

1. FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA

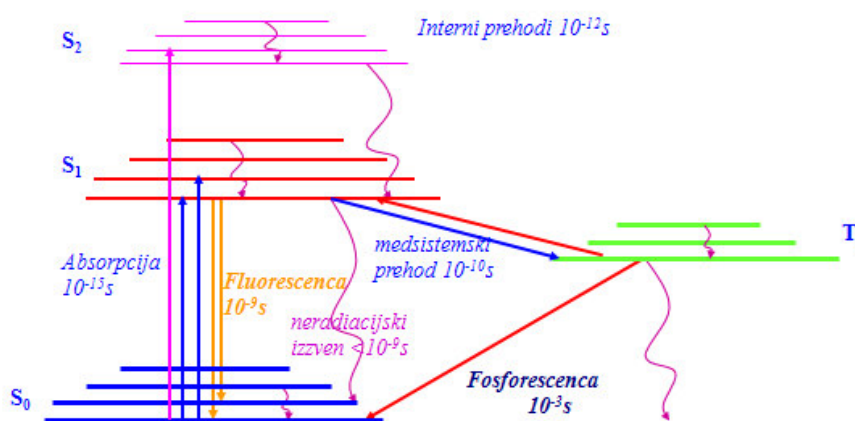
1.1. FLUORESCENCA

Pojav, pri katerem molekula absorbira določene valovne dolžine in posledično ob prehodu v osnovno stanje emitira svetlobo druge, višje valovne dolžine, imenujemo fotoluminiscenca. Le to delimo na fosforescenco in fluorescenco. Kadar emisija svetlobe poteka daljši časovni interval po izpostavitvi ekscitacijski svetlobi, imenujemo ta pojav fosforescenca. Če pa emisija svetlobe poteka samo med izpostavitvijo ekscitacijski svetlobi se ta pojav imenuje fluorescenca.

Fluorescenca je pojav, ki ga je prvič opazoval Sir George Gabriel Stokes leta 1852, fizikalno pa ga je opisal Alexander Jablonski leta 1935. Del molekule, ki je odgovoren za fluorescenco imenujemo fluorofor. Fluorofor v osnovnem energijskem stanju absorbira svetlobno energijo (foton), pri čemer pride do sprememb v elektronskem, vibracijskem in rotacijskem energijskem stanju. Vibracijska relaksacija in fluorescenca sta poglavitni poti vračanja fluoroforov v osnovno energijsko stanje.

- EKSCITACIJSKI IN EMISIJSKI SPEKTER

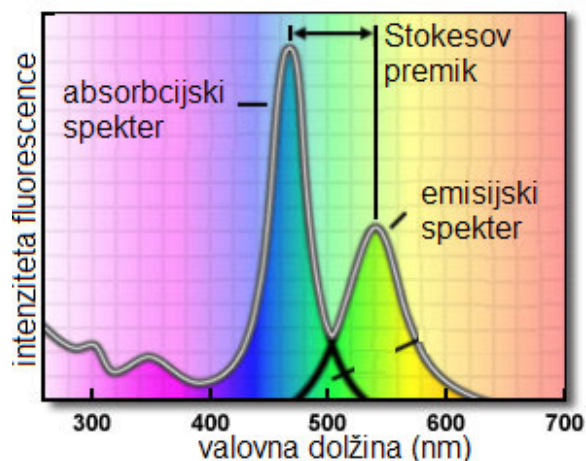
Pojav fluorescence najlažje predstavimo z Jablonskijevim diagramom (slika 1), kjer so predstavljena energijska stanja molekule. Fluorofor, ki ni absorbiral energije, se nahaja v najnižjem vibracijskem stanju osnovnega stanja S_0 . Kadar fluorofor absorbira svetlobo se vsa energija fotona, ki je odvisna od valovne dolžine, prenese na fluorofor. Kadar je ta energija večja, kot je potrebno za preskok elektrona iz osnovnega v vzbujeno energetska stanje, bo molekula podvržena tudi rotacijskim in vibracijskim spremembam. Zato obstaja širok interval valovnih dolžin, ki lahko povzročijo ekscitacijo molekule. Minimalna energija potrebna za fluorescenco je tista, pri kateri pride do prehoda elektrona iz osnovnega S_0 v vzbujeno stanje S_1 .



Slika 1: Jablonski diagram. Prikazan je časovni potek ekscitacije in emisije.

Sposobnost fluorofora, da absorbira foton, označuje molarni ekstincijski koeficient z oznako ϵ ($\text{m}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Fluorofor izgublja pridobljeno energijo na več načinov. Sprva pride do interne konverzije in vibracijske relaksacije. Fluorofor se vrne v najnižje vibracijsko stanje vzbujenega stanja S_1 , pri čemer ne pride do oddajanja fotona, saj se presežna energija prenese na sosednje molekule preko direktnih interakcij. V fluoroforu je končna stopnja izgube prejete energije oddajanje fotona, katerega energija je enaka razliki med najnižjim vibracijskim stanjem S_1 in kateremkoli vibracijskim oz. rotacijskim stanjem S_0 .

Energija oddanega fotona je zaradi interne konverzije in vibracijske relaksacije do najnižjega vibracijskega stanja S_1 manjša kot energija absorbiranega fotona. Spekter emitirane svetlobe je zato pomaknjen k daljšim valovnim dolžinam, kar imenujemo Stokesov premik. Dolžina Stokesovega premika je odvisna od fluorofora. Večji kot je Stokesov premik, lažje ločimo emitirano svetlobo od ekscitacijske svetlobe.



Slika 2: Ekscitacijski in emisijski spekter fluorofora.

Poznavanje absorpcijskih in emisijskih spektrov fluoroforov (slika 2) nam pomaga pri optimalni izbiri filtrov in pri izbiri valovnih dolžin ekscitacijske svetlobe v fluorescenčni mikroskopiji ter pri kombiniranju fluoroforov za istočasno zaznavo večjega števila komponent preiskovanega sistema.

1.2. FLUOROFORI V FLUORESCENČNI MIKROSKOPIJI

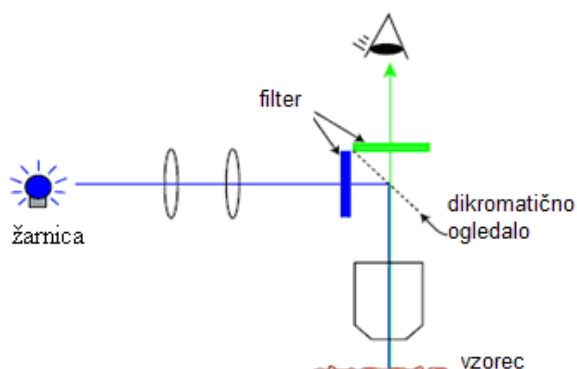
Fluorofore razporejamo glede na značilnosti njihovih absorpcijskih in emisijskih spektrov, valovno dolžino maksimalne absorbance in emisije ter intenziteto emitirane fluorescenčne svetlobe. Fluorofor mora imeti visok kvantni izkoristek pri ekscitacijski valovni dolžini, tako da bodo emitirani fotoni zadostovali za zajem slike visoke ločljivosti pri intenziteti ekscitacijske svetlobe, ki ne povzroča fotobledenja. Izbiramo fluorofora moramo prilagoditi sposobnostim in karakteristikam fluorescenčnega sistema (omejeni smo z valovnimi dolžinami, ki so na voljo za ekscitacijo, emisijskimi filtri ter učinkovitostjo detektorja), s katerim preiskujemo vzorce.

Pri preiskovanju živih celic mora dostava in integracija fluorofora zagotavljati fiziološko in strukturno integriteto celice.

Osnova večine fluoroforov je sintezna aromatska spojina, ki se specifično veže na preiskovano makromolekulo (DNA ali protein), oz. se lokalizira v specifični strukturni regiji, kot je citoskelet, mitohondriji, Golgijev aparat, endoplazemski retikulum in jedro na podlagi kovalentnih, elektrostatskih oz. hidrofobnih interakcij. Poznamo tudi fluorofore, ki so namenjeni sledenju dinamičnih procesov in lokaliziranim spremembam okolja, vključujoč koncentracije kovinskih ionov, pH, reaktivnih kisikovih spojin in spremembam membranskega potenciala. S fluorofori lahko tudi preučujemo celično integriteto, proces apoptoze, endo- in eksocitozo, fluidnost membrane, proteinski transport, prevajanje signalov in encimsko aktivnost. Fluorofor omogoča detekcijo in kvantifikacijo izbrane tarče s fluorimetrijo oz. njeno vizualizacijo s fluorescenčno mikroskopijo.

1.3. EPIFLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA

Po absorpciji ekscitacijske svetlobe ustrezne valovne dolžine fluorofori emitirajo svetlobo daljših valovnih dolžin. Fluorescenčni mikroskop omogoča ločitev emitirane svetlobe daljše valovne dolžine od ekscitacijske svetlobe s katero osvetlimo s fluoroforom označen vzorec. Tip fluorescenčnega mikroskopa, kjer isti objektiv uporabljamo tako za kondenzor ekscitacijske svetlobe kot za zbiranje emitirane fluorescenčne svetlobe, imenujemo epifluorescenčni mikroskop (slika 3). Zaradi skupne optične poti ekscitacijske in emitirane svetlobe mikroskop uporablja dikromatično ogledalo, ki odbija svetlobo manjših valovnih dolžin in prepušča svetlobo večjih valovnih dolžin. Optični sistem vodi ekscitacijsko svetlobo preko ekscitacijskega filtra, ki prepušča svetlobo izbrane valovne dolžine. Le-ta se na dikromatičnem ogledalu pod kotom 90° odbije do objektiva, kateri deluje kot kondenzor ekscitacijske svetlobe in osvetli vzorec. Ekscitacijska svetloba potuje skozi vzorec in v stran od objektiva, ki v tej stopnji služi kot zbiralec emitirane svetlobe. Optični sistem vodi emitirano svetlobo preko dikromatičnega ogledala, ki prepušča samo svetlobo daljših valovnih dolžin, in preko emisijskega filtra do detektorja, kjer se tvori slika vzorca.



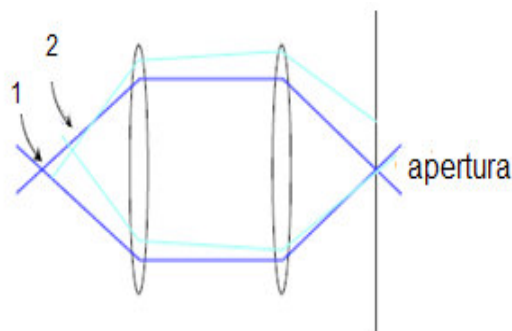
Slika 3: Shema epifluorescenčnega mikroskopa.

1.4. KONFOKALNA MIKROSKOPIJA

Osnovni koncept konfokalne mikroskopije je patentiral Marvin Minsky leta 1961, vendar je zaradi neustreznih svetlobnih virov in slabe računalniške zmogljivosti za obdelavo velikega števila podatkov njegov izum takrat ostal neopažen. Zaradi napredka v laserski in računalniški tehnologiji skupaj z razvojem novih algoritmov za obdelavo podatkov ter relativno enostavnega zajetja visokokakovostnih slik vzorcev, pripravljenih za fluorescenčno mikroskopijo, je prišlo v zadnjih letih do razširjene uporabe laserskih vrstičnih konfokalnih mikroskopov ter razvoja novih aplikacij konfokalne mikroskopije v celični biologiji.

V epifluorescenčnem mikroskopu je celoten vzorec osvetljen z ekscitacijsko svetlobo. Nastala slika, ki je posledica fluorescence, je vidna direktno preko okularja oz. je projicirana na površino elektronskega detektorja. Rezultat je velika količina signala, ki izvira iz fluoroforov nad in pod optično ravnino, kar zmanjša ločljivost in kontrast zajete slike. V nasproti s tem osnovnim konceptom je zajemanje slike v konfokalni mikroskopiji bistveno drugačno in omogoča odstranitev svetlobe, ki ne izvira iz preučevane optične ravnine.

Osnovni pristop v konfokalni mikroskopiji temelji na sestavu para leč, ki ostrita svetlobo iz gorišča ene leče v gorišče druge leče. Na sliki 4 točki 1 in 2 ležita v različnih optičnih ravninah, zato nastaneta sliki točk 1 (v gorišču leče) in 2 na različnih mestih. Cilj konfokalne mikroskopije je opazovati samo sliko, ki nastane v gorišču leče. To dosežemo z postavitvijo zaslona z aperturo (luknjica) za sistemom leč. Apertura namreč prepušča samo svetlobo iz gorišča leče. Z istočasno postavitvijo zaslona z aperturo pred izvor svetlobe dosežemo točkovno osvetlitev vzorca, kar še dodatno zmanjša količino svetlobe, ki ne izvira iz gorišča leče (24).

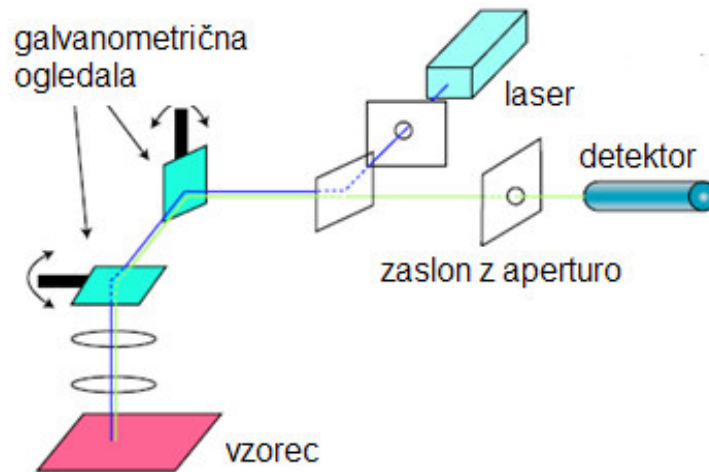


Slika 4: Osnovni princip konfokalne mikroskopije.

Slika, ustvarjena s konfokalnim mikroskopom, je slika tanke planarne regije preparata oz. t.i. optične rezine preparata. Ker je svetloba, ki ne izvira iz dane optične rezine odstranjena dobimo ostrejšo sliko z večjo ločljivostjo.

Pri vrstični konfokalni mikroskopiji v danem trenutku celotna slika ne obstaja, saj je vzorec osvetljen samo v eni točki. Za točkovno skeniranje vzorca je odgovoren sestav dveh računalniško vodenih galvanometričnih ogledal, ki vodita žarek po preiskovanem vzorcu v x in y smeri, kar v povprečju omogoča zajemanje ene slike na sekundo. Fluorescenčna svetloba je preko galvanometričnih ogledal vodena nazaj do aperture, ki prepušča le svetlobo

preiskovane valovne dolžine. Od velikosti aperture je odvisna debelina optične rezine. Čeprav se z zmanjševanjem aperture do določene meje zmanjšuje debelina optične rezine, hkrati zmanjšamo število fotonov, ki so na voljo za detekcijo, kar vodi v znižanje razmerja signal/šum. Svetlobo, ki preide aperturo, zazna fotopomnoževalna cev (PMT), ki proizvede analogni elektronski signal, na podlagi katerega računalnik naknadno sestavi sliko preiskovane optične ravnine.



Slika 11: Shema konfokalnega mikroskopa.

Zaradi točkovnega skeniranja vzorca je v danem trenutku na voljo manj emitiranih fotonov za detekcijo s fotopomnoževalno cevjo. Natančnost meritve se namreč povečuje s številom fotonov, ki pridejo do detektorja. Natančnost ter razmerje signal/šum tako najlažje povečamo z povečanjem intenzitete fluorescence.

Intenziteto fluorescence lahko povečamo z podaljševanjem časa točkovne osvetlitve, vendar to vodi v povečanje časa, ki je potreben za zajetje slike s točkovnim skeniranjem. Podaljševanju časa osvetlitve se lahko izognemo z uporabo večje koncentracije fluorofora oz. povečanjem intenzitete ekscitacijske svetlobe. Tako danes v vrstičnem konfokalnem mikroskopu najdemo močan vir laserske ekscitacijske svetlobe različnih valovnih dolžin.

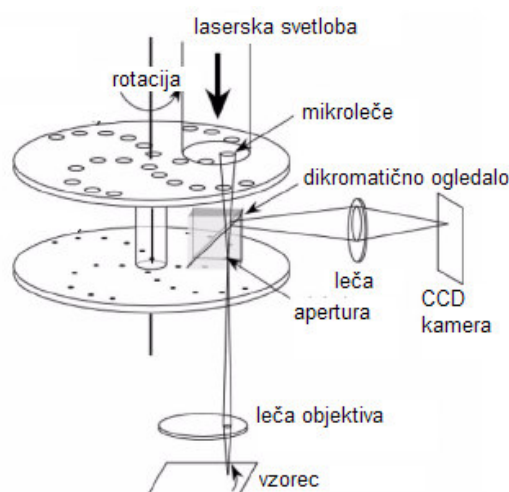
Čeprav laserski vrstični konfokalni mikroskop z izdelovanjem natančnih optičnih rezin omogoča opazovanje struktur v vzorcu večje debeline, je njegova pglavitna pomanjkljivost počasno zajemanje slike. Večina laserskih vrstičnih konfokalnih mikroskopov potrebuje 0.1-1s za zajetje slike. Za veliko dinamičnih procesov v živih celicah je ta časovni interval prevelik, še posebej kadar je potrebna nadaljnja tridimenzionalna rekonstrukcija dogodkov. Primerni so predvsem za preučevanje fiksiranih vzorcev. Zato so bili razviti sistemi, ki omogočajo hitrejše zajemanje slike. Med njimi najdemo konfokalni vrstični mikroskop z akustično-optičnim deflektorjem (AOD), ki nadomešča skenirajoča galvanometrična ogledala in omogoča hitrejše vrstično skeniranje. Nov pristop v konfokalni mikroskopiji pa predstavljajo konfokalni mikroskopi z vrtečim diskom.

1.5. FLUORESCENČNI MIKROSKOP Z VRTEČIM DISKOM

Konfokalni mikroskopi z vrtečim diskom nudijo boljši izkoristek ekscitacijske in emitirane svetlobe, čeprav zagotavljajo manjšo stopnjo konfokalnosti. Optimizirani so za raziskovalce, za katere je hitrost zajemanja slike pomembnejša kot izdelava tankih optičnih rezin, kar je pomembno pri preučevanju 3D oz. 4D dinamike živih celic.

Osnova fluorescenčnega mikroskopa z vrtečim diskom predstavlja Nipkow disk s številnimi majhnimi aperturami in CCD kamera. Razporeditev apertur na disku omogoča, da je ob vrtenju diska osvetljena vsaka točka vidnega polja. Ko z razširjenim žarkom ekscitacijske svetlobe osvetlimo del vrtečega diska, del te svetlobe prehaja disk preko apertur in tako tvori skupino svetlobnih žarkov, ki zaradi rotacije diska vrstično osvetljujejo celotno vidno polje. Vsak žarek je sam po sebi konfokalen, saj je ista apertura namenjena tako ekscitacijski kot tudi emitirani svetlobi.

Fluorescenčni mikroskopi z vrtečim diskom uporabljajo dvodimenzionalni detektor (CCD kamera), ki istočasno zazna intenziteto in prostorski položaj signala. Ker je glede na teoretične ocene celokupna izguba svetlobne informacije pri laserskem vrstičnem konfokalnem mikroskopu in pri fluorescenčnem mikroskopu z vrtečim diskom enaka, je razlika v občutljivosti odvisna predvsem od detektorja. Kvantna učinkovitost trenutno dostopnih CCD kamer je nekajkrat višja kot je kvantna učinkovitost fotopomnoževalne cevi. Večja učinkovitost zaznave fotonov zmanjša fotobledenje in fototoksičnost saj lahko zmanjšamo intenziteto ekscitacijske svetlobe brez vpliva na končno kvaliteto zajete slike. Pri fluorescenčnem mikroskopu z vrtečim diskom je ekscitacijska svetloba razbita na več mini-žarkov nižje intenzitete. Ker pa več žarkov osvetli regijo zaporedno, je emitirana svetloba vseh prehodov zbrana tekom enega osvetlitvenega časa CCD kamere. S tem se osvetlitveni čas izbrane točke preparata poveča več kot 1000-krat v primerjavi z lasersko vrstično konfokalno mikroskopijo.



Slika 12: Princip delovanja CSU.

Proizvajalec Olympus je predstavil DSU (angl.: disk scanning unit) konfokalni mikroskop z vrtečim diskom, ki ohranja optične lastnosti Nipkowega diska, vendar omogoča večjo prepustnost svetlobe. Namesto z aperturami je disk pokrit z režami, ki omogočajo večjo prepustnost, hkrati pa ohranjajo odlično konfokalnost. Na voljo je pet različnih diskov, ki ustrezajo različnim povečavam in numeričnim aperturam objektivov. Postavitev diska v optično pot je motoriziran proces, kar omogoča raziskovalcu enostaven preklon med epifluorescenčno in konfokalno mikroskopijo. Takšen mikroskopski sistem uporabljamo tudi na FFA.

Prednosti fluorescenčnega mikroskopa z vrtečim diskom pridejo do izraza pri opazovanju živih celic saj omogoča hitrejše zajemanje slik ob hkratnem zmanjšanju intenzitete ekscitacijske svetlobe.

1.7. APLIKACIJE FLUORESCENČNE MIKROSKOPIJE V DIAGNOSTIKI

DOLOČANJE ONKOGENA HER 2 PRI KARCINOMU DOJKE*

*povzeto po strokovnem prispevku Določanje onkogenega Her-2 pri karcinomu dojke, Drev P et al

Her-2, imenovan tudi »c-erbB-2« ali »neu«, je transmembranski glikoprotein iz skupine receptorjev rastnih faktorjev. Protein je izražen v nizkih koncentracijah v mnogih normalnih epitelijih, tudi v duktalnem epiteliju dojke. V signifikantno večji meri pa je pomnožen pri eni petini do eni četrtini invazivnih karcinomov dojke. V mnogih raziskavah so dokazali, da je pomnoženi Her-2 neodvisen napovedni dejavnik preživetja posebej pri bolnicah s karcinomom dojke in z limfogenimi zasevki.

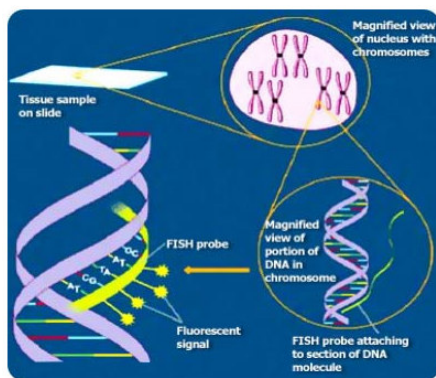
Pomnoženi protein napoveduje dober odziv na adriamicinsko kemoterapijo, hkrati pa slab odziv na tamoksifen celo pri bolnicah z izraženimi estrogenskimi receptorji. V zadnjem času je postalo dokazovanje pomnoženega proteina Her-2 metoda za selekcijo tistih bolnic z metastatskim karcinomom dojke, ki bi bile primerne za imunoterapijo s humaniziranim protitelesom proti Her-2 proteinu, trastuzumabom (Herceptin®). Ugotavljanje Her-2 pri karcinomu dojke, podobno kot določanje steroidnih receptorjev, ne nadomešča, ampak samo dopolnjuje dokazovanje ostalih tradicionalnih prognostičnih znakov, kot so tip tumorja, njegova velikost, gradus in ugotavljanje zasevkov v bezgavkah.

HER-2 LAHKO DOKAZUJEMO NA VEČ NAČINOV

Pomnoženi protein Her-2 je razen v izjemnih situacijah neposredna posledica zvečanega števila kopij gena Her-2, ki se iz neznanega razloga pojavijo v genomu. Zdi se, da je količina pomnoženega proteina Her-2 na membrani tumorski celici odvisna od števila kopij gena Her-2. Status Her-2 lahko določimo torej na dva načina. Število kopij gena Her-2 lahko analiziramo

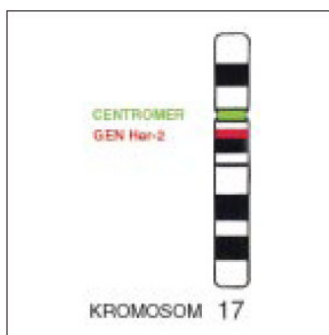
z metodo fluorescentne hibridizacije in situ (FISH), množino membranskega proteina Her-2 pa z imunohistokemijo. Obe metodi sta v kirurški patologiji izjemno praktični, saj lahko za preiskave uporabljamo tumorsko tkivo iz standardnih parafinskih blokov.

Metoda FISH, hibrid molekularne biologije in citogenetike, je novejša metoda prikazovanja nukleinskih kislin. Pri FISH izkoristimo osnovno lastnost nukleinskih kislin prileganja dveh komplementarnih enojnih verig. Proces imenujemo hibridizacija. V praksi predhodno označimo eno od verig DNK. Tako označeno verigo DNK imenujemo sonda. Potem ko komplementarna sonda prileže na iskano verigo DNK v jedru, lahko s primerno detekcijsko metodo prikažemo nastali hibrid. V primerjavi z ostalimi molekularnimi metodami ima FISH to prednost, da nukleinskih kislin iz vzorca ne ekstrahiramo, ampak ostane preiskovano tkivo ohranjeno. Na poseben način obarvan histološki preparat analiziramo s fluorescentnim mikroskopom.



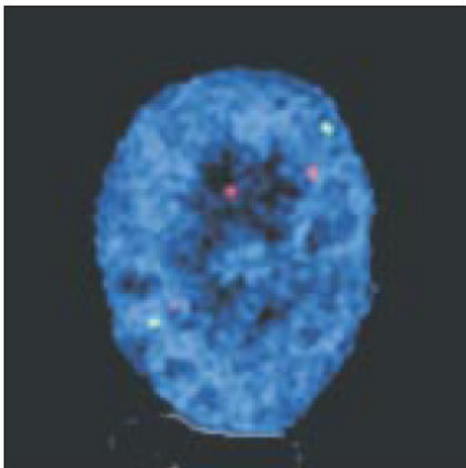
Na splošno velja, da lahko z metodo FISH prikažemo v jedru lokalizacijo in število kopij DNK. Razen pri spolnih kromosomih pričakujemo zaradi dvojnih kromosomov v interfazi v vsakem običajnem jedru po dva signala iste DNK. Metodo FISH uporabljamo najpogosteje za odkrivanje štirih osnovnih kromosomskih sprememb aneuploidije, genskih delecij, translokacij in pomnožitev.

Pri karcinomu dojke nas zanima zadnja kromosomska sprememba, to je pomnožitev specifičnega gena. Gen Her-2 leži na kromosomu 17 (slika 2).

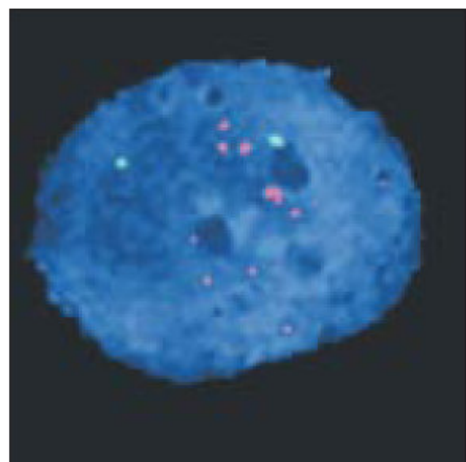


Slika 2. Na shemi kromosoma 17 sta označeni mesti za centromer (zeleno) in za gen Her-2 (rdeče).

V običajnih celicah najdemo torej po dva kromosoma 17 in na vsakem od njiju po en gen Her-2. Teoretično bi bilo vsako število jedrnih genskih kopij, ki je večje od dve, že znak pomnožitve. Ker pa je pri invazivnih karcinomi dojke aneuploidija kromosoma 17 zelo pogosta, saj so kromosomi pomnoženi po nekaterih raziskavah v 47% primerov, je povečano število kopij gena Her-2 lahko posledica polisomije kromosoma 17, in ne pomnožitve. Če ne bi poznali števila kromosomov 17, bi v takem primeru samo po številu signalov lahko napačno ugotovili pomnožitev. To velja še posebej takrat, ko je število kopij gena Her-2 le malo zvišano. Za natančnejšo interpretacijo rezultatov uporabljamo zato dve sondi. Z eno prikažemo število signalov gena, z drugo pa število centromerov kromosoma 17 in s tem število kromosomov 17. Lokalizacije genov so v fluorescentnem mikroskopu obarvane rdeče, centromeri pa zeleno (slika 3). V analizi vzorca preštejemo signale v 60 jedrih tumorskih celic invazivne komponente tumorja. O pomnožitvi sklepamo na podlagi razmerja števila signalov gena Her-2 in števila signalov centromera kromosoma 17. Če je količnik med obema enak ali večji od 2, govorimo o pomnožitvi Her-2 protoonkogene (slika 4). Če je količnik manjši od 2, ni pomnožitve. FISH je kvantitativna metoda s 100% specifičnostjo in 96-98% senzitivnostjo. Preiskava traja tri dni.



Slika 3. Celica duktalnega epitela dojke z običajnim številom zelenih signalov (2) za centromer kromosoma 17 in rdečih signalov (2) za gen Her-2.



Slika 4. Celica invazivnega karcinoma dojke. Običajno število zelenih signalov (2) za centromer kromosoma 17 in povečano število rdečih signalov (najmanj 8) za gen kaže na očitno pomnožitev gena Her-2.

1.8. RAZISKOVALNI PROBLEM

Protein A sestavljata podenoti α in β , ki se v endoplazemskem retikulumu nekovalentno povežeta v heterodimer. Protein A se preko Golgijevega aparata izloča iz celice. Posamezni podenoti sta biološko neaktivni. Kot mnogo drugih glikoproteinov tudi protein A kaže visoko stopnjo strukturne heterogenosti na nivoju posttranslacijskih modifikacij, ki je posledica razlik v količini in sestavi oligosaharidov, med katerimi najbolj izstopa količina sialične kisline.

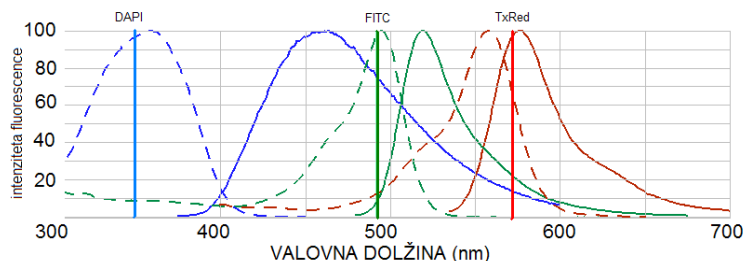
Cilj raziskovalnega problema je opredeliti vzroke nizki količini rekombinantnega proteina A izločenega v ekstracelularni prostor rCHO celic, gojenih v perfuzijskem bioreaktorju. Kot možen vzrok nizki produktivnosti rCHO celice smo predpostavili morebitne napake v celičnem procesiranju rekombinantnega proteina A, ki bi lahko vodile v nezmožnost sestavljanja heterodimernega proteina A oziroma v akumulacijo heterodimernega proteina A oz. posamičnih podenot v celici. Na lastnosti celičnega procesiranja proteina A smo sklepali na podlagi lokalizacije proteina A ter posamičnih podenot v rCHO celici.

Po optimizaciji postopka označevanja proteina A ter obeh podenot smo s fluorescenčno mikroskopijo s pomočjo označevanja različnih celičnih struktur ter istočasnega označevanja dimernega proteina A ter posamičnih podenot ugotavljali lokalizacijo le-teh v celici.

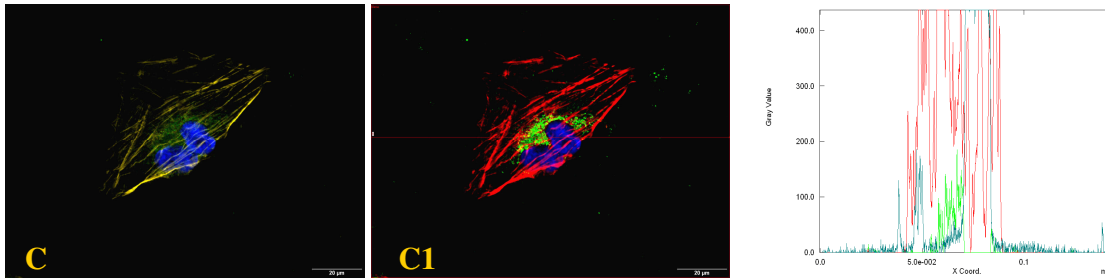
1.8.1. LOKALIZACIJA PROTEINA A, PODENOTE α IN PODENOTE β V CELICI

Z istočasnim označevanjem jedra, aktinskih niti ter heterodimernega proteina A oziroma posamičnih podenot smo ugotavljali lokalizacijo proteina A ter podenote α in β v celični citoplazmi. Z označevanjem aktina, ki je del celičnega skeleta, smo lahko določili strukturne meje ene same celice, medtem ko jedro pripomore k umestitvi drugih struktur v lumnu celice.

Zaradi prekrivanja absorpcijskih spektrov uporabljenih fluorofor (slika 26) smo morali prispevke fluorofor k posameznemu barvnemu kanalu pred interpretacijo zajetih slik prispevke uporabljenih fluoroforov k posameznemu barvnemu kanalu.



Prekrivanje absorpcijskih (prekinjena črta) in emisijskih (polna črta) spektrov uporabljenih fluorofor (a). Hoechst (modra črta), fluorescein (zeleno črta), rodamin (rdeča črta). DAPI, FITC, TxRed = ekscitacijski filtri, ki so na voljo v okviru fluorescenčnega mikroskopskega sistema Cell^R.



Slika 27: Lokalizacija proteina A in B v rCHO celici.

C/ C1: protein A (pred / po izvedbi funkcije Unmixing); GRAF A1/B1/C1: profil intenzitete fluorescence in izbranem delu (rdeča črta) slik A1/B1/C1.

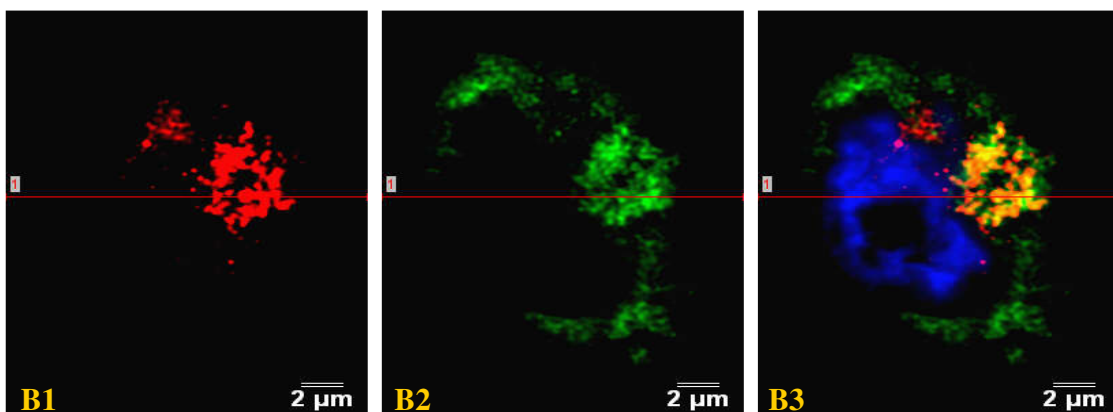
Kot je razvidno iz zajetih slik (slika 27) in profilov intenzitete se heterodimerni protein A, ter posamični podenoti α in β v največji meri nahajajo v okolici jedra.

S preučevanjem zajetih optičnih rezin smo ugotovili, da so heterodimerni protein A, kakor tudi posamezni podenoti α in β , v celici lokalizirani. Ker spada protein A med glikoproteine, sklepamo, da se protein A, podenota α in podenota β nahajajo v endoplazemskem retikulumu

oz. Golgijevem aparatu, ne pa v citosolu.

Z istočasnim označevanjem jedra, Golgijevega aparata ter heterodimernega proteina A in posameznih podenot smo ugotavljali lokalizacijo heterodimernega proteina A ter posamičnih podenot v Golgijevem aparatu. Na podlagi rezultatov smo lahko sklepali na lastnosti celičnega procesiranja rekombinantnega proteina A.

KOLOKALIZACIJA PROTEINA A Z GOLGIJEVIM APARATOM

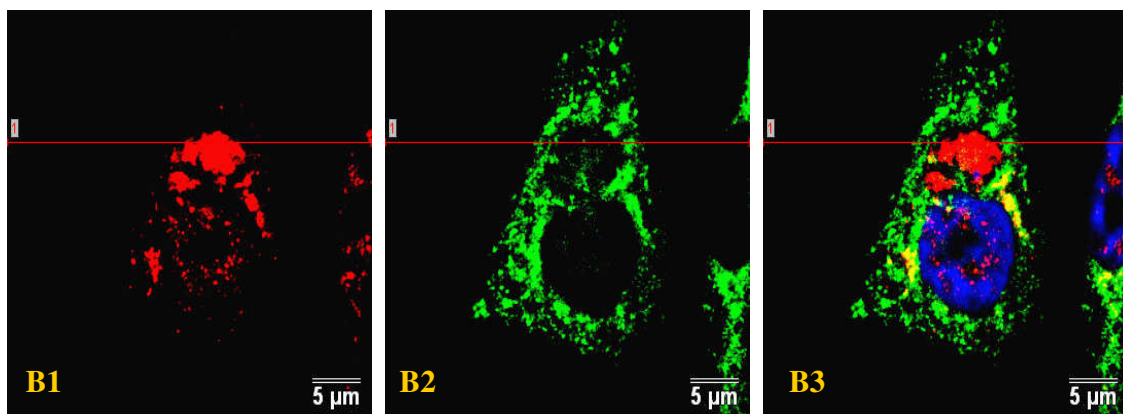


Kolokalizacija proteina A z proteinom GM130 (α).

B1: kanal TxRed (protein GM130) ; B2: kanal FITC (protein A), B3: združeni kanali (TxRed, FITC, DAPI).

Glede na to, da smo dokazali lokalizacijo proteina A v Golgijevem aparatu v vseh preiskovanih celicah (štiri izmed njih prikazujeta sliki 32 in 33), lahko zaključimo, da se protein A ne zadržuje v endoplazemskem retikulumu rCHO celic in da akumulacija rekombinantnega proteina A v celici ni vzrok zmanjšani količini izločenega rekombinantnega proteina A v biorektorsko gojišče.

KOLOKALIZACIJA PODENOTE β Z GOLGIJEVIM APARATOM

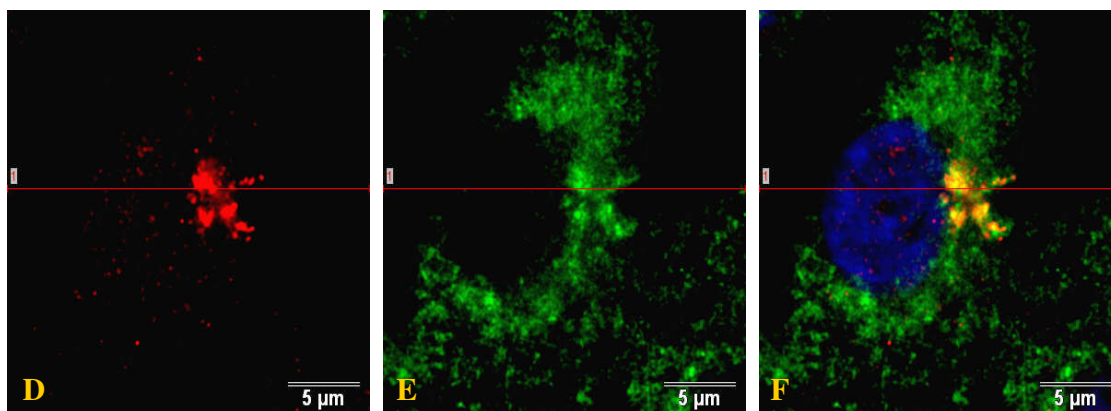


Kolokalizacija podenote β z proteinom GM130 (a).

B1: kanal TxRed (protein GM130) ; B2: kanal FITC (podenota β), B3: združeni kanali (TxRed, FITC, DAPI).

Pri večini analiziranih celic (štiri izmed njih prikazujeta sliki 39 in 40) se podenota β ne nahaja v Golgijevem aparatu, zato sklepamo, da se podenota β po translaciji in pravilnem zvitju ter glikozilaciji, zadržuje v endoplazemskem retikulumu in samostojna ne prehaja iz endoplazemskega retikuluma v Golgijev aparat. Naša opažanja se skladajo tudi z literaturnimi podatki.

KOLOKALIZACIJA PODENOTE α Z GOLGIJEVIM APARATOM



Kolokalizacija podenote α z proteinom GM130 (α).

D: kanal TxRed (protein GM130) ; E: kanal FITC (podenota β), F: združeni kanali (TxRed, FITC, DAPI).

Pri večini analiziranih celic, katere smo preučili (štiri izmed njih prikazujeta sliki 44 in 45) se podenota α nahaja v Golgijevem aparatu. Sklepamo, da lahko podenota α po translaciji in pravilnem zvitju ter glikozilaciji v endoplazemskem retikulumu brez predhodne vezave na podenoto β prehaja iz endoplazemskega retikuluma v Golgijev aparat in se lahko samostojna izloča iz celice. V Golgijevem aparatu lahko poteče O-glikozilacija podenote α , s čimer se prepreči njena vezava s podenoto β .

Preučevali smo problem nizkega izločanja rekombinantnega proteina A v biorektorsko gojišče. S preučevanjem kolokalizacije proteina A, podenote α in podenote β z Golgijevim aparatom smo dokazali, da je celično procesiranje proteina A skladno z osnovnimi načeli posttranslacijskega procesiranja glikoproteinov. Majhen delež rCHO celic v katerem se nahaja rekombinantni protein A hkrati nakazuje, da vzroki za nizko ekspresijo rekombinantnega proteina A najverjetneje ležijo na nivoju translacijskih mehanizmov in ne na nivoju celičnega procesiranja proteinov, kot smo to sprva domnevali.

2. NAVODILA ZA DELO : OZNAČEVANJE CELIČNIH STRUKTUR

2.1. MATERIALI IN APARATURE

- medij DMEM (Sigma, Chemical Co. St. Louis, ZDA)
- paraformaldehid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija)
- Triton X-100 (Aldrich, Nemčija)
- goveji serumski albumin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija)
- Hoechst 33342[®] (Molecular Probes[™], Invitrogen)
- MitoTracker Red CMXRos[®] (Molecular Probes[™], Invitrogen)
- Rhodamine Phalloidin[®] (Molecular Probes[™], Invitrogen)
- protitelesa proti govejemu α -tubulinu, proizvedeno v miši (Molecular Probes[™], Invitrogen)
- sekundarno protitelo proti mišjim IgG, konjugirano z fluoroforom AlexaFluor 488, proizvedeno v kozi (Molecular Probes[™], Invitrogen)
- ProLong[®] Antifade kit (Molecular Probes[™], Invitrogen)
- bidestilirana sterilna voda
- krovna stekelca Assistent 50 Elka (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Nemčija)
- objektna stekla Assistent 50 (Elka Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Nemčija)
- fluorescenčni mikroskopski sistem Cell^R : fluorescenčni mikroskop IX81, svetlobni vir MT-20, vrteči disk DSU (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Nemčija)
- invertni svetlobni mikroskop CX40-SL (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg,
- računalniška programska oprema:
 - Cell^R (Olympus)

2.1. PRIPRAVA CELIČNIH KULTUR

- PRIPRAVA CELIČNE KULTURE

Krovna stekelca, ki smo jih predhodno sterilizirali z avtoklaviranjem, bomo položili v mikrotitrne ploščice. Na krovna stekelca bomo nato nasadili $1.5 \cdot 10^5$ HEPG2 celic ($C = 0.5 \cdot 10^5$ celic/mL, $V = 3$ mL) v ustreznem mediju. Celice bomo inkubirali 24 ur v inkubatorju pri 5% CO_2 in 37°C , da so se namnožile in oprijele podlage.

- PRIPRAVA PBS

Za spiranje celične kulture in pripravo ostalih reagentov bomo uporabili fosfatni pufer s pH 7,4 (PBS). Pripravimo ga z raztapljanjem 80 g NaCl, 2 g KCl, 36.3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ in 2.4 g KH_2PO_4 v 800 mL destilirane vode. Po uravnavi pH na 7.4 s HCl dopolnimo do 1 litra z destilirano vodo. Pred uporabo tako pripravljeno raztopino steriliziramo, razdelimo v alikvote in pred končno uporabo redčimo v razmerju 1:10 s sterilno bidestilirano vodo.

- FIKSACIJA CELIC

Poznamo tri načine trajne ohranitve strukturne organizacije celice. Fiksacija s premreževanjem, fiksacija z precipitacijo ter fiksacijo z zamrzovanjem. Fiksacija s premreževanjem je najpogosteje uporabljena metoda v fluorescenčni mikroskopiji. Najpogosteje uporabljeni reagenti so aldehidi, ki preko tvorbe inter- in intra-molekularnih kovalentnih vezi z aaminsko skupino omogočajo premreženje proteinov in nukleinskih kislin. Formaldehid je pogosto reagent izbire. Za fiksacijo celic bomo uporabili 4% raztopino paraformaldehida v PBS.

- PERMEABILIZACIJA CELIC

Po fiksaciji celic sledi permeabilizacija celične membrane, da omogočimo vstop fluorescenčnih barvil in primarnih ter sekundarnih protiteles. Za permeabilizacijo lahko uporabimo organska topila oz. detergente.

Za permeabilizacijo HEPG2 celic bomo uporabili detergent Triton X-100, ki učinkovito permeabilizira celične membrane, hkrati pa ne vpliva na proteinske interakcije ter spremembo epitopov.

Zaradi visoke viskoznosti Tritona X-100 bomo najprej pripravili 20% raztopino Tritona X-100 v PBS, ki jo bomo po potrebi redčili do delovne, 0.25% raztopine Tritona X-100 v PBS.

- **PREPREČEVANJE BLEDENJA FLUORESCENČNIH BARVIL**

Po izpostavitvi ekscitacijski svetlobi pogosto pride do t.i. foto-bledenja, ki je posledica reakcije fluorofora s kisikom in kisikovimi radikali. Za preprečevanje foto-bledenja bomo uporabili ProLong Antifade Kit[®], ki inhibira nastanek in difuzijo reaktivnih kisikovih spojin. Predhodno ogreti komponenti A (ProLong[®] medij) in B (ProLong[®] reagent) zmešamo, vorteksiramo ter s kratkim centrifugiranjem odstranimo morebitne zračne mehurčke v viskozni mešanici. Na skoraj posušen vzorec kanemo kapljico mešanice, ter vzorec počasi prekrijemo s krovnim stekelcem. Predno krovno stekelce dokončno fiksiramo in shranimo vzorce pri – 20°C, počakamo, da se ProLong[®] medij posuši, saj je ProLong[®] reagent občutljiv na vlago in lahko po določenem času razpade.

SKUPINA 1/2/3/

2.1.2. OZNAČEVANJE CELIČNIH JEDER

Fluorescenčno barvanje celičnih jeter se pogosto porablja za ugotavljanje faze celičnega cikla in za razlikovanje med različnimi celičnimi populacijami. Hkrati nam jedro pomaga pri preučevanju in prostorski umestitvi drugih celičnih struktur v celici. Najpogosteje barvila delujejo kot interkalatorji DNA (etidijev bromid, propidijev jodid) ter preko vezave v mali žleb DNA (DAPI, Hoechst).

- **HOECHST 33342**
(*Ek. maks.: 350 nm / Em. maks.: 461 nm; filter: DAPI*)

Hoechst, barvilo bis-benzimidinskega tipa, prosto prehaja celično membrano in se veže v mali žleb DNA, pri čemer regije, bogate z AT pari, močno ojačajo fluorescenco. Zaradi ekscitacije v UV področju in relativno velikega Stokesovega premika je barvilo uporabno za kombinacijo z drugimi fluorofori. Primerno je za barvanje fiksiranih in živih celic.

Osnovno raztopino barvila Hoechst 33342 (1 mg/mL) pred uporabo redčimo z PBS do delovne koncentracije 5 µg/mL.

- **POSTOPEK PRIPRAVE PREPARATA**

- Odstranili bomo celični medij nad kulturo HEPG2 celic,
- spirali bomo s PBS,
- fiksirali bomo v 4% formaldehidu (10 min),
- spirali bomo s PBS,
- inkubirali bomo z barvilom Hoechst (5 µg/mL, 30 min),
- spirali smo s PBS.

→ **POSTOPEK I**

SKUPINA 1

2.1.3. OZNAČEVANJE AKTINSKIH NITI

- RODAMIN FALOIDIN®
(*Ek. maks.: 540 nm / Em. maks.: 565 nm; filter: TxRed*)

Strukturni protein aktinskih niti (F-aktin) učinkovito označimo z uporabo falotoksinov, označenih s fluorofori. Falotoksini, izolirani iz gobe *Amanthia phalloides*, so biciklični peptidi, ki se vežejo v aktivno mesto polimeriziranega F-aktina, pri čemer je nespecifična vezava zanemarljiva. Afiniteta vezave se ne spreminja glede na vrsto preiskovanega organizma. Uporabili smo faloidin označen s fluoroforo rodaminom.

Osnovno raztopino koncentracije 200 enot/mL smo pred uporabo redčili z 1% BSA v PBS do končne koncentracije 5 enot/mL.

- POSTOPEK PRIPRAVE PREPARATA
 - Odstranili bomo celični medij nad kulturo HEPG2 celic,
 - spirali bomo s PBS,
 - fiksirali bomo v 4% formaldehidu (10 min),
 - spirali bomo s PBS,
 - permeabilizirali bomo z 0.25 % raztopino Tritona-X 100 (10 min),
 - jedro smo označili po *postopku 1*,
 - inkubirali bomo z raztopino Rodamin Faloidin-a (5 enot/mL, 30 min),
 - spirali bomo s PBS,
 - delno bomo osušili celice in dodali ProLong Antifade reagent.

SKUPINA 2

2.1.4. OZNAČEVANJE MITOHONDRIJEV

Mitochondriji so pleomorfni organeli, katerih struktura je odvisna od celičnega tipa, celičnega cikla in metabolnega stanja celice. Privzem barvil v mitochondrije v večini primerov temelji na mitohondrijskem membranskem potencialu. Konvencionalna barvila kot sta rodamin 123 in tetrametilrozamin, se po izgubi membranskega potenciala zaradi fiksacije hitro izplavijo iz celice. MitoTracker® barvila pa omogočajo vezavo fluorofore tudi po fiksaciji z formaldehidom.

- MITOTRACKER RED CMXRos®
(*Ek. maks.: 579 nm / Em. maks.: 599 nm; filter: TxRed*)

MitoTracker® barvila vsebujejo klorometilno skupino, ki preko reakcije s tiolno skupino omogoča zadrževanje fluorofora v mitohondriju tudi po izgubi membranskega potenciala. Pred uporabo smo osnovno raztopino redčili z predhodno ogretim svežim medijem do končne koncentracije 50 nM.

- **POSTOPEK PRIPRAVE PREPARATA**

- Odstranili bomo celični medij nad kulturo HEPG2 celic,
- inkubirali bomo z raztopino MitoTracker®-ja (50 nM, v inkubatorju, 30 min),
- odstranili bomo raztopino MitoTracker®-ja,
- spirali bomo s PBS,
- fiksirali smo v 4% formaldehidu (10 min),
- jedro smo označili po *postopku I*,
- delno smo osušili celice in dodali ProLong Antifade reagent.

SKUPINA 3

2.1.5 OZNAČEVANJE MIKROTUBULOV

Mikrotubuli so zgrajeni iz tubulina in sestavljajo del celičnega skeleta. Ker so dinamični celični elementi je ohranitev njihove notranje strukture težka. Ker spontano razpadejo pri nižjih temperaturah je potrebno paraformaldehid predhodno ogreti na fiziološko temperaturo celice (37°C). Mikrotubule smo s fluoroforo označili posredno s pomočjo primarnih in sekundarnih protiteles.

- **PRIMARNA PROTITELESA**

Uporabili bomo v miših proizvedena monoklonska primarna protitelesa, ki prepoznajo 65-97 amiokislino zaporedje N-terminalnega konca govejega α -tubulina. Prepoznajo tudi α -tubulin v HEPG2 celicah.

Osnovno raztopino primarnih protiteles bomo pred uporabo redčili z 3% BSA v PBS do delovne koncentracije 1 μ g/mL.

- **SEKUNDARNA PROTITELESA**

(*Ek. maks.: 494 nm / Em. maks.: 519 nm; filter: FITC*)

Za zaznavo primarnih protiteles smo uporabili v kozi proizvedena protitelesa proti mišjim IgG, označena z fluoresceinom. Osnovno raztopino sekundarnih protiteles smo pred uporabo redčili z 3% BSA v PBS do delovne koncentracije 2 μ g/mL.

- POSTOPEK PRIPRAVE PREPARATA

- Odstranili smo celični medij nad kulturo CHO celic,
- spirali smo s PBS,
- fiksirali smo v 4% formaldehidu (10 min),
- spirali smo s PBS,
- permeabiliziramo z 0.25 % raztopino Tritona-X 100 (10 min),
- jedro smo označili po *postopku I*,
- inkubirali smo z 3% raztopino BSA (10 min),
- inkubirali smo z raztopino primarnih protiteles proti α -tubulinu (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 45 min),
- spirali smo s PBS,
- inkubirali smo z raztopino sekundarnih protiteles (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 min),
- spirali smo s PBS,
- delno smo osušili celice in dodali ProLong Antifade reagent