

Buněčné regulace I

Základní morfogenetické dráhy

Vítězslav Bryja

Vlastnosti buněk v průběhu dynamické homeostázy

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

= Vlastnosti buněk v průběhu embryonálního vývoje

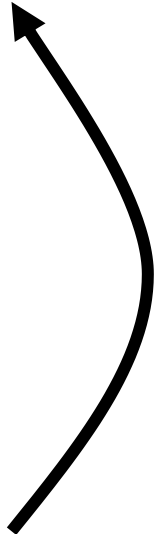
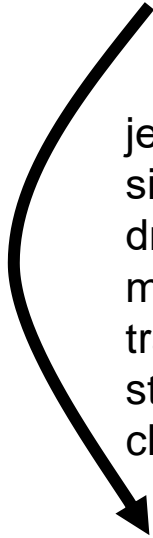
Role signálních drah v regulaci dynamických procesů

a) signály z okolního prostředí

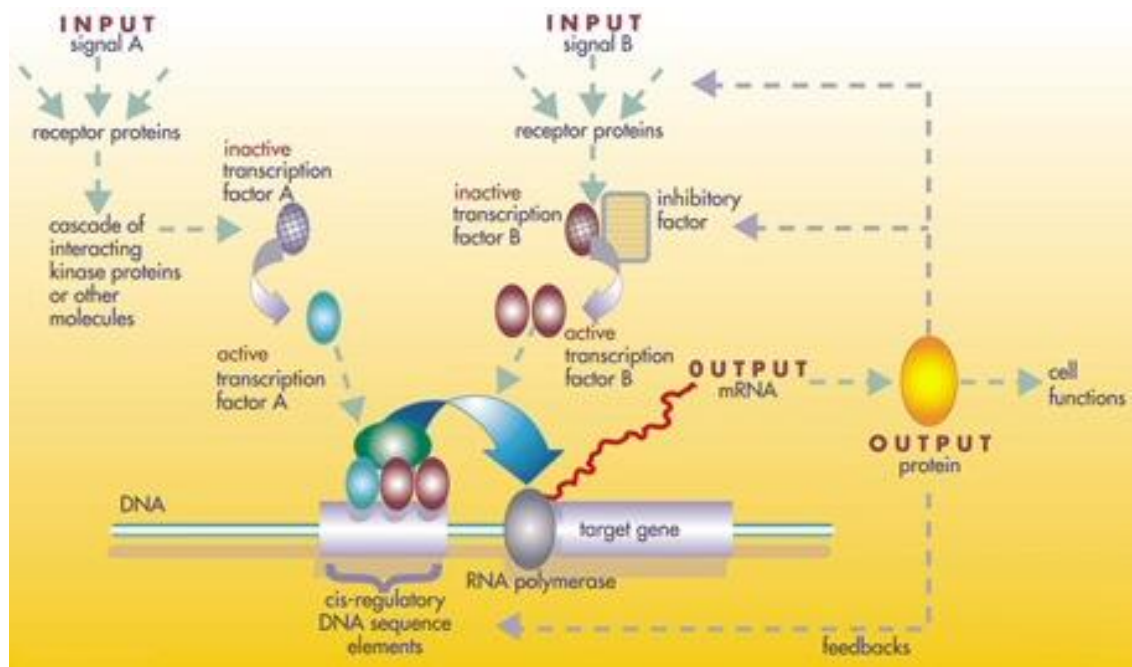
jednotlivé
signální
dráhy
modulují
transkripci a
strukturu
chromatinu

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

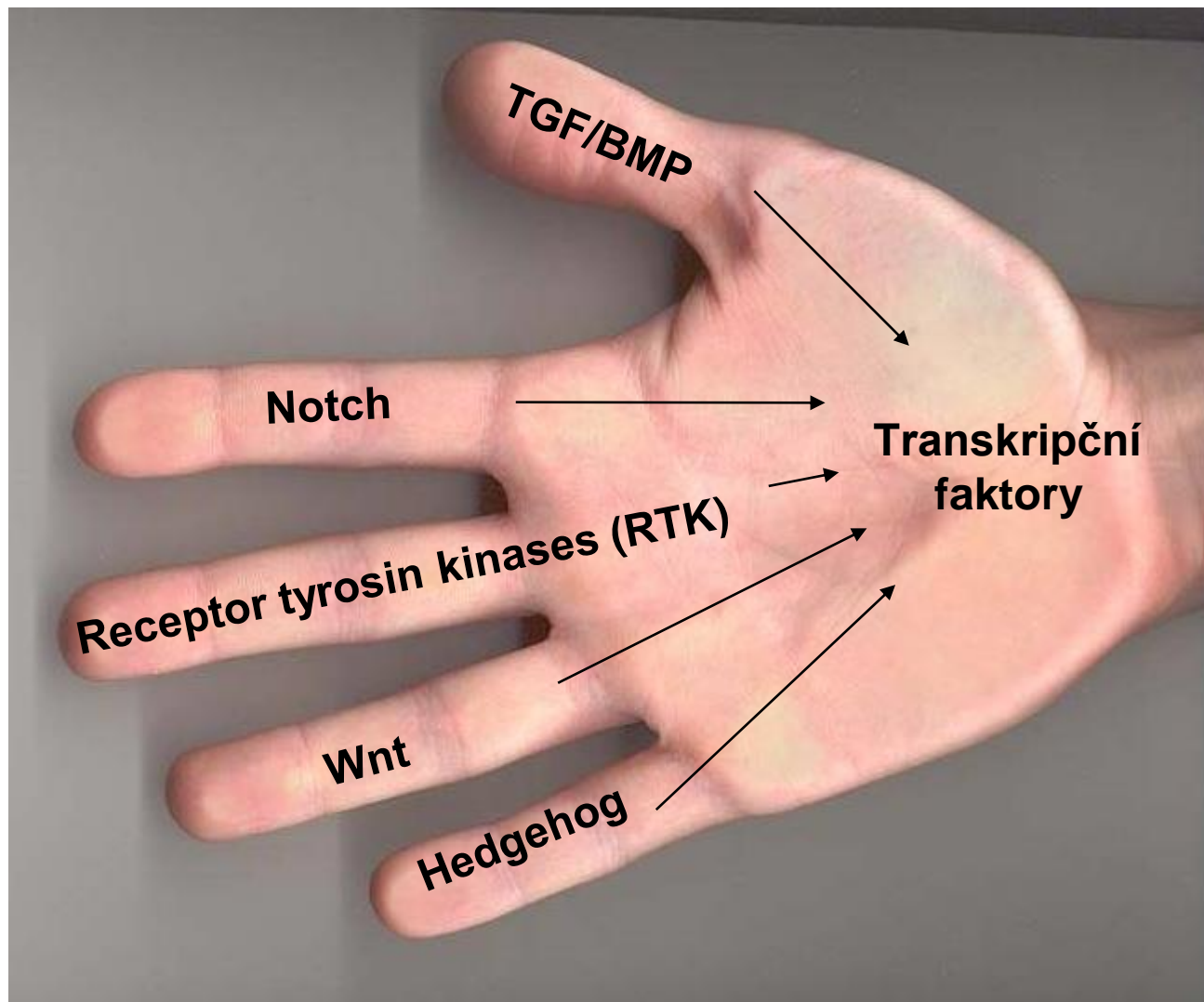
b) transkripční program v jádře



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

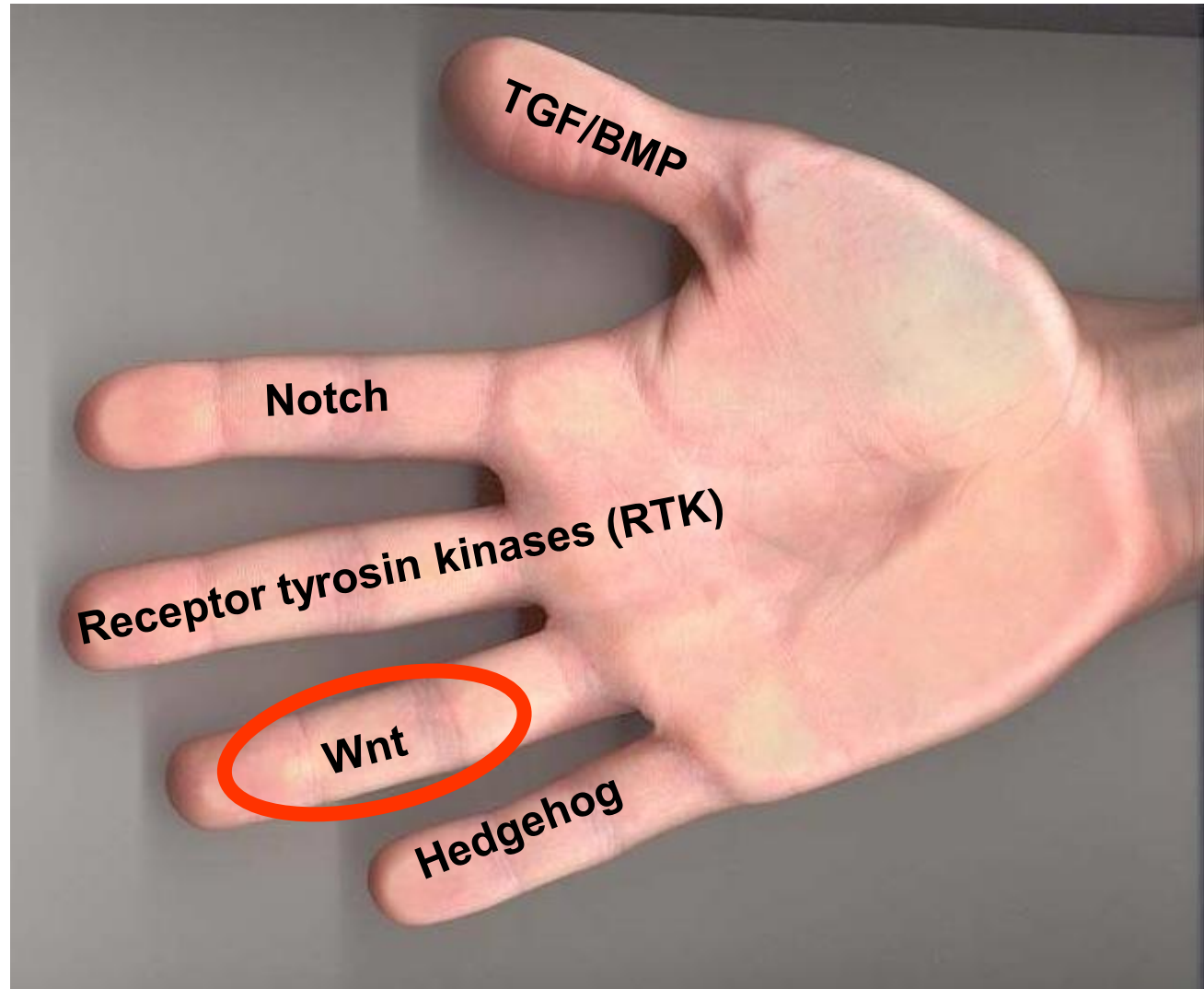


Během práce na genech majících vliv na vývoj embryí Eric Wieschaus s kolegy vůbec netušili, jak je jejich pokus významný. Ukázala to až následující léta.

Eric Wieschaus tráví v podstatě celý život obklopen octomilkami. Není přitom 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**.

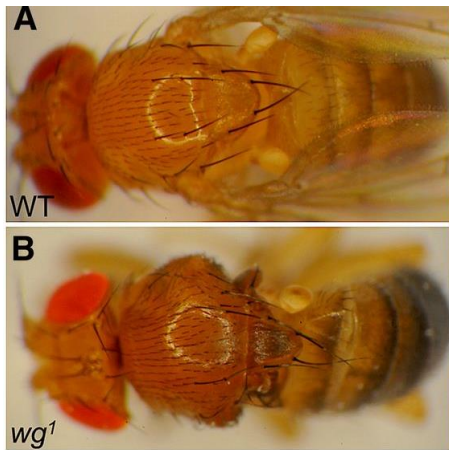
I kdybychom nedostali Nobelovu cenu, pořád bychom měli krásné výsledky i příběh, říká Wieschaus.

Klíčové molekulární komponenty vývoje

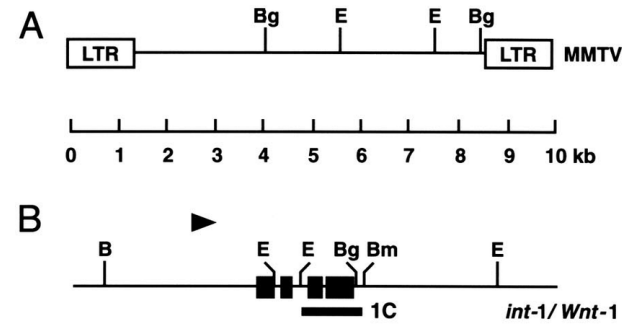


Wingless

Int-1



WNT

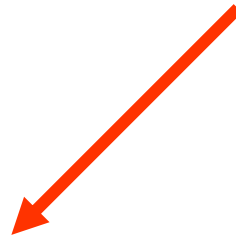


Röel Nusse

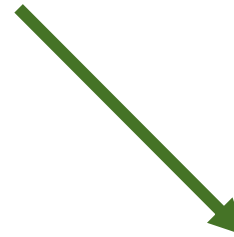


Wnt (Wingless/Int)

- 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

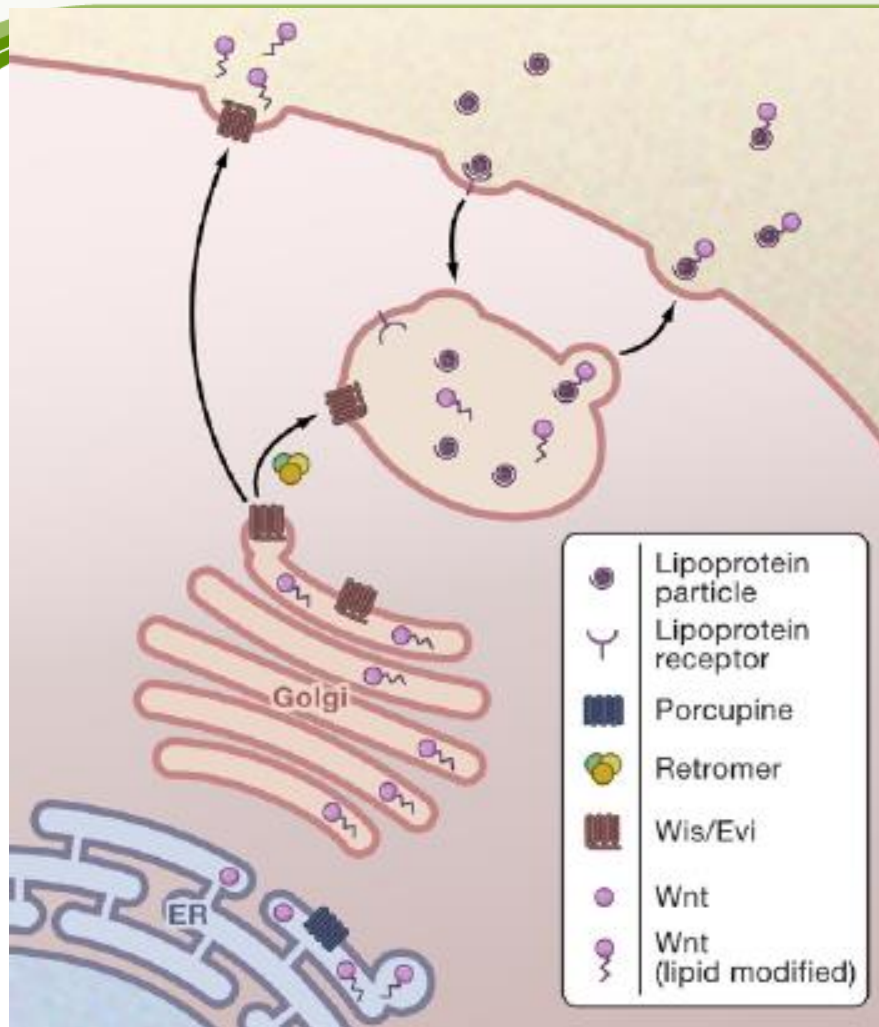
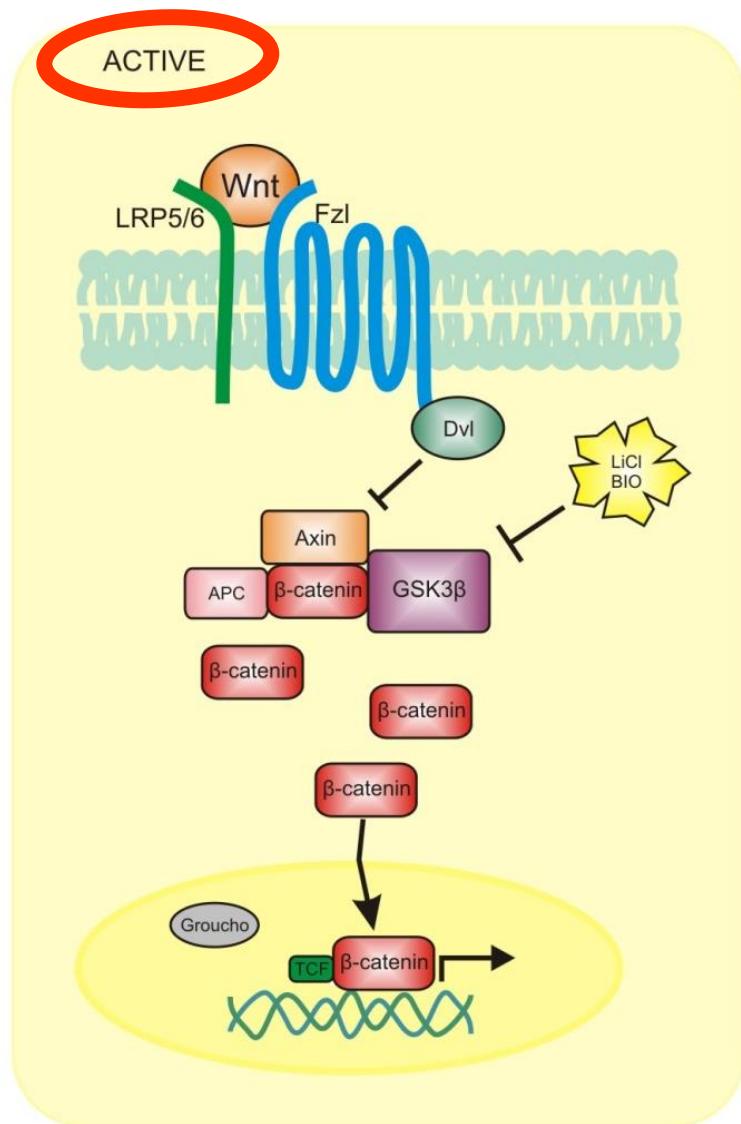
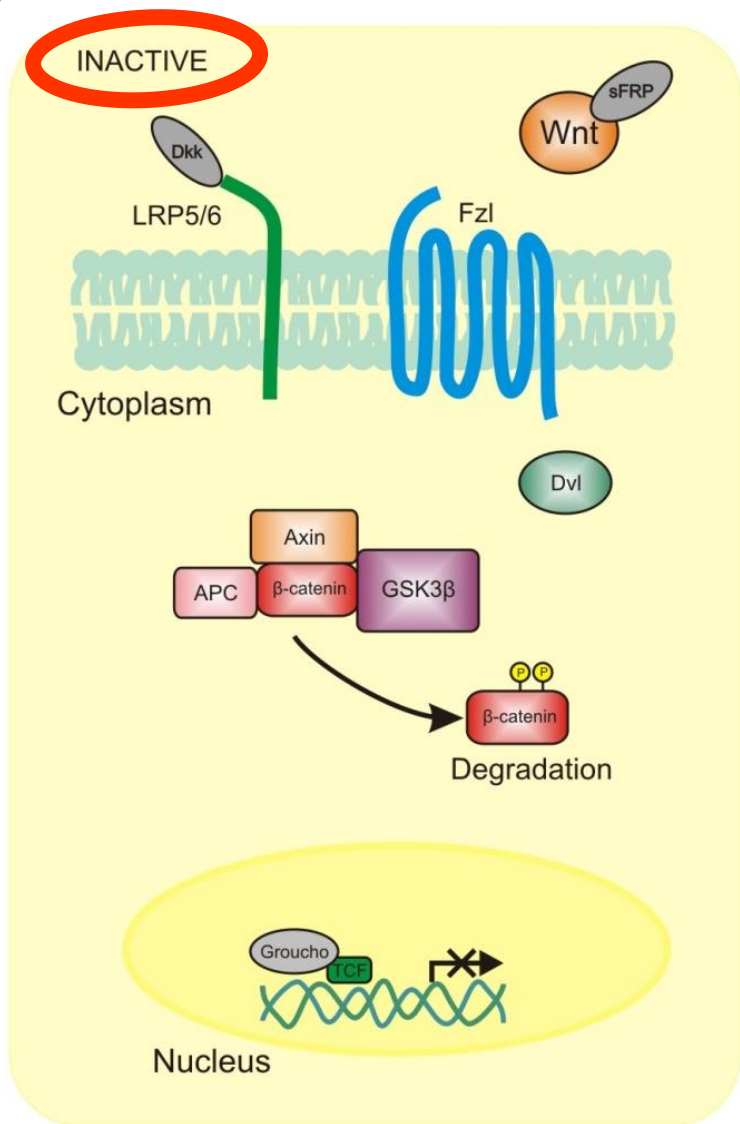


Figure 1. Wnt Secretion

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

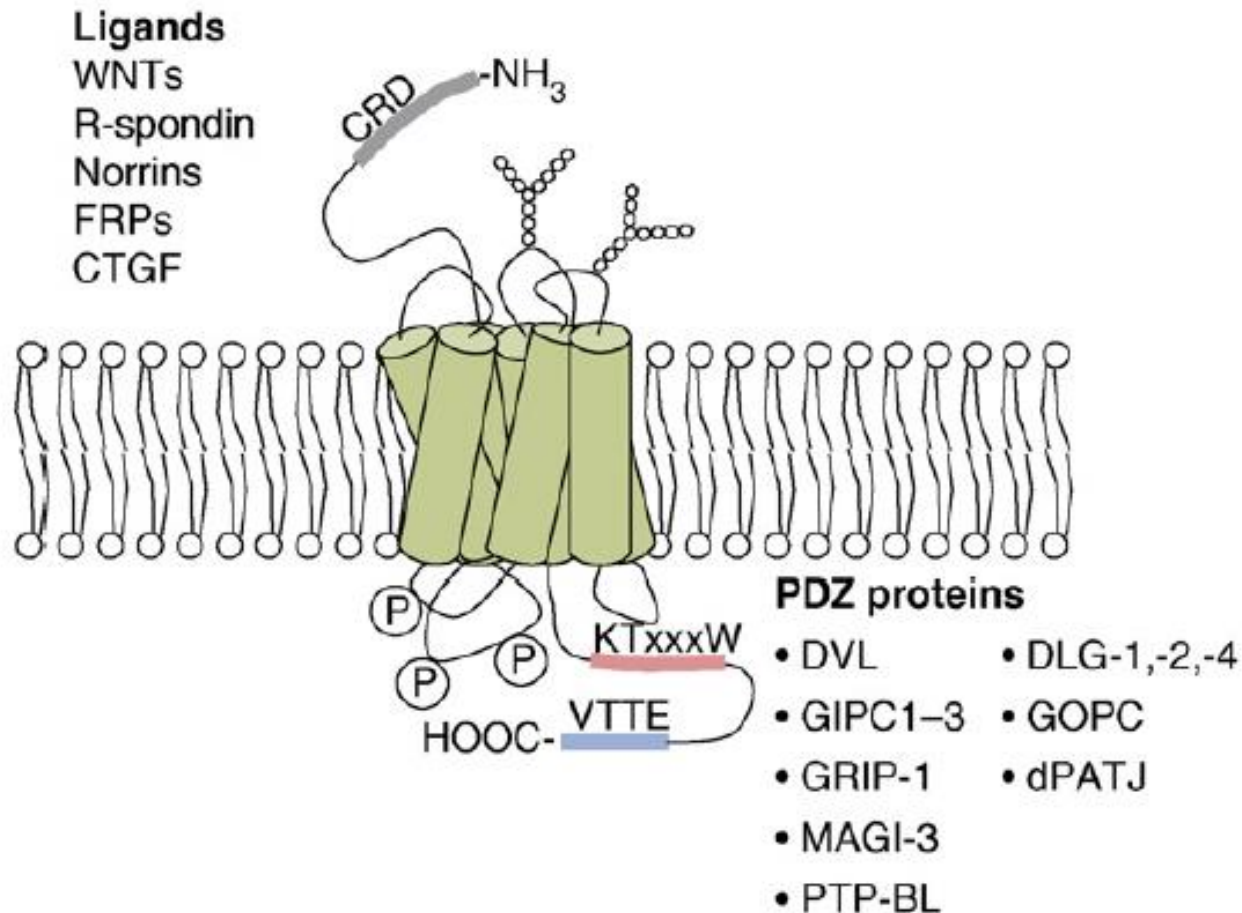
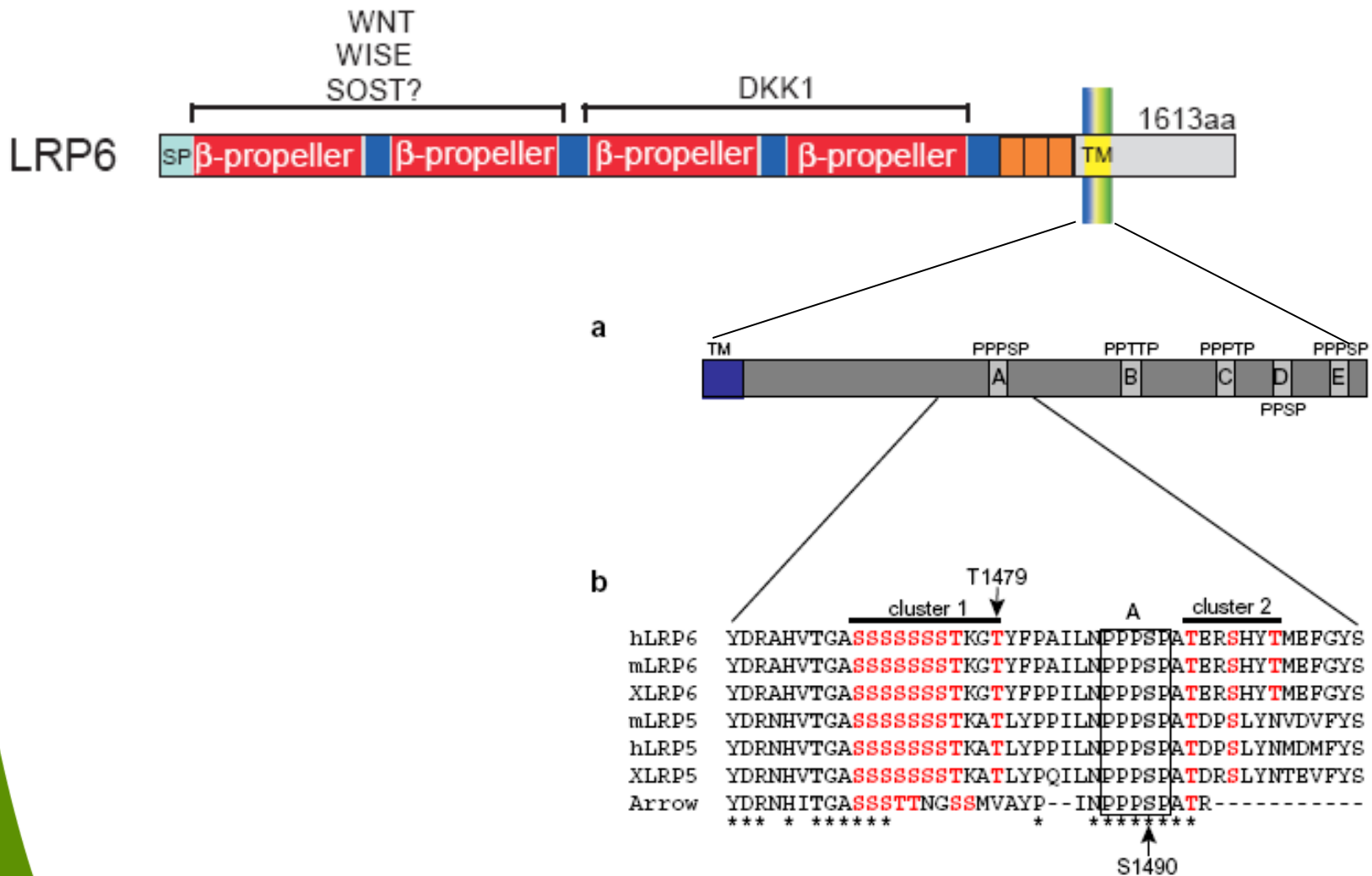
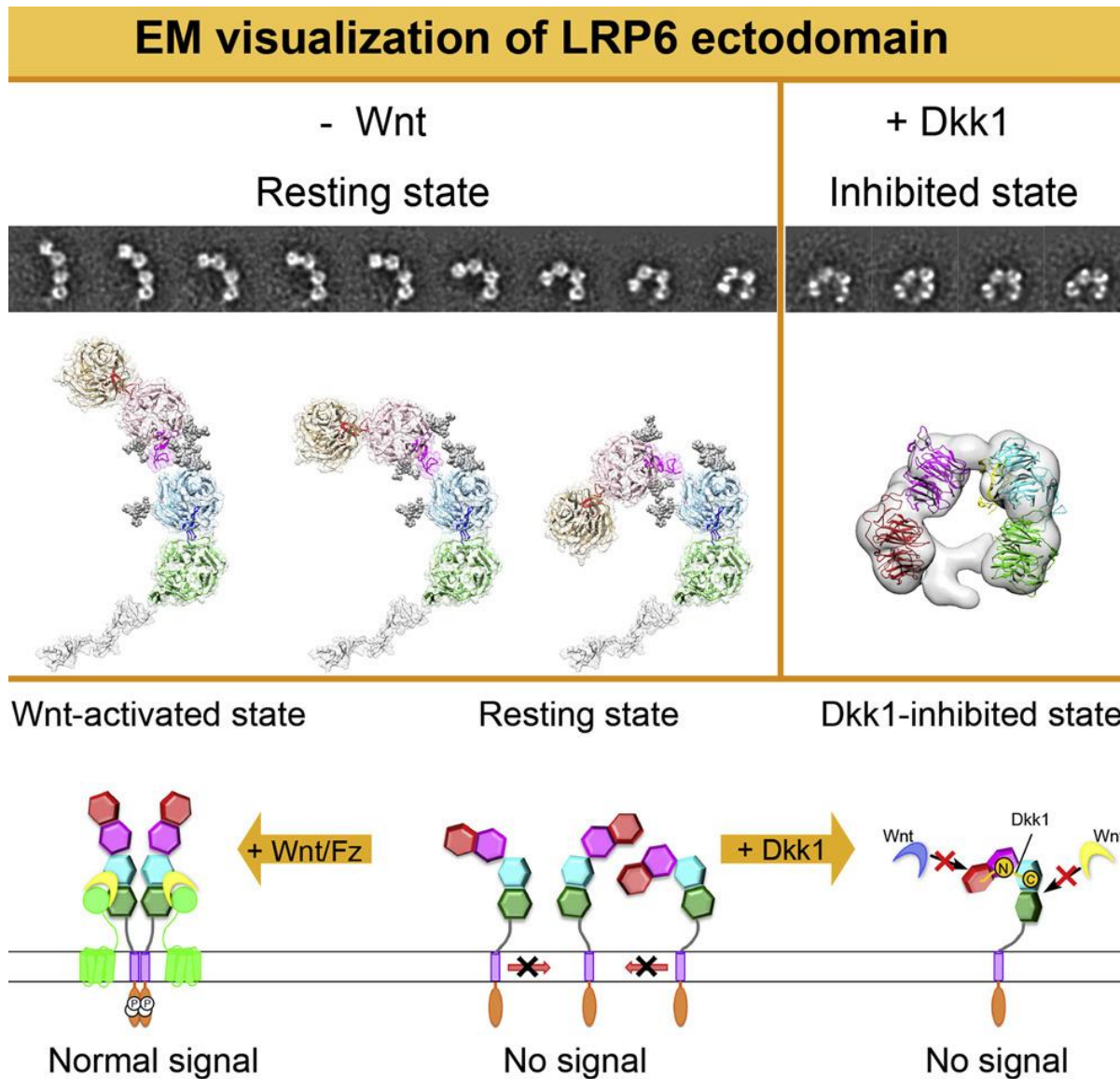


Figure 1. Schematic view of the 7TM model of FZDs. The model indicates extra- and intracellularly interacting proteins, putative glycosylation and phosphorylation sites. The N-terminal CRD is the primary binding site for ligands. The pink stretch in the C terminus indicates the internal PDZ-interacting 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.

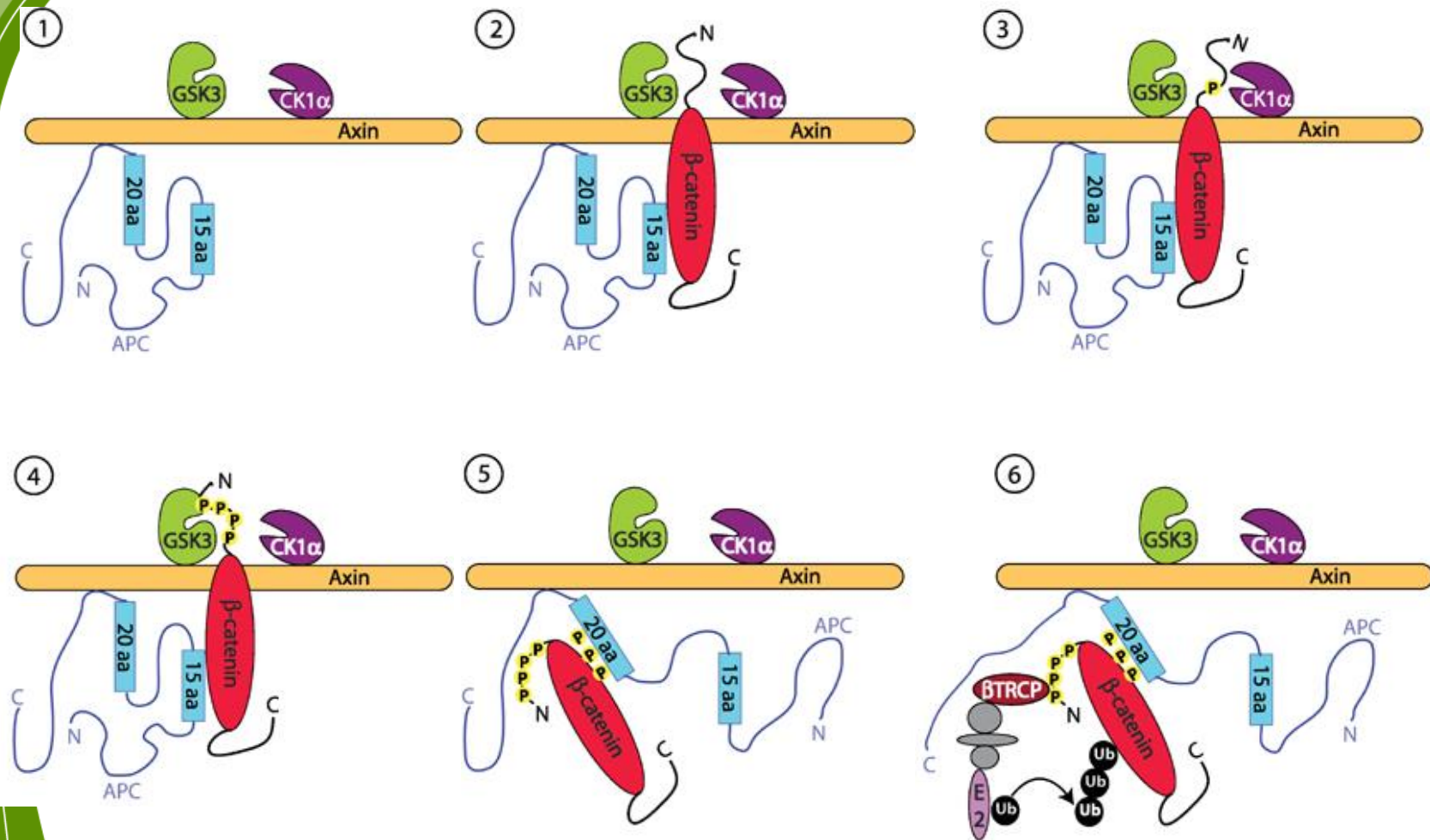
Lrp5/6 – stěžejní ko-receptor kanonické signální dráhy Wnt



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



Destrukční komplex pro beta-kenatin



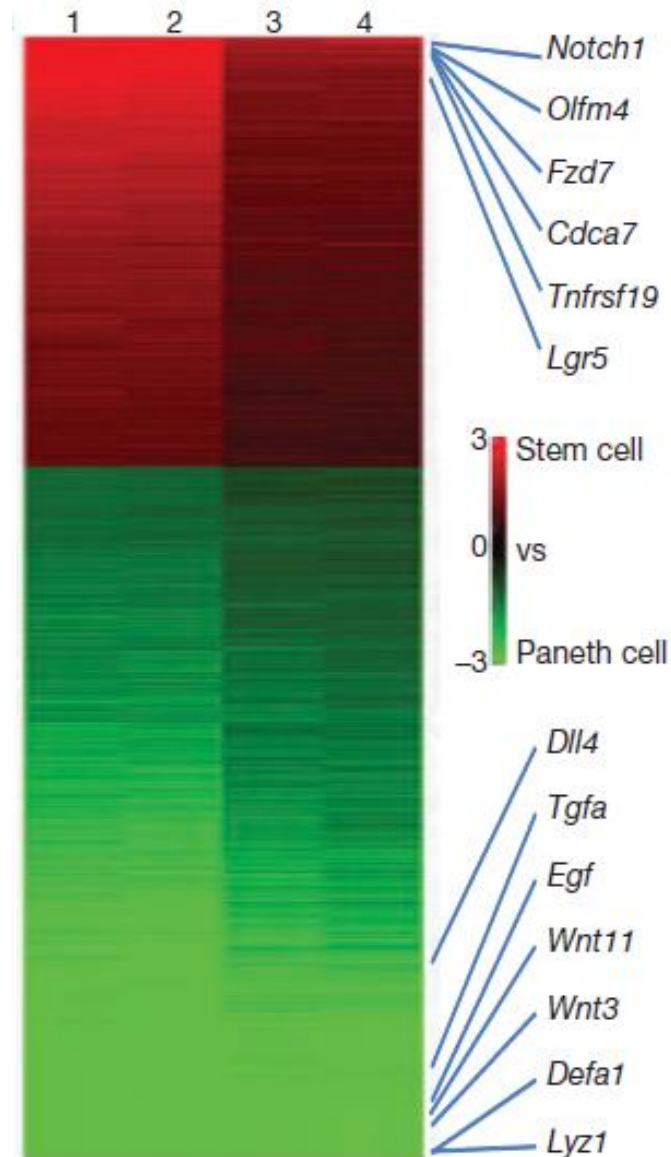
Destrukční komplex

- 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

Geny pod kontrolou Wnt dráhy v kmenových buňkách



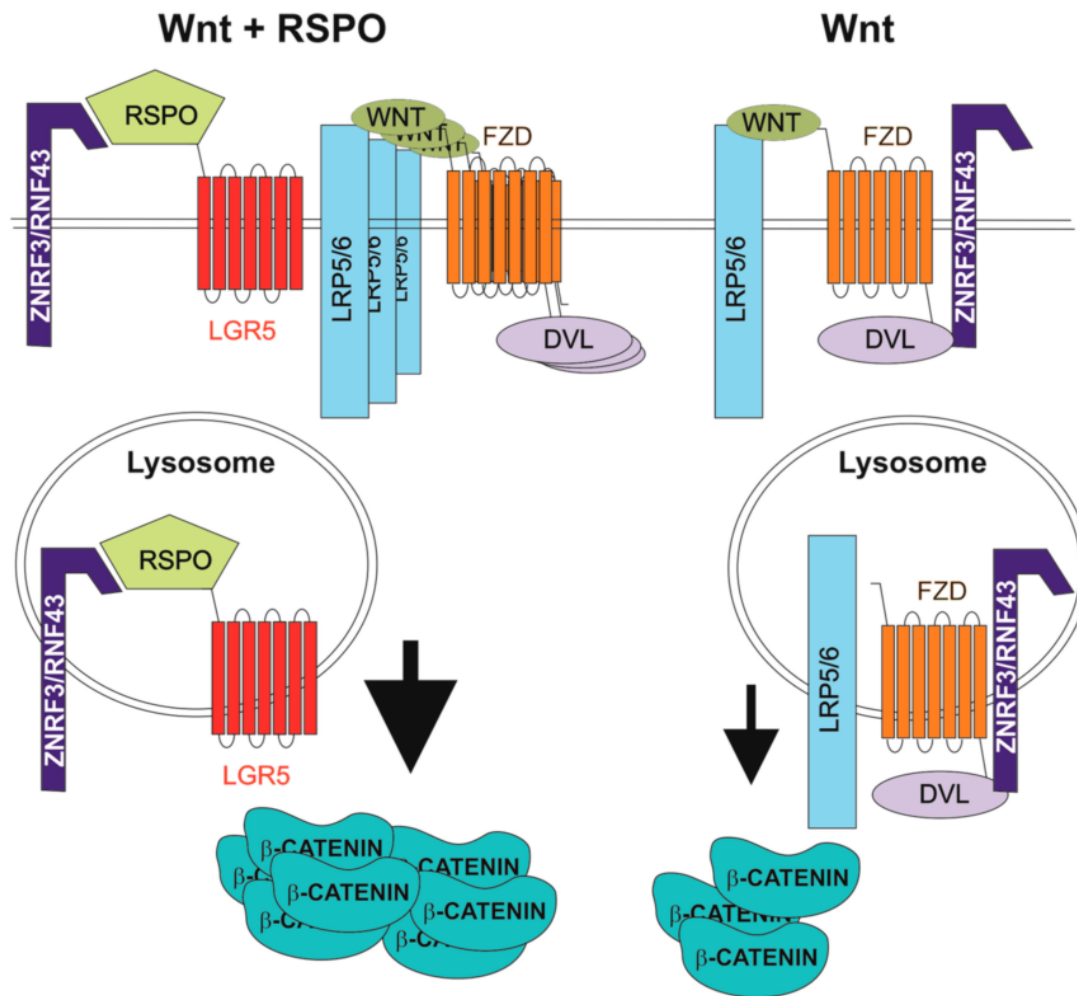
Propojení mezi Wnt dráhou a kmenovými buňkami

- Lgr5 jako cílový gen Wnt dráhy

Propojení mezi Wnt dráhou a kmenovými buňkami

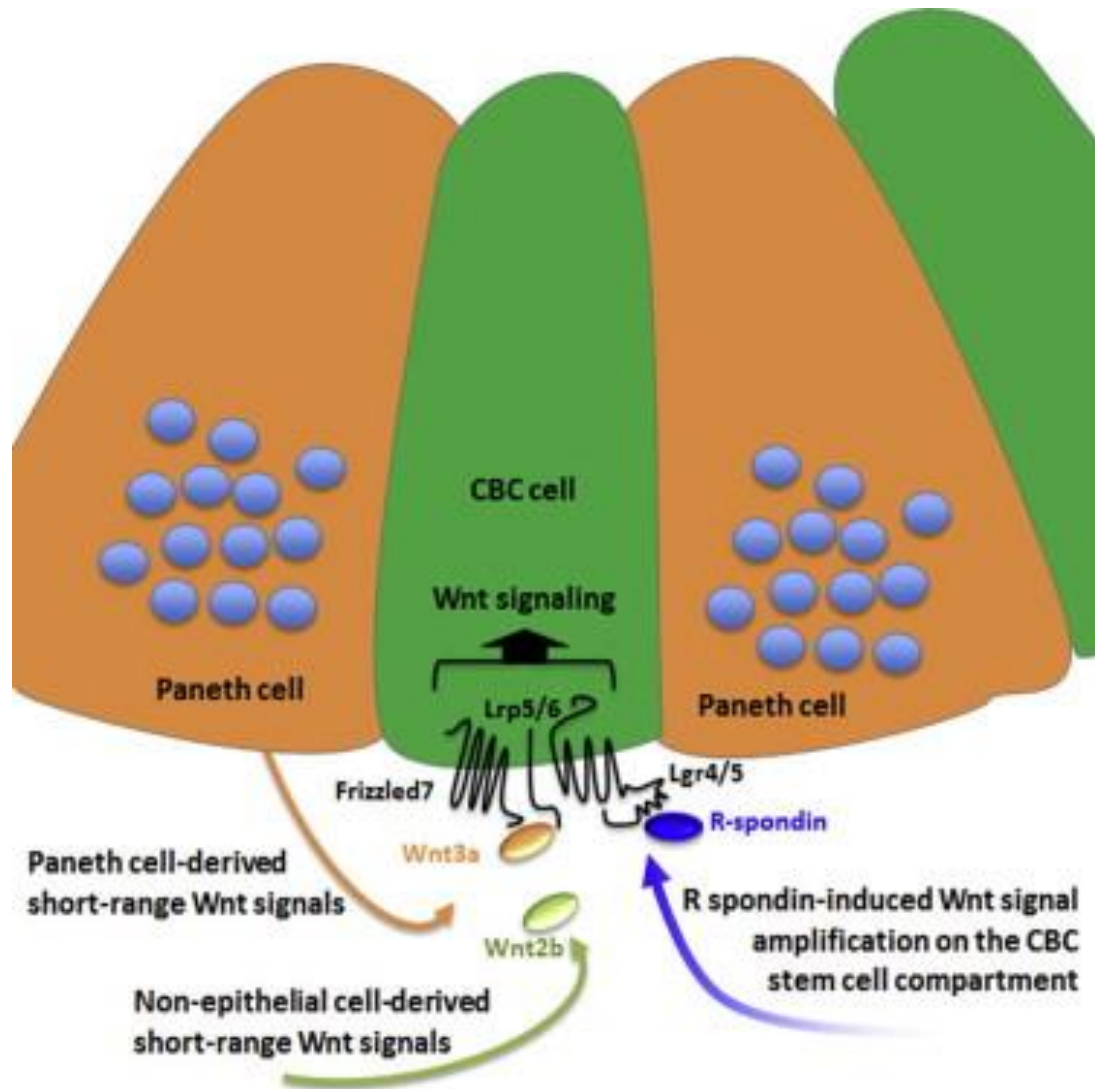
- Lgr5 jako cílový gen Wnt dráhy
- Lgr5 jako marker kmenových buněk ve střevě
- R-spondin jako ligand Lgr5 a jako aktivátor Wnt dráhy

Vazba R-spondinu na LGR5 aktivuje Wnt dráhu



Propojení mezi Wnt dráhou a kmenovými buňkami

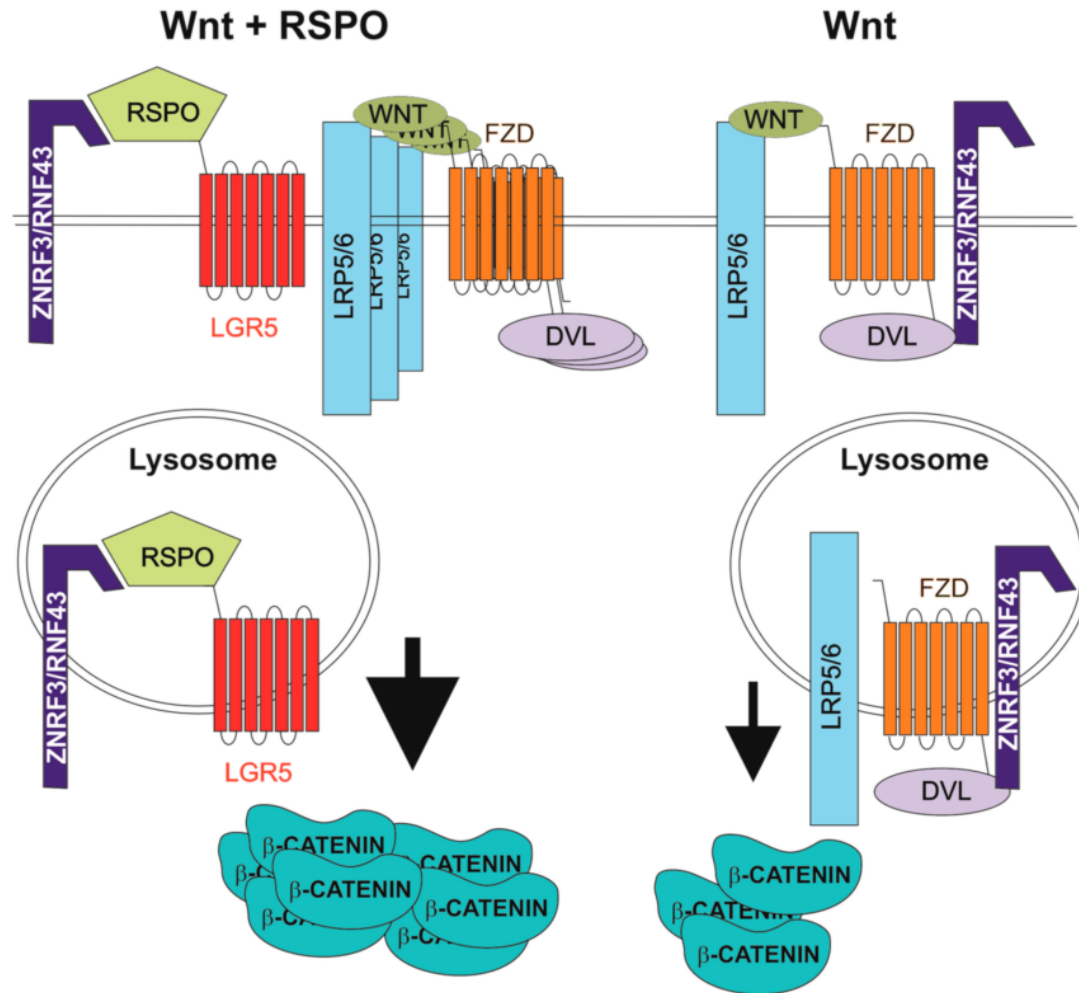
- **Lgr5 jako cílový gen Wnt dráhy**
- **Lgr5 jako marker kmenových buněk ve střevě**
- **R-spondin jako ligand Lgr5 a jako aktivátor Wnt dráhy**
- **Wnt signalizace jako klíčová složka komunikace mezi kmenovými buňkami a jejich nikou**



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

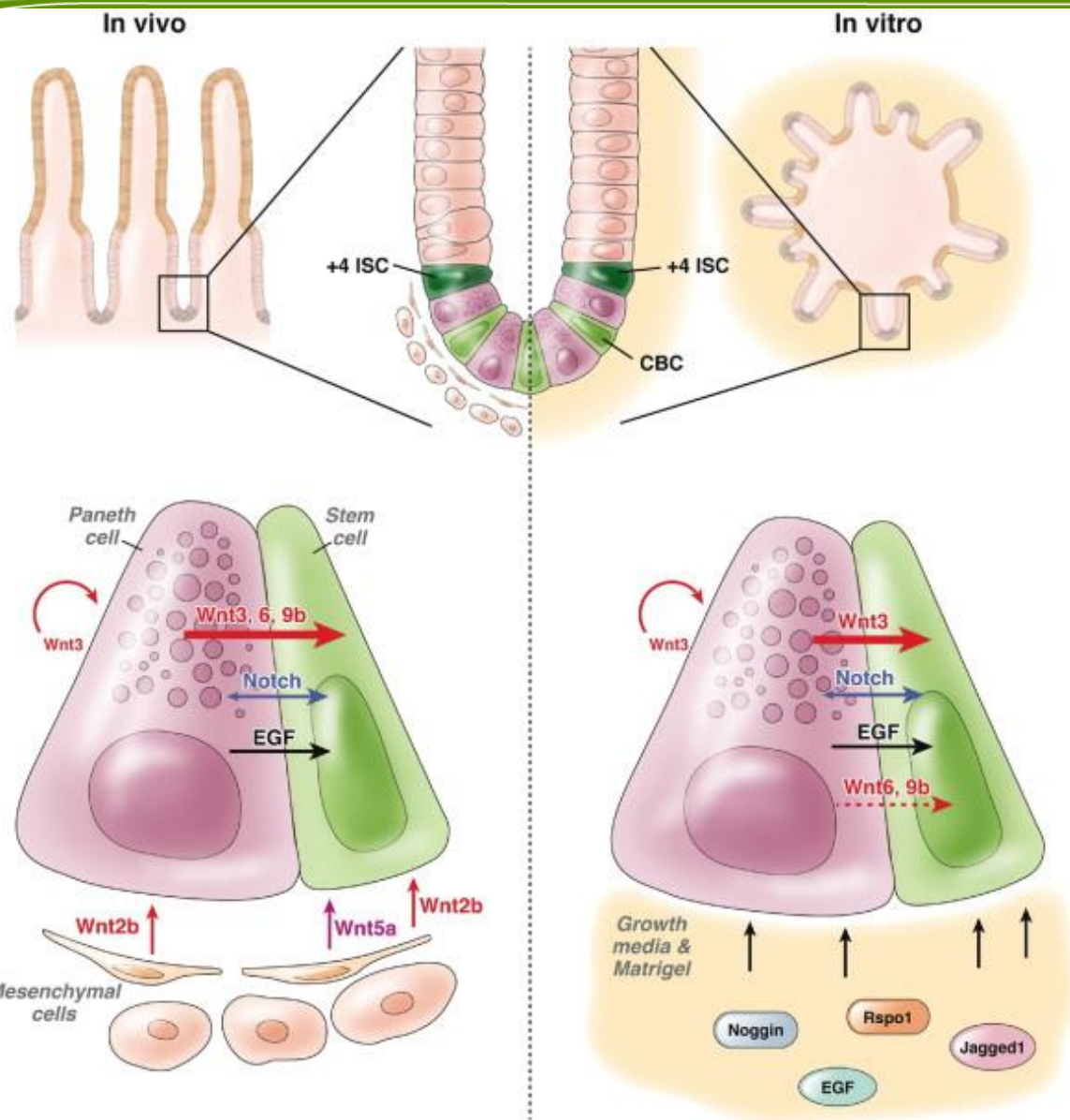


RNF43 je specializovaná E3 ubikvitin ligáza pro Frizzled (FZD)

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



Kmenové buňky, Wnt a nádory

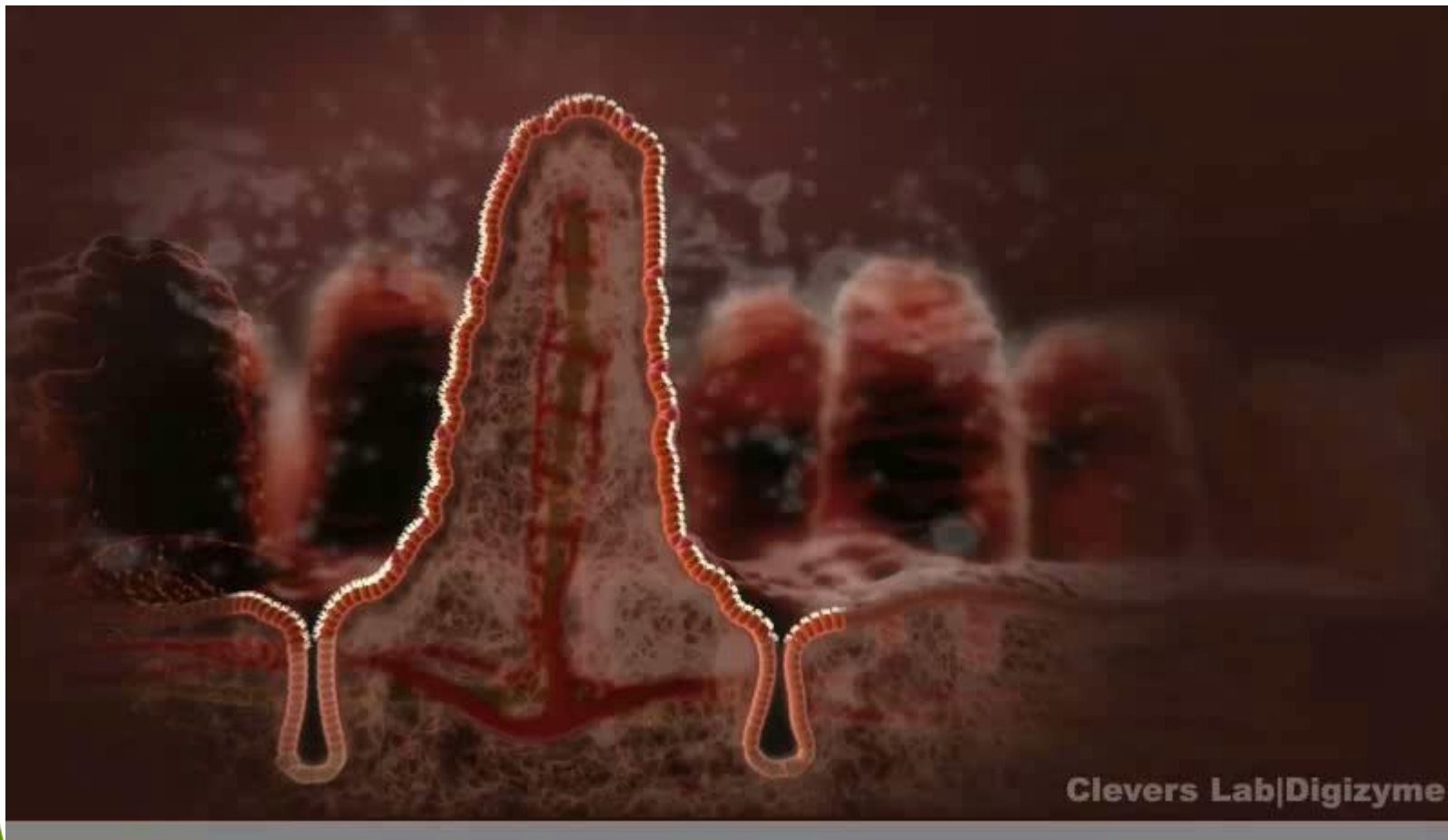
Familiární adenomatózní polypóza

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



Kmenové buňky, Wnt a nádory

Familiární adenomatózní polypóza



Role kmenových buněk v rozvoji nádoru

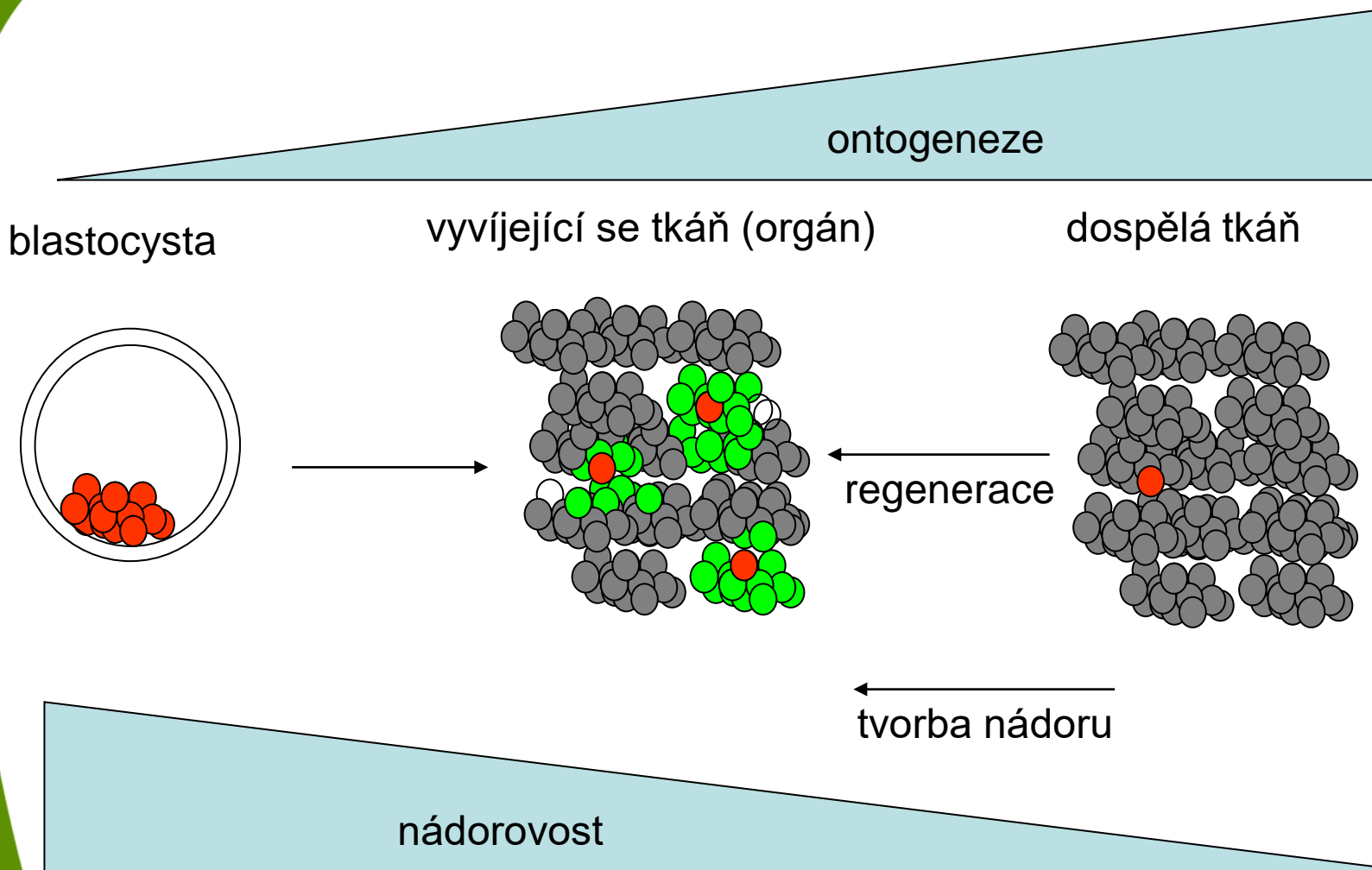
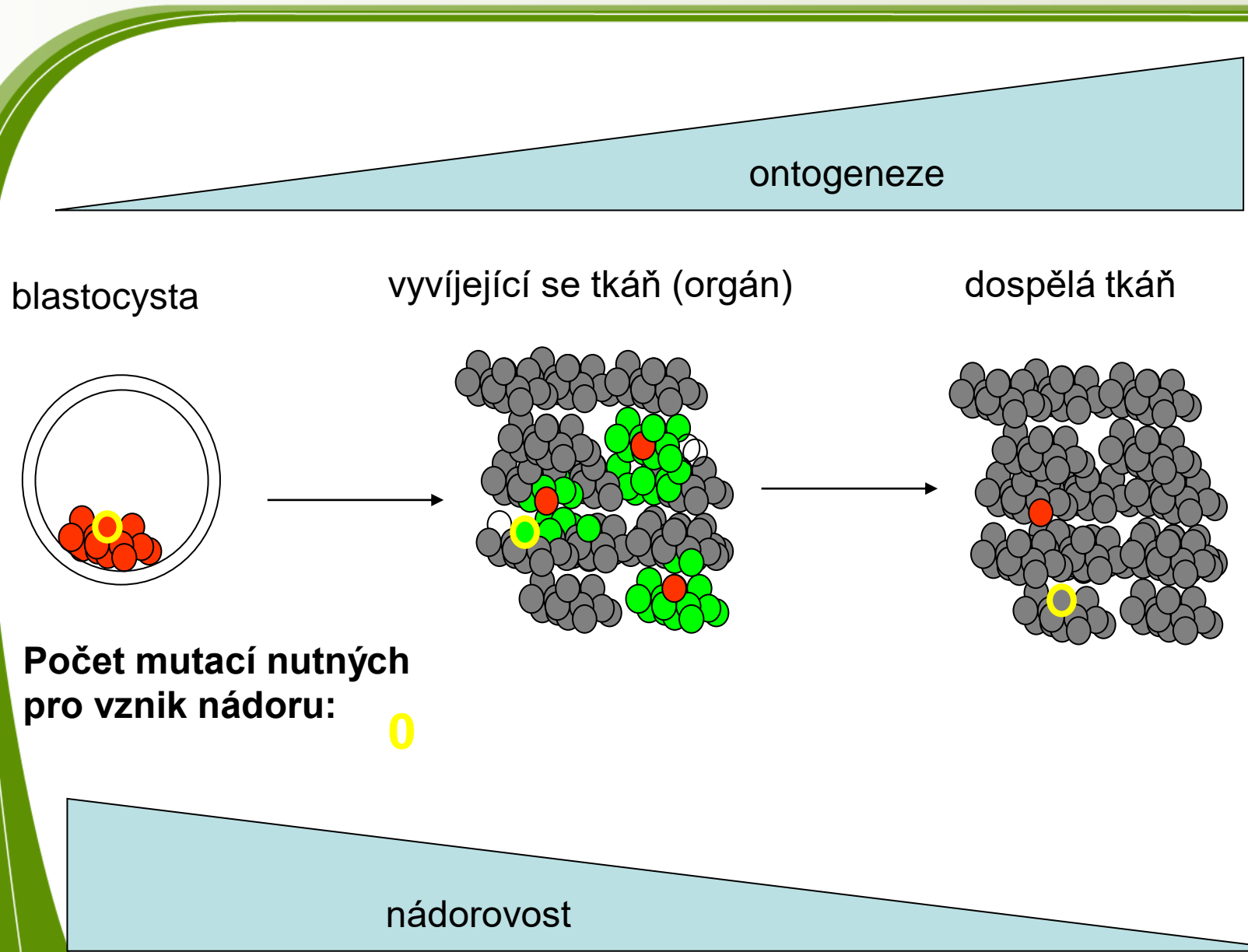


Table 2 Hh and Wnt pathways in cancer

Tissue	Tumour	Evidence of pathway involvement	References
Hh pathway			
Brain	Medulloblastoma	Tumorigenesis by inactivation of <i>PTCH</i> ; allograft and cell-line growth inhibition by cyclopamine; inhibition of autochthonous tumour growth by synthetic small molecule antagonist	37, 81; reviewed in 6
		Tumorigenesis by inactivation of <i>Su(fu)</i>	86
	Glioma	Gli amplification; growth inhibition of some cell lines by cyclopamine	87, 88
Skin	Basal cell carcinoma	Tumorigenesis by inactivation of <i>PTCH</i> ; <i>in vivo</i> tumorigenesis by expression of activating form of <i>SMO</i> or by <i>Shh</i> overexpression and <i>in vitro</i> growth inhibition by synthetic Hh pathway antagonist; inhibition of human tumour growth topical cyclopamine	82, 83; reviewed in 6
Muscle	Rhabdomyosarcoma	Tumorigenesis by inactivation of <i>PTCH</i>	reviewed in 6
Oesophagus	Adenocarcinoma	Cell-line growth inhibition by cyclopamine, Hh blocking antibody	42
Stomach	Adenocarcinoma	Cell-line growth inhibition by cyclopamine, Hh blocking antibody	42
Pancreas	Adenocarcinoma	Xenograft and cell-line growth inhibition by cyclopamine, Hh blocking antibody; tumour initiation (in mouse) by <i>Shh</i> overexpression	42, 43
Biliary tract	Adenocarcinoma	Xenograft and cell-line growth inhibition by cyclopamine, Hh blocking antibody	42
Lung	Small-cell lung cancer	Xenograft and cell-line growth inhibition by cyclopamine, Hh blocking antibody	41
Prostate	Adenocarcinoma	Xenograft and cell-line growth inhibition and suppression of metastasis by cyclopamine; increased xenograft growth by <i>Shh</i> and <i>Gli</i> overexpression	29, 89, 90
Bladder	Urothelial carcinoma	Increased tumour induction (in mouse) by alkylating agent in <i>Ptch</i> heterozygote	91
Oral cavity	Squamous cell cancer	Growth inhibition of cell lines by cyclopamine;	92
Wnt pathway			
Colon	Adenocarcinoma	Tumorigenesis by inactivation of APC, Axin; tumorigenesis by stabilization of β -catenin; epigenetic inactivation of SFRPs	47; reviewed in 45
Liver	Hepatoblastoma	Tumorigenesis (in mouse) by inactivation of APC and by stabilization of β -catenin	reviewed in 45
Blood	Multiple myeloma	Cell-growth inhibition by dominant negative TCF4; growth stimulation by Wnt ligand	93
Hair follicle	Pilomatricoma	Tumorigenesis (in mouse) by overexpression of β -catenin	reviewed in 45
Bone	Osteosarcoma	<i>Dkk3</i> and <i>LRP5</i> expression inhibits tumour cell growth <i>in vitro</i>	94, 95
Lung	Non-small-cell carcinoma	Apoptosis and cell-growth inhibition by short interfering RNA and a blocking antibody against Wnt2	96
Pleura	Mesothelioma	Apoptosis and cell-growth inhibition by transfection of SFRP	97

Emphasis is placed on functional data showing a requirement for pathway activation in tumour formation and/or tumour cell growth. (See Fig. 1 and text for gene abbreviations.)

Vztah „kmenovosti“ a „nádorovosti“



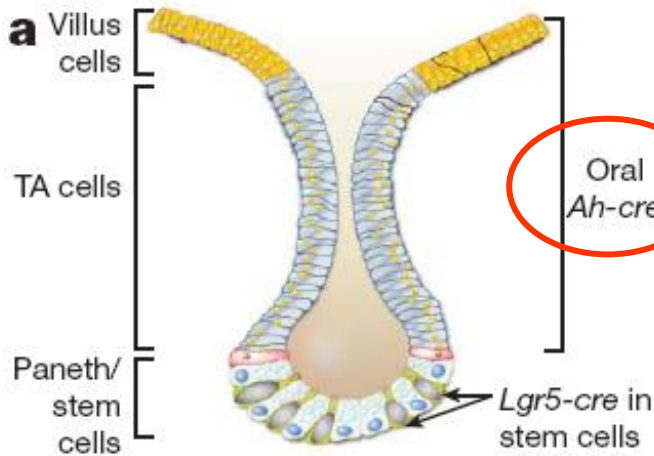
Teratomy



Je to pravda?

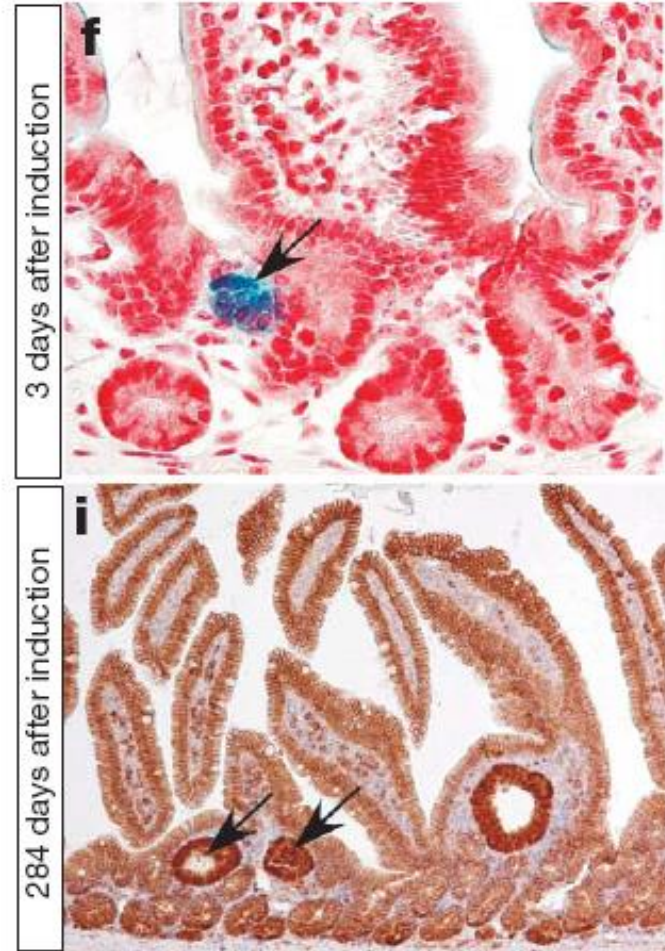
Experimentální důkaz:

Tkáňově specifický knockout nádorového supresoru APC

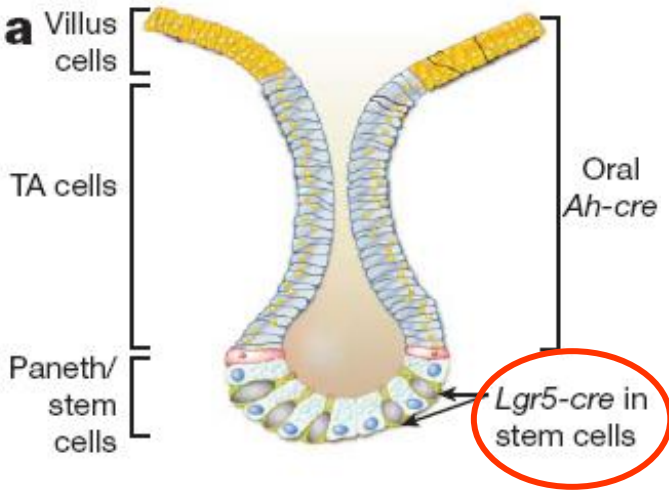


Zkřížení s APC flox/flox myšima + tamoxifen

Vznik malých adenomů, které neprogradují



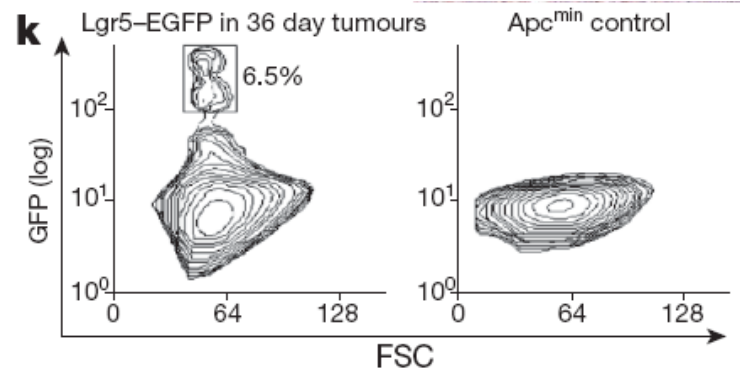
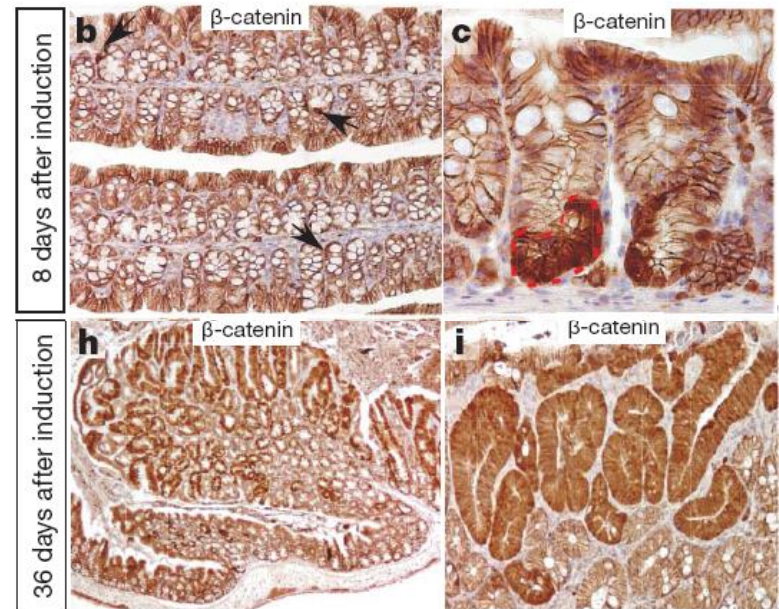
Nekontrolovaná aktivace kmenových buněk má fatální následky



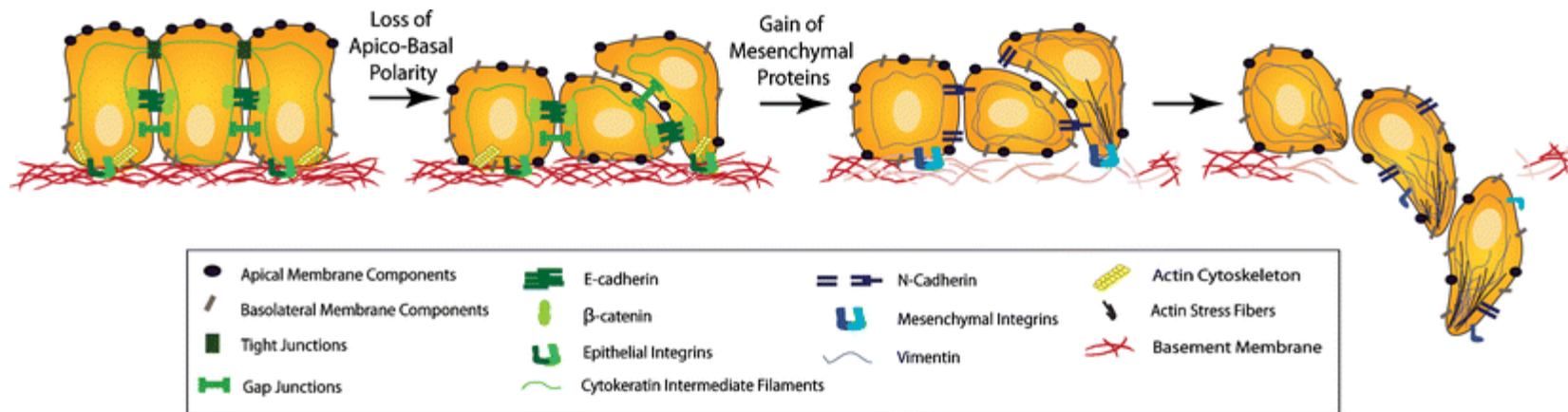
Zkřížení s APC flox/flox myšima + tamoxifen

Rychlý vznik adenomů a nádorů

NATURE | Vol 457 | 29 January 2009



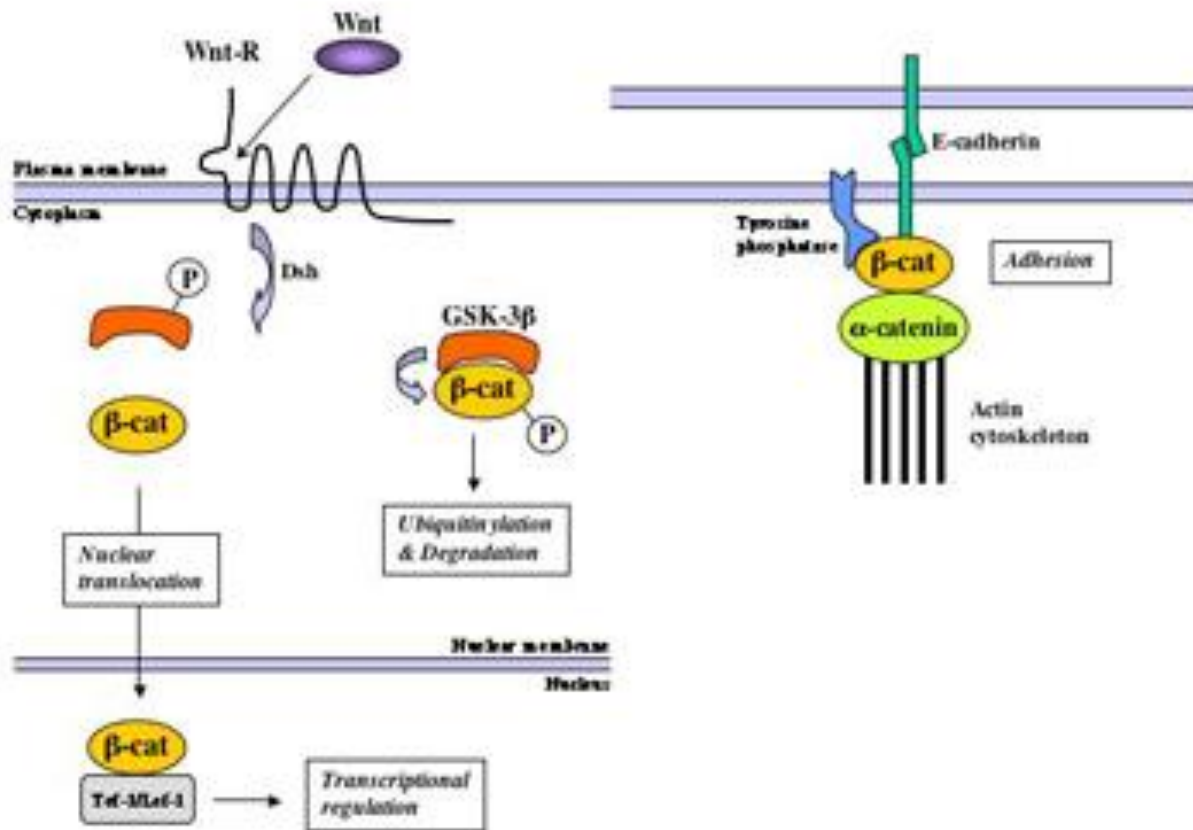
Epitelo-mesenchymální přechod (EMT – epithelio-mesenchymal transition)



Epiteliální - mezenchymální přechod (EMT) je proces, při kterém epitelové buňky ztratí svoji buněčnou polaritu a adhezi a získají migrační a invazivní vlastnosti, stanou se mezenchymálními. EMT je nezbytný pro četné vývojové procesy včetně tvorby mezodermu 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 „polech“ – biochemických komplexech

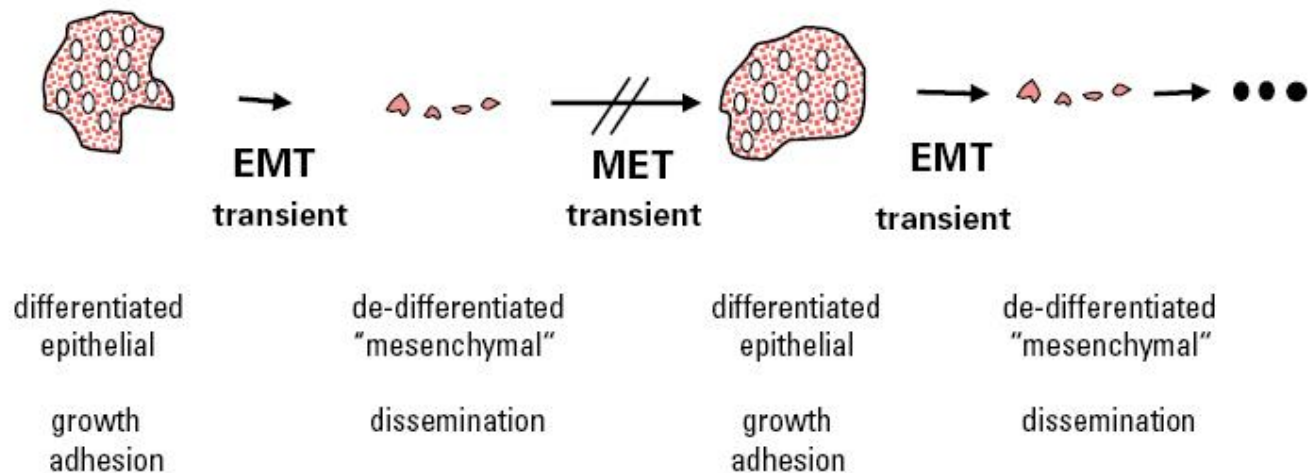
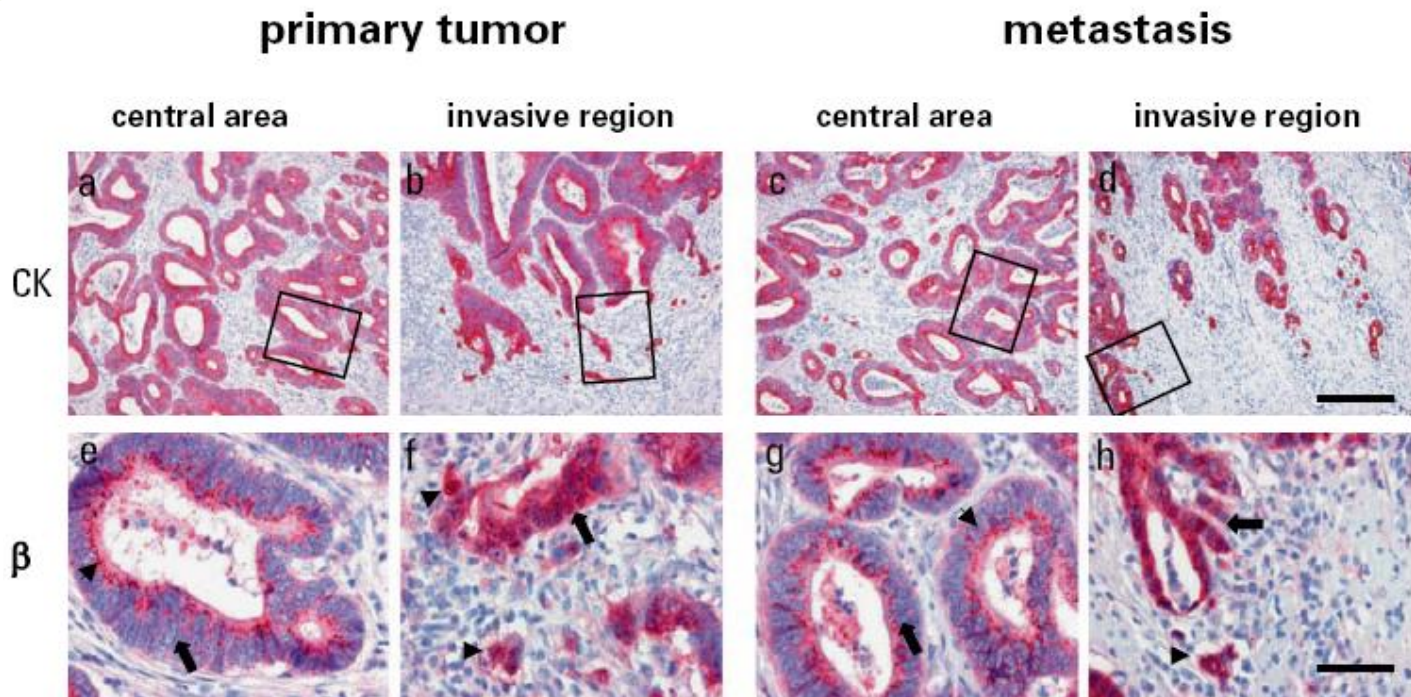
Wnt and E-cadherin pathways



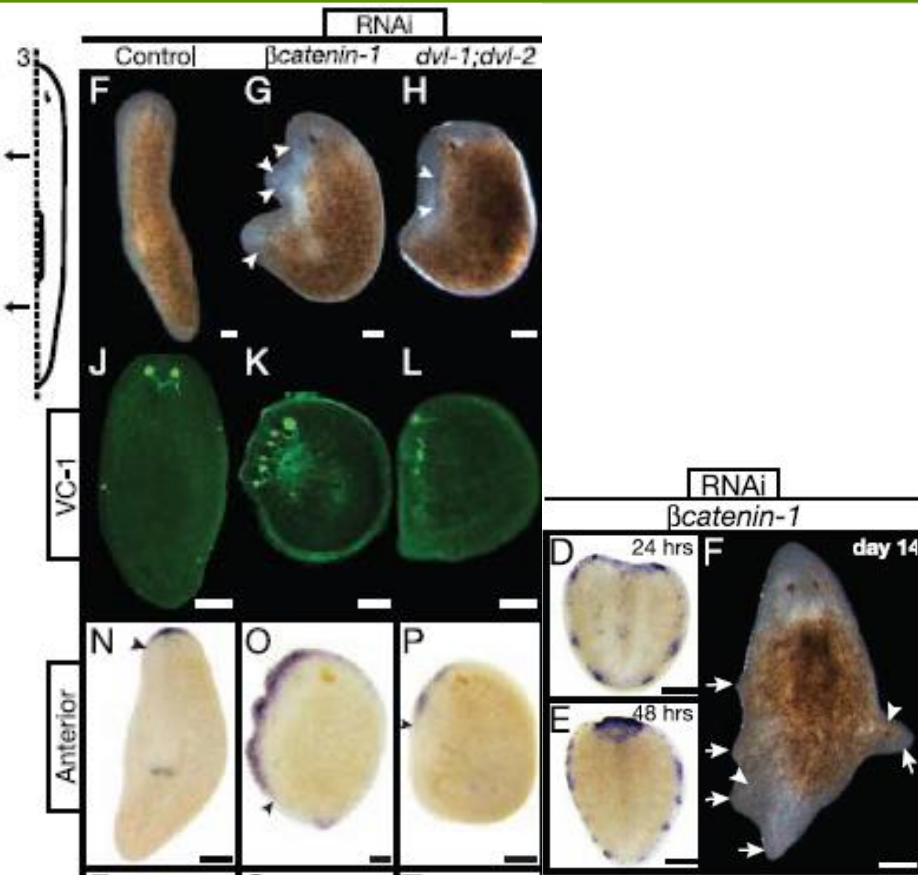
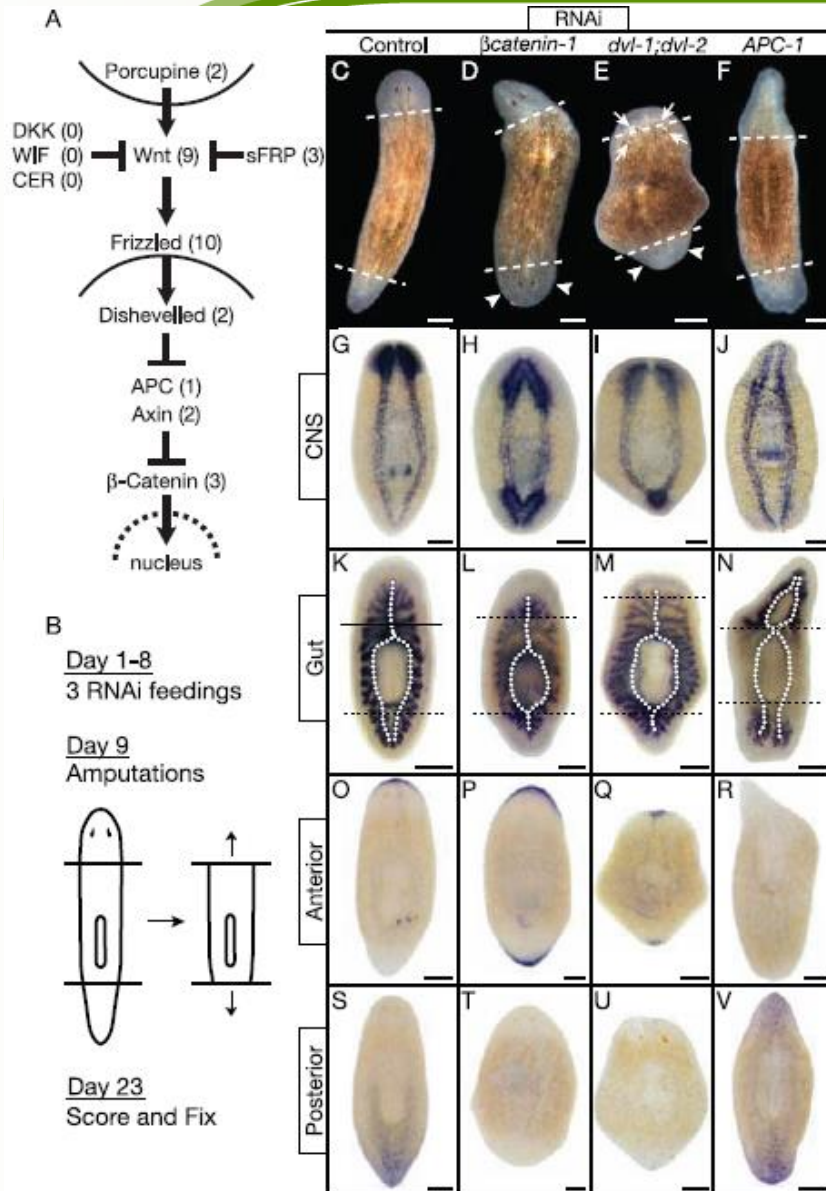
1. Jako součást Wnt signalizace

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*

SCIENCE VOL 319 18 JANUARY 2008

Typové otázky z této přednášky

- Načrtni a krátce popiš fungování signální dráhy Wnt/beta-catenin
- Jak se beta-katenin podílí na procesu epithelio-mesenchymální tranzice?
- Co víš o genu/proteinu APC?
- Jak funguje R-spondin?
- Jak je aktivována Wnt dráha v epitelu střeva?
- Co je to destrukční komplex beta-kateninu a z jakých proteinů se skládá?
- Co je to epitelo-mesenchymální tranzice (EMT)?