

Elusa raku talitlus

huvitab nii biolooge kui ka arste

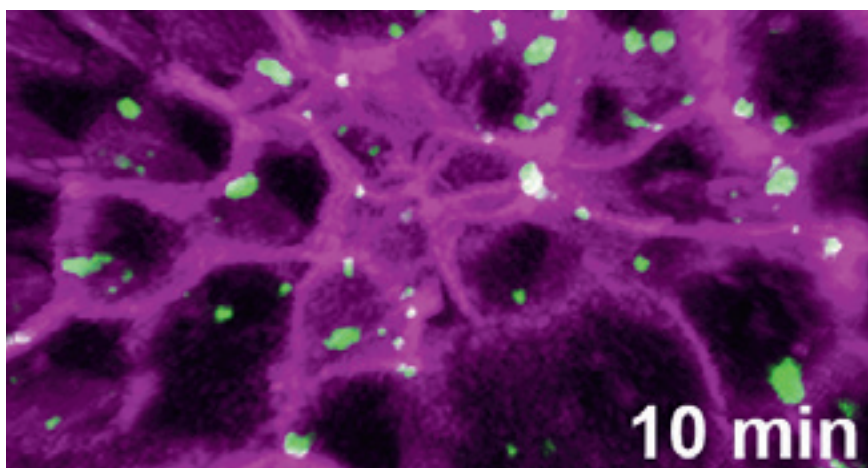
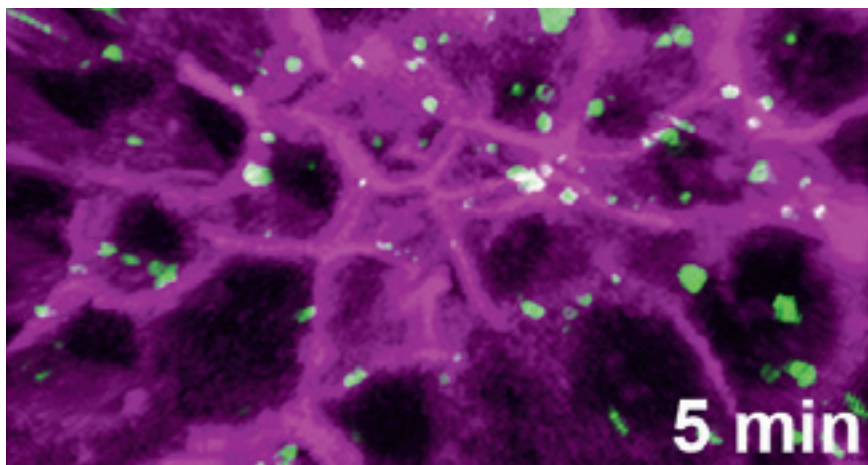
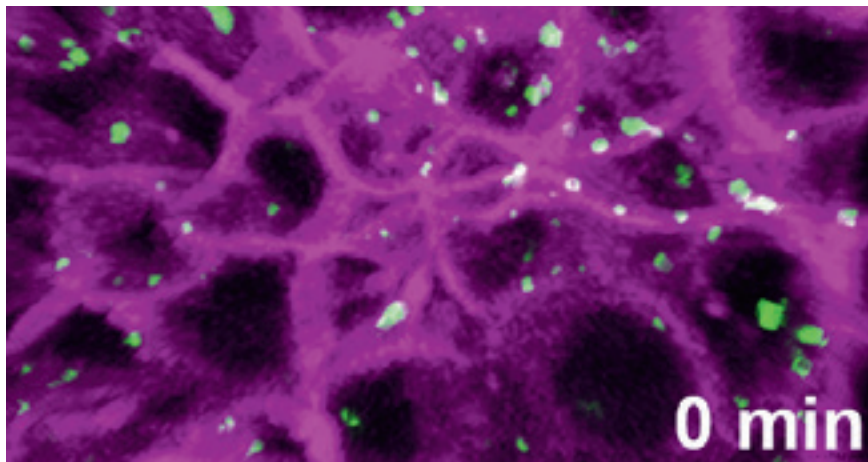
Osamu Shimmi, Tambet Tõnissoo, Sulev Kuuse

Eelmises ajakirjanumbris alustasime ülevaadet biokuvamisest. Seekord vaatame, kuidas saab jälgida molekule ja rakuorganelle ning mil moel võivad uued meetodid olla kasulikud meditsiinis.

Rakuorganellide ja molekulide tasemel uuritakse elusraku tavaliselt mikromeetrist väiksemal skaalal. Kui objekti on saanud helendava märgise, on võimalik jälgida ja pildistada mitokondreid, endosoomi (membraaniga ümbritsetud rakustruktuur, mis on seotud raku pinnalt pärineva materjali ladestamise, sortimise, transpordi ja lagundamisega), DNA-d, retseptoreid ja ioonkanaleid (◇ 1). Konfokaalmikroskoopiat [1] rakendades saab eristada struktuure, kus kahe punkti kaugus on ainult 200 nanomeetrit (200×10^{-10} meetrit), superlahutusmikroskoopia korral saab võimet eristada kahte punkti suurendada kuni 10 nanomeetrini.

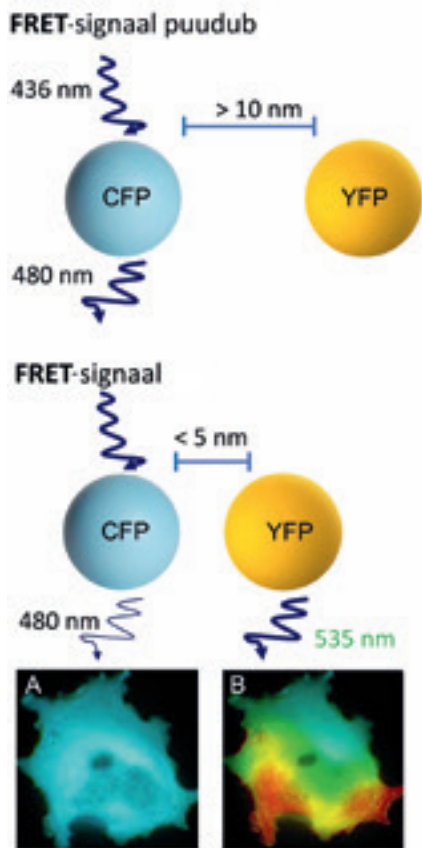
Konfokaalmikroskoopia edasiarendusena on kasutusele võetud pöörlev Nipkowi-Petrani punktavadega (ingl *pinholes*) ketas, mis võimaldab valida ketta parima pöörlemiskiiruse ja objekti valgustamise aja ning saada seetõttu teravama ja kvaliteetsema pildi. Selline meetodika kannab nime: spinning disc confocal microscopy).

Selleks et elutähtsad protsessid saaksid rakkudes toimida, on ülilolulised eri valkude vastastikmõjud. Mõõtmaks näiteks kaugust kahe valgumolekuli vahel, rakendatakse FRET-mikroskoopiat. Försteri resonantse energiaülekanne (ingl *Förster resonance energy transfer*, FRET) korral peavad kahe helendava struktuuri kiirgusspektrid kattuma: nõnda tagatakse, et ühe neelatud energia kandub



Fotod: Osamu Shimmi

◇ 1. Äädikakärbse areneva tiiva epiteelirakkude endosoomide biokuvamine (järjestikused pildid samast piirkonnast ajalise nihkega). Membraanseoseline valk CAAX on märgistatud purpurpunase valguga mCherry. Raku endosoomi marker FYVE-domeen on tehtud nähtavaks rohelise helendava valguga. Vaadake ka biokuvamise videot: arengubioloogia.ut.ee



◀ ◊ 2. FRET-mikroskoopia tööpõhimõte. (A, B) Inimese emakakaela kartsinoomi HeLa-rakkudes on FRET-metoodika abil hinnatud kaltsiumioonide taseme muutusi. Enne kui pole lisatud Ca-indutseeriva ainet ionomütsiini, on rakk nähtav 436 nm fluorestsentsvalguses rohekassinisena, kuna FRET-signaali puudub tsüaanisise mCerulean (CFP) ja kollase mVenus (YFP) vahel (omavahel seob neid Ca-tundlik peptiid, ei ole joonisel näidatud). Kui on lisatud ionomütsiini, moodustab Ca-tundlik peptiid kompleksi, mistõttu kaugus CFP-i ja YFP-i vahel väheneb ja liitfluorestsentssignaal (FRET) käitub kui biosensor. FRET on markeeritud pseudovärvidega (kollane, punane, roheline); punane viitab kõrgeimale Ca-iooni tasemele. Joonise on teinud Tambet Tõnissoo MicroscopyU põhjal



▲ ◊ 3. FRAP-meetodi tööpõhimõte. Uuritav valk on märgistatud GFP-ga. Kui uuritavat piirkonda (kollane sõõr) kiiritada suure intensiivsusega monokromaatilise laserikiiriga, põhjustab see fluorestsentsi intensiivsuse kao vastavas piirkonnas (must ala kollase ovaali sees). Kui seejärel vaadelda rakke UV-lainepikkusega valgusega, on nn fotopleegitatud piirkonnas võimalik taastada fluorestsentssignaali molekulide liikumise tõttu, aga vaid juhul, kui hiljem kasutatava laseri intensiivsus on väiksem kui algne intensiivsus. Joonise on biosciences.exeter.ac.uk/bioimaging/services/lm/frap järgi modifitseerinud Tambet Tõnissoo

üle teisele ja signaal võimendub. Ent ainult juhul, kui kahe molekuli vahemaa ei ületa 8–10 nanomeetrit.

Kui kaks molekuli on märgistatud erisuguste fluorestsentseerivate valkudega, näiteks rohekassiniselt helendava tsüaanisise (ingl *cyan fluorescent protein*, CFP) ja kollaselt helendava valguga (ingl *yellow fluorescent protein* YFP), siis FRET-i efektiivsusanalüüs näitab, et need kaks valku on seostunud meid huvitavate rakupiirkondadega ja need molekulid paiknevad teineteise lähedal (◊ 2).

Tsüaaniline ehk tsüaanvalk ergastatakse valguse lainepikkusel 436 nanomeetrit (lillakassinine). Seejärel kiirgub ergastatud valgus, s.o fluorestsentsvalguse emissioon lainepikkusel 480 nanomeetrit (rohekassinine). Juhul kui need kaks valku asuvad teineteisest alla viie nanomeetri kaugusel, leiab aset FRET, mille tulemusena energiad liituvad. Eralduva valguse lainepikkus on umbes 535 nm. See pole mitte rohekassinine, vaid kirkasroheline fluorestsents.

Et saada aru molekulide ajaliruumilisest liikumisest, kasutatakse

ka FRAP-tehnikat (ingl *fluorescence recovery after photobleaching*). Siis jälgitakse fluorestsentseerivalt märgistatud molekule, mida on fotopleegitatud suure võimsusega laseriga (nende kiirguse intensiivsus on vähenenud), ja uuritakse nende paiknemist pleegitamata ehk intensiivselt fluorestsentseerivate molekulide suhtes. Kasutades väikese võimsusega laserikiirt, jälgitakse helendavate molekulide liikumist fotopleegitatud piirkonda (◊ 3).

Biokuvamise plussid ja miinused.

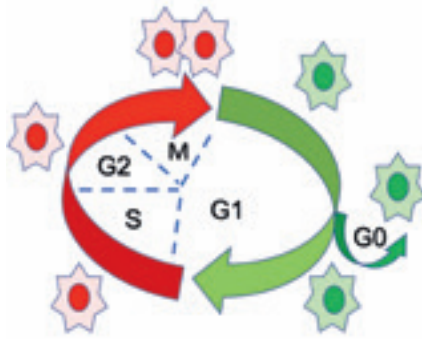
Helendavate valkude tarvitamine on suhteliselt odav ja elusatele kudedele ohutu. Niimoodi saab reaajas nähtavaks muuta dünaamilisi protsesse ja sündmusi, mis muidu jäävad raku inimsilmale märkamatuks. Tähtis on proov asjakohaselt ette valmistada. Uurija peab ette teadma, kuidas ta soovib protsessi või objekti dokumenteerida.

Tuleb arvestada, milliseid tingimusi vajatakse kuvamiseks: näiteks tugev signaal lühikese aja jooksul, kauakestev stabiilne signaal, suure energiaga signaal kogu spektri ulatuses. Eelkatsete põhjal saab koostada hästi

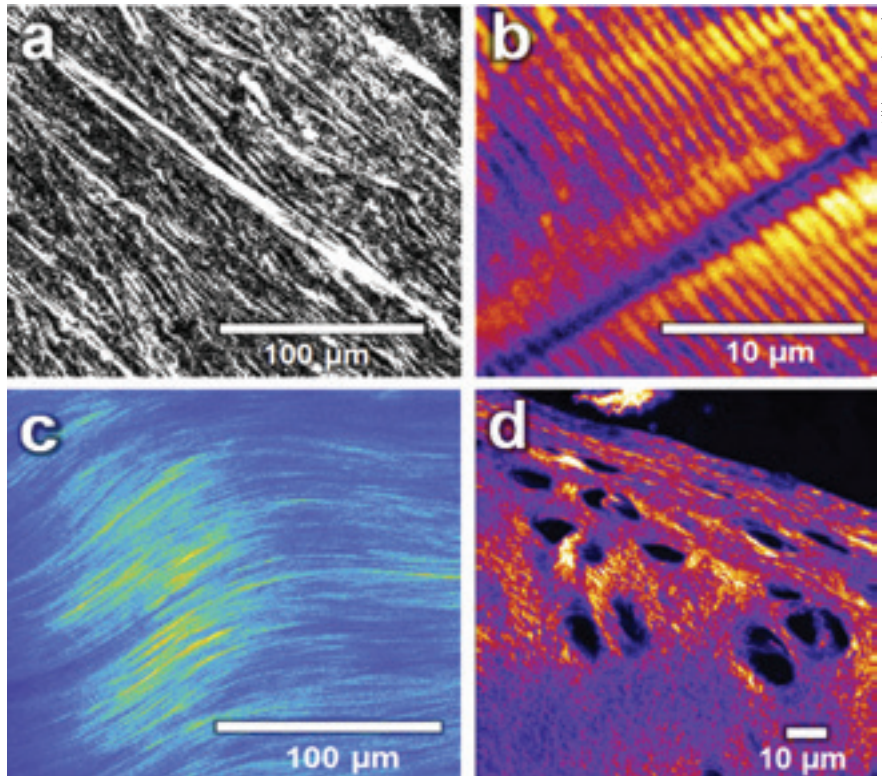
toimivad juhised. Samuti tuleb arvestada sellega, et fluorestsentssignaal võib kiiresti kaduda (ergastusvalgusest tulenev signaali pleekimine). Seega tuleb enne valida mikroskoopia eri võimaluste vahel ja leida sobiv kompromisslahendus (kasutada väiksema võimsusega lasereid, pildistada väiksema sagedusega, proovida foto teha võimalikult lühikese säriaajaga jne).

Andmete kogumine ja jäädvustamine.

Kui rakud või molekulid on märgistatud, tuleb signaal jäädvustada. Helendavad molekulid võivad eksisteerida kas väikese energia (emissioon) või suure energia (ergastuskiirgus). Kui molekule mõjutada emissioonvalgusega, neelavad nad energiat, mis viib nad kõrgemasse ergastusolekusse. Seejärel salvestab spetsiaalne kaamera vabaneva suure energiaga kiirguse ehk fluorestsentssignaali. Proovi fluorestsentssignaali püüdmiseks kasutatakse fluorestsentsmikroskoopi [1]. Kui soovitakse suurema lahutuse ehk sügavusteravusega pilte, siis kasutatakse konfokaalmikroskoopi.



◇ 4. Elusas koos jälgitakse rakutsükli FUCCI biokuvamise kaudu, kus geneetiliselt kodeeritud helendavad markervalgud (nt roheline GFP ja punane RFP) märgistavad rakutsükli eri faase. G1 – kasvufaas, S – DNA sünteesifaas, vajalike valkude ja rakuorganellide hulga kahekordistumine; G2 – kasvufaas, valmistumine mitoosiks, rakutsükli kontrollpunkt, et tuvastada kõik vajalik rakkude jagunemiseks; M – mitoosifaas, raku jagunemine; G0 – puhkefaas. Joonise on MBL (Medical & Biological Laboratories Co) kodulehe põhjal modifitseerinud Tambet Tõnissoo



◇ 5. Eri kudede SHG-mikroskoopia näidised. a) inimese silma sarvkest, b) sebrakala skeletilihase valk müosiin, c) koduhiire saba kõõlus, d) hobuse põlvkõhr

Signaali saab jäädvustada niimoodi: 1) proovid (koed, rakud), milles toodetakse helendavaid valke, sulundatakse alusklaasile või koekultuuritassile ja paigutatakse mikroskoobi vaatevälja; 2) proovimaterjalis analüüsitakse fluorestskeeriva signaali intensiivsust, registreerides vastava lainepikkusega helenduse; 3) detektor salvestab fluorestsentssignaali andmed digikujul, et neid oleks võimalik hiljem analüüsida; 4) uuringu proovi jälgitakse ja pildistatakse kindla ajavahemiku järel, korrates kuvamist pikema aja vältel (◇ 1).

Kokkuvõtteks tuleb arvestada, et biokuvamisel saadakse küllaltki mahukad katseandmed (näiteks ruumiline andmestik X-, Y- ja Z-koordinaadistikus ja selle muutumine ajas), mida tuleb analüüsida.

Biokuvamine ja meditsiin. Eluskudede kuvamisel on suur tähtsus tänapäeva meditsiiniuuringutes. Näiteks on kasvajakudede iseloomulik kontrollimatu jagunemine ja võime aktiivselt liikuda. Sellised normist kõrvale kaldunud rakud võivad

tungida kahjustatud koest veresoontesse ja lümfiringesse ning liikuda organismi teistesse piirkondadesse. Elusorganismis on keeruline seda täpsemalt uurida. Kuidas teha nähtavaks näiteks kontrollimatult jagunevaid rakke elusas organismis?

Üks võimalus on märgistada raku jagunemisel osalevaid valke. Meetodi nimi on FUCCI (ingl *fluorescence ubiquitination cell cycle indicator*). Põhimõte seisneb selles, et ajalis-ruumiliselt eristatakse elusates rakkudes rakutsükli eri faase: FUCCI-süsteem võimaldab seega jälgida ka aktiivselt paljunevaid või selleks valmistuvaid vähirakke ja rakkude liikumist. Niimoodi saab hinnata ka mitmesuguste ravimite mõju kasvajakude arengule (◇ 4).

Eluskoe kuvamise tehnoloogiaid on kasutatud ka selleks, et panna haiguse diagnoosi. Loomsed koed on tihti autofluorestskeeruvad, peamiselt iseloomustab see kollageeni ja mikroruuki.

Kui koele langeb ergastav valgus, vabaneb spetsiifilise lainepikkusega signaal. Selle lainepikkus on kaks

korda lühem (sagedus vastavalt kaks korda suurem) kui ergastava valguse oma. Seda nimetatakse teise harmoonilise sageduse signaaliks (ingl *second-harmonic generation signal*; SHGS) ja vastavat mikroskoopiat SHMG-mikroskoopiaks (ingl *second-harmonic imaging microscopy*; ◇ 5).

Kuna selle puhul kasutatakse kudede autofluorestsentsi, saab hinnata nii kudede seisundit kui ka leida üles kasvajakud. Muutused kollageeni struktuuris on iseloomulikud näiteks rinnanäärme-, munasarja- ja nahakasvajatele. Meetodit arendatakse, et luua uusi diagnoosivõimalusi peale tavapärase biopsiapõhise kasvajakollete määramise. ■

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 kaasprofessor.

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