

Buněčné regulace I

Základní morfogenetické dráhy

Vítězslav Bryja

Vlastnosti buněk v průběhu embryonálního vývoje

- Rychlé buněčné dělení
- Dynamické změny diferenciačního stavu (cell fate)
- Intenzivní migrace
- Změny tvaru a velikosti buňky
- Schopnost odpovědi na poškození

= Vlastnosti buněk v průběhu dynamické homeostázy

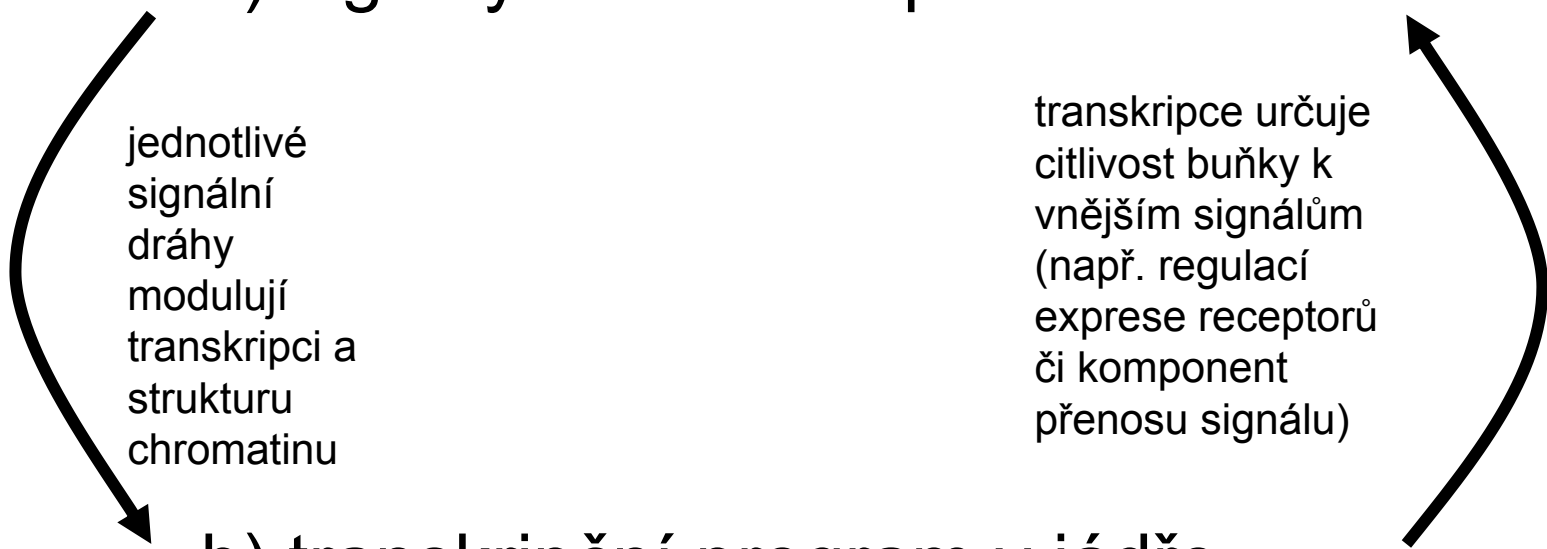
Role signálních drah v regulaci dynamických procesů

a) signály z okolního prostředí

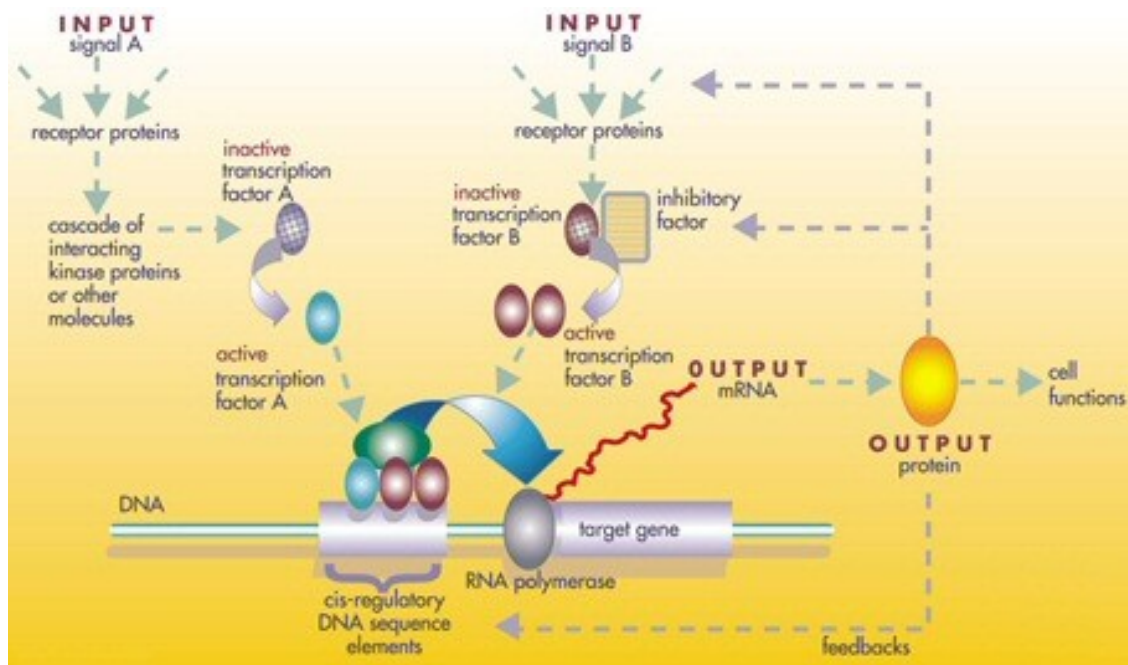
jednotlivé
signální
dráhy
modulují
transkripci a
strukturu
chromatinu

transkripce určuje
citlivost buňky k
vnějším signálům
(např. regulací
exprese receptorů
či komponent
přenosu signálu)

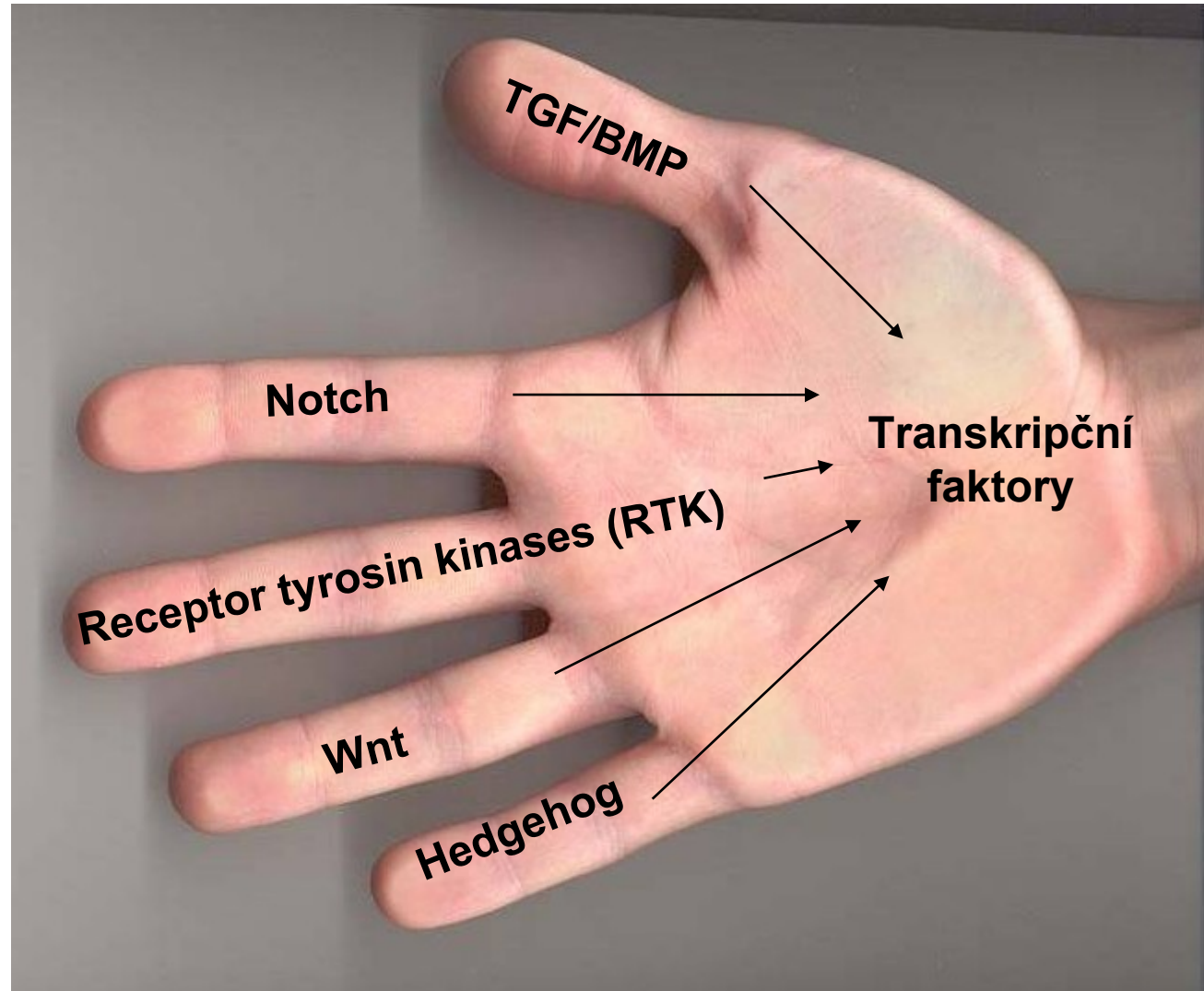
b) transkripční program v jádře



Fyziologie buň. systémů



Hlavní signální dráhy – velká pětka





Zasvětil život octomilkám. Získal díky tomu Nobelovu cenu

Na Masarykovu univerzitu přijel v rámci přednáškového cyklu Mendel Lectures molekulární biolog Eric Wieschaus.

Věda & výzkum | 22. října 2018 | Ema Wiesnerová | CC-BY

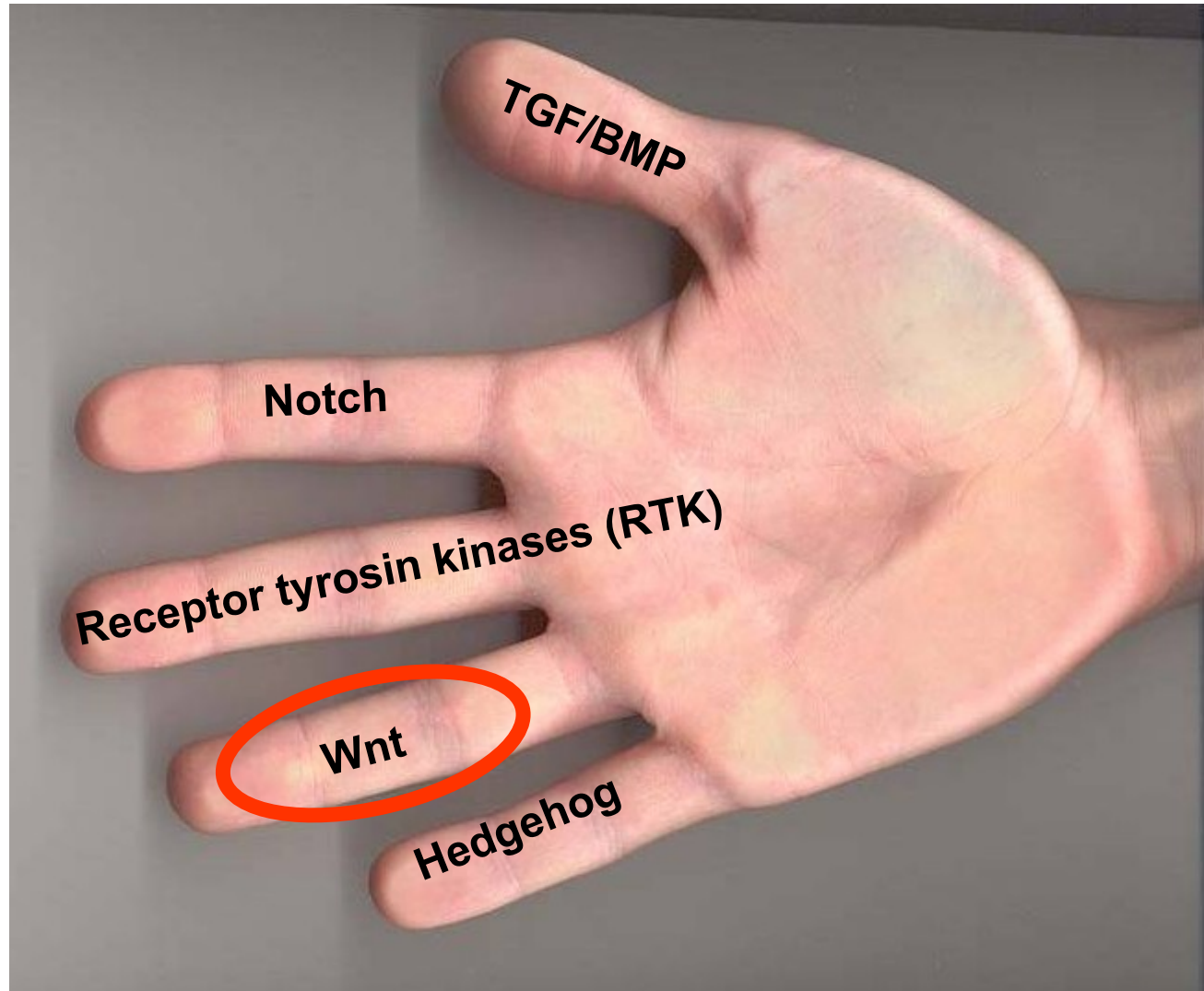


Během práce na genech majících vliv na vývoj embryí Eric Wieschaus s kolegy vůbec netušili, jak je jejich pokus významný. Ukázala to až následující léta.

Eric Wieschaus tráví v podstatě celý život obklopen octomilkami. Není přítom vinař či ovocnář, ale molekulární biolog, který se zajímá o vliv genů na vývoj embryí. Za popis tohoto procesu získal spolu s Christiane Nüsslein-Volhardovou a Edwardem Lewisem v roce 1995 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. Začátkem října přijel na Masarykovu univerzitu v rámci prestižního přednáškového cyklu **Mendel Lectures**.

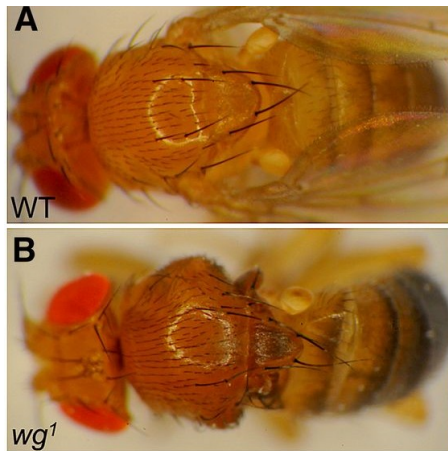
I kdybychom nedostali Nobelovu cenu, pořád bychom měli krásné výsledky i příběh, říká Wieschaus.

Klíčové molekulární komponenty vývoje

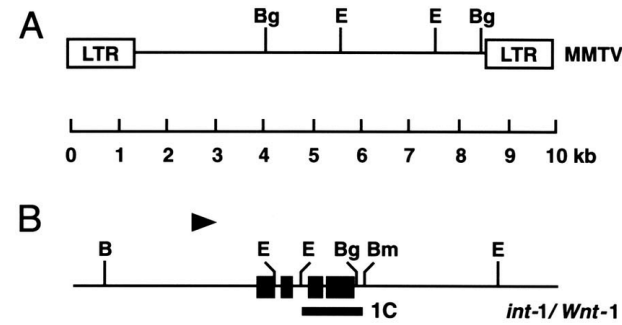


Wingless

Int-1



WNT



Röel Nusse

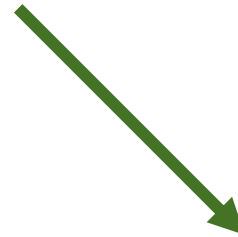


Wnt (Wingless/Int)

- rodina ligandů
- 19 genů pro proteiny Wnt u člověka a u myši
- extracelulární proteiny modifikované glykosylací a palmitoylací
- působí na krátké vzdálenosti, váží se k extracelulární matrix
- pouze u mnohobuněčných živočichů



kanonická dráha
/závislá na β -kateninu/
(např. Wnt-1 or Wnt-3a)



nekanonická dráha
/na β -kateninu nezávislá/
(např. Wnt-5a)

Wnt/ β -kateninová dráha (= kanonická dráha)



- indukuje duplikaci tělní osy u *Xenopus*
- indukuje transformaci buněčné linie odvozené od lidských prsních epiteliálních buněk C57mg
- signál přenášen přes translokaci β -kateninu do jádra

Speciální buněčný aparát pro sekrece Wnt proteinů

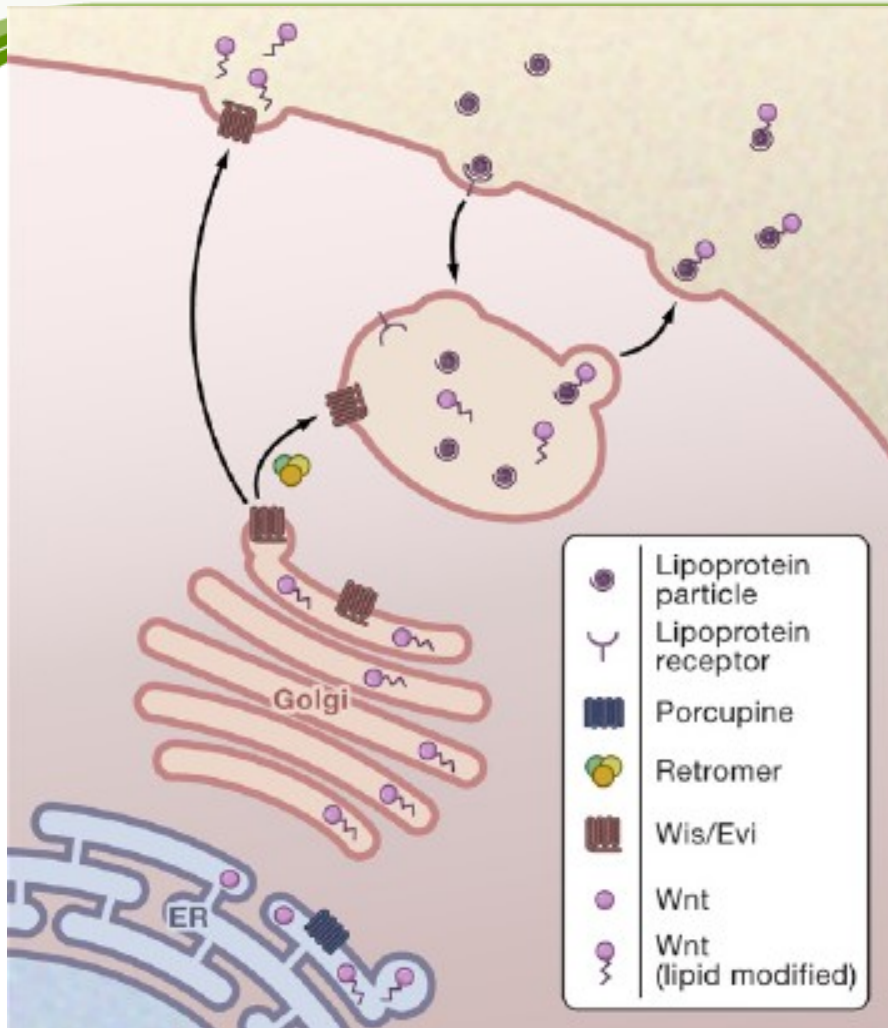
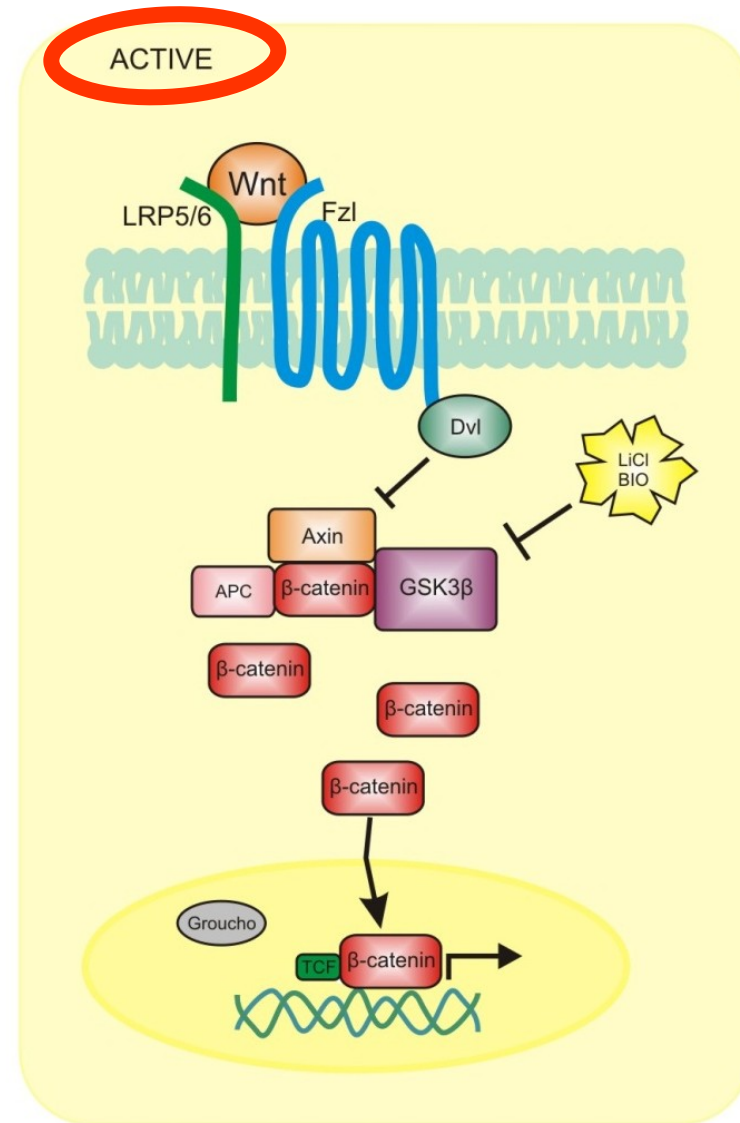
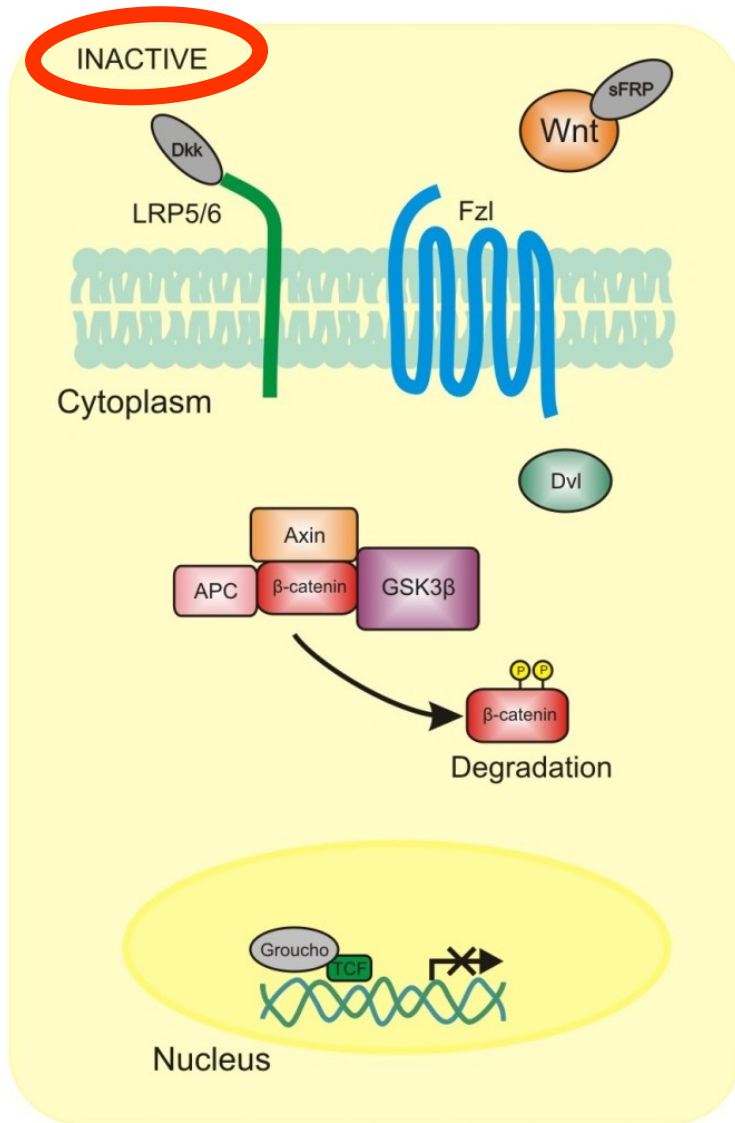


Figure 1. Wnt Secretion

To be secreted, Wnt proteins in the endoplasmic reticulum (ER) need to be palmitoylated by the action of Porcupine. Wnt proteins also require Wntless (Wis/Evi) in order to be routed to the outside of the cell. Loading onto lipoprotein particles may occur in a dedicated endo/exocytic compartment. The retromer complex may shuttle Wis between the Golgi and the endo/exocytic compartment.

Kanonická signální dráha Wnt



Kanonická signální dráha Wnt

- legenda k obrázku:

The Canonical Wnt signalling cascade. Canonical Wnt signalling mediates its effect by binding to their receptors frizzled (Fzd) and co-receptors, LRP 5/6. This causes activation of intracellular Dishevelled (Dvl) which, in turn, inhibits glycogen synthase kinase-3 (GSK3 β). This results in the stabilisation and nuclear translocation of β -catenin, inducing gene transcription via the LEF/TCF family of transcription factors. In the absence of Wnt signalling, a complex containing GSK3 β phosphorylates β -catenin, leading to degradation by ubiquitination. Copyright BTR ©

Frizzled – klíčový receptor signálních drah Wnt

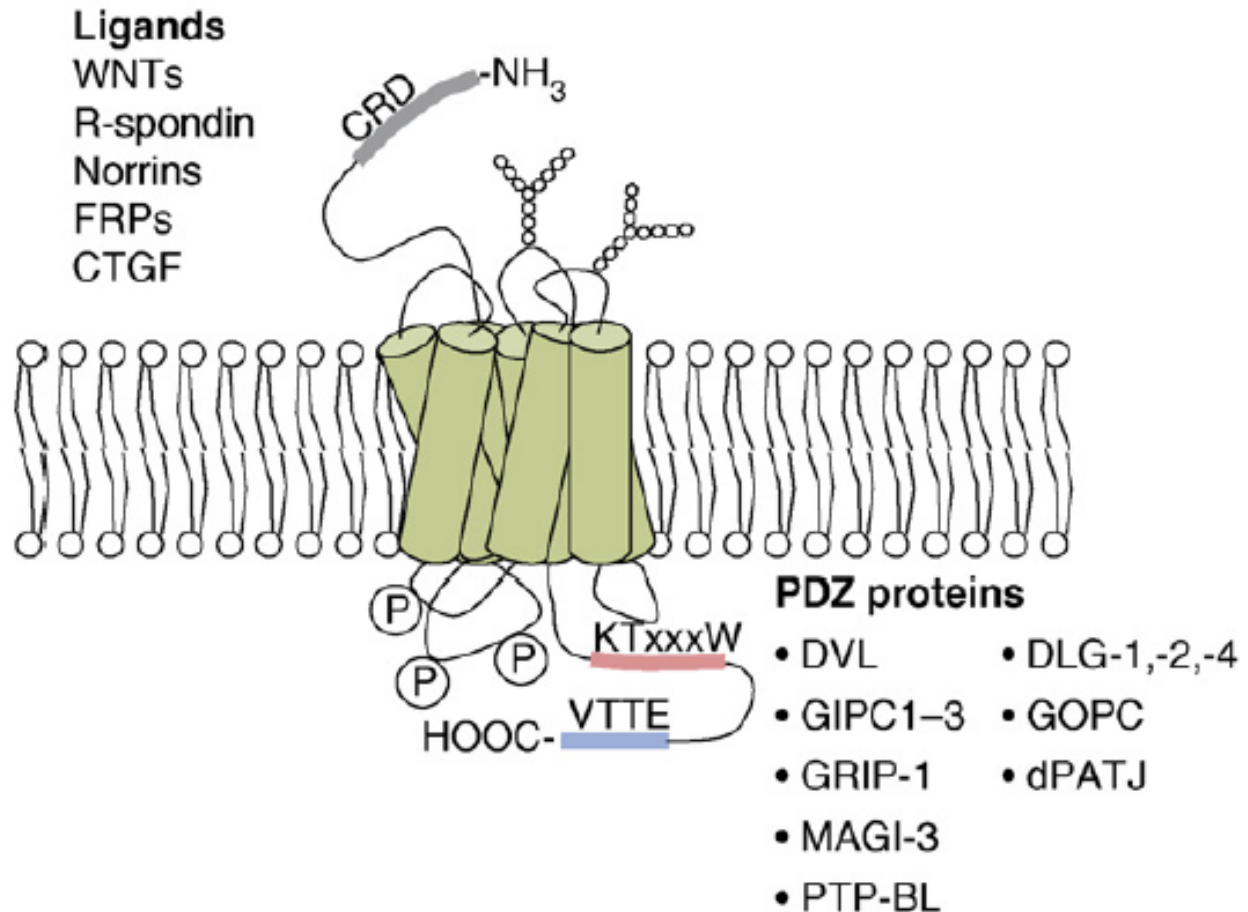
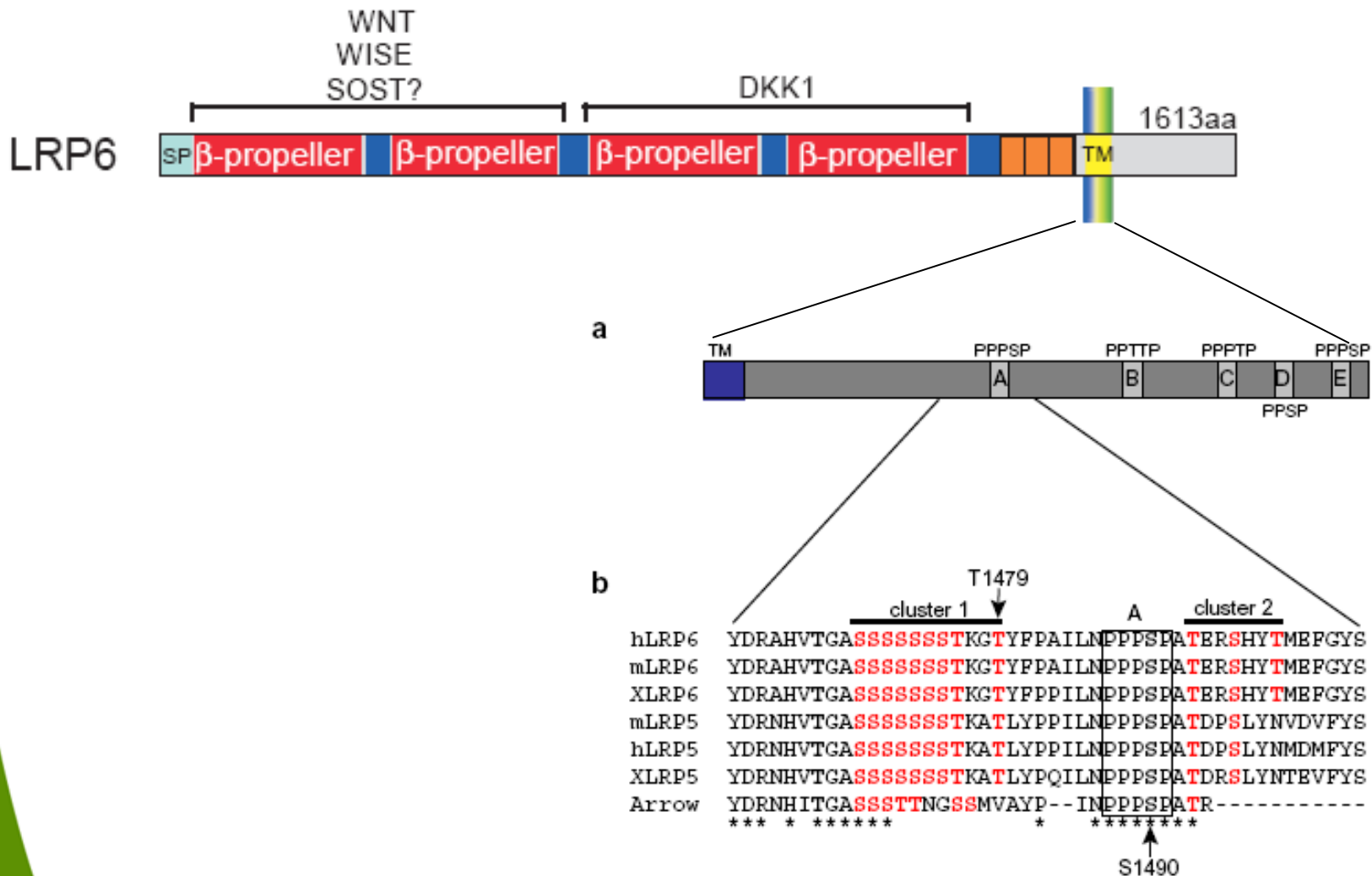


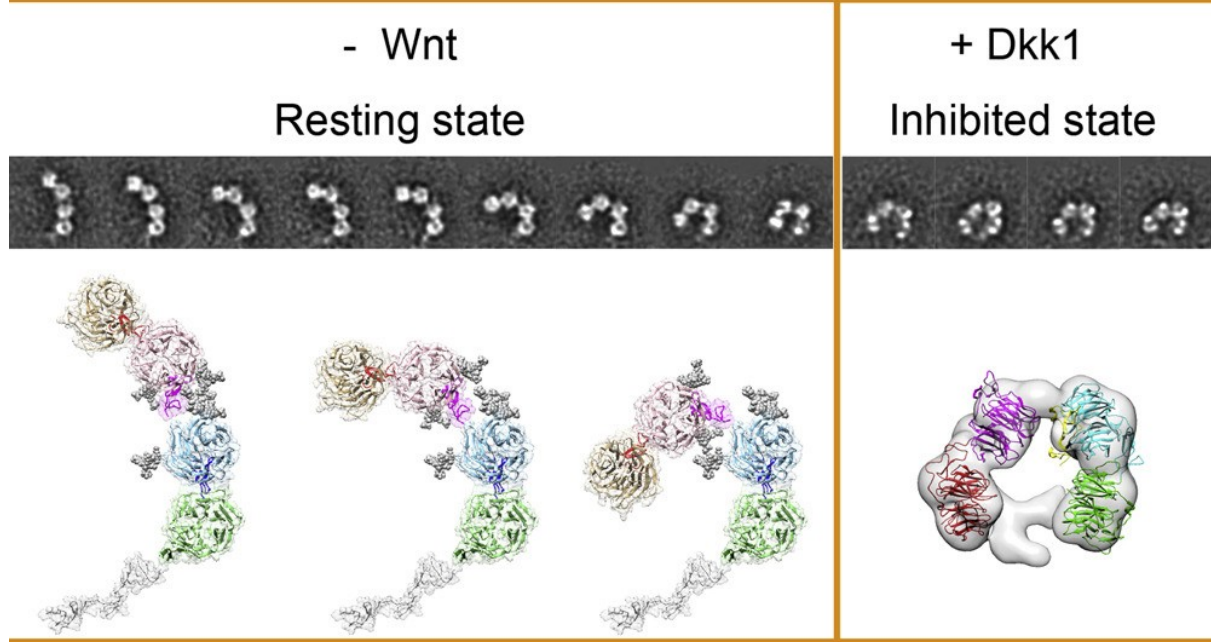
Figure 1. Schematic view of the 7TM model of FZDs. The model indicates extra- and intracellularly interacting proteins, putative glycosylation and phosphorylation sites. The N-terminal CRD is the primary binding site for ligands. The pink stretch in the C terminus indicates the internal PDZ-interacting motif (KTxxxW), which is absolutely conserved in the different FZD isoforms and necessary for DVL binding and signaling. The blue stretch at the far C terminus indicates the presence of a classical, less well-conserved PDZ-ligand sequence present in a subset of FZDs.

Lrp5/6 – stěžejní ko-receptor kanonické signální dráhy Wnt

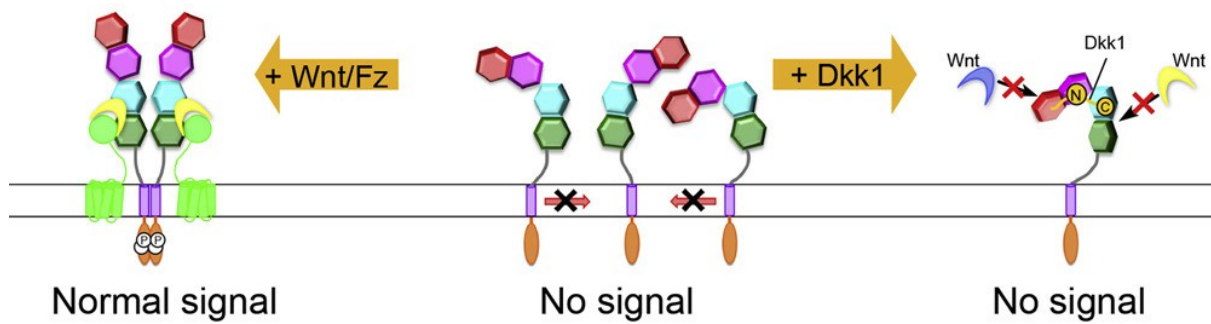


Lrp5/6 – stěžejní ko-receptor kanonické signální dráhy Wnt

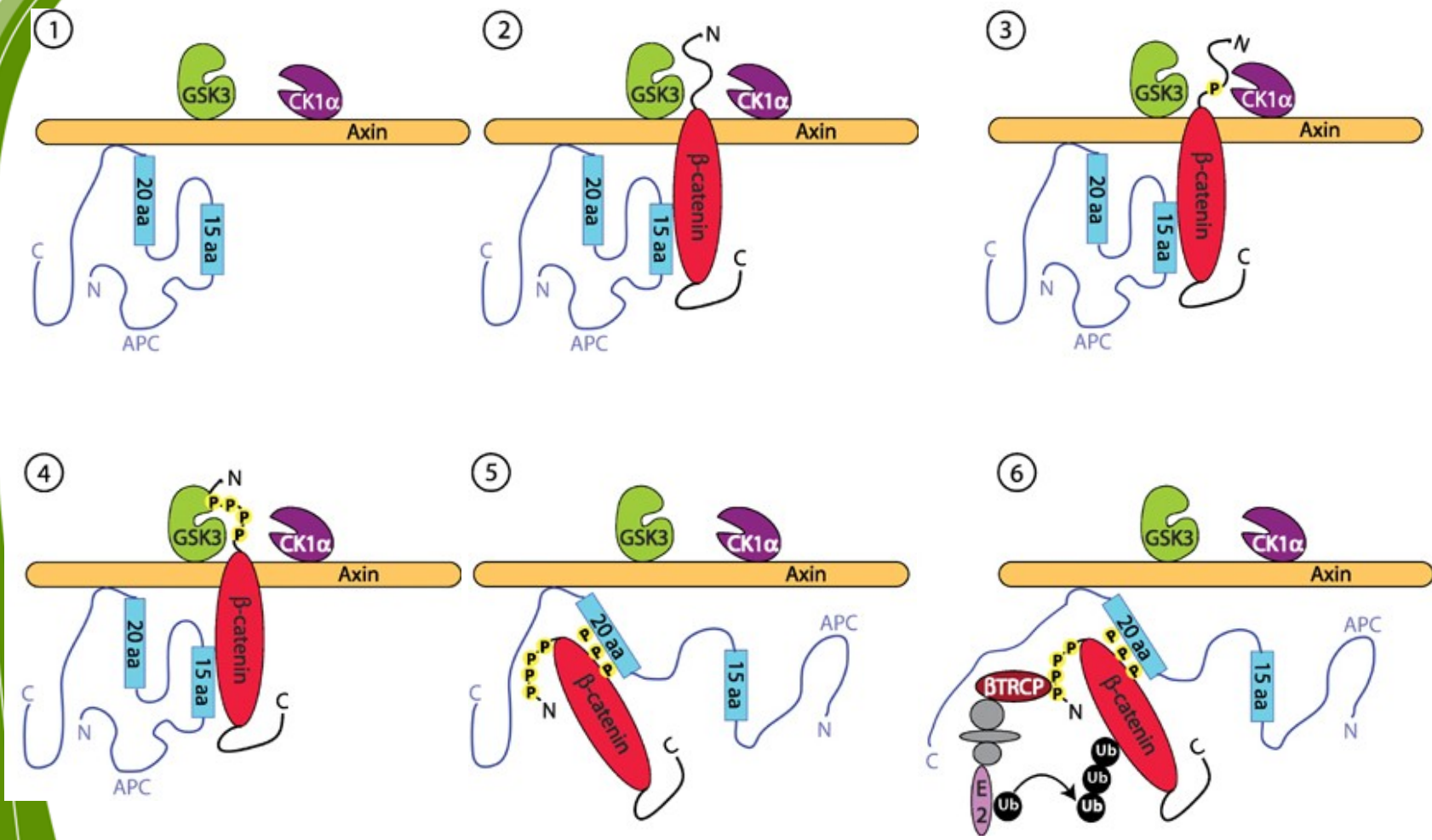
EM visualization of LRP6 ectodomain



Wnt-activated state Resting state Dkk1-inhibited state



Destrukční komplex pro beta-kenenin



Destrukční komplex

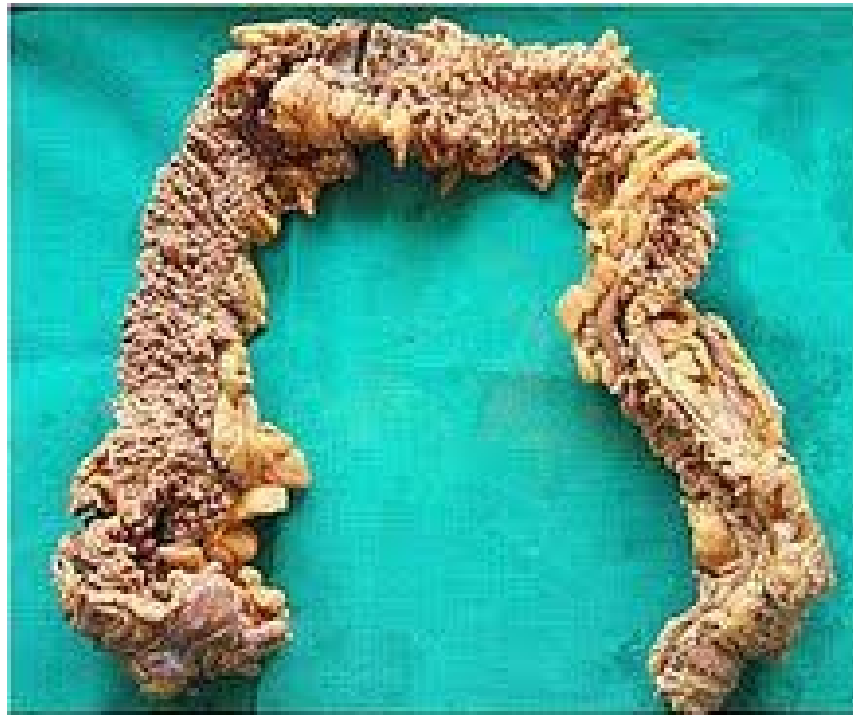
- legenda k obrázku destrukčního komplexu:

A working model for the destruction complex. (1) Initially, the destruction complex contains Axin, GSK3, CK1 and APC (with the 15 aa and 20 aa repeat regions shown). The complex contains other components such as PP2A, which are not shown here. (2) -Catenin enters the complex by binding Axin and potentially the APC 15 aa repeats. This positions the N-terminus of -catenin near CK1 and GSK3. (3) CK1 phosphorylates -catenin at Ser45. (4) GSK3 phosphorylates -catenin at, successively, Thr41, Ser37 and Ser33. (5) The 20 aa repeats, particularly repeat 3, are phosphorylated by a CK1 (and possibly GSK3) which greatly increases their affinity for -catenin. The binding of a phosphorylated 20 aa repeat to -catenin displaces Axin from -catenin. (6) -TRCP1 binds the phosphorylated N-terminus of -catenin, causing the ubiquitination of -catenin by an E2 ligase. APC is then either desphosphorylated within the complex, allowing the ubiquitinated -catenin to leave the complex, or the ubiquitinated -catenin bound to APC leaves the complex and is separated from APC at the proteasome. The complex then returns to Step 1

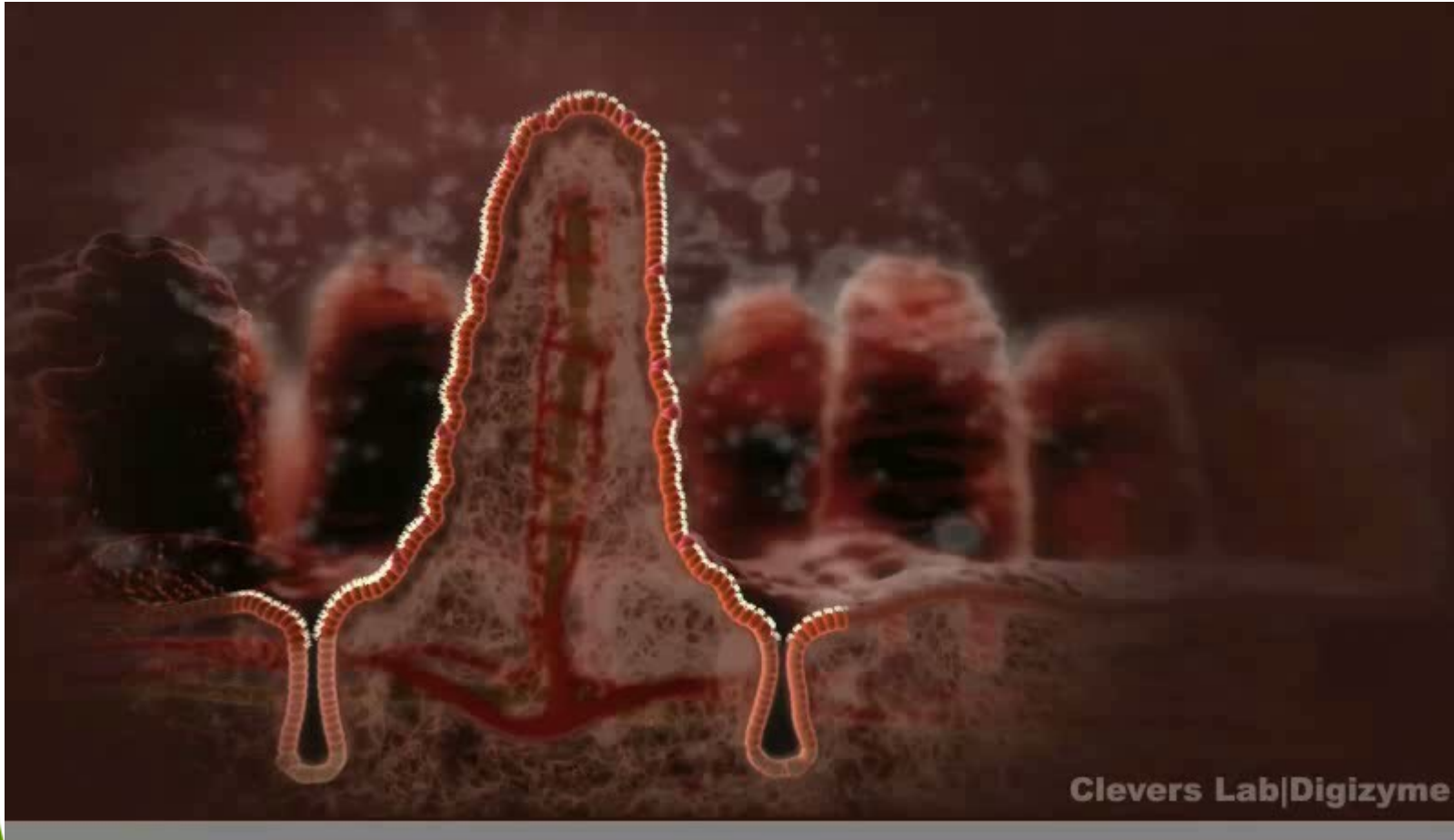
Kanonická signální Wnt dráha - video

Familiární adenomatózní polypóza

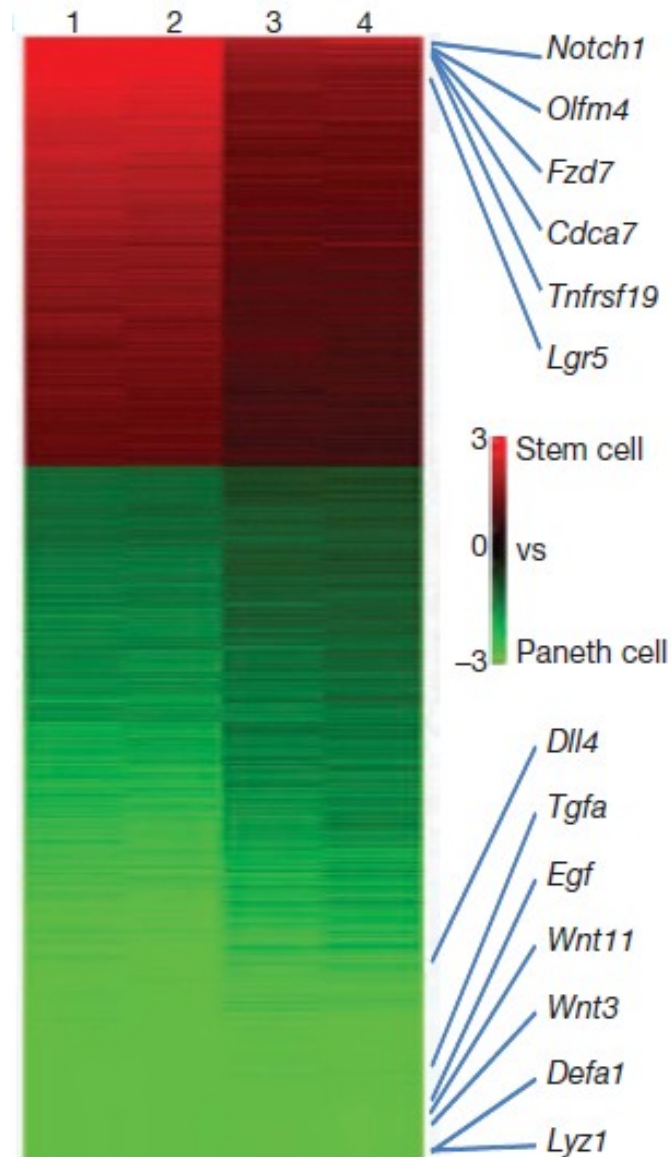
- ▶ zkráceně FAP, je autozomálně dominantní dědičné onemocnění tlustého střeva s výskytem četných (tisíce) polypů a adenomů, které později malignizují. Onemocnění způsobuje zmutovaný gen APC



Familiární adenomatózní polypóza



Geny pod kontrolou Wnt dráhy v kmenových buňkách



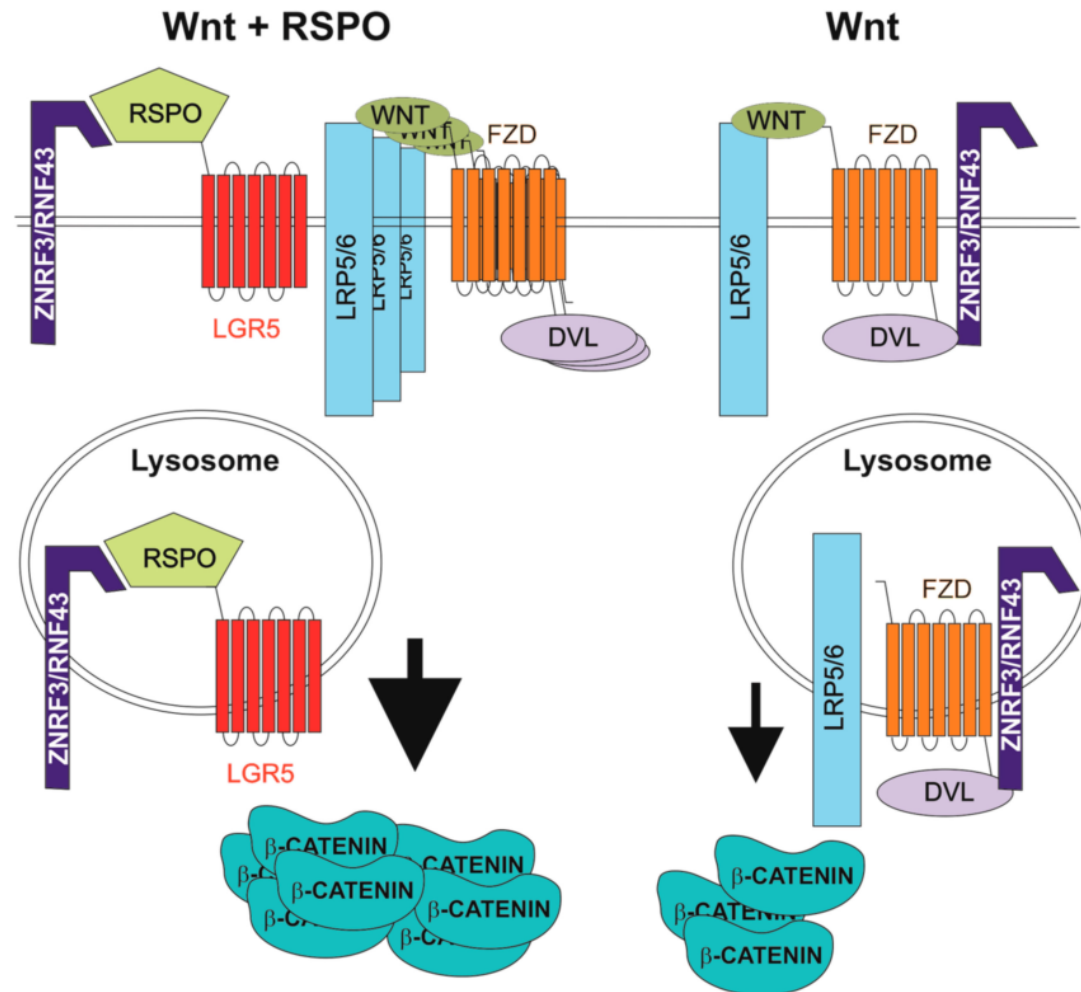
Propojení mezi Wnt dráhou a kmenovými buňkami

- Lgr5 jako cílový gen Wnt dráhy

Propojení mezi Wnt dráhou a kmenovými buňkami

- Lgr5 jako cílový gen Wnt dráhy
- Lgr5 jako marker kmenových buněk ve střevě
- R-spondin jako ligand Lgr5 a jako aktivátor Wnt dráhy

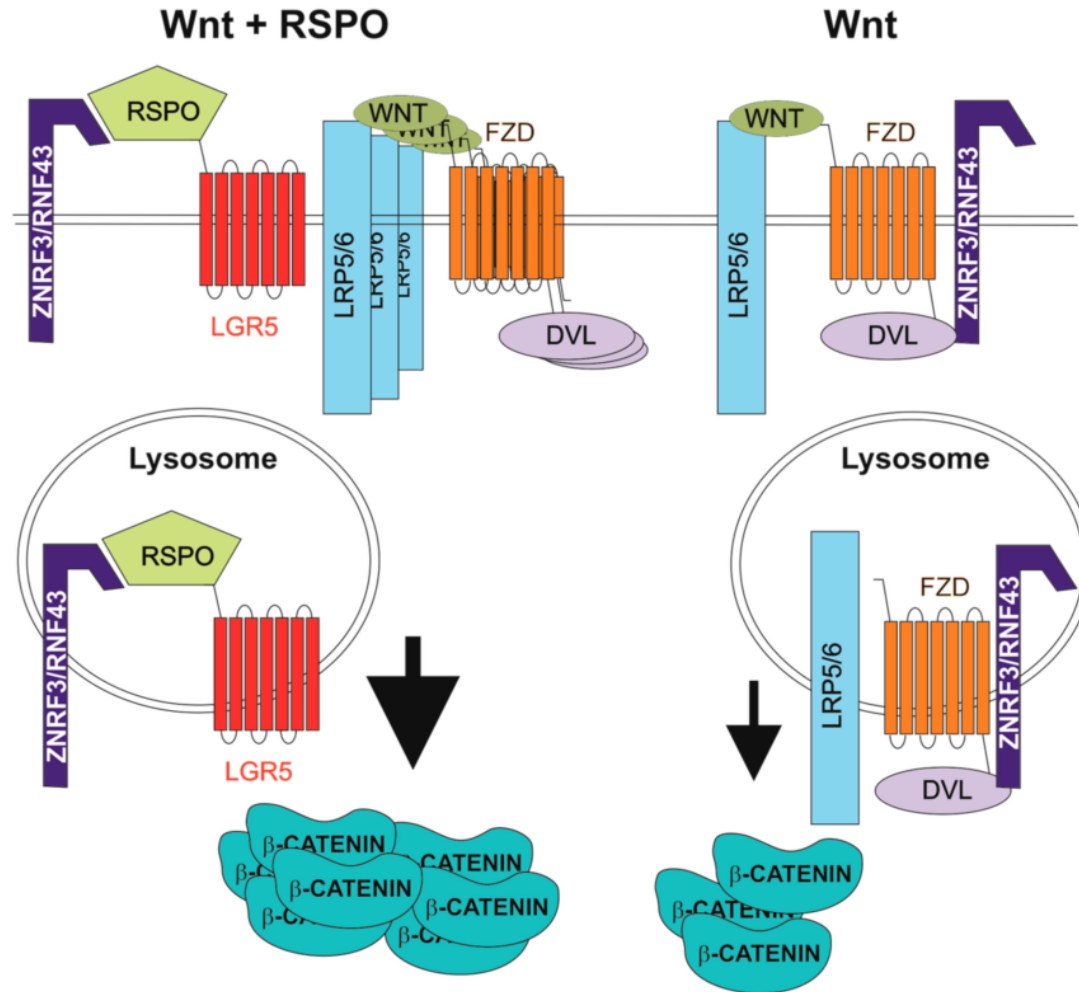
Vazba R-spondinu na LGR5 aktivuje Wnt dráhu



Propojení mezi Wnt dráhou a kmenovými buňkami

- **Lgr5 jako cílový gen Wnt dráhy**
- **Lgr5 jako marker kmenových buněk ve střevě**
- **R-spondin jako ligand Lgr5 a jako aktivátor Wnt dráhy**
- **Wnt signalizace jako klíčová složka komunikace mezi kmenovými buňkami a jejich nikou**
- **Inhibitory Wnt dráhy - RNF43/Znrf3 – jako cíle kontrolované R-spondiny**

Vazba R-spondinu na LGR5 aktivuje Wnt dráhu díky internalizaci E3-ubikvitin ligáz ZNRF3/RNF43

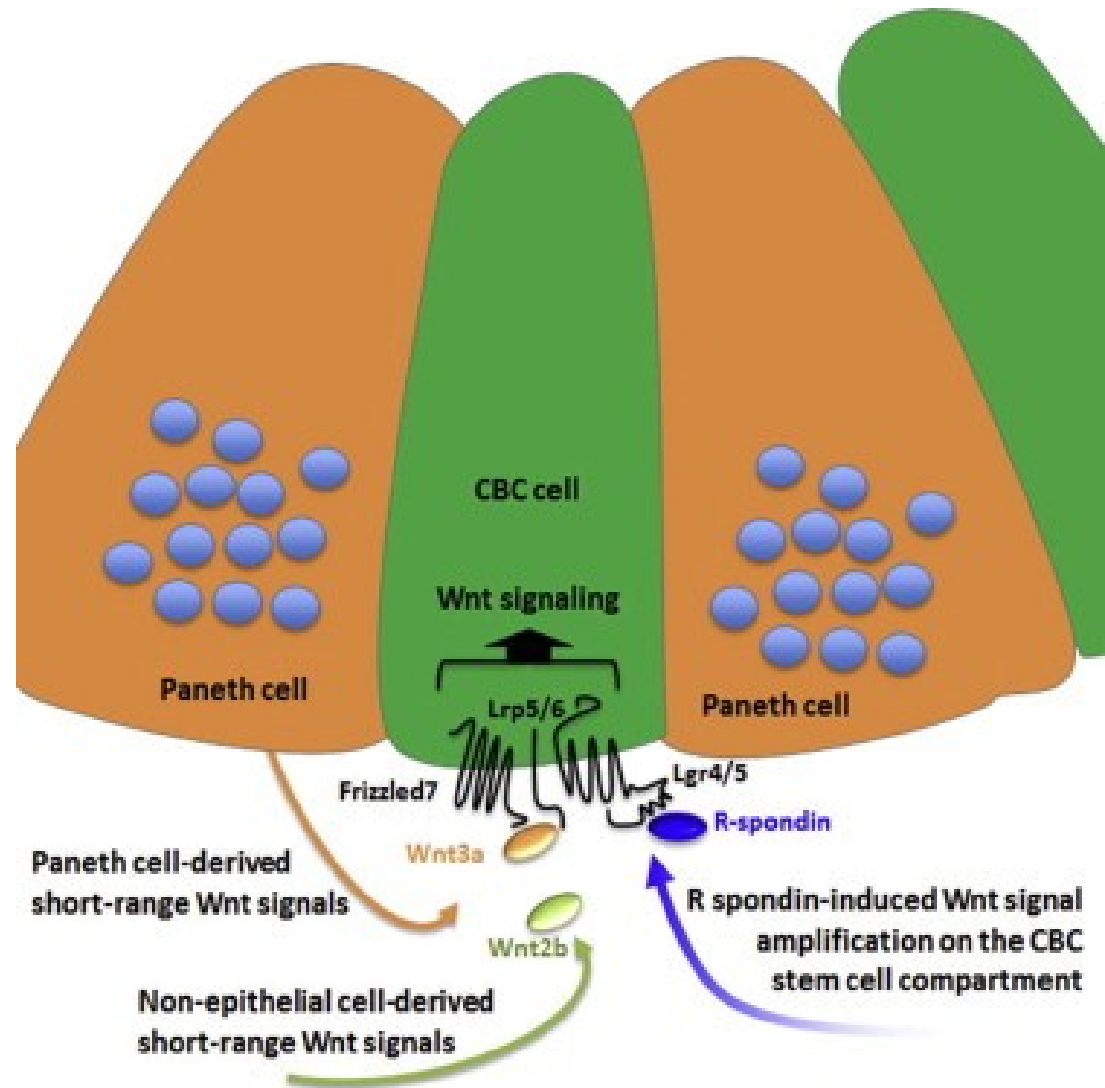


RNF43 je specializovaná E3 ubikvitin ligáza pro Frizzled (FZD)

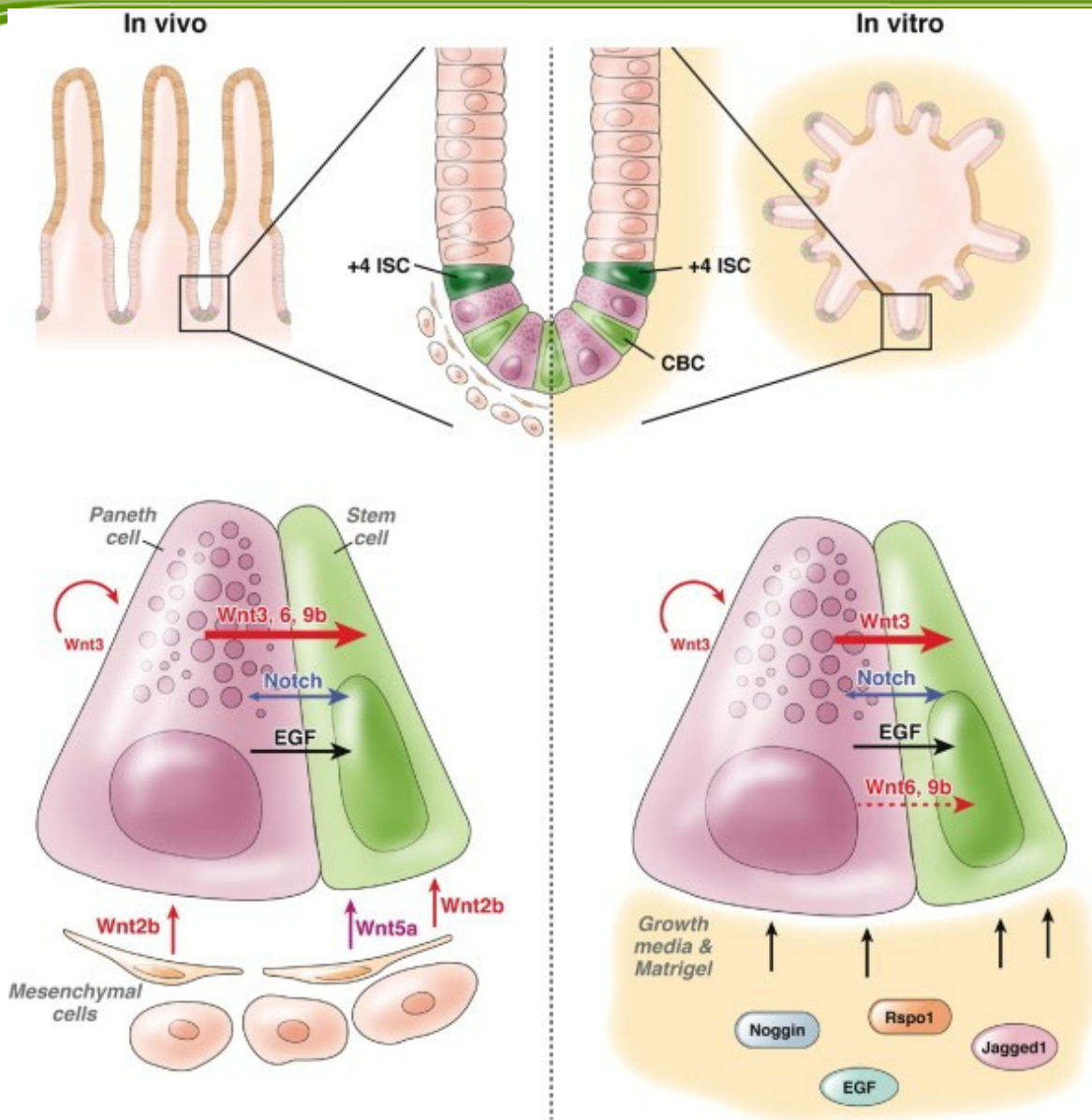
Propojení mezi Wnt dráhou a kmenovými buňkami

- **Lgr5 jako cílový gen Wnt dráhy**
- **Lgr5 jako marker kmenových buněk ve střevě**
- **R-spondin jako ligand Lgr5 a jako aktivátor Wnt dráhy**
- **Wnt signalizace jako klíčová složka komunikace mezi kmenovými buňkami a jejich nikou**
- **Inhibitory Wnt dráhy - RNF43/Znrf3 – jako cíle kontrolované R-spondiny**
- **R-spondin jako klíčový faktor potřebný pro růst organoidů**

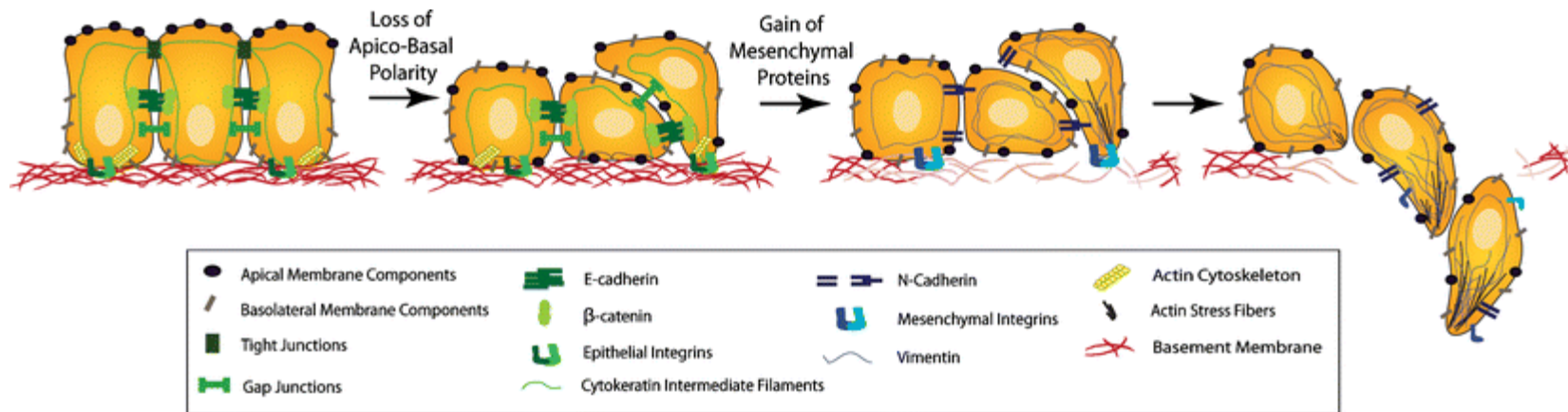
Fyziologie buň. systémů



Fyziologie buň. systémů



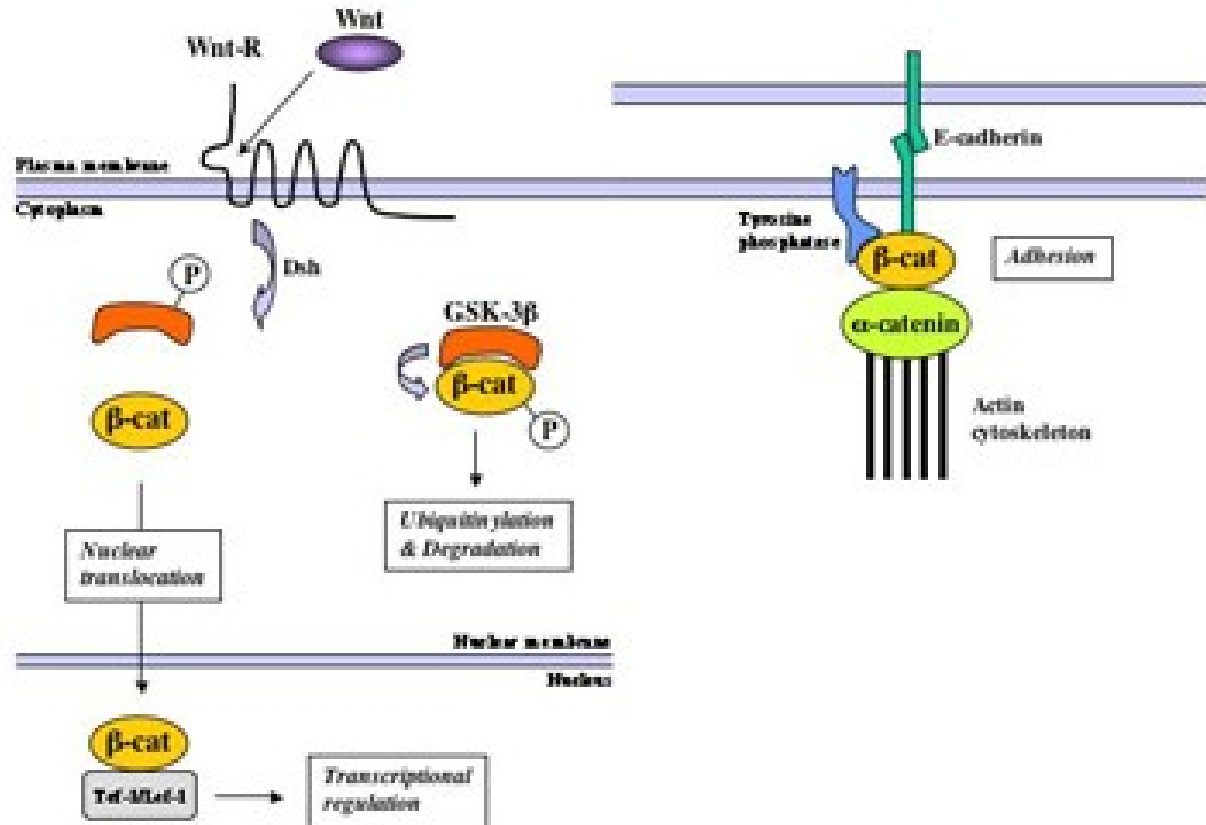
Epitelo-mesenchymální přechod (EMT – epithelio-mesenchymal transition)



Epiteliální - mezenchymální přechod (EMT) je proces, při kterém epitelové buňky ztratí svoji buněčnou polaritu a adhezi buněčných buněk a získají migrační a invazivní vlastnosti, stanou se mezenchymálními. EMT je nezbytný pro četné vývojové procesy včetně tvorby mezodermy a tvorby neurální lišty. EMT se uplatňuje při hojení ran, při orgánové fibróze a při iniciaci metastáz v progresi rakoviny.

Beta-catenin se v buňkách vyskytuje ve dvou hlavních „poolech“ – biochemických komplexech

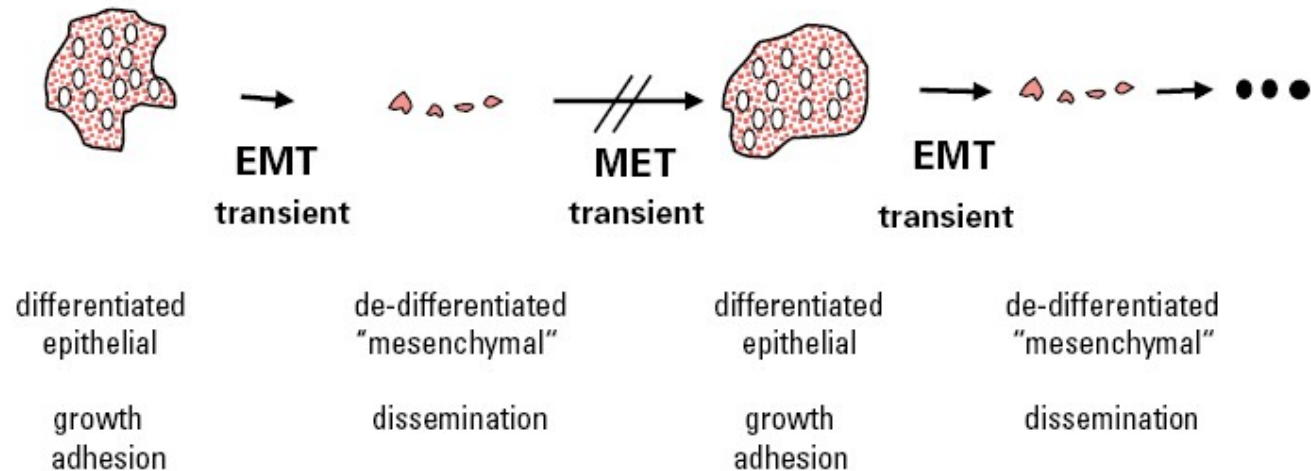
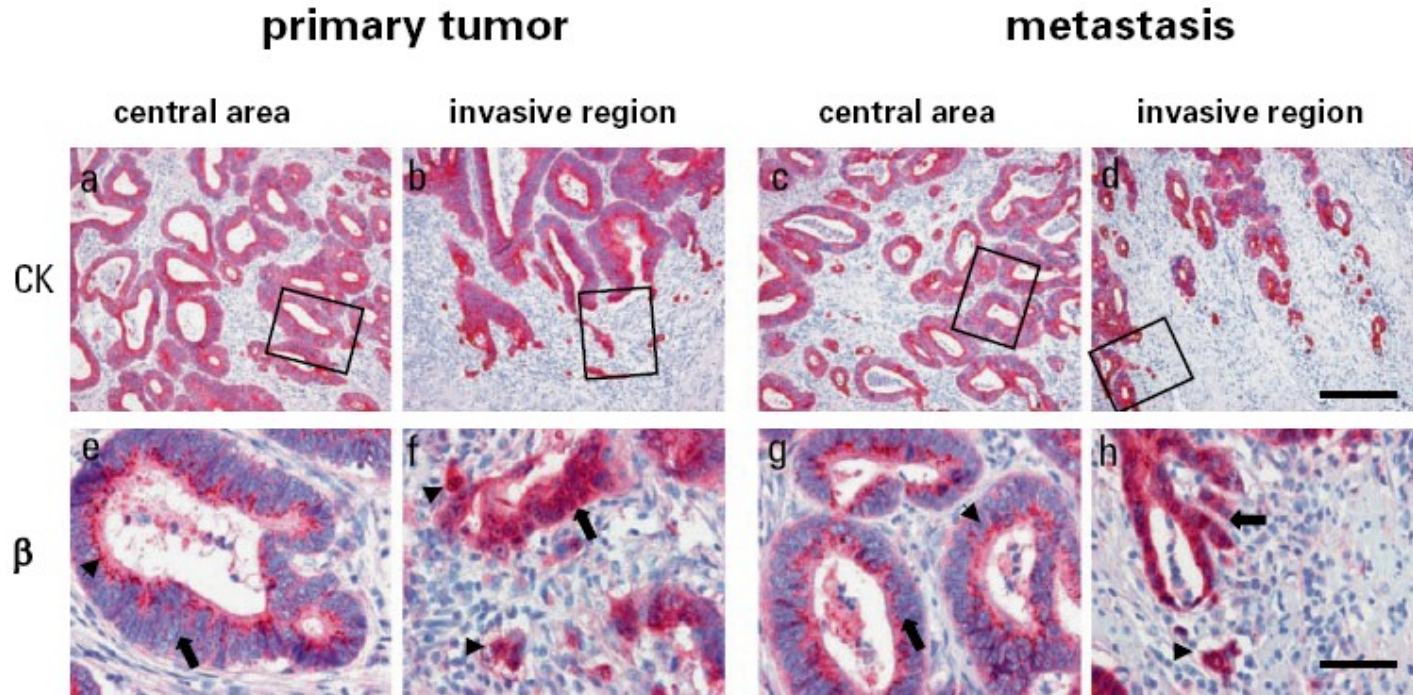
Wnt and E-cadherin pathways



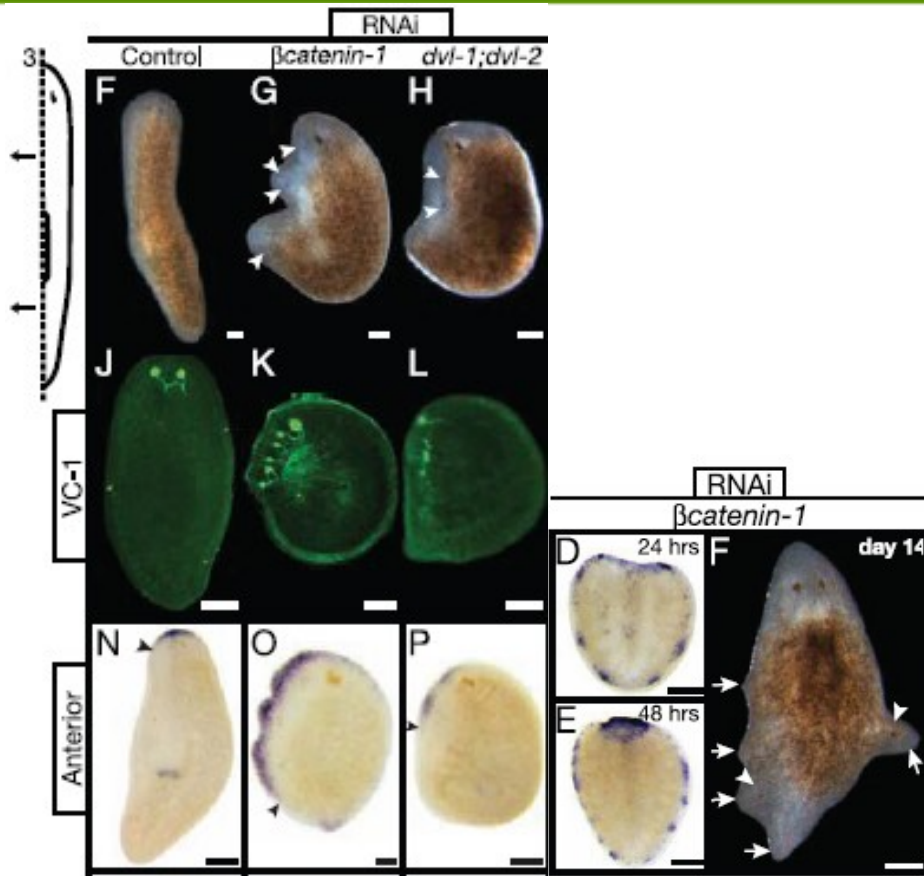
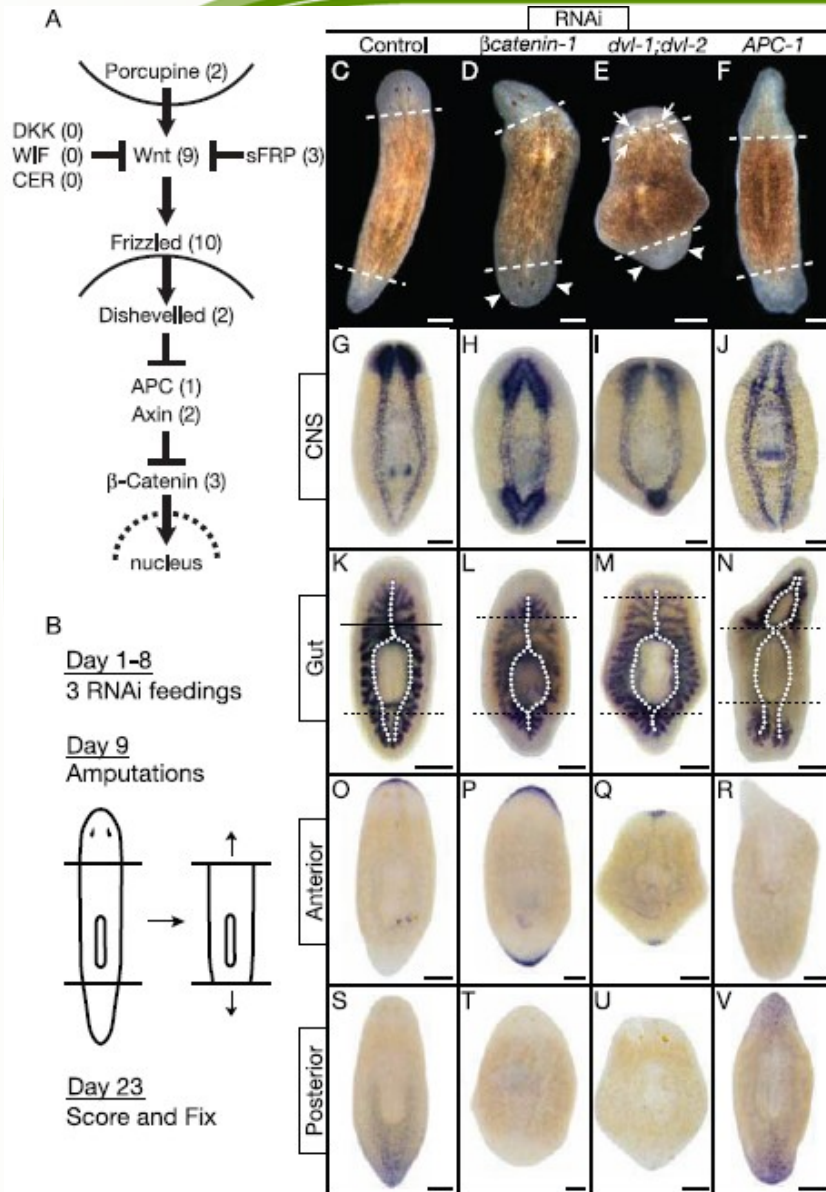
1. Jako součást Wnt signalizace

2. V komplexu s E-cadherinem jako součást „adherens junctions“

Epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT) v nádorech



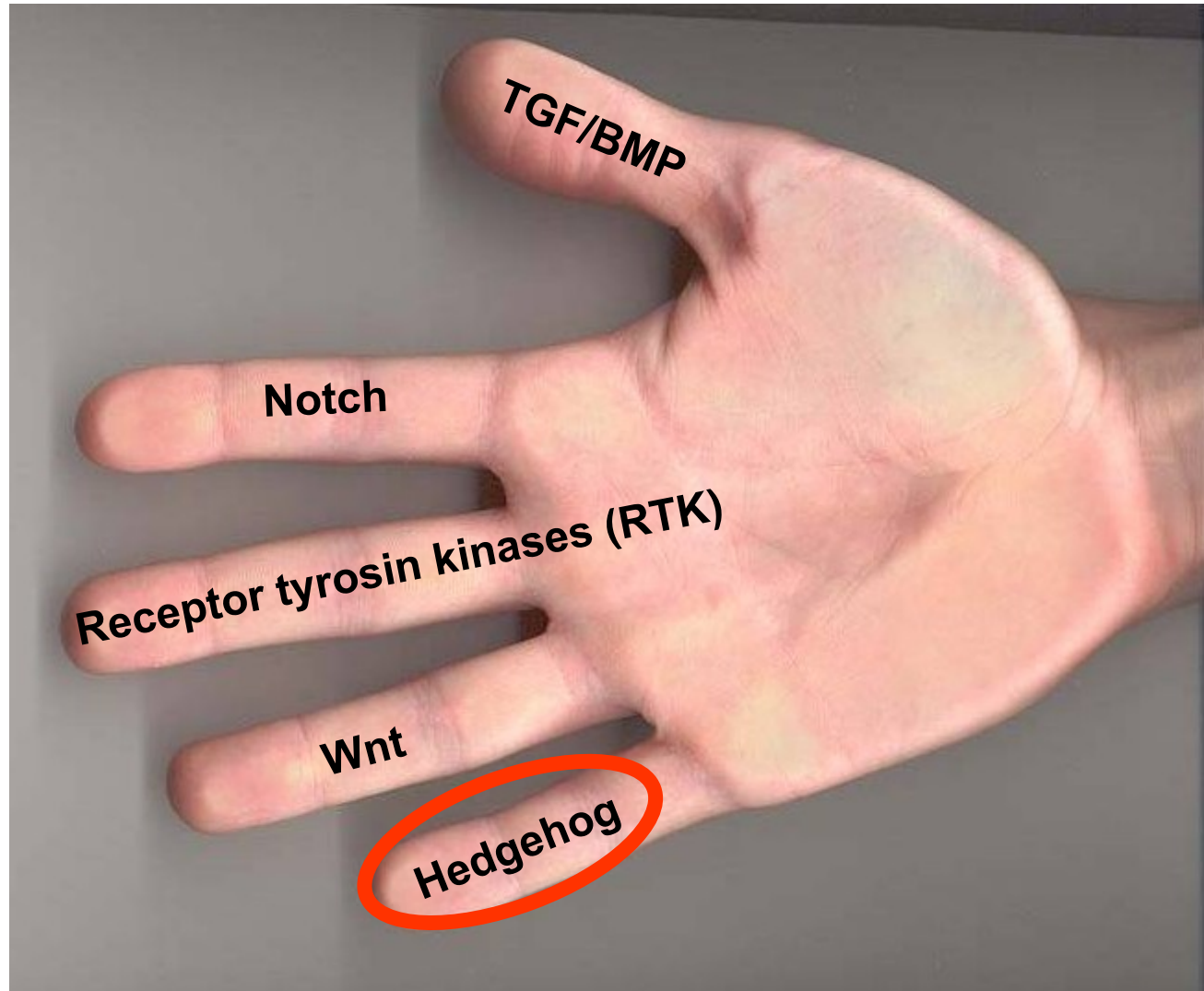
Wnt signální dráha určuje předozadní osu i při regeneraci u ploštěnky



β-Catenin Defines Head Versus Tail Identity During Planarian Regeneration and Homeostasis

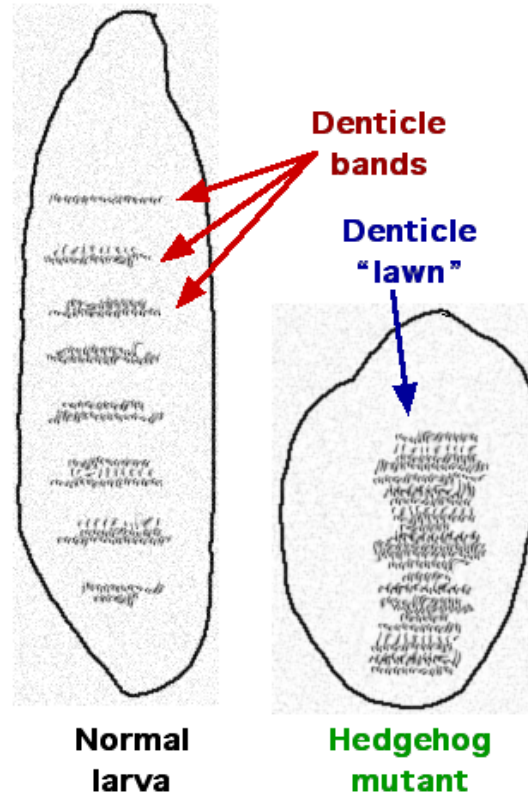
Kyle A. Gurley, Jochen C. Rink, Alejandro Sánchez Alvarado*

Klíčové molekulární komponenty vývoje



Hedgehog dráha

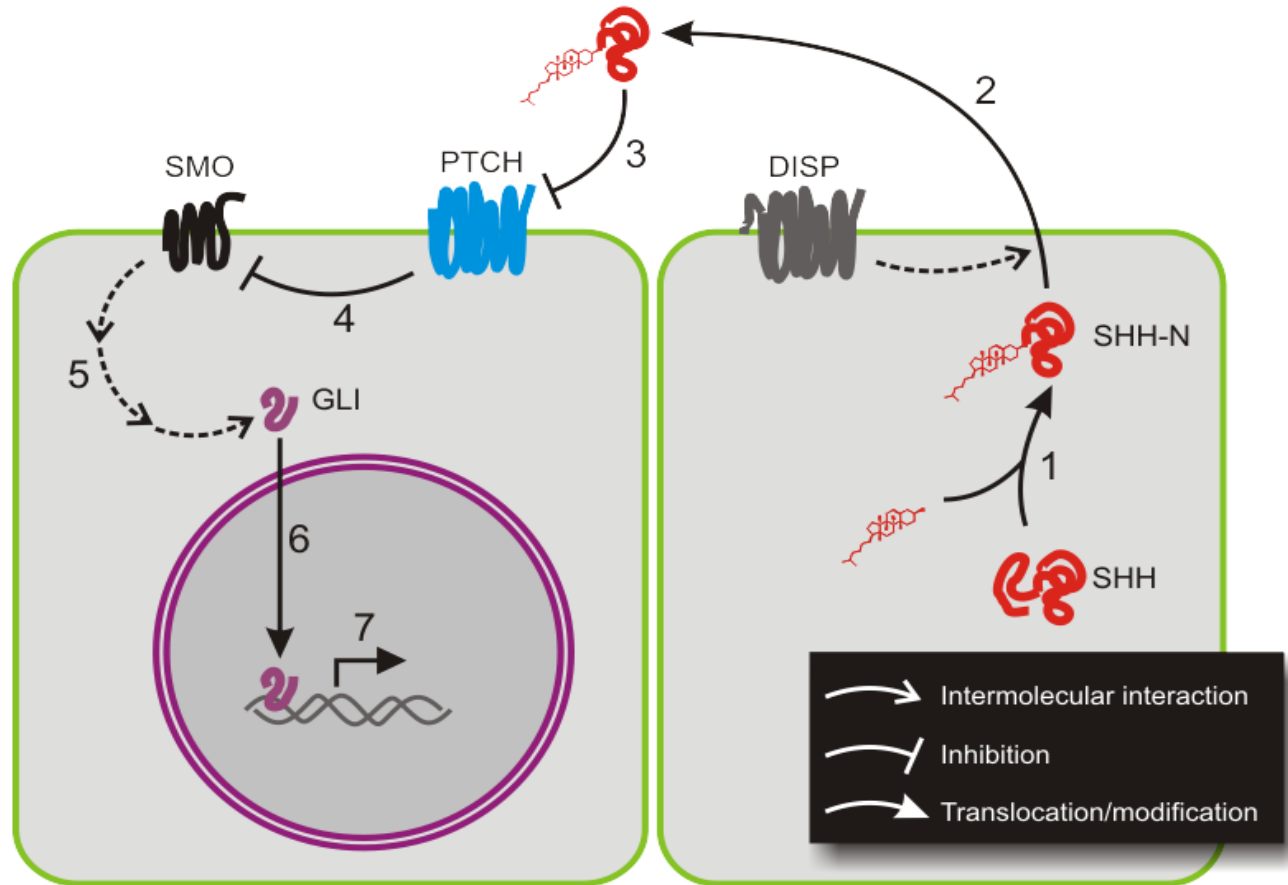
- hedgehog (Hh) u octomilky – název „ježek“ podle fenotypu larvy
- u savců jsou tři homology:
 - sonic hedgehog (Shh)
 - indian hedgehog (Ihh)
 - desert hedgehog (Dhh)



Sonic the Hedgehog

The hedgehog gene (hh) was first identified in the fruit-fly *Drosophila melanogaster* in the classic Heidelberg screens of Christiane Nüsslein-Volhard and Eric Wieschaus, as published in 1980. These screens, which led to them winning the Nobel Prize in 1995 along with developmental geneticist Edward B. Lewis, identified genes that control the segmentation pattern of the *Drosophila* embryos.

Schéma Shh dráhy



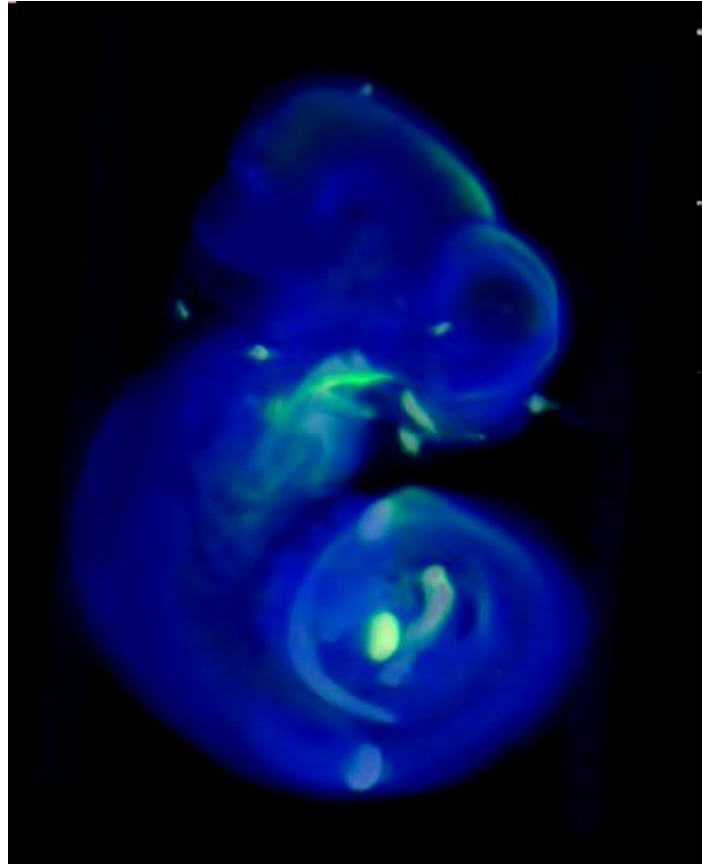
- Sonic hedgehog (SHH) je modifikován oxysterolem a pro sekreci vyžaduje protein Dispatched (Disp)
- Shh váže Patched (PTCH), který je za normálních okolností inhibítozem Smoothened (SMO), po vazbě Shh je tato inhibice přerušena
- Uvolnění SMO umožňuje aktivaci transkripčních faktorů z rodiny GLI, které se přesouvají do jádra a spouští transkripci

Schéma Shh dráhy

- legenda k obrázku:

Sonic hedgehog (SHH) is translated as a ~45kDa precursor and undergoes autocatalytic processing to produce an ~20kDa N-terminal signaling domain (referred to as SHH-N) and a ~25kDa C-terminal domain with no known signaling role (1 on figure 5). During the cleavage, a cholesterol molecule is added to the carboxyl end of the N-terminal domain, which is involved in trafficking, secretion and receptor interaction of the ligand. When SHH reaches its target cell, it binds to the Patched-1 (PTCH1) receptor(3). In the absence of ligand, PTCH1 inhibits Smoothed (SMO), a downstream protein in the pathway(4). It has been suggested that SMO is regulated by a small molecule, the cellular localisation of which is controlled by PTCH. PTCH1 has a sterol sensing domain (SSD), which has been shown to be essential for suppression of Smo activity. A current theory of how PTCH regulates SMO is by removing oxysterols from SMO. PTCH acts like a sterol pump and remove oxysterols that have been created by 7-dehydrocholesterol reductase. Upon binding of a Hh protein or a mutation in the SSD of PTCH the pump is turned off allowing oxysterols to accumulate around SMO. This accumulation of sterols allows SMO to become active or stay on the membrane for a longer period of time. The binding of SHH relieves SMO inhibition, leading to activation of the GLI transcription factors(5): the activators Gli1 and Gli2 and the repressor Gli3. The sequence of molecular events that connect SMO to GLIs is poorly understood. Activated GLI accumulates in the nucleus(6) and controls the transcription of hedgehog target genes(7).

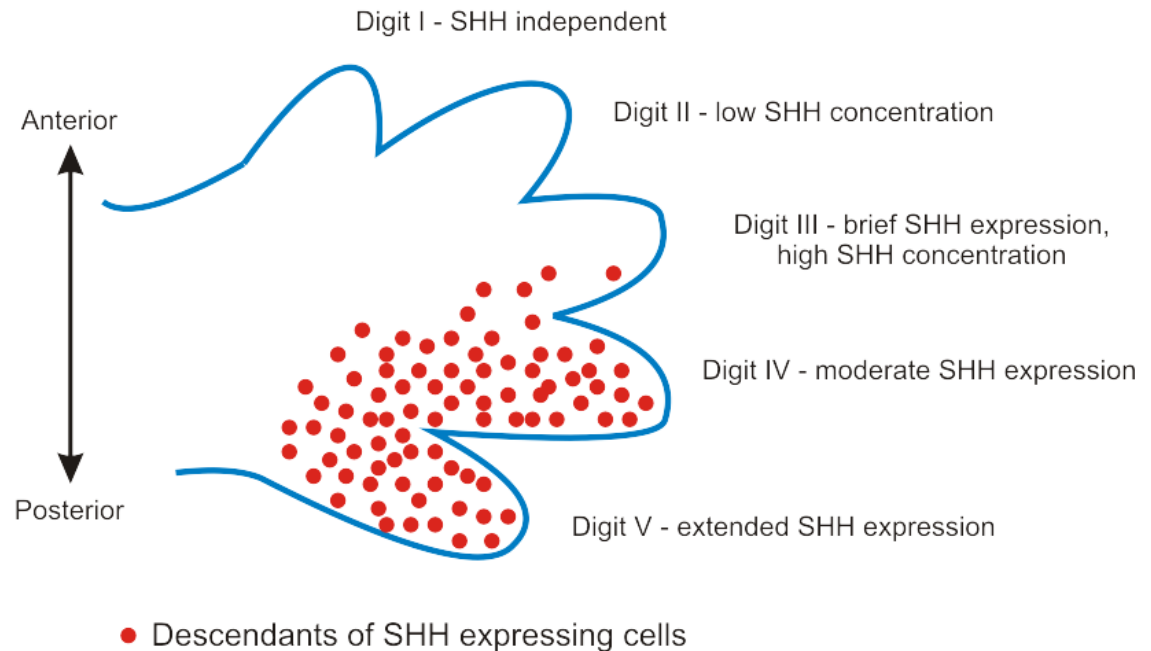
Shh – učebnicový morfogen



Např. specifikace jednotlivých prstů končetiny

Shh

Shh = jeden z nejlépe popsáných klasických morfogenů (tzv. **model francouzské vlajky**) – v závislosti na koncentraci morfogenu se spouští odlišné transkripční programy

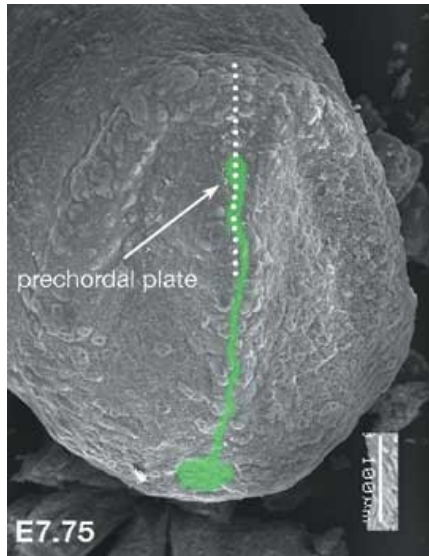


Např. specifikace jednotlivých prstů končetiny

Přirozené inhibitory Shh dráhy

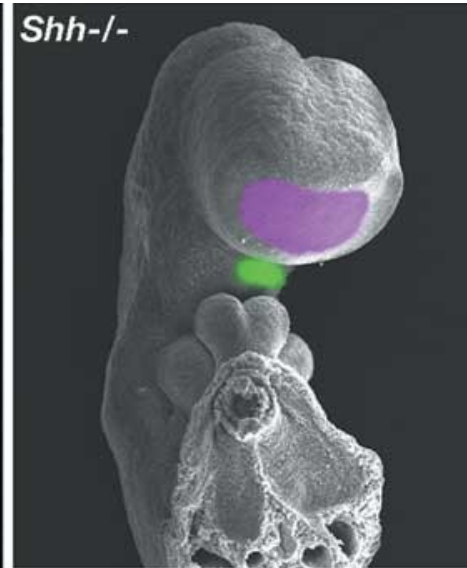
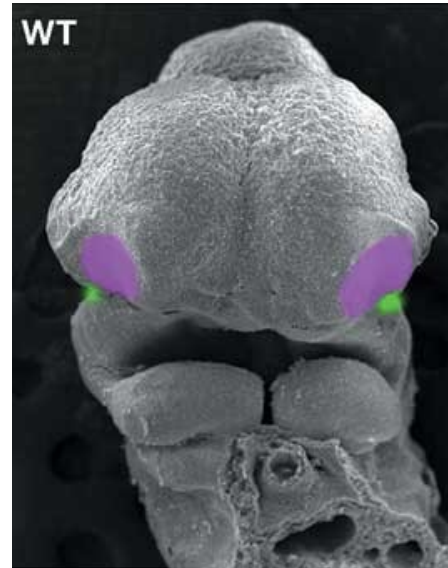


cyclopamin – teratogenní alkaloid z kýchavice (*Veratrum californicum*), poprvé identifikován jako látku způsobující cyklopii (= 1 oko) a holoprosencephalii u ovcí



Expression of Sonic hedgehog (Shh) protein and the determination of the midline structure in mouse embryo.

An SEM micrograph of the frontal view of a mouse embryo (fetal age 7.75 days). Shh protein is green. The dotted line in the micrograph shows the region: Shh antibody reveals Shh. The part that will become the brain (head fold) is followed by the prechordal plate. Shh (in green) that is expressed in the prechordal plate induces midline structure formation.

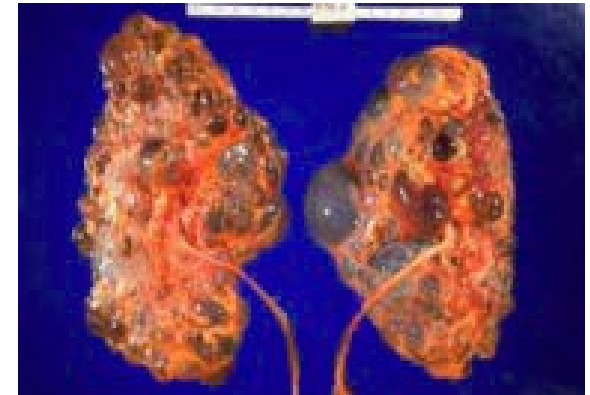


Model mice with Holoprosencephaly due to a Sonic Hedgehog (Shh) deficiency.

An SEM micrograph of ten-day old mouse embryos (front view of face). The mouse deficient in Shh gene (right) has no midline structure and only one region (eye position shown in green). Note, too, the lack of nostril separation due to no midline structure. The normal embryo (left), by contrast, has both the eyes and nostrils separated to between the two hemispheres.

Hedgehog (Hh) dráha je vázána na primární cilie

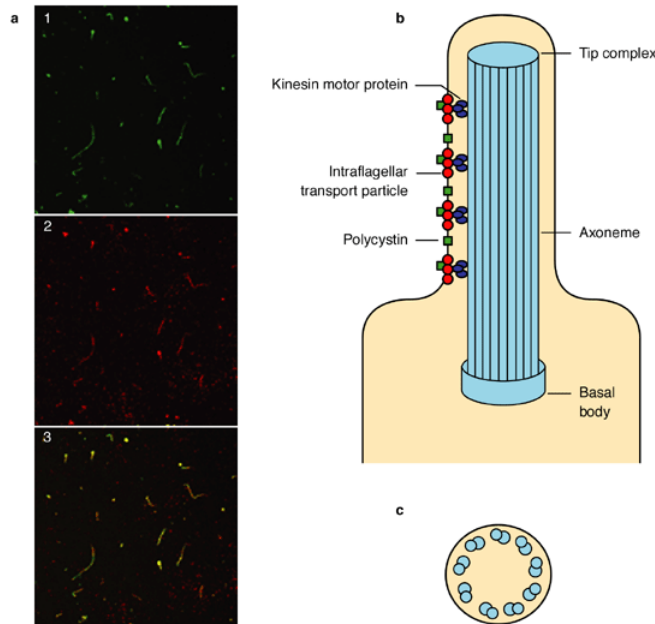
- Abnormální Hh/Wnt a s nimi spojená onemocnění jsou způsobena defekty ve tvorbě primárních cilií (infertilita, polydaktylie, polycystické ledviny, degenerace retiny).
- Hh je přímo vázán na primární cílie.



Primary cilia vs. motile (secondary) cilia

PRIMÁRNÍ

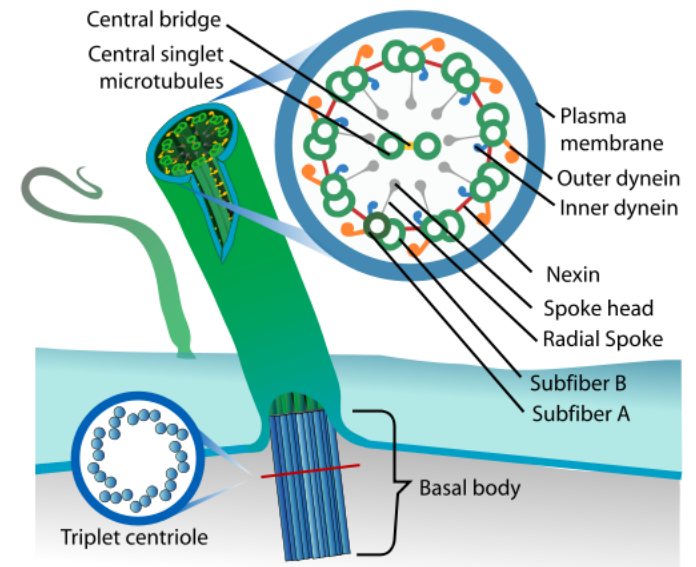
- struktura 9+0
- nepohyblivé
- téměř všechny buňky (www.primary-cilium.co.uk)
- solitérní



The primary cilium

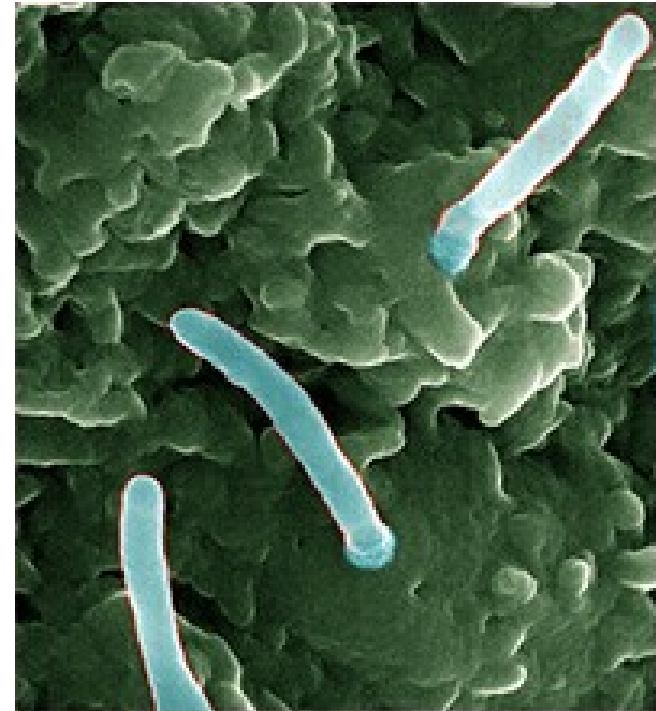
SEKUNDÁRNÍ

- struktura 9+2
- pohyblivé
- epitel tracheje, vejcovodů, ependym...



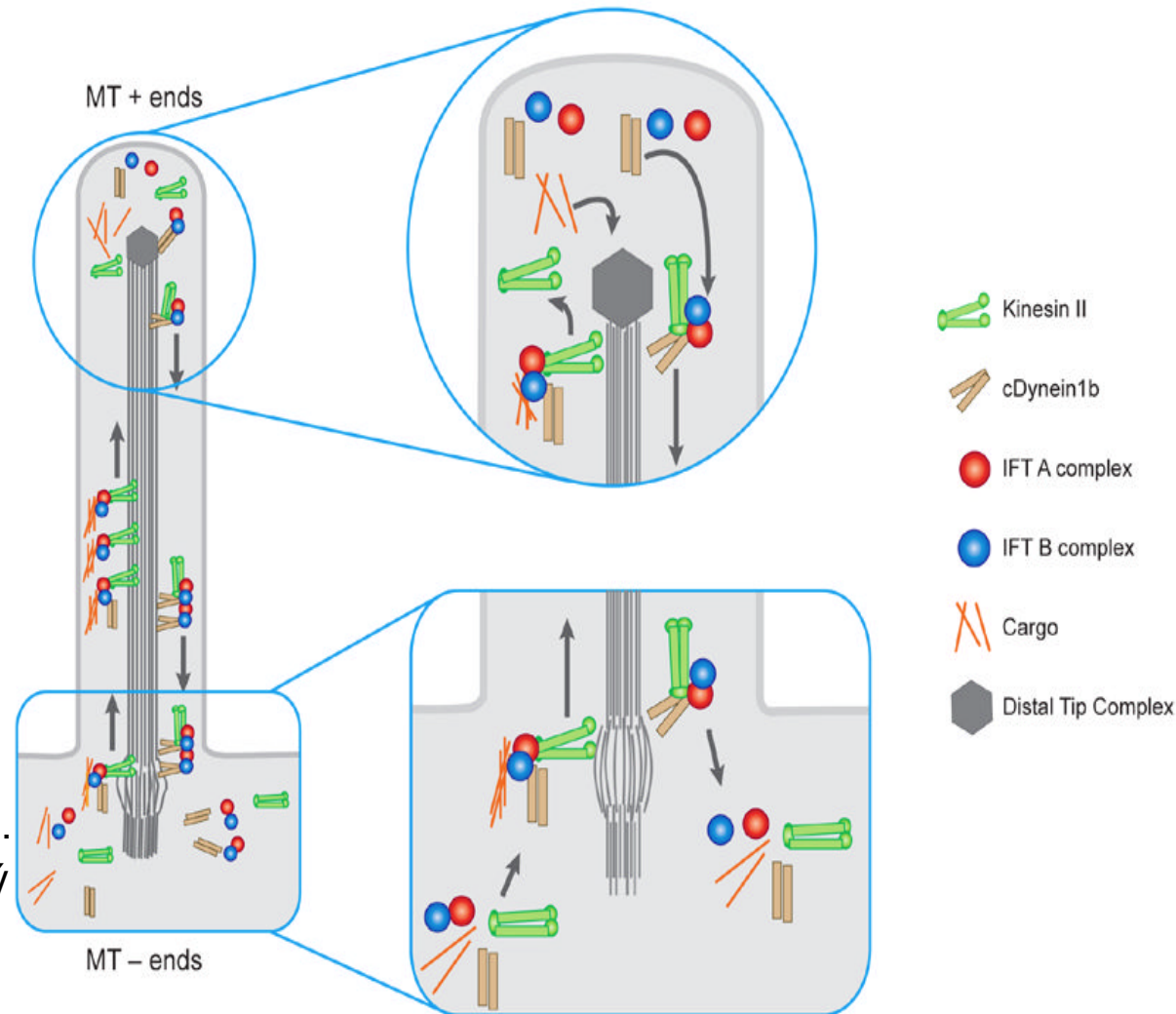
Primární cilie - funkce

- délka 2-10 μm , průměr 0.25 μm
- chemo- a osmosenzory
- fotoreceptory
- mechanoreceptory
- komunikace v extracelulární matrix
- nodální cilie
 - pohyblivá
 - blastocysta
 - pravolevá souměrnost
- model transdukce – receptory iontové kanály, efektorové proteiny, transkripční faktory

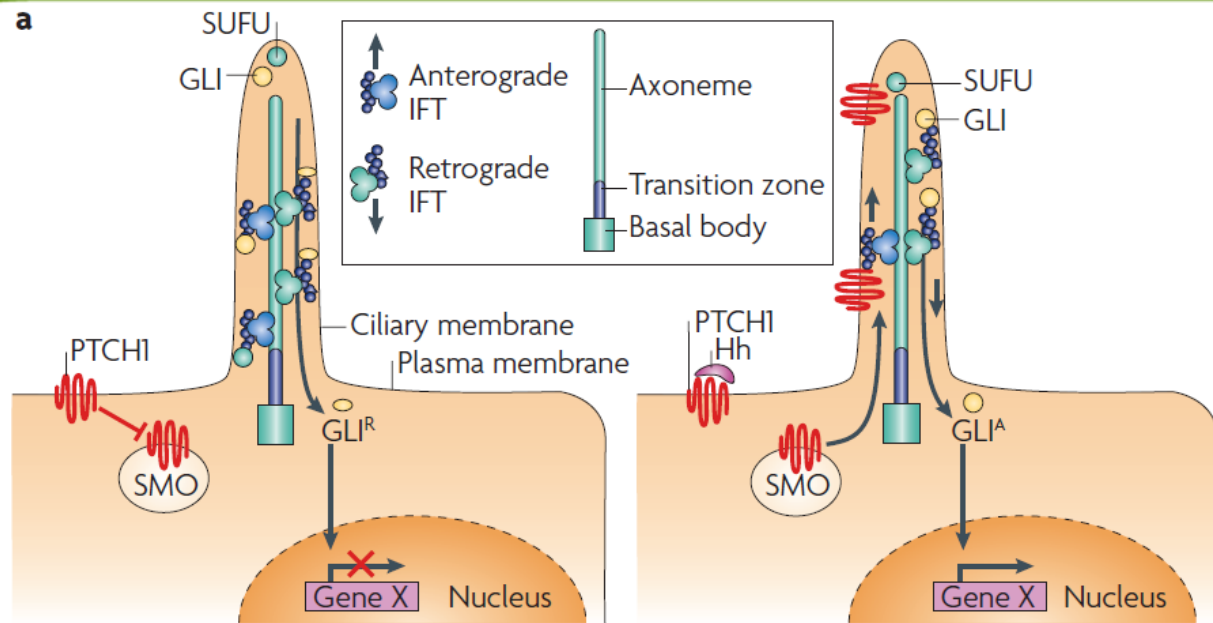


Intraflagelární transport (IFT)

- Poprvé popsali Kozminski et al. 1993 pomocí DIC mikroskopie
- Za transport zodpovědný kinesin-II – transport k distálnímu „+“ konci a dynein zodpovědný za transport k „-“ konci.
- Kif3A, Kif3B (podjednotky kinesinu) KO buňky netvoří cile.
- IFT je zodpovědný za regulaci signálních drah vázaných na primární cile



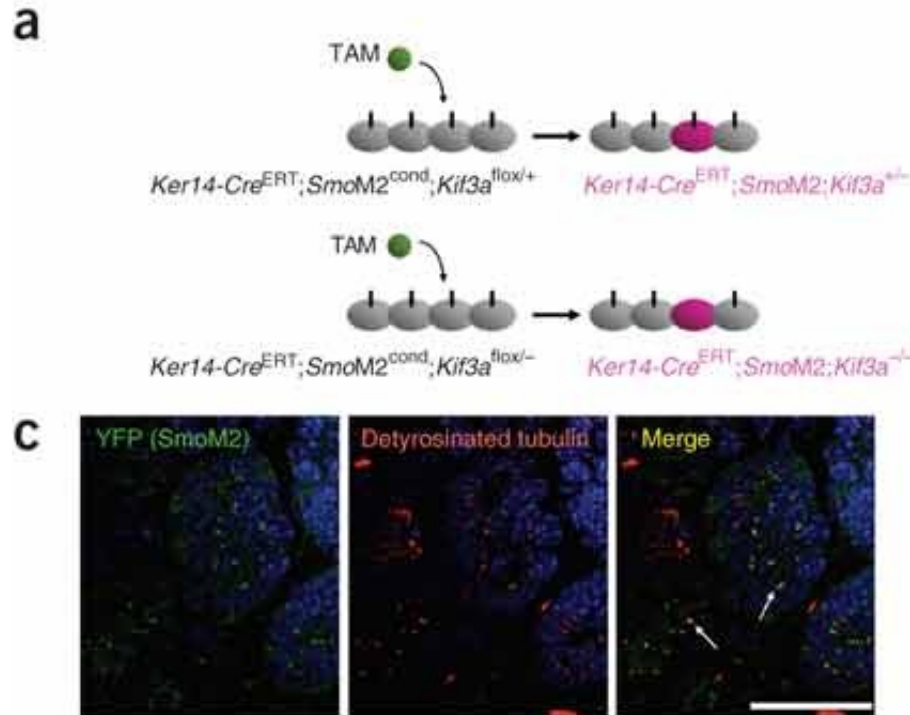
Primární cilie a Hh signalizace



- Je spojen s primárními ciliemi
- Ligand se naváže na patch (Ptc) protein, což způsobí zrušení inhibičního efektu Ptc na protein smoothened (Smo), který transdukuje signál přes glioma transkripční faktory (Gli) do jádra, kde řídí expresi Hh genů. (Gli1, Gli2 a Gli3A jsou aktivátory a Gli3R je represor). Hlavním represorem je SuFu.
- IFT hraje klíčovou úlohu ve funkci regulace Hh signální dráhy (spojuje Smo a Gli)
- Mutace Kif3A a Kif3B mají podobné fenotypy v důsledku ztráty cilie.

Primární cilie a Hh signalizace: důkaz

Basal cell carcinoma – způsobena aktivací Smoothened

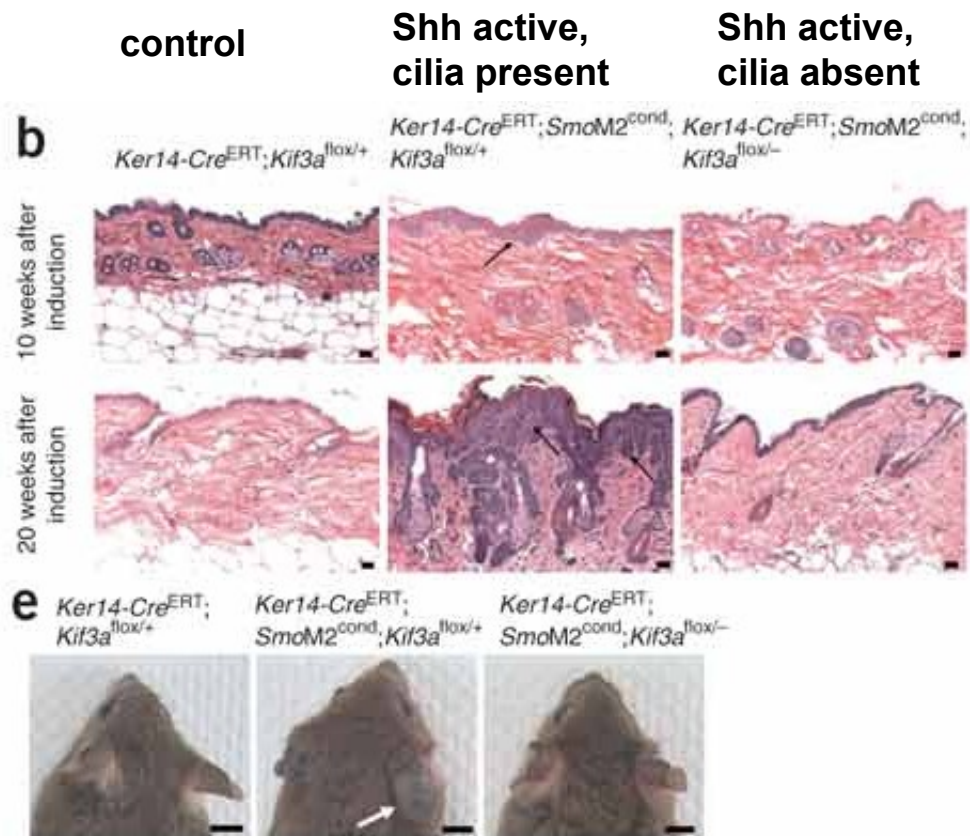


Ker14-Cre: drives expression to the epidermis

SmoM2 (cond): constitutively active Smoothened (activated by Cre)

Kif3a Flox: following Cre leads to Kif3a deletion and primary cilia loss

Primární cilie a Hh signalizace: důkaz

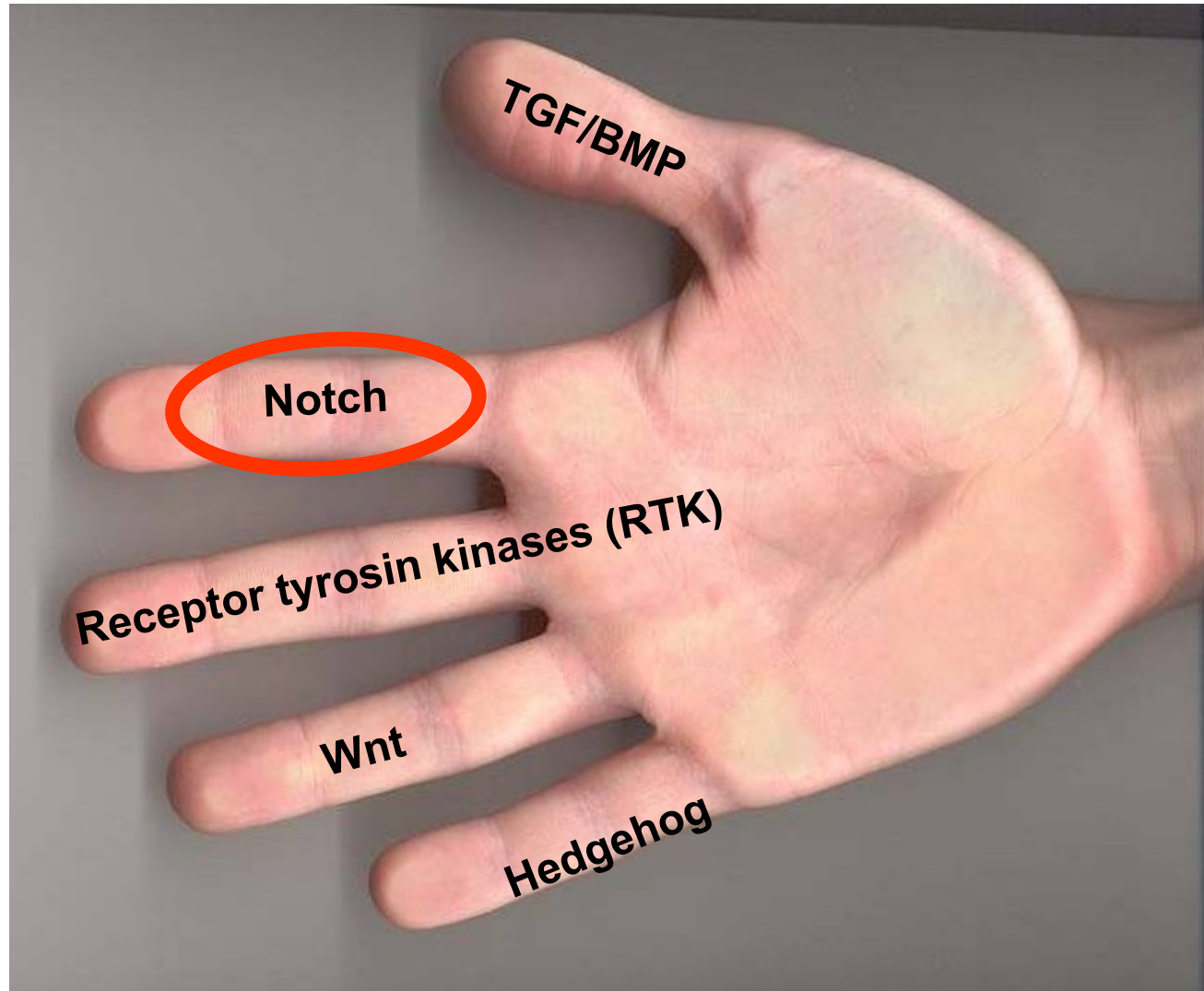


Ker14-Cre: drives expression to the epidermis

SmoM2 (cond): constitutively active Smoothened (activated by Cre)

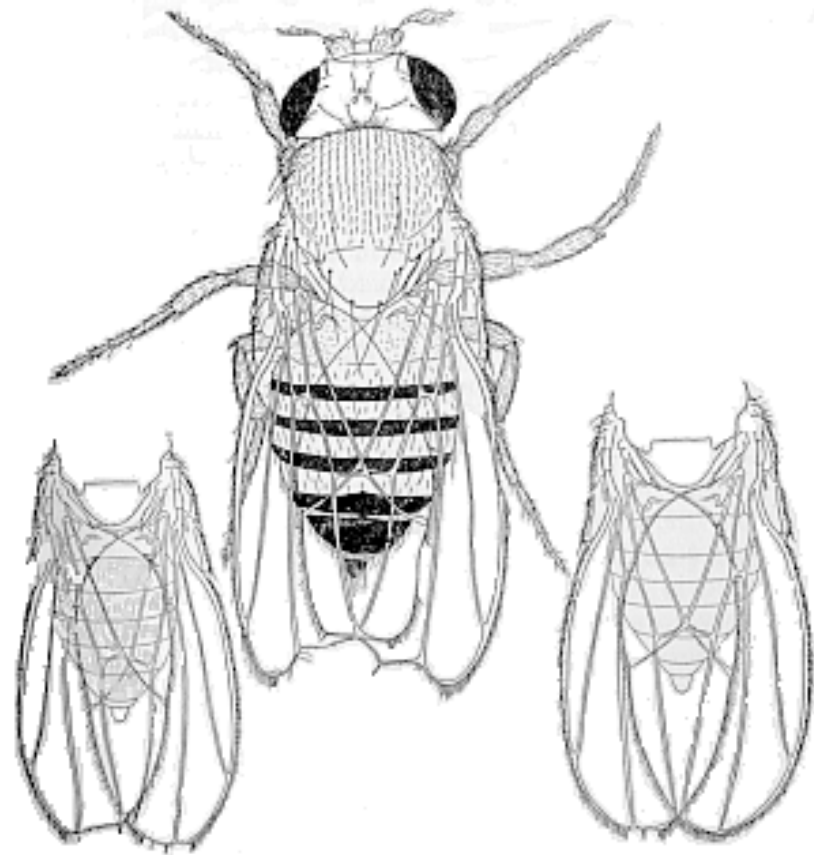
Kif3a Flox: following Cre leads to Kif3a deletion and primary cilia loss

Klíčové molekulární komponenty vývoje

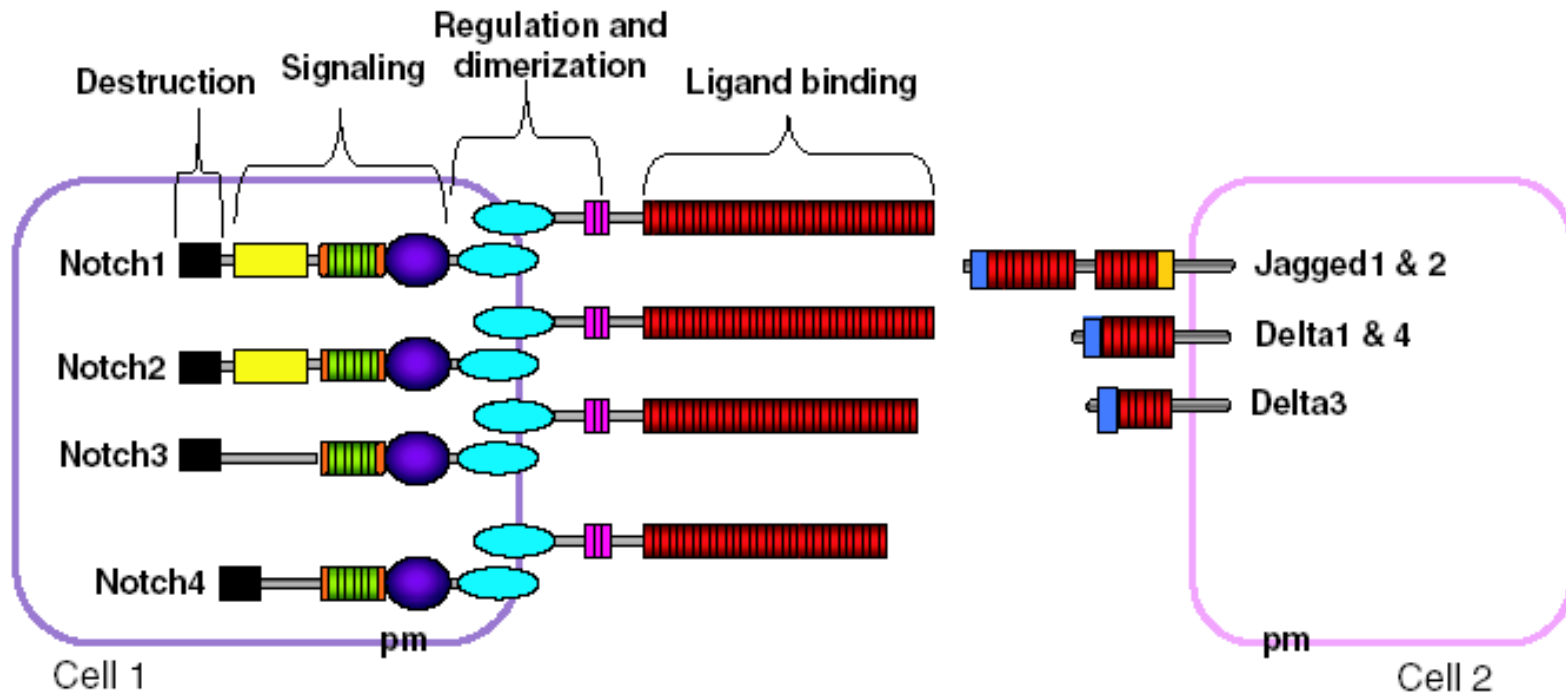


Notch

- Notch=zářez – podle prvního fenotypu octomilky se zářezy na křídlech (T.H. Morgan, 1919)



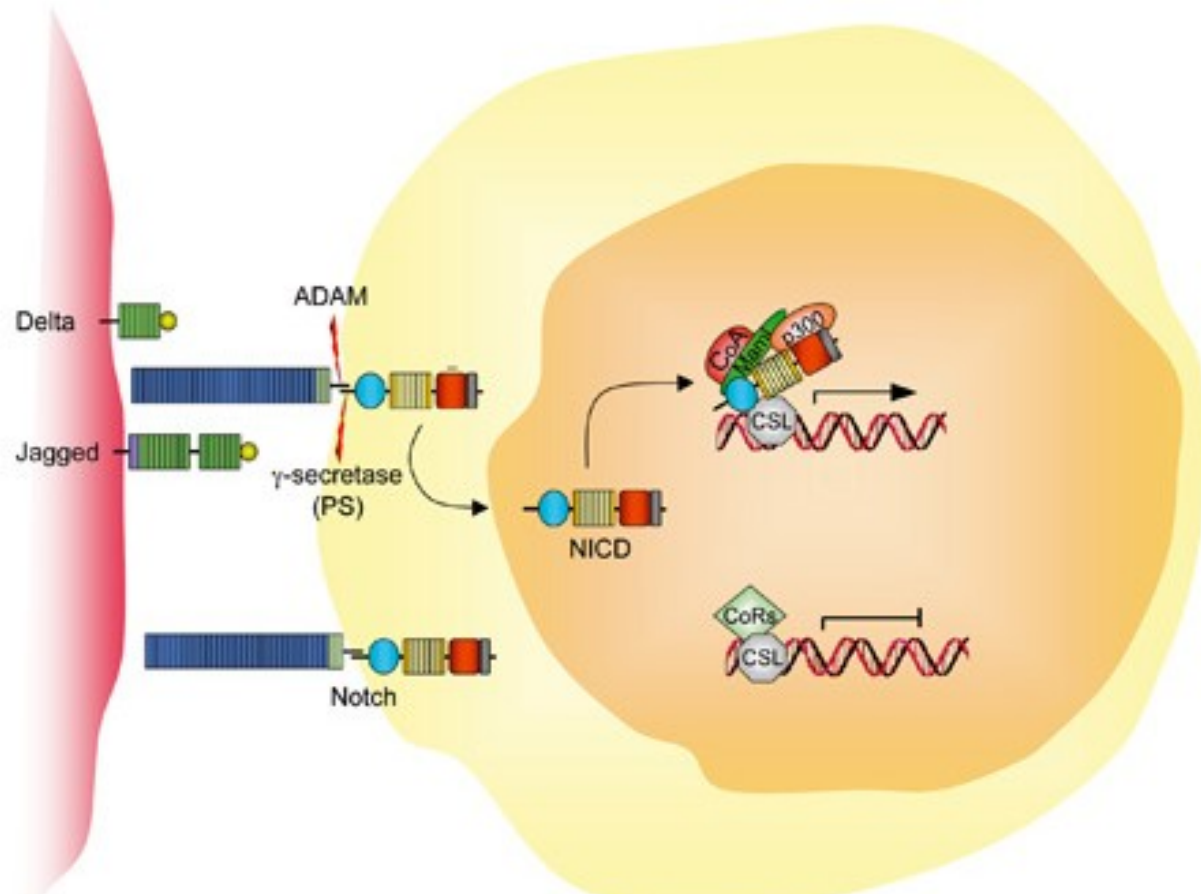
Notch



Transmembránové
heterodimerické receptory
Notch 1-4

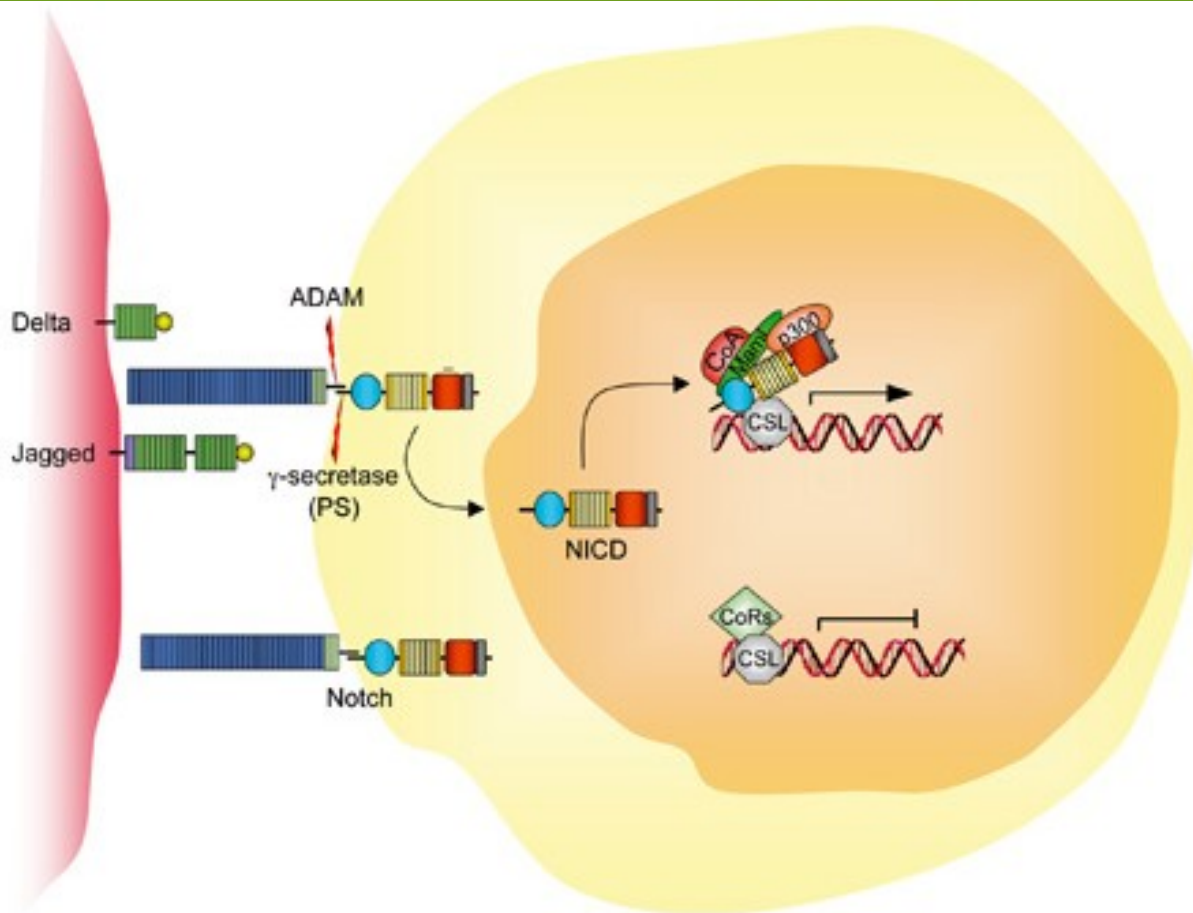
Notch ligandy Jagged a Delta
– jsou vázány na buněčný
povrch

Notch dráha - overview



- Vazba ligandu Notch receptor aktivuje dvě proteázy (enzymy specificky štěpící protein)
- Proteázy jsou z rodiny ADAM a gamma-sekretáz
- Štěpení Notch těmito proteázami uvolňuje tzv. NICD (Notch intracellular domain), který se uvolňuje a do cytoplazmy a následně přesouvá do jádra
- NICD přímo interaguje s transkripčními faktory CBF1/Mastermind a spouští transkripci

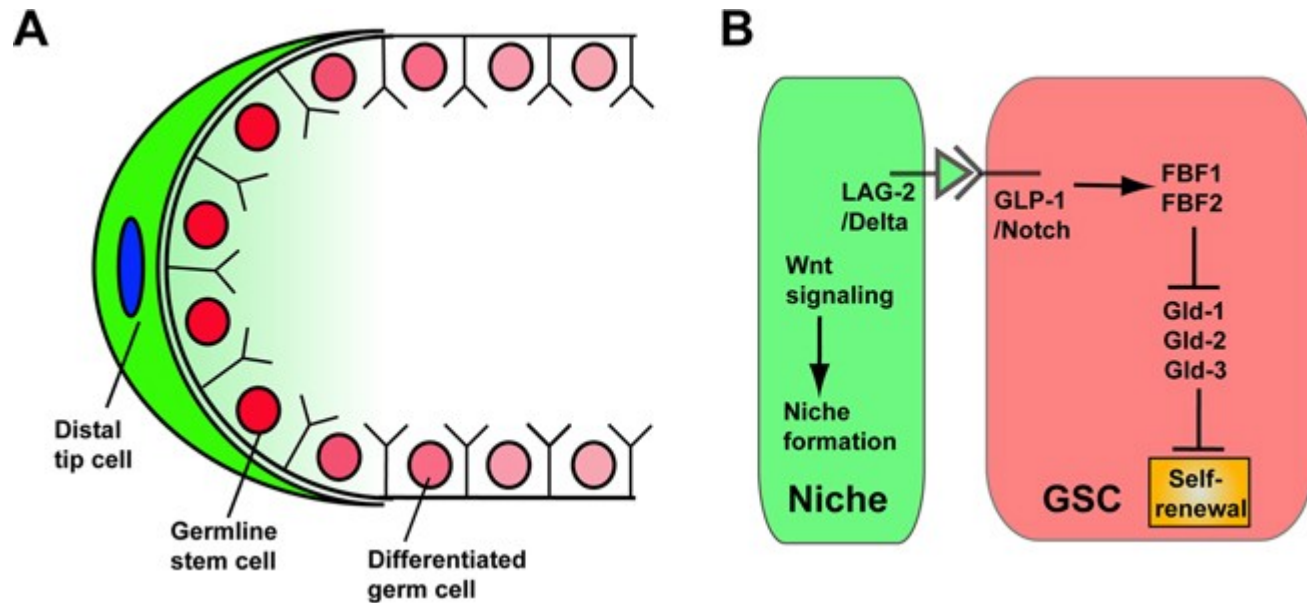
Notch dráha - biologie



- Díky přímému působení má význam zejména při diferenciaci
- Typicky např. „Binary decisions“ a laterální inhibici
- Role v nikách kmenových buněk nebo při angiogenezi

Nika zárodečných kmenových buněk (*Caenorhabditis elegans*)

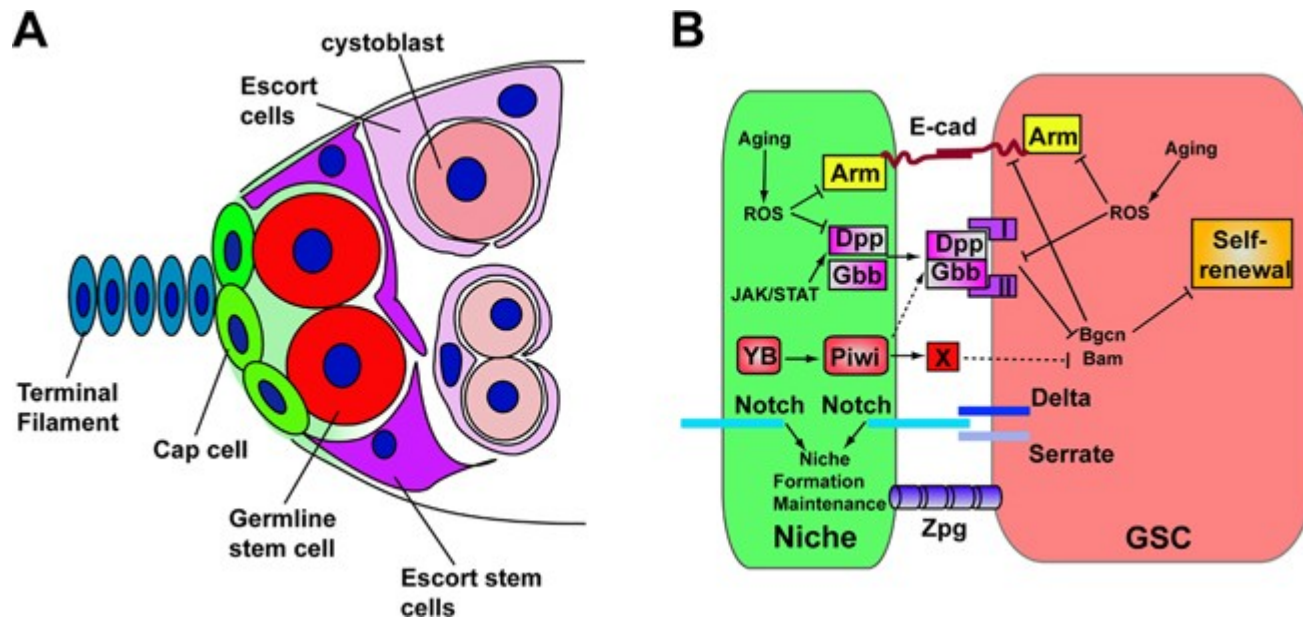
➔ <https://www.stembook.org/node/497>



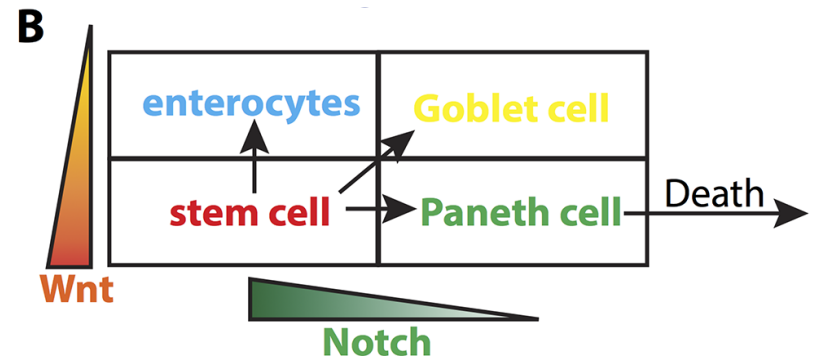
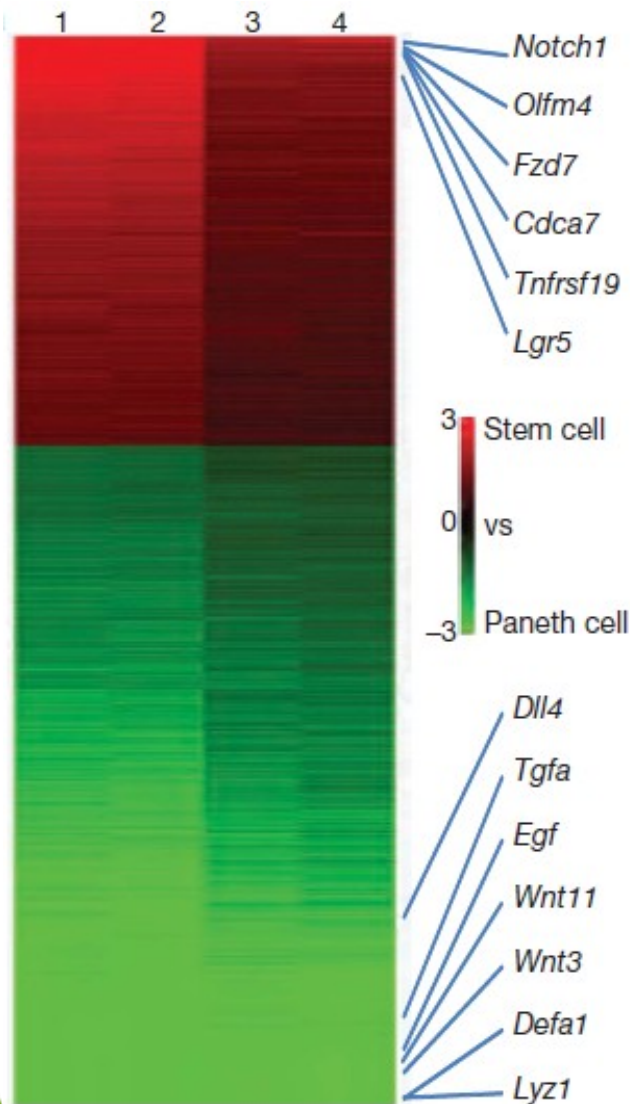
Laterální inhibice – proces, který zajistí, že dvě sousedící buňky nebudou mít stejnou buněčnou identitu (fate); díky signálním drahám (např. Notch), které díky přímému kontaktu zajistí odlišnost sousedících buněk

Nika zárodečných kmenových buněk (Drosophila melanogaster)

➔ <https://www.stembook.org/node/497>



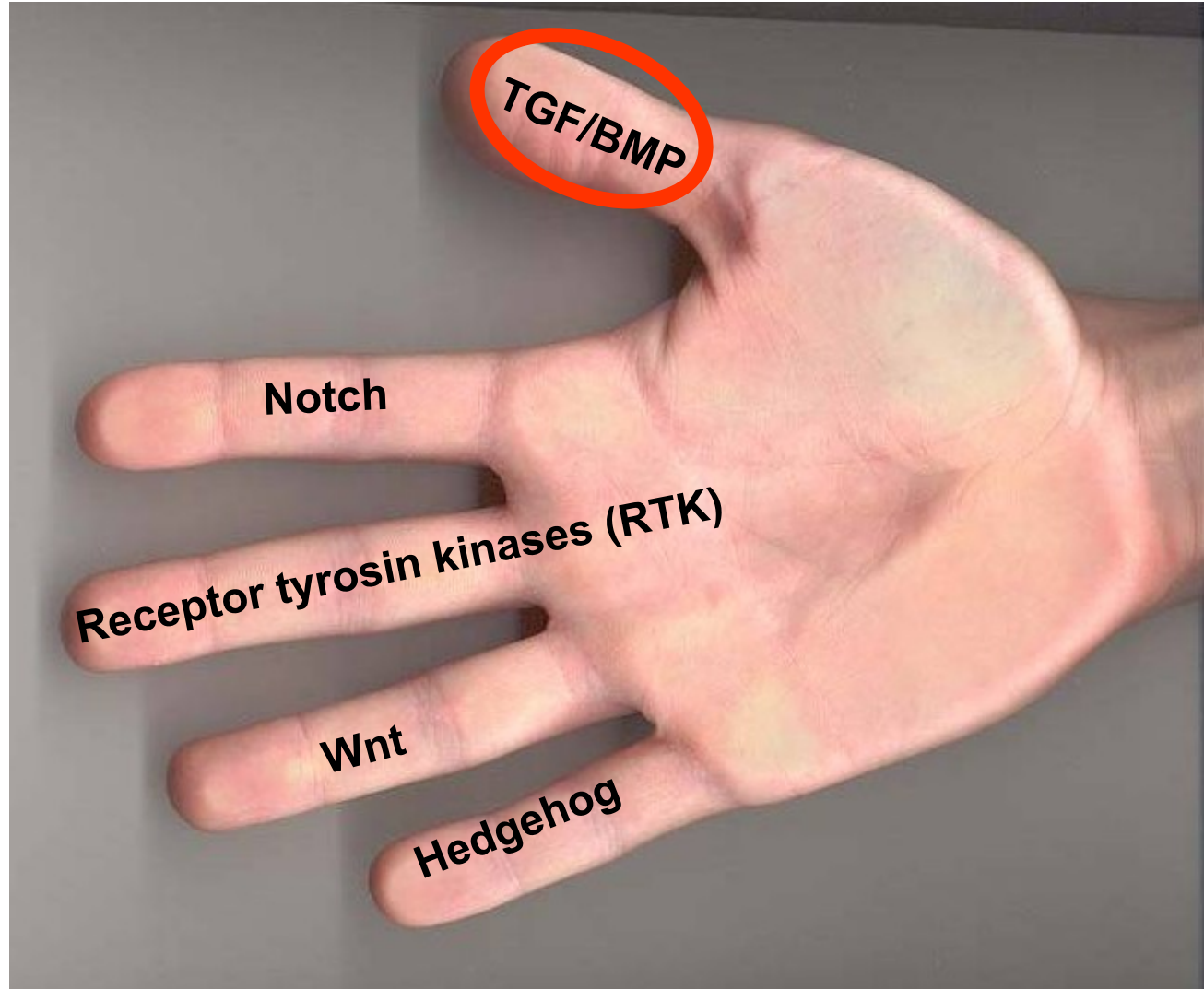
Nika kmenových buněk ve střevě



Notch dráha – role v angiogenezi

- Viz další přednáška

Klíčové molekulární komponenty vývoje



TGF/BMP

- TGF – transforming growth factor (transformující růstový faktor)
- BMP – bone morphogenetic protein (kostní morfogenetický protein)
- patří do TGF β nadrodiny

TGF beta nadrodina:

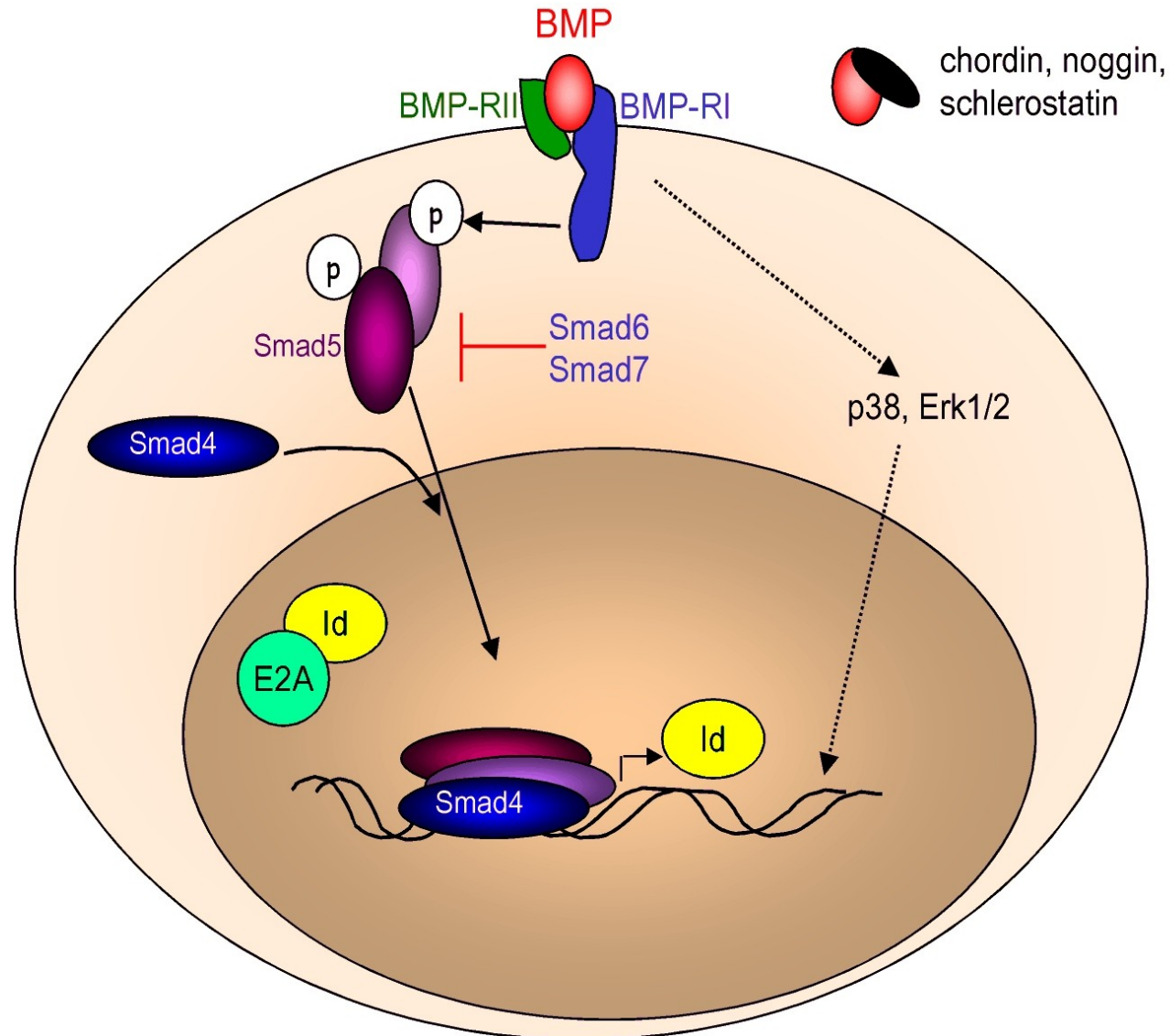
TGF β nadrodina má následující podrodiny:

1. TGF β 1-3
2. BMPs – 20 různých ligandů
3. GDF (growth differentiation factor): 9 ligandů
4. activin/inhibin/nodal

Společným znakem je signalizace přes:

- konzervativní rodinu Ser/Thr kinázových receptorů – jsou dvou typů a po vazbě ligandu dimerizují
- cytoplazmatická signalizace přes tzv. SMAD proteiny

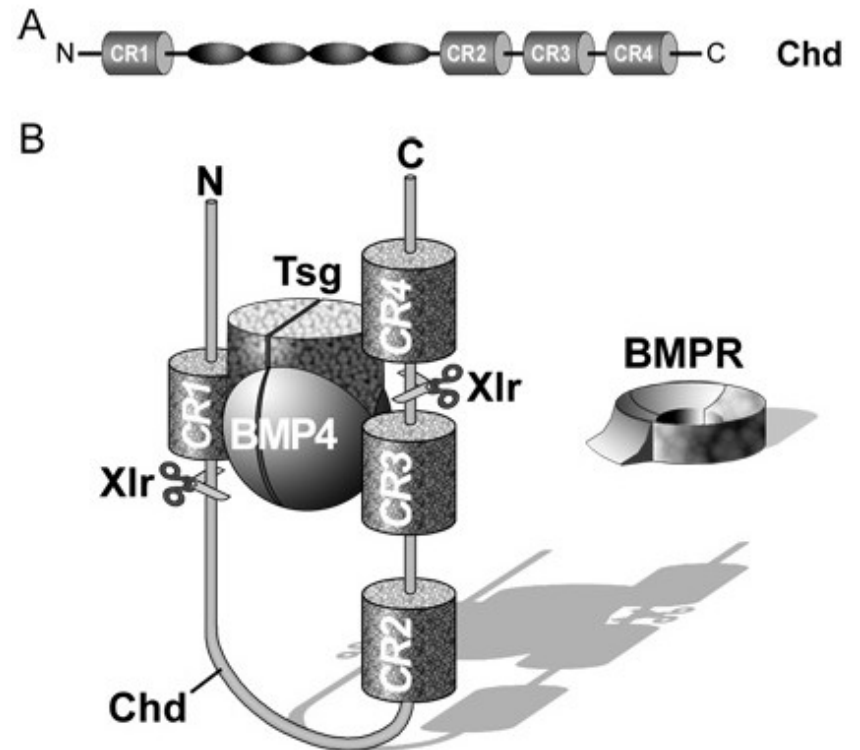
Signální dráha BMP



Inhibitory BMP faktorů

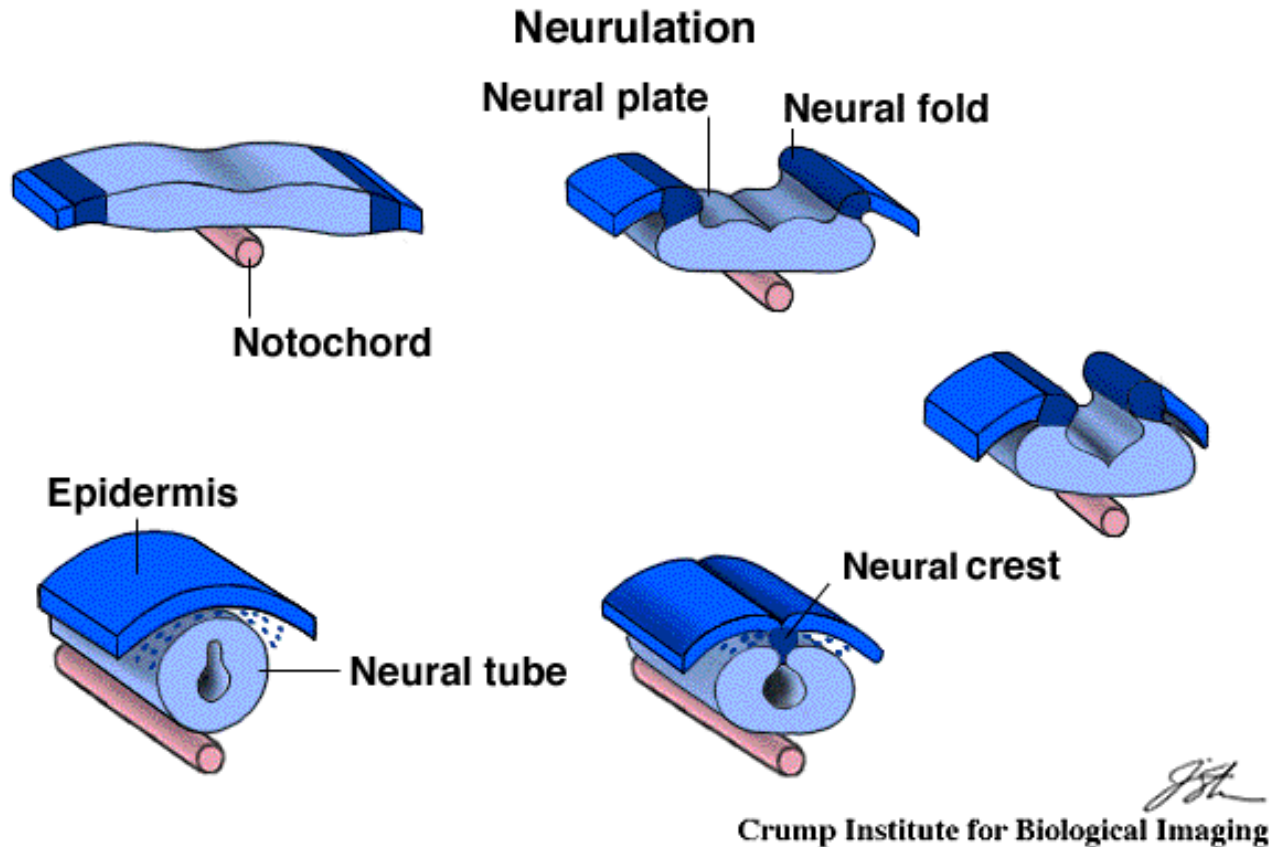
jsou klíčové pro fyziologické funkce BMP

- noggin
- chordin (Chd)
- sklerostin



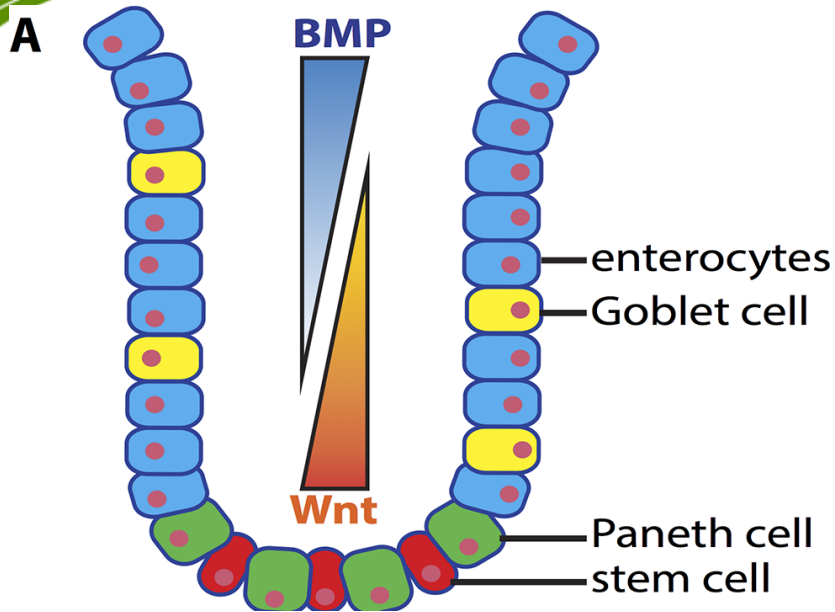
Přímá fyzická interakce mezi chordinem a BMP je podstatou inhibičního působení chordinu

Klíčová role BMP inhibitorů produkovaných notochordem při indukci nervové ploténky



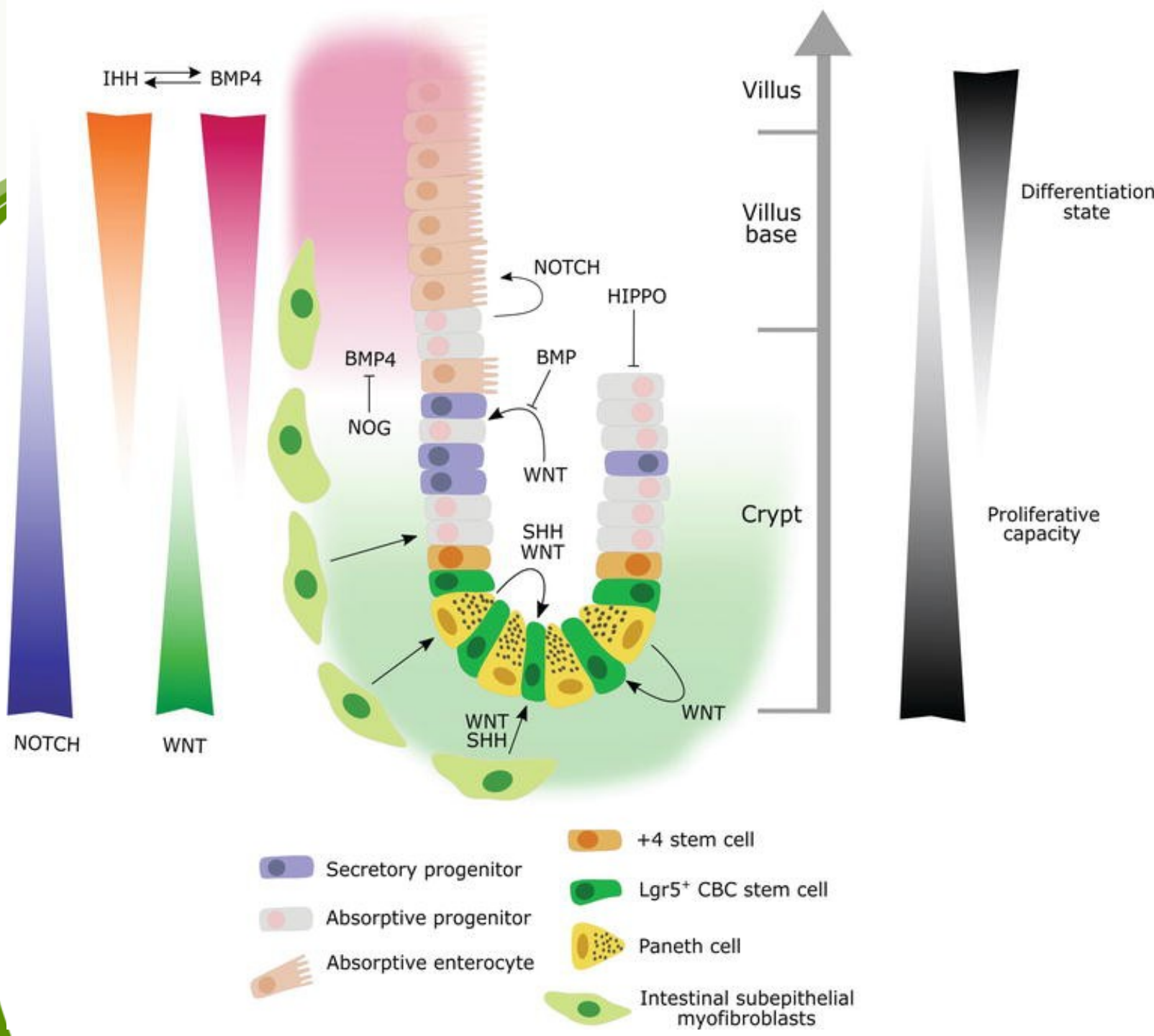
notochord (= chorda) produkuje faktory, které specifikují ektoderm a vedou ke tvorbě nervové ploténky (neural plate). Jde zejména o následující faktory: **noggin**, **chordin** a **folliculin** (inhibitory BMP a aktivinu).

BMP signalizace přímo antagonizuje Wnt ve střevní kryptě

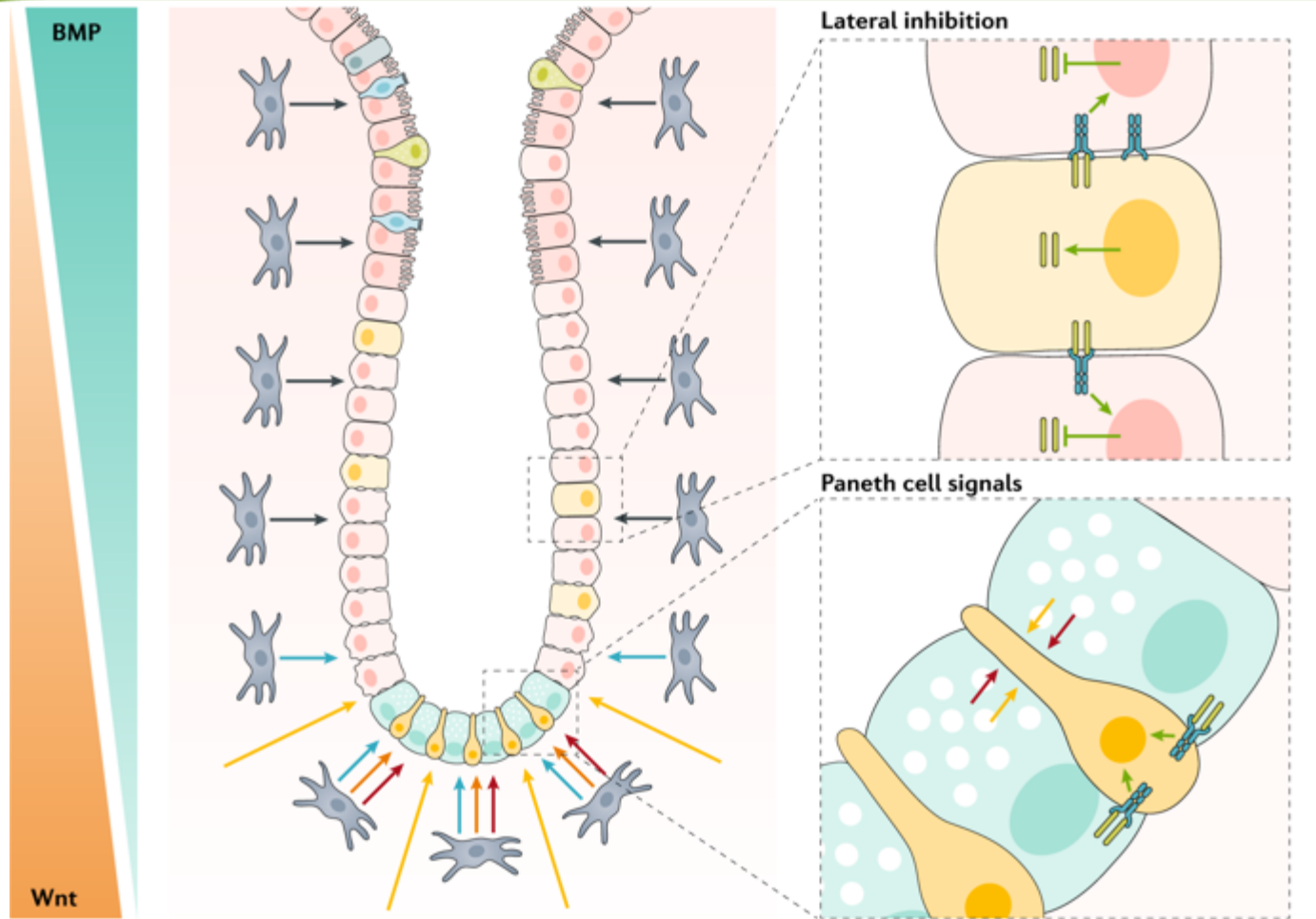


- Noggin (inhibitor BMP) je spolu s Wnt, R-spondinem a EGF základní složkou média pro kultivaci organoidů

Fyziologie buň. systémů



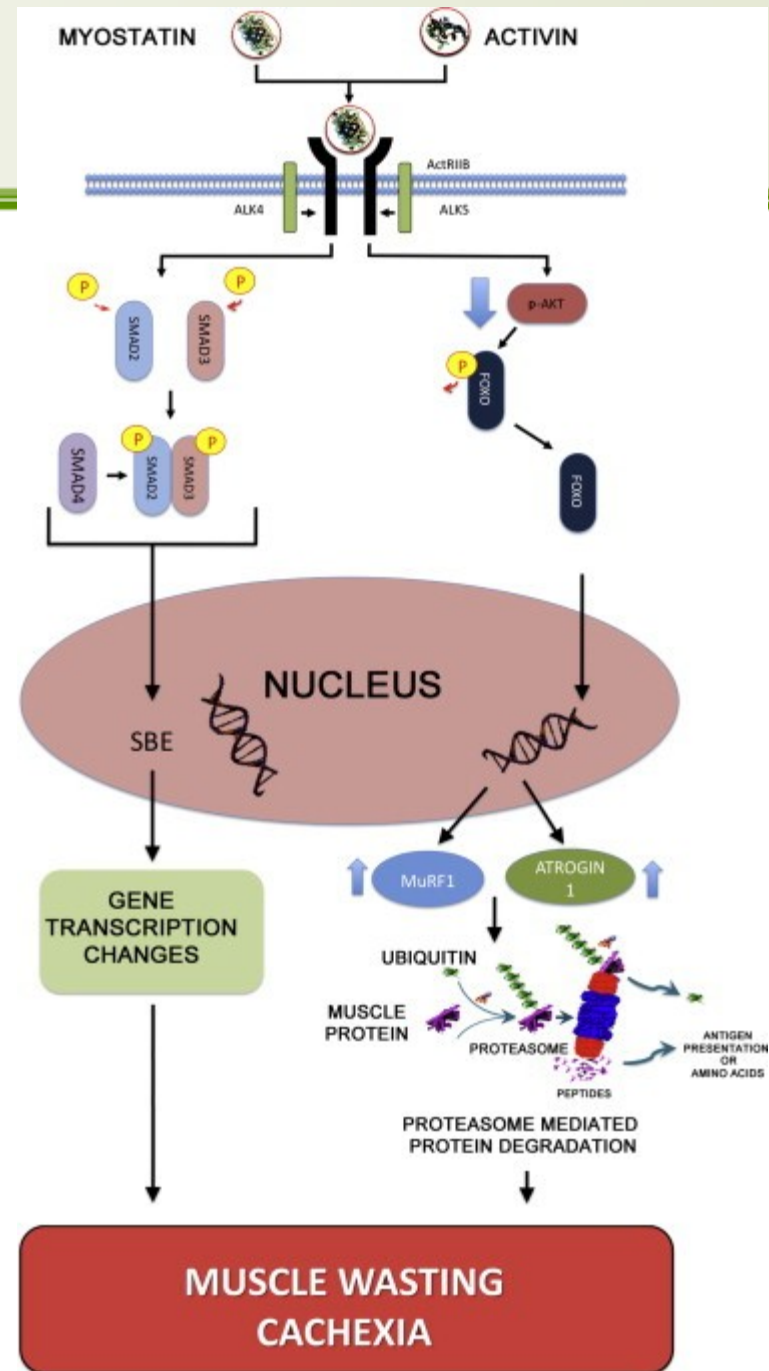
Integrace signálů vede k homeostáze



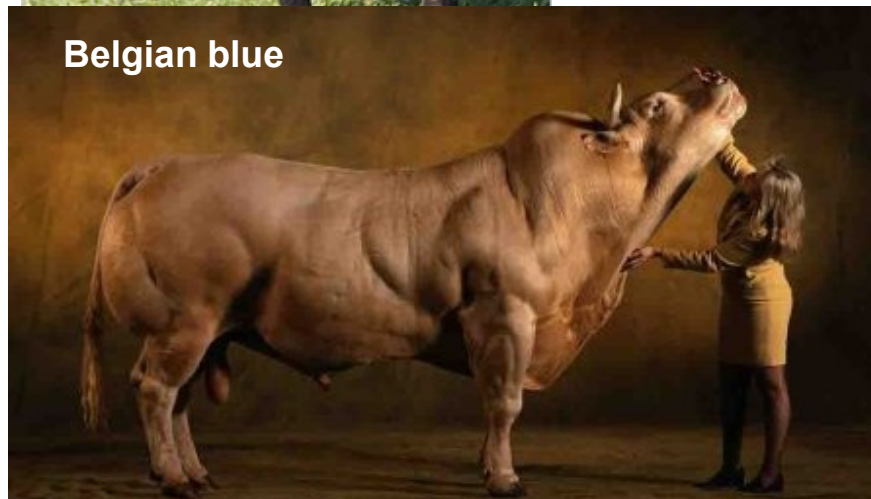
→ BMP ligands	→ R-spondins	Enterocyte	Tuft cell	Goblet cell	Paneth cell
→ BMP inhibitors	→ EGF	CBC cell	Absorptive progenitor	Secretory progenitor	Enteroendocrine cell
→ Wnt ligands	→ Notch signal	Mesenchymal cell			
Notch ligand	Notch receptor				

Další zajímavé proteiny z BMP rodiny

Myostatin (GDF8) – regulátor diference svalů



GDF8 (myostatin) – příklad tzv. master regulátoru konkrétní tkáně



ASK THE TRAINER #8 – MYOSTATIN INHIBITORS

POSTED ON FEBRUARY 17, 2015 BY CHAD SHAW



QUESTION:

What do you think of myostatin inhibitors? I am asking because my workout partner bought one of these products. After doing my own research I am on the fence. I am aware that Myostatin is something the human body produces to slow and regulate muscle growth. I don't know if stopping something your body does naturally is a good idea?

Glen

ANSWER:

Hi, Glen. Myostatin, which is also known as "Growth Differentiation Factor-8" (GDF-8), is a protein embedded in the MSTN gene in humans. It's produced mainly in skeletal muscle cells and binds to receptors in muscle tissue.

TOP RATED PRODUCTS



Kre Alkalyln Hardcore



\$26.99



Vita Drive



\$20.99



Karbolyln Hydrate



\$44.99 - \$48.99



Training Ground Isolate



\$31.99 - \$42.99



Training Ground EAA



\$24.99



Training Ground Protein 6



\$35.99

NATURE | NEWS



Super-muscly pigs created by small genetic tweak

Researchers hope the genetically engineered animals will speed past regulators.

David Cyranoski

30 June 2015



PDF



Rights & Permissions



Xi-jun Yin

These meaty pigs could become the first genetically engineered animals to be approved for human consumption.

Belgian Blue cattle are hulking animals that provide unusually large amounts of prized, lean cuts of beef, the result of decades of selective breeding. Now, a team of scientists from South Korea and China says that it has created the porcine equivalent using a much faster method