

Mechanismy diferenciace buněk a tkání za vývoje

Miloš Grim



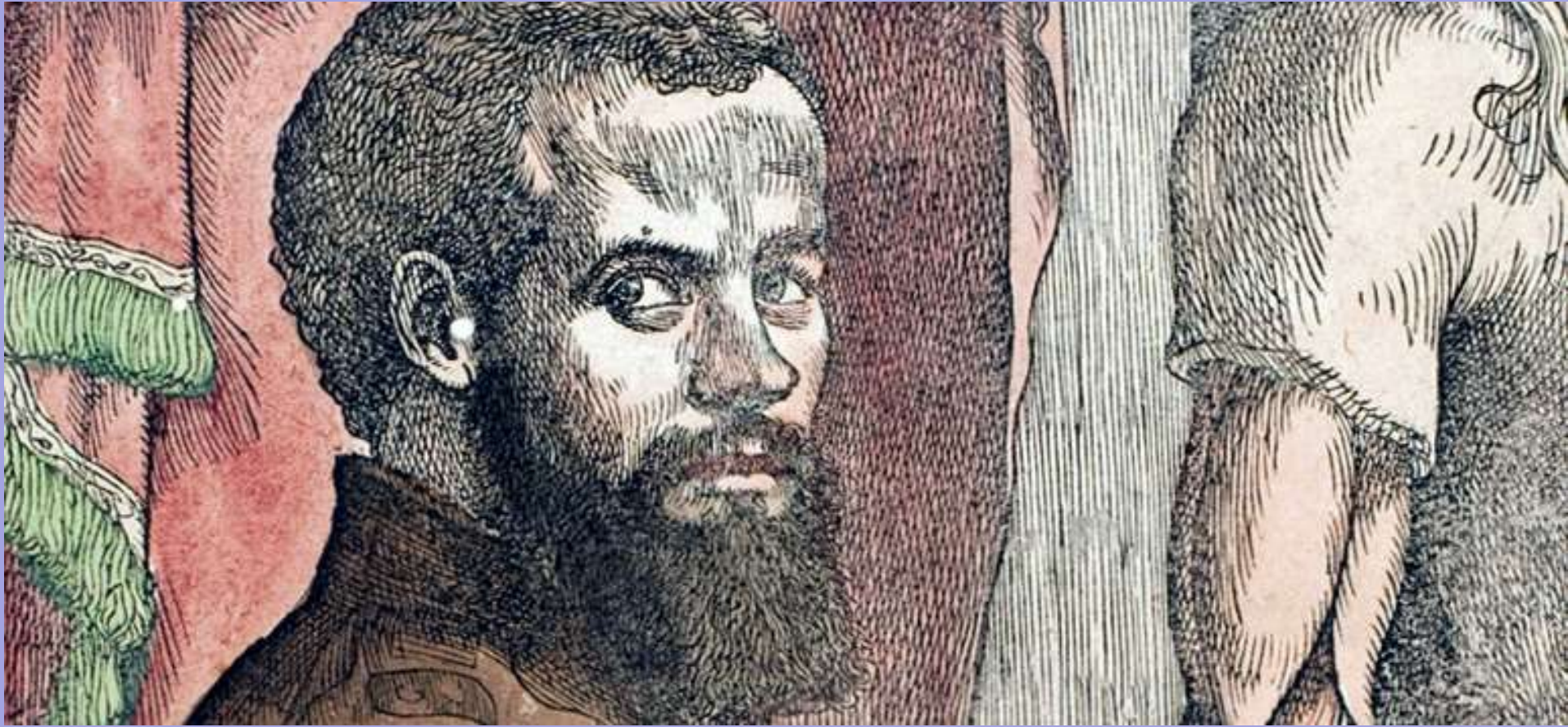
U3V říjen 2016

Anatomický ústav 1. lékařské fakulty
Univerzita Karlova v Praze

<http://anat.lf1.cuni.cz/internet.htm>

<http://www.lf1.cuni.cz/>

Andreas Vesalius (31.12. 1514, Brusel – 15. 10. 1564, Zakynthos)



Ve stejném roce jako Vesalius (1543), publikoval Mikuláš Koperník spis *De orbium revolutionibus coelestium* (O obězích nebeských sfér), který má pro vnímání světa podobný význam jako sedm Vesaliových knih pro poznání anatomie člověka.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, 1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

ČESKÁ ANATOMICKÁ SPOLEČNOST

ANATOMIE OD VESALIA PO SOUČASNOST

1514 – 2014

PUBLIKACE K 500. VÝROČÍ NAROZENÍ ANDREA VESALIA



EDITORI: MILOŠ GRIM, ONDŘEJ NAŇKA, KAREL ČERNÝ

GRADA

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, 1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA
ANATOMICKÝ ÚSTAV A
ÚSTAV DĚJIN LÉKAŘSTVÍ A CIZÍCH JAZYKŮ
SPOLU S ČESKOU ANATOMICKOU SPOLEČNOSTÍ
POD ZÁŠTITOU REKTORA UNIVERZITY KARLOVY
PROF. MUDR. TOMÁŠE ZIMY, DRSc., MBA.

POŘADAJÍ K 500. VÝROČÍ NAROZENÍ ANDREA VESALIA SYMPOSIUM

ANATOMIE OD VESALIA PO SOUČASNOST

1514 – 2014

VELKÁ POSLUCHÁRNA ANATOMICKÉHO ÚSTAVU,
U NEMOCNICE 3, PRAHA 2
V ÚTERÝ DNE 23. ZÁŘÍ 2014 V 10:00



GRADA



Vyobrazení pitvy na stěně studovny v bývalé jezuitské koleji v Jindřichově Hradci bylo objeveno před cca 10 lety. Je to monumentální freska, která je datovaná do počátku 18. stol. (1700 – 1720) ? Předpokládá se, že předlohou pro zobrazení pitvajícího muže v paruce byl Löw z Erlsfeldu (1648 – 1725) rektor university a děkan lékařské fakulty.



"Jak v anatomii makroskopické
tak již v mnohém ohledu
i v histologii
a mikroskopické anatomii...
**pouhé popsání
přestalo již býti vědou**
a všude do popředí
se tlačí otázka proč.
Za jediné správné východiště ...
tu možno bráti ...
histo- a organogenesi."
(1892)

Jan Janošík (1856 – 1927)

profesor histologie, embryologie a anatomie, přednosta histol.- embryol.
ústavu (1887- 94) a anatomického ústavu (1894 – 1926) České lék. fakulty

Struktura přednášky

**1. Historie - jak byl a jak je studován vývoj organismu
(deskriptivní embryologie, experimentální
embryologie, vývojová biologie)**

**2. Buněčné aktivity za vývoje
(proliferace, apoptosa, migrace, epithelo-
mesenchymová transformace buněk,
diferenciace, schopnost adherovat, růst,
interakce buněk)**

3. Signální molekuly

4. Transkripční faktory

Diferenciace příčně pruhovaného kosterního svalu

*Doporučená literatura: M. Grim: Buněčné a molekulární
mechanismy vývoje. V: R. Čihák: Anatomie 1, 3. vydání
str. 47 – 55, Grada, 2011*

Definice pojmů

Embryonální vývoj - proces, kterým z oplozeného vajíčka vzniká nový jedinec

Mechanismy embryonálního vývoje

- Proliferace, migrace a diferenciace buněk
- Vývoj tvaru - morfogeneze
- Růst

1. Historie poznávání vývoje organismu

a) **Deskriptivní embryologie** přinesla popis: oplození, rýhování, gastrulace, popsala **vznik zárodečných listů**: ektoderm, mesoderm, entoderm, a co z nich vzniká.

Byl poznán základní stavební plán organismu: chorda, neurální trubice, somity, somatopleura, splanchnopleura

b) Experimentální embryologie studovala kauzalitu (otázku proč?) autodiferenciace a podmíněná diferenciace, migrace buněk - značkování, chiméry, embryonální indukce, regenerace

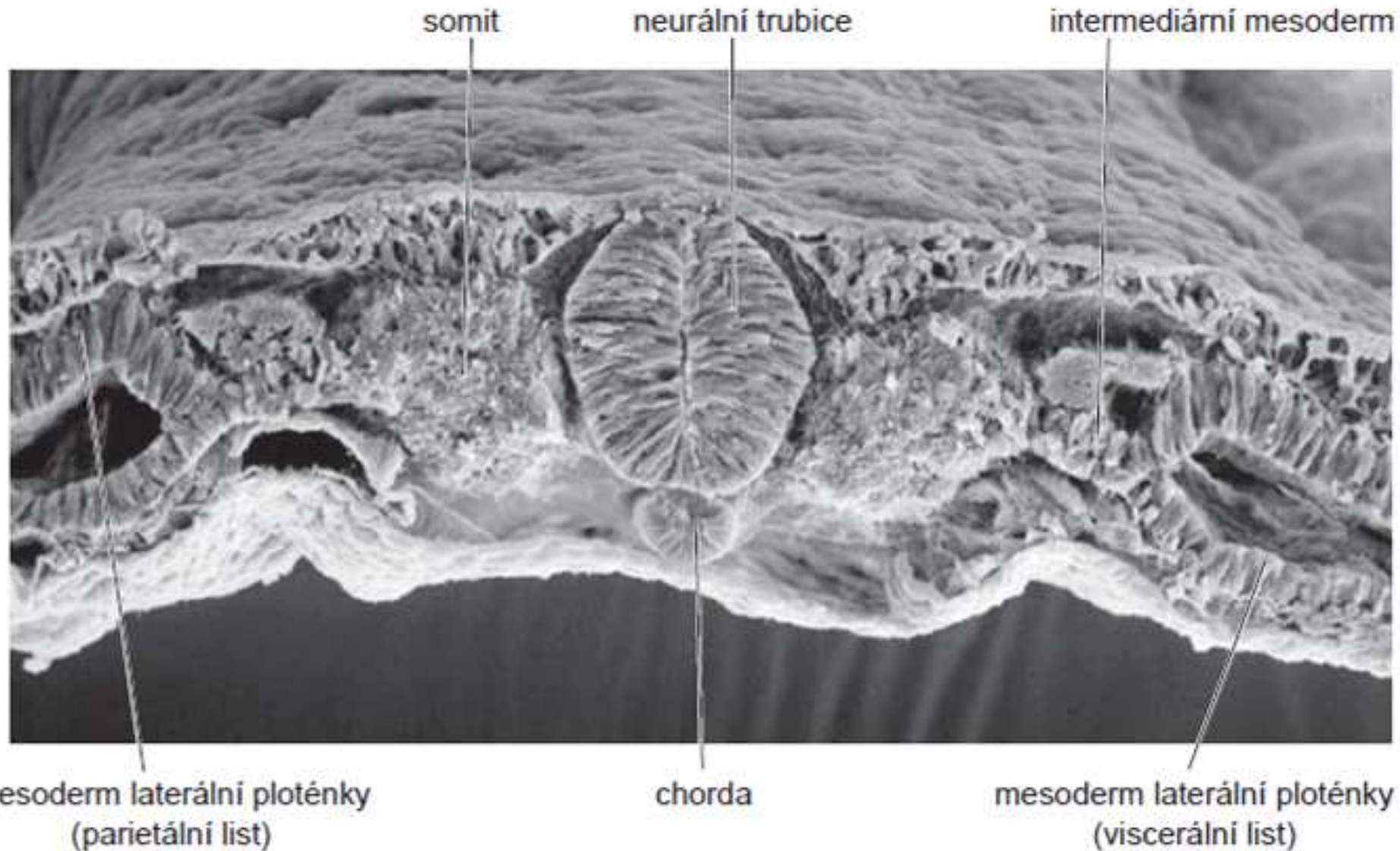
Teorie poziční informace: během gastrulace získávají buňky informace o své poloze a vyvíjejí se podle místa svého původu.
(L. Wolpert)

Metody - ultrastrukturální, biochemické, histochemické a imunohistochemické postupy

c) Vývojová biologie: molekulární biologie + genetika + morfologie; vývoj studován jako řízený děj na úrovni genů a proteinů.

Metody: in situ hybridizace mRNA, transgenní embrya, mutace, vyřazení a nadexprese genů, impakt v lékařství, v prevenci vrozených vad

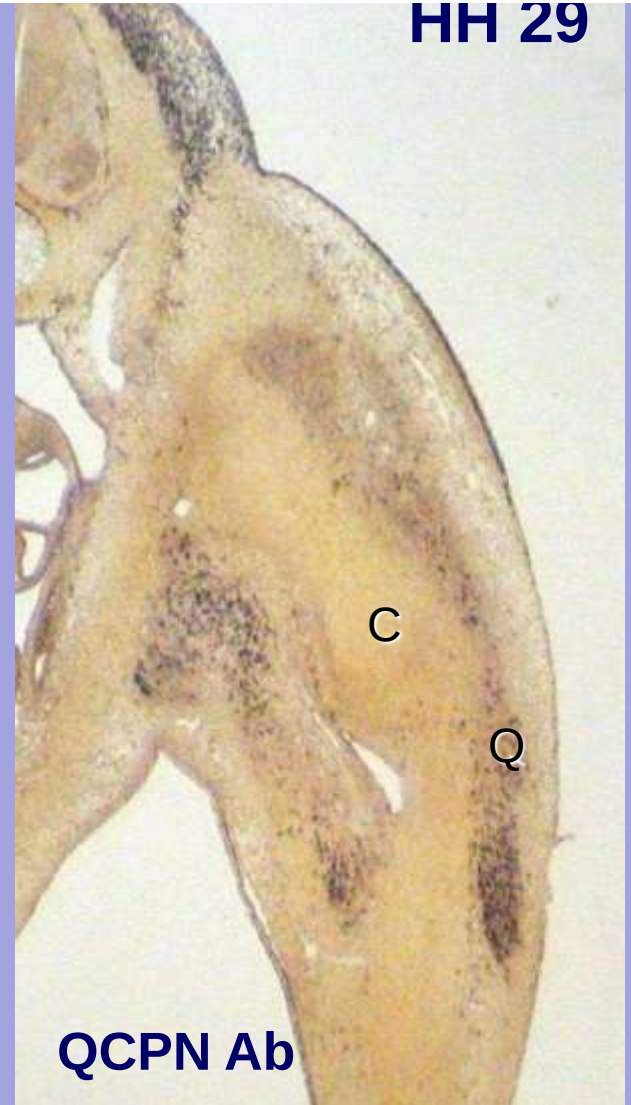
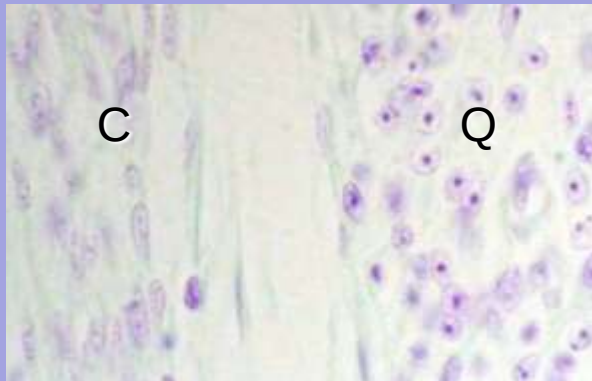
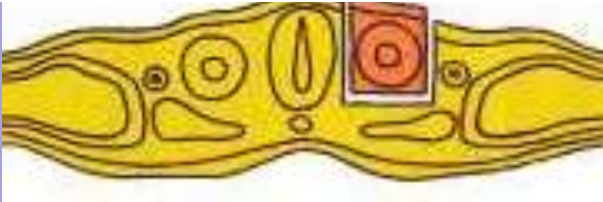
Základní stavební plán embrya obratlovců



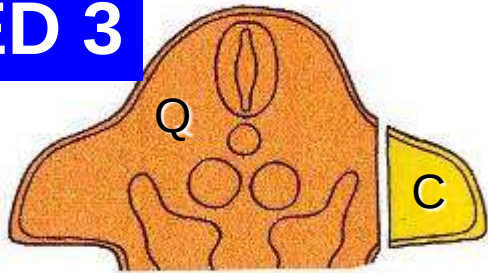
Příčný řez embryem (kuře 58 h inkubace, člověk konec 3. týdne)

Experimentální embryologie

Embryonální chiméra japonské křepelky (Q) a bílé leghornky (C)
transplantace somitu, myogenní buňky v končetině



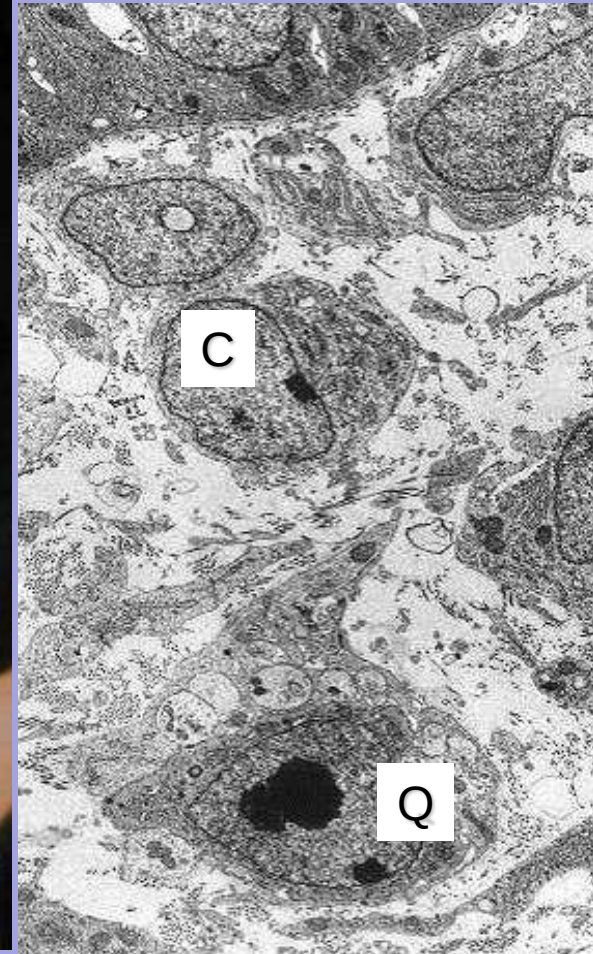
ED 3



Embryonální chiméra japonské křepelky (Q) a bílé leghornky (C) – transplantace základu končetiny



ED 17



Technika *in situ* hybridizace (ISH)

mRNA MyoD HH 25



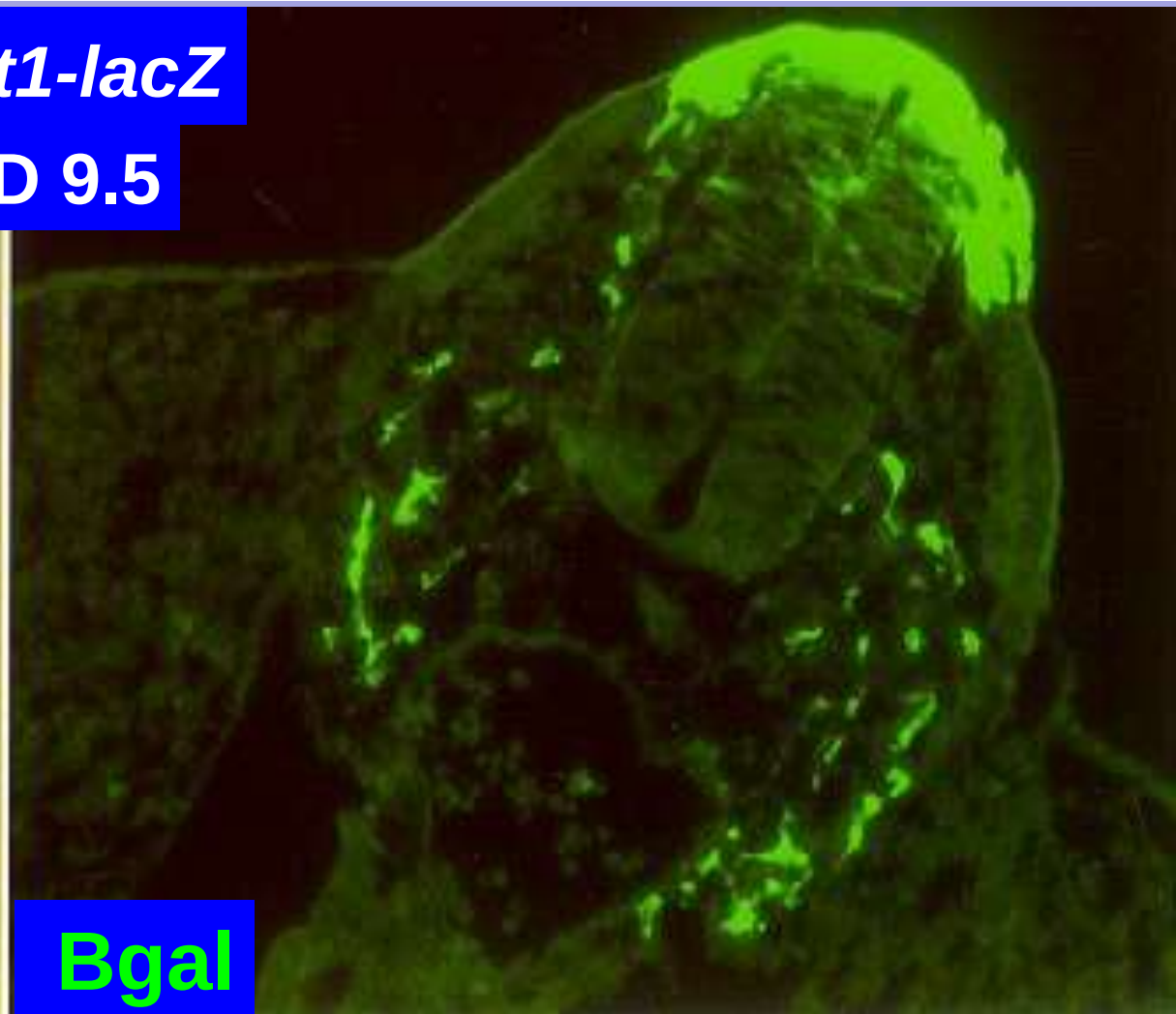
umožňuje prokázat přítomnost určité genové sekvence v genomu. Je založena na vzájemné afinitě komplementárních sekvencí nukleových kyselin. Uměle připravené jednovláknové sondy hybridizují s příslušným úsekem nukleové kyseliny. K jejich přípravě se používá nukleotidů značených digoxigeninem, který lze v dalším průběhu reakce vizualizovat pomocí protilátky. S komplementárně připravenou RNA (antisens-sondou) tvoří mRNA stabilní hybrid a tak umožňuje prokázat mRNA vytvořenou v průběhu transkripce exprimovaného genu.

Využití reportérového genu *lacZ* ke studiu buněk neurální lišty



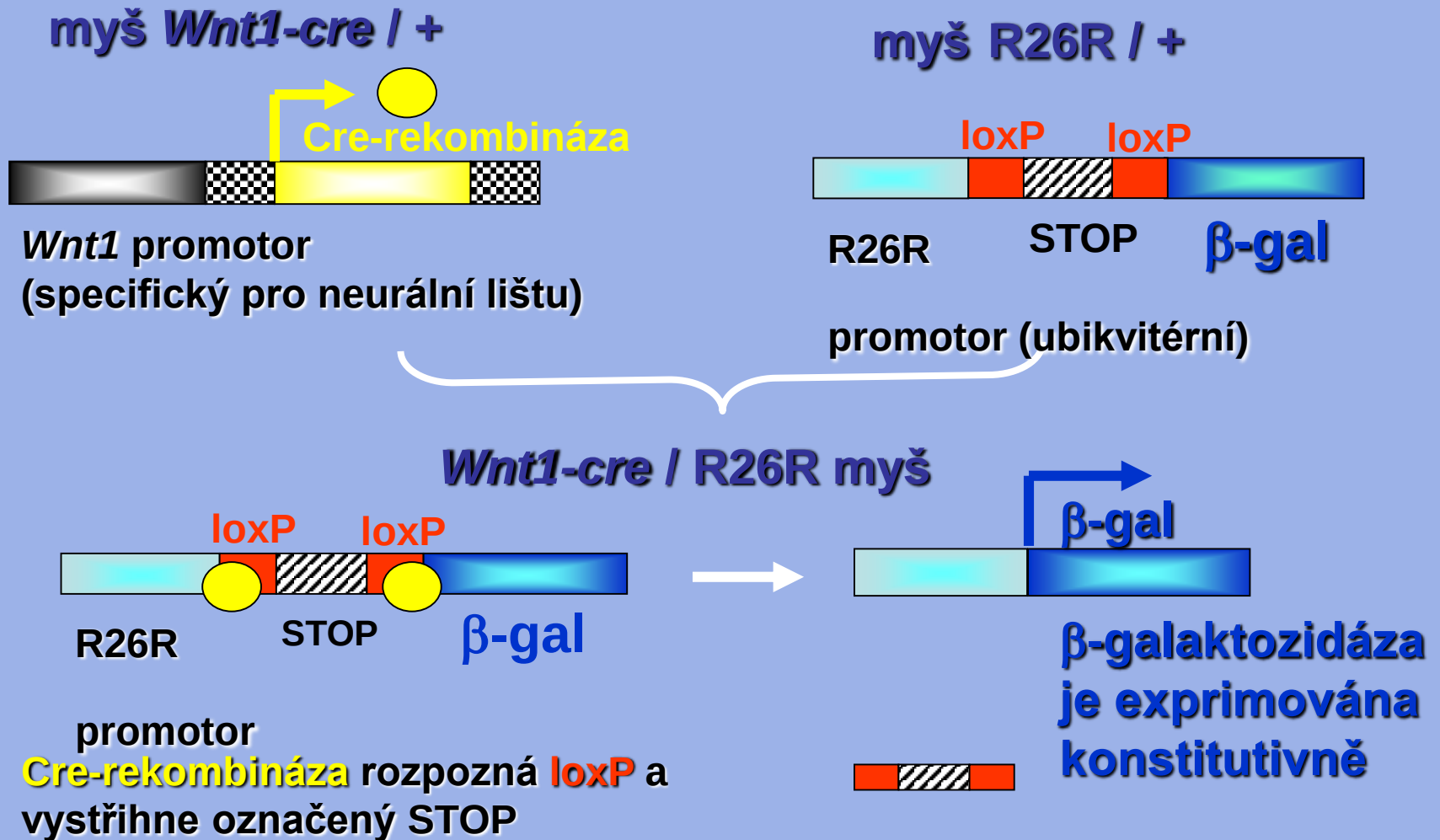
Wnt1-lacZ

ED 9.5



Bgal

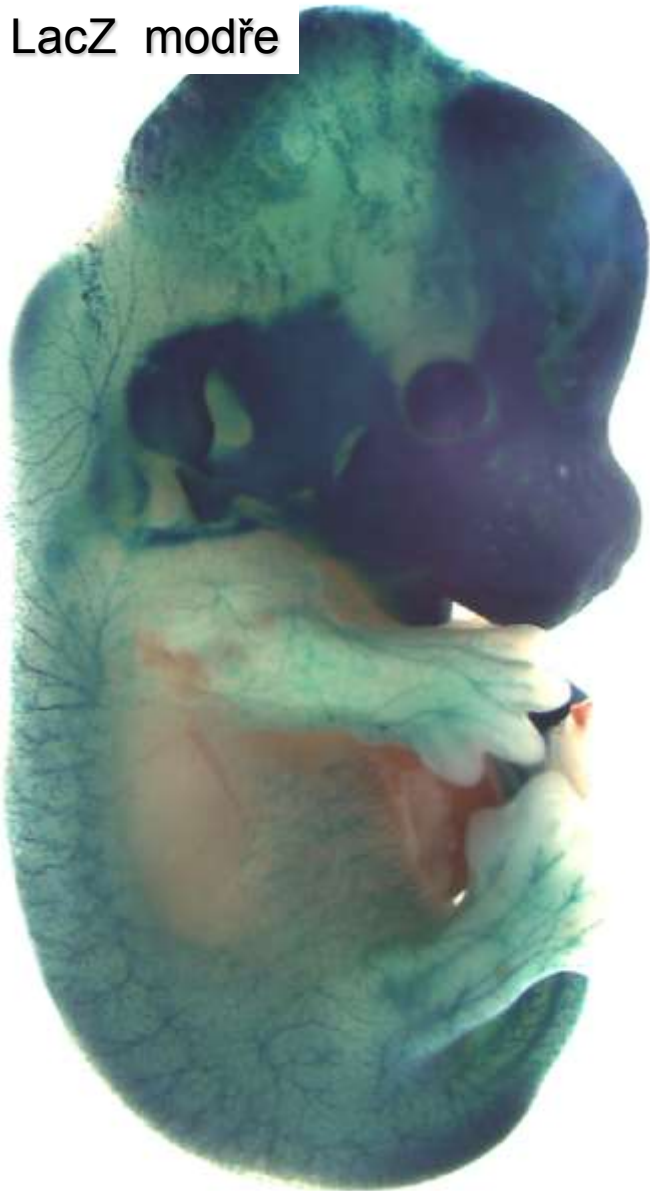
Cre-lox systém: trvalá exprese reportérového genu v buňkách neurální lišty (NL)



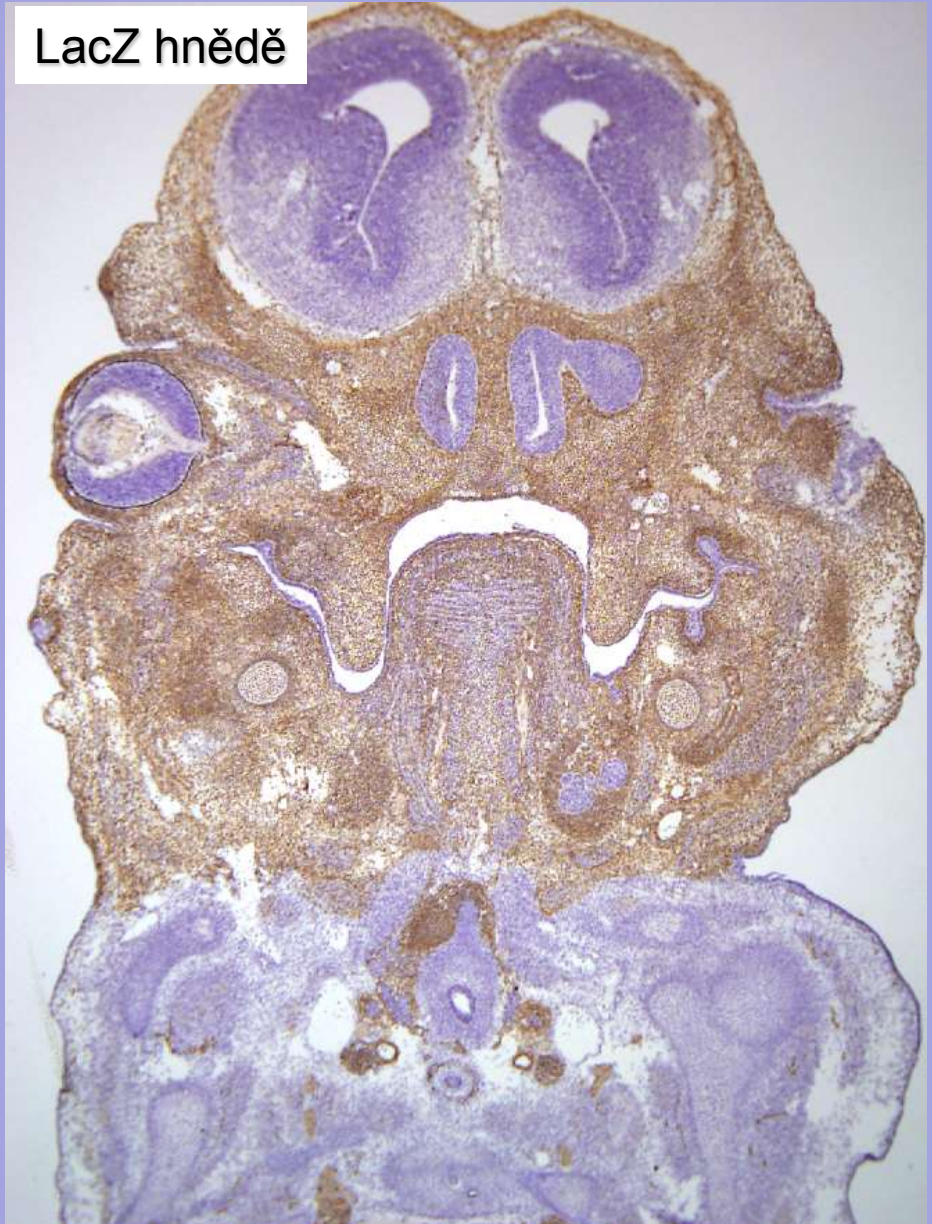
Průkaz buněk NL pomocí reportérového genu *lacZ*

Wnt1-cre/R26R ED 14

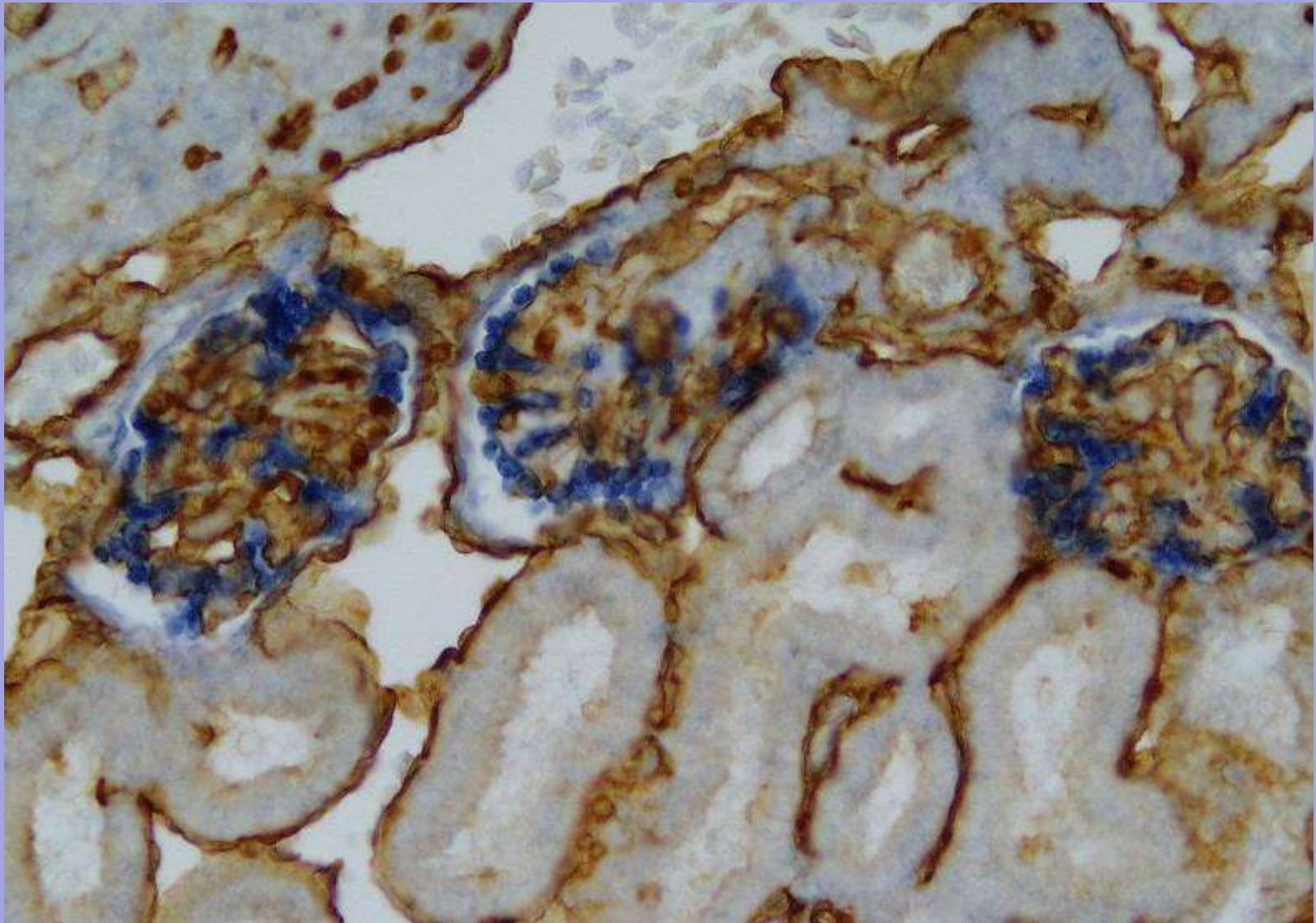
LacZ modře



LacZ hnědě



***In situ* hybridizace (ISH) mRNA VEGF v řezech (modře) v kombinaci s imunohistochemickým průkazem endotelu krevních cév (hnědě)**

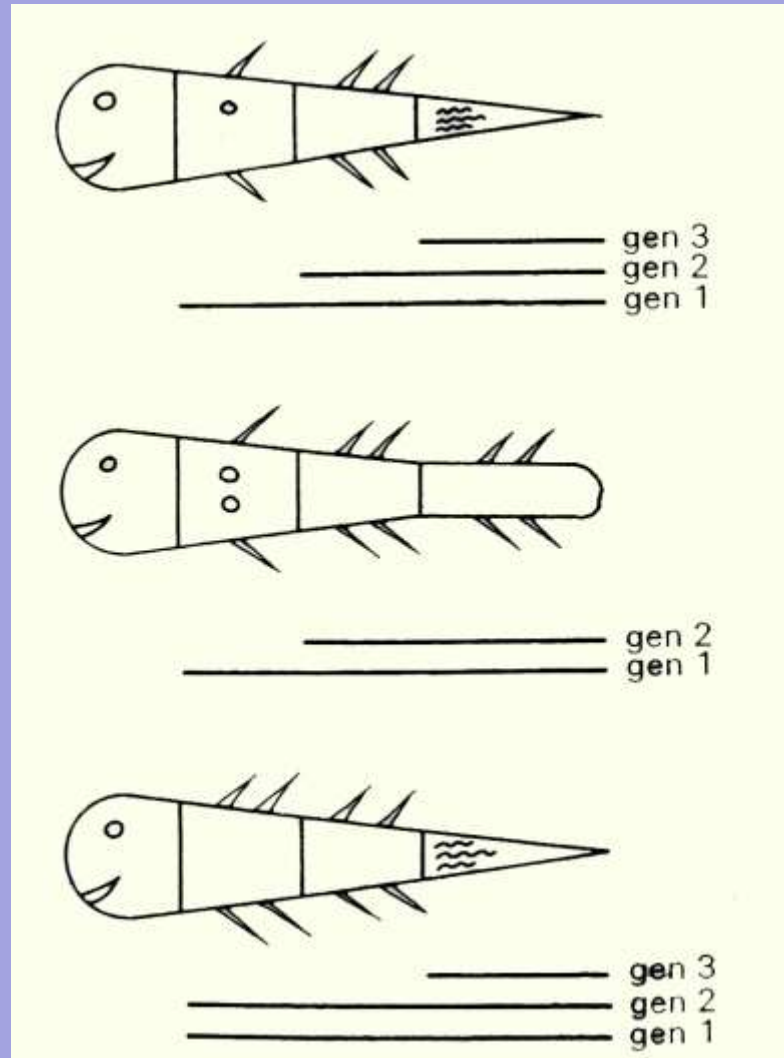


Vývojová biologie

(molekulární biologie + genetika + morfologie) studuje vývoj na úrovni genů a proteinů. Toto studium přineslo:

- poznání, jak signály z buněčných interakcí ovlivňují genovou expresi**
- poznání transkripčních faktorů jako regulátorů genové exprese**
- poznávání molekulárních mechanismů diferenciace a morfogeneze na molekulární úrovni**

Homeosis = přeměna jedné části segmentálně uspořádaného úseku těla ve druhou při narušené expresi Hox genů



Exprese homeotických genů (HOX génů)

v kraniokaudální ose embrya řídí expresi podřízených genů a ty určují chování buněčných populací embrya. Hox gény určují okrsky, ve kterých se tvoří určité tkáně a orgány, určují **lokální identitu buněk**.

V konečném důsledku **řídí HOX gény realizaci stavebního plánu** tvořícího se organismu.

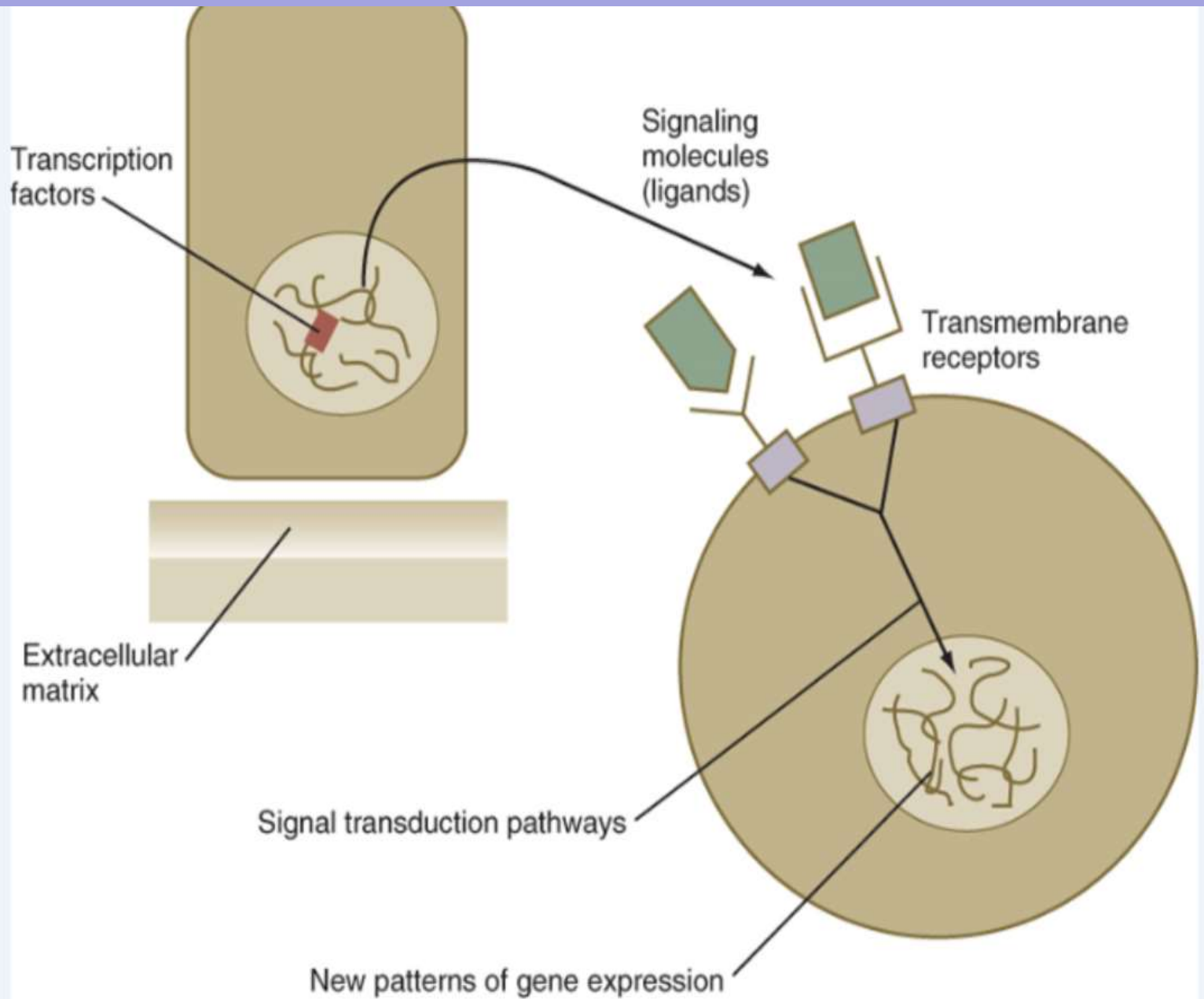
Vývoj mnohobuněčného organismu

je podmíněn schopností jeho buněk využít genetickou informaci různým způsobem a vytvořit cca 200 typů specializovaných buněk.

Genom však neobsahuje návod k prostorovému uspořádání různě diferencovaných buněk. K realizaci tohoto úkolu je nutný dialog mezi buňkami (interakce buněk) = epigenetické faktory vývoje.

Interakce buněk jsou zdrojem signálů zprostředkovaných molekulami na jejich povrchu a v mezibuněčném materiálu = signální molekuly a jejich receptory.

Buňky reagují na signály změnou genové exprese (nejprve tvorbou transkripčních faktorů), které řídí diferenciaci buněk a jejich uspořádání do určitého tvaru = morfogenese.



Signální molekuly

Signální molekuly **působí mezi buňkami**. Jsou identifikovány odpovídající **receptory**, které přenášejí signál do jádra a to odpovídá změnou **genové exprese**.

Mezi signální molekuly se řadí **cytokiny, růstové faktory, hormony a neurotransmitery**.

Transkripční faktory

jsou proteiny, které mají schopnost vázat se na specifické sekvence DNA. **Působí v jádře** jako regulátory genové exprese dalších genů.

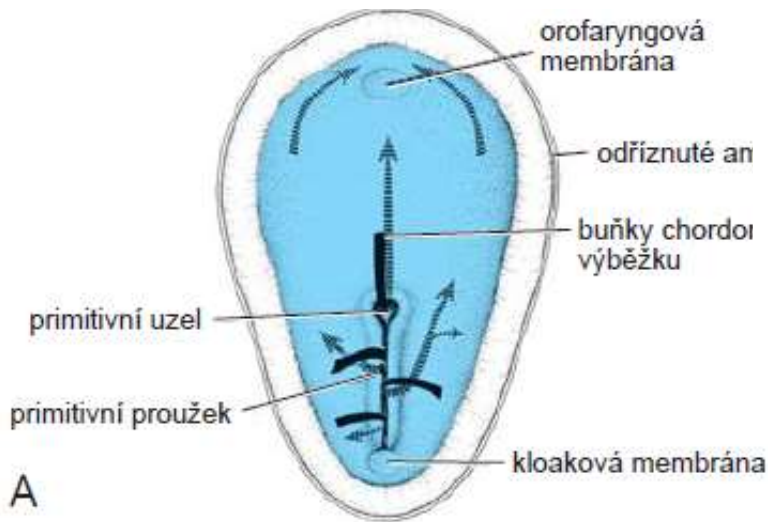
Proces vzniku entodermu a mesodermu se nazývá gastrulace. Vznikají nové prostorové vztahy buněčných populací, které jsou podmínkou pro induktivní interakce buněk nutné pro vznik komplexních struktur embrya

It is not birth, marriage,
or death,
but gastrulation,
which is truly
the most important time
in your life.

Lewis Wolpert (1986)
(born 1929, emeritus professor
of biology at University College
London, retired in 2013)

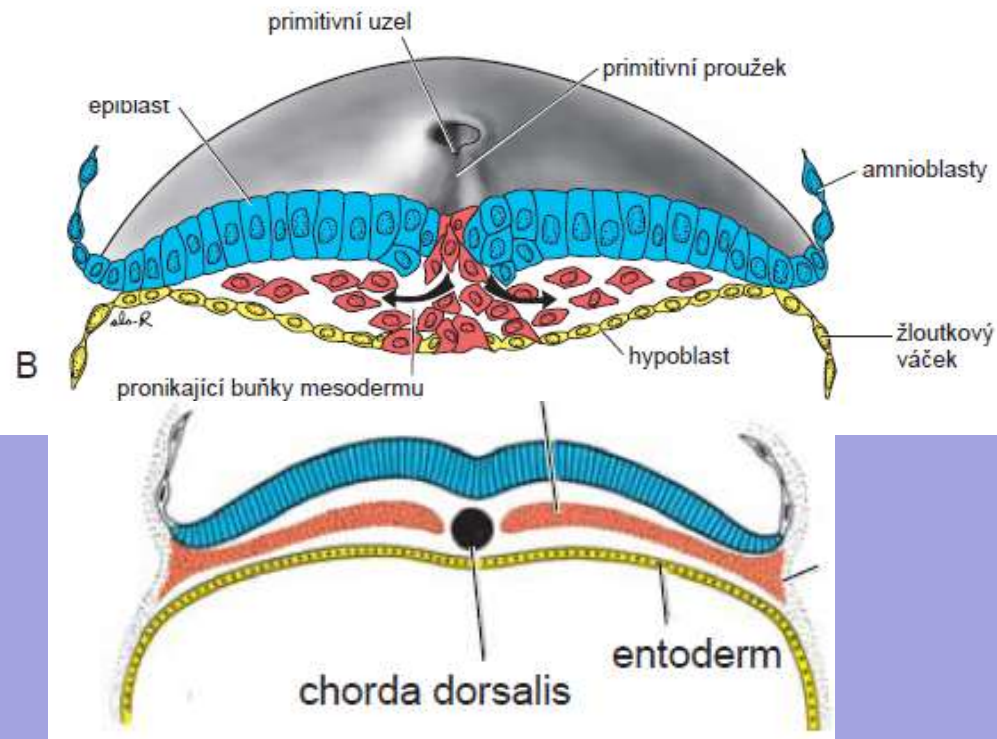


Vznik třívrstevného zárodku (ektoderm, mesoderm, entoderm)



A. Zárodečný terčik 16ti denního embrya. V epiblastu je patrný primitivní proužek a primitivní uzel. Šipky- pohyb buněk epiblastu a jejich následná migrace mezi epiblast a hypoblast.

B. Příčný řez primitivním proužkem 15. den vývoje ukazuje jak buňky epiblastu (modře) migrují (červeně) do hypoblastu (žlutě) a tvoří definitivní entoderm. Další buňky epiblastu tvoří mesoderm.

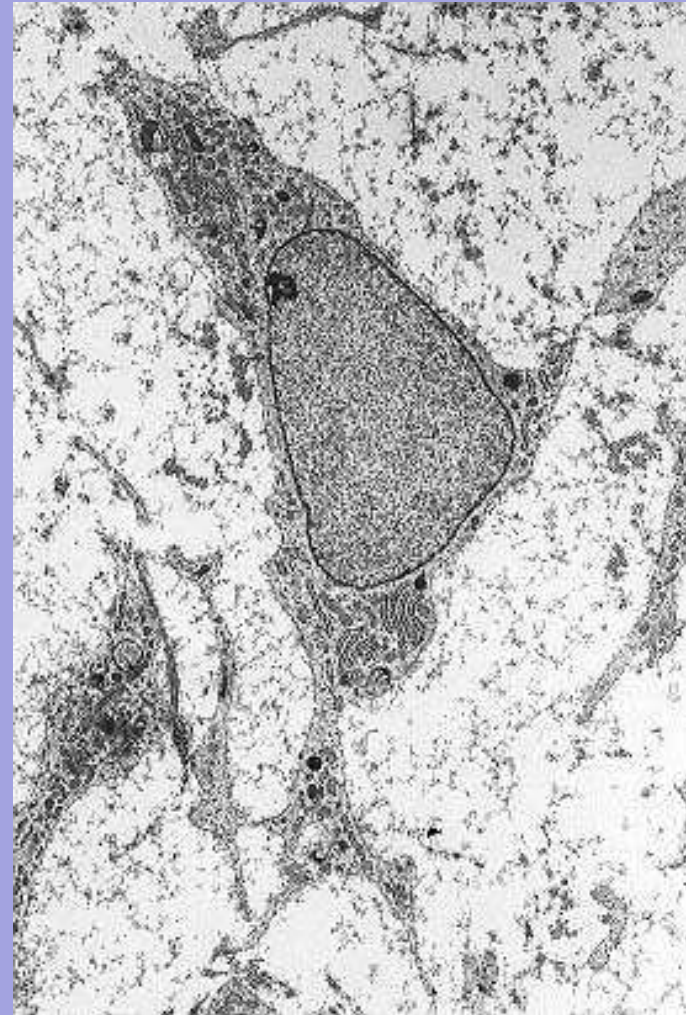


Nositelem stavebního plánu orgánu jsou buňky mesenchymu. Během gastrulace (viz další dia) získaly svoji lokální identitu a ta určuje jejich vývoj.

Mesenchym je vazivová embryonální tkáň. Během vývoje tvoří stroma orgánů a vznikají z ní další pojivové tkáně (a také hladká svalovina).

Mesenchym obsahuje málo diferencované buňky. Uvolnily se z epithelově uspořádaného mesodermu procesem nazvaným **epithelo-mesenchymová transformace**.

V hlavové oblasti pocházejí mesenchymové buňky z neurální lišty a jsou proto nazývány **ektomesenchym**.



Frontální řez embryem kuřete 5. den inkubace: mesenchym ve stěně trupu a v končetinovém pupenu, apikální ektodermový hřeben, neurální trubice, chorda, dermomyotom, dorsální aorty, ductus mesonephricus, entoderm trávicí trubice,

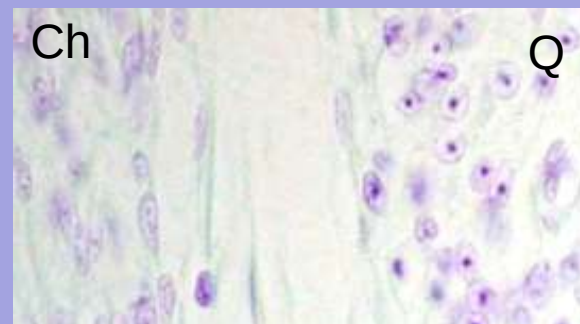
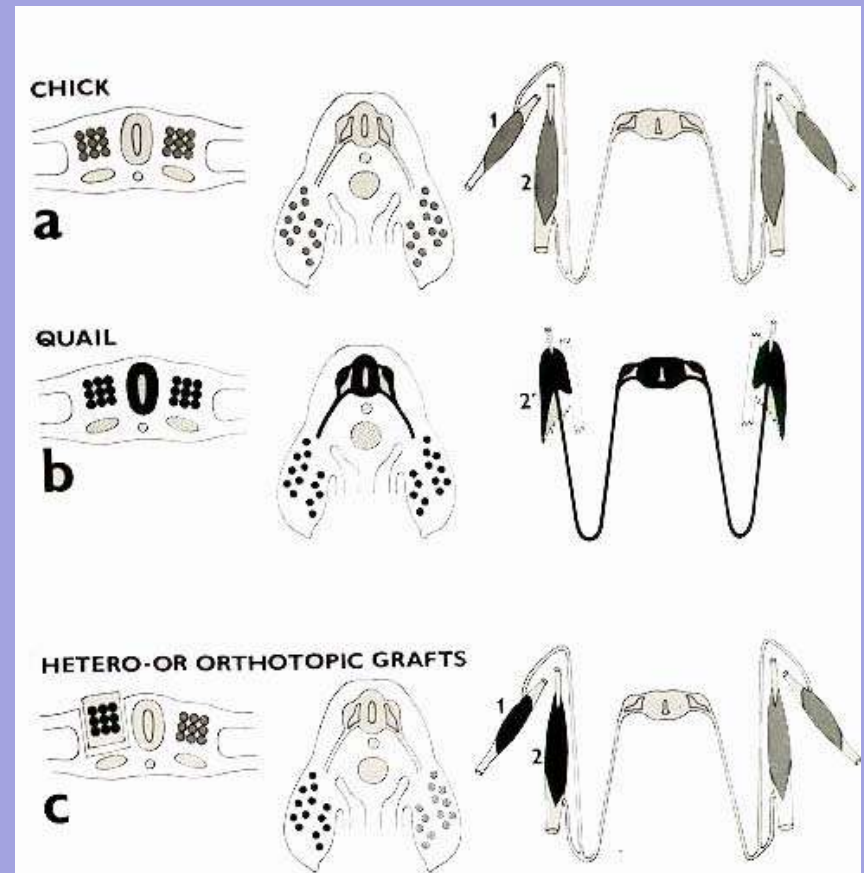


Vývojový osud jednotlivých částí zárodku je určen expresí homeotických genů. V tomto rámci se tvoří **základy orgánů**. Jejich vývoj je řízen signály, které vycházejí z interakce mesenchymových buněk a prekursorových buněk funkční tkáně orgánu.

Z buněk mesenchymu se diferencuje vazivové stroma orgánu (interstitium) a prekursorové buňky vytvoří parenchym orgánu.

Nositelem stavebního plánu orgánu jsou buňky mesenchymu.

Např. končetinový sval, který se vyznačuje určitým tvarem a polohou se v experimentálních podmínkách vytvoří normálně, i když do jeho základu tvořeného mesenchymem vcestovaly svalové buňky jiného původu.



Grim M: In: Developmental patterning of the vertebrate limb. Plenum Press, New York, 1991 pp 293 - 297

TBX5 gen je gen, který řídí vývoj horní končetiny a podmiňuje její identitu

Mutace TBX5 genu vede ke vzniku Holtové-Oramova syndromu (HOS,1960)

Projevuje se vývojovými defekty horní končetiny (amelie, fokomelie, dysplasie radia) a také vývojovými vadami srdce (defekty septa předsíní a komor, transpozice aorty a truncus pulmonalis)

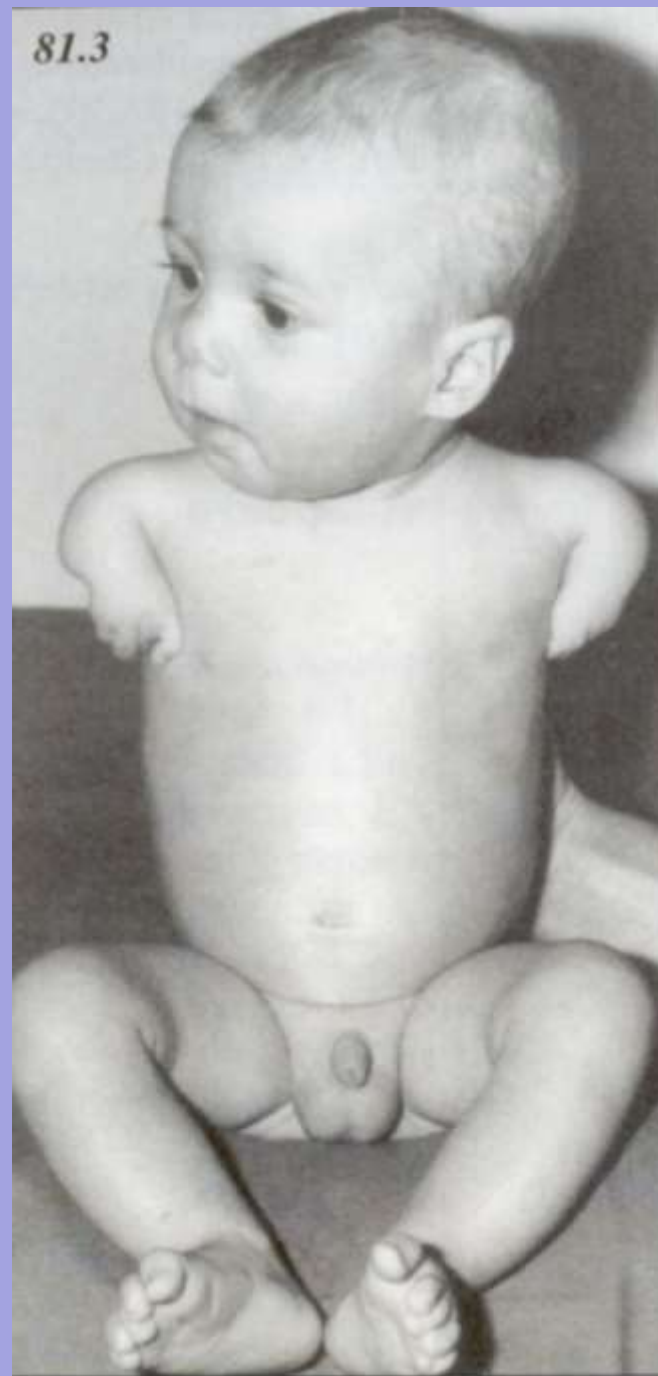


Fig. 2. Gross morphology of normal and *Pitx1*-infected limbs. (A) Normal wing, stage 36. (B) *Pitx1*-infected wing, stage 35. In the *Pitx1*-infected wing, the normal flexure of the wing has changed, no patagium has formed, and the ectoderm is smooth, with no evidence of formation of nascent featherbuds. The blue arrows indicate the areas of interdigital cell death at the distal extreme of the limb, as normally occurs in the leg. (C) Normal leg, stage 36. Red arrows are discussed in the text.



(D) An example of a different embryo (stage 35) in which *Pitx1* has been misexpressed in the right wing. The overall morphology of the infected wing has been altered, and in addition, the digits have rotated 90° relative to their normal position (compare with the uninfected, left wing) and are now aligned similarly to the digits of the leg.

Logan, Tabin 1999

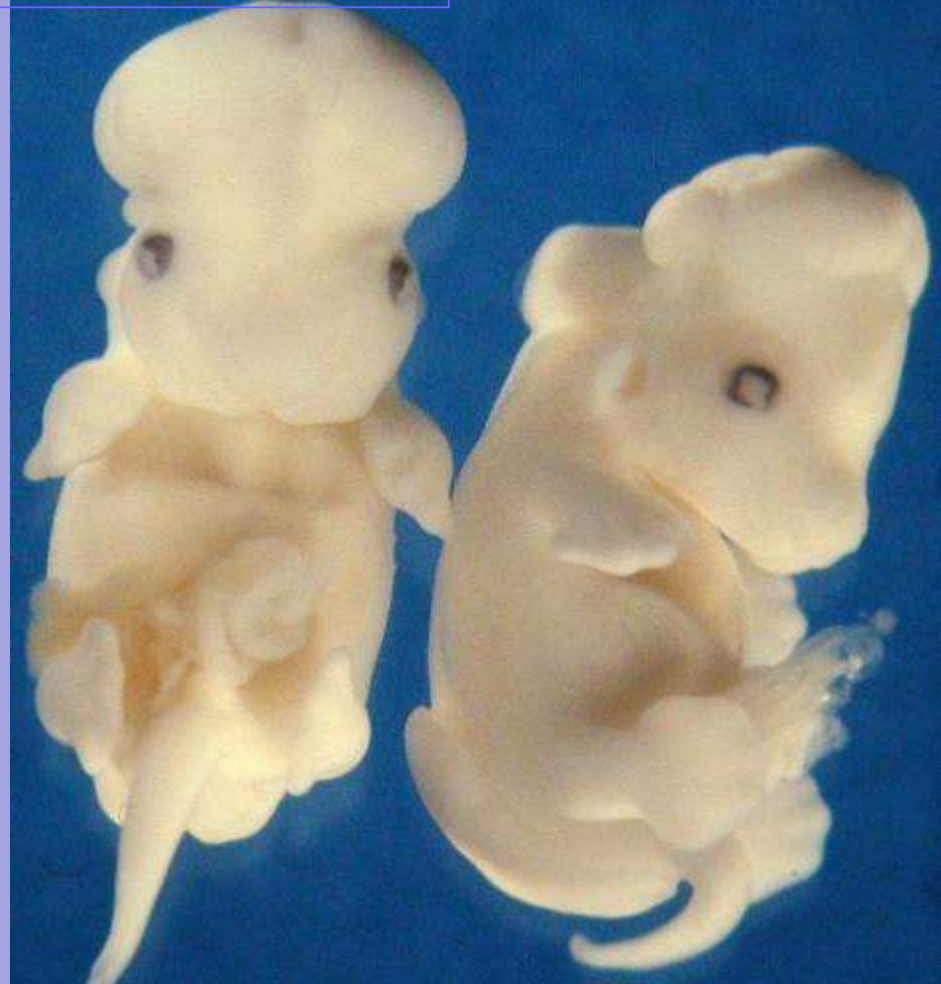
Ptx1 - gen identity dolní končetiny byl vnesen do základu křídla. Jeho vývoj je narušen a vykazuje znaky dolní končetiny

***Pax3* mutace u myši (splotch mutation)**



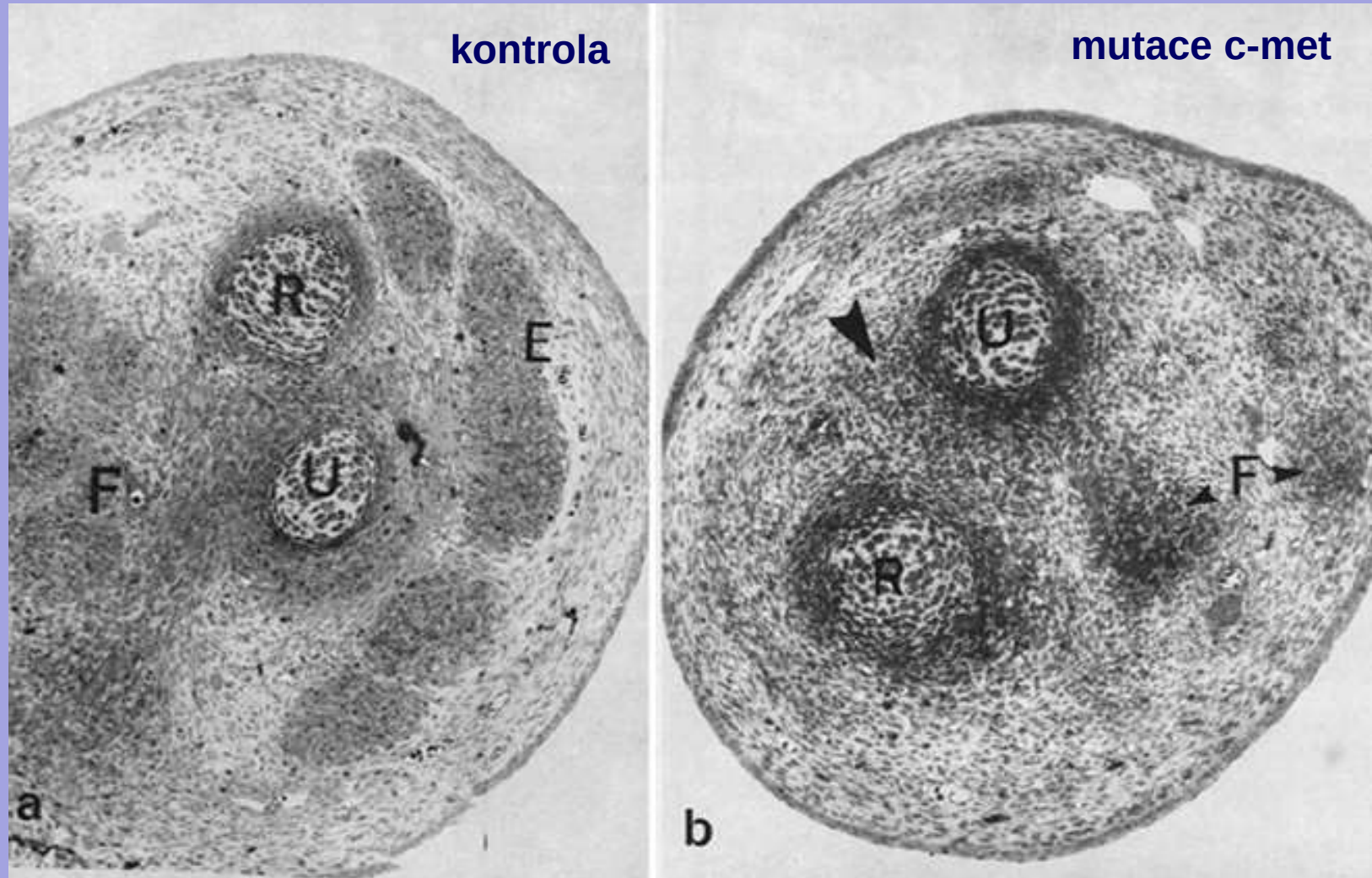
***Sp*^{1H/} *Sp*^{1H}**

ED 13.5



***Pax3* mutace u člověka: Waardenburgův syndrom (defekty pigmentace, defekty svalů končetin, kardiovaskulární defekty, hypertelorismus, rozštěp patra)**

Signální molekula scatter factor (HGF) se tvoří v mesenchymu základu končetiny. Svalové buňky mají c-met receptor pro tuto molekulu a migrují do oblasti její větší koncentrace v základu končetiny. Je-li však gen pro c-met receptor mutován, signalizace vážne a vyvíjí se končetina bez svaloviny.



T. Franz, R. Kothary, M.A.H. Surani, Z. Halata, M. Grim: The Splotch mutation interferes with muscle development in the limbs. *Anat Embryol* (1993) 187:153-160

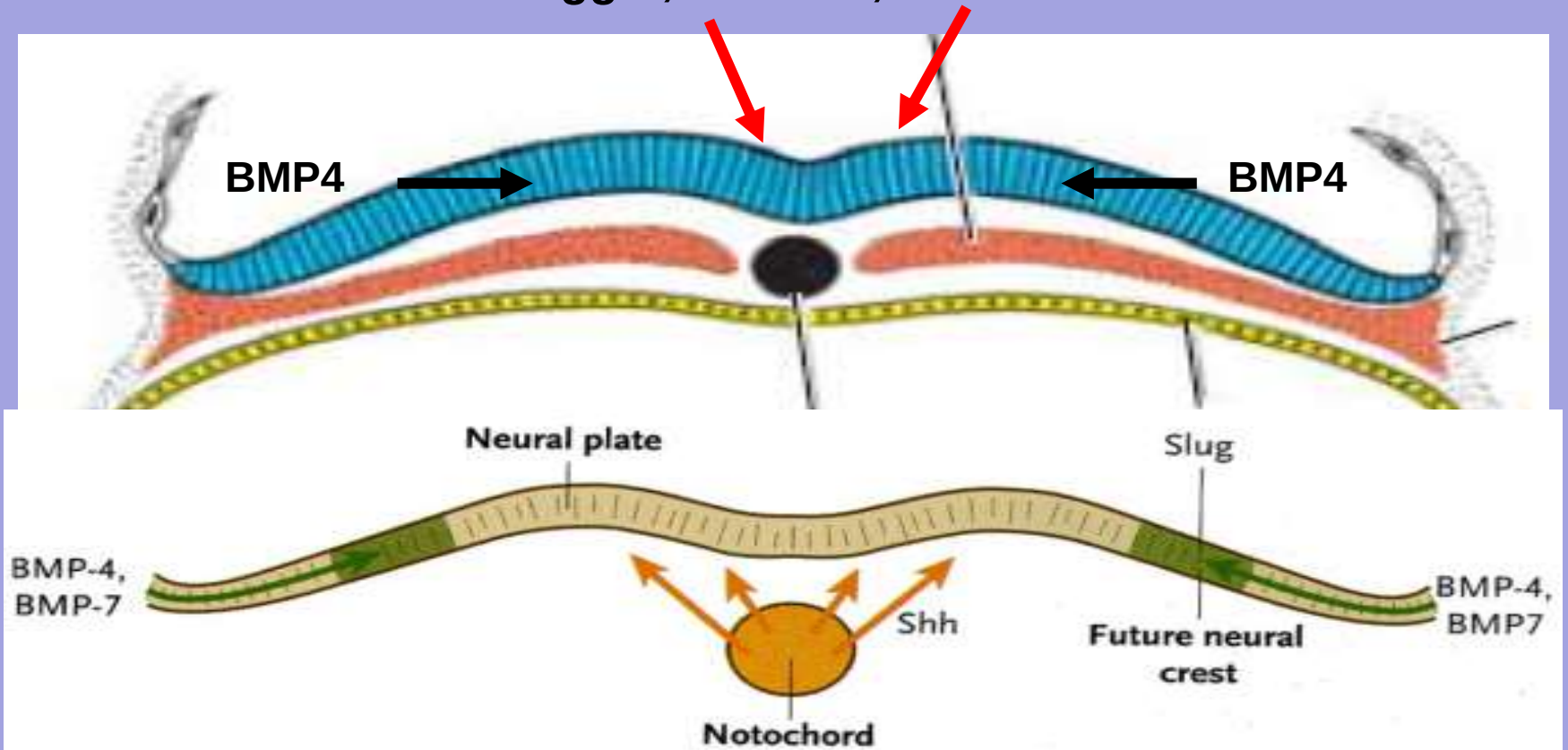


Piebaldism - defektní migrace buněk: poruchy pigmentace, sterilita, anemie. Vyvoláno mutací *KIT* genu u člověka právě tak jako mutací *Kit* genu u myši

Signální molekuly za neurulace

Indukce neurální ploténky je navozena **inaktivací signální molekuly BMP4** tvořené v ektodermu. BMP4 je inaktivován signálními molekulami **Noggin, Chordin a Follistatin**, které produkují buňky primitivního uzlu, chordy dorsalis a prechordového mesodermu.

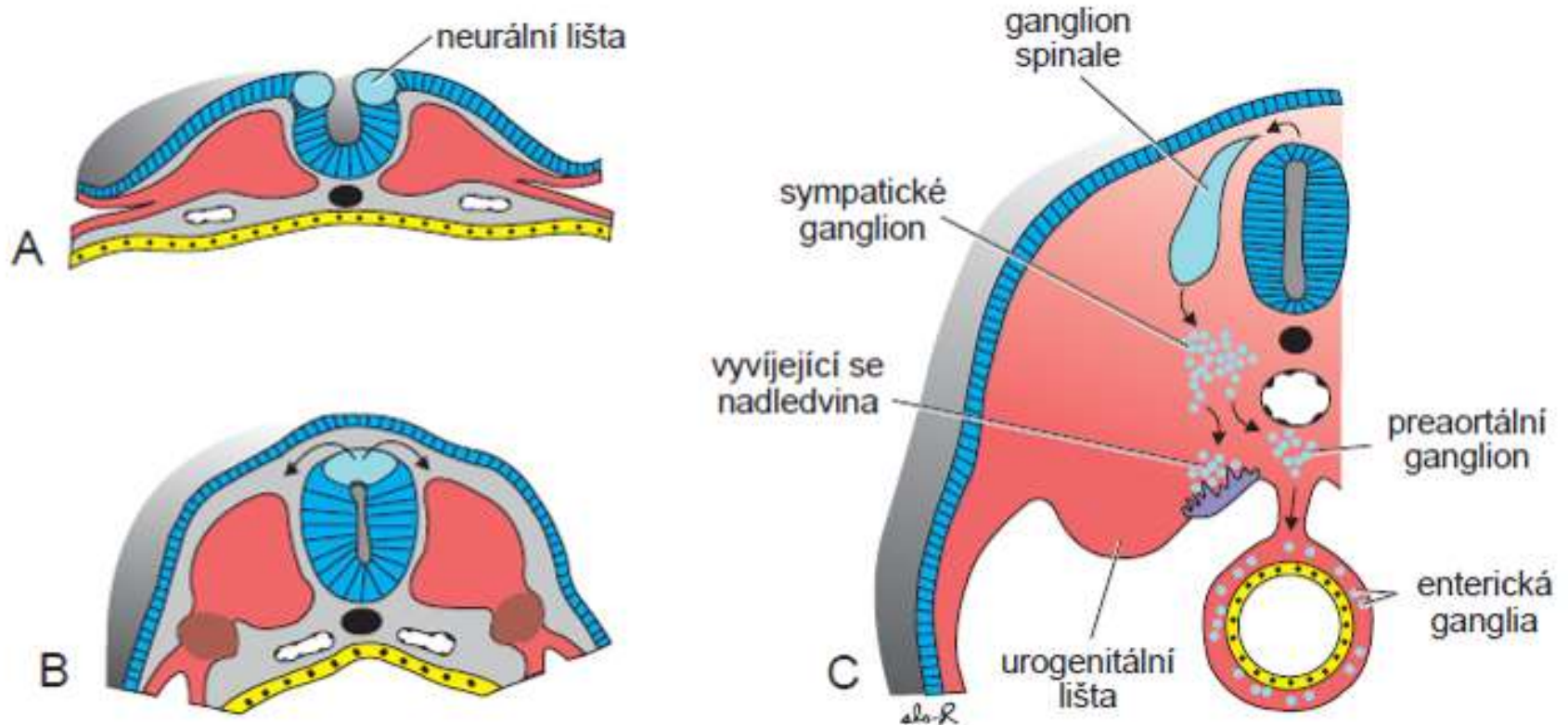
Noggin, Chordin, Follistatin



SHH (sonic hedgehog) indukuje tvorbu spodinové ploténky v neurální trubici

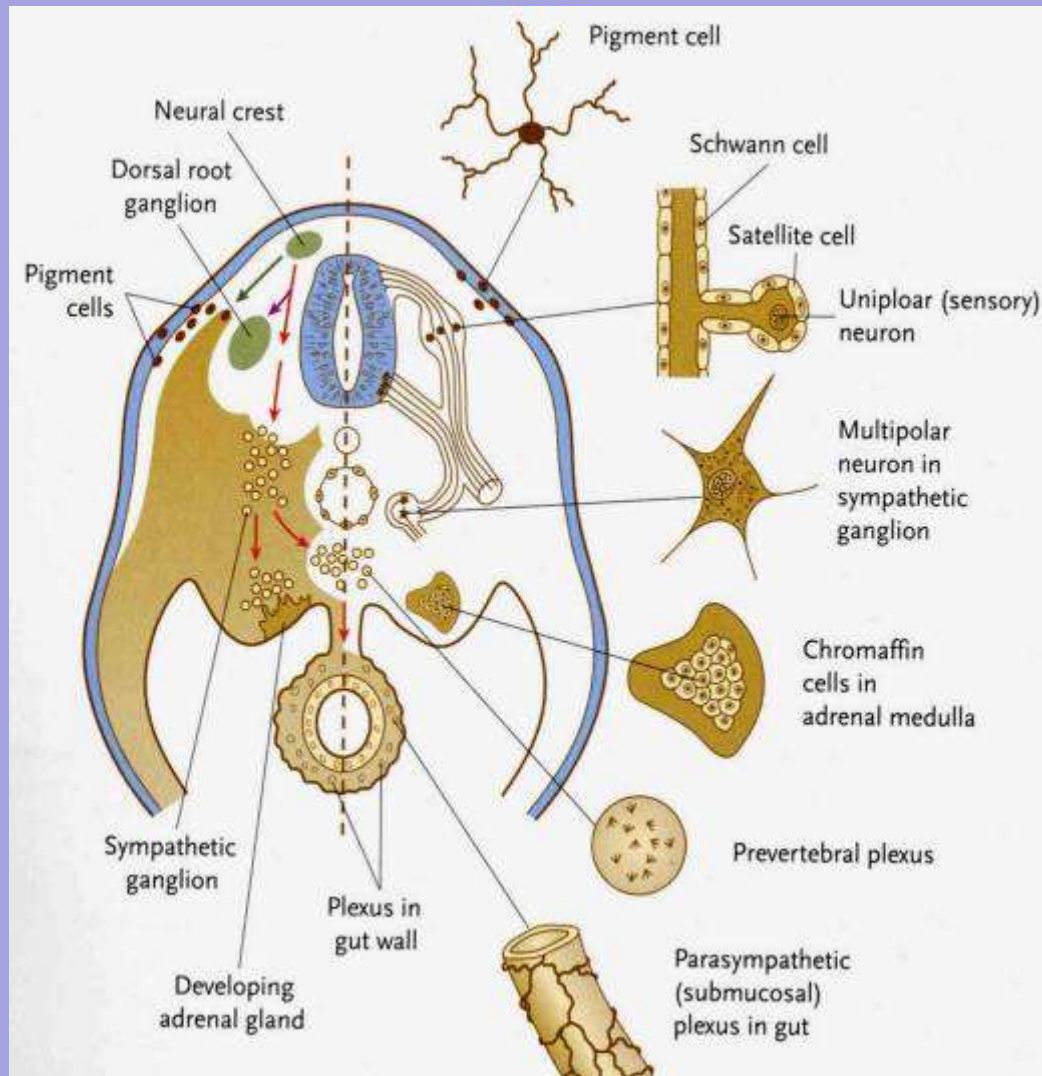
Vývoj ektodermu

b) tvorba neurální trubice a neurální lišty: neurulace



A, B. Buňky neurální lišty (světle modře) na vrcholech neurálních valů.
C. Migrující buňky neurální lišty vytvářejí spinální ganglia, řetězce sympatických ganglií, dřeň nadledviny a další tkáně.

Deriváty neurální lišty (na hlavě také ektomesenchym)

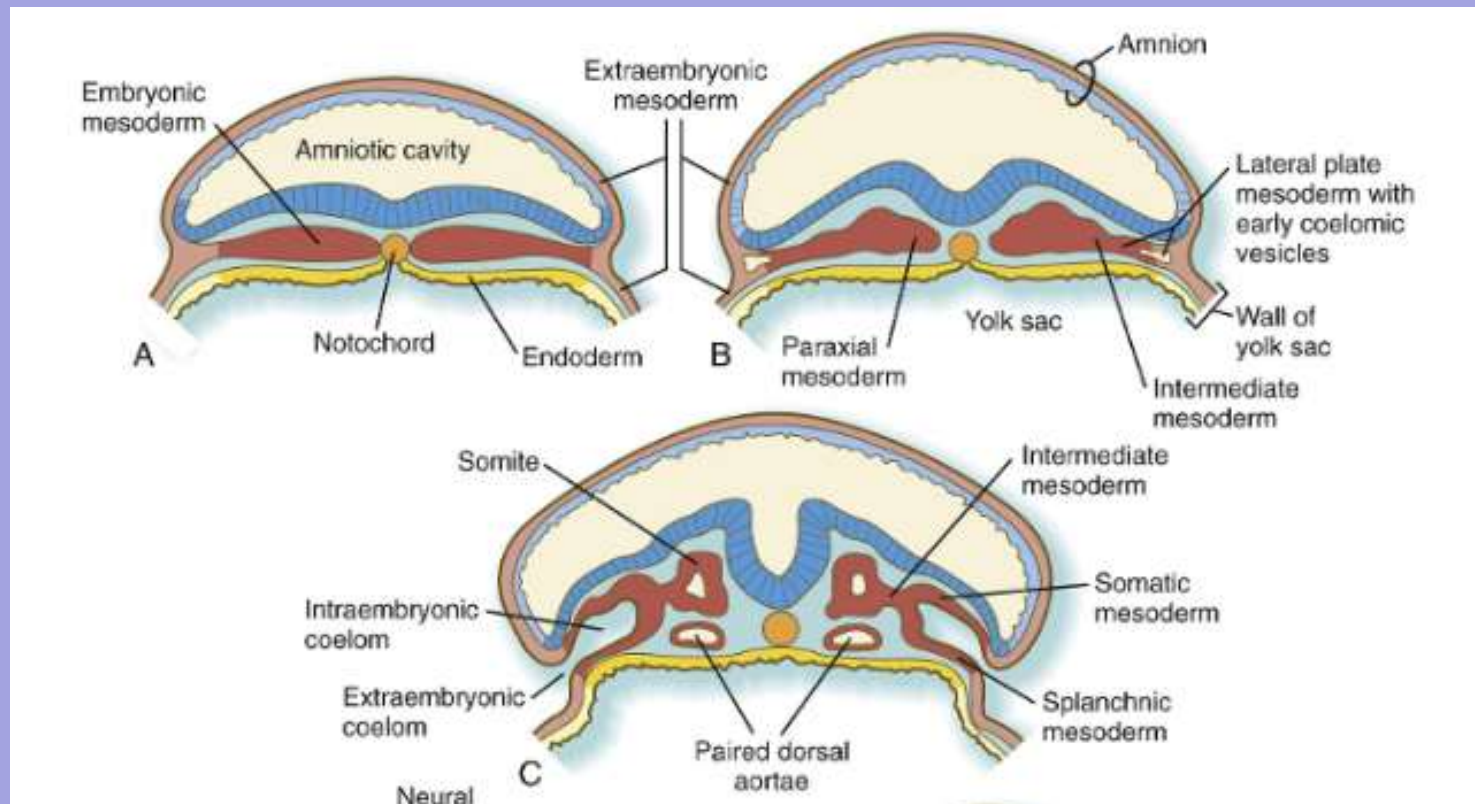


Ektomesenchym:

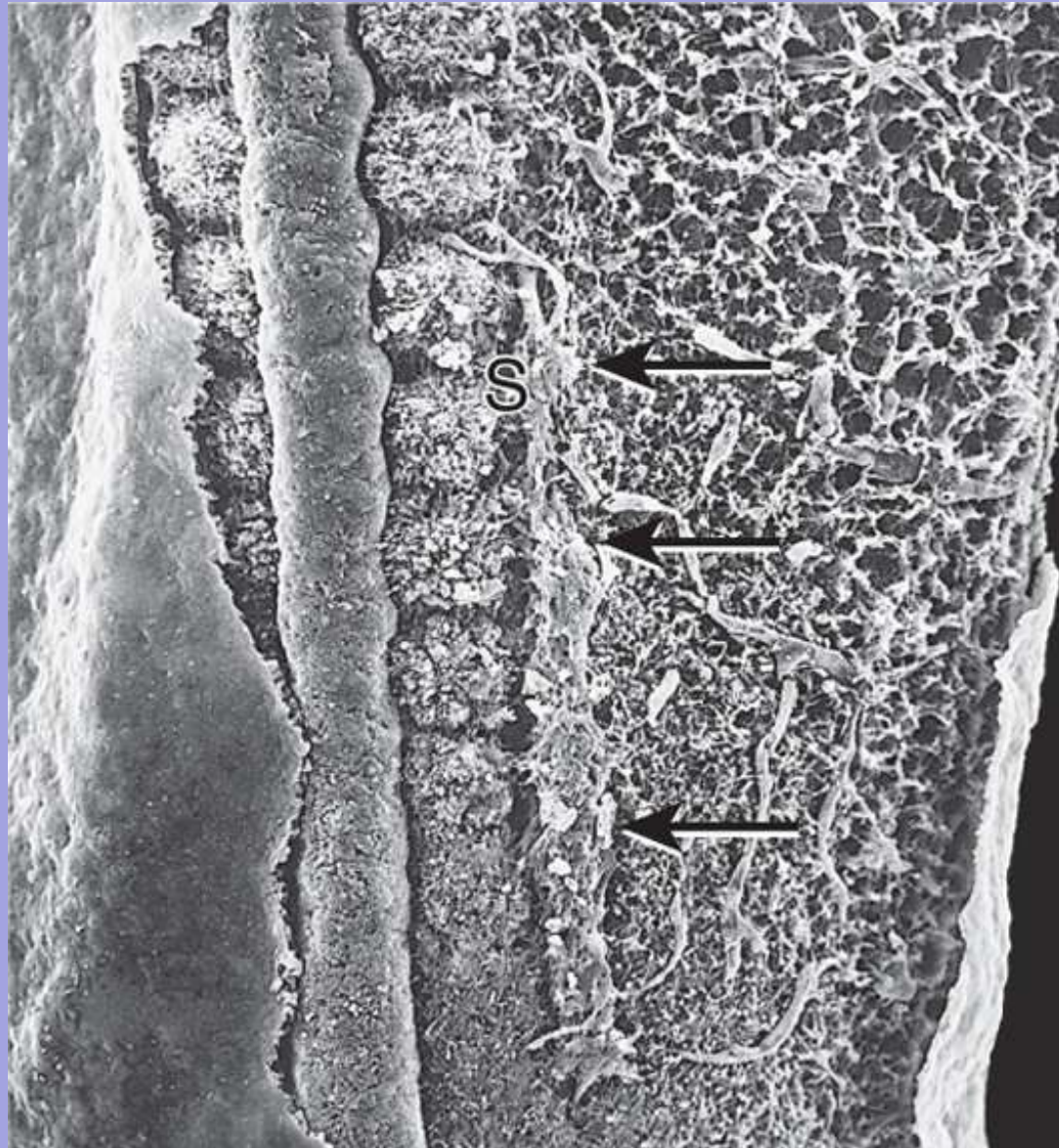
osteoblasty, fibroblasty,
chondroblasty, hladké
svalové buňky, tukové
buňky, odontoblasty

Členění mesodermu

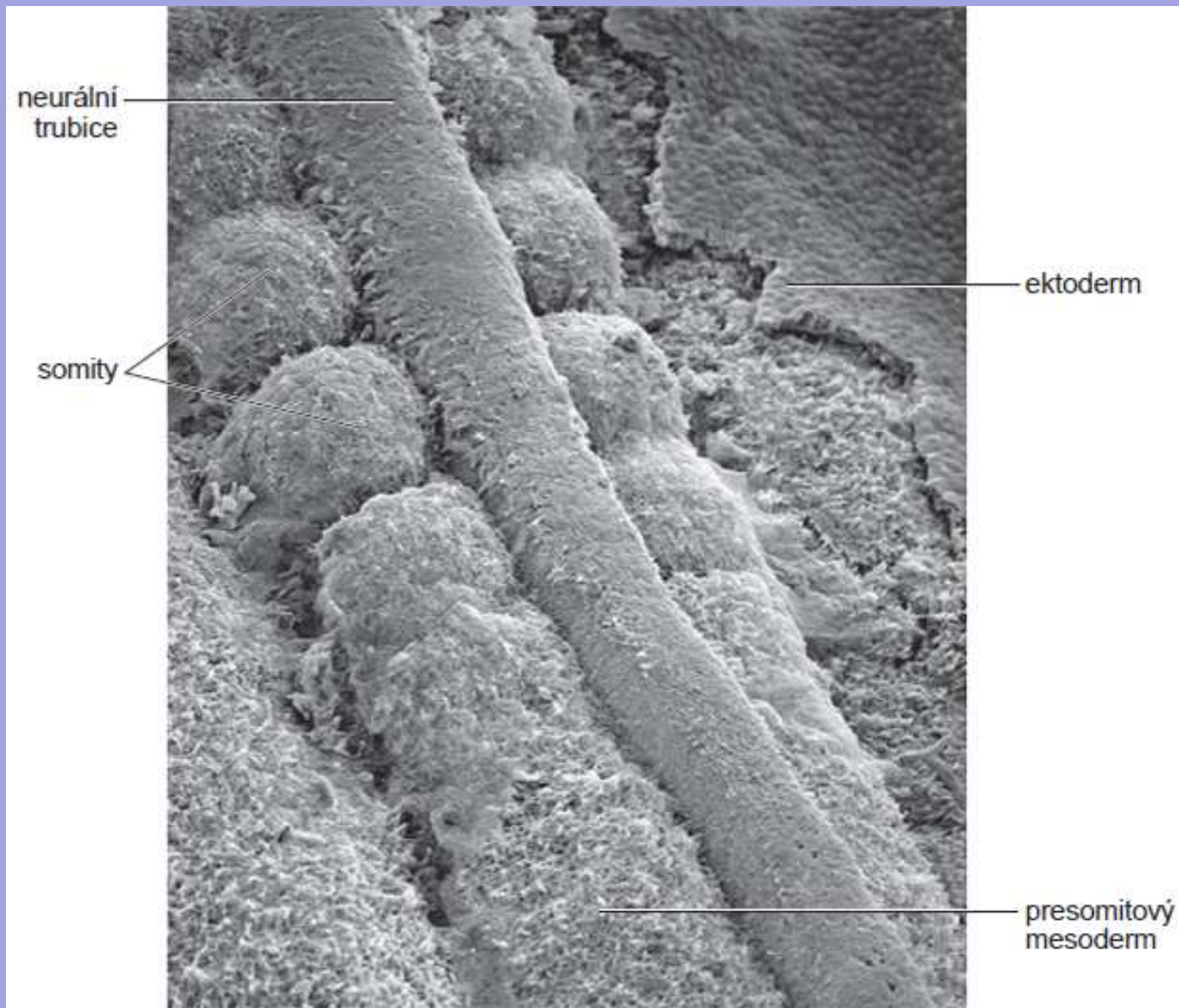
paraaxiální mesoderm (somity),
intermediární mesoderm (urogenitální systém),
laterální ploténka (somatopleura, splanchnopleura),
kardiogenní mesoderm, cévní řečiště



Členění mesodermu: paraaxiální mesoderm (somity), intermediární mesoderm (urogenitální systém), laterální ploténka (somatopleura, splanchnopleura)



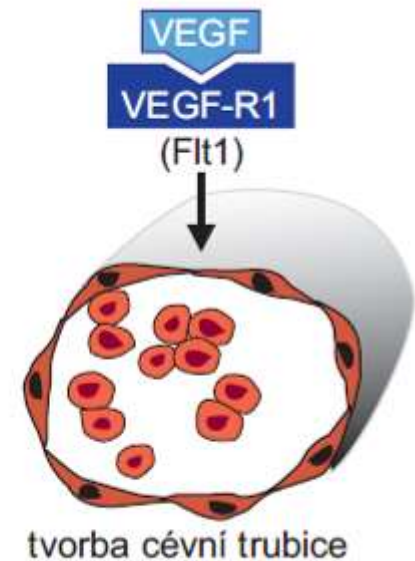
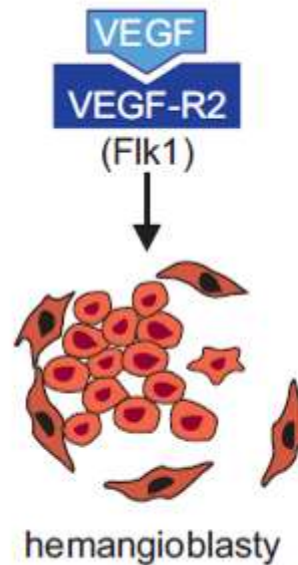
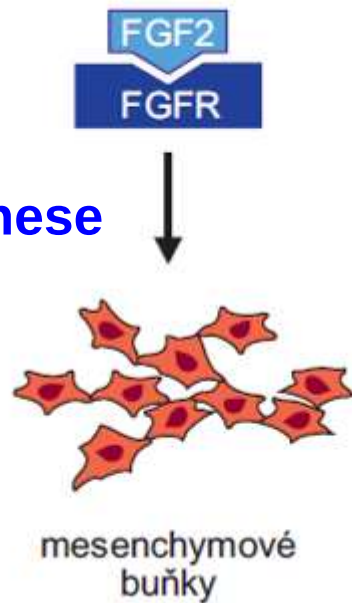
Somity



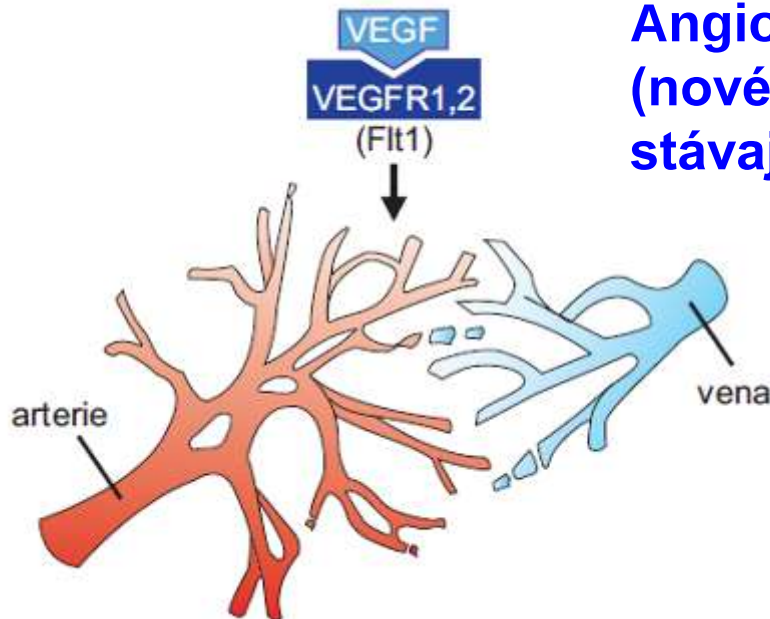
Somity podél neurální trubice po částečném odstranění ektodermu

Diferenciace mesodermu – tvorba cév

Vaskulogenese

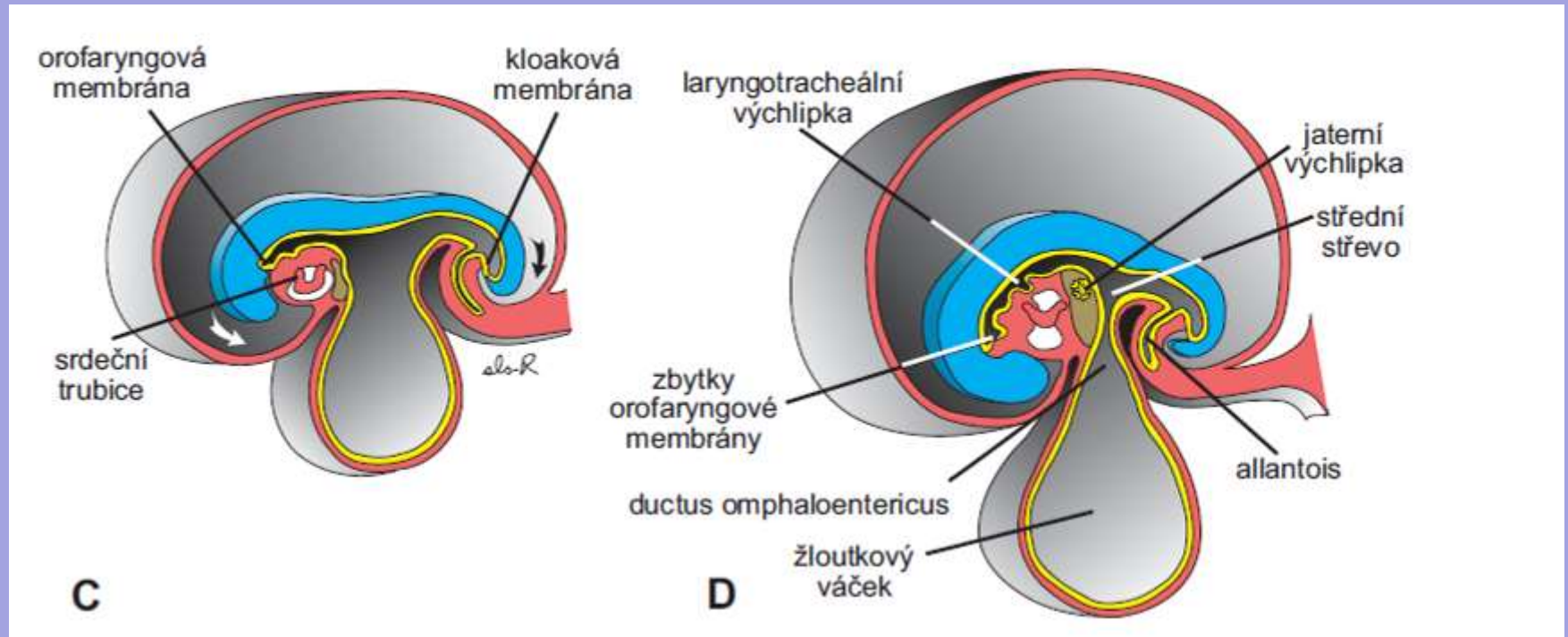


Angiogenese (nové cévy vznikají pučením ze stávajících cév)



Růstový faktor endotelu krevních cév (VEGF) indukuje diferenciaci endotelových buněk a jejich proliferaci vazbou na jeho receptory VEGFR2 - Flk1 a VEGFR1 - Flt1

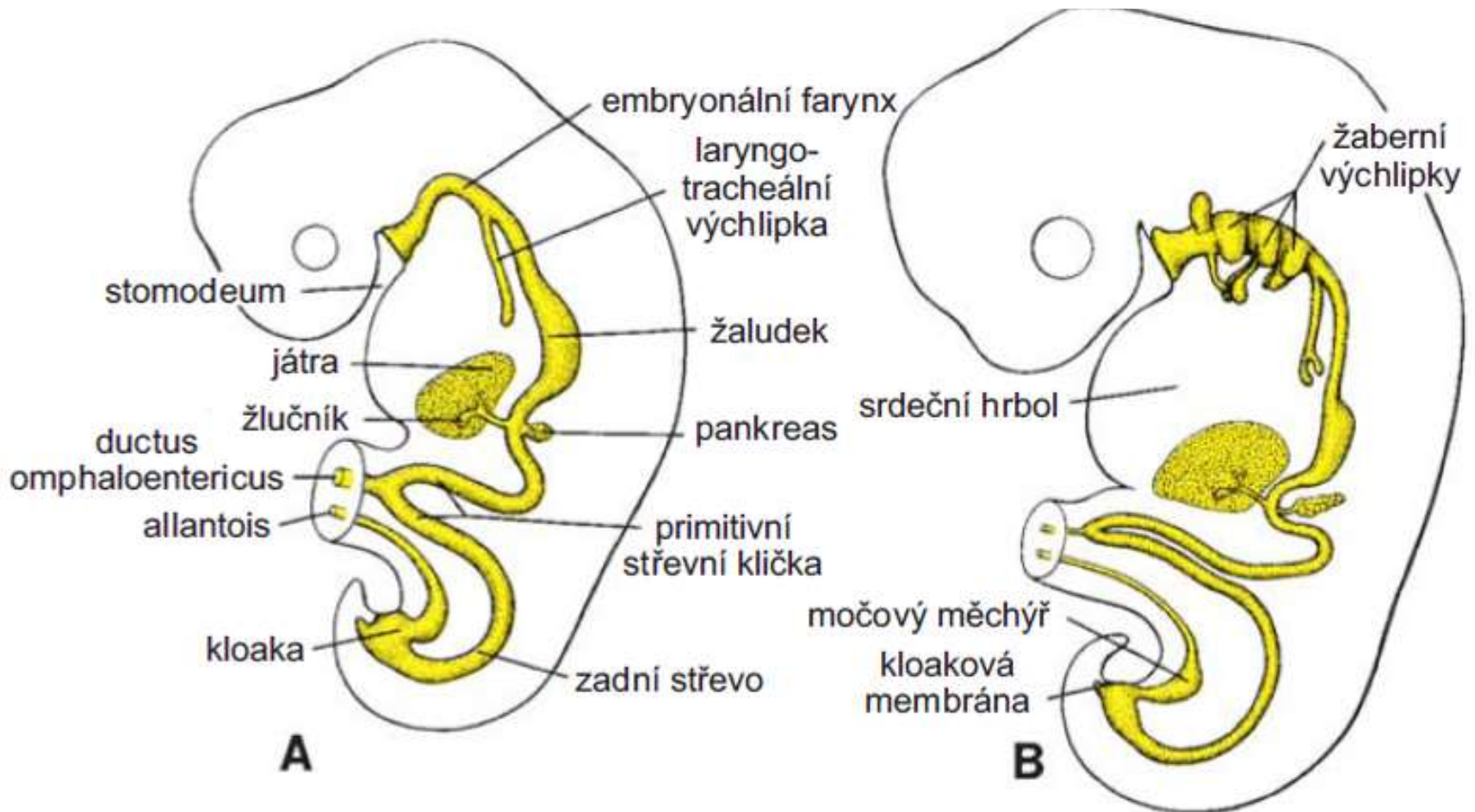
Vývoj entodermu



Vývoj dutiny vystlané entodermem (žlutě) na mediánním řezu embryem ve 3. a 4. týdnu vývoje.

Deriváty entodermu:

epithelová výstelka trávicí trubice a žlučových cest, parenchym štítné žlázy, příštítných tělísek, jater a pankreatu, základ výstelky dýchacího systému a močového měchýře



2) Buněčné aktivity za vývoje:

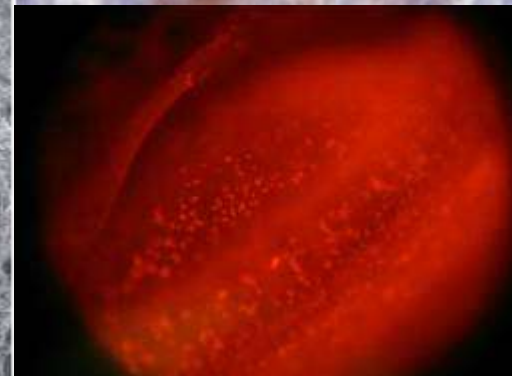
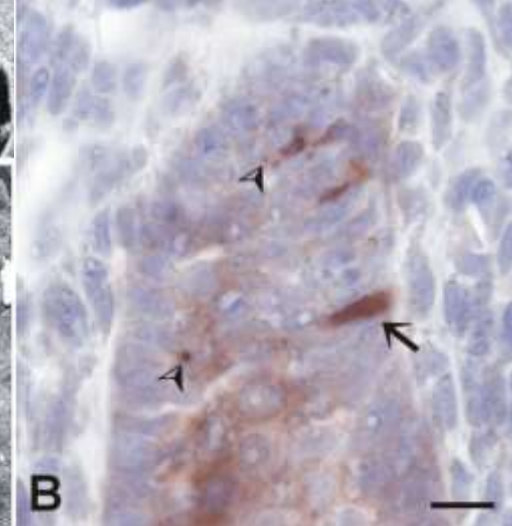
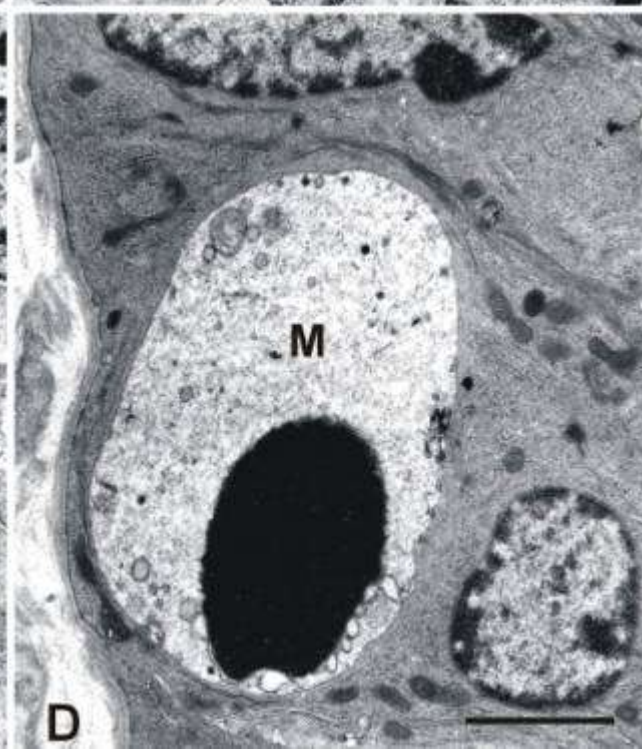
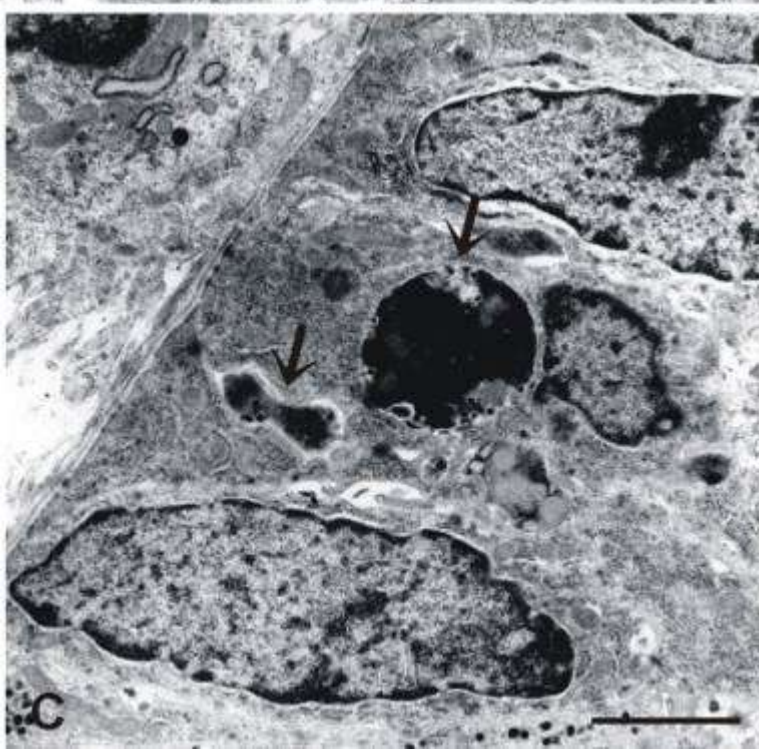
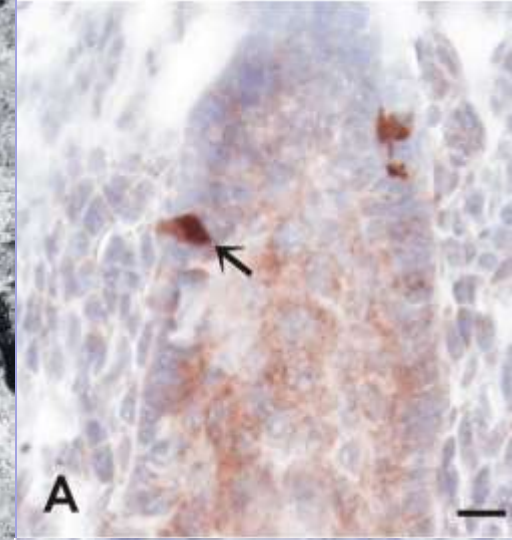
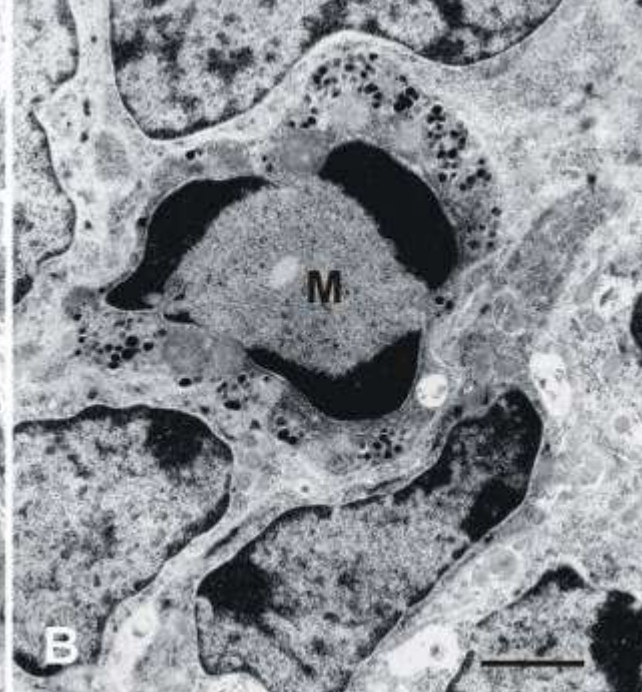
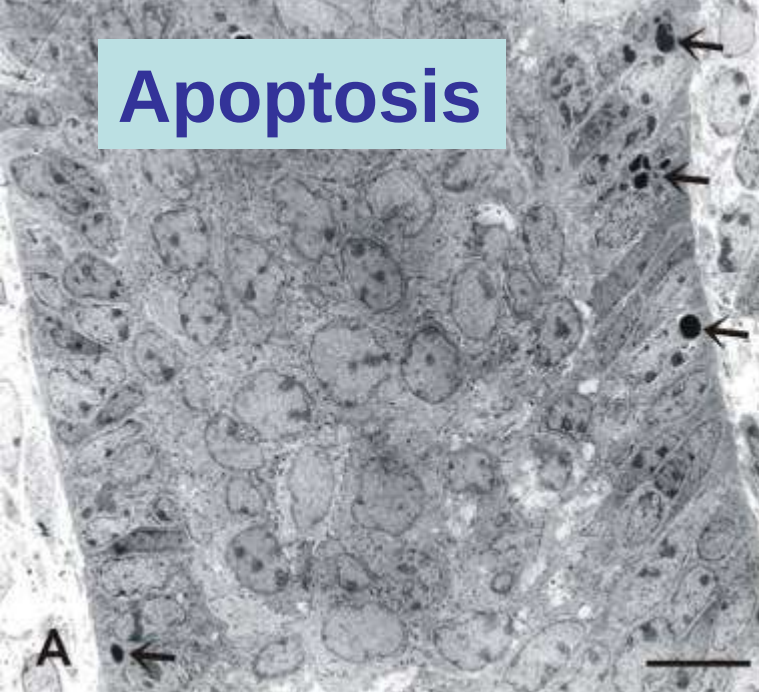
- **proliferace** - dělení buněk, trvale se obnovující buněčné populace, statické populace
- **diferenciace buněk** - využití genetické informace různým způsobem, embryonální kmenová buňka (**totipotentní**), orgánové kmenové buňky (pouze (**multipotentní**))
- **epithelo-mesenchymová transformace**
- **migrace** - buňky se mohou pohybovat.
- **schopnost adherovat**
- **buněčná smrt - apoptosis**
- **růst organismu**— růst velikosti a počtu buněk, růst objemu mezibuněčné hmoty.

Základní uspořádání organismu vzniká ve velmi malém měřítku. Růst miniaturu zvětšuje do dospělé velikosti, vyžaduje regulaci genové aktivity.

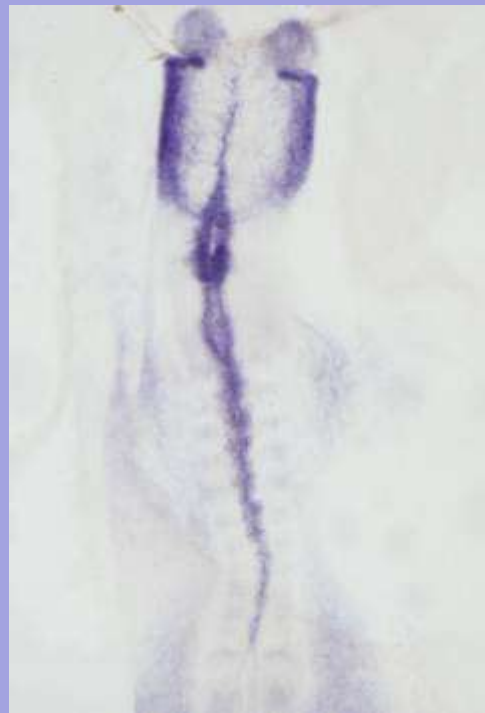
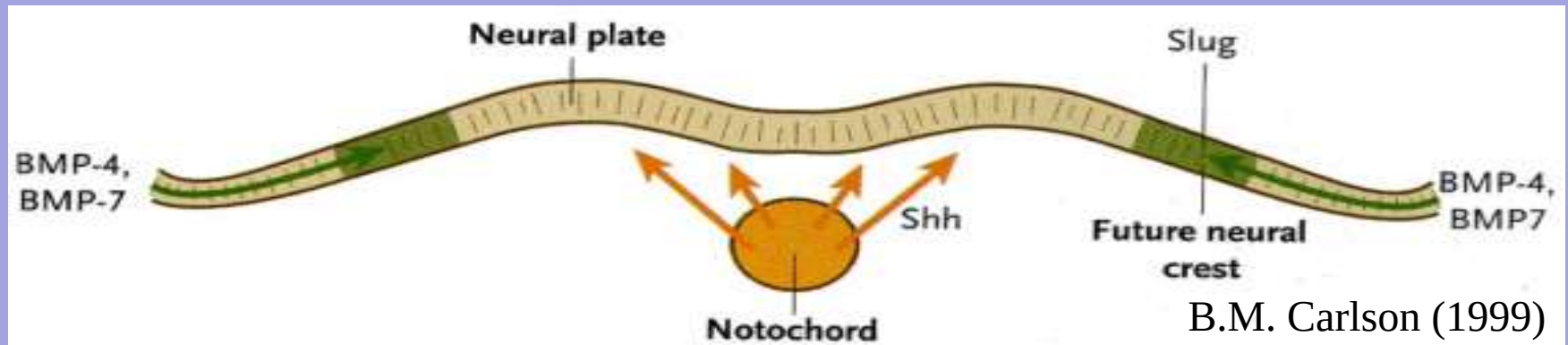
Proliferující buňky ve vlasových folikulech (zeleně)



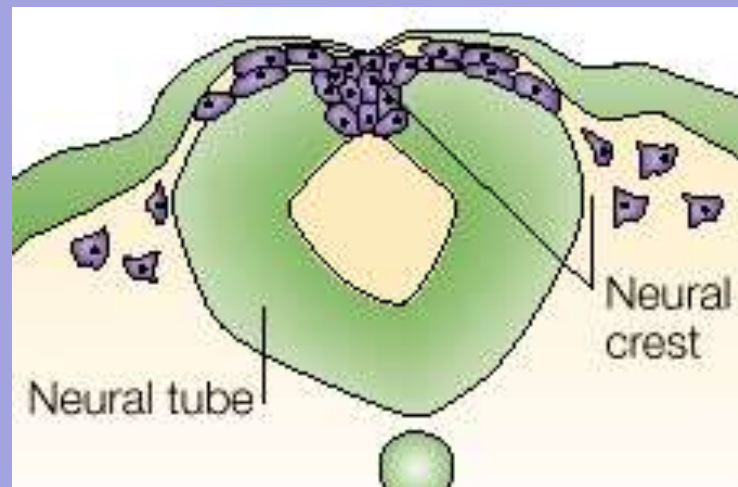
Apoptosis



Epithelo-mesenchymová transformace buněk neurální lišty



ISH mRNA Slug



HH 10

Migrace buněk

(embryonální buňky během gastrulace, buňky neurální lišty, germinální buňky, myogenní buňky, atd.)

- **aktinový motor generuje pohyb buněk**
- **permisivní contact-guidance + chemorepelentní molekuly**

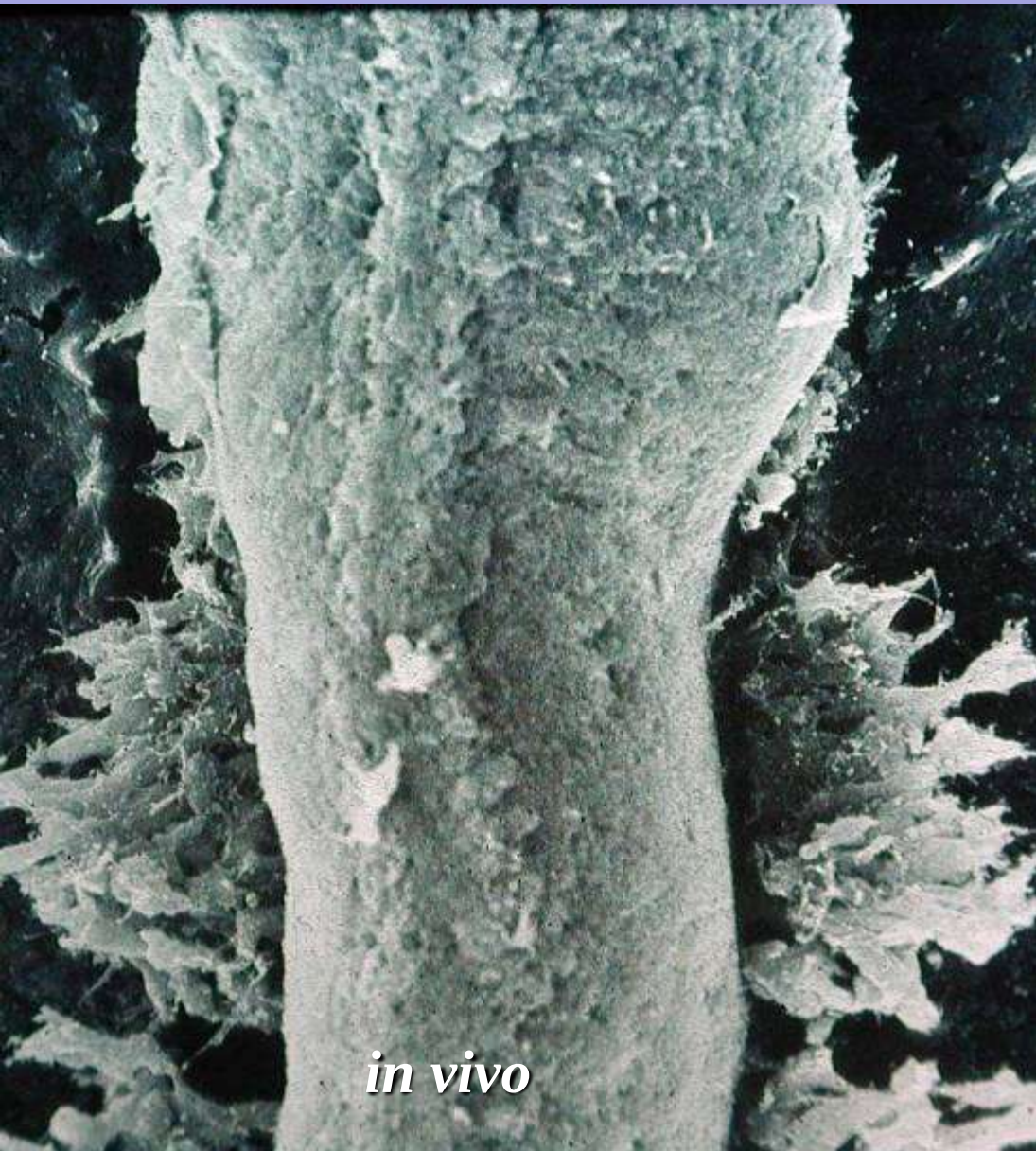
Permisivní prostředí: na trasách migrace fibronectin, laminin, kolagen IV, v interstitiu hyaluronová kyselina, na povrchu buněk integriny

Chemorepelentní prostředí (proteoglykany, chondrotinsulfát

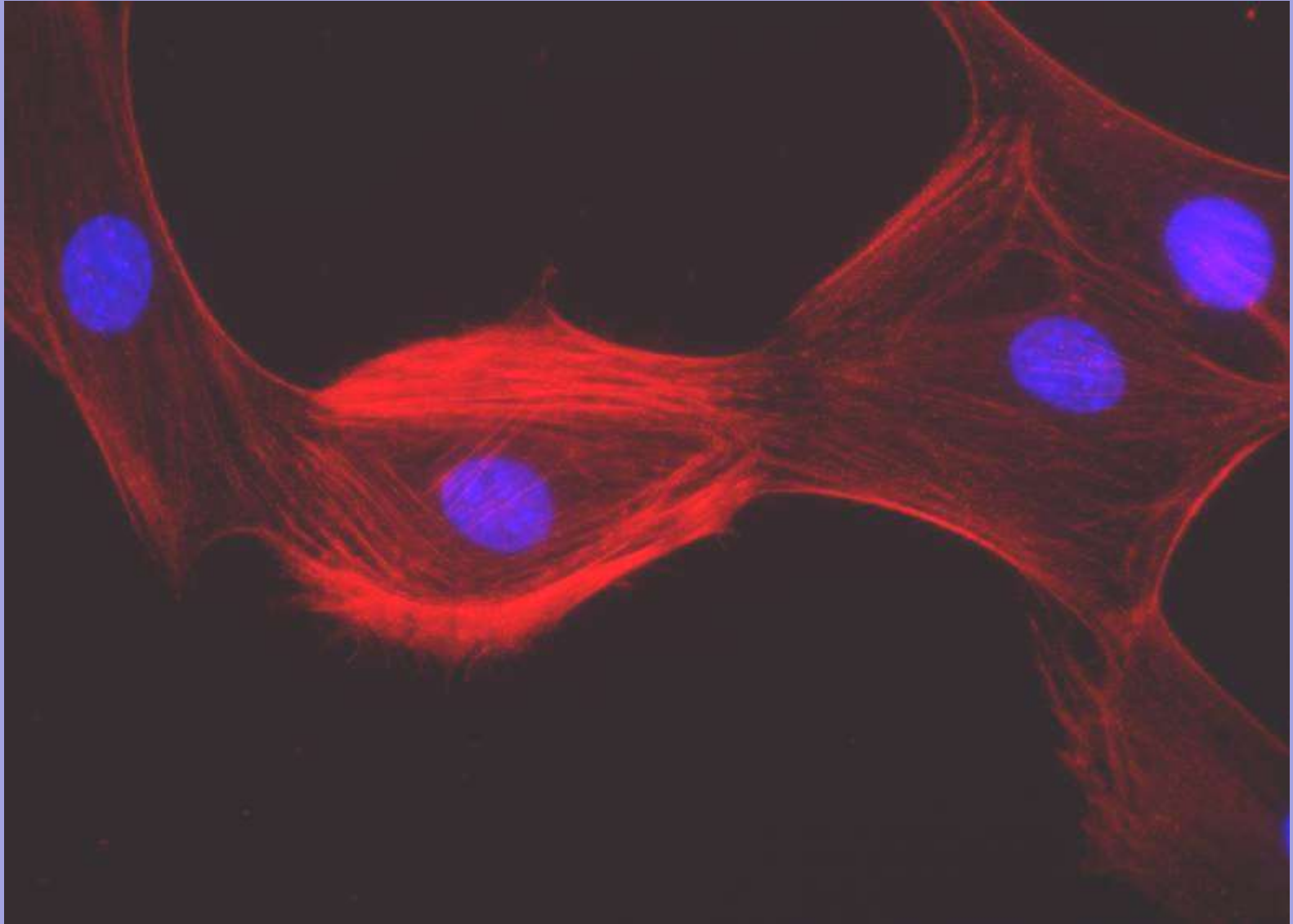
Parakrinní signální systémy migrace

- **Scatter factor /c-met receptor**
- **Steel factor (stem cell factor) / Kit protein**
c-kit gen koduje transmembránový tyrosin kinasový receptor
Steel gen koduje jeho ligand Steel factor
- **Stromal derived factor 1/ jeho CXCR4 receptor**

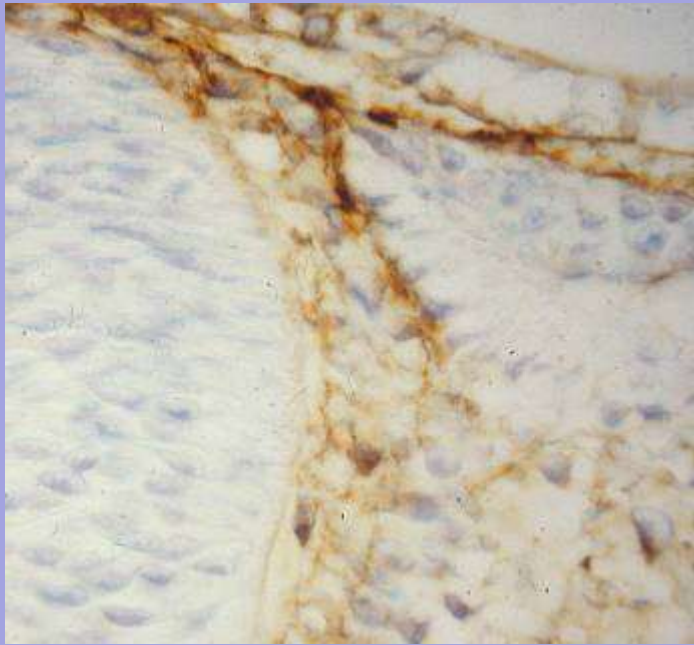
Migrace buněk - buňky neurální lišty



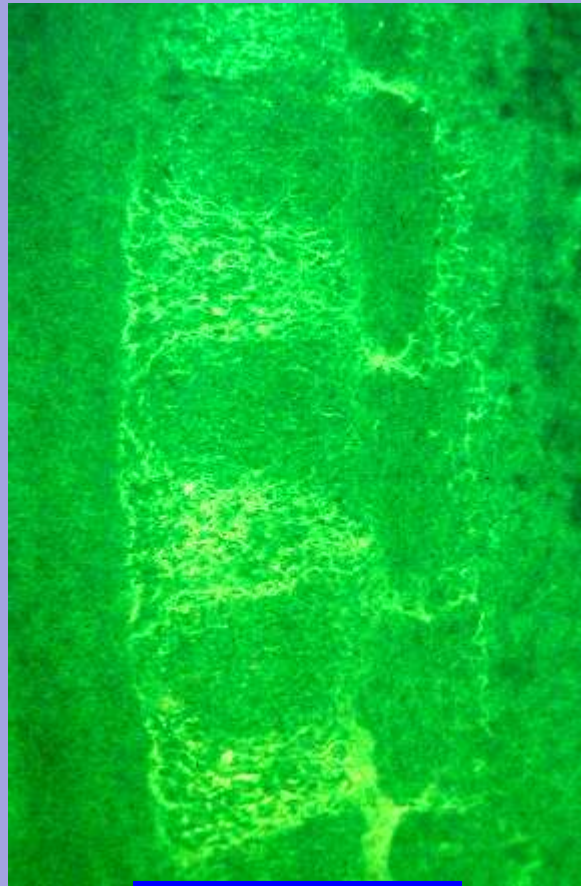
**Sítě filament aktinu (červeně) zajišťují pohyb buňky,
jádra obarvena modře (buňky *in vitro*)**



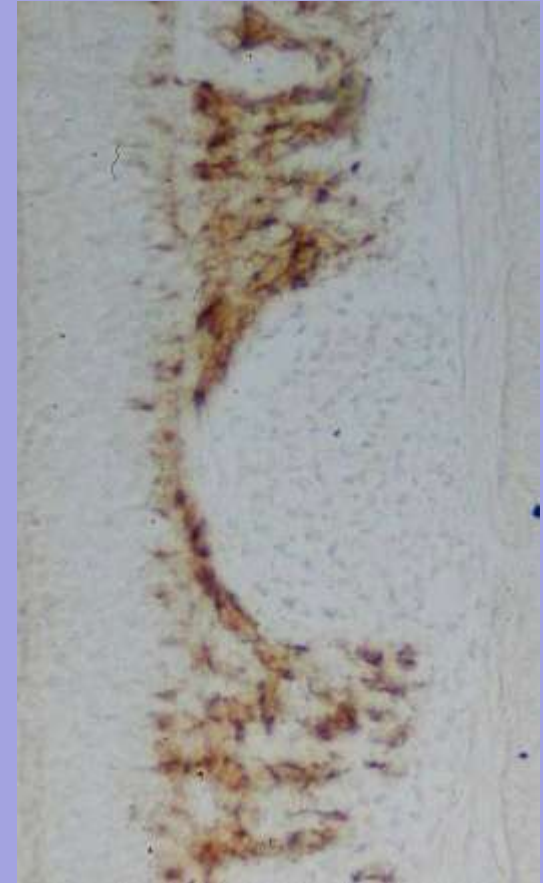
Permisivní contact-guidance migrujících buněk neurální lišty umožňuje fibronektin a tenascin v extracelulární matrix



Fibronektin



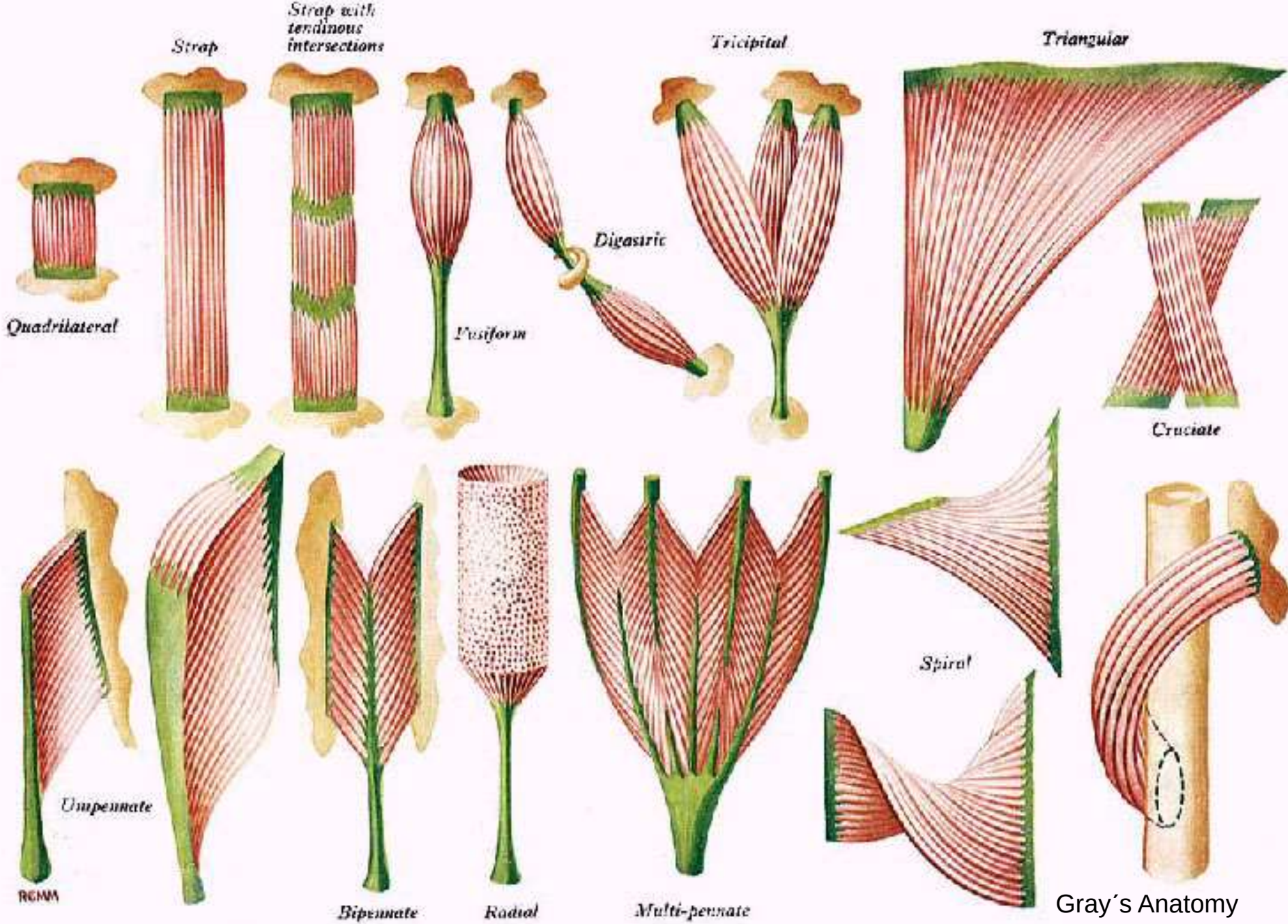
Tenascin



**Buňky NL
značené průkazem
HNK-1**

Kosterní sval a jeho vývoj jako příklad diferenciaci tkáně a vývoje orgánu

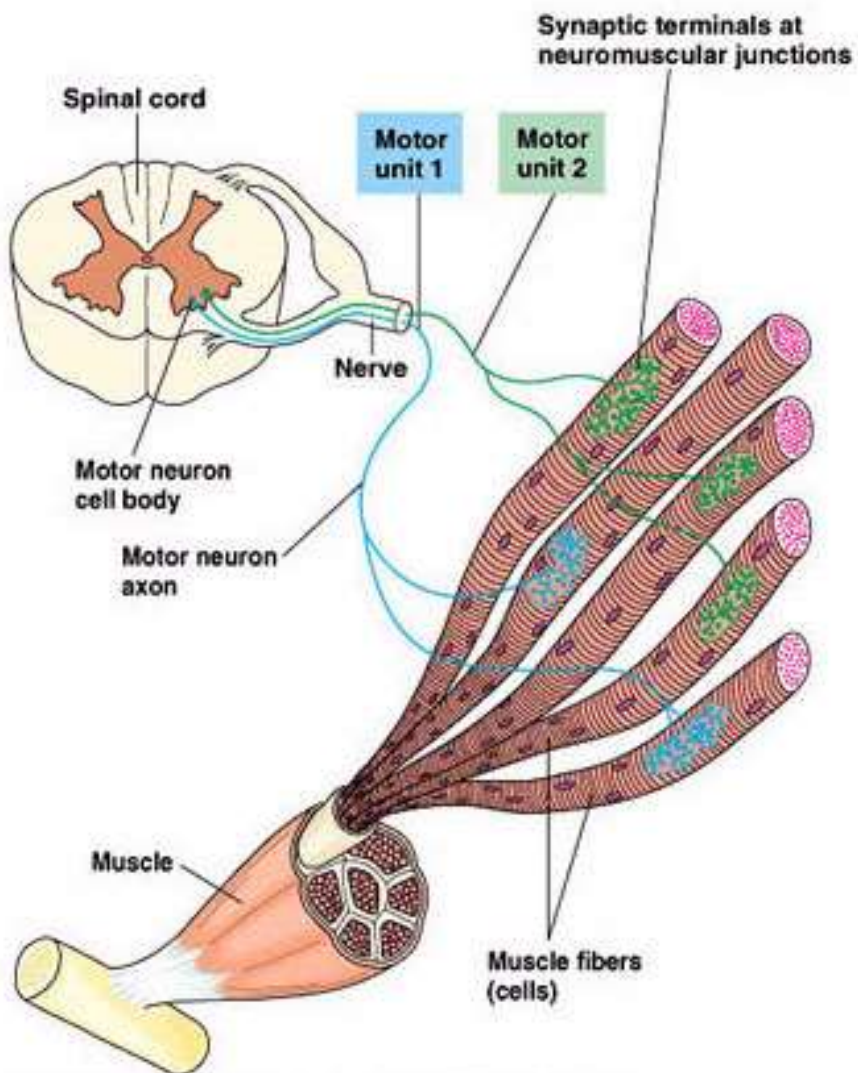
- histogenese: myoblast, myotuba, svalové vlákno, inervace
- transkripční faktory: myogenin, MyoD, Myf-5
- myostatin
- diversifikace linie „pomalých“ a „rychlých“ svalových buněk
- morfogenese: blastémy, základy, štěpení, fuse, sarkolysa



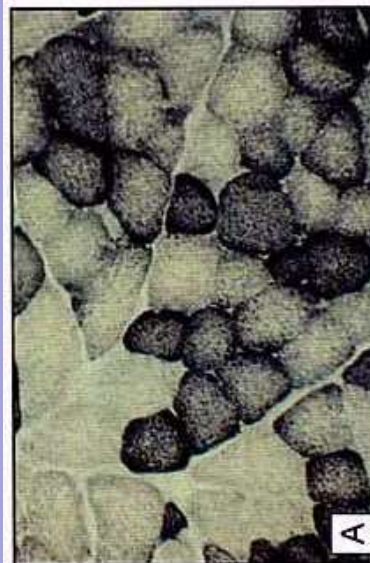
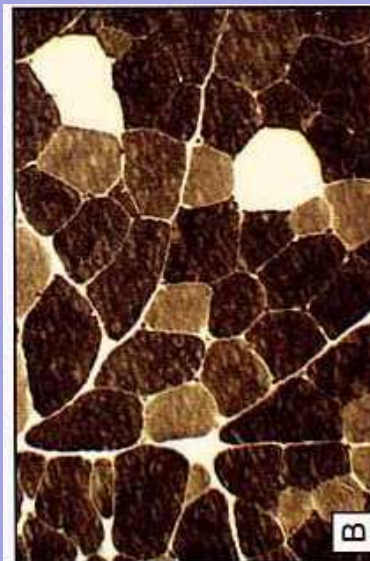
Gray's Anatomy

Tvar svalu

Kosterní sval, typy svalových vláken



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

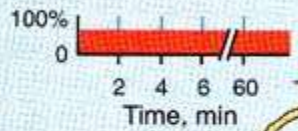
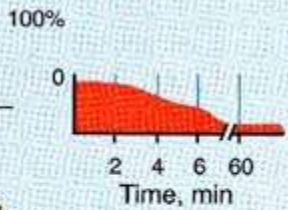
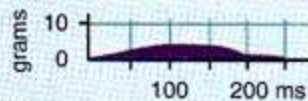
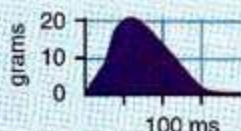
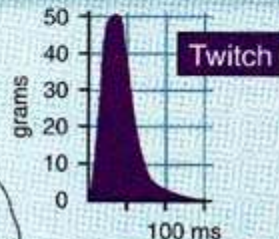


- Fast twitch
- High force
- High fatigue

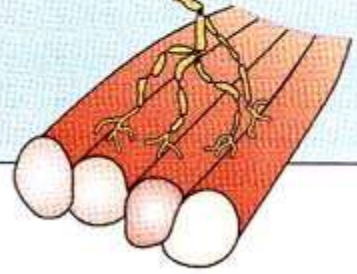
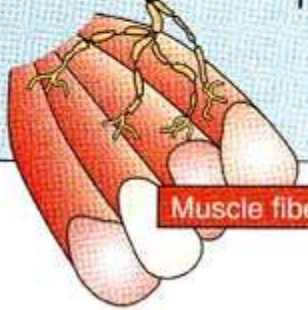
- Fast twitch
- Moderate force
- Fatigue resistant

- Slow twitch
- Low tension
- Fatigue resistant

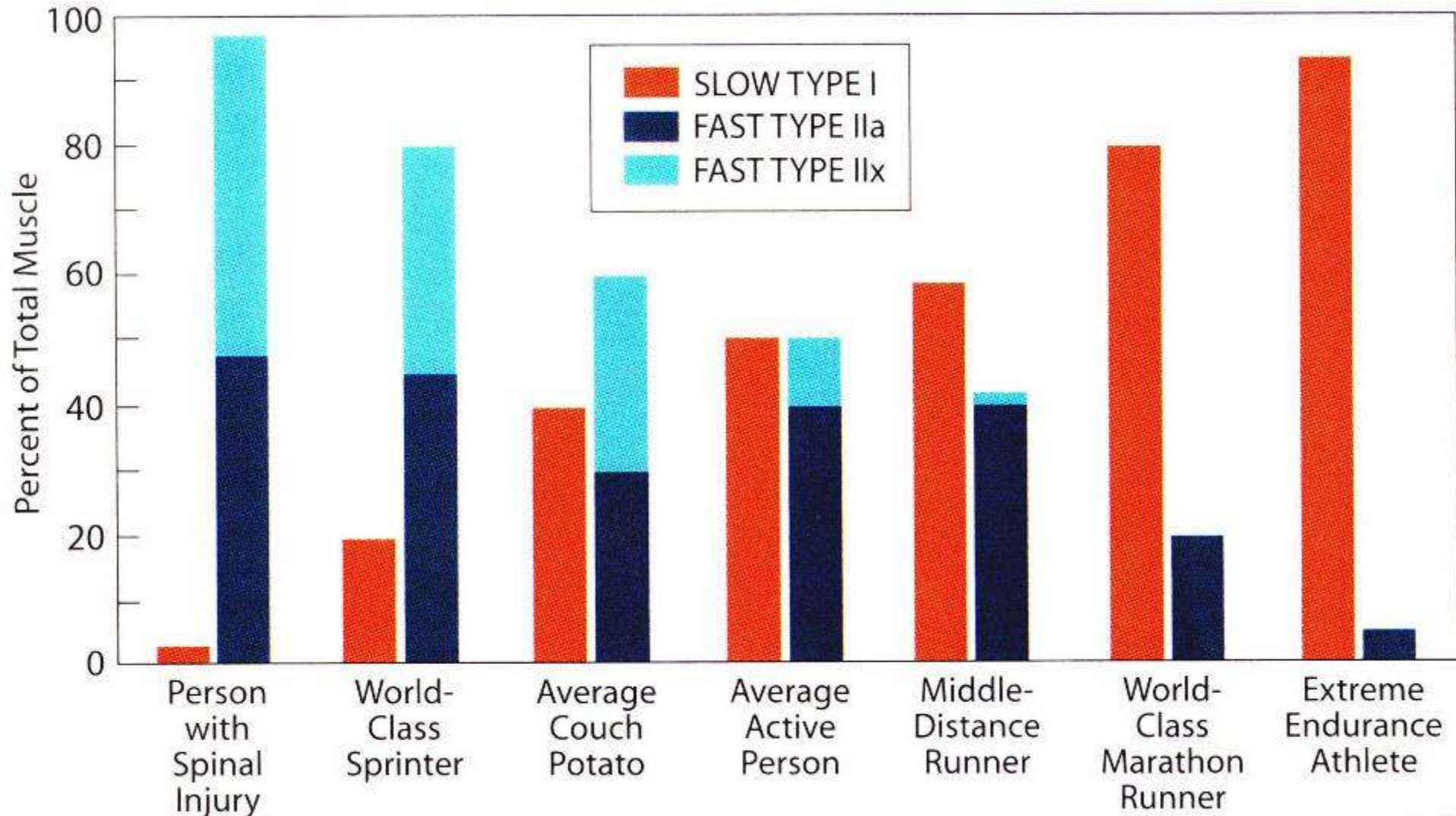
Motoneuron



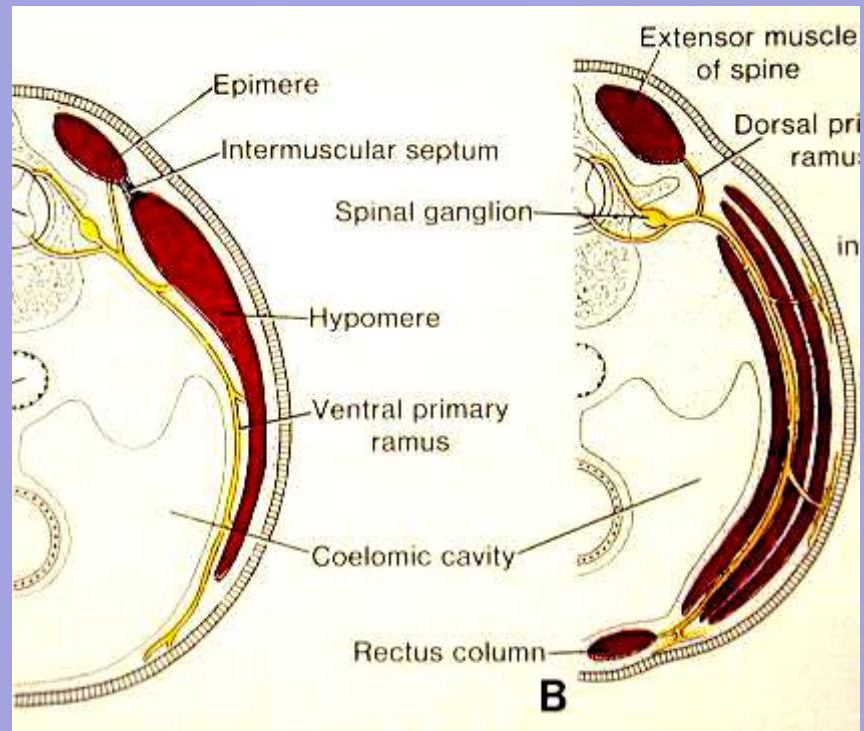
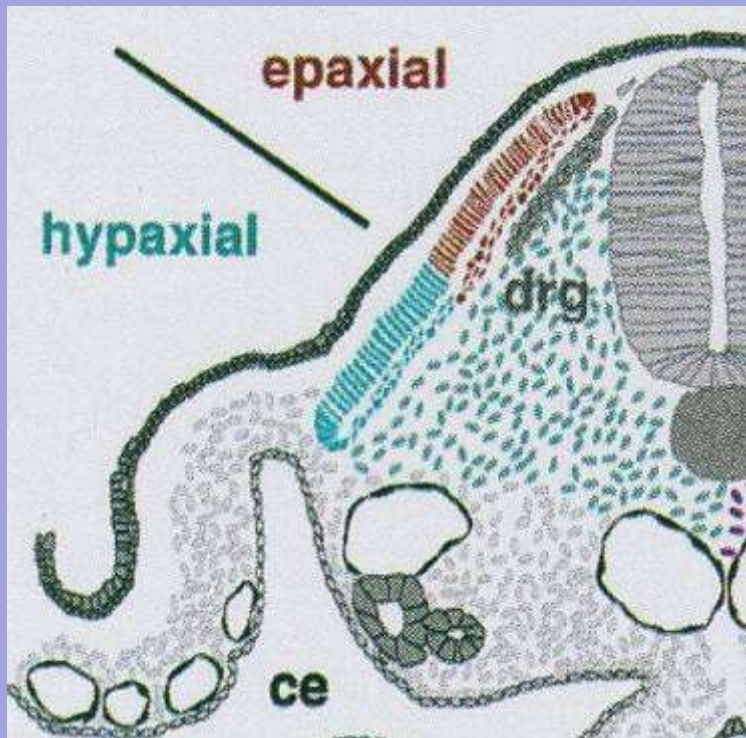
Muscle fibers



Individuální rozdíly v zastoupení typů svalových vláken

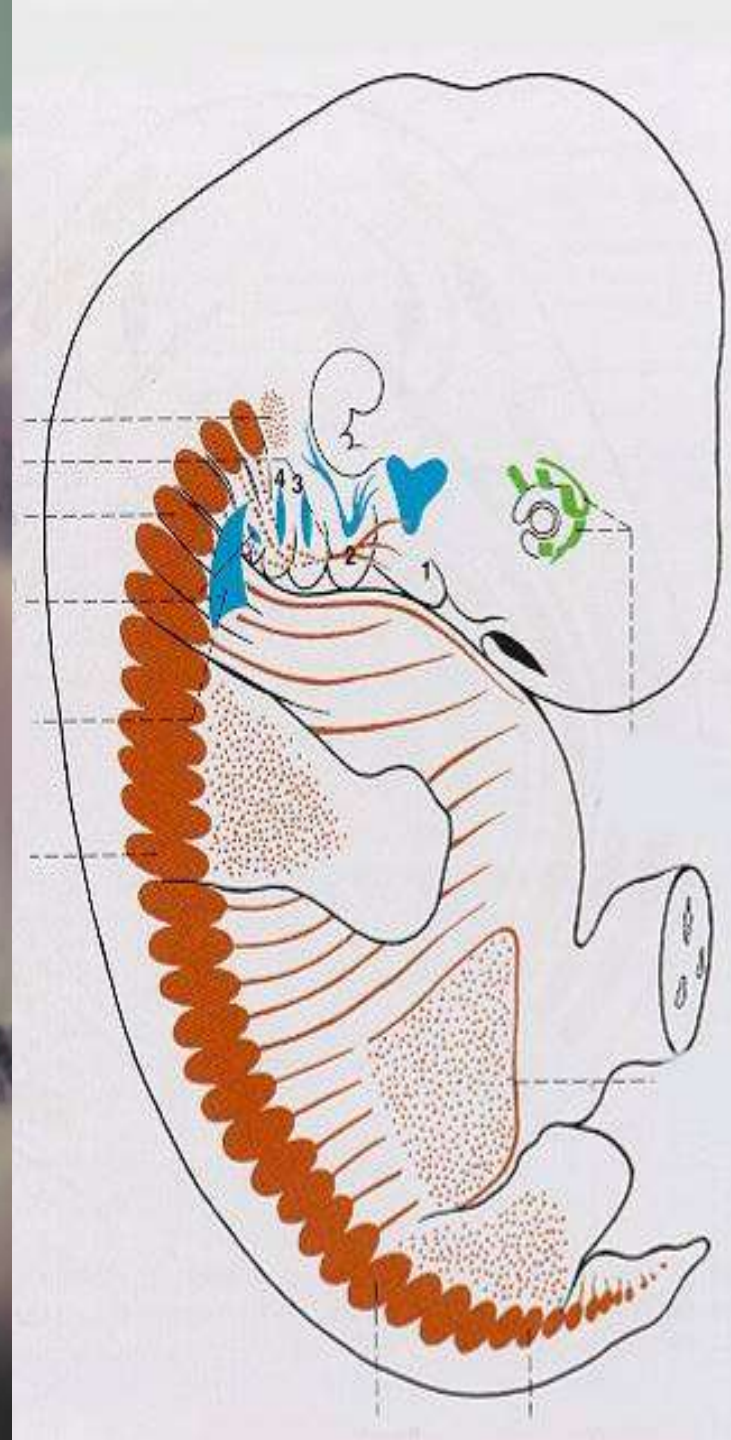


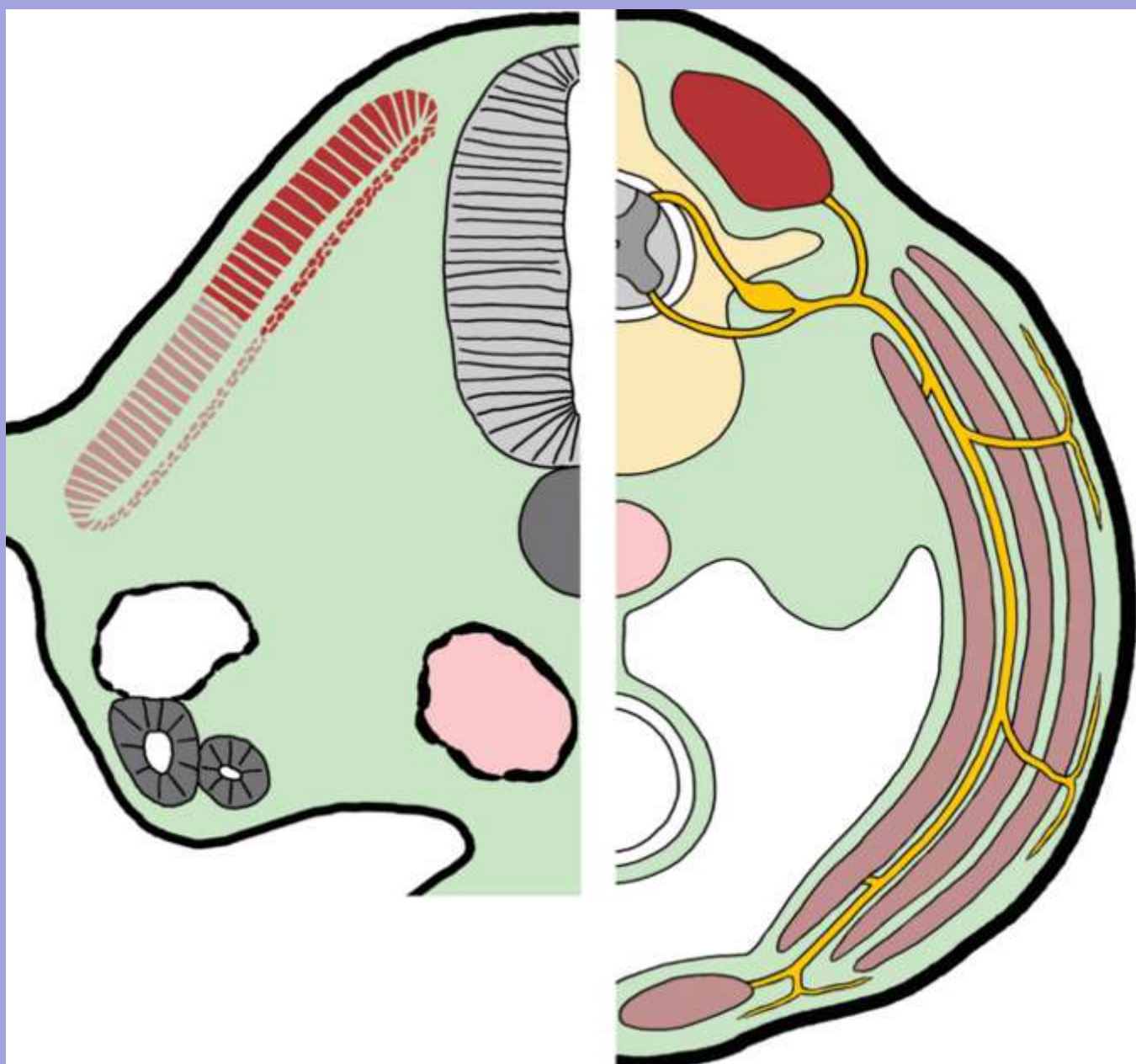
Morfogeneze svalu



ISH mRNA MyoD, myogeneze v trupu

HH 25





Původ a uspořádání epaxiální a hypaxiální svaloviny na transversálním řezu embryem v úrovni břišní stěny v časném (vlevo) a v pozdějším (vpravo) vývojovém období

Histogeneze svalu

Myogenní buňka

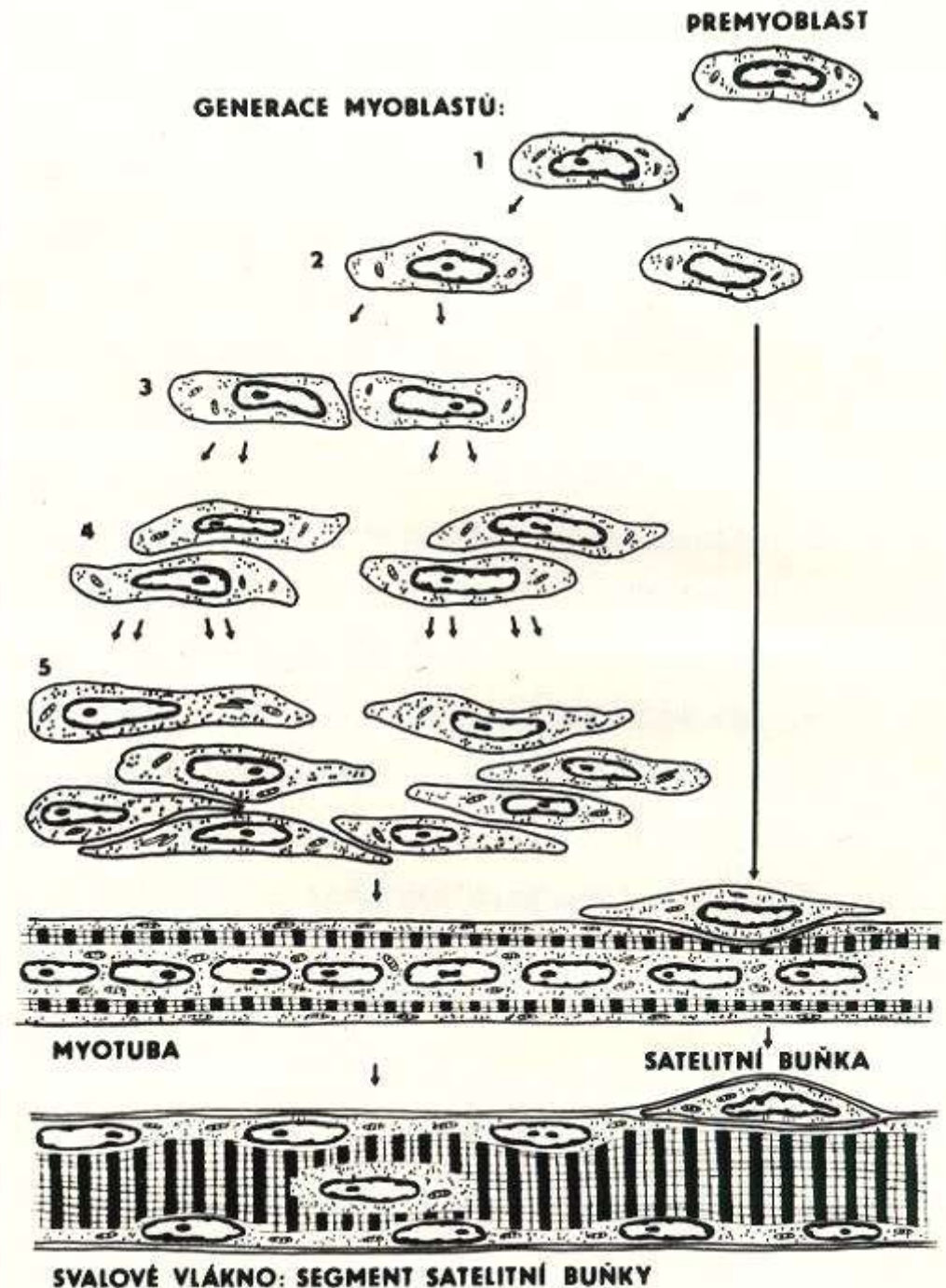
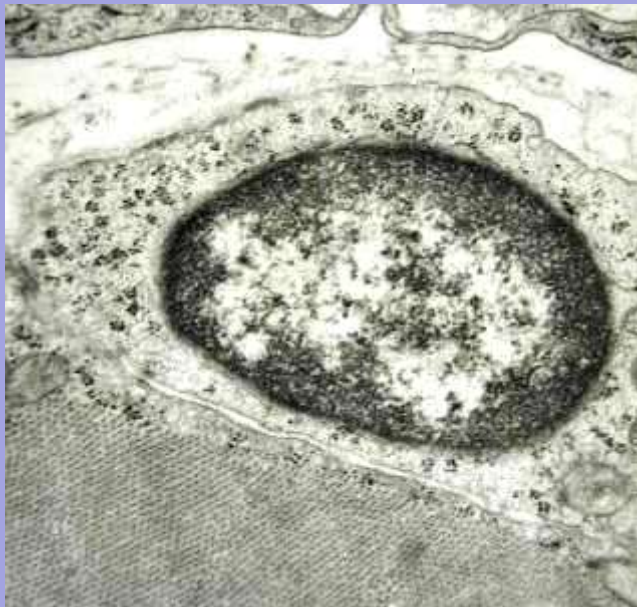
(MyoD, Myf5,
myogenin)

Myoblast, (proliferace,
myostatin)

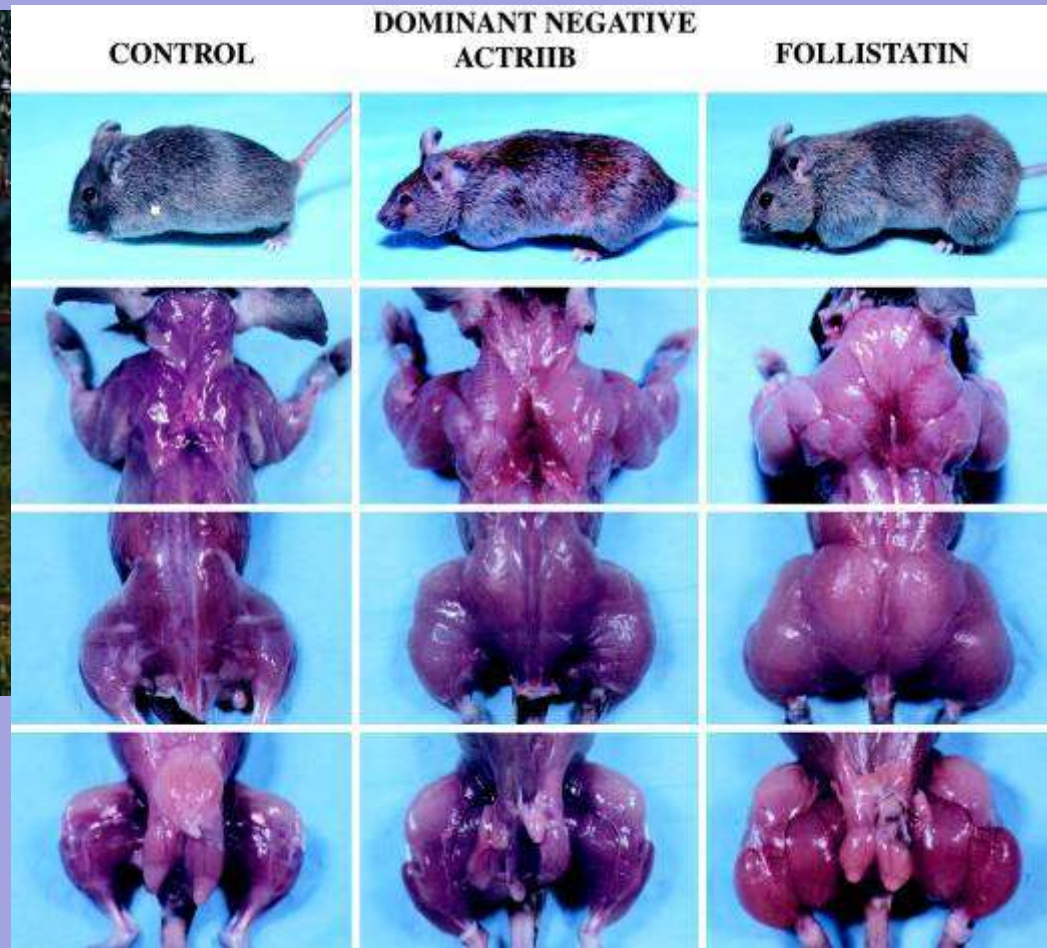
Myotuba (fúze),

Svalové vlákno
(diferenciace),

Satelitní buňka



Myostatin a jeho vývojový význam



**Mutace genu pro myostatin:
nadměrná proliferace
svalových buněk**

**Uvádí se, že minimálně jeden
evropský šampion ve vzpírání
má vrozený defekt myostatinu,
ale asi tomu tak není**

**Blokáda receptoru pro myostatin,
Nadexprese follistatinu,
antagonisty myostatinu**

Gen ACTN3 kóduje alfa-actinin-3 a má dvě alely (R,X). Alela R má cytosin v kodonu 577, který kóduje arginin. V alele X je cytosin nahrazen thyminem, čímž je translace předčasně ukončena a nevytváří se funkční protein. Pouze R alela umožňuje syntézu alfa actininu 3, proteinu, který je obsažen převážně v FG (IIX) svalových vláknech zodpovědných za rychlý a vydatný stah svalu.

Nositelem alespoň jedné R alely je 95% elitních sprinterů a 50% z nich má dokonce obě R alely - každou od jednoho z rodičů.

V Keni je 99% populace nositelem alespoň jedné R alely, na Jamajce je to 98% populace, ale v evropské populaci je to jen 82% jedinců. Předpokládá se, že homozygotů X/X, kteří netvoří alfa-actinin 3 je celosvětově $\frac{1}{6}$ – $\frac{1}{4}$ populace.

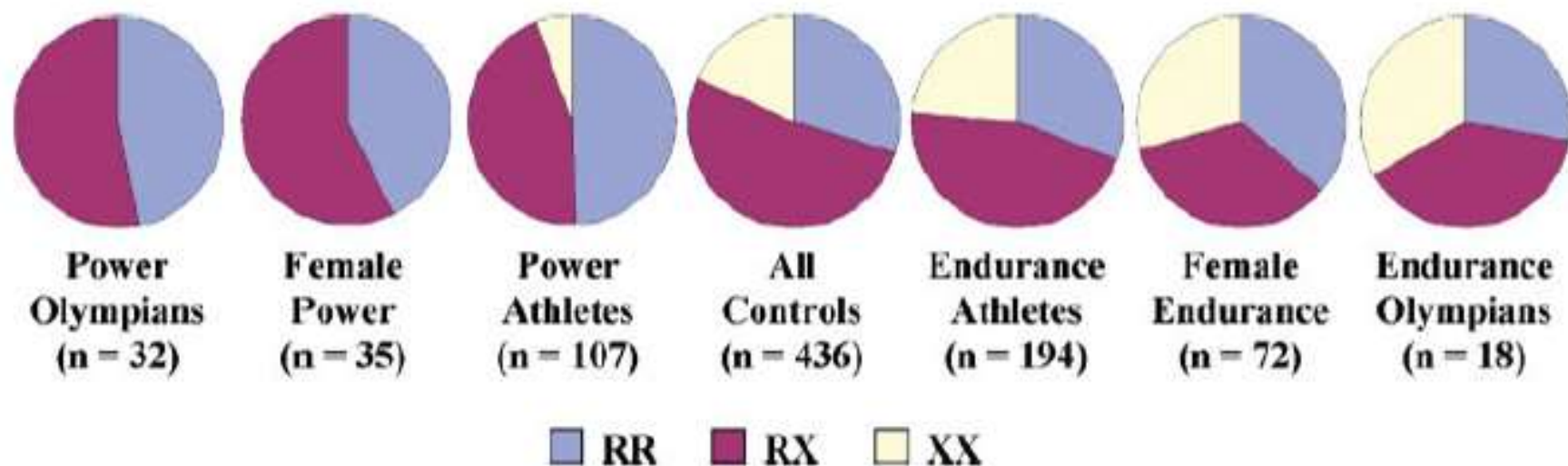
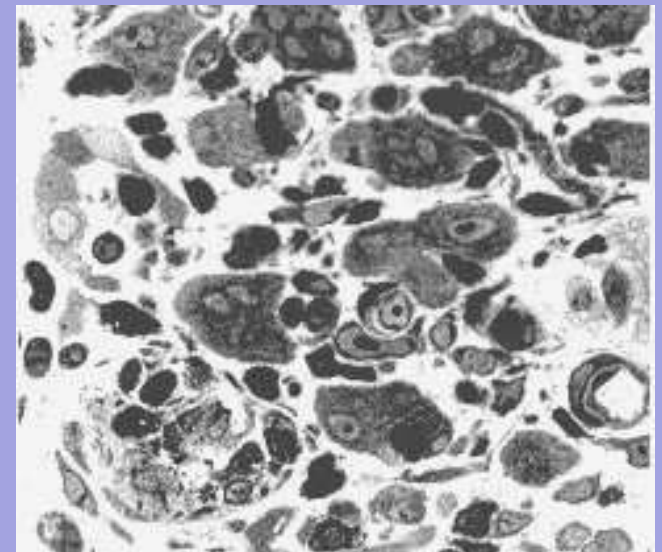
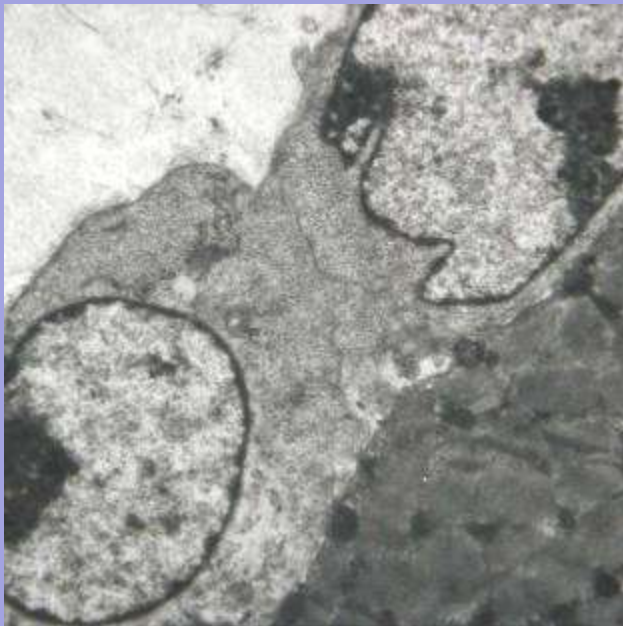
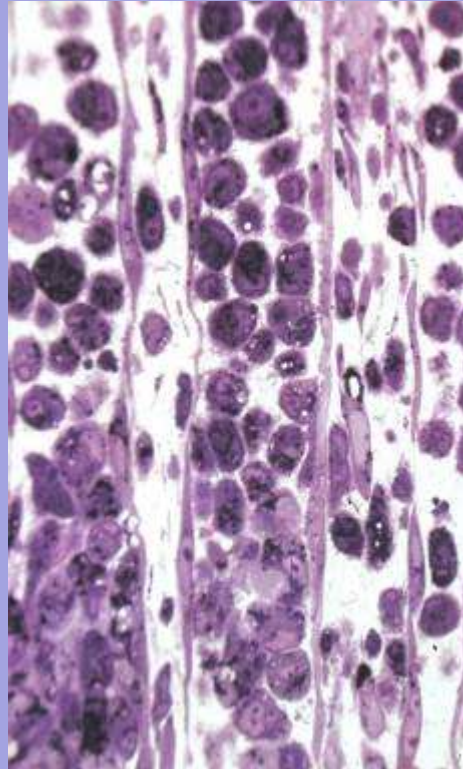
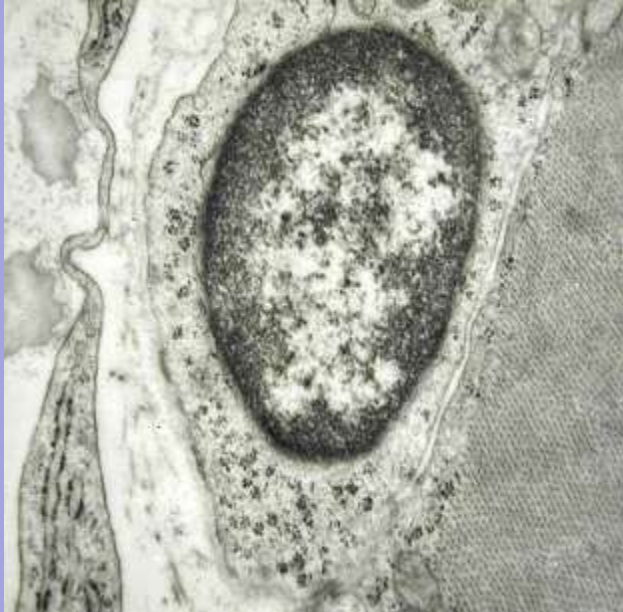


Figure 3. Frequencies of the three *ACTN3* R577X genotypes in controls and elite athletes. The sample size in each group is shown. Female athletes and athletes who had competed at an Olympic level are shown as separate groups for both power/sprint and endurance athletes. Significant differences from genotype frequencies in controls (by a χ^2 test for homogeneity of genotype frequencies between groups) were seen for total power athletes ($P < 0.0001$), female power athletes ($P < 0.05$), power Olympians ($P < 0.01$) and female endurance athletes ($P < 0.05$).

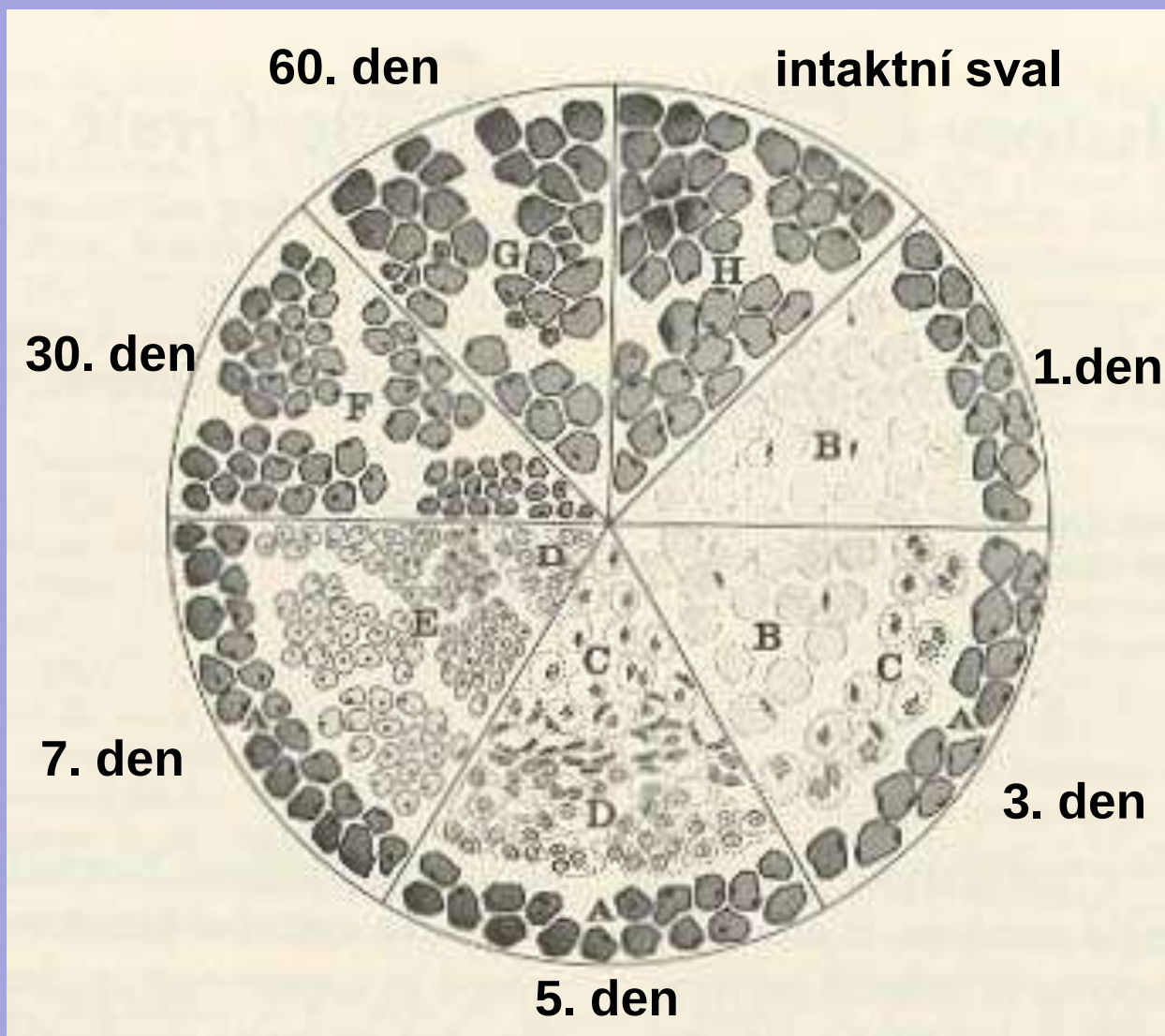
Regenerace kosterního svalu

- satelitní buňka – kmenová buňka svalového vlákna
- aktivace satelitních buněk, proliferace, fúze, diferenciac
- regenerace po poranění, po transplantaci: revaskularisace, reinervace
- časový průběh x proliferace vaziva

Satelitní buňka a regenerace svalu



Osud volného svalové štěpu u laboratorního potkana



Doporučená literatura

k základům vývoje orgánových systémů

Čihák R: Anatomie I (3. vydání)

str. 31 – 59, a z toho zejména str. 47 - 53

Langmanova lékařská embryologie kapitola 6

Embryonální období, str. 79 – 102