

CYTOSZKIELET - część 1

Barwienie komórek metodą Pena

Cytoszkielec to występująca we wszystkich komórkach eukariotycznych skomplikowana sieć filamentów białkowych rozciągających się wewnątrz cytoplazmy. Cytoszkielec zbudowany jest z trzech rodzajów filamentów: filamentów aktynowych zwanych również mikrofilamentami, filamentów pośrednich i mikrotubul. Układy tych filamentów są ze sobą powiązane zarówno strukturalnie jak i funkcjonalnie. Oddziałują również (czasem za pośrednictwem złożonych kompleksów białkowych) z błonami i organellami komórkowymi, a także, poprzez białka błonowe, z macierzą zewnątrzkomórkową. Cytoszkielec, zgodnie ze swoją nazwą może pełnić w komórce funkcje podporowe nadające jej mechaniczną wytrzymałość (filamenty pośrednie), ale wbrew swojej nazwie elementy cytoszkieletu są strukturą wysoce dynamiczną. Mogą one ulegać szybkiej reorganizacji w komórce w wyniku aktywacji przez bodźce zewnętrzne. Filamenty aktynowe i mikrotubule stanowią "tory", po których poruszają się białka motoryczne wykorzystujące energię chemiczną do transportu organelli błonowych, przemieszczania się filamentów względem siebie lub błon. Cytoszkielec może uczestniczyć również w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu sygnałów.

Ćwiczenie ma na celu zapoznanie się z budową, organizacją i funkcją cytoszkieletu w różnych typach komórek zwierzęcych.

Ćwiczenie obejmuje:

I. **część seminaryjną**- wygłoszenie referatów związanych z budową cytoszkieletu i dyskusja dotycząca przedstawionych treści.

Tematy referatów:

1. **Organizacja cytoszkieletu aktynowego w komórkach niemięśniowych**
2. **Cytoszkielec mikrotubularny – budowa i organizacja w różnych typach komórek**

II. część doświadczalną –

polegającą na inkubacji wybranych komórek zwierzęcych w hodowli *in vitro* w pełnej pożywce hodowlanej oraz w takiej samej pożywce z dodatkiem czynników destabilizujących filamenty aktynowe oraz mikrotubule i porównaniu morfologii tych komórek.

Ćwiczenie umożliwi też zapoznanie się z metodami utrwalania i barwienia komórek oraz obserwacji zarówno komórek żywych jak i utrwalonych i wybarwionych w mikroskopie jasnego pola i kontrastowo-fazowym.

Skład pożywek i roztworów:

Pożywka do hodowli ludzkich fibroblastów:

Modified Eagle Medium (MEM) z dodatkiem:

- 10% cielejącej surowicy płodowej (FCS)
- antybiotyków (100 i.u./ml penicyliny, 10 µg/ml neomycyny, 10 µg/ml streptomycyny)

PBS – zbuforowany roztwór soli fizjologicznej nie zawierający soli wapnia i magnezu

Roztwór utrwalający:

- 3,7% roztwór formaldehydu w PBS

Roztwór ekstrahujący:

- Triton X-100 : H₂O dest : glicerol (w stosunku 1:2:36)

Roztwór barwiący (wg Pena):

- 200 mg Coomassie Brilliant Blue R250
- 45 ml metanolu
- 45 ml wody destylowanej
- 7 ml kwasu octowego

Wykonanie ćwiczenia:

1. Oglądnąć, w mikroskopie odwróconym komórki wysiane na szkiełkach w szalkach hodowlanych: fibroblasty skóry ludzkiej (HSF) i komórki nowotworowe- szczurzego mięsakoraka XC
2. Wybrać 2 szalki z takim samym typem komórek i zmienić w nich pożywkę hodowlaną na świeżą (po 1 ml), odpowiednio na:
 - a) MEM z 10% FCS
 - b) MEM z 10% FCS z dodatkiem 1 µg/ml cytochalazyny D lub 10 µg/ml nokodazolu (decyduje o tym asystent). Inkubować komórki w temp. 37°C, przez 60 min.**[REFERATY]**
3. Przygotować mikroskop MB-30S do pracy w jasnym polu i kontraście faz (obiektywy 10, 20 i 40 PhS)
4. Po zakończonej inkubacji zlać pożywkę znad komórek i przepłukać każde szkiełko 3 razy roztworem PBS bez jonów Ca⁺² i Mg⁺² o temp. 37°C.
5. Zalać komórki 3.7% roztworem formaldehydu w PBS o temp.37°C i utrwalać je przez 15 min w cieplarni.
Zlać utrwalacz znad komórek i przepłukać każde szkiełko 2 razy roztworem PBS.
6. Szkiełka wybarwić wg metody Pena:
 - Zalać komórki roztworem ekstrahującym i pozostawić na 15 min w temperaturze pokojowej. Zlać roztwór ekstrahujący znad komórek i przepłukać każde szkiełko 3 razy H₂O destylowaną.
 - Zalać komórki roztworem barwiącym Pena na 90 sekund (w temperaturze pokojowej). Zlać roztwór barwnika znad komórek i przepłukać szkiełko 5 razy H₂O destylowaną.

7. Wyczyścić szkiełko podstawowe i nakropić na nie 2 razy po 20 μ l H₂O destylowanej. Na jedną kroplę wody nałożyć, komórkami do dołu, szkiełko z wybarwionymi komórkami kontrolnymi, a na drugą kroplę wody nałożyć szkiełko z wybarwionymi komórkami inkubowanymi z cytochalazyny lub nokodazolem. Lekko suszyć brzegi szkiełka bibułą.
8. Przygotowane preparaty oglądać w mikroskopie MB-30S (różne powiększenia) w jasnym polu i kontraście faz.
Porównać obrazy wybarwionych komórek inkubowanych w pożywce hodowlanej (kontrola) oraz w takiej samej pożywce z dodatkiem czynnika destabilizującego cytoszkielet aktynowy lub mikrotubule i wyjaśnić, czy analizowane komórki były inkubowane z cytochalazyną D czy nokodazolem (swoją odpowiedź uzasadnić).
9. Przygotować preparat żywych komórek rosnących na szkiełku nakrywkowym w pożywce hodowlanej (MEM z 10% FCS) i oglądać go w mikroskopie MB-30S w kontraście faz.

Zakres materiału, który należy przygotować do ćwiczeń:

- 1) **Cytoszkielet w komórkach zwierzęcych - budowa i organizacja:**
 - a) mikrofilamenty
 - b) mikrotubule
 - c) filamenty pośrednie
- 2) **Udział cytoszkieletu w zachowaniu kształtu komórki i generacji ruchu**
- 3) **Związki używane do badań organizacji i funkcji cytoszkieletu komórki**