

ŽIVOTNÍ CYKLUS ŽIVOČIŠNÉ BUŇKY – BUNĚČNÝ CYKLUS, DIFERENCIACE A BUNĚČNÁ SMRT

Karel Souček

Buněčný cyklus

The Nobel Prize in Physiology or Medicine
2001



Leland Hartwell, Tim Hunt, Sir Paul Nurse

- Duplikace chromozomální DNA a její segregace do dvou identických kopií dceřiných buněk
- S fáze (DNA synthesis) – 10-12h, představuje cca 1/2 délky celého buněčného cyklu
- M fáze – segregace a rozdělení buněk, < 1 hodinu²
 - Mitóza – rozdělení jádra
 - Cytokineze – rozdělení cytoplazmy a oddělení buněk

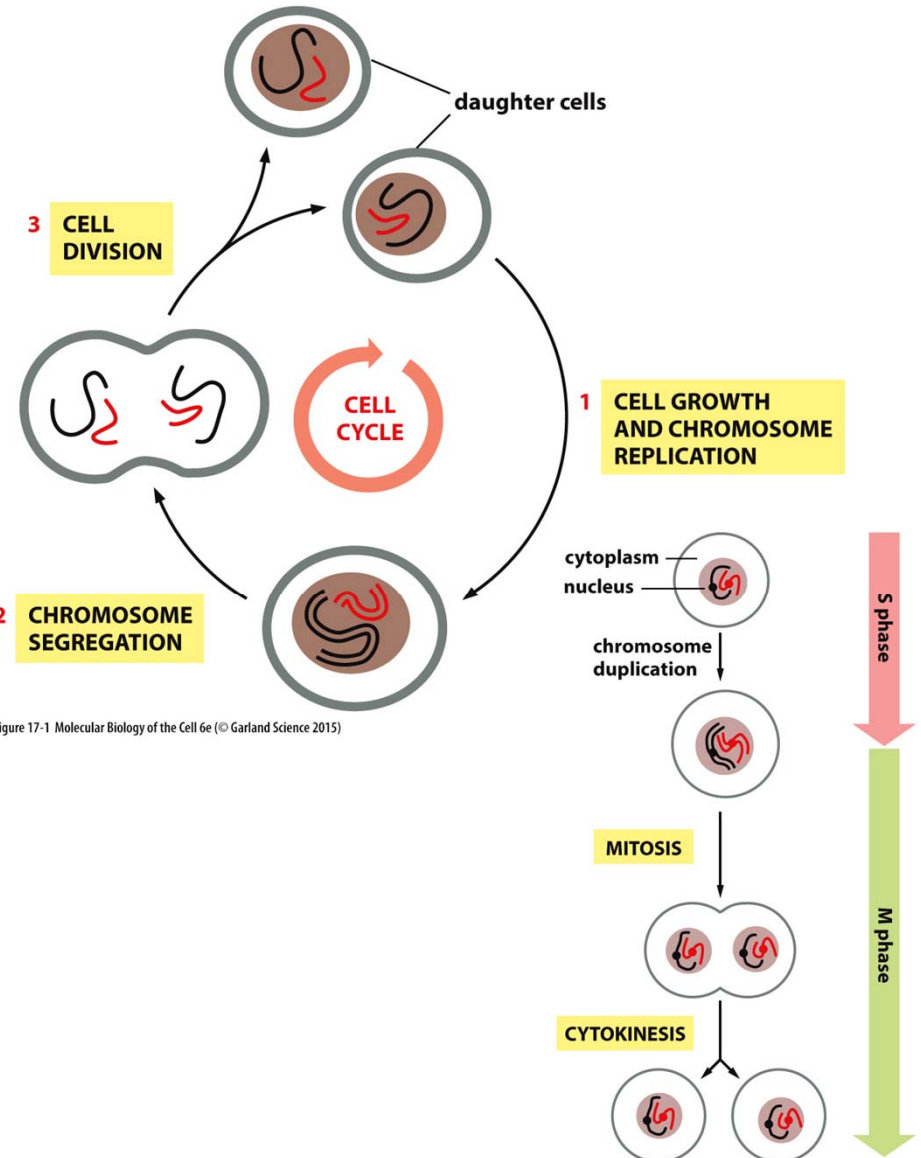


Figure 17-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Figure 17-2 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Mitóza

- Profáze – sesterné chromatidy, zformované mitotické vřeténko, intaktní jaderná membrána
- Prometafáze – rozpad jaderné membrány, asociace chromozomů s mikrotubuly
- Metafáze – seřazení chromozómů
- Anafáze – oddělení sesterných chromatid
- Telofáze – dekonzenzace chromatinu, formování jaderných membrán, počátek oddělování cytoplazmy
- Cytokineze – oddělení cytoplazmy dceřiných buněk

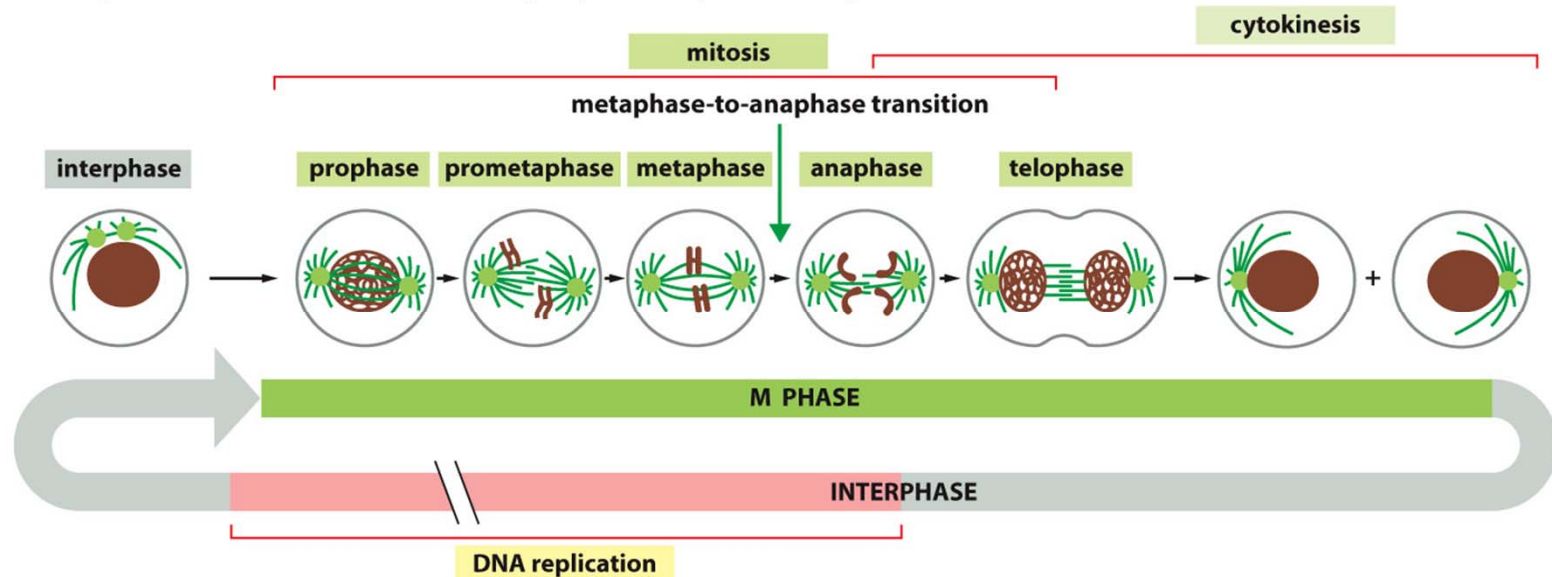
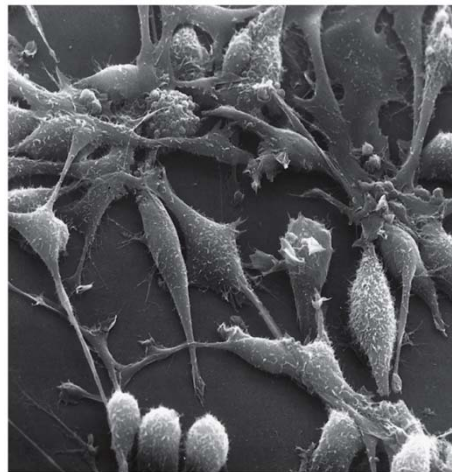


Figure 17-3 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Fáze buněčného cyklu

- G1 – gap fáze mezi M a S fází
- G2 – gap mezi S a M fází
 - Poskytují potřebný čas pro monitorování vnějšího a vnitřního stavu mikroprostředí, délka závisí na vnějších podmínkách a signálech od okolních buněk
- G0 – klidová fáze (ve smyslu buněčného dělení), dny až roky
- Restrikční bod, restriction point
 - Na konci G1 – za ním dochází k replikaci DNA i po odejmutí mitogenních stimulů



10 μ m

Figure 17-5 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

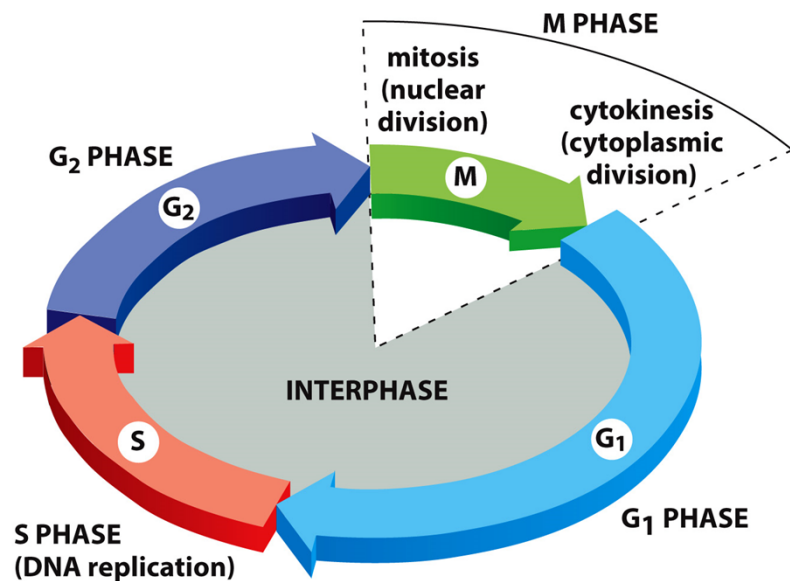


Figure 17-4 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Studium buněčného cyklu

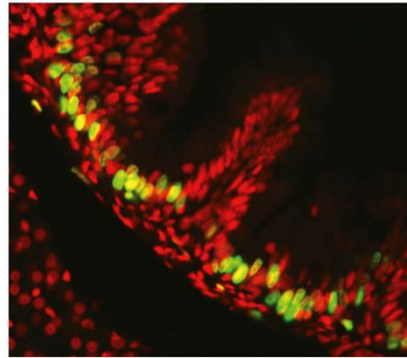


Figure 17-7 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

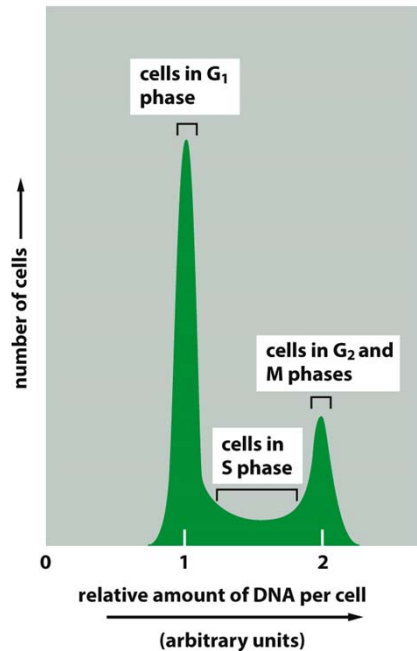
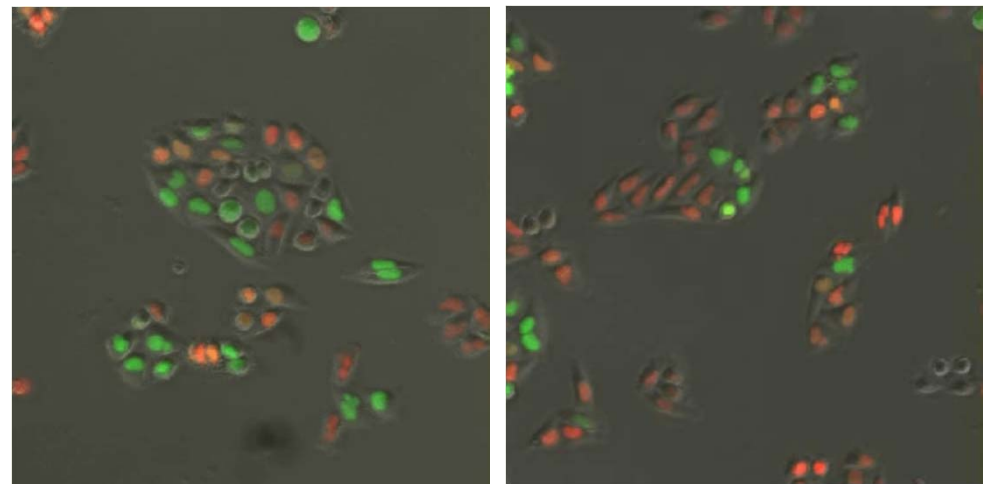
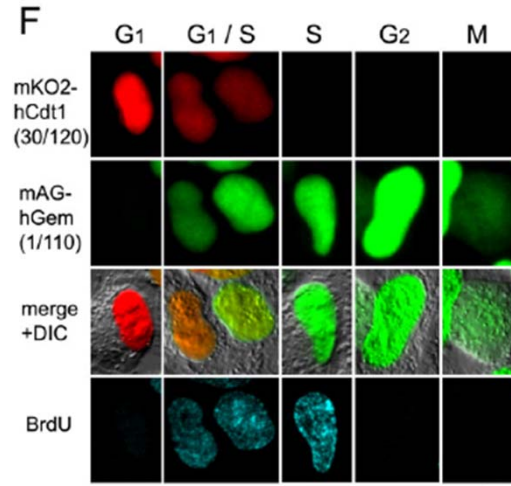


Figure 17-8 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Kontrola buněčného cyklu

- Propojená série biochemických přepínačů iniciujících konkrétní události v průběhu buněčného cyklu
 - binární – ano/ne
 - nereverzibilní – další se spouští až po úplném dokončení předchozího kroku
 - spolehlivé – zálohované
 - adaptibilní – různé typy buněk v různém tkáňovém mikroporostředí
- tři hlavní kontrolní/přechodové body
 - G₁ → S, vnější prostředí OK?
 - G₂ → M – DNA, replikovaná, nepoškozená?
 - M: metafáze → anafáze – všechny chromozómy připojeny k dělicímu vřeténku?

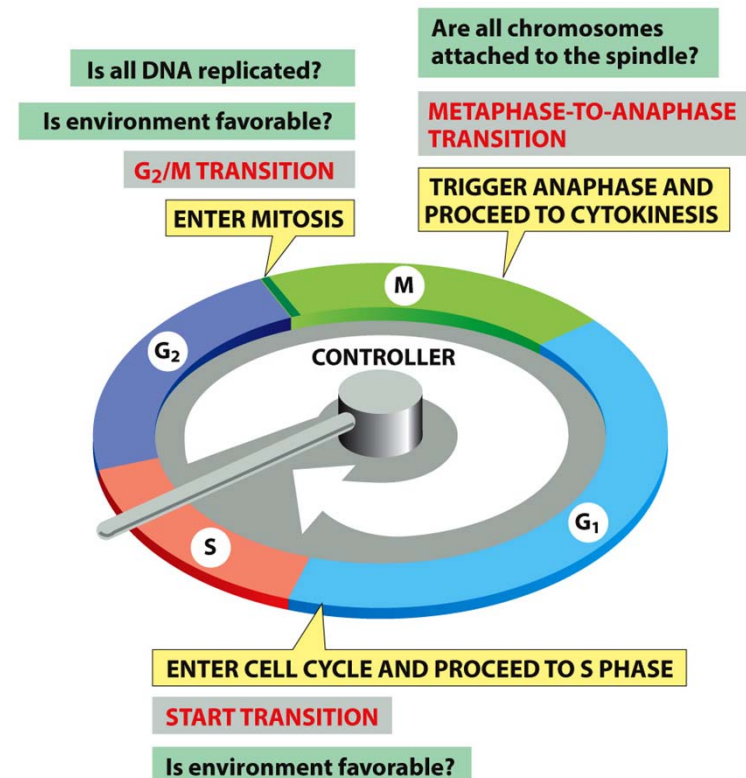
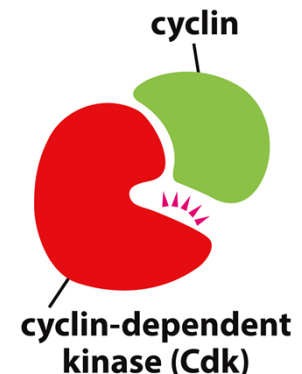


Figure 17-9 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Cyklin dependentní kinázy (Cdks) a cykliny

- rodina proteinových kináz
- jejich kinázová aktivita stoupá a klesá v průběhu buněčného cyklu -> cyklické změny ve fosforylaci intracelulárních cílových proteinů – iniciace a regulace událostí spojených s cyklem
- nejvýznamnějším kontrolorem jejich aktivity jsou cykliny
- hladiny cyklinů se mění, hladina Cdks je konstatní
- cyklování hladiny cyklinů v průběhu buněčného cyklu ovlivňuje sestavení a aktivaci komplexu cyklin-Cdk v konkrétních fázích cyklu



Cyklin dependentní kinázy (Cdks) a cykliny

- ▶ 4 skupiny cyklinů
 - ▶ G1 cykliny – napomáhají řídit aktivitu G1/S cyklinů
 - ▶ G1/S cykliny – aktivují Cdks v pozdní G1, vstup do buněčného cyklu, hladina klesá v S fázi
 - ▶ S cykliny – vážou se na Cdks ihned po vstupu do cyklu, hladina udržovaná až do mitózy
 - ▶ M- cykliny – aktivují Cdks regulující vstup do G2/M přechodu, pokles uprostřed mitózy

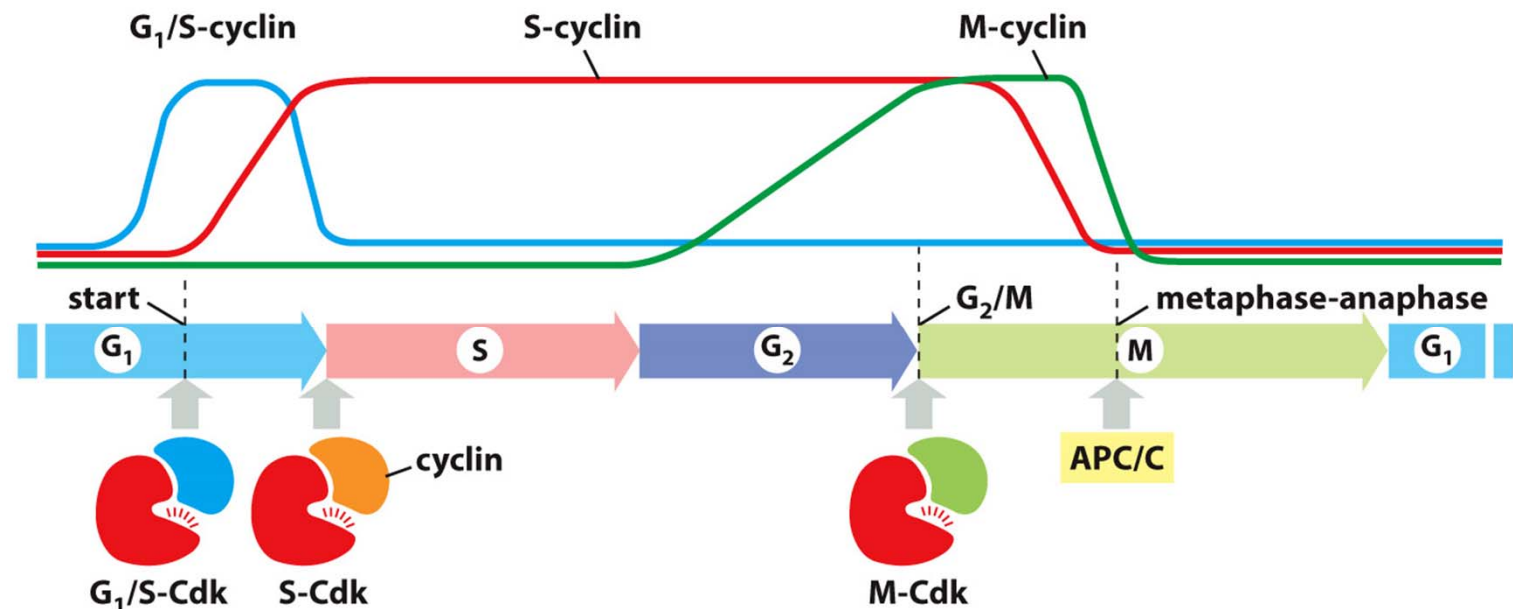


Figure 17-11 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Cyklin dependentní kinázy (Cdks) a cykliny

TABLE 17-1 The Major Cyclins and Cdks of Vertebrates and Budding Yeast

Cyclin-Cdk complex	Vertebrates		Budding yeast	
	Cyclin	Cdk partner	Cyclin	Cdk partner
G ₁ -Cdk	Cyclin D*	Cdk4, Cdk6	Cln3	Cdk1**
G ₁ /S-Cdk	Cyclin E	Cdk2	Cln1, 2	Cdk1
S-Cdk	Cyclin A	Cdk2, Cdk1**	Clb5, 6	Cdk1
M-Cdk	Cyclin B	Cdk1	Clb1, 2, 3, 4	Cdk1

* There are three D cyclins in mammals (cyclins D1, D2, and D3).

** The original name of Cdk1 was Cdc2 in both vertebrates and fission yeast, and Cdc28 in budding yeast.

Table 17-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

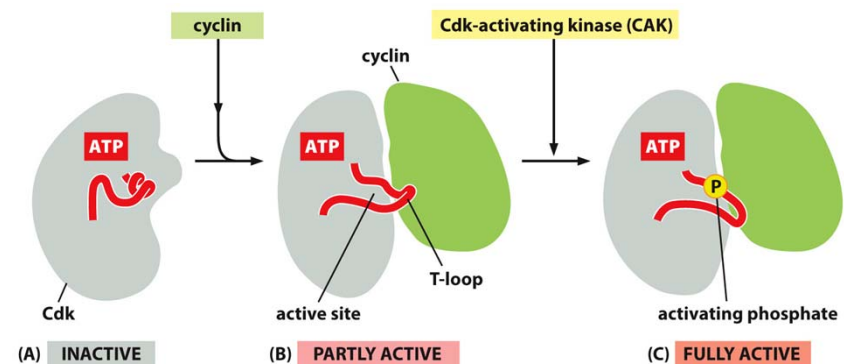


Figure 17-12 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Inhibice Cdk aktivity

- Fosforylace v aktivním místě Cdk inhibuje aktivitu cyclin-Cdk komplexu
 - Wee1 kináza
- Naopak jeho defosforylace aktivitu zvyšuje
 - Cdc25 fosfatáza
- Vazba inhibitorů Cdk (Cdk inhibitor proteins, CDKs) inaktivuje komplexy cyklin-Cdk

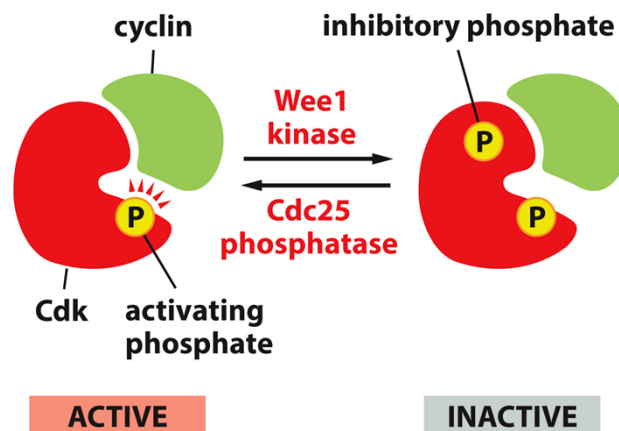


Figure 17-13 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

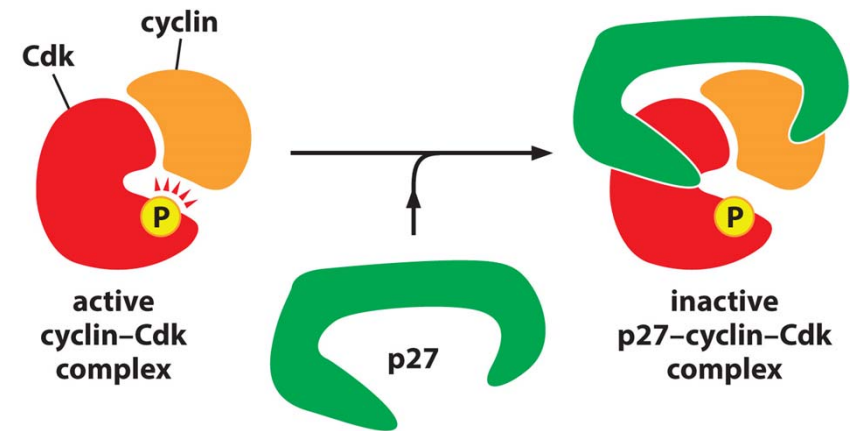
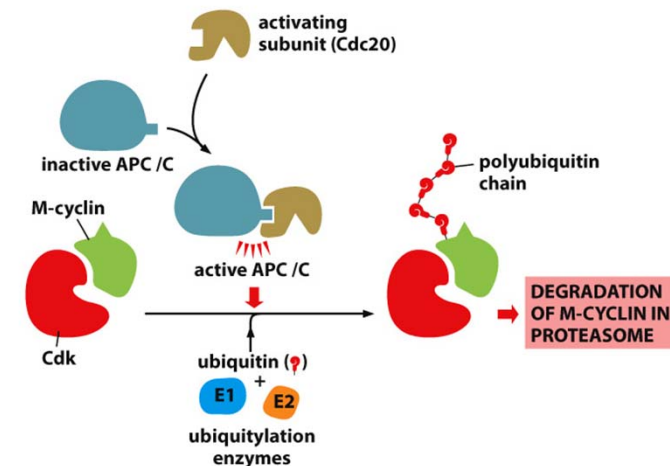


Figure 17-14 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Řízená proteolýza v regulaci buněčného cyklu

- APC/C (anaphase promoting complex, cyclosome)
 - komplex určující vstup do anafáze
 - Ubiquitin ligáza
 - securin (chrání spojení sesterských chromatid)
 - S- a M- cykliny
- SCF (Skp, Cullin, F-box containing complex)
 - multi-protein E3 ubiquitin ligase
 - CKI, G1/S cykliny
 - konstantní aktivita

(A) control of proteolysis by APC /C



(B) control of proteolysis by SCF

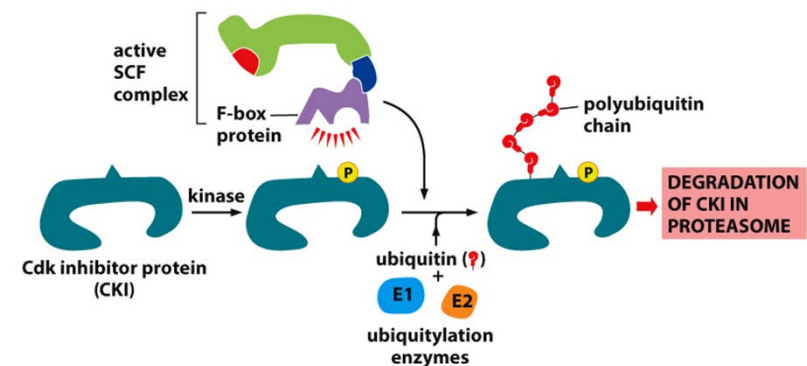


Figure 17-15 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Přehled hlavních regulátorů buněčného cyklu

TABLE 17-2 Summary of the Major Cell Cycle Regulatory Proteins	
General name	Functions and comments
Protein kinases and protein phosphatases that modify Cdks	
Cdk-activating kinase (CAK)	Phosphorylates an activating site in Cdks
Wee1 kinase	Phosphorylates inhibitory sites in Cdks; primarily involved in suppressing Cdk1 activity before mitosis
Cdc25 phosphatase	Removes inhibitory phosphates from Cdks; three family members (Cdc25A, B, C) in mammals; primarily involved in controlling Cdk1 activation at the onset of mitosis
Cdk inhibitor proteins (CKIs)	
Sic1 (budding yeast)	Suppresses Cdk1 activity in G ₁ ; phosphorylation by Cdk1 at the end of G ₁ triggers its destruction
p27 (mammals)	Suppresses G ₁ /S-Cdk and S-Cdk activities in G ₁ ; helps cells withdraw from cell cycle when they terminally differentiate; phosphorylation by Cdk2 triggers its ubiquitylation by SCF
p21 (mammals)	Suppresses G ₁ /S-Cdk and S-Cdk activities following DNA damage
p16 (mammals)	Suppresses G ₁ -Cdk activity in G ₁ ; frequently inactivated in cancer
Ubiquitin ligases and their activators	
APC/C	Catalyzes ubiquitylation of regulatory proteins involved primarily in exit from mitosis, including securin and S- and M-cyclins; regulated by association with activating subunits Cdc20 or Cdh1
Cdc20	APC/C-activating subunit in all cells; triggers initial activation of APC/C at metaphase-to-anaphase transition; stimulated by M-Cdk activity
Cdh1	APC/C-activating subunit that maintains APC/C activity after anaphase and throughout G ₁ ; inhibited by Cdk activity
SCF	Catalyzes ubiquitylation of regulatory proteins involved in G ₁ control, including some CKIs (Sic1 in budding yeast, p27 in mammals); phosphorylation of target protein usually required for this activity

Table 17-2 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Přehled systému řízení buněčného cyklu

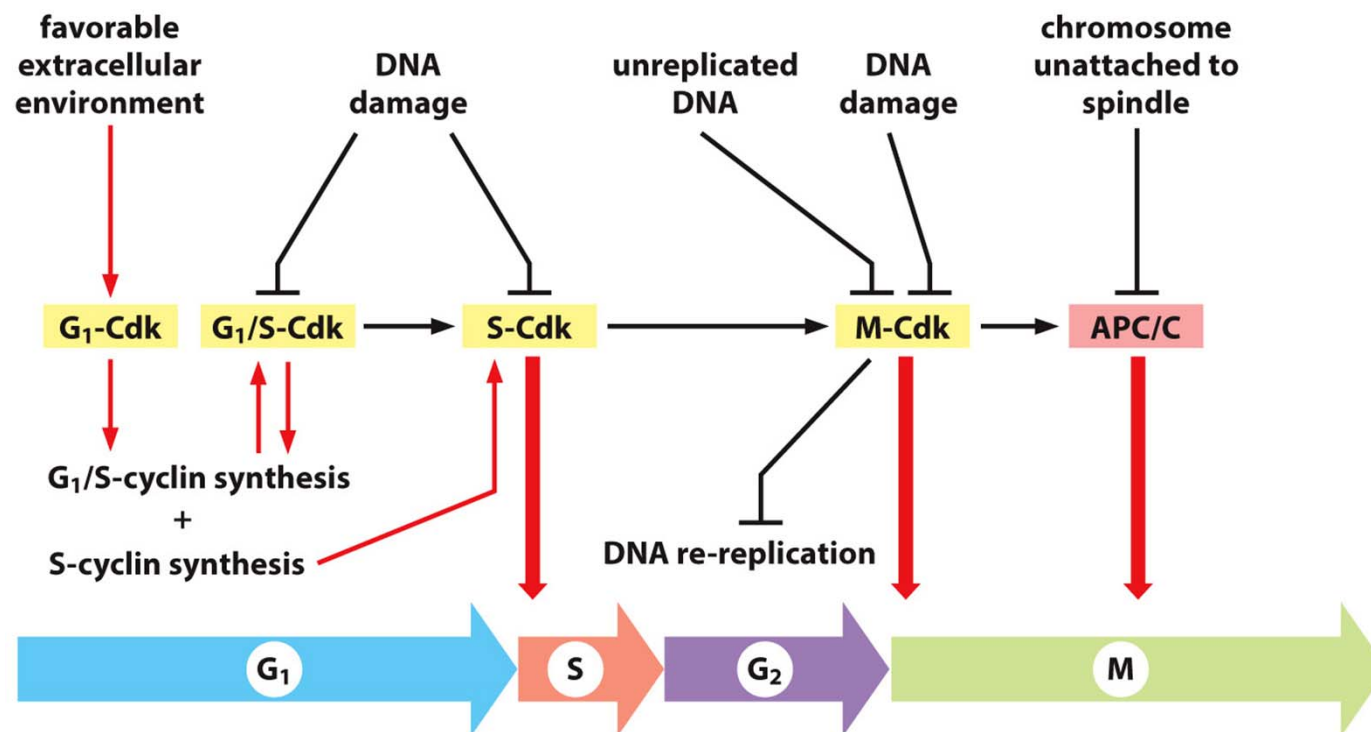


Figure 17-16 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Kontrola buněčného dělení a růstu

- ▶ Buněčný růst, dělení a přežívání buňek jsou klíčové procesy ovlivňující velikost orgánů a celých organismů (např. myš vs. člověk)
- ▶ Vliv extracelulárních signálů
 - ▶ Mitogeny – stimulují buněčné dělení, G1/S-Cdk aktivita
 - ▶ Růstové faktory – stimulují růst buněčné hmoty, indukce syntézy proteinů a dalších makromolekul, inhibice jejich degradace
 - ▶ Faktory přežití „survival factors“ – inhibují buněčnou smrt, apoptózu

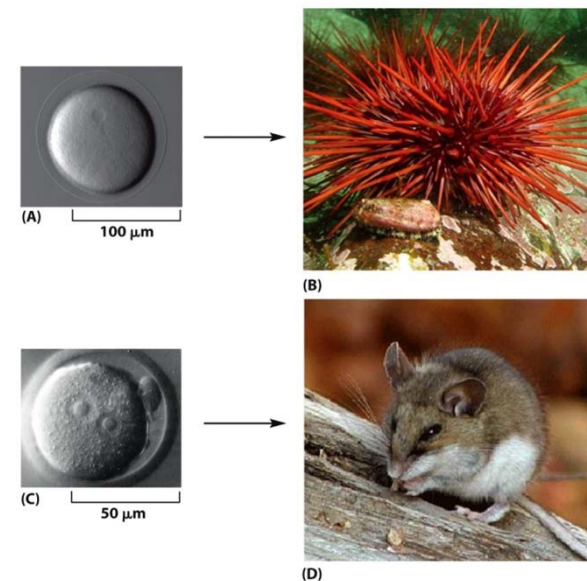


Figure 20-33 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

Mitogeny

- Extracelulární signál mitogenních faktorů vede k překonání vnitřního mechanismu blokujícího buněčné dělení
- PDGF – platelet-derived growth factor, jeden z cca 50-ti známých mitogenních faktorů
- V řadě tkání jsou přítomny extracelulární proteiny inhibující působení mitogenů např. TGF-β1
- Mitogeny stimulují G1-Cdk a G1/S-Cdk aktivitu
- vybrané klíčové molekuly:
 - Ras – monomeric GTPase
 - MAPs – mitogen activated protein kinases – časná odpověď
 - Myc, E2F – transkripční faktory
 - Rb protein - pocket protein (nádorový supresor)

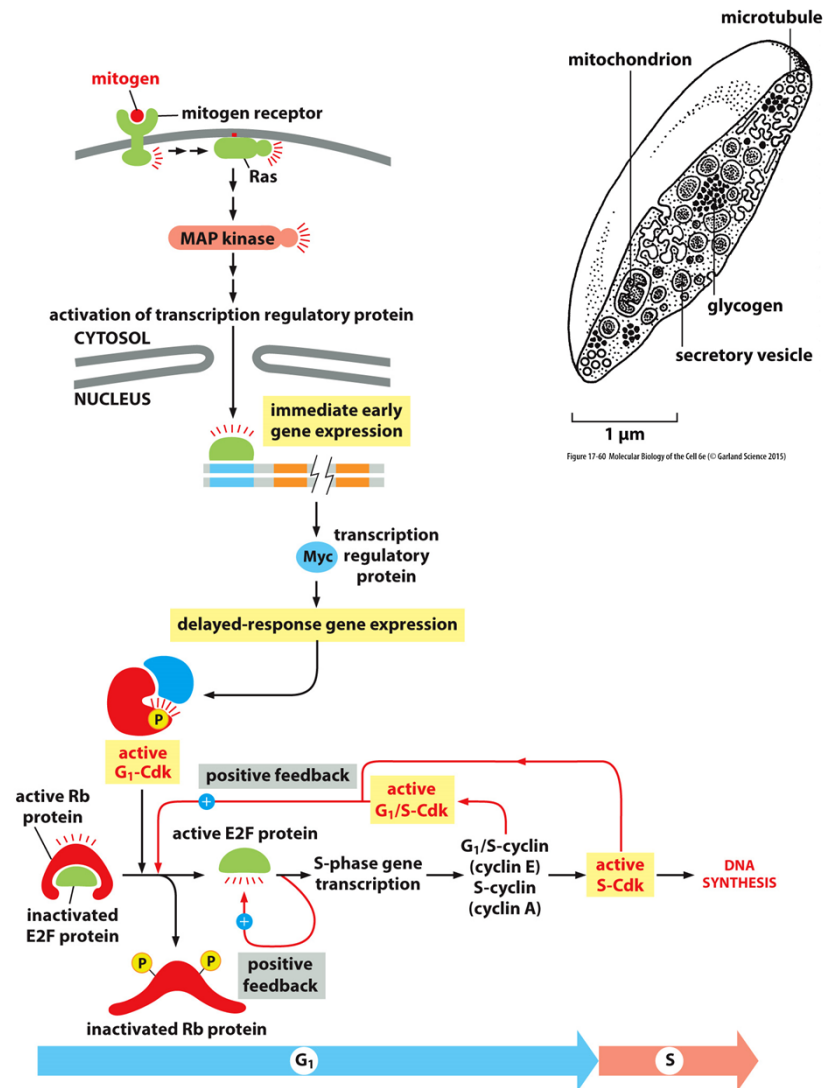


Figure 17-61 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Regulace buněčného cyklu po poškození DNA

- Oprava poškozené DNA před její replikací je esenciální
- V případě detekce poškození, zástava proliferace před počátkem S fáze nebo před vstupem do mitózy
- vybrané klíčové molekuly:
 - ATM (ataxia-telangiectasia mutated), ATR (ATM- and Rad3-Related) – kinázy
 - Chk1, Chk2 - kinázy
 - p53 – transkripční faktor
 - MDM2 – regulátor stability p53
 - p21 – CDK inhibitor

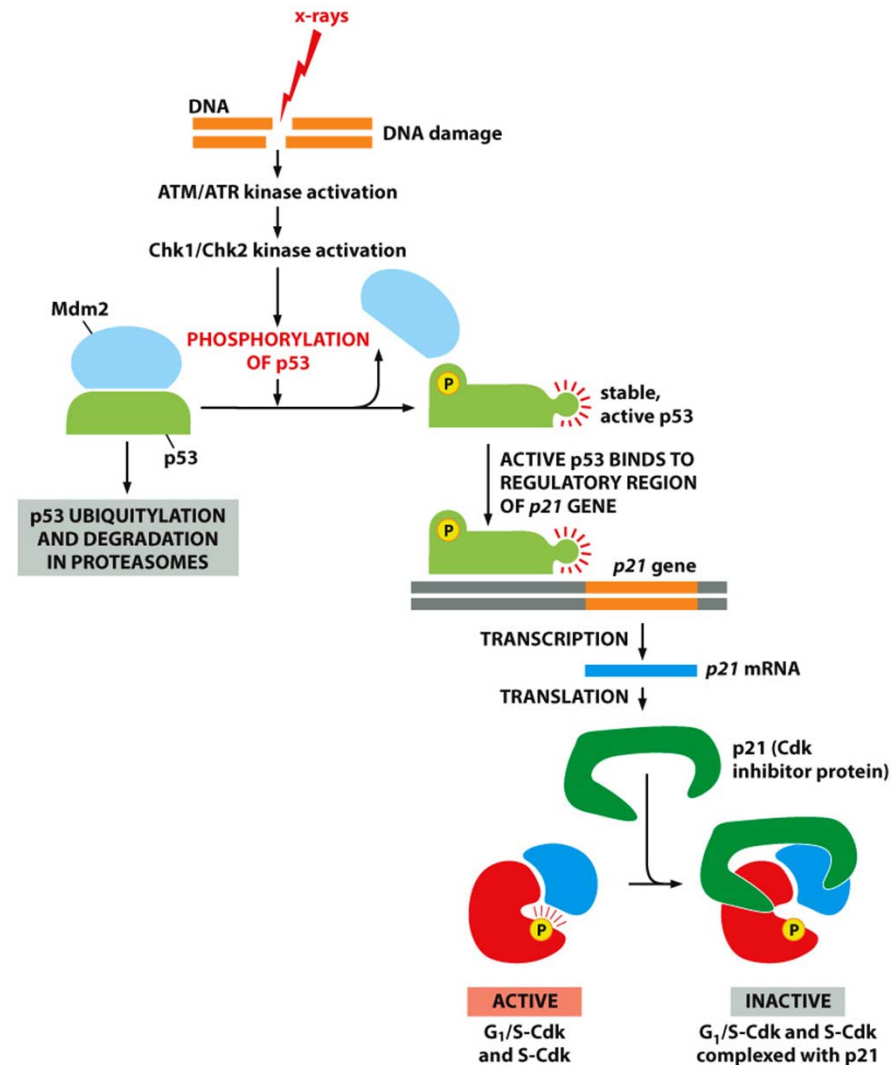


Figure 17-62 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Zástava buněčného cyklu v případě nadměrné mitogenní stimulace

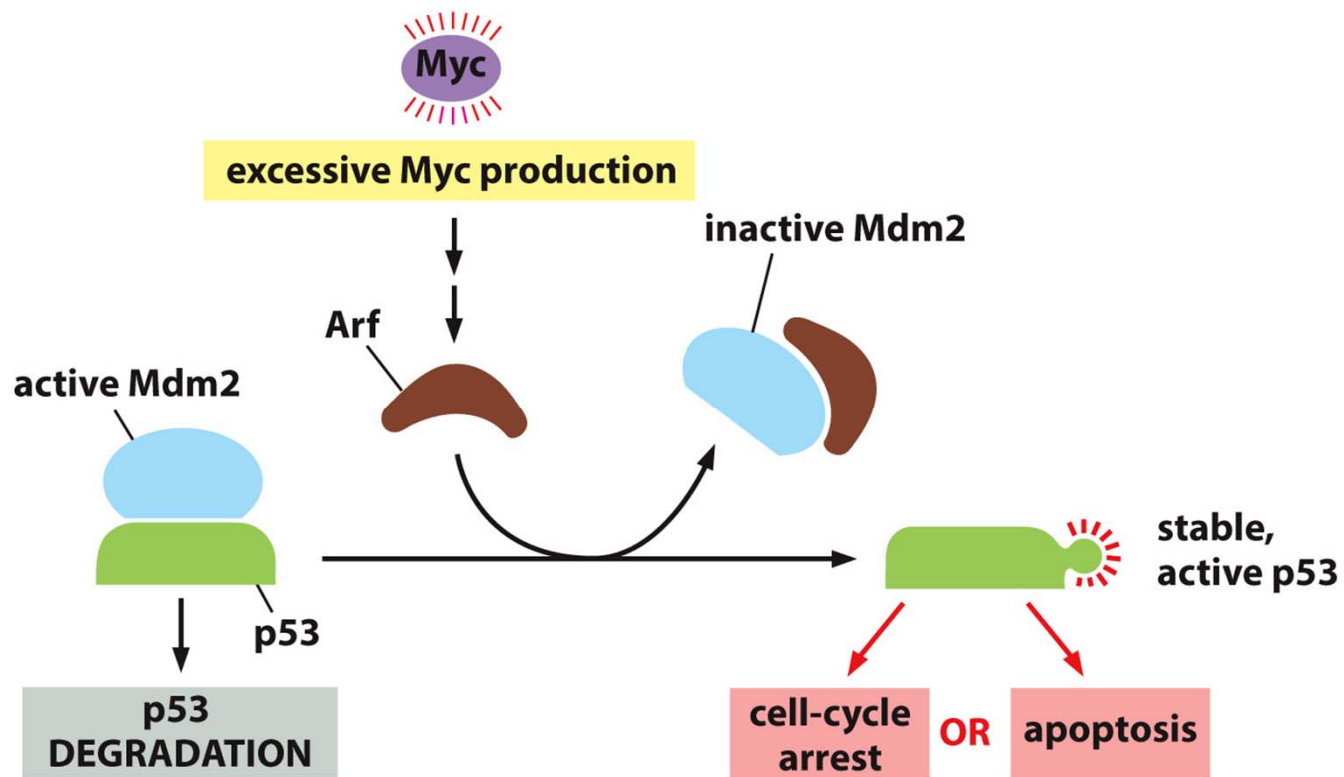


Figure 17-63 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Buněčná proliferace je doprovázena buněčným růstem

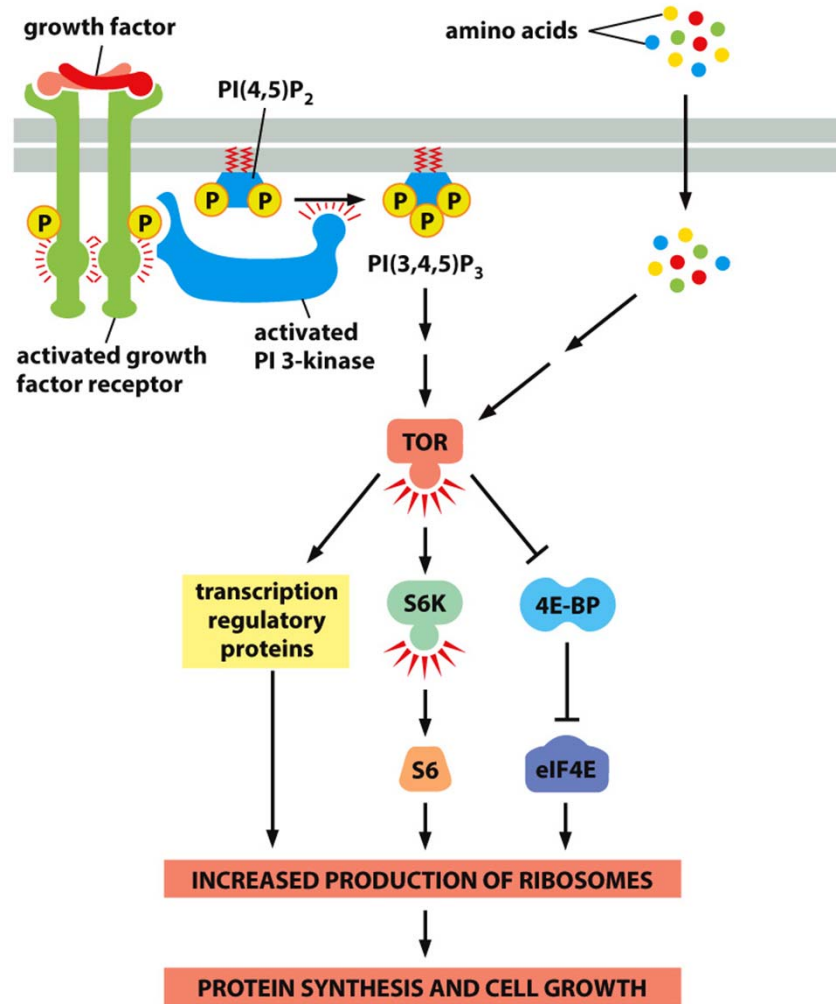


Figure 17-64 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

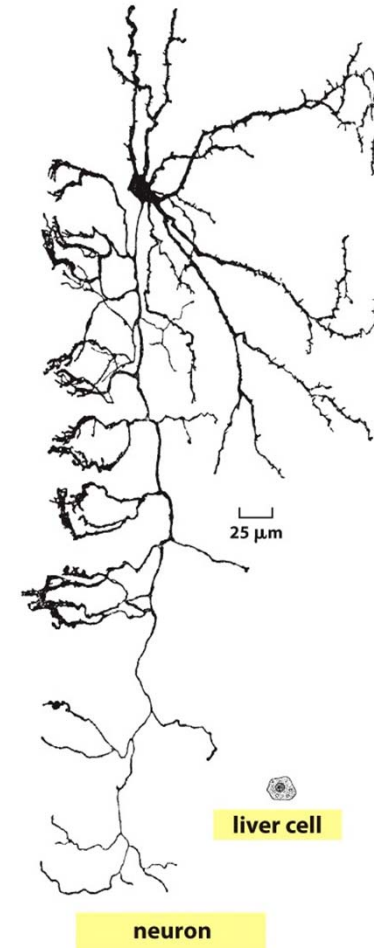


Figure 18-44 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

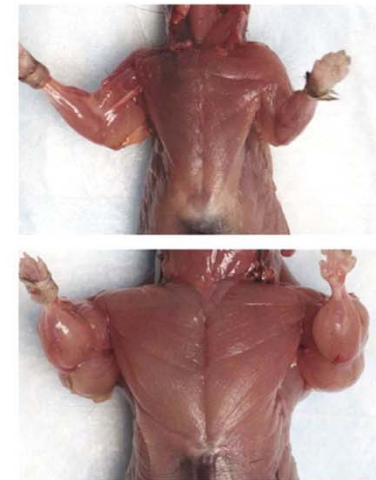
Buněčná proliferace je doprovázena buněčným růstem

Mutovaný gen myostatin

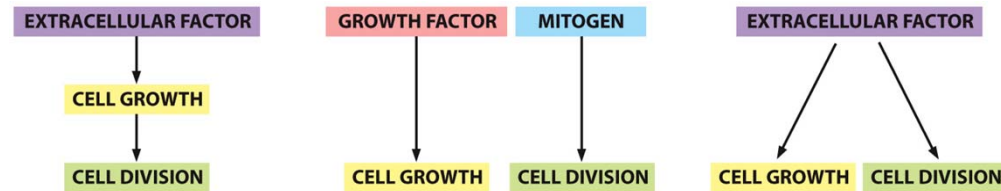


(A)

Figure 18-45 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)



(B)



(A)

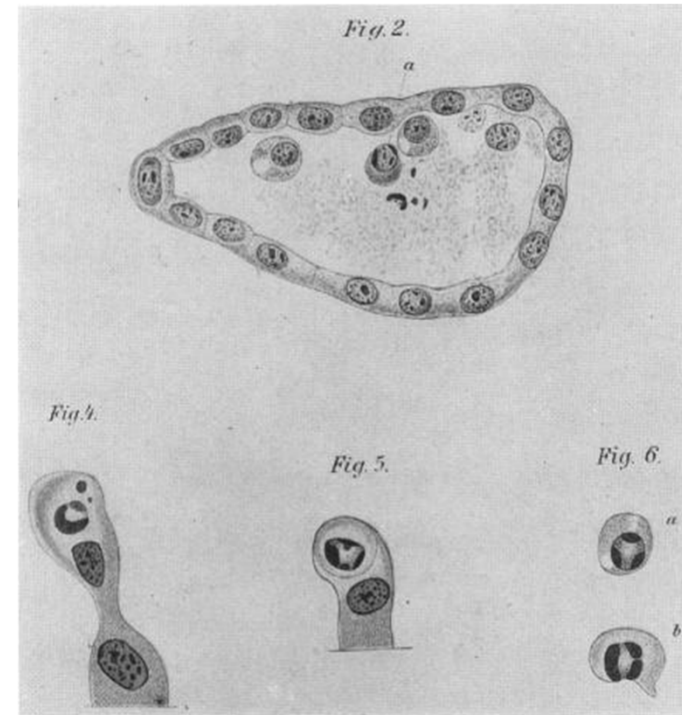
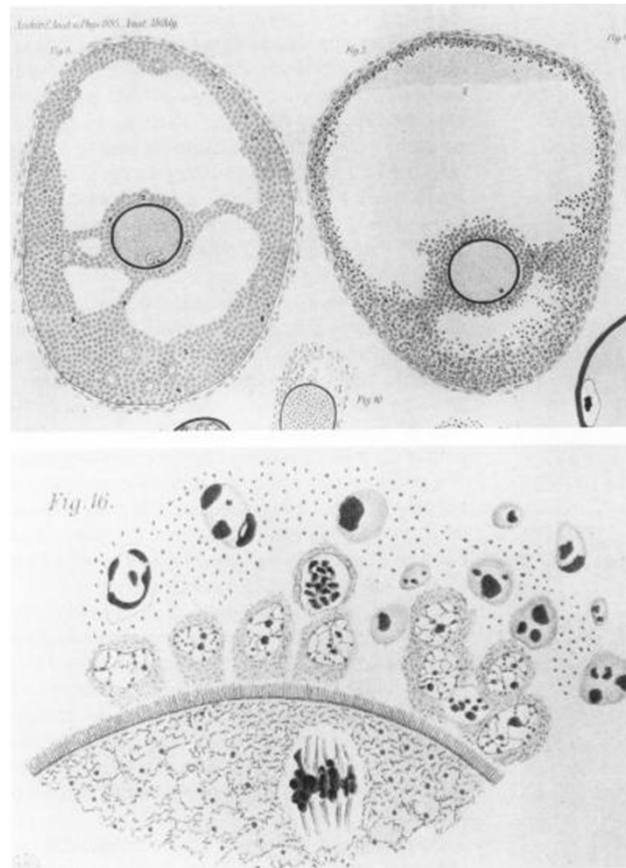
(B)

(C)

Figure 17-65 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Buněčná smrt



Apoptosis as seen in 1886 by a German medical student, Franz Nissen, in the lactating mammary gland

Apotosis as observed in 1885 by Flemming, who called it chromatolysis.

Buněčná smrt

- Vývoj, růst, regenerace a udržování homeostázy mnohobuněčných organismů vyžaduje mechanismy umožňující řízenou destrukci nežádoucích buněk
 - Apoptóza – řízený způsob smrti
 - Nekróza – neřízená odpověď na akutní poškození
 - Nekroptóza – forma řízené buněčné smrti v odpovědi na specifické stimuly

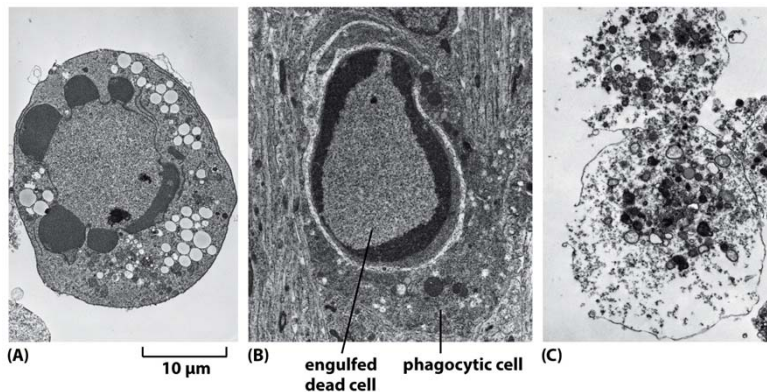


Figure 18-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

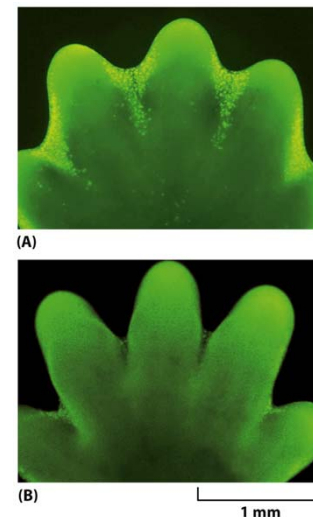


Figure 18-2 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



N Engl J Med 2013; 369:e1

Základní mechanismus apoptózy

- Aktivace intracelulárních proteáz – kaspáz (caspases)
 - Vnitřní nebo vnější cestou
- Syntetizovány jako inaktivní prekurzory
 - Iniciační
 - Aktivují exekuční kaspázy
 - Exekuční
 - štěpí řadu substrátů (cytoskelet, proteiny jaderného obalu, atd.)
- Fragmentace DNA
 - Vznik apoptotických tělísek

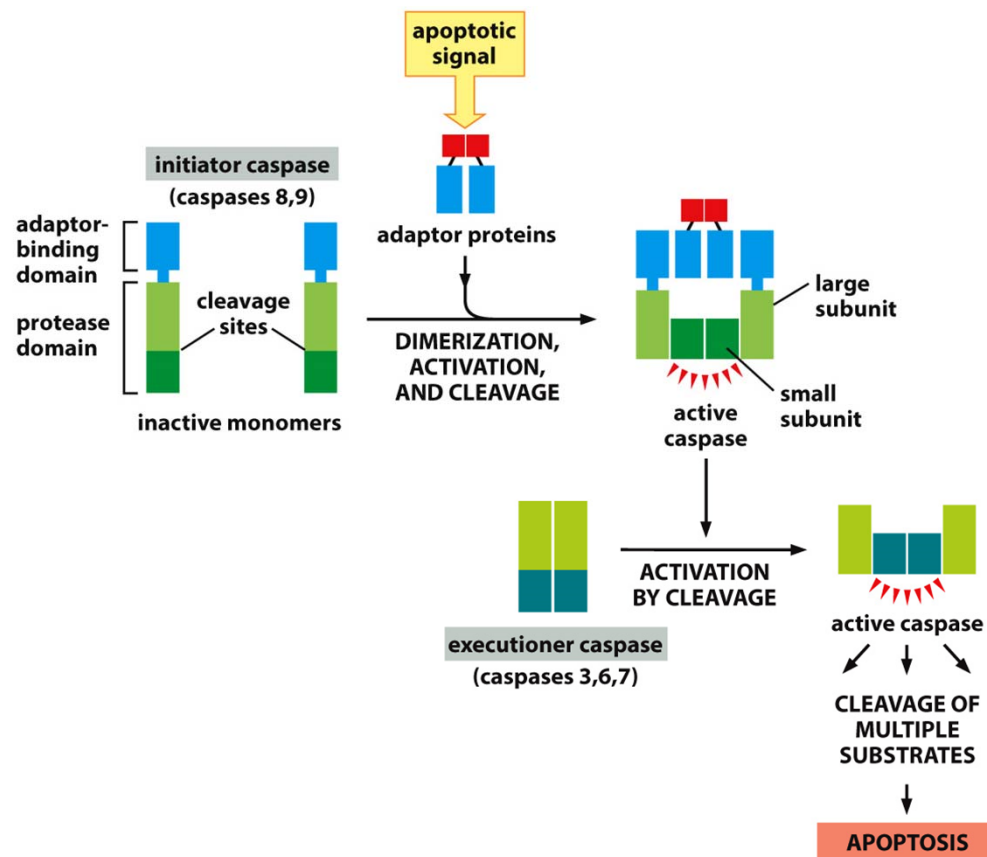
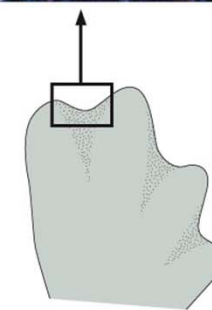
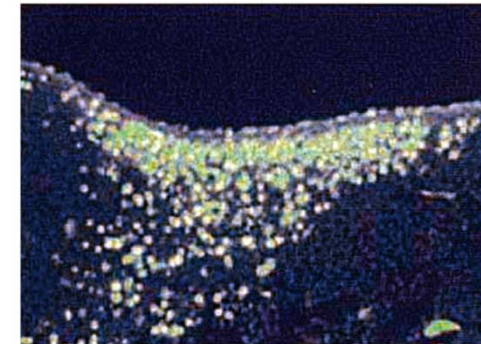
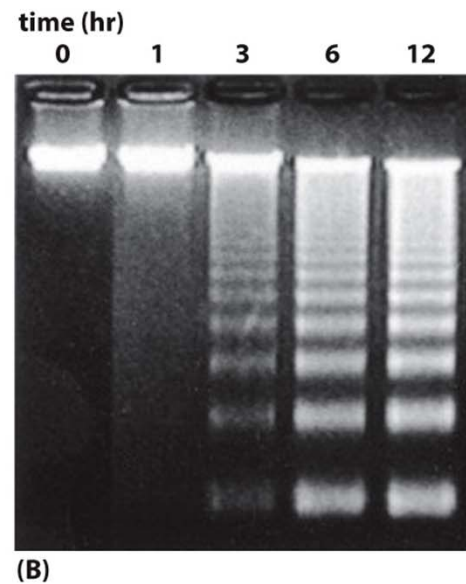
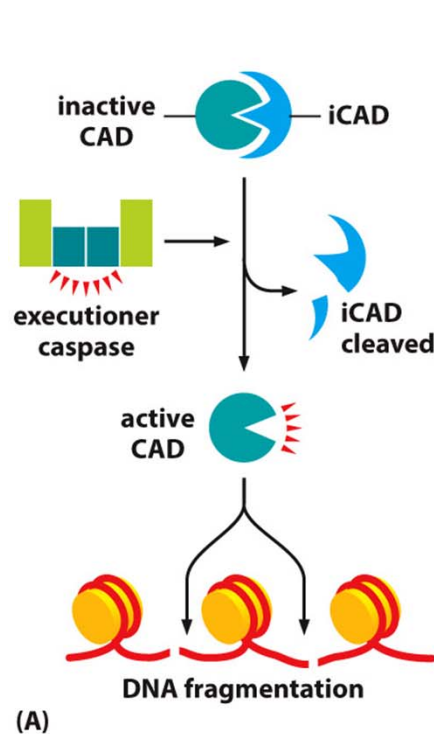


Figure 18-3 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Fragmentace DNA během apoptózy

- CAD (Caspase-activated Dnase) endonukleáza je u intaktních buněk neaktivní díky asociaci se svým inhibítoem iCAD
- Exekuční kaspázy štěpí iCAD a dochází k aktivaci CAD
- Štěpení DNA mezi nucleosomy vede ke vzniku fragmentů DNA



(A)

(B)

(C)

Vnější aktivace apoptotické dráhy

- receptory smrti (dead receptors), homotrimery
 - Ligand vázající extracelulární doména, intracelulární dead doména
- rodina cytokinů Tumor Necrosis Factor- α
 - TNF- α , FasL, TRAIL
- death-inducing signaling complex (DISC)
 - Kaspáza-8, FADD, death doména receptoru

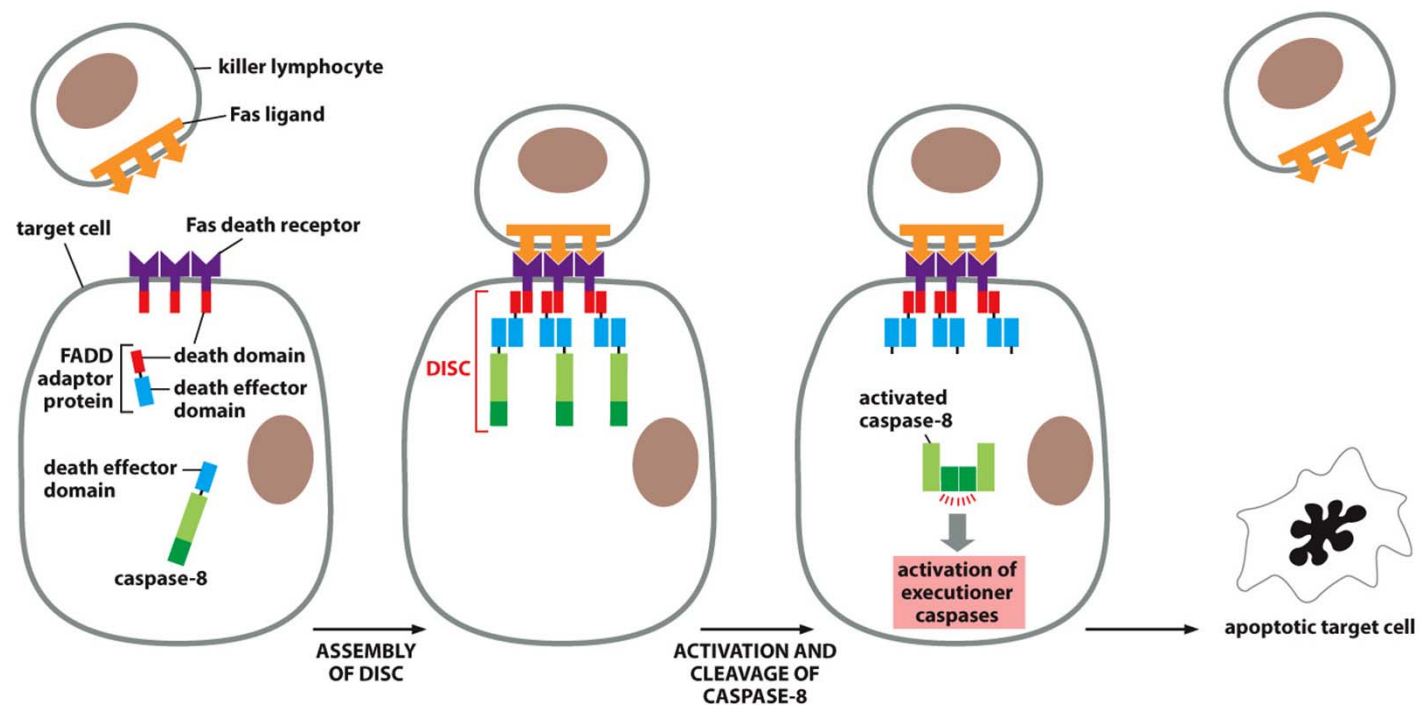


Figure 18-5 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Role mitochondrií ve vnitřní dráze apoptózy

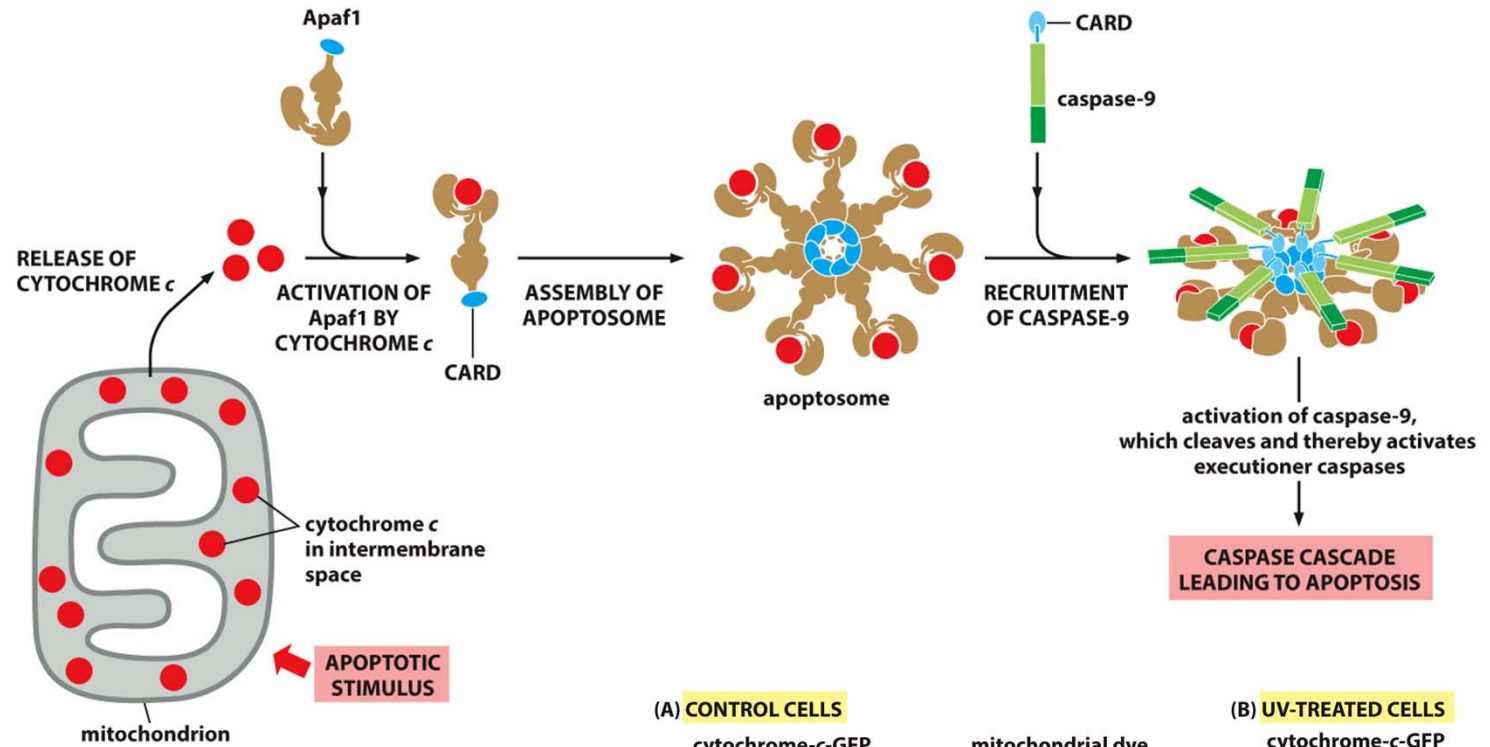


Figure 18-7 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

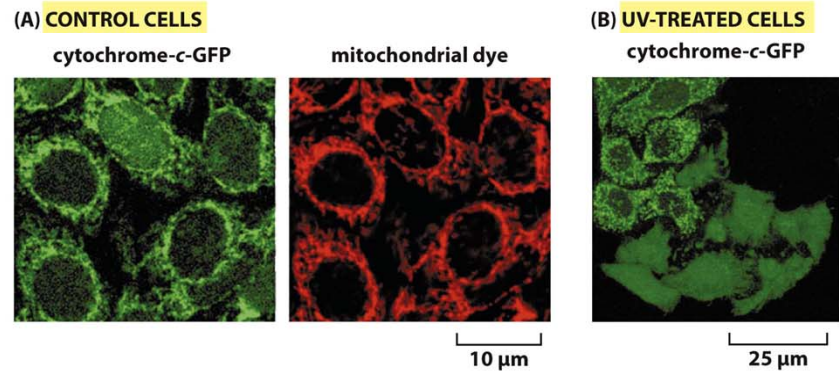


Figure 18-6 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Bcl-2 rodina

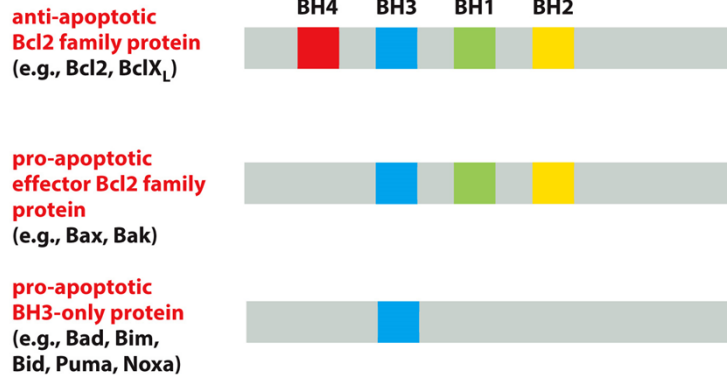


Figure 18-8 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

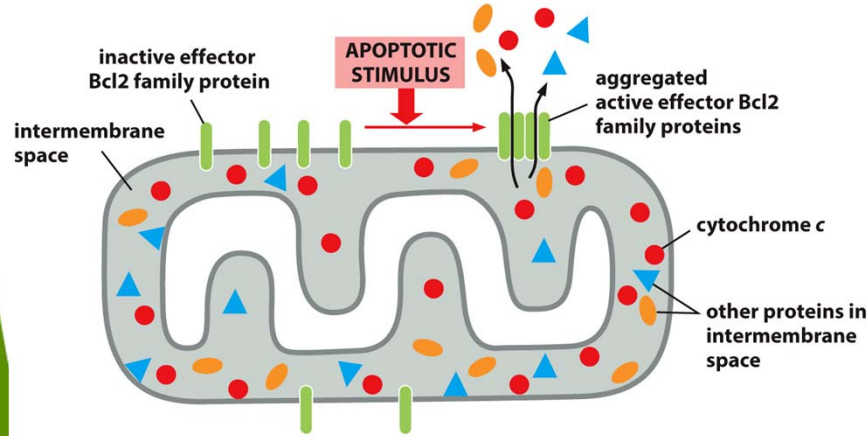


Figure 18-9 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

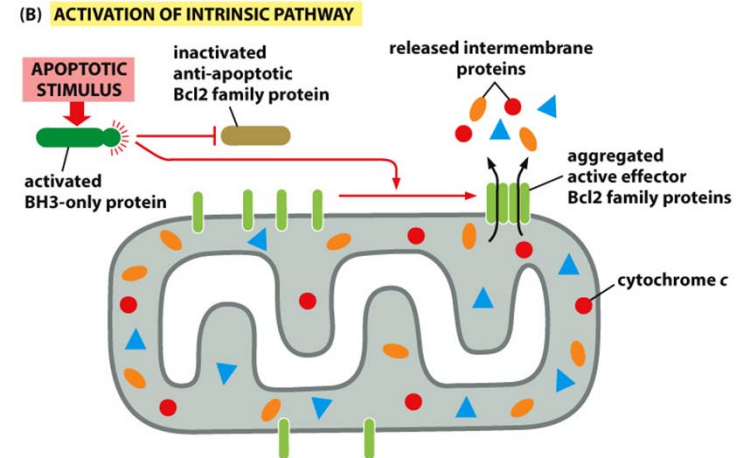
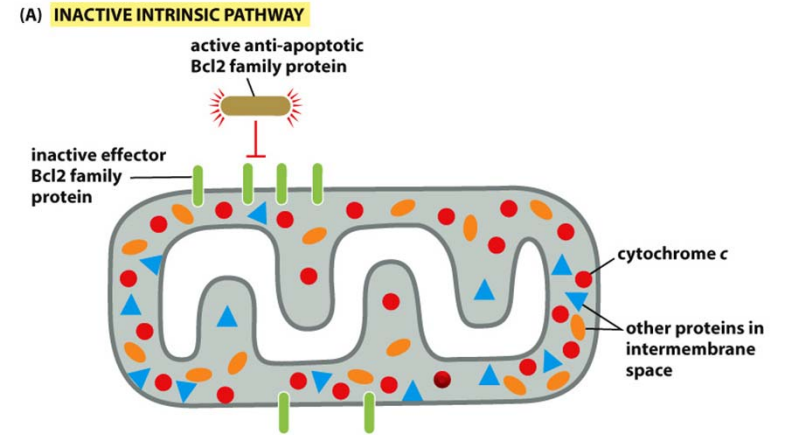


Figure 18-10 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Role extracelulárních „survival“ faktorů v inhibici apoptózy

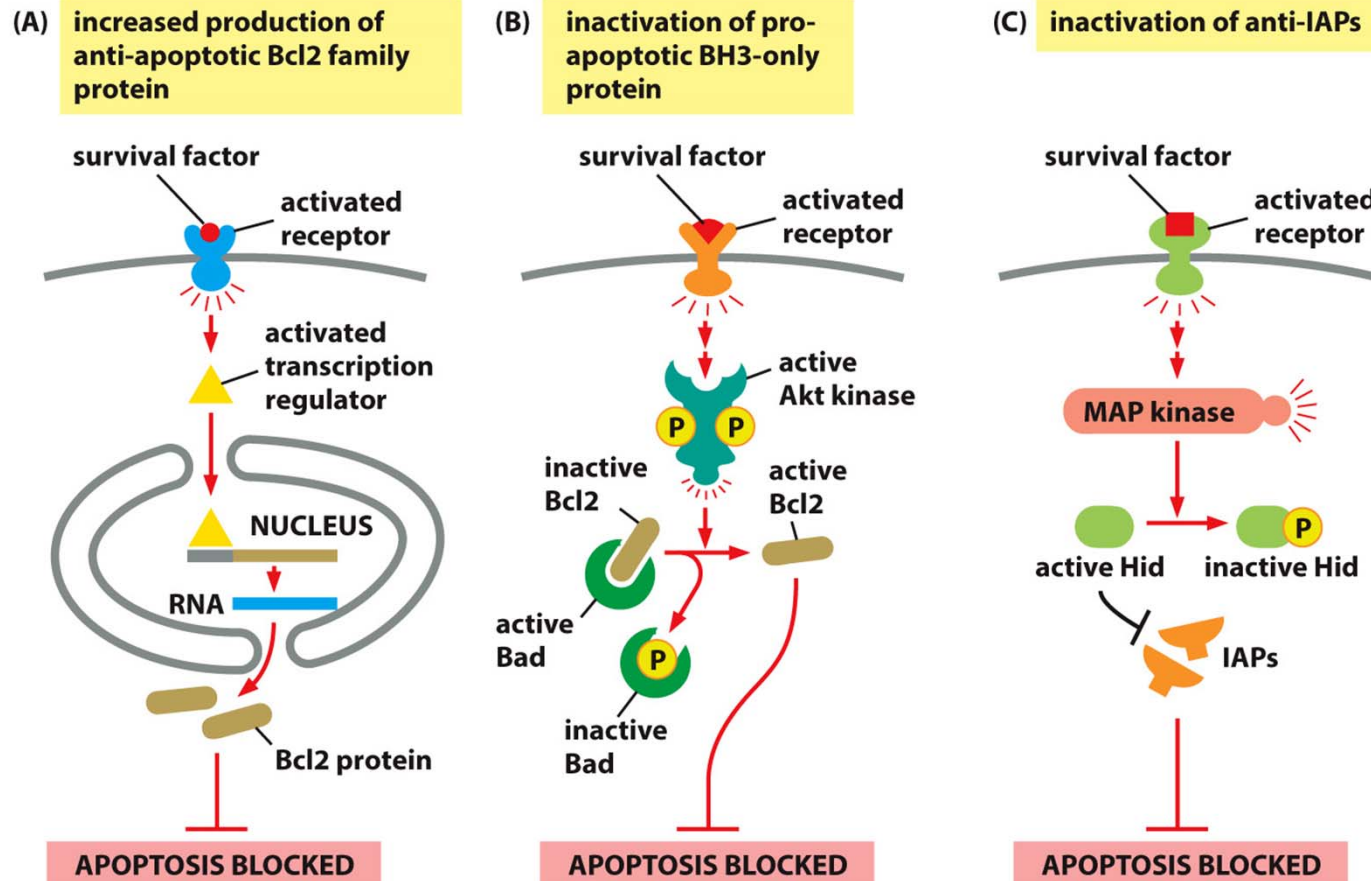


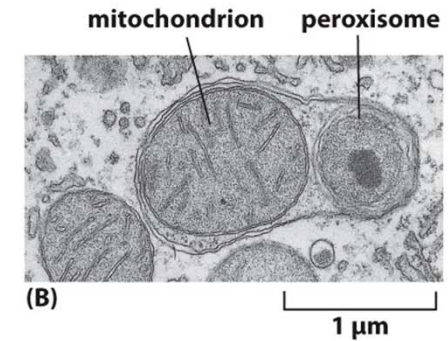
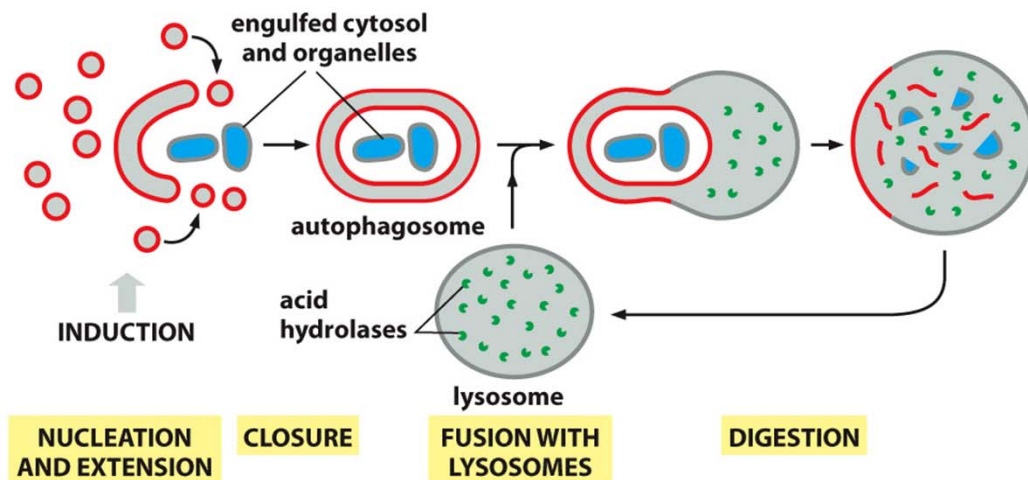
Figure 18-12 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Autofagie

Yoshinori Ohsumi, 2016



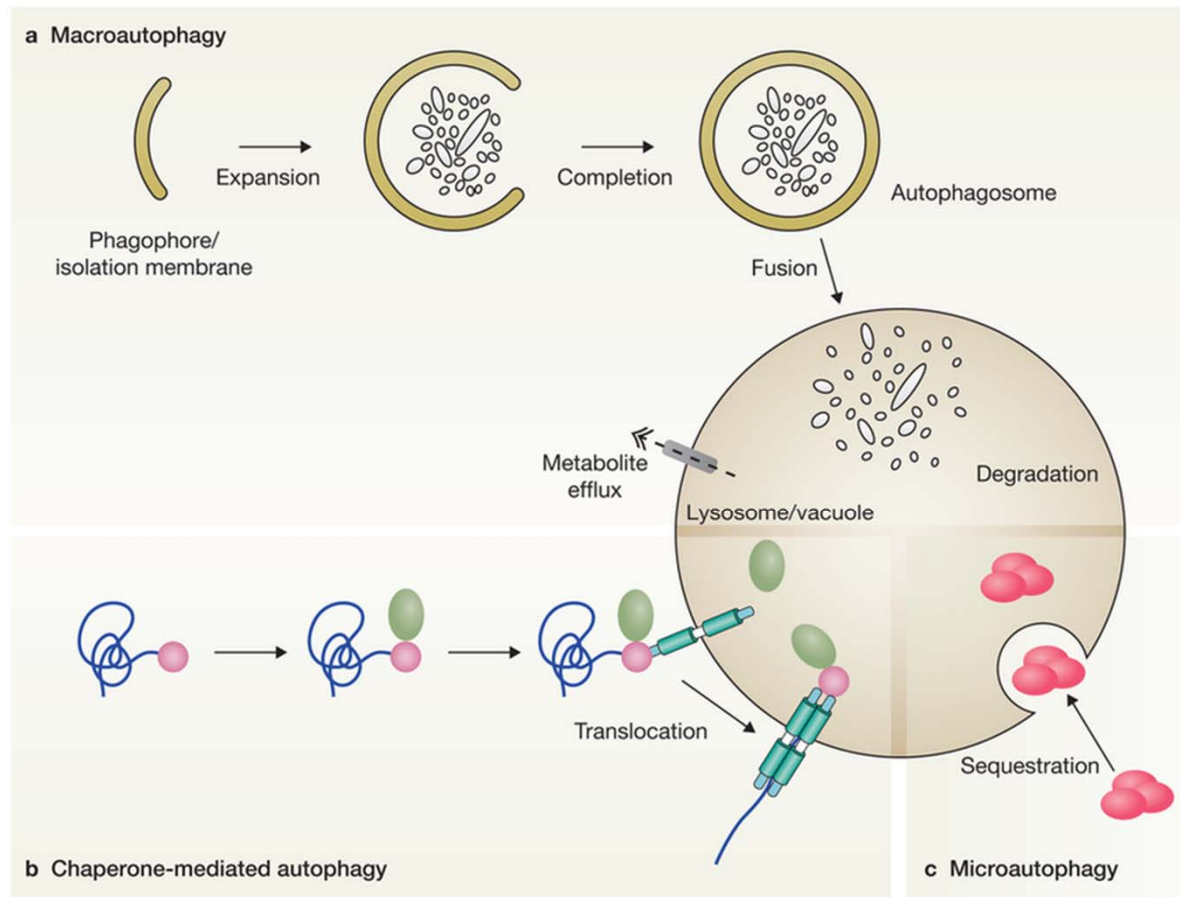
- Degradční proces – normální během vývoje, diference (restrukturalizace), adaptace na stres (hladovění, infekce)
- Neselektivní vs. selektivní (např. mitofagie)



(A)

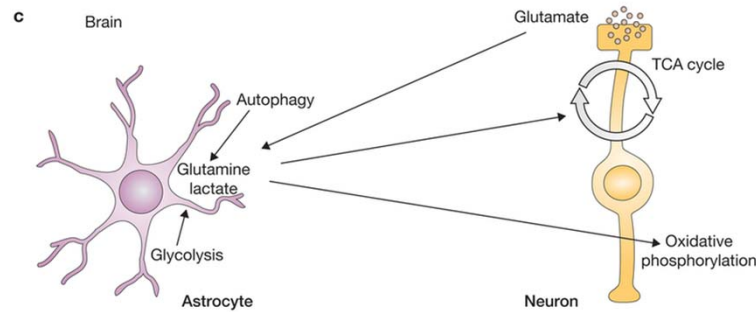
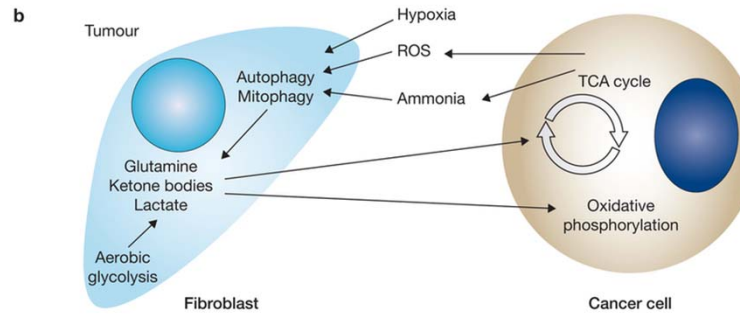
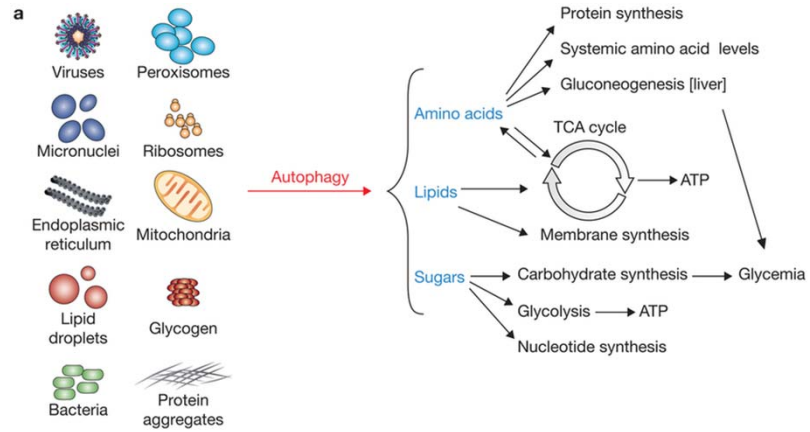
Figure 13-43 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Typy autofagie

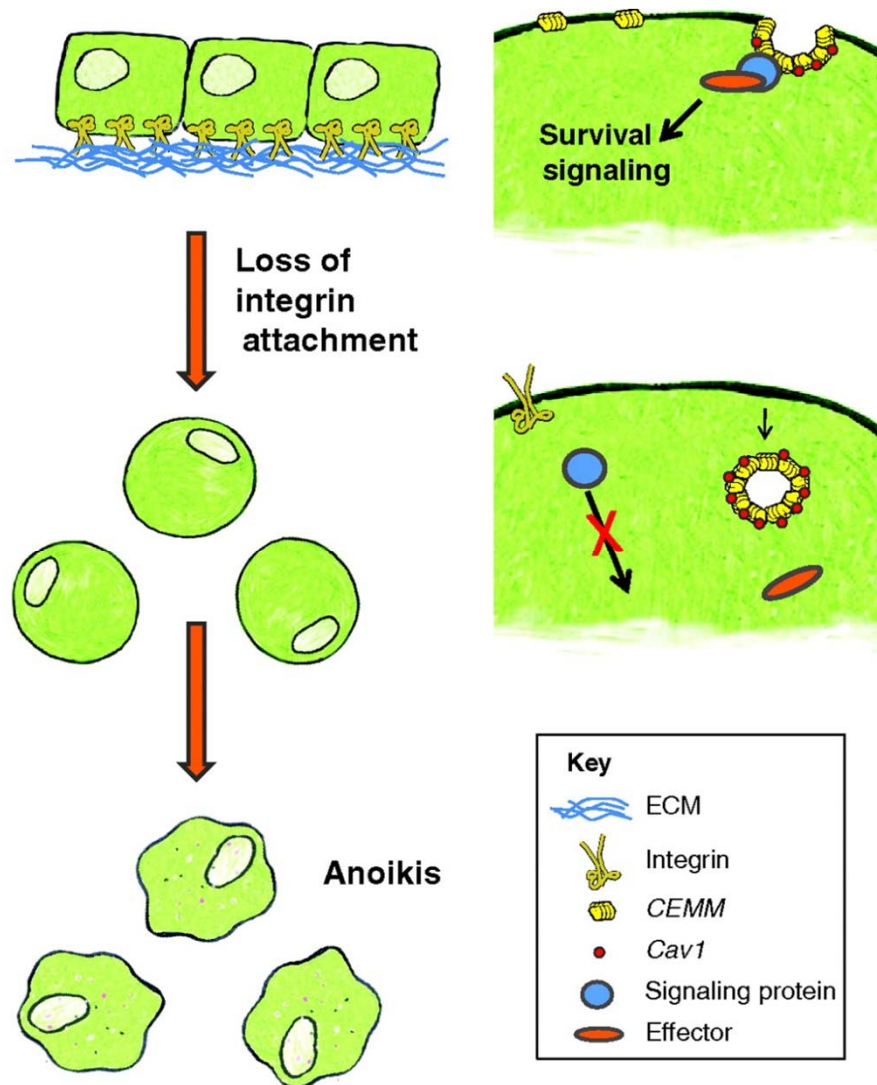


-  LAMP-2A
-  Hsp70 chaperone
-  Protein
-  KFERQ motif
-  Metabolite transporter

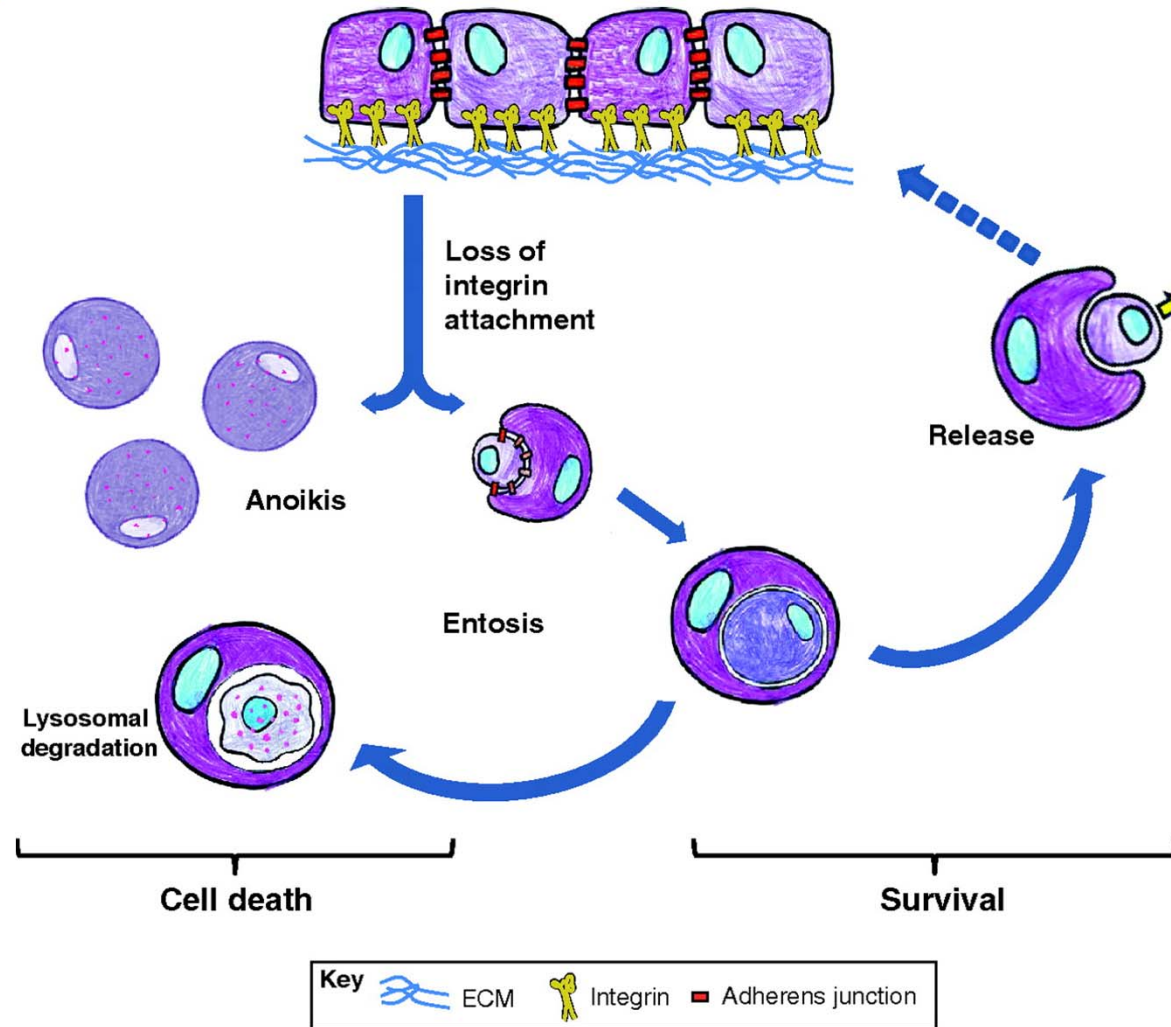
Autofagie a metabolismus



Anoikis (cell-detachment-induced apoptosis)



Entóza



Diferenciace, obnova tkání, kmenové buňky

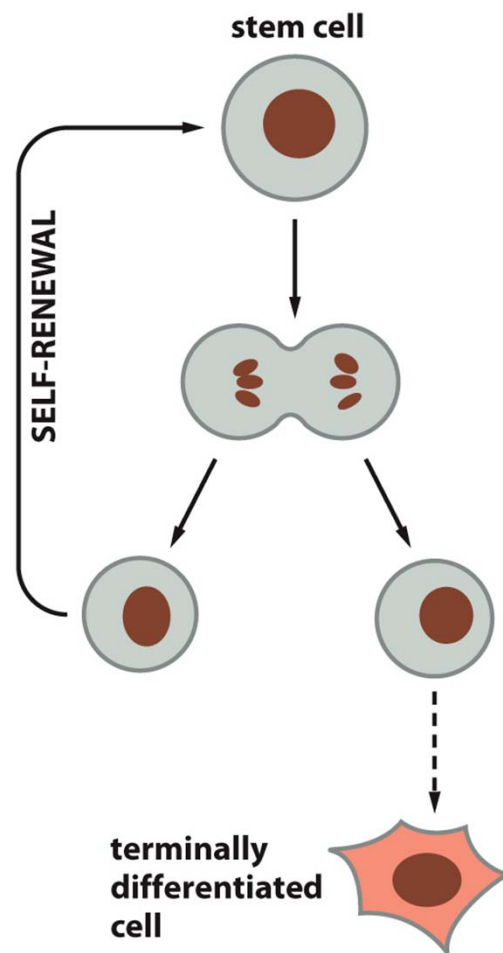


Figure 22-3 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Fyziologie živočišné buňky

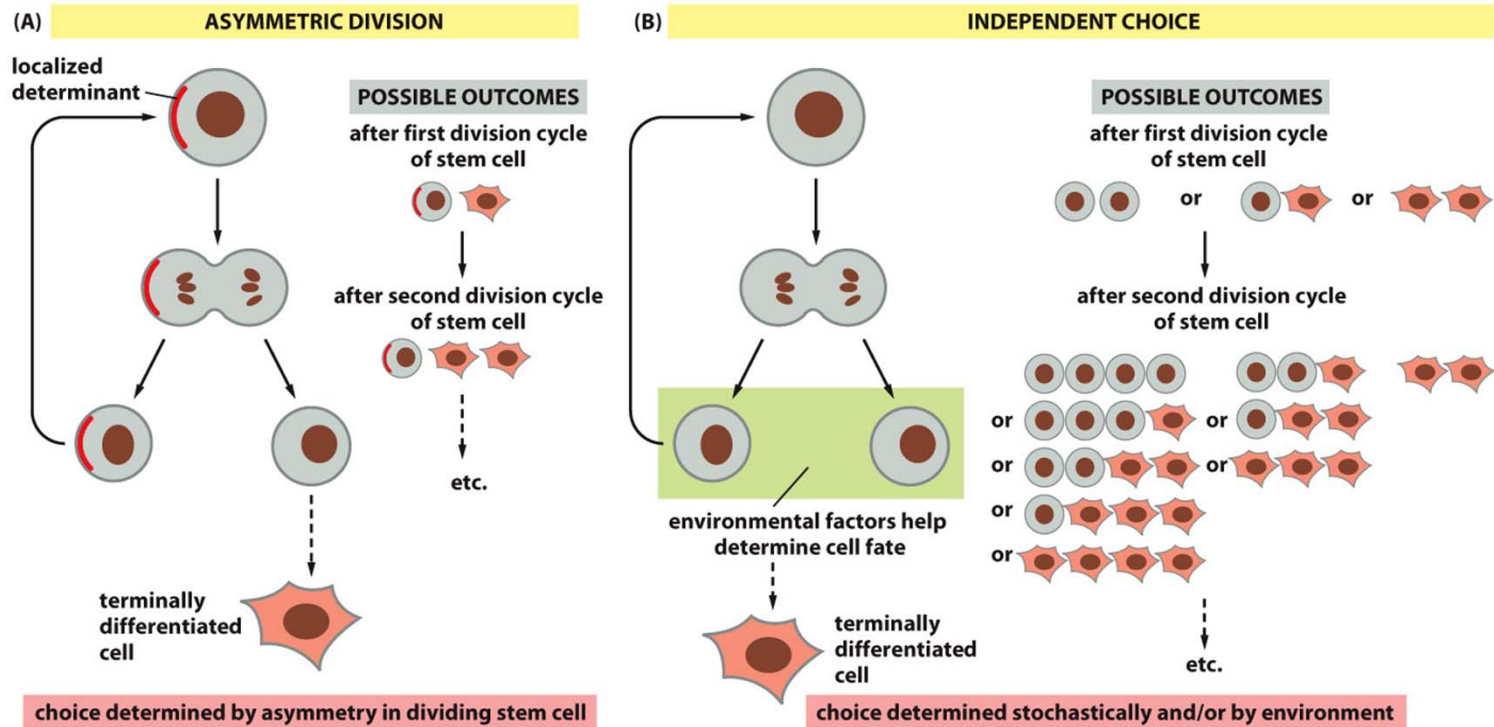


Figure 22-7 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Střevní epitel

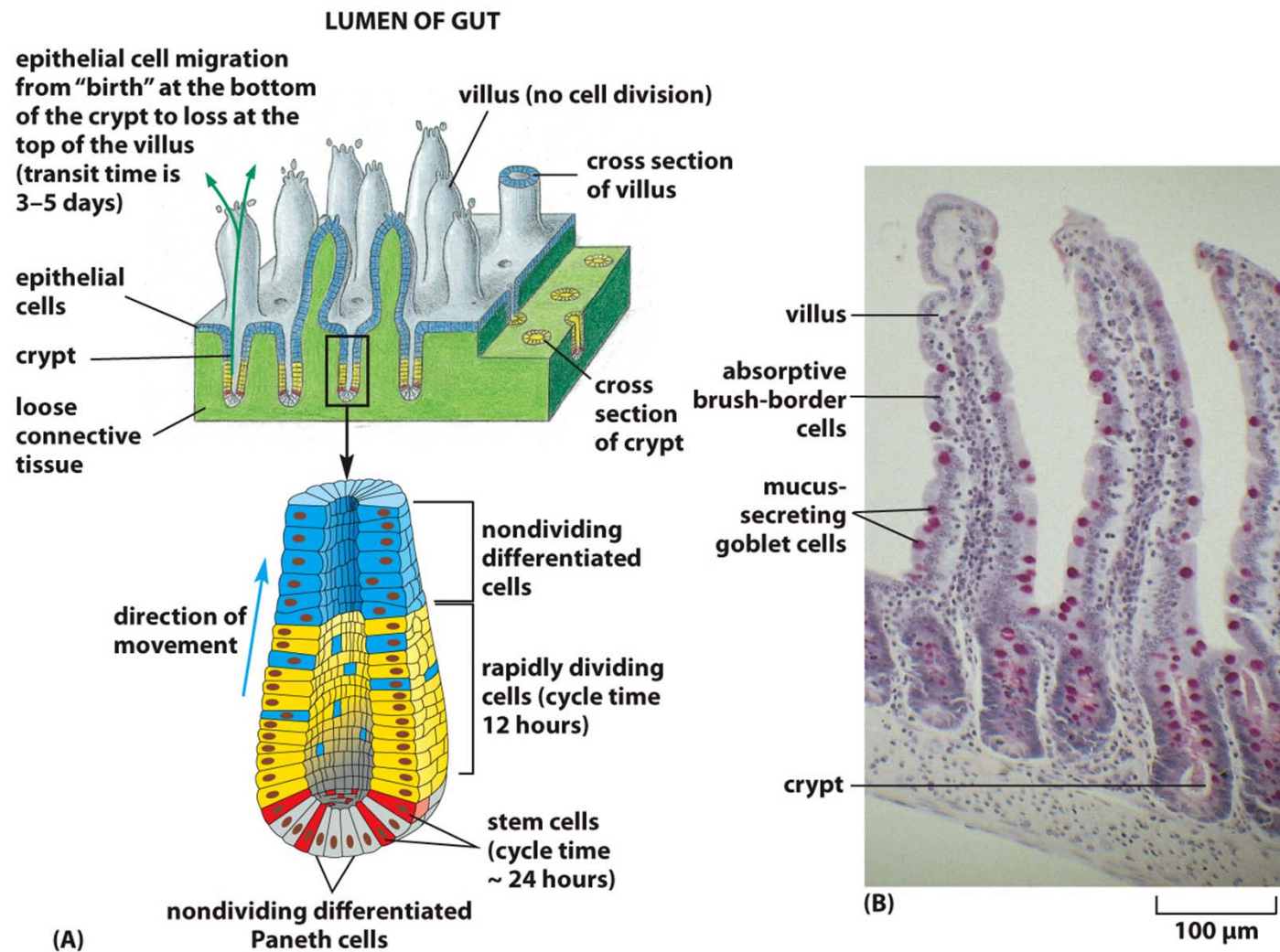
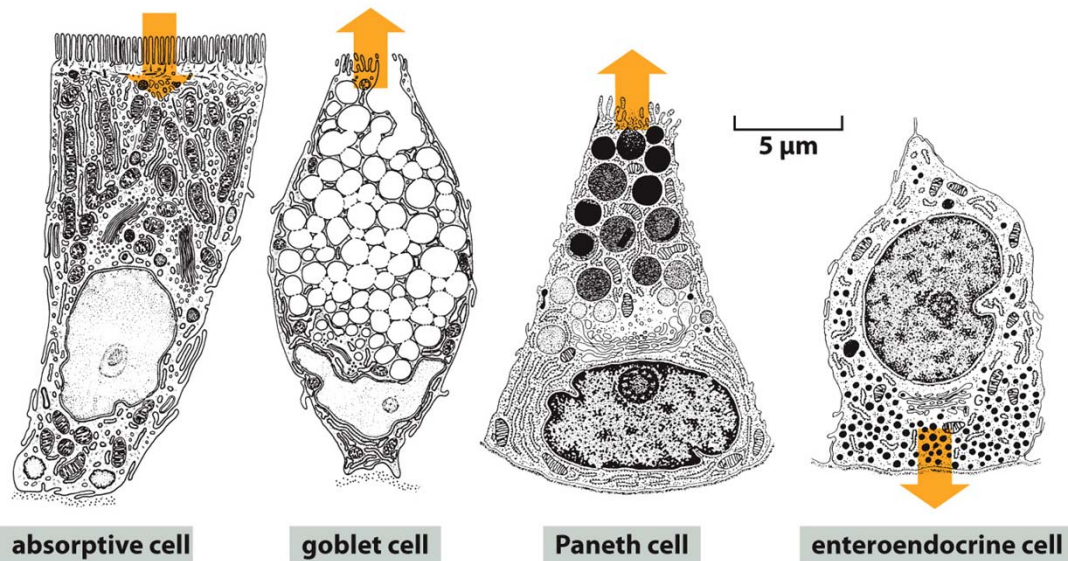


Figure 22-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Hlavní buněčné typy střevního epitelu



absorptive cell

goblet cell

Paneth cell

enteroendocrine cell

Figure 22-2 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Největší
počet – 10x
Plocha 30x

Sekretují
hlen

Sekretují
cryptdin
(defensin)

Sekretují
cholecystokinin

Notch & Wnt signálizace udržuje kmenovost a řídí diferenciaci střevního epitelu

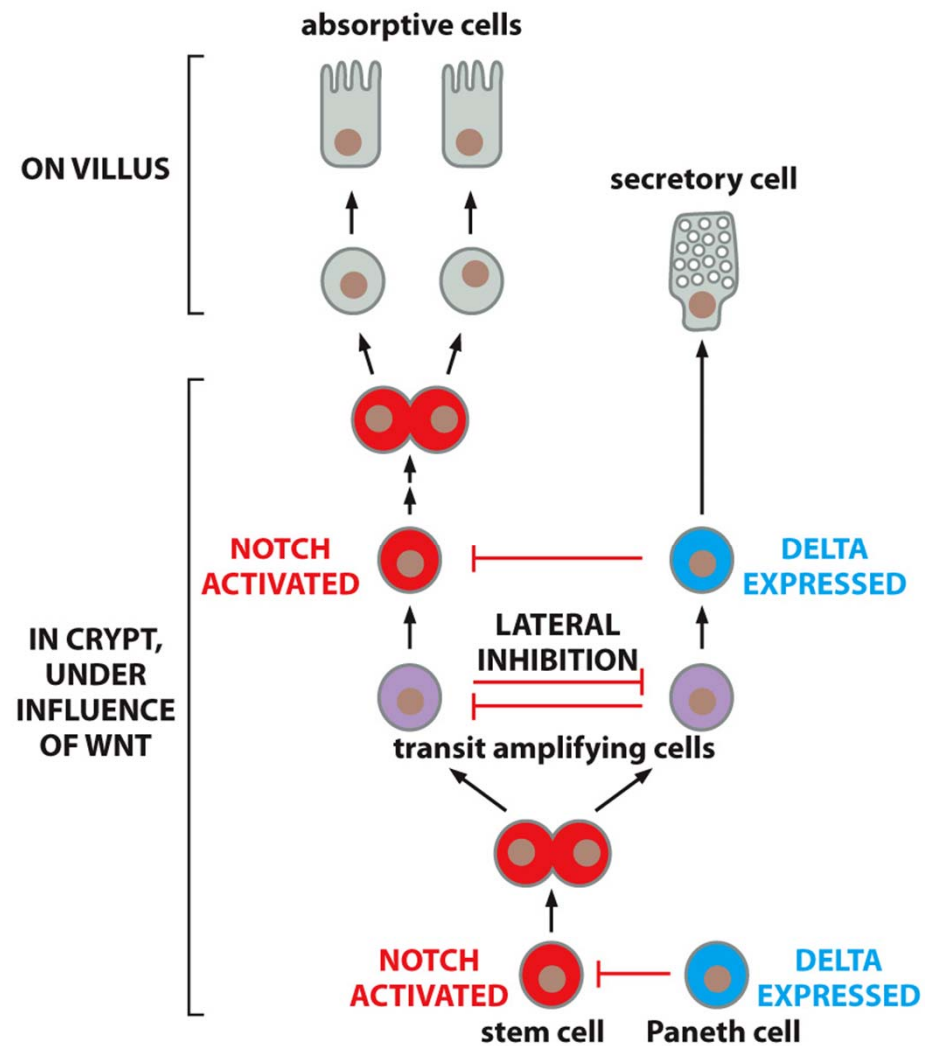
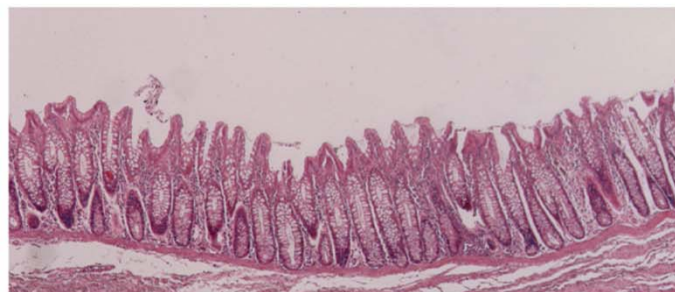
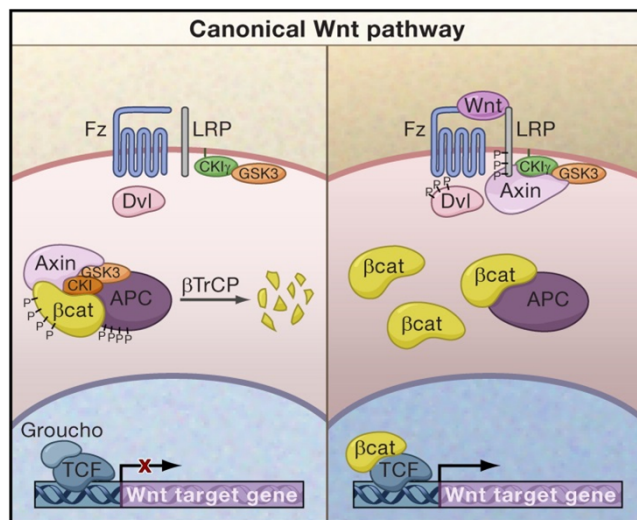


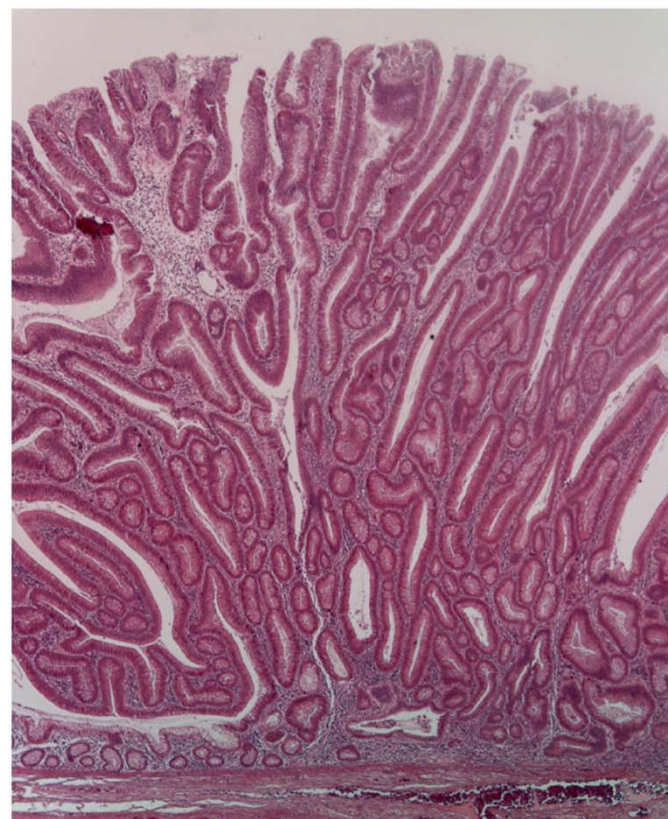
Figure 22-9 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Adenom střeva

- Pacient s mutací v APC (adenomatous polyposis coli)- > permanentní aktivace Wnt



NORMAL COLON



ADENOMA

200 μm

Figure 22-4 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Fyziologie živočišné buňky

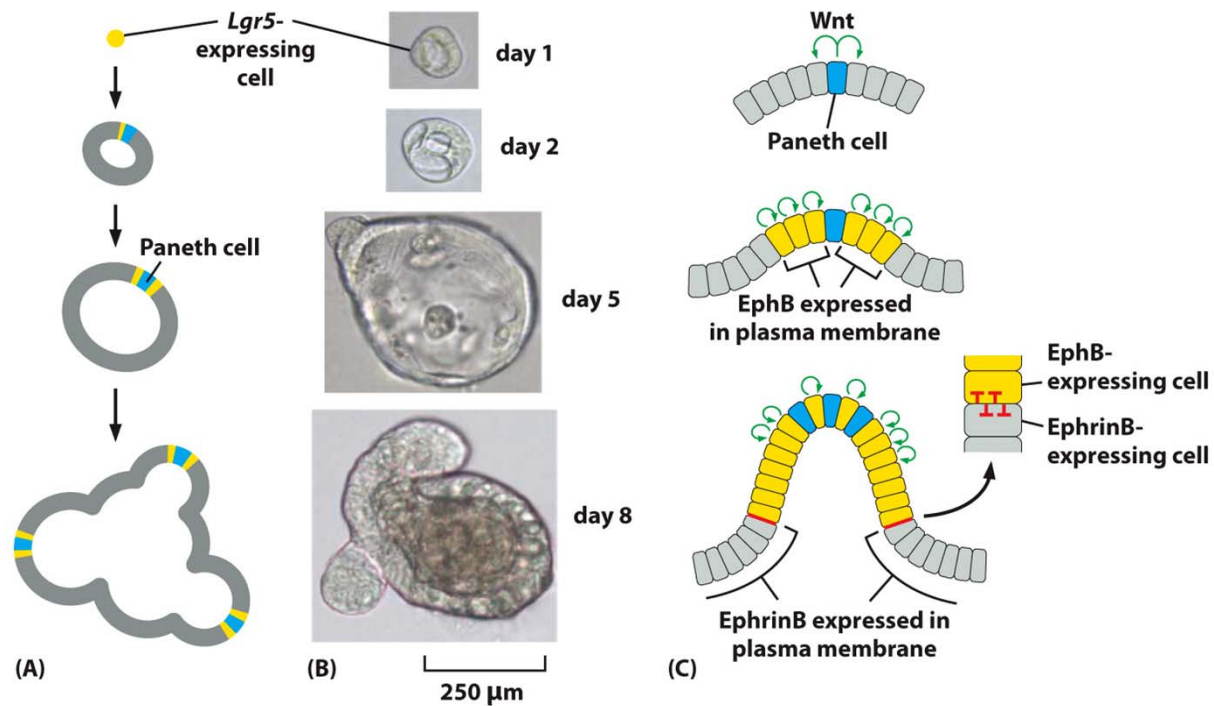


Figure 22-8 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

LETTERS

Single Lgr5 stem cells build crypt–villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche

Toshiro Sato¹, Robert G. Vries¹, Hugo J. Snippert¹, Marc van de Wetering¹, Nick Barker¹, Daniel E. Stange¹, Johan H. van Es¹, Arie Abo², Pekka Kujala³, Peter J. Peters³ & Hans Clevers¹



Hematopoéza – hierarchický systém

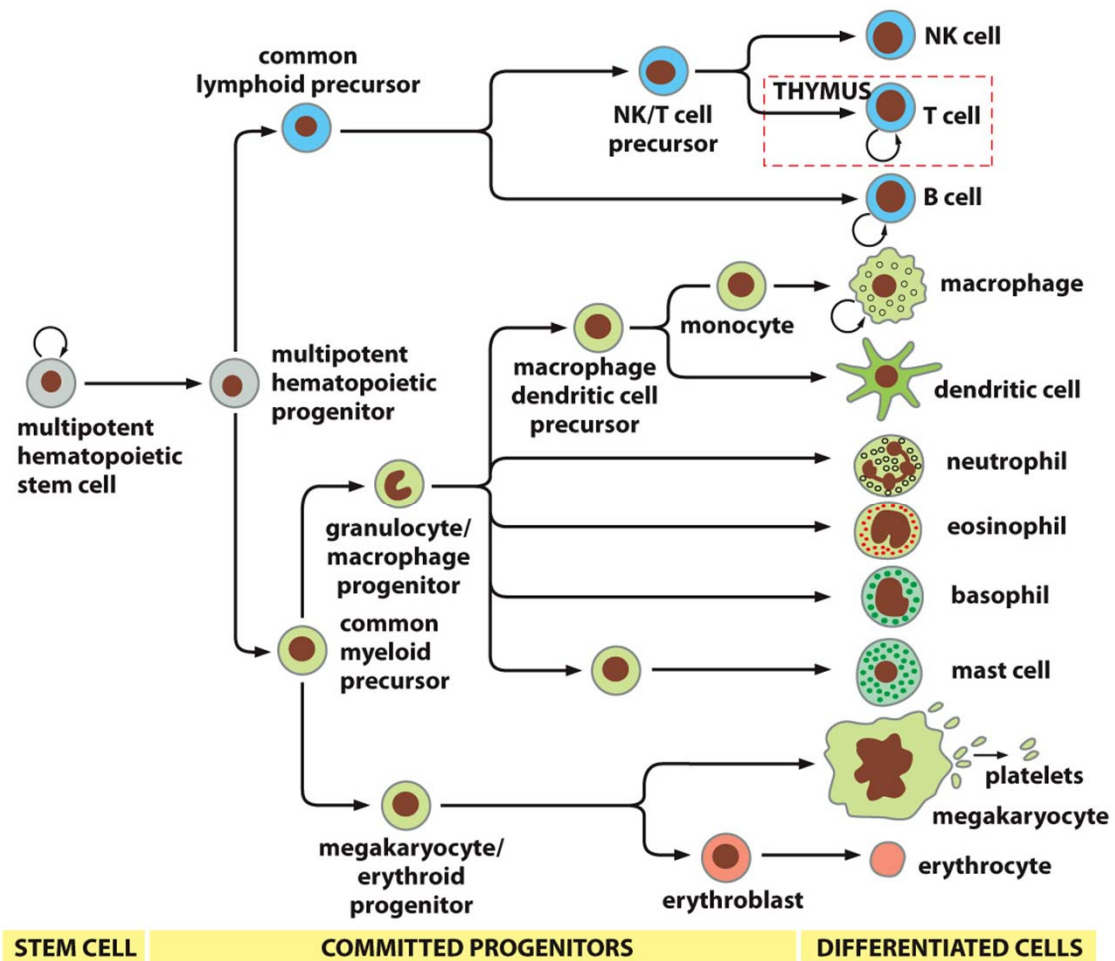
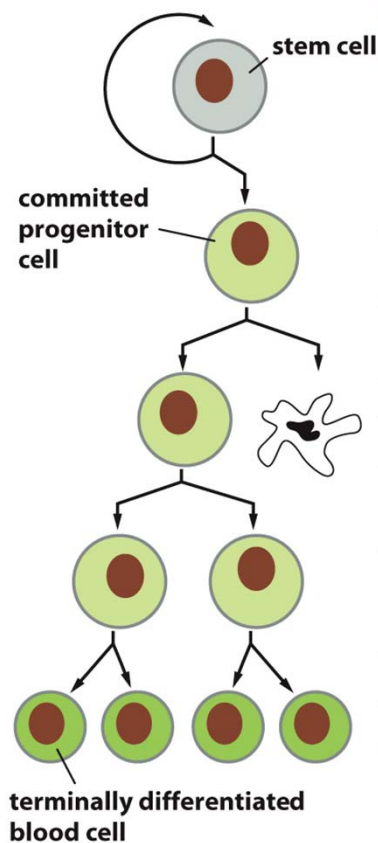


Figure 22-31 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Regulace

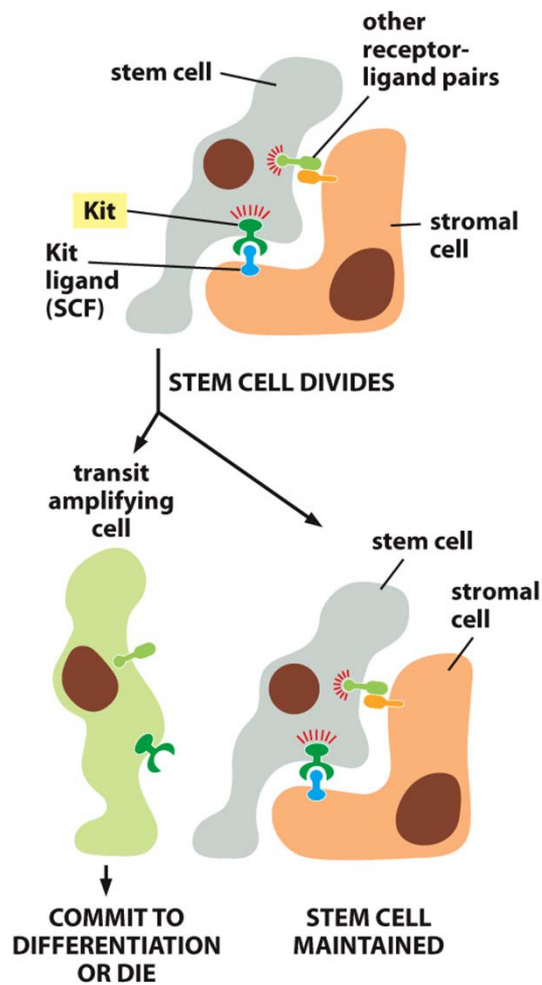


CONTROLLABLE PARAMETER

1. Frequency of stem-cell division
2. Probability of stem-cell death
3. Probability that stem-cell daughter will become a committed progenitor cell of the given type
4. Division cycle time of committed progenitor cell
5. Probability of progenitor-cell death
6. Number of committed progenitor-cell divisions before terminal differentiation
7. Lifetime of differentiated cells

Figure 22-34 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Závislost kmenové buňky na kontaktu se stromatem



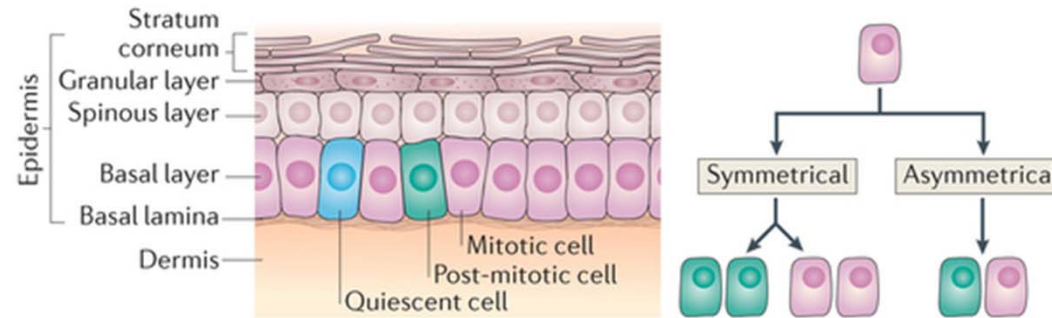
c-kit receptor – CD117,
receptorová tyrosin kináza

SCF – stem cells factor,
cytokin

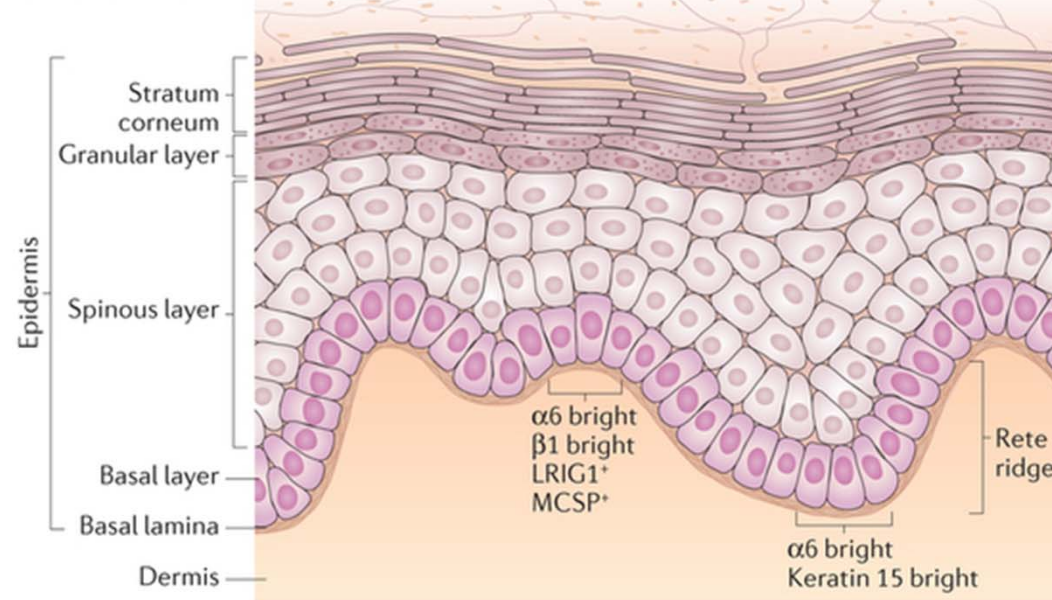
Figure 22-32 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Obnova epidermis

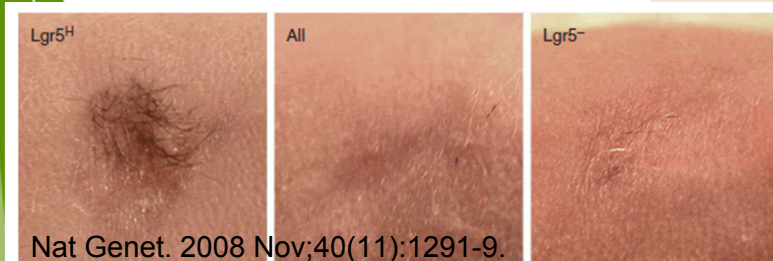
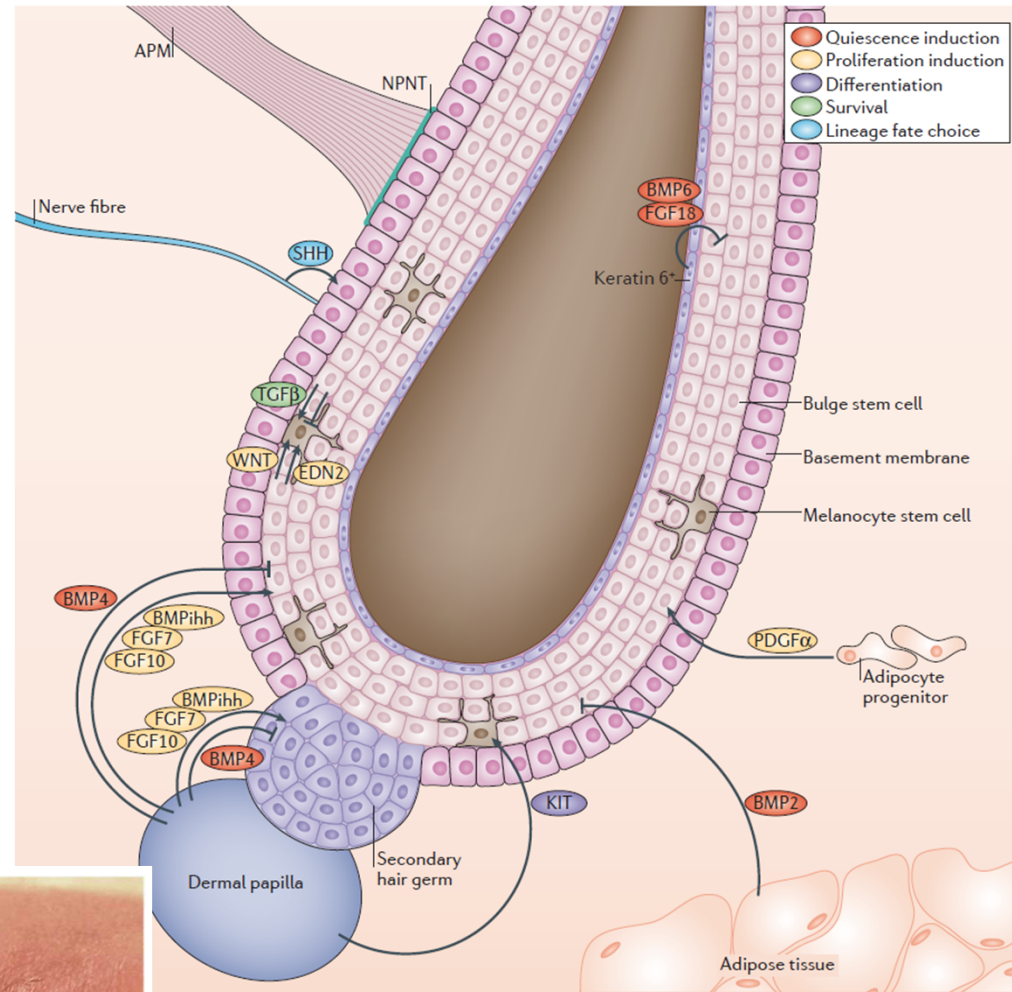
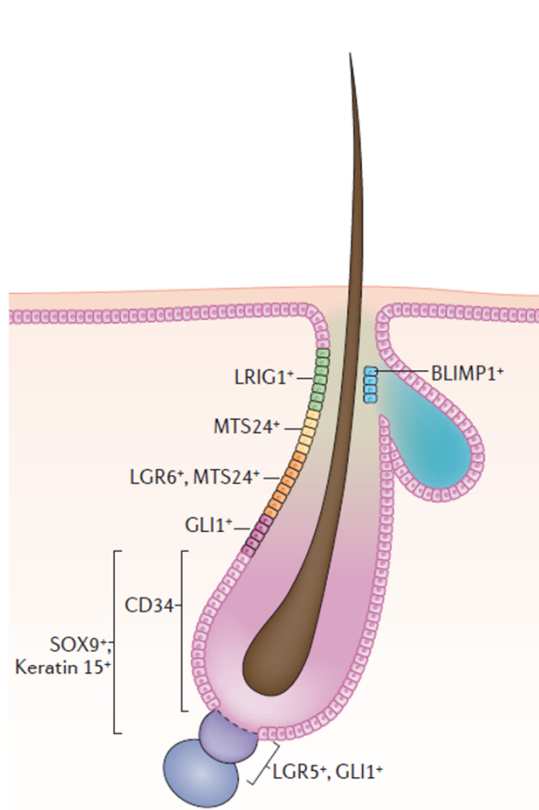
a Mouse interfollicular epidermis



b Human interfollicular epidermis



Kmenová buňka vlasového folikulu



Nat Genet. 2008 Nov;40(11):1291-9.

Diferenciace *in vitro*

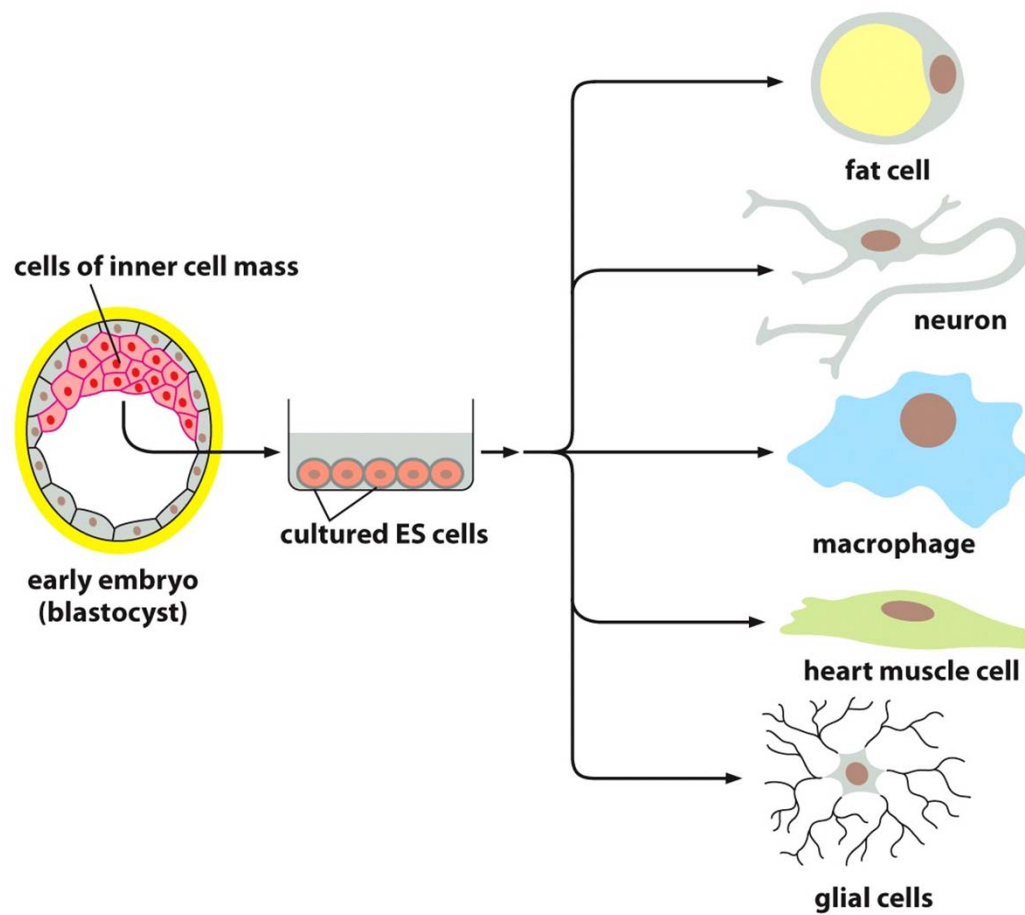


Figure 20-41 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

Přeprogramování

The Nobel Prize in Physiology or Medicine
2012

Sir John B. Gurdon, Shinya Yamanaka

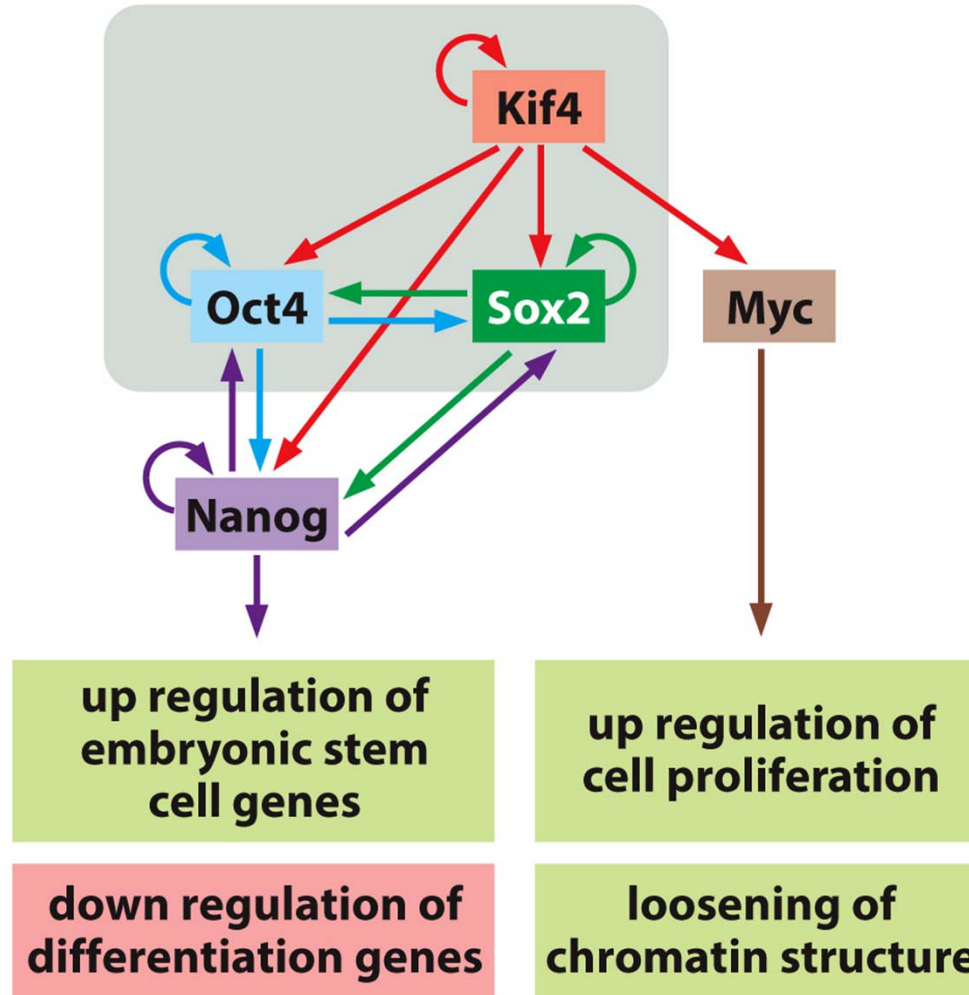


Figure 22-41 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Fyziologie živočišné buňky

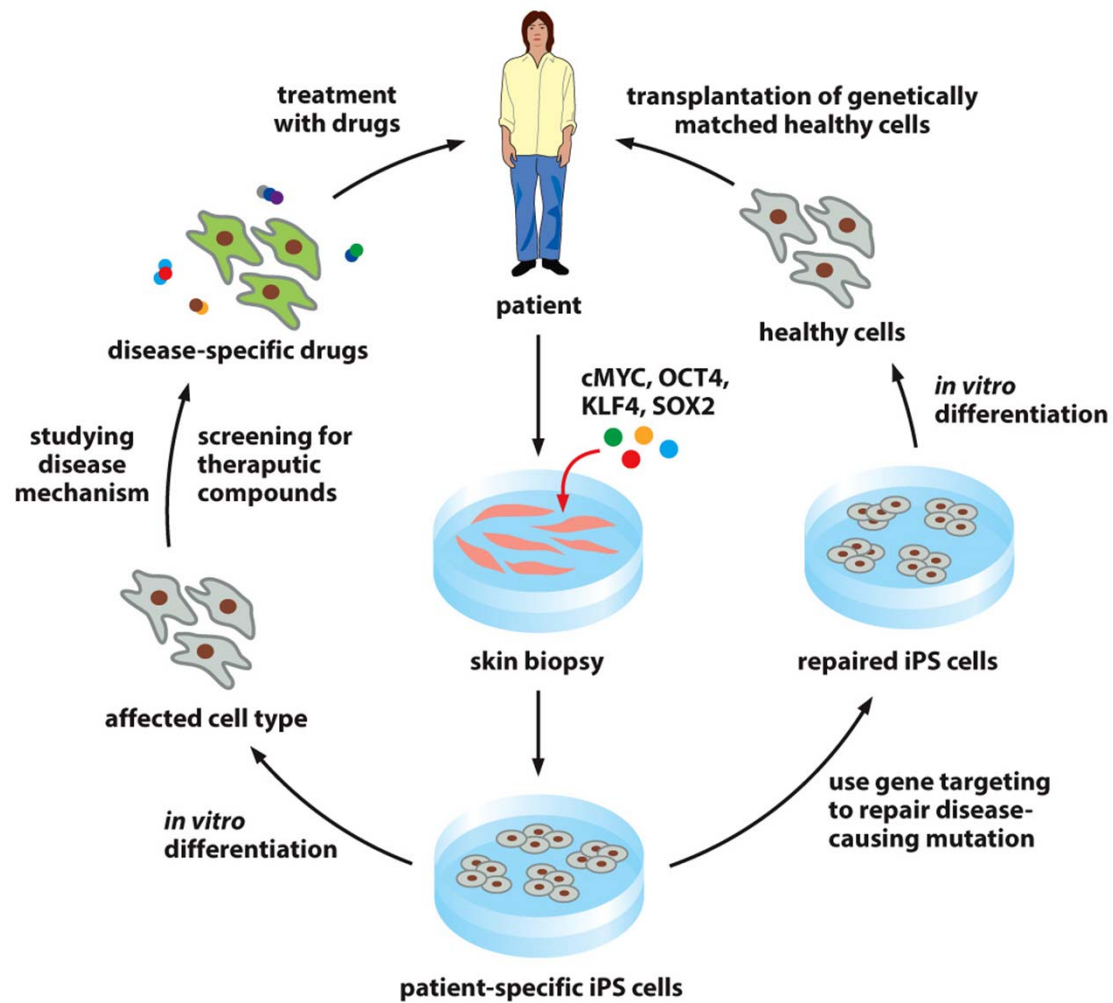


Figure 22-47 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Deregulace proliferace a buněčné smrti

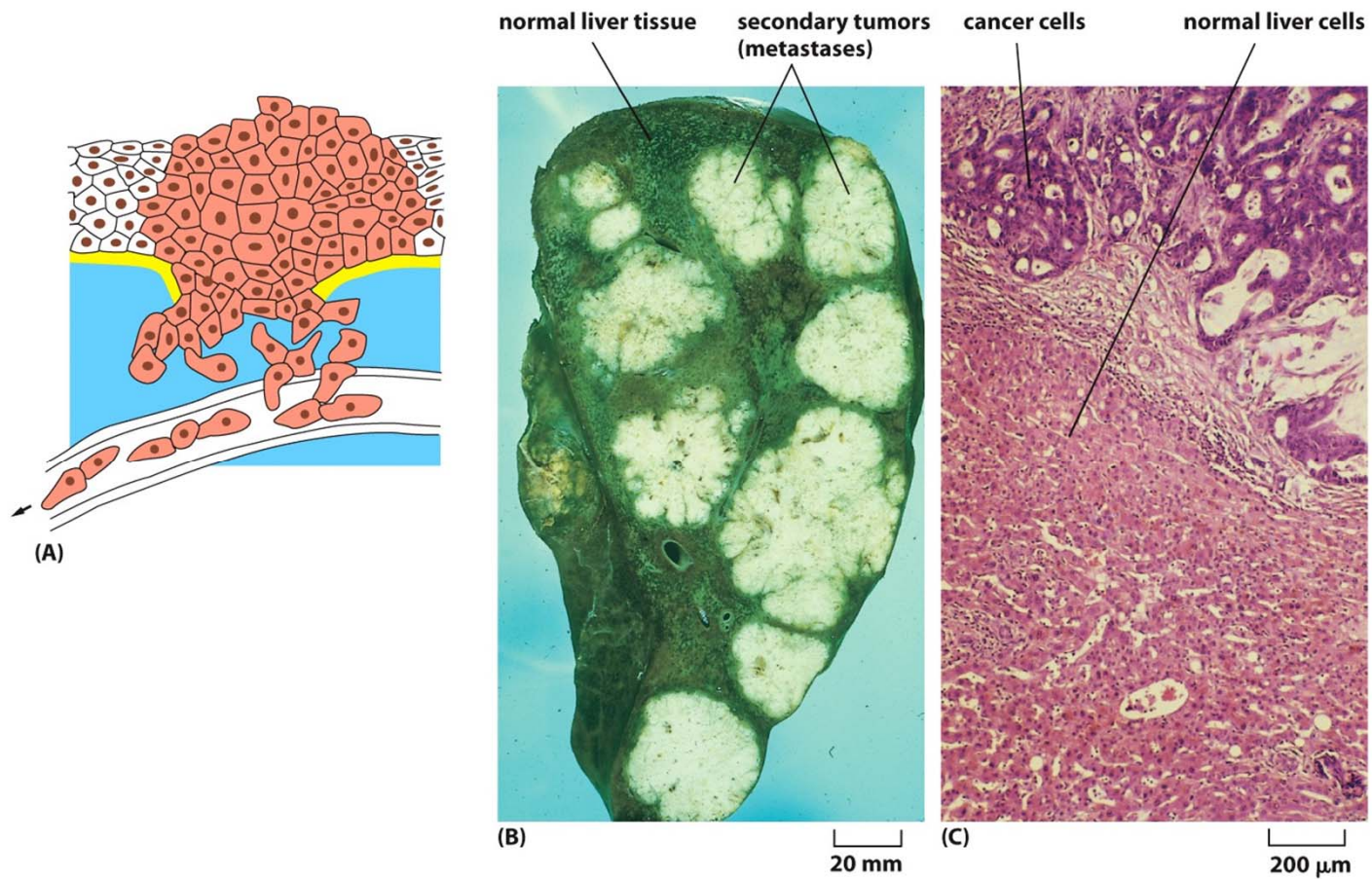
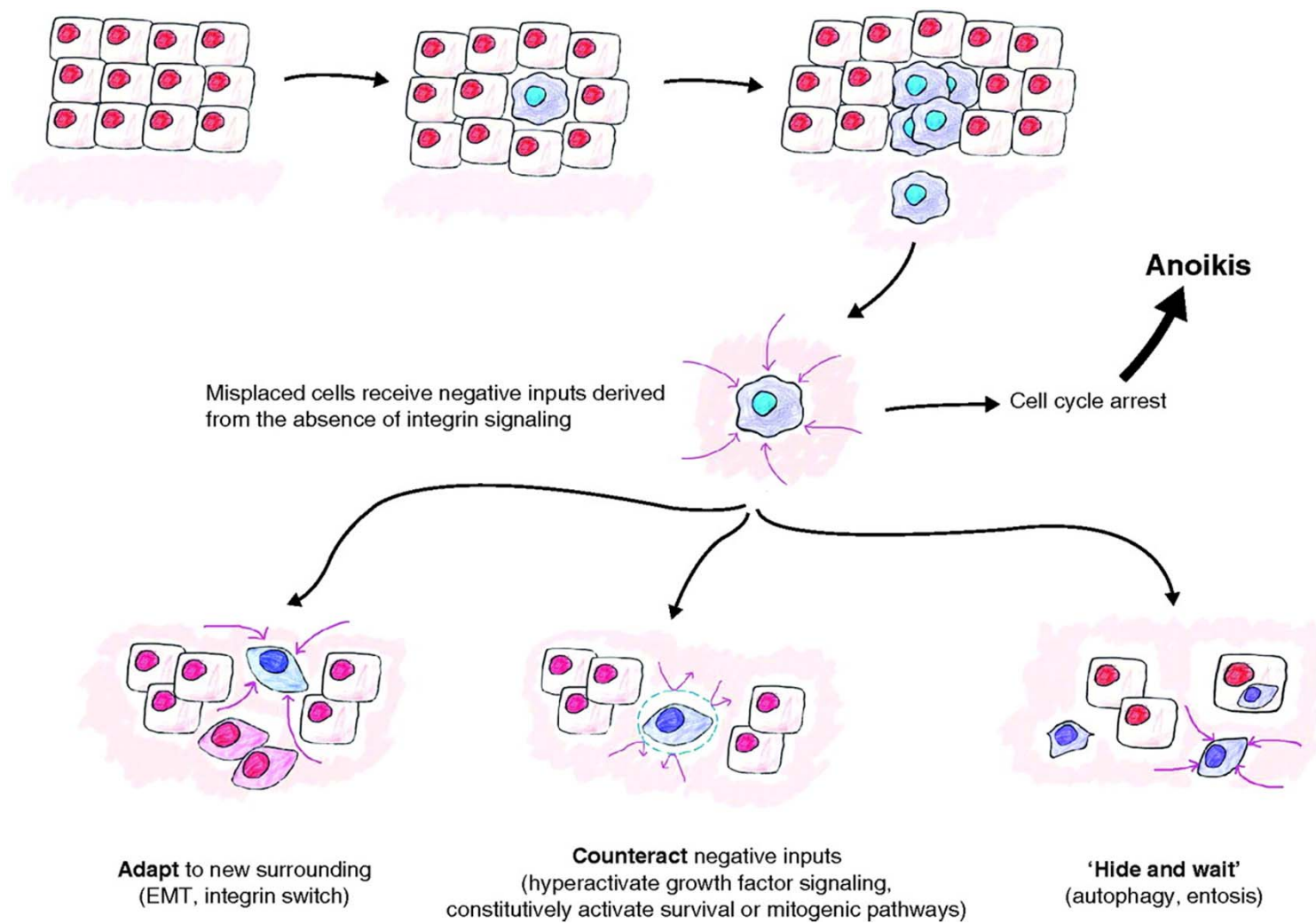


Figure 20-45 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

Strategie úniku transformované buňky



Deregulace proliferace a buněčné smrti

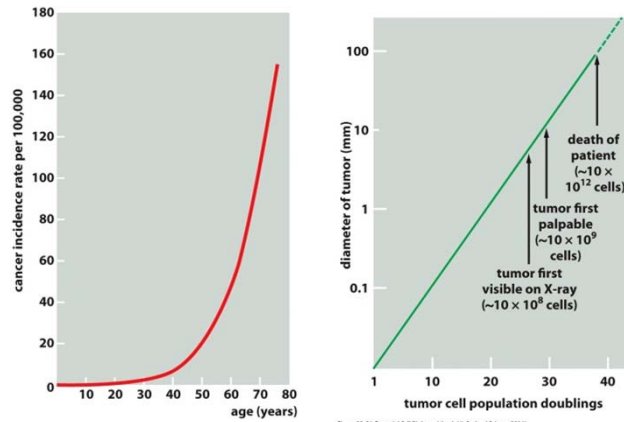


Figure 20-16 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

Figure 20-54 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

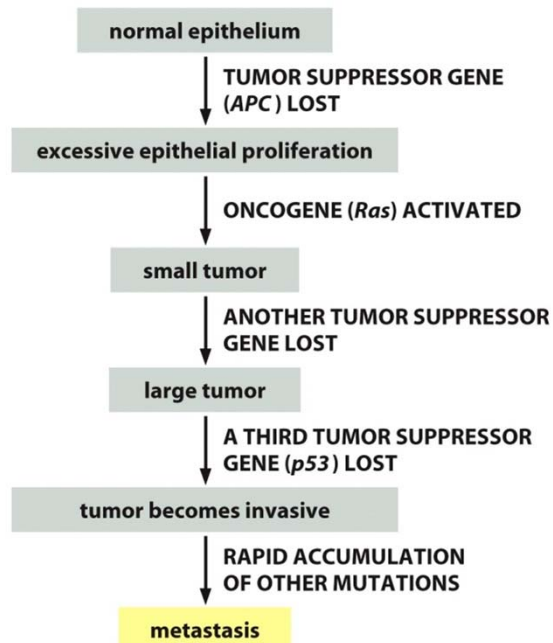


Figure 20-53 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

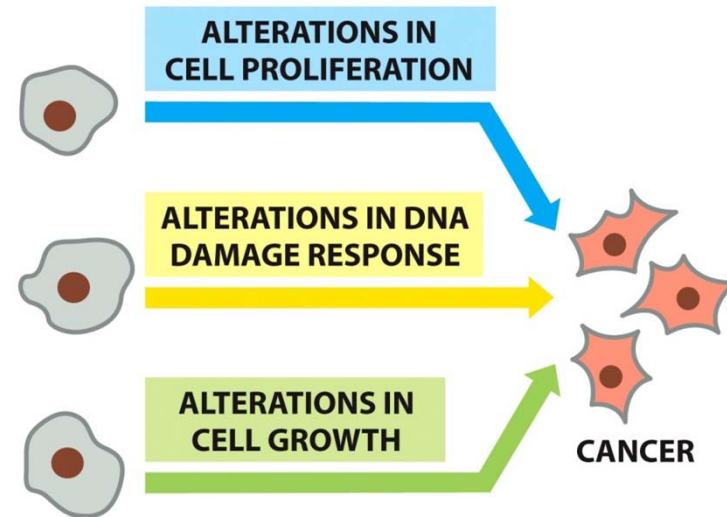
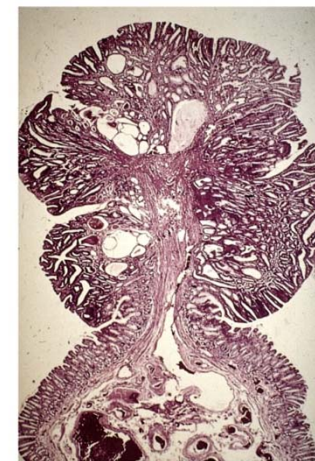


Figure 20-51 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)



(A)



(B)

1 mm

Figure 20-52 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)