

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 14.3.2012

# Biomembrány

doc. RNDr. Renata Veselská, Ph.D., M.Sc.  
Ústav experimentální biologie  
Přírodovědecká fakulta MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

## Program přednášky:

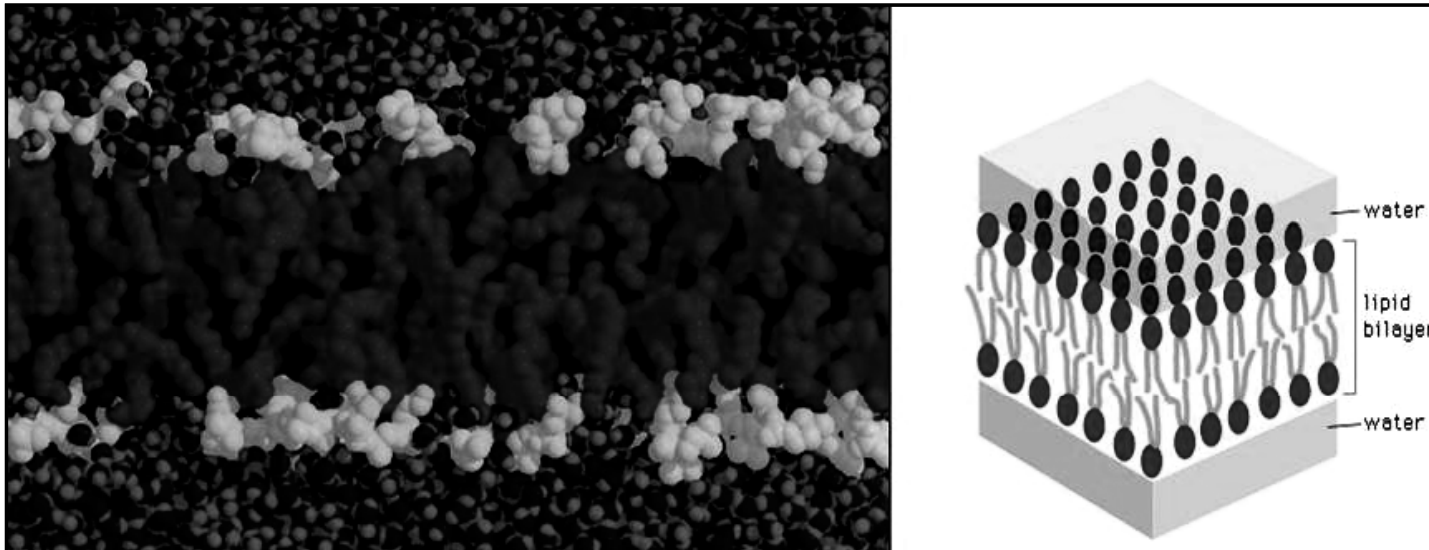
- struktura a vlastnosti biomembrán  
praktické aplikace - imunofenotypizace buněk
- fúze membrán a vezikulární transport  
praktické aplikace - medicínské aspekty  
praktické aplikace - liposomy a micely
- buněčná fúze  
praktické aplikace - hybridomová technologie
- transport látek přes membrány  
praktické aplikace - dialýza

# STRUKTURA A VLASTNOSTI BIOMEMBRÁN

---

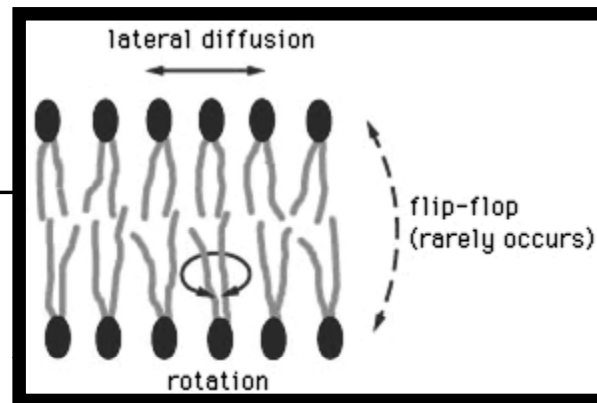
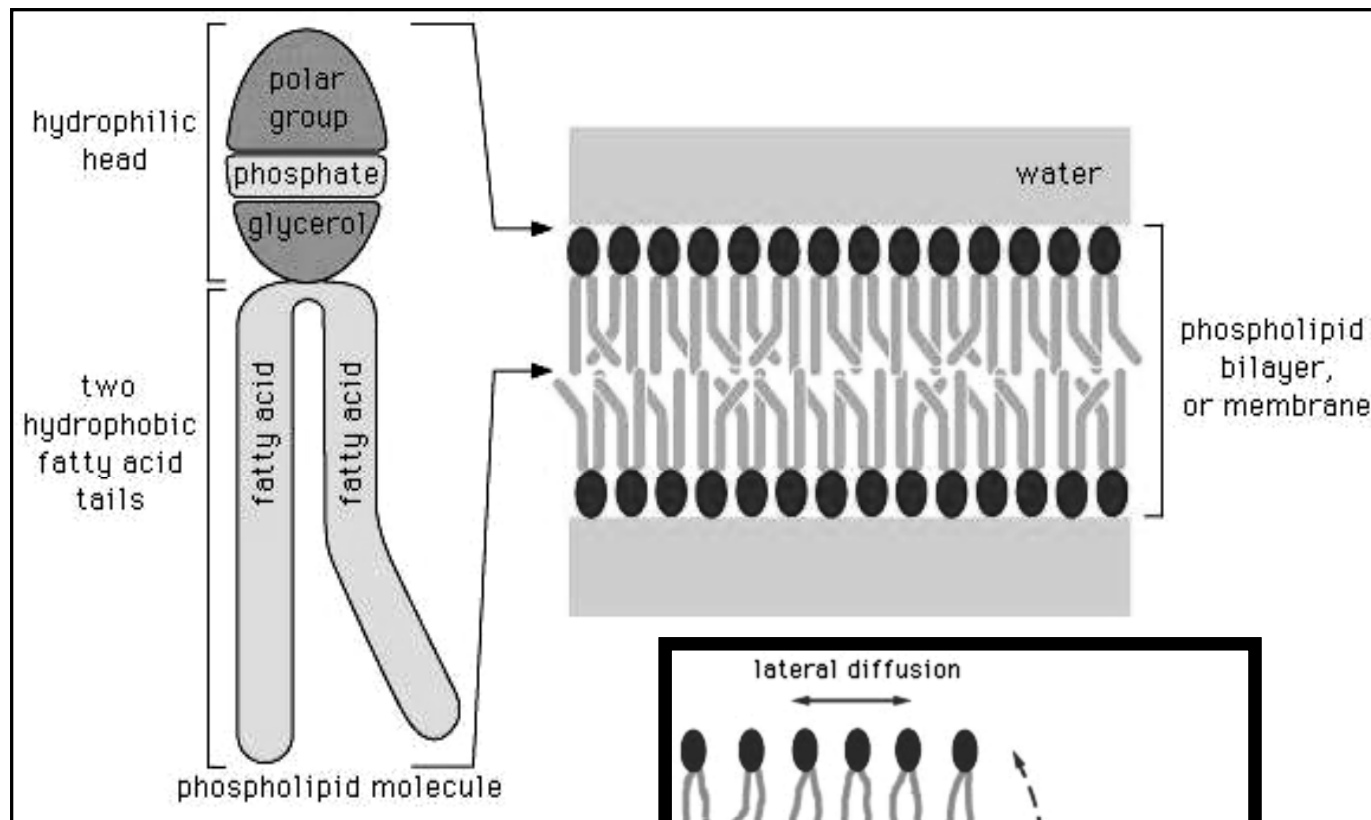
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012

# Lipidová dvojvrstva



---

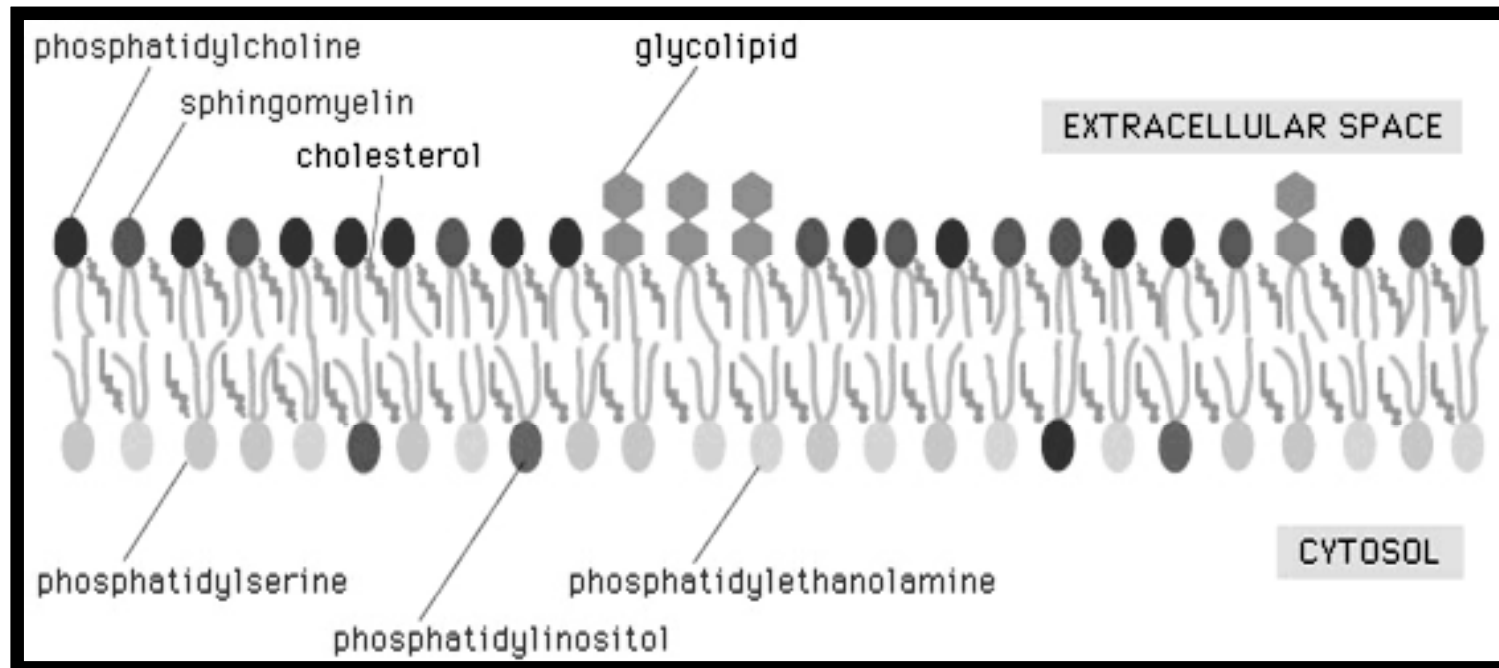
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012



## Fluidita membrány

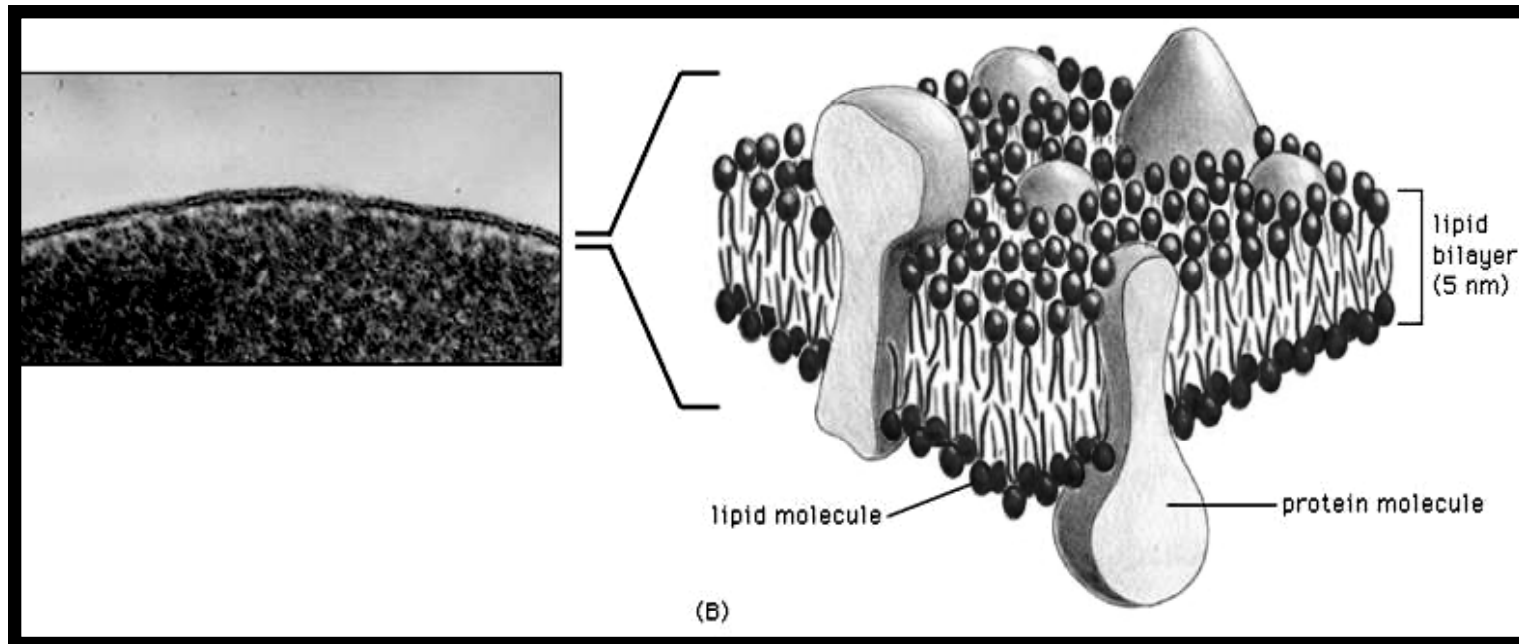
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012

## Složení plazmatické membrány:

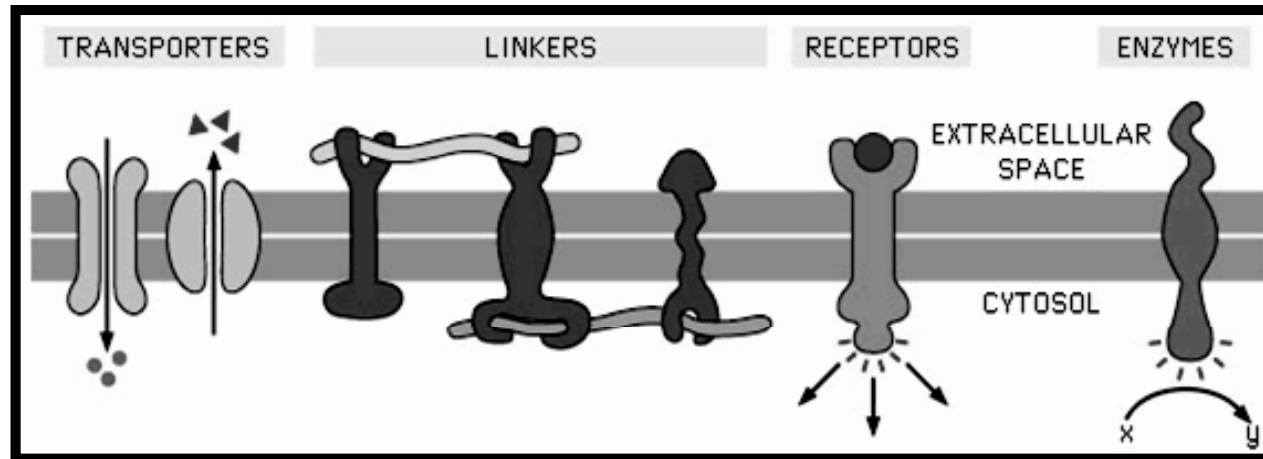


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012

## Stavba plazmatické membrány:



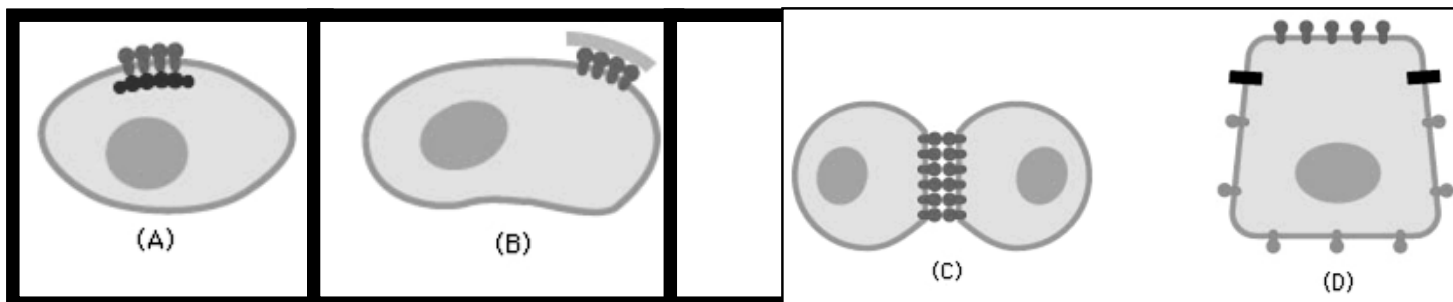
## Funkce transmembránových proteinů:



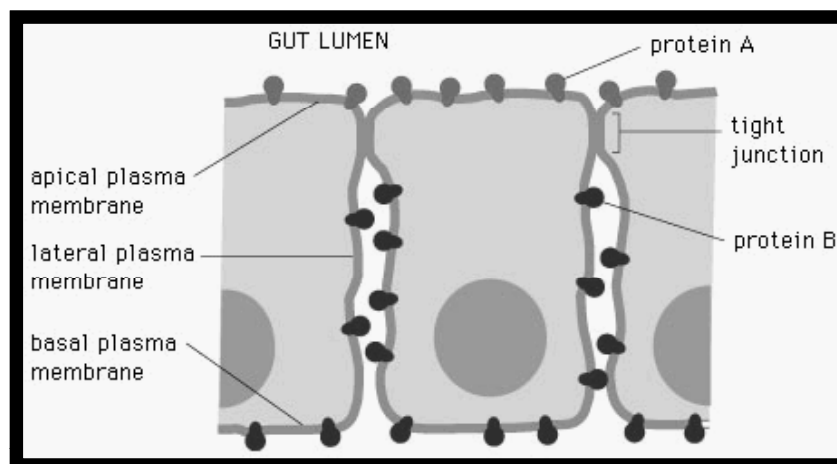
- přenašeče ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpa...)
- spojovací proteiny (intergriny...)
- receptory (EGFR, receptory pro FGF, PDGF, TNF...)
- enzymy (adenylátcykláza...)



## Lokalizace transmembránových proteinů:

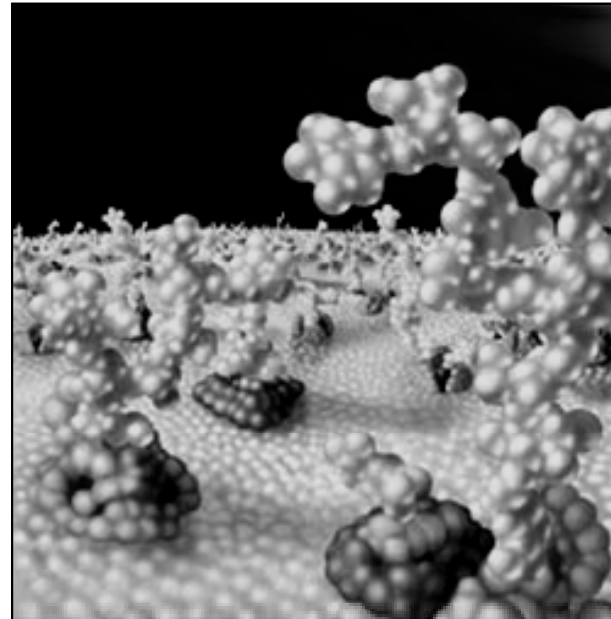


střevní epitel

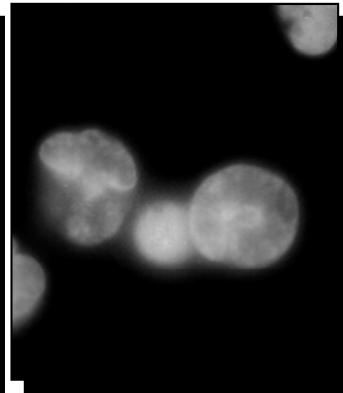
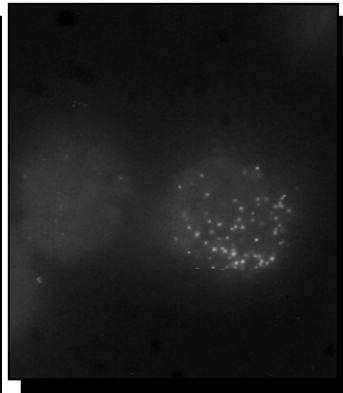
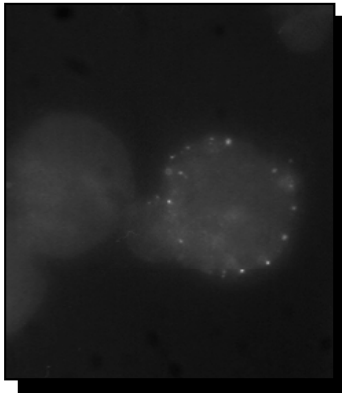


## CD markery (antigeny)

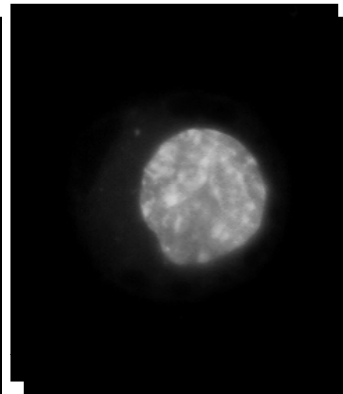
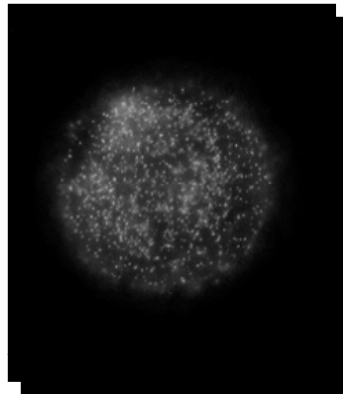
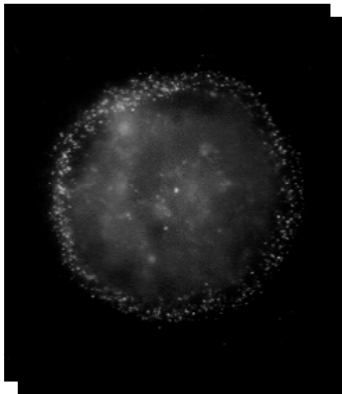
- glykoproteiny na povrchu lidských buněk
- v současnosti cca 250
- imunofenotypizace (zejména v hematologii)
- nespecifické:  
CD47, CD118
- specifické:  
CD66b - granulocyty  
CD85, CD205 - dendritické buňky  
CD133 - kmenové, resp. progenitorové buňky  
CD141 - vaskulární endotelové buňky  
CD168 - buňky karcinomu prsu  
CD207 - Langerhansovy buňky



## Příklady detekce CD markerů: linie HL-60

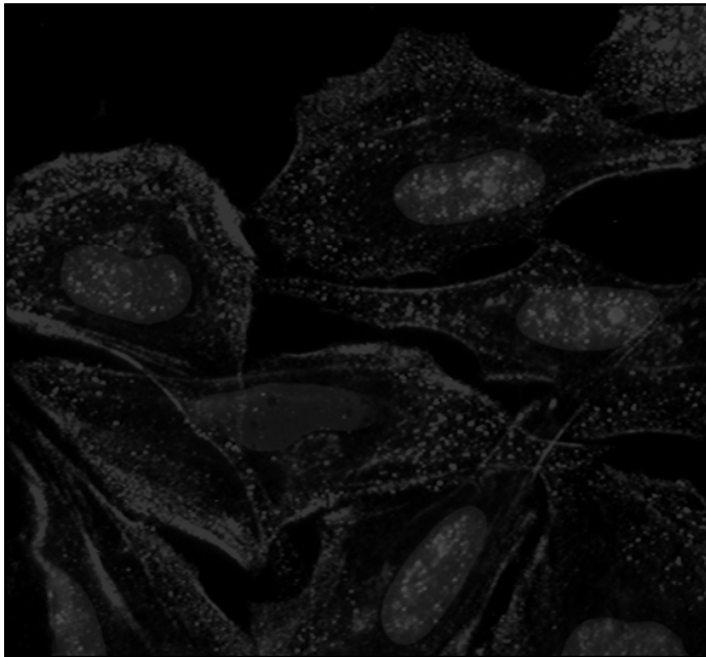


granulocyty:  
CD66b  
DAPI

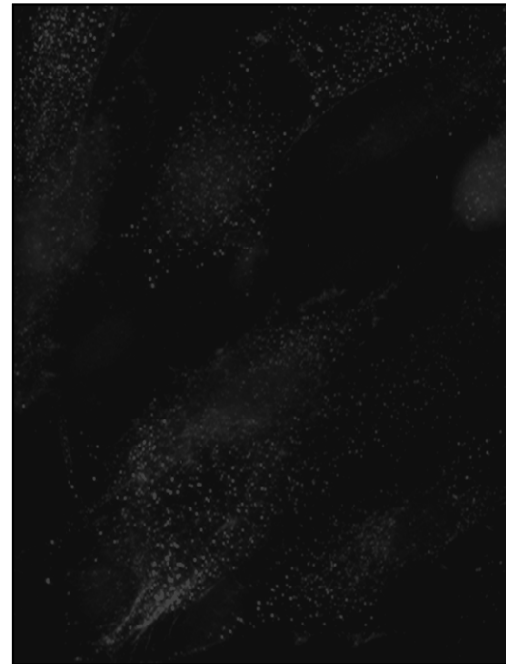


makrofágy:  
CD14  
DAPI

Příklady detekce CD markerů:  
linie derivované z osteosarkomů



Saos-2: CD133 / DAPI



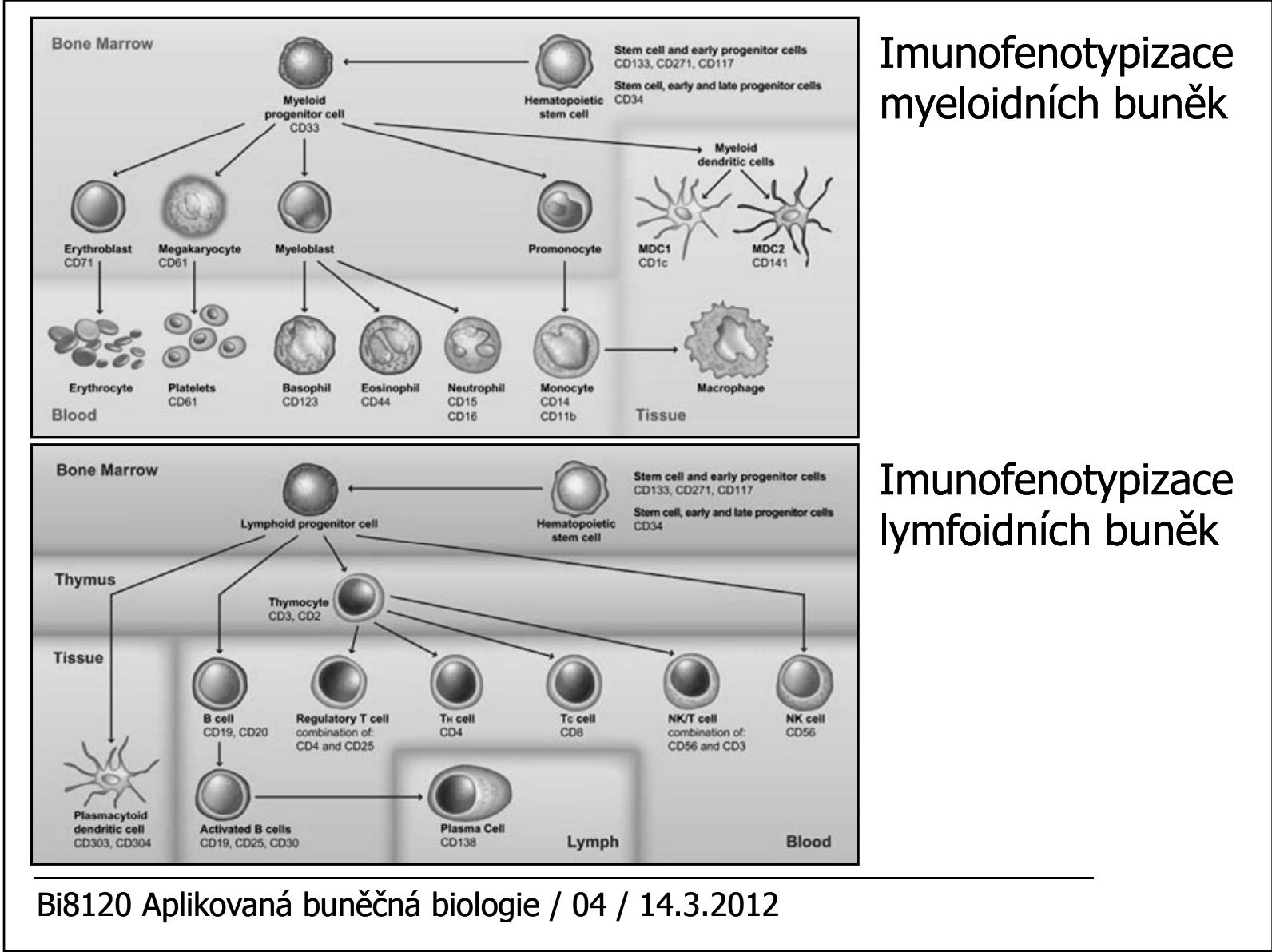
OSA-03: CD133

CD133

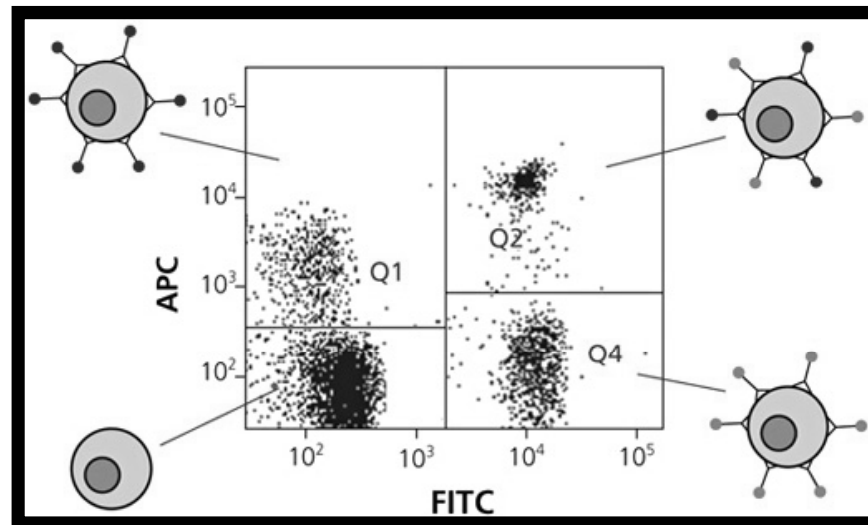


---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012



## Imunofenotypizace buněk pomocí průtokové cytometrie



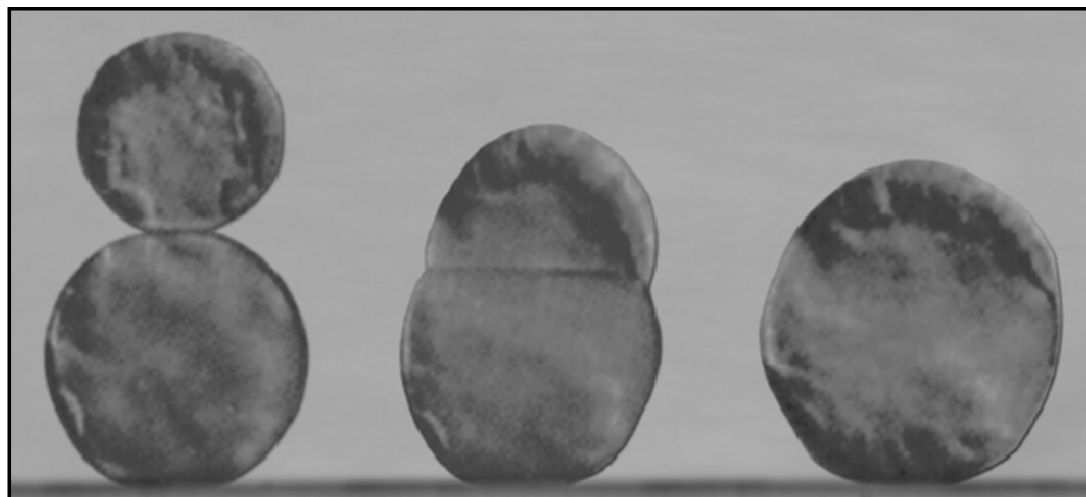
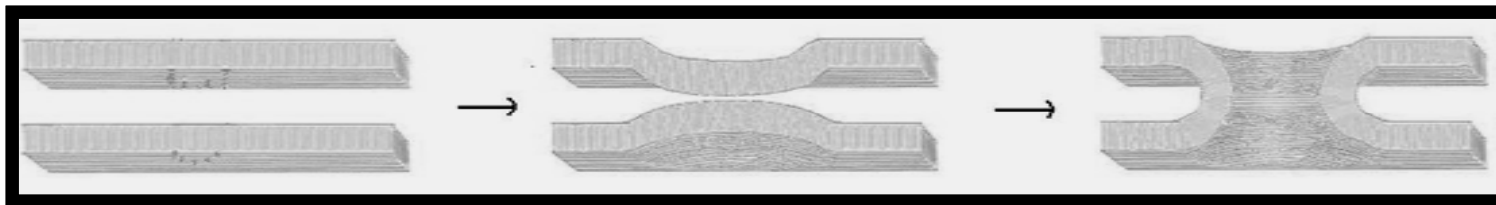
# FÚZE MEMBRÁN A VEZIKULÁRNÍ TRANSPORT

---

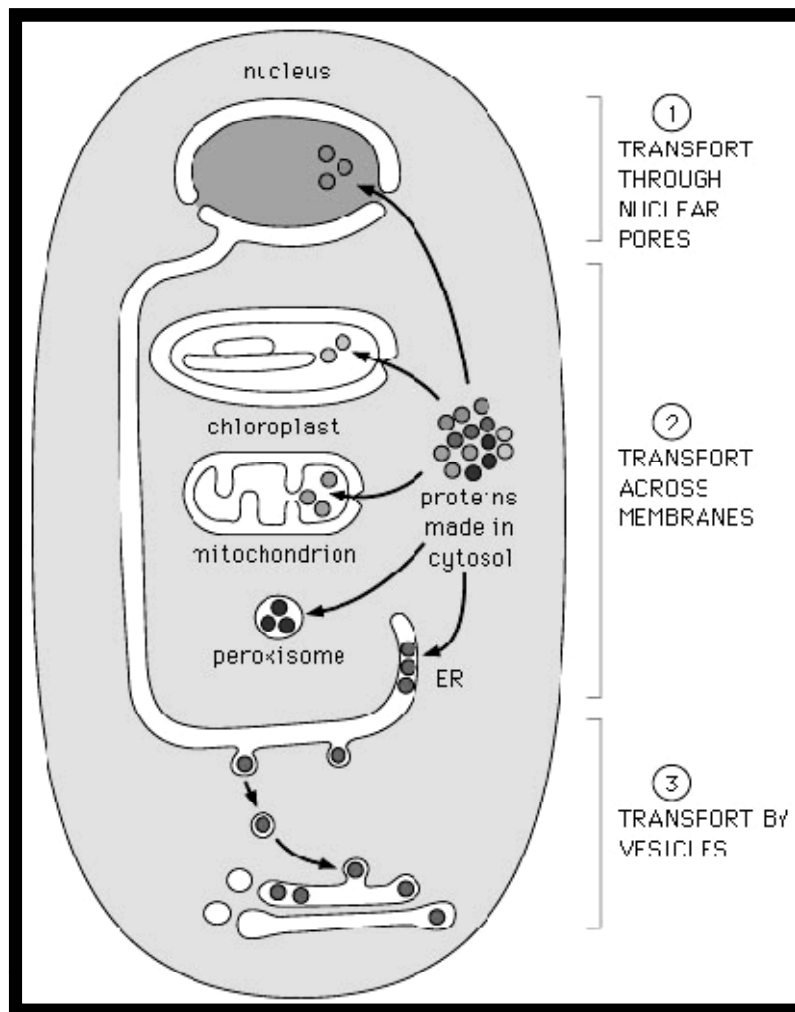
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012



## Průběh fúze

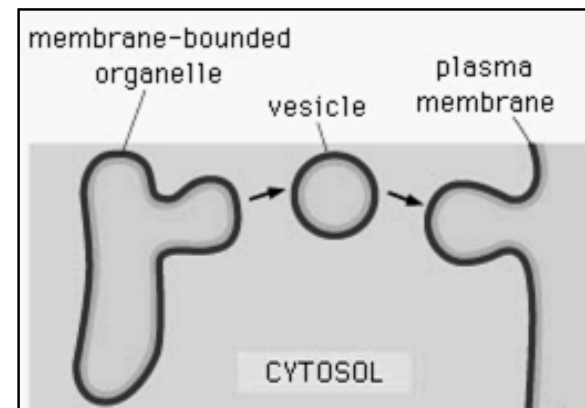


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012

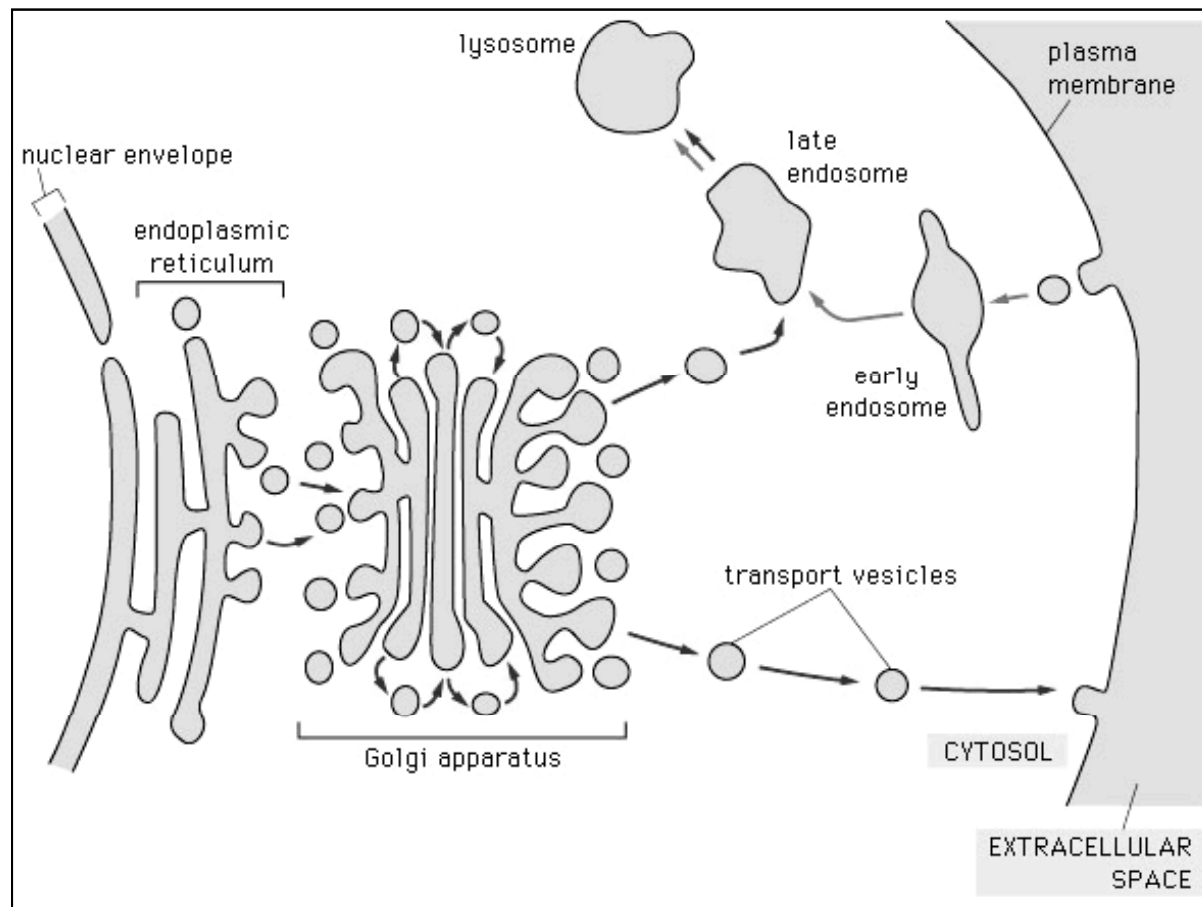


## Intracelulární transport proteinů:

- jadernými póry
- přes membrány
- prostřednictvím vezikulů



## Schéma vezikulárního transportu:



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012



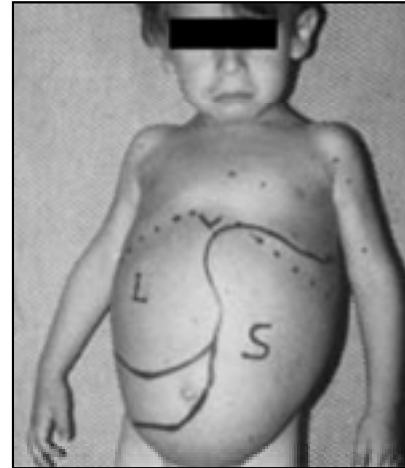
## Gaucherova nemoc

- příčinou mutace v genu kódujícím glukocerebrosidázu (= enzym nutný pro rozklad glykolipidů v lysozomech)
- AR typ dědičnosti
- zvětšení velikosti a počtu lysozomů s nedegradovaným materiálem
- základem terapie podávání chybějícího enzymu (např. preparát Cerezyme)
- kandidát pro genovou terapii (začlenění cDNA kódující daný enzym do kostní dřeně)



### Typ I:

- není zasažen nervový systém
- zvětšení sleziny, jater, poruchy struktury kostí
- neohrožuje život člověka



### Typ II:

- nervový systém je zasažen, poruchy jsou zřejmé od raného dětství, pacienti umírají velmi brzy

### Typ III:

- nervový systém je zasažen (demence), poruchy se začnou projevovat přibližně od 10. roku věku





## Gaucher cells

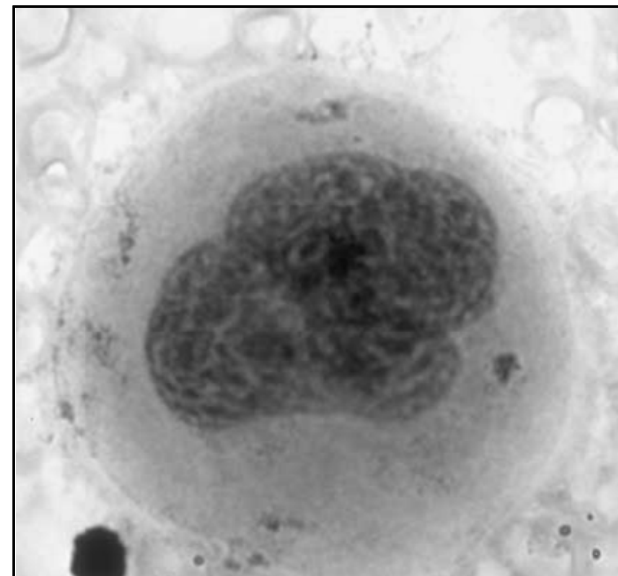
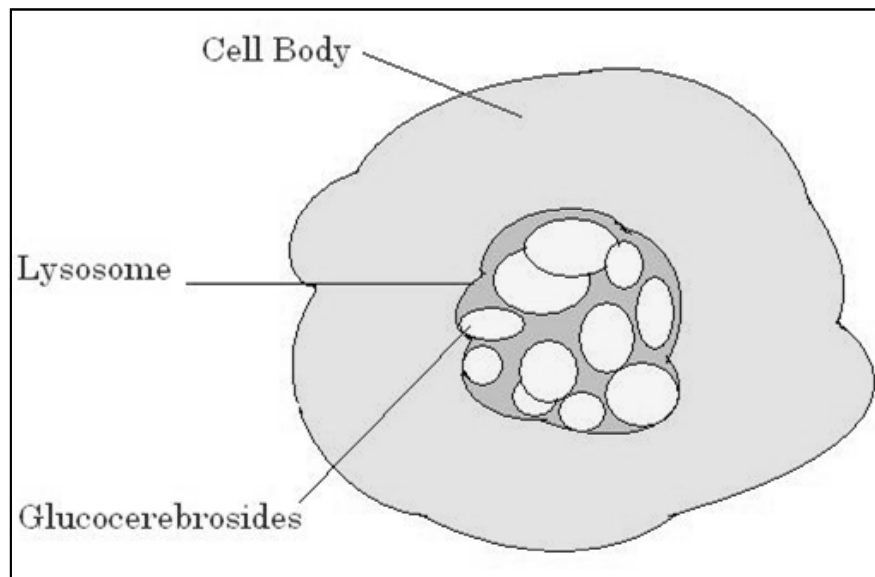
- makrofágy
- vyskytují se izolovaně v postižené tkáni
- pozitivní po obarvení činidlem PAS (Periodic Acid Schiff)

## Pseudo-Gaucher cells

- výskyt u onemocnění spojených s vysokým turnoverm membrán (chronická granulomatózní leukémie, mnohočetný myelom, Hodgkinova choroba, AIDS...)
- ve tkáni se vyskytují ve shlucích

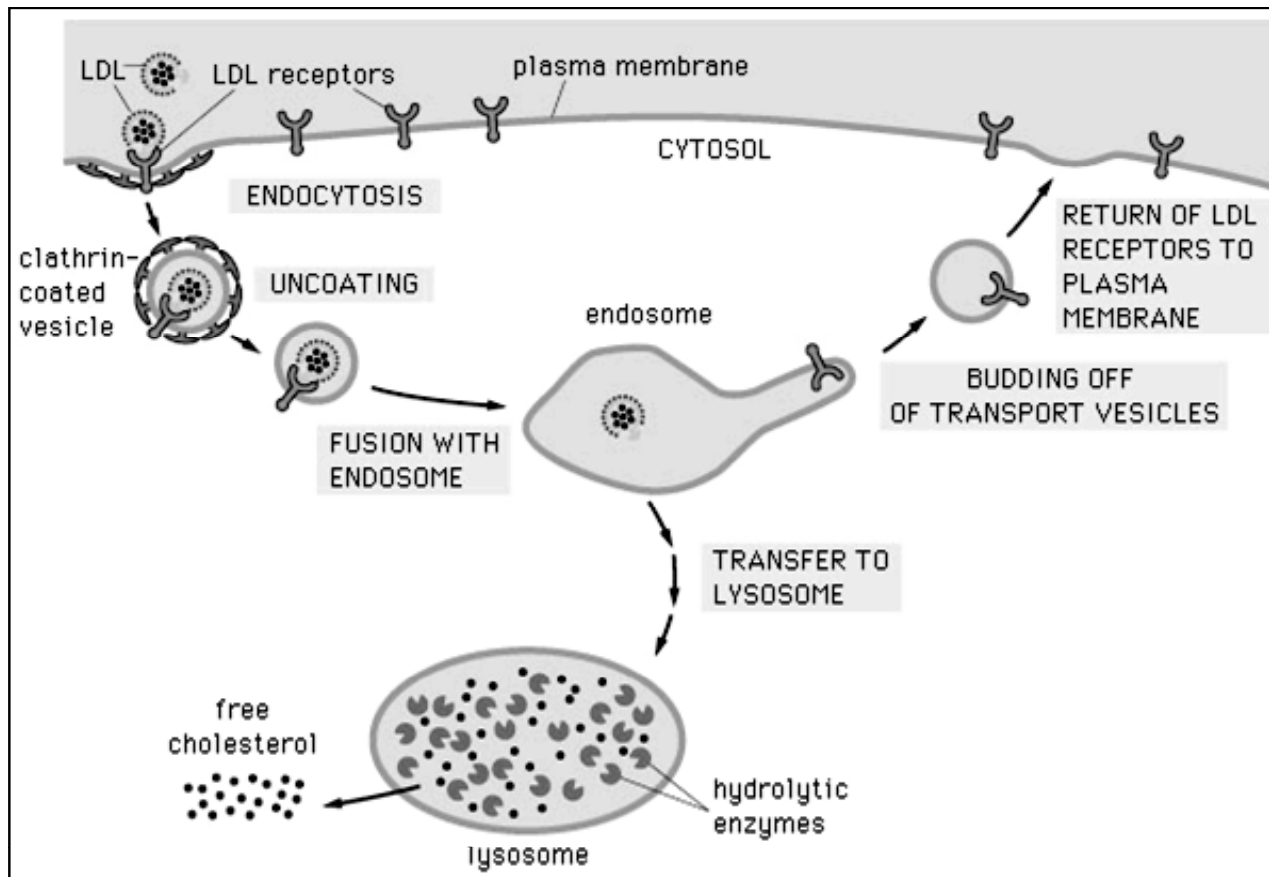


## Gaucher cells





## Příklad endocytózy: LDL (low-density lipoprotein)



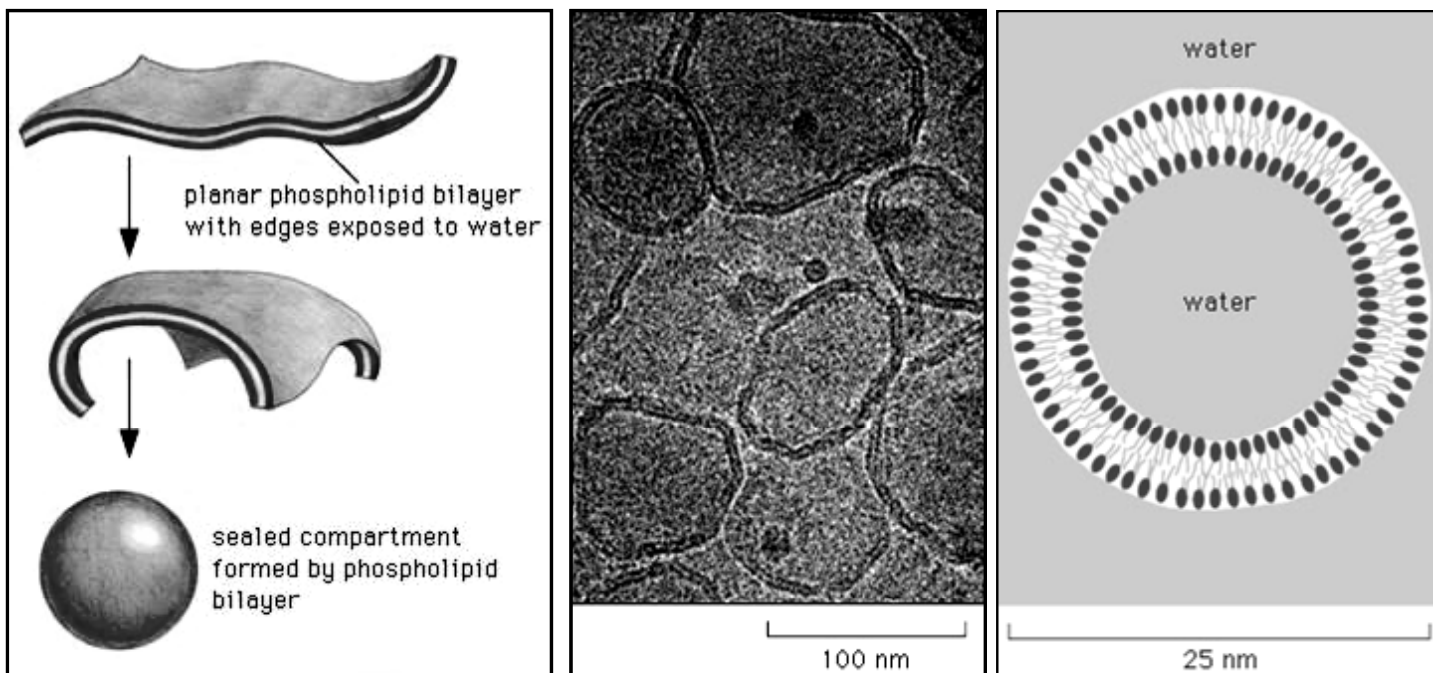
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012

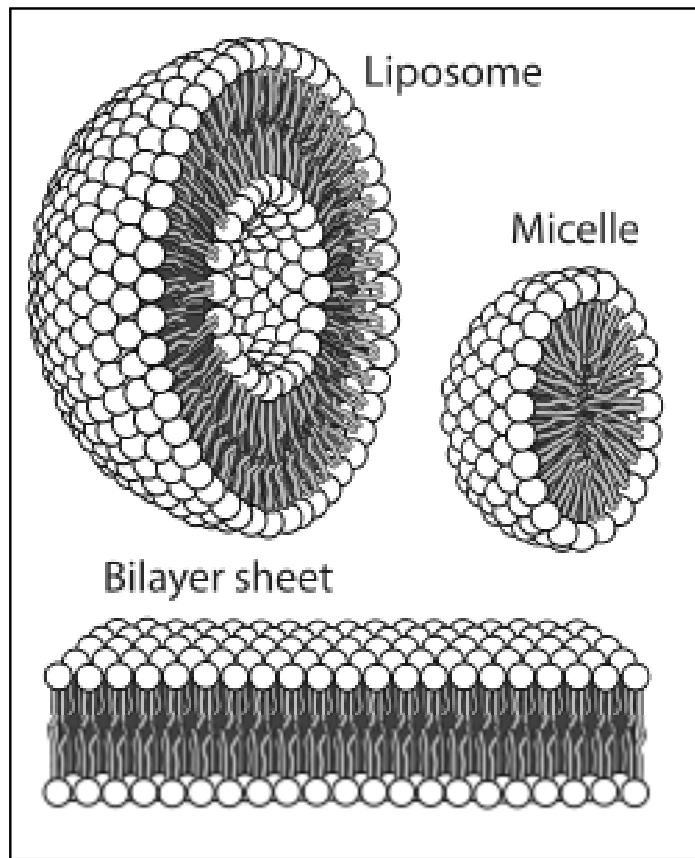


## Poruchy příjmu cholesterolu

- příčinou porucha struktury LDL-receptoru
- buňky nepřijímají cholesterol
- cholesterol se hromadí v krvi a napomáhá vzniku aterosklerózy
- většina pacientů umírá v raném věku na srdeční záchvat (důsledek ucpání tepen zásobujících srdce)

## Tvorba liposomů:

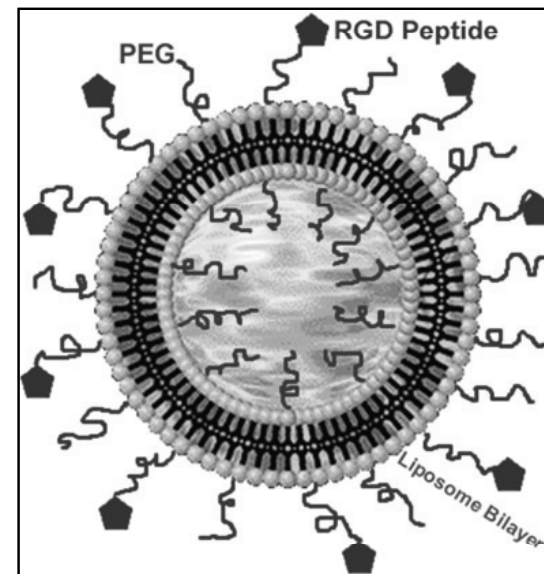
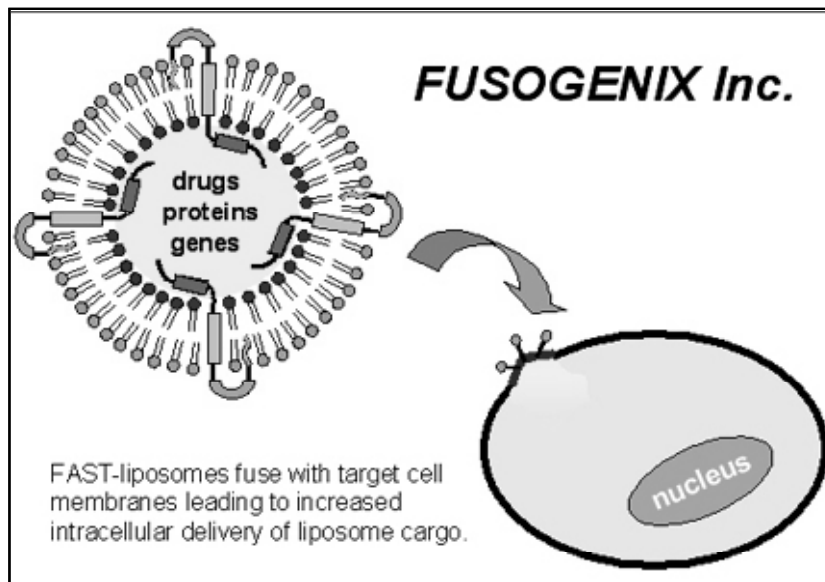




---

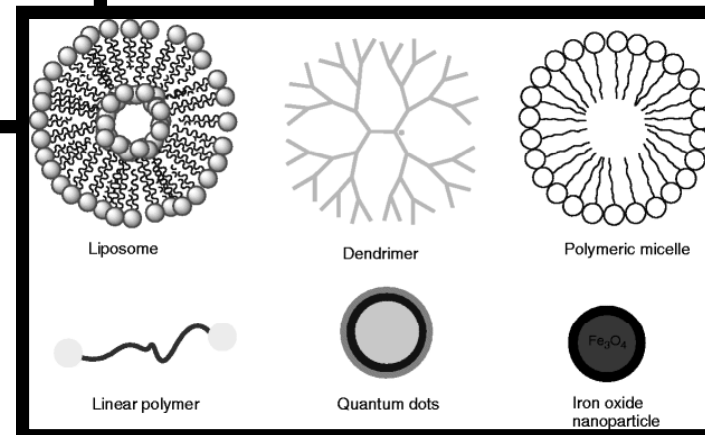
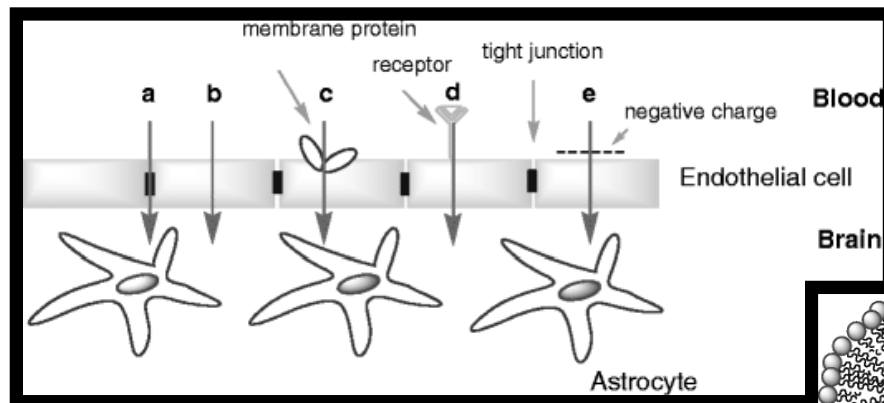
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012

## Liposome-delivery systems:



## Využití liposomů a micel pro cílenou aplikaci léčiv a dalších látek do organismu

- transport přes BBB (blood-brain barrier) / tight junctions



Yang H:  
Nanoparticle-Mediated Brain-Specific  
Drug Delivery, Imaging, and  
Diagnosis.  
Pharmaceutical Research, 2010.

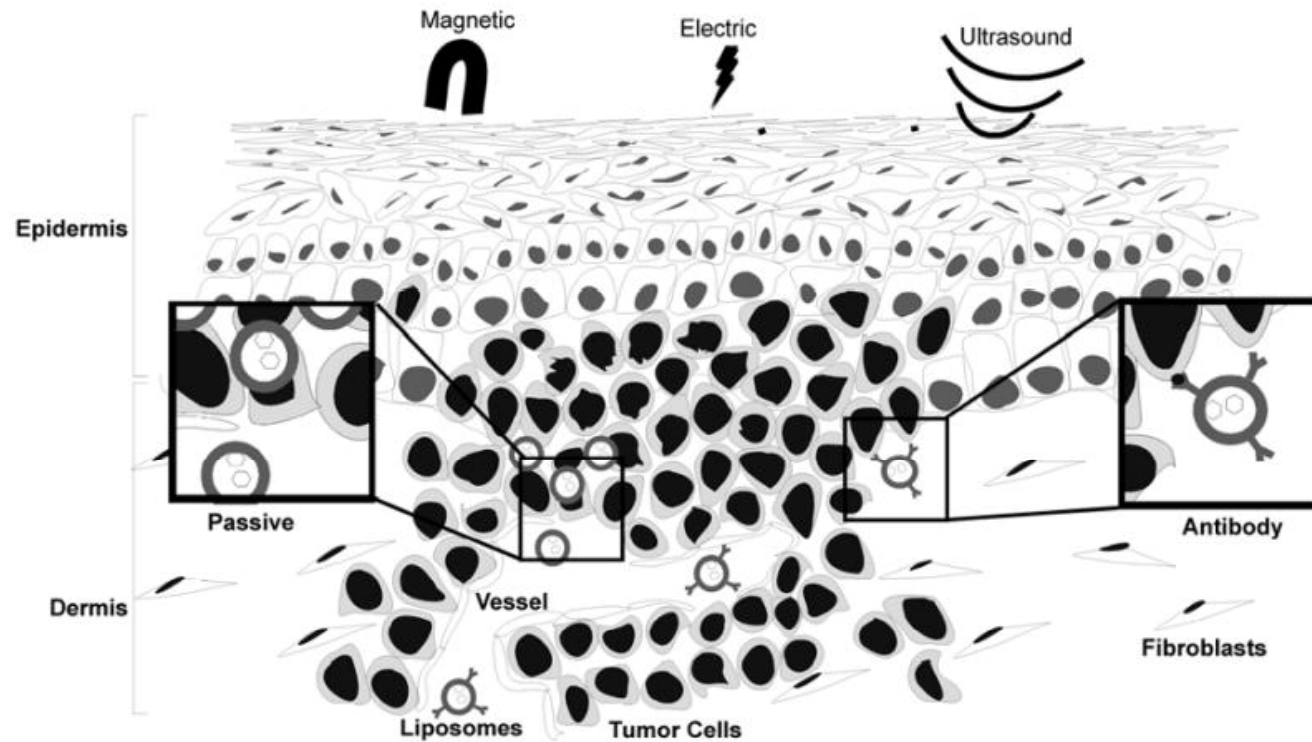
Yang H: Nanoparticle-Mediated Brain-Specific Drug Delivery, Imaging, and Diagnosis. Pharmaceutical Research, 2010.

Drug	Property/Function	Nanocarrier	Delivery means	Model (s)	Admin. route for <i>in vivo</i>
Boron	Metal used in boron neutron capture technology	EGF-carrying boronated PAMAM dendrimer	Covalent conjugation	Rats	Intratumoral injection or CED
Ciprofloxacin	Antibiotic	Cholesterol conjugated PEG and anchored with TAT peptide	Encapsulation	Cell culture and rats	i.v.
Doxorubicin	Anthracycline antibiotic used for cancer treatment	Ox26-conjugated PEGylated liposome	Encapsulation	Rats	i.v.
		Folate-conjugated PEGylated liposome	Encapsulation	Rats	i.v.
		Cysteine-cleavable PEGylated liposome conjugated with folate	Encapsulation	Rats	i.v.
		Poly(ethylene glycol)-b-poly(aspartic acid) block copolymer	Covalent conjugation	Cell culture and rats	CED
DNA plasmid coding pGL2-control vector coding luciferase	Expressing luciferase for bioluminescence	Lactoferrin-conjugated dendrimer	Complexation	Cell culture and monolayer	
EGFR siRNA	Knockdown EGFR expression	Dendriforms	Complexation	Mice	i.v. or CED
Horse radish peroxidase	Model polypeptide	Pitronic block copolymer	Covalent conjugation through degradable disulfide links	Cell culture, monolayer, and mice	i.v.
N-Hexyl carbamoyl-5-fluorouracil	Prodrug of 5-fluorouracil used for cancer treatment	Polysorbate 80-coated nanogel (cross-linked copolymeric micelles of N-isopropylacrylamide and N-vinylpyrrolidone)	Encapsulation	Rabbits	i.v.
Oligodeoxynucleotides (ODN)	Containing a NF- $\kappa$ B cis-element	PEGylated liposome	Encapsulation of PEI-ODN complexes	Cell culture and mice	i.v.
Ovalbumin	Model protein	Cationic liposome	Encapsulation	Rats	intranasal
Plasmid pEGFP-N2	Encoding green fluorescence protein for bioluminescence	Angiopep-carrying PEGylated PAMAM dendrimer G5.0	Complexation	Cell culture, monolayer, and mice	i.v.
Rivastigmine	Cholinesterase inhibitor for treatment of Alzheimer's disease and Parkinson's disease	Multi lamellar liposome	Encapsulation	Rats	intranasal
Sodium borocaptate	Carrying boron for boron neutron capture technology	EGFR-antibody carrying liposome	Encapsulation	Cell culture and mice	i.v.
Tempamine	Stable radical with antioxidant and proapoptotic activities	PEGylated Liposome	Encapsulation	Mice	i.v.
Topotecan	Topoisomerase I inhibitor	Non-PEGylated liposome	Encapsulation	Rats	CED

- liposomy
- micely

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012

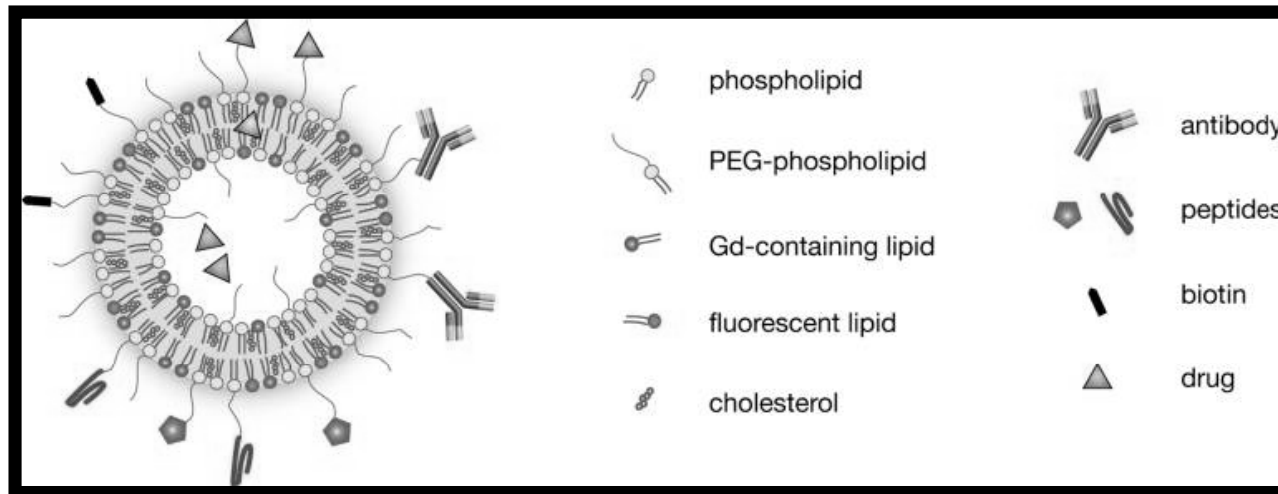
## Možnosti zacílení liposomů do nádorové tkáně (maligní melanom)



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012



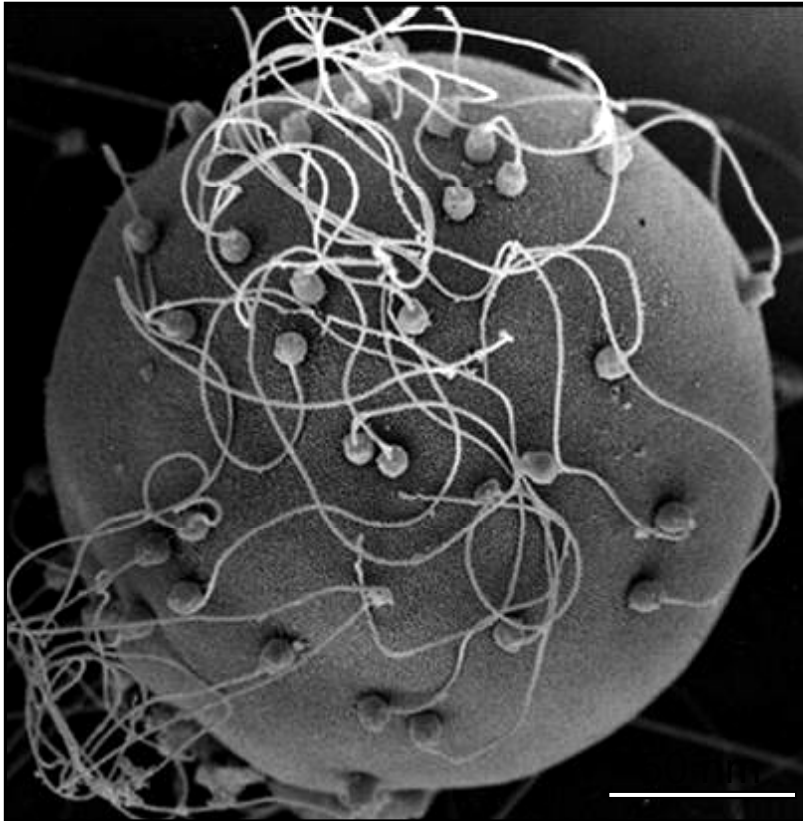
## Target-specific multimodal liposome (for combined angiogenesis imaging and therapy)



# FÚZE MEMBRÁN

---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012

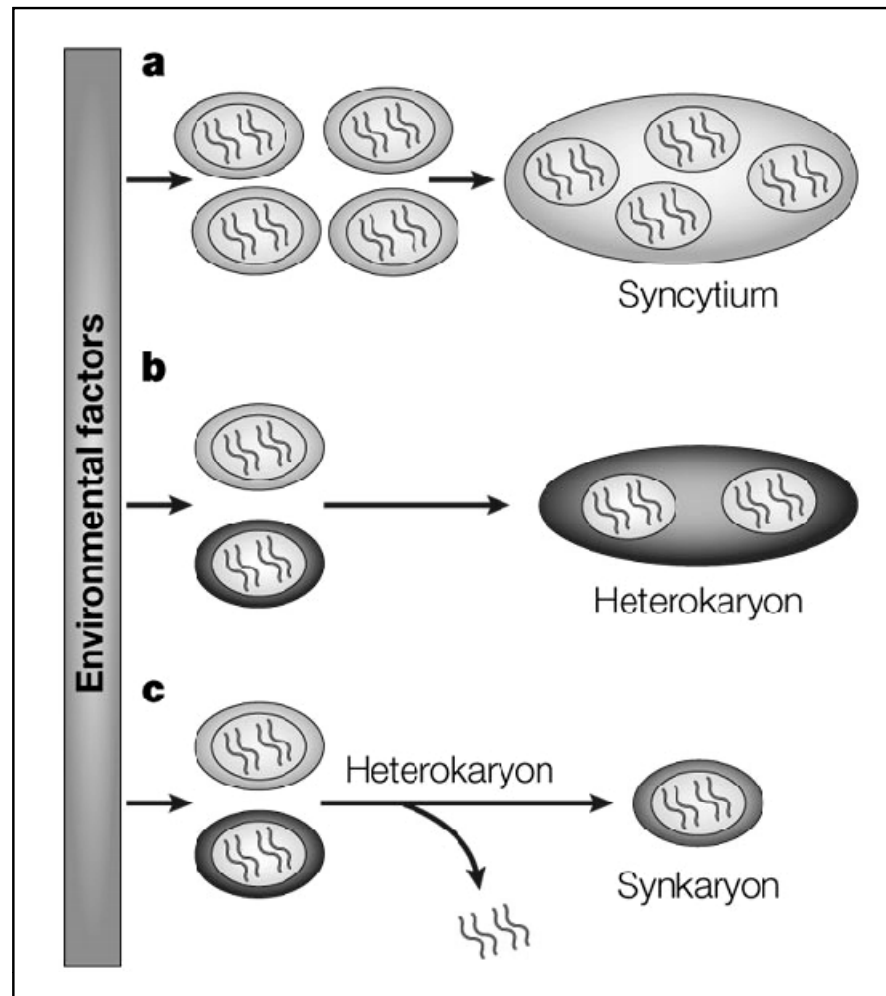


### Přirozená fúze:

- fertilizace
- vznik syncytia

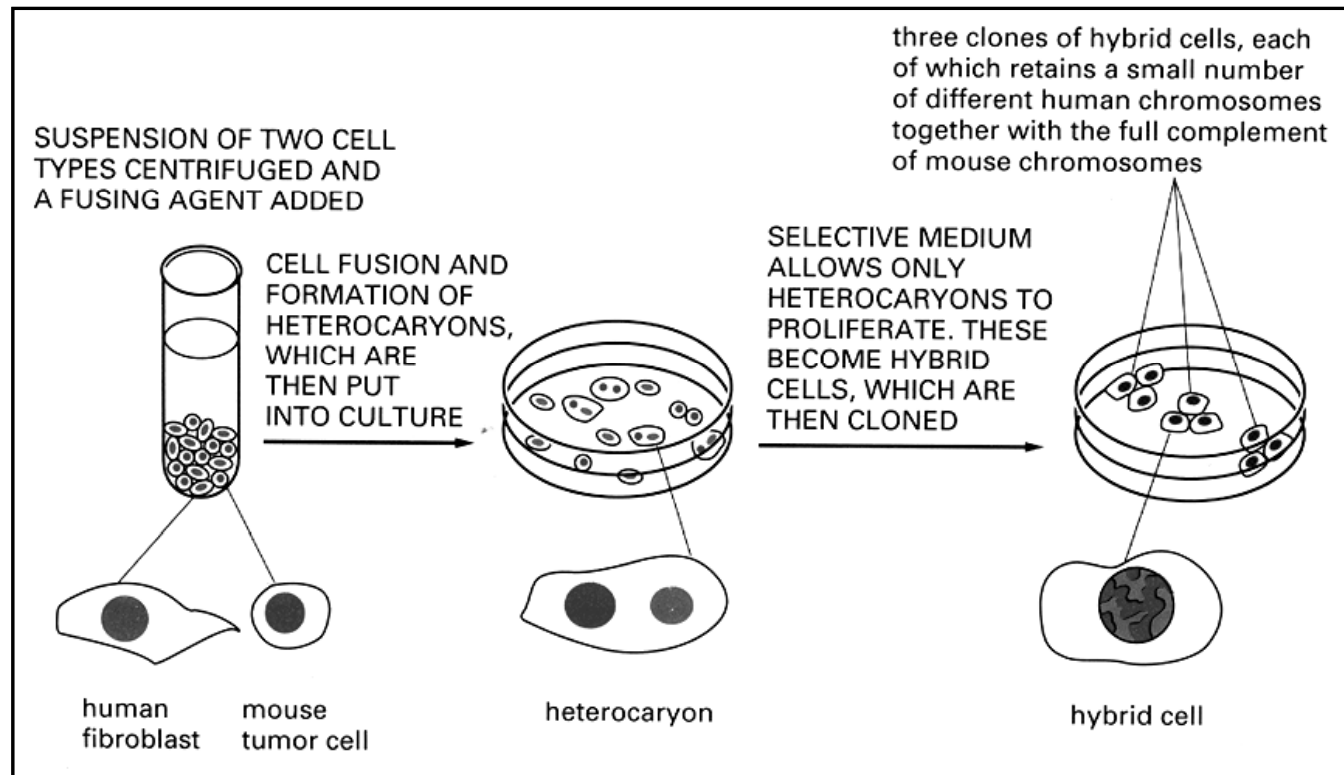
### Indukovaná fúze:

- fúzogeny:
  - elektrické pole
  - chemikálie  
(polyethylenglykol)
  - virusy  
(Sendai virus)



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012

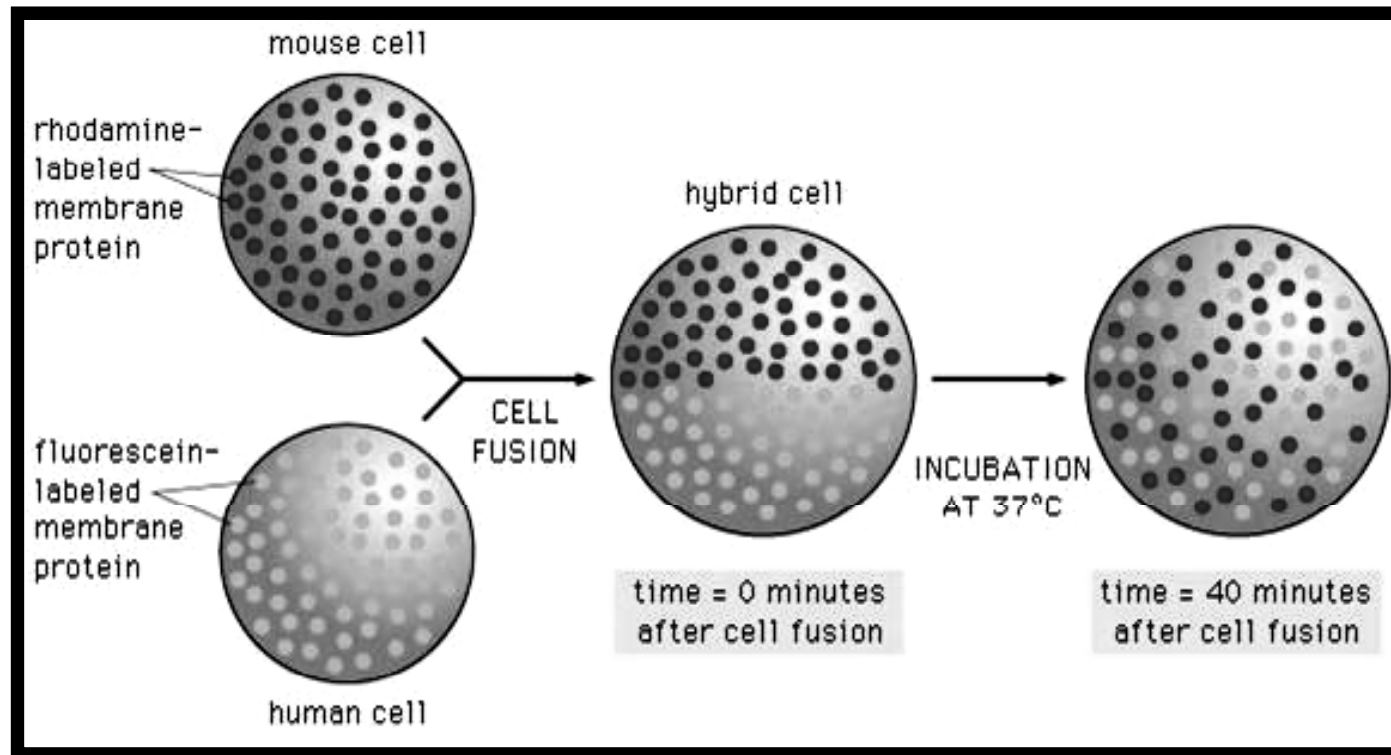
# Princip mezidruhové fúze



Heterokaryon = hybridní buňka se 2 jádry

Synkaryon = hybridní buňka se zfúzovaným jádrem

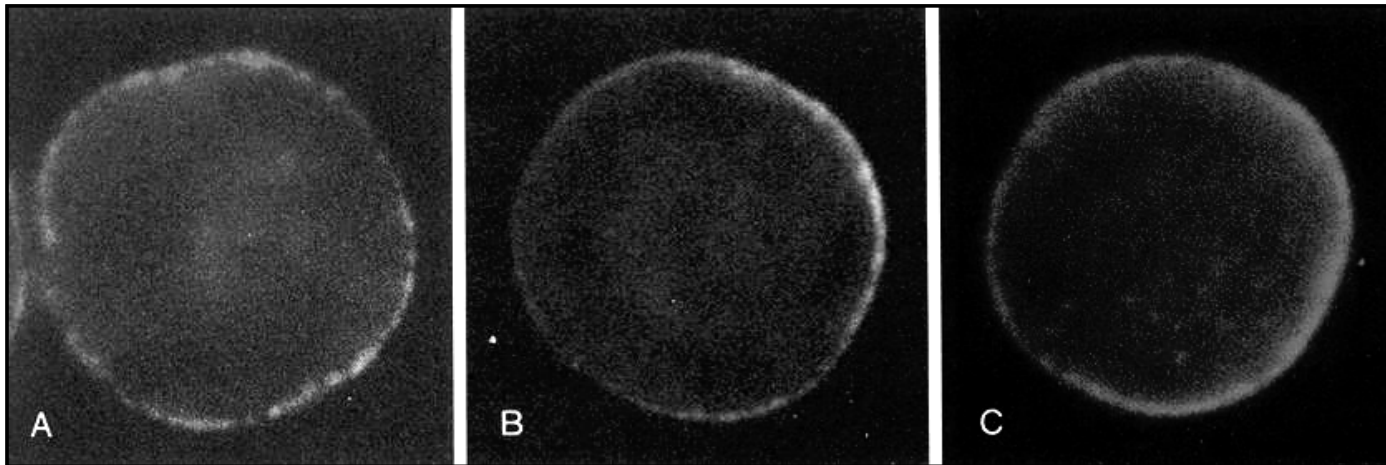
## Využití fúze buněk k průkazu fluidity membrán:



Frye a Edidin, 1970

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012

## Využití fúze buněk k průkazu fluidity membrán:



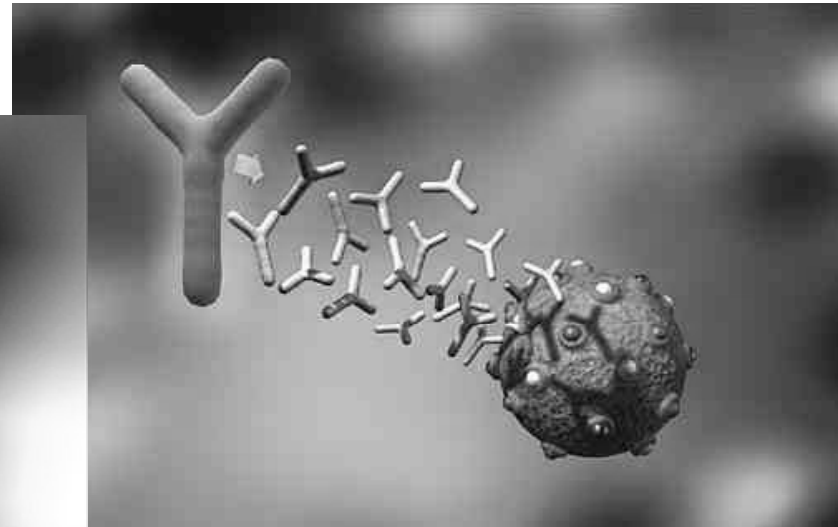
t = 0 min  
myší antigeny  
lidské antigeny

t = 40 min  
lidské antigeny

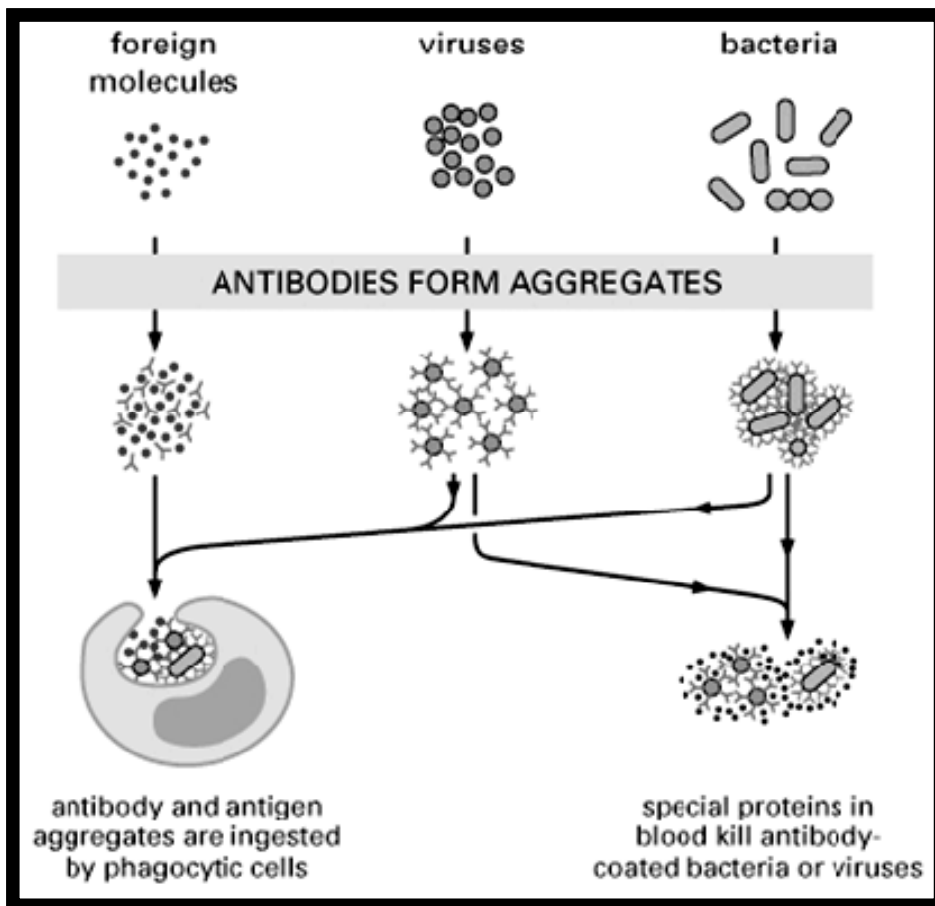
t = 40 min  
myší antigeny

## Hybridomová technologie

= využití indukované buněčné fúze pro výrobu monoklonálních protilátek

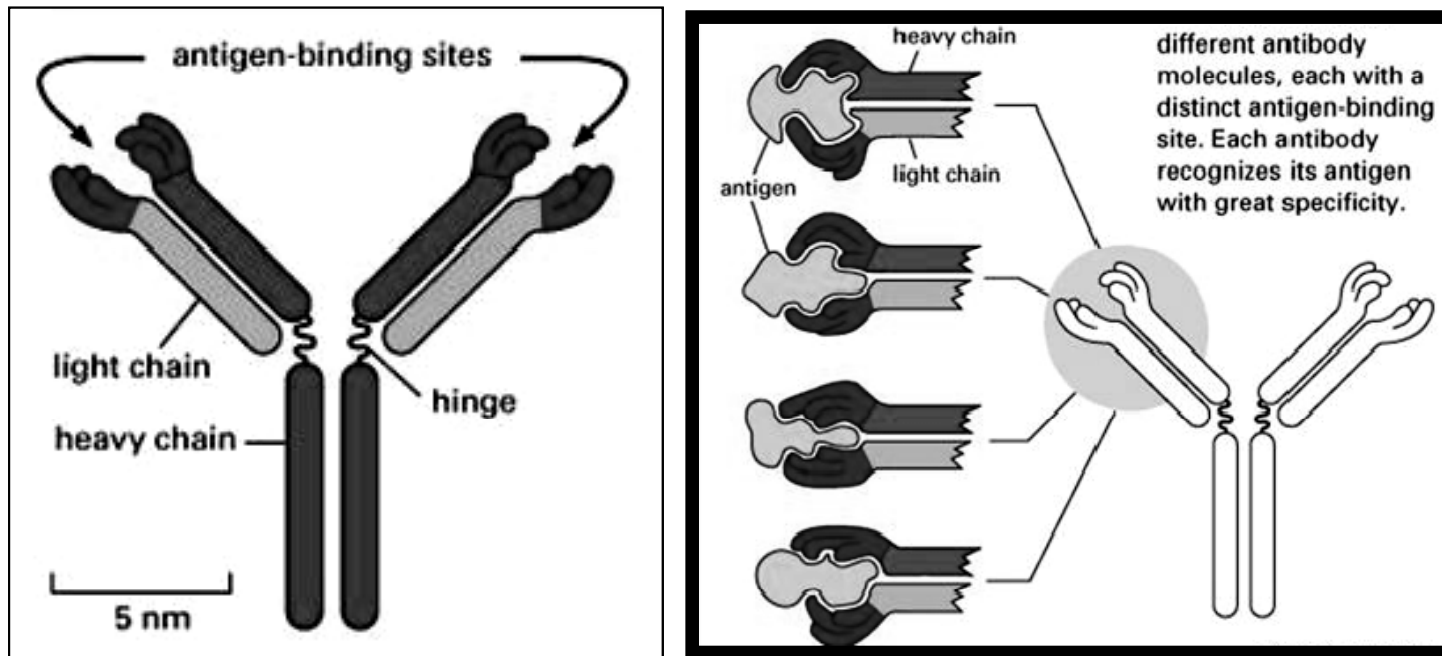






Přirozená role  
protilátek v obraně  
proti infekcím  
nebo toxinům

## Struktura a specifita protilátek



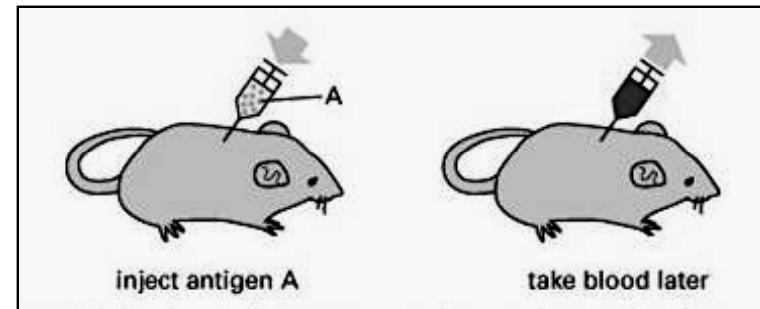
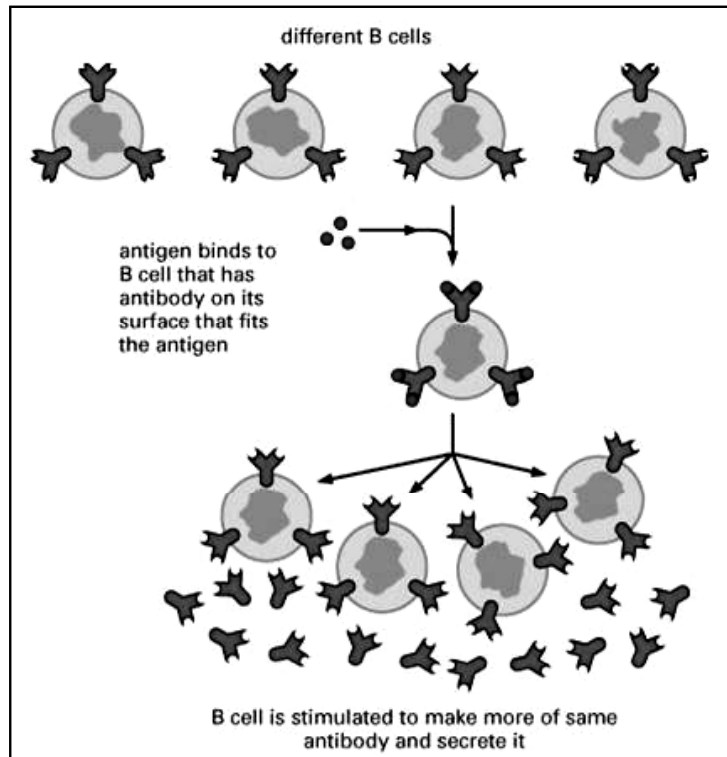
### Polyklonální protilátky:

- produkovány velkým počtem klonů plazmocytů (aktivovaných B-lymfocytů)
- směs stovek až tisíců odlišných molekul imunoglobulinů
- vazba na různé epitopy téhož antigenu

### Monoklonální protilátky:

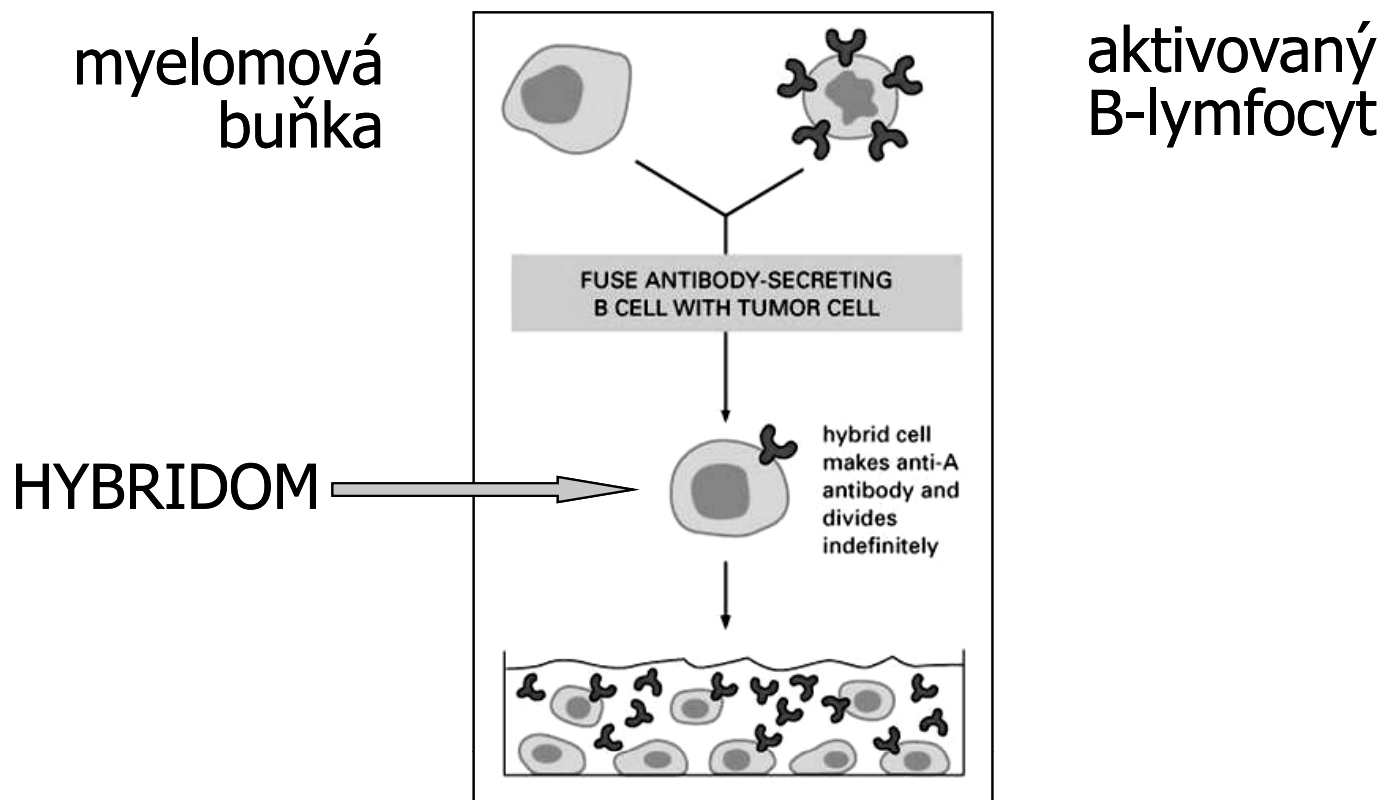
- produkovány jedním klonem plazmocytů (aktivovaných B-lymfocytů)
- jediný typ imunoglobulinu
- vazba na jediný epitop příslušného antigenu

# Příprava polyklonálních protilátek

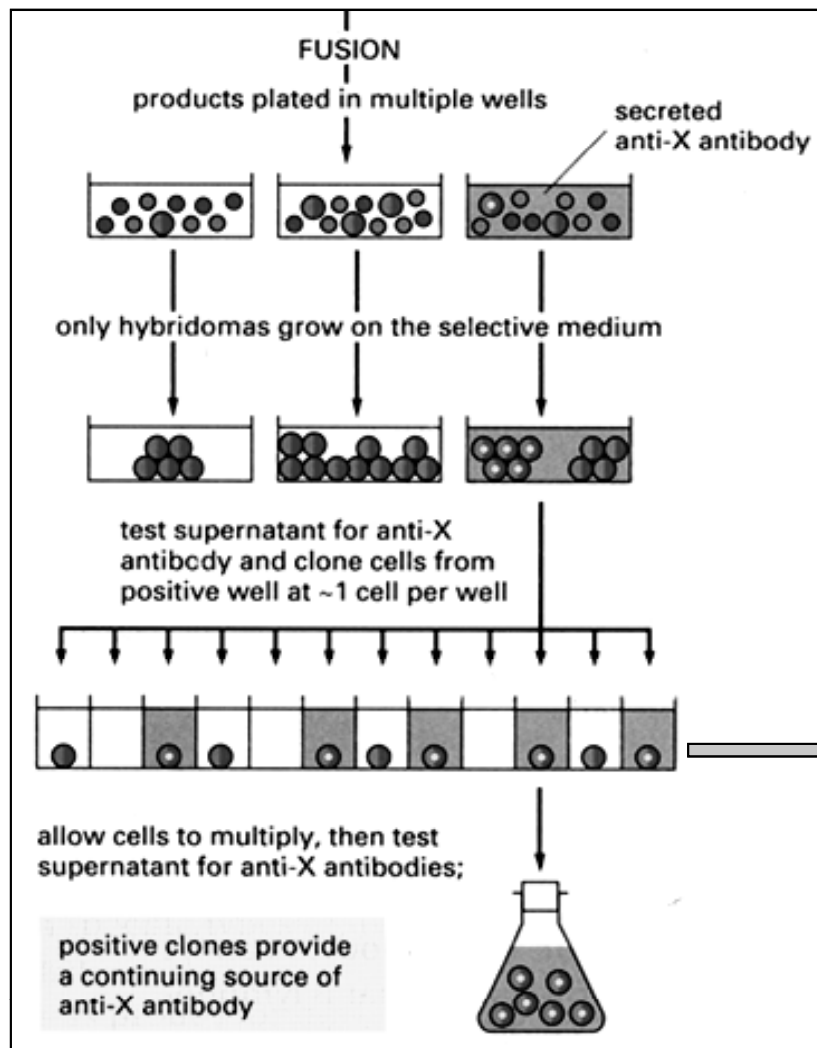


- imunizace pokusného zvířete
- izolace směsi protilátek z krve imunizovaného zvířete

## Princip hybridomové technologie (příprava monoklonálních protilátek)

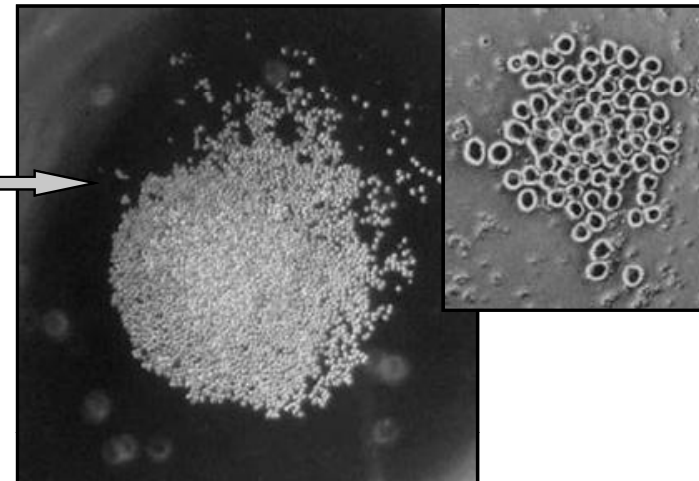


Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012



Výsledek hybridomové technologie:

monoklonální protilátky jsou produkovány buňkami téhož buněčného klonu, vážou se na stejnou antigenní determinantu a mají identické složení molekuly



## Využití monoklonálních protilátek v buněčné biologii a v medicíně

- morfologické a funkční studie v základním výzkumu (exprese proteinu, lokalizace, transport...)
- imunofenotypizace buněk a tkání (CD antigeny, intracelulární markery...) - patologie, hematologie, onkologie

### Metodické přístupy:

- imunodetekce pro mikroskopii (imunocytochemie, imunofluorescence, imunogold-labelling)
- Western-blotting a následná imunodetekce
- imunoafinitní sloupcová chromatografie
- imunoprecipitace

# TRANSPORT LÁTEK PŘES MEMBRÁNY

---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012



## Mechanismy membránového přenosu

- difúze
- osmóza
- iontové kanály
- přenašečový transport
- transportní váčky,  
resp. endocytóza / exocytóza

# OSMOTICKÉ JEVY

## Difúze

- permeabilní membrána  
(prochází rozpuštěná látka i rozpouštědlo)

## Osmóza

- semipermeabilní membrána  
(prochází pouze rozpouštědlo)

### Hypotonické prostředí

- prostředí s nižším osmotickým tlakem
- voda proniká do buněk
- plazmoptýza (erytrocyty: hemolýza)

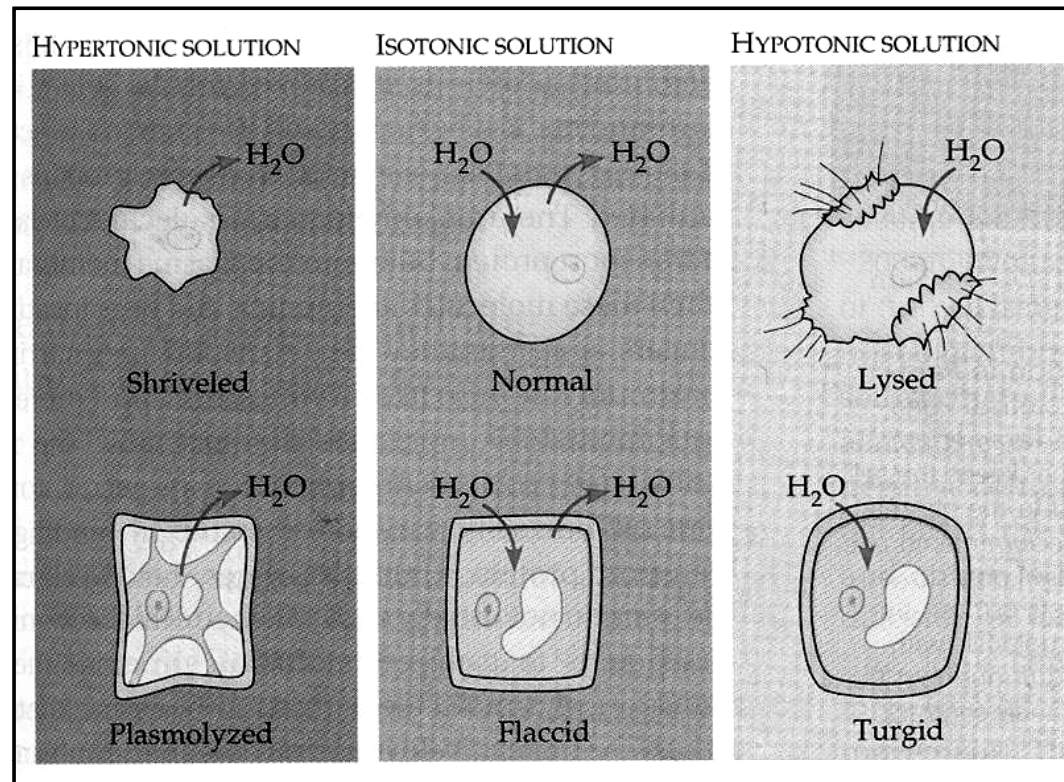
### Hypertonické prostředí

- prostředí s vyšším osmotickým tlakem
- voda uniká z buněk do prostředí
- plazmolýza (rostlinné buňky)
- plazmorýza (živočišné buňky)

### Izotonické prostředí

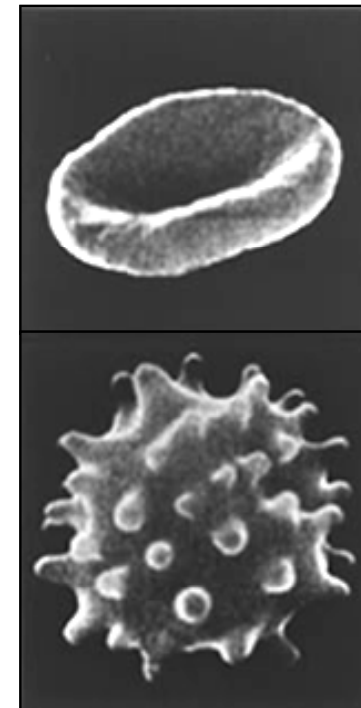
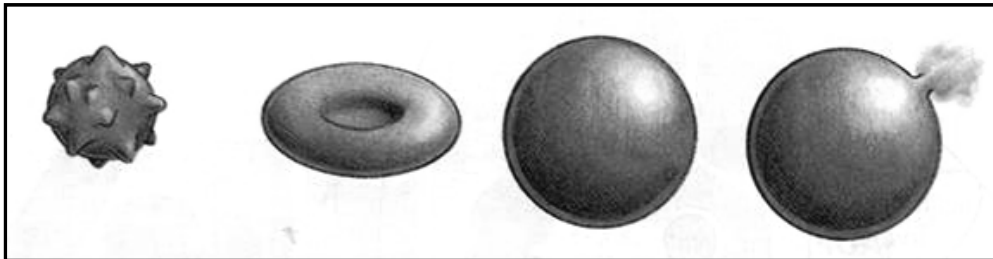
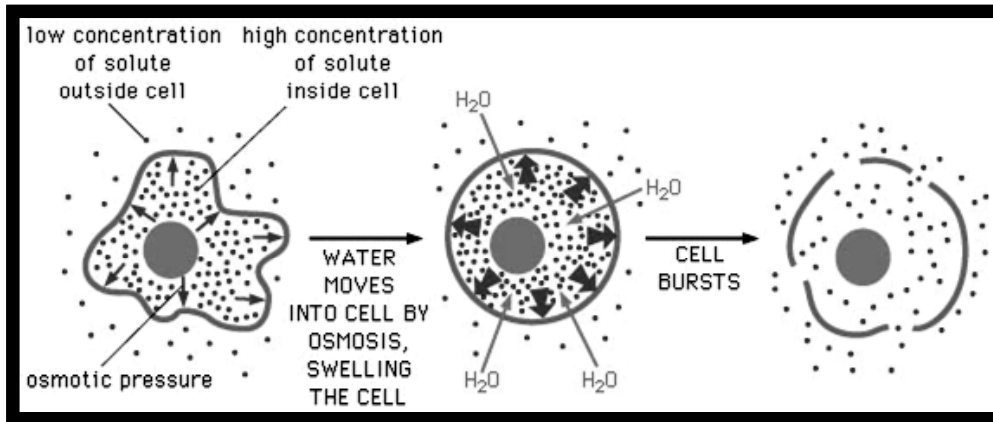
- prostředí o stejném osmotickém tlaku

# Porovnání osmotických jevů u živočišné a rostlinné buňky:



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012

# Reakce živočišné buňky na změny osmotického tlaku:

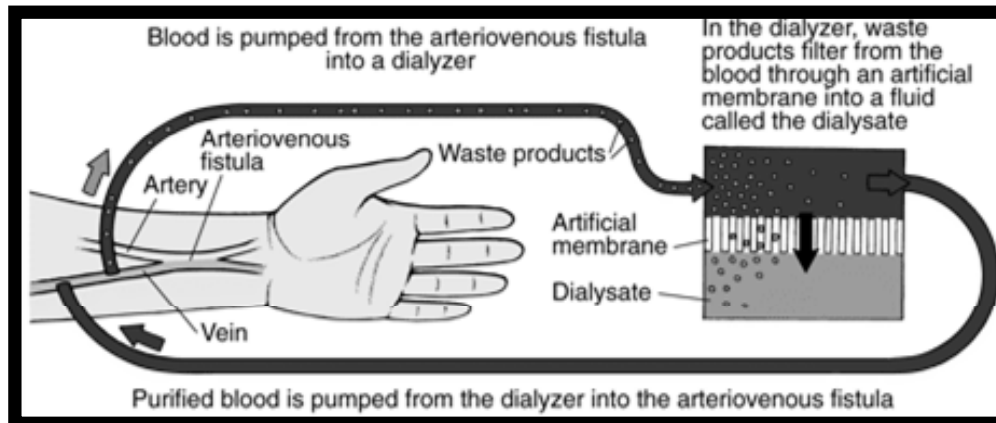


PRAKTICKÉ APLIKACE:  
DIALÝZA U PACIENTŮ  
S NEFUNKČNÍMI LEDVINAMI

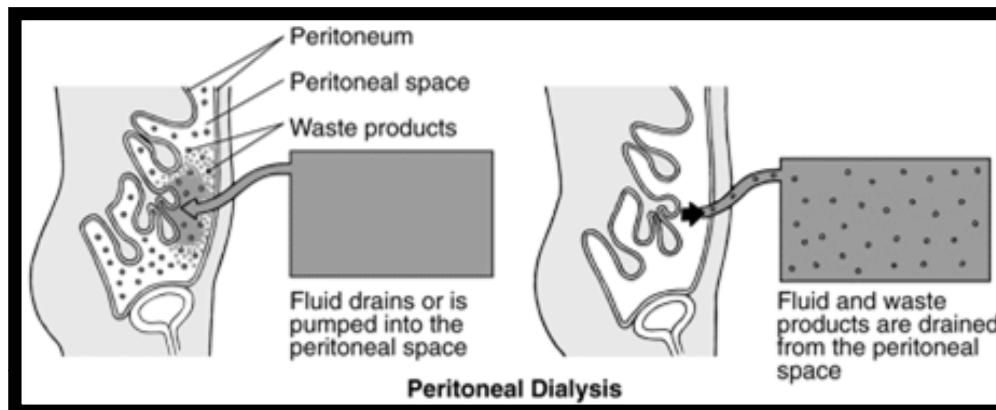
---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012

Dialýza = parciální difúze  
(přes membránu prochází voda a nízkomolekulární látky)



hemodialýza  
(umělá ledvina)

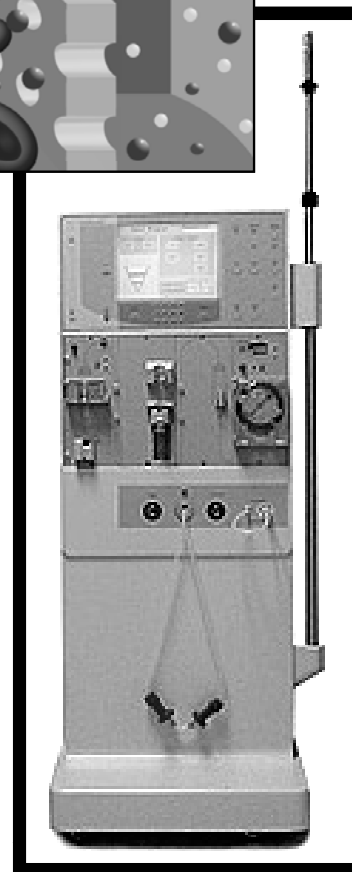
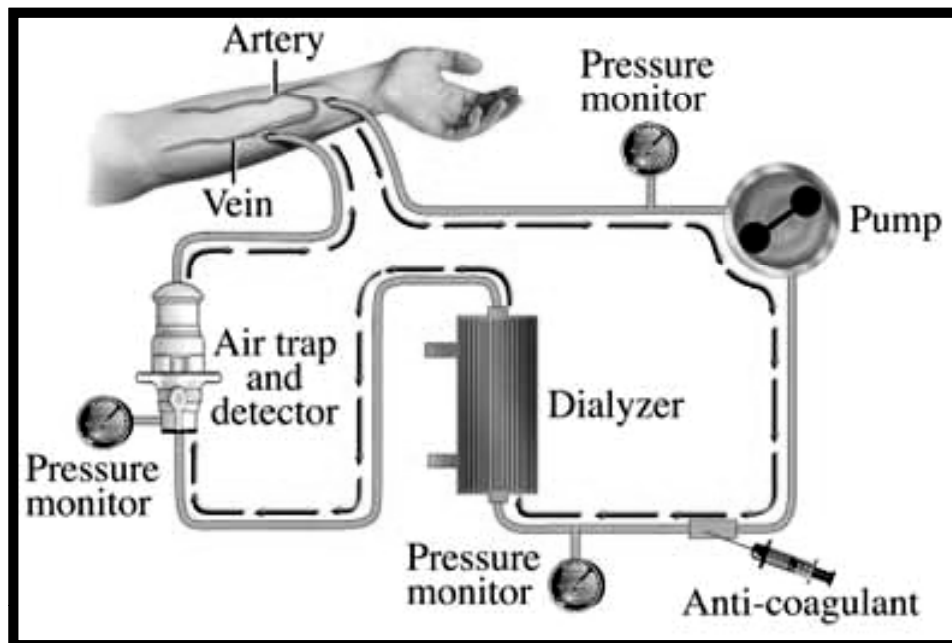
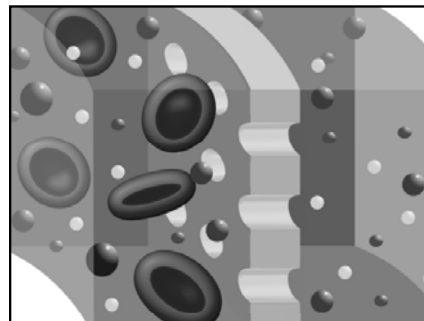


peritoneální  
dialýza

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012

# Princip hemodialýzy

Dialyzační roztok:  
voda, NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>,  
MgCl<sub>2</sub>, acetát sodný



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012





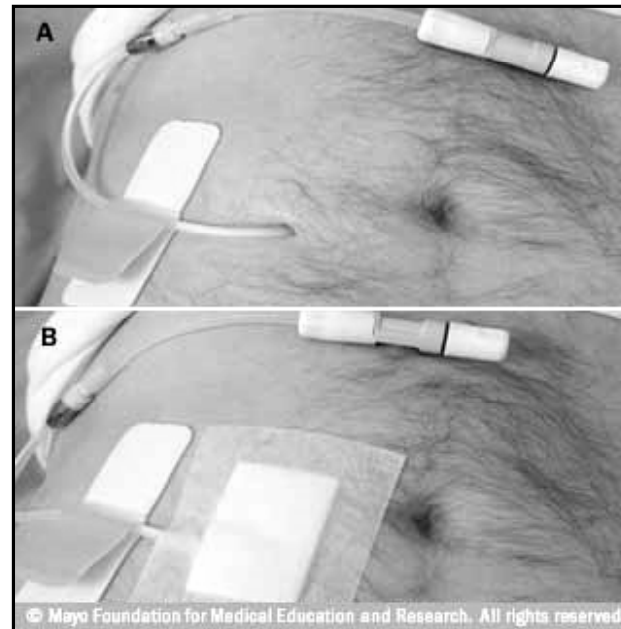
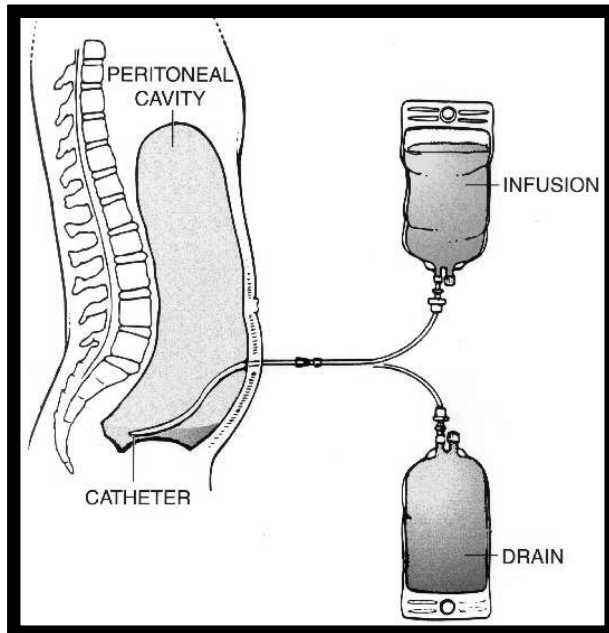
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012



---

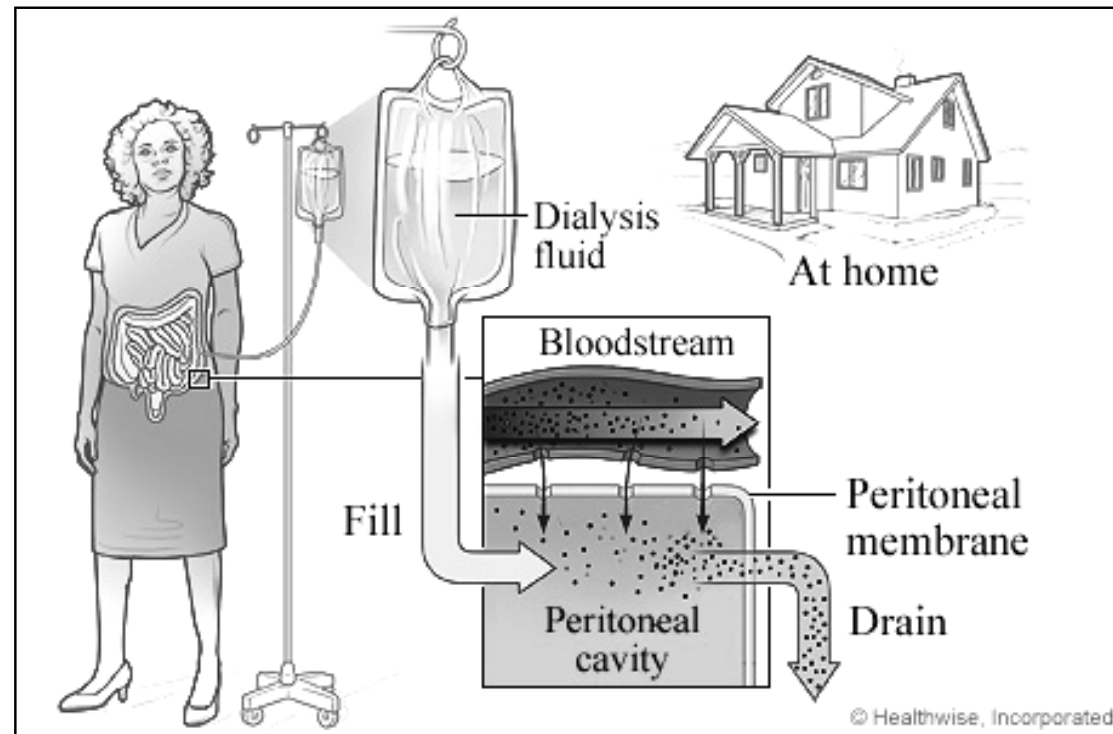
Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012

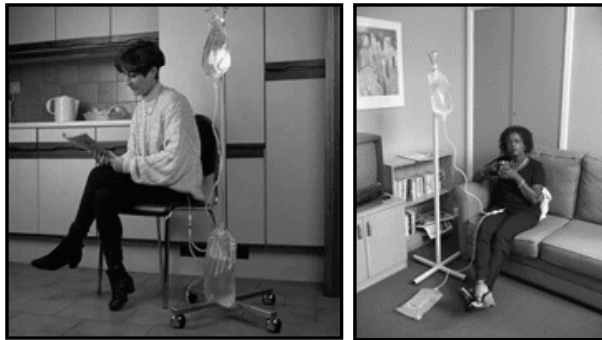
# Peritoneální dialýza



Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012

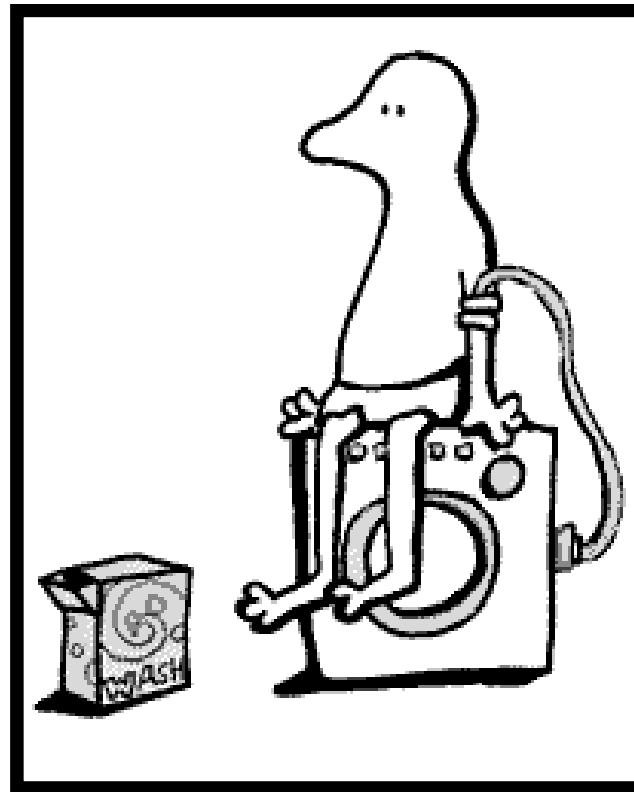
## Princip peritoneální dialýzy





---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012



---

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie / 04 / 14.3.2012