

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

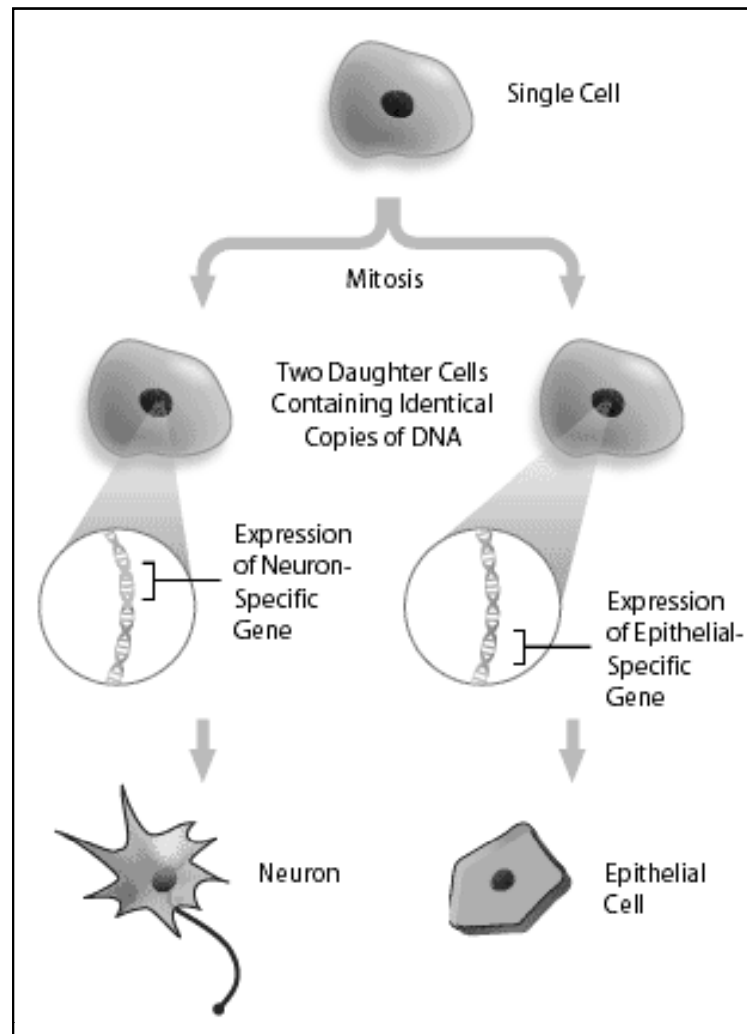
Vývoj mnohobuněčného organismu

- 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)



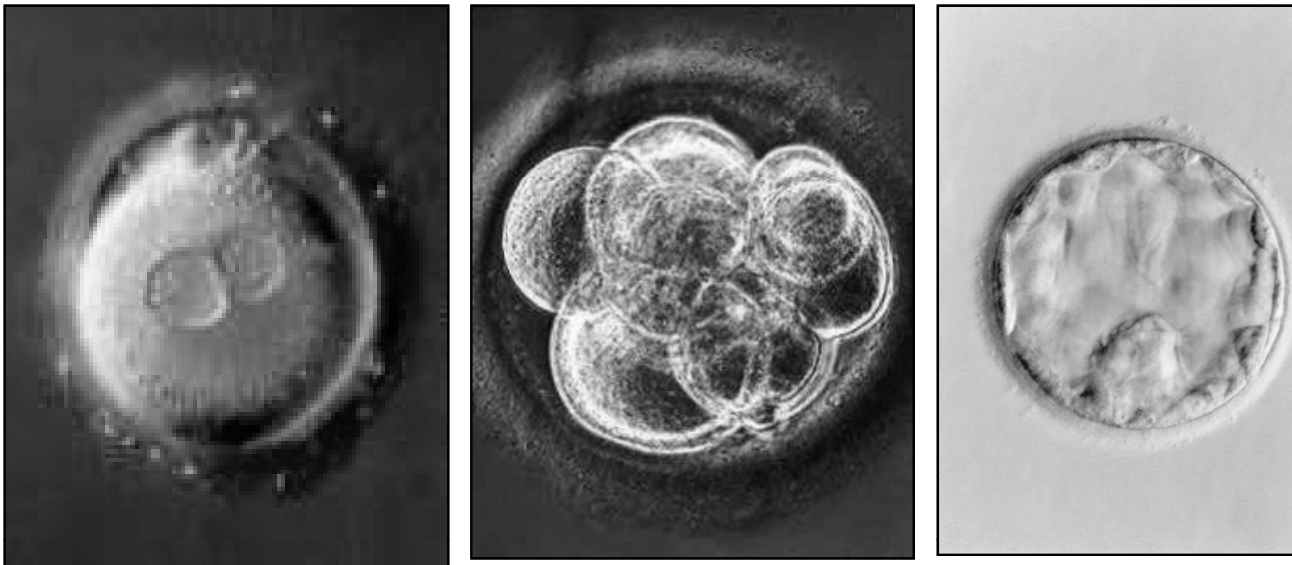
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 08 / 13.4.

DIFERENCIAČNÍ POTENCIÁL BUNĚK

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 08 / 13.4.

Časná embryogeneze u savců:

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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 08 / 13.4.

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

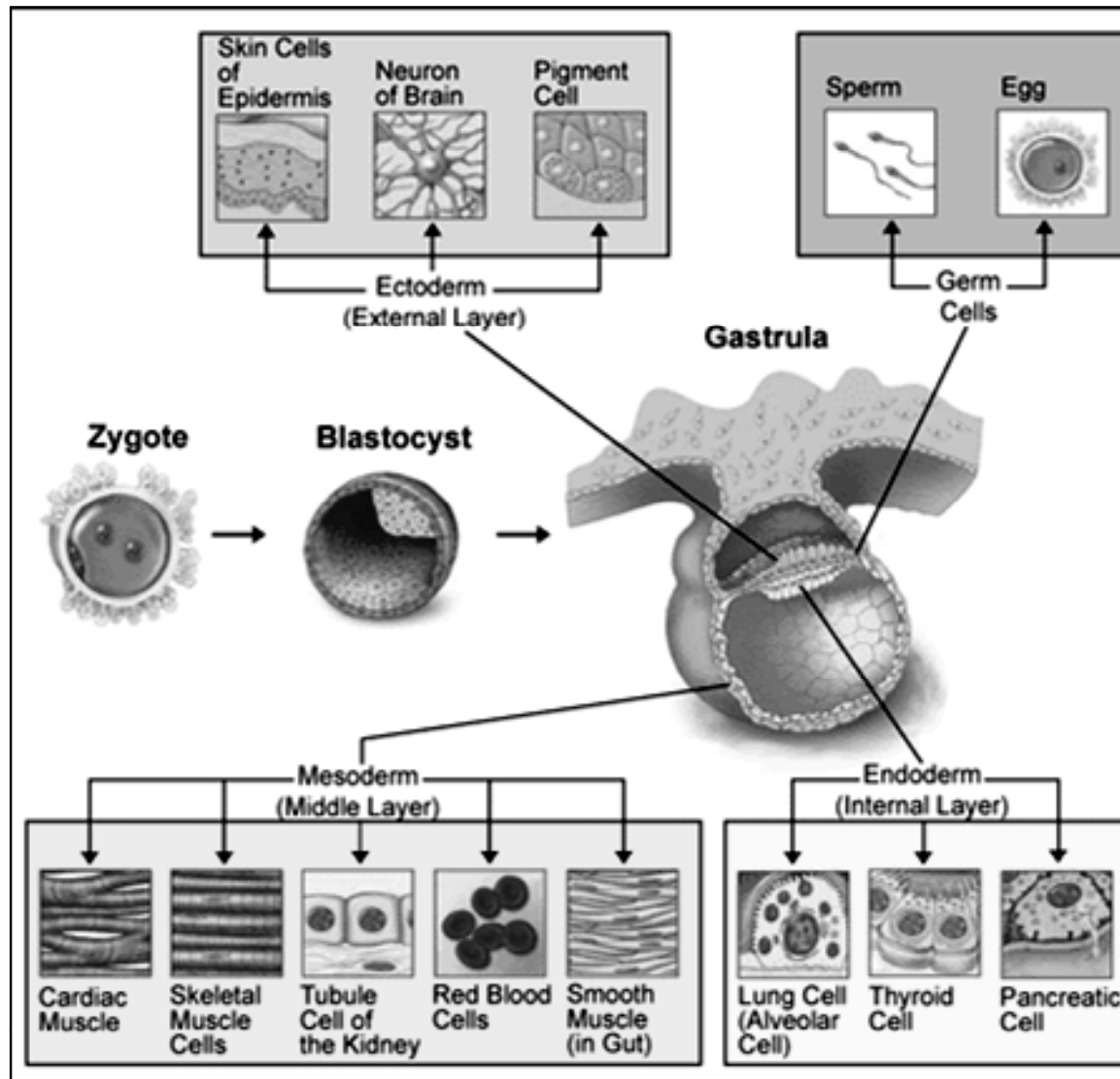
- CNS
- sítnice a čočky
- lebeční a senzorická ganglia a nervy
- pigmentové buňky
- pojivová tkáň hlavy
- epidermis
- vlasy, ochlupení
- prsní žlázy

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



Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 08 / 13.4.

Totipotence

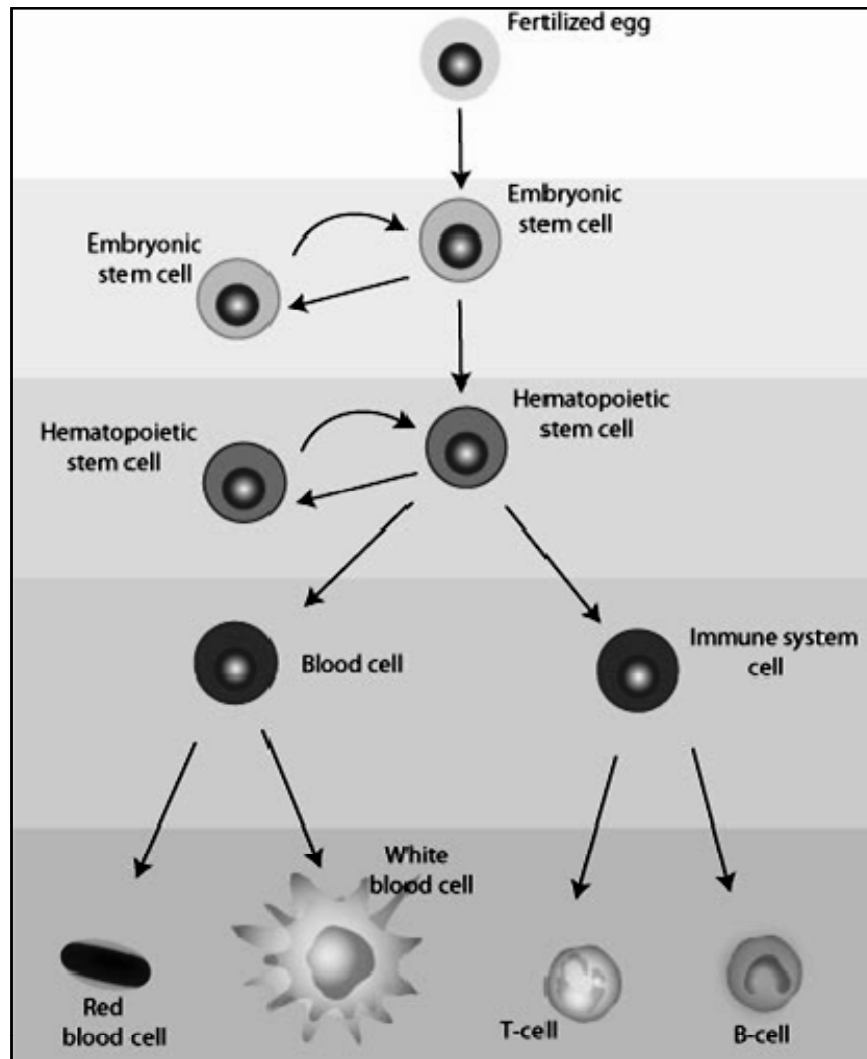
- nelimitovaný diferenciační potenciál
- schopnost tvořit embryonální i extraembryonální tkáně
- časná stádia rýhování zygoty (1-4 dny)

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...



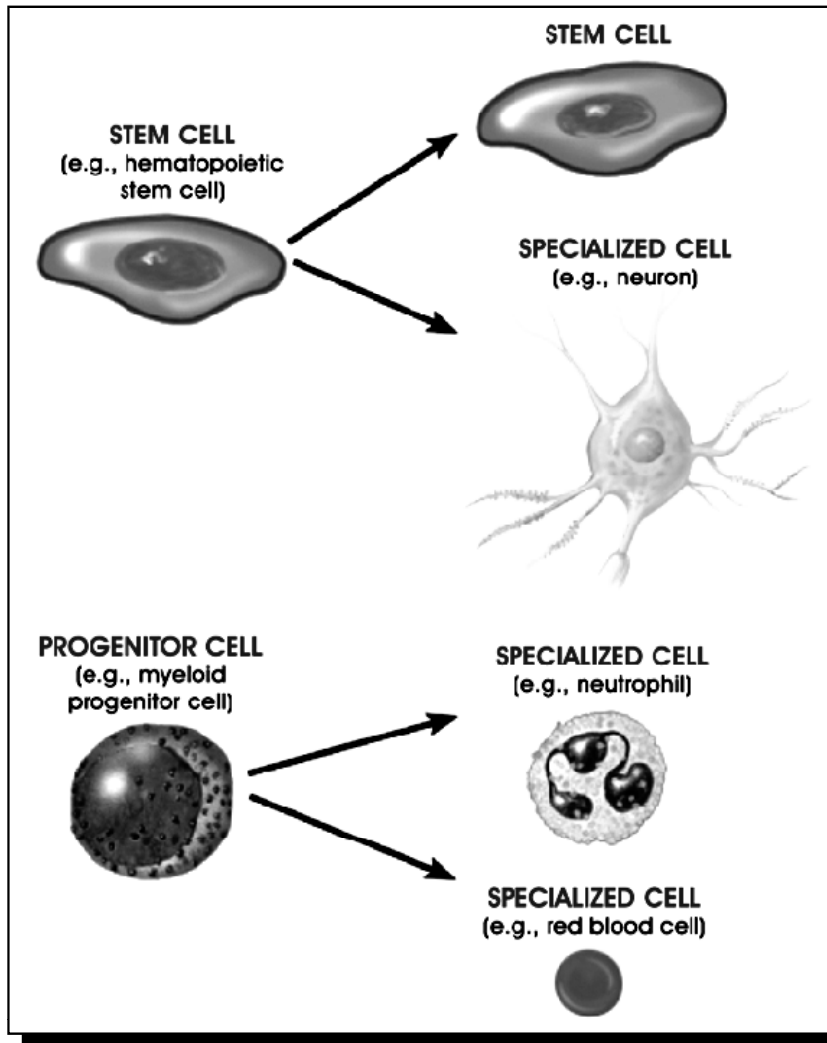
totipotentní buňka

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, ...)

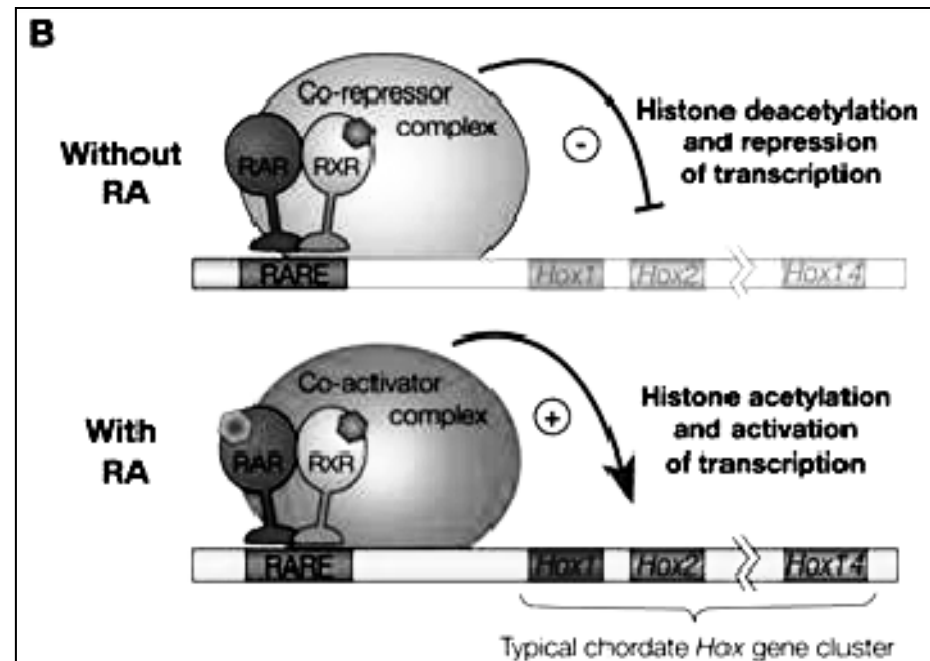
Polarita a tvar buněk

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

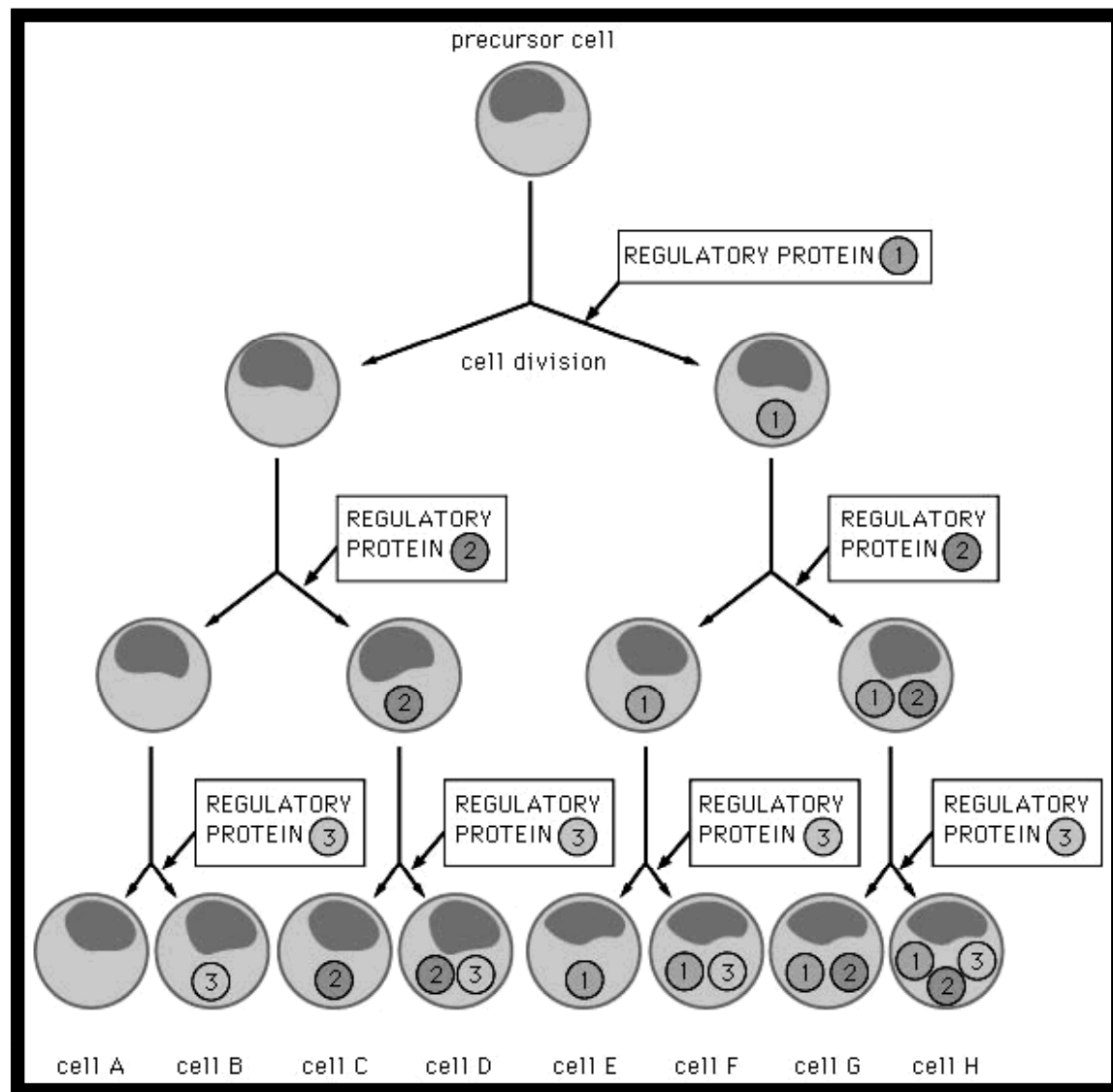
Molekulární mechanismy diferenciace

- 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

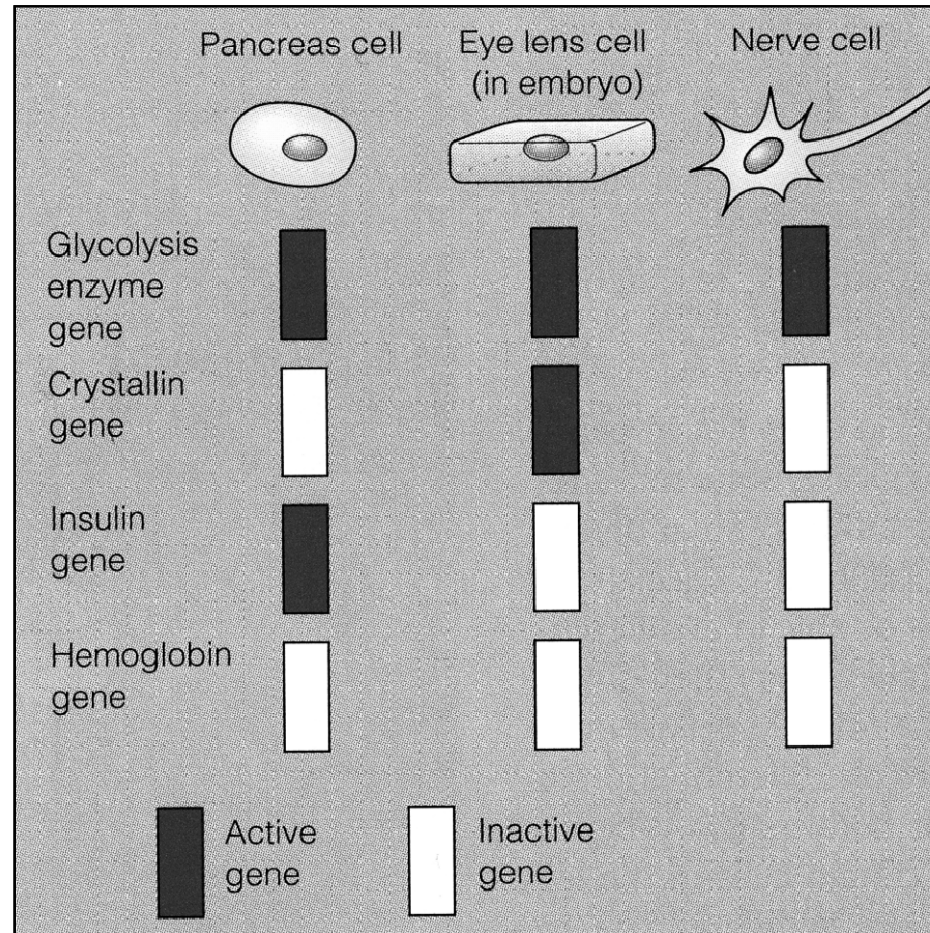
Kyselina retinová (RA) jako modelový induktor diferenciacie (a morfogeneze)



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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 08 / 13.4.



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 08 / 13.4.

DIFERENCIAČNÍ DRÁHY

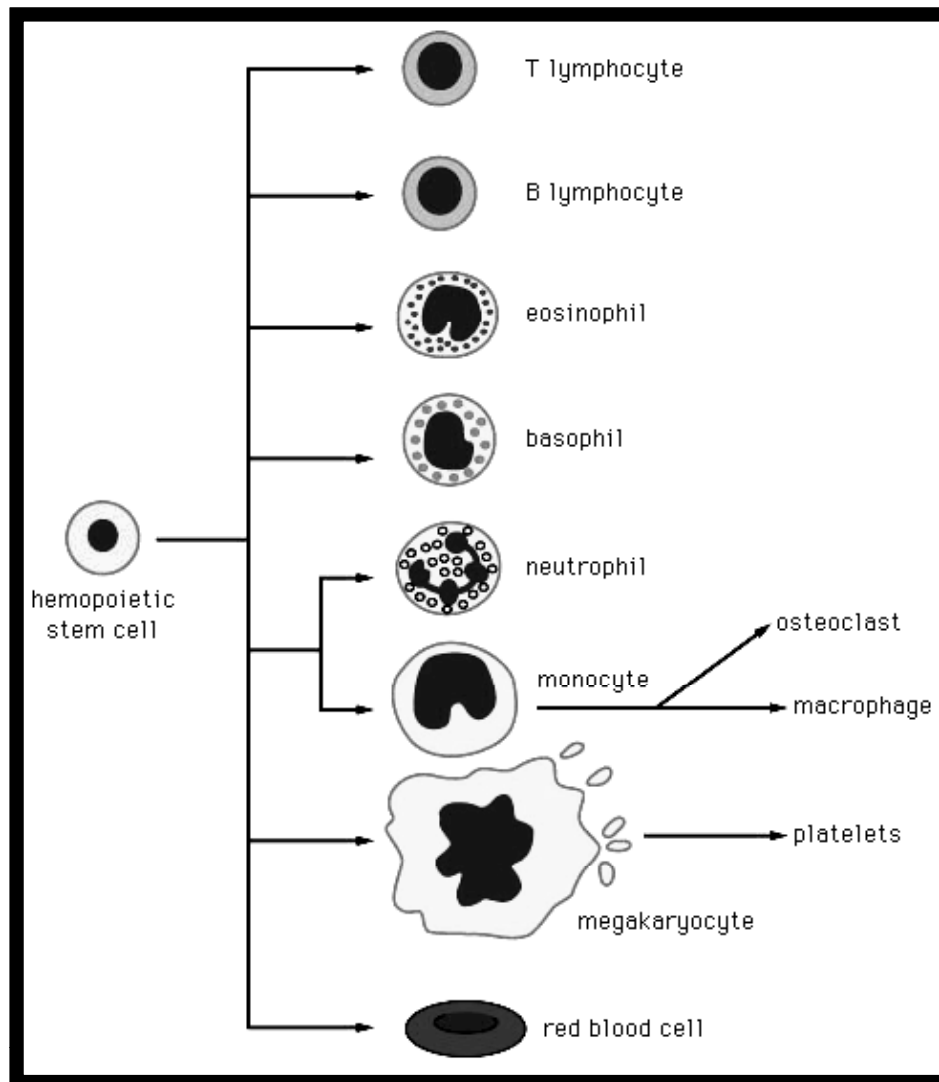
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 08 / 13.4.

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

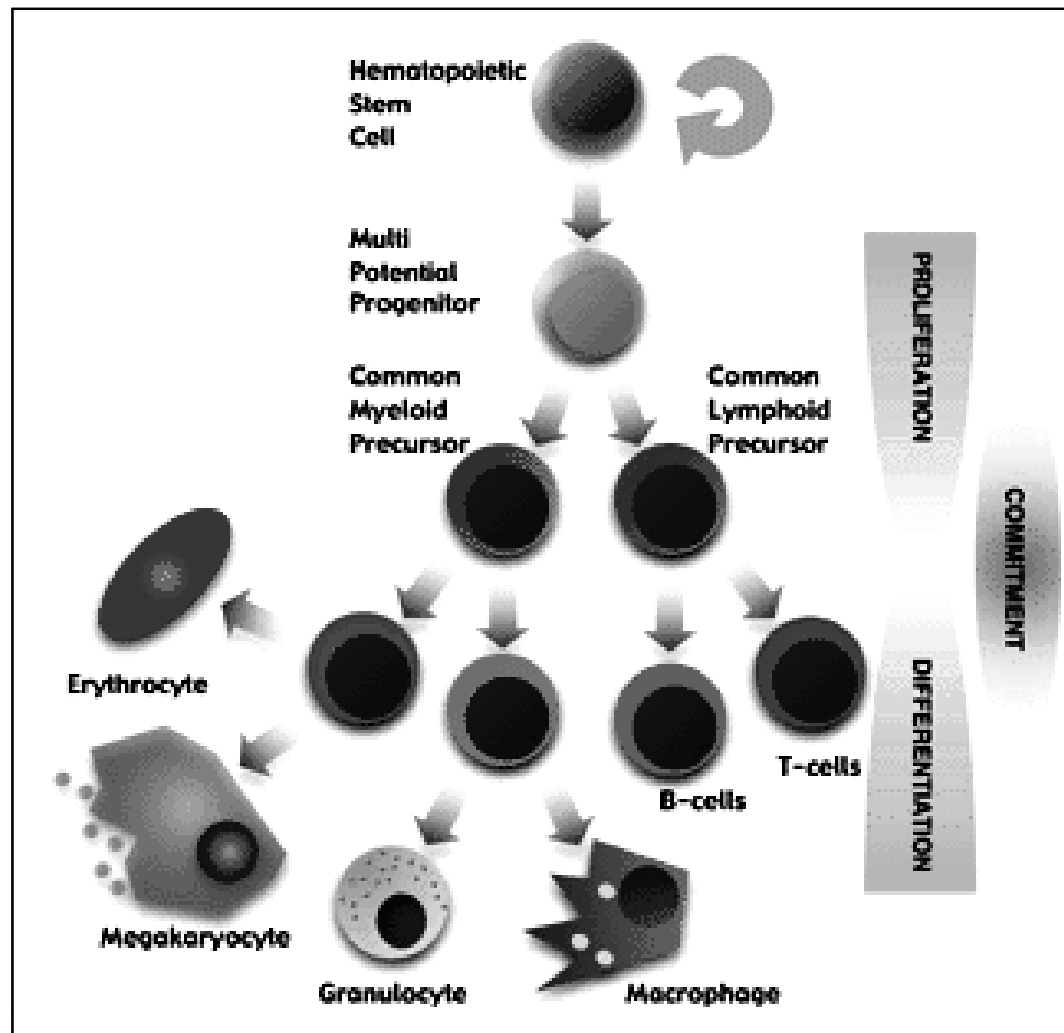
Dediferenciace - ztráta diferencovaného fenotypu

- 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)

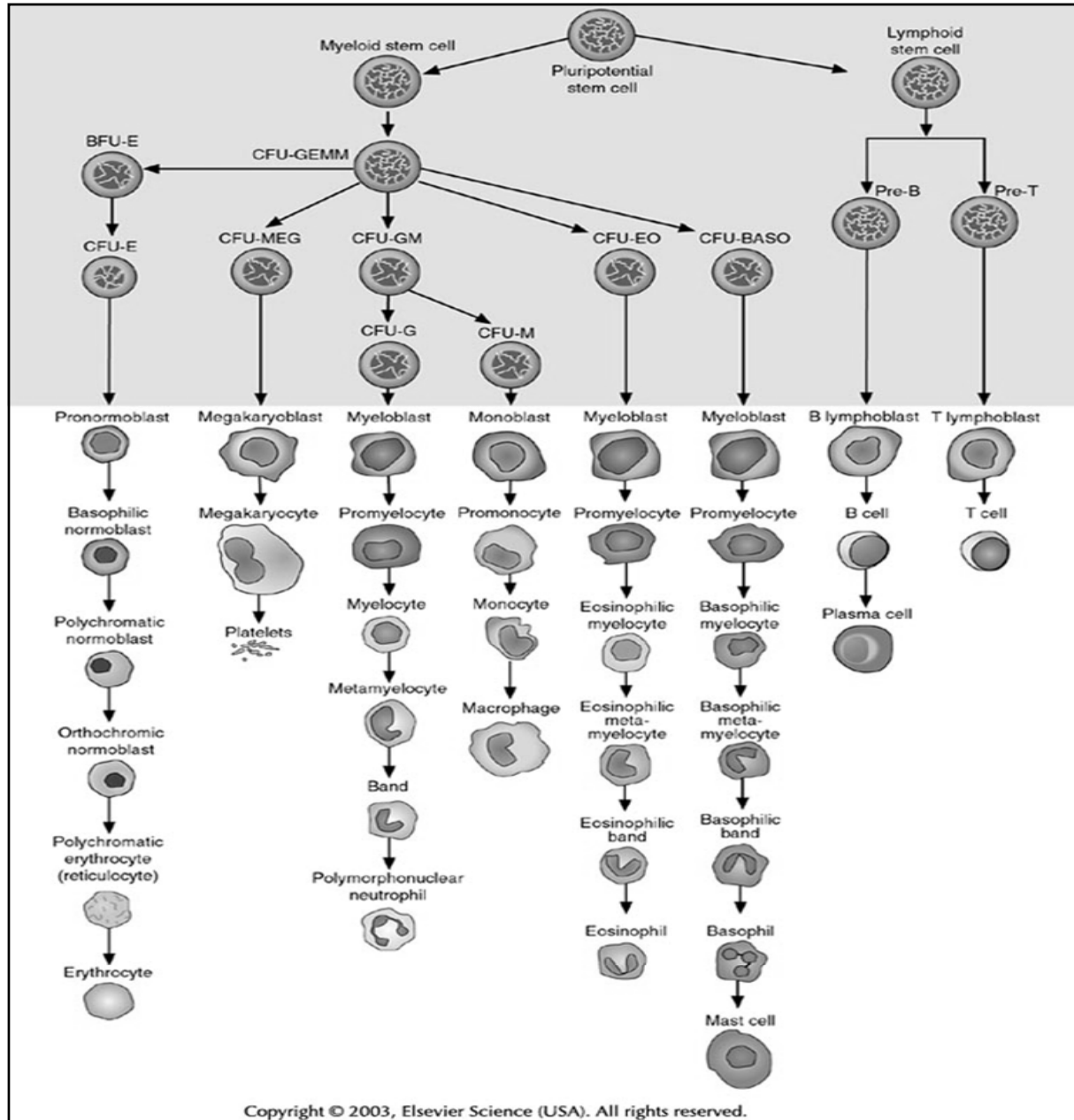


Diferenciační potenciál hematopoetických kmenových buněk



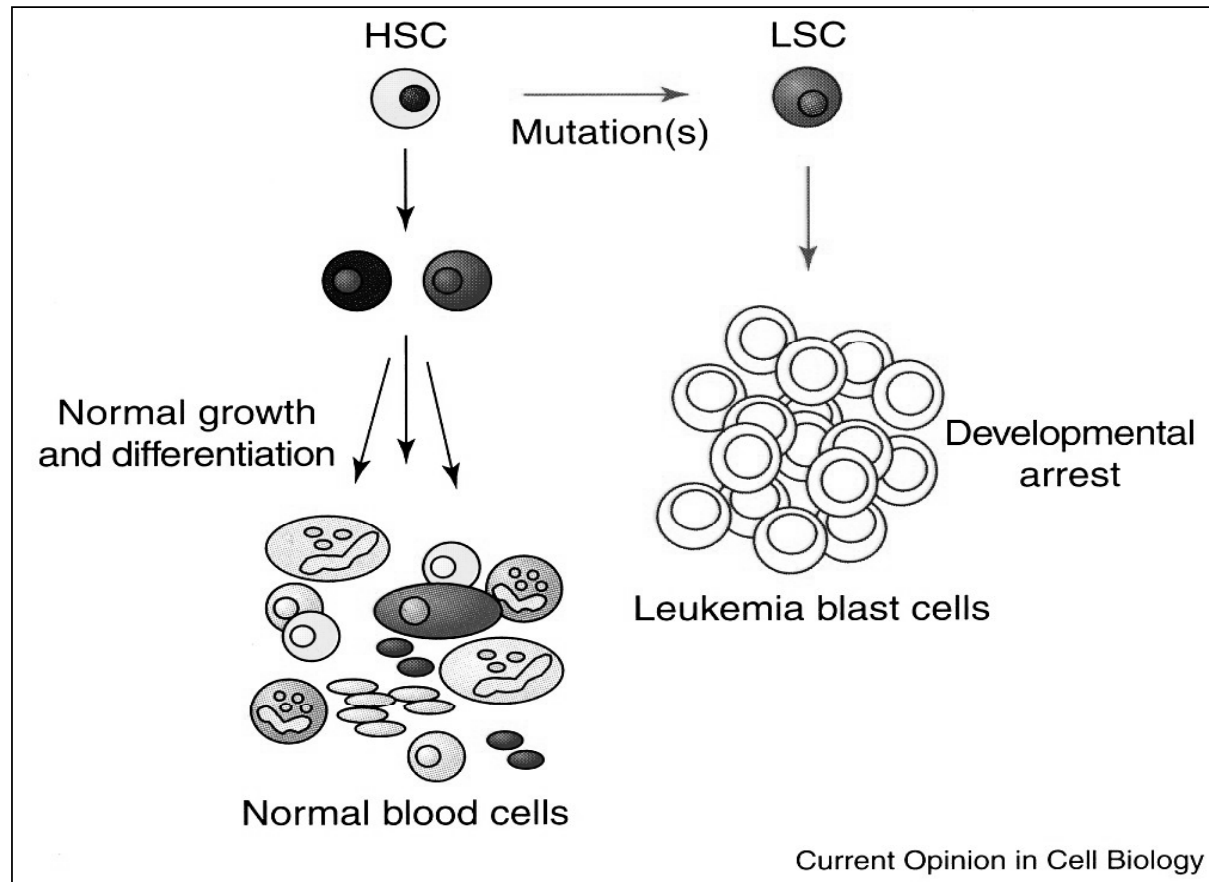
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 08 / 13.4.

Diferenciace krevních buněk

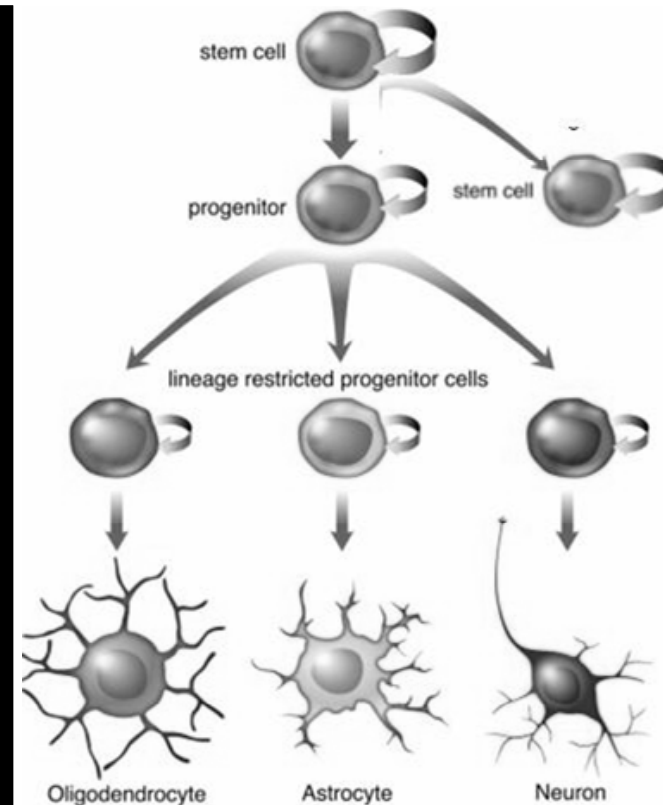
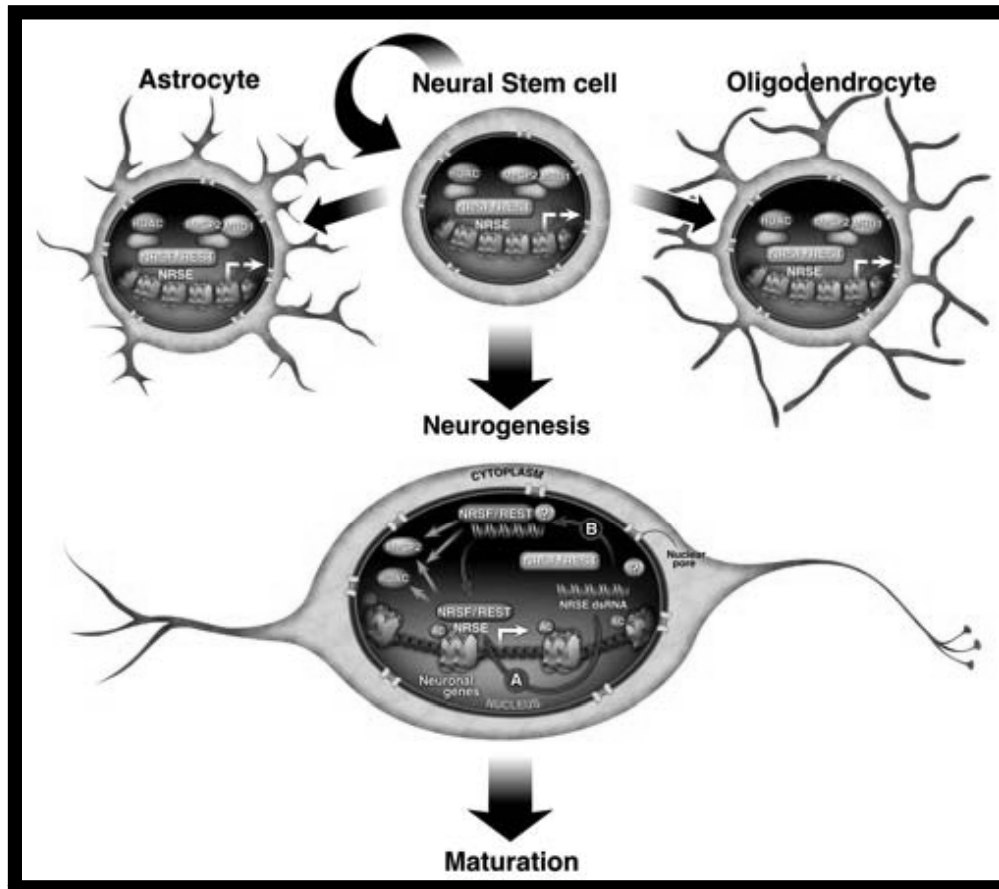


Copyright © 2003, Elsevier Science (USA). All rights reserved.

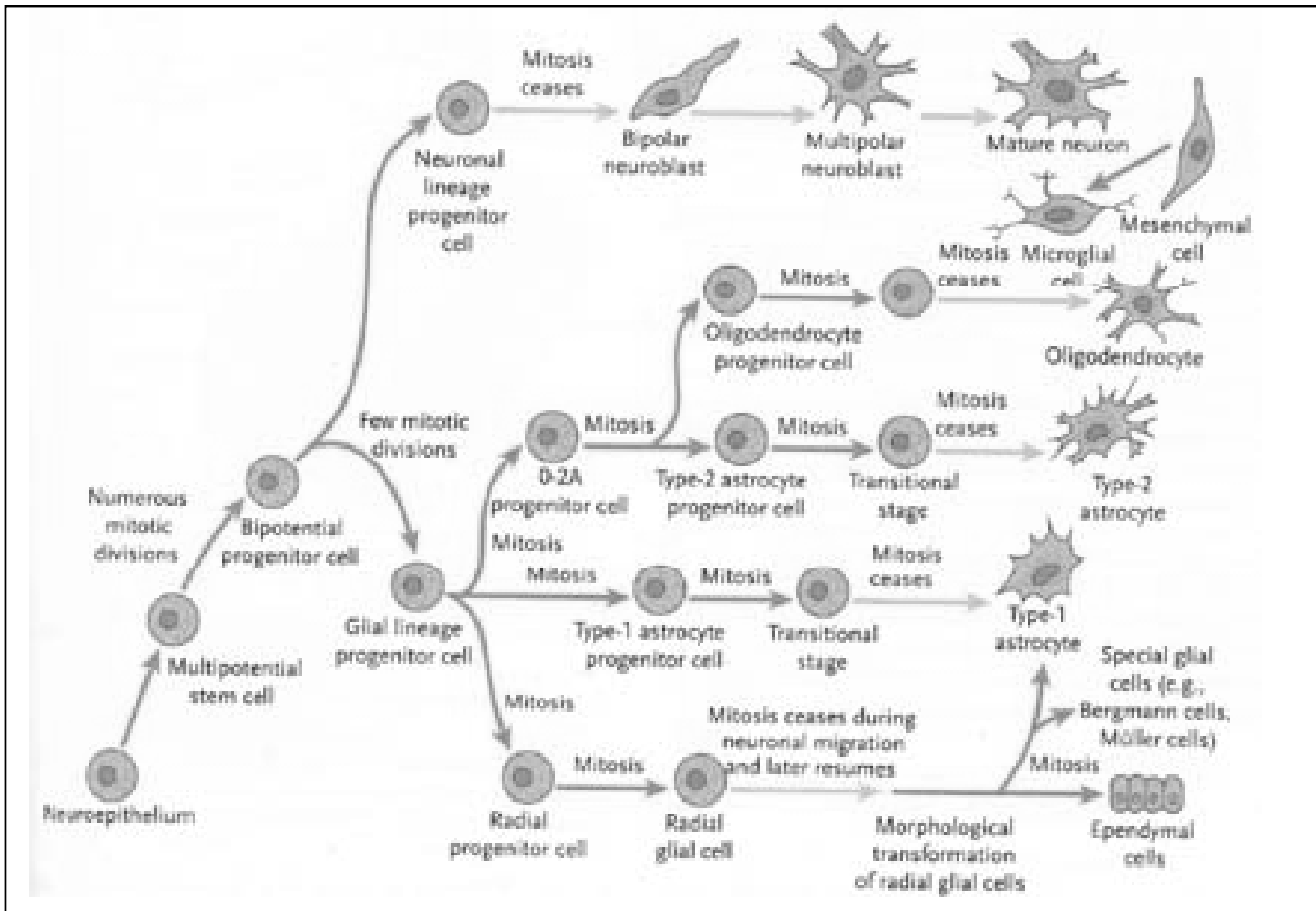
Porucha diferenciace krevních buněk



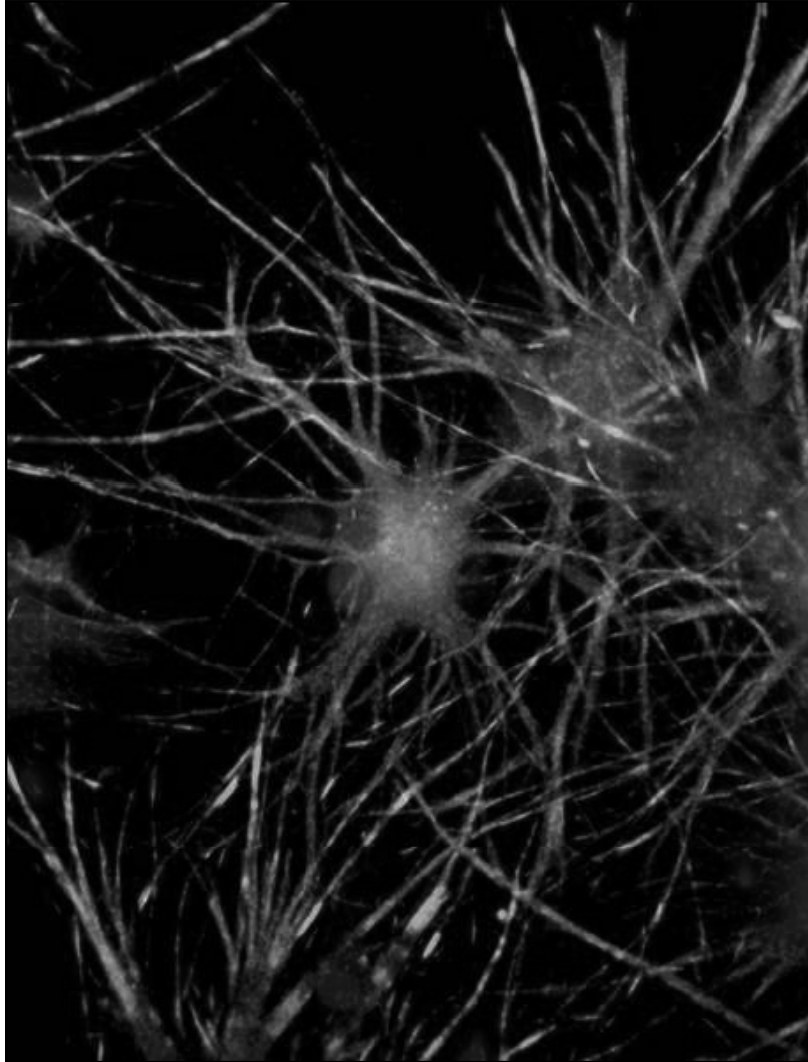
Průběh neuronální diferenciace



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 08 / 13.4.

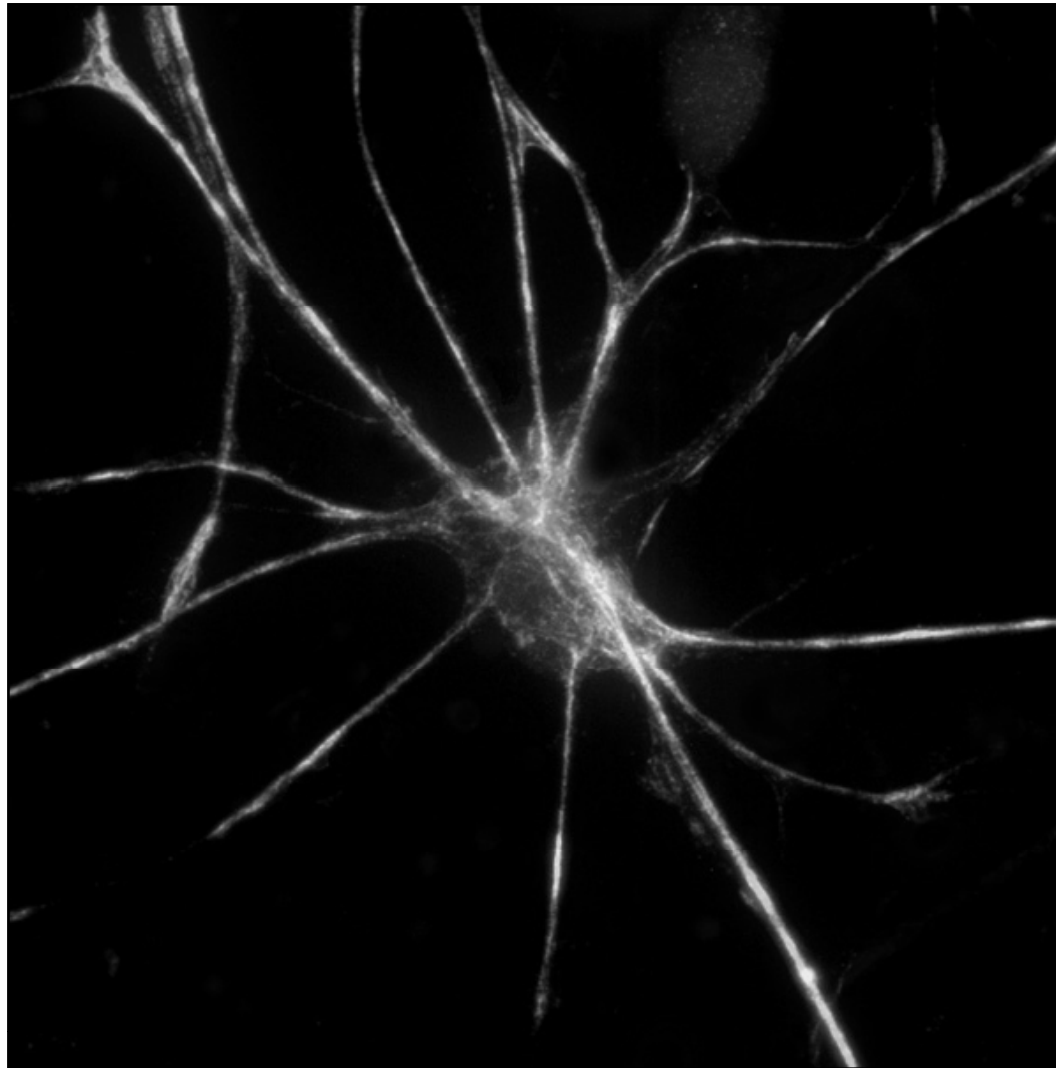


Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 08 / 13.4.



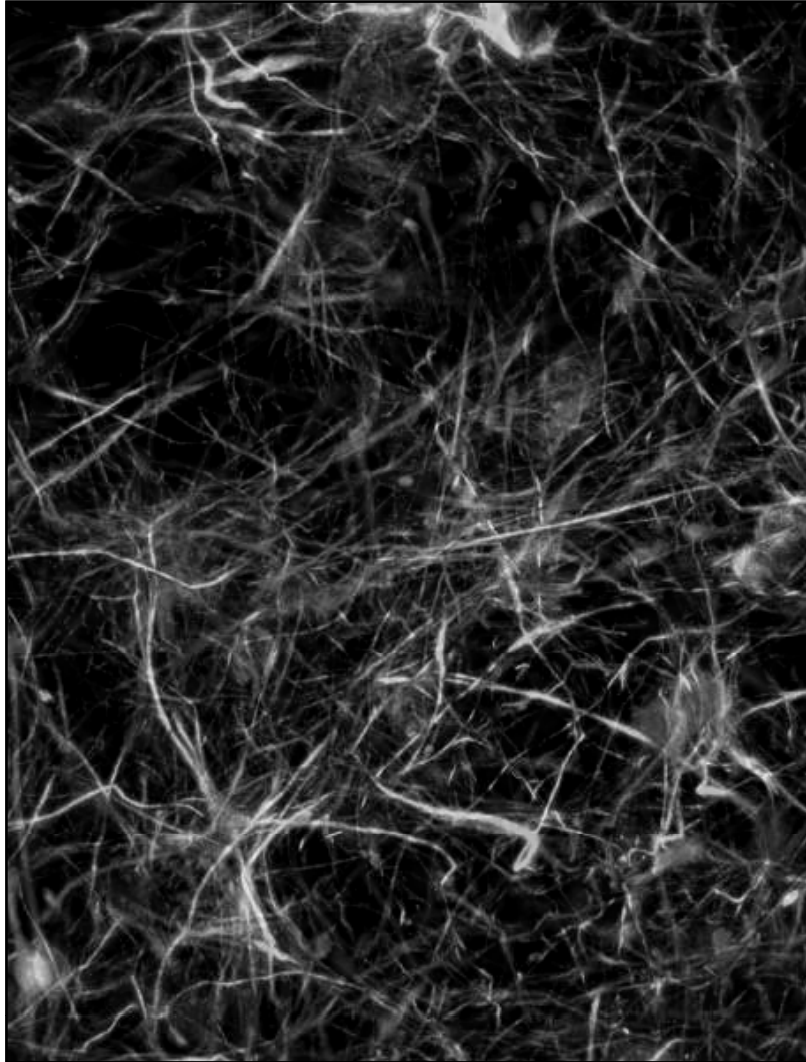
Neuronální diferenciace Kmenová buňka:

- 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

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 08 / 13.4.

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 diferenciacce
- např. cytokiny, hormony (insulin)

Cytokiny

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

EGF (Epidermal Growth Factor)

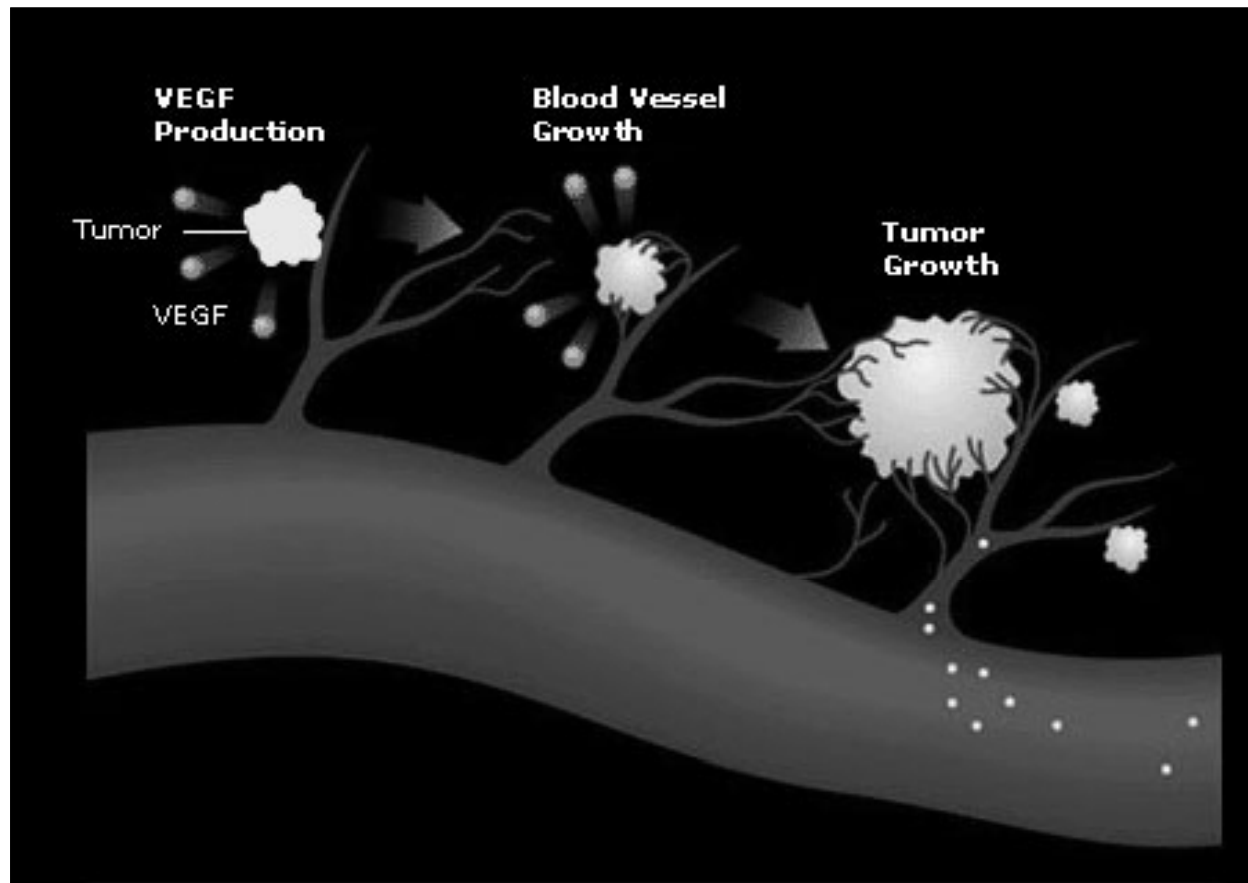
- specifická vazba na EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) → aktivace RTK kaskády

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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 08 / 13.4.

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 $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$: diferenciaci buněk,
vývoj embrya, regenerace tkání, regulace
imunitního systému

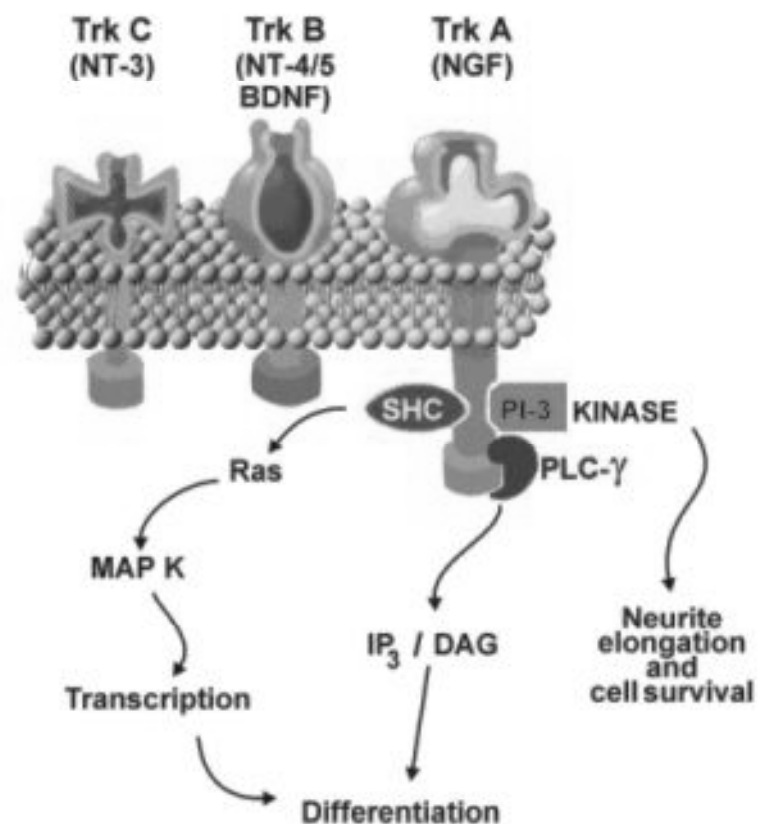
Neurotrofiny (Neurotrophins)

- produkovány cílovou tkání → přežívání neuronů, neuronální diferenciace

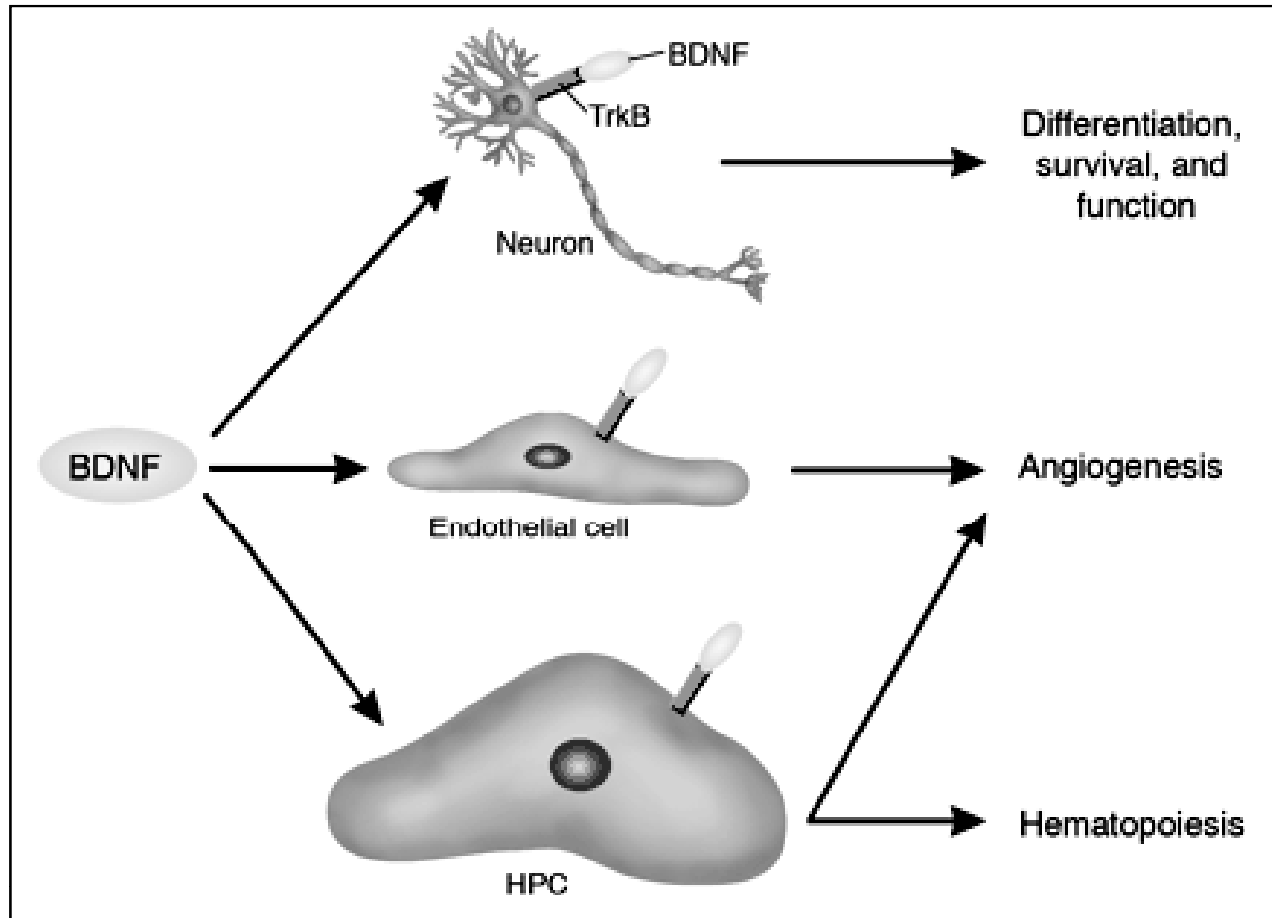
- receptory:

p75, Trk receptory (A,B,C)

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

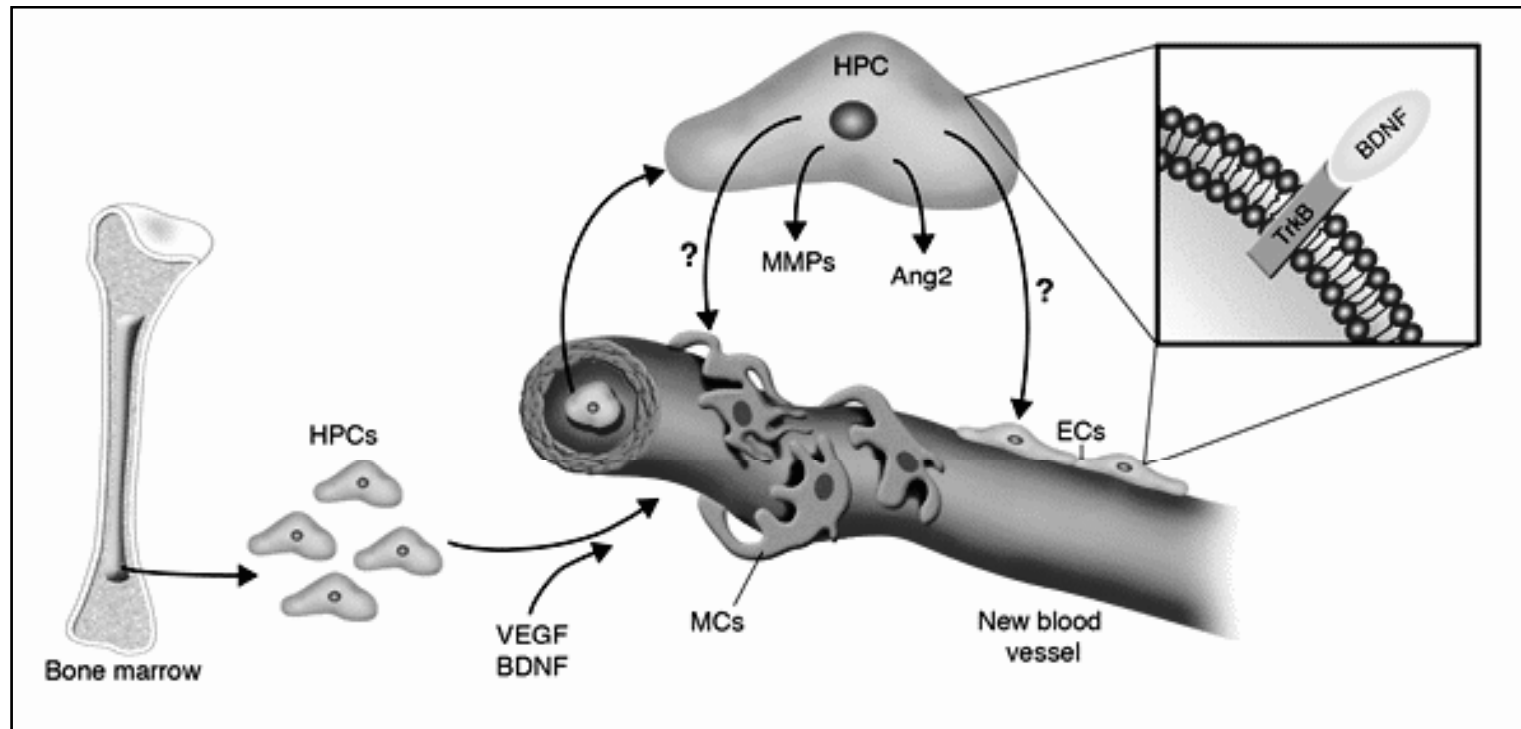


Pleiotropní efekt BDNF



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 08 / 13.4.

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

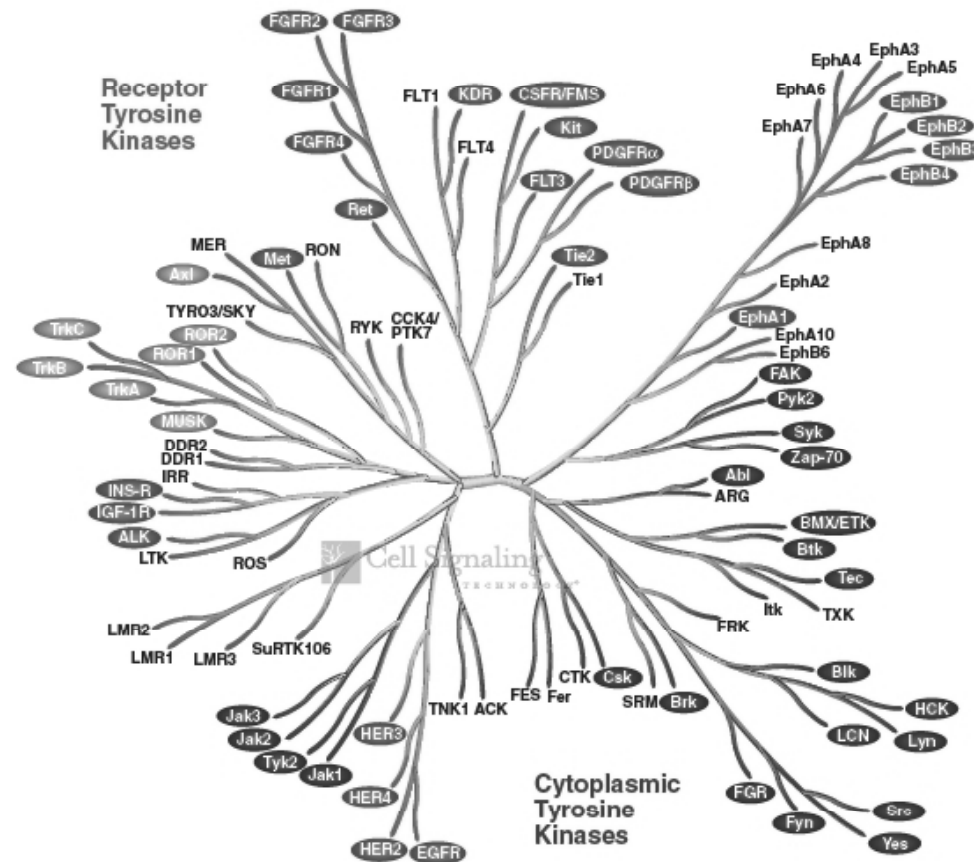
G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor)

- stimulace tvorby granulocytů/neutrofilů

GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)

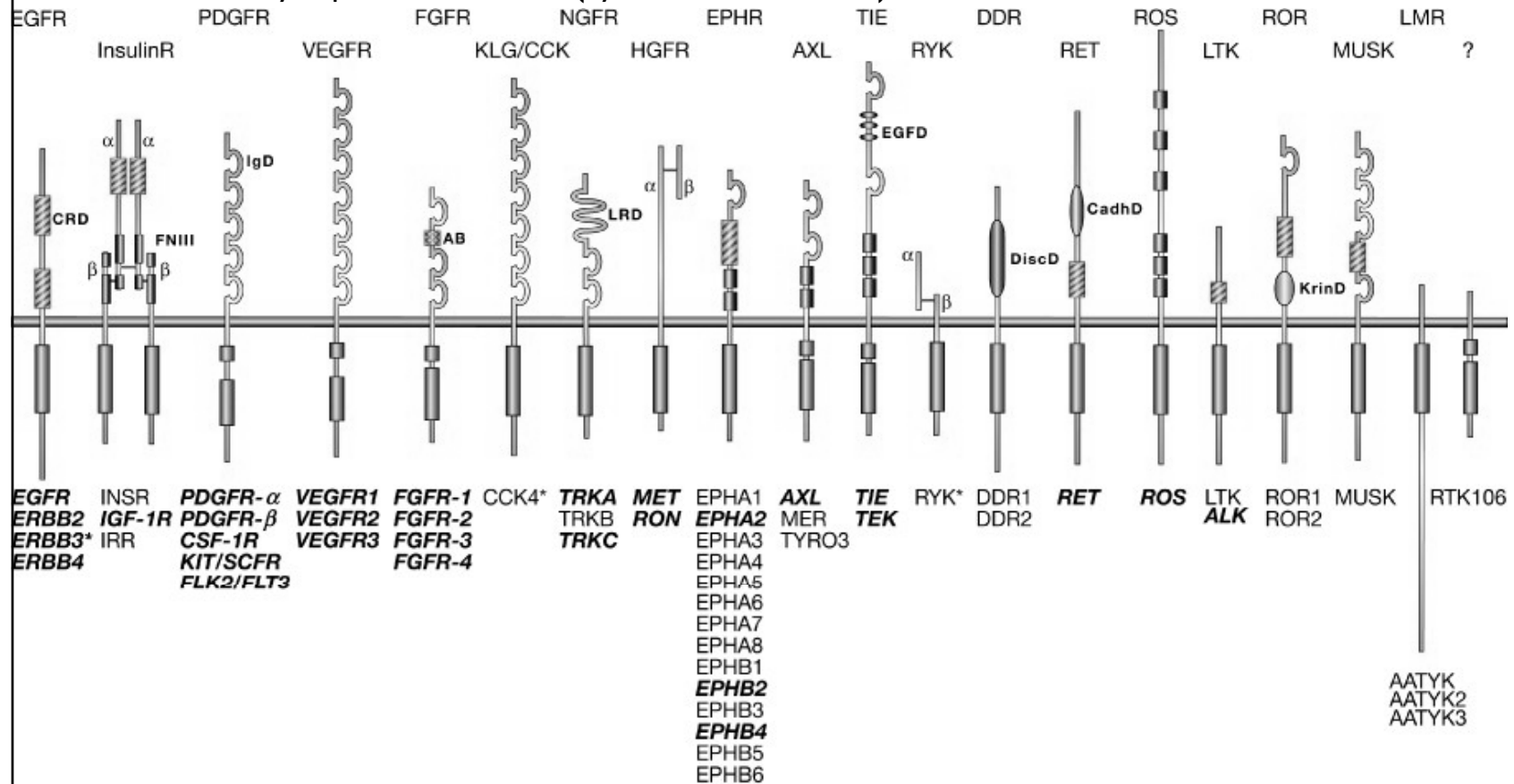
RECEPTOROVÉ TYROZIN-KINÁZY

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



DOMÉNY :

- extracelulární (receptorová)
- transmembránová
- cytoplasmatická (tyrozin kinázová)

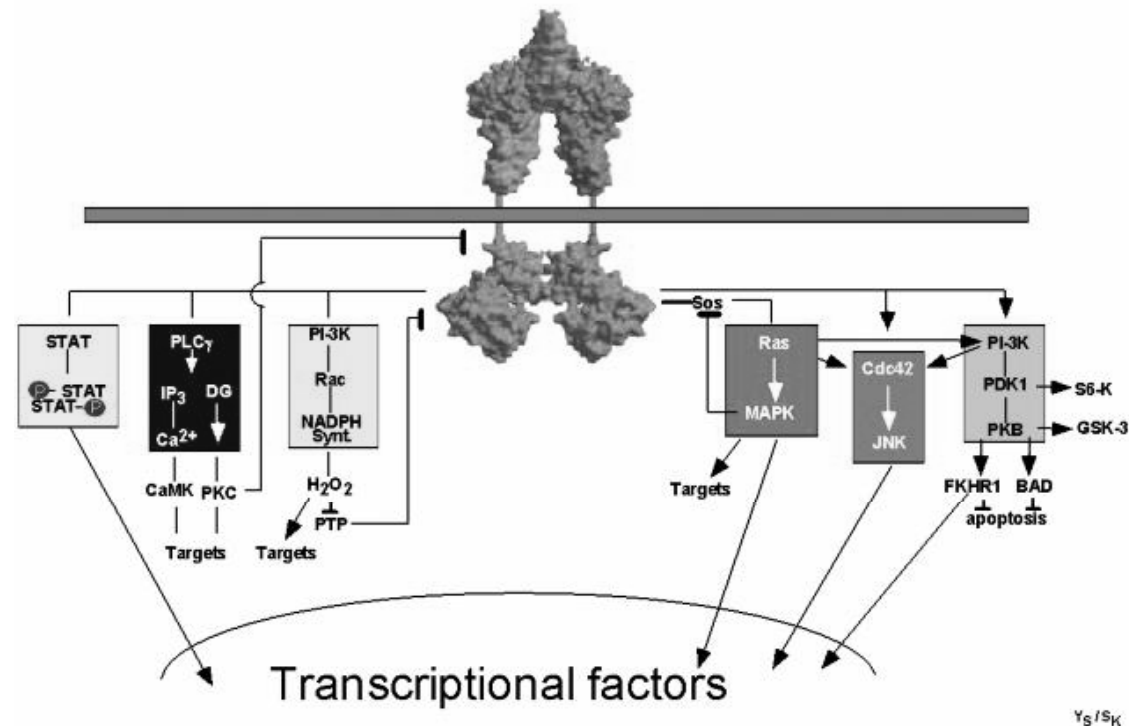


AKTIVACE:

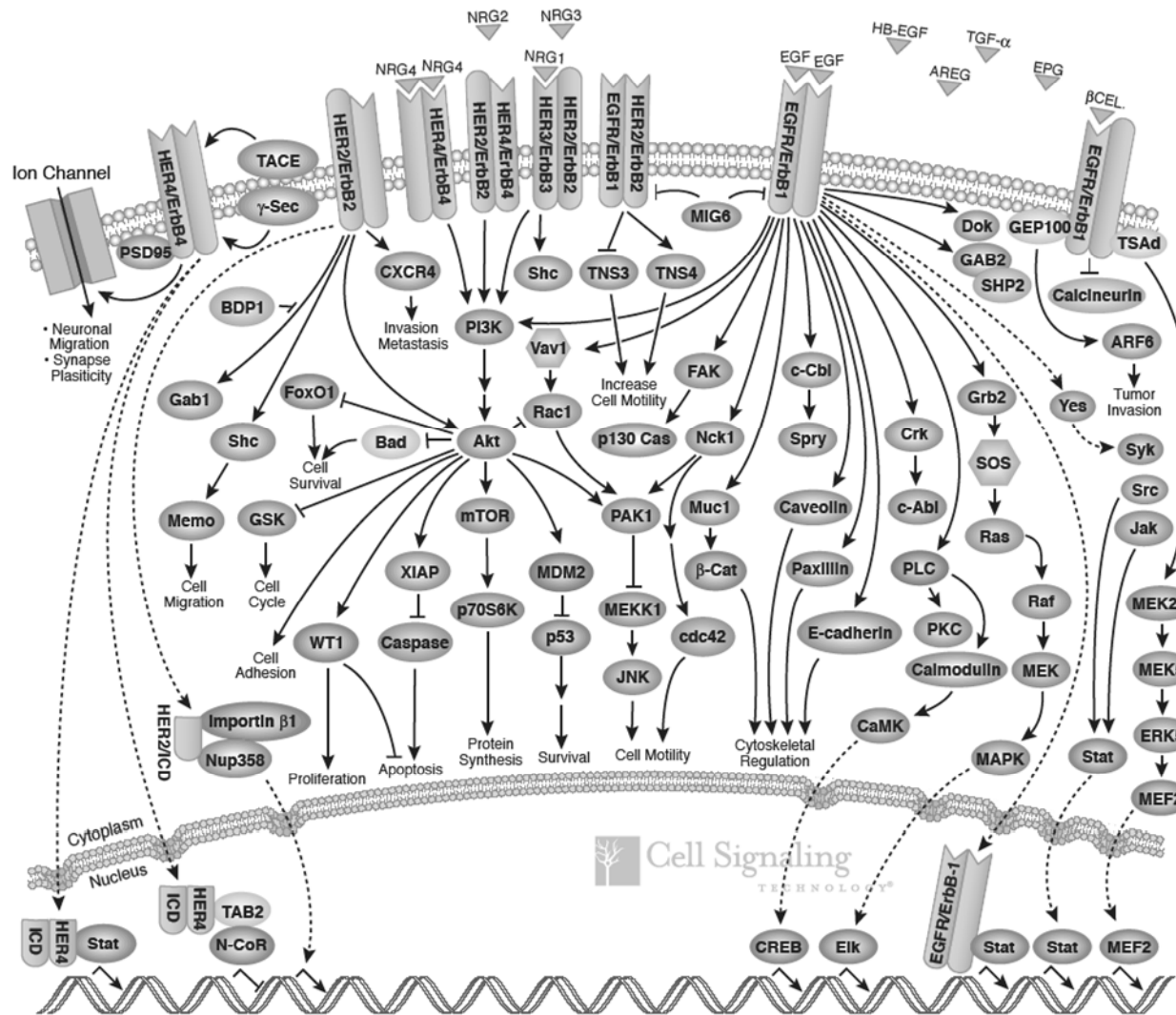
dimerizace vlivem růstových faktorů → cross-fosforylace

a) → konformační změna – stimulace katalytické aktivity

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



ErbB/HER Signaling Network



Bi81 20 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 08 / 13.4.

INDUKOVANÁ DIFERENCIACE

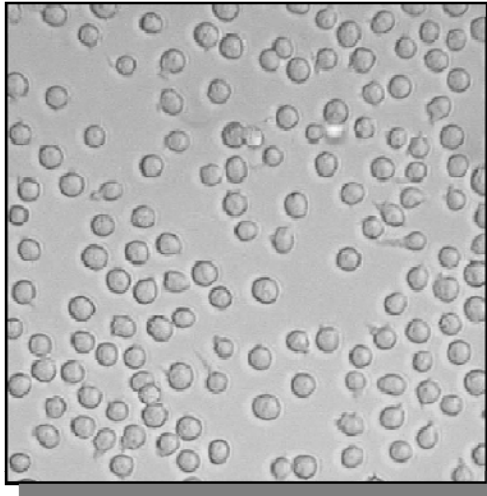
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2011 - 08 / 13.4.

Indukovaná diferenciace

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

Příklady induktorů diferenciace *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

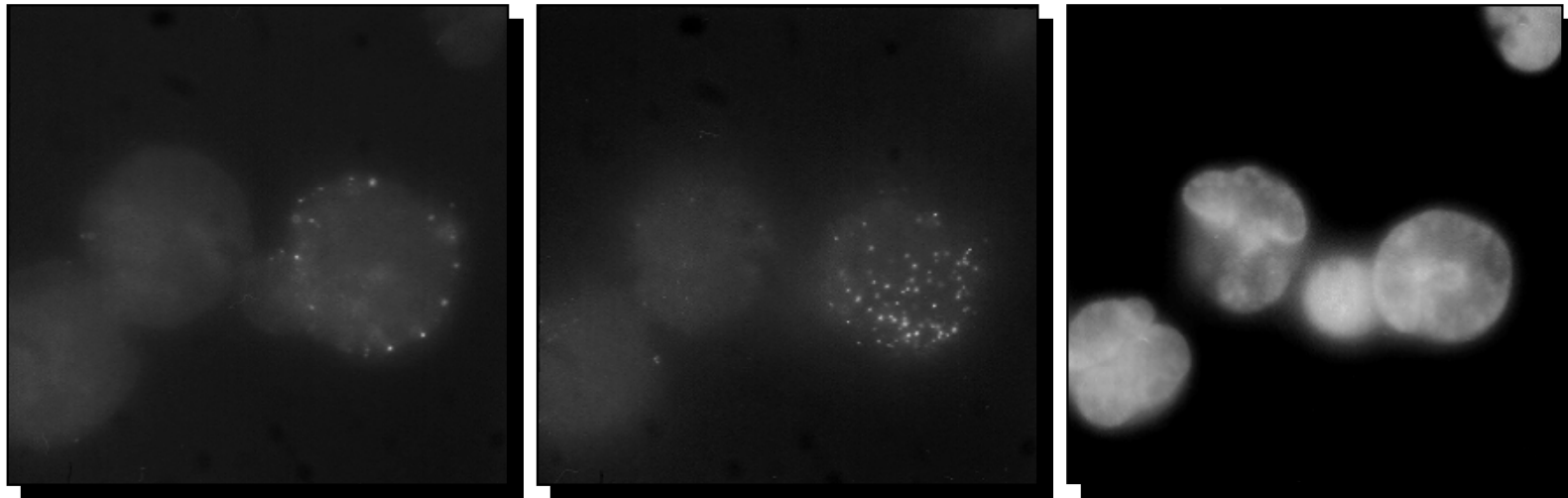
- induktory granulocytární diferenciaci:
kyselina *all-trans* retinová (*atRA*)
dimethylsulfoxid (DMSO)
- induktory monocyto/makrofágové diferenciaci:
phorbolmyristyl acetát (PMA)
1,25-dihydroxyvitamin D₃

Diferenciace linie HL-60 do stádia granulocytů:

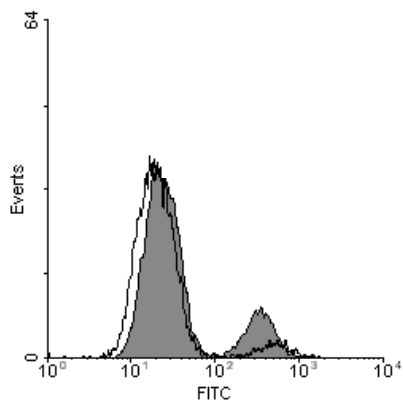
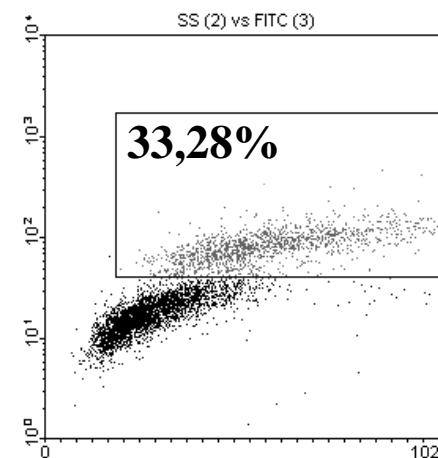
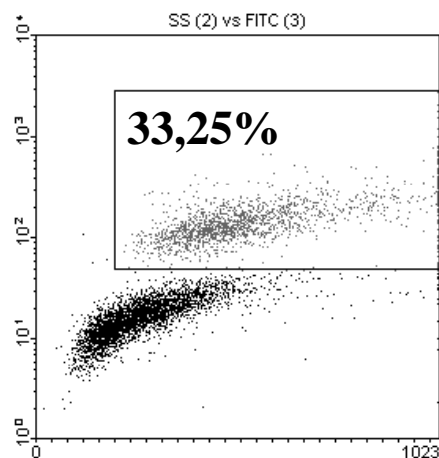
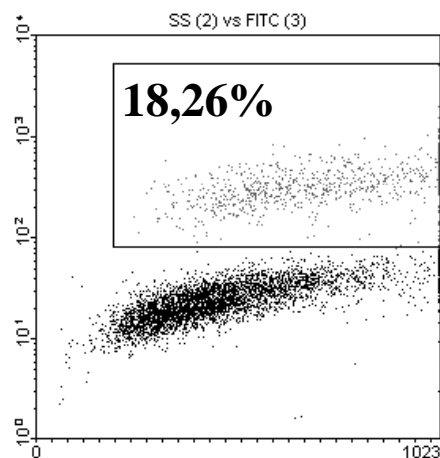
Induktor: 1 μ M kyselina *all-trans* retinová

Marker: CD-66b (CD-67)

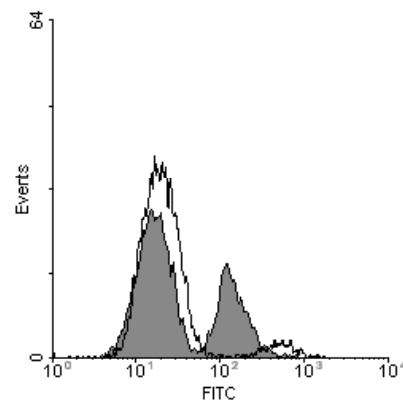
Detekce: anti-CD66b, SwAM-FITC



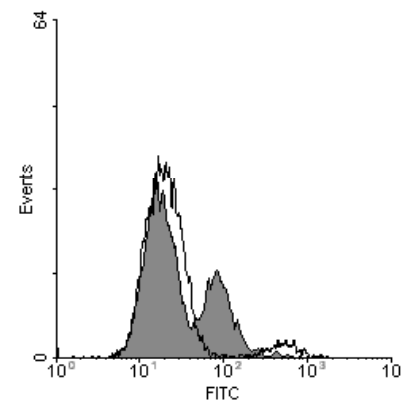
Granulocytární diferenciaci HL-60: flow cytometrie / CD66b



1 μM ATRA



1 μM ATRA + 13 μM CA



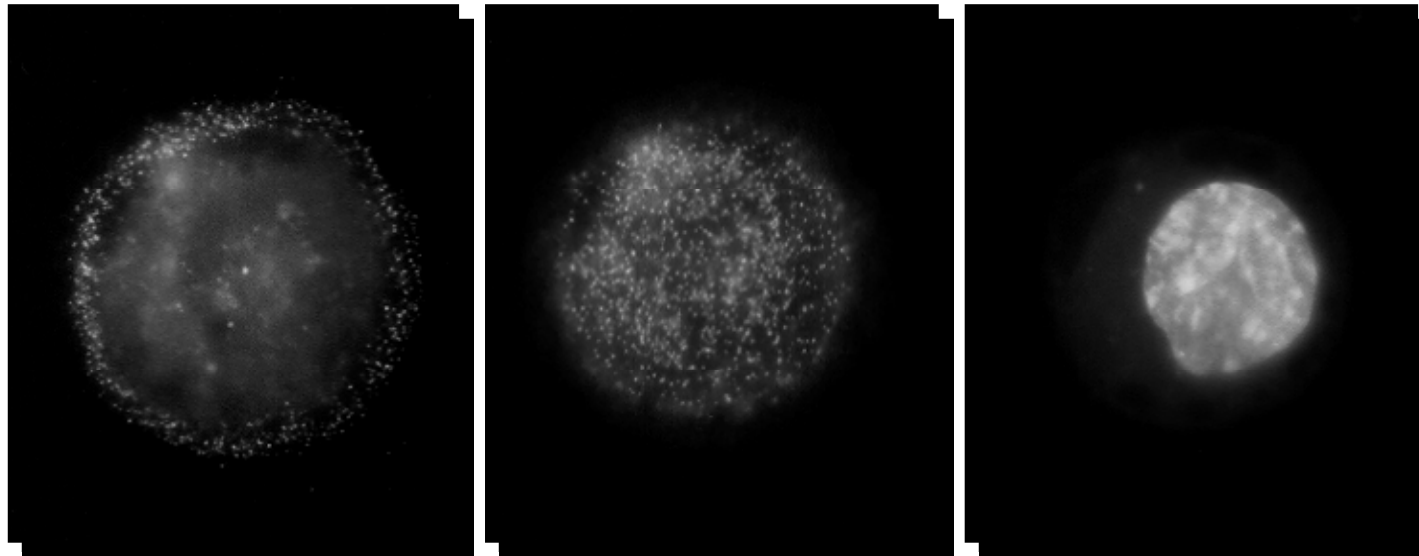
1 μM ATRA + 52 μM CA

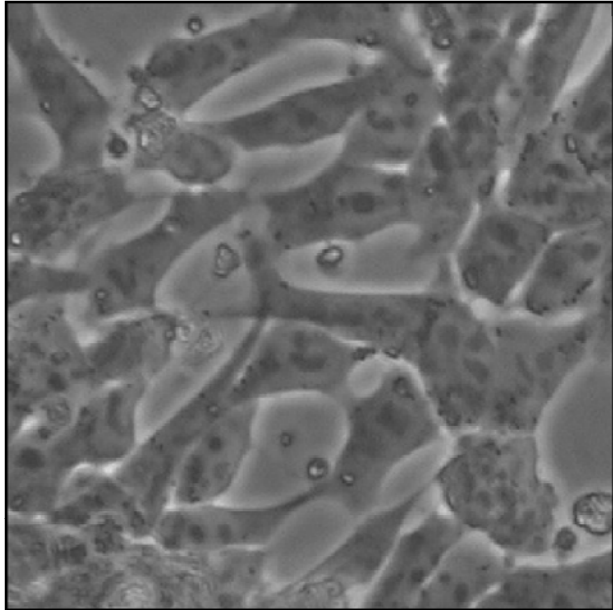
Diferenciace linie HL-60 do stádia makrofágů:

Induktor: 1,6 nM phorbolmyristyl acetát (PMA)

Marker: CD-14

Detekce: anti-CD14, SwAM-FITC



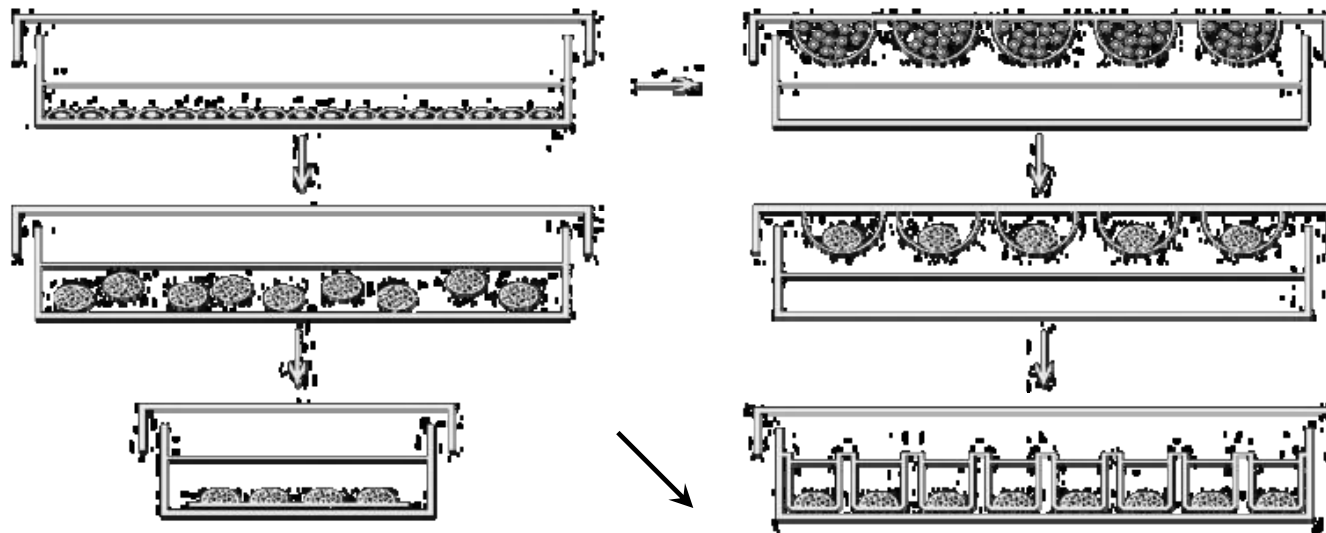


Linie P19:

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

- induktory mesodermální diferenciace:
kyselina *all-trans* retinová (*atRA*)
dimethylsulfoxid (DMSO)
- induktor neuronální diferenciace:
kyselina *all-trans* retinová (*atRA*)

Schéma diferenciace buněk P19



metoda kultivace na
bakteriologických miskách

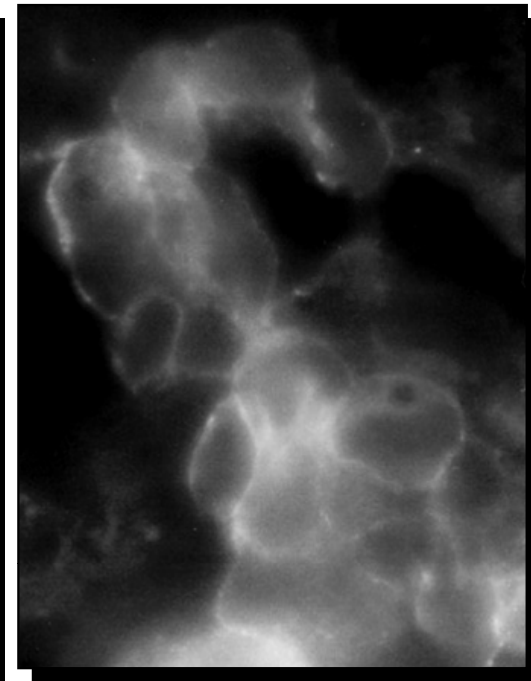
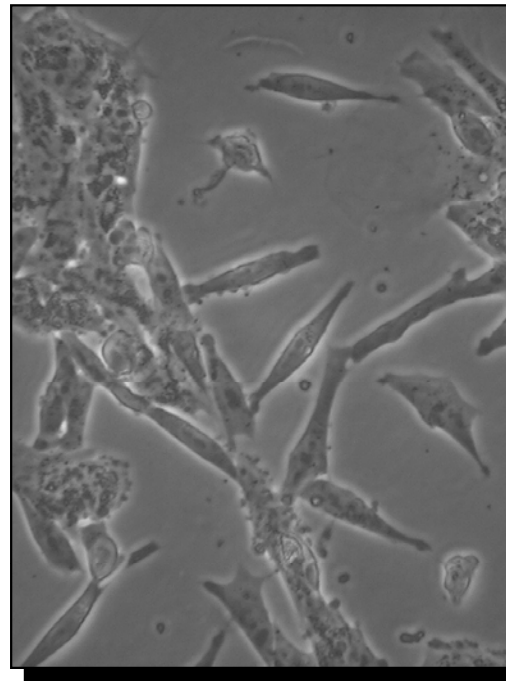
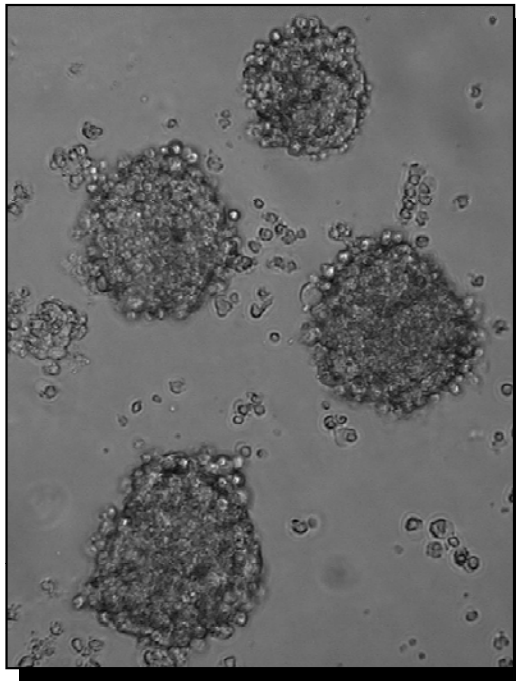
metoda „visících kapek“

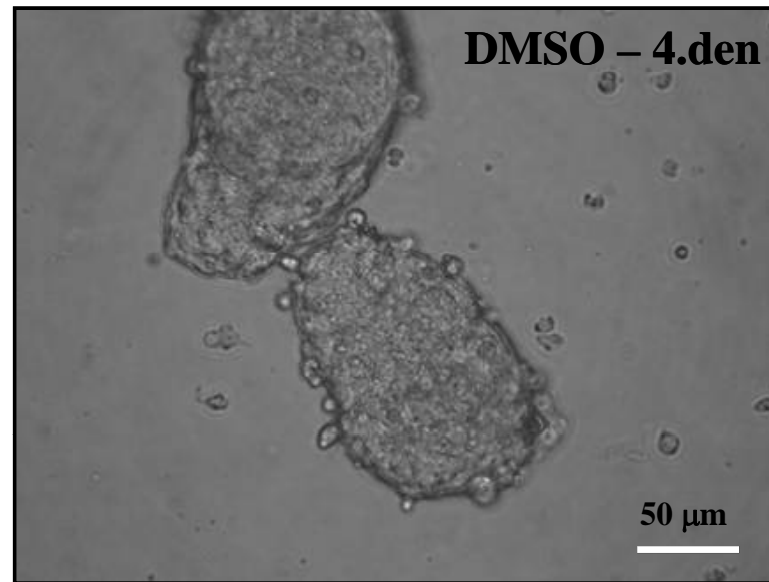
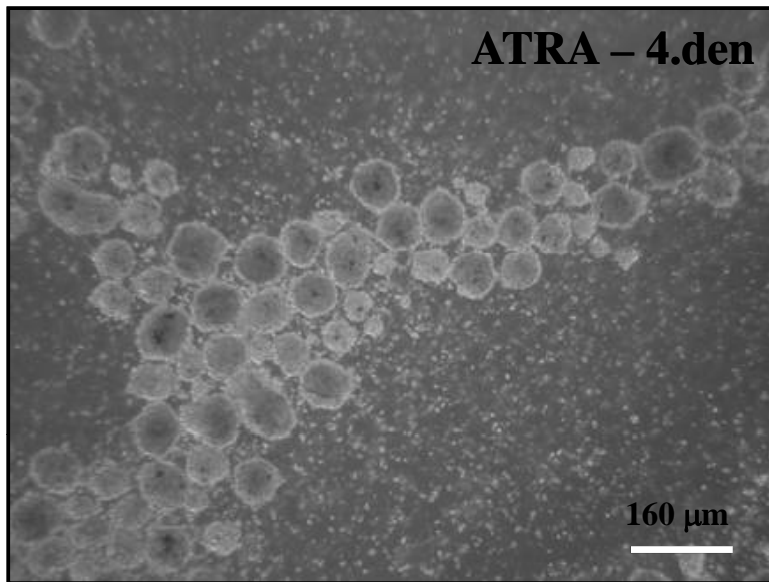
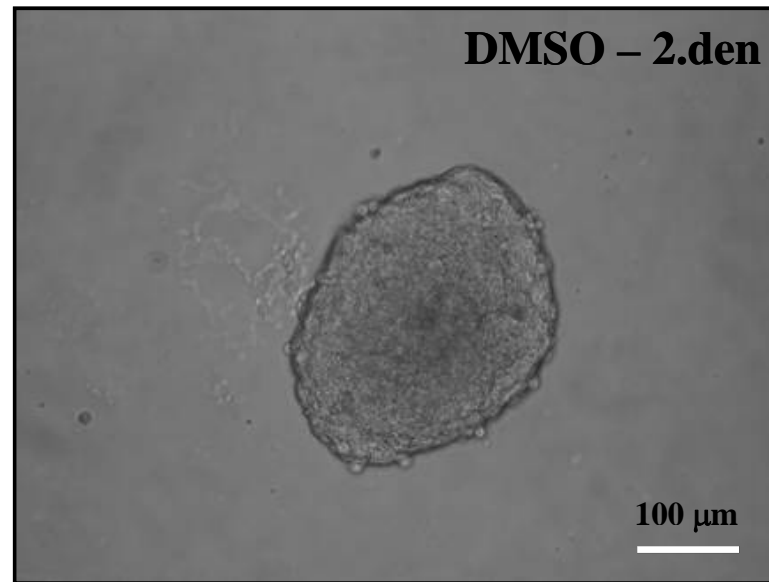
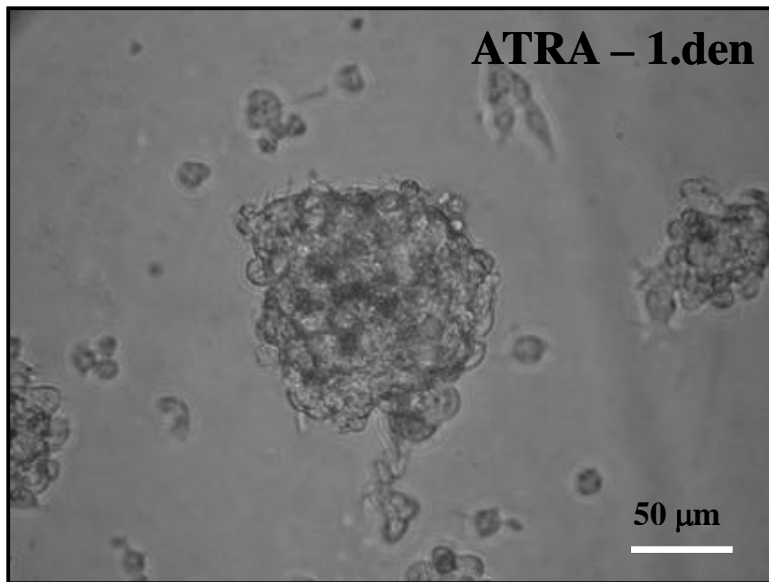
Mesodermální diferenciace buněk P19:

Induktor: 0,8% DMSO

Marker: myosin

Detekce: anti-skeletal myosin, SwAM-FITC



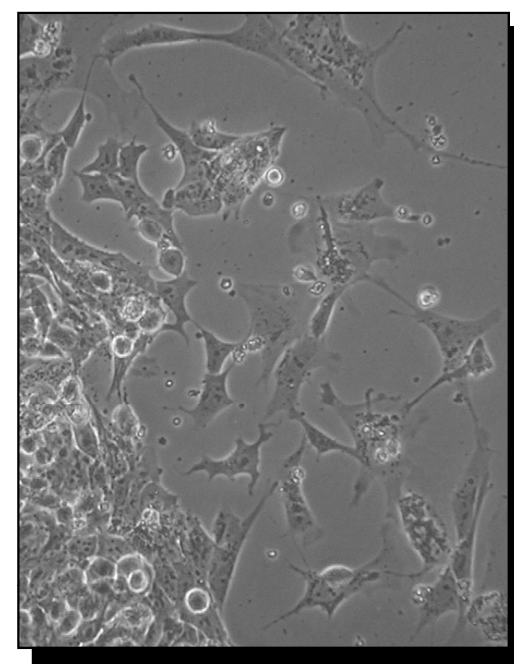
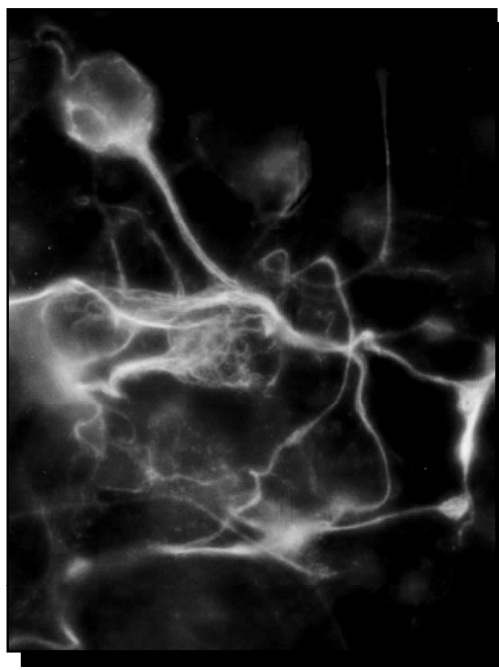
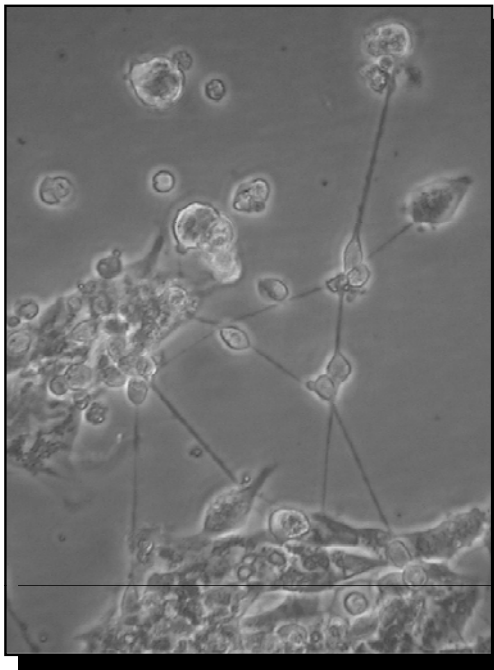


Neuronální diferenciace buněk P19:

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

Marker: neurofilamin

Detekce: anti-neurofilament 160, SwAM-FITC



Praktické využití indukované diferenciacce:

- 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

inhibitor cyclooxygenázy

antiangiogenní účinek

etoposid

inhibitor topomerázy II

zástava b. cyklu

temozolomid

alkylační činidlo

apoptóza

kys. retinová

diferenciační činidlo

diferenciace/apoptóza

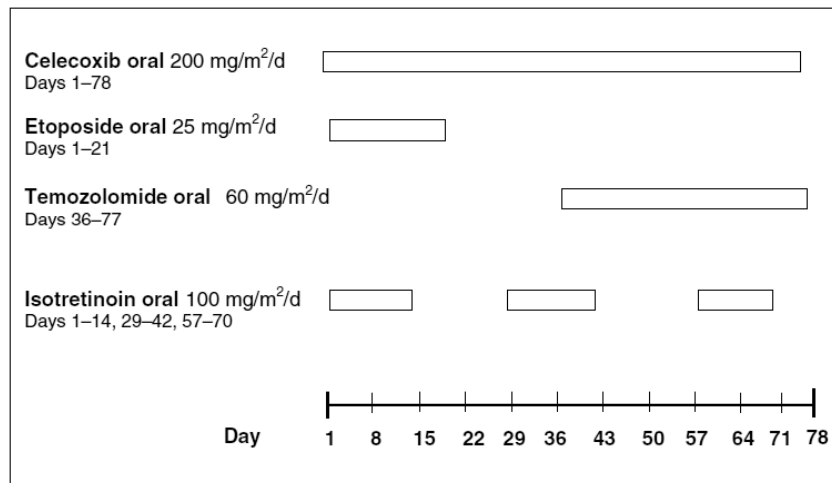


Fig. 1. Combined oral maintenance biodifferentiating and antiangiogenic therapy (COMBAT) – treatment plan.

ONKOLOGIE

Original Article · Originalarbeit

Onkologie 2006;29:308–313
DOI: 10.1159/000093474

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 Valík^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