

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 23.2.2015

Biomembrány

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

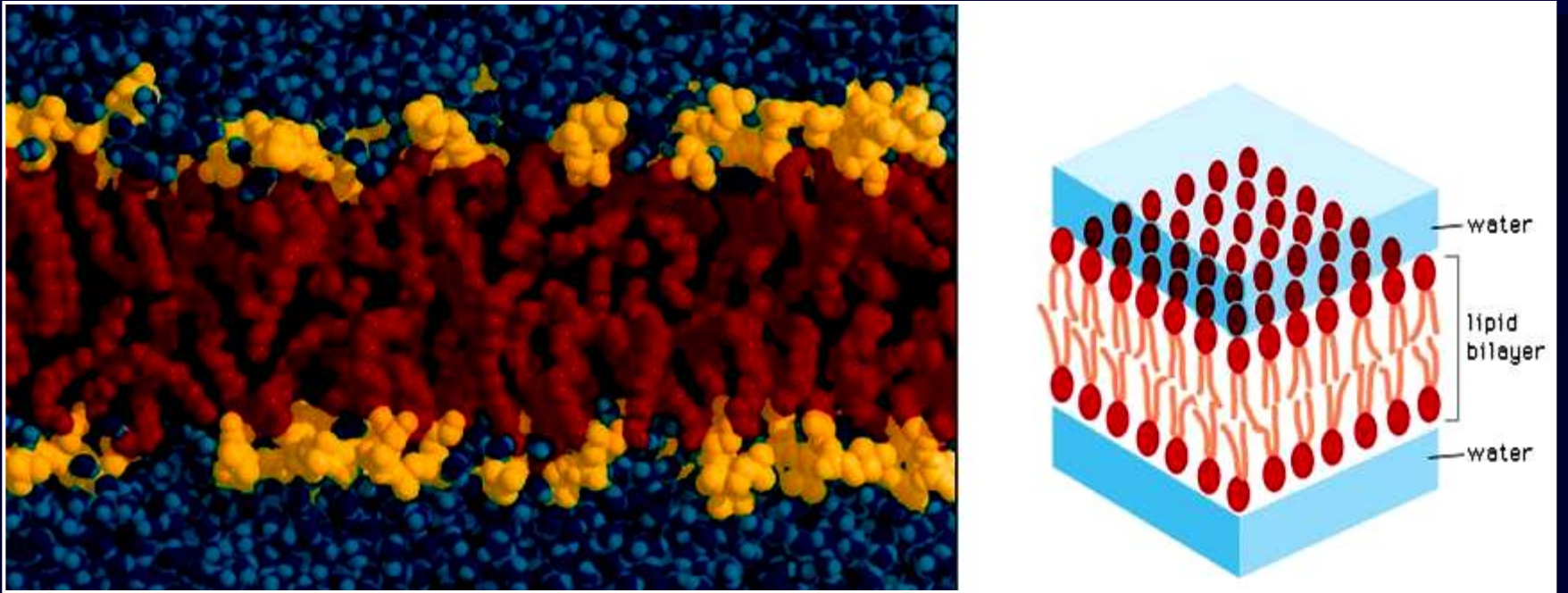
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

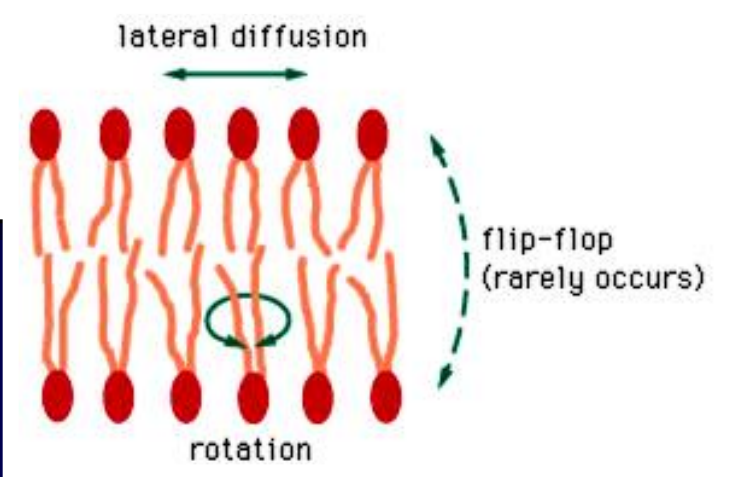
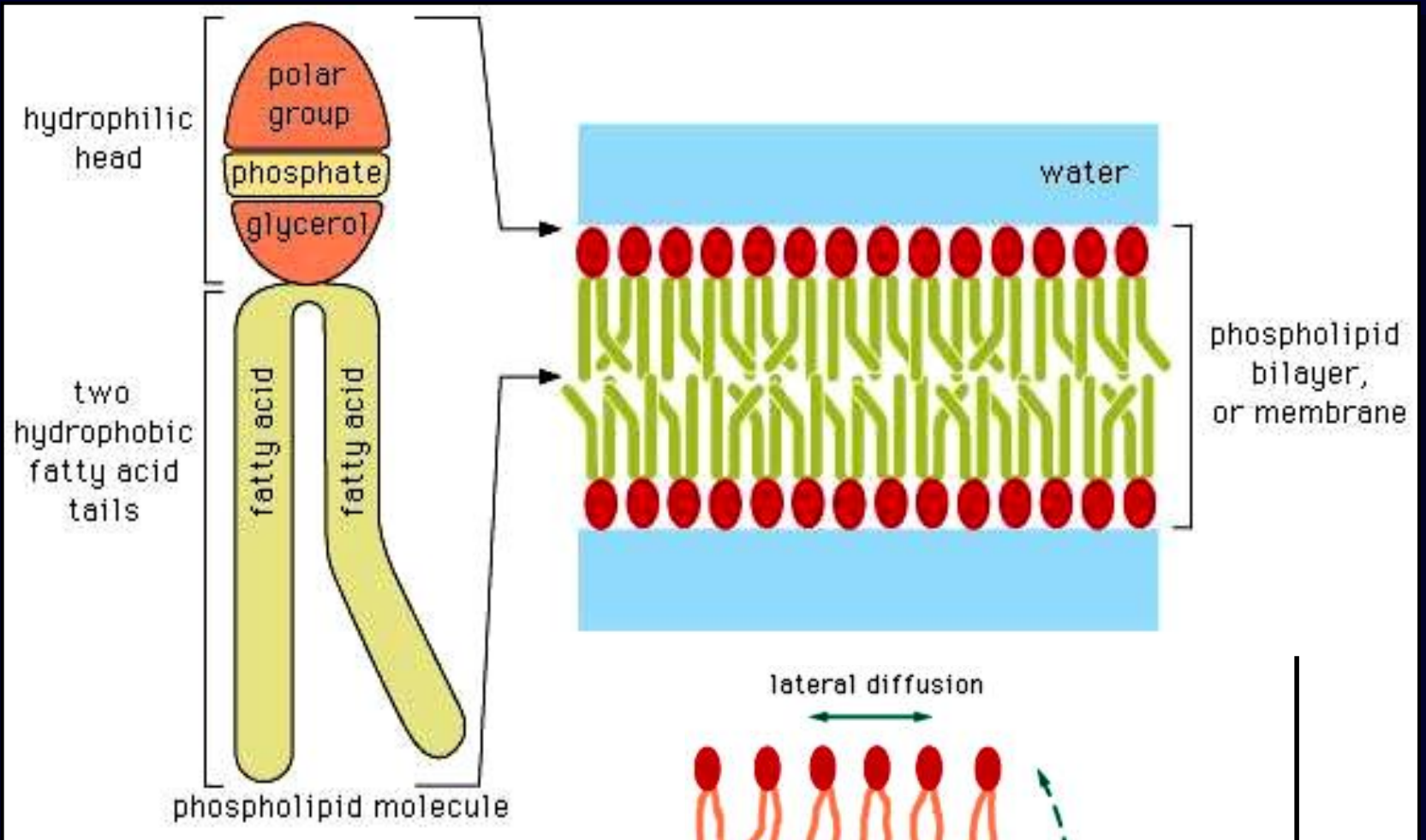
Program přednášky:

- 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

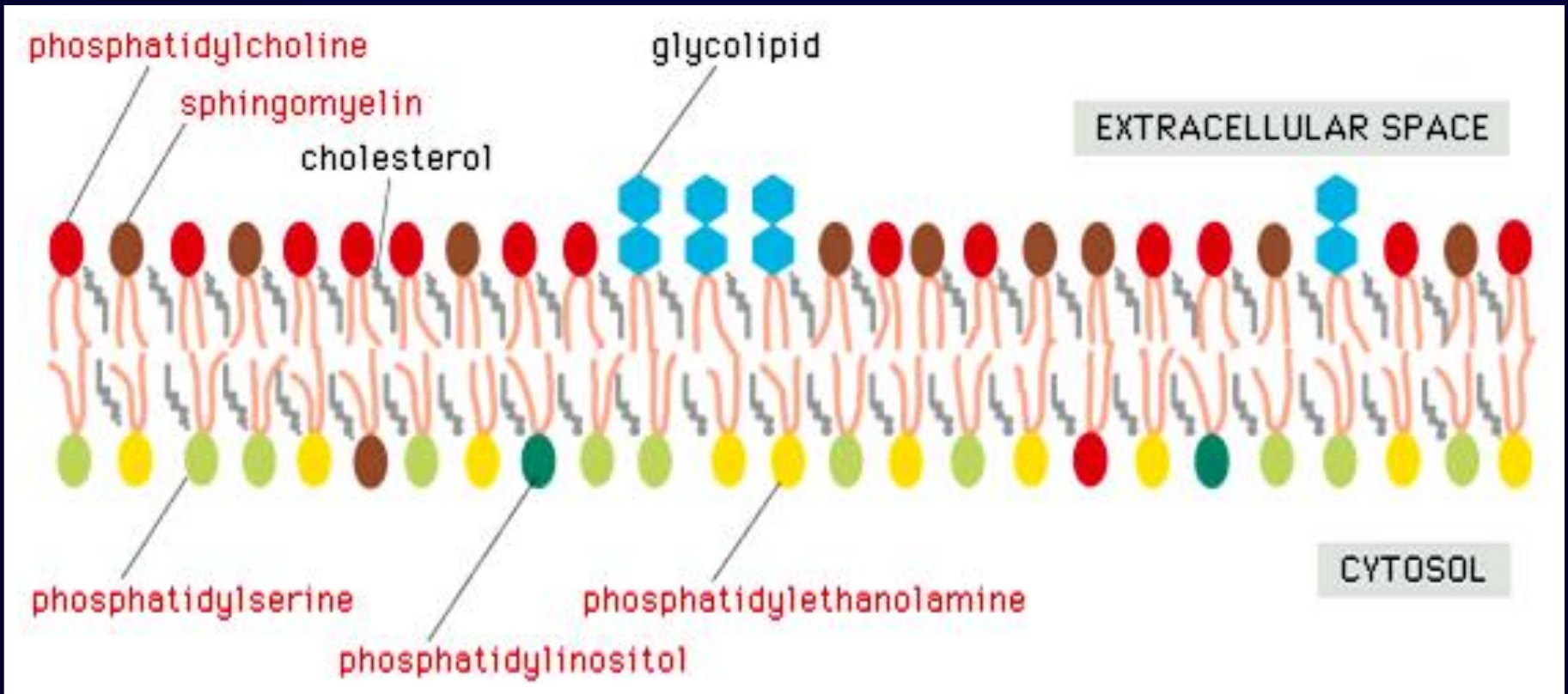




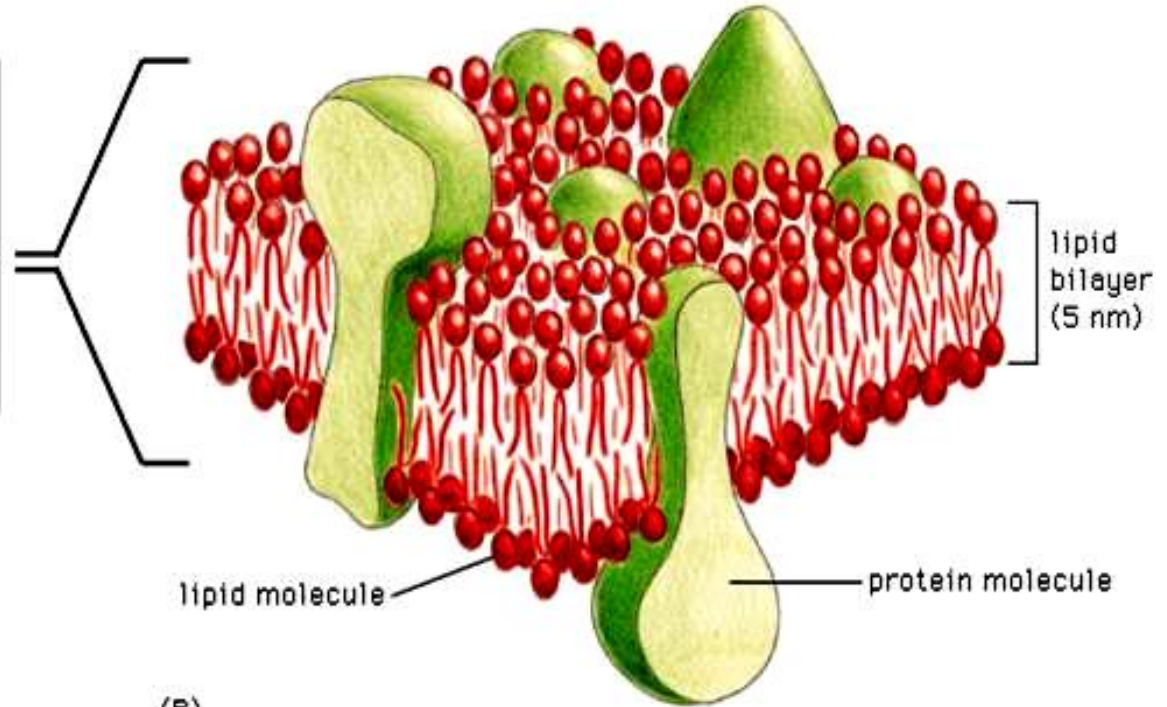
Fluidita membrány



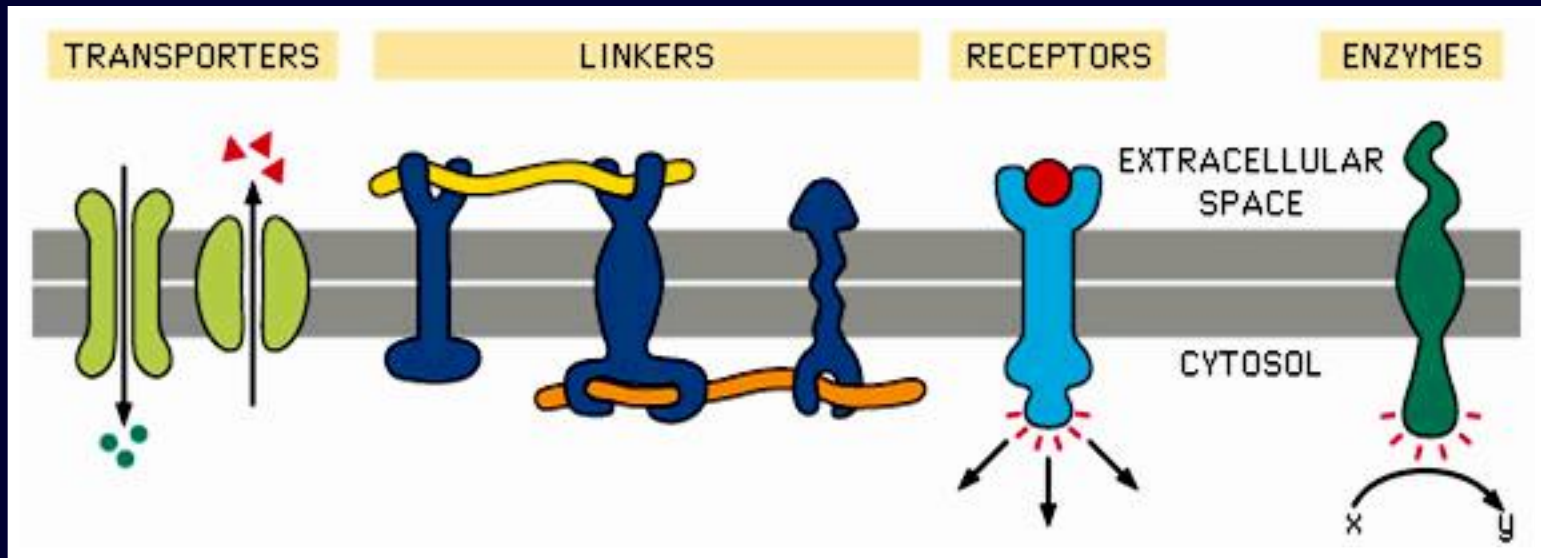
Složení plazmatické membrány:



Stavba plazmatické membrány:

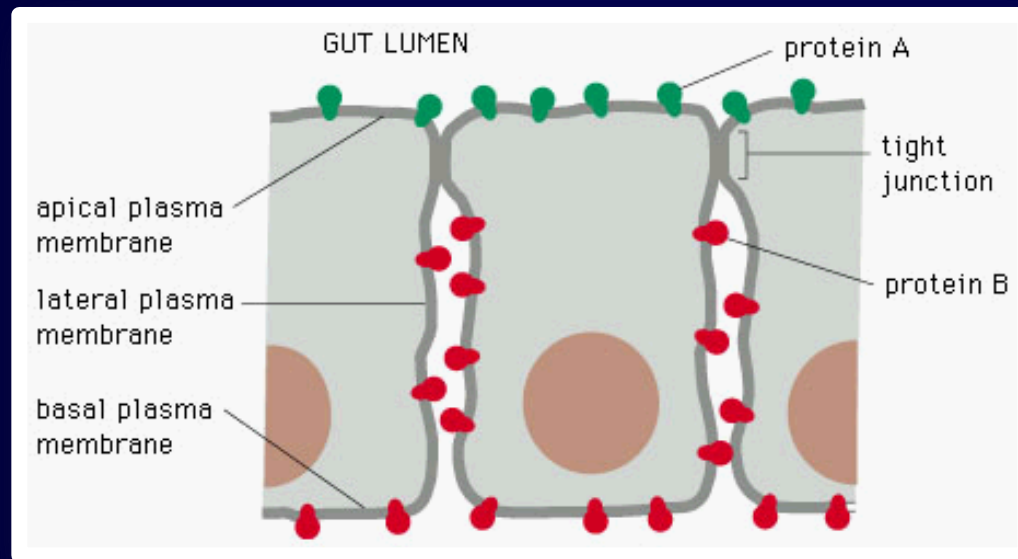
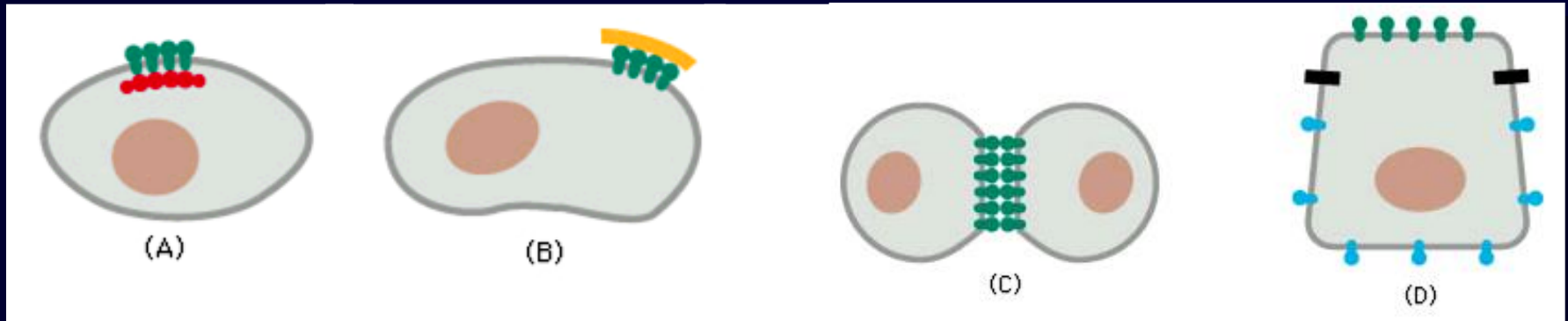


Funkce transmembránových proteinů:



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

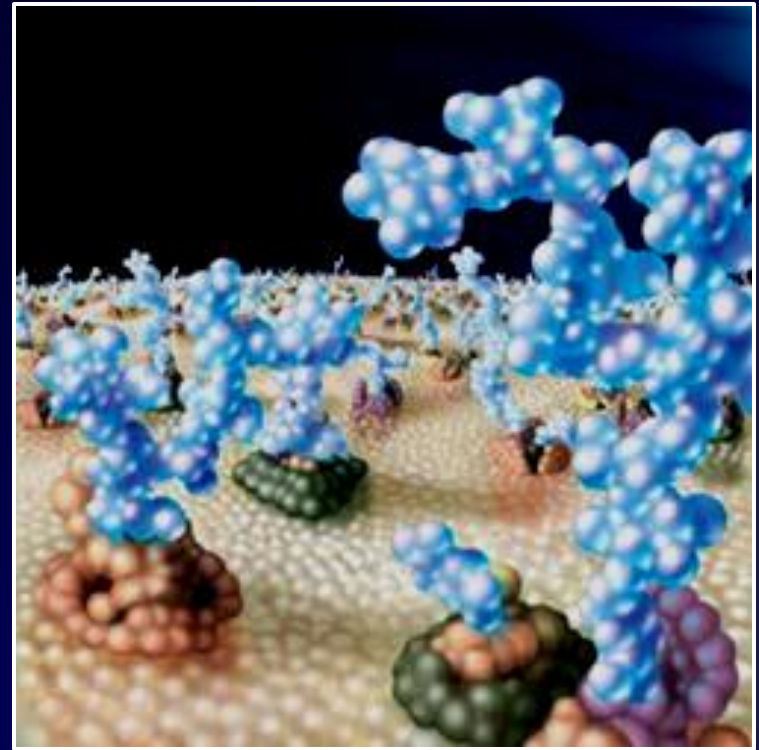
Lokalizace transmembránových proteinů:



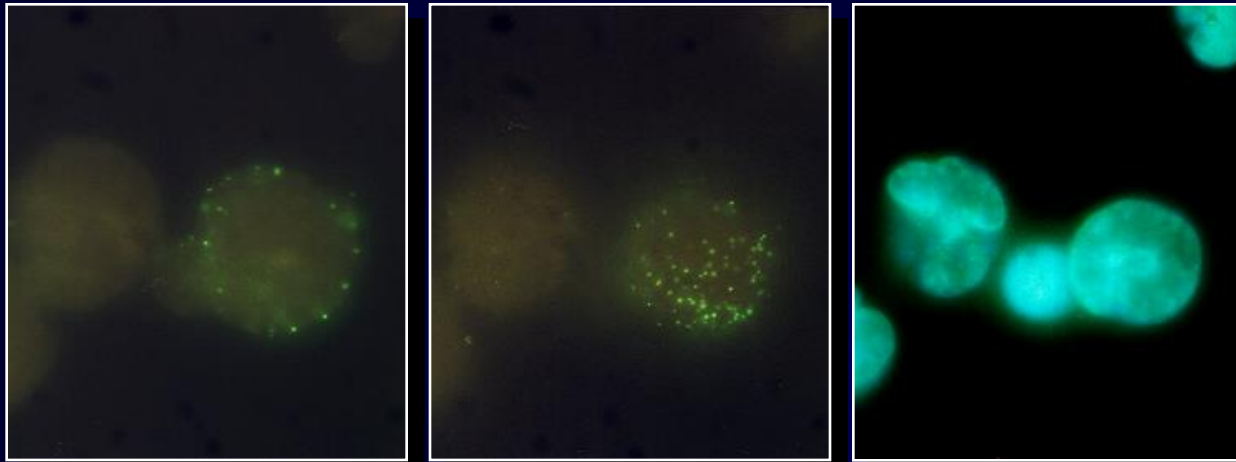
střevní epitel

CD markery (antigeny)

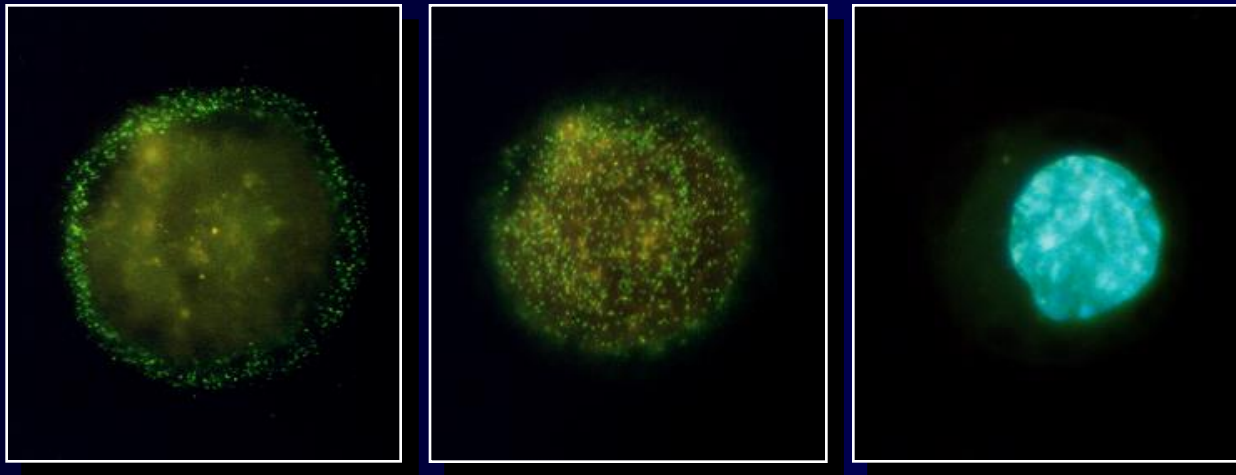
- glykoproteiny na povrchu lidských buněk
- v současnosti cca 250
- imunofenotypizace (zejména v hematologii)
- nespecifické:
CD47, CD118
- specifické:
CD66b - granulocyty
CD85, CD205 - dendritické buňky
CD133 - kmenové, resp. progenitorové buňky
CD141 - vaskulární endotelové buňky
CD168 - buňky karcinomu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



Příklady detekce CD markerů: linie HL-60

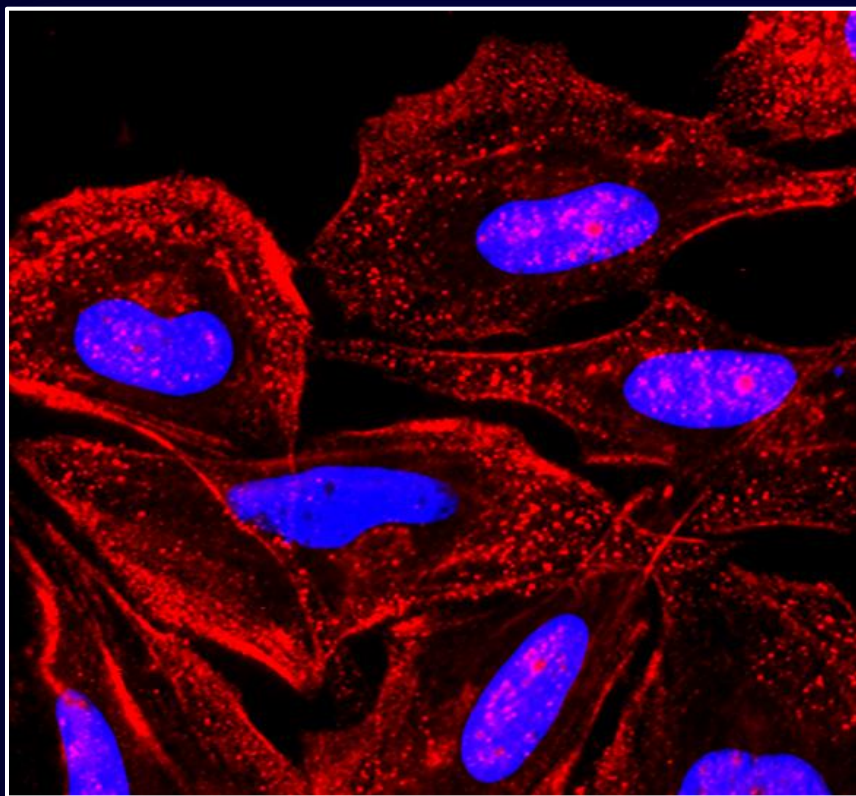


granulocyty:
CD66b
DAPI

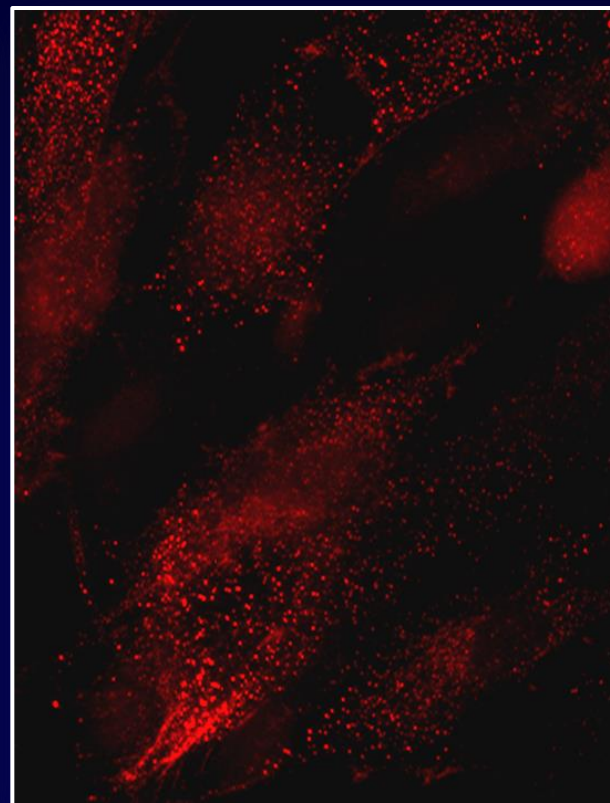


makrofágy:
CD14
DAPI

Příklady detekce CD markerů: linie derivované z osteosarkomů

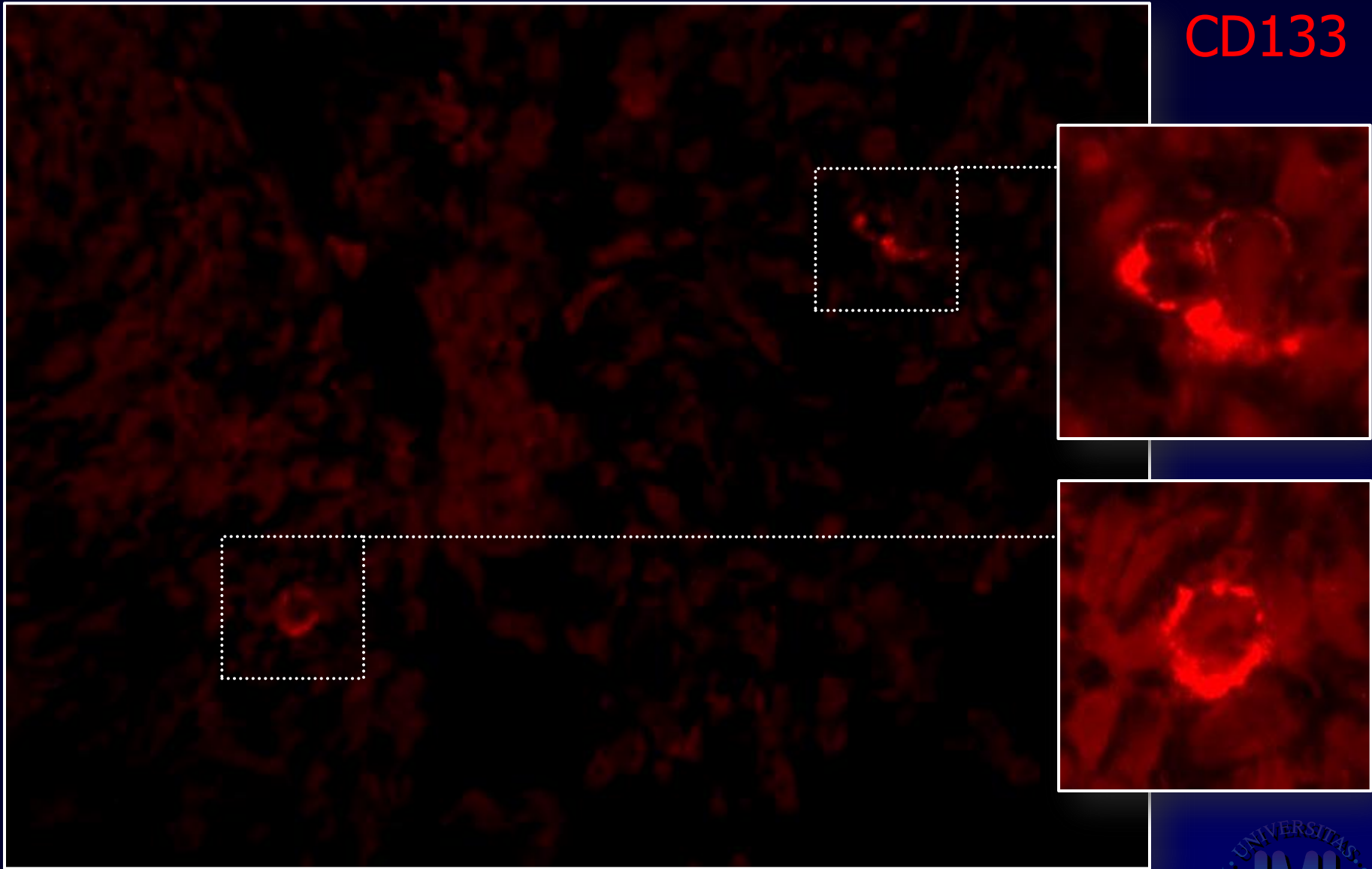


Saos-2: **CD133** / **DAPI**

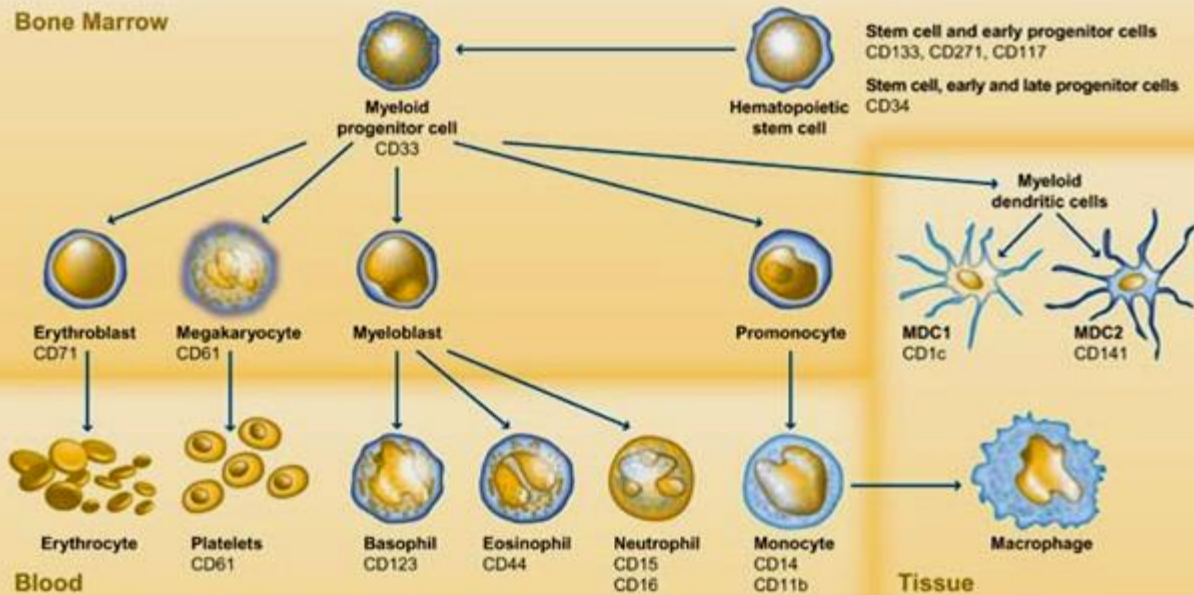


OSA-03: **CD133**

CD133

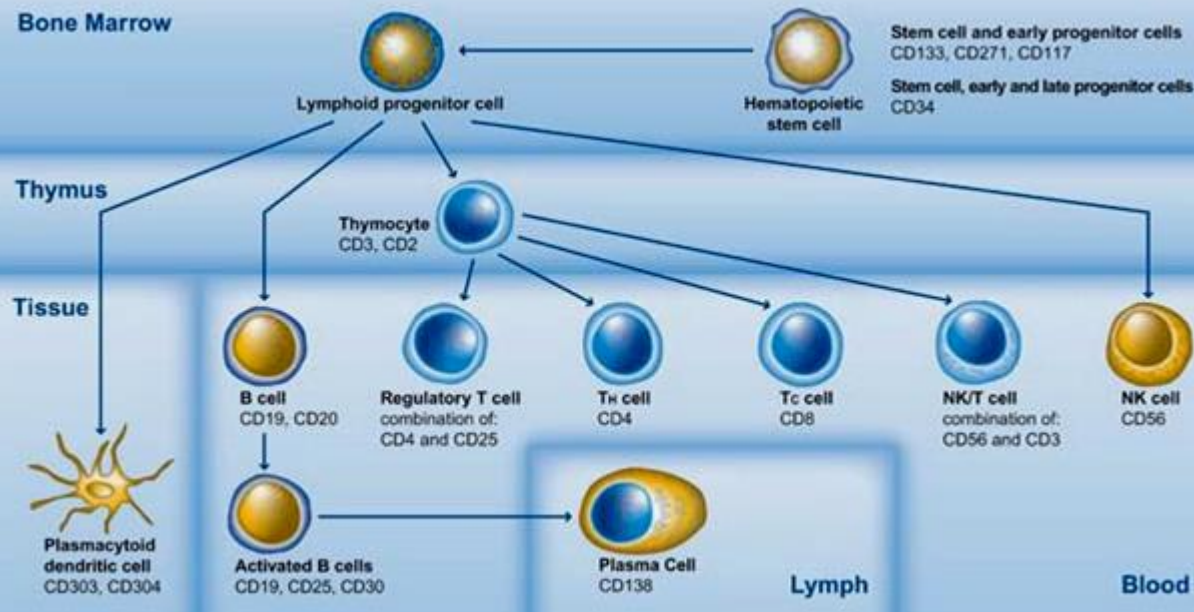


Bone Marrow



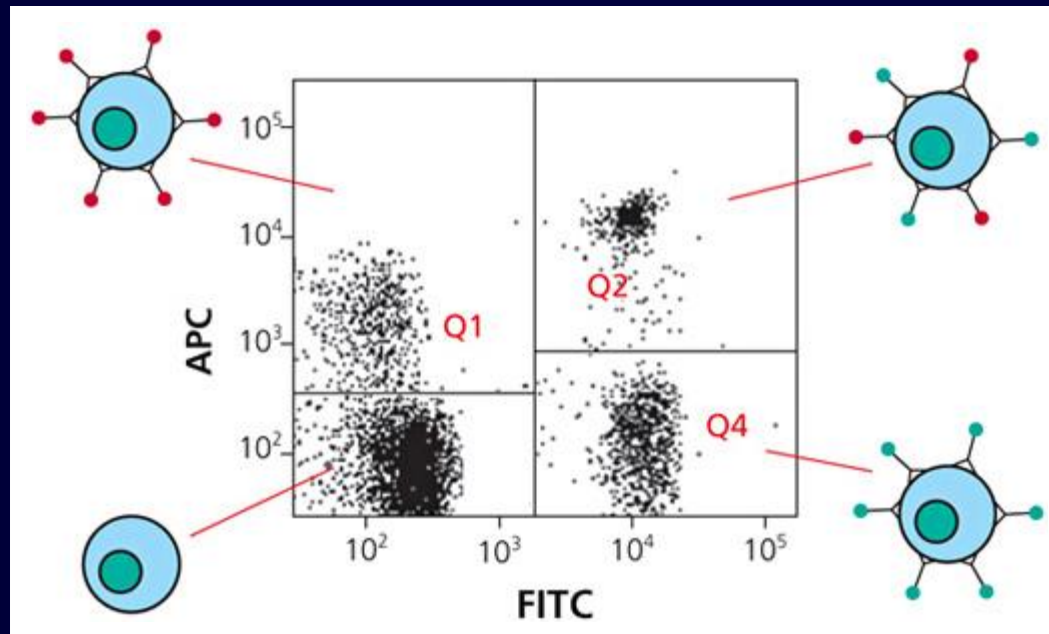
Imunofenotypizace myeloidních buněk

Bone Marrow



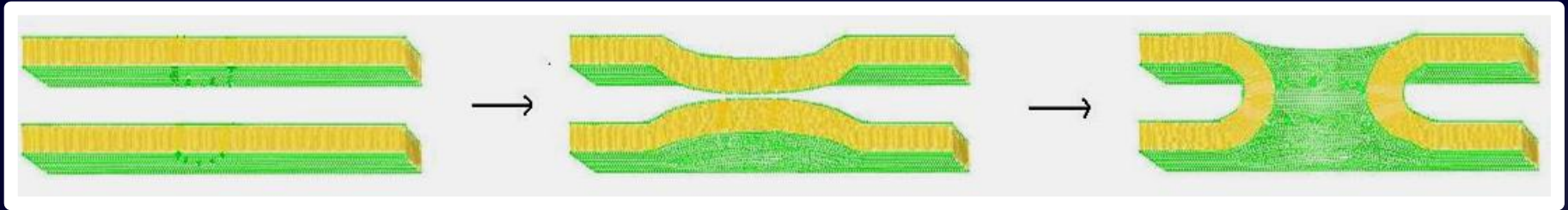
Imunofenotypizace lymfoidních buněk

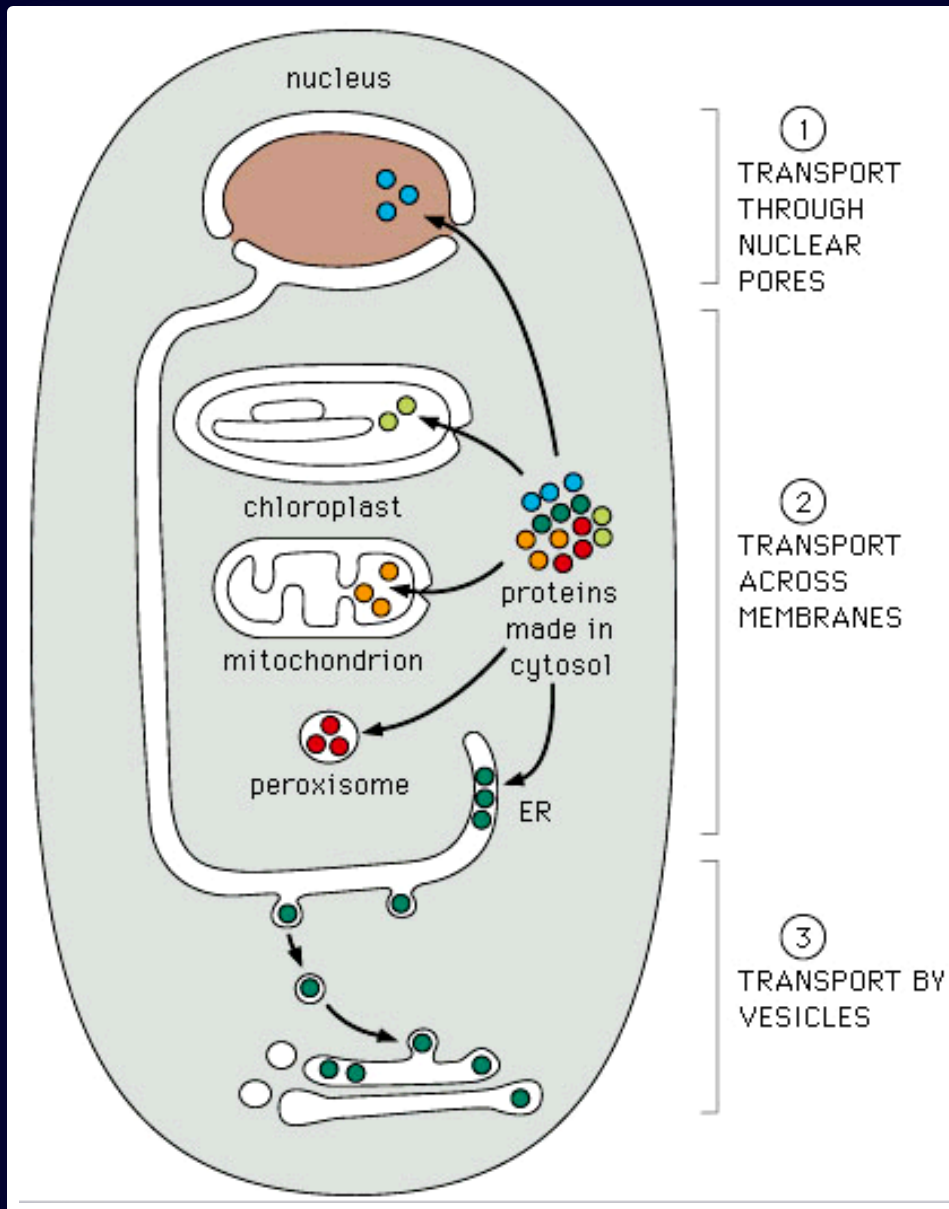
Imunofenotypizace buněk pomocí průtokové cytometrie



FÚZE MEMBRÁN A VEZIKULÁRNÍ TRANSPORT

Průběh fúze





Intracelulární transport proteinů:

- jadernými póry
- přes membrány
- prostřednictvím vezikulů

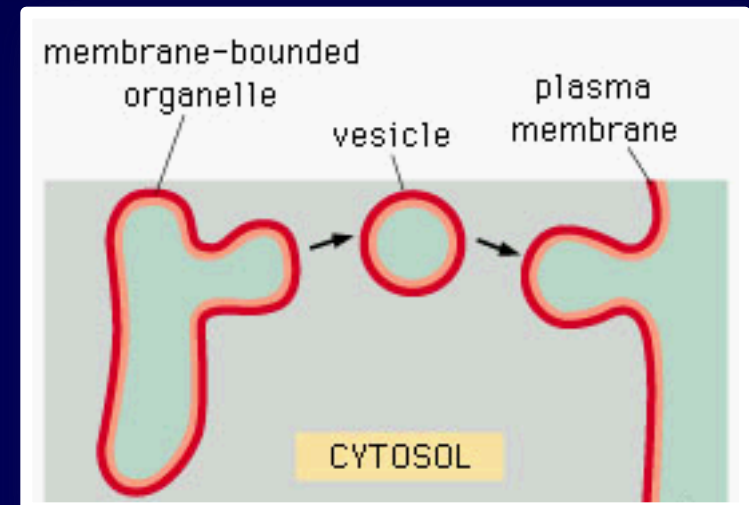
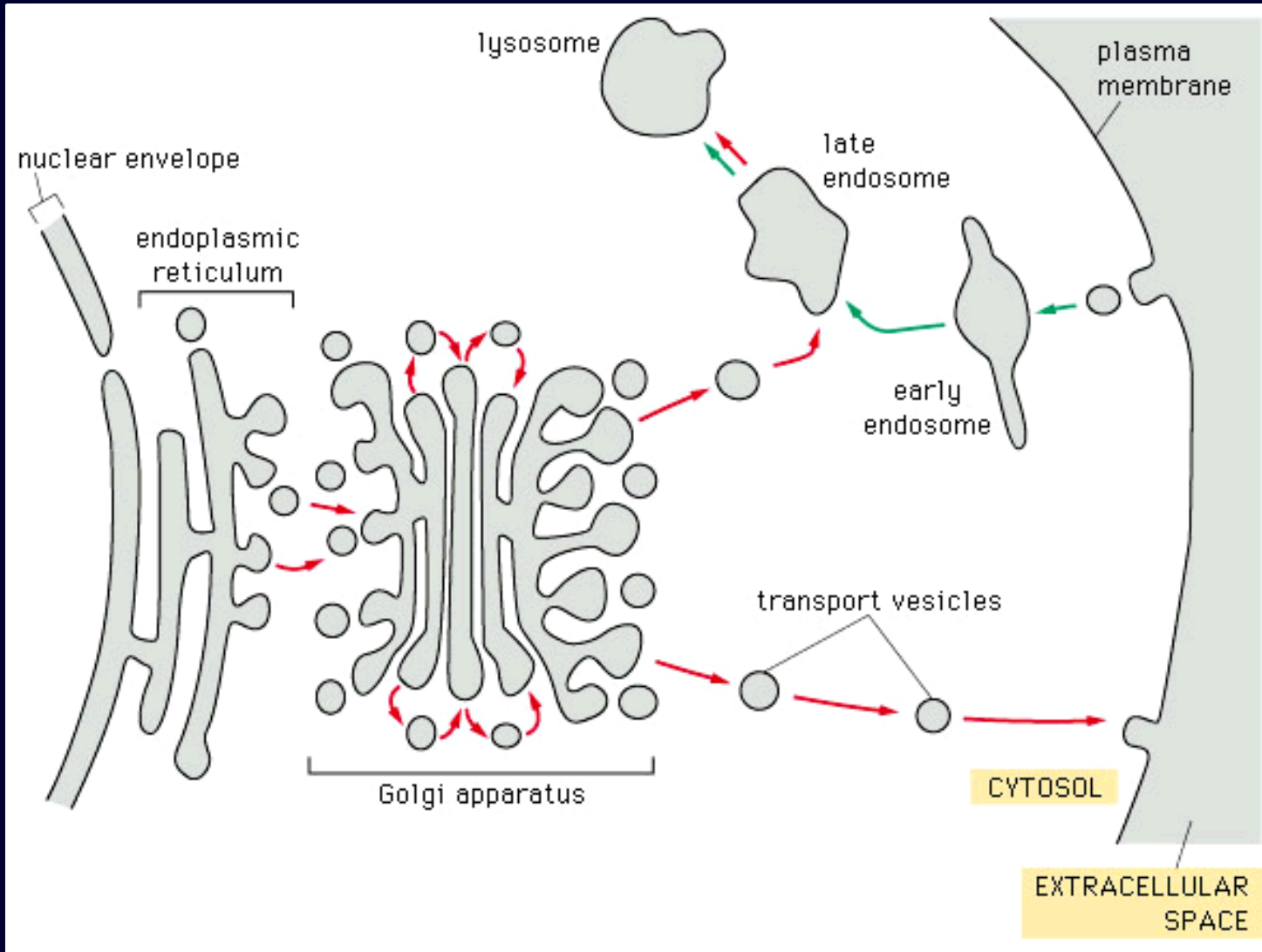


Schéma vezikulárního transportu:





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

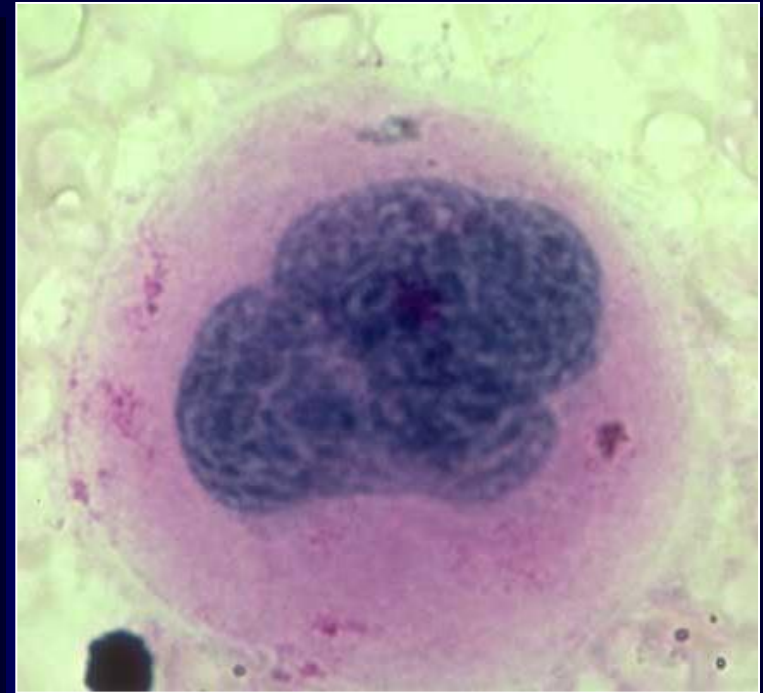
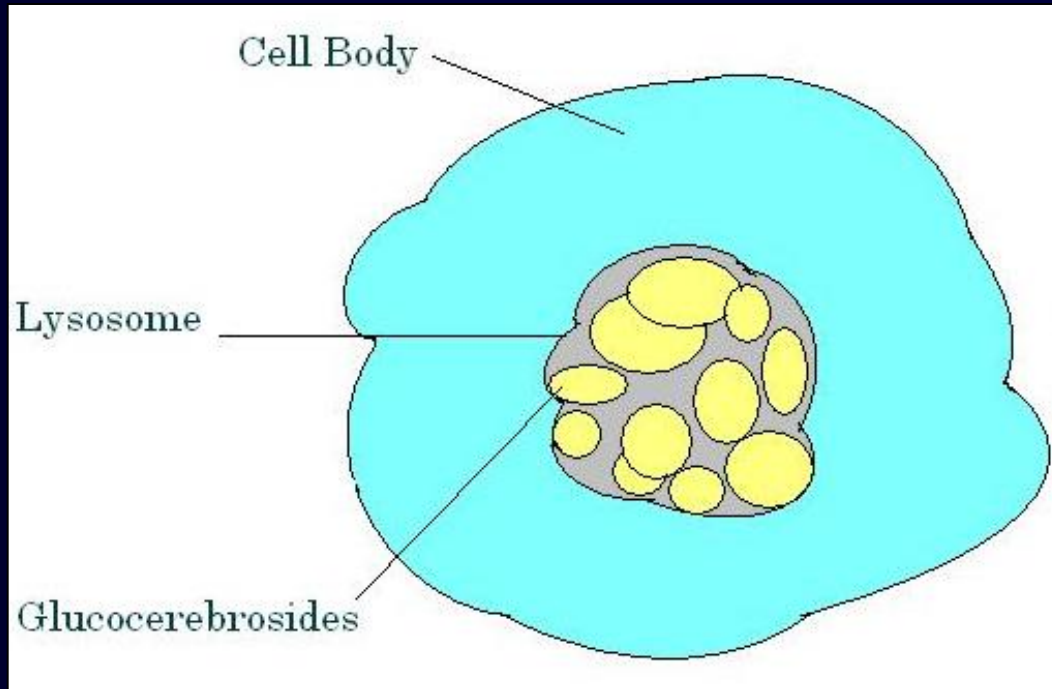
- makrofágy
- vyskytují se izolovaně v postižené tkáni
- pozitivní po obarvení činidlem PAS (Periodic Acid Schiff)

Pseudo-Gaucher cells

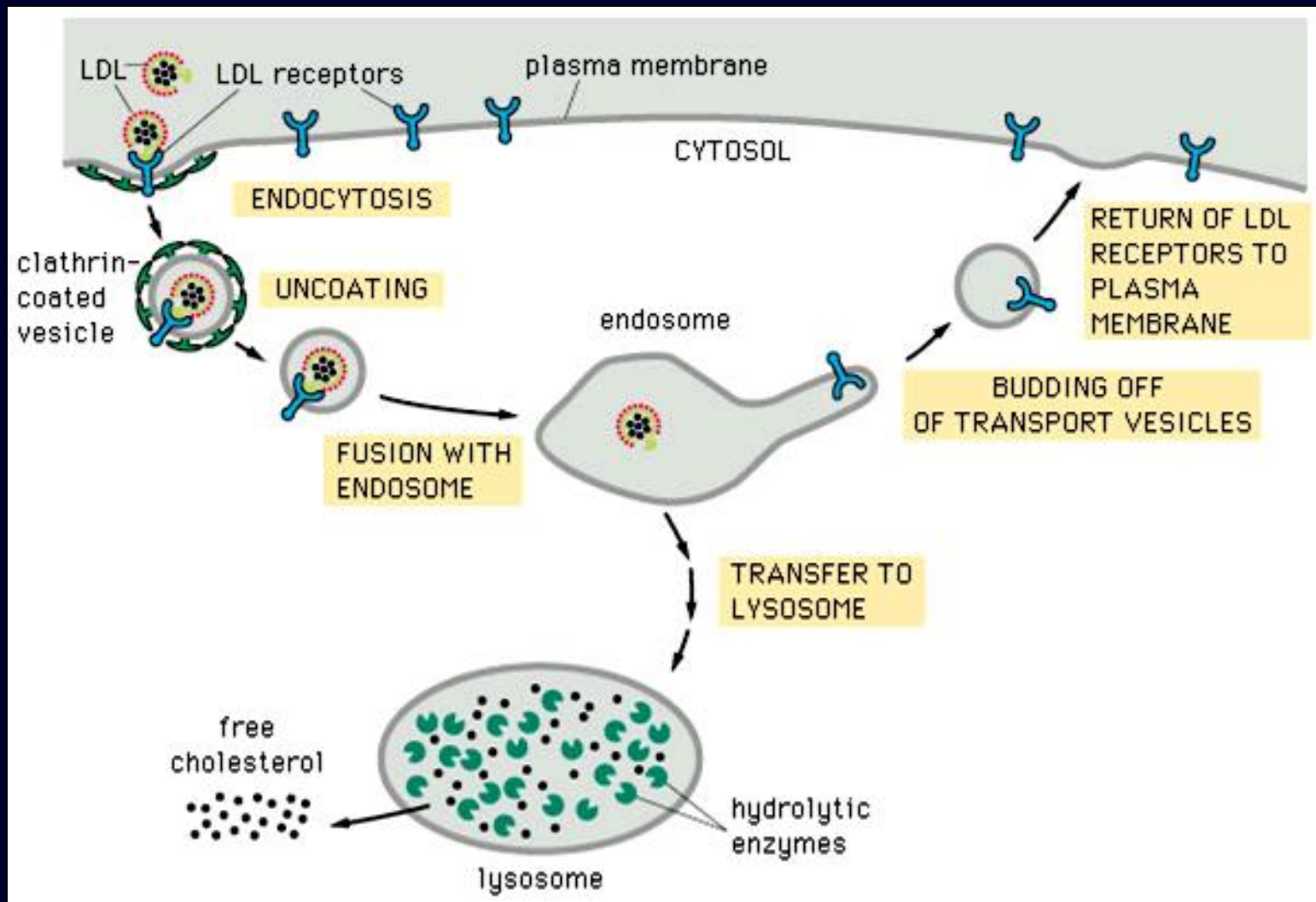
- výskyt u onemocnění spojených s vysokým turnoverm membrán (chronická granulomatózní leukémie, mnohočetný myelom, Hodgkinova choroba, AIDS...)
- ve tkáni se vyskytují ve shlucích



Gaucher cells



Příklad endocytózy: LDL (low-density lipoprotein)

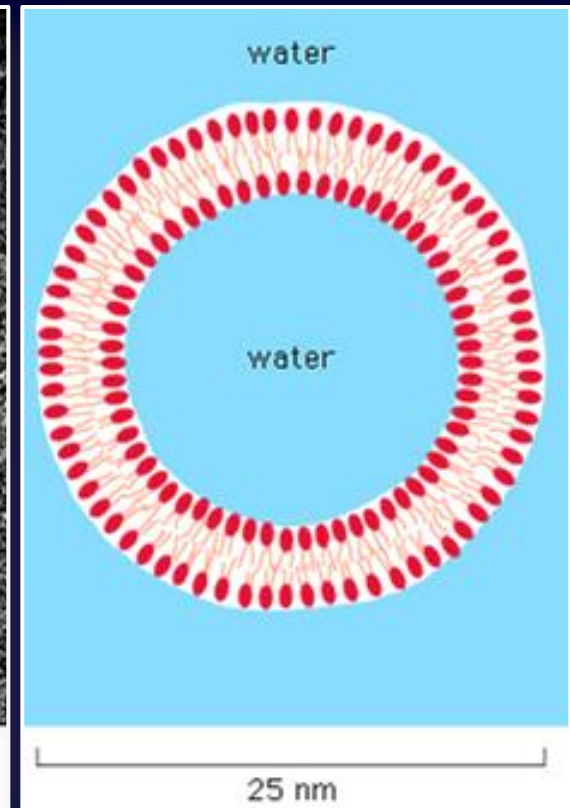
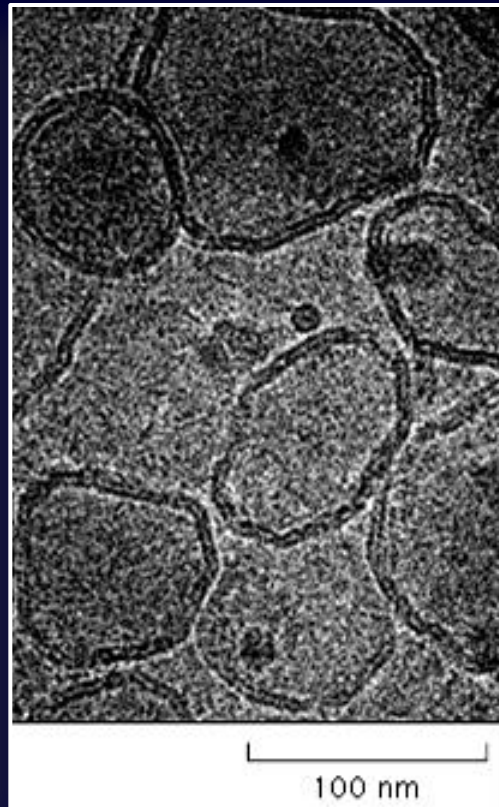
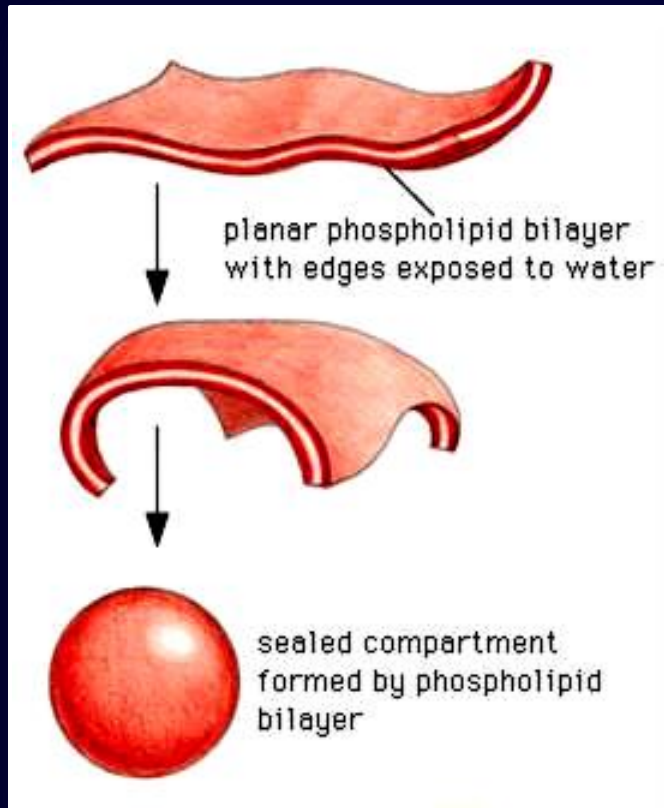


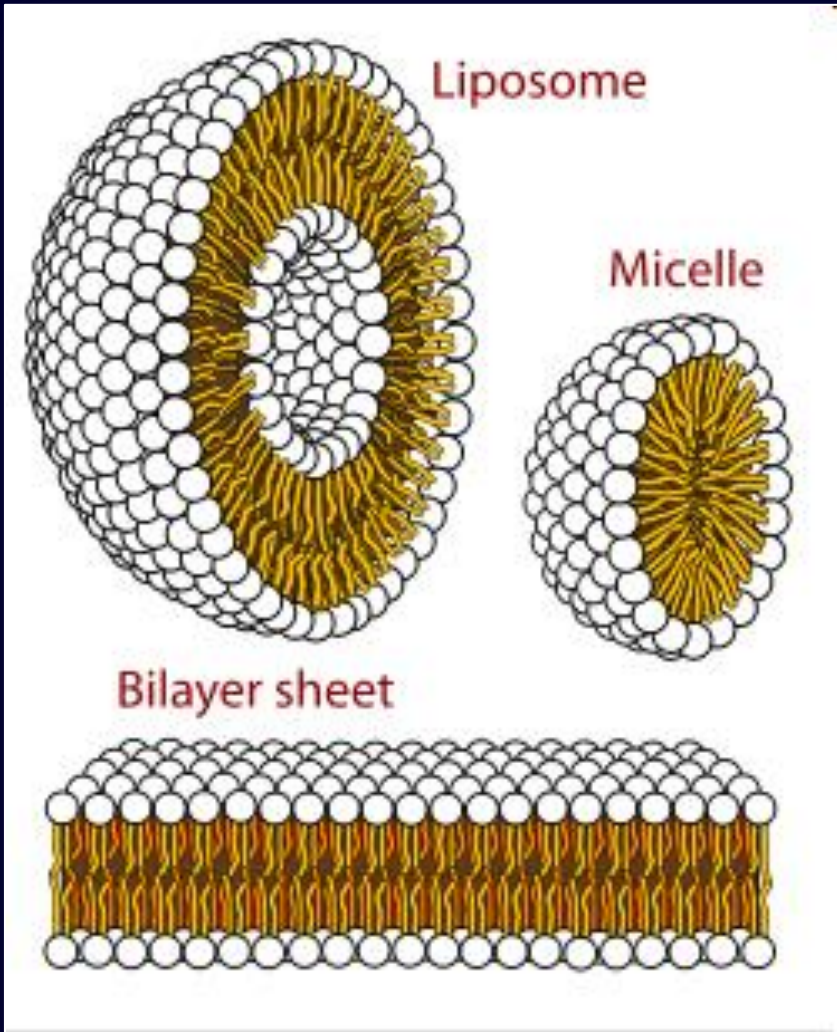


Poruchy příjmu cholesterolu

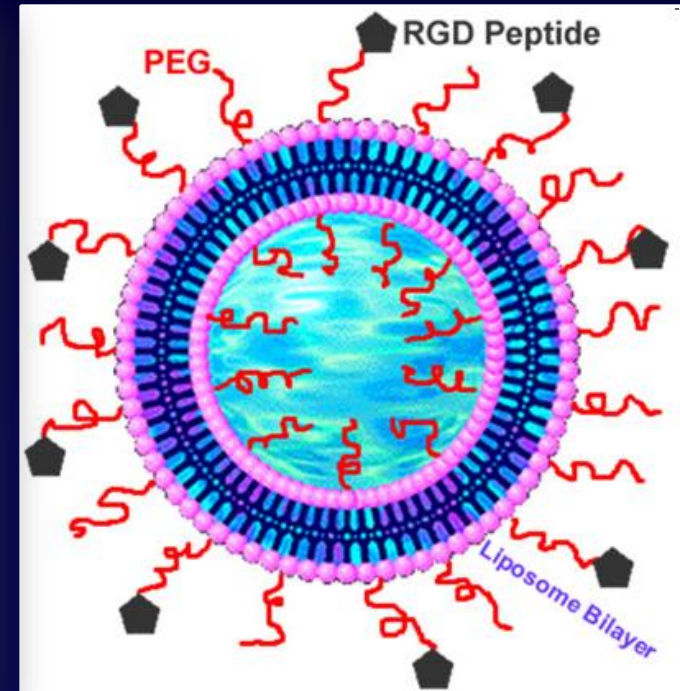
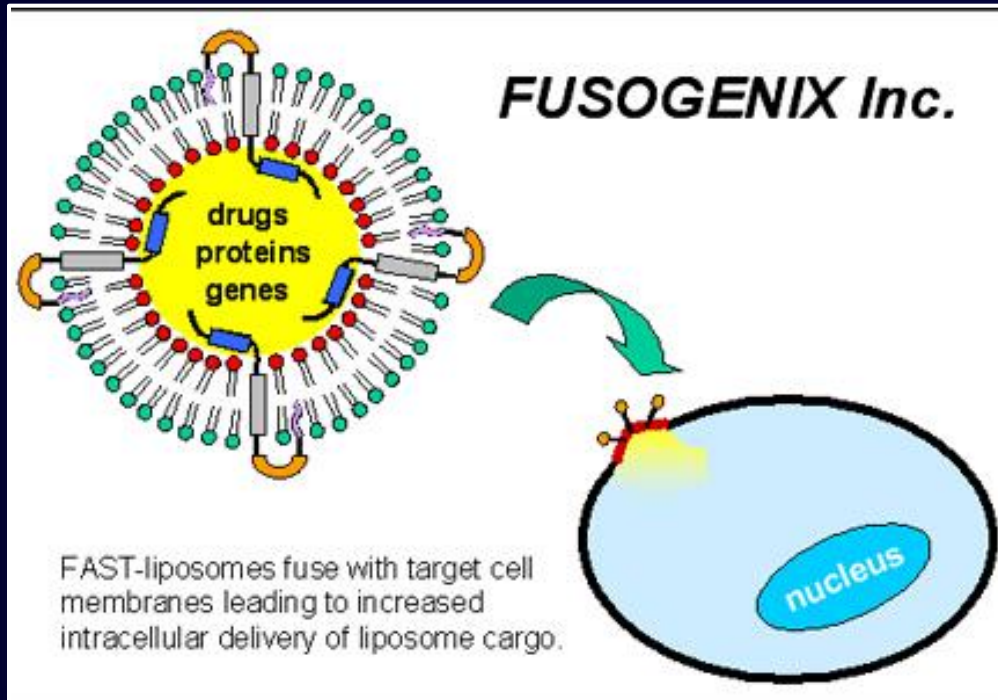
- příčinou porucha struktury LDL-receptoru
- buňky nepřijímají cholesterol
- cholesterol se hromadí v krvi a napomáhá vzniku aterosklerózy
- většina pacientů umírá v raném věku na srdeční záchvat (důsledek ucpání tepen zásobujících srdce)

Tvorba liposomů:



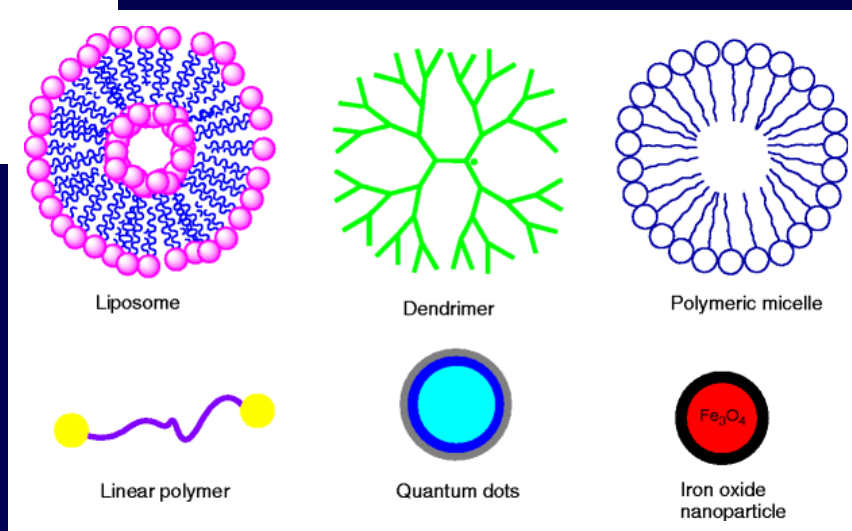
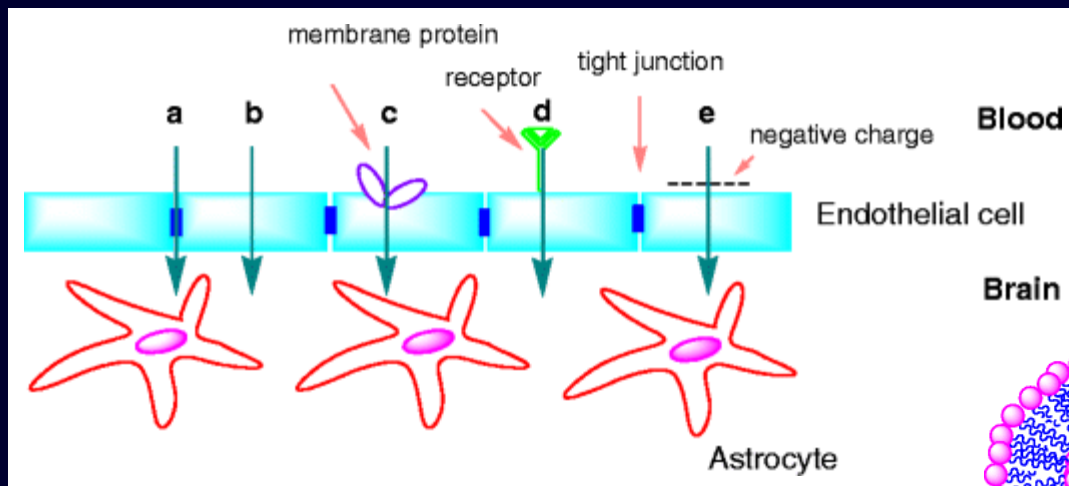


Liposome-delivery systems:



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

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



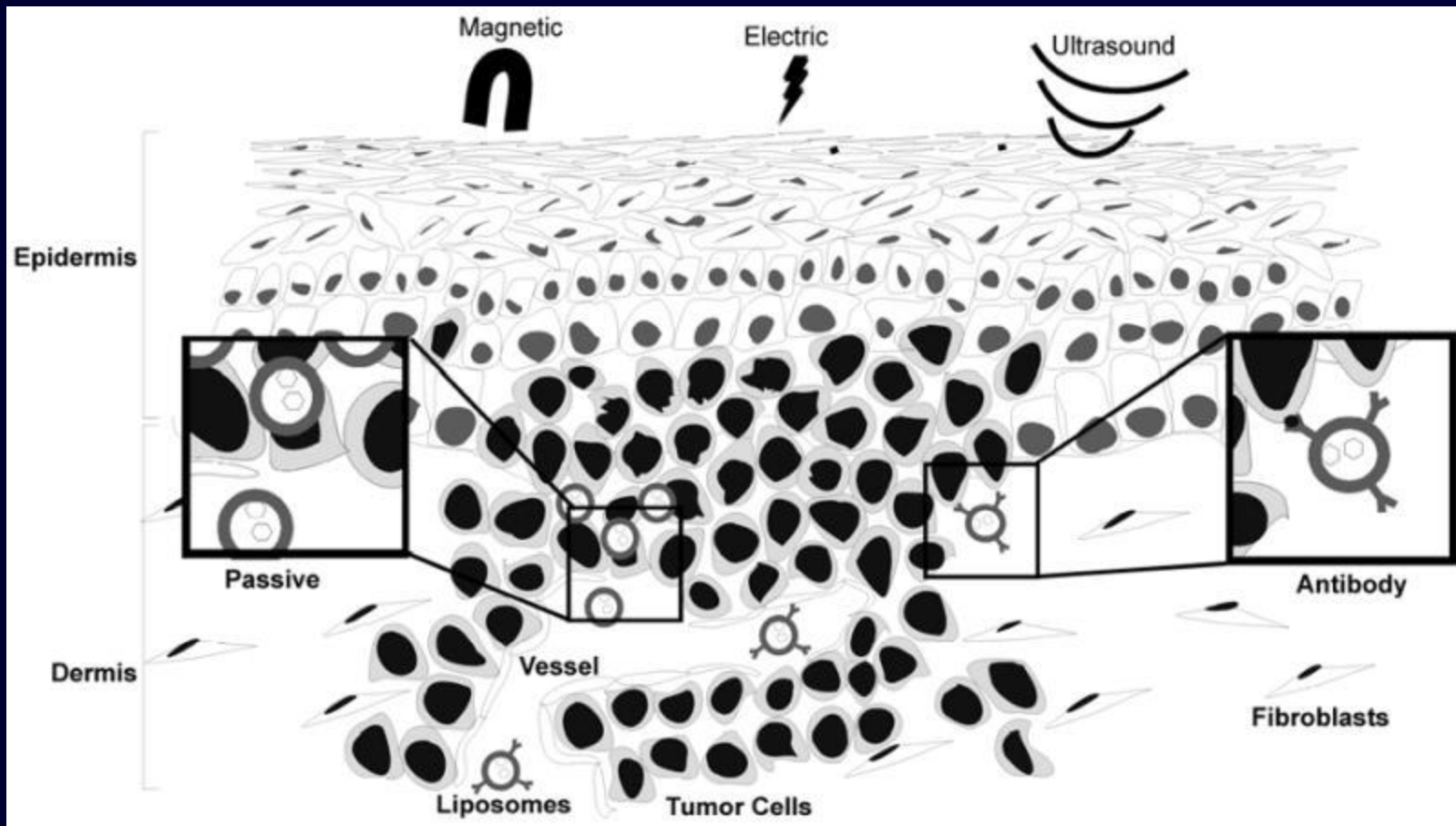
Yang H:
Nanoparticle-Mediated Brain-Specific
Drug Delivery, Imaging, and
Diagnosis.

Pharmaceutical Research, 2010.

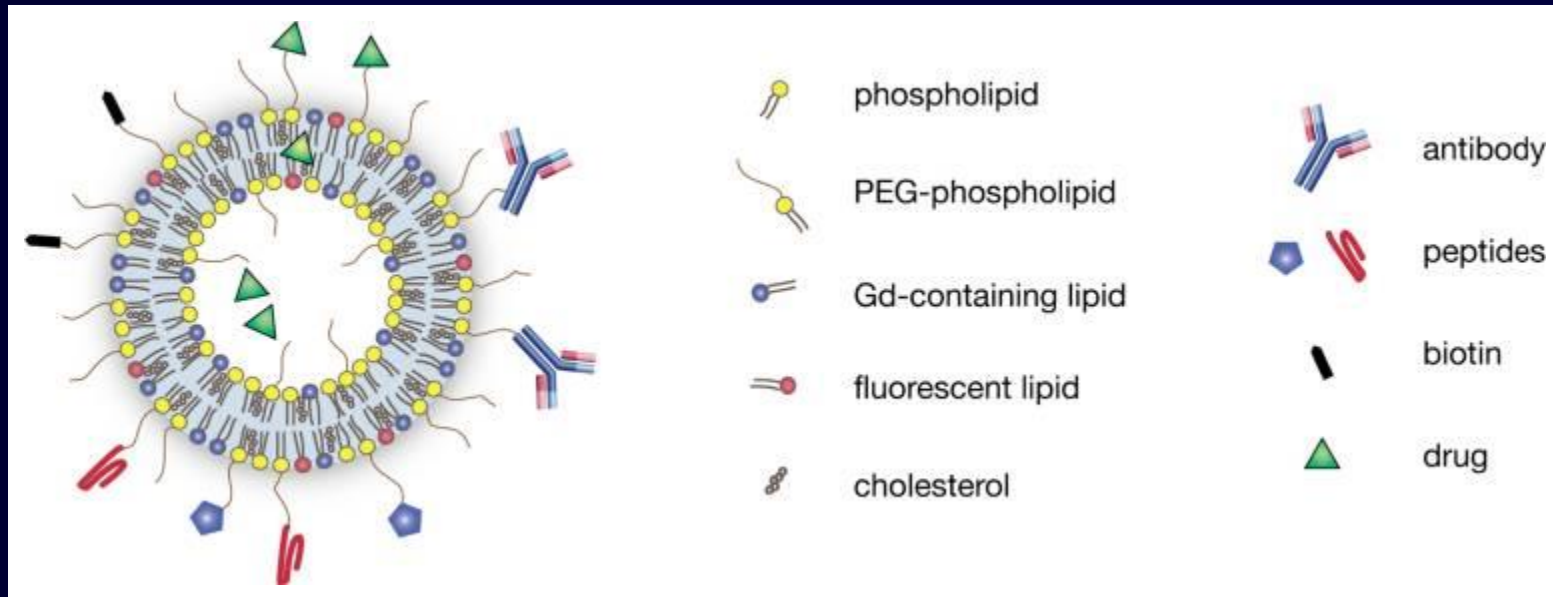
Drug	Property/Function	Nanocarrier	Delivery means	Model (s)	Admin. route for <i>in vivo</i>
Boron	Metal used in boron neutron capture technology	EGF-carrying boronated PAMAM dendrimer	Covalent conjugation	Rats	Intratumoral injection or CED
Ciprofloxacin	Antibiotic	Cholesterol conjugated PEG and anchored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

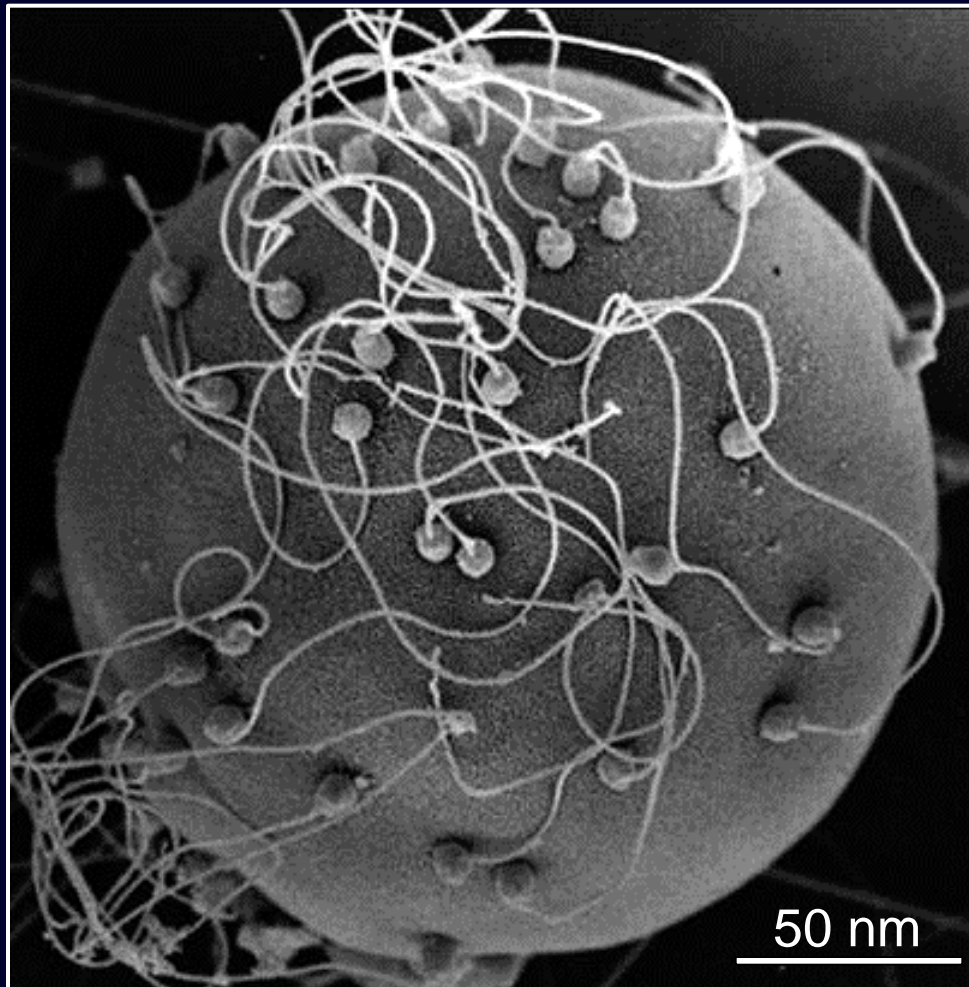
Možnosti zacílení liposomů do nádorové tkáně (maligní melanom)



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



FÚZE MEMBRÁN

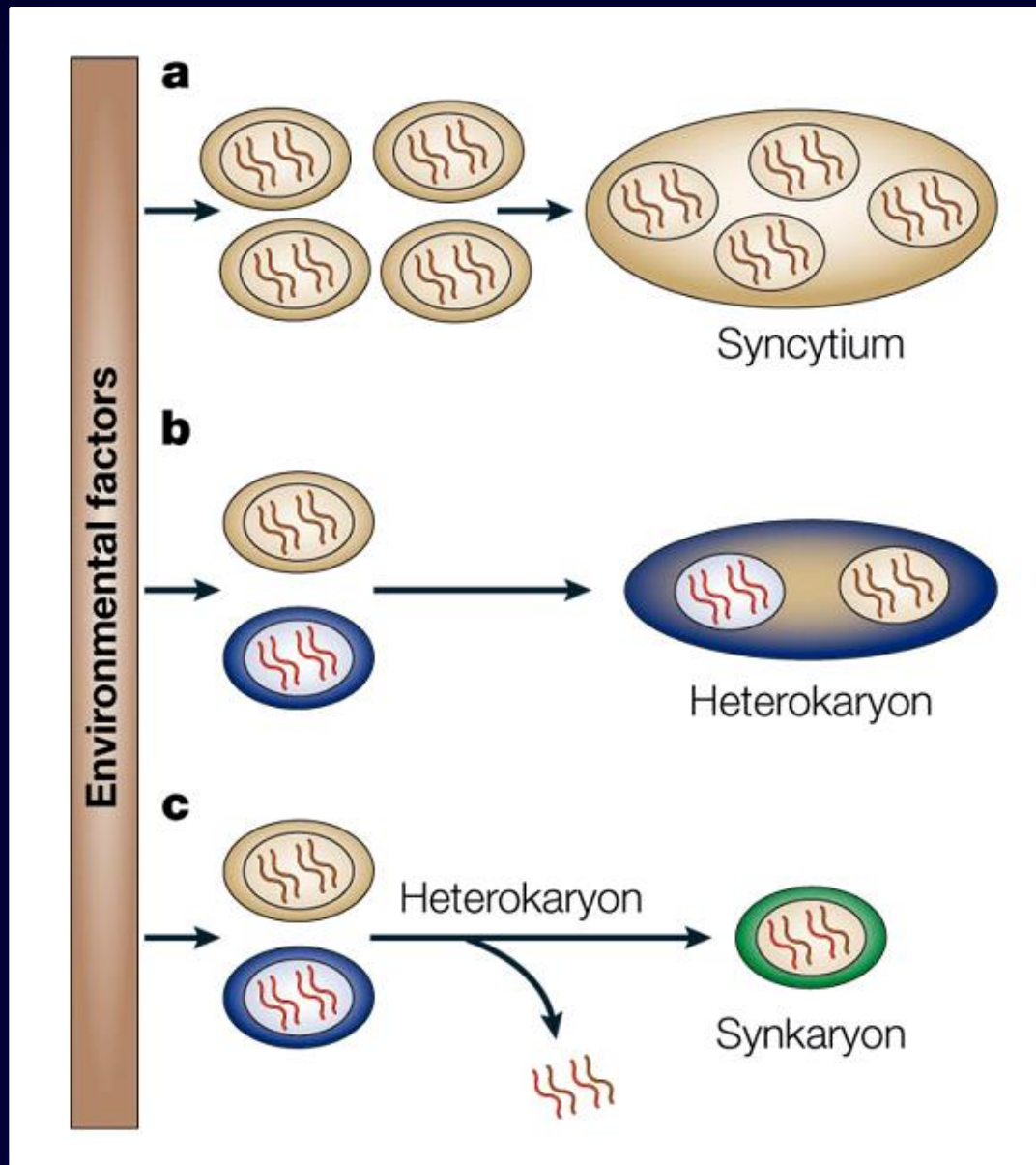


Přirozená fúze:

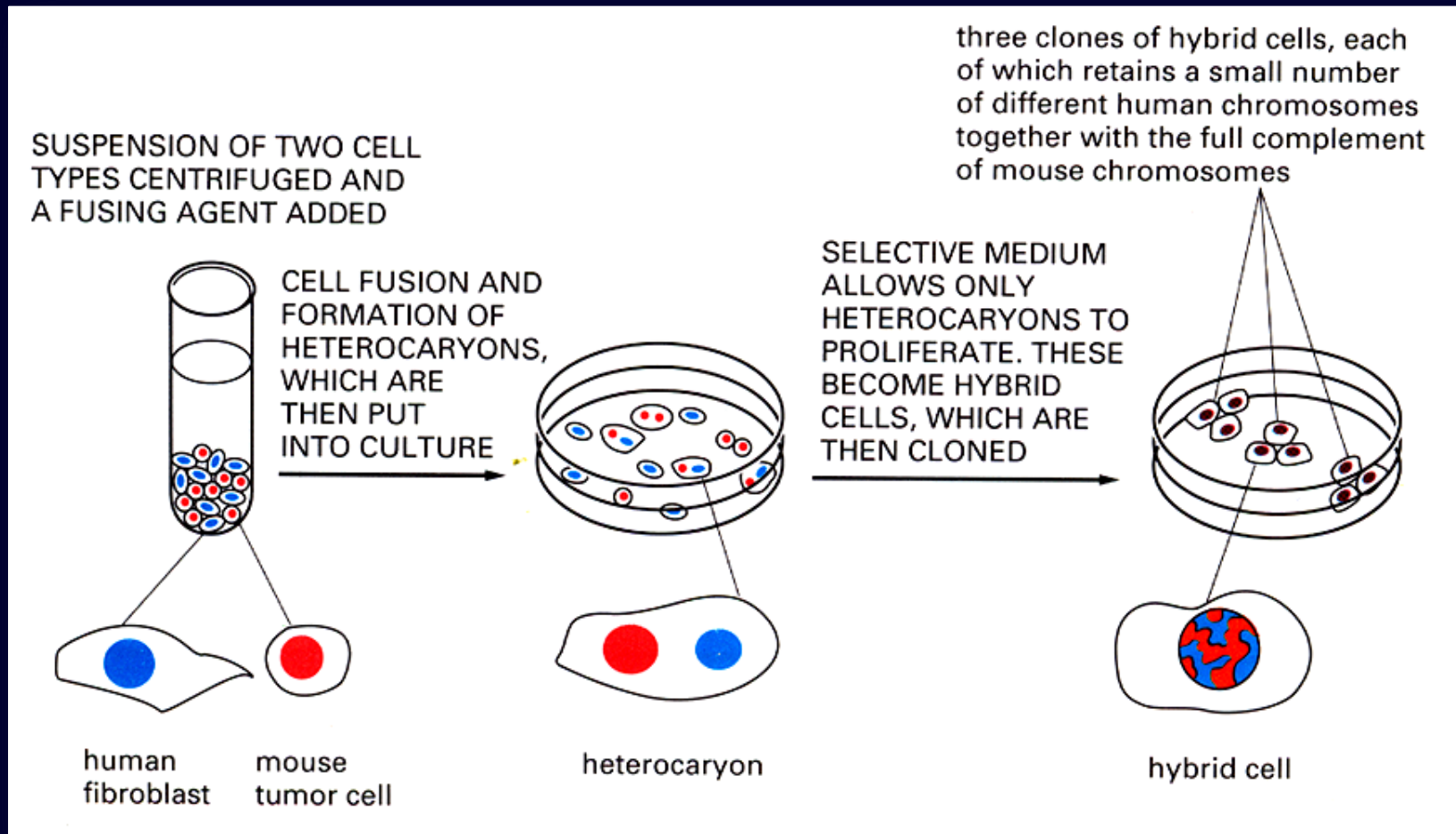
- fertilizace
- vznik syncytia

Indukovaná fúze:

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



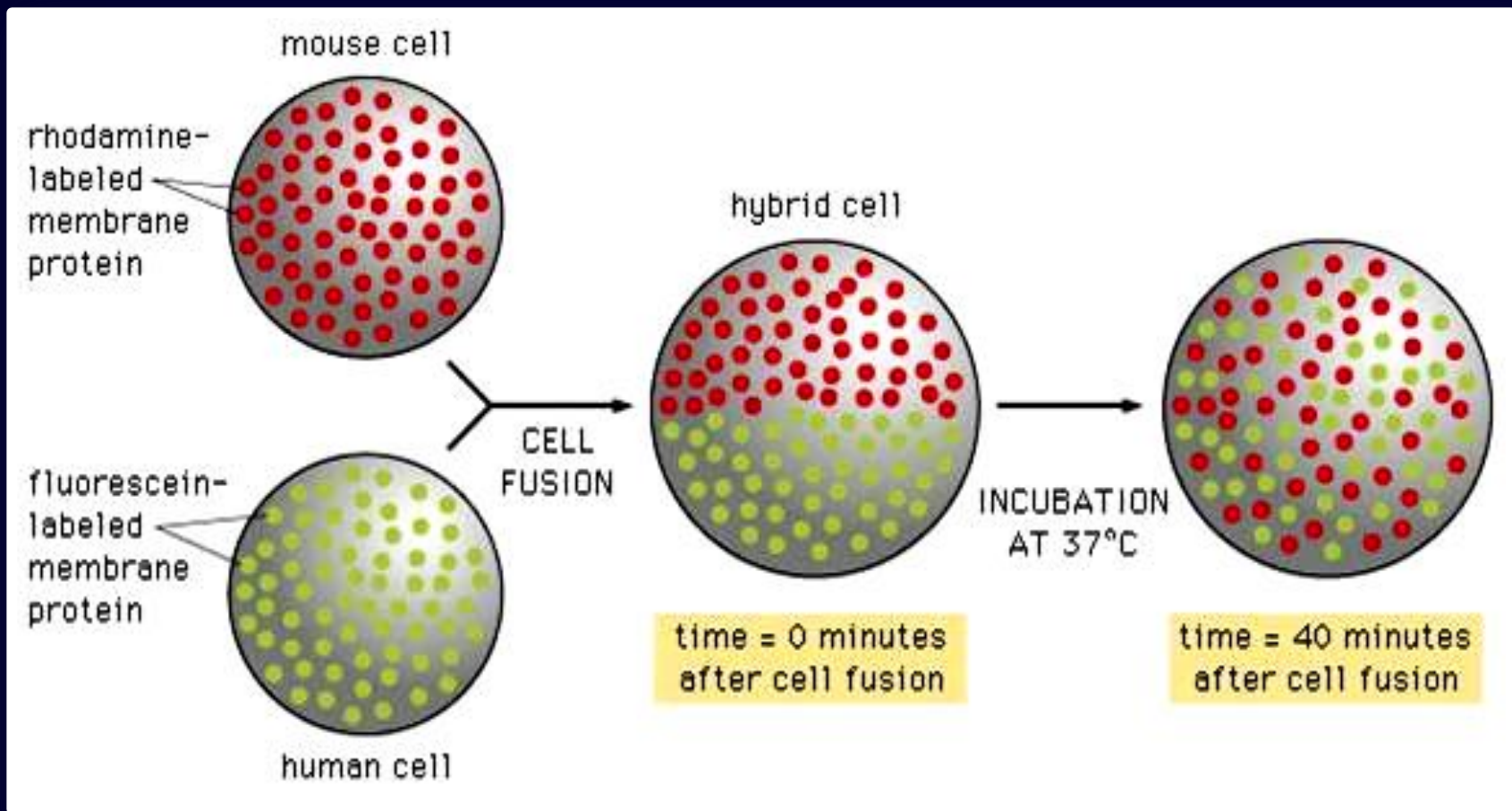
Princip mezidruhové fúze



Heterokaryon = hybridní buňka se 2 jádry

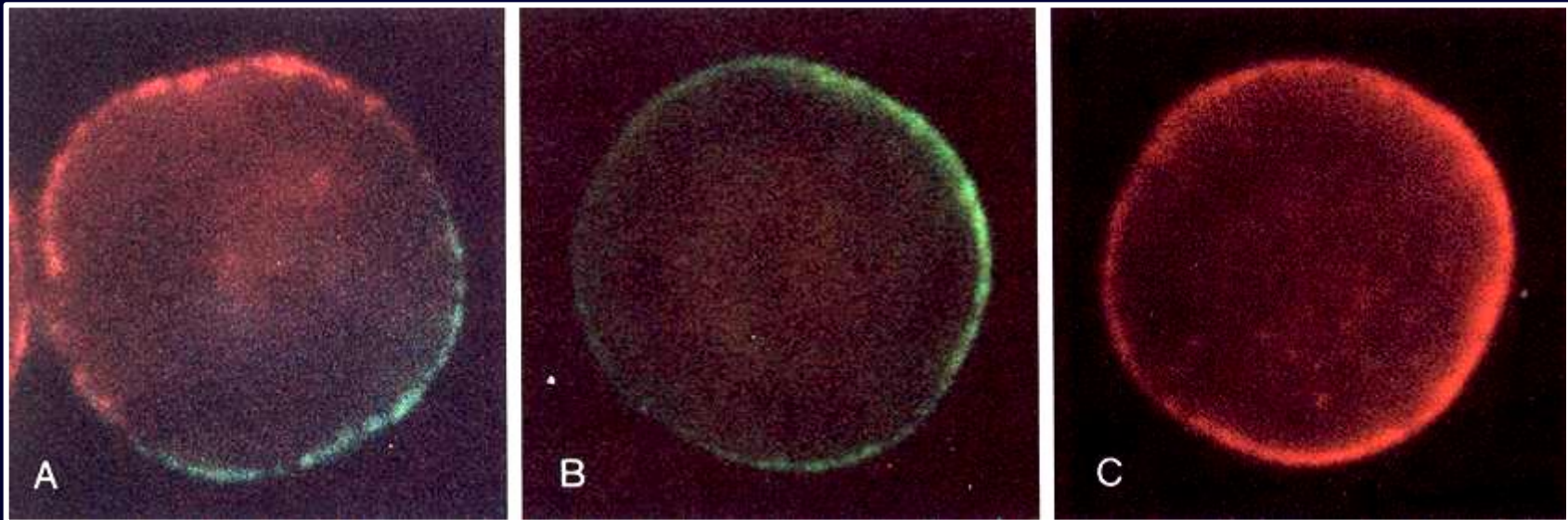
Synkaryon = hybridní buňka se zfúzovaným jádrem

Využití fúze buněk k průkazu fluidity membrán:



Frye a Edidin, 1970

Využití fúze buněk k průkazu fluidity membrán:



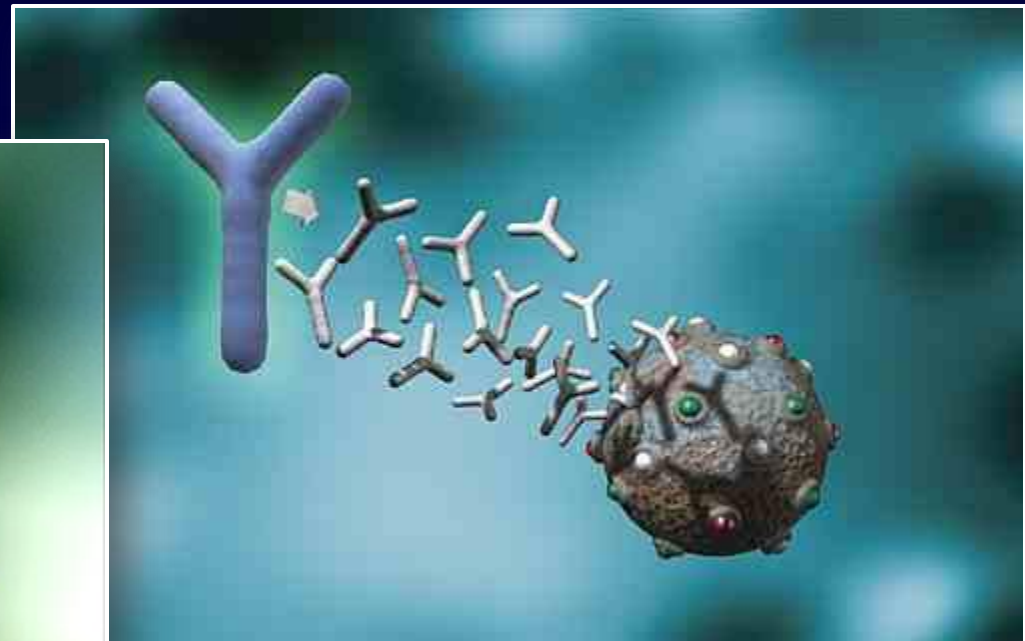
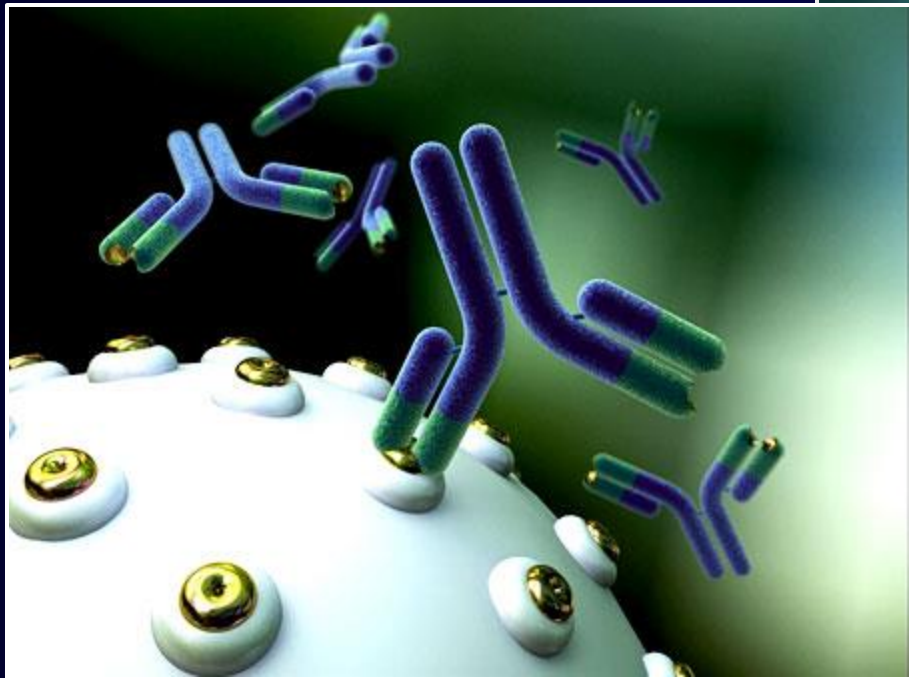
t = 0 min
myší antigeny
lidské antigeny

t = 40 min
lidské antigeny

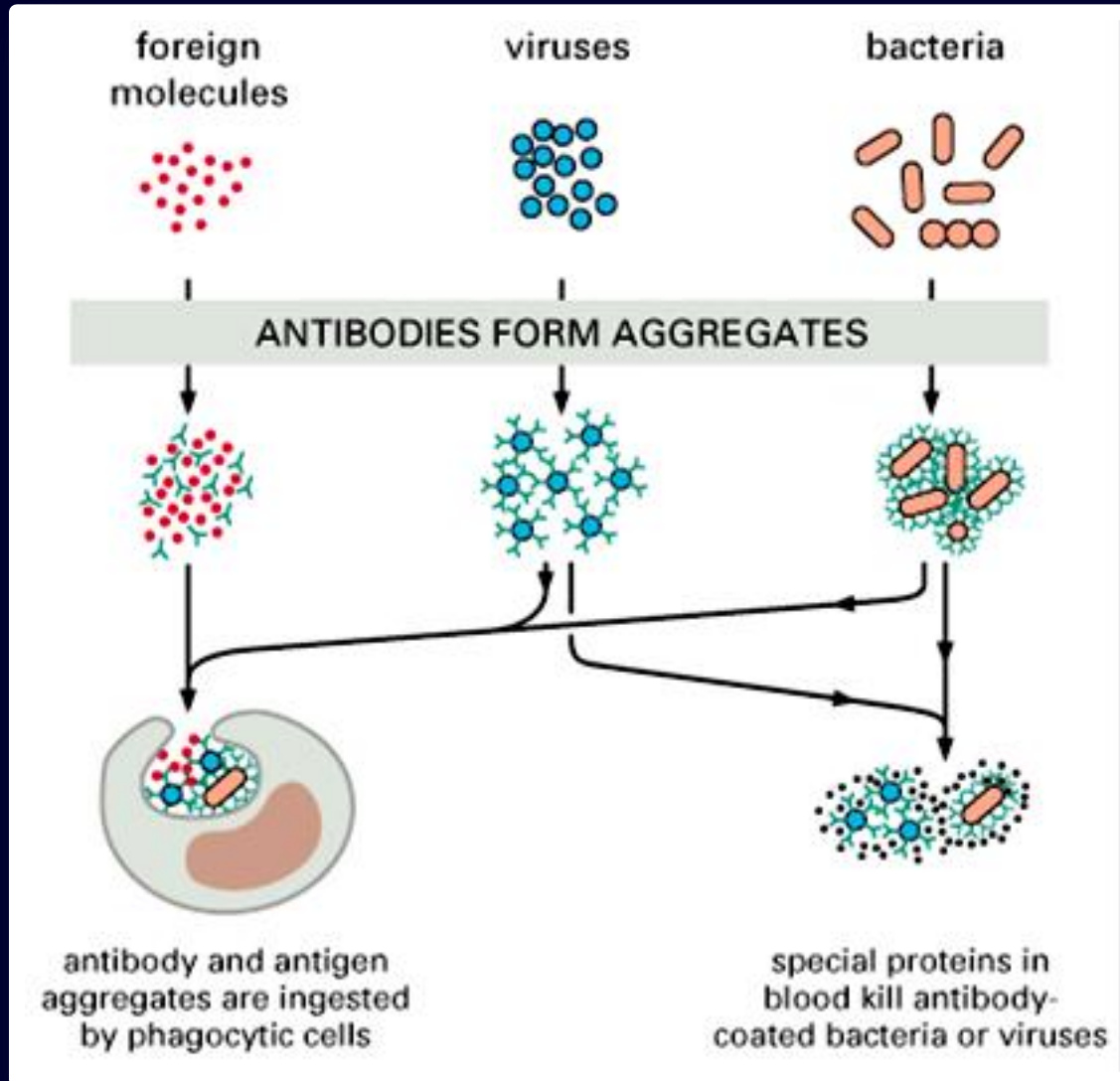
t = 40 min
myší antigeny

Hybridomová technologie

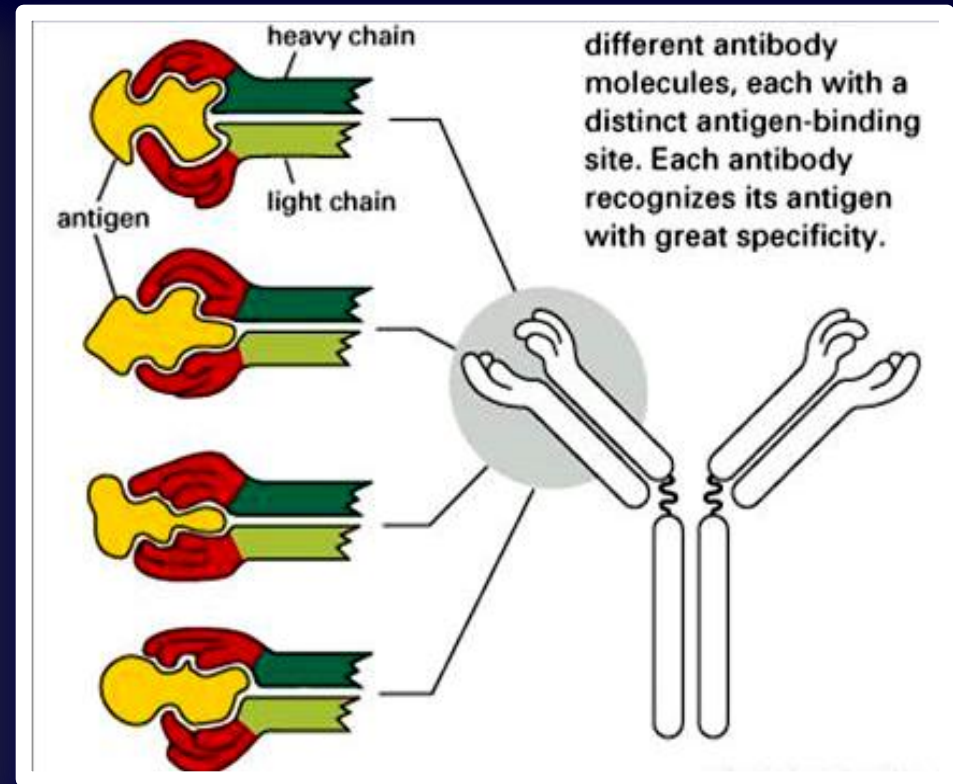
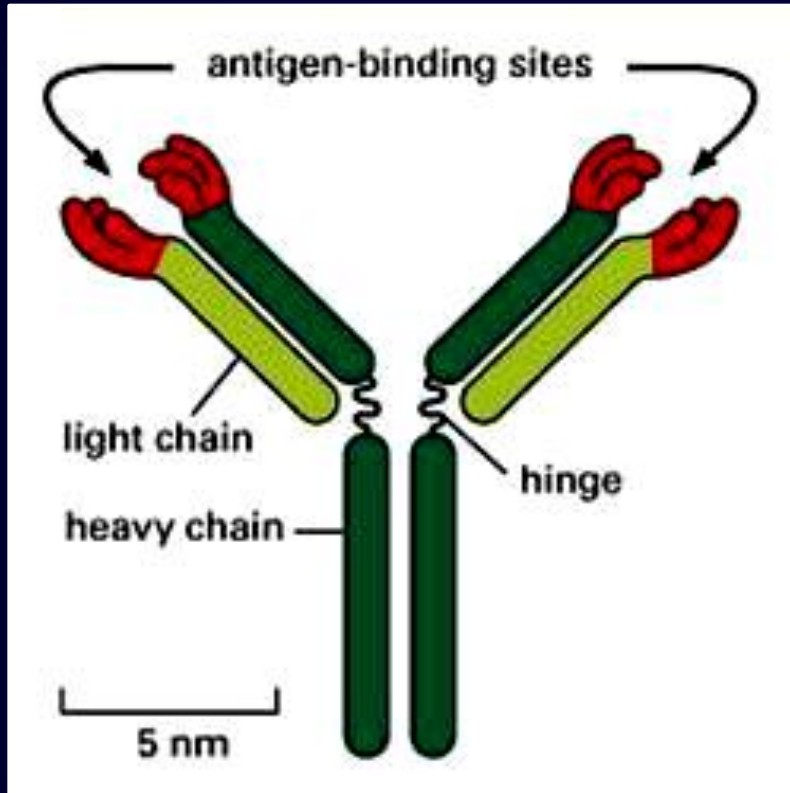
= využití indukované buněčné fúze pro výrobu monoklonálních protilátek



Přirozená role protilátek v obraně proti infekcím nebo toxinům



Struktura a specifita protilátek



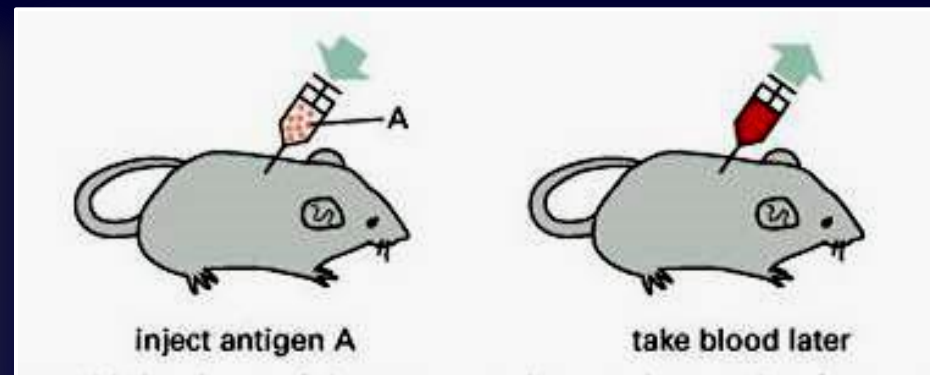
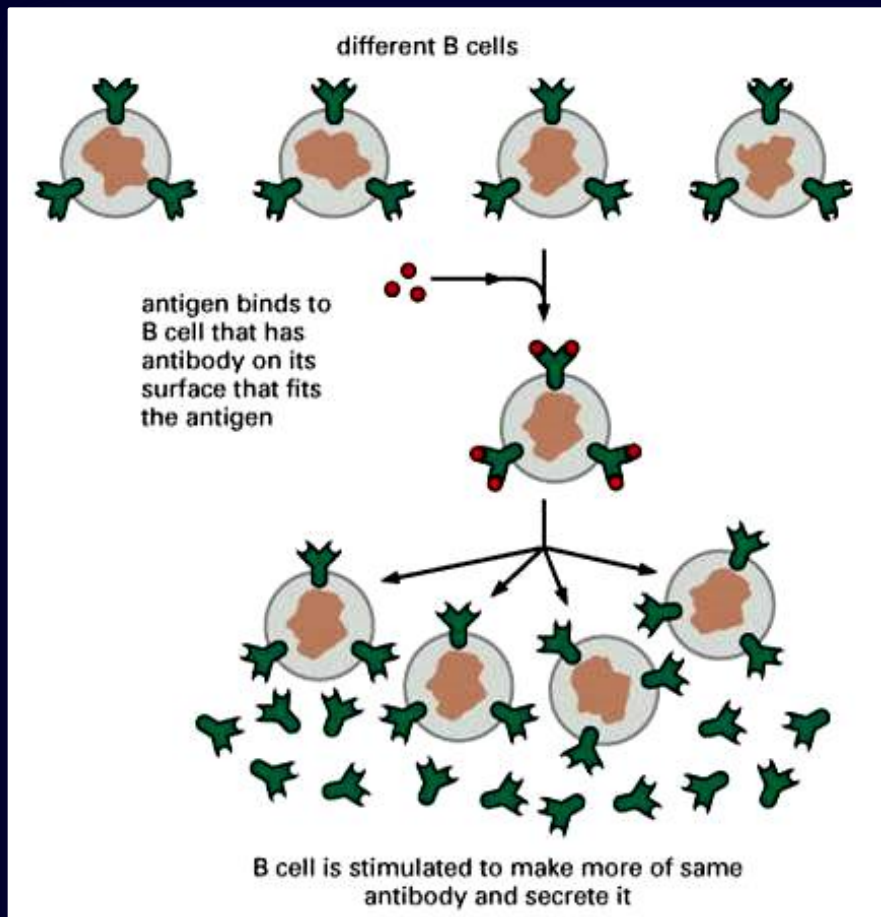
Polyklonální protilátky:

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

Monoklonální protilátky:

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

Příprava polyklonálních protilátek

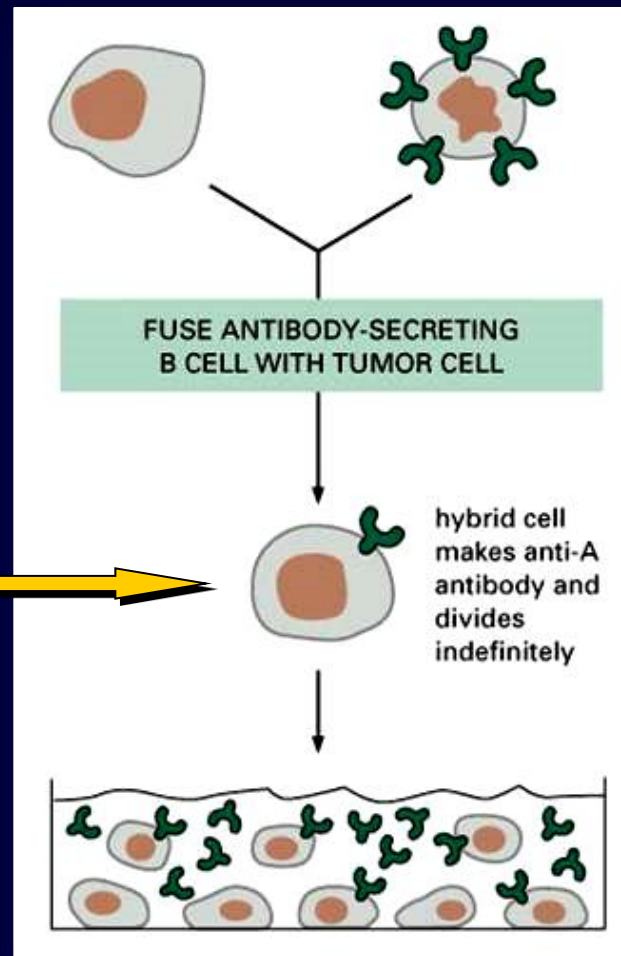


- imunizace pokusného zvířete
- izolace směsi protilátek z krve imunizovaného zvířete

Princip hybridomové technologie (příprava monoklonálních protilátek)

myelomová
buňka

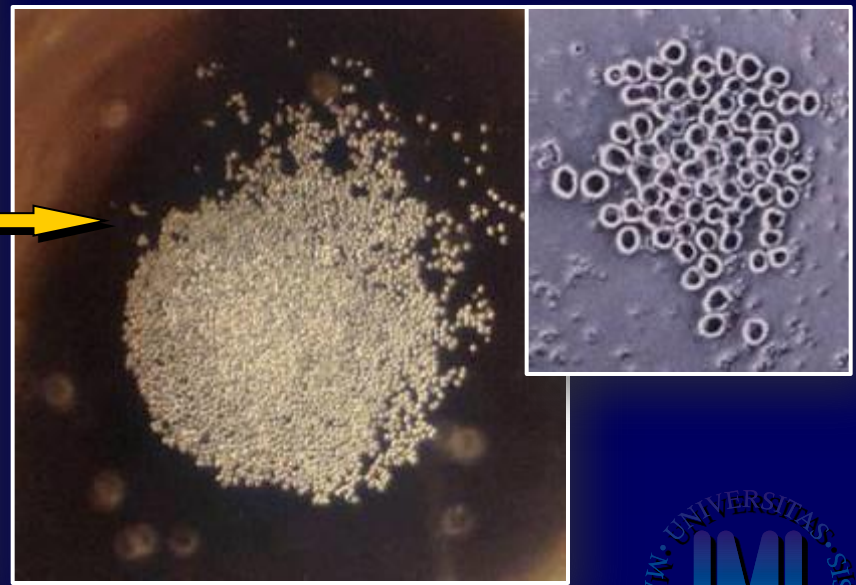
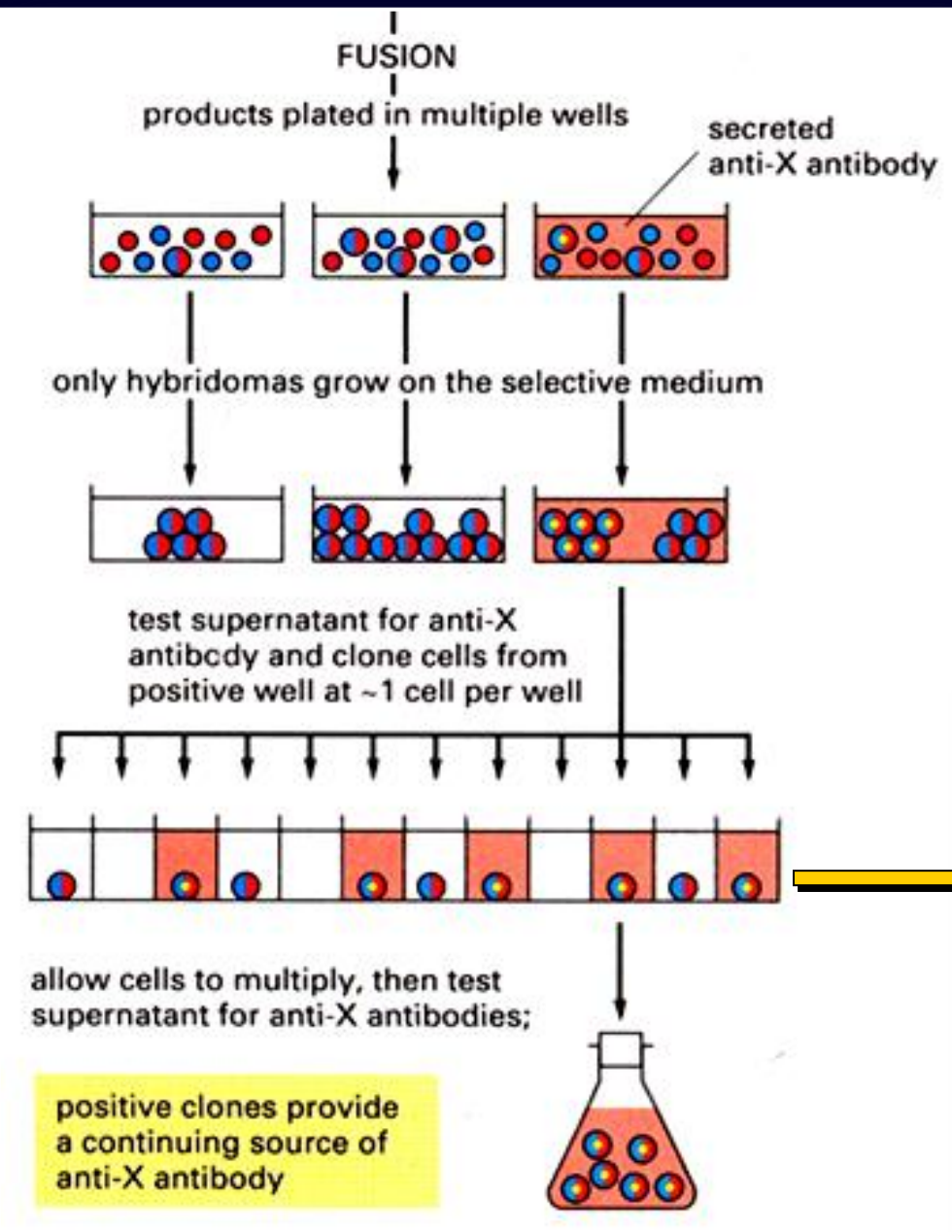
aktivovaný
B-lymfocyt



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

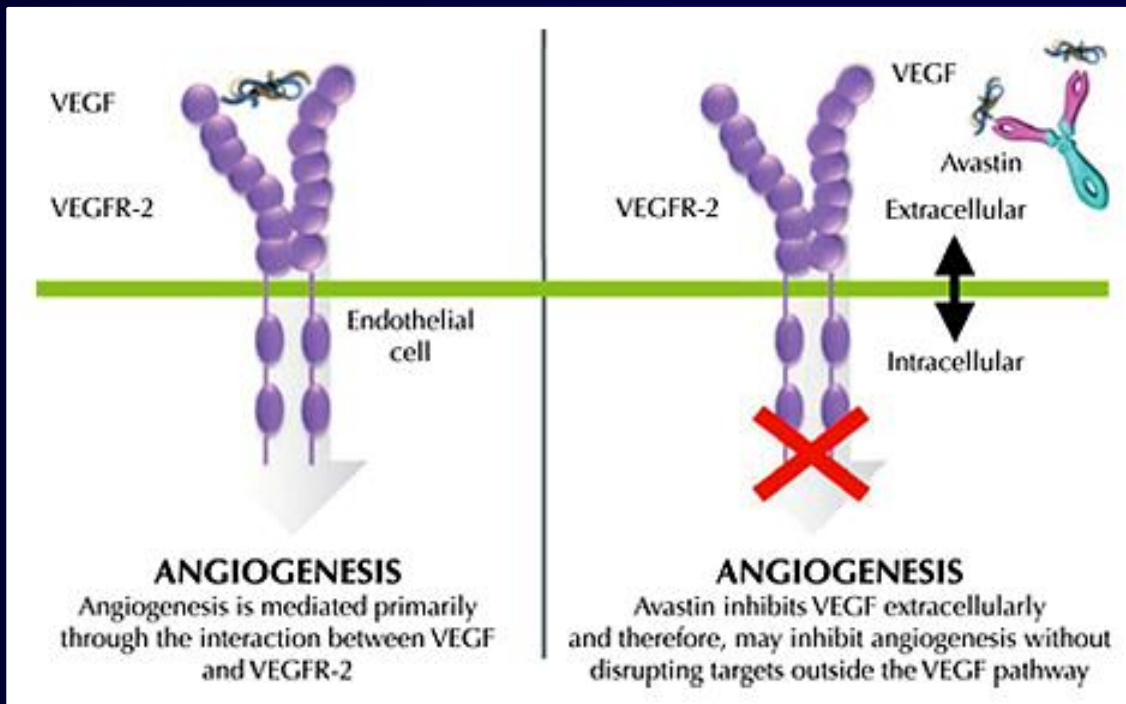
- morfologické a funkční studie v základním výzkumu (exprese proteinu, lokalizace, transport...)
- imunofenotypizace buněk a tkání (CD antigeny, intracelulární markery...) - patologie, hematologie, onkologie
- nová léčiva (biologická léčba)

Metodické přístupy:

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

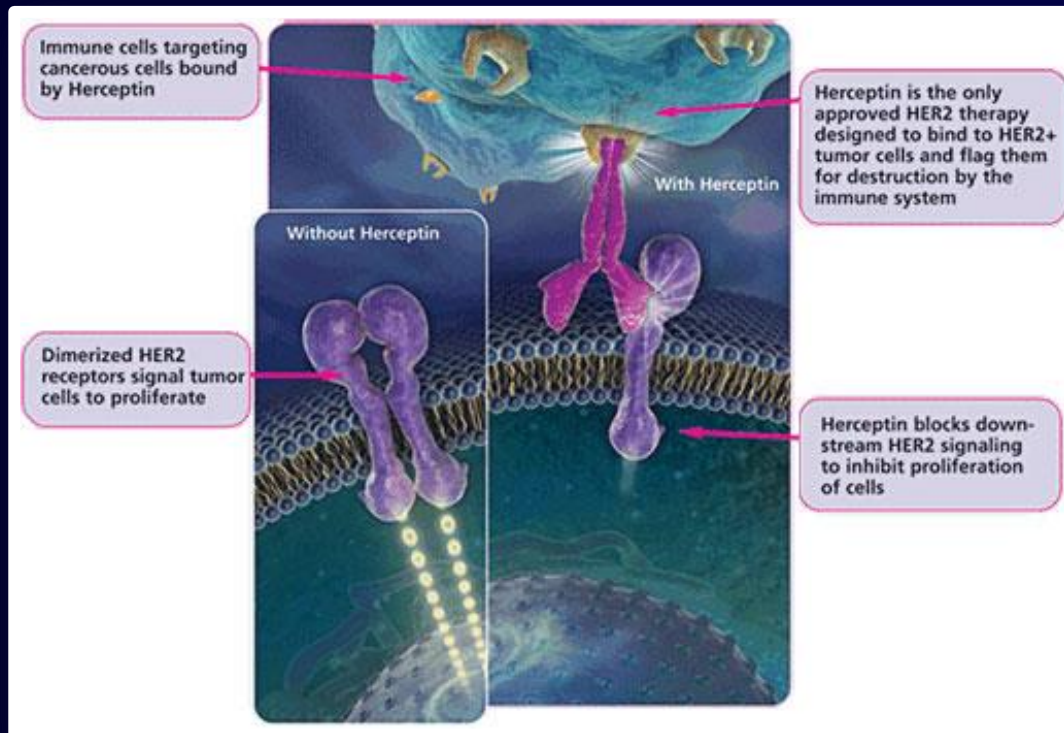
Avastin (bevacizumab)

- **MoAb proti VEGF** (vascular endothelial growth factor)
- protinádorová léčba: **inhibice angiogeneze**
- kolorektální karcinom, karcinom plic, karcinom ledviny, glioblastom



Herceptin (trastuzumab)

- MoAb proti HER2 (= receptor pro EGF)
- protinádorová léčba: **zablokování signální dráhy EGF**
- HER2+ karcinom prsu, HER2+ metastatický karcinom žaludku



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**)

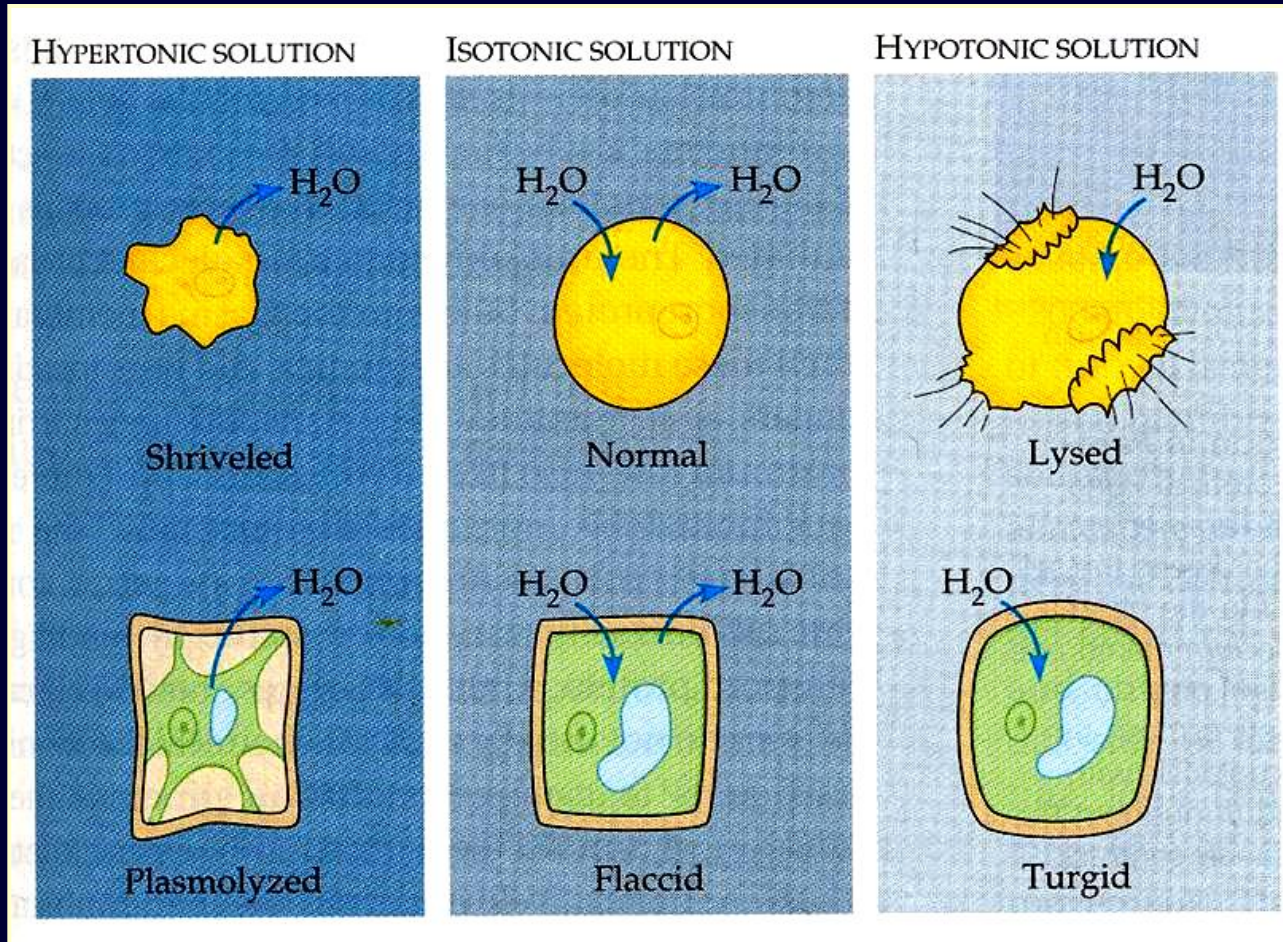
Hypertonické prostředí

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

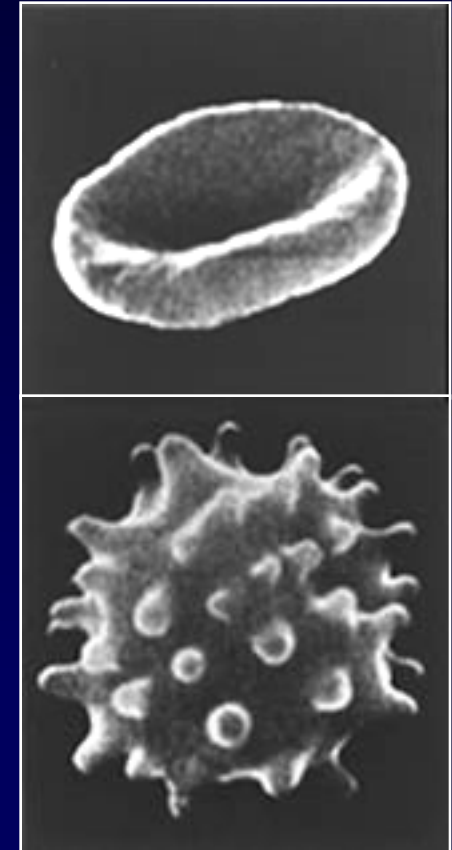
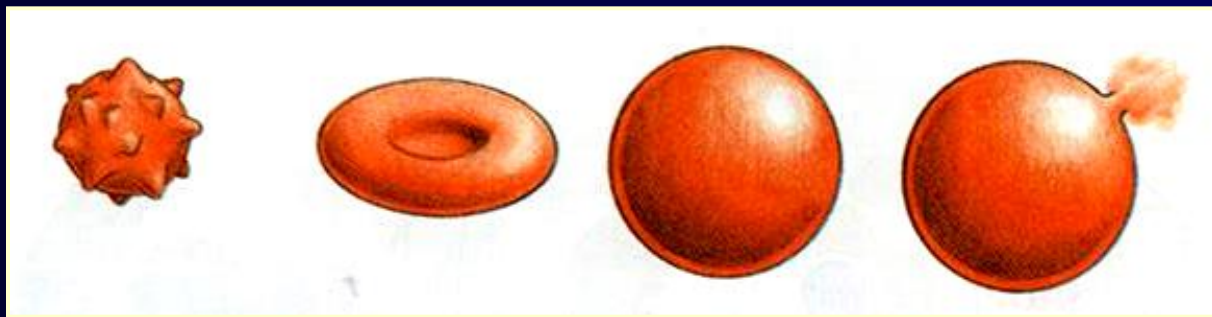
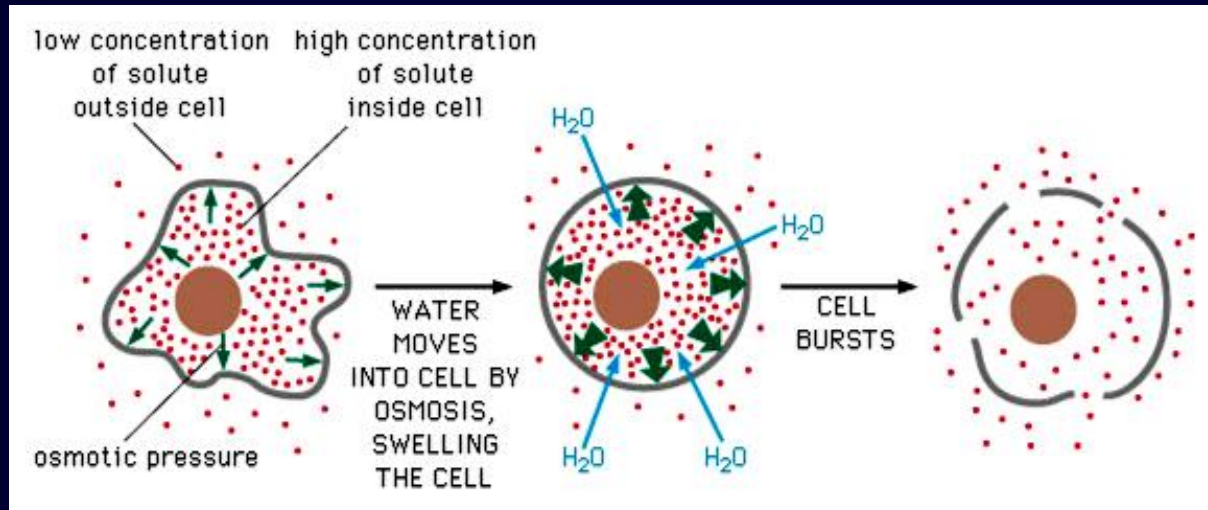
Izotonické prostředí

- prostředí o stejném osmotickém tlaku

Porovnání osmotických jevů u živočišné a rostlinné buňky:



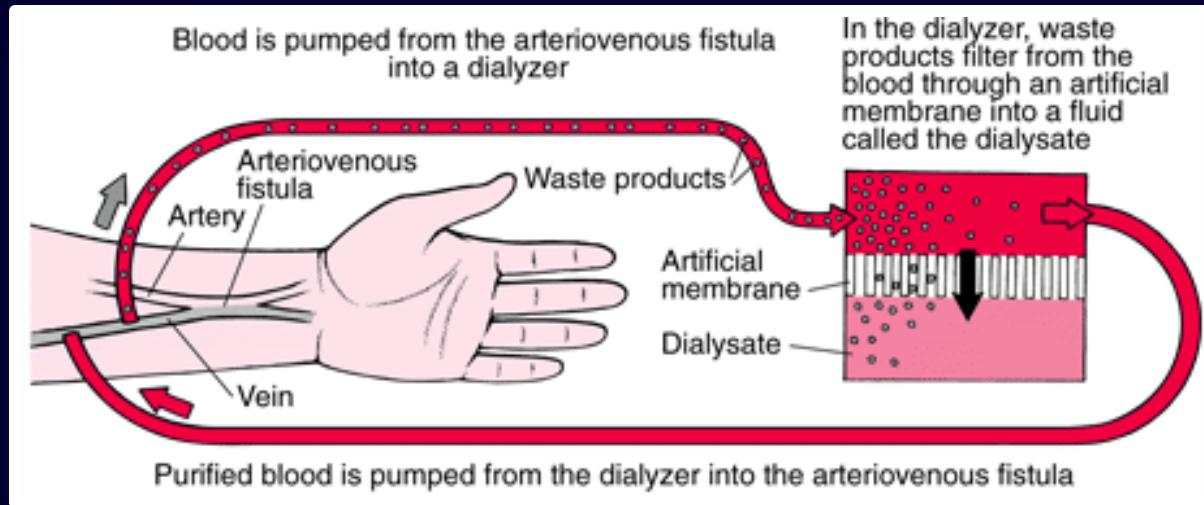
Reakce živočišné buňky na změny osmotického tlaku:



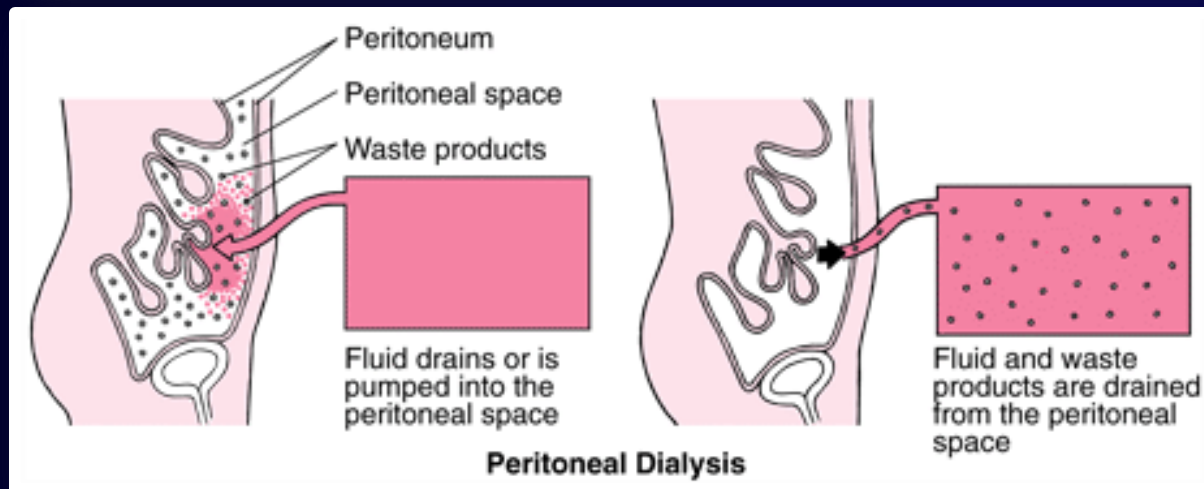
PRAKTICKÉ APLIKACE:
DIALÝZA U PACIENTŮ
S NEFUNKČNÍMI LEDVINAMI

Dialýza = parciální difúze

(přes membránu prochází voda a nízkomolekulární látky)



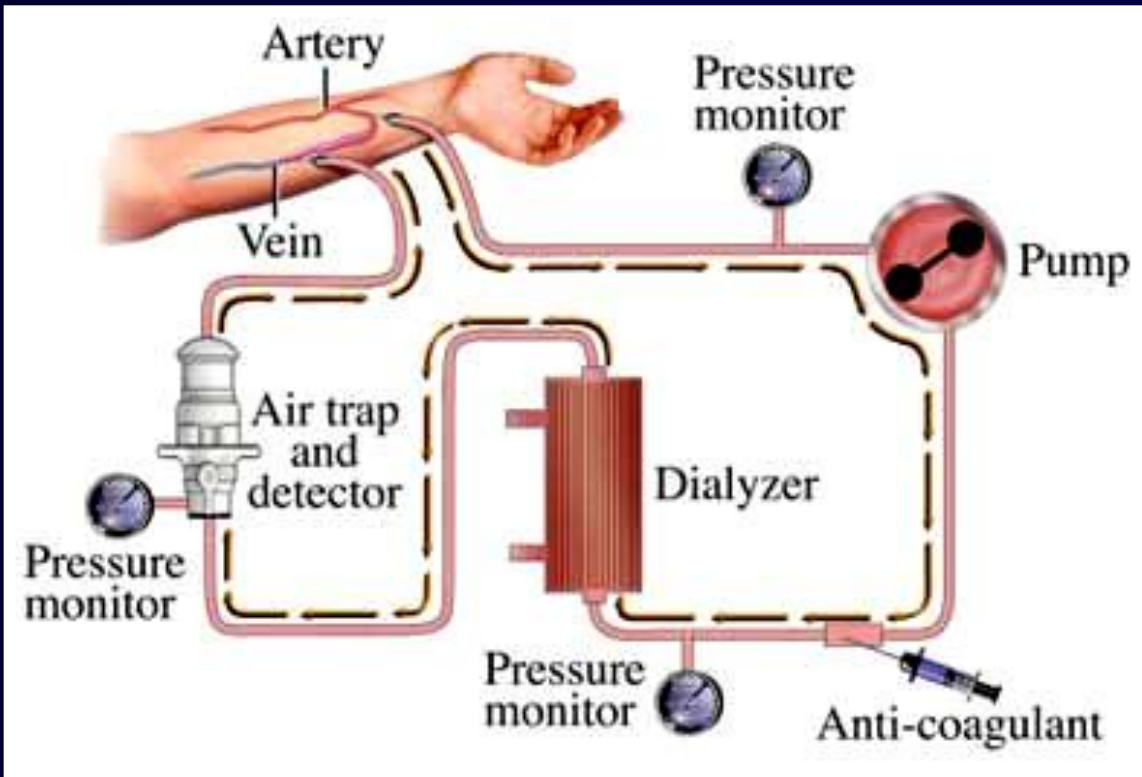
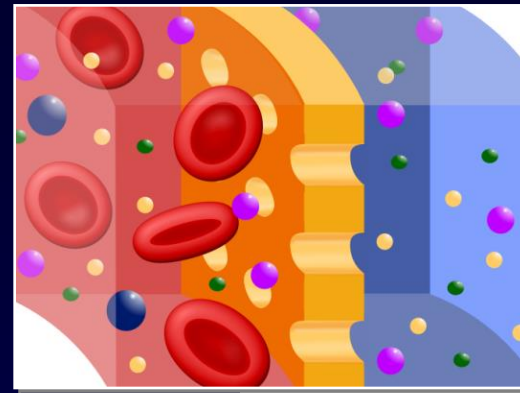
hemodialýza
(umělá ledvina)



peritoneální
dialýza

Princip hemodialýzy

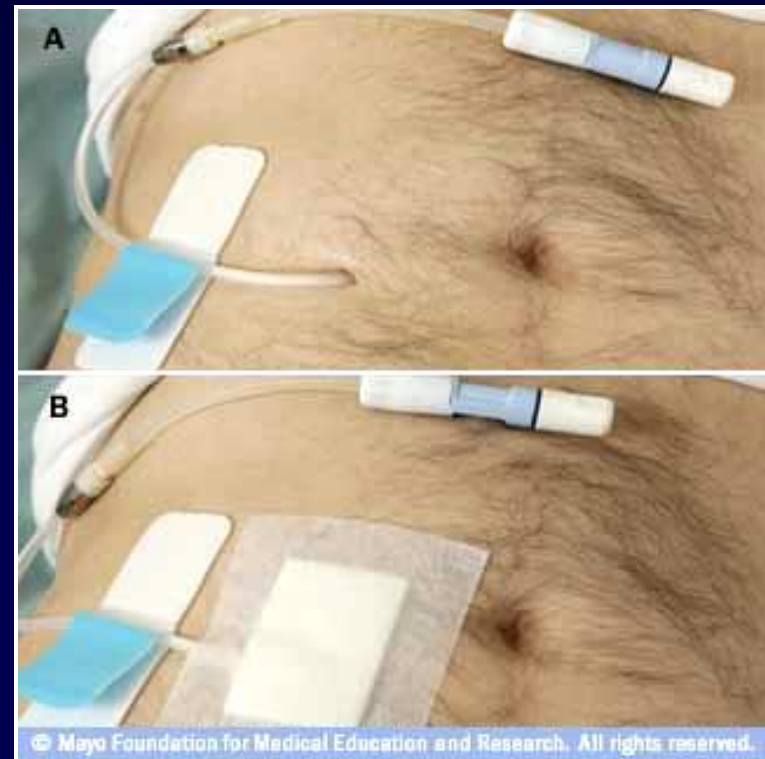
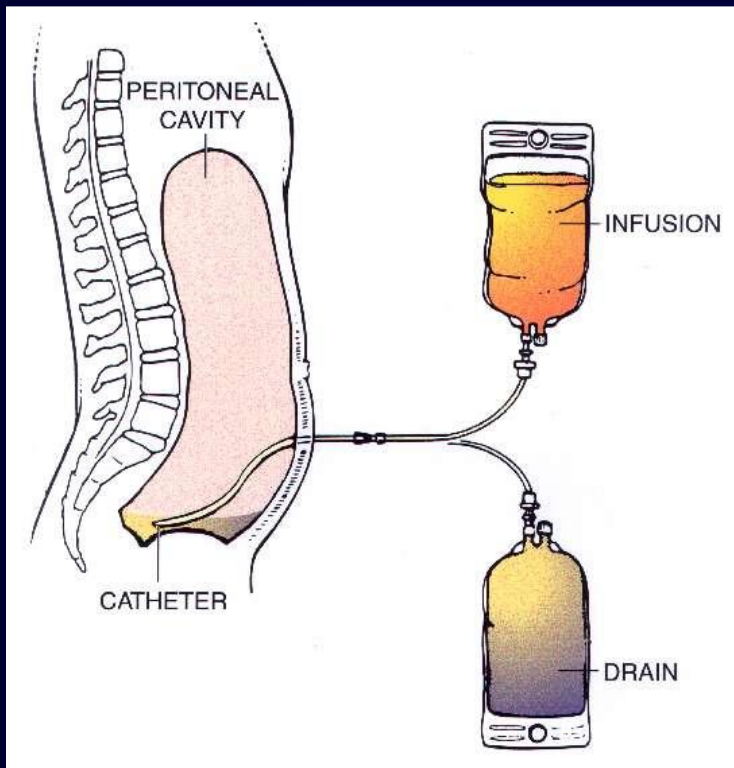
Dialyzační roztok:
voda, NaCl, KCl, CaCl₂,
MgCl₂, acetát sodný







Peritoneální dialýza



Princip peritoneální dialýzy

