

# 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

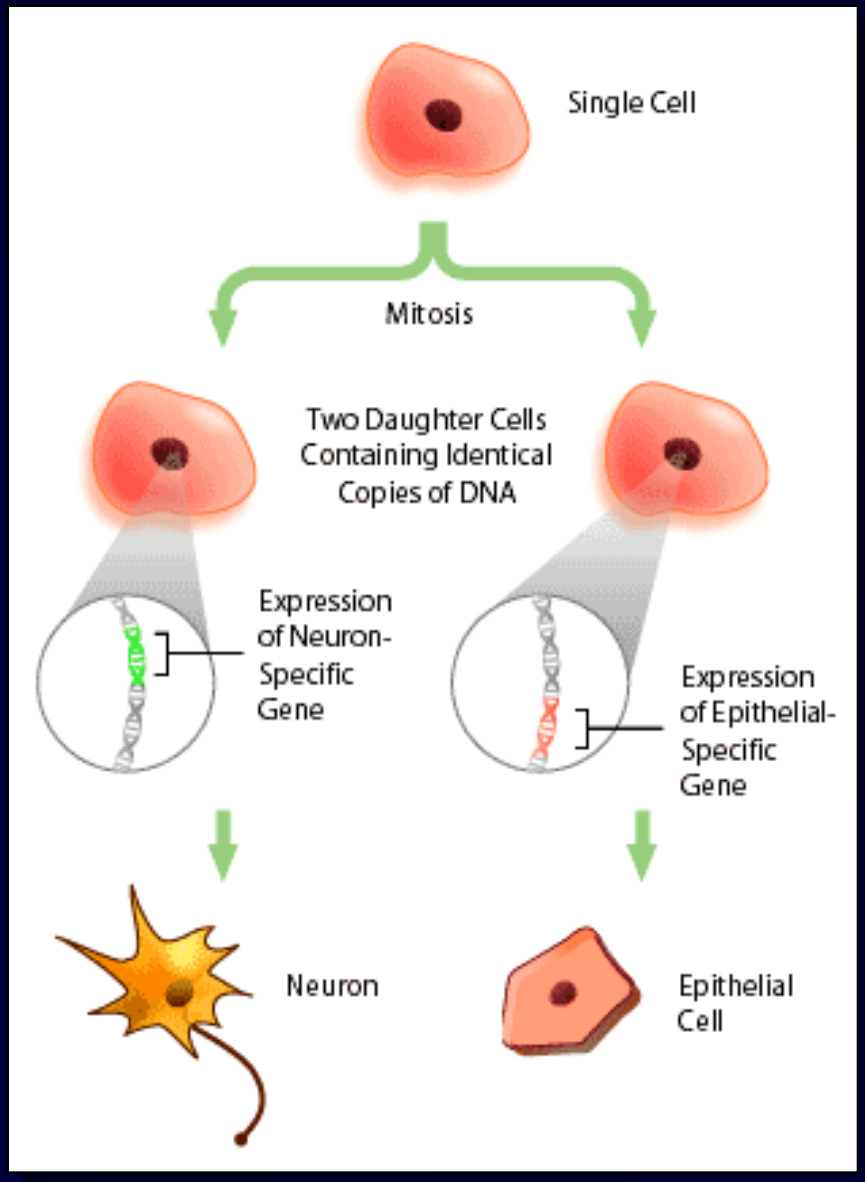
- identický genom ve všech buňkách
- kontrola na úrovni genové exprese

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)



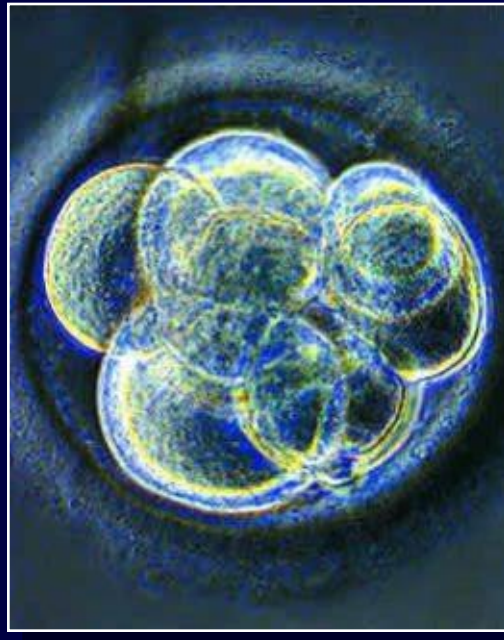
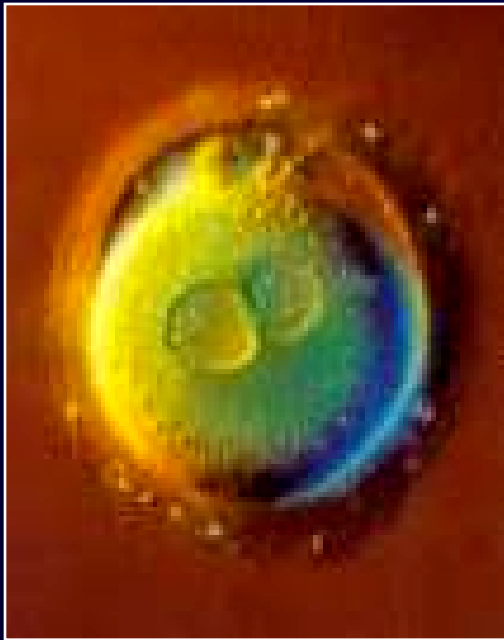


# DIFERENCIAČNÍ POTENCIÁL BUNĚK



## 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

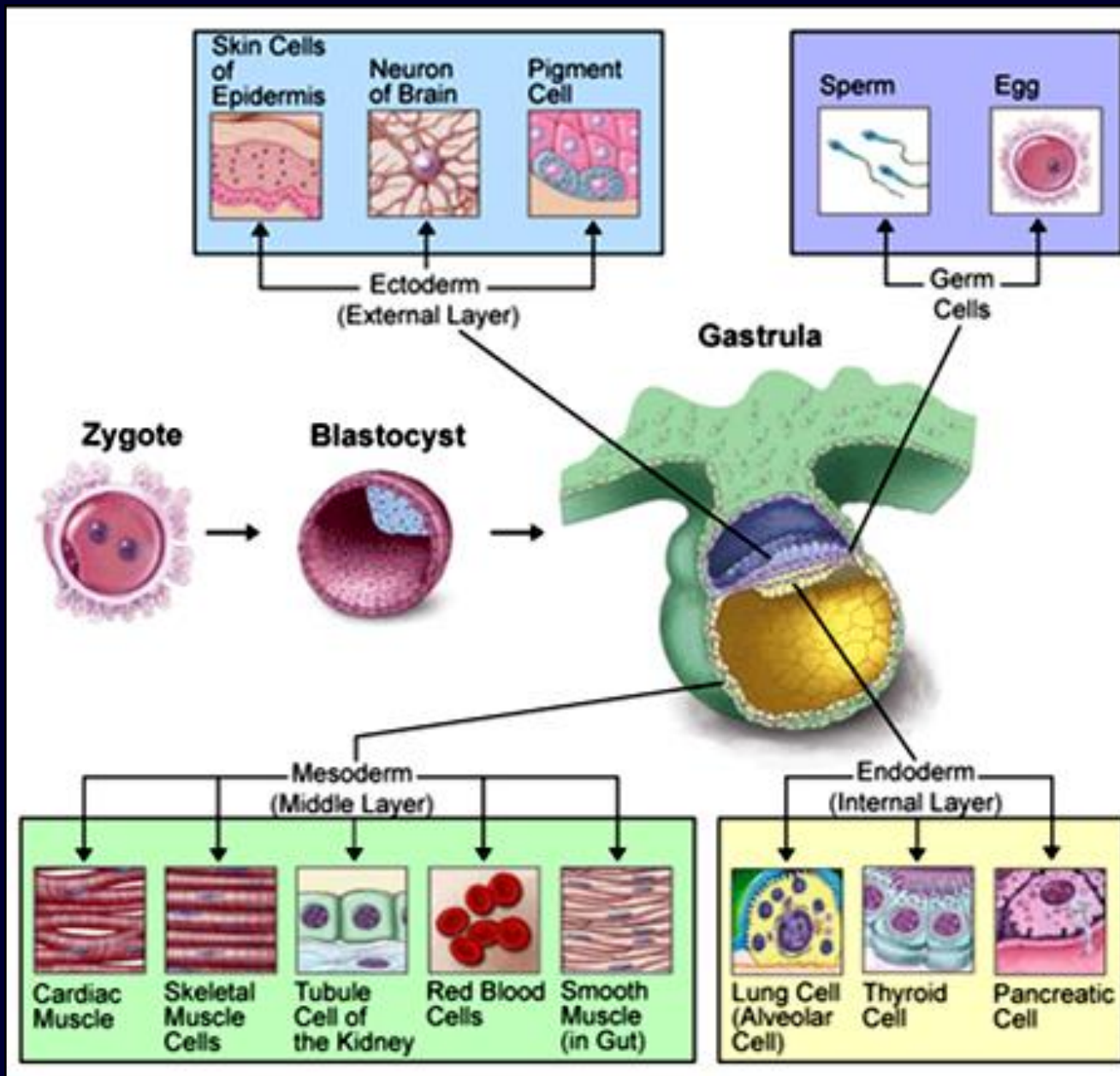


## Mesoderm

- 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

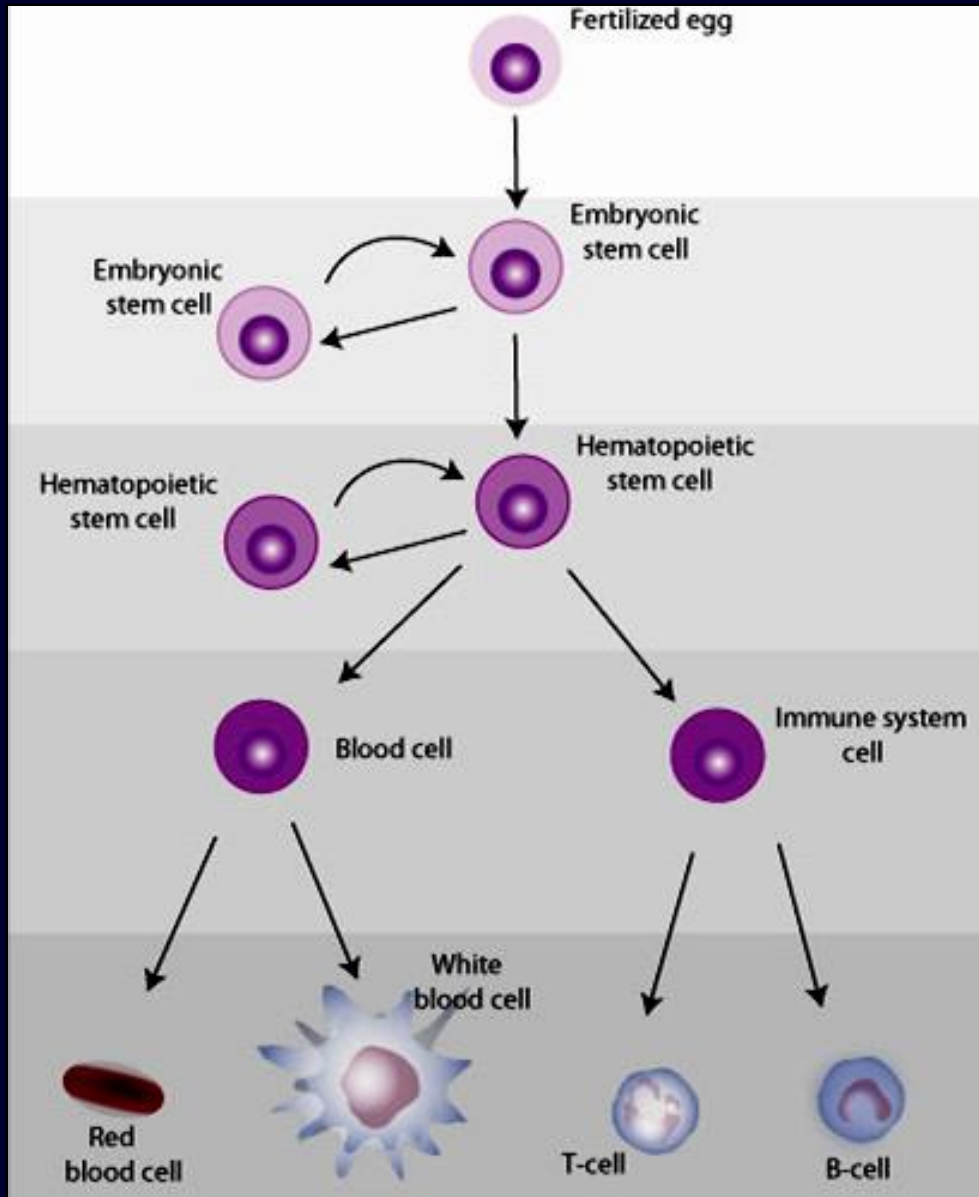
- nelimitovaný diferenciační potenciál
- schopnost tvořit embryonální i extraembryonální tkáně
- časná stádia rýhování zygoty (1-4 dny)

## 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)

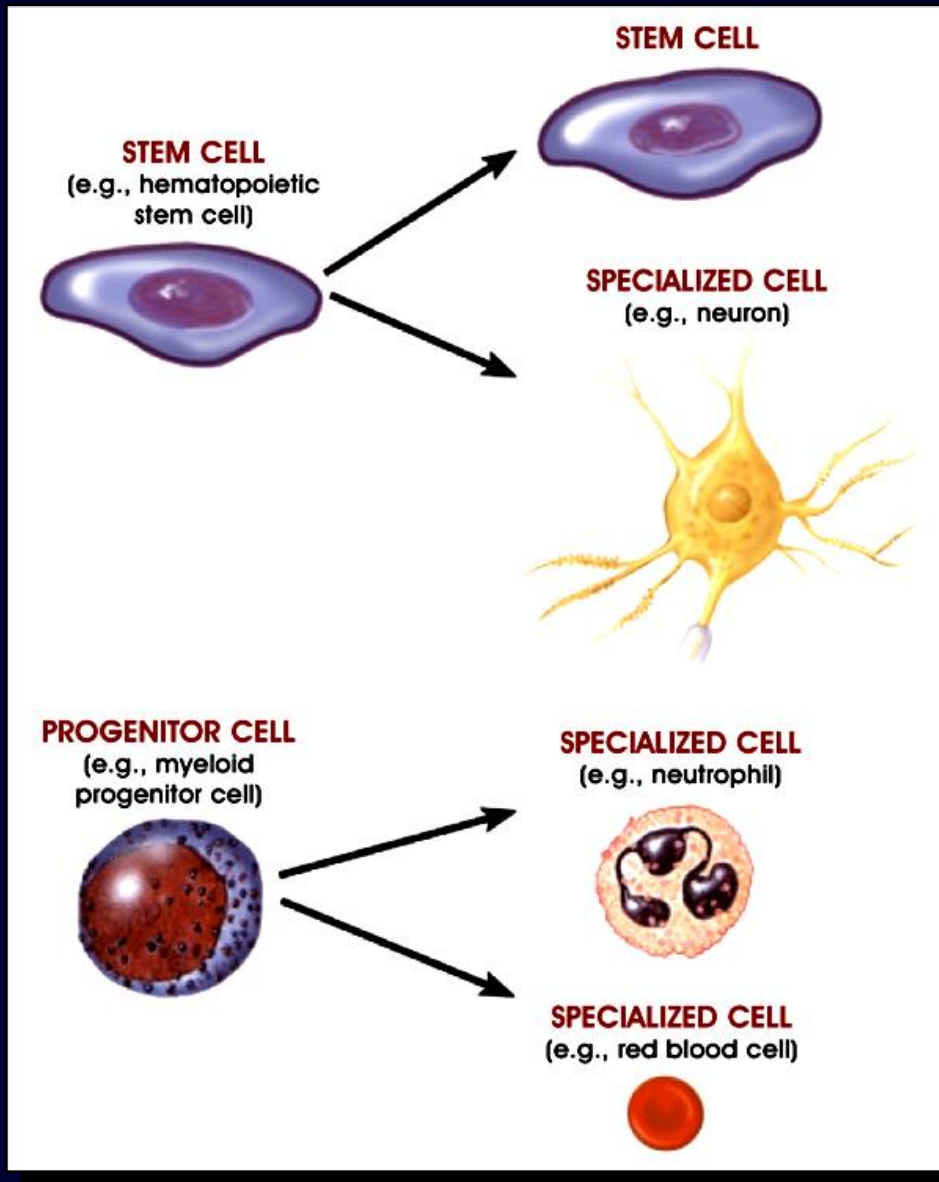
pluripotentní buňky  
(embryonální kmenové)

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 diferenciaci:

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





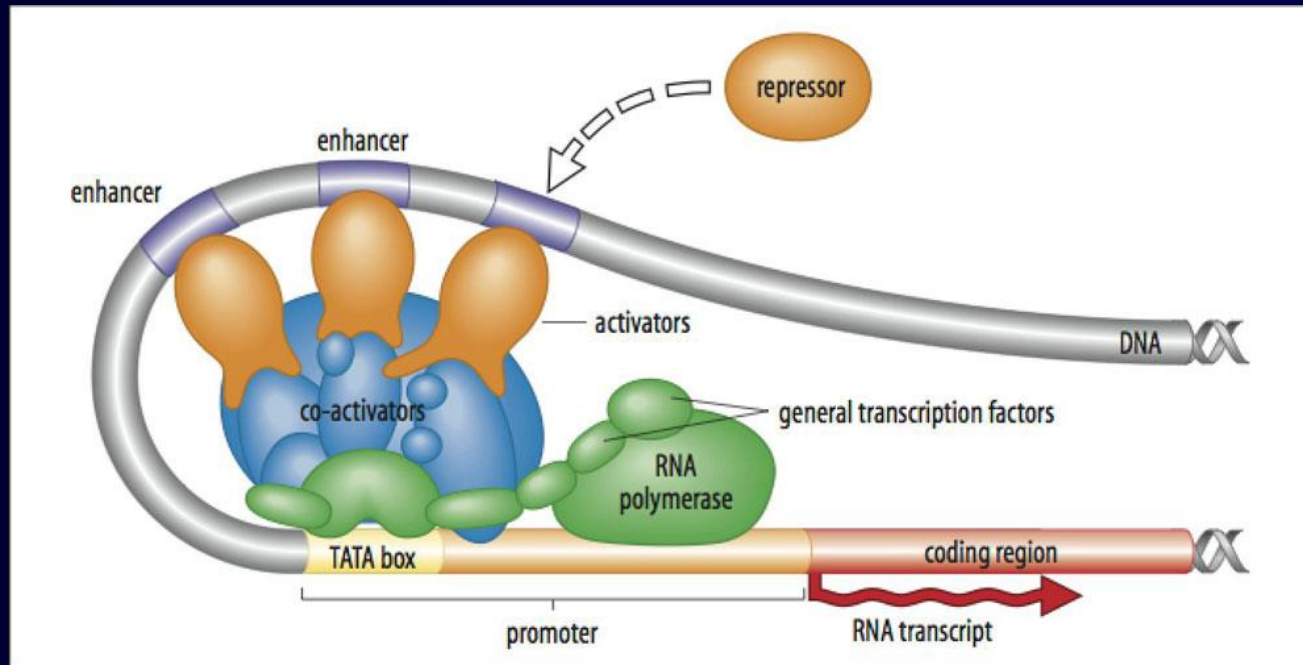
# Signály regulující diferenciaci

- Solubilní regulátory
  - Hormony (glukagon, hydrokortison, tyroxin,...)
  - Růstové faktory (TGF-transformující růstový faktor, FGF-fibroblastový růstový faktor, interleukiny, ...)
  - Vitaminy (D, A ...)
  - Ionty ( $\text{Ca}^{2+}$ , ...)
- Fyzické kontakty mezi buňkami (gap junctions)
- Kontakt buněk s mezibuněčnou matrix (kolagen, laminin, ...)
- Polarita a tvar buněk
- Fyzikální parametry prostředí (teplota, parciální tlak  $\text{O}_2$ , ...)



## Molekulární mechanismy diferenciace

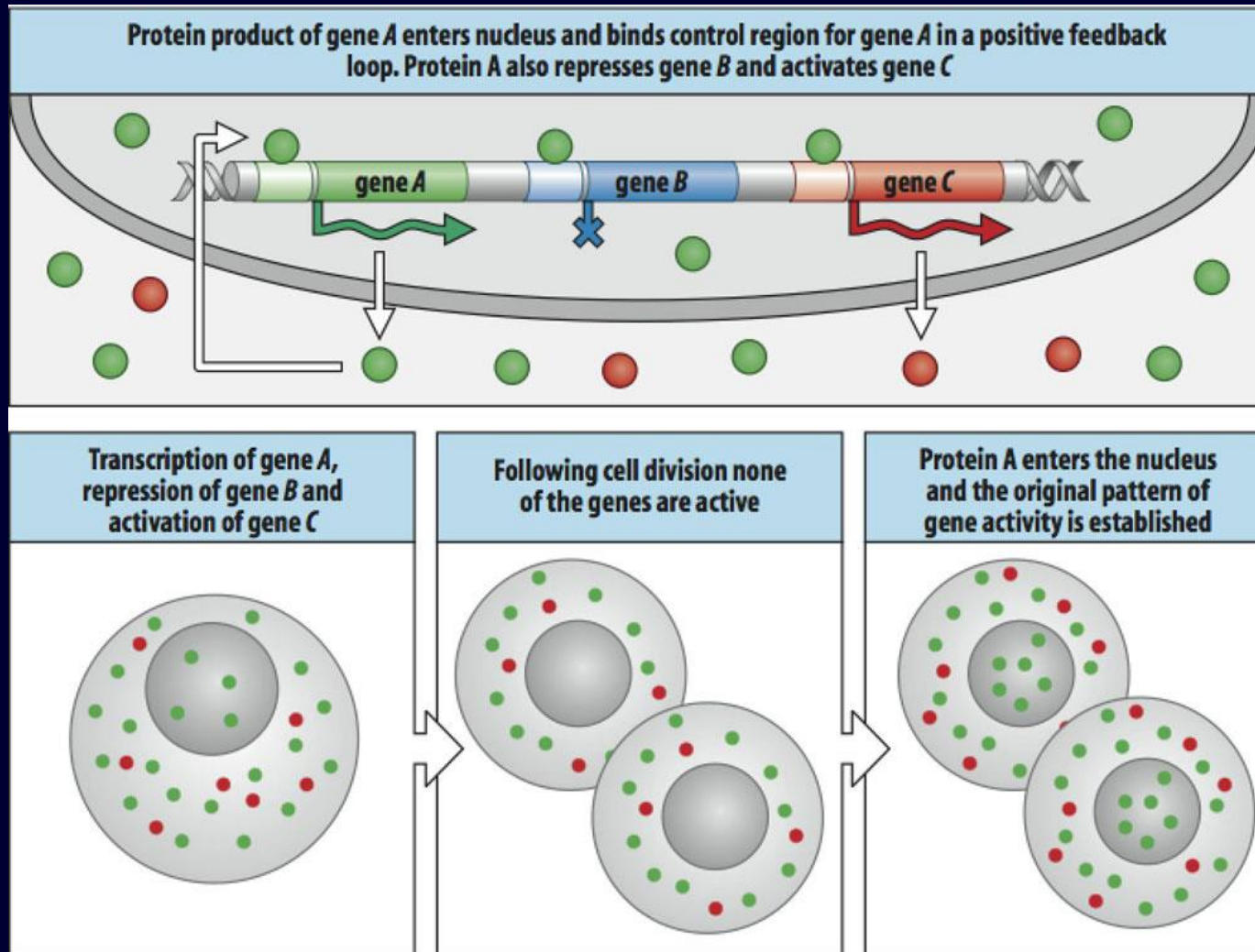
- nejdůležitějším místem regulace je **iniciace transkripce**
- vazba regulačních proteinů na specifické sekvence DNA (regulační oblasti)
- relativně malý počet strukturních motivů

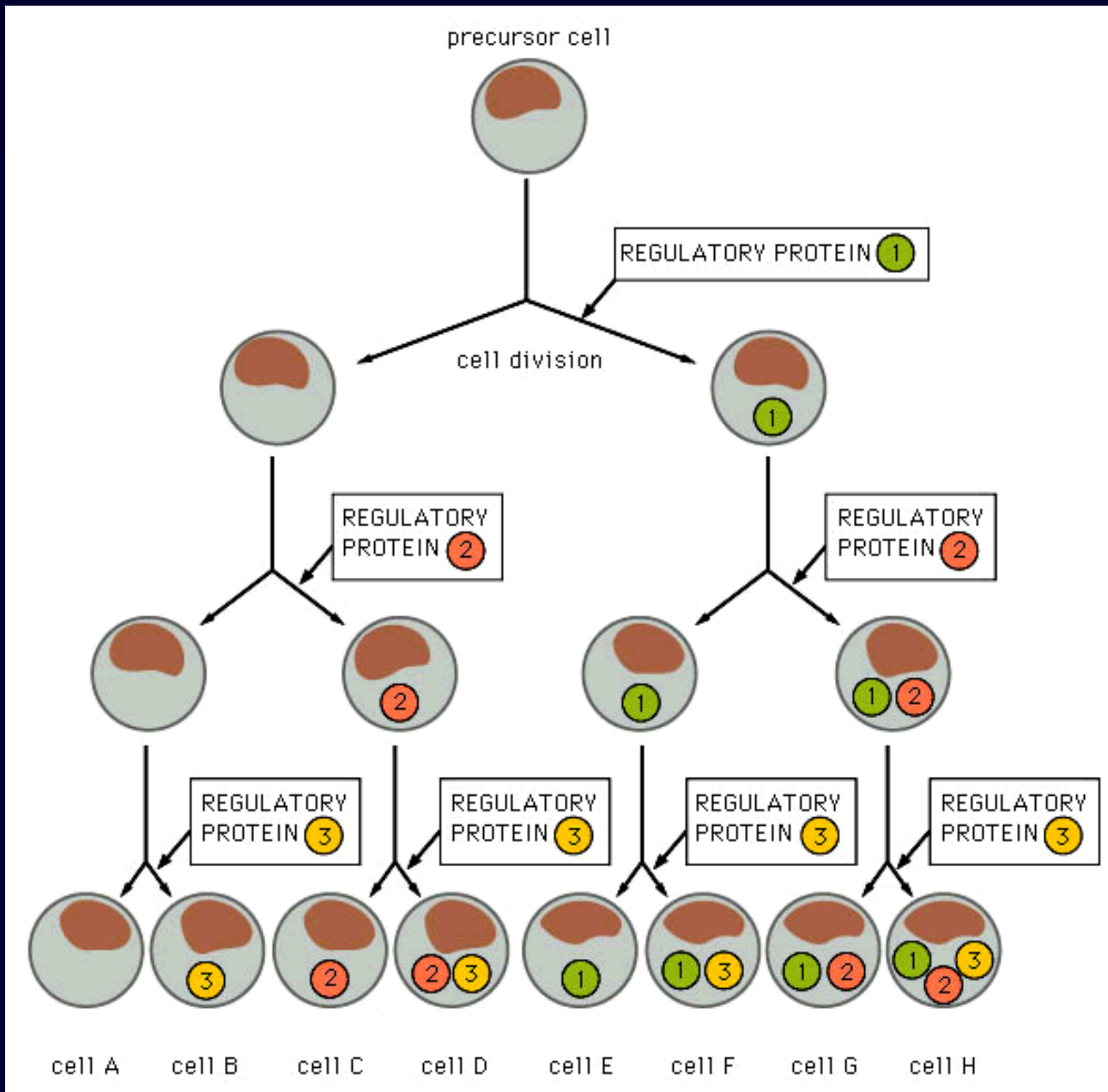


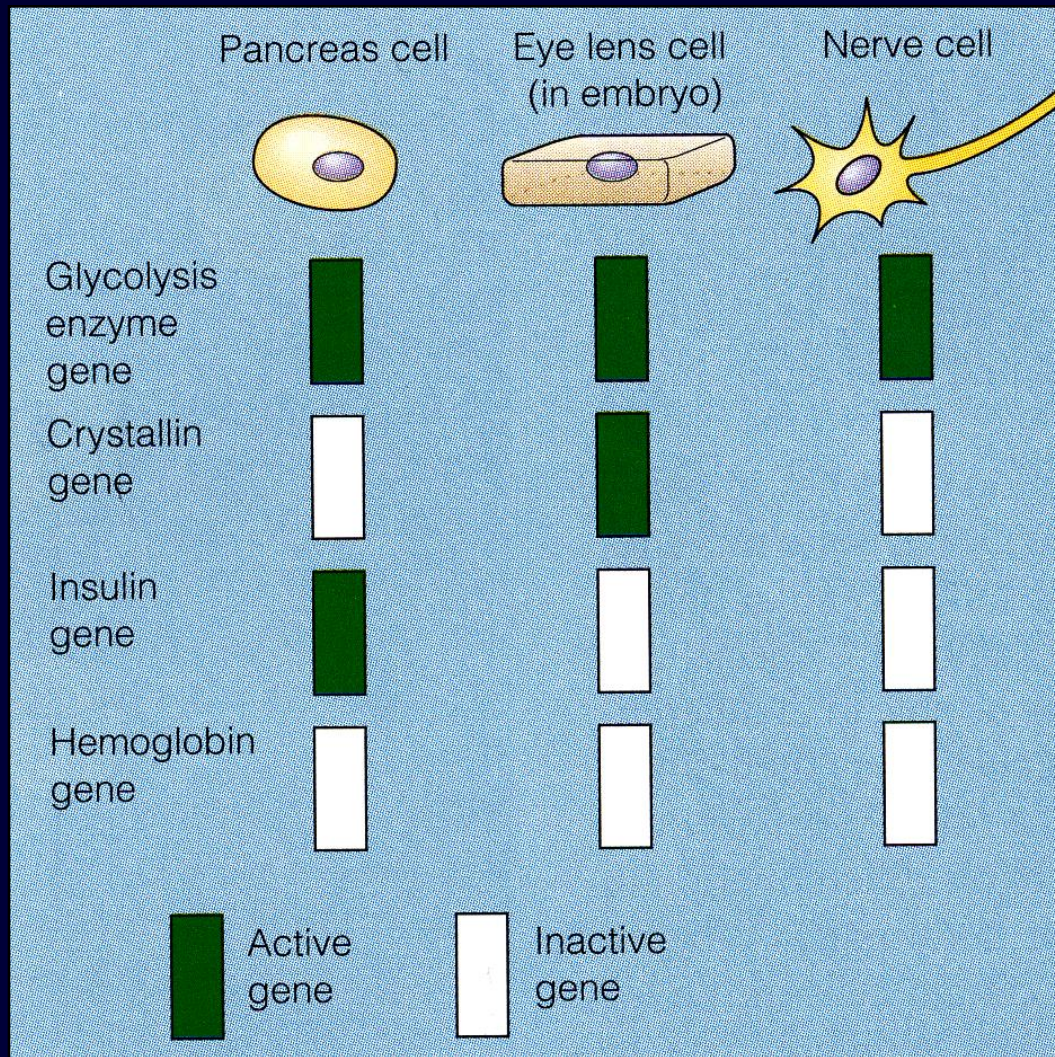
# Molekulární mechanismy diferenciace

- 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
- $\pm 5$  TFs působí společně a reguluje transkripci jednoho genu
- jeden TF reguluje více genů (pozitivně i negativně)
- tkáňová specifita

# Zachování exprese genů po rozdělení buňky







# 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

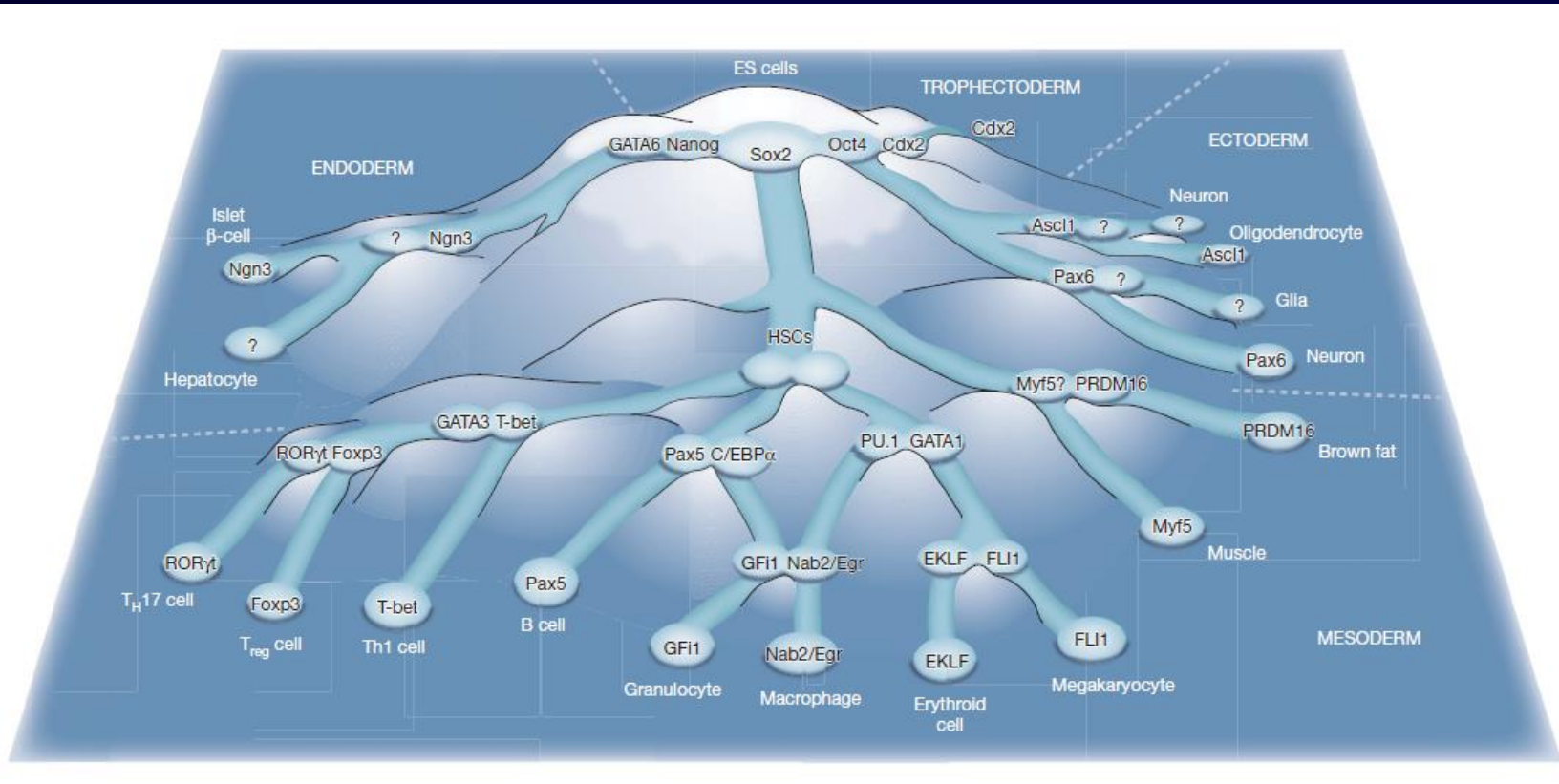
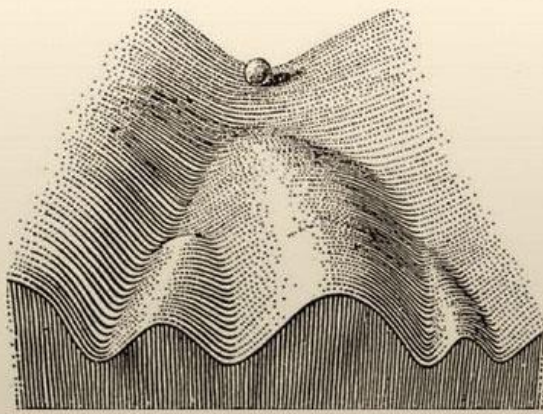
## Transdiferenciace

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

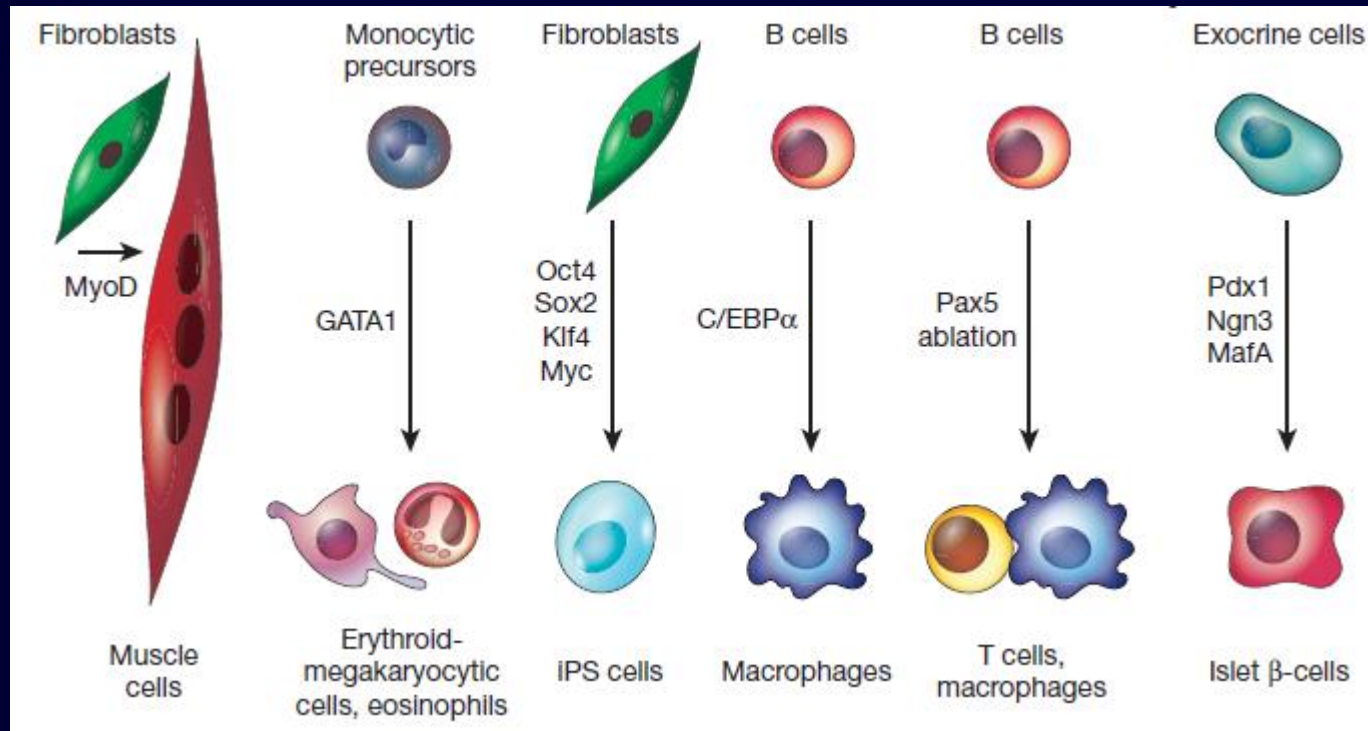


Epigenetic landscape: H.C. Waddington (1957)

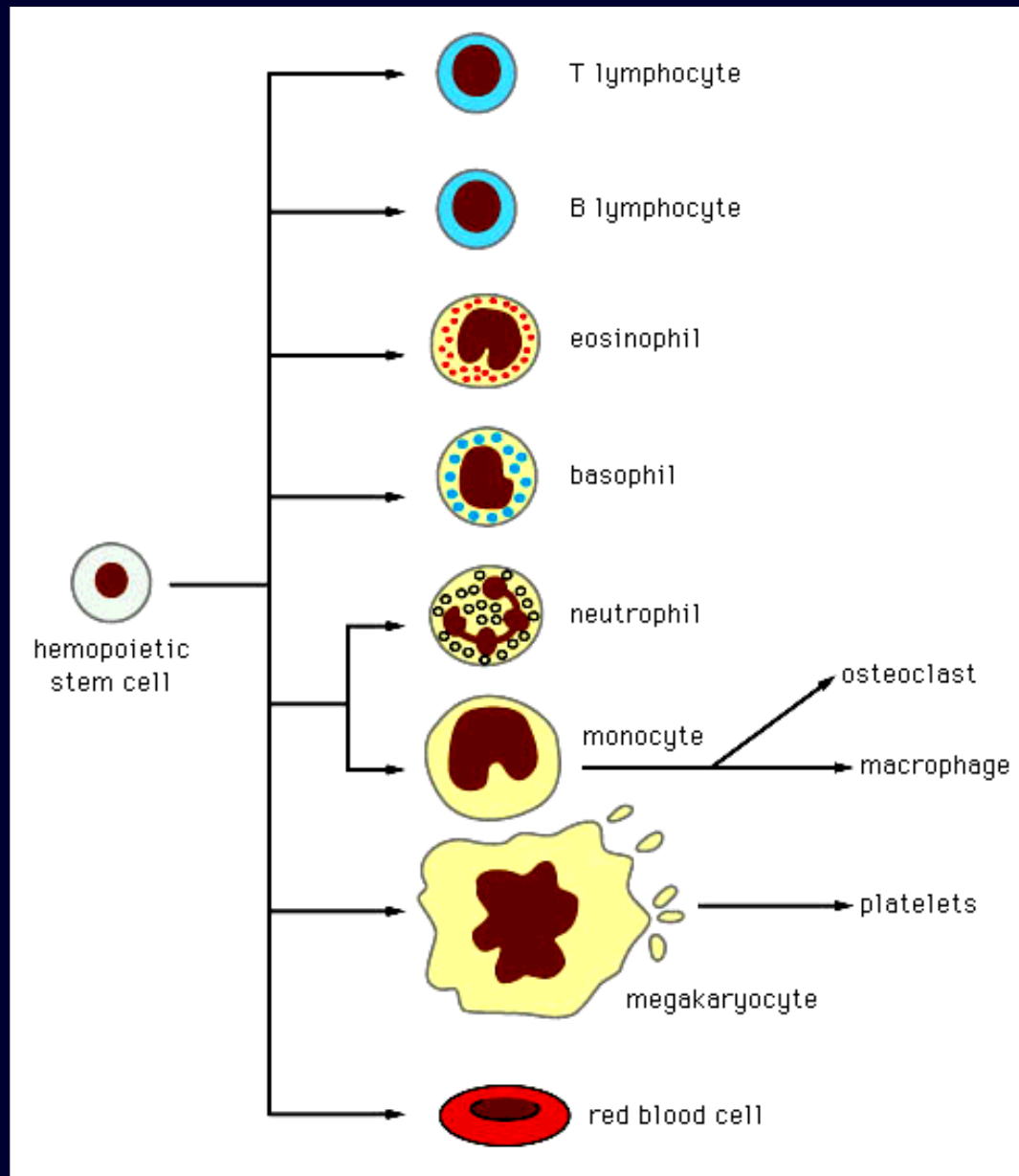
Epigenetic landscape: T. Graf & T. Enver (2009)  
- role transkripčních faktorů

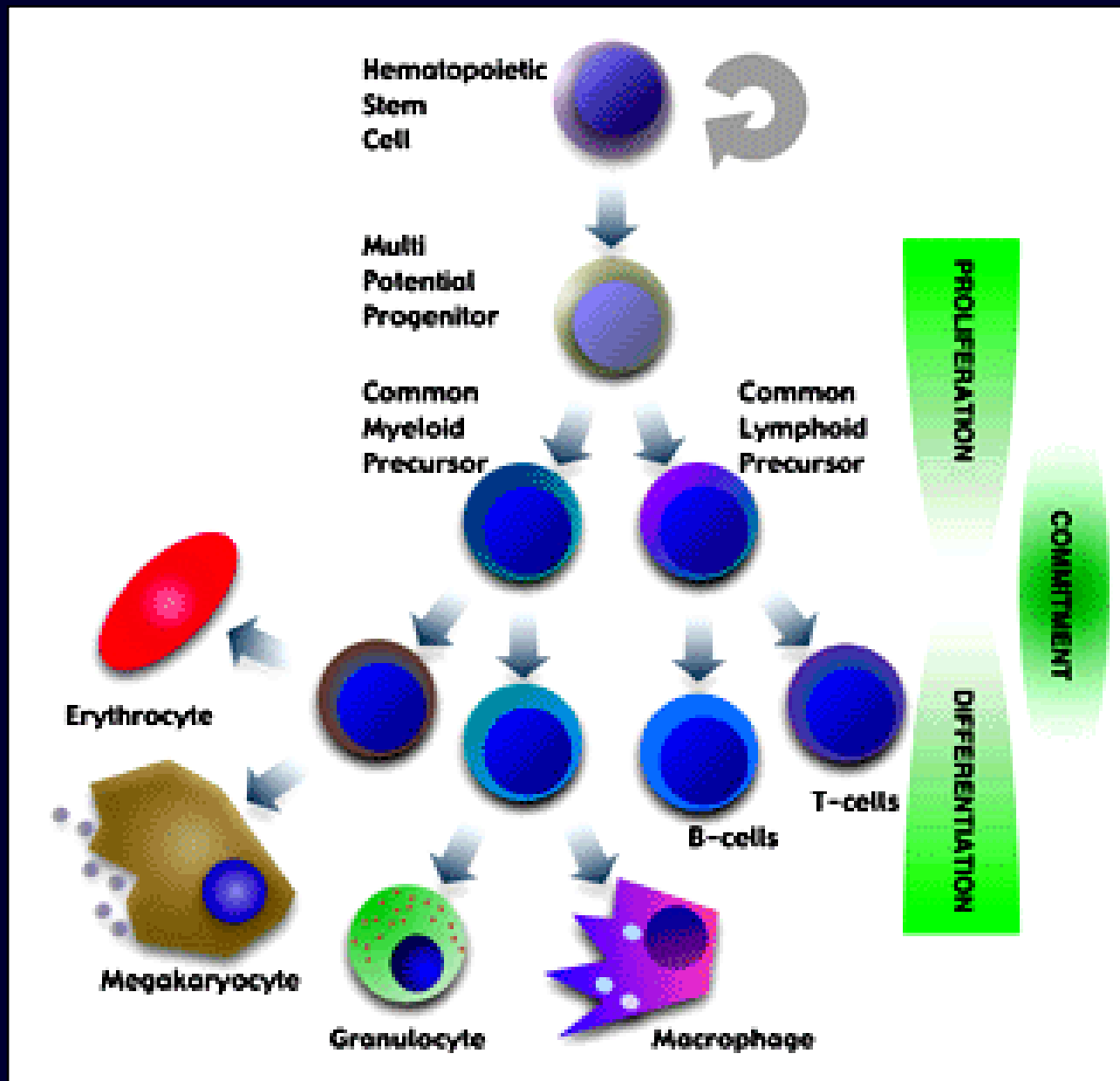


# Indukovaná transdiferenciace



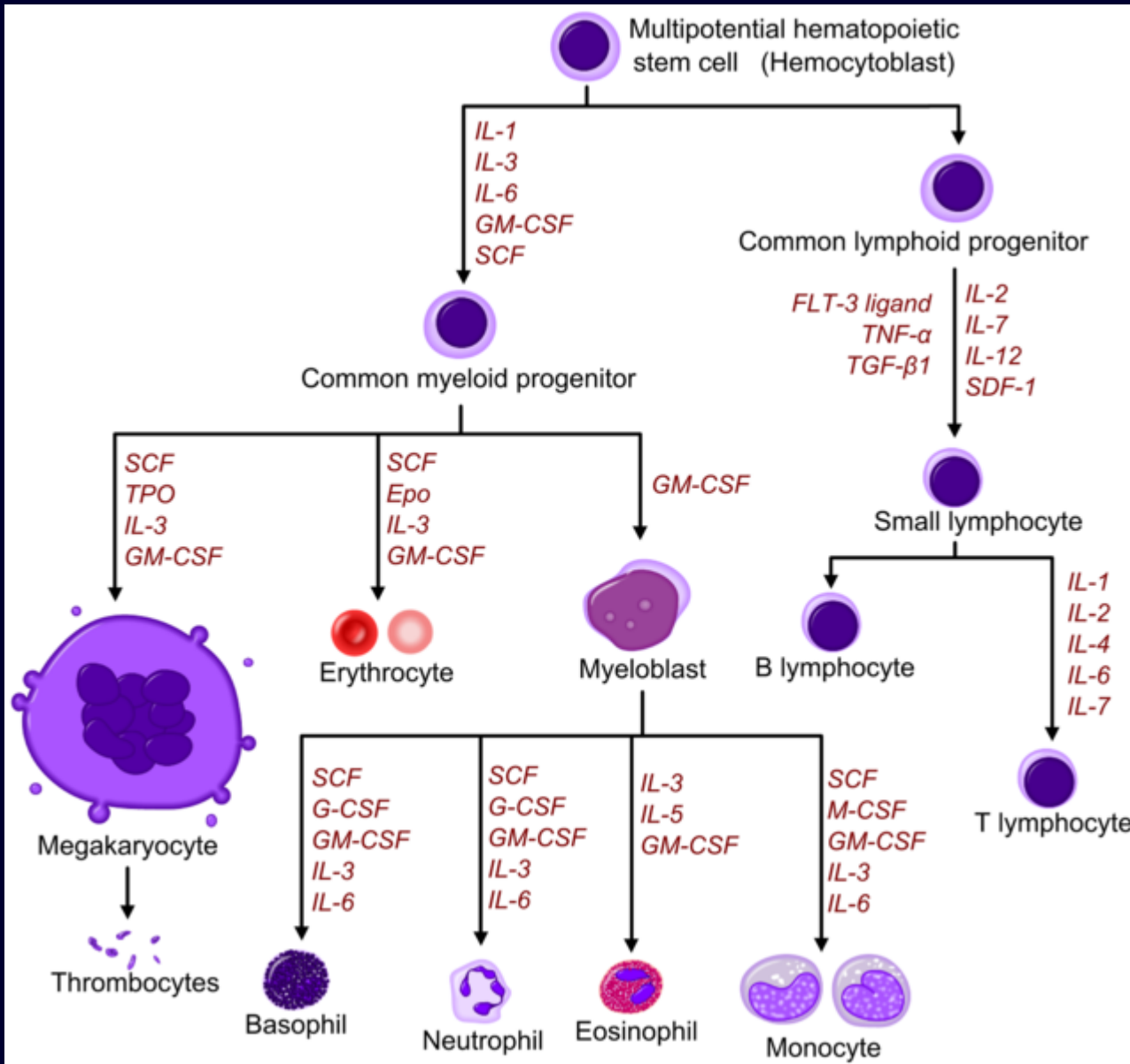
# Diferenciační potenciál hematopoetických kmenových buněk





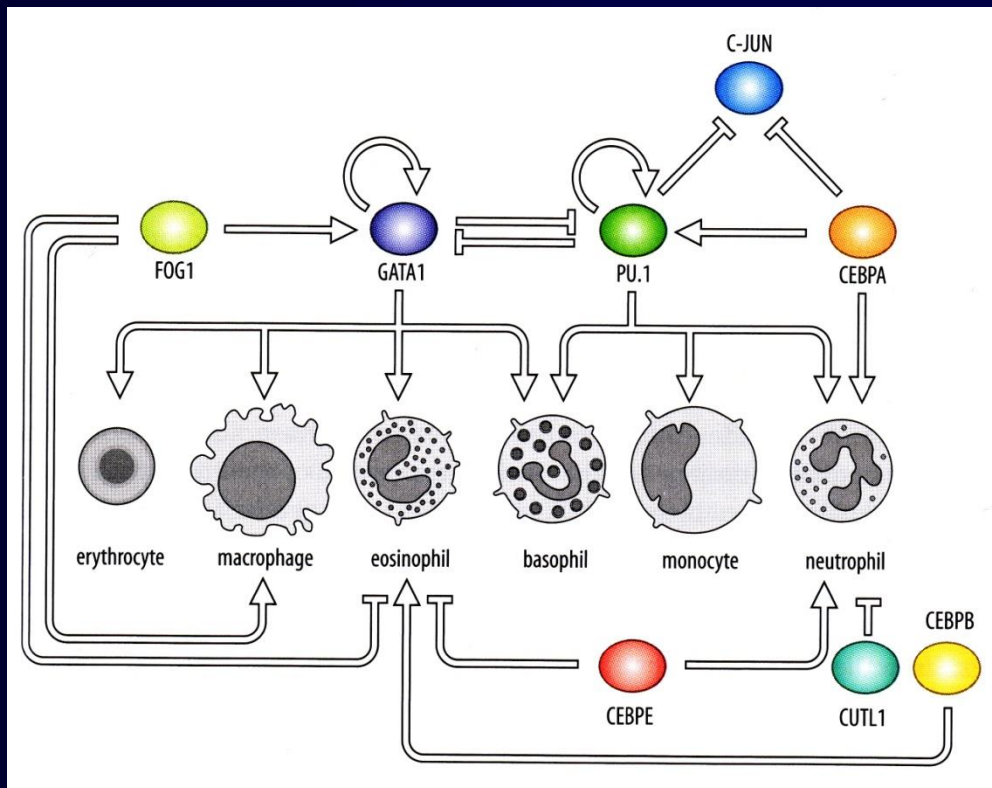
# Diferenciace krevních buněk

- vliv růstových faktorů a jiných cytokinů



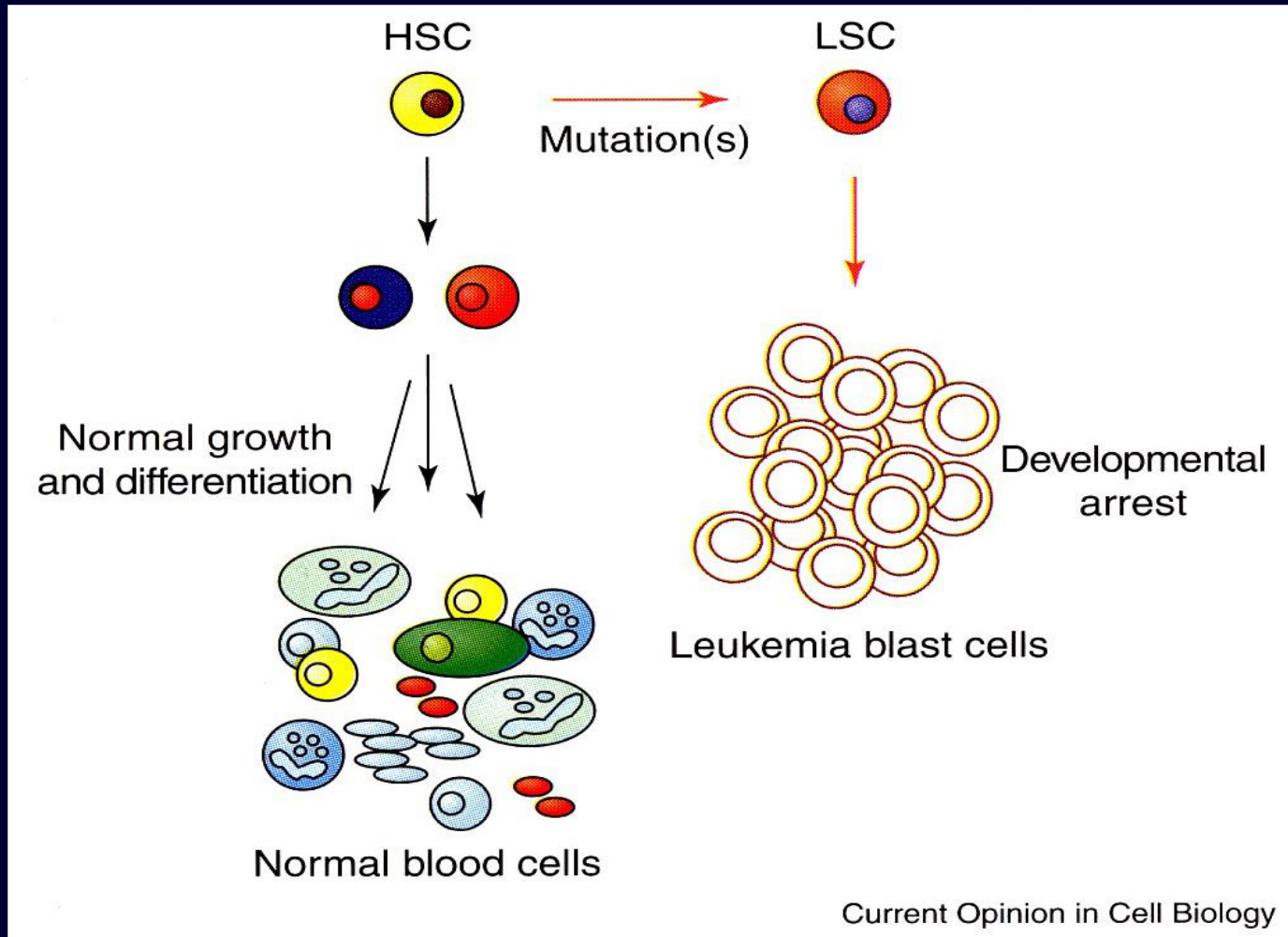
## Some hematopoietic growth factors and their target cells

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

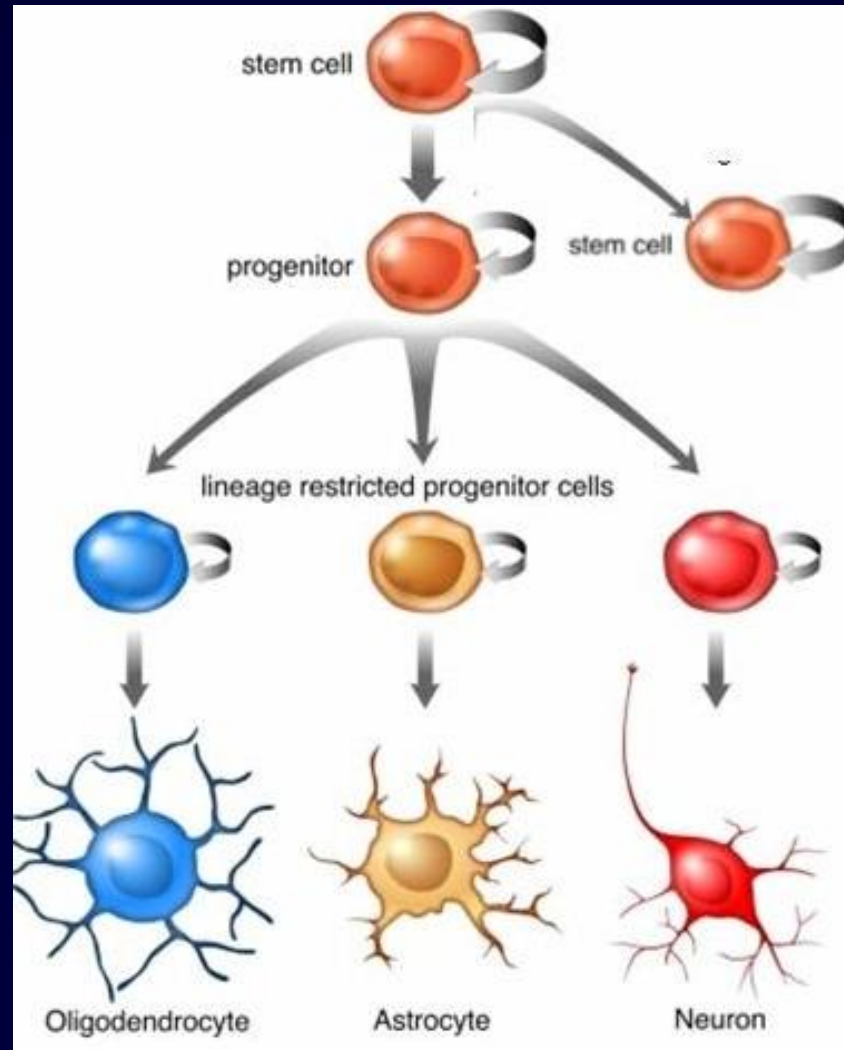


Vliv TFs na diferenciaci krevních buněk

# Porucha diferenciace krevních buněk



# Průběh neuronální diferenciace





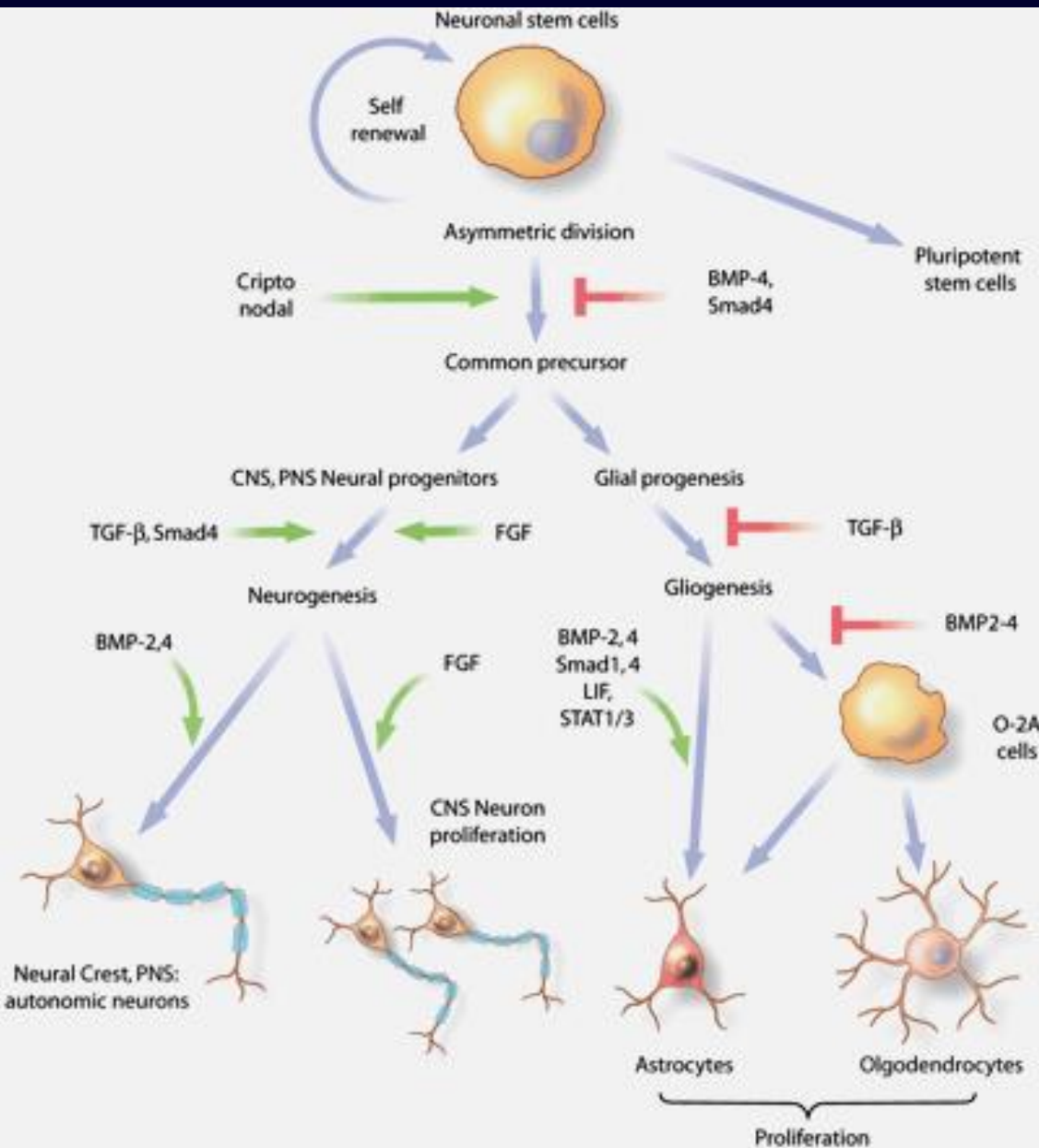
# Regulace neuronální diferenciace

## TGF- $\beta$ superfamily

- TGF-  $\beta$  (1-3)  
(transforming/tumor growth factor)
- BMPs  
(bone morphogenetic proteins)
- nodal
- activin

## Růstové faktory

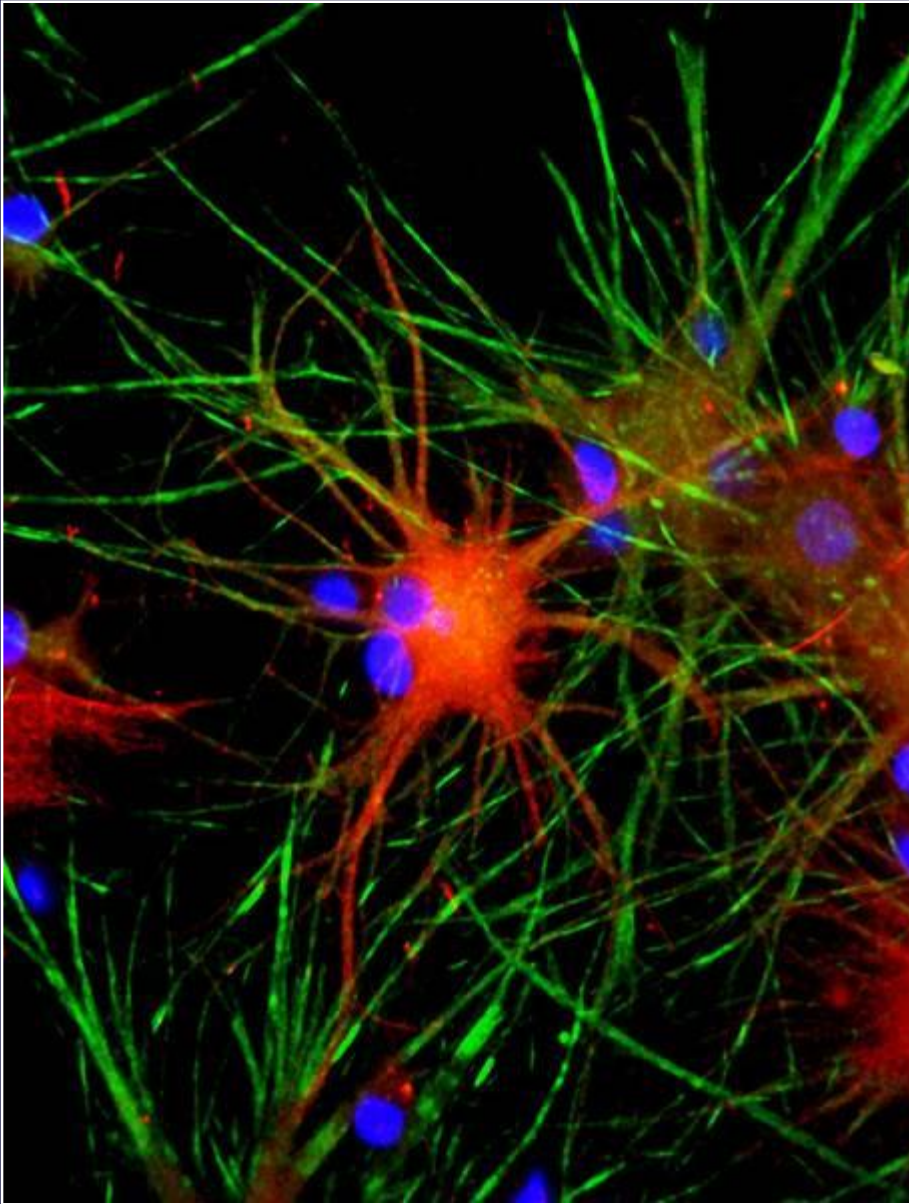
- FGF
- LIF

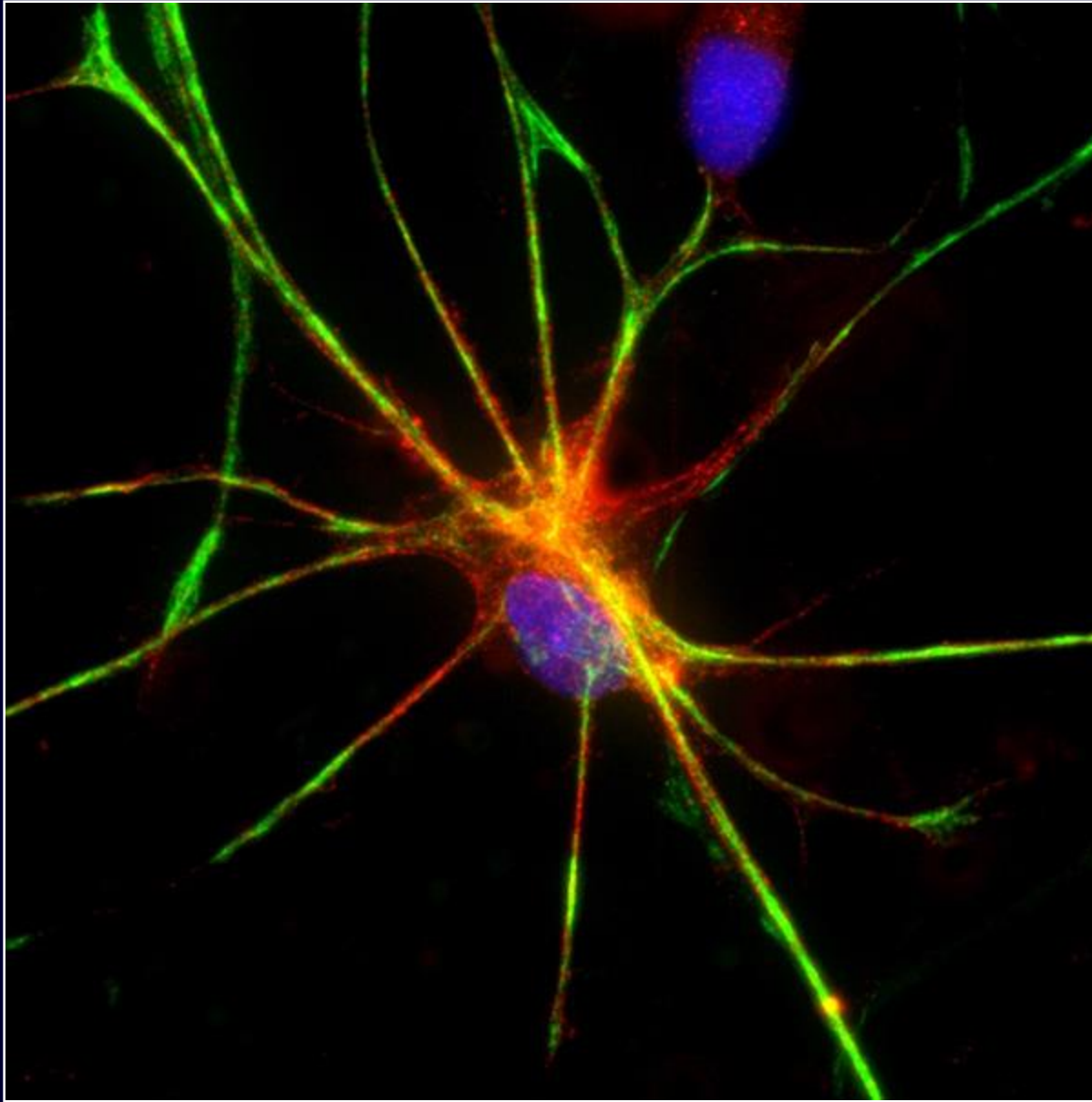


# Neuronální diferenciace

## Kmenová buňka:

- nestin
- GFAP
- DNA





## Neuronální diferenciace

### Progenitorová buňka:

- $\beta$ -tubulin III
- GFAP
- DNA

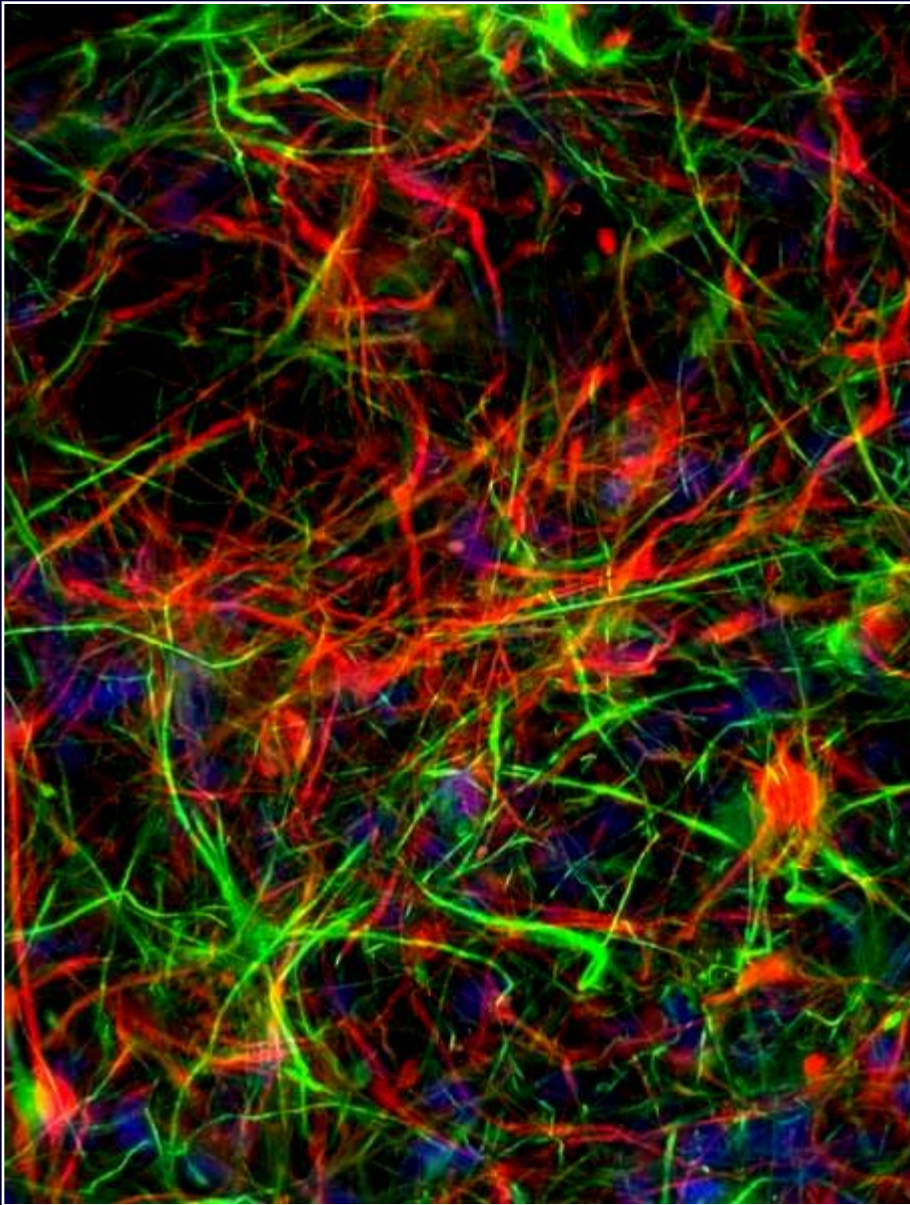
# Neuronální diferenciaci

## Neurony:

- $\beta$ -tubulin III
- DNA

## Gliové buňky:

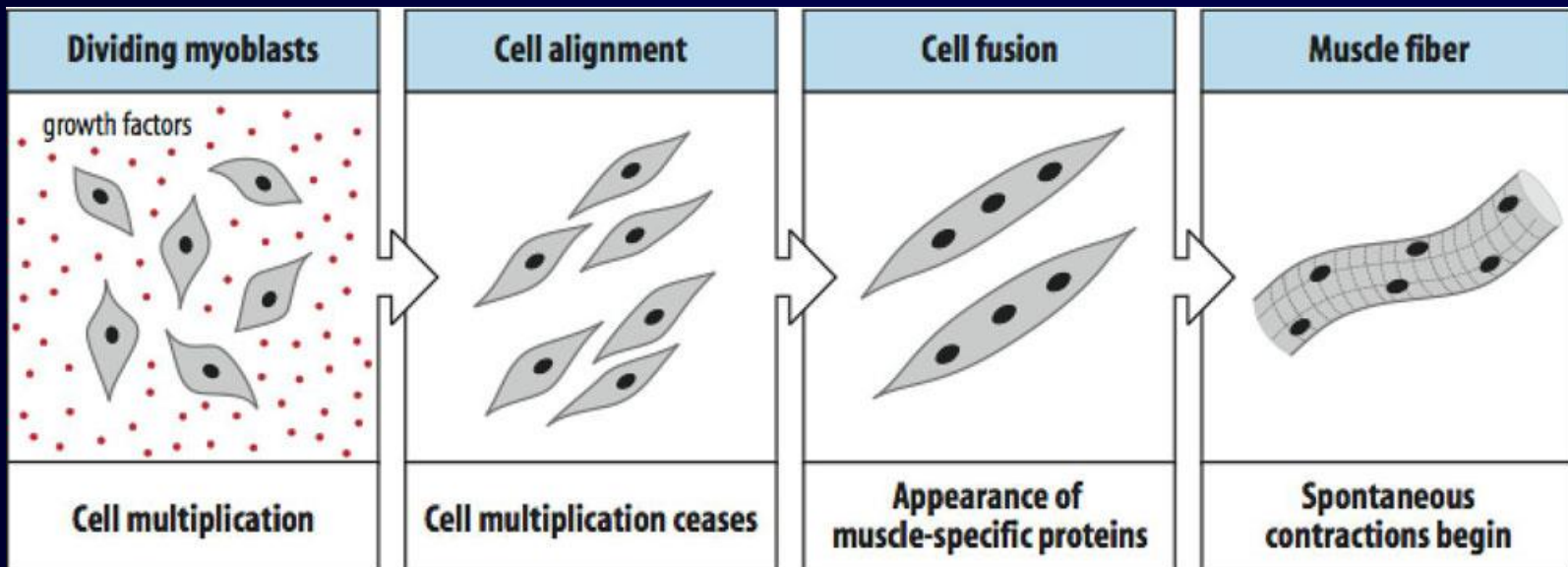
- GFAP
- DNA



# Diferenciace příčně pruhované svaloviny

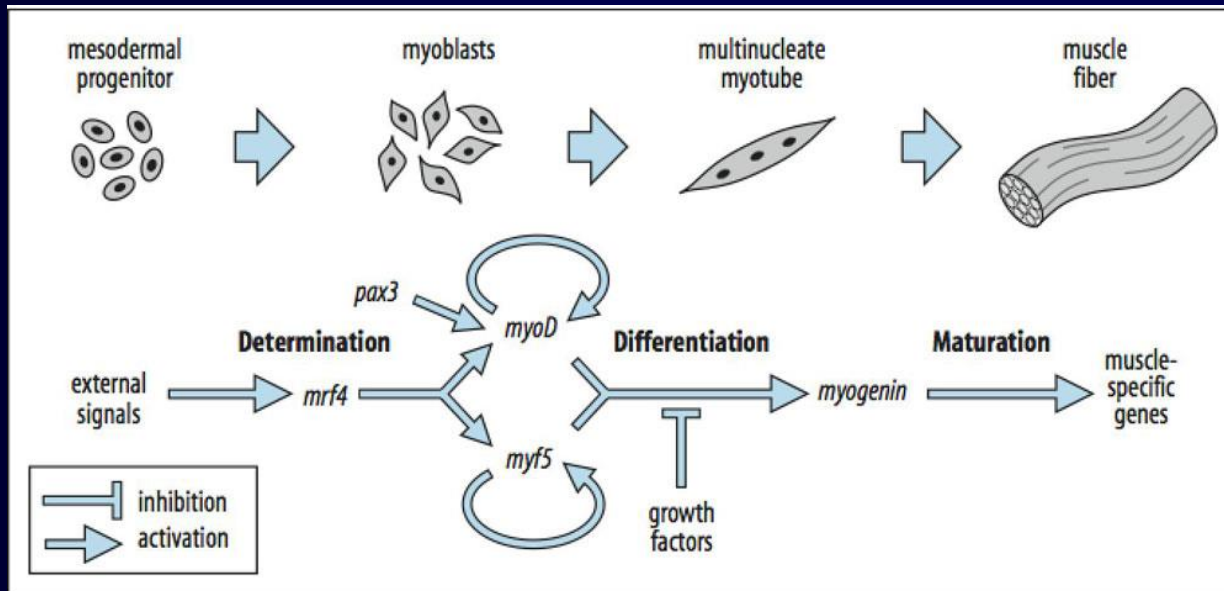
diferenciaci doprovází

- zástava buněčného cyklu
- změna morfologie
- fúze v syncytia



# Diferenciace příčně pruhované svaloviny

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

- signální proteiny ovlivňující buněčnou proliferaci, diferenciaci a imunitní odpověď  
(interleukiny, INFs, G-CSF, GM-CSF, chemokiny...)



# Příklady růstových faktorů

## EGF (Epidermal Growth Factor)

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

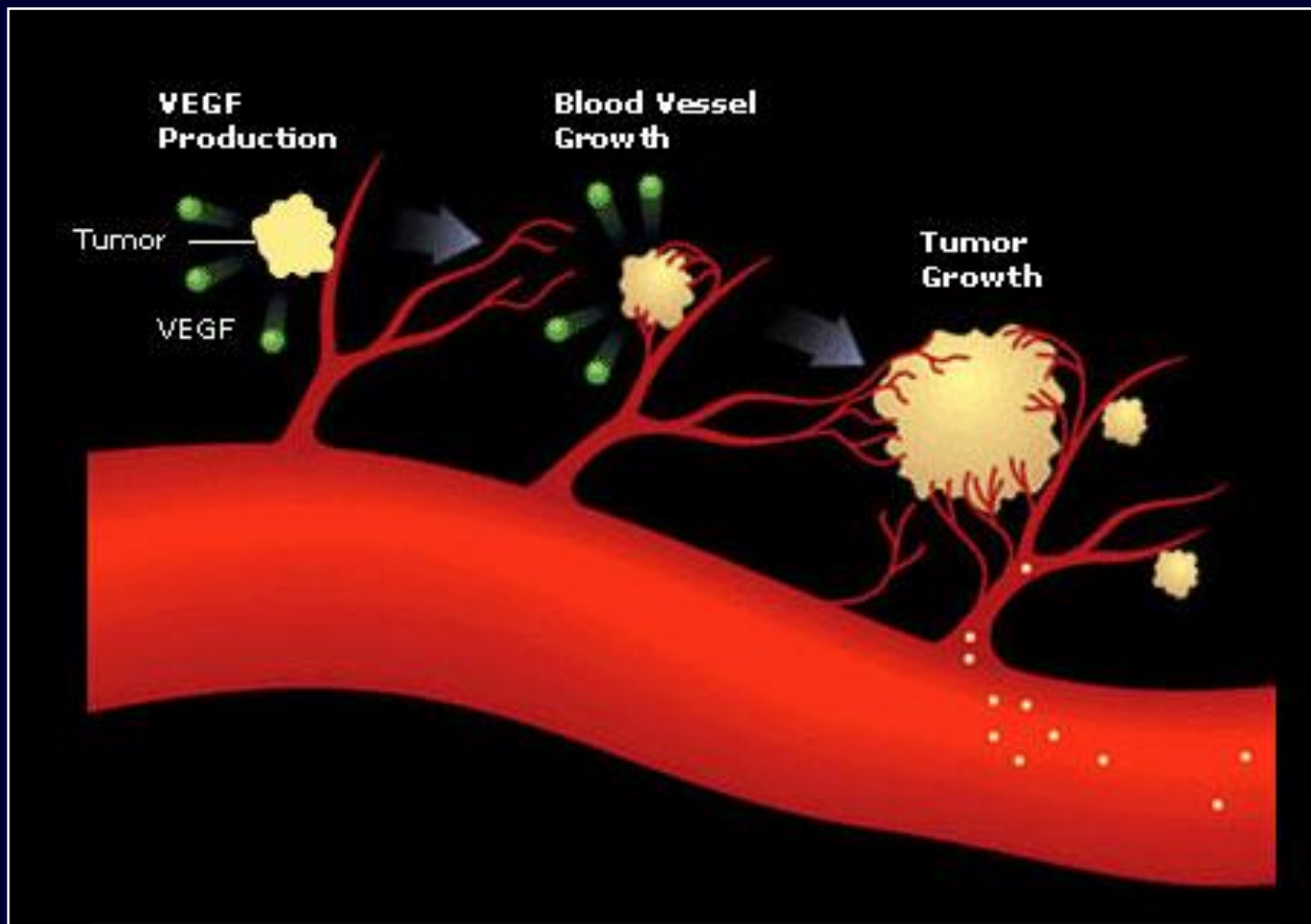
## FGF Family (Fibroblast Growth Factor)

- 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/Tumor Growth Factor)

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

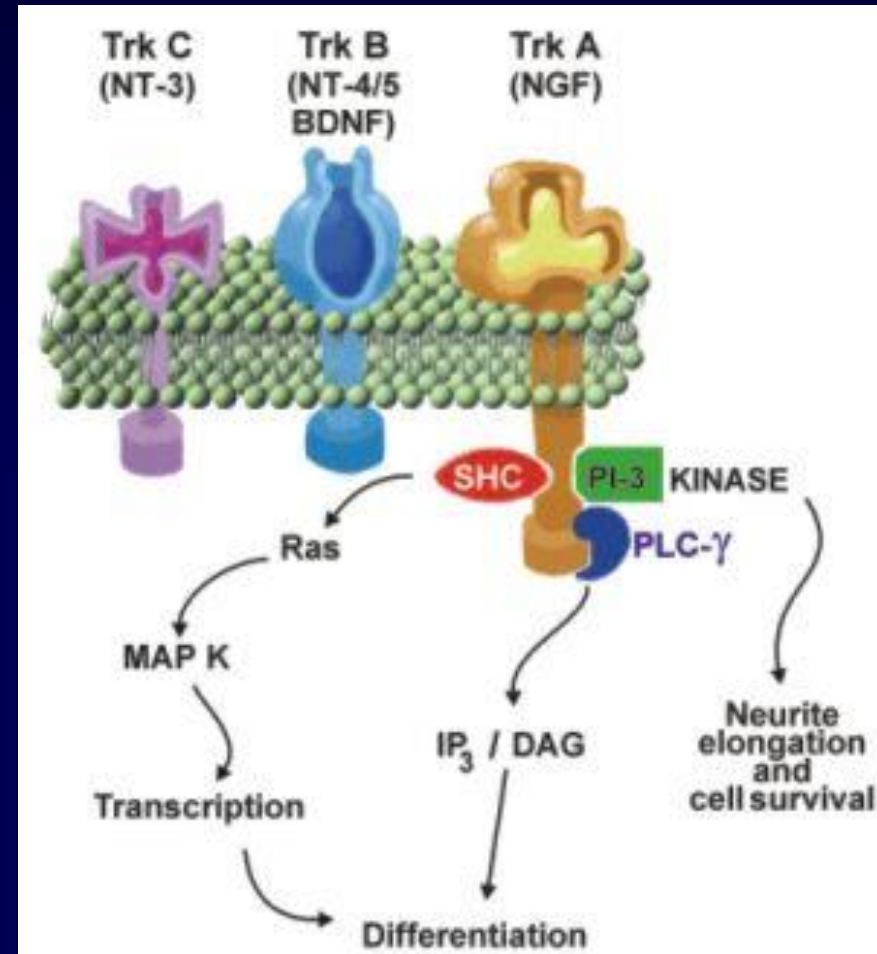
## Neurotrofiny (Neurotrophins)

- produkovány cílovou tkání → přežívání neuronů, neuronální diferenciace

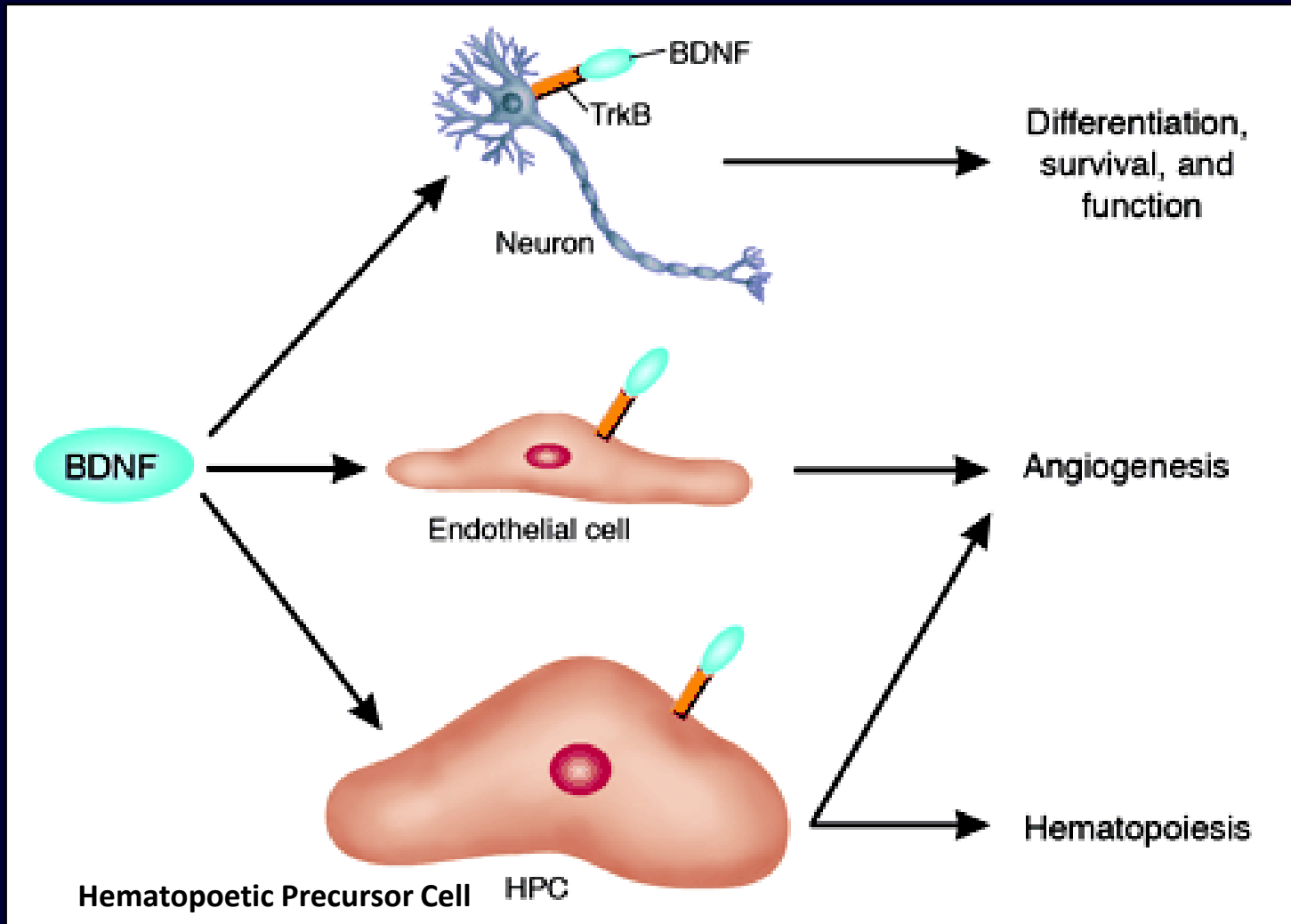
- receptory:

p75, Trk receptory (A,B,C)

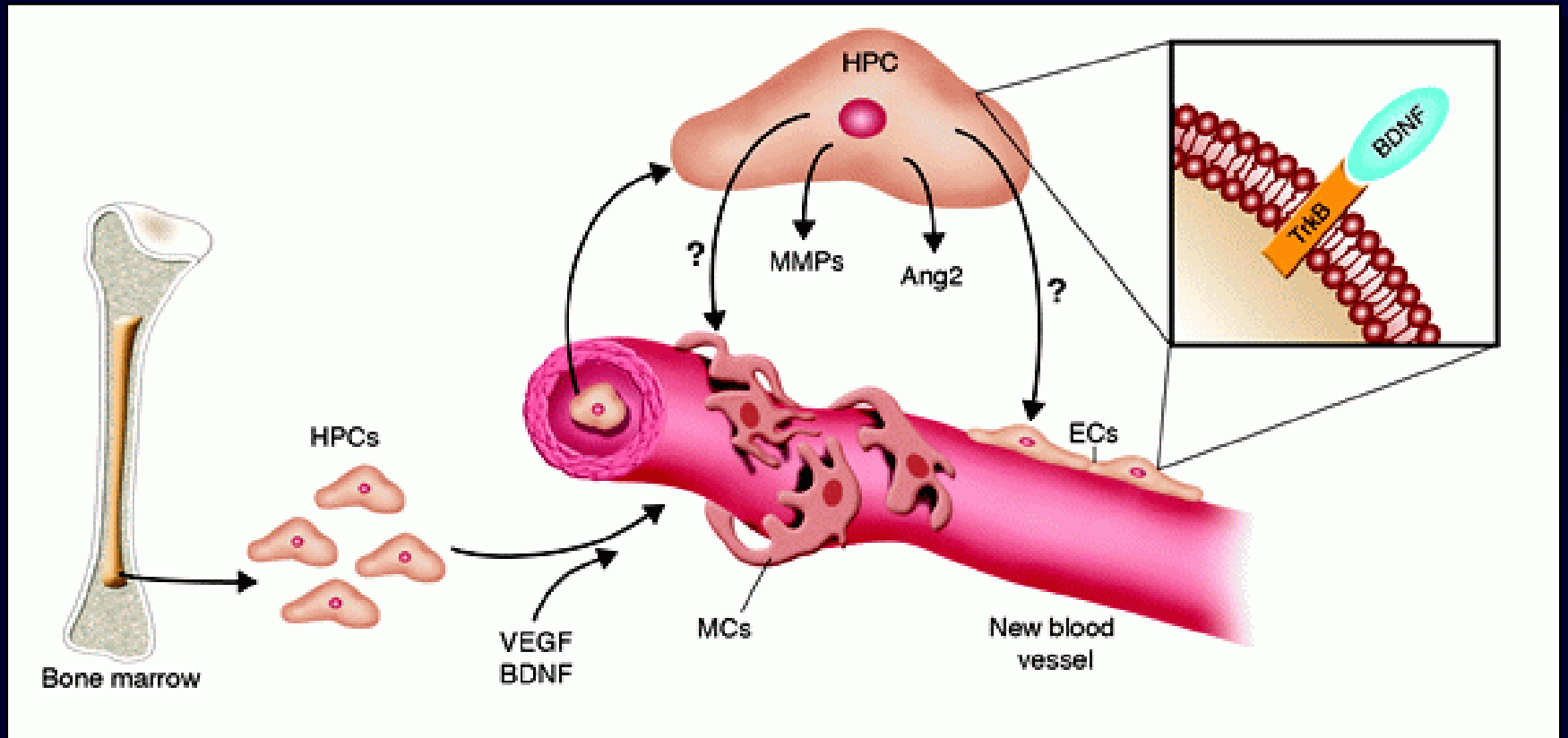
- NGF (nerve growth factor)
- BDNF (brain-derived neurotrophic factor)
- NT-3 (neurotrophin-3)
- NT-4 (neurotrophin-4)



# Pleiotropní efekt BDNF



# BDNF-indukovaná neovaskularizace



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

## Příklady cytokinů

### 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)

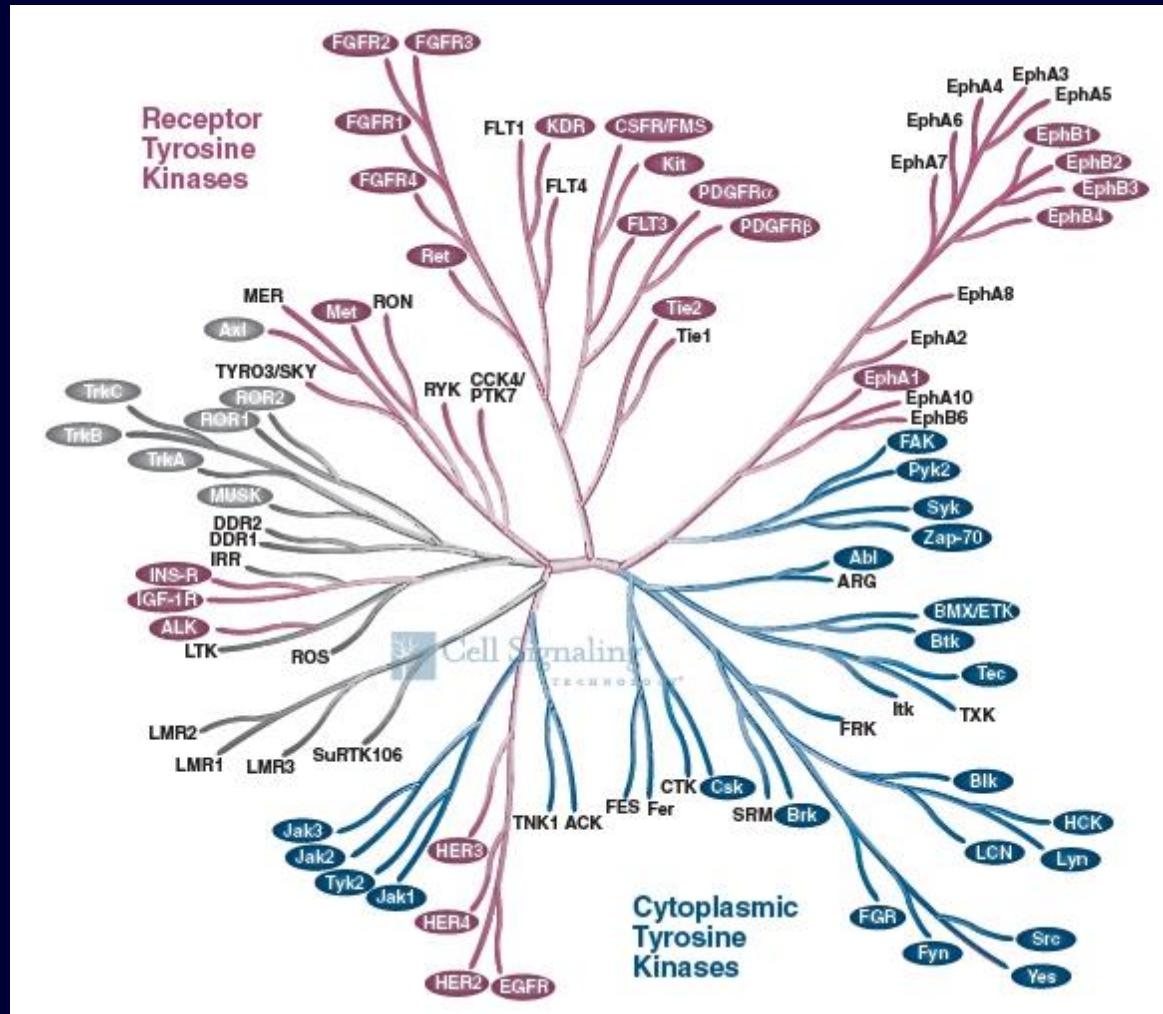
- stimulace tvorby granulocytů/neutrofilů

### GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)

# RECEPTOROVÉ TYROZIN-KINÁZY

funkce: regulace proliferace, diferenciace, metabolismu, aj.

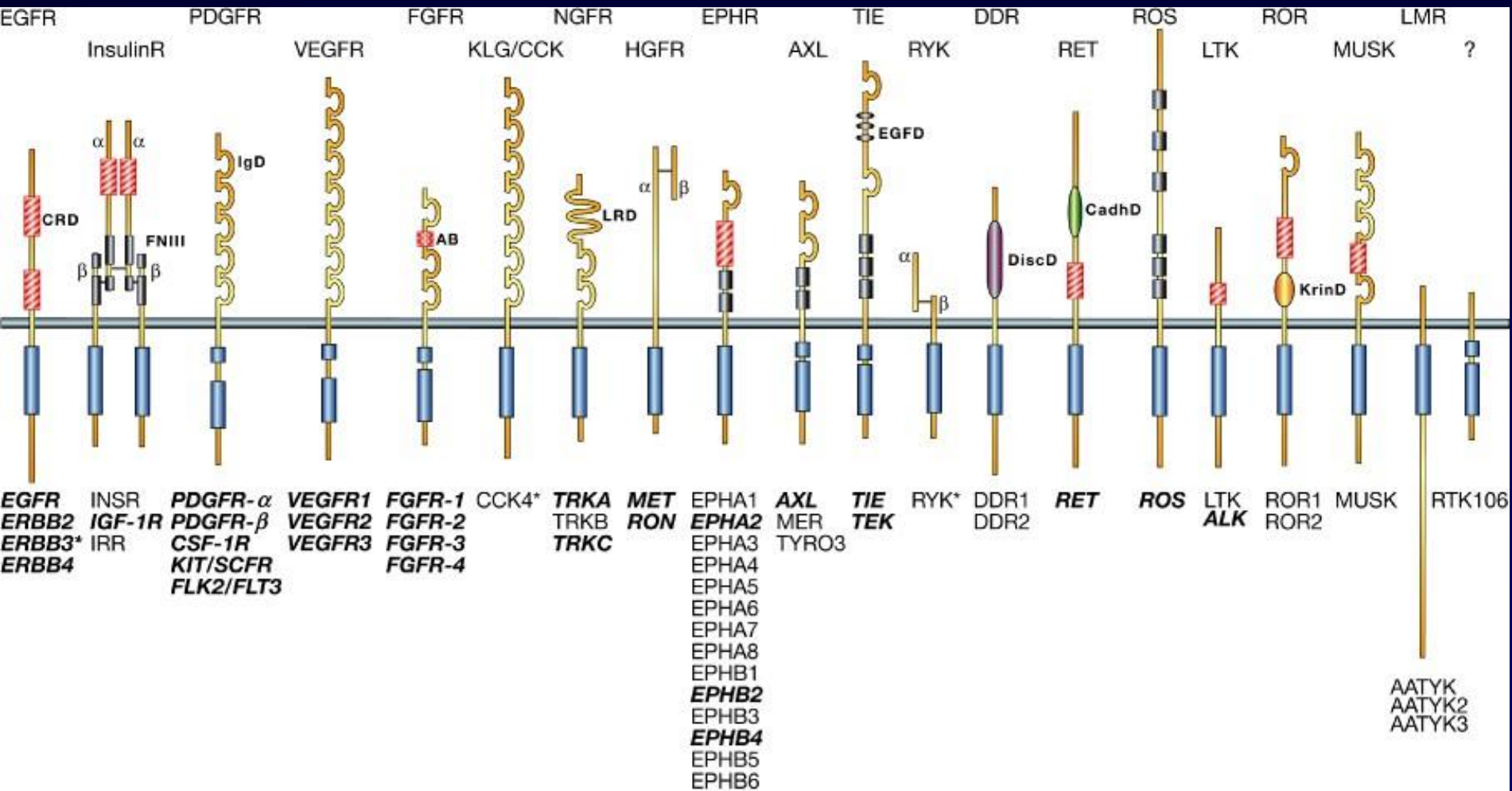
lidský genom : 59 genů (+alternativní sestřih) → 20 receptorových rodin





# DOMÉNY :

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

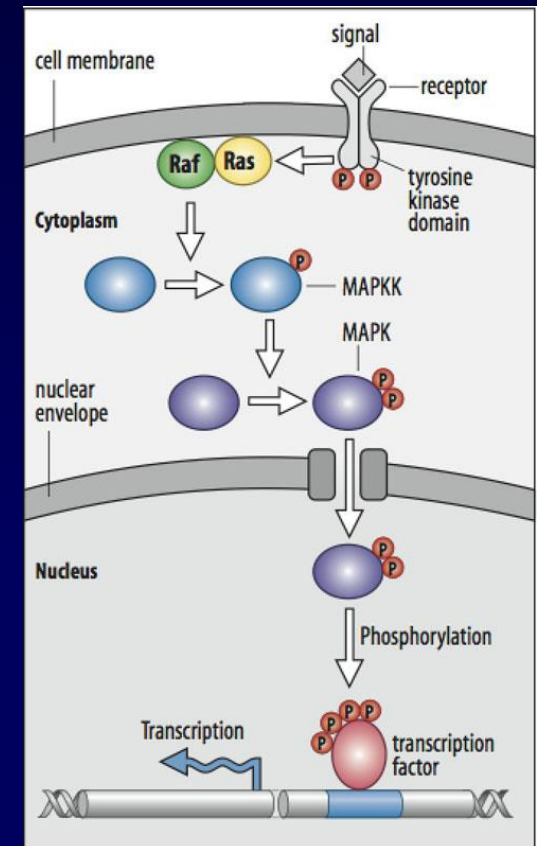
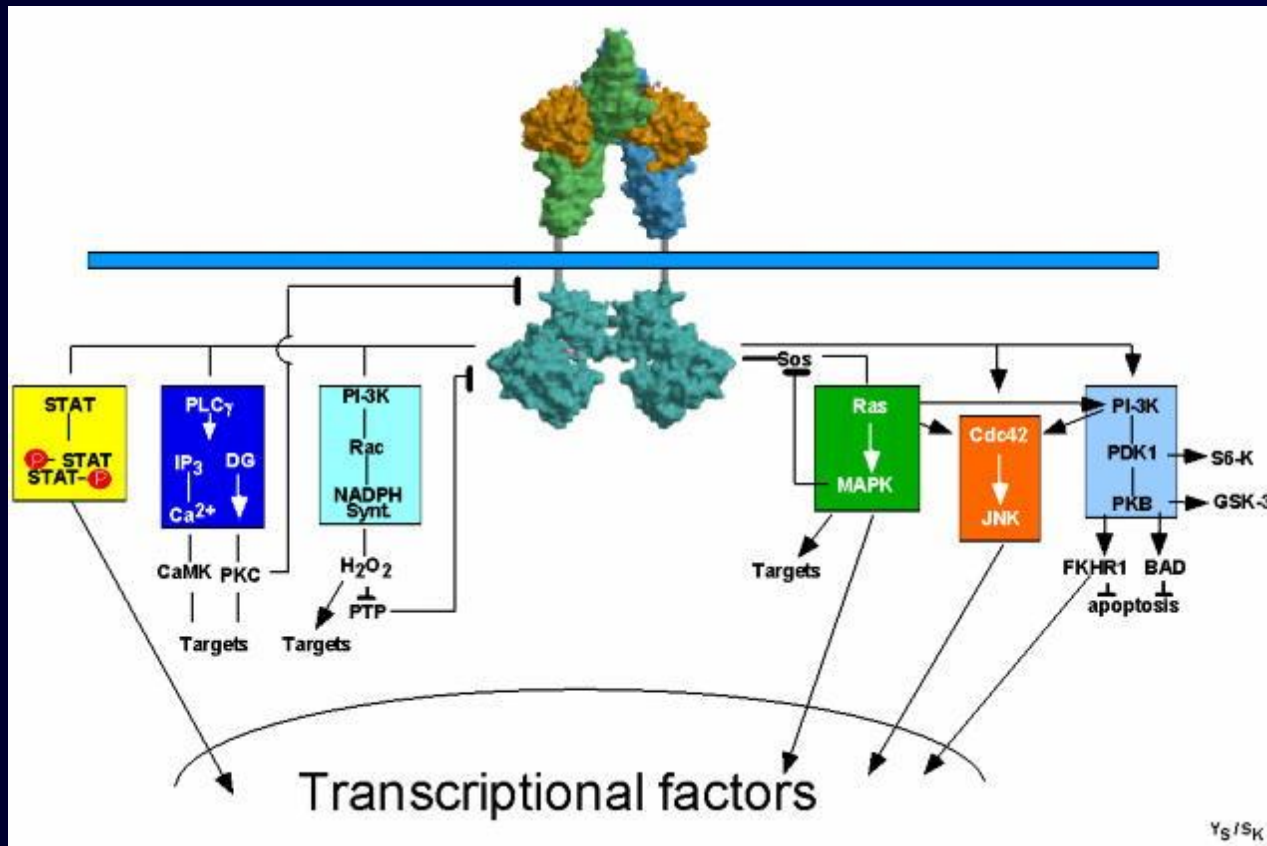


# AKTIVACE:

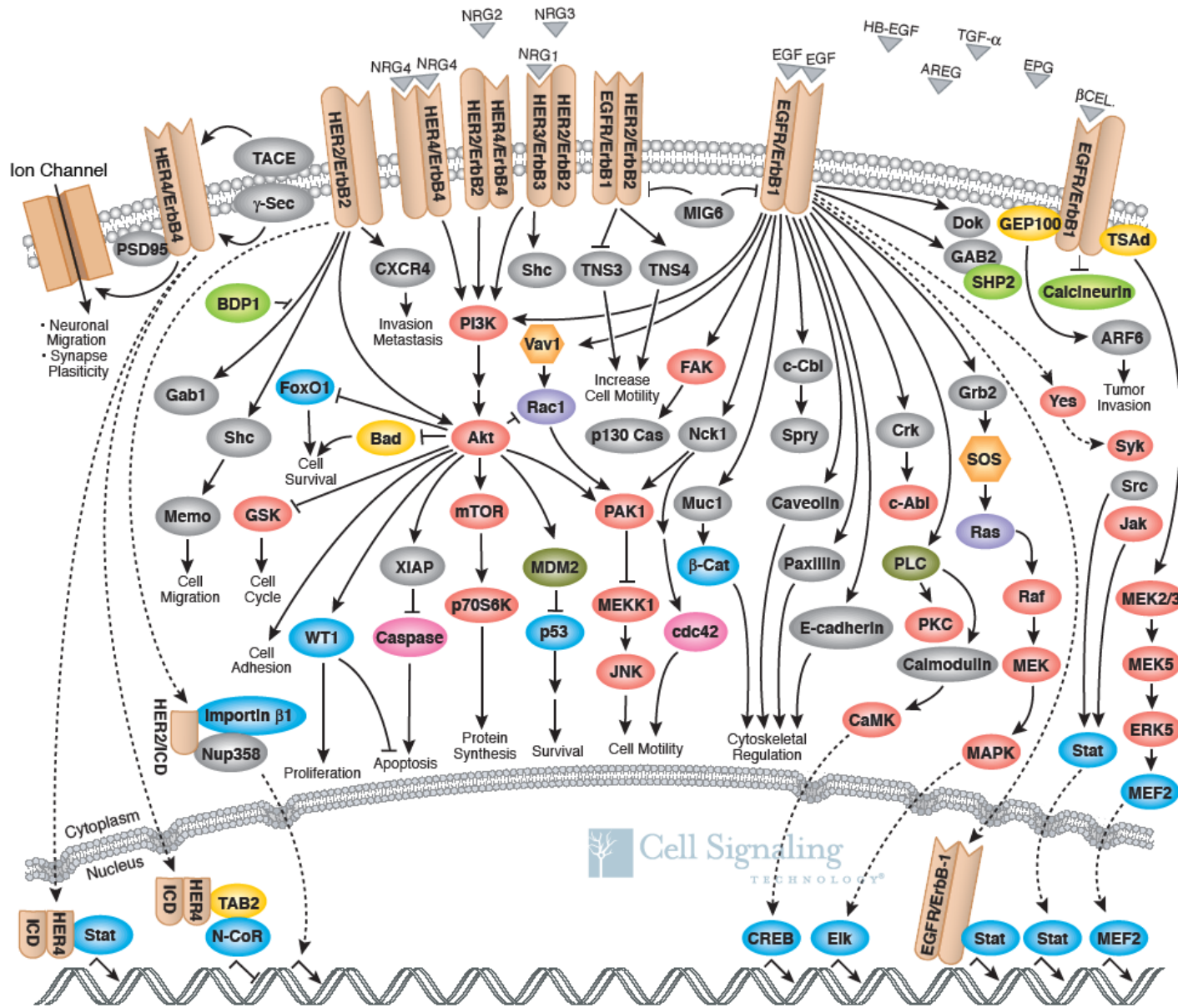
dimerizace vlivem růstových faktorů → cross-fosforylace

a) → konformační změna – stimulace katalytické aktivity

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



# ErbB/HER Signaling Network



# INDUKOVANÁ DIFERENCIACE



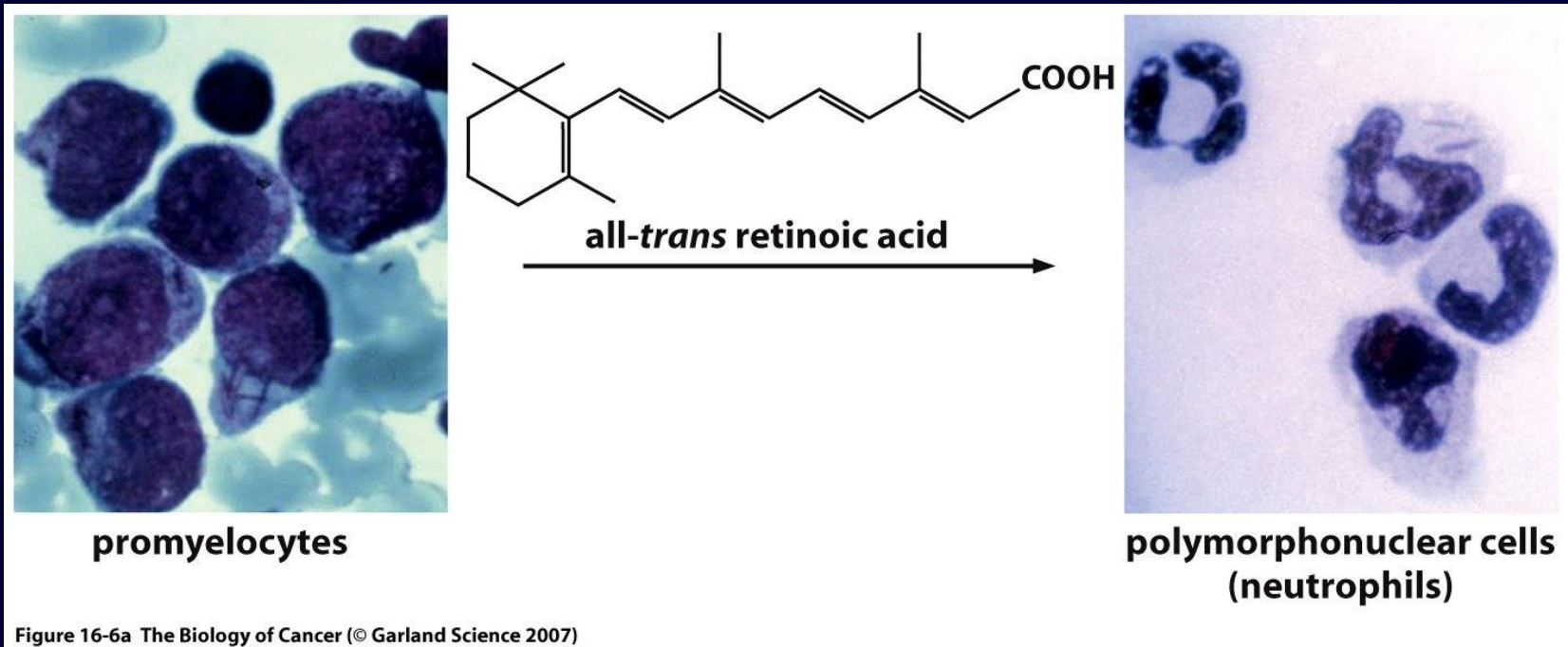
## Indukovaná diferenciac

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

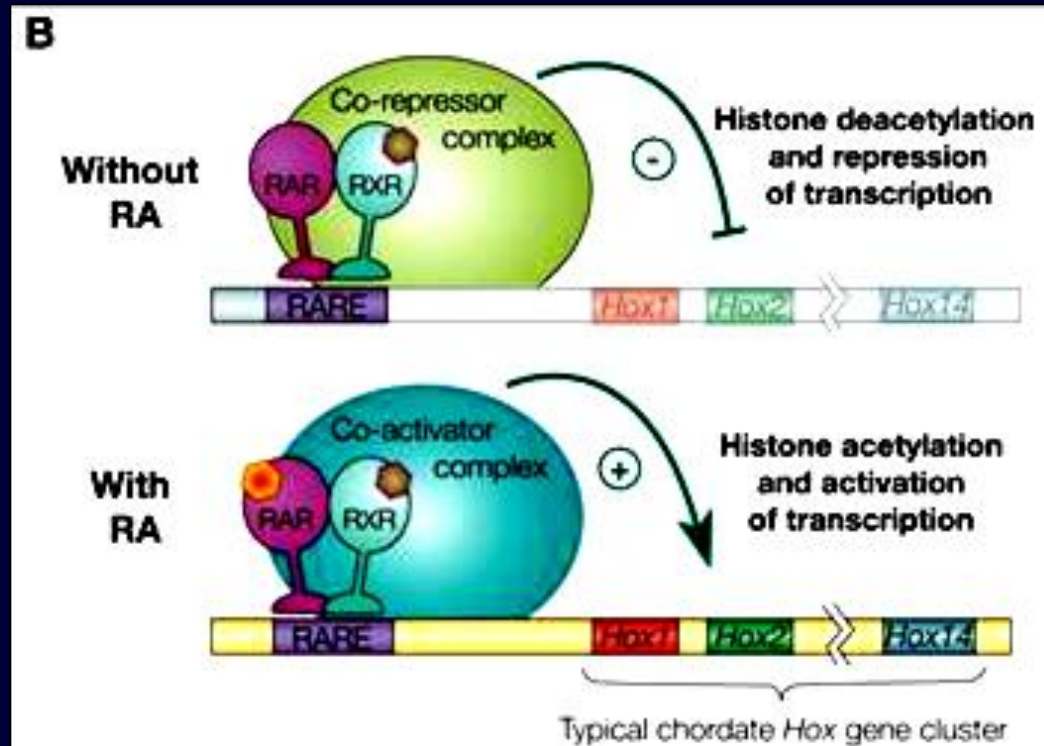
## Příklady induktorů diferenciac *in vitro*:

- 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)...

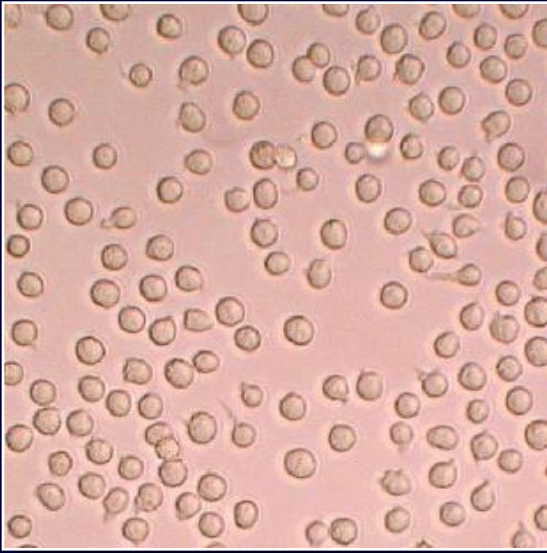
# Kyselina *all-trans* retinová (ATRA) jako induktor diferenciacie



# 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



## 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 D<sub>3</sub>

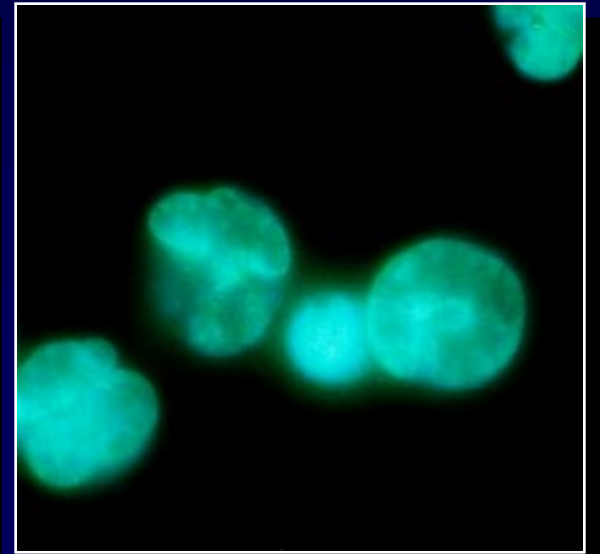
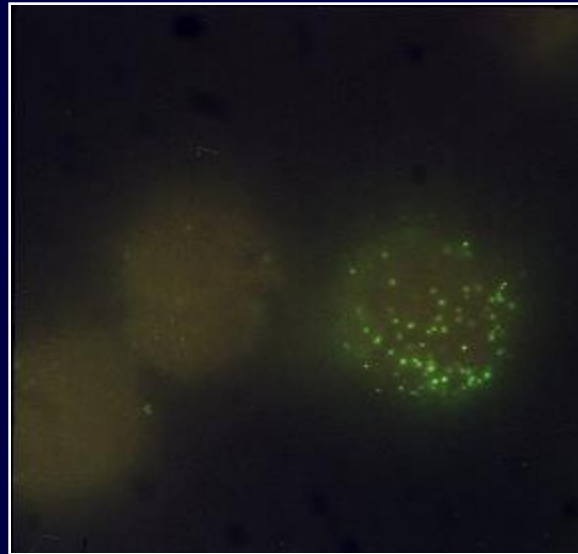
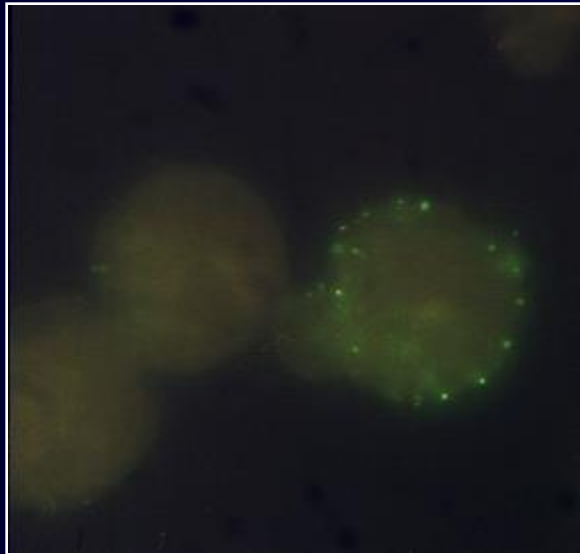


## Diferenciace linie HL-60 do stádia granulocytů:

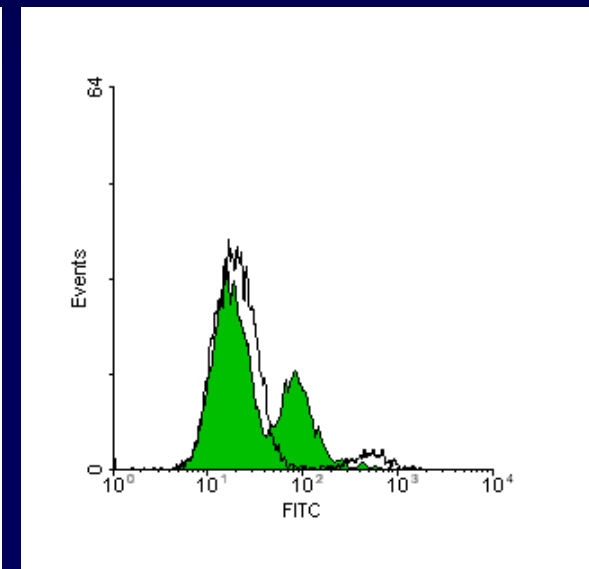
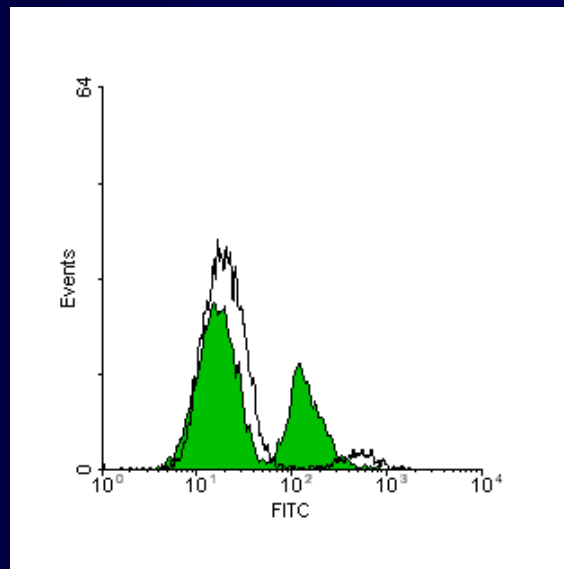
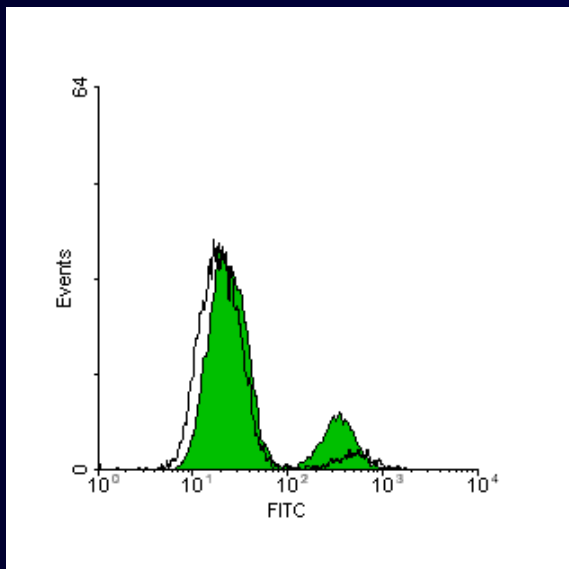
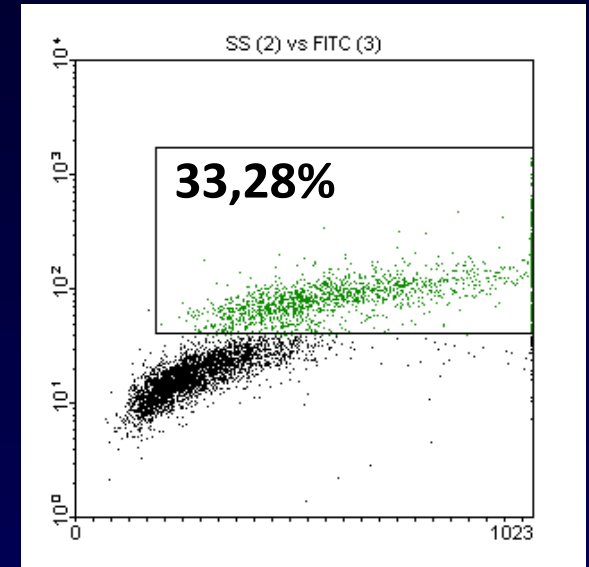
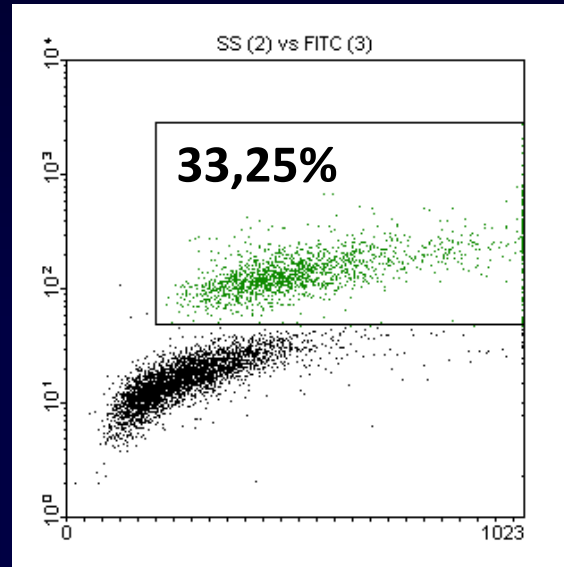
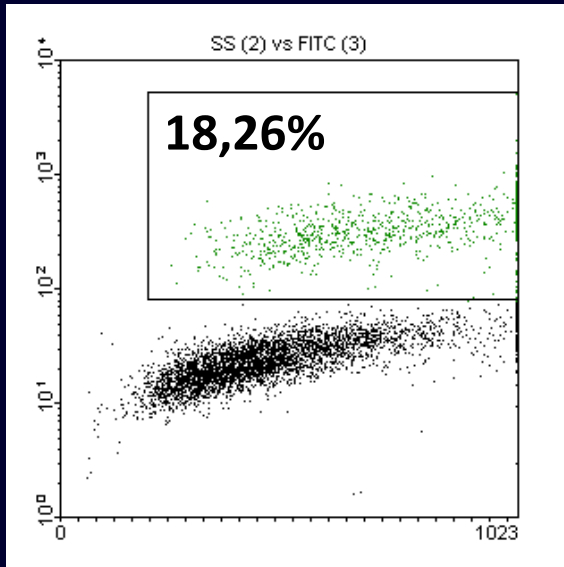
Induktor: 1mM kyselina *all-trans* retinová

Marker: CD-66b (CD-67)

Detekce: anti-CD66b, SwAM-FITC



# Granulocytární diferenciace HL-60: flow cytometrie / CD66b



1mM ATRA

1mM ATRA + 13mM CA

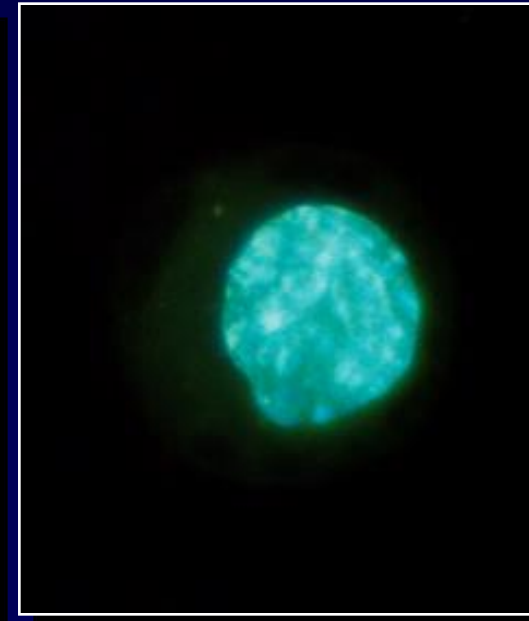
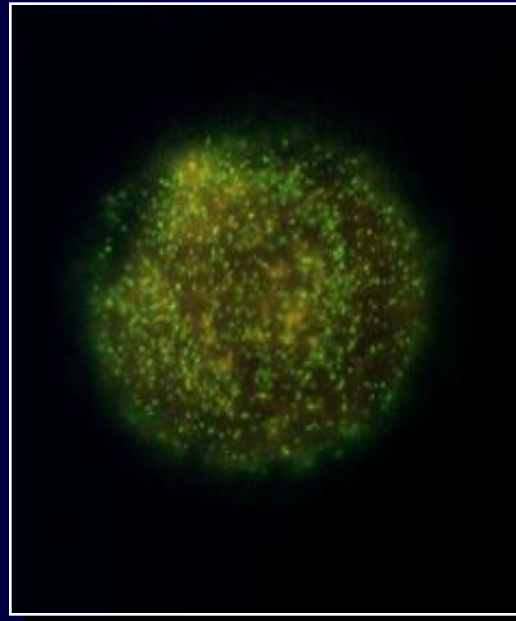
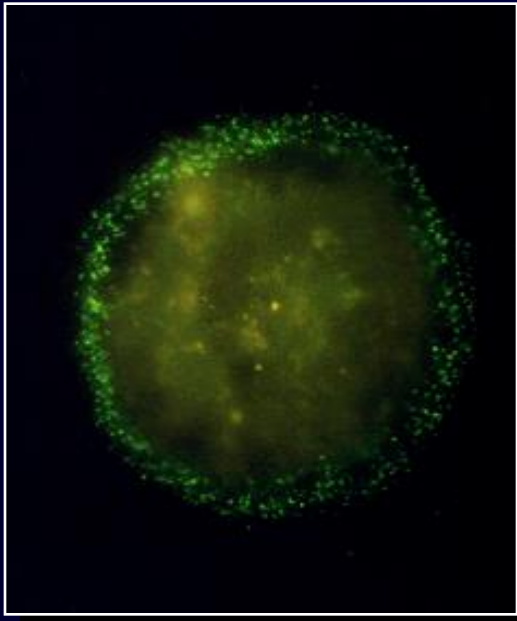
1mM ATRA + 52mM CA

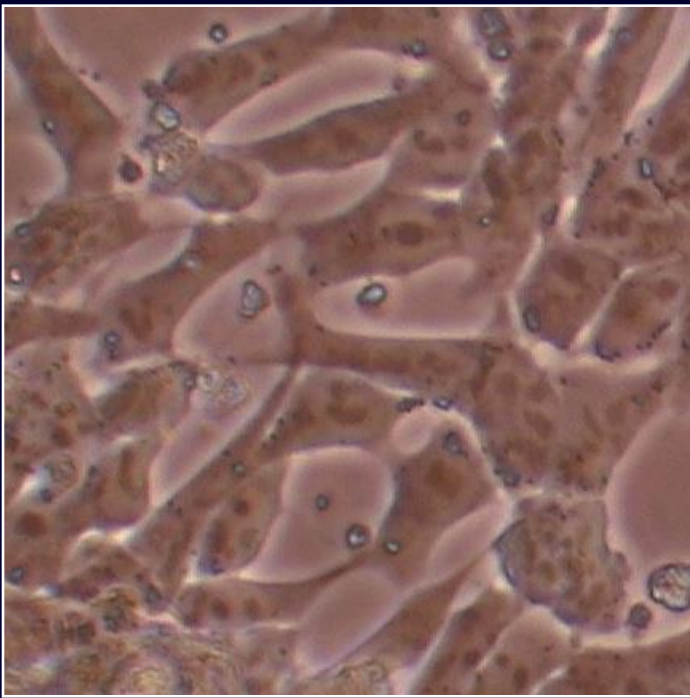
## Diferenciace linie HL-60 do stádia makrofágů:

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:**

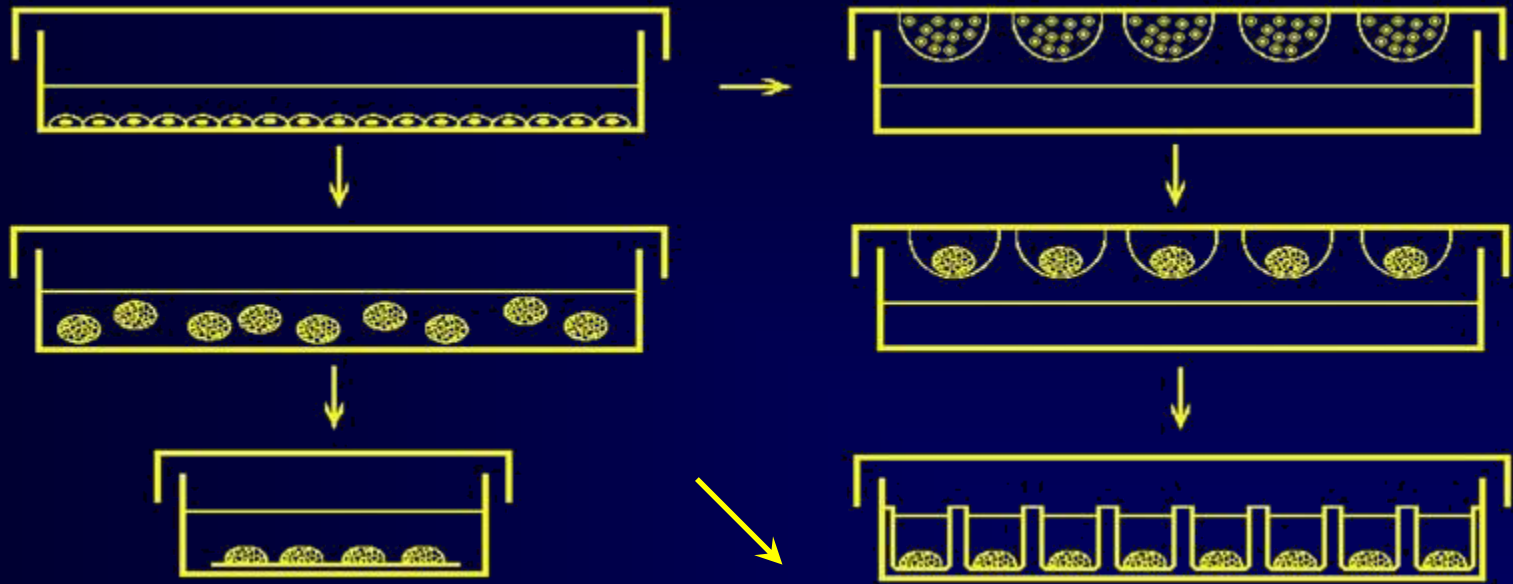
kyselina *all-trans* retinová (ATRA)

dimethylsulfoxid (DMSO)

- **induktor neuronální diferenciace:**

kyselina *all-trans* retinová (ATRA)

# Schéma diferenciacie buněk P19



metoda kultivace na  
bakteriologických miskách

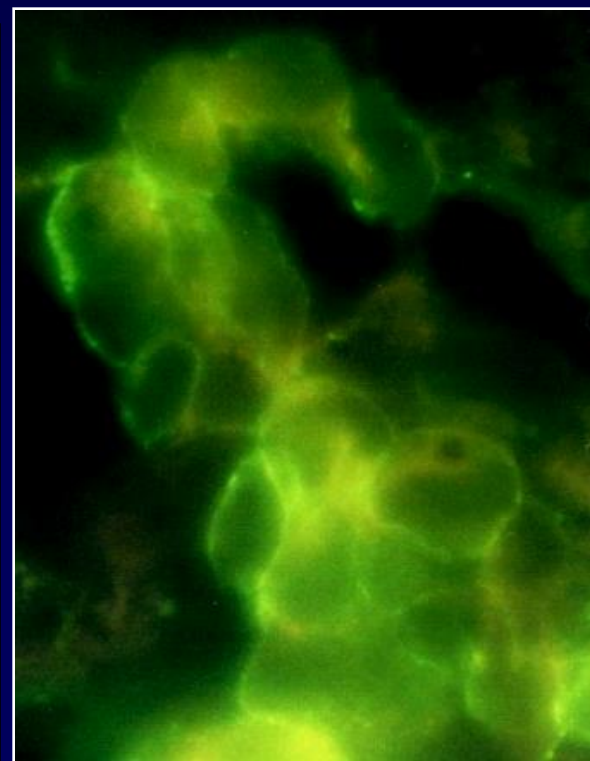
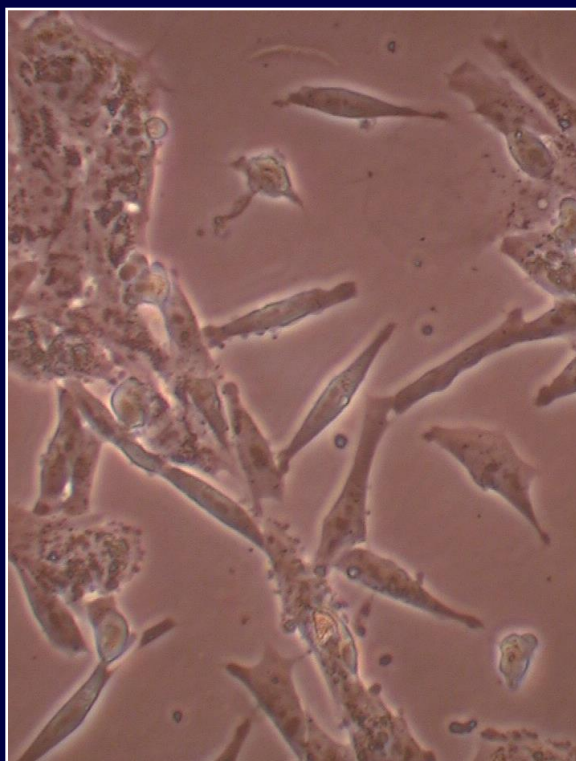
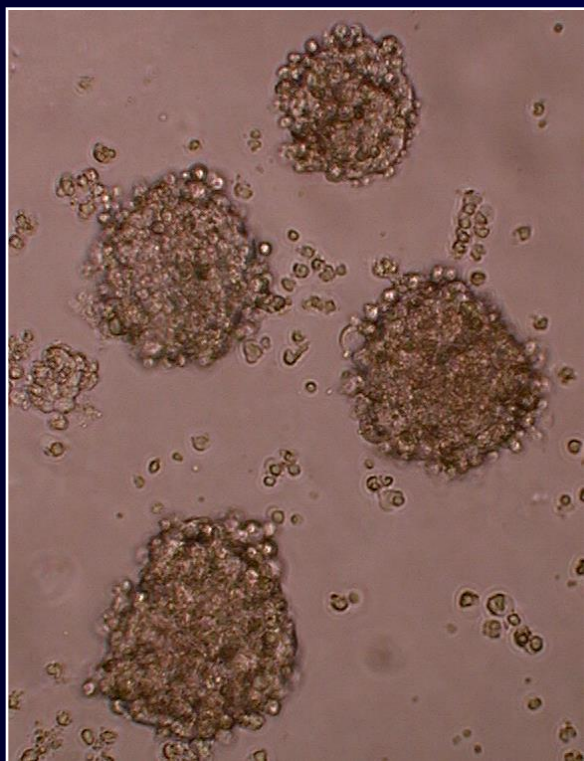
metoda „visících kapek“  
(hanging drops)

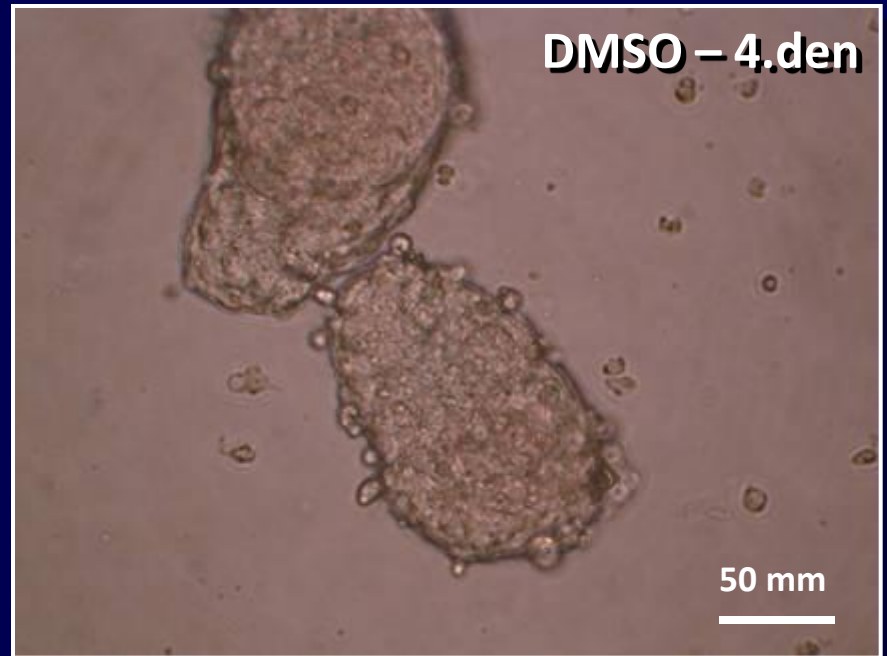
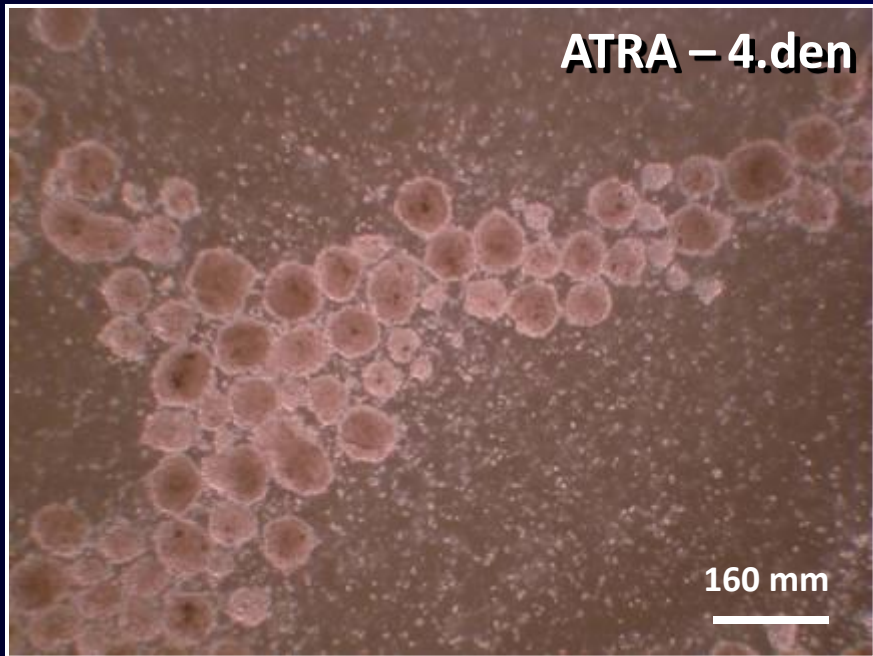
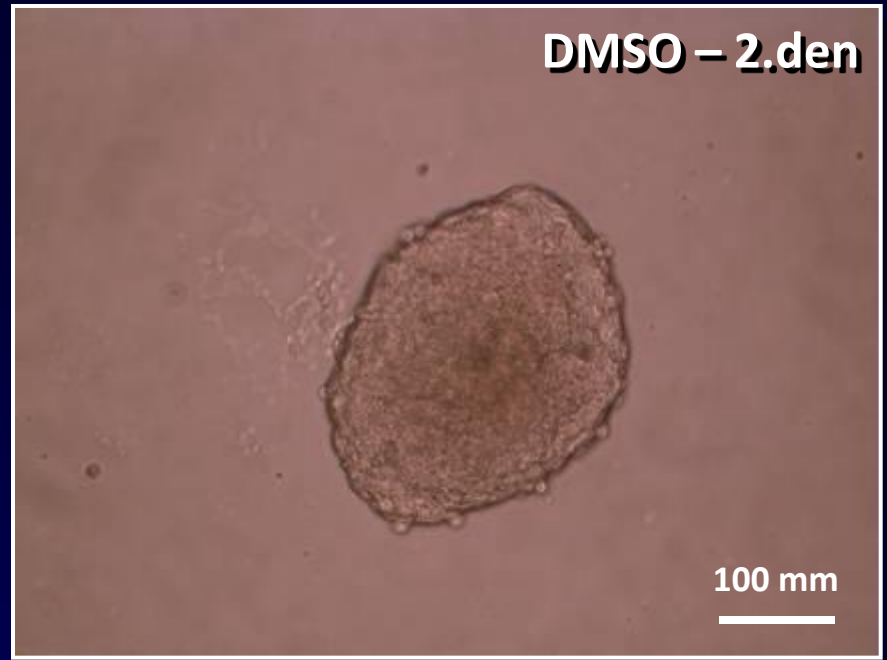
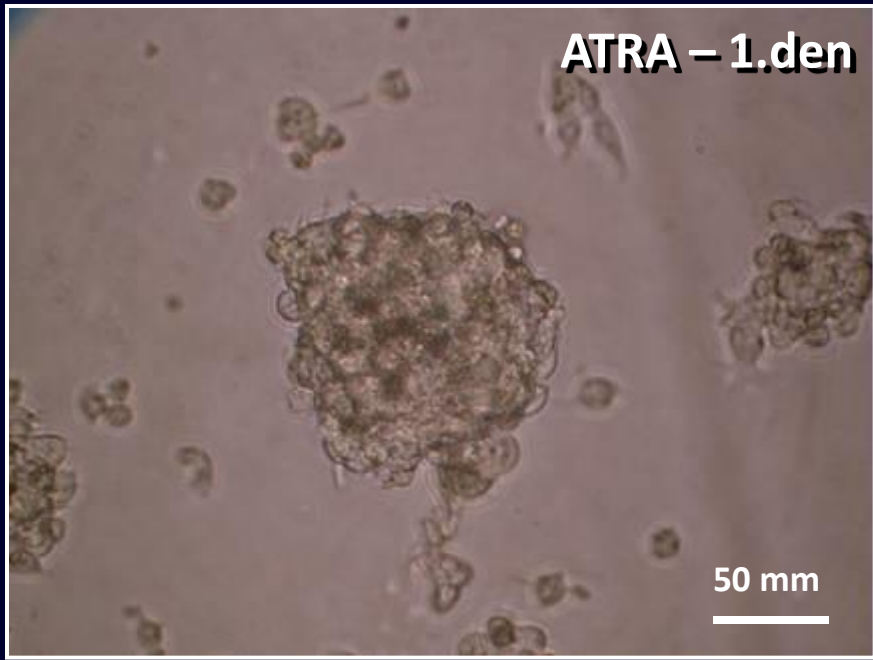
## Mesodermální diferenciaci buněk P19:

Induktor: 0,8% DMSO

Marker: myosin II

Detekce: anti-skeletal myosin, SwAM-FITC



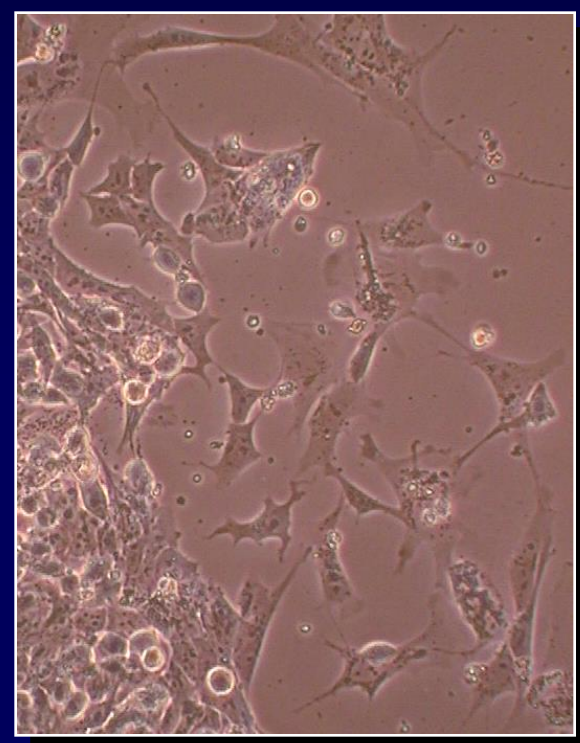
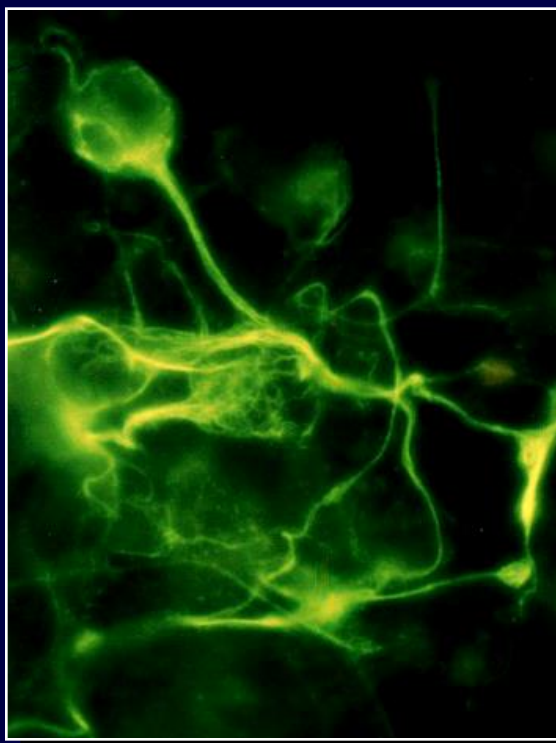
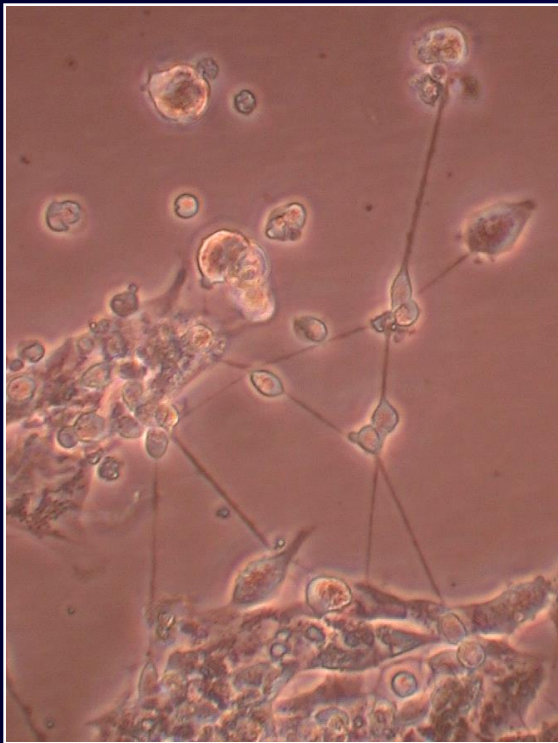


## Neuronální diferenciace buněk P19:

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

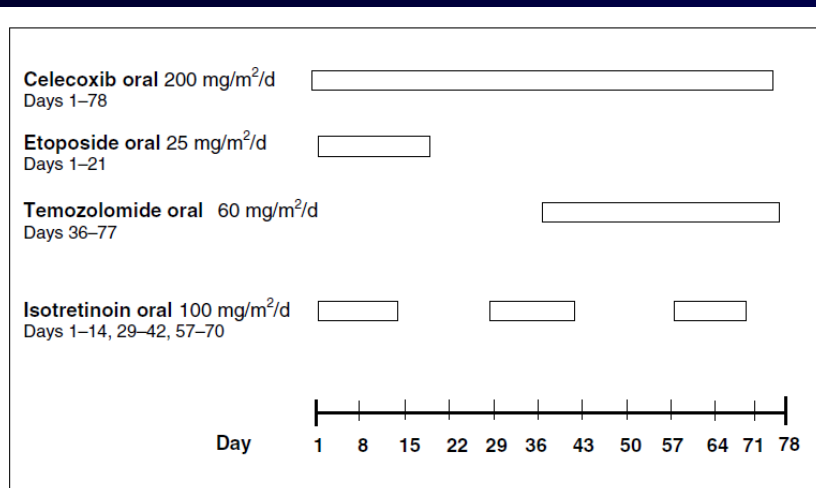
alkylační činidlo

apoptóza

kys. retinová

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](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<sup>a</sup> Dalibor Valik<sup>b</sup> Peter Mudry<sup>a</sup> Tomas Kepak<sup>a</sup> Zdenek Pavelka<sup>a</sup>  
Viera Bajciová<sup>a</sup> Karel Zitterbart<sup>a</sup> Vera Kadlecová<sup>a</sup> Pavel Mazanek<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pediatric Oncology, University Hospital Brno,

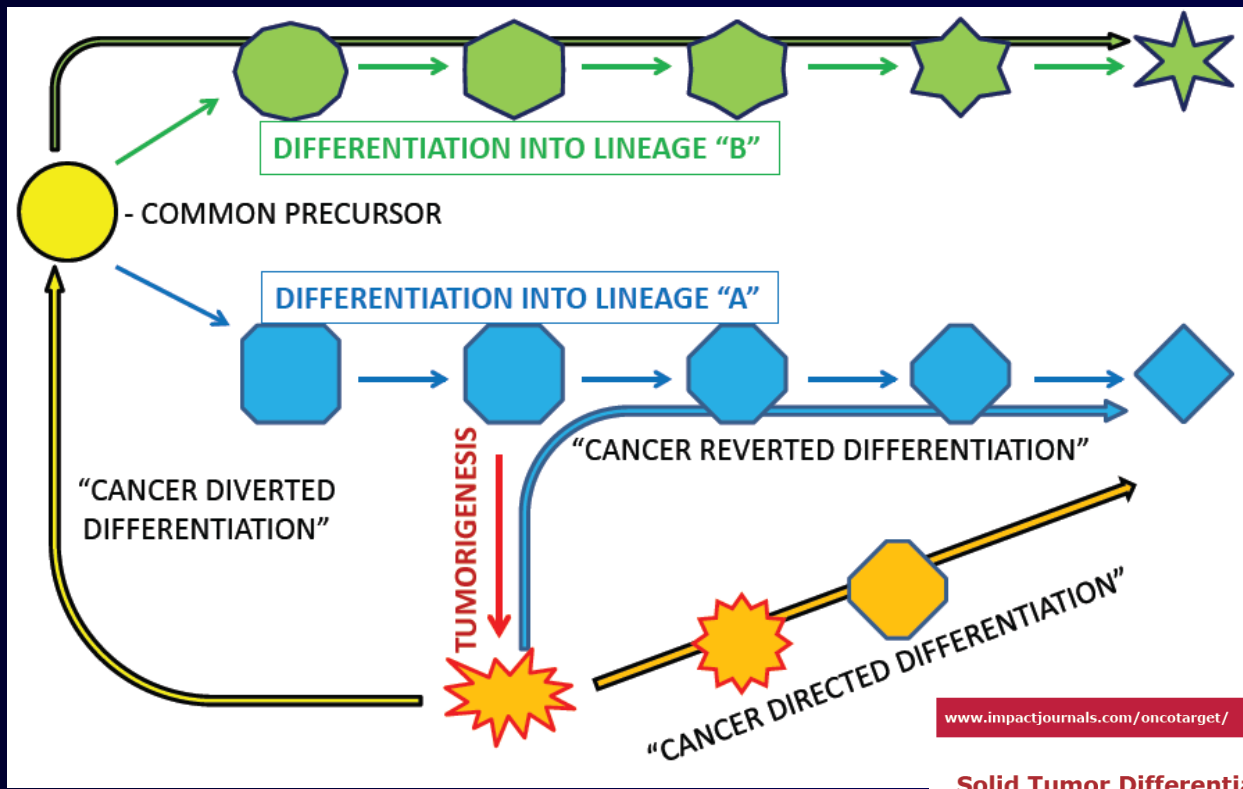
<sup>b</sup>Department of Laboratory Medicine, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

## Metronomic Chemotherapy with the COMBAT Regimen in Advanced Pediatric Malignancies: A Multicenter Experience

D. Zapletalová<sup>a</sup> N. André<sup>h,i</sup> L. Deak<sup>g</sup> M. Kyr<sup>a</sup> V. Bajciová<sup>a</sup> P. Mudry<sup>a</sup> L. Dubska<sup>f,j</sup>  
R. Demlova<sup>f,j</sup> Z. Pavelka<sup>a</sup> K. Zitterbart<sup>a</sup> J. Skotakova<sup>b</sup> K. Husek<sup>c</sup> A. Martincekova<sup>a</sup>  
P. Mazanek<sup>a</sup> T. Kepak<sup>a</sup> M. Doubek<sup>d,e</sup> L. Kutnikova<sup>a</sup> D. Valik<sup>f</sup> J. Sterba<sup>a,h</sup>

# Teoretické modely diferenciční terapie

- přímá diferenciaci nádorové buňky
- oprava onkogenního mechanismu vede k původní diferenciaci
- „přesměrování“ na prekursor → jiná diferenciacní dráha



[www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)

Oncotarget, May, Vol.3, No 5

**Solid Tumor Differentiation Therapy – Is It Possible?**

Filemon Dela Cruz<sup>1</sup> and Igor Matushansky<sup>2</sup>