

Inżynieria genetyczna INGE4

Michał Mikula

Zakład Genetyki
Centrum Onkologii-Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie

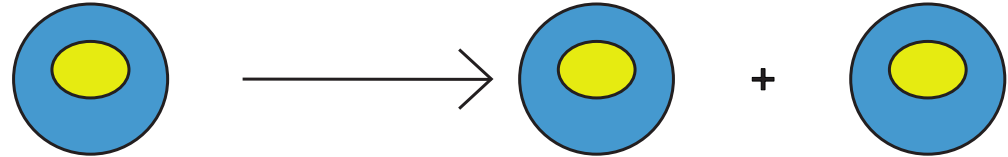
email: mikula.michal@gmail.com

<http://www.ire.pw.edu.pl/~trubel/dydaktyka/inge/>

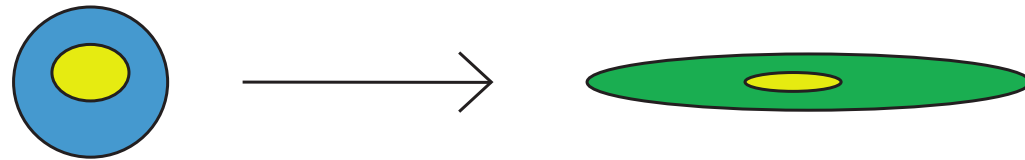
Los komórek

► Zmiany ekspresji genów w komórce determinują jej los:

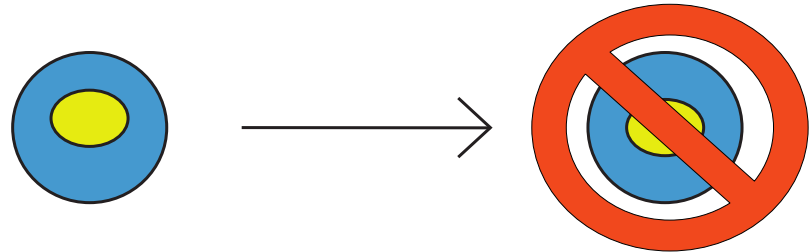
► **Podział komórkowy** – Mitoza
(dwie identyczne potomne komórki)



► **Różnicowanie komórek** –
zmiana struktury i specjalizacja
komórek do pełnienia określonych
funkcji

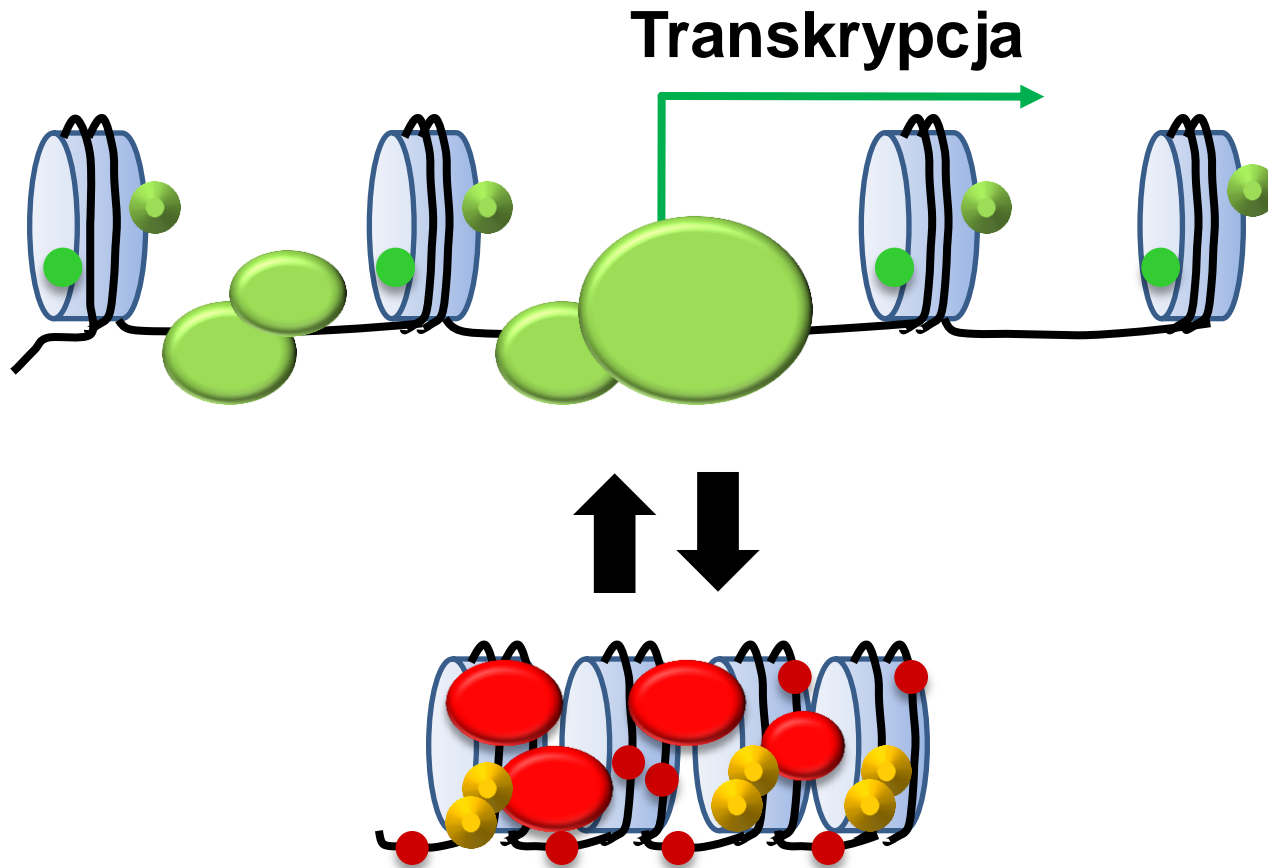


► **Programowana śmierć komórki**
- apoptoza



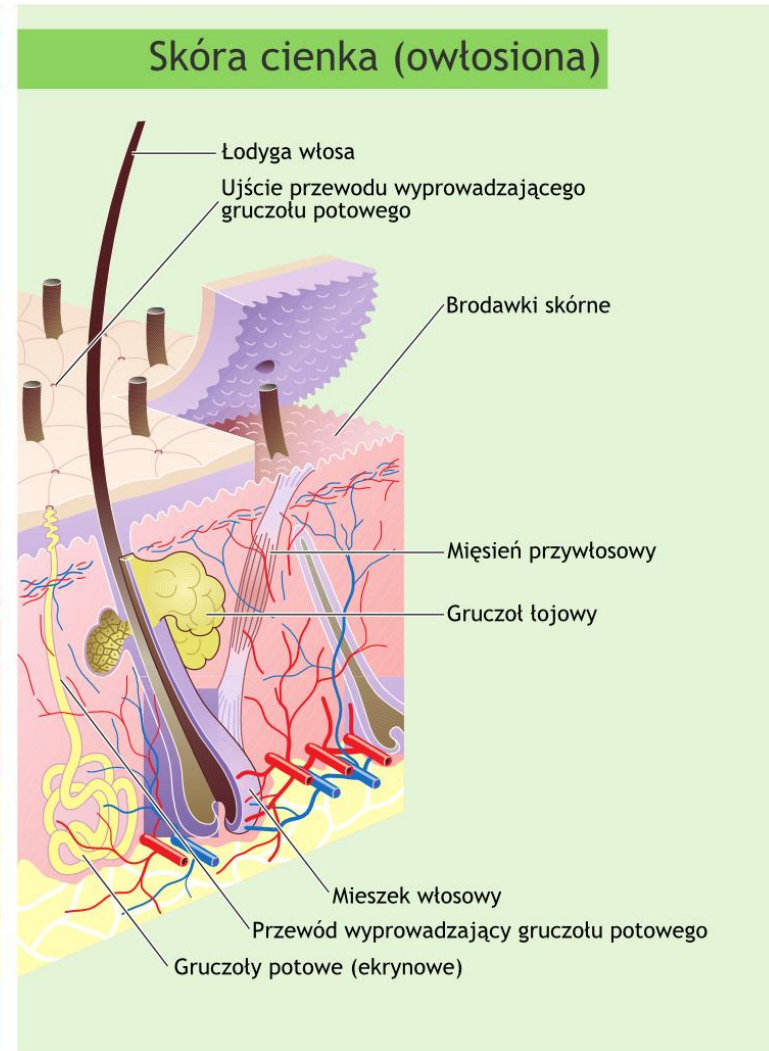
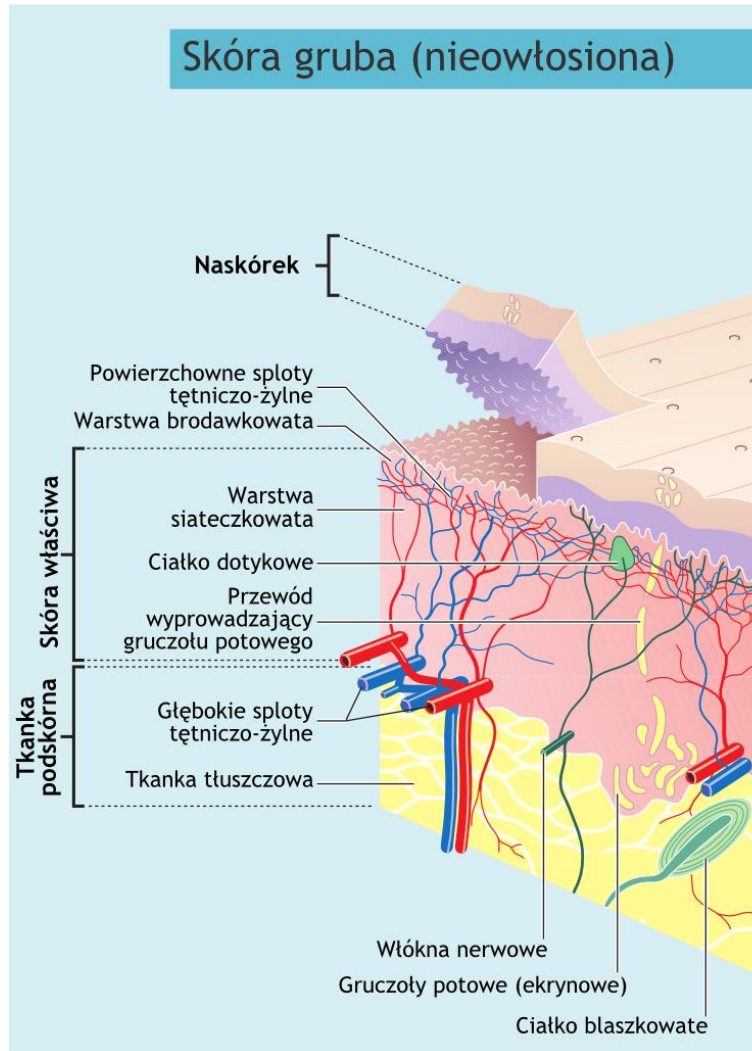
Los komórek

- Zmiany ekspresji genów w komórce determinują jej los:



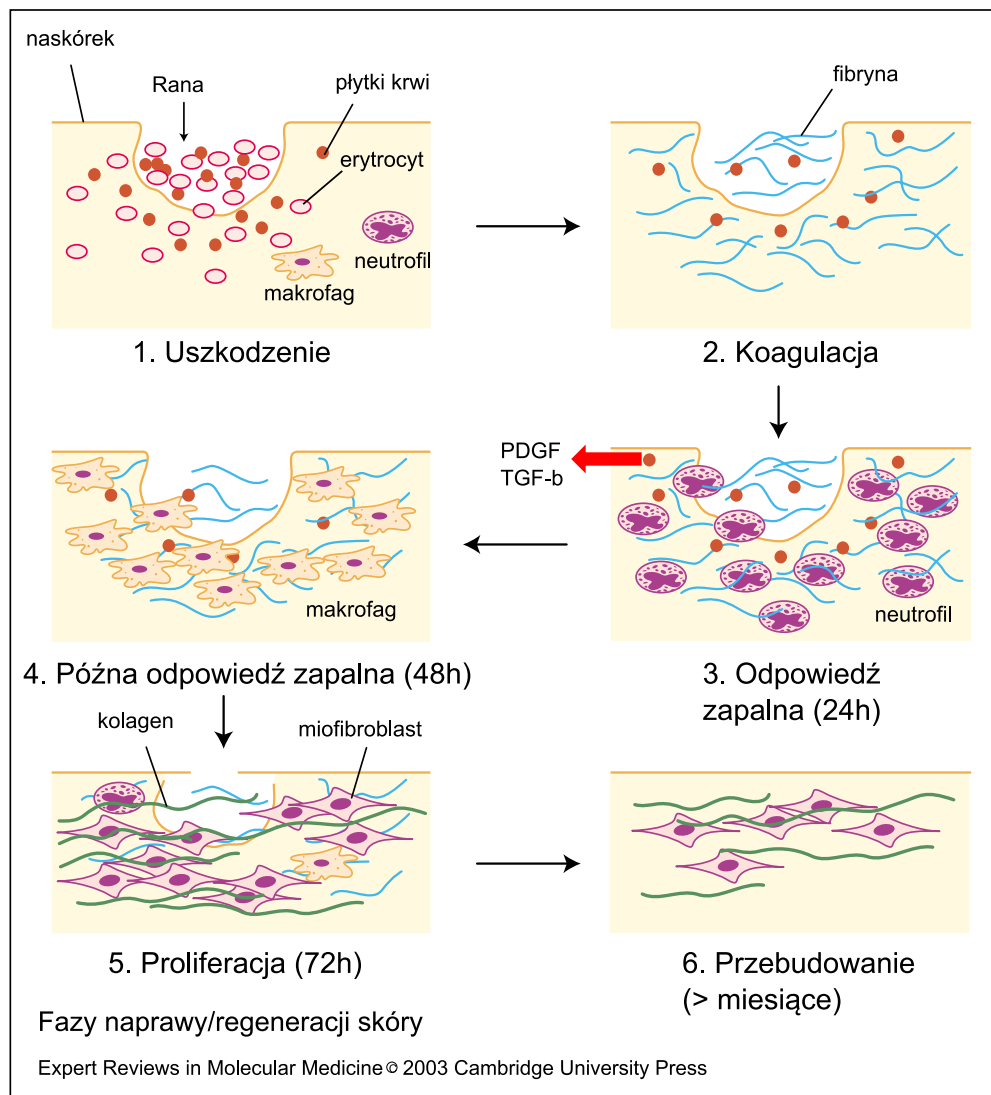
Los komórek : podział komórkowy

- Regeneracja skóry po uszkodzeniu jako przykład odnowienia tkanki



Los komórek : podział komórkowy

► Regeneracja skóry po uszkodzeniu jako przykład odnowienia tkanki



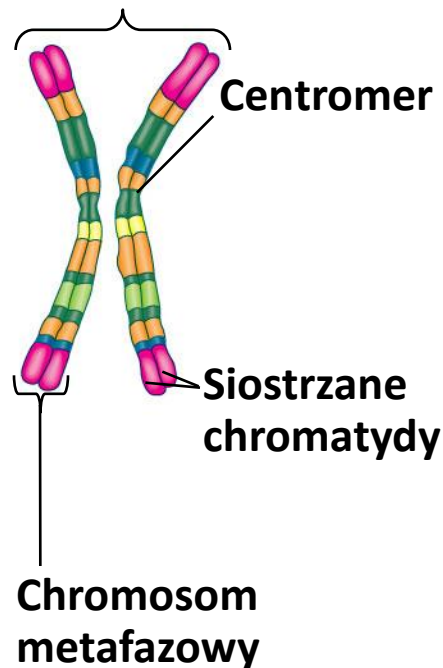
PDGF - płytkowy czynnik wzrostu

TGF- β - transformujący czynnik wzrostu β

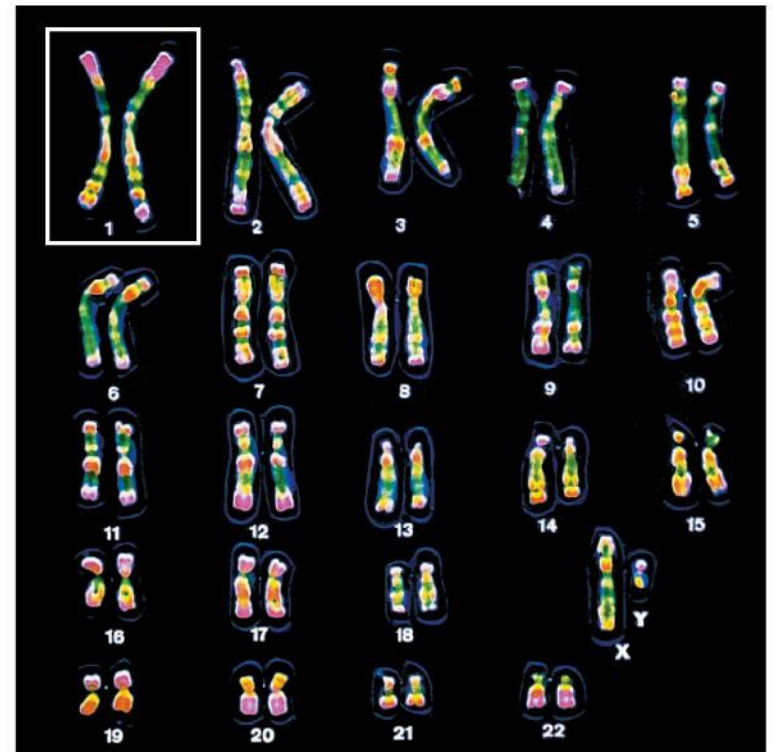
Los komórek : podział komórkowy

- ▶ Podział komórkowy generuje komórki potomne z identyczną informacją DNA
- ▶ Wyjątkiem jest **mejoza** – podział komórkowy, w wyniku którego powstają plemniki i komórki jajowe
- ▶ Całkowite DNA danego organizmu nazywane jest **genomem**
- ▶ DNA w jądrze jest zapakowane w struktury zwane **chromosomami**

Para homologicznych zduplikowanych chromosomów

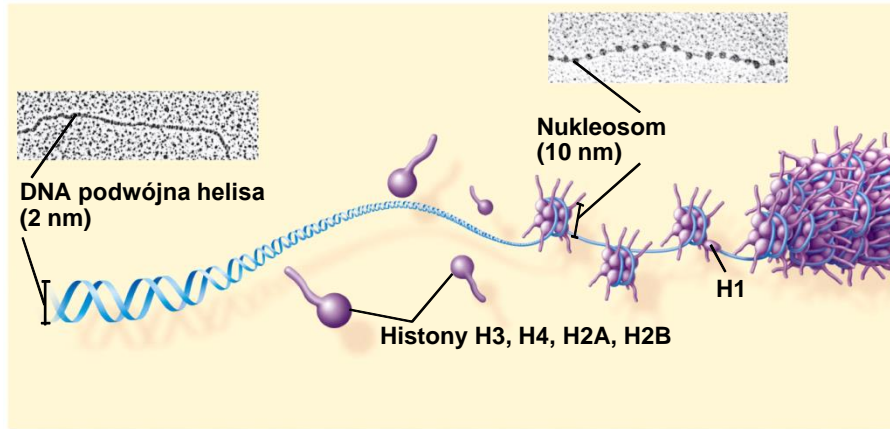


5 μm

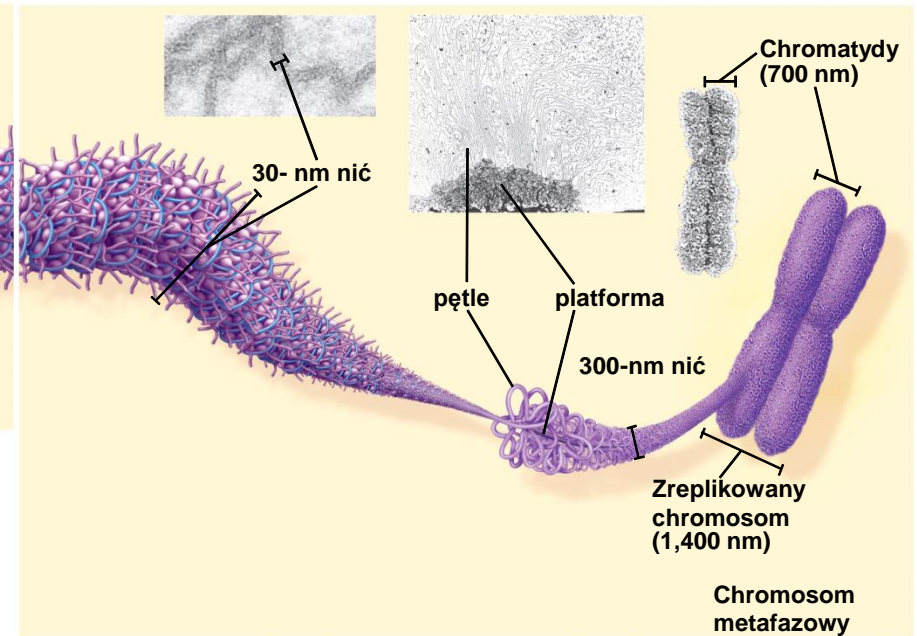


Los komórek : podział komórkowy

► Chromosomy eukariotyczne zbudowane są z **kompleksu DNA i białek** zwanej **chromatyną**, która podlega kondensacji w trakcie podziału komórkowego



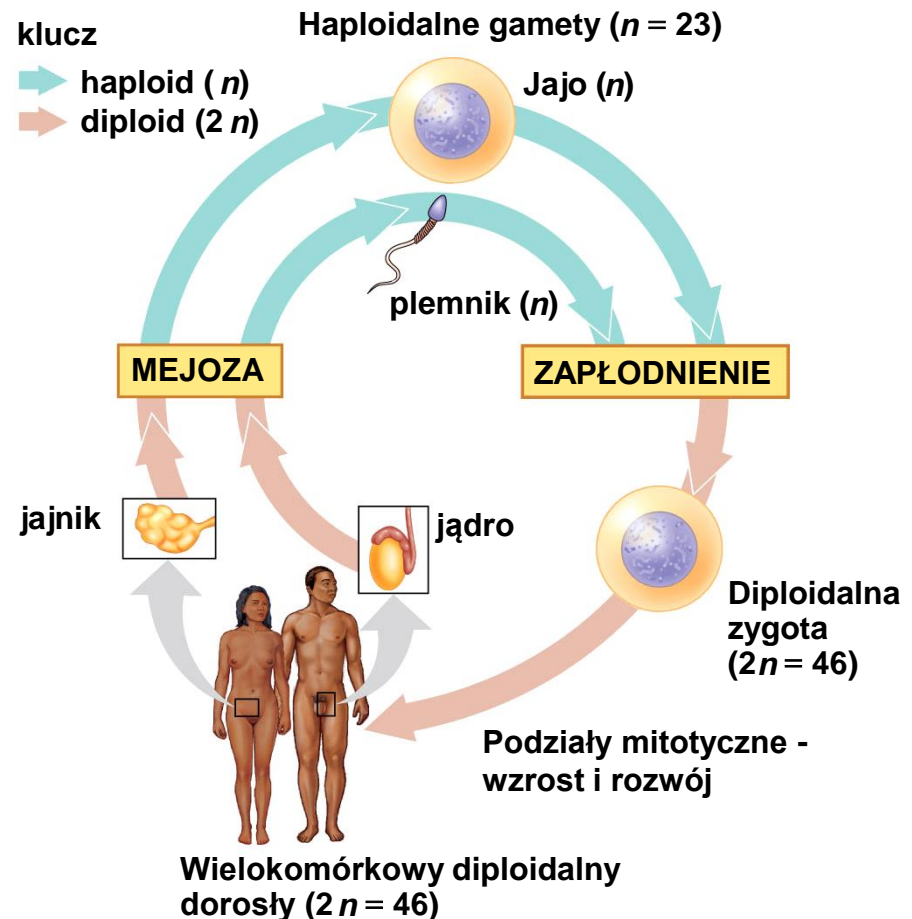
© 2011 Pearson Education, Inc.



© 2011 Pearson Education, Inc.

Los komórek : podział komórkowy

- ▶ Każdy gatunek eukariotyczny posiada charakterystyczną liczbę chromosomów w jądrze (człowiek $n=23$)
- ▶ **Komórki somatyczne** posiadają dwa zestawy chromosomów ($n=46$) mówimy, że są **diploidalne**
- ▶ Gamety posiadają pojedynczy zestaw ($n=23$) chromosomów mówimy, że są **haploidalne**
- ▶ **Chromosomy płciowe**, które determinują płeć, nazwane są **X** i **Y**
- ▶ **Kobiety** posiadają homologiczną parę chromosomu X (**XX**)
- ▶ **Mężczyźni** mają pojedynczy chromosom Y i X (**XY**)
- ▶ Pozostałe **22** pary chromosomów nazywamy **autosomami**

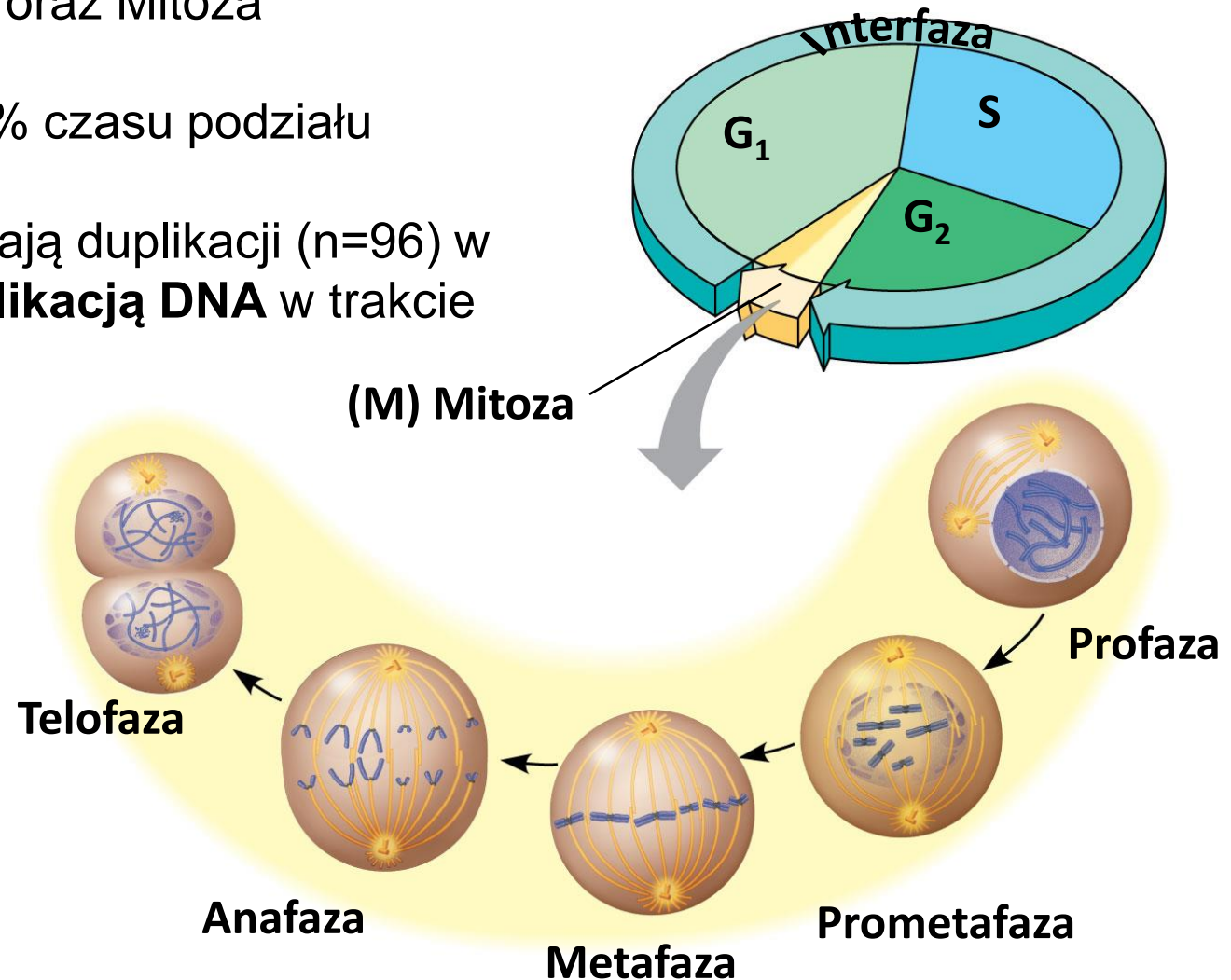


Los komórek : podział komórkowy

► Podział komórki eukariotycznej składa się z 4 etapów, których kolejność jest zawsze taka sama: G₁, S, G₂ (Interfaza), oraz Mitoza

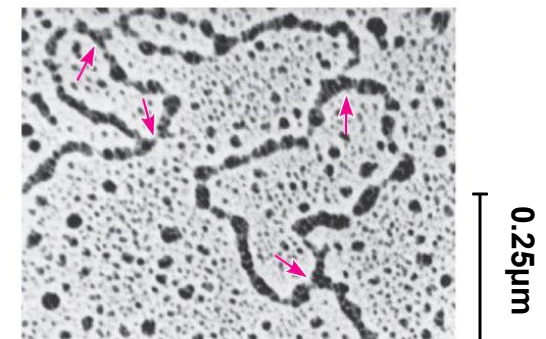
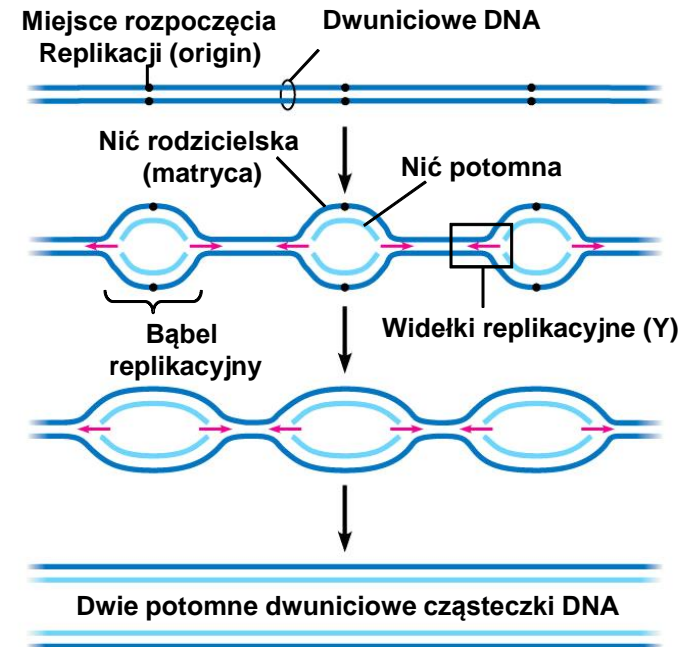
► Interfaza zajmuje 90% czasu podziału

► Chromosomy podlegają duplikacji ($n=96$) w procesie zwanym **replikacją DNA** w trakcie fazy S

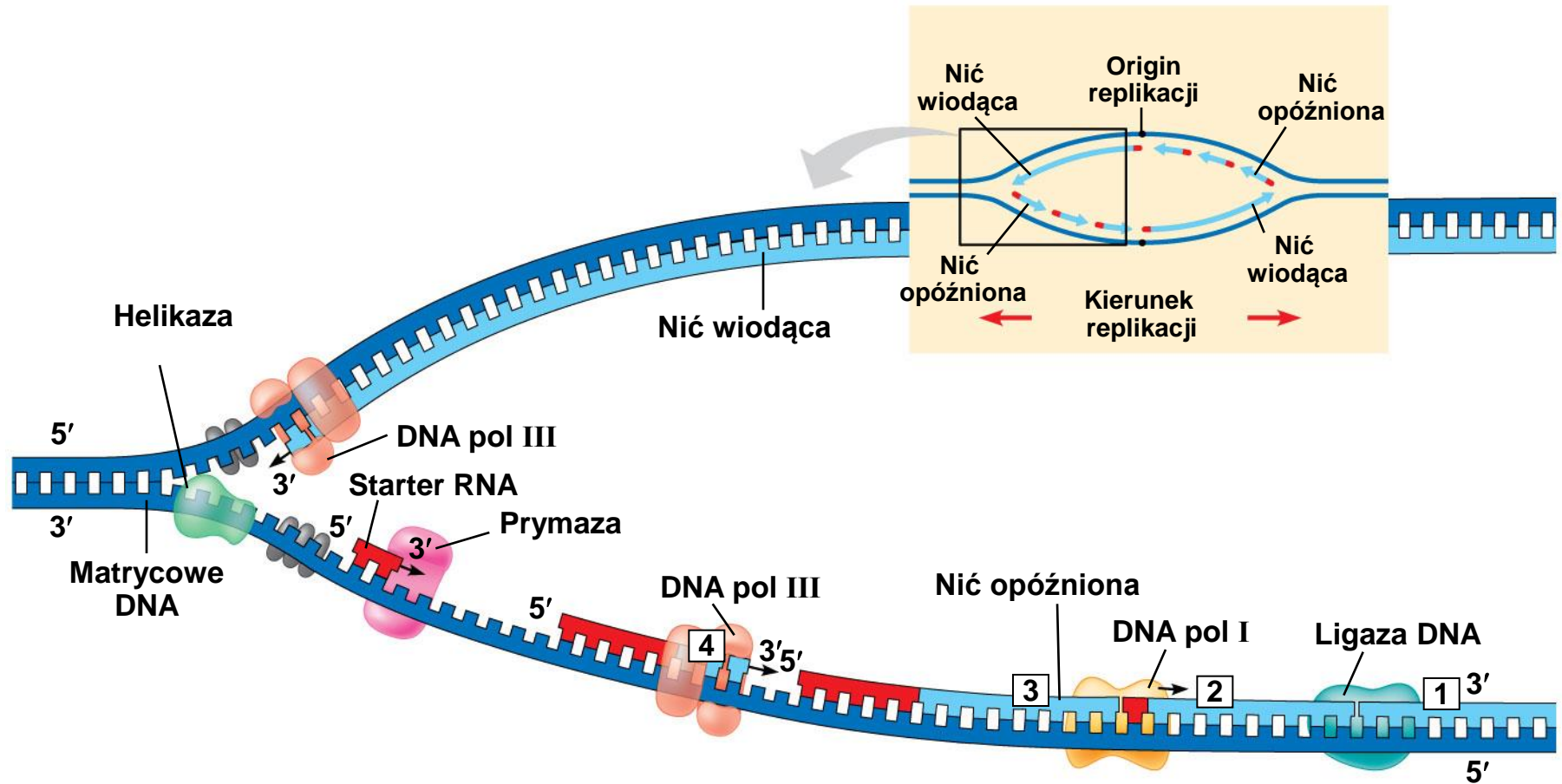


Los komórek : podział komórkowy – replikacja DNA

- ▶ Replikacja rozpoczyna się w specyficznych rejonach zwanych *origin* replikacji, w których dochodzi do rozłączenia nici DNA i powstania struktury bąbla
- ▶ Chromosom eukariotyczny może mieć setki a nawet tysiące *origin* replikacji
- ▶ Replikacja odbywa się w obu kierunkach to momentu skopiowania całej cząsteczki
- ▶ W proces zaangażowanych jest dziesiątki enzymów i białek: **helikazy** (rozwijają DNA), **topoizomerazy** (relaksują zwinięte DNA przez cięcie i łączenie nici) oraz **polimeraza DNA** katalizująca wydłużanie nowej nici DNA
- ▶ Szybkość kopiowania to ok. 500 nukleotydów na sekundę u bakterii i **50 nukleotydów na sekundę w komórkach ludzkich**
- ▶ Polimeraza DNA posiada mechanizm korekcji źle sparowanych nukleotydów – *proofreading*
- ▶ Przed podziałem komórkowym dodatkowe mechanizmy kontroli naprawiają błędy w DNA

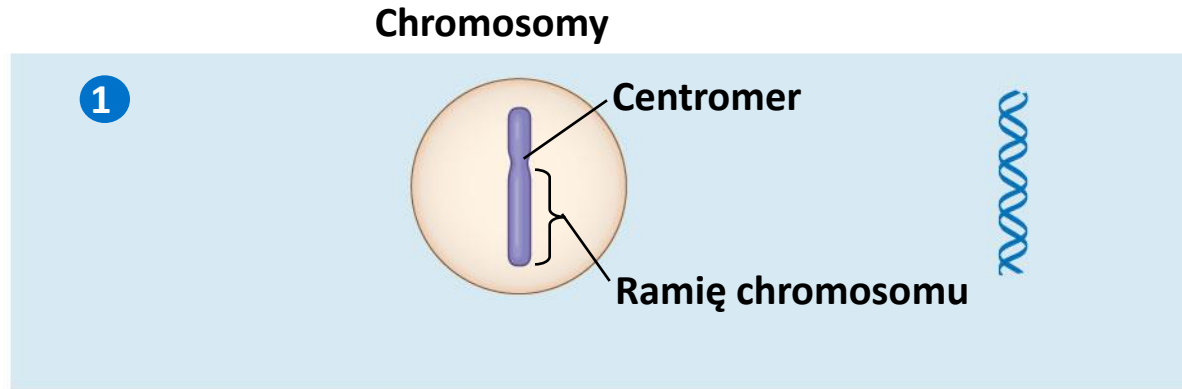


Los komórek : podział komórkowy – replikacja DNA



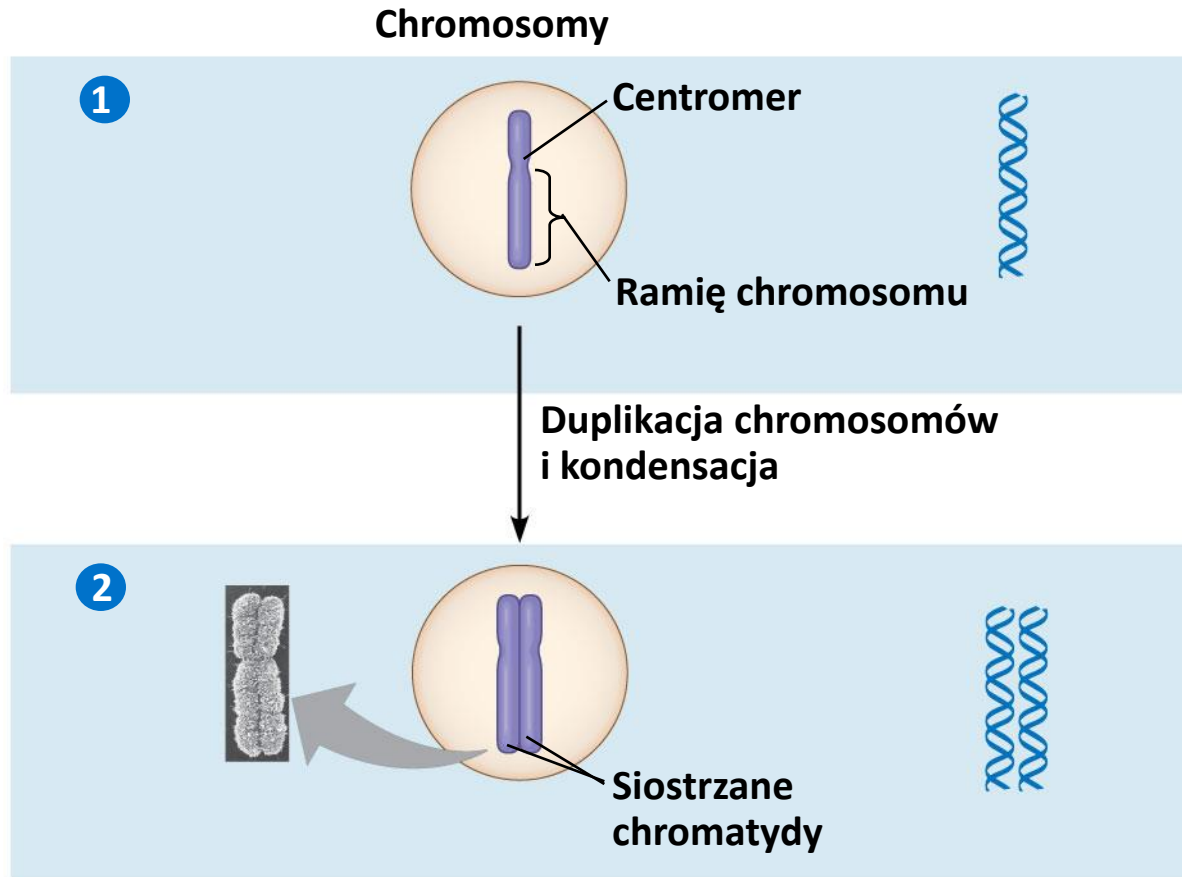
Los komórek : podział komórkowy

Mitoza



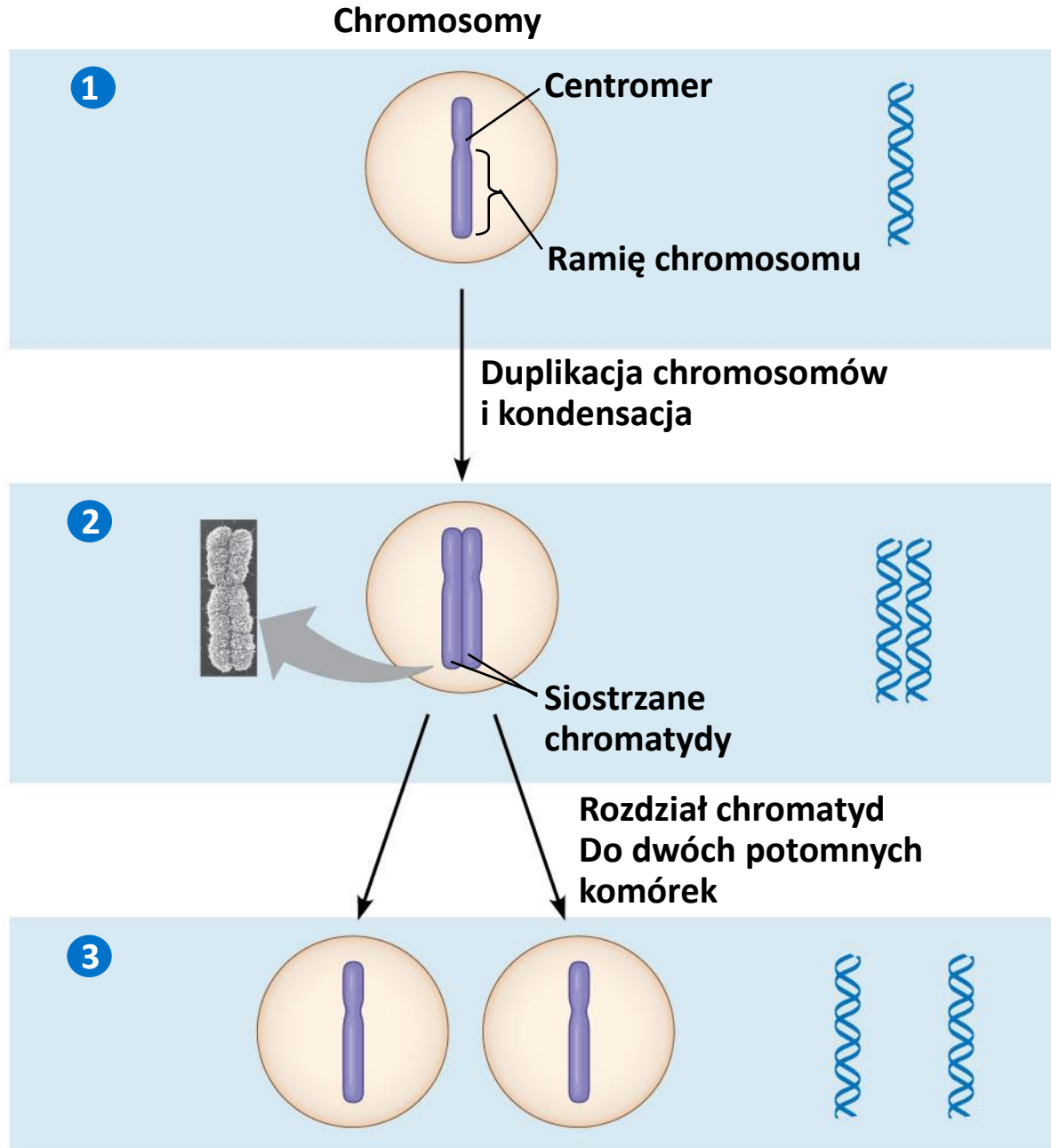
Los komórek : podział komórkowy

Mitoza



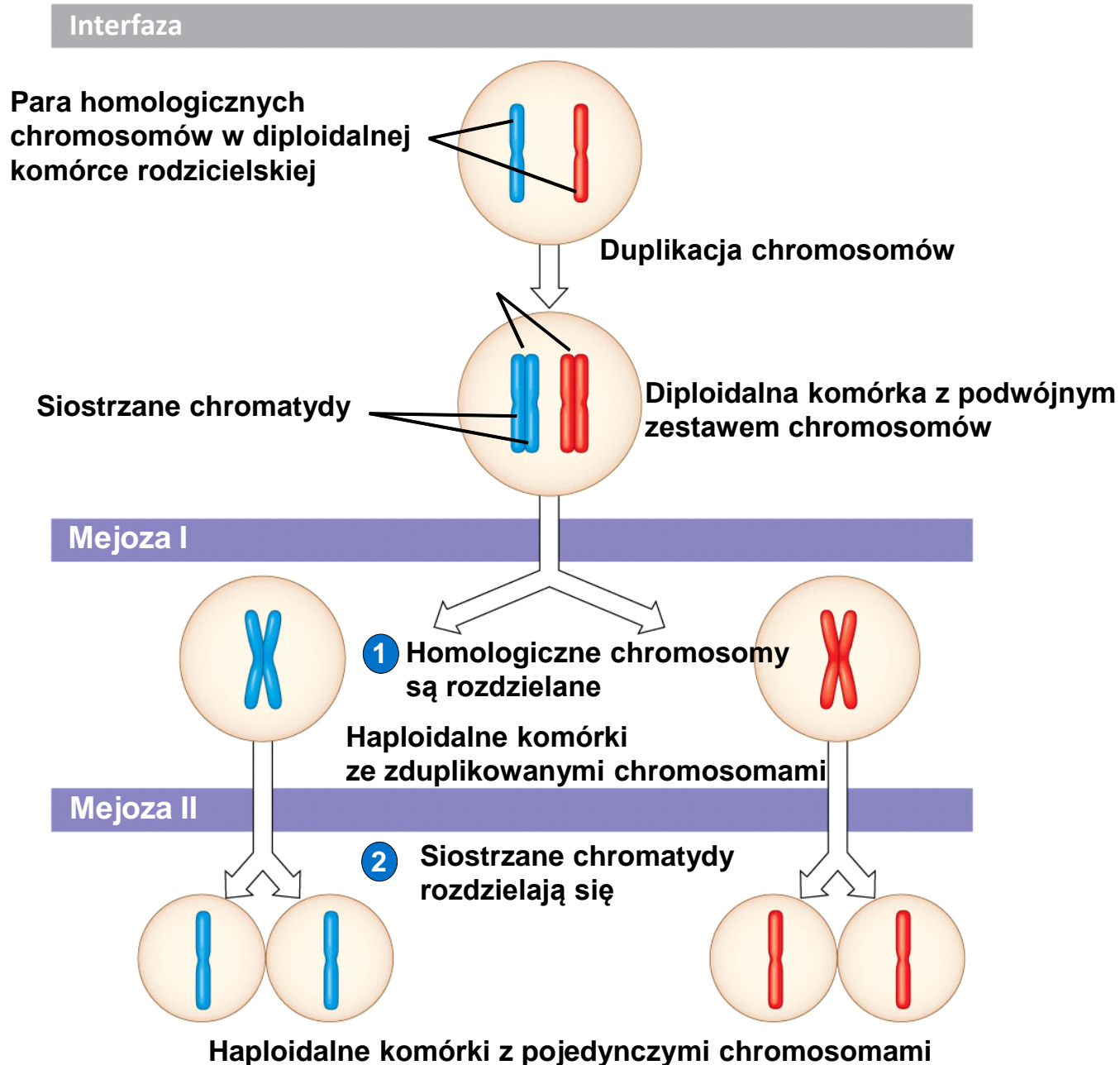
Los komórek : podział komórkowy

Mitoza



Los komórek : podział komórkowy

Mejoza

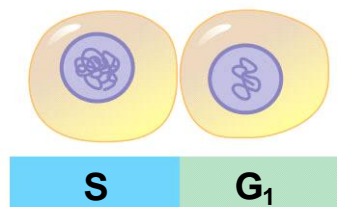


Regulacja cyklu komórkowego

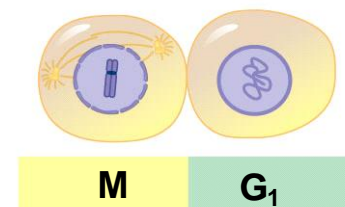
- ▶ Częstość podziałów różni się pomiędzy rodzajami komórek
- ▶ Podział komórki eukariotycznej jest regulowany przez molekularny system kontroli
- ▶ Dowody na istnienie systemu kontroli cyklu komórkowego pochodzą z doświadczenia gdzie przeprowadzano fuzje ssaczych komórek będących w różnych fazach cyklu komórkowego – powstały hybrydy z podwójnym jądrem

Eksperyment

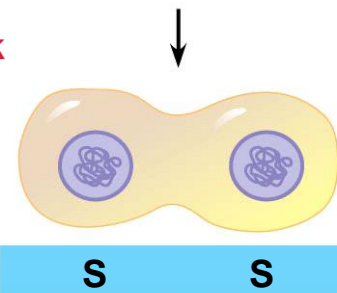
Eksperyment 1



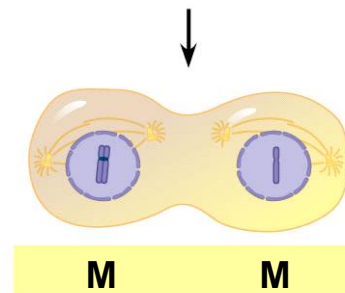
Eksperyment 2



Wynik



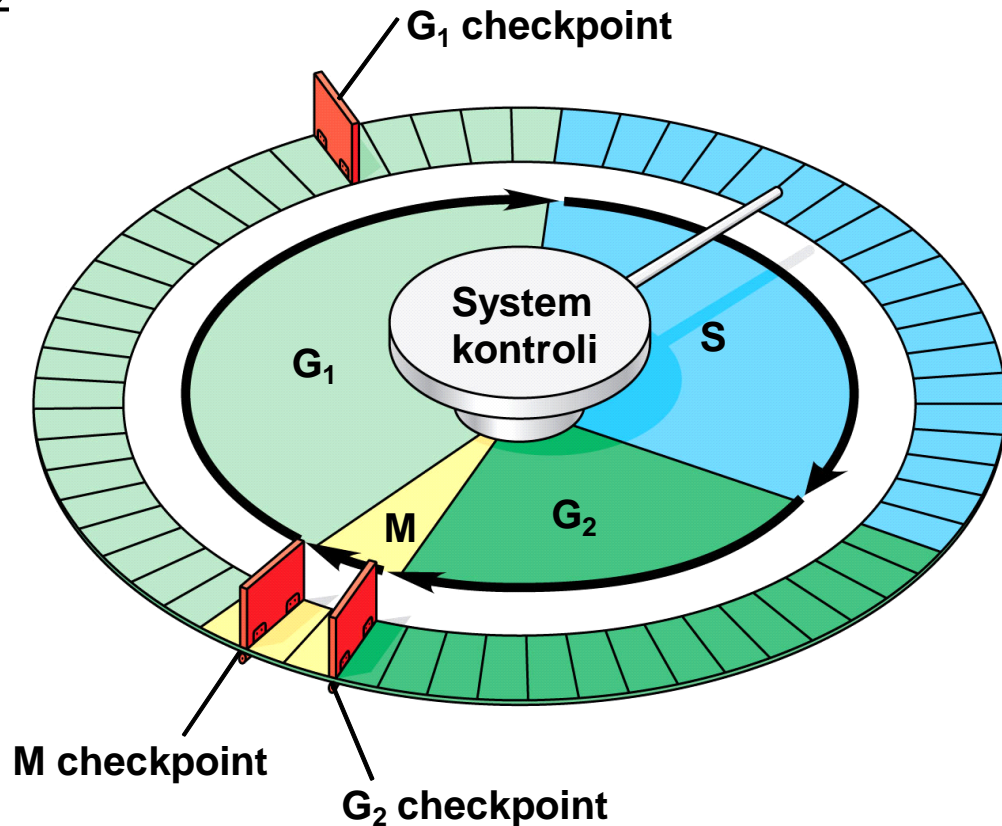
Fuzja komórek w fazie S i G₁ spowodowała natychmiastowe przejście jądra z fazy G₁ do S – nastąpiła synteza DNA



Fuzja komórek w fazie M i G₁ spowodowała natychmiastowe przejście jądra z fazy G₁ do M – rozpoczęła się mitozą pojawiło się wrzeciono podziałowe chromatyna skondensowała, ale nie nastąpiła synteza DNA

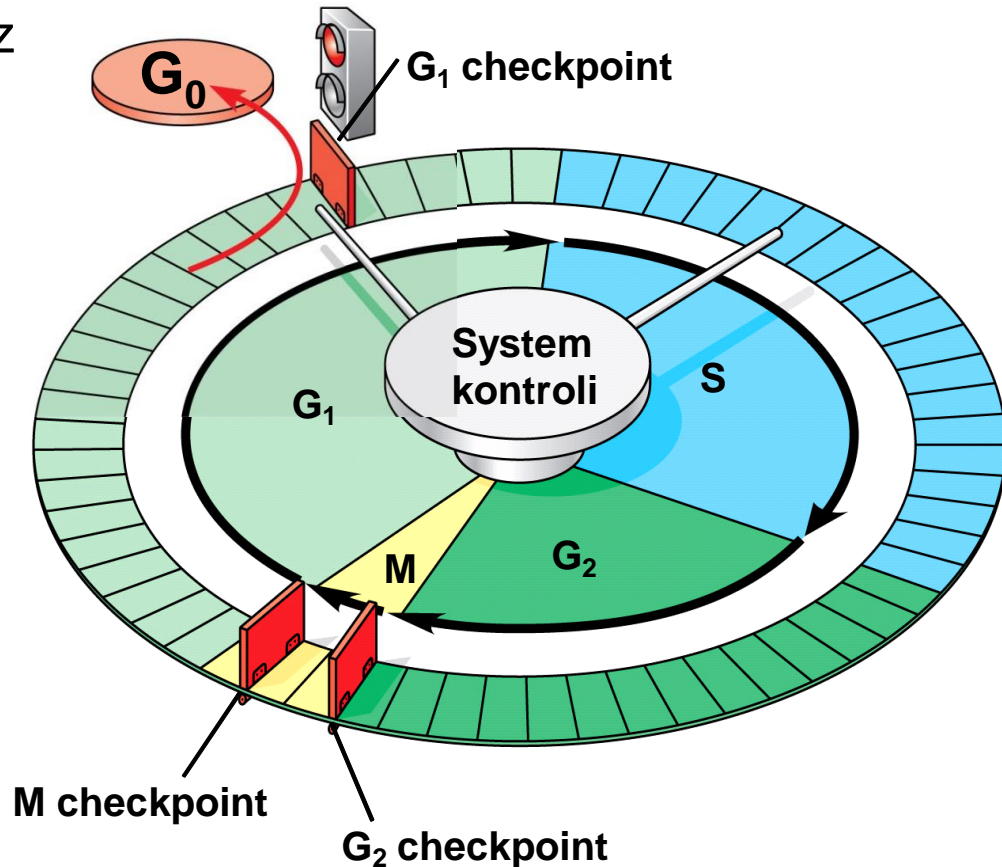
Regulacja cyklu komórkowego

- Sekwencja wydarzeń w cyklu komórkowym jest kontrolowana przez system, który przez analogię można porównać do zegara
- Zegar posiada specyficzne punkty kontrolne (**checkpoints**), w których cykl zatrzymuje się do momentu aż pojawi się sygnał zezwalający na przejście do kolejnej fazy
- Istotny jest punkt kontrolny **G₁**
- Jeśli komórka otrzyma sygnał na przejście przez **G₁** zazwyczaj dochodzi do zamknięcia cyklu i podziału komórki



Regulacja cyklu komórkowego

- Sekwencja wydarzeń w cyklu komórkowym jest kontrolowana przez system, który przez analogię można porównać do zegara
- Zegar posiada specyficzne punkty kontrolne (**checkpoints**), w których cykl zatrzymuje się do momentu aż pojawi się sygnał zezwalający na przejście do kolejnej fazy
- Istotny jest punkt kontrolny **G₁**
- Jeśli komórka otrzyma sygnał na przejście przez **G₁** zazwyczaj dochodzi do zamknięcia cyklu i podziału komórki
- Brak sygnału na **G₁** powoduje przejście w stan „bez podziałów” zwany fazą **G₀**
- Większość komórek ludzkiego ciała jest w fazie **G₀**

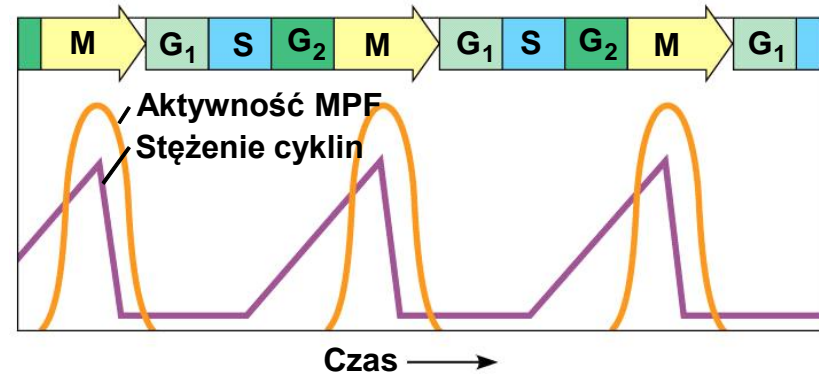


Regulacja cyklu komórkowego – cykliny i kinazy zależne od cyklin

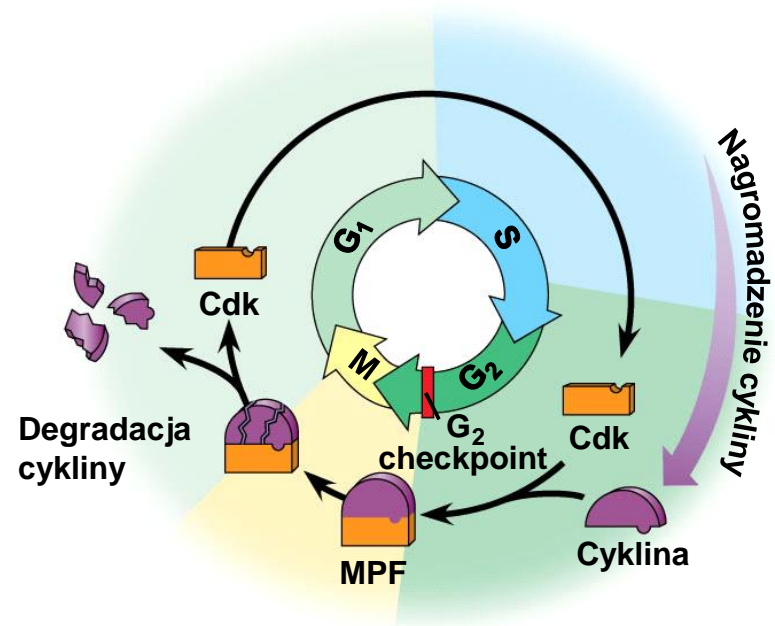
► Cykl komórkowy regulują dwa rodzaje białek: **cykliny** oraz **kinazy zależne od cyklin** – ang. *cyclin-dependent kinases* (**CDKs**)

► Aktywność **CDKs** zmienia się w trakcie cyklu gdyż jest kontrolowana przez cykliny, białka nazwane tak gdyż ich stężenie zależy od fazy cyklu komórkowego

► Kompleks **MPF** (ang. *maturation-promoting factor*) powstaje z połączenia **cyklina-CDK** i wyzwala przejście z fazy G₂ do M



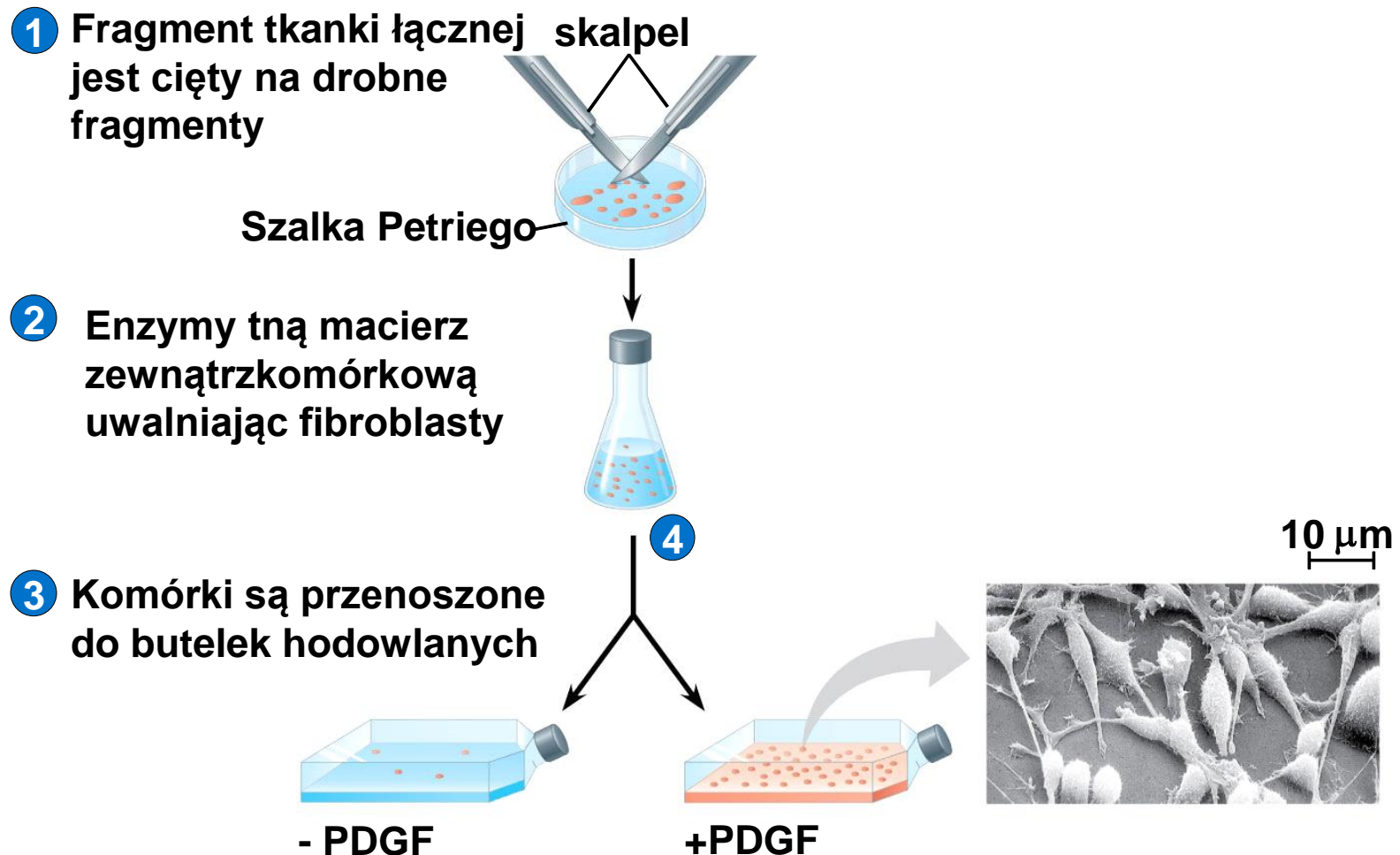
(a) Zmiana aktywności kompleksu MPF oraz stężenia cyklin w trakcie cyklu komórkowego



(b) Mechanizm molekularny kontrolujący cykl komórkowy

Regulacja cyklu komórkowego – czynniki wzrostu

- Sygnały zewnętrzne pod postacią białek wydzielanych przez jedne komórki mogą inicjować podział komórkowy innych komórek
- Płytkowy czynnik wzrostu ang. *platelet-derived growth factor* (**PDGF**) stymuluje podziały ludzkich fibroblastów rekrutowanych do rany oraz w hodowli



Regulacja cyklu komórkowego – przyleganie i inhibicja kontaktowa

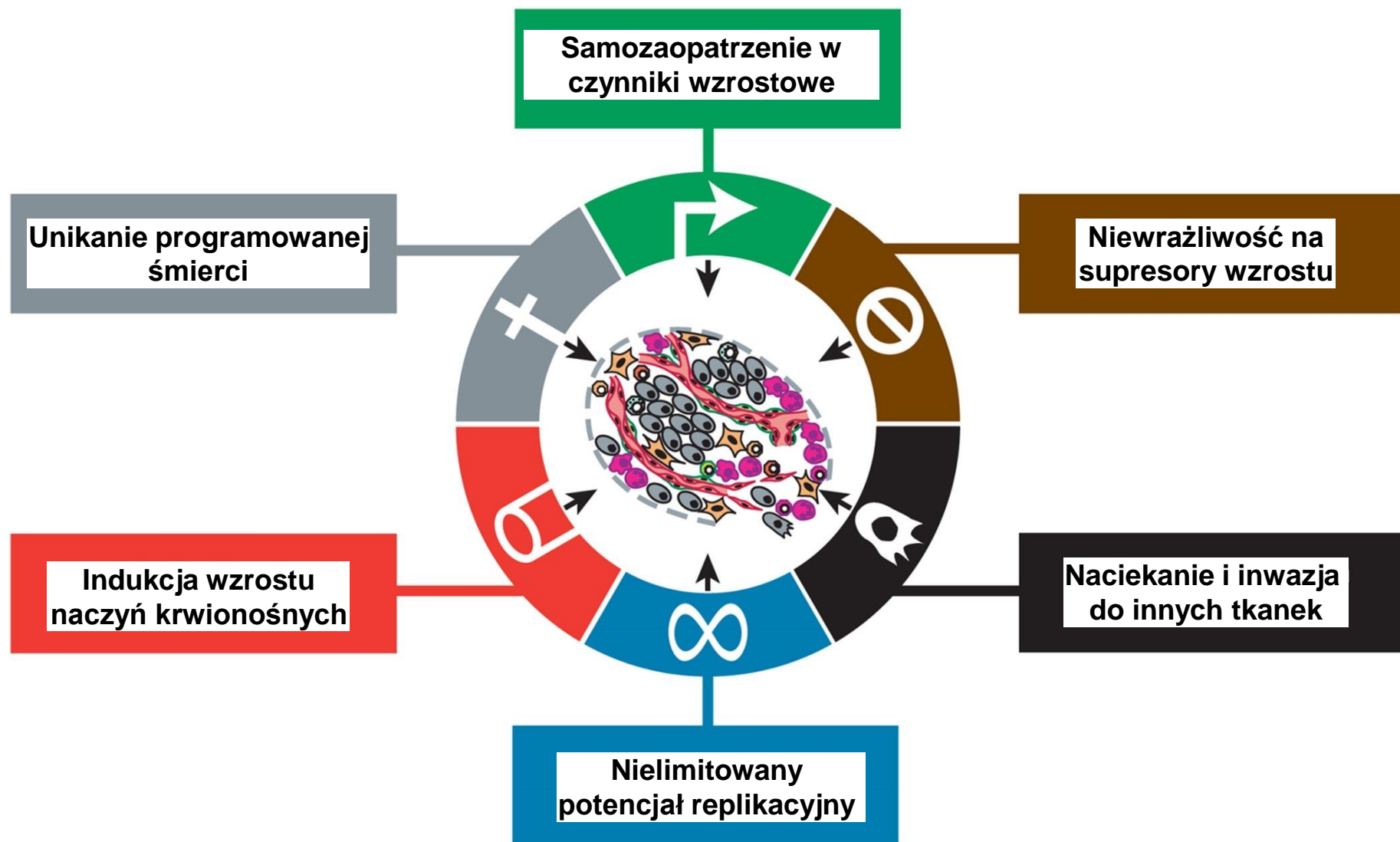
- ▶ Przykładem sygnałów zewnętrznych regulujących podziały komórkowe jest **inhibicja kontaktowa** – ograniczanie gęstości komórek
- ▶ Również podłoże warunkujące odpowiednie **przyleganie** jest konieczne dla podziałów większości komórek zwierzęcych
- ▶ **Komórki nowotworowe nie wykazują konieczności przylegania i nie podlegają inhibicji kontaktowej**



Cechy raka

- ▶ Rak - ~100 chorób, które charakteryzuje nowotworowa przemiana nabłonka - neoplazja (dysplazja)
- ▶ Komórka prawidłowa zamienia się w nowotworową procesie nazywanym **transformacją**
- ▶ Nie dziedziczymy raka, a podatność na zachorowanie
- ▶ Rak jest nabytą chorobą wielogenową; pojedyncza mutacja nie wystarczy do rozwoju/podtrzymania raka, choć może go inicjować
- ▶ Nieliczne zespoły genetyczne są związane ze 100% ryzykiem powstania nowotworu
- ▶ Białkowe produkty „**genów raka**” odgrywają kluczowe role w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych oraz sygnalizacji międzykomórkowej

Cechy raka



Cechy raka - mutacje

► Komórki nowotworowe nie odpowiadają na mechanizm kontroli podziałów – posiadają **mutacje** w genach kodujących białka regulujące cykl komórkowy

► Rodzaje mutacji

- utrata, nabycie, rearanżacje chromosomu(ów)
- utrata lub nabycie krótkich sekwencji nukleotydowych
- zamiana, insercja bądź delecja pojedynczych nukleotydów z sekwencji DNA

► Powstałe naturalnie

► Źle sparowany nukleotyd jest wstawiany do powielanej nici DNA raz na 10^5 - 10^6 nowowłączanych nukleotydów → 30 tys. błędów w sekwencji zreplikowanego DNA. Błędy są naprawiane przed podziałem, ale nie zawsze w całości.

► Indukowane czynnikami środowiska

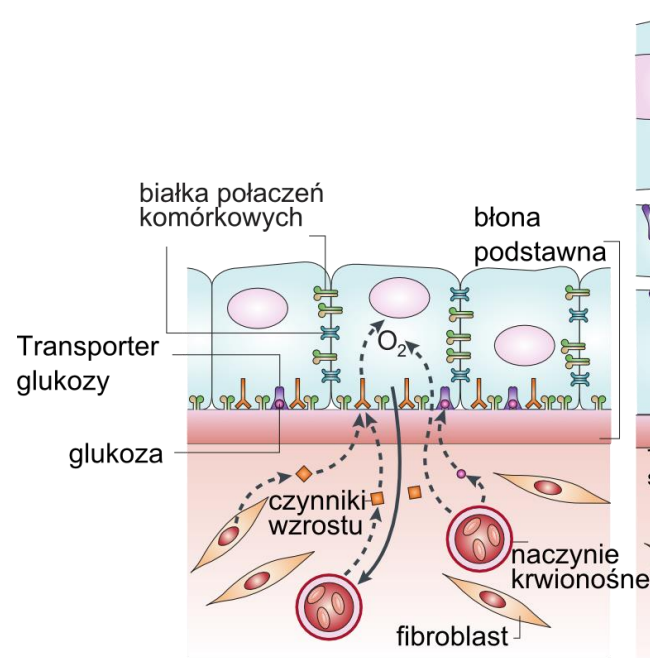
► Uszkodzenia DNA przez mutageny



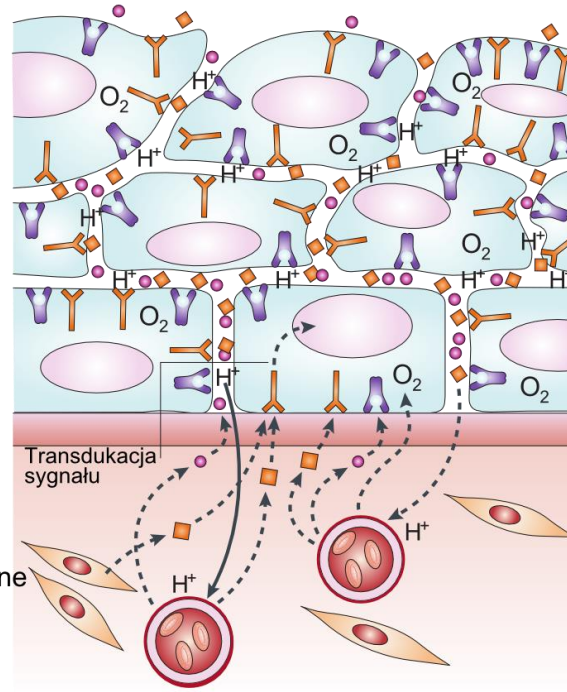
FIGURE 9.33 DNA and Biotechnology Autorzy: Molly Fitzgerald-Hayes and Frieda Reichsman

Utrata regulacji cyklu komórkowego w raku

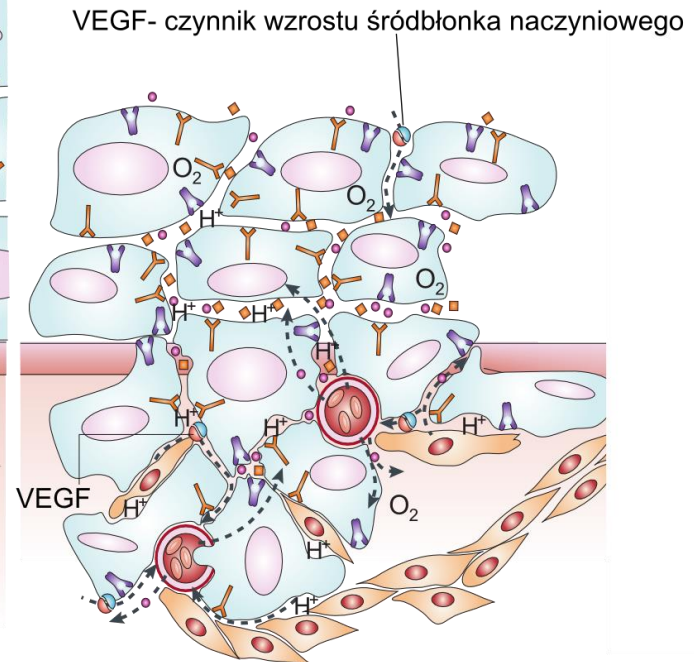
1. Nabłonek prawidłowy



2. Nabłonek dysplastyczny nowotwór łagodny (benign)



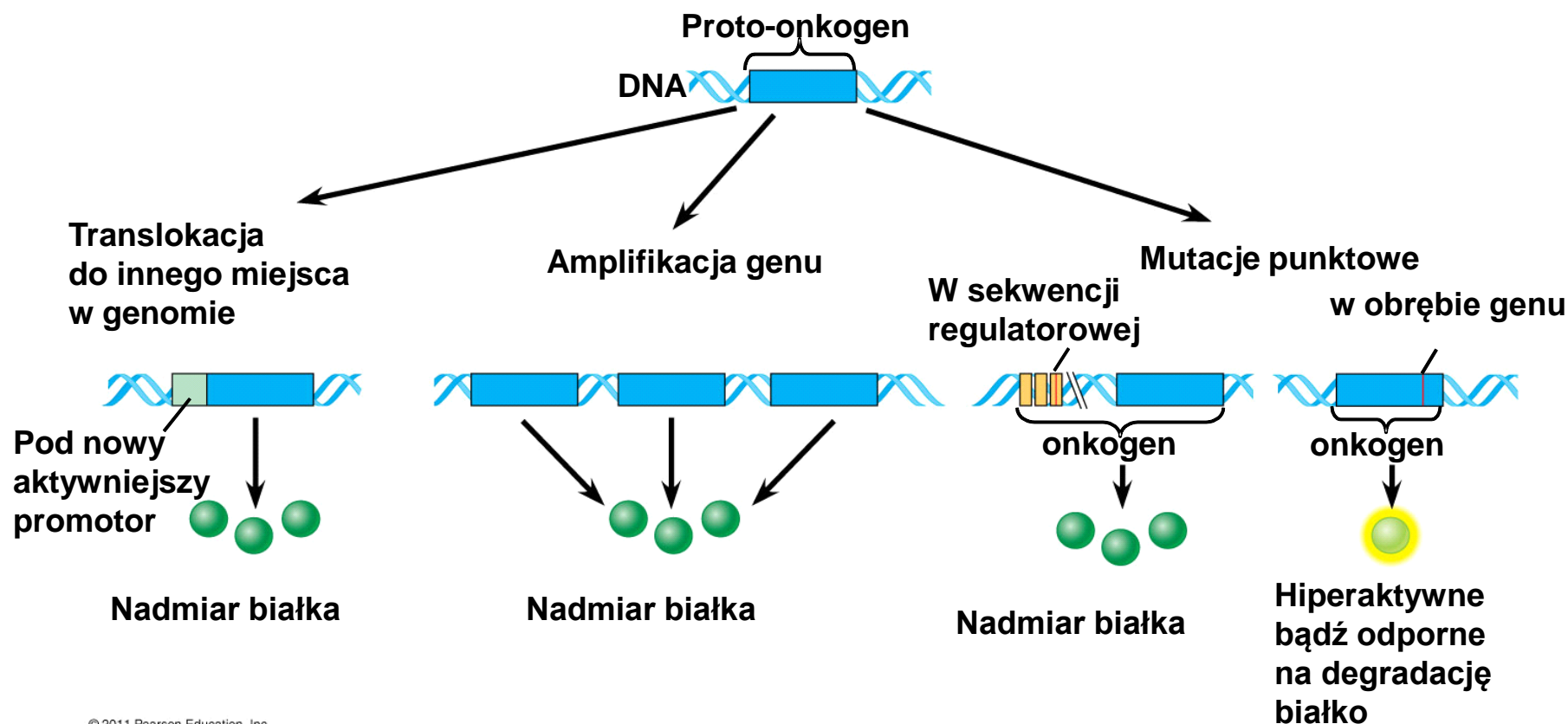
3. Nowotwór złośliwy (malignant) mikroinwazja do tkanek sąsiadujących



- ▶ Komórki nowotworowe niewyeliminowane przez układ odpornościowy mogą tworzyć **guzy**, skupiska komórek raka w obrębie prawidłowej tkanki
- ▶ Nowotwór często nie potrzebuje czynników wzrostowych
 - Wytwarza własne czynniki wzrostu
 - Może „udawać” sygnalizację od czynnika wzrostu bez tego czynnika
- ▶ Nowotwór złośliwy zasiedla sąsiadujące tkanki i może podlegać rozsiewowi, **metastazji** do innych organów

Utrata regulacji cyklu komórkowego w raku – onkogeny

- ▶ **Onkogeny** – geny wywołujące transformację nowotworową
- ▶ **Proto-onkogeny** to prawidłowe wersje genów kontrolujących wzrost i podziały komórkowe
- ▶ Konwersja proto-onkogeny w onkogen może wywołać nieprawidłowy przebieg cyklu komórkowego
- ▶ Możliwe scenariusze zamiany:

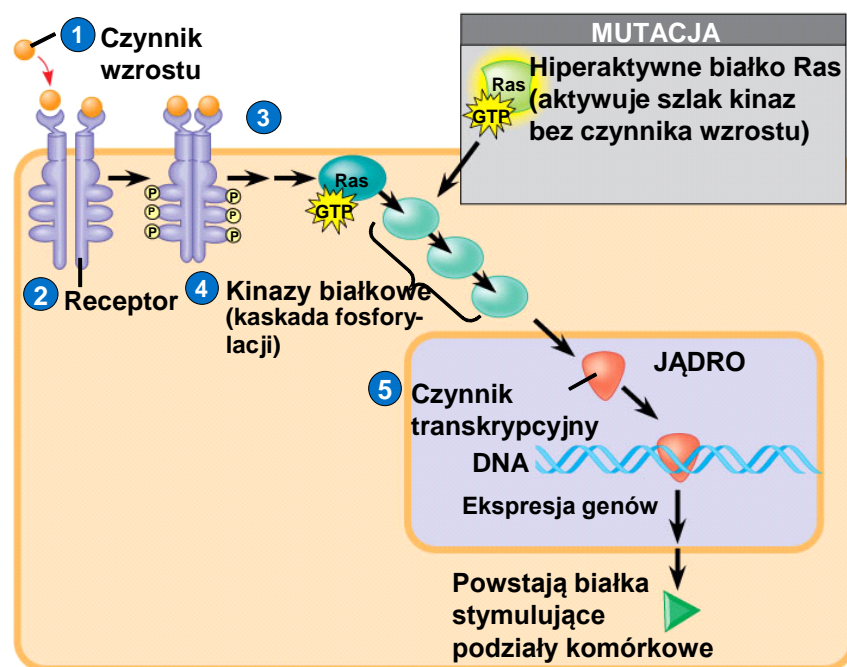


Utrata regulacji cyklu komórkowego w raku – geny supresorowe

- ▶ Obok genów których produkty stymulują podziały komórkowe komórki zawierają **geny supresorowe** kodujące białka hamujące cykl komórkowy, zapobiegające niekontrolowanym podziałom
- ▶ Mutacje w genach supresorowych zmieniających aktywność bądź ilość białka oraz mogą się przyczynić do transformacji nowotworowej
- ▶ Białka supresorowe pełnią różne funkcje np.:
 - Naprawa uszkodzonego DNA
 - Kontrola adhezji komórkowej
 - Kontrola i hamowanie cyklu komórkowego
- ▶ Następstwa mutacji protoonkogenów i genów supresorowych guza są podobne: **zaburzają równowagę między proliferacją a utratą komórek**

Utrata regulacji cyklu komórkowego w raku

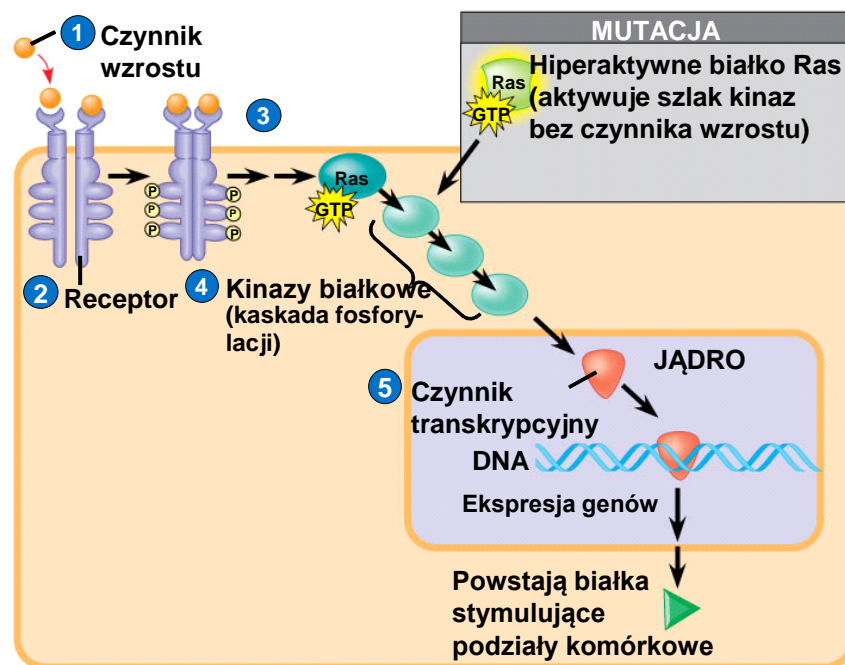
- ▶ Białka kodowane przez proto-onkogeny i geny supresorowe są ważnymi składnikami szlaków sygnałowych w komórce
- ▶ Mutacje proto-onkogenu **Ras** i genu supresorowego **p53** często występują w nowotworach człowieka
- ▶ Mutacje w genie **Ras** i **p53** występują odpowiednio u ok. **30%** i **50%** ludzkich raków



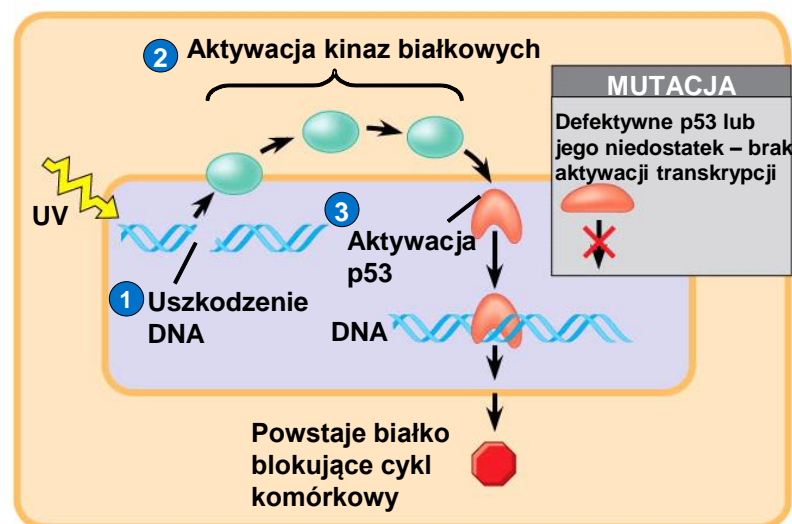
(a) Szlak aktywujący cykl komórkowy

Utrata regulacji cyklu komórkowego w raku

- ▶ Białka kodowane przez proto-onkogeny i geny supresorowe są ważnymi składnikami szlaków sygnałowych w komórce
- ▶ Mutacje proto-onkogenu **Ras** i genu supresorowego **p53** często występują w nowotworach człowieka
- ▶ Mutacje w genie **Ras** i **p53** występują odpowiednio u ok. **30%** i **50%** ludzkich raków



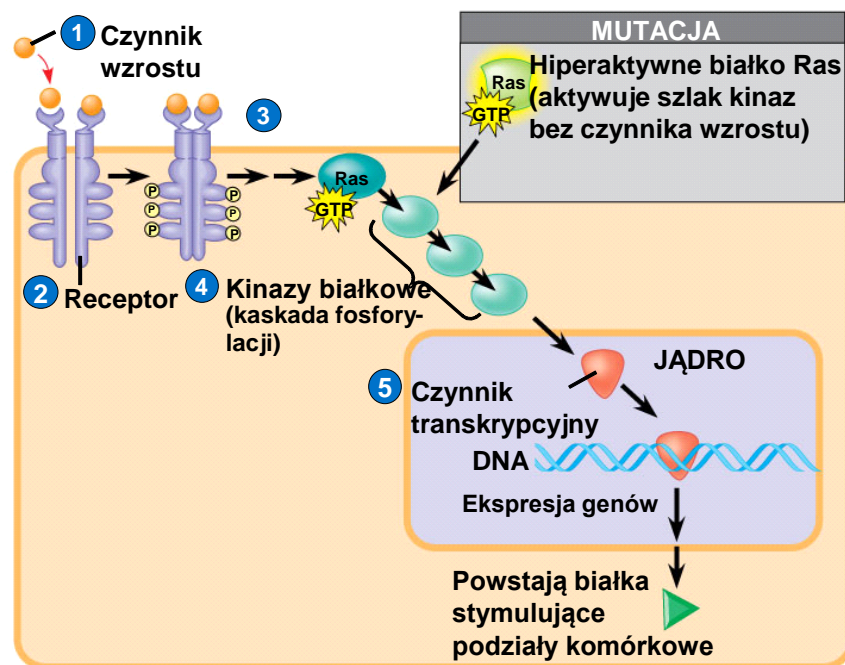
(a) Szlak aktywujący cykl komórkowy



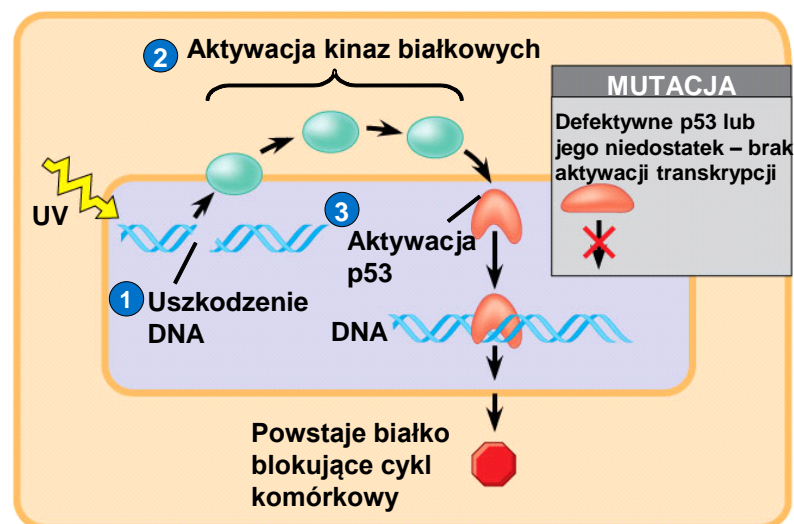
(b) Ścieżka blokująca cykl komórkowy

Utrata regulacji cyklu komórkowego w raku

- ▶ Białka kodowane przez proto-onkogeny i geny supresorowe są ważnymi składnikami szlaków sygnałowych w komórce
- ▶ Mutacje proto-onkogenu **Ras** i genu supresorowego **p53** często występują w nowotworach człowieka
- ▶ Mutacje w genie **Ras** i **p53** występują odpowiednio u ok. **30%** i **50%** ludzkich raków



(a) Szlak aktywujący cykl komórkowy

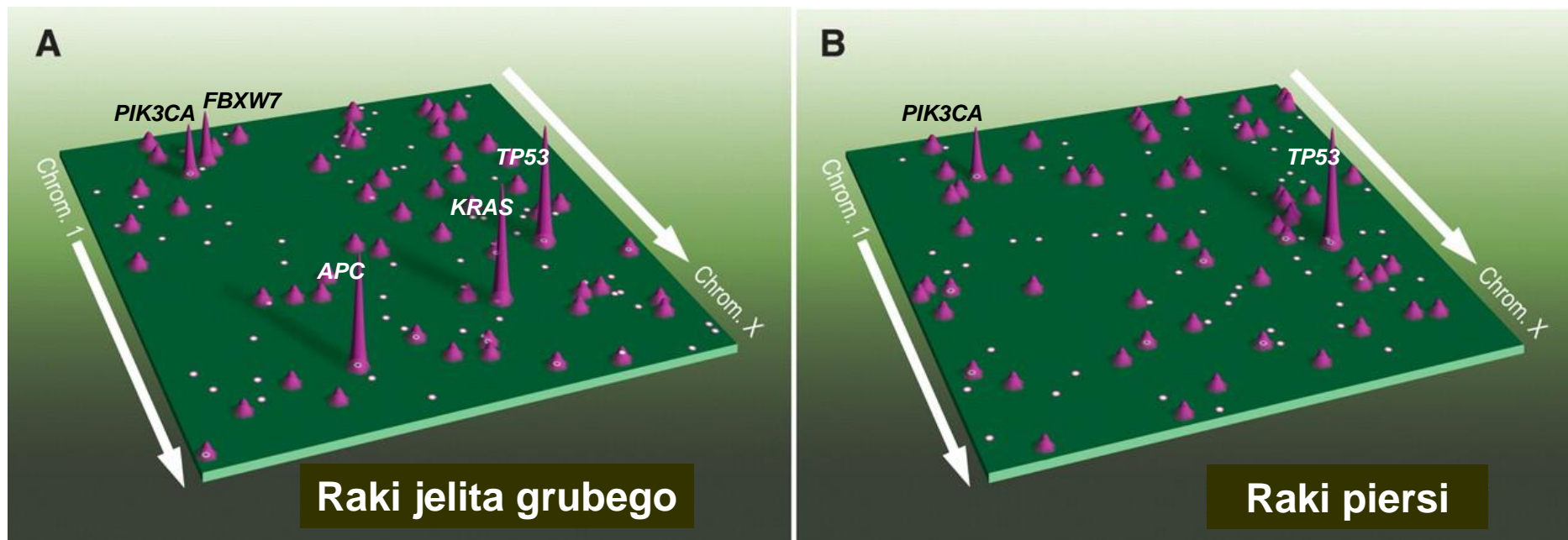


(b) Ścieżka blokująca cykl komórkowy



Heterogenność genetyczna w raku

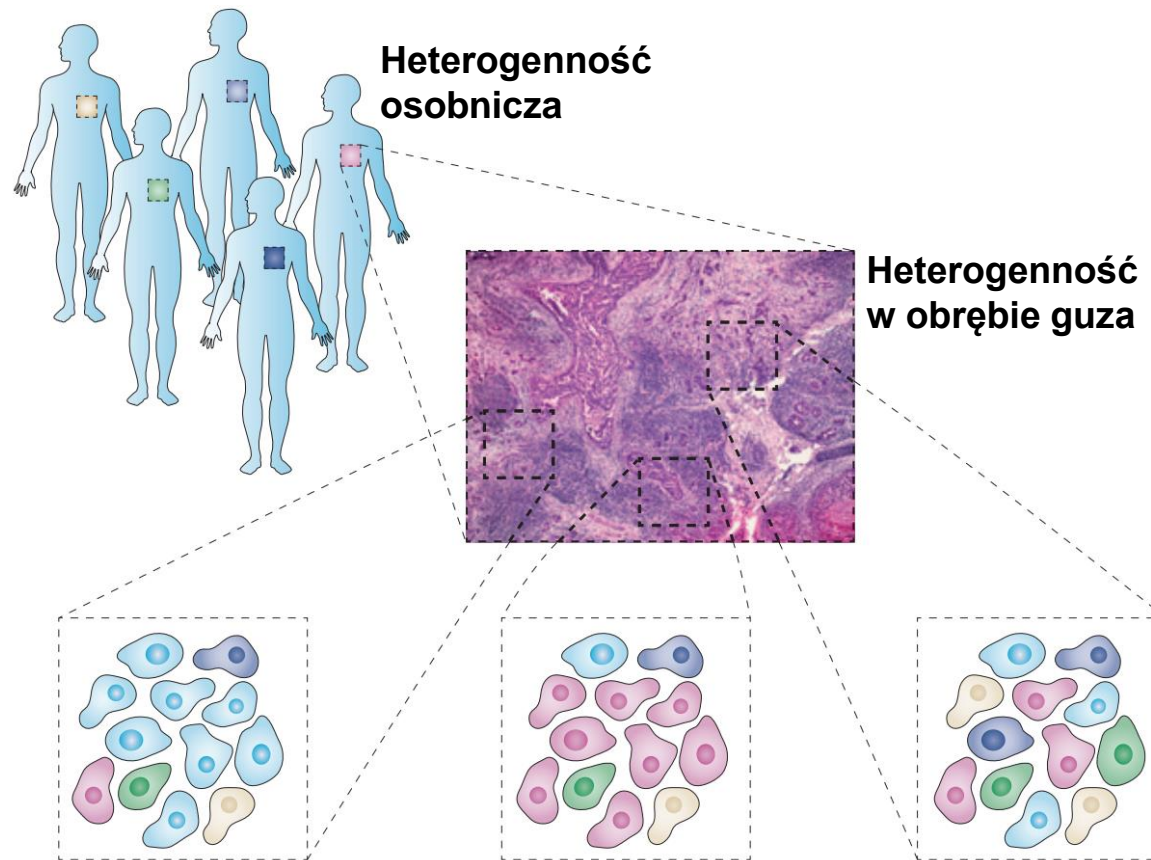
- ▶ W 2007 roku zsekwencjonowano części kodujące ~18 200 genów w 11 rakach piersi i 11 rakach jelita grubego
- ▶ Zidentyfikowano 2185 somatycznych mutacji w 1885 genach
- ▶ >200 mutacji dotyczyło „genów raka”, inne były mutacjami „towarzyszącymi”
- ▶ W każdym z raków znaleziono ~80 różnych mutacji somatycznych, w tym 15-20 mutacji „genów raka”



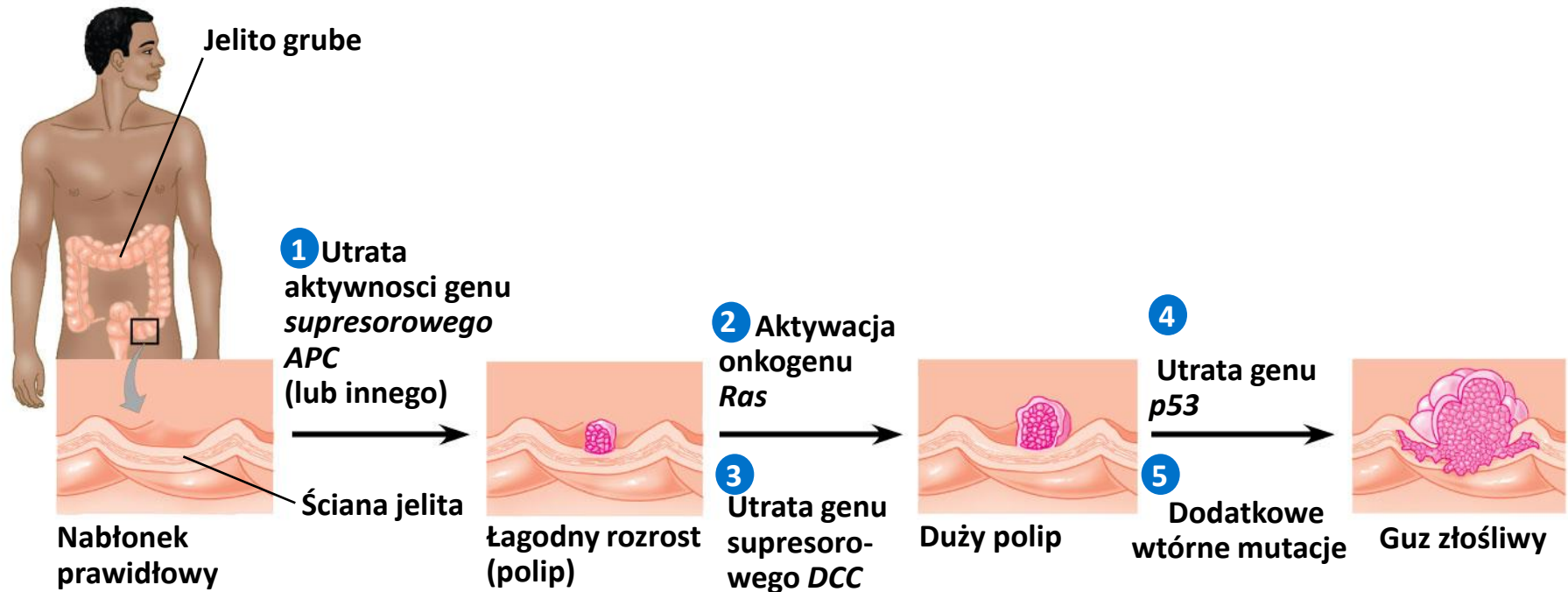
Wood *et al.* The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007;318:1108

Heterogenność genetyczna w raku

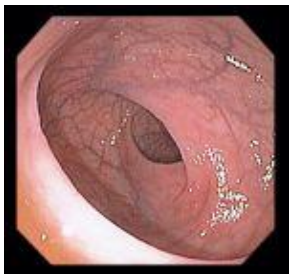
- ▶ Nie ma dwóch identycznych raków
- ▶ Narastanie **niestabilności genetycznej** sprzyja powstawaniu **kolejnych mutacji** i pojawianiu się **kolejnych klonów** komórek raka
- ▶ Ma to konsekwencje dla doboru sposobu leczenia i jego efektywności



Wieloetapowy model rozwoju raka – rak jelita grubego (RJG)



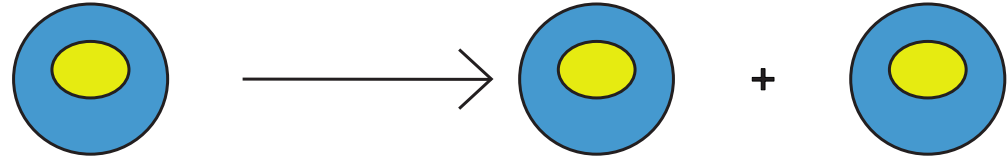
© 2011 Pearson Education, Inc.



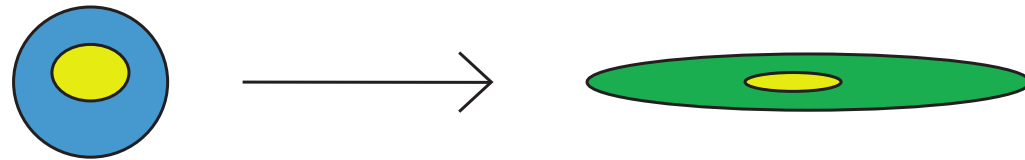
Los komórek - różnicowanie komórek

► Zmiany ekspresji genów w komórce determinują jej los:

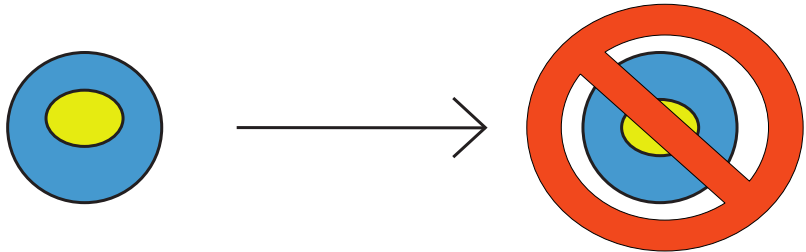
► **Podział komórkowy** – Mitoza
(dwie identyczne potomne komórki)



► **Różnicowanie komórek** –
zmiana struktury i specjalizacja
komórek do pełnienia określonych
funkcji



► **Programowana śmierć komórki**
- apoptoza



Los komórek - różnicowanie komórek

- ▶ Różnicowanie komórek: proces w którym komórki nabywają zdolność do pełnienia wyspecjalizowanych funkcji. **Odróżnicowanie jest stabilne.**
- ▶ **Różnicowanie jest procesem ciągłym u dorosłego organizmu.** Organizm żyje dłużej niż jego pojedyncze komórki. Po śmierci komórki, kolejne odróżnicowują by ją zastąpić.
- ▶ **Tempo wymiany komórek jest różne między tkankami.** Nabłonek jelita grubego jest wymieniany w kilka dni. Neurony nie podlegają odnowie.



migracja i złuszczenie dojrzałych komórek nabłonkowych i endokrynnych (24 - 48 godz)

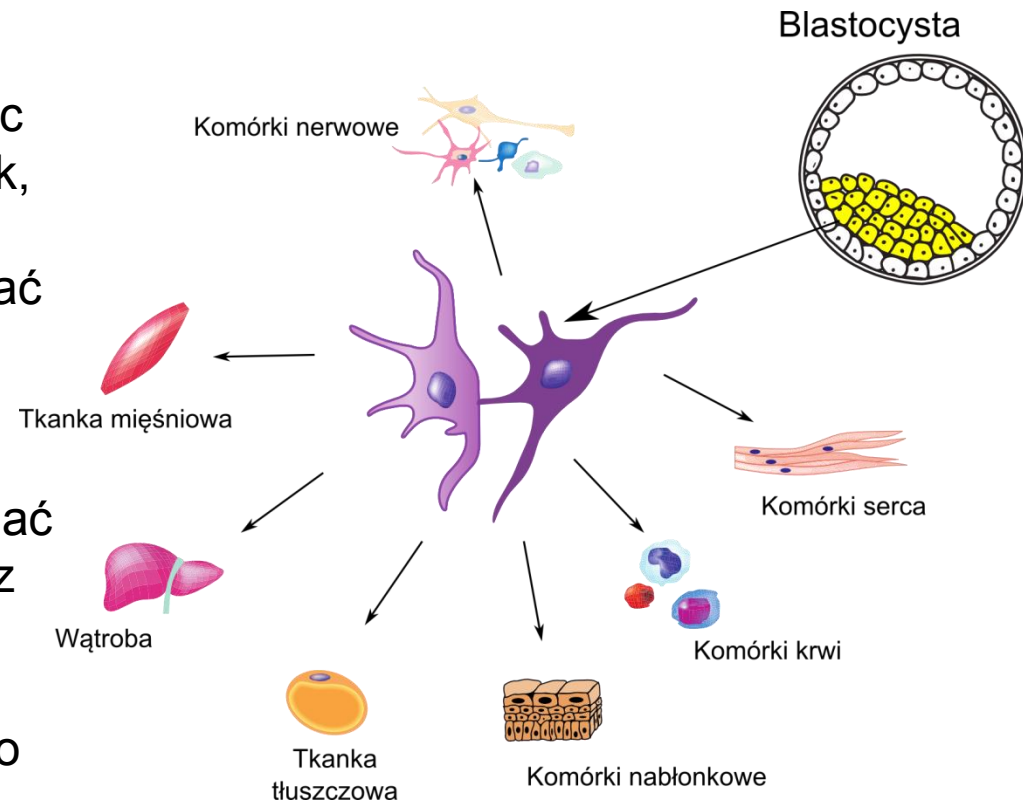
proliferujące komórki
(24 - 36 godz)

komórki macierzyste
(sporadyczne podziały)

Los komórek - różnicowanie z komórek macierzystych

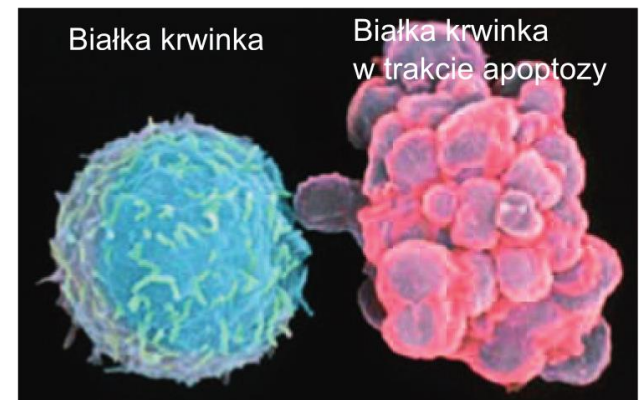
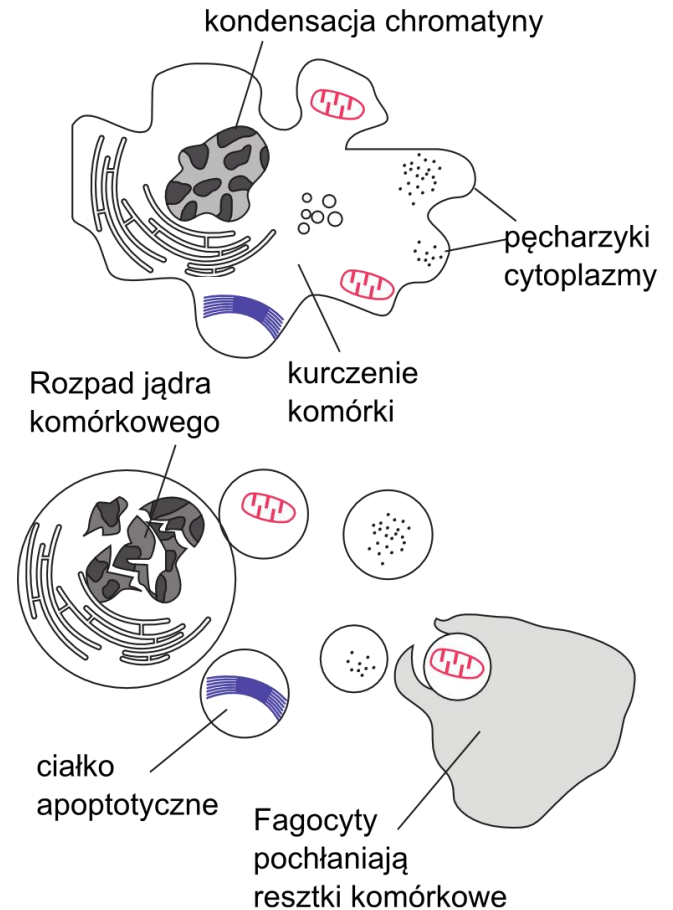
► Ze względu na zdolność do różnicowania komórki macierzyste dzieli się na:

- **totipotentne** – takie, które mogą ulec zróżnicowaniu do każdego typu komórek, w tym komórek tworzących łożysko
- **pluripotentne** – takie, które mogą dać początek każdemu typowi komórek dorosłego organizmu z wyjątkiem komórek łożyska
- **multipotentne** – takie, które mogą dać początek kilku różnym typom komórek, z reguły o podobnych właściwościach
- **unipotentne**, inaczej komórki prekursorowe, mogą różnicować tylko do jednego typu komórek



Los komórek – programowana śmierć - apoptoza

- ▶ W trakcie rozwoju zarodkowego oraz życia dorosłego organizmu komórki obumierają w zaprogramowany sposób by mogły być zastąpione przez bardziej wyspecjalizowane bądź nowe komórki tego samego rodzaju
- ▶ **Apoptoza** jest rutynową formą usuwania niechcianych komórek które osiągnęły swój limit życia lub uległy uszkodzeniu
- ▶ Jak sugeruje nazwa „**programowana śmierć**” komórka przechodzi przez serię kontrolowanych zmian ostatecznie prowadzących do jej śmierci
- ▶ Włączana jest ekspresja odpowiednich **genów apoptozy** i komórka przechodzi serię zmian biochemicznych (aktywacja **kaspaz** - proteinazy cysteinowe, enzymy trawiące białka jądrowe i cytoplazmatyczne) i morfologicznych (zmiana symetrii błony komórkowej, tworzenie pęcherzyków)



Los komórek – programowana śmierć - apoptoza

- ▶ Apoptoza jest ściśle kontrolowanym procesem również w trakcie embriogenezy.
- ▶ Nieprawidłowy przebieg apoptozy może być przyczyną wrodzonej wady (**syndaktylia**) polegającej na zrośnięciu dwóch lub więcej palców
- ▶ Defekt spowodowany jest mutacją w genie, która zapobiega obumieraniu komórek pomiędzy palcami płodu

