Úvod do předmětu

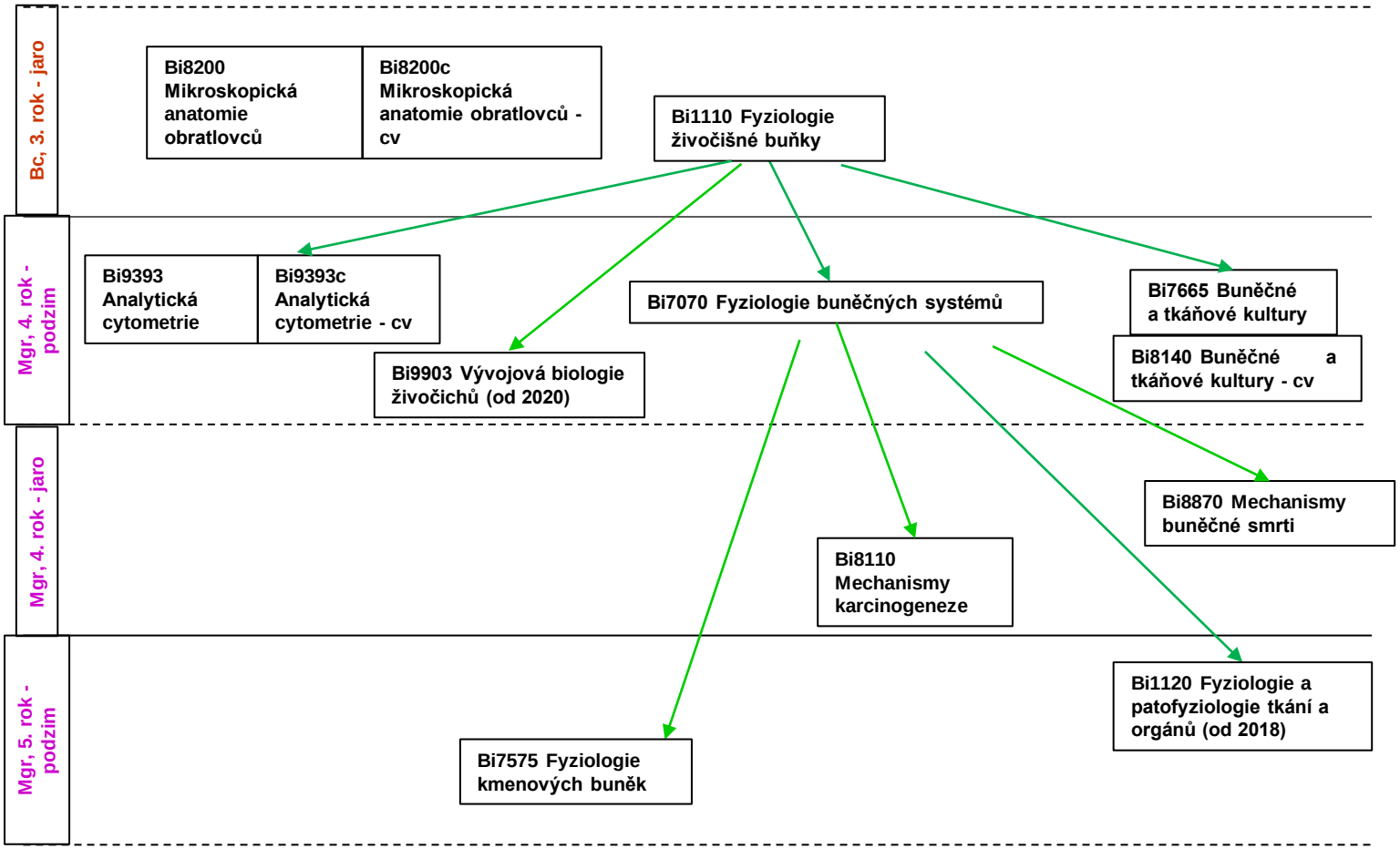
Opakování: Základní principy organizace a funkce živočišné buňky

Vítězslav Bryja

Fyziologie buněčných systémů – od roku 2017/2020

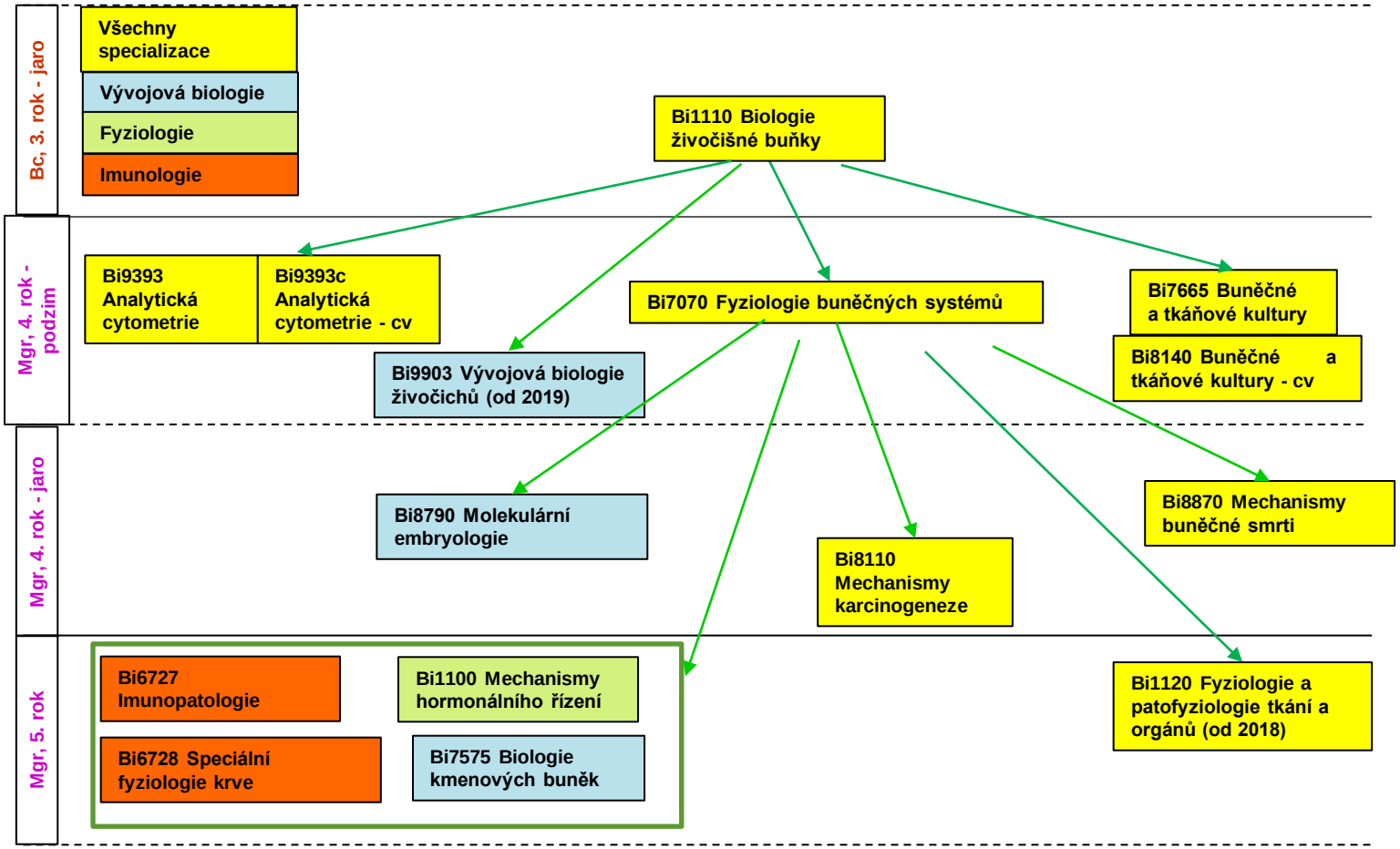
Úvod a základní fakta

- Inovovaný předmět s nově definovanými návaznostmi



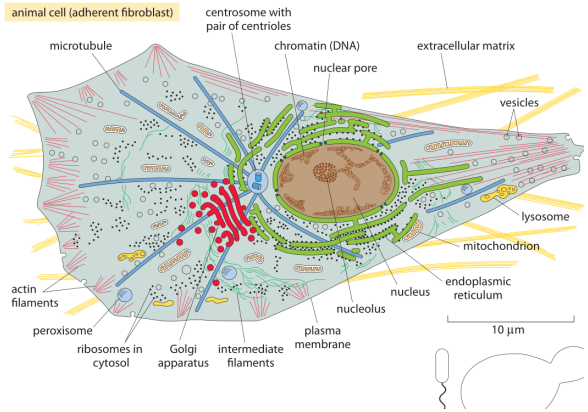
Fyziologie buněčných systémů – od roku 2020

- Inovovaný předmět s nově definovanými návaznostmi



Úvod a základní fakta

Buňka vs. buněčné systémy



Sylabus předmětu

- 1) ÚVOD – základní principy organizace a funkce živočišné buňky (shrnutí klíčových fakt jak základ pro přednáškový cyklus);
- 2) KMENOVÉ BUŇKY A HIERARCHICKÁ ORGANIZACE TKÁNÍ – definice kmenových buněk, embryonální kmenové buňky – definice, příprava, využití; indukované pluripotentní kmenové buňky, tkáňové kmenové buňky, nika kmenových buněk, hierarchická organizace tkání – střevní epitel jako modelový příklad, homeostáza střevní krypty; pomalu a rychle se obnovující buněčné populace, organoidy, regenerace tkání
- 3) REGULACE BUNĚČNÝCH SYSTÉMŮ I–hlavní signální kaskády uplatňující se v homeostáze a regeneraci (Wnt, Hedgehog, Notch, systémy receptorových tyrozinkináz, BMP/TGF signalizace) a příklady jimi regulovaných procesů;
- 4) REGULACE BUNĚČNÝCH SYSTÉMŮ II – kontrola tkáňové organizace vnějšími vlivy – hypoxie, poškození, mechanické vlivy (role signální dráhy Hippo), význam buněčné polarity a migrace buněk/skupin buněk

Sylabus předmětu

- 5) BUNĚČNÝ METABOLISMUS A TRANSPORT I - hepatocyt - modelový systém pro metabolismus lipidů a mastných kyselin, tvorbu a ukládání cukrů a jejich metabolismus, metabolismus dusíkatých látek;
- 6) MODELOVÉ BUNĚČNÉ SYSTÉMY I – vývoj, architektura a regenerace jater, játra jako modelový příklad tkáně regenerující z diferencovaných buněk; jaterní zonace a molekulární mechanismy regulace základních jaterních funkcí (produkce žluči, detoxifikace a produkce významných látek pro organismus)
- 7) MODELOVÉ BUNĚČNÉ SYSTÉMY II – plíce a dýchací cesty – principy vývoje a organizace; transport plynů buňkami a orgány;
- 8) MODELOVÉ BUNĚČNÉ SYSTÉMY III – krvetvorba, systém krevních buněk a krvetvorné orgány; principy diferenciace

Sylabus předmětu

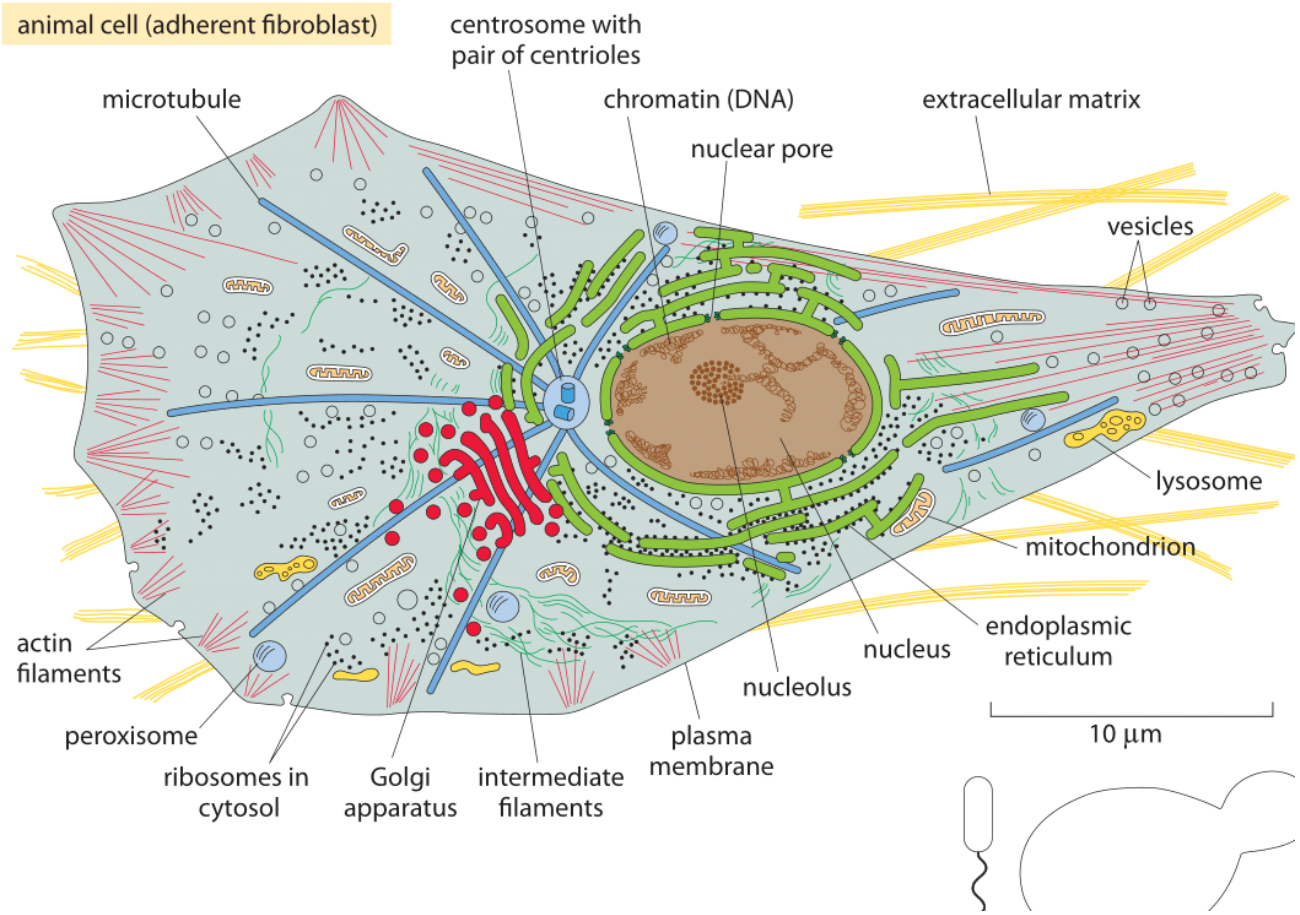
- 9) MODELOVÉ BUNĚČNÉ SYSTÉMY IV – kůže, její obnova a regenerace; prostata a prsní epitel jako příklady endokrinně regulovaných tkání;
- 10) SIGNALIZACE A ZPĚTNÉ VAZBY - obecné principy, jejich aplikace ve fyziologii;
- 11-12) HOMEOSTÁZA, ZDRAVÍ, NEMOC – organismus jako hierarchický systém, spolupůsobení nervové a endokrinní soustavy – příklady ovlivnění buněčných populací, intermediární metabolismus a jeho jednotlivé složky – jejich úloha v regulaci buněčných populací; systémové reakce – stres; chování buněčných systémů ve stresu a nemoci – příklady možných terapeutických intervencí;

Plán semestru

- 6. 10. VB - úvod, základní principy organizace a funkce živočišné buňky
- 13. 10. VB - kmenové buňky a hierarchická organizace tkání
- 20. 10. VB - regulace buněčných systémů I – hlavní signální kaskády uplatňující se v homeostáze a regeneraci
- 27. 10. VB - regulace buněčných systémů II – kontrola tkáňové organizace vnějšími vlivy
- 3. 11. JV - buněčný metabolismus
- 10. 11. JV - modelové buněčné systémy – vývoj, architektura a regenerace jater, játra jako modelový příklad tkáně regenerující z diferencovaných buněk
- 17. 11. svátek
- 24. 11. JV - modelové buněčné systémy - plíce a dýchací cesty – principy vývoje a organizace
- 1. 12. KS - modelové buněčné systémy - krvetvorba, systém krevních buněk a krvetvorné orgány, slinivka
- 8. 12. KS - modelové buněčné systémy - kůže, její obnova a regenerace; prostata, prsní epitel jako příklady endokrinně regulovaných tkání
- 15.12. AK - signalizace a zpětné vazby
- 22. 12. AK - homeostáza, zdraví, nemoc I
- 5. 1. AK - homeostáza, zdraví, nemoc II

12.1. předtermín ?

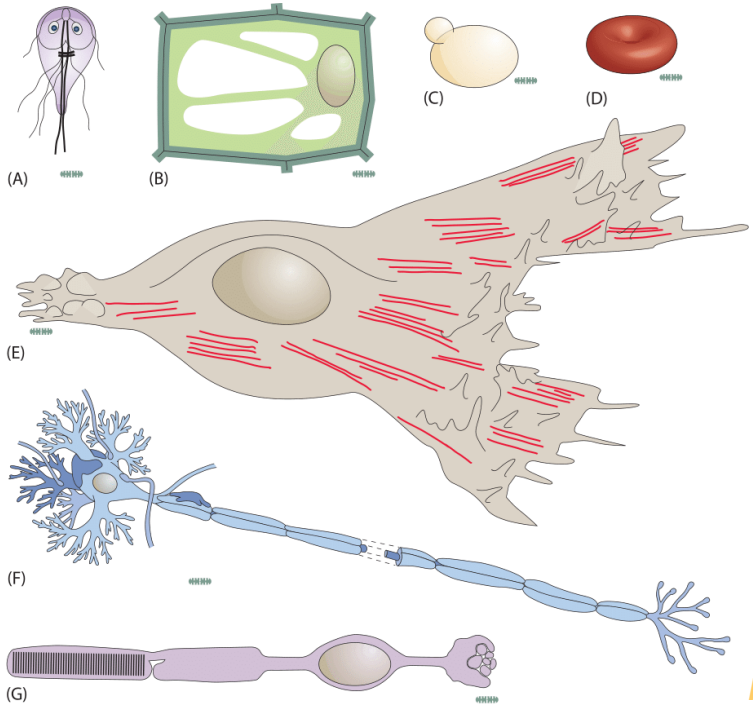
Architektura živočišné buňky



Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 5th ed., New York, Garland Science, 2008

Množství a variabilita buněk v těle

- lidské tělo – cca 3,7 ± 0.8 × 10^{13} buněk (plus podobné množství bakterií) – zahrnují cca 200 různých buněčných typů;



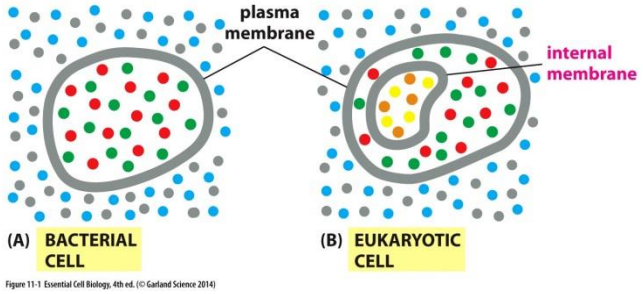
cell type	average volume (μm³)	BNID
sperm cell	30	109891, 109892
red blood cell	100	107600
lymphocyte	130	111439
neutrophil	300	108241
beta cell	1,000	109227
enterocyte	1,400	111216
fibroblast	2,000	108244
HeLa, cervix	3,000	103725, 105879
hair cell (ear)	4,000	108242
osteoblast	4,000	108088
alveolar macrophage	5,000	103566
cardiomyocyte	15,000	108243
megakaryocyte	30,000	110129
fat cell	600,000	107668
oocyte	4,000,000	101664

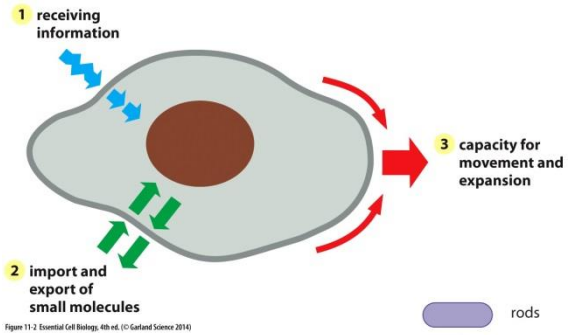
Milo et al., Cell Biology by the Numbers, New York, Garland Science, 2016

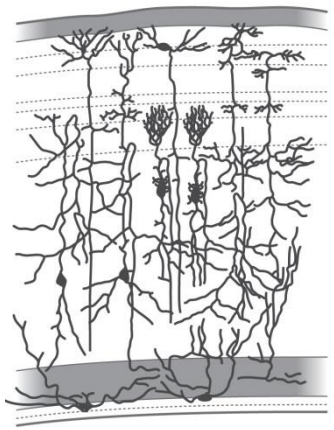
(A) prvok Giardia lamblia, (B) rostlinná buňka, (C) pučící kvasinka, (D) červená krvinka, (E) fibroblast, (F) nervová buňka (G), tyčinka (sítnice)

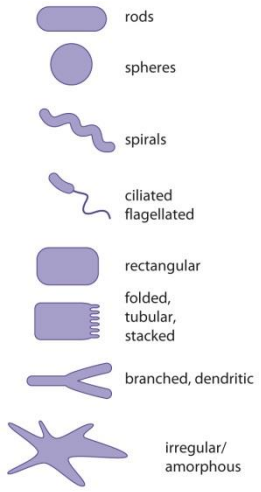
Membrána: zajišťuje základní buněčné funkce

- Separace
  - Semipermeabilní bariéra, izolace
- Výměna
  - Transport a translokace metabolitů a makromolekul dovnitř a ven, zajištění distribuce uvnitř buňky
- Integrace
  - Zajištění mezibuněčné komunikace, adheze, signalizace prostřednictvím receptorů, regulace funkční a prostorové integrity
- Metabolismus
  - Součást metabolických drah, obsahují enzymy pro syntézu, přestavbu a degradaci



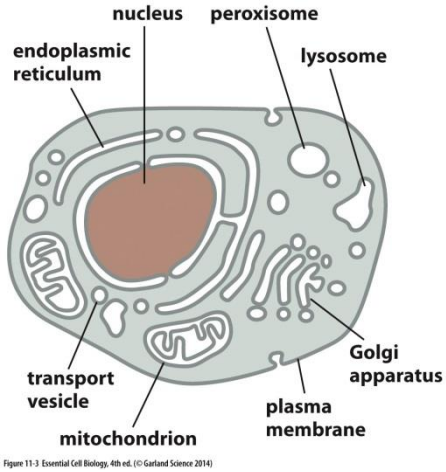


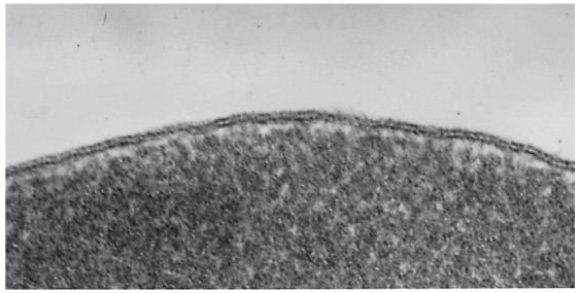




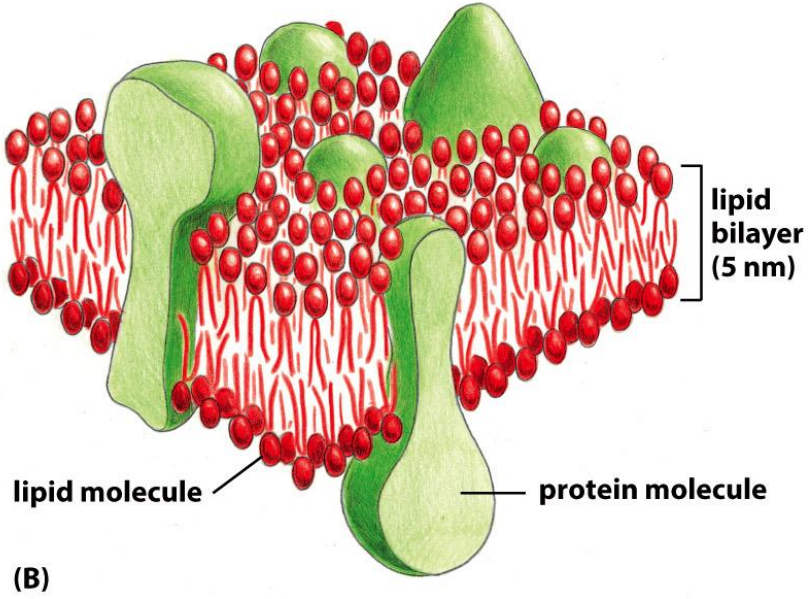
Membrány

- Všechny biologické membrány mají shodnou obecnou strukturu
- Tenká vrstva tvořena molekulami lipidů (lipidová dvouvrstva) a proteinů spojených nekovalentními vazbami (model fluidní mozaiky)





(A)



(B)

Figure 10-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Asymetrie lipidové membrány

- Funkčně důležitá v přenosu signálu
- řada cytosolických proteinů specificky rozpoznává určité struktury v lipidové membráně
- Glykolipidy na vnější straně membrány
- Orientace zůstává zachována během transferu mezi buněčnými kompartementy

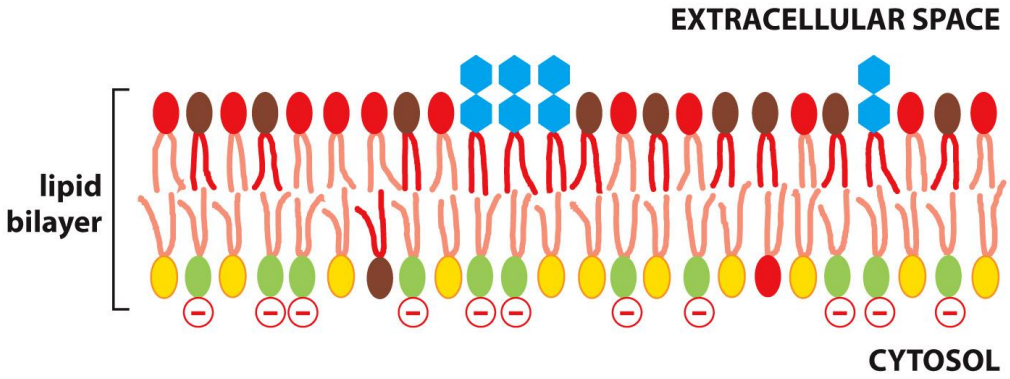


Figure 10-15 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

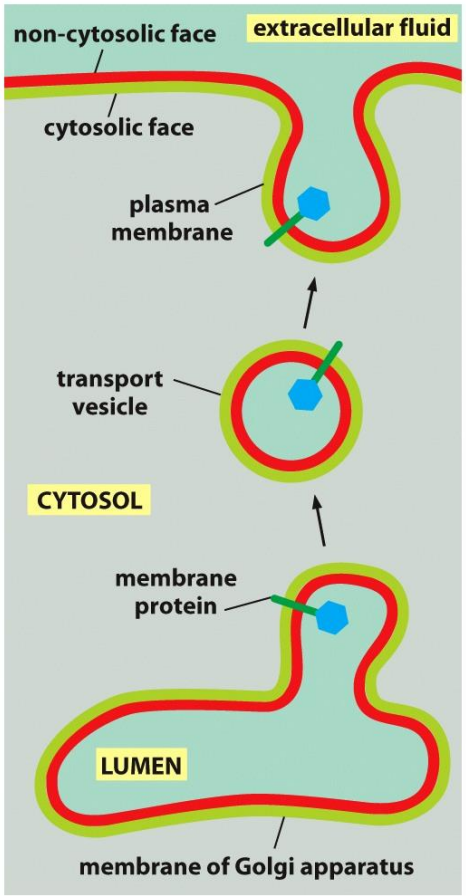


Figure 11-17 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

Membránové proteiny – různé funkce

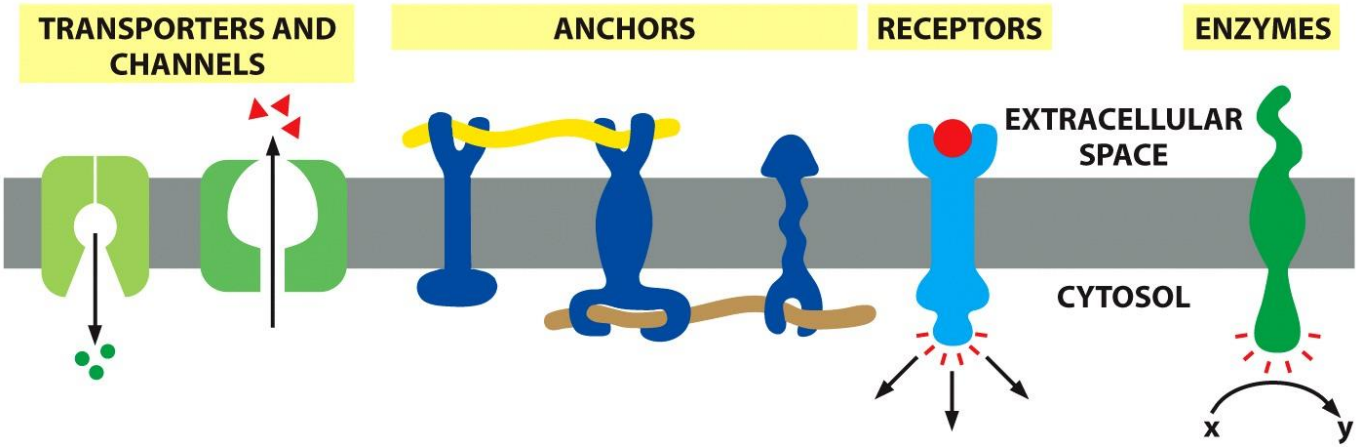


Figure 11-19 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

Vnitrobuněčný membránový transport

- plazmatická i vnitřní buněčné membrány jsou v procesu neustálé změny kompozice v souvislosti s nutností buňky komunikovat s vnějším prostředím a dostatečně rychle reagovat na různé podněty
- komplexní systém membrán slouží přidávání a odebírání membránových proteinů (receptorů, iontových kanálů, transportérů)
- exocytóza zajišťuje transport nově syntetizovaných látek ven z buňky nebo na plazmatickou membránu
- endocytóza umožňuje odejmutí membránových komponent a jejich internalizaci do endosomu
  - recyklace nebo degradace v lysozomu

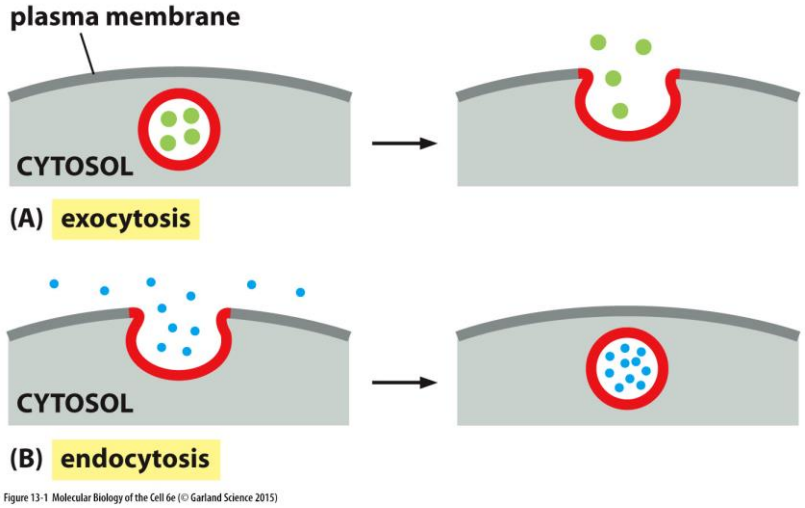


Figure 13-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Endocytóza – clathrinový systém

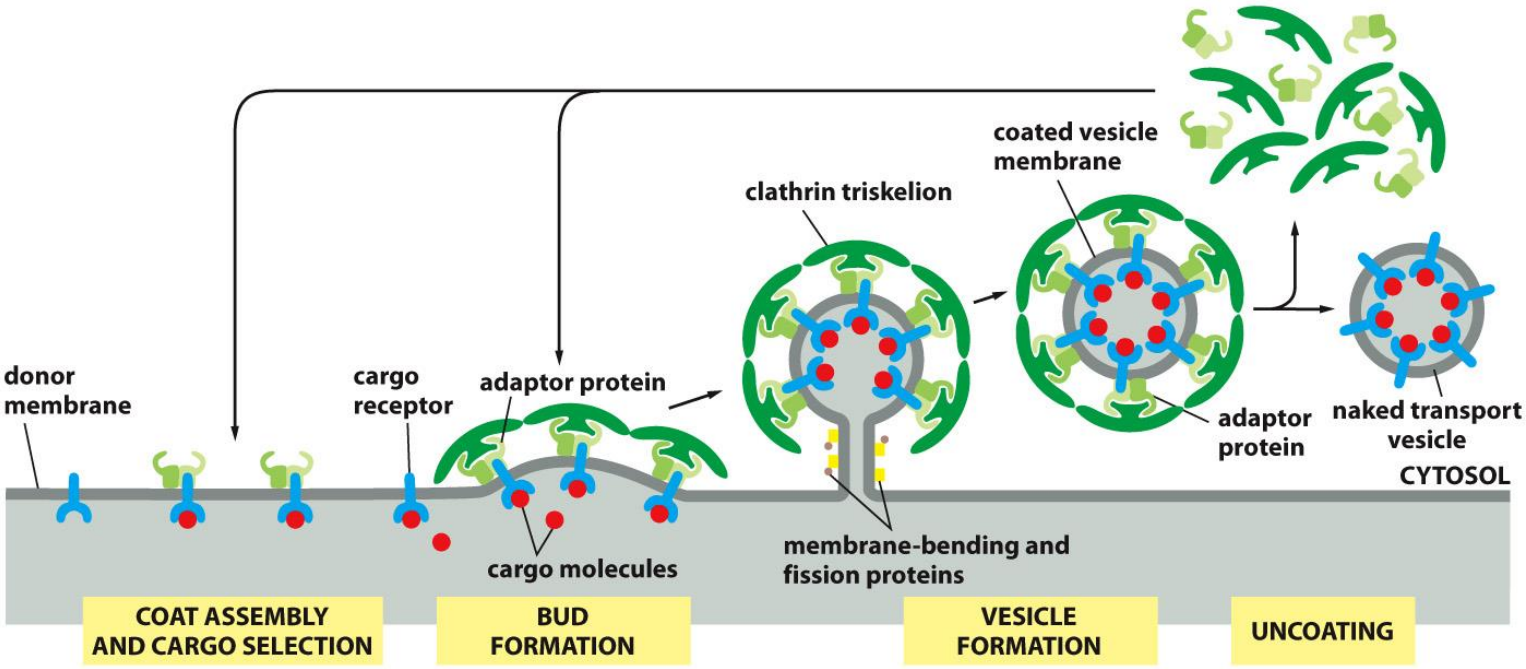


Figure 13-8 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Sekrece a endocytóza

- Sekrece: ER → GA → plasmatická membrána
- Endocytóza: plasmatická membrána → …

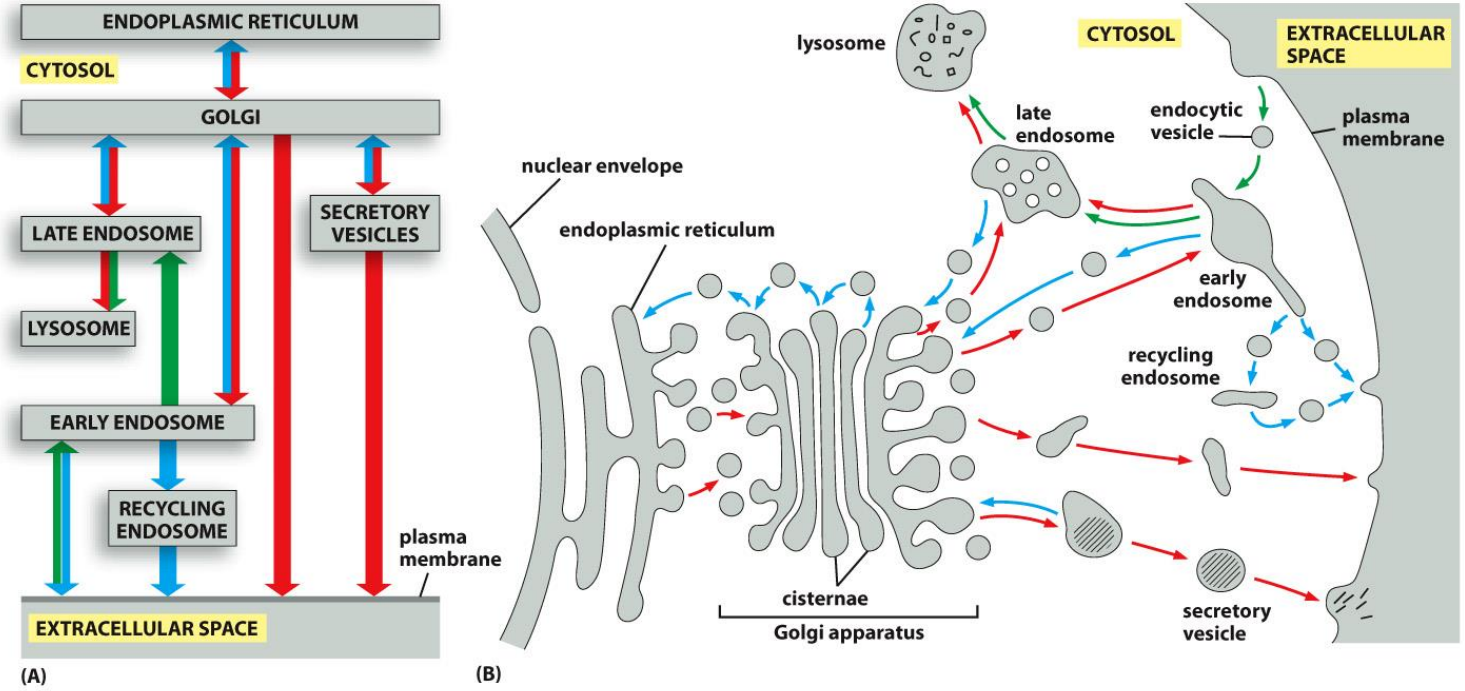
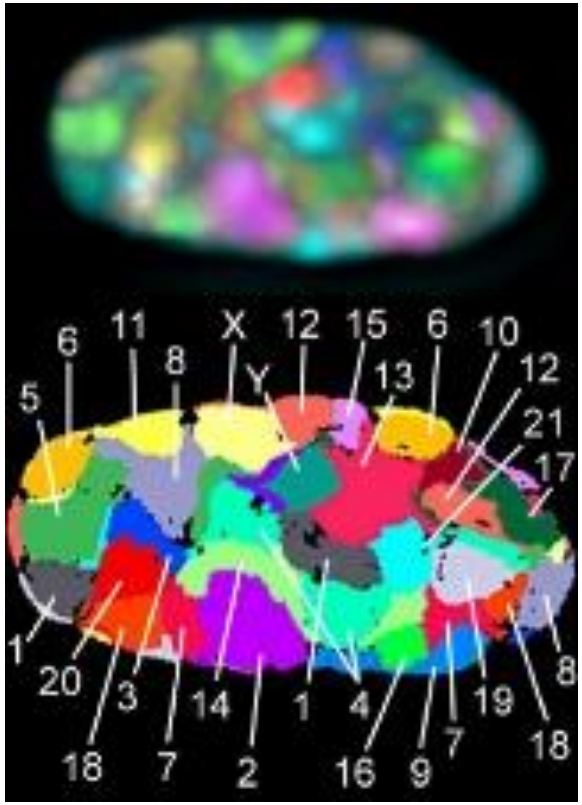


Figure 13-3 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Buněčné jádro: místo lokalizace DNA a transkripce

- **pozice genů v jádře se mění v závislosti na intenzitě exprese**; často dochází po dekondenzaci chromatinu k vytvoření smyčky, která se nachází mimo teritorium daného chromozómu – pravděpodobně to souvisí s nutností asociace s proteiny zapojenými do transkripce – DNA se přemisťuje do oblastí bohatých na tyto proteiny;
- tyto oblasti (podobně jako jadérka, Cajalových tělísek, interchromatinových granulí apod.) **vytvářejí struktury umožňující přístup proteinům a RNA – vytvářejí specifické biochemické prostředí** nezbytné pro reakce spojené s transkripcí a post-transkripčními úpravami mRNA;

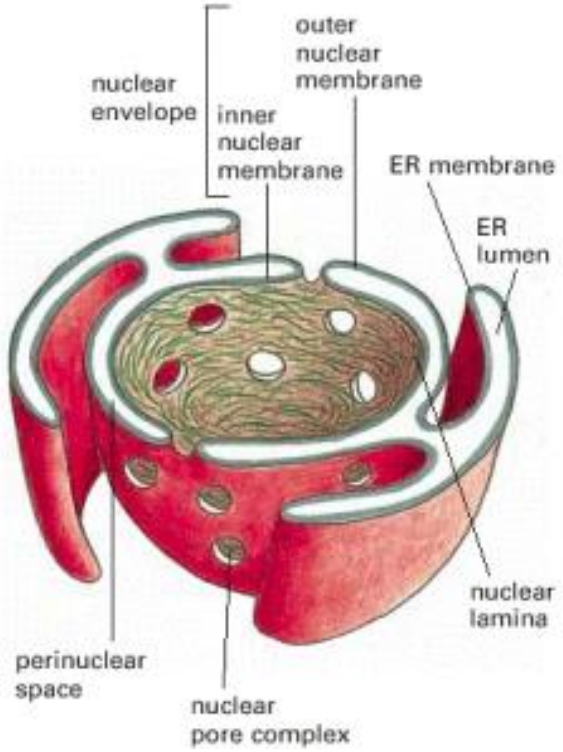
PLoS Biol 3(5): e157



pozice všech chromozómů v jádře lidského fibroblastu

Principy transportu mezi jádrem a cytosolem

- jaderný obal (nuclear envelope) sestává z:
- **vnitřní a vnější jaderné membrány** obklopující **perinukleární prostor**;
- na vnější jaderné membráně je lokalizováno velké množství **ribozómů** – probíhá zde intenzívní proteosyntéza proteinů uvolňovaných do perinukl. prostoru;
- jádro je propojeno s cytosolem prostřednictvím **jaderných pórů**;
- mezi jádrem a cytosolem probíhá **velmi intenzívní transport**;
- **jaderné proteiny** (histony, DNA polymerázy, RNA polymerázy, transkripční regulátory, proteiny zapojené do procesování RNA) jsou **importovány do jádra z cytosolu**;
- naopak **téměř všechny formy RNA** – mediátorová, ribozomální, transferová, mikro a malé jaderné RNA jsou **exportovány do cytosolu**;



Molecular Biology of the Cell. 4th edition. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. New York: Garland Science; 2002.

Translace „narození proteinu“probíhá na ribozomu

- **krok 1** – vazba tRNA;
- **krok 2** – tvorba peptidové vazby – uvolnění karboxylového konce peptidu z tRNA a jeho spojení s N-koncem nové AA – reakce katalyzovaná peptidyl transferázou velké podjednotky;
- **krok 3** – translokace velké podjednotky – posun E a P místa;
- **krok 4** – translokace malé podjednotky spojená s uvolněním tRNA;
- rychlost – cca 2 AA/s;
- účinnost a přesnost je závislá na elongačních faktorech – EF1 a EF2;

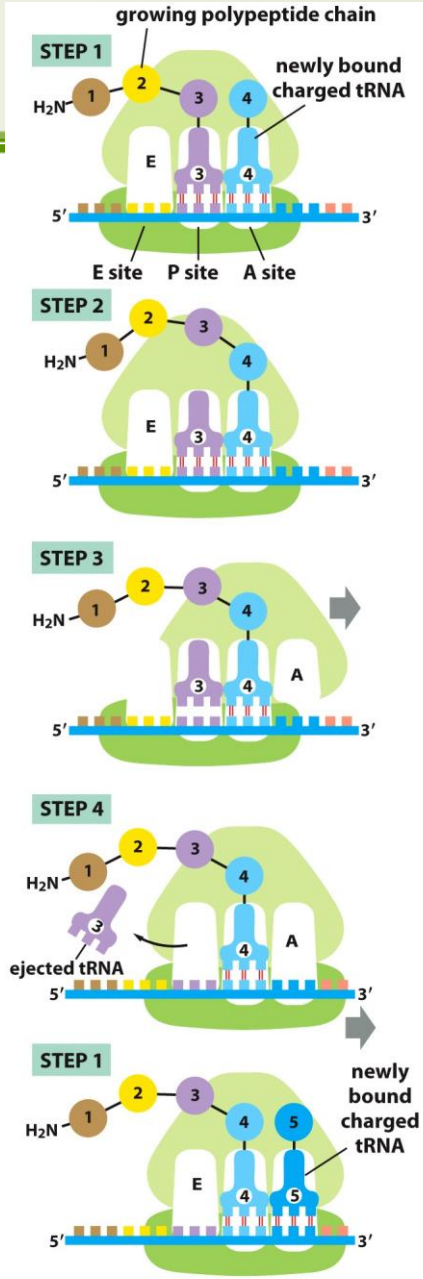


Figure 6-64 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Ubikvitinace a cílená degradace „smrt proteinu“ probíhá v proteazómu

- v jádře i cytoplazmě; je také součástí systému, který umožňuje degradaci nesprávně složených proteinů po jejich exportu z ER;
- rozpoznává **polyubikvitinované** proteiny;

- ubikvitinace umožňuje velmi přesnou regulaci degradace proteinů;
- skládá se z **centrálního válce** (aktivní proteázy) a na jeho konci jsou umístěny komplexy proteinů (**unfoldase ring** – AAA proteiny) umožňující rozbalení proteinu (spotřeba ATP) dojde k jeho nasměrování jako řetězce do dutiny válce, kde je štěpen na velmi krátké peptidy;

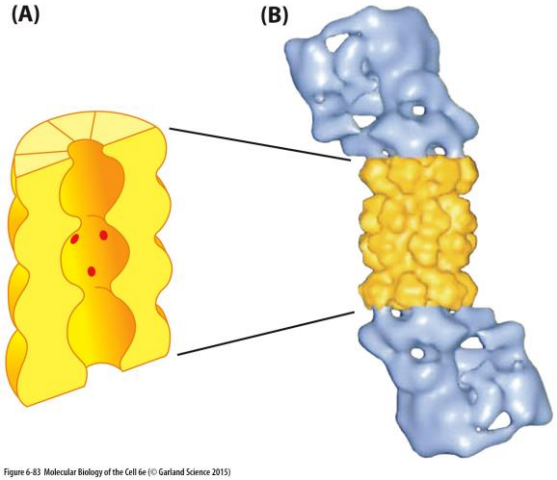


Figure 6-83 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

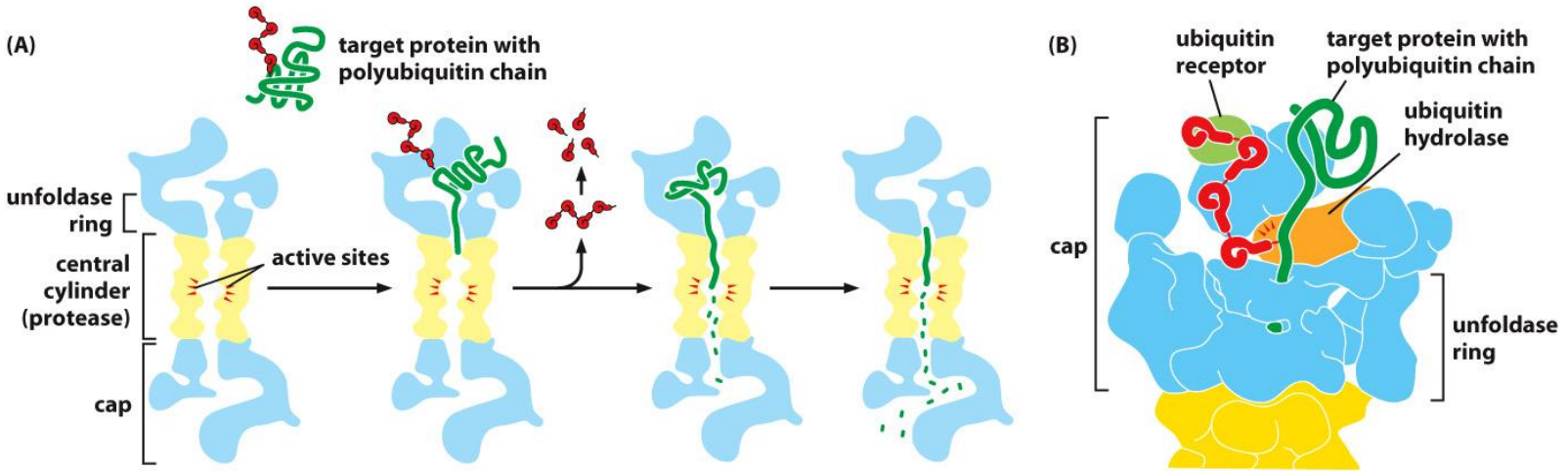


Figure 6-84 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Cytoskelet

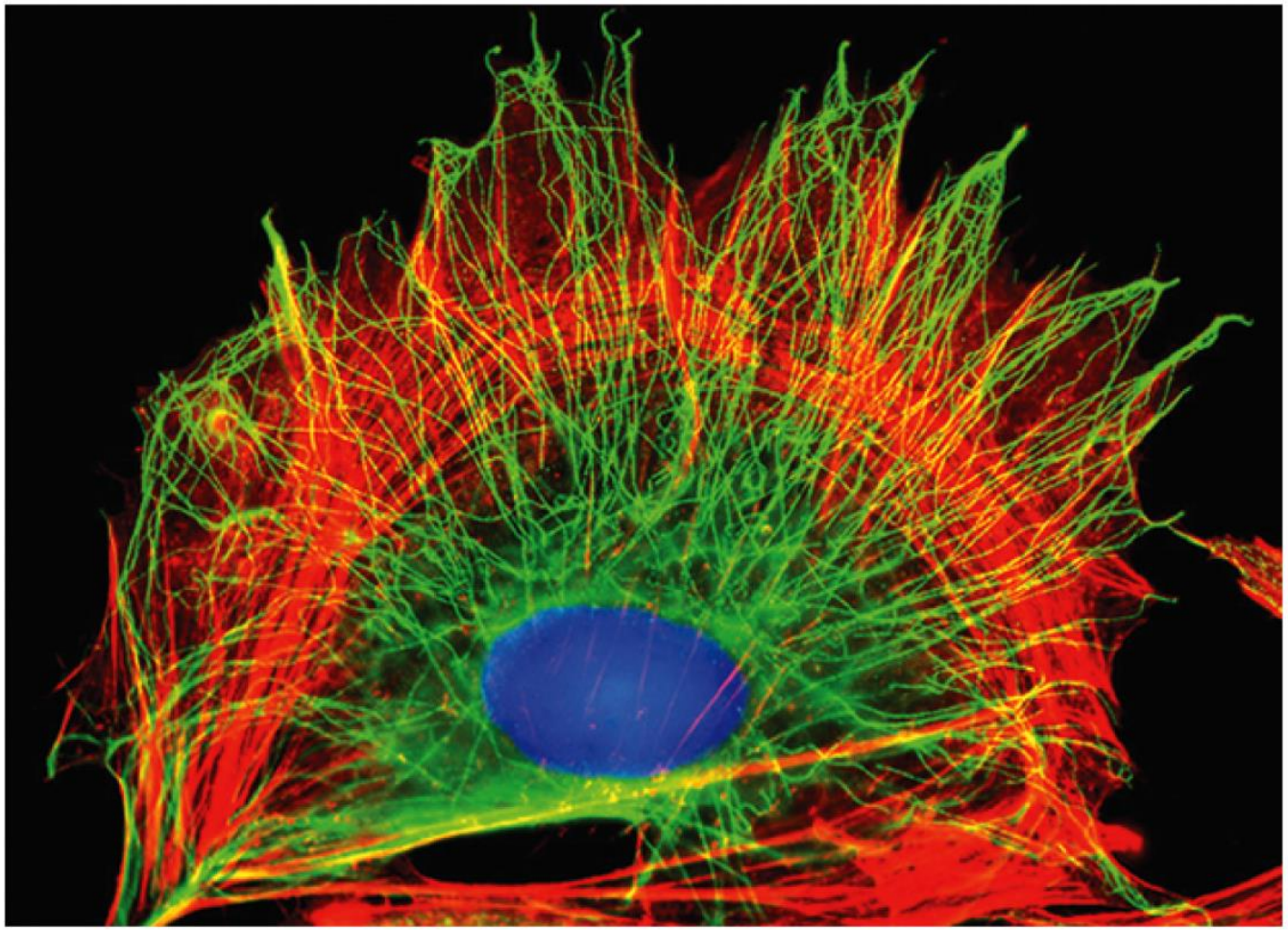
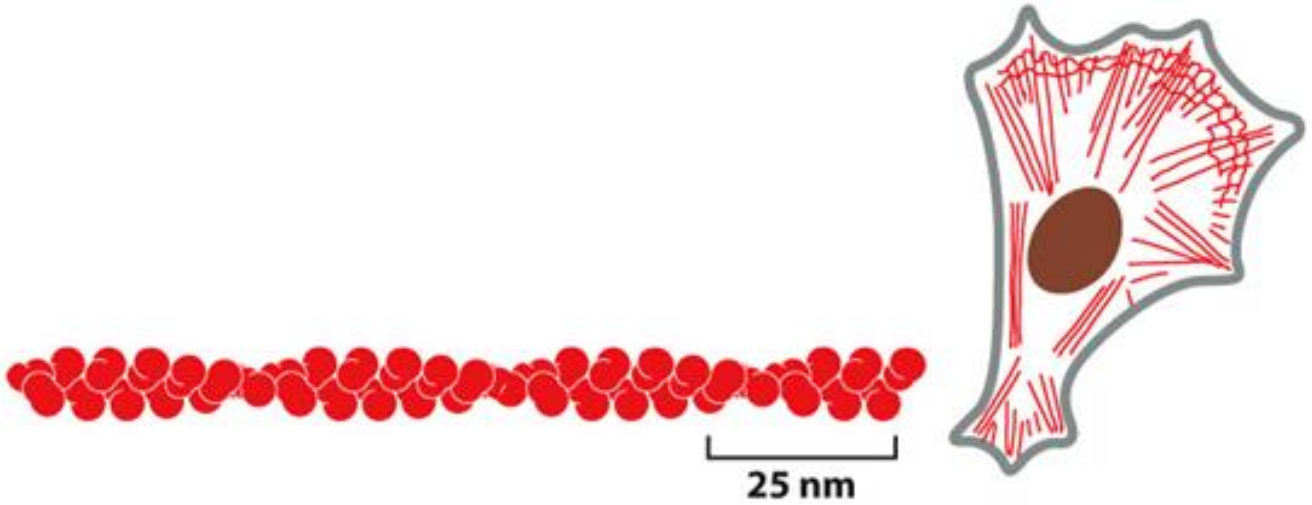


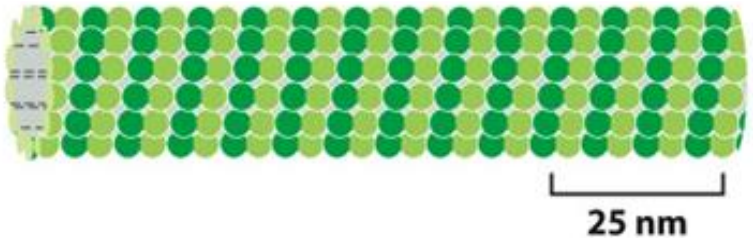
Figure 16-1a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

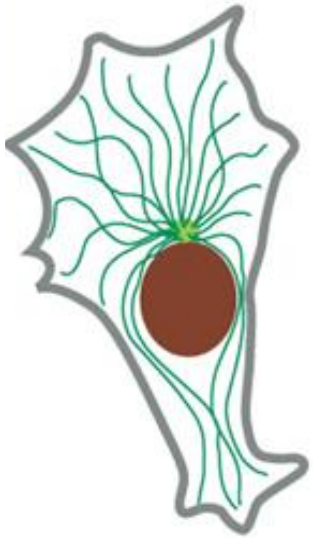
Aktinová filamenta = mikrofilamenta



- zvaná také mikrofilamenta
- spirálovitá vlákna/polymery tvořené proteinem aktinem
- tvoří flexibilní struktury o průměru 8 nm, které mohou být organizovány do lineárních svazků, dvou- či trojrozměrných sítí
- jsou rozprostřena po celé buňce, ale koncentrována jsou především přímo pod cytoplasmatickou membránou

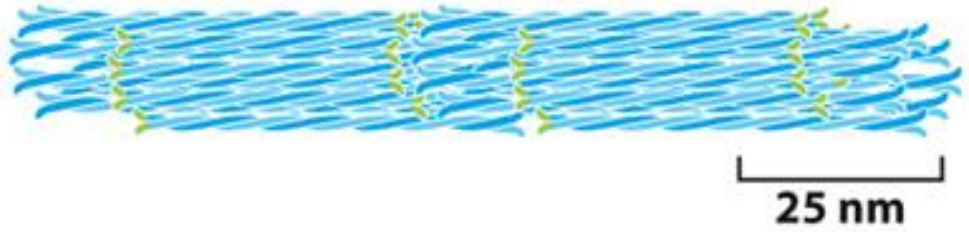
Mikrotubuly

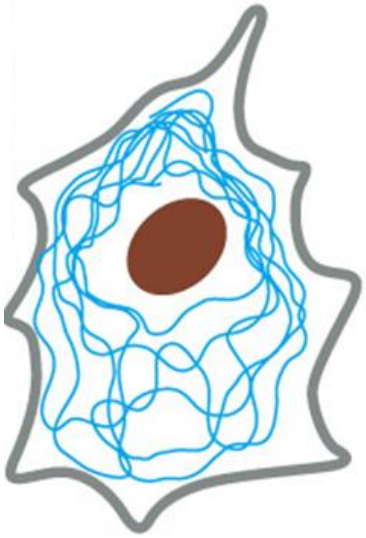




- dlouhé duté válce tvořené proteinem tubulinem (vnější průměr 25 nm)
- tužší oproti aktinovým filamentům
- dlouhá rovná vlákna, často jedním koncem uchycená v mikrotubuly-organizujícím centru (MTOC) zvaném centrozom

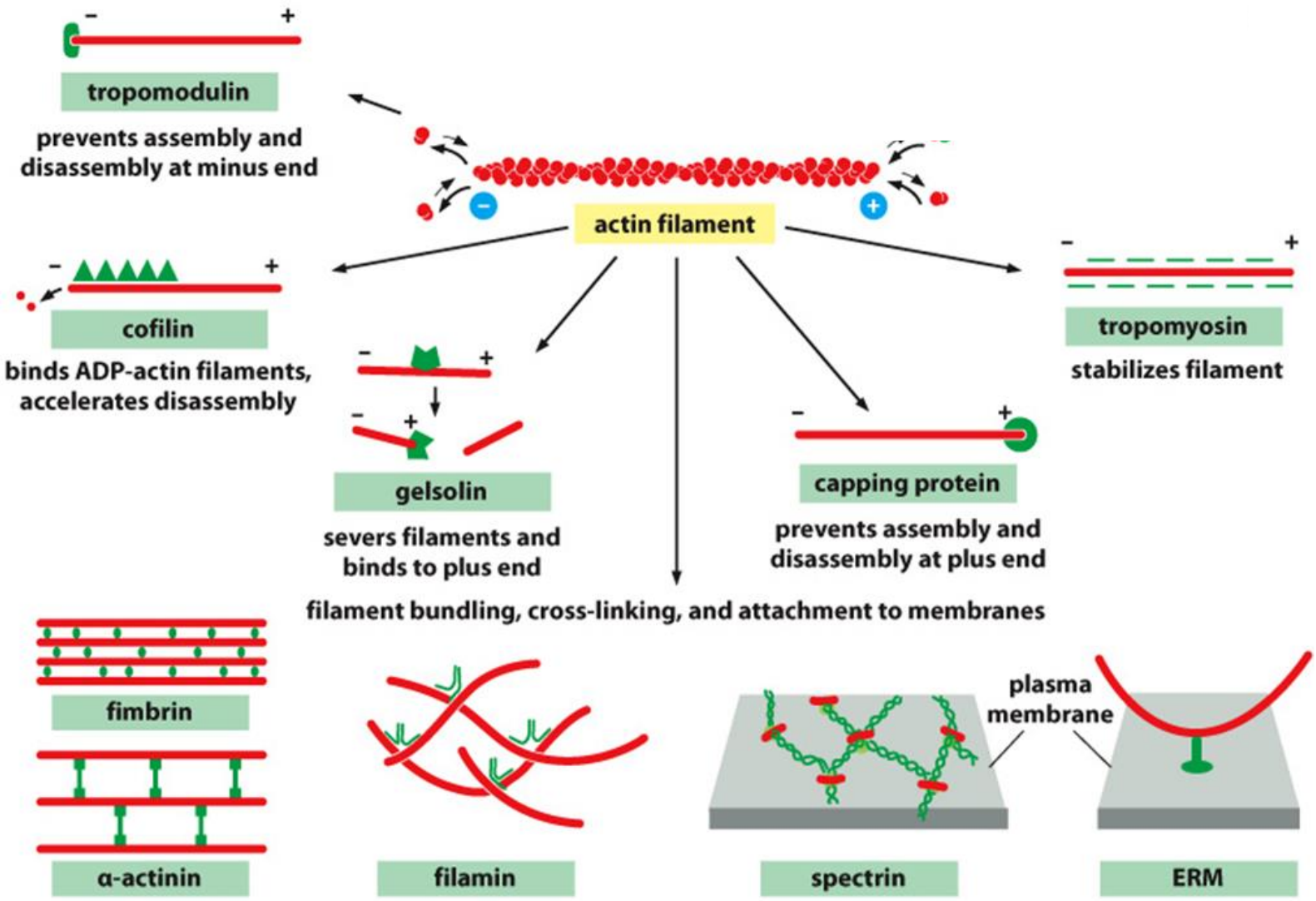
Intermediární filamenta



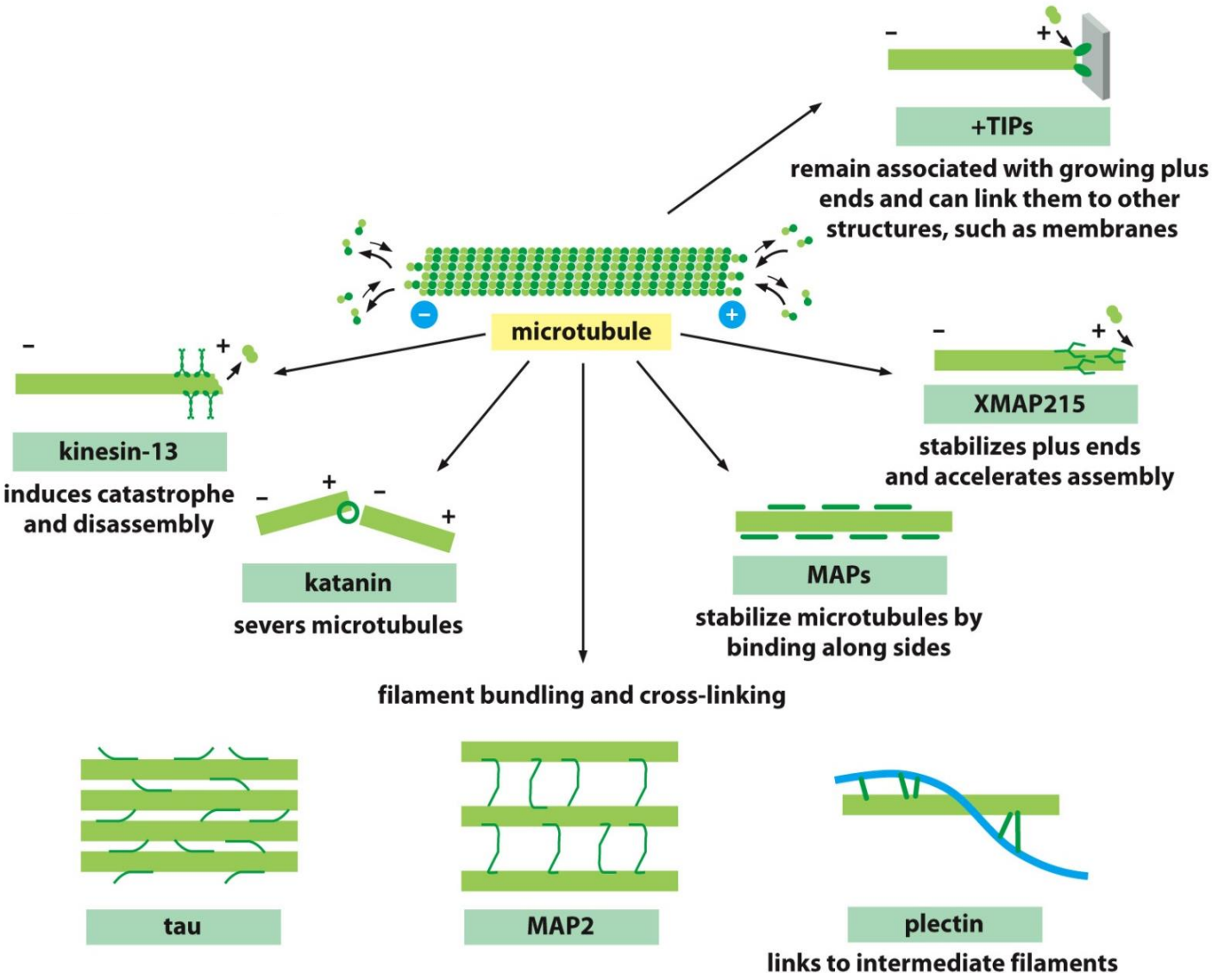


- vlákna strukturou připomínající lano s průměrem 10 nm
- tvořena heterogenní rodinou proteinů
- jeden typ intermediárních filament (IF) tvoří jadernou laminu pod jadernou membránou
- další typy IF jsou rozprostřeny napříč cytoplasmou a zajišťují mechanickou odolnost buňky
- v epiteliálních tkáních IF zajišťují spojení buněk mezi sebou

Proteiny asociované s aktinem



Proteiny asociované s mikrotubuly



Mitochondrie - ústřední organela energetického metabolismu

- NADH předává elektrony s vysokou energií komplexům dýchacího řetězce – finální krok je vznik H_2O; tato energie je využita k transportu H^+ protonovými pumpami - vzniklý protonový gradient pohání ATP syntázu;
- mitochondrie – **velikost, tvar i množství se liší** ~ typ buňky, intenzita metabolismu, apod.; typicky cca 20 % objemu cytoplasmy;
- jsou to vysoce dynamické organely – neustále mění tvar, dělí se fúzují, apod.; liší se pohyblivostí;

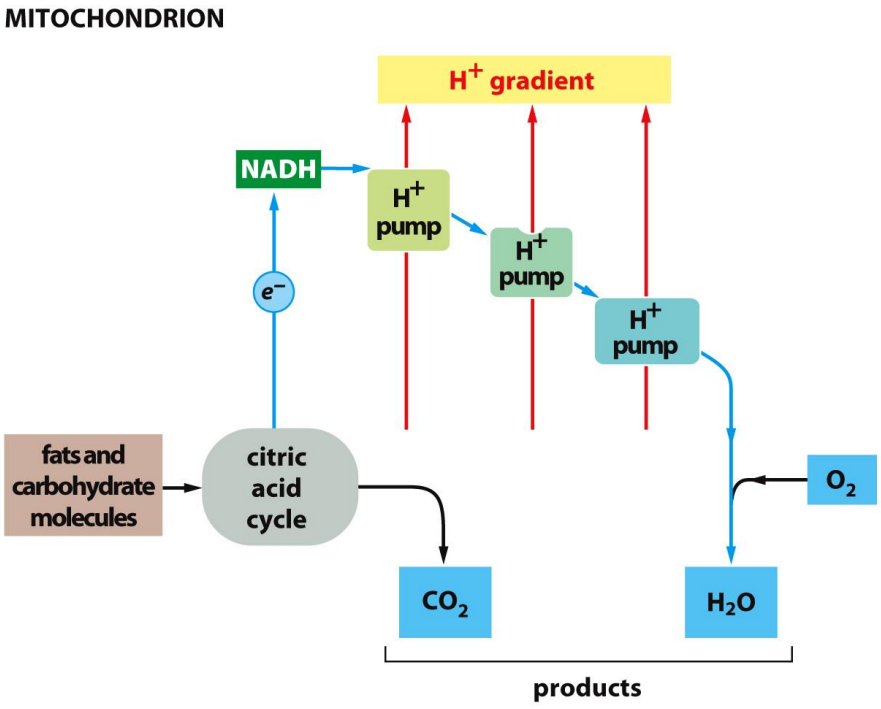


Figure 14-4a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

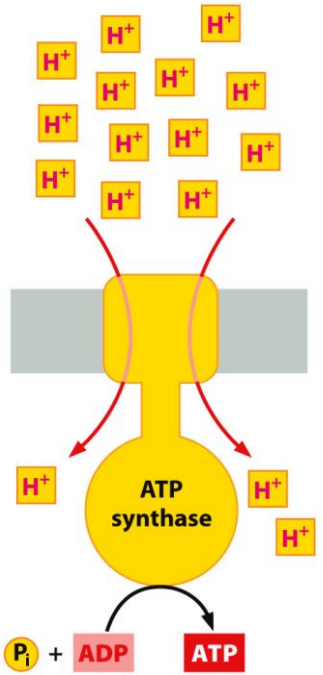


Figure 14-3 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Dynamika buňky

- buněčné dělení
- buněčná smrt
- diferenciace (změna osudu)
- morfogeneze (změna tvaru)
- pohyb

Buněčný cyklus - připomenutí

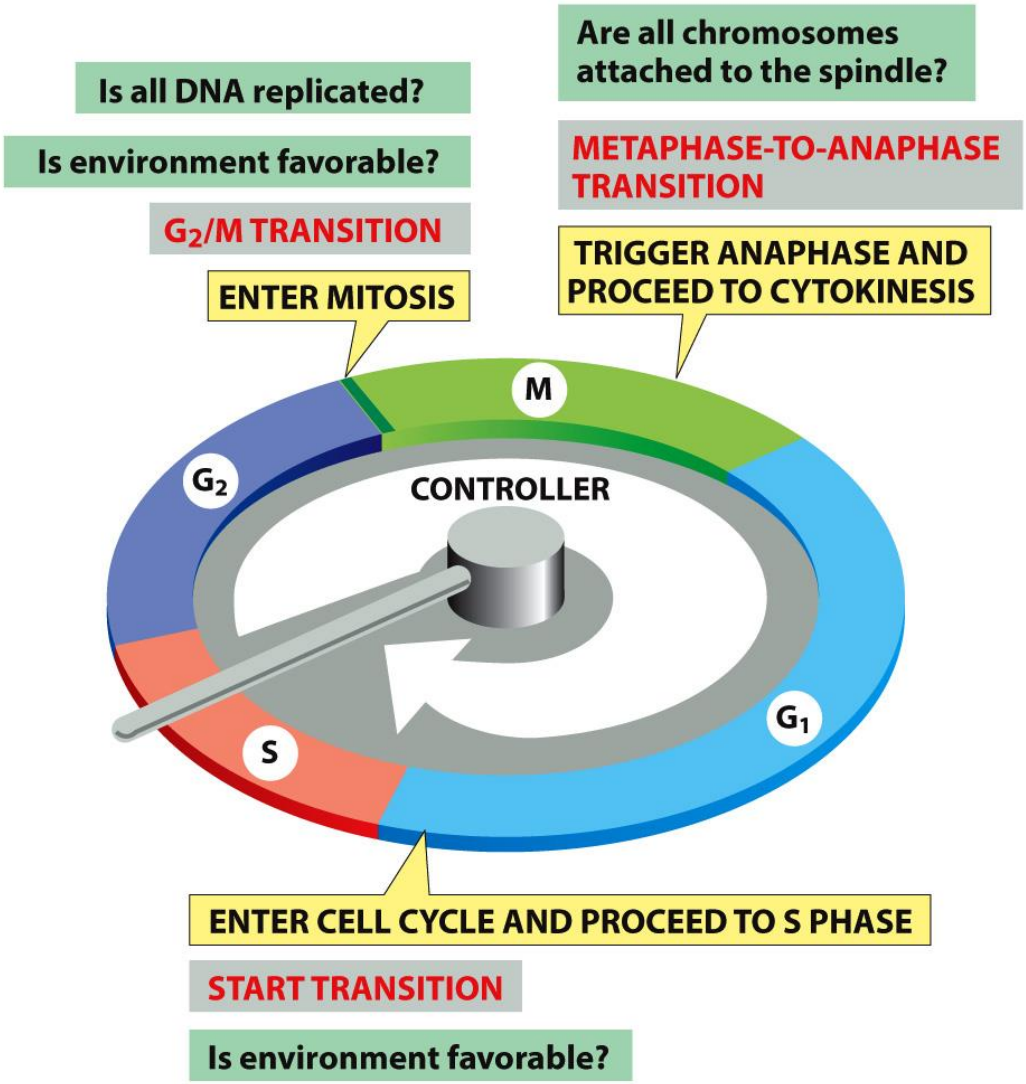


Figure 17-9 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Buněčný cyklus - kontrola

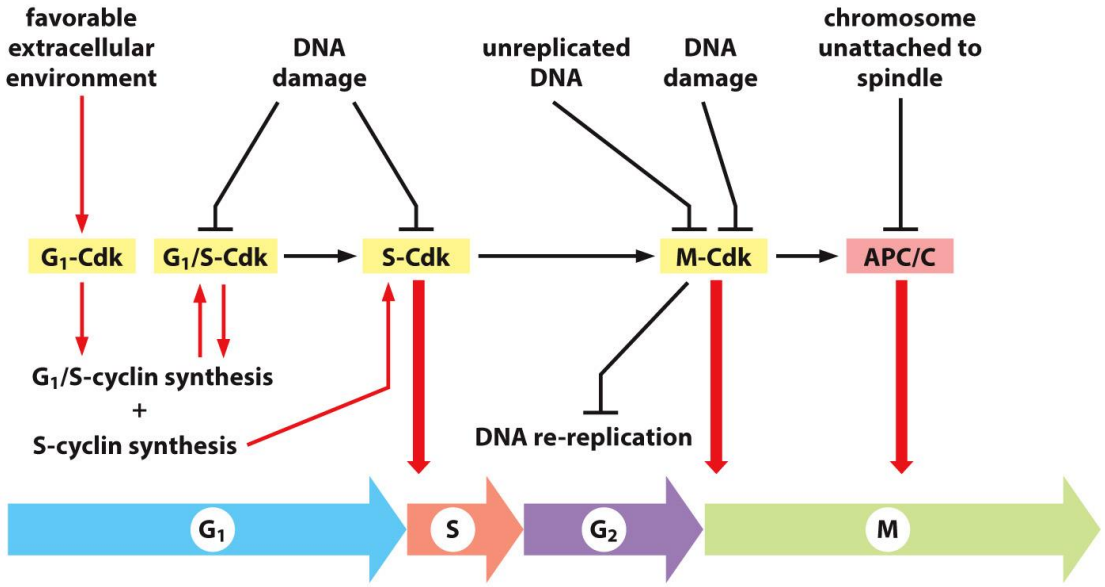


Figure 17-16 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

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

	Vertebrates		Budding yeast	
Cyclin–Cdk complex	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)

Mechanika buněčného dělení

Aktin – červeně
Tubulin – zeleně
DNA - hnědě

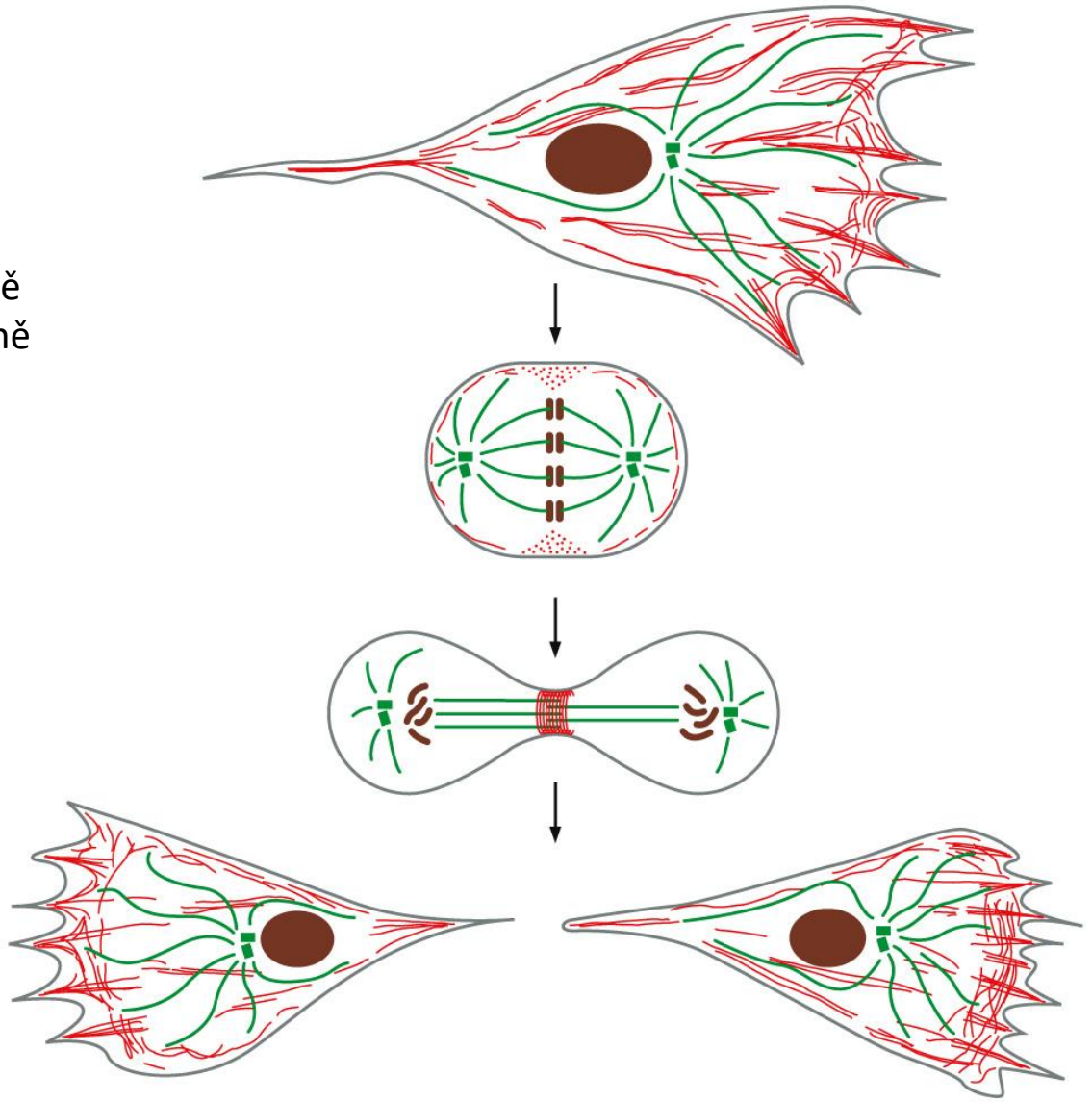


Figure 16-2 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Centrosom

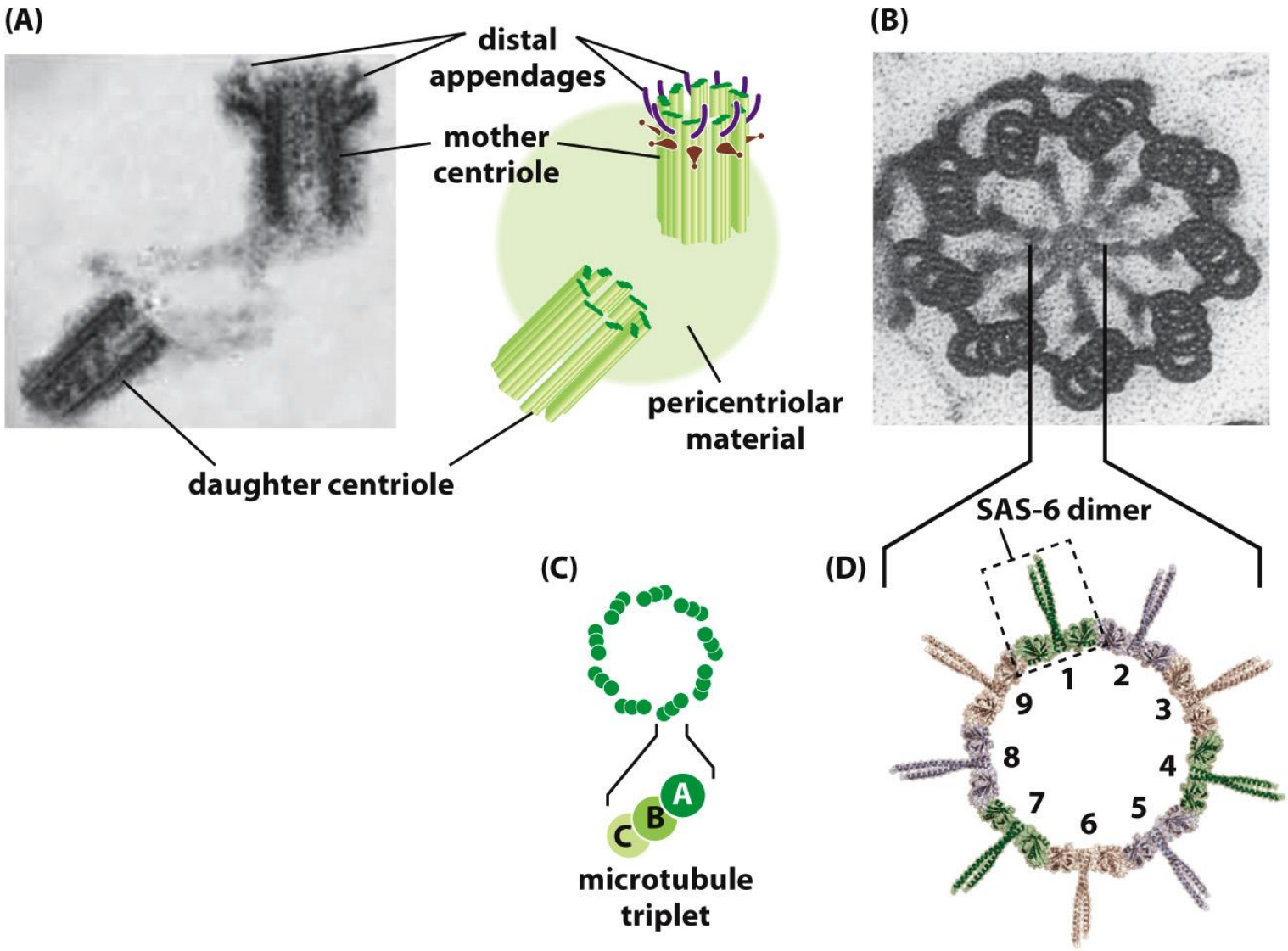
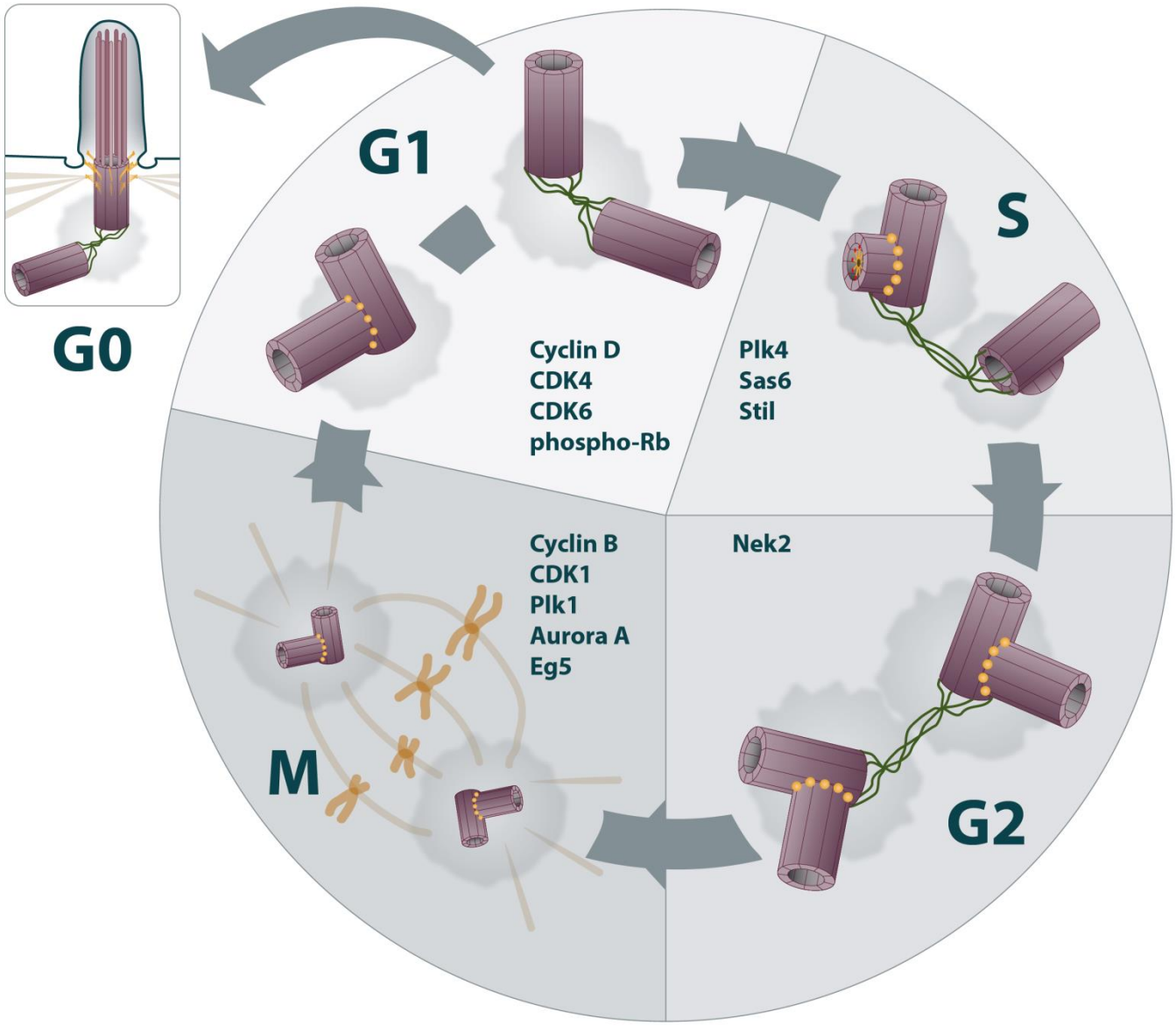


Figure 16-48 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Centrosom a jeho dynamika



Buněčná smrt

- Vývoj, růst, regenerace a udržování homeostázy mnohobuněčných organizmů 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

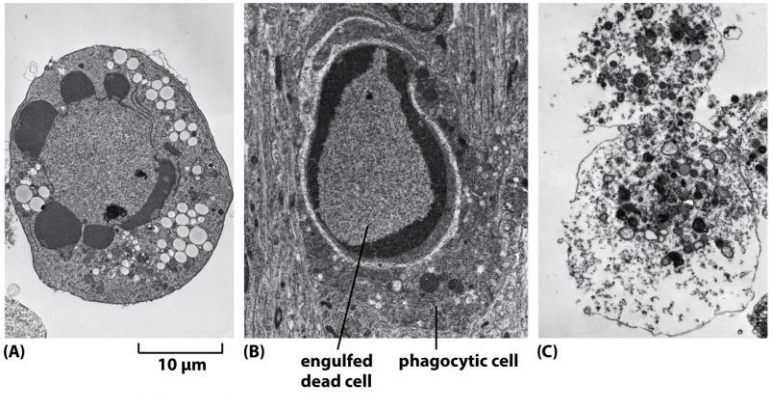


Figure 18-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

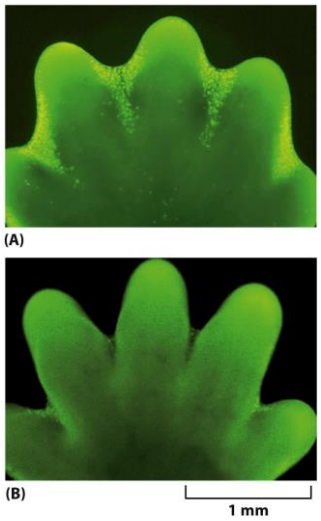


Figure 18-2 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Komunikace buňky s prostředím

- Kontakty buňka-buňka
- Kontakty buňka-mezibuněčné prostředí

- Přenos informace:

Extracelulární signál-buňka

Mesenchymová nebo pojivová tkáň vs. epitel

- Pojivová tkáň, např. kost, šlacha – mezibuněčná hmota produkovaná buňkami
  - matrix – mechanicky odolná
- Epitel – buňky jsou těsně spojeny jedna k druhé a organizovány do vrstev
  - Matrix je méně zřetelná – bazální lamina
  - Mezibuněčné spoje a ukotvení k buněčnému skeletu a k BL

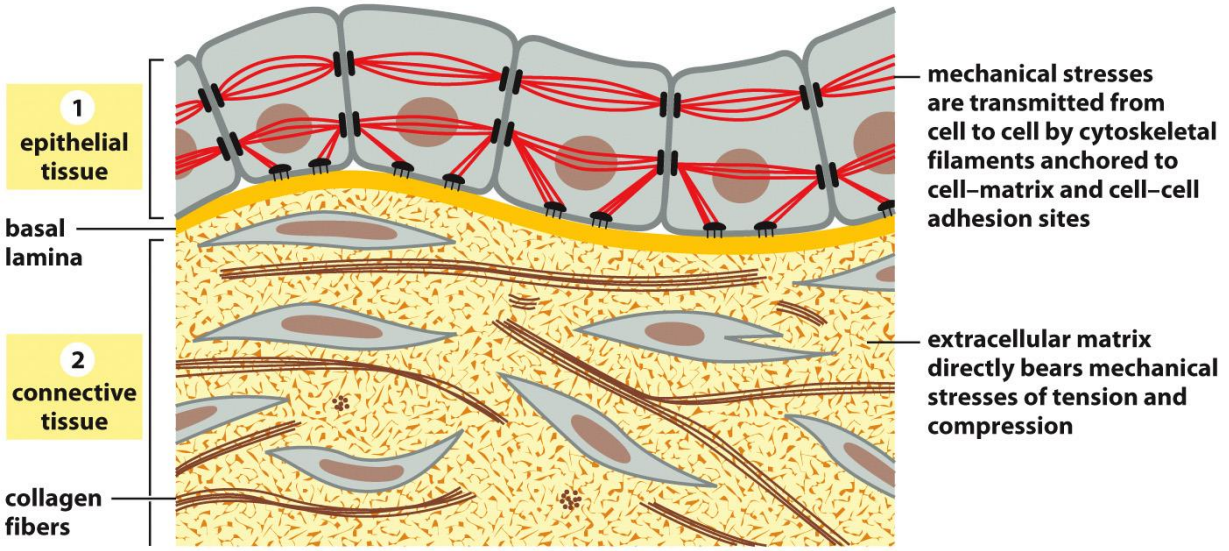


Figure 19-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Mezibuněčné spoje epitelu obratlovců

- Kotvící spojení
  - Adhezní spoj – adherens junction
    - Mechanický úchyt mezi buňkami, propojený s cytoskeletem
  - Desmosome
    - Propojení prostřednictvím intermediárních filament
  - Hemidesmosome
    - Propojení intermediárních filament s mezibuněčnou hmotou
  - Actin-linked cell-matrix junction
    - Propojení aktinového cytoskeletu s mezibuněčnou hmotoy
- Těsný spoj – tight junction
  - Zaceluje mezery mezi membránami
- Vodivý spoj – gap junction
  - Průchod ve vodě rozpustných látek <1500 Da

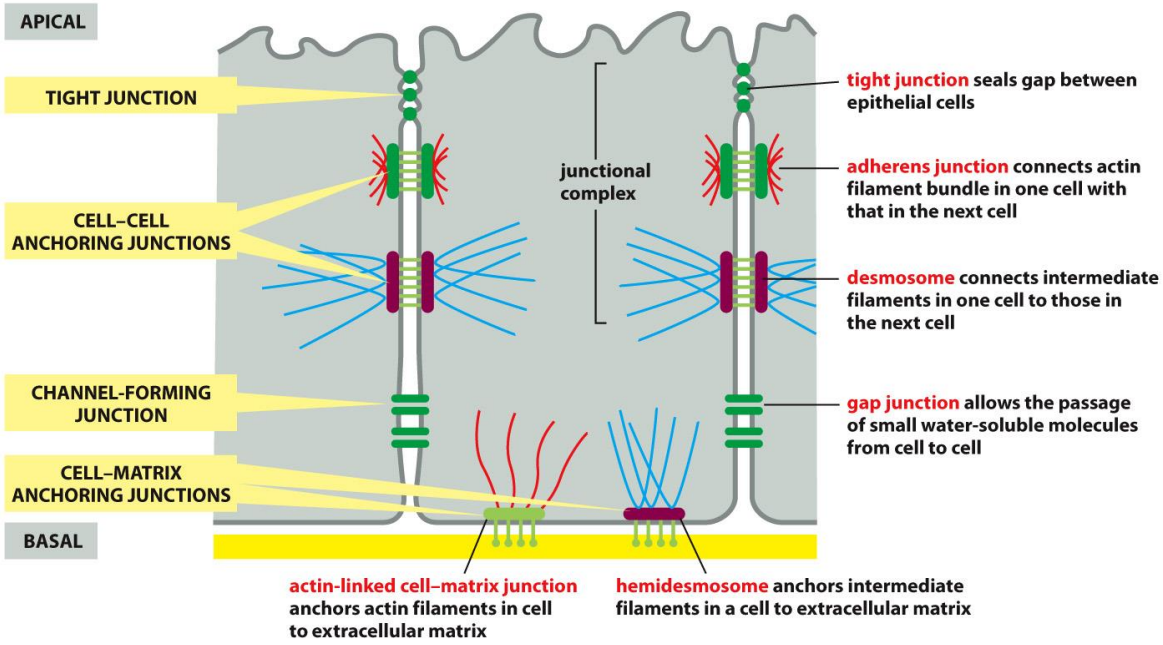


Figure 19-2 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Spojení buňka - matrix

- receptory pro matrix – klíčové pro propojení ECM vně buňky s cytoskeletem uvnitř
- nemají jen mechanickou funkci – zprostředkovávají odpověď buněk na složky ECM
- řada molekul slouží jako receptory či koreceptory ECM
- integriny - nejdůležitější

Integriny

- tvořeny dvěma nekovalentně vázanými jednotkami - α a β
- obě mají krátkou C-terminální intracelulární doménu a dlouhou extracelulární N-terminální doménu
- extracelulární část se váže na specifický motiv aa extracelulárních proteinů, nejznámější - RGD
- u člověka – 24 typů integrinů, každý má specifické vlastnosti
  - 8 genů pro β podjednotku
  - 18 genů pro α podjednotku
  - vazba je závislá na koncentraci Ca^{2+} a Mg^{2+}
  - všechny varianty intracelulárně vážou aktinová filamenta
    - adaptorový protein – talin
    - kindlin, vinkulin

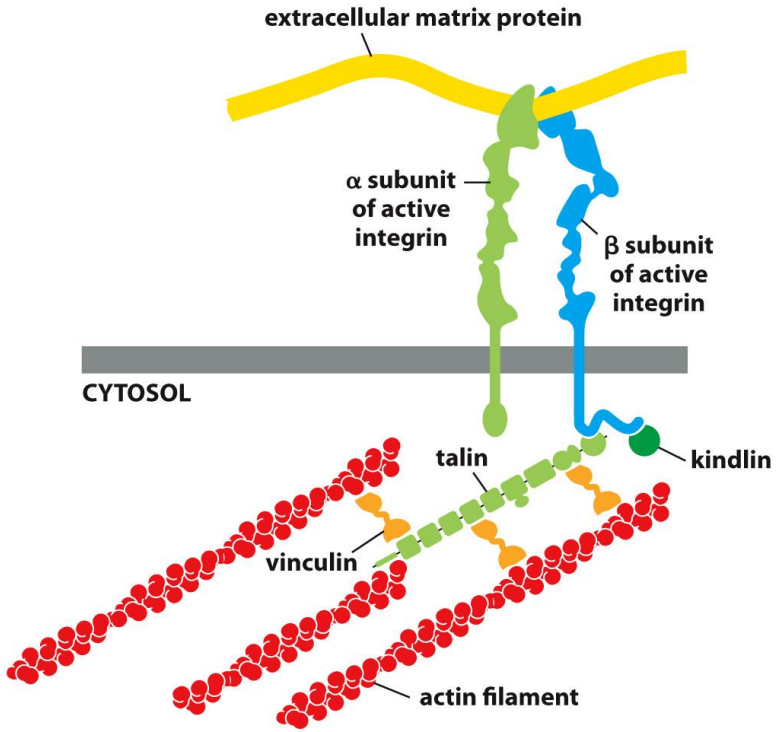


Figure 19-55 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Komunikace s okolním prostředím

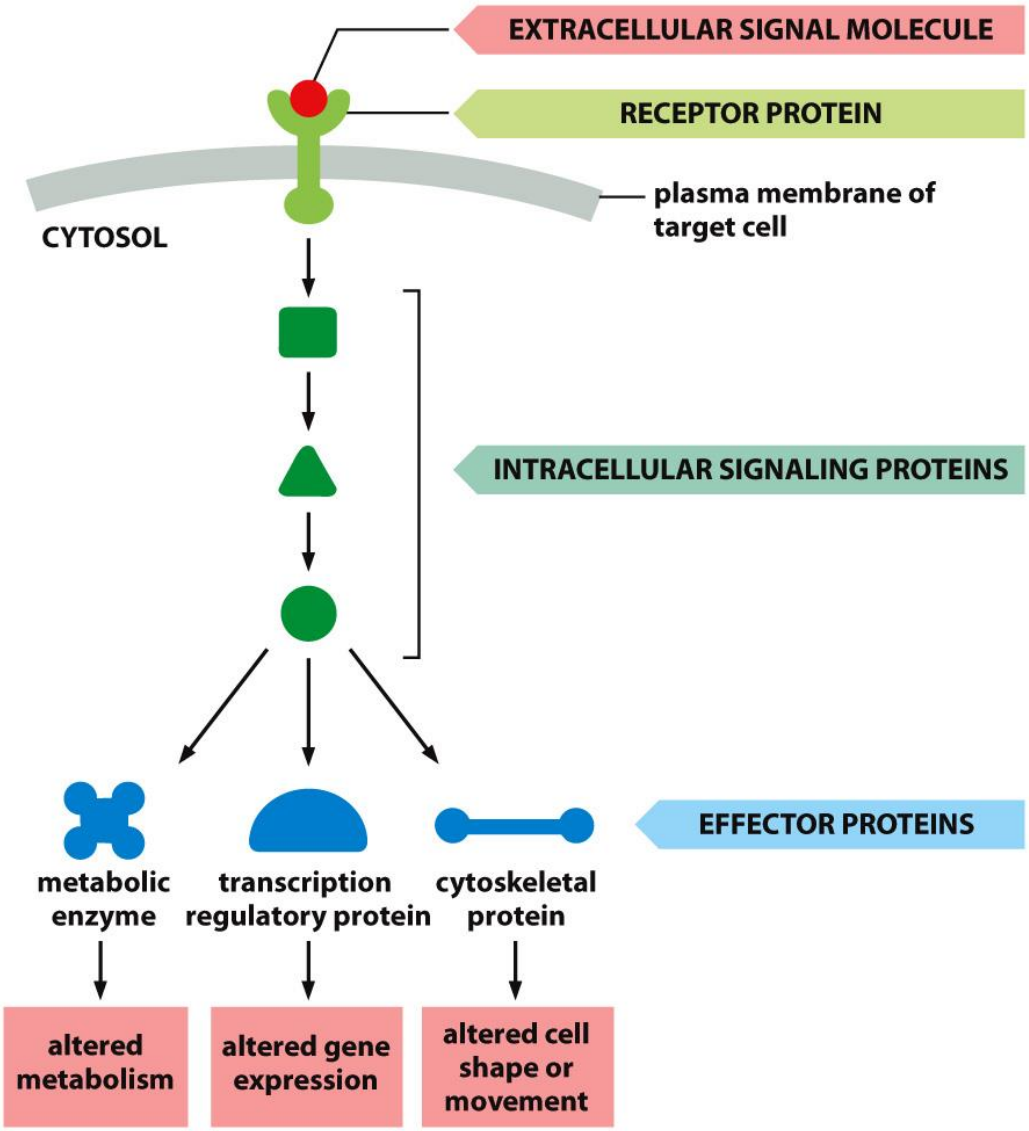


Figure 15-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Základní biochemické mechanismy buněčné signalizace

- 1. Fosforylace – kovalentní přidání anorganického fosfátu (z ATP) na molekulu tyrosinu nebo serinu/threoninu enzymem, který se jmenuje kináza

- 2. Nekovalentní záměna GDP za GTP

Základní mechanismy buněčné signalizace

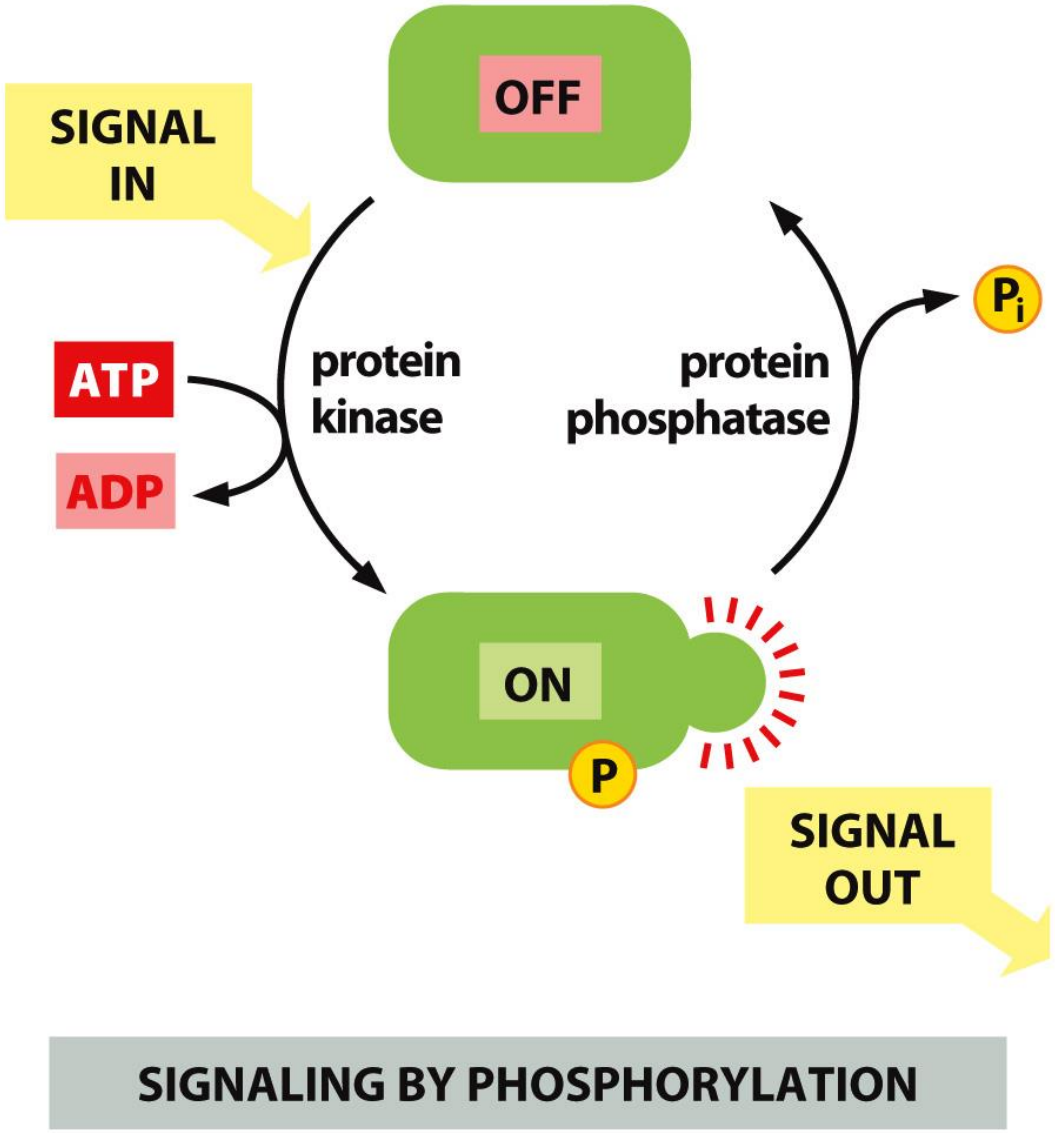


Figure 15-7a Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Základní mechanismy buněčné signalizace

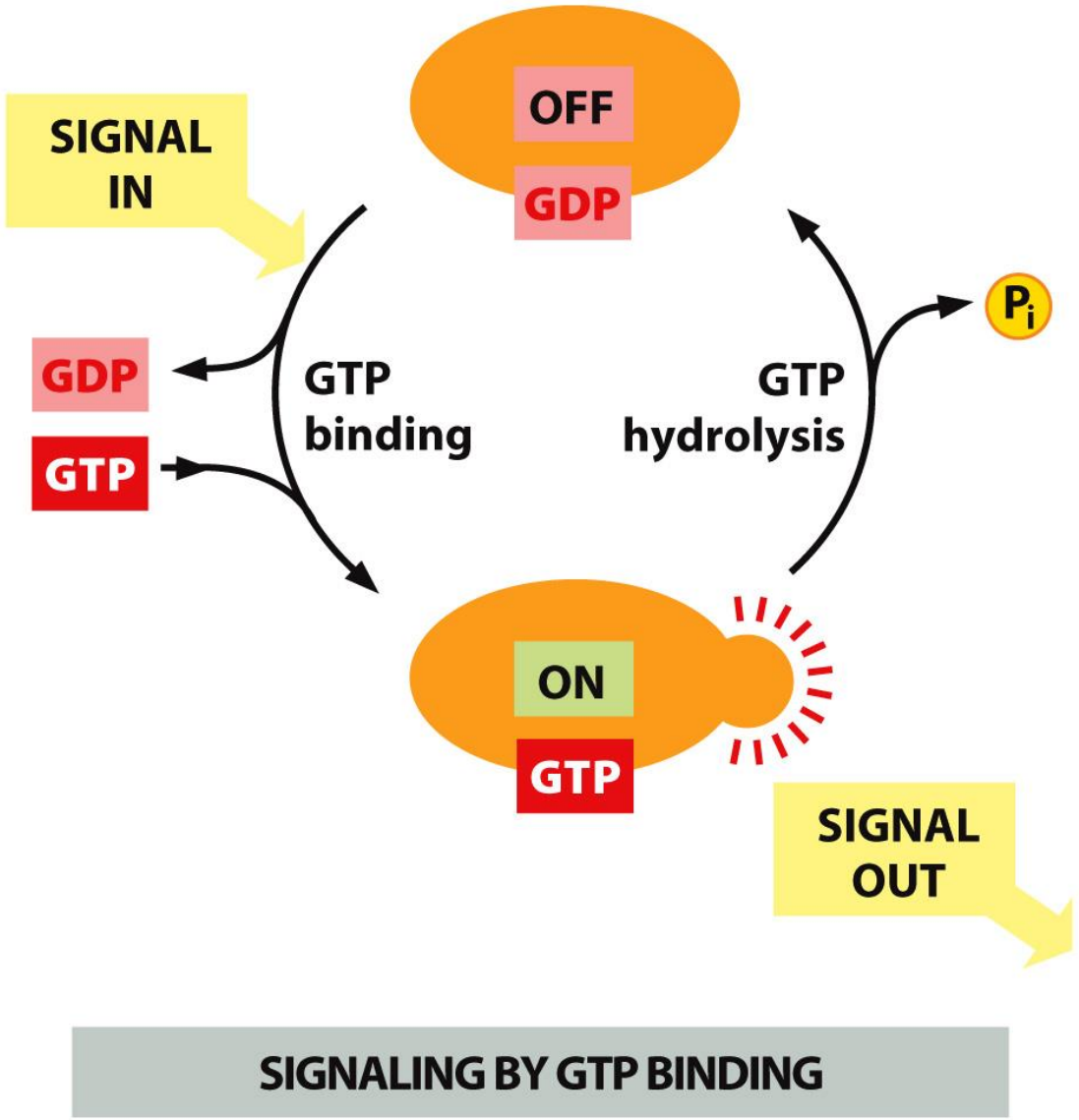


Figure 15-7b Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Základní mechanismy buněčné signalizace

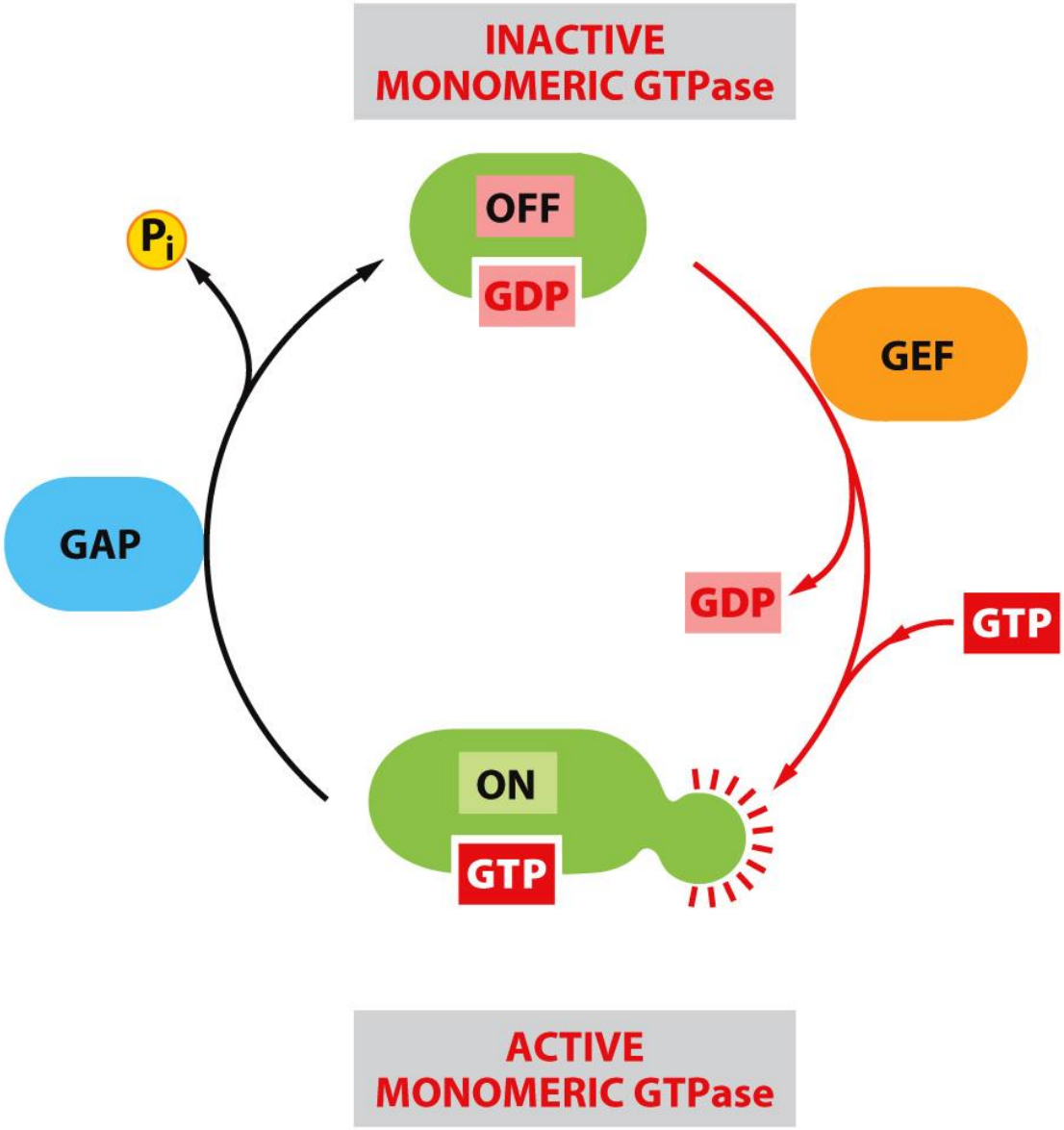


Figure 15-8 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Amplifikace signálu a „druhý posel“

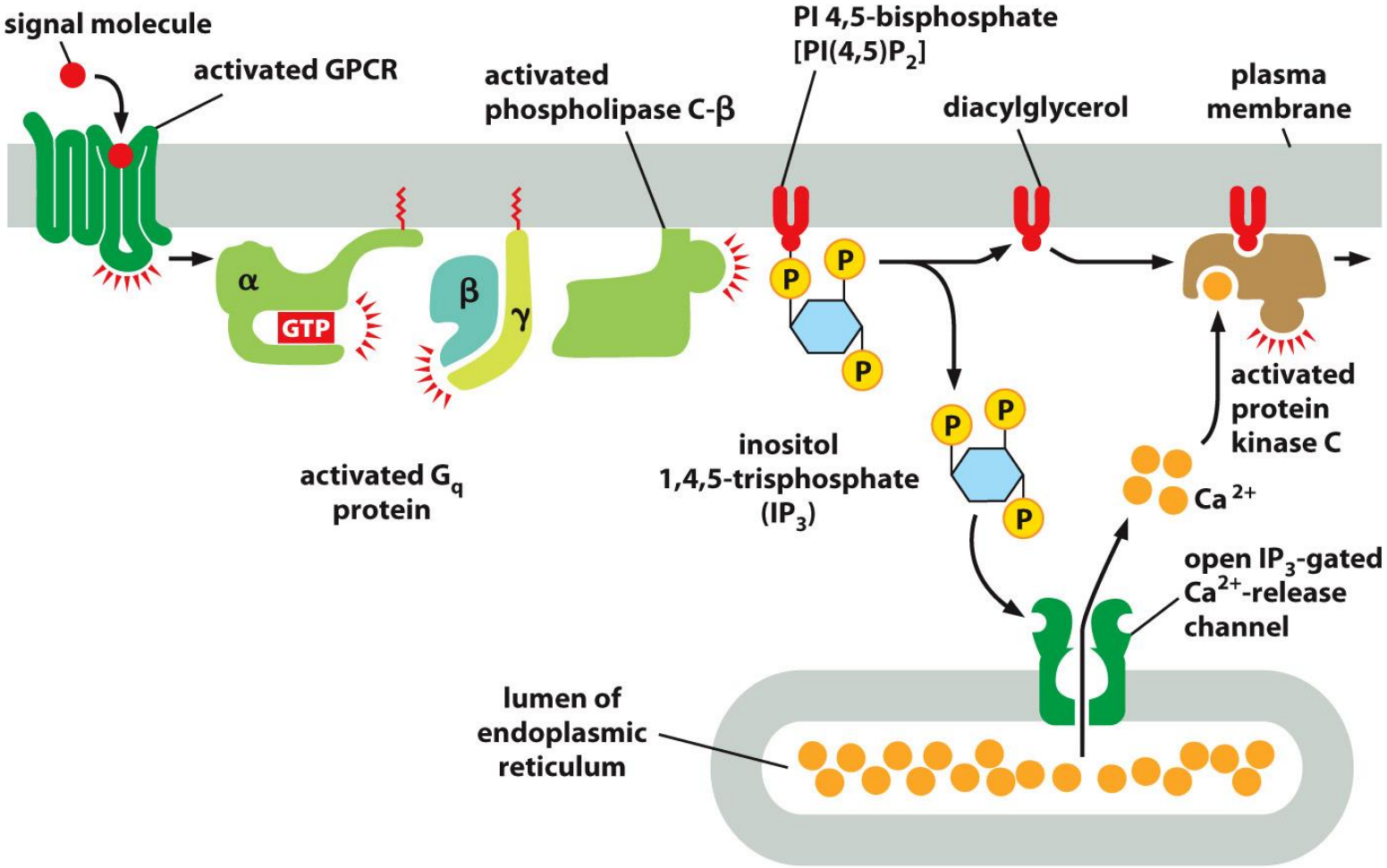


Figure 15-29 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Počty nejdůležitějších biomolekul

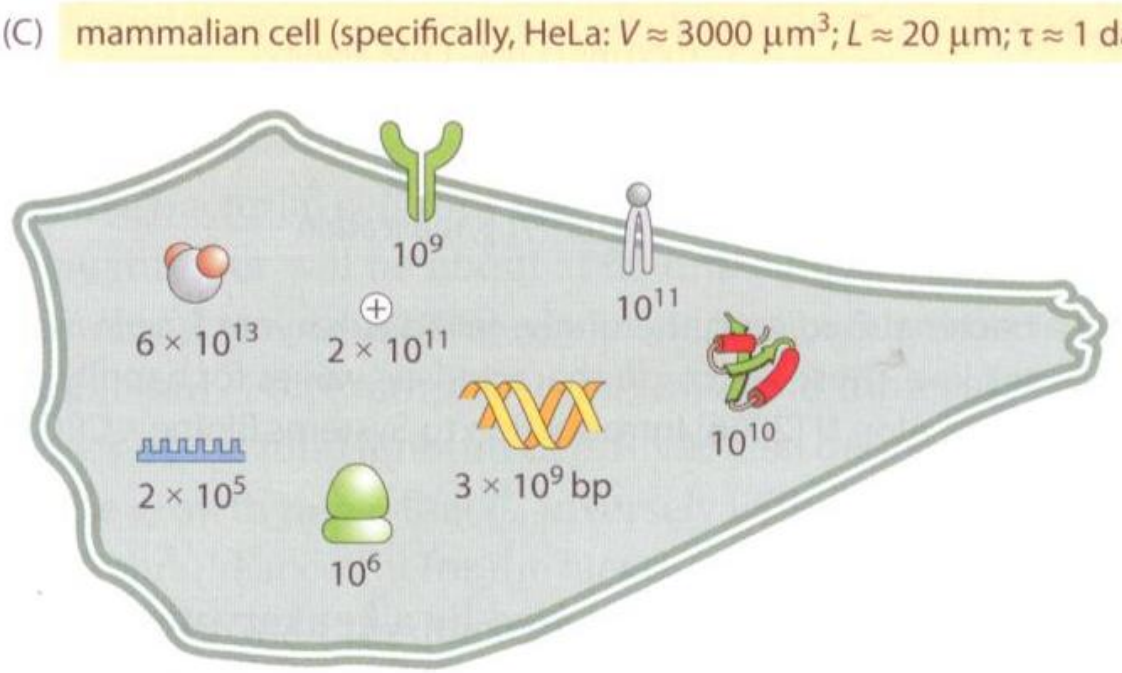


Figure 0-2 An order-of-magnitude census of the major components of the three model cells we employ often in the lab and in this book. A bacterial cell (*E. coli*), a unicellular eukaryote (the budding yeast *S. cerevisiae*), and a mammalian cell line (such as an adherent HeLa cell).

Počty buněk v těle

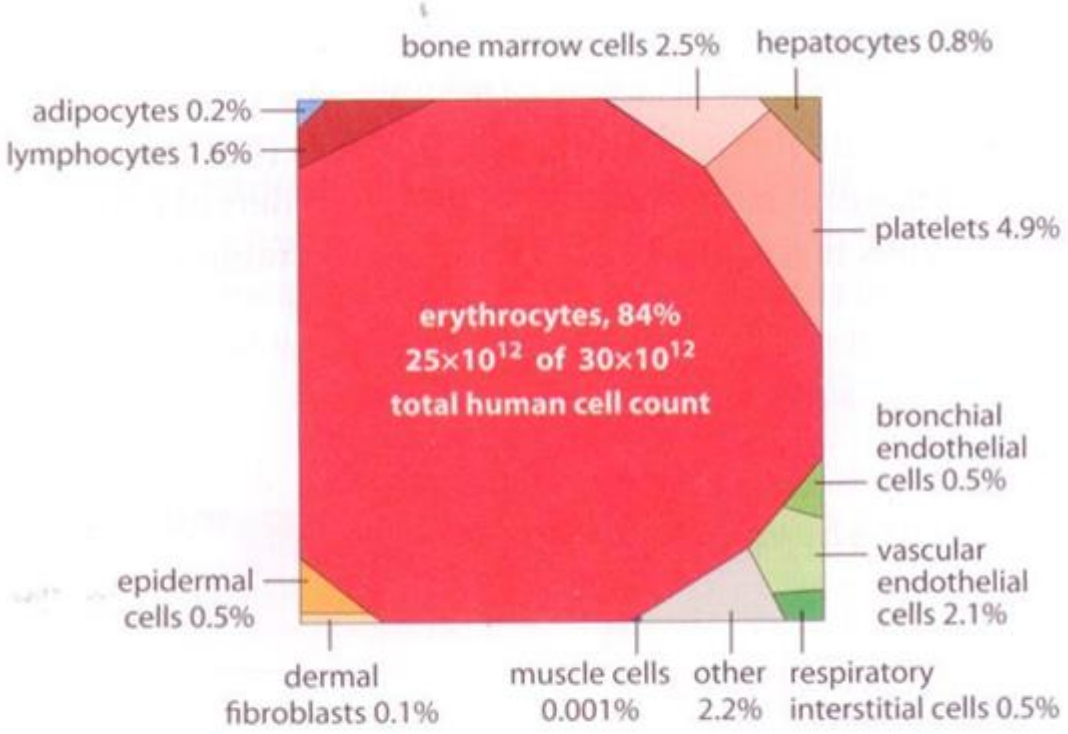


Figure 6-1 Estimate of the number of cells in an adult human partitioned according to cell type. Each cell type in the human body is represented as a polygon with an area proportional to the number of cells. The dominant component is red blood cells. (Based on data from Sender R et al. [2015] in preparation.)

Časy – buněčný cyklus

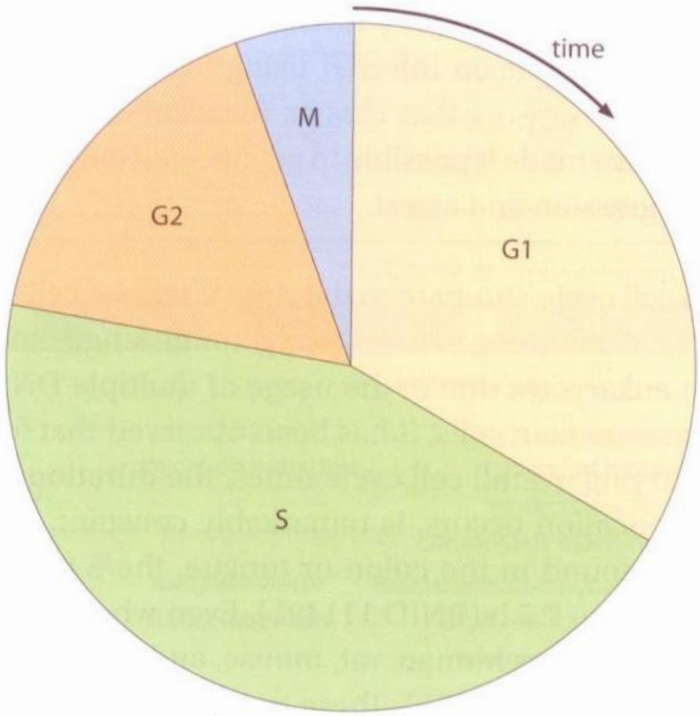


Figure 4-45 Cell cycle times for different cell types. Each pie chart shows the fraction of the cell cycle devoted to each of the primary stages of the cell cycle. The area of each chart is proportional to the overall cell cycle duration. Cell cycle durations reflect minimal doubling times under ideal conditions. (Adapted from Morgan D [2007] The Cell Cycle: Principles of Control. Sinauer Associates.)