

Souhrn

CIDEa (Cell death-inducing DFF[DNA fragmentation factor]-like effector-a) je protein, který může iniciovat apoptózu skrze narušení heterodimerického proteinu DFF, složeného z nukleázy DFF40, kterou aktivuje kaspáza 3 a jejího inhibitoru DFF45. Měřili jsme hladiny mRNA CIDEa v tkáních laboratorního potkana a detekovali tento protein ve vysokých hladinách v bílé tukové tkáni. Potvrdili jsme také přítomnost proteinu CIDEa v mitochondriích a důležitost jeho CIDE-C domény pro tuto lokalizaci. Ukázalo se, že zvýšená exprese proteinu CIDEa vedla k apoptóze. Dále jsme provedli imunodetekci buněčných frakcí HeLa buněk upravených na tetracyklinem indukovanou expresi. Po inkubaci s camptotecinem nebo valinomycinem jsme sledovali redistribuci proteinu CIDEa do jádra. Předpokládáme, že CIDEa se nachází v mitochondriích a její transport do jádra může zesílit nebo iniciovat mechanismus apoptózy.

Mitochondrie tvoří v buňkách retikulární struktury, které kontinuálně procházejí procesy fúze a fragmentace. Doposud provedené trojrozměrné analýzy mitochondrií ale nepopsaly detailně jejich strukturu. Analyzovali jsme mitochondriální síť u buněčných linií INS1E a HEPG2 tranfekovaných mitochondriálně adresovaným GFP. Pomocí 4Pi mikroskopie se mohou sledovat přesné změny v 3D struktuře, odpovídající změnám energetických stavů v buňkách, a to při rozlišení 100nm. Mitochondrie INS1E buněk za normálních kultivačních podmínek, tedy v médiu s 11 mM glukózou měly hustou mitochondriální síť s tenkými větvenými tubuly, které tvořily jedno propojené retikulum o průměru tubulů 262 ± 26 nm. U buněk kultivovaných v nízké 5mM glukóze buňky změnil svůj tvar z typického protáhlého na spíše oválný a jejich tubuly byly silnější, v průměru 311 ± 36 nm. Podobně, mitochondrie buněk HEPG2, rostoucích v optimálním médiu s glukózou o koncentraci 5mM nebo v hyperglykemických podmínkách, měly propojené retikulum a průměr tubulů 284 ± 38 nm a 417 ± 110 nm. Při inhibované respiraci, indukované rotenonem došlo k rozpadu mitochondriální sítě na několik hlavních částí a mnoho menších, ~300 nm tubulů a koulí. Po odpřažení indukovaném FCCP se navíc formovaly prstencové útvary o průměru 700 až 2000 nm. Po inkubaci s odpřahovačem i rotenonem se projevil větší poměr fúze k fragmentaci než v předchozím případě a utvořily se miskovité útvary o velikosti 0,7 až 2 μ m. Doplnili jsme tedy dříve nepopsané detaily tvarů mitochondriální sítě při její desintegraci a jasně ukázali, že je vysoké 3D rozlišení 4Pi mikroskopie nezbytné pro detailní popis mitochondrií.