

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie

DIFERENCIACE BUNĚK

Mgr. Jakub Neradil, Ph.D.
Ústav experimentální biologie PŘF MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Program přednášky:

- diferenciační potenciál buněk
- diferenciační dráhy
- růstové faktory
- indukovaná diferenciace

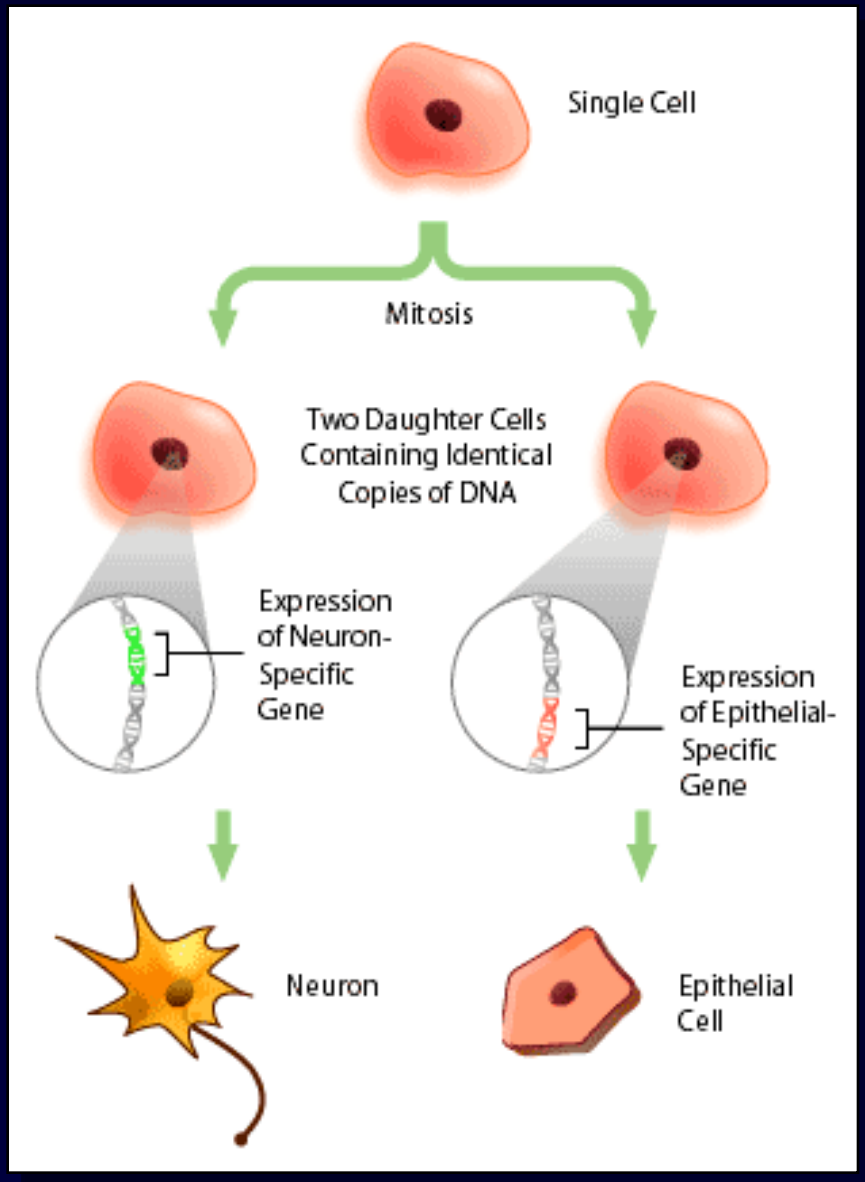
Vývoj mnohobuněčného organismu

- identický genom ve všech buňkách
- kontrola na úrovni genové exprese

1. buněčná proliferace
2. diferenciace buněk
3. buněčné interakce
4. pohyb buněk
5. buněčná smrt

Lidský organismus:

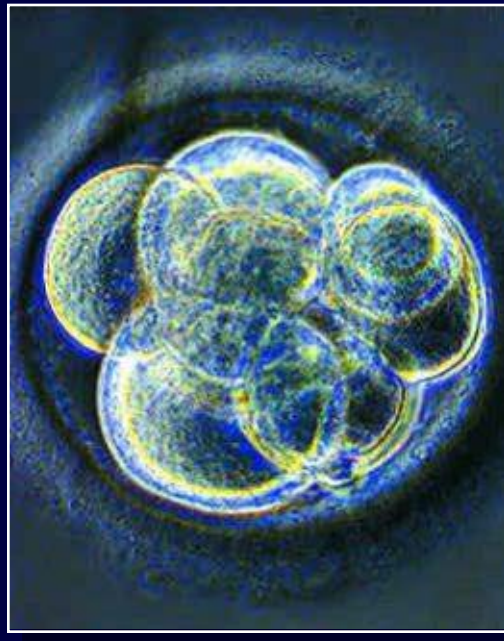
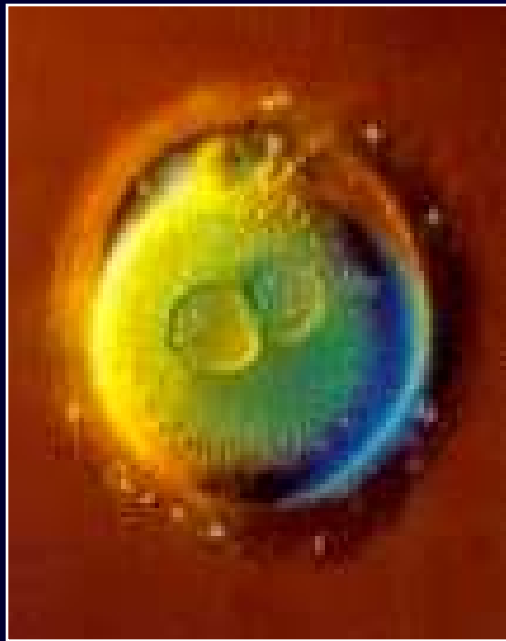
1 zygota → 10^{11} buněk (250 různých typů)



DIFERENCIAČNÍ POTENCIÁL BUNĚK

Časná embryogeneze u savců:

- zygota
- morula (8, resp. 16 buněk = blastomery)
- blastocysta (~ 64 buněk)



Blastocysta:

- trofoektoderm →
extraembryonální tkáň (placenta)
- inner cell mass (ICM) →
embryo

Gastrulace → 3 zárodečné listy:

- ektoderm (neurální a epidermální buňky)
- mesoderm (svalová a pojivová tkáň)
- endoderm (epitel vnitřních orgánů)

Ektoderm

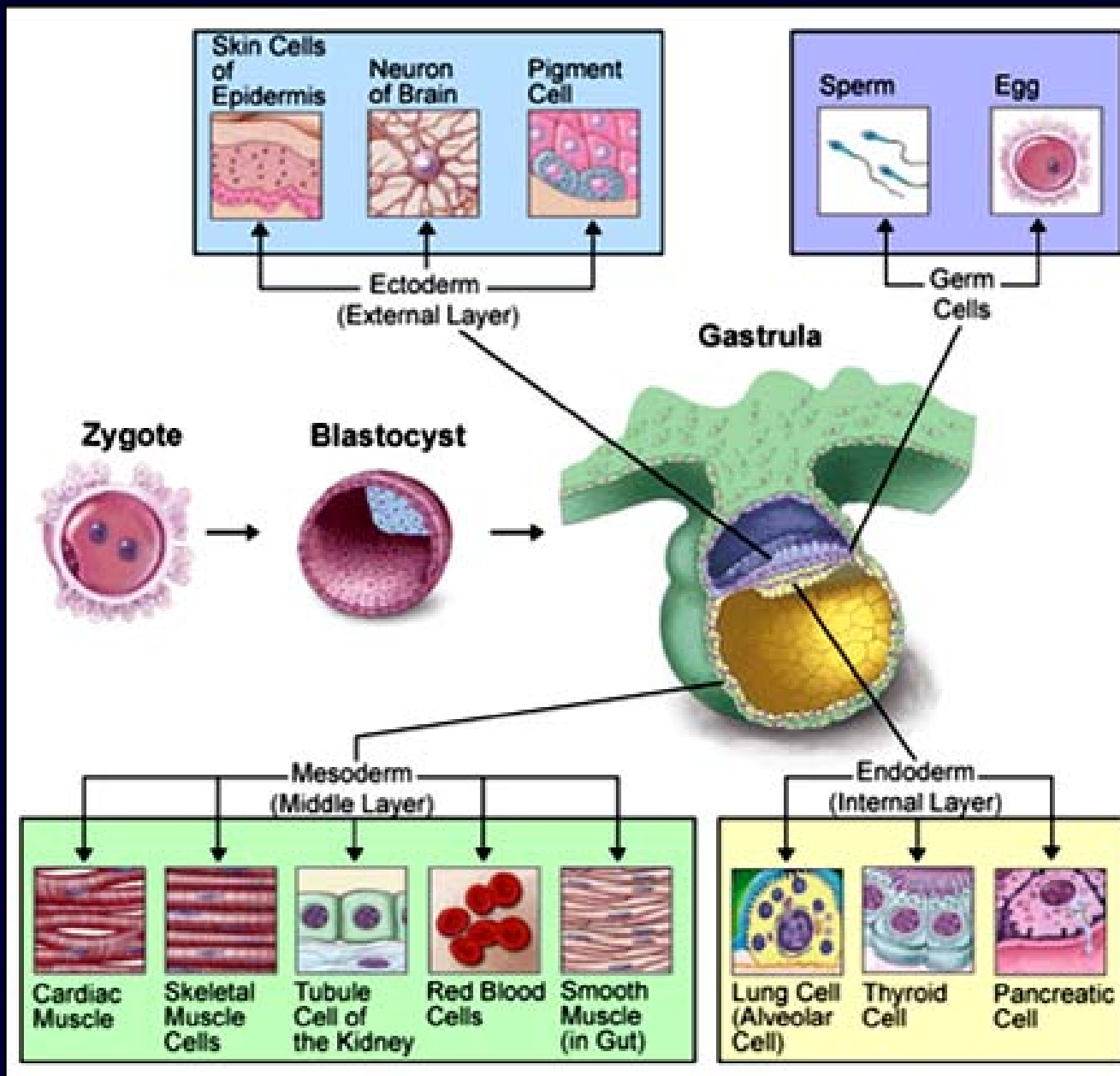
- CNS
- sítnice a čočky
- lebeční a senzorická ganglia a nervy
- pigmentové buňky
- pojivová tkáň hlavy
- epidermis
- vlasy, ochlupení
- prsní žlázy

Mesoderm

- lebka a kostra
- svalová tkáň (lebka i kosterní svalstvo)
- dermis
- pojivová tkáň
- urogenitální systém
- střevní svalovina
- srdce
- krevní a lymfatické buňky
- slezina

Endoderm

- žaludek
- tračník
- játra
- slinivka
- močový měchýř
- epiteliální výstelka průdušnice, plic, hltanu, štítné žlázy, střev



Totipotence

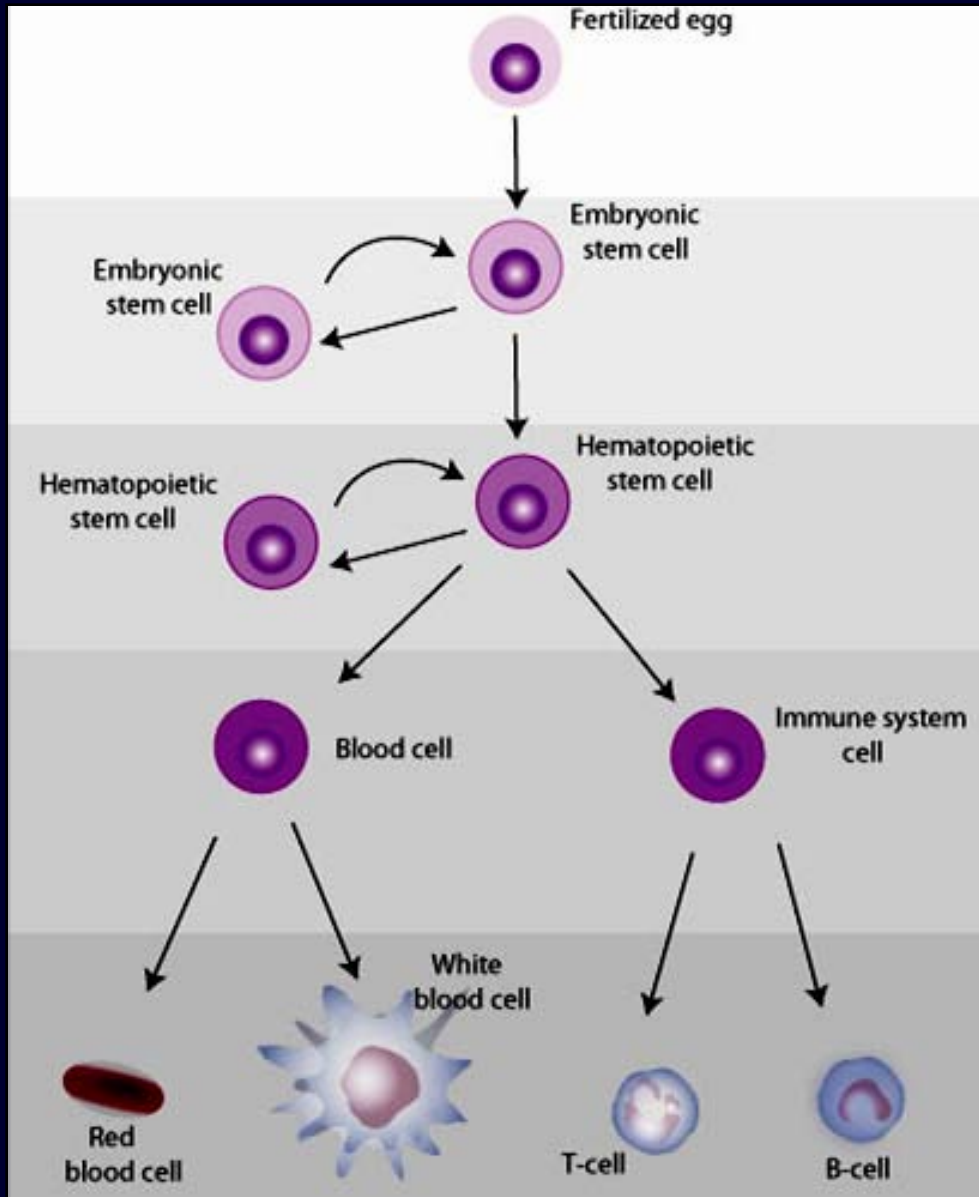
- nelimitovaný diferenciační potenciál
- schopnost tvořit embryonální i extraembryonální tkáně
- časná stádia rýhování zygoty (1-4 dny)

Pluripotence

- schopnost tvořit buňky všech 3 zárodečných listů
- buňky ICM (embryonální kmenové buňky, 5-14 dní)

Multipotence

- schopnost tvořit buňky příslušného typu tkáně
- např. hematopoetické kmenové buňky, neuronální kmenové buňky...



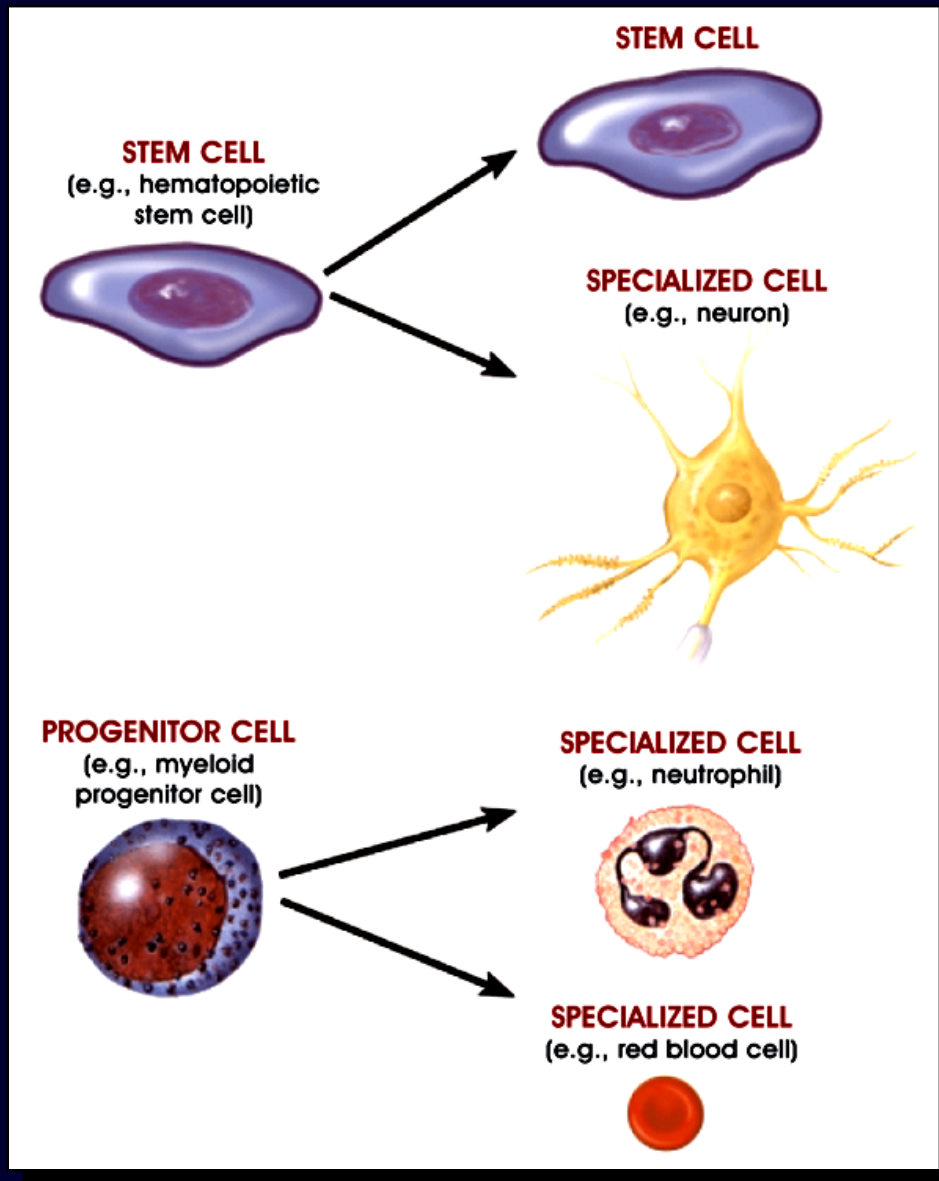
totipotentní buňka

pluripotentní buňky
(embryonální kmenové)

multipotentní buňky
(hematopetické kmenové)

progenitorové buňky

terminálně diferencované
buňky



Rozdíl v diferenciačním potenciálu kmenových a progenitorových buněk

Eukaryontní buňka:

- 5000 různých bílkovin (10^9 - 10^{10} molekul)
- každý buněčný typ vytváří asi 100 specifických proteinů
- **housekeeping genes:**
exprimovány konstitutivně na relativně nízké úrovni ve všech buňkách organismu
- **housekeeping proteins:**
esenciální metabolické enzymy, buněčné komponenty
- exprese různých genů závisí na typu buňky, fázi buněčného cyklu atd.

Příčiny diferenciacce:

- postupné změny v aktivitě genů
(programovány v genomu)
- odpověď na molekulární signály vysílané ostatními buňkami
- odpověď na fyzikální kontakt s ostatními buňkami

Signály regulující diferenciaci

Solubilní regulátory

- Hormony (glukagon, hydrokortison, tyroxin, ...)
- Růstové faktory (TGF-transformující růstový faktor, FGF-fibroblastový růstový faktor, interleukiny, ...)
- Vitaminy (D, A ...)
- Ionty (Ca^{2+} , ...)

Fyzické kontakty mezi buňkami (gap junctions)

Kontakt buněk s mezibuněčnou matrix (kolagen, laminin, ...)

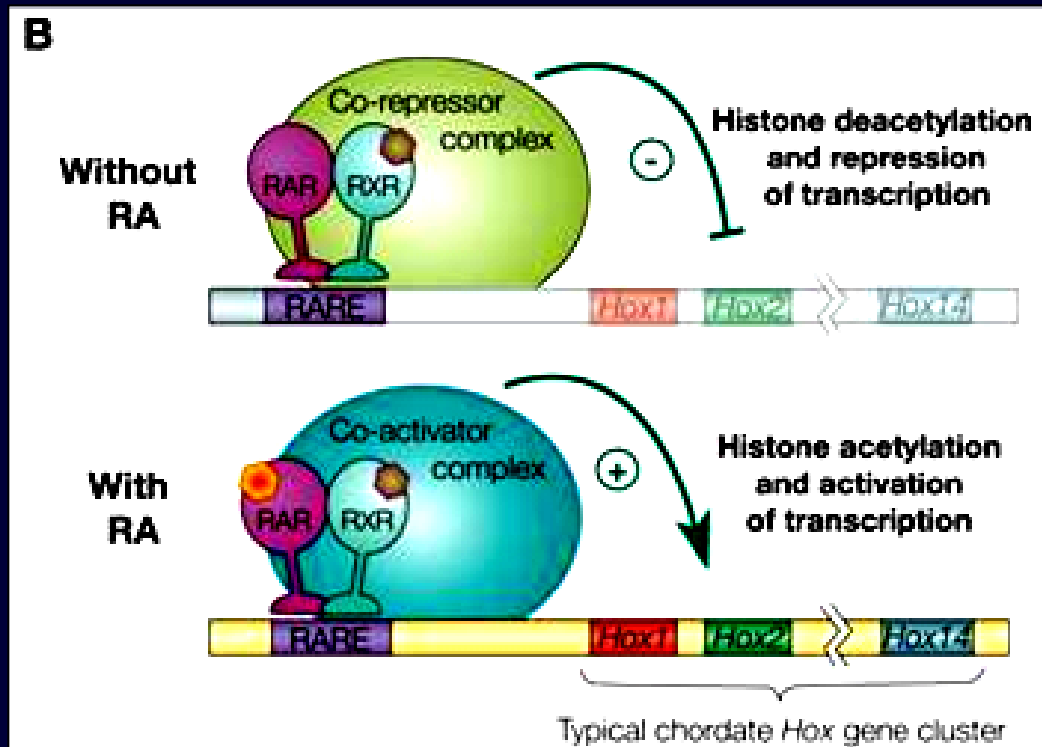
Polarita a tvar buněk

Fyzikální parametry prostředí (teplota, parciální tlak O_2 , ...)

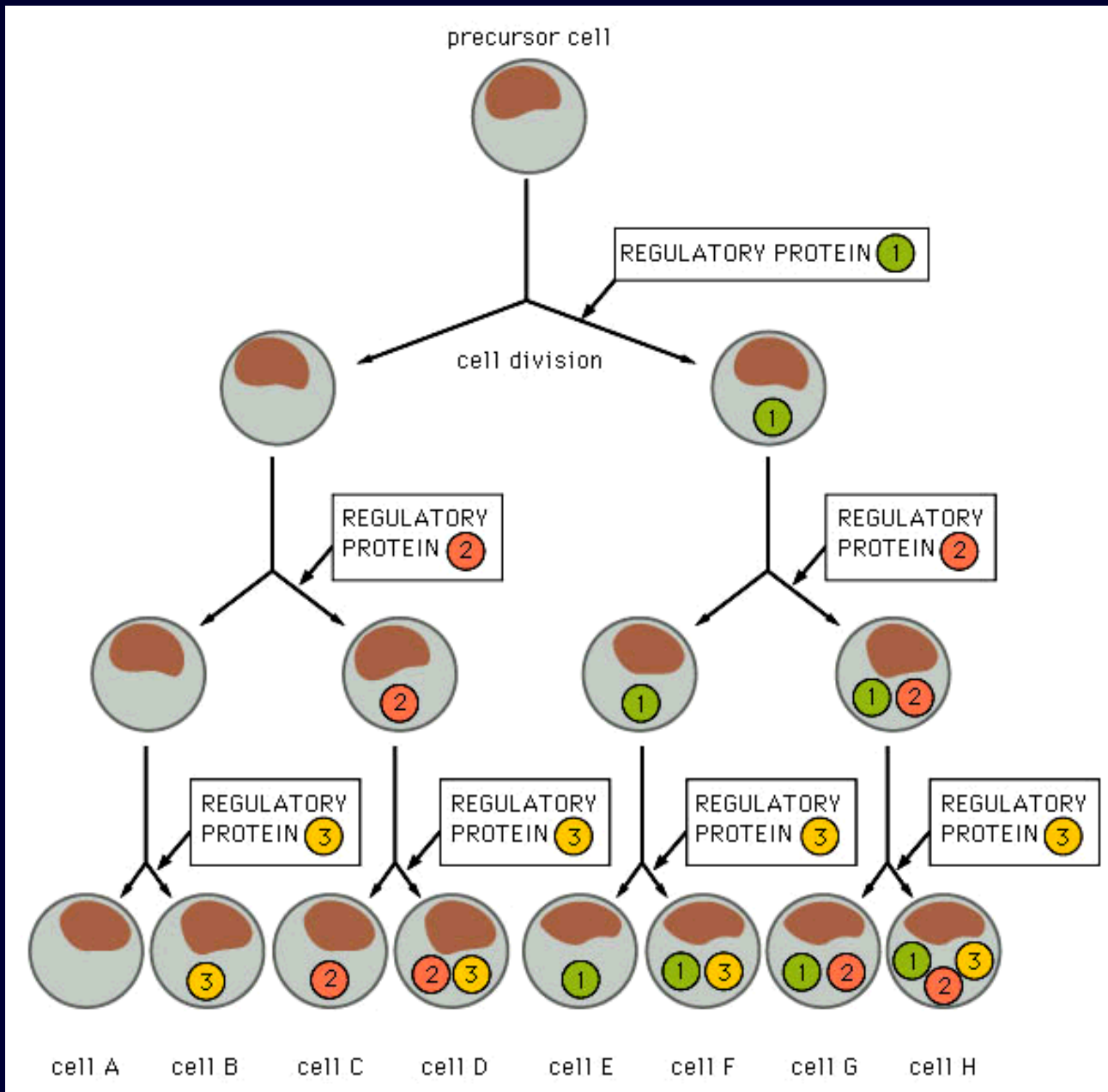
Molekulární mechanismy diferenciace

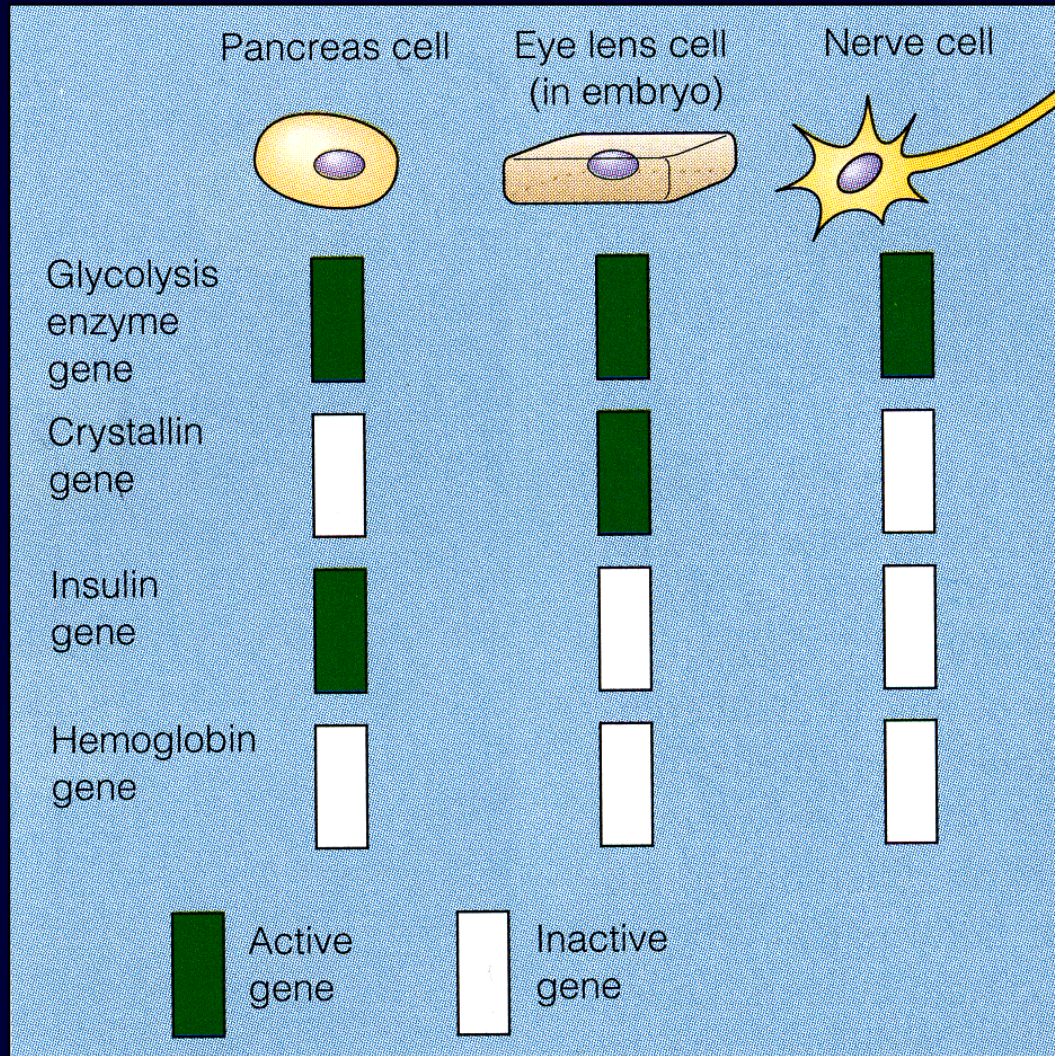
- nejdůležitějším místem regulace je **iniciace transkripce**
- vazba regulačních proteinů na specifické sekvence DNA (regulační oblasti)
- relativně malý počet strukturních motivů
- **2 základní mechanismy účinku regulačních proteinů:**
 - a) ovlivnění vazby RNA polymerázy a transkripčních faktorů na promotor
 - b) lokální modifikace struktury chromatinu v oblasti promotoru
- kombinace regulačních proteinů
- tkáňová specifita

Kyselina retinová (RA) jako modelový induktor diferenciace (a morfogeneze)



1. vazba na jaderné receptory (RAR, RXR)
2. vazba komplexu na regulační oblast (RARE)
3. aktivace transkripce





DIFERENCIAČNÍ DRÁHY



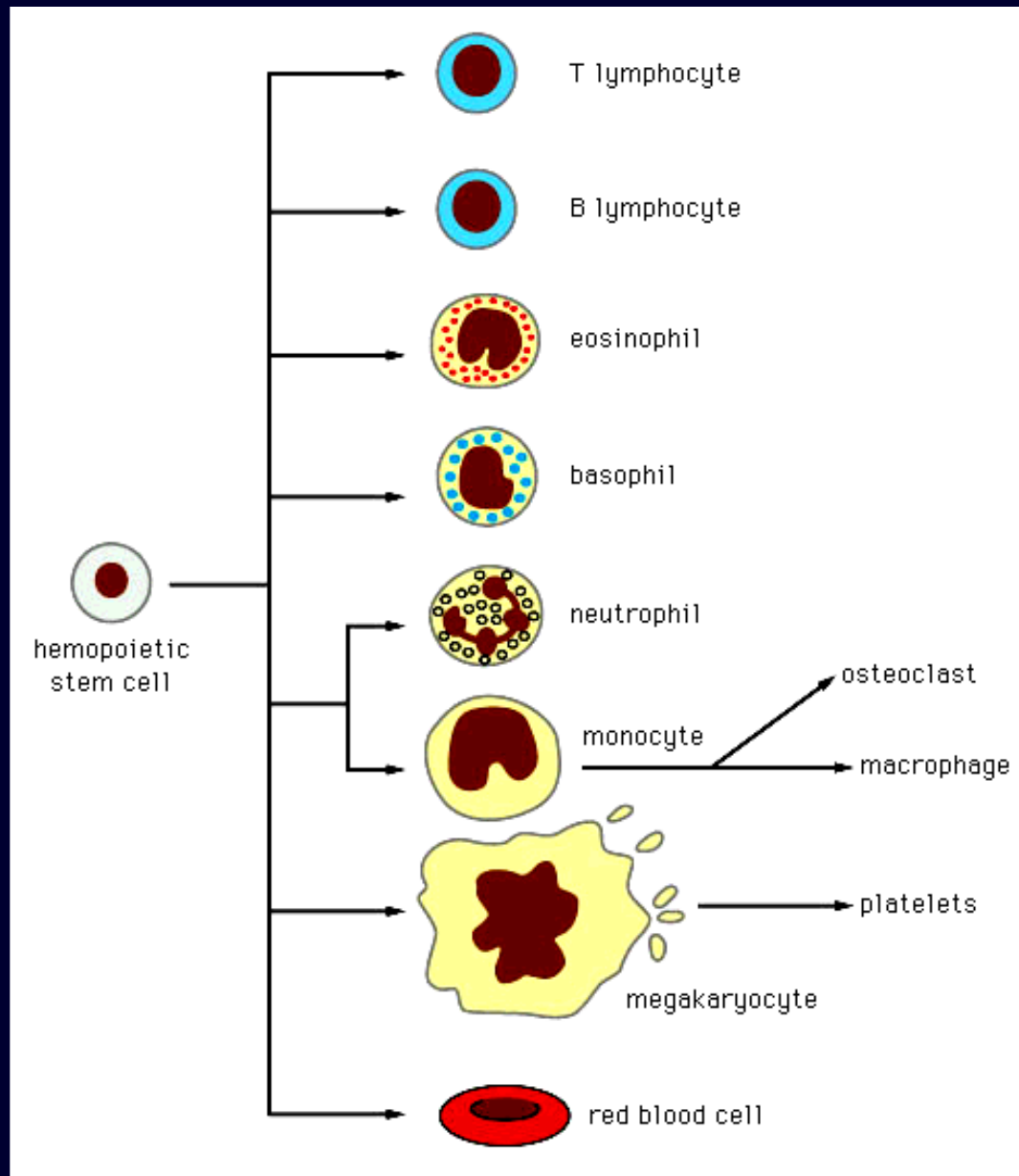
Diferenciace - buňky směřovány do určitého vývojového směru (linie) – tento stav nelze měnit (například buňky erytroidní linie „nepřeskočí“ do linie myeloidní)

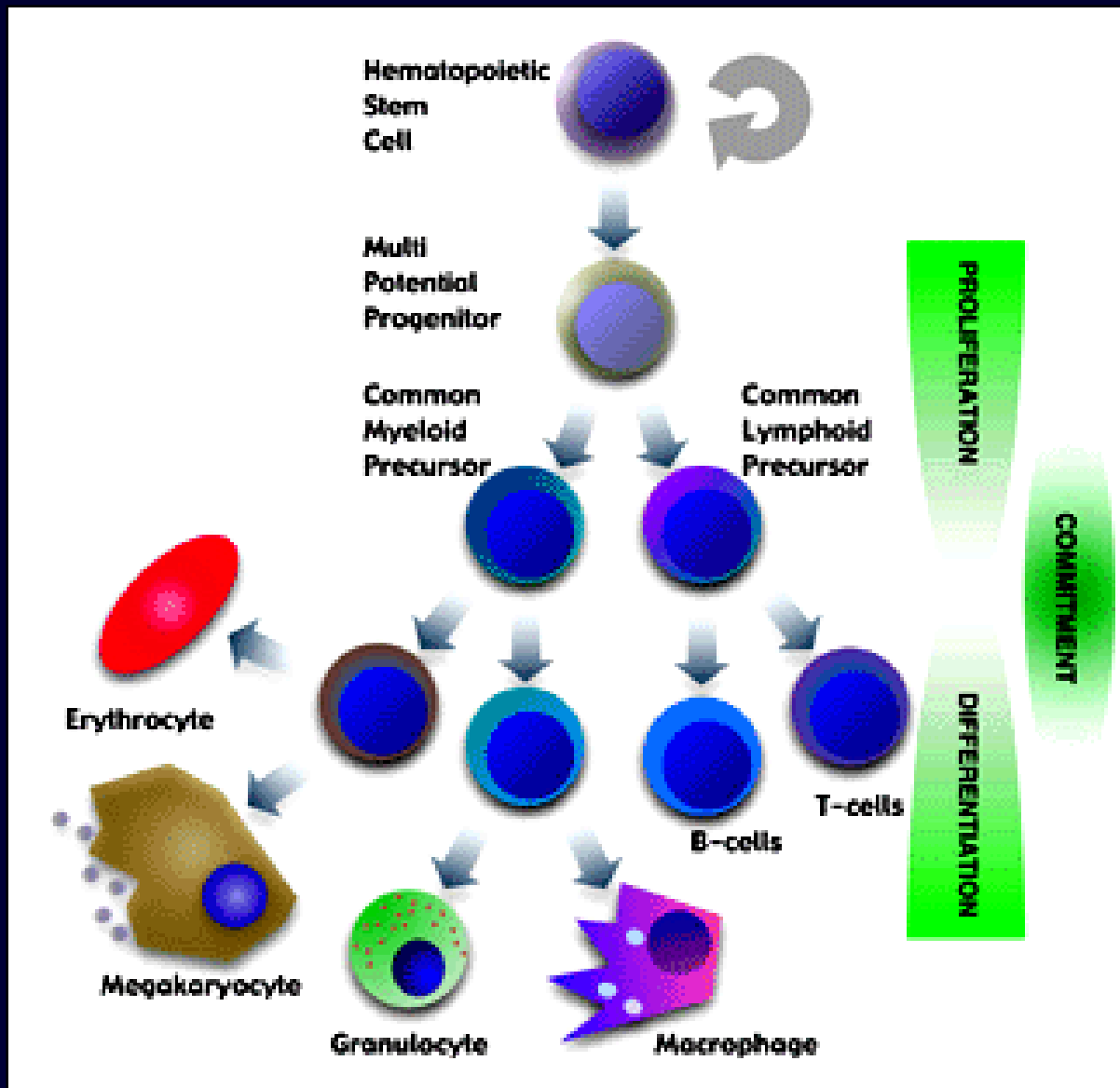
Dediferenciace - ztráta diferencovaného fenotypu

- je obvyklá *in vitro* (adaptace na kultivační podmínky)
- existence dediferenciace *in vivo* je předmětem výzkumu (stejně jako transdiferenciace)

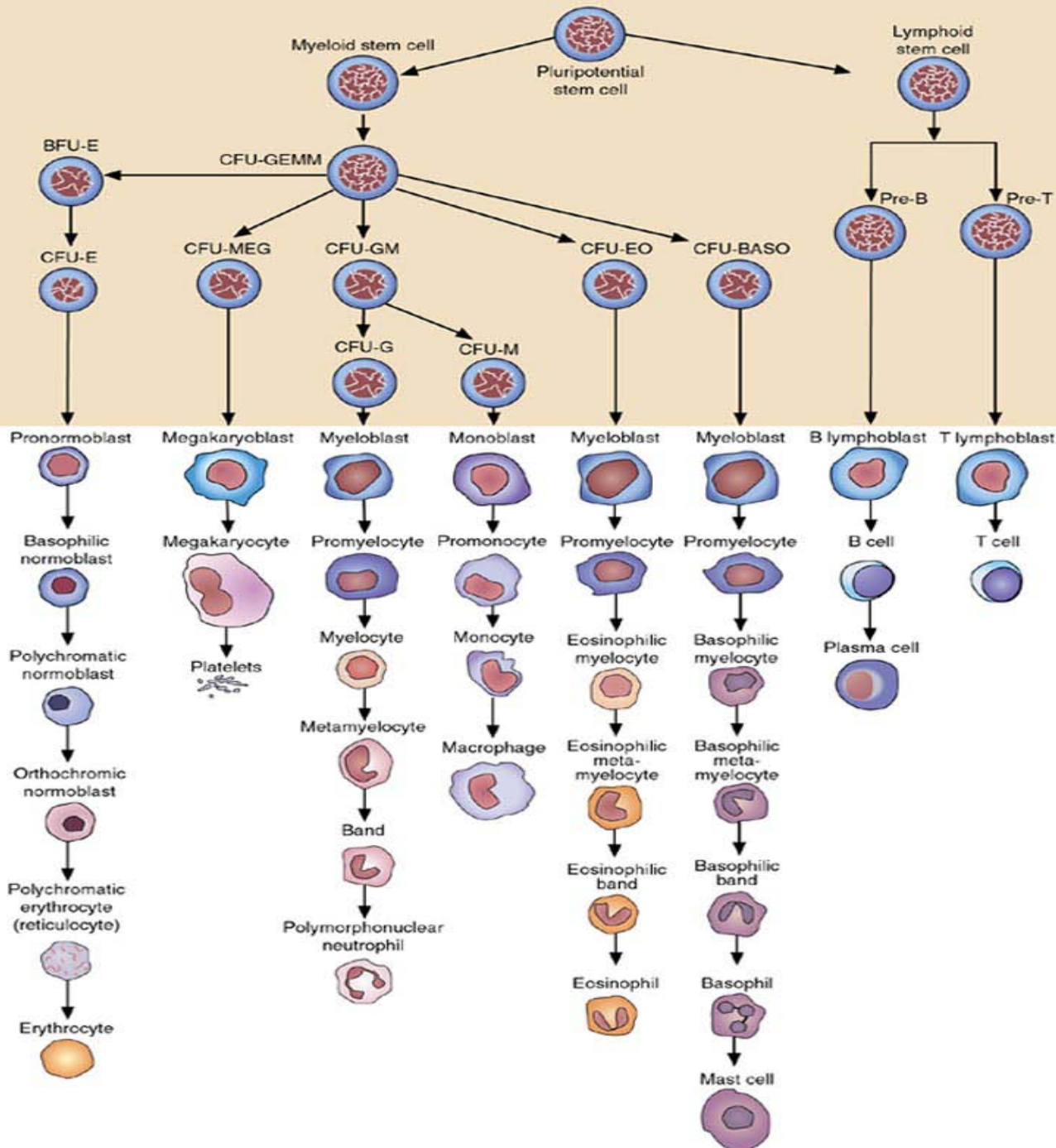
Transdiferenciace - schopnost určitých buněk určité tkáně (včetně SCs nebo progenitorů) diferencovat do buněk typických pro jiné orgány nebo tkáně (např. hematopoetické)

Diferenciační potenciál hematopoetických kmenových buněk

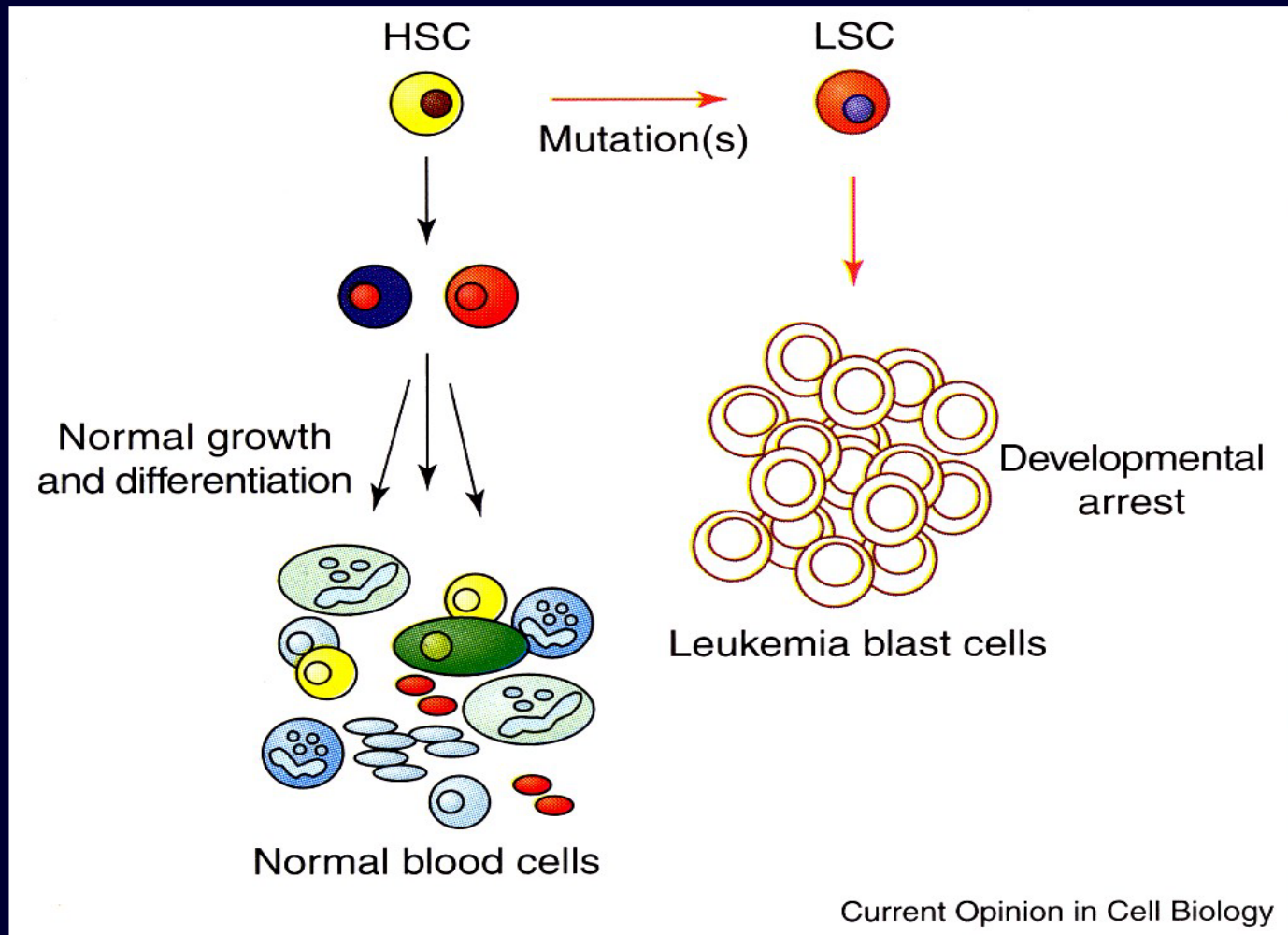




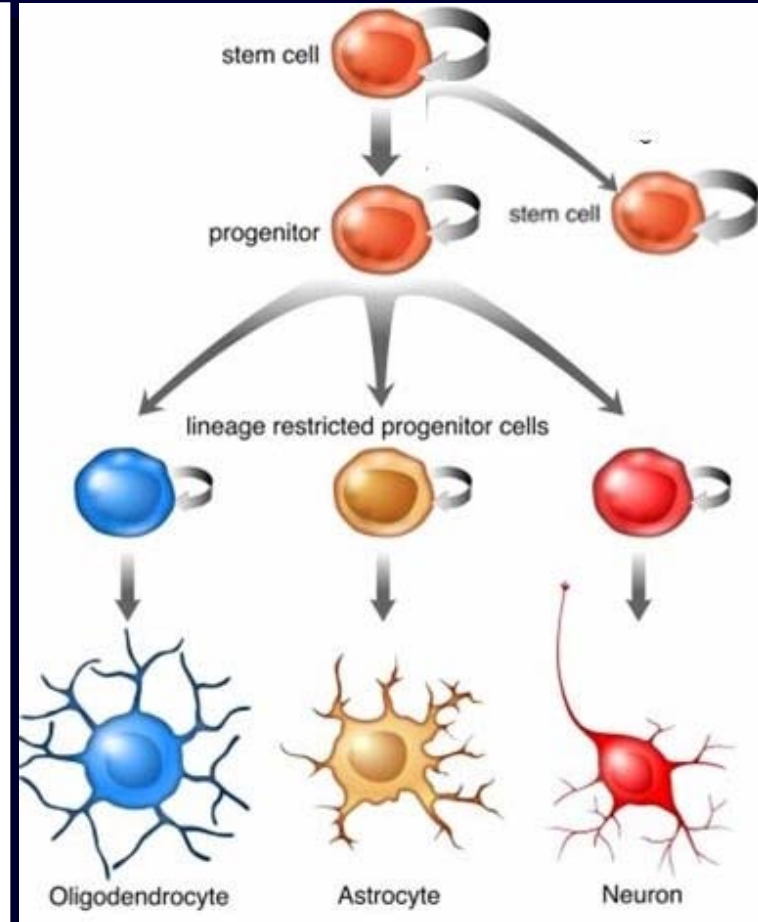
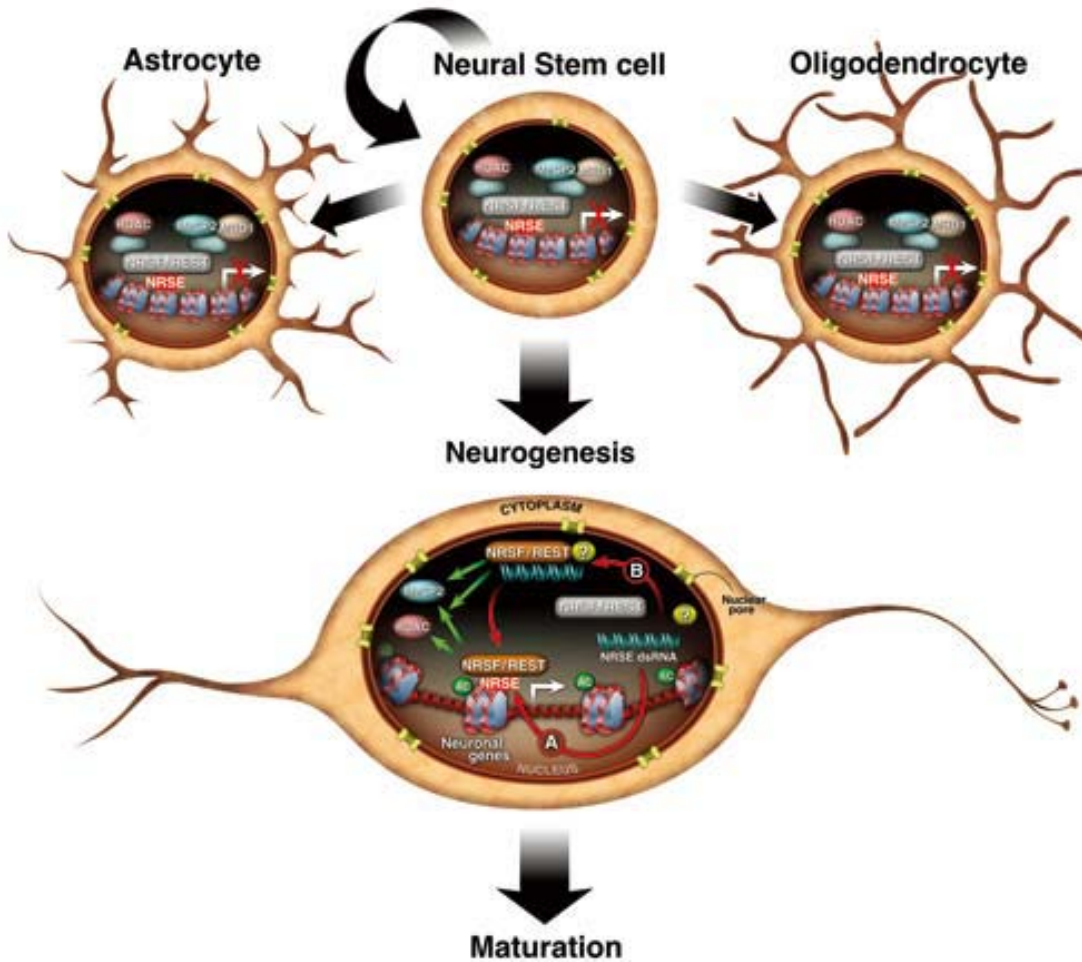
Diferenciace krevních buněk

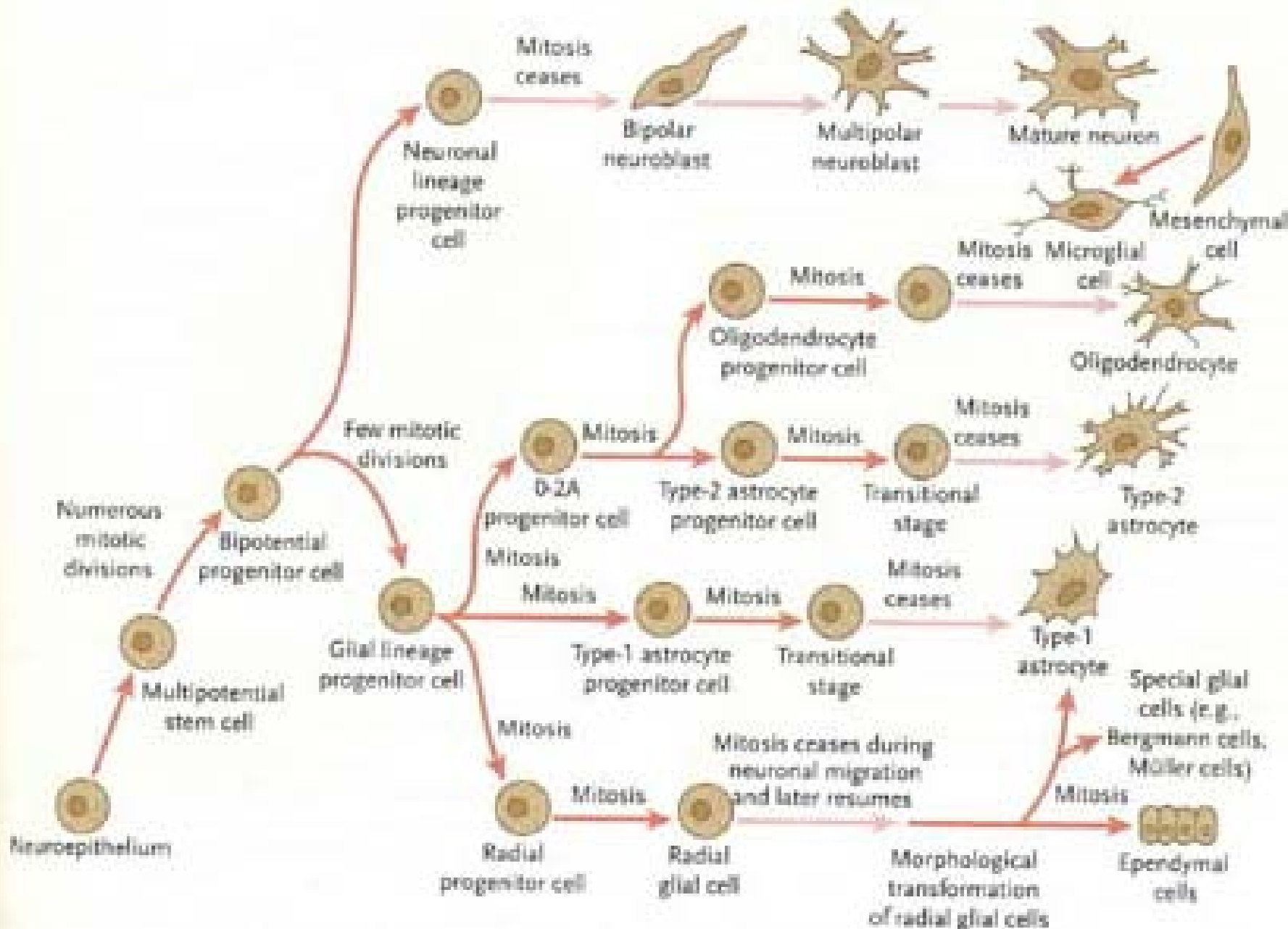


Porucha diferenciácie krvných buniek



Průběh neuronální diferenciace

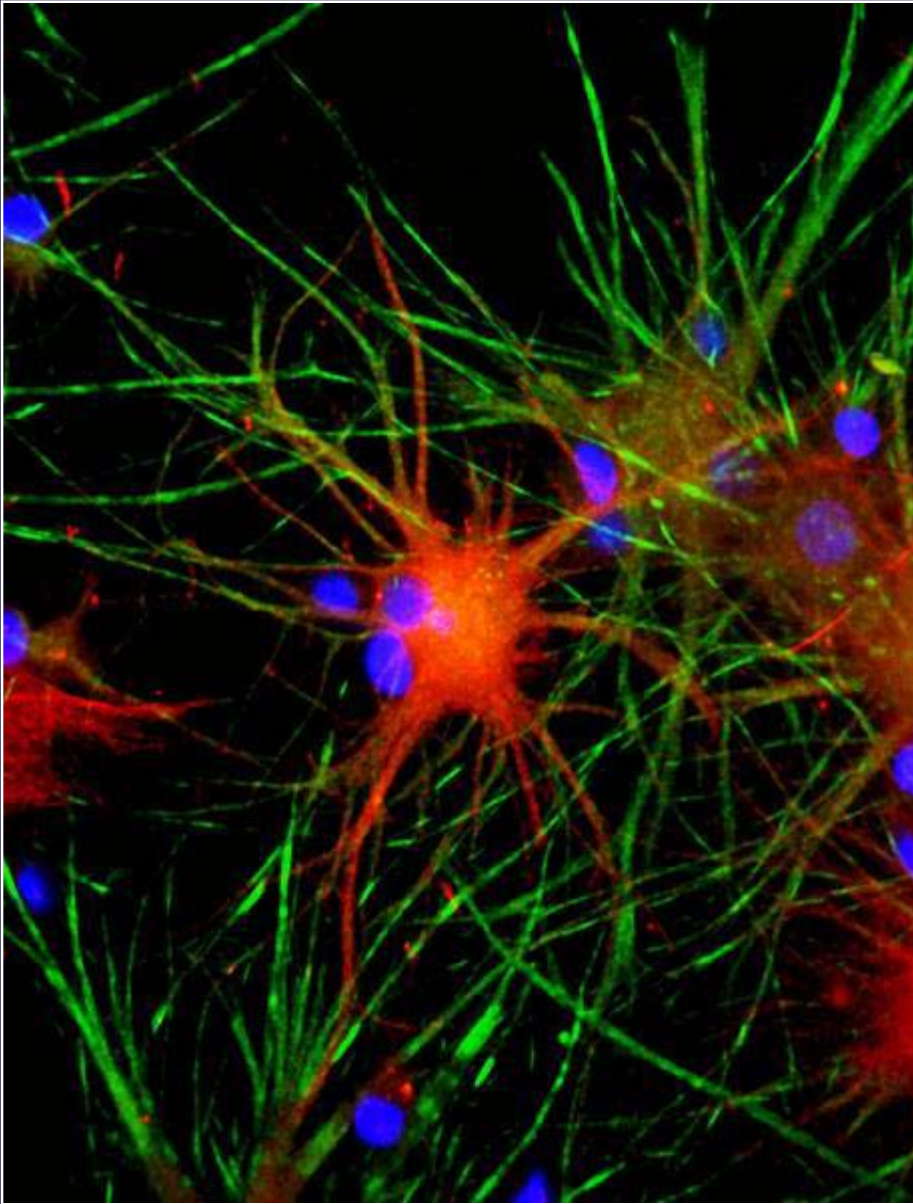


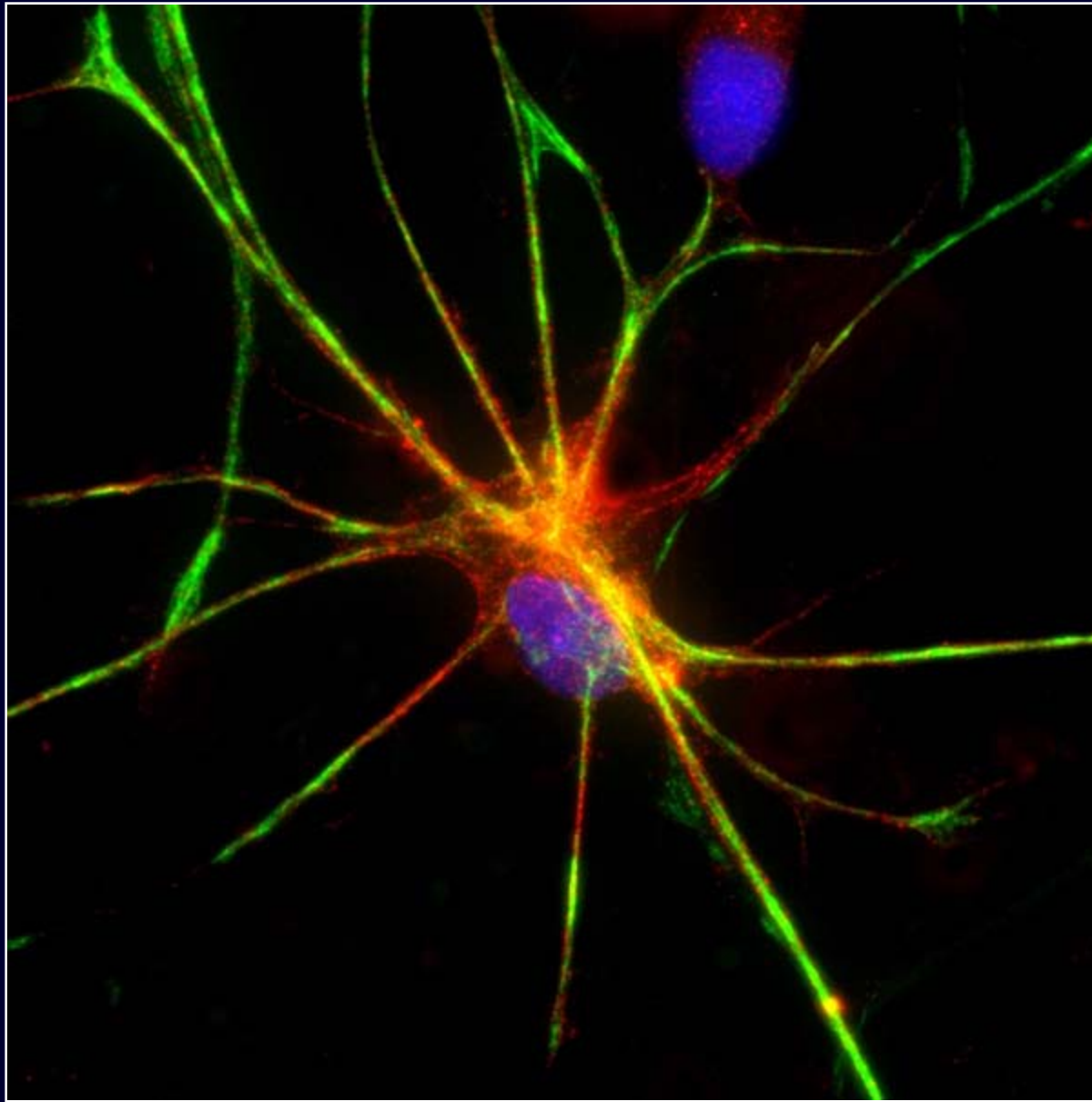


Neuronální diferenciace

Kmenová buňka:

- nestin
- GFAP
- DNA





Neuronální
diferenciace
Progenitorová
buňka:

- β -tubulin III
- GFAP
- DNA

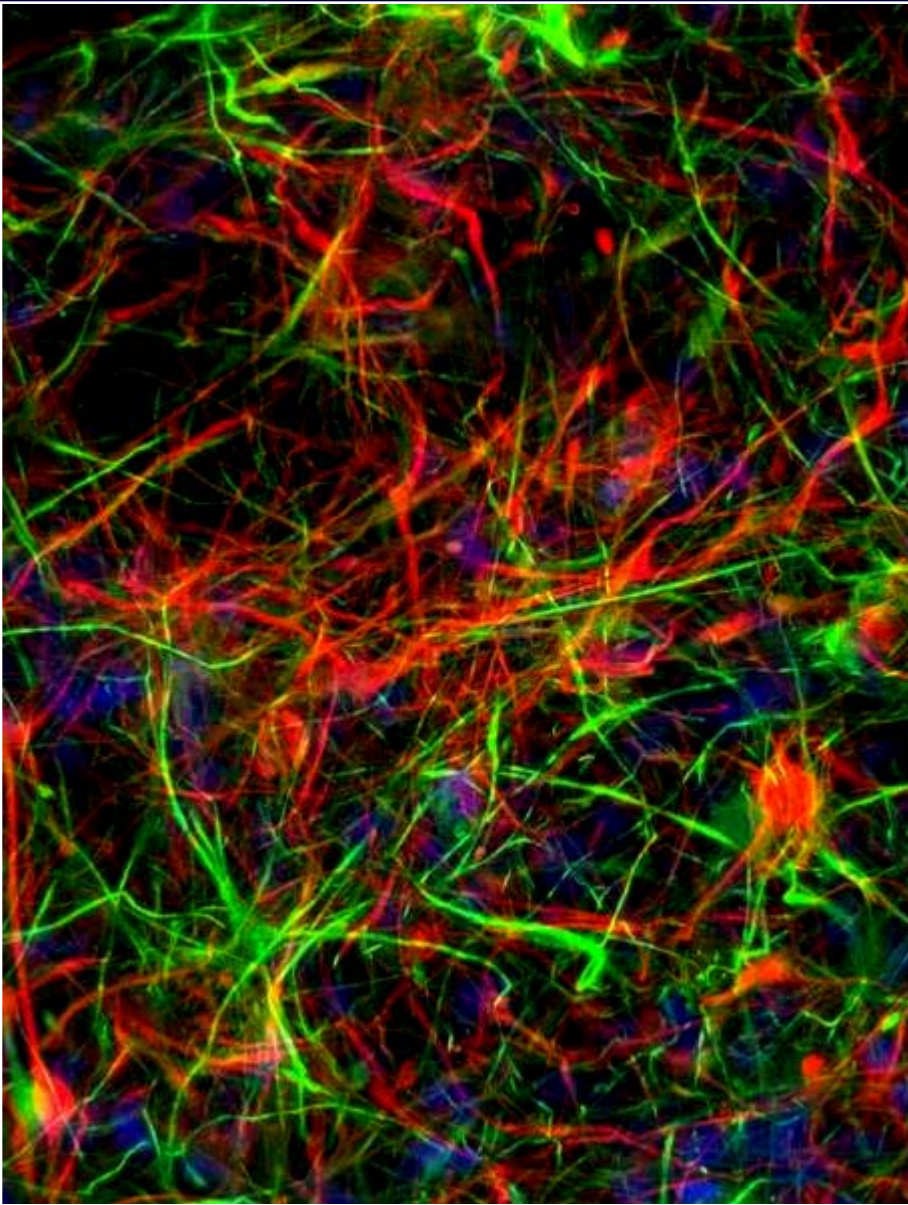
Neuronální diferenciace

Neurony:

- β -tubulin III
- DNA

Gliové buňky:

- GFAP
- DNA



RŮSTOVÉ FAKTORY

Růstové faktory (Growth Factors)

- vazba na příslušný membránový receptor
- aktivace specifické intracelulární signální dráhy
- **stimulace přežívání a růstu buněk**
(metabolismus, zvyšování objemu)
- některé fungují i jako **mitogeny** (např. PDGF),
resp. **induktory diferenciac**e
- např. cytokiny, hormony (insulin)

Cytokiny

- molekuly ovlivňující buněčnou proliferaci
(G-CSF, GM-CSF vs. Fas-liganda)

EGF (Epidermal Growth Factor)

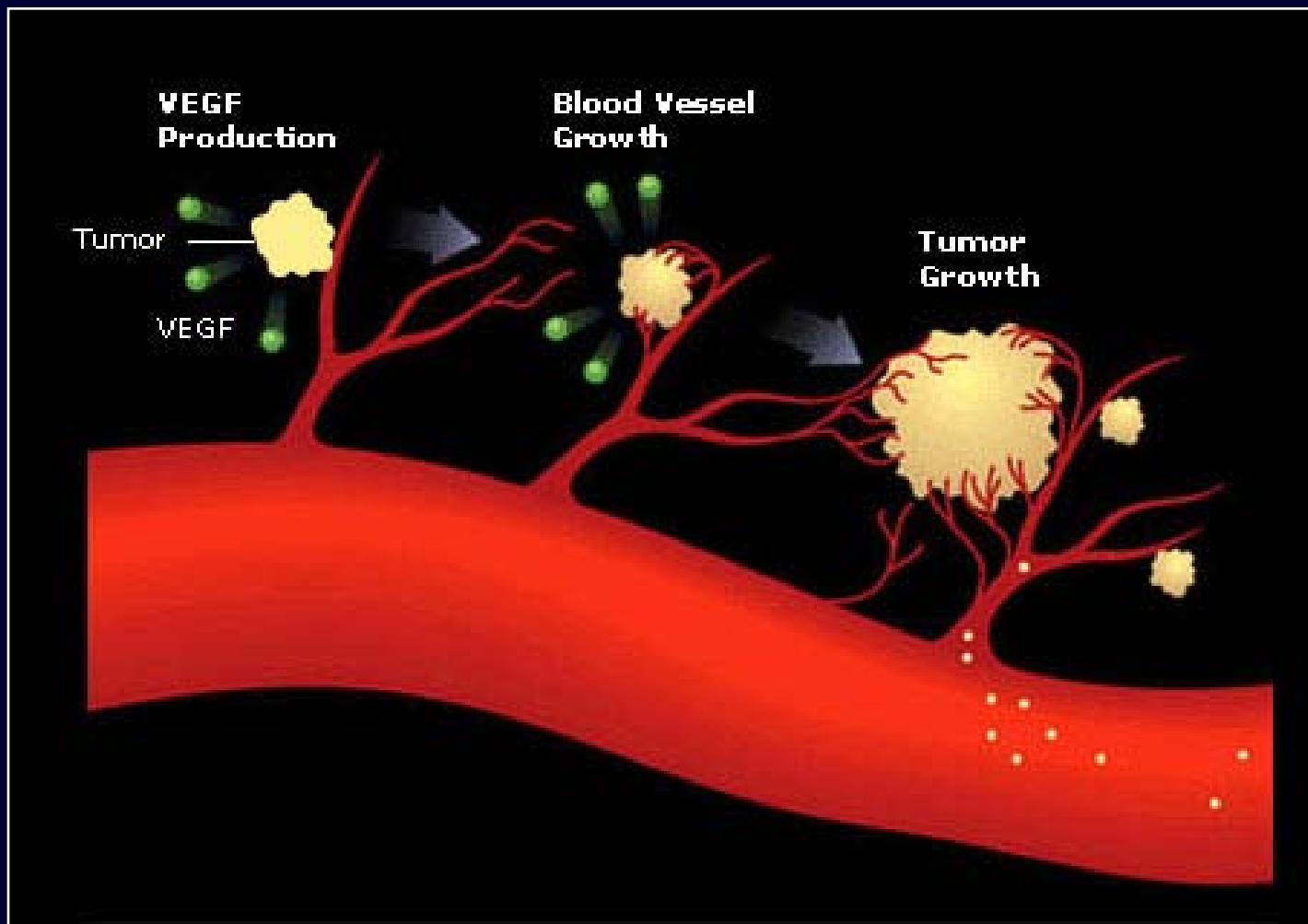
- specifická vazba na EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) → aktivace RTK kaskády

FGF Family (Fibroblast Growth Factor)

- 22 molekul
- FGF2 = bFGF (basic fibroblast growth factor)
- receptory FGFR1-4

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

- stimulace vaskulárních endotelií → angiogeneze
- v případě hypoxie - exprese HIF -> VEGF



TGF (Transforming Growth Factor)

- up-regulace u některých typů nádorů
- schopnost indukovat nádorovou transformaci v podmínkách *in vitro* (kryší fibroblasty ledvin)
- **TGF- α** (makrofágy, mozkové buňky, keratinocyty):
vývoj epitelu - příbuznost s EGF, vazba na EGFR
- **TGF- β** - isoformy **$\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$** : diferenciace buněk, vývoj embrya, regenerace tkání, regulace imunitního systému

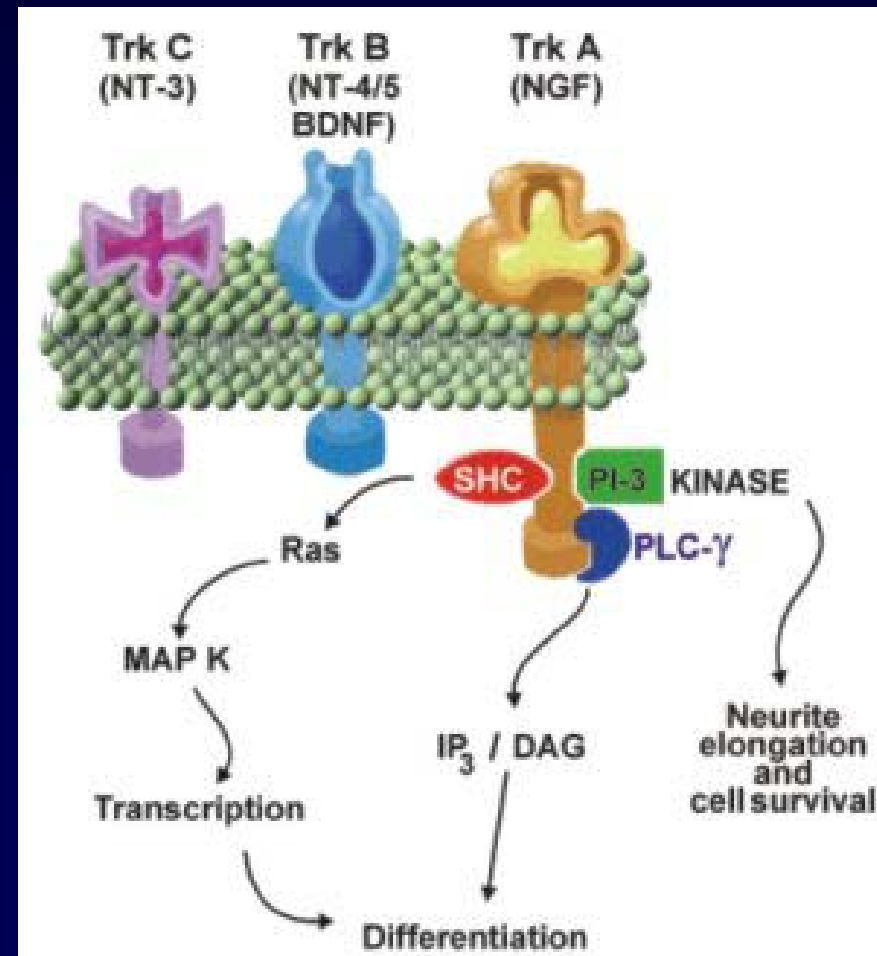
Neurotrofiny (Neurotrophins)

- produkovány cílovou tkání → přežívání neuronů, neuronální diferenciace

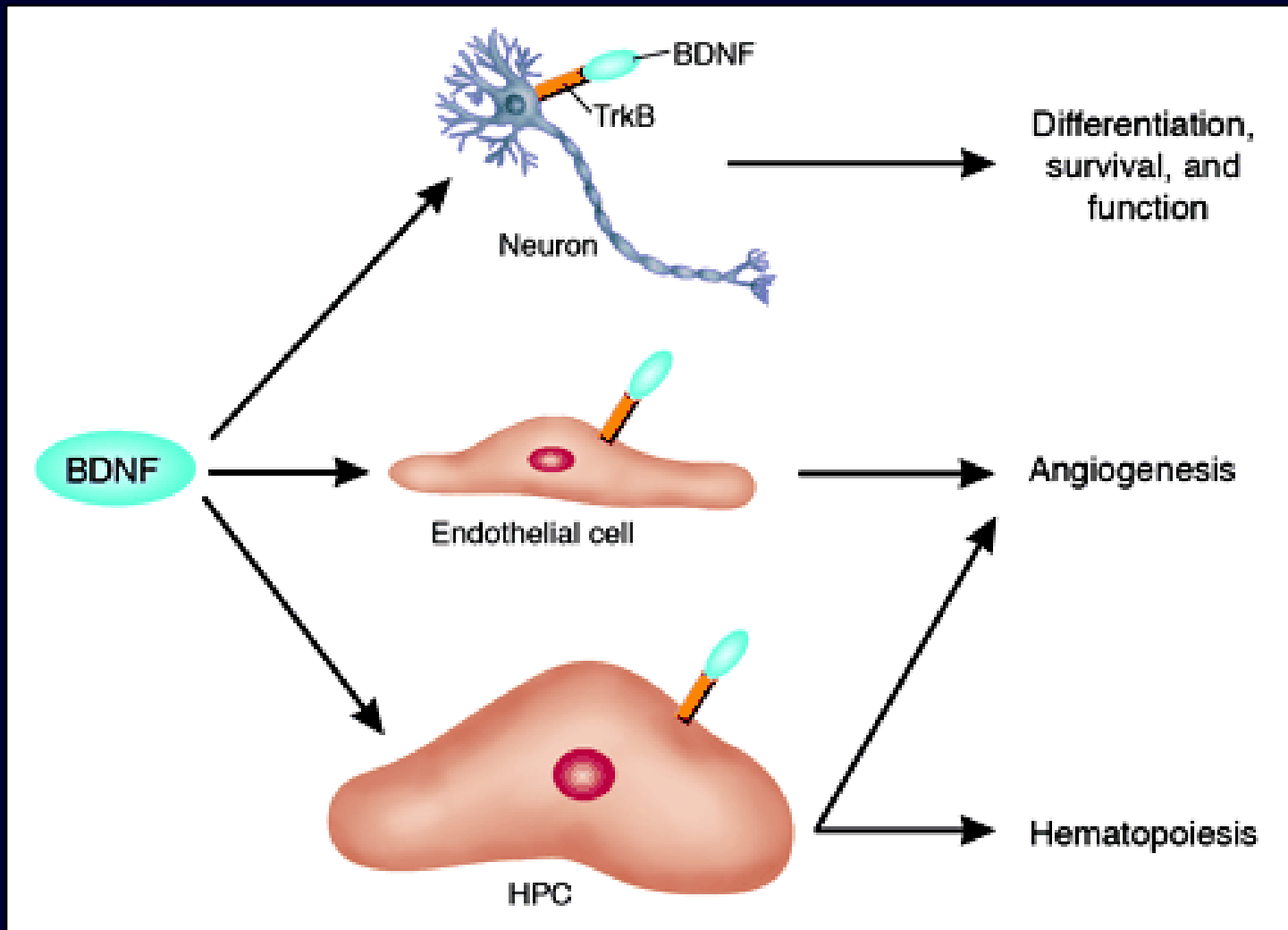
- receptory:

p75, Trk receptory (A,B,C)

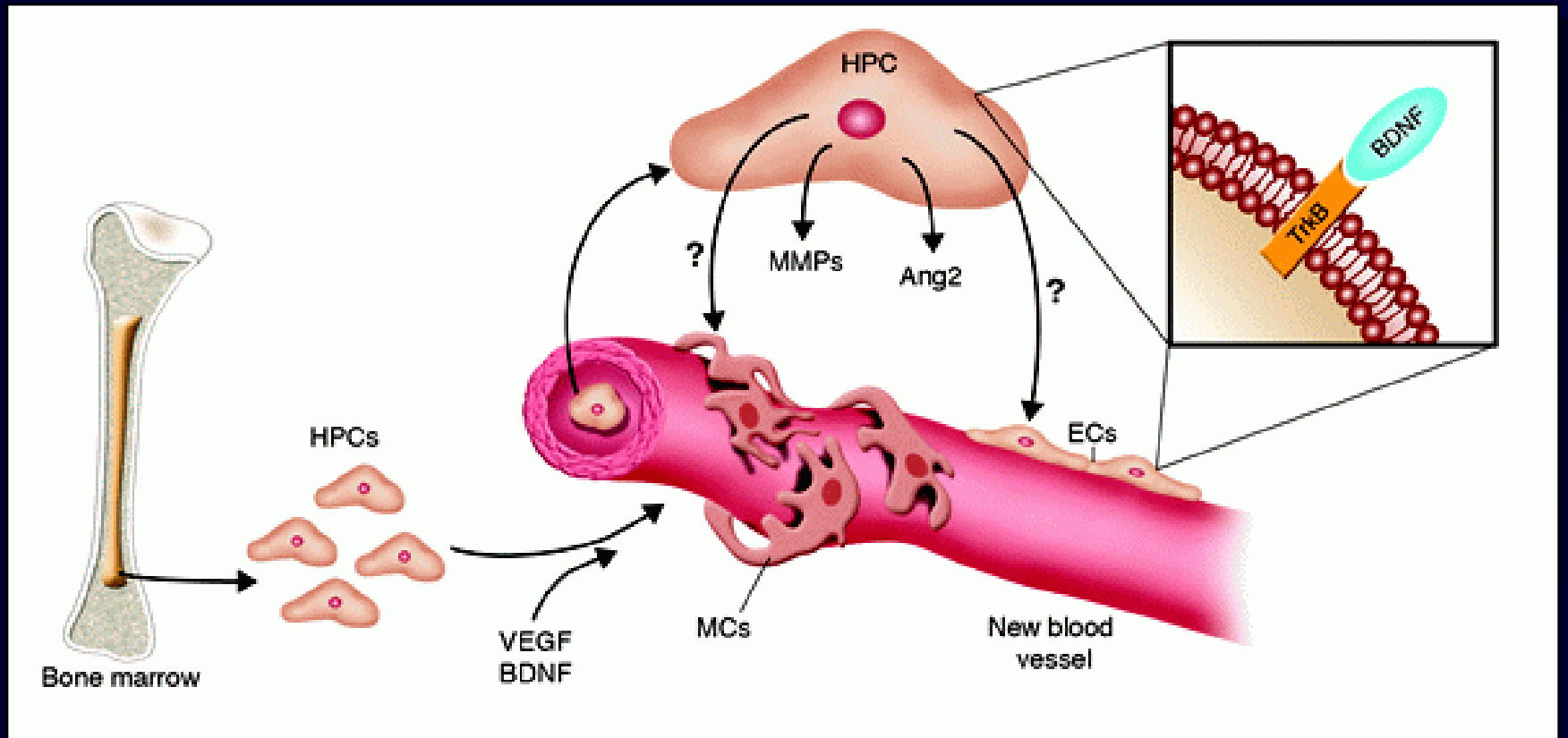
- NGF (nerve growth factor)
- BDNF (brain-derived neurotrophic factor)
- NT-3 (neurotrophin-3)
- NT-4 (neurotrophin-4)



Pleiotropní efekt BDNF



BDNF-indukovaná neovaskularizace



EPO (Erythropoietin)

- produkce v ledvinách
- stimulace tvorby erytrocytů
- rekombinantní EPO

TPO (Thrombopoietin)

- produkce ve slezině a v ledvinách
- stimulace tvorby megakaryocytů, krevních destiček

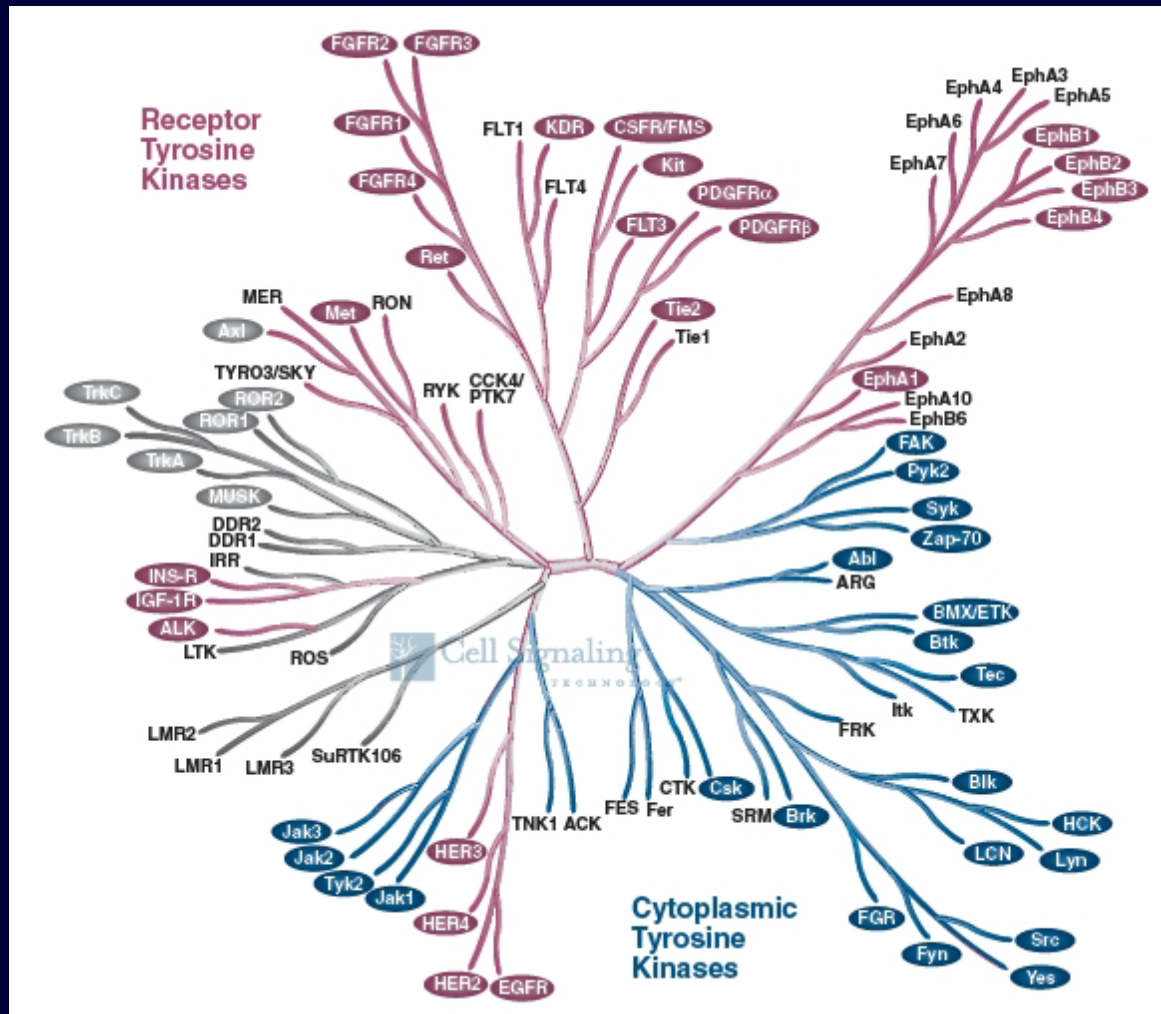
G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor)

- stimulace tvorby granulocytů/neutrofilů

GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)

RECEPTOROVÉ TYROZIN-KINÁZY

funkce: regulace proliferace, diferenciace, metabolismu, aj.
genom: 59 genů → 20 receptorových rodin (+alternativní sestřih)

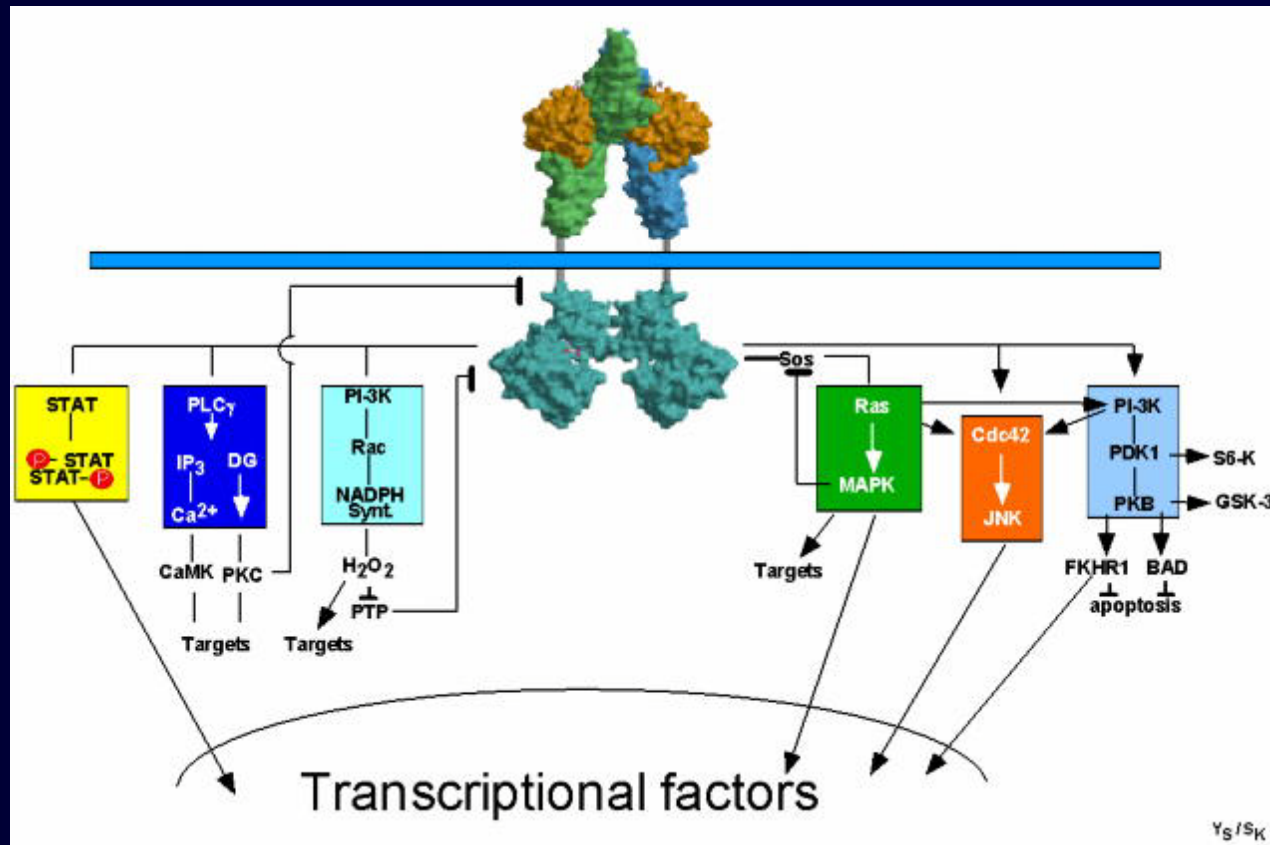


AKTIVACE:

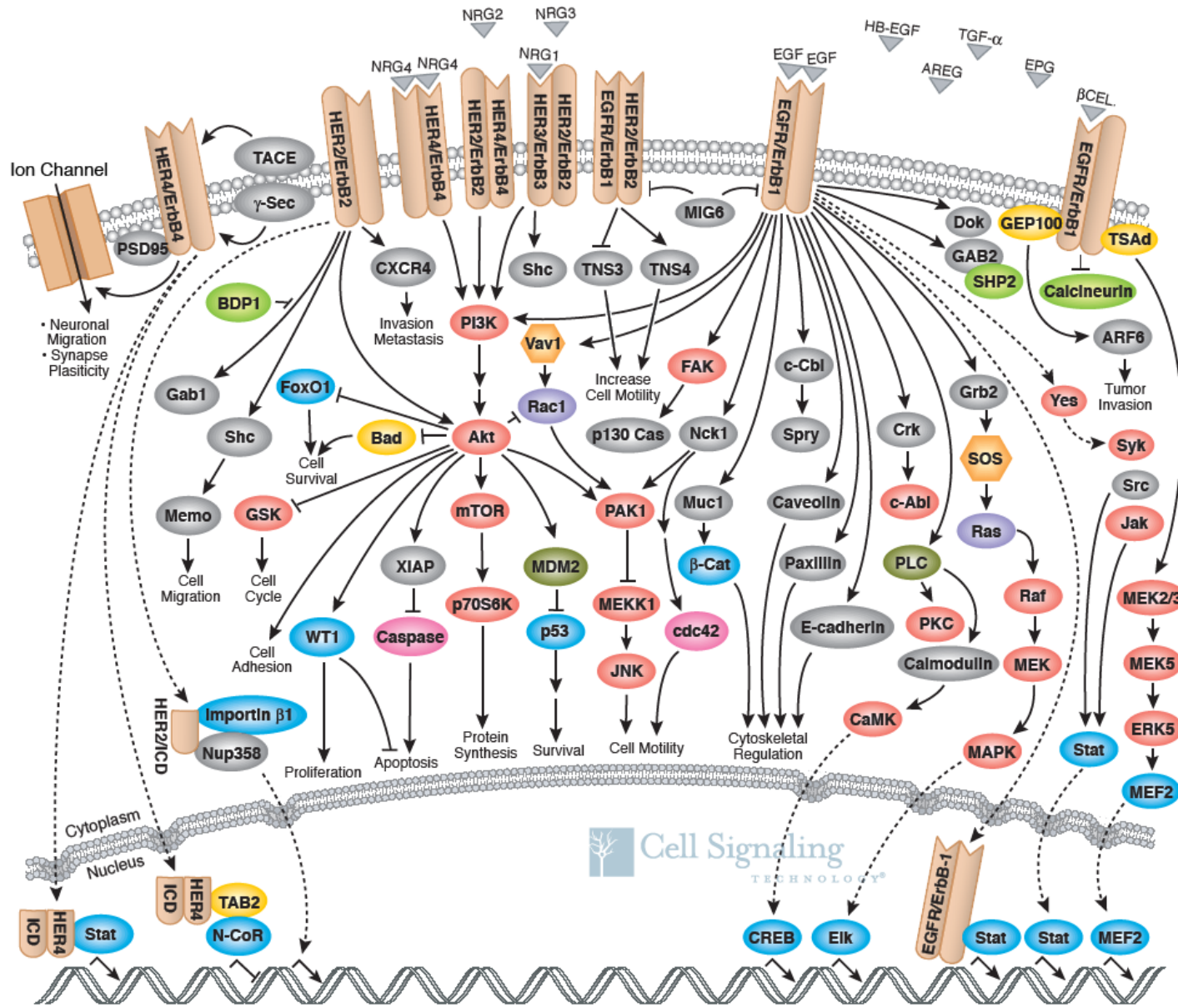
dimerizace vlivem růstových faktorů → cross-fosforylace

a) → konformační změna – stimulace katalytické aktivity

b) → tvorba vazebných míst pro domény adaptorových proteinů (Grb-2)



ErbB/HER Signaling Network



Cell Signaling TECHNOLOGY



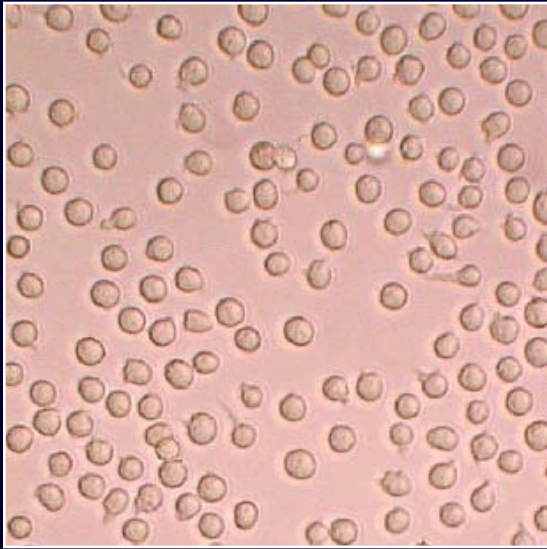
INDUKOVANÁ DIFERENCIACE

Indukovaná diferenciacie

- induktory diferenciacie (růstové faktory, vitamíny, inhibitory kináz, změny v kultivaci, syntetické látky...)
- indukce příslušné diferenciační dráhy
- inhibice signálních drah pro „self-renewal“

Příklady induktorů diferenciacie *in vitro*:

- kyselina all-*trans* retinová (ATRA)
- $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$)
- phorbol myristylacetát (PMA)
- trichostatin
- dimethylsulfoxid (DMSO)
- SU5402 (inhibitor FGFR1)



Linie HL-60:

- lidská myeloidní leukémie
- spontánní diferenciaci:
asi 10 % buněk populace

- **induktory granulocytární diferenciaci:**

kyselina *all-trans* retinová (*atRA*)
dimethylsulfoxid (DMSO)

- **induktory monocyto/makrofágové diferenciaci:**

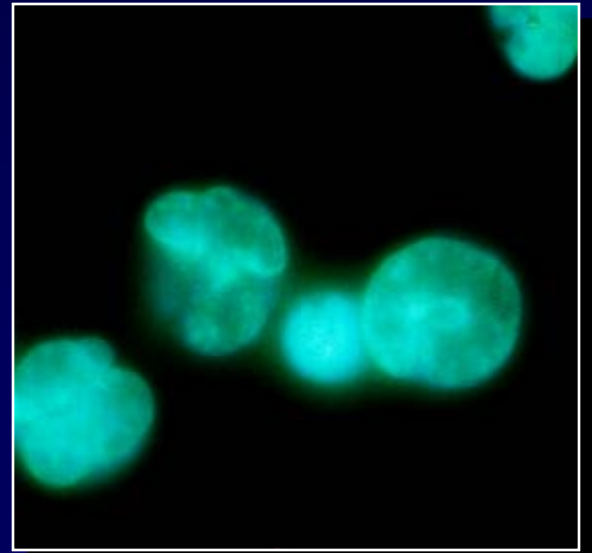
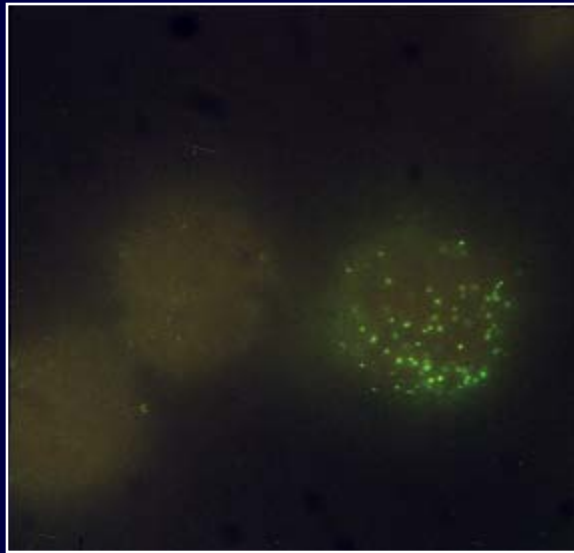
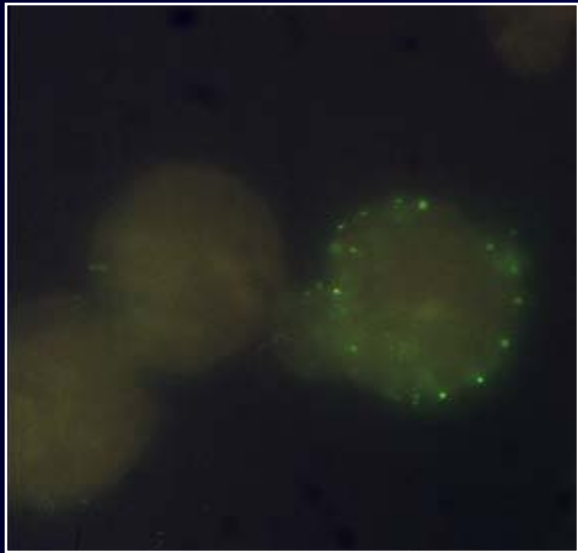
phorbolmyristyl acetát (PMA)
1,25-dihydroxyvitamin D₃

Diferenciace linie HL-60 do stádia granulocytů:

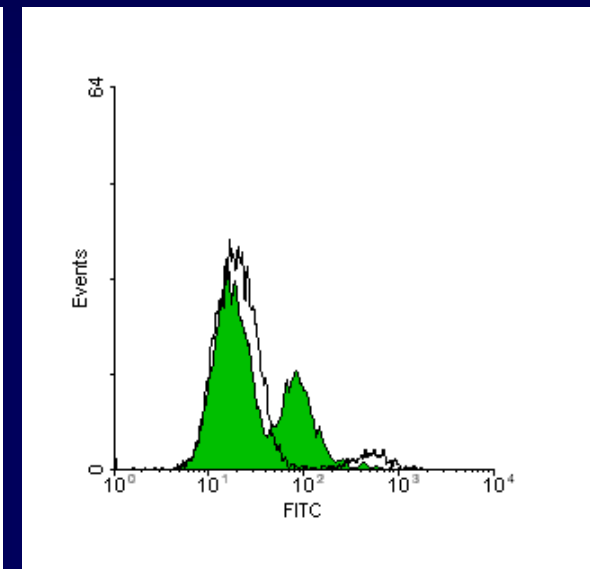
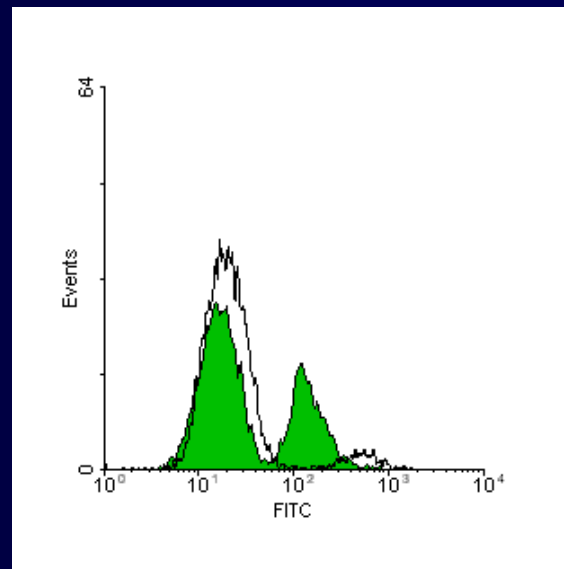
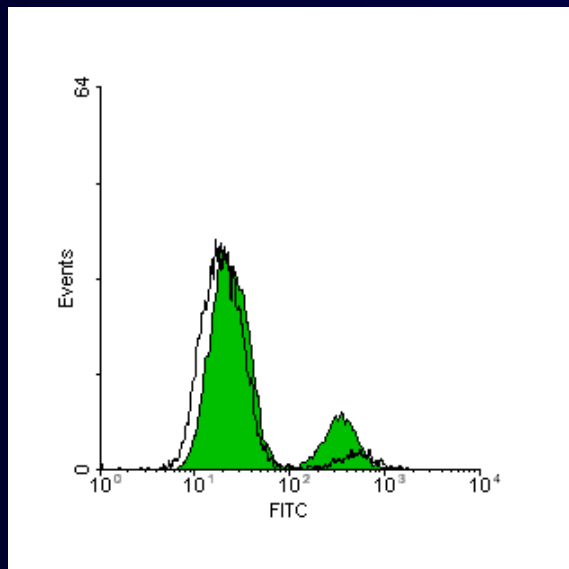
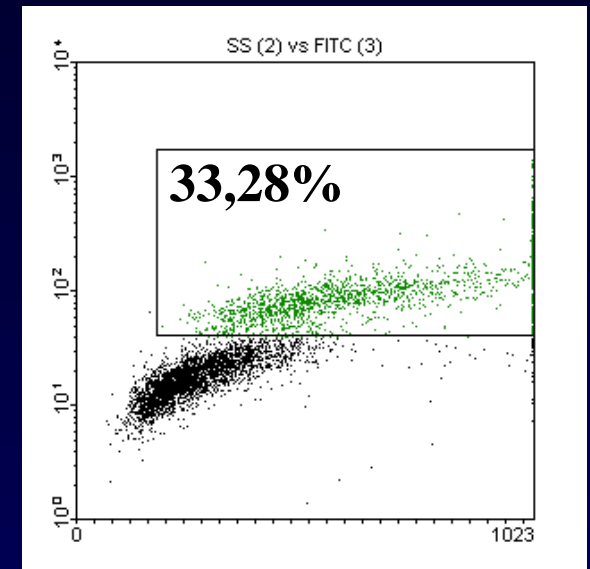
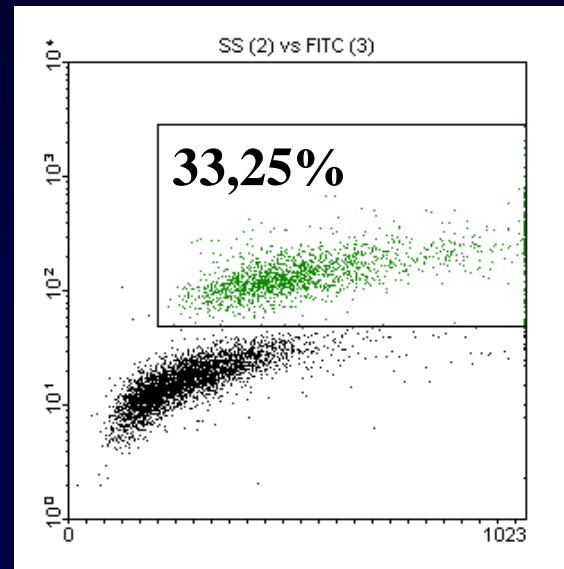
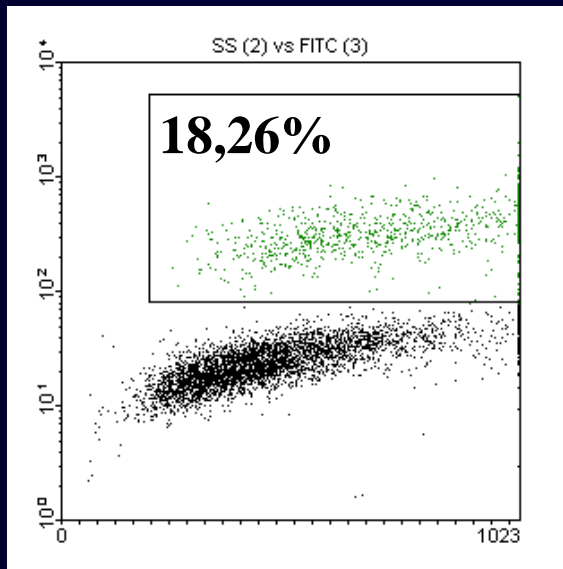
Induktor: 1 μ M kyselina *all-trans* retinová

Marker: CD-66b (CD-67)

Detekce: anti-CD66b, SwAM-FITC



Granulocytární diferenciace HL-60: flow cytometrie / CD66b



1 μM ATRA

1 μM ATRA + 13 μM CA

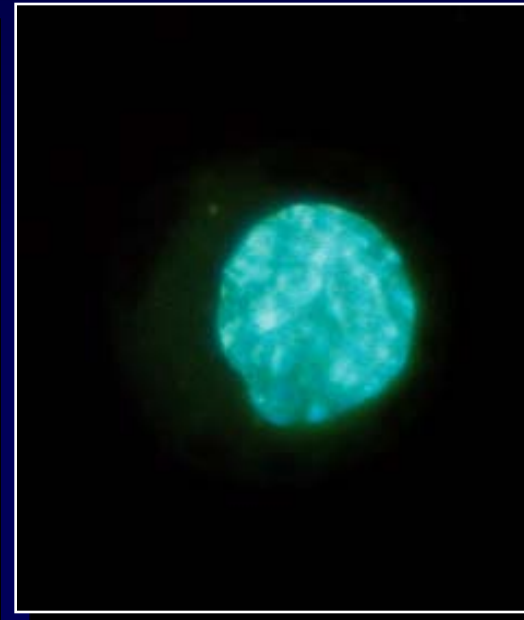
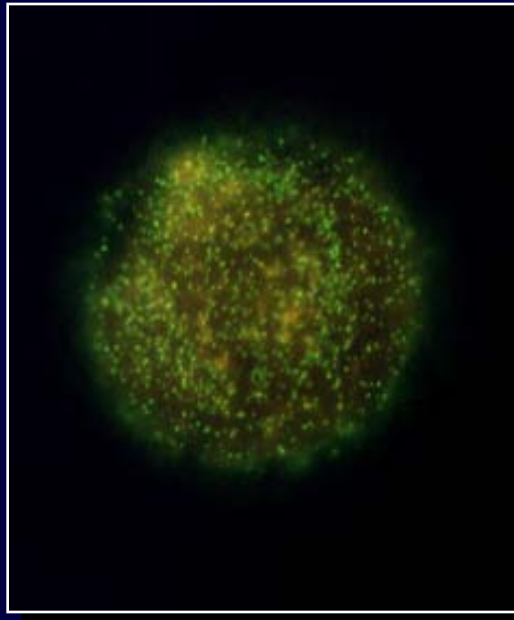
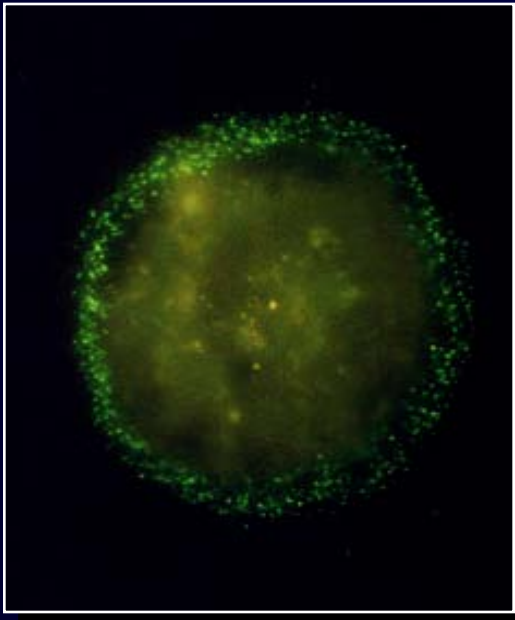
1 μM ATRA + 52 μM CA

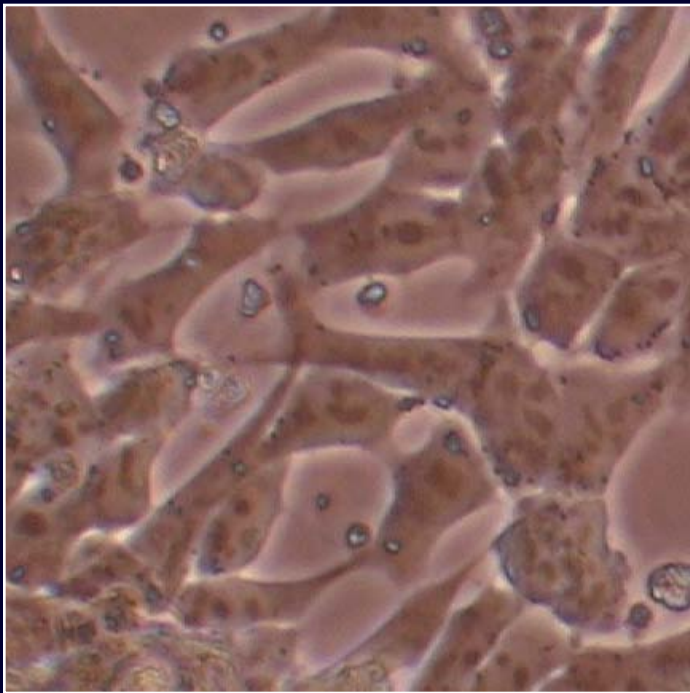
Diferenciace linie HL-60 do stádia makrofágů:

Induktor: 1,6 nM phorbolmyristyl acetát (PMA)

Marker: CD-14

Detekce: anti-CD14, SwAM-FITC





Linie P19:

- myší embryonální karcinom
- 7denní embryo do testes
- „embryoid bodies“ (EB)

- induktory mesodermální diferenciaci:

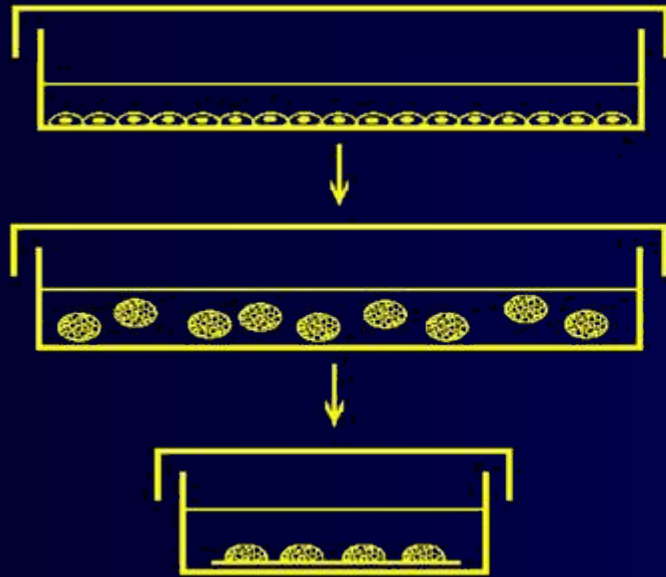
kyselina *all-trans* retinová (*atRA*)

dimethylsulfoxid (DMSO)

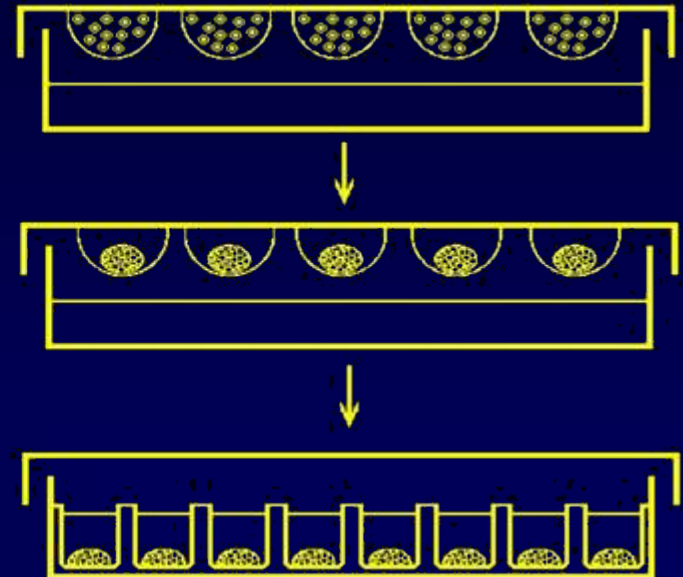
- induktor neuronální diferenciaci:

kyselina *all-trans* retinová (*atRA*)

Schéma diferenciace buněk P19



metoda kultivace na
bakteriologických miskách



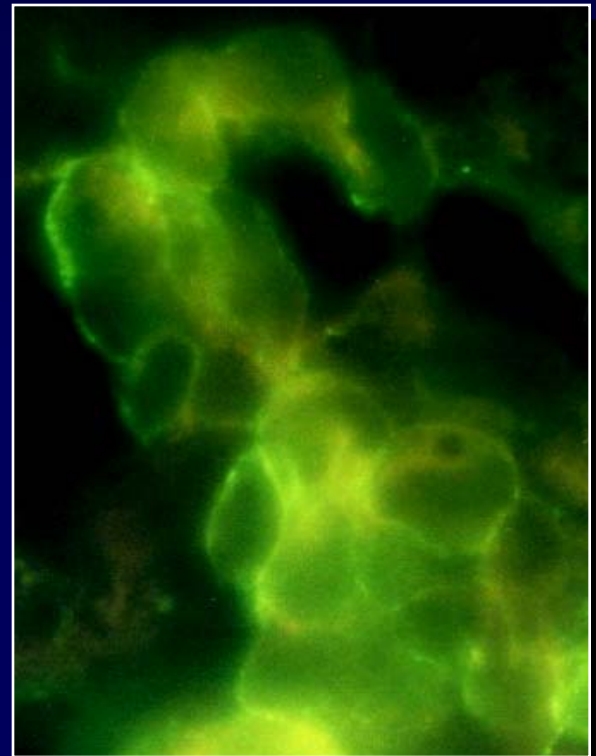
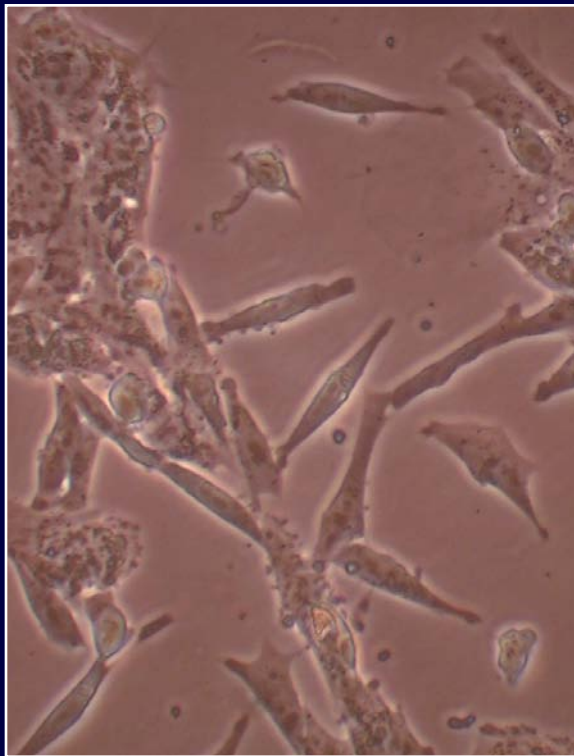
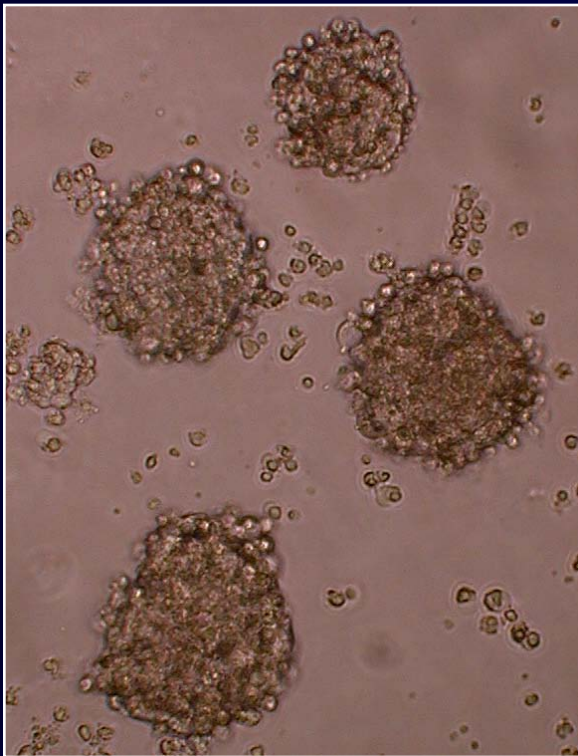
metoda „visících kapek“

Mesodermální diferenciace buněk P19:

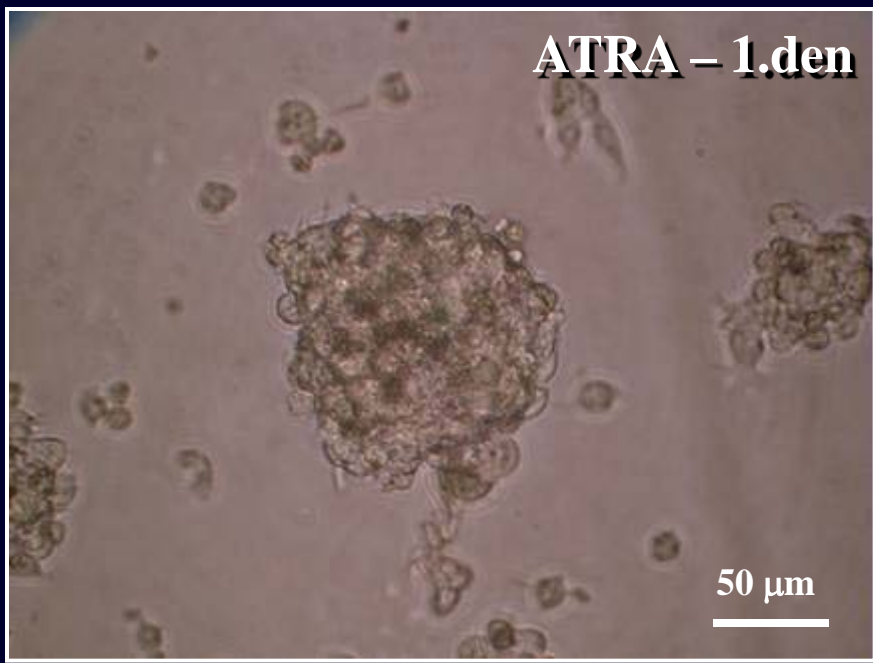
Induktor: 0,8% DMSO

Marker: myosin

Detekce: anti-skeletal myosin, SwAM-FITC

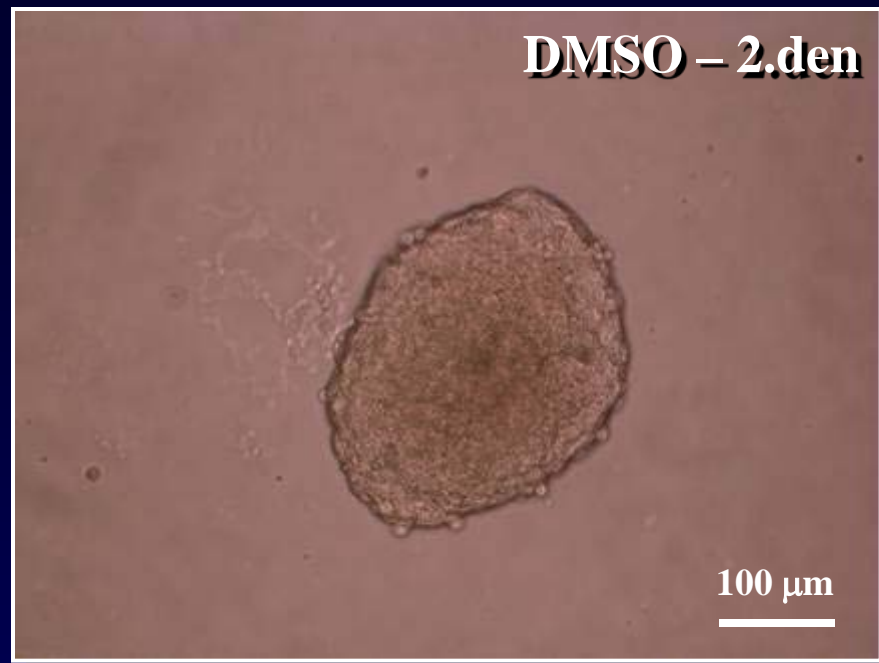


ATRA – 1.den



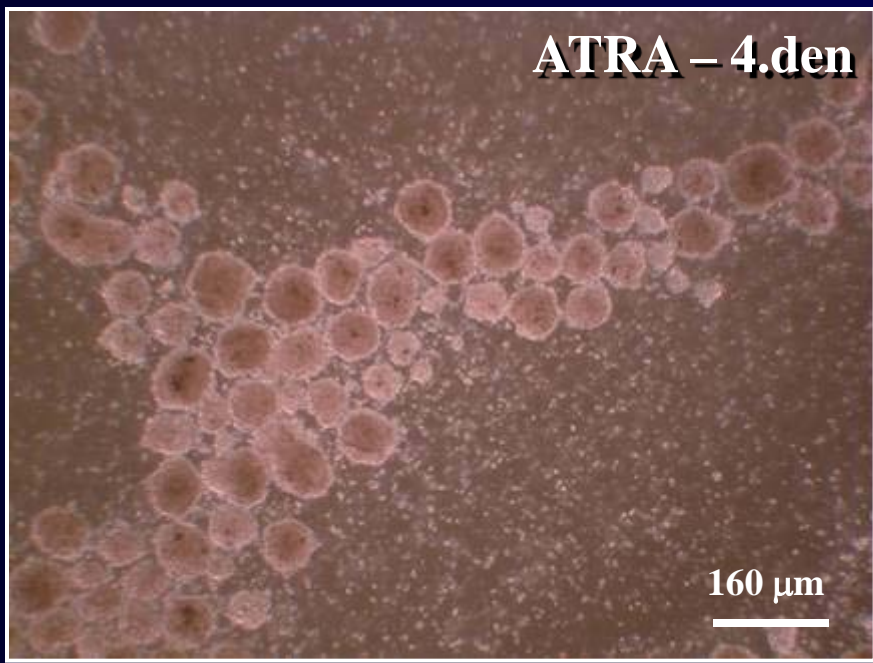
50 μm

DMSO – 2.den



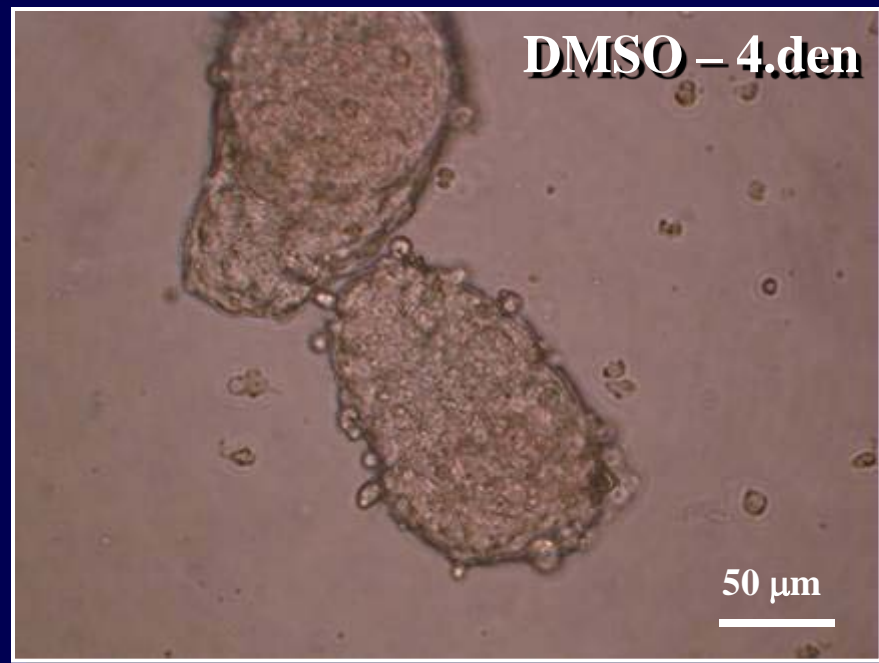
100 μm

ATRA – 4.den



160 μm

DMSO – 4.den



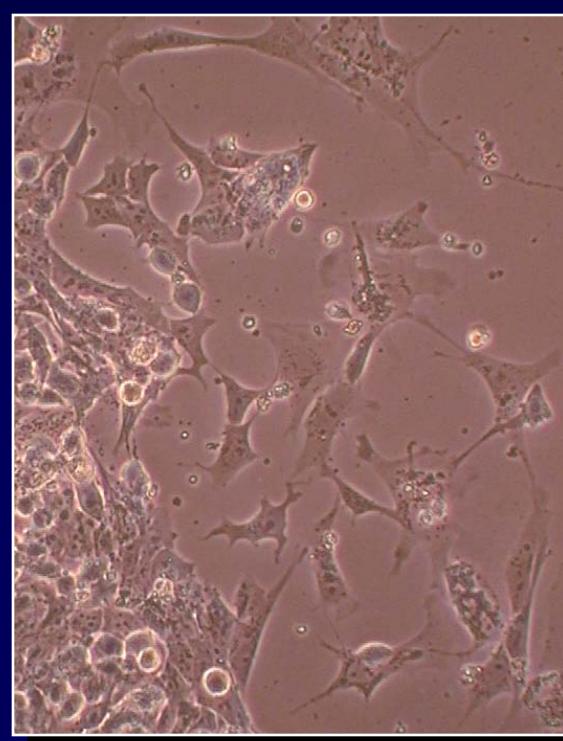
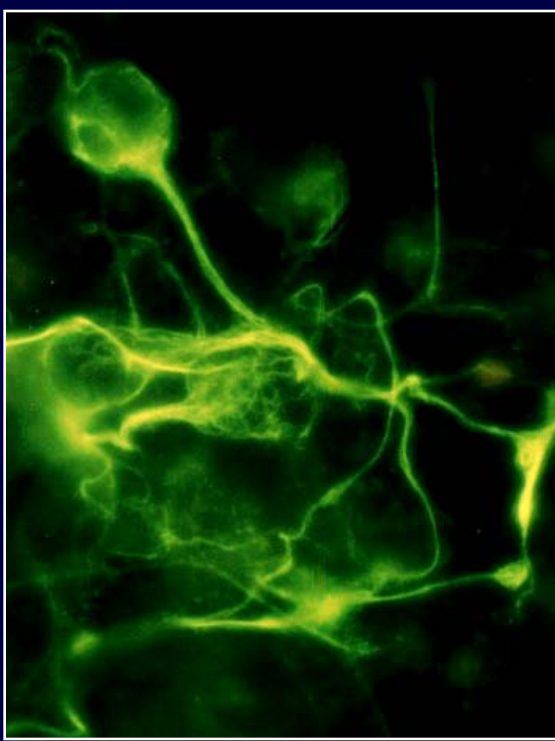
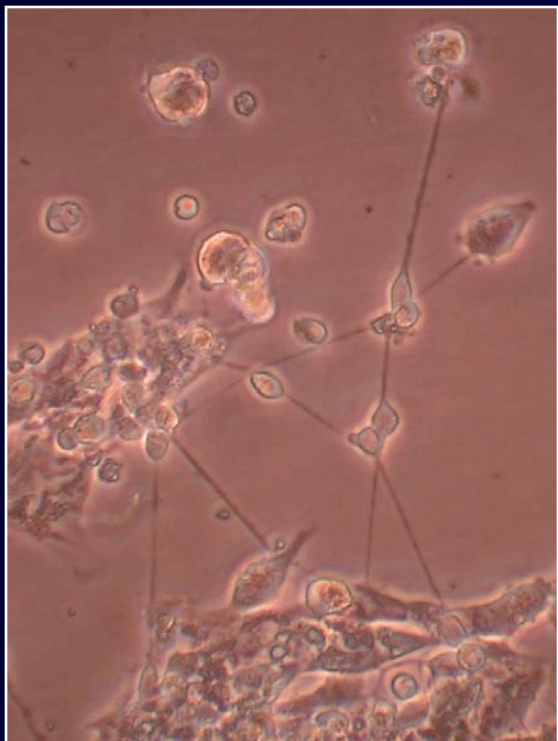
50 μm

Neuronální diferenciace buněk P19:

Induktor: 1 μ M kyselina *all-trans* retinová (ATRA)

Marker: neurofilamin

Detekce: anti-neurofilament 160, SwAM-FITC



Praktické využití indukované diferenciaci:

- základní výzkum
- diferenciační terapie v onkologii
 - hematologické malignity (APL, AML)
 - vybrané typy solidních nádorů (neuroblastom)
- diferenciační terapie v dermatologii
 - akné
- příprava buněčných derivátů *in vitro*

Retinoidy jako induktory diferenciace v klinické praxi:

Roaccutane (isotretinoin, 13-cis-RA)

- akné, neuroblastom



Vesanoid (tretinoin, all-trans-RA)

- akutní leukemie



COMBAT

léčba solidních nádorů (meduloblastom , neuroblastom, sarkomy...)

celecoxib

etoposid

temozolomid

kys. retinová

inhibitor cyclooxygenázy

inhibitor topomerázy II

alkylační činidlo

diferenciační činidlo

antiangiogenní účinek

zástava b. cyklu

apoptóza

diferenciace/apoptóza

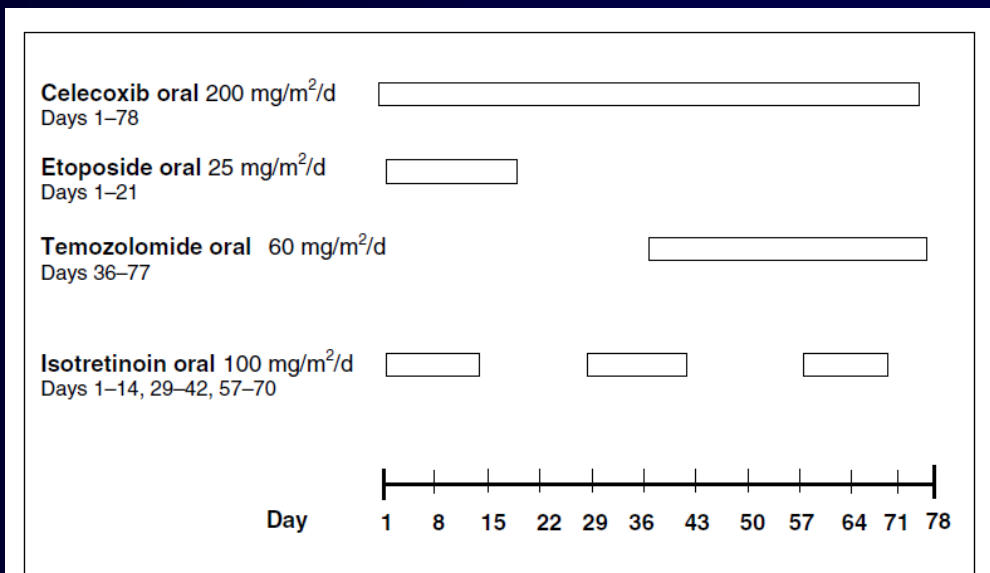


Fig. 1. Combined oral maintenance biodifferentiating and antiangiogenic therapy (COMBAT) – treatment plan.

ONKOLOGIE

Original Article · Originalarbeit

Onkologie 2006;29:308–313

DOI: [10.1159/000093474](https://doi.org/10.1159/000093474)

Published online: June 9, 2006

Combined Biodifferentiating and Antiangiogenic Oral Metronomic Therapy is Feasible and Effective in Relapsed Solid Tumors in Children: Single-Center Pilot Study

Jaroslav Sterba^a Dalibor Valik^b Peter Mudry^a Tomas Kepak^a Zdenek Pavelka^a
Viera Bajciová^a Karel Zitterbart^a Vera Kadlecová^a Pavel Mazanek^a

^aDepartment of Pediatric Oncology, University Hospital Brno,

^bDepartment of Laboratory Medicine, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic