

## **KBB/MTSB – Moderní techniky studia buňky**

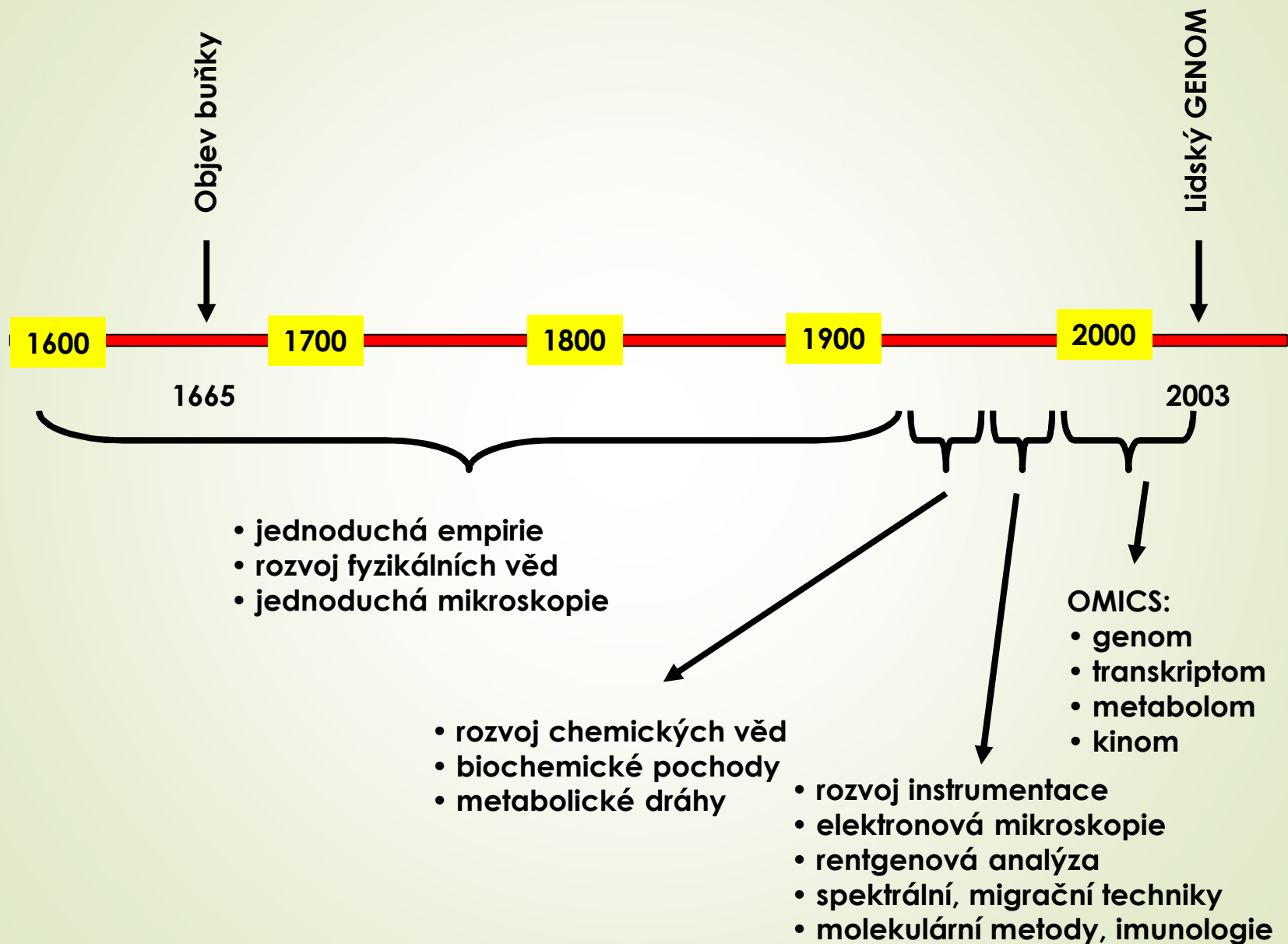
|                     |                                                                                                                                                                        |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>23. 9. 2020</b>  | Úvodní přednáška                                                                                                                                                       |
| <b>30. 9. 2020</b>  | Sondy a značky. Využití cDNA a RNA sond ke studiu buňky.<br>Techniky Northern blot, RNase protection assay, electrophoretic mobility shift assay, gene reporter assays |
| <b>7. 10. 2020</b>  | Metodologie buněčné a molekulární toxikologie. Buněčné kultury, mechanismy buněčného poškození, metody hodnocení buněčného poškození                                   |
| <b>14. 10. 2020</b> | Ovlivnění genové exprese, metody transfekce/transdukce, CRISPR/Cas system                                                                                              |
| <b>21. 10. 2020</b> | Studium genové exprese – RNA interference, metody qRT-PCR                                                                                                              |

# **MODERNÍ TECHNIKY STUDIA BUŇKY**

## **1. Úvod do problematiky. Historické aspekty a souvislosti.**

**Mgr. Aneta Vrzalová, PhD.  
Katedra buněčné biologie a genetiky  
Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci**

# MODERNÍ TECHNIKY STUDIA BUŇKY



# OBJEV BUŇKY – ROBERT HOOK

\*18.7.1635 Freshwater, Isle of Wight, Anglie  
+3.3.1703 Londýn, Anglie

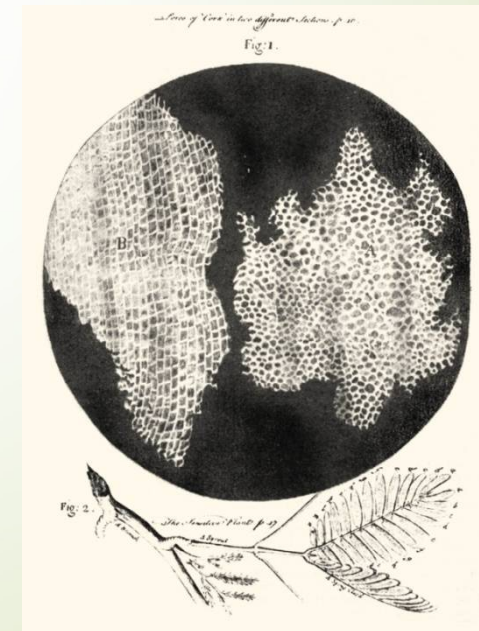
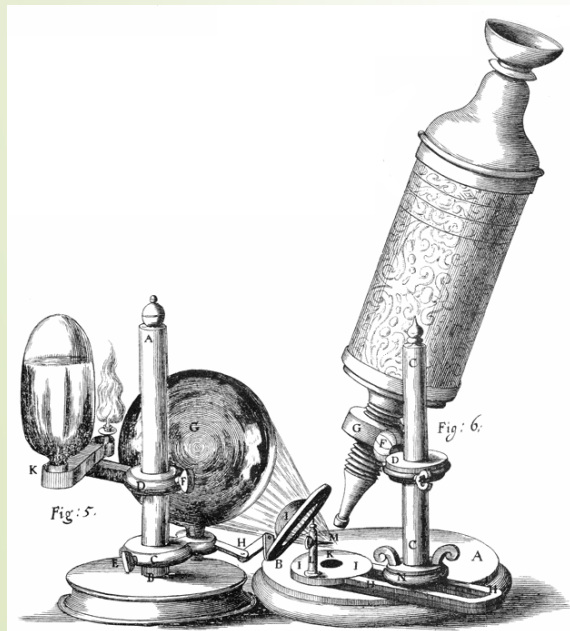
- anglický fyzik, malíř
- skutečný portrét Hooka není znám, Hook prý byl „hubený, shrbený, ošklivý muž“

## OBJEVY

- asistent Boylea – pomáhal mu s konstrukcí vzduchové pumpy (20 let)
- mechanismus kapesních hodinek (30 let)
- zkonstruoval mikroskop - jako první na světě pozoroval rostlinnou a živočišnou buňku a popsal ji
- zrcadlový dalekohled, optický telegraf a helioskop
- meteorologické přístroje, jako je srážkoměr, vlhkoměr a přístroj na měření síly větru
- Po požáru Londýna vypracoval stavební plány na obnovu města a jako první rozpoznal ve fosíliích zbytky organismů

# OBJEV BUŇKY – ROBERT HOOK

- Hook pozoroval mnoho předmětů pod mikroskopem, jež si sám vyrobil
- roku 1665 publikuje knihu *Micrografia* kde popisuje svá četná mikroskopická a dalekohledná pozorování
- zavádí pojem „buňka = cell“ – důvod pro pojmenování – rostlinná buňka připomínala svým tvarem cely mnichů
- poprvé pozoroval buňky v korku



# BUNĚČNÁ TEORIE

- 1838 objevili Schleiden a Schwann buněčné jádro rostlinných i živočišných buněk
- Vědecká teorie – základní kámen biologie
- Považují se za zakladatele buněčné teorie spolu s dalšími vědci



**Matthias Jacob Schleiden**

\*5.4.1804 Hamburg, Prusko  
+23.6.1881 Frankfurt n. M.

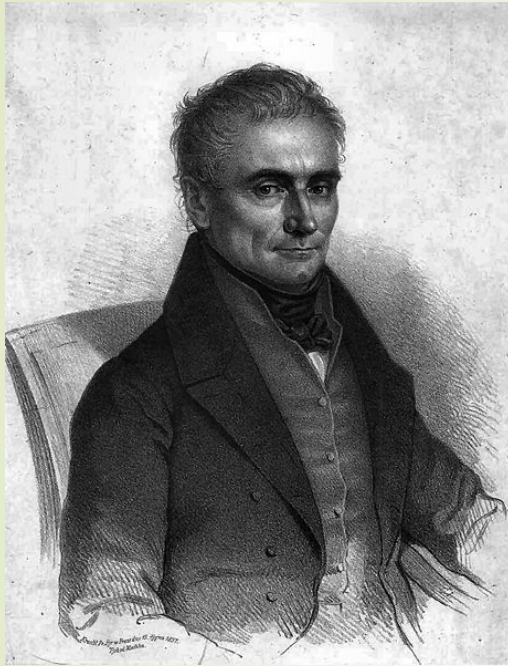


**Theodor Schwann**

\*17.12 1810 Neuss, Prusko  
+11.1.1882 Kolín n. R.



# BUNĚČNÁ TEORIE



**Jan E. Purkyně**

\*18.12.1787 Libochovice  
+28.7.1869 Praha

- Principiální analogie stavby těla živočichů a rostlin (1837)
- Termín *protoplasma*



**Rudolf L. K. Virchow**

\*13.10.1821 Schivelbein  
+5.9.1902 Berlin

- Omnis cellula e cellula (1858)



**Max Schultze**

\*25.3.1825 Freiburg  
+16.1.1874

Definice buňky (1861):  
„Mass of protoplasm which contain the nucleus..“

# BUNĚČNÁ TEORIE

- vědecká teorie – základní kámen biologie
- 1. Buňka je **základní strukturní a funkční jednotkou** živých soustav
- 2. Všechny **organismy** se skládají **z jedné nebo více buněk** nebo jsou na buňkách závislé (viry)
- 3. Buňky **vznikají** z jiných buněk **buněčným dělením**
- 4. Buňky nesou **genetický materiál** a při dělení jej předávají dceřiným buňkám
- 5. **Chemické složení** buněk je v zásadě stejné
- 6. Uvnitř buněk se odehrávají v zásadě **stejné procesy** (metabolické, energetické, biochemické..)



# OBJEV ORGANEL - JÁDRO

- **první objevená organela**
- poprvé jádro pravděpodobně pozoroval Rakušan **Franz Andreas Bauer** (1802
- podrobnější studie prováděl Skotský botanik **Robert Brown**
- jádro popsal v publikaci zaslané Linnean Society r. 1831 a publikované 1833
- objevil jej při mikroskopickém pozorování orchidejí - opakní oblast v buňce



**Robert Brown**

\*21.12.1773 Montrose, Skotsko

+10.6.1857 Londýn, Anglie

- Brown ovšem nepopsal funkci jádra
- roku 1838 navrhl **Matthias Jacob Schleiden**, že **jádro hraje roli při „generování buněk“** a nazval jej CYTOBLAST
- oponoval Franz Meyen - tvrdil, že popsal mnoho buněk vzniklých dělením, které nemají jádro
- definitivní verdikt postuloval Virchow (Omnis cellula e cellula)

# OBJEV ORGANEL - MITOCHONDRIE

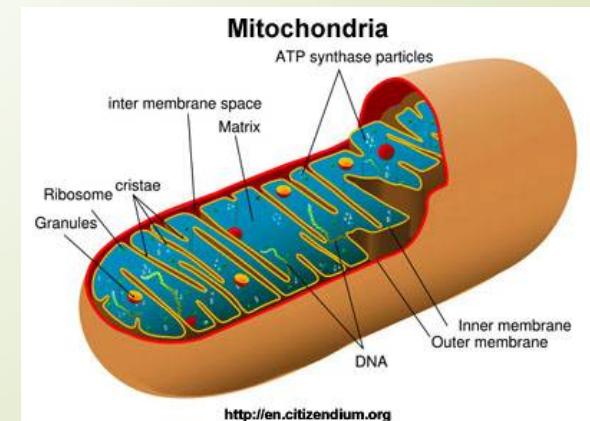
Richard Altmann (12.3.1852 – 8.12.1900)

- Pruský patolog a histolog
- Zavedl různé techniky barvení buněk – fuchsinem, anilinem atd.
- Zkoumal malé granule v buněčné protoplasmě a nazval tyto částice BIOBLASTY
- Následně postuloval, že se jedná o **elementární organismy, které mají autonomní metabolický a genetický aparát**
- Roku 1890 svá pozorování publikoval v Die Elementarorganismen a čelil za to silnému skepticismu ve vědecké komunitě!
- Výzkum mitochondrií probíhá velmi intenzivně dodnes

**Objev chemiosmotických dějů** – P. Mitchell; Nobelova cena za chemii 1978

**Objasnění funkce ATP-synthasy** - Paul D. Boyer a John E. Walker

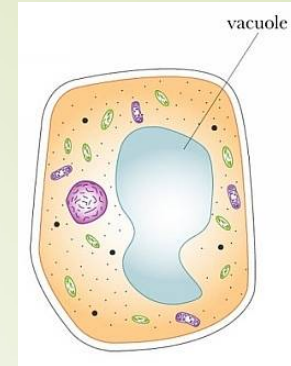
Nobelova cena za chemii 1997



# OBJEV ORGANEL

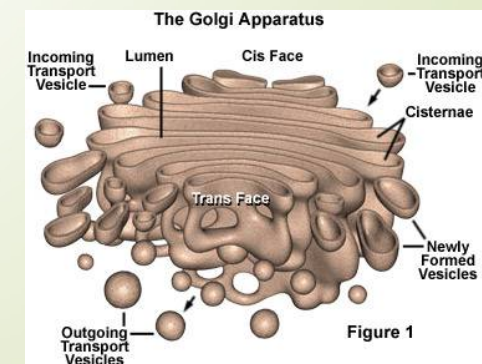
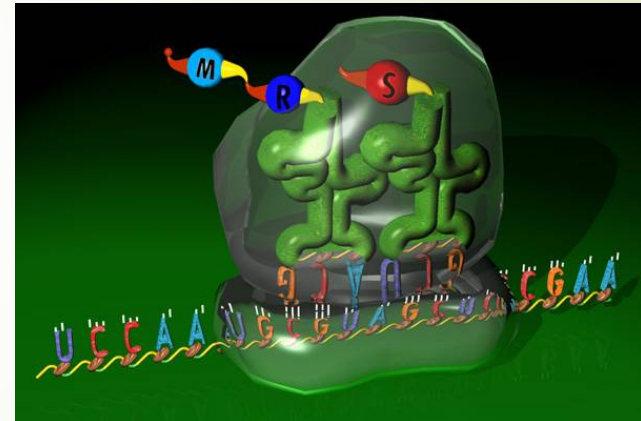
## VAKUOLY, RIBOSOMY

- George Emil Palade (19.11.1912 – 7.10.2008)
- Rumunský biolog, objevil ribosomy a vakuoly pomocí elektronové mikroskopie
- Nobelova cena za Fyziologii a medicínu 1974



## GOLGIHO APARÁT

- Camillo Golgi (7.7.1843 – 21.1.1926)
- Italský lékař a patolog
- Barvil tkáně a buňky stříbrem – popsal neuron
- Objev Golgiho aparátu r. 1898
- Nobelova cena za Fyziologii a Medicínu 1906

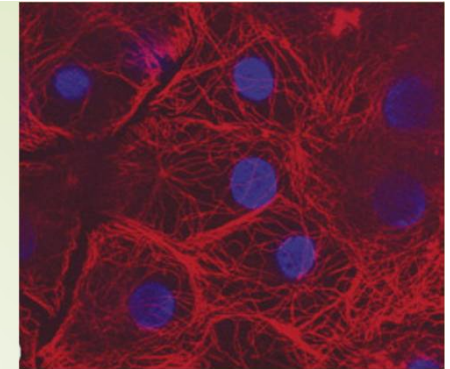


# STAVBA BUŇKY

## CYTOSKELET

Paul Wintrebert (1867 - 1966)

- Francouzský embryolog a teoretik vývojové biologie
- Zavedl pojem cytoskelet (*cytosquelette*) a koncept cytoskeletu buňky
- Výzkum funkce cytoskeletu je stále vysoce aktuální a mnohé otázky nejsou doposud vysvětleny



## BUNĚČNÁ MEMBRÁNA

- 1855 Naegeli a Cramer popisují membránu jako **nezbytnou bariéru k vysvětlení osmosy v rostlinných buňkách**
- 1871 Hugo de Vries popisuje **permeabilitu** membrány pro glycerol a amoniak
- 1888 Walter Nersts – teorie **elektrochemického potenciálu**
- 1925 Gorter a Grendel navrhují strukturu **lipidové dvojvrstvy**
- 1972 Singer a Nicholson navrhují **fluidně-mozaikový model membrány**, postulují explicitně integrální proteiny jako součásti membrány
- 1975 Elektronová mikroskopie membránových proteinů bakteriofága
- 1976 Patch-clamp technika studia membrány
- 1985 **Rentgenová struktura** membránových proteinů

# MIKROORGANISMY - BAKTERIE

**Antonie van Leeuwenhoek** (24.10.1632 – 30.8.1723)

- Holandský obchodník a vědec
- Považován za **otce mikrobiologie** a prvního mikrobiologa
- Pozoroval bakterie jednočočkovým vlastnoručně vyrobeným mikroskopem (1676) a nazval je „animalcules“



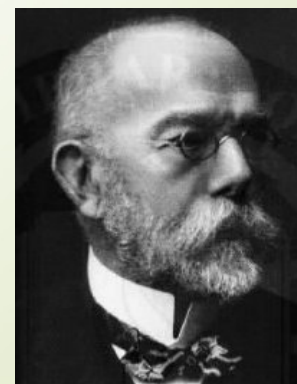
Výraz „bakterie“ zavedl německý zoolog a anatom **Christian Gottfried Ehrenberg** (1838)

**Louis Pasteur** prokázal, že proces **fermentace** je závislý na růstu bakterií (1859),  
protilátka proti vzteklině (1885)

**Eduard Buchner** (1907 NC) - ke kvašení není třeba živých mikroorganismů, ale stačí jejich enzymy

**Robert Koch** (11.12.1843 – 27.5.1910)

- objev původců cholery, sněti slezinné a tuberkulózy
- je autorem **Teorie o mikrobiálním původu chorob**
- Kochovy postuláty
- Nobelova cena (1905)







# NOBELOVA CENA



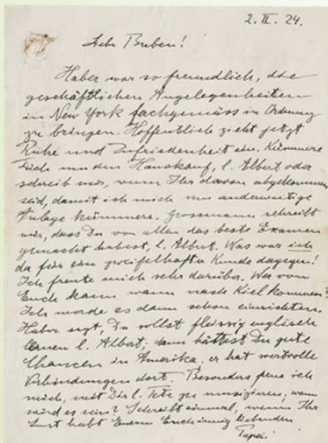
**Alfred Nobel** (1833–1896) – chemik, vynálezce dynamitu

Ve své závěti rozhodl, že jeho majetek bude vložen do fondu, z něhož bude každoročně udělována cena za významné vědecké objevy, literární tvorbu a zásluhy o mír ve světě

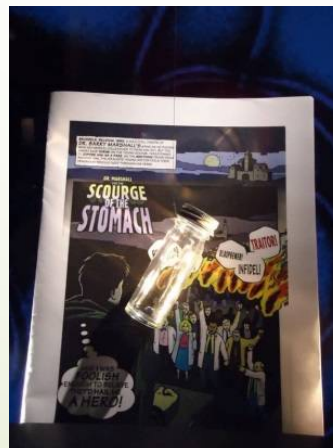
32 mil. SEK – cena udělována z úroků (10 mil. SEK)

Jména kandidátů na Nobelovu cenu jsou tajná ještě 50 let po nominaci

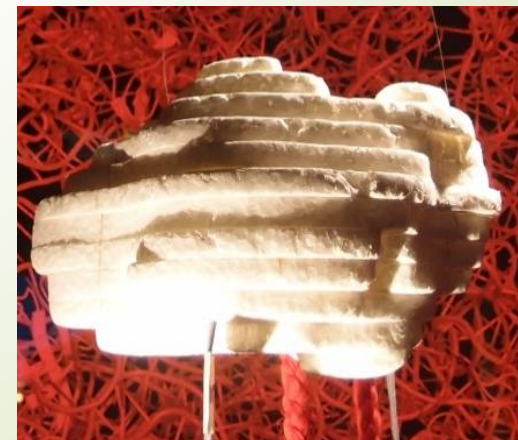
**Albert Einstein (1922)**



**Barry Marshall (2005)**



**Ada Yonath (2009)**





# **Vyhlášení Nobelovy ceny pro rok 2020**

fyziologie nebo medicína – pondělí 5. října

fyzika – úterý 6. října

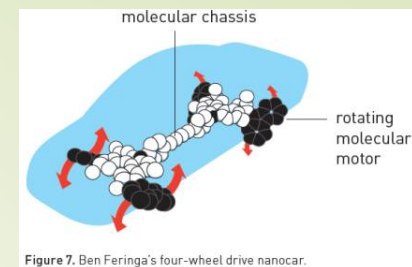
chemie - středa 7. října

literatura – čtvrtek 8. října

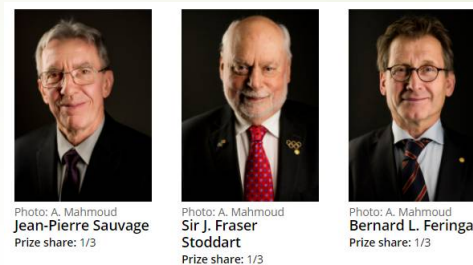
mír - pátek 9. října

ekonomické vědy - pondělí 12. října

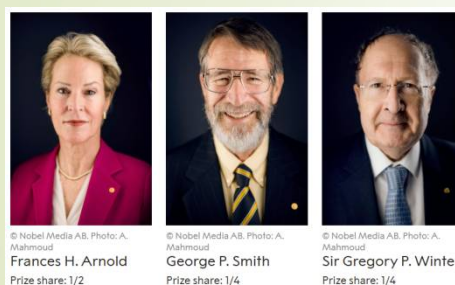
# NOBELOVA CENA ZA CHEMIJ



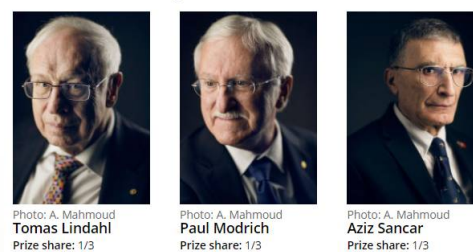
**2019**  
"for the development of  
lithium-ion batteries "



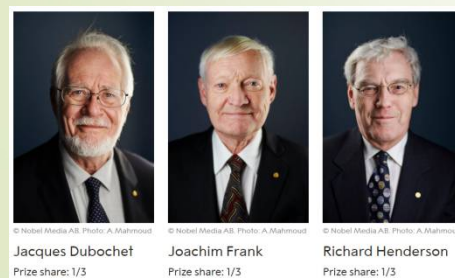
**2016**  
"for the design and  
synthesis of molecular  
machines".



**2018**  
"for the directed  
evolution of enzymes,,  
„ for the phage display of  
peptides and antibodies“



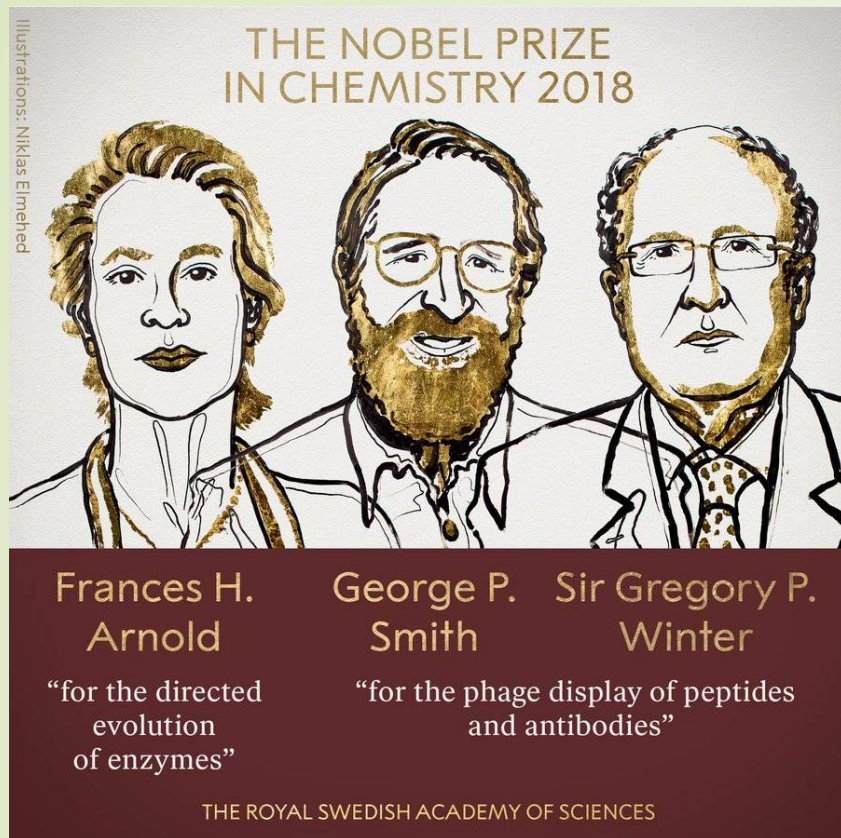
**2015**  
"for mechanistic  
studies of DNA repair"



**2017**  
"for developing  
cryo-electron microscopy  
for the high-resolution  
structure determination  
of biomolecules in  
solution "



**2014**  
"for the development of  
super-resolved  
fluorescence  
microscopy".



## Roku 1993 provedla první přímou řízenou evoluci enzymů

### PRINCIP

- Gen pro enzym je podroben mutaci a poté vložen do mikroorganismu s oslabenými reparačními mechanismy, testování, selekce

### VYUŽITÍ

- výroba chemikálií, které jsou mnohem méně škodlivé pro životní prostředí – to se týká především výroby léčiv
- výroba biopaliv pro ekologičtější dopravu
- Stabilita enzymu – vyřešena 3D struktura receptorů vázaných na G-proteiny (NC 2012)

Smith roku 1985 vyvinul elegantní metodu, které se dnes říká fágový displej. Spočívá v tom, že bakteriofág (tedy virus napadající bakterie) může být využitý pro vývoj nových proteinů. Cizorodý gen X vložen do části genu kódující obalový protein - výsledný fág tak na svém povrchu "vystavuje" protein X

Sir Winter – přímá evoluce protilátek – tvorba monoklonálních protilátek, humanizační protokol, vývoj nových léčiv

Adalimumab - První schválená plně humánní terapeutická protilátka odvozená pomocí fágového zobrazení (revmatoidní artritida, lupénka, zánětlivé onemocnění střev)



# NOBELOVA CENA ZA MEDICÍNU NEBO FYZIOLOGII



**2019**  
***"for their discoveries of how cells sense and adapt to oxygen availability".***



**2016**  
***"for his discoveries of mechanisms for autophagy".***



**2018**  
***"for their discovery of cancer therapy by inhibition of negative immune regulation".***



**2015**  
***"for her discoveries concerning a novel therapy against Malaria".***



**2017**  
***"for their discoveries of molecular mechanisms controlling the circadian rhythm".***



**2014**  
***"for their discoveries of cells that constitute a positioning system in the brain".***

# METABOLISMUS – BIOCHEMICKÉ POCHODY



Otto Heinrich Warburg  
1883 - 1970

Nobel Prize  
1931



Otto Meyerhof  
1884 - 1951

Nobel Prize  
1922

glykolýza



Hans Adolf Krebs  
1900-1981

Nobel Prize  
1953

Citrátový c.  
Močovinový c.



# NOBELOVA CENA

Jaroslav Heyrovský (1959)  
18x nominován



1890–1967

"for his discovery and development of the polarographic methods of analysis"



1901–1986

"for his poetry which endowed with freshness, sensuality and rich inventiveness provides a liberating image of the indomitable spirit and versatility of man"

## Čtyři osobnosti získaly dvě Nobelovy ceny:

Maria Curie-Skłodowska – za fyziku, 1903 a za chemii, 1911

Linus Pauling – za chemii, 1954 a za mír, 1962

John Bardeen – za fyziku, 1956, 1972

Frederick Sanger – za chemii, 1958 (struktura proteinů - inzulín),  
1980 (sekvence nukleových kyselin)

# ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

- průlomová metoda studia buňky
- vizualizace atomární struktury neživé hmoty
- jedinečná technologie pro virologii
- **Ernst August Friedrich Ruska (1906-1988) a Max Knoll zkonstruovali první prototyp elektronového mikroskopu v roce 1931**
- 1933 Ruska konstruuje první elektronový mikroskop s vyšším rozlišením než optický m.
- Siemens sponzoruje Ruska – 1937 – konstrukce elektronového mikroskopu
- Siemens (1939) – transmisní elektronový mikroskop (TEM)
- Ruska - Nobelova cena za fyziku 1986

## NEVÝHODY:

- 1) vzorek umístěný v komoře vyplněné vakuem → živá hmota ztrácí své původní vlastnosti (odpaření vody ve vzorku = destrukce biomolekul)
- 2) vzorek je snímán pomocí silného paprsku elektronů → poškození → výsledek neodpovídá reálné situaci

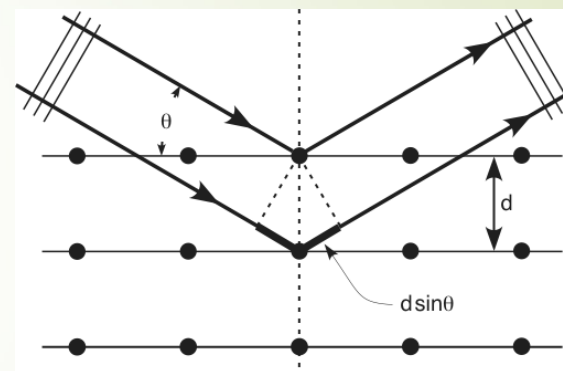
## Kryoelektronová mikroskopie – NB za chemii 2017

- popsání povrchové bílkovinné struktury viru Zika, která zapříčiňuje jeho rezistenci k antibiotikům
- identifikace povrchové struktury viru způsobujícího paralýzu včel

# RENTGENOSTRUKTURNÍ ANALÝZA PROTEINŮ

- X-ray crystallography
- **metoda, která určuje uspořádání atomů v krystalu – lze určit přesnou strukturu molekuly, což nelze žádnou jinou metodou!!!**
- pro strukturní analýzu velmi významná m. – nízkomolekulární látky i proteiny
- měří se difrakce roentgenova záření na krystalu (existuje i elektronová a neutronová difrakce)
- difrakce se řídí Braggovým zákonem (1912)

$$2d \sin \theta = n\lambda$$



|           |                                                                                                    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1915-1920 | analýza jednoduchých anorganických sloučenin ( $\text{CaF}_2$ , $\text{TiO}_2$ , $\text{CaCO}_3$ ) |
| 1920-1930 | organické molekuly – hexamethylbenzen, ferroceny atd.                                              |

**Bioorganické molekuly:** Dorothy Crowfoot Hodgkin (NC za chemii 1964)

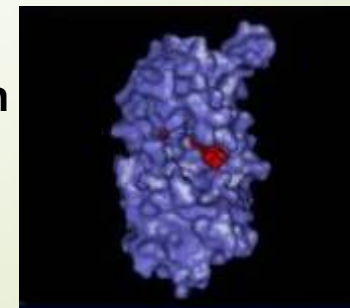
- cholesterol (1937), vitamin B12 (1945), penicilin (1954)
- navrhla i strukturu insulinu (1969)

# RENTGENOSTRUKTURNÍ ANALÝZA PROTEINŮ

- X-ray proteinová krystalografie se začala rozvíjet koncem 50 let
- mnohem složitější než analýza jednoduchých molekul
- **struktura vorvaního myoglobinu – Perutz a Kendrew – Nobelova cena za chemii 1962**
- rozřešeny struktury několika desítek tisíc proteinů a nukleových kyselin
- většinou proteiny vnitrobuněčné, výzvou zůstává spousta membránových proteinů (receptory, iontové kanály) – problémy solubilizace a rekonstituce
- **metoda využívána ve farmaceutickém průmyslu**
- interakce léčiva s buněčným cílem (enzym, receptor)
- obrovský potenciál při vývoji antagonistů a inhibitorů!!

## IMATINIB – Gleevec (Novartis) - blokátor

- identifikace aberantní kinasy bcr-abl v pathogenesi chronické myeloidní leukémie (CML)
- krystalizace tyrosinkinasy, charakterizace struktury a vazebného místa bcr-abl (X-ray)
- počítačově simulovaný fitting knihoven potenciálních léčiv



# SEKVENACE DNA A PROTEINŮ

1976-1977

Maxam a Gilbert vyvinuli metodu sekvenování DNA pomocí **chemické modifikace bazí** a následným štěpením na specifických bazích  
Metodu publikovali až po Sangerovi, ale v té době se stala více populární než Sangerova!!!

1975

Sangerova metoda – „chain termination“  
DNA s využitím **radioaktivních ddNTPs**

**Oba teamy dostaly v roce 1980 Nobelovu cenu**

Edmanovo odbourávání (1950)

- derivatizace fenylizothiokyanátem a štěpení (HCl – thiazolinon)
- Sangerovo činidlo (1-fluoro-2,4-dinitrobenzen) - inzulin
- Sekvence z N-konce; max. 50 aminokyselin
- dnes automatizace na matricích

Hmotnostní spektroskopie

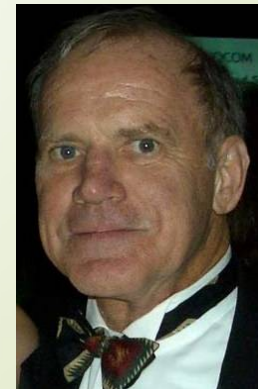
- příprava štěpů (peptidů - endoproteasou) – separace HPLC, analýza MS
- kombinace různých štěpení a fragmentů, sestavení překrývajících se sekvencí
- **John Bennett Fenn – Nobelova cena za chemii 2002**





# POLYMERASE CHAIN REACTION - PCR

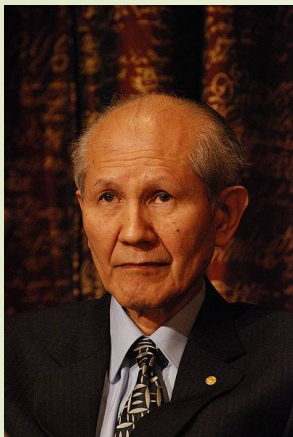
- technika umožňující **amplifikaci několika málo kopií DNA o několik řádů**
  - výsledkem je několik milionů kopií určité sekvence DNA
  - principem metody je „thermal cycling“ – cyklicky se opakuje „DNA melting“ a enzymová syntéza DNA (**denaturation-annealing-elongation**)
  - využívají se termostabilní polymerasy (DNA-dependentní-DNA-polymerasa)
  - **kvantifikace** amplifikované DNA po separaci v agarosovém gelu
  - kvantifikace v reálném čase – fluorescenční sondy – RT = real time PCR
  - PCR má široké využití – výzkum, mol. biologie, medicína, kriminalistika.....
  - analýza DNA
  - analýza genové exprese – hladiny mRNA – přepis RNA do cDNA pomocí reversní transkriptasy (RNA-dependentní-DNA-polymerasa) – odtud RT = reverse transcription
  - PCR v nejrůznějších modifikacích – nested, assymetric, multiplex atd....
- 
- **PCR vyvinul v roce 1984 Dr. Kary Mullis**
  - obdržel Nobelovu cenu za chemii 1993



# GFP-FÚZNÍ PROTEINY - HYBRIDY

Nobelova cena za chemii 2008

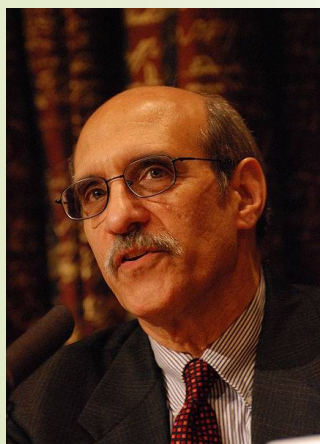
"for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP"



Osamu Shimomura

1962 - izoloval GFP protein z medúzy *Aequorea victoria*, ve které se společně s proteinem aequorinem podílejí na chemiluminiscenci

**aequorin interaguje s  $\text{Ca}^{2+}$  ionty a vyzáří se modré světlo, a jeho energie se přenesse na GFP a ten svítí zeleně**



Martin Chalfie

Studoval vývoj neuronů v hádčátku  
1992 vnesl gen pro GFP do bakterie *E. coli*,  
Následně protein exprimován v hádčátku, octomilce, kvasinkách, savčích buňkách a jiných organismech



Roger Tsien

3D struktura GFP objasnil princip fluorescence GFP a zabýval se mutantními variantami

**Hodně štěstí při studiu buňky  
moderními technikami!!!**

**Děkuji za pozornost**