

Wrocław, 24. kwietnia 2013

Streszczenie wykładu:

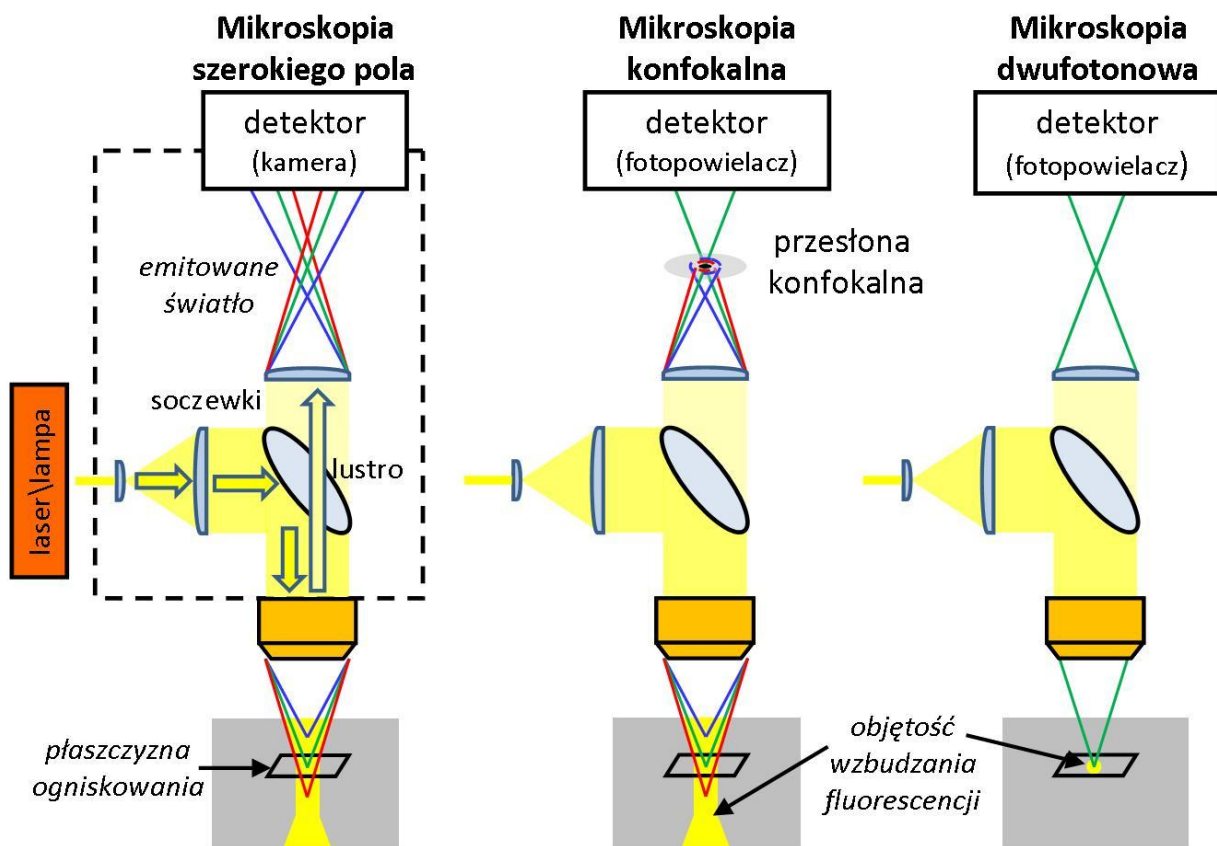
## **Obrazowanie *in vivo* oddziaływań komórek układu odpornościowego**

**Dr Grzegorz Chodaczek**

*La Jolla Institute for Allergy & Immunology, La Jolla, California, USA*

Mikroskopia przyżyciowa (*intravital microscopy*) jest to stosunkowo młoda, wciąż rozwijająca się dziedzina obrazowania z zastosowaniem mikroskopii świetlnej. Jej głównym zadaniem jest wizualizacja dynamicznych procesów na poziomie komórkowym i subkomórkowym przebiegających w różnych tkankach i organach w żywym organizmie przy zachowaniu normalnych warunków fizjologicznych. Pierwsze obserwacje dynamiki komórek przeprowadzono za pomocą mikroskopii szerokiego/jasnego pola, studiując głównie ruch komórek w naczyniach krwionośnych, np. w mięśniu dźwigacza jądra u myszy lub szczurów, rejestrując obraz analogowymi kamerami video. W tym rodzaju mikroskopii kontrast i rozróżnienie obiektów uzyskuje się na podstawie różnic pochłaniania i rozpraszania światła, dlatego też analizowana tkanka powinna być możliwie jak najcieńsza i przepuszczalna dla światła. Dzięki tej technice zdefiniowano podstawowe etapy migracji komórek z łożyska naczynia do tkanek, takie jak toczenie się leukocytów po powierzchni śródbłonna czy ich adhezja do komórek śródbłonna. Metoda ta nie ma jednak szerszego zastosowania, ponieważ zdecydowana większość tkanek i organów z uwagi na położenie i właściwości optyczne nie nadaje się do tego typu mikroskopii. W konsekwencji poszukiwano alternatywnych technik pozwalających uzyskać obraz z tkanek nieprzezroczystych a jednocześnie dających możliwość lepszej identyfikacji analizowanych struktur.

Przełomem w rozwoju mikroskopii przyżyciowej okazała się mikroskopia fluorescencyjna, która opiera się na rejestrowaniu światła emitowanego przez wzbudzone odpowiednią długością fali świetlnej cząsteczki fluoroforów. Jest to aktualnie podstawowa metoda w mikroskopii przyżyciowej, która pozwala osiągnąć wysoką rozdzielczość obrazowania wykorzystując różnego rodzaju znaczniki fluorescencyjne oraz zjawisko autofluorescencji tkanek. W przeciwieństwie do przyżyciowej mikroskopii szerokiego/jasnego pola, która do wytworzenia obrazu używa niespolaryzowane światło białe, mikroskopia fluorescencyjna najczęściej wykorzystuje światło laserów o długości fali dostosowanej do spektralnych właściwości wizualizowanych fluoroforów. Zwykle stosowane lasery emitują światło widzialne i podczerwone, przeważnie w zakresie 405–1000 nm (UV-VIS-IR). Penetrująca tkanki wiązka lasera o działaniu ciągłym (w odróżnieniu do pulsującego) wzbudza wszystkie fluorofory na swojej drodze, więc zbierany sygnał emisji pochodzi z całej objętości tkanki, która podlegała naświetlaniu (Ryc. 1). To powoduje, że rejestrowany obraz jest rozmyty i nie można precyzyjnie wskazać przestrzennej lokalizacji obserwowanych obiektów. Zwiększony kontrast i rozdzielczość uzyskuje się dzięki specjalnej przesłonie konfokalnej, która powoduje odrzucenie światła nie pochodzącego z płaszczyzny skupiania światła. Mikroskopia konfokalna pozwala więc na rejestrację sygnału z wybranej warstwy wewnątrz tkanki, dzięki czemu wykonuje się np. trójwymiarowe rekonstrukcje obrazowanych tkanek w wysokiej rozdzielczości. Modyfikacją tej techniki jest zastosowanie pulsującego lasera podczerwonego umożliwiającego ekscytację dwufotonową, która polega na wzbudzeniu jednej cząsteczki fluoroforu przez dwa fotony o niższej energii niż światło emitowane. Efekt ten ograniczony jest tylko do punktu ogniskowego obiektywu, w związku z czym fluorofory w pozostałych płaszczyznach nie ulegają ekscytacji i potencjalna fototoksyczność lasera jest znacznie ograniczona (Ryc. 1). Największą zaletą mikroskopii

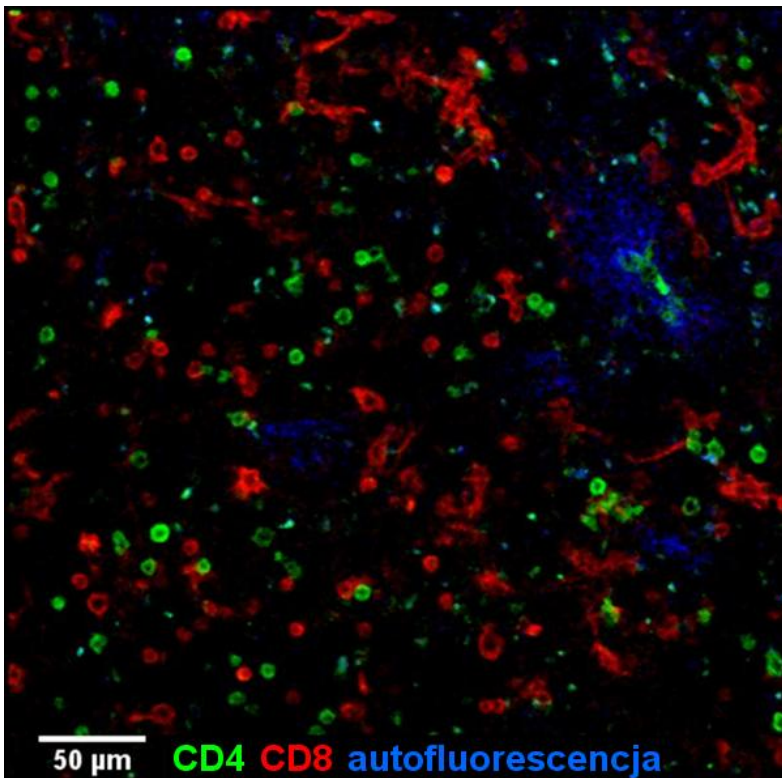


**Ryc.1 Rodzaje fluorescencyjnej mikroskopii przyżyciowej.**

dwufotonowej jest jednak głębsza penetracja lasera podczerwonego do wnętrza tkanki w porównaniu do laserów UV-VIS, które z uwagi na większą energię fotonów łatwiej ulegają rozpraszaniu na strukturach tkankowych. W zależności od rodzaju tkanki dzięki mikroskopii dwufotonowej można przeprowadzać obrazowanie nawet na głębokości 1 mm (przeważnie jednak 250  $\mu\text{m}$ ), podczas gdy mikroskopia konfokalna z laserami UV-VIS sięga zazwyczaj nie głębiej niż 80  $\mu\text{m}$ . Polepszenie detekcji sygnału uzyskuje się poprzez obiektywy o wysokiej aperturze numerycznej, pozwalające efektywnie zbierać emitowane wielokierunkowe światło, i stosowanie detektorów nowej generacji (fotopowielacze Ga-As-P) ze zwiększoną czułością. W konsekwencji obniżenie mocy lasera potrzebnej do wzbudzenia fluoroforów przyczynia się do zmniejszenia fototoksycznych efektów związanych z naświetlaniem tkanek, np. powstawania toksycznych wolnych rodników. Przy zastosowaniu odpowiedniego skanera, który kieruje wiązką lasera w trybie rezonansowym, co kilkakrotnie zwiększa prędkość skanowania, długość kontaktu światła lasera z tkanką ulega znacznemu skróceniu i prowadzi do dalszego zmniejszenia fototoksyczności podczas obserwacji. Idealny mikroskop do badań przyżyciowych powinien więc być wyposażony w kilka linii laserów z zakresu UV-VIS-IR dając możliwość swobodnego wzbudzenia fluoroforów o różnorodnych właściwościach spektralnych. Powinien też posiadać bardzo czułe detektory do rejestracji słabych sygnałów i szybki skaner do obrazowania wydarzeń rozgrywających się z dużą prędkością (np. ruch komórek wewnątrz naczyń krwionośnych). Instrument powinien również umożliwiać łatwy dostęp i manipulację przy obiekcie badań, jakim jest najczęściej mysz laboratoryjna spoczywająca na podgrzewanym stoliku mikroskopowym i podłączona do aparatury

z anestezją lub dodatkowych akcesoriów (np. stabilizatora ruchu organów podlegających obserwacji, respiratora).

Naświetlanie tkanek wiązką lasera generuje autofluorescencję. Ten rodzaj sygnału jest bardzo powszechny lecz mało charakterystyczny, przez co nie pozwala na różnicowanie obrazowanych typów komórek. Wyjątkiem mogą być makrofagi, które niekiedy identyfikuje się na podstawie autofluorescencyjnych ziarnistości. Dodatkowo białka strukturalne tkanek również można obrazować w oparciu o autofluorescencję (elastyna) lub – przy zastosowaniu pulsującego lasera podczerwonego – przez generację drugiej harmonicznej (kolagen). Endogenne fluorofory i sygnał drugiej harmonicznej są bardzo użyteczne, ponieważ tworzą tło i kontekst dla dynamiki komórek. Uzyskanie swobodnego źródła fluorescencji wewnątrz tkanek, które pozwoliłoby na uwidocznienie pożądanego struktury lub komórek, jest jednak wciąż wyzwaniem. W przypadku badań nad

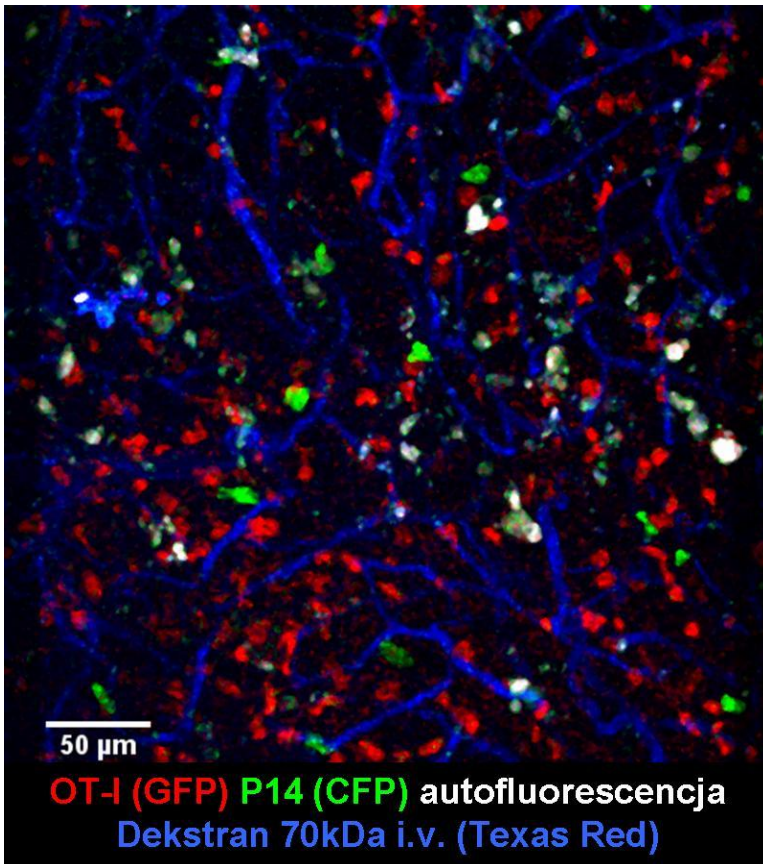


**Ryc. 2. Przyżyciowe obrazowanie limfocytów CD4 i CD8 w śledzionie za pomocą fluorescencyjnie znakowanych przeciwciał.**

komórkami układu immunologicznego próbuje się je wizualizować *in vivo* na kilka sposobów. Najprostszą metodą jest wyznakowanie analizowanej populacji komórek poprzez wstrzyknięcie wyznakowanego fluorescencyjnie przeciwciała rozpoznającego swoje antygeny powierzchniowe na badanych komórkach. W ten sposób można np. identyfikować limfocyty CD4 i CD8 w krwiobiegu lub śledzionie (Ryc. 2). Ograniczeniem tej metody jest konieczność kontaktu analizowanych komórek z krwią, więc komórki przebywające poza naczyniami krwionośnymi, np. w węźle chłonnym, się nie barwią. Przeciwciała ulegają także internalizacji i degradacji wewnątrzkomórkowej, dlatego ich sygnał utrzymuje się do kilku godzin. Ponadto przeciwciała niosą ryzyko sieciowania i aktywacji receptorów powierzchniowych, przez co mogą zmieniać status badanych komórek. Inną metodą wizualizacji komórek układu immunologicznego jest izolacja leukocytów z organizmu dawcy i ich znakowanie *in vitro* za pomocą odpowiednich barwników fluorescencyjnych, np. CFSE, CMRA czy SNARF-1. Wyznakowane komórki wprowadza się następnie do organizmu biorcy i analizuje ich ruchliwość oraz

oddziaływania międzykomórkowe w wybranym organie. Procedura ta, podobnie jak znakowanie przeciwciałami, może indukować zmiany w zachowaniu analizowanych komórek. Poza tym barwniki są stopniowo usuwane z cytoplazmy, więc komórki można obserwować *in vivo* przeważnie nie dłużej niż dwa dni. Odkrycie białek fluorescencyjnych i rozwój inżynierii genetycznej pozwoliły na wyznaczenie pożądanych populacji komórek poprzez endogenną ekspresję zielonego białka fluorescencyjnego (GFP) lub jego pochodnych (cyjanowe/CFP, żółte/YFP, czerwone/RFP) bez konieczności dodatkowych manipulacji. Stworzone zostały specjalne szczepy myszy, tzw. myszy reporterowe, w których poszczególne typy komórek, definiowane na podstawie białek powierzchniowych lub czynników transkrypcyjnych, wytwarzają duże ilości białka fluorescencyjnego, dzięki czemu można śledzić ich los w organizmie przez cały okres życia komórkowego. Przykładowo, komórki dendrytyczne, których rolą jest prezentacja antygenów limfocytom, obrazuje się w myszy CD11c-YFP. Z kolei szczep LysM-GFP zawiera fluorescencyjne neutrofile i makrofagi; natomiast komórki T fluoryzują w myszy CD2-DsRed.

Mikroskopia przyżyciowa ma zastosowanie w różnych badaniach podstawowych oraz w modelach wielu chorób, ponieważ pozwala na dokładną analizę oddziaływań komórkowych. W laboratorium kierowanym przez Dra Matthiasa von Herratha w La Jolla Institute of Allergy & Immunology studiuje mechanizmy rozwoju cukrzycy typu 1. Jedną z wiodących hipotez powstawania tej choroby jest bliżej nieznaną infekcją wirusową prowadzącą do aktywacji auto-reaktywnych cytotoksycznych komórek T z linii CD8 i destrukcji wysp trzustkowych, które odpowiadają za produkcję insuliny. Model, który stosujemy w naszych badaniach, jest oparty na genetycznie modyfikowanych myszach wytwarzających w wyspach trzustkowych białko gp33 pochodzące z wirusa limfocytarnego zapalenia siatkówki i opon mózgowych (LCMV) pod kontrolą transgenu – szczurzego promotora insuliny (szczep RIP-GP). Po infekcji LCMV swoiste dla wirusa limfocyty T CD8 ulegają aktywacji w węzle chłonny pod wpływem oddziaływań z komórkami dendrytycznymi, które prezentują peptydy pochodzące z białka gp33. Zaktywowane limfocyty T CD8 migrują do trzustki, gdzie po ponownym rozpoznaniu peptydów wirusowych na powierzchni komórek produkujących insulinę, uwalniają czynniki cytotoksyczne, które niszczą wyspy trzustkowe. W konsekwencji wydzielanie insuliny ulega zatrzymaniu i mysz rozwija cukrzycę. Kluczowe etapy procesu chorobotwórczego zostały zobrazowane za pomocą przyżyciowej mikroskopii dwufotonowej w oparciu o technikę preparacji trzustki opracowaną w naszym laboratorium. Było to możliwe dzięki fluorescencyjnym szczepom myszy, w których wyspy trzustkowe fluoryzują dzięki produkcji GFP lub jego pochodnych wytwarzanych pod kontrolą transgenicznego mysiego lub szczurzego promotora insuliny. Ponadto, receptor komórek T CD8, który wiąże się z peptydem pochodzącym z białka gp33 został sklonowany, dzięki czemu stworzono transgeniczne myszy (szczep P14), w których wszystkie komórki T wytwarzają ten receptor. Szczep ten po skrzyżowaniu z myszami z powszechną ekspresją białka fluorescencyjnego we wszystkich komórkach służy jako źródło limfocytów cytotoksycznych, które po przeniesieniu do myszy RIP-GP i ich infekcji wirusem indukują cukrzycę. Badania z różnych laboratoriów pokazują, że w trakcie rozwoju choroby w wyspach trzustkowych dochodzi do akumulacji komórek T, które nie mają swoistego receptora dla antygenów trzustkowych a które stanowią zdecydowaną większość w mikrośrodku wysp trzustkowych. Nasze obecne prace koncentrują się na próbach zrozumienia mechanizmów pozwalających tym nieswoistym limfocytom na penetrację trzustki i ich potencjalnej roli w patogenezie cukrzycy typu 1. W tym celu oprócz autoreaktywnych komórek P14 obrazujemy dodatkowo zachowanie komórek T CD8 rozpoznających peptyd nieistotny w tym modelu cukrzycy – modelowy peptyd z białka jaja kurzego – owalbuminy (Ryc. 3). Na obecnym etapie rozwoju technologicznego



**Ryc. 3. Infiltracja trzustki przez komórki P14 i OT-I w myszy RIP-GP 10 dni po infekcji wirusem LCMV-OVA. Naczynia krwionośne zobrazowane fluorescencyjnym dekstranem podanym dożylnie.**

mikroskopia przyżyciowa nie jest w stanie uwidocznić wszystkich typów komórek, które zasiedlają trzustkę lub do niej migrują, dlatego też opisaną technikę wizualizacji oddziaływań komórkowych *in vivo* łączymy z klasycznymi metodami statycznej analizy mikroskopowej na utrwalonych i wybarwionych immunofluorescencyjnie tkankach. Dopiero takie połączenie różnorodnych technik ma potencjał do pełnej charakteryzacji procesu chorobotwórczego, dzięki czemu projektowanie nowych interwencji terapeutycznych w cukrzycy typu 1 będzie bardziej efektywne.