

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie

DIFERENCIACE BUNĚK

RNDr. 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

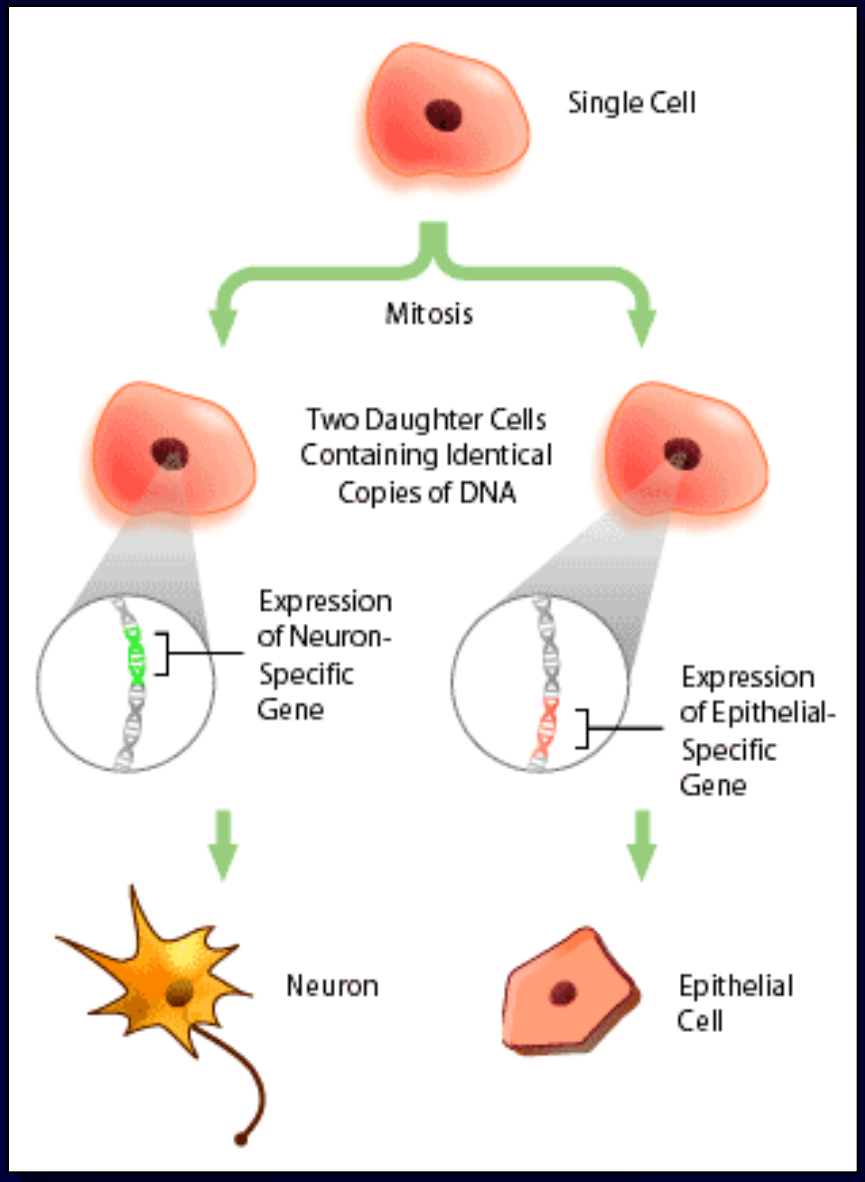
Vývoj mnohobuněčného organismu

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

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

Lidský organismus:

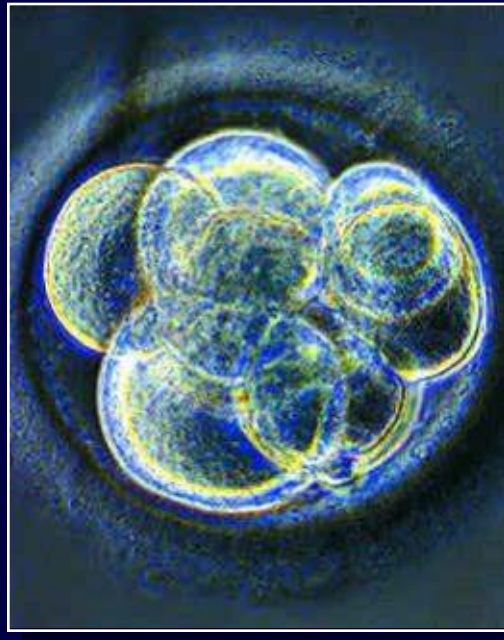
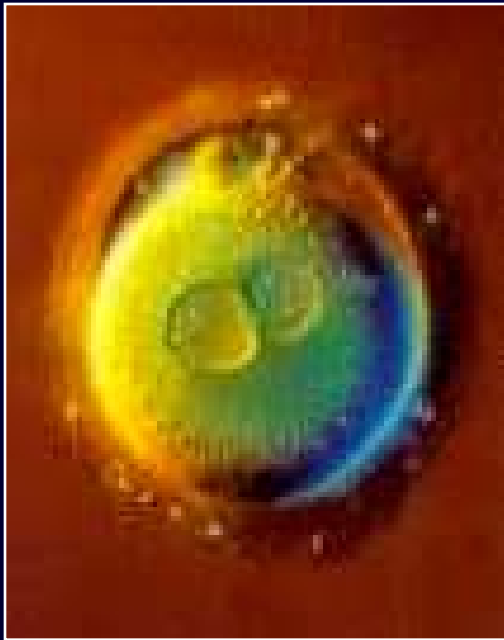
1 zygota → 10^{13} buněk (250 různých typů)



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

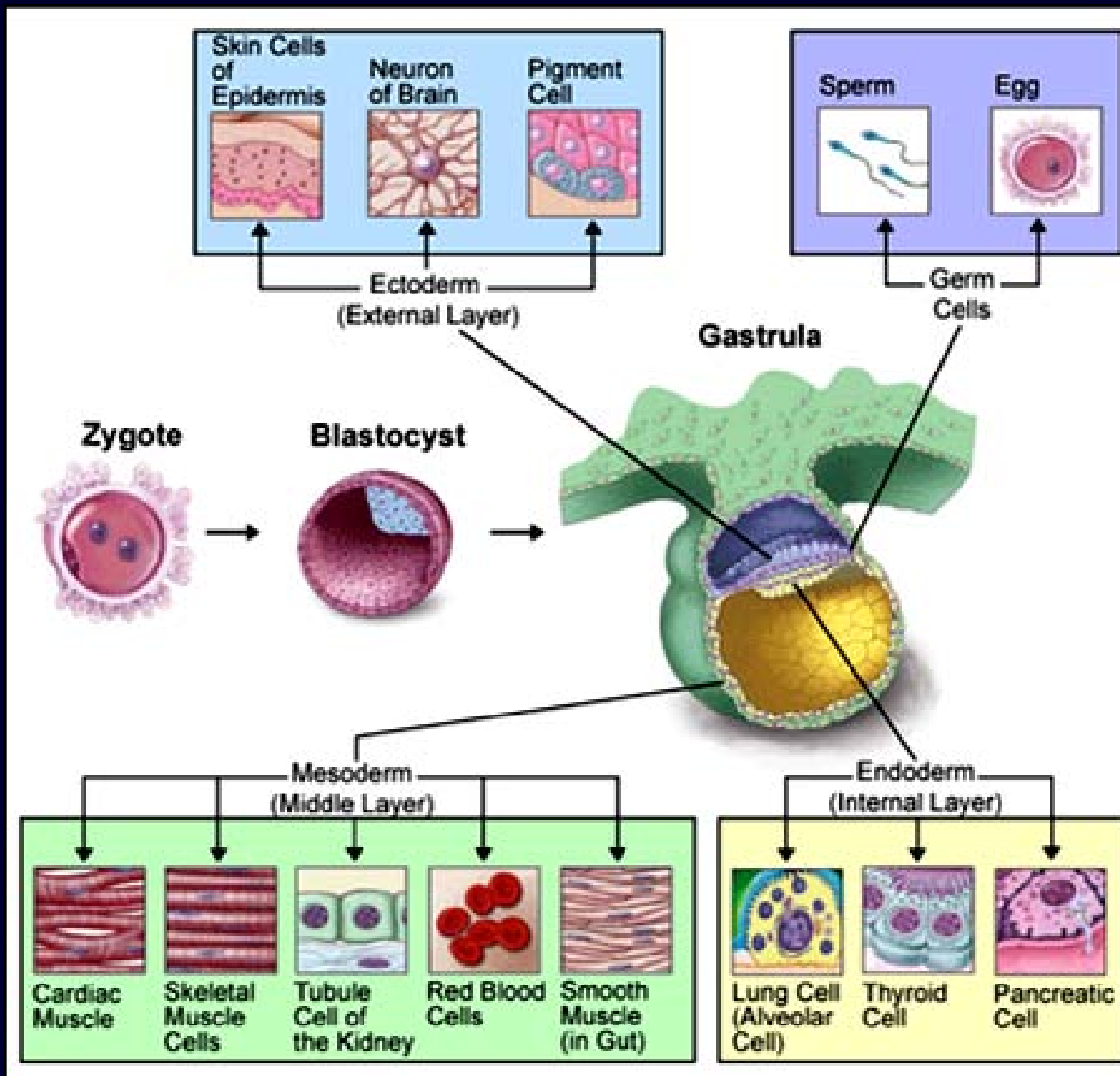
- CNS
- sítnice a čočky
- lebeční a senzorická ganglia a nervy
- pigmentové buňky
- pojivová tkáň hlavy
- epidermis
- vlasy, ochlupení
- prsní žlázy

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

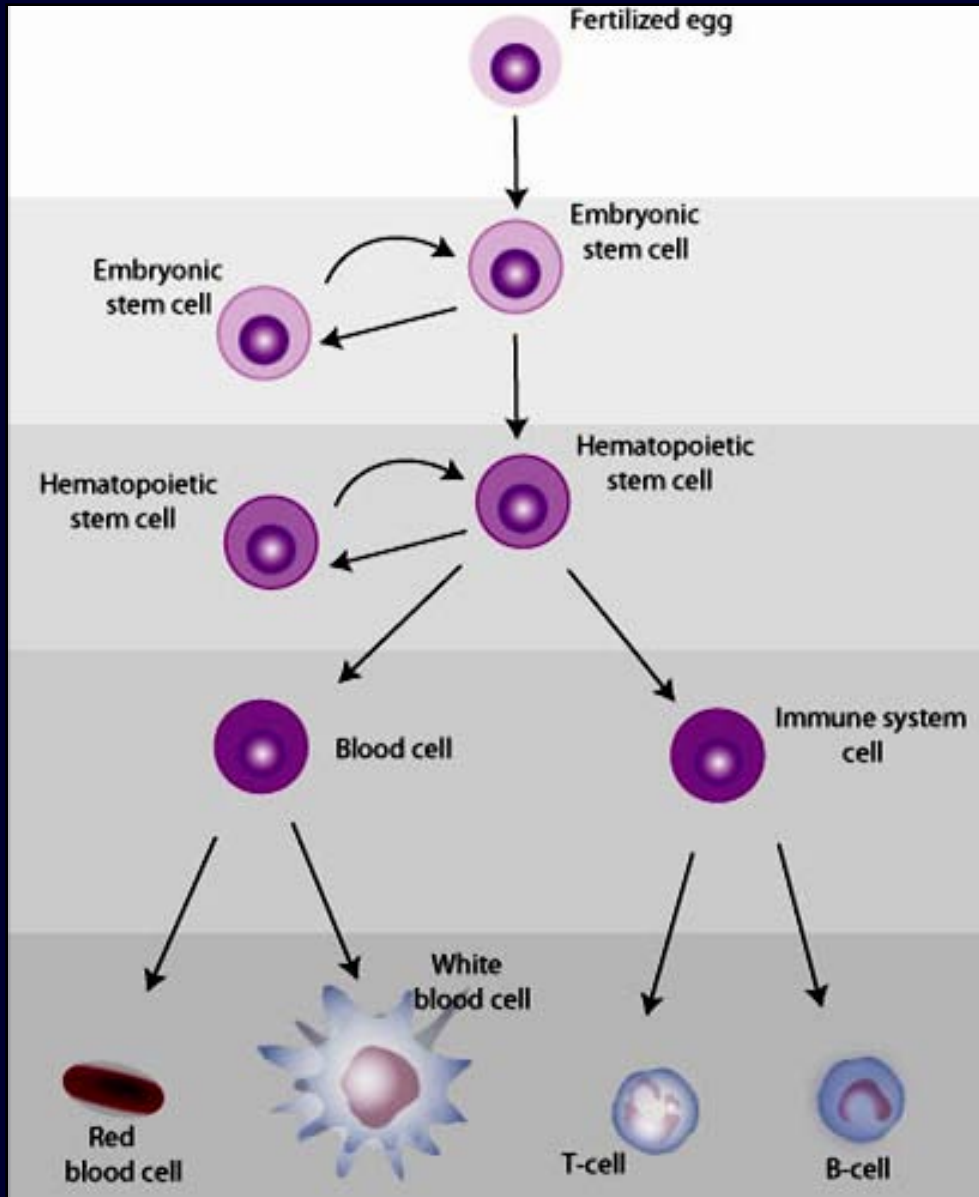
- nelimitovaný diferenciační potenciál
- schopnost tvořit embryonální i extraembryonální tkáně
- časná stádia rýhování zygoty (1-4 dny)

Pluripotence

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

Multipotence

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



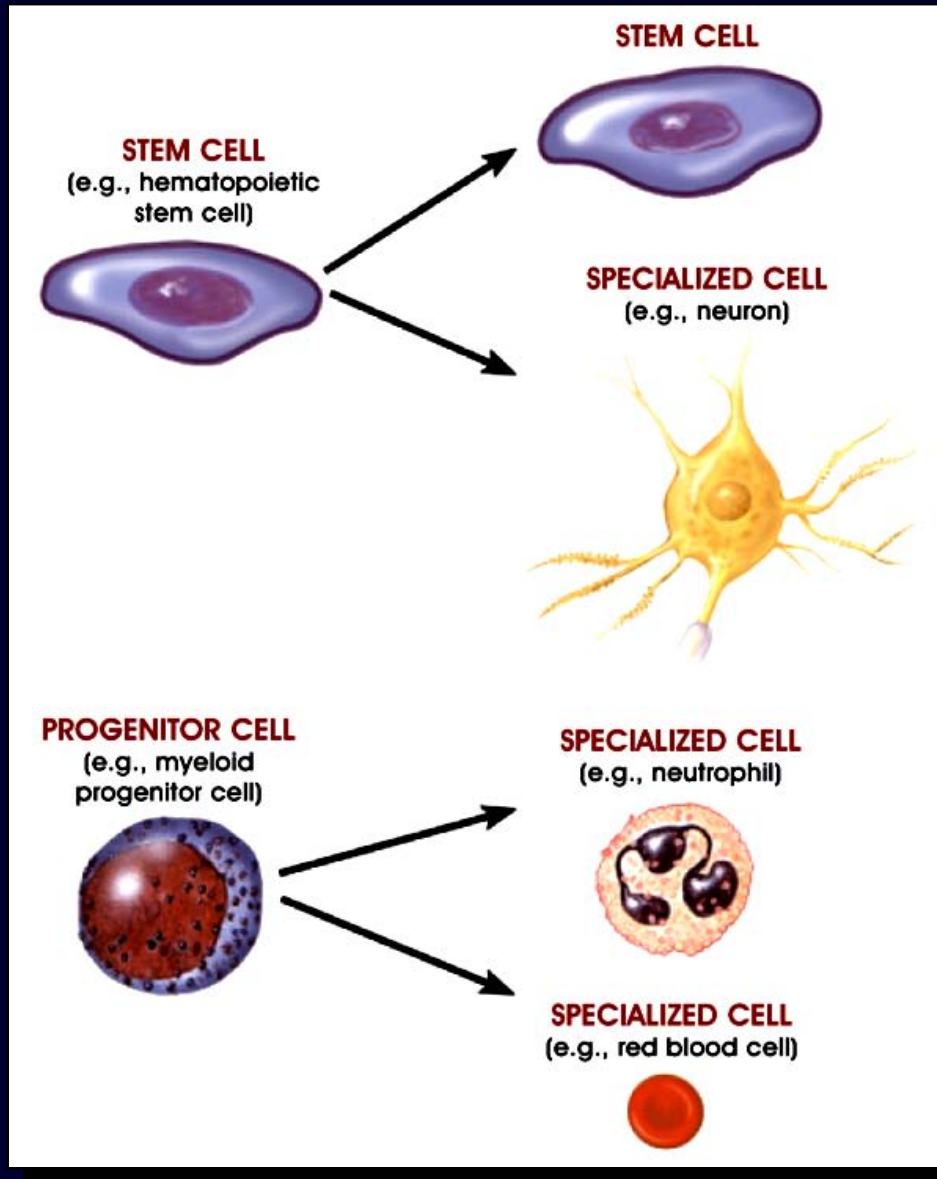
totipotentní buňka
(zygota, blastomery)

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 diferenciace:

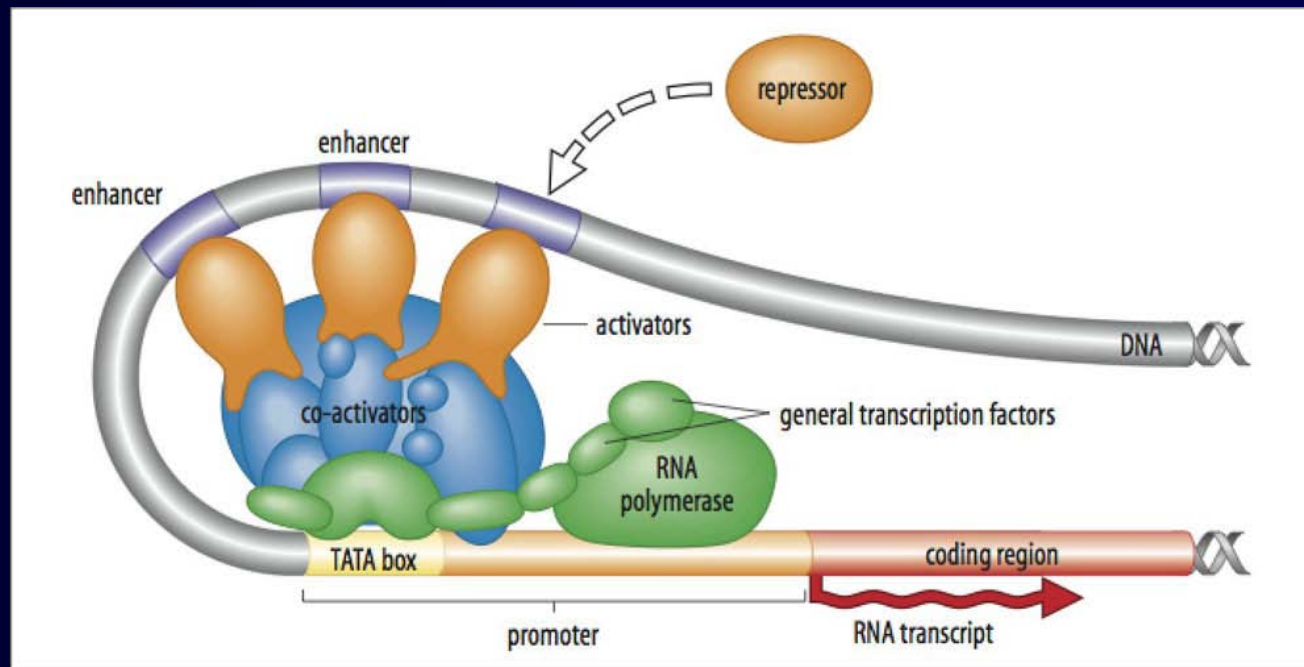
- postupné změny v aktivitě genů
(programovány v genomu)
- odpověď na molekulární signály vysílané ostatními buňkami
- odpověď na fyzikální kontakt s ostatními buňkami

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

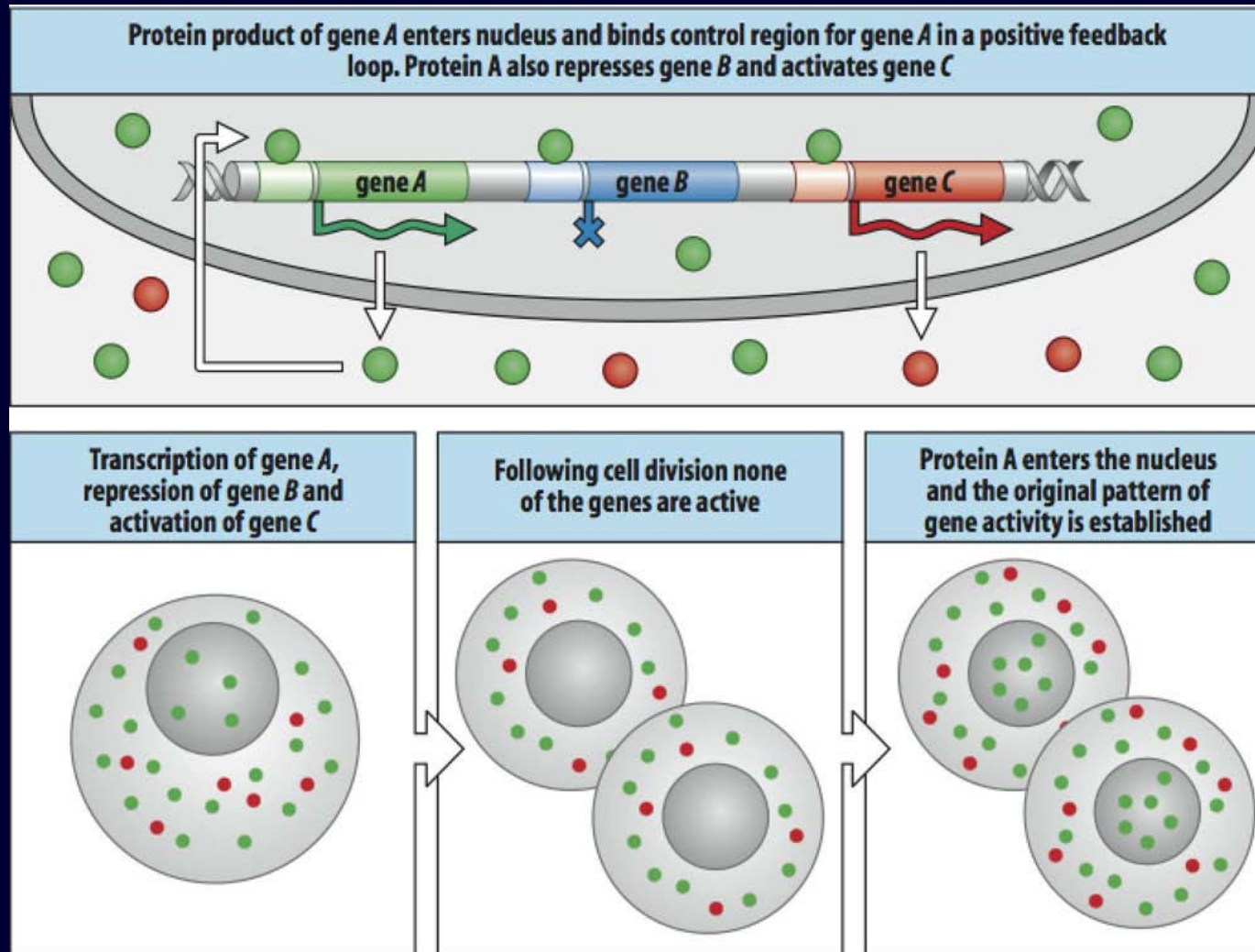
- nejdůležitějším místem regulace je **iniciace transkripce**
- vazba regulačních proteinů na specifické sekvence DNA (regulační oblasti)
- relativně malý počet strukturních motivů

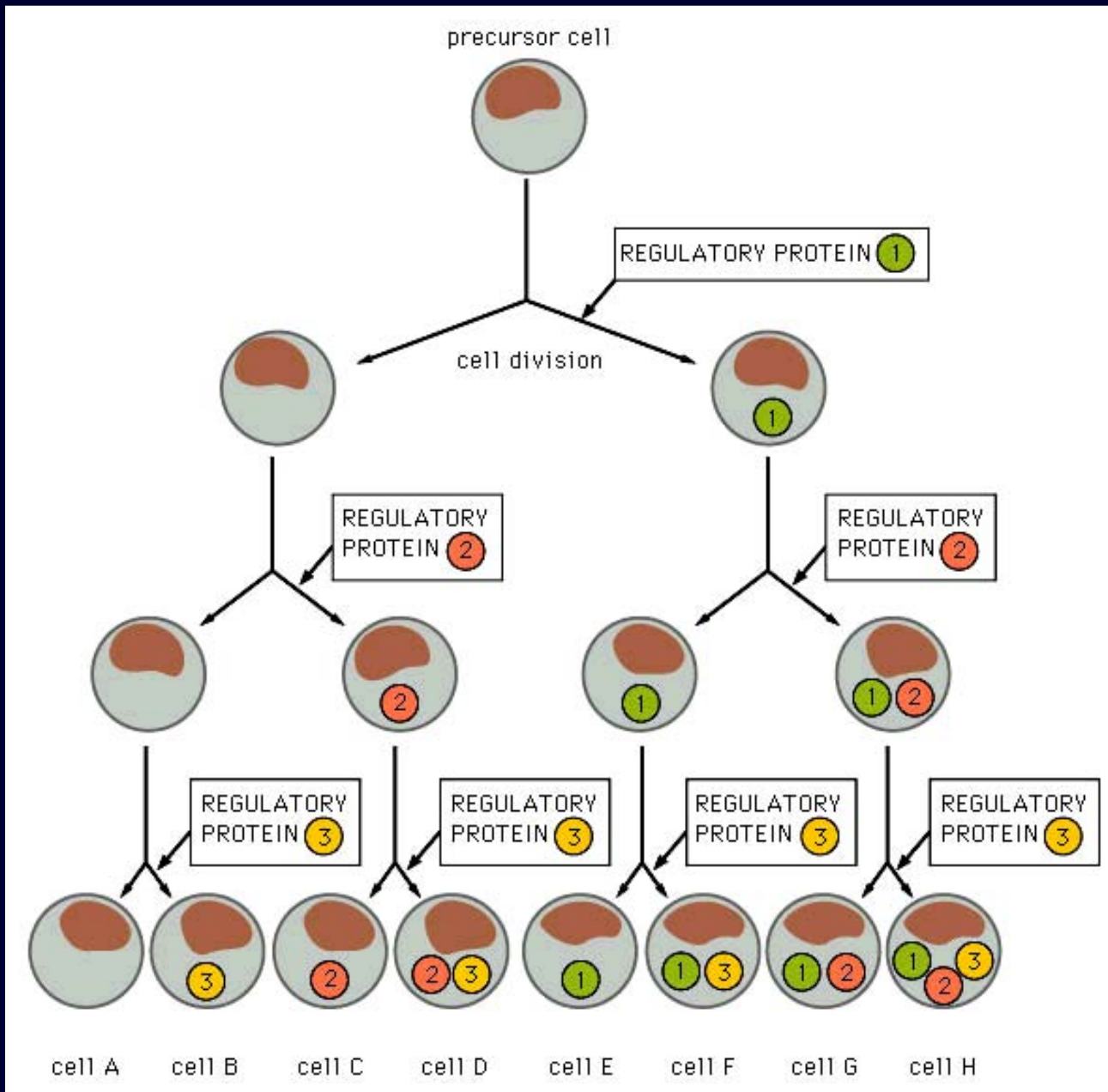


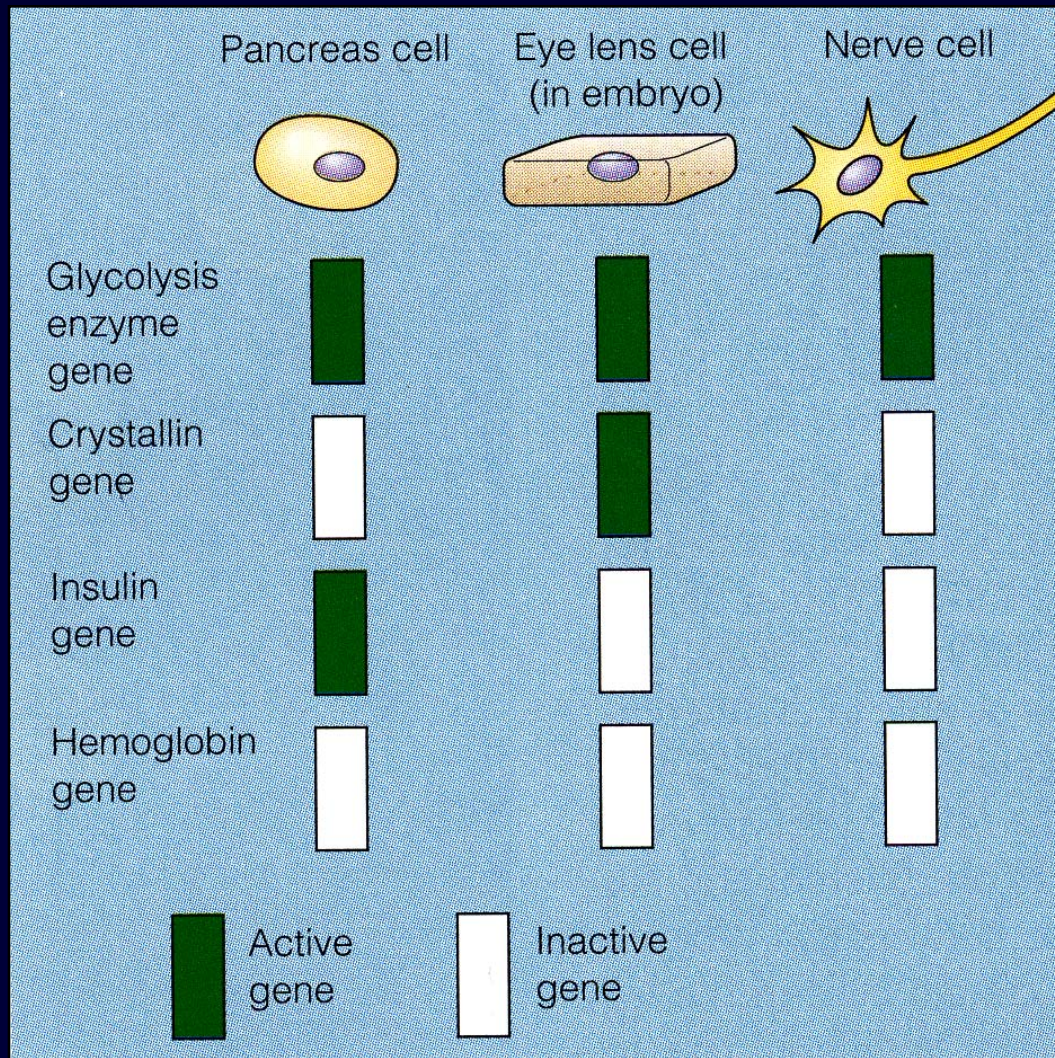
Molekulární mechanismy diferenciace

- 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
- u člověka asi 3000 TFs
- ± 5 TFs působí společně a reguluje transkripci jednoho genu
- jeden TF reguluje více genů (pozitivně i negativně)
- tkáňová specifita

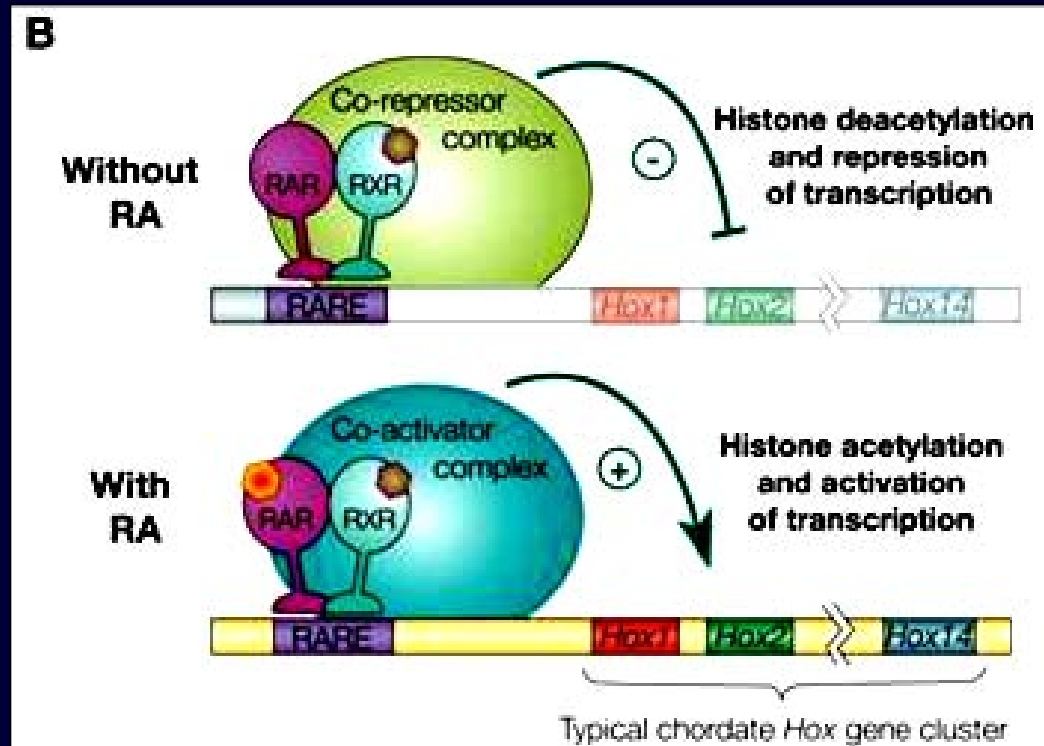
Zachování exprese genů po rozdělení buňky







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



1. vazba na jaderné receptory (RAR, RXR)
2. vazba komplexu na regulační oblast (RARE)
3. acetylace histonů → 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

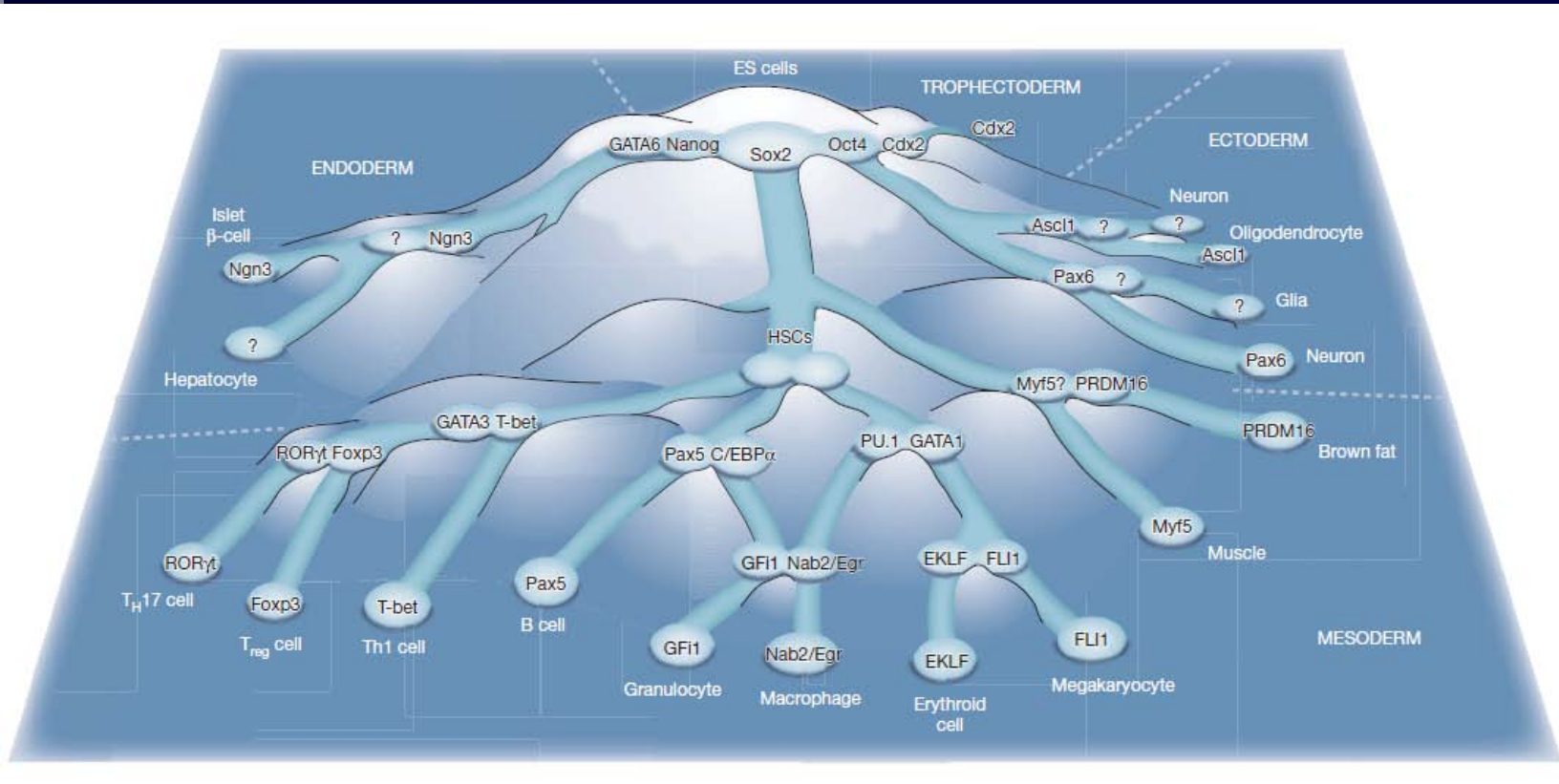
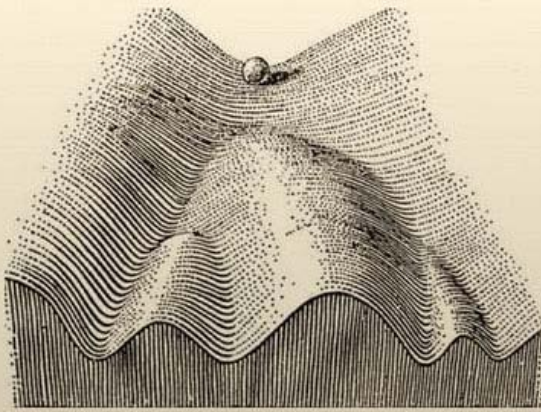
- je obvyklá *in vitro* (adaptace na kultivační podmínky)
- *in vivo* u nižších živočichů (regenerace obojživelníků)
- experimentálně – příprava iPS cells

Transdiferenciace

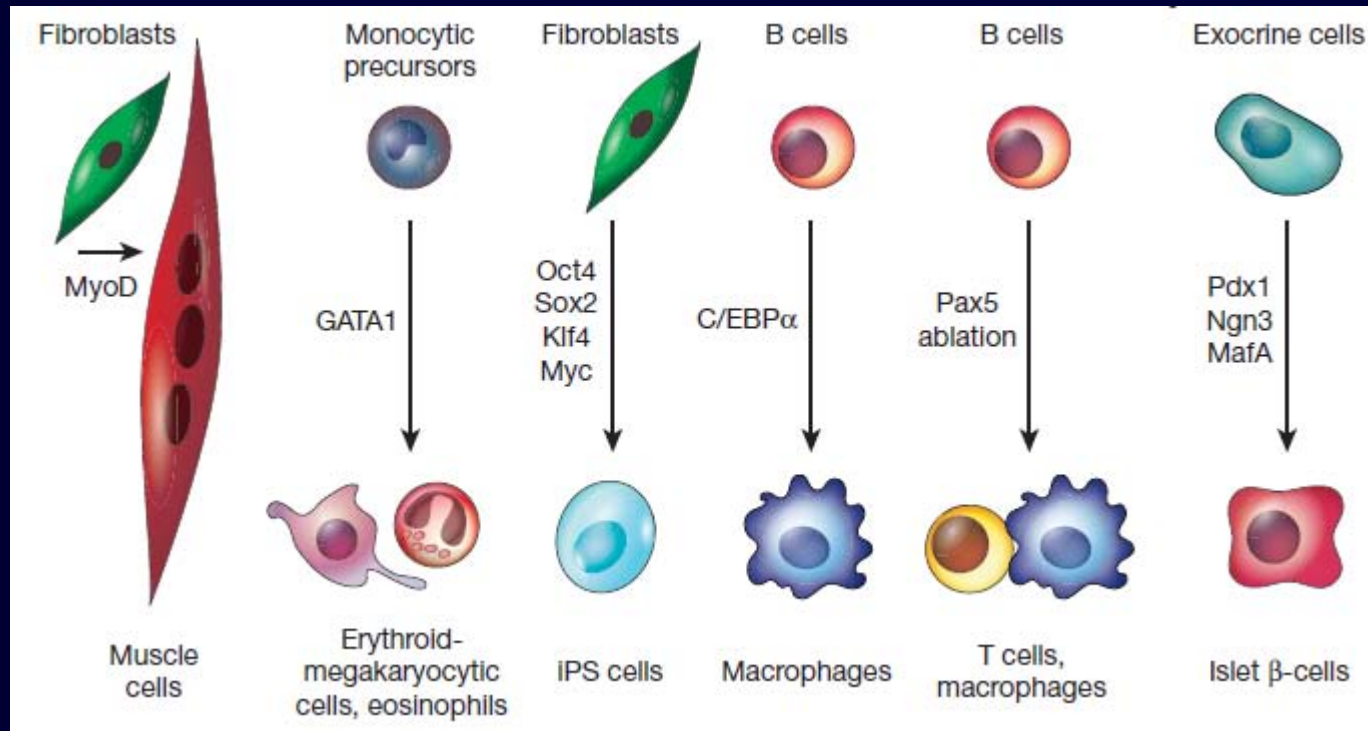
schopnost určitých buněk určité tkáně (včetně SCs nebo progenitorů) diferencovat do buněk typických pro jiné orgány nebo tkáně (např. hematopoetické)

Epigenetic landscape: H.C. Waddington (1957)

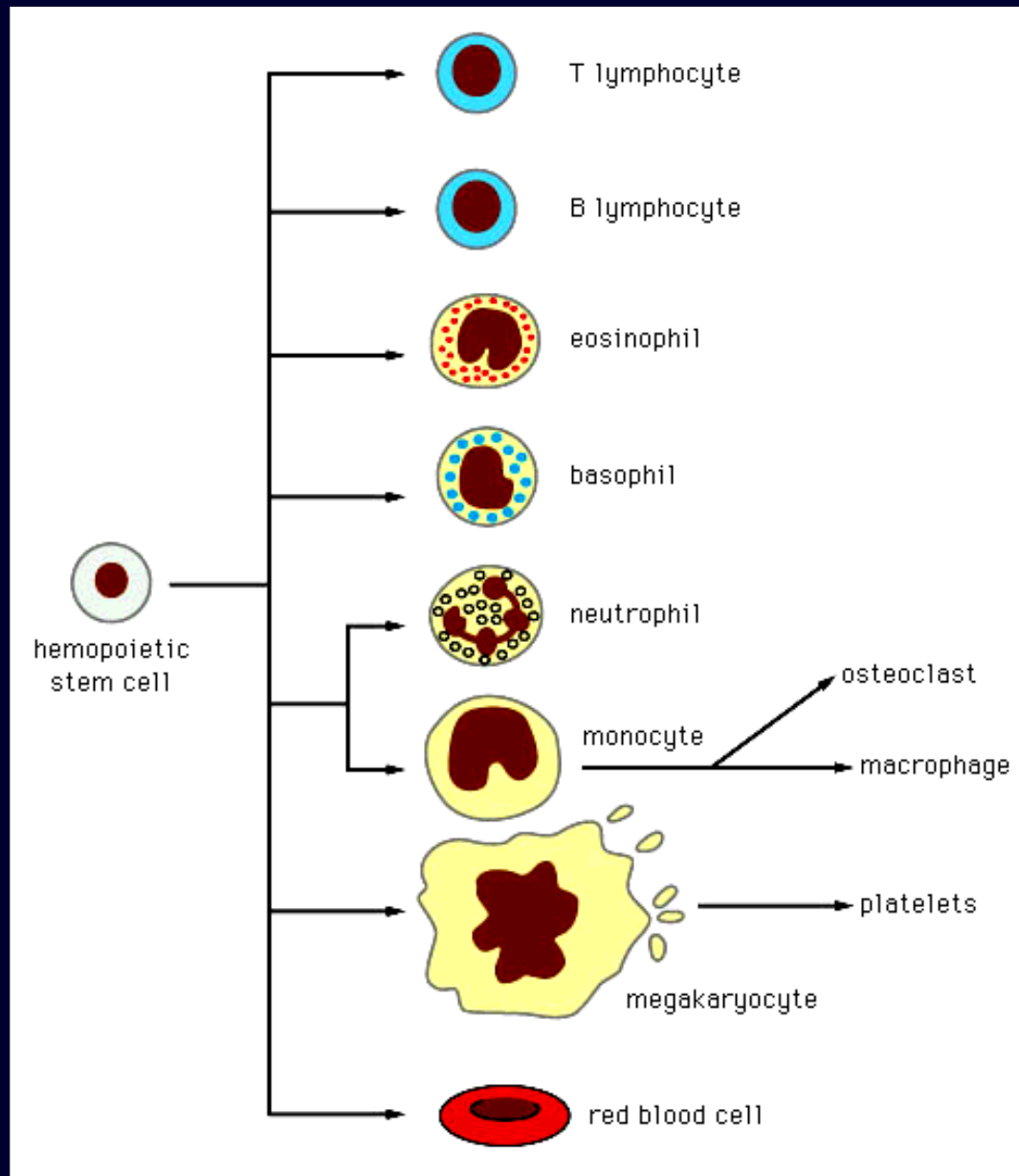
Epigenetic landscape: T. Graf & T. Enver (2009) - role transkripčních faktorů

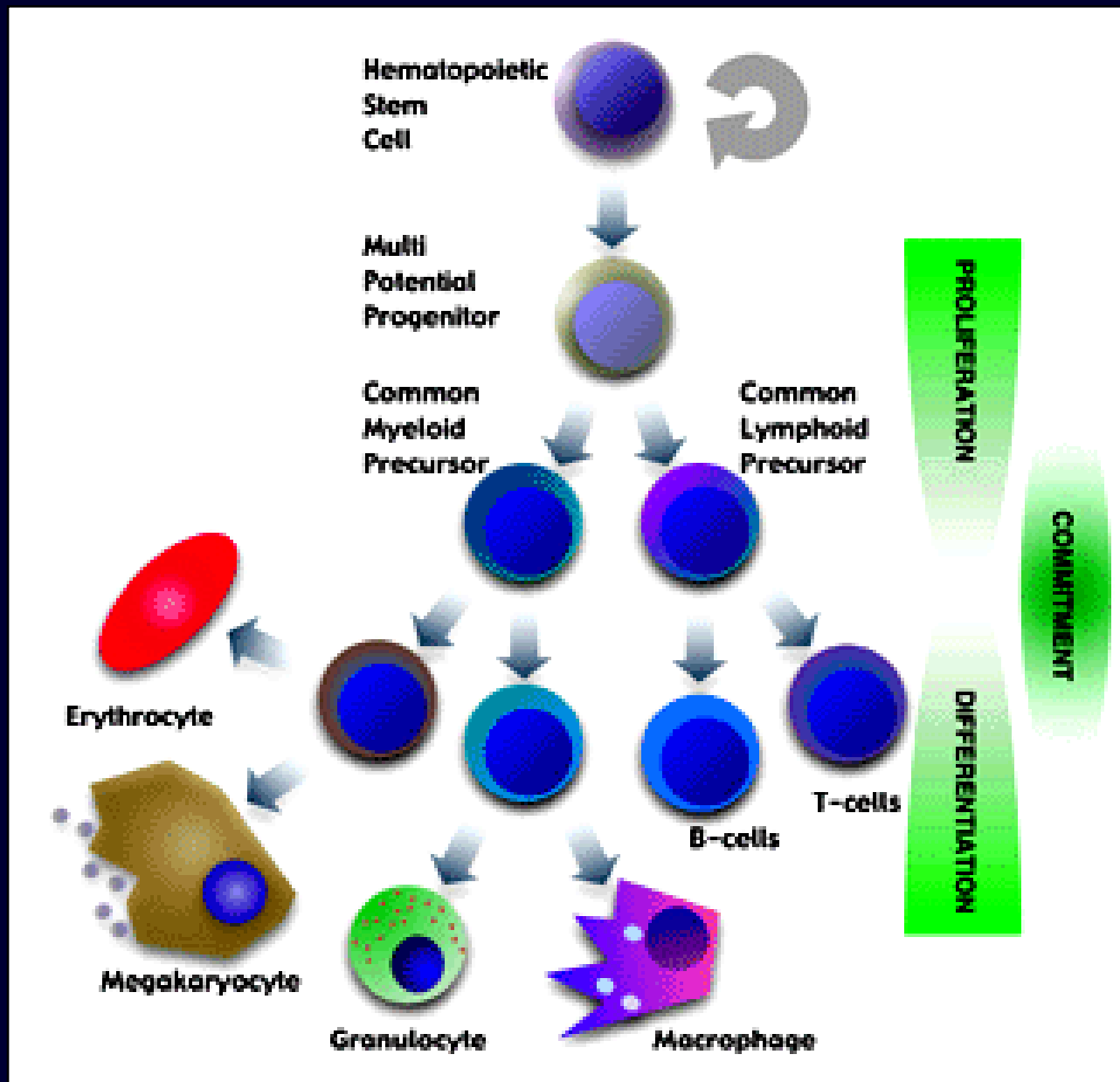


Indukovaná transdiferenciace

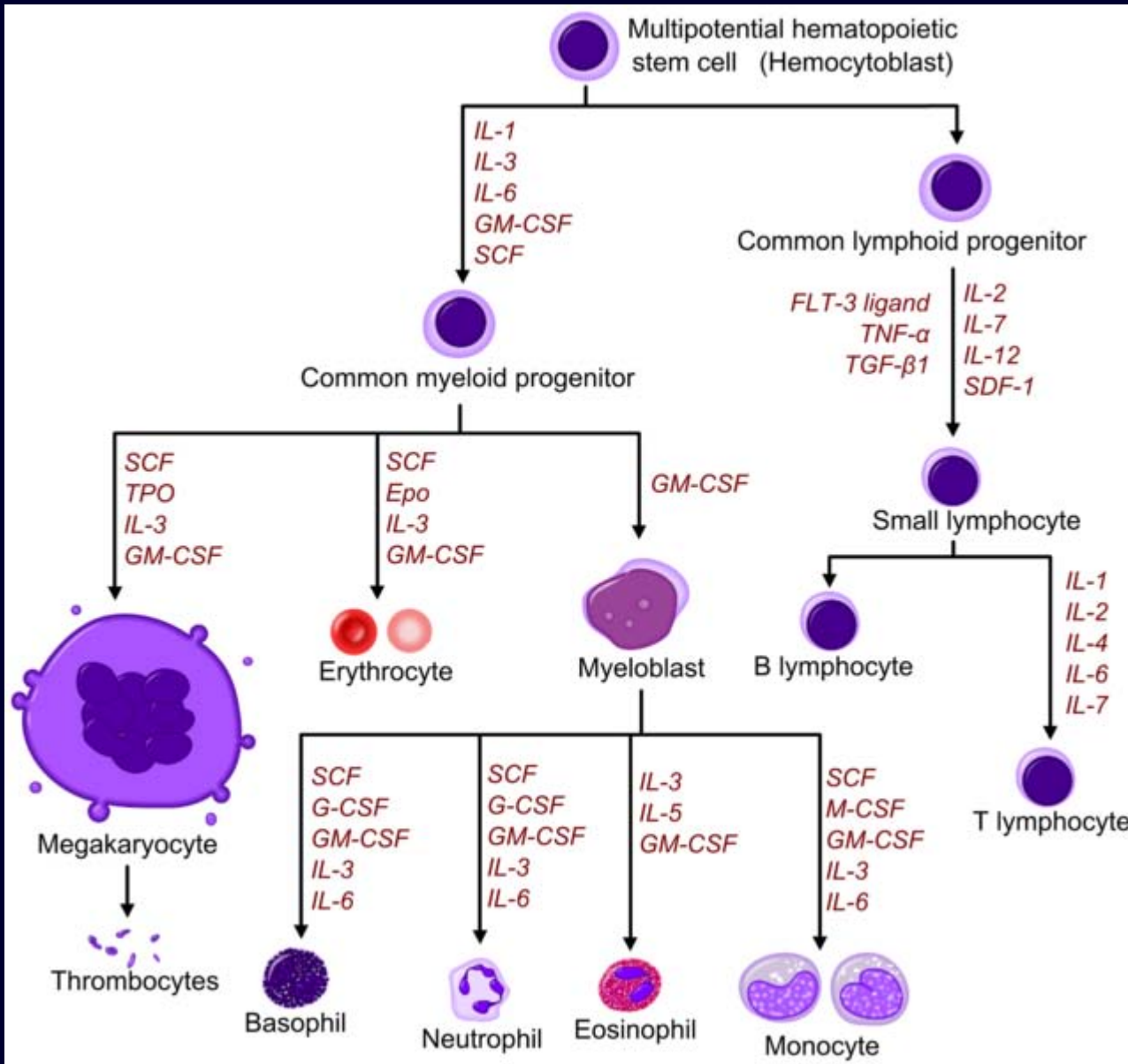


Diferenciační potenciál hematopoetických kmenových buněk



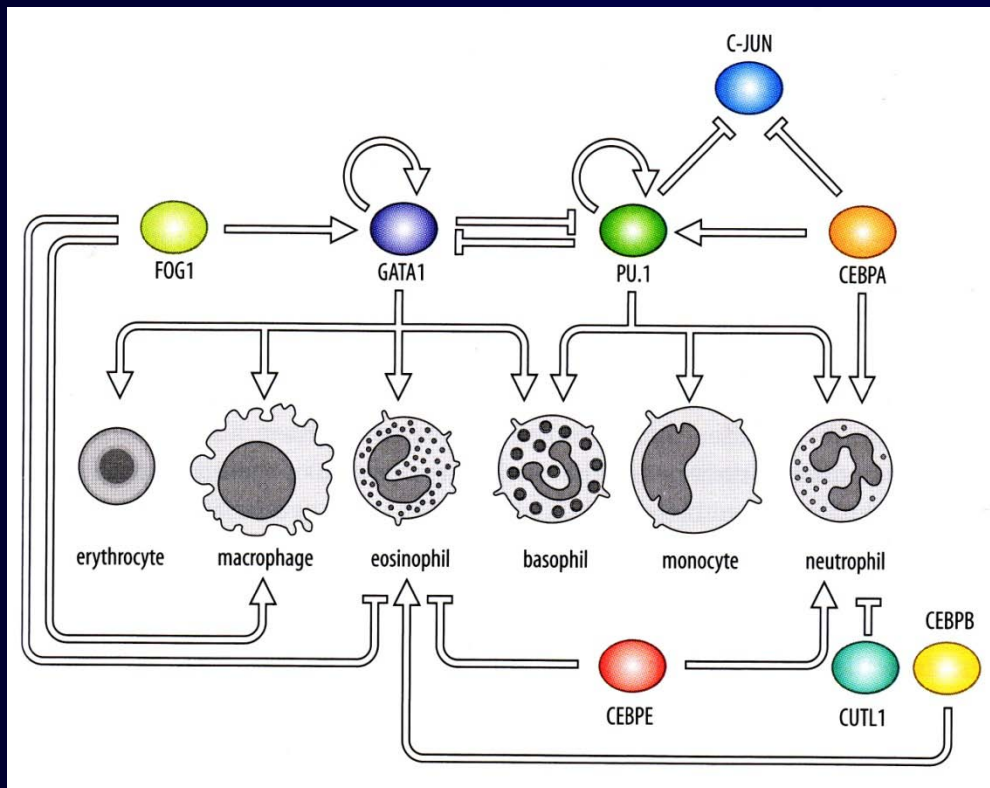


Diferenciace krevních buněk



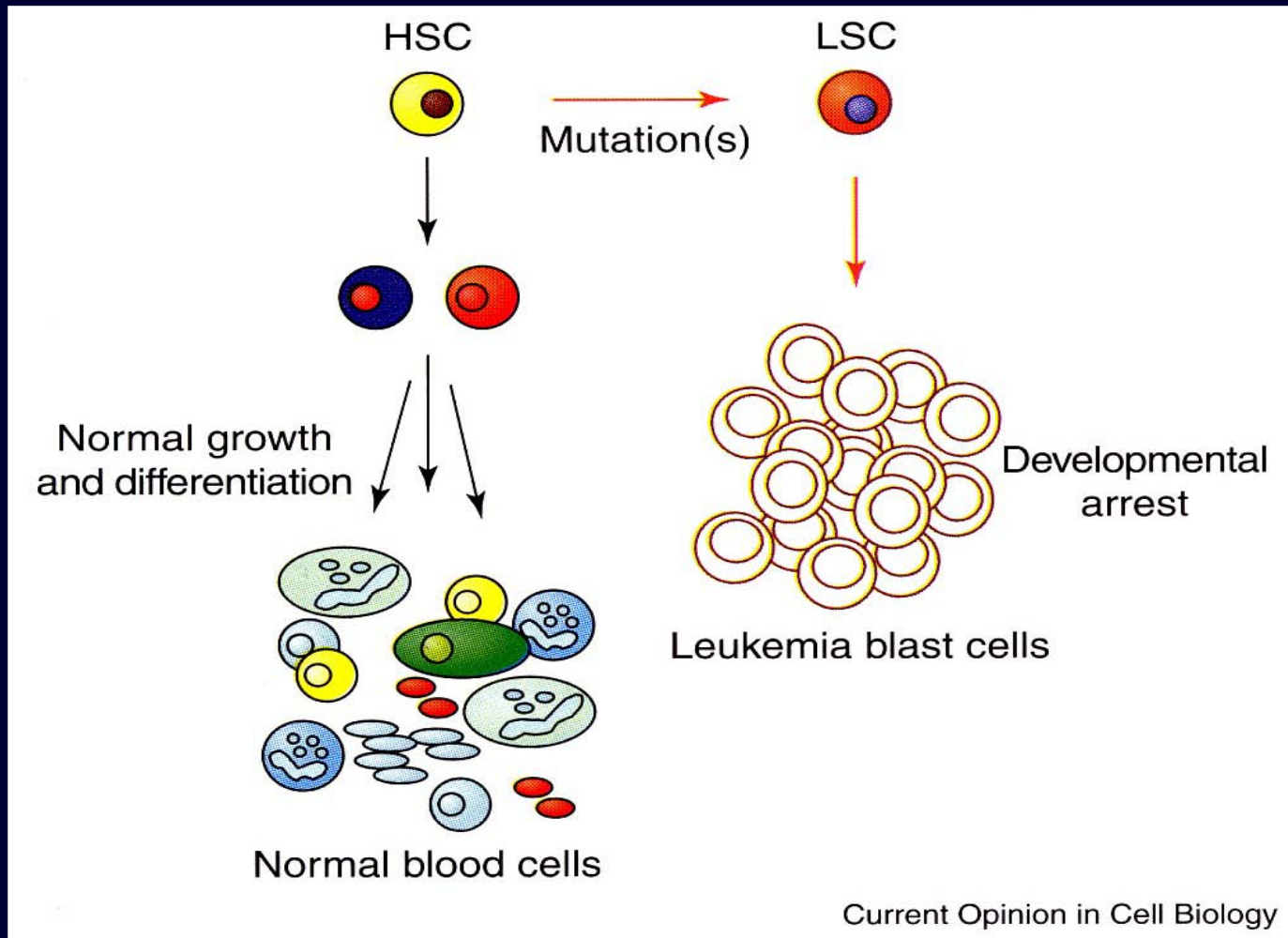
Some hematopoietic growth factors and their target cells

Type of growth factor	Responding hematopoietic cells
Erythropoietin (EPO)	Erythroid progenitors
Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)	Granulocytes, neutrophils
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	Granulocytes, macrophages
Interleukin-3	Multipotent precursor cells
Stem cell factor (SCF)	Stem cells
Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)	Macrophages, granulocytes

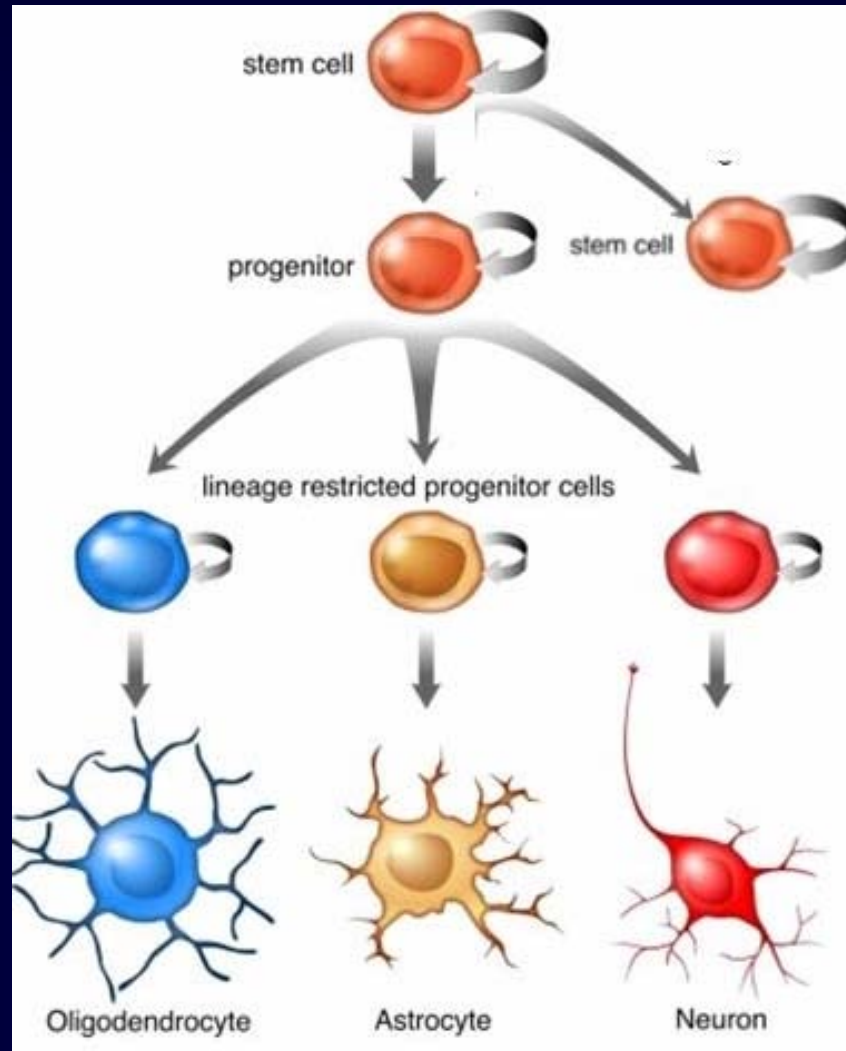


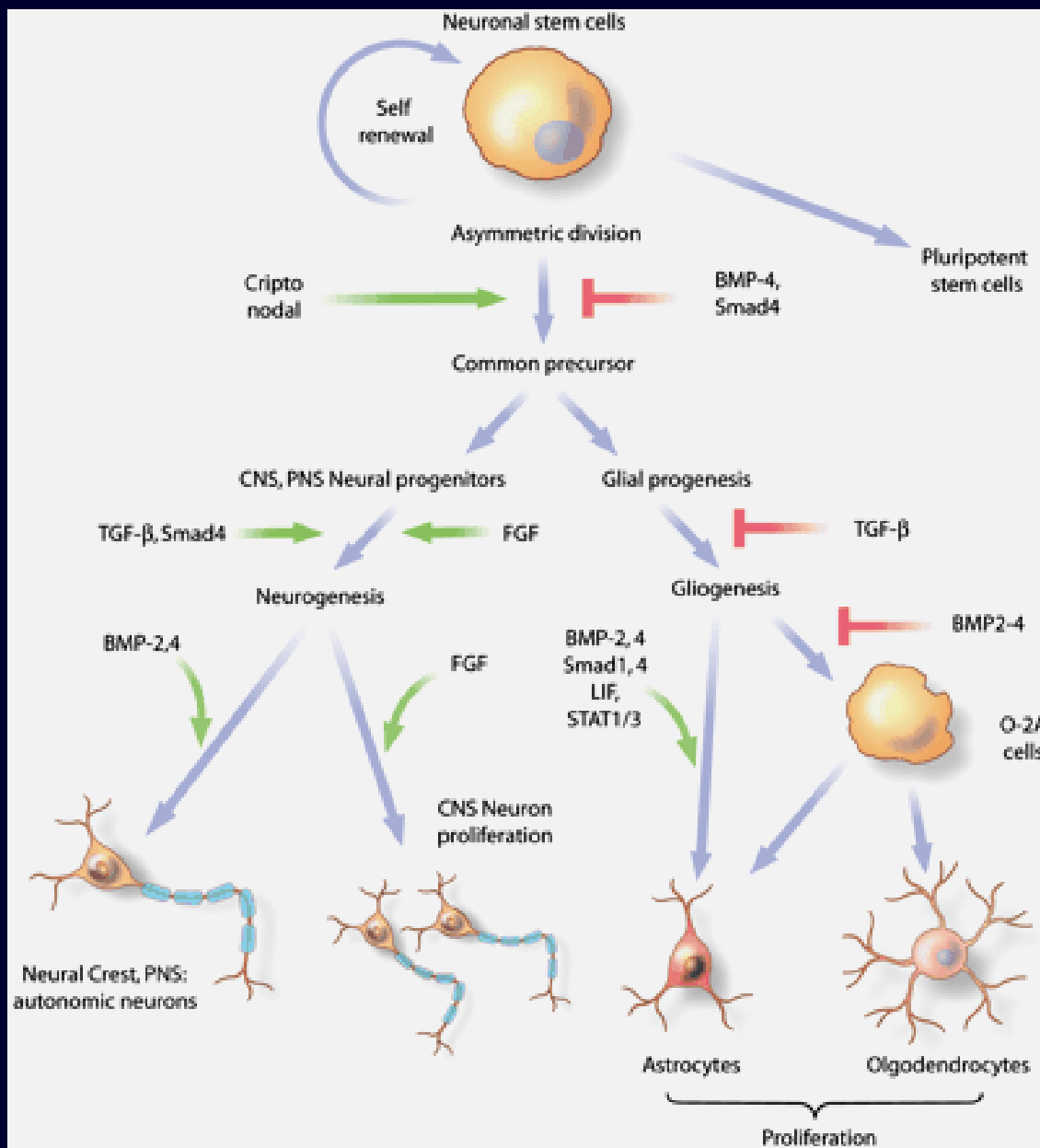
Vliv TFs na diferenciaci krevních buněk

Porucha diferenciace krevních buněk



Průběh neuronální diferenciace





Regulace neuronální diferenciace

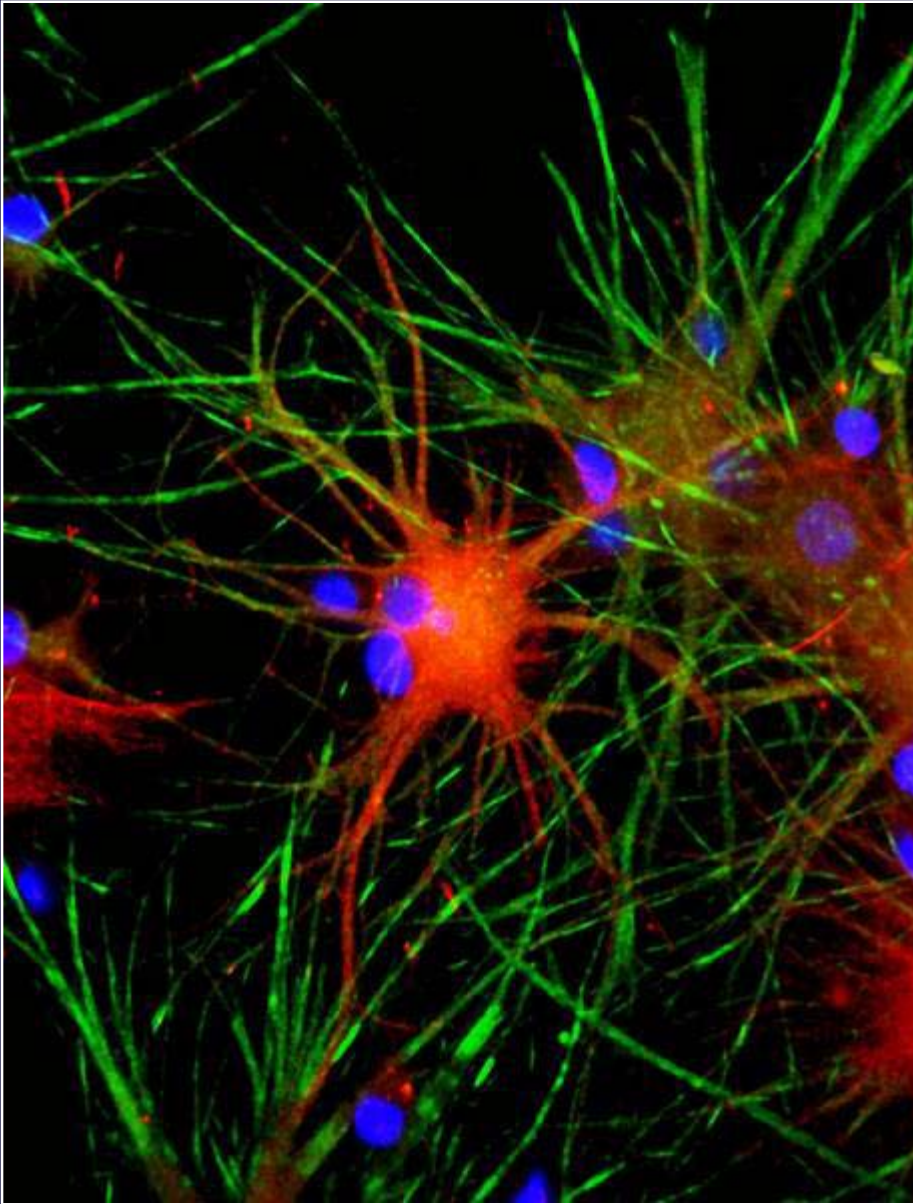
TGF- β superfamily

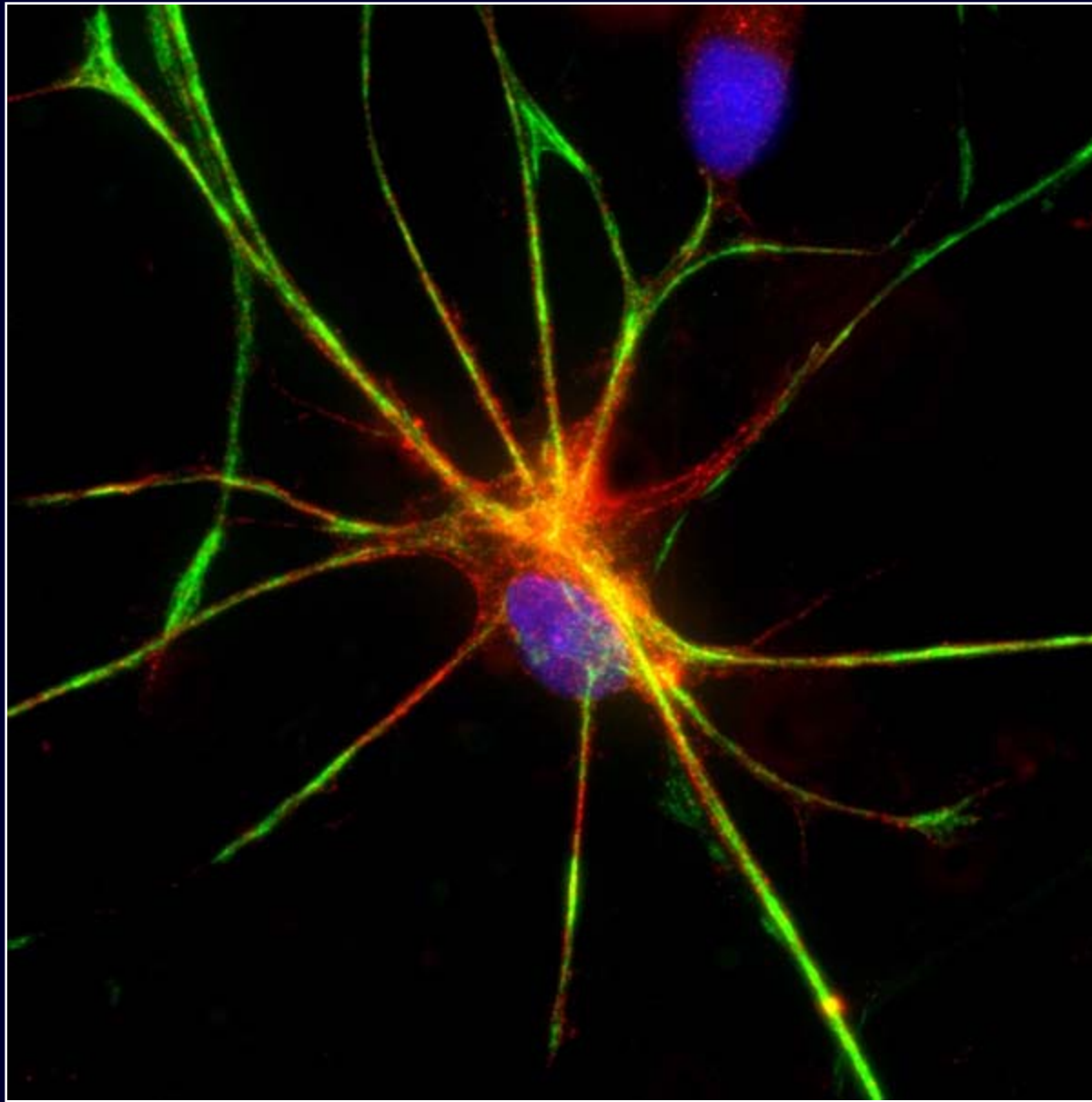
- TGF- β (1-3)
- BMPs
- nodal
- activin

Neuronální diferenciace

Kmenová buňka:

- nestin
- GFAP
- DNA





Neuronální
diferenciace
Progenitorová
buňka:

- β -tubulin III
- GFAP
- DNA

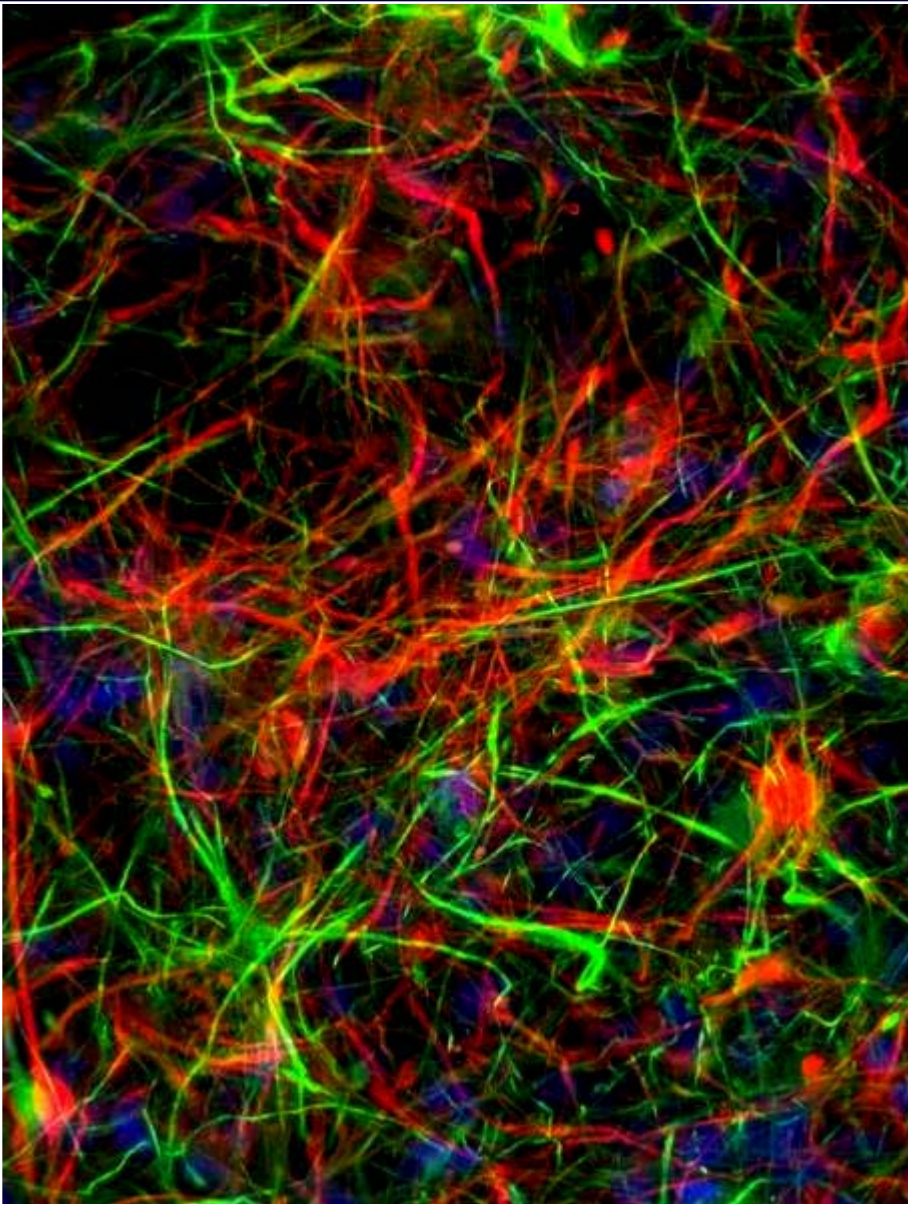
Neuronální diferenciace

Neurony:

- β -tubulin III
- DNA

Gliové buňky:

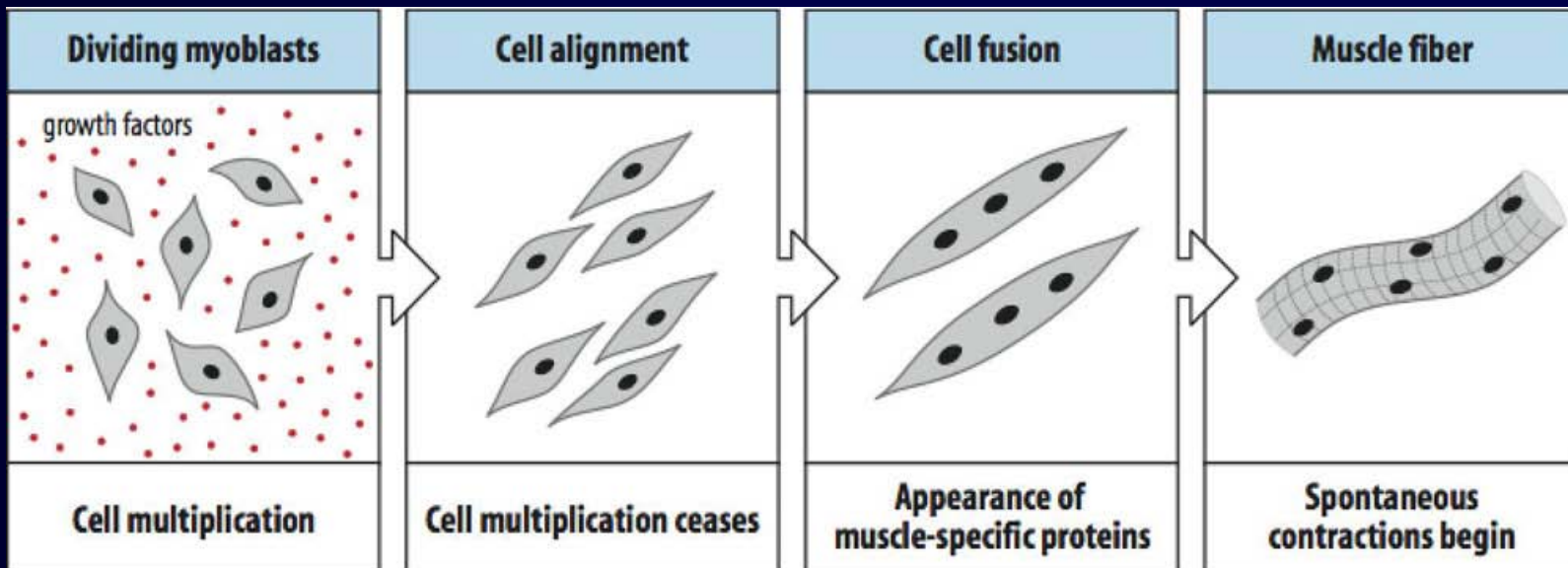
- GFAP
- DNA



Diferenciace příčně pruhované svaloviny

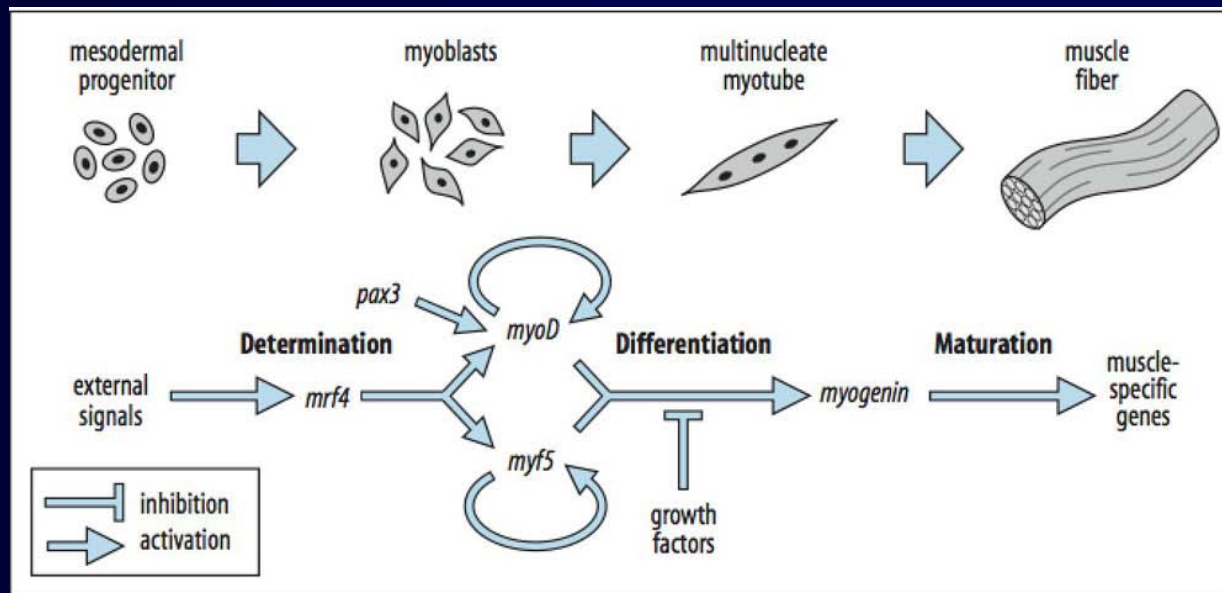
diferenciaci doprovází

- zástava buněčného cyklu
- změna morfologie
- fúze v syncytia



Diferenciace příčně pruhované svaloviny

- svalové prekurzory exprimují *mrf4*, *myf5* a *myoD*
- *in vitro*: po odstanění růstových faktorů se spustí diferenciace
- exprese svalově specifických proteinů:
myogenin, *svalový aktin*, *myosinII*, *tropomyosin* ...



RŮSTOVÉ FAKTORY

Růstové faktory (Growth Factors)

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

Cytokiny

- molekuly ovlivňující buněčnou proliferaci (interleukiny, G-CSF, GM-CSF...)

EGF (Epidermal Growth Factor)

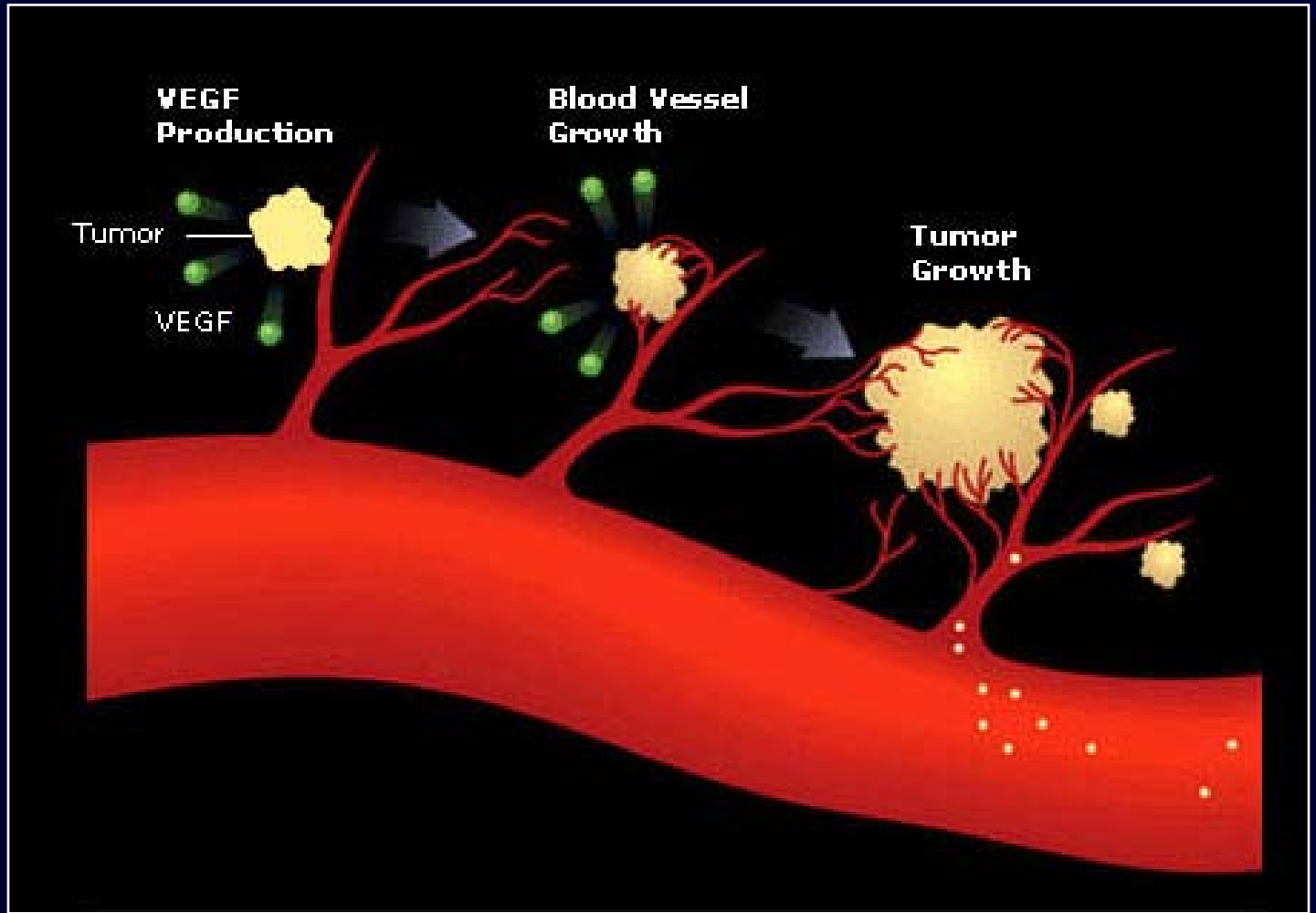
- specifická vazba na **EGFR** (Epidermal Growth Factor Receptor) → aktivace RTK kaskády

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 β 1, β 2, β 3: diferenciaci buněk, vývoj embrya, regulace imunitního systému, apoptóza

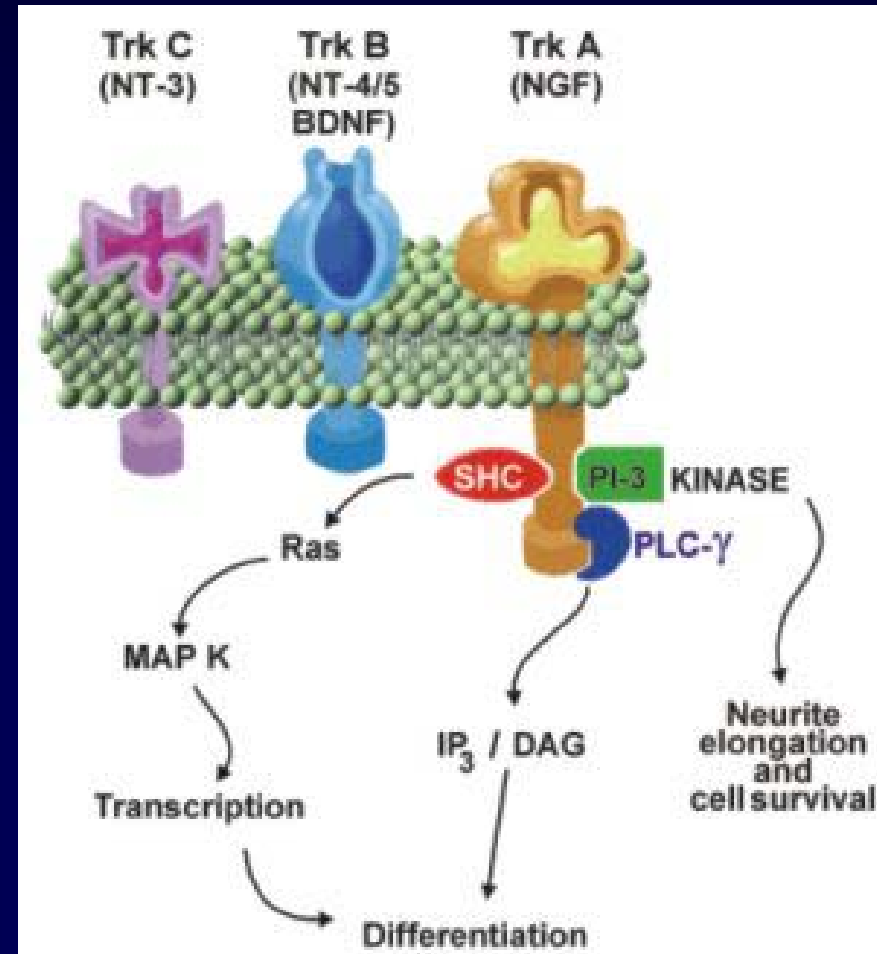
Neurotrofiny (Neurotrophins)

- produkovány cílovou tkání → přežívání neuronů, neuronální diferenciace

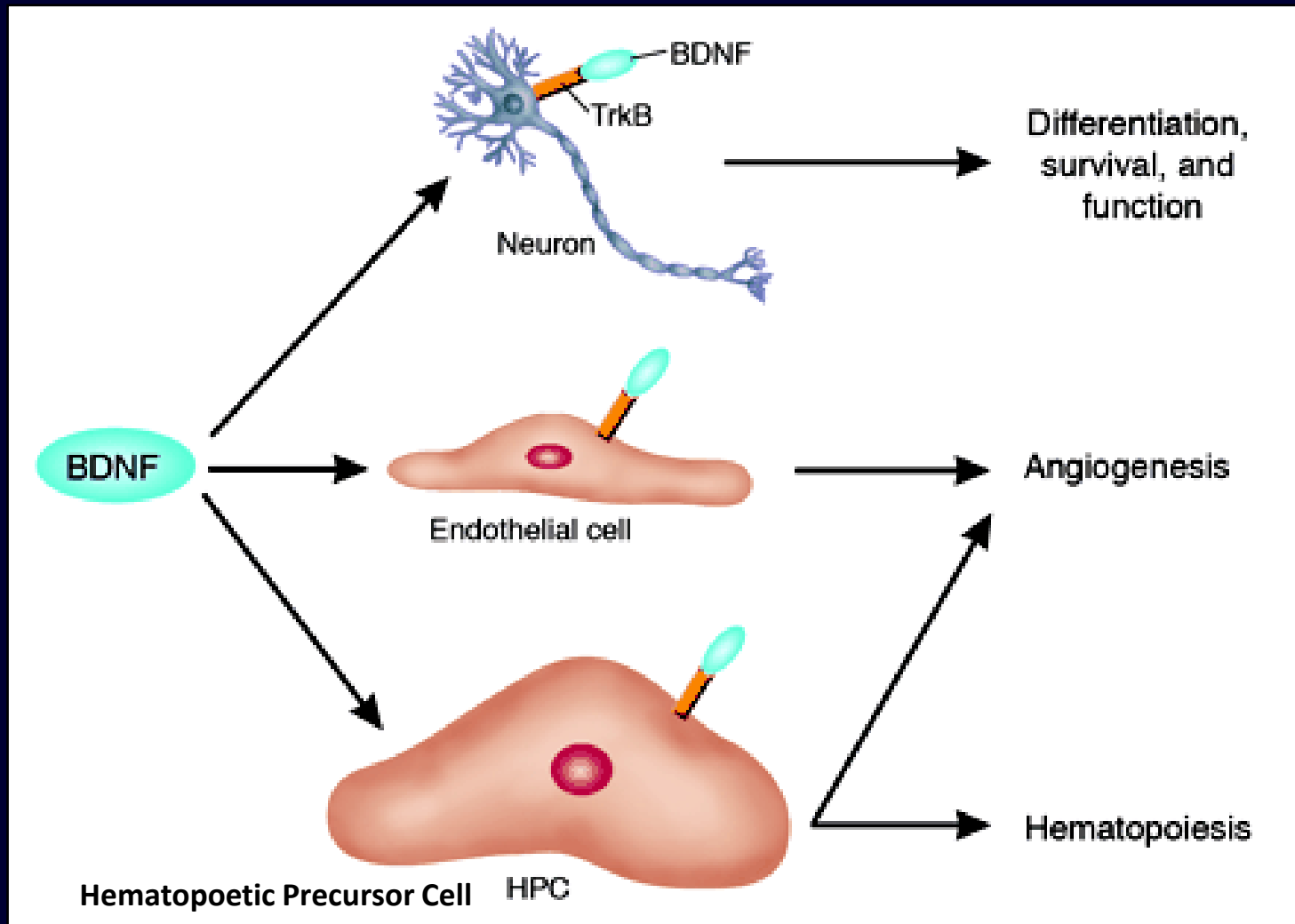
- receptory:

p75, Trk receptory (A,B,C)

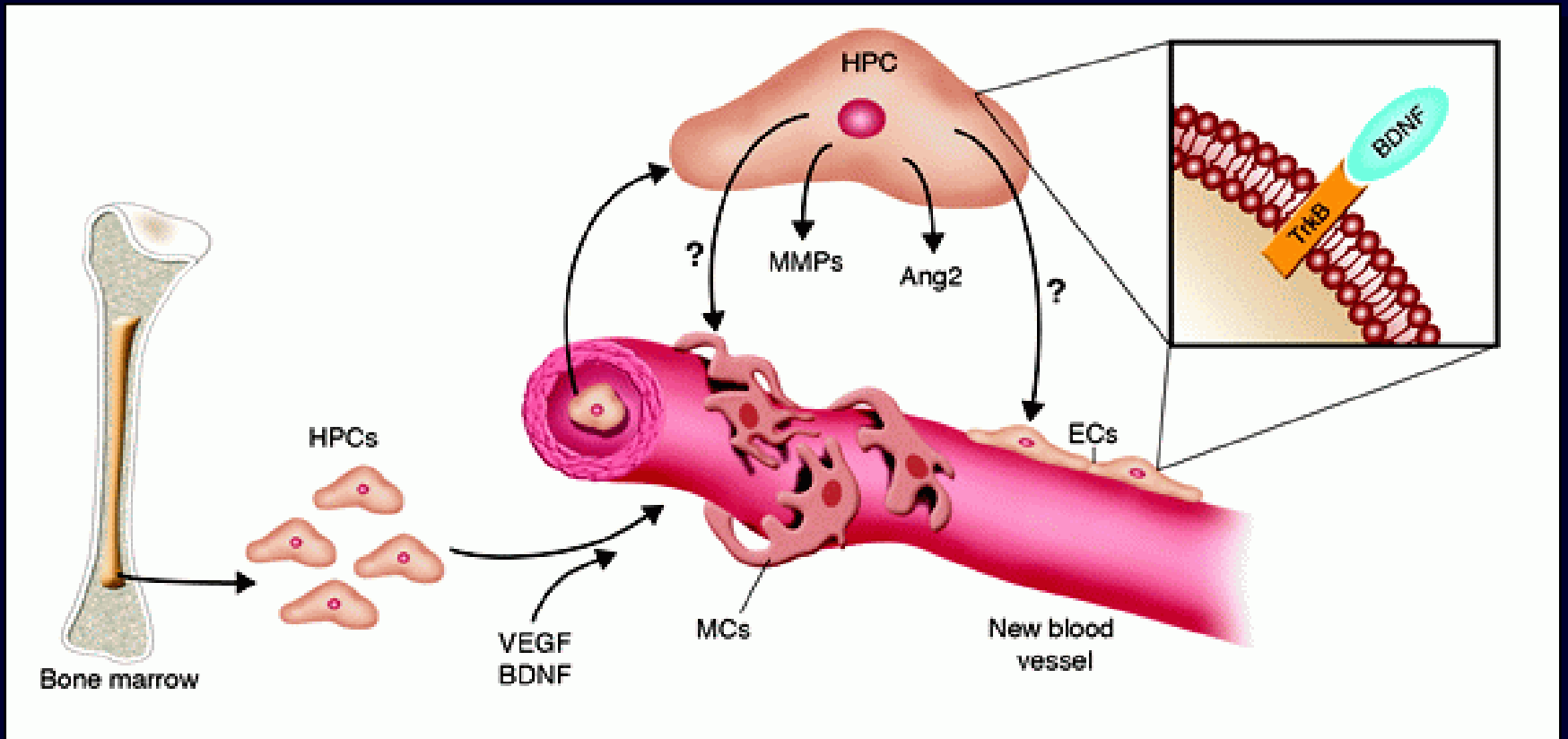
- NGF (nerve growth factor)
- BDNF (brain-derived neurotrophic factor)
- NT-3 (neurotrophin-3)
- NT-4 (neurotrophin-4)



Pleiotropní efekt BDNF



BDNF-indukovaná neovaskularizace



HPCs- hematopoietic precursor cells, MCs - mural cell, ECs endothelial cells

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)

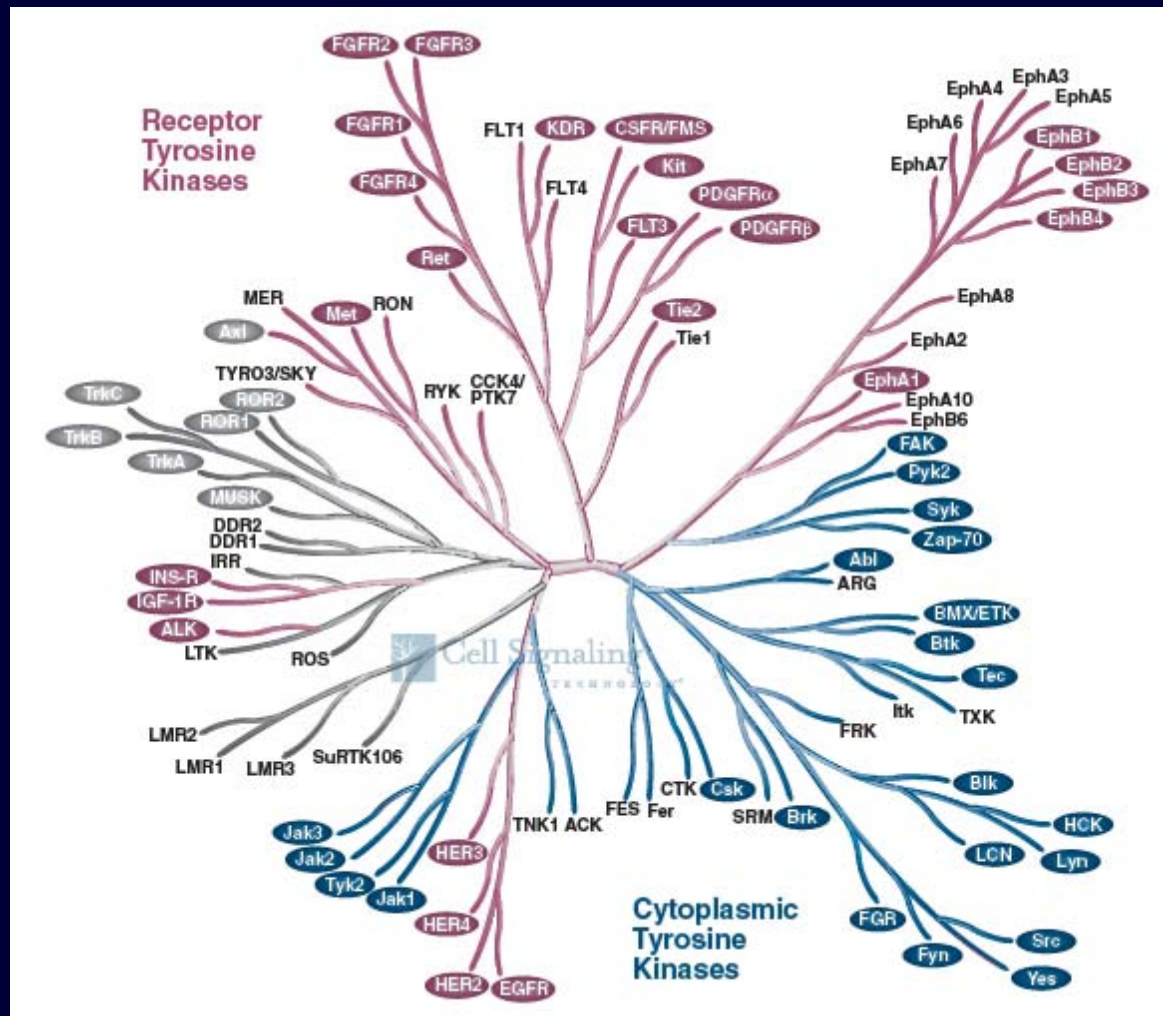
- stimulace tvorby granulocytů/neutrofilů

GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)

RECEPTOROVÉ TYROZIN-KINÁZY

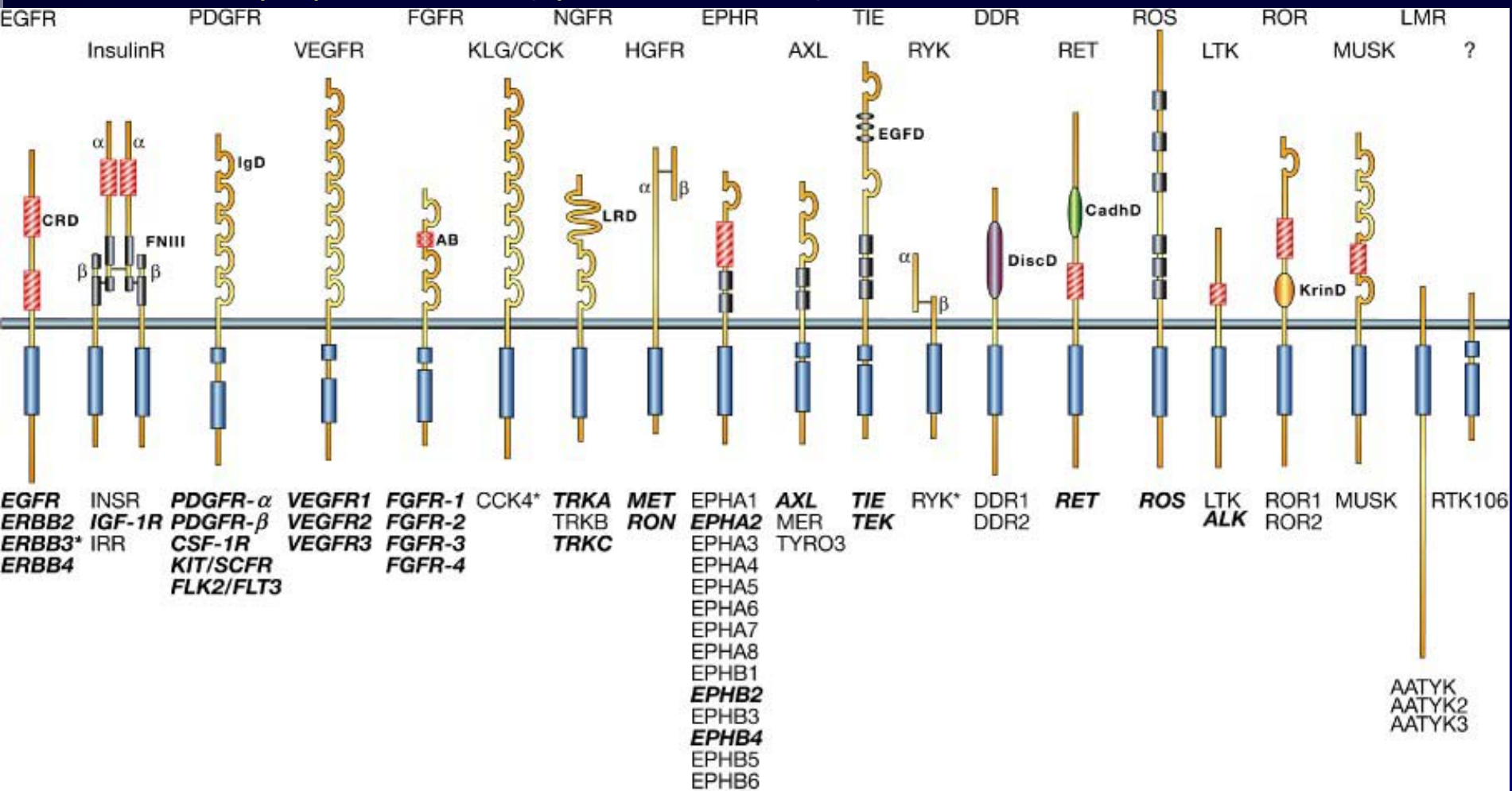
funkce: regulace proliferace, diferenciace, metabolismu, aj.

genom: 59 genů → 20 receptorových rodin (+alternativní sestřih)

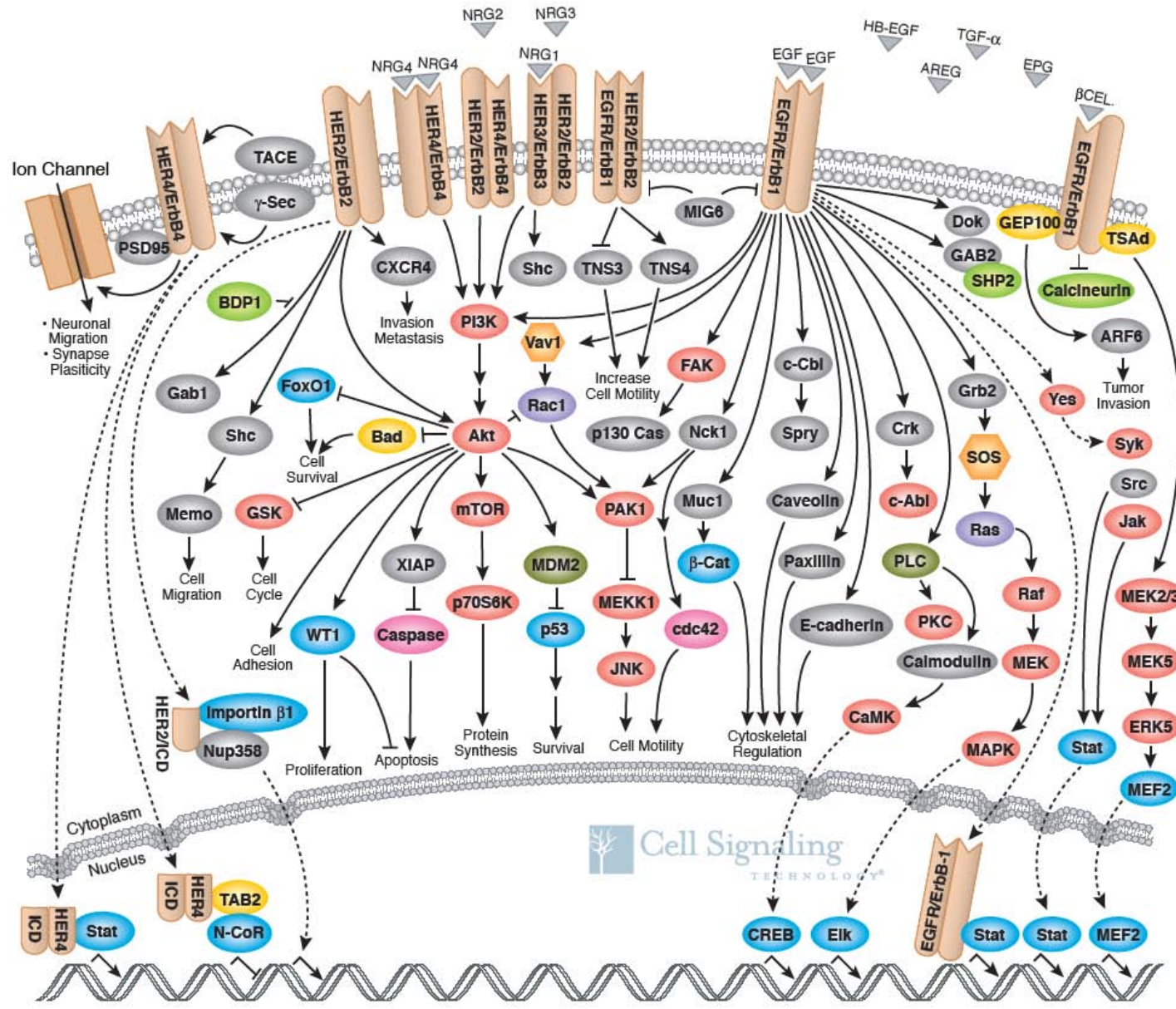


DOMÉNY :

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



ErbB/HER Signaling Network



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)...

Kyselina *all-trans* retinová (ATRA) jako induktor diferenciacie

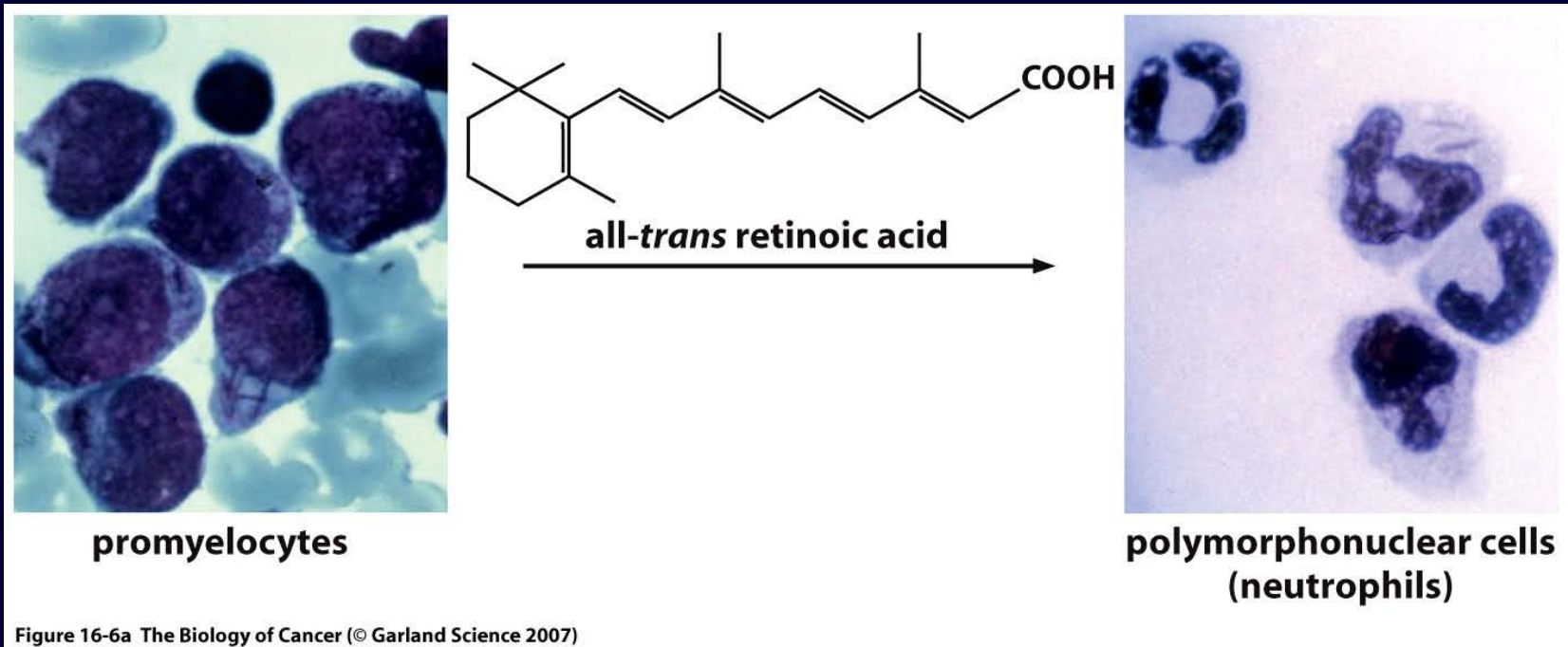
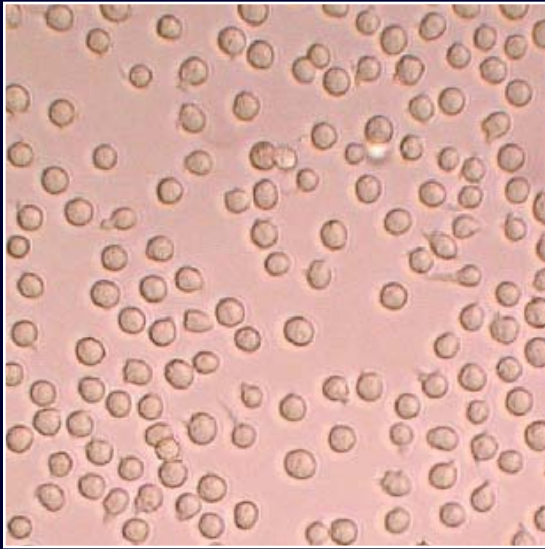


Figure 16-6a The Biology of Cancer (© Garland Science 2007)



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**:

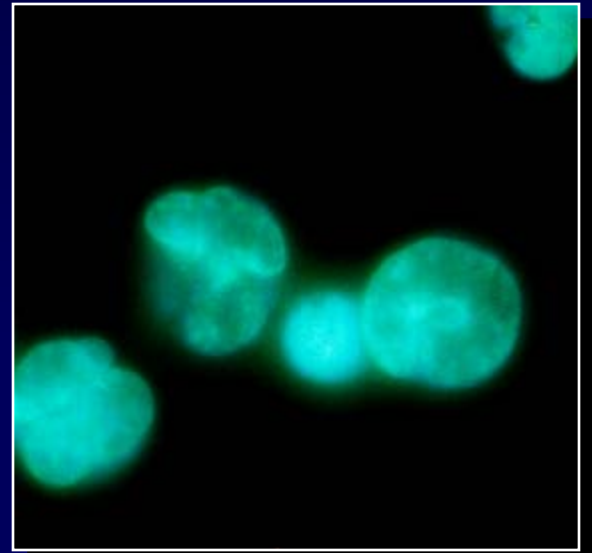
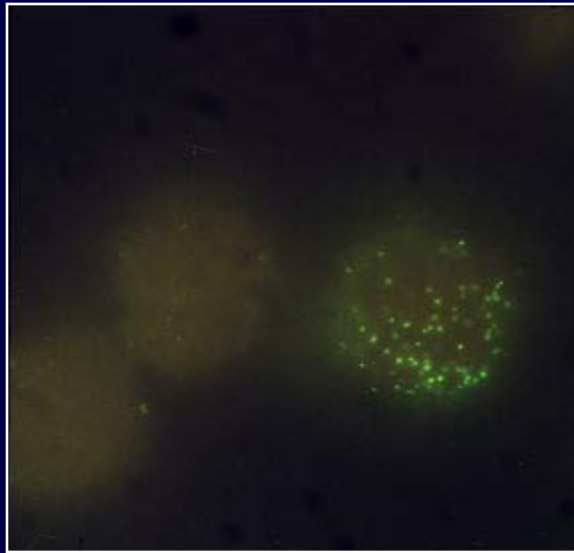
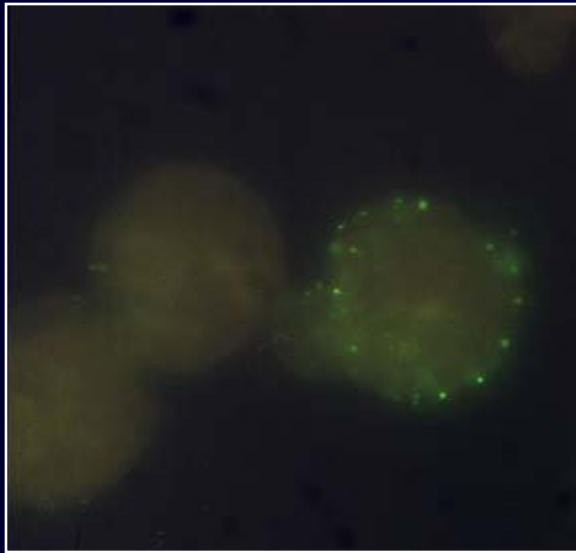
phorbolmyristyl acetát (PMA)
1,25-dihydroxyvitamin D₃

Diferenciace linie HL-60 do stádia granulocytů:

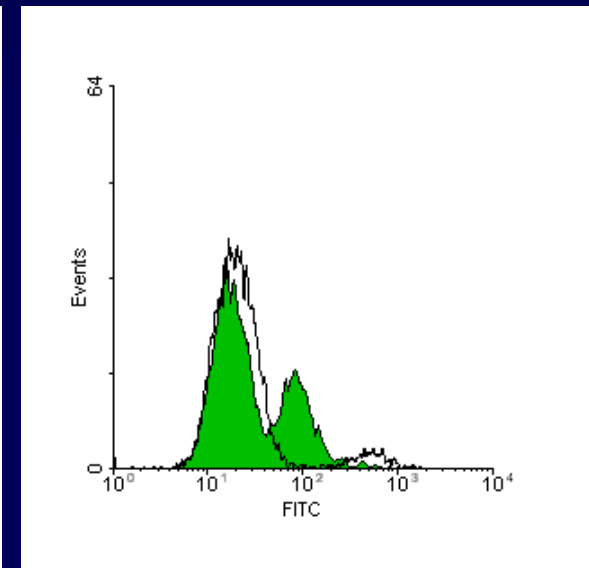
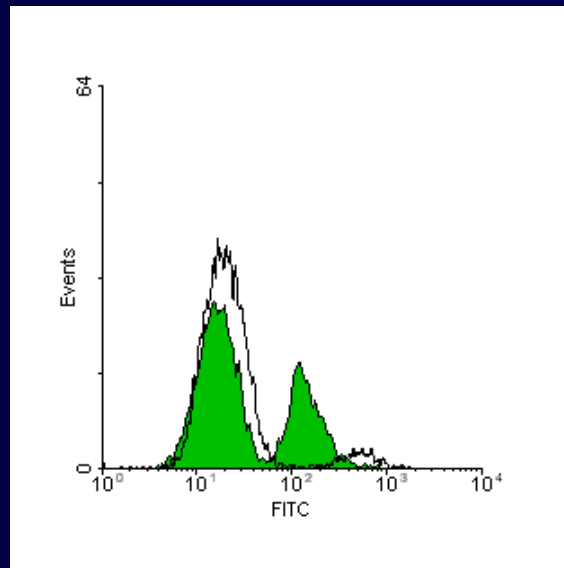
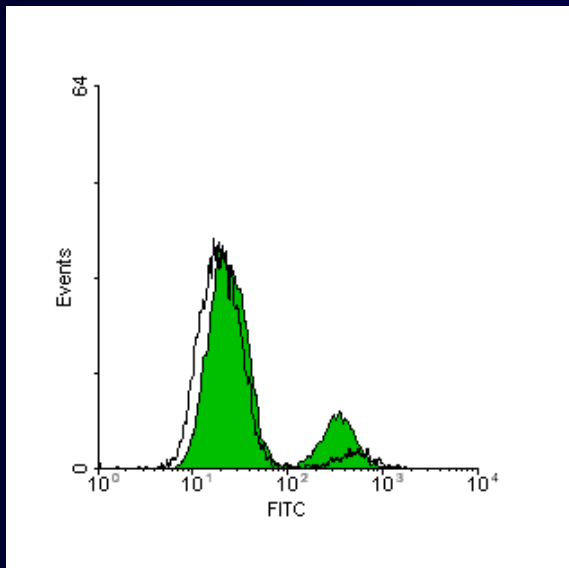
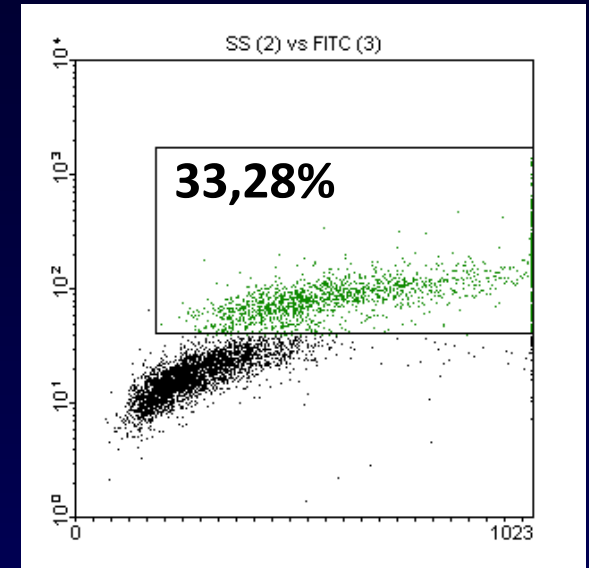
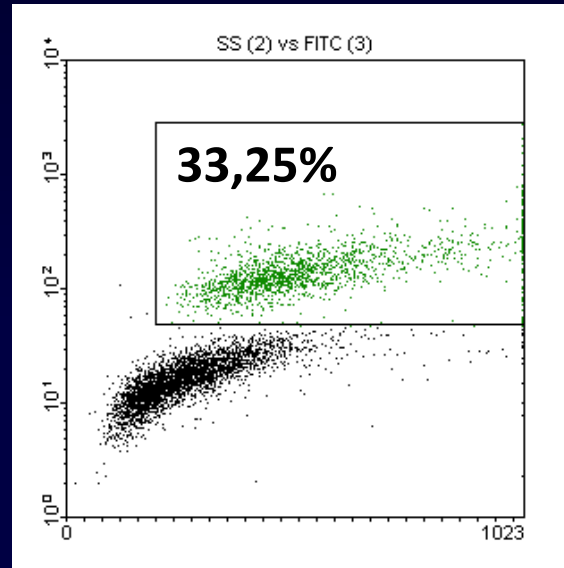
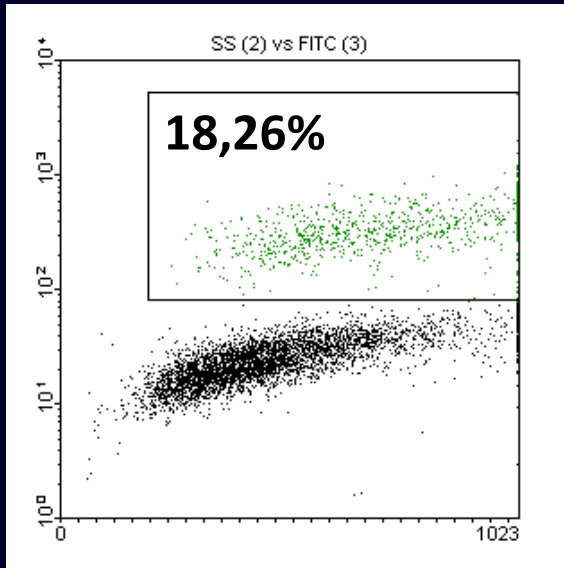
Induktor: 1mM kyselina *all-trans* retinová

Marker: CD-66b (CD-67)

Detekce: anti-CD66b, SwAM-FITC



Granulocytární diferenciace HL-60: flow cytometrie / CD66b



1mM ATRA

1mM ATRA + 13mM CA

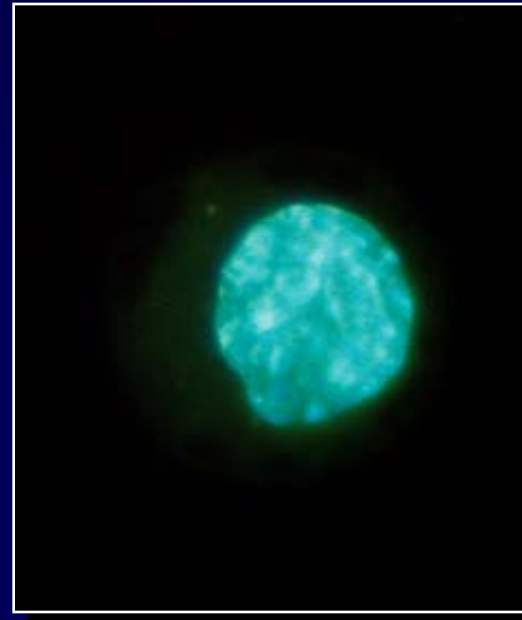
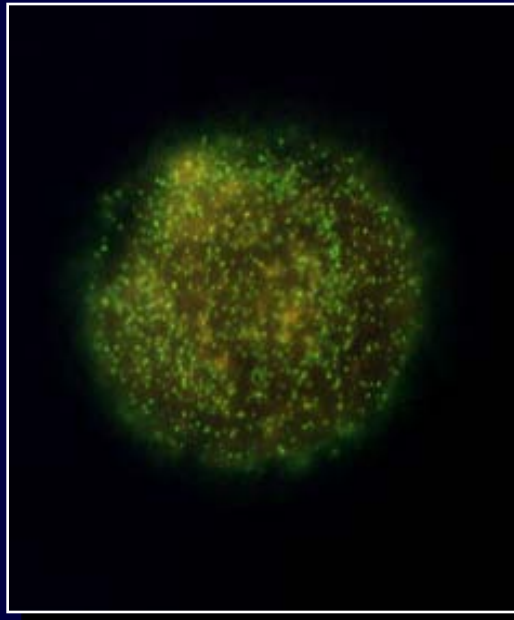
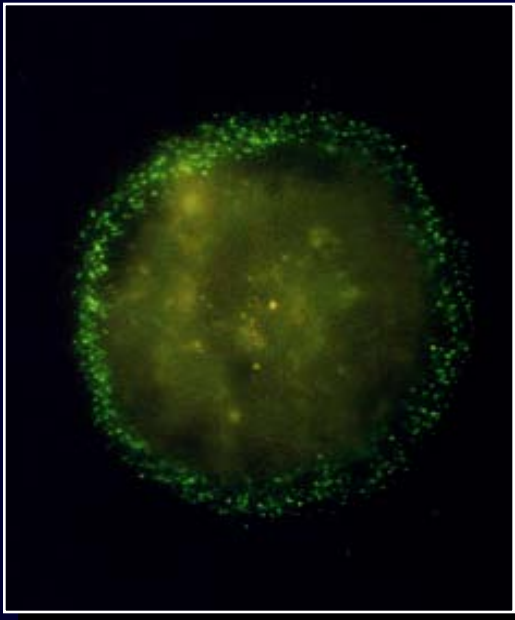
1mM ATRA + 52mM CA

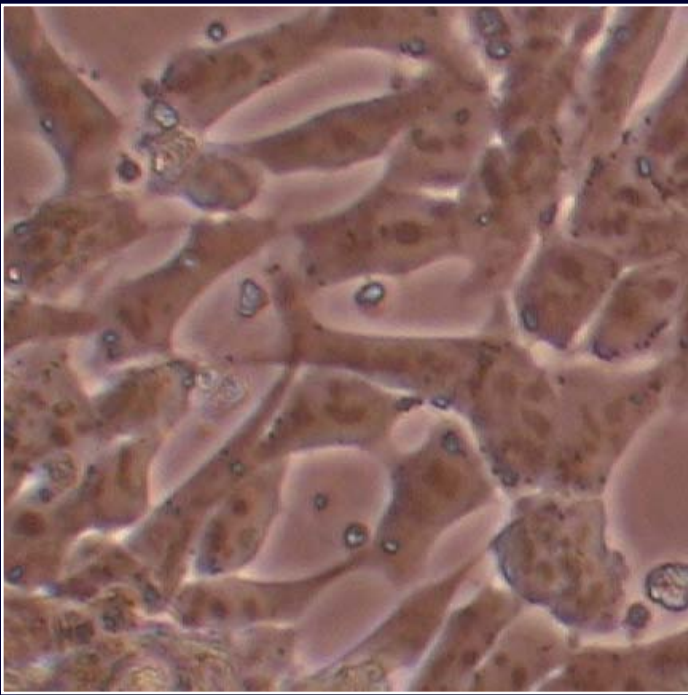
Diferenciace linie HL-60 do stádia makrofágů:

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:**

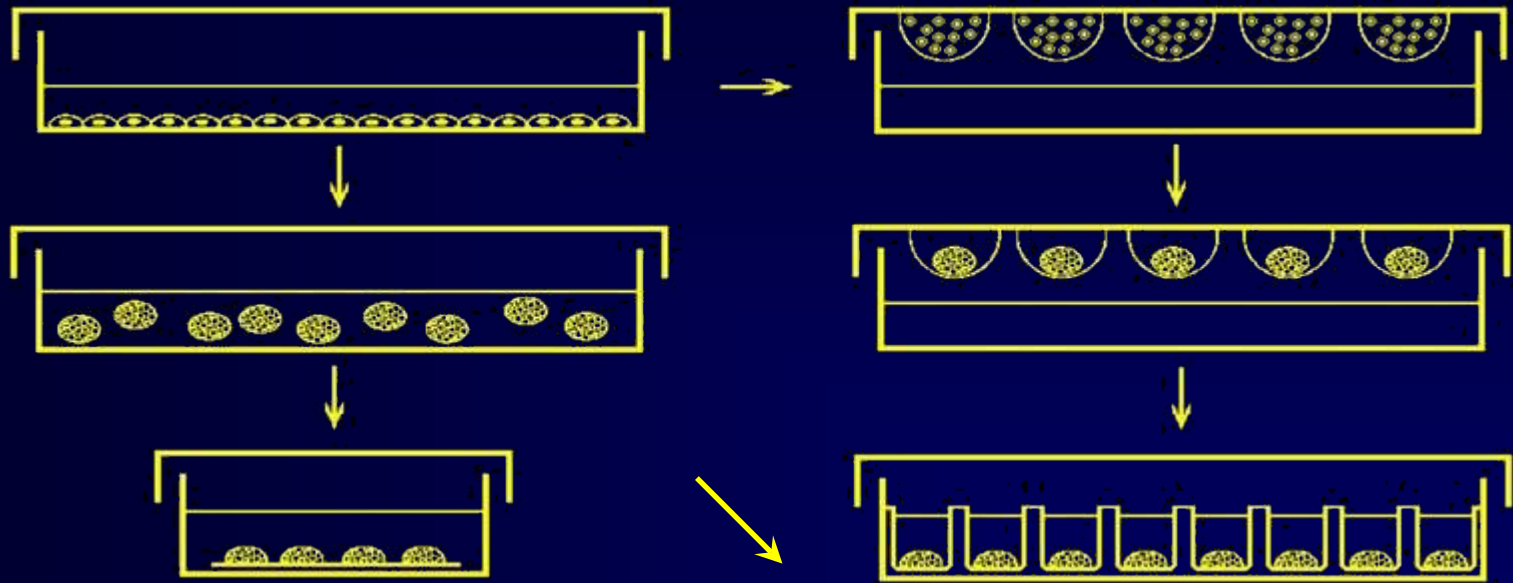
kyselina *all-trans* retinová (*atRA*)

dimethylsulfoxid (DMSO)

- **induktor neuronální diferenciace:**

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

Schéma diferenciace buněk P19



metoda kultivace na
bakteriologických miskách

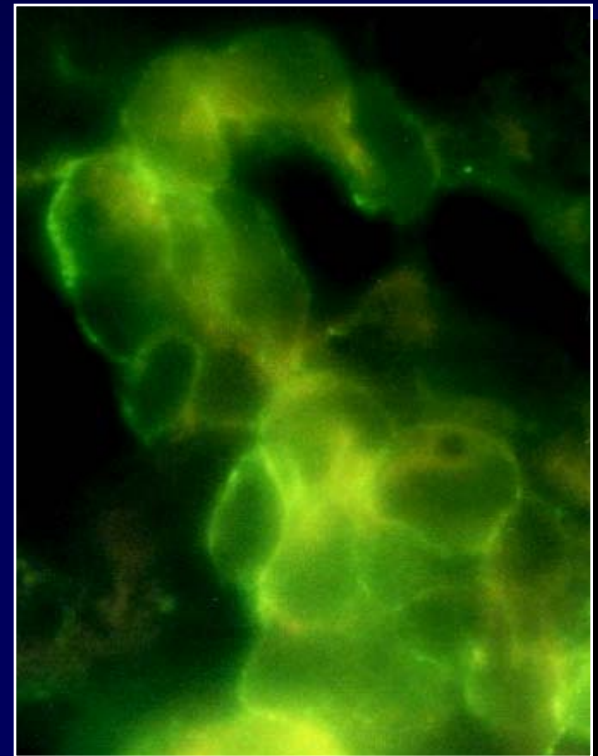
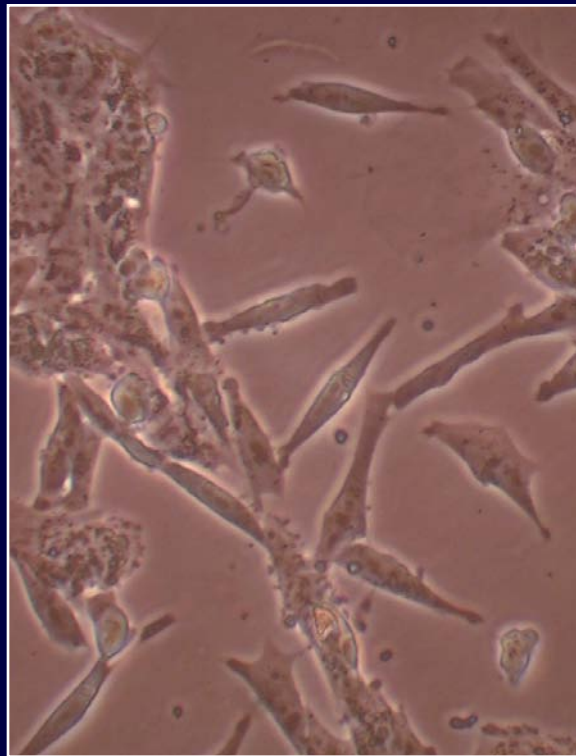
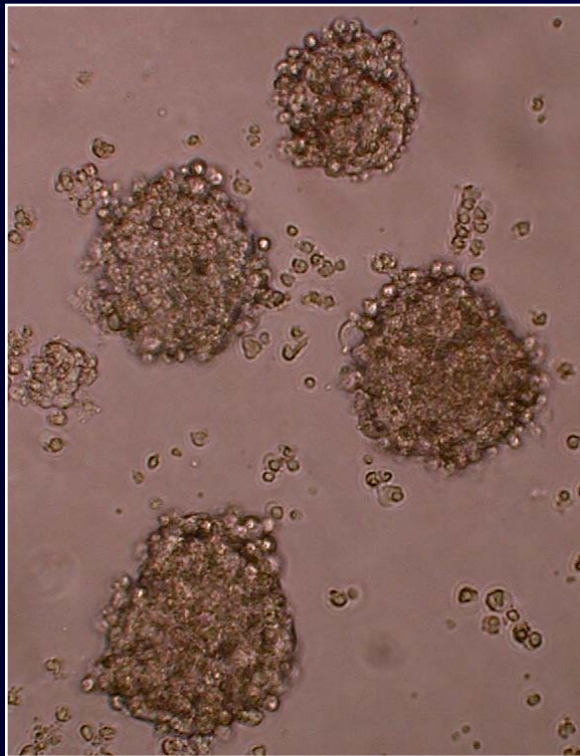
metoda „visících kapek“

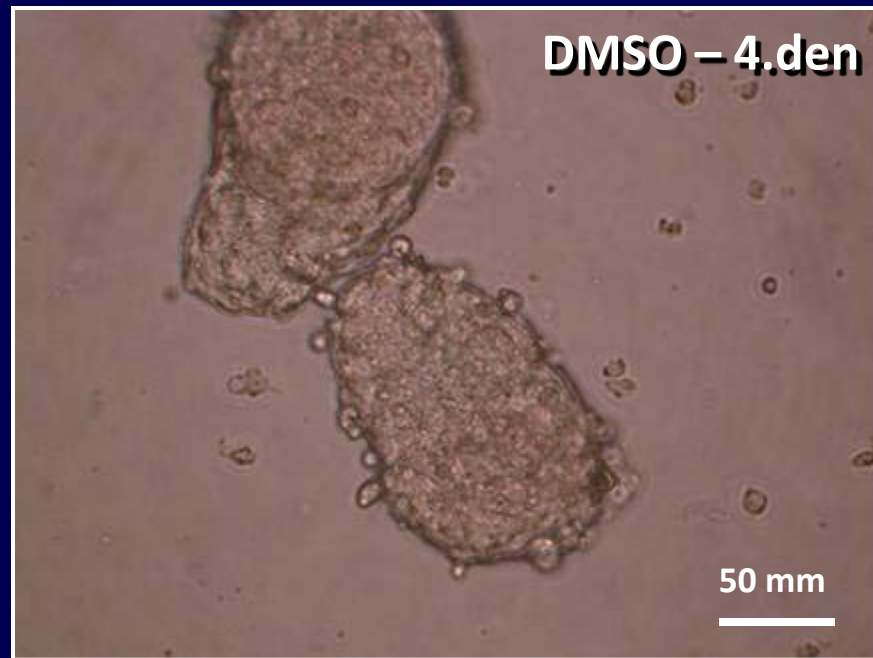
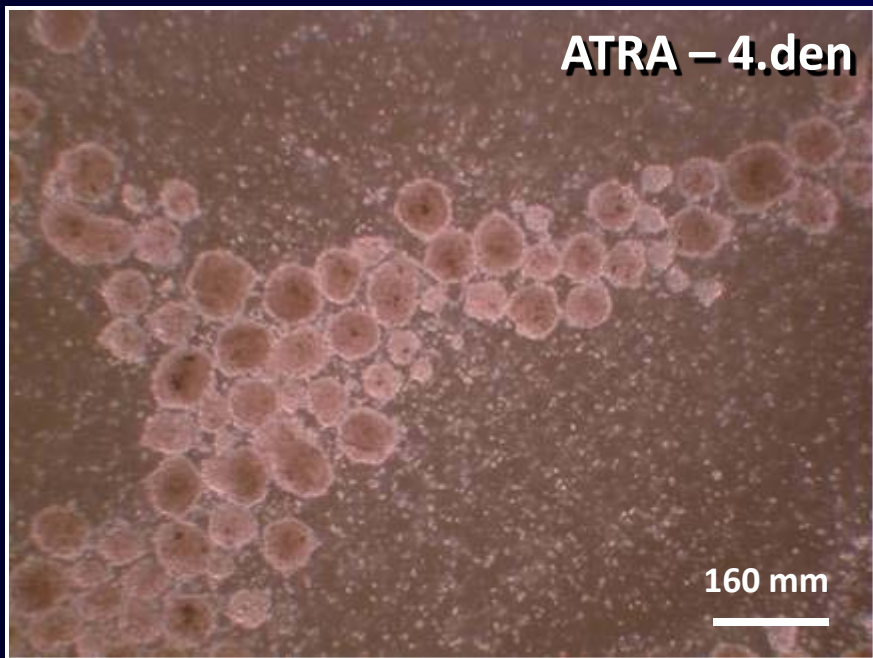
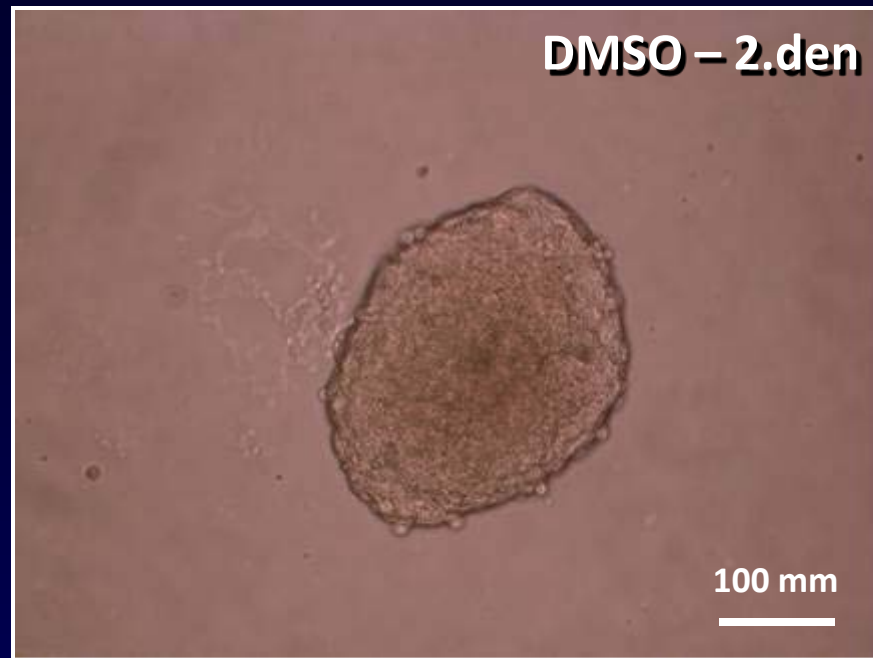
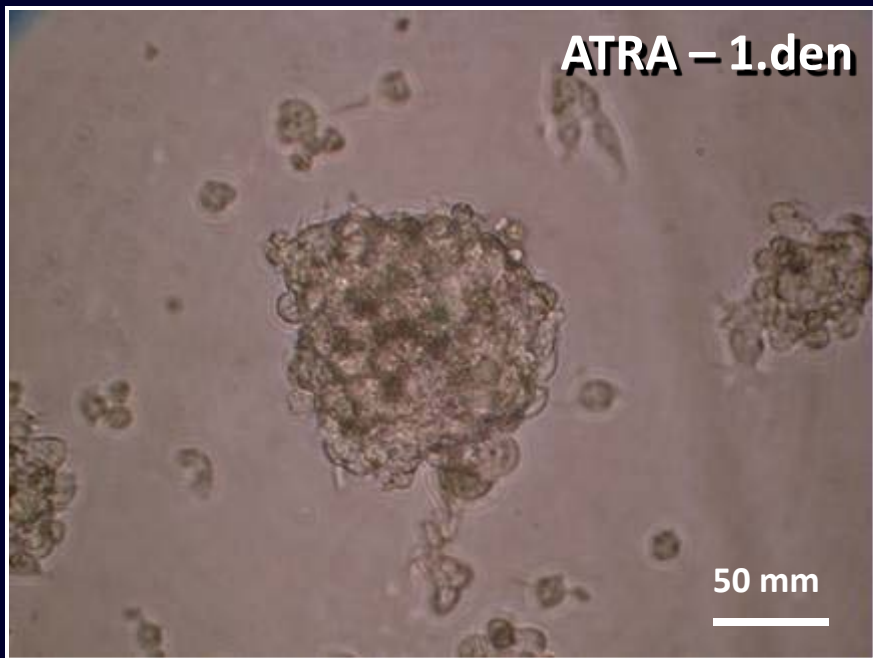
Mesodermální diferenciaci buněk P19:

Induktor: 0,8% DMSO

Marker: myosin II

Detekce: anti-skeletal myosin, SwAM-FITC



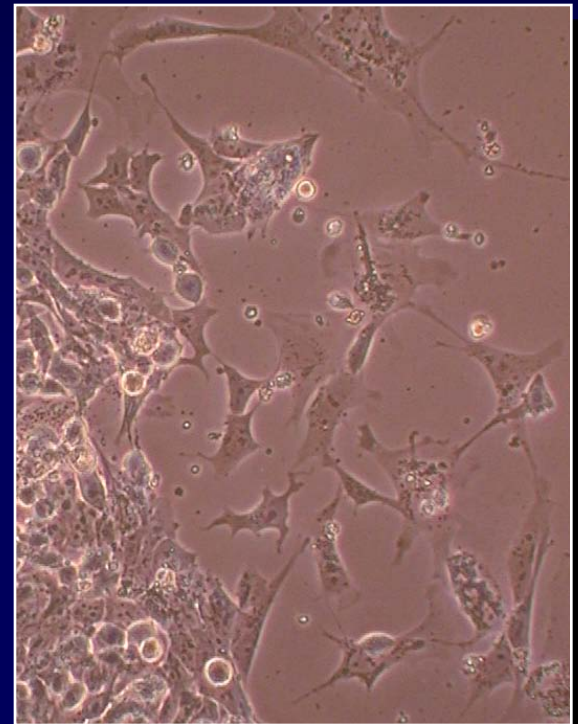
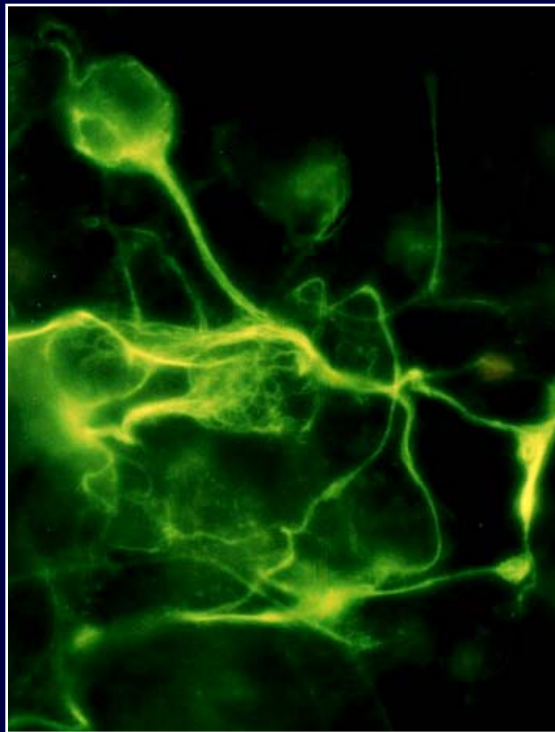
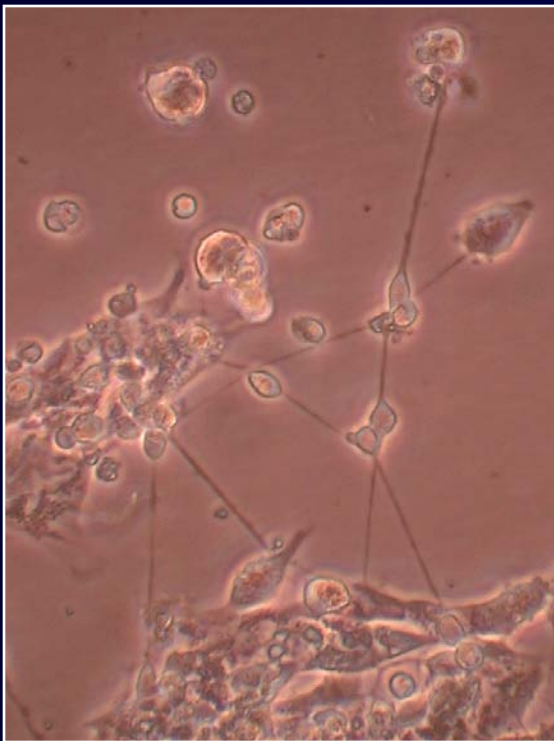


Neuronální diferenciace buněk P19:

Induktor: 1mM 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 diferenciacie 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

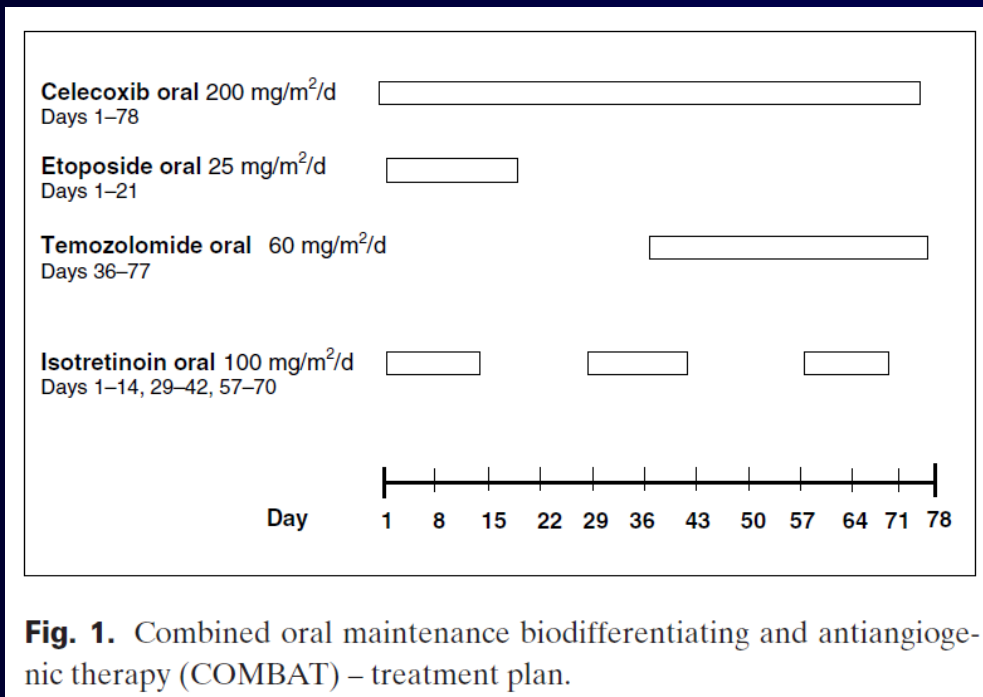
alkylační činidlo

apoptóza

kys. retinová

diferenční činidlo

diferenciace/apoptóza



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