

BIOLOGIA KOMÓRKI

MIKROSKOPIA FLUORESCENCYJNA 2 CYTOSZKIELET

Barwienie filamentów aktynowych

Wstęp

Cytoszkielekt aktynowy zbudowany jest z filamentów aktynowych, o średnicy około 6 nm, które dzięki ich zdolności do interakcji z wieloma białkami strukturalnymi i funkcjonalnymi tworzy w komórkach złożone układy przestrzenne, takie jak kortykalna sieć aktynowa, włókna naprężeniowe wewnątrz cytoplazmy, pierścień kurczliwy formowany podczas cytokinezy, a także wypustki powierzchniowe (lamellipodia, filopodia i pofałdowania błon). Dynamiczny cytoszkielekt aktynowy uczestniczy w szeregu funkcji komorkowych, w tym endo- i egzocytozie, migracji, skurczu, wreszcie w cytokinezie. Ciągłe rearanżacje jego architektury kontrolowane są przez złożone szlaki biochemiczne, przy czym nadrzędną rolę w kontroli tych zjawisk przypisuje się białkom z rodziny Rho, należącej do nadrodziny małych białek G.

Ze względu na swoje właściwości powszechnie używanym narzędziem w badaniach wpływu organizacji cytoszkieletu aktynowego na podstawowe funkcje komórek, w tym ich ruchliwość i transport wewnątrzkomórkowy są niektóre substancje z grupy mykotoksyn, czyli toksyn wytwarzanych przez niektóre gatunki grzybów (pleśni). Zaliczyć do nich można czynniki z grupy cytochalazyn, izolowanych z grzybów z rodziny *Metarrhizium*, oraz falloidynę - alkaloid wytwarzany przez muchomora sromotnikowego (*Amanita phalloides*) oraz muchomora jadowitego (*Amanita virosa*), współdecydujący o silnie toksycznych właściwościach tych grzybów po ich spożyciu.

Cytochalazyny (oznaczane kolejnymi literami alfabetu od A do J) to grupa organicznych związków chemicznych o podobnej strukturze, które wykazując pleiotropowe działanie na komórki, oddziałują przede wszystkim z cytoszkieletem aktynowym. Większość cytochalazyn (między innymi cytochalazyna D wyizolowana z *Metarrhizium anisopliae*) wiąże się z F-aktyną na końcu „+” filamentu, blokując dołączanie nowych monomerów aktynowych do filamentu, co w konsekwencji prowadzi do rozpadu już istniejących mikrofilamentów. Cytochalazyna D może również wiązać się z monomerami i dimerami aktynowymi, podczas gdy cytochalazyna B fragmentuje już powstałe mikrofilamenty. Cytochalazyny są związkami przechodzącymi przez błony plazmatyczne i wpływającymi również na właściwości tych błon oraz na wiele procesów wewnątrzkomórkowych, a szczególnie wywołują enukleację komórek *in vitro*. Ponadto wykazano, że np. cytochalazyny A i B hamują transport monosacharydów przez błonę komórkową, cytochalazyna D hamuje syntezę białek. Z kolei falloidyna jest to organiczny związek chemiczny, należący do grupy fallotoksyn występujących w grzybach z rodzaju (*Amanita sp.*). Wiąże się ona zarówno *in vivo* jak i *in vitro* z aktyną powodując stabilizację F-aktyny, także we wiązkach mikrofilamentów tworzących włókna naprężeniowe. Falloidyna ma takie samo powinowactwo do krótkich jak i długich mikrofilamentów. Ponieważ falloidyna wiąże się z aktyną w stosunku stechiometrycznym 1:1 (1 cząsteczka falloidyny na 1 cząsteczkę aktyny w filamencie aktynowym) w mięśniach, jak i w komórkach mięśniowych analizy te służyć mogą do ilościowych pomiarów zawartości F-aktyny w komórkach, w tym tych traktowanych cytochalazynami. Cecha ta została wykorzystana w mikroskopii fluorescencyjnej, gdzie specjalnie znakowana falloidyna (zazwyczaj koniugowana z fluorochromem) jest związkiem używanym powszechnie do wizualizacji organizacji cytoszkieletu aktynowego w komórkach w hodowli *in vitro* oraz na skrawkach tkankowych.

Cel ćwiczenia:

- wizualizacja cytoszkieletu aktynowego w różnych typach komórek zwierzęcych z hodowli *in vitro* (komórki prawidłowe i nowotworowe)
- wykazanie roli cytoszkieletu aktynowego w utrzymaniu wielkości i kształtu komórki;

Metodyka:

W tym celu należy w wybranych komórkach hodowanych *in vitro* w standardowych warunkach (odpowiednia pożywka, temperatura 37°C, 5% CO₂) oraz w komórkach hodowanych w takich samych warunkach, ale inkubowanych w pożywce z dodatkiem cytochalazyny D, wybarwić filamenty aktynowe znakowaną fluorescencyjnie falloidyną. Tak wybarwione komórki można następnie obserwować w mikroskopie kontrastowo-fazowym z przystawką do epifluorescencji i porównać:

- organizację filamentów aktynowych w różnych typach komórek zwierzęcych
- morfologię i organizację cytoszkieletu aktynowego w komórkach inkubowanych w standardowej pożywce hodowlanej i w pożywce z cytochalazyną D.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Oglądnąć, w mikroskopie odwróconym, komórki wysiane na szkiełkach w szalkach hodowlanych:
fibroblasty skóry ludzkiej lub ludzkie fibroblasty płucne - komórki prawidłowe
komórki mysiego czerniaka B16 (melanoma B16) lub komórki szczurzego mięsaka XC (sarkoma XC) - komórki nowotworowe
2. Do wykonania ćwiczenia wybrać 2 szalki z takimi samymi komórkami
3. Przygotować po 2 ml pożywki do hodowli komórek:
a) MEM z 10% FCS
b) MEM z 10% FCS z dodatkiem 1 µg/ml cytochalazyny D
4. Zmienić pożywki w szalkach hodowlanych:
- zlać pożywkę znad komórek
- w jednej szalce zalać komórki pożywką MEM z 10% FCS
- w drugiej szalce zalać komórki pożywką MEM z 10% FCS z dodatkiem cytochalazyny;
szalki opisać!
5. Inkubować komórki w inkubatorze (w temp. 37°C, w obecności 5% CO₂), przez 30 min
[czas na REFERAT]
6. Wyjąć szalki z inkubatora. Zlać pożywkę znad komórek i przepłukać każde szkiełko 3 razy roztworem PBS bez jonów Ca⁺² i Mg⁺², o temp. 37°C.
7. Zalać komórki 3,7% roztworem formaldehydu w PBS o temp. 37°C i utrzymywać je przez 10 min w cieplarni.
8. Zlać utrwalacz znad komórek i przepłukać każde szkiełko 3 razy roztworem PBS.
9. Zalać komórki 0.1% roztworem Tritonu X-100 i pozostawić na 5 min w temp. pokojowej.
10. Zlać Triton X-100 znad komórek i przepłukać każde szkiełko 3 razy H₂O destylowaną.
11. Wyjąć szkiełka z szalek i przełożyć na suche wieczka (pamiętając, aby komórki znajdowały się na górze szkiełek) i osuszyć brzegi każdego szkiełka bibułą.
12. Na każde szkiełko nakropić 20 µl roztworu falloidyny znakowanej TRITC(izotiocyanianem rodaminy) o stężeniu 500 ng/ml lub falloidyny-AlexaFluor 546 (1 jedn/200 µl).
Barwić komórki 30 min, w ciemności, w temperaturze pokojowej, w szalkach wyłożonych wilgotną watą, aby krople barwnika nie wysychały.

[czas na REFERAT]

13. Mikropipetą zdjąć krople barwnika ze szkiełek i starannie przepłukać każde szkiełko 3 razy H_2O destylowaną.
14. Wyczyścić szkiełko podstawowe i nakropić na nie 2 razy po 20 μl H_2O destylowanej. Na każdą kroplę wody nałożyć 1 szkiełko z wybarwionymi komórkami (komórkami do dołu), osuszyć brzegi każdego szkiełka bibułą i okleić je lakierem do paznokci. Pamiętać o opisaniu preparatu.
15. Tak przygotowane preparaty oglądać w mikroskopie fluorescencyjnym - światło wzbudzające: max 554 nm, a emisja: max 576 nm
16. W mikroskopie kontrastowo-fazowym porównać obrazy morfologii komórek inkubowanych w standardowej pożywce hodowlanej bez i z dodatkiem cytochalazyny D i wyciągnąć wnioski.
17. W mikroskopie fluorescencyjnym porównać obrazy organizacji cytoszkieletu aktynowego komórek inkubowanych w pożywce hodowlanej bez (kontrola) i z dodatkiem cytochalazyny D i wyciągnąć wnioski.
18. Porównać organizację filamentów aktynowych w różnych typach komórek (*oglądając preparaty przygotowane przez kolegów z innych zespołów*).

Zakres materiału, który należy przygotować do ćwiczeń:

Budowa i funkcje cytoszkieletu aktynowego w komórkach eukariotycznych:

1. Aktyny i białka wiążące aktynę
2. Organizacja cytoszkieletu aktynowego w mięśniach i komórkach niemięśniowych.
3. Rola małych białek G w regulacji funkcji cytoszkieletu aktynowego
4. Białka motoryczne związane z filamentami aktynowymi
5. Funkcje cytoszkieletu aktynowego w komórkach niemięśniowych
6. Mechanizm skurczu mięśni prądkowanych

Zalecana literatura:

- B. Alberts i in.: Podstawy biologii komórki, PWN 2005; część II, rozdział 17
- red. R. Makuch i M. Rędownicz: Cytoszkielet; Kosmos, 2001, t.50, nr 3, str. 283-295
- red. H. Strzelecka-Gołaszewska: Motory molekularne, Kosmos, 2001, t.50, nr 4, str. 349-358; 375-390
- red. B. Alberts et al. - Molecular biology of the cell, 2009 (V), rozdział 16.
- T. Pollard i W. Earnshaw – Cell biology, 2nd ed., 2008, rozdziały 33 i 36

Tematy referatów do przygotowania i wygłoszenia na tych ćwiczeniach:

1. Organizacja cytoszkieletu aktynowego w komórkach niemięśniowych
2. Rola białek Rho w regulacji cytoszkieletu