

BIOLOGIA KOMÓRKI

**Podstawy mikroskopii fluorescencyjnej - część 2
Budowa i funkcje cytoszkieletu - barwienie filamentów
aktynowych**

Wstęp

Cytoszkielekt aktynowy zbudowany jest z filamentów aktynowych, o średnicy około 6 nm i dzięki łączeniu się mikrofilamentów z wieloma białkami wiążącymi aktynę tworzy w komórkach różnorodne formy (złożone układy wiązek lub sieci) takie jak kortykalna sieć aktynowa, włókna naprężeniowe wewnątrz cytoplazmy, pierścień kurczliwy formowany podczas cytokinezy, wypustki powierzchniowe (lamellipodia, filopodia, pofałdowania błon). Dynamiczny cytoszkielekt aktynowy umożliwia komórce pełnienie różnorodnych funkcji takich jak: migracja, zmiana kształtu, skurcz komórek mięśniowych, cytokineza, endo- i egzocytoza. Ciągłe przeobrażenia cytoszkieletu aktynowego są kontrolowane przez komórkę, a nadrzędną rolę w kontroli tych zjawisk pełni rodzina białek Rho, należąca do nadrodziny małych białek G.

Cel ćwiczenia

Ćwiczenie ma na celu wizualizację cytoszkieletu aktynowego w komórkach prawidłowych (fibroblasty skóry ludzkiej lub ludzkie fibroblasty płucne) z hodowli *in vitro*. W tym celu należy w utrwalonych komórkach wybarwić filamente aktynowe znakowaną fluorescencyjnie falloidyną. Wybarwione komórki należy oglądać w mikroskopie fluorescencyjnym. Falloidyna jest silną toksyną wytwarzaną przez muchomora sromotnikowego (*Amanita phalloides*), która zarówno *in vivo* jak i *in vitro* wiąże się z aktyną powodując stabilizację F-aktyny, także we wiązkach tworzących włókna naprężeniowe. Znakowana falloidyna (zazwyczaj fluorescencyjnie) jest związkiem używanym powszechnie do wykrywania F-aktyny w komórkach i to nie tylko do wizualizacji organizacji cytoszkieletu aktynowego, ale również do pomiarów ilościowych zawartości F-aktyny w komórkach w hodowli *in vitro*, na skrawkach tkankowych oraz w ekstraktach komórkowych. Znakowana falloidyna ma takie samo powinowactwo do krótkich jak i długich mikrofilamentów, gdyż w przybliżeniu wiąże się z aktyną w stosunku stechiometrycznym 1 : 1 (1 cząsteczka falloidyny na 1 cząsteczkę aktyny w filamencie aktynowym), zarówno w mięśniach jak i w komórkach niemięśniowych różnych gatunków zwierząt i roślin.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Oglądając, w mikroskopie odwróconym, komórki wysiane na szkiełkach w szalkach hodowlanych (fibroblasty skóry ludzkiej lub ludzkie fibroblasty płucne - komórki prawidłowe).
2. Wybrać do barwienia cytoszkieletu aktynowego 1 szalkę ze szkiełkiem z komórkami.
3. Zlać pożywkę hodowlaną znad komórek i przepłukać szkiełko 3 razy roztworem PBS bez jonów Ca^{+2} i Mg^{+2} , o temp. 37°C.
4. Zalać komórki 3.7% roztworem formaldehydu w PBS o temp. 37°C i utrzymywać je przez 10 min w cieplarni.
5. Zlać utrwalacz znad komórek i przepłukać szkiełko 3 razy roztworem PBS.
6. Zalać komórki 0.1% roztworem Tritonu X-100 i pozostawić na 5 min w temp. pokojowej.

7. Zlać Triton X-100 znad komórek i przepłukać szkiełko 3 razy PBS.
8. Wyjąć szkiełko z szalki i przełożyć na suche wieczko (pamiętając, aby komórki znajdowały się na górze szkiełka) i osuszyć brzegi szkiełka bibułą, a następnie nakropić na szkiełko 20µl roztworu falloidyny znakowanej TRITC (izotiocyjanianem rodaminy) o stężeniu 500ng/ml falloidyny-AlexaFluor 546 (1jedn./200 µl).
9. Barwić komórki w ciemności przez 30-45minut (**CZAS NA PRELEKCJE**). w temp. pokojowej, w szalkach wyłożonych wilgotną watą, aby krople barwnika nie wysychały.
10. Mikropipetą zdjąć krople barwnika ze szkiełka i starannie przepłukać komórki 3 razy wodą destylowaną.
11. Wyczyścić szkiełko podstawowe i nakropić na nie 20µl wody destylowanej. Na kroplę wody nałożyć szkiełko z wybarwionymi komórkami (komórkami do dołu), osuszyć brzegi szkiełka bibułą i okleić je lakierem do paznokci.
12. Tak przygotowane preparaty oglądać w mikroskopie kontrastowo-fazowym z przystawką do epifluorescencji: zestaw filtrów „4” (światło wzbudzające: max 554 nm, a emisja: max 576 nm).
13. Porównać obrazy wybarwionych komórek w mikroskopie kontrastowo- fazowym oraz w mikroskopie fluorescencyjnym.

Zakres materiału, który należy przygotować do ćwiczeń:

Cytoszkielekt aktynowy c.d.:

- 1) Organizacja cytoszkieletu aktynowego w mięśniach i komórkach niemięśniowych
- 2) Funkcje cytoszkieletu aktynowego w komórkach niemięśniowych
- 3) Mechanizm skurczu mięśni prążkowanych
- 4) Białka motoryczne związane z filamentami aktynowymi
- 5) Rola małych białek G w regulacji cytoszkieletu aktynowego

Zalecana literatura:

- B. Alberts i in.: Podstawy biologii komórki, PWN 2005; część II, rozdział 17
- red. J. Kawiak, M. Zabel: Seminaria z cytofizjologii, Wrocław 2002; rozdział 7
- red. R. Makuch i M. Rędownicz: Cytoszkielekt; 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