

# FUZJOWANIE KOMÓREK ZA POMOCĄ GLIKOLU POLIETYLENOWEGO

**Zjawisko fuzji** – łączenia dwóch lub więcej komórek w jedną strukturę – występuje w przyrodzie w czasie wielu procesów fizjologicznych. Zjawisko to często można zaobserwować w przebiegu rozwoju zarodkowego organizmów. Ważnym etapem procesu zapłodnienia jest fuzja komórki jajowej i plemnika. W czasie tworzenia włókien mięśniowych dochodzi do fuzji mioblastów i powstania wielojądrzastych miotub.

W warunkach hodowli *in vitro* rzadko dochodzi do spontanicznych fuzji między komórkami. Jednakże częstość tego zjawiska można znacznie zwiększyć działając na komórki odpowiednimi czynnikami. Do najczęściej stosowanych w tym celu związków chemicznych należą: glikol polietylenowy i lizolecytyna. Wydajności procesu fuzjowania sprzyja również wysokie stężenie jonów wapnia oraz wysokie pH pożywki. Komórki można również fuzjować poddając je działaniu zmiennego pola elektrycznego o częstotliwościach radiowych przez czas rzędu milisekund (elektrofuzja) lub inkubując z inaktywowanym wirusem Sendai.

Proces fuzji komórek wykorzystywany jest jako metoda badawcza zarówno w biologii komórki jak również w biotechnologii. Istnieje możliwość przeprowadzania fuzji różnych typów komórek tego samego gatunku, jak również komórek pochodzących z różnych, odległych filogenetycznie organizmów. W wyniku takich połączeń powstają heterokarionty (posiadające dwa różne jądra) lub, jeśli doszło do fuzji jąder, synkarionty (komórki mieszańcowe). Komórki powstałe na drodze tego typu eksperymentów stanowią dogodny model w badaniach genetycznych oraz w badaniach procesów różnicowania. Najważniejszym praktycznym zastosowaniem fuzji jest łączenie komórek szpiczaków mysich (zdolnych do szybkiego i nieograniczonego wzrostu w hodowli *in vitro*) z komórkami plazmatycznymi (produkującymi przeciwciała). Proces ten umożliwia produkcję przeciwciał monoklonalnych. Mimo szerokiego wykorzystania samo zjawisko fuzji nie jest do końca poznane. Proces ten zachodzi prawdopodobnie w kilku etapach:

- 1/ kontakt i fuzja błon komórkowych
- 2/ powstanie mostków cytoplazmatycznych pomiędzy komórkami.
- 3/ reorganizacja cytoszkieletu i zmiana położenia organelli komórkowych prowadząca do utworzenia nowej, stabilnej struktury.

**Ćwiczenie ma na celu** obserwację zjawiska fuzji, przyczepionych do podłoża komórek sznurczego mięsaka XC, wywołanej działaniem glikolu polietylenowego o masie cząsteczkowej 6000. W celu ułatwienia określenia wydajności fuzji jądra utrwalonych komórek należy wybarwić barwnikiem fluorescencyjnym specyficznym wiążącym się z DNA – Hoechst 33 342 lub 33 258. Ponieważ glikol polietylenowy w stężeniach wykorzystywanych w ćwiczeniu może być dla komórek toksyczny, krytyczne znaczenie dla powodzenia eksperymentu ma przestrzeganie podanego czasu inkubacji komórek z roztworem glikolu polietylenowego, a następnie dokładne jego wypłukanie. Pożywka, w której następnie inkubujemy fuzjujące komórki nie powinna już zawierać glikolu.

## Materiały:

1. podłoże hodowlane Eagle'a (**MEM**)
2. pożywka hodowlana o składzie: 90 % MEM + 10% surowica bydlęca + 10mM buforu HEPES (**pożywka**)
3. 50 % roztwór glikolu polietylenowego (m.cz. 6000) w MEM o temp. 37°C, pH = 7
4. Roztwór barwnika Hoechst 33 342 lub 33 258 (1 µg/ml w PBS)
5. 3.7% roztwór formaldehydu w PBS
6. hodowle komórek mięsaka XC –komórki wysiane na szkiełka nakrywkowe umieszczone w szalkach Petriego w pożywce MEM. Komórki w gęstości zapewniającej pokrycie ok. 80% powierzchni szkiełka

## Wykonanie ćwiczenia:

1. Do jednej szalki Petriego wlać 2 ml 50% roztworu glikolu polietylenowego, a do drugiej szalki 2 ml pożywki EMEM
2. Jedno szkiełko nakrywkowe z komórkami XC przenieść delikatnie, używając łopatkę do ważenia, do szalki zawierającej roztwór glikolu polietylenowego ( Nie odwrócić szkiełka!). Włączyć stoper. Drugie szkiełko jako próbę kontrolną pozostawić w szalce bez glikolu.
3. Po 2 minutach wyjąć szkiełko z komórkami z glikolu polietylenowego i przenieść do szalki z EMEM. Komórki przepłukać, a płyn hodowlany delikatnie usnąć przy użyciu pipety automatycznej. Wlać do szalki 2 ml świeżego EMEM i powtórnie komórki odpłukać. Czynność tę powtórzyć 3-krotnie. Następnie komórki zalać płynem EMEM z 10% surowicą, szalkę przykryć i umieścić w cieplarni w 37°C na okres jednej godziny.
4. Po godzinie oglądnąć szalki pod mikroskopem odwróconym
5. Następnie zlać z szalki pożywkę, komórki przepłukać PBS i utrwalić przez 10 min. w 3.7% formaldehydzie w PBS.
6. Komórki przepłukać 2x PBS, a następnie barwić przez 10 min w roztworze barwnika Hoechst 33258 (1 µg/ml w PBS)
7. Po 10 minutach komórki dokładnie przepłukać 3x wodą i sporządzić preparat.
8. W ten sam sposób utrwalić i wybarwić komórki kontrolne.
9. Otrzymane preparaty obejrzyć w mikroskopie kontrastowo-fazowym i fluorescencyjnym ( światło wzbudzające - UV).  
Określić wydajność fuzji jako % komórek zawierających 2 lub więcej jąder.

## Zakres materiału, który należy przygotować do ćwiczeń:

1. Budowa błony komórkowej
2. Fuzja błon komórkowych w procesach biologicznych