

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 6.3.2013

Biomembrány

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

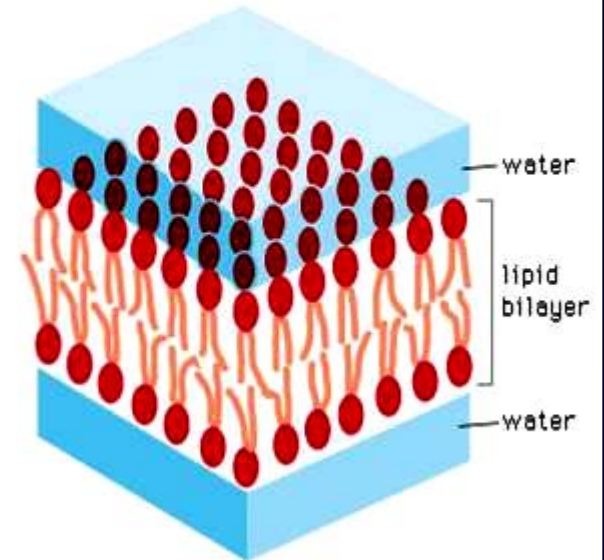
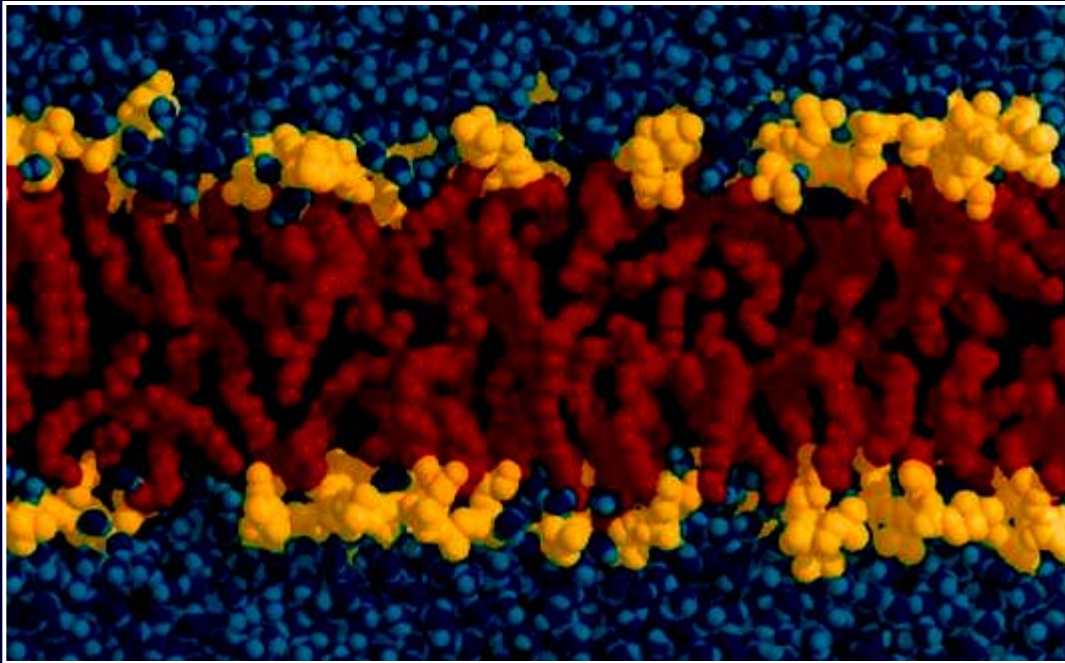
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

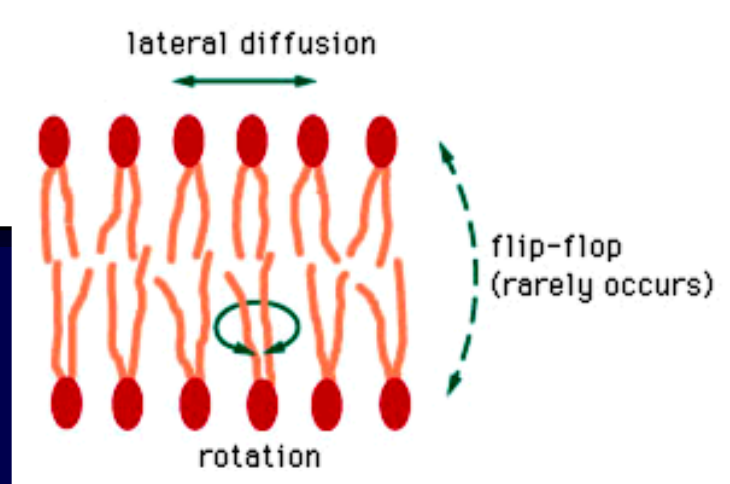
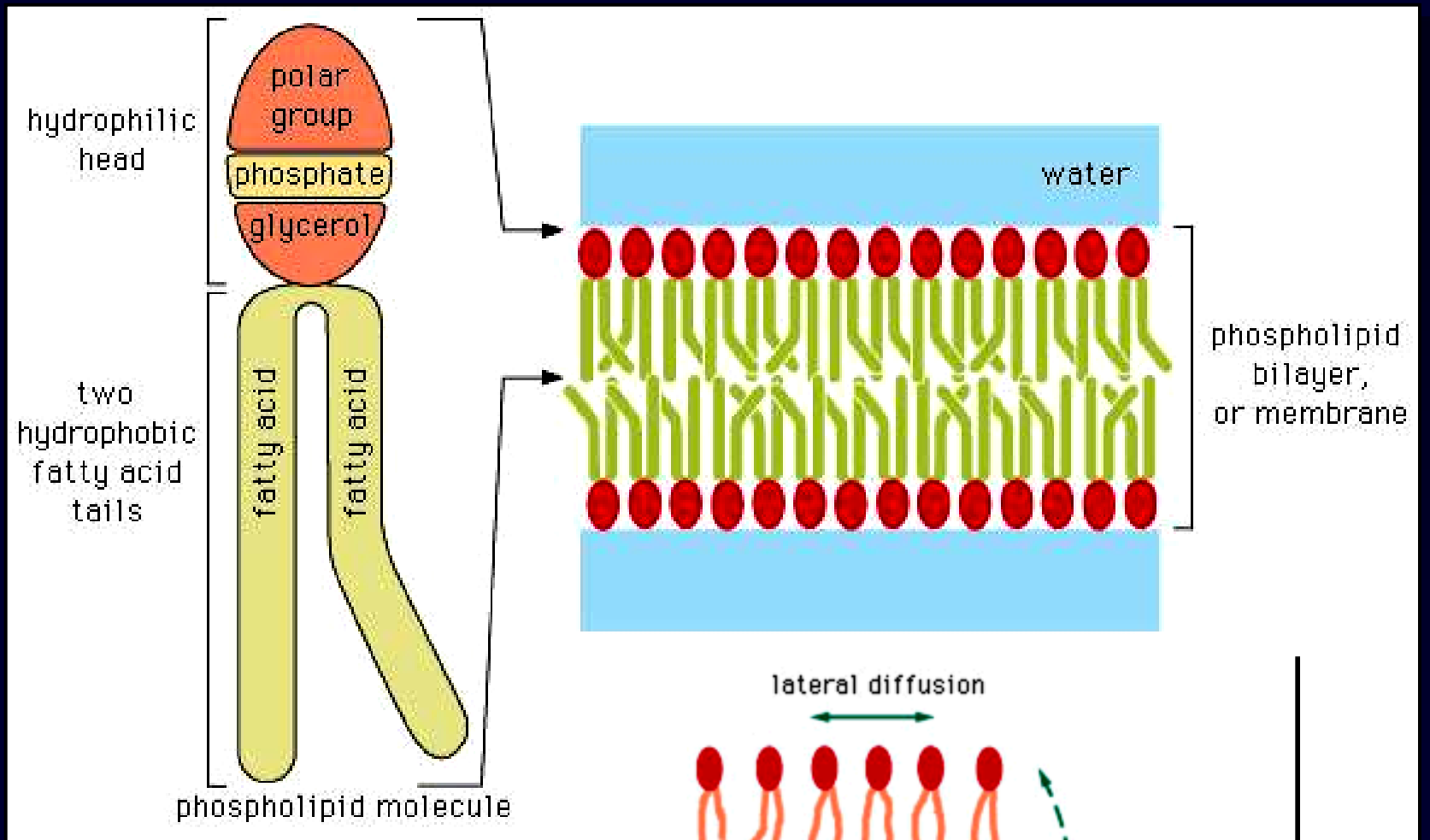
Program přednášky:

- 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

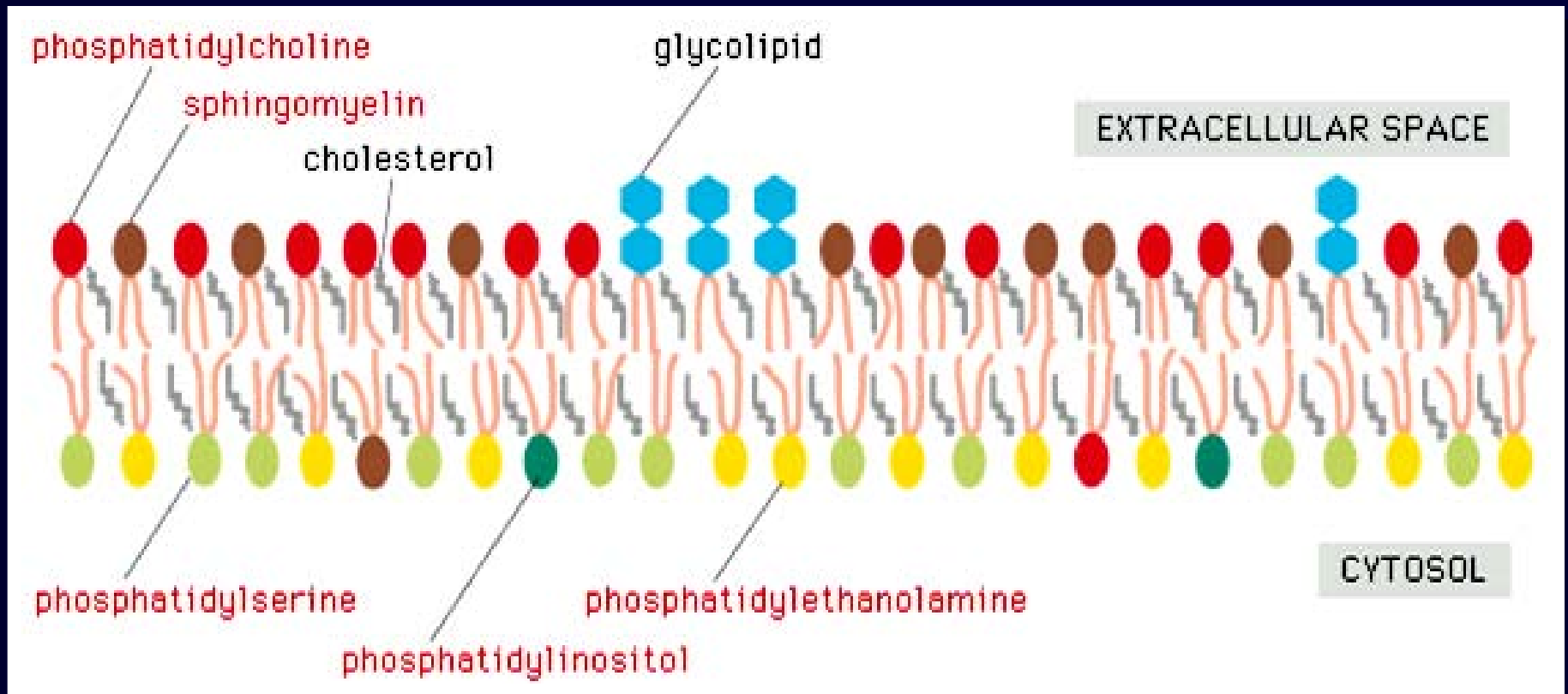
Lipidová dvojvrstva



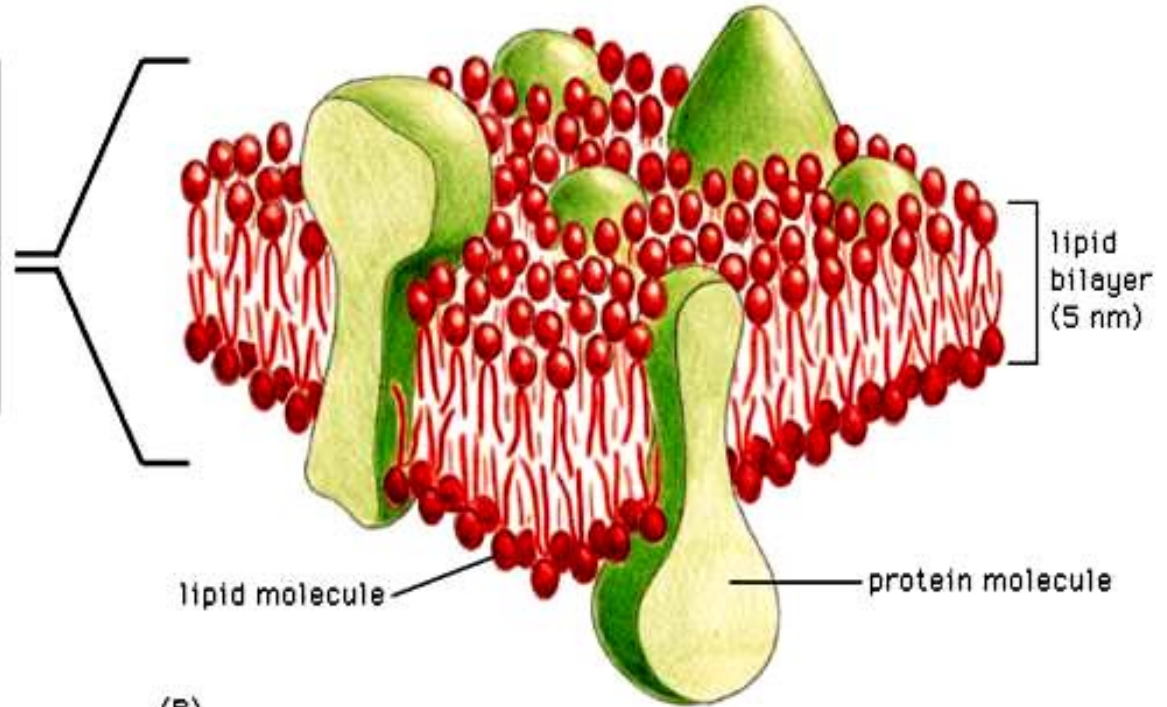
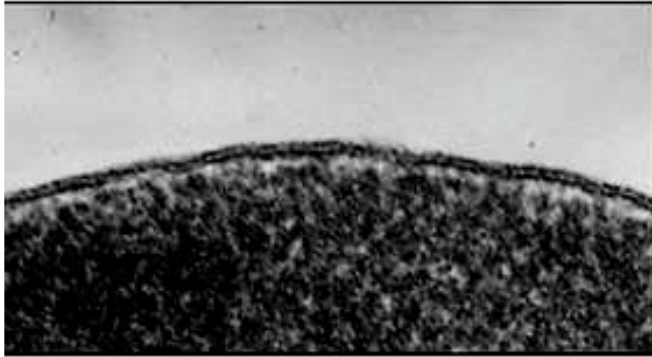


Fluidita membrány

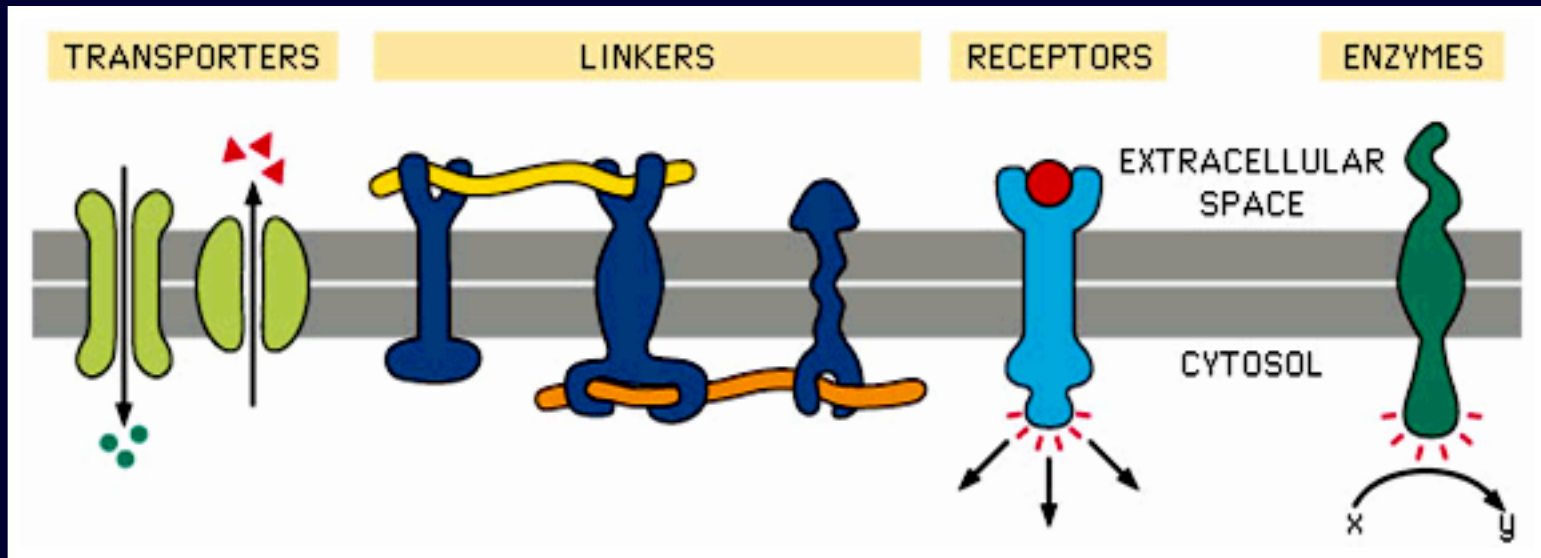
Složení plazmatické membrány:



Stavba plazmatické membrány:

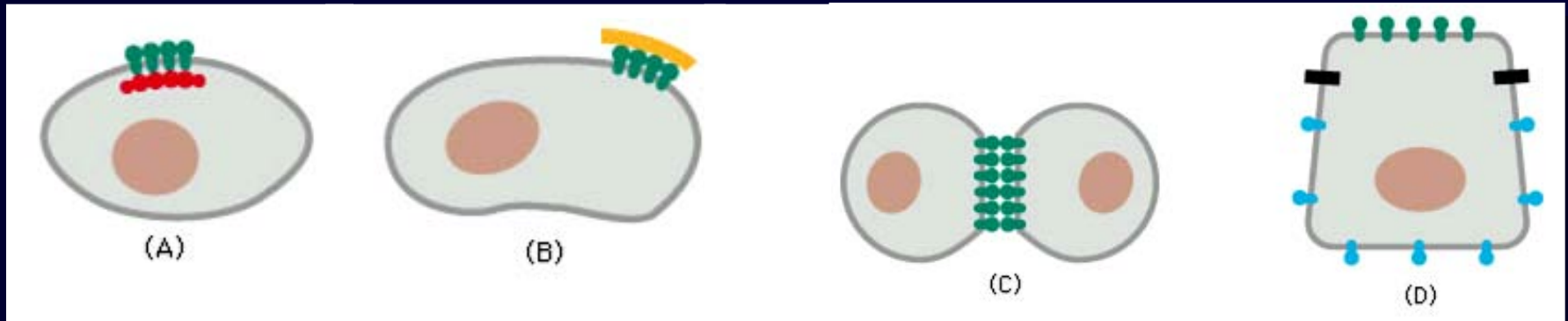


Funkce transmembránových proteinů:

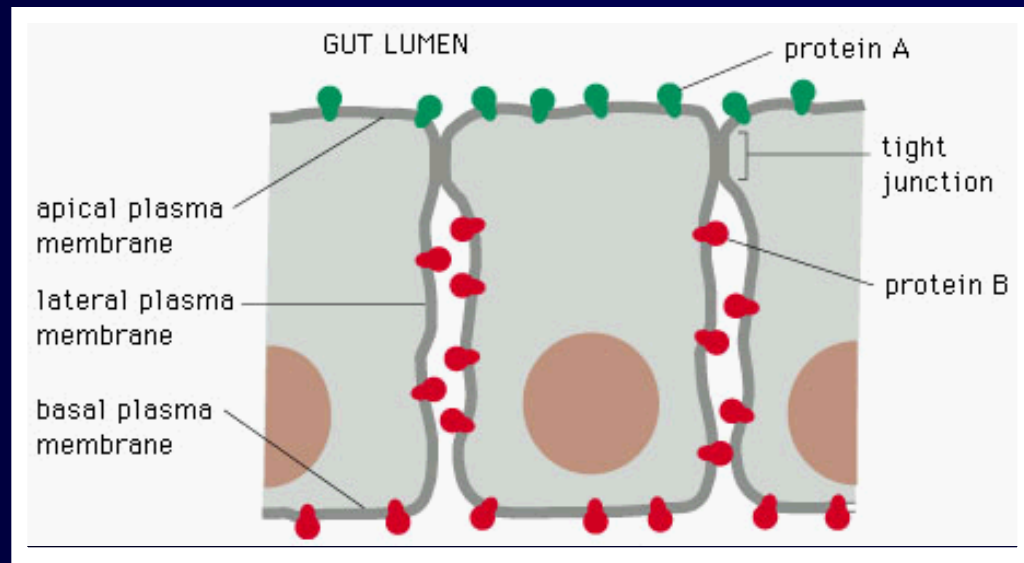


- **přenašeče** (Na^+/K^+ pumpa...)
- **spojovací proteiny** (intergriny...)
- **receptory** (EGFR, receptory pro FGF, PDGF, TNF...)
- **enzymy** (adenylátcykláza...)

Lokalizace transmembránových proteinů:

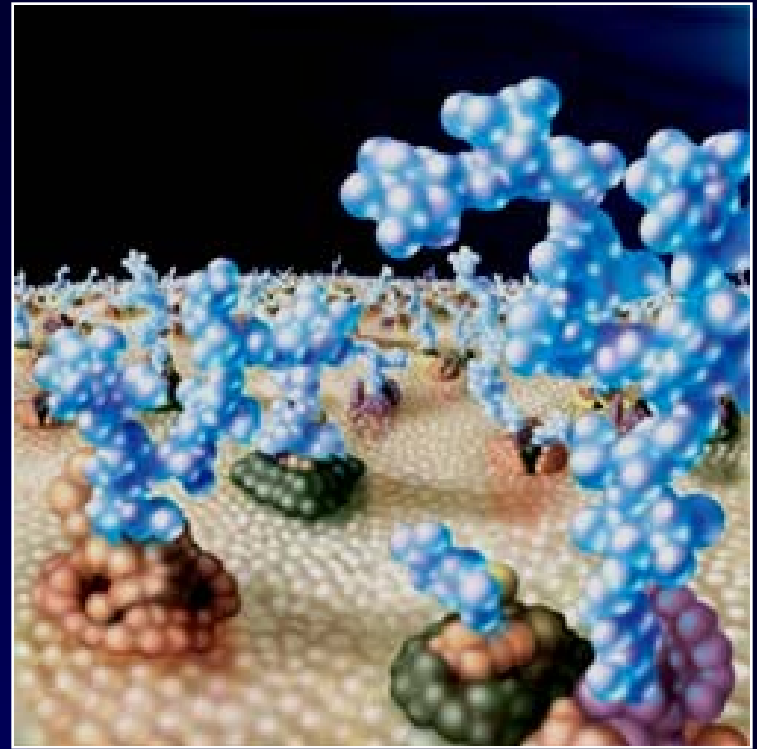


střevní epitel

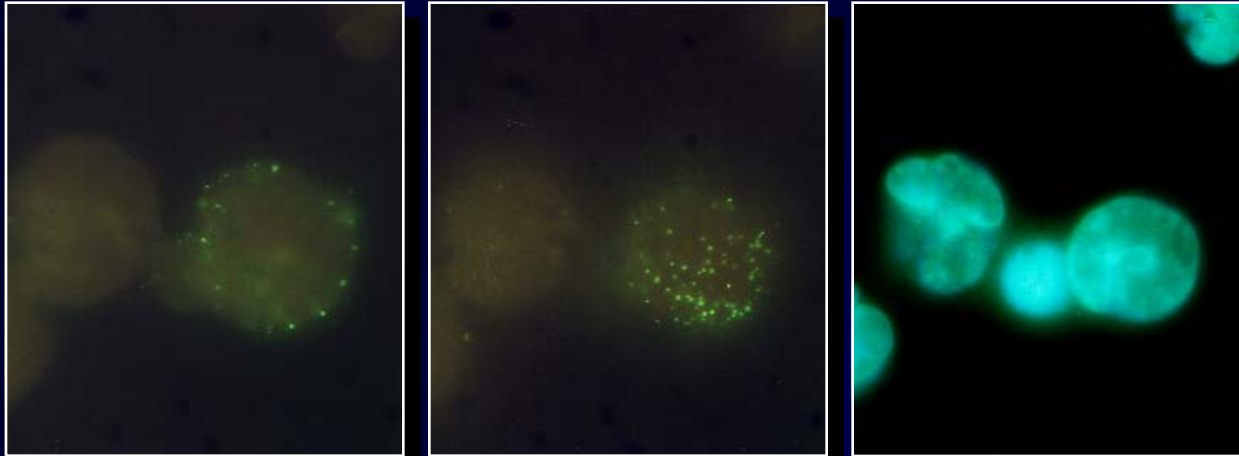


CD markery (antigeny)

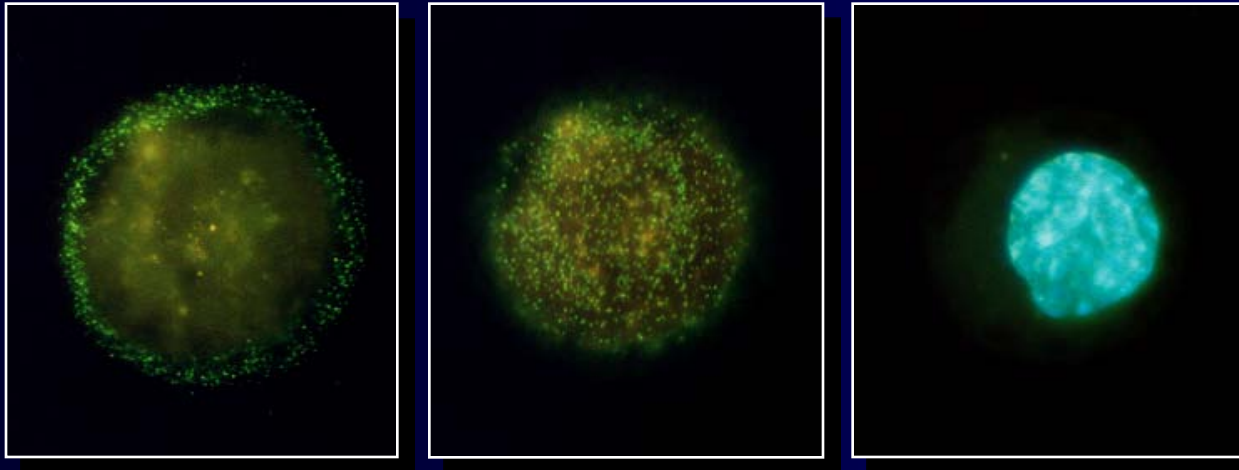
- glykoproteiny na povrchu lidských buněk
- v současnosti cca 250
- imunofenotypizace (zejména v hematologii)
- nespecifické:
CD47, CD118
- specifické:
CD66b - granulocyty
CD85, CD205 - dendritické buňky
CD133 - kmenové, resp. progenitorové buňky
CD141 - vaskulární endotelové buňky
CD168 - buňky karcinomu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



Příklady detekce CD markerů: linie HL-60

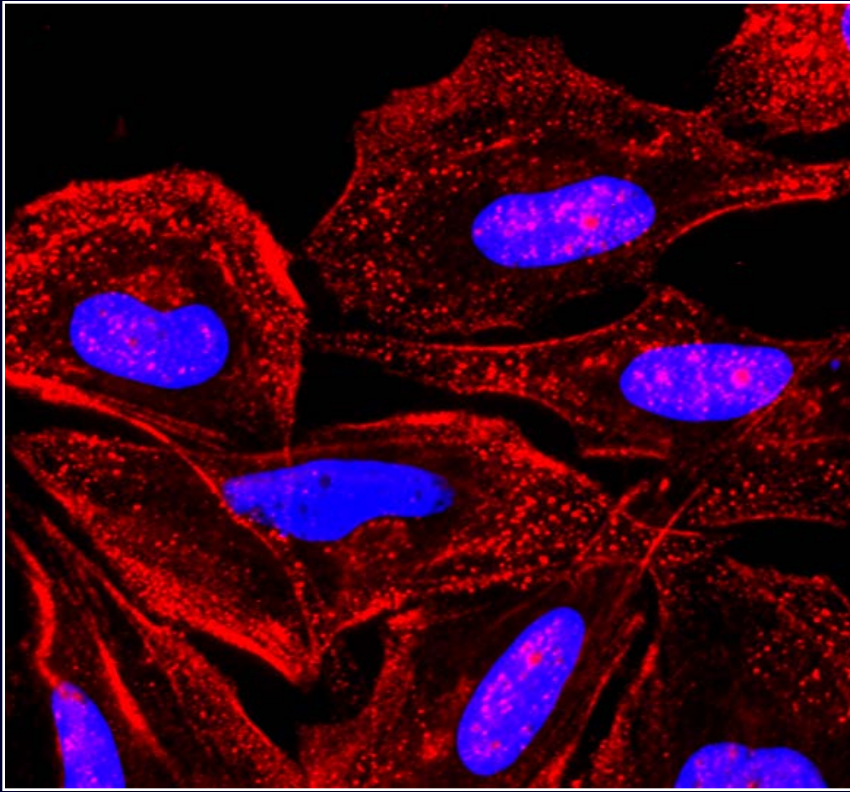


granulocyty:
CD66b
DAPI

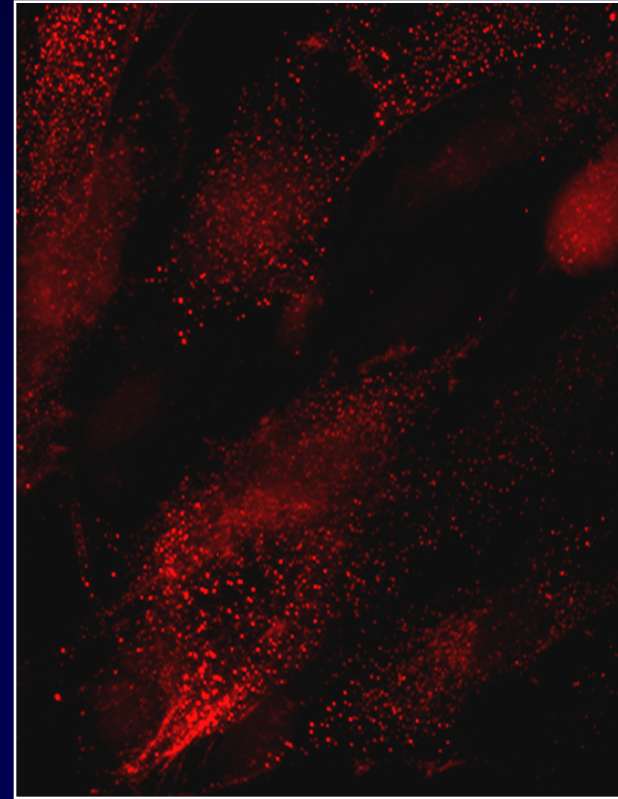


makrofágy:
CD14
DAPI

Příklady detekce CD markerů: linie derivované z osteosarkomů

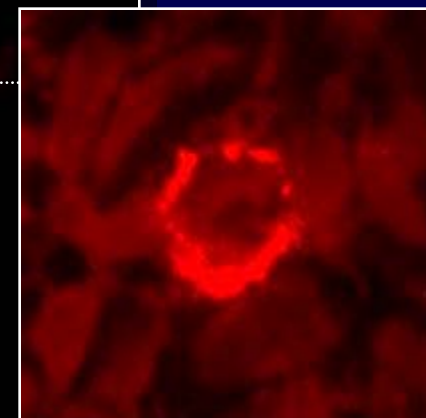
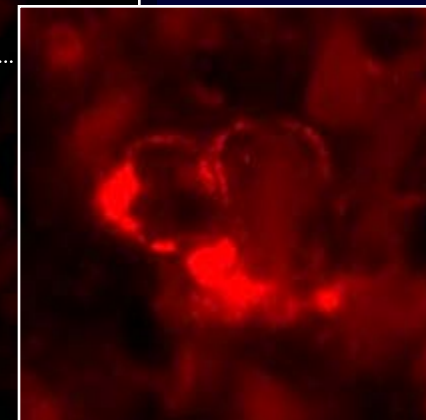
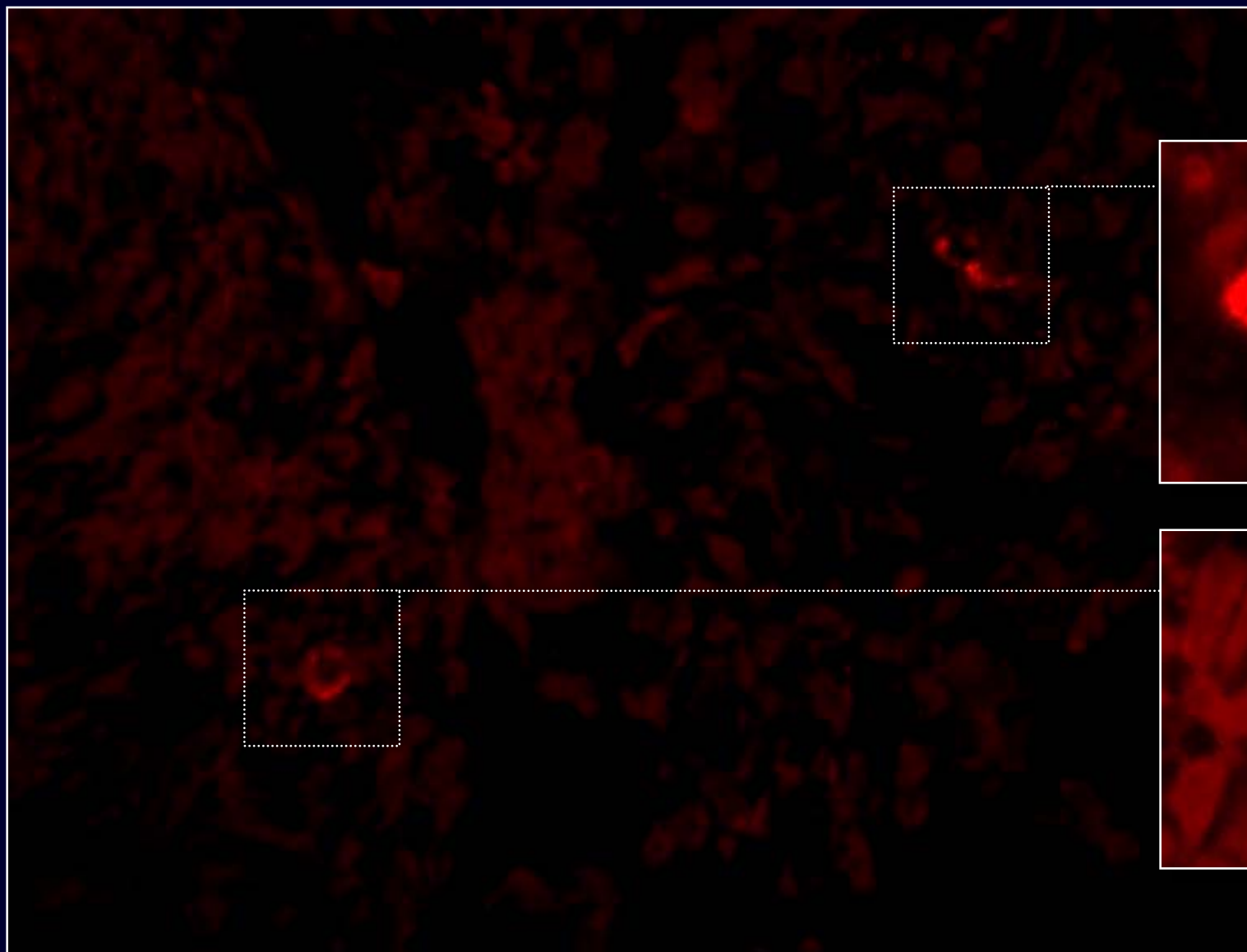


Saos-2: **CD133** / **DAPI**

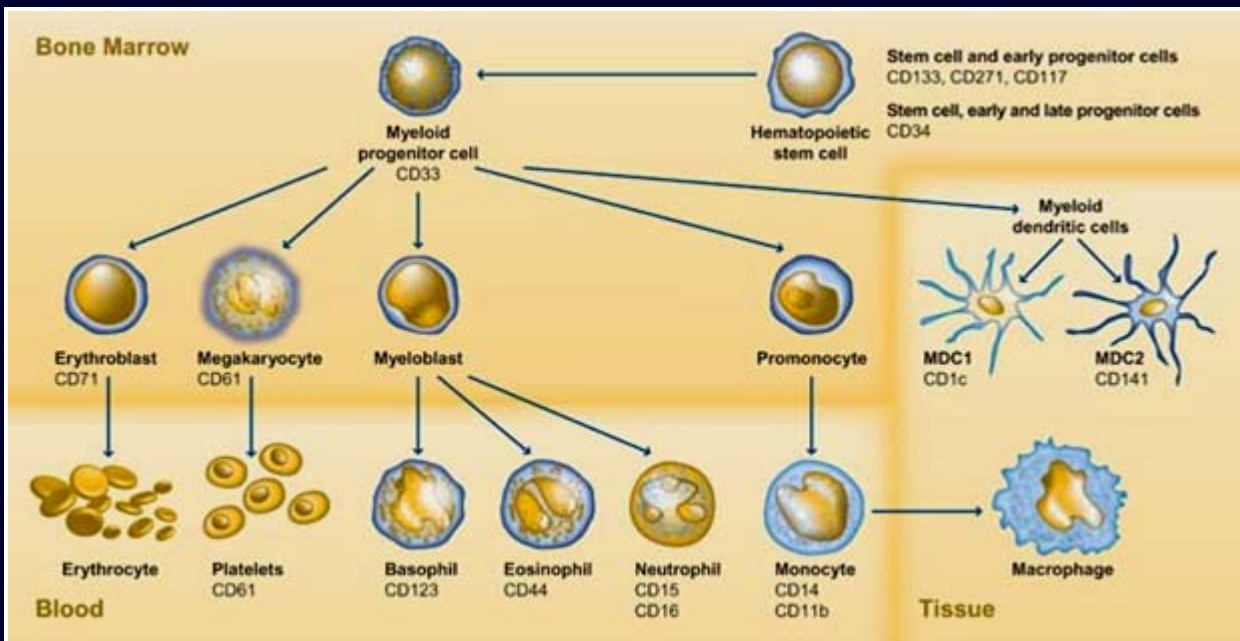


OSA-03: **CD133**

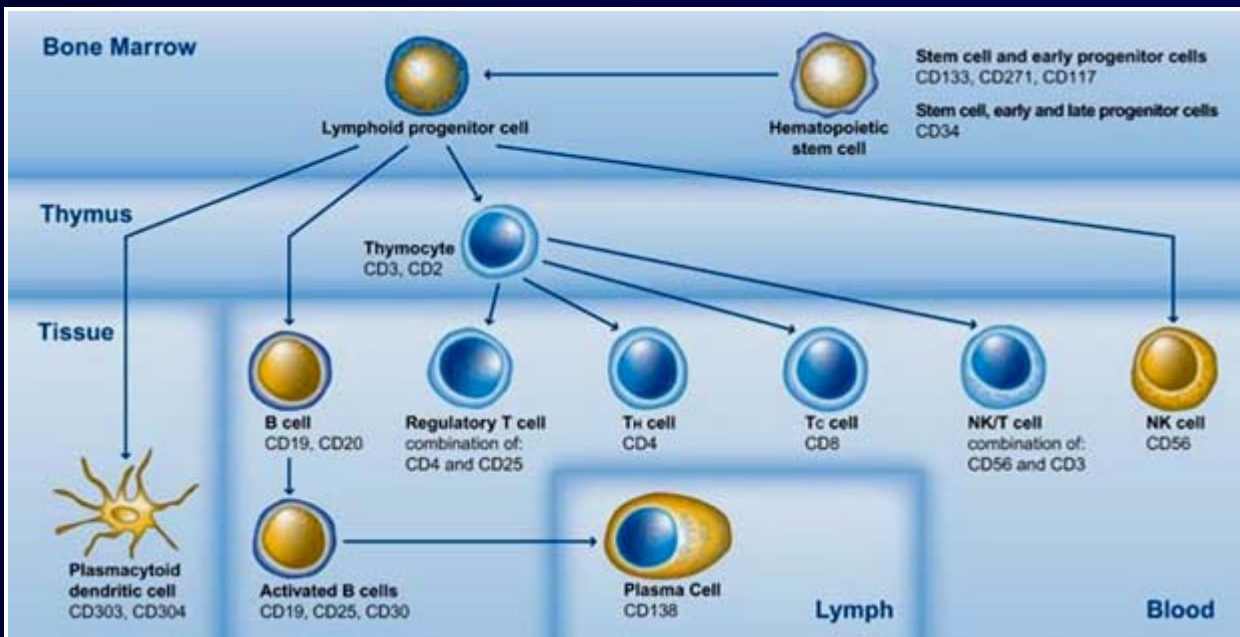
CD133



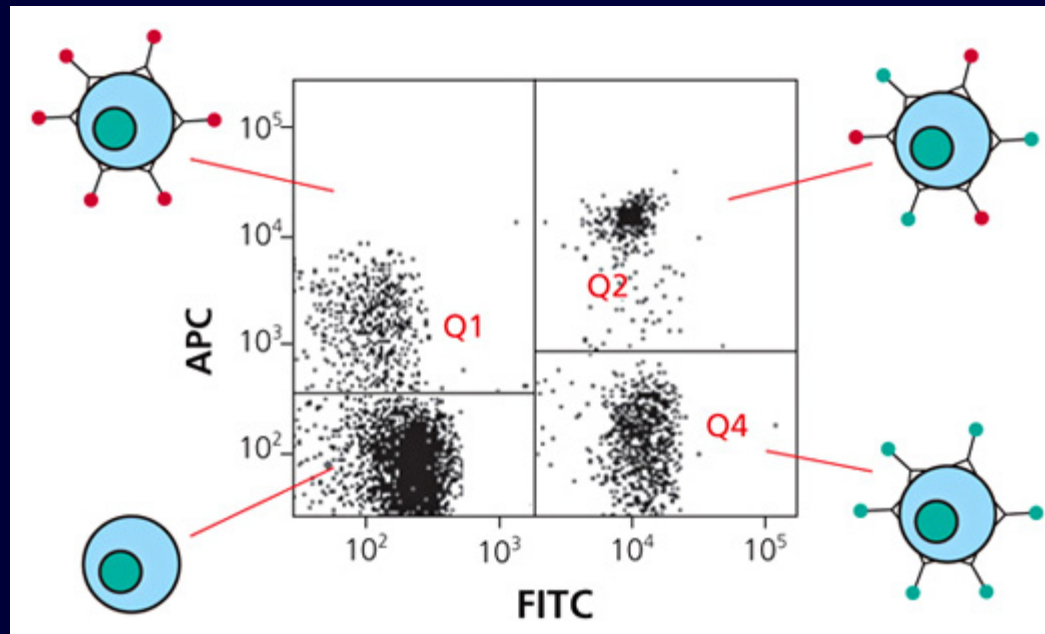
Imunofenotypizace myeloidních buněk



Imunofenotypizace lymfoidních buněk

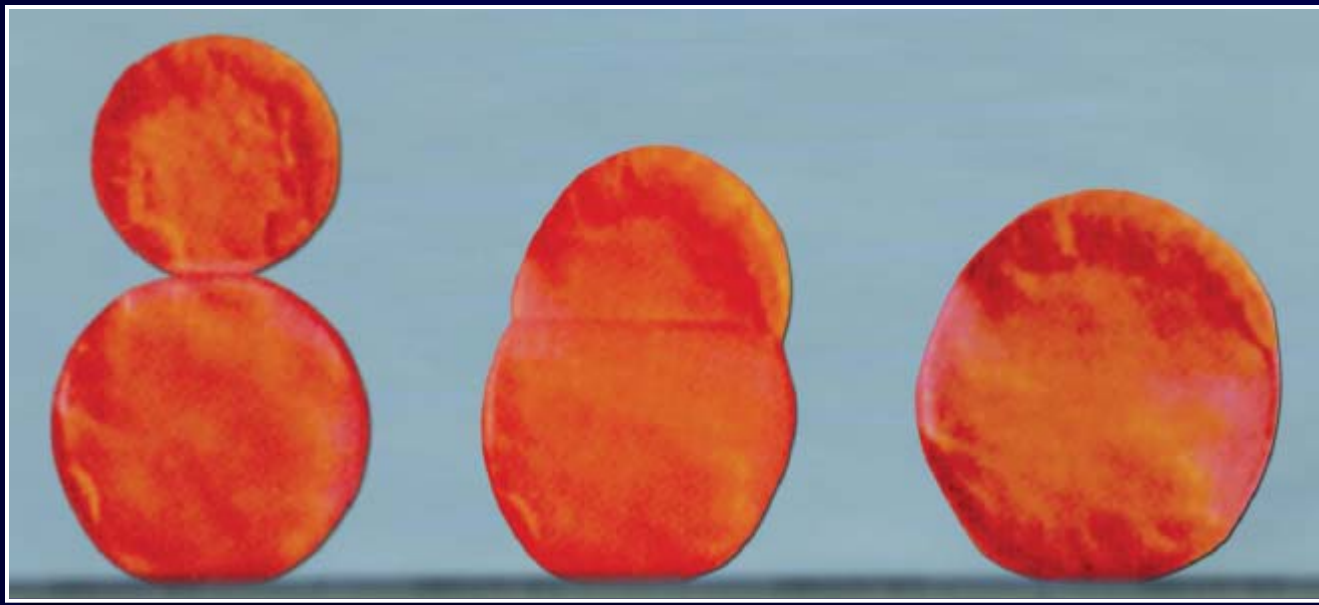
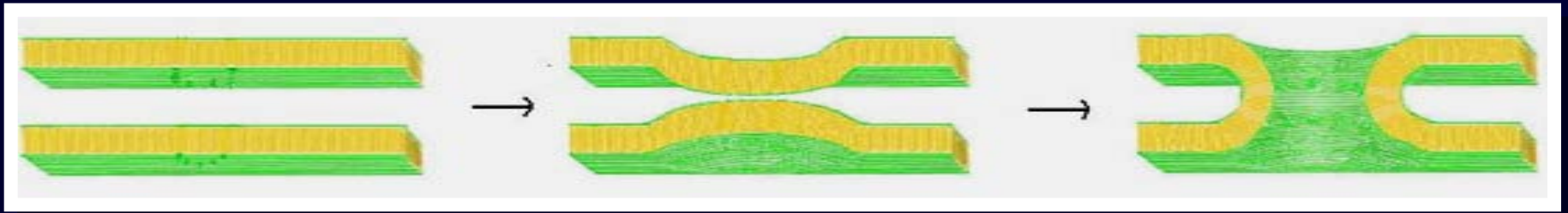


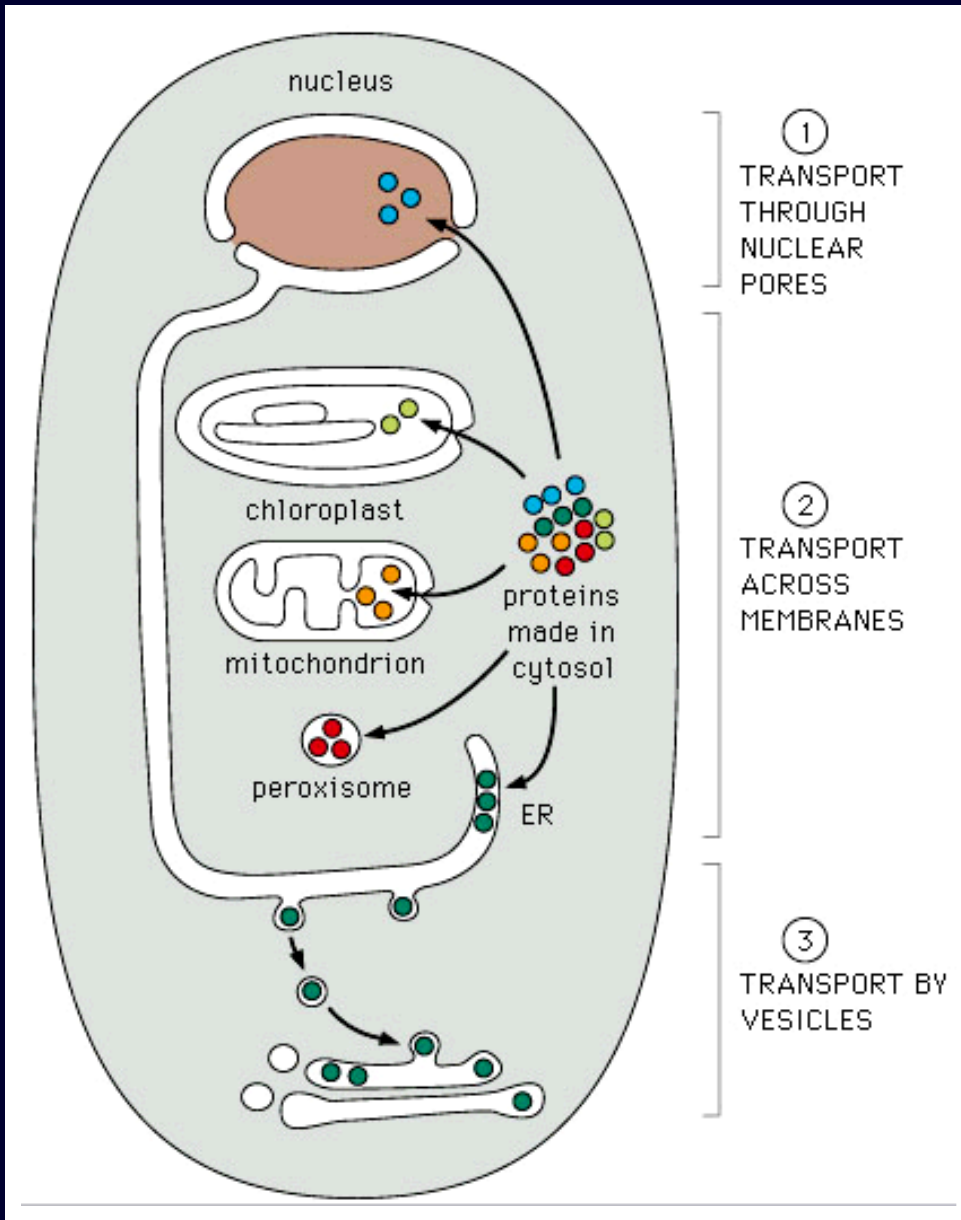
Imunofenotypizace buněk pomocí průtokové cytometrie



FÚZE MEMBRÁN A VEZIKULÁRNÍ TRANSPORT

Průběh fúze





Intracelulární transport proteinů:

- jadernými póry
- přes membrány
- prostřednictvím vezikulů

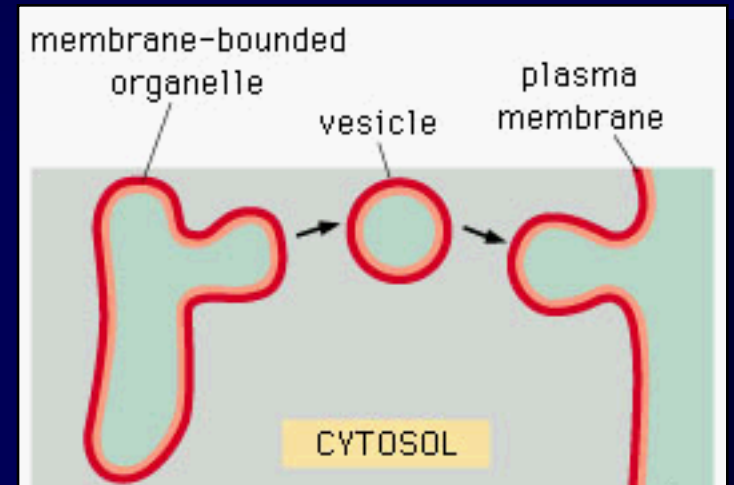
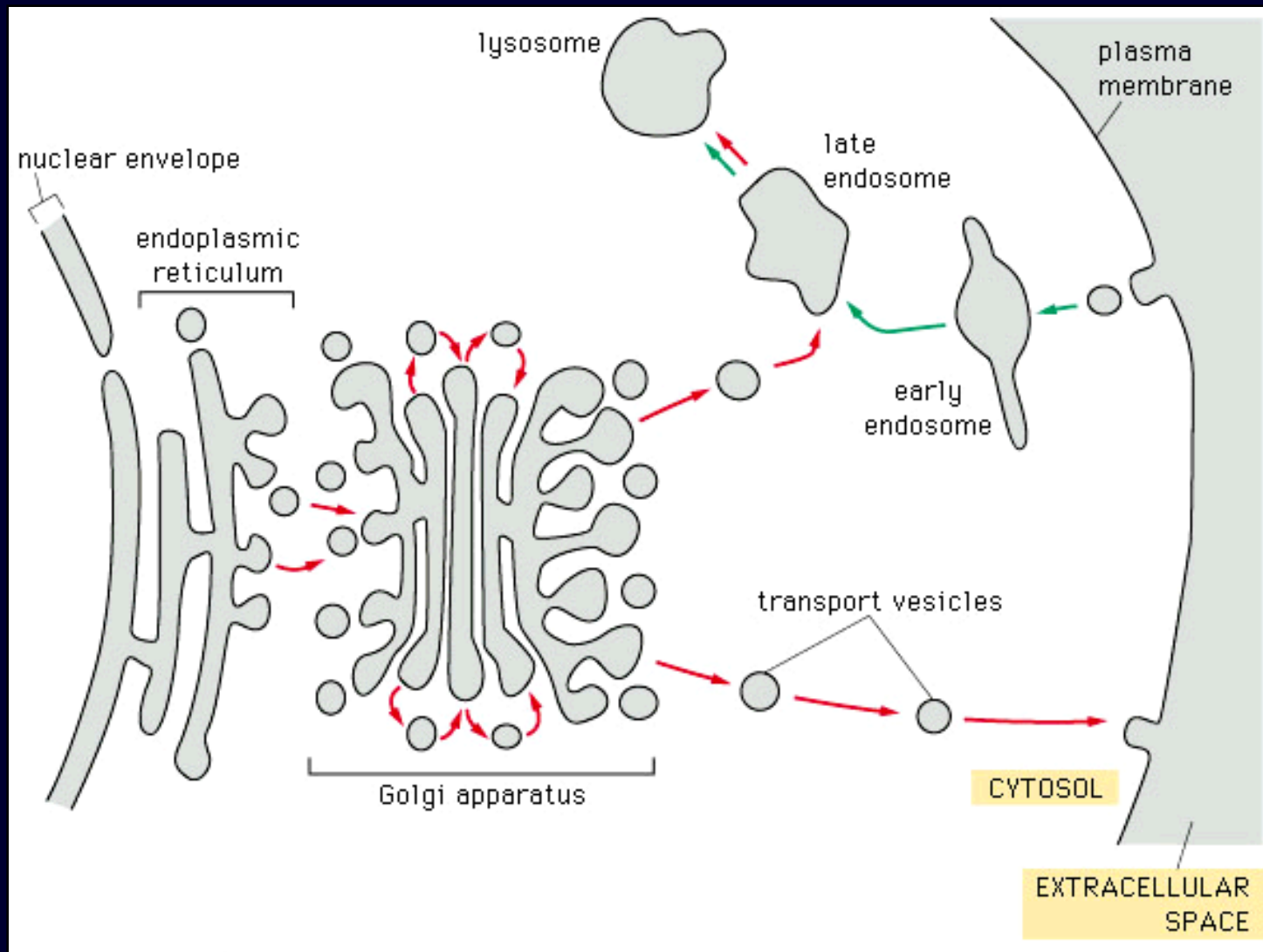


Schéma vezikulárního transportu:





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

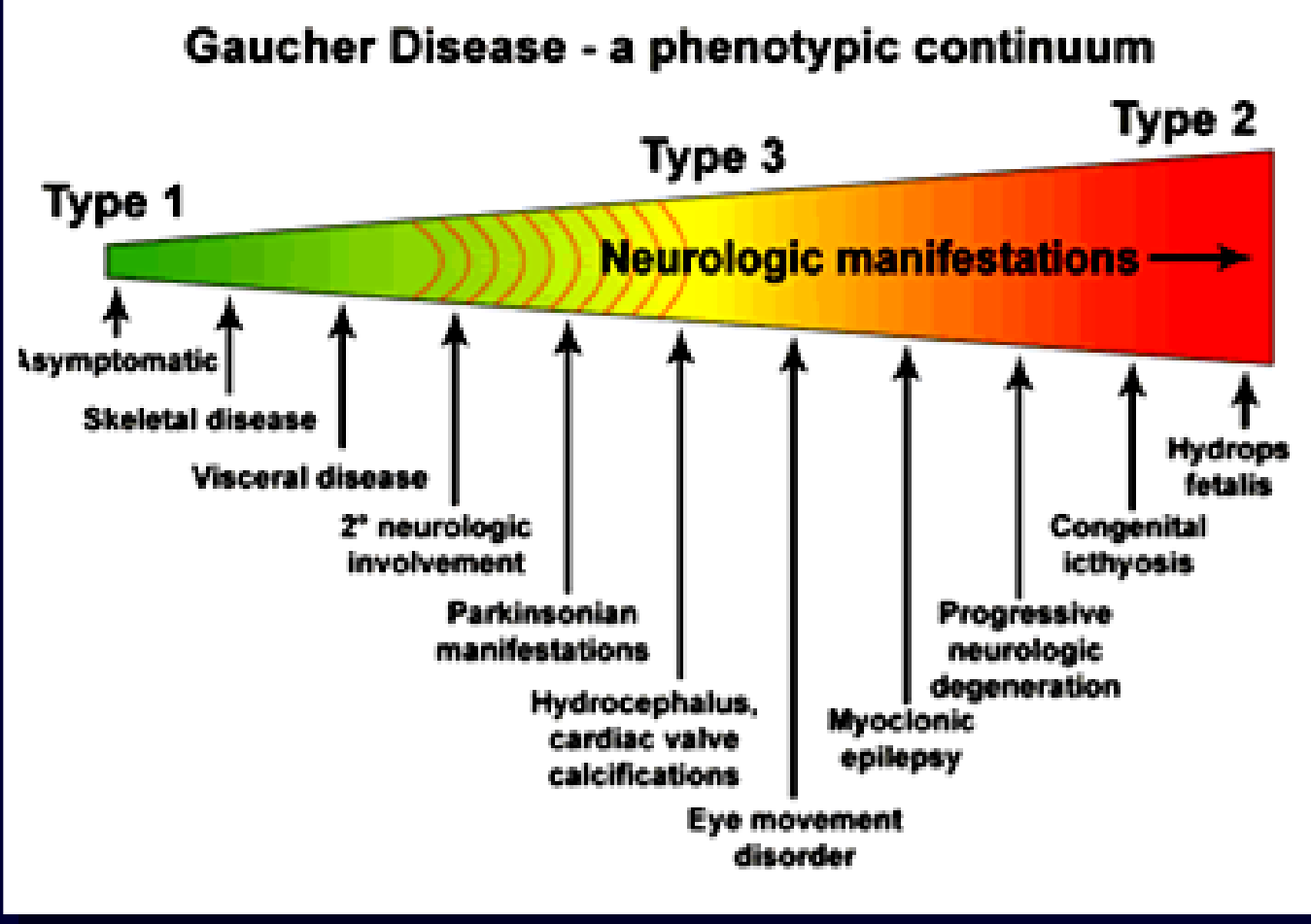


Typ II:

- 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

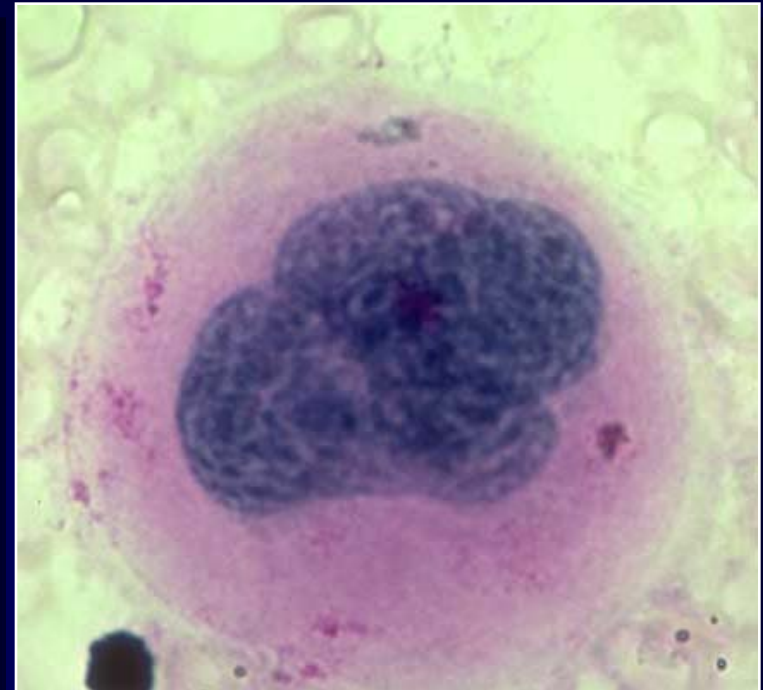
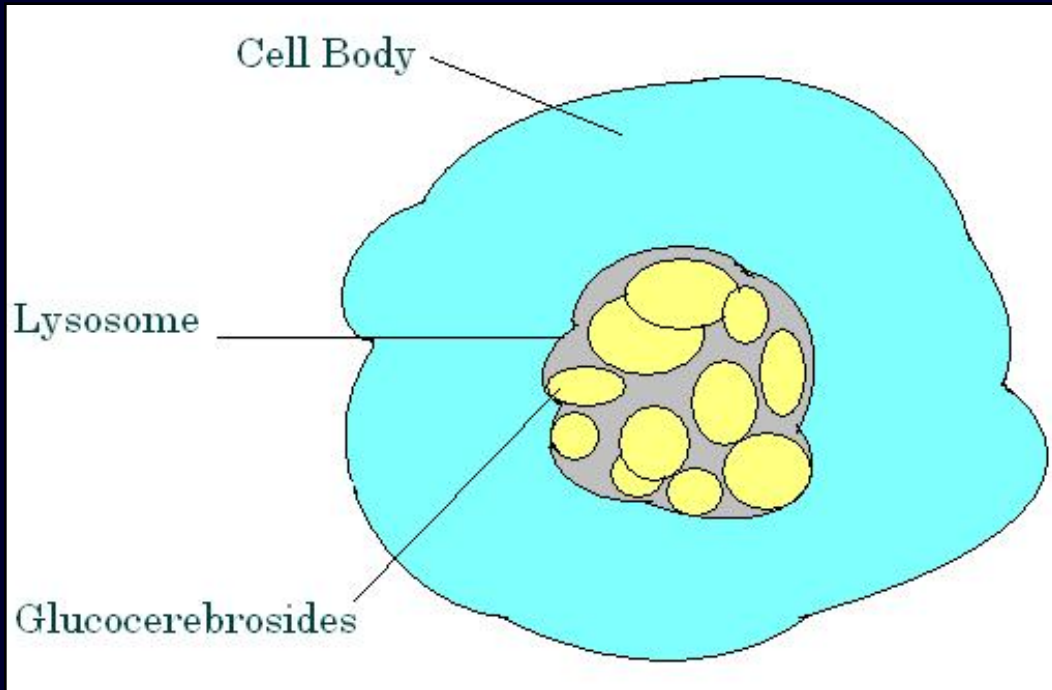
- makrofágy
- vyskytují se izolovaně v postižené tkáni
- pozitivní po obarvení činidlem PAS (Periodic Acid Schiff)

Pseudo-Gaucher cells

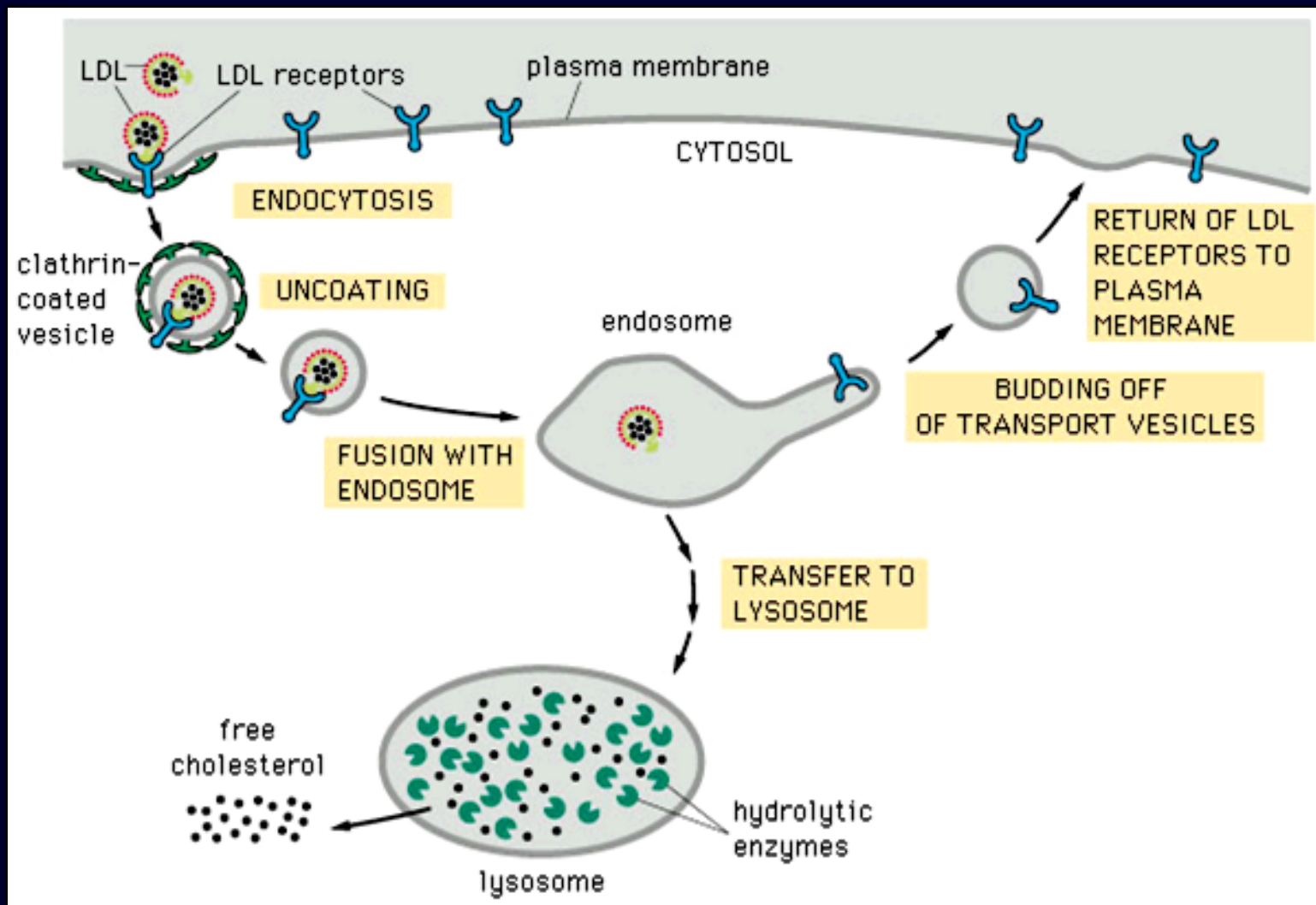
- výskyt u onemocnění spojených s vysokým turnoverem membrán (chronická granulomatózní leukémie, mnohočetný myelom, Hodgkinova choroba, AIDS...)
- ve tkáni se vyskytují ve shlucích



Gaucher cells



Příklad endocytózy: LDL (low-density lipoprotein)

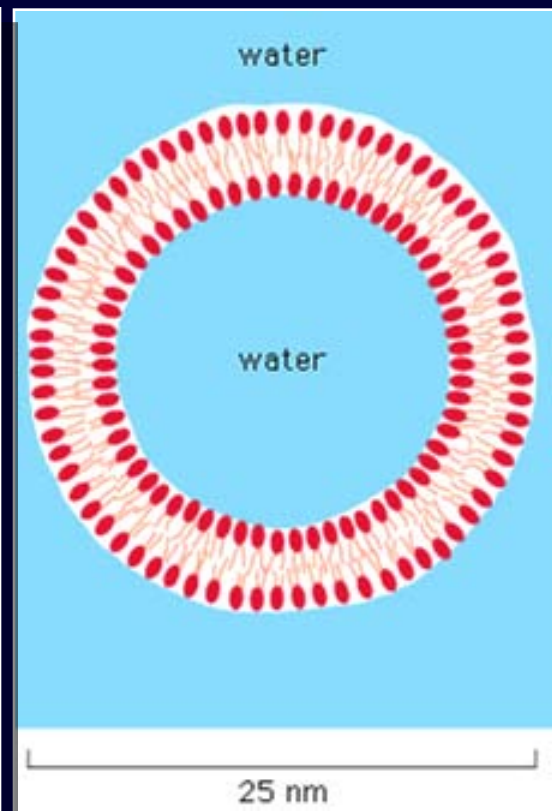
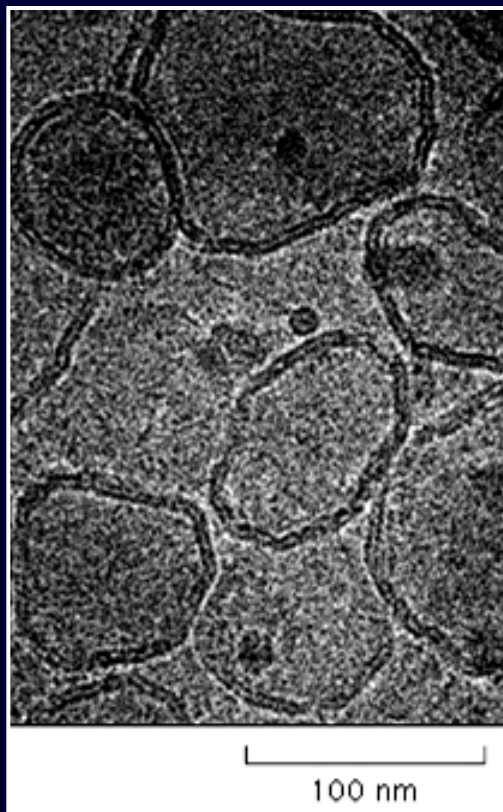
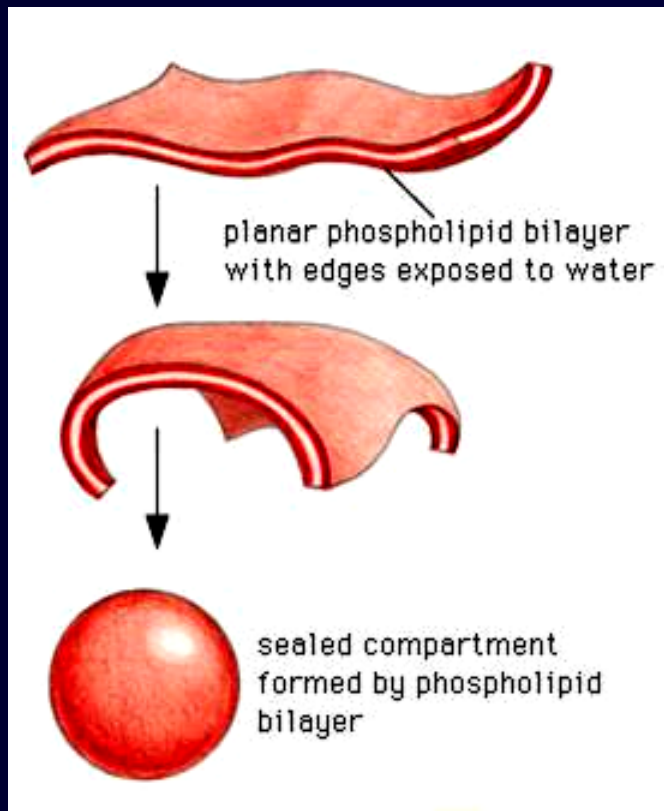


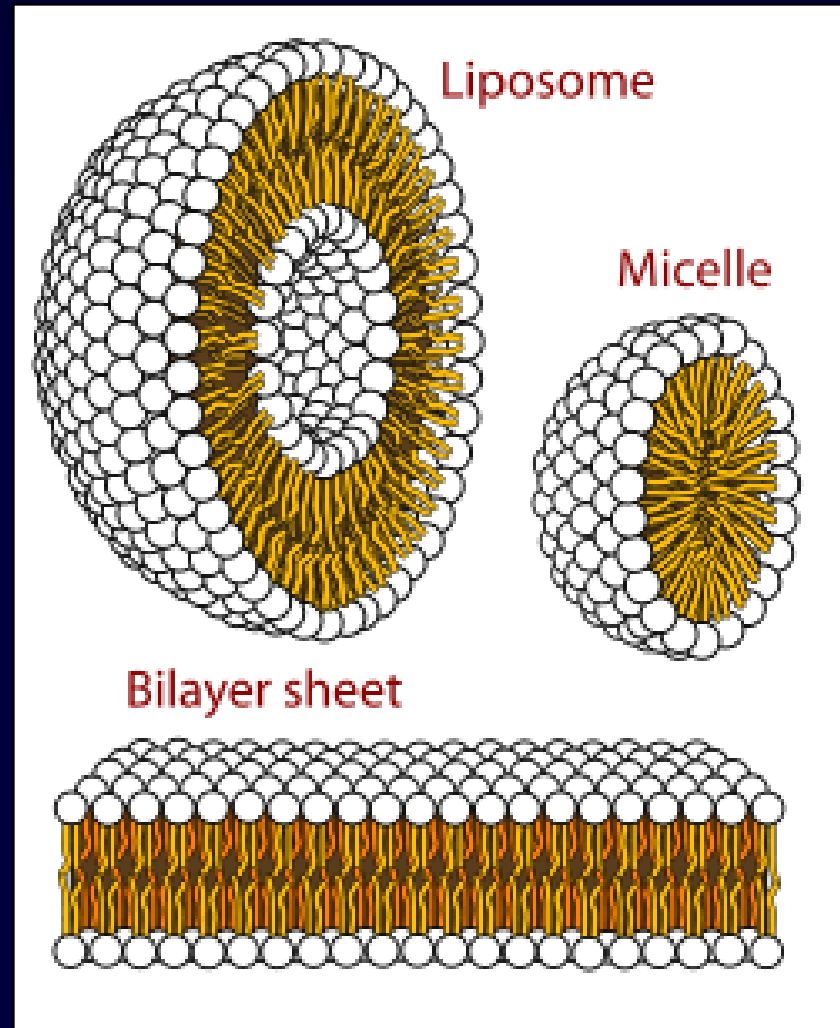


Poruchy příjmu cholesterolu

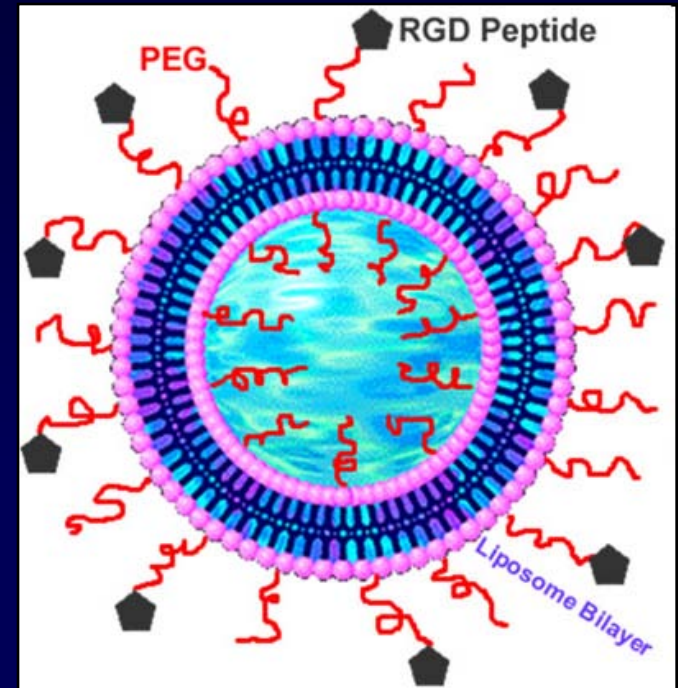
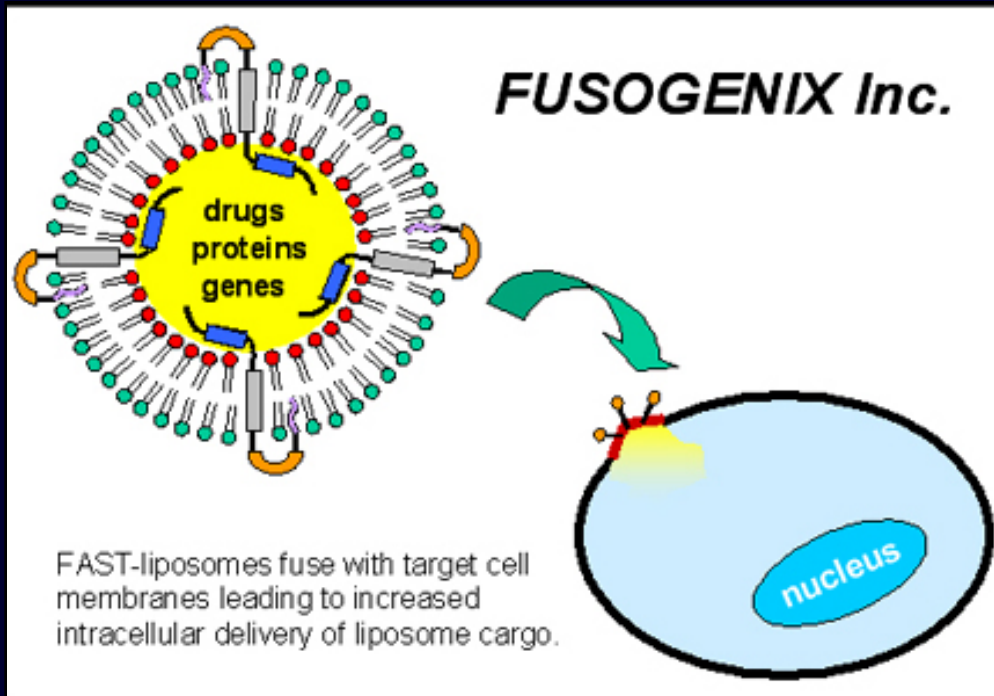
- příčinou porucha struktury LDL-receptoru
- buňky nepřijímají cholesterol
- cholesterol se hromadí v krvi a napomáhá vzniku aterosklerózy
- většina pacientů umírá v raném věku na srdeční záchvat (důsledek ucpání tepen zásobujících srdce)

Tvorba liposomů:



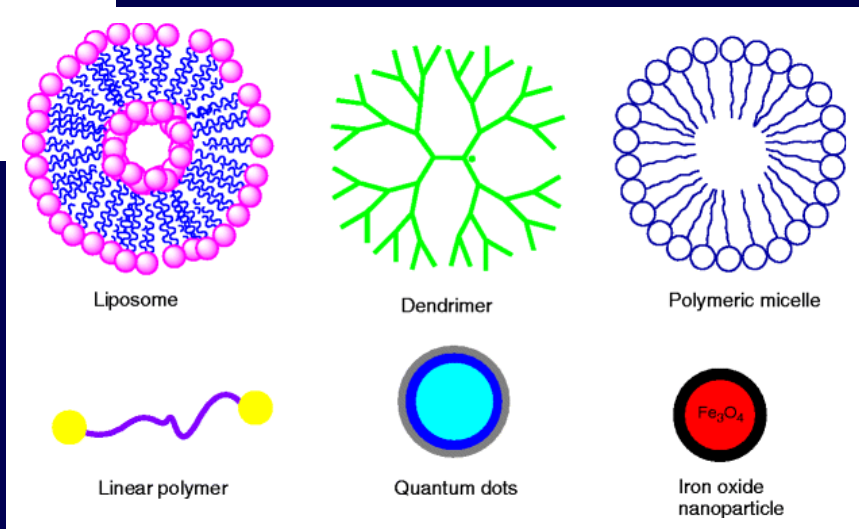
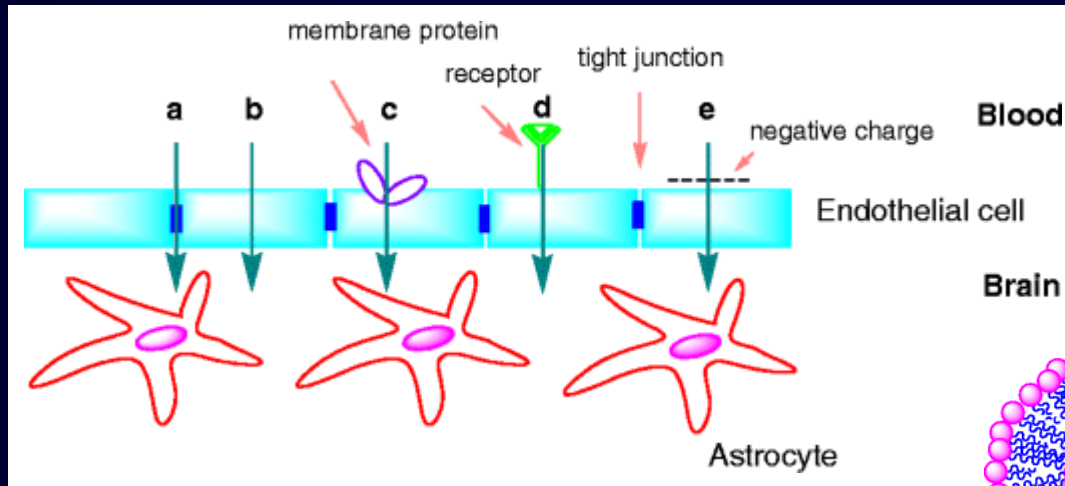


Liposome-delivery systems:



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.

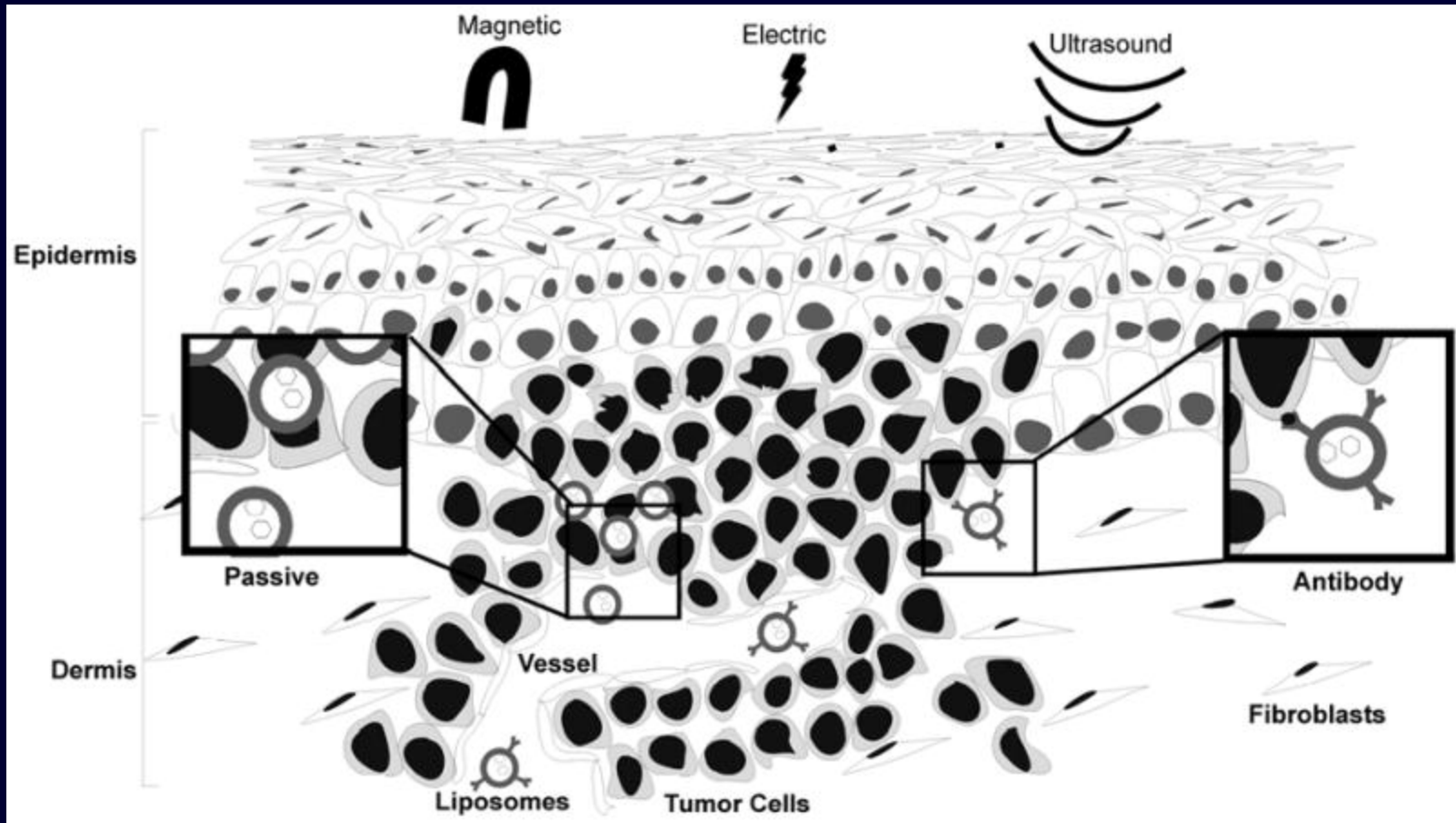
Pharmaceutical Research, 2010.

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

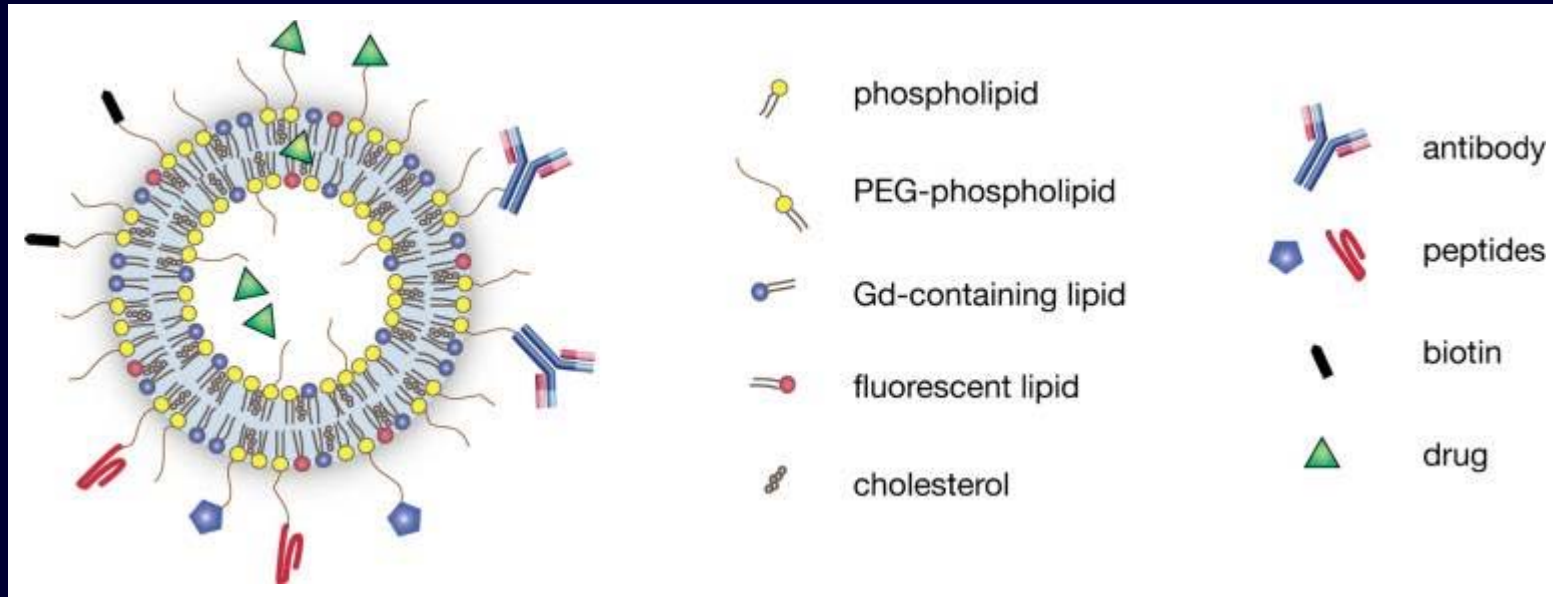
Drug	Property/Function	Nanocarrier	Delivery means	Model (s)	Admin. route for <i>in vivo</i>
Boron	Metal used in boron neutron capture technology	EGF-carrying boronated PAMAM dendrimer	Covalent conjugation	Rats	Intratumoral injection or CED
Ciprofloxacin	Antibiotic	Cholesterol conjugated PEG and anchored 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	Dendriworms	Complexation	Mice	i.v. or CED
Horseradish peroxidase	Model polypeptide	Pluronic 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- κ 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

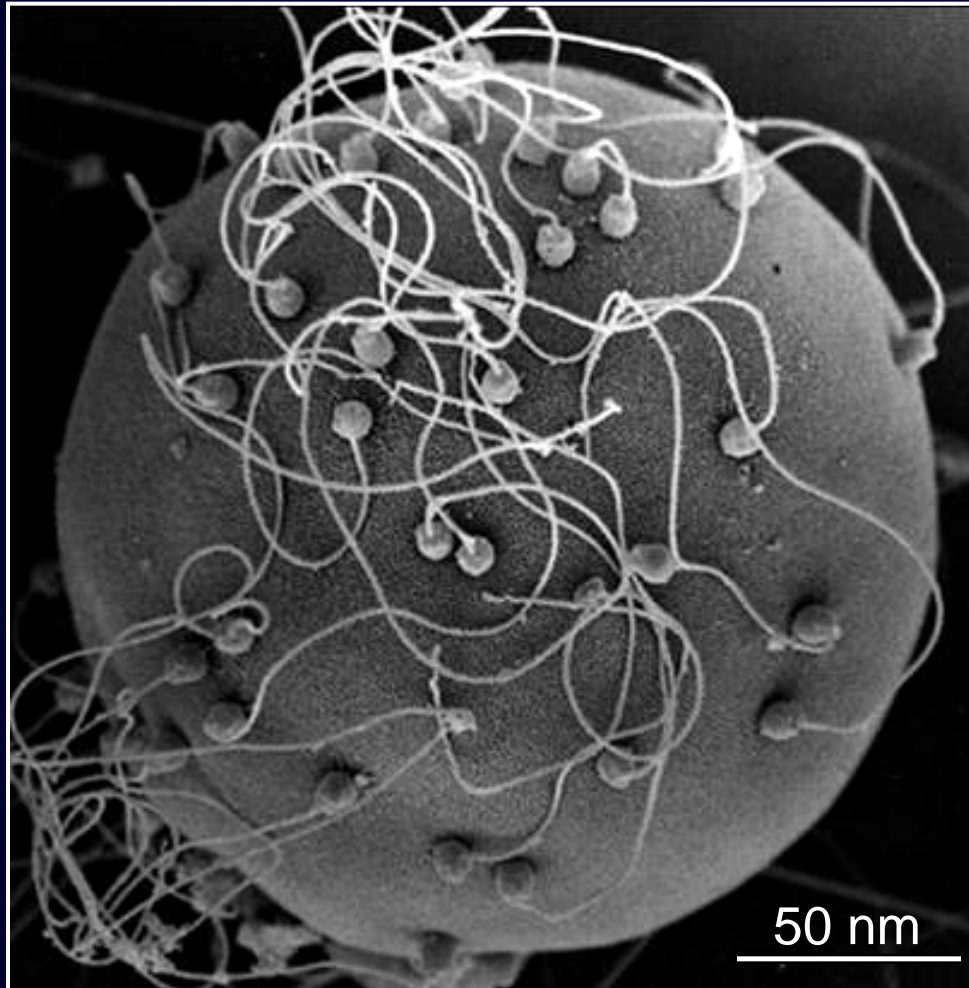
Možnosti zacílení liposomů do nádorové tkáně (maligní melanom)



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



FÚZE MEMBRÁN

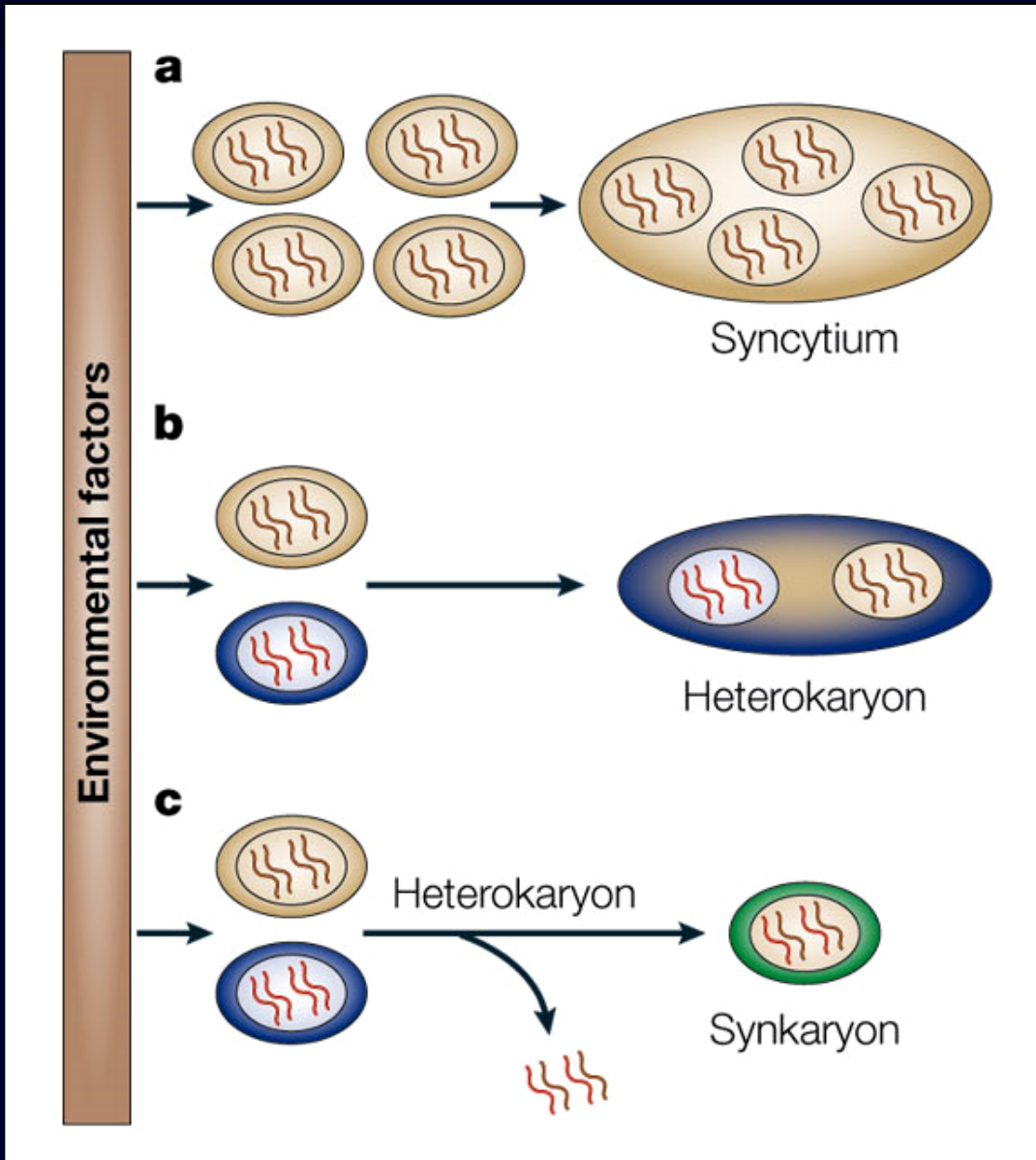


Přirozená fúze:

- fertilizace
- vznik syncytia

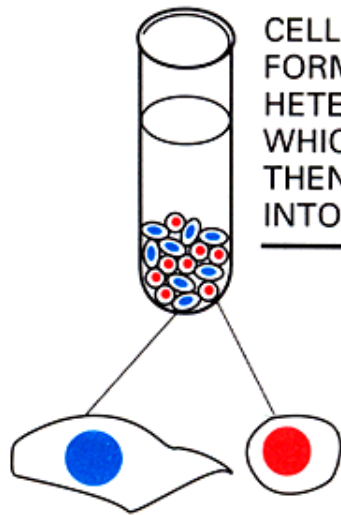
Indukovaná fúze:

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



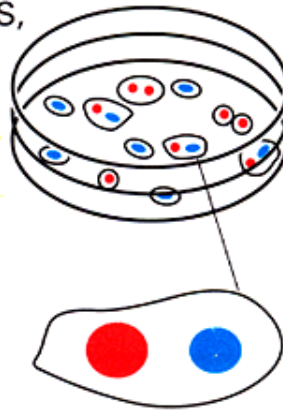
Princip mezidruhové fúze

SUSPENSION OF TWO CELL TYPES CENTRIFUGED AND A FUSING AGENT ADDED



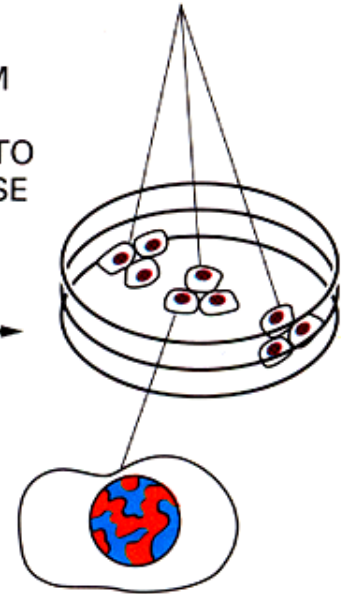
human fibroblast mouse tumor cell

CELL FUSION AND FORMATION OF HETEROCARYONS, WHICH ARE THEN PUT INTO CULTURE



heterocaryon

SELECTIVE MEDIUM ALLOWS ONLY HETEROCARYONS TO PROLIFERATE. THESE BECOME HYBRID CELLS, WHICH ARE THEN CLONED

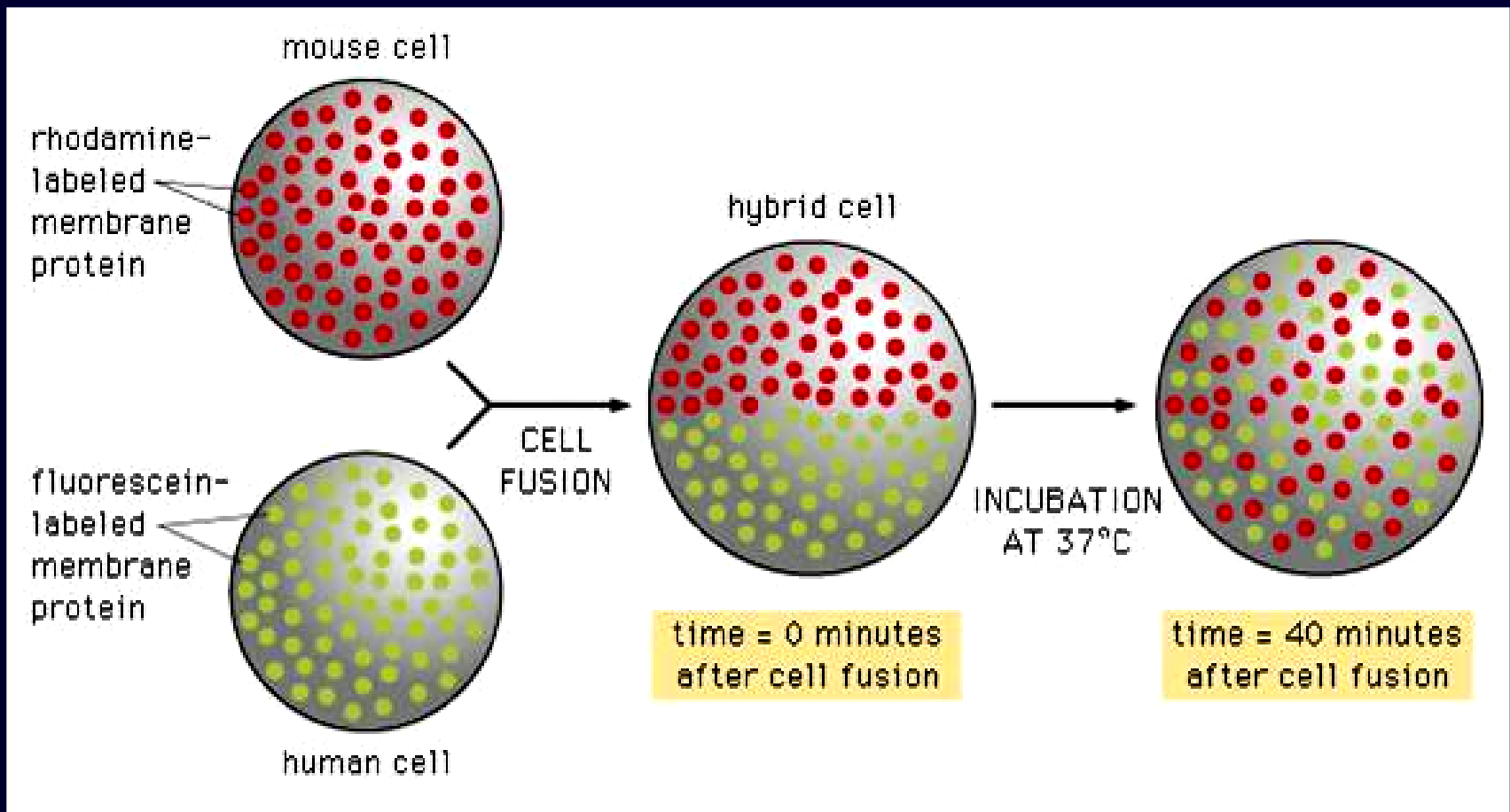


hybrid cell

three clones of hybrid cells, each of which retains a small number of different human chromosomes together with the full complement of mouse chromosomes

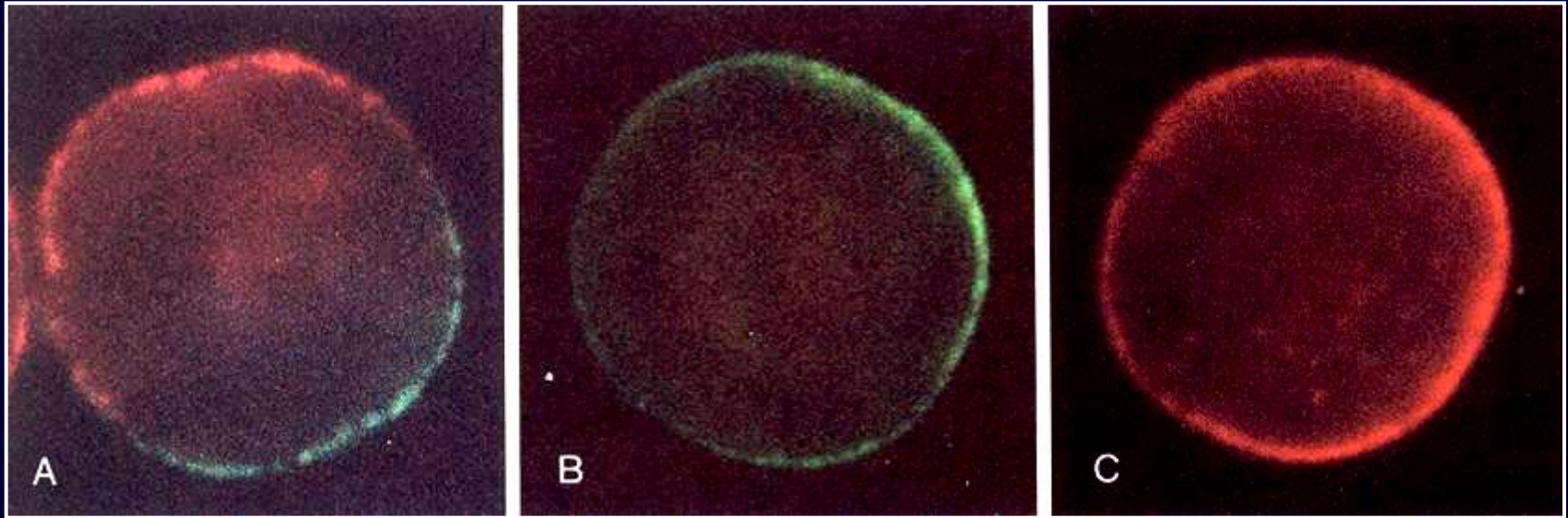
Heterokaryon = hybridní buňka se 2 jádry
Synkaryon = hybridní buňka se zfúzovaným jádrem

Využití fúze buněk k průkazu fluidity membrán:



Frye a Edidin, 1970

Využití fúze buněk k průkazu fluidity membrán:



t = 0 min

myší antigeny
lidské antigeny

t = 40 min

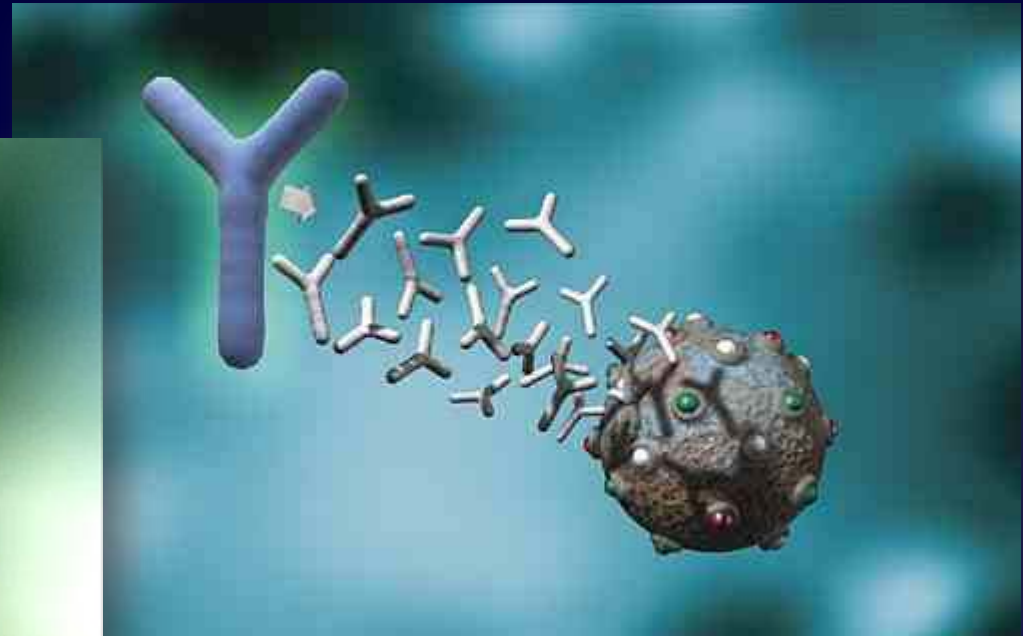
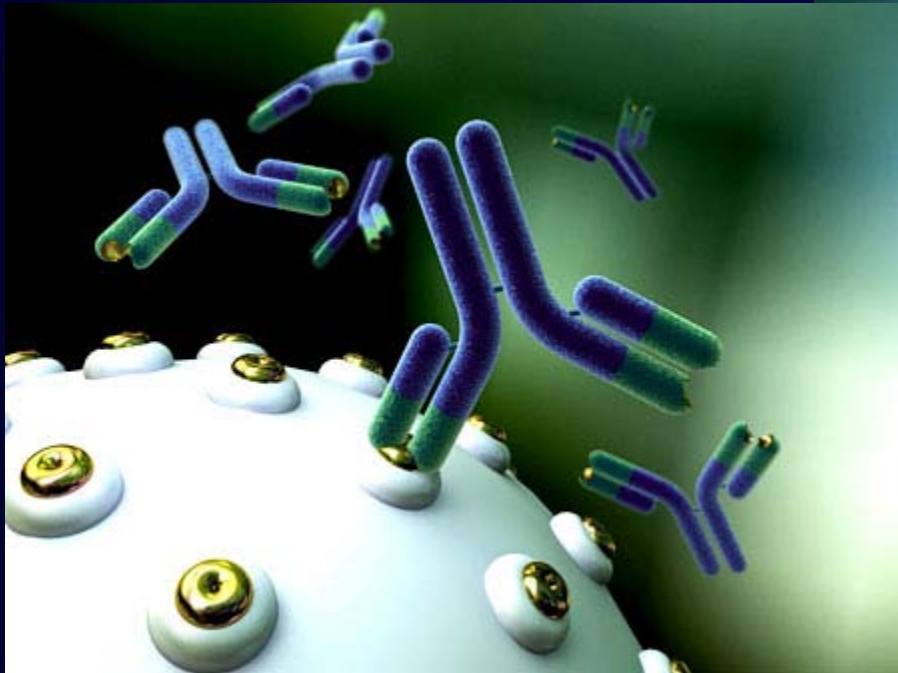
lidské antigeny

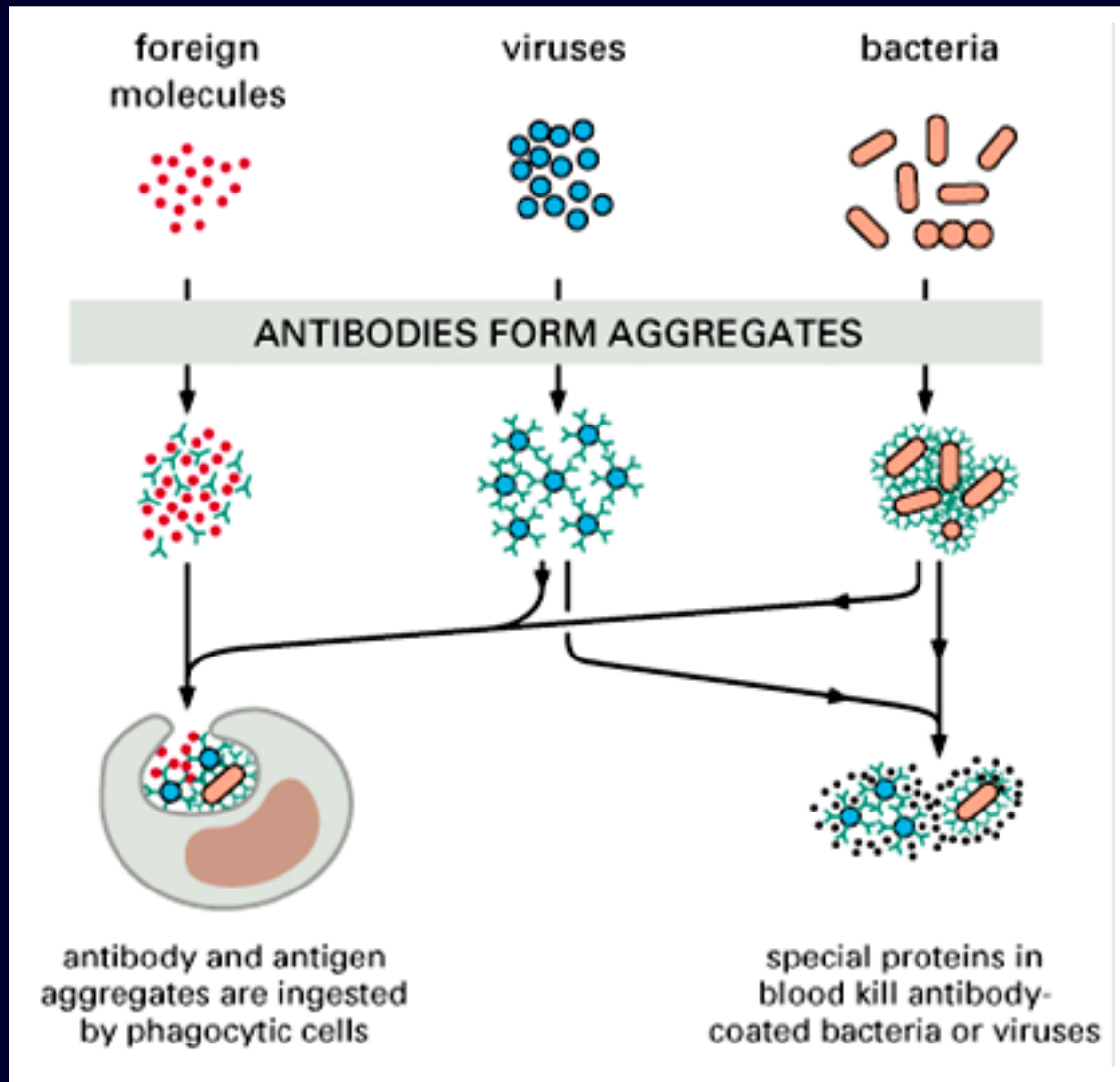
t = 40 min

myší antigeny

Hybridomová technologie

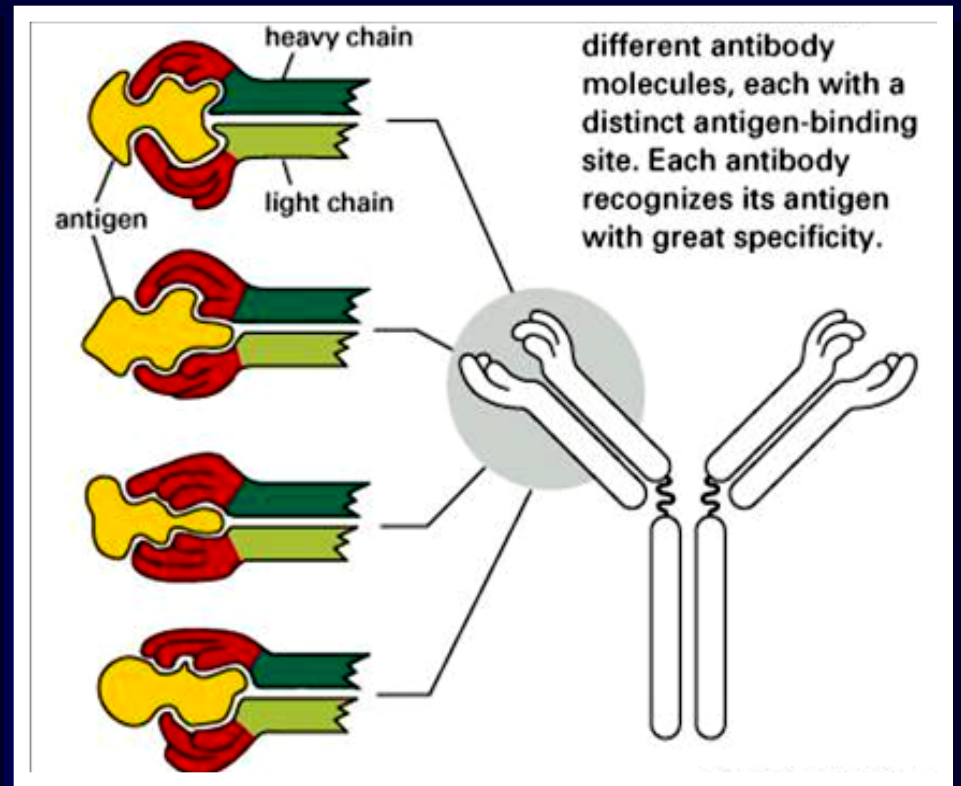
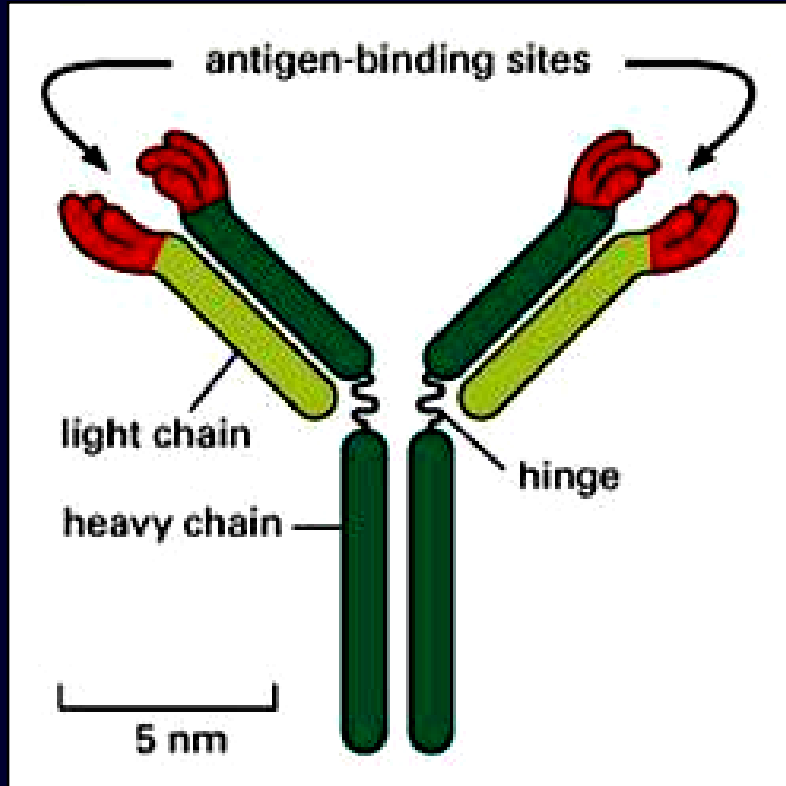
= využití indukované buněčné fúze pro výrobu monoklonálních protilátek





Přirozená role
protilátek v obraně
proti infekcím
nebo toxinům

Struktura a specifita protilátek



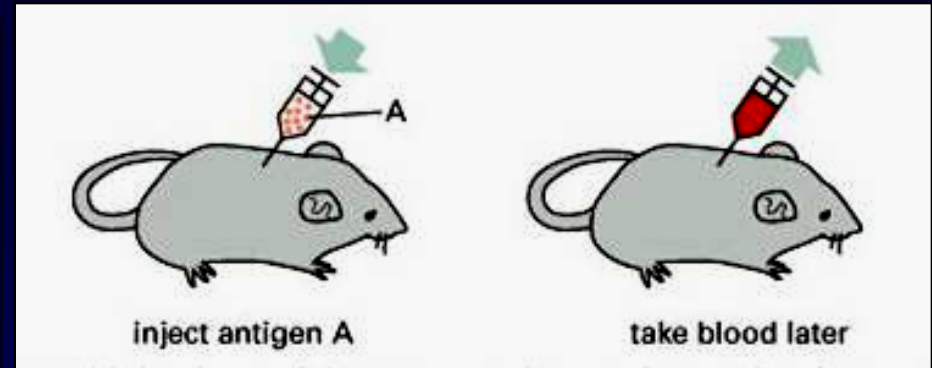
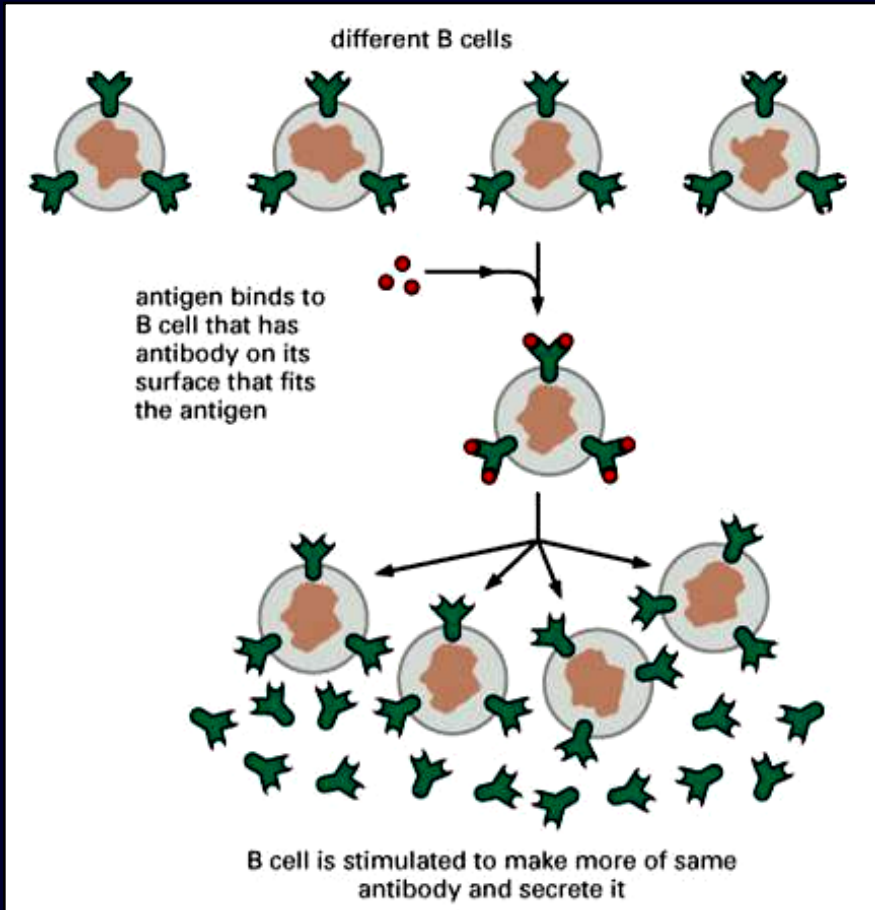
Polyklonální protilátky:

- 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



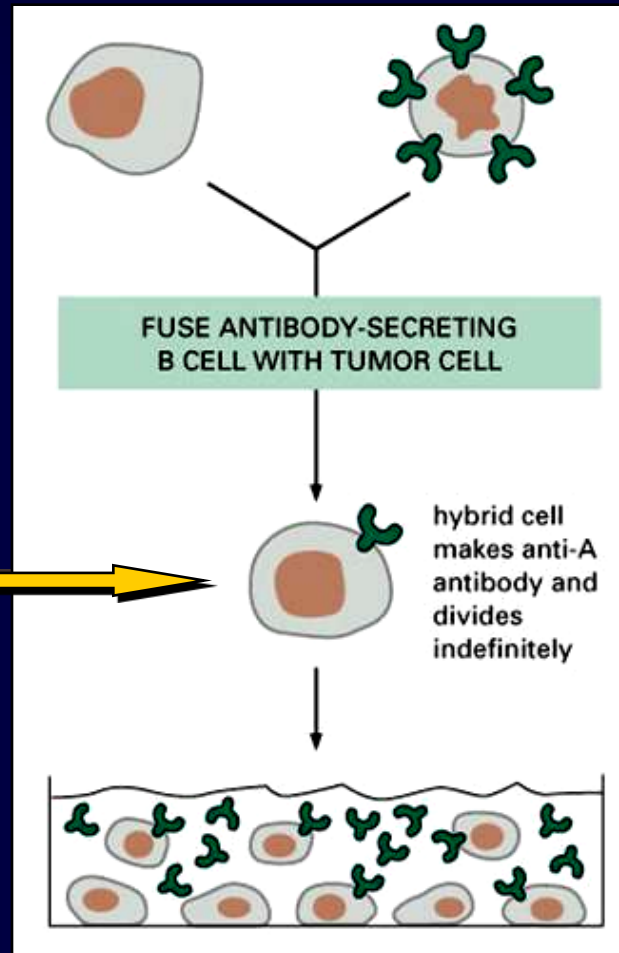
- imunizace pokusného zvířete
- izolace směsi protilátek z krve imunizovaného zvířete

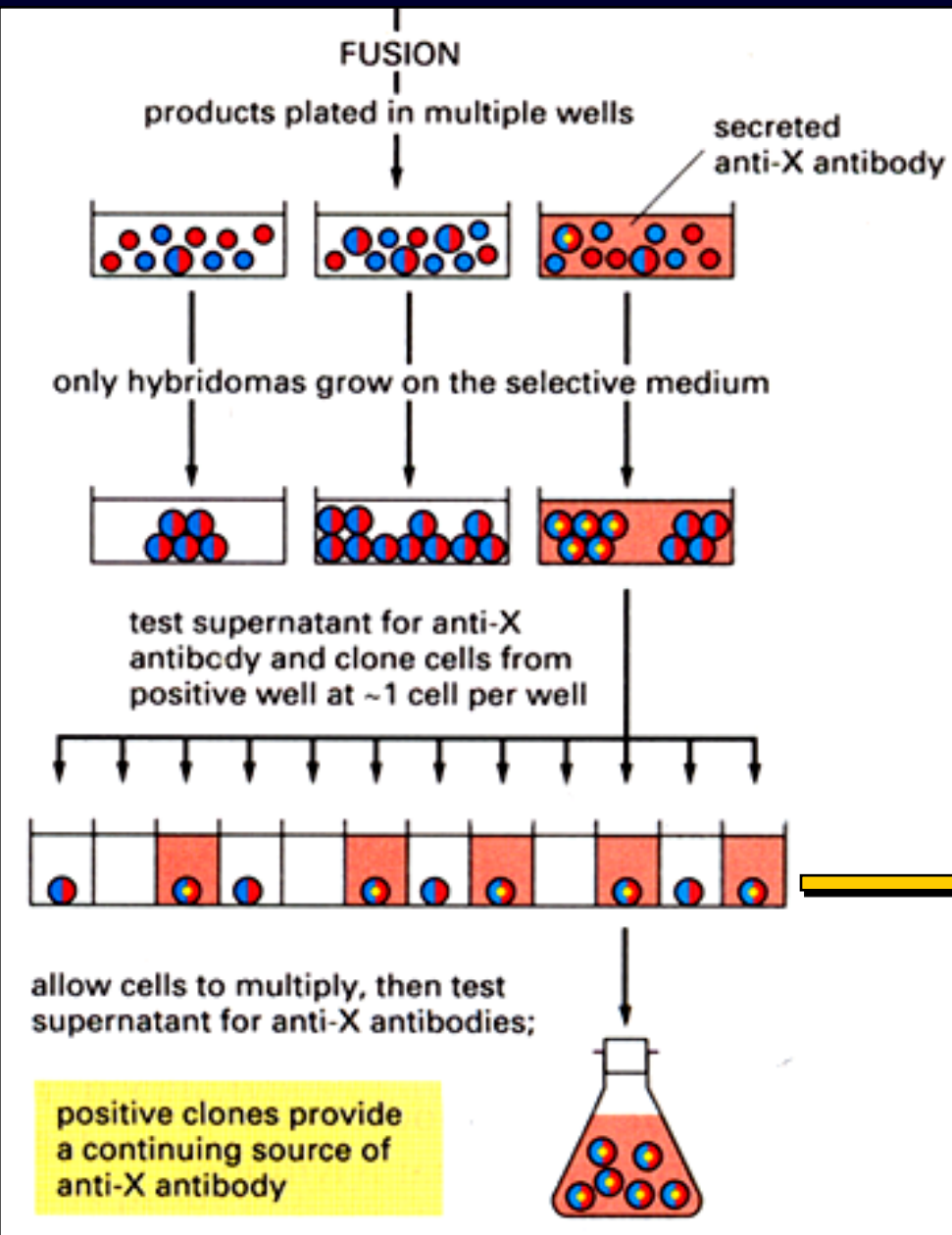
Princip hybridomové technologie (příprava monoklonálních protilátek)

myelomová
buňka

aktivovaný
B-lymfocyt

HYBRIDOM →





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

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)

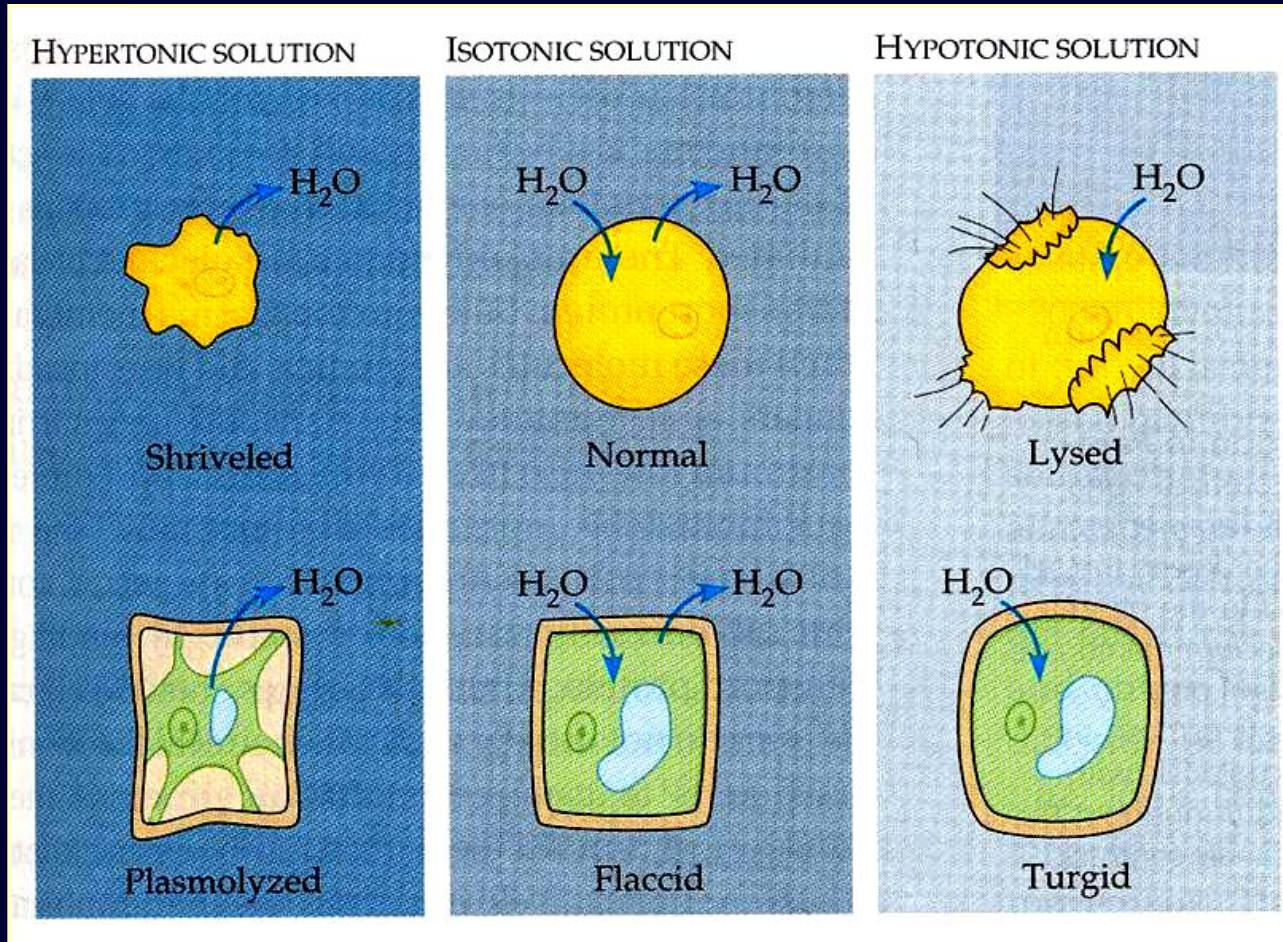
Hypertonické prostředí

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

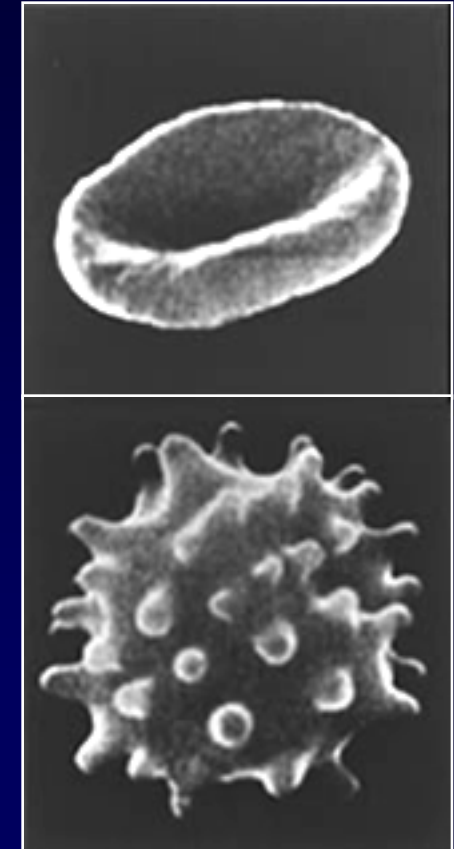
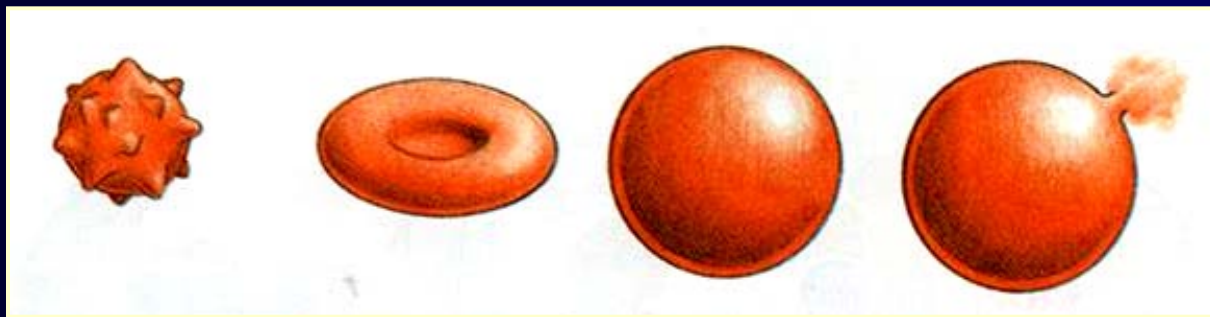
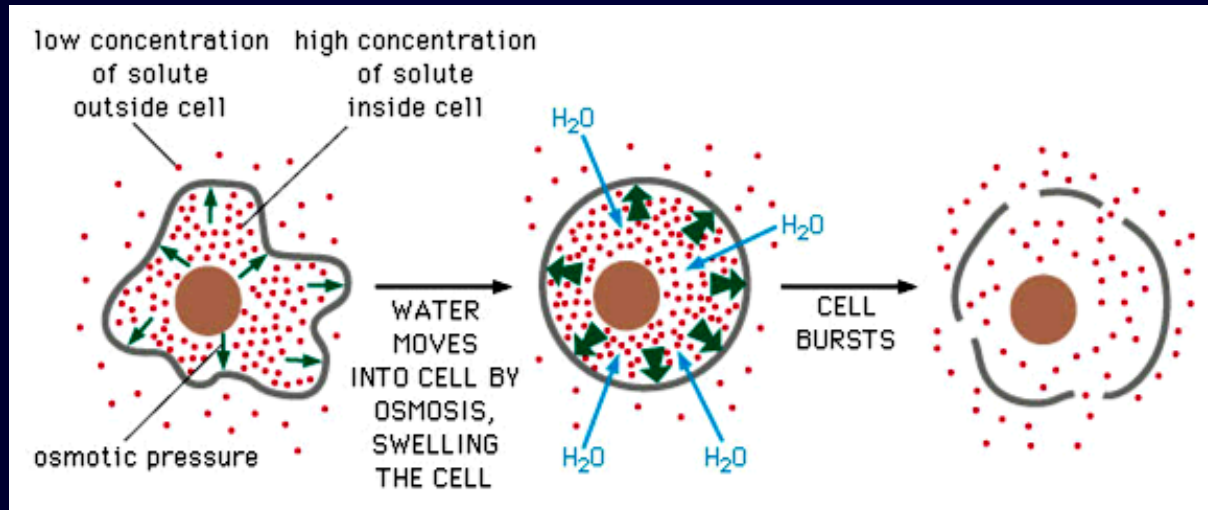
Izotonické prostředí

- prostředí o stejném osmotickém tlaku

Porovnání osmotických jevů u živočišné a rostlinné buňky:



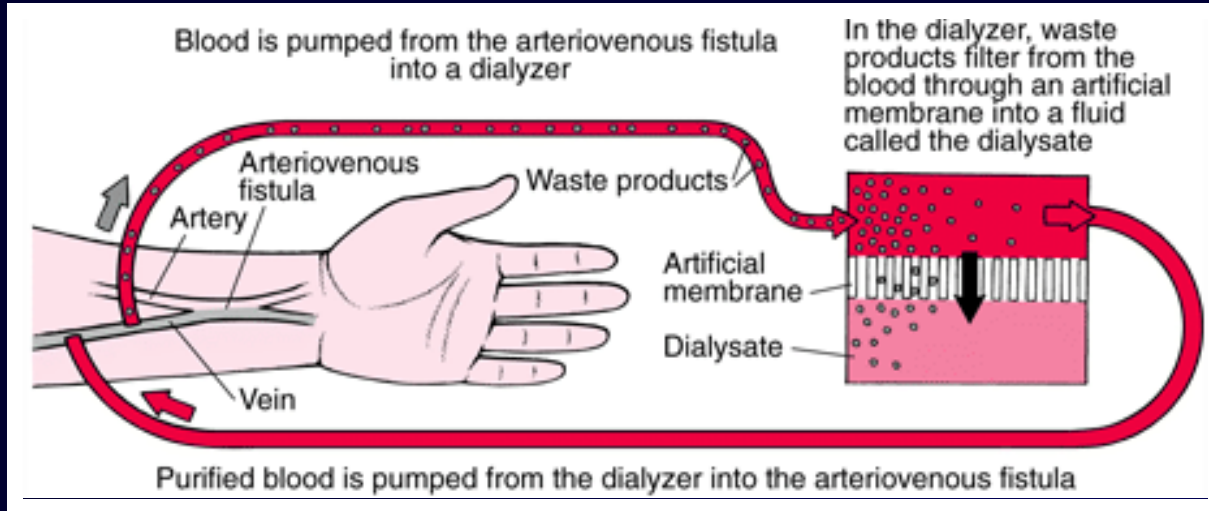
Reakce živočišné buňky na změny osmotického tlaku:



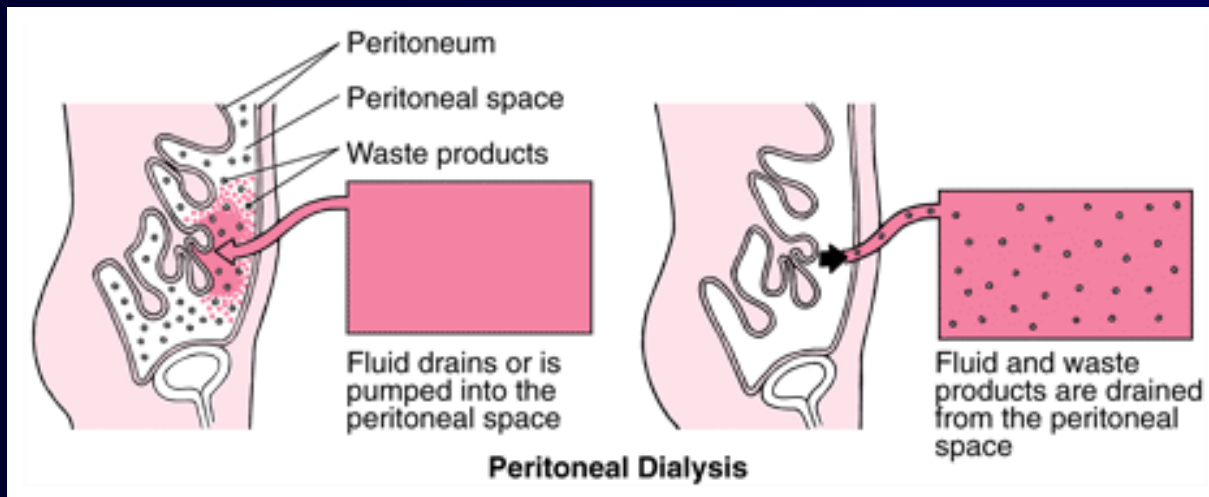
PRAKTICKÉ APLIKACE:
DIALÝZA U PACIENTŮ
S NEFUNKČNÍMI LEDVINAMI

Dialýza = parciální difúze

(přes membránu prochází voda a nízkomolekulární látky)



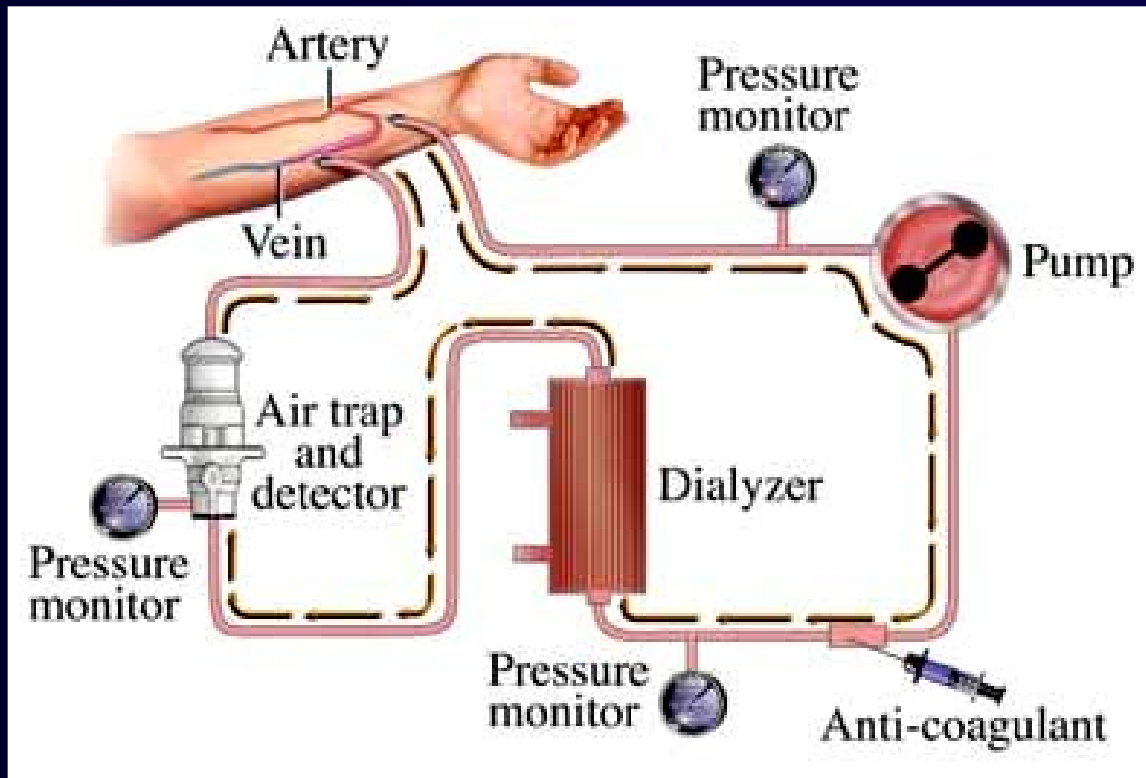
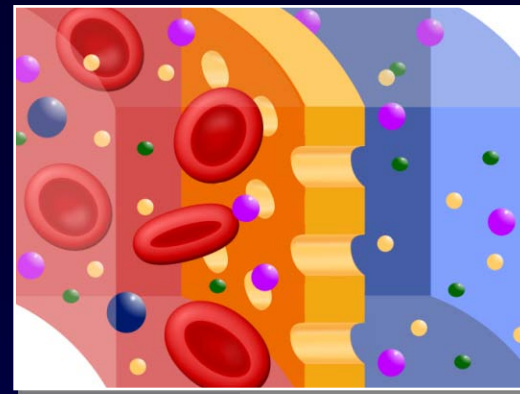
hemodialýza
(umělá ledvina)



peritoneální
dialýza

Princip hemodialýzy

Dialyzační roztok:
voda, NaCl, KCl, CaCl₂,
MgCl₂, acetát sodný

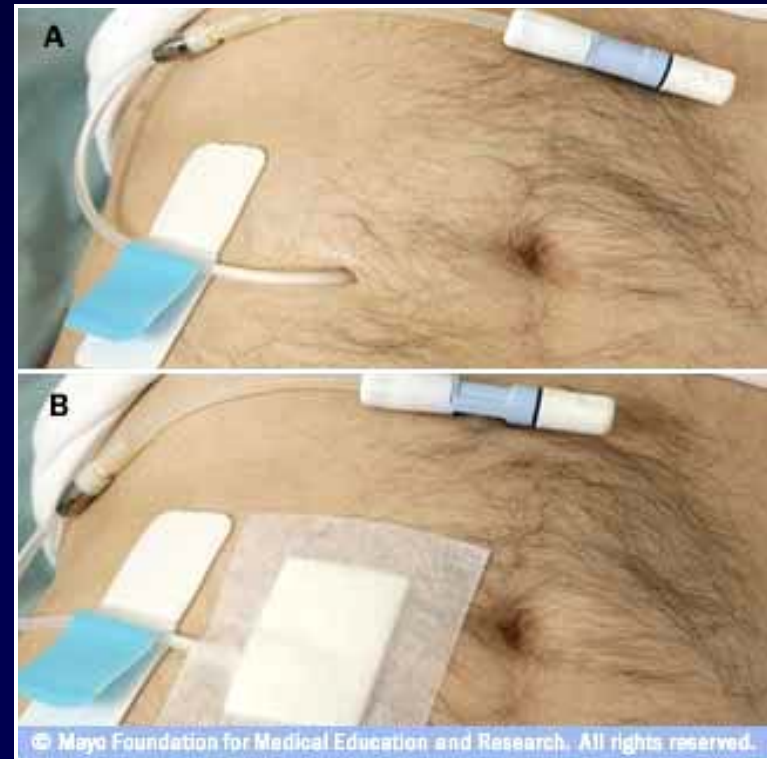
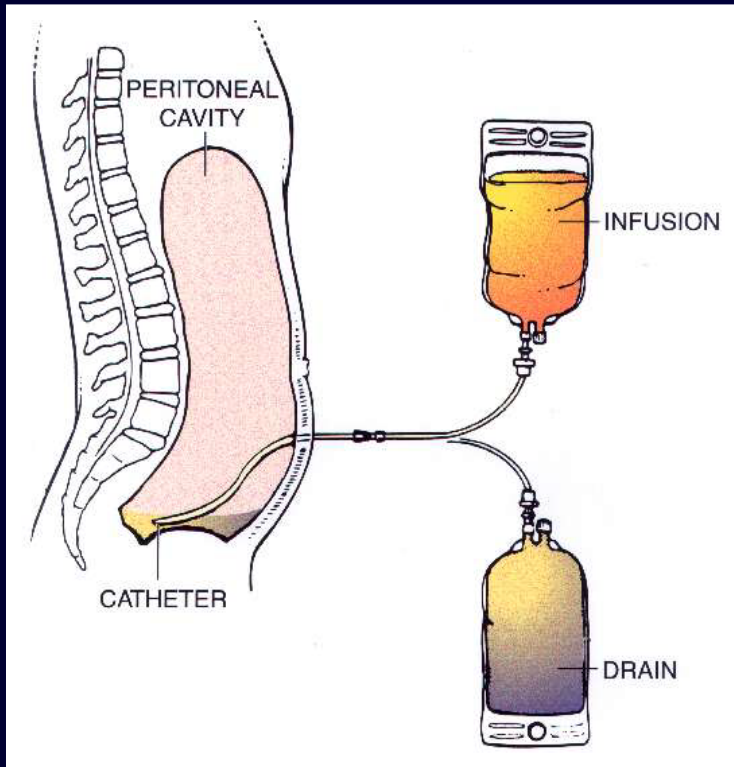






I don't care what day it is.
Four hours is four hours.

Peritoneální dialýza



Princip peritoneální dialýzy

