

Obrazowanie włókien macierzy zewnątrzkomórkowej z wykorzystaniem nowej sondy fluorescencyjnej Col-F

Ewa Biela

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Dobruckiego

Macierz zewnątrzkomórkowa (ECM) stanowi zespół różnych substancji wypełniających przestrzeń pomiędzy komórkami. Jej składniki tworzą swoiste rusztowanie dla komórek, zapewniają odporność mechaniczną tkankom. Ich interakcje z komórkami są niezbędne dla procesów takich jak embriogeneza, gojenie ran, czy przebudowa tkanek. Macierz zewnątrzkomórkowa ma także wpływ na powstawanie przerzutów nowotworów. Badania struktury i funkcji ECM prowadzone są wykorzystaniem wielu technik, w tym również tradycyjnych i nowych technik mikroskopowych. Znanych jest niewiele metod pozwalających na obrazowanie białek fibrylarnych ECM w otoczeniu żywych komórek.

Col-F jest syntetycznym barwnikiem, emitującym zieloną fluorescencję. Wykazano, że barwnik ten wiąże się z włóknistymi strukturami macierzy zewnątrzkomórkowej aktywnych metabolicznie tkanek. Wykorzystano go w opracowaniu nowej metody barwienia białek fibrylarnych macierzy zewnątrzkomórkowej.

Do zbadania powinowactwa barwnika do poszczególnych składników ECM wykorzystano spolimeryzowany *in vitro* kolagen, hodowle komórkowe linii ustabilizowanych, hodowle pierwotne, oraz tkanki zwierzęce obrazowane przy użyciu mikroskopów konfokalnych. Wykonano pomiary FRAP, a później we współpracy z badaczami z innych ośrodków naukowych wykorzystano techniki modelowania molekularnego i pomiar rezonansu plazmonów powierzchniowych, dla przewidzenia mechanizmu oddziaływania barwnika z ligandami.

Badanie barwienia przez Col-F spolimeryzowanego *in vitro* kolagenu, macierzy kolagenowej produkowanej przez ludzkie fibroblasty skórne w hodowli pierwotnej, oraz mysiego ścięgna, dowiodły oddziaływania barwnika z kolagenem. Następnie wykazano, że Col-F związany z elastyną daje znacznie silniejszy sygnał fluorescencyjny, niż kiedy jest związany z kolagenem. Może być to wynik wyższego powinowactwa do elastyny lub większej ilości miejsc wiązania na jej powierzchni.

Metodę udoskonalono, uzupełniając barwienie o sulforodaminę B (SRB) – fluoryzujący na czerwono drobnocząsteczkowy barwnik opisany, jako specyficzny dla elastyny. Wykazano jednocześnie, że sulforodamina B barwi także kolagen, jednak oddziałuje z nim znacznie słabiej, niż Col-F. Dzięki połączeniu barwników uzyskano dwubarwne obrazy, w których elastyna fluoryzuje na żółto, co jest połączeniem fluorescencji Col-F i SRB związanych z tym białkiem, zaś Col-F związany z kolagenem fluoryzuje na zielono.

Opracowaną metodę barwienia białek fibrylarnych macierzy zewnątrzkomórkowej wykorzystano z powodzeniem do barwienia aktywnych metabolicznie tkanek i narządów takich jak mięśnie, płuca, naczynia krwionośne, przepona, ścięgna, otrzewna oraz eksperymentalnych guzów litych, a także utrwalonych w etanolu skrawków mrożeniowych preparatów tkankowych.

Col-F jako barwnik drobnocząsteczkowy wykazuje doskonałą penetrację w obrębie tkanki ale nie wnika do żywych komórek nawet w czasie kilkudniowej obserwacji. W eksperymentach FRAP wykazano, że cząsteczki barwnika związanego z kolagenem i elastyną są w równowadze z cząsteczkami rozpuszczonymi w roztworze i ulegają szybkiej wymianie, co wyklucza udział wiązań kowalencyjnych w oddziaływaniu barwnika z białkami. Wiązanie barwnika jest prawdopodobnie oparte na oddziaływaniach van der Waalsa, zaś modelowanie molekularne wskazuje na możliwość powstawania wiązań wodorowych.

W trakcie obrazowania różnorodnych tkanek zaobserwowano, że w niektórych przypadkach, kiedy dochodzi do zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych, oraz w utrwalonych preparatach Col-F i SRB mogą dawać silny sygnał po połączeniu z pewnymi strukturami w komórkach mięśniowych. Dodatkowo SRB może barwić niewielkie struktury we wnętrzu innych typów komórek, stąd zastosowanie barwników w utrwalonych preparatach jest ograniczone.

Główną zaletą opisaney metody jest proste stosowanie, szybki efekt barwienia, dobra penetracja Col-F w głąb tkanki oraz uzyskiwany silny i stabilny sygnał. Dzięki szybkiej wymianie barwnika jego fotobłaknięcie jest niemal niezauważalne.

Ze względu na zakres i ilość badań prowadzonych nad ECM oraz właściwości barwnika nowa metoda obrazowania może okazać się szczególnie użyteczna w badaniach żywych tkanek.