

METODY STABILIZACJI FLUORESCENCJI ENDOGENNYCH BIAŁKOWYCH FLUOROCHROMÓW PODCZAS OPTYCZNEGO OCZYSZCZANIA TKANEK ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM OCZYSZCZANIA METODAMI ROZPUSZCZALNIKOWYMI

APPROACHES TO STABILIZATION OF ENDOGENOUS PROTEINACEOUS
FLUOROPHORES DURING TISSUE OPTICAL CLEARING
WITH SPECIAL EMPHASIS ON SOLVENT-BASED METHODS

Paweł MATRYBA, Jakub GOŁĄB

Zakład Immunologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Streszczenie: Niemal każdy proces komórkowy w organizmie uzależniony jest od przestrzennej organizacji tkanek, w których zachodzi. Liczne odmiany mikroskopii fluorescencyjnej umożliwiają zbadanie zależności pomiędzy strukturą i funkcją na poziomie komórkowym. Jednakże z powodu naturalnej budowy tkanek, których komponenty uniemożliwiają przenikanie światła do głębszych ich warstw, dotychczasowy zakres obserwacji mikroskopowych był ograniczony do dziesiątek mikrometrów w głąb narządu. Niedawno opracowana grupa metod optycznego oczyszczania tkanek czyni je przezroczystymi, tym samym rozszerzając zakres penetracji światła laserów przez całe narządy, a nawet ciała gryzoni laboratoryjnych. Niestety, niczym każda technika, optyczne oczyszczanie tkanek ma nie tylko zalety, ale również wady, z których głównym jest prędkie wyzarcenie fluorescencji endogennych białkowych fluorochromów, znacznie ograniczające zastosowanie tych technik do badania tkanek pochodzących z licznych, wartościowych modeli zwierząt transgenicznych. W niniejszym opracowaniu przedstawiona została klasyfikacja technik optycznego oczyszczania wraz z ich ogólną charakterystyką, ze szczególnym uwzględnieniem najnowszych rozwiązań umożliwiających stabilizację funkcji endogennych fluorochromów.

Słowa kluczowe: optyczne oczyszczanie, tkanki, przezroczysty, CUBIC, DISCO, CLARITY

Summary: Presumably every process taking place in our organs relies on 3-dimensional context of tissues. Various fluorescence microscopy techniques were successfully implemented to unravel relation between structure and function at cellular level. However, these approaches were limited to

dozens of micrometers deep into the tissues, by light-obstructing nature of their components. Recently developed set of methodology, tissue optical clearing (TOC), was developed to overcome this obstacle and extend undisturbed passage of laser light through the entire organs, even whole bodies of laboratory rodents. As every technique, TOC possess certain advantages and disadvantages, out of which main is rapid quenching of fluorescence of proteinaceous fluorophores that greatly limits wide application of TOC to continuously growing number of valuable transgenic animals models. Here we provide general information about TOC classification and discuss recent advancements that now allow to greatly stabilize function of endogenous fluorochromes.

Keywords: tissue clearing, tissues, transparent, CUBIC, DISCO, CLARITY

WSTĘP

Mimo iż trudno jest wyobrazić sobie jak duży wpływ na postęp w dziedzinach histologii i biologii komórki mają techniki mikroskopii konfokalnej, mają one jedno wspólne, znaczące ograniczenie – umożliwiają obrazowanie wyłącznie powierzchni preparatu (osiągając 150-250 μm zakresu obrazowania w głębi tkanki, w zależności od jej budowy). Wynika to z (i) pochłaniania energii wiązki lasera przez obecne w tkance lipidy oraz barwniki (np. hemoglobina, melanina, lipofuscyna) oraz (ii) rozpraszania fali światła przenikającego przez macierz zewnątrzkomórkową oraz komórki, których wnętrze złożone jest z elementów o znacząco zróżnicowanym współczynniku załamania światła [31] (ang. *refractive index*, RI, od wartości 1.33 dla wody po ~ 1.58 dla białek). Niedawno opisane techniki tzw. optycznego oczyszczania tkanek (ang. *tissue optical clearing*, TOC) znoszą to ograniczenie pozwalając na zobrazowanie nawet całych ciał drobnych gryzoni laboratoryjnych (myszy oraz szczurów) z komórkową rozdzielczością [24, 36, 39]. Jest to możliwe dzięki usunięciu związków absorbujących światło oraz wyrównanie RI w obrębie danego narządu. Ten ostatni etap jest osiąganym w sposób odmienny w trzech, chemicznie skrajnych metodach [37] – (a) przewodniących (ang. *aqueous-based clearing*), w których sumaryczny RI ulega obniżeniu po zastosowaniu związków stymulujących napływ wody w obręb tkanki, (b) monomerowych/żelowych, opartych na przesyleniu tkanki monomerami np. akrylamidu (łączącym białka oraz kwasy nukleinowe) oraz późniejszym wypłukaniu lipidów oraz (c) rozpuszczalnikowych (ang. *solvent-based clearing*), wykorzystujących dehydratujące właściwości gradientu alkoholi oraz późniejszą silną delipidację tkanki. Spośród wszystkich, ponad już 30 oryginalnych technik TOC, techniki rozpuszczalnikowe są postrzegane jako najefektywniejsze [23, 31] z uwagi na (i) krótki czas preparatyki (liczący od godzin dla drobnych tkanek takich jak mysie węzły limfatyczne [5], czy rdzeń kręgowy [6], po niecałe dwa tygodnie dla oczyszczenia całych mysich ciał) oraz (ii) osiąganym przez rozpuszczalniki wysoki RI bardzo zbliżony do dehydratowanych białek [4] (np. 1.56 dla metody 3DISCO oraz 1.55 dla uDISCO).*

*Czytelników zainteresowanych podstawami TOC wraz z ich pełną charakterystyką odsyłamy do artykułów przeglądowych [21, 26, 31] w niniejszym opracowaniu ograniczając się do znaczącego postępu w metodyce zachowania fluorescencji białkowych fluorochromów w tkankach poddawanych TOC.

Niestety, począwszy od pierwszych publikacji w 2012, podstawowym, bardzo znaczącym ograniczeniem metod rozpuszczalnikowych było gwałtowne (zachodzące nawet poniżej 24 godzin!) zanikanie sygnału pochodzącego z endogennych fluorochromów, takich jak białka zielonej i żółtej fluorescencji (ang. *green/yellow fluorescent protein*, GFP, YFP) oraz tdTomato [5, 6]. Uniemożliwiało to wykorzystanie rozlicznych, szeroko stosowanych linii zwierząt transgenicznych i skracало dostępny czas obrazowania do zaledwie kilku godzin/dni po oczyszczeniu. Dotychczas powszechne było przekonanie, jakoby to obecność cząsteczek wody odpowiadała za zdolność fluorescencji wspomnianych białkowych fluorochromów [31]. Liczne zaproponowane rozwiązania przedstawione w tym opracowaniu wykazały, iż jest to mylny pogląd, zaś ostatni rok przyniósł przełom w kwestii zachowania zdolności fluorescencji, co niewątpliwie znajdzie swe odzwierciedlenie w jeszcze powszechniejszym zastosowaniu technik rozpuszczalnikowych.

METODY STABILIZACJI I DETEKCJI SYGNAŁU FLUORESCENCJI ENDOGENNYCH BIAŁKOWYCH FLUOROCHROMÓW PODCZAS TOC

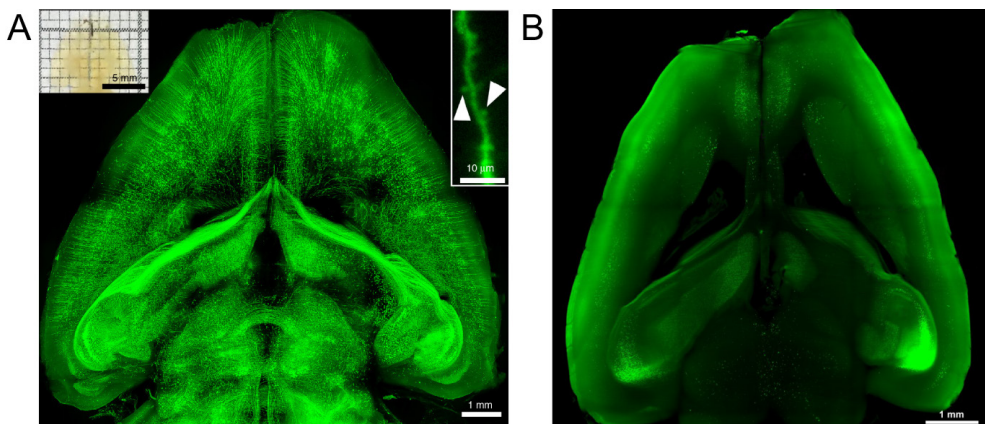
DODATKOWE BARWIENIE IMMUNOHISTOCHEMICZNE

Najwcześniej zaproponowanym [30] i wielokrotnie optymalizowanym [1, 29] rozwiązaniem problemu wyżarzania fluorochromów było znakowanie immunohistochemiczne tkanek z zastosowaniem przeciwciał anty-GFP sprzężonych ze znacznie odporniejszymi na wyżarzenie fluorochromami z rodziny AlexaFluor. Niestety, takie podejście nie tylko rodzi wątpliwości dotyczące specyficzności znakowania (należy pamiętać, iż możliwość obecności niespecyficznego wiązania jest wyższa w wypadku penetracji przeciwciał przez kilka centymetrów tkanki niż kilka, kilkadziesiąt jej mikrometrów), jego jednorodnej dystrybucji (często zaburzonej przez wzmożone wiązanie przeciwciał na powierzchni preparatu [42]), ale przede wszystkim znacząco wydłuża procedurę (której szybki przebieg jest jedną z dwóch podstawowych zalet metod rozpuszczalnikowych) o 3-6 dni na inkubację przeciwciałem, w zależności od typu oraz wielkości tkanki [30]. Nie bez znaczenia jest również wyższy koszt związany z zastosowaniem przeciwciał. Warto podkreślić, że niejednorodne wiązanie przeciwciał ogranicza prowadzenie analiz ilościowych, a także znacząco utrudnia procedurę obrazowania preparatu, który pozostaje prześwietlony na obrzeżach i niewystarczająco doświetlony w kolejnych warstwach głębokości tkanki. Co więcej, dla niektórych tkanek dodatkowe znakowanie immunohistochemiczne jest wręcz niewykonalne – przykładowo brakuje protokołu zdolnego do efektywnego barwienia kości z zastosowaniem przeciwciał [9]. Ostatnia jednak optymalizacja tego podejścia opartego

na znakowaniu immunohistochemicznym, polegająca na perfuzji ciała zwierzęcia nanoprzeciwciałami skoniungowanymi z bardzo stabilną grupą barwników fluorescencyjnych typu Atto [2], pokazała że może być to szybkie, efektywne podejście do znakowania i obrazowania całych narządów, a nawet organizmów, z ustabilizowanym, wielokrotnie wzmocnionym sygnałem fluorescencyjnym (aż 118-krotnie w porównaniu z fluorescencją białka).

ZWIĄZKI PRZECIWUTLENIAJĄCE

Mimo iż od pierwszych publikacji dotyczących zastosowania metod rozpuszczalnikowych podnoszona była kwestia akumulacji nadtlenu w tetrahydrofuranie [5] (związku dehydratującym w klasycznej metodzie 3DISCO podejrzewanym o destrukcyjny wpływ na zdolność białek do wykazywania fluorescencji), dopiero w roku 2016 w metodzie uDISCO [24] (od ang. *ultimate-DISCO*) podjęto próbę zastosowania alfa-tokoferolu (jednego z głównych składników witaminy E) jako zmiatacza nadtlenu (Ryc. 1, ale nie podczas dehydratacji, a wyrównania RI).

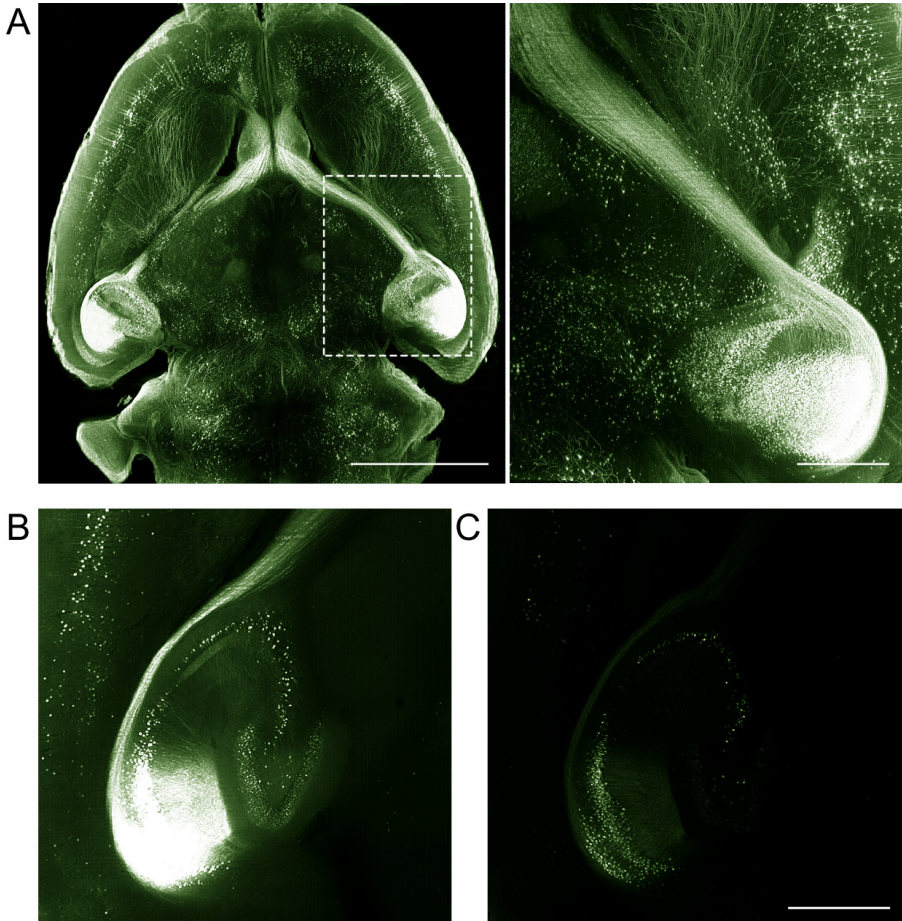


RYCINA 1. Metoda uDISCO znacząco wydłuża zdolność GFP do fluorescencji.

(A) Zamiana dehydratującego THF na *tert*-butanol oraz dodanie eteru difenylu i zmiatacza nadtlenu w postaci alfa-tokoferolu do odczynnika wyrównującego RI – BABB-D, znamienne stabilizuje sygnał pochodzący z GFP, co wykazano na przykładzie oczyszczonego mózgu myszy linii *Thy-1* (lewy górny róg – makrofotografia przezroczystego mózgu, prawy górny róg – kolce dendrytyczne). **(B)** Klasyczna metoda 3DISCO prowadzi do gwałtownego wyżarzenia sygnału GFP. Stworzono za pozwoleniem na podstawie [24], Springer Nature, 2016

FIGURE 1. uDISCO method significantly prolongs GFP fluorescence.

(A) Replacement of THF with *tert*-butanol and addition of diphenyl ether and peroxide scavenger, alpha-tocopherol to the RI-matching solution – BABB-D, contributes to significant preservation of GFP, as shown in cleared, *Thy-1* mouse brain (left upper corner – macrophotography of the cleared brain, right upper corner – dendritic spines). **(B)** Classic 3DISCO clearing leads to rapid quenching of GFP in the same model. Reproduced with permission [24], Springer Nature, 2016



RYCINA 2. Eliminacja nadtlenków i aldehydów z DBE jest kluczowa dla zachowania długotrwałej fluorescencji GFP.

(A) Mysi mózg oczyszczony z wykorzystaniem nowego protokołu sDISCO nawet 22 miesiące po procedurze utrzymuje fluorescencję umożliwiającą obserwację całego mózgu z rozdzielczością komórkową (prawy panel). Skala odpowiada 2 mm w lewym i 500 μm w prawym panelu. (B) Początkowo oczyszczony i utrzymany w pozbawionym zarówno nadtlenków, jak i aldehydów DBE mózg myszy (C) traci niemal całą fluorescencję już w 3 dni po przeniesieniu do DBE pozbawionego nadtlenków (z galusanem propylu), jednak nieoczyszczonego z aldehydów. Skala odpowiada 500 μm . Stworzono za pozwoleniem na podstawie [10], Wiley-VCH, 2019

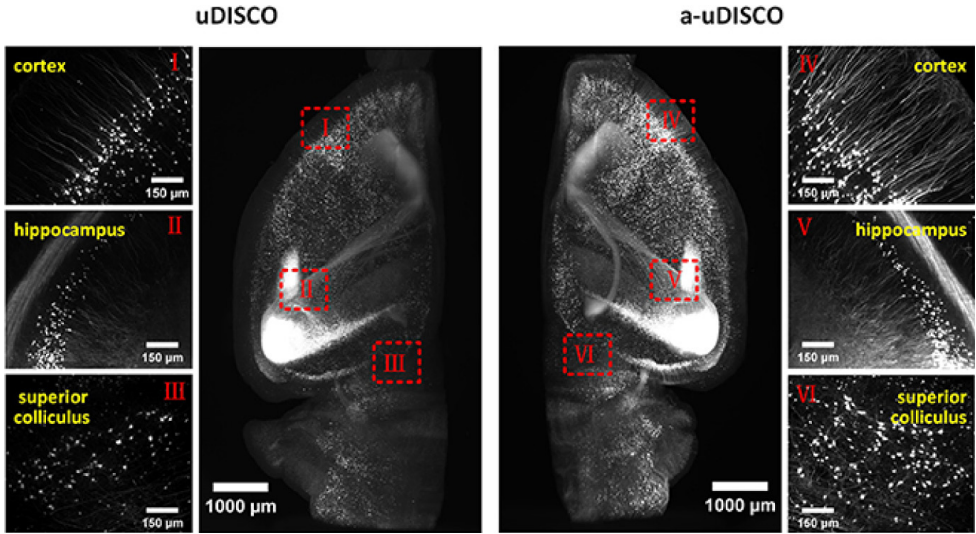
FIGURE 2. Elimination of both peroxides and aldehydes from DBE solution is crucial of long-term preservation of GFP fluorescence.

(A) Even 22 months after clearing with sDISCO, preservation of fluorescence is sufficient for whole-brain imaging with cellular resolution (right panel). Scale bar, 2 mm and 500 μm for left and right panel, respectively. (B) Cleared and stored in peroxide- and aldehyde-free DBE (C) losses almost the entire fluorescence after 3 days of incubation in peroxide-free (due to addition of propyl gallate) but not aldehyde-free DBE. Scale bar, 500 μm . Reproduced with permission [10], Wiley-VCH, 2019

Trudno ocenić wpływ obecności tokoferolu na utrzymanie fluorescencji, gdyż jednocześnie do ostatniego roztworu (zwanego BABB, składającego się z benzoesanu benzylu oraz alkoholu benzylowego), pełniącego funkcję wyrównującą RI tkanki, dodano stabilizujący GFP difenyl eteru (tym samym nazywając nowy roztwór mianem BABB-D). Pomimo wydłużenia okresu półtrwania fluorescencji GFP, dodatek difenylu eteru wpływa negatywnie na ostateczny poziom przezroczystości tkanek, niewątpliwie nie jest więc on optymalnym rozwiązaniem. Niedawno Hahn i wsp. [10] szczegółowo przeanalizowali wpływ wielu związków na eliminację nadtlenków, a tym samym zachowanie fluorescencji pochodzącej z modelowego GFP. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, iż stabilizacja sygnału z GFP na poziomie pozwalającym na obrazowanie nawet rok po oczyszczeniu wymaga zarówno usunięcia nadtlenków, jak i aldehydów obecnych w wyrównującym RI benzylu eteru (DBE, Ryc. 2). W zaproponowanym protokole, THF i DBE początkowo podlegają oczyszczeniu z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej z tlenkiem glinu (usunięcie nadtlenków oraz aldehydów), po czym do DBE (w którym tkanka pozostaje cały czas po dokonanej dehydratacji) dodawany jest galusan propylu – silny przeciwutleniacz powszechnie stosowany m.in. w przemyśle spożywczym i kosmetykach. Warto podkreślić, iż samo oczyszczenie DBE, bez późniejszej stabilizacji galusanem propylu, prowadzi do ponownego pojawienia się nadtlenków w roztworze, a wraz z nimi aldehydów degradujących GFP, zaś w teście bezpośrednio porównującym galusan propylu i alfa-tokoferol, ten ostatni wykazał znacznie słabsze właściwości przeciwutleniające.

KONTROLA pH

Drugim, kluczowym czynnikiem wpływającym na stabilizację sygnału z GFP i innych białkowych fluorochromów jest pH wykorzystywanych odczynników. Mimo iż badania przeprowadzone dekadę wcześniej opisywały zachowanie aktywności fluorescencyjnej wyizolowanych cząsteczek GFP w środowisku zasadowym oraz dramatyczny spadek już w lekko kwaśnym pH = 6.5 [27], pierwszą metodą zwracającą uwagę na konieczność stosowania zasadowych związków dehydratujących (dokładnie *tert*-butanolu lub 1-propanolu) w wypadku technik rozpuszczalnikowych był protokół FluoClearBABB opublikowany w 2016 roku przez Schwarza i wsp. [32] Prace opublikowane w ciągu ostatnich 2 lat dobitnie potwierdzają, iż zastosowanie alkalicznych związków dehydratujących i/lub związków wyrównujących RI tkanki stabilizuje sygnał fluorescencyjny niezależnie od zastosowanego związku (Ryc. 3, *tert*-butanolu w wypadku wspomnianego już FluoClearBABB [32] oraz PEGASOS [14], *tert*-butanolu i BABB-D w alkalicznym a-uDISCO [18], THF w FDISCO [28], etanolu w protokole ECi [16] oraz 1-propanolu w drugiej generacji ECi [20]). Hahn i wsp. [10] niedawno zaproponowali zastosowanie alkalicznych roztworów już na etapie perfuzji, w szczególności PBS o pH = 8.3,



RYCINA 3. Alkalizacja związków wykorzystywanych podczas TOC wzmacnia zachowanie sygnału fluorescencyjnego.

Na przykładzie mysiego mózgu linii *Thy-1* oczyszczonego klasycznym uDISCO oraz alkalicznym uDISCO (a-uDISCO) zobrazowano, iż alkalizacja zarówno związków dehydratujących (tu: *tert*-butanol), jak i wyrównujących współczynnik załamania światła tkanki (tu: BABB-D) powoduje znaczący wzrost zachowania sygnału fluorescencyjnego podczas procedury oczyszczania. Stworzono za pozwoleniem na podstawie [18], Frontiers Media, 2018

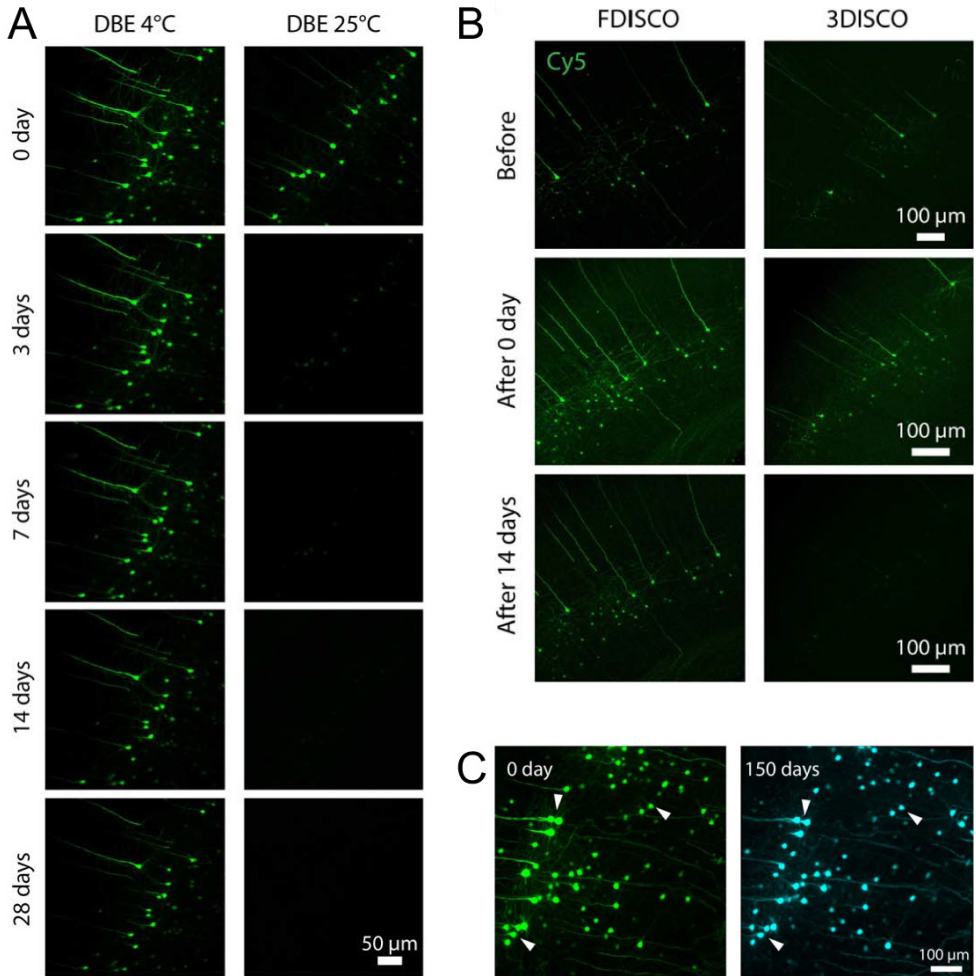
FIGURE 3. Alkalization of TOC reagents leads to improved stabilization of fluorescent signal.

Using *Thy-1* mouse brain cleared with uDISCO and alkaline uDISCO (a-uDISCO), it was shown that application of alkaline both dehydrating (here: *tert*-butanol) and RI-matching agents (here: BABB-D) significantly enhances preservation of fluorescence signal. Reproduced with permission [18], Frontiers Media, 2018

zamiast standardowo wykorzystywanego PBS o pH obojętnym. Niestety, bezpośrednie porównanie sygnału fluorescencji z tkanek perfundowanych roztworami PBS o odmiennych odczynach nie zostało przedstawione, co uniemożliwia ocenę zasadności tego działania.

KONTROLA TEMPERATURY

TOC jest na nadal we wczesnej fazie optymalizacji metodyki. Nie dziwi więc fakt, iż wciąż stosunkowo niewielkie zmiany protokołów, prowadzą do znaczących udoskonaleń metodyki. Ważnym tego przykładem jest przeprowadzanie protokołu 3DISCO (dehydratacja THF, wyrównanie RI z wykorzystaniem DBE) w temperaturze 4°C zamiast temperatury pokojowej, co pozwoliło na spektakularne wydłużenie zdolności GFP i YFP do fluorescencji oraz pozwoliło na ustabilizowanie fluorescencji tdTomato (zupełnie niekompatybilnego ze standardowym 3DISCO,



RYCINA 4. Obniżenie temperatury podczas TOC jest istotnym czynnikiem zwiększającym zachowanie fluorescencji oczyszczonych tkanek.

(A) Inkubacja tkanki w odczynniku wyrównującym RI w temperaturze 4°C (FDISCO) w porównaniu z 25°C (3DISCO) istotnie zwiększa zachowanie fluorescencji GFP oraz (B) Cy5, którego sygnał zanika kompletnie już w 14 dni po inkubacji w temperaturze pokojowej. (C) Protokół FDISCO umożliwia obrazowanie oczyszczonej tkanki w 150 dni po procedurze. Stworzono za pozwoleniem na podstawie [28], American Association for the Advancement of Science, 2019

FIGURE 4. TOC performed at lower temperature is an important approach stabilizing fluorescence within cleared tissues.

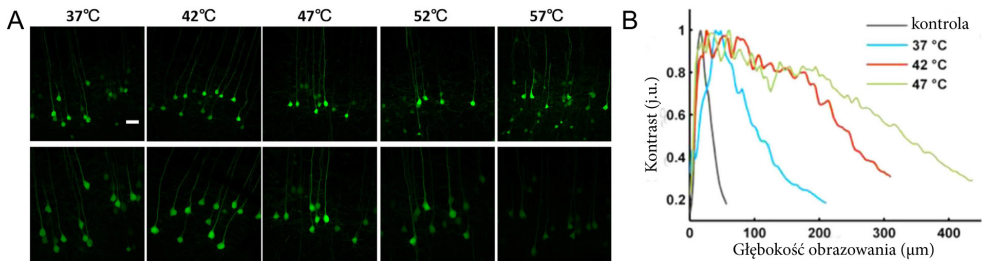
(A) Tissue incubation in RI-matching solution at 4°C (FDISCO) greatly enhances GFP signal with the same procedure performed at 25°C (3DISCO) and (B) Cy5 signal, which is completely lost when incubated at room temperature. (C) FDISCO protocol allows to image the tissue still after 150 days post clearing. Reproduced with permission [28], American Association for the Advancement of Science, 2019

Ryc. 4). Protokół ten, nazwany FDISCO [28], został już wykorzystany do opisu dystrybucji przestrzennej płytek nerwowo-mięśniowych w myszach transgenicznych wykazujących ekspresję YFP pod promotorem *Thy1* [40]. W połączeniu z przeprowadzonymi badaniami elektrofizjologicznymi po raz pierwszy pozwoliło to na wyodrębnienie funkcjonalnych grup włókien mięśniowych, co w przyszłości potencjalnie znajdzie zastosowanie podczas wykonywania celowanych na poszczególne, nowoodkryte grupy funkcjonalne, oznaczeń elektroneurograficznych.

Badania z wykorzystaniem innych niż rozpuszczalnikowe metody TOC wykazały logiczną pozytywną korelację pomiędzy wzrostem temperatury, w której zachodzi oczyszczanie, a czasem niezbędnym do zakończenia procesu, oraz korelację ujemną ze stabilnością fluorescencji pochodzącej z GFP [34, 41]. Dla tych metod optymalna temperatura opisywana przez autorów waha się między 37 a 47°C, przy znacznym spadku fluorescencji począwszy od 52°C (Ryc. 5). Należy jednak pamiętać, że w wypadku zastosowania barwień immunohistochemicznych, temperaturę podczas etapu odpłukiwania należy obniżyć (np. do temperatury pokojowej), aby ograniczyć proces dysocjacji przeciwciał [17].

USIECIOWANIE GFP

Podczas gdy wszystkie opisywane w literaturze optymalizacje metod TOC dotyczące utrzymania sygnału fluorescencji skupione były na etapach odbywających się po izolacji oraz utrwaleniu tkanek, grupa kierowana przez Chunga wprowadziła nowe rozwiązanie już na etapie utrwalaania preparatu [25]. Wykorzystując



RYCINA 5. Temperatura zmienia efektywność TOC również z wykorzystaniem technik hydrożelowych.

(A) Usieciowane hydrożelem białka GFP zaczynają zanikać podczas oczyszczania metodą PACT w temperaturze 52-57°C, zaś (B) w temperaturze 47°C osiągany jest najwyższy poziom kontrastu na danej głębokości obrazowanej tkanki. Stworzono za pozwoleniem na podstawie [41], Springer Nature, 2017

FIGURE 5. Temperature is a factor that impacts TOC using hydrogel techniques.

(A) Cross-linked GFP during PACT-mediated clearing begins to quench at 52-57°C, while (B) tissue incubation at 47°C leads to the highest normalized contrast at studied imaging depths. Reproduced with permission [41], Springer Nature, 2017

najpierw stymulacje komputerowe GFP, a następnie badania laboratoryjne, wyselekcjonowano eter poliglicerolo-3-poliglicydylu jako związek sieciujący, którego dodatek do standardowo wykorzystywanego związku utrwalającego, 4% paraformaldehydu, pozwala na spektakularny wzrost odporności GFP na wyżarzenie. Warto podkreślić, iż tak przygotowana tkanka nie tylko utrzymuje fluorescencję cząsteczek GFP nawet po 24 godzinach ogrzewania w temperaturze 70°C, ale również zachowuje jej naturalny kształt, co ma fundamentalne znaczenie podczas badań porównawczych z wykorzystaniem nowopowstałych komórkowych atlasów mózgu myszy [22, 29]. Zastosowanie eteru poliglicerolo-3-poliglicydylu jako związku sieciującego stabilizuje również inne białka, a wraz z nimi ich epitopy, pozwalając na wykonanie wiele rund znakowania przeciwciałami tego samego rejonu preparatu.

INNE METODY TOC A STABILIZACJA BIAŁEK RODZINY GFP

Destabilizacja sygnału endogennych białek fluorescencyjnych nie stanowi problemu w przypadku metod przewodniących, z których najczęściej dotychczas stosowaną była metoda CUBIC. Mimo znacznego stężenia mocznika, stanowiącego składnik wielu z tych metod TOC (m.in. FRUIT [12], Scale [11], CUBIC [36], UbasM [3]), fluorescencja pozostaje zachowana dzięki lekko zasadowemu odczynowi wykorzystywanych roztworów [37]. Niemniej badania ilościowe z zastosowaniem technik przewodniących powinny być prowadzone z ostrożnością, gdyż charakteryzują się one wzmożonym wypływem białek obserwowanym podczas procesu oczyszczania. Grupą technik, której problem ten niemal nie obejmuje, są wspomniane już we wstępie techniki żelowe/polimerowe [8], które dzięki usieciowaniu białek świetnie chronią tkankę przed ich wypłukaniem, a nawet stabilizują mRNA – pozwalają na przeprowadzenie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* w obrębie całych, przezroczystych narządów [39]. Niestety podstawowym ograniczeniem tych technik jest bardzo długi czas inkubacji, wynoszący np. 4, 6 i 10 tygodni dla odpowiednio opracowanych protokołów TOC kości [9], mięśni szkieletowych [43] oraz jajnika [7] myszy.

Metodą gwarantującą niewątpliwie najkrótszy czas inkubacji niezbędny do osiągnięcia pełnej przezroczystości jest technika FOCM (ang. *ultrafast optical clearing method*) [44], składająca się z zaledwie jednego odczynnika, w którego skład wchodzi nietoksyczne i tanie substancje: DMSO, mocznik, D-sorbitol oraz glicerol. Niebywale szybka inkubacja z FOCM trwa zaledwie 2 minuty, pozwala jednak na pełne uprzeczystwienie wyłącznie ~300 µm skrawków mysiego mózgu (co jest wynikiem 60× szybszym od CUBIC, 75× od SeeDB, 90× od ScaleS, i 450× od CLARITY) oczywiście pozwalając na zachowanie sygnału fluorescencji z GFP/YFP. Mimo to, bazując na załączonych makrofotografiach, FOCM nie wydaje się być podejściem, które można byłoby zastosować do całych narządów (serce, wątroba, nerki), czy półkul mózgu.

PODSUMOWANIE

W ciągu niecałych 10 lat od pierwszych doniesień opisujących nowoczesne metody TOC, zostały one zastosowane w ponad 300 publikacjach naukowych, do niemal każdego głównego narządu/tkanki myszy (z wyłączeniem prącia) [21]. Tym samym przyczyniły do opisanego licznego odkryć, tak odmiennych jak m.in. nowy, okołonaczyniowy typ komórek Cajala w ludzkim jelicie [19], udział makrofagów w przewodnictwie układu bodźco-przewodzącego serca [13], zweryfikowany model megakariopoezy, w której to rozmieszczenie przestrzenne megakariocytów zależy od lokalnego unaczynienia, nie zaś dojrzałości komórek [35], czy dokładniejsza charakterystyka typów gruczołów macicznych [38]. Możliwość dokonania obserwacji w obrębie całej tkanki z rozdzielczością komórkową (a nawet subkomórkową, co potwierdzają analizy tworzących synapsy kolców dendrytycznych) w krótkim czasie z przystosowaną do tego mikroskopią arkusza światła (ang. *light-sheet fluorescence microscopy*) stopniowo przenosi więc badania obrazowe tkanek ze skrawków histologicznych do trzech wymiarów. Jednak zanim TOC stanie się podobnym do podejścia histologicznego standardem wykorzystywanym w setkach tysięcy laboratoriów, musi zostać zoptymalizowana i przystosowana, niewątpliwie w sposób odmienny i specyficzny dla każdego narządu [15]. Wydaje się, że przedstawione w niniejszym opracowaniu podejścia w sposób powtarzalny pozwalają już na wyeliminowanie jednej z głównych ograniczeń tej metodyki – gwałtownego wyżarzania endogennych białkowych fluorochromów. Warto jednak podkreślić, iż wciąż są to pojedyncze doniesienia nielicznych grup badawczych obejmujące zgoła odmienne zabiegi: (i) kontrolę warunków oczyszczania (pH, temperatura), (ii) specyficzne przygotowanie odczynników do oczyszczania (oczyszczenie i stabilizacja THF i DBE) oraz (iii) modyfikację związków stosowanych podczas samego procesu utrwalania tkanki (eter poliglicerolo-3-poliglicydylu). Bez wątplenia wymagają więc dalszej optymalizacji, prawdopodobnie połączenia w jeden protokół który, wraz z zastosowaniem nowych, oporniejszych na degenerację form GFP [33], pozwoli na uzyskiwanie powtarzalnych rezultatów również w laboratoriach niemających wcześniejszego doświadczenia w stosowaniu tej metodologii.

PODZIĘKOWANIA

Badania prowadzone przez autorów pracy finansowane były ze środków na naukę przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego na realizację projektu DI2016 007446.

LITERATURA

- [1] BELLE M, GODEFROY D, COULY G, MALONE SA, COLLIER F, GIACOBINI P, CHÉDOTAL A. Tridimensional Visualization and Analysis of Early Human Development. *Cell* 2017; **169**: 161-173.
- [2] CAI R, PAN C, GHASEMIGHARAGOZ A, TODOROV MI, FÖRSTERA B, ZHAO S, BHATIA HS, PARRA-DAMAS A, MROWKA L, THEODOROU D, REMPFLE M, XAVIER ALR, KRESS BT, BENAKIS C, STEINKE H, LIEBSCHER S, BECHMANN I, LIESZ A, MENZE B, KERSCHENSTEINER M, NEDERGAARD M, ERTÜRK A. Panoptic imaging of transparent mice reveals whole-body neuronal projections and skull–meninges connections. *Nat. Neurosci.* 2019; **22**: 317-327.
- [3] CHEN L, LI G, LI Y, LI Y, ZHU H, TANG L, FRENCH P, MCGINTY J, RUAN S. UbasM: An effective balanced optical clearing method for intact biomedical imaging. *Sci Rep* 2017; **7**: 12218.
- [4] DECROIX L, VAN MUYLDER V, DESENDER L, SAMPAOLESI M, THORREZ L. Tissue clearing for confocal imaging of native and bio-artificial skeletal muscle. *Biotech Histochem* 2015; **90**: 424-431.
- [5] ERTÜRK A, BECKER K, JÄHRLING N, MAUCH CP, HOJER CD, EGEN JG, HELLAL F, BRADKE F, SHENG M, DODT HU. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat. Protoc.* 2012; **7**: 1983-1995.
- [6] ERTÜRK A, MAUCH CP, HELLAL F, FÖRSTNER F, KECK T, BECKER K, JÄHRLING N, STEFFENS H, RICHTER M, HÜBENER H, KRAMER E, KIRCHHOFF F, DODT, BRADKE F. Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. *Nat. Med.* 2012; **18**: 166-171.
- [7] FENG Y, CUI P, LU X, HSUEH B, MÖLLER BILLIG F, ZARNESCU YANEZ L, TOMER R, BOERBOOM D, CARMELIET P, DEISSEROTH K, HSUEH AJW. CLARITY reveals dynamics of ovarian follicular architecture and vasculature in three-dimensions. *Sci Rep* 2017; **7**: 44810.
- [8] GRADINARU V, TREWEEK J, OVERTON K, DEISSEROTH K. Hydrogel-Tissue Chemistry: Principles and Applications. *Annu Rev Biophys* 2018; **47**: 355-376.
- [9] GREENBAUM A, CHAN KY, DOBREVA T, BROWN D, BALANI DH, BOYCE R, KRONENBERG HM, MCBRIDE HJ, GRADINARU V. Bone CLARITY: Clearing, imaging, and computational analysis of osteoprogenitors within intact bone marrow. *Sci Transl Med* 2017; **9**: eaah6518.
- [10] HAHN C, BECKER K, SAGHAFI S, PENDE M, AVDIBAŠIĆ A, FOROUGHIPOUR M, HEINZ DE, WOTJAK CT, DODT HU. High-resolution imaging of fluorescent whole mouse brains using stabilised organic media (sDISCO). *J Biophotonics* 2019; **12**: e201800368.
- [11] HAMA H, HIOKI H, NAMIKI K, HOSHIDA T, KUROKAWA K, ISHIDATE F, KANEKO T, AKAGI T, SAITO T, SAIDO T, MIYAWAKI A. ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. *Nat. Neurosci.* 2015; **18**: 1518-1529.
- [12] HOU B, ZHANG D, ZHAO S, WEI M, YANG Z, WANG S, WANG J, ZHANG X, LIU B, FAN L, LI Y, QIU Z, ZHANG C, JIANG T. Scalable and DiI-compatible optical clearance of the mammalian brain. *Front Neuroanat* 2015; **9**: 19.
- [13] HULSMANS M, CLAUSS S, XIAO L, AGUIRRE AD, KING KR, HANLEY A, HUCKER WJ, WÜLFERS EM, SEEMANN G, COURTIES G, IWAMOTO Y, SUN Y, SAVOL AJ, SAGER HB, LAVINE KJ, FISHBEIN GA, CAPEN DE, SILVA ND, MIQUEROL L, WAKIMOTO H, SEIDMAN CE, SEIDMAN JG, SADREYEV RI, NAXEROVA K, MITCHELL RN, BROWN D, LIBBY P, WEISSLEDER R, SWIRSKI FK, KOHL P, VINEGONI C, MILAN DJ, ELLINOR PT, NAHRENDORF M. Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell* 2017; **169**: 510-522.
- [14] JING D, ZHANG S, LUO W, GAO X, MEN Y, MA C, LIU X, YI Y, BUGDE A, ZHOU BO, ZHAO Z, YUAN Q, FENG JQ, GAO L, GE WP, ZHAO H. Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the PEGASOS method. *Cell Res.* 2018; **28**:803-818.
- [15] KIM JH, JANG MJ, CHOI J, LEE E, SONG KD, CHO J, KIM KT, CHA HJ, SUN W. Optimizing tissue-clearing conditions based on analysis of the critical factors affecting tissue-clearing procedures. *Sci Rep* 2018; **8**: 12815.

- [16] KLINGBERG A, HASENBERG A, LUDWIG-PORTUGALL I, MEDYUKHINA A, MÄNN L, BRENZEL A, ENGEL DR, FIGGE MT, KURTS C, GUNZER M. Fully Automated Evaluation of Total Glomerular Number and Capillary Tuft Size in Nephritic Kidneys Using Lightsheet Microscopy. *J Am Soc Nephrol* 2017; **28**: 451-459.
- [17] LI W, GERMAIN RN, GERNER MY. Multiplex, quantitative cellular analysis in large tissue volumes with clearing-enhanced 3D microscopy (Ce3D). *PNAS* 2017; **114**: E7321-E7330.
- [18] LI Y, XU J, WAN P, YU T, ZHU D. Optimization of GFP Fluorescence Preservation by a Modified uDISCO Clearing Protocol. *Front. Neuroanat.* 2018; **12**: 67.
- [19] LIU YA, CHUNG YC, SHEN MY, PAN ST, KUO CW, PENG SJ, PASRICHA PJ, TANG SC. Perivascular Interstitial Cells of Cajal in Human Colon. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2014; **1**: 101-119.
- [20] MASSELINK W, REUMANN D, MURAWALA P, PASIERBEK P, TANIGUCHI Y, BONNAY F, MEIXNER K, KNOBlich JA, TANAKA EM. Broad applicability of a streamlined ethyl cinnamate-based clearing procedure. *Development* 2019; **146**: dev166884.
- [21] MATRYBA P, KACZMAREK L, GOŁĄB J. Advances in Ex Situ Tissue Optical Clearing. *Laser Photon Rev* 2019; **13**: 1800292.
- [22] MURAKAMI TC, MANO T, SAIKAWA S, Horiguchi SA, SHIGETA D, BABA K, SEKIYA H, SHIMIZU Y, TANAKA KF, KIYONARI H, IINO M, MOCHIZUKI H, TAINAKA K, UEDA HR. A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing. *Nat. Neurosci.* 2018; **21**: 625-637.
- [23] ORLICH M, KIEFER F. A qualitative comparison of ten tissue clearing techniques. *Histol. Histopathol.* 2018; **33**: 181-199.
- [24] PAN C, CAI R, QUACQUARELLI FP, GHASEMIGHARAGOZ A, LOURBOPOULOS A, MATRYBA P, PLESNILA N, DICHGANS M, HELLAL F, ERTÜRK A. Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat. Methods* 2016; **13**: 859-867.
- [25] PARK YG, SOHN CH, CHEN R, MCCUE M, YUN DH, DRUMMOND GT, KU T, EVANS NB, OAK HC, TRIEU W, CHOI H, JIN X, LILASCHAROEN V, WANG J, TRUTTMANN MC, QI HW, PLOEGH HL, GOLUB TR, CHEN SC, FROSCHE MP, KULIK HJ, LIM BK, CHUNG K. Protection of tissue physicochemical properties using polyfunctional crosslinkers. *Nat Biotechnol* 2019; **37**: 73-83.
- [26] PAWŁOWSKA M, LEGUTKO D, STEFANIUK M. Getting an insight into the brain – new optical clearing techniques and imaging using light-sheet microscope. *Postepy Biochem.* 2017; **63**: 8-15.
- [27] PIATKEVICH KD, MALASHKEVICH VN, MOROZOVA KS, NEMKOVICH NA, ALMO SC, VERKHUSHA VV. Extended Stokes Shift in Fluorescent Proteins: Chromophore-Protein Interactions in a Near-Infrared TagRFP675 Variant. *Sci Rep* 2013; **3**: 1847.
- [28] QI Y, YU T, XU J, WAN P, MA Y, ZHU J, LI Y, GONG H, LUO Q, ZHU D. FDISCO: Advanced solvent-based clearing method for imaging whole organs. *Sci Adv* 2019; **5**: eaau8355.
- [29] RENIER N, ADAMS EL, KIRST C, WU Z, AZEVEDO R, KOHL J, AUTRY AE, KADIRI L, UMADEVI VENKATARAJU K, ZHOU Y, WANG VX, TANG CY, OLSEN O, DULAC C, OSTEN P, TESSIER-LAVIGNE M. Mapping of brain activity by automated volume analysis of immediate early genes. *Cell* 2016; **165**: 1789-1802.
- [30] RENIER N, WU Z, SIMON DJ, YANG J, ARIEL P, TESSIER-LAVIGNE M. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* 2014; **159**: 896-910.
- [31] RICHARDSON DS, LICHTMAN JW. Clarifying Tissue Clearing. *Cell* 2015; **162**: 246-257.
- [32] SCHWARZ MK, SCHERBARTH A, SPRENGEL R, ENGELHARDT J, THERE P, GIESE G. Fluorescent-Protein Stabilization and High-Resolution Imaging of Cleared, Intact Mouse Brains. *PLoS ONE* 2015; **10**: e0124650.
- [33] SCOTT DJ, GUNN NJ, YONG KJ, WIMMER VC, VELDHUIS NA, CHALLIS LM, HAIDAR M, PETROU S, BATHGATE RAD, GRIFFIN MDW. A Novel Ultra-Stable, Monomeric Green Fluorescent Protein For Direct Volumetric Imaging of Whole Organs Using CLARITY. *Sci Rep* 2018; **8**: 667.
- [34] SINDHWANI S, SYED AM, WILHELM S, CHAN WCW. Exploring Passive Clearing for 3D Optical Imaging of Nanoparticles in Intact Tissues. *Bioconjugate Chem.* 2017; **28**: 253-259.

- [35] STEGNER D, M. VAN EEUWIJK JM, ANGAY O, GORELASHVILI MG, SEMENIAK D, PINNECKER J, SCHMITHAUSEN P, MEYER I, FRIEDRICH M, DÜTTING S, BREDE C, BEILHACK A, SCHULZE H, NIESWANDT B, HEINZE KG. Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature. *Nat Commun* 2017; **8**: 127.
- [36] SUSAKI EA, TAINAKA K, PERRIN D, YUKINAGA H, KUNO A, UEDA HR. Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nat Prot* 2015; **10**: 1709–1727.
- [37] TAINAKA K, KUNO A, KUBOTA SI, MURAKAMI T, UEDA HR. Chemical Principles in Tissue Clearing and Staining Protocols for Whole-Body Cell Profiling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2016; **32**: 713-741.
- [38] VUE Z, GONZALEZ G, STEWART CA, MEHRA S, BEHRINGER RR. Volumetric imaging of the developing prepubertal mouse uterine epithelium using light sheet microscopy. *Mol Reprod Dev* 2018; **85**: 397-405.
- [39] YANG B, TREWEEK JB, KULKARNI RP, DEVERMAN BE, CHEN CK, LUBECK E, SHAH S, CAI L, GRADINARU V. Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell* 2014; **158**: 945-958.
- [40] YIN X, YU T, CHEN B, XU J, CHEN W, QI Y, ZHANG P, LI Y, KOU Y, MA Y, HAN N, WAN P, LUO Q, ZHU D, JIANG B. Spatial Distribution of Motor Endplates and its Adaptive Change in Skeletal Muscle. *Theranostics* 2019; **9**: 734-746.
- [41] YU T, QI Y, ZHU J, XU J, GONG H, LUO Q, ZHU D. Elevated-temperature-induced acceleration of PACT clearing process of mouse brain tissue. *Scientific Reports* 2017; **7**: 38848.
- [42] YUN DH, PARK YG, CHO JH, KAMENSKY L, EVANS NB, ALBANESE A, XIE K, SWANEY J, SOHN CH, TIAN Y, ZHANG Q, DRUMMOND G, GUAN W, DI NAPOLI N, CHOI H, JUNG HY, RUELAS L, FENG G, CHUNG K. Ultrafast immunostaining of organ-scale tissues for scalable proteomic phenotyping. *BioRxiv* 2019; 660373.
- [43] ZHANG WL, LIU SH, ZHANG WC, HU W, JIANG M, TAMADON A, FENG Y. Skeletal Muscle CLARITY: A Preliminary Study of Imaging The Three-Dimensional Architecture of Blood Vessels and Neurons. *Cell J* 2018; **20**: 131-137.
- [44] ZHU X, HUANG L, ZHENG Y, SONG Y, XU Q, WANG J, SI K, DUAN S, GONG W. Ultrafast optical clearing method for three-dimensional imaging with cellular resolution. *PNAS* 2019; **116**: 11480-11489.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 28.07.2019

Przyjęto: 03.09.2019

Paweł Matryba, Jakub Gołąb

Zakład Immunologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

ul. Nielubowicza 5, 02-097 Warszawa.

tel: +4822 599 21 99, fax: +48 22 5992194

e-mail: p.matryba@nencki.gov.pl, jakub.golab@wum.edu.pl