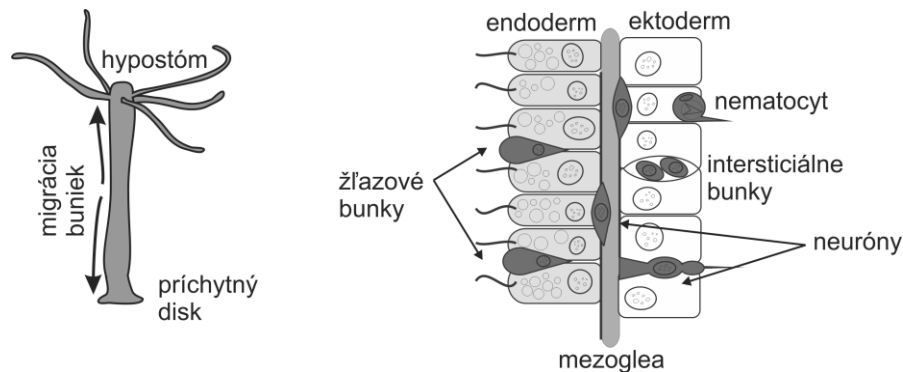


Teoreticko-praktická časť**Praktická úloha č. 2****Téma: Vývinová biológia – diferenciácia buniek u nezmara (*Hydra vulgaris*)**

Jednou z hlavných evolučných výhod tiel mnohobunkových organizmov je, že rôzne procesy bolo možné kompartmentalizovať v určitých orgánoch a tkanivách. Aj jeden z najjednoduchších mnohobunkových organizmov, sekundárne zjednodušený *Trichoplax adhaerens*, má minimálne 4 rozdielne typy buniek. Ako však doceliť, že identické bunky, vzniknuté napr. delením zygoty, sa špecializujú na určité činnosti?

Pomôcky a materiál: Mikroskop, trvalé preparáty, pravítko, priesvitná lepiaca páska, kľúč bunkových typov nezmara, milimetrový papier

Nezmar je známy predovšetkým vďaka svojim regeneračným schopnostiam, ktoré sú do veľkej miery spôsobené tým, že väčšina buniek v jeho tele nie je úplne (terminálne) diferencovaná. Väčšina buniek nezmara teda pripomína skôr kmeňové bunky, ktoré sa neustále delia a posúvajú oboma smermi na okraje tela (chápadilá a prichytný disk), kde sa bunky diferencujú, po istom čase odumierajú a sú nahradené novými. V tele nezmara existujú 3 hlavné bunkové línie: Epitelovo-svalové bunky ektodermu, tráviaci epitel endodermu a intersticiálne bunky (rez stenou tela na obrázku nižšie). Hoci epitelové bunky sú čiastočne špecializované (tj. ektoderm zabezpečujúci ochranu a pohyby, endoderm trávenie), predsa nie sú úplne (terminálne) diferencované. K tomuto procesu dochádza až na prichytnom disku, kde sa napr. ektoderm diferencuje na podlhovasté bunky produkujúce adhezívny sekrét. Podobný proces prebieha v epiteloch chápadiel, kde sa ektoderm diferencuje na batériové bunky, ktoré tvoria akési „lešenie“ pre nematocyty (přhlivé bunky). Epitelové bunky tela sú však schopné opäť vytvoriť ďalšie epitelové bunky a v prípade potreby aj celé telo. Intersticiálne bunky sú zaujímavé tým, že dávajú vzniknúť omnoho širšiemu spektru terminálne diferencovaných buniek. Medzi ich potomstvo patria přhlivé bunky (nematocyty), neuróny, žľazové bunky a pohlavné bunky.



1. Najskôr budete analyzovať rozloženie rôznych bunkových typov v tele nezmara na macerovaných preparátoch. Tieto preparáty boli pripravené tak, že jednotlivé časti tela nezmara (hypostóm s chápadlami, samotné telo a príchytý disk) boli oddelené a tkanivo bolo chemicky ošetrené tak, aby sa jednotlivé bunky uvoľnili, ale zostali neporušené. To nám umožňuje určiť pomerné zastúpenie jednotlivých typov buniek v týchto častiach tela. V každom z troch preparátov, označených 1-3, spočítajte 50 buniek a podľa kľúča určte, o aký typ buniek sa jedná. Pri počítaní postupujte tak, že najskôr spočítate všetky bunky v určitom zornom poli. Potom sa posuňte na veľjšie zorné pole v rámci rovnakého preparátu a opäť spočítajte všetky bunky. Tento postup opakujte až dokým ste celkovo spočítali minimálne 50 buniek. Bunky počítajte s použitím objektívu 40x alebo 20x. Výsledky uveďte do nasledujúcej tabuľky a pre každý bunkový typ určte aj jeho percentuálne zastúpenie (percentuálne zastúpenie zaokrúhlite na celé čísla).

Bunkový typ	Preparát č. 1		Preparát č. 2		Preparát č. 3	
	počet	%	počet	%	počet	%
Epitelové bunky (ekto + endoderm)						
Intersticiálne bunky (nediferencované)						
Žľazové bunky						
Neuróny						
Batériové bunky						
Nematocyty (všetky typy)						
Bunky príchytého disku						
SPOLU		100		100		100

2. Na základe vašich znalostí o biológii nezmara a zastúpení bunkových typov z predchádzajúceho experimentu určte, ktorým častiam jeho tela zodpovedajú jednotlivé preparáty.

Preparát č. 1	Preparát č. 2	Preparát č. 3

Po vyplnení prelepte tabuľku priesvitnou lepiacou páskou, aby ju už nebolo možné meniť a privolajte vedúceho úlohy, ktorý vám dá dáta pre ďalšiu časť úlohy.

3. Hoci všetky tri línie kmeňových buniek sa stále delia, jedna z nich má podstatne kratší bunkový cyklus. Túto populáciu buniek je možné eliminovať použitím látok, ktoré preferenčne zabíjajú rýchlo sa deliace bunky. Jednou z takýchto látok je hydroxymočovina. Na obrázkoch, ktoré ste dostali, vidíte reprezentatívne maceráty z oblasti stredu tela – neošetrenú kontrolu a vzorku z jedinca ošetreného

hydroxymočovinou. Spočítajte v každom z preparátov tri línie kmeňových buniek a celkový počet buniek. Výsledky uveďte do tabuľky.

Bunkový typ	KONTROLA		HYDROXYMOČOVINA	
	počet	%	počet	%
Ektodermálne bunky				
Endodermálne bunky				
Nediferencované intersticiálne bunky				
Všetky bunky		100		100

4. Nakreslite na milimetrový papier stĺpcový graf, ktorý bude porovnávať percentuálne zastúpenie týchto troch bunkových línií pred, a po ošetrení hydroxymočovinou. Milimetrový papier označte svojím súťažným číslom a odovzdajte spolu s riešením.

5. Ktorá populácia kmeňových buniek nezmar má na základe vašich zistení najrýchlejší bunkový cyklus? Pokúste sa vysvetliť prečo. Pomôcka – uvažujte o vlastnostiach jej dcérskych buniek.

6. Je zaujímavé, že nezmar dokáže tolerovať úplnú elimináciu tejto línie aj z nej diferencovaných dcérskych buniek. Samozrejme, takto pripravené jedince majú viaceré problémy, ale napr. regenerácia a pučanie u nich prebiehajú normálne. Označte (+) tie z nasledujúcich defektov, ktoré by ste očakávali u jedincov s chýbajúcou najrýchlejšie sa deliacou líniou kmeňových buniek a jej derivátmi. Ostatné možnosti označte (-).

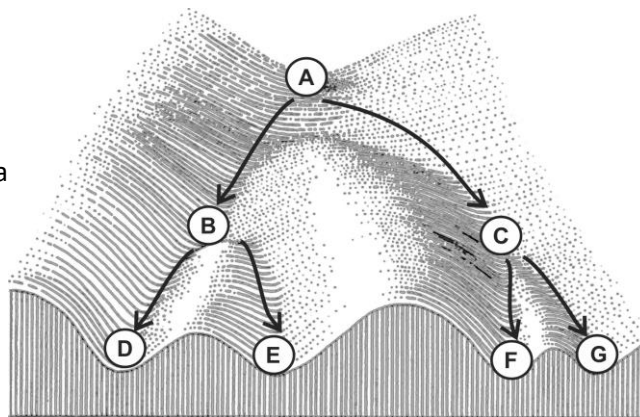
Nechopnosť autonómne sa pohybovať	
Neschopnosť prichytiť sa k podkladu	
Neschopnosť uloviť potravu	
Strata pohlavného rozmnožovania	
Telo tvorené iba jednovrstvovým epitelom.	

7. Schopnosť buniek dať vznik iným diferencovaným typom buniek (potencia) je rôzna a líši sa aj medzi rôznymi líniami kmeňových buniek. Oplodnená zygota je príkladom totipotentnej bunky schopnej dať vznik všetkým tkanivám organizmu, ako aj mimoembryonálnym tkanivám. Pluripotentné kmeňové bunky sú síce schopné vytvoriť všetky bunkové línie tela, ale už nie mimoembryonálne tkanivá. Ešte špecializovanejšie sú multipotentné kmeňové bunky, ktoré dávajú vznik viacerým, ale nie všetkým bunkovým typom. Napokon unipotentné kmeňové bunky sú najužšie špecializované. Jedna z dcérskych

buniek unipotentnej kmeňovej bunky zostáva kmeňovou a druhá sa diferencuje, ale vždy iba na jeden bunkový typ. Označte krížikom stupeň potencie pre každý z uvedených bunkových typov.

	potencia			
	toti	pluri	multi	uni
Embryonálne kmeňové bunky potkana				
Bunky vzniknuté po prvom delení ľudskej zygoty				
Intersticiálne bunky nezmara				
Hematopoetické bunky kostnej drene				
Ektodermálne kmeňové bunky nezmara				
Hepatoblasty, ktoré dávajú vznik hepatocytom				
Bunky trofoblastu, ktoré dávajú vznik mimoebryonálnym tkanivám				

8. Analógiou k postupnej redukcii potencie buniek až k terminálnej diferenciacii môže byť predstava guľôčky kotúľajúcej sa dolu kopcom v imaginárnej "krajine", ktorá predstavuje rôzne bunkové stavy. Túto analógiu navrhol biológ Conrad Waddington a podľa neho sa niekedy označuje ako Waddingtonova krajina. Sklon kopca v tomto prípade predstavuje potenciu buniek, teda na vrchole kopca by bol stav zodpovedajúci totipotentnej zygoty a dolu v údoliach terminálne diferencovaným bunkám. Tento model tiež predpokladá, že diferencované bunkové stavy sú stabilnejšie ako viac potentné, keďže pri nich už neexistuje možnosť "skĺznuť sa" do ďalšieho údolia. Samotný tvar svahu je potom určený rôznymi genetickými interakciami a faktormi prostredia, ktoré bunku "navigujú" počas diferenciacie. Tvar krajiny zároveň poukazuje na to, že procesy ako dediferenciácia, či transdiferenciácia (zmena jedného diferencovaného bunkového typu na iný), nie sú dosiahnuteľné tak jednoducho ako normálna diferenciacia, keďže vyžadujú pohyb do kopca.



Predstavte si, že model Waddingtonovej krajiny na obrázku reprezentuje diferenciaciu pluripotentnej bunky na diferencované dcérske typy.

Napíšte písmená, ktoré v schéme reprezentujú multipotentné bunky: _____

Napíšte ľubovoľnú trajektóriu, ktorá by v schéme reprezentovala dediferenciáciu: ____ → ____ → ____

Napíšte ľubovoľnú trajektóriu, ktorá by v schéme reprezentovala transdiferenciáciu: ____ → ____

Autor: Mgr. Jaroslav Ferenc

Recenzia: Mgr. Zuzana Dzirbiková, PhD.