

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBIOLÓGIAI INTÉZET

SEJTBIOLÓGIA LABORATÓRIUMI GYAKORLATOK



DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBIOLÓGIAI INTÉZET

SEJTBIOLÓGIA
LABORATÓRIUMI
GYAKORLATOK

egyetemi jegyzet

Az 1997-es kiadás változatlan utánnnyomása

Debreceni Egyetemi Kiadó
Debrecen University Press
2015

Bacsó Zsolt
Bodnár Andrea
Goda Katalin
Jenei Attila
Nagy Péter
Péter Mózés
Varga Tamás
Vámosi György
Vereb György

A jegyzetben található ábrák részben a Molecular Cell Biology (Lodish-Baltimore-Berk-Zipursky-Matsudaira-Darnell, Scientific American Books, 1995) ábrái alapján készültek.

Az 1997-es első kiadás a PHARE Program támogatásával a HU-94.05 0201-L013-37 sz. project keretében készült

ISBN 978 963 318 155 3

© Debreceni Egyetemi Kiadó Debrecen University Press,
beleértve az egyetemi hálózaton belüli elektronikus terjesztés jogát is

Kiadta a Debreceni Egyetemi Kiadó Debrecen University Press
Felelős kiadó: Karácsony Gyöngyi
Készült a DE sokszorosítóüzemében, 2015-ben

TARTALOMJEGYZÉK

SEJTTENYÉSZTÉSI ALAPISMERETEK (BODNÁR A.).....	1
A FÉNYMIKROSKÓP FELÉPÍTÉSE (JENEI A.)	9
LIMFOCITÁK ÉS GRANULOCITÁK SZEPARÁLÁSA, SEJTSZÁMOLÁS, SEJTMAGFESTÉS (PÉTER M.).....	17
LIMFOCITÁK ÉS GRANULOCITÁK SZEPARÁLÁSA	17
SEJTSZÁMOLÁS	20
KENETKÉSZÍTÉS	22
FEULGEN-FESTÉS	22
SEJTKÁROSODÁSRA VEZETŐ FIZIKAI ÉS KÉMIAI FOLYAMATOK HATÁSÁNAK TANULMÁNYOZÁSA (NAGY P.)	25
<i>A SEJTKÁROSODÁS MECHANIZMUSA</i>	25
<i>SEJTEK ÉLETKÉPESSÉGÉNEK VIZSGÁLATA</i>	30
FELADATOK	34
SEJTALKOTÓK LUMINESZCENS JELÖLÉSE, VIZSGÁLATA FLUORESZCENCIÁS MIKROSKÓPBAN (VEREB GY.).....	39
A FLUORESZCENCIÁS ÉS TRANZMISSZIÓS (ABSZORPCIÓS) KÉPALKOTÁS ÖSSZEHAJONLÍTÁSA	39
<i>A fluoreszcenciás mikroszkópia néhány alkalmazása</i>	40
FEHÉRJÉK ÉS NUKLEINSAVAK JELÖLÉSE SPECIFIKUSAN KÖTÖDŐ MOLEKULÁK SEGÍTSÉGÉVEL.....	41
<i>Jelölés antitestek segítségével</i>	41
<i>Jelölés toxinokkal és más bioaktív vegyületekkel</i>	44
<i>Jelölés szubsztráttal és liganddal</i>	44
<i>DNS festékek (VÁMOSI GY.)</i>	45
<i>Szekvencia-specifikus nukleinsav próbák</i>	47
<i>Szekvencia-specifikus nukleinsav próbák</i>	48
<i>Indirekt jelölési módszerek</i>	50
<i>Egyéb, ex vivo jelölési módszerek</i>	51
A PRÓBÁK ELJUTTATÁSA A CÉLMOLEKULÁKHOZ	52
GYAKORLATI FELADAT	53
<i>Protokoll</i>	56

A P-GLIKOPROTEIN ÉS A MULTIDROG REZISZTENCIA FEHÉRJE (MRP) ÁLTALI AKTÍV DROG TRANSZPORT VIZSGÁLATA (GODA K.) 59

A PASSZÍV ÉS AZ AKTÍV TRANSZPORT FOLYAMATOK	59
<i>P-glikoprotein és a multidrog rezisztencia protein (MRP)</i>	60
<i>A P-gp és az MRP mint a szervezet védekező mechanizmusai</i>	61
<i>A passzív és az aktív drog transzport</i>	62
A P-GP ÉS AZ MRP ÁLTALI DROG TRANSZPORT TANULMÁNYOZÁSA	63
<i>Spektrofluorimetria</i>	64
<i>A gyakorlat leírása</i>	66
<i>Feladatok</i>	66

A KROMATIN SZERKEZETÉNEK ÉS A DNS REPLIKÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA (VARGA T.) 69

I., NUKLEÁRIS "HALO" PREPARÁLÁSA	69
<i>A kromatin szerkezete</i>	69
<i>A nukleáris "halo"</i>	70
<i>A DNS szuperhelikális szerkezete</i>	70
<i>Gyakorlat: Nukleáris "halo" vizsgálata</i>	71
II. SEJTSZTÓDÁS NYOMONKÖVETÉSE A REPLIKÁLÓDÓ DNS BROMODEOXYURIDIN JELÖLÉSÉVEL	72
<i>Sejtsztódás, sejtciklus</i>	72
<i>Replikálódó DNS in vivo jelölése BrdU-val</i>	73

DNS KÁROSODÁS VIZSGÁLATA (BACSÓ ZS.) 74

<i>DNS LÁNCTÖRÉSEK</i>	74
<i>EGYEDI SEJT GÉL ELEKTROFORÉZIS (COMET ASSAY)</i>	75
<i>A DNS KÁROSODÁS MÉRÉSE SEJTENKÉNT</i>	78
<i>AZ ETOPOZID KEZELÉSSSEL ÉS AZ APOPTÓZISSAL KAPCSOLATOS DNS KÁROSODÁS</i>	79
<i>GYAKORLATI FELADATOK</i>	81

Sejttenyésztési alapismeretek

1. Bevezetés

A sejteknek ún. sejtkultúrákban történő tenyésztése (a sejteket az eredeti helyükről eltávolítva *in vitro* tartjuk fenn ill. szaporítjuk) és tanulmányozása több szempontból előnyös:

- Míg a legtöbb állati (és természetesen növényi) szerv illetve szövet több különböző sejtípusból épül fel, addig a sejtkultúrákban lehetőség nyílik az egyes specifikus sejt fajták szeparáltan történő tenyésztésére, amely a tulajdonságaikat tekintve sokkal homogénebb sejt populációt eredményez.
- A kísérleti körülmények kontrollálása sejtkultúrák esetén könnyebben megoldható, mint intakt organizmusok esetén. (Pl. a növekedési körülmények manipulálásával viszonylag egyszerűen vizsgálható a különböző növekedési faktorok hatása az adott sejt típusra.)
- A szervekben, szövetekben nehéz elkülöníteni a sejtek „saját” tulajdonságait a többi, ott jelenlévő sejt típusal való kölcsönhatásából következő sajátságoktól; sejtkultúrák esetén ez nem jelent problémát.
- Sok esetben akár egyetlen sejtből is könnyen kifejlődhet egy genetikailag homogén sejt populáció, ami egyszerűbbé teszi a genetikailag különböző sejtek elkülönítését és vizsgálatát.

Nemcsak sejtek, hanem szervek illetve szövetek is tenyészthetők *in vitro* körülmények között, ilyenkor beszélünk szerv- ill. szövetkultúráról. Mivel a sejtbiológia gyakorlatok során kizárólag sejtkultúrákkal találkozunk, a jegyzetben ezek tárgyalására szorítkozunk.

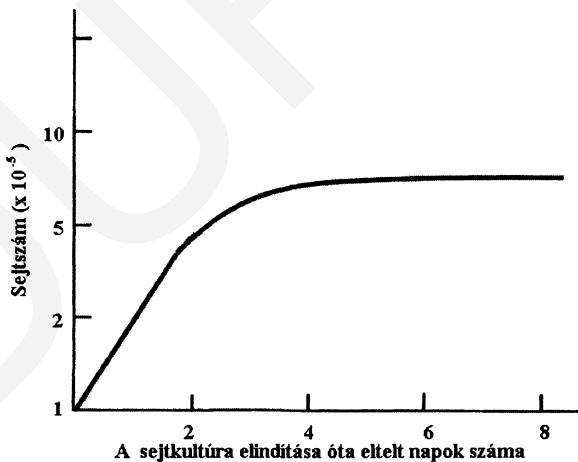
A továbbiakban néhány, a sejttenyésztésben alkalmazott alapfogalommal ismerkedünk meg:

- primér (elsődleges) ill. szekunder (másodlagos) kultúra: az eredeti szervből, szövetből frissen eltávolított sejtekből illetve azok egyszeri átoltása (passzálása) révén készült kultúra;

- sejttörzs: a primer kultúrából néhány passzálás után kialakult, véges élettartamú (kb. 40-50 passzálás) sejt kultúra;
- sejtvonal: genetikailag viszonylag homogén, megfelelő körülmények között korlátlan ideig fenntartható sejt kultúra. A legtöbb esetben vagy normál sejtek *in vitro* (kultúrában történő) transzformációjával (retrovirális transzdukciós onkogén-transzfekció révén) vagy tumor sejtek (amelyek a normál sejtek szervezetben belül transzformált változatának tekinthetők) felhasználásával nyerik a sejtvonalakat.
- a sejt kultúrákat alkothatják szuszpenzióban illetve letapadva növekvő sejtek. Ez utóbbi esetben a sejtek mátrix fehérjéket termelnek és ezek, valamint a tápoldatban jelenlévő Ca^{2+} ionok segítségével szorosan kitapadnak a tenyésztő edény falához, ún. egyrétegű (monolayer) kultúrát alkotnak.

2. A sejt kultúrák fenntartása

Az *in vitro* sejtenyésztés során a sejteket a fiziológiást közelítő körülmények között, azaz megfelelő tápoldatban (médiüm), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubáljuk. Az 1. ábrán egy, a sejtvonalakra jellemző növekedési görbét láthatunk szemilogaritmikus ábrázolásban.



1. ábra

Láthatjuk, hogy a kultúrát egy adott sejtsűrűséggel indítva a sejtek száma egy ideig exponenciálisan nő, majd elér egy ún. telítési szakaszt, ahol a sejtek az osztódást befejezik (G_1/G_0 fázisban vannak), a sejtszám nem változik tovább. Általában ebben a

stádiumban történik a sejtek passzálása: ekkor a sejteket friss médiummal „meghígítjuk”, azaz olyan koncentrációban vesszük fel őket, amelynél újból képesek az osztódásra.

A passzálás több módon történhet:

- szuszpenzióban növő sejtek: sokszor elegendő, ha a sejtuszuszpenziót a friss médiummal egyszerűen a kívánt arányban meghígítjuk. Másik lehetőség, hogy a szuszpenzió lecentrifugálása és a felülúszó (régi médium) eltávolítása után a megfelelő mennyiségű friss tápoldatban vesszük fel a sejteket.
- letapadó sejtek: ezek passzálása általában akkor történik, amikor a sejtek már az egész rendelkezésükre álló felületet benőtték (konfluens kultúra). A kitapadó sejteket passzálás előtt szuszpenzióba kell vinni, ez néhány esetben a tenyésztő edény egyszerű rázásával, ütögetésével elérhető, de legtöbbször enzimekre (proteázok - a kitapadást okozó mátrix fehérjék proteolitikus hasításához) vagy kelátképző anyagokra (a kitapadáshoz szükséges kétértékű ionok megkötéséhez) van szükség. Leggyakrabban a tripszin nevű enzimet használják, sokszor együtt alkalmazzák EDTA-val (etilén-diamin-tetraacetát – kelátképző anyag). (Előfordul a kollagenáz enzim használata is.) A tripszinezés során a megfelelő pufferben elkészített tripszinoldatot ráöntik a letapadt sejtekre (a médium előzetes eltávolítása és a sejtek PBS-sel történő leöblítése után), majd 1-2 percig 37 °C-on inkubálják őket. Ezután friss médium hozzáadásával leállítják a reakciót (a médium szérumtartalma ui. leállítja a tripszint), a sejteket lefugálják és a kívánt mennyiségű friss médiumban veszik fel.

A szuszpenzióba vitt sejteket a passzálás előtt meg kell számolni. A sejtszámolás alapelveivel illetve az élő/elpusztult sejtek megkülönböztetésére használatos módszerekkel több gyakorlat leírása során is találkozhatnak, ezért ennek tárgyalására most nem térünk ki.

A sejtek passzálása során két dologra feltétlenül ügyelnünk kell: minden lépést steril körülmények között kell elvégeznünk, hogy elkerüljük a sejtenyészetek mikrobiális fertőzését; illetve a többféle sejtet is fenntartó laboratóriumokban a sejtek közötti kontamináció elkerülése végett a steril fülkében egyidőben csak egyféle sejtet szabad dolgozni.

3. A sejt kultúrák fenntartásához szükséges anyagok és eszközök

3/a. Tápfolyadék (médium)

A médium feladata, hogy a sejtek számára biztosítsa a növekedéshez szükséges tápanyagokat, növekedési faktorokat, a megfelelő fizikai és kémiai környezetet. A tápoldat ideális összetétele sejt típusonként különböző lehet az adott sejt sajátosságainak megfelelően. A következőkben felsoroljuk a tápoldatokban szereplő alkotóelemeket:

- sóoldat: biztosítja a nélkülözhetelen anorganikus ionokat (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , foszfát, hidrogénkarbonát), fenntartja az ozmolalitást;
- glükóz: energiaforrás, felhasználható a szénhidrátok, lipidek, nukleinsavak valamint a szerin, az alanin és a glicin szintézisére;
- esszenciális aminosavak (arginin, hisztidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofán és valin): ezeket az aminosavakat a gerincesekből származó sejtek nem tudják előállítani, ezért a tápoldatnak kell számukra biztosítani őket. A felsorolt tíz esszenciális aminosavon kívül a legtöbb sejt kultúra igényli a glutamin, tirozin és cisztein jelenlétét is. Ezeket az aminosavakat általában specializált sejtek termelik az eredeti szervezetben
- vitaminok: kolin, folsav, nikotinamid, inozitol, pantoténsav, piridoxin, riboflavin, tiamin, biotin, B_{12} (és néhány zsírolékony vitamin, de ez utóbbiakat a tápfolyadék egyéb összetevői tartalmazzák a megfelelő mennyiségben);
- pufferrendszer a pH fenntartásához: a médium pH-ját általában oldott CO_2 /bikarbonát puffer segítségével tartják fenn, ekkor az oldott CO_2 szintet az CO_2 nyomás megfelelő beállításával szabályozzák. (Alternatív lehetőség a 20 mM-os HEPES puffer, de ez kismértékben toxikus, ezért ritkábban alkalmazzuk).
- fenolvörös: a sejtek metabolizmusuk során savas vegyhatású anyagokat (pl. tejsav) termelnek, amelyek az alkalmazott pufferek ellenére egy adott szint felett jelentősen megváltoztathatják a tápfolyadék pH-ját, ami sejt károsodást okozhat. A pH ellenőrzésére alkalmazzuk a fenolvörös indikátort, amely savas közegben sárga, lúgos közegben lila színű. Ha a médium megsavanyodik, akkor cserélni kell a tápoldatot. Ha az indikátor hosszabb inkubáció után is lila

marad, akkor az azt jelenti, hogy a sejtek valamilyen ok folytán nem növekednek megfelelő mértékben.

- **szérum:** a legtöbb sejtípus esetén 5-20 % foetális (magzati, pl. fetal calf serum (FCS) – foetalis borjú szérum) vagy felnőtt szérummal egészítik ki a médiumot. A szérum számos olyan faktort tartalmaz, amely nélkülözhetetlen a sejtek kultúrában történő proliferációjához (pl. inzulin – a legtöbb gerinces sejt növekedéséhez szükséges). Néhány sejtípus szérummentes médiumban is fenntartható, de a megfelelő növekedési faktorokat és egyéb komponenseket (pl. inzulin, transferrin, szelén) ekkor is biztosítani kell a sejtek számára.
- antibiotikumok (penicillin, streptomycin, gentamycin): a bakteriális fertőzések ellen véd.

3/b. Steril fülke

A szűrt levegővel ellátott steril fülke (laminar box; laminar air flow cabinet) lehetőséget ad arra, hogy a sejtenyészettel illetve a médiummal kapcsolatos manipulációkat steril környezetben tudjuk elvégezni. A fülkékben megfelelően szűrt levegőt (a 0.3 μm -nél nagyobb részecskéket szűrik ki, így pl. a legtöbb baktériumot illetve gomba spórát) áramoltatnak a munkafelület fölé, így a kontamináció veszélye csökken. Emellett a levegő áramoltatása a sejtek kezelése közben képződő aeroszolt is gyorsan eltávolítja. A steril fülkékben a gáz-, víz- és elektromos csatlakozást biztosítani kell.

A steril fülkék számos konfigurációban elérhetők, ezek méretükben és a levegőáram irányában változhatnak. Nemcsak a sejteket védik meg a fertőzésektől, de – tervezésüktől függően – a felhasználó számára is különböző szintű védeltséget biztosítanak, emiatt kiválasztásuknál azt is figyelembe kell venni, hogy milyen, az egészségre mennyire veszélyes sejt kultúrákkal foglalkoznak bennük.

A steril fülkéket gyakran UV lámpával (germicid) is felszerelik, ami segít fenntartani a sterilitást. Ilyen esetekben figyelni kell arra, hogy a fülke használata közben az UV lámpa ne működjön.

3/c. Inkubátor

A sejtenyésztésben alkalmazott inkubátorokkal szembeni fő elvárás, hogy a bennük tartott sejt kultúrák számára az optimális növekedési hőmérsékletet biztosítsák (emlős sejt vonalak esetén ez általában 37 °C). A legtöbb esetben állandó parciális nyomású CO₂ atmoszférát valamint megfelelő páratartalmat is biztosítaniuk kell. A hőmérséklet és a CO₂ tartalom (általában 5 %) szabályozása általában elektromos úton történik.

A megfelelő páratartalmat legtöbbször steril víznek az inkubátorba helyezésével és azon steril CO₂ átbuborékolásával biztosítják.

3/d. Mikroszkóp

A sejtenyészetek mikroszkóppal (invert mikroszkóp – a sejtek közvetlenül a tenyésztő edényben vizsgálhatók) történő megfigyelése a napi rutinfeladatok közé tartozik. Így nyomon követhető a sejtek növekedési üteme, még korai stádiumban felfedezhetők az esetleges problémák (pl. fertőzések). A mikroszkópokról egy külön fejezet található a gyakorlati jegyzetben, ezért ezek ismertetésétől most eltekintünk.

3/e. Egyéb eszközök

- sejtenyésztő edények: általában műanyagból (ritkábban üvegből) készülnek. Míg szuszpenzióban növő sejtek esetén ugyanaz az edény többszöri passzáláshoz is felhasználható, addig letapadó sejteknél minden egyes passzáláskor újabb edényt érdemes használni (bár az üvegből készült tenyésztő edényeket letapadó sejteknél is többször felhasználhatjuk).
- centrifuga: a sejtek mosásához, töményítéséhez illetve ülepítéséhez használjuk.
- üveg vagy műanyag pipetták, automata pipetták; centrifugacsövek stb.
- steril szűrők, sterilizáló berendezések: a tápfolyadék illetve az alkalmazott eszközök sterilizálására használják.
- vízfürdő: a médiumok, oldatok megfelelő hőmérsékletének beállításához (általában 37 °C).

4. A steril munkavégzés szabályai

- A sejtlaboratóriumi munkavégzés során mindig viseljük lehetőleg erre a célra rendszeresített köpenyt.
- A munka megkezdése előtt és befejezése után mindig alaposan mossunk kezet. Az egészségre veszélyes sejt kultúrák esetén viseljük kesztyűt.
- Használat előtt és után illetve különböző fajtájú sejtek kezelése között a munkafelületet mossuk le 70 %-os alkohollal. A felület lemosása a fülke belsejéből kifelé történjen.
- A médiumot illetve a különböző oldatokat tartalmazó üvegeket mossuk le alkohollal, mielőtt a fülkébe tesszük őket.
- Használat előtt ellenőrizzük a steril eszközöket tartalmazó csomagolás épségét.
- Vigyázzunk arra, hogy a nyitott edények felett ne nyúljunk át, hogy se az edények szája, sem az alkalmazott egyéb eszközök (pl. pipetták) ne érjenek hozzá semmihez.
- A még nagyobb biztonság érdekében az üvegpipetták illetve az edények szája használat előtt gázlánggal „leégethető”.

A fent felsoroltakon kívül szigorú rendszabályok vonatkoznak a sejtlaboratóriumban napi, heti, havi stb. rendszerességgel elvégzendő takarítási és karbantartási feladatokra; a tápfolyadékok és egyéb oldatok valamint az alkalmazott eszközök sterilizálására is.

A fénymikroszkóp és a sejt felépítése

A sejt „tökéletes” valóság-hű képe nem állítható elő, ezért nagyon fontos a különböző kulcsfontosságú sejtvizsgáló módszerek néhány tulajdonságának (az előállított kép tulajdonságainak és a módszer korlátjainak) megértése.

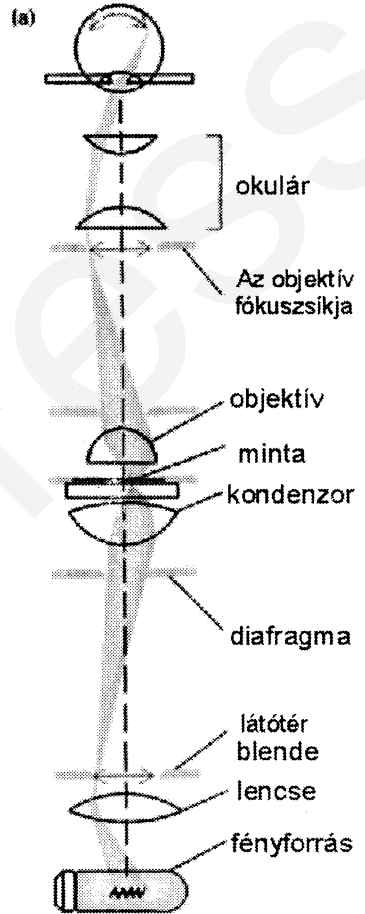
Az elektronmikroszkópos technika kidolgozása nagyban kiterjesztette azon képességünket, hogy láthatóvá tegyünk sejtalkotókat és nagyon sok információhoz jutottunk a növényi és állati sejtek szerkezetéről illetve a sejtalkotók szerveződéséről. A képek információtartalma elsősorban az alkalmazott fény- illetve elektronmikroszkóp tulajdonságaitól és a vizsgálatot megelőző preparációs eljárástól függ. Ezeket a technikákat a sejtek strukturális sajátosságainak vizsgálatára dolgozták ki. Habár a leghétköznapibb alkalmazása a fény és elektronmikroszkópnak a fixált, élettelen sejtekről származó minél több információ beszerzése, kritikus kérdés az eredmények értékelésekor, hogy mennyire vethető össze a vizsgálat előtt fixált, dehidrált esetleg megfestett preparátum az élő objektummal.

Fénymikroszkóp.

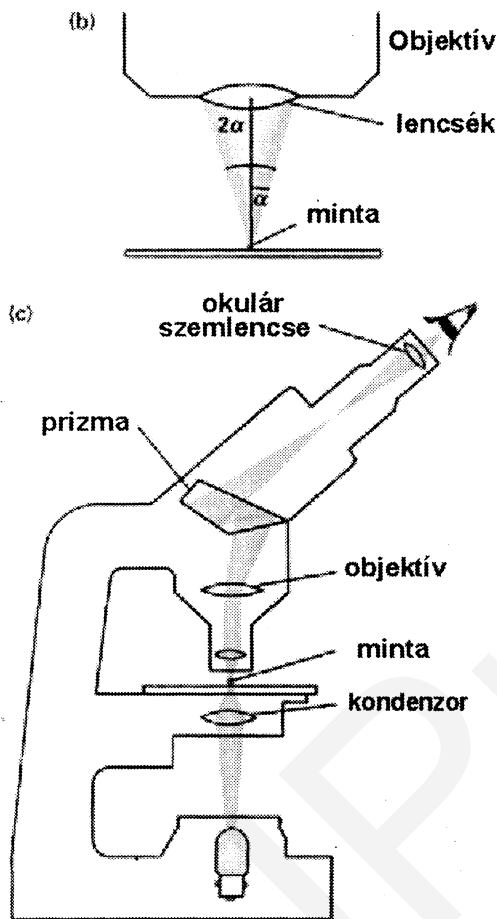
A fénymikroszkóp mely a legjobban elterjedt vizsgáló eszköz, számos, a mintáról származó kép megnagyítására szolgáló lencsét tartalmaz.

A mikroszkóp sugármenetét az 1. ábrán mutatjuk

be. Az átlátszó tárgylemezre applikált minta mozgatható tárgyasztalra van helyezve. A fényforrásból jövő fényt a kollektor és a kondenzor lencsék fókuszálják a mintára. Az objektív gyűjti össze és fókuszálja a fókusz síkba a mintán áthaladt sugarakat. Így



1. ábra



2. ábra

nagyított képet állít elő a mintáról. Ez a kép akár direkt módon is detektálható. Általában ezt a képet az objektív fókusz síkjába fókuszált szemlencse (okulár) segítségével tovább nagyítjuk. A szemlencse összegyűjti a már nagyított képről érkező sugarakat és az emberi szem vagy a fotólemez síkjába vetíti. A különböző diafragmák (látótérhatárolók) és rések a mintára érkező és az abból az észlelőig eljutó fény egyenletes eloszlását és élesen határolt látóteret biztosítanak. Az optikai leképezés egyik fontos paramétere a mintáról érkező fénysugár fél nyílásszöge α (2.b ábra). A mikroszkópot általában két fontos paraméter jellemzi. Az egyik a teljes nagyítás, amely az egyes lencsék nagyításának szorzatából kapható meg. A másik, talán ettől is fontosabb

jellemző a mikroszkóp feloldóképessége, két közel levő pont megkülönböztetése. A

$$D = \frac{0.61\lambda}{N \sin \alpha}$$

mikroszkóp felbontása egyenlő D-vel, a két még megkülönböztethető pont távolságával.

A kisebb szám nagyobb feloldásra utal. A D szám három paraméter függvényeként írható fel. Az apertúraszög α , vagy más néven a mintára érkező fénysugár nyílásszögének fele, a lencse és a minta között levő közeg törésmutatója N és az alkalmazott fény hullámhosszának λ a függvénye.

A felbontás növelése az alkalmazott fény hullámhosszának csökkentésével vagy a törésmutató és az apertúra növelésével érhető el. Az $N \sin \alpha$ értéket numerikus apertúrának nevezzük.

A törésmutató megmutatja, hogy mennyire téríti el a közeg a fénysugarakat. Definíció szerint a levegő törésmutatója $N=1.0$. A törésmutató immerziós olajjal történő növelése az egyik lehetséges megoldás. Immerziós olaj alkalmazásával a minta és az objektív között a törésmutató 1.5-es értékre növelhető. Így a felbontás is 1.5-szeresére nő. Ilyenkor az alkalmazott fénysugarak jobban eltérülnek ha nagyobb törésmutatójú közegben haladnak át. Így kisebb felületről érkezik fény az objektívhez.

Ennek ellenére a fénymikroszkóp felbontási határa $0.2 \mu\text{m}$, bármekkora is nagyítjuk a tárgyról érkező képet. A fénymikroszkóp esetében ez azt jelenti, hogy csak azokat a tárgyreszleteket lehet leképezni, amelyeknek távolsága nagyobb néhány tized mikrométernél, másképpen a tárgy két, ennél a távolságnál kisebb távolságra levő pontja nem választható szét.

A felbontási limit kiszámolásakor szükségünk van a legjobb objektív apertúraszögének értékére ($\sin 70^\circ=0.94$), a látható tartományban még használható kék színű fény hullámhosszára ($\lambda=450 \text{ nm}$) és az alkalmazott immerziós olaj törésmutatójára ($N=1.5$)

$$D = \frac{0.61 \cdot 450 \text{ nm}}{1.5 \cdot 0.94} = 194 \text{ nm}$$

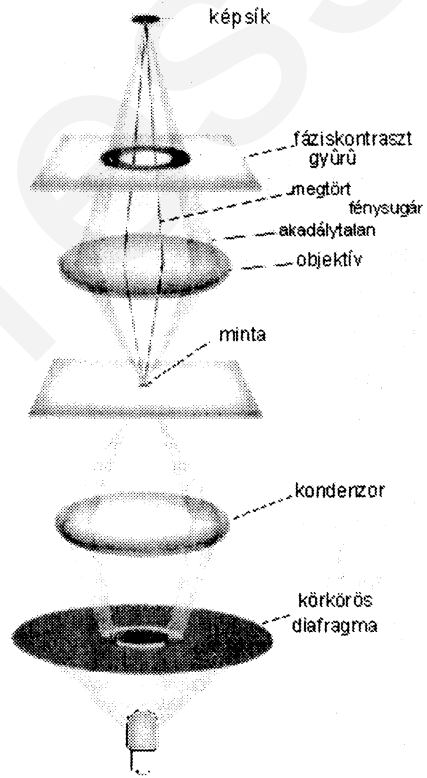
A minta és az objektív között levegő esetén a fenti eredmény 292 nm körüli értéknek adódik. Kézenfekvő a lehetőség, hogy a hullámhossz további csökkentésével esetleg jobb eredményt lehetne elérni. A problémát néhány technikai nehézség okozza. A röntgen- vagy gammasugarak hullámhossza rövidebb, tehát kedvezőbb leképezési körülményeket kellene nyújtaniuk, de képalkotásra nem alkalmazhatóak, mivel gyakorlatilag nincs számukra megfelelő tulajdonságokkal rendelkező törőközeg amellyel a sugarakat fókuszálni lehetne. Ilyen szempontból előnyösebbek az elektronsugarak.

Az elektromos kölcsönhatás tulajdonságait kihasználó elektronmikroszkóp (amelyet itt nem tárgyalunk részletesen) kidolgozása volt egy lépés ebbe az irányba. Az alkalmazott hullámtulajdonságokkal is rendelkező rövidebb hullámhosszúságú elektronnyaláb segítségével sikerült, természetesen rengeteg kompromisszum árán (minta preparáció

nehézkés volta stb.) a feloldást növelni. Az elektronmikroszkópiás módszerek nagy, elvi hátránya a fénymikroszkópiákkal szemben, hogy a vizsgálat rendszerint olyan preparálási eljárásokat és vizsgálati körülményeket követel meg, amelyek igen távol állnak a természetes körülményektől. A vizsgálatok vákuumba helyezett, vízmentes, vezetőanyaggal bevont mintát igényelnek. Ezek a hátrányok halmozottan jelentkeznek biológiai, pl. sejttes rendszerek vizsgálatánál.

Fáziskontraszt mikroszkóp.

Az optikai technikák általában transzparens élő sejtekről szövetekről szolgáltatnak részletes információt. Általában kis vastagságbeli illetve törésmutatóbeli különbségeket alakítanak át intenzitáskülönbségekké. Az 3. ábrán látható fáziskontraszt mikroszkóp által létrehozott kép a törésmutató különbségekből származó információt tartalmazza. A fényforrásból érkező fény először egy körkörös diafragmán halad át melynek segítségével egy gyűrű alakú intenzitásprofil fókuszálódik a mintára. A minta belsejében a különböző törésmutatójú részeket elválasztó felületeken a fénysugár egy része sorozatos reflexiót és törést szenved. Az akadálytalanul, törést nem szenvedett fénysugár egy vastag szürke gyűrűn halad át a fázissíkon. A gyűrű a beérkező fénysugár egy részét abszorbeálja (intenzitását csökkenti) és az úthosszát (fázisát) negyed hullámhosszyival megváltoztatja. Amennyiben a mintán áthaladás



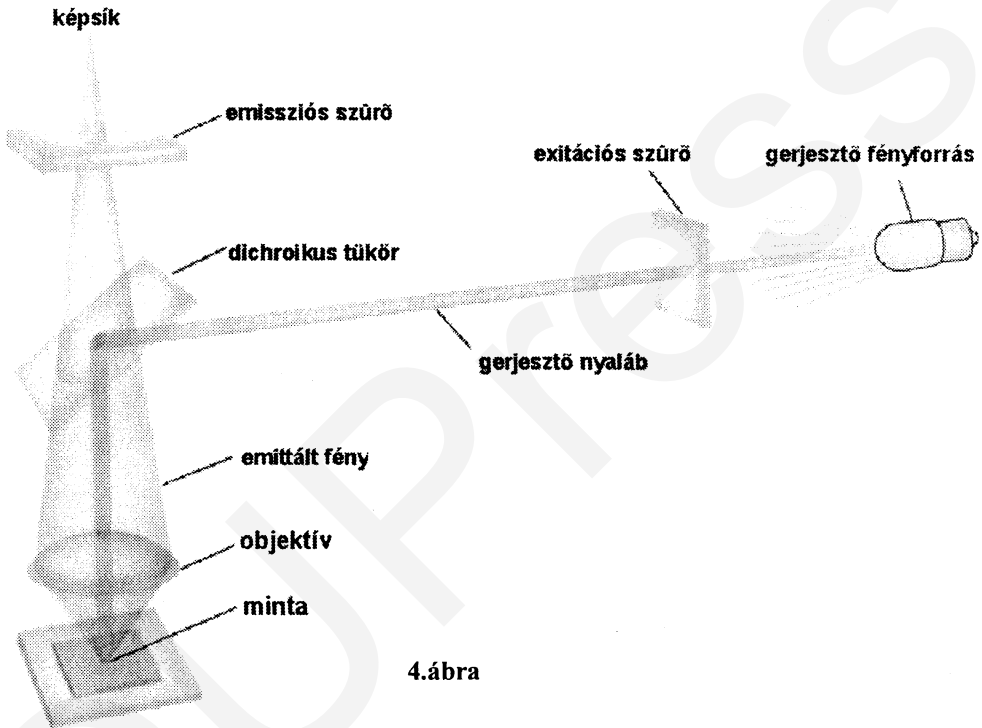
3. ábra

során a fény diffrakciót szenved vagy megtörik akkor ezek a sugarak a fázisuk vékony, átlátszó részén haladnak át. Így a kapott kép a különböző fázisú megtört és fénytörést nem szenvedett azonos intenzitású fénysugarak összegződéséből áll elő.

Fáziskontraszt mikroszkóp segítségével nagyobb sejtalkotók vizsgálatára van lehetőség.

Fluoreszcenciás mikroszkóp.

Sejten belüli fehérjék lokalizálására a leghatékonyabb eszköz a kiválasztott fehérje



elleni specifikus antitestek és fluoreszcens mikroszkóp alkalmazása. A fluoreszcencia legegyszerűbb megfogalmazása amikor egy anyag abszorbeál egy adott hullámhosszú fényt (gerjesztési hullámhossz) majd kibocsát egy adott hosszabb hullámhosszú de még a látható tartományon belüli sugarat. A modern fluoreszcens mikroszkópok használatkor a minta által emittált fény segítségével állítunk elő képet. A fluoreszcens mikroszkóp felépítése látható a 4. ábrán. A sok hullámhossz komponenset tartalmazó gerjesztő fény a fényforrást elhagyva egy optikai szűrőn halad át. A szűrőn a fénynek csak az általunk kiválasztott hullámhosszú komponense halad tovább. Dichroikus tükör segítségével vetítjük, majd az objektívvel fókuszáljuk a mintára,

gerjesztve vele a fluoreszcens festékkel jelölt molekulákat. Az emittált fluoreszcens fény az objektíven áthaladva hosszabb hullámhossza lévén nem reflektálódik a dikroikus tükrön, hanem áthalad és az emissziós tükkörre érkeve a tükkör blokkolja a gerjesztésből származó megmaradt komponenseket. A kapott képen csak a fluoreszcens molekuláktól származó emittált fluoreszcens fényt és a háttér intenzitást, az un. autofluoreszcenciát vizsgálhatjuk. Ezt az összeállítást mindig fáziskontraszt mikroszkóppal együtt alakítják ki, megkönnyítendő a fókuszálást és a minta beazonosítását.

Immunofluoreszcens technika alkalmazása során számos nehézséggel állunk szemben. A struktúra megőrzése érdekében alkalmazott fixálás sokszor roncsolja a fehérjéket, megváltoztatja az antigén-antitest kötődést stb. Ezen kívül a vékony metszetek készítésénél alkalmazott beágyazó anyag un. autofluoreszcenciája is befolyásolja a vizsgált antitestektől származó specifikus jelek tulajdonságait. Egy egész sejt mikroszkópos vizsgálata során a fókuszíks két oldaláról (alulról és felülről) is érkezik fluoreszcens fény a mintáról, így a megfigyelő a különböző mélységből érkező, különböző intenzitású komponensek szuperpozícióját detektálja. Így természetesen szinte lehetetlen az aktuális háromdimenziós elrendeződésről bármiféle információt nyerni.

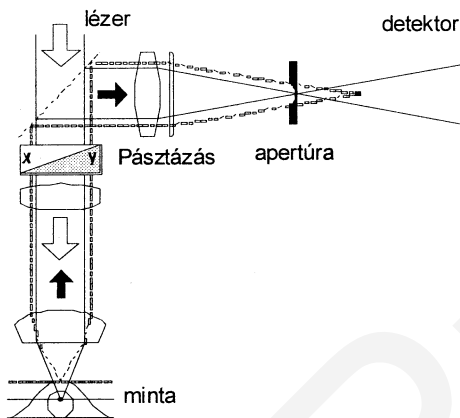
A viszonylag nagy feloldású transzmissziós elektronmikroszkópos technikáknak is egyik nagy hátránya, hogy nagyon nehezen állítható elő jó minőségű háromdimenziós kép. Ezeket a problémákat a mintakészítés még fokozza (beágyazás, mechanikai szeletelés, stb.) A konvencionális optikai mikroszkópos technikáknál ez a mintakészítési probléma kiküszöbölhető, hiszen élő sejtek dinamikus tulajdonságai is vizsgálhatók. Az első kézenfekvő probléma a felbontáson túl az, hogy a vizsgált mintaterület magasabban illetve mélyebben levő (fókuszon kívül eső) részéről érkező információ csökkenti az előállított kép kontrasztosságát. Ez a jelenség főként vastag mintákra érvényes.

Konfokális Lézer Pásztázó Mikroszkóp

A vastagabb biológiai preparátumok, szövetek, sejtek vizsgálatában a Konfokális Lézer Pásztázó Mikroszkóp (CLSM) tudta megoldani azt a problémát, hogy a különböző egymáshoz közel lévő rétegek egyszerre történő, összefolyó leképezése helyett, optikailag élesen elválasztható vékony rétegekből kapott képeket vegyen fel, azokat komputerben tárolja, és a vékony rétegekből a képeket tetszőlegesen összerakja.

A 5. ábra mutatja a pásztázás nyújtotta előnyöket. A kép egyes pontjai szűk apertúrán keresztül, raszterpontoszerűen képződnek le. Ezzel a hagyományos mikroszkópos képhez képest keskeny, jól definiált rétegből nyert éles képeket lehet kapni. A komputeres tárolási és újra előhívási lehetőség azzal jár, hogy pl. adott sejt belsejébe "betekinthetünk", anélkül, hogy azt elmetszenénk.

A lézersugár közvetlenül a mintára fókuszált, egy pásztázó rendszer és egy nagy numerikus aperturájú lencse segítségével. A pásztázó lézersugár által gerjesztett



5. ábra

fluoreszcens fény a tér minden irányába szóródik. Ennek a fénynek egy része az objektív lencse által összegyűjtődik és így visszajut a pásztázó rendszerbe majd onnan egy féligáteresztő tükör segítségével jut a detektorra. A lencse fókuszában levő helyről érkező nyaláb a gerjesztő fényvel azonos úton ellentétes irányban halad a nyalábosztó irányába. A nyalábosztó és a detektor közé helyezett apró lyuk csak ezt a nyalábot engedi át a detektor felé. A fókuszon

kívül eső fluoreszcens fény (szaggatott vonal) nem jut el a detektorig ebben a rendszerben, növelve ezzel a kontrasztot. Ez esetben a sugarak fókuszpontja valahol az apertúra mögött van, ld. 5. ábra. A kétdimenziós képi ábrázoláshoz a lézer egy adott területet pásztáz végig és az indukált fluoreszcens fény detektálódik és konvertálódik videó jellé, ami a képernyőn megjelenik. A lézer jelentősége abból fakad, hogy a keskeny apertúrán (gyakorlatilag μm nagyságrendű átmérőjű lyuk; pinhole) áthaladó fénysugár intenzitása igen legyengül. A lézerfény intenzitása azonban még ekkor is elegendő ahhoz, hogy elektronikusan értékelhető jelet kapjunk. A kép nyilván annál élesebb, minél kisebb a fénypont szétterülése. A modern nagyteljesítményű asztali számítógépek ugyancsak hozzájárultak ahhoz, hogy a Davidovitz és munkatársai által 1969-ben megkonstruált CLSM elterjedjen és valóban igen jól használható készülékké váljon. A kiinduló pont Nomarski (1955) differenciális fáziskontraszt optikai mikroszkópja volt, ami a Zernike féle hagyományos fáziskontraszt mikroszkópot

jelentősen felülmúlta abban, hogy az optikai "késleltetés" mértékét regisztrálta pontonként.

Az igazi differencia a CLSM javára az, hogy a reflektált, vagy áthaladó fénysugarakat optikai lencse fókuszálja a kimenő apertúrára, mielőtt egy fotodetektor érzékeli. Ezzel a fókuszának a mélysége nagymértékben csökken, ami a konfokalitásnak a feltétele. Így csak azonos keskeny rétegből származó sugarak jutnak az egy pásztázási mező által kialakított képre. Tehát az elv egyszerű és lényegében a készülék alig valamivel bonyolultabb, mint a hagyományos optikai mikroszkóp, mégis forradalmasította az új biológiai ismeretek szerzésének lehetőségeit.

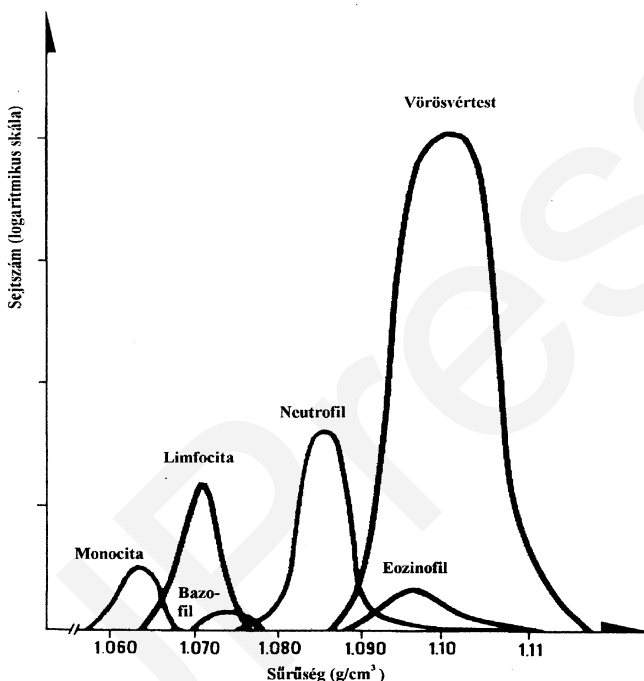
Limfociták és granulociták szeparálása, sejtszámolás, sejtmagfestés.

A vér plazmából és benne található alakos elemekből áll. A vérplazma körülbelül a vér térfogatának 56%-át, míg az alakos elemek a 44%-át teszik ki. Az alakos elemek háromfélék: vörösvértestek (eritrociták), fehérvérsejtek (leukociták) és vérlemezkék (trombociták). A vörösvértestek mag nélküli, korong alakú sejtek. Átmérőjük 7,2 μm , vastagságuk a szélikön körben 2 μm , középen ennél kevesebb. Így átmetszetben piskóta alakúak. Alakjukat nem tartják mereven, így átmérőjükkel jóval kisebb keresztmetszetű kapillárisokon is képesek átjutni, ugyanakkor hipozmotikus közegben könnyen lizálnak. Számuk 4,5-5,5 millió/ μl . A fehérvérsejtek maggal rendelkező sejtek, számuk 5-8 ezer/ μl . Három csoportra oszthatók: granulociták, limfociták és monociták. A granulociták lebonyozott magvúak (polimorfonukleáris sejtek), és a plazmájukban jellemző granulomok vannak. A granulomok festődési tulajdonságai alapján három alcsoportot különböztetünk meg: neutrofil, eosinofil és basofil granulocitákat. A keringő vérben a limfociták, a sejtek 20-40%-át teszik. Fénymikroszkóppal vizsgálva kis limfocitákat és nagy limfocitákat különböztetünk meg. A kis limfociták alkotják a limfociták nagy részét (92%). A limfociták gömb alakúak, sejtmagjukat keskeny plazmaszegély veszi körül. A monociták a fehérvérsejtek 3-8%-át teszik ki. Aránylag nagy sejtek, 12-15 μm átmérővel. Magvuk bab alakú, de a magon található behúzóda fokozódása miatt érett sejteken patkó alakú is lehet. A vérlemezkék a vörösvértestek felénél valamivel kisebb ovoid vagy kerek, lapos korongnak megfelelő alakú sejt-fragmentumok. Számuk 150-300 ezer/ μl , sejtmagjuk nincsen.

Limfociták és granulociták szeparálása:

Boyum 1968-ban ismertette módszerét, mely alkalmas a mononukleáris sejtek (limfociták, monociták) izolálására vérből és csontvelőből. A módszer a vérben található sejtek eltérő sűrűségén alapszik. Azóta ezen módszer továbbfejlesztésével más vérsejtek megbízható szeparálása is lehetővé vált, illetve újabb technikák bevezetésével

az egyes sejtféleségeken belül található különböző csoportok megbízható szeparálására is lehetőség nyílt. Vérszövetek szeparálására nagyon gyakran van szükség a klinikai diagnosztikában és a kutatásban egyaránt. A vérben található sejtféleségek sűrűsége különböző: legkisebb a limfociták és a monociták sűrűsége, nagyobb a granulocitáké és a legnagyobb a vörösvértesteké.



A vérben található sejtek sűrűségének eloszlása.

Ha olyan szeparáló oldatra rétegezzük a vért, melynek sűrűsége a mononukleáris sejtek sűrűségénél nagyobb, de a granulociták sűrűségénél kisebb, és centrifuga segítségével a normál nehézségi gyorsulás sokszorosát alkalmazzuk, akkor a mononukleáris sejtek kisebb sűrűségük miatt a szeparáló oldat felett maradnak, míg a többi sejt átlép a két oldat határán és a cső aljára ülepszik. Az általunk használt szeparáló oldat sűrűsége 1.077 g/ml . A centrifugálás végén legfelül található a plazma, alatta a szeparáló oldaton úszó mononukleáris sejteket tartalmazó áttetsző, vékony réteg, és a szeparáló oldat alatt a leülepedett vörösvértesteket és granulocitákat tartalmazó

réteg. A mononukleáris sejtek kinyerhetők az áttetsző vékony rétegből, míg a vörösvértesteket és granulocitákat tartalmazó rétegből mosás után dextranszedimentációval a granulocitákat szeparálhatjuk.

Szeparálás menete:

1. Hígítson fel megfelelő mennyiségű vért (amennyit a 2. pontban fel akar használni) térfogatának kétszeresére PBS-sel.
2. Rétegezze egymásra a szeparáló oldatot és a hígított vért legalább két 15 ml-es centrifugacsőben. Két módszer közül választhat vagy kipróbálhatja mind a kettőt:
 - a) Rétegezzen 1/3 rész szeparáló oldatra 2/3 rész hígított vért nagyon óvatosan úgy, hogy a szeparáló oldat ne keveredjen a hígított vérrel. Érdeemes a centrifugacsövet megdőnteni és a hígított vért a cső falára lassan, de folyamatosan pipettázni a szeparáló oldat felé körülbelül fél centiméterrel, hogy onnan lecsorogjon. (Üvegből készült pipettával ezt könnyebb megtenni, mert az automata pipetta könnyen „megszalad”.)
 - b) Másik módszer az, hogy a centrifugacsőben levő vér alá rétegezzük a szeparáló oldatot vékony Pasteur pipetta segítségével. Ehhez öntse előbb a vért a centrifugacsőbe, majd állítson bele egy Pasteur pipettát, és a Pasteur pipetta végébe töltse bele a szeparáló oldatot egy másik pipetta segítségével. Ha a szeparáló oldat lefolyt, vegye ki a pipettát úgy, hogy közben a végét befogja. A rétegezés után mielőbb centrifugáljon, és vigyázzon, hogy a rétegek ne keveredjenek amikor a centrifugába helyezi a csöveket. A centrifugát lassan pörgesse fel, és lassan, fék nélkül állítsa le! (A gyors felpörgetés vagy leállítás a rétegek keveredését okozhatja.) A centrifugacsöveket mindig pontosan ellensúlyozva kell a centrifugába betenni!
3. Centrifugáljon 400g-vel pontosan 30 percig szobahőmérsékleten. (Közben elkészíthetik a vérkeneteket a kenetkészítésnél leírtak szerint.)
4. Centrifugálás után óvatosan vegye ki a centrifugacsöveket. Pipettával eltávolíthatja a felülúszó nagy részét felülről haladva addig, amíg körülbelül 0,5 cm-re meg nem közelíti a mononukleáris sejtek áttetsző rétegét. Ezután leszívhatja a mononukleáris sejtek rétegét pipettával anélkül, hogy a pipetta behelyezésével a rétegeket összekeverné. A felső réteg eltávolítására nincs szükség, ha vékony Pasteur pipettát használ a mononukleáris sejtek leszívásához. Az így kinyert limfocitadús mintákat

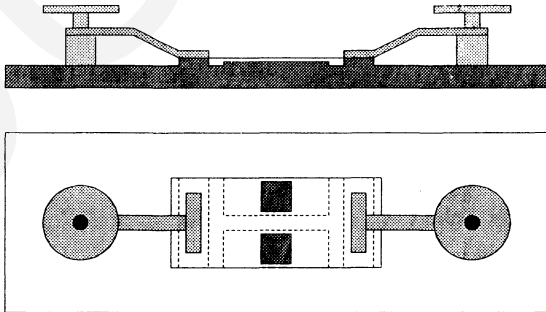
tegye egy 15 ml-es centrifugacsőbe és mossa kétszer a sejteket. (A centrifugálások ideje alatt folytassa a gyakorlatot a következő ponttól.) A második mosás után 0,3 ml FCS-ben (FCS: Fetal Calf Serum) szuszpendálja fel a sejteket és készítsen belőle kenetet.

5. A szeparáló oldatot a leülepedett vörösvértesteket és granulocitákat tartalmazó rétegről maradéktalanul távolítsa el és mossa a sejteket egyszer PBS-sel. Szuszpendálja fel a sejteket PBS-ben és töltsé fel a centrifugacsövet úgy, hogy a teljes térfogat körülbelül 10 ml legyen. Adjon hozzá annyi dextrans oldatot (6% dextransz fziológias sóoldatban), hogy a végső dextransz koncentráció 1% legyen és hagyja állni, amíg a vörösvértestek leülepednek (körülbelül 1 óra). Ha a vörösvértestek leülepedtek szívja le a granulocitadús felülúszót és mossa a granulocitákat egyszer PBS-ben, majd vegye fel a sejteket 0,3 ml FCS-ben és készítsen belőle kenetet.

Mosás: Töltsé fel teljesen a centrifugacsövet PBS-sel és centrifugálja le a sejteket tartalmazó oldatot 250g-vel 10 percig. Ezután öntse le a felülúszót és óvatosan szuszpendálja fel a sejteket.

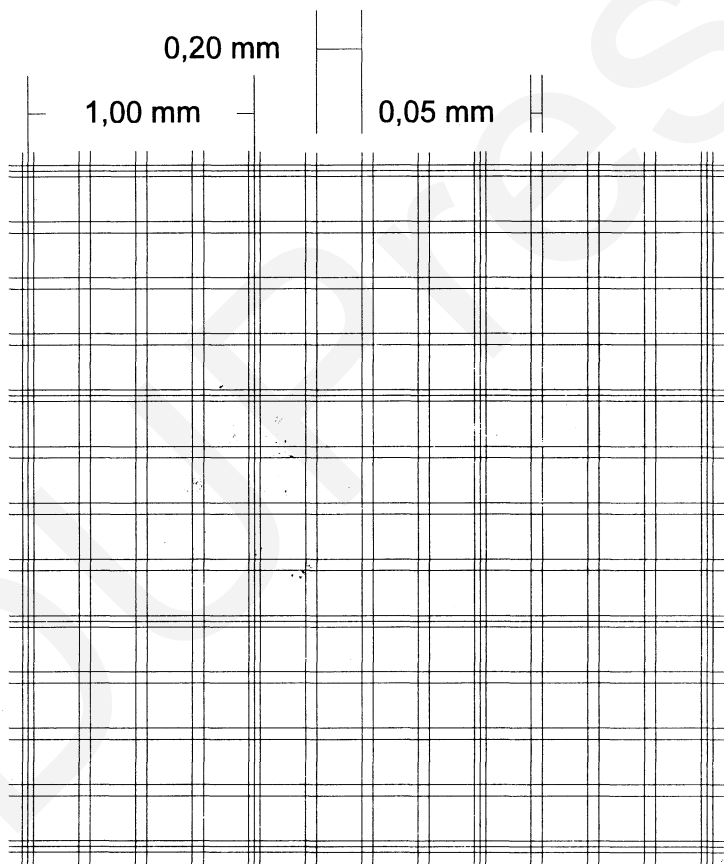
Sejtszámolás:

Vérsejtek számolásához készítették a Bürker kamrát.



Bürker kamra oldalnézetben (felül) és felülnézetben (alul).

Ez egy vastagabb üveglemezből és egy vékony fedőlemezből áll. A vastag lemezre finom beosztás van karcolva. A kamra olyan, hogy ha a fedőlemez a vastag lemezre helyezük és azt leszorítjuk, akkor pontosan 0,1 mm vastag rés marad közöttük. A vizsgálandó anyagot ebbe a résbe helyezük be a fedőlemez felhelyezése után úgy, hogy a vastag lemezbe vésett H alakú mélyedés szarai között található négyzetnél a fedőlemez széléhez cseppentjük. Mivel tudjuk a rés vastagságát és a vastag üveglemezen levő beosztások távolságát, a beosztások és a fedőlemez által határolt bármelyik téglatest térfogatát meg tudjuk határozni, így meg tudjuk adni a térfogategységben található sejtek számát.



A Bürker kamrában látható beosztás.

Határozza meg a granulocitákat és a limfocitákat tartalmazó oldatokban található sejtek koncentrációját Bürker kamra segítségével. A sejteket tartalmazó oldat

kicsiny (10 μl) térfogatát egy külön csőben úgy kell hígítani, hogy a $0,1 \text{ mm}^3$ térfogatban lehetőleg néhányszor tíz sejt legyen. Érdekes $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ oldalhosszúságú négyzetek felett található sejtek számát meghatározni. Egy ilyen négyzet felett található téglatest térfogata $0,1 \text{ mm}^3$. Legalább három négyzetben számolja meg a sejteket és ezt átlagolja. Határozza meg az összes sejtszámot és azt, hogy 1 ml vérből hány sejtet sikerült szeparálni. Az adatokat foglalja táblázatba az alábbi módon:

	Limfocita	Granulocita
1.		
2.		
3.		
Átlag		
Összes sejtszám		
Összes sejtszám/ml vér		

Kenetkészítés:

A kenetkészítés lényege, hogy a tárgylemezen a sejteket egy sejtrétegben széthúzzuk, majd fixáljuk, festjük és végül fénymikroszkóppal vizsgáljuk. Készítsen keneteket a szeparált sejtekből (legalább 2-2 kenetet) és egy csepp vérből is (legalább kettőt).

1. Zsírtalanítsa a tárgylemezt acetonnal, majd várja meg amíg megszárad.
2. A sejteket tartalmazó oldatot cseppentse a tárgylemez egyik végére középre, és gyors, egyenletes mozdulattal csiszolt végű tárgylemezzel a cseppet kenje ki. A tárgylemezt eközben körülbelül 30° -os szögben kell megdőnteni és így tolni előre.
3. Várja meg, amíg a kenet megszárad.
4. Fixálja a kenetet metanollal 25 percig.
5. Szárítsa meg a keneteket.

Feulgen-festés:

A módszer lényege a következő: ha a vizsgált DNS tartalmú mintát 5N HCl oldatban hidrolizáljuk, akkor a molekula elveszíti bázisait és a DNS-ben található

dezoxiribóz molekulák aldehid csoportjai szabaddá válnak. A szabad aldehid csoport pedig Schiff reagenssel kimutatható.

Oldatok:

1. Schiff reagens
 2. 5N HCl.
 3. 0,05M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (nátrium-tioszulfát, fixírsó).
-
1. Hidrolizálja a vizsgált anyagot 40 percig 5N HCl oldatban. (Közben végezze el a sejtek átlagos átmérőjének meghatározása című feladatot.)
 2. Öblítse le desztillált vízzel.
 3. Fesse Schiff reagenssel 10 percig.
 4. Öblítse le a keneteket 0,05M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -al.
 5. Mossa csapvízzel 10 percig.
 6. Az elkészített kenetet vizsgálja meg fénymikroszkópban különböző nagyításokkal.

A festés eredménye:

A DNS sötét lilás-piros színnel festődik, míg a többi sejtalkotók nem vagy csak igen kis mértékben festődnek. Tanulmányozza a kenetekben található sejtek magjainak morfológiáját. Vizsgálja meg a keneteket, írja és rajzolja le a látottakat.

Sejtek átlagos átmérőjének meghatározása:

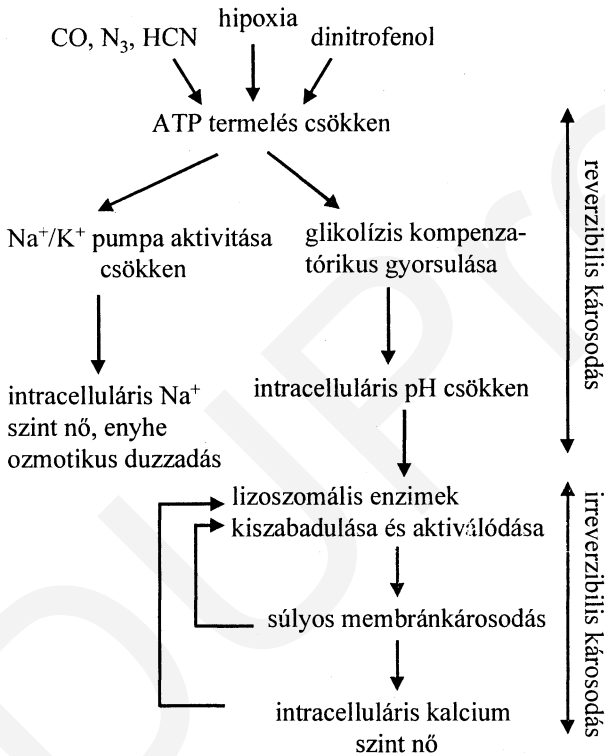
Kalibrálja az okulárskálát tárgymikrométer segítségével, határozza meg a kiadott keneteken található sejtek átmérőjét és ábrázolja hisztogrammon.

1. Állítsa élesre a tárgymikrométert.
2. Számolja meg, hogy hány okulárskálára beosztás felel meg a tárgymikrométer kalibrált beosztásának.
3. Ismerve a tárgymikrométer skáláját számítsa ki azt, hogy egy okulárskála egység hány μm -nek felel meg.
4. Vizsgálja meg a keneteken található sejtek átmérőinek eloszlását és a mért adatokat ábrázolja hisztogrammon.

Sejtkárosodásra vezető fizikai és kémiai folyamatok hatásának tanulmányozása

A sejtkárosodás mechanizmusa

Az élő sejt a környezetével dinamikus kölcsönhatásban lévő rendszer, amely a környezet változásaihoz alkalmazkodni, adaptálódni képes. Ha a változások nagysága meghaladja a sejt adaptációs képességét, akkor sejtkárosodás jön létre.



1. ábra A mitokondriális energiatermelést gátló anyagok egyszerűsített hatásmechanismusa

A sejtkárosodást kiváltó okok rendkívül sokféle lehetnek, de az elsődleges tényező által kiváltott másodlagos folyamatok már sokkal sablonosabbak. Az elsődleges tényezők különféle mediátorokat (pl. szabad gyökök, l. később) szabadítanak fel, és többféle másodlagos folyamatot indítanak el, amelyek végül a sejt pusztulásához vezetnek. A másodlagos folyamatok alapján két alapvető mechanizmust tárgyalunk: a sejt anyagcseréjének károsodása különféle primer behatásokra és a sejt-

membrán károsodása. Látni fogjuk azonban, hogy a két folyamat keveredik is (pl. a sejtmembrán károsodása megfigyelhető az anyagcsere károsodása esetén is). Az anyagcsere károsodását több primer tényező is kiválthatja:

- a hipoxia (az O_2 koncentráció csökkenése, mint pl. szívinfarktus esetén az elzáródott artéria ellátási területén)
- a mitokondriumot károsító ágensek (pl. azid, cián és szén-monoxid, amelyek a mitokondriális elektrontranszport működését gátolják, mert a ferro-ferri átalakulást gátolják azáltal, hogy a ferri (azid és cián), ill. a ferro (szén-monoxid) alakot stabilizálják; dinitrofenol, ami a mitokondriális belső membrán proton permeabilitását növeli meg, és megszünteti a protongradienst és ezáltal az ATP termelést)
- a sejt tartós éhezése.

Ezen folyamatokban közös, hogy az ATP termelés csökkenéséhez vezetnek. A sejt az ATP koncentráció csökkenése ellen védekezik: ha a mitokondriális energiatermelés sérül pl. hipoxia miatt (mivel az O_2 a végső elektron akceptor a terminális oxidációban), akkor a glikolízisen keresztül termel a sejt ATP-t; ha az alacsony vércukor szint miatt nem történhet glikolízis, akkor a zsírsavakat vagy a proteineket kezdi a sejt lebontani. Ha a károsító tényező hatása tartós vagy erős, akkor ezen adaptációs folyamatok ellenére a sejt ATP koncentrációja jelentősen csökken. Ennek hatására csökken a plazmamembrán ATP-függő pumpáinak (eleinte főleg a Na^+/K^+ pumpa) működése. Az ép és a károsodott sejtekbe is történik nátrium beáramlás. Ez egyrészt a membrán aspecifikus permeabilitásának következménye, másrészt bizonyos sejtfunkciókhoz kötődő ioncsatorna aktivitások miatt történik (pl. idegsejtekben az akciós potenciál során feszültségfüggő nátrium csatornák nyílnak meg). Ha a sejtbe beáramló nátrium nem pumpálódik ki a sejtől, az intracelluláris nátrium koncentráció nő. Mivel a nátrium ionokat az ozmotikus egyensúly fenntartása miatt víz is követi, ez a sejt ozmotikus duzzadását eredményezi. A sejtmembránon kitüremkedések (blebek) keletkeznek. Ebben a folyamatban fontos szerepet tölt be az, hogy a sejtmembrán vízpermeabilitása igen nagy. Ezért egyes sejtekben (pl. vörösvértestek) egy, a membránban található csatornaképző protein felelős, amelyet aquaporinnak vagy CHIP-nek (channel-forming integral protein) neveznek, amelyet a víz számára átjárható pórusokat alakít ki a membránban.

A sejt az ozmotikus károsodás ellen is próbál védekezni. Ha a sejt ozmotikusan duzzad, sejtmembránjában olyan ioncsatornák aktiválódnak (pl. klorid és kálium csatornák, de semmiképpen nem nátrium), amelyek nyitása valamilyen ion (pl. az említett esetekben klorid és kálium ionok) kiáramlását eredményezi, ami vízvesztéssel jár együtt. Ezen ionok a csatornákon keresztül passzívan, tehát ATP felhasználása nélkül, a károsodott sejtben kialakult elektrokémiai potenciálgadiensüknek megfelelően transzportálódnak. Ha a sejt hiperozmoláris közegbe kerül, akkor zsugorodás indul be, ami ellen a sejt nátrium ionok számára permeábilis csatornák megnyitásával védekezik, amelyeken keresztül nátrium, és következményesen víz áramlik a sejtbe.

Amíg a plazmamembrán károsodása nem nagyon kiterjedt, a károsodások reverzibilisek. Ha azonban folytatódik a strukturális elemek (protein, lipid) lebontása és a sejt ATP szintje alacsony marad, irreverzibilis károsodás keletkezik. Az irreverzibilis károsodás legfontosabb tényezője a plazmamembrán és az intracelluláris membránok jelentősen megnövekedett specifikus permeabilitása. A megnövekedett permeabilitás miatt jelentős mennyiségű kalcium áramlik a citoplazmába az extracelluláris térből és az intracelluláris raktárakból. A megnövekedett kalcium koncentráció kalcium függő proteázokat és lipázokat aktivál, ami tovább emeli a membránok permeabilitását. A membránok permeabilissá válnak fehérjék számára is, ami egyrészt a citoplazmatikus proteinek elvesztését jelenti, másrészt a lizoszómákból különféle bontó enzimek szabadulnak fel, amik a citoplazma és a mag állományának további emésztését és a sejt teljes pusztulását okozzák.

A károsító tényezők egy másik csoportjának támadáspontja a plazmamembrán és a citoplazmatikus **membránrendszerek**. (A membránkárosodás az előbbi csoportban is szerepel, de nem elsődleges támadáspont.) A membránokon belül károsodhat a fehérjék működése (pl. a Na^+/K^+ ATPáz specifikus blokkolója a ouabain, ami ezáltal az intracelluláris nátrium koncentráció emelkedéséhez és ozmotikus duzzadáshoz vezet; a higany vegyületek gátolják a szulfhidril csoporttal rendelkező fehérjék működését, így a membránok ATP függő pumpáit is). Ezen csoportba tartozó hatások másik támadáspontja a membrán lipidje. Ezt károsíthatják pl. lipidoldószeres és szabad gyökök. A szabad gyökök olyan elektroneutrális vegyületek, amelyekben párosítatlan elektron van. Ezen molekulák instabilak és rendkívül reakcióképesek. A szabad

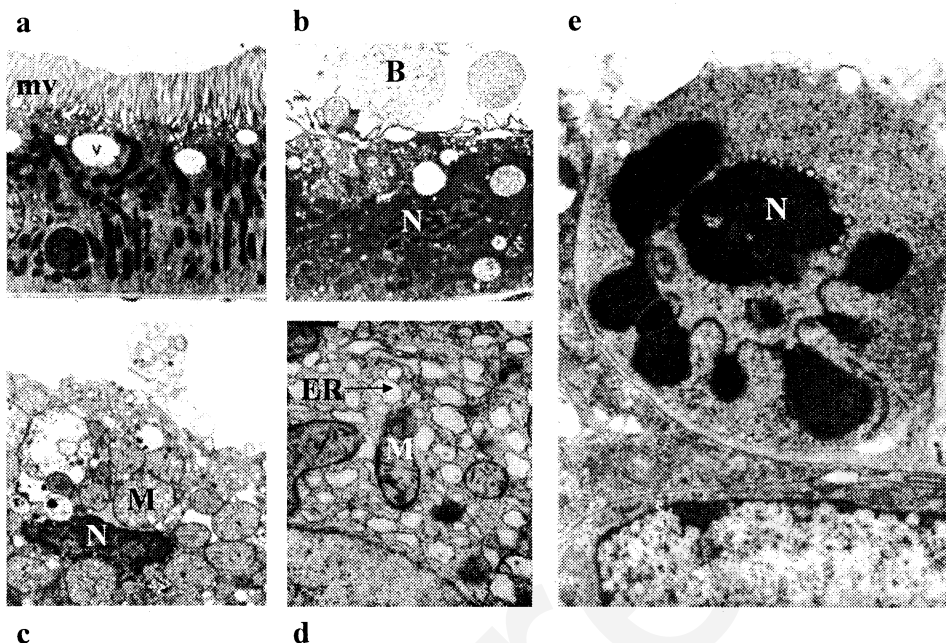
gyökök a membránok lipidjeiben a kettőskötéseket támadják meg, és peroxidokat képeznek, ami a membránok aspecifikus permeabilitását nagymértékben fokozza. A szabad gyökök károsíthatják még a fehérjéket és a DNS-t is. Szabad gyökök keletkeznek pl. a következő esetekben:

- ionizáló sugárzás hatásakor,
- az oxidatív anyagcsere melléktermékeként (amikor az elektrontranszport során az elektron nem a megfelelő akceptorra jut),
- fehérvérsejtekben enzimatikus úton a baktériumok és gombák elpusztításakor (bizonyos enzimek, pl. NADPH oxidáz, képesek szabad gyökök katalitikus termelésére. Az így keletkező szabad gyökök károsítják a baktériumokat és a gombákat. Mivel a folyamat szabályozott, nem jár a szervezet saját sejtjeinek nagyfokú károsodásával.),
- úgynevezett reperfüziós károsodás esetén. Utóbbi akkor következik be, ha a szervezetben egy hipoxiás szövetterületre újból oxigénben gazdag vér áramlik. Az oxigén szabad gyököket valószínűleg a vérben levő fehérvérsejtek termelik,
- egyes fémionok által katalizált reakciókban (pl. Fe^{2+} a Fenton-reakcióban).

A fentebb részletezett károsító folyamatoknak három kimenetele lehetséges:

- a sejt gyors elhalása következik be. Ezt a folyamatot nekrózisnak hívjuk (ezt ismertettük a fentiekben). A nekrosis folyamatában a sejt csak passzívan vesz részt.
- más esetekben a sejtelhalás egy másik formája, az apoptózis játszódik le. Az apoptózis folyamatában az elhaló sejt aktívan részt vesz, egy a genomban kódolt program végrehajtásának eredményeképpen a sejt elpusztul. Apoptózisban a membránok kevésbé károsodnak, így a bontó enzimek kiszabadulásának mértéke is kisebb. Ezért apoptózis esetén a sejtet körülvevő szövetkörnyezet károsodása kisebb mértékű.
- a legenyhébb változásokhoz a sejt képes adaptálódni.

Meg kell jegyezni, hogy az apoptózis és a nekrosis folyamatában és mechanizmusában több közös vonás is van: pl. bizonyos enzimek aktiválódása mindkét esetben megfigyelhető. Azt, hogy egy adott esetben melyik folyamat alakul ki, a behatás típusa, erőssége (egyes tényezők enyhe behatás esetén apoptózist, súlyosabb károsodás esetén



2. ábra

- a. Normális epiteliális sejt a vese proximális tubulusból (mv - mikrovillus)
- b. Reverzibilis hipoxiás károsodást szenvedett proximális tubulussejt. A mikrovillusok eltűntek, membrán kitüremkedések (blebek) keletkeztek. (B – bleb, N – mag)
- c. Irreverzibilis hipoxiás károsodás proximális tubulussejtben. Nagy, duzzadt mitokondriumok (M), súlyosan károsodott citoplazma membrán, elektrondenz magállomány (N).
- d. CCl_4 mérgezés hatása patkány májsejtekre. Az endoplazmatikus retikulum (ER) duzzadt. (M – mitokondrium)
- e. Apoptotikus sejt az emlőben. A magállomány (N) rendkívül kondenzált, a citoplazma és a plazmamembrán majdnem teljesen sértetlen. A kép alján egy ép sejt részlete látható.

nekrózist váltanak ki) és a sejt milyensége szabja meg (bizonyos sejtek nagyon könnyen apoptotizálnak, mások nem).

A fenti hatások főleg rövid távon okoznak károsodást. Ha azonban a károsító agens a DNS-t támadja meg, annak hatása később is megnyilvánul. Kifejezett DNS károsodás szintén vezethet nekrotikus sejtelhaláshoz, de a soksejtű szervezetekben legalább ekkora veszélyt jelent a daganatképződés is. A kialakult mutációk ellen a sejt többféleképpen védekezik:

- megpróbálja a mutációkat kijavítani,
- ha a mutációk kijavítása nem sikerül, akkor a sejt apoptózist szenved, így megelőzi a daganatok kialakulását. Ennek kiváltásában központi szerepet tölt be a p53 fehérje.

A fenti, széleskörűen ismert nomenklatúrában újabban változtatásokat javasoltak. A sejtelhalás kezdeti fázisának két lehetséges mechanizmusát különítik el: apoptotikus sejthalál és onkotikus sejthalál (amely megfelel a korábban nekrozisnak nevezett folyamat kezdeti lépéseinek). Mindkét folyamat egy végső közös út felé konvergál. Az új nomenklatura ezt a végső közös fázist nevezi nekrozisnak. Az új nevezéktan azon a már korábban említett felismerésen alapszik, hogy a sejtelhalás két típusában vannak közös lépések és a folyamat végső fázisa a korábban apoptotikusnak, ill. nekrotikusnak leírt folyamatokban nagymértékben hasonló: mindkét esetben a sejt teljes feloldódásával jár.

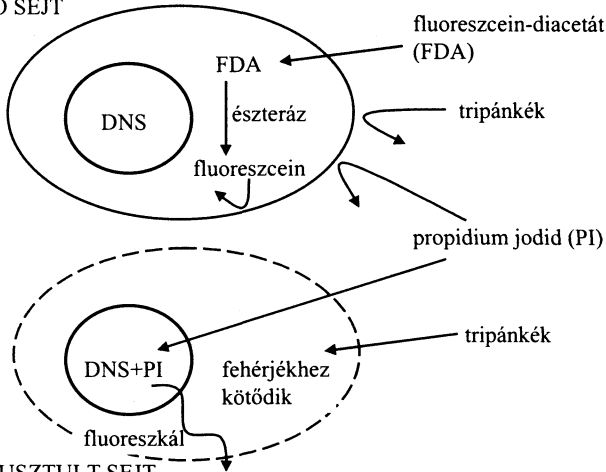
Sejtek életképességének vizsgálata

A kísérletes orvostudományban gyakran van szükség arra, hogy egy sejtpopuláción belül az élő és az elpusztult sejtek arányát meg tudjuk határozni. Az életképesség vizsgálata a gyakorlatban ezen arány megadását jelenti. Az alkalmazott kísérleti módszerek által szolgáltatott eredmények azonban csak részben felelnek meg egymásnak. Ennek oka az, hogy a sejt élő vagy elpusztult voltát nem lehet egyértelműen definiálni, és az egyes eljárások érzékenysége jelentősen eltér.

1. A leggyakrabban alkalmazott eljárások alapja az, hogy a károsodott sejtekben megnő a sejtmembrán aspecifikus permeabilitása.

- Ez az elvi alapja a *propidium-jodiddal (PI) vagy etidium-bromiddal (EBr)* történő életképesség mérésnek. Ezen fluoreszcens indikátorok az élő sejtek membránján nem képesek áthatolni. Élettelen sejtek megnövekedett permeabilitású membránján behatolnak, és a sejtmagba diffundálnak, ahol a DNS-hez kötődnek. Ezen kötődés fluoreszcencia kvantumhatásfokukat jelentősen megnöveli. A fentiek miatt csak az elpusztult sejtek fognak fluoreszcenciát mutatni. A propidium-jodidot és etidium-bromidot legáltalánosabban áramlási citométerekben alkalmazzák. Az etidium-bromid alacsonyabb molekulatömege miatt lassan képes ép sejtek membránján is áthatolni, így az élő és elpusztult sejtek közötti különbségtétel kevésbé megbízható.

ÉLŐ SEJT



ELPUSZTULT SEJT

3. ábra Sejtek élepképességének meghatározása membrán-permeabilitás-méréssel

• (Hasonló elven alapszik a *tripánkékel* történő vizsgálat is. Ezt az indikátort szintén csak a megnövekedett aspecifikus permeabilitású, elpusztult sejtek veszik fel. Az intracelluláris térben a tripánkék fehérjékhez adszorbeálódnak. Ez az indikátor nem fluoreszcens, de kék színe miatt az

elpusztult sejtek egyszerű fénymikroszkópban megszámolhatók. Ezen vizsgálat hátránya az, hogy a tripánkék hosszabb idő alatt az élő sejtekbe is képes behatolni.

- A *fluoreszcein-diacetát* (FDA) felhasználásának az alapja az, hogy ezt az indikátort az élő sejtek felveszik, és az intracelluláris térben levő aspecifikus észterázok elhidrolizálják. Így a nem fluoreszcens FDA-ból fluoreszcens szabad fluoreszcein keletkezik, ami hidrófil karaktere miatt nem képes az ép membránnal rendelkező sejtekből kiáramlani. Az elpusztult sejtek egyrészt nem hidrolizálják el az FDA-t, mert enzimeik kiáramlottak a sejtől, másrészt ha el is hidrolizálják, a szabad fluoreszcein kidiffundál a citoplazmából. Ezen eljárás esetén az élő sejtek mutatnak fluoreszcenciát. A módszert leginkább fluoreszcens mikroszkópban és áramlási citométerben alkalmazzák. Az FDA és a PI vagy EBr együttesen is alkalmazható. Ebben az esetben az élő sejtek zöld fluoreszcenciát mutatnak a fluoreszcein miatt, míg az elpusztultak vöröset a PI vagy az EBr jelenléte miatt.
- A *radioaktív króm* (^{51}Cr) felszabadulás mérése az FDA-hoz hasonló elven alapszik. Ebben az esetben a sejteket előzetesen megtöltik radioaktív

krómmal, majd azt vizsgálják, hogy a sejtek által felvett radioaktivitás hány százaléka szabadul fel valamilyen kezelés hatására. A radioaktív króm a megnövekedett aspecifikus permeabilitású sejtekből szabadul fel. Az arányból tudnak arra következtetni, hogy az adott kezelés a sejtek hány százalékát pusztította el. Újabban a radioaktív króm helyett *europiumot* használnak, amit lumineszcenciája alapján detektálnak. Teljesen hasonló elven nyugszik az a megközelítés is, amiben a sejtekből felszabaduló valamilyen enzim aktivitását mérik (pl. laktát dehidrogenáz, kreatin-kináz). Érdeemes megjegyezni, hogy ilyen vizsgálatokat a klinikai orvostudomány is alkalmaz a szívinfarktus diagnosztikájában, amikor a szérumban az infarktus miatt sérült sejtekből kiáramló enzimek aktivitását mérik.

- Indirekten szintén a membrán épségével függ össze a *membránpotenciál* is. Különböző indikátorokkal a plazmamembrán és a mitokondrium belső membránjának potenciálja is megmérhető.

2. Bizonyos esetekben a sejtek életképességét a mitokondriális energiatermelés segítségével mérik. Ennek helyszíne a mitokondrium belső membránja és a mitokondriális mátrix. Az energiatermelés elektrontranszporttal és oxidatív reakciókkal jár együtt. Ezért ha a sejteket vízben oldható *tetrazólium sóval* kezelik (pl. 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazólium bromid, *MTT*), a mitokondriális dehidrogenázok ezt vízben oldhatatlan kék formazánná redukálják. Emiatt az élő sejtek kék színűek lesznek. Mivel a sejtek életképessége a mitokondriális elektrontranszport és energiatermelés függvénye, ez a módszer értékes alternatívája a membránpermeabilitás mérésen alapuló eljárásoknak. Sejt kultúrákban ezt a módszert használják különböző anyagok életképességre kifejtett hatásának mérésére (microculture tetrazolium assay=MTA).

Szintén az energiatermelés becslésén alapszik az intracelluláris ATP szint mérése, amit szintén fel lehet használni életképesség-mérésre.

3. Olyan vizsgálatok esetében, ahol a sejtek osztódását vizsgálják, az életképesség nem egyszerűen a membrán épségét jelenti, hanem azt, hogy a sejt egy adott stimulusra osztódni képes. Ha DNS-t szintetizáló sejteket *radioaktív timidin*

jelenlétében inkubáljuk, a sejt a nukleozidot felveszi és nukleozid-trifoszfátot szintetizál belőle, ami a DNS szintézis szubsztrátja. A radioaktív timidin ezáltal beépül a DNS-be. A DNS-t nem szintetizáló sejtek nem építik be ezt a nukleotidot, mert az RNS nem tartalmaz timin bázist. Teljesen hasonló elven alapul a *bróm-deoxi-uridin (BrdU)* beépülésének vizsgálata. A bróm-deoxi-uridin a timidin helyett épül be a DNS-be. Ezt fluoreszcensen jelzett anti-BrdU antitest segítségével lehet kimutatni.

Törzsoldatok

- 0.4 % tripánkék oldat PBS-ben (phosphate buffered saline) oldva
- 0.5 mg/ml fluoreszcein-diacetát acetonban oldva (hűtőben tartani). Ebből 20x, PBS-ben történő hígítással készül a festéshez használt 25 µg/ml-es oldat (mindennap újat készíteni).
- 1 mg/ml-es propidium-jodid PBS-ben oldva (hűtőben tartani). Ebből 5x, PBS-ben történő hígítással készül a festéshez használt 200 µg/ml-es oldat (mindennap újat készíteni).

Feladatok

1., Ábrázolja a fordulatszám függvényében a centripetális gyorsulást $r=0.06$ és 0.12 m sugár esetében! A megadott képletek segítségével számolja ki, hogy mekkora fordulatszám mellett lesz az Eppendorf centrifuga térerőssége 400 g a gyakorlaton használt centrifuga sugarát használva!

$$a_c = \omega^2 r = (2\pi f)^2 r = \frac{N_p^2 4\pi^2 r}{60^2} \qquad N_p = \sqrt{\frac{a_c 60^2}{r 4\pi^2}}$$

ahol a_c a centripetális gyorsulás, ω és r rendre a szögsebesség és a centrifuga rotorjának sugara, f a másodpercenkénti, N_p a percenkénti fordulatszám.

fordulatszám (1/min)	centripetális gyorsulás (m/s ²)	
	$r=0.06$ m	$r=0.12$ m
1000		
2000		
3000		
4000		
5000		

2., A gyakorlaton HL60 nevű leukémia sejtvonal életképességét fogják vizsgálni. Szuszpendálja fel a sejteket, centrifugálja 400 g-vel 10 percig. Vegye fel a sejteket

1	40 perc, 37 °C
2	0.5 % azid 40 perc, 37 °C
3	centrifuga, 1 perc 40 perc, 37 °C
4	37 °C centrifuga, 3 perc 40 perc, 37 °C
5	37 °C centrifuga, 5 perc 40 perc, 37 °C
6	37 °C centrifuga, 10 perc 40 perc, 37 °C
7	20 perc fagyasztás 20 perc, 37 °C
8	40 perc, 37 °C, 200 mOsm

10 ml PBS-ben. A sejteket Bürker-kamrában történő számolás után centrifugálja le ismét 400 g-vel 10 percig, majd szuszpendálja fel 10^7 /ml töménységben PBS-ben. Számozott Eppendorf csövekbe töltsön 80 µl sejtsuszpenziót.

- A 2. mintához az inkubáció elején adjon 0.5 % Na-azidot.
- A 3-6. mintákat inkubálja 37 °C-os vízfürdőben, közben a magadott ideig centrifugálja őket az Eppendorf centrifugában. A centrifugálás után óvatosan szuszpendálja fel a sejteket, majd inkubálja az Eppendorf csöveket 40 percig 37 °C-on.
- A 7. mintát 20 percre rakja mélyhűtőbe, majd utána rakja vissza 20 percre a 37 °C-os vízfürdőbe.
- A 8. Eppendorf csőbe a 80 µl sejtsuszpenzióhoz adjon 40 µl desztillált vizet.

Az inkubáció végén a mintákat helyezze jégre. Ezáltal a sejtek életképességében további változások nem fognak történni (ill. csak sokkal lassabban, mint szobahőmérsékleten vagy 37 °C-on).

3., Festés tripánkéssel, fénymikroszkópos vizsgálat:

Szintén számozott Eppendorf csövekbe mérjen ki 30-30 μl 0.4 % tripánkék oldatot. Adjon ezekhez a csövekhez 30 μl sejtuszuspenziót a megfelelő sorszámú csövekből. Inkubálja a csöveket 3 percig szobahőmérsékleten. Ezt követően cseppentsen ki 10-10 μl -t minden mintából tárgylemezre, fedje le fedőlemezrel. 100x immerziós objektív használatával számoljon le 100-100 sejtet minden mintában, és adja meg a tripánkék festéket felvevő (nem életképes) és az azt fel nem vevő (életképes) sejtek arányát. (A tripánkék pozitív sejtek egészen halványkék színűek.)

4., Sejtek festése propidium-jodid és fluoreszcein-diacetát keverékkel. Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat

Számozott Eppendorf csövekbe mérjen 30 μl 25 $\mu\text{g/ml}$ -es fluoreszcein-diacetát oldatot és 30 μl 200 $\mu\text{g/ml}$ töménységű propidium-jodid oldatot. Adjon ezekhez a csövekhez 30-30 μl -t a megfelelő sejtuszuspenziókból. Inkubálja ezeket a csöveket 5 percig szobahőmérsékleten. Cseppentsen ki a szuszpenziókból 10-10 μl -t tárgylemezre. Lefedés után 100 sejt megvizsgálása segítségével határozza meg a propidium-jodid (vörös) és a fluoreszcein (zöld) pozitív sejtek arányát. (Egy sejt általában vagy propidium-jodid pozitív (teljesen vörös) vagy fluoreszcein pozitív (teljesen zöld). Előfordul azonban, hogy az éppen permeabilizálódó sejtek még nem vesztek el fluoreszcein tartalmukat, de a propidium-jodidot már felveszik. Ezen sejtek általában sárga-narancssárga színűek. Ezeket ne számolja.)

5., Ábrázolja oszlopdiaagramon a nyolc minta esetében a tripánkékekkel és a propidium-jodid+fluoreszcein-diacetát festéssel kapott elpusztult sejt arányt. Milyen eredményeket kapott a két különböző módszerrel?

	Kezelés	tripánkék		PI+FDA	
		pozitív	negatív	PI pozitív	fluoreszcein pozitív
1	kontroll				
2	0.5 % azid				
3	centrifugálás, 1 perc				
4	centrifugálás, 3 perc				
5	centrifugálás, 5 perc				
6	centrifugálás, 10 perc				
7	fagyasztás, olvasztás				
8	200 mOsm				

Sejtalkotók lumineszcens jelölése, vizsgálata fluoreszcenciás mikroszkópban

A fluoreszcenciás és transzmissziós (abszorpciós) képalkotás összehasonlítása

Az élő minták abszorpciója viszonylag csekély, ezért az egyes sejtalkotók kontrasztja egymáshoz viszonyítva alacsony. A kontraszt fokozására alkalmazhatunk festékeket, melyek egyes sejtalkotókhoz specifikusan kötődnek. Az ilyen jellegű festés általában a sejt pusztulását vonja maga után, tehát a módszer élő sejtek megfigyelésére csak elvétve alkalmas. Az élő sejtekben lejátszódó folyamatok megfigyelésére ezért a transzmissziós mikroszkópia számos változatát dolgozták ki, pl.: sötétlátóteres (ultramikroszkóp), fáziskontraszt, interferenciakontraszt, és polarizációs mikroszkópok. A mindennapi gyakorlatban többnyire a fáziskontraszt mikroszkópot alkalmazzuk, mely a minta különböző pontjain áthaladó fotonok fáziskülönbségét intenzitáskülönbséggé alakítja.

Szemben az abszorpcióval, a lumineszcencia (fluoreszcencia) *in vivo* megfigyelése nagy érzékenységet és jó kontrasztot biztosíthat. Ennek oka egyrészt az, hogy a lumineszcencia megfigyelésekor az emittált fotonokat sötét háttérrel szemben detektáljuk, így minden emittált foton elvileg 100%-os intenzitásnövekedést jelent. Emellett a fluoreszcens jelzést tetszőleges megfigyelendő sejtalkotóhoz vagy molekulához kapcsolhatjuk, szükség esetén sokkal specifikusabb módon használhatjuk, mint a transzmissziós mikroszkópiában alkalmazott festések többségét. Ugyanakkor a legtöbb fluoreszcens jelzés a sejteket csak csekély mértékben károsítja, hiszen nem összetett kémiai reakciók eredménye, s így a sejtműködéssel összeegyeztethető. A sejtekbe (sejtekre) juttatott fluorofór megfigyelésére többnyire epifluoreszcenciás technikát alkalmaznak.

A fluoreszcenciás mikroszkópia néhány alkalmazása

1. Morfológia, mennyiségi jellemzés
 - a. Sejtalkotók megfigyelése, pl. sejtmag és mitokondrium DNS-ének jelölése interkalálódó festékekkel, membránstruktúrák jelölése fluoreszcens lipidekkel, mitokondrium jelölése rodamin 123-mal.
 - b. Sejtfelszíni vagy sejten belüli fehérjék (antigének) kimutatása. Általában specifikus monoklonális antitesthez, vagy nagy affinitással kötődő ligandhoz, szubsztráthoz, vagy toxinhoz kötött fluoreszcens festék segítségével történik. A specifikusan jelölt fehérjék eloszlásából a sejtalkotók szerkezetére is lehet következtetni – pl. a sejtvázas egyes filamentumainak jelölésekor.
 - c. Specifikus DNS vagy RNS szekvenciák kimutatása *in situ* hibridizációval.
2. Dinamikusan változó paraméterek vizsgálata
 - a. Fehérjék *in situ* megfigyelése (módszereit tekintve lásd 1/b). Meghatározhatjuk egyes membránfehérjék laterális és rotációs diffúzióját (FRAP, időfüggő foszforeszcencia anizotrópia), vagy akár egyes molekulák mozgásának pályáját (“single particle tracking”), a fehérjék sorsát szintézisüktől lebontásukig, az egyes fehérjék kölcsönhatását a sejtek életfolyamatai során (energiatranszfer és korrelációs spektroszkópiás mikroszkópiák).
 - b. DNS szintézis mértékének meghatározása (Br-deoxiuridin (BrdU) beépítése a DNS-t szintetizáló sejtekbe, majd ennek kvantitatív meghatározása fluoreszcensen jelölt anti- BrdU antitest segítségével)
 - c. Membránpotenciál mérése. Erre a célra alkalmazhatunk megoszláson alapuló próbákat, pl. bis-oxonol (negatív töltésű), karbocianinok (pozitív töltésű), valamint töltéseltolódáson alapuló (ún. charge-shift) próbákat, pl. di-4-ANEPPS.
 - d. Intracelluláris ionkoncentráció mérése. Itt gyakran felhasználjuk, hogy az adott iont megkötő és a szabad indikátor eltérő excitációs vagy emissziós maximummal rendelkezik, s a két maximumon mért fluoreszcencia intenzitás hányadosát képezve (arány-mérés vagy “ratio imaging”) a sejtbe juttatott festék

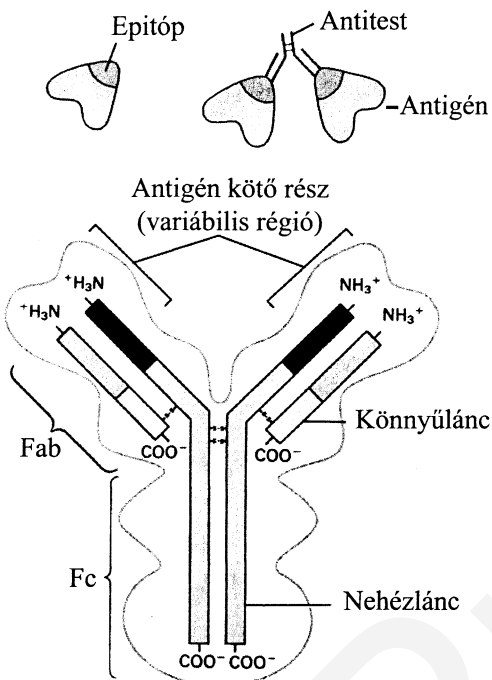
koncentrációjától függetlenül határozhatjuk meg az ion pillanatnyi koncentrációját. Az egyik leggyakrabban vizsgált ion a másodlagos hírvivő szerepét betöltő Ca^{2+} . Gyakran alkalmazott kalcium kelátor fluoreszcens indikátorok az Indo-1 (emissziós arányt mérünk) és a Fura-2 (excitációs arányt mérünk). A kalcium mellett más ionok sejten belüli koncentrációját is tudjuk mérni, pl. Na^+ -ot az SBFI, K^+ -ot a PBFI, H^+ -t (pH) a BCECF nevű indikátorokkal.

Fehérjék és nukleinsavak jelölése specifikusan kötődő molekulák segítségével

A fehérjék és nukleinsavak jelöléséhez leggyakrabban specifikusan kötődő molekulákat (próbákat) használunk, melyeket fluoreszcens jelzővel látunk el. A lumineszcens jelző lehet közvetlenül a próbához kötve (direkt jelölés), vagy konjugálhatják más, a próbához specifikusan kötődő molekulákhoz (indirekt jelölés). A továbbiakban először a specifikus próbák főbb kategóriáit ismertetjük, majd a direkt és indirekt jelölés módszereiről ejtünk néhány szót.

Jelölés antitestek segítségével

A fehérjék és más, antigenitással rendelkező makromolekulák jelölésére az egyik leggyakrabban alkalmazott próba a specifikus antitest. Alkalmazásakor immunfluoreszcens, ill. immuncitokémiai jelölésről beszélünk. Az antitestek nagy affinitással kötődnek az általuk felismert molekulához, az antigénhez (*1. ábra*). Az antigént megkötő részük hatalmas diverzitást mutat, a különböző plazmasejtek által termelt antitestek más és más antigénhez kötődnek, de mindegyik nagy specificitással, melynek hátterében az antitest Fab részének és az antigénen felismert régió (epitóp) térszerkezetének komplementer volta áll. Immunfluoreszcens jelöléshez lehetőség szerint monoklonális, tehát egy plazmasejt klón által termelt, egyfajta epitóphoz kötődő antitestet alkalmazunk. Azonban a poliklonális antitestek használata is sokszor eredményes, kiváltképp ha kis számban előforduló molekulát kívánunk láthatóvá tenni.



Ekkor ugyanis előny, ha egy molekulához több epitópon több antitest kötődhet. A teljes antitest bivalens, tehát két Fab részt tartalmaz, s azokkal egyszerre két, azonos epitóphoz képes kötődni (1. ábra). Emiatt egymástól egyébként távollevő epitópok is kereszt-kötődhetnek, ami a vizsgált struktúra (pl. receptormintázat) megváltozásához vezethet. Ilyen esetekben hasznos a szóban forgó antitest Fab fragmentumának alkalmazása, melyet a teljes antitestből papainos emésztéssel nyerhetünk. Ekkor lehasad az antitestet termelő fajra jellemző aminosav sorrendű, állandó

összetételű Fc (konstans) fragmentum, és két Fab fragmentum képződik. Az Fc fragmentumhoz hasonlóan az Fab fragmentum karboxi-terminális vége konstans, a fajra jellemző aminosav sorrendet mutat, tehát indirekt jelölés esetén (lásd később) fajspecifikus másodlagos antitestekkel jelölhető.

A monoklonális antitesteket leggyakrabban hibridómák segítségével állítják elő. A módszer lényege, hogy a megfelelő antitestet termelő plazmasejtet fúzionálják egy mielóma (limfoid tumor) sejttel, és a keletkező sejt optimális esetben egyesíti a plazmasejt antitest termelő tulajdonságát a daganatsejt korlátlan szaporodóképességével. A hibridóma előállításánál során a plazmasejtek forrását képező állatot immunizálják az antigénnel, s a lépéből kinyert sejteket fúzionálják mielóma sejtekkel. Így rengeteg hibridóma vonalat nyernek, melyek közül az antigénhez megfelelő helyen és nagy affinitással kötődő antitestet termelőt ki kell választani és tovább szaporítani. A gyakran sikertelen, drága procedúra alternatíváját a molekuláris biológia gyors fejlődése teremtette meg. Az ún. phagemid módszer azon alapszik, hogy az antitest

specifitásának változatosságát az Fab fragmentum területén az amino-terminális részen található variábilis régiók adják, s ezek önállóan – vagyis akár a nehéz-, akár a könnyűlánc a másik nélkül – is képesek változatos térszerkezeteket felvenni. Az ilyen, egy polipeptid láncból álló variábilis régiót szokás egyszálú antitestnek (single-chain antibody) is nevezni. Az ezen láncokat kódoló szekvencia beépíthető valamely egyszerű, könnyen előállítható fehérjét kódoló DNS-be, és azzal együtt szaporítható. Általában 8-15 aminosavat kódoló szekvenciát alkalmaznak, és azt valamely bakteriofág kapszidfehérjéjét kódoló DNS szakaszhoz illesztik hozzá – természetesen a lehető legnagyobb számú kombinációban. A bakteriofágok jól tenyészthetők, s az egyes törzsek közül a megfelelő antitest-szekvenciát a burkukon hordozók könnyen elkülöníthetők továbbszaporítás céljából. A belőlük nyert egyszálú antitest kis mérete és nagy (bár a kétszálúnál kisebb) affinitása miatt minden olyan alkalmazásban ígéretes, ahol a kis méret és a könnyű előállítás, tesztelhetőség követelmény, pl. ahol kiterjedése miatt még az Fab fragmentum is gátolja vagy megváltoztatja az antitest segítségével megfigyelni kívánt folyamatokat.

Eme gondolat kapcsán célszerű összefoglalni, hogy az alkalmazott immunfluoreszcens jelzés mely különböző szinteken képes a vizsgált rendszer működésébe beavatkozni. A bivalens antitestek által létrehozott keresztkötést, mint a fehérjék csoportos rendezettségét megváltoztató hatást már fentebb említettük. A keresztkötés emellett jelátviteli folyamatokat is képes megindítani, mégpedig azokban az esetekben, amikor két megkötött molekula fizikai közelsége, esetleg az antitest konformációt megváltoztató hatásával kiegészítve, elegendő trigger (lásd a gyakorlat leírásánál az EGF receptor példáját). Amennyiben a jelátviteli folyamat elindításához elegendő egy molekula konformációváltozása, és ezt az antitest létre tudja hozni, nemcsak a teljes antitest, de az Fab alkalmazása is lényeges beavatkozást jelent a megfigyelt rendszer működésébe. Ilyen esetben mimikriáról beszélünk, az antitest utánozza a ligand hatását. A jelenség ellentettje is előfordul: számos antitest kötődése nemhogy aktiválná, de inaktívvá teszi a jelölendő receptort, enzimet – akár szteriku gátlás miatt, akár azért, mert konformáció változást indukál.

Jelölés toxinokkal és más bioaktív vegyületekkel

A kis méret és specifikus, erős kötődés követelményének más molekulák is elegendőek. Ezek különböző toxinok és más bioaktív vegyületek (gyógyszerek, metabolitok, alkaloidok, lektinek), melyek gyakran növényi vagy állati eredetűek, s bizonyos makromolekulákhoz kötődve azok működését befolyásolják. A hatás feltétele a szelektív, kis K_d -jú kötődés, melyet kihasználhatunk a célmolekula jelölésére, ha a próbát lumineszcens vegyülettel konjugáljuk. Fontos azonban szem előtt tartanunk, hogy ezek a próbák biológiailag aktívak, így felhasználásuk beavatkozást jelent a vizsgált sejt életfolyamataiba. Néhány példát az alábbi táblázatban adunk közre.

Jelölt makromolekula	Specifikus próba
F-aktin	Falloidin
Feszültségfüggő K^+ csatorna	β -skorpiótoxin
Feszültségfüggő Na^+ csatorna	tetrodotoxin, saxitoxin
N típusú kalcium csatorna	ω -conotoxin
L típusú kalcium csatorna	dihidropiridinek, fenilalkilaminok
intracelluláris (IP_3 -függő) kalcium csatorna	Rianodin
Na^+/K^+ ATP-áz	Ouabain
nikotinerg acetilkolin receptor	α -bungarotoxin
μ -opioid receptor	naloxon
α -adrenerg receptor	prazosin

Jelölés szubsztráttal és liganddal

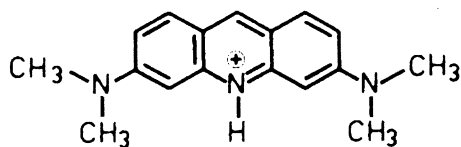
Az enzimaktivitással bíró fehérjék jelölésére alkalmazhatjuk azok specifikus szubsztrátját, ill. annak módosított formáit, ún. pszeudoszubsztrátokat, amelyek lumineszcens tulajdonságúak, vagy lumineszcens festékhez kötődtek, beilleszkednek a szubsztrátkötőhelyre és irreverzibilisen kötődnek az enzimhez – gyakran azért, mert megváltoztatott szerkezetük miatt az enzim által katalizálendő reakció nem tud lezajlani, s ezért a következő lépés, a termék disszociációja is elmarad. A szubsztrát

jelölésre való felhasználásának további lehetősége, hogy a fluoreszcens (pszeudo)szubsztrátot valamilyen keresztköti ágenssel rögzítjük a rá specifikus enzimhez. Ez a technika nem csak enzim-szubsztrát viszonylatban alkalmazható, hanem bármely más molekuláris asszociáció kimutatására is. Keresztköti ágens alkalmazása helyett elláthatjuk magát a szubsztrátot is egy reaktív csoporttal, amely az enzimhez köti. A kapcsolódási reakció tervezhető úgy, hogy az enzimműködés indítsa el, de használhatunk fényenergiát igénylő, ún. fotoaffinitás reagenseket is, amelyek tetszés szerinti időpontban, általában UV fényel aktiválhatóak.

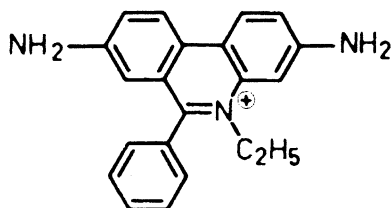
A különféle receptorok jelölésére szintén felhasználható az általuk specifikusan kötött molekula, a ligandjuk. A kimutatandó receptortól, ill. ligandjától függően kell megválasztanunk a jelölési stratégiát: a ligand kémiai szerkezete és a receptorral érintkező felületei szabják meg, hogy a lumineszcens jelzés hogyan köthető hozzá, ill. esetleg hogyan alakítható át a ligand fluoreszcens molekulává. Ugyanakkor szem előtt kell tartani, hogy a ligand – receptor komplex kialakulása szignalizációs folyamatokat indíthat el, melyek módosíthatják az általunk vizsgálni kívánt rendszert. Így a legtöbb esetben akkor használunk ligandot a receptor azonosításához, ha egyben a jelátviteli folyamatot is el kívánjuk indítani, ill. a ligandot kötő receptor sorsát kívánjuk tanulmányozni (pl. leszabályozás internalizáció útján). Alternatívaképpen lelassíthatjuk a ligandkötődés által indukált folyamatokat a rendszer hűtésével, azonban ez a módszer csak akkor hatékony, ha a jelátviteli folyamat fehérjék lipidmembránban történő elmozdulásához kötött, mely a membrán fagyáspontja alatt lehetetlenné válik. A kizárólag konformáció-változáson alapuló folyamatokat a hűtés csak lassítja, de nem gátolja meg.

DNS festékek

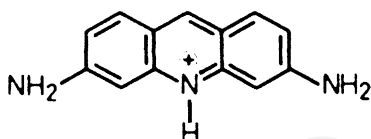
A fluoreszcens festékek többsége planáris, aromás gyűrűkkel rendelkező molekula, s szerkezetéből adódóan hajlamos lehet a homo- (egymással történő) és hetero- (egyéb molekulákkal történő) aggregációra. Egyes festékek pl. kötődhetnek a DNS molekulához. A DNS-hez való kötődés fő típusai: a DNS molekula felszínéhez való kötődés (outside binding), a DNS kis, vagy nagy árkába történő bekötődés (minor és major groove binding), valamint az interkaláció. Az utóbbi esetben a festékmolekula planáris gyűrűrendszerével befekszik, beékelődik két szomszédos DNS bázispár közé.



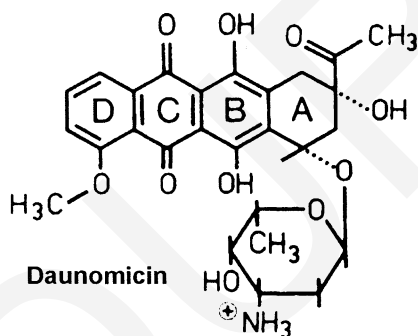
Akridin narancs



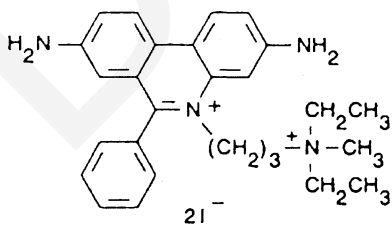
Ethidium



Proflavin



Daunomicin



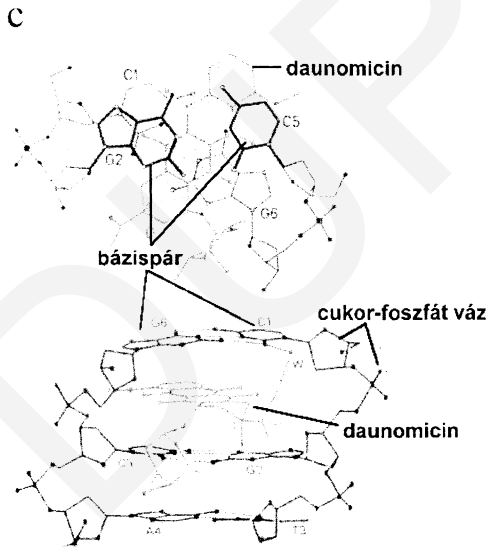
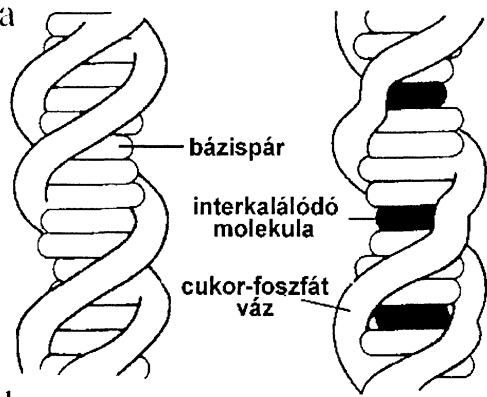
Propidium jodid

2. ábra

Néhány interkalálódó festék szerkezeti képlete az 2. ábrán, az interkaláció sémája a 3. ábrán látható. Az interkalálódó molekula kötődhet a DNS molekula nagy árka („major groove”) felől (pl. etidium bromid, propidium jodid, proflavin); ilyenkor a festék hossz tengelye a bázispárokat összekötő tengellyel párhuzamos (3b ábra). Más molekulák (pl. daunomicin) a kis árok („minor groove”) felől interkalálódnak; ekkor a festék hossz tengelye merőleges a bázispárokat összekötő tengelyre (3c ábra). Az interkalálódó molekula a molekula típusától függően kisebb-nagyobb mértékben megváltoztatja a DNS molekula szerkezetét. Közös vonás, hogy kissé eltávolítja egymástól a molekula két oldalán elhelyezkedő bázispárokat, így az egyenes menetemelkedésű, helikális DNS struktúra torzul, a DNS szál megnyúlik, továbbá a hélix kissé kitekeredik. A DNS viszonylag rugalmas szerkezete ellenére a potenciális kötőhelyek közül legfeljebb minden második tölthető be. Interkalálódó festékekkel mérhető pl. a sejtek DNS tartalma, megállapítható, hogy a nukleinsavak duplex vagy egyszálas állapotban vannak-e (ugyanis az interkalálódás feltétele a duplex struktúra).

A DNS festékek közül némelyek bázisspecifitást mutatnak.

Pl. a Hoechst festékek és a DAPI (ezek kis árokba kötődő festékek) az AT gazdag régiókhoz kötődnek elsősorban. Ezt kihasználva - esetleg több festéket kombináltnan alkalmazva - a metafázis kromoszómák sávjait fluoreszcenciás mikroszkópban is vizsgálhatjuk. A DNS-nek a replikációban és a fehérjeszintézisben betöltött központi szerepe miatt az interkalálódó festékek jelentősen befolyásolhatják a sejt metabolizmusát. Csökkenthetik vagy meg is állíthatják a sejtek növekedését, osztódását, ezért sejtmérgek.



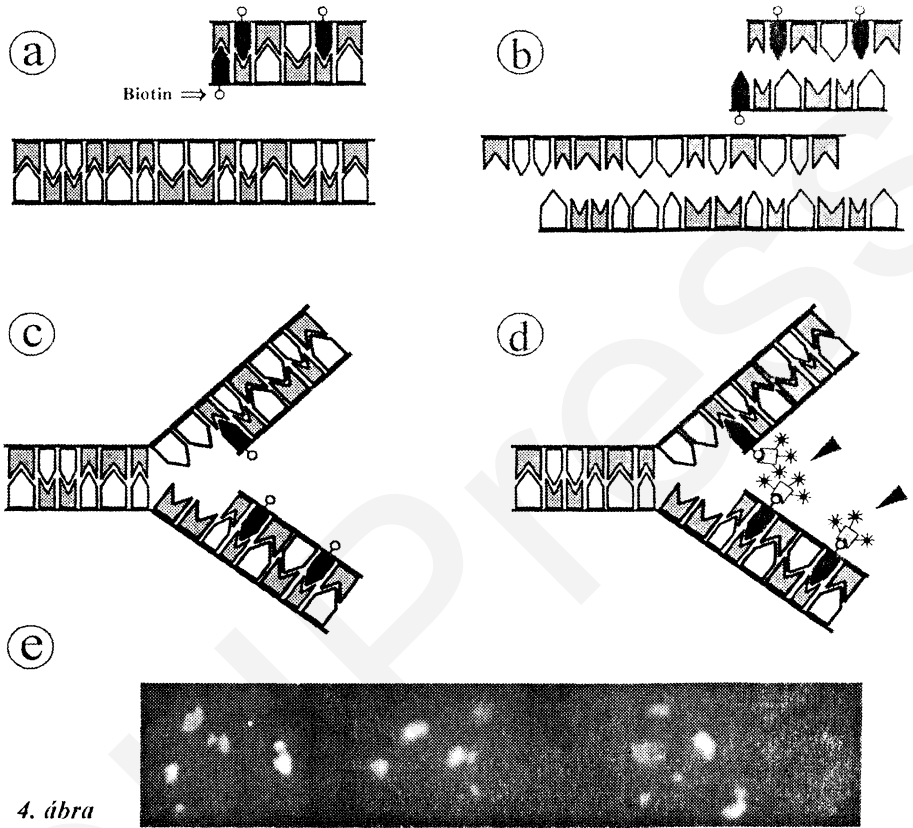
A DNS-hez kötődött festék kvantumhatásfoka többnyire sokkal nagyobb mint a szabad festéké, így a bekötődött festék 10-szer, 100-szor intenzívebben fluoreszkál mint a szabad festék. A kvantumhatásfok növekedése annak köszönhető, hogy az interkalálódott festék védve van az oldószer molekuláival való ütközésektől és így a fluoreszcencia kioltásától. Bizonyos festékek fluoreszcenciája (pl. a daunomiciné) ezzel szemben alacsonyabb a DNS-hez kötött állapotban.

3. ábra

Szekvencia-specifikus nukleinsav próbák

A nukleinsavak kimutatásakor gyakran nem morfológiai vagy mennyiségi kérdésekre kívánunk választ kapni, tehát pl. nem a sejtmag elhelyezkedésére, DNS tartalmának haploid vagy diploid voltára vagyunk kíváncsiak, hanem egyes specifikus nukleinsav szekvenciák előfordulására DNS vagy RNS szinten. Az esetek többségében egyes génszakaszok meglétére, kópiaszámára, kromoszómán belüli elhelyezkedésére, a belőlük átírt mRNS jelenlétére irányul vizsgálatunk. Ilyenkor a kimutatandó bázissorrenddel azonos, vagy komplementer DNS szakaszt szintetizálunk próbaként. Ha a detektálni kívánt molekula mRNS, mely a kódoló (sense) DNS szálról íródott át, a kódoló DNS-sel azonos szekvenciájú próba DNS lesz vele komplementer. Ha kettős szálú DNS-t kívánunk kimutatni, akkor a kimutatandó szállal azonos szekvenciájú DNS szakaszokat kell szintetizálnunk. A szintézis során valamilyen markert építünk be a DNS-be, melyet később specifikusan kötődő jelző molekulával, vagy molekula komplexszel teszünk láthatóvá. Az így megszintetizált komplementer nukleinsav molekulákat ezután a vizsgált sejtben található jelölendő molekulákhoz hibridizáljuk, és a beépített marker révén detektáljuk. Az eljárás neve fluoreszcens *in situ* hibridizáció, tekintve, hogy a megfigyelni kívánt nukleinsavhoz a sejtben, az eredeti helyén hibridizáljuk a próba DNS-t, majd pedig fluoreszcens jelzés segítségével tesszük láthatóvá. A folyamat főbb részleteit a 4a-d. ábrák mutatják: 4a. A hosszabb kettős szál a cél-DNS-t jelképezi, a rövidebb, melybe biotin van beépítve, a próbát. 4b. A próba DNS-t a feltárt sejtbe juttatjuk, a cél és próba DNS-t együtt denaturáljuk (megfelelő sókoncentrációk, pH, magas hőmérséklet). 4c. A lehűlő közegben a komplementer szálak egymásra találhatnak és újra kialakul a kettős hélix. Mivel a próba DNS-t nagy feleslegben adjuk a rendszerhez, valószínűbb, hogy az a bázisszekvencia, ami a próbával komplementer, a próba megfelelő szálával fog renaturálódni, és nem a saját eredeti komplementer szálával, amelyből csak egy van. Megfelelő próba hosszúság esetén egy cél szekvenciához – egymáshoz képest eltolódva – több próba DNS is tud hibridizálódni: ilyenkor a próba DNS-nek a nagyobb része, melyet egy másik próba DNS kötődése meggátolt a cél szekvenciához való kötődésben, saját komplementer próba DNS szálával hibridizálódik, s a kettős szálú próbák egy egy kis szakaszon rögzítve a cél DNS-hez, kilógnak arról mint az üvegmosókefe sörtéi. Mivel a próba

DNS egész hosszában tartalmazza a markert (az ábrán biotin, de lehet pl. digoxigenin is), ez a sokszoros kötődés képezi az intenzív jelölődés alapját. 4d. A hibridizáció lezajlása után a próba DNS-en levő markert specifikusan kötődő molekulák. ill.



4. ábra

molekulakomplexek segítségével jelöljük, s az ezekhez kötött lumineszcens anyagokat detektáljuk (nyílhegyek, lásd még az indirekt jelölésről írottakat). 4e. Az 1-es kromoszóma pericentromerikus régiójára specifikus próbával *in situ* hibridizációt végezve kiténik, hogy a bemutatott, malignusan transzformált sejtekben ez a régió a normális két kópia helyett legalább 6 db, változatos méretű példányban van jelen.

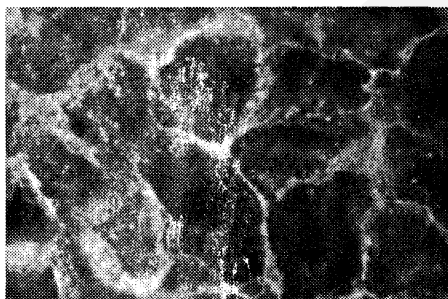
A specifikus nukleinsav póbákat *in situ* hibridizáció mellett számos egyéb vizsgálatra felhasználhatjuk, pl. összehasonlító genomiális hibridizációban (comparative

genomic hybridization, CGH), vagy – antiszensz és nonszensz oligonukleotidok formájában génkifejezés gátlására.

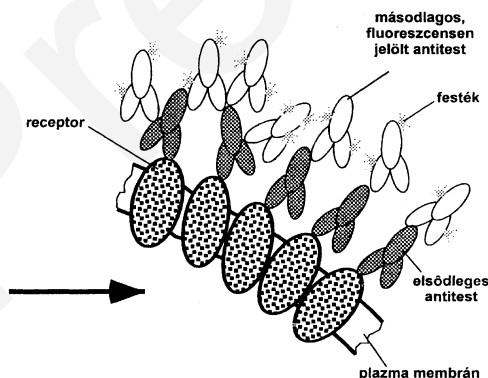
Indirekt jelölési módszerek

Mint arra már fentebb utaltunk, a specifikus jelölés során nem mindig a próba hordozza közvetlenül a fluorofórt, hanem indirekt jelölést is alkalmazhatunk. Ezt általában abból a megfontolásból tesszük, hogy a közvetlenül a próbához köthető fluorofórok limitált számát megnövelhessük, és ezáltal intenzívebb lumineszcens jelet nyerjünk. Akkor is alkalmazhatjuk azonban, ha a próbát közvetlenül nem jelölhetjük fluorofórral, de valamely más, fluoreszcensen jelölt molekulát hozzáköthetünk.

Az indirekt jelölés egyik egyszerű és gyakran alkalmazott formája az elsődleges és másodlagos antitestek szekvenciális alkalmazása (5. ábra). Az ábrán



5. ábra



látható A431 epidermoid karcinóma sejteket először aktivált (tirozinon foszforilált) EGF receptor ellenes (elsődleges) antitestekkel kezeltük. Ezeket a monoklonális antitesteket egérből származó hibridómával termeltettük. A nem kötődött antitestek kimosása után olyan fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestekkel inkubáltuk a sejteket, melyeket kecskében termeltettünk az egér immunglobulin konstans (Fc) régiója ellen. Mivel ez poliklonális ellenanyag, egy primer antitesthez több szekunder antitest is kötődhet különböző epitópokon (5. ábra, vázlat). Az eredmény a direkt jelölésnél intenzívebb fluoreszcencia, mely a sejtmembránban és apró vezikuláris szerkezetekben a citoplazmában található.

A nagyon érzékeny detektálást kívánó vizsgálatok során – pl. *in situ* hibridizáció esetén – gyakran alkalmazzák az ún. “szendvics” módszereket. Itt a próba mellett két másik molekula játszik még főszerepet, a biotin és az avidin. Az avidin négy biotin megkötésére képes, és a kötés igen nagy erősségű. A biotinált próba, avidin és további, fluorofórral konjugált biotin egymást követő felkötése eredményezi a legegyszerűbb “szendvicset”. Ekkor az erősítés legalább háromszoros, hiszen a primer biotinhoz – mely egy fluorofórt helyettesít a próbán – az avidinen keresztül 3 másik kötődik. Természetesen a 3 biotin molekula is lehet valamely fehérjéhez, pl. fluoreszcensen jelölt antitesthez konjugálva. A rendszer tetszés szerint továbbgondolható, pl. ha ezeken az antitesteken két biotin van, akkor további avidin molekulákon keresztül több biotint és fluoreszcensen jelölt antitestek kapcsolhatók, stb. Határt az szab, hogy az egyes “rétegek” felkötésekor mindig van aspecifikus kötődés, mely a háttér fluoreszcenciát növeli, ill. a következő hozzáadásokkal maga is mint jel (artefaktum) tovább nőhet, ill. a túl nagyra nőtt detektálási komplex a térbeli feloldást behatárolja, a lokalizációt bizonytalanná teszi.

Egyéb, *ex vivo* jelölési módszerek

A fentebb ismertetett, *in situ*, tehát helyben (a sejtben, ill. akár élő sejtben) alkalmazható specifikus jelölési módszerek mellett lehetőségünk van egyes vizsgálni kívánt molekulákat a sejtől kivonva (*ex vivo*) megjelölni, majd ezt követően visszajuttatni és megfigyelni. Ellentétben az *in situ* módszerekkel a specificitást itt nem egy próba molekula sztérikus viszonyai biztosítják, hanem a kiszemelt molekula megfelelő tisztítása, jelölése és élő sejtbe történő atraumatikus (a sejt működéseit nem sértő) visszajuttatása. A kiemelt molekula jelölésére számtalan lehetőség kínálkozik. A fehérjék reaktív aminos (NH₂) vagy tiol (SH) oldalláncait közvetlenül konjugálhatjuk festékmolekulákhoz, hasonlóan ahhoz, ahogy a jelölésre használt antitestekkel tesszük. Kicserélhetjük a fehérjék prosztetikus csoportjait vagy kofaktorait a működést nem befolyásoló lumineszcens analógra, pl. lantanida ionokra, Pt- és Pd-porfirinekre.

A molekuláris biológia szintén nyújt új lehetőségeket az egyes fehérjék fluoreszcens jelölésére. A zöld fluoreszcens proteint (green fluorescent protein, GFP)

egy medúzafaj termeli, illetve ma már nem kizárólagosan, hiszen a GFP genetikai kódjának megfejtését követően a kódoló DNS szakaszt tetszőleges fehérjét kódoló szekvencia elé vagy mögé be lehet építeni. Az így átalakított gént megfelelően szabályozott expressziós vektorba ültetve, és a célsejtbe juttatva az expresszió indukciójakor egy olyan fehérje kezd el termelődni a sejtben, amelynek része a megfigyelni kívánt protein, de bele van építve a GFP is, amit mint egy lámpást mindig magával hordoz. A GFP-nek ma már léteznek kék és sárga változatai is, melyek többszínű jelölést, ill a kék-zöld valamint zöld-sárga párok között fluoreszcencia rezonancia energiáttranszfer mérést tesznek lehetővé.

A próbák eljuttatása a célmolekulákhoz

Az egyes molekulák *ex vivo* jelölése és visszajuttatásának igénye - de hasonlóképpen a sejtmembránon átjutni nem tudó poláros próbák is - szükségessé tették olyan módszerek kidolgozását, amelyek sejtmembrán végleges károsodása nélkül átjutást biztosítanak a sejt belseje felé. E módszerek közés tartozik a mikroinjekciós technika, mely egy hegyes kapillárison keresztül a sejtbe juttatja az igen kis térfogatban feloldott próbát vagy jelölt molekulát, valamint a próbák lipid vezikulába zárása, amely fuzionálni képes a sejtmembránnal, és azt követően a citoplazmába üríti tartalmát. Alkalmazhatjuk még a "kaparva töltés" (scrape loading) módszerét, melynek során egy durva szélű tárgyat végighúzzunk a kitapadva növény (adherens) sejtrétegen, és a feltároló membrán sérülésein keresztül az oldatban levő molekulák egy része bejut a sejtbe. A sértési vonalban a sejtek általában elpusztulnak, de a vonal két oldalán számos olyan sejt lesz, melynek megnyitott membránja rövid időn belül bezárul, a homeosztázisa helyreáll, és ugyanakkor tartalmazza a bejuttatni kívánt molekulát. Figyelmet érdemlő módszer a kis molekulájú poláros festékek sejtbe juttatására kifejlesztett AM (acetoximetil) észterezés. A poláros molekula karboxil csoportjaiból acetoximetilésztert képezve a molekula amfipatikussá válik és a sejtmembránon könnyen átjut. A citoplazma észteráz enzimek ezután elbontják, és felszabadul az eredeti poláros molekula, amely számára a membrán – immár kifelé – átjárhatatlan, de a citoszolban célpontjához kötődhet. Ilyen elven működik a legtöbb ion indikátor (lásd fenn).

Ha a sejtmembrán integritása, a vizsgált sejt életbenmaradása nem szükséges feltétele a kísérletnek, alkalmazhatunk általános fixálási, permeabilizálási módszereket a próbák bejuttatására. A két leggyakoribb módszer a szerves oldószerben történő fixálás, mely egyben feltárás is, valamint a 'ormaldehides fixálást követő detergens kezelés. Az előbbinél gyakran alkalmazott szer az acetone, vagy az acetone és metanol 1:1 keveréke. Az detergens kezelésnél a választott szer leggyakrabban a Triton-X 100.

Gyakorlati feladat:

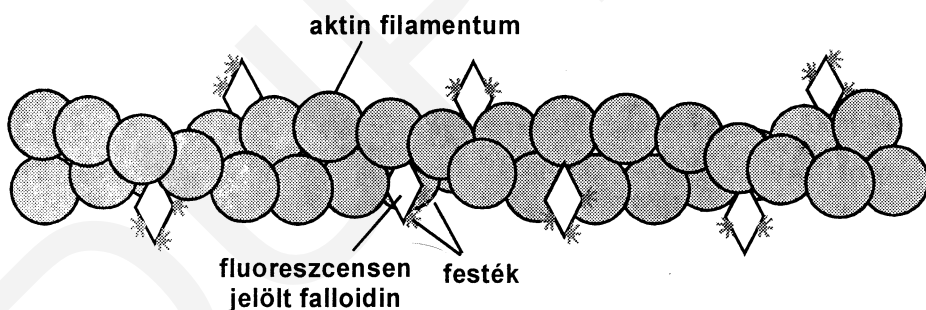
A431 epidermoid karcinóma sejtek fluoreszcens jelölése. A vizualizálni kívánt sejtalkotók:

- az EGF receptor a sejtmembránban
- a citoskeletális váz egyik alkotóeleme, az F-aktin
- a sejtmag (DNS)

Az A431 karcinóma sejtek emberi eredetűek, kitapadva, egy rétegben (monolayer) nőnek. Membránjukban sejtenként $\sim 10^6$ - 10^7 EGF (epidermal growth factor = epidermális növekedési faktor) receptor található. Az epidermális növekedési faktor receptora a tirozin kináz típusú membrán receptorok csoportjába tartozik (lásd bővebben a Sejtbiológia jegyzet jelátvitelről szóló fejezetében). Ezekon a sejteken alacsony és nagy affinitású EGF receptorokat különíthetünk el; az összes receptor több, mint 90 %-a alacsony affinitással köti az EGF-t. A jelölésüket indirekt immunfluoreszcens módszerrel végezzük (5. ábra). Az elsődleges antitestet a 2E9 jelű egér eredetű hibridóma által termelt (monoklonális) antitest, mely az alacsony affinitású EGF receptorokhoz kötődik. A receptorokhoz kötött 2E9 antitestek kimutatására fluoreszcenccel konjugált másodlagos poliklonális antitesteket használunk. Ezeket kecskében termeltették az egér immunoglobulin Fc fragmentuma ellen. Mivel mind a 2E9, mind a másodlagos antitest bivalens, fennáll az EGF receptorok keresztkötésének a lehetősége. Ez, hasonlóan az EGF kötődéséhez, a receptorok tirozin-foszforilációját indíthatja el, melyet a korai megfigyelések alapján autofoszforilációnak nevezünk. Ma már tudjuk, hogy az EGF kötés eredményeképpen dimerizált, ill. a keresztkötött receptorok nem önmagukat, hanem közvetlen szomszédait foszforilálják. Ezt a jelátviteli folyamat későbbi

lépéseiben az aktivált receptorok internalizációja követi. A gyakorlat során a membránban található EGF receptorokat vizualizáljuk, ill a jelölés kapcsán internalizált, már mejelölt receptorokat fogjuk megfigyelni. Mivel a jelátviteli folyamat szobahőmérsékleten igen gyors, az antitesttel történő inkubálás alatt a receptorok nagy része internalizálódna. Ennek megakadályozására a kísérletet jégen hűtött sejteken végezzük, és a jelölést követően paraformaldehiddel fixáljuk. A fixálás azért is szükséges, mert a jelölési procedúra során pusztulásnak induló enélkül leválnának a fedőlemezkeről, mielőtt a mikroszkópos megfigyelésre sor kerülne.

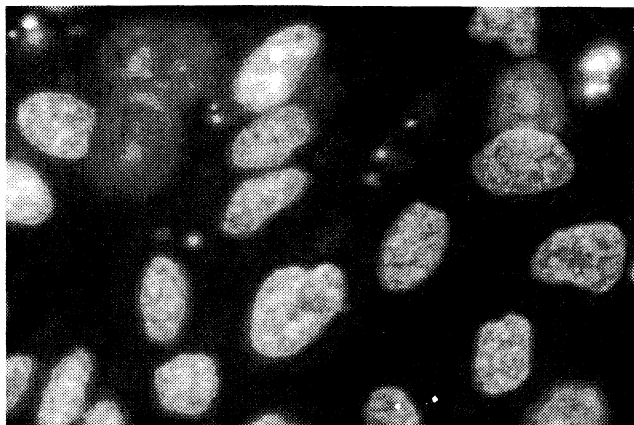
A kitapadva növő sejtekre jellemző a fibrilláris aktinból (F-aktin) felépülő citoplazmatikus kötegrendszer, az ún. stresszfilamentum hálózat. Ez feltehetőleg szerepet játszik abban, hogy a sejtek meg tudják tartani szétterült, kilapult alakjukat (lásd bővebben a jegyzet citoszkeletonról szóló fejezetében). Az F-aktin specifikus jelzésére – megfelelő antitesteken kívül – a fallatoxinok (falloidin és fallacidin) kiválóan alkalmasak. Ezek a gyilkos galócából (*Amanita phalloides*) izolálható biciklikus peptidek, melyek szelektíven a polimerizált, fibrilláris aktinhoz kötődnek, a globuláris monomerhez nem (6. ábra). A kötődés sztöchiometrikus, és az F-aktin \leftrightarrow G-



6. ábra

aktin egyensúlyt a polimerizáció irányába tolja el. Ugyanakkor a kis méret miatt (12-15 Å) a kötődő fallatoxinok nem gátolják az F-aktin motilitással kapcsolatos funkcióját, a miozin, tropomiozin kötését és a kontrakciót. A kísérlet során az aktint fluoreszcens festékekkel közvetlenül konjugált falloidinnel jelöljük. Vigyázat! A falloidin mérgező! A falloidint hígítva, a jelöléshez alkalmas nanomoláris koncentrációban kapják kézhez. A kiméréséhez használt pipettahegyet a külön erre a célra kijelölt konténerbe kell kidobni.

A sejtmag festéséhez az általános részben ismertett interkaláló vegyületek egyikét, a propidium jodidot (PI) használjuk. A PI nem szelektíven kötődik a DNS-hez, a mag és a mitokondriumok DNS állományán kívül a kettős szálú RNS-t is jelöli. Az alkalmazott megfigyelési körülmények között (szuboptimális gerjesztés és detektálás)



7. ábra
kézhez.

Mind a falloidin, mind a PI számára az ép sejtmembrán kevésbé átjárható. Ezért az intracelluláris komponensek általuk történő jelöléséhez szükséges a sejtmembrán permeabilizálása. A kísérlet során az általános részben említett módszerek közül az acetonos fixálást alkalmazzuk, mivel ez egy egyszerű, jól kontrollálható művelet, amely nem befolyásolja jelentősen a megfigyelni kívánt struktúrákat, és egyben a sejtek morfológiájának, integritásának megőrzéséről is gondoskodik.

azonban jól elkülöníthető jelölődést a sejtmagban várhatunk (7. ábra). Mivel a PI anyag mutagén hatású, kezelésekor nagyfokú elővigyázatosság szükséges. A jelöléshez közvetlenül használandó 20 µg/ml koncentrációra kihígított festéket kapják

Protokoll:

Előkészítés: A sejteket 12 mm-es kerek fedőlemezkén kapják, médiumban.

Teendő	Idő (perc)
I. fedőlemez – membrán EGF receptor indirekt immunfluoreszcens jelölése <i>(A fixálásig valamennyi műveletet jégen, ill. hűtött oldatokkal végezzük, ezt követően pedig szobahőn)</i>	
Ellenőrizzük, hogy a nedveskamra alján az itatós papír elég nedves-e. A nedveskamrát a jégre helyezzük. A fedőlemezkét kiemeljük a médiumból, s a nedveskamra alján levő parafilmre tesszük (a sejtek felfelé néznek!). Mosás 3x PBS-ben: 500 µl jéghideg PBS-t pipetázunk óvatosan, lassan a fedőlemezke szélére, majd 2 perc múlva leszívjuk (még ugyanazzal a pipetta hegygel). Pipetta hegyet cserélünk, és a mosást még kétszer megismételjük. A leszívások között ne késlekedjünk, a sejteket ne hagyjuk kiszáradni! Az utolsó leszívás után rögtön mérjük ki az elsődleges antitestet. (Lásd következő lépés.)	15
Inkubálás jégen, nedveskamrában 2E9 antitesttel az EGF receptor jelölésére. A 2E9 egér hibridóma által termelt monoklonális antitest, mely a humán EGF receptorra specifikus. Az kiadott antitest 5 µg/ml koncentrációjú, PBS-ben. Az utolsó PBS-es mosást követően 15 µl-t pipetázunk óvatosan a fedőlemezkére, a széléhez közelítve a pipetta hegyét.	30
Mosás 3x3 percig jéges PBS-ben	10
Inkubálás jégen nedveskamrában FITC, vagy Cy3 konjugált második antitesttel. A második antitest GAMIG (goat anti mouse immunoglobulin), kecskében termeltetett poliklonális ellenanyag egér IgG antitest konstans része (Fc) ellen. Az első antitesthez hasonlóan 15 µl-t mérünk a jégen tárolt, előre kihígított antitest oldatból a fedőlemezke szélére.	30
Mosás 3x 3 percig jéges PBS-ben	10
Fixálás 3.8 % PFA-val (paraformaldehid). Az utolsó PBS mosást	10

<p>követően 100 µl jéghideg PFA oldatot pipetázunk a fedőlemezkére, 5 percig még jégen tartjuk, majd a következő 5 percben hagyjuk szobahőmérsékletre melegedni.</p>	
<p>Mosás szobahőn (!): 3x 2 percig PBS-ben (500-500 µl térfogatokat alkalmazunk)</p>	10
<p>A PBS leszívása után a fedőlemezkére 20 µl "antifade" (elhalványulás gátló) oldatot pipetázunk, s a pipetta szívogatásával óvatosan eloszlatjuk. Ennek hiányában a jelzés fluoreszcenciája, különösen FITC esetén, igen gyorsan kiég. A fedőlemezkét függőlegesen tartva a felesleget papírvattával (éppen csak érintse a fedőlemezke szélét!) leszívátjuk. A fedőlemezkét sejtekkel lefelé buborékmentesen a tárgylemezre borítjuk. 10 perc száradás után a szélét vékony körömlakk gyűrűvel zárjuk le. A mintát a II. mintával együtt a gyakorlat végén vizsgáljuk fluoreszcenciás mikroszkópban. A fluoreszcenciát excitációs maximuma (494 nm) közelében kék fényel gerjesztjük, és az emissziós maximum (520 nm) fölött (zöld fény) detektáljuk. Amennyiben Cy3-konjugált második antitestet használtunk, a gerjesztéshez zöld fényt használunk, és az emissziót piros szűrőn keresztül vizsgáljuk. A Cy3 abszorpciós és emissziós maximuma 554 és 568 nm-en van. Megfigyeljük a sejthatárokat jól láthatóvá tevő membrán-jelölődést, az esetlegesen intracellulárisan elhelyezkedő internalizált receptorokat. Megfigyeléseinket rajzban is rögzítjük.</p>	15
<p>II. fedőlemez – F-aktin direkt jelölése FITC-falloiddinnel és a sejtmag jelölése PI-dal <i>(Valamennyi műveletet szobahőmérsékleten végezzük)</i></p>	
<p>Ellenőrizzük, hogy a nedveskamra alján az itatós papír elég nedves-e. A fedőlemezkét kiemeljük a médiumból, s a nedveskamra alján levő parafilmre tesszük (a sejtek felfelé néznek!). Mosás 3x PBS-ben, hasonlóképpen az I. mintához.</p>	15
<p>Fixálás acetonban. A PBS leszívása után a fedőlemezkét csipesszel felemeljük, és az acetont tartalmazó edénybe merítjük 2 percre (a csipeszt</p>	5

nem engedjük el!). Ezután átemeljük az <i>erre a célra elkülönített</i> főzőpohárba, melybe előzőleg ~10 ml PBS-t öntöttünk. Itt tartjuk 1 percig, majd kiemeljük és sejtekkel felfelé visszatesszük a nedveskamrába.	
Mosás 2x 2 percig PBS-ben	5
Inkubálás szobahőn, nedveskamrában FITC-falloidinnel és PI-dal. A kiadott jelölő oldat 1 µg/ml koncentrációjú FITC-falloidint és 20 µg/ml koncentrációjú PI-ot tartalmaz. Ebből 15 µl-t pipetázunk óvatosan a fedőlemezkére, a széléhez közelítve a pipetta hegyét. 30 percig inkubáljuk a nedveskamrában.	35
Mosás 3x 3 percig PBS-ben	10
A PBS leszívása után a fedőlemezkét az I. mintához hasonlóan "antifade"-del bevonva, sejtekkel lefelé, buborékmentesen a tárgylemezre borítjuk. A szélét vékony körömlakk gyűrűvel zárjuk le. A mintát az I. mintával együtt vizsgáljuk fluoreszcenciás mikroszkópban. A fluoreszcenciát excitációs maximuma (494 nm) közelében kék fényrel gerjesztjük, és az emissziós maximum (520 nm) fölött (zöld fény) detektáljuk. A propidium jodid excitációs és emissziós maximuma 535 és 617 nm, de a FITC gerjesztésére alkalmazott hullámhossz tartományban még jól gerjeszthető, és az 520 nm feletti emissziót figyelve piros fluoreszcenciája jól látszik, tehát a FITC-falloidinnel együtt azonos szűrőkészlettel megfigyelhető. Természetesen lehetséges a két próba külön-külön történő megfigyelése is, megfelelő szelektív szűrőkészlettel, amelyekben a FITC emissziót zöld sávszűrőn keresztül nézzük, a PI-t pedig csak 620 nm feletti hullámhosszakon detektáljuk. Megvizsgáljuk a zöld színben feltűnő aktin filamentumokat, a piros (narancs) fluoreszcenciájú sejtmagot, a sejtmagvacskákat, és az egymáshoz és a sejt alakjához való viszonyukat. Megfigyeléseinket rajzban is rögzítjük.	25

Feladat az inkubálások idejére: Különbféle fluoreszcens jelölések megtekintése számítógépes adatbázisból, sejtalkotók felismerése a morfológia alapján. Ligand-receptor kölcsönhatásra bekövetkező kalcium jel vizsgálata "ratio imaging" képelemző digitális mikroszkópiával: időfüggő mérések visszajátszása számítógép segítségével.

A P-glikoprotein és a multidrog rezisztencia fehérje (MRP) általi aktív drog transzport vizsgálata

1. A passzív és az aktív transzport folyamatok

A sejtek citoplazma membránja szemipermeábilis barriert képez a sejtek és az extracelluláris tér között. A sejtmembrán szelektív permeabilitása biztosítja, hogy a megfelelő szubsztrátok bekerülhessenek a sejtekbe, a szükséges metabolikus intermedierek a sejtekben maradjanak, valamint a szükségtelen és káros anyagcsere termékek elhagyják a sejtet. Másrészt a sejtmembránon keresztül zajló aktív és passzív transzport folyamatok biztosítják a megfelelő intracelluláris ion miliőt. Hasonlóképpen a különböző sejtorganellumoknak is lehet a citoszoltól különböző belső környezete, pl. a lizoszómák belső proton koncentrációja 100-1000-szerese a citoszolra jellemző proton koncentrációnak.

A foszfolipidekből és koleszterinből álló mesterséges membrán csak kevés anyagra permeábilis: a vízre, oxigénre, szén-dioxidra és kis méretű apoláros, de vízben még oldható molekulákra mint pl. az etanolra. Ugyanakkor a membrán alapvetően átjárhatatlan a legtöbb vízoldható molekulára mint pl. glükóz, glükóz-foszfát, ATP, nukleozidok, aminosavak és fehérjék, valamint a H^+ , Na^+ , Ca^{2+} és K^+ ionok. Ezen anyagok sejtekbe történő bejutását különböző transzporter fehérjék biztosítják ill. a nagyobb molekulatömegű molekulákat endocitózissal veszik fel a sejtek.

A transzport folyamatokat energetikai szempontból **passzív** és **aktív** transzportra oszthatjuk. A passzív transzport nem igényel energia befektetést, mivel a permeáló részecske a koncentráció gradiens irányában halad át a sejtmembránon ill. töltött részecske esetében az elektrokémiai potenciál gradiensnek megfelelő irányban történik a transzport. A passzív transzport végbemehet egyszerű diffúzió útján vagy membrán fehérjék részvételével, például ioncsatornákon keresztül vagy transzporter molekulák működése útján. A passzív transzport speciális esete a facilitált transzport, amikor bizonyos anyagoknak a sejtmembránon való átjutását az adott molekulára vagy

molekula típusra specifikus transzporterek segítik elő. Facilitált transzporttal kerül be a sejtekbe pl. a glükóz, melyet a glükóz permeáz tesz lehetővé.

Az aktív transzport folyamatok során a molekulák az elektrokémiai potenciál gradienssel ellentétes irányban szállítódnak, így a folyamat metabolikus energia befektetését igényli. Az aktív transzport ún. transzport ATPázok közreműködésével zajlik. A kationokat transzportáló ATPázokon kívül (Na^+/K^+ pumpa, Ca^{2+} pumpa) orvosi szempontból is rendkívül jelentősek az **ABC transzporter** fehérjék családjának tagjai. Számos fehérje tartozik ebbe a csoportba, melyek közös sajátossága, hogy nagy mértékben konzervált felépítésű ATP-kötő régióval rendelkeznek (fajtól és az ATPáz típusától függetlenül hasonló aminosav szekvenciával). A prokarióta szervezetekben több mint 50 tagja ismeretes az ABC transzporter családnak, melyek fehérjék, peptidek, aminosavak, cukrok, poliszacharidok és anionos természetű anyagok ATP-függő transzportjában vesznek részt. Az ABC transzporterek családjának fontos tagja az MHC1-hez kapcsolódó antigén prezentációban részt vevő TAP1/TAP2 fehérje-komplex is, amely a bemutatásra kerülő oligopeptideket szállítja a citoszolból az endoplazmás retikulum lumenébe. Ide tartozik még a CFTR (cisztikus fibrózis transzmembrán regulátor fehérje), mely olyan Cl^- csatornaként működő fehérje, melynek a nyitáshoz, rendhagyó módon, ATP hidrolízis és c-AMP-függő foszforiláció is szükséges. A multidrog rezisztenciát okozó P-glikoproteinen és az MRP fehérjén kívül (a továbbiakban részletesen lesz róluk szó) ebbe a családba tartozik még az MDR2 fehérje is, mely elsősorban a hepatocitákban expresszálódik és foszfolipidek kiválasztását végzi az epébe. Az alacsonyabbrendű eukarióta szervezetekben is számos P-glikoproteinnel homológ gén található, mint pl. a maláriát okozó Plasmodium falciparum cloroquine (malária ellenes gyógyszer) rezisztenciájáért felelős transzporter fehérje.

2. P-glikoprotein és a multidrog rezisztencia protein (MRP)

A sejtbiológusok megfigyelték, hogy bizonyos sejtkultúrák egyfajta citosztatikummal történő szelekció után számos egyéb citosztatikummal szemben is rezisztenssé, **multidrog rezisztenssé** váltak. Ezek a sejtek számos citosztatikumot kisebb mértékben akumulálnak mint a nem szelektált kontrol sejtek. Később kimutatták, hogy a fenti jelenségért két transzport ATPáz valamelyikének az expressziója tehető felelőssé. Egyikük az ún. **P-glikoprotein (P-gp)**, a másik pedig a

multidrog rezisztencia protein (MRP). Mindkét transzmembrán fehérje a citoplazma membránban lokalizálódik és képes egymástól kémiaiilag nagy mértékben különböző, de általában néhány száztól ezerig terjedő molekula tömegű anyagok széles spektrumának a megkötésére és ATP bontás energiájának hasznosításával a sejtekből történő kipumpálására. A két fehérje szubsztrát spektruma azonban jelentősen eltér egymástól. A P-glikoprotein elsősorban hidrofób, enyhén pozitív töltésű szubsztrátokat transzportál, míg az MRP ezeken kívül hidrofíl glukuronid és glutation konjugátumokat és organikus anionokat is megköt, majd eltávolítja a sejtekből.

A daganatos betegek kemoterápiás kezelése során gyakran lép fel rezisztencia a különböző citosztatikumokkal szemben. Kimutatták, hogy a fent említett transzport ATPázok hozhatók kapcsolatba a daganatos betegek multidrog rezisztenciájával, valószínűleg egyéb itt nem tárgyalt rezisztencia mechanizmusokkal együtt. A P-gp és az MRP szubsztrátja számos a kemoterápiában alkalmazott citosztatikum (vinca alkaloidok, antraciklinek, epipodophyllotoxinnok stb.), melyek aktív kipumpálása miatt ezen drogok intracelluláris szintje nem éri el a daganatos sejtekben a letális koncentrációt.

Mindkét pumpa-mechanizmus működése gátolható bizonyos ágensek által, melyek egy része a klinikumban is alkalmazható a multidrog rezisztencia reverziójára. A P-gp általi drog transzport blokkolható verapamillal, ciklosporin származékokkal, ill. bizonyos szubsztrátok kompetitíven gátolják egyéb szubsztrátok kipumpálását. Néhány detergens jellegű anyag (pl. Tween 80) szintén gátolja a P-gp működését, feltehetően a membránban való elhelyezkedésének és konformációjának befolyásolásával. Az MRP általi drog transzport szintén gátolható verapamillal, valamint pl. genisteinnel.

3. A P-gp és az MRP mint a szervezet védekező mechanizmusai

Mindkét fehérjének van fiziológias szerepe is a szervezetben. A P-glikoprotein expressziója pl. kimutatható a vér-agy gátban, ahol valószínűleg az agy toxikus anyagokkal szembeni védelmében játszik szerepet. Másrészt jelen van a fehérje olyan szövetekben is, ahol feltehetőleg a szervezetre káros anyagok kiválasztásában működik közre pl. vékonybél és a vese. Az MRP fiziológias funkciója szintén a szervezet toxikus anyagokkal szembeni védelmével kapcsolatos, mivel különböző toxikus anyagok glutation-konjugátumait távolítja el a sejtekből.

4. A passzív és az aktív drog transzport

Számos kis molekulájú hidrofób gyógyszert és citosztatikumot a sejtek passzívan, diffúzióval vesznek fel. Felvételük mértékét és sebességét meghatározza, hogy milyen a molekulatömegük, hidrofobicitásuk és a töltésük. A töltéssel nem rendelkező molekulák passzív diffúziója sokkal gyorsabb, mint a töltött molekuláké. A töltött ill. a töltetlen molekulák arányát a pH szabja meg a Henderson-Hasselbach egyenletnek megfelelően:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log ([\text{M}] / [\text{M}^+])$$

Az egyenletben a pK az adott molekula savi disszociációs állandójának negatív tízes alapú logaritmus, [M] és [M⁺] pedig a kérdéses anyag neutrális ill. protonált formájának a moláris koncentrációi. A fenti egyenletet átrendezve a vizsgált molekula neutrális formájának koncentrációját egyszerűen kiszámíthatjuk:

$$[\text{M}] = [\text{M}_{\text{tot}}] / (10^{\text{pK}-\text{pH}} + 1)$$

([M_{tot}] = [M] + [M⁺], ahol [M^{tot}] a vizsgált anyag teljes mennyiségét jelenti).

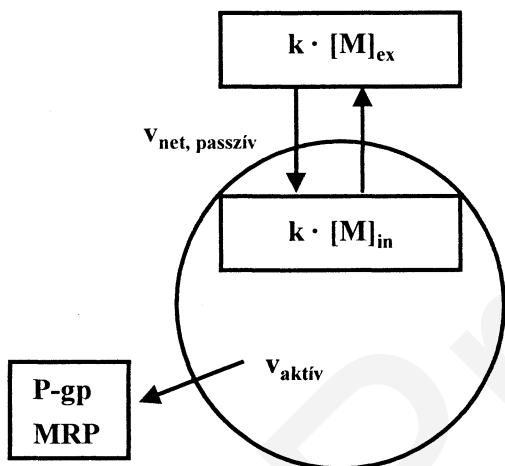
A vizsgált molekula nettó felvételi sebességét (v_{net}) egyértelműen meghatározza a sejtmembrán permeabilitási állandója (k) és a molekula neutrális formájának a koncentrációja a membrán extracelluláris ([M]_{ex}) ill. intracelluláris ([M]_{in}) oldalán, amennyiben feltételezzük, hogy egyéb transzport mechanizmus nem játszik szerepet ezen molekula felvételében vagy leadásában:

$$v_{\text{net,passzív}} = k \cdot [\text{M}]_{\text{ex}} - k \cdot [\text{M}]_{\text{in}}$$

Amennyiben azonban a vizsgált anyag sejtekből történő eltávolításában valamely molekuláris pumpa is szerepet játszik (P-gp vagy MRP), az aktív transzport sebességét a Michaelis-Menten kinetikai modell alapján a következőképpen írhatjuk fel:

$$V_{\text{aktív}} = V_{\text{MAX}} \cdot [\text{X}]_{\text{in}} / ([K_M + [\text{X}]_{\text{in}}])$$

Az egyenletben V_{MAX} a pumpa működés maximális sebességét jelenti (telítő szubsztrát koncentrációnál), K_M a Michaelis konstans, azaz a $V_{MAX} / 2$ sebességhez tartozó szubsztrát koncentráció. $[X]_{in}$ pedig szubsztrát intracelluláris koncentrációját jelenti, mely lehet az adott anyag protonált vagy neutrális formájának az intracelluláris koncentrációja attól függően, hogy melyik forma a vizsgált pumpa-mechanizmus szubsztrátja. Így egy rezisztens sejt drog transzport folyamatait az alábbi modell ábrán foglalhatjuk össze:



1. ábra. Egy multidrog rezisztens modell-sejt drog transzport folyamatai

5. A P-gp és az MRP általi drog transzport tanulmányozása

A P-gp-nek és az MRP-nek számos citosztatikum mellett szubsztrátja néhány fluoreszcens sajátosságokkal rendelkező anyag is mint pl. a daunorubicine, a rhodamine 123, a Hoechst 33342 és a calcein-AM. Ezen szubsztrátok egyensúlyi akkumulációja vagy a sejtek általi fevételük és leadásuk kinetikája egyszerűen mérhető fluoreszcens technikákkal, áramlási citometriával vagy fluorimetriával.

A calcein festéket a sejtek acetoxi-metilészter formájában veszik fel, majd a citoplazmában aspecifikus észterázok az észter csoportot lehasítják és szabad calcein keletkezik. A szabad calcein erősen hidofil, így gyakorlatilag nem jut át a sejtmembránon, ezért a passzív festék efflux nullának tekinthető. A szabad calcein keletkezése során nem a festék hidrolízise, hanem a festéknek a sejtbe történő bejutása a

folyamat sebességét meghatározó lépés, ezért a sejtek fluoreszcenciájának időbeni követésével valójában a calcein felvétel kinetikáját vizsgáljuk. Mivel a calcein-AM gyakorlatilag nem fluoreszcens, viszont az elhidrolizált festék intenzíven fluoreszkál a sejtek mosása nélkül fluorimetrián tudjuk követni a sejtek festék felvételét.

Kísérleteinkben az ATP depléció, a verapamil és a Tween 80 hatását vizsgáljuk a P-gp és az MRP általi aktív drog transzportra. A KB-V1 humán epidermoid karcinóma sejtvonalat és HL-60 MRP humán leukémia sejtvonalat használjuk. A KB-V1 sejtvonala nagy mennyiségben expresszálja a P-gp-t a HL60 MRP sejtvonala pedig a MRP-t fejezi ki. A KB-V1 sejtek a tenyésztőedény falához tapadva növekednek, ezért tripszines kezeléssel készítünk sejtuszuspenziót.

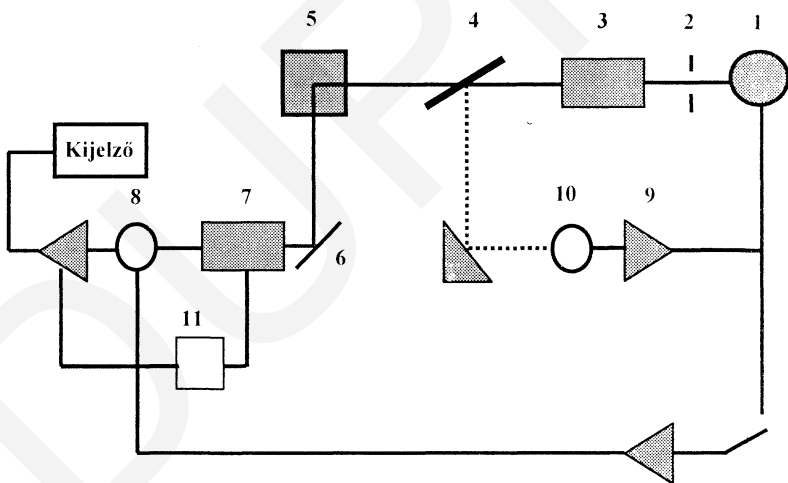
6. Spektrofluorimetria

A spektrofluorimetriás mérés során valamely atomi vagy molekuláris rendszer fényel történő gerjesztését követően az emittált sugárzás intenzitását és spektrális eloszlását vizsgáljuk. A technika többnyire nem igényel erős külső behatásokat, így a biológiai minták is általában natív, funkcióképes állapotukban vizsgálhatók. Másrészt a módszer rendkívül nagy érzékenységgel is rendelkezik. Ezen kedvező tulajdonságai miatt megfelelő fluoreszcens próbák felhasználásával alkalmazható élő sejtpopulációk bizonyos paramétereinek vizsgálatára is, pl. az intracelluláris pH és az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció változásainak követésére, a sejtmembrán fluiditásának mérésére, valamint fluoreszkáló anyagok felvételi és leadási kinetikájának követésére.

A vizsgálatok elvégzésére alkalmas mérőrendszer a spektrofluoriméter. A fluoreszcens sajátosságokkal rendelkező minta gerjesztésére nagy feszültségű xenon lámpa szolgál, amely az ultraibolya és a látható spektrális tartományban is megfelelő intenzitású vonalakat emittál. Ezután a lámpa által kibocsátott sugárzás a fényszaggatón (chopper) halad át, majd a gerjesztési monokromátor biztosítja a megfelelő hullámhosszú sugarak kiválasztását. A monokromatikus fény egy fényelosztó optikai elem (beam splitter) halad át, ahonnan a fény egyik része a mintát tartalmazó küvettára jut, másik része pedig a lámpaintenzitás ingadozásainak korrigálására szolgál referenciaként. A küvettában a gerjesztő fény egy része elnyelődik, és a minta az elnyelt energia bizonyos hányadát fluoreszcens fény formájában emittálja. Az emittált fénynek a gerjesztő fény irányára merőleges komponensét vizsgáljuk, hogy az előre irányuló

fényszórás zavaró hatását elkerüljük. A minta által 90° -os szögben emittált sugárzást egy tükör az emissziós monokromátorra juttatja. Ez lehetővé teszi az emittált fény adott hullámhosszú komponenseinek tetszés szerinti kiválasztását, vizsgálatát. Az emittált fotonokat a fotoelektronsokszorozó (fotomultiplier) detektálja és alakítja a minta által emittált fotonok számával arányos elektromos jellé.

A gerjesztő fényforrás által kibocsátott sugárzás intenzitás eloszlása és a fotomultiplier érzékenysége egyaránt hullámhossz-függést mutat, ezért a teljes vizsgált spektrális tartományban a konstans lámpa-intenzitásra és a konstans fotomultiplier érzékenységre korrekciót kell végezni. A gerjesztő fényből elvezetett referencia nyalábot ezért egy ismert kvantumhatásfokú referencia anyagra pl. Rhodamin b festékre, vagy egy fényszóró lemezre juttatják és az ezek által emittált sugárzást egy referencia multiplier érzékeli. Ennek a kimenő jele visszacsatolódik a minta által emittált fotonokat detektáló fotomultiplierre és annak a tápfeszültségét szabályozva kiküszöböli a lámpaintenzitás hullámhossztól való függését. A fotomultiplier érzékenységének hullámhossz függését pedig egy szabályozó egység korrigálja.



2. ábra. A spektrofluoriméter vázlatos rajza.

- (1) xenon lámpa, (2) fényzaggató (chopper), (3) excitációs monokromátor,
- (4) fényelosztó (beam splitter), (5) küvetta, (6) tükör, (7) emissziós monokromátor,
- (8) fotomultiplier, (9) elektronikus erősítőegység, (10) referencia multiplier.
- (11) szabályozó egység

7. A gyakorlat leírása

Oldatok

1. Tripszin-EDTA oldat (0.05 % tripszin, 0.02 % EDTA és 0.009 % NaCl PBS-ben oldva)
2. Normál, valamint 7 mM glükózt tartalmazó PBS (phosphate buffered saline, 150 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 8,6 mM Na₂HPO₄, 1.69 mM KH₂PO₄, pH = 7.4)
3. Verapamil (5mg / ml, vízben oldva)
4. Na-azid (1 M-os, vízben oldva)
5. Calcein-acetoxi-metilészter (200 μM), dimetil-szulfoxidban oldva
6. 0.5 % -os Tween 80 oldat

Feladatok

1. Távolítsa el a tenyésztőfolyadékot a letapadva növő KB-V1 sejtekről. Mossa meg a sejteket 1-2 ml PBS-sel majd adjon hozzájuk 2.5 ml tripszin-EDTA oldatot. 2-3 perc múlva a sejtek enyhe szuszpendálás hatására felválnak. Állítsa le a tripszint az előzőleg eltávolított tápfolyadék visszaadásával.
2. Ezután centrifugálja le a sejteket (8 perc, 400g), majd mossa kétszer PBS-sel.
3. A második mosás előtt számolja meg a sejteket Bürker-kamrában és ossza két részre. Az utolsó centrifugálás után vegye fel a sejteket 0.1 X 10⁶ sejt/ ml koncentrációnál 7mM glükózt tartalmazó PBS-ben (**A** minta) ill. glükózmentes 10 mM Na-azidot tartalmazó PBS-ben (**B** minta). Mindkét mintát tartsa 37 °C-on.
4. Az **A** mintából vegyen ki 2ml-t egy küvettába és adjon hozzá 5 μl calcein-AM-et és percnként detektálja a fluoreszcenciát 493 / 515 nm hullámhossznál. A mérések között a küvettát helyezze vissza a termosztátba és mérés előtt mindig szuszpendálja fel a sejteket. Kb. 7.5 perc inkubálás után adjon 16 μl verapamilt a küvettához és ismét kövesse 5-6 percig a fluoreszcencia változását. A mért fluoreszcencia intenzitásokat ábrázolja az idő függvényében és értelmezze a verapamil hatását az elméleti részben leírt modell alapján.

5. Vegyen ki 2ml sejtszuszpenziót a **B** mintából és adjon hozzá 5 μ l calcein-AM-et, majd az előbbiekhöz hasonlóan kövesse nyomon a calcein-AM felvétel kinetikáját. Kb. 7.5 perc múlva adjon 16 μ l verapamilt a sejtekhez. Ismét kövesse a fluoreszcencia változását 5-6 percig. Ábrázolja a mért fluoreszcencia intenzitásokat az idő függvényében. Tapasztalatait magyarázza meg.

6. Inkubáljon 2ml sejtszuszpenziót 0.005 % Tween 80 jelenlétében 15 percig, majd az előzőekhez hasonlóan vizsgálja meg calcein-AM felvételüket. Hasonlítsa össze a Tween 80 jelenlétében mért calcein-AM felvételi kinetikát a verapamil és a Na-azid kezelés esetén kapott eredményekkel.

7. Végezze el a fenti kísérleteket a HL60-MRP sejtvonalon is. Tapasztalatait magyarázza meg.

A kromatin szerkezetének és a DNS replikációjának vizsgálata

I., Nukleáris "halo" preparálása

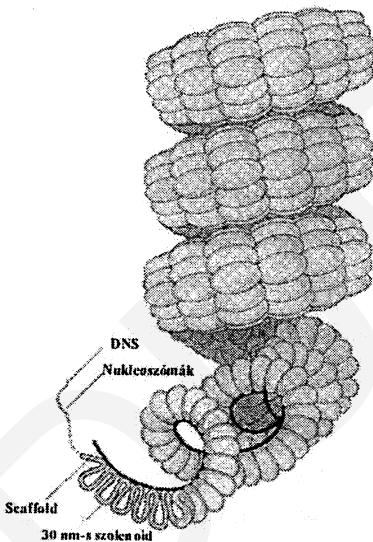
1. A kromatin szerkezete

A élő szervezetek örökítőanyaga, a DNS az eukarióta sejtek esetében a sejtmagban található. Bár a diploid humán genom 6×10^9 bázispárból áll, amely a DNS molekula teljes relaxációja esetén mintegy 2 méter hosszú molekulát jelentene, a 46 kromoszóma a pusztán 3-10 μm átmérőjű sejtmagban van. Ezt a nagymértékű méretcsökkenést a DNS molekuláknak kromatinszerkezetbe való "bepakolása" teszi lehetővé. A kromatint a DNS molekulák alkotják a hozzájuk kötődő hiszton-, és nem-hiszton jellegű fehérjékkel

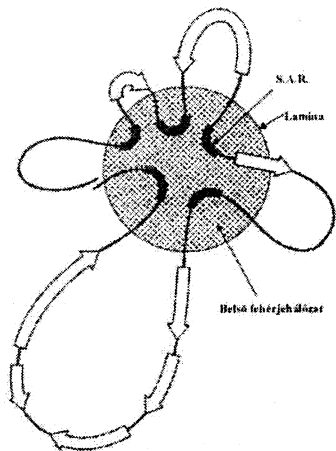
együtt. A kromatinszerkezetbe való pakolás alapvető szerkezeti elemei a hisztonok.

2-2 molekula H2A, H2B, H3 és H4 hisztonmolekula a körük teleredő kb. 166 bp DNS szakasszal együtt alkotják az úgynevezett nukleoszómakat, amelyeket különböző hosszúságú linker DNS és a H1 hiszton köt össze egymással. A kromatinszálnak ezen a szerveződési szinten gyöngyfűzér-szerű (beads-on-a-string) megjelenése van. A kromatin azonban a sejten belül tovább "pakolódik", és 25-35 nm átmérőjű fonal-szerű formát, úgynevezett szolenoid struktúrát képez. Ennek a szerveződési

szintnek a kialakulásának módja nem ismert pontosan. A kromatin magasabb rendű szerkezetére jellemző, hogy a kromatinszálnak kapcsolódó fehérjék segítségével a szolenoid struktúra tovább pakolódik 10-90 kb DNS-t tartalmazó hurkokba. A hurkok alapjánál lévő DNS az ún. *scaffold*hoz, a kromoszómák fehérje-vázához kapcsolódik. A hurkok további kondenzációs szinteken keresztül építik fel a kromoszómát.



2. A nukleáris "halo"



is kapcsolódik.

3. A DNS szuperhelikális szerkezete

Cirkuláris DNS molekulák, valamint a végüknek rögzített lineáris DNS molekulák esetén a Watson-Crick-féle hélix hossz tengelye körül megtekeredhet, szuperhelikális szerkezetet (supercoil) létrehozva. Valószínűleg az eukarióta kromatin 10-90 kb hurkainak végei is rögzítve vannak a scaffoldhoz, és az eukarióta DNS feltehetőleg negatív (balmenetes) szuperhelikális szerkezetet vesz fel a kromatinon belül. A szuperhelikális szerkezet valószínűleg szerepet játszik a kromatin működésének szabályozásában, valamint feltekervén a DNS-t, jelentősen csökkenti annak hosszát.

A DNS molekulák festésére alkalmas az etídium-bromid, amely a DNS kettős spiráljába interkalálódik, és ezáltal fluoreszcencia kvantumhatásfoka megnő. Az interkalálódás hatására a DNS szerkezetében is változás történik. A negatív (balmenetes) szuperhelikális szerkezetű DNS etídium-bromid hozzáadásának hatására relaxálódik, illetve nagyobb koncentráció esetén "túltekereedik", és pozitív (jobbmenetes) szuperhelikális szerkezetet vesz fel.

Ha permeabilizált membránú sejteket emelkedő koncentrációjú sóoldatokba helyezünk, elérhető a kromatint alkotó fehérjék egy részének, többek között a hisztonoknak kioldása.

Ennek hatására a DNS, megszabadulván a pakolását biztosító fehérjék egy részétől, szétterül, és hurkok formájában kitüremkedik a sejtmagból, ugynevezett nukleáris halo-t alkotva. A DNS a scaffoldhoz kötődő szekvenciái révén (SAR) a kromatin maradék fehérjevázához

4. Gyakorlat: Nukleáris "halo" vizsgálata

A gyakorlathoz HL-60 humán sejtvonalat használunk.

- 1., Számolja meg a sejteket Bürker-kamra segítségével.
- 2., Citocentrifuga segítségével centrifugáljon 200 µl sejtuszpenziót polilizinnel borított tárgylemezre (7 tárgylemezt készítsen).
- 3., Tartsa a tárgylemezeket 10 másodpercig lízis pufferben (50mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂, 0,22M szacharóz, 0,5% NP-40, pH=7,8)
- 4., Tartson 5 tárgylemezt egyre emelkedő koncentrációjú NaCl oldatokban (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2M) 30-30 másodpercig, valamint 1 tárgylemezt kizárólag 2M-s NaCl oldatban.
- 5., Kezelje az egyik tárgylemezt 0,05 mg/ml DN-áz I oldattal szobahőmérsékleten 1 percig, egy másikat pedig 1 mg/ml DN-áz oldattal 10 másodpercig. (puffer: 2M NaCl, 0,5 mM MgCl₂, 10 mM TRIS, pH=7,4)
- 6., Óvatosan itassa le a folyadékot a tárgylemezről a kiadott szűrőpapír segítségével
- 7., Fesse a mintákat a táblázatban megadott koncentrációjú etídium-bromiddal (10 µl) 1 percig
- 8., Vizsgálja meg a mintákat fluoreszcenciás mikroszkóp alatt.

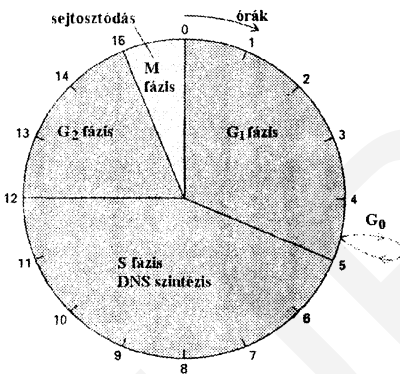
Tárgylemez	Sóoldat (NaCl)	Enzimatiskeus kezelés	Etídium-bromid koncentráció
1.	-	-	4 µg/ml
2.	Koncentráció sor	-	1 µg/ml
3.	Koncentráció sor	-	4 µg/ml
4.	Koncentráció sor	-	100 µg/ml
5.	Koncentráció sor	DN-áz I 0,05mg/ml	4 µg/ml
6.	Koncentráció sor	DN-áz I 1 mg/ml	4 µg/ml

Feladatok:

- 1., Figyelje meg a sejtmagok illetve a halo preparátumok méretét, illetve külalakját a különböző kezelések után. Adjon magyarázatot a megfigyelt eltérésekre.
- 2., Mérje meg okulár mikrométer segítségével a halo-preparátumok átmérőjét.
Becsülje meg a DNS hurkok hosszát a 4. minta esetén, feltételezván, hogy a DNS relaxált állapotú, és 10 bp 36 nm-nek felel meg.

II. Sejtosztódás nyomonkövetése a replikálódó DNS bromodeoxyuridin jelölésével

1. Sejtosztódás, sejtciklus



Az ábrán egy átlagos eukarióta sejt sejtciklusa látható. A DNS replikációja az S fázisban, míg a sejtosztódás az M fázisban történik. Ennek következtében a sejt az S fázis végén, valamint a G₂ fázisban a haploid genetikai állomány négyszeresét tartalmazza, és csak az M fázis végére áll vissza a kiindulási állapot. Áramlási citométer segítségével a DNS-t sztöchiometrikan jelölő festéket (pl.:

propidium jodid) használva egy sejtpopulációban pontosan meg lehet határozni, hogy a sejtek milyen hányada volt a festés pillanatában a G₁/G₀ fázisokban, illetve az S fázis elején; valamint, hogy mely sejtek tartottak az S fázis végén, illetve a G₂/M fázisokban.

Ha osztódó sejtek tenyészetéhez bromodeoxyuridint (timidin analóg) adunk, akkor a sejtek felveszik környezetükből a BrdU-t, és a timidin helyére beépítik a növekvő, éppen szintetizálódó DNS molekulákba. Félórás jelölés hatására mindazon sejtek tartalmazni fognak DNS molekulába beépült BrdU-t, amelyek a jelölés során S fázisban voltak. A BrdU jelenléte immunofluoreszcens módszerekkel könnyen kimutatható. Az S fázisban levő sejtek aránya egy adott sejtpopuláción belül ezáltal fluoreszcens mikroszkóppal, illetve áramlási citométerrel meghatározható.

A gyakorlaton a DNS-be beépült BrdU molekulákat anti-BrdU antitesttel, majd FITC-cel jelölt másodlagos antitesttel mutatjuk ki.

2., Replikálódó DNS in vivo jelölése BrdU-val

1., Adjon sejt kultúrában növesztett HL-60 sejtek tenyészetéhez 10 μ M BrdU-t, és tenéssze tovább a sejteket 30 percig.

2., Citocentrifuga segítségével centrifugálja a sejteket tárgylemezre (800g, 10 perc).

Készítsen hasonló preparátumot BrdU-val nem jelölt sejtekből is.

3., Fixálja a sejteket 30 percig 70%-os etanolban szobahőmérsékleten.

4., Szárítsa meg a tárgylemezeket.

5., Helyezze a tárgylemezeket 0,07 M-s NaOH oldatba 2 percig.

Ez a kezelés részlegesen denaturálja a DNS szálakat, így hozzáférhetővé teszi a beépült BrdU molekulákat az antitest számára.

6., Mossa PBS-ben a lemezeket 2 \times .

7., Adjon 20 μ l megfelelő arányban hígított egér anti-BrdU-t a tárgylemezekre, és inkubáljon 30 percig nedves kamrában.

8., Mossa PBS-sel a tárgylemezeket.

9., Adjon 20 μ l megfelelő arányban hígított másodlagos antitestet (GAM Ig-FITC), és inkubáljon 30 percig nedves kamrában.

10., Fesse a lemezeket 0,04 μ g/ml propidium jodiddal 1 percig.

11., Mossa a lemezeket desztillált vízzel.

12., Az úgynevezett foto-elhalványítás jelenség csökkentése érdekében fedje le a preparátumokat a kiadott "anti-fading" oldattal, majd helyezzen fedőlemezt a mintákra.

Feladatok:

1., Vizsgálja meg a preparátumokat floureszcens mikroszkóppal. Írja le, mit tapasztal.

2., Becsülje meg a BrdU jelölés idején S fázisban levő sejtek arányát a mikroszkópos kép alapján.

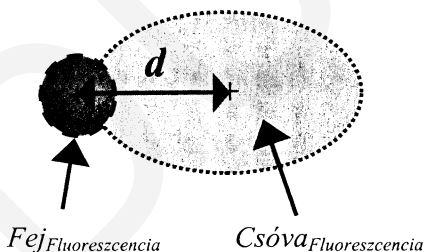
DNS károsodás vizsgálata

DNS lánc törések

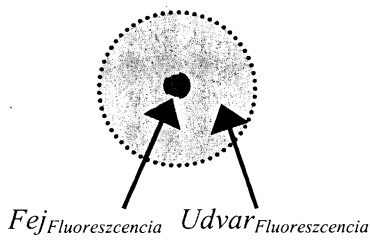
Az ionizáló sugárzások következtében létrejövő sejt inaktiválódásban a DNS-t ért sugárkárosodásnak elsődleges szerepe van. A sugárzás indukálta sejtpusztulás oka a komplex DNS léziók kijavításának a hiányában vagy a hibák téves javításában keresendő. Az ionizáló sugárzások 1 Gray (G) dózisa egy átlagos diploid sejtben kb. 1000 db egyszálú és 25-40 db kétszálú törést eredményez, függetlenül a sejtek típusától. (Néhány fontosabb kivétel ez alól, pl. a hipoxiás sejt, vagy a glutationban szegény sejt.) Ezen DNS károsodásokra adott sejtválaszok viszont már nagymértékben különbözhetnek a sejtek szöveti hovatartozásától és a sejtek aktuális állapotától függően. A különböző eredetű sejtek "belső" sugárérzékenységében mutatott eltérések értelmezésében nagy szerepet tulajdonítunk a sejtek DNS károsítást követő DNS javítási képességekben mutatott különbségeknek. Ilyen tekintetben eltérések lehetnek, pl. a sejtek DNS kijavító enzim működések hatásfokában, vagy ezen enzimek mennyiségében, stb.

DNS lánc töréseket nem csak ionizáló sugárzás hozhat létre. Hasonló primer DNS károsító hatással bír a tumorok kemoterápiájában használt jó néhány citosztatikum

Komit-esszé

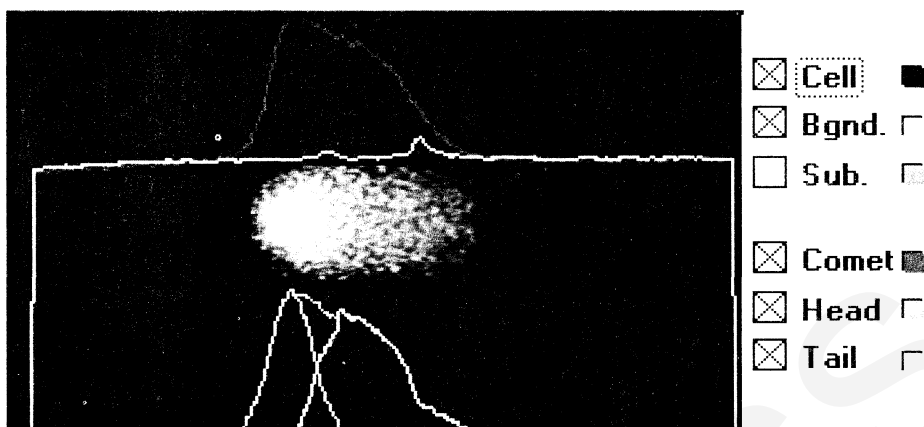


Apoptotikus hélo-esszé



$$\text{Csóva index} = d \frac{\text{CsóvaFluoreszcencia}}{\text{FejFluoreszcencia} + \text{CsóvaFluoreszcencia}}$$

1. ábra. A DNS károsodás mérése sejtenként

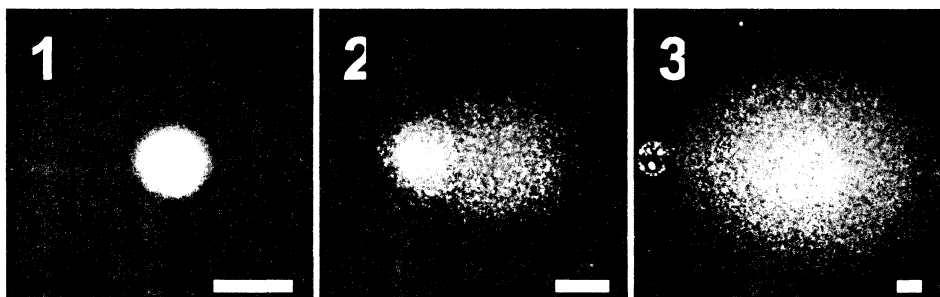


2. ábra. Komit-esszé képi analízise

is. Ilyen hatásúak például az alkiláló szerek vagy a topoizomeráz I és II enzim gátló tumor ellenes gyógyszerek (kamptotekin, etopozid). A modern agrárgazdálkodásban széles körben használt peszticidok és a herbicidek sokféle módon ható, széles spektrumú vegyület családot alkotnak. Ismert, hogy több közülük DNS töréseket képes indukálni, így genetikai károsító hatásukon keresztül akár a tumorok keletkezésében is szerepet játszhatnak, ha a környezetünkben megfelelő mennyiségben a szervezetünkbe kerülnek.

Egyedi sejt gél elektroforézis (Comet assay)

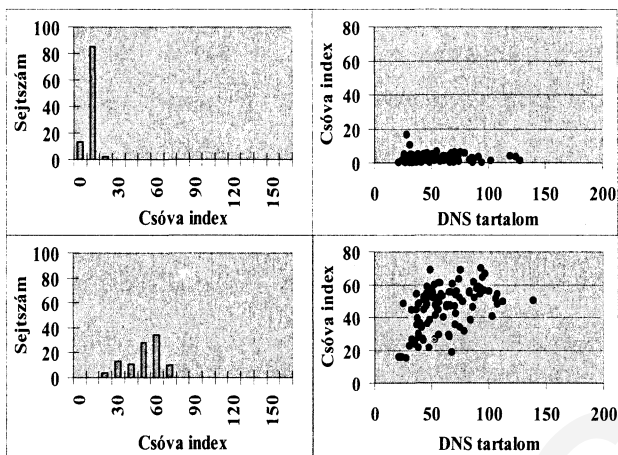
Jó néhány mérési módszer ismeretes a DNS lánc-törések mérésére. Ide tartoznak például a konvencionális és a pulzáló-tér (pulsed field) gél elektroforézisen alapuló módszerek, vagy például a DNS filter elúció, melyek közös jellemzője, hogy mindegyik eljárás a sejtek nagyobb populációit egyszerre képes csak vizsgálni. A nagyobb mértékű apoptotikus DNS károsodás sejtszintű mérésére a háló-esszé (halo assay, háló - holdudvar) vagy az ún. TUNEL-esszé használható. Östling és Johanson 1984-ben dolgozta ki a *komit-esszét* (comet assay, comet - üstökös), melyet *egyedi sejt gél elektroforézisnek* (single cell gel electrophoresis) is nevezünk. Ez egy "mikrogél" készítésen alapuló elektroforetikus eljárás, mely segítségével *sejtenként* lehetséges a *DNS károsodás vizsgálata*. Az ionizáló sugárzással kezelt sejteket még folyékony állapotú agaróz gélbe keverik, melyet utána tárgylemez felületére visznek vékony rétegben. A beágyazott sejteket lizálják (feltárják), kioldják belőlük a membránokat és



3. ábra. Különböző mértékű DNS károsodások képe egyedi sejt gél elektroforézissel vizsgálva

1. panel: nincsen károsodás (csóva index < 1).
 2. panel: károsodott sejt (csóva index 6-60).
 3. panel: igen nagy mértékű DNS károsodás: apoptotikus sejtmag (csóva index > 60).
- A képeken látható vonal mérete $20 \mu\text{m}$.

a fehérjéket. A gélben visszamaradó magot elektroforetizálják és DNS kötő festékekkel festik a tárgylemezen. Az elektromos térbe helyezett sejtmagból a töltéssel rendelkező DNS darabokat a térerő "kihúzza", így a károsodott DNS egy csóva formájában jelenik meg a mag mellett. Az így keletkezett mikroszkópos képeket használják a DNS károsodás mértékének a megítélésére. A módszert a kapott kép alapján nevezték el comet assay-nek (comet - üstökös). Östlingék azt találták, hogy a magból kiáramló DNS darabok mennyisége arányos volt a sejtekre leadott ionizáló sugárzás dóziséval. A 80-as évek vége felé Singh módosított az eredeti eljárásán, így sokkal érzékenyebbé vált a módszer. A 90-es években Olive és munkatársai fejlesztették tovább a technikát, mely révén a DNS károsodás mértékének sejtciklus függését is ki lehetett mérni. A klinikai technikák fejlődésével sugárterápián vagy kemoterápián átesett betegekből nyert biopsziás szövetekből is ki lehetett mutatni az ionizáló sugárzás illetve a tumor ellenes gyógyszerek hatására (pl. a bleomycin) keletkezett DNS károsodást. A DNS károsodás sejtenkénti mérésének eredményeképpen meg lehet állapítani, hogy milyen homogén vagy heterogén a sejt károsodás. A sejtek tumor ellenes kezelésre adott heterogén válasza előjelezhet, pl. terápiára rezisztens sejtek kis populációját, melyek



4. ábra. A DNS károsodás mérése

Csóva index gyakorisági eloszlások láthatóak a bal oldali paneleken. A jobb oldali panelek a DNS károsodás mértékét (csóva index) ábrázolják a DNS tartalom függvényében. Minden pont egy-egy sejtnek felel meg. Etopozid kezelt HL-60 sejtek láthatóak az alsó paneleken. Hasonlítsa össze őket a felső paneleken lévő kontroll sejtekkel.

megjelenése kedvezőtlenül befolyásolhatja a kívánatos terápia hatást. Az eljárás segítségével így a sugárterápiák illetve tumor ellenes kemoterápiák várható kimenetele vizsgálható. A komit-esszé alkalmas a DNS károsodást javító enzimek működésének kinetikai vizsgálatára és következtetni lehet segítségével a genotoxicitásra is.

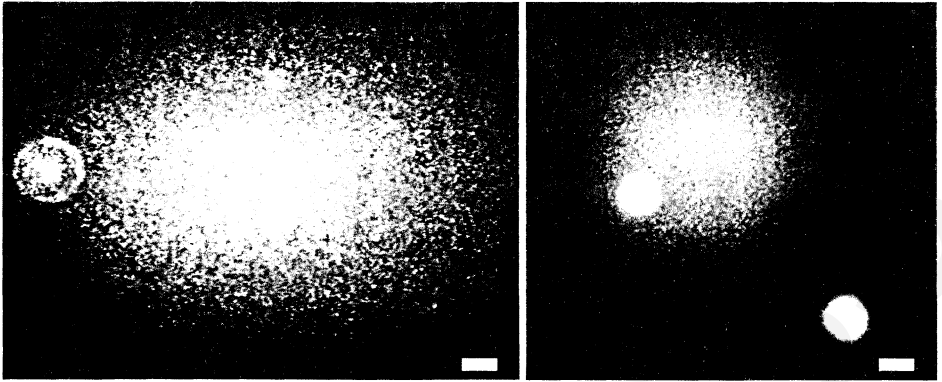
A DNS károsítás mérése általában azon az elven alapszik, hogy a lánctörések következtében csökken az egybefüggő DNS molekulák mérete és így azok molekulatömege. Ehhez adódik még hozzá az, hogy egyszálú és kétszálú DNS töréseknek dramatikusan hatása lehet a magasabb szintű kromatin szerveződésre a "supercoiling" és a magba való szoros "becsomagolás" mértékének a megváltoztatása révén. Az egyszálú lánctörések érzékeny méréséhez a DNS molekula denaturálására és "kitérkedésére" van szükség. A DNS molekula denaturálásának, relaxálásának és az egyszálú lánctörések feltárásának elősegítésére a magas pH használata (>12.3, NaOH hozzáadásával) az elterjedt. Az alkáliák használata a lúgos kémhatás segítségével az u.n. alkáli-labilis DNS léziók kimutatására is alkalmas.

A komitok keletkezésekor a negatív töltésű DNS törvégek és a DNS fragmentek a pozitív anód felé vándorolnak. Így alapvetően két fő elv határozza meg az "üstökösök" csóvájának a kialakulását. A csóva hossza növekszik a DNS károsodás mértékének a növekedésével, de ez egy idő után elér egy maximumot, mely maximum értékét elsődlegesen az elektroforézis körülményei határoznak meg (térerő, idő), és nem csak a fragmentek mérete. Alacsony szintű DNS károsodás esetén, a DNS hurkok nagy valószínűséggel még csak egy-egy láncötrest szenvednek. Ebben az esetben a DNS szabad törvégei a térerő hatására eltávolodnak a magtól, de a törvégeivel tovahaladó DNS lánc egy idő után mint valami húr kifeszül a gélben, hiszen a DNS szál másik vége még "kapaszkodik" a maghoz. Kis számú törveg esetén tehát a rögzült DNS fonalak kifeszülése a jellemzőbb, nem pedig a különálló kis méretű DNS fragmentumok migrációja. Ilyenkor a csóva egy keskeny szalagos formát vesz fel (2. ábra). Nagyobb számú láncötrest esetén az egyre kisebb méretű fragmentek egyre szabadabban képesek eltávolodni a sejt magjától, és szélsőséges esetben (pl. apoptotikus DNS károsodás esetén) az üstökös magja és a csóva jól elkülönülnek egymástól (3. ábra, 3. képe). A csóva maghoz képesti fluoreszcencia intenzitása felvilágosítást nyújt a csóvába vándorolt DNS mennyiségéről, és ezen keresztül a láncötrestek számáról. A leírtak alapján tehát a kifeszülő DNS fonalak és a tovahaladó DNS fragmentek együttesen hozzák létre a kvantifikálható üstökös formátumot.

A DNS károsodás mérése sejtenként

A számítógépes képfeldolgozó rendszerek lehetővé teszik a DNS károsodás precíz mérését (1. és 2. ábra.) A kvantitatív analízis elősegítésére egy speciális paramétert a "csóva indexet" vezették be. A csóva indexet megkapjuk, ha a fej és a csóva tömegközéppontjainak a távolságát megszorozzuk a csóvában lévő DNS-nek a teljes DNS-hez viszonyított arányával (1. és 3. ábra). A csóva index magába foglalja mind a kis méretű DNS fragmenteket jól jellemző elmozdulást a csóva hosszában (d), mind a csóvában lévő mobilis DNS mennyiségének jellemzésére szolgáló DNS arányát. A comet képkieértékelő szoftverekkel meghatározható az "üstökös" teljes fluoreszcencia intenzitása is, ami arányos a sejt teljes DNS mennyiségével, és így jellemzi a sejtnek a sejtcikluson belül elfoglalt helyét. A DNS tartalom és a DNS károsodás együttes

meghatározása lehetővé teszi különböző kezelések hatására a sejtcikluson belül létrejött egészen kis változások statisztikailag megalapozott felderítését (4. ábra.).



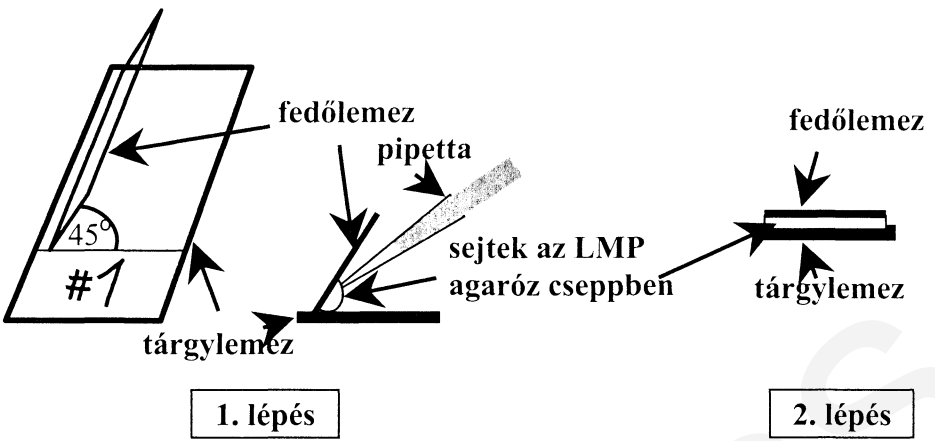
5. ábra. Apoptotikus sejtek komit és hélo-esszéivel vizsgálva

A bal oldalon egy apoptotikus sejtmag komit-esszéivel készült képe. A jobb oldalon két normál és egy apoptotikus sejtmagot látunk hélo-esszéivel vizsgálva.

Az etopozid kezeléssel és az apoptózissal kapcsolatos DNS károsodás

A gyakorlat keretén belül az etopozid DNS károsító hatását fogjuk vizsgálni. Az etopozid a tumorok kemoterápiájában széles körben alkalmazott citosztatikum, mely a topoizomeráz II enzim gátlásán keresztül fejt ki hatását oly módon, hogy rögzíti a topoizomeráz enzim normál működése következtében átmenetileg keletkező DNS lánc kettős töréseket (4. ábra).

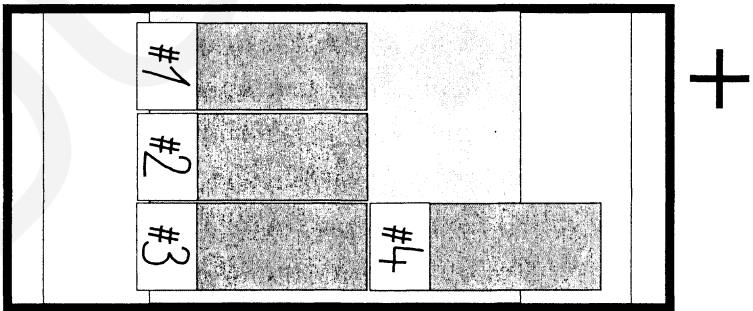
A programozott sejthalál vagy *apoptózis* a sejtciklus egy meghatározott program szerinti befejezését beindító folyamat, melyet különböző károsító környezeti tényezők indukálhatnak. Ilyenek, pl. a fejezet elején említett ionizáló sugárzás vagy a kemikáliák. Az apoptotikus program végső fázisában endogén nukleázokat aktivál, mely a kromatin hasítását eredményezi. Ez a folyamat egy a teljes genomhoz képest igen apró, 180-200 bázispár hosszúságú, oligo-nukleoszóma méretű DNS fragmenteket,



6. ábra. A sejtek tárgylemezre rétegzése

illetve azok egész számú többszöröseit eredményezi. A komit-esszé egy jellegzetes apoptotikus DNS fragmentációs kép létrehozásával képes azonosítani az apoptotikus sejteket. (5. ábra bal oldali kép).

A kis molekulatömegű fragmentek igen gyorsan diffundálnak ki elektroforézis nélkül is a mag területéről. Ezt a folyamatot használja ki az un. *apoptotikus háló-esszé*, amely segítségével az apoptotikus sejtek olyan módon különíthetők el, hogy a normális magot tartalmazó sejtek képéhez képest az apoptotikus sejtekben egy kisebb intenzitású mag körül egy diffúz DNS udvar jelenik meg. (5. ábra bal oldali képe).



7. ábra. Elektroforetikus tartály.

Gyakorlati feladatok:

DNS károsodás vizsgálata: a DNS lánc törések detektálása egyedi sejteken

A gyakorlat célja **kétszálú** DNS lánc törések etopozid kezeléssel történő indukálása és a törések mennyiségének sejtenkénti láthatóvá tételé HL-60 sejtekben egyedi sejt gél elektroforézis (**comet assay** - komit-esszé) és **halo assay** (héló-esszé) segítségével.

A komit-esszé rövid **leírása**: A sejteket agarózba ágyazva tárgylemezre rétegezzük. A tárgylemezt a sejtekkel lizis pufferbe tesszük, mely **kezelés** kioldja a citoplazma- és magmembránt, illetve denaturálja a fehérjék döntő többségét és a DNS-t. Ezután a sejtek egy erősen alkalikus (Futtató) pufferbe kerülnek, ahol a DNS tovább denaturálódik és így a **fehérje** vesztett kromatin relaxálódik. Az elektroforézis során elektromos erőtérrel kapcsolva a géltre a **sejtmagban** lévő negatív töltésű DNS az anód irányába mozdul. Adott térerő megfelelő ideig történő alkalmazásával a **károsodott**, azaz a lánc töréseket tartalmazó és kis molekula tömegű DNS elhagyja a magot, csóvát alkotva, **míg** a lánc töréseket nem szenvedett, a genom méretével összevethető méretű egybefüggő DNS láncok a mag **területéről** nem képesek elmozdulni, létrehozva így az „üstökös” fejt. A magok a gélben DNS kötő festékkel **való** megfestésük után mikroszkóppal vizsgálva tehát üstökös-szerű képződményeket hoznak létre (1. és 2. ábra, **ahonnan** az eljárás neve származik: comet - üstökös). Megfelelő képanalizáló rendszer segítségével a kapott **alakzatok** képi kiértékelése alapján a DNS károsodás sejtenként kvantifikálható. A DNS károsodás mértéke **arányos** lesz a csóva hosszával illetve a csóvában található DNS mennyiségével.

A **halo assay** (halo - holdudvar), egy módosított komit-esszé, mely során a sejteket nem elektroforetizáljuk, csak hagyjuk a károsodott DNS-t a magból kидiffundálni. Ezen eljárás nagyobb mértékű DNS károsodás mérésére használt módszer. **Különbösen** alkalmas apoptotikus DNS károsodás sejtenkénti láthatóvá tételére (5. ábra).

Előkészítés:

A HL-60 sejteket egy nappal a gyakorlat előtt 2.5×10^5 /ml koncentrációban friss médiumba helyezzük (10ml/T25 tenyésztő flaska - 10% FCS RPMI-ben).

A gyakorlat napján 5 ml HL-60 sejtet készítünk elő.

A gyakorlaton végzendő kísérleti protokoll:

	Idő	percben
1. Tegye az 1%-os LMP (Low Melting Point - alacsony olvadáspontú) agarózt tartalmazó eppendorf-csővet a 60 °C-os. (A melegítő a "Limfociták és granulociták szeparálása, sejtszámolás, sejtmagfestés" című gyakorlat gyakorlati helyén található. Az LMP agaróz 60 °C-on való megfelelő felolvasztása kb. 15 percet vesz igénybe.)		
2. Szuszpendálja fel az előkészített sejteket, majd számolja meg őket Bürker-kamrában. A számolás menetét ld. a "Limfociták és granulociták szeparálása, sejtszámolás, sejtmagfestés" című gyakorlatnál. A számolás ideje alatt centrifugálja le a HL-60 sejteket 15 ml-es centrifuga csőben 1200-as fordulatszám, 5 percig. Öntse le a felülúszót és a sejteket tartalmazó üledéket kímélje meg.	15	15
3. Allítsa be a sejt koncentrációt 2×10^6 /ml-re PBS felhasználásával a következő módon: A megkímélt sejt üledéket mutatóujjának a fricskázásával szuszpendálja fel alaposan. Adjon a számlolt sejt szám alapján kalkulált megfelelő térfogatú PBS-t a sejtekhez, és szuszpendálja ismételtel fel a sejteket.	5	20
4. A minimum 15 perces kiolvasztás után rázza alaposan össze a forró 1%-os LMP agarózt és tegye bele a csővecskét a 37 °C-os vízfürdőbe. Az agarózra a későbbiek során lesz szükség.		
5. Kezelje a HL-60 sejteket 272 μM etopoziddal, míg a kontrollt csak az oldószerrel (alkohol) a következő módon: Számozzon meg 4 eppendorf csövet 1-től 4-ig. Mérje bele a megjelölt csövekbe a sejteket, a hordozót és az etopozidot az 1. táblázatnak megfelelően.	5	25

6.	Inkubálja a sejteket 30 percig a 37 °C-os vízfürdőben. A hosszabb inkubálások alatt nézze meg az előző csoportok által elkészített komit és héló alakzatok képeit a számítógépen. Készítsen róluk intenzitás profilt a gyakorlat végén leírt programok felhasználásával.	30	55
7.	A tárgylemezek előkészítése (mintánként): Jelöljön meg 4 agaróz kezelt tárgylemezt 1-től 4-ig ceruzával. Melegítse elő a megjelölt tárgylemezeket és 4 db 60x24mm-es fedőlemezt a 37 °C-os vízfürdőben lévő fém felületre helyezve. Jelöljön meg 4 db új eppendorf csövet 1-től IV-ig. Legalább 3 percig melegítse a tárgylemezeket és a csöveket a vízfürdőben!	3	58
8.	Pipetázzon 150 µl 37 °C-ra melegített folyékony 1%-os LMP agarózt és 50 µl sejt szuszpenziót az előmelegített előjelölt eppendorf csövekbe a minták jelölésével összhangban. A csövek maradjanak a vízfürdőben végig! Dolgozzon gyorsan az LMP agarózzal, mert szobahőn azonnal megszilárdul, és nem tudja elvégezni megfelelően a rétegzést! Minden sejt mintához új hegyet használjon!	3	61
9.	A tárgylemezeket egyenként készítse el a következőknek megfelelően: Pipetázással keverje össze a sejteket az agarózzal. 80 µl-t pipetázzon a mintáknak megfelelően jelölt előmelegített tárgylemezekre a 6. ábrán látottak alapján az előmelegített 60x24mm-es fedőlemez segítségével. A fedőlemez óvatos, de gyors tárgylemezre engedésével rétegezze a két üveg felület közé a még folyékony LMP agarózt, mely a sejteket tartalmazza.	5	66
10.	Helyezze fedőlemezzel felfelé a tárgylemezt 1 percre a jégben lévő hideg fém felületre, hogy a még folyékony agaróz megszilárduljon.	1	67
11.	Távolítsa el a fedőlemezt óvatos oldalirányú elcsúsztatással, úgy, hogy a tárgylemezen maradjon az arra rétegzett agaróz. A fedőlemezeket tegye a 37 °C-os fém tartóra!	2	69
12.	Rétegezen az előzőekhez hasonlóan minden tárgylemezre egy második réteget az 1%-os 37 °C hőmérsékletű LMP agarózból. Helyezze a tárgylemezt 1 percre a jégben lévő hideg fém felületre, hogy az agaróz megszilárduljon. Távolítsa el a fedőlemezt óvatos oldalirányú elcsúsztatással, úgy, hogy a tárgylemezen maradjon a ráregeztett agaróz. A fedőlemezeket tegye 37 °C-ra, mely később újra szükséges lesz!	7	76
13.	*Fordítsa az #1 és #2 tárgylemezeket azok üres hátoldalával egymásra, majd helyezze bele őket 35 ml alkalikus lízis pufferbe egy 50 ml-es centrifuga csőben. Ismétlje meg az előző lépést a #3 és #4 tárgylemezzel egy másik 50 ml-es csőben.	4	80
14.	Inkubálja a tárgylemezeket a pufferben szobahőn 1 órán keresztül.	60	140
15.	Vegye ki a tárgylemezeket a lízis pufferből, és élével merítve óvatosan, írással felfelé tegye bele őket az elektroforetikus kádban lévő futtató pufferbe. Rendezze el a tárgylemezeket a 7. ábrának megfelelően.	2	142
16.	Inkubáljon 15 percig a futtató pufferben: <i>DNS relaxálás.</i>	15	157
17.	Vegye ki a #3 és #4 tárgylemezeket a <i>futtató pufferből</i> , és a *-nál leírt módon hátlapjukkal összefektetve tegye bele a <i>neutralizáló oldatba</i> .		
18.	Elektroforetízálja az #1 és #2 tárgylemezen lévő géleket: állítsa a feszültség forrást Constant Current üzemmódba, és állítsa az áramot 200 mA-re.	3	160
19.	Futtassa a gélt 15 percig, majd állítsa le a futtatást a feszültség forrás kikapcsolásával.	15	175
20.	Vegye ki az #1 és #2 tárgylemezeket a <i>futtató pufferből</i> , és a *-nál leírt módon hátlapjukkal összefektetve tegye bele a <i>neutralizáló oldatba</i> 5 percre a #3 és #4 tárgylemezek helyére.	5	180
21.	A tárgylemezeket a hideg fém lapon a hátlapjukra fektetve fedje le a sejteket 50 µl 20 µg/ml propidium jodid oldattal a 6. ábránál leírt módszert követve a fedőlemez segítségével: <i>DNS festés.</i>	5	185
22.	Vizsgálja meg a sejtmagot fluoreszcens mikroszkóp segítségével. Keressen a látótérben komitét, hélót és intakt sejtmagot. A mikroszkópot zöld gerjesztő fényvel használja, a magok piros emissziót mutatnak.	10	195
23.	Készítsen képeket az alakzatokról a kamerával. A ScionImage program segítségével vegyen fel intenzitás profilokat az alakzatokról.	10	205
24.	Rajzolja és írja le eredményeit a jegyzőkönyvébe!	10	215

Összesen:	3 óra 35 perc
-----------	------------------

Használjon gumikesztyűt minden lépésnél, hogy a tárgylemezek és az oldatok DNáz mentesek maradjanak!

1. táblázat	HL-60 sejtek (2 x 10 ⁶ cells/ml PBS-ben)				
	Jelölés	Minta	Sejtek	Alkohol	Etopozid
Komit-esszé	1	Etopozid	250 µl	-	2 µl
	2	Kontroll	250 µl	2 µl	-
Héló-esszé	3	Etopozid	250 µl	-	2 µl
	4	Kontroll	250 µl	2 µl	-

Oldatok:

Alkalikus lízis puffer

1	1% lauryl sulfate	10 g	<i>2 x 35 ml gyakorlatonként</i> (L-5125, SIGMA)
2	2,5 M NaCl	146,1 g	(S-3014, SIGMA)
3	10 mM Tris (base)	1,21 g	(Trisma Base T-1503, SIGMA)
4	NaOH	6 g	(S-0899, SIGMA)
5	100 mM EDTA	37,22 g	(E-5134, SIGMA, EDTA + 2xH ₂ O)
6	Állítsa be a pH-t 10-re		
7	Töltse fel 1 L-re H ₂ O-el és kevertesse a következő napig. Szobahőn tárolva tetszőleges ideig felhasználható. A használat napján adja hozzá:		
8	100 ml DMSO (10%, 1,28 M)		
9	10 ml Triton-x-100 (1%, 16 mM)		

Neutralizáló oldat

0.4M Trisma base	48,4g	<i>35 ml gyakorlatonként</i> (Trisma Base T-1503, SIGMA)
Töltsd fel 1 L-re H ₂ O-el pH 7,5		

Futtató puffer

300 mM NaOH	24 g	<i>500 ml gyakorlatonként</i> (S-0899, SIGMA)
1 mM EDTA	0,744 g	(E-5134, SIGMA, EDTA + 2xH ₂ O)
Töltsd fel 1 L-re H ₂ O-el		

Etopozid (MW: 588,6)

34 mM etopozid alkoholban (20 mg/ml-es ampulla; Vepeside, Sandoz, Rueil Malmaison, France)	<i>4 µl gyakorlatonként</i>
---	-----------------------------

Propidium jodid

20 µg/ml H ₂ O-ben	<i>2 x 50 µl gyakorlatonként</i> (SIGMA)
-------------------------------	---

LMP agaróz

1% LMP agaróz PBS-ben	<i>920 µl gyakorlatonként</i> (SIGMA)
-----------------------	--

PBS

6 ml gyakorlatonként

Alkohol

4 µl gyakorlatonként

Eszköz szükséglet:

Elektroforetizáló tartály
Egyenáramú feszültség forrás megfelelő kábelekkel
37 °C-os vízfürdő
Centrifuga
60 °C-os melegítő (másik gyakorlatnál van!)
Fluoreszcens mikroszkóp
Jég, tartóban
Vízszintes hideg fém felület a jég tetejére helyezve
Vízszintes meleg fém felület a 37 °C-os vízfürdőbe helyezve
Vízszintes fém felületű állvány a tárgylemezek készítéséhez
200 és 10 µl-es illetve 1 ml-es pipetták
Új 200 és 10 µl-es illetve mosott 1 ml-es pipetta hegyek
1 x 15 ml-es mosott centrifuga cső tartóval együtt
8 x új 1.5 ml-es eppendorf-cső
6 x előjelölt 50 ml-es centrifuga cső tartóval együtt
4 x agaróz kezelt tárgylemez.
Az agaróz kezelt tárgylemez készítése a következő
módon történik: mérítse a Superfrost+ típusú
tárgylemezeket 90-100 °C-os 1%-os H₂O-ben oldott
agarózba (nem LMP), majd szárítsa pormentes helyen.
Tárolás 100-as műanyag tartókban. A tárgylemez
felszínén az agar réteget meg kell kímélni! Szobahőn
tetszőlegesen ideig tárolható!
4 x 60x24-mm fedőlemez
3 x Gumikesztyű
Csipesz
Papír vatta felvágva, tartóban
Minden előkészítendő tárgy tálcán legyen!

A képek kiértékelésekor használt programok és menüpontok sorrendje:

Használandó programok:

Program menüpontok sorrendje:

Olimpus C-w95

↓
Camera
Camera Control
Take Picture
↓
File
Save as: .bmp
kiterjesztésű fájl

ScionImage

↓
File
Open: .bmp
↓
Options
Scale to Fit Window
↓
Process
Enhance Contrast
↓
Tools
Line tool: húzzon egy vonalat a
kiértékelendő alakzaton keresztül
↓
Analyze
Plot profile