

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

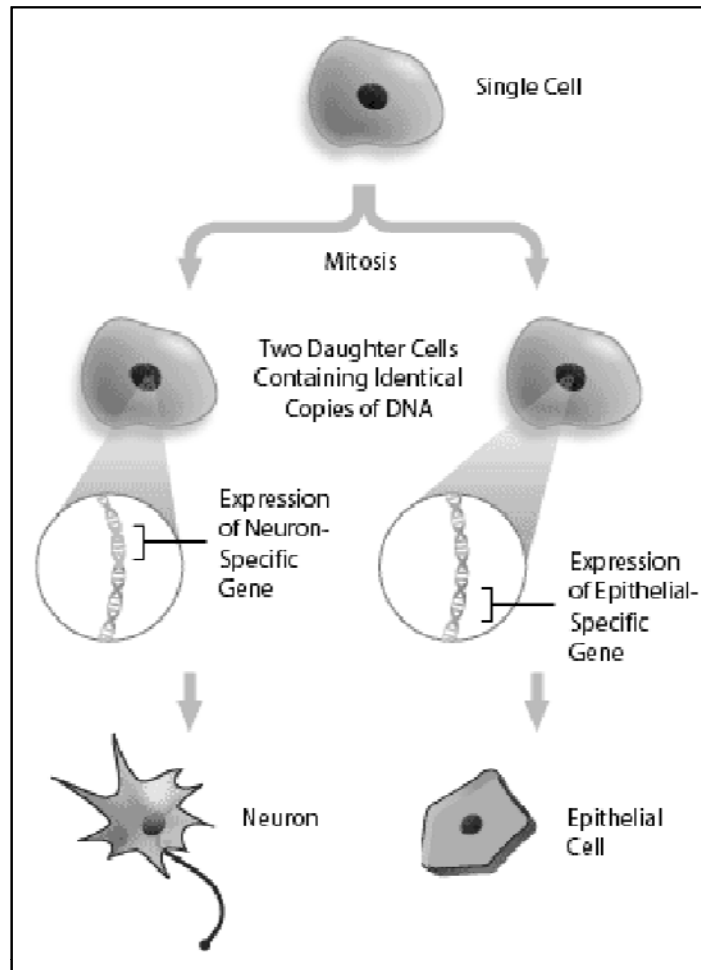
- identický genom ve všech buňkách
- kontrola na úrovni genové exprese
 1. buněčná proliferace
 2. diferenciaci buněk
 3. buněčné interakce
 4. pohyb buněk
 5. buněčná smrt

Lidský organismus:

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

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



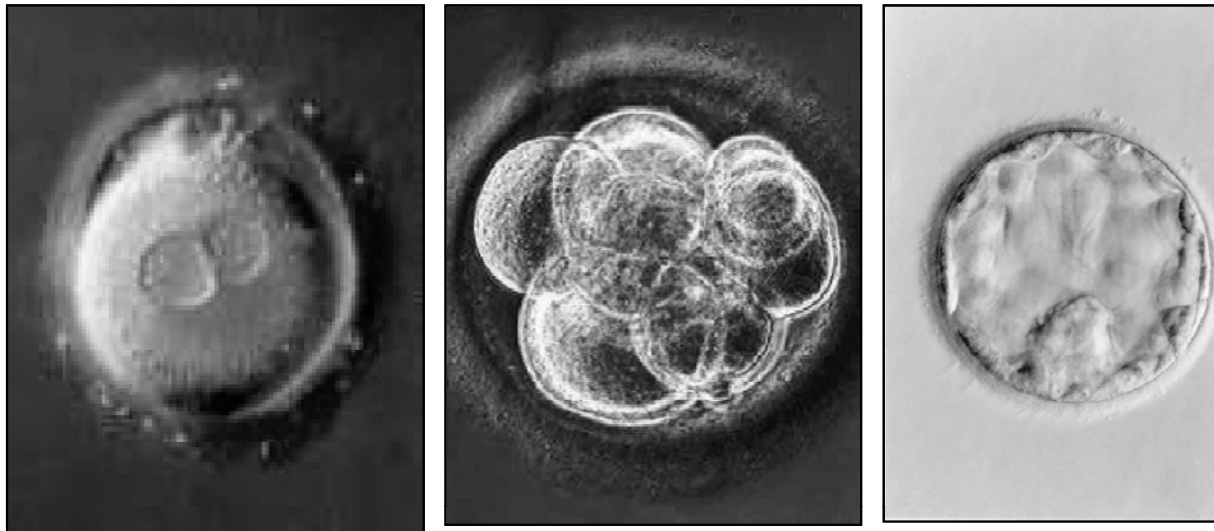
DIFERENCIAČNÍ POTENCIÁL BUNĚK

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



Časná embryogeneze u savců:

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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



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

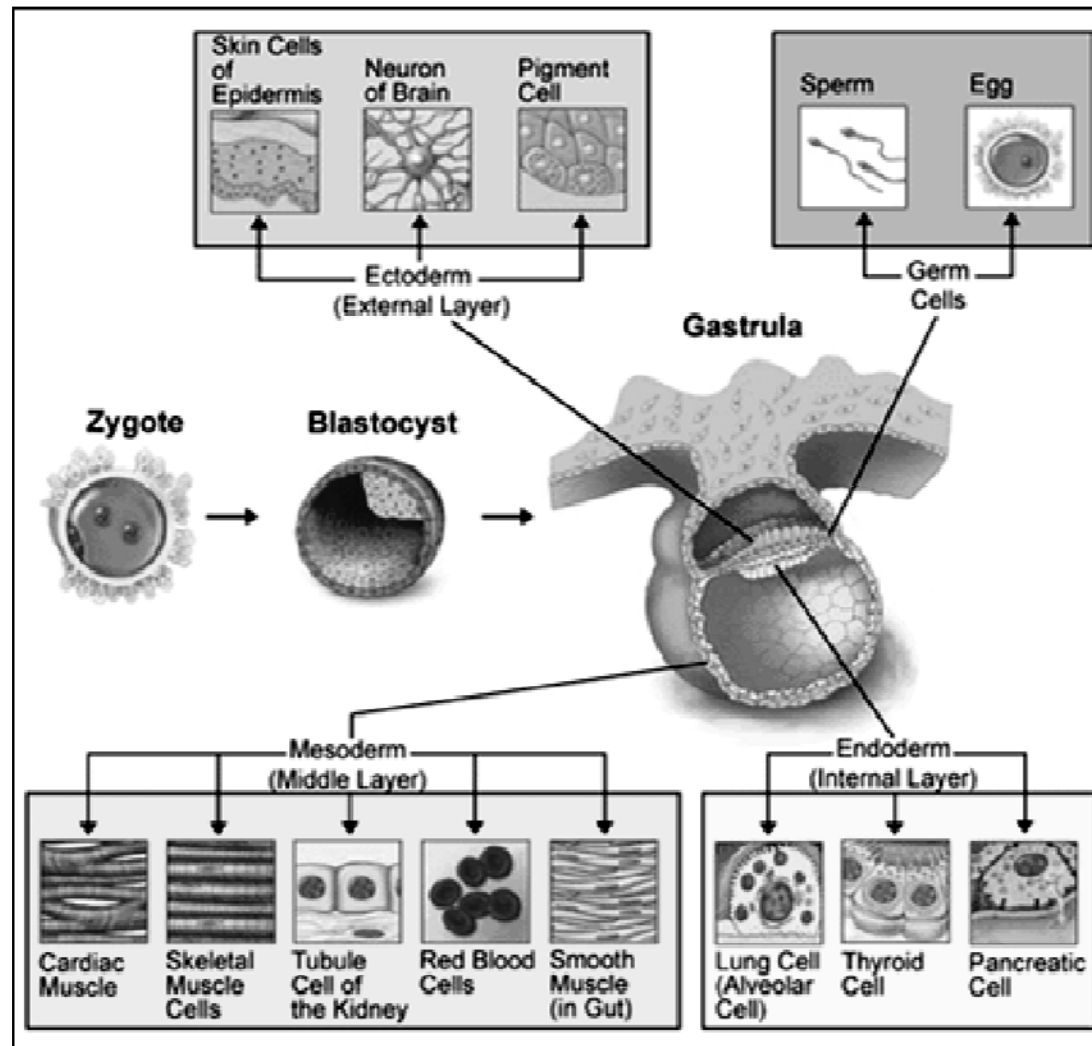
- lebka a kostra
- svalová tkáň (lebka i kosterní svalstvo)
- dermis
- pojivová tkáň
- urogenitální systém
- střevní svalovina
- srdce
- krevní a lymfatické buňky
- slezina



Endoderm

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





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



Totipotence

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

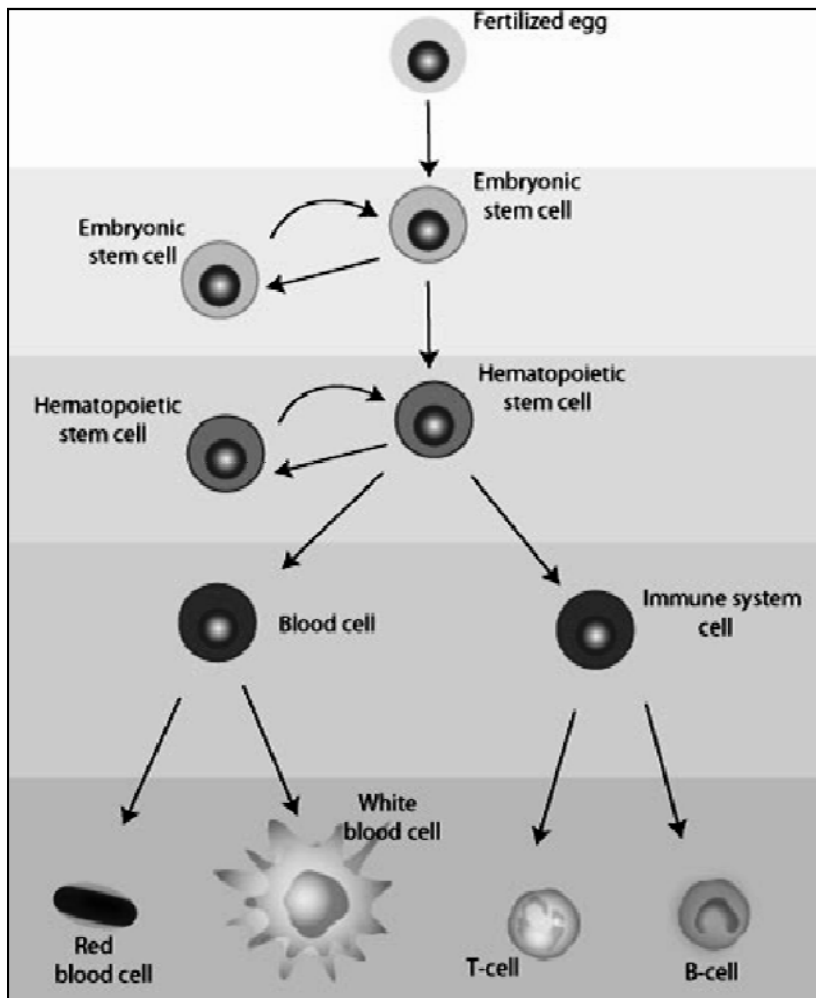
Pluripotence

- 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...





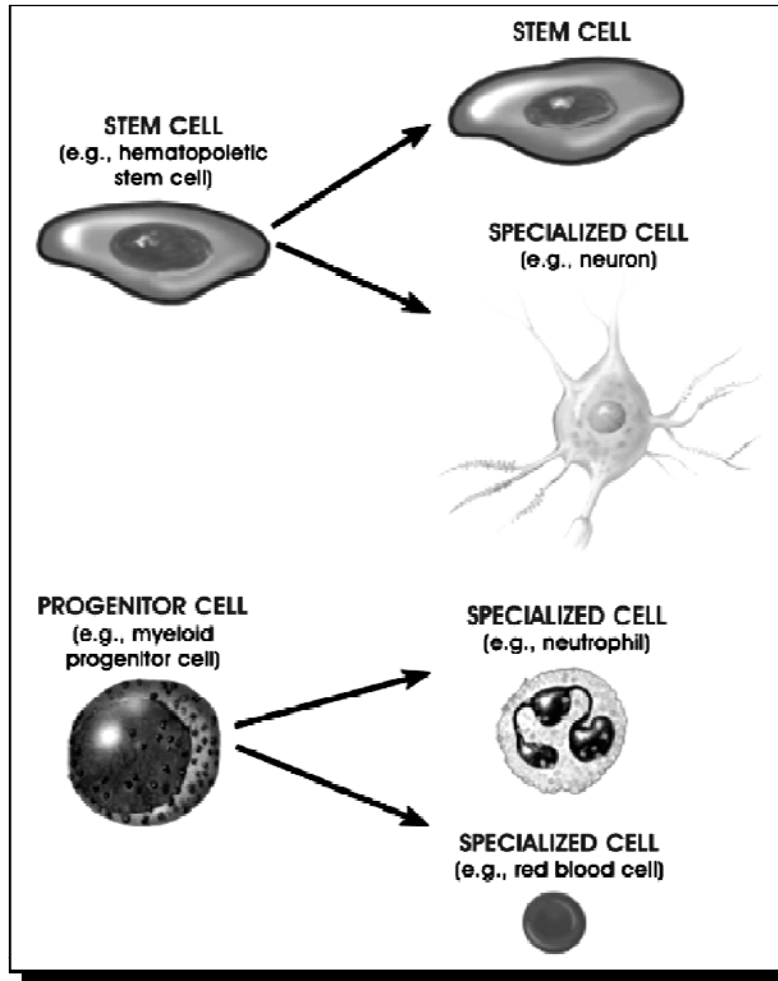
totipotentní buňka
(zygota, blastomery)

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 diferenciaci:

- 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, ...)

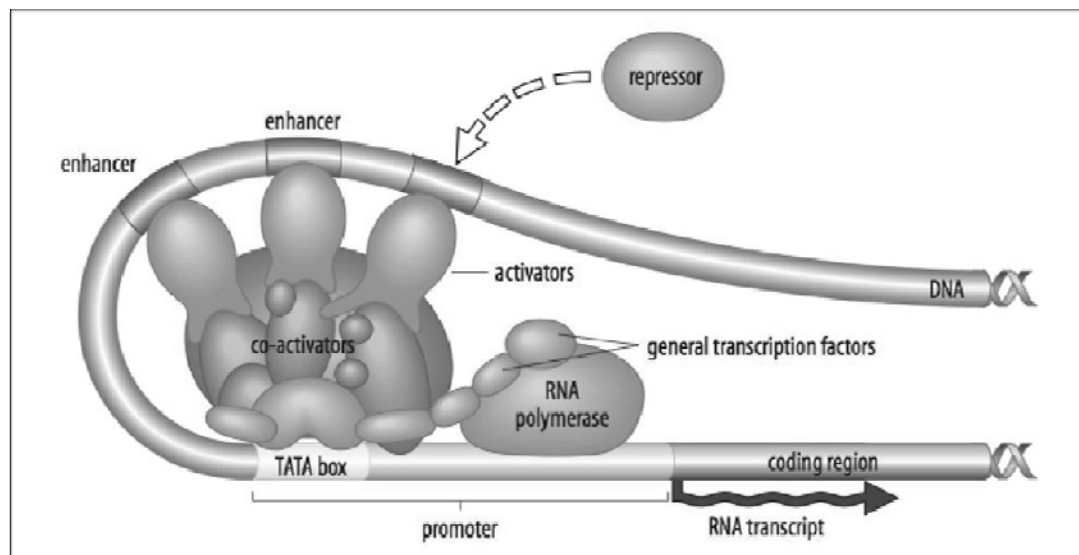
- Polarita a tvar buněk

- 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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.

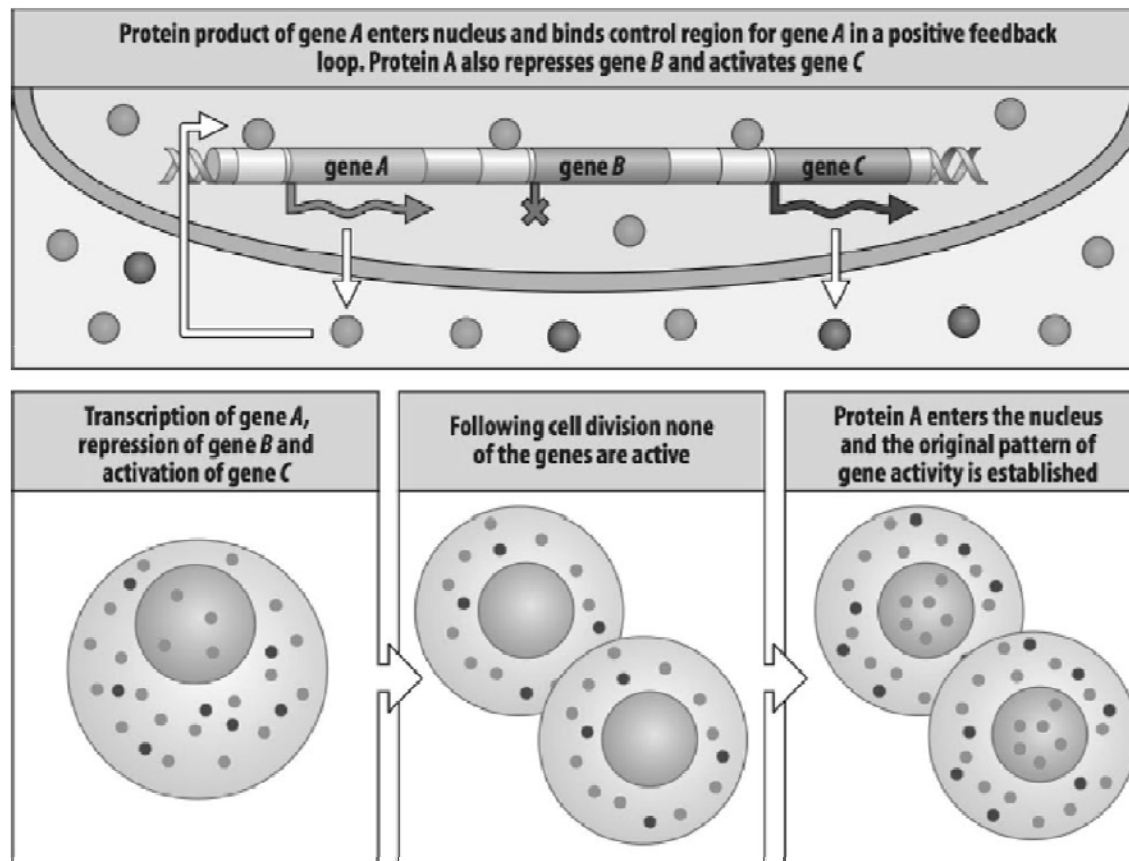


Molekulární mechanismy diferenciace

- 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

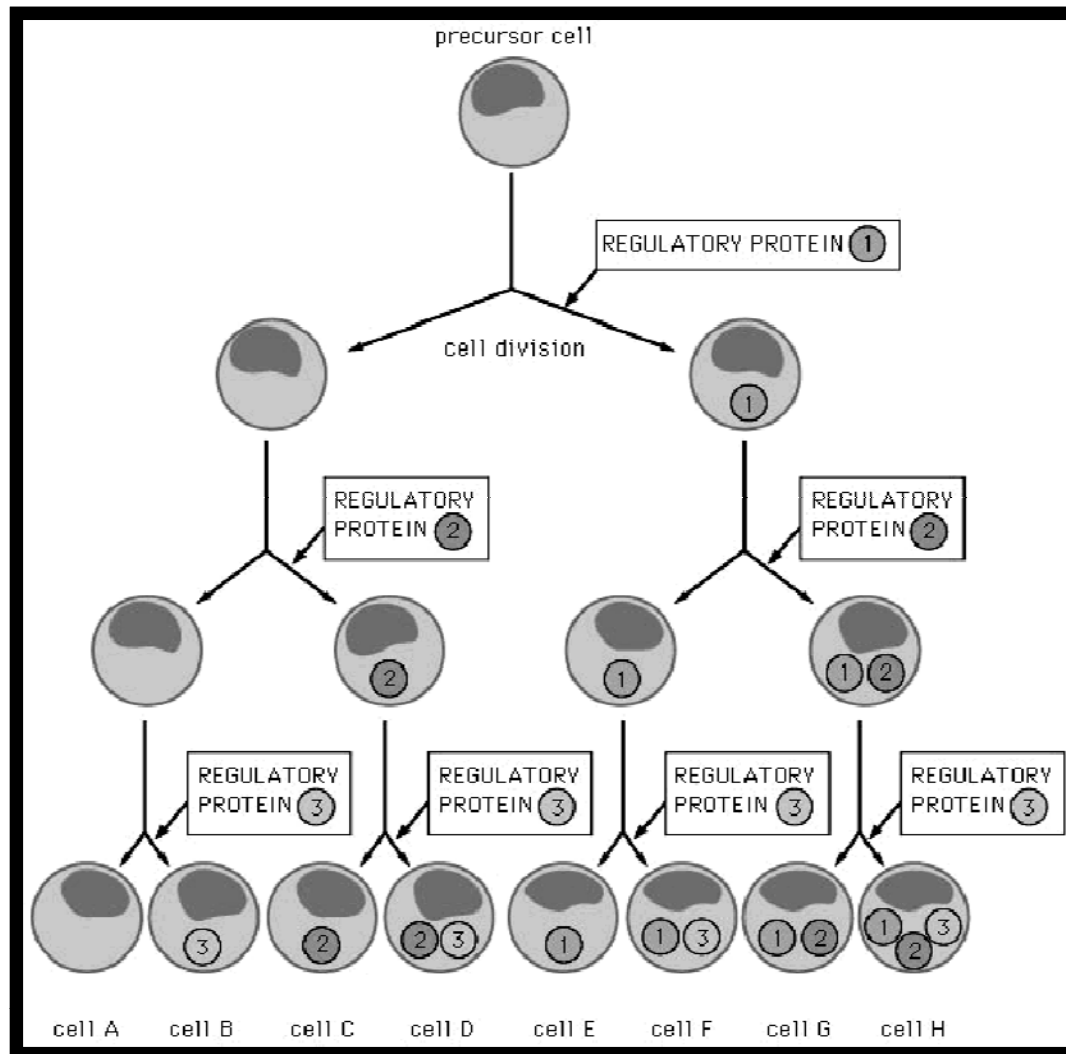


Zachování exprese genů po rozdělení buňky



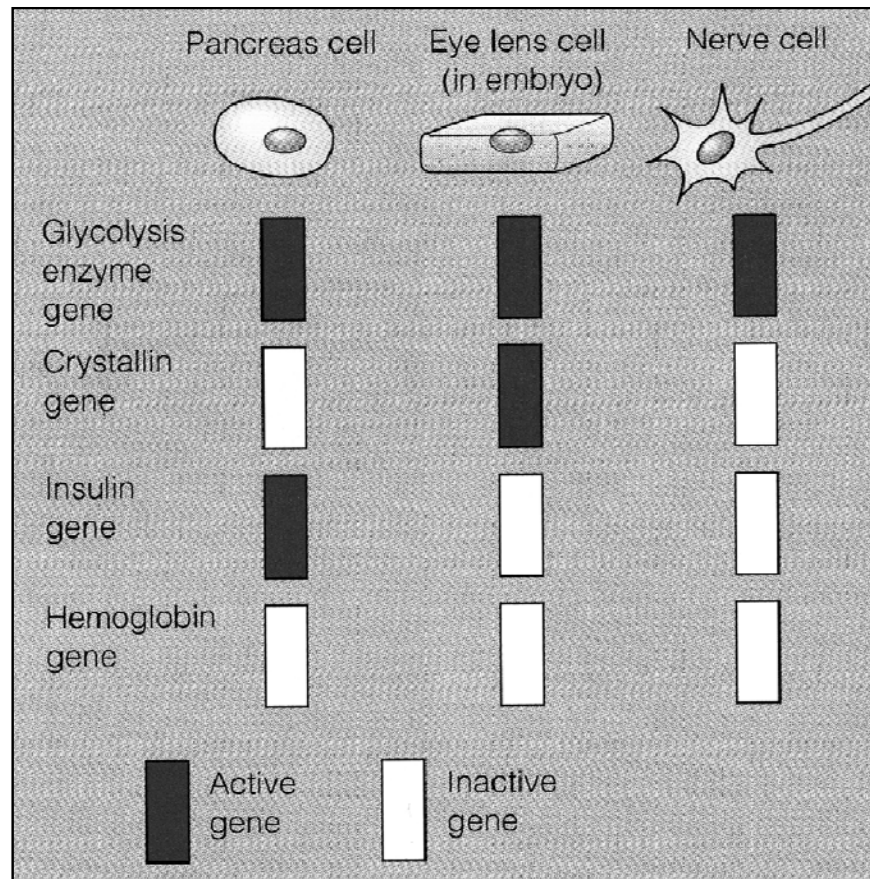
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.

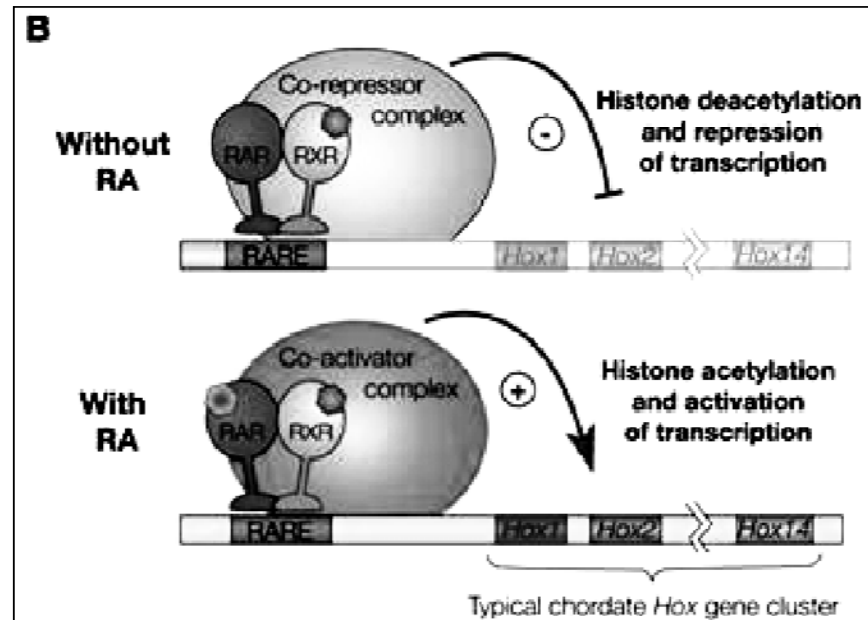




Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



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

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



Diferenciace

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

Dediferenciace

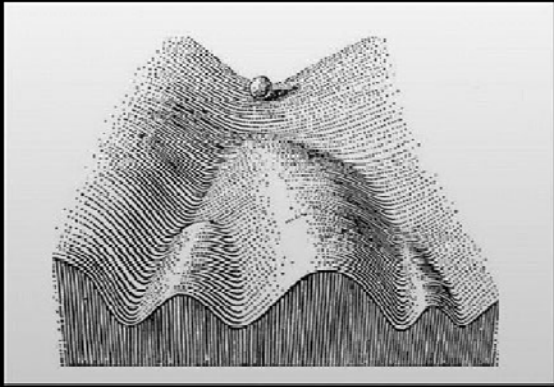
ztráta diferencovaného fenotypu

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

Transdiferenciace

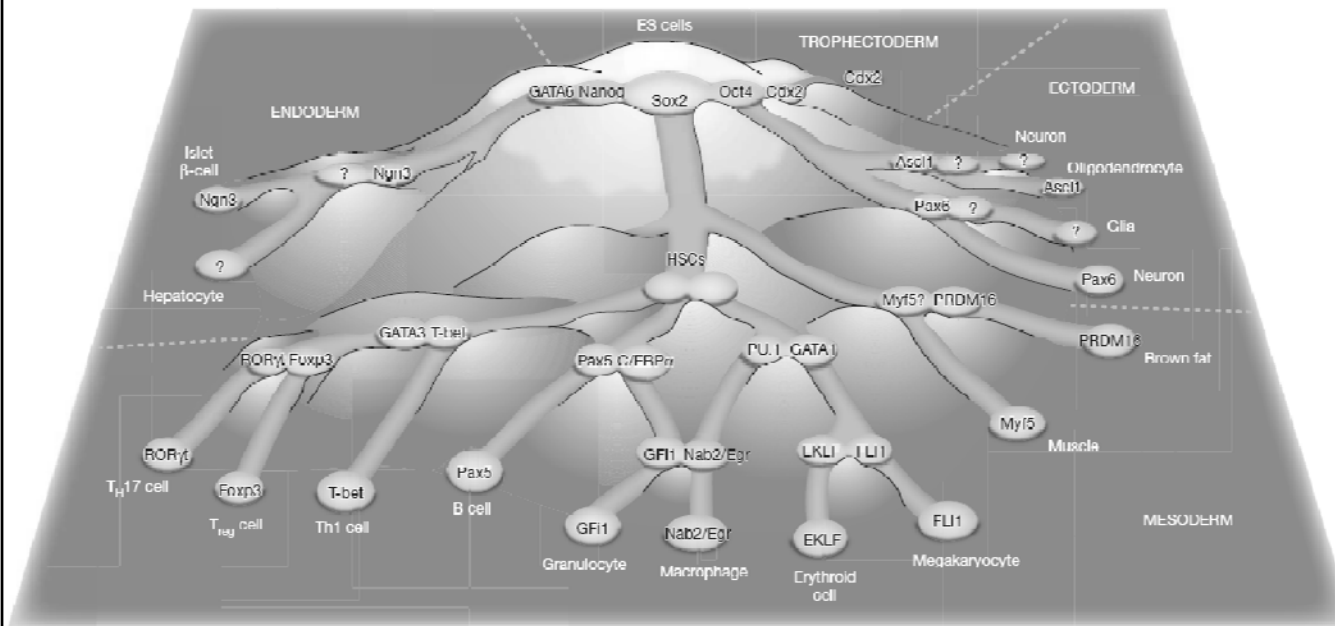
schopnost určitých buněk určité tkáně (včetně SCs nebo progenitorů) diferencovat do buněk typických pro jiné orgány nebo tkáně (např. hematopoetické)





Epigenetic landscape: H.C. Waddington (1957)

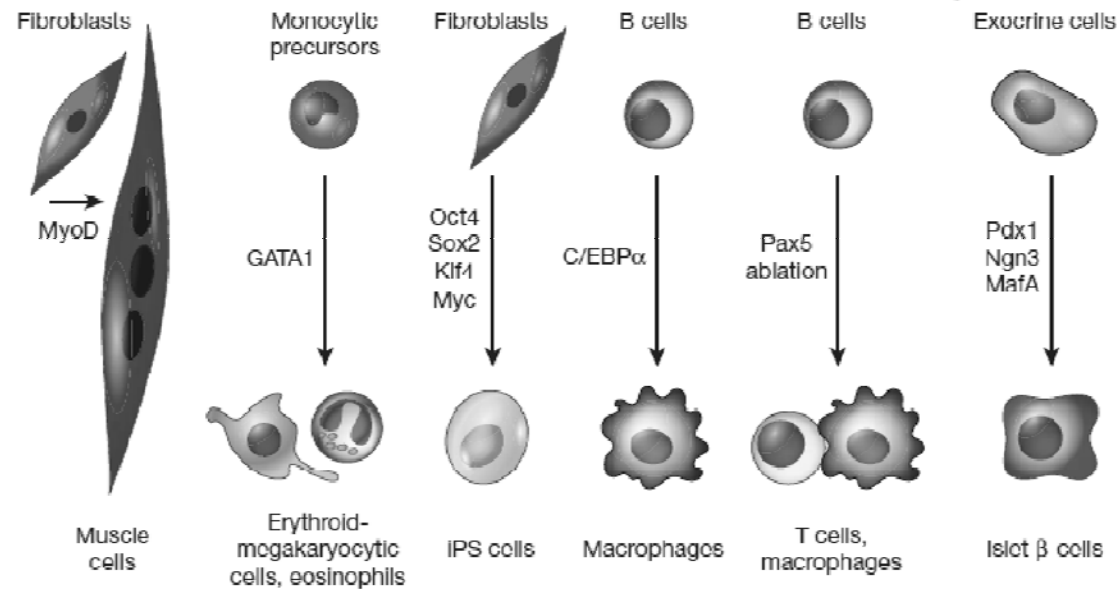
Epigenetic landscape: T. Graf & T. Enver (2009)
- role transkripčních faktorů

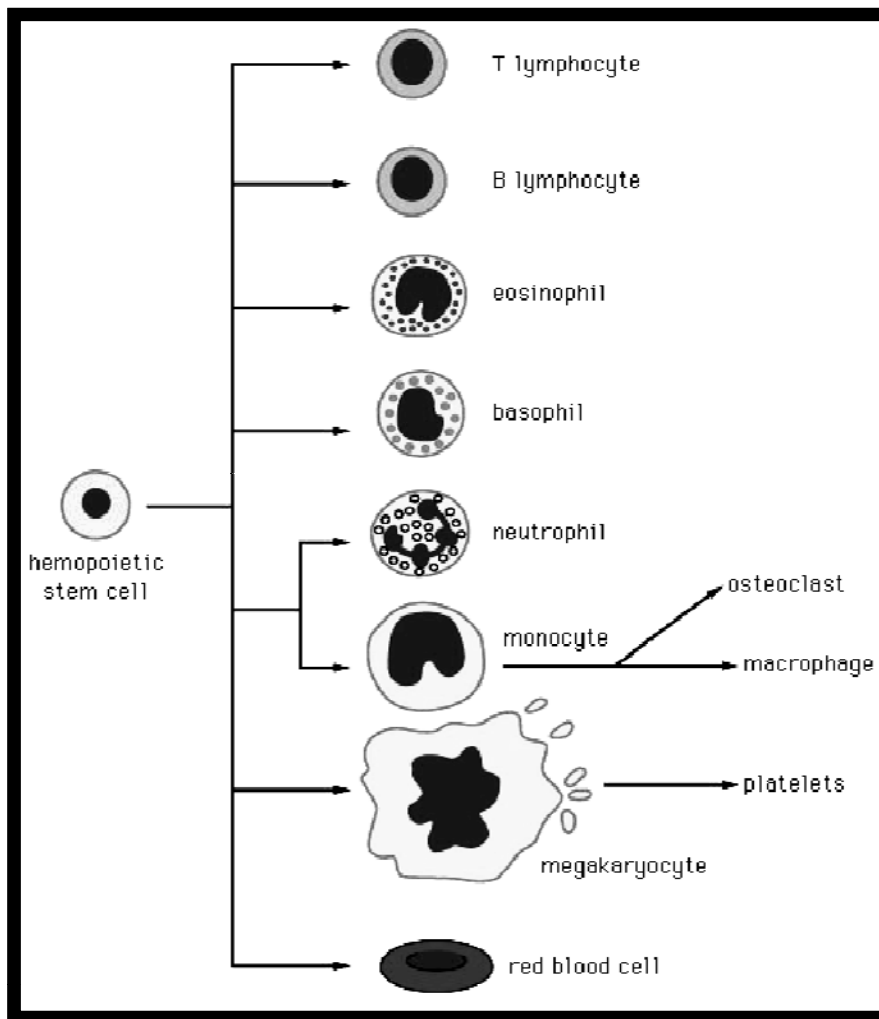


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



Indukovaná transdiferenciace

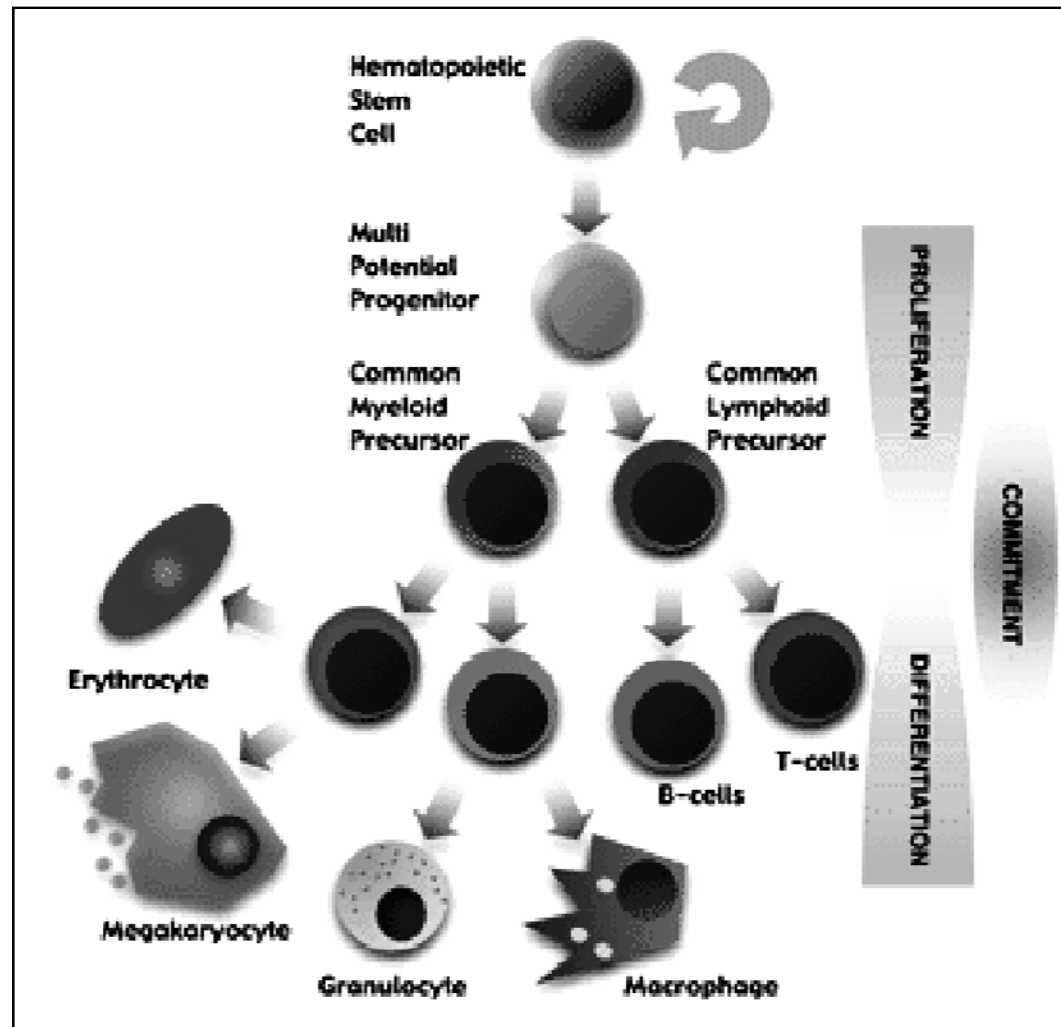




Diferenciační potenciál hematopoetických kmenových buněk

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.

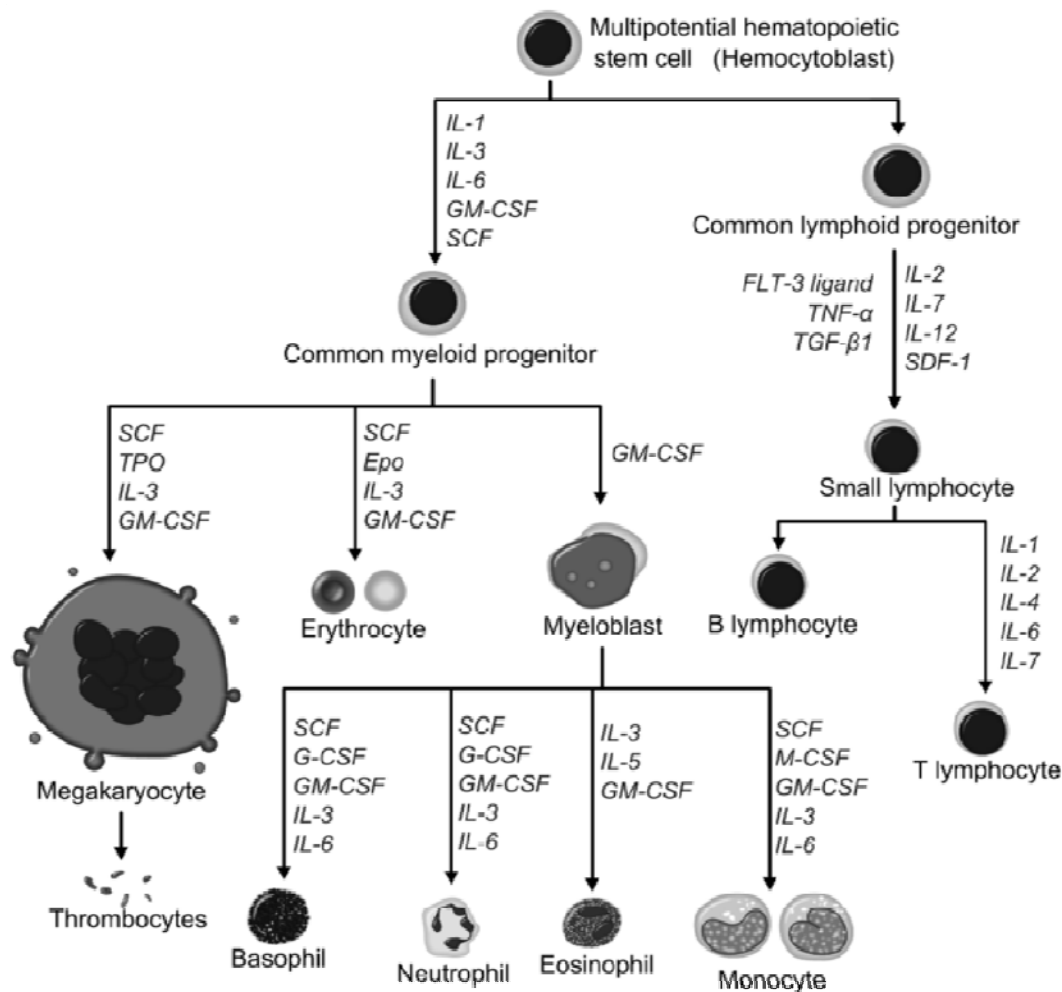




Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



Diferenciace krevních buněk

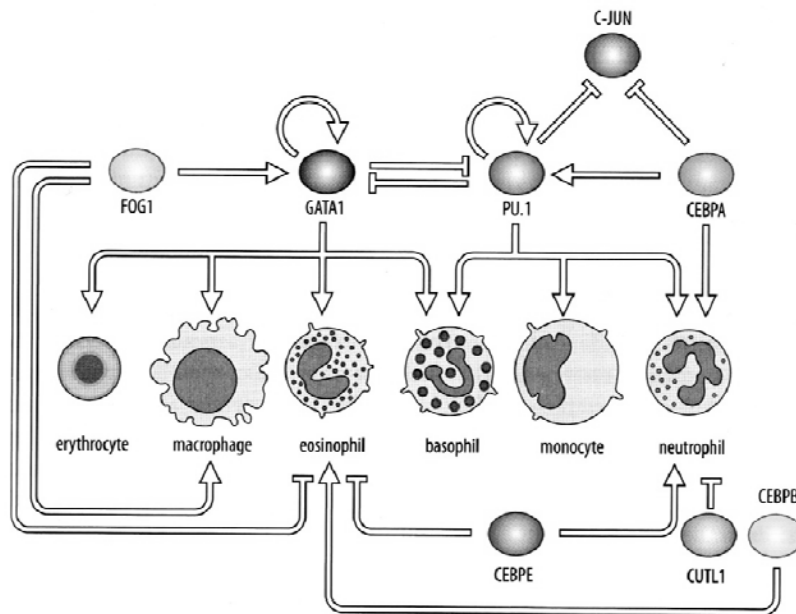


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



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

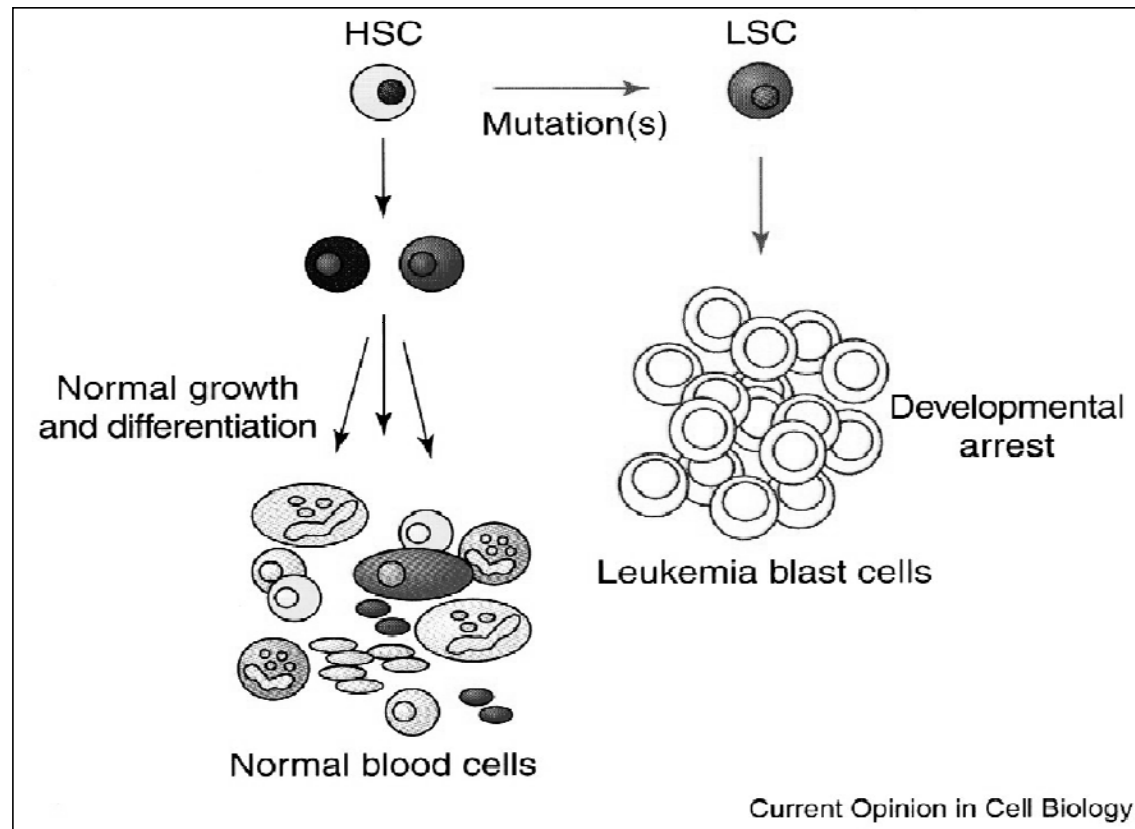


Vliv TFs na diferenciaci krevních buněk

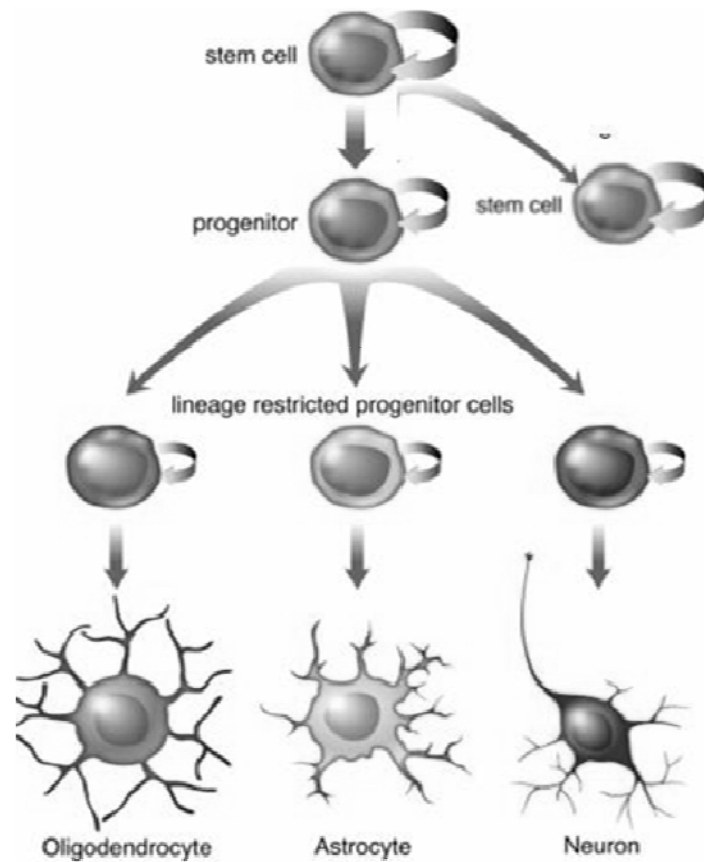
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



Porucha diferenciácie krvných buniek

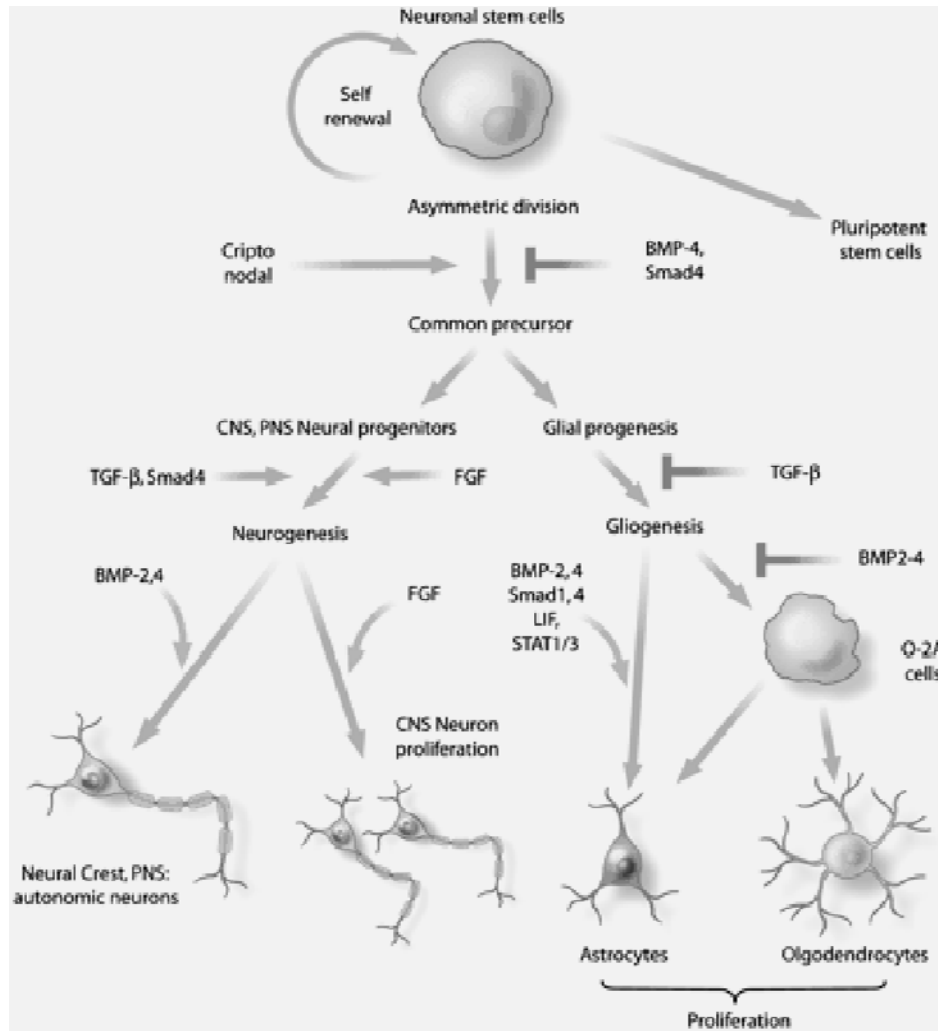


Průběh neuronální diferenciace



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.





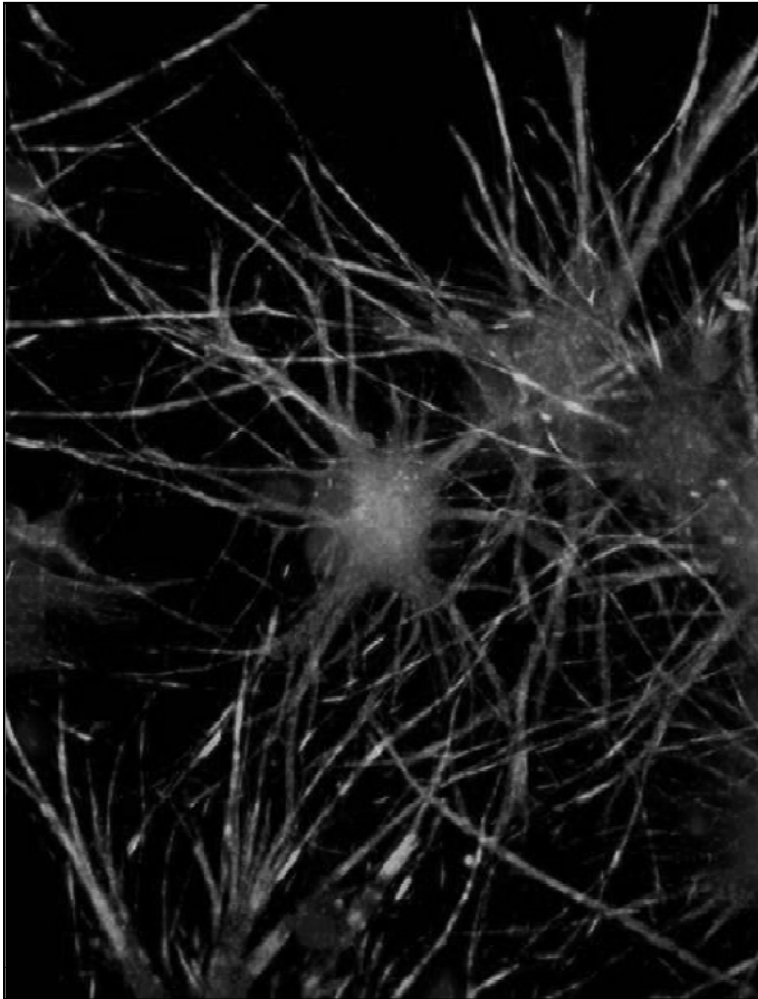
Regulace neuronální diferenciace

TGF-β superfamily

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

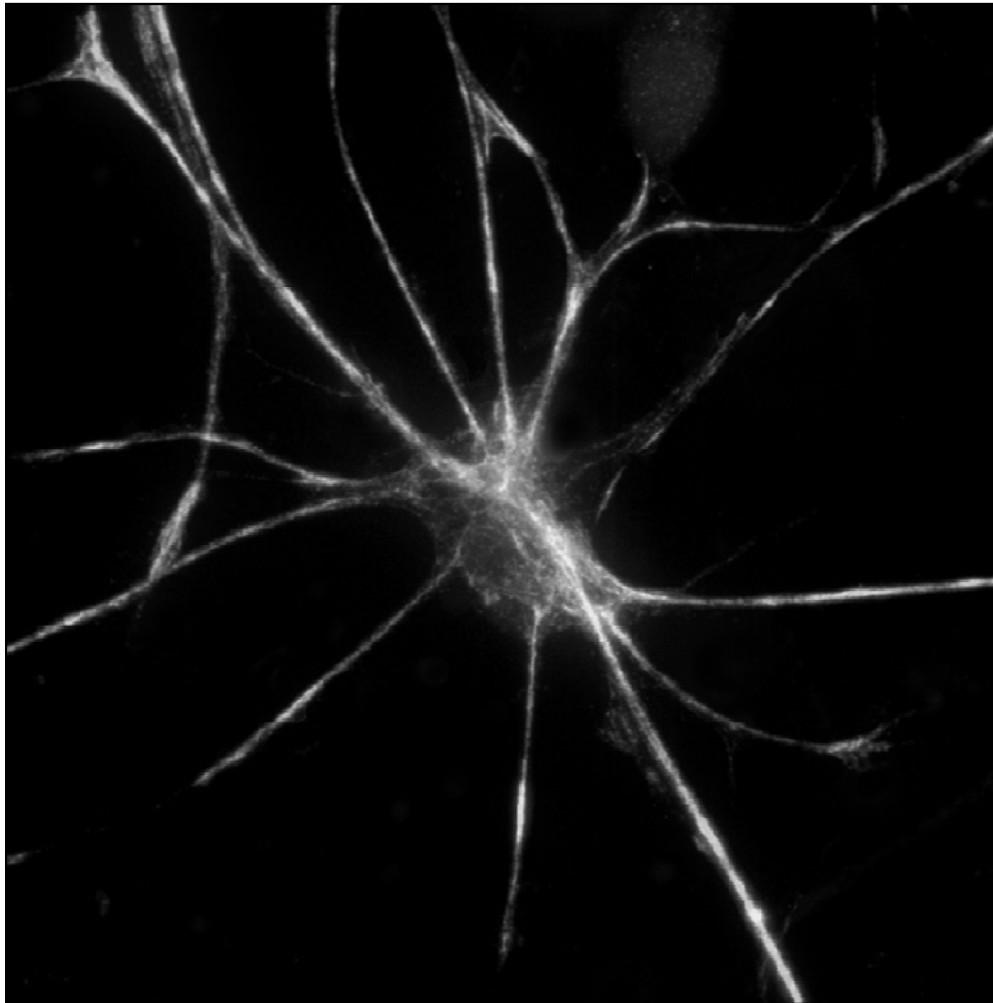
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.





Neuronální diferenciace Kmenová buňka:

- nestin
- GFAP
- DNA

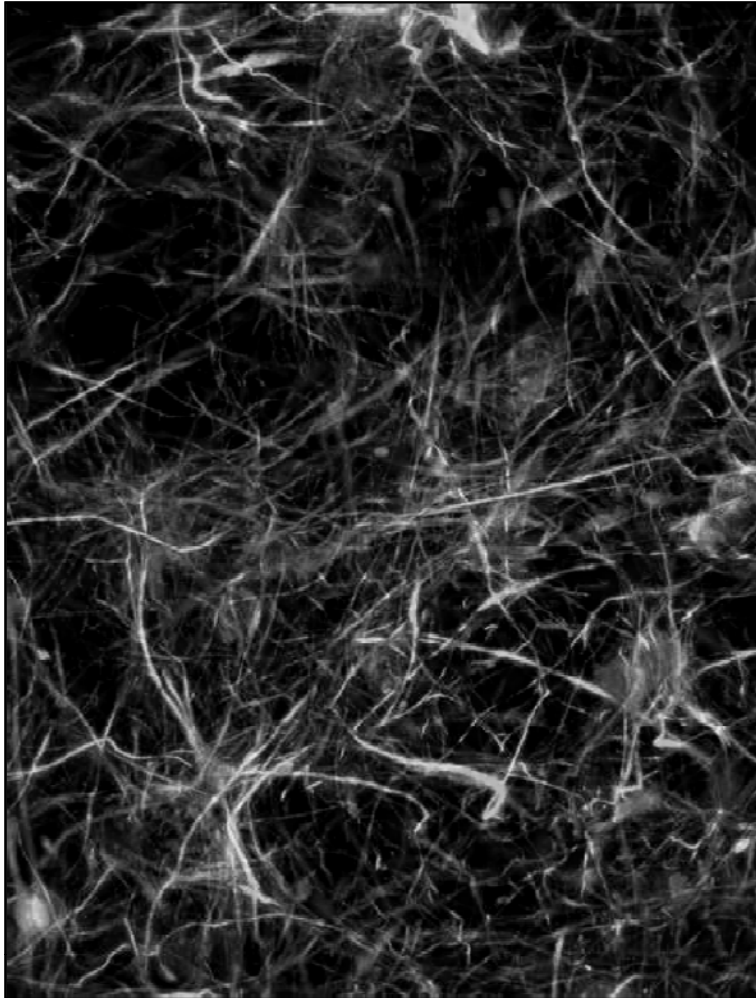


Neuronální
diferenciace
Progenitorová
buňka:

- β -tubulin III
- GFAP
- DNA

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.





Neuronální diferenciace

Neurony:

- β -tubulin III
- **DNA**

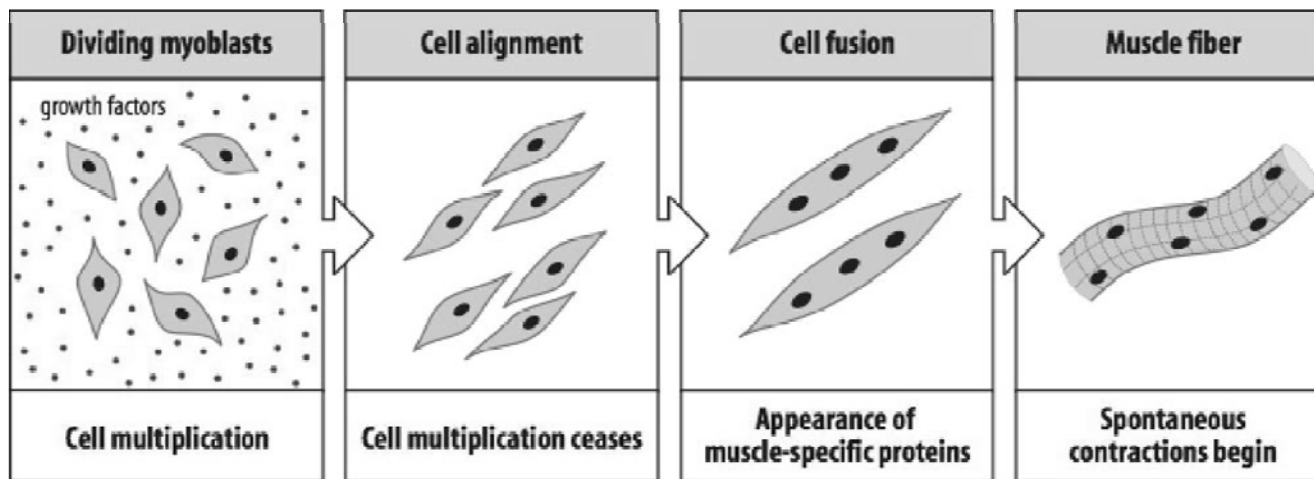
Gliové buňky:

- GFAP
- **DNA**

Diferenciace příčně pruhované svaloviny

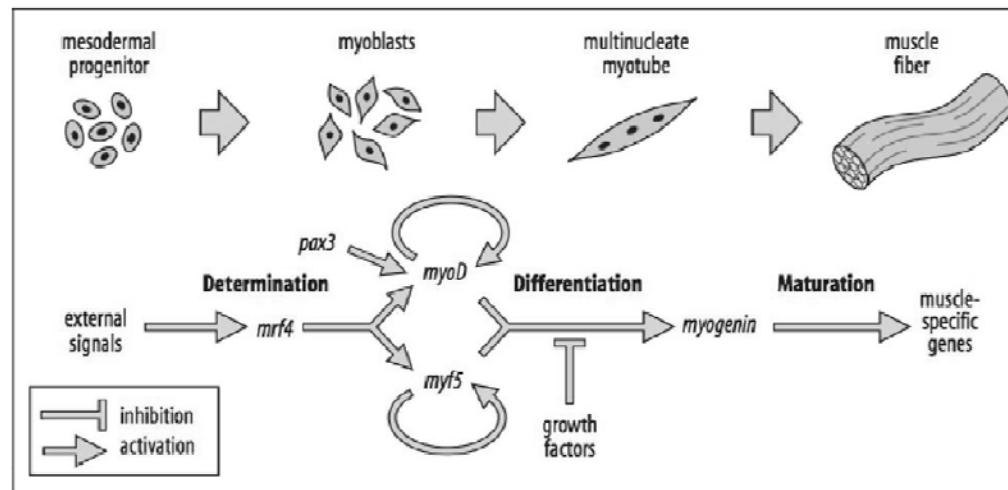
diferenciaci doprovází

- 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 ...



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



RŮSTOVÉ FAKTORY

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



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 diference
- 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

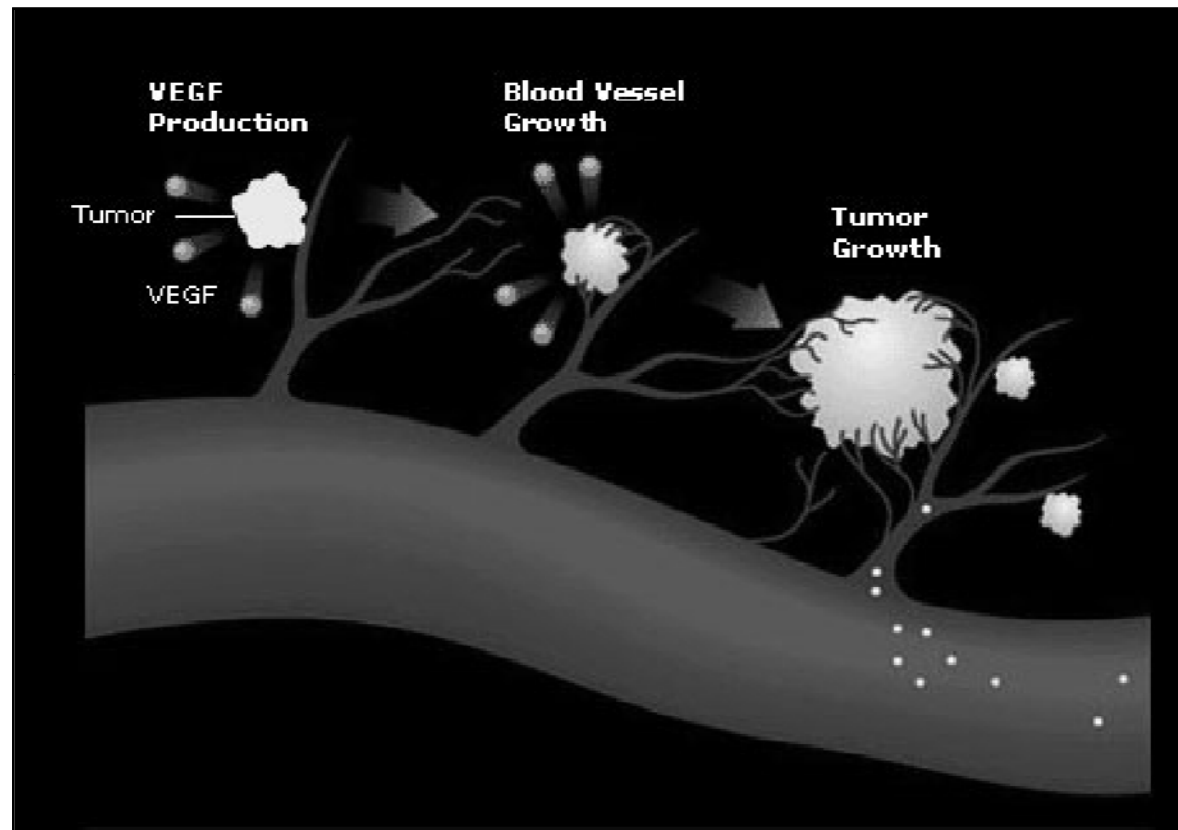
FGF Family (Fibroblast Growth Factor)

- 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





Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



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



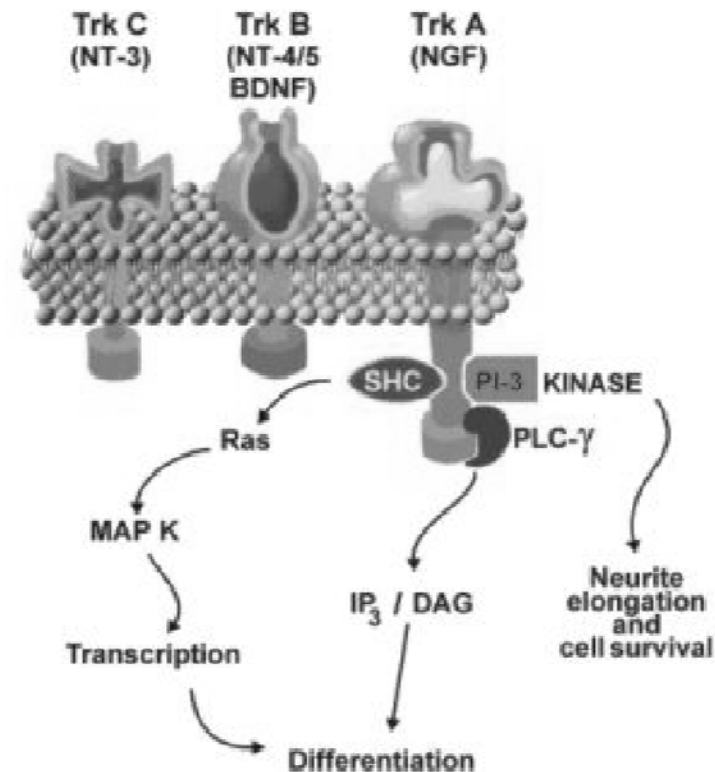
Neurotrofiny (Neurotrophins)

- produkovány cílovou tkání → přežívání neuronů, neuronální diferenciace

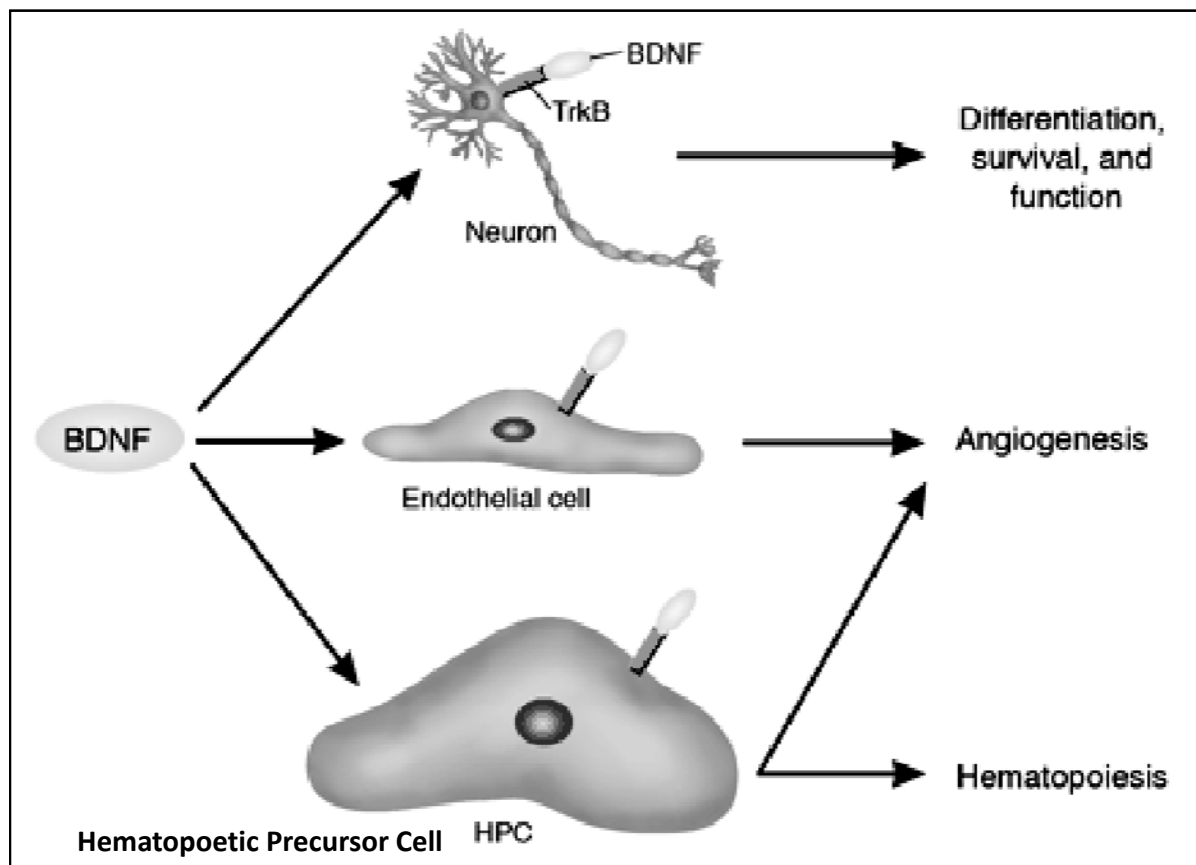
- receptory:

p75, Trk receptory (A,B,C)

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



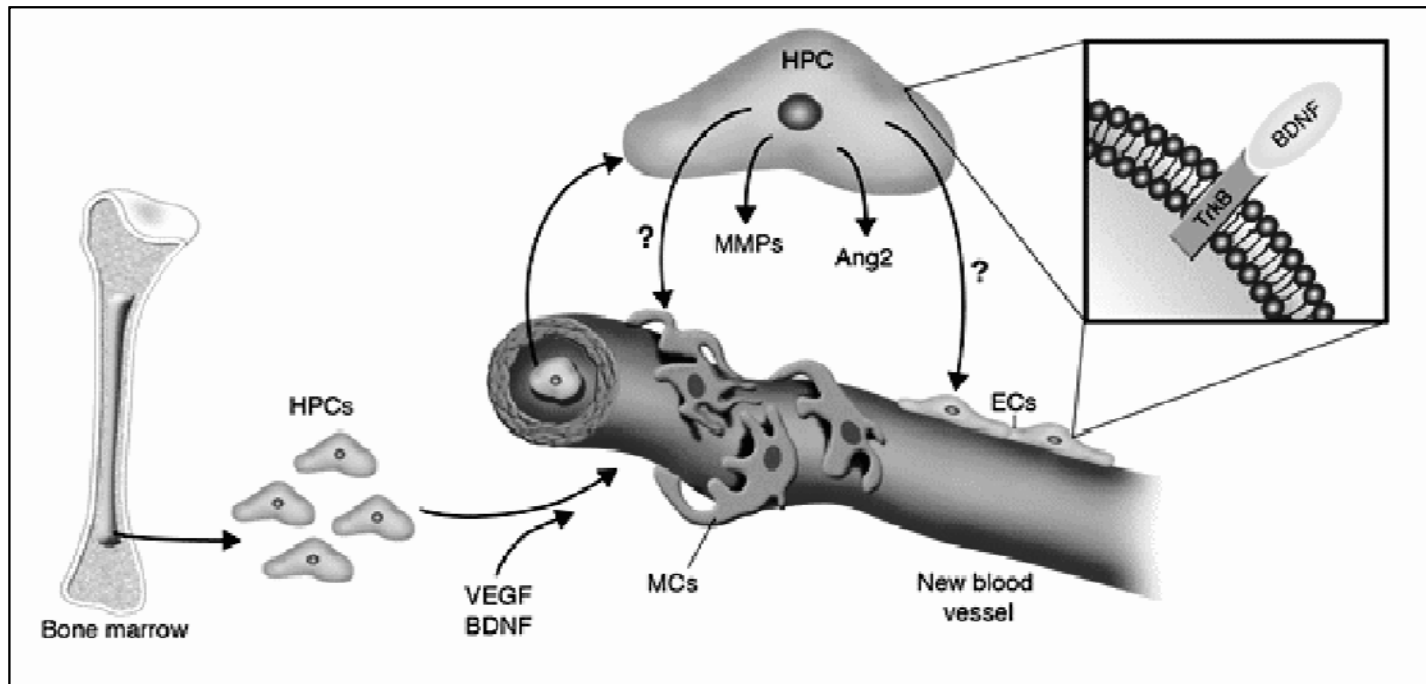
Pleiotropní efekt BDNF



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



BDNF-indukovaná neovaskularizace



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

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



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

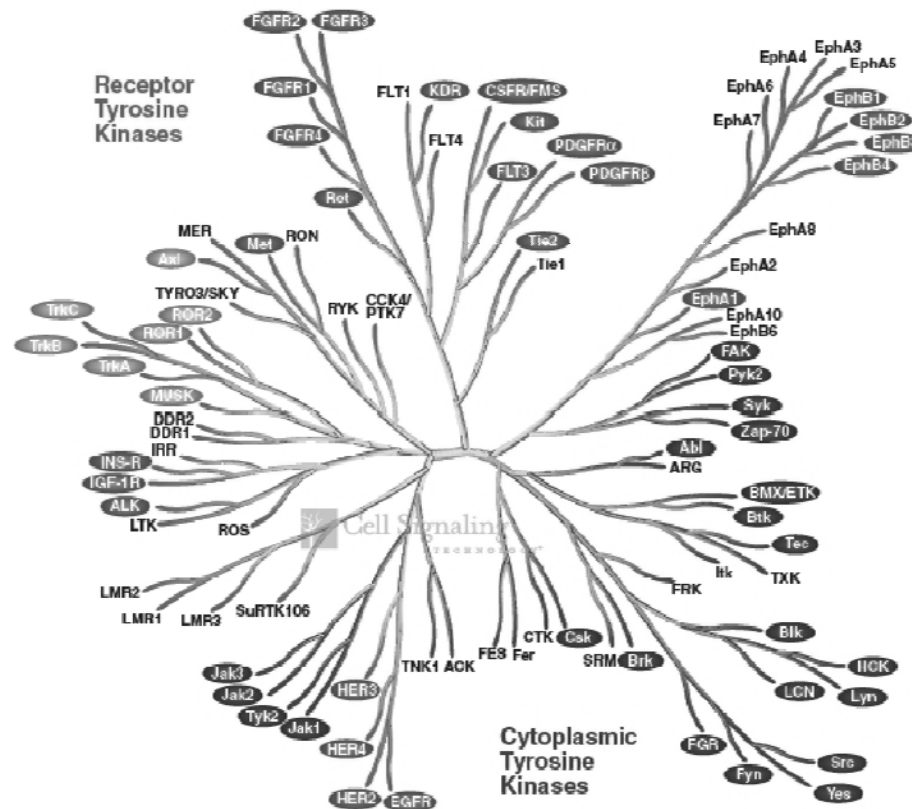
GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)



RECEPTOROVÉ TYROZIN-KINÁZY

funkce: regulace proliferace, diferenciace, metabolismu, aj.

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

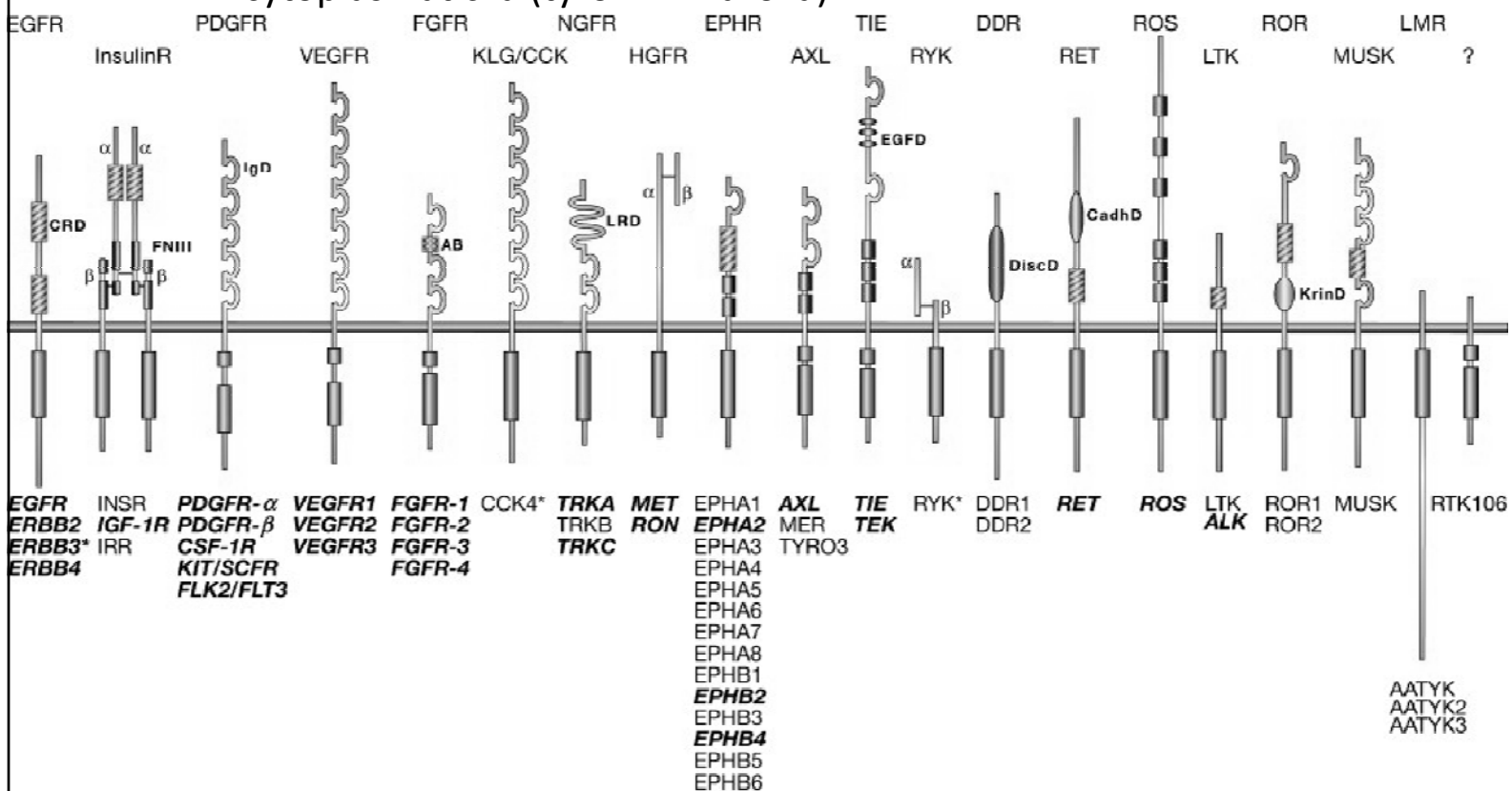


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



DOMÉNY :

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



Bi120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.

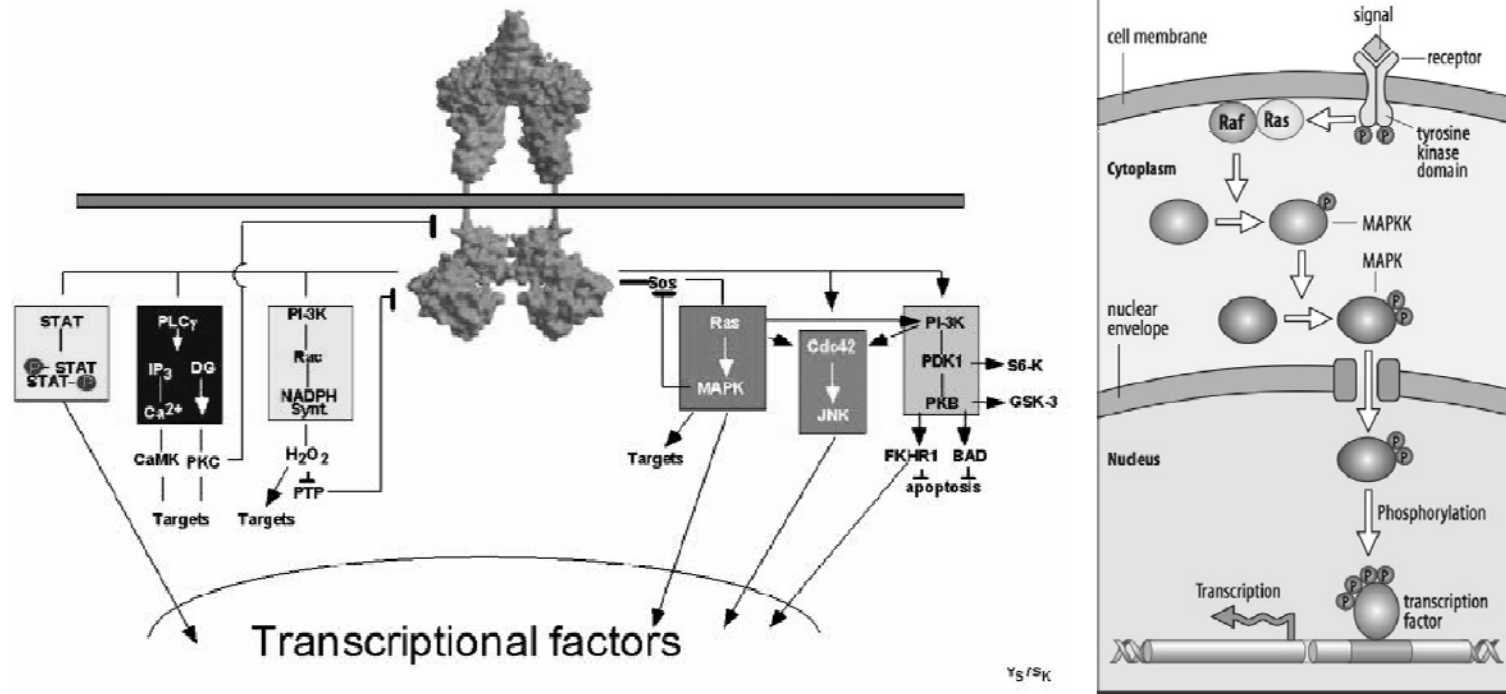


AKTIVACE:

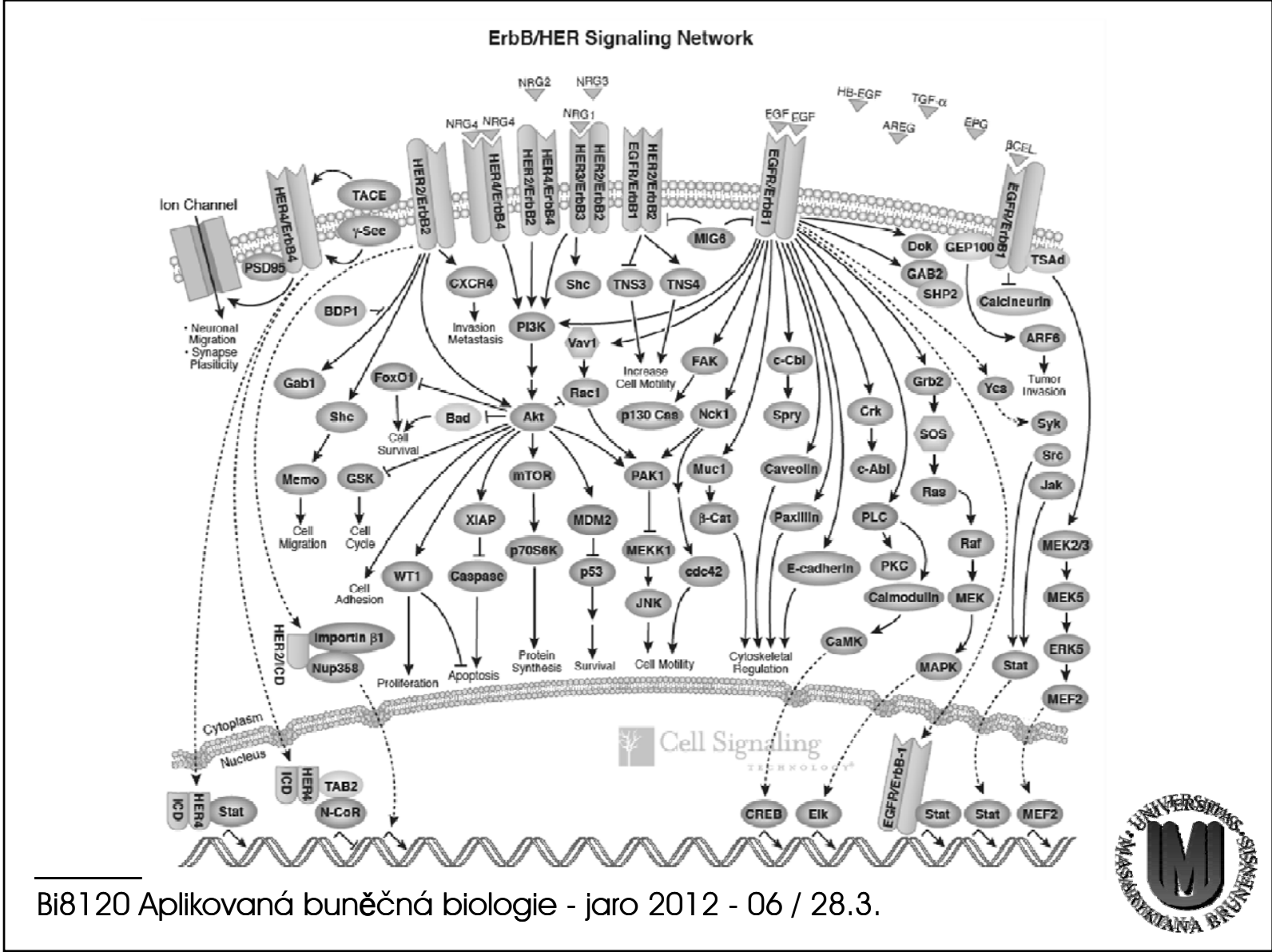
dimerizace vlivem růstových faktorů → cross-fosforylace

a) → konformační změna – stimulace katalytické aktivity

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



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



INDUKOVANÁ DIFERENCIACE

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



Indukovaná diferenciace

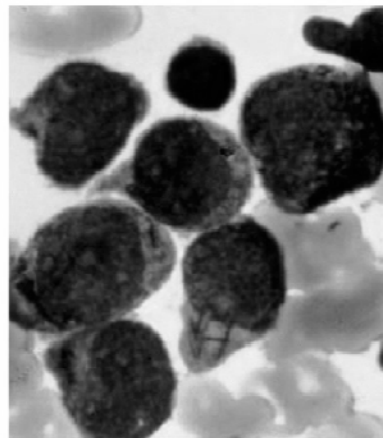
- induktory diferenciace (růstové faktory, vitamíny, inhibitory kináz, změny v kultivaci, syntetické látky...)
- indukce příslušné diferenciační dráhy
- inhibice signálních drah pro „self-renewal“

Příklady induktorů diferenciace *in vitro*:

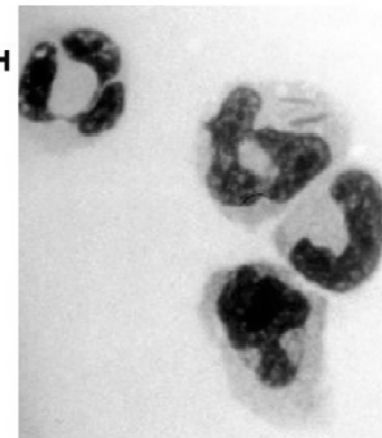
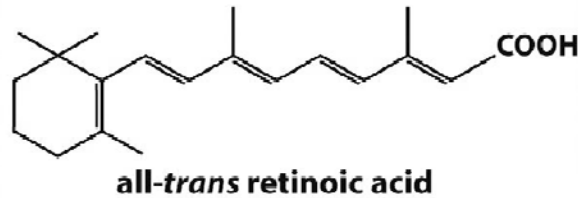
- kyselina all-*trans* retinová (ATRA)
- $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$)
- phorbol myristylacetát (PMA)
- trichostatin
- dimethylsulfoxid (DMSO)
- SU5402 (inhibitor FGFR1)...



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

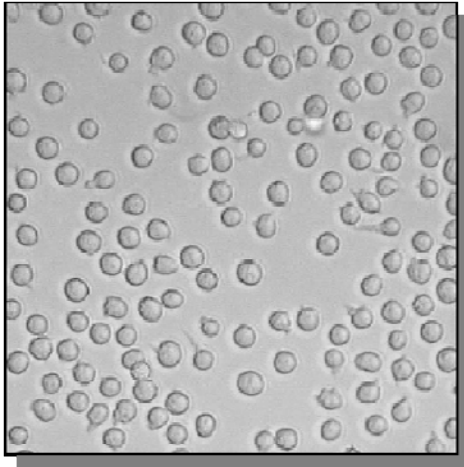


promyelocytes



**polymorphonuclear cells
(neutrophils)**

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



Linie HL-60:

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

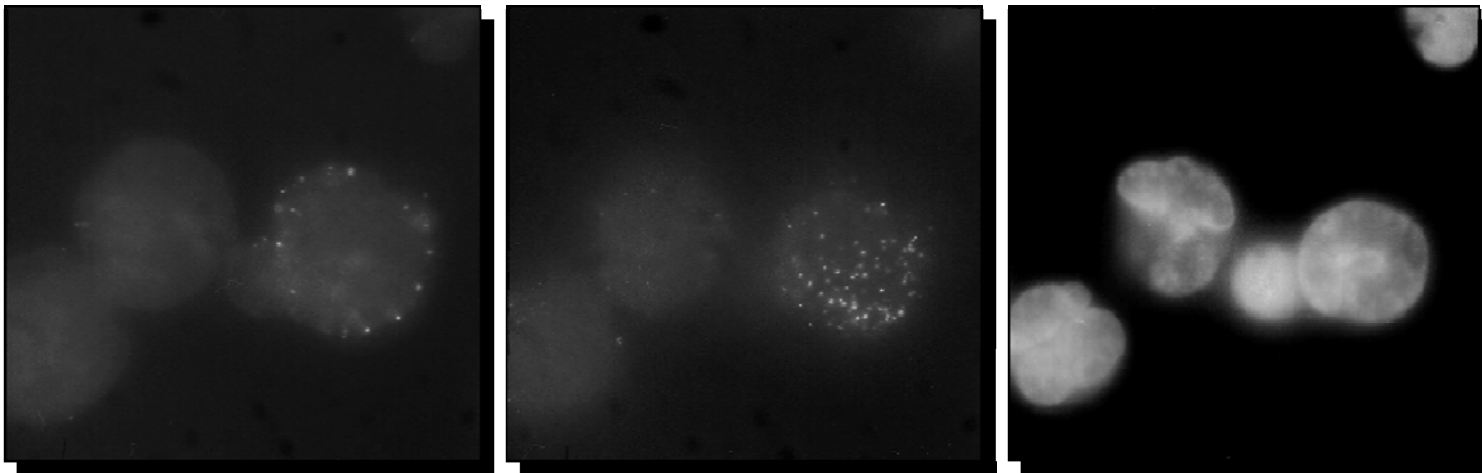
- induktory granulocytární diferenciaci:
kyselina *all-trans* retinová (*atRA*)
dimethylsulfoxid (DMSO)
- induktory monocyto/makrofágové diferenciaci:
phorbolmyristyl acetát (PMA)
1,25-dihydroxyvitamin D₃

Diferenciace linie HL-60 do stádia granulocytů:

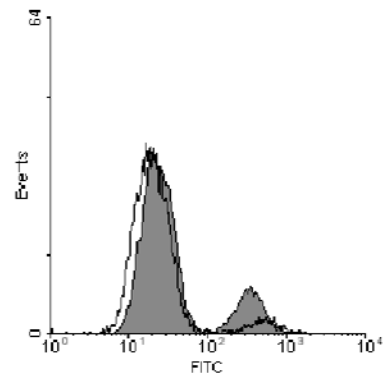
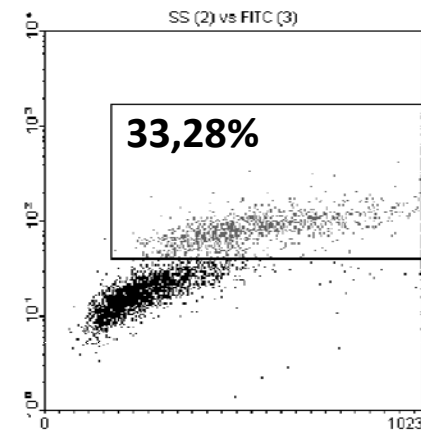
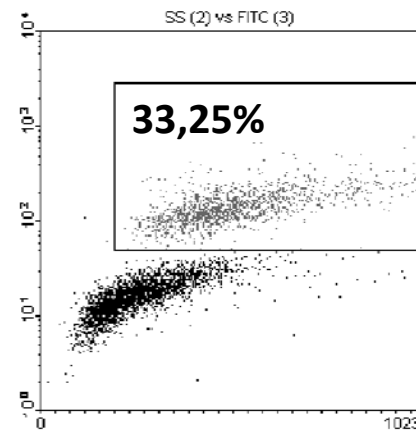
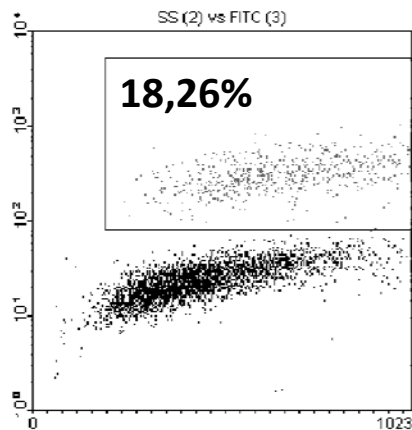
Induktor: 1mM kyselina *all-trans* retinová

Marker: CD-66b (CD-67)

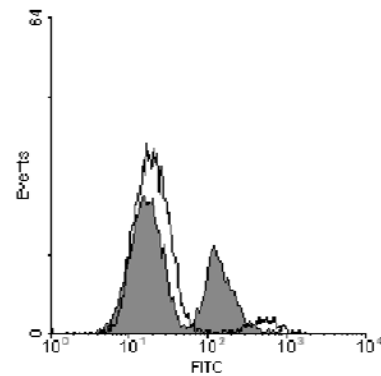
Detekce: anti-CD66b, SwAM-FITC



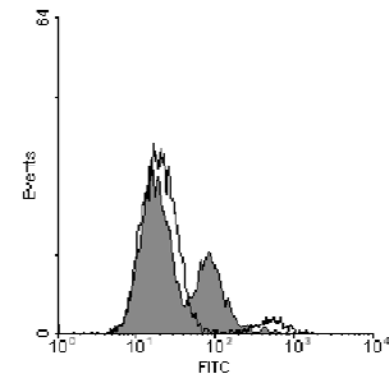
Granulocytární diferenciaci HL-60: flow cytometrie / CD66b



1mM ATRA



1mM ATRA + 13mM CA



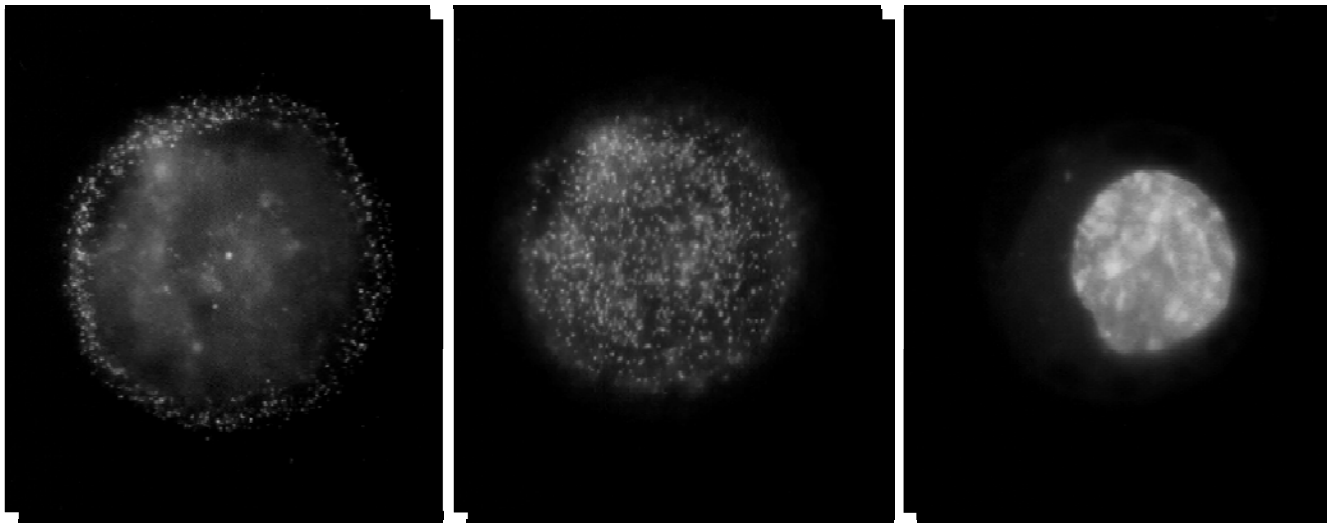
1mM ATRA + 52mM CA

Diferenciace linie HL-60 do stádia makrofágů:

Induktor: 1,6 nM phorbolmyristyl acetát (PMA)

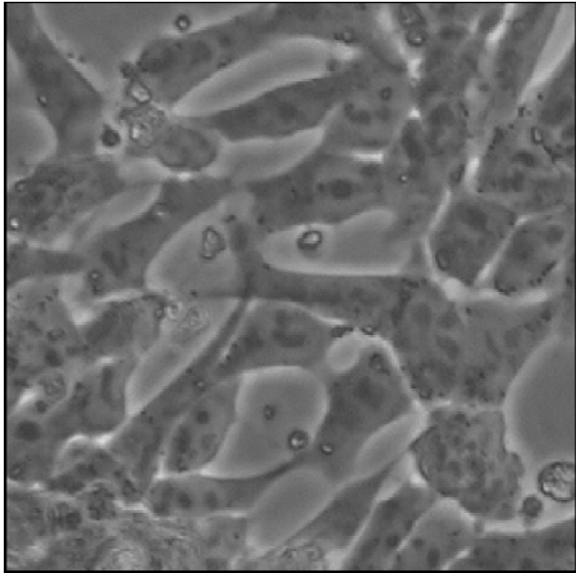
Marker: CD-14

Detekce: anti-CD14, SwAM-FITC



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - jaro 2012 - 06 / 28.3.



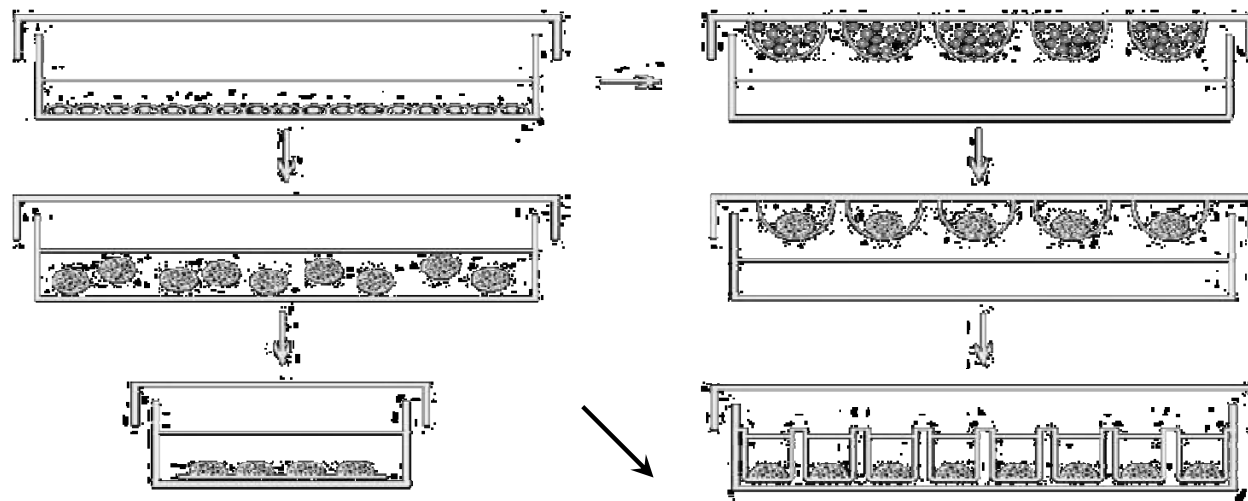


Linie P19:

- 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 diferenciacie buněk P19



metoda kultivace na
bakteriologických miskách

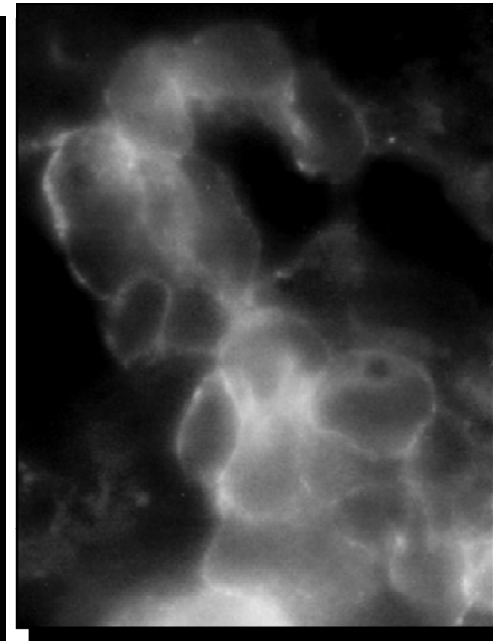
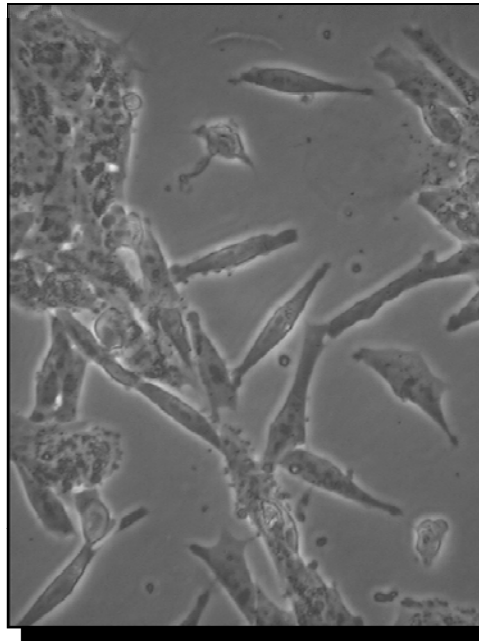
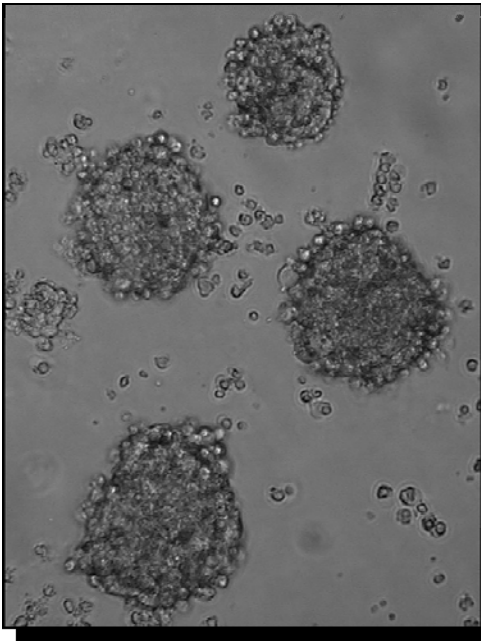
metoda „visících kapek“

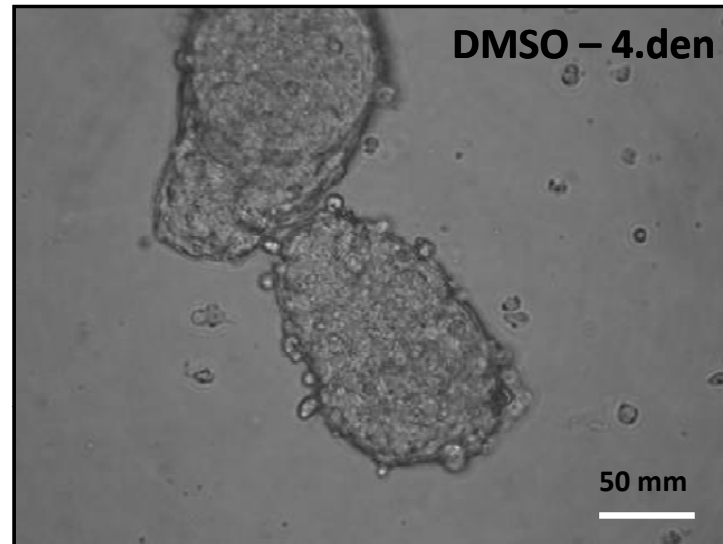
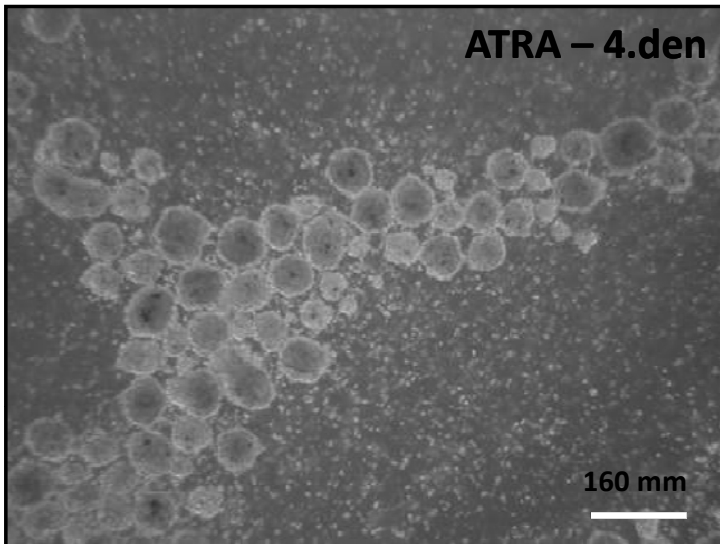
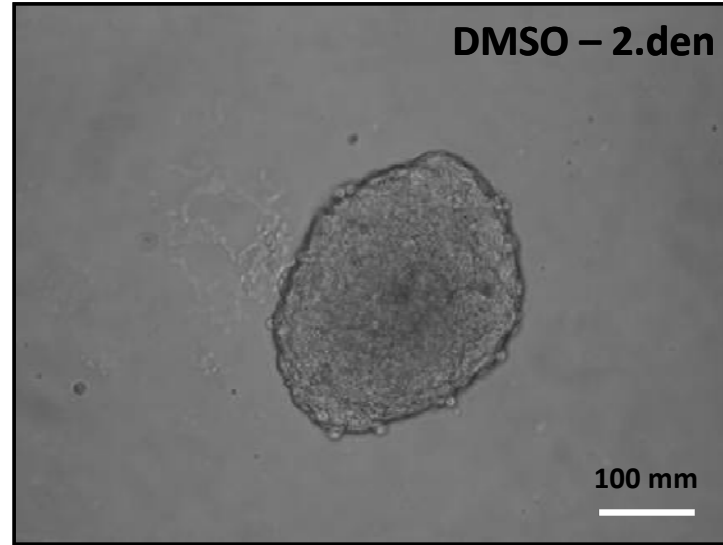
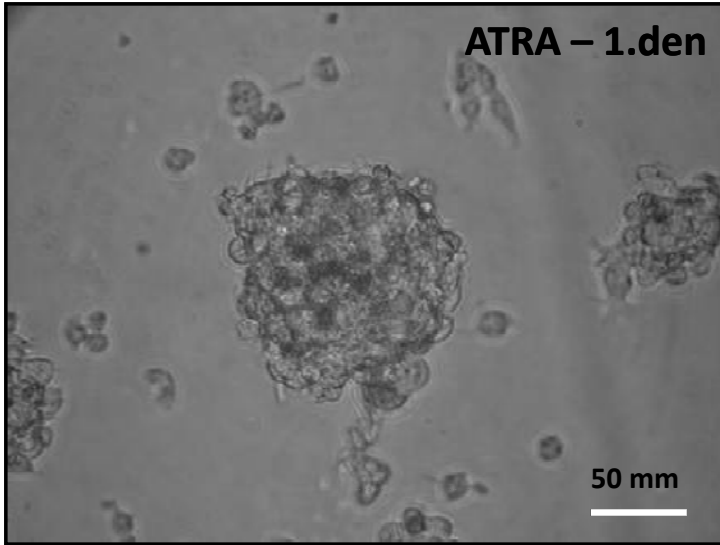
Mesodermální diferenciace buněk P19:

Induktor: 0,8% DMSO

Marker: myosin II

Detekce: anti-skeletal myosin, SwAM-FITC



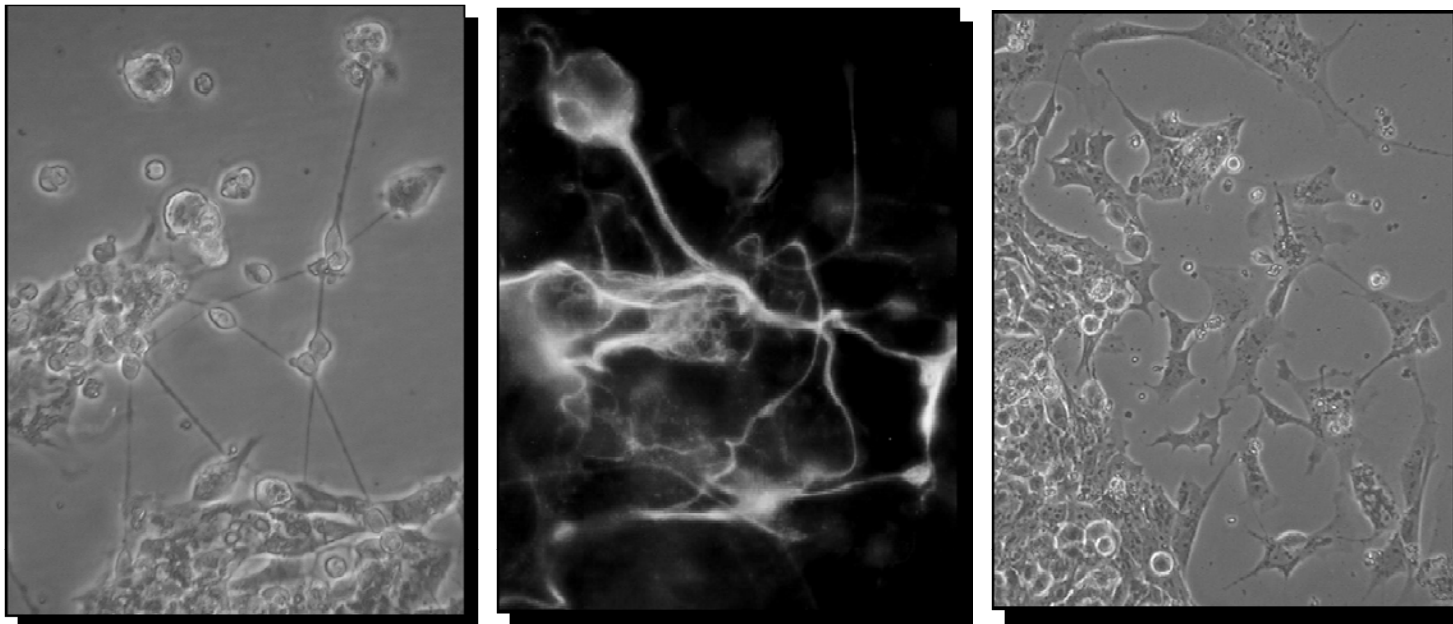


Neuronální diferenciace buněk P19:

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 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

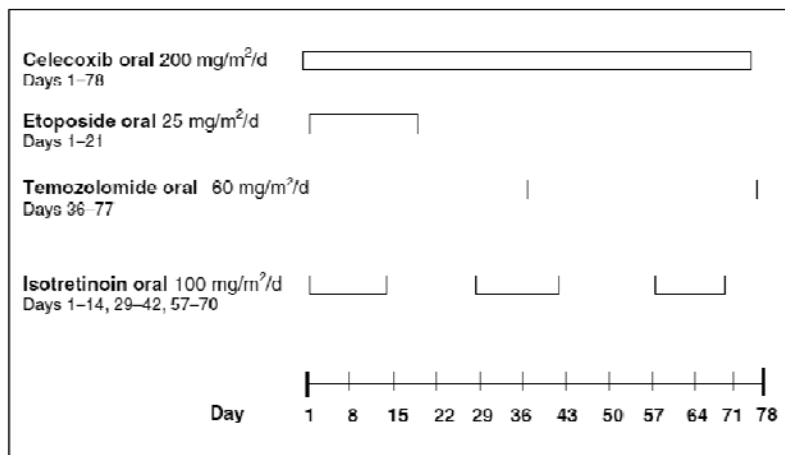


Fig. 1. Combined oral maintenance biodifferentiating and antiangiogenic therapy (COMBAT) – treatment plan.

ONKOLOGIE

Original Article · Originalarbeit

Onkologie 2006;29:308-313
DOI: 10.1159/000093174

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 Petr 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

