

APOPTOSA

Programovaná buněčná smrt neboli apoptosa je vysoce regulovaný a geneticky kódovaný proces sebeustrukturace buňky. Apoptosou jsou odstraňovány buňky nadbytečné, nesprávně fungující, nevhodně lokalizované, pro organismus nebezpečné, závažně postižené či infikované virem apod. Dochází s její pomocí k udržení rovnováhy mezi produkcí nových buněk a odstraňováním starých. Dále se apoptóza uplatňuje např. při tvarování prstů či tělních dutin plodu v období embryonálního vývoje, při odstraňování nepotřebných struktur (ocas pulce žáby), při cyklických změnách endometria během reprodukčního cyklu ženy nebo při eliminaci nadbytečných aktivovaných T a B-lymfocytů atd. Apoptosa může být vyvolána i některými negativními vlivy prostředí: ionizujícím zářením, toxickými chemikáliemi, tepelným šokem, hypoxií apod. Při poruchách apoptosy může dojít k její patologické aktivaci, vznikají tak některá závažná neurodegenerativní onemocnění jako např.: Parkinsonova či Alzheimerova nemoc, dále také AIDS, myelodysplastické syndromy či infarkt myokardu. V opačném případě, při patologické inhibici apoptosy, vznikají nádorová onemocnění, některé imunitní či autoimunitní choroby (alergie) apod. Určité viry a bakterie (herpes viry, poxviry) tuto inhibici mohou také vyvolat. Význam programované buněčné smrti v řadě onemocnění vede v současné době k vývoji nových léčiv, jejichž cílem jsou právě molekulární dráhy apoptosy.

METODY DETEKCE APOPTOSY

Světelná a elektronová mikroskopie

Pomocí této metody lze sledovat některé morfologické znaky apoptosy např. kondenzaci chromatinu, puchýřkovatění membrány, tvorbu apoptotických tělísek atd.

Translokace fosfatidylserinu

Annexin-V je protein o velikosti 35-36 kDa vykazující vysokou afinitu k fosfatidylserinu, který je během apoptózy translokován z vnitřní strany plazmatické membrány na vnější. Běžně se vyskytuje na povrchu fagocytujících buněk, které s jeho pomocí rozpoznávají apoptotické buňky a likvidují je. Problém nastává u nekrotických buněk s porušenou integritou plazmatické membrány, kde annexin-V vstupuje do nitra buňky a váže se na fosfatidylserin z vnitřní strany. Pro jejich odlišení se využívá dvojitého barvení např. s využitím červeného fluorescenčního barviva propidium jodidu (PI), který se přes narušenou membránu nekrotických a zároveň i pozdně apoptotických buněk dostává do jádra, kde barví DNA. Ve výsledku pak můžeme odlišit 3 populace buněk: živé (annexin-V-negativní, PI-negativní), raně apoptotické (annexin-V-pozitivní, PI-negativní) a pozdně apoptotické a nekrotické (annexinV-pozitivní, PI-pozitivní). Vyhodnocování je prováděno průtokovou cytometrií či pomocí fluorescenční mikroskopie (Vermes et al., 1995).

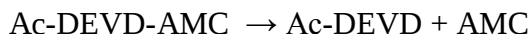
Permeabilizace membrány

Některá barviva např. zelené fluorescenční barvivo Yo-pro se dostává do buňky pouze přes mírně permeabilizovanou plazmatickou membránu apoptotických či porušenou membránu nekrotických buněk, kde se váže na jadernou DNA. Živé buňky zůstávají Yo-pro negativní. Pro odlišení nekrotických buněk od apoptotických se využívá např. propidium jodid (Idziorek et al., 1995).

Aktivace caspasy 3

Caspasy (Cysteine-rich Aspartate protease) jsou hlavními výkonnými jednotkami apoptosy, jejichž cílem je proteolytické štěpení celé řady proteinových substrátů. Společným znakem těchto proteinů je specifická sekvence třech až čtyřech aminokyselin následovaná aspartátem, za níž dochází ke štěpení. Caspasa 3 (CPP32, apopain) je členem podrodiny caspas CED-3 a patří mezi jednu z hlavních výkonných (efektorových) caspas. Caspasa 3 patří mezi nejlépe prostudované a charakterizované savčí caspasy. Specificky štěpí velký počet proteinů, mezi něž patří například jaderný enzym poly(ADP-ribose)polymerasa (PARP), inhibitor caspasou-aktivované deoxyribonukleasy (ICAD), či další významné regulátory apoptózy gelsolin a fodrin. Caspasy se v buňkách nachází v neaktivním stavu ve formě procaspas, které jsou při aktivaci proteolyticky štěpeny. Aktivaci caspasy 3 je možné sledovat různými nezávislými metodami jako je např. fluorimetrické stanovení její aktivity, průtoková cytometrie či fluorescenční mikroskopie.

Fluorimetrické měření aktivity caspasy 3 je založeno na hydrolýze peptidového substrátu značeného 7-amido-4-methylkumarinem. Produktem hydrolýzy je 7-amino-4-methylkumarin (AMC), jehož emisní fluorescenční spektrum se výrazně liší od peptidového konjugátu a umožňuje tak kvantifikovat průběh reakce.



Excitační a emisní spektra 7-amino-4-methylkumarinu mají maxima při 360 nm a 460 nm. Fluorimetrické měření aktivity caspasy 3 je rychlou a citlivou metodou pro stanovení aktivity tohoto enzymu v extraktech tkání nebo buněk, které jsou vystaveny působení podnětu vyvolávajícího apoptózu. Měření aktivity se s výhodou provádí v mikrotitrační destičce pomocí vhodného fluorimetru. Pokud jako výstup nestačí relativní srovnání aktivity caspasy 3 ve vzorku s negativní kontrolou, lze přesně kvantifikovat aktivitu enzymu a rychlost reakce. Koncentrace AMC uvolněného hydrolýzou Ac-DEVD-AMC může být vypočítána na základě kalibrační křivky zkonstruované ze závislosti intenzity fluorescence na koncentraci standardního roztoku AMC.

Průtoková cytometrie a fluorescenční mikroskopie využívá vizualizace aktivního fragmentu caspasy 3 pomocí primární protilátky a sekundární protilátky konjugované s fluorochromem.

Fragmentace DNA

Fragmentace DNA je jedním z hlavních ukazatelů apoptózy. DNA je štěpena na větší části o velikostech 50 - 300 kbp, které jsou dále štěpeny na menší okolo 200 bp. Fragmenty pak mohou být z buněk extrahovány a detekovány pomocí horizontální gelové elektroforézy následované barvením ethidium bromidem (Wyllie, 1980).

Štěpení substrátů caspas

PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) je jedním z nejvýznamnějších substrátů caspas o velikosti 116 kDa, který je během apoptózy štěpen na fragmenty o velikostech 89 a 25 kDa. K jejich detekci se využívá immunoblotting, průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie atd. (Shah et al., 1995).

Změny mitochondriálního membránového potenciálu

Pro sledování změn mitochondriálního membránového potenciálu se využívá např. fluorescenční barvivo TMRE (tetramethylrhodamin ethyl ester). Tato oranžovo-červená fluorescenční molekula se akumuluje v mitochondriích živých buněk a v případě ztráty membránového potenciálu mitochondrií dochází k poklesu intenzity fluorescence. K detekci lze použít fluorescenční mikroskop nebo průtokový cytometr (O'Reilly et al., 2004).

Literatura:

- Gurtu, V., Kain, S.R., Zhang, G.H.: Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Analytical Biochemistry* 251, 98-102, 1997.
- Idziorek, T., Estaquier, J., de Bels, F., Ameisen, J.C.: YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *Journal of Immunological Methods* 185, 249-258, 1995.
- O'Reilly, C.M., Fogarty, K.E., Drummond, R.M., Tuft, R.A., Walsh, J.V. Jr.: Spontaneous mitochondrial depolarizations are independent of SR Ca²⁺ release. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 286, 1139-51, 2004.
- Shah, G.M., Kaufmann, S.H., Poirier, G.G.: Detection of poly(ADP-ribose) polymerase and its apoptosis-specific fragment by a nonisotopic activity-western blot technique. *Analytical Biochemistry* 232, 251-254, 1995.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffensnacken, H., Reutelingsperger, C.: A novel assay for apoptosis - flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin-V. *Journal of Immunological Methods* 184, 39-51, 1995.
- Wyllie, A.H.: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556, 1980.
- Zuliani, T., Duval, R., Jayat, C., Schnebert, S., Andre, P., Dumas, M., Ratinaud, M.H.: Sensitive and reliable JC-1 and TOTO-3 double staining to assess mitochondrial transmembrane potential and plasma membrane integrity: Interest for cell death investigations. *Cytometry Part A* 54, 100-108, 2003.

FLUORIMETRICKÉ STANOVENÍ AKTIVITY CASPASY 3

Vybavení a pomůcky

10 ml zkumavky, mikrozkušavky, skleněné zkumavky, stojánky na zkumavky a mikrozkušavky, nádoba s ledem, mikrotitrační destička, sada pipet a špiček, centrifuga, sonikátor, fluorimetr

Chemikálie a roztoky:

- Lyzační pufr: 10 mM KCl, 5 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,2 % CHAPS, pH 7,4, těsně před použitím přidat: 2 mM DTT, leupeptin 0,5 µg/ml, aprotinin 2 µg/ml a 1 mM PMSF
- PBS (fosfátový pufr)
- Reakční pufr: 25 mM PIPES/KOH, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, pH 7,4
Těsně před použitím přidat: 5 mM DTT a 100 µM Ac-DEVD-AMC
- Roztok inhibitoru caspas: 1 mM roztok Ac-DEVD-CHO v DMSO, uchovávat při -20 °C.

Vlastní postup:

Sklízení buněk

1. Sklid' suspenzní buňky (10^6) centrifugací (2400 rpm, 5 min, 4 °C).
2. Promyj buňky **2x 1 ml PBS** (suchý pelet je možné uchovat zamražený v – 80 °C).

Lyzování buněk a měření koncentrace proteinů

3. Resuspenduj pelet ve vychlazeném lyzačním pufru (cca. 50 μ l na 10^6 buněk).
4. Inkubuj 20 min na ledu, občas propipetuj.
5. Ultrazvukuj v sonikátoru (3x 10 sekund), chladit!
6. Centrifuguj 20 min, 14 000 g, 4 °C.
7. Supernatant převed' do čistých mikrozkušavek.
8. Metodou podle Bradfordové změř koncentraci proteinů v lyzátu (1 μ l vzorku napipetuj do 1 ml Bradfordova činidla ve skleněné zkumavce. Pro každý vzorek vytvoř duplikát. Inkubuj 10 min a poté změř na spektrofotometru ve vhodném programu. Koncentrace v duplikátech zprůměruj.)
9. Lyzáty nařed' lyzačním pufrům na stejnou koncentraci proteinů (obvykle 3 – 5 μ g/ μ l).

Měření aktivity caspasy 3 a 7

10. Do mikrotitrační destičky pipetuj buněčný lyzát, reakční pufr (případně lyzační pufr) a inhibitor podle schématu:

- pozadí – 5 µl lyzačního pufru + 100 µl reakčního pufru,
- vzorky – 5 µl lyzátu + 100 µl reakčního pufru
- vzorky + inhibitor – 5 µl lyzátu + 0,5 µl inhibitoru + 100 µl reakčního pufru

[illegible]

11. Destičku inkubuj 1 h při laboratorní teplotě ve tmě.
12. Po inkubaci změř fluorescenci na přístroji Fluoroskan Ascent při 346/442 (excitace/emise).

Výpočet aktivity v programu Excel

13. Od naměřených hodnot odečti průměrnou hodnotu pozadí.
14. Vypočítej relativní nárůst aktivity caspasy 3/7 v buňkách ovlivněných inhibitory proliferace oproti kontrolním buňkám.

Příklad:

	pozadí	olomoucín II [µM]					
		0	1,25	2,5	5	10	20
naměřené hodnoty	405,6	634,1	601,6	636,1	714,1	1368	2288
	406,8	624,9	607,1	622,9	713,5	1335	2252
průměr pozadí	406,19						
hodnoty - průměr pozadí		227,9	195,4	229,9	307,9	961,3	1881,4
		218,7	200,9	216,7	307,3	929,0	1846,3
průměr kontroly		223,29					
hodnoty / průměr kontroly		1,02	0,87	1,03	1,38	4,31	8,43
		0,98	0,90	0,97	1,38	4,16	8,27
průměr výsledných hodnot		1,00	0,89	1,00	1,38	4,23	8,35
směrodatná odchylka		0,03	0,02	0,04	0,00	0,10	0,11

