

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

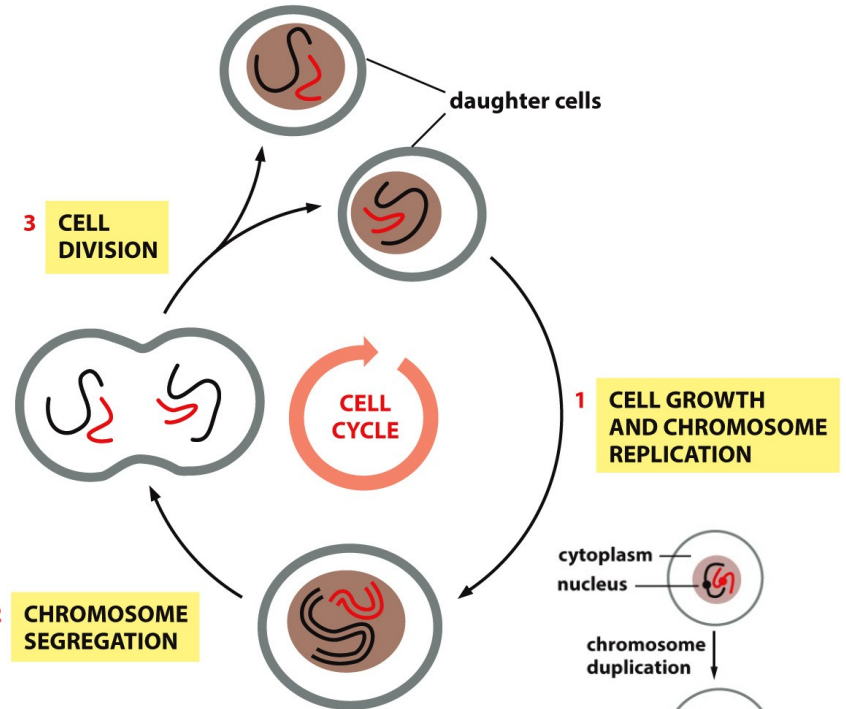


Figure 17-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

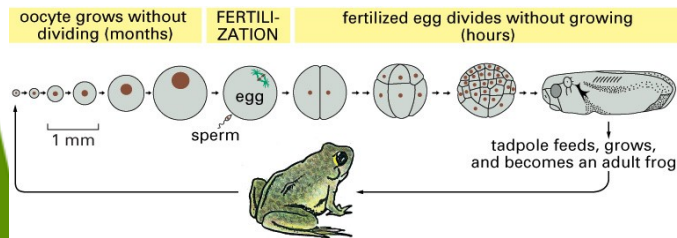


Figure 17-8. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

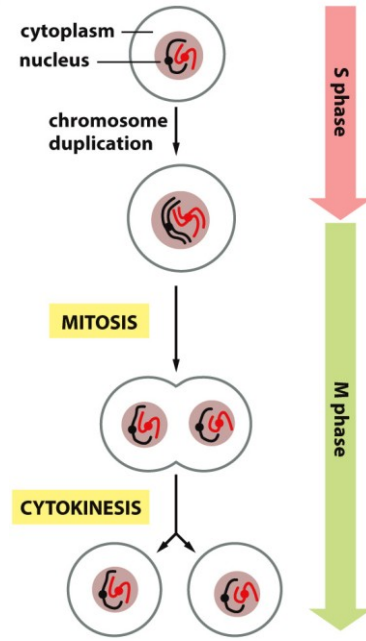
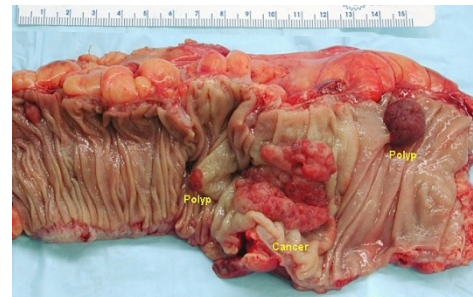


Figure 17-2 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Mitóza

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

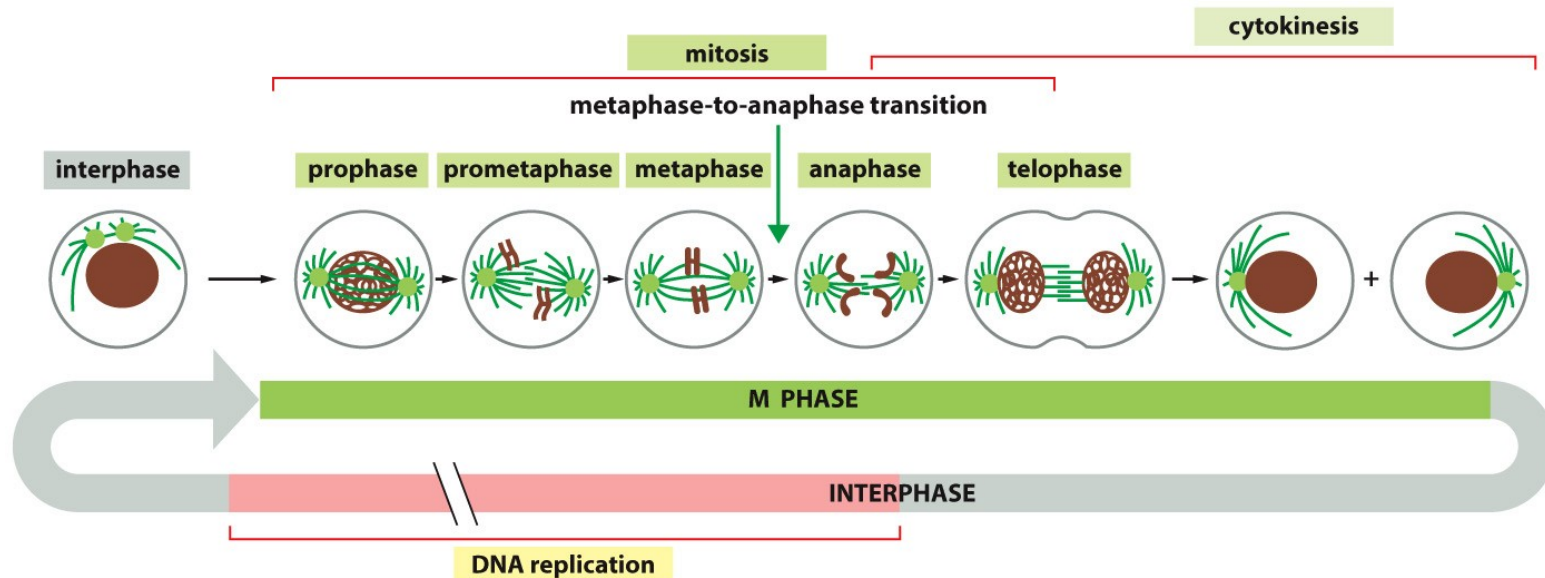
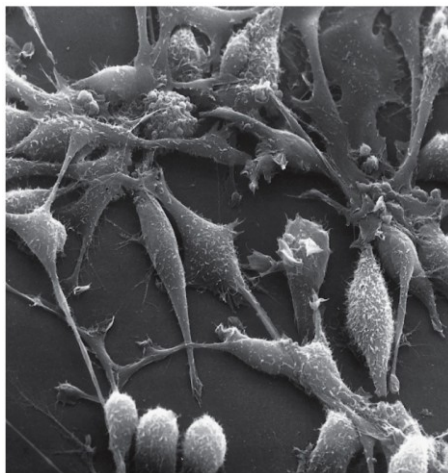


Figure 17-3 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

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
 - např. na konci G1 – za ním dochází k replikaci DNA i po odejmutí mitogenních stimulů



10 μm

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

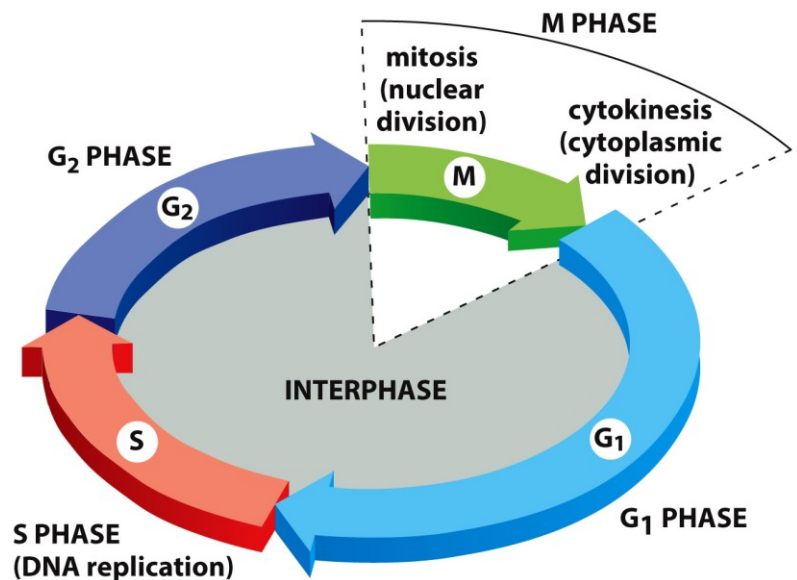


Figure 17-4 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Studium buněčného cyklu

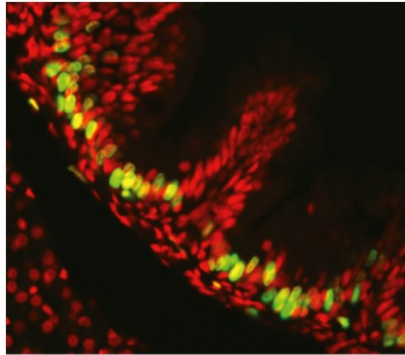


Figure 17-7 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

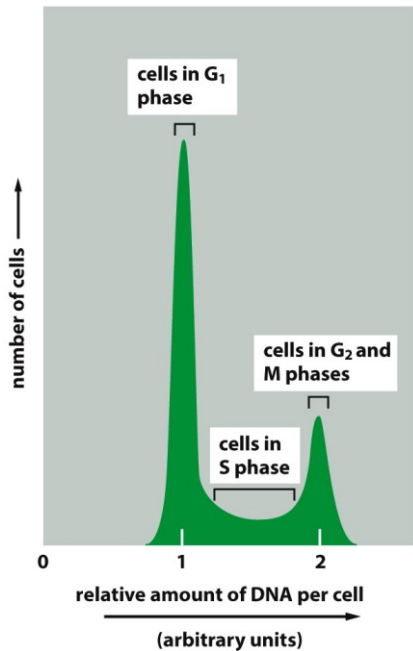
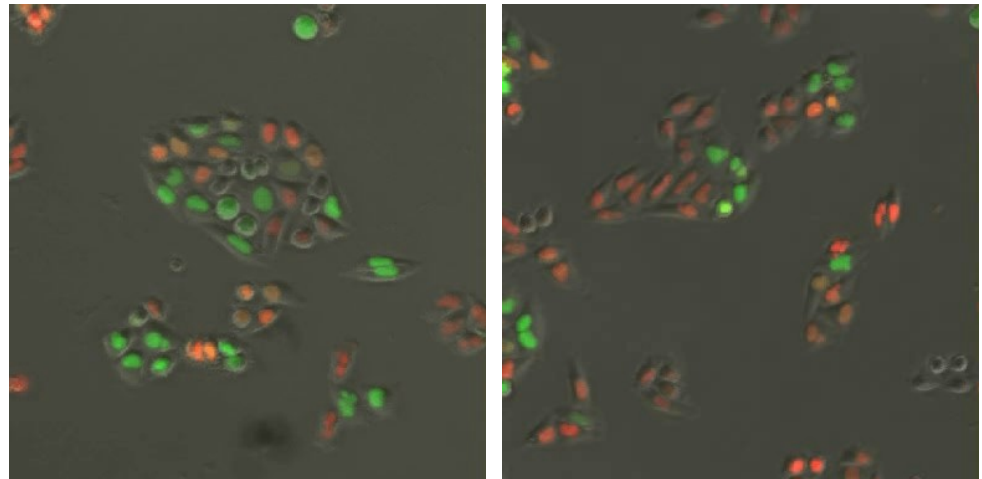
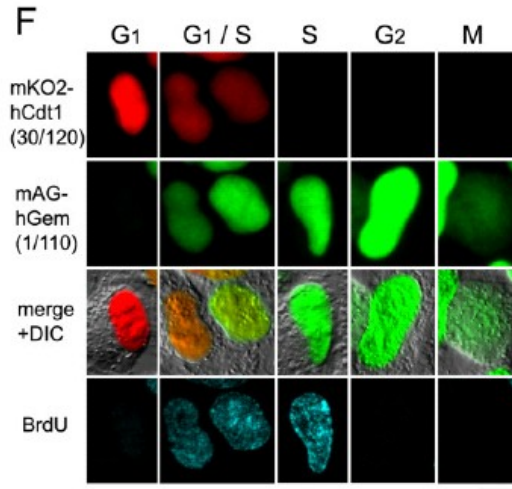


Figure 17-8 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



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?

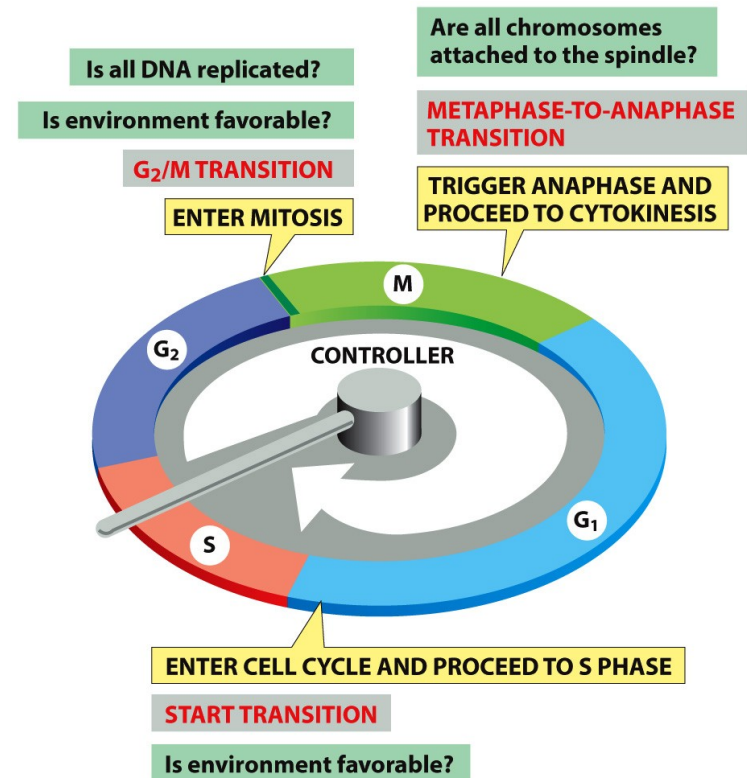
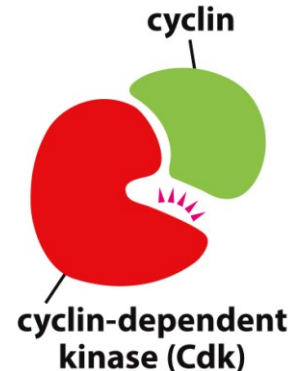


Figure 17-9 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

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

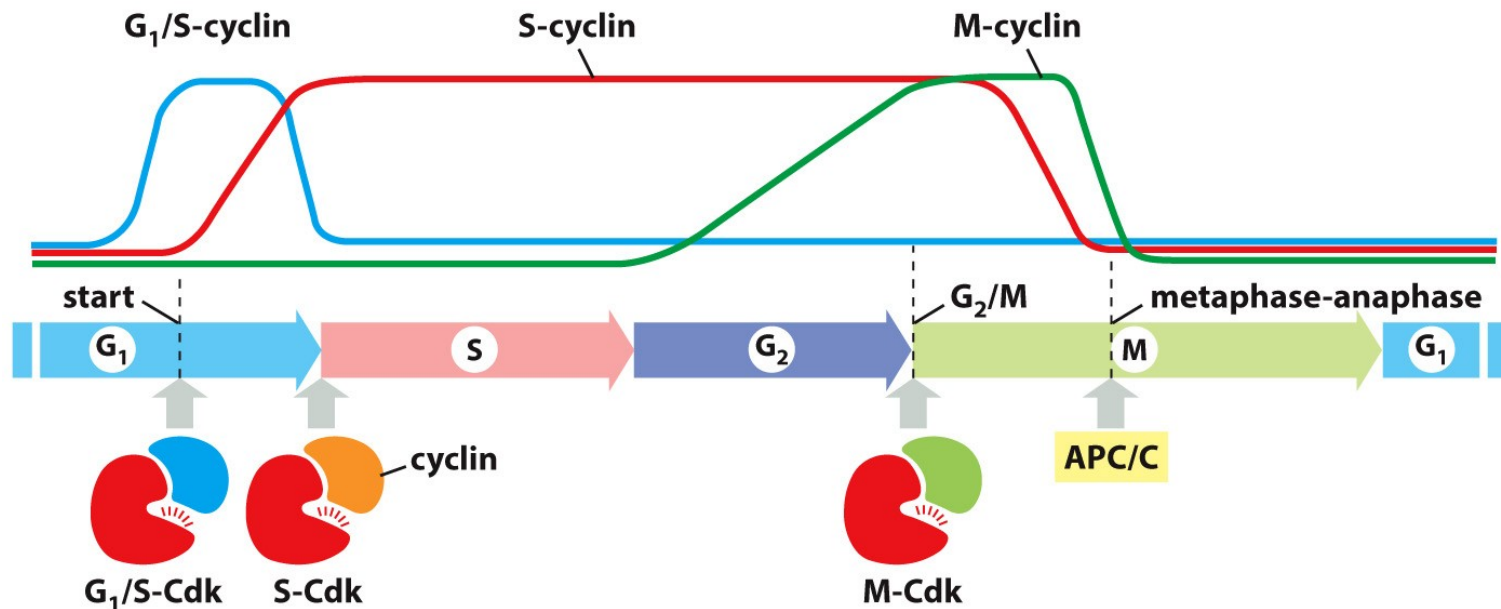


Figure 17-11 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

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)

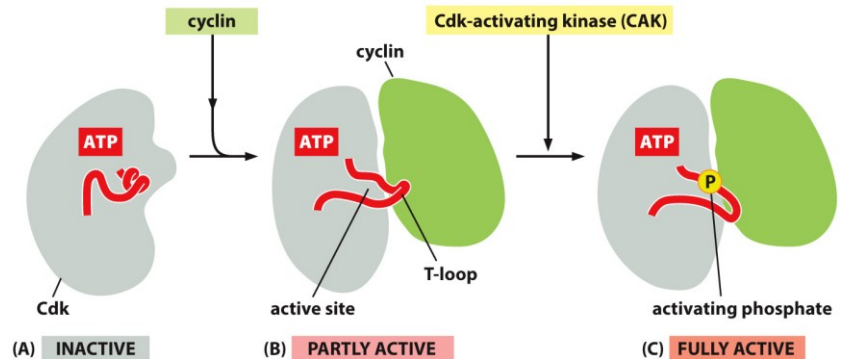


Figure 17-12 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

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

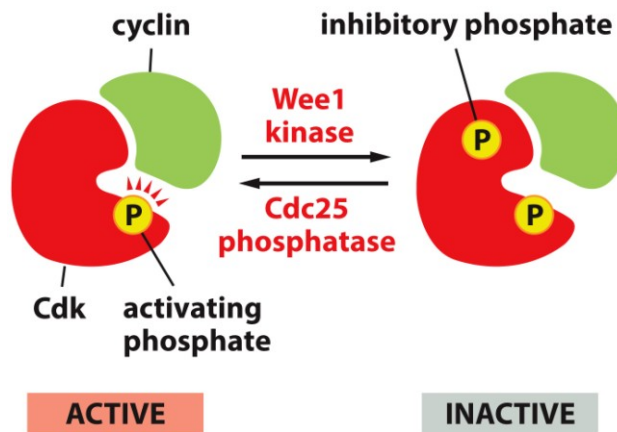


Figure 17-13 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

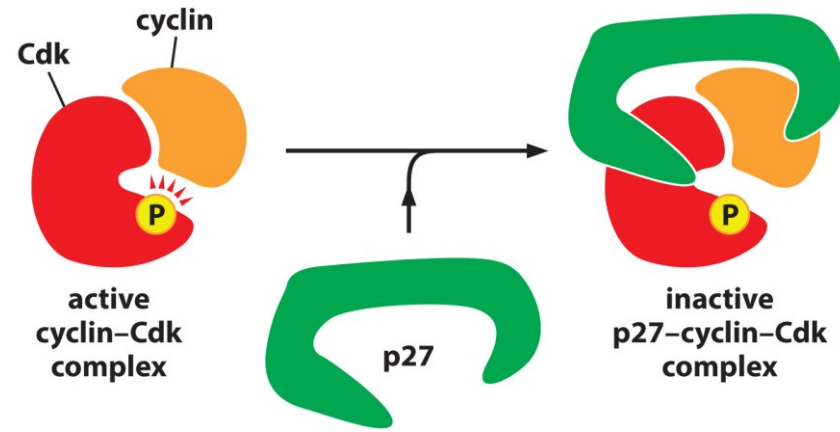
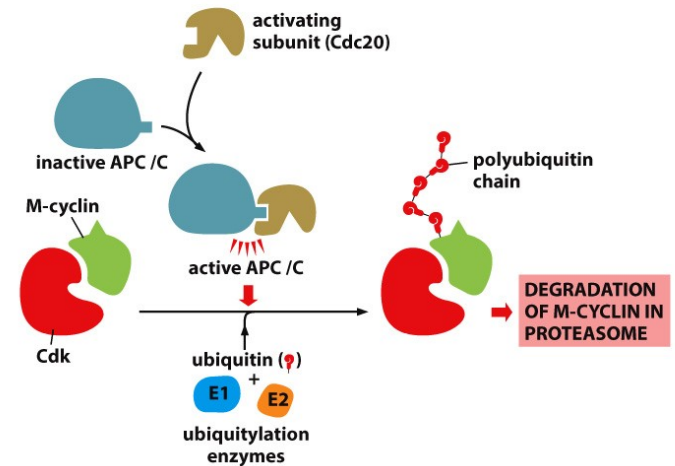


Figure 17-14 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

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

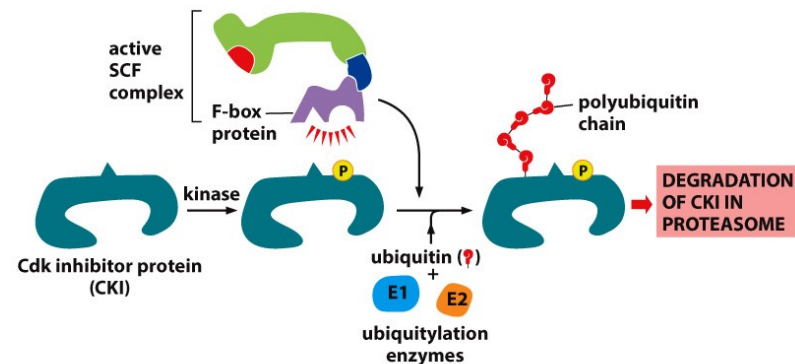


Figure 17-15 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

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

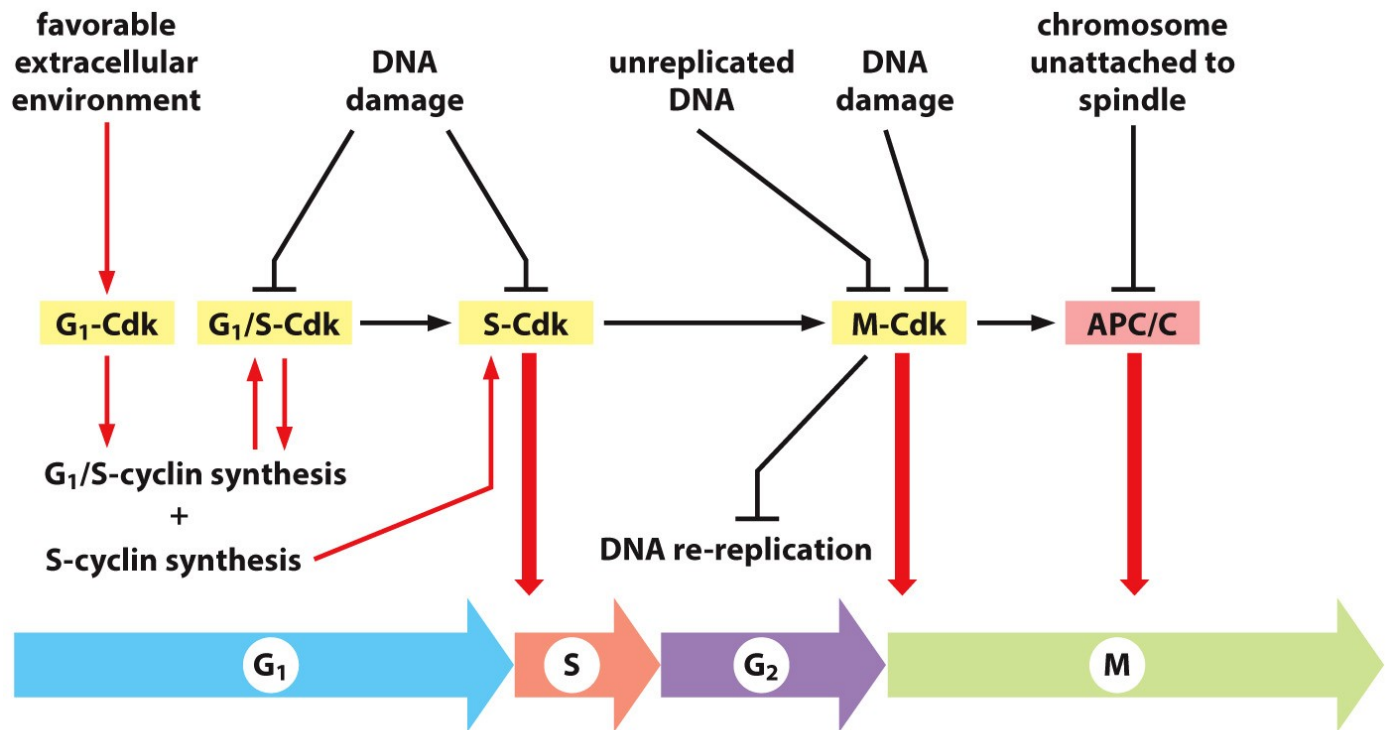


Figure 17-16 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

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

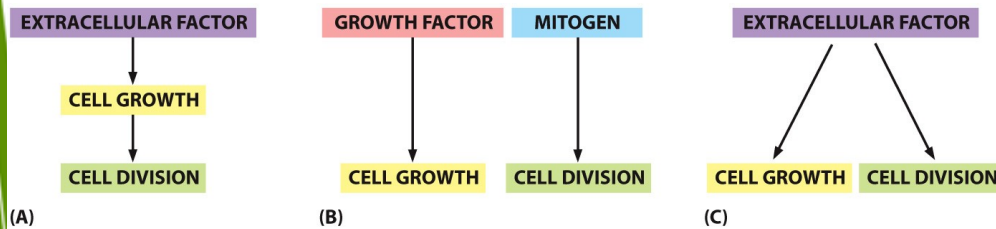


Figure 17-65 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

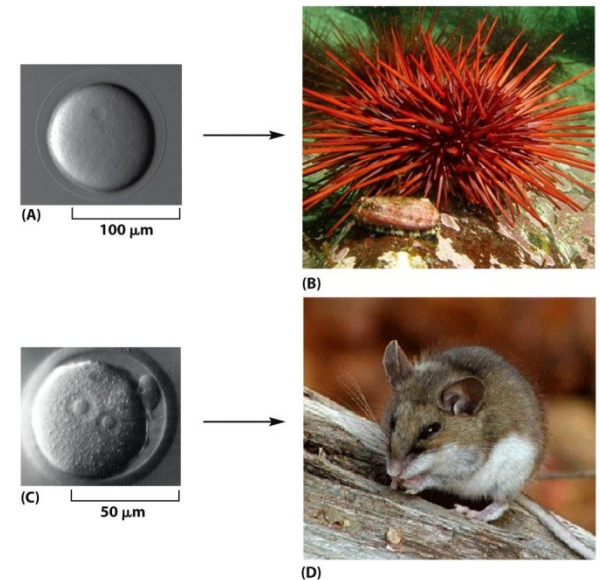


Figure 20-33 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

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- β 1
- 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)

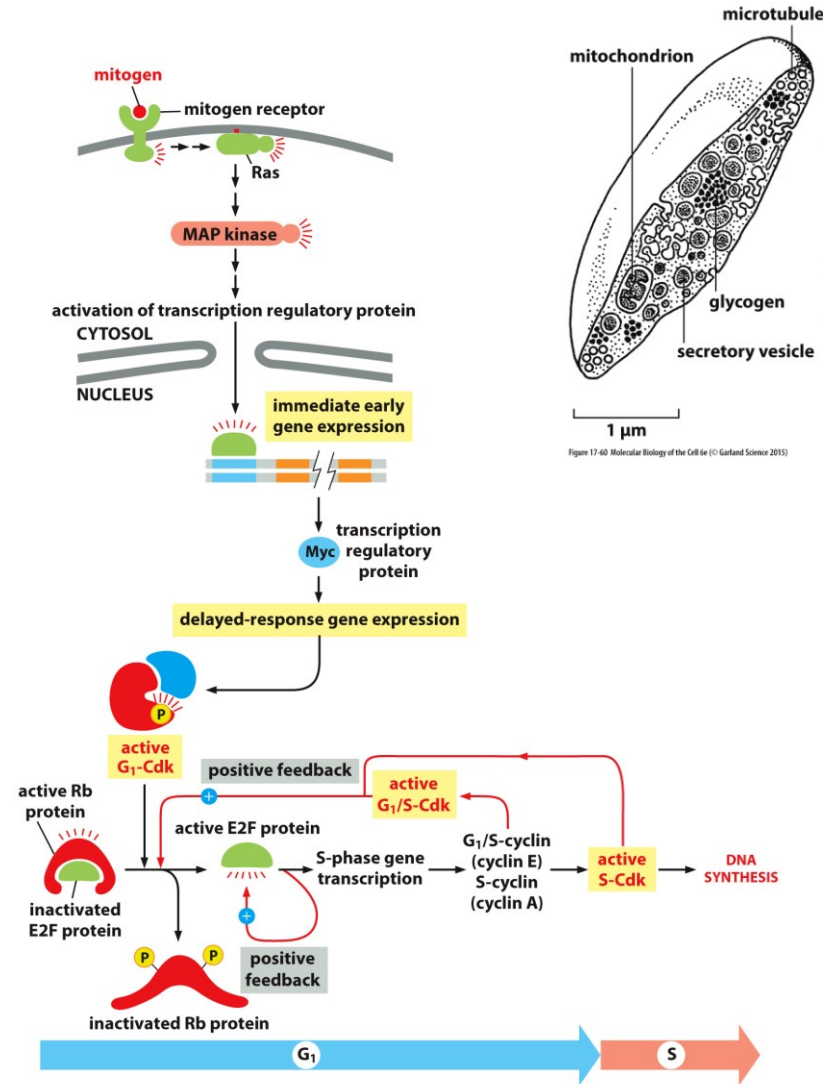


Figure 17-61 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

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

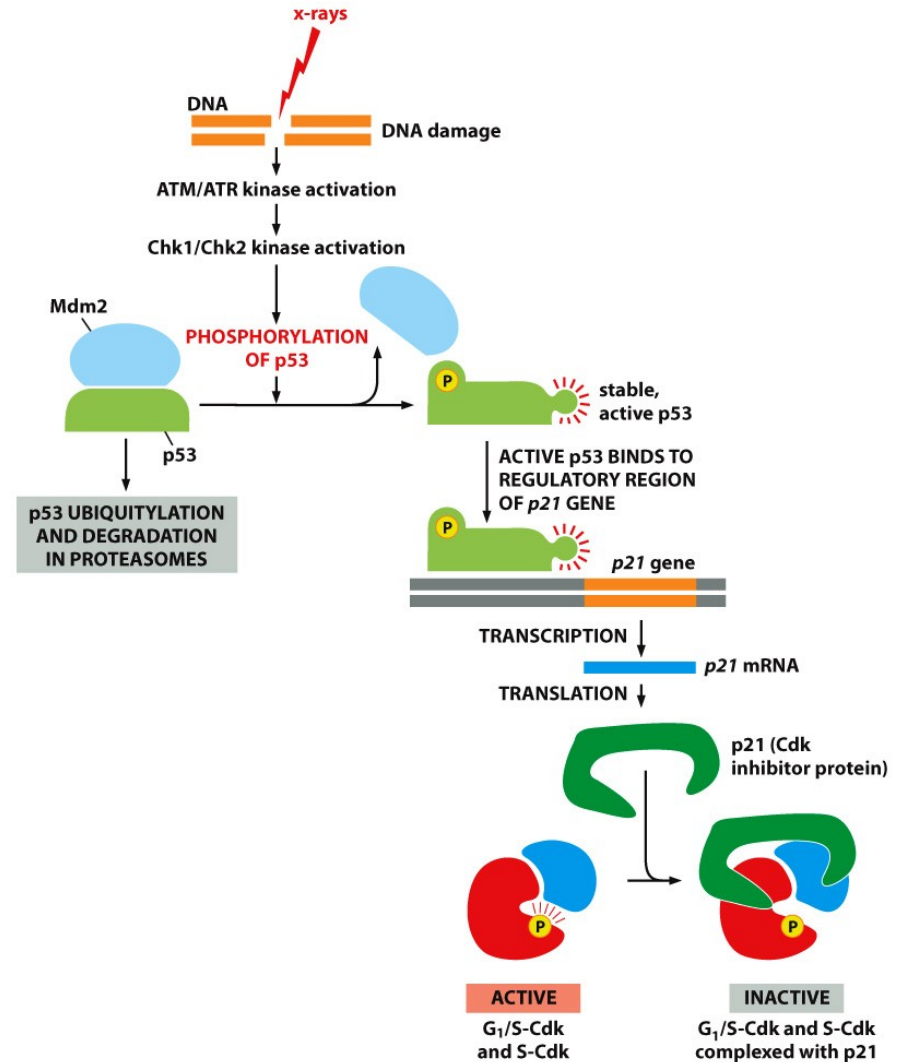


Figure 17-62. Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Zástava buněčného cyklu v případě nadměrné mitogenní stimulace

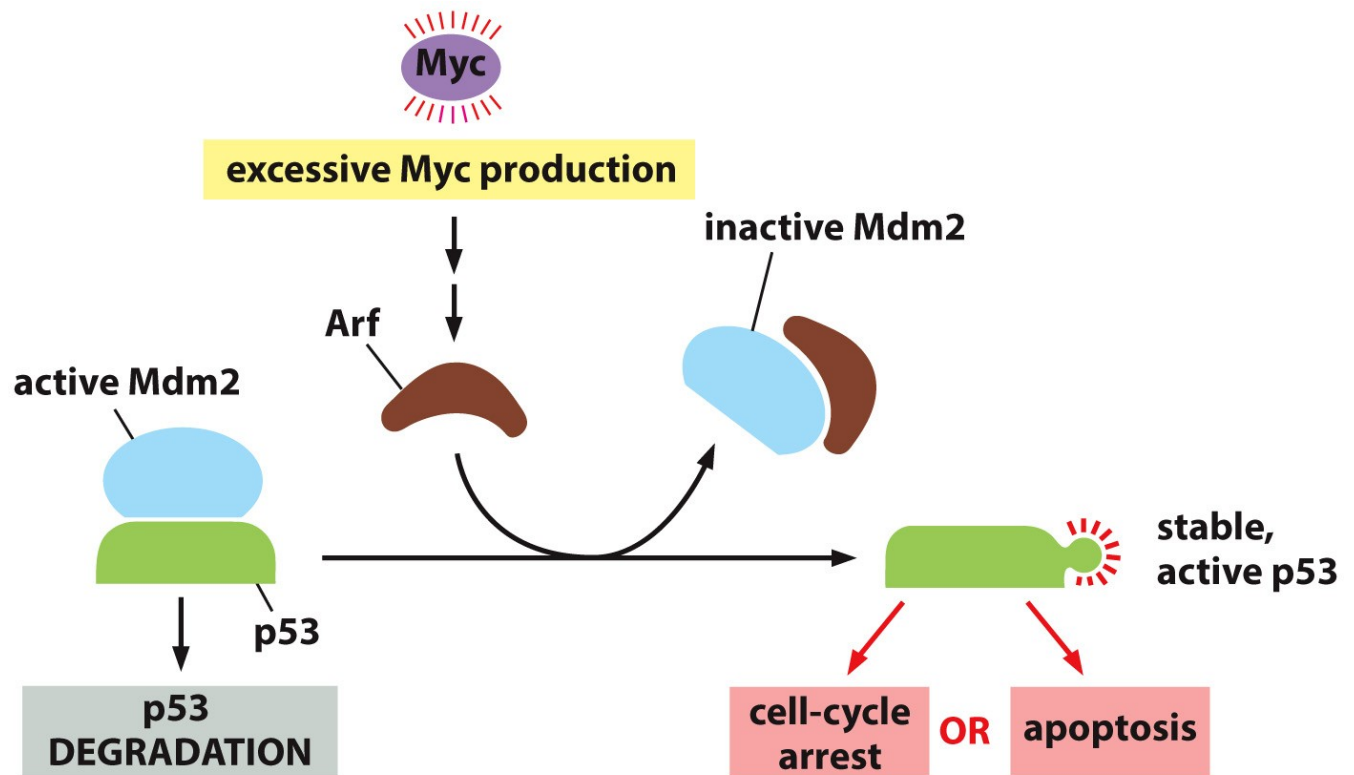


Figure 17-63 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Buněčná proliferace je doprovázena buněčným růstem

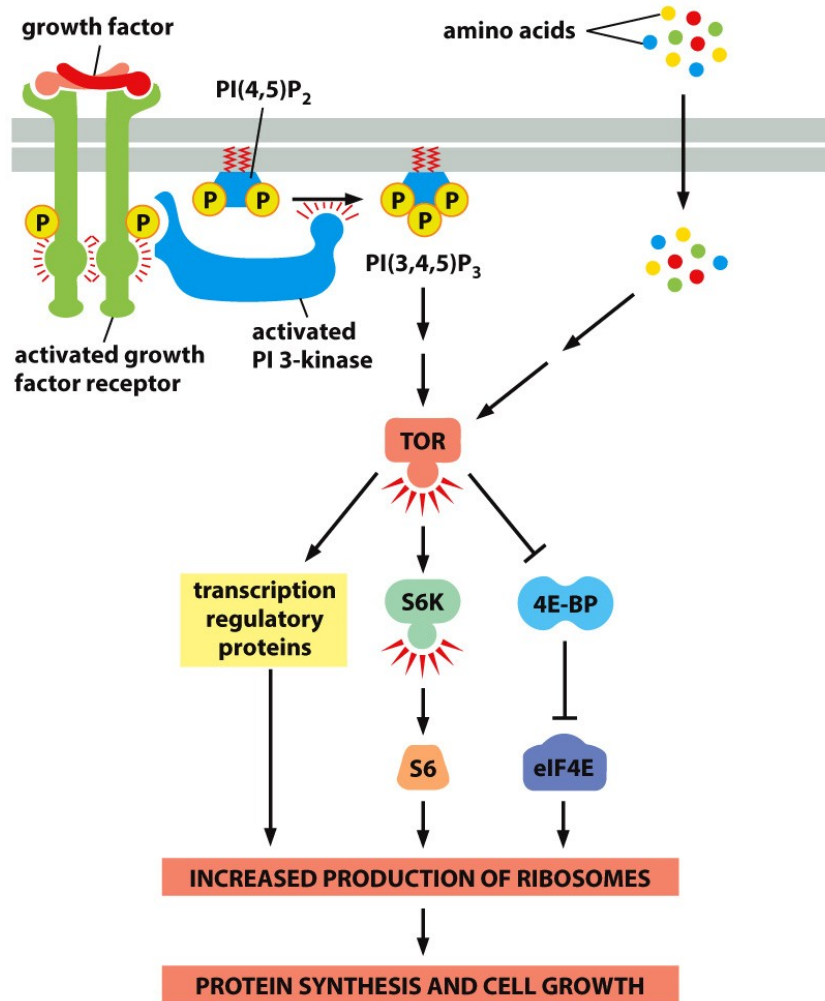


Figure 17-64 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

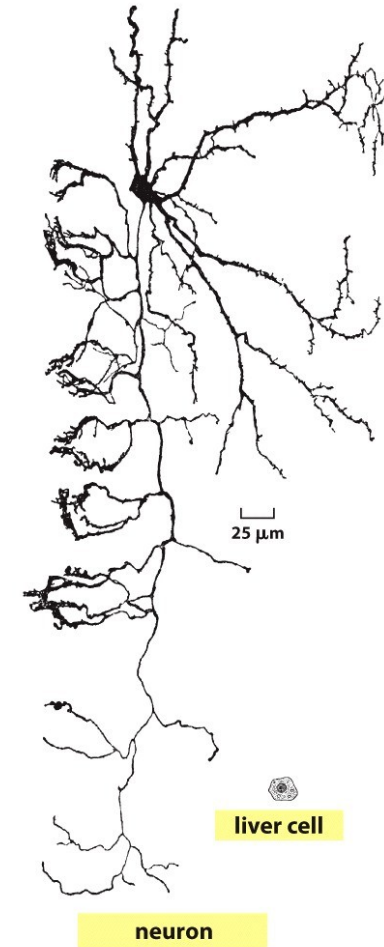
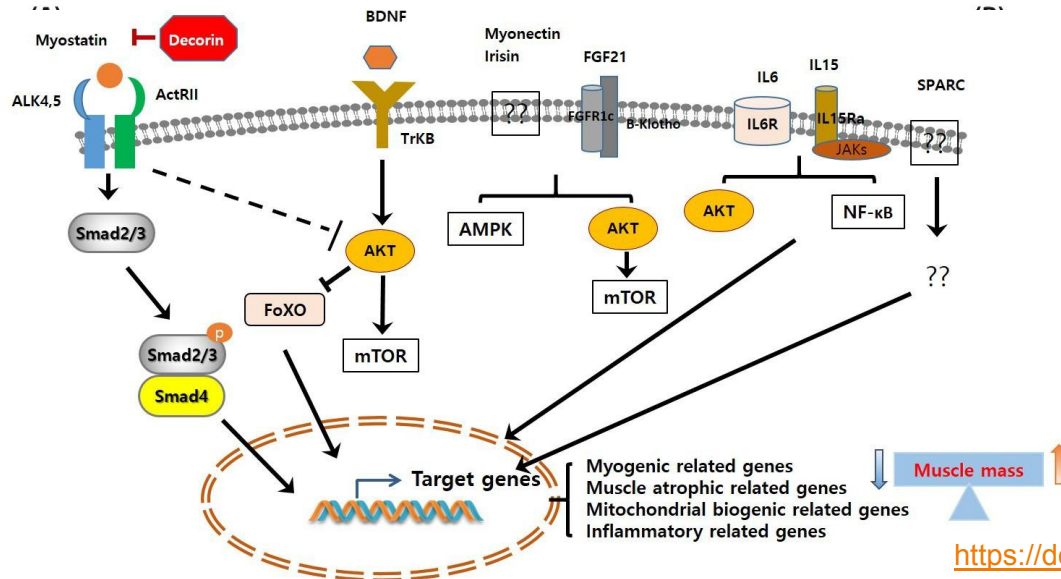
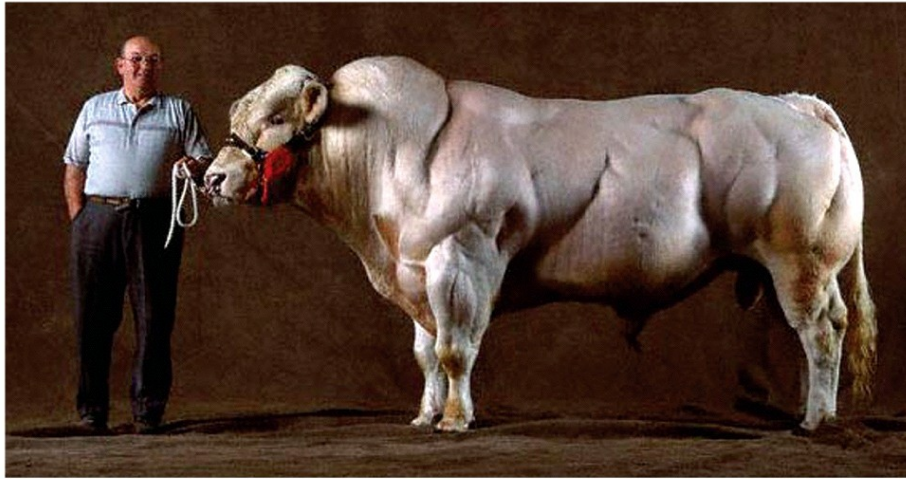


Figure 18-44 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

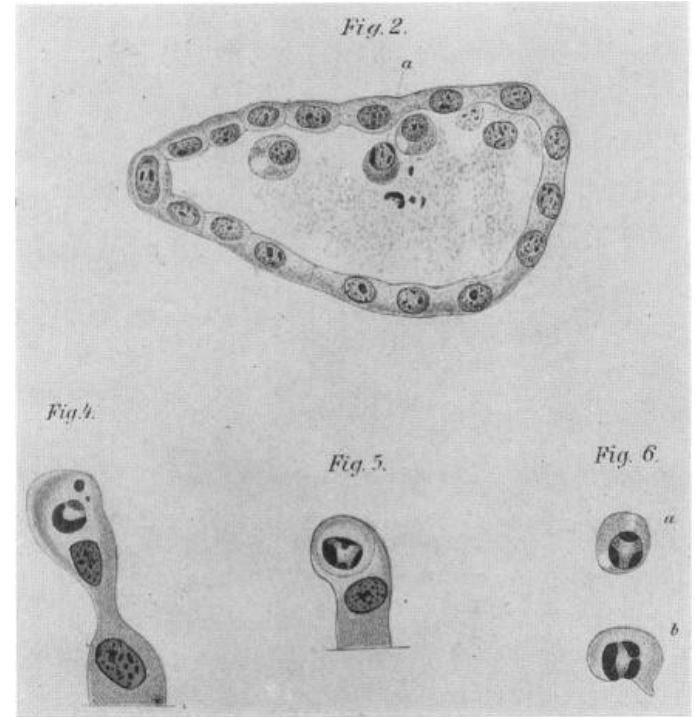
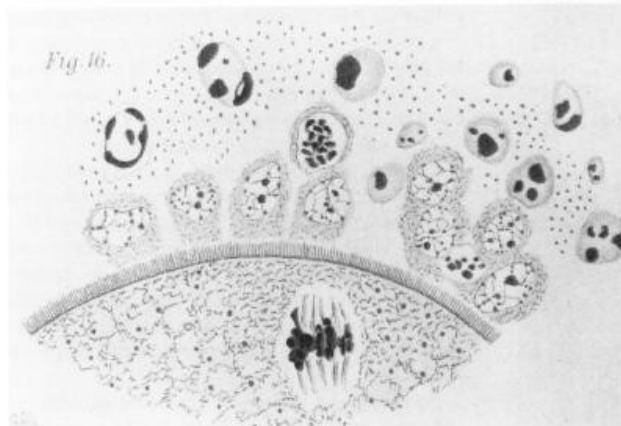
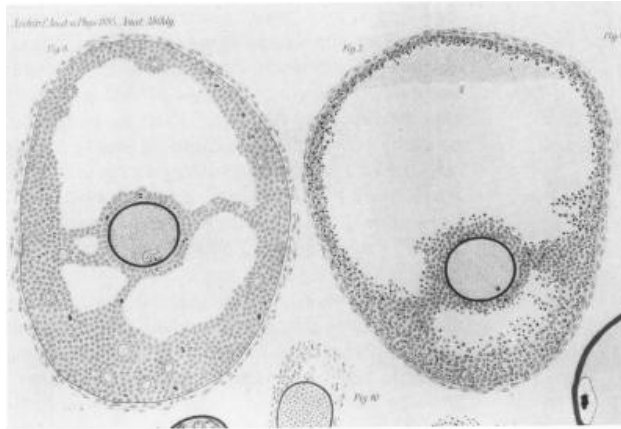
Buněčná proliferace je doprovázena buněčným růstem

Mutovaný gen myostatin





Buněčná smrt



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

Apoptosis 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

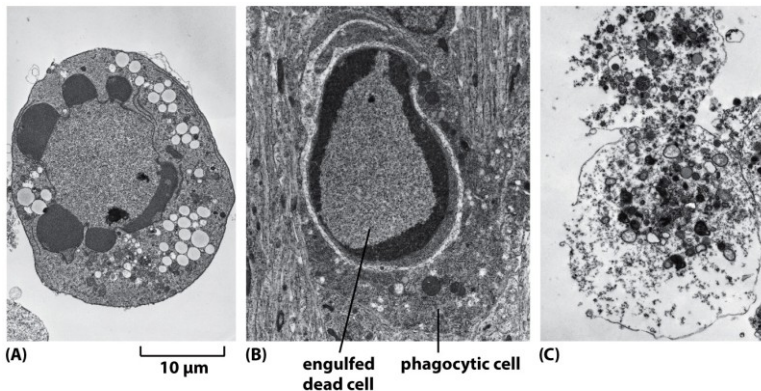


Figure 18-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

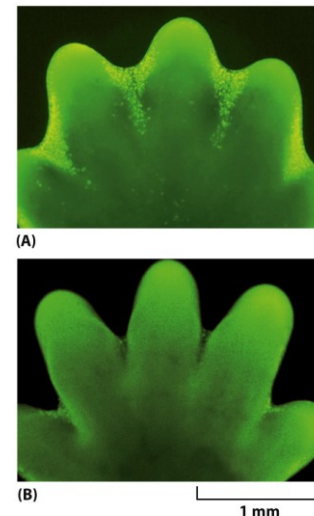


Figure 18-2 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



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

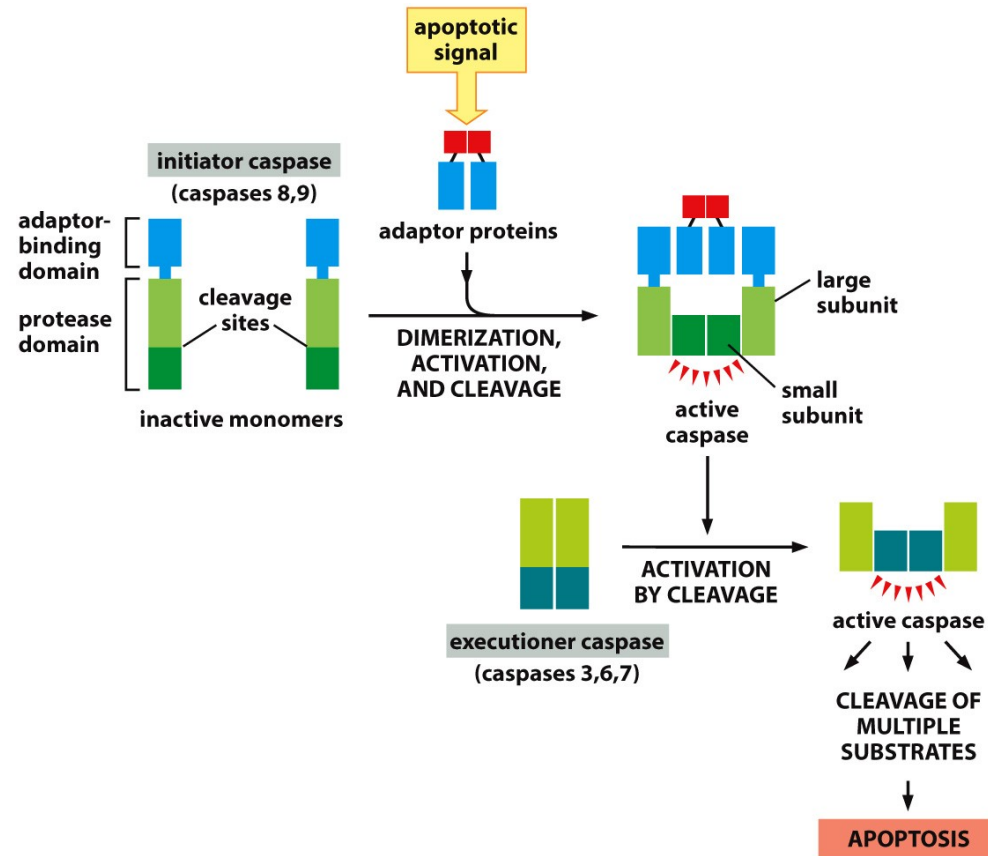


Figure 18-3 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Fragmentace DNA během apoptózy

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

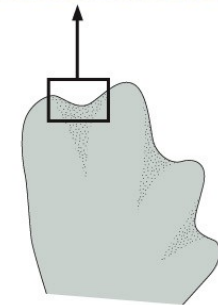
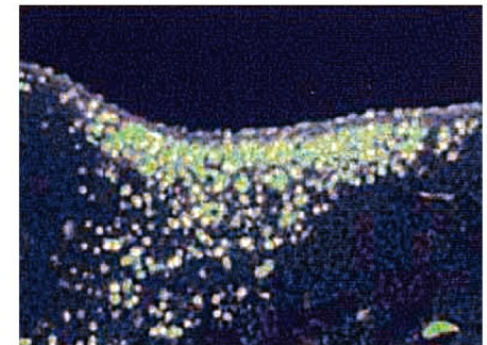
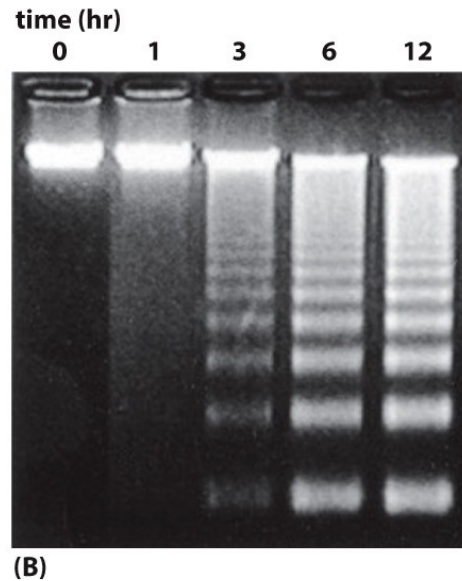
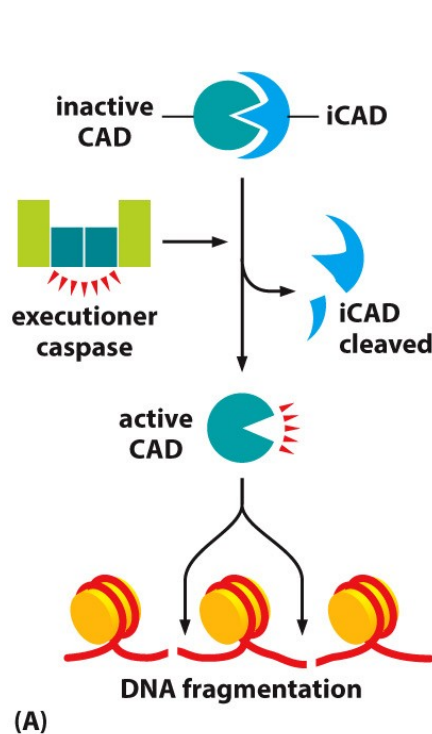


Figure 18-4 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

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

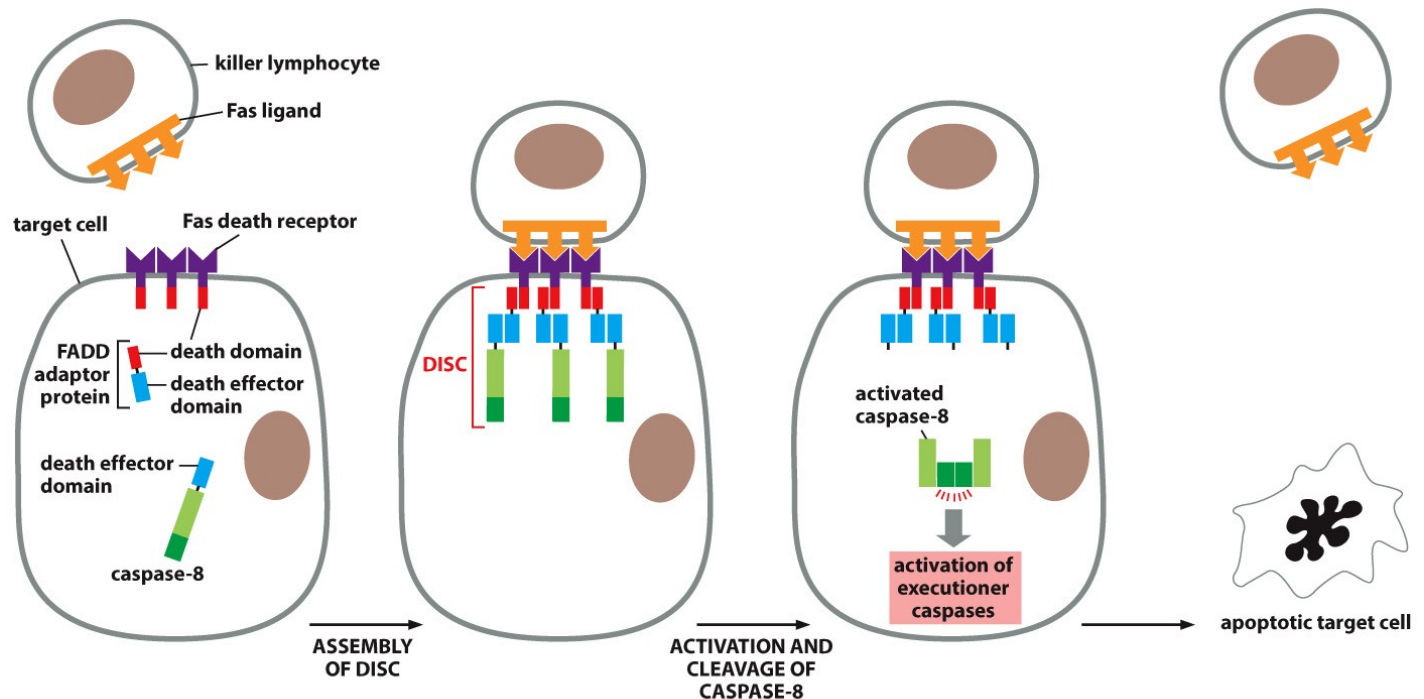


Figure 18-5 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Role mitochondrií ve vnitřní dráze apoptózy

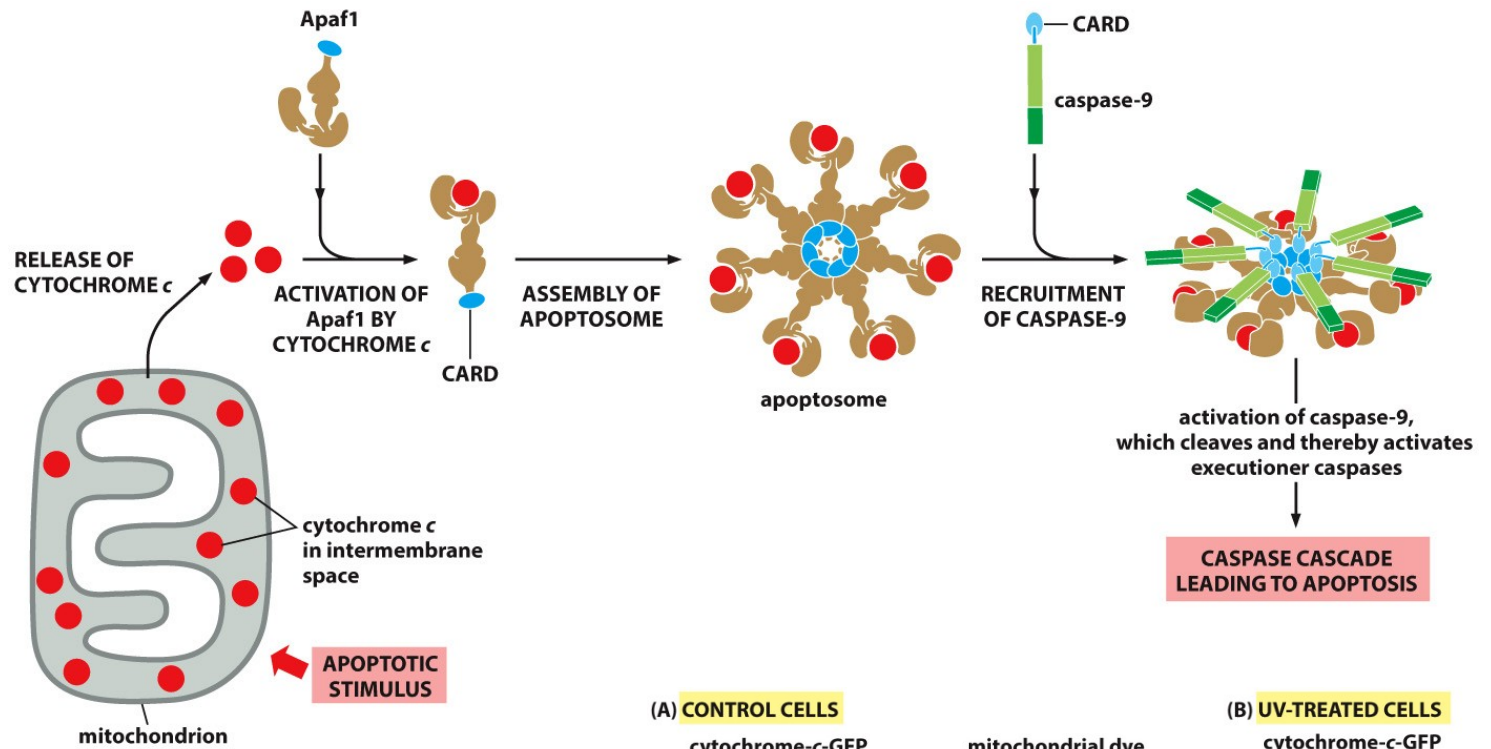


Figure 18-7 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

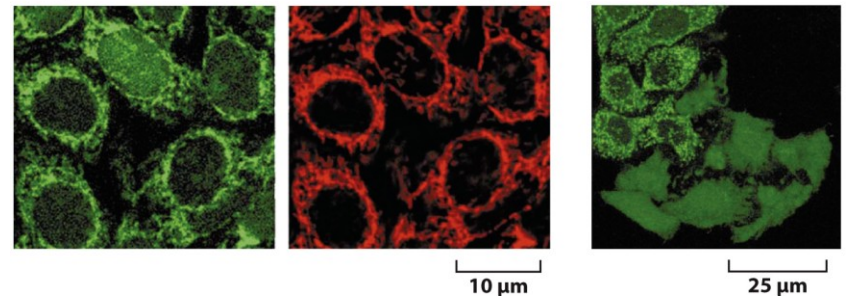


Figure 18-6 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Bcl-2 rodina

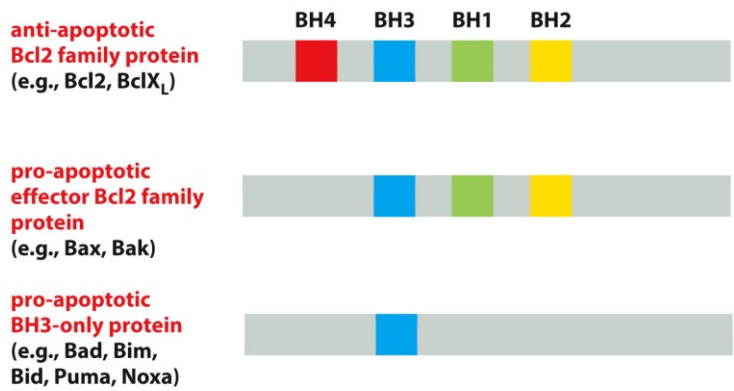


Figure 18-8 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

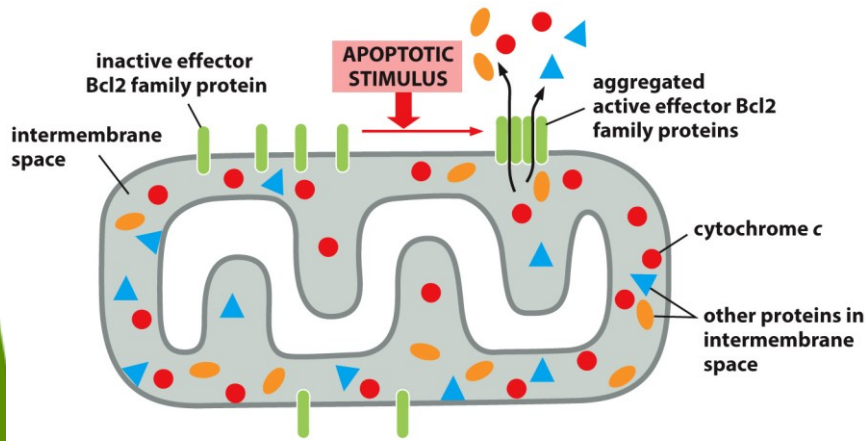


Figure 18-9 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

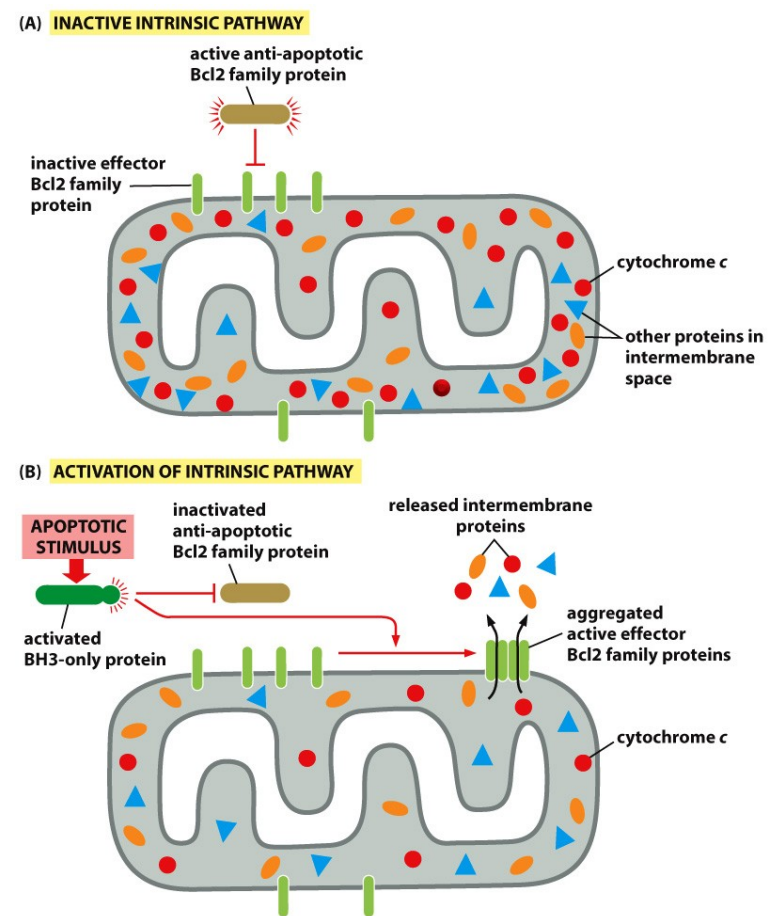


Figure 18-10 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Role extracelulárních „survival“ faktorů v inhibici apoptózy

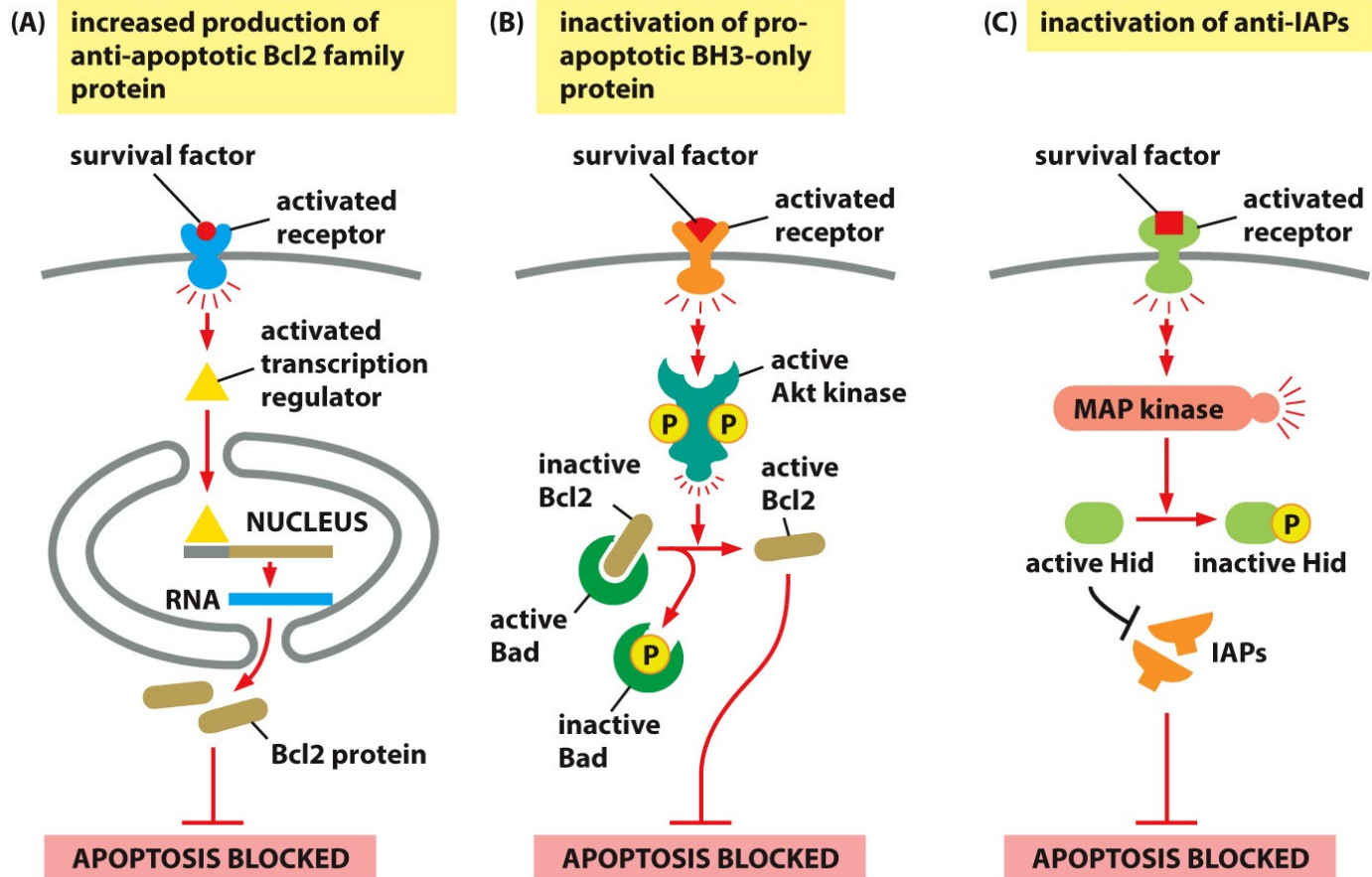


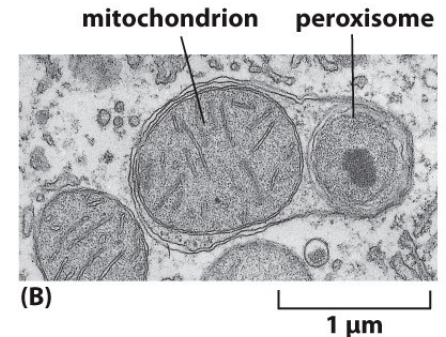
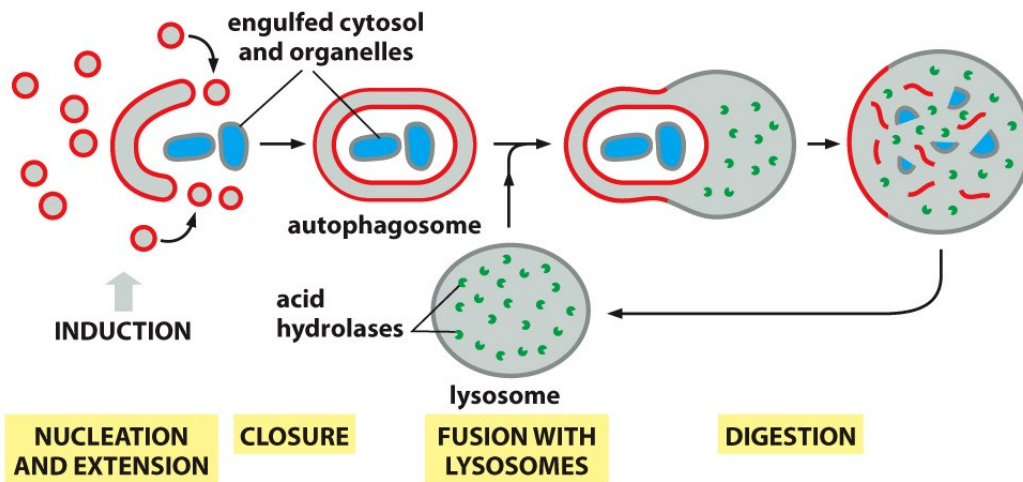
Figure 18-12 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Autofagie

Yoshinori Ohsumi, 2016



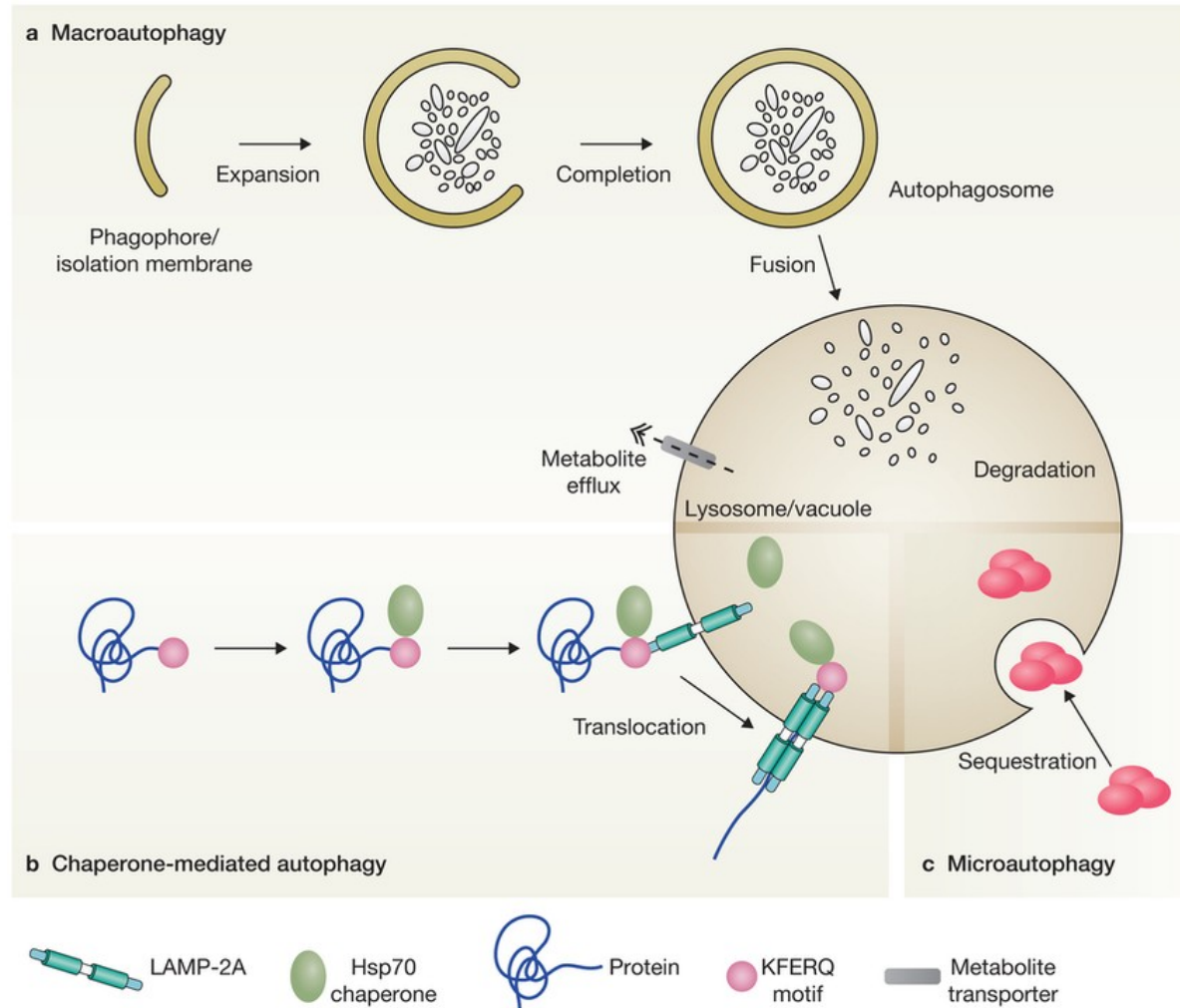
- Degradční proces – normální během vývoje, diference, adaptace na stres (hladovění, infekce)
- Neselektivní vs. selektivní (např. mitofagie)



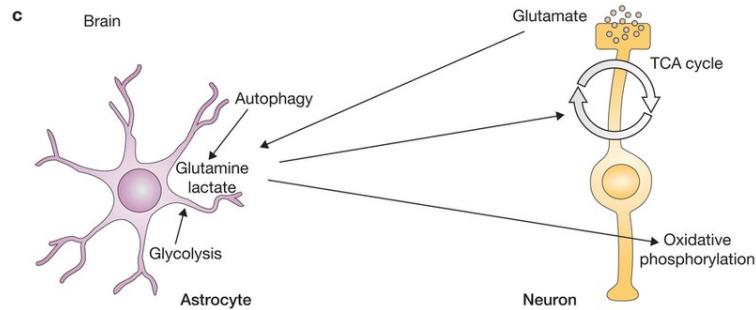
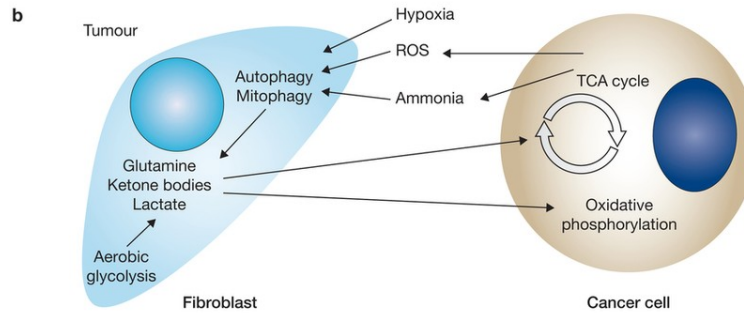
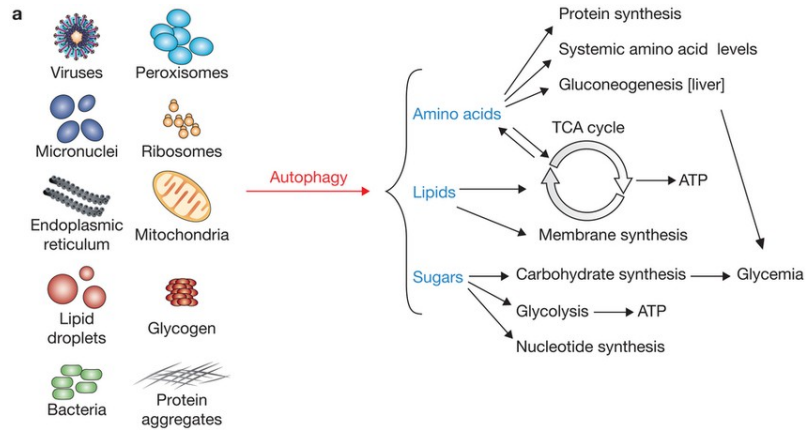
(A)

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

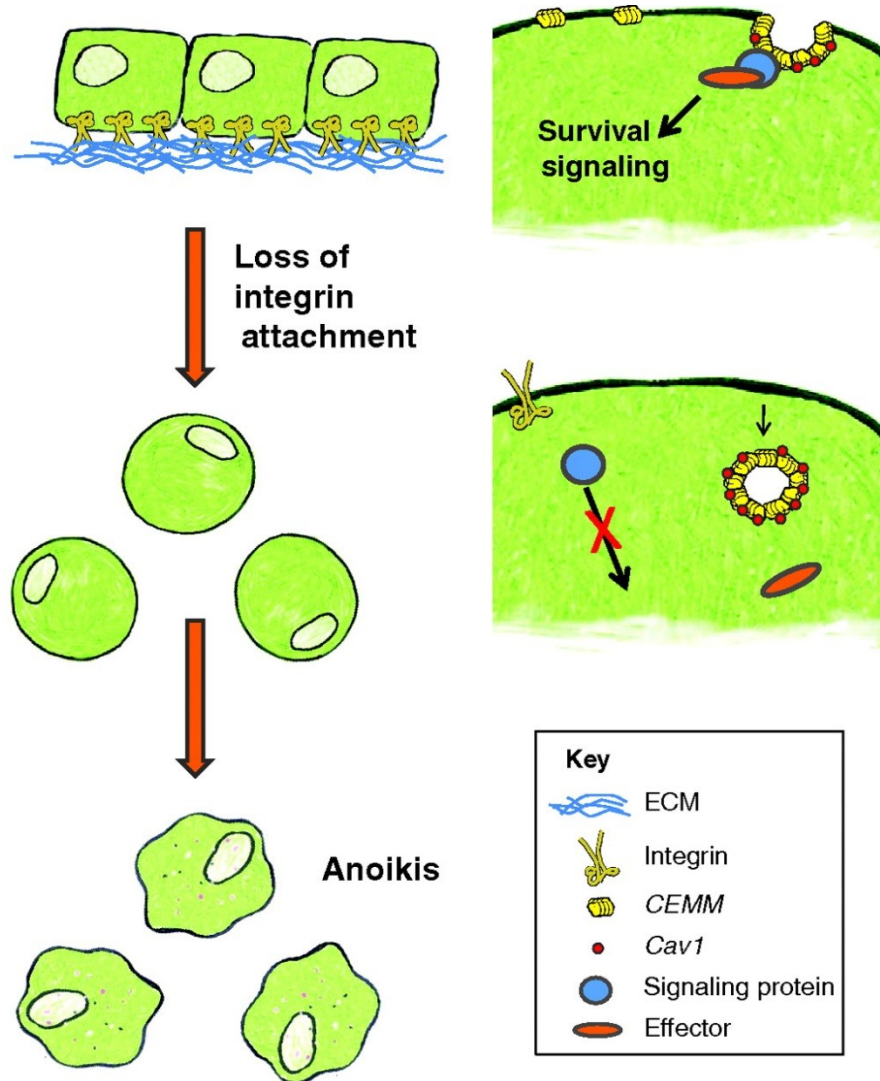
Typy autofagie



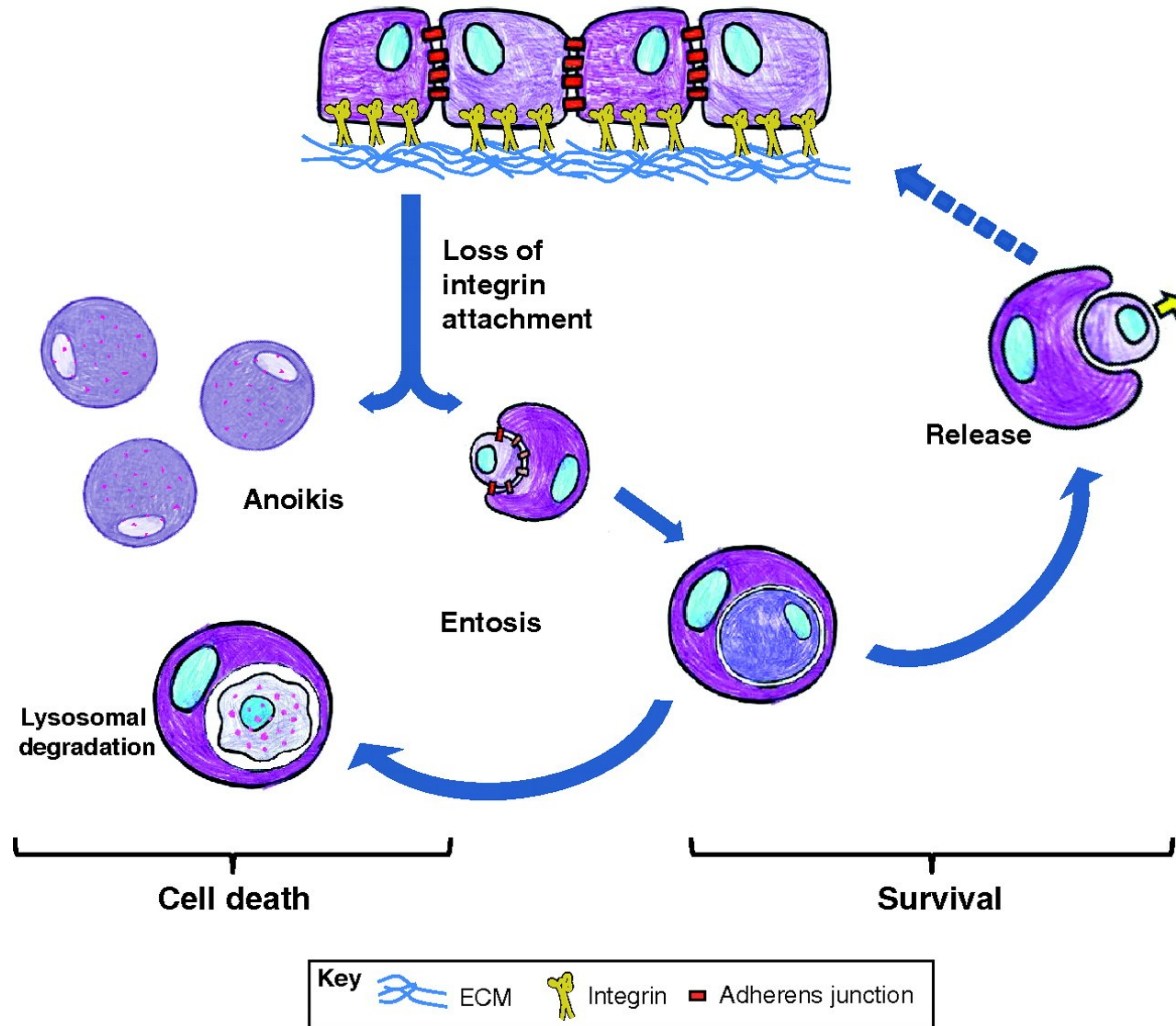
Autofagie a metabolismus



Anoikis (cell-detachment-induced apoptosis)



Entóza



Diferenciace, obnova tkání, kmenové buňky

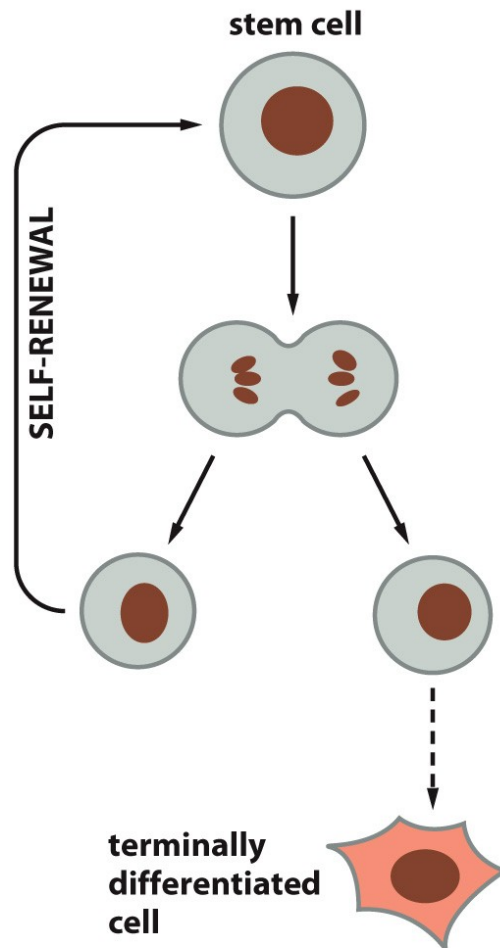


Figure 22-3 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

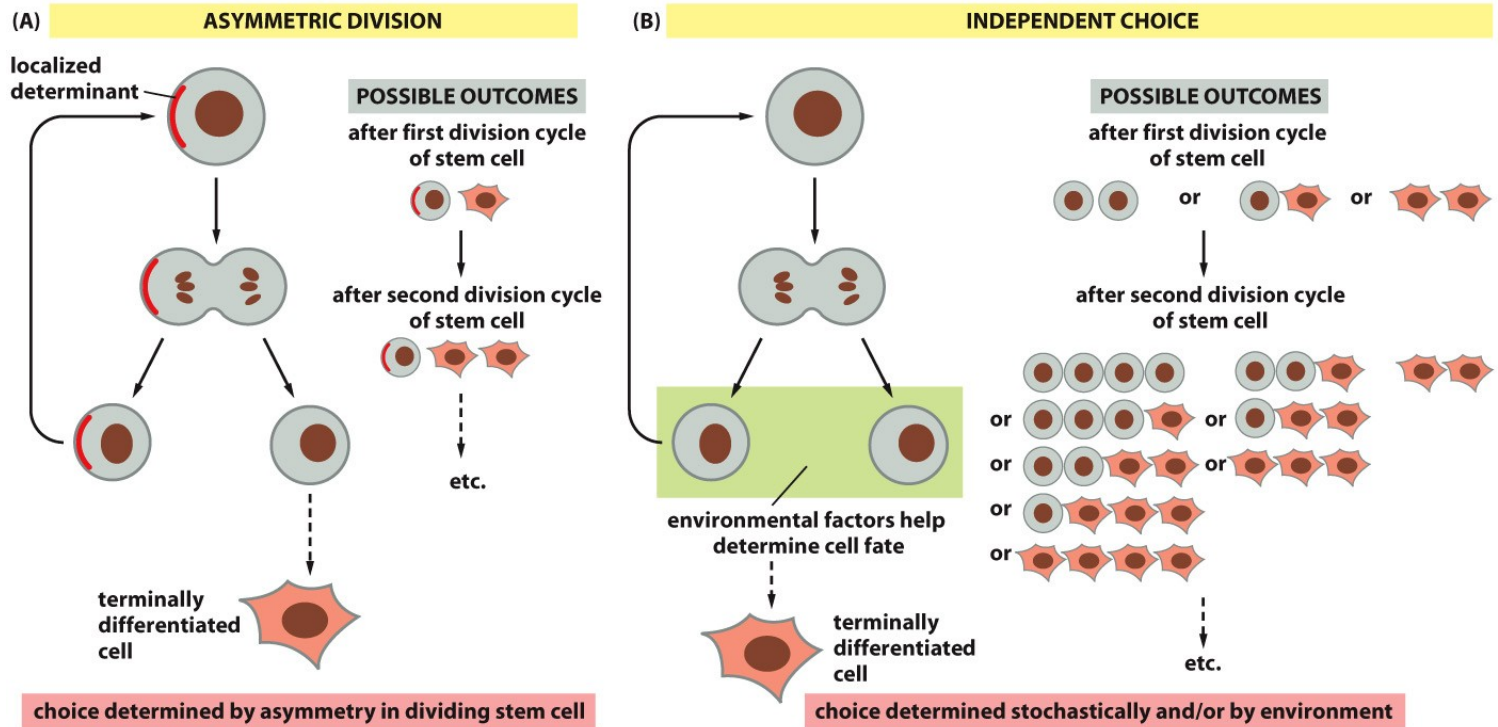


Figure 22-7 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Střevní epitel

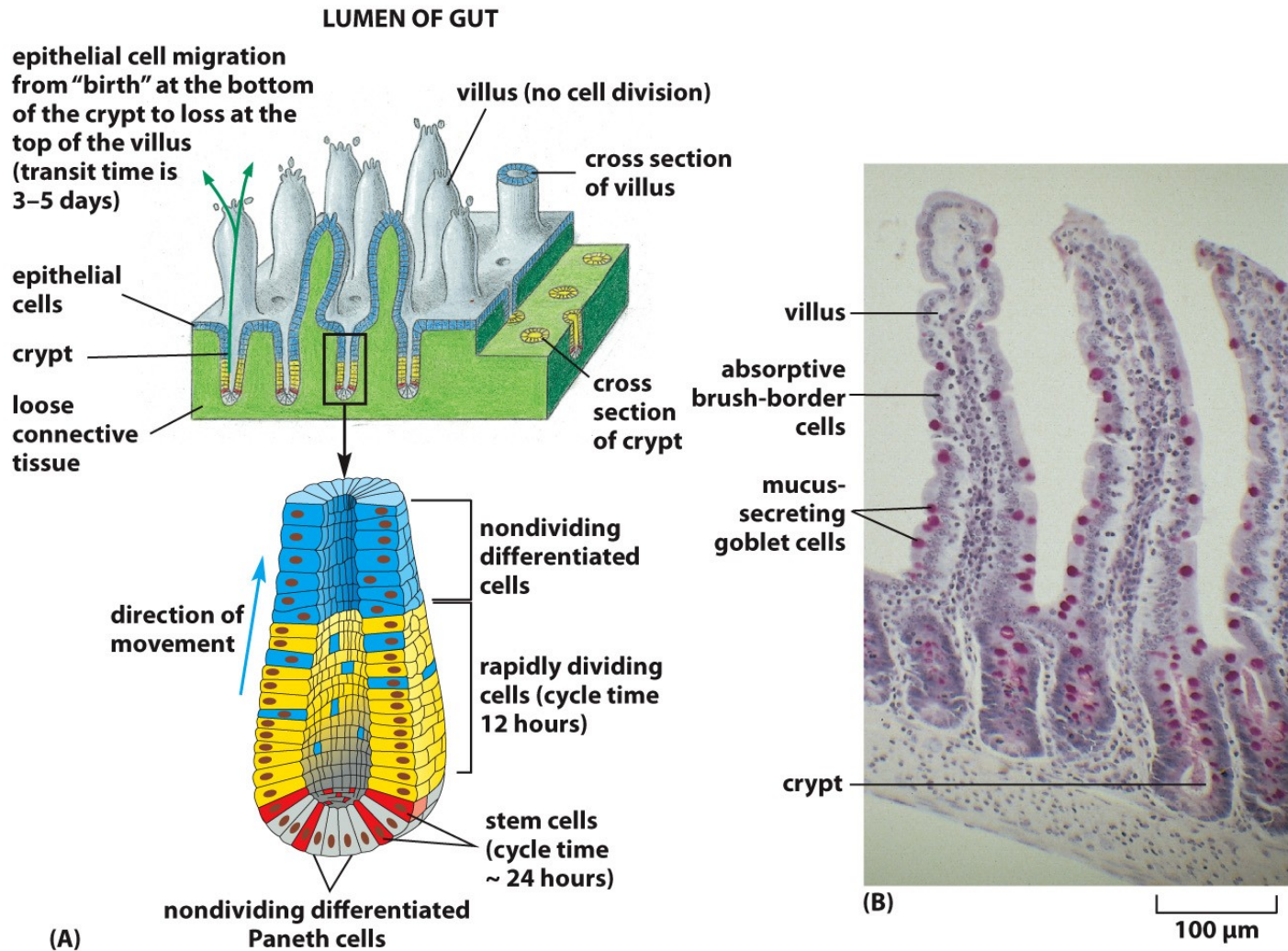
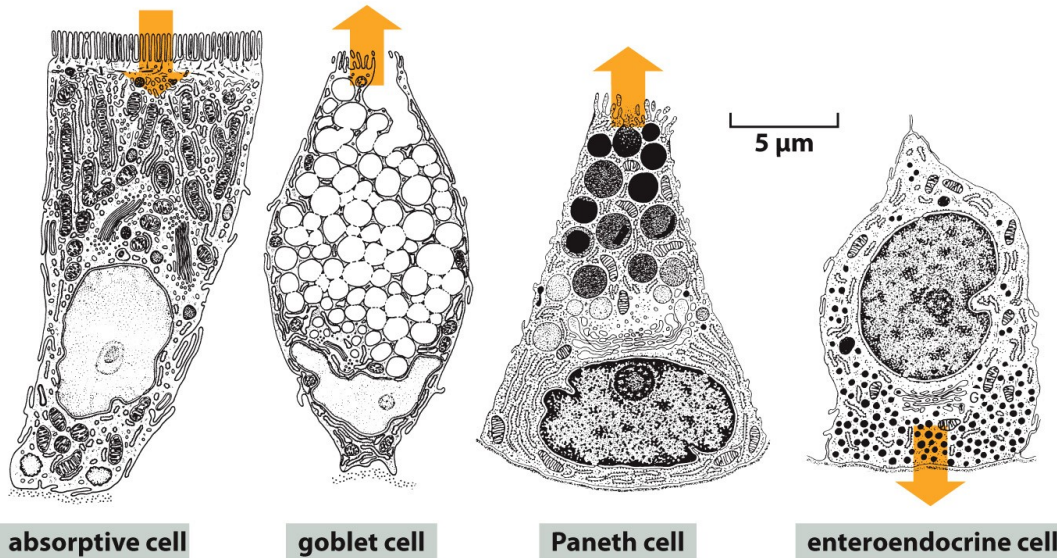


Figure 22-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

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

Clevers group: The intestinal Crypt

➤ <https://www.youtube.com/watch?v=NIT1VYqMzgc>



Hans Clevers (Hubrecht I., UU) 1: Discovery and Characterization of Adult Stem Cells in the Gut

<https://www.youtube.com/watch?v=HgVivkoA7UA>

Notch & Wnt signálizace udržuje kmenovost a řídí diferenciaci střevního epitelu

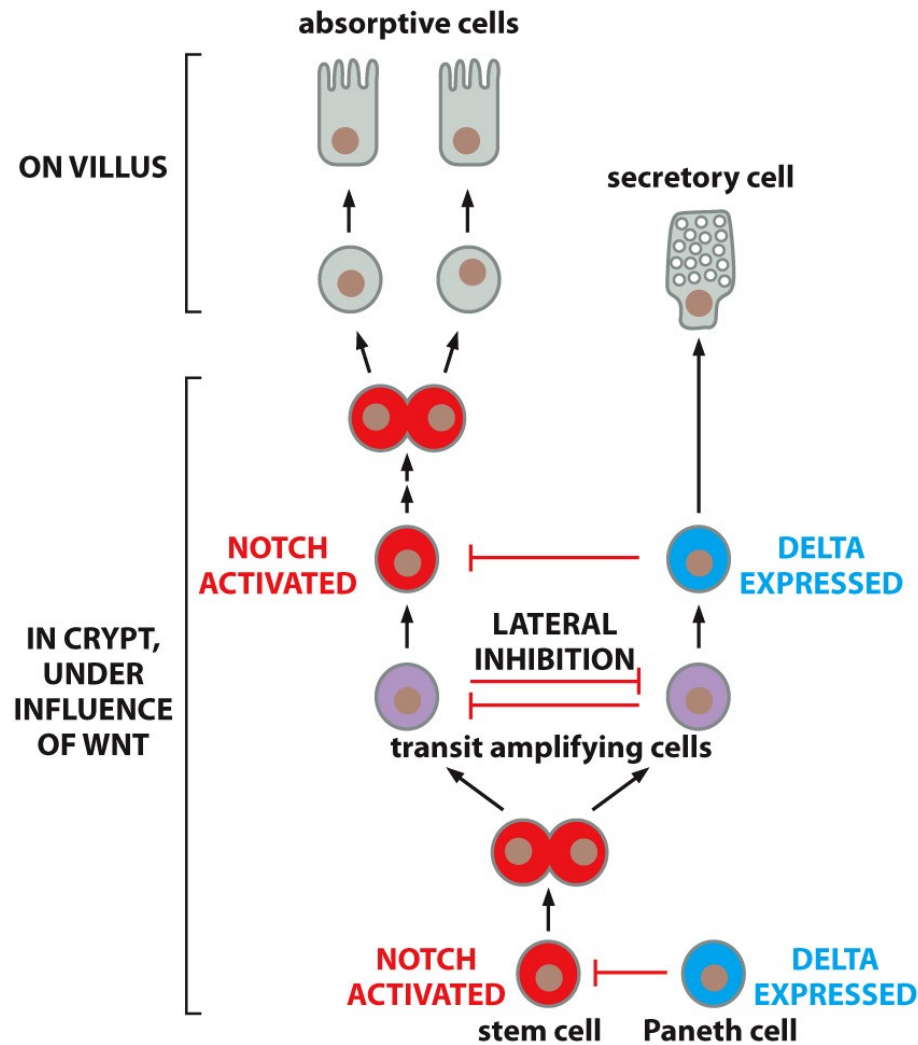
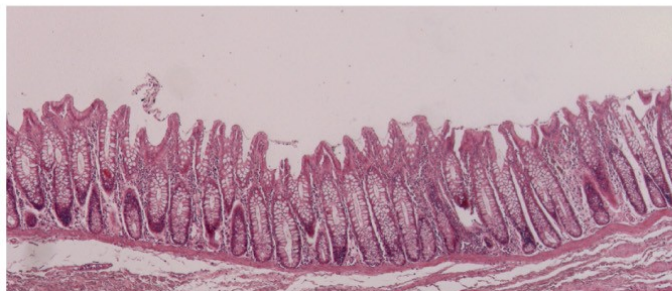
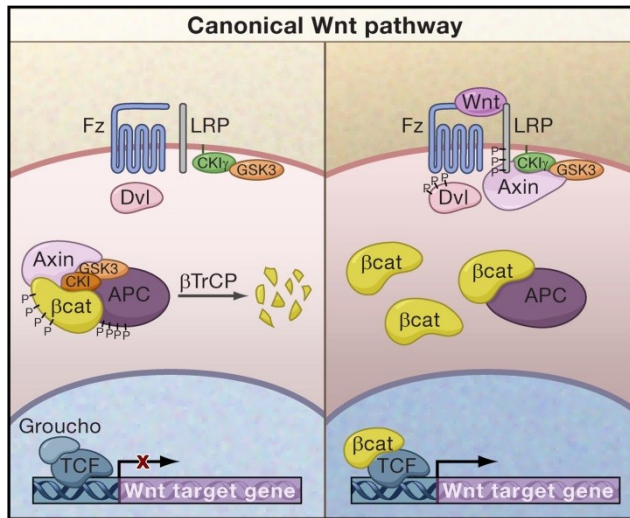


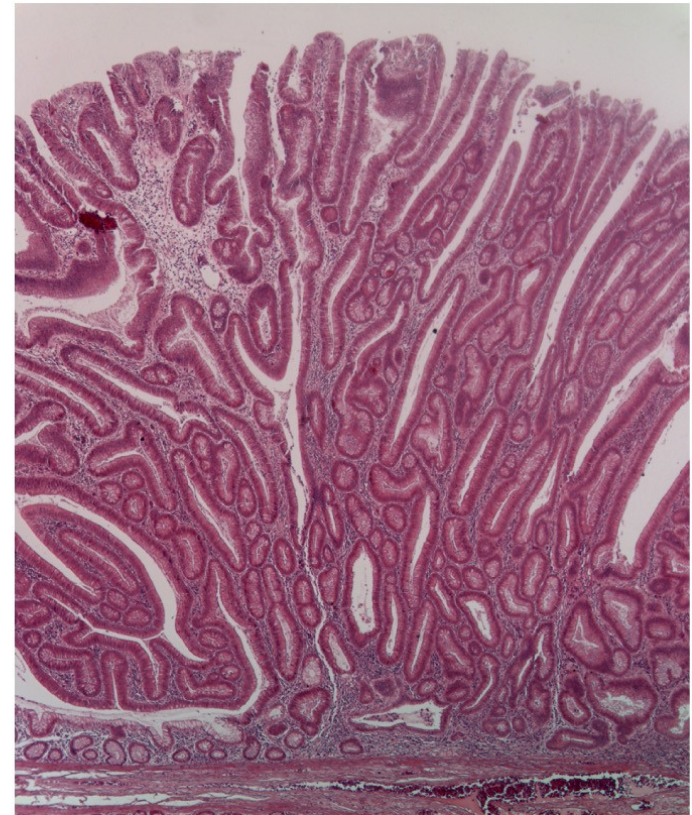
Figure 22-9 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Adenom střeva

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



NORMAL COLON



ADENOMA

200 μm

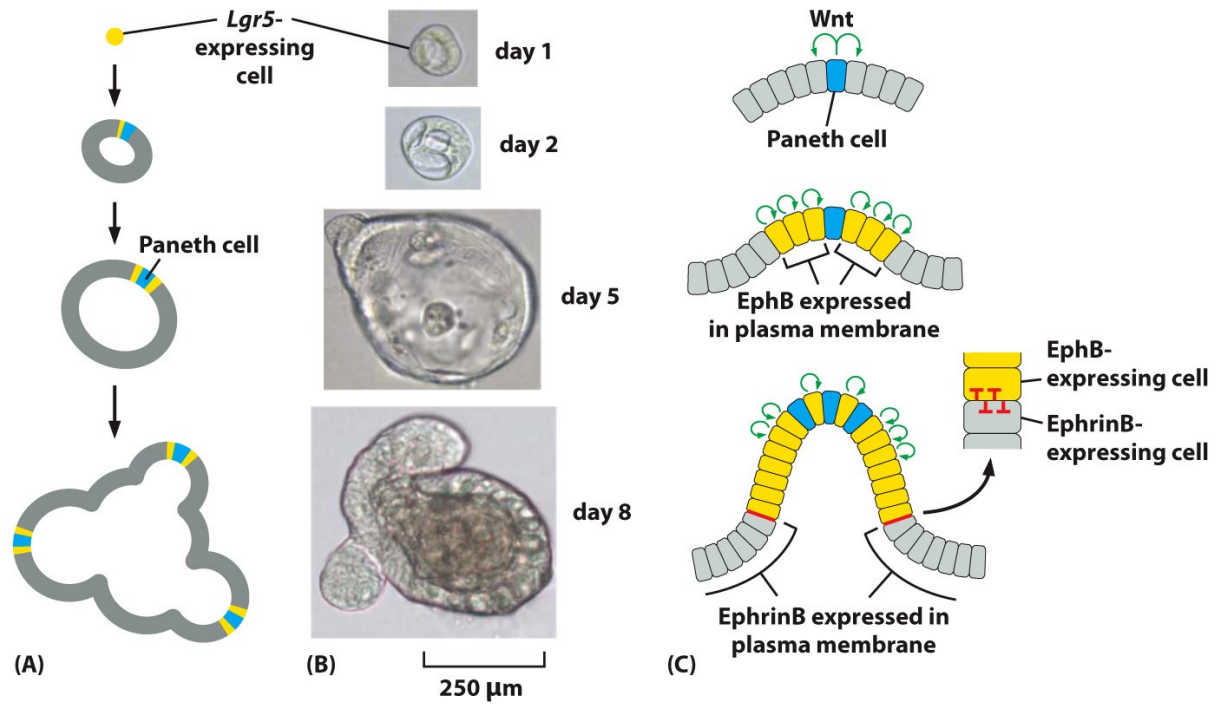


Figure 22-8 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

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



<https://www.youtube.com/watch?v=XddaxQcFOs8>

Hematopoéza – hierarchický systém

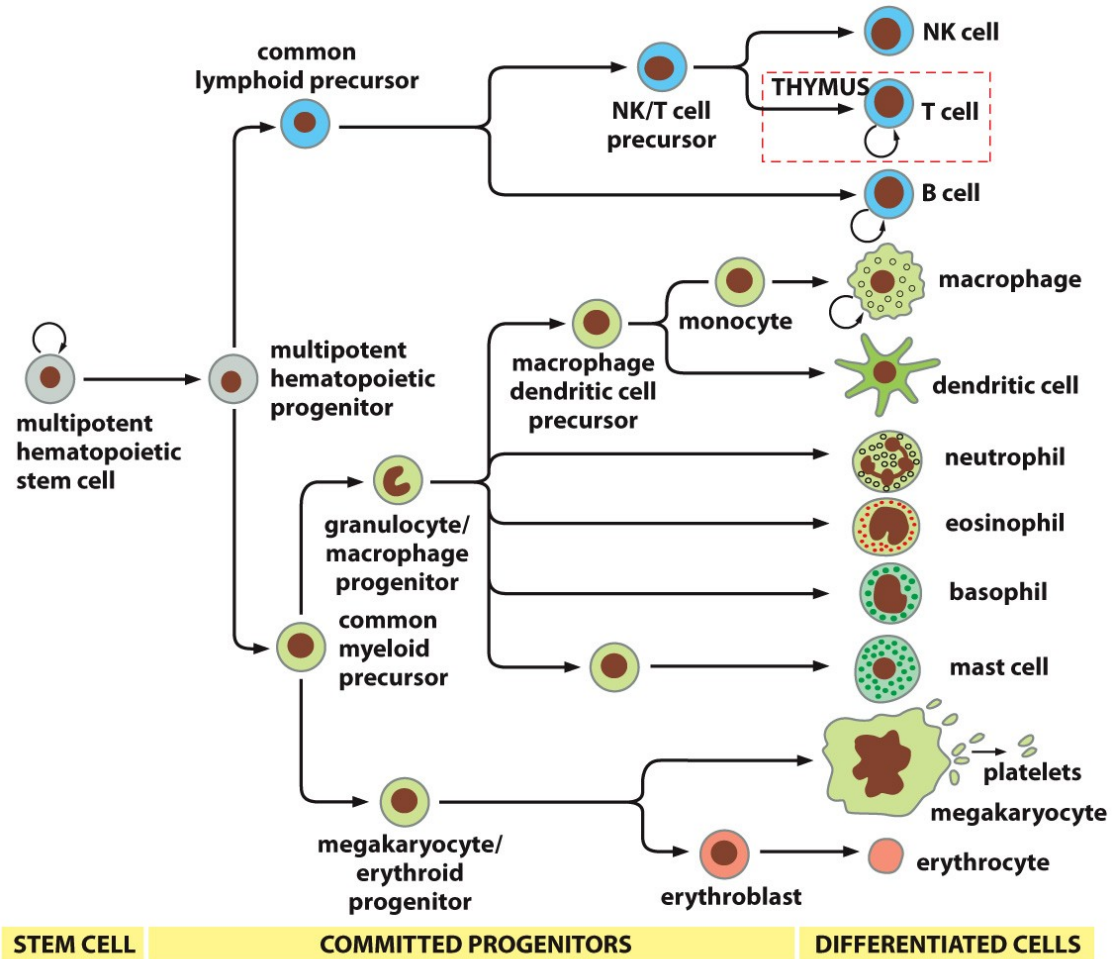
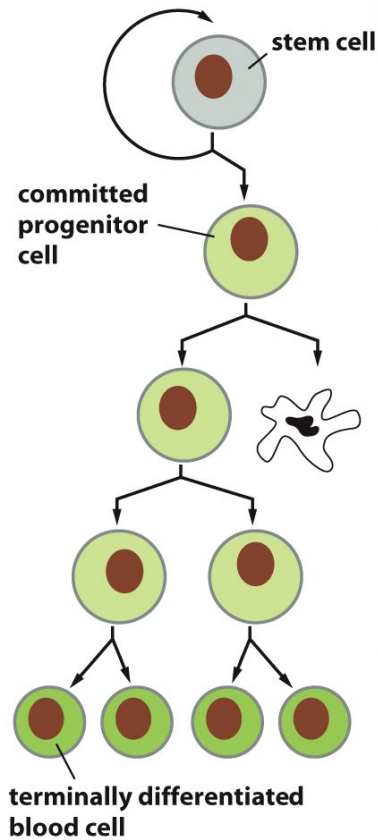


Figure 22-31 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Regulace

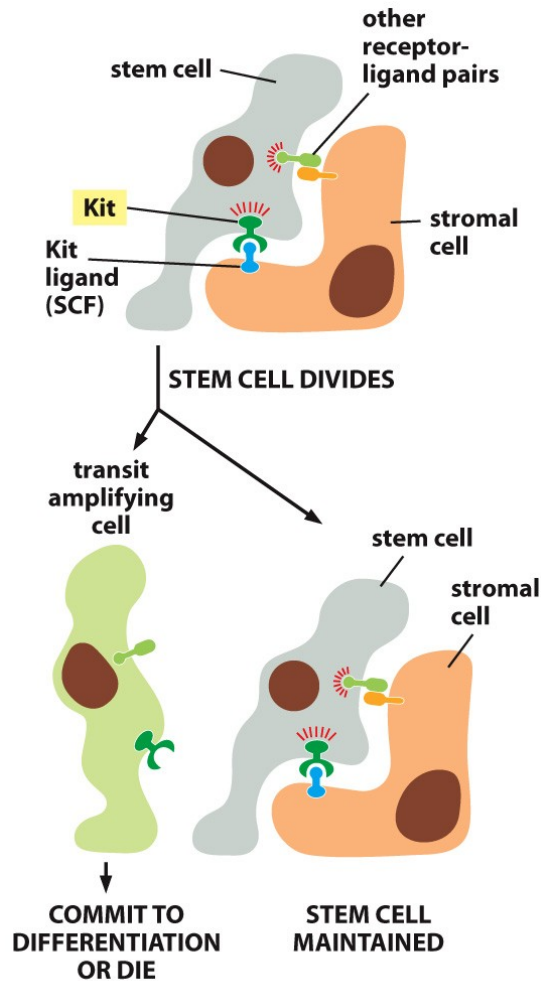


CONTROLLABLE PARAMETER

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



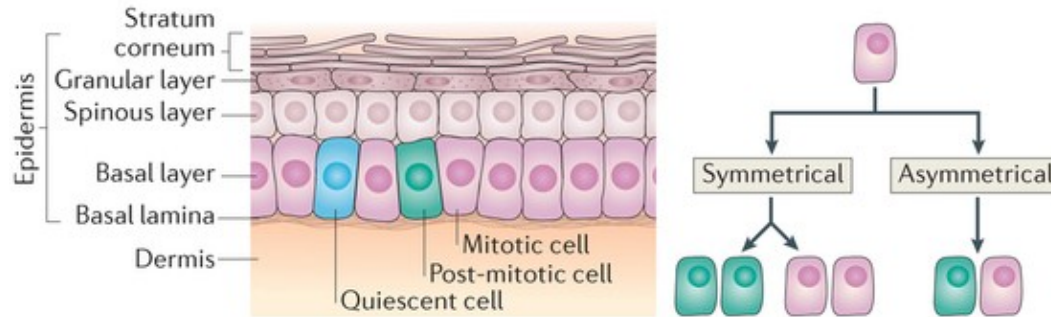
c-kit receptor – CD117,
receptorová tyrosin kináza

SCF – stem cells factor,
cytokin

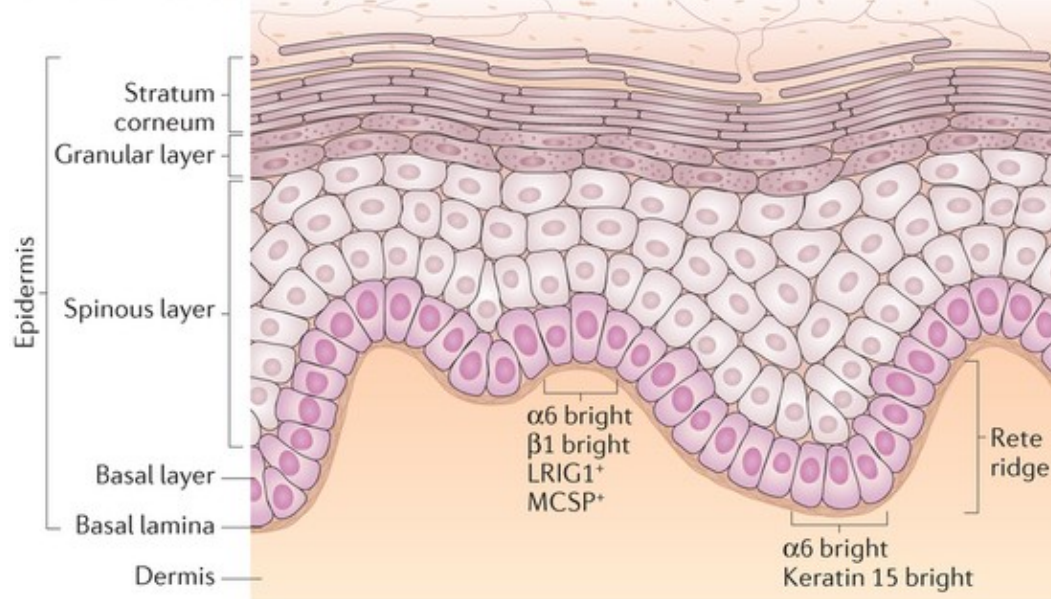
Figure 22-32 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Obnova epidermis

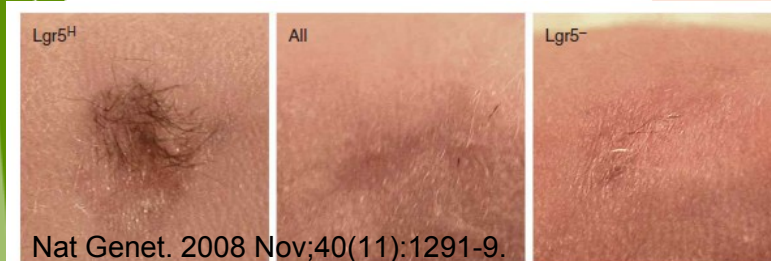
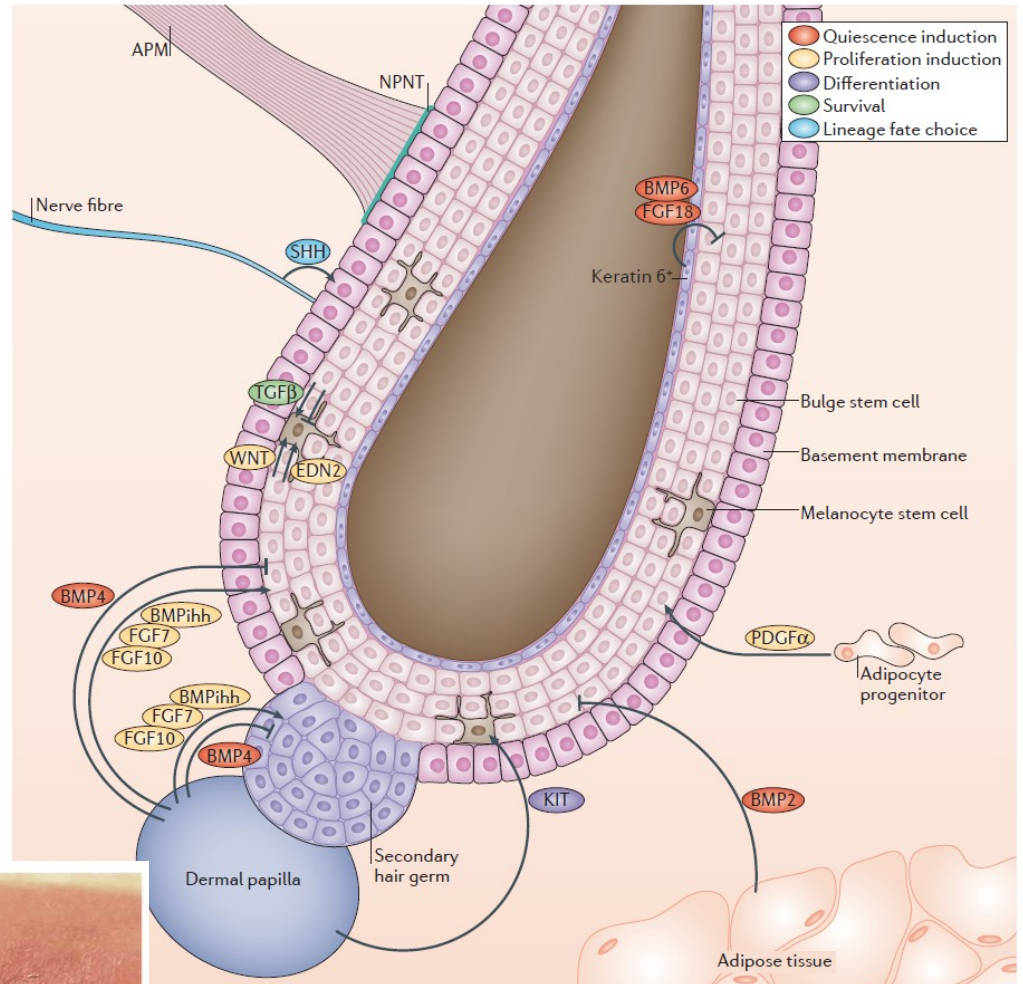
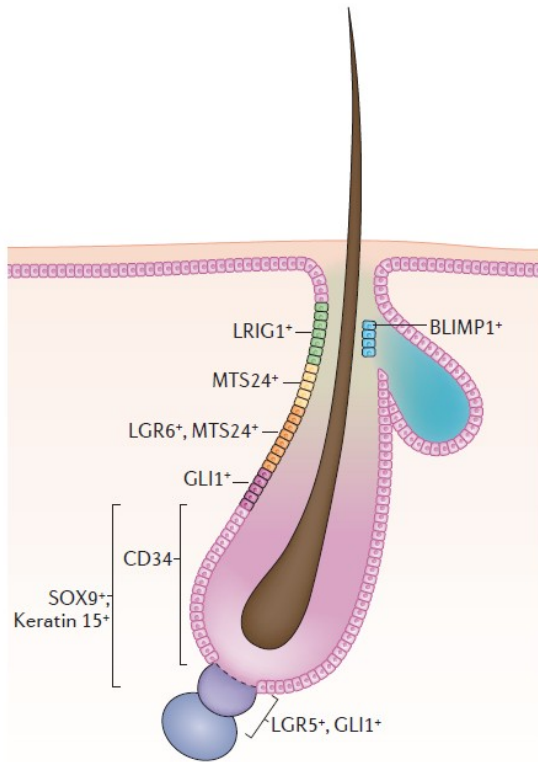
a Mouse interfollicular epidermis



b Human interfollicular epidermis








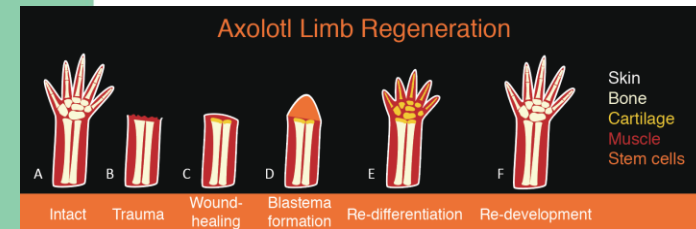
Kmenová buňka vlasového folikulu



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

Regenerace

Animal		What they regenerate
Invertebrates	Flatworm	 Any part of their bodies, including their heads!
	Sea star	 Limbs and even their whole bodies if their central nerve ring is intact.
Vertebrates	Axolotl	 Limbs and spine.
	Frog	 Tadpoles can regenerate limbs but lose this ability in adulthood.
	Human	 Adult human regeneration is largely limited to skin and liver cells.



<http://sitn.hms.harvard.edu/flash/2018/regeneration-axolotl-can-teach-us-regrowing-human-limbs/>

Diferenciace *in vitro*

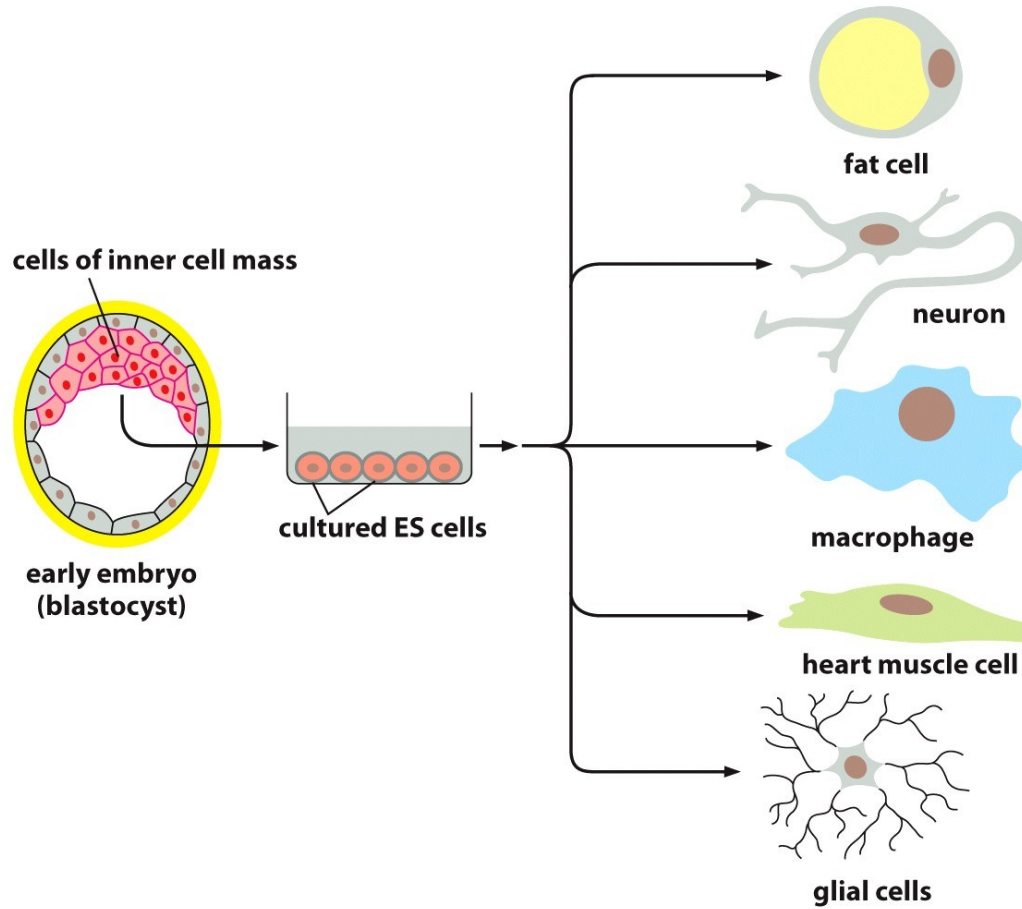


Figure 20-41 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

Přeprogramování

The Nobel Prize in Physiology or Medicine
2012

Sir John B. Gurdon, Shinya Yamanaka

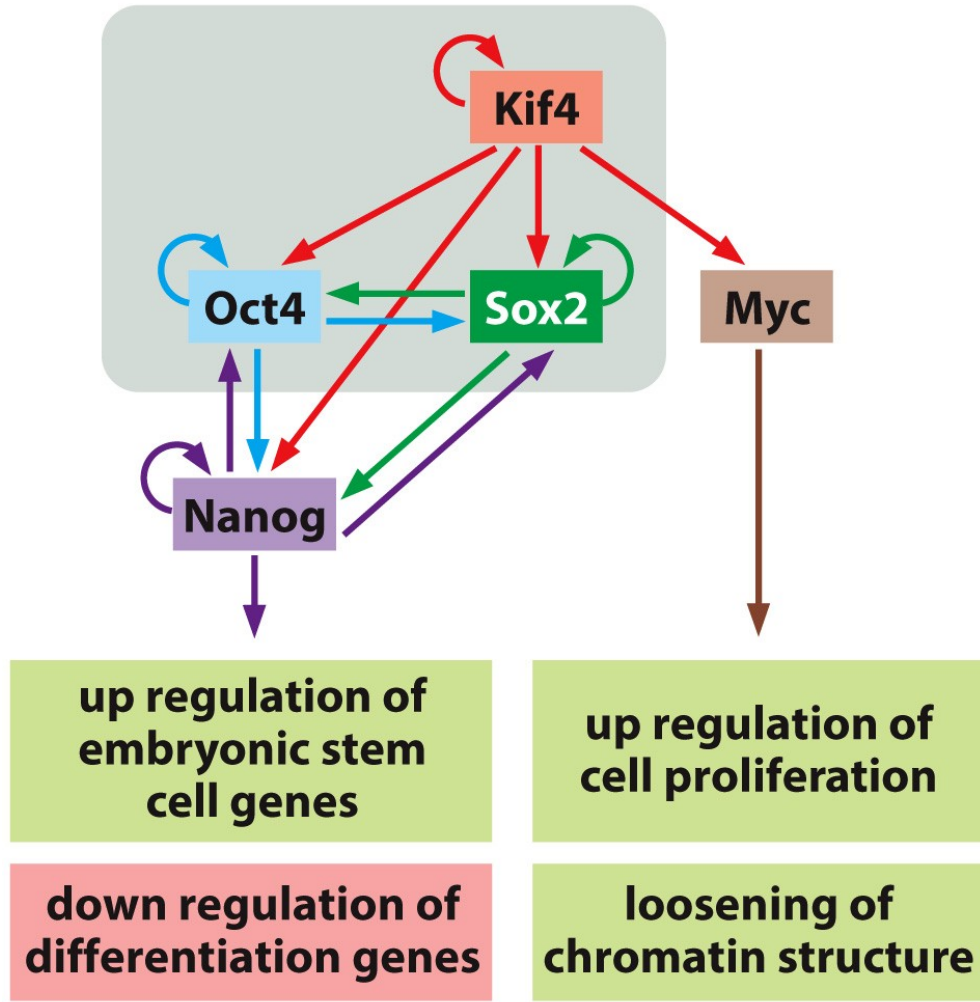


Figure 22-41 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

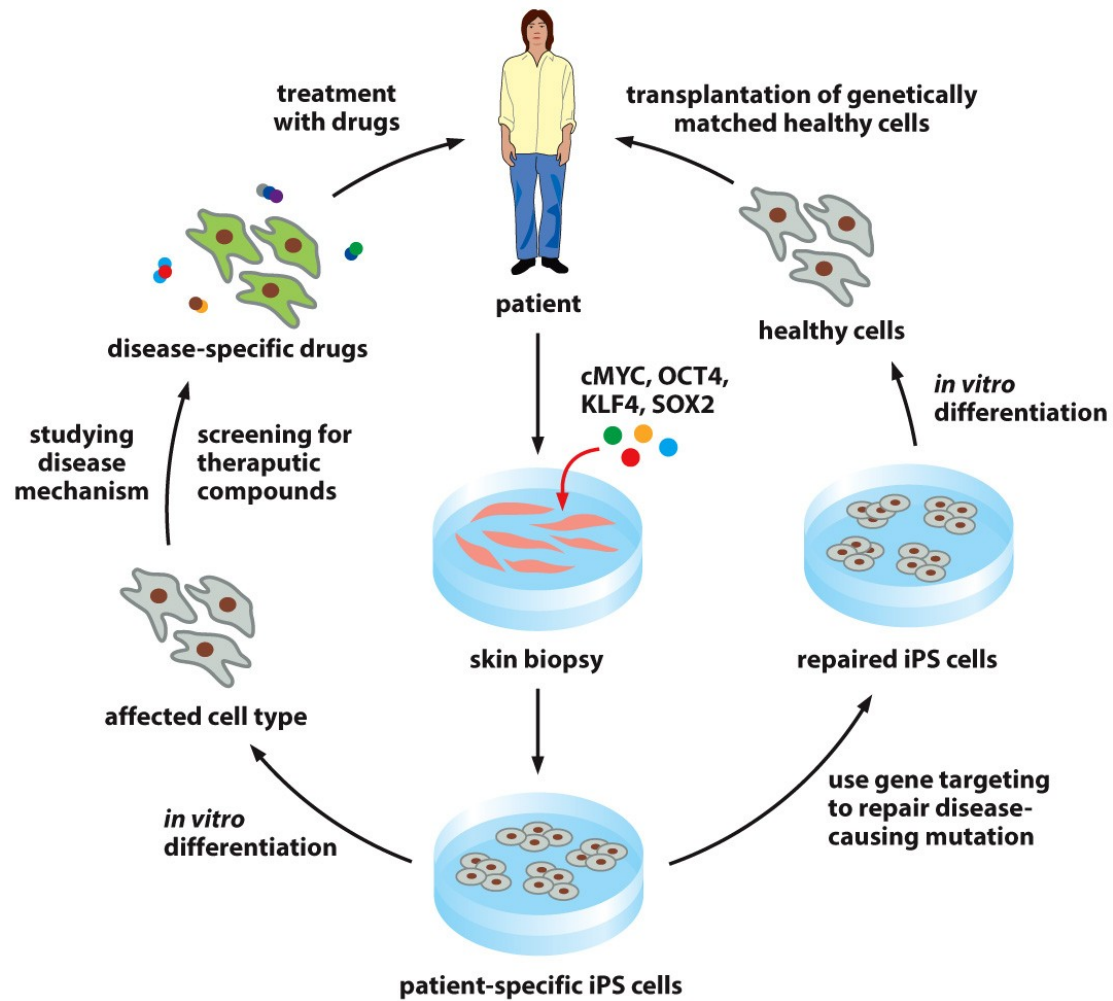


Figure 22-47 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Deregulace proliferace a buněčné smrti

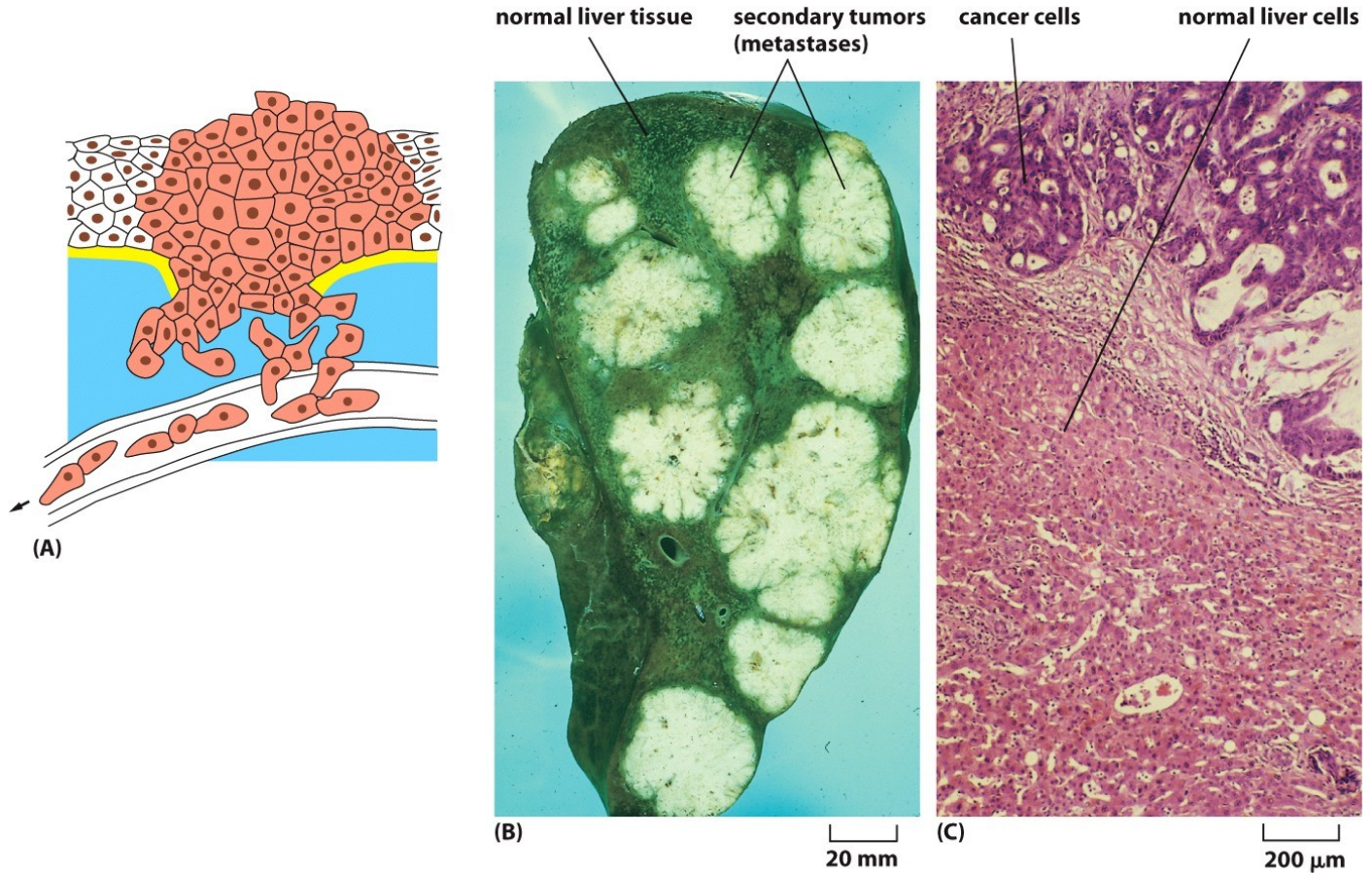
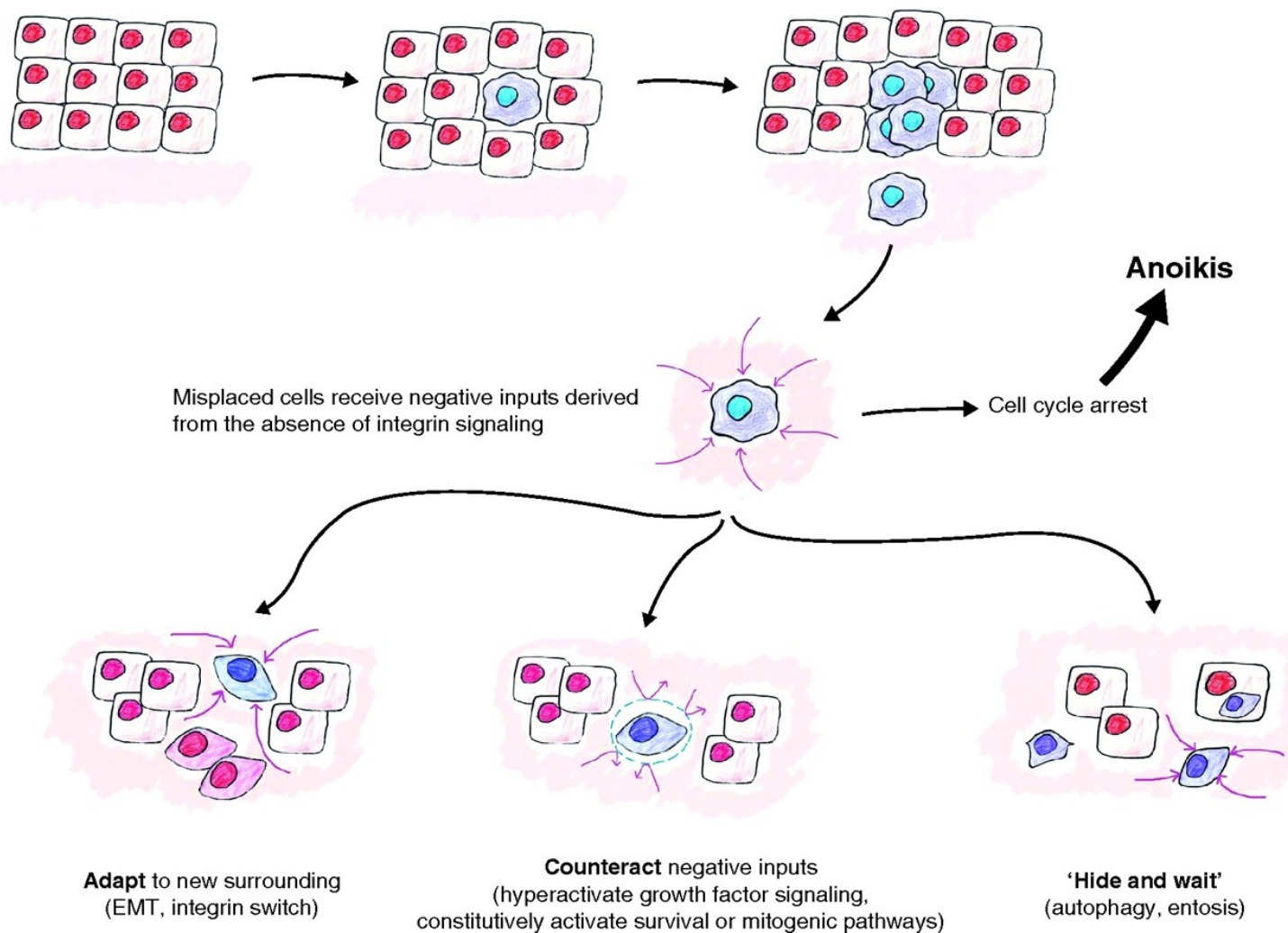


Figure 20-45 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

Strategie úniku transformované buňky



Deregulace proliferace a buněčné smrti

