

CVIČENÍ Z BUNĚČNÉ BIOLOGIE

5. CYTOSKELET

TEORETICKÝ ÚVOD:

Cytoskelet je vysoce dynamická proteinová struktura buňky, která je neustále reorganizována během změn tvaru buněk, buněčného dělení a reakcí na okolní podněty. Cytoskelet určuje nejen tvar buňky a rozmístění organel, ale odpovídá také za buněčný i vnitrobuněčný pohyb, jako je rozchod chromozomů během mitózy, pohyb organel, bičků a řasinek a také svalový stah.

Cytoskelet je tvořen třemi typy vláken: mikrotubuly, mikrofilamenty a intermediálními filamenty. Mikrotubuly jsou tvořeny proteinem tubulinem a odpovídají za pohyb na intracelulární úrovni (měchýřkový transport) a také za tvorbu dělicího vřeténka během mitózy. Mikrofilamenta jsou tvořena bílkovinou aktinem a jsou spojena především s pohybem celé buňky. Intermediální filamenta jsou pak tvořena například keratinem ale i jinými proteiny. Intracelulární rozmístění jednotlivých cytoskeletálních složek se od sebe také liší. Mikrotubuly volně prostupují celou buňku, mikrofilamenta tvoří hustou síť těsně pod cytoplazmatickou membránou a intermediální filamenta se vyskytují hlavně v jádře, kde vytváří jadernou laminu. S cytoskeletem jsou navíc asociovány další proteiny, které jednak zajišťují jeho stabilitu či se podílejí na dynamice pohybu. Jako příklad proteinů asociovaných s cytoskeletem je možné jmenovat dynein a kinesin pro mikrotubuly a myosin pro aktinová mikrofilamenta.

Poznatky získané studiem cytoskeletu se uplatňují v medicíně při léčbě některých nádorových onemocnění, kdy se používají látky označované jako mikrotubulární inhibitory např. taxol, vinblastin, kolchicin, které blokují buněčné dělení. Mikrotubulární jed kolchicin se pevně váže k volným tubulinovým podjednotkám, a tím znemožňuje jejich polymeraci do mikrotubulárních vláken. Po ovlivnění buněk kolchicinem nedochází během mitózy k tvorbě

dělicího vřeténka a segregaci chromozomů do dceřiných buněk, což vede k navození buněčné smrti.

Pro studium cytoskeletu se namísto světelné mikroskopie nejčastěji využívá mikroskopie fluorescenční, která se díky využití vhodných fluorescenčních prób vyznačuje výrazně vyšší citlivostí, specifitostí a lepším kontrastem zobrazení. Jako zdroj záření se v případě fluorescenční mikroskopie nejčastěji využívá rtuťová výbojka. Nedílnou součástí fluorescenčního mikroskopu jsou rovněž tzv. excitační filtry, které ze světelného zdroje propouští záření o určité vlnové délce, které je nezbytné pro vyvolání fluorescence daného fluorochromu. Bariérový filtr pak brání vstupu excitačního světla do okuláru a chrání zrak před poškozením.

Praktické cvičení bude zaměřeno na vizualizaci mikrotubulů v nádorové buněčné linii HeLa pomocí metody nepřímé imunofluorescence. Principem této metody je vazba specifické protilátky na molekuly tubulinu. Po vytvoření komplexu je tato primární protilátka naznačena protilátkou sekundární nesoucí fluorescenční značku, které po ozáření světlem o vhodné vlnové délce emituje záření. Pro lepší orientaci v preparátu je následně za použití DNA interkalačního barviva DAPI naznačeno buněčné jádro. Použité fluorochromy se vždy musí lišit svými excitačními i emisními spektry.

Úkol č. 1: Vizualizace mikrotubulů a buněčných jader

Materiál: buněčná linie HeLa zafixovaná na krycím sklíčku

Chemikálie: PBS, 0,2% triton X-100 v PBS, 0,2% BSA v PBS, protilátka proti α -tubulinu (myší monoklonální protilátka), sekundární protilátka nesoucí fluorescenční značku Alexa Fluor 488 (králičí protilátka specifická proti myší protilátce), DAPI (10 mg/ml), mowiol

Pomůcky: kultivační šestijamkový panel, pinzeta, preparační jehla, destička potažená parafilmem, podložní sklíčka

Postup:

- 1. Krycí sklíčka se zafixovanými buňkami HeLa byla předem připravena vedoucím cvičení. Buňky byly vysazeny na sterilní krycí sklíčka potažená želatinou. Druhý den po jejich*

*adherování byly buňky promyty PBS a následně zafixovány 4% roztokem formaldehydu.
Takto zafixované vzorky byly skladovány při 4 °C.*

2. Sklíčko se zafixovanými buňkami vložte do jamky šesti jamkového panelu lícovou stranou s buňkami nahoru.

Rehydratace:

3. Do jamky přidejte 2 ml PBS a rehydratujte buňky několik minut. Poté PBS odpipetujte.

Permeabilizace

4. Přidejte 2 ml 0,2% roztoku tritonu X-100 v PBS a ihned odpipetujte.
5. Sklíčko se zafixovanými buňkami 3x promyjte 2 ml roztoku PBS a následně odpipetujte.

Blokování

6. Do jamky přidejte 2 ml 0,2% BSA v PBS a inkubujte 10 min pro blokování nespecifických vazeb.

Primární protilátka proti α -tubulinu

7. Primární protilátku zředte 50x v roztoku 0,2% BSA v PBS.
8. 50 μ l zředěné protilátky napipetujte na destičku potaženou parafilmem (bez bublin) a následně položte krycí sklíčko lícovou stranou s buňkami dolů do roztoku protilátky.
9. Inkubujte po dobu 30 min.
10. Krycí sklíčko přeneste do jamky 6ti jamkového panelu lícovou stranou nahoru.
11. Sklíčko se zafixovanými buňkami 3x promyjte 2 ml roztoku PBS a následně odpipetujte.

Sekundární protilátka

12. Sekundární protilátku zředte 500x v roztoku 0,2% BSA v PBS.
13. 50 μ l zředěné protilátky napipetujte na destičku potaženou parafilmem (bez bublin) a následně položte krycí sklíčko lícovou stranou s buňkami dolů do roztoku protilátky.
14. Inkubujte po dobu 30 min ve TMĚ.
15. Krycí sklíčko přeneste do jamky 6ti jamkového panelu lícovou stranou nahoru.
16. Sklíčko se zafixovanými buňkami 3x promyjte 2 ml roztoku PBS a následně odpipetujte.

Barvení DNA fluorescenčním barvivem DAPI

17. 1500x zředte DAPI do roztoku PBS.

18. 50 μ l zředěného DAPI napipetujte na destičku potaženou parafilmem (bez bublin) a následně položte krycí sklíčko lícovou stranou s buňkami dolů do roztoku DAPI.
19. Inkubujte po dobu 15 min ve TMĚ.
20. Krycí sklíčko přeneste do jamky 6ti jamkového panelu lícovou stranou nahoru.
21. Sklíčko se zafixovanými buňkami 3x promyjte 2 ml roztoku PBS a následně odpipetujte.
22. Opláchněte sklíčko 2 ml destilované H₂O.

Vytvoření trvalého preparátu

23. Na podložní sklíčko napipetujte sestřiženou špičkou 10 μ l montovacího činidla mowiol (bez bublin) a následně přiklopte krycím sklíčkem lícovou stranou dolů.
24. Sklíčka jsou uchována ve tmě při 4 °C.

Pozorování ve fluorescenčním mikroskopu

25. Jádra obsahující DNA jsou díky DAPI zbarvena modře, zatímco mikrotubuly díky fluorescenční značce Alexa Fluor 488 zeleně.
26. Zakreslete buňku linie HeLa s obarveným jádrem a mikrotubuly do protokolu.

Otázky:

1. Zjistěte, jaká je vlnová délka excitační a emisního spektra pro Alexa Fluor 488.
2. Srovnajte v tabulce jednotlivé typy cytoskeletálních vláken z hlediska jejich složení, velikost, umístění a funkce.

Použitá literatura:

AescuLab – systematické laboratorní vzdělávání studentů a pracovníků VaV v oblasti Life Sciences s podporou e-learningu, úloha číslo AE-211: Příprava buněk pro mikroskopickou analýzu.