

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

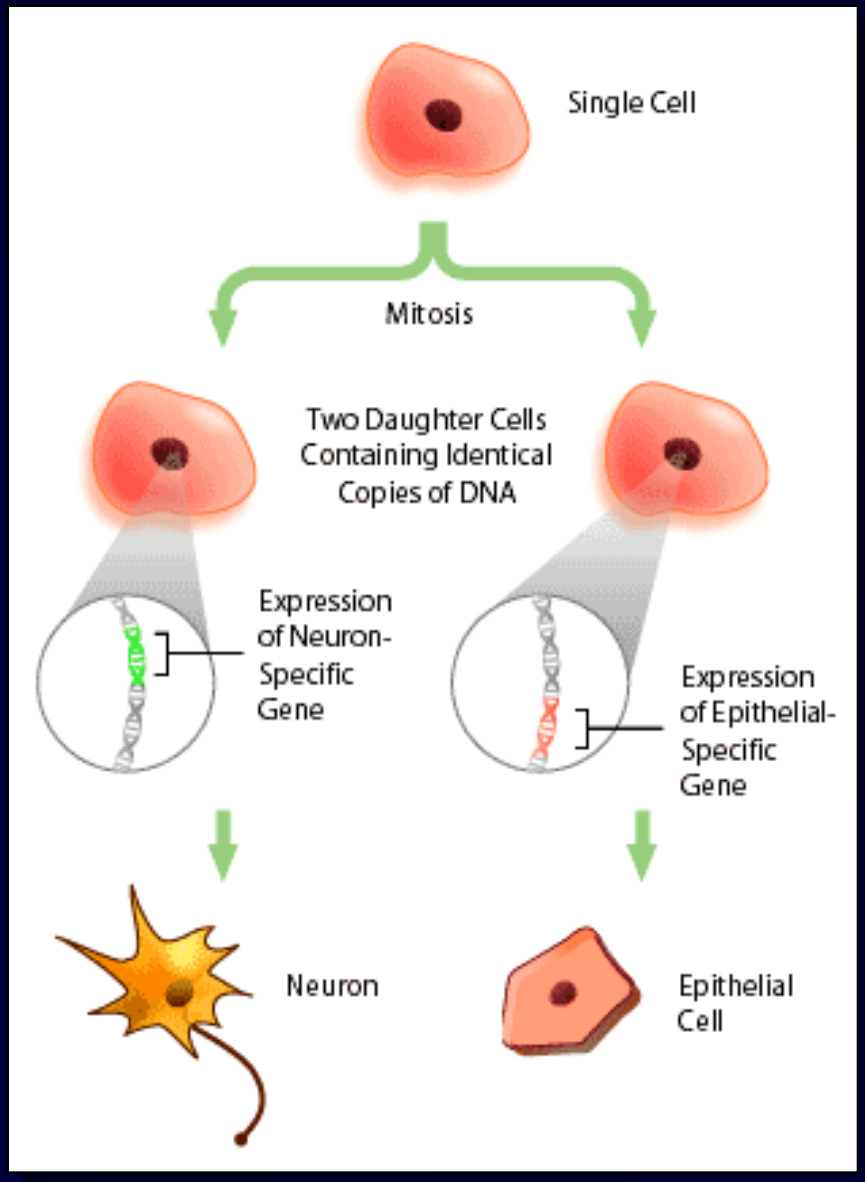
- identický genom ve všech buňkách
- kontrola na úrovni genové exprese

1. buněčná proliferace
2. diferenciace buněk
3. buněčné interakce
4. pohyb buněk
5. buněčná smrt

Lidský organismus:

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



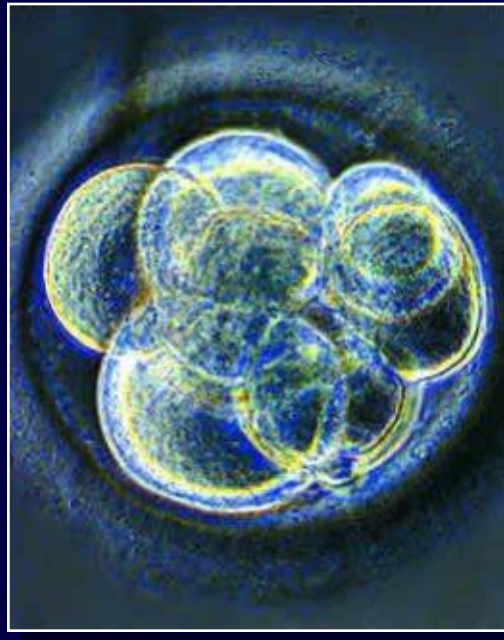
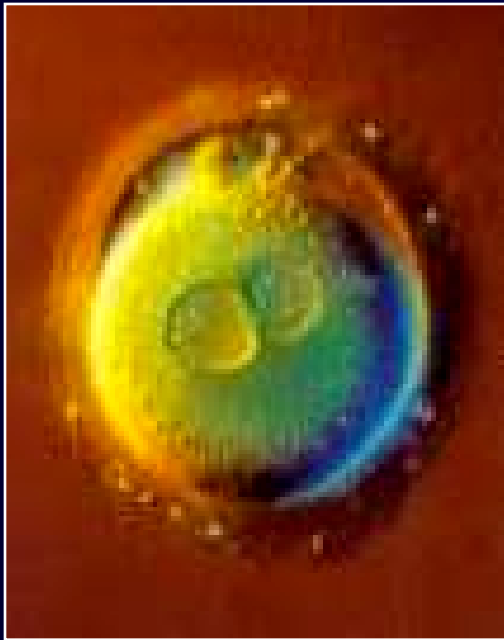


DIFERENCIAČNÍ POTENCIÁL BUNĚK



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

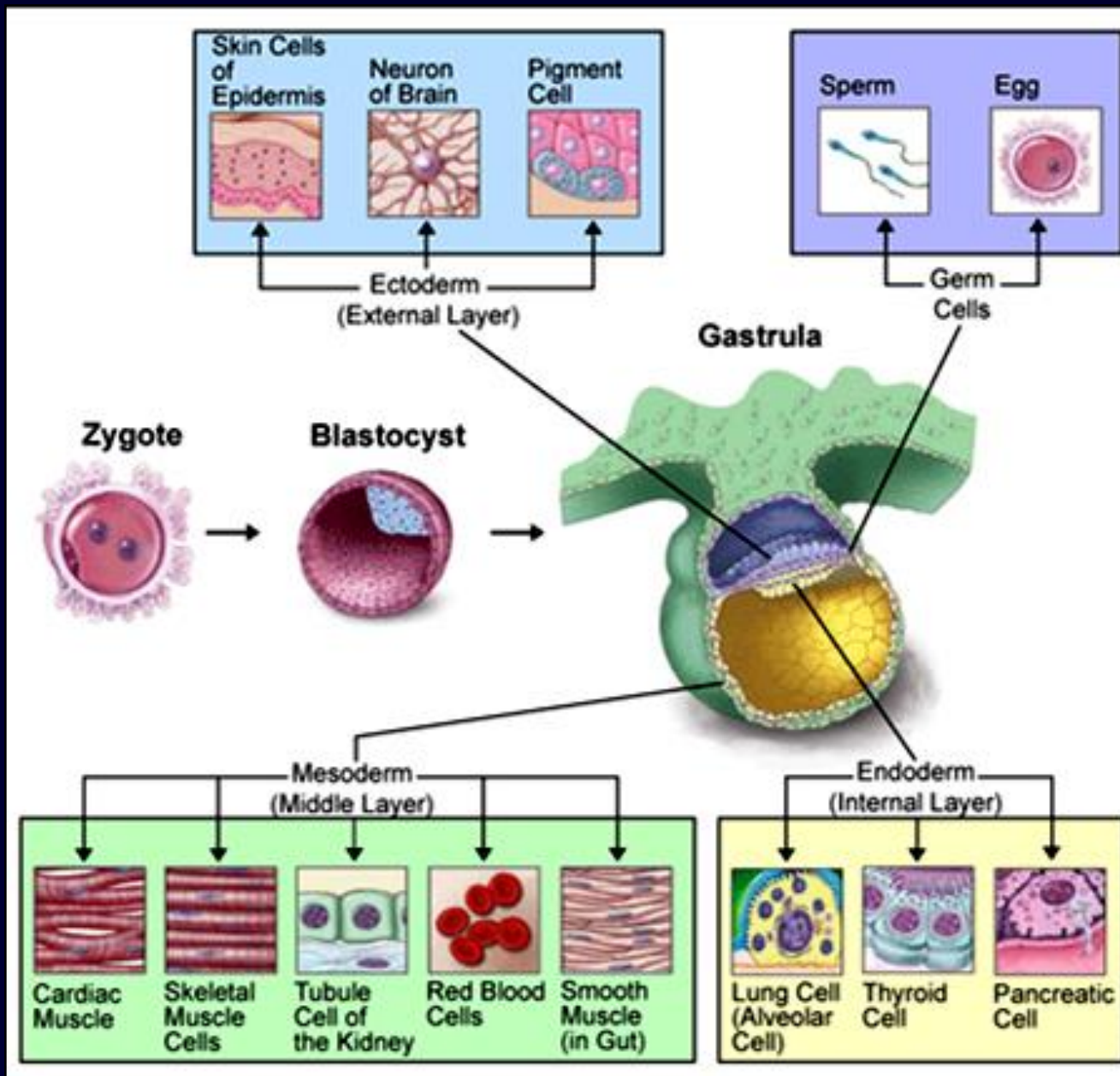
- lebka a kostra
- svalová tkáň (lebka i kosterní svalstvo)
- dermis
- pojivová tkáň
- urogenitální systém
- střevní svalovina
- srdce
- krevní a lymfatické buňky
- slezina



Endoderm

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





Totipotence

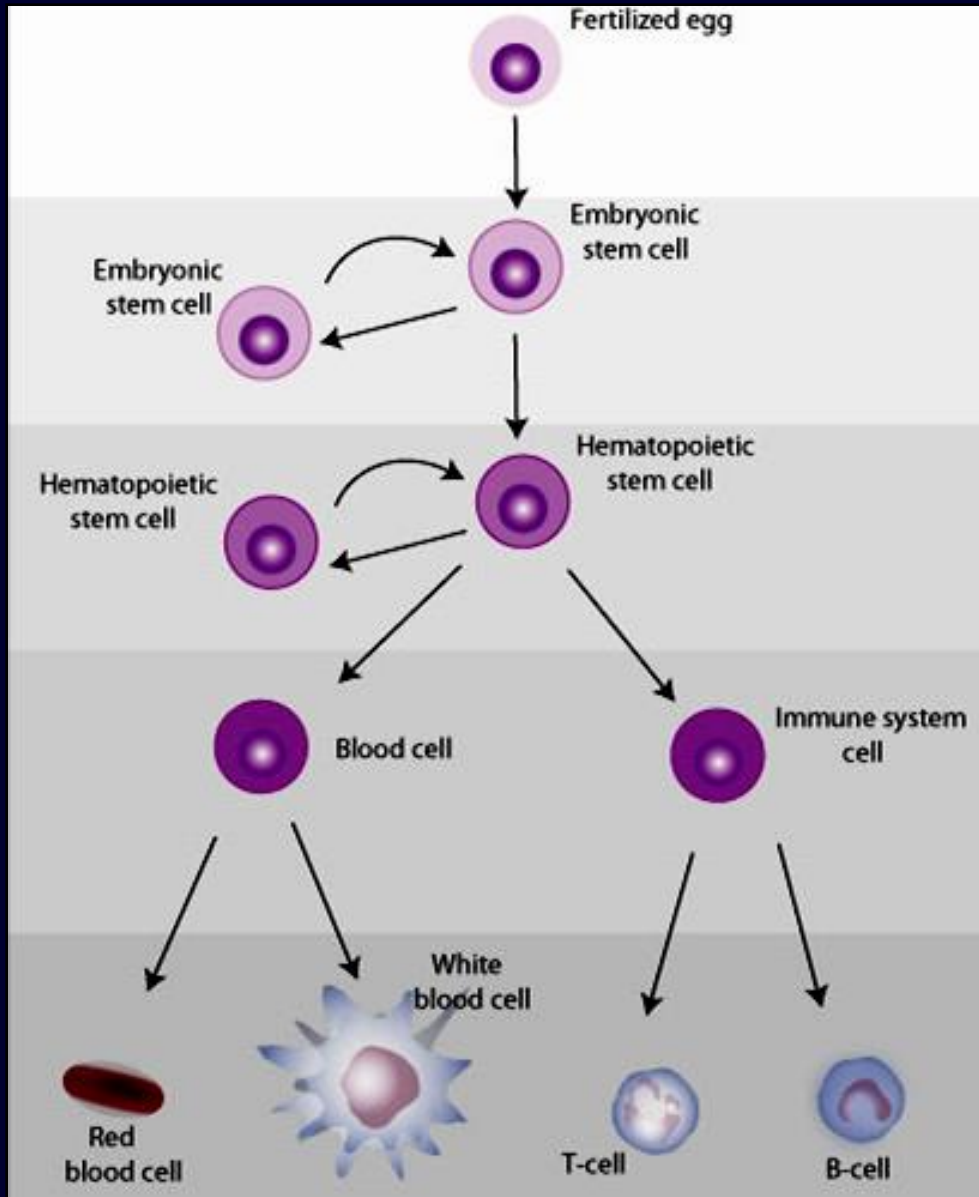
- nelimitovaný diferenciační potenciál
- schopnost tvořit embryonální i extraembryonální tkáně
- časná stádia rýhování zygoty (1-4 dny)

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)

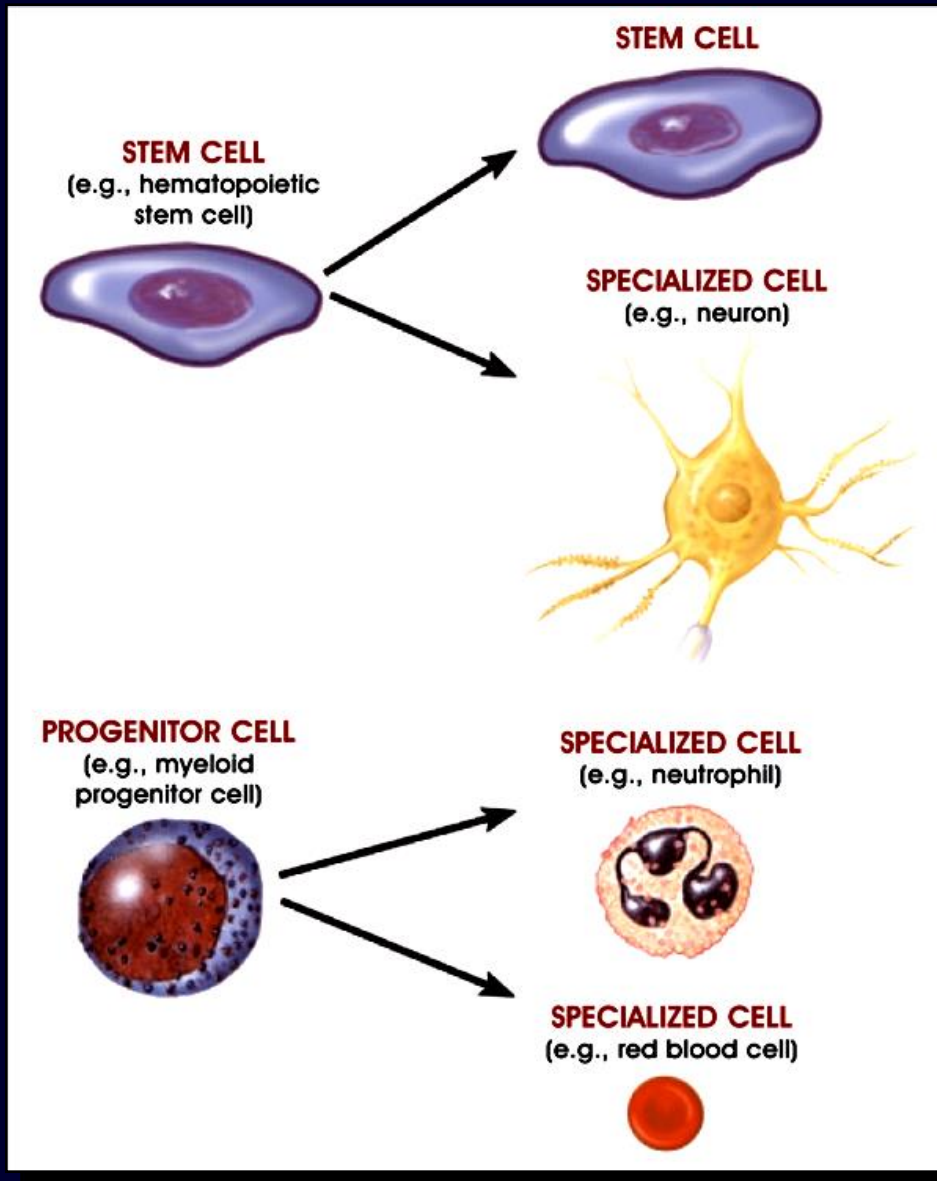
pluripotentní buňky
(embryonální kmenové)

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:

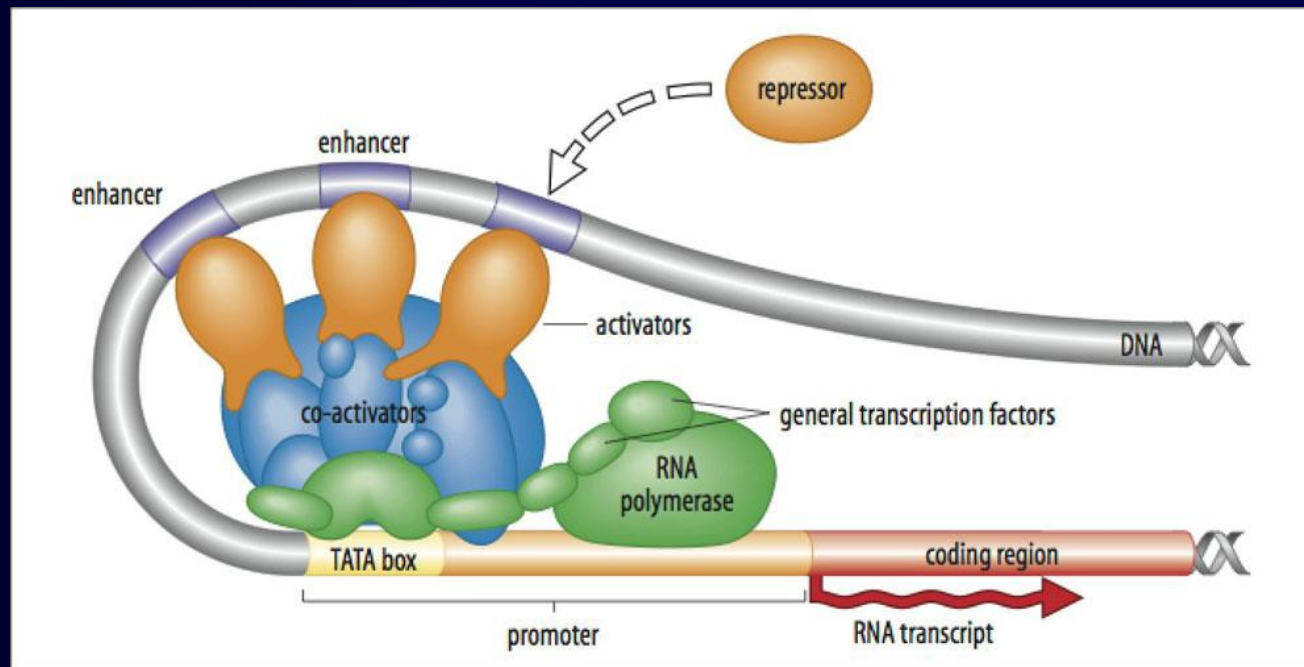
- postupné změny v aktivitě genů (programovány v genomu)
- odpověď na molekulární signály vysílané ostatními buňkami
- odpověď na fyzikální kontakt s ostatními buňkami

Signály regulující diferenciaci

- Solubilní regulátory
 - Hormony (glukagon, hydrokortison, tyroxin,...)
 - Růstové faktory (TGF-transformující růstový faktor, FGF-fibroblastový růstový faktor, interleukiny, ...)
 - Vitaminy (D, A ...)
 - Ionty (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

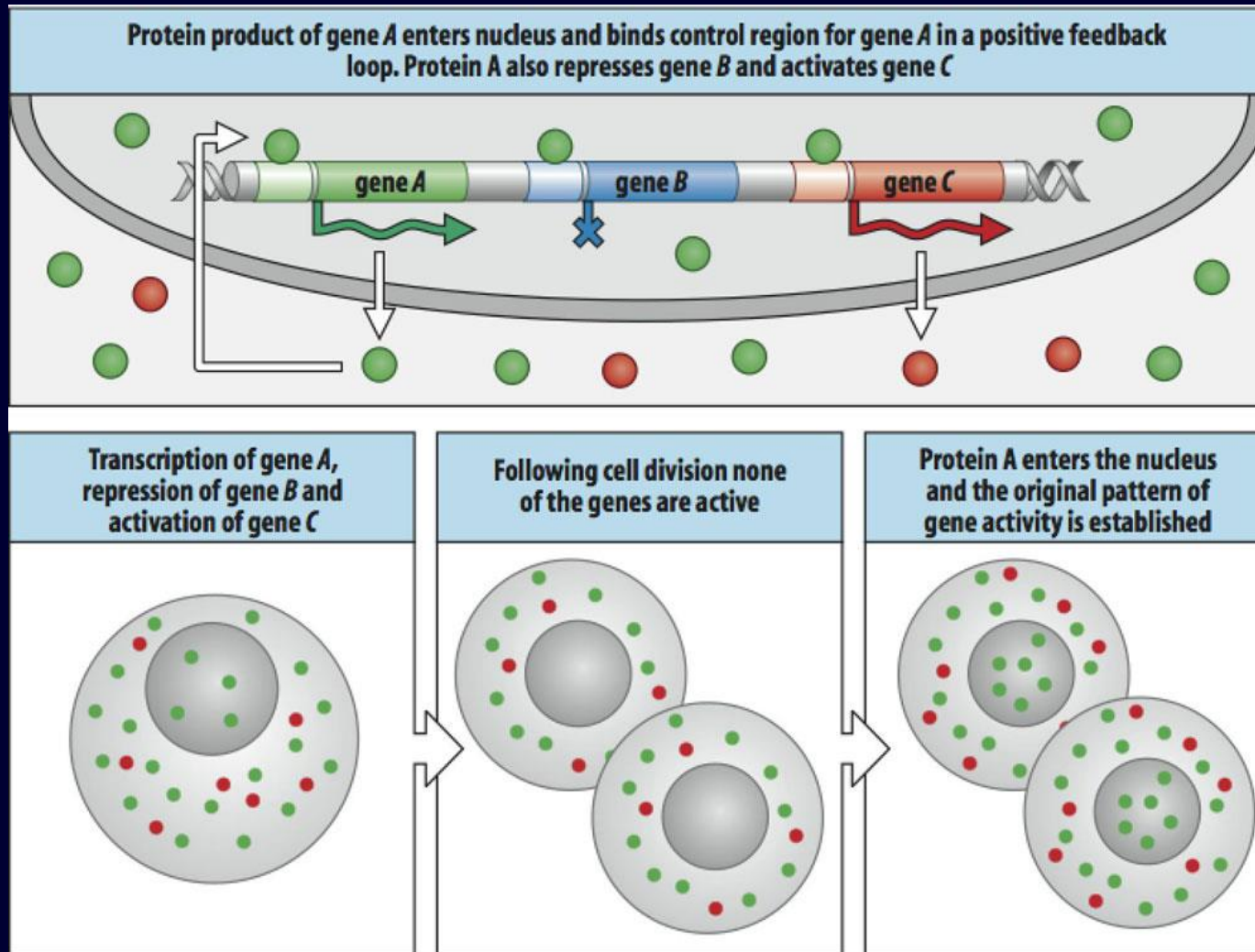


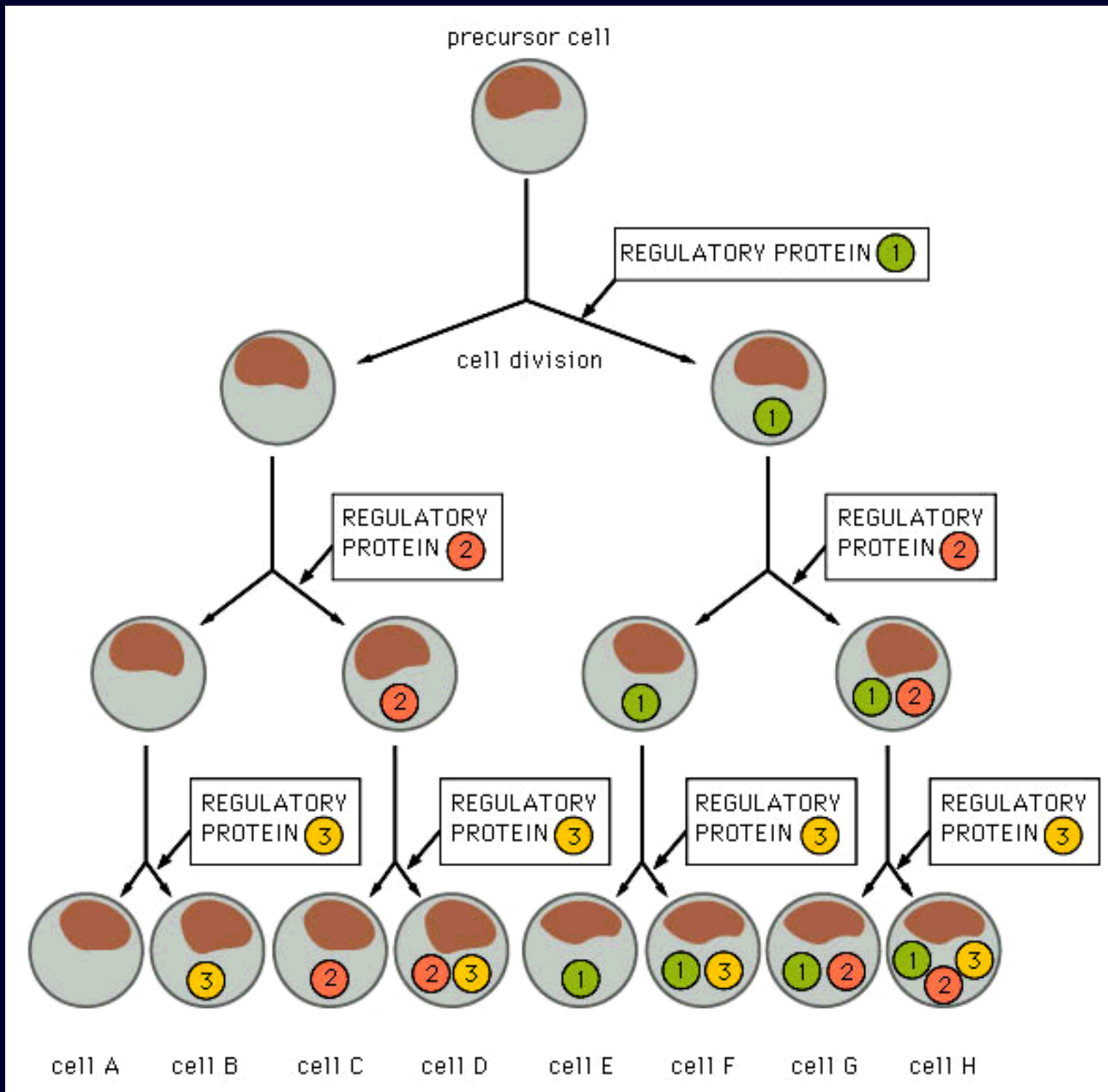
Molekulární mechanismy diferenciace

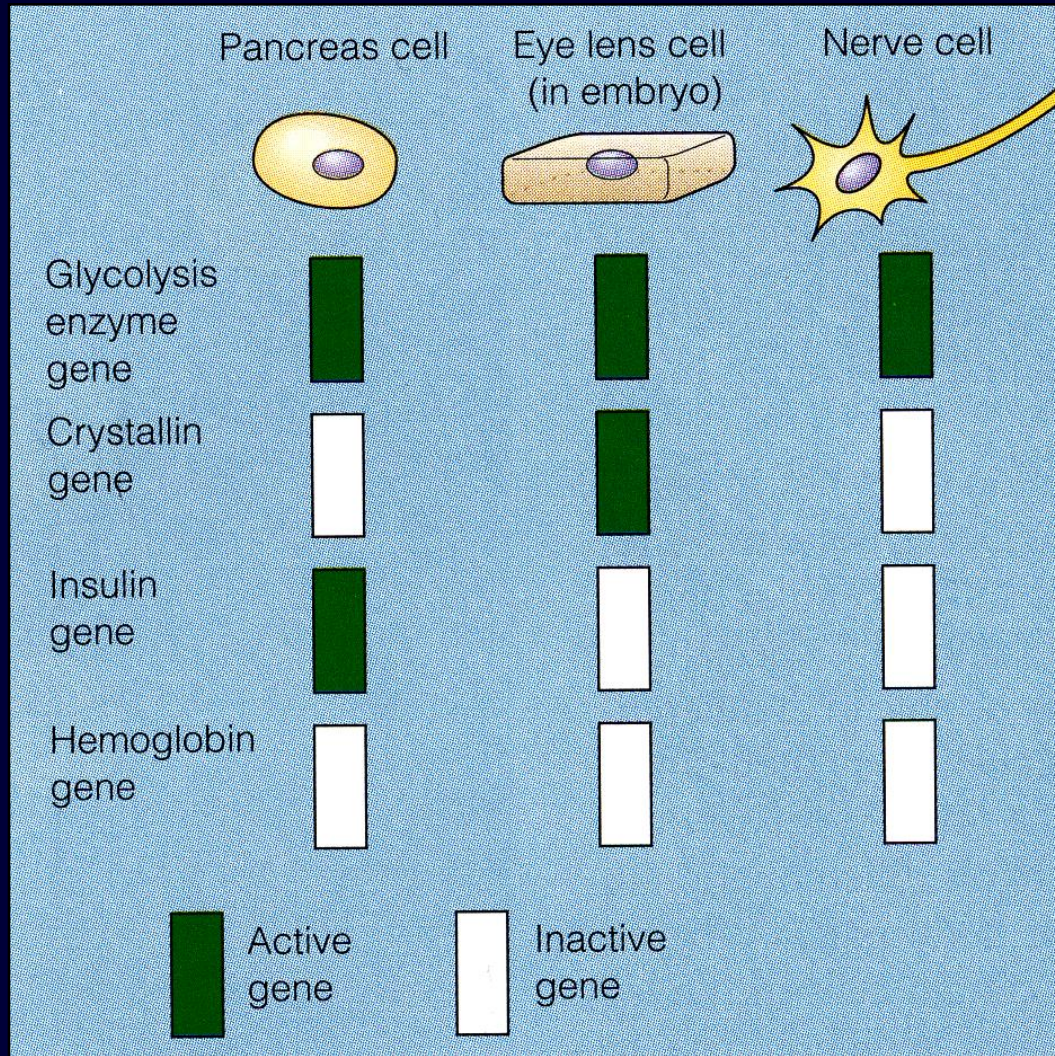
- 2 základní mechanismy účinku regulačních proteinů:
 - a) ovlivnění vazby RNA polymerázy a transkripčních faktorů na promotor
 - b) lokální modifikace struktury chromatinu v oblasti promotoru
- kombinace regulačních proteinů
- u člověka asi 3000 TFs (predikovaných)
- ± 5 TFs působí společně a reguluje 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

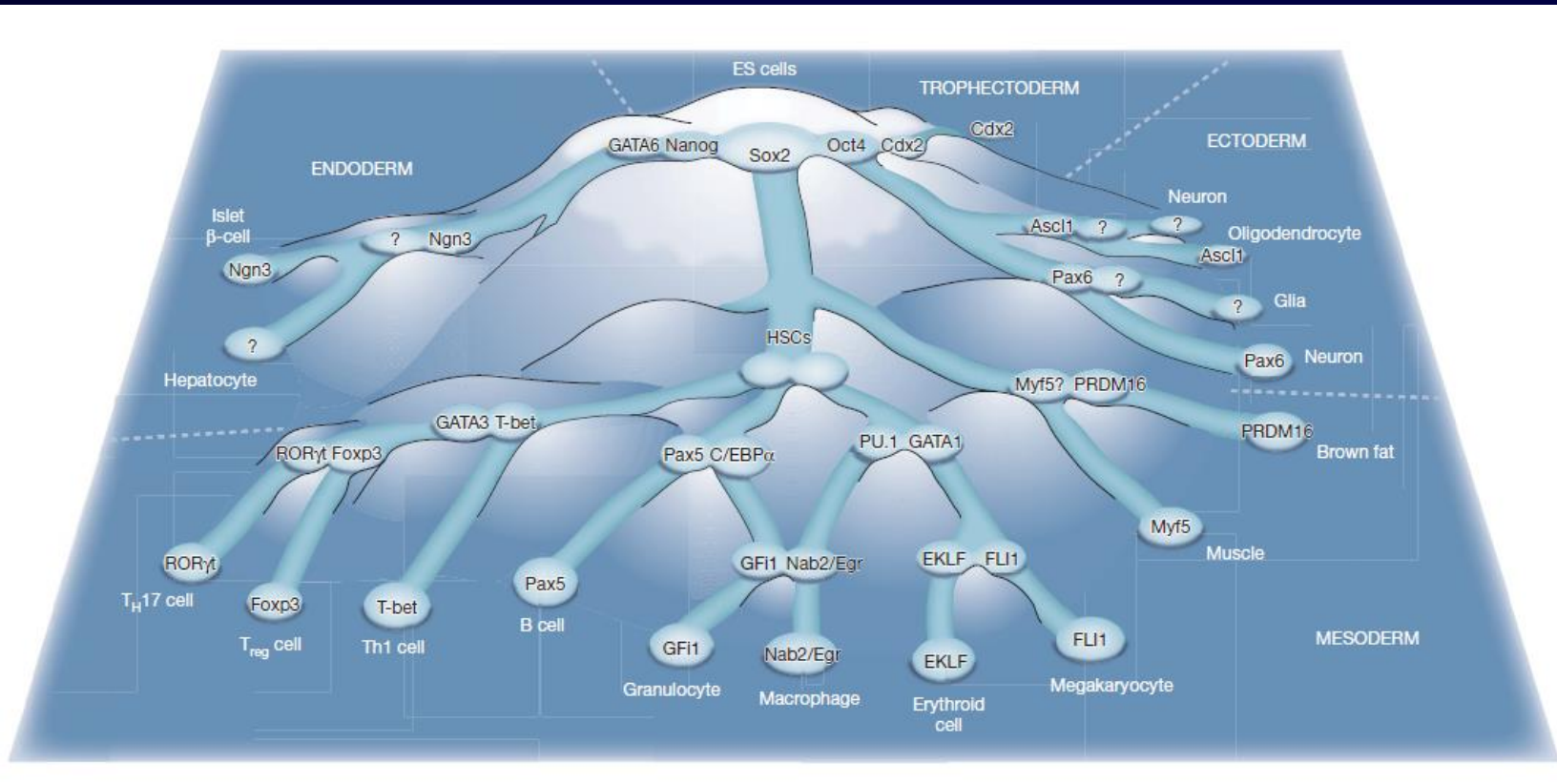
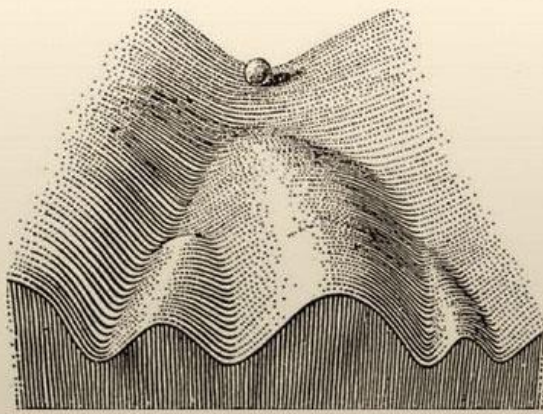
Transdiferenciace

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

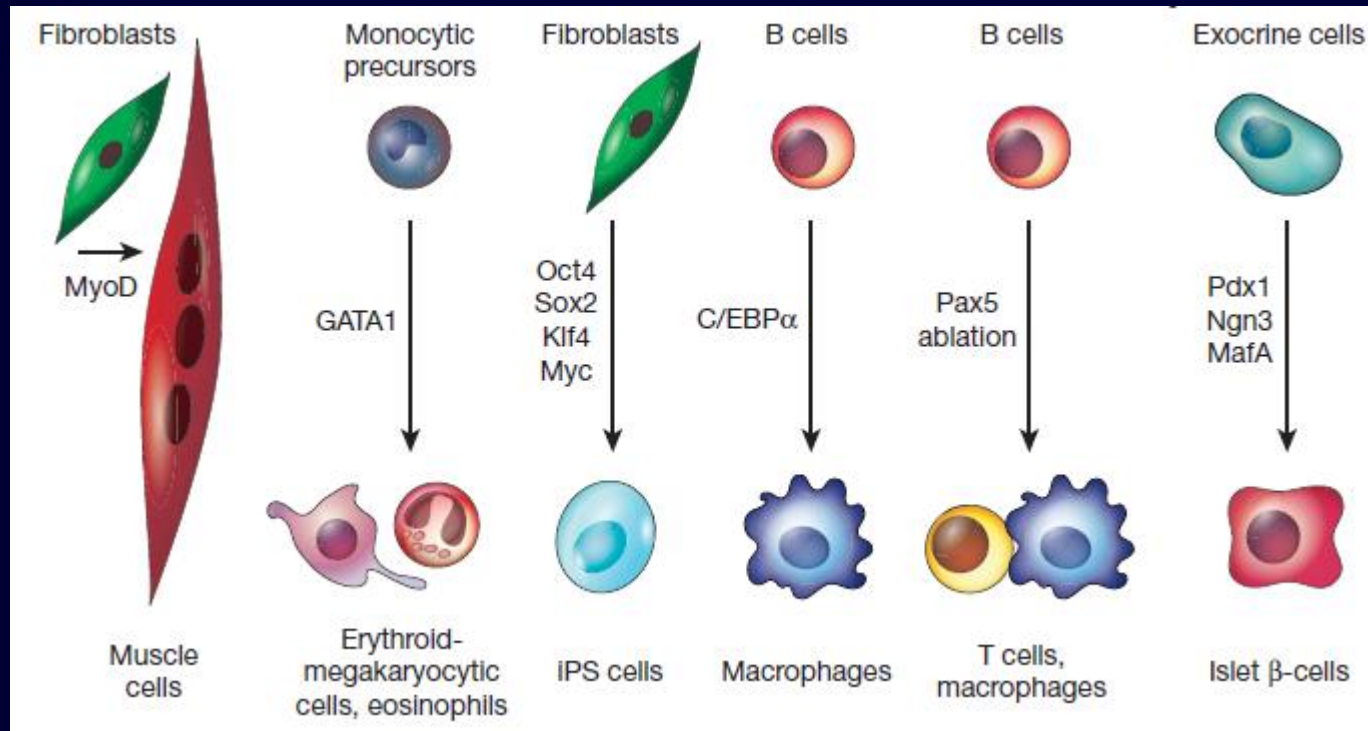


Epigenetic landscape: H.C. Waddington (1957)

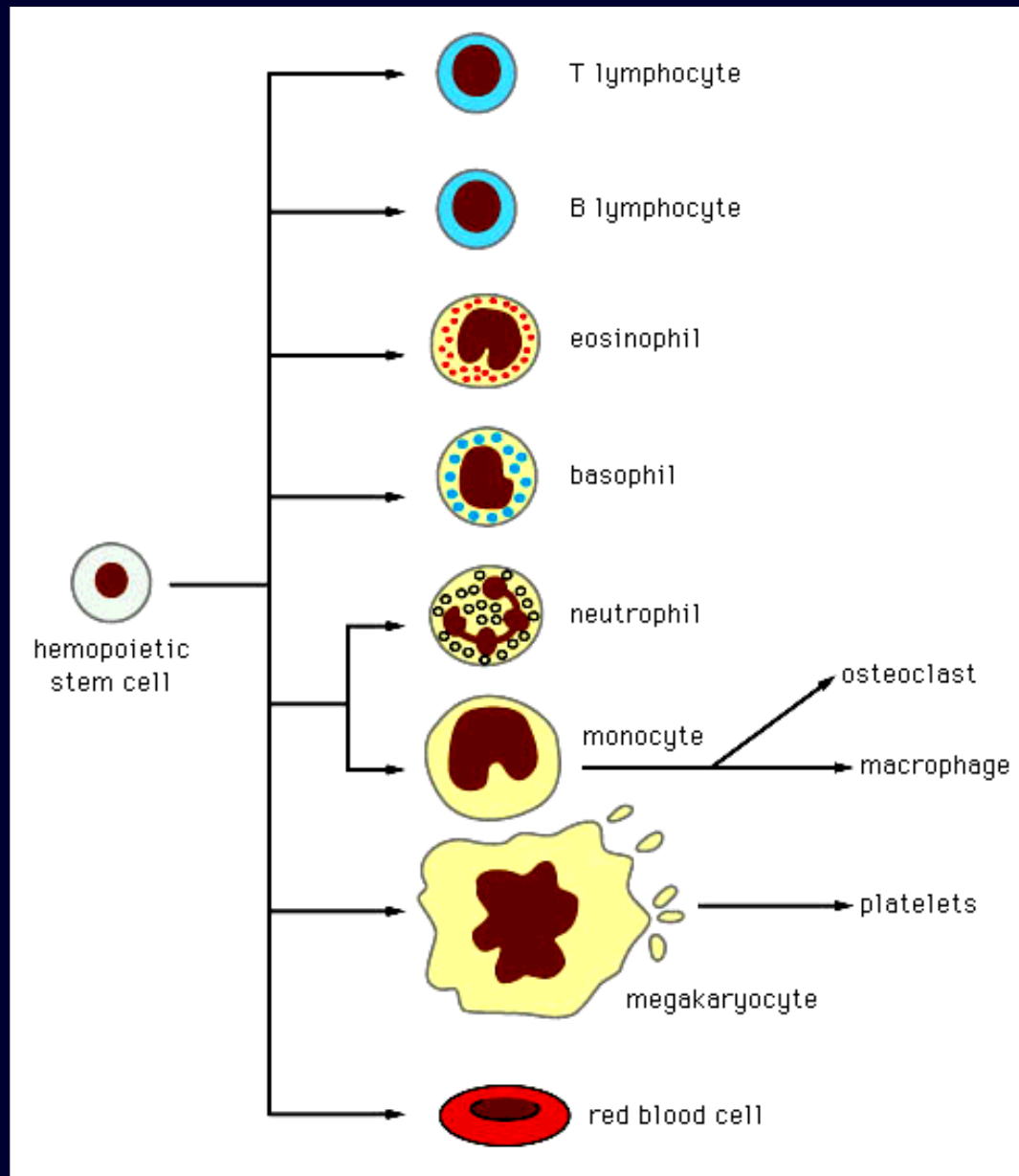
Epigenetic landscape: T. Graf & T. Enver (2009)
- role transkripčních faktorů

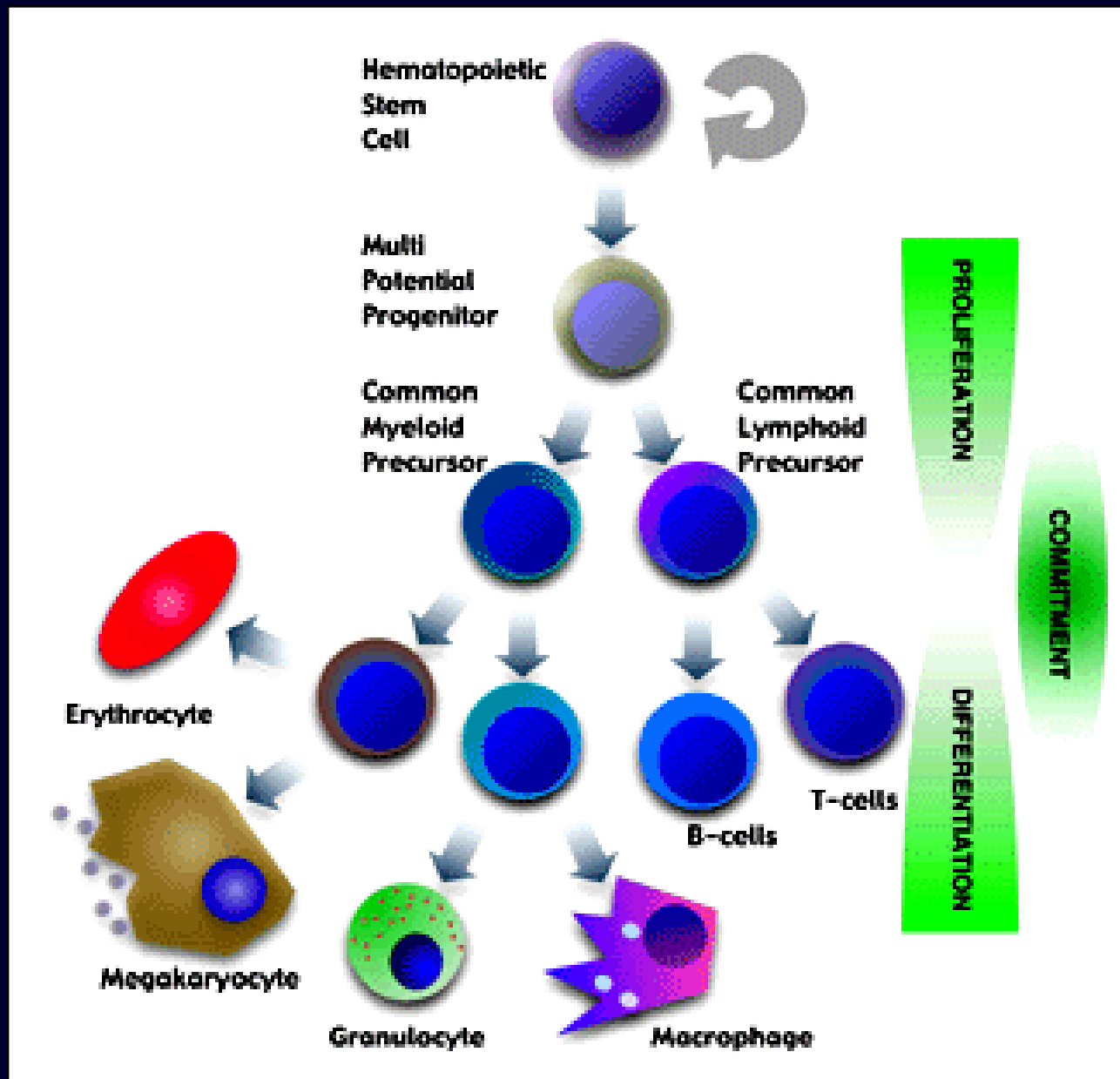


Indukovaná transdiferenciace



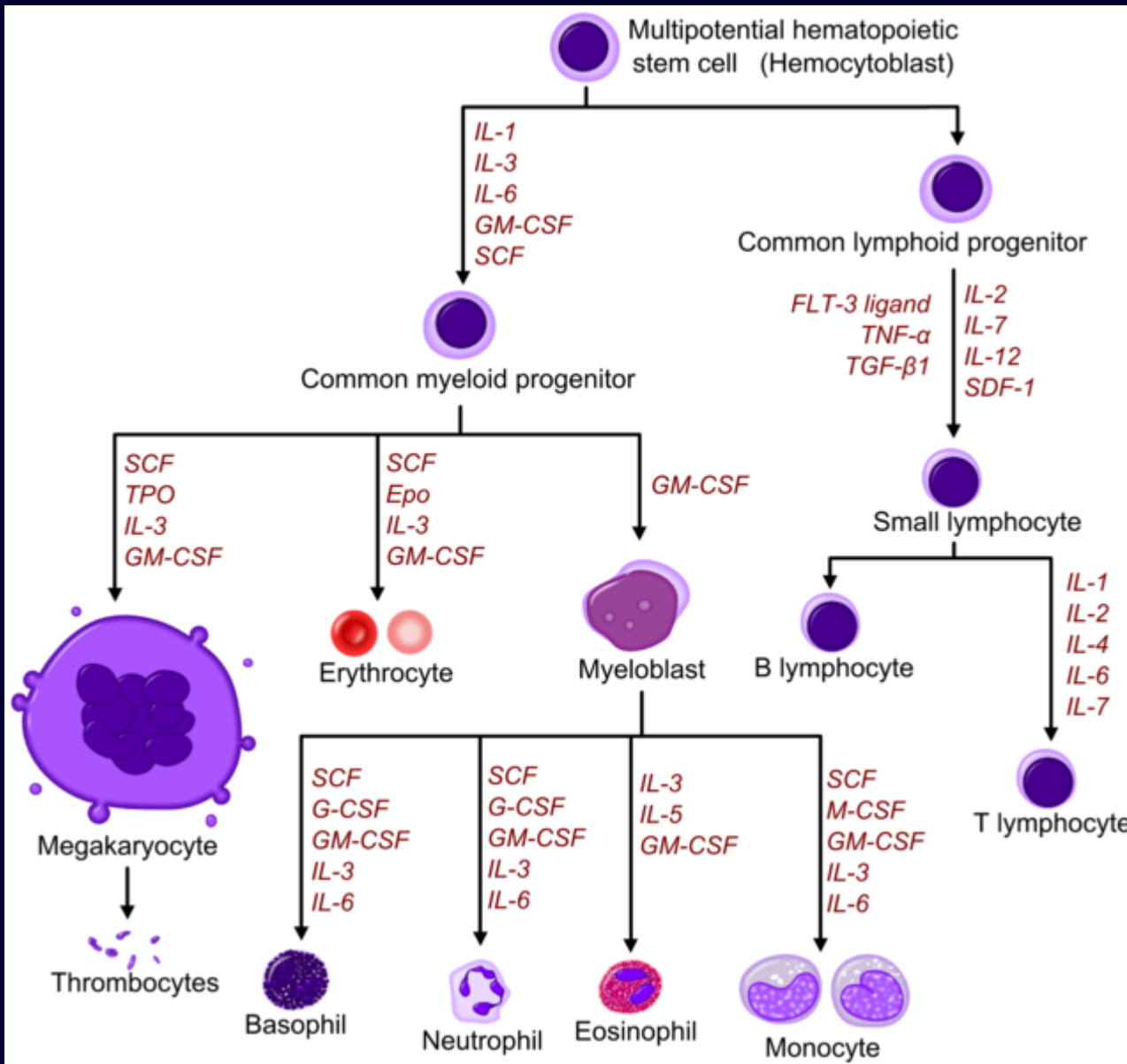
Diferenciační potenciál hematopoetických kmenových buněk





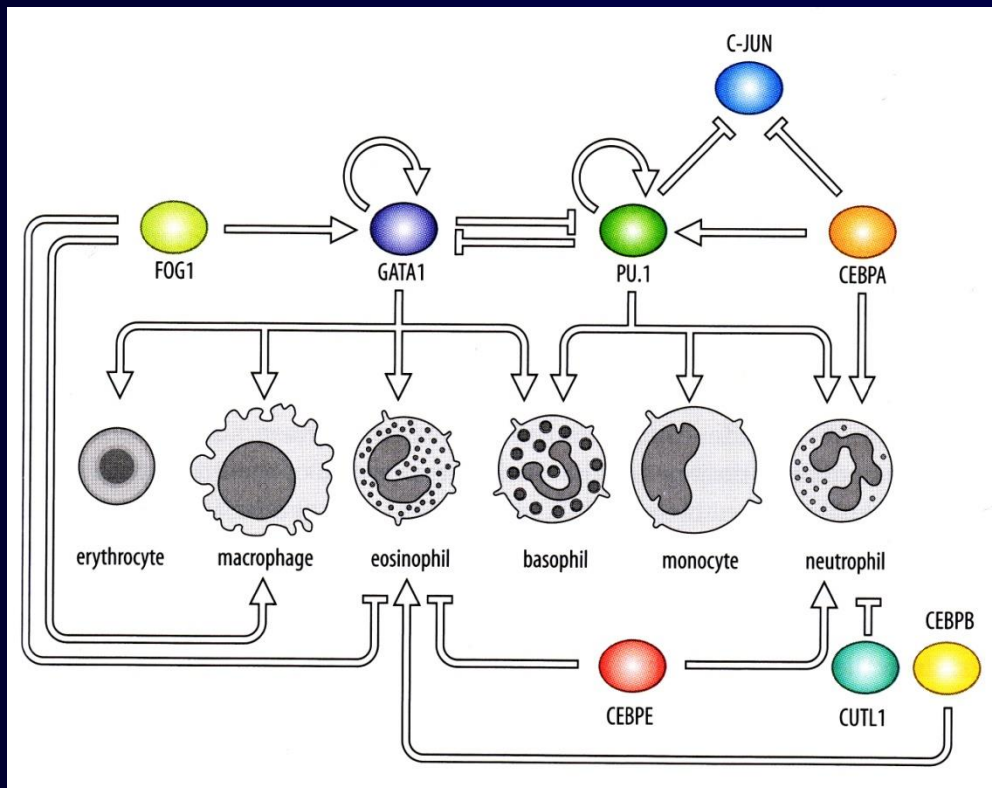
Diferenciace krevních buněk

- vliv růstových faktorů a jiných cytokinů



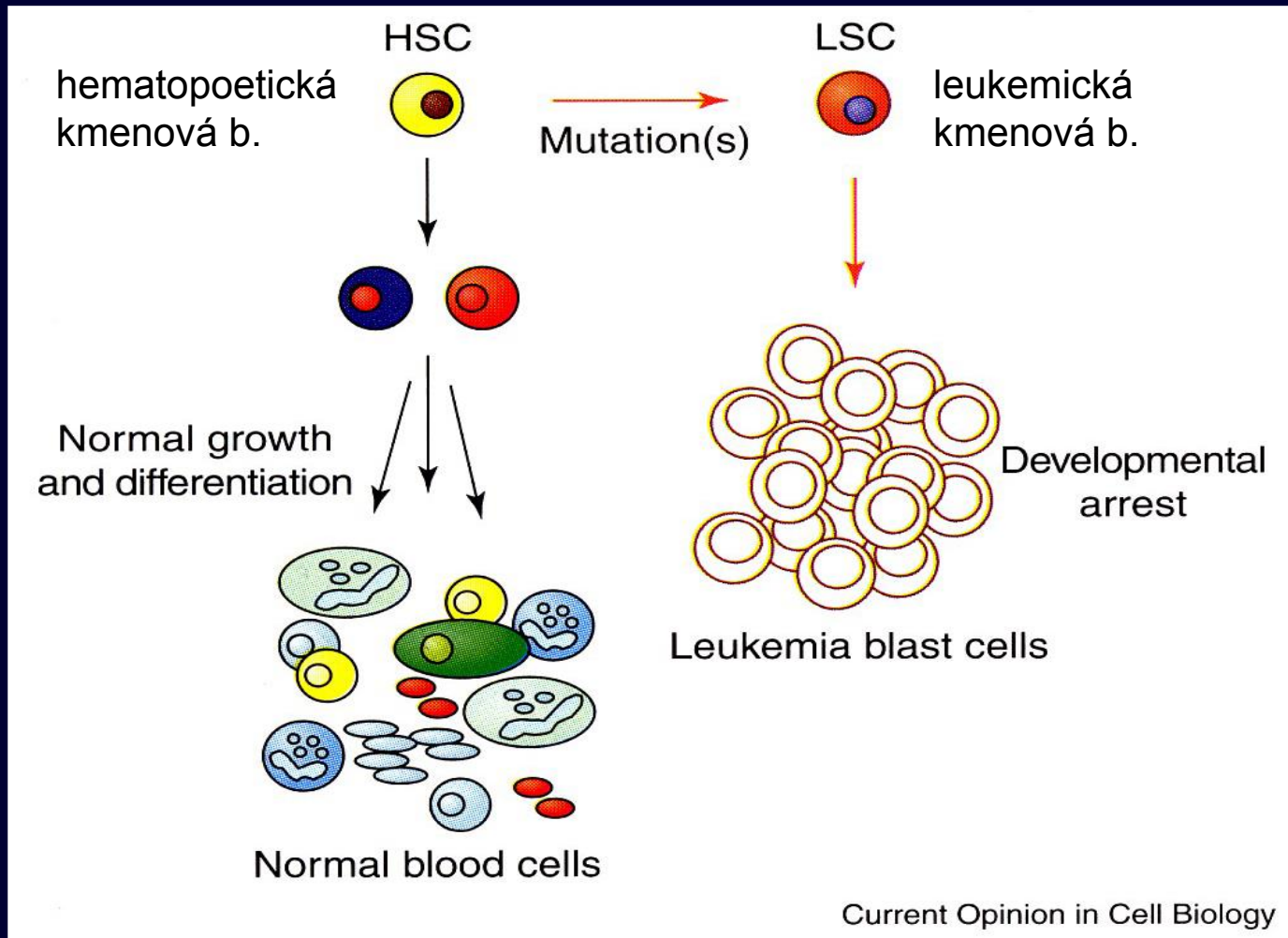
Some hematopoietic growth factors and their target cells

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

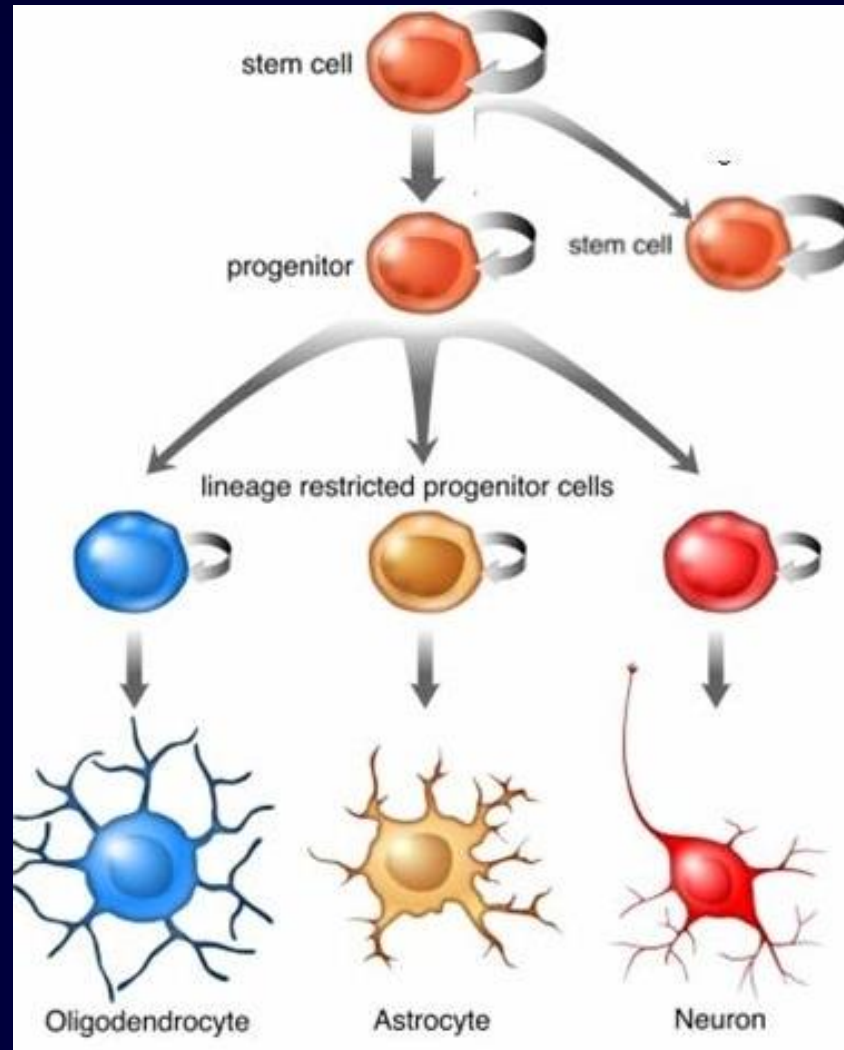


Vliv TFs na diferenciaci krevních buněk

Porucha diferenciace krevních buněk



Průběh neuronální diferenciace



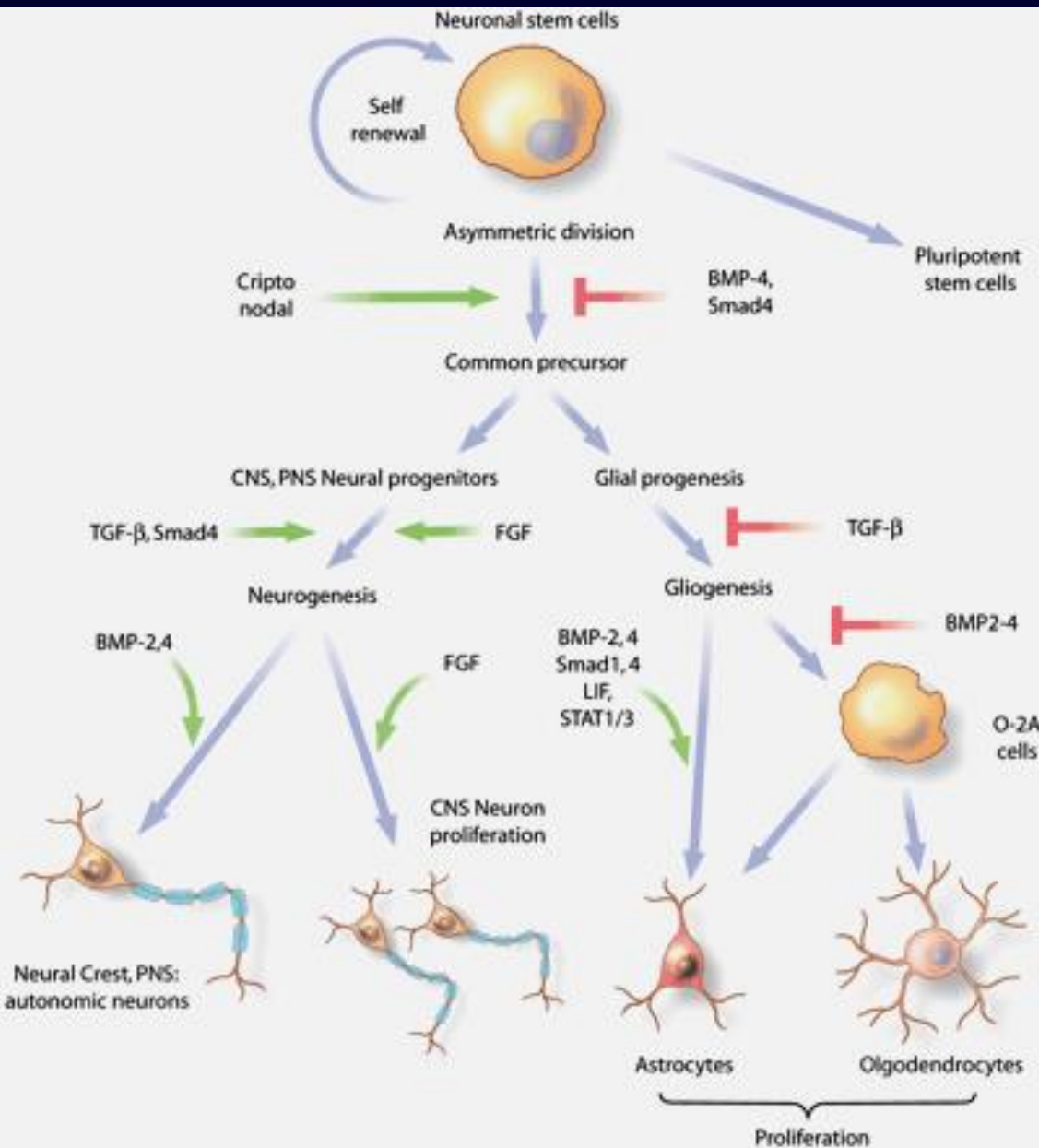
Regulace neuronální diferenciace

TGF- β superfamily

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

Růstové faktory

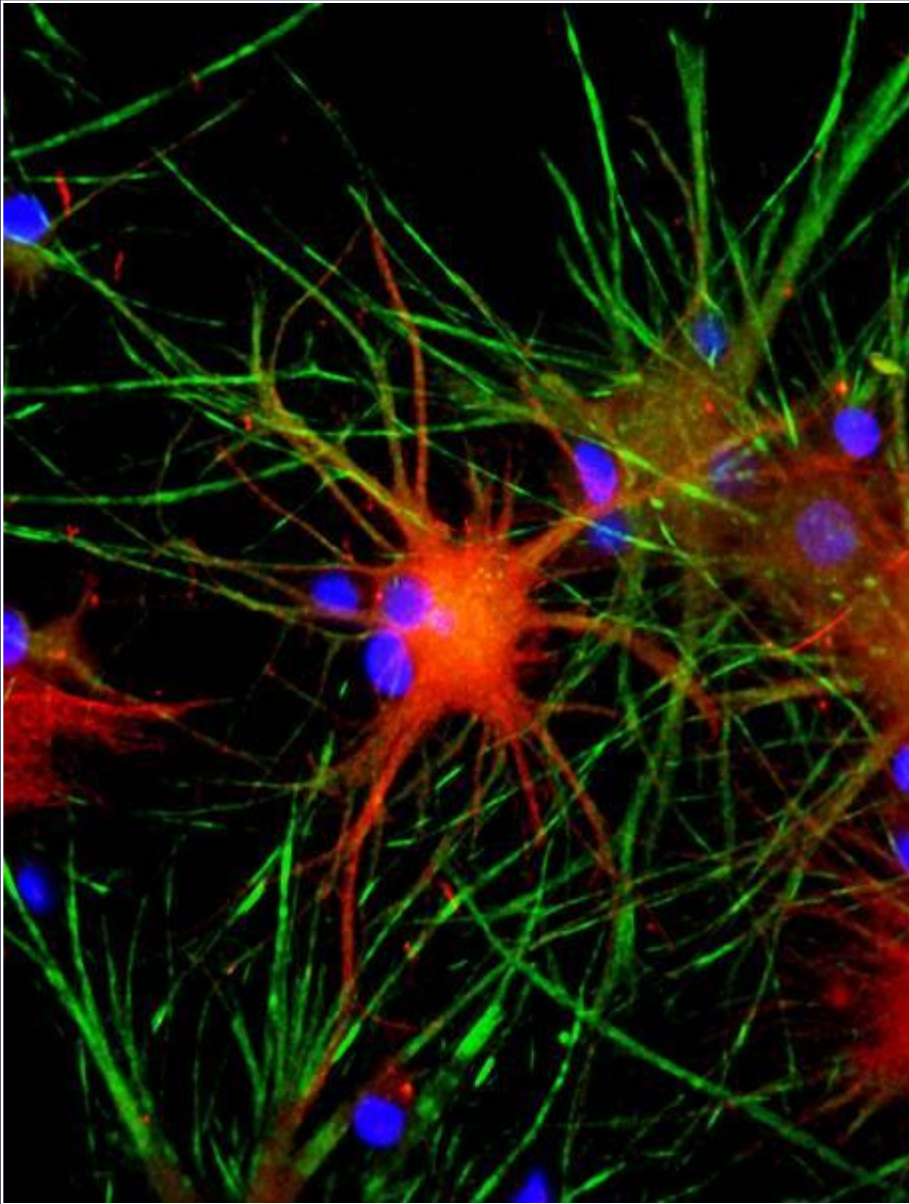
- FGF
- LIF

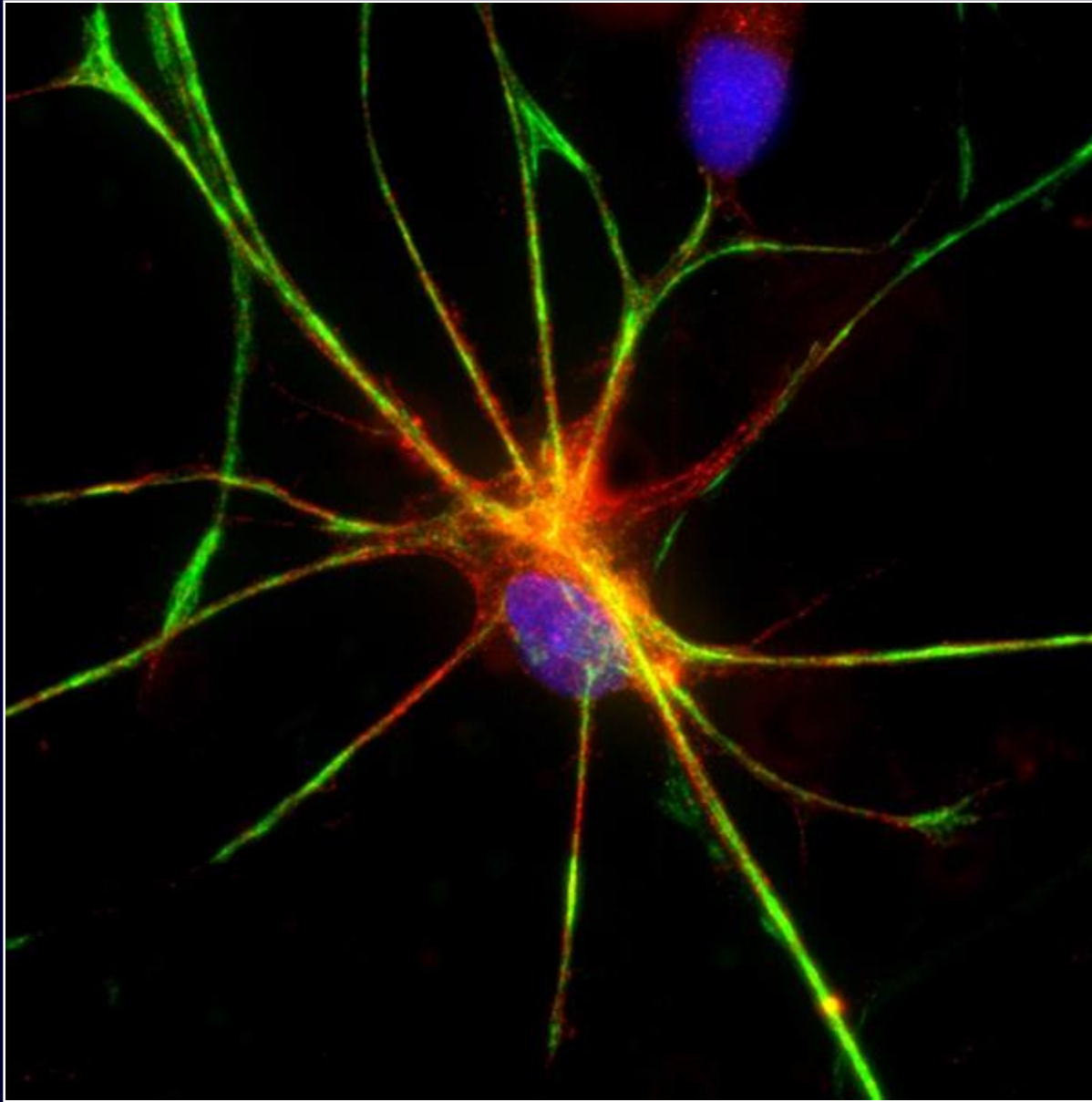


Neuronální diferenciace

Kmenová buňka:

- nestin
- GFAP
- DNA





Neuronální diferenciace

Progenitorová buňka:

- β -tubulin III
- GFAP
- DNA

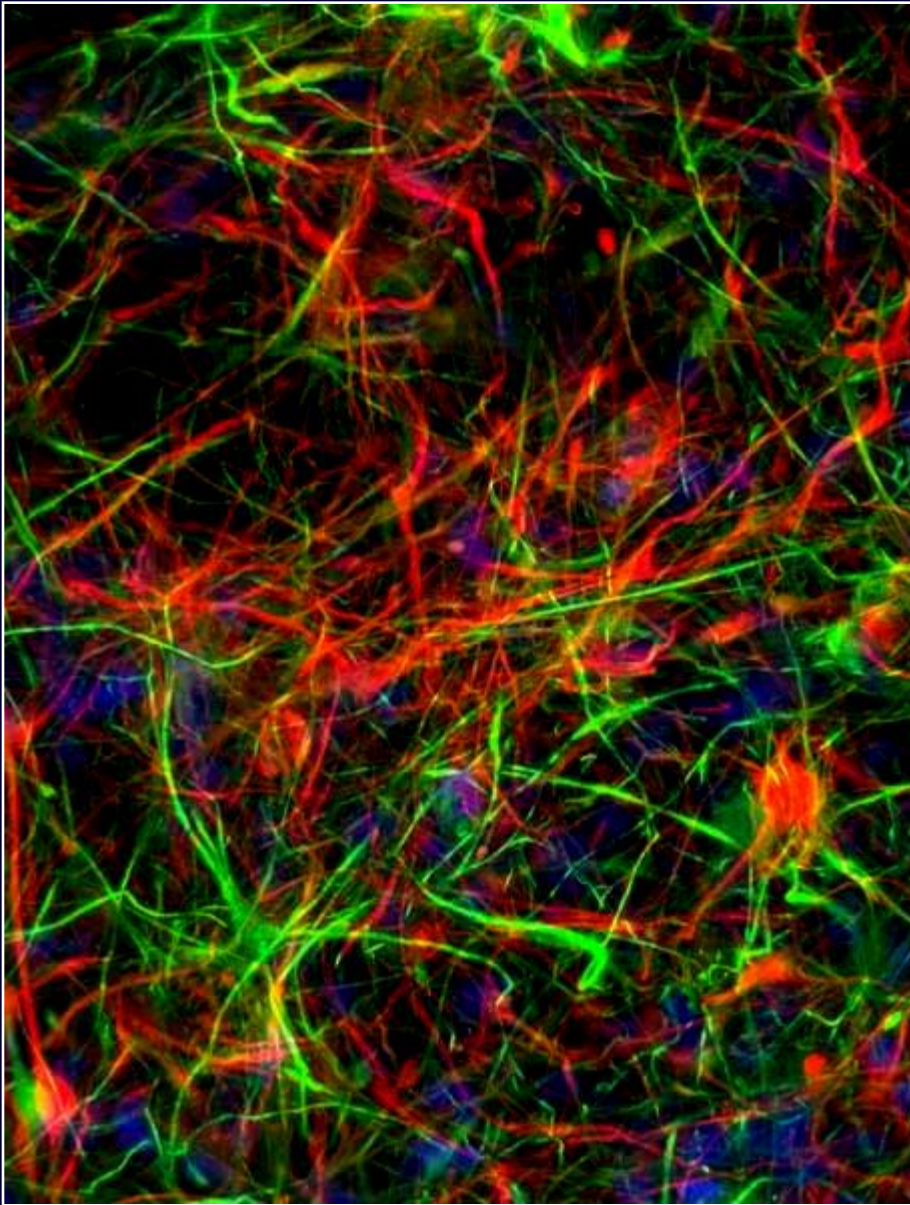
Neuronální diferenciaci

Neurony:

- β -tubulin III
- DNA

Gliové buňky:

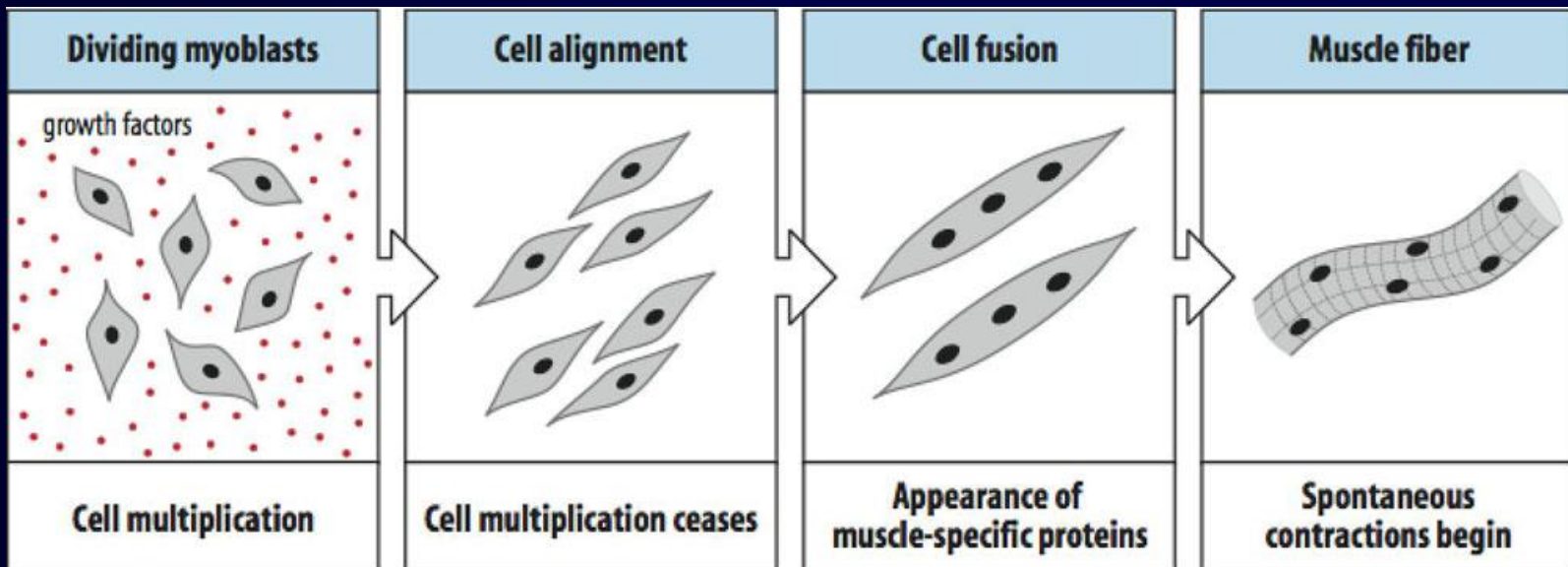
- GFAP
- DNA



Diferenciace příčně pruhované svaloviny

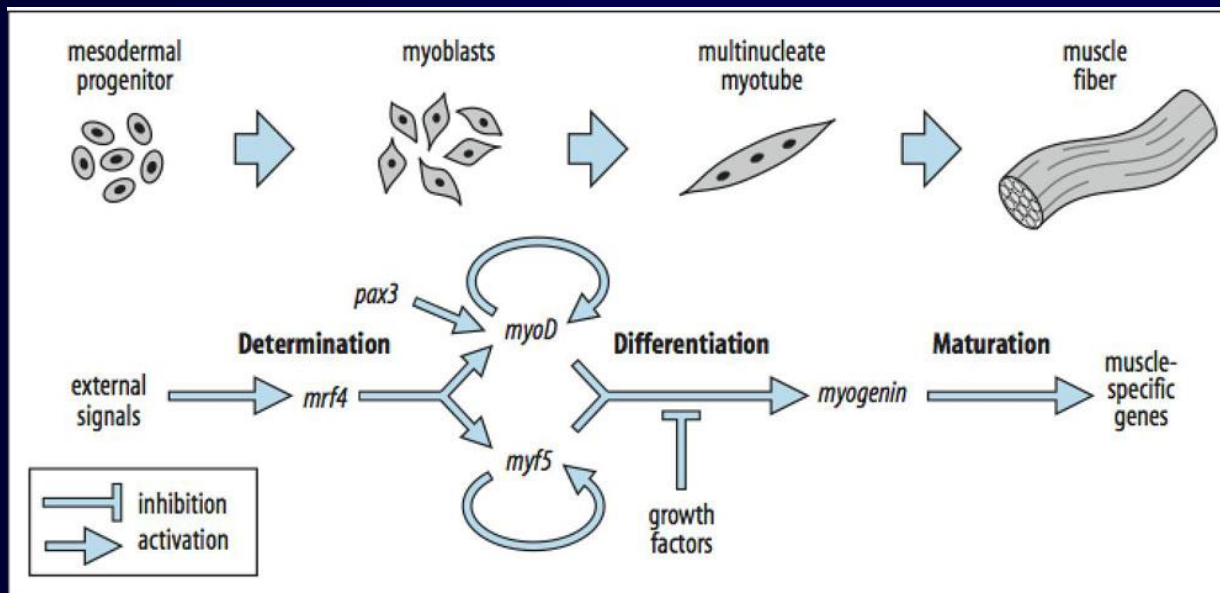
diferenciaci doprovází

- zástava buněčného cyklu
- změna morfologie
- fúze v syncytia



Diferenciace příčně pruhované svaloviny

- svalové prekurzory exprimují 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**
- 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)

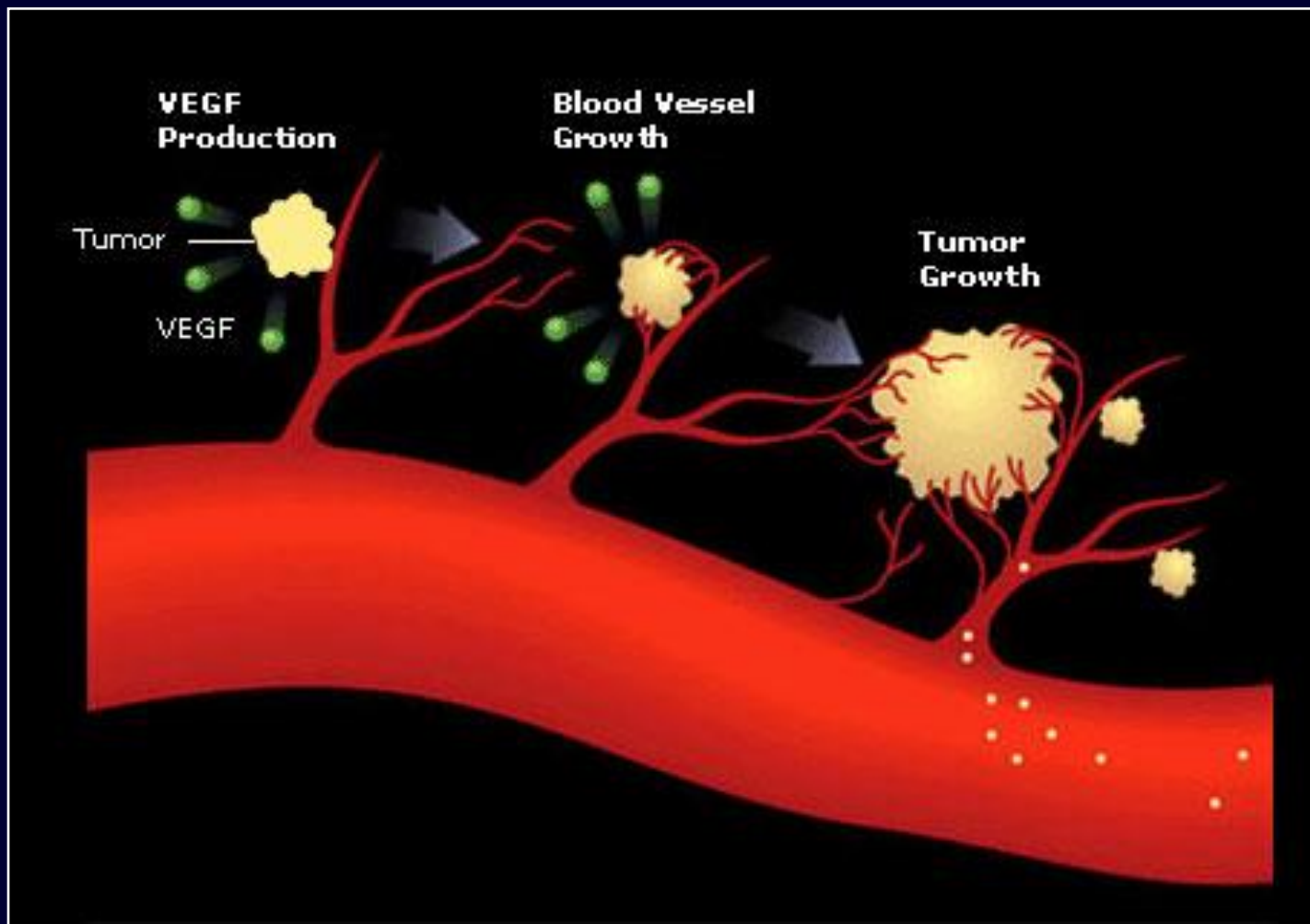
- specifická vazba na **EGFR** (Epidermal Growth Factor Receptor)
→ aktivace RTK kaskády

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* (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

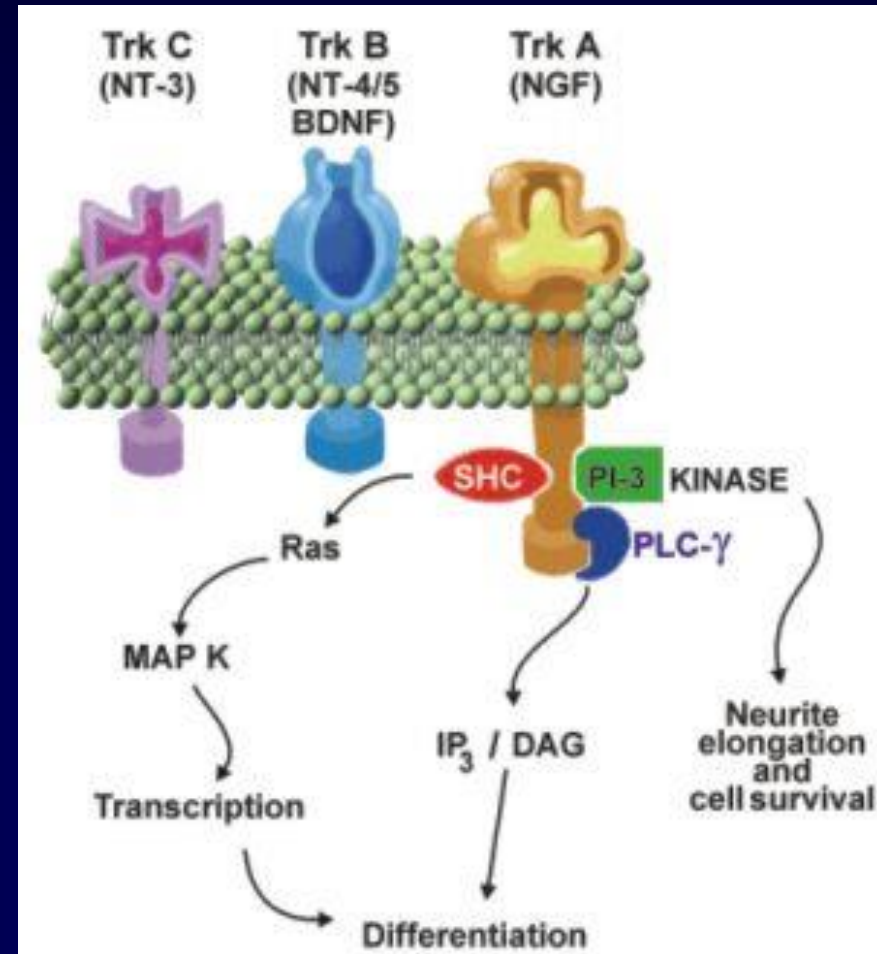
Neurotrofiny (Neurotrophins)

- produkovány cílovou tkání → přežívání neuronů, neuronální diferenciace

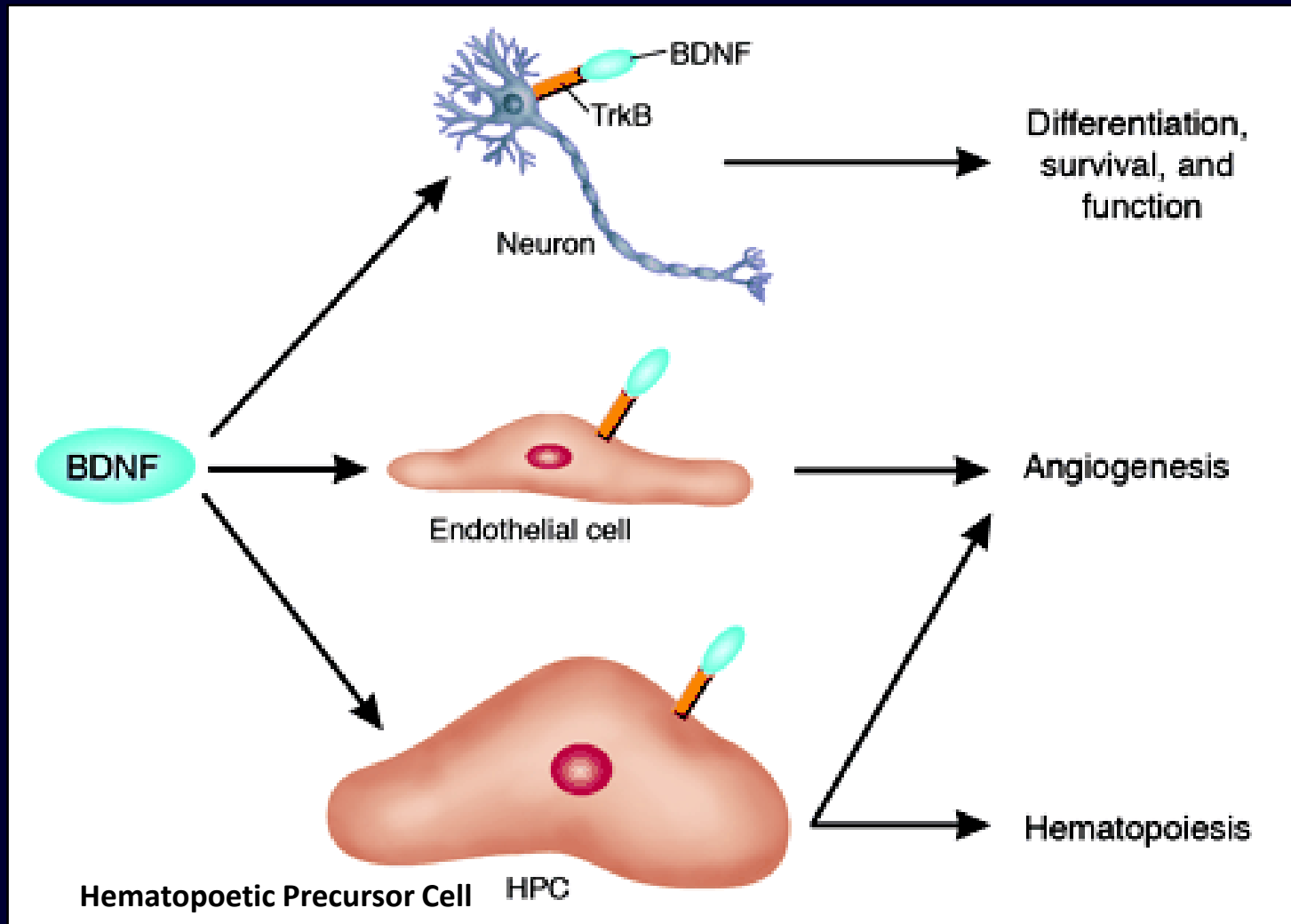
- receptory:

p75, Trk receptory (A,B,C)

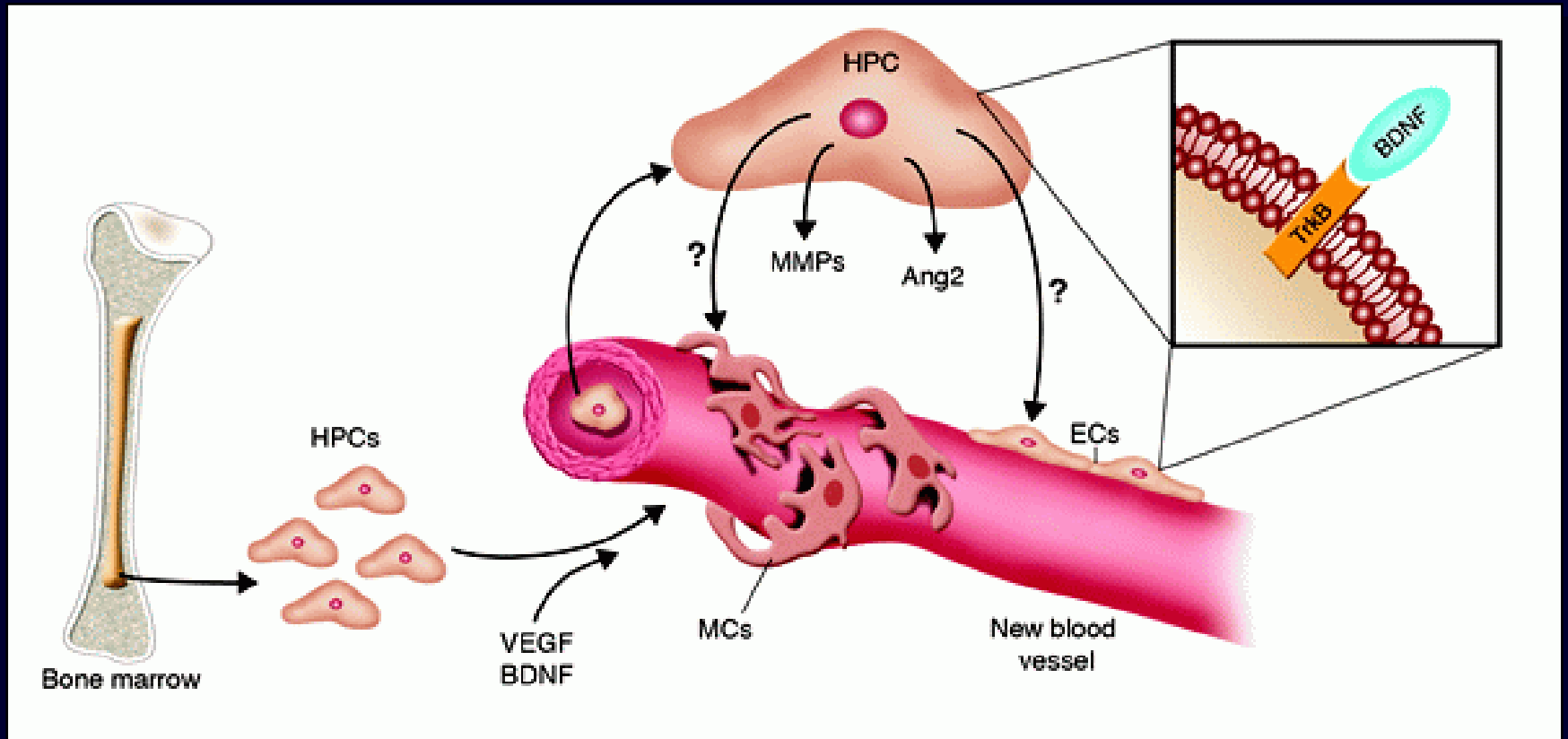
- NGF (nerve growth factor)
- BDNF (brain-derived neurotrophic factor)
- NT-3 (neurotrophin-3)
- NT-4 (neurotrophin-4)



Pleiotropní efekt BDNF



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)

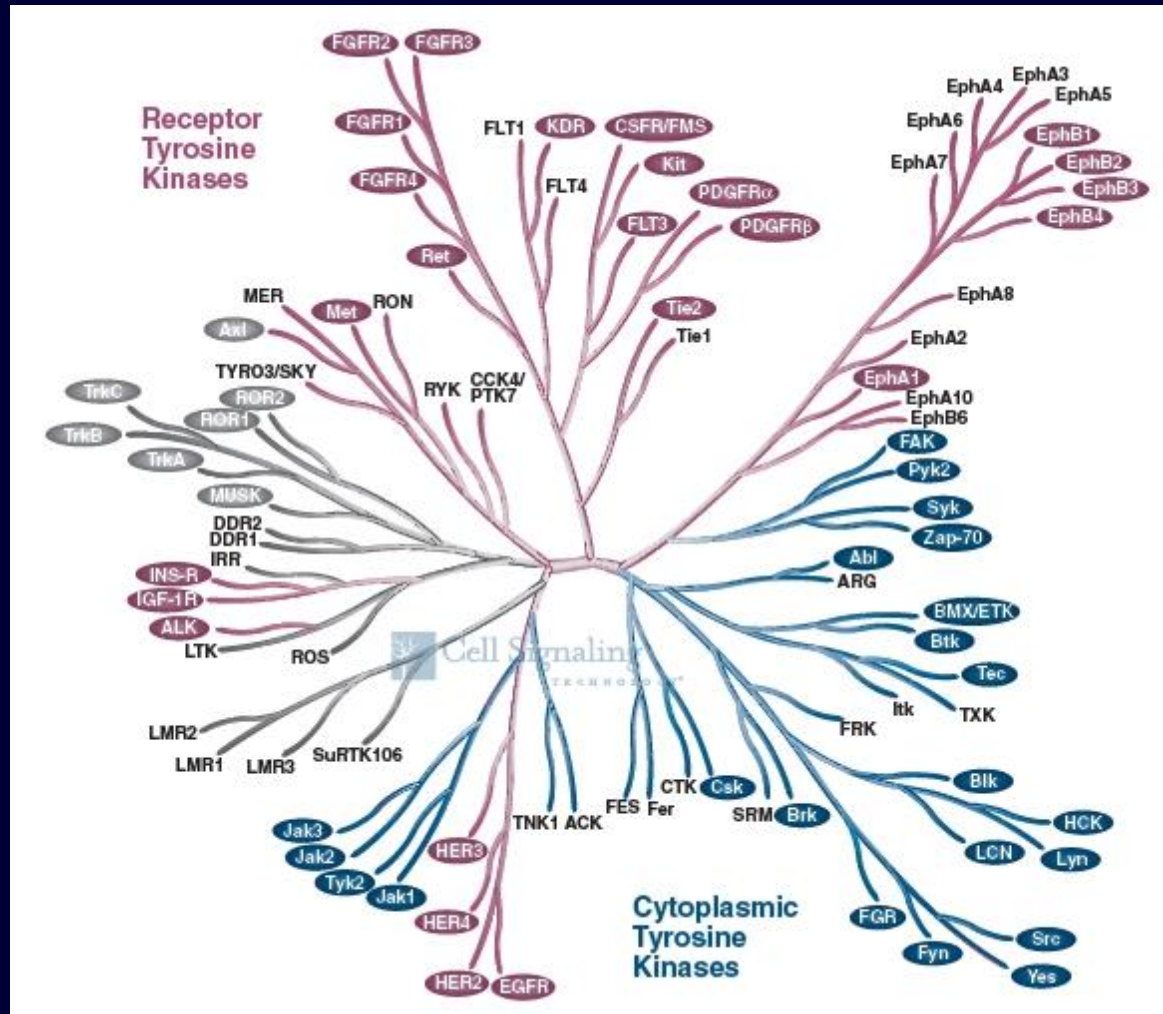
- stimulace tvorby granulocytů/neutrofilů

GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)

RECEPTOROVÉ TYROZIN-KINÁZY

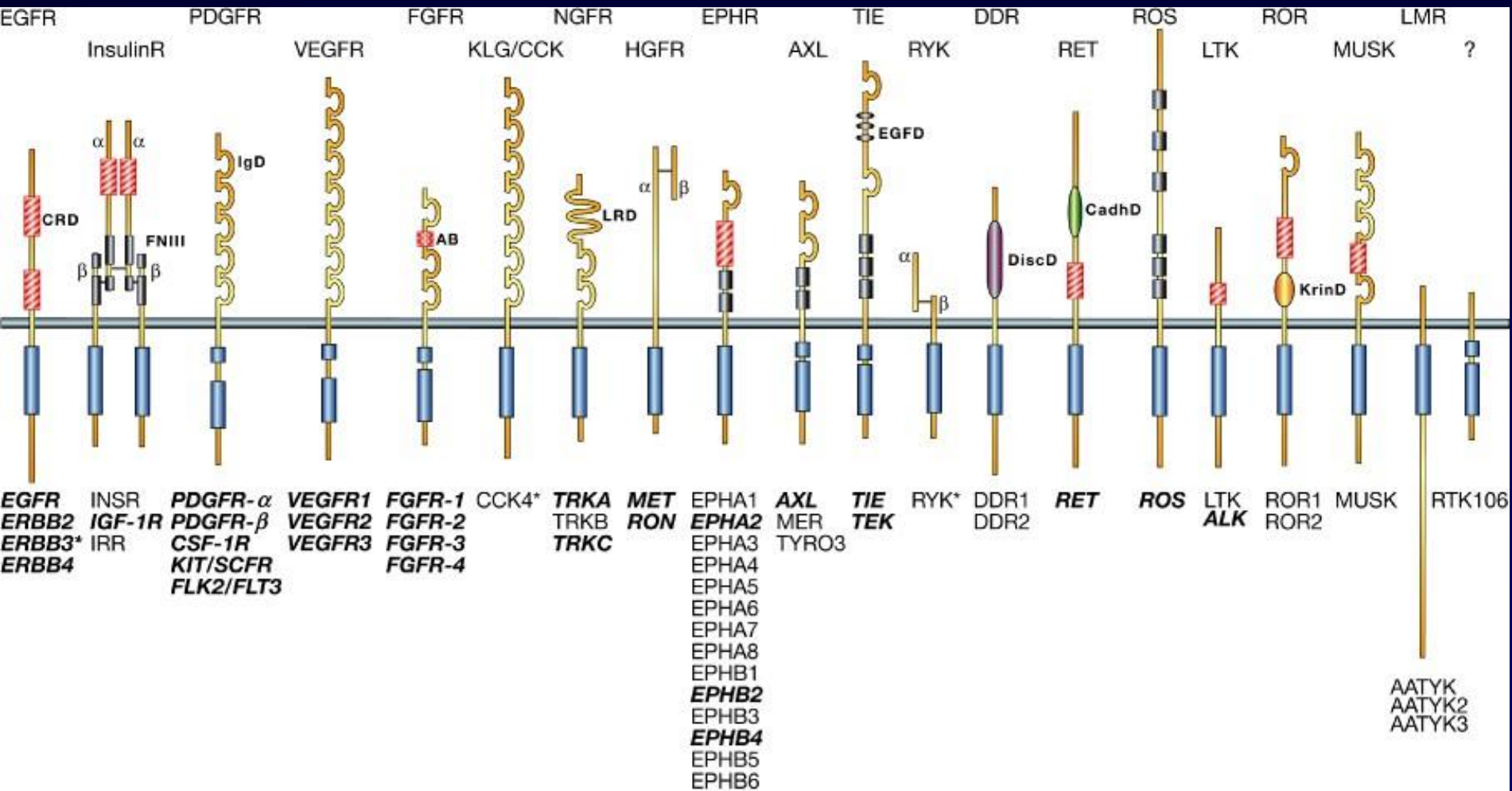
funkce: regulace proliferace, diferenciace, metabolismu, aj.

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



DOMÉNY :

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

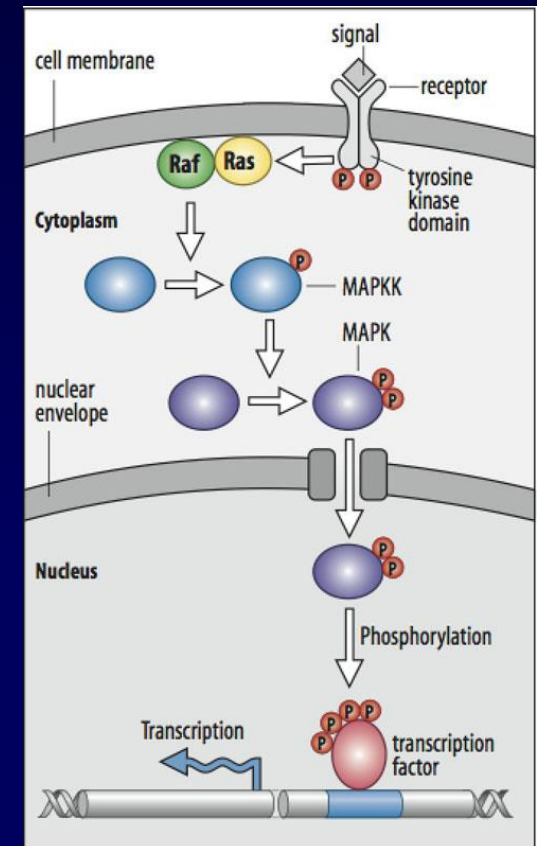
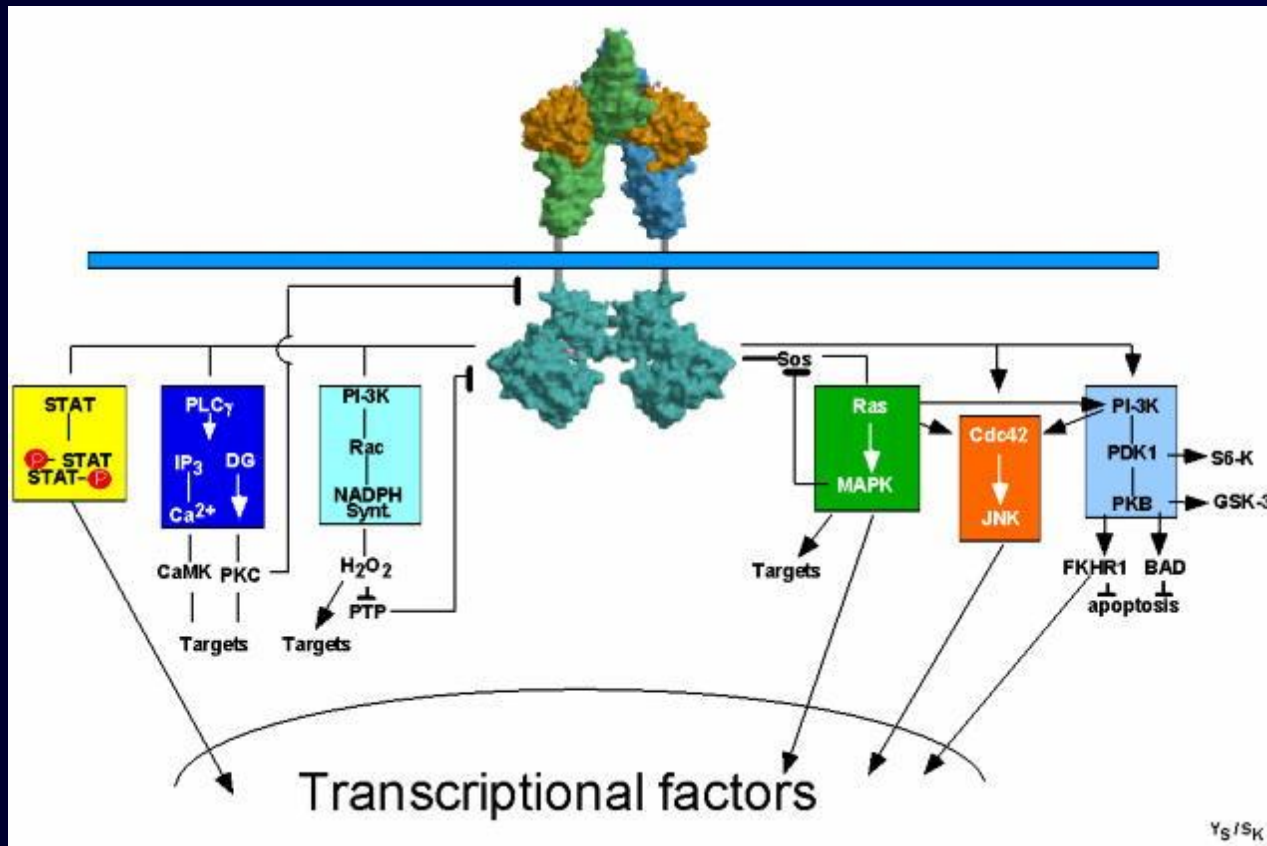


AKTIVACE:

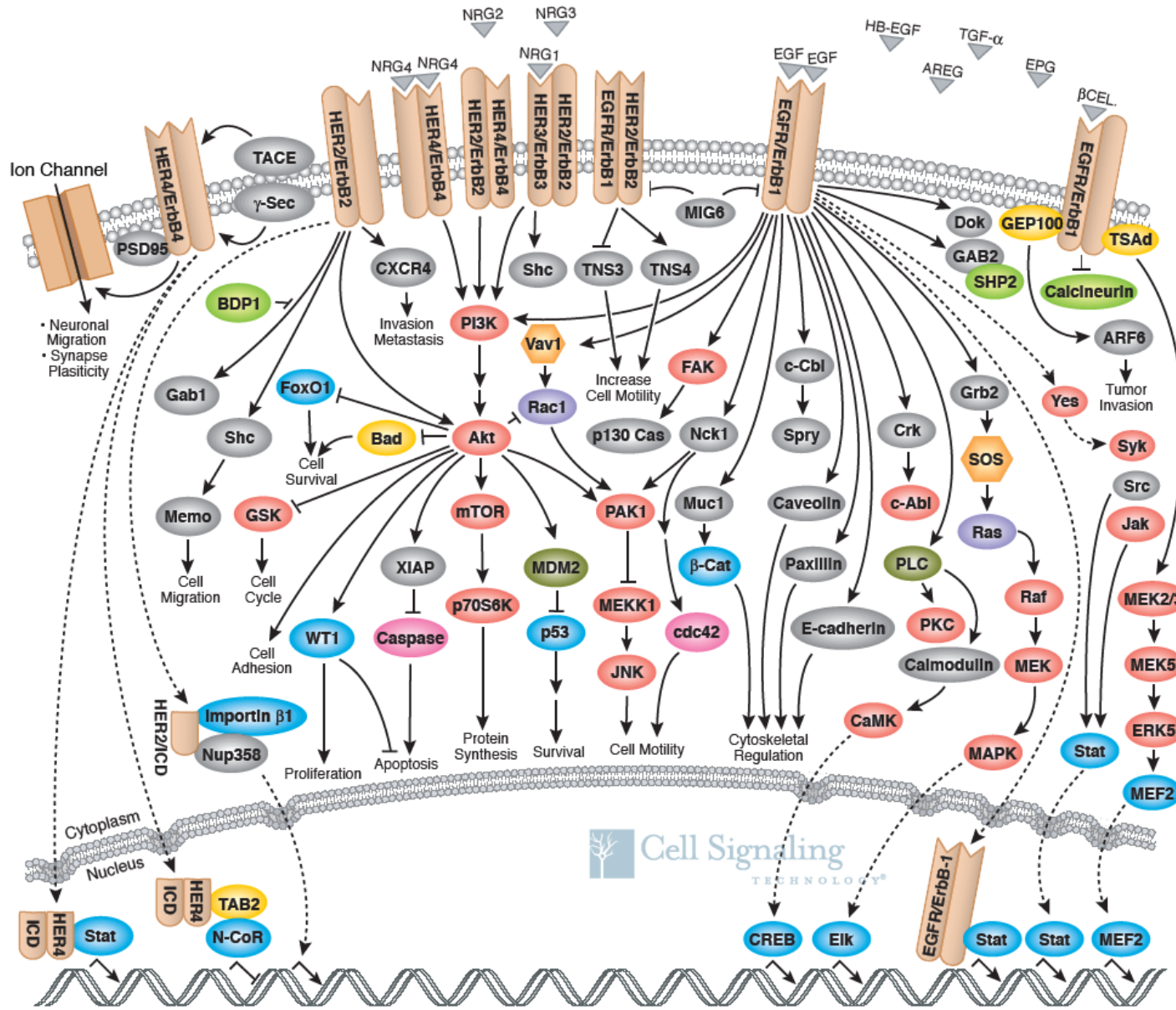
dimerizace vlivem růstových faktorů → cross-fosforylace

a) → konformační změna – stimulace katalytické aktivity

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



ErbB/HER Signaling Network



Cell Signaling TECHNOLOGY®



INDUKOVANÁ DIFERENCIACE

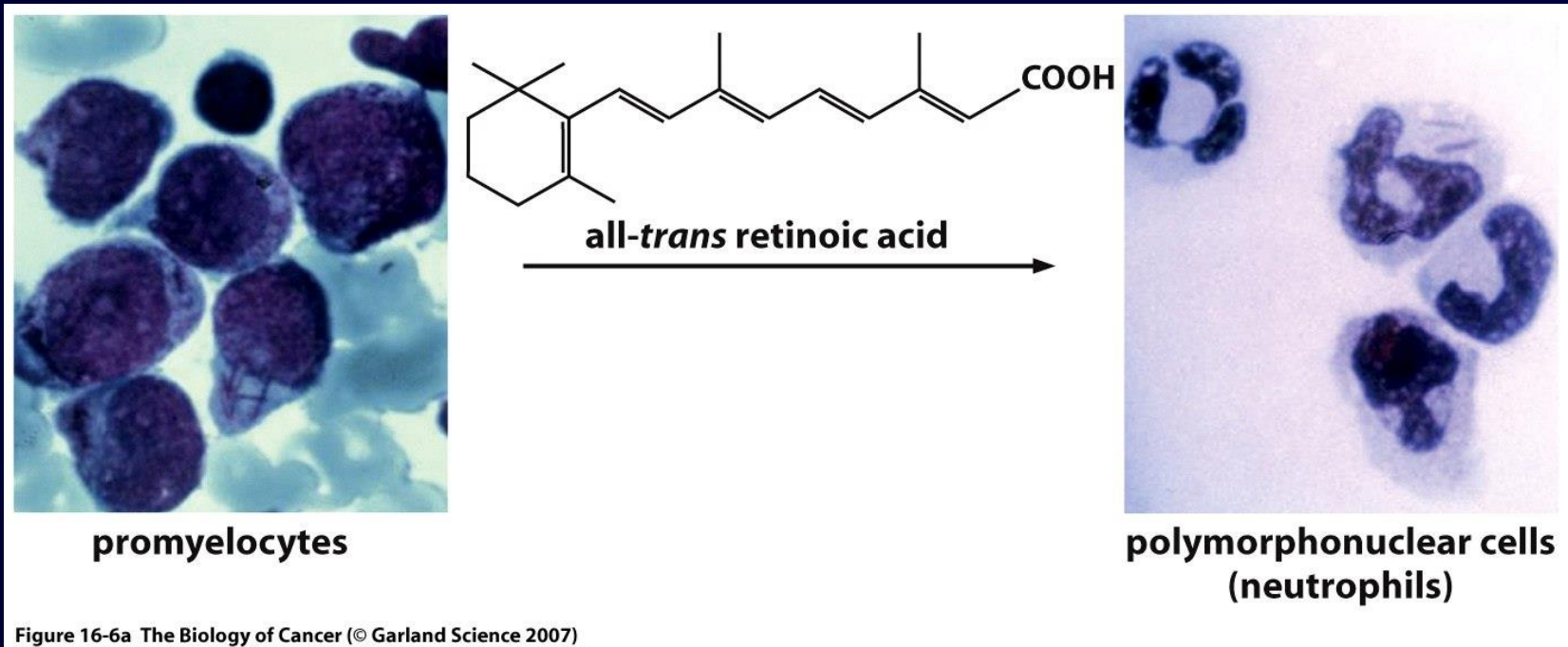
Indukovaná diferenciacie

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

Příklady induktorů diferenciacie *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



The diagram illustrates the differentiation of promyelocytes into polymorphonuclear cells (neutrophils) induced by all-trans retinoic acid (ATRA). On the left, a microscopic image shows several promyelocytes, which are large cells with granular cytoplasm and a high nucleus-to-cytoplasm ratio. In the center, the chemical structure of all-trans retinoic acid is shown, consisting of a cyclohexene ring with a methyl group and a side chain containing four trans double bonds and a terminal carboxylic acid group (COOH). An arrow labeled "all-trans retinoic acid" points from the promyelocytes to the right. On the right, a microscopic image shows several polymorphonuclear cells (neutrophils), which are smaller cells with a characteristic multi-lobed nucleus.

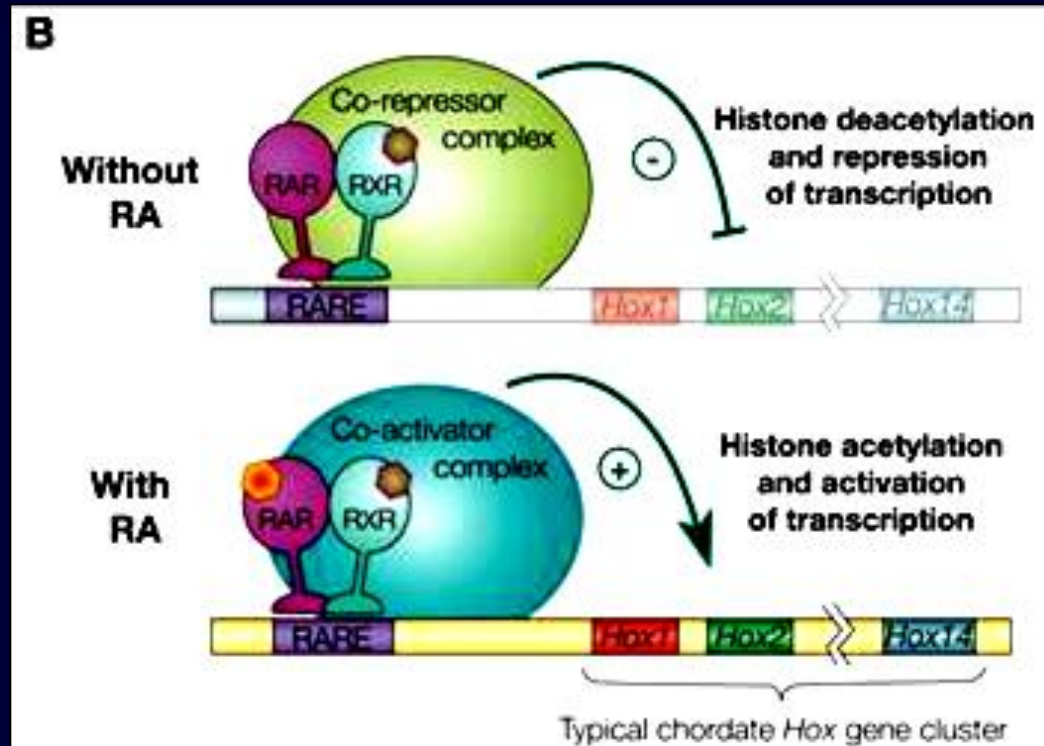
promyelocytes

all-trans retinoic acid

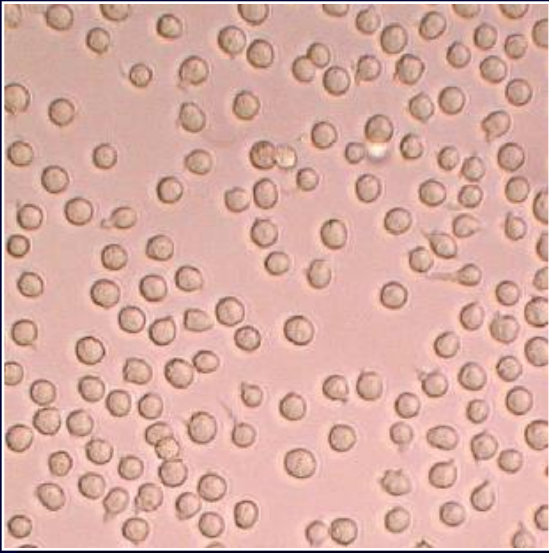
polymorphonuclear cells
(neutrophils)

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

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:**

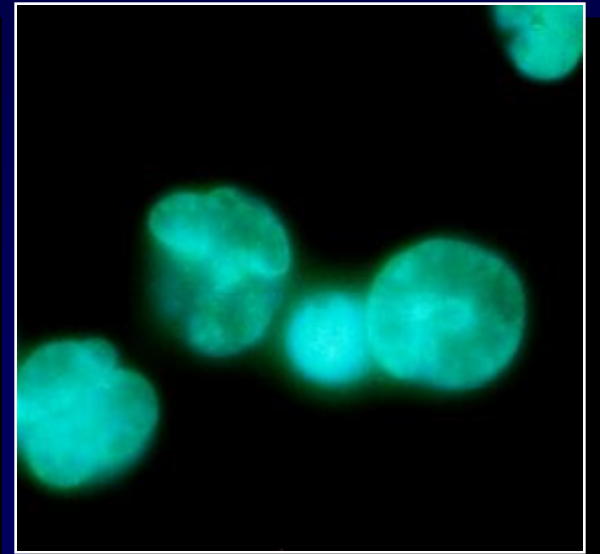
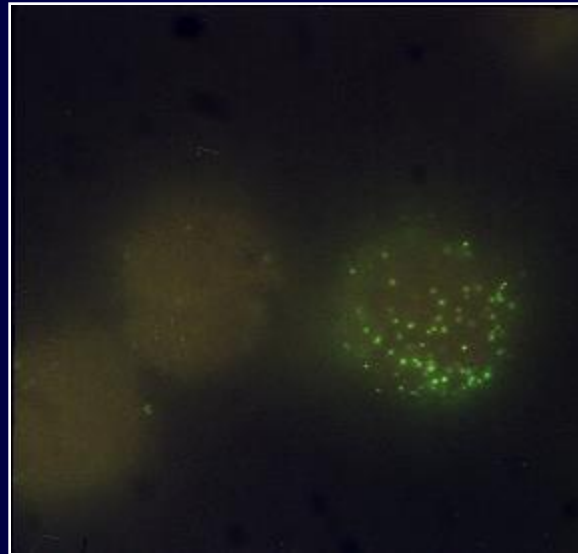
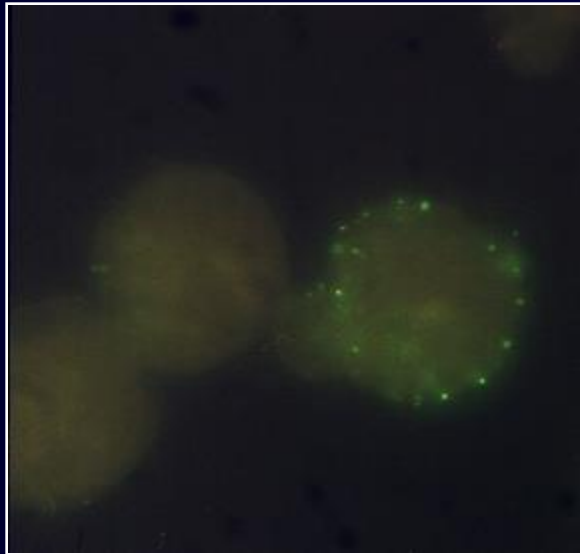
phorbolmyristyl acetát (PMA)
1,25-dihydroxyvitamin D₃

Diferenciace linie HL-60 do stádia granulocytů:

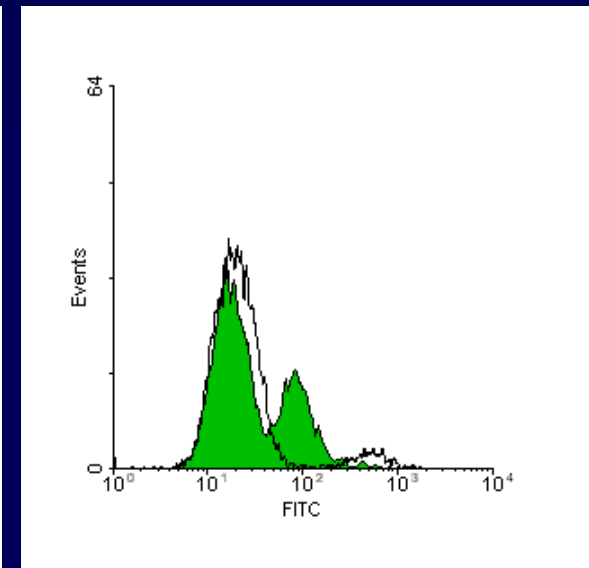
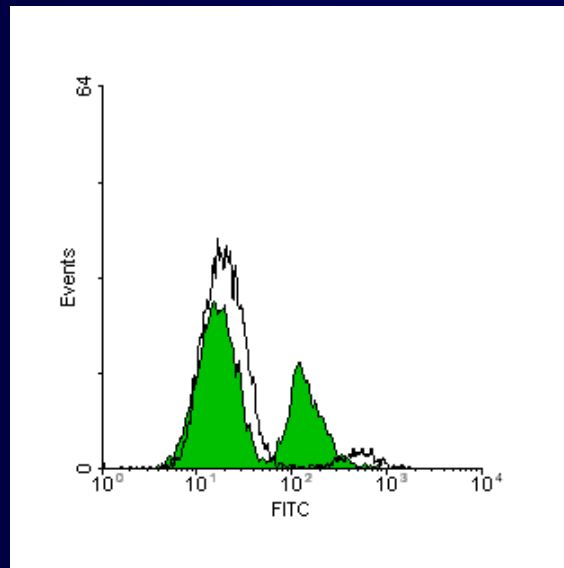
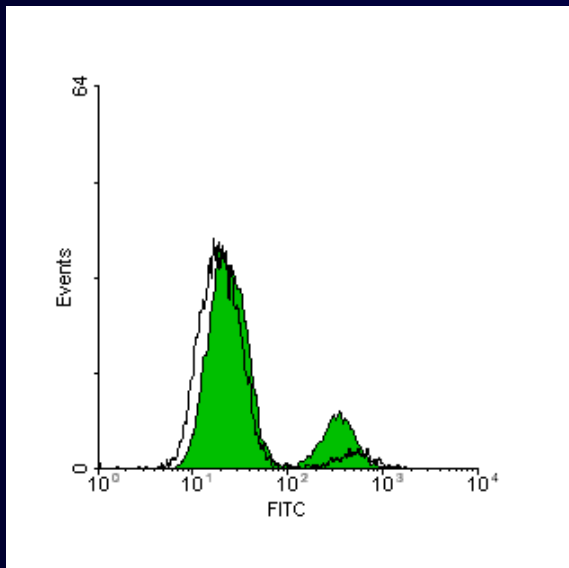
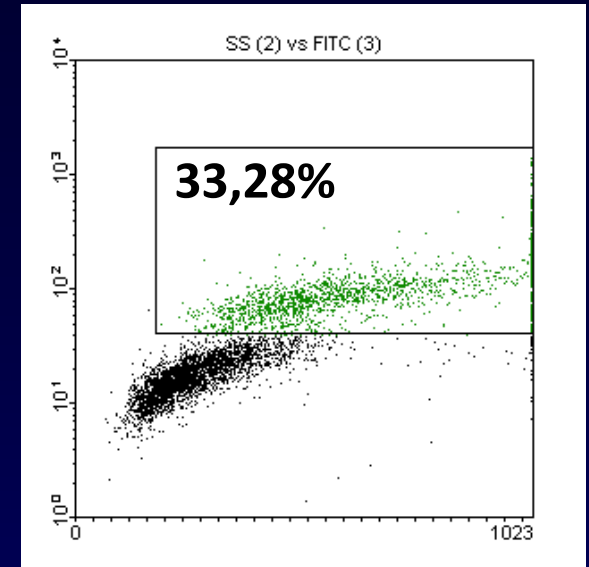
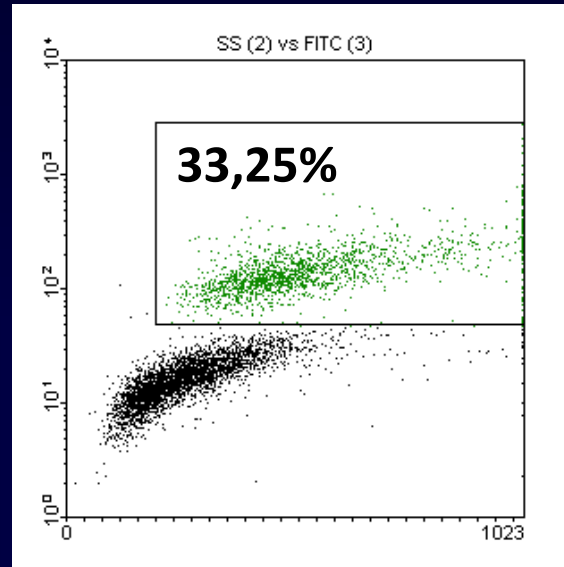
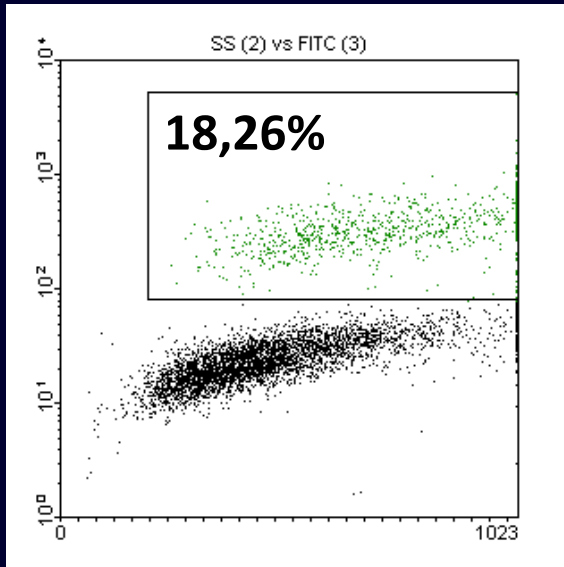
Induktor: 1mM kyselina *all-trans* retinová

Marker: CD-66b (CD-67)

Detekce: anti-CD66b, SwAM-FITC



Granulocytární diferenciace HL-60: flow cytometrie / CD66b



1mM ATRA

1mM ATRA + 13mM CA

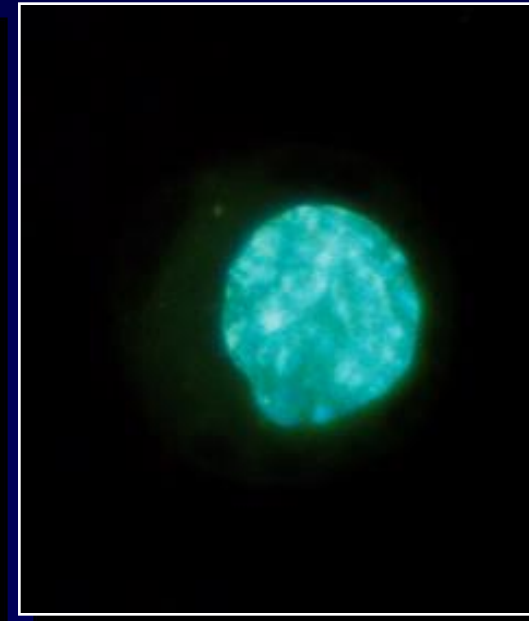
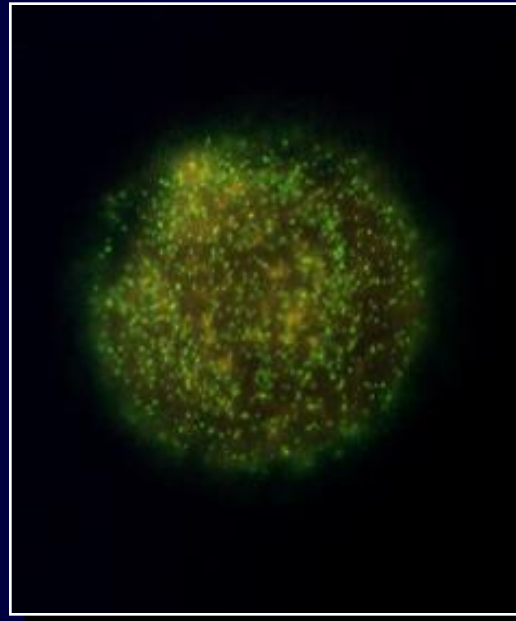
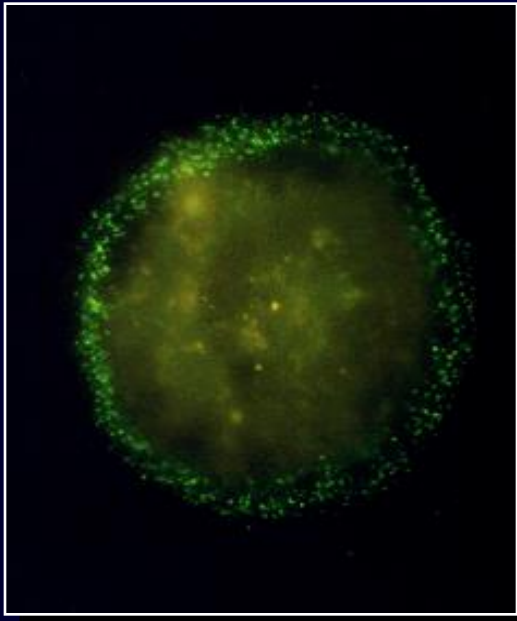
1mM ATRA + 52mM CA

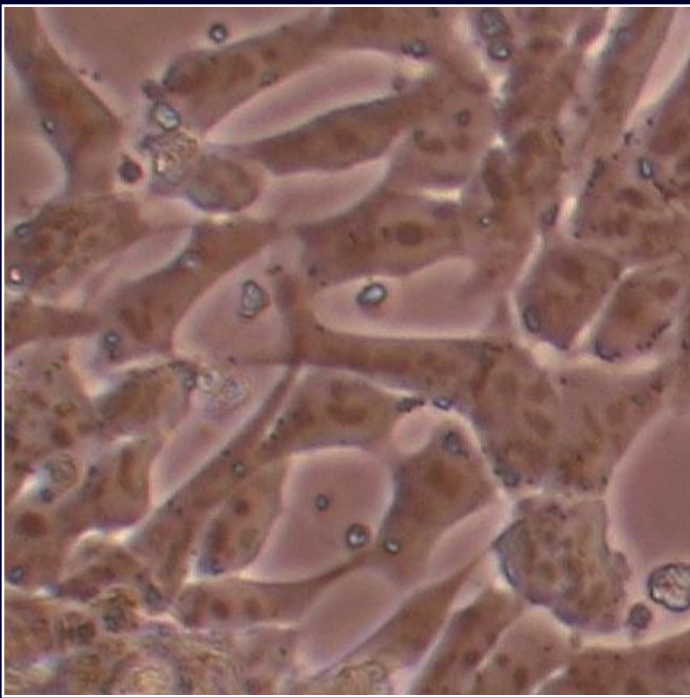
Diferenciace linie HL-60 do stádia makrofágů:

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:**

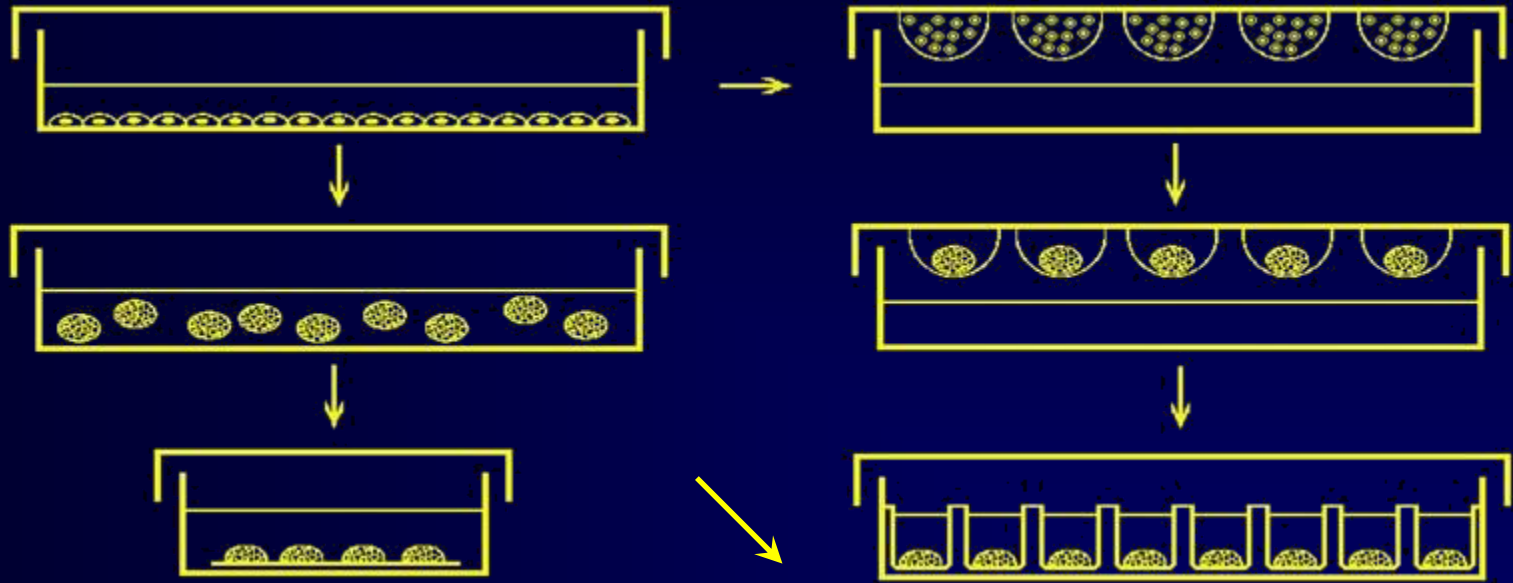
kyselina *all-trans* retinová (ATRA)

dimethylsulfoxid (DMSO)

- **induktor neuronální diferenciace:**

kyselina *all-trans* retinová (ATRA)

Schéma diferenciacie buněk P19



metoda kultivace na
bakteriologických miskách

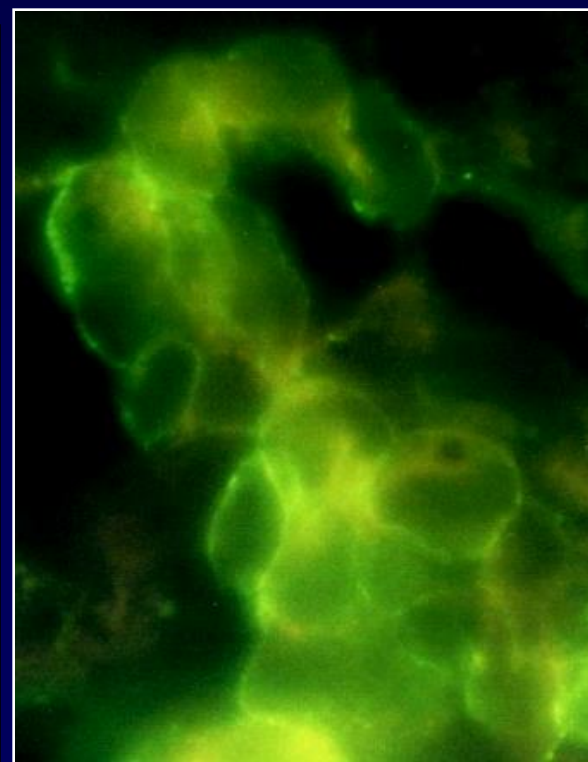
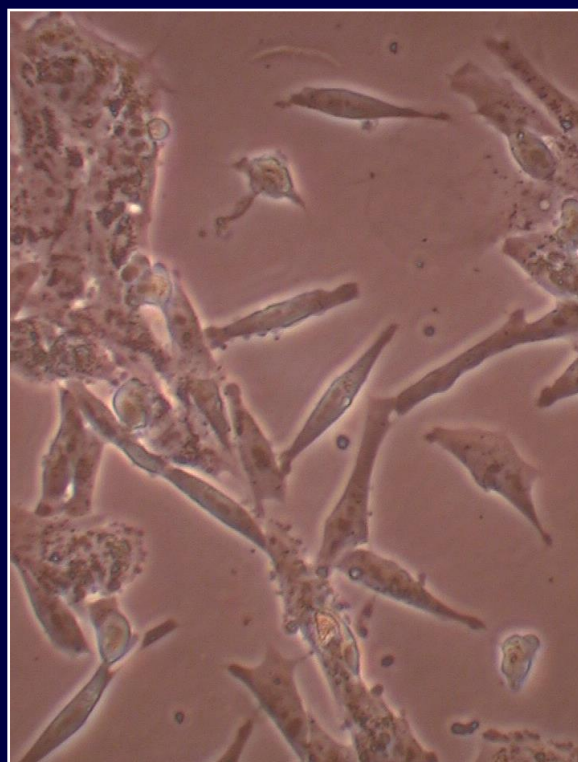
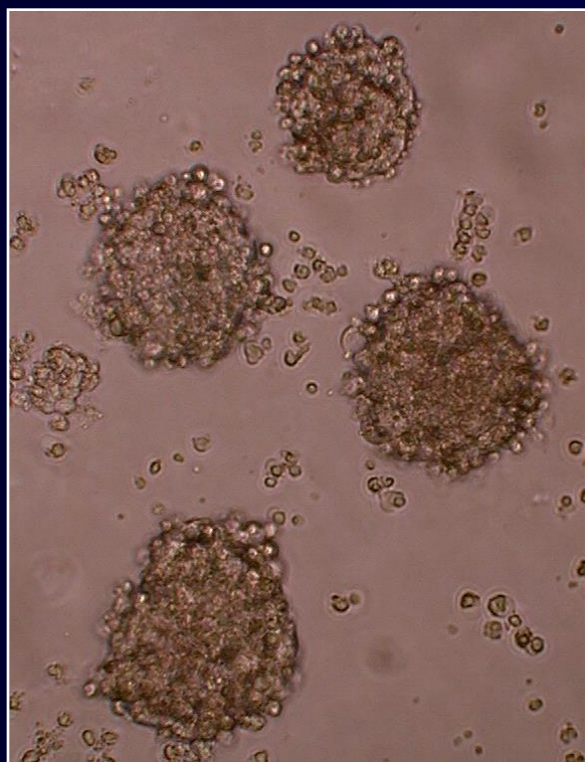
metoda „visících kapek“
(hanging drops)

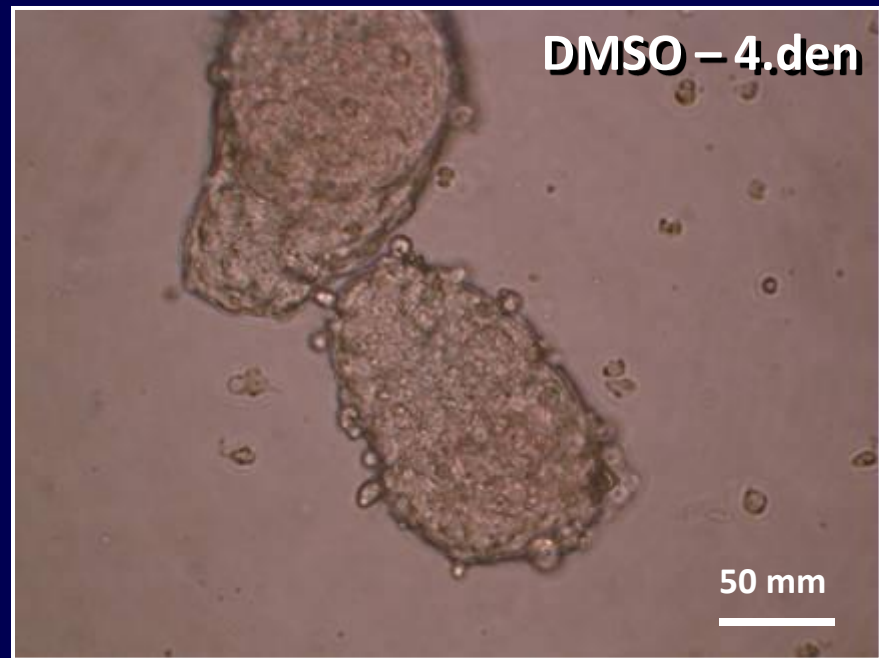
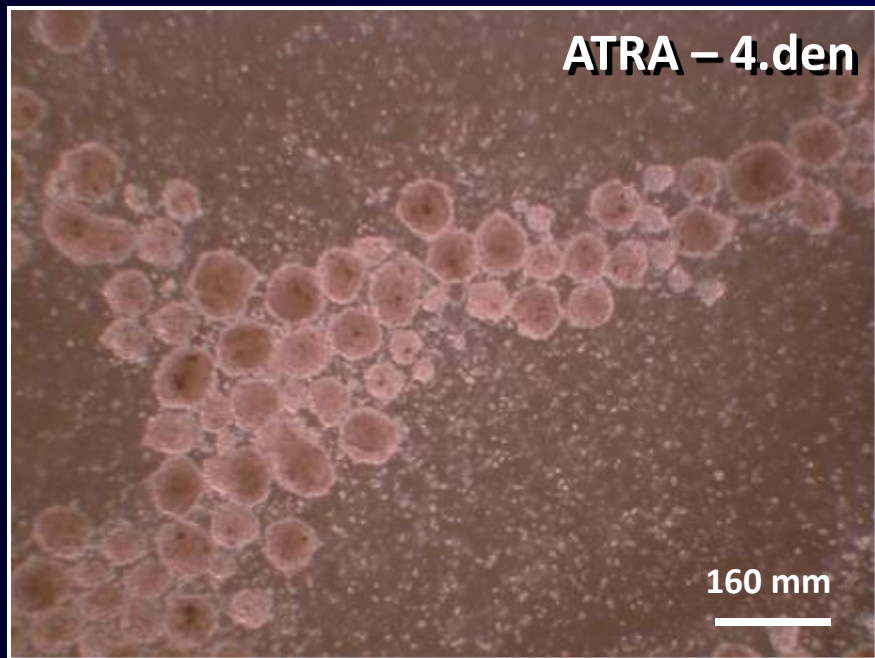
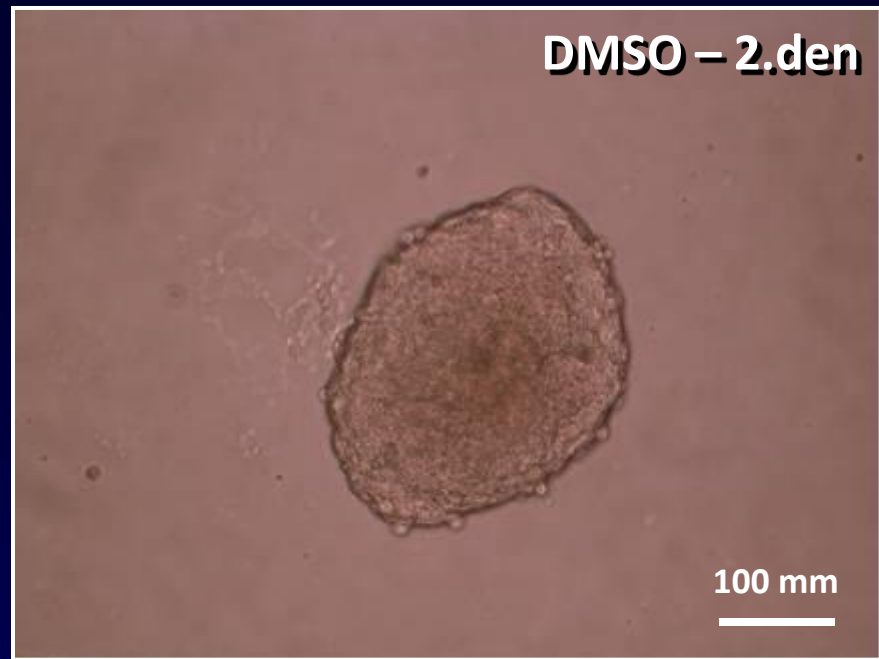
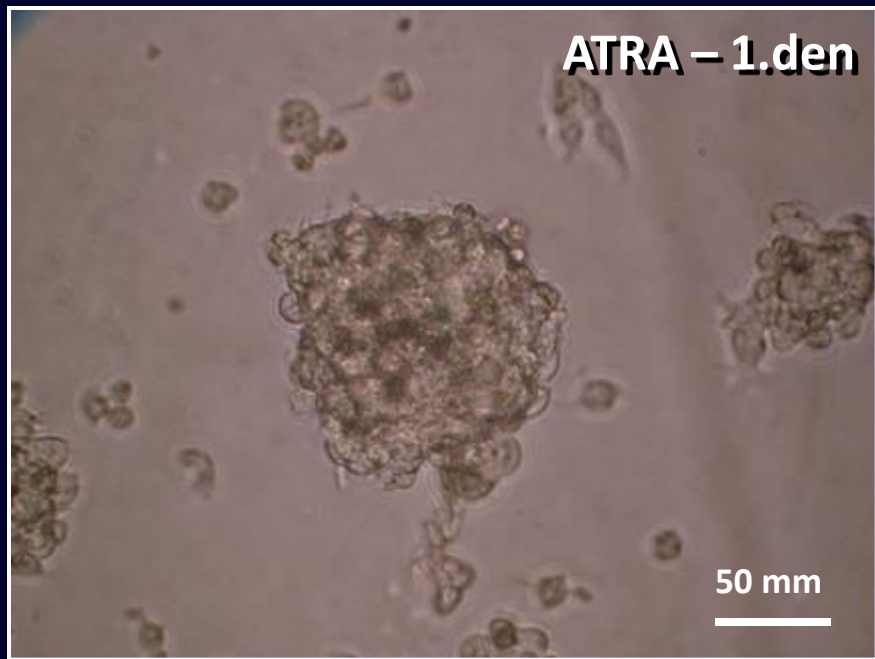
Mesodermální diferenciaci buněk P19:

Induktor: 0,8% DMSO

Marker: myosin II

Detekce: anti-skeletal myosin, SwAM-FITC



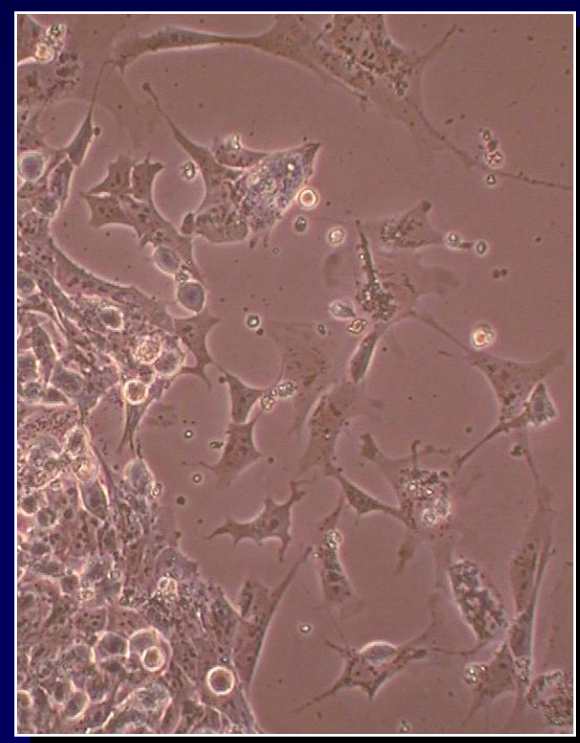
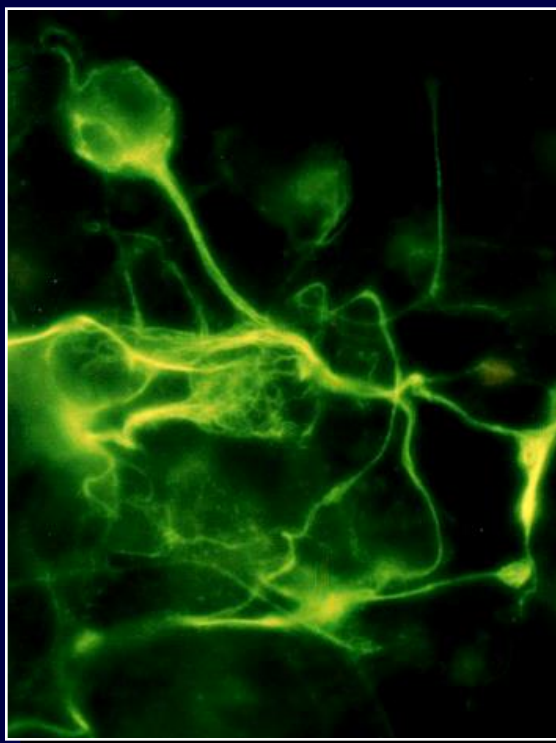
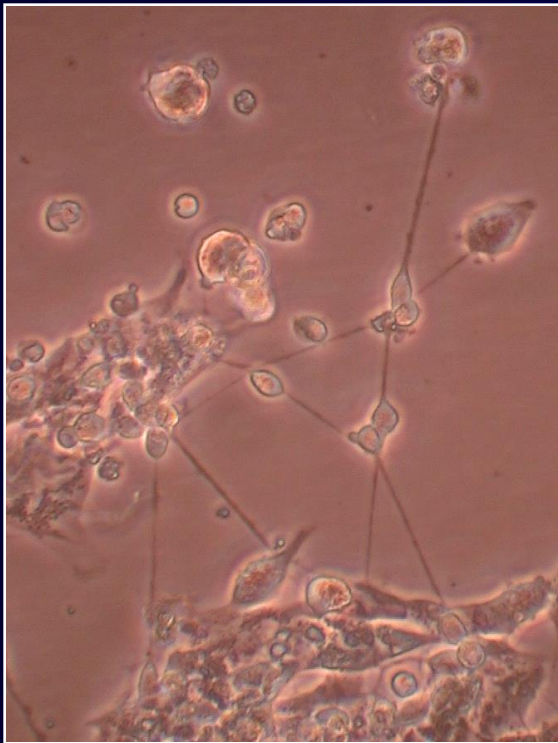


Neuronální diferenciace buněk P19:

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

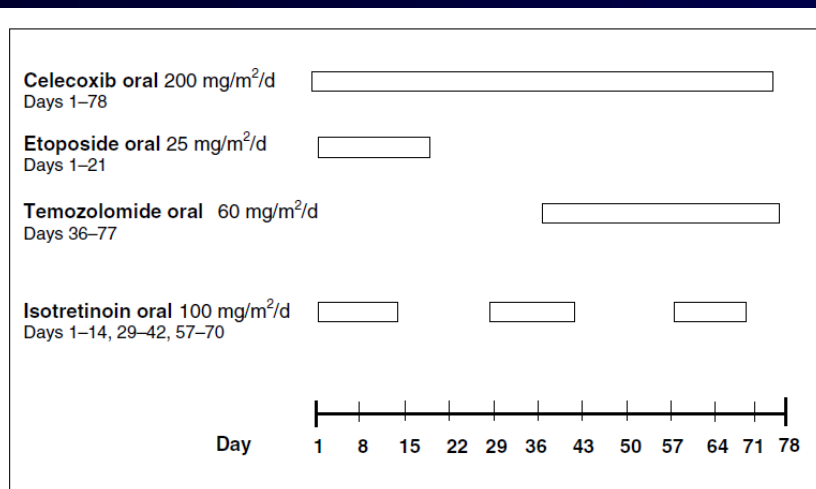


Fig. 1. Combined oral maintenance biodifferentiating and antiangiogenic therapy (COMBAT) – treatment plan.

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^a Dalibor Valik^b Peter 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,

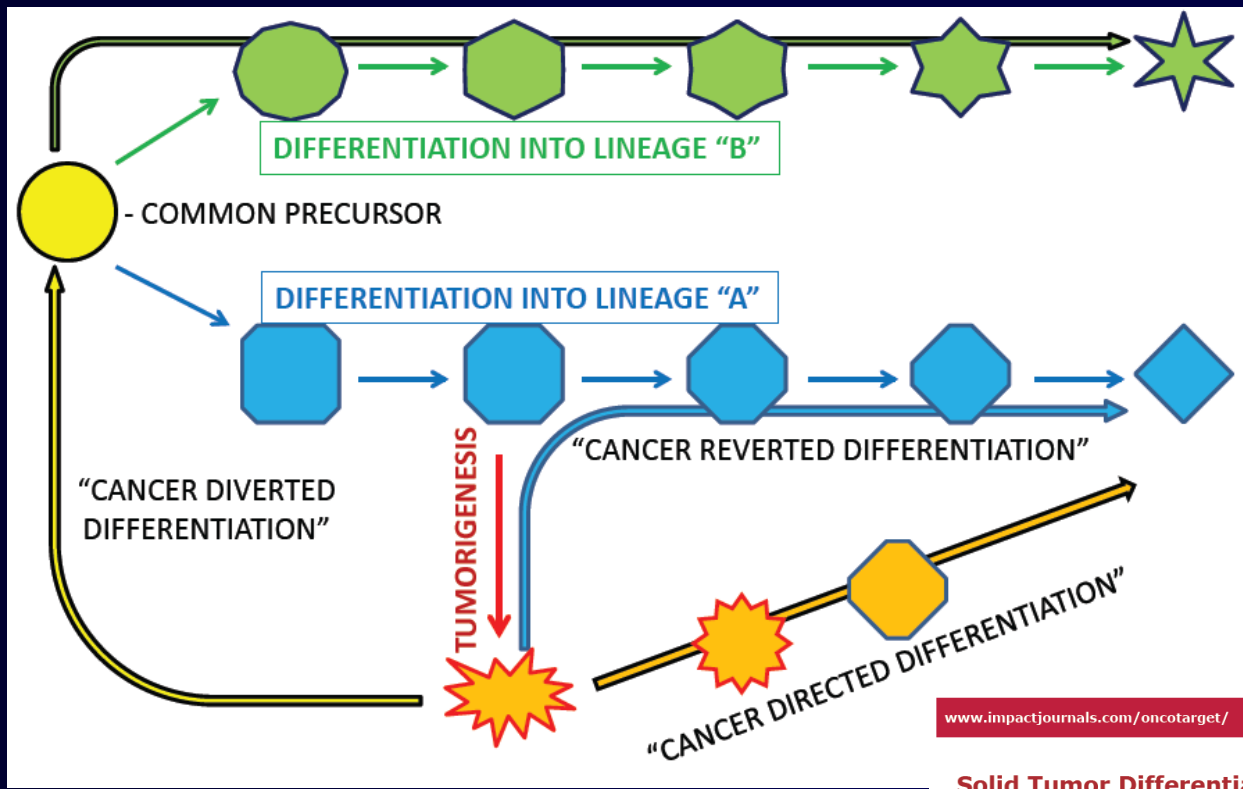
^bDepartment of Laboratory Medicine, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

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

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

Teoretické modely diferenciální terapie

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



www.impactjournals.com/oncotarget/

Oncotarget, May, Vol.3, No 5

Solid Tumor Differentiation Therapy – Is It Possible?

Filemon Dela Cruz¹ and Igor Matushansky²