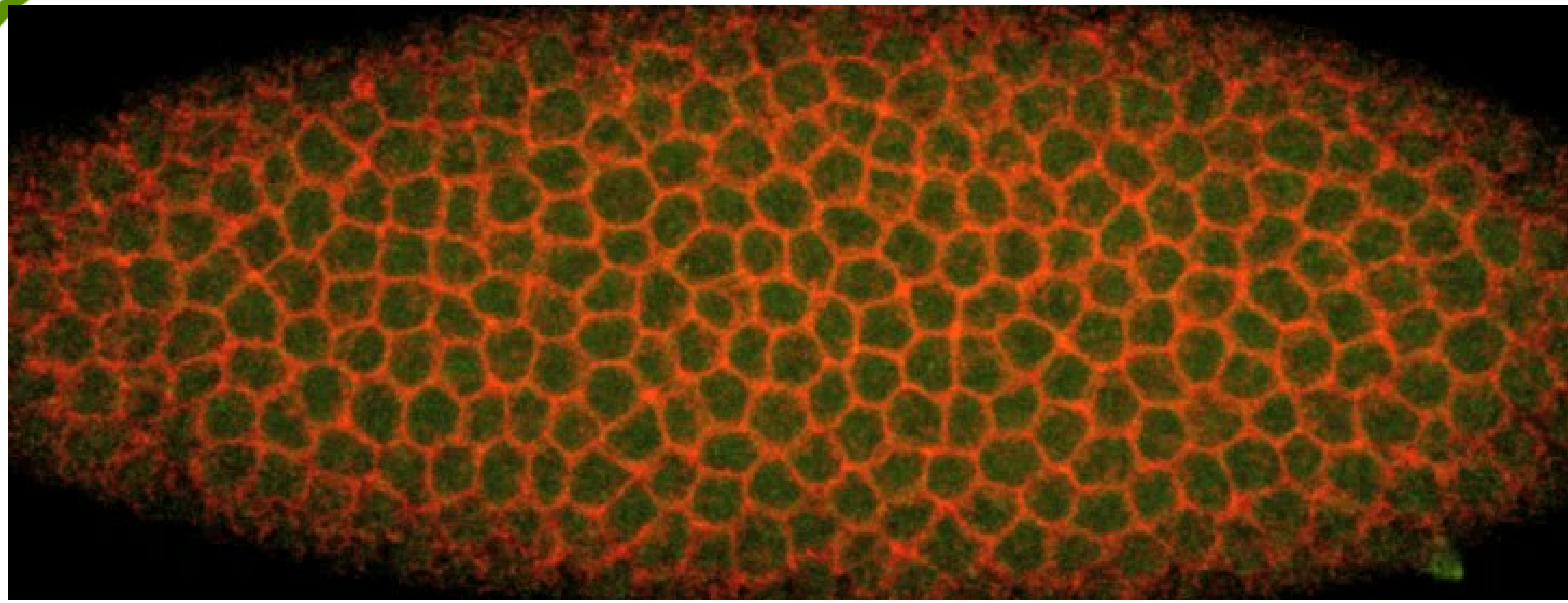


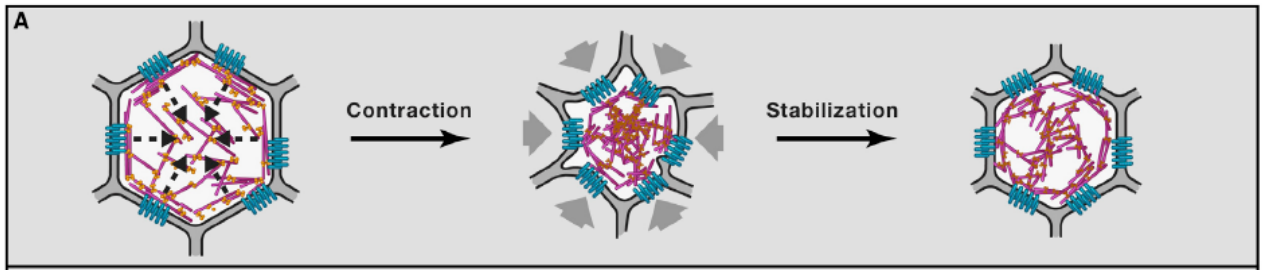
Figure 1. Self-Organization of Cells at Steady State Determined by Actin-Myosin Contractility and Cell Adhesion

(A) Upon cell-cell contact, the contacting cells change their shape in response to mechanical forces associated with actin-myosin contractility (green arrow) and adhesion (blue arrow).

(B) In epithelial tissues, adhesive contacts and the actin-myosin network are organized in belt-like structures at the apical domain of the cell. At steady state, the arrangement of epithelial cells at their apex is determined by actin-myosin contractility and cell-cell adhesion.

Mechanosensing v embryogenezi – gastrulace a indukce mezodermu

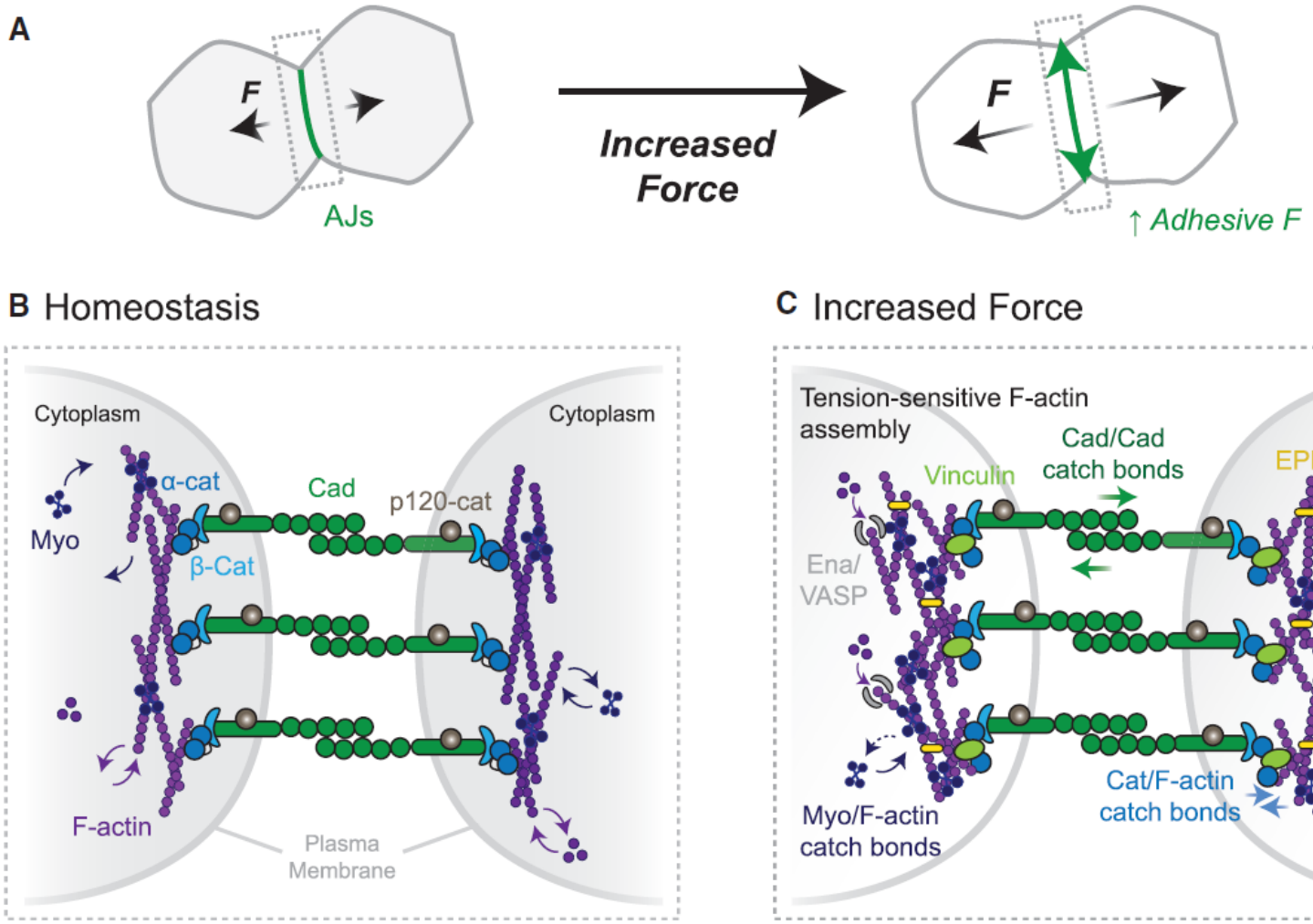




Forces in Tissue Morphogenesis and Patterning

Carl-Philipp Heisenberg[1,*] and Yohanns Bellaïche[2,*]
[1]Institute of Science and Technology Austria, 3400 Klosterneuburg, Austria
[2]Institut Curie, CNRS UMR3215, INSERM U934, 75248 Paris Cedex 05, France
*Correspondence: heisenberg@ist.ac.at (C.-P.H.), yohanns.bellaiche@curie.fr (Y.B.)
http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.008

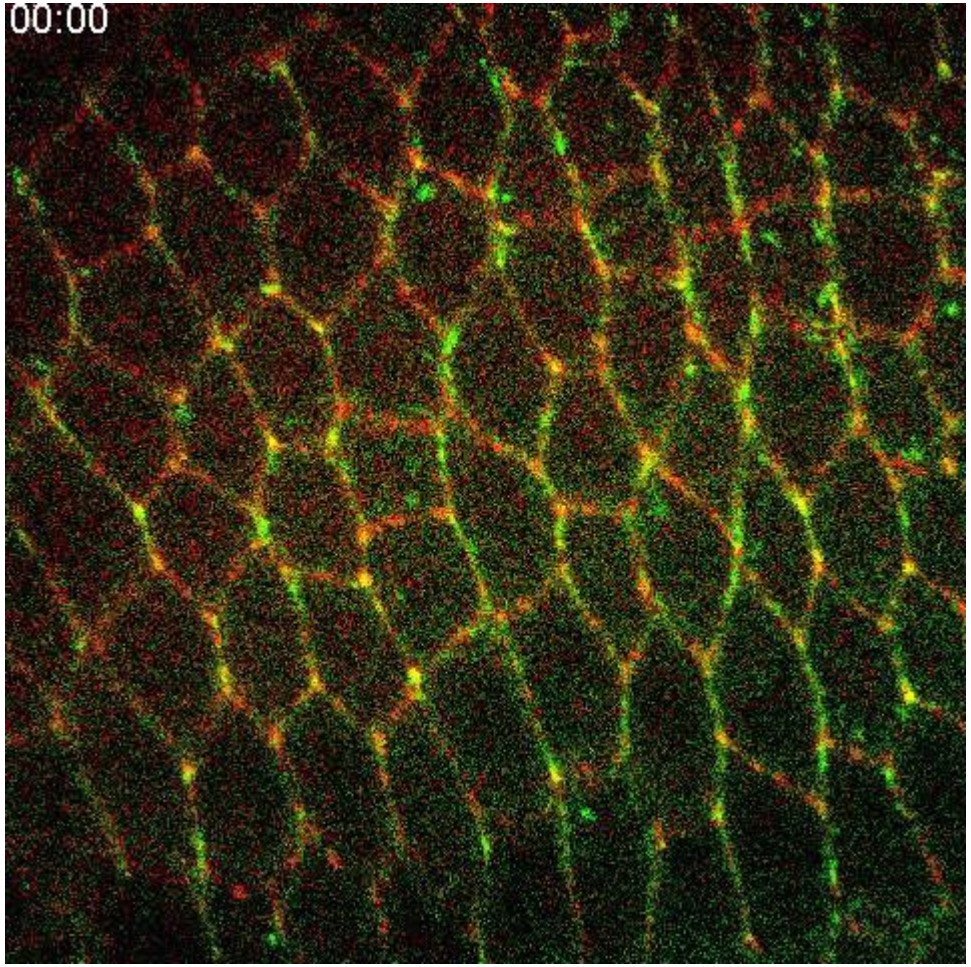
Mechanické síly a morfogeneze



Mechanical Force-Driven Adherens Junction Remodeling and Epithelial Dynamics

Diana Pinheiro[1,2,3] and Yohanns Bellaïche[1,2,*]
[1]Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMR 3215, INSERM U934, 75248 Paris Cedex 05, France
[2]Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS, CNRS UMR 3215, INSERM U934, 75005 Paris, France
[3]Present address: Institute of Science and Technology Austria, Am Campus 1, 3400 Klosterneuburg, Austria
*Correspondence: yohanns.bellaiche@curie.fr
https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.09.014

Mechanické síly a morfogeneze



Mechanické síly – diferenciace a proliferace buněk

- Schopnost buněk vnímat vnější mechanické síly ovlivňuje velikost a architekturu tkáně nejen změnou jejich adhezivní a cytoskeletální organizace, ale také ovlivněním jejich diferenciace.

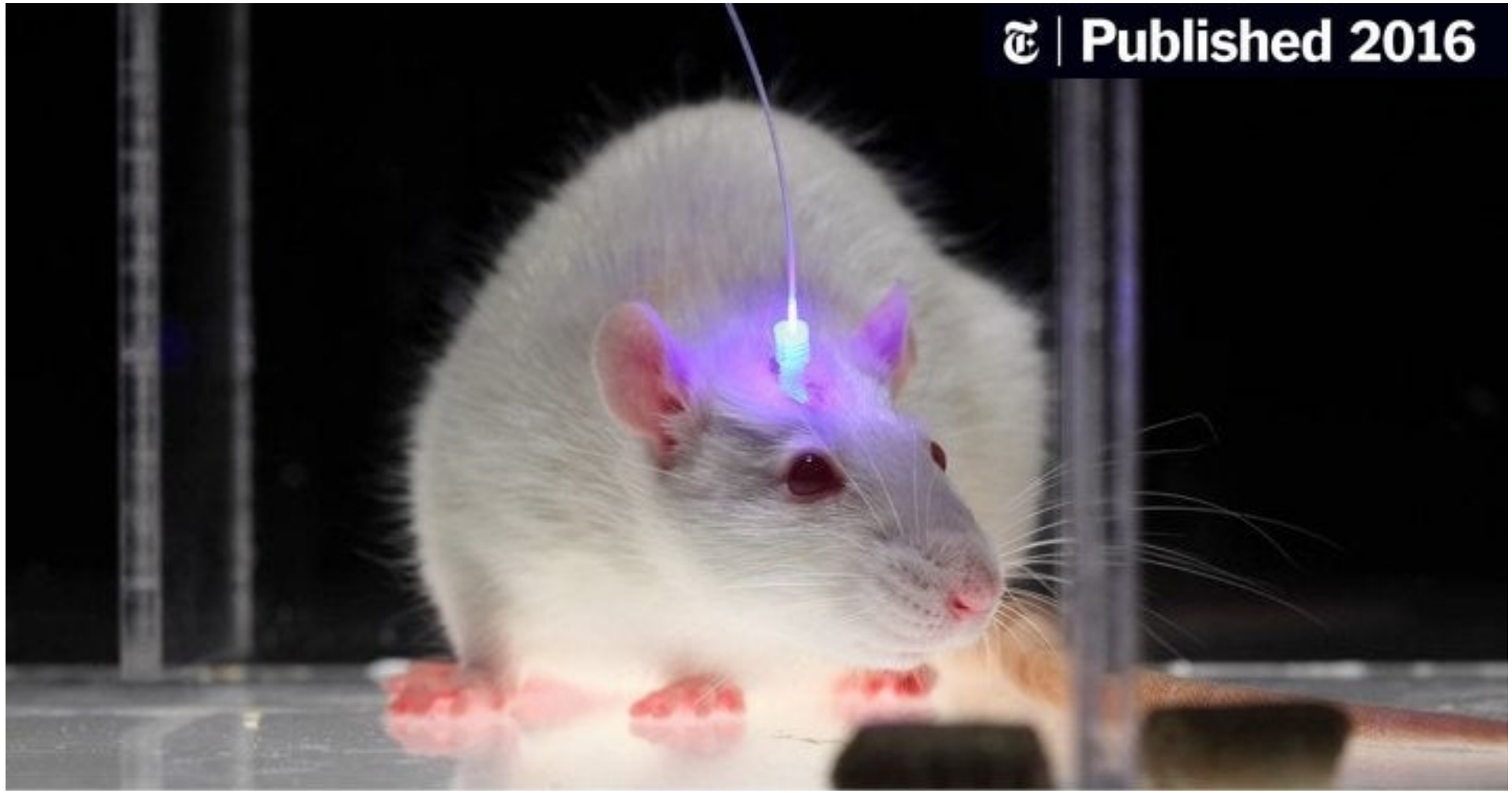
BONUS: Vibrational cues alter developmental timing

Agalychnis callidryas

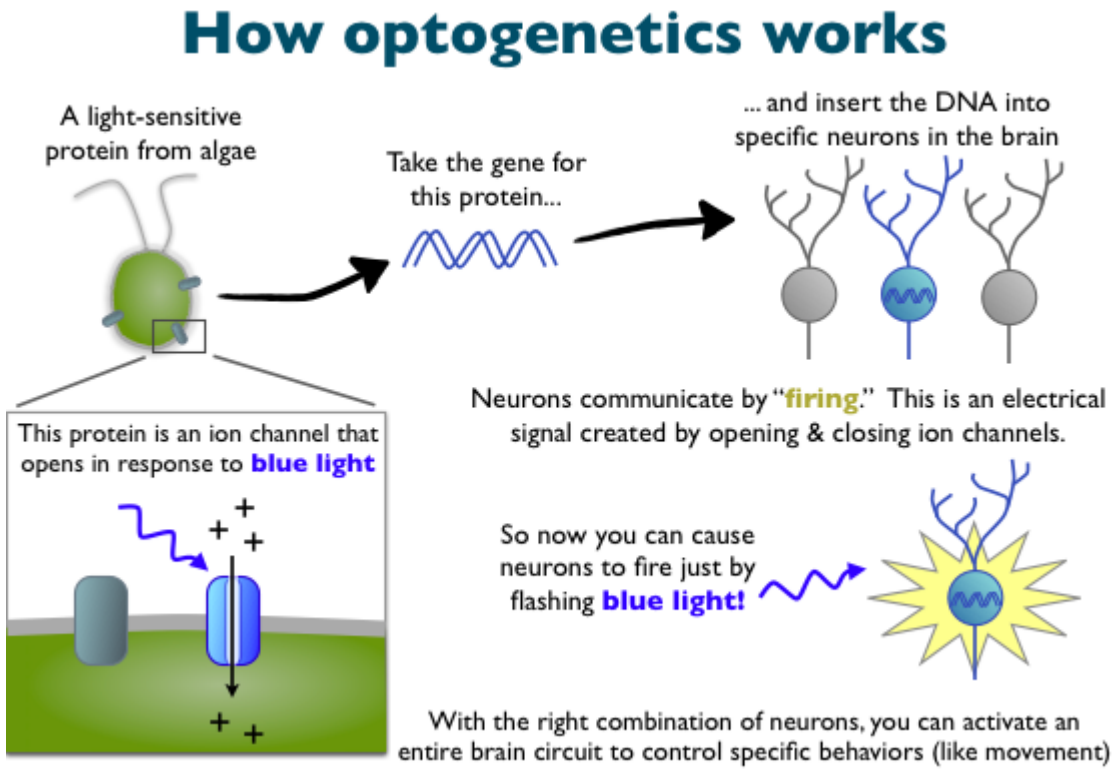
- Klade vajíčka na listy, které se nacházejí nad vodou
- Normální vývoj trvá 7 dní.
- V případě útoku predátora dochází (v rámci sekund!) k líhnutí larev, pokud vajíčka mají za sebou cca 5 dní vývoje.
- Signalizace napadení vajíček predátorem je prostřednictvím vibrací
- To vede k produkci enzymů, které narušují obal

How do embryos escape from danger?
Kristina L. Cohen, Marc A. Seid & Karen M. Warkentin

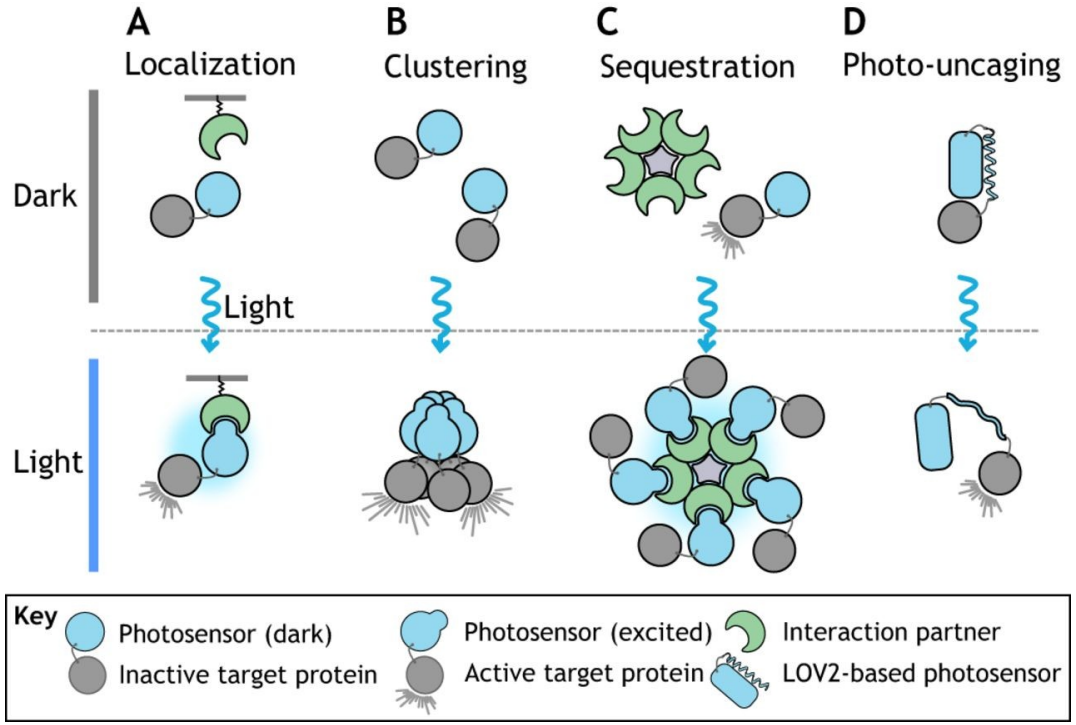
BONUS: optogenetika



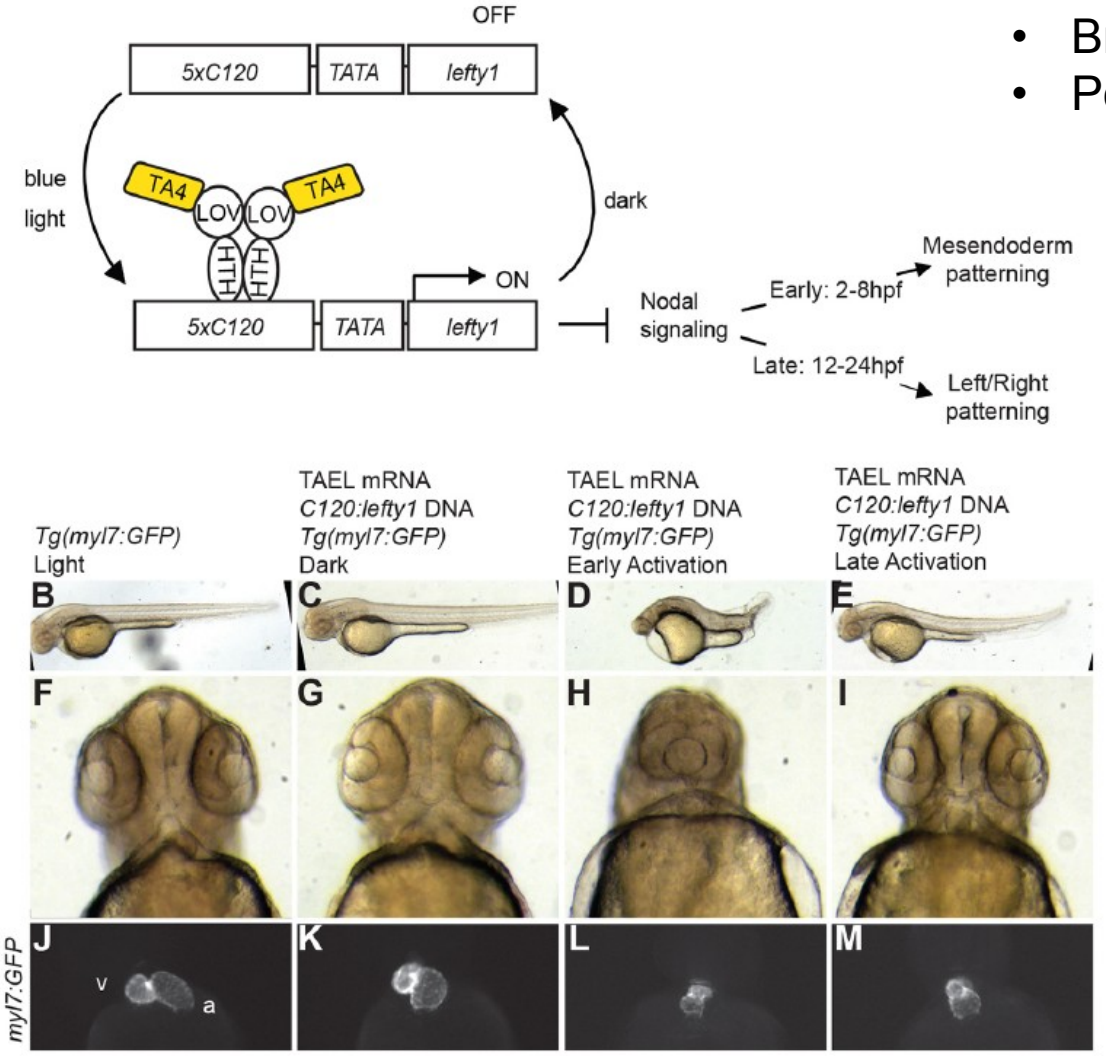
BONUS: optogenetika



BONUS: optogenetika



BONUS: optogenetika – vývojová biologie



- Brzká aktivace -> zkrácení těla a kyklop
- Pozdní aktivace -> symetrie srdce

Development (2017) 144, 345-355 doi:10.1242/dev.139238

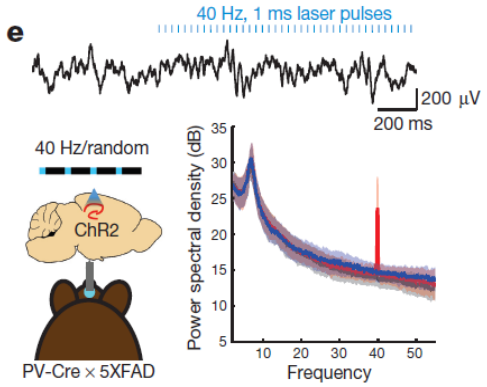
BONUS: optogenetika

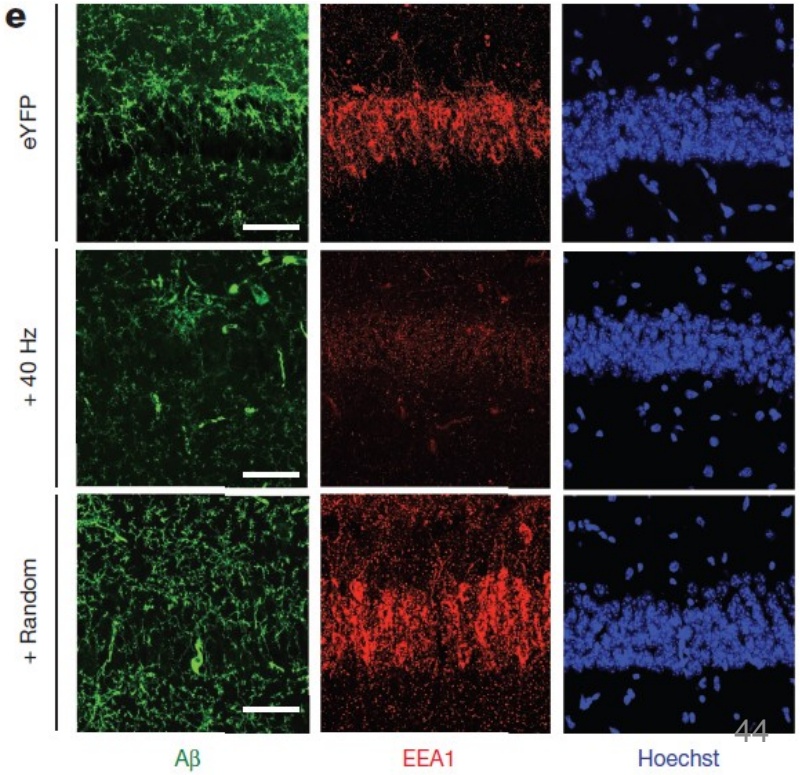
ARTICLE

doi:10.1038/nature20587

Gamma frequency entrainment attenuates amyloid load and modifies microglia

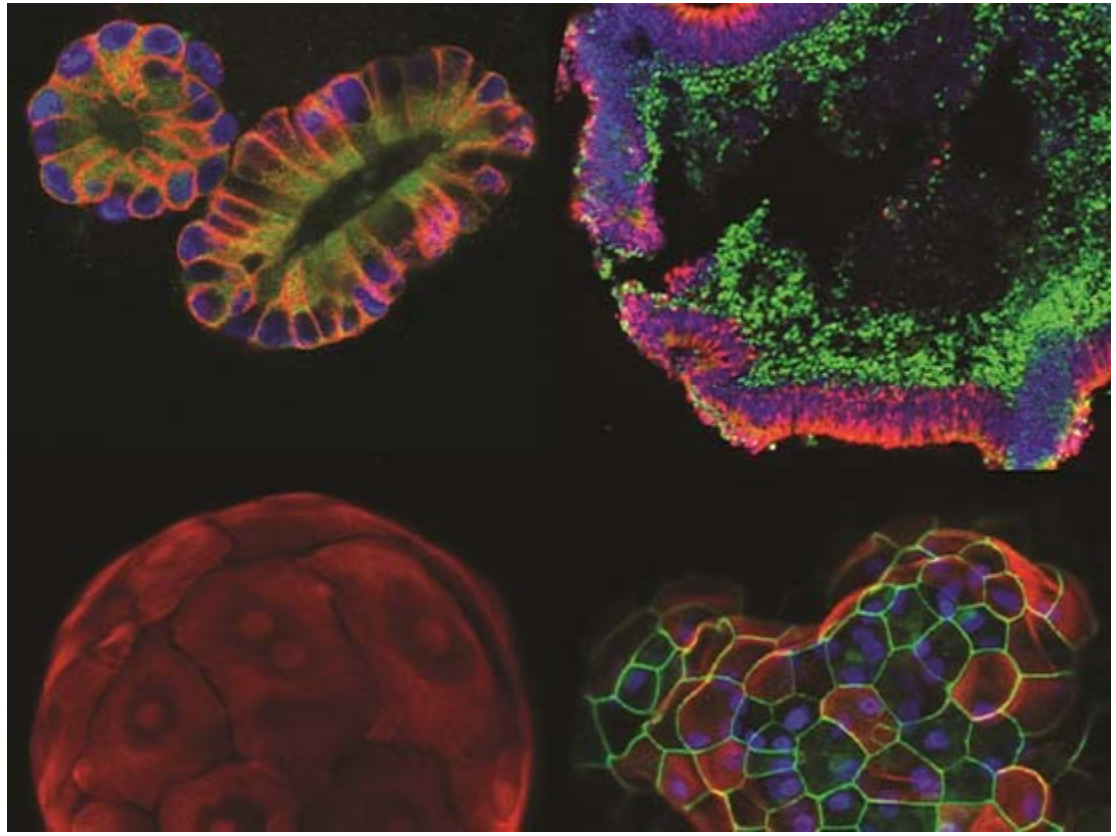
Hannah F. Iaccarino[1,3]*, Annabelle C. Singer[2,3,4]*, Anthony J. Martorell[1,3], Andrii Rudenko[1,3], Fan Gao[1,3], Tyler Z. Gillingham[1,3], Hansruedi Mathys[1,3], Jinsoo Seo[1,3], Oleg Kritskiy[1,3], Fatema Abdurrob[1,3], Chinnakkaruppan Adaikkan[1,3], Rebecca G. Canter[1,3], Richard Rueda[1,3], Emery N. Brown[1,3,5,6], Edward S. Boyden[2,3,4] & Li-Huei Tsai[1,3,7]



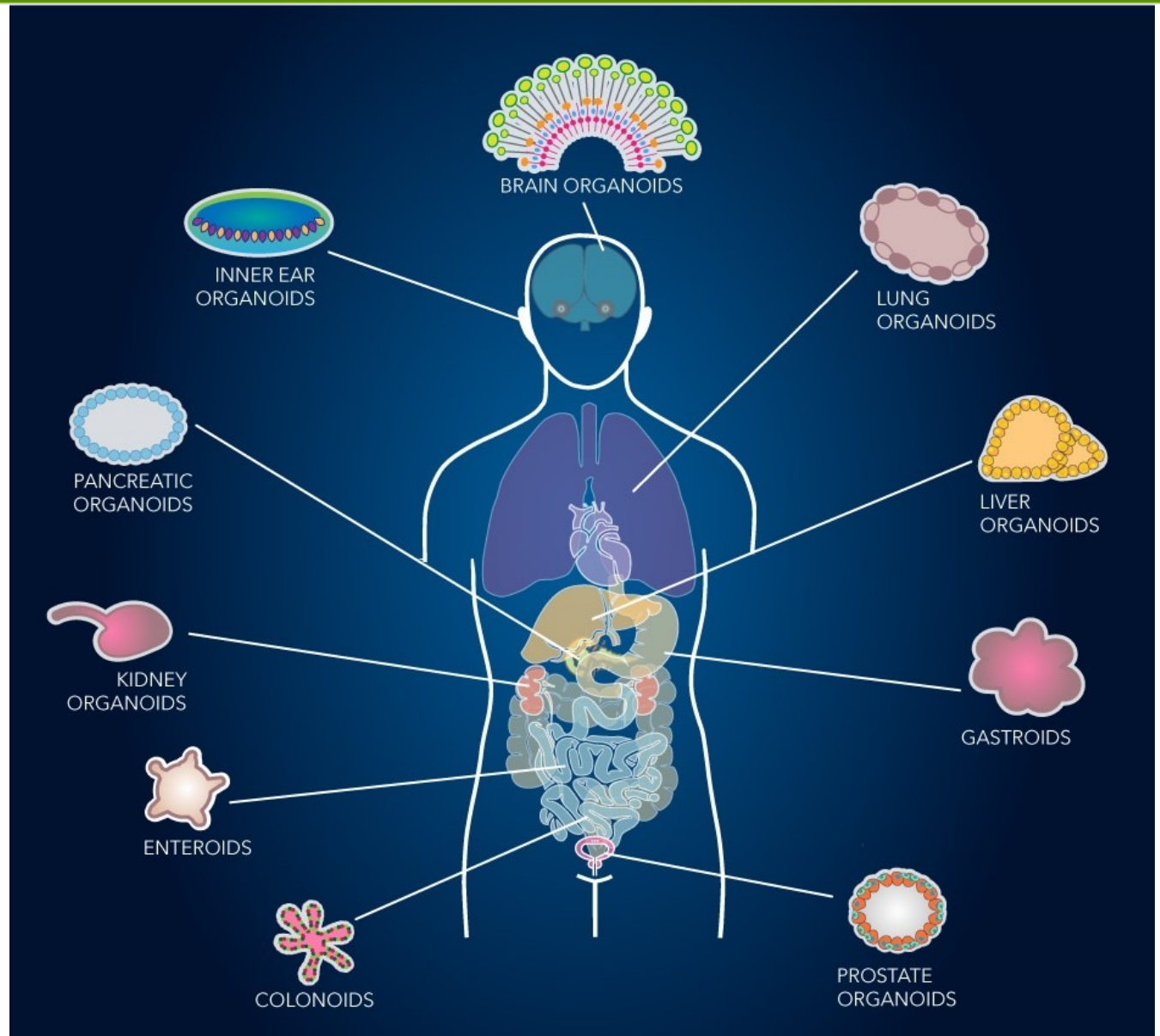


BONUS: organoidy pro studium vlivu fyzikálních jevů na vývoj a fyziologii

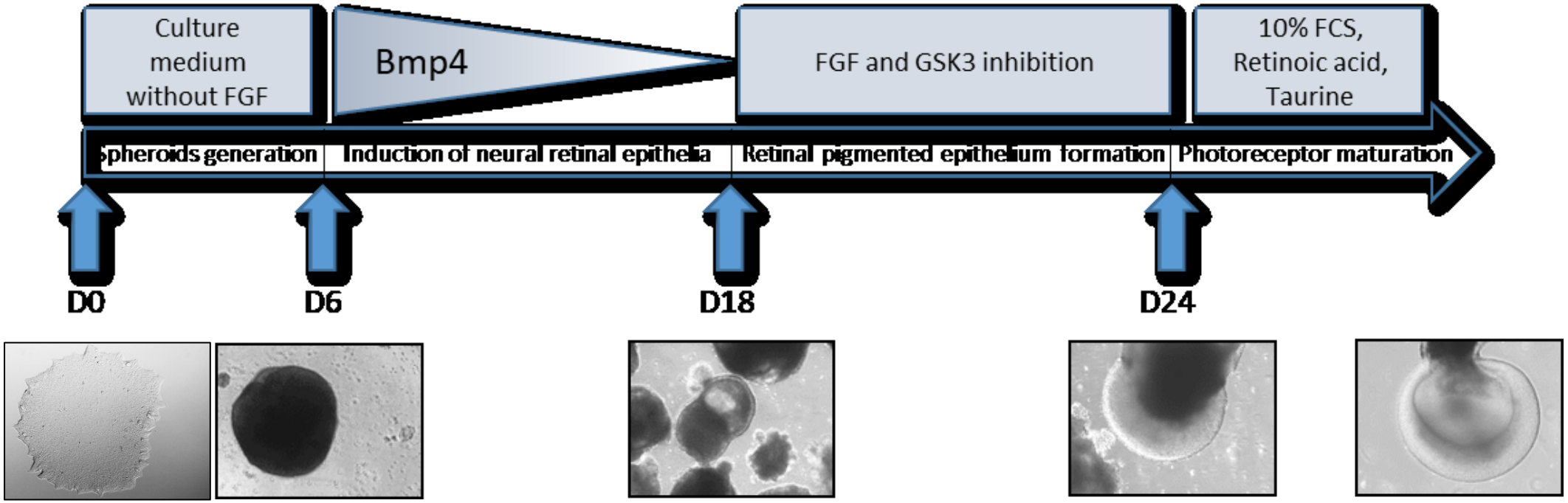
- Organoidy jsou trojrozměrné zmenšeniny orgánů, které mají podobnou strukturu a **funkci** jako daný orgán



BONUS: organoidy pro studium fyzikálních jevů na vývoj a fyziologii



BONUS:


Culture medium without FGF
Bmp4
FGF and GSK3 inhibition
10% FCS, Retinoic acid, Taurine
spheroids generation
Induction of neural retinal epithelia
Retinal pigmented epithelium formation
Photoreceptor maturation
D0
D6
D18
D24

Vývojová biologie

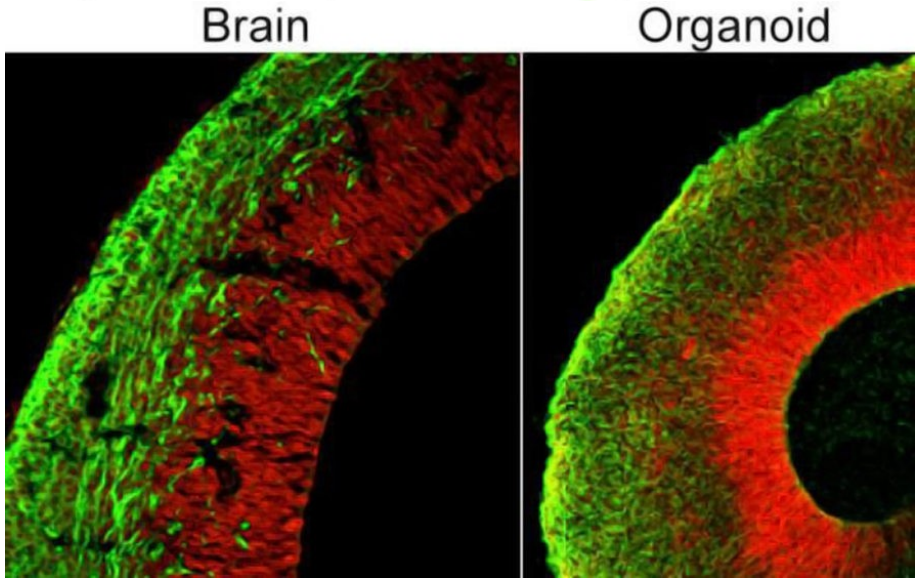
communications biology

ARTICLE

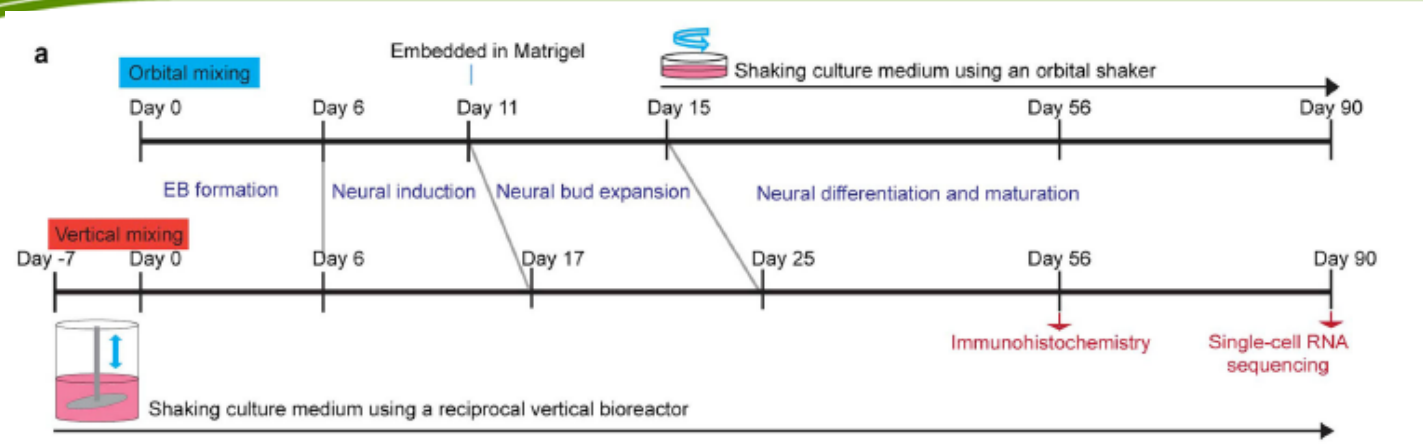
https://doi.org/10.1038/s42003-021-02719-5 OPEN

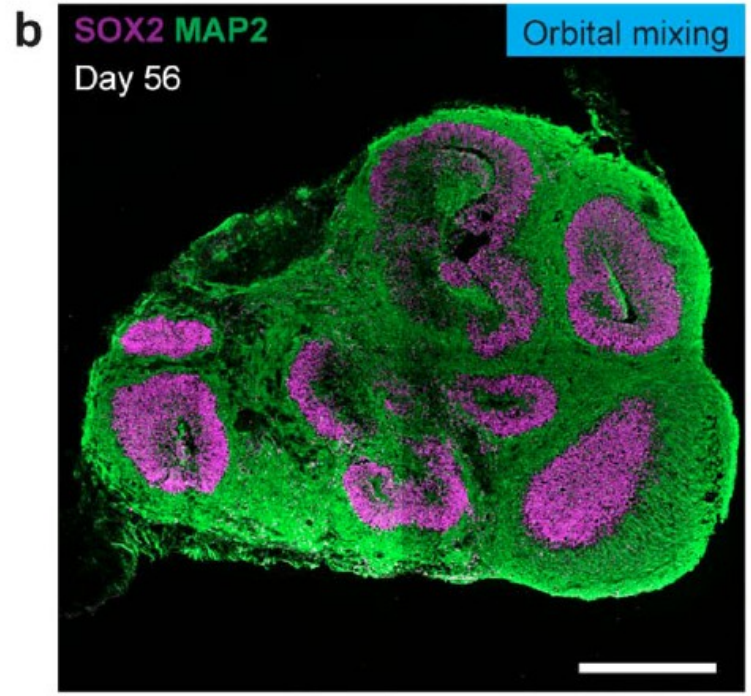
Induction of inverted morphology in brain organoids by vertical-mixing bioreactors

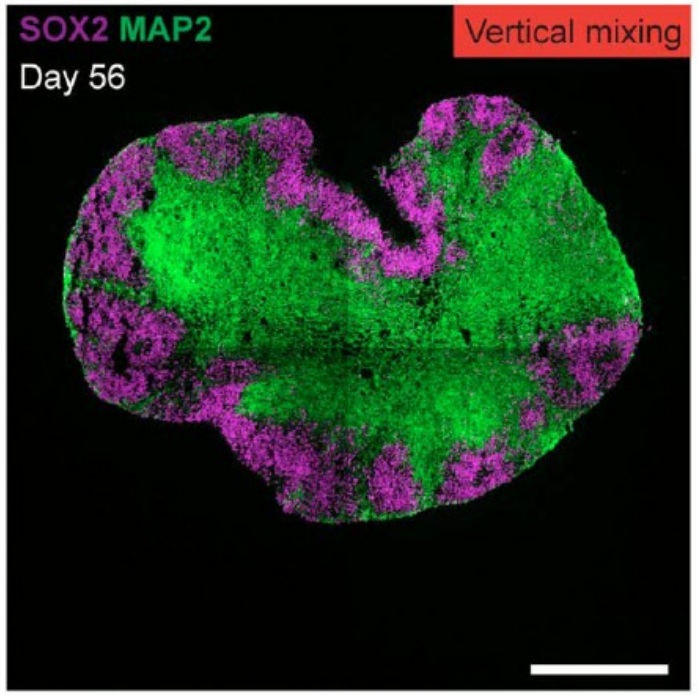
Dang Ngoc Anh Suong[1,2], Keiko Imamura[1,2,3], Ikuyo Inoue[1,3], Ryotaro Kabai[4], Satoko Sakamoto[4], Tatsuya Okumura[4], Yoshikazu Kato[5], Takayuki Kondo[1,2,3], Yuichiro Yada[1,2], William L. Klein[6], Akira Watanabe[4] & Haruhisa Inoue[1,2,3,7]✉

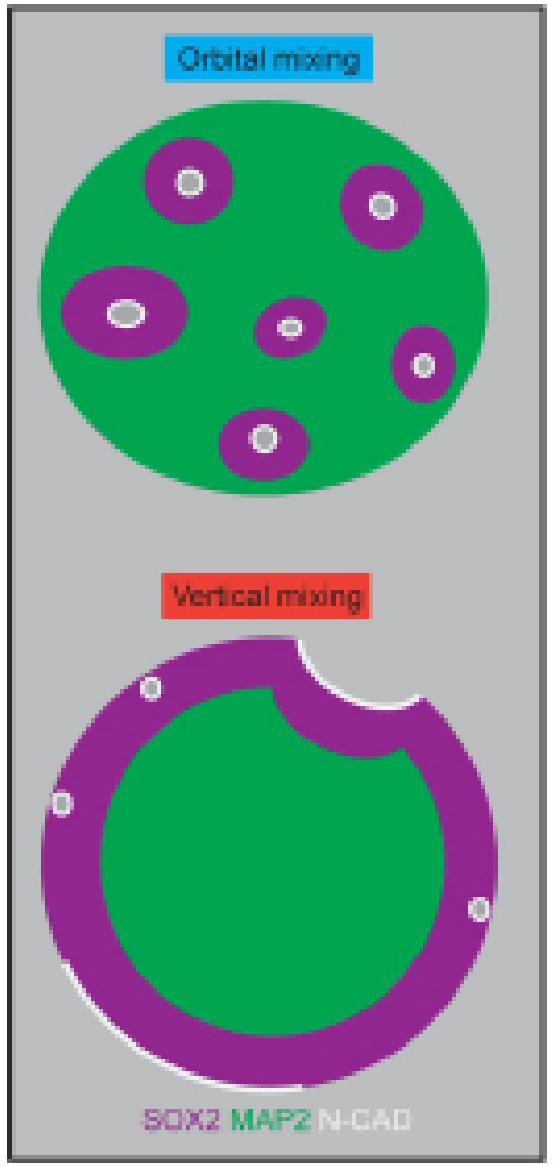


BONUS:

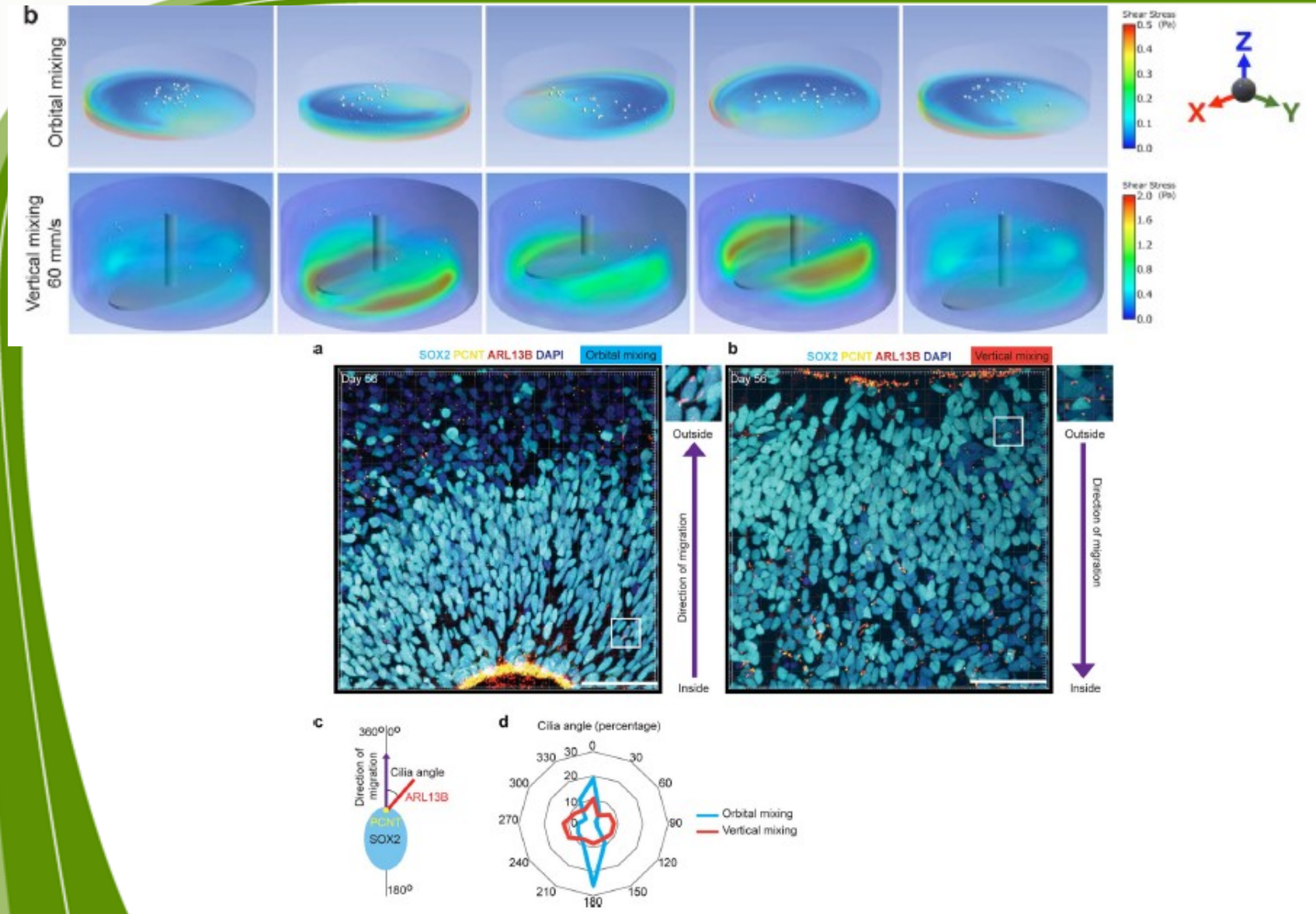

a
Orbital mixing
Embedded in Matrigel
Shaking culture medium using an orbital shaker
Day 0
Day 6
Day 11
Day 15
Day 56
Day 90
EB formation
Neural induction
Neural bud expansion
Neural differentiation and maturation
Vertical mixing
Day -7
Day 0
Day 6
Day 17
Day 25
Day 56
Day 90
Immunohistochemistry
Single-cell RNA sequencing
Shaking culture medium using a reciprocal vertical bioreactor

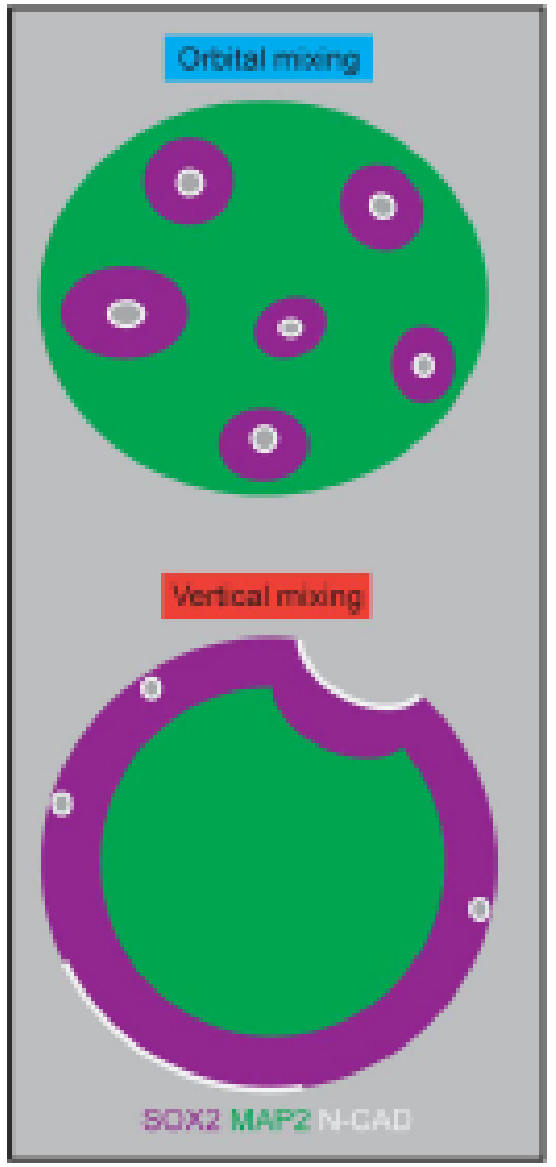

b
SOX2 MAP2
Orbital mixing
Day 56


c
SOX2 MAP2
Vertical mixing
Day 56


Orbital mixing
Vertical mixing
SOX2 MAP2 N-CAD

BONUS:


b
Orbital mixing
Vertical mixing
60 mm/s
Shear Stress
Z
X
Y
a
SOX2 PCNT ARL13B DAPI
Orbital mixing
Day 56
Outside
Inside
Direction of migration
b
SOX2 PCNT ARL13B DAPI
Vertical mixing
c
Direction of migration
Cilia angle
ARL13B
PCNT
SOX2
d
Cilia angle (percentage)
Orbital mixing
Vertical mixing


Orbital mixing
Vertical mixing
SOX2 MAP2 N-CAD

Závěr a otázky

- Jak/čím buňka vnímá mechanické síly?
- Úloha Cadherinů a Integrinů v mechano recepci? A jak funguje?
- Signální dráha Hippo a vnímání mechanické síly.
- Jak smykové síly působí na vývoj srdce?
- Jak je důležitá mechanorecepce v průběhu gastrulace

Děkuji za pozornost

Tomáš Bárta
tbarta@med.muni.cz