

Fluorescensmikroskopi som værktøj til at studere biologiske fænomener i levende celler

Ved at bruge en visuel målemetode er det muligt at screene proteiner direkte for deres evne til at lokalisere til kernen i den levende celle. Dette gør det nemt og hurtigt at isolere interessante kandidater til videre undersøgelse

Af Iben Plate, cand.scient., ph.d., Center for Mikrobiel Bioteknologi (CMB), BioCentrum-DTU, nu ansat i Fluxome Sciences A/S

Saccharomyces cerevisiae, almindelig kendt som bagegær, bliver hyppigt brugt som modelorganisme til at studere genetik i eukaryote celler. Gængenomet blev som det første eukaryote genom sekventeret i 1996, hvilket er en medvirkende faktor til bagegærs popularitet som modelorganisme. Desuden har gærcellen stor lighed med den menneskelige celle og kan derfor bruges til at studere en lang række af menneskelige sygdomme. Det er også nemt og hurtigt at dyrke gærceller og manipulere dem genetisk. Gærceller gror hurtigt og har både en haploid og en diploid celleyklus, dvs. at de kan gro med en eller to kopier af hvert gen.

DNA-skader

En af de mekanismer, som med fordel studeres i gærceller, er homolog rekombination. I de senere år har man fundet ud af, at homolog rekombination er en vigtig DNA-reparationsmekanisme til reparation af DNA-dobbeltstrengsbrud (DSB). DNA DSB opstår som følge af cellens naturlige metabolisme samt som følge af ydre påvirkninger som f.eks. stråling. Brud på begge DNA-strenger kan have fatale følger, hvis det ikke repareres, eller hvis det repareres ukorrekt. Repareres en DNA-skade utilstrækkeligt, kan det føre til mutationer, deletioner, genomisk reorganisering eller sågar tab af kromosomer. Sådanne genetiske begivenheder er en af hovedårsagerne til udvikling af cancer i højere eukaryoter, hvorfor denne mekanisme er uhyre vigtig at kende til bunds. Ydermere er reparationsmekanismen evolutionelt konserveret fra gær til menneske, hvilket gør det muligt at studere denne proces i gær. Denne viden kan således overføres til det menneskelige system og hjælpe os til bedre at forstå mekanismerne i den menneskelige celle.

Reparation af DNA-skader

Reparation af DNA DSB via homolog rekombination involverer en lang række af proteiner, hvoraf mange er de samme i gær- og i menneskeceller. Blandt disse proteiner er Rad52 et nøgleprotein. En deletion af *RAD52*-genet i gær resulterer således i langsom vækst og hypersensitivitet over for ioniseret stråling og kemikalier som introducerer DNA DSB. Den egentlige funktion af Rad52-proteinet er endnu ikke fuldstændig kortlagt, men Rad52 er et multifunktionelt protein, som virker på flere niveauer i reparationsprocessen. Det er blevet vist tidligere, at Rad52 binder direkte til DNA-strengen, og at det virker som bindeled mellem flere af de proteiner, der er involverede i reparationsprocessen. Denne bindeledsfunktion kan være en af forklaringerne på, hvorfor Rad52 er uundværlig for korrekt reparation af DNA DSB.

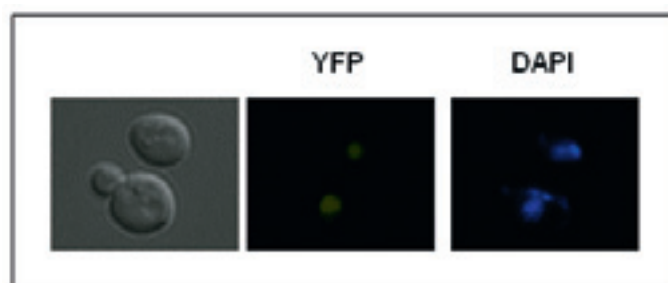
Kernetransport af nogleproteiner

Til trods for at Rad52-proteinet er blevet studeret intenst i mange år, er der stadig vigtige spørgsmål, som forbliver ubesvarede. F.eks. har det indtil nu været uvist, hvordan Rad52 bliver transporteret

fra cytoplasmaet til cellekernen, hvor DNAet og de potentielle DNA-skader befinder sig. Der har været fremsat flere modeller til at forklare, hvordan denne transport foregår, bl.a. har det været foreslået, at Rad52 bliver indbygget i et større proteinkompleks i cytoplasmaet, som dernæst bliver transporteret ind i kernen via nukleære lokaliseringssignaler (NLS'er) udtrykt på et eller flere af de andre proteiner i komplekset, som Rad52 interagerer med. Dette studium forsøger at identificere de områder af Rad52, der er ansvarlige for dets transport til cellekernen vha. et visuelt assay.

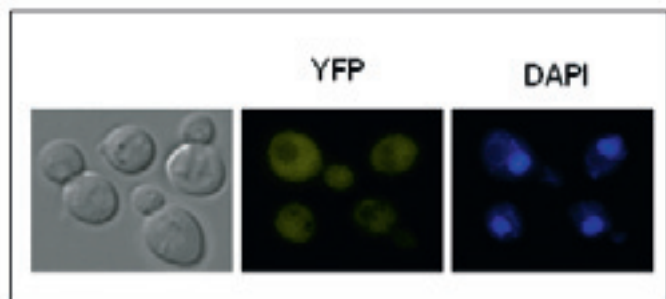
Visuelt assay

Ved at fusionere proteiner som eksempelvis Rad52 til et Grønt Fluorescerende Protein, GFP, er det muligt at følge proteinets lokalisering i cellen ved hjælp af et fluorescensmikroskop. GFP blev oprindeligt isoleret fra vandmanden *Aequorea victoria* og er siden hyppigt blevet anvendt til at undersøge biologiske fænomener i levende celler. Når man belyser det fluorescerende molekyle med en bestemt bølgelængde, vil det fluorescere, når man studerer det i et fluorescensmikroskop. Det er imidlertid ikke problemfrit at fusionere et protein med GFP, idet GFP-proben i sig selv kan forstyrre funktionen af det protein, som det fusioneres til. Det er derfor nødvendigt at undersøge, hvorvidt fusionsproteinet har samme funktion som det oprindelige protein uden GFP fusioneret dertil. Rad52-GFP-fusionsprotein er biologisk funktionelt, hvilket vil sige, at gærstammer, som udtrykker fusionsproteinet Rad52-GFP lige som stammer der udtrykker Rad52, er i stand til at reparere DNA-skader, der er induceret ved hjælp af et kemikalie. Rad52-GFP er udelukkende lokaliseret i cellekernen, hvilket fremgår, når stammer der udtrykker Rad52-GFP eksamineres ved hjælp af fluorescensmikroskopi (figur 1).



Figur 1 viser Rad52-GFP proteinet lokaliseret i kernen af gærceller. Billedet t.v. er taget med et normalt filter, billede i midten er taget vha. et YFP-filter (excitation bølgelængde på 480 nm og emission på 535 nm) og viser Rad52-GFP-proteinet lokaliseret som en koncentreret plet i cellen. Billedet t.h. viser gærceller, som er blevet behandlet med et kemikalie, DAPI, som specifikt farver cellens DNA. Vha. et DAPI-filter (excitation 365 nm, emission 450 nm) er det muligt at bestemme lokalisering af cellens DNA i cellekernen. Ved at sammenligne de to sidste billeder kan man se, at Rad52-YFP ko-lokaliserer med cellekernen. Foto: Michael Lisby, Københavns Universitet.

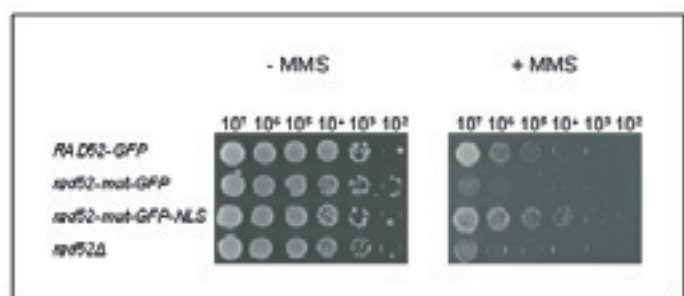
Dette visuelle assay har gjort det muligt at identificere regioner af Rad52, som er nødvendige for proteinets nukleære transport. Til dette formål er en lang række Rad52-mutantproteiner blevet konstrueret, som alle er mærkede med GFP og efterfølgende undersøgt med fluorescensmikroskopi. Et af disse mutantproteiner, som kun udtrykker dele af Rad52-proteinet, kommer ikke fra cytoplasmaet til cellekernen efter translation, men forbliver i cytoplasmaet (figur 2).



Figur 2 viser billeder af gærceller, som udtrykker et Rad52-mutantprotein fusioneret med GFP. Fusionsproteinet er lokaliseret i cytoplasmaet ude af stand til at sortere korrekt til cellekernen. Ved at sammenligne billedet i midten (GFP) med billedet til højre (DAPI) kan man se, at proteinet ikke ko-lokaliserer med cellekernen. Foto: Michael Lisby, Københavns Universitet.

Sekvensanalyse

Vi anvendte sekvensanalyse til at eksaminere Rad52-proteinsekvensen og fandt frem til, at den midterste del af Rad52-proteinet indeholder aminosyreresten prolin efterfulgt af et stræk af positive aminosyrerester. Positive aminosyrerester er ofte at finde i NLS-sekvenser, hvilket tyder på, at denne del af proteinet spiller en rolle i kernelokalisering af Rad52. For at undersøge dette nærmere konstruerede vi et protein, som er muteret i dette stræk af positive aminosyrerester i det midterste område af Rad52-proteinet, fusionerede det med GFP og fulgte dets cel-lelokalisering vha. fluorescensmikroskopi. Ganske som forventet er dette fusionsprotein ikke i stand til at lokalisere korrekt til cellekernen, men findes hovedsageligt i cellens cytoplasma. For at udelukke at mutationen ikke har medført foldningsproblemer for proteinet, som umuliggør kernetransport, fusioneres proteinet også med en kendt og velkarakteriseret NLS-sekvens. Dette fusionsprotein relokaliserer til kernen, hvilket tyder på, at vi har



Figur 3 viser gærcellers overlevelse efter at have været behandlet med MMS, som inducerer DNA-skader. Den øverste række af celler udtrykker Rad52-GFP, den næste udtrykker det fejlsortierende mutantprotein fusioneret med GFP (mut-GFP), den tredje række af celler udtrykker det fejlsortierende mutantprotein fusioneret med GFP og en NLS (mut-GFP-NLS). I den fjerde og sidste række er celler, som ikke udtrykker Rad52 (rad52Δ). Disse gærceller er spottet på agarplader med og uden MMS i en 10 ganges fortynding fra 10⁷ celler/mL til 100 celler/mL. Overlevelsen af cellerne er bestemt efter to dages inkubering ved 30 grader. Et spot på pladen indikerer, at cellerne er i stand til at overleve.

muteret et område i Rad52-proteinet, som er nødvendigt for korrekt transport til cellekernen.

Biologisk assay

Ydermere undersøgte vi, hvorvidt det fejlsortierende Rad52-protein er i stand til at reparere DNA-skader, som er induceret vha. kemikaliet methyl methansulfonat, MMS. Resultatet af denne undersøgelse viser, at celler, der udtrykker det fejlsortierende protein, er lige så sensitive over for MMS som celler helt uden Rad52. De celler, som udtrykker det fejlsortierende protein forlænget med en NLS-sekvens, overlever MMS-skader lige så godt, som celler der udtrykker det oprindelige Rad52-protein (figur 3). Det kan således konkluderes, at den midterste region af Rad52-proteinet er nødvendigt for at sikre effektiv kernetransport, men ikke for reparation af MMS-inducerede DNA-skader.

Vi har brugt en kombination af metoder til at identificere en specifik sekvens i Rad52, som er nødvendig for, at proteinet kommer fra cytoplasmaet til cellekernen, hvor det har sin funktion. Denne sekvens er ikke nødvendig for andre Rad52-funktioner, som f.eks. reparation af DNA-skader induceret ved hjælp af MMS. Ved at bruge et visuelt assay er det muligt at screene proteiner direkte for deres evne til at lokalisere til kernen i den levende celle. Dette gør det nemt og hurtigt at isolere interessante kandidater til videre undersøgelse i funktionelle biologiske assays.

E-mail-adresse

Iben Plate: ip@fluxome.com

Innovating for Health

The Promise of Lighter Liquid Handling

Manuelle Enkelt- & Multikanal Pipetter

"Enjoy your work"
mLINE pipetter gør det muligt.

Egenskaber som: den pipette på markedet, hvor der skal anvendes færrest kræfter, letvægter med en unik "Opti-load" af spids påsætning, som gør mLINE pipetten til det bedste valg af en manuel pipette. Vigtigst er at mLINE pipetten er komfortabel at anvende time efter time, dag efter dag - uden at risikere en overbelastning.

Tilbuddet gælder 1. Sept. - 30 Nov. 2006

Vallensbækvej 22A
2605 Brøndby
Tlf. 4343 3057

DANDIAG
Pipetter ApS

www.dandiag.dk
dandiag@dandiag.dk
Fax 4343 3059

Særtilbud !
Køb 4 mLINE pipetter efter eget valg og få den billigste pipette, samt en karrusel stander GRATIS.