

# Poruchy vývoje dentice u myši s Tabby syndromem



Veronika Škvorová, Tomáš Boráň

Práce vznikla v rámci projektu Otevřená věda

Veškeré tkáně embrya mnohobuněčných živočichů se vyvíjejí ze tří zárodečných listů — ektodermu, mezodermu a endodermu. Zuby savců se zakládají z ektomezenchymu, je však zapotřebí jeho interakce s mezenchymem původu neurální lišty (Živa 2001, 3: 130–132). Ke správnému vývoji a správné interakci je nutná přítomnost řady regulačních proteinů, přičemž ve vývoji zubů hraje klíčovou roli protein s názvem ektodysplazin. Jeho přesná úloha není známa, podle nejnovějších studií má význam v regulaci programové buněčné smrti — apoptózy.

Apoptóza představuje přesně řízený buněčný proces (Živa 2004, 5: 194–197). Buňky mnohobuněčného organismu jsou totiž součástí vysoce organizovaného celku a jejich množství musí být regulováno, a to nejen prostřednictvím kontroly jejich dělení, ale také prostřednictvím kontroly buněčné smrti. Když už buňky nejsou déle potřebné nebo jsou pro organismus hrozbou, dají si pokyn k zániku aktivováním tohoto vnitrobuněčného smrtičního programu.

To, co apoptóza, která se vyskytuje ve vyvíjejících se i dospělých tkáních, obnáší, může být někdy překvapivé. Např. ve vývoji míšního nervového systému obvykle více než polovina nervových buněk zemře dříve, než se vyvine. U zdravého dospělého člověka zemrou miliony buněk kostní dřeni každou hodinu. Zdá se to jako zbytečné mrhání, když ztratíte takové množství buněk, zvláště když velká většina je zdravá. K čemu to slouží?

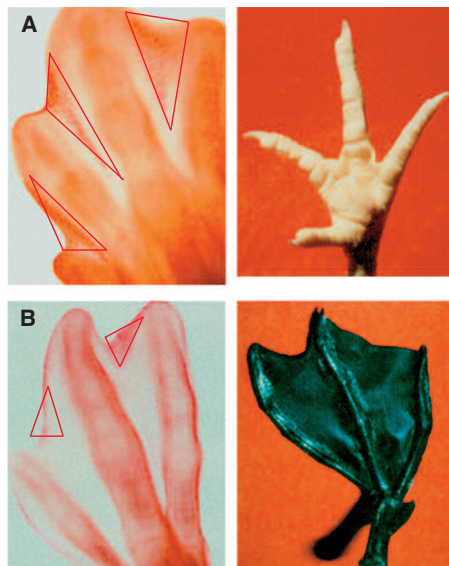
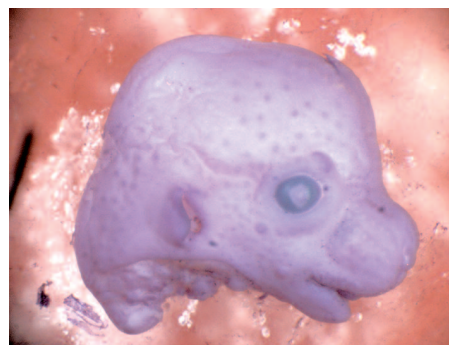
Během embryonálního vývoje jsou postižovány buněčnou smrtí např. myši končetiny. Zpočátku vypadají jako lopatkovité útvary. Jednotlivé prsty se formují a oddělí až později tak, že buňky mezi nimi odumrou. Stejně je tomu i u mnohých dalších živočichů včetně člověka. Naproti tomu např. u kachny tato tkáň postižena apoptózou není, nedochází k jejímu vymizení a zůstává mezi prsty ve formě plovací blány (viz obr.). V jiných případech buňky umírají, když jimi vytvořená struktura není již déle potřebná. Při přeměně pulce v žabu umírají buňky ocasu a ocásek, který už dospělec nepotřebuje, zmizí (část je resorbována). V mnoha dalších případech pomáhá buněčná smrt regulovat počet buněk, což lze sle-

dovat při vývoji nervového systému, kde buněčná smrt upravuje počet neuronů, aby se rovnal cílovému počtu buněk, které vyžadují inervaci.

V dospělých tkáních buněčná smrt přesně vyvažuje buněčné dělení (proliferaci). Kdyby tomu tak nebylo, tkáň by rostla, nebo se zmenšovala. K vysvětlení tohoto jevu poslouží pokus s laboratorním potkanem. Pokud odstraníme část jater dospělého potkana, jaterní buňky budou proliferací přibývat, aby doplnily ztrátu. Naopak když zvířeti podáváme látky stimulující dělení jaterních buněk, čímž se játra zvětšují, a následně léčbu zastavíme, přibývá apoptózy až do doby, kdy se játra vrátí do původní velikosti. Játra jsou tudíž uchovávána ve stále velikosti regulací jak stupně buněčné smrti, tak stupně buněčného dělení.

Apoptózu zprostředkovávají proteolytické enzymy zvané kaspázy, které spouštějí buněčnou smrt štěpením specifických pro-

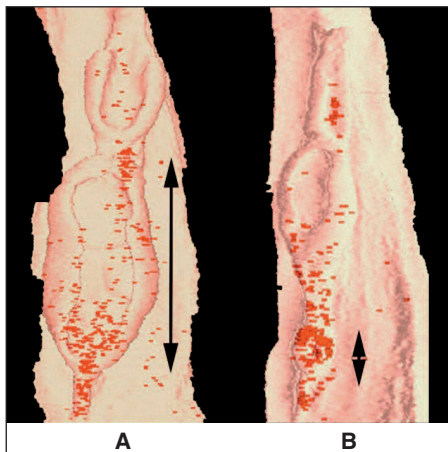
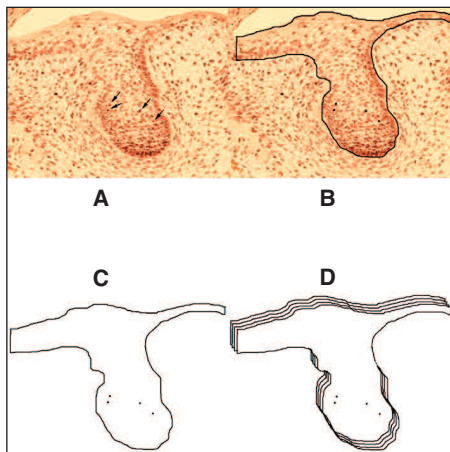
Vlevo: A — histologický řez zubním epitelem v oblasti stoličky dolní čelisti kontrolní myši. Vidíme zubní základ, šipky označují buňky postižené apoptózou. B, C — obrys zubního epitelu se zakreslenými apoptózami (tečky); D — skládáním nákresů za sebe dostaneme trojrozměrnou rekonstrukci zubního epitelu (zajímá nás pohled zdola) ♦ Vpravo trojrozměrná rekonstrukce zubního epitelu oblasti stoliček dolní čelisti, vidíme dva zubní základy: A — kontrolní myš, B — myš s Tabby syndromem. Červené tečky znamenají apoptózu, šipka označuje rozsah prvního základu stoličky. Pověšněte si rozdílné velikosti jednotlivých zubních základů a rozdílné hustoty a rozšíření apoptózy u obou skupin. Orig. T. Boráň



Hlavička myšního embrya (zvětšeno), nahoře. Foto T. Boráň ♦ Dole: A — u kuřete je apoptózou odstraněna blána mezi prsty; B — u kachny je apoptózou postižena pouze malá část, zbytek blány se zachoval ve formě plovací blány (buňky ohrožené apoptózou jsou ohraničeny červenými trojúhelníky). Podle Gilberta (2003), upraveno

teinů v cytoplasmě a v jádře. Kaspázy existují ve všech buňkách jako neaktivní předchůdci — prokaspázy, které jsou obvykle aktivovány štěpením jiných kaspáz, podněcujících proteolytickou kaspázovou řadu. Aktivací proces zahajují mimobuněčné nebo vnitrobuněčné smrtiční signály, které přinutí regulační molekuly uvnitř buňky ke shlukování a aktivaci prokaspáz.

Regulace apoptózy probíhá na mnoha úrovních a účastní se jí řada regulačních pochodů. Závisí na produkci faktorů blokujících a jiných faktorů stimulujících apoptózu. K poruchám její regulace u člověka dochází při onemocnění tzv. hypohidrotickou ektodermální dysplazií. Jde o genetickou chorobu vznikající mutací genu pro již zmíněný transmembránový protein ektodysplazin, který se podílí na interakcích mezi ektodermem (jedním ze tří zárodečných listů) a mezenchymem (mezibuněčnou pojivovou tkání) a ovlivňuje tak vývoj ektodermálních derivátů. Jsou to především vlasy, zuby, nehty a potní žlázy. S tím také souvisí příznaky, kterými lze chorobu charakterizovat. Dochází k poruše termoregulace v důsledku chybného vývoje potních žláz (odtud název hypohidrotická — předpona hypo — snížení, nedostatek a hidros = řecky pot), hrozí nebezpečí zvýšené teploty až nad 41 °C, vlasy a obočí jsou řídké a hodně postižené je také chrup. Zuby při této chorobě často chybějí, mají atypický tvar i velikost.



Obdobná genetická porucha existuje i u myši a nazývá se Tabby syndrom (tabby je orientální tkanina charakteristická měnlivým efektem v dopadajícím světle; syndrom byl po ní pojmenován kvůli podobnosti srsti nemocných myši s touto tkaninou). Stejně jako u člověka i u myši jsou postiženy zuby a srst. Myši s Tabby syndromem dobře slouží jako model pro studium nejen samotné hypohidrotické ektodermální dysplazie, ale i pro studium zubního vývoje.

Cílem mého pozorování bylo porovnat vývoj zubů u postižených myši a u kontrolních myši bez Tabby syndromu a sledovat distribuci apoptózy v zubním epitelu. Zuby se v tomto případě jeví jako ideální model — můžeme na nich pozorovat velikost, tvar, změny v počtu a uspořádání. Tyto změny je možné sledovat na histologických řezech zubního epitelu buď po prořezání zubů, nebo, což má mnohem větší přínos, v jednotlivých stadiích zubního vývoje. Tak můžeme posoudit samotný zubní vývoj a pozorovat i buňky postižené apoptózou. Metoda patří sice k časově náročným, ale trpělivost se vyplácí. Důležitá je také přesnost práce

od začátku až do konce, případné chyby se totiž nedají vždy opravit.

Nejprve odebereme hlavičky myších embryí v různých stadiích vývoje (viz obr.), které následně zalijeme do parafínu, aby bylo možné zhotovit několik mikronů tenké řezy, které jsou po ukrojení na mikrotomu přeneseny na podložní sklíčko a napínány na vodní hladině. Řezy jsou téměř průhledné, a proto je obarvíme, aby se zvýraznily jednotlivé buněčné struktury. Pro obarvení řezů lze použít kombinaci barviv hematoxylin a eozin. Hematoxylin je přírodním extraktem z kampaškového dřeva (*Haematoxylon campechianum*), patří mezi bazická (jádrová) barviva. Eozin je syntetické kyselé barvivo ze skupiny xantinových derivátů, které barví cytoplazmu. Výsledkem barvení jsou modrá jádra a bazofilní substance (obarvené hematoxylinem), ostatní části preparátu v různých odstínech červené až fialové (obarvené eozinem).

Tím však práce zdaleka nekončí. Jednotlivé řezy jsou nyní viditelné v mikroskopu. Abychom získali představu o zubním základu jako celku, musíme z každého histologického

řezu zhotovit nákrasy obrysů zubního epitelu a pomocí počítače z nich sestavit trojrozměrnou podobu zubního základu (viz obr.). Získáme tak plastický obraz zubního epitelu, z pohledu jakoby od kořene zubů. Stejným způsobem můžeme získat prostorové rozložení buněk postižených apoptózou, pokud je do nákrasu zaznamenáme (viz obr.).

Srovnáním trojrozměrných rekonstrukcí zubního epitelu bylo zjištěno, že vývoj zubů u myši s Tabby syndromem se liší od zdravých kontrolních jedinců. Zubní základy jsou rozdílné ve velikosti i tvaru. Rovněž i distribuce apoptózy je odlišná. Právě apoptóza zde hraje velmi důležitou roli a souvisí s chybným vývojem zubního epitelu a s jeho změněnou strukturou. Tyto výsledky podporují teorii, že ektodysplazie do jisté míry ovlivňuje apoptózu a interakci ektoderm – mezenchym.

*Autorka je studentkou gymnázia Na Vítězné pláni v Praze; v Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR, v. v. i. se zapojila do přípravy počítačové 3D rekonstrukce zubního epitelu myších embryí.*

## Počítačové modelování struktury a interakcí bílkovin



**Tereza Zavřelová, Lucie Koláčná**

*Práce vznikla v rámci projektu Otevřená věda*

Počítačové modelování intracelulárních (nitrobuněčných) a extracelulárních (mezi buněčných) bílkovin má mezioborové využití a napomáhá urychlení vývoje v mnoha oblastech. Nachází široké uplatnění v základním i aplikovaném výzkumu. Podílí se např. na objasňování biochemických a biofyzikálních pochodů v organismu, ale i na vývoji umělých tkání. Využívá se zejména tehdy, kdy strukturu bílkoviny nelze určit experimentálními metodami. Bez počítačového modelování se již neobejde žádné moderní přírodovědné pracoviště.

### Bílkoviny a počítačové modelování

Bílkoviny — proteiny bývají někdy označovány jako základní stavební jednotky živé hmoty. Zatím nebyla na Zemi zjištěna žádná forma života, která by se bez nich obešla.

Základními stavebními jednotkami bílkovin je 22 aminokyselin, jejichž posloupnost je pro každý protein charakteristická a nazývá se primární struktura. Sekundární strukturou rozumíme geometrické uspořádání polypeptidového řetězce. Terciární struk-

turou nazýváme trojrozměrné uspořádání proteinu, pokud je tvořen více řetězci; jeho celkovou strukturu označujeme jako kvaternární.

Počítačové modelování intracelulárních a extracelulárních bílkovin je jednou z nepostradatelných metod moderní strukturní

*Obr. 1 Čerpací cyklus enzymu Na,K-ATPázy zajišťující přenos iontů přes plazmatickou membránu. Na<sup>+</sup> se váže na pumpu v místech uvnitř buňky (fáze 1). Dojde k rozštěpení ATP, uvolnění ADP a přenosu fosforylované skupiny (fáze 2). Fosforylace vyvolá změnu konformace pumpy a uvolnění Na<sup>+</sup> na vnějším povrchu buňky a současně vystaví vazebné místo pro K<sup>+</sup> (fáze 3). Navázáním mimobuněčného K<sup>+</sup> se uvolní fosforylová skupina (defosforylace) (fáze 4 a 5), což způsobí návrat pumpy do její původní konformace a uvolnění K<sup>+</sup> do vnitřku buňky (fáze 6). Podle Albertse a kol.: Základy buněčné biologie (2000), upraveno ♦ Obr. 2 Schematické znázornění α-podjednotky Na,K-ATPázy s 10 transmembránovými segmenty. Na nitrobuněčně orientované H<sub>4</sub>-H<sub>5</sub> smyčce mezi 4. a 5. transmembránovým segmentem se nachází vazebné místo pro ATP. Kreslil S. Holeček podle obr. z archivu autorek. Blíže v textu*

