

Biologie + Histologie

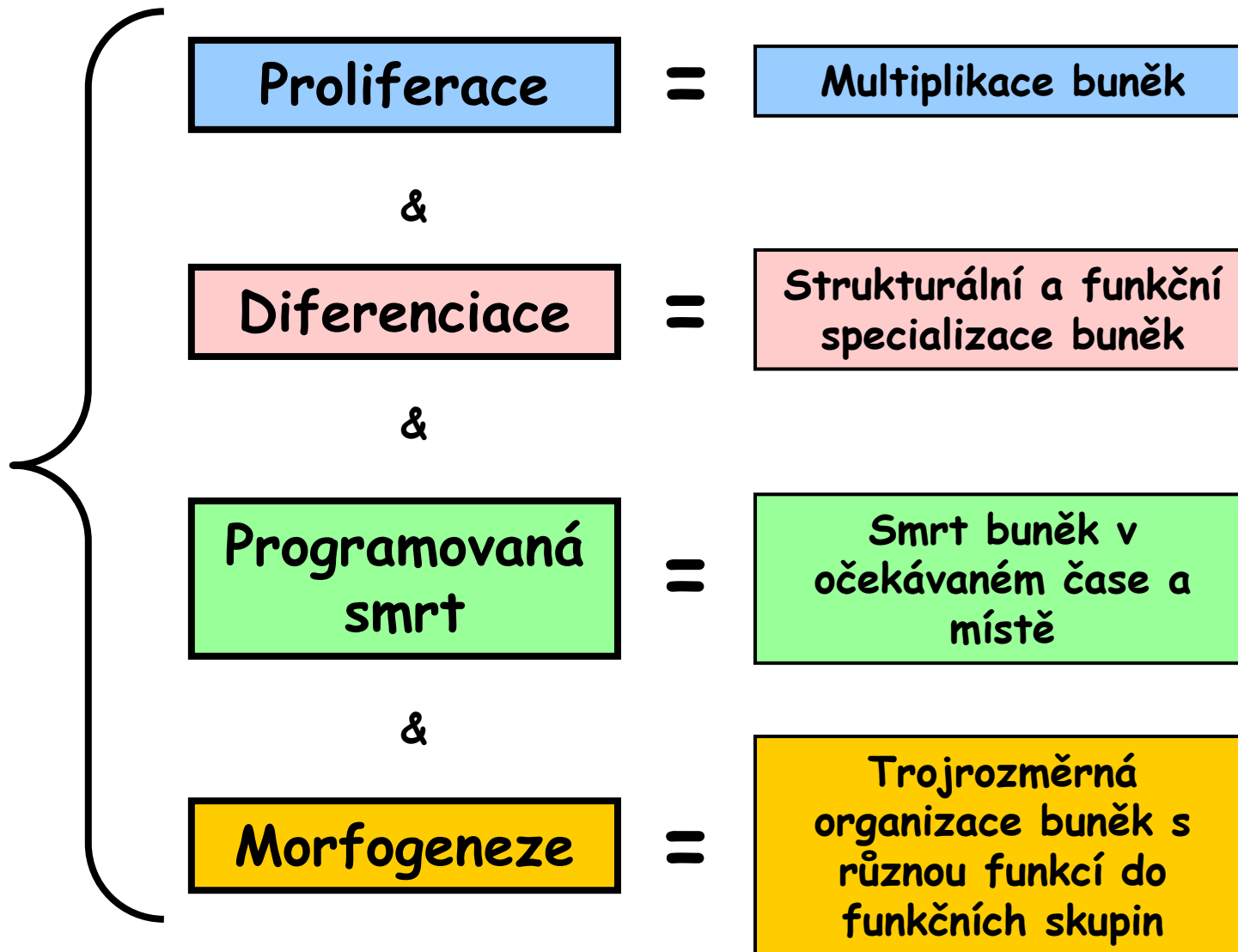
Aleš Hampl

Brno, 2011

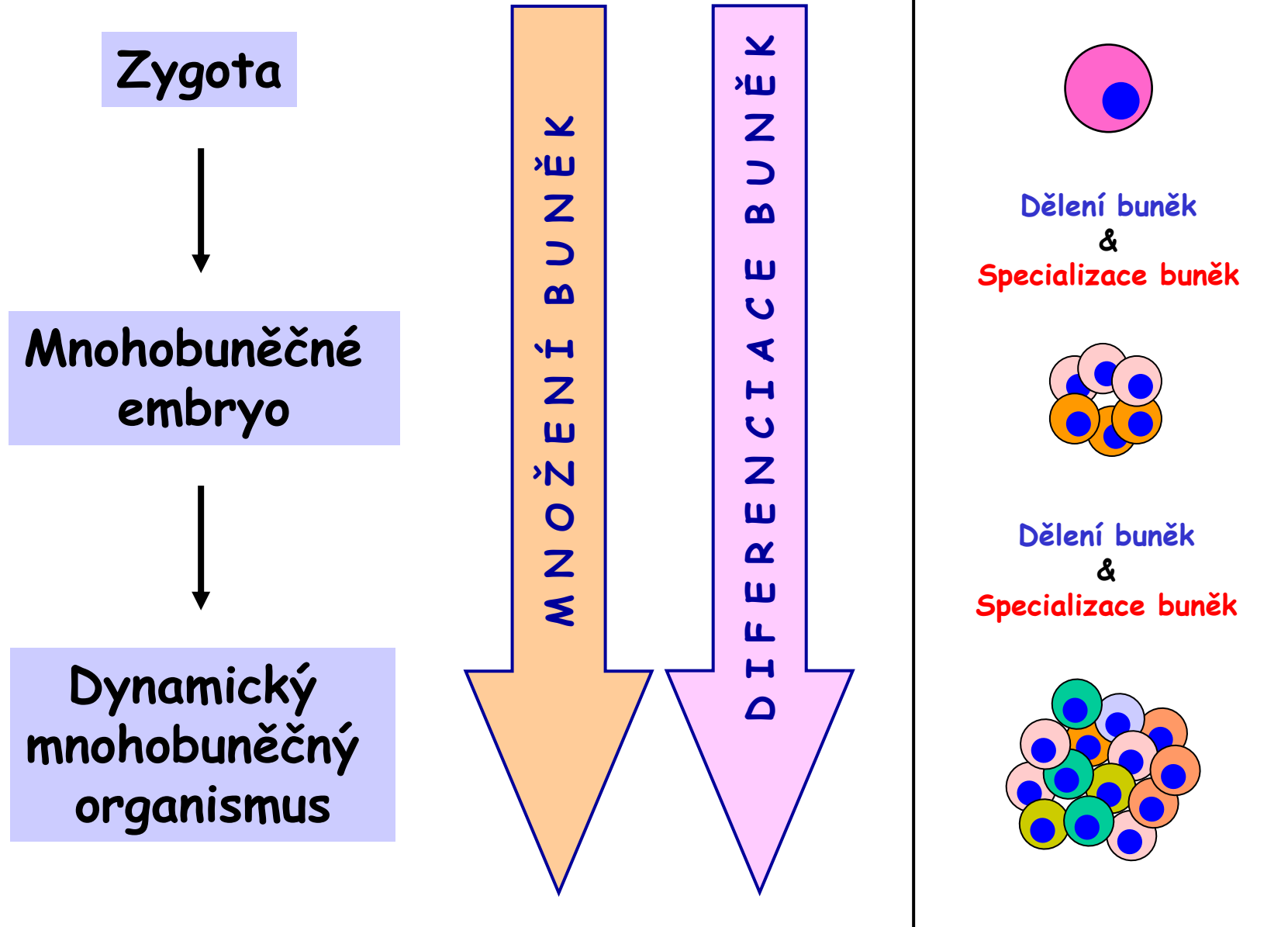
Přednáška 2

- Živá hmota, nebuněčné organismy, prokaryontní a eukaryontní buňky
- Mnohotvárnost (diverzita) buněk
- Proliferace buněk
- Diferenciace buněk
- Podstata diverzity buněk - exprese genetické informace (mRNA, proteiny)
- Programovaná buněčná smrt
- Strukturální organizace buňky

Vývoj



Mnohotvárnost buněk je produktem vývojových procesů

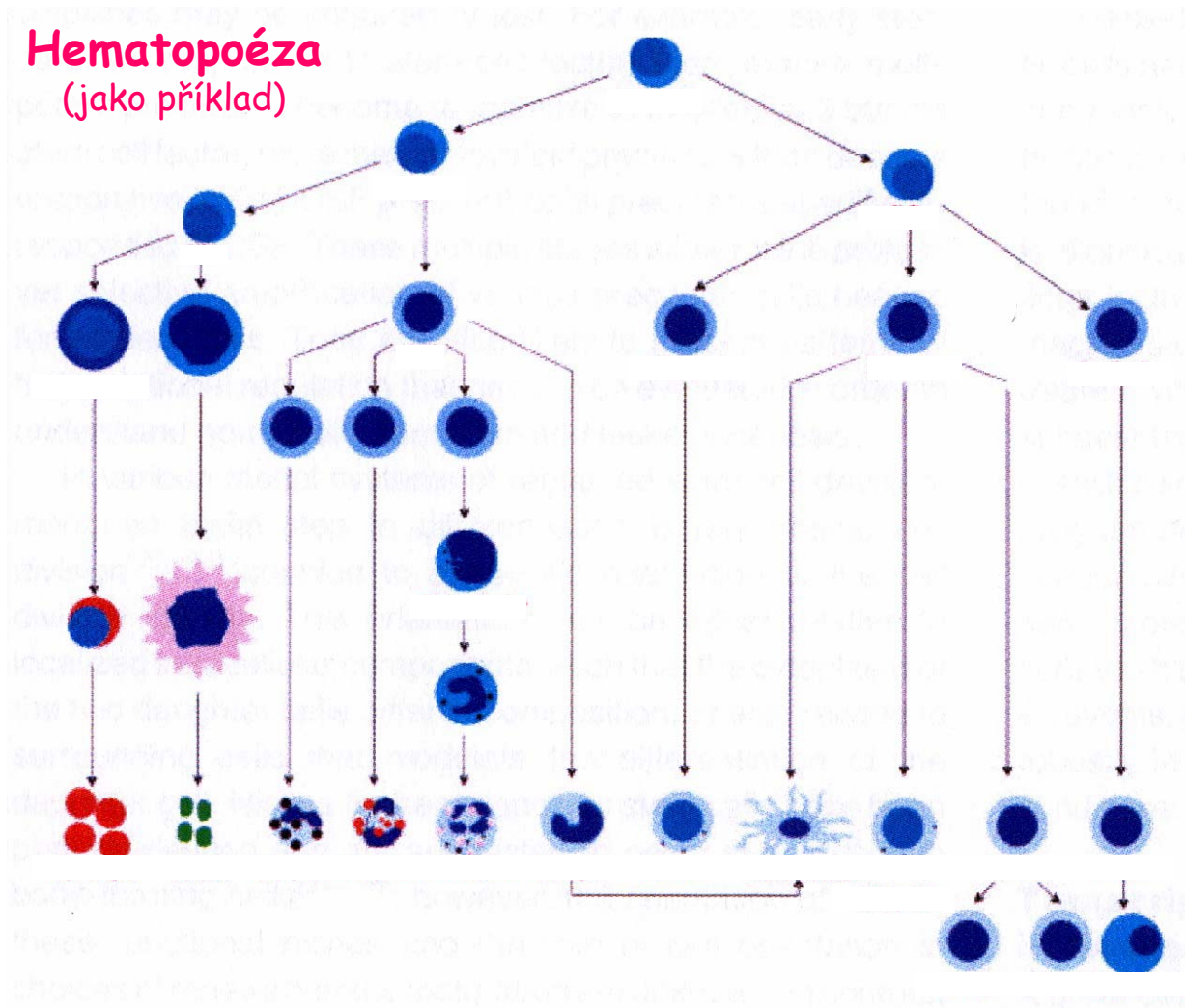


**Diferenciace je postupný
(vícestupňový) proces**

Zvyšování diferencovanosti buněk

Zužování vývojové kapacity buněk - *determinace*

Hematopoéza
(jako příklad)



Kmenová buňka

Prekurzory
(myeloidní a lymfoidní)

Progenitory

**Terminálně
diferencované buňky**

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

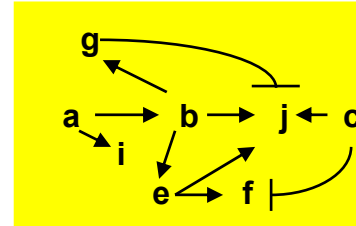
- nádorové buňky jedné linie se mohou vlivem chemoterapie „změnit“ v nádorové buňky jiné linie
- u nádorových buněk je často obtížné říct z jaké buněčné linie jsou odvozeny

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

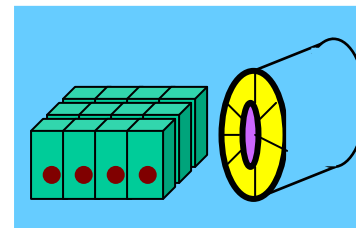
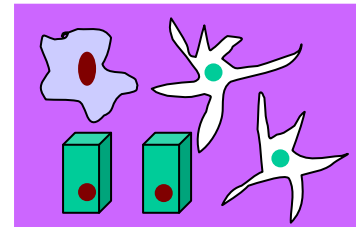
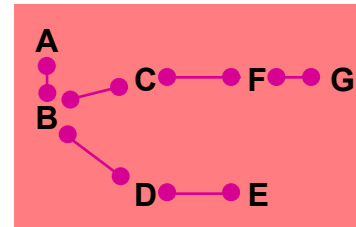


Genetická informace je užívána postupně na základě aktivity malého počtu funkčních modulů, které jsou hierarchicky uspořádány s rostoucí úrovní složitosti.

Proteiny

Buňky

Tkáně
Orgány



Každá úroveň obsahuje informaci pro zbudování následující vyšší úrovně.

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.

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

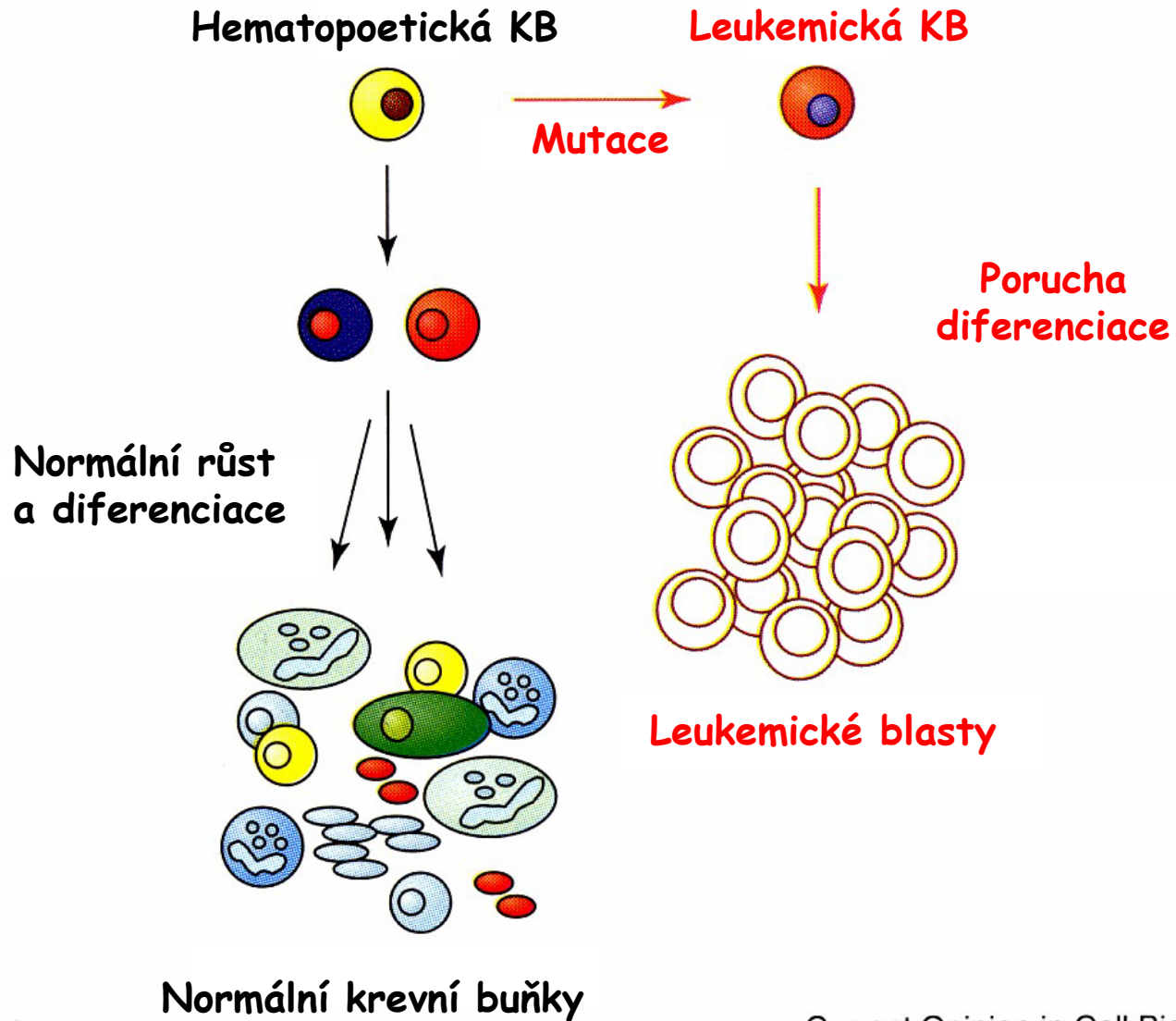
- Existuje relativně malý počet různých molekulárních sítí
- Tyto molekulární sítě jsou evolučně značně konzervovány
- Stejně molekulární sítě jsou používány v různých částech organismu pro řízení různých procesů (jedna molekulární síť interpretuje jeden signál v závislosti na aktuální molekulární konstelaci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



Fibroblastový růstový faktor - FGF

Porucha diferenciace jako zdroj nemoci

Jeden příklad za všechny



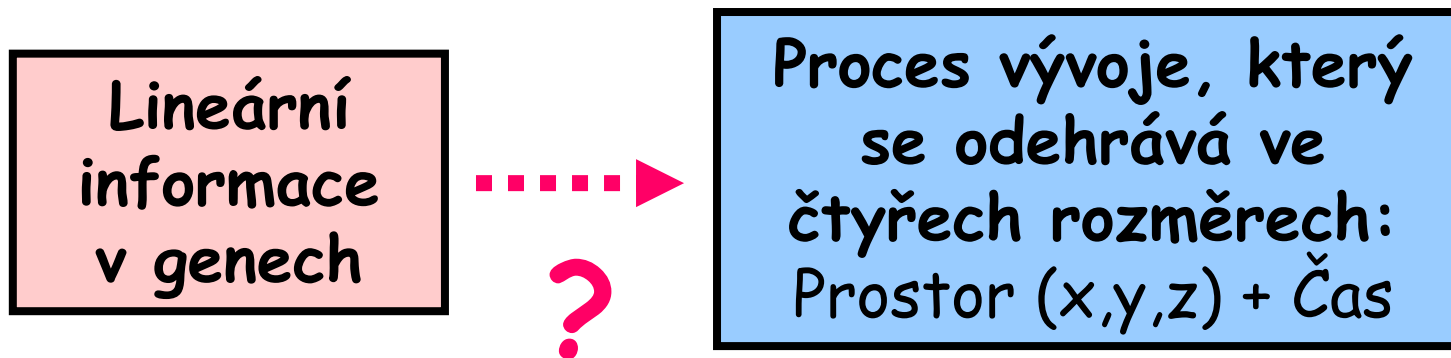
Máme použití pro znalost molekulárních mechanismů, které řídí diferenciaci ?

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

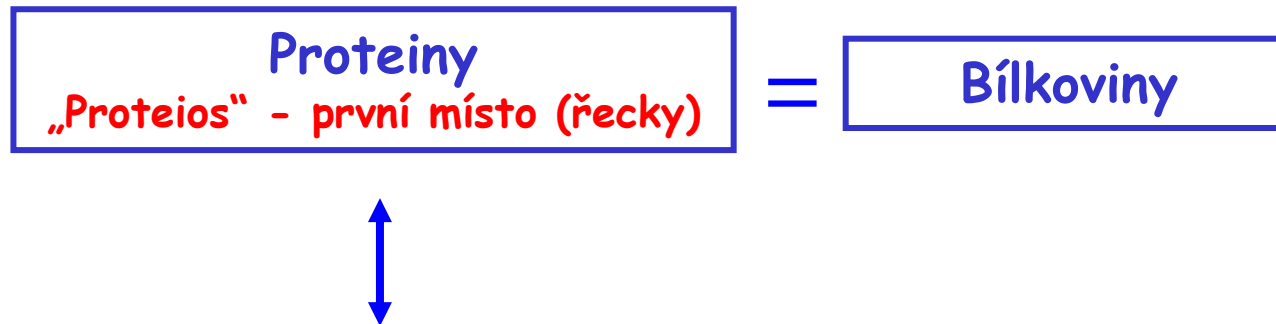
Diferenciace buněk *in vitro*
(manipulace s kmenovými buňkami = buněčná terapie)

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

... protože



Jak buňka vypadá a co vše umí určují bílkoviny - proteiny



- u většiny buněčných typů tvoří nejméně 50% jejich suché hmoty
- hrají klíčovou úlohu ve většině biologických procesů

Klíčová úloha proteinů je dána mnohočetností jejich funkcí

Enzymatická

Proteiny - enzymy, které selektivně moduluji chemické reakce

Strukturální

Strukturální (stavební, podpůrné) proteiny - kolagen, elastin, keratin ...

Signální

Proteiny zprostředkující přenos informací - hormony, cytokiny, receptory...

Motorická

Proteiny zajišťující pohyb - myosin, aktin ...

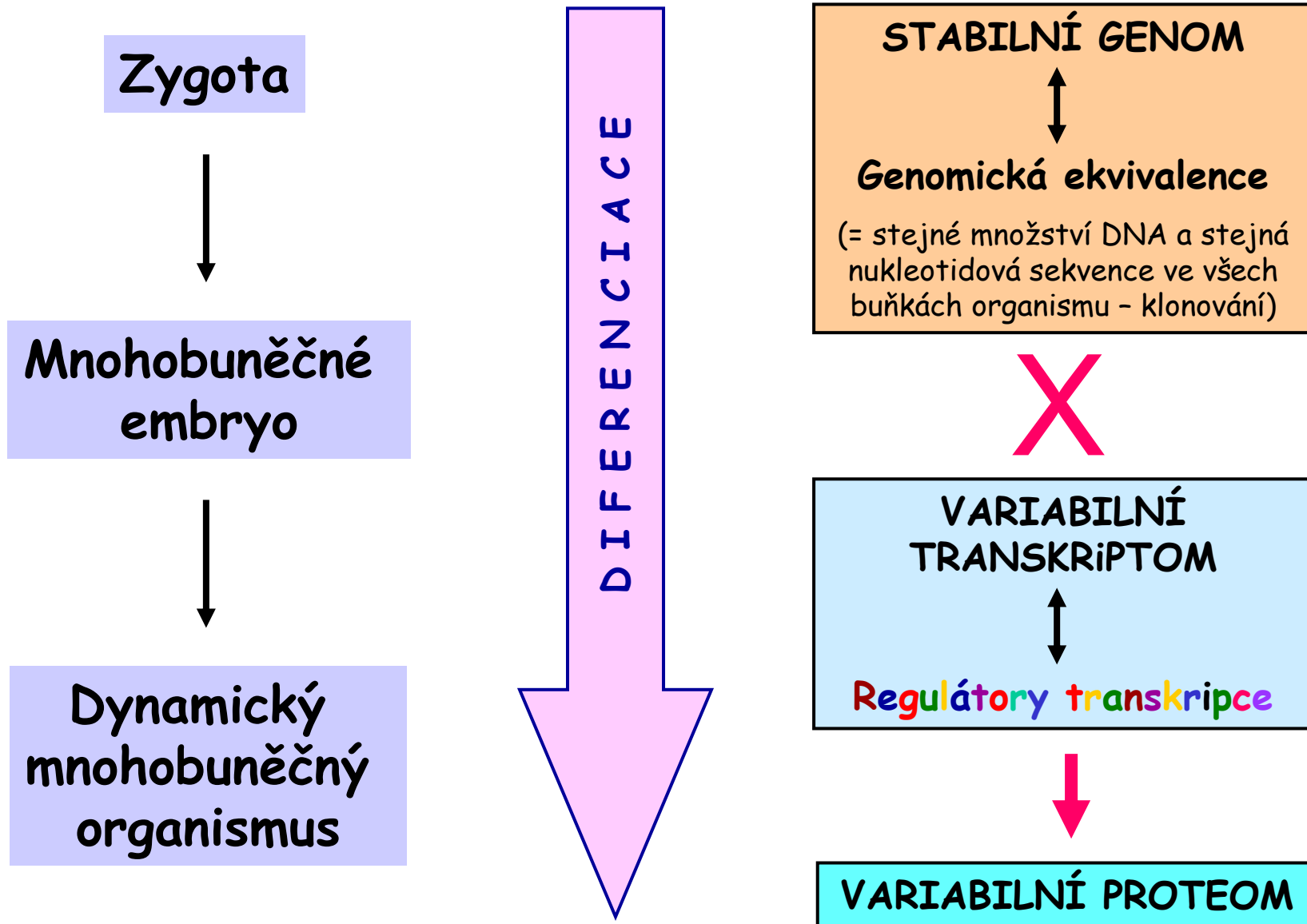
Transportní

Proteiny přenášející substance - hemoglobin, transferin, ...

Ochranná

Proteiny chránící před nežádoucími substancemi - imunoglobuliny ...





Mnohočetnost funkcí proteinů stojí na unikátních vlastnostech jednotlivých proteinů

DNA

Sekvence nukleotidů
(4 různé nukleotidy)

PROTEINY

Sekvence aminokyselin
(20 různých aminokyselin)

← **Stejný princip**

Stejně vlastnosti

+

Jediná funkce

Uložení a přenos informace

X

Různé vlastnosti

+

Různé funkce

?

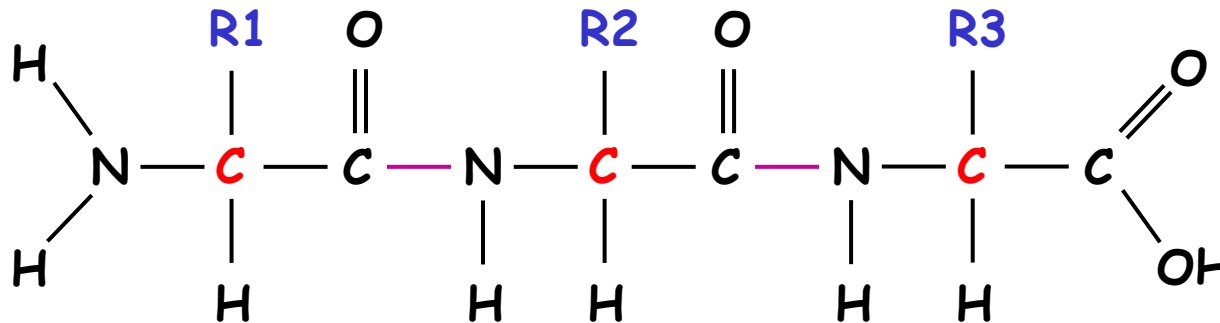
Sekvence nukleotidů
neovlivňuje zásadně
vyšší uspořádání
řetězce DNA

X

Sekvence aminokyselin
má zásadní vliv na
vyšší uspořádání
molekuly proteinu

!

Vyšší uspořádání molekuly proteinu je určeno sekvencí aminokyselin a jejich postranními řetězci (R)



Primární struktura

Představuje lineární sekvenci aminokyselin v polypeptidovém řetězci.

Sekundární struktura

Je podmíněna interakcemi mezi komponentami páteřního řetězce polypeptidu (alfa helix, beta skládaný list).

Terciární struktura

Je podmíněna interakcemi mezi postranními řetězci (vodíkové vazby, disulfidické můstky, iontové vazby, hydrofobní interakce).

Kvarterní struktura

Je podmíněna spojením více polypeptidových podjednotek.

Vyšší uspořádání molekuly proteinu

Denaturace

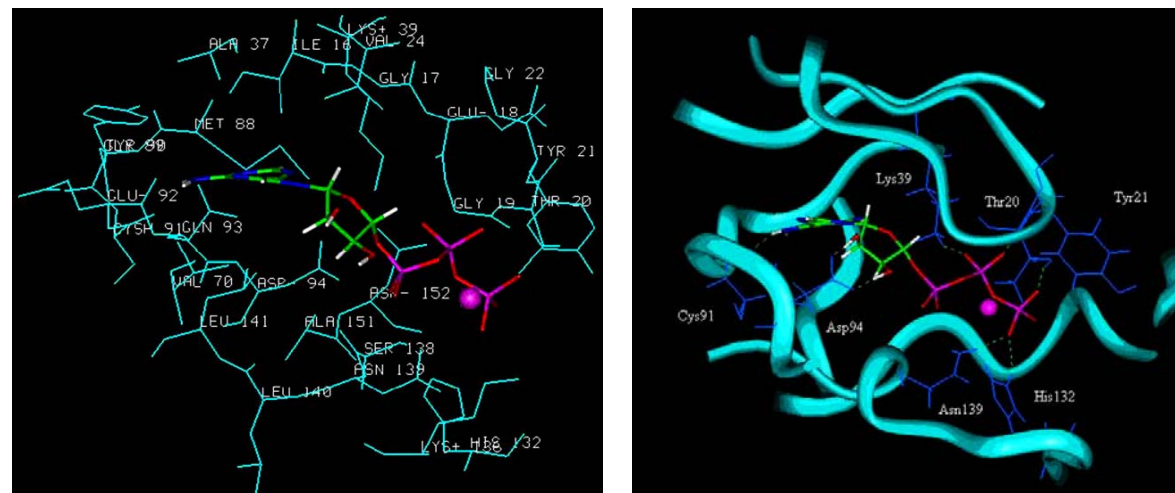
- ztráta vyššího uspořádání molekuly proteinu daná změnou fyzikálních či chemických podmínek prostředí, obvykle doprovázena ztrátou funkce proteinu, může být reverzibilní (např. poškození proteinů při horečce)

K čemu je dobré vyšší
uspořádání molekuly proteinu ?

Vyšší uspořádání proteinu spolurozhoduje
o jeho funkci.

&

Funkce proteinu je téměř vždy závislá na jeho
schopnosti rozeznávat či vázat jiné molekuly.



Molekula CDK10 s vazebným místem pro ATP

DNA určuje expresi/metabolismus proteinů v zásadě dvojím způsobem

Na úrovni transkriptů

Na úrovni proteinů

Translace ANO/NE

Syntéza mRNA daného proteinu

+

Stabilita mRNA daného proteinu

Primární sekvence aminokyselin daného proteinu
(určuje vlastnosti - stabilitu daného proteinu)

Syntéza polypeptidů podle sekvence mRNA se odehrává procesem zvaným „translace“

**Messenger RNA
(mRNA)**

Ribosomy

**Transferová RNA
(tRNA)**

**Molekulární komponenty
klíčové pro translaci**

Ribosomy - obecně

Vytváří prostředí pro rozeznání kodónů mRNA a následnou syntézu polypeptidového řetězce

Obecné složení ribosomů

Proteiny - 1/3

Ribosomální RNA
rRNA - 2/3



Díky obrovskému počtu ribosomů v buňce je rRNA nejhojnějším typem RNA (syntetizována v jadércích RNA PolI)

Rozdíly mezi ribosomy eukaryot a prokaryot mají medicínský význam

Eukaryota

Ribosomy **necitlivé**
k některým
antibiotikům



Prokaryota

Ribosomy **citlivé** k
některým
antibiotikům

Transferová RNA - tRNA

Zajišťuje:

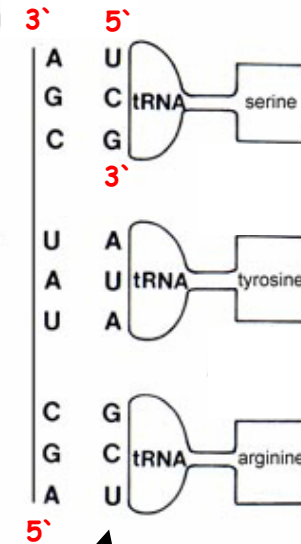
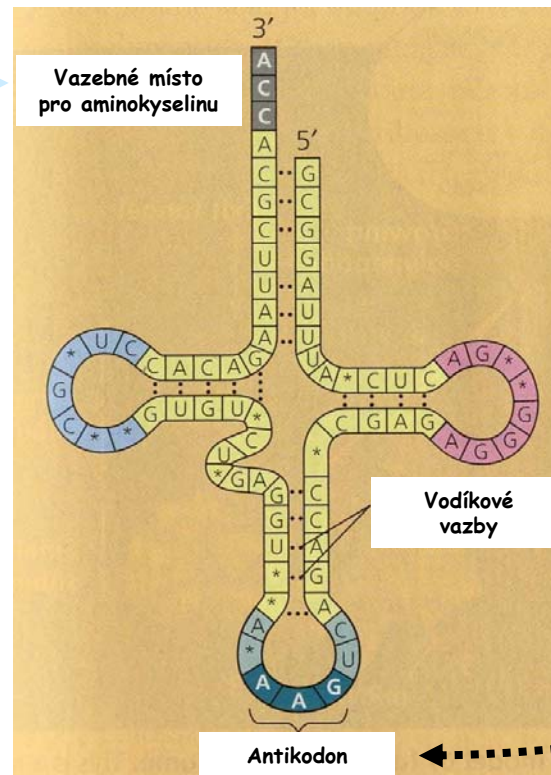
- transport aminokyselin do místa syntézy polypeptidového řetězce
- interpretaci kodónů mRNA

Délka tRNA - jen asi 80 nukleotidů

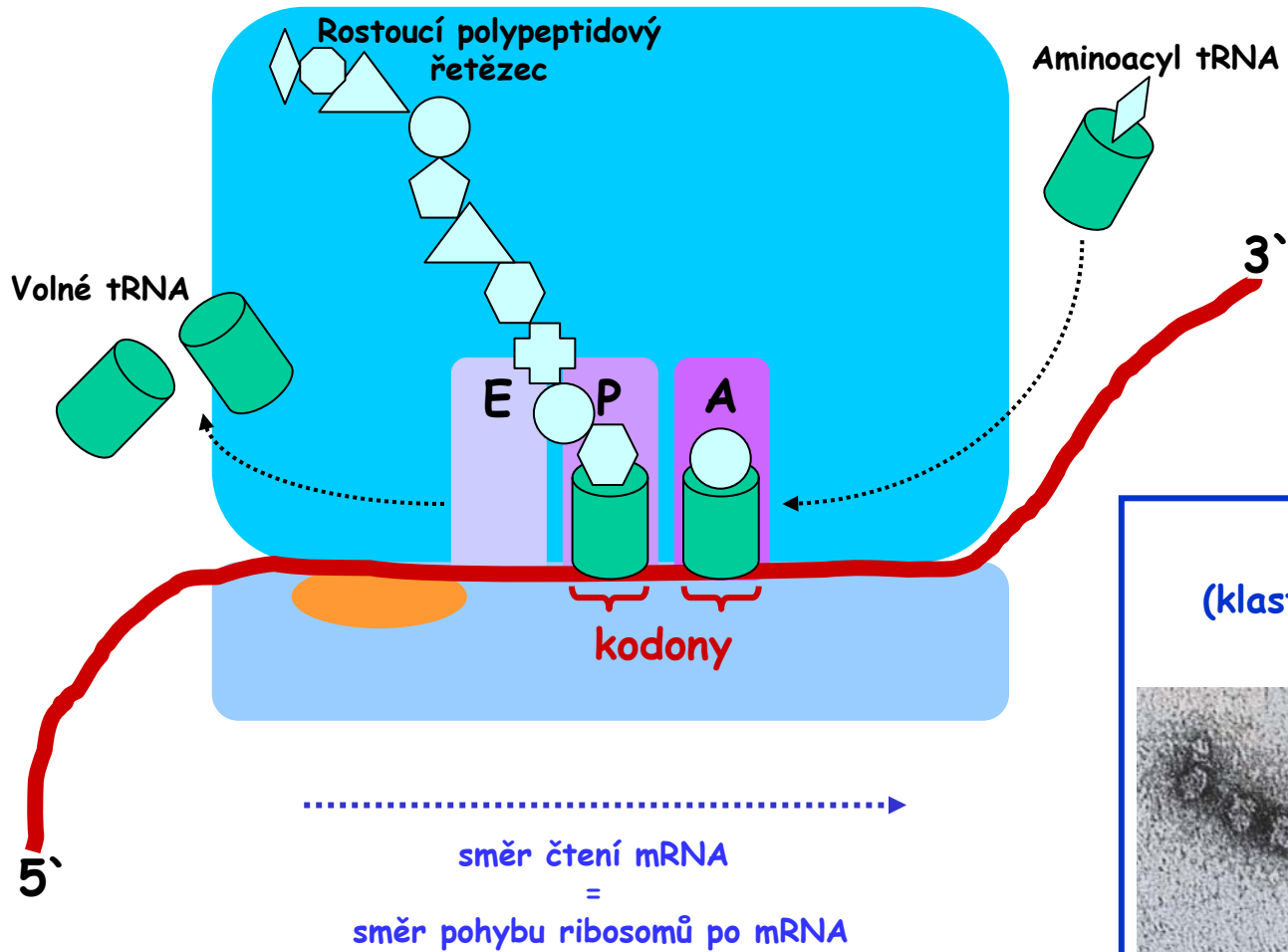
Aminoacyl-tRNA syntetáza

- katalyzuje vznik kovalentní vazby mezi aminokyselinou a jí odpovídající tRNA
- požaduje ATP
- výsledným produktem je **aminoacyl tRNA** (= „aktivovaná aminokyselina“)

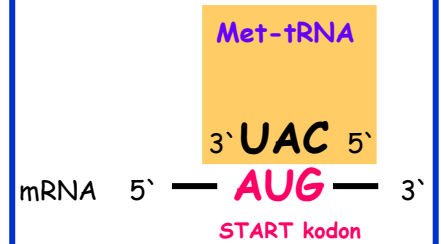
UUU } Phe	UCU	UAU } Tyr	UGU } Cys
UUC } UCC	UUA } Leu	UAC } Ser	UGC } UGA Stop
UUA } UCA	UUG } UCG	UAA Stop	UGA Stop
UUG } UCA	UUG } UCG	UAG Stop	UGG } Trp
CUU } CCU	CAU } His	CGU } Arg	
CUC } CCC	CAC } His	CGC } Arg	
CUA } CCA	CAA } Gln	CGA } Arg	
CUG } CCG	CAG } Gln	CGG } Arg	
AUU } ACU	AAU } Asn	AGU } Ser	
AUC } UCU	AAC } Thr	AGC } Ser	
AUA } ACA	AAA } Lys	AGA } Arg	
AUG } Met or start	ACG } Gln	AAG } Arg	
GUU } GCU	GAU } Asp	GGU } Gly	
GUC } GCC	GAC } Asp	GGC } Gly	
GUA } Val	GCA } Ala	GGA } Gly	
GUG } GCG	GAA } Glu	GGG } Gly	



Translace



Začátek translace

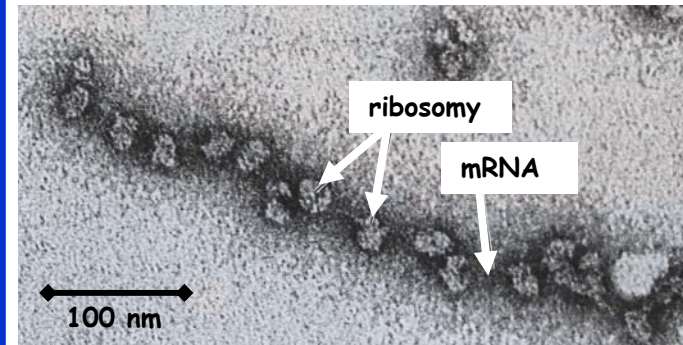


Konec translace



POLYRIBOSOM

(klastř ribosomů překládající určitý úsek mRNA)



Regulace translace

Obvykle se odehrává na úrovni iniciace translace

Blokování mRNA regulačními proteiny

- vazbou na specifické struktury/sekvence v nepřekládané 5' oblasti mRNA, obvykle brání vazbě ribosomů

Nedostatečně dlouhý poly-A konec mRNA

- na 3' nepřekládaném konci mRNA
- mechanismus typický pro dormantní mRNA akumulovanou ve vajíčku

Inaktivace faktorů/ů nutných pro iniciaci translace

- globální inhibice translace
- mechanismus také typický pro vajíčko

Regulace funkce proteinů se odehrává také po jejich syntéze

Posttranslační modifikace proteinu

- proteolytické štěpení pro-proteinu (inaktivní forma) za vzniku aktivního proteinu (např. pro-insulin na insulin)
- přidání modifikujících chemických skupin (fosforylace, glykosylace, acetylace, metylace - a reverze těchto změn)

Transport proteinu do místa jeho funkce

- transport z cytoplasmy do jádra (např. transkripční faktory)
- transport z cytoplasmy na membránu (např. receptory)

Regulace doby života proteinu

- doba života proteinů se pohybuje v širokém rozmezí (minuty až dny)

Regulace doby života proteinů

Délka života proteinů spolurozhoduje o jejich účinkování v buňce

Degradace proteinů musí být proto realizována mechanismem umožňujícím precizní řízení

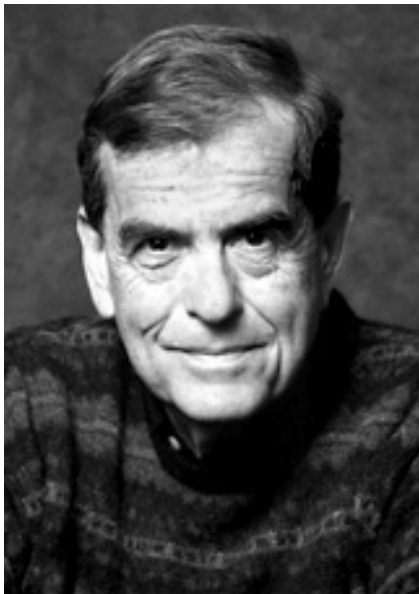
Který to je ?

~~Hydrolytické štěpení proteinů v lysosomech~~

Degradace proteinů „ubiquitin-proteasomovou“ cestou

Nobelova cena za chemii 2004

„za objev degradace proteinů mechanismem využívajícím ubiquitin“



Aaron Ciechanover
*1947

Israel

Technion - Israel Institute
of Technology, Haifa



Avram Hershko
*1937

Israel

Technion - Israel Institute
of Technology, Haifa



Irwin Rose
*1926

USA

University of California
Irvine, CA, USA

Degradační cesta „ubiquitin-proteasom“

KLÍČOVÁ FAKTA

Je zodpovědná za degradaci většiny (minimálně 80%) všech druhů proteinů přítomných v buňce

Realizuje se v cytoplasmě i v jádře

Je zodpovědná za:

- regulaci hladiny/funkce mnoha proteinů
(cykliny, transkripční faktory, signální proteiny,...)
- eliminaci denaturovaných, nesprávně syntetizovaných, nesprávně posttranslačně upravených, či jinak poškozených proteinů
(až 30% nově syntetizovaných proteinů je u eukaryot degradováno během několika minut po jejich syntéze)

Její klíčoví „hráči“ jsou:

Ubiquitin - evolučně konzervovaný protein, 76 aminokyselin

Proteasom - proteolytický komplex, jehož funkce je závislá na ATP, a který sestává ze tří jednotek:

- jeden centrální 20S proteasom (štěpí proteiny)
- dva 19S komplexy (řídí substrátovou specifitu a hrají regulační úlohu)

Molekulární aparáty pro translaci a degradaci
proteinů jako zdroje či účastníci abnormalit
člověka

ANO či NE ???



A N O

Abnormální translace jako důvod rakoviny?

Podpůrné nálezy:

Vnímavost k nádorům má vazbu na geny, které kontrolují proteosyntézu (např. TCS1/2, PTEN) a biogenezu ribosomů (např. DKC1, S19)

Experimenty na zvířatech ukázaly, že deregulovaná exprese regulátorů translace má onkogenní efekty (například myši s mutovaným genem Dkc-1 mají tendenci ke vzniku nádorů)

Některá efektivní protinádorová léčiva jsou cílena na klíčové regulátory proteosyntézy (například Rapamycin ovlivňuje mTOR kinázu)

Možné mechanismy:



Abnormality v intracelulární degradaci proteinů jako důvod neurodegenerativních onemocnění?

Proteinopatie



Neurodegenerativní onemocnění s pozdním nástupem, která jsou typická akumulací agregátů toxických proteinů

Příklady onemocnění:

Cytosolická akumulace

- Parkinsonova choroba
- Huntingtonova choroba s nástupem v dospělosti

Nukleární akumulace

- Spinocerebelární ataxie typu 1

Extracelulární akumulace

- Alzheimerova choroba (beta amyloid)

Příklady dysfunkcí:

Hladiny a aktivity 20/26S proteasomů jsou sníženy v citlivých oblastech u pacientů se sporadickou Parkinsonovou chorobou

Autosomálně recesivní mutace genu E3 ligázy (parkin), způsobující ztrátu funkce, vyvolává Parkinsonovu chorobu.

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)



NEKRÓZA

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

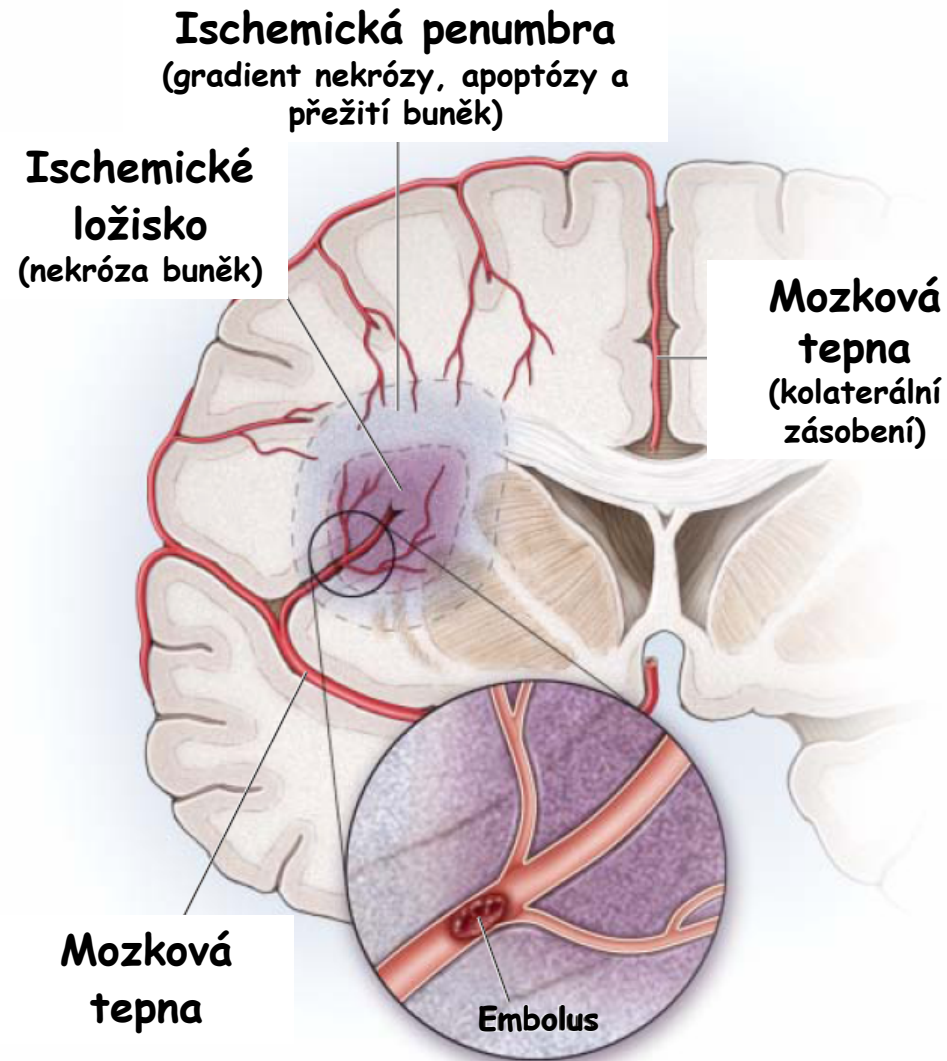
- Zduření jádra
- Zduření buňky
- Disrupce buněčných organel a membrán
- Ruptura buňky a uvolnění buněčných komponent
- Zánětlivá reakce

Patologický proces

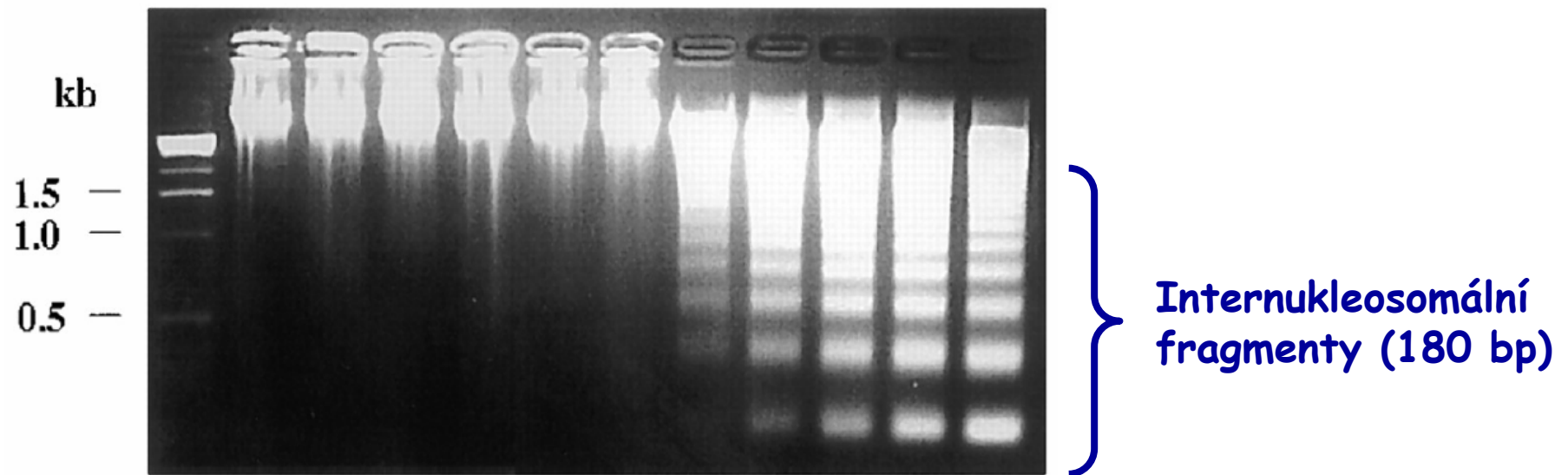
Mechanismus

Histologické
a
biochemické
znaky

Apoptóza a nekróza při nemoci



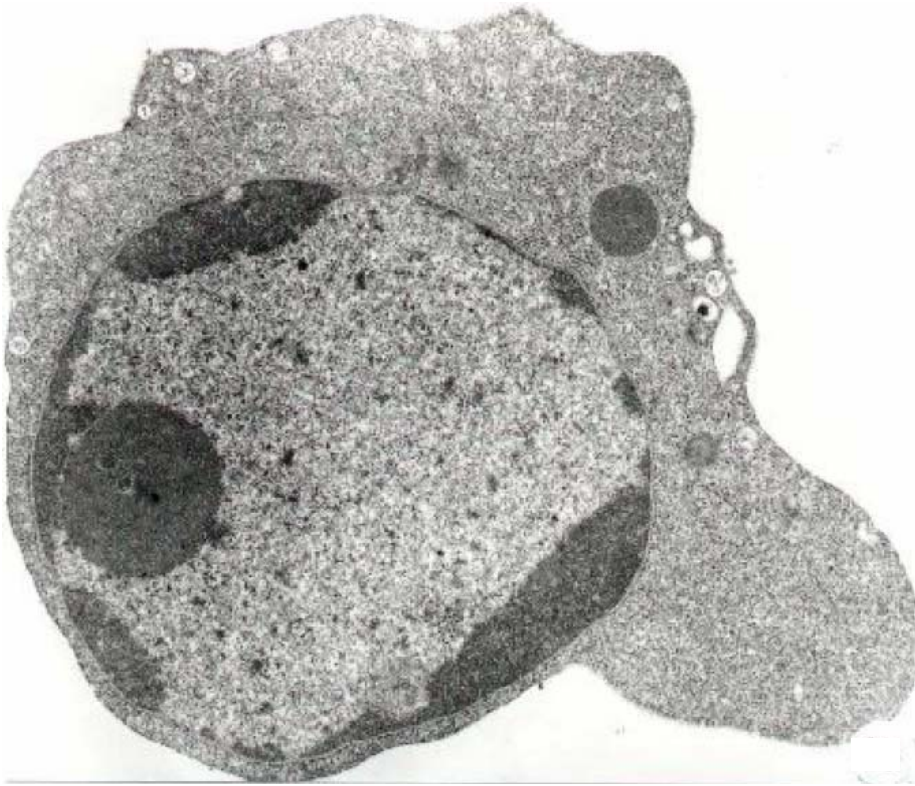
Fragmentace genomické DNA



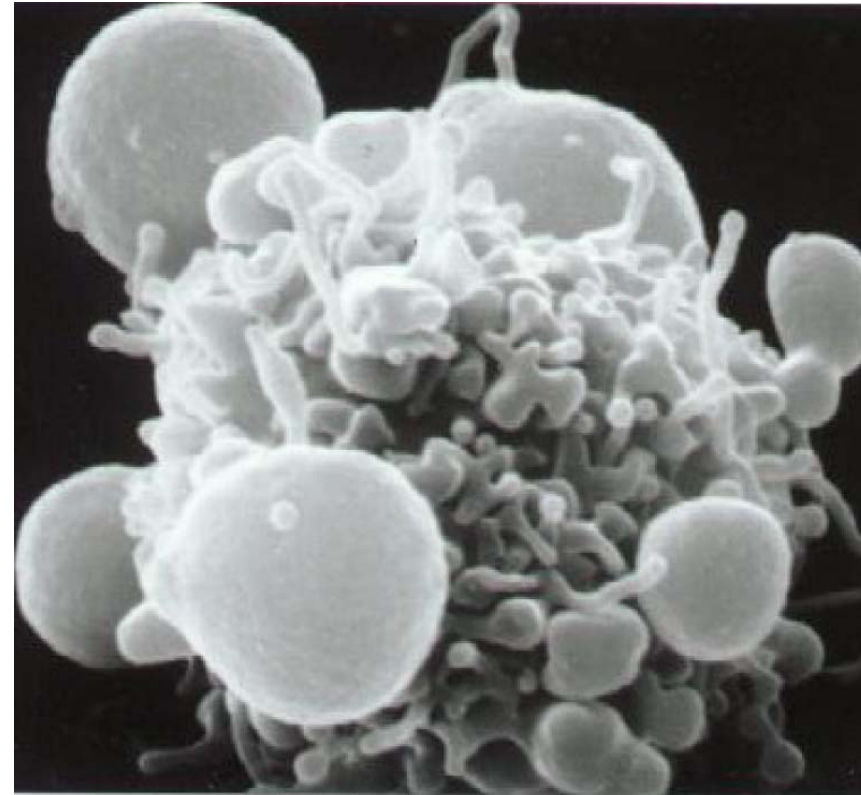
Elektroforetická separace DNA v agarózovém gelu

Morfologické znaky apoptózy

- Kondenzace chromatinu
- Tvorba měchýřků na povrchu buněk



Obraz v transmisním elektronovém mikroskopu



Obraz ve skenovacím elektronovém mikroskopu

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

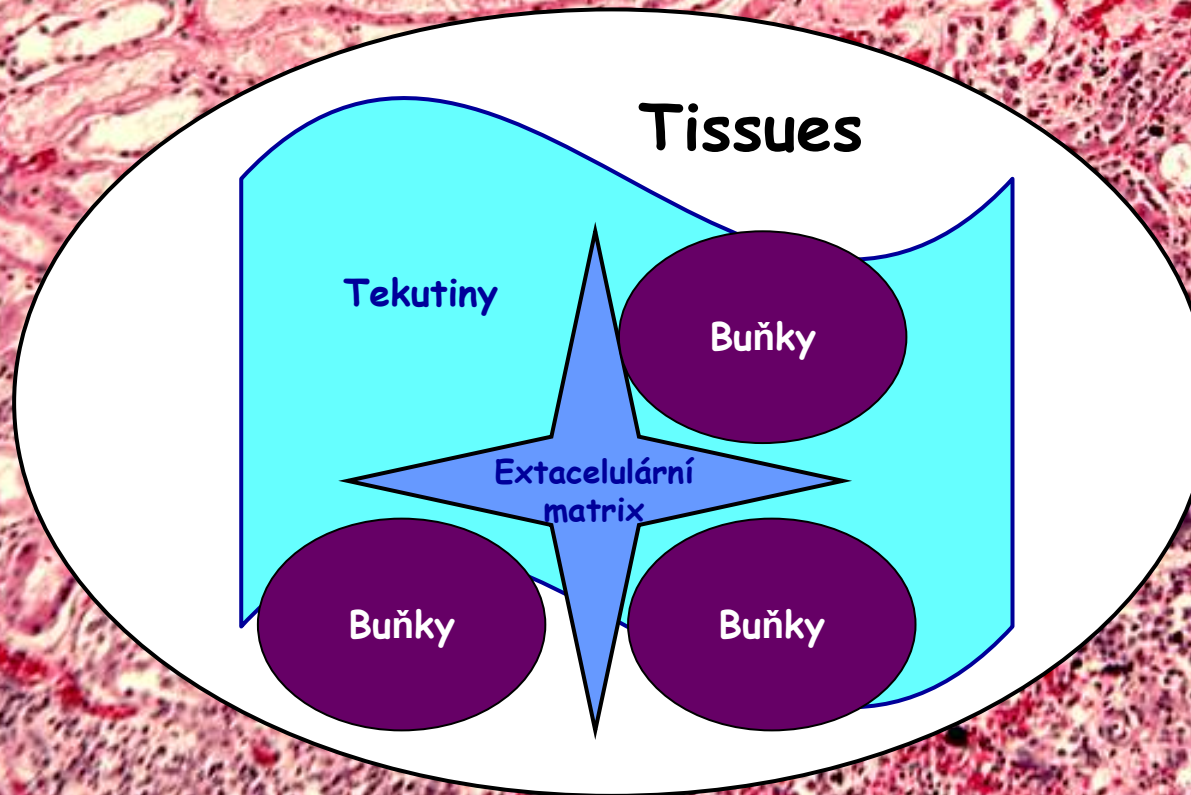
Nemoci + Apoptóza

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 !!!

Pochopení komplexních systémů musí stát
na pochopení struktury a funkce jejich součástí



Tekutiny

- Intersticiální tekutina
 - Plazma (krev)
- Lymfa (v lymfatických cévách)
 - Cerebrospinální mok
- Intracelulární tekutina (cytosol)

Vše je produktem buněk !

Histologické metody studia buněk a tkání 1

Učinit pozorovatelným



Stabilizovat struktury

Fixace

Učinit objekty menšími - dostupnými pro světlo

Zalítí + Příprava řezů

Zviditelnit struktury

„Barvení“

Zvětšit



Použití mikroskopů



Světelné (optické) mikroskopy

(interakce fotonů s hmotou)

Rozlišení 0.1 μm

- Pouze s viditelným světlem
- S fluorescenčním světlem
- Konfokální laserový skenovací mikr.



Elektronové mikroskopy

(interakce elektronů s hmotou)

Rozlišení až 0.1 nm (v praxi 1 nm)

- Transmisní
- Skenovací

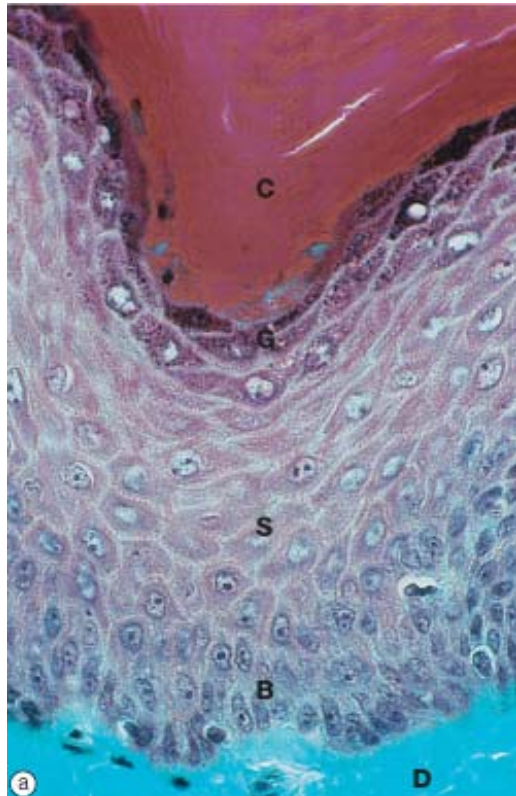
Marcello Malpighi

1628 - 1694

Italský lékař

Zakladatel mikroskopické anatomie a první histolog

- Popsal **chut'ové pohárky**
- Popsal krevní **kapiláry**
- Možná první, kdo viděl v mikroskopu **červené krvinky**



Malpighiho vrstva kůže

Stratum basale a stratum spinosum kůže

Malpighiho tělíska v ledvinách a slezině



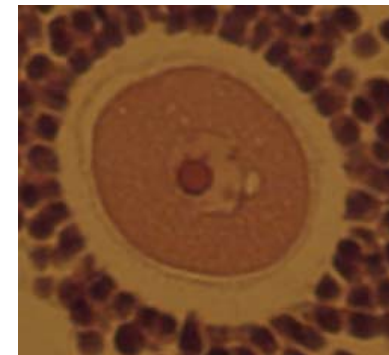
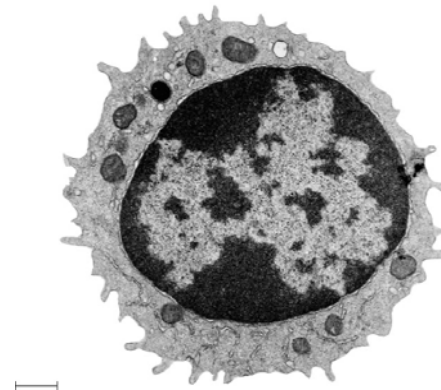
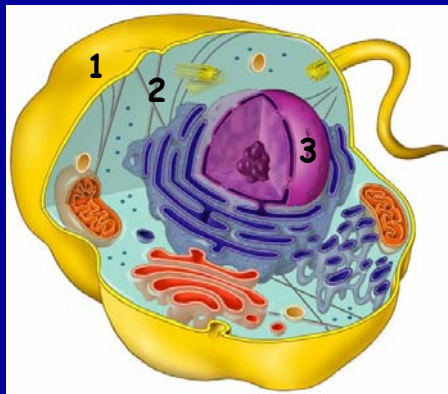
MARCELLO MALPIGHI.
From an engraving of the engraving by A. M. Tabor, presented to the Royal Society by Malpighi.

Žádná buňka není zcela stejná jako buňky ostatní, všechny buňky ale mají společné strukturální a funkční znaky.

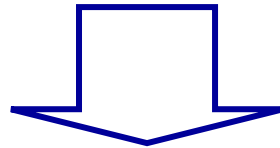
Ne všechny buňky obsahují všechny komponenty o kterých budeme mluvit !

Buňky mají 3 hlavní součásti:

1. Plazmatickou membránu
2. Cytoplazmu
3. Jádro (eukaryontní b.)

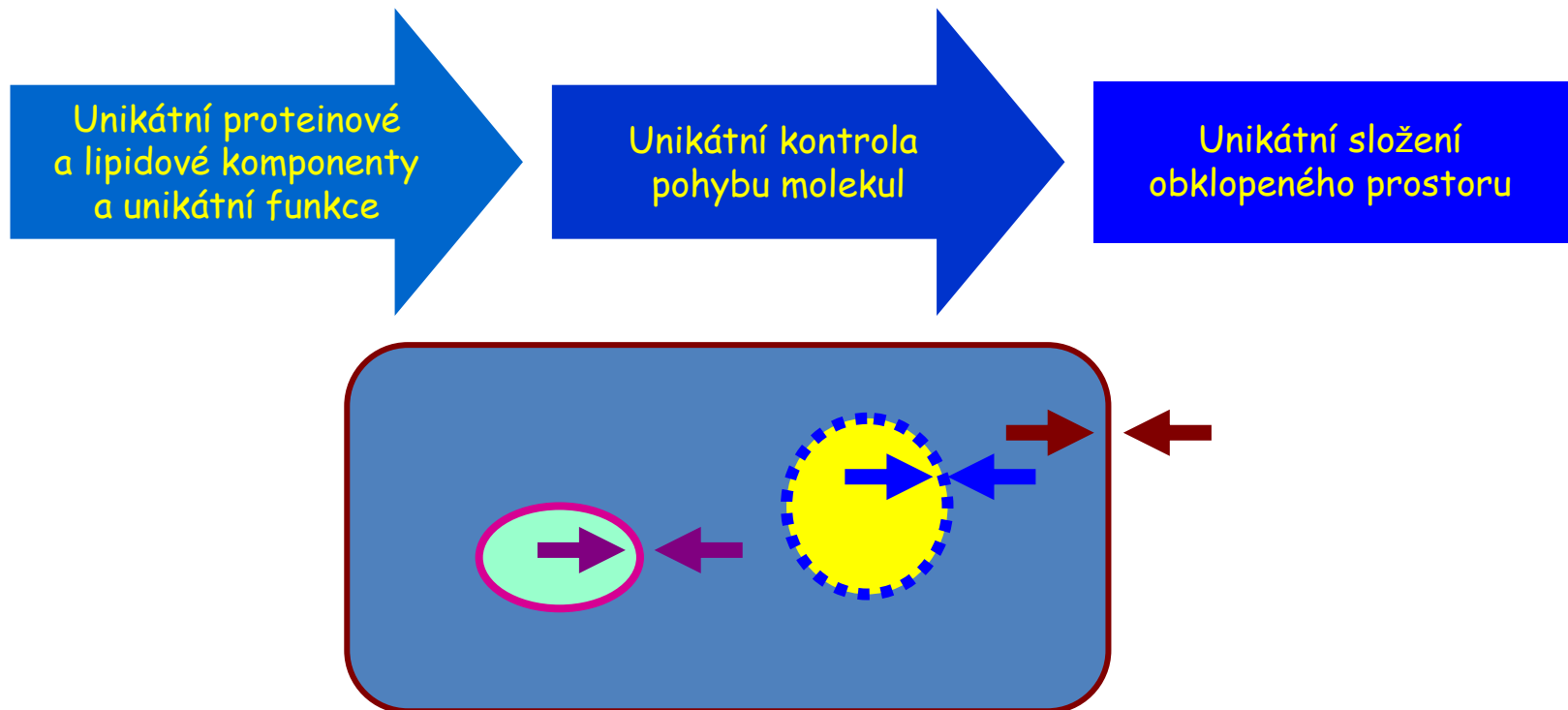


Organizace buňky je postavena na KOMPARTMENTALIZACI



Specializované funkce se mohou plnit v různých sektorech buňky

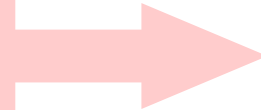
Membrány tvoří hranice mezi jednotlivými kompartmenty



Kompartmenty & Membrány

Mnoho malých kompartmentů je lepší

Větší plocha membrány
na obklopený objem



Více plochy pro:

- regulaci
- výměnu živin
- odstranění odpadních látek

Plocha povrchu je proporcionální se čtvercem poloměru (r^2).
Objem je proporcionální se třetí mocninou poloměru (r^3).

Zmnožení X Redukce
vybraných kompartmentů

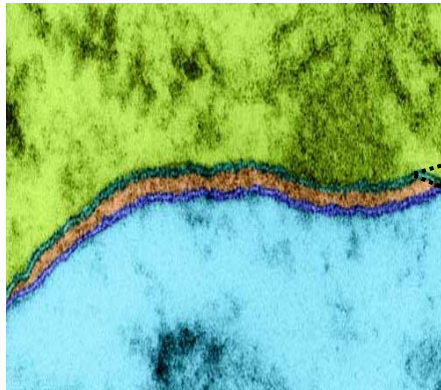


Specializace buněk
pro různé funkce

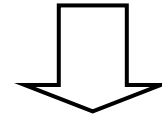
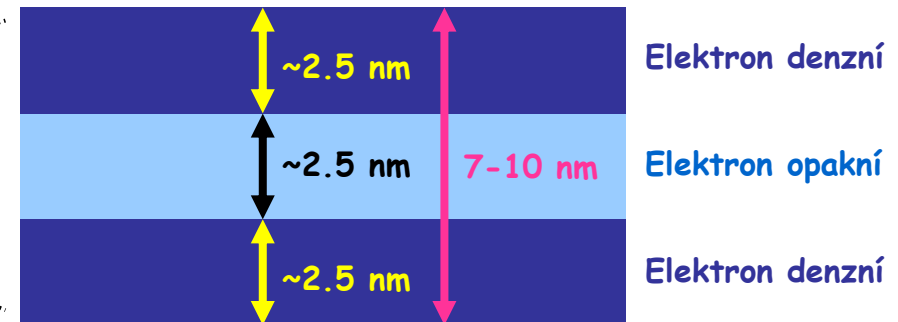
Diferenciace buněk

Drsné ER v sekrečních buňkách
Mitochondrie v buňkách srdeční svaloviny

Struktura biologické membrány 1



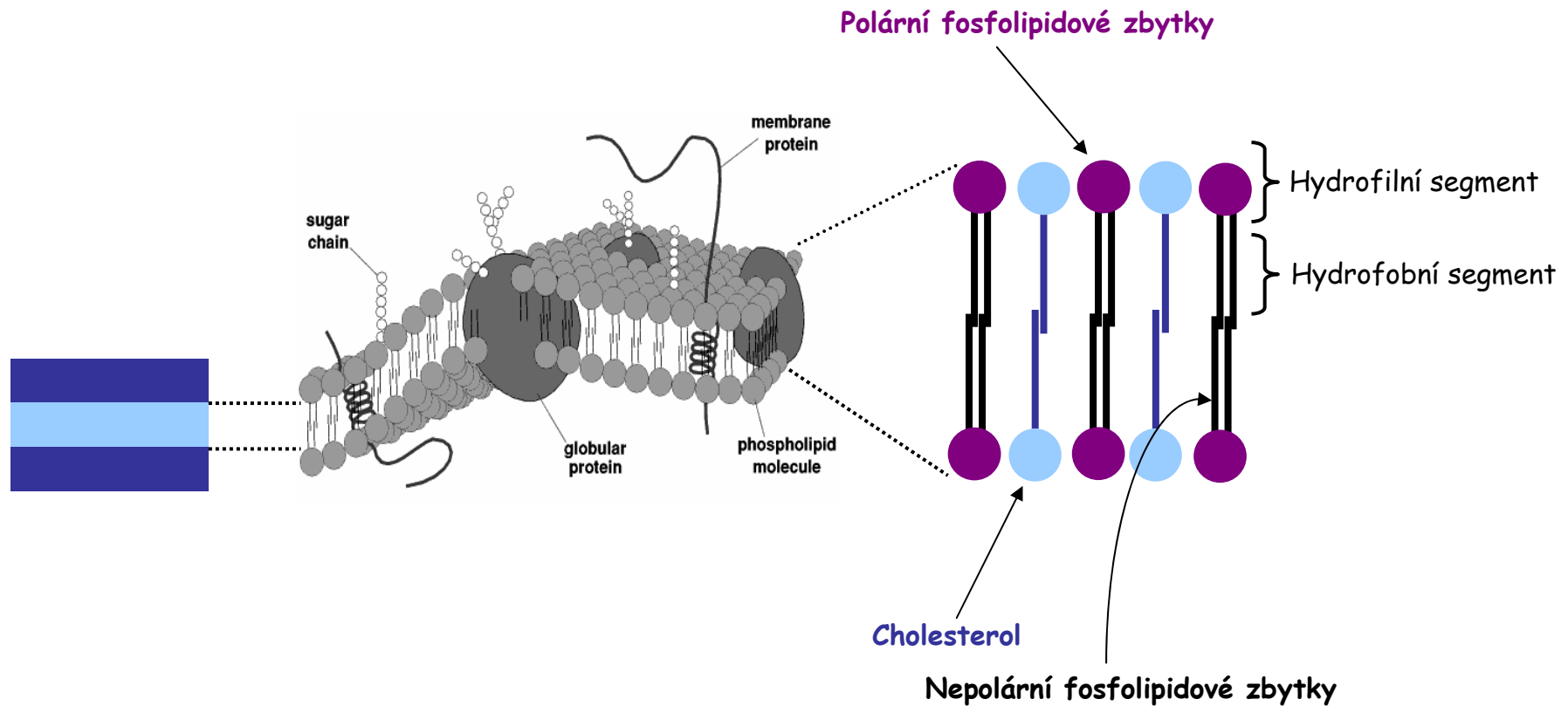
Buněčné membrány viděné elektronovým mikroskopem (pseudokolorováno)



Membránová jednotka
společná všem membránám

Struktura biologické membrány 2

Fluidní mosaika - Dvojvrstva lipidů s mobilními globulárními proteiny



Struktura biologické membrány 3

Membránové lipidy

Představují 90-99% molekul v membráně (v počtech).

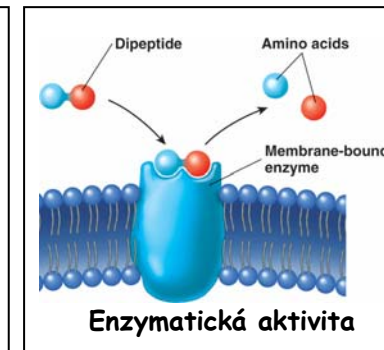
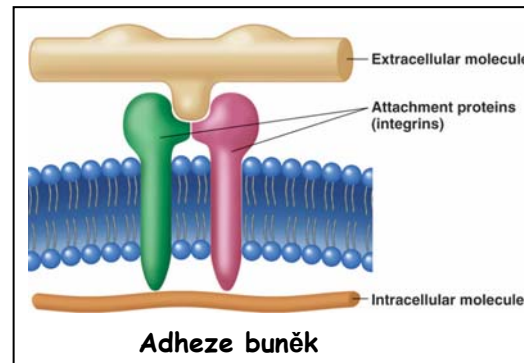
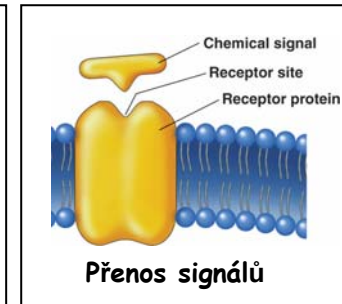
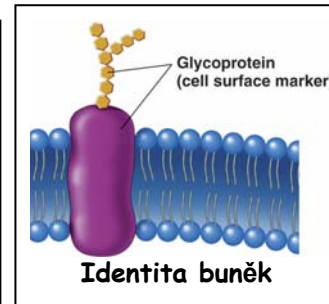
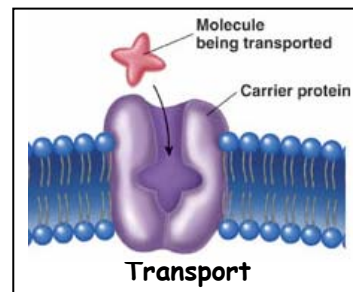
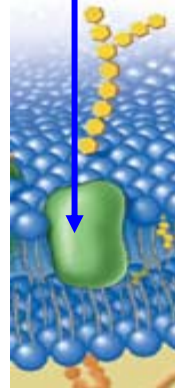
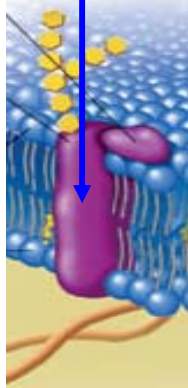
- Fosfolipidy - 75%
- Cholesterol - 20%
- Glykolipidy - 5% - pouze cytoplazmatická membrána - GLYCOCALYX

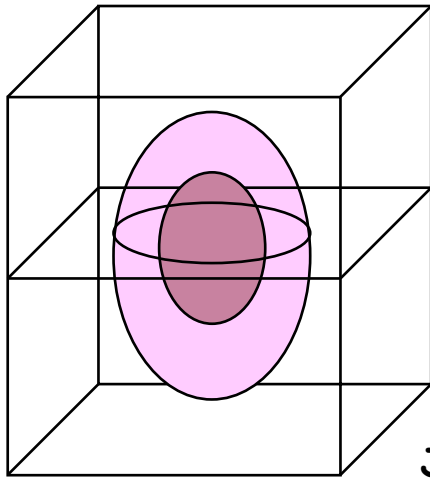
Membránové proteiny

Představují 1-10% všech molekul, ale 50% hmotnosti díky jejich velikosti.

Integrální

Periferní





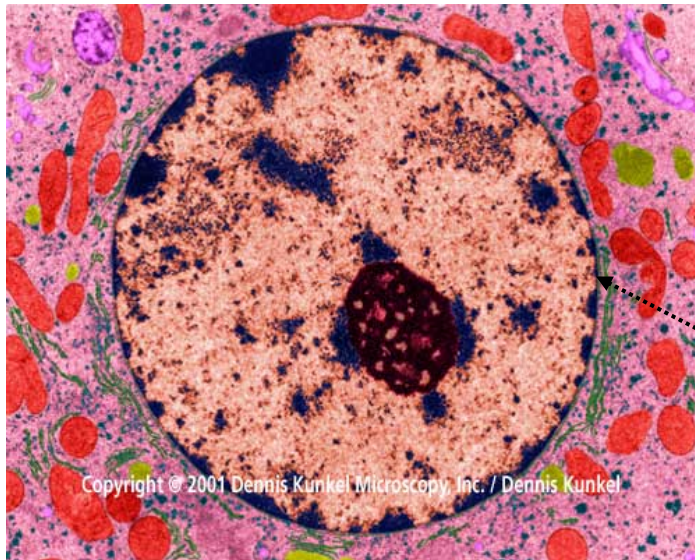
Jádro jaterní buňky

Jádro 1

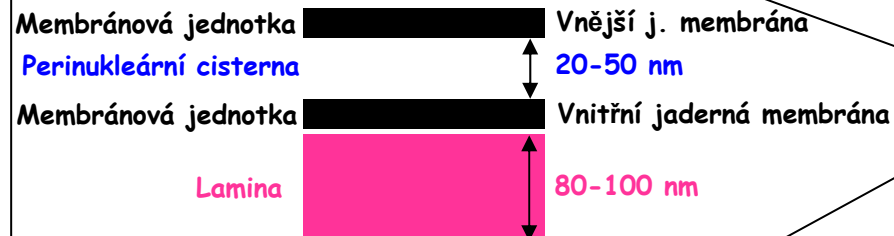
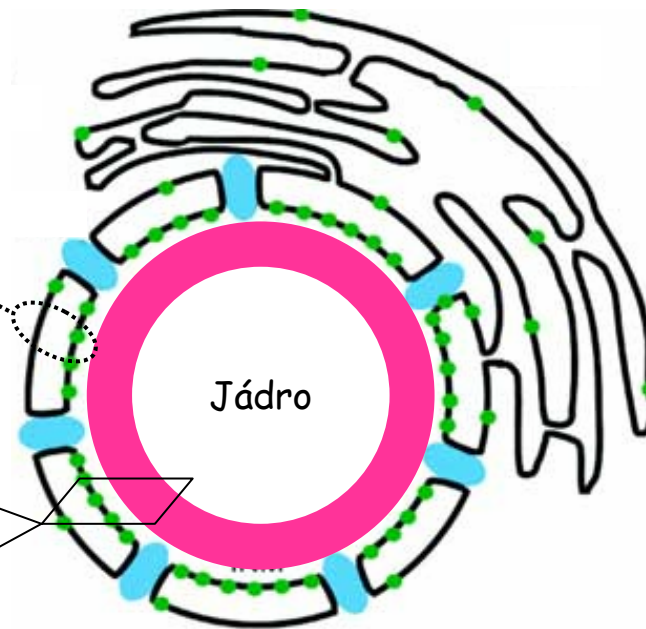
membránou ohraničená organela

Nejčastěji:

- Sférické (5-10 μm) (lobulární, prohnuté, diskovité,...)
- Uloženo centrálně
- Jedno v buňce (osteoklast více, erytrocyt žádné)

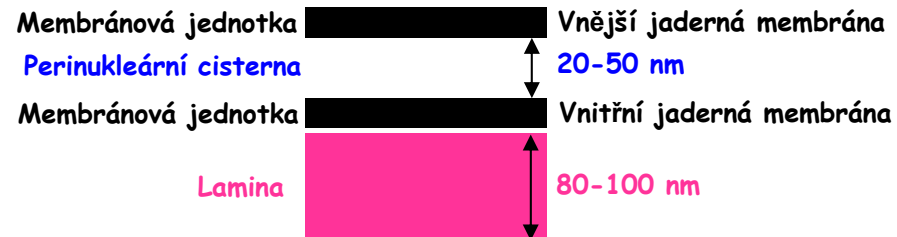
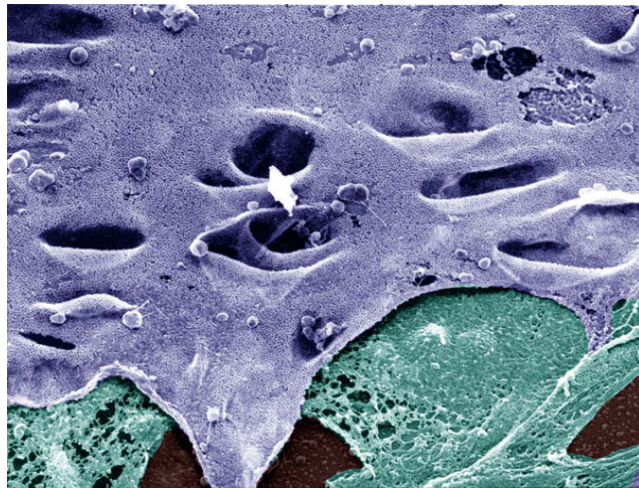
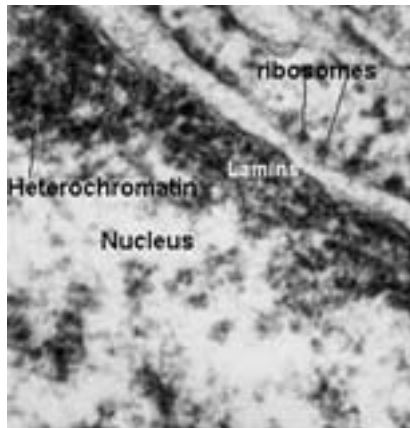


Jaderná membrána



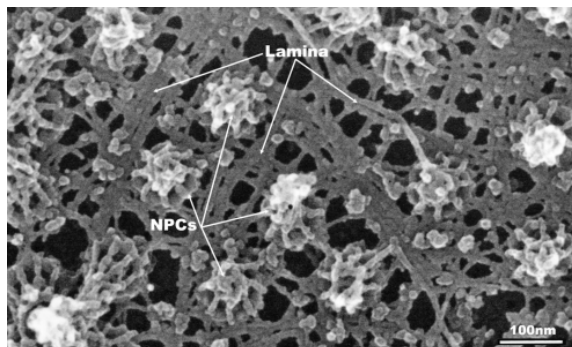
Jádro 2

Jaderná membrána - pokračování



Laminy:

- Intermediární filamenta - proteiny (A, B, C)
- Tvoří síť na vnitřní straně VJM, pronikají i do nukleoplazmy
- Udržují pevnost a architekturu jádra
- Ukotvují chromatin
- Regulují replikaci DNA a transkripci rRNA
- Účastní se regulace apoptózy



Laminopatie

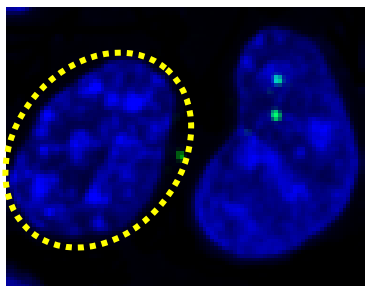
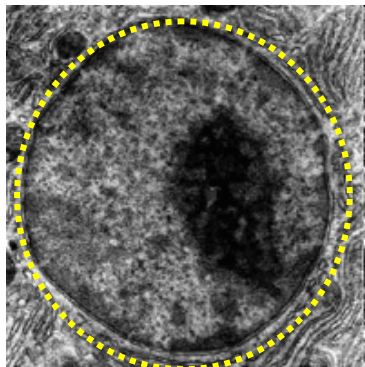
- Lidské choroby (nejméně 13 známých)
- Mutace v genech pro laminy (popsáno asi 200 mutací)
- Deregulace exprese genů
- Předčasné stárnutí



Hutchinson-Gilford progerie

Vzácná - 1-4 na 8 milionů porodů
Missense mutace v laminu typu A

Jádro 4 Chromatin



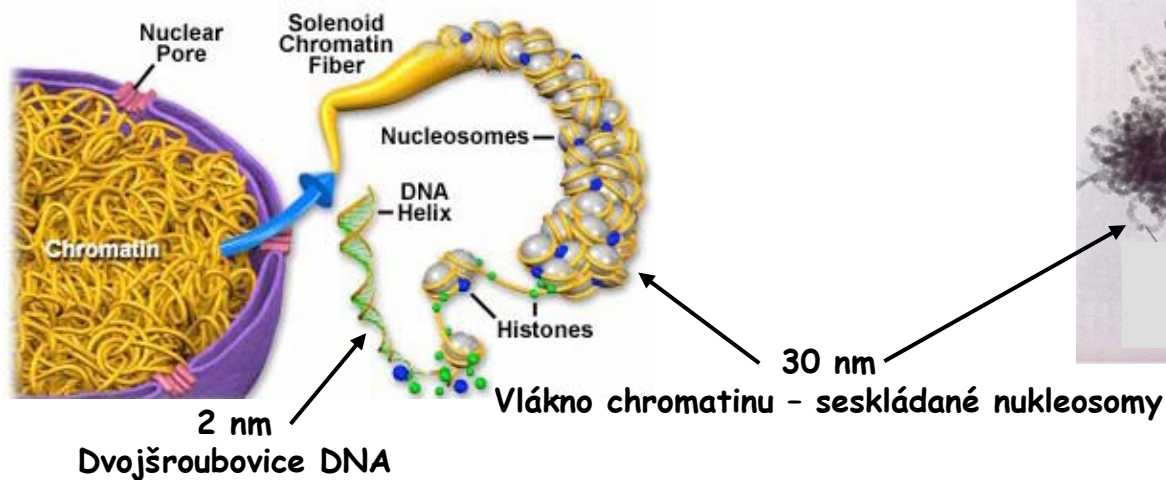
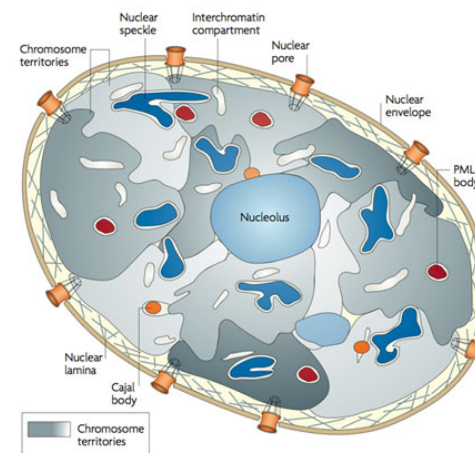
Interfázové jádro

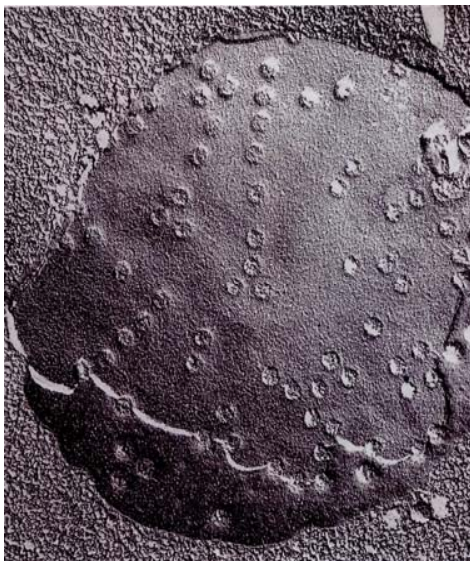
Heterochromatin

Feulgen pozitivní - tmavé ve světelném mikr.
Tmavé/denzí granula v TEM
Transkripčně inaktivní

Euchromatin

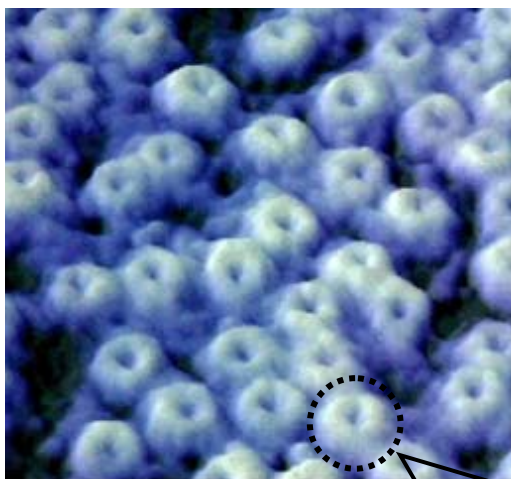
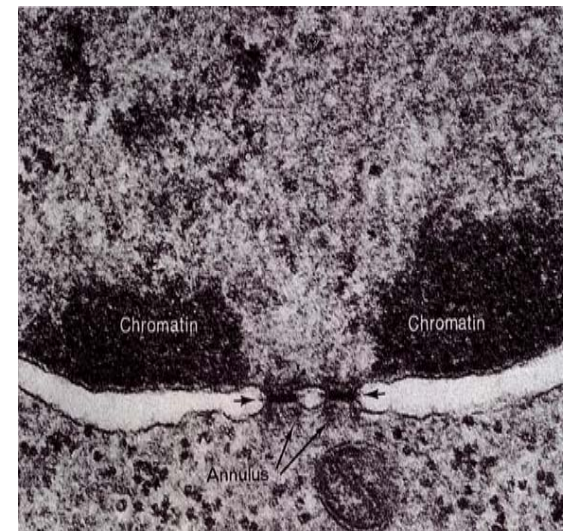
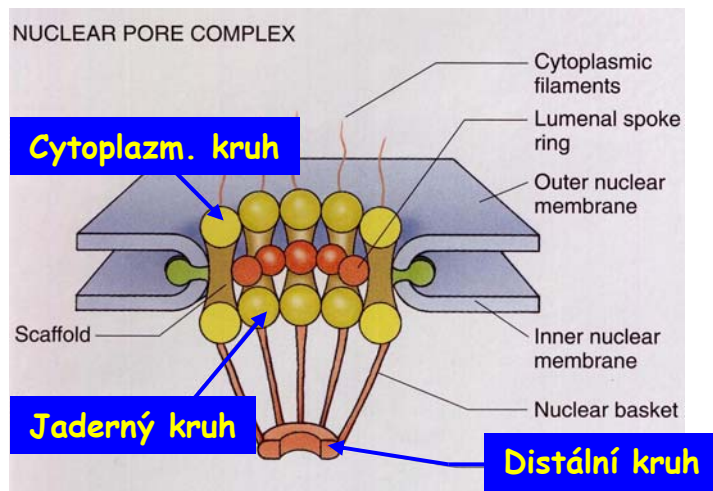
Neviditelný ve světelném mikroskopu
Relaxované chromosomy
Transkripčně aktivní





Jádro 3

Komplex jaderného póru



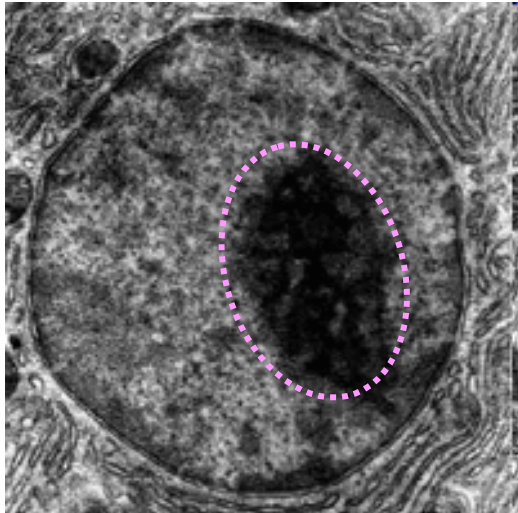
Průměr ~ 100 - 125 nm

Tři kruhy (každý 8 podjednotek)

Vnitřní vláknitý košík

Transport jadernými póry (Nukleocytoplazmatický přesun)

- Proteiny, RNA, podjednotky ribosomů
- Oboustranný
- Vyžaduje jaderné lokalizační/exportní signály
- Podporován importiny/exportiny
- Regulován Ran GTPázami

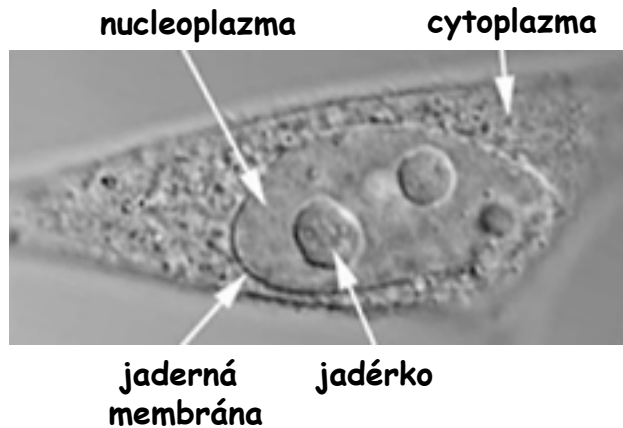


Jádro 5 Jadérko

Není ohraničeno membránou

Hlavní funkce

Syntéza RNA
Skládání ribosomů



Pars granulosa
Skládání ribosomů

Pars fibrosa
Primární transkripty rRNA

Fibrilární centra
Netranskribovaná DNA

NOR - nukleolární organizátor (na DNA)

V lidských buňkách na 5-ti chromosomech
(chr. 13, 14, 15, 21, 22)

Děkuji za pozornost

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