

Metodeudvikling – et bachelorprojekt

# Farvning med DUOLink kan påvise proteinreaktion i regenererende muskelfibre

Projektet skulle undersøge proteininteraktion i regenererende muskel fibre. Derfor blev væv fra patienter med kompartment syndrom og Duchennes myskeldystrofi valgt. Her følger en kort gennemgang om sygdommene. Jeg skrev mit bachelorprojekt på Odense Universitetshospitals Afdeling for Klinisk Patologi i vinteren 2012-13 sammen med min medstuderende, Lars Frost. Ideen til projektet kom fra ph.d. Louise Helskov Jørgensen, forsker ved Syddansk Universitets Kliniske Institut, der havde en hypotese om, at proteinerne actin og Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) interagerede i regenererende muskelfibre. Hvis denne hypotese kunne støttes, ville der være taget endnu et skridt på vejen til at forstå cellens funktioner. Vi havde til opgave at undersøge, om metoden DUOLink fra Olink kunne anvendes til påvisning af denne interaktion i formalinfikseret, paraffinindstøbt vævsmateriale. En af årsagerne til at anvende lige netop dette materiale var, at det findes på depoter i store mængder og strækker sig langt tilbage i tiden. Dette betyder bl.a., at der vil kunne undersøges væv fra forskellige generationer.

## I gang med arbejdet

Metoden DUOLink var tidligere blevet anvendt til påvisning af proteininteraktioner på cytologisk (celler) og cryomateriale (frosset væv), og med udgangspunkt i disse forsøg lavede vi protokollen til formalinfikseret, paraffinindstøbt materiale.

DUOLink blev testet på muskelvæv fra patienter med bl.a. Duchennes muskeldystrofi og kompartmentssyndrom.

Vi besluttede at tilføje en modfarvning med NCAM-antistoffer til at synliggøre de regenererende fibre, hvor hypotesen sagde, at SPARC/actin-interaktionen skulle foregå.

Vi valgte at arbejde med vævssnit i tykkelsen 2 µm sat på

Super Frost-glas, som efter farvningen skulle monteres med et monteringsmiddel indeholdende kernefarvestoffet DAPI.

## Metoden DUOLink

Metoden er en blanding af in situ hybridisering og immunhistokemi. DUOLink fra Olink virker vha. proximity ligation assay prober (PLAprober), der bindes til to primære antistoffer, som er bundet til et specifikt protein hver. Er disse proteiner inden for 30 nm af hinanden, danner PLAproberne et produkt, der er synligt ved fluorescensmikroskopi (fig. 1).

Udfordringer, som skulle overkommes, var bl.a. autofluorescens og uspecifikke bindinger i fx mastceller og erythrocytter. Ved at finde de mest effektive metoder til demaskerings-, afparaffinerings- og inkuberingstider blev det muligt at udføre farvningen med DUOLink med tilfredsstillende høj kvalitet.

Vi medtog tre kontroller for hvert snit: en negativ kontrol, en actin-negativ kontrol og en SPARC-negativ kontrol.

## Resultaterne

Over al forventning lykkedes vores DUOLink-farvning første gang. NCAM-modfarvningen farvede de regenererende muskelfibre grønne, og DUOLink lavede røde produkter, der hvor SPARC og actin interagerede. Sidst, men ikke mindst, blev kernefarvet blå af DAPI fra monteringsmidlet.

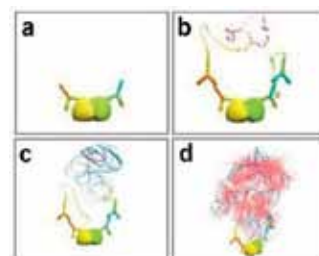
I vævet med kompartmentssyndrom (billede 1) var der meget nekrotisk væv og blødning, der begge satte metoden på prøve. Det, at vævet var under genopbygning stort set overalt, gjorde, at NCAM-modfarvninger farvede næsten hele vævet. Heldigvis kunne dette udlignes med de rette indstillinger på mikroskopet. Erythrocytter og mastceller blev også farvet røde, men til alt held var der størrelsesmæssigt så stor forskel på DUO-

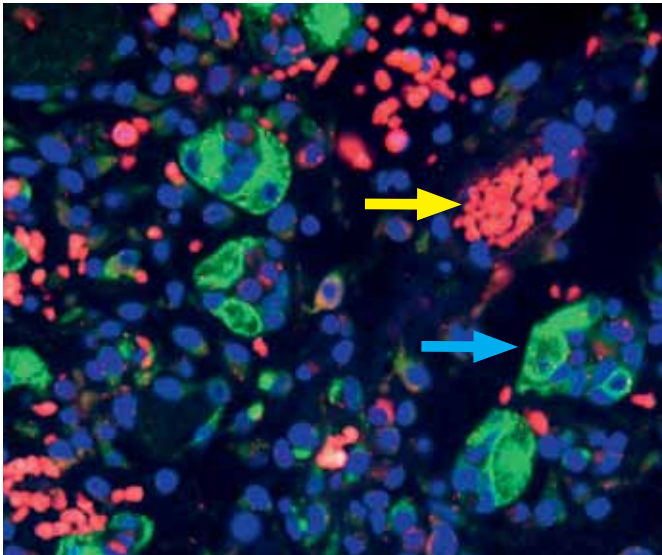


Af bioanalytiker // **Martin Rudbeck Krumborg**  
Nuklearmedicinsk Afdeling  
Odense Universitetshospital

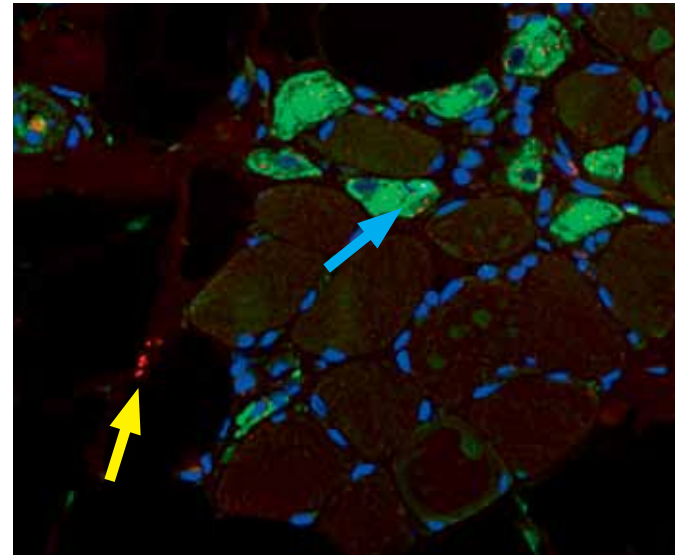
FIGUR 1

(a.) Primære antistoffer tilsættes.  
(b.) Herefter bliver sekundære antistoffer konjugerede med Proximity Ligation Assay prober (PLAprober) tilsat.  
(c.) PLAproberne danner "bro" mellem hinanden, hvis disse er tæt nok på hinanden.  
(d.) Amplifikationsopløsningen, bestående af nukleotider og oligonukleotider mærket med fluorescerende partikler, tilføjes sammen med polymerase. Den ene PLAprobes oligonukleotid-arm virker som primer til en såkaldt Rolling-Circle Amplifikation (RCA), der bruger den ligerede cirkel som template og danner concatameriske produkter.





**BILLEDE 1** Kompartmentsyndrom. Her viser de gule pile mastceller og erythrocytter, der også er blevet farvet. Den blå pil viser en regenererende muskelfiber, der er farvet grøn (NCAM), og som er fyldt med røde prikker (DUOlink-produkt), som indikerer interaktion mellem actin og SPARC.



**BILLEDE 2** Dschennes muskeldystrofi. Som det var tilfældet med billede 1, ses også her røde prikker markeret med gul pil, som ikke indikerer proteininteraktionen, der farves for. Disse uspecifikke reaktioner er ganske anderledes fra de "sande" DUOlink-produkter, så det er let at se forskel (se den blå pil).

link-produkterne og disse celler, at det ikke gav nogen vanskeligheder at skelne dem fra hinanden.

Vævet med Duchennes muskeldystrofi (billede 2) gav mere "rene" resultater. Vævet havde klart afgrænsede regenererende fibre og få mastceller og blødning. Dette gjorde det lettere at se interaktionen tydeligt og kunne bruges som en standart for, hvordan snittene optimalt kunne se ud.

Kontrollerne blev vurderet negative for reaktioner, hvilket også var ønskeligt.

### Hvorfor metodeudvikling?

Baggrunden og drivkraften for at gå ind i projektet var en interesse for at være med til at trampe nye stier og være med til at udvikle og indføre nye metoder. Alle bachelorprojekter følger denne form, mere eller mindre, men langt fra alle har en forsker tilknyttet. Det tilførte et sundt forventningspres til projektet, at der var en, som forventede resultater af høj kvalitet til brug i en videnskabelig artikel. Det gav hele forløbet et præg af at være en del af noget større, hvilket var meget motiverende.

Jeg kan kun varmt anbefale, at man skriver sit bachelorprojekt under en ph.d. eller lignende. Louise Helskov Jørgensen

kom hele tiden med nye input fra sin anden forskning, som enten understøttede det, vi lavede, eller skulle understøttes af det, vi lavede. Det var en fed proces at være i. Da vi blev hurtigere færdige med første del af projektet, kom Louise Helskov Jørgensen på nogle flere ting, hun gerne ville have undersøgt. Der var altså hele tiden et samspil og altid en at gå til, som var lige så interesseret i resultaterne som vi selv – og det skader aldrig at have en ekstra "vejleder". Vores resultater er blevet præsenteret til både lægekongresser og afdelingsmøder på Odense Universitetshospitals Afdeling for Klinisk Patologi, og det er mit indtryk, at der er interesse i at anvende metoden til andre projekter i fremtiden.

Den fulde rapport hedder: *Påvisning af proteininteraktion i regenererende muskelfibre vha. den immunhistokemiske metode "DUOlink"*, og abstrakt kan findes i databasen UCviden.

Til sidst en tak til min medstuderende Lars Frost, ph.d. Louise Helskov Jørgensen, forsker ved Syddansk Universitets Kliniske Institut, og vejledere: bioanalytikerundervisere Kirsten Hartmann fra Afdeling for Klinisk Patologi og Aino Elemegaard Larsen fra University College Lillebælt. □

Projektet skulle undersøge proteininteraktion i regenererende muskelfibre. Derfor blev væv fra patienter med kompartmentsyndrom og Duchennes muskeldystrofi valgt. Her følger en kort gennemgang af sygdommene.

**KOMPARTMENTSYNDROM**  
Ved fraktur i tibia/skindebenskno- len kan tilstanden kompartmentsyndrom indtræde. Årsagen til denne tilstand er en af følgende, som optræder enten samtidigt eller hver for sig: Øget tryk i et afgrænset/lukket område som fx blødning, og/eller hvis et område trykkes sammen, fx for stram gips. Når det intramuskulære tryk overstiger perfusionsstryk- ket i kapillærerne, kan iskæmi forekomme og senere celledød. Kom-

partmentsyndrom rammer hyppigst mænd under 35 år.

**DUCHENNES MUSKELDYSTROFI (DMD)**  
DMD er en recessivt nedarvet sygdom bundet på X-kromosomet. Genfejl medfører, at proteinet dystrofin enten reduceres i mængde eller er helt fraværende i skelet- og hjertemuskulaturen. Hver muskelfiber omslutes af en membran, sarcolemma, der kontinuerligt udsættes for stress

pga. muskelsammentrækning. Dystrofin menes at have en vigtig rolle i beskyttelsen af sarcolemma ved at facilitere forbindelse fra actinen i sarcolemmas cytoskelet og intermedieære filamenter i muskelfibren til EMC. Så når dystrofin ikke er til stede, kan musklen ikke genopbygge sig selv med samme effektivitet som raske muskler og omdannes langsomt til bindevæv. DMD har en prævalens på 1 ud af 3.500 drengefødsler.