

# Biokuvamine:

## kuidas uurida eluprotsesse reaajas

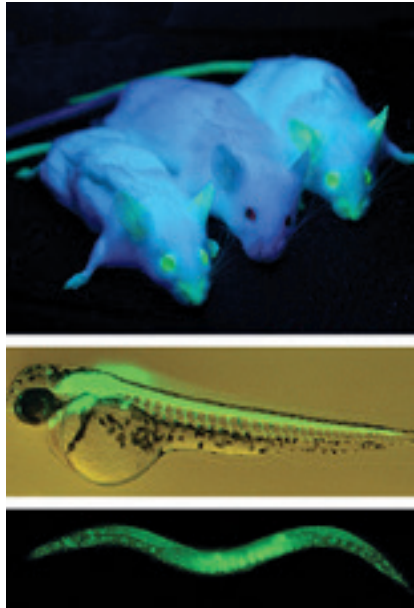
**Osamu Shimmi, Tambet Tõnissoo, Sulev Kuuse**

Sajandeid on teadlasi paelunud, mismoodi saab viljastatud munarakust arengu käigus uus keeruline terviklik organism. Tänu viimastel kümnenditel tunduvalt täiustunud meetodikatele ja tehnikavõtetele on teadlastel olnud võimalus üha lähemalt piiluda, kuidas saab elu alguse.

Arenguprotsessid kulgevad dünaamiliselt, olenedes ajast ja asukohast, mistõttu on rakkudel vaja teha ümberkorraldusi, rännata, jaguneda, omavahel suhelda, lõpetada paljunemine ja vajaduse korral teha n-ö programmeeritud suitsiid ehk apoptoos, teisi juhendada, täita liidrirolli ning muuta oma kuju. Neid teisenemisi on tähtis dokumenteerida nii elusa organismi, organi, koe, kui ka raku tasemel. Vaid nii saame mõista, miks ja kuidas eluprotsessid toimivad.

Siin tuleb teadlastele appi nn reaajas pildistamise tehnoloogia (ingl *real-time imaging*) ehk biokuvamine (ingl *bioimaging*). See võimaldab tänu fluorestseerivatele valkudele visualiseerida eluprotsesse, sekkudes võimalikult vähe. Nii saab jälgida, kuidas moodustuvad organid, kuidas rakud migreeruvad, kasvavad, uuenevad, eristuvad ja lähevad apoptoosi ning mismoodi arenevad tüvirakud. Protsesse on võimalik seirata sellisena, nagu need parajasti kulgevad.

Seetõttu saame paremini mõista elusates kudedes toimuvat, aru saada kõrvalekalletest arengus ja seeläbi parandada ka inimese elukvaliteeti. Laiemas plaanis hõlmab biokuvamine ühtlasi meetodeid, mis visualiseerivad vaatlusteks ette valmistatud bioloogilist materjali.



Fotod: Wikimedia Commons

◇ 1. Mudelorganismide genoomi on muudetud geenitehnoloogiliste võtetega. Nende kudedes ekspresseeritakse roheliselt helendavat valku GFP, mida on võimalik vaadelda UV-valguses. Ülemisel fotol on äärtel transgeensed hiired (*Mus musculus*), kelle silmaümbruse ja nina piirkond ning kõrvad ja saba helendavad roheliselt. Kolmest hiirest keskmine on võrdluseks tavaline laborihiir. Keskmisel fotol on sebrakala (*Danio rerio*) embrüo. Alloleval fotol on läbipaistev umbes millimeetri pikkune selgrootu varbuss (*Caenorhabditis elegans*), kes elab pinnases

Biokuvamist võimaldavad mitmesugused füüsikanähtused: lihtsad optikanähtused, aga ka fluorestsents ja tuumamagnetresonants. On võimalik rakendada elementaariosakesi ja lainenähtusi: elektrone, positrone, eri lainepikkusega valgust, röntgenikiirgust ja ultraheli.

Selles ja järgmises ajakirjanumbris käsitleme eelkõige eluprotsesside bio-

kuvamise võimalusi, mis põhinevad fluorestsentssignaalidel.

**Biokuvamise ajalugu.** Mikroskoopia ajalugu ja edusamme on põhjalikult käsitletud Eesti Looduse mulluse aastakäigu numbrites 6, 8, 9, 10 ja 12. Eluskoe digipildistamist võimaldavad seadmed said teadlastele kättesaadavaks 21. sajandi teisel kümnendil ja muutusid aegamisi igapäevaseks töövahendiks.

Suur edasimineku oli helendava meduusi *Aequorea victoria* rakkudest eraldatud roheliselt fluorestseeruv valk (GFP), mis kiirgab UV-kiirgusega ergastatult. Kasutades seda mehhanismi ja kombineerides geenitehnoloogia meetodeid, on võimalik konstrueerida ühendgeene ehk kimäärgeene, kus koos uuritava geeniga (märklau) on ka GFP-sünteesi määrav DNA-järjestus.

Valgusünteesil moodustuv hübriidvalk (märklau + GFP) helendab UV-valguses. Kuna GFP on väike, ei mõjuta see uuritava valguga omadusi märkimisväärselt. Peale selle võib GFP toimida koespetsiifilise markerina, kui GFP avaldumine on geenitehnoloogiliste võtete abil viidud teatud koespetsiifilise geeni *cis*-reguleerivate elementide (enhanserid) kontrolli alla (◇ 1). 2008. aastal said Osamu Shimomura, Martin Chalfie ja Roger Tsien Nobeli keemiaauhinna GFP avastamise ja asjaomase arenduse eest.

Kuna GFP-valk ei ole loomadele üldiselt toksiline, sobivad sellised loomamudelid (◇ 1) biokuvamiseks fluorestsentsmikroskoopia eri meetoditega. Ühtlasi on avastatud järjest uusi helendavaid valke (sinine BFP, kollane YFP, punane RFP). Samuti on välja arendatud mitme-

külgne valik sünteetilisi fluorestseerivaid valke (◇ 2).

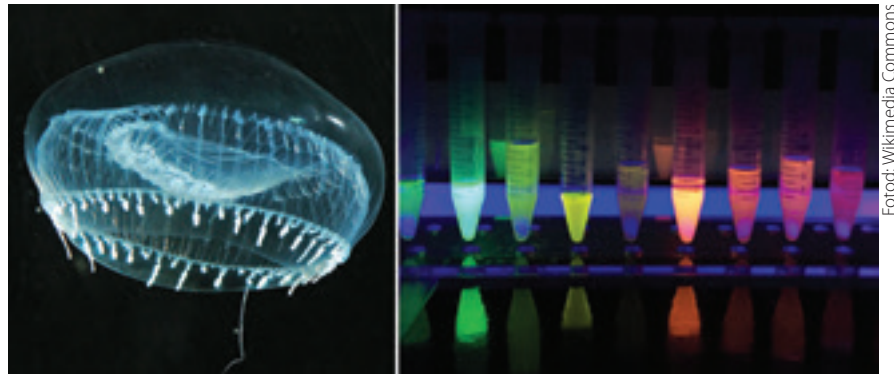
Vaadeldes bioprotsesse reaajas, on oluline, millisel skaalal objekti uurida. Selleks on hulk võimalusi.

**Elusorganismide ja -kudede biokuvamine.** Kui eesmärk on vaadelda ja dokumenteerida tervikorganismi või teha seda kudede ja organite tasemel, siis kuvatakse millimeetrise, aga ka suurema skaala ulatuses. Näiteks on võimalik küllaltki detailselt vaadelda väiksemaid mudelorganisme: äädikakärbest (*Drosophila melanogaster*), sebrakala (*Danio rerio*) või varbussi (*Caenorhabditis elegans*; ◇ 1). Uurida saab ka organisme koelõike või terveid organeid (nt süda, kops, neerud jt).

Tähtis on silmas pidada, et uuritavad organismid, organid ja koed peavad püsima uuringu vältel elus, et neid saaks teatud aja jooksul (mõni tund kuni mõni päev) ning kindlate ajavahemike möödudes uurida ja tulemusi jäädvustada. Selleks et kudesid paremini kuvada, on vaja optimeerida vaadeldava struktuuri optilist läbipaistvust ja valgustustingimusi. Kui rakendada mikroskoopia eritehnikaid (nt multifootonmikroskoopia, ingl *multiphoton microscopy*) ja peegelvalgustust, saab elusaid kudesid paremini vaadelda.

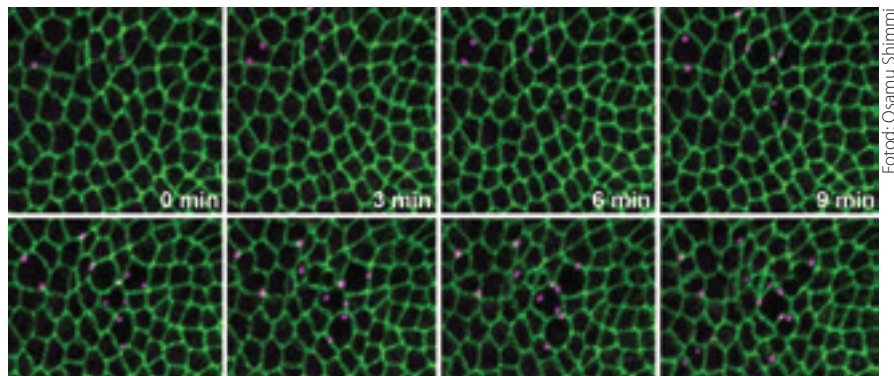
Multifootonmikroskoopia lubab tungida elava koe/rakkude sisse, et näha vaadeldavat objekti sügavamalt (näiteks, kui proovi katab mõne teine kude, vt ◇ 3). Sel juhul võimaldab kasutatavate laserite pikem lainepikkus (780 kuni 1000 nanomeetrit) valgusel paremini ja efektiivsemalt kudesid läbida. Samas hajub pikema lainepikkusega valgus vähem, tagades kujutise suurema selguse. Nii võib näiteks ajukoe uurimisel jõuda kuni 1,5 mm sügavuseni (s.o paksuse poolest umbes 30–40-rakuline struktuur).

Kahe laseri eelis seisneb ka selles, et vaadeldava preparaadi ergastus ja emissioon kulgeb üksnes täpselt teravustatud piirkonnas, mistõttu saadakse suure lahutusega pildid. Kolmandaks, seda tüüpi



Fotod: Wikimedia Commons

◇ 2. Vasakul helendav meduus *Aequorea victoria*, kelle rakkudes toodetakse roheliselt fluorestseerivat valku GFP. Paremal UV-valgusega kokkupuutel helendavad sünteetilised valgud eri värvitoonides



Fotod: Osamu Shimmi

◇ 3. Biokuvad äädikakärbe areneva tiiva epiteelrakkude jagunemisest (järjestikused pildid samast piirkonnast ajalise nihkega). Rakkudevaheline adhesioonivalk DE-kaderiin on märgistatud roheliselt helendava GFP-ga (märgistab raku piire) ja tsentrosoomide komponent tsentrosomiin purpurpunaselt helendava mCherry-ga (märgistab jagunevat rakku). Niimoodi on võimalik jälgida elusas koes jagunevaid rakke. Vaadake ka asjaomast biokuvamise videot: [tymri.ut.ee/arengubioloogia](http://tymri.ut.ee/arengubioloogia)

mikroskoop on kudedele vähem fototoksiline, mistõttu helendav signaal pleegitab proovi vähem ja fluorestsents ei kao proovist lühiajalisel vaatlusel.

**Et jälgida raku protsesse, kasutatakse sageli mitmesuguseid fluorestseerivaid valke ja ühendeid.**

**Elusate rakkude biokuvamine.** Elusrakud tehakse nähtavaks mikromeetrilises skaalas (1–50 µm). Et jälgida raku protsesse (näiteks jagunemine, signaaliülekanne, rakustruktuuride muutused), kasutatakse sageli mitmesuguseid fluorestseerivaid valke ja ühendeid (◇ 3). Parema tule-

muse nimel vaadeldakse preparaati interferentskontrastmikroskoopia või fluorestsentsmikroskoopia meetodil. Sellest oleme põhjalikult kirjutanud mulluses augustinumbris, vaadake artikli [1] jooniseid 4–7).

Loomulikult võimaldab biokuvamine uurida ka molekule ja rakuosi, aga sellest saab lugeda järgmisest numbrist. ■

1. Dmitri Lubenets, Toivo Maimets, Sulev Kuuse 2021. Kuidas näha elusate rakkude sisse? – Eesti Loodus 72 (8): 56–61.

**Osamu Shimmi** (1965) on Tartu ülikooli arengubioloogia professor.

**Tambet Tõnissoo** (1976) on Tartu ülikooli arengubioloogia õppetooli juhataja ja kaasprofessor.

**Sulev Kuuse** (1962) on rakubioloog, Tartu ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi vivaariumi juhataja.