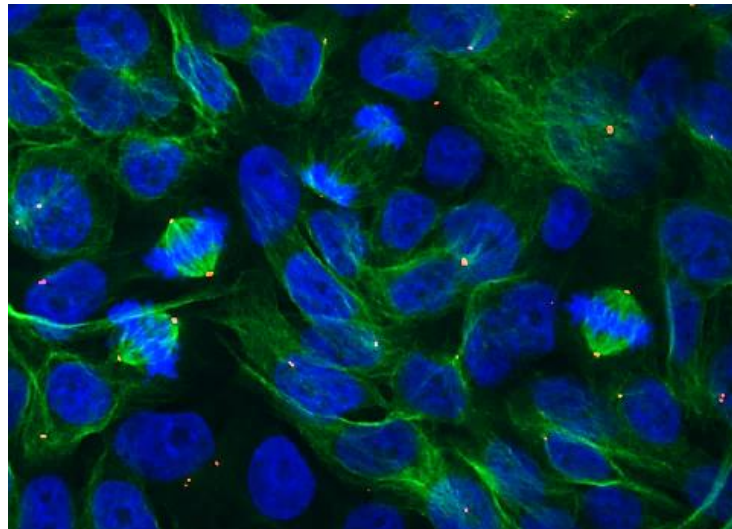


# Mitotické dělení ve zdravých a nádorových buňkách

---

seminár

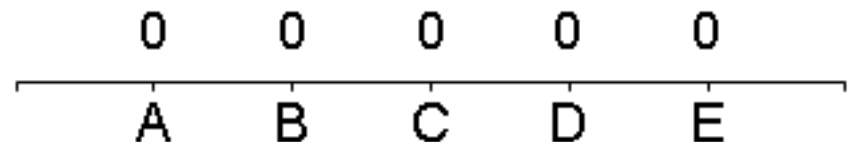


Lívia Eiselleová

[eiselle@med.muni.cz](mailto:eiselle@med.muni.cz)

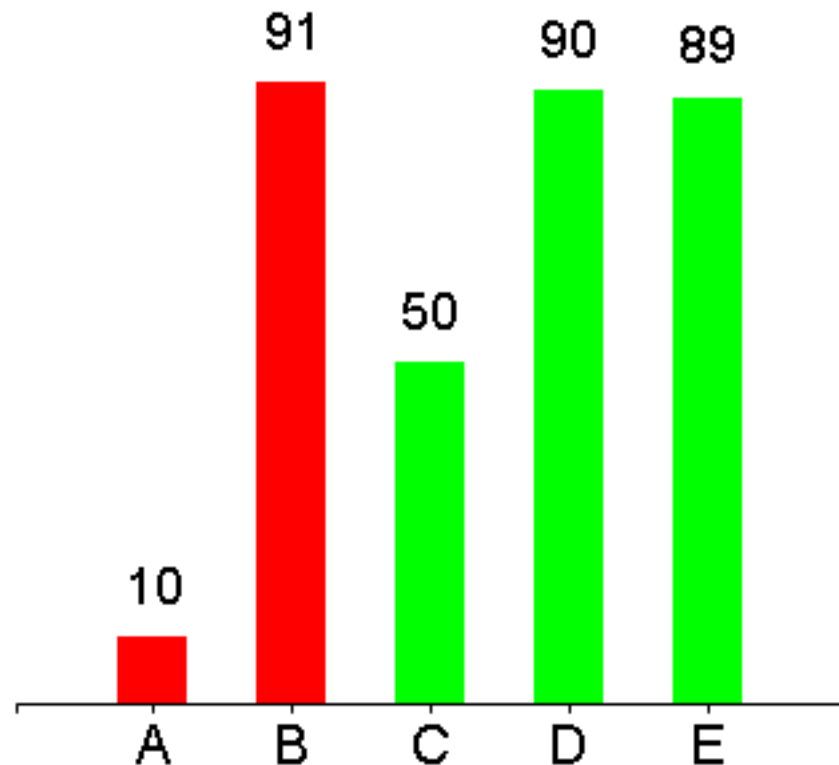
# Co je účelem mitotického dělení?

- A. Produkce gamet
- B. Produkce dvou ve všech ohledech identických buněk
- C. Klíčový proces udržující populace asexuálních organismů
- D. Regenerace tkáně
- E. Růst organismu



# Co je účelem mitotického dělení?

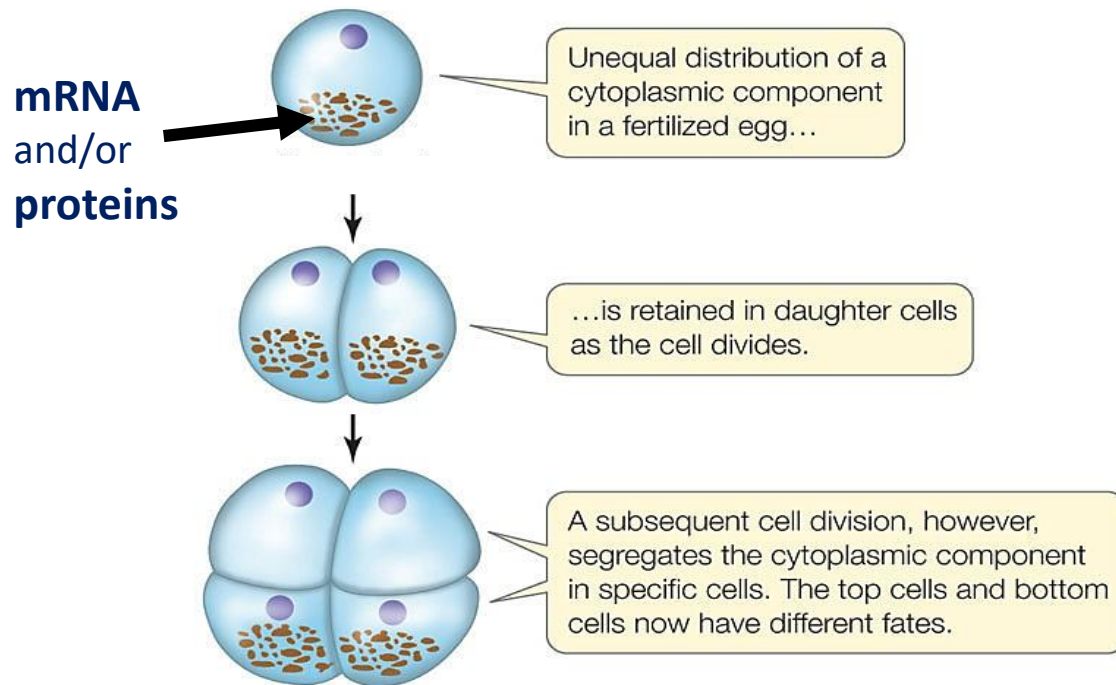
- A. Produkce gamet
- B. Produkce dvou ve všech ohledech identických buněk
- ✓ C. Klíčový proces udržující populace asexuálních organismů
- ✓ D. Regenerace tkáně
- ✓ E. Růst organismu



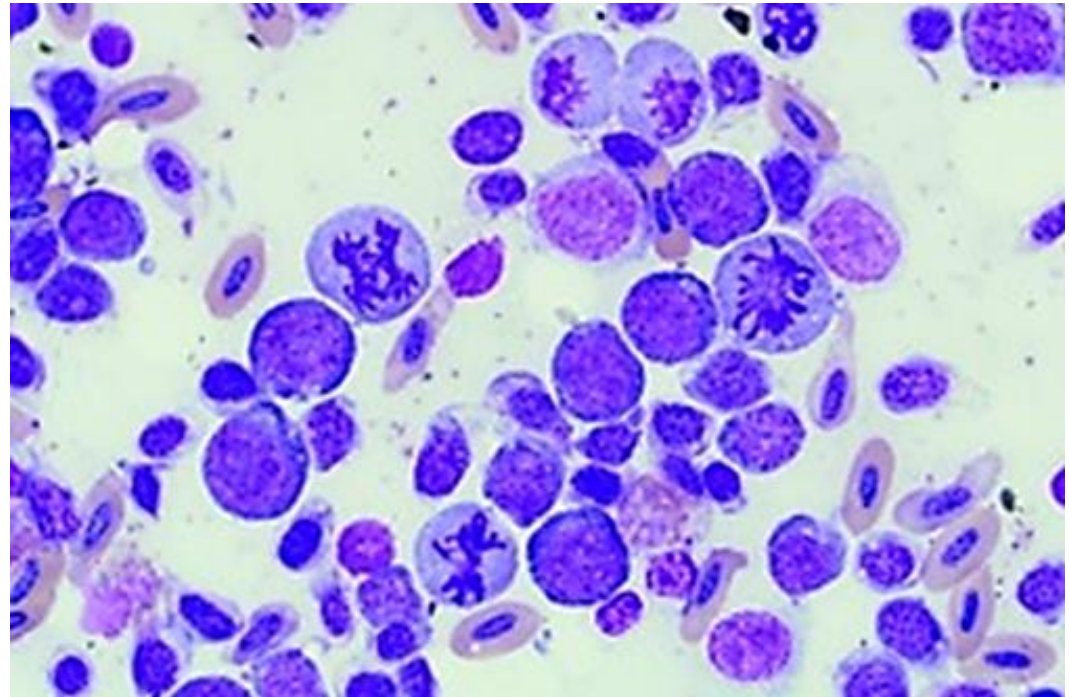
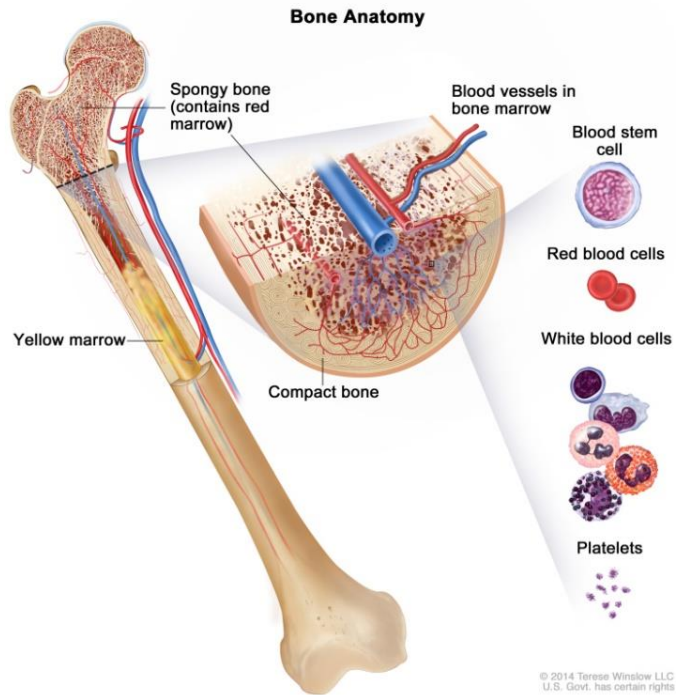
# Účel mitotického dělení

- rozdělení buňky za vzniku dvou **geneticky identických** buněk
- umožnit mnohobuněčnému organismu **organizovaně růst**
- **regulovat regeneraci** - nahradit poškozené a opotřebované buňky

Účelem mitotického dělení není vždy vytvořit dvě zcela identické buňky



# Regenerace tkání



Trust LIV! 😊

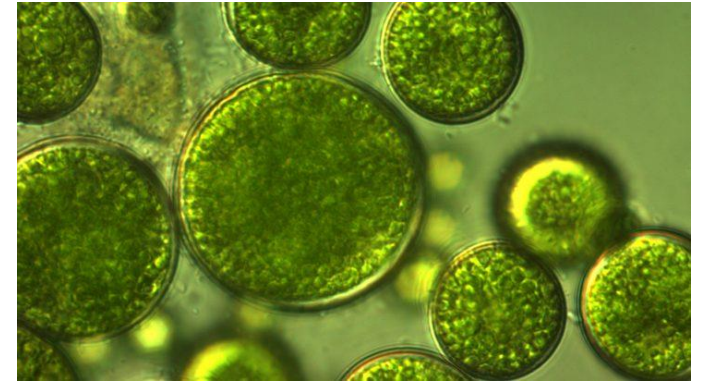
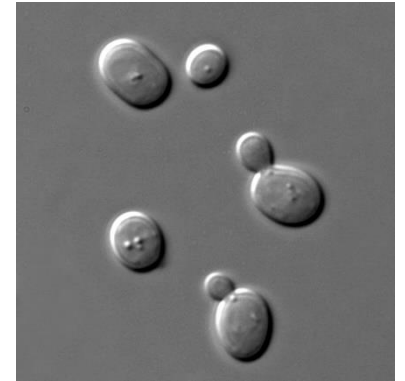




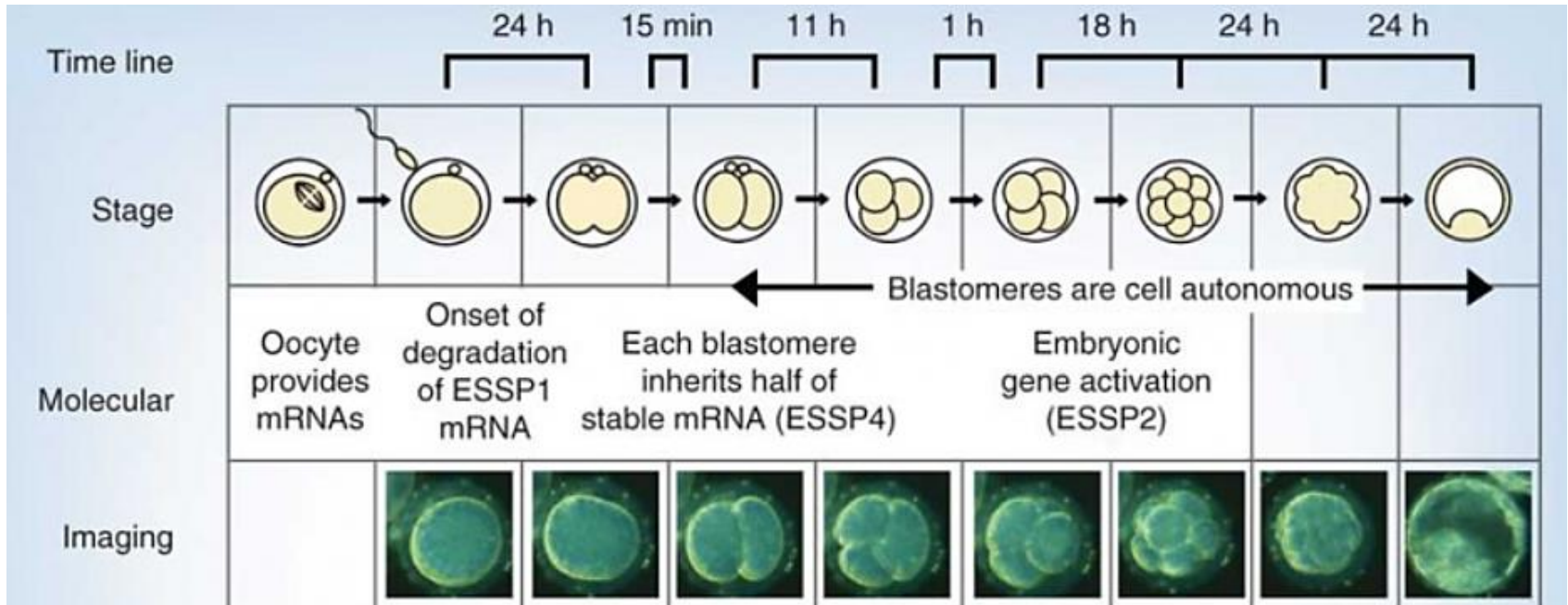
# Asexuální reprodukce

---

- především u jednobuňových organismů, některých menších živočichů a u rostlin
- potomci jsou identičtí s rodiči
- většinou rychlý proces, který vede k velkému počtu potomků
- **binární dělení** (nálevníci, améby, bakterie, řasy)
- **pučení** (kvasičky)

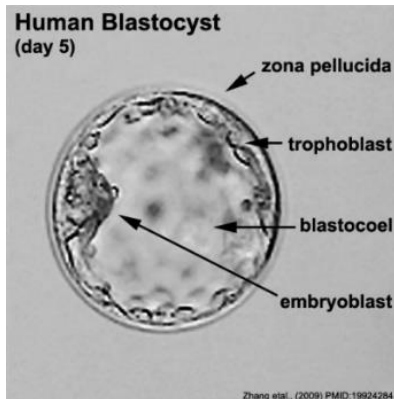


# Rüst organismu



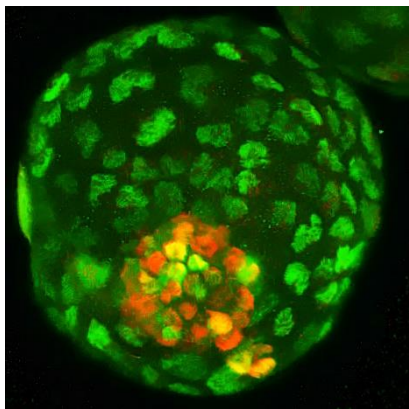
Niakan et al, Development, 2012

[https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Blastocyst\\_Day\\_3-6\\_Movie](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Blastocyst_Day_3-6_Movie)





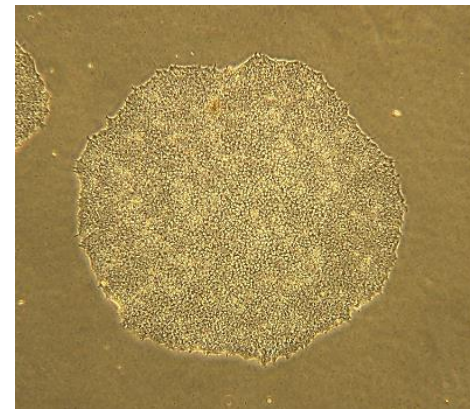
# Růst organismu – lidské embryo ve stadiu blastocysty



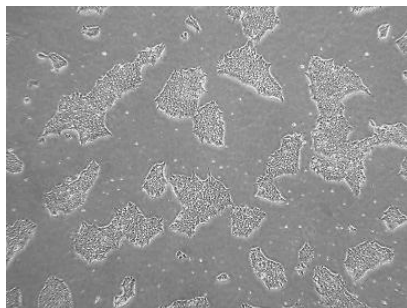
myší blastocysta  
(Li et al., Cell, 2019)



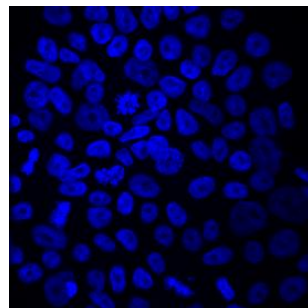
lidská blastocysta



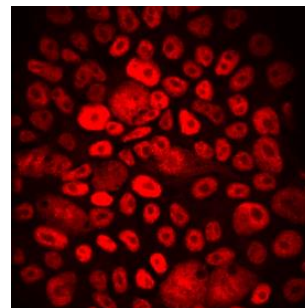
kolonie lidských  
embryonálních buněk



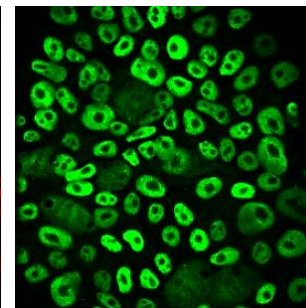
kolonie lidských  
embryonálních buněk



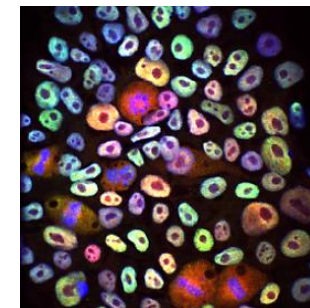
DAPI



oct4



NANOG



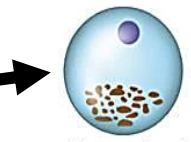
merge



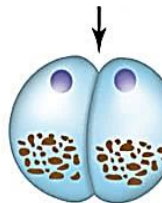
# Mitoza v raním lidském embryu

- v raném vývoji do fáze moruly buňky procházejí rychlými buněčnými mitotickými děleními a nemají obvyklou regulaci kontrolního bodu G1 a G2
- během M-fáze buňky stále udržují kontrolní bod sestavení vřeténka, ale ne aktivaci apoptózy. Kontrolní bod sestavení vřeténka se zdá být také klíčem k progresi mitotického buněčného cyklu během těchto časných buněčných dělení

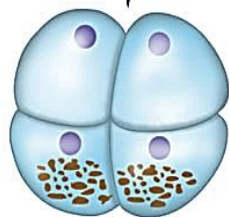
**mRNA and/or proteins**



Unequal distribution of a cytoplasmic component in a fertilized egg...

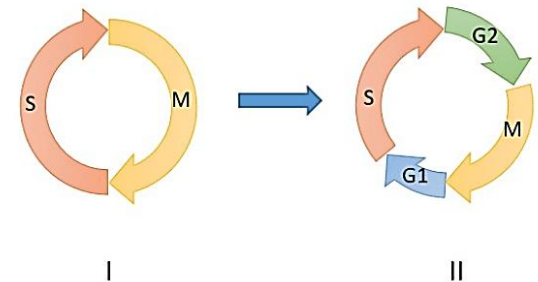


...is retained in daughter cells as the cell divides.

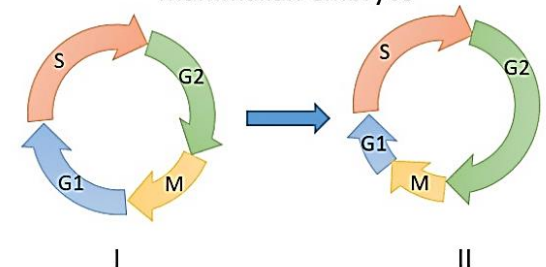


A subsequent cell division, however, segregates the cytoplasmic component in specific cells. The top cells and bottom cells now have different fates.

Fast cleaving embryos

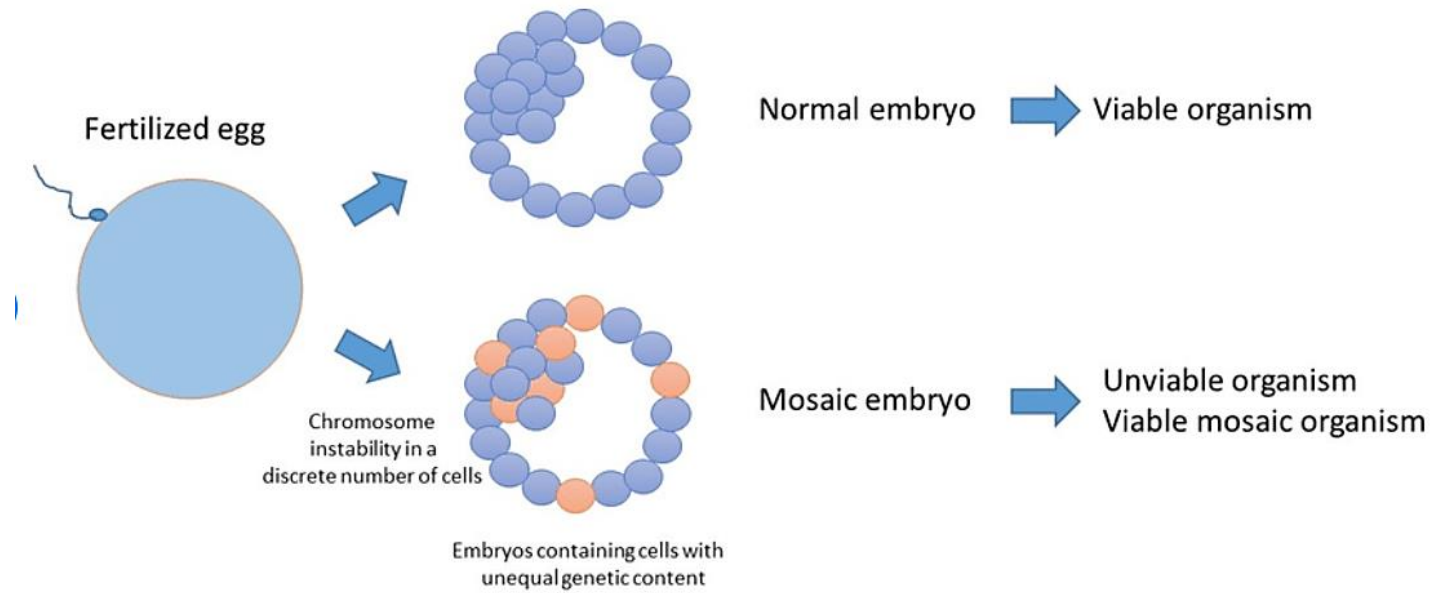


Mammalian embryos



## Mitoza v raním embryu

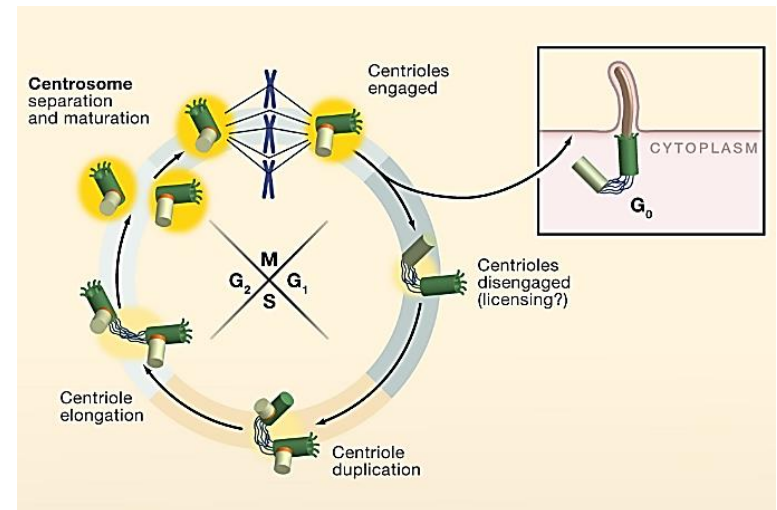
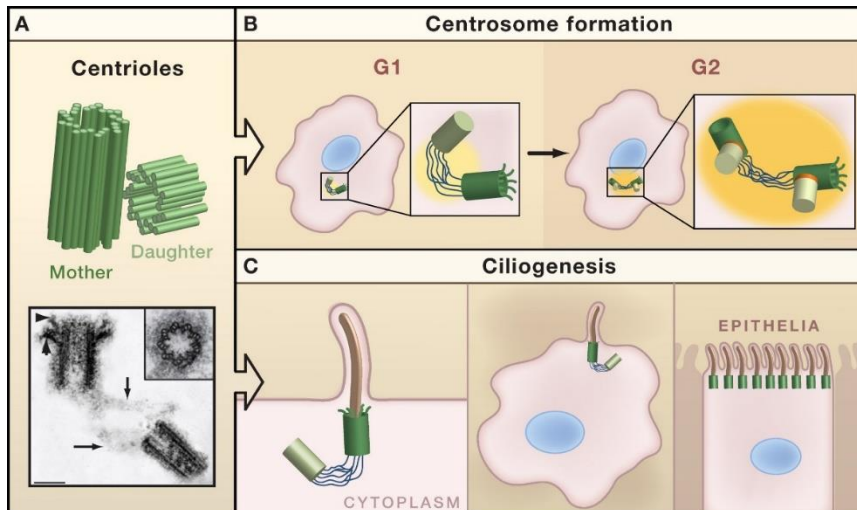
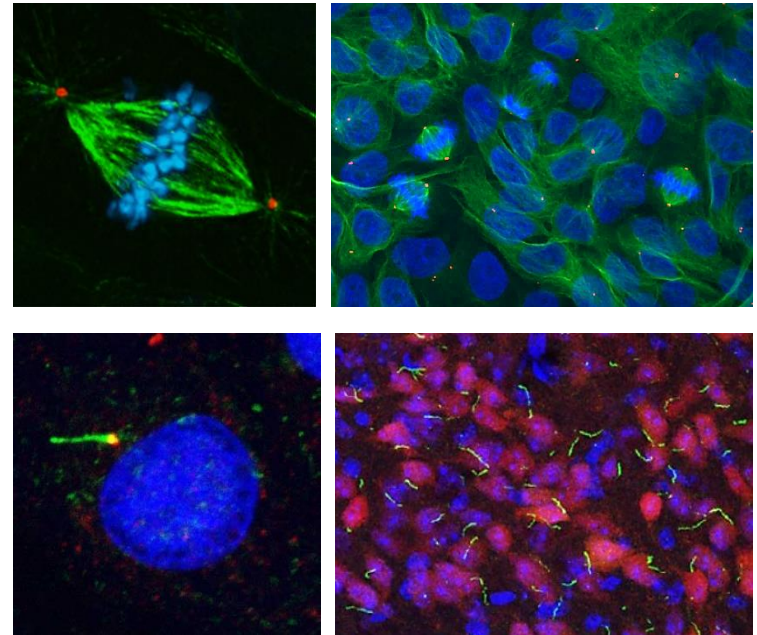
- zygota: rychlý buněčný cyklus bez významného celkového růstu (vytvářejí shluk buněk stejné velikosti jako původní zygota – zona pellucida)
- buňky vzniknuté rýhováním se nazývají blastomery a tvoří kompaktní hmotu zvanou morula
- rýhování končí tvorbou blastuly
- mitotické chyby **jsou běžné** během raného embryonálního vývoje
- tyto chyby produkují dvě nebo více karyotypicky odlišných buněčných linií v rámci jednoho embrya - jev nazývaný chromozomální **mozaika**



Consequences of chromosome abnormalities in early mammalian embryos. Each circle represent a blastomere, normal (blue) or having a different genetic content (orange).

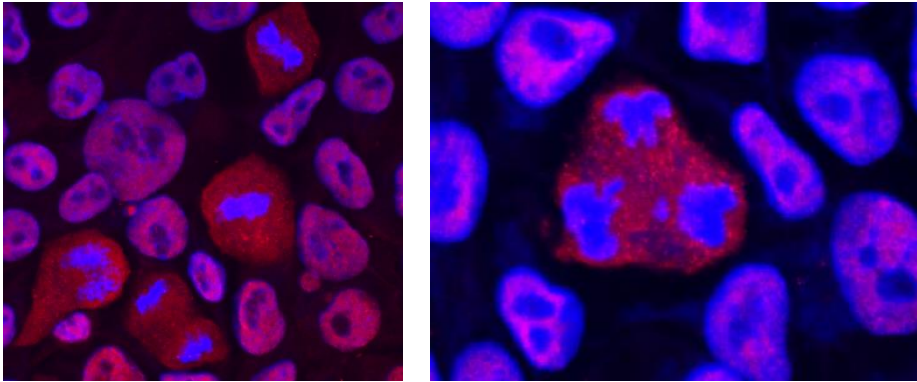
# Centrozom: malá organela, velká zodpovědnost

- v živočišných buňkách jsou největším zdrojem mikrotubulů vřeténka
- složený z dvou ortogonálně uspořádaných centriol
- v proliferujících buňkách je znám jako MTOC (microtubule-organizing center)
- v neproloferujících buňkách centrozom migruje na povrch buňky a z mateřské centrioly vzniká cílium – sensorická organela
- centrozom chybí v rostlinných buňkách, buňkách kvasinek a taky ve vajíčku



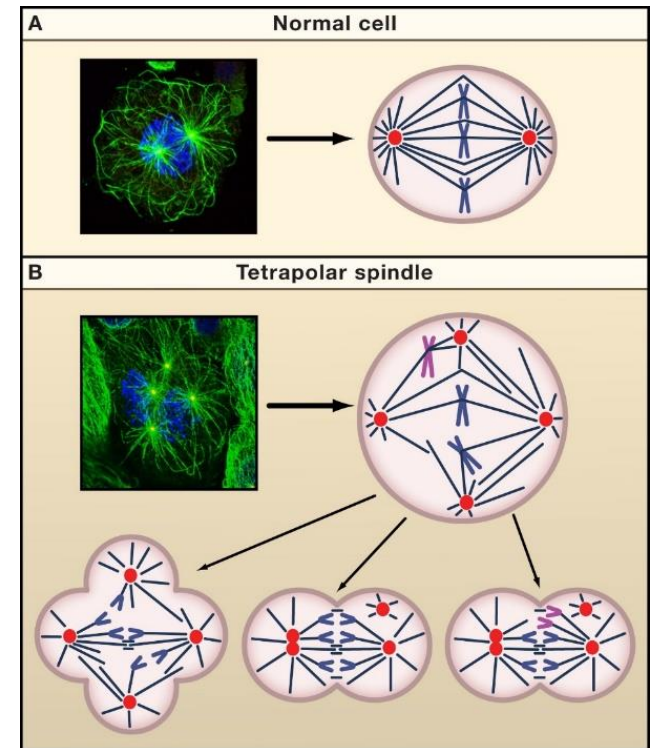
## Centrozom a abnormální mitóza

Poruchy centrozomů představují hlavní mechanismus vedoucí k **chromozomální nestabilitě** a k **aneuploidii** (vznik multipolárního vřeténka a následný nesprávný rozchod chromozomů)



Poruchy centrozomů jsou časté v mnoha **nádorech**

- možná souvislost s přechodem z časných do **pokročilých stádií karcinogeneze**
- klinicky jsou poruchy centrozomů obvykle asociovány s **horší prognózou**
- centrozomy představují jeden z cílů molekulární **protinádorové terapie**

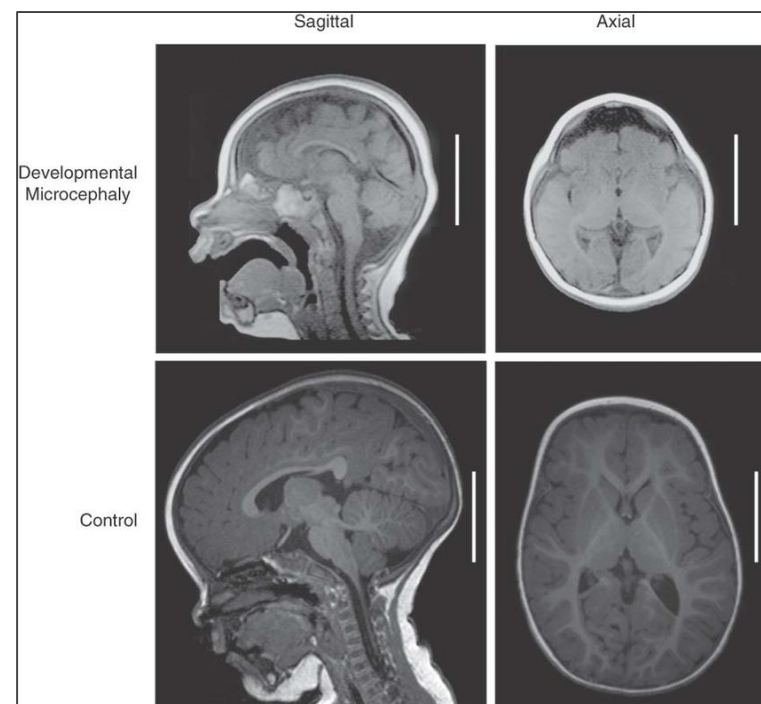


Nigg, Raff, Cell, 2009



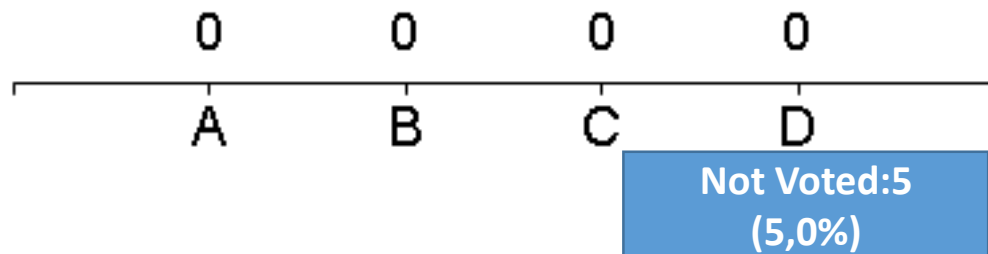
# Klinický případ

- 6-letý chlapec, narozen z příbuzenského sňatku
- Zpožděný psychomotorický vývoj, mírná svalová hypotonie a neprogresivní (nezhoršující se) mentální retardace
- Magnetická rezonance mozku ukázala **menší mozek**, s normální strukturou



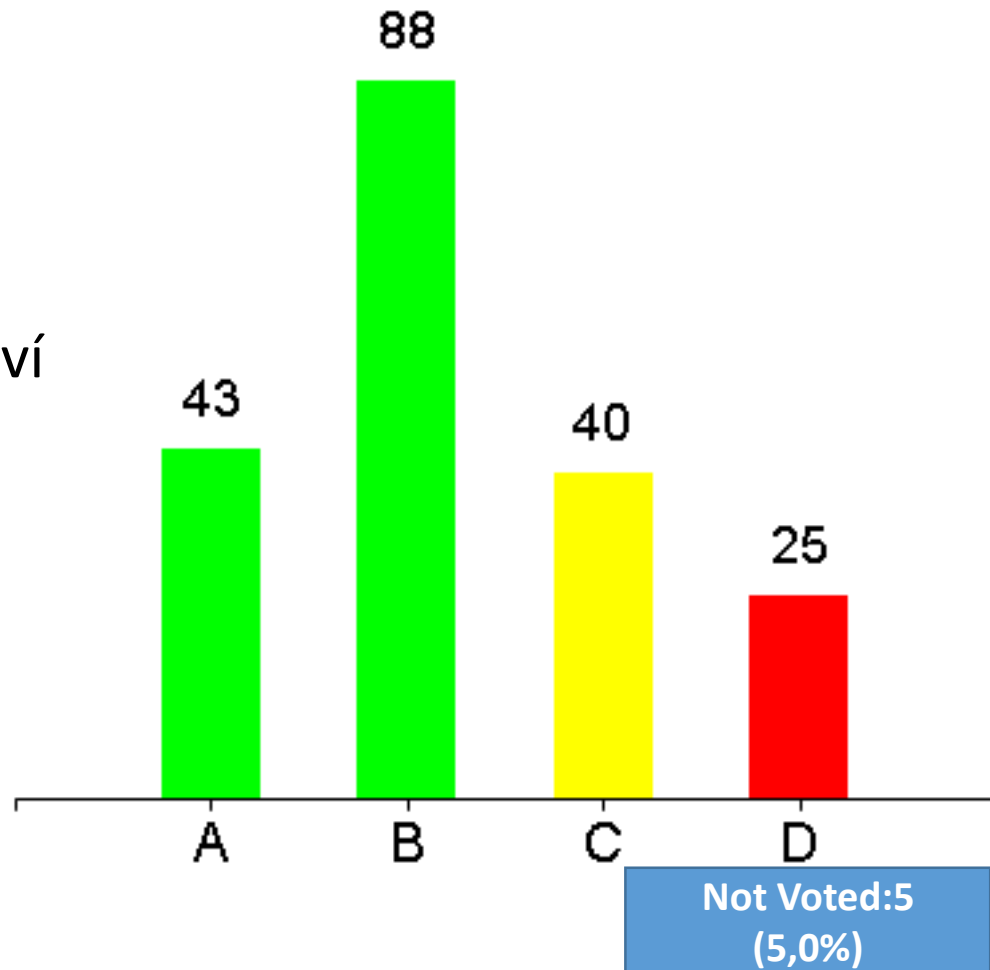
# Co může být příčinou mikrocefalie?

- A. Zika virus
- B. Mutace v genech sehrávající úlohy v duplikaci centriol
- C. Nesprávná výživa v těhotenství
- D. Nesprávná poloha plodu v děloze počas porodu



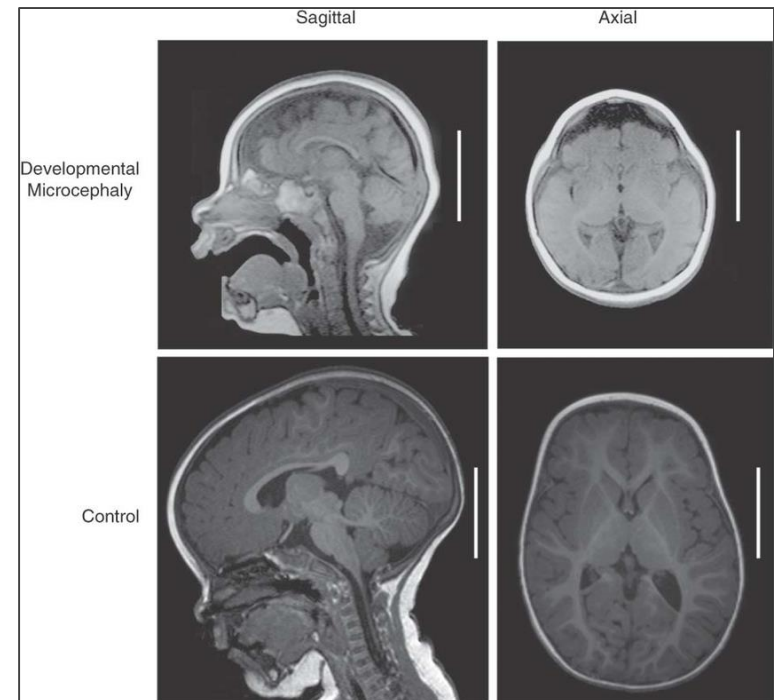
# Co může být příčinou mikrocefalie?

- ✓ A. Zika virus
- ✓ B. Mutace v genech sehrávající úlohy v duplikaci centriol
- C. Nesprávná výživa v těhotenství
- D. Nesprávná poloha plodu v děloze počas porodu



# Klinický případ

- 6-letý chlapec, narozen z příbuzenského sňatku
- Zpožděný psychomotorický vývoj, mírná svalová hypotonie a neprogresivní (nezhoršující se) mentální retardace
- Magnetická rezonance mozku ukázala **menší mozek**, s normální strukturou
- Molekulární testy ukázaly mutaci způsobující stop kodon v genu *CDK5RAP2* (kódující **centrozomální protein vysoce exprimovaný v mozku**)
- **Primární dědičná mikrocefalie**





# Mikrocefalie

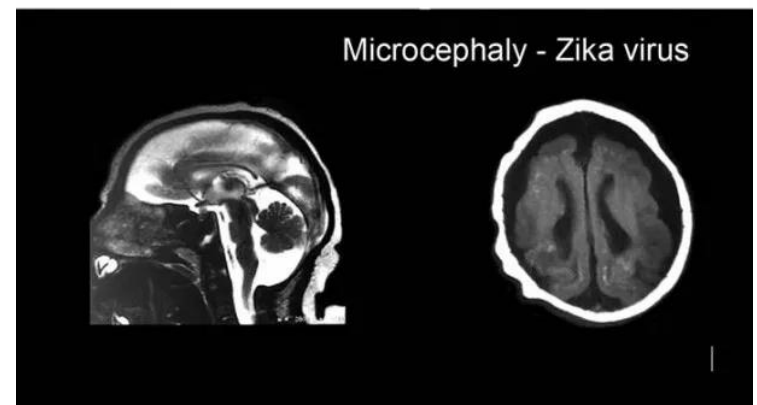
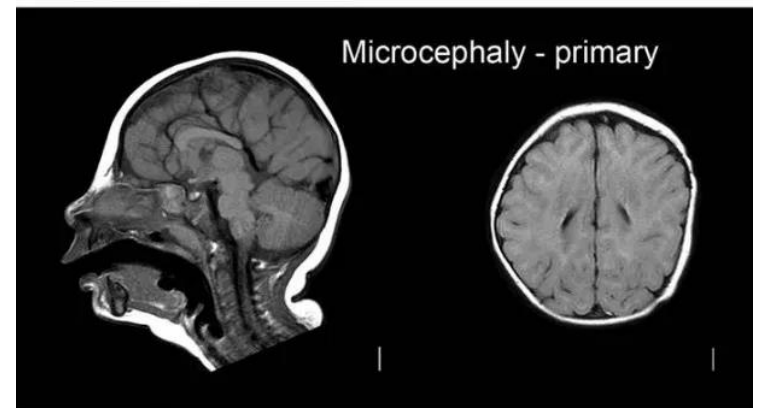
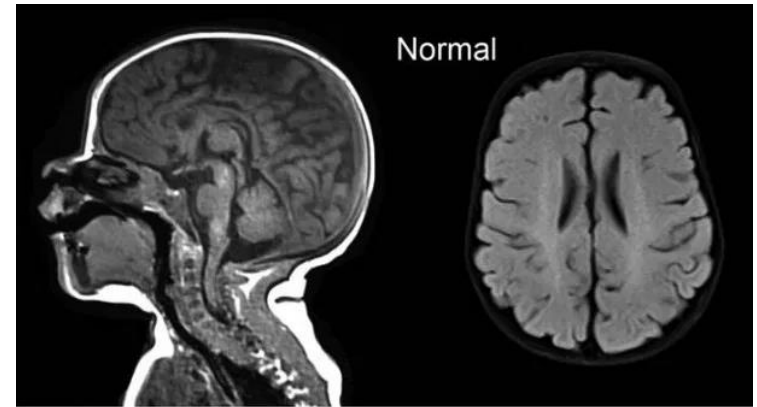
## Genetické příčiny mikrocefalie:

- mikrocefalie vzniká jako součást komplexnějších syndromům
- mikrocefalie s doprovodným postižením CNS hlavním projevem jediné genové mutace

Syndromů, v rámci kterých lze identifikovat i mikrocefalii je známo mnoho – patří sem hned několik syndromů podmíněných odchylkami chromozomů (syndromy Edwardsův, Patauův, syndrom kočičího křiku aj.), ale i syndromy zapříčiněné mutací jednotlivých genů

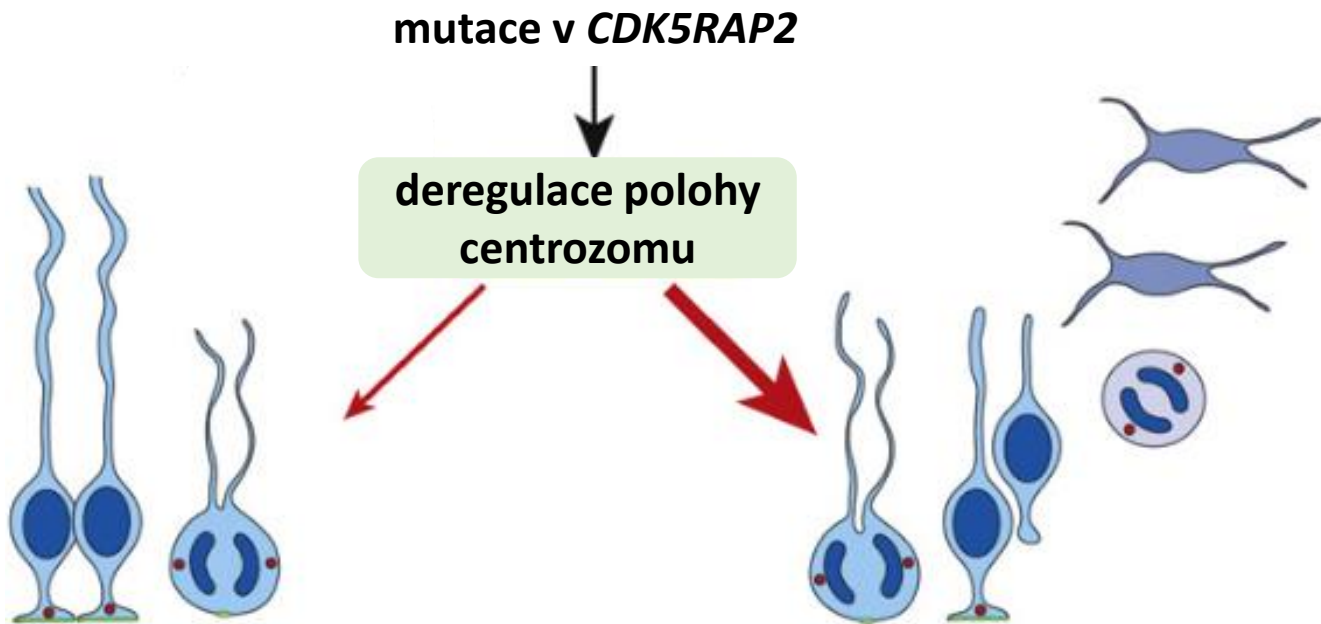
## Negenetické – environmentální příčiny mikrocefalie

- jsou nyní známé hlavně díky zvažované souvislosti zvýšeného výskytu mikrocefalie v Jižní Americe s rozšířením infekce způsobené virem Zika (prenášaný komáři)

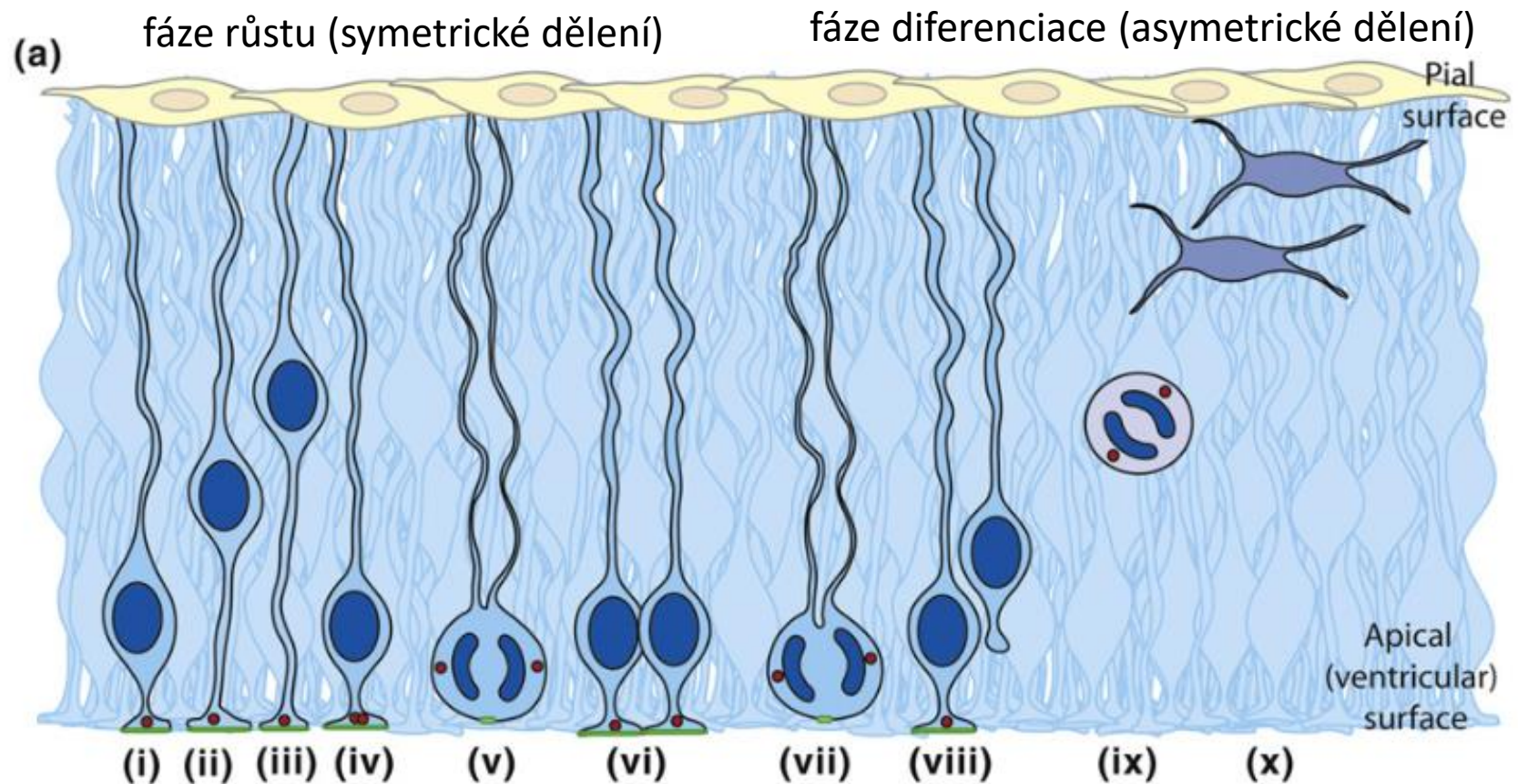


## Centrozomální defekty a primární mikrocefalie

- centrozomální defekty postihují ze všech tkání nejvíce nervovou tkáň – narušení **symetrie** dělení buněk vedoucí k předčasné diferenciaci progenitorových buněk
- je-li pozice centrozomů náhodná, buňky se častěji dělí asymetricky, nevznikne dostatečně velká populace neuroepiteliálních progenitorů a tím ani dostatek funkčních neuronů

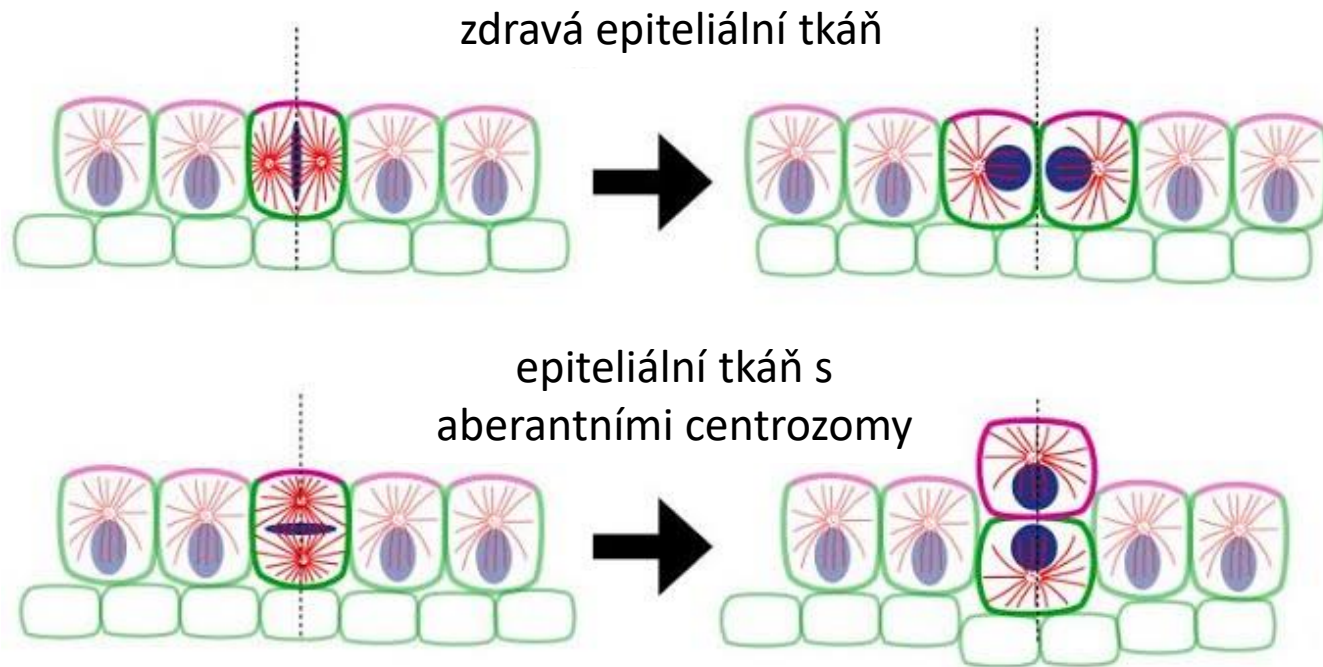


# Regulace polohy centrozomů je klíčová pro zachování polarity buněk ve tkáni



Při vývoji neuroepiteliální tkáně se nejprve symetrickým dělením množí buňky neuroepiteliálních progenitorů (iv-vi), které se poté dělí asymetricky (vii-viii) a dávají vznik více diferencovaným buněčným typům (ix-x). *Centrozomy jsou označeny červeně.*

# Regulace polohy centrozomů je klíčová pro zachování polarity buněk ve tkáni



**Nahoře:** Poloha dělicího vřeténka je ve zdravé epiteliální tkáni regulována tak, aby umožnila dělení buněk pouze v takové rovině, která zajistí zařazení nově vzniklé buňky do stávající tkáně.

**Dole:** Strukturální aberace centrozomů způsobují deregulaci polohy dělicího vřeténka. Výsledkem je dceřiná buňka, která není pevně ukotvená v epiteliální tkáni a může se z epitelu snadněji oddělit. Pokud taková buňka navíc nese mutace v dalších genech, může dát vznik metastáze.



# Co „pohání“ přechod jednotlivých fází buněčného cyklu do fází následujících?

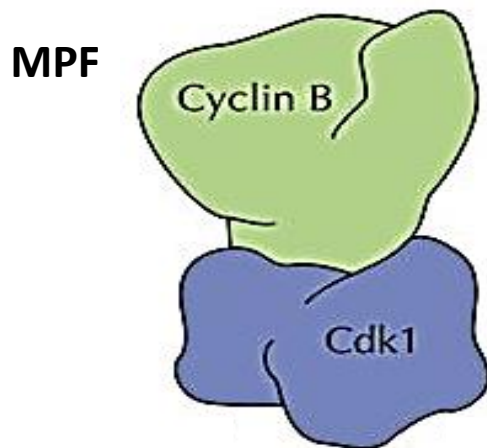
---

- komplexy cyklinů a cyklin-dependentních kináz

## Co dělají cyklin-dependentní kinázy?

## Co dělají cykliny?

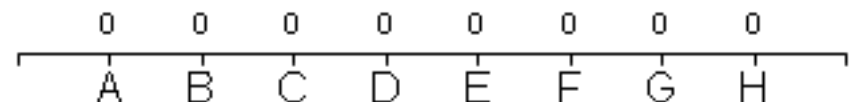
- cykliny se váží na konkrétní **cyklin-dependentní kinázy** a tím je **aktivují**
- v každé fázi buněčného cyklu se exprimují jiné **cykliny**
- aktivní kinázy (CDK) **fosforylují** (tedy většinou aktivují) další proteiny a transkripční faktory: **aktivace a tvorba proteinů** důležitých pro další fáze buněčného cyklu



**R. Timothy Hunt** (objevitel cyklinů, Nobelova cena 2001):  
„By the way, the name cyclin, which I coined, was really a joke, it's because I liked cycling so much at the time, but they did come and go in the cell...“ 😊

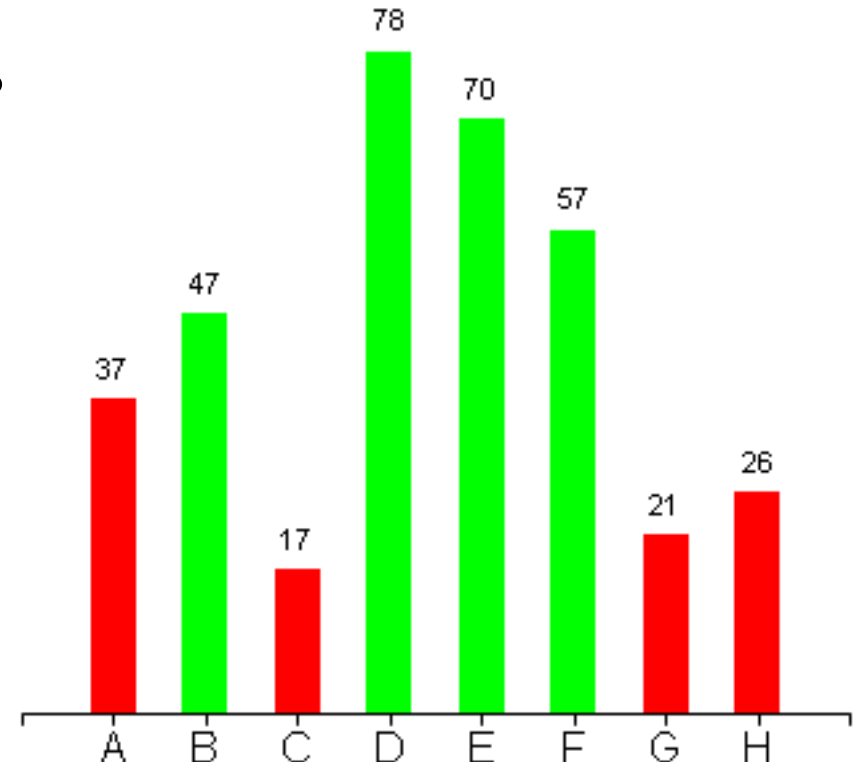
## Co musí být ve zdravých buňkách splněno, aby mitóza (M-fáze) mohla začít?

- A. Musí se výrazně zvýšit hladina CDK1
- B. Musí výrazně narůst hladina cyklinu B
- C. Musí se zvýšit hladina proteinu p21
- D. Všechna jaderná DNA musí být kompletně replikovaná
- E. Nesmí být poškozená DNA
- F. Musí být duplikován centrozom
- G. Buňka musí zdvojnásobit počet všech svých organel
- H. Všechny chromozomy musí být správně připojeny k dělicímu vřeténku

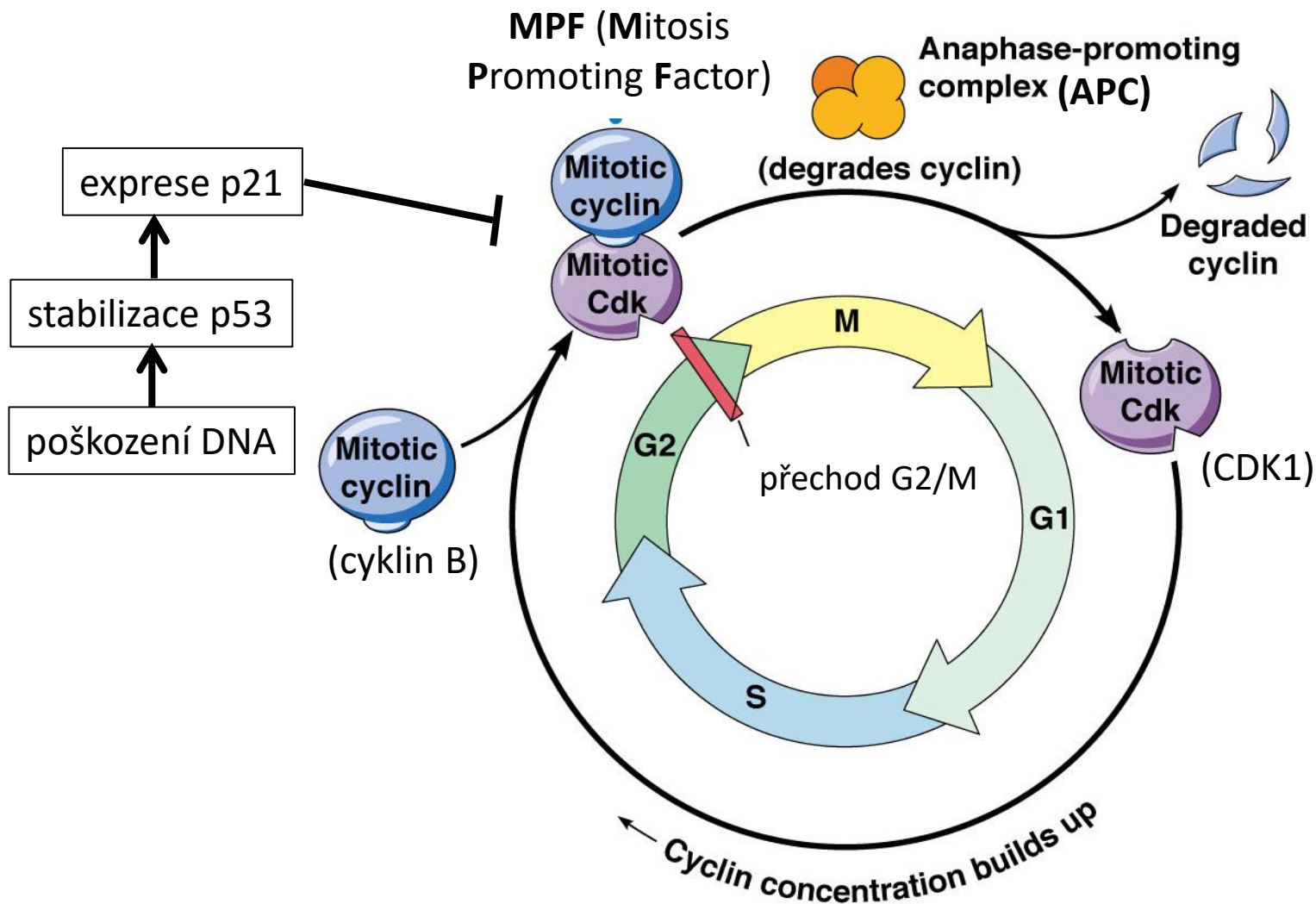


# Co musí být ve zdravých buňkách splněno, aby mitóza (M-fáze) mohla začít?

- A. Musí se výrazně zvýšit hladina CDK1
- ✓ B. Musí výrazně narůst hladina cyklinu B
- C. Musí se zvýšit hladina proteinu p21
- ✓ D. Všechna jaderná DNA musí být kompletně replikovaná
- ✓ E. Nesmí být poškozená DNA
- ✓ F. Musí být duplikován centrozom
- G. Buňka musí zdvojnásobit počet všech svých organel
- H. Všechny chromozomy musí být správně připojeny k dělicímu vřeténku



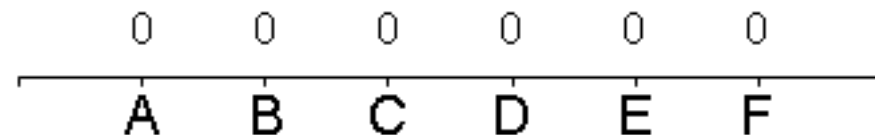
# Zahájení mitózy – nárůst mitotického cyklinu (cyklin B)





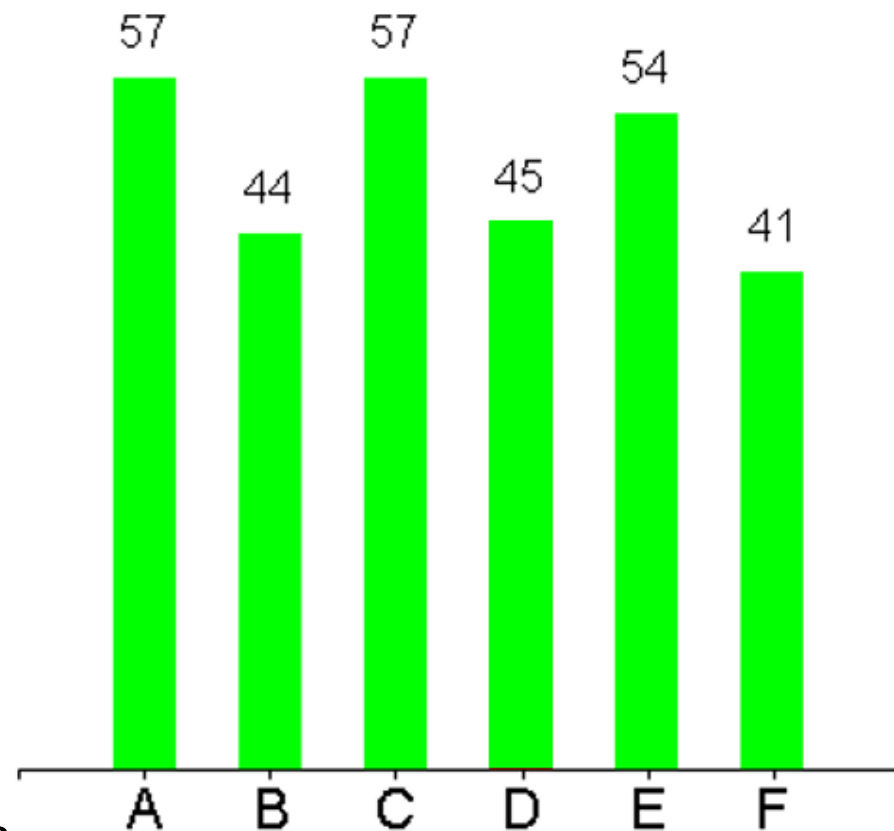
## K čemu je MPF (CDK1 + cyklin B) důležitý?

- A. Fosforyluje kondenziny, aby došlo ke kondenzaci chromatinu
- B. Fosforyluje tubulin a další proteiny, aby se vytvořilo dělicí vřeténko
- C. Fosforyluje laminy, aby došlo k rozpadu jaderného obalu
- D. Aktivuje ubikvitin-ligázu, která označí ubikvitinem sekurin
- E. Aktivuje APC (anaphase promoting complex), který zahájí separaci chromatid
- F. Aktivuje APC, který degraduje cyklin B



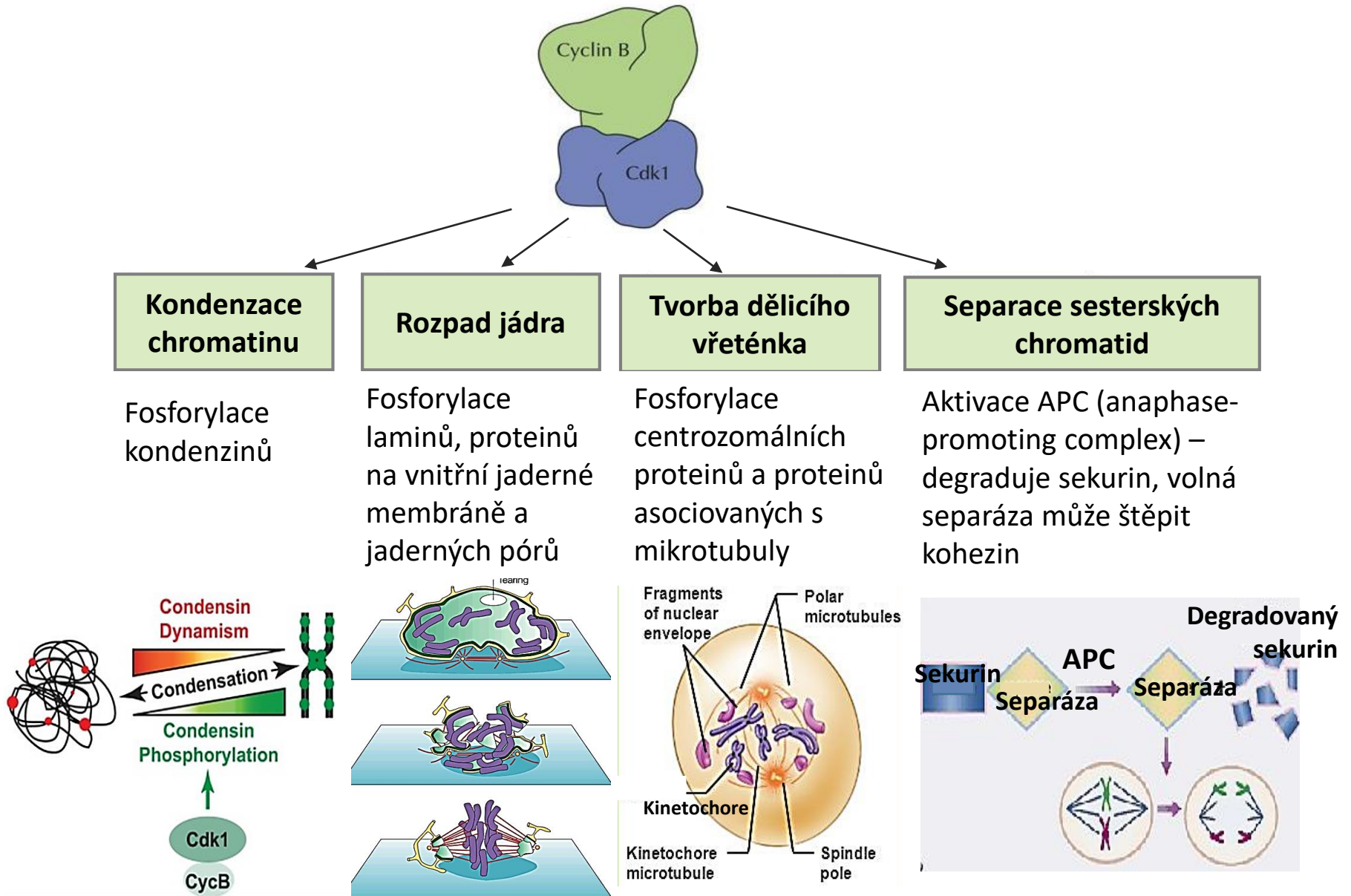
# K čemu je MPF (CDK1 + cyklin B) důležitý?

- ✓ A. Fosforyluje kondenziny, aby došlo ke kondenzaci chromatinu
- ✓ B. Fosforyluje tubulin a další proteiny, aby se vytvořilo dělicí vřeténko
- ✓ C. Fosforyluje laminy, aby došlo k rozpadu jaderného obalu
- ✓ D. Aktivuje ubikvitin-ligázu, která označí ubikvitinem sekurin
- ✓ E. Aktivuje APC (anaphase promoting complex), který zahájí separaci chromatid
- ✓ F. Aktivuje APC, který degraduje cyklin B

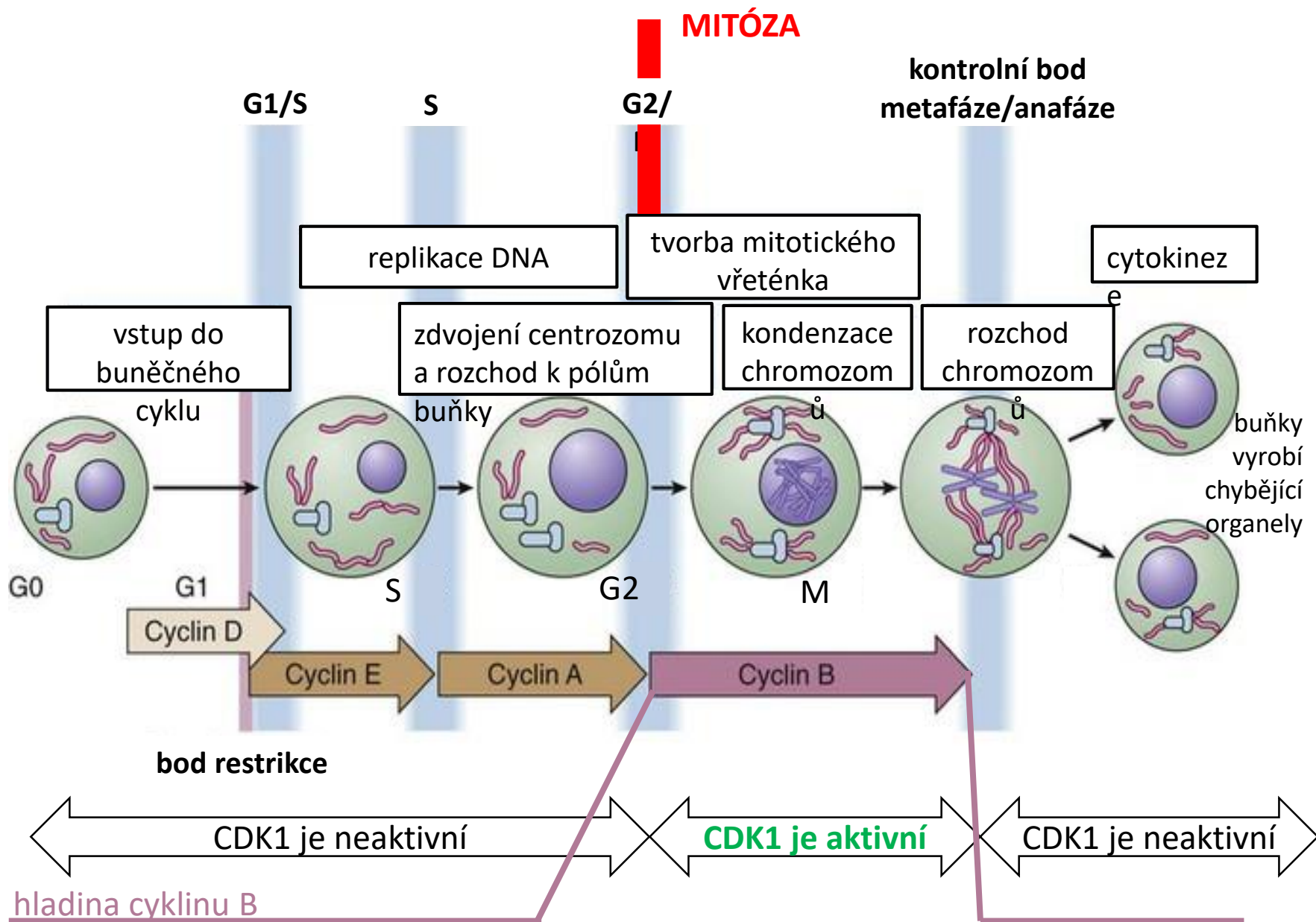


Not Voted:16  
(16,0%)

# MPF – maturation/mitosis promoting factor



# Přehled kontrolních bodů, cyklinů a CDK v průběhu buněčného cyklu

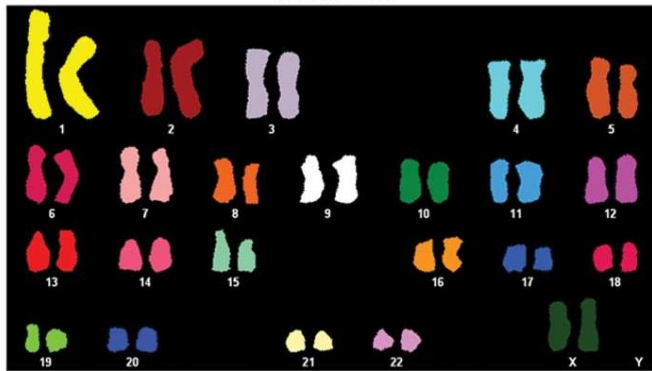




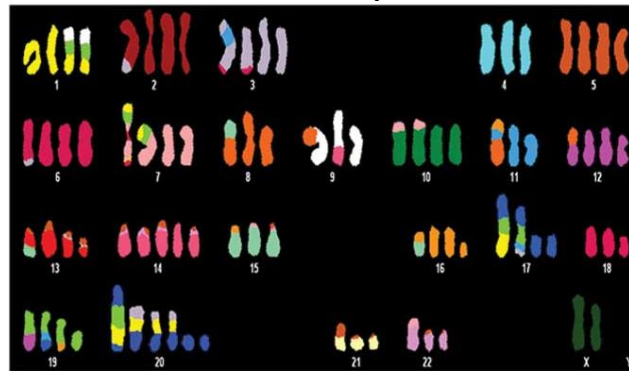
# Co může být příčinou vzniku následujících karyotypů (pacient 1 a 2)?

01:50

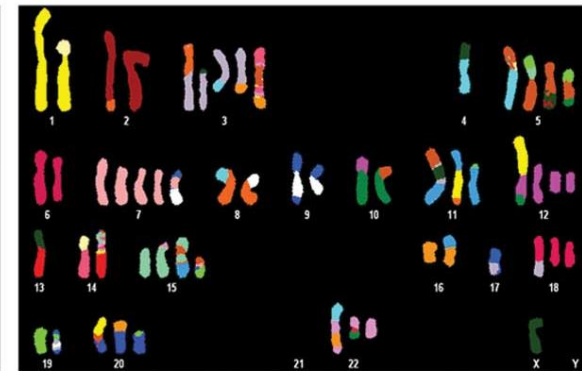
Zdravá buňka



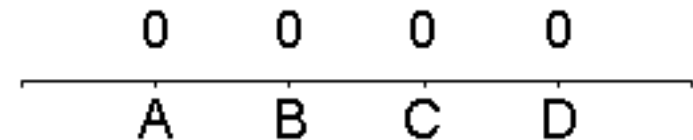
Nádorová buňka pacienta 1



Nádorová buňka pacienta 2



- A. Mutace v genech regulujících zdvojení centrozomu
- B. Dělení buněk s kriticky zkrácenými telomerami, které vedlo k náhodné fúzi některých chromozomů
- C. Nesprávné připojení dělicího vřeténka ke chromozomům
- D. Selhání jednoho nebo více kontrolních bodů buněčného cyklu

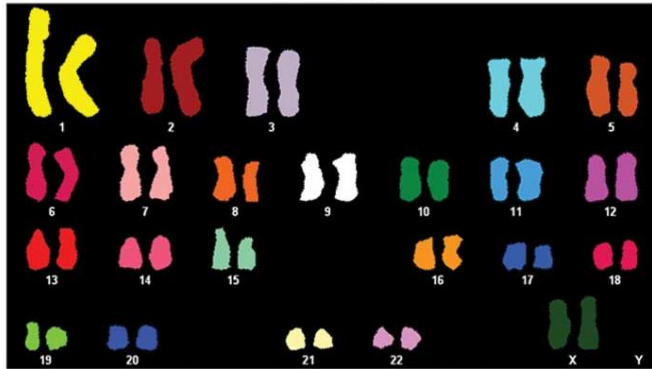


Not Voted:13  
(13,0%)

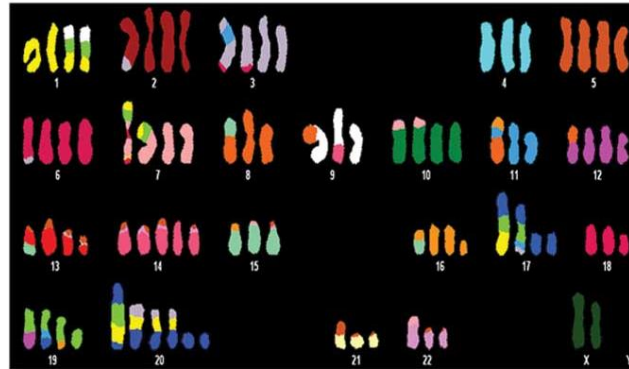
# Co může být příčinou vzniku následujících karyotypů (pacient 1 a 2)?

01:50

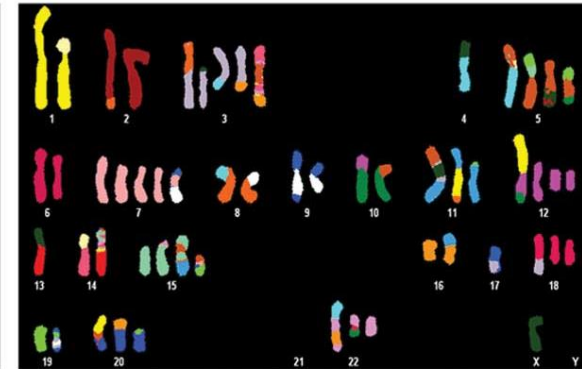
Zdravá buňka



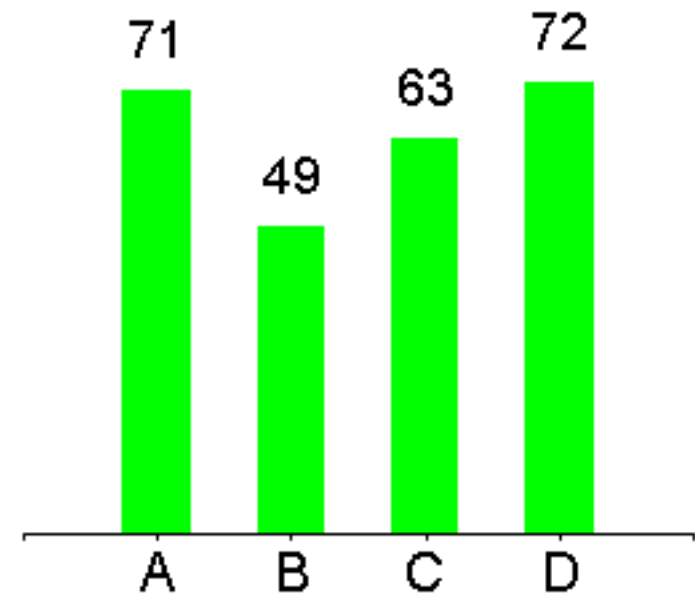
Nádorová buňka pacienta 1



Nádorová buňka pacienta 2



- ✓ A. Mutace v genech regulujících zdvojení centrozomu
- ✓ B. Dělení buněk s kriticky zkrácenými telomerami, které vedlo k náhodné fúzi některých chromozomů
- ✓ C. Nesprávné připojení dělicího vřeténka ke chromozomům
- ✓ D. Selhání jednoho nebo více kontrolních bodů buněčného cyklu



Not Voted:13  
(13,0%)

## Anti-mitotická protinádorová léčba

---

Mitóza je nejkratší fází buněčného cyklu, ale zároveň jsou buňky během mitózy nejcitlivější k stresovým signálům vyvolávajícím buněčnou smrt

Proč?

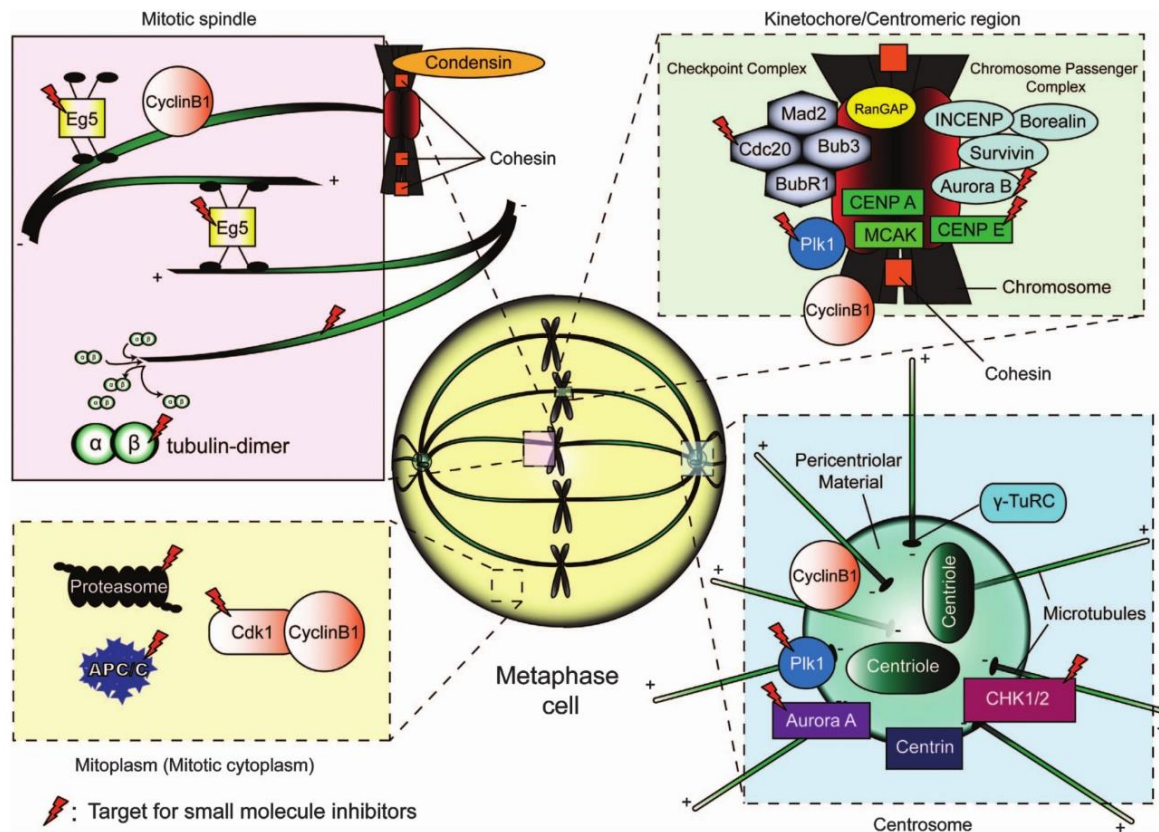
- dynamické zapínání/vypínání mnoha signálních drah
- velké a rychlé změny v hladinách mnoha proteinů
- obrovská reorganizace buněčných struktur
- buňka se více „kontroluje“ → **snadnější spuštění apoptózy**

Principem protinádorových terapií cílících na mitózu je **zastavit buňku v mitóze**, což často povede ke spuštění **buněčné smrti**

# Protinádorová terapie cílí na mitózu

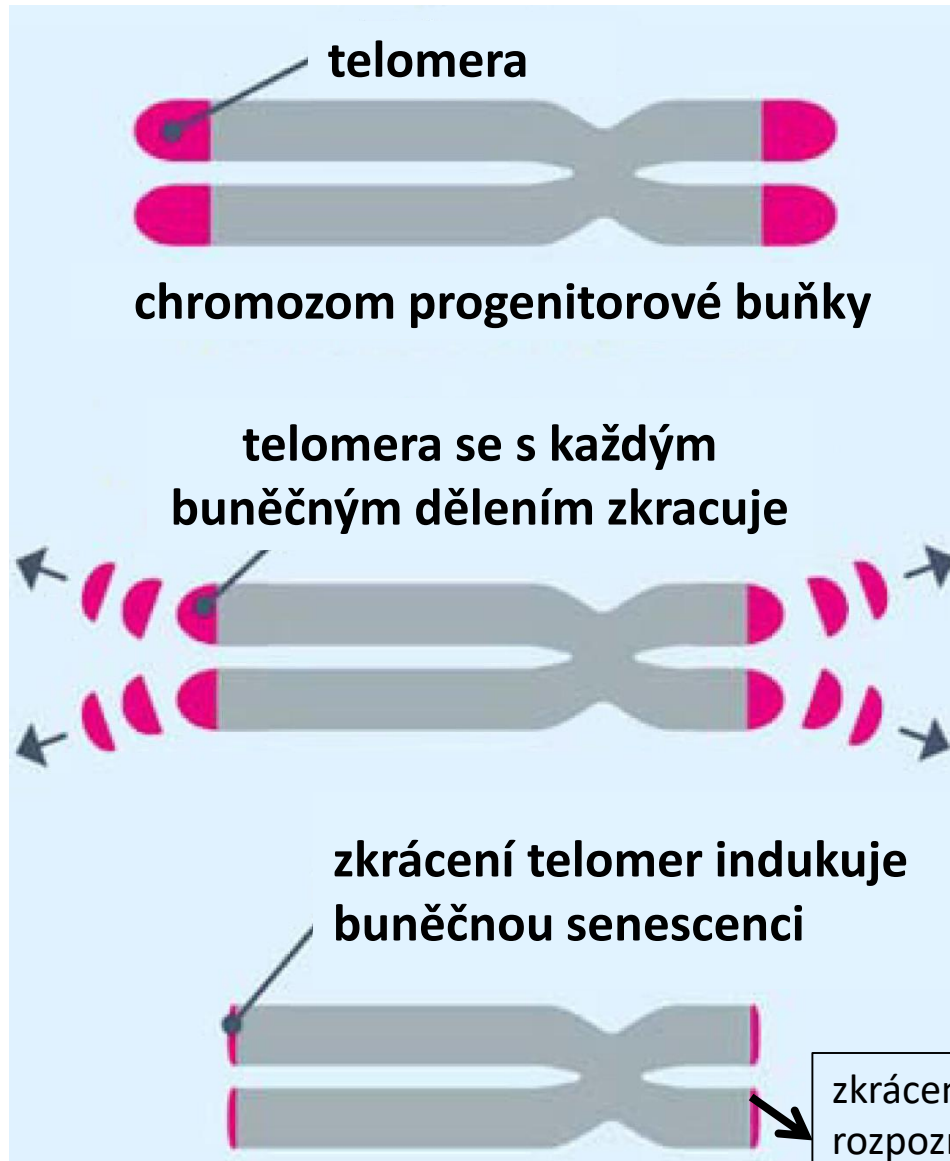
## Lokalizace proteinů, na které v současnosti cílí protinádorová léčba:

- dělicí vřeténko
- oblast kinetochoru/centromery
- centrozom
- mitoplazma (mitotická cytoplazma = cytoplazma + nukleoplazma).





# Replikativní senescence



- v progenitorových buňkách přestává být exprimován enzym **telomeráza**, který umí doreplikovat konce chromozomů, proto se progenitorům s každým dělením zkracují telomery

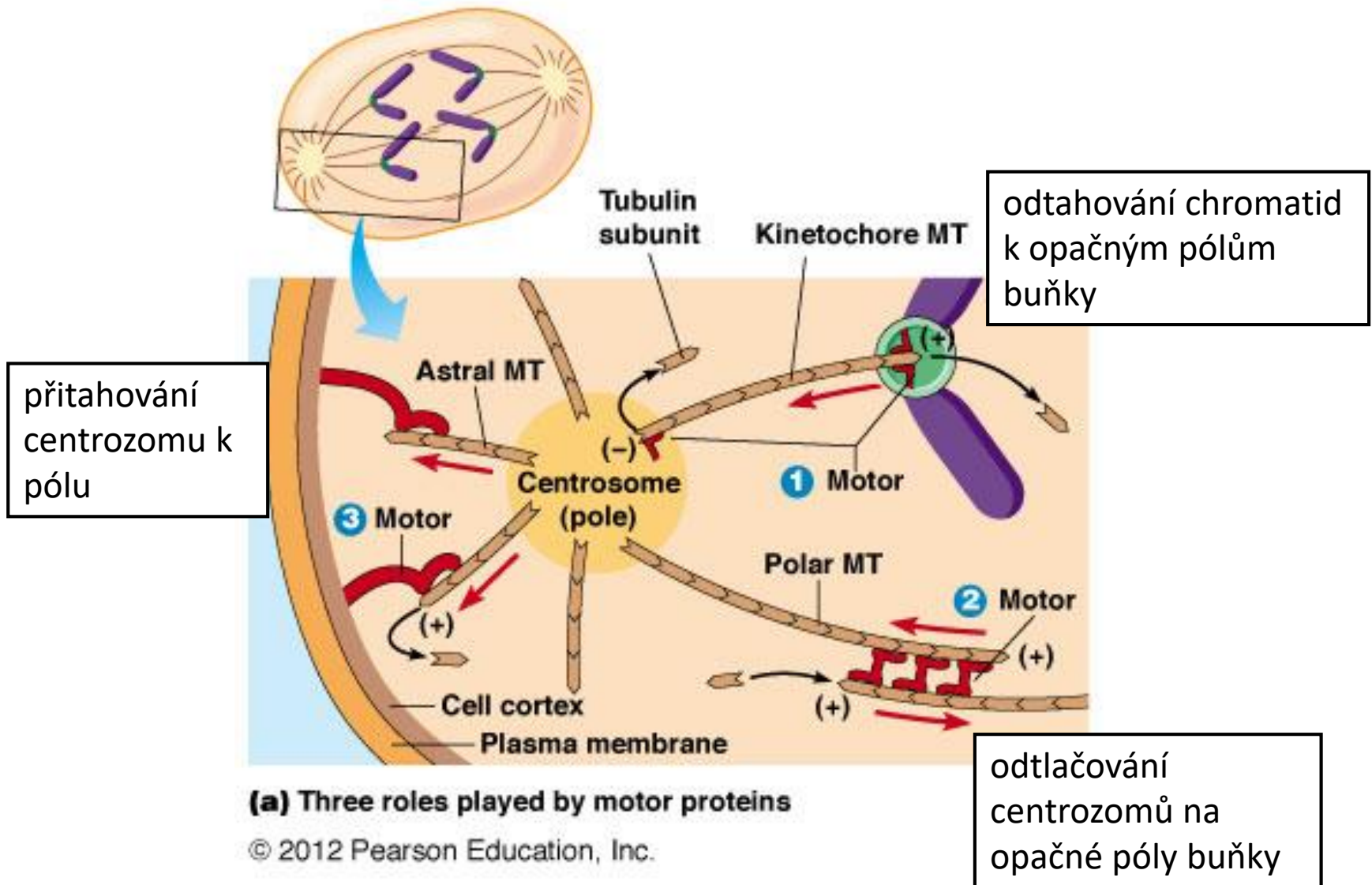
- buňky s telomery zkrácenými pod určitou mez vstupují do **senescence** – nadále vykonávají svou funkci, ale **nemohou je již dělit**

- senescence představuje **obranný mechanismus** proti nadměrnému dělení buněk – je-li tento mechanismus poškozený, mohou být obnaženy nechráněné konce chromozomů, rozpoznány jako dvouřetězcové zlomy a v rámci „opravy DNA“ připojeny k jiným molekulám DNA

zkrácení telomer je rozpoznáno jako forma poškození DNA

exprese inhibitorů CDK (např. p16)

# Motorové proteiny



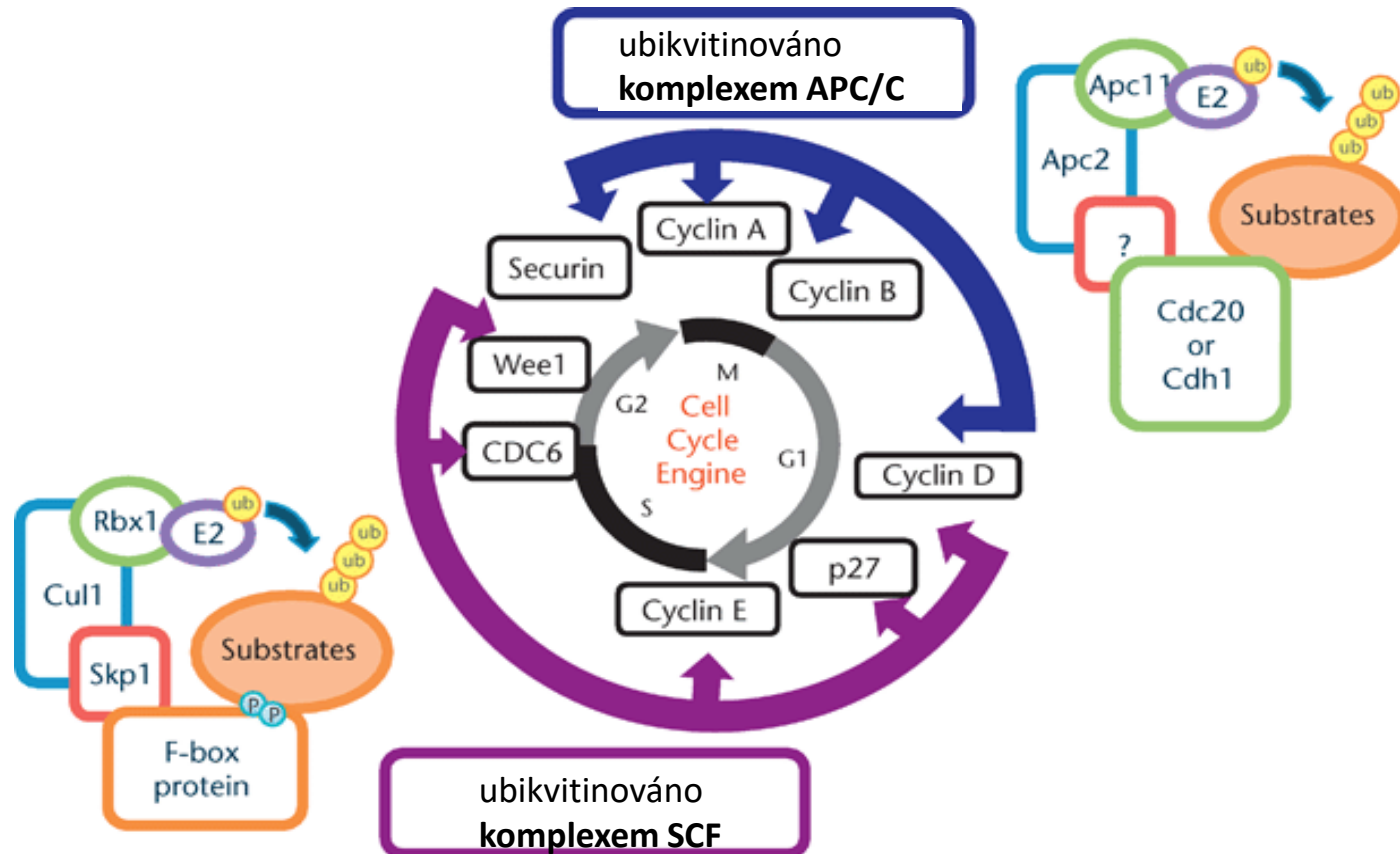
# Motorové proteiny a mikrotubuly jako cíle protinádorové terapie

- nepříznivé účinky na normální (nenádorové) buňky – narušení fyziologických procesů jako např. vezikulární transport, funkce cytoskeletu,...

Cílová molekula	Inhibiční efekt	Léčiva	Testované typy nádorů
<b><i>Vřeténkové jedy</i></b>			
<u>Tubulin</u>	Stabilizace mikrotubulů	Paclitaxel Epothilone (ve fázi klinického testování)	Glioblastom, nádory hlavy a krku, plic, prsu, vaječnicků
	Depolymerace mikrotubulů	Vincristine Vinblastine	Lymfomy, leukémie, nefroblastomy, nádory prsu
<u>Kinesin-5</u>	Tvorba monopolárního vřeténka	Ispinezib Monastrol (oba ve fázi klinického testování)	Karcinom vaječnicku, rakovina prsu, karcinom tlustého střeva

## Proteazom jako cíl protinádorové terapie

- v průběhu celého buněčného cyklu musí být **rychle odstraněno** mnoho regulačních proteinů (např. cycliny, sekurin, kináza Wee1), aby mohl buněčný cyklus pokračovat – to mají na starost dva ubikvitin-ligázové komplexy (SCF a APC/C) – ubikvitinované proteiny jsou poté všechny **degradovány v proteozomu**





## Proteazom jako cíl protinádorové terapie

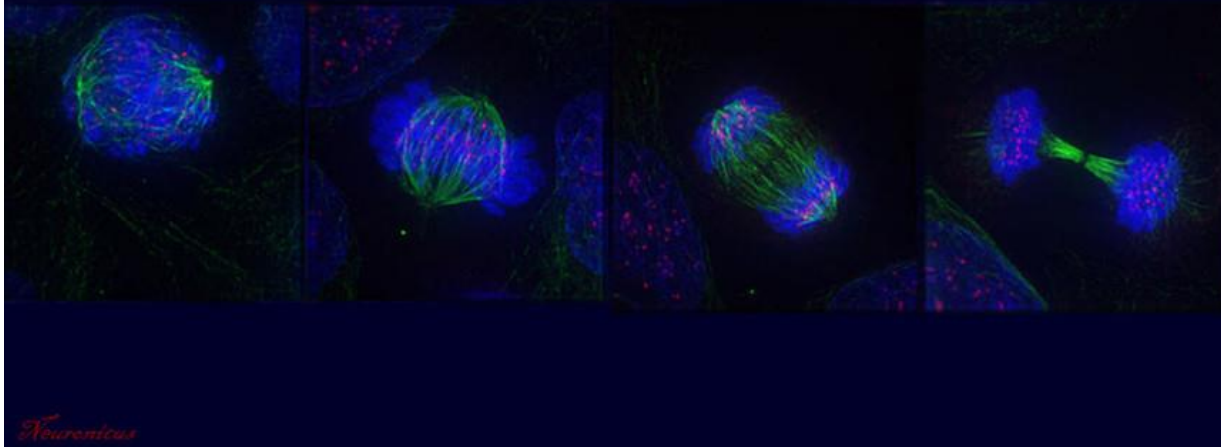
---

- i když je blokování funkce proteazomu velmi nespecifické, vedlejší účinky bortezomibu jsou překvapivě nízké

Cílová molekula	Inhibiční efekt	Léčiva	Testované typy nádorů
<b><i>Proteazom</i></b>	Zabraňuje degradaci cyklinu B, sekurinu a mnoha dalších proteinů	Bortezomib	Mnohočetný myelom, lymfom z plášťových buněk

**Biology is the only science in  
which multiplication is the same  
thing as division**

*Anonymous*



There's nothing funny about mitosis jokes. Once you say one, everyone splits.