

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SONJA PETKOVŠEK

PRIMERJAVA METOD HIBRIDIZACIJE *IN SITU*  
Z RADIOAKTIVNO IN NERADIOAKTIVNO  
OZNAČENIMI SONDAMI

DIPLOMSKA NALOGA

LJUBLJANA, 2009

# **VSEBINA**

<b>1.</b>	<b>UVOD .....</b>	<b>5</b>
1.1	RAZNOLIKOST MIŠIČNIH VLAKEN .....	5
1.2	PLASTIČNOST SKELETNE MIŠICE .....	7
1.3	HIBRIDIZACIJA <i>IN SITU</i> .....	8
<b>2.</b>	<b>NAMEN DELA.....</b>	<b>11</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>12</b>
3.1	MIŠIČNI VZORCI.....	12
3.2	PRIPRAVA VZORCEV .....	13
3.3	SONDE .....	13
3.3.1	Priprava radioaktivno označenih sond .....	14
3.3.2	Priprava neradioaktivno označenih sond.....	15
3.4	HIBRIDIZACIJA IN SITU .....	16
3.4.1	Hibridizacija <i>in situ</i> z radioaktivno označenimi sondami .....	16
3.4.2	Hibridizacija <i>in situ</i> z neradioaktivno označenimi sondami .....	17
3.5	KONTROLNI IMUНОHISTOKEMIČNI PRIKAZ MHC .....	18
3.6	MATERIALI IN OPREMA .....	19
<b>4.</b>	<b>REZULTATI IN DISKUSIJA .....</b>	<b>22</b>
4.1	HIBRIDIZACIJA <i>IN SITU</i> Z RADIOAKTIVNO OZNAČENIMI SONDAMI .....	22
4.2	SINTEZA SOND OZNAČENIH Z DIGOKSIGENINOM .....	25
4.3	HIBRIDIZACIJA <i>IN SITU</i> Z NERADIOAKTIVNO OZNAČENIMI SONDAMI .....	26
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČKI.....</b>	<b>31</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>32</b>

## OKRAJŠAVE V BESEDILOU

<b>β, 2a, 2x</b>	prepisi genov (mRNA) za izoblike težkih verig miozina in vlakna, ki te prepise izražajo
<b><sup>35</sup>S</b>	izotop žvepla
<b>A, C, G, T</b>	adenin, citozin, gvanin, timin (nukleotidne baze DNA)
<b>APES</b>	3-aminopropiletoksilan
<b>ATP</b>	adenozin-5'-trifosfat
<b>ATPaza</b>	adenozin-trifosfataza
<b>BCIP</b>	5-bromo-4-kloro-3-indolil-fosfat
<b>cDNA</b>	komplementarna deoksiribonukleinska kislina (komplementarni prepis mRNA)
<b>cpm</b>	število impulzov, ki jih zazna števec za merjenje radioaktivnosti (counts per minutes)
<b>CTP</b>	citidin-5'-trifosfat
<b>DEPC</b>	dietilpirokarbonat
<b>DIG</b>	digoksičen
<b>DTT</b>	ditiotreitol
<b>GSA</b>	goveji serumski albumin
<b>GTP</b>	gvanozin-5'-trifosfat
<b>I, IIC, IIA in IIX (prvotno IIB)</b>	tipi mišičnih vlaken
<b>MHC</b>	miozinska težka veriga (myosin heavy chain)
<b>mRNA</b>	informacijska ribonukleinska kislina (messenger RNA)
<b>NBT</b>	nitro tetrazolijev modrilo
<b>PBS</b>	fosfatni pufer v fiziološki raztopini
<b>SSC</b>	Na-citratno kloridni pufer (sodium chloride–sodium citrate buffer)
<b>U</b>	uracil (nukleotidna baza RNA)
<b>UTP</b>	uridin-5'-trifosfat

## **POVZETEK**

Tip mišičnega vlakna je odvisen od vsebnosti različnih oblik oziroma izooblik težkih verig miozina (myosin heavy chain, MHC). V zrelih mišicah človeka so poznane tri izooblike težkih verig miozina MHC-I, -IIA in -IIB, ki jih določajo ločeni geni za MHC. Da bi lahko prikazali prisotnost ustreznih prepisov mRNA v tkivu, smo prepise za MyHC v vlaknih prikazali s tehniko hibridizacije *in situ*. Uporabili smo specifične, radioaktivno označene RNA sonde ter sonde, označene z digoksigeninom. Mesta v tkivu, kjer so se vezale radioaktivno označene sonde, smo prikazali s tehniko avtoradiografije, imunohistokemijsko pa smo prikazali mesta vezave sonde, označene z digoksigeninom. Z namenom, da bi preverili, ali so se sonde specifično vezale na ustreza mesta v tkivu, smo izooblike MHC v vlaknih prikazali z monoklonskimi protitelesi, specifičnimi za izooblike MHC podgane.

Pri hibridizaciji *in situ* z radioaktivno označenimi sondami je v večini počasnih vlaken, ali tipu I, ki smo ga prikazali s protitelesom BA-D5 hibridizirala sonda 1, v vlaknih tipa IIA in IIX pa sta hibridizirali sonda 2a ali 2x. V nekaj vlaknih tipa II pa sta hibridizirali obe sondi, očitno gre pri teh vlaknih za t.i. hibridna vlakna, ki smo jih poimenovali IIAX. Tudi v vlaknih tipa IIC, ki so izražala hkrati MHC-I in -IIA, sta večinoma hibridizirali sonda 1 in 2a. V manjšem številu vlaken pa izražena vrsta prepisov mRNA ni bila skladna z izraženo izoobliko MHC, ki smo jo prikazali s protitelesi. Takšna neskladnost je verjetno posledica pretvorbe tipov mišičnih vlaken oziroma pretvorbe iz enega tipa vlakna v drugega. Rezultati hibridizacije sond, označenih z digoksigeninom, so pokazali enak vzorec izražanja prepisov mRNA za MHC glede na prikazane izooblike MHC v vlaknih kot v primeru hibridizacije *in situ* z radioaktivno označenimi sondami.

# **1. UVOD**

Skeletne mišice skupaj z živci, ki jih oživčujejo, omogočajo s svojim delovanjem premikanje telesa, ščitijo notranje organe, hkrati pa s svojo podporno vlogo dajejo oporo kostem in sklepom. Pri človeku je podpora vloga mišic še posebno pomembna, saj mišice z oporo, ki jo nudijo hrbtnici, kolčnemu in kolenskemu sklepu omogočajo pokončno držo človeka. Funkcijska raznolikost skeletnih mišic, ki pri gibanju telesa omogoča, da vsaka mišica prispeva svoj specifični delež k izvedbi giba, je odraz raznolikosti mišičnih vlaken ter motoričnih nevronov, ki jih oživčujejo. (1)

## **1.1 RAZNOLIKOST MIŠIČNIH VLAKEN**

Raznolikost mišic je bila poznana že pred več kot stoletjem, saj so lahko že s prostim očesom ugotovili, da so nekatere mišice bolj temne oziroma »rdeče«, druge pa svetlejše oziroma »bela«. Ta raznolikost mišic je seveda odraz raznolikosti vlaken, ki so jih sprva tudi delili na rdeča in bela vlakna (2).

Z morfološkimi in biokemijskimi študijami so kasneje dokazali, da vsebujejo rdeča vlakna veliko mioglobina, veliko mitohondrijev in imajo bogat kapilarni preplet na svoji površini, kar jim zagotavlja nenehno preskrbo s kisikom in substrati za aerobni način pridobivanja energije. Nasprotno pa bela vlakna vsebujejo manj mioglobina, manj mitohondrijev in manj kapilar, zato energijo pridobivajo z anaerobno presnovo lastnih zalog glikogena.

Kasneje so ugotovili, da je raznolikost vlaken odraz molekulske raznolikosti kontraktilnih proteinov mišičnega vlakna, predvsem miozina. Dokazali so, da so rdeča vlakna počasi krčljiva, nasprotno pa so bela vlakna hitro krčljiva. Ugotovili so, da imata miozina obe vrst različno aktivnost encima adenosin-trifosfataze (ATPaze) (3), ki je premosorazmerna s hitrostjo krčenja vlakna (4). Zato je bila histokemijska reakcija za prikaz aktivnosti miozinske ali miofibrilne ATPaze v preteklih desetletjih najpogostejsa metoda za prikaz raznolikosti mišičnih vlaken. Aktivnost miofibrilne ATPaze v počasnih vlaknih (tip I) je labilna v alkalnem in hkrati stabilna v kislem mediju, obratno pa je v hitrih vlaknih (tip II) stabilna v alkalnem in labilna v kislem mediju (5). Vlakna tipa II pa lahko glede na labilnost v različno kislih medijih delimo še v tri podtipe. Tako lahko s predinkubacijo v alkalnem mediju (pH 9,4–10,4) in v različno kislih medijih (pH 4,3–4,6) pri človeku razlikujemo tri tipe mišičnih vlaken: tip I, IIA in IIB (6). Poleg teh treh

tipov vlaken se predvsem v razvijajoči se in regenerajoči mišici pojavljajo še t.i. prehodna ali intermediarna vlakna tipa IIC, ki se po svojih lastnostih uvrščajo med počasna vlakna tipa I in hitra vlakna tipa IIA (7; 8).

Kasnejše imunohistokemijske in elektroforezne raziskave so potrdile, da sta aktivnost miofibrilne ATPaze in tip mišičnega vlakna predvsem odvisna od vsebnosti različnih oblik oziroma izooblik težkih verig miozina (myosin heavy chain, MHC). Tako so v vlaknih tipa I, IIA in IIB človeka z uporabo specifičnih monoklonskih protiteles in z elektroforezo dokazali izooblike MHC-I, -IIA in -IIB, v vlaknih tipa IIC pa MHC-I in -IIA hkrati (9; 10). Poleg teh glavnih izooblik MHC se pojavljata še dve razvojni izoobliki in sicer embrionalne ter perinatalne (neonatalne) MHC. Embrionalna izooblika prevladuje v zgodnjem obdobju razvoja skeletne mišice, perinatalna pa kasneje, tik pred rojstvom in ob njem. Obe razvojni obliki se pred pojavom odraslih izooblik ponovno pojavita tudi v času obnove mišičnega vlakna po poškodbi (11). Pri nekaterih manjših sesalcih (miš, podgana, morski prašiček, kuneč) so odkrili še tretjo izoobliko MHC, ki so jo poimenovali IIX (12; 13) oziroma IID (14; 15). Vlakna z izraženo izoobliko MHC-IIX/IID (MHC-IIX v nadaljevanju) se po hitrosti krčenja uvrščajo med vlakna tipa IIA in IIB (16).

Z genetskimi študijami so dokazali, da vsako od izooblik MHC določa ločen gen (17; 18) in da je pri človeku v vlaknih tipa IIB dejansko izražen gen za MHC-IIX (19). Z analizo vzorca izražanja genov za izooblike MHC, so dokazali, da so v vlaknih tipa I, IIA in IIX (prvotno IIB) večinoma izraženi ustrezni prepisi gena (mRNA) za MHC-I, -IIA in -IIX v nekaterih vlaknih tipa II pa so bili hkrati izraženi prepisi za MHC-IIA in -IIX (vlakna IIAX), v intermediarnih vlaknih tipa IIC pa prepisi za MHC-I in -IIA (20). Horton in sodelavci (21) so sicer v nekaterih vlaknih zunanje poševne trebušne (m. obliquus externus abdominis) in žvečne mišice (m. masseter) odkrili mRNA za MHC-IIB, vendar so bile izražene skupaj s prepisi še za druge izooblike MHC. Prisotnosti ustreznegra proteina oziroma izooblike MHC-IIB v teh vlaknih niso uspeli dokazati.

## 1.2 PLASTIČNOST SKELETNE MIŠICE

Mišice se zaradi različne funkcije razlikujejo v sestavi glede na delež posameznih tipov vlaken. Tako imajo mišice, ki imajo posturalno vlogo več počasnih vlaken, v mišicah, ki omogočajo občasne hitre gibe pa prevladujejo hitra vlakna (fazične mišice). Vendar pa ima skeletna mišica sposobnost, da v primeru spremenjenih fizioloških potreb organizma prilagodi oziroma spremeni svojo sestavo glede na tipe vlaken. To lastnost imenujemo plastičnost skeletne mišice.

Čeprav je plastičnost skeletne mišice oziroma sposobnost spreminjanja kontrakcijskih lastnosti vlaken oziroma tipov vlaken glede na zahteve iz okolja že vrsto let poznana, so domnevali, da so za sprožitev pretvorbe tipov vlaken potrebni bolj ekstremni vplivi. Tako je poznano, da povečana obremenitev in živčno-mišična aktivnost ter hipotiroidizem sprožijo pretvorbo vlaken v smeri od hitrih tipov vlaken proti počasnim. Pretvorbo vlaken v nasprotni smeri, to je od počasnih tipov vlaken proti hitrim tipom pa povzročijo razbremenitev mišice, zmanjšana živčno-mišična aktivnost, denervacija in hipertiroidizem. Obseg pretvorbe je odvisen od vrste in trajanja vpliva teh dejavnikov na mišico (22; 23). V preteklih desetletjih je bilo uveljavljeno prepričanje, da v normalnih mišicah obstajajo vlakna, ki izražajo le eno vrsto oziroma izobliko MHC. Domnevali so, da se vlakna, ki izražajo več kot eno izobliko pojavljajo le v mišicah, v katerih poteka proces pretvorbe tipov vlaken. Novejše raziskave z občutljivejšimi metodami pa so pokazale, da so hibridna vlakna prisotna tudi v normalni mišici (24; 25). Prisotnost hibridnih vlaken z različnim razmerjem med so-izraženimi izoblikami MHC dejansko zagotavlja skeletni mišici cel spekter kontrakcijskih lastnosti vlaken, ki lahko zadostijo različnim fiziološkim potrebam organizma.

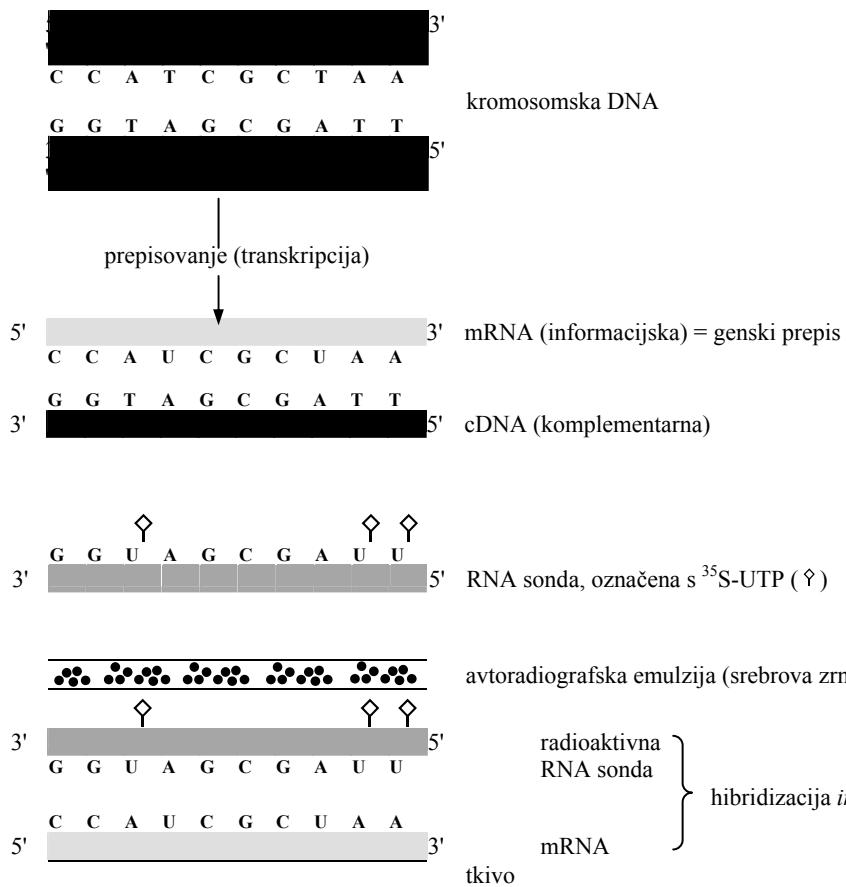
Pretvorba tipov vlaken se začne najprej na nivoju izražanja genov za MHC. Mehanizem kontrole izražanja genov za MHC še ni poznan, ni povsem jasno ali prihaja do regulacije na ravni transkripcije ali na ravni translacije mRNA (25; 26). Vendar pa je jasno, da pred pojavom proteina prihaja do spremembe izražanja ustreznih mRNA prepisov, obratno pa prisotnost mRNA prepisov ne zagotavlja pojava ustreznega proteina (26). Ne glede na to, kako poteka regulacija preklapljanja genov, pa sklepajo, da ob ugašanju predhodno aktivnega gena njegovi prepisi usihajo, saj je njihova polovična življenjska doba približno 2-3 dni (27). Medtem se gen za bodočo izobliko aktivira in začnejo se pojavljati njegovi prepisi. Sprememba histokemičnega fenotipa pa

postane zaznavna šele po določenem časovnem zamiku, potrebnem, da se iz mišičnega vlakna odstrani prvotna izoblika, saj je njihova polovična življenjska doba približno 2-3 tedne. Nato se sintetizira nova izoblika MHC, ki se vgradi v miofibrilo in določa novi fenotip vlakna. Domnevajo celo, da je proces zamenjave izoblik v miofibrili zaviralni dejavnik hitrosti pretvorbe vlaken (28). Če upoštevamo zamik med izraženim prepisom za MHC in pojmom proteina, ki ga ta prepis določa, lahko določimo tudi smer pretvorbe vlakna. Njegov histokemični fenotip namreč določa njegovo trenutno oziroma »staro« stanje, izraženi prepis za MHC pa bodoči fenotip vlakna. Pretvorba tipov vlaken naj bi potekala po ustaljeni poti:  $I \leftrightarrow IIC \leftrightarrow IIA \leftrightarrow IIAX \leftrightarrow IIX$  (10; 29). Na ravni izraženih izoblik MHC pretvorba verjetno poteka po naslednji shemi:  $I \leftrightarrow I/IIA \leftrightarrow IIA \leftrightarrow IIA/IIX \leftrightarrow IIX$ , na ravni izraženih prepisov za MHC pa bi pričakovali naslednji potek pretvorbe:  $\beta \leftrightarrow \beta/2a \leftrightarrow 2a \leftrightarrow 2a/2x \leftrightarrow 2x$ . Pri takšnem, tako imenovanem »posrednem načinu« pretvorbe vlaken preklapljanje genov poteka zvezno, preko prehodnega sočasnega izražanja dveh vrst različnih prepisov za MHC (20).

Poznavanje mehanizma pretvorbe tipov vlaken nam lahko pomaga k boljšemu poznavanju osnovnih značilnosti skeletne mišice človeka in tako tudi k boljšemu razumevanju fizioloških, patoloških in regeneracijskih procesov v skeletni mišici.

### 1.3 HIBRIDIZACIJA *IN SITU*

Ena od metod, ki nam omogoča študij izražanja genov je tehnika hibridizacije *in situ*, s katero lahko prikažemo prisotnost ustreznih prepisov mRNA v tkivu. Pri tej metodi gre za povezavo med tarčno RNA (mRNA), in komplementarnimi, protismiselnimi (antisense) predeli majhnih, označenih delcev nukleinskih kislin, t.i. sond. Te so lahko označene z različnimi radioaktivnimi in neradioaktivnimi označevalci. Sprva so uporabljali predvsem s tricijem označene dvojnoverižne in enoverižne DNA sonde, občutljivost metode pa se je povečala, ko so začeli uporabljati enoverižne RNA sonde, označene zlasti s  $^{32}P$  ter  $^{35}S$ , vezanim na enega od nukleotidov. Princip hibridizacije *in situ* z radioaktivno označeno RNA sondijo s  $^{35}S$  vezanim na uridin-5'-trifosfat (UTP) je shematsko prikazan na sliki 1.



Slika 1. Shematski prikaz tehnike hibridizacije *in situ*.

Za prikaz mesta vezave radioaktivno označene sonde v tkivu se uporablja metoda avtoradiografije. V avtoradiografski emulziji nad mestom vezave radioaktivno označene sonde, radioaktivni delci  $\beta$  izbijajo elektrone iz kristalov srebrovega halogenida v emulziji. Prosti elektroni pa privlačijo srebrove ione v emulziji, kar povzroči akumulacijo srebrovih zrnčic nad mestom hibridizacije (slika 1). Srebrova zrnčica lahko zaznamo s svetlobnim mikroskopom kot temna zrnčica v svetlem vidnem polju, in obratno kot svetla zrnčica na temnem ozadju v temnem vidnem polju.

Pomanjkljivost hibridizacije *in situ* z radioaktivno označenimi sondami je v zahtevnejšem delu z izotopi. Za takšno delo je potrebno ustrezno dodatno znanje, v času, ko smo uporabljali radioaktivne sonde, je bilo za delo z izotopi potrebno pridobiti ustrezno dovoljenje in opraviti izpit. Zelo pomembna je tudi ustrezna zaščita pred sevanjem, varno shranjevanje izotopa in radioaktivnih odpadkov, kar gotovo otežuje raziskovalno delo in povečuje stroške dela. Zaradi razpolovne dobe izotopa je potrebno natančnejše načrtovanje dela in nabave izotopa. Dodatno pomankljivost radioaktivne metode predstavlja tudi relativno dolgo časovno obdobje, ki je potrebno, da dobimo

rezultate, t.j. od 1 - 2 tednov ali celo več. Zaradi omenjenih slabosti in v želji po uporabi zdravju in okolju manj škodljive metode, so v zadnjih letih razvili metode neradioaktivnega označevanja sond, za kar se največkrat uporablja biotin in digoksigenin. Princip hibridizacije *in situ* z neradioaktivno sondijo je podoben, vezavo sonde v tkivu prikažemo s protitelesom, specifičnim za digoksigenin. Na protitelo je vezana alkalna fosfataza, ki jo prikažemo z dodatkom substrata za ta encim (5-bromo-4-kloro-3-indolil-fosfata (BCIP) in nitroblue-tetrazolium-klorida (NBT)), pri reakciji nastane modro obarvan produkt, ki je viden pod svetlobnim mikroskopom.

## **2. NAMEN DELA**

Na Inštitutu za anatomijo se že vrsto let ukvarjamo z raziskavo skeletnih mišic človeka, v katerih določamo tipe mišičnih vlaken. Starejše metode za določanje tipov vlaken kot sta reakcija za miofibrilno ATPazo in imunohistokemijsko določanje MHC smo v zadnjih letih nadgradili z novejšo metodo hibridizacije *in situ* z radioaktivno označenimi sondami. Ker je delo z radioaktivnimi izotopi zahtevnejše in zdravju škodljivo, smo v raziskovalno delo nameravali vpeljati metodo hibridizacije *in situ* z neradioaktivno označenimi sondami in sicer z digoksigeninom vezanim na UTP. Hkrati smo nameravali ugotoviti, ali sta obe metodi primerljivi oziroma enako občutljivi.

### **3. MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 MIŠIČNI VZORCI**

Z radioaktivno označenimi sondami smo analizirali avtopsijske vzorce 14 različnih humanih mišic, ki so bile odvzete 14 moškim, starim od 17 do 49 let, ki so umrli zaradi nenasne smrti. Trije vzorci paravertebralne mišice erector spinae pa so bili odvzeti trem bolnikom z diagnozo *Hernia discii* (starim 45, 49 in 70 let) med kirurškim posegom na Ortopedski kliniki Kliničnega centra v Ljubljani (Razpredelnica 1).

Razpredelnica 1. *Mišice, ki so bile analizirane z radioaktivno označenimi sondami*

<b>Mišice zgornjega uda</b>	<b>Število vzorcev</b>	<b>Starost oseb</b>
<i>deltoideus</i>	1	40
<i>extensor digitorum</i>	2	19,37
<i>biceps brachii</i>	6	17,19,30,37,40,49
<i>triceps brachii</i>	3	17,19,37
<i>flexor digitorum superficialis</i>	3	17,19,37
<b>Mišice trupa</b>		
<i>latissimus dorsi</i>	3	26,30,49
<i>erector spinae</i>	3	45,49,70
<i>rectus abdominis</i>	2	32,41
<b>Mišice spodnjega uda</b>		
<i>vastus lateralis</i>	7	18,26,25,30,34,34,37
<i>vastus medialis</i>	1	30
<i>rectus femoris</i>	2	30,40
<i>biceps femoris</i>	1	30
<i>tibialis anterior</i>	5	19,25,37,40,49
<i>gastrocnemius, caput mediale</i>	2	19,37

Raziskavo z neradioaktivno označenimi sondami pa smo opravili na avtopsijskih vzorcih mišice *vastus lateralis* in *diafragme* (moški, 41 let, nenasna smrt) in *biceps femoris* (moški, 37 let, nenasna smrt) ter na 2 biopsijskih vzorcih paravertebralnih mišic *erector spinae* in *multifidus* (moški, 35 let in ženska 53 let), ki so bili tudi odvzeti pacientoma s *Hernio discii* na Ortopedski kliniki.

Za vse odvzeme, tako za avtopsijske kot za biopsijske vzorce različnih mišic, je bilo pridobljeno soglasje Komisije za medicinsko etična vprašanja.

### **3.2 PRIPRAVA VZORCEV**

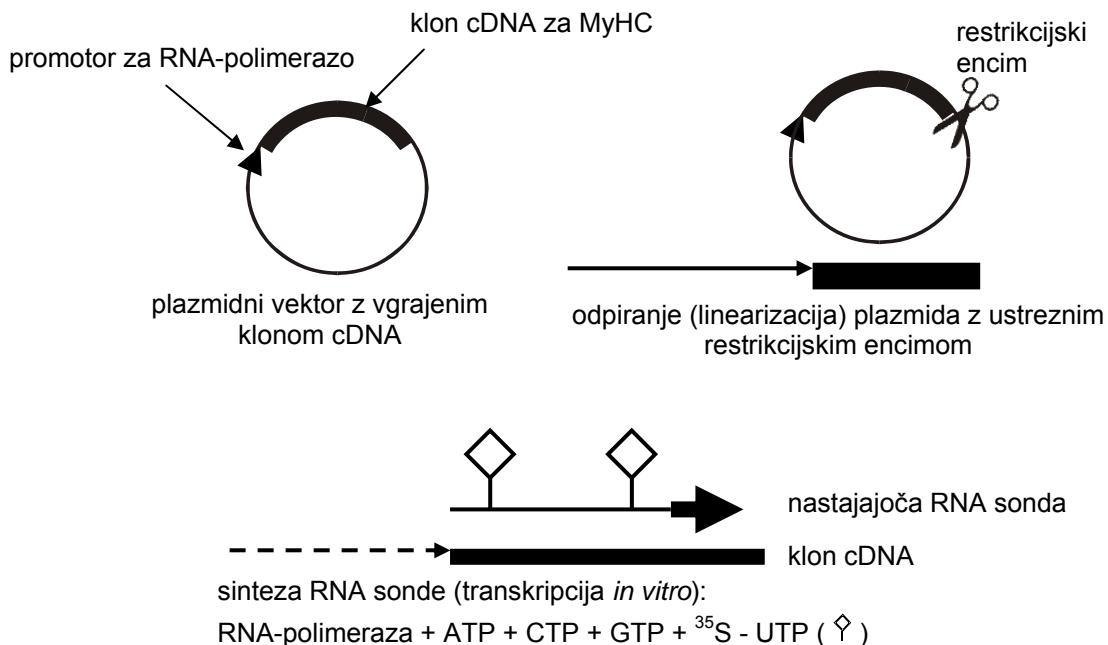
Mišične vzorce smo zamrznili v tekočem dušiku in jih s kriotomom (Reichert-Young 2800 Frigocut) narezali na 10 µm debele zaporedne rezine. Rezilo kriostata smo predhodno očistili s čistim papirjem, namočenim v koncentriran etanol in obvezno uporabljali rokavice, da bi se izognili kontaminaciji z encimom RNAaza, ki razgradi RNA in je prisoten na koži. Pri obeh metodah smo uporabljali predmetna stekelca, prekrita z 2 % raztopino 3-aminopropiletoksisilana (APES) v acetonu ali metanolu (30). Ker so se med poizkusom rezine nekaterih mišic odlepile, smo preizkusili tudi predmetna stekelca Superfrost Plus (Menzel-Gläser, Nemčija) in HistoBond (Marienfeld, Nemčija), ki so pozitivno nabita, zato naj bi se rezine zaradi elektrostatičnega naboja bolje vezale na njihovo površino.

V primeru hibridizacije *in situ* z radioaktivno označenimi sondami, smo mišične rezine posušili na zraku (od 30 minut do nekaj ur), jih vložili v čisto škatlo, zavili v alufolijo in jih zamrznili na -70 °C.

Pri metodi z neradioaktivno označenimi sondami smo rezine sušili 1–2 uri na 50 °C, nato smo jih fiksirali v 4 % paraformaldehidu, raztopljenem v fiziološki raztopini, ki je bila moderirana s fosfatnim pufrom (PBS, pH 7,2). Po izpiranju v PBS (3-krat po 5 min), smo rezine dehidrirali v etanolu, nato posušili na zraku, jih vložili v škatle ter zamrznili na -70 °C.

### **3.3 SONDE**

Sonde smo pripravili s postopkom transkripcije *in vitro* (slika 2). Vsi kloni cDNA za MHC, ki smo jih uporabljali kot matrica za sintezo sond, so bili vgrajeni v plazmidni vektor. Plazmidna DNA vsebuje na obeh koncih vgrajenega klona promotorje za različne RNA-polimeraze, ki na osnovi matrice sintetizirajo RNA sondi. Z ustreznimi restrikcijskimi encimi smo linearizirali krožno plazmidno DNA in preprečili prepisovanje plazmidne DNA. Z izborom ustreznih RNA-polimeraz smo lahko določili smer prepisovanja vgrajenega klona. Tako smo za sintezo sond, ki morajo biti komplementarne tkivni mRNA, izbrali protismiselno smer sinteze (31).



Slika 2. Shema priprave radioaktivno označenih RNA sond s postopkom transkripcije *in vitro*.

V raziskavi smo uporabljali 3 različne sonde in sicer specifične za MHC-I, -IIA in -IIX, ki smo jih poimenovali sonda 1, 2a in 2x. Za sintezo teh sond smo uporabili klone cDNA, katerih značilnosti so prikazane v razpredelnici 2.

Razpredelnica 2. Značilnosti klonov cDNA ter RNA-polimeraze, ki smo jih uporabili za pripravo protismiselnih RNA sond za prikaz genskih prepisov za MHC.

Sonda	velikost cDNA (bp)*	RNA polimeraza
1	170	SP6
2a	132	T3
2x	121	T3

\*bp = bazni pari

### 3.3.1 Priprava radioaktivno označenih sond

Sintezo smo izvajali po postopku kot so ga opisali Sasson in sodelavci (31) in je opisan tudi v članku Smerdu in Eržen (20).

Za postopek transkripcije *in vitro* smo uporabili 300 ng linearizirane plazmidne DNA z vstavljenim klonom za MHC. Transkripcijskemu pufru (40 mM tris (hidroksimetil)-aminometan-HCl (Tris-HCl)/pH 7,5, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM spermidin, 10 mM NaCl, 100 mM ditiotreitol (DTT)) smo poleg DNA in ustrezne RNA-polimeraze dodali še

nukleotide (0,5 mM) adenozin-5'-trifosfat (ATP), citidin-5'-trifosfat (CTP) in gvanozin-5'-trifosfat (GTP). Sonde smo radioaktivno označili z izotopom žvepla ( $^{35}\text{S}$ ), vezanim na uridin-5'-trifosfat (UTP), ki smo ga poleg neoznačenih nukleotidov dodali mediju za postopek transkripcije *in vitro*. Po končani sintezi (2 uri) smo z dodajanjem encima DNAaze I razgradili cDNA, sintetizirane RNA sonde pa smo oborili s 3 M Na acetatom (pH 5,5) ter prečistili s fenolom in kloroformom. Nato smo izmerili njihovo radioaktivno moč s scintilacijskim števcem.

### 3.3.2 Priprava neradioaktivno označenih sond

Za sintezo neradioaktivno označenih sond smo uporabili komplet za označevanje nukleinskih kislin z digoksigeninom (DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)). Na 1  $\mu\text{g}$  DNA matrice smo dodali nukleotide ATP, CTP, GTP (1 mM), poleg neoznačenega UTP (0,65 mM) smo za označevanje sonde dodali še 0,35 mM UTP, na katerega je bil vezan digoksigenin. Poleg transkripcijskega pufra (40 mM Tris-HCl/pH 8, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM spermidin, 10 mM NaCl, 100 mM DTT) smo DNA matrici dodali še encim inhibitor RNAAz (20 U) in ustrezno RNA polimerazo (40 U). Po dveh urah inkubacije pri 37°C pri sintezi sonde s T3 in pri 40°C pri sintezi s SP6 RNA-polimerazo, smo DNA matrico razgradili z dodatkom DNAaze I (20 U). RNA sonde smo čez noč oborili (3 M Na acetat, pH 5,5).

Koncentracijo sond smo ovrednotili s točkovnim pivnanjem (angl. dot blot). Na pozitivno nabito najljonsko membrano smo nanesli različne razredčitve sonde in že označene kontrolne RNA, katere koncentracija je bila poznana. Membrano smo inkubirali s protitelesi proti digoksigeninu (ovčje poliklonsko protitelo), na katere je vezana alkalna fosfataza. Vezavo protiteles na označeno RNA smo prikazali z inkubacijo membrane (6-16 ur) v substratu za alkalno fosfatazo, t.j. 5-bromo-4-kloro-3-indolil-fosfat (BCIP, 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in nitroblue-tetrazolium-klorid (NBT, 340  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) v detekcijskem pufru (0,1 M Tris-HCl pufru, pH 9,5, z dodanim 0,1 M NaCl). Nato smo primerjali intenzitet obarvanja nanosov različnih koncentracij RNA sonde in označene kontrolne RNA ter na osnovi tega določili okvirno koncentracijo sonde.

### **3.4 HIBRIDIZACIJA IN SITU**

Vse raztopine smo pripravljali z vodo, ki smo jo predhodno inkubirali z dodatkom 0,1 % DEPC 12 ur pri 37°C in jo nato sterilizirali v avtoklavu (1 atmosfera, 120 °C, 20 minut). Raztopine, ki jih zaradi njihovih specifičnih lastnosti ne smemo sterilizirati pod temi pogoji, smo filtrirali preko sterilnega filtra z velikostjo por 0,2 µm (Minisart NML, Sartorius).

#### **3.4.1 Hibridizacija in situ z radioaktivno označenimi sondami**

Uporabili smo modificirano tehniko hibridizacije *in situ* (31). V prehibridizacijskem postopku smo mišične rezine 30 minut fiksirali s 4 % paraformaldehidom v fiziološki raztopini (pH 7,2), moderirani s fosfatnim pufrom (PBS). Da bi olajšali prodor sondam v fiksirano tkivo, smo rezine inkubirali 7,5 minut z encimom proteinazo K (20 mg/L Tris-HCl/pH 8,0). Po izpiranjih v PBS, smo tkivo acetilirali v 0,1 M trietanolaminu in 0,25 % anhidridni kislini. S tem postopkom smo acetilirali proste aminoskupine v tkivu in s tem zmanjšali možnost nespecifične, elektrostatične vezave sond. Po acetilaciji smo rezine ponovno izpirali v PBS, jih nato postopno dehidrali ter osušili na zraku.

Na dobro osušene mišične rezine smo nanesli sonde v končni razredčitvi 25.000 do 50.000 cpm/ µL hibridizacijskega pufra, ki je vseboval 0,3 M NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 5 mM etilendiamintetraocetno kislino (EDTA)/pH 8,0, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/pH 8,0, 10 % dekstran sulfat, Denhardtovo raztopino (0,02 % Ficoll, 0,02 % polivinilpirolidon, 0,02 % goveji serumski albumin), 0,5 g/L tRNA (prenašalna RNA) kvasovk in 10 mM DDT. Da bi olajšali hibridizacijo sond z mRNA, smo sonde pred nanosom ogreli na 80 °C in jih denaturirali. Po nanosu 20 µL sonde, razredčene v hibridizacijskem pufru, smo rezine prekrili s Parafilmom (American National Can, Greenwich) in predmetna stekelca vložili v plastično posodo, navlaženo z raztopino 50 % formamida in pufra, pripravljenega z 0,6 M NaCl in 0,06 M Na-citratom /pH 7,0 (SSC 4X). Postopek hibridizacije sond je potekal 16 ur pri temperaturi 50-52 °C.

Po hibridizaciji smo rezine izpirali pod t.i. strogimi pogoji v raztopinah s postopno padajočimi koncentracijami soli. S takšnim izpiranjem se iz tkiva odstanijo nespecifično vezane sonde, ki so morda le delno hibridizirale s »tujimi« mRNA, ali pa so se vezale na t.i. lepljive dele tkiva.

Najprej smo rezine izpirali 30 minut, pri 42–45 °C v raztopini, ki je poleg 10 mM DTT vsebovala še 0,75 M NaCl in 75 mM Na-citrat/pH 7,0 (SSC 5X). Sledilo je drugo,

20 minutno izpiranje v raztopini 50 % formamida, 100 mM DTT, 0,3 M NaCl in 0,03 M Na-citrata/pH 7,0 (SSC 2X), pri temperaturi 65 °C. Za naslednji dve izpiranji, ki sta trajali po 5 minut pri 37 °C, smo pripravili izpiralni pufer, ki je vseboval 0,01 M Tris-HCl/pH 7,5, 5 mM EDTA/pH 8,0 in 0,4 M NaCl. Da bi dodatno odstranili morebitne nespecifično vezane sonde, ki jih z izpiranjem pod strogimi pogoji nismo odstranili, smo rezine za 30 minut inkubirali z RNazo A (20 mg/L v izpirальнem pufru), ki razgradi vso RNA v tkivu, razen popolnih hibridov RNA/RNA. Rezine smo ponovno izprali v izpirальнem pufru (5 minut, 37 °C), nato pa še 15 minut v pufru (pH 7,0), pripravljenem iz 150 mM NaCl in 15 mM Na-citrata (SSC 1X). Nazadnje smo rezine izpirali v isti, vendar 10-krat razredčeni raztopini (SSC 0,1X).

Mesta v tkivu, kjer so se vezale sonde, smo prikazali s tehniko avtoradiografije. Po izpiranju in dehidraciji smo osušene rezine v temnici potopili v ogreto (45 °C) avtoradiografsko emulzijo (Kodak NTB-2) in jih približno po dveh urah sušenja na zraku shranili v dobro zaprte plastične posode, ki smo jih zaščitili pred vdorom svetlobe. Po približno 7 do 14 dneh hrانjenja v hladilniku smo emulzijo razvili (Kodak Developer D-19) in fiksirali (Kodak Unifix). Da bi si olajšali mikroskopsko pregledovanje rezin, smo jih rahlo obarvali z eozinom, dehidrirali in pokrili z balzamom (DPX Mountant, Fluka) in pokrovnnimi stekelci.

### **3.4.2 Hibridizacija *in situ* z neradioaktivno označenimi sondami**

Za hibridizacijo *in situ* z digoksigeninom označenimi sondami smo priredili postopek, ki ga priporoča proizvajalec kompleta za neradioaktivno označevanje nukleinskih kislin, predvsem pa smo sledili objavljenim opisom postopkov te metode na skeletnih mišicah (21; 32; 33; 34).

Predhibridizacijski postopek z rezinami je bil podoben kot pri hibridizaciji *in situ* z radioaktivno označenimi sondami. Pred zamrzovanjem smo predhodno fiksirane in dehidrirane rezine odtalili, posušili (1 uro) in rehidrirali. Po obdelavi rezin s proteinazo K in acetilacijo v raztopini trietanolamina in anhidridne kisline ter izpiranju (SSC 0,2X) smo rezine ponovno fiksirali v 4 % paraformaldehidu v PBS (2 minuti). Nato smo rezine izprali v PBS, jih dehidrirali in posušili na sobni temperaturi (najmanj 1 uro).

Za hibridizacijo smo uporabljali različne koncentracije sond v hibridizacijskem pufru (40 % formamid, SSC 1X, 10 % dekstran sulfat, Denhardtova raztopina 1X, 0,67 M NaCl, 100 mg/L tRNA in 100mg/L DNA iz lososove sperme) in sicer 0,45 mg/L, 0,9 mg/L in 1,3 mg/L .

Sonde smo pred nanosom denaturirali s segrevanjem na 80 °C (10 minut), na rezino smo nanesli 20 µL sonde v hibridizacijskem pufru. Sprva smo rezine prekrivali s parafilmom, kasneje smo ta postopek opustili. Stekelca z rezinami smo shranili v neprodušno zaprto in navlaženo posodo (s SSC 5X). Postopek hibridizacije je potekal čez noč (od 16 do 20 ur) pri temperaturi 45 °C.

Posthibridizacijska izpiranja so bila podobna kot pri metodi z radioaktivno označenimi sondami. Po 30 minutnem izpiranju v SSC 6X, je sledilo izpiranje s 20 % formamidu v SSC 0,5X (10 minut), nato še izpiranje v SSC 2X. Po inkubaciji rezin z RNazo A, kot je opisano pri prvi metodi hibridizacije *in situ*, smo dvakrat ponovili izpiranje s 20 % formamidom v SSC 0,5X (10 minut). Nato smo rezine izpirali še v SSC 2X in maleinskem pufru (0,1 M maleinska kislina, 0,15 M NaCl, pH 7,5).

Za prikaz mesta vezave sond v tkivu smo uporabili komplet (DIG Nucleic Acid Detection Kit) proizvajalca Roche. Možno nespecifično vezavo protiteles smo želeli preprečiti z namakanjem rezin v 5 % raztopini reagenta za blokado (Blocking reagent) v maleinskem pufru in sicer dvakrat po 15 minut in nato še 1 uro. Nato smo rezine inkubirali čez noč pri 4 °C s protitelesom proti digoksigeninu, na katerega je vezana alkalna fosfataza. Uporabili smo 1:200 in 1:2000 razredčitvi protitelesa v 1 % raztopini reagenta za blokado v maleinskem pufru.

Po izpiranju v maleinskem pufru (trikrat po 10 minut) in 10 minut v detekcijskem pufru (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5, 0,1M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub> in 0,1 % Tween-20) smo rezine čez noč (približno 18 ur) inkubirali s substratom za barvno reakcijo NBT/BCIP (0,340 g/L NBT in 0,180 g/L BCIP) v detekcijskem pufru, ki smo mu dodali 10 % polivinil alkohol (PVA) in 1 mM levamisol, ki je zaviralec endogenih fosfataz. Rezine smo večinoma inkubirali v vertikalnem položaju, potopljene v substrat v neprodušno zaprti posodi. V nekaj primerih smo raztopino substrata v detekcijskem pufru nakapali na rezino in stekelca za čas inkubacije shranili v vodoravnem položaju v neprodušno zaprti posodi. Reakcijo smo ustavili z 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 in 1 mM EDTA. Rezine smo pokrili z želatino v glicerolu.

### **3.5 KONTROLNI IMUNOHISTOKEMIJSKI PRIKAZ MHC**

Z namenom, da bi preverili, ali so se sonde specifično vezale na ustreznna mesta v tkivu, smo na zaporednih rezinah vzorcev, katere smo analizirali s tehniko hibridizacije *in situ*, imunohistokemijsko dokazovali še prisotnost izoblik MHC (I, IIA in IIX).

Izooblike MHC v vlaknih smo prikazali z monoklonskimi protitelesi, specifičnimi za izooblike MHC podgane (13). S protitelesom BA-D5 smo prikazali počasno izoobliko ali MHC-I, hitri izoobliki MHC-IIA in -IIX smo poizkušali dokazati s protitelesom SC-71, specifičnim za MHC-IIA podgane in BF-35, ki prepozna vse izooblike MHC podgane, razen -IIX.

Primarna protiteesa, ki so bila prisotna v supernatantu celičnih kultur hibridoma celic, smo na osnovi testiranj primerno razredčili s PBS, kateremu smo dodali 0,3 % govejega serumskega albumina (PBS/GSA). Rezine smo inkubirali v hladilniku pri 4 °C čez noč, nato smo protitelo odstranili z dvakratnim izpiranjem v PBS. Reaktivnost primarnih monoklonskih protiteles smo prikazali z indirektno imuno peroksidazno metodo (29). Kot sekundarna protiteesa smo uporabili s peroksidazo konjugirane kunčje imunoglobuline, pridobljene proti mišjim imunoglobulinom (P 260, Dakopats). Sekundarna protiteesa smo razredčili v razmerju 1:40 s PBS/GSA, temu mediju smo dodali še podganji predimunski serum (1:40), da bi preprečili nespecifično vezavo protiteles.

Inkubacija s sekundarnim protitelesom je potekala pri sobni temperaturi 1 uro. Po izpiranju s PBS (3 do 4-krat), smo prikazali aktivnost peroksidaze tako, da smo rezine inkubirali v mediju, ki je vseboval 0,2 M acetatni pufer (pH 5,2), 0,05 % diaminobenzidin in 0,01 % vodikov peroksid kot substrat. Po 5-10 minutah inkubacije v temi smo reakcijo prekinili s kratkim izpiranjem v PBS, rezine smo nato dehidrirali in vklopili v kanadski balzam. Na mestu vezave primarnega in sekundarnega protitelesa se je diaminobenzidin pretvoril v temno do zlato rjavo obarvan kondenzacijski produkt.

### **3.6 MATERIALI IN OPREMA**

- dietilpirokarbonat, Sigma, St.Louis, ZDA
- 3-aminopropiletoksilan, Sigma, St.Louis, ZDA
- paraformaldehid, Sigma, St.Louis, ZDA
- etanol, p.a., Merck, New Jersey, ZDA
- (hidroksimetil)-aminometan-HCl, Merck, New Jersey, ZDA
- MgCl<sub>2</sub>, Merck, New Jersey, ZDA
- spermidin, Sigma, St.Louis, ZDA
- ditiotreitol, Sigma, St.Louis, ZDA
- adenozin-5'-trifosfat, Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska

- citidin-5'-trifosfat, Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska
- gvanozin-5'-trifosfat, Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska
- uridin-5'-trifosfat, označen z izotopom žvepla ( $^{35}\text{S}$ ), Du Pont, Wilmington, ZDA
- Na acetat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- fenol, Sigma, St.Louis, ZDA
- kloroform, Sigma, St.Louis, ZDA
- DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7), Roche, Basel, Švica
- encim inhibitor RNAAz, Roche, Basel, Švica
- encim RNA polimeraza, Roche, Basel, Švica
- encim DNAaza I, Roche, Basel, Švica
- ovčja poliklonska protitelesa, označena z alkalno fosfatazo, Dako, Glostrup, Danska
- 5-bromo-4-kloro-3-indolil-fosfat, Roche, Basel, Švica
- nitroblue-tetrazolium-klorid, Roche, Basel, Švica
- NaCl, Merck, New Jersey, ZDA
- encim proteinaza K, Fermentas, Ontario, Kanada
- trietanolamin, Sigma, St.Louis, ZDA
- anhidridna kislina, Sigma, St.Louis, ZDA
- etilendiamintetraocetna kislina, Merck, New Jersey, ZDA
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- dekstran sulfat, Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska
- ficoll, Sigma, St.Louis, ZDA
- polivinilpirolidon, Sigma, St.Louis, ZDA
- goveji serumski albumin, Sigma, St.Louis, ZDA
- formamid, Merck, New Jersey, ZDA
- Na-citrat, Analyticals, Carlo Erba, Milano, Italija
- avtoradiografska emulzija, Kodak, ZDA
- razvijalec, Kodak, ZDA
- fiksir, Kodak, ZDA
- balzam, Fluka, St. Gallen, Švica
- eozin, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- maleinska kislina, Sigma, St.Louis, ZDA
- DIG Nucleic Acid Detection Kit, Roche, Basel, Švica
- polivinil alkohol, Wacker-Chemie GmbH, Munchen, Nemčija
- levamisol, Sigma, St.Louis, ZDA
- glicerol želatina, Sigma, St.Louis, ZDA

- primarna protitelesa, Schiaffino in sod., 1989, Padova, Italija
  - sekundarna protitelesa, Dako, Glostrup, Danska
  - diaminobenzidin, Sigma, St.Louis, ZDA
  - vodikov peroksid, Merck, New Jersey, ZDA
  - tween, Sigma, St.Louis, ZDA
  - Na dodecil sulfat, Sigma, St.Louis, ZDA
- 
- Reichert-Young 2800 Frigocut, Heidelberg, Nemčija
  - scintilacijski števec, LKB Wallac, Ontario, Kanada
  - avtoklav, international pbi S.p.A., Milano, Italija

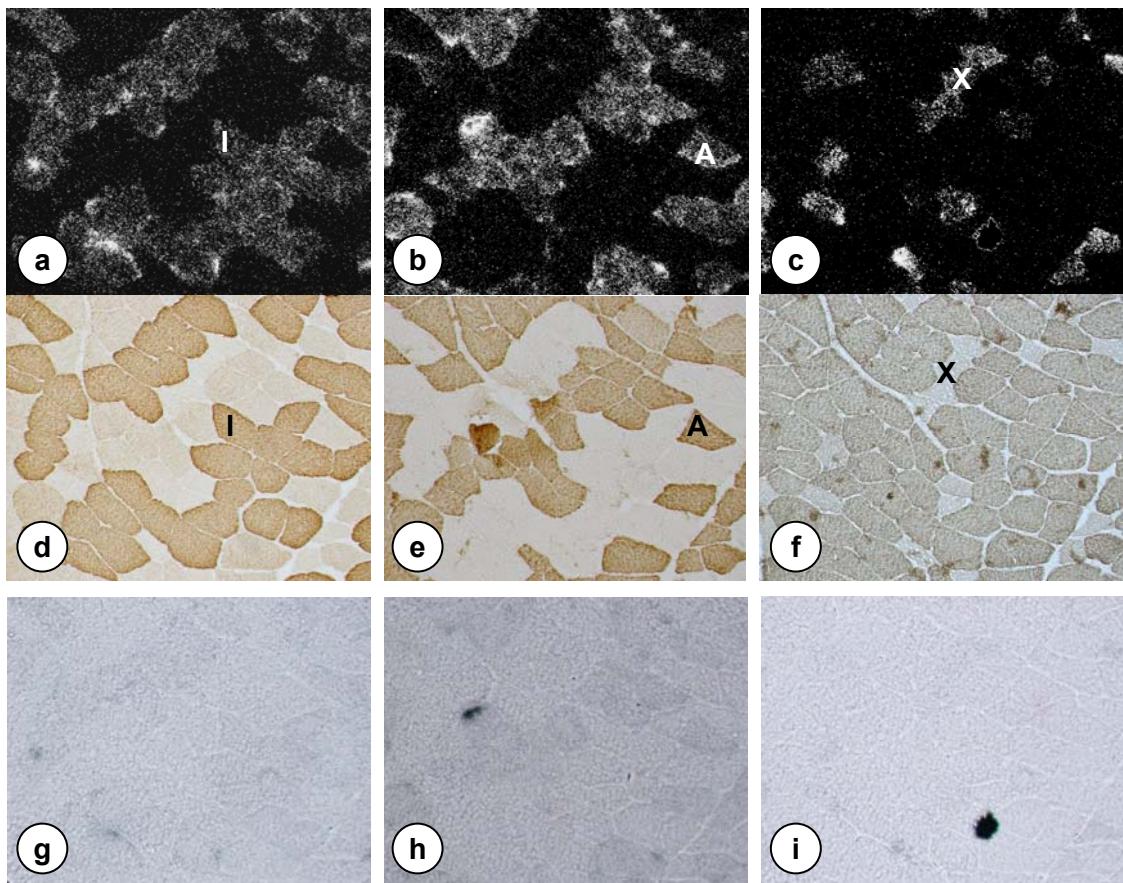
## **4. REZULTATI IN DISKUSIJA**

Na Inštitutu za anatomijo smo hibridizacijo *in situ* z radioaktivno označenimi sondami uporabljali pri mišičnih raziskavah pred nekaj leti. Isto metodo z neradioaktivno označenimi sondami pa smo preizkušali v preteklem letu. Zaradi tehničnih težav z zmrzovalno opremo so bili mišični vzorci, ki so bili vključeni v prvotno raziskavo, neuporabni za analizo z neradioaktivno označenimi sondami, zato so bili v drugi del raziskave vključeni drugi vzorci istoimenskih mišic.

Ker smo pri postopku hibridizacije *in situ* dokazovali prisotnost mRNA z RNA sondami, smo morali neprestano upoštevati možnost kontaminacije raztopin in uporabljenih materialov z encimom RNAAzo, ki razgradi RNA. Ta encim je namreč prisoten povsod, tudi na koži in je termostabilen. Zato smo pri delu ves čas uporabljali rokavice in posebno, samo za ta postopek namenjeno, sterilno laboratorijsko steklovino, ki smo jo pred prvo uporabo več ur namakali v 0,1 % vodni raztopini dietilpirokarbonata, ki inaktivira RNAAze.

### **4.1 HIBRIDIZACIJA *IN SITU* Z RADIOAKTIVNO OZNAČENIMI SONDAMI**

Da bi preverili rezultate hibridizacije *in situ* z radioaktivno označenimi sondami, smo emulzijo na nekaj stekelcih praviloma razvili po 7 dneh. Na serijskih rezinah, obdelanih po metodi hibridizacije *in situ* in imunohistokemije, smo poiskali isto mesto. Rezultati hibridizacije *in situ* z radioaktivno označenimi sondami za MHC-1, -2a in -2x v mišici vastus lateralis so prikazani na sliki 3.

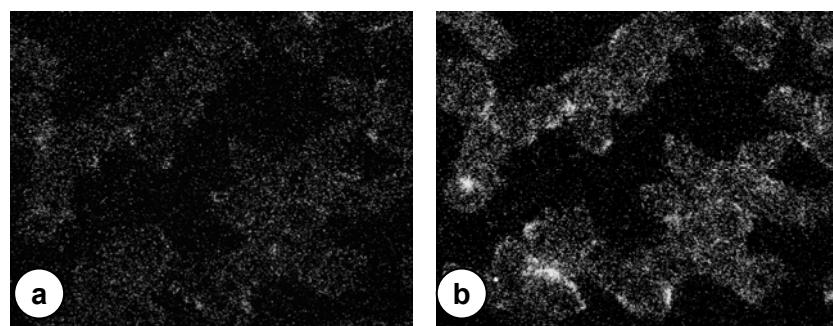


Slika 3. Hibridizacija *in situ* z radioaktivno ( $^{35}\text{S}$ -UTP) označeno sondo 1 (a), 2a (b) in 2x (c) v mišici *vastus lateralis*; fotografirano v temnem (a-c) in svetlem (g-i) vidnem polju ter imunohistokemičen prikaz izoblik MHC s specifičnimi protitelesi: d. BA-D5 (MHC-I), e. SC-71 (MHC-IIA in -IIX) in f. BF-35 (MHC-I in MHC-IIA). Na slikah je označeno vlakno tipa I (I), ki je obarvano s protitelesom BA-D5 (d) in izraža 1-MHC prepise (a), vlakno tipa IIA (A) je obarvano s SC-71 (e) in izraža 2a-MHC prepise (b), vlakno tipa IIX (X) je neobarvano s BF-35 (f) in izraža 2x-MHC prepise (c).

Rezine smo sprva pregledali v svetlem vidnem polju s faznim kontrastom in poiskali določeno mesto, ki smo ga fotografirali. Nad mestom vezave sonde so bila v emulziji temna zrnca srebrovega halogenida (slika 3 g-i). Nato smo isto mesto fotografirali še v temnem vidnem polju, pri tej vrsti mikroskopiranja pa so bila zrnca svetla (slika 3 a-c). V večini počasnih vlaken, ali tipu I, ki smo ga prikazali s protitelesom BA-D5 je hibridizirala sonda 1, v vlaknih tipa IIA in IIX, ki ju v vseh mišicah s protitelesi nismo uspeli razlikovati, pa sta hibridizirali sonda 2a ali 2x. V nekaj vlaknih tipa II pa sta hibridizirali obe sondi, očitno gre pri teh vlaknih za t.i. hibridna vlakna, ki smo jih poimenovali IIAX. Tudi v vlaknih tipa IIC, ki so izražala hkrati MHC-I in -IIA, sta večinoma hibridizirali sonda 1 in 2a. V manjšem številu vlaken pa izražena vrsta prepisov mRNA ni bila skladna z izraženo izobliko MHC, ki smo jo prikazali s protitelesi. Takšna neskladnost je verjetno posledica pretvorbe tipov mišičnih vlaken oziroma

pretvorbe iz enega tipa vlakna v drugega. Ta proces se začne najprej na nivoju genov z izklapljanjem enega gena in aktiviranjem drugega gena. Temu sledi izražanje ustreznega »novega« mRNA prepisa v vlaknu, v katerem pa do zamenjave na nivoju proteina (izooblike MHC) še ni prišlo. Zato sklepamo, da so vlakna z neskladno izraženostjo mRNA prepisov in izoobliko MHC dejansko vlakna v procesu pretvorbe (20).

Po 10 dneh pa smo razvili emulzijo še na preostalih stekelcih, kajti rezultati so bili izrazitejši po daljšem časovnem obdobju po nanosu emulzije (slika 4).



Slika 4. *Hibridizacija in situ z radioaktivno označeno sondou 1 v mišici vastus lateralis po 7-dnevni (a) in 20-dnevni (b) ekspoziciji avtoradiografske emulzije; pri slednji so rezultati izrazitejši.*

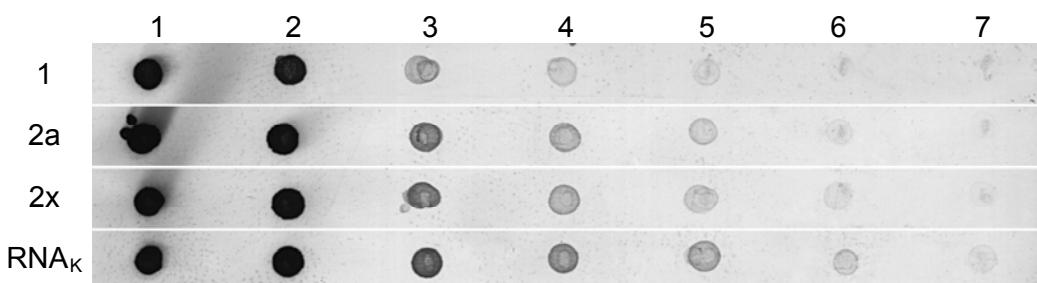
Rezultati hibridizacije *in situ* kljub enakim pogojem niso bili vedno enako intenzivni; na nekaterih vzorecih mišic, ki smo jih izločili iz raziskave, so celo izostali. Očitno je v teh mišicah prišlo do razgradnje mRNA iz nam neznanih razlogov. Opazili smo, da so rezultati v primeru sonde 2a nekoliko šibkejši kot pri ostalih dveh sondah. Vzroka za to ne moremo jasno določiti. Morda so mRNA prepisi šibkeje izraženi, ali pa je to problem same sonde, ki ga tudi ne znamo pojasniti.

Kot že omenjeno, je delo z izotopi dokaj zahtevno in zato predstavlja precejšnjo pomankljivost hibridizacije *in situ* z radioaktivno označenimi sondami. Izotop in avtoradiografska emulzija predstavljata dokaj velik strošek. Dodatno pomankljivost radioaktivne metode predstavlja tudi relativno dolgo časovno obdobje, ki je potrebno, da dobimo rezultate, t.j. od enega do 2 tednov ali celo več. Zaradi omenjenih slabosti in v želji po uporabi zdravju in okolju manj škodljive metode, smo se odločili za uporabo neradioaktivno označenih sond.

## 4.2 PRIPRAVA SOND, OZNAČENIH Z DIGOKSIGENINOM

Količina sintetizirane sonde v našem primeru je bila večinoma bistveno manjša od pričakovane (od 1-3 µg), zlasti v primeru sonde 1 (le 10 ng). Domnevali smo, da so te težave v določeni meri lahko posledica le okvirne ocene vhodne koncentracije DNA matrice, zato smo količino preventivno podvojili iz priporočenega 1 µg na 2 µg. Po priporočilu proizvajalca smo poiskusili povečati koncentracijo sintetizirane sonde tudi z večkratnim (do 5-kratnim) povečanjem količin ostalih komponent kompleta za neradioaktivno označevanje nukleinskih kislin. Šele z uvedbo teh sprememb smo uspeli pridobiti višje koncentracije sond, ki so zadostovale za več poizkusov (od 3-9 µg).

Količino sintetizirane sonde smo določevali skladno s priporočili proizvajalca po metodi točkovnega pivnanja, kjer smo primerjali različne razredčitve sonde z enakimi razredčitvami kontrolne RNA, označene z digoksigeninom (slika 5).



Slika 5. Določanje koncentracije sintetiziranih sond 1, 2a in 2x glede na obarvanje kontrolne, t.j. predhodno označene RNA ( $RNA_k$ ) po metodi točkovnega pivnanja. Osnovna koncentracija  $RNA_k$  in predvidoma tudi sond je bila 10 mg/L (1), naslednje razredčitve osnovne koncentracije  $RNA_k$  in sond so: 1:10 (2), 1:1000 (3), 1:3300 (4), 1: $10^4$  (5), 1:  $3,3 \times 10^4$  (6), 1: $10^5$  (7). S primerjavo intenzivnosti obarvanja posameznih razredčitev sond in  $RNA_k$ , smo ocenili približno koncentracijo sintetiziranih sond.

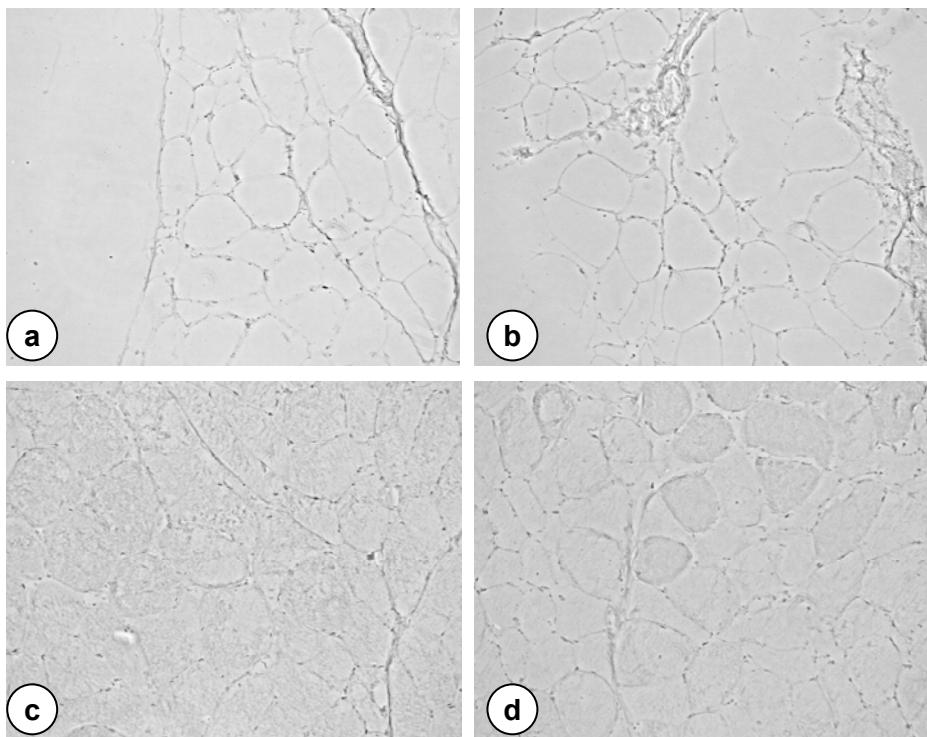
Ta metoda za oceno količine sintetizirane sonde, ki temelji na primerjalni oceni kolorimetrične reakcije različnih razredčitev sonde in kontrolne, z digoksigeninom označene RNA, s poznano koncentracijo, je po naših izkušnjah zahtevna.

Kljub temu, da smo natančno sledili navodilom, smo pogosto dobili nejasne rezultate in smo vrednotenje koncentracije sonde morali večkrat ponavljati.

#### **4.3 HIBRIDIZACIJA IN SITU Z NERADIOAKTIVNO OZNAČENIMI SONDAMI**

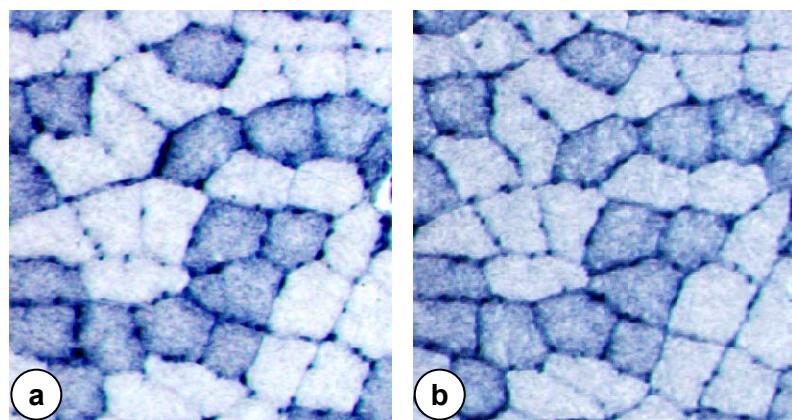
Z uporabo sond označenih z digoksigeninom smo dosegli rezultate, ki so primerljivi z rezultati, dobljenimi z radioaktivno označenimi sondami. Čeprav smo sledili postopku hibridizacije *in situ* (21), se je že na začetku izkazalo, da je potrebno postopek na osnovi izkušenj iz poizkusov delno spremeniti. Ugotovili smo, da je fiksacija rezin pred zmrzovanjem nujno potrebna za zagotovitev kvalitetnih rezultatov. Pri prvih poizkusih so se rezine že med predhibridizacijskim postopkom odlepile s predmetnega stekelca. V primeru nekaterih mišic, zlasti paravertebralnih, je bilo odlepljanje popolno, pri drugih mišicah pa le delno. Problem odlepljanja rezin v predhibridizacijskem postopku smo rešili s sušenjem rezin neposredno po rezanju na 50 °C 1,5 ure. Zelo dobro so se glede tega problema obnesla tudi stekelca Superfrost Plus in Histobond, ki smo jih preizkusili v zadnjem poizkusu. Odločili smo se, da jih bomo uporabljali namesto stekelc, prevlečenih z APES, saj se bomo tako izognili tudi zamudni pripravi predmetnih stekelc.

Drugi problem, na katerega smo naleteli, pa so bila takorekoč »prazna vlakna«. Ugotovili smo namreč, da veliko vlaken v rezini ne vsebuje citoplazme, dejansko so bile rezine kot mreža, katere nitke je predstavljalo vezivo med vlakni (slika 6). Ker sta bila koncentracija proteinaze K in čas obdelave rezin s tem encimom v postopku po Hortonu in sodelavcih (21) bistveno višja, oziroma daljša (30–45 mg/L, 20 minut) (slika 6 a), kot pa tista, ki smo jo uporabljali v postopku z neradioaktivno označenimi sondami (20 mg/L, 7,5 minute), smo domnevali, da prihaja do razgradnje citoplazme vlaken. S preizkušanjem različnih koncentracij proteinaze K (10–45 mg/L) in časa obdelave (od 3–20 minut), smo ugotovili, da sta koncentracija (20 mg/L) in čas obdelave (7,5 minute) pri hibridizaciji *in situ* z neradioaktivno označenimi sondami na sobni temperaturi najustreznejša. Tudi problem odlepljanja rezin se je zmanjšal.



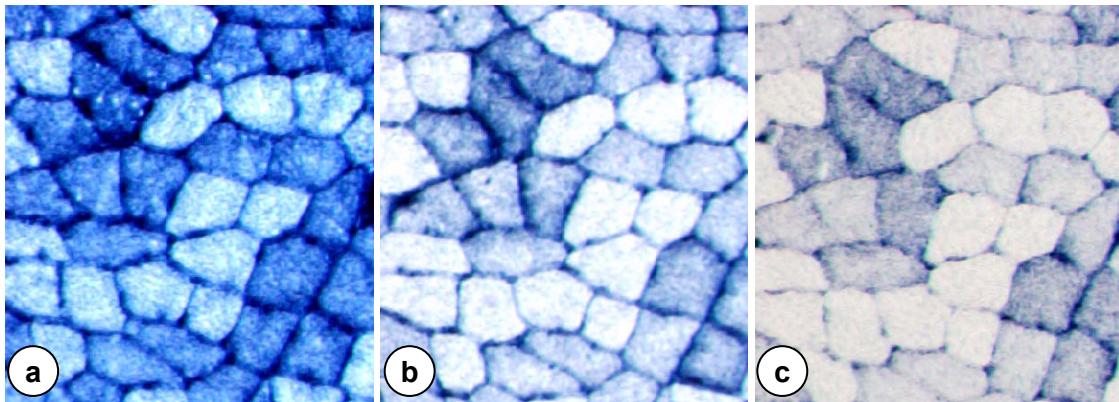
Slika 6. Določanje primerne koncentracije proteinaze K za pripravo rezin na hibridizacijo *in situ*: a. 45 mg/L, 20 minut na sobni temperaturi; b. 30 mg/L, 20 minut na sobni temperaturi; c. 20 mg/L, 3 minute pri 37 °C in d. 20 mg/L, 7,5 minute na sobni temperaturi.

Ker so bili rezultati prvih preizkusov šibki, smo zvečali koncentracijo sonde iz priporočenih 0,5 mg/L na 1,3 mg/L. Ker so bili rezultati še vedno nejasni, smo poizkusili z višjo koncentracijo protitelesa proti digoksigeninu, namesto priporočene 1:5000 smo uporabili koncentracijo 1:2000, ki se je izkazala za primernejšo (slika 7b). Pri še višji preverjeni koncentraciji protitelesa 1:200 so bili rezultati bolj zabrisani (slika 7a).



Slika 7. Hibridizacija *in situ* z digoksigeninom označeno sondijo 1 v mišici biceps femoris. Za prikaz vezave sonde smo uprabili dve različni razredčitvi protitelesa proti digoksigeninu: a. 1:200 in b. 1:2000.

Z opisanimi spremembami postopka smo dobili dobre rezultate s sondo 1 in 2x, ne pa s sondo 2a, v primeru te so bile rezine v celoti močno obarvane. Šele z zmanjševanjem koncentracije te sonde na 0,45 mg/L smo dosegli željene rezultate (slika 8).

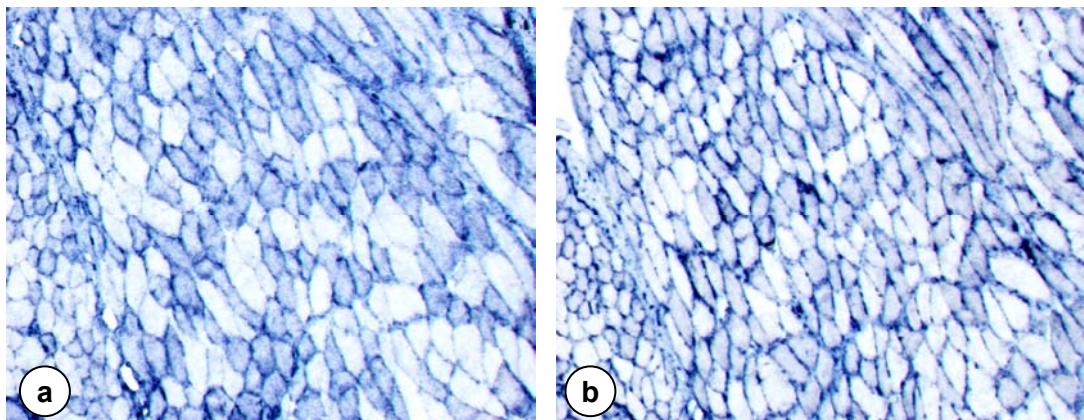


Slika 8. *Hibridizacija in situ* z različnimi koncentracijami neradioaktivno označene sonde 2a v mišici biceps femoris: a. 1,3 mg/L; b. 0,9 mg/L in c. 0,45 mg/L. Koncentracija protitelesa proti digoksigeninu je bila 1:200.

Glede na to sklepamo, da je ključen faktor za doseganje dobrih rezultatov pri postopku hibridizacije *in situ* tudi ustrezna koncentracija uporabljene sonde. Kot smo že omenili, je ocena koncentracije sintetizirane sonde, kot jo priporoča proizvajalec kompleta za neradioaktivno označevanje nukleinskih kislin, le okvirna kolorimetrična metoda, ki kljub natančnemu delu ne omogoča vedno jasne ocene koncentracije sonde. Zato je bilo po vsaki novi sintezi sonde potrebno empirično, z uporabo različnih razredčitev določiti ustrezno koncentracijo sonde, ki nam je omogočala najboljše rezultate. Glede na naše izkušnje, je potrebno prilagoditi koncentracijo sonde tudi za posamezne mišične vzorce, saj nam ista koncentracija sonde ni dala enakih rezultatov na različnih mišičnih vzorcih, ki so bili na istem stekelcu in so bili torej podvrženi enakim pogojem med samim postopkom.

Ker smo hkrati spreminali koncentracijo sonde in protitelesa, težko ocenimo kolikšen je delež teh sprememb pri izboljšanju rezultatov. Poleg tega smo sledili priporočilom Dijkmana in sodelavcev (35), ki so ugotovili, da pokrivanje rezin s predmetnimi stekelci ali parafilmom po nanosu sonde zmanjša hibridizacijski signal. Zato smo pokrivanje rezin s parafilmom opustili, s tem pa smo si prihranili tudi čas in olajšali delo pri nanašanju sond ter kasneje pri posthibridizacijskih izpiranjih, ko se pri odstranjevanju parafilma lahko poškoduje rezina.

Po priporočilih istega avtorja (35) smo rezine inkubirali s substratom tako, da smo jih vanj potopili v navpičnem položaju. Tak pristop je zahteval večje količine substrata na stekelce, to je najmanj 30 mL detekcijskega pufra s substratom za največ 16 stekelc v eni kiveti. Vendar smo ugotovili, da tudi nanašanje raztopine substrata na rezine, za kar zadostuje približno 400  $\mu$ L, zagotavlja enako kvalitetne rezultate, hkrati pa zmanjšuje stroške porabe substrata in drugih sestavin detekcijskega pufra (slika 9).



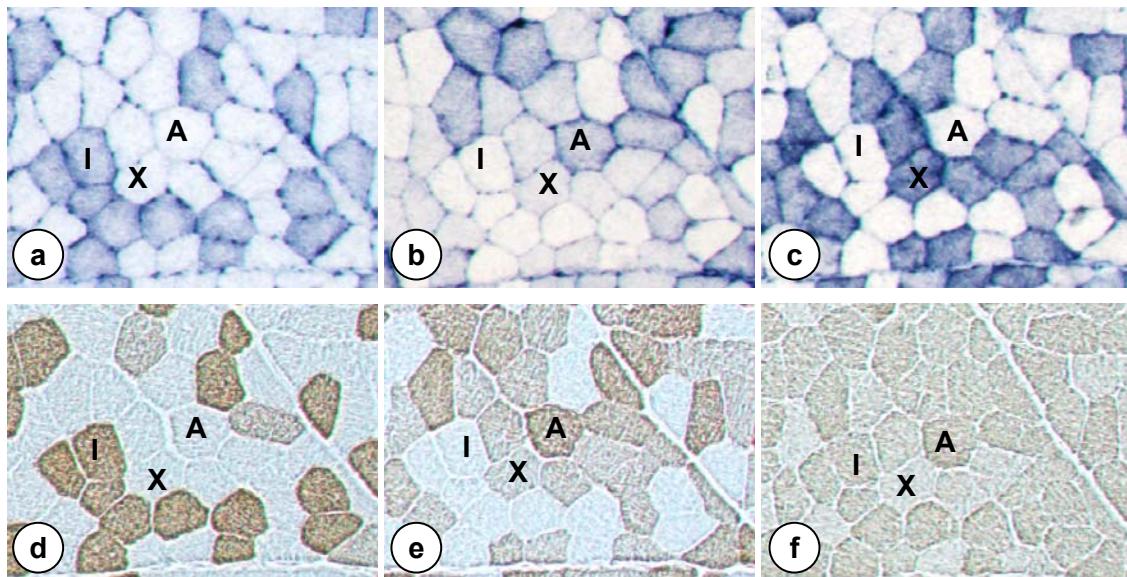
Slika 9. Hibrizacija *in situ* z neradioaktivno označeno sondno 2a; rezine so bile potopljene v substrat NTB/BCIP (a), ali pa smo ga nakapljali na rezino (b).

Da bi dodatno izboljšali rezultate, smo medij s substratom zgostili z 10 % polivinil alkoholom (36). Z dodatkom polivinil alkohola, ki ima visoko molekulsко težo, preprečimo difuzijo indoksila, ki nastaja pri reakciji ter tako povečamo intenziteto in občutljivost reakcije, saj oborina ostaja nad mestom hibrizacije v tkivu. Kot je bilo že navedeno, zaradi spremjanja postopka hibrizacije *in situ* na več točkah, neposrednega doprinosa uporabe polivinil alkohola k kvaliteti rezultatov ne moremo oceniti. Ne glede na to, se nam zdi uporaba polivinil alkohola potrebna zlasti v primeru, ko se substrat nanaša na rezino. Zgoščen medij se namreč težje razlije s stekelca ter težje izhlapi.

Čas inkubacije rezin s substratom za alkalno fosfatazo je bil v naših poizkusih približno 18 ur, vendar smo lahko šibko obarvanje vlaken zaznali že po 4-6 urah, vsekakor pa je bilo to obarvanje po nadaljnih 12 urah intenzivnejše. Zaradi tega in zaradi organizacije dela smo rezine inkubirali čez noč, nekaj ur po nanosu substrata pa smo se že lahko prepričali, če je poizkus uspel.

Rezultati hibrizacije sond označenih z digoksigeninom so pokazali enak vzorec izražanja prepisov mRNA za MHC glede na prikazane izoblike MHC v vlaknih kot smo ga opisali v primeru hibrizacije *in situ* z radioaktivno označenimi sondami. Toda

v tem primeru so bili rezultati znani že peti dan po začetku poizkusa. Rezine smo lahko pregledovali le v svetlem vidnem polju, kjer smo hkrati lahko zaznali mesta, kjer so se sonde vezale in prepoznali določeno mesto v rezini (slika 10).



Slika 10. Hibridizacija *in situ* z digoksigeninom označeno sondijo 1 (a), 2a (b) in 2x (c) v mišici *biceps femoris* ter imunohistokemijski prikaz MHC-I s protitelesom BA-D5 (d), MHC-IIA s SC-71 (e) in MHC-IIB s BF-35 (f). Vlakna tipa I (I) so se obarvala z BA-D5 in so izražala 1-MHC prepise, vlakna tipa IIa (A) so se intenzivno obarvala s SC-71 in so izražala 2a-MHC prepise, vlakna tipa IIb (X) so se šibkeje obarvala s SC-71 in bila neobarvana z BF-35, izražala pa so 2x-MHC prepise.

Tudi pri neradioaktivni različici metode smo ugotovili, da v nekaterih vzorcih nismo uspeli prikazati iskanih prepisov mRNA in domnevamo, da je tudi v teh vzorcih iz neznanih razlogov prišlo do razgradnje mRNA.

Ne glede na vse težave pri uvedbi metode z neradioaktivno označenimi sondami, smo ugotovili, da ima ta metoda številne prednosti v primerjavi hibridizacije *in situ* z radioaktivno označenimi sondami. Visoka občutljivost metode, občutno krajsi čas celotnega postopka, večja varnost ter stabilnost sond so prednosti zaradi katerih smo se na Inštitutu za anatomijsko odločili hibridizacijo *in situ* z radioaktivno označenimi sondami nadomestili z uporabo sond, označenih z digoksigeninom.

## **5. ZAKLJUČKI**

1. Glede na rezultate te raziskave sklepamo, da je kljub nekaterim težavam pri uvedbi metode hibridizacije *in situ* z digoksigeninom označenimi sondami, ta metoda enako občutljiva kot metoda z radioaktivno označenimi sondami.
2. Problem odlepljanja mišičnih rezin v predhibridizacijskem postopku smo rešili s sušenjem rezin neposredno po rezanju na 50 °C 1,5 ure. Namesto predmetnih stekelc prevlečenih z APES so se bolje obnesla predmetna stekelca s pozitivnim nabojem.
3. V primeru hibridizacije *in situ* z neradioaktivno označenimi sondami je fiksacija mišičnih rezin pred zmrzovanjem nujno potrebna za zagotovitev kvalitetnih rezultatov.
4. Ključen faktor za doseganje dobrih rezultatov je tudi ustrezna koncentracija uporabljene sonde. Ugotovili smo, da je v primeru sonde 1 in 2x potrebna višja koncentracija (1,3 mg/L) od priporočene (0,5mg/L), v primeru sonde 2a pa je bila primernejša nižja koncentracija sonde (0,45mg/L).
5. S preizkušanjem različnih koncentracij proteinaze K smo ugotovili, da je koncentracija 20mg/L in čas obdelave 7,5 minute najustreznejša.
6. Ugotovili smo, da nanašanje raztopine substrata na mišične rezine zagotavlja enako kvalitetne rezultate, kot če bi jih potopili v raztopino s substratom, hkrati pa zmanjšuje stroške porabe substrata in drugih sestavin detekcijskega pufra.
7. Da bi dodatno izboljšali rezultate, smo medij s substratom zgostili z 10 % polivinil alkoholom. S tem smo tudi zmanjšali nevarnost, da se medij razlije in izhlapi.
8. Najprimernejša koncentracija protitelesa proti digoksigeninu je bila 1:2000, namesto priporočene 1:5000.
9. Uporaba z digoksigeninom označenih sond je cenejša, čas za pridobitev rezultatov je bistveno krajsi, večja varnost ter stabilnost sond so prednosti, zaradi katerih smo se na Inštitutu za anatomijsko odločili hibridizacijo *in situ* z radioaktivno označenimi sondami nadomestili z uporabo sond, označenih z digoksigeninom.

## 6. LITERATURA

1. Engel AG, Banker BQ. Myology. New York: Mc Graw-Hill Book Inc. 1986: 419-37.
2. Ranzier LA. De quelques faits relatifs à l' histologie et à la physiologie des muscles striés. Archives de Physiologie Normale et Pathologique Deuxième Série 1874; 5-15.
3. Engel WK. The essentially of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular diseases. Neurology 1962; 12: 778-84.
4. Bárány M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. J Gen Physiol 1967; 50: 197-218.
5. Guth L, Samaha FJ. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. Exp Neurol 1969; 25: 138-52.
6. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? Arch Neurol 1970; 23: 369-79.
7. Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. Biochemistry 1972; 11: 2627-33.
8. Dubowitz V. Histological and histochemical stains and reactions. In: Dubowitz V, ed. Muscle biopsy. London: Bailliere Tindall; 1985. pp. 19-40.
9. Pierobon-Bormioli S, Sartore S, Dalla Libera L, Vitadello M, Schiaffino S. 'Fast' isomyosins and fiber types in mammalian skeletal muscle. J Histochem Cytochem 1981; 29: 1179-88.
10. Biral D, Betto R, Danieli-Betto D, Salviati G. Myosin heavy chain composition of single fibres from normal human muscle. Biochem J 1988; 250: 307-8.
11. Allbrook D. Skeletal muscle regeneration. Muscle Nerve 1981; 4: 234-45.
12. Schiaffino S, Saggin L, Viel A, Ausoni S, Sartore S, Gorza L. Muscle fiber types identified by monoclonal antibodies to myosin heavy chains. In: Benzi G, Packer L, Siliprandi N, eds. Biochemical aspects of physical exercise. Amsterdam: Elsevier; 1986. pp. 27-34.
13. Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Vianello M, Gundersen K, Lomo T. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. J Muscle Res Cell Motil 1989; 10: 197-205.
14. Bär A, Pette D. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. FEBS Lett 1988; 235: 153-5.
15. Termin A, Staron RS, Pette D. Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. Histochemistry 1989; 92: 453-7.

16. Bottinelli R, Betto R, Schiaffino S, Reggiani C. Maximum shortening velocity and coexistence of myosin heavy chain isoforms in single skinned fast fibres of rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 1994; 15: 413-19.
17. Weiss A, McDonough D, Wertman B, Acakpo-Satchivi L, Montgomery K, Kucherlapati R, Leinwand LA, Krauter K. Organization of human and mouse skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999a; 96: 2958-63.
18. Weiss A, Schiaffino S, Leinwand LA. Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: implication for functional diversity. *J Mol Biol* 1999b; 290: 61-75.
19. Smerdu V, Karsch-Mizrachi I, Campione M, Leinwand LA, Schiaffino S. Type IIX myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIX fibers of human skeletal muscle. *Am J Physiol* 1994; 267: C1723-8.
20. Smerdu V, Eržen I. Dynamic nature of fibre-type specific expression of myosin heavy chain transcripts in 14 different human skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 2001; 22 (8): 647-55.
21. Horton MJ, Brandon CA, Morris TJ, Braun TW, Yaw KM, Sciote JJ. Abundant expression of myosin heavy-chain IIB RNA in a subset of human masseter muscle fibres. *Arch Oral Biol* 2001; 57: 1039-50.
22. Pette D, Staron RS. Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol* 1997; 170: 143-223.
23. Baldwin K, Haddad F. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle. Invited review: Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscles. *J Appl Physiol* 2001; 90: 345-57.
24. Pette D, Peuker H, Staron RS. The impact of biochemical methods for single muscle fibre analysis. *Acta Physiol Scand* 1999; 166: 261-77.
25. Talmadge RL. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. *Muscle Nerve* 2000; 23: 661-79.
26. Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiological Review* 1996; 76: 371-423.
27. Nadal-Ginard B, Medford RM, Nguyen HT, Periasamy M, Wydro RM, Hornig D, Gubits R, Garfinkel LI, Weiczorek D, Bekesi E, Mahdavi V. Structure and regulation of a mammalian sarcomeric myosin heavy chain gene. In: Pearson ML, ed. *Muscle development: molecular and cellular control*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1982. pp. 143-68.

28. Termin A, Pette D. Changes in myosin heavy-chain isoform synthesis of chronically stimulated rat rabbit fast twitch muscle. *Eur J Biochem* 1992; 204: 569-73.
30. Rentrop M, Knapp B, Winter H, Schweizer J. Aminoalkylsilane-treated glass slides as support for *in situ* hybridization of keratin cDNAs to frozen tissue sections under varying fixation and pretreatment conditions. *Histochem J* 1986; 18: 271-276
29. Gorza L. Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 257-65.
31. Sassoon D, Garner I, Buckingham M. Transcripts of  $\alpha$ -cardiac and  $\alpha$ -skeletal actins are early markers for myogenesis in the mouse embryo. *Development (Camb.)* 1988; 104: 155-64.
32. Jostarndt K, Puntschart A, Hoppeler H, Billeter R. The use of 33 P-labelled riboprobes for *in situ* hybridizations: localization of myosin alkali light-chain mRNAs in adult human skeletal muscle. *Biochem J* 1994; 26: 32-40
33. Eizema K, van den Burg M, Kiri A, Dingboom EG, van Oudheusden H, Goldspink G, Weijs AW. Differential expression of equine myosin heavy-chain mRNA and protein isoforms in a limb muscle. *J Histochem Cytochem* 2003; 51 (9): 1207-1216
34. Kalhovde JM, Jerkovic R, Seflrand I, Cordonnier C, Calabria E, Schiaffino S, Lomo T. »Fast« and »slow« muscle fibres in hindlimb muscles of adult rats regenerate from intrinsically different satellite cells. *J Physiol.* 2005; 562 (3): 847-57
35. Dijkman HBPM, Mentzel S, de Jong AS, Assmann KJM. RNA *in situ* hybridization using digoxigenin-labeled cRNA probes. *Biochemica* 1995; 23-27
36. Deblock M, Debrouwer D. RNA-RNA *in situ* hybridization using digoxigenin-labeled probes: the use of high molecular weight polyvinyl alcohol in the alkaline phosphatase indoxyl-nitroblue tetrazolium. *Biochem A* 1993; 216: 88-89



# **PRIMERJAVA METOD HIBRIDIZACIJE *IN SITU* Z RADIOAKTIVNO IN NERADIOAKTIVNO OZNAČENIMI SONDAMI**

---

## **DIPLOMSKA NALOGA**

**Sonja Petkovšek**

Mentor: izr. prof. dr. Borut Božič, mag. farm., spec. med. biokem.  
Somentorica: doc.dr. Vika Smerdu, dr.vet.med.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

# UVOD

---

- Raznolikost mišičnih vlaken
  - tipi vlaken (reakcija za mATP-azo)

pH	I	IIC	IIA	IIAX(B)	IIX(B)
9,4					
4,6					
4,3					

# UVOD

---

## □ Miozinske težke verige (MHC)

počasi krčljiva, oksidativna vlakna ali tip I

MHC-I

hitro krčljiva, oksidativno-glikolitična vlakna ali tip IIA

MHC-IIA

hitro krčljiva, glikolitična vlakna ali tip IIB

MHC-IIB

prehodna ali intermediarna, oksidativna vlakna ali tip IIC

MHC-I+IIA

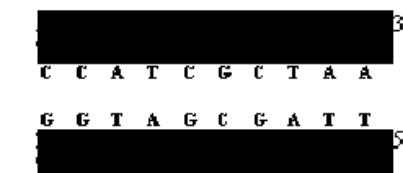
## □ Plastičnost skeletne mišice

MHC: I↔I/IIA↔IIA↔IIA/IIX↔IIX

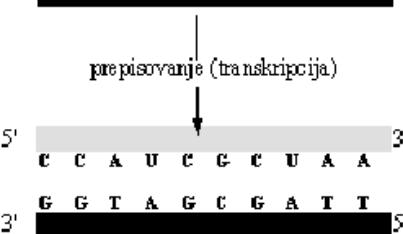
---

# UVOD

## □ Tehnika hibridizacije *in situ*



kromosomska DNA



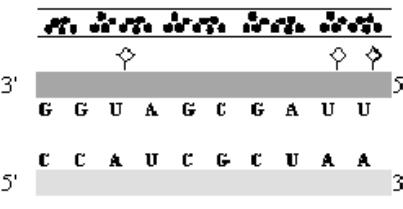
mRNA (informacijska) = genski prepis



cDNA (komplementarna)



RNA sonda, označena s  $^{35}\text{S}$ -UTP



radioaktivna  
RNA sonda  
mRNA  
tkivo

hibridizacija *in situ*

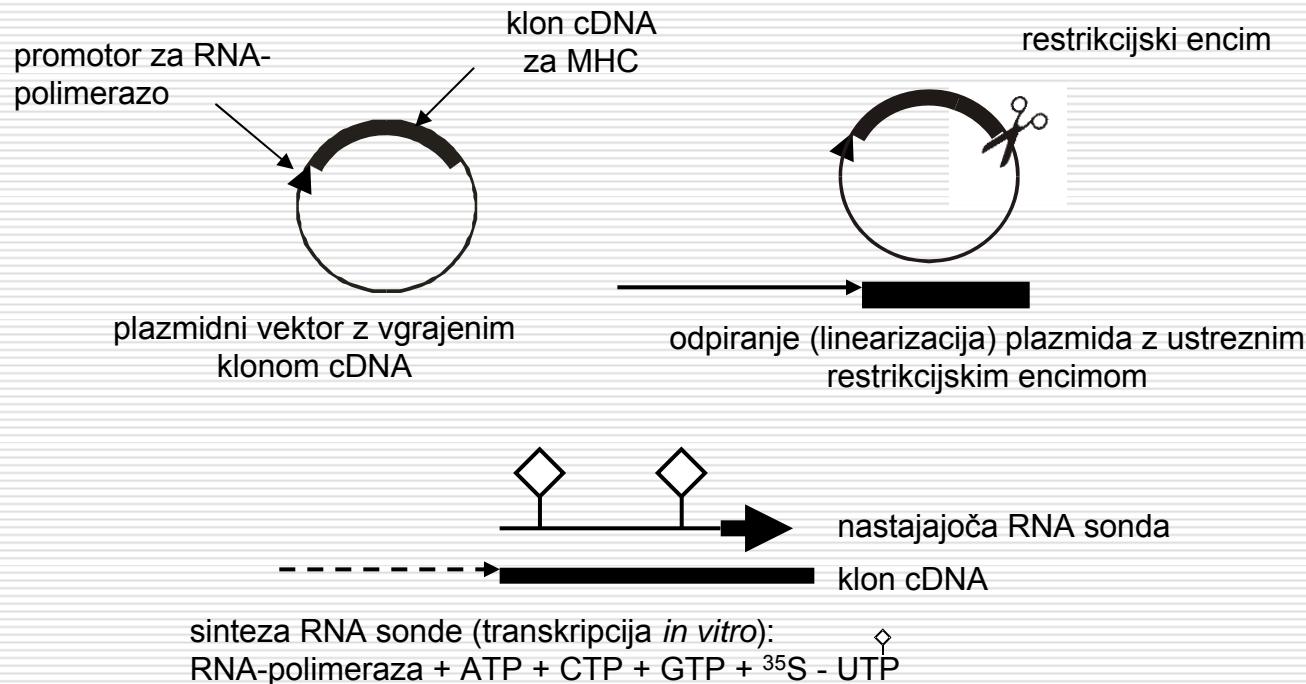
## NAMEN DELA

---

- nadgradnja obstoječih metod za določanje tipov vlaken
  - primerjava hibridizacije *in situ* z radioaktivno in neradioaktivno označenimi sondami
-

# MATERIALI IN METODE

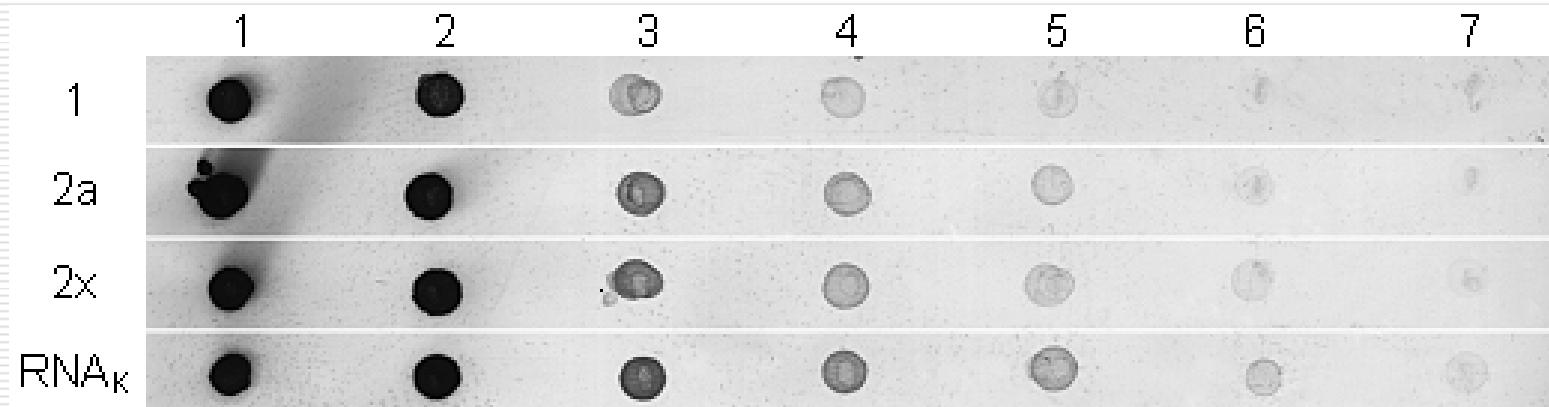
- Priprava mišičnih vzorcev
- Priprava sond



# MATERIALI IN METODE

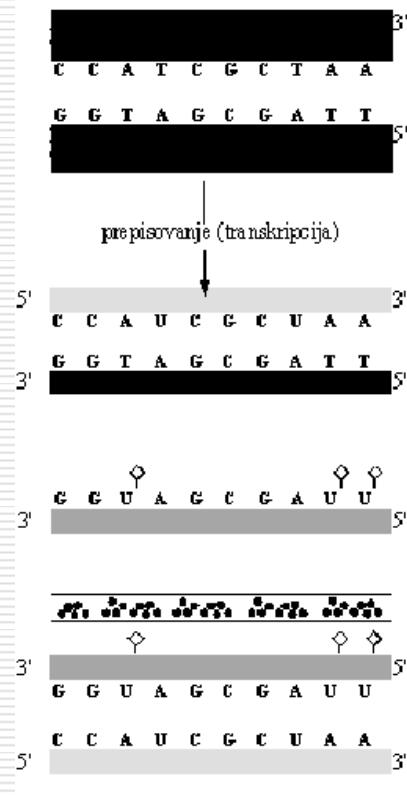
---

- določanje koncentracije neradioaktivne sonde s tehniko točkovnega pivnanja



# MATERIALI IN METODE

- Hibridizacija *in situ* z radioaktivno označenimi sondami

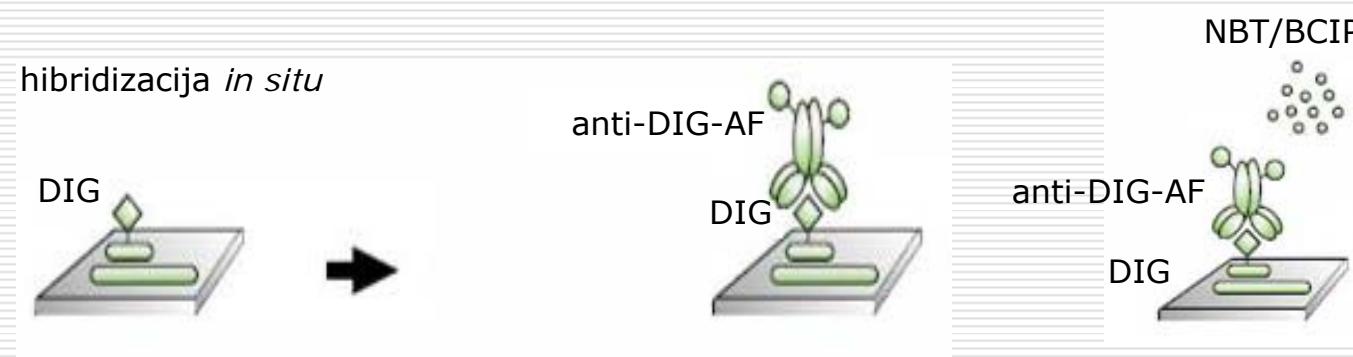


## ■ Avtoradiografija

# MATERIALI IN METODE

---

- hibridizacija *in situ* z neradioaktivno označenimi sondami
  - prikaz mesta vezave sond v tkivu s protitelesi



# MATERIALI IN METODE

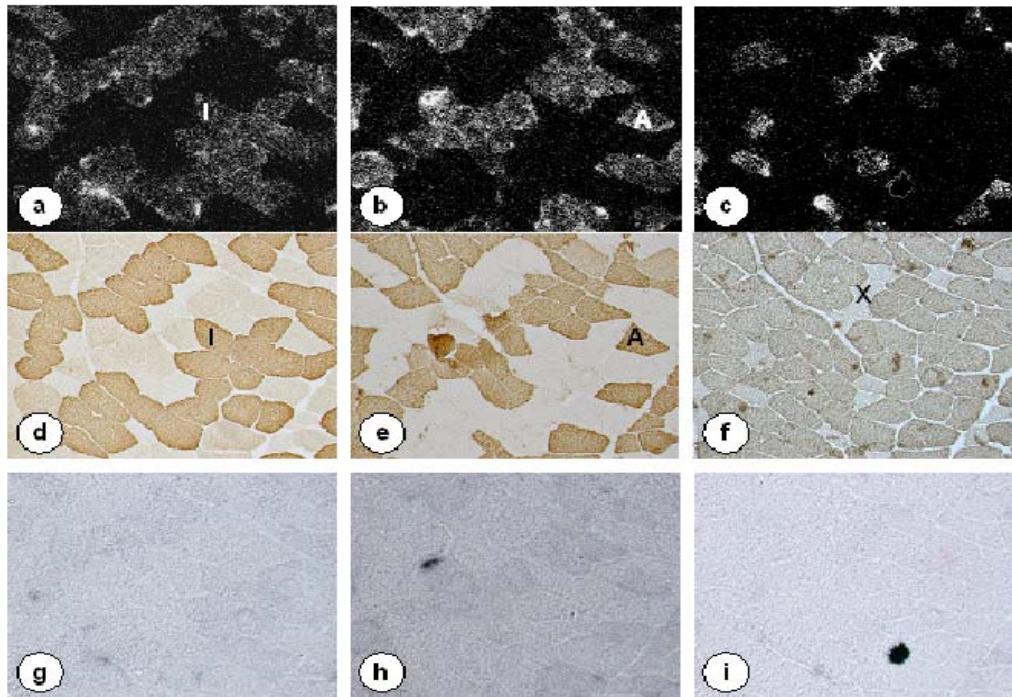
---

- Kontrolni imunohistokemijski prikaz MHC
  - prikaz izooblik MHC v vlaknih z uporabo specifičnih monoklonskih protiteles

Protitelo	MHC
BA-D5	I
SC-71	IIA(++)+IIX(+)
BF-35	I+IIA

# REZULTATI IN DISKUSIJA

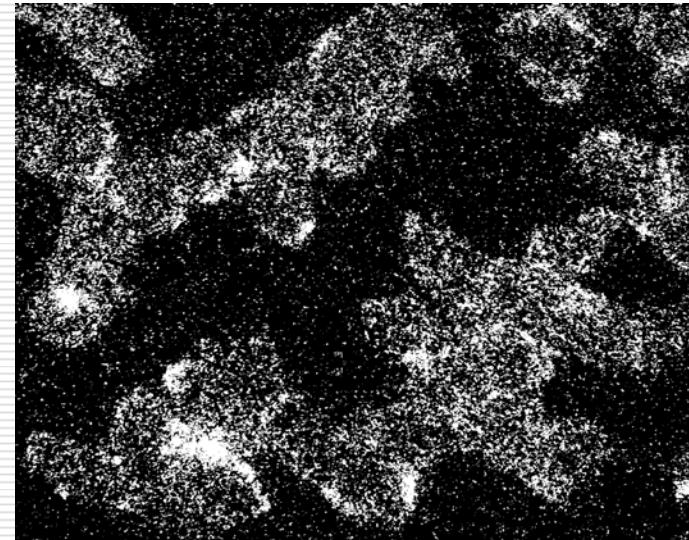
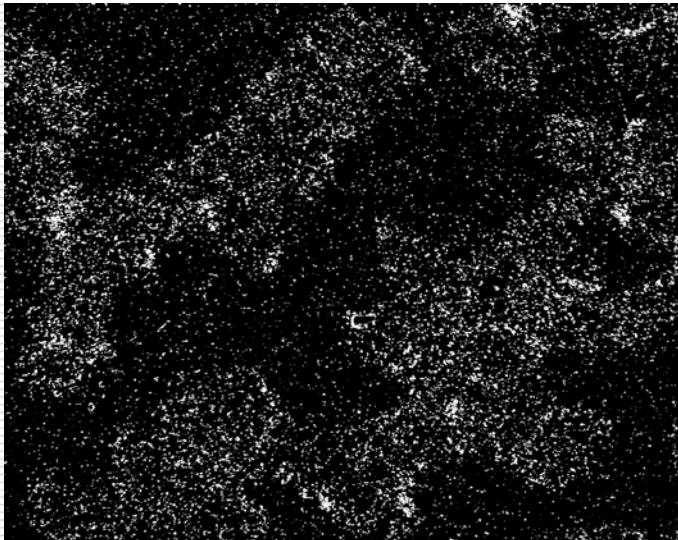
Rezultati hibridizacije *in situ* z radioaktivno označenimi sondami za MHC-1, -2a in -2x v mišici vastus lateralis ter imunohistokemijski prikaz



# REZULTATI IN DISKUSIJA

---

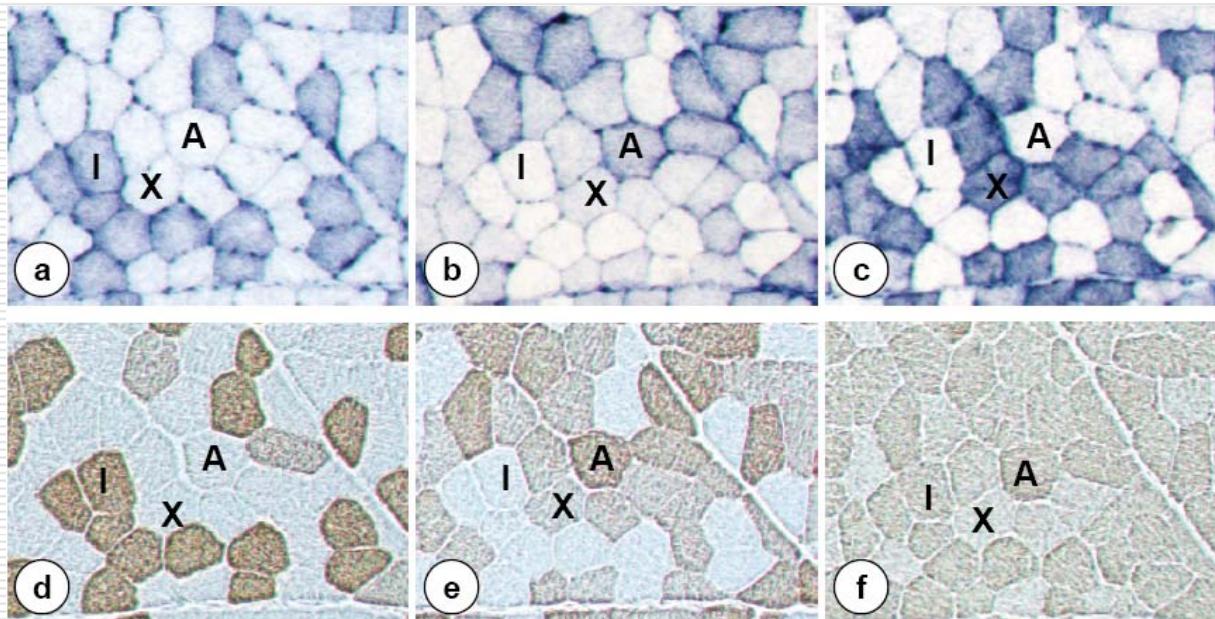
Hibridizacija *in situ* z radioaktivno označeno sondjo 1 po 7 in 20-dnevni ekspoziciji avtoradiografske emulzije



# REZULTATI IN DISKUSIJA

---

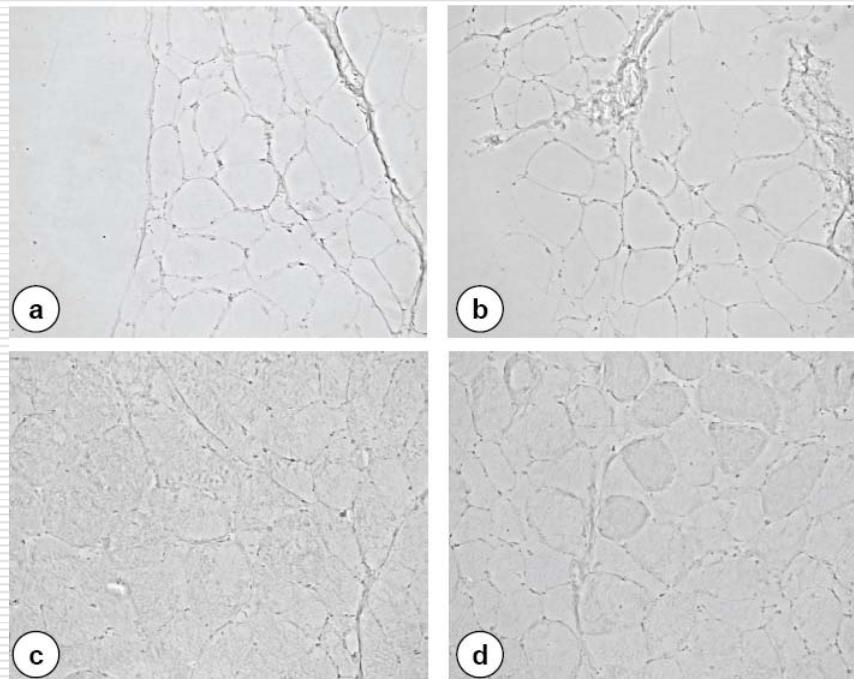
Hibridizacija *in situ* z digoksigeninom označeno sondo 1 (a), 2a (b) in 2x (c) v mišici biceps femoris ter imunohistokemijski prikaz MHC-I s protitelesom BA-D5 (d), MHC-IIA s SC-71 (e) in MHC-IIX s BF-35 (f)



# REZULTATI IN DISKUSIJA

---

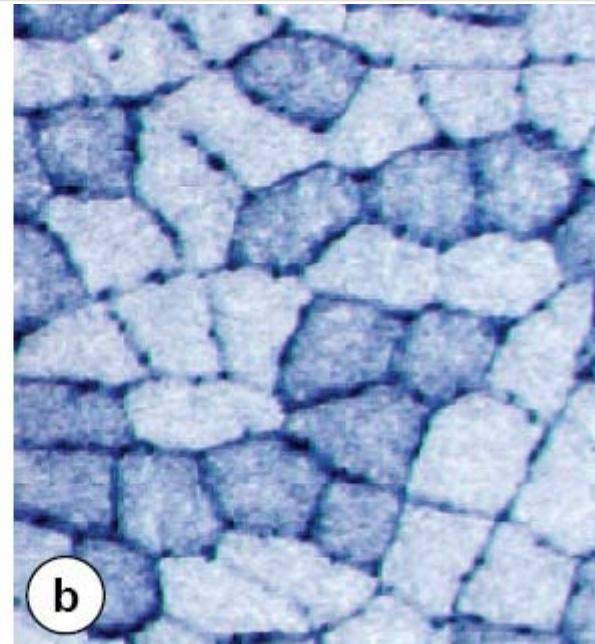
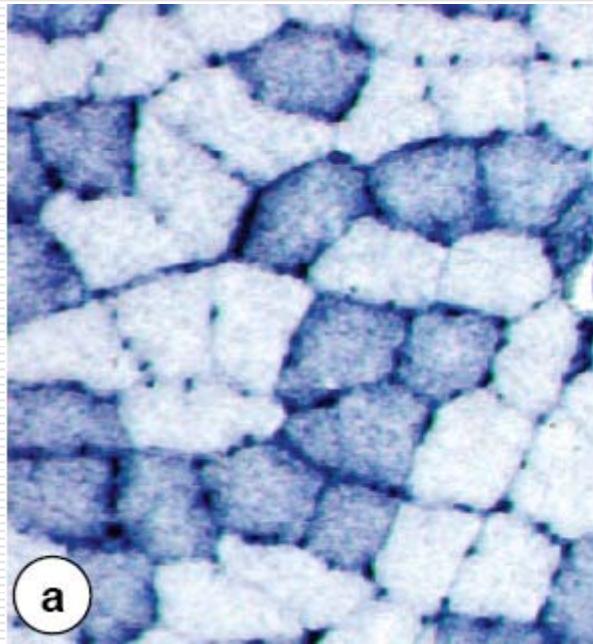
Določanje primerne koncentracije proteinaze K



# REZULTATI IN DISKUSIJA

---

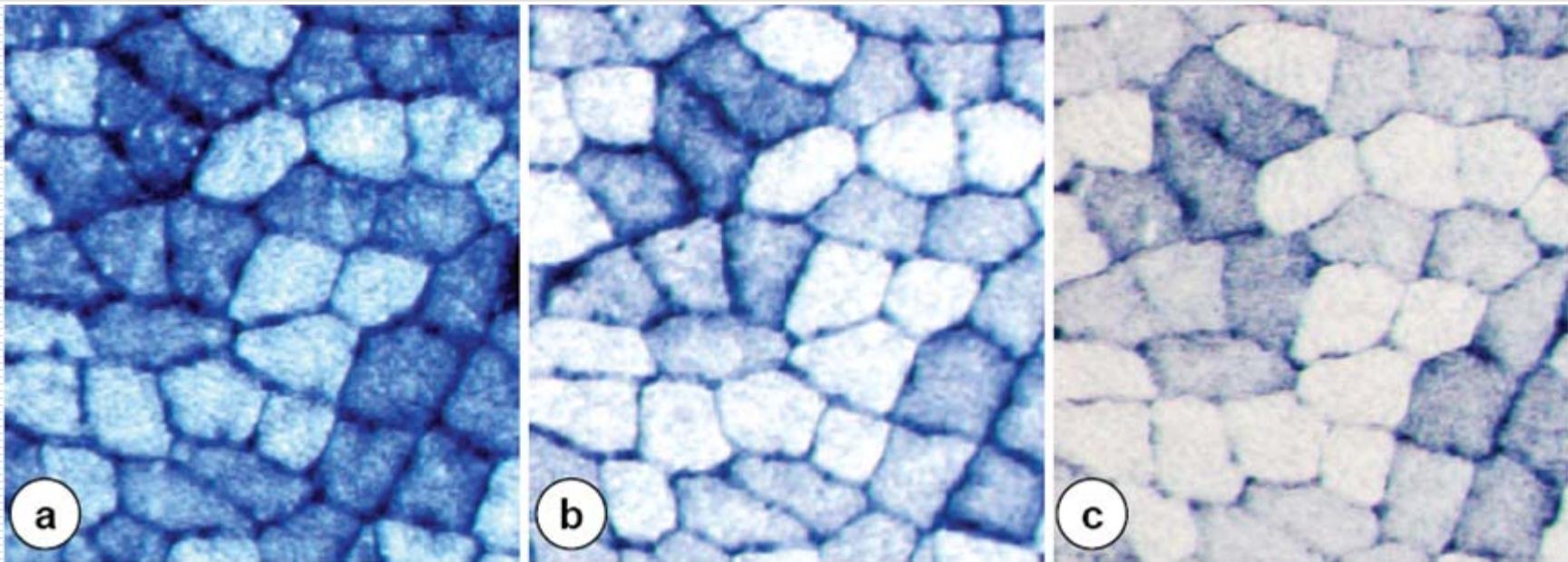
Hibridizacija *in situ* z digoksigeninom označeno sondo 1 pri razredčitvi protitelesa proti digoksigeninu a) 1:2000 in b) 1:200



# REZULTATI IN DISKUSIJA

---

Hibridizacija *in situ* z različnimi koncentracijami neradioaktivno označene sonde 2a



## ZAKLJUČKI

---

- rezultati po obeh metodah so bili primerljivi
  - ustreznna koncentracija sonde 1 in 2x je bila 1,3mg/L, sonde 2a pa 0,45mg/L
  - najustreznejša koncentracija proteinaze K je bila 20mg/L, čas obdelave 7,5 minut
  - najprimernejša koncentracija protitelesa proti digoksigeninu je bila 1:2000
  - prednosti uporabe z digoksigeninom označenih sond:
    - krajši čas za pridobitev rezultatov
    - stabilnost in varnost sond
    - zdravju manj škodljiva metoda
-