

Imunofluorescenčního značení α - a γ -tubulinu - sledování poruch mitózy vlivem vybraných inhibitorů proliferace.

Teoretický úvod

Imunofluorescenční značení

Metoda imunofluorescenčního značení patří mezi nejvýznamnější experimentálně biologické a biomedicínské techniky s širokým spektrem využití v praxi. Podstatou je vazba primární protilátky na antigen našeho zájmu. Následuje vazba sekundární protilátky konjugované s fluorochromem rozpoznávající imunoglobuliny organismu, z něhož pochází primární protilátka. Jinou možností je značení antigenu přímo primární protilátkou značenou fluorochromem. Po excitaci zářením příslušné vlnové délky ve fluorescenčním mikroskopu molekula fluorochromu emituje záření o vyšší vlnové délce (tedy nižší energii) ve viditelné oblasti spektra. Imunofluorescenční značení umožňuje takto vizualizovat například subcelulární lokalizaci vybraných struktur, relativní úroveň exprese proteinů, aktivací stav proteinů (například přes jejich fosforylační status) atd. Perspektiva této moderní metody spočívá v teoretické možnosti vizualizovat jakýkoliv genový produkt na buněčné úrovni.

Teorie vytvoření mikroskopického preparátu

Pro vytvoření mikroskopického preparátu jsou vhodné adherentní buněčné linie rostoucí přisedle na kultivační podložce, kterou může být i krycí sklíčko. Na ně je optimalizován i následující protokol. Buňky suspenzní, rostoucí v celém objemu media, vyžadují speciální přístup. Buňky jsou vysazovány do šestijamkových panelů, do kterých se předtím vloží sterilní krycí sklíčko. Přibližně po 24h inkubaci při 37 °C, 5 % CO₂ a 100% vlhkosti (pro každou linii je počet hodin nutných k adhezi nutné optimalizovat) jsou buňky ovlivněny inhibitory proliferace a kultivovány po požadovanou dobu v inkubátoru. Po promytí je nutné buňky zafixovat, což se provádí buď pomocí organických rozpouštědel nebo aldehydů. Organická rozpouštědla (alkoholy a aceton) odstraňují lipidy, dehydratují buňky a zároveň precipitují proteiny buněčné architektury. Aldehydy (např. paraformaldehyd, formaldehyd/gluteraldehyd) tvoří intra a zejména intermolekulární mosty mezi volnými aminoskupinami a vytváří kovalentní sítě antigenů. Aldehydy konzervují strukturu proteinů lépe než organická rozpouštědla, ale redukují antigenicitu některých složek buňky. Výběr fixativa závisí na detekovaném antigenu. Pro volný přístup protilátky k antigenu je nutná permeabilizace buněk. Fixování pomocí alkoholů a acetonu zároveň narušuje integritu membrán, permeabilizační krok tedy není nutný. Aldehydy však tuto vlastnost nemají, a proto je třeba permeabilizaci provést např. pomocí zředěných roztoků detergentů (0,5% Triton-X/PBS). Před vlastní aplikací protilátek je nutné sklíčko vyblokovat, tzn. zabránit nespecifické vazbě protilátek. Toho je obvykle dosaženo inkubací sklíček s roztokem BSA (hovězí sérový albumin) nebo s fetálním sérem, které BSA také obsahuje. Dále následuje inkubace s primárními, sekundárními protilátkami, popř. dalšími fluorescenčními próbami (např. DAPI). Při aplikaci protilátek konjugovaných s fluorochromy je nutné inkubaci provádět ve

tmě. Na závěr jsou ze sklíček s buňkami vytvořeny mikroskopické preparáty pomocí tzv. montovacích médií (50% glycerol, mowiol). Pozorování se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu pod různými filtry v závislosti na sledovaném fluorochromu.

Mikrotubulární cytoskelet

Mikrotubuly jsou tuhé, duté, válcovité útvary o konstantní šířce cca 25 nm, s tloušťkou stěny přibližně 5 nm a proměnlivé délce, která může nabývat hodnot řádově nanometrů až po několik desítek centimetrů (nervová vlákna). Stěnu tvoří zpravidla 13 lineárně seřazených řetězců – protofilament, jejichž základní stavební jednotkou jsou heterodimery tubulinu složené z globulárních α - a β -tubulinových podjednotek. Iniciace tvorby mikrotubulů probíhá v živočišných buňkách v centrosomech. Jsou to drobné struktury nacházející se v blízkosti jádra, odkud mikrotubuly vybíhají k periférii buňky. Skládají se ze dvou centriol a amorfní proteinové hmoty obsahující stovky nukleárních míst pro tvorbu mikrotubulů tvořených prstenci γ -tubulinu.

Mikrotubuly jsou velmi dynamické útvary, ve kterých se neustále střídá fáze dorůstání a zkracování. Tato dynamická nestabilita je důležitou vlastností nezbytnou pro správné vykonávání všech jejích funkcí.

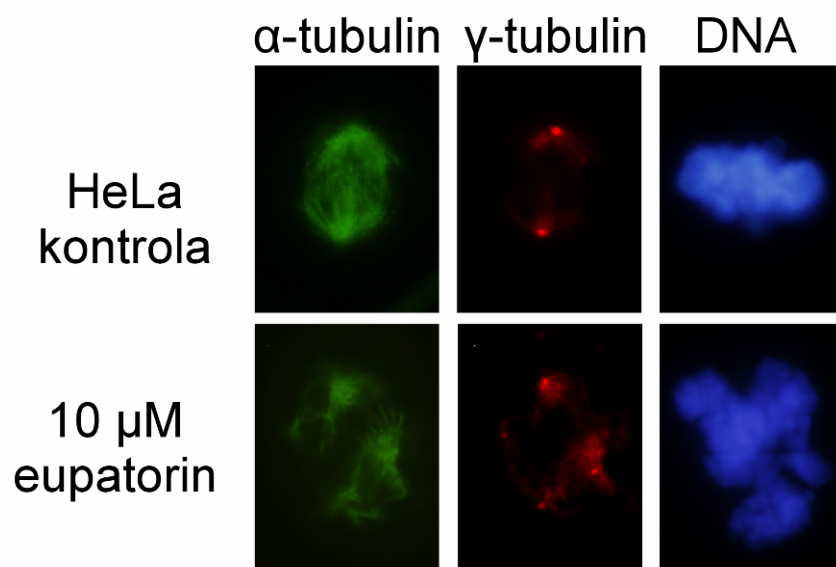
Klíčovou úlohu hrají mikrotubuly při jaderném dělení - mitóze, kde zajišťují přesné rozdělení genomu mateřské buňky do buněk dceřinných. Vytváří zde složitý, vysoce specializovaný útvar zvaný mitotické vřeténko. Na přechodu G_1/S -fáze dochází k rozpojení a duplikaci centriol uvnitř centrosomu, které dále rostou a zvětšují se až do konce G_2 -fáze. Oba takto vytvořené centrosomy přitom po celou dobu zůstávají spojené, až během profáze se rozcházejí do protilehlých stran buňky a dávají tak základ pólům mitotického vřeténka. Na počátku mitózy dochází k rozpadu dosavadních mikrotubulů a vytvoření nových, kratších, jejichž typickou vlastností je extrémně zvýšená dynamická nestabilita, která je 4-100x vyšší oproti interfázi. Z pólů vřeténka vybíhají hvězdovitě uspořádané mikrotubuly s konci směřujícími volně do cytoplazmy popř. navázané na vnitřní stranu plazmatické membrány - tzv. astrální mikrotubuly. Některé mikrotubuly se v ekvatoriální rovině spojují pomocí asociovaných proteinů s mikrotubuly z druhého pólu. Takto vytvořený mikrotubulus procházející cytoplazmou od jednoho pólu k druhému se označuje jako polární. Kinetochorové mikrotubuly pronikají po rozpadu jaderné membrány ke kondenzovaným chromozómům a napojují se do míst jejich centromer se speciálními komplexy proteinů zvaných kinetochory. V případě správného průběhu mitózy jsou všechny zdvojené chromozómy vázány dvěma svazky mikrotubulů k oběma pólům vřeténka a jsou postupně přesouvány do ekvatoriální roviny buňky, kde vytváří tzv. metafázní destičku, ve které neustále mírně kmitají vlivem přetahování obou připojených svazků mikrotubulů. Pokud chromozómy nejsou správně a oboustranně připojeny, dochází k zastavení buněčného cyklu na přechodu metafáze/anafáze vlivem kontrolního bodu vřeténka. V anafázi se sesterské chromatidy oddělují v místě centromer a jsou přitahovány k pólům kinetochorovými mikrotubuly. Souběžně s tímto se polární mikrotubuly prodlužují polymerací na plus-koncích a posouváním dílčích mikrotubulů vzájemně od sebe v oblasti jejich překryvu pomocí asociovaných proteinů. Astrální mikrotubuly se

v této fázi připojují k plazmatické membráně a přitahují k ní póly vřeténka. Tah těchto astrálních mikrotubulů a prodlužování polárních mikrotubulů oddaluje póly vřeténka od sebe a napomáhá tak segregaci chromozómů. Póly vřeténka se později stávají základem centrosomů v dceřinných buňkách.

Mikrotubulární inhibitory jako protinádorová léčiva

Správná funkce dělicího vřeténka je nezbytným předpokladem pro úspěšný průběh mitózy, a proto se mikrotubuly stávají jedním z cílů různých antimitotických látek, které se váží na molekuly volného tubulinu nebo přímo na mikrotubuly a které se dnes s úspěchem používají jako jedny z nejvýznamnějších chemoterapeutických protinádorových léčiv. Mikrotubuly jsou také častým cílem řady toxických látek, alkaloidů mnoha mikroorganismů, rostlin i živočichů, a právě rozsáhlým screeningem přírodních produktů byly objeveny některé významné látky dnes používané v klinické praxi při léčbě rakoviny. Antimitotické látky působící na mikrotubuly bývají většinou rozděleny do dvou hlavních skupin podle jejich stabilizujícího či destabilizujícího účinku. První skupinou jsou látky destabilizující mikrotubuly (kolchicin, nocodazol, vincristin, combretastatin...), které se již s velkým úspěchem používají v klinické praxi nebo jsou ve stadiu klinických zkoušek pro léčbu rakoviny. Kromě toho tato skupina zahrnuje množství dalších látek používajících se i v jiných oblastech jako např. herbicidy, fungicidy, antihelmintika, antibiotika, psychoaktivní drogy, látky proti kašli atd. Druhou hlavní skupinou jsou potom látky stabilizující mikrotubuly (taxol, epothilony, laulimalid...). Mikrotubuly však zastávají v buňce řadu dalších významných funkcí včetně intracelulárního transportu, sekrečních procesů, přenosu receptorových signálů, vnitřní kostry buňky atd., čímž se i normální, nedělící se buňky v interfázi stávají terčem těchto látek. Tato nedostatečná selektivita vůči nádorovým buňkám je často příčinou řady vedlejších účinků a toxicity pro organismus, maximální tolerovaná dávka je u všech látek inhibujících mikrotubuly poměrně nízká.

Příklad:



Obrázek 1: Tvorba multipolárních dělicích vřetének působením 10 μ M eupatorinu na 24h v nádorových buňkách děložního čípku HeLa.

Pracovní postup:

Biologický materiál

nádorové buňky děložního čípku HeLa (kontrolní či ovlivněné inhibitory proliferace),

Vybavení a pomůcky

šestijamkový panel, pinzeta, podložní sklíčka, destička obalená parafilmem, fluorescenční mikroskop Olympus vybavený digitální kamerou CoolSnap, sada pipet a špiček

Chemikálie, roztoky a protilátky:

aceton

anti- α -tubulin-AlexaFluor488

anti- γ -tubulin-Dyomics647

DAPI (10 mg/ml)

DMEM s 10 % fetálním sérem (DMEM/FS)

methanol

mowiol

PBS (fosfátový pufr)

0,1%Tween/PBS

Vlastní postup:

1. Buňky jsou kultivovány na krycích sklíčkách v šestijamkových panelech v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂, 100% vlhkost) a inkubovány s inhibitory proliferace na 24 h.

Promývání:

2. 2x 1 ml PBS, 2 min.

Fixace a permeabilizace buněk:

3. Odsaj PBS.
4. Opatrně přidej 1 ml **ledově vychlazené** fixační směsi methanol – aceton (1:1).
5. Inkubuj 10 min v -20 °C.
6. Pinzetou podeber sklíčko a opři ho o stěnu jamky, nechej na vzduchu uschnout.
7. Suchá, zafixovaná sklíčka lze v tomto stavu uchovávat v -20 °C.

Rehydratace:

8. 1 ml PBS, 10 min.

Blokování:

9. 1 ml DMEM/FS, 15 min

Primární protilátka anti- α -tubulin-AlexaFluor488

10. Nařed' zásobní roztok protilátky do DMEM/FS (na 1 sklíčko počítej 25 μ l) **100x**

11. Nanes 25 μ l roztoku primární protilátky na destičku obalenou parafilmem, přiklop krycí sklíčko s buňkami naspod a ulož vše do krabice s víkem zvlhčené uvnitř destilovanou vodou.
12. Inkubuj 1 hod při laboratorní teplotě ve tmě!!!.

Promývání

13. 1 ml PBS, 2 min
14. 1 ml PBS-T, 2 min
15. 1 ml PBS, 2 min.

Primární protilátka anti- γ -tubulin-Dyomics647

16. Nařed' zásobní roztoky protilátek do DMEM/FS (na 1 sklíčko počítej 25 μ l) **50x**
17. Nanes 25 μ l roztoku primární protilátky na destičku obalenou parafilmem, přiklop krycí sklíčko s buňkami naspod a ulož vše do krabice s víkem zvlhčené uvnitř destilovanou vodou.
18. Inkubuj 1 hod při laboratorní teplotě ve tmě!!!.

Promývání

19. 1 ml PBS, 2 min
20. 1 ml PBS-T, 2 min
21. 1 ml PBS, 2 min.

DAPI

22. Nařed' **2000x** zásobní roztok DAPI 10 mg/ml do PBS (konečná koncentrace 5 μ g/ml).
23. Přidej do každé jamky 1 ml roztoku DAPI.
24. Inkubuj 10 min při laboratorní teplotě ve tmě.

Promývání

25. 1 ml PBS, 2 min
26. 1 ml PBS, 2 min
27. 1 ml **H₂O**, 2 min.

Vytvoření trvalého preparátu

28. Nanes na podložní sklíčko 5 μ l mowiolu a přiklop sklíčko buňkami na spodní straně.
29. Preparát lze ihned pozorovat, pro použití imerzního objektivu je však třeba nechat mowiol ztuhnout do druhého dne při 4 °C.

Uchovávání preparátů

30. Sklípka jsou uchovávána ve tmě při 4 °C.