

CYTOSZKIELET - część 2

Barwienie filamentów aktynowych

Cytoszkielekt aktynowy zbudowany jest z filamentów aktynowych, o średnicy około 6 nm i dzięki łączeniu się mikrofilamentów z wieloma białkami wiążącymi aktyne tworzy w komórkach różnorodne formy (złożone układy wiązek lub sieci) takie jak kortykalna sieć aktynowa, włókna naprężeniowe wewnątrz cytoplazmy, pierścień kurczliwy formowany podczas cytokinezy, wypustki powierzchniowe (lamellipodia, filopodia, pofałdowania błon). Dynamiczny cytoszkielekt aktynowy umożliwia komórce pełnienie różnorodnych funkcji takich jak: migracja, zmiana kształtu, skurcz komórek mięśniowych, cytokineza, endo- i egzocytoza. Ciągłe przeobrażenia cytoszkielektu aktynowego są kontrolowane przez komórkę, a nadrzędną rolę w kontroli tych zjawisk pełni rodzina białek Rho, należąca do nadrodziny małych białek G.

Ćwiczenie ma na celu wizualizację cytoszkielektu aktynowego w różnych typach komórek z hodowli *in vitro*. W tym celu należy w utrwalonych komórkach wybarwić filamente aktynowe znakowaną fluorescencyjnie falloidyną. Wybarwione komórki należy oglądać w mikroskopie fluorescencyjnym i porównać organizację filamentów aktynowych w różnych typach komórek.

Falloidyna jest silną toksyną wytwarzaną przez muchomor sromotnikowego (*Amanita phalloides*), która zarówno *in vivo* jak i *in vitro* wiąże się z aktyną powodując stabilizację F-aktyny, także we wiązkach tworzących włókna naprężeniowe. Znakowana falloidyna (zazwyczaj fluorescencyjnie) jest związkiem używanym powszechnie do wykrywania F-aktyny w komórkach i to nie tylko do wizualizacji organizacji cytoszkielektu aktynowego, ale również do pomiarów ilościowych zawartości F-aktyny w komórkach w hodowli *in vitro*, na skrawkach tkankowych oraz w ekstraktach komórkowych. Znakowana falloidyna ma takie samo powinowactwo do krótkich jak i długich mikrofilamentów, gdyż w przybliżeniu wiąże się z aktyną w stosunku stechiometrycznym 1 : 1 (1 cząsteczka falloidyny na 1 cząsteczkę aktyny w filamencie aktynowym), zarówno w mięśniach jak i w komórkach niemięśniowych różnych gatunków zwierząt i roślin.

Zakres materiału, który należy przygotować do ćwiczeń:

Cytoszkielekt aktynowy c.d.:

- 1) Organizacja cytoszkielektu aktynowego w mięśniach i komórkach niemięśniowych
- 2) Funkcje cytoszkielektu aktynowego w komórkach niemięśniowych
- 3) Mechanizm skurczu mięśni prążkowanych
- 4) Białka motoryczne związane z filamentami aktynowymi
- 5) Rola białek Rho w regulacji cytoszkielektu aktynowego

Wykonanie ćwiczenia:

- Oglądać, w mikroskopie odwróconym, komórki wysiane na szkiełkach w szalkach hodowlanych.
 - mysie fibroblasty linii 3T3- komórki prawidłowe
 - komórki mysiego czerniaka B16 (melanoma B16) - komórki nowotworowe
- Wybrać do barwienia cytoszkieletu aktynowego 1 szalkę ze szkiełkiem z komórkami (fibroblastami 3T3 lub melanoma B16).
- Zlać pożywkę hodowlaną z nad komórek i przepłukać szkiełko 3 razy roztworem PBS bez jonów Ca^{+2} i Mg^{+2} , o temp. 37°C .
- Zalać komórki 3.7% roztworem formaldehydu w PBS o temp. 37°C i utrwalać je przez 15 min w cieplarni.
- Zlać utrwalacz z nad komórek i przepłukać szkiełko 3 razy roztworem PBS.
- Zalać komórki 0.1% roztworem Tritonu X-100 i pozostawić na 10 min w temp. pokojowej.
- Zlać Triton X-100 z nad komórek i przepłukać szkiełko 3 razy PBS.
- Wyjąć szkiełko z szalki i przełożyć na suche wieczko (pamiętając, aby komórki znajdowały się na górze szkiełka) i osuszyć brzegi szkiełka bibułą, a następnie nakropić na szkiełko $20\mu\text{l}$ roztworu falloidyny znakowanej TRITC (izotiocyanianem rodaminy) o stężeniu 500ng/ml .
- Barwić komórki w ciemności, czas: od 45 min do 60 min [**czas na REFERATY**], w temp. pokojowej, w szalkach wyłożonych wilgotną watą, aby krople barwnika nie wysychały.
- Mikropipetą zdjąć krople barwnika ze szkiełka i starannie przepłukać komórki 3 razy H_2O destylowaną.
- Wyczyścić szkiełko podstawowe i nakropić na nie $20\mu\text{l}$ H_2O destylowanej. Na kroplę wody nałożyć szkiełko z wybarwionymi komórkami (komórkami do dołu), osuszyć brzegi szkiełka bibułą i okleić je lakierem do paznokci.
- Tak przygotowane preparaty oglądać w mikroskopie kontrastowo-fazowym Leitz Orthoplan z przystawką do epifluorescencji
Dla komórek wybarwionych TRITC-falloidyną:
zestaw filtrów „4” (światło wzbudzające: max 554 nm , a emisja: max 576 nm).
- Porównać obrazy wybarwionych komórek w mikroskopie kontrastowo- fazowym oraz w mikroskopie fluorescencyjnym.
Porównać organizację filamentów aktynowych w komórkach prawidłowych i nowotworowych i wyciągnąć wnioski.