

## Immunocytochemia

### W poszukiwaniu białek w komórkach

Aby zbadać komórki nerwowe w ustandaryzowanych warunkach, można je wyhodować w kulturze komórkowej (↓). W ten sposób możliwe jest stymulowanie komórek nerwowych za pomocą różnych substancji, które wpływają na działania białek w obrębie komórki lub obserwować, jak aktywność genów wpływa na zachowanie komórek nerwowych. Takie sztucznie otoczenie ma ważną zaletę – pozwala na otrzymanie porównywalnych i powtarzalnych wyników. W tym celu musimy jednak być w stanie zaobserwować procesy zachodzące we wnętrzu danej komórki nerwowej (oraz samą komórkę nerwową).

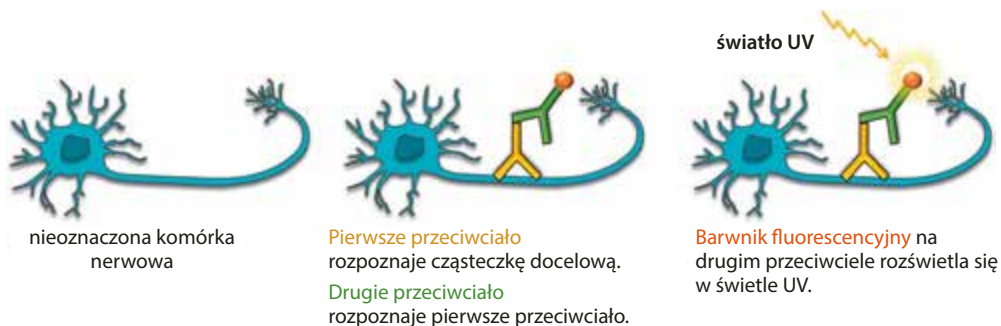
Takie możliwości daje nam immunocytochemia. Dzięki tej metodzie można wybarwić poszczególne białka wewnątrz komórki, a następnie za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (↓) określić, gdzie się dokładnie znajdują. Brzmi to raczej niezbyt spektakularnie, lecz jest to istotne dla zrozumienia, co tak naprawdę dzieje się w komórce nerwowej.

Immunocytochemia przypomina immunohistochemię (↓). Komórki (z gr. *cyto*) są najpierw umieszczane i unieruchamiane na szalce, aby zgromadzić w jednym

miejscu wszystkie struktury komórkowe oraz białka. Następnie wykorzystuje się przeciwciało (stąd częśćka „immuno” w nazwie), które rozpoznaje „swoje” białko i się z nim wiąże.

Jeśli chcemy więc zaobserwować przebieg włókien nerwowych, aby zbadać, jak duża będzie komórka, powinniśmy zastosować przeciwciało, które ujawnia zarys szkieletu komórkowego. Może ono związać się z cząsteczką strukturalną o nazwie tubulina (↓), tworząc niejako system podpór w danym neuronie. Dzięki temu przeciwciało zarysowuje szkielet komórkowy, który przebiega przez włókna nerwowe.

W kolejnym kroku dodaje się drugie przeciwciało, które wiąże się z pierwszym i niesie ze sobą fluorescencyjny barwnik. Pozwala to zaobserwować szukane białko, czyli w naszym przypadku tubulinę,



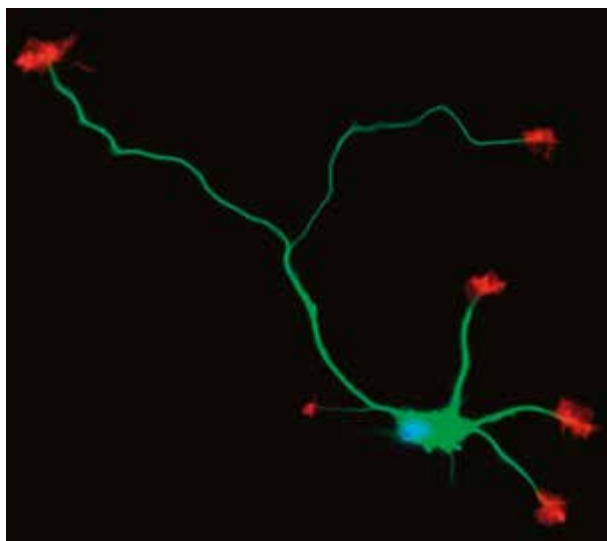
W metodzie immunocytochemii barwienie białek w komórce zachodzi etapami. Najpierw komórki nerwowe rozrastają się w hodowli komórkowej. Zostają one unieruchomione i potraktowane przeciwciałem, które rozpoznaje konkretną cząsteczkę w obrębie komórki nerwowej. Drugie przeciwciało wiąże się z pierwszym, niosąc ze sobą barwnik, który następnie rozświetla się barwnie w świetle UV pod mikroskopem. W ten sposób można stwierdzić, gdzie w danym neuronie znajdują się konkretne białka.

i prześledzić przebieg włókien nerwowych (por. ilustrację na dole po lewej).

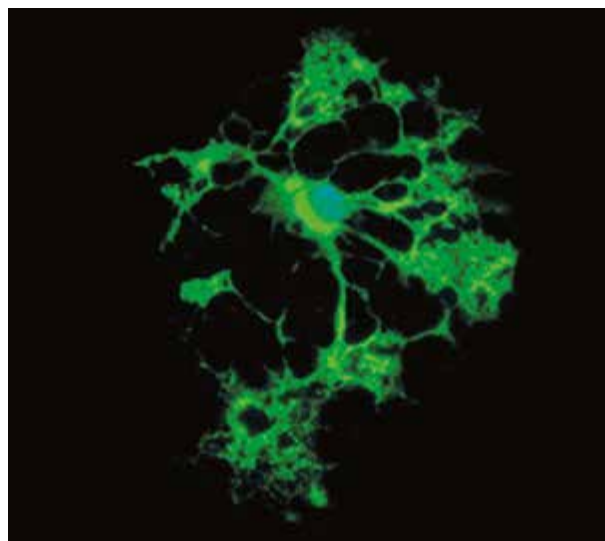
Oczywiście ta metoda pozwala barwić nie tylko cząsteczki strukturalne. Zasadniczo możemy w ten sposób zlokalizować i zaznaczyć barwnikiem każde białko w komórce. Następnie sztucznie wyhodowane w laboratorium komórki mogą zostać zbadane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. W takim mikroskopie barwne sygnały oznaczonych białek są podświetlane na dany kolor. Dzięki temu jesteśmy w stanie precyzyjnie określić ich położenie w obrębie komórki lub zbadać, które białka łączą się ze sobą.

W tym przypadku różne barwy, za pomocą których oznaczono białka, nakładają się na siebie, dzięki czemu możemy się dowiedzieć, jakie funkcje białek są ważne dla działania komórek nerwowych.

Immunocytochemia jest ważną, standardową metodą badania zachowania neuronów w różnych warunkach hodowli. Aktywność niektórych genów powoduje np. charakterystyczne odkładanie się białek wewnątrz komórek nerwowych, co jest oznaką choroby Huntingtona (↓). W warunkach laboratoryjnych można znacznie łatwiej zbadać, jak dochodzi do takich procesów oraz w jaki sposób można im zapobiec.



Taki obraz daje wybarwienie szkieletu komórkowego neuronu. Na zielono przedstawiono cząsteczki tubulinowe wewnętrznego rusztowania komórki, na czerwono – cząsteczki aktynowe, tworzące misterną sieć na zakończeniach włókien nerwowych. Na niebiesko zaznaczono DNA jądra komórkowego.



W kulturze komórkowej można wybarwić również komórki glejowe. Na tym zdjęciu przedstawiono na zielono błonę komórkową oligodendrocytu, a na niebiesko – jego jądro komórkowe. Tak jak wszystkie inne oligodendrocyty, również ten owija się wokół włókien nerwowych sąsiednich neuronów (nie są one widoczne na zdjęciu, ponieważ nie zostały wybarwione).

