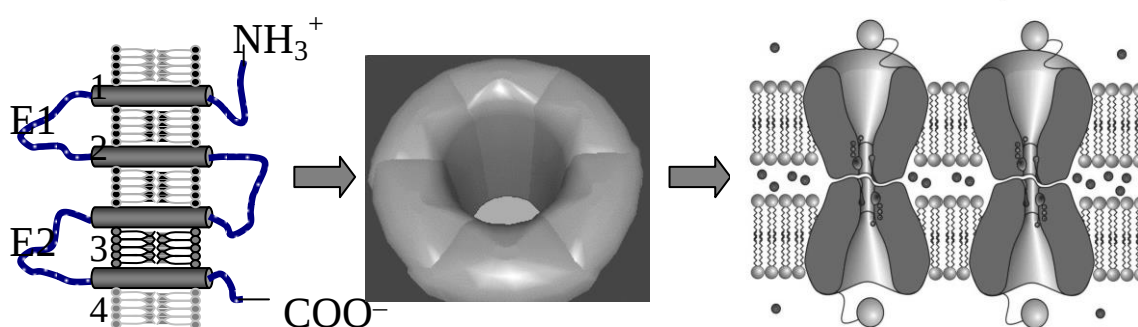


Wykorzystanie mikroskopii
fluorescencyjnej w badaniach funkcji
złącz szczelinowych

PRAKTIKUM Z CYTOCHEMII
(BCH395)

Komunikacja międzykomórkowa

Złącza szczelinowe zbudowane są z kompleksów białkowych tworzących międzykomórkowe kanały, które łączą przedziały cytoplazmatyczne sąsiednich komórek. Kanały złącz zbudowane są z dwóch koneksonów, heksamerów białek z rodziny koneksyn (Rys. 1). Odpowiedzialne są one za bezpośrednią międzykomórkową wymianę jonów, drobnocząsteczkowych metabolitów i cząsteczek regulatorowych. W związku z tym struktury te, wraz z systemami opartymi na międzykomórkowej wymianie bodźców o charakterze chemicznym (np. za pośrednictwem czynników wzrostowych i cytokin), oraz mechanicznym (za pośrednictwem receptorów adhezji komórkowej), determinują synchronizację funkcji komórek w tkankach kręgowców.



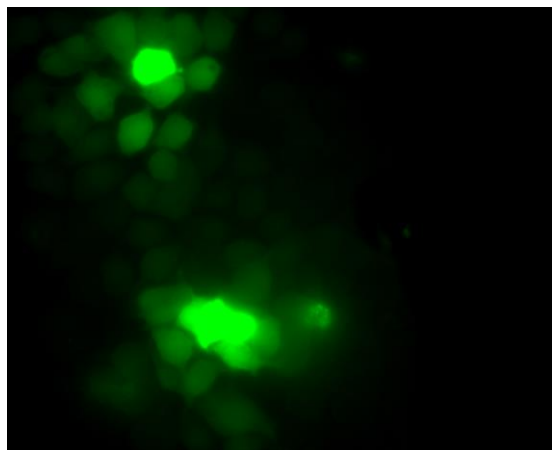
Ryc. 1. Struktura koneksyn, koneksonów i złącz szczelinowych

W tkankach pobudliwych, np. w mięśniu sercowym i układzie nerwowym, złącza szczelinowe przewodzą potencjały czynnościowe między błonami sąsiadujących komórek. Na przykład międzykomórkowy transfer jonów wapnia za pośrednictwem złącz szczelinowych powoduje powstawanie „fal wapniowych”, które decydują o synchronizacji aktywności skurczowej kardiomiocytów i całego mięśnia sercowego. W innych tkankach, np. w wątrobie i trzustce, wymiana metabolitów za pośrednictwem złącz szczelinowych koordynuje funkcje kryczne tych narządów w tym, odpowiednio, wydzielanie glukozy i insuliny. Ponadto, komunikacja międzykomórkowa za pośrednictwem złącz szczelinowych odgrywa rolę w rozwoju procesów patologicznych, w tym choroby nowotworowej. Co ciekawe, zaangażowanie złącz szczelinowych w rozwój choroby nowotworowej zależy może od etapu procesu nowotworzenia. Spadek intensywności międzykomórkowej wymiany metabolitów wydaje się korelować z nabyciem przez komórki cech nowotworowych, jednak zaobserwowano również korelację między wzrostem ekspresji koneksyn i komunikacji międzykomórkowej za pośrednictwem złącz szczelinowych, a nabyciem przez komórki nowotworowe cech inwazyjnych. Z tych m.in. powodów opracowanie odpowiednich modeli doświadczalnych, które pozwalałyby na wszechstronną analizę ekspresji i funkcji koneksyn w powiązaniu z innymi parametrami komórek decydującymi o przebiegu procesów rozwojowych i patologicznych, zyskuje na znaczeniu.

Metoda „w pigułce”

Koncentracja calceiny w komórce możliwa jest wyłącznie gdy: (i) błona komórkowa jest nienaruszona i (ii) w komórce aktywne są enzymy, w tym te z grupy esteraz. W wyniku ich

aktywności dochodzi do de-estryfikacji kalceiny. Taka komórka widoczna jest w mikroskopie fluorescencyjnym, gdyż kalceina w niej zawarta emituje światło zielone ($\lambda=520$ nm) w odpowiedzi na wzbudzenie światłem niebieskim ($\lambda=480$ nm). Formowanie kanałów złącz szczelinowych między komórką naładowaną kalceiną a komórkami „akceptorowymi” powoduje bardziej lub mniej gwałtowną dyfuzję kalceiny do ich cytoplazmy, przez co komórki te stają się widoczne w mikroskopie fluorescencyjnym (Rys. 2).



Cel doświadczenia:

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z techniką wizualizacji komunikacji międzykomórkowej za pośrednictwem złącz szczelinowych z wykorzystaniem kalceiny AM.

Przebieg doświadczenia:

1. Pasaż komórek „donorowych”:

- a) komórki melanoma B16 w naczyniu hodowlanym 25 cm² przepłukać roztworem PBS i zalać 0.25% roztworem trypsyny

Rys. 2. Wizualizacja transferu kalceiny AM z komórek donorowych do akceptorowych.

- b) nadmiar trypsyny zlać, po

czym komórki inkubować przez ok. 1-3 minuty

- c) komórki zawiesić w 5 ml pożywki MEM i wirować przez 5 min. przy 1000 obr./min.

2. Barwienie komórek:

- a) nadsącz zlać, a komórki zawiesić w 0.5 ml roztworu barwników fluorescencyjnych (5 uM calceiny AM, 10 uM DiI) i przenieść do cieplarki na 30 min.
b) komórki wirować przez 5 min. przy 1000 obr./min, nadsącz zlać a komórki zawiesić w 5 ml PBS
c) czynność tą powtórzyć 2-krotnie
d) następnie komórki zawiesić w 5 ml pożywki, a gęstość zawiesiny oznaczyć za pomocą komory Buerkera

- e) objętość zawiesiny zawierającą 20 000 komórek dopełnić do 2ml i całość przenieść do szalki z komórkami akceptorowymi po uprzednim usunięciu z niej pożywki

3. Obserwacje mikroskopowe:

- a) rozchodzenie się barwnika fluorescencyjnego z komórek donorowych do komórek akceptorowych obserwować w przy użyciu systemów fluorescencyjnych Leica Orthoplan i DMIRE2

Temat referatu:

Budowa i funkcje koneksyn.

Zagadnienia:

- Zasada działania mikroskopu fluorescencyjnego
- Test żywotności komórek z wykorzystaniem dwuocianu fluoresceiny

Zalecana literatura:

- B. Alberts i inni.-Podstawy Biologii Komórki, PWN 2005
- Instrukcje do ćwiczeń