

Obdobná genetická porucha existuje i u myši a nazývá se Tabby syndrom (tabby je orientální tkanina charakteristická měnlivým efektem v dopadajícím světle; syndrom byl po ní pojmenován kvůli podobnosti srsti nemocných myši s touto tkaninou). Stejně jako u člověka i u myši jsou postiženy zuby a srst. Myši s Tabby syndromem dobře slouží jako model pro studium nejen samotné hypohidrotické ektodermální dysplazie, ale i pro studium zubního vývoje.

Cílem mého pozorování bylo porovnat vývoj zubů u postižených myši a u kontrolních myši bez Tabby syndromu a sledovat distribuci apoptózy v zubním epitelu. Zuby se v tomto případě jeví jako ideální model — můžeme na nich pozorovat velikost, tvar, změny v počtu a uspořádání. Tyto změny je možné sledovat na histologických řezech zubního epitelu buď po prořezání zubů, nebo, což má mnohem větší přínos, v jednotlivých stádiích zubního vývoje. Tak můžeme posoudit samotný zubní vývoj a pozorovat i buňky postižené apoptózou. Metoda patří sice k časově náročným, ale trpělivost se vyplácí. Důležitá je také přesnost práce

od začátku až do konce, případné chyby se totiž nedají vždy opravit.

Nejprve odebereme hlavičky myších embryí v různých stádiích vývoje (viz obr.), které následně zalijeme do parafínu, aby bylo možné zhotovit několik mikronů tenké řezy, které jsou po ukrojení na mikrotomu přeneseny na podložní sklíčko a napínány na vodní hladině. Řezy jsou téměř průhledné, a proto je obarvíme, aby se zvýraznily jednotlivé buněčné struktury. Pro obarvení řezů lze použít kombinaci barviv hematoxylin a eozin. Hematoxylin je přírodním extraktem z kampaškového dřeva (*Haematoxylon campechianum*), patří mezi bazická (jádrová) barviva. Eozin je syntetické kyselé barvivo ze skupiny xantinových derivátů, které barví cytoplazmu. Výsledkem barvení jsou modrá jádra a bazofilní substance (obarvené hematoxylinem), ostatní části preparátu v různých odstínech červené až fialové (obarvené eozinem).

Tím však práce zdaleka nekončí. Jednotlivé řezy jsou nyní viditelné v mikroskopu. Abychom získali představu o zubním základu jako celku, musíme z každého histologického

řezu zhotovit nákrasy obrysů zubního epitelu a pomocí počítače z nich sestavit trojrozměrnou podobu zubního základu (viz obr.). Získáme tak plastický obraz zubního epitelu, z pohledu jakoby od kořene zubů. Stejným způsobem můžeme získat prostorové rozložení buněk postižených apoptózou, pokud je do nákrasu zaznamenáme (viz obr.).

Srovnáním trojrozměrných rekonstrukcí zubního epitelu bylo zjištěno, že vývoj zubů u myši s Tabby syndromem se liší od zdravých kontrolních jedinců. Zubní základy jsou rozdílné ve velikosti i tvaru. Rovněž i distribuce apoptózy je odlišná. Právě apoptóza zde hraje velmi důležitou roli a souvisí s chybným vývojem zubního epitelu a s jeho změněnou strukturou. Tyto výsledky podporují teorii, že ektodysplazie do jisté míry ovlivňuje apoptózu a interakci ektoderm – mezenchym.

Autorka je studentkou gymnázia Na Vítězné pláni v Praze; v Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR, v. v. i. se zapojila do přípravy počítačové 3D rekonstrukce zubního epitelu myších embryí.

Počítačové modelování struktury a interakcí bílkovin



Tereza Zavřelová, Lucie Koláčná

Práce vznikla v rámci projektu Otevřená věda

Počítačové modelování intracelulárních (nitrobuněčných) a extracelulárních (mezi buněčných) bílkovin má mezioborové využití a napomáhá urychlení vývoje v mnoha oblastech. Nachází široké uplatnění v základním i aplikovaném výzkumu. Podílí se např. na objasňování biochemických a biofyzikálních pochodů v organismu, ale i na vývoji umělých tkání. Využívá se zejména tehdy, kdy strukturu bílkoviny nelze určit experimentálními metodami. Bez počítačového modelování se již neobejde žádné moderní přírodovědné pracoviště.

Bílkoviny a počítačové modelování

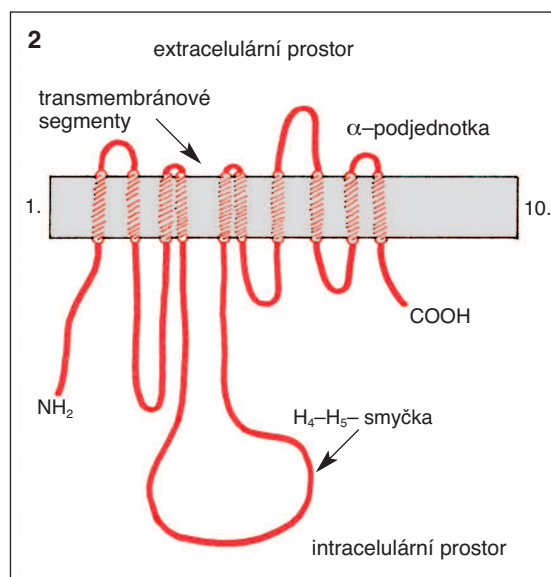
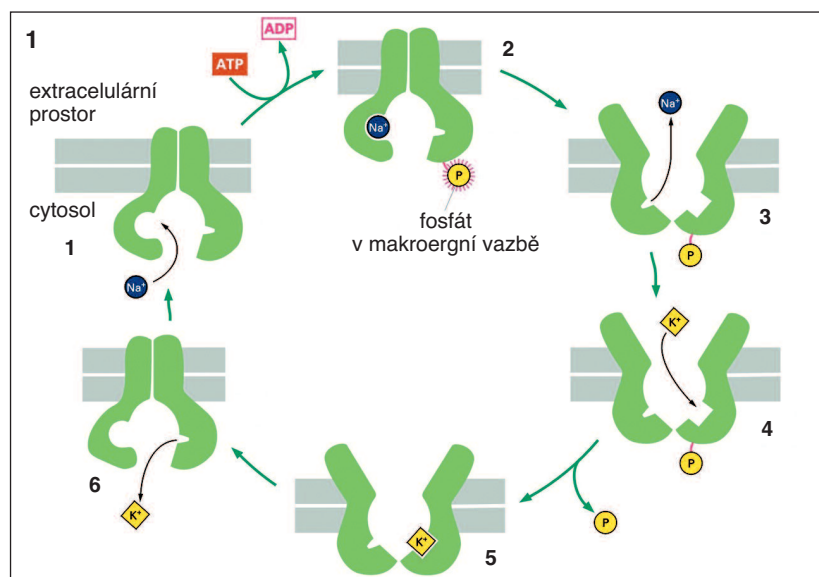
Bílkoviny — proteiny bývají někdy označovány jako základní stavební jednotky živé hmoty. Zatím nebyla na Zemi zjištěna žádná forma života, která by se bez nich obešla.

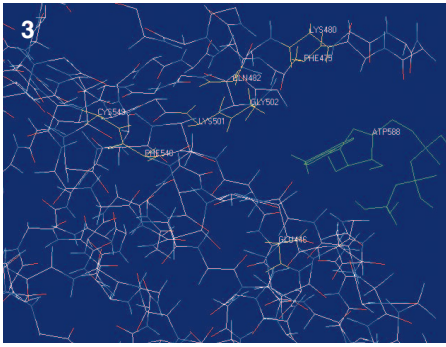
Základními stavebními jednotkami bílkovin je 22 aminokyselin, jejichž posloupnost je pro každý protein charakteristická a nazývá se primární struktura. Sekundární strukturou rozumíme geometrické uspořádání polypeptidového řetězce. Terciární struk-

turou nazýváme trojrozměrné uspořádání proteinu, pokud je tvořen více řetězci; jeho celkovou strukturu označujeme jako kvaternární.

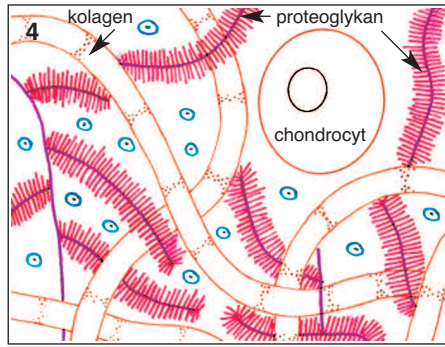
Počítačové modelování intracelulárních a extracelulárních bílkovin je jednou z nepostradatelných metod moderní strukturní

Obr. 1 Čerpací cyklus enzymu Na,K-ATPázy zajišťující přenos iontů přes plazmatickou membránu. Na⁺ se váže na pumpu v místech uvnitř buňky (fáze 1). Dojde k rozštěpení ATP, uvolnění ADP a přenosu fosforylované skupiny (fáze 2). Fosforylace vyvolá změnu konformace pumpy a uvolnění Na⁺ na vnějším povrchu buňky a současně vystaví vazebné místo pro K⁺ (fáze 3). Navázáním mimobuněčného K⁺ se uvolní fosforylová skupina (defosforylace) (fáze 4 a 5), což způsobí návrat pumpy do její původní konformace a uvolnění K⁺ do vnitřku buňky (fáze 6). Podle Albertse a kol.: Základy buněčné biologie (2000), upraveno ♦ Obr. 2 Schematické znázornění α-podjednotky Na,K-ATPázy s 10 transmembránovými segmenty. Na nitrobuněčně orientované H₄-H₅ smyčce mezi 4. a 5. transmembránovým segmentem se nachází vazebné místo pro ATP. Kreslil S. Holeček podle obr. z archivu autorek. Blíže v textu

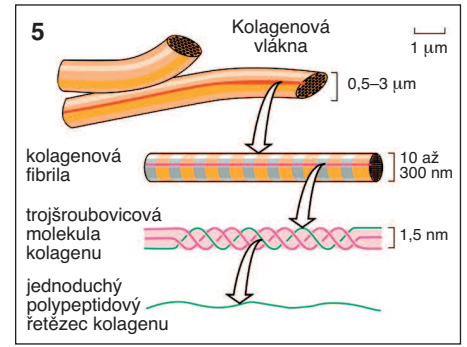




Obr. 3 Molekula ATP ve vazebné kapse H_4-H_5 -smyčky Na,K-ATPázy vizualizovaná pomocí programu Swiss-PdbViewer. Na obr. je žlutě vyznačeno 8 aminokyselin podléjících se na vazbě ATP; molekula ATP je znázorněna zelenou barvou. Z archivu T. Zavřelové



Obr. 4 Stavba mezibuněčné hmoty chrupavky, která je produkována chondrocyty. K jejím základním složkám patří kolagen, jehož vlákna dodávají chrupavce tvar a pevnost. Proteoglykanové makromolekuly zvyšují odolnost chrupavky při stlačení a zajišťují pružnost celé tkáně. Upravil S. Holeček podle obr. z archivu autorek



Obr. 5 Struktura kolagenu. Charakteristickým znakem kolagenové molekuly je její dlouhá tuhá trojřoubovicová struktura, ve které jsou tři kolagenové polypeptidové řetězce vzájemně kolem sebe obtočeny a vytvářejí tzv. superhelix podobný lanu. Tyto molekuly pak vytvářejí kolagenové fibrily — uspořádané polymery s průměrem 10–300 nm, dlouhé mnoho mikrometrů. Ty se dále skládají v ještě mnohem silnější kolagenová vlákna. Podle Albertse a kol.: *Základy buněčné biologie* (2000), upraveno

biologie. V současnosti se velmi intenzivně pracuje na vývoji počítačových programů, které by dokázaly proteiny nejen zobrazovat a modelovat jejich strukturu, ale i simulovat jejich interakce s okolím. Jak již bylo řečeno v úvodu, modelování nachází široké uplatnění zejména v případě, kdy strukturu proteinu nelze určit experimentálními metodami, např. pomocí metody nukleární magnetické rezonance (NMR) nebo krystalografie. V oblasti tkáňového inženýrství lze modelování využít k určování struktury a vlastností připravovaných tkáňových náhrad.

Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství se zabývá vývojem a využitím arteficiálních — v laboratorii připravených molekul, buněk, tkání a orgánů k obnově nebo náhradě defektní nebo poškozené části těla. Aplikuje tedy zákonitosti a metody inženýrství a přírodních věd na vývoj biologických náhrad sloužících k obnově, zachování nebo zlepšení funkcí tkání. Např. v ortopedii se uplatňuje při regeneraci poškozené kolenní chrupavky. Oddělení tkáňového inženýrství Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR se zabývá vývojem trojrozměrných buněčných nosičů (scaffoldů) a vývojem umělých chrupavek na bázi autologních chondrocytů. To znamená, že k vývoji umělé tkáně, v našem případě chrupavky, se používají chondrocyty, jejichž dárce je sám příjemce. Scaffoldy rozumíme matrice s odpovídajícími biologickými a biomechanickými vlastnostmi, vhodné pro kultivaci chondrocytů i přípravu náhradní chrupavky, které současně podporují obnovu poškozené tkáně. Svým složením a dalšími vlastnostmi by měly co nejvíce odpovídat extracelulární hmotě chrupavky.

Intracelulární proteiny

Intracelulárními proteiny nazýváme bílkoviny, které se nacházejí uvnitř buňky. Enzym Na,K-ATPáza zajišťuje přenos iontů přes plazmatickou membránu — Na^+ z buňky do mezibuněčného (extracelulárního) prostoru a K^+ z extracelulárního prostoru dovnitř buňky — a přispívá tím k udržení buněčné homeostázy. Proto je velmi důležité poznat mechanismus jeho práce. Enzymová pumpa pracuje v cyklu znázorněném na obr. 1. Na^+ se váže na transportní protein Na,K-ATPázu v místech expo-

novaných dovnitř buňky (fáze 1). Dojde k rozštěpení molekuly ATP (zajišťuje energii pro pochody v buňce) — uvolnění ADP a přenosu fosforylové skupiny. To znamená, že se protein fosforyluje (fáze 2). Fosforylace vyvolá změnu konformace pumpy a uvolnění Na^+ na vnějším povrchu buňky a současně vystaví vazebné místo pro K^+ (fáze 3). Navázáním K^+ z vnějšího prostředí se uvolní fosforylová skupina — dojde k defosforylaci (fáze 4 a 5); to způsobí návrat pumpy do jejího původního uspořádání a uvolnění K^+ do vnitřku buňky (fáze 6). Celý cyklus, který zabere asi 10 milisekund, se může opakovat. Každý děj v cyklu závisí na předchozím kroku; jestliže některý z nich zablokujeme, zastavíme práci celé pumpy. Toto těsné sprážení zajistí, že pumpa funguje jen tehdy, když jsou dostupné pouze správné ionty; tak se zamezí zbytečné hydrolyze ATP. Na,K-ATPáza je složena z několika podjednotek. Její α -podjednotka (obr. 2) desetkrát protíná plazmatickou membránu, má tedy 10 transmembránových segmentů.

Počítačově modelovanou částí Na,K-ATPázy byla H_4-H_5 -smyčka (obr. 2), nitro-buněčně orientovaná část α -podjednotky mezi 4. a 5. transmembránovým segmentem, která váže ATP. K modelování její struktury byl použit počítačový program Swiss-PdbViewer, který na základě vstupních dat charakterizujících strukturu bílkoviny zobrazí trojrozměrný model. Je také možné zjišťovat interakce mezi jednotlivými aminokyselinami H_4-H_5 -smyčky, měnit je na jiné a sledovat změny vlastností vazebného místa pro ATP. Pomocí tohoto programu byla např. zobrazena molekula ATP ve vazebné kapse H_4-H_5 -smyčky Na,K-ATPázy (obr. 3).

Extracelulární proteiny

Mimobuněčné bílkoviny se vyskytují v mezibuněčné hmotě. Mezibuněčnou hmotu chrupavky (obr. 4) produkují chondrocyty, jediné buňky zastoupené ve zdravé kloubní (hyalinní) chrupavce. Chondrocyty tvoří méně než 10 % hmotnosti chrupavky, zbytek připadá na extracelulární hmotu s vysokým podílem vody. K základním složkám extracelulární hmoty patří bílkovina kolagen (obr. 5). Charakteristickým znakem kolagenové molekuly je její dlouhá tuhá trojřoubovicová struktura, ve které jsou

vzájemně kolem sebe obtočeny tři kolagenové polypeptidové řetězce a vytvářejí superhelix podobný lanu. Tyto molekuly pak tvoří kolagenové fibrily — uspořádané polymery s průměrem 10 až 300 nm, dlouhé mnoho mikrometrů. Ty se dále skládají v ještě mnohem silnější kolagenová vlákna. V případě kolenní chrupavky jde z více než 80 % o kolagen typu II. Kolagen ve formě vláken a fibril vytváří síťovinu, která dodává chrupavce její tvar a pevnost.

Dále jsou v extracelulární hmotě zastoupeny proteoglykany, bílkoviny připojené k negativně nabitým polysacharidům — glykozaminoglykanům. Pro chrupavku je specifický proteoglykan agregan vázající se na kyselinu hyaluronovou. Proteoglykanové agregáty mají typický tvar, který připomíná štětku na zkumavky. Proteoglykanové makromolekuly zvyšují odolnost chrupavky při stlačení a zajišťují pružnost celé tkáně.

Další významnou složkou mezibuněčné hmoty chrupavky jsou glykoproteiny, např. spojovací glykoproteiny fibronektin a chondronektin, které zvyšují přilnavost chondrocytů ke kolagenu.

K modelování extracelulárního prostoru byl na základě rešerše vytipován postup podle M. Israelowitz a kol. (2005), který využívá program TissueLab. Model vzniká na základě vypočítávaných vodíkových můstků, elektrostatických energií a van der Waalových sil. Postup popsany Israelowitzem pro kolagen typu I lze využít také k modelování tkání, tedy i mezibuněčného prostoru. Toto modelování by mělo sloužit k určení vlastností nosičů (scaffoldů) pro autologní chondrocyty, jejichž vývoj a testování jsou finančně velmi náročné.

T. Zavřelová z Křestanského gymnázia v Praze se v rámci projektu *Otevřená věda zúčastnila výzkumu na Oddělení tkáňového inženýrství v Ústavu experimentální medicíny AV ČR, v. v. i., kde se podílela na vizualizaci struktur na základě počítačových modelů.*

Práce vychází z grantů GA AV 1ET40011010 a GA UK 121/2005/B-BIO/2.LF

O projektu AV ČR *Otevřená věda se dozvíte podrobněji na str. XI kulové přílohy.*