

**Molekulární mechanismy diferenciace
a programované buněčné smrti -
vztah k patologickým procesům buněk**

Aleš Hampl

Tkáně

Orgány

Jedinci

(zvířata & rostliny)

**Živé buňky, které
plní různé funkce**

(podpora struktury, přijímání
živin, lokomoce, snímání
a přenos signálů,...)



**Charakteristické pro:
komplexní mnohobuněčné
organismy**

Vývoj komplexního mnohobuněčného organismu

Zygota



Mnohobuněčné
embryo

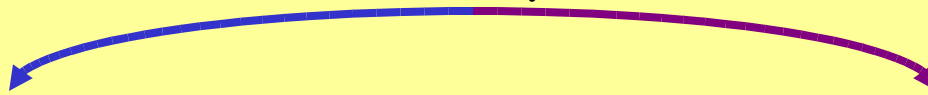


Dynamický
mnohobuněčný
organismus

Jak se z jedné buňky vyvine komplexní mnohobuněčný organismus ?

= jedna z nejvýznamnějších biologických otázek

Jak na ni odpovědět ?



Vývoj
mnohobuněčného
organismu v pojetí
KLASICKÉ
EMBRYOLOGIE

=

Změny v počtu,
lokalizaci a tvaru
buněk během
vývoje.

X

Vývoj mnohobuněčného
organismu v pojetí MODERNÍ
VÝVOJOVÉ BIOLOGIE

=

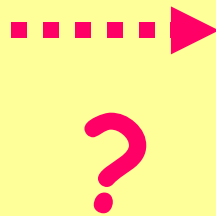
Procesy, kterými vznikají různé
buňky, a kterými je řízena
jejich organizace do funkčních
struktur živého organismu.
Experimenty, vedoucí k odhalení
příčinných vztahů.

Umožněno až nástroji současné
molekulární genetiky a biologie !

Ani současné techniky molekulární biologie však nečiní
z poznání vývojových procesů triviální úkol !!!

... protože

Lineární
informace
v genech



Proces vývoje, který
se odehrává ve
čtyřech rozměrech:
Prostor (x,y,z) + Čas

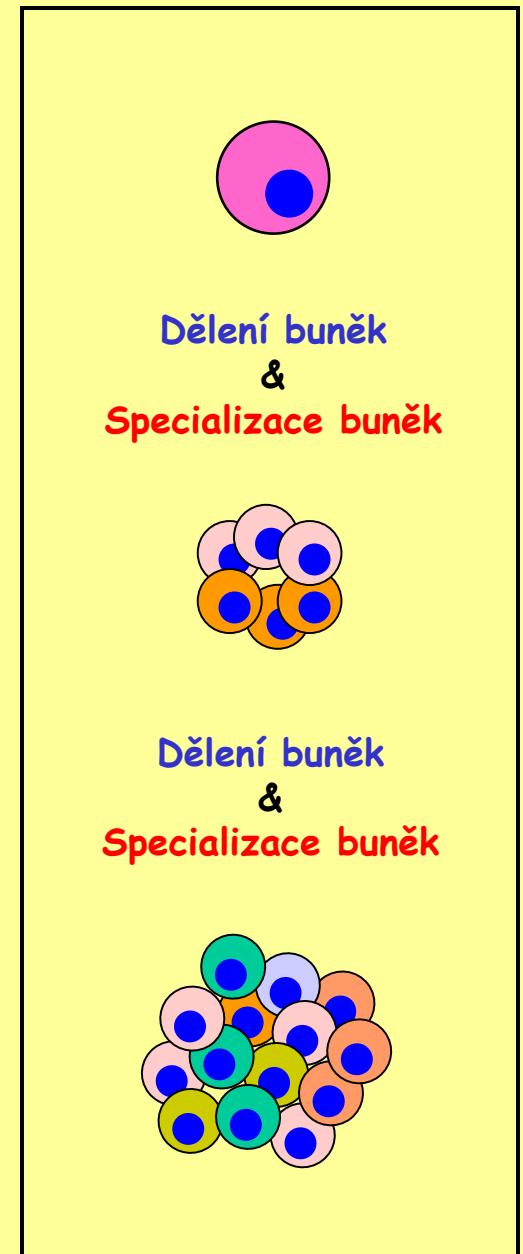
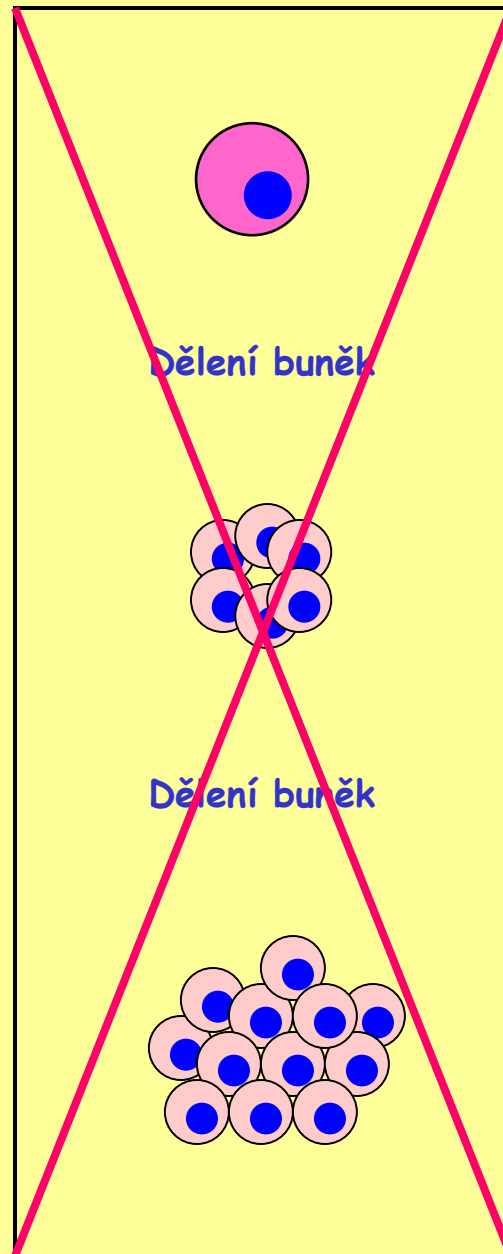
Zygota



Mnohobuněčné
embryo



Dynamický
mnohobuněčný
organismus



Vývoj

Proliferace

=

Multiplikace buněk

&

Diferenciace

=

Strukturální a funkční specializace buněk

&

Programovaná smrt

=

Smrt buněk v očekávaném čase a místě

&

Morfogeneze

=

Trojrozměrná organizace buněk s různou funkcí do funkčních skupin

Vývoj

Proliferace

&

Diferenciace

&

Programovaná
smrt

&

Morfogeneze

Udržování
funkce
tkání

- „zdraví“ tkání
- adaptace na prostředí
- oprava po poškození

Proliferace

&

Diferenciace

&

Programovaná
smrt

&

Morfogeneze

Výsledky
buněčného
signálování

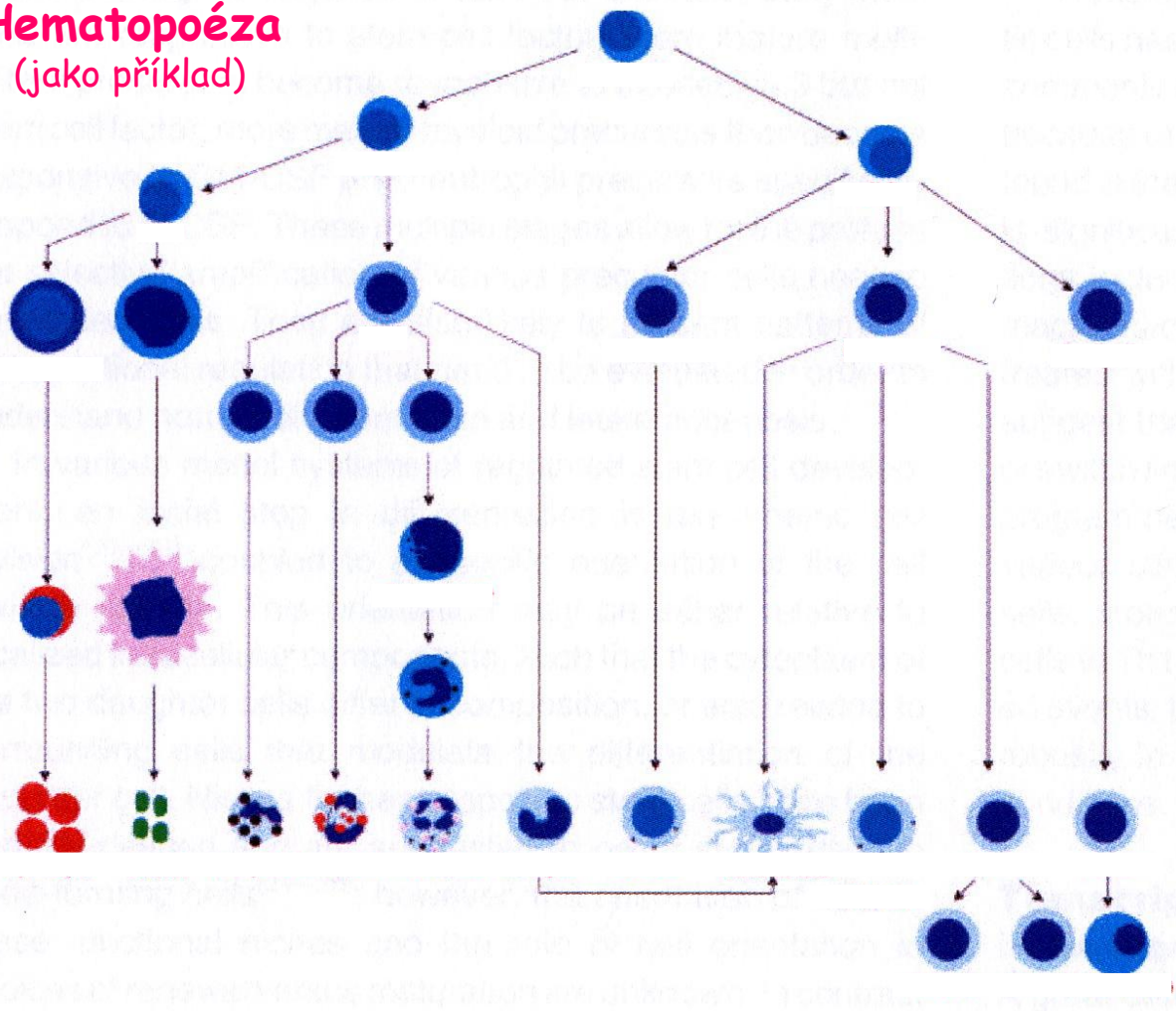
Diferenciace

**Diferenciace je postupný
(vícestupňový) proces**

Zvyšování diferencovanosti buněk

Zužování vývojové kapacity buněk - *determinace*

Hematopoéza
(jako příklad)



D I F E R E N C I A C E

Kmenová buňka

Prekurzory
(myeloidní a lymfoidní)

Progenitory

**Terminálně
diferencované buňky**

Zygota



Mnohobuněčné
embryo



Dynamický
mnohobuněčný
organismus

DIFERENCIACE

STABILNÍ GENOM



Genomická ekvivalence

(= stejné množství DNA a stejná
nukleotidová sekvence ve všech
buňkách organismu - klonování)



VARIABILNÍ
TRANSKRIPTOM



Regulátory transkripce

Jakmile buňky jednou vstoupí do určitého vývojového směru (linie), již tento směr (linii) nemění.
(například buňky erytroidní linie „nepřeskočí“ do linie myeloidní)

Výjimkou jsou nádorové buňky

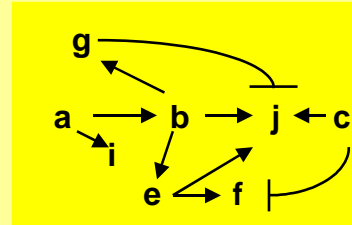
- nádorové buňky jedné linie se mohou vlivem chemoterapie „změnit“ v nádorové buňky jiné linie
- u nádorových buněk je často obtížné říct z jaké buněčné linie jsou odvozeny

Dediferenciace - ztráta diferencovaného fenotypu

- je obvyklá v podmínkách *in vitro* (představuje adaptaci na kultivační podmínky)
- existence tohoto jevu *in vivo* je otazná a je předmětem výzkumu (stejně jako **transdiferenciace**)

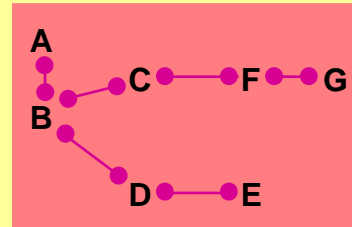
Obecný princip regulace

Genetický program
= Geny



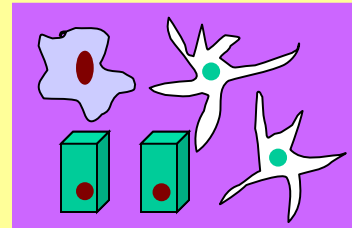
Genetická informace je užívána postupně na základě aktivity malého počtu funkčních modulů, které jsou hierarchicky uspořádány s rostoucí úrovní složitosti.

Proteiny



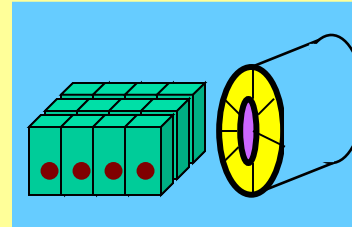
Každá úroveň obsahuje informaci pro zbudování následující vyšší úrovně.

Buňky



Na každé úrovni vznikají funkční sítě z daných elementů. Jedna část těchto sítí působí zpětně na předchozí úroveň, druhá část podmiňuje formování elementů vyšší úrovně.

Tkáně
Orgány



Faktory (signály) regulující diferenciaci

Solubilní regulátory

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

Fyzické kontakty mezi buňkami (gap junctions)

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

Polarita a tvar buněk

Fyzikální parametry prostředí (teplota, tenze O_2 , ...)



Jsou zpracovány molekulárními regulačními mechanismy a sítěmi

Univerzální molekulární podstata regulačních mechanismů a sítí

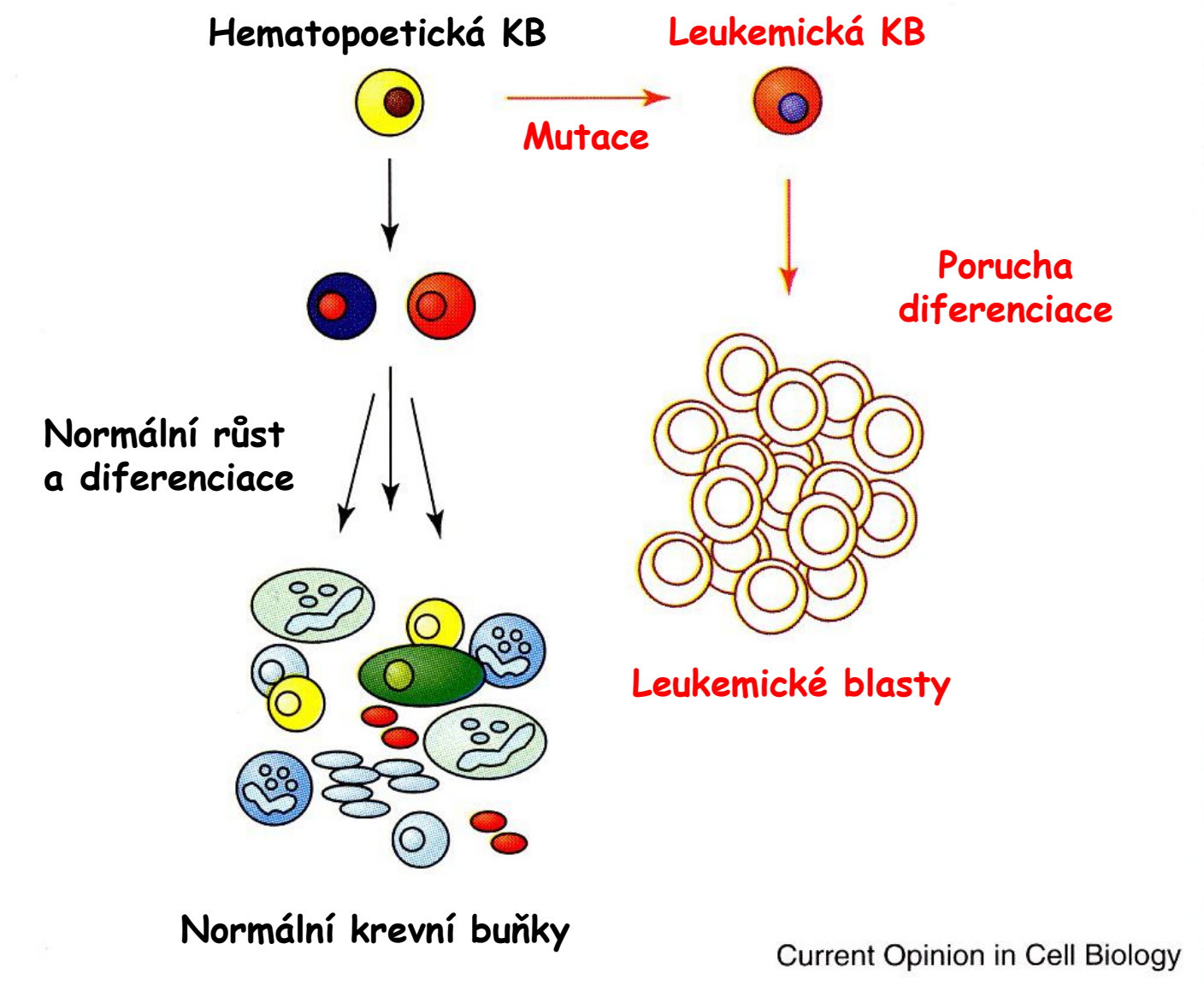
- Existuje relativně malý počet různých molekulárních sítí
- Tyto molekulární sítě jsou evolučně značně konzervovány
- Stejně molekulární sítě jsou používány v různých částech organismu pro řízení různých procesů (jedna molekulární síť interpretuje jeden signál v závislosti na aktuální molekulární konstelaci buňky)



Fibroblastový růstový faktor - FGF

Porucha diferenciace jako zdroj nemoci

Jeden příklad za všechny



Máme použití pro znalost molekulárních mechanismů, které řídí diferenciaci ?

Diferenciace buněk *in vivo*
(léčba nemocí = „diferenciační terapie“ - cancer, ...)

Diferenciace buněk *in vitro*
(manipulace s kmenovými buňkami = buněčná terapie)

Programovaná buněčná smrt

Přirozený proces umožňující odstranění nežádoucích buněk.
(buněk nepotřebných pro další vývoj, buněk nesoucích genetické abnormality, infikovaných buněk, ...)

Programovaná buněčná smrt

Termín, originálně popisující buňky,
které umírají na očekávaném místě
v očekávaném čase

Apoptóza

Vyjadřuje morfologické charakteristiky
umírajících buněk, které jsou odlišné
od znaků **nekrózy**

Většina programované
buněčné smrti se
odehrává apoptózou



Termíny se zaměňují

APOPTÓZA

Stimulus indukující buněčnou smrt aktivuje kaskádu dějů, která finálně vede k destrukci buňky

- Kondenzace chromatinu
- Smrštění buňky
- Zachování buněčných organel a membrán
- Rychlé pohlcení sousedními buňkami zabraňující zánětu
- Fragmentace DNA-TYPICKÝ ZNAK

Fyziologická
(součást vývoje)

Aberantní
(při nemoci)



Mechanismus

Histologické
a
biochemické
znaky

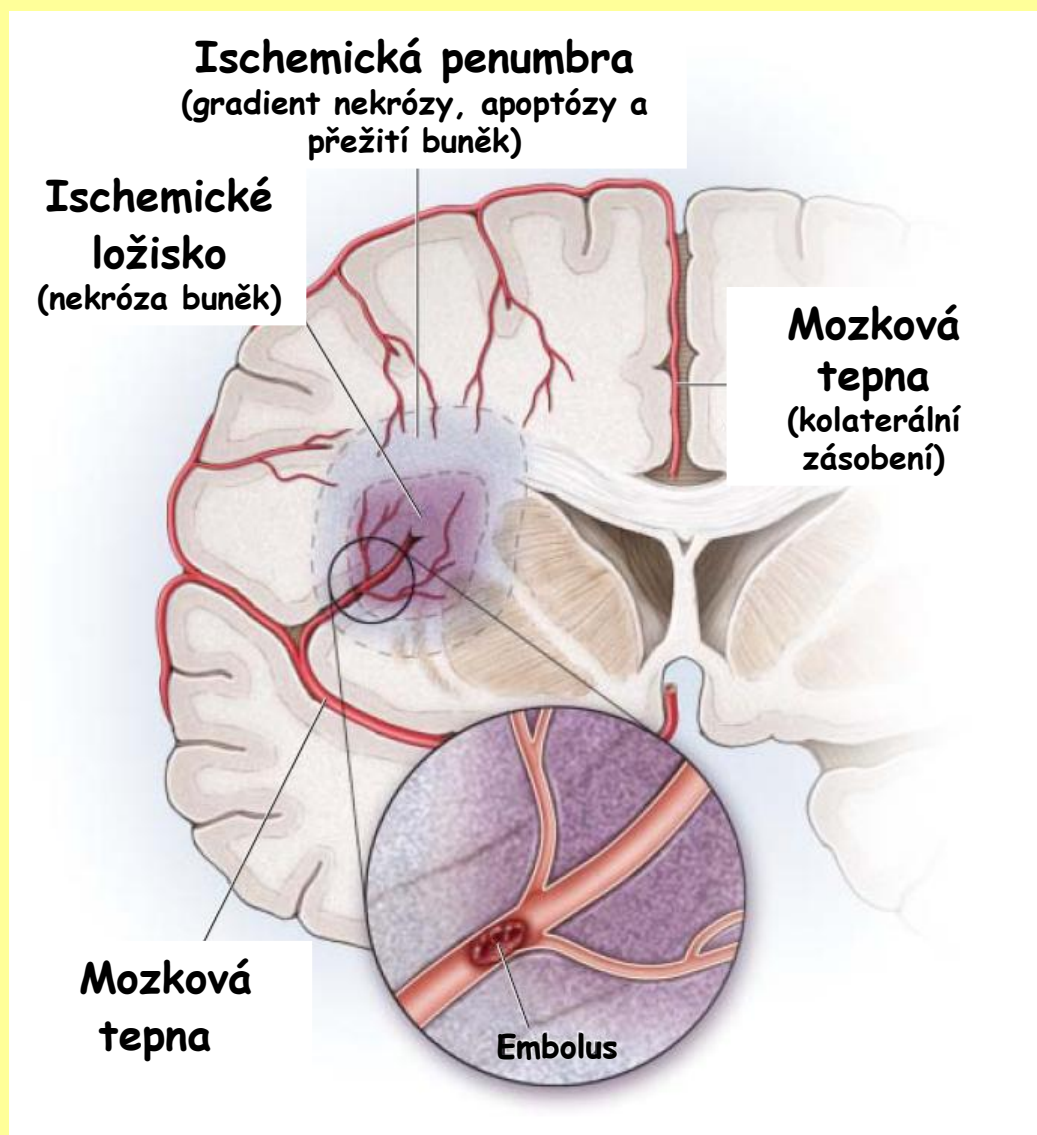
NEKRÓZA

Stimulus indukující buněčnou smrt (např. ischemie) je sám o sobě přímou příčinou likvidace buňky

- Zduření jádra
- Zduření buňky
- Disrupce buněčných organel a membrán
- Ruptura buňky a uvolnění buněčných komponent
- Zánětlivá reakce

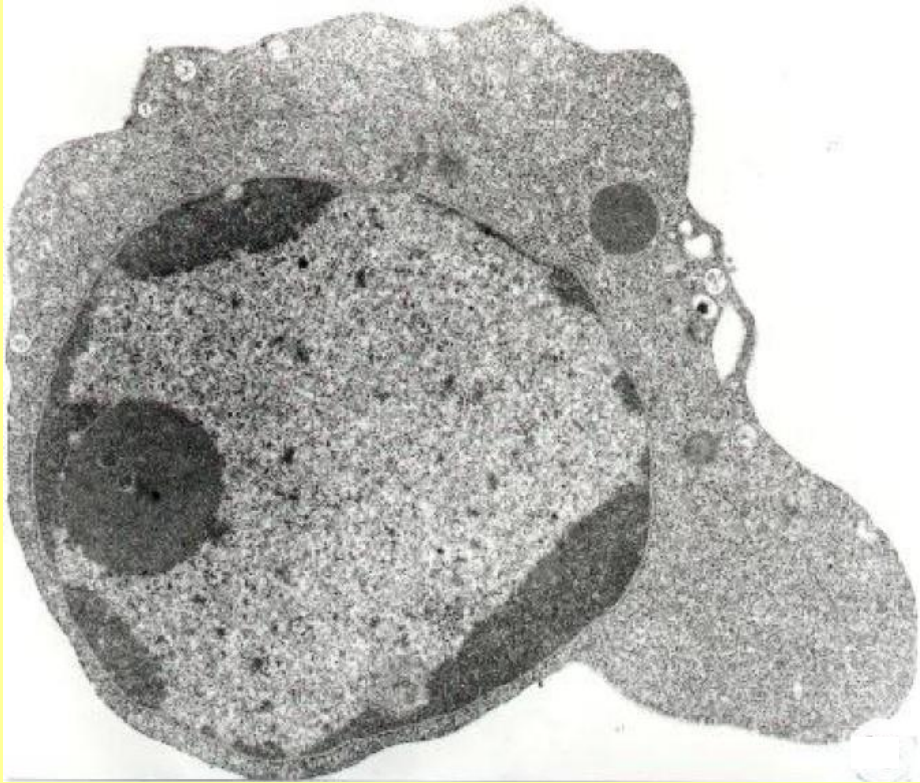
Patologický proces

Apoptóza a nekróza při nemoci

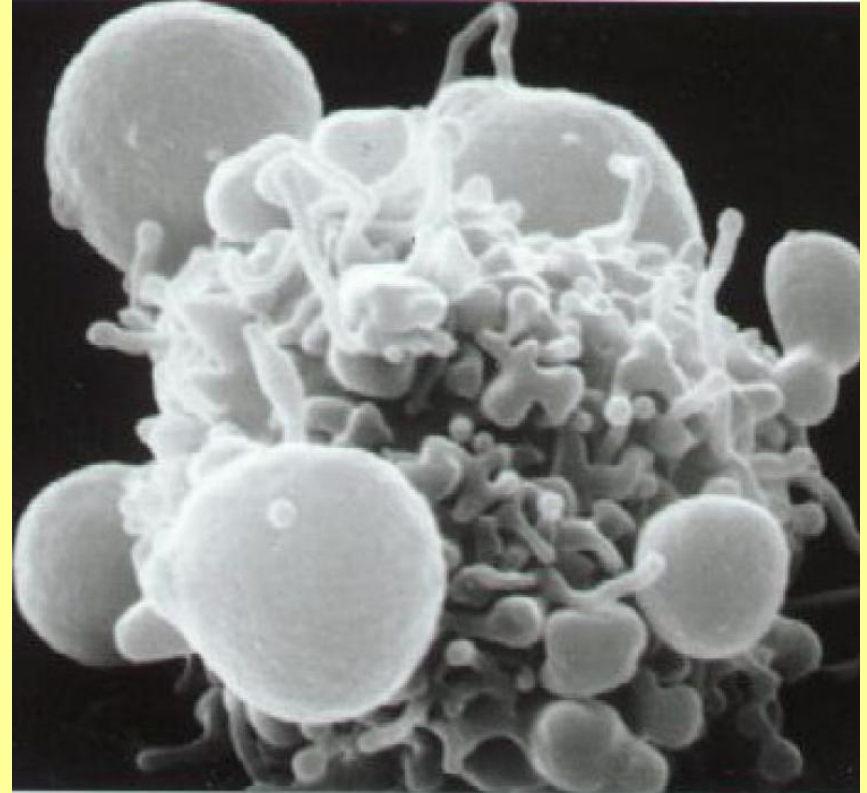


Morfologické znaky apoptózy

- Kondenzace chromatinu
- Tvorba měchýřků na povrchu buněk

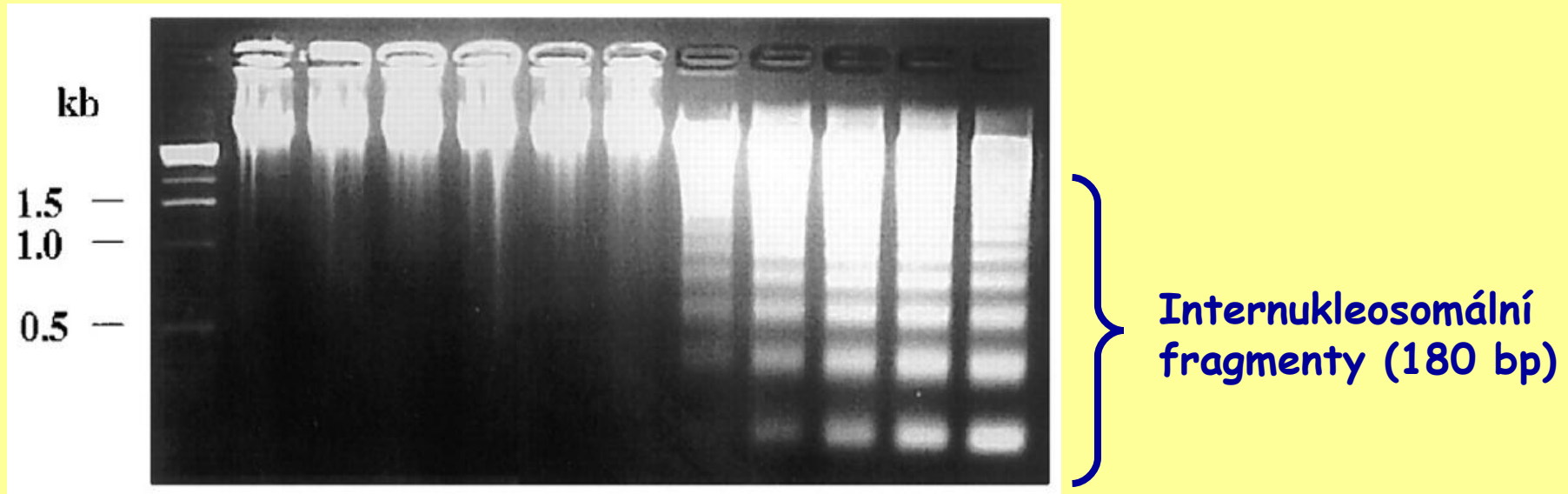


Obraz v transmisním elektronovém mikroskopu



Obraz ve skenovacím elektronovém mikroskopu

Fragmentace genomické DNA



Elektroforetická separace DNA v agarózovém gelu

1972

Poprvé definován koncept **programované buněčné smrti.**

(Kerr, Willie, Currie - Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer)

2002

Nobel Prize in Physiology or Medicine

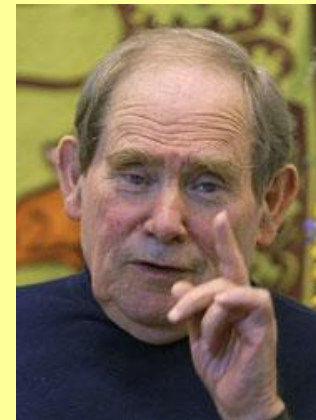
„Genetic regulation of organ development and
programmed cell death“



Robert Horvitz (1947)
USA



John Sulston (1942)
UK



Sydney Brenner (1927)
UK

Jaké molekulární mechanismy řídí apoptózu

Poslední dekáda 20-tého století
Klíčové poznatky získány studiem *Caenorhabditis elegans*
(laboratoř Roberta Horvitze)

C. elegans

- celý organismus má celkem 1090 buněk
- 131 buněk podléhá během vývoje apoptóze
- osud všech buněk je znám
- umožňuje chemickou mutagenezu

Čtyři geny nezbytné
pro exekuci apoptózy
během vývoje *C. elegans*

ced-3

ced-4

egl-1

ced-9

Homology u vyšších metazoi

kaspázy

Apaf-1

Bcl-2

BH3-only
geny

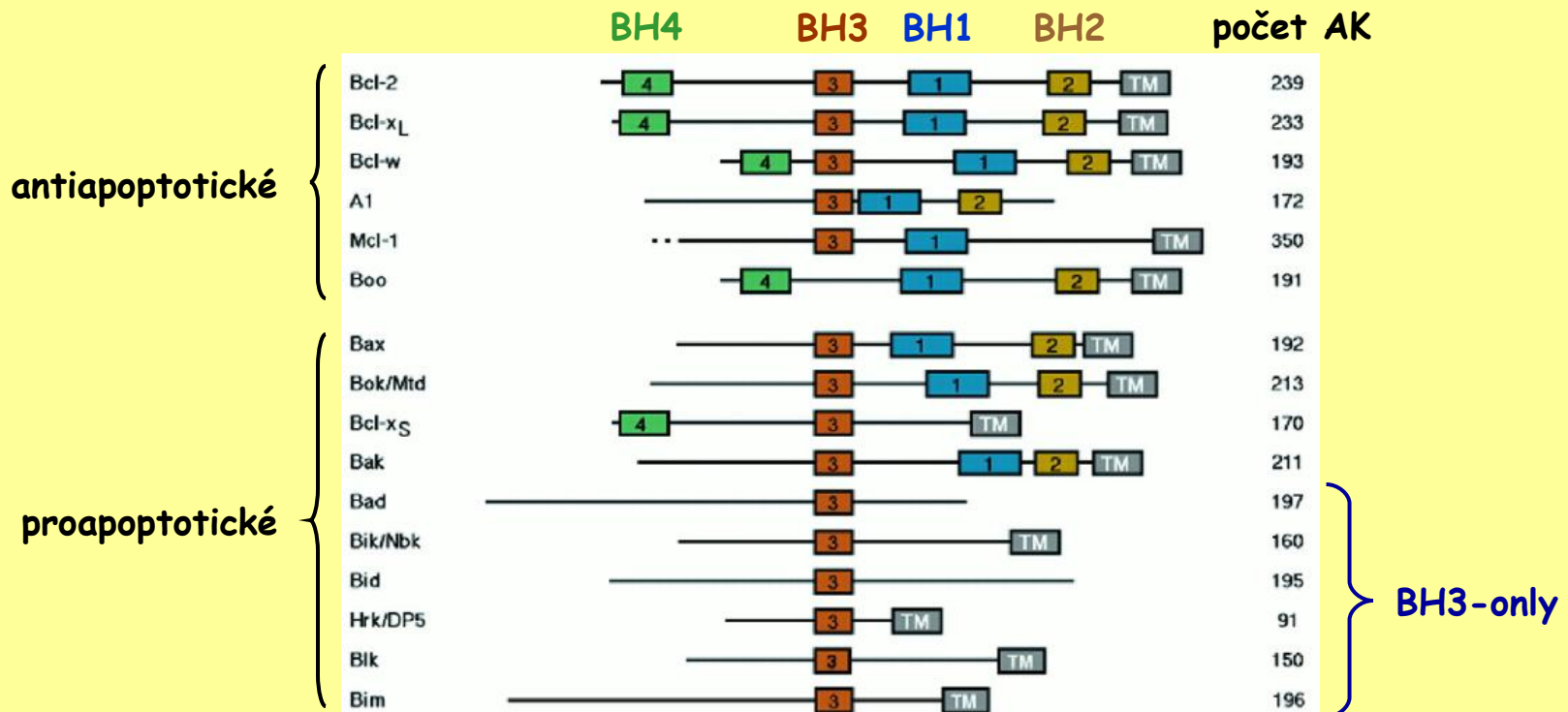
Kaspázy - klíčoví vykonavatelé apoptózy

Kaspázy (caspases) = cysteinyl aspartate proteases

- Proteázy závislé na cysteinu, které štepí za AK asparagin
- Regulovány jsou zejména posttranslačně štěpením (v buňkách jsou v inaktivním stavu - prokaspázy = zymogeny)
- Regulovány jsou však i transkripčně (některá neurodegenerativní onemocnění jsou charakteristická vyšší expresí kaspáz)
- Mají mnoho substrátů včetně sebe sama - to umožňuje amplifikaci kaskád
- Dnes je známo 14 členů rodiny kaspáz, z nichž 11 se vyskytuje u člověka
- Ne všechny kaspázy se účastní procesu apoptózy
- Kaspázy, které se účastní apoptózy se podle pozice v aktivační kaskádě člení na „**iniciační**“ a „**výkonné**“ (exekuční)

Proteiny rodiny BCL2 - klíčové regulátory apoptózy

- Mají alespoň jednu oblast homologie s BCL2 (BCL2 homology region - BH)
- Podle aktivity se člení na „**antiapoptotické**“ a „**proapoptotické**“
- BCL2 - první nalezený člen této rodiny, antiapoptotický efekt
- BAX - objeven na základě asociace s BCL2, proapoptotický efekt



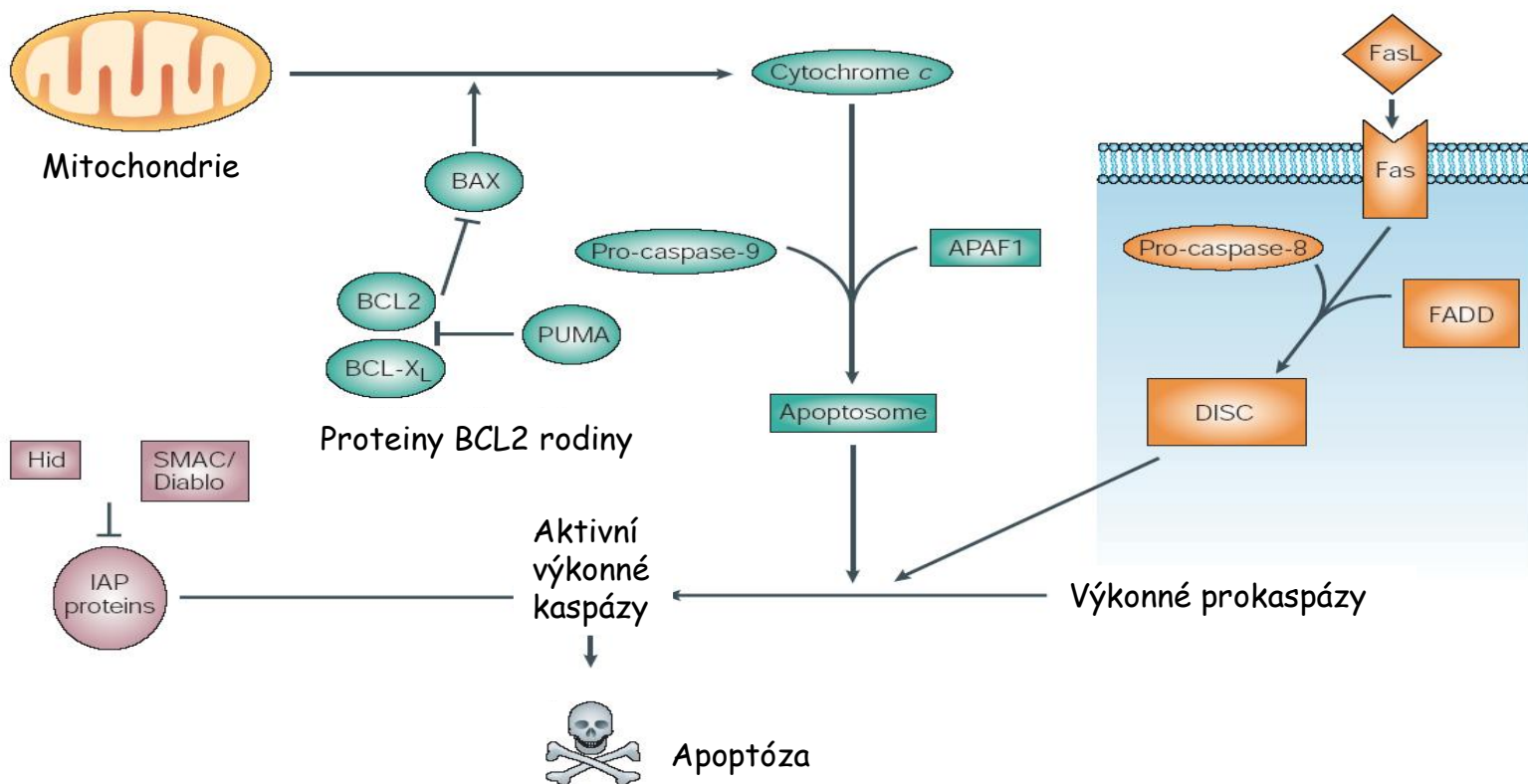
Dvě cesty iniciace a exekuce apoptózy

Vnitřní (intrinsic)

- Spouští se jako rce na různé stimuly generované v buňce (poškození DNA, aktivace onkogenů, oxidativní stres...)
- Zprostředkovaná mitochondriemi, které jako rci na stress uvolňují proteiny z intermembránového prostoru (cytochrom c, SMAC, AIF, endoG...)
- Např. cytochrom c váže APAF1 a ATP, což dále vede ke konverzi iniciační prokaspázy-9 na aktivní kaspázu-9

Vnější (extrinsic)

- Spouští se vazbou sekretovaného ligandu (např. FasL) na „smrtící“ receptor z rodiny TNFR (tumor necrosis factor rec.) (např. Fas)
- Spojení s dalšími proteiny vede ke vzniku DISC (death-inducing signalling complex)



Nemoci + Apoptóza

Abnormality v apoptóze se uplatňují u mnoha onemocnění !

Rakovina
Autoimunitní onemocnění
Diabetes
Neurodegenerativní onemocnění
Infertilita
Hepatitis
Septické stavy
Virové infekce
+ mnoho dalších

Molekuly regulující apoptózu jsou atraktivními cíli pro farmakologickou intervenci !!!

Děkuji za pozornost

**Otázky a komentáře na:
ahampl@med.muni.cz**