

Sylabus

Moderní metody buněčné biologie – nový

1. Buněčné kultury

Stanovení počtu a viability buněk: ukázka vybavení laboratoře, obsluha flow boxu, typy plastů pro buněčné kultury, bezpečnost práce, pasážování buněk, počítání částic na Coulter Counter, určení životnosti buněk barvením eosinem.

Detekce apoptotických buněk: stanovení apoptotického indexu - barvení pomocí DAPI (fluorescenční detekce buněk s kondenzovaným a fragmentovaným chromatinem). Měření mitochondriálního membránového potenciálu apoptotických buněk pomocí barvení TMRE (tetrametyl rhodamin etylester) a detekce průtokovou cytometrií.

Stanovení stupně diferenciac leukemických buněk: detekce povrchových molekul CD11b a CD14 u buněk myeloidní linie HL-60 průtokovou cytometrií pomocí přímé imunocytochemie s protilátkami značenými fluorescenčními barvivy. Stanovení míry oxidativního vzplanutí jako ukazatele diferenciac u buněk HL-60 za použití různých aktivátorů fagocytózy (zymosan, forbol myristat acetat, Ca²⁺ ionofor) na destičkovém luminometru.

Stanovení diferenciac buněk nádoru kolonu (linie HT-29): stanovení alkalické fosfatázy kolorimetricky (alkalická fosfatáza štěpí bezbarvý substrát 4-p-nitrofenyl fosfát za vzniku žlutého zbarvení).

2. Fluorescenční a konfokální mikroskopie

Princip funkce fluorescenčního mikroskopu (výhody a limitace), rozdíly mezi konvenční a konfokální mikroskopií. Pozorování trojrozměrně fixovaných interfázních jader, ve kterých je fluorescenčně značený gen a jinou fluorescenční značkou obarven celý chromozom, na kterém se daný gen nachází.

3. Biochemické metody

Příprava buněčného lyzátu pro Western blotting a izolaci RNA: metodika přípravy buněčného lyzátu pro detekci proteinů a pro izolaci RNA, stanovení koncentrace proteinů pomocí kitu Bio-Rad DC protein.

Elektroforéza a transfer proteinů na membránu: separace stanoveného množství proteinů připravených v rámci předchozího cvičení pomocí SDS-PAGE, přenos na PVDF membránu pomocí semidry electroblotting.

Imunodetekce: imunodetekce beta-aktinu pomocí primární neznačené protilátky (anti-beta-aktin) a sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou ve vzorcích zpracovaných a separovaných v rámci předchozích cvičení, vizualizace bude provedena pomocí kitu ECL Plus.

Izolace celkové RNA, stanovení koncentrace a kvality: izolace RNA z připraveného buněčného lyzátu pomocí komerčního kitu, stanovení koncentrace RNA a její čistota na přístroji Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer
pokračuje

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) metoda: stanovení tumor nekrotizujícího faktoru alfa pomocí komerčního kitu od firmy R&D system DuoSet v médiu získaného z diferencovaných myeloidních buněk THP-1 po aplikaci endotoxinu v různých koncentracích po dobu 24 hodin.

Časový harmonogram cvičení:

24. 11. 2008

Teoretický úvod:

laboratoř buněčných kultur, kultivace buněk, typy buněčných kultur, měření základních parametrů cytogenetiky, vyjadřování výsledků atd.

apoptóza a metody její detekce, diferenciace a její detekce

Praktické cvičení:

seznámení s laboratoří buněčných kultur a jejím vybavením

kultivace a pasážování různých typů buněčných linií

detekce apoptotických buněk (stanovení apoptotického indexu - barvení pomocí DAPI a fluorescenční detekce buněk s kondenzovaným a fragmentovaným chromatinem; měření mitochondriálního membránového potenciálu apoptotických buněk pomocí barvení TMRE (tetrametyl rhodamin etylester) a detekce průtokovou cytometrií

stanovení stupně diferenciace epiteliálních buněk z nádorové linie kolonu (HT-29) po

indukci butyrátem sodným (NaBt) - kolorimetrické stanovení aktivity alkalické fosfatázy.

1.12. 2008

Diferenciace leukemických buněk:

stanovení počtu a viability buněk myeloidní linie HL-60

detekce povrchových molekul CD11b a CD14 u buněk HL-60 průtokovou cytometrií
stanovení míry oxidativního vzplanutí jako ukazatele diferenciace u buněk HL-60 za
použití různých aktivátorů fagocytózy na destičkovém luminometru.

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) metoda:

stanovení cytokinu - tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF) pomocí komerčního
kitu v médiu získaného z diferencovaných myeloidních buněk po aplikaci endotoxinu
v různých koncentracích po dobu 24 hodin.

8. 12. 2008

Fluorescenční a konfokální mikroskopie

- Princip funkce fluorescenčního mikroskopu (výhody a limitace), rozdíly mezi
konvenční a konfokální mikroskopií. Pozorování trojrozměrně fixovaných
interfázních jader - vysokorozlišovací cytometrie

- Izolace celkové RNA z připraveného buněčného lyzátu pomocí komerčního kitu,
stanovení koncentrace a kvality na přístroji Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.

- přehledné seznámení s dalšími metodami (detekce exprese specifických proteinů
Western blotting, elektroforéza SDS-PAGE, imunodetekce)

TKÁŇOVÉ (BUNĚČNÉ) KULTURY *IN VITRO*

živočišné, rostlinné, hmyzí, rybí atd.

Živočišné buněčné kultury (získané z různých tkání např. hlodavců jako je myš, krysa, křeček nebo opic, člověka)

PRIMÁRNÍ KULTURY - buňky získané přímo z živočišných tkání, kousek tkáně, nutná disociace (rozvolnění) buněk a odstranění nežádoucích částí, omezená doba kultivace, specifické požadavky

BUNĚČNÉ LINIE - adaptované na dlouhodobý růst *in vitro*

diploidní - karyotyp identický s živočišným druhem, z něhož byly izolovány většinou omezený počet pasáží, stárnou a hynou (omezený tzv. "life-span")

heteroploidní - karyotyp a často i morfologie odlišné, dlouhodobá kultivace

Udržují se tzv. **pasážováním** - určitý počet buněk se po určité době přenesou do čerstvého živného prostředí

ADHERENTNÍ kultury - rostou přichyceny k pevnému podkladu (kultivační nádoby, mikronosiče)

SUSPENZNÍ kultury - nevyžadují podklad, rostou volně v médiu

Hlavní komerční dodavatelé buněčných linií

The American Type Culture Collection (ATCC)

<http://www.atcc.com/>

The European Collection of Cell Cultures (ECACC)

<http://www.ecacc.org.uk/>

ECACC Cell Lines

Product	Product Number	Storage Conditions	Unit Size
<p>A2780</p> <p><i>Species:</i> human <i>Tissue:</i> ovary <i>Morphology:</i> epithelial <i>Subculture Methods:</i> Split sub-confluent cultures (70-80%) 1:3 to 1:6 i.e. seeding at $3-6 \times 10^4$ cells/cm² using 0.25% trypsin or trypsin/EDTA; 5% CO₂; 37 °C. <i>Medium:</i> RPMI 1640 + 2 mM L-Glutamine + 10% Fetal Bovine Serum (FBS). <i>Karyotype:</i> Not specified <i>Description:</i> The A2780 human ovarian cancer cell line was established from tumor tissue from an untreated patient. Cells grow as a monolayer and in suspension in spinner cultures. A2780 is the parent line to the cisplatin resistant cell line A2780 cis (ECACC catalog no. 93112517) and the adriamycin resistant cell line A2780 ADR (ECACC catalog no. 93112520). Shipped on dry ice</p>	93112519	-196°C	1 vial
<p>A2780cis</p> <p><i>Species:</i> human <i>Tissue:</i> ovary <i>Morphology:</i> epithelial <i>Subculture Methods:</i> Split sub-confluent cultures (70-80%) 1:5 to 1:20 i.e. seeding at 1×10^3 to 1×10^4 cells/cm² using 0.25% trypsin or trypsin/EDTA; 5% CO₂; 37 °C. Cells will attach slowly after resuscitation and take up to 7 days to reach confluency. Recommendation: resuscitate cells in media without cisplatin. Add after subculture of attached cells. <i>Medium:</i> RPMI 1640 + 2 mM L-Glutamine + 1 µm cisplatinum + 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (cisplatinum only necessary every 2-3 passages). <i>Karyotype:</i> Modal no. 46 <i>Description:</i> This cisplatin-resistant cell line has been developed by chronic exposure of the parent cisplatin-sensitive A2780 cell line (ECACC catalog no. 93112519) to increasing concentrations of cisplatin. A2780cis is cross-resistant to melphalan, adriamycin and irradiation. An increased ability to repair DNA damage as well as cytogenetic abnormalities has been observed. In order to retain resistance cisplatinum has to be added to the media every 2-3 passages. In addition to this matched pair of drug-sensitive/resistant cell lines an adriamycin-resistant cell line, A2780adr (ECACC catalog no. 93112520), has been isolated from the same parental line A2780. Shipped on dry ice</p>	93112517	-196°C	1 vial
<p>A431</p> <p><i>Species:</i> human <i>Tissue:</i> skin <i>Morphology:</i> epithelial <i>Subculture Methods:</i> Split sub-confluent cultures (70-80%) 1:3 to 1:6 i.e. seeding at $2-4 \times 10^4$ cells/cm² using 0.25% trypsin or trypsin/EDTA; 5% CO₂; 37 °C. <i>Medium:</i> EMEM (EBSS) + 2 mM L-Glutamine + 1% Non Essential Amino Acids (NEAA) + 10% Fetal Bovine Serum (FBS). <i>Karyotype:</i> Hypertriploid <i>Description:</i> Derived from an 85 year old female with epidermal carcinoma. The cells carry large numbers of EGF binding sites and is an indicator cell for anti-TGF binding. Shipped on dry ice</p>	85090402	-196°C	1 vial

KULTIVACE BUNĚK

Speciální plastické lahvičky, misky různé velikosti – sterilní
Kultivace v živném médiu podle růstových a metabolických požadavků buněk v termostatu s řízenou atmosférou - 37° C, 95% vlhkost, 5% CO₂.
Nutná přísná sterilita!!!! - sterilní roztoky, plastik. nádoby, sklo, pipety atd.,
sterilizace autoklávem (120 °C), nebo horkým vzduchem (180 °C)
Práce ve **sterilním laminárním boxu** (typ BioHazard – laminární proudění vzduchu, filtry -chrání i uživatele - práce s nebezpečnými viry apod.)

Základní médium je balancované chemické prostředí - zdroj pro energii a biosyntézu.

Doplňky: a) nedefinované složky - **zvířecí séra** (hovězí, telecí, fetální, koňské)

b) definované složky (růstové faktory, hormony atd.) - specializované podle typu buněk

Živočišná séra

nejdražší součást média - ze zvířat z ekologicky málo poškozených oblastí vhodné definované náhrady sér

Antibiotika a antimykotika

penicilin + streptomycin, gentamicin (i proti mykoplazmatům)

Suspenzní buňky - po spočítání buněk se část supenze doplní čerstvým kultivačním médiem

Adherentní (přisedlé) buňky - uvolnění od podkladu a rozvolnění shluků enzymy např. trypsinem, spočítání buněk, vysetí do čerstvého média. Některé buňky vyžadují tzv. feeder layer - vrstvu buněk inaktivovaných zářením nebo chemicky sloužící jako podklad pro růst specifických typů buněk

Kultivace ve sterilních plastických lahvičkách se šroubovacími uzávěry nebo v miskách různé velikosti.

Velkokapacitní kultivace - na mikročasticích ve velkých kontejnerech - automatická výměna média

Uchovávání buněk v hlubokozmrazeném stavu (-180 °C - mraznice, tekutý dusík) ve speciálních ampulích a kontejnerech několik let. Nutné kryoprotektivum (proti tvorbě krystalů vody) - většinou dimetylsulfoxid nebo glycerol. Zmrazování je pomalé (řízené po 1 °C), rozmrazování rychlé - ponoření ampulí do lázně 37 °C.

VYUŽITÍ BUNĚČNÝCH KULTUR

Buněčné kultury se staly nástrojem pro detekci a objasňování mechanismů účinků buněčných regulátorů a genů, které určují individuální aspekty chování buněk.

Tato technologie umožnila pokrok ve virologii, somatické buněčné genetice, endokrinologii, toxikologii, farmakologii, hematologii, imunologii i ve výzkumu karcinogeneze a stala se významným nástrojem vývojové biologie, komplexní tkáňové fyziologie a průmyslové výroby specifických buněčných produktů.

Výhody:

- ▶ lze sledovat účinky různých faktorů a mechanismy studovaných dějů bez nežádoucí interakce s buňkami jiných typů nebo tkání, účinku humorálních faktorů i celkového stavu organismu
- ▶ lze získat rozsáhlé populace buněk shodných vlastností a sledovat jejich reakce v kontrolovatelných podmínkách
- ▶ homogenita, reprodukovatelnost a množství materiálu umožňuje studovat a odhalovat základní mechanismy vybraných aspektů chování těchto buněk
- ▶ specifické buněčné kultury lze využít k produkci a získávání množství důležitých biologických látek (enzymy, hormony) - hybridomy
- ▶ etické hledisko - systém omezuje využívání laboratorních zvířat

Nevýhody:

- ▶ umělý zjednodušený systém
- ▶ poznatky nelze beze zbytku aplikovat na podmínky *in vivo*

Buňky nezralé (nediferencované nebo částečně diferencované)

- ▶ buňky kmenové (toti- nebo pluripotentní)
- ▶ buňky progenitorové

Jsou schopny sebeobnovy, mohou se dále dělit a diferencovat do zralejších stádií. Charakteristické pro embryonální stadium a v dospělém organismu pro některé tkáně (krevní tkáň, střevní a kožní epitel, zárodečné buňky).

Schopné kultivace a dozrávání *in vitro* ve specifických podmínkách.

Buňky zralé - diferencované

Rozrůzněné podle typu tkáně se specifickými vlastnostmi. Nejsou schopny se dále dělit, stárnou a umírají apoptózou (nervové, jaterní buňky apod.)

Schopné kultivace *in vitro* omezený počet pasáží (diploidní stav) nebo se z nich vytvářejí heteroploidní permanentní linie.

Buněčné populace *in vitro*

Imortalizované nádorové linie

asynchronní - buňky se nacházejí v různých fázích buněčného cyklu - přirozený stav

synchronní - buňky jsou ve stejné fázi buněčného cyklu - uměle navozené různými chemickými látkami, homogenní populace, stejné reakce

Využití:

při výzkumu dějů vázaných na určitou fázi buněčného cyklu
v praxi v nádorové terapii (léčba cytostatiky)

KREVNÍ BUŇKY

primární - z krve nebo kostní dřeně člověka a laboratorních zvířat
detekce jednotlivých typů a počtů na hemocytometru
kultivace progenitorů *in vitro* - BFU-E, CFU-S, GM-CFU - vyžadují specifické podmínky a specifické růstové faktory (erythropetin, GM-CSF, IL-3 apod.)
Využití při transplantacích – namnožení buněk

permanentní linie - z krve leukemických pacientů nebo lab. zvířat
HL-60 - lidská promyelocytární leukémie - promyelocyty schopné diferencovat *in vitro* - bipotentní, deficientní v p53

kys. retinová (RA), DMSO - diferenciaci do granulocytů

vit. D3., forbol ester (TPA), butyrát - diferenciaci do monocytů-makrofágů

Vhodný model pro

- ▶ studium regulace proliferace, diferenciaci a apoptózy myeloidních buněk
- ▶ studium příčin leukemických poruch
- ▶ studium účinků kyseliny arachidonové (AA), eikosanoidů a cytokinů (TGF- β a TNF α)

Při diferenciaci

se mění morfologie buněk (mikroskopická detekce na preparátech z cytocentrifugy)

stoupá aktivita specifických enzymů (např. nespecifické esterázy)

stoupá exprese specif. povrchových antigenů (CD11b, CD 14) - FCM

vzniká schopnost fagocytózy a produkce kyslíkových radikálů (měření redukce NBT nebo chemiluminiscenčně)

U937 - promonocytární leukémie - promonocyty schopné diferencovat do monocytů po RA, DMSO, TPA, mutovaný p53

ML 1 - lidská myeloidní leukémie - normální (wild type) p53

EPITELIÁLNÍ BUŇKY

z adenokarcinomu kolonu - linie HT29, CaCO2, HCT115 - nádorové buňky ,
FHC – fetální střevo – nenádorové. Schopnost diferencovat *in vitro* po
působení butyrátu sodného (NaBt):

- ▶ růst aktivity alkalické fosfatázy
- ▶ morfologické změny doprovázené polymerizací F-aktinu
- ▶ zvýšení exprese adhezivních molekul - E-kadherinu

Vhodný model

- ▶ pro studium regulace prolif., dif. a apoptózy epitelu střeva a mechanismů vzniku nádorů kolonu
- ▶ pro studium účinků nenasyc. MK a cytokinů

Pro ekotoxikologické studie jsou vhodné

- ▶ **buňky z kůže - keratinocyty** - linie HaCaT - normální buňky s aktivním metabolismem AA a citlivé k působení cytokinů
- ▶ **jaterní buňky**: primární hepatocyty (kryší), linie nádorových buněk hepatomu (lidského nebo hlodavců), kryší jaterní fibroblasty

▶ **geneticky modifikované buněčné linie:**

pro detekci dioxinové aktivity (H4IIELuc)

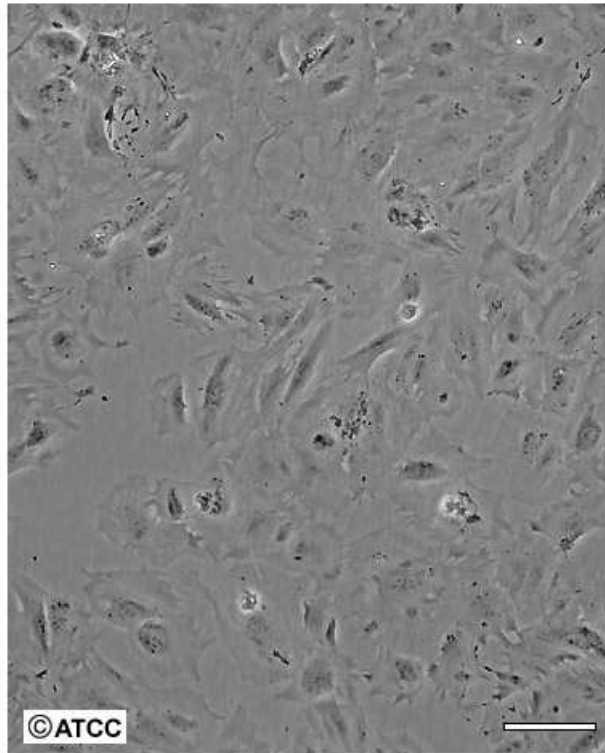
pro detekci estrogenní aktivity (MCF-7, MVLN) studovaných látek

Vnesený gen s luciferázou - intenzita odráží aktivaci příslušných
vnitrobuněčných receptorů (AhR nebo ER) a je detekována na luminometru

Linie lidských epiteliálních buněk kolonu

FHC

normální
fetální střevo

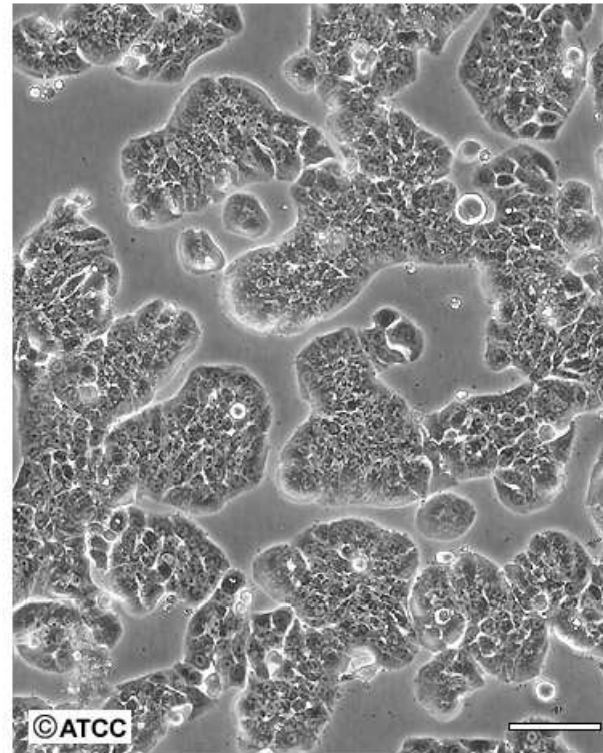


High Density

Scale Bar = 100µm

HT-29

diferencující
neinvazivní

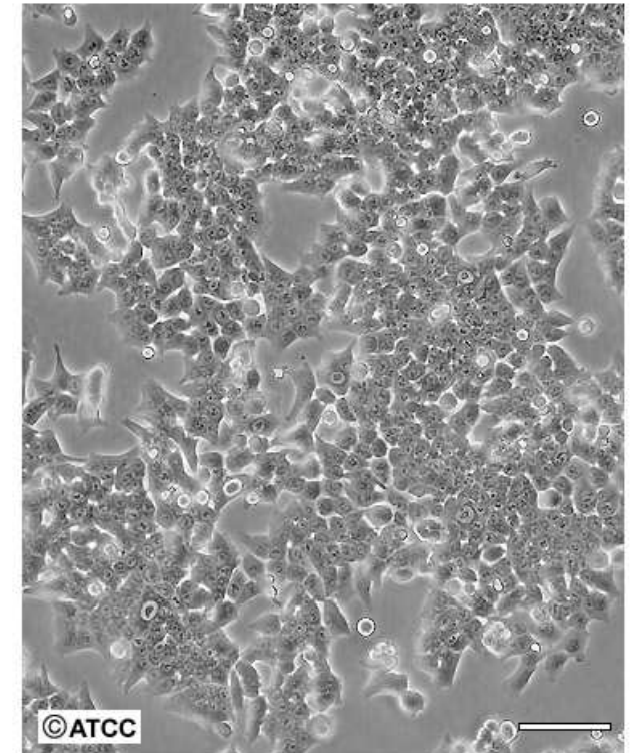


High Density

Scale Bar = 100µm

HCT-116

nediferencující
invazivní



High Density

Scale Bar = 100µm

Adenokarcinom kolonu

CaCo-2

SW 620 – lymf. uzlina

VYBAVENÍ LABORATOŘE PRO KULTIVACE BUNĚK

- ▶ **Sterilní prostředí** – speciální plastik, sklo, pipety (skleněné, automatické -různé objemy autokláv, horkovzdušná sterilizace (130 °C)
 - ▶ **Klimatizace, UV světlo**
 - ▶ **Destilační přístroj** na superčistou vodu
 - ▶ **Laminární box (Biohazard)** – laminární proudění vzduchu, filtry – sterilní prostředí pro práci, ochrana při práci
 - ▶ **Inkubátor** – 37 °C, 5% CO₂, 95% vlhkost
 - ▶ **Počítač částic** (buněk)
 - ▶ **Inverzní mikroskop**
 - ▶ **Centrifugy**
-

- ▶ **ELISA reader**
- ▶ **Cytocentrifuga**
- ▶ **Fluorescenční mikroskop**
- ▶ **Vysokoobrátková chlazená centrifuga** (výměnné rotory)
- ▶ **Průtokový cytometr** (FACSCalibur, Beckton Dickinson)
lasery, 4 fluorescence, sortovací modul
stanovení několika parametrů současně u rozsáhlých
buněčných populací
- ▶ **Fluostar** – multifunkční přístroj – spektrofotometr, fluorimetr,
chemiluminometr
- ▶ **Zařízení pro molekulární biologii**
- ▶ **Výkonná výpočetní technika**

MÉDIA

Řada druhů – vhodné podle typu buněk (Eaglovo, Dulbecco, RPMI-1640), dodávají se kompletní tekutá, koncentráty, prášková - skladování 4° C.

Nutná kvalitní apyrogenní voda o vodivosti 0,2-0-1 μS a chemikálie nejvyšší čistoty.

Nutná sterilizace přes filtr 0,2 μm .

Základní složky:

Glukóza (nebo galaktóza) a glutamin - zdroj energie a uhlíku

Aminokyseliny - zdroj energie a dusíku

Vitamíny - kofaktory pro enzymatické reakce

Lipidy - esenciální mastné kyseliny, cholesterol, etanolamin apod.

Anorganické soli - zajišťují osmolalitu, tlumí aciditu, nutriční faktor

Pufrační solné směsi - Earlov roztok (fyziolog. roztok s vysokým obsahem NaHCO_3) - kultivace v řízené atmosféře s regulovaným obsahem 5% CO_2 zabraňuje rozpadu a alkalizaci média.

Požadované pH většinou 7,2 - 7,4 - úprava HCl a NaOH

Otevřený systém - Petriho misky nebo lahvičky s povoleným uzávěren

Optická kontrola - indikátor fenolová červeň

Organické pufrační systémy - HEPES 20mM

Cell Culture Media

Classic Media: Media Formulations

RPMI-1640 Medium

Component	R 0883 [1x] g/L	R 1145 [10x] g/L	R 1383 g/L	R 6504 g/L	R 8758 [1x] g/L
INORGANIC SALTS					
Calcium Nitrate • 4H ₂ O	0.1	1.0	0.1	0.1	0.1
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.04884	0.04884	0.04884	0.04884	0.04884
Potassium Chloride	0.4	4.0	0.4	0.4	0.4
Sodium Bicarbonate	2.0	—	6.0	—	2.0
Sodium Chloride	6.0	60.0	6.8	6.0	6.0
Sodium Phosphate Dibasic (anhydrous)	0.8	8.0	0.8	0.8	0.8
AMINO ACIDS					
L-Arginine	0.2	2.0	0.2	0.2	0.2
L-Asparagine (anhydrous)	0.05	0.5	0.05	0.05	0.05
L-Aspartic Acid	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
L-Cystine • 2HCl	0.0652	0.652	0.0652	0.0652	0.0652
L-Glutamic Acid	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
L-Glutamine	—	—	0.3	0.3	0.3
Glycine	0.01	0.1	0.01	0.01	0.01
L-Histidine	0.015	0.15	0.015	0.015	0.015
Hydroxy-L-Proline	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
L-Isoleucine	0.05	0.5	0.05	0.05	0.05
L-Leucine	0.05	0.5	0.05	0.05	0.05
L-Lysine • HCl	0.04	0.4	0.04	0.04	0.04
L-Methionine	0.015	0.15	0.015	0.015	0.015
L-Phenylalanine	0.015	0.15	0.015	0.015	0.015
L-Proline	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
L-Serine	0.03	0.3	0.03	0.03	0.03
L-Threonine	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
L-Tryptophan	0.005	0.05	0.005	0.005	0.005
L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.02883	0.2883	0.02883	0.02883	0.02883
L-Valine	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
VITAMINS					
D-Biotin	0.0002	0.002	0.0002	0.0002	0.0002
Choline Chloride	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
Folic Acid	0.001	—	0.001	0.001	0.001
myo-Inositol	0.035	0.35	0.035	0.035	0.035
Niacinamide	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001
p-Amino Benzoic Acid	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.00025	0.0025	0.00025	0.00025	0.00025
Pyridoxine • HCl	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001
Riboflavin	0.0002	0.002	0.0002	0.0002	0.0002
Thiamine • HCl	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001
Vitamin B ₁₂	0.000005	0.00005	0.000005	0.000005	0.000005
OTHER					
D-Glucose	2.0	20.0	—	2.0	2.0
Glutathione (reduced)	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001
Phenol Red • Na	0.0053	0.053	0.0053	0.0053	0.0053
ADD					
L-Glutamine	0.3	0.3 at 1x	—	—	—
Sodium Bicarbonate	—	2.0 at 1x	2.0	2.0	—

Cell Culture Media

Classic Media: Media Formulations

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME)

Component	D 5523 g/L	D 5546 [1x] g/L	D 5648 g/L	D 5671 [1x] g/L	D 5796 [1x] g/L
INORGANIC SALTS					
Calcium Chloride • 2H ₂ O	0.265	0.265	0.265	0.265	0.265
Ferric Nitrate • 9H ₂ O	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767	0.09767	0.09767	0.09767	0.09767
Potassium Chloride	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Sodium Bicarbonate	—	—	3.7	—	3.7
Sodium Chloride	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	—	0.109	0.109	0.109	0.109
AMINO ACIDS					
L-Arginine • HCl	0.084	0.084	0.084	0.084	0.084
L-Cystine • 2HCl	0.0626	0.0626	0.0626	0.0626	0.0626
L-Glutamine	0.584	0.584	—	0.584	0.584
Glycine	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042
L-Isoleucine	0.105	0.105	0.105	0.105	0.105
L-Leucine	0.105	0.105	0.105	0.105	0.105
L-Lysine • HCl	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146
L-Methionine	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
L-Phenylalanine	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066
L-Serine	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042
L-Threonine	0.095	0.095	0.095	0.095	0.095
L-Tryptophan	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016
L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.10379	0.10379	0.10379	0.10379	0.10379
L-Valine	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094
VITAMINS					
Choline Chloride	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
Folic Acid	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
myo-Inositol	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072
Niacinamide	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
Pyridoxal • HCl	0.004	0.004	—	0.004	—
Pyridoxine • HCl	—	—	0.004	—	0.004
Riboflavin	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004
Thiamine • HCl	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
OTHER					
D-Glucose	4.5	1.0	1.0	4.5	4.5
Phenol Red • Na	0.0159	0.0159	0.0159	0.0159	0.0159
Pyruvic Acid • Na	—	0.11	0.11	—	—
ADD					
L-Glutamine	—	—	0.584	—	—
Sodium Bicarbonate	3.7	3.7	—	3.7	—
Sodium Phosphate	0.109	—	—	—	—

Doplňky médií – živočišné sérum (hovězí, telecí, koňské) – zdroj dalších důležitých látek (cytokiny, růstové faktory, esenciální mastné kyseliny atd.) nejčastěji používané fetální bovinní sérum

Animal Sera

Product Testing for Fetal Bovine Sera

	F 2442	F 0643	F 3885	F 4135	F 3018	F 0392
SOURCE	bovine	bovine	bovine	bovine	bovine	bovine
COUNTRY	USA	USA	USA	USA	USA	USA
STERILITY	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PERFORMANCE	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CLONING ASSAY	✓	✓	✓	✓	✓	✓
VIRUS (raw material)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
MYCOPLASMA	✓	✓	✓	✓	✓	✓
BACTERIOPHAGE	✓	N/A	✓	✓	N/A	N/A
ENDOTOXIN (EU/ml)	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10
HEMOGLOBIN (mg %)	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20
TOTAL PROTEIN (g %)	3.0-4.5	3.0-4.5	3.0-4.5	3.0-4.5	3.0-4.5	3.0-4.5
ELECTROPHORECTIC PATTERN	✓	✓	✓	✓	✓	✓
IgG	✓	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
HORMONE TESTING	Report result	N/A	Report result	Report result	N/A	N/A
pH at RT	6.7-8.0	6.7-8.0	6.7-8.0	6.7-8.0	6.7-8.0	6.7-8.0
OSMOLALITY (mOsm/Kg H ₂ O)	260-340	260-340	260-340	260-340	260-340	260-340
CHEMICAL ANALYSIS	✓	N/A	✓	✓	N/A	N/A

✓ — Indicates testing is performed and product meets specification.



**Laboratoř
ytokinetiky**

Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

Scientific interests:

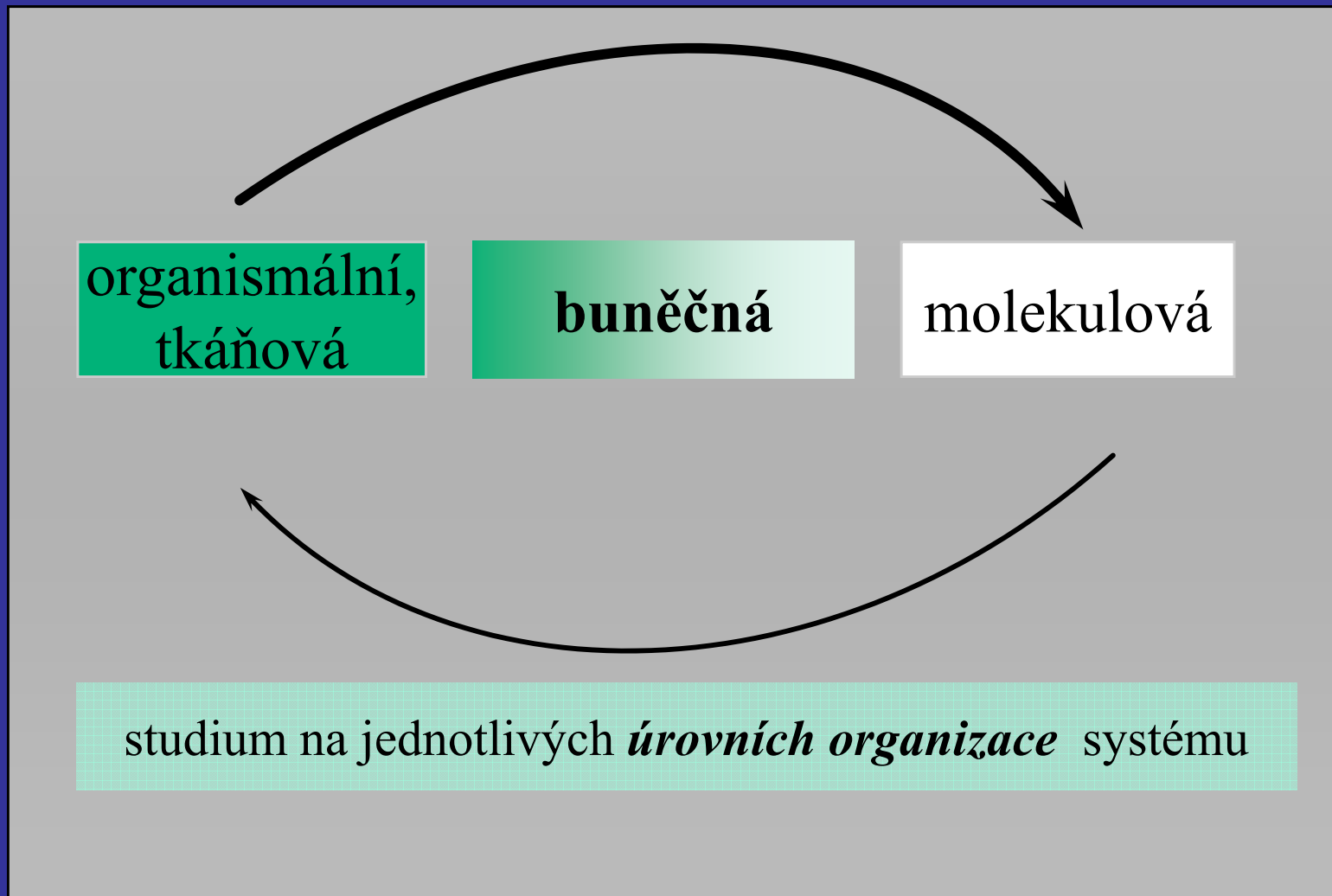
- ▶ Lipid dietary compounds in regulation of cytokinetics
- ▶ Growth regulators in cancer cell signalling
- ▶ Interaction of lipids and cytokines
- ▶ Effects of anticancer drugs
- ▶ Molecular and cellular mechanisms of toxicity of organic compounds

Laboratoř cytokinetiky BFÚ
(hlavní oblasti výzkumu
a odborného směřování)



- Používané modely a metodický potenciál
- Příklady výsledků s využitím tkáňových kultur
- Někteřá úskalí, klady a omezení modelů *in vitro*

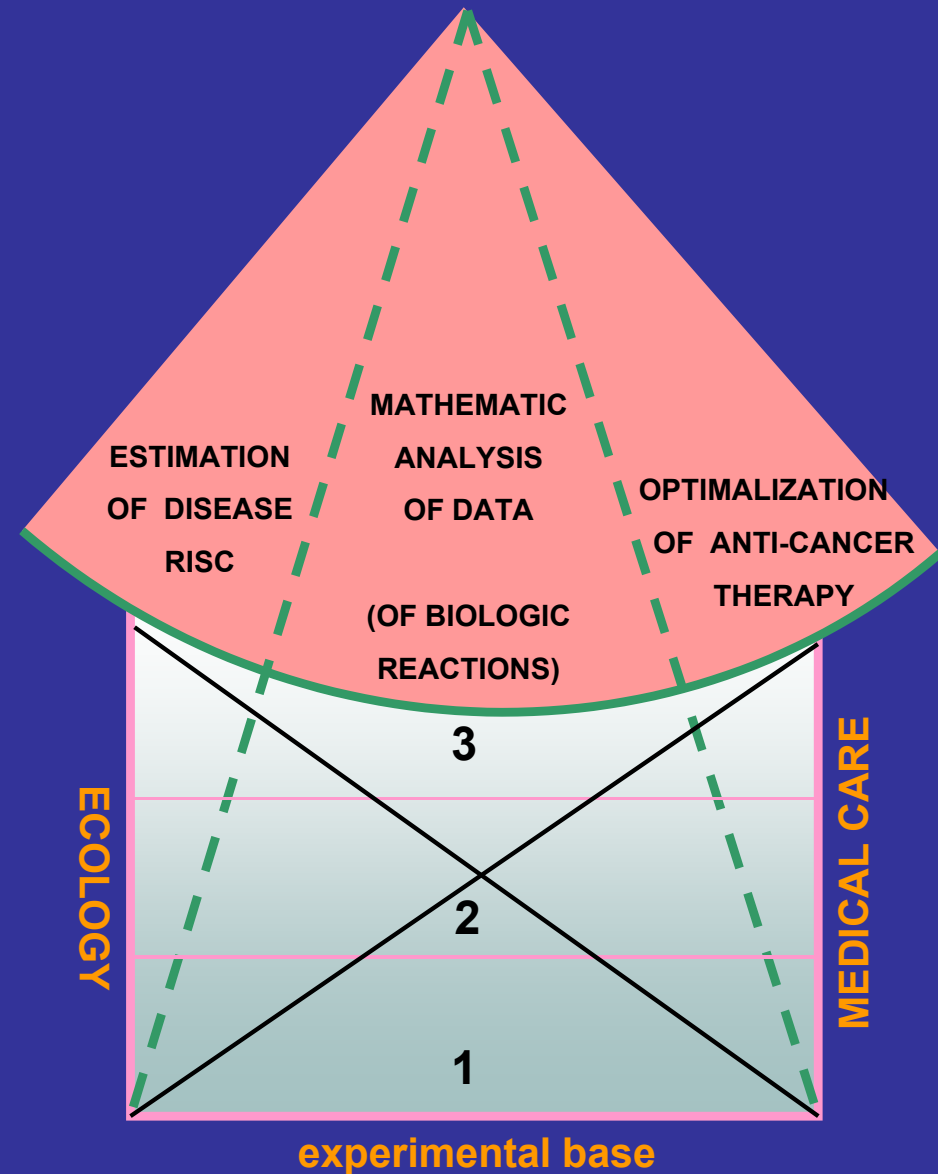
Komplexní povaha biologických systémů vyžaduje komplexní přístupy k jejich studiu



TOXICOLOGY



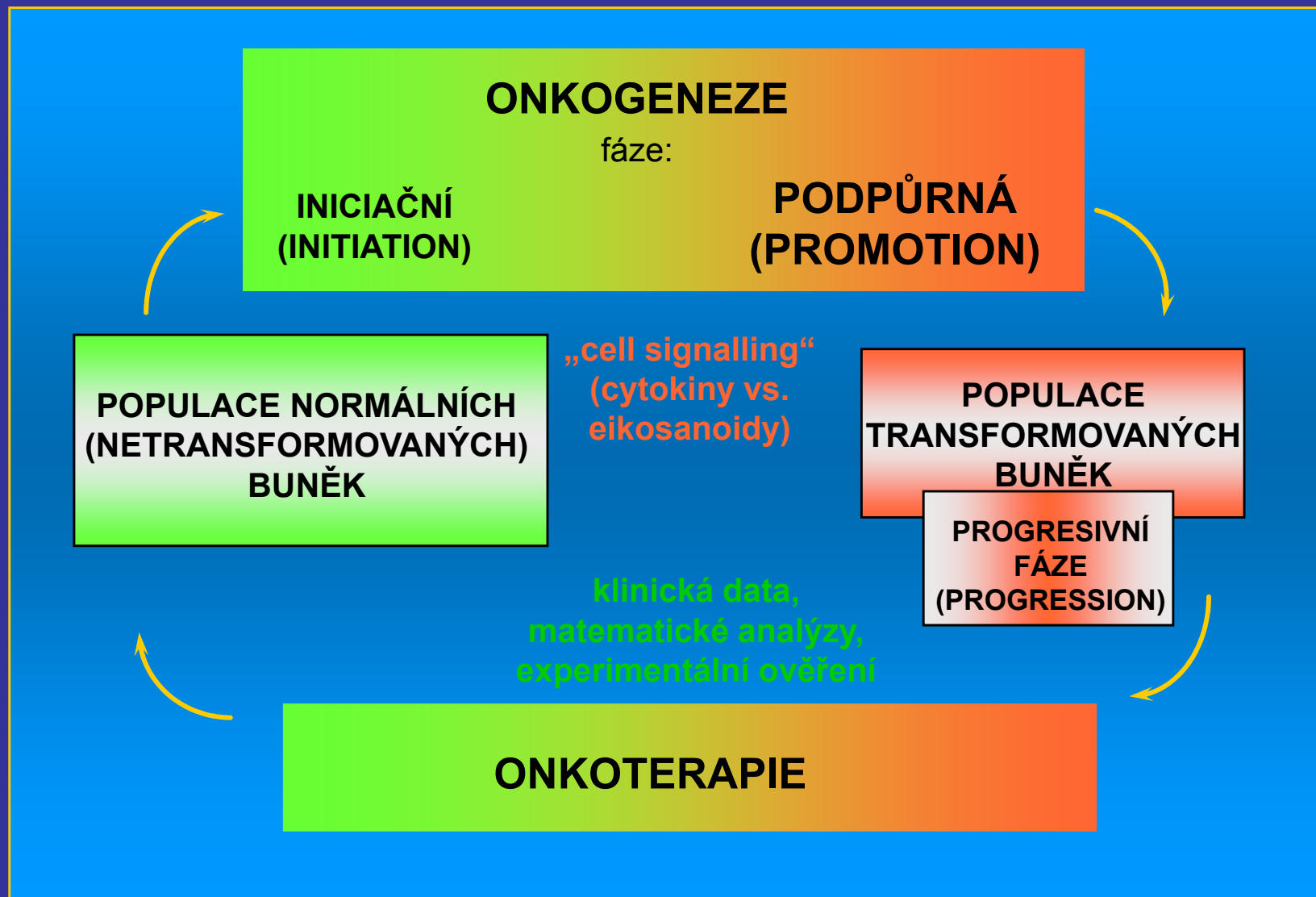
ECOTOXICOLOGY ←



REGULATION OF CELL KINETICS
(PROLIFERATION, DIFFERENTIATION, APOPTOSIS)

1 - molecular level
2 - cellular level
3 - systemic level (organism, population, ecosystem)

VÝZKUMNÉ CÍLE A OBLASTI PRAKTICKÉHO VYUŽITÍ





Snaha o naplnění cyklu
a důsledky pro finanční zajištění

DETEKCE PROLIFERAČNÍ AKTIVITY BUNĚK

Růst buněk

počty buněk (Bürkerova komůrka, Coulter Counter) v časových intervalech od vyšetí určitého počtu - růstové křivky

spektrofotometrické stanovení celkových proteinů - Amido black

doba zdvojení populace (doubling time),

generační doba (trvání buněčného cyklu)

Metabolicky aktivní část populace

izotopové metody - stanovení podílu populace syntetizující DNA - inkorporace ³H-tymidinu do DNA - detekce hladiny radioaktivity autoradiograficky nebo scintilačně – detektor β záření

spektrofotometrické metody - inkorporace bromdeoxyuridinu - detekce pomocí navázané protilátky - ELISA reader nebo průtoková cytometrie (FCM)

metoda redukce MTT na formazan - založeno na aktivitě mitochondrií

Stanovení mitotického indexu

mikroskopické stanovení podílu buněk v mitóze na řezech z tkání či buněčných preparátech

Detekce počtu buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu

Flow cytometrie - procento buněk v G0/G1, S a G2/M fázi

Stanovení délky fází buněčného cyklu - autoradiografické metody, BrDU

Testy cytotoxicity

MTT test

Stanovení viability - vitální barvení trypanovou modří nebo eosinem

Detekce apoptózy/nekrózy

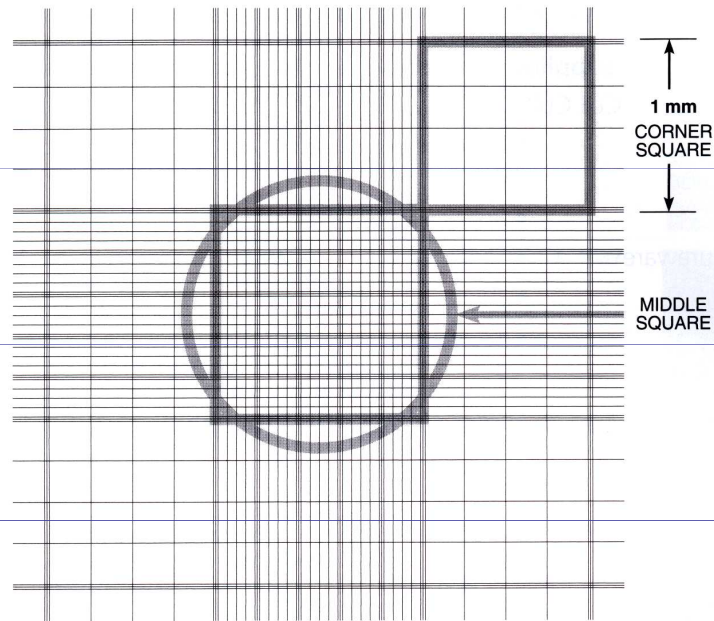
Morfologicky –světelný mikroskop

Fluorescenční mikroskop

Flow cytometrie (AnnexinV, TUNEL, subG0/G1 populace)

TRYPAN BLUE

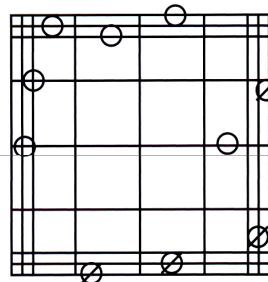
DIAGRAM I
STANDARD HEMOCYTOMETER CHAMBER



The circle indicates the approximate area covered at 100x microscope magnification (10x ocular and 10x objective). Include cells on top and left touching middle line (O). Do not

count cells touching middle line at bottom and right (Ø). Count 4 corner squares and middle square in both chambers (one chamber represented here).

DIAGRAM II
CORNER SQUARE (ENLARGEMENT)



Count cells on top and left touching middle line (O). Do not count cells touching middle line at bottom and right (Ø).

- ▶ Na počátku stojí pracovní hypotéza, kterou ověřujeme
- ▶ Důležité jsou časové a koncentrační závislosti (dose-response)
- ▶ Studium působení jednotlivých faktorů nebo jejich kombinací (multivariační analýzy)
- ▶ Souvislost proliferace, diferenciací a apoptózy na buněčné úrovni
- ▶ Po stanovení základních cytotkinetických dat studium detailnějších mechanismů účinků na subbuněčné a molekulární úrovni
- ▶ Experimenty se opakují nezávisle nejméně 3x (v případě nejasností i vícekrát) a v mnoha případech zahrnují ještě paralelní měření, která upřesňují získanou hodnotu.
- ▶ Výsledky jsou vždy statisticky zhodnoceny a je určena významnost rozdílů.
- ▶ Výsledky jsou prezentovány formou tabulek, grafů nebo reprezentativních obrázků či fotografií.

Příklady výsledků s využitím buněčných linií



Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

Růstové křivky

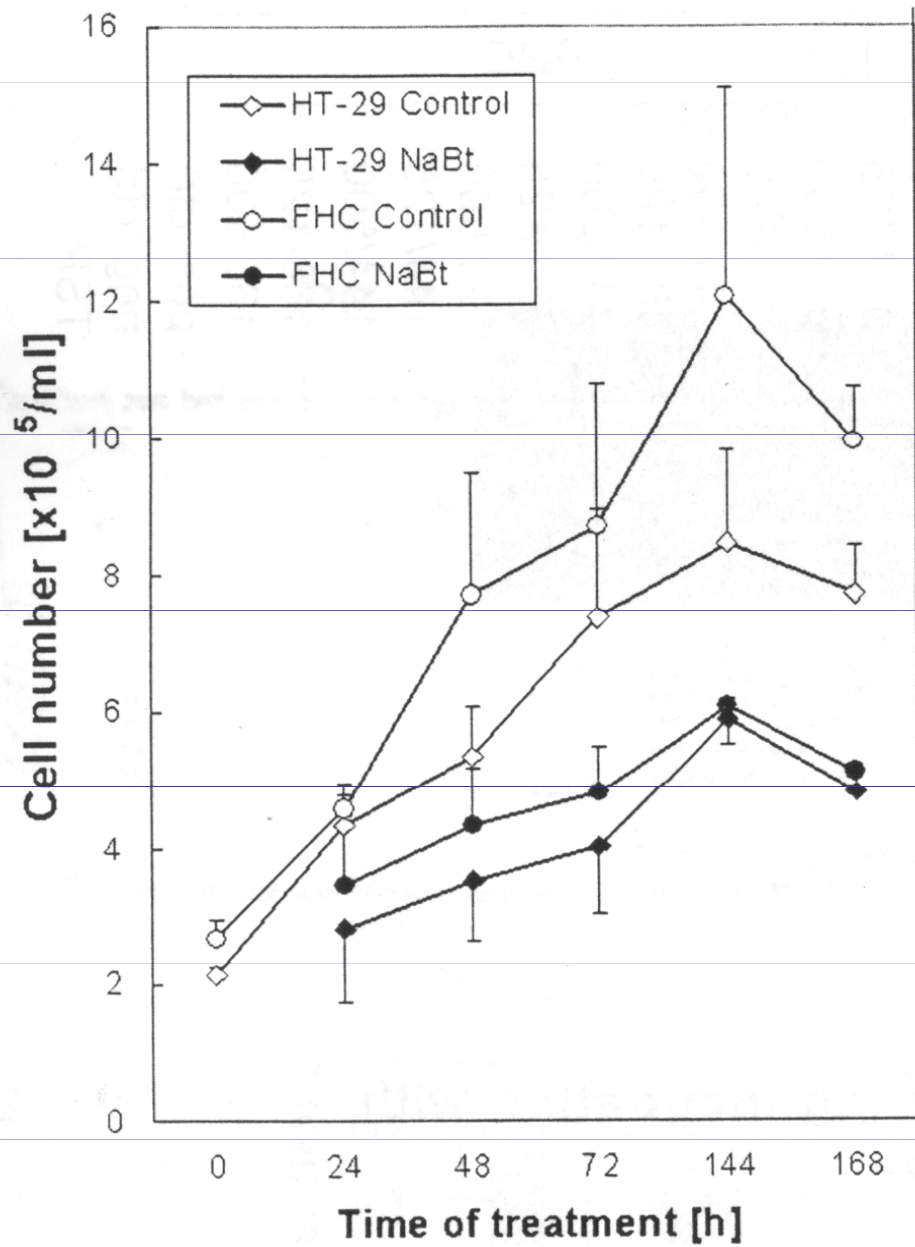


Figure 1. Effect of NaBt (5 mM) on growth of HT-29 and FHC cells (starting density $\times 10^5/\text{ml}$). The values are means \pm SEM of three independent experiments.

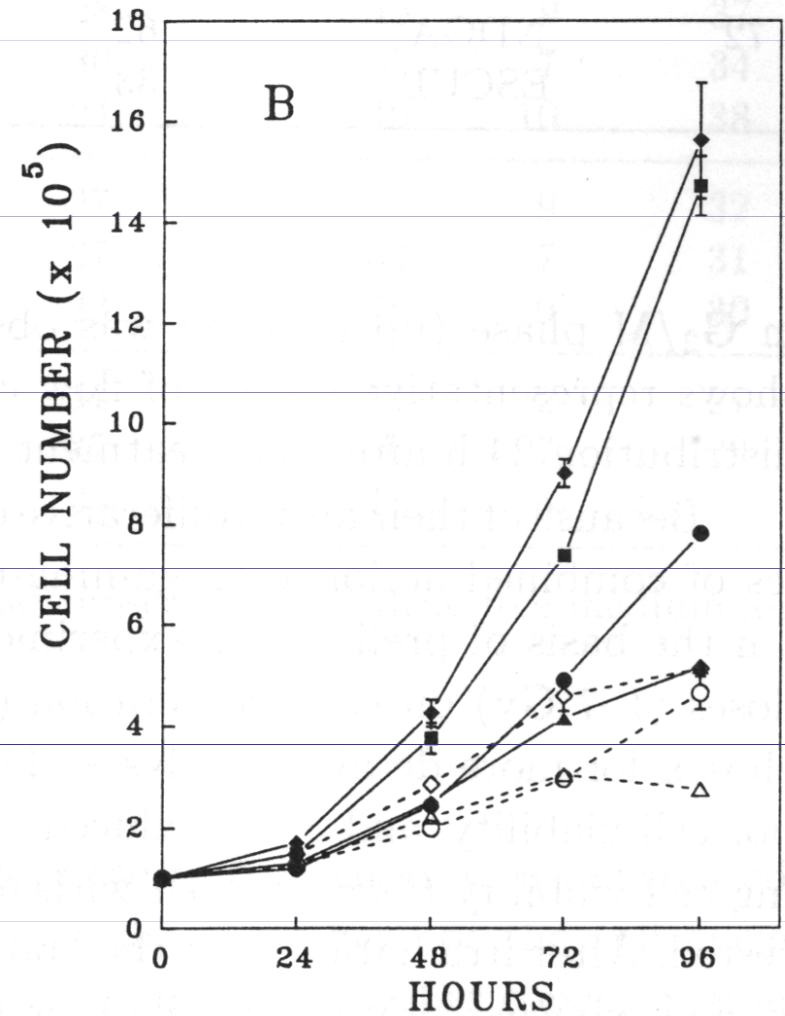
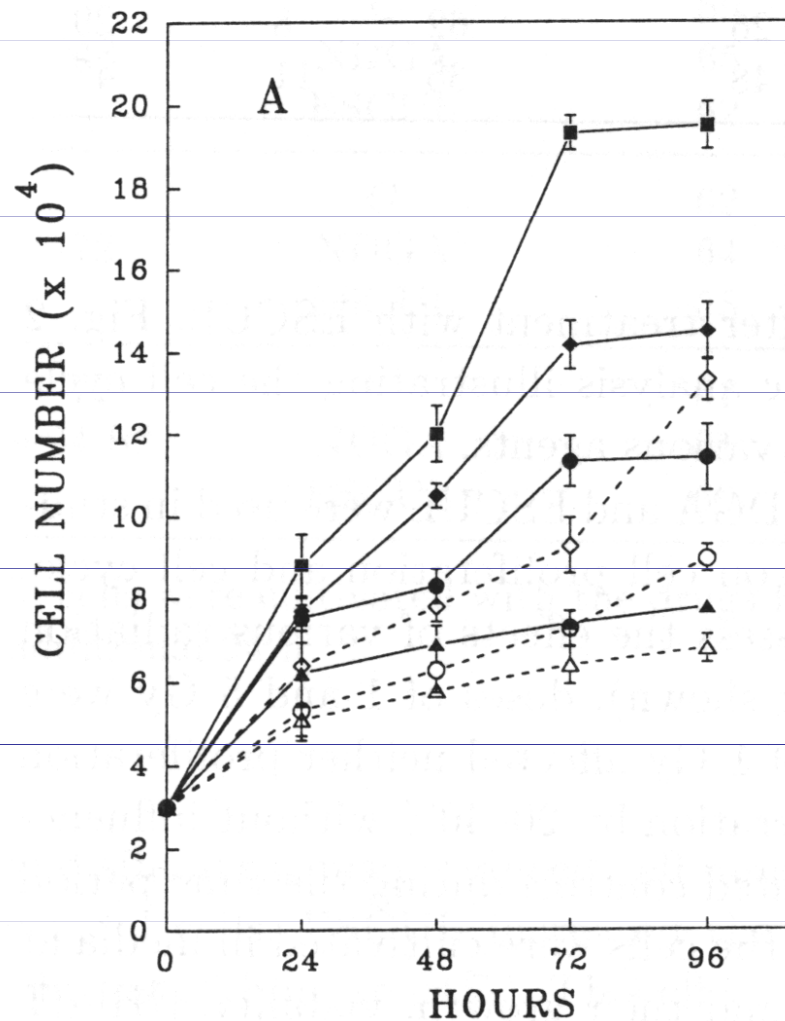


Figure 3. Growth of HS578T (A) and U937 (B) cells cultivated in the absence (diamonds) or in the presence of 50 $\mu\text{mol/l}$ PIROX (squares), 25 $\mu\text{mol/l}$ NDGA (circles) or 50 $\mu\text{mol/l}$ ESCUL (triangles). The solid lines and solid symbols represent nonirradiated cells. The dashed lines and open symbols represent cells irradiated with 5 Gy. The data are means \pm S.E.M. for three independent experiments performed in triplicates.

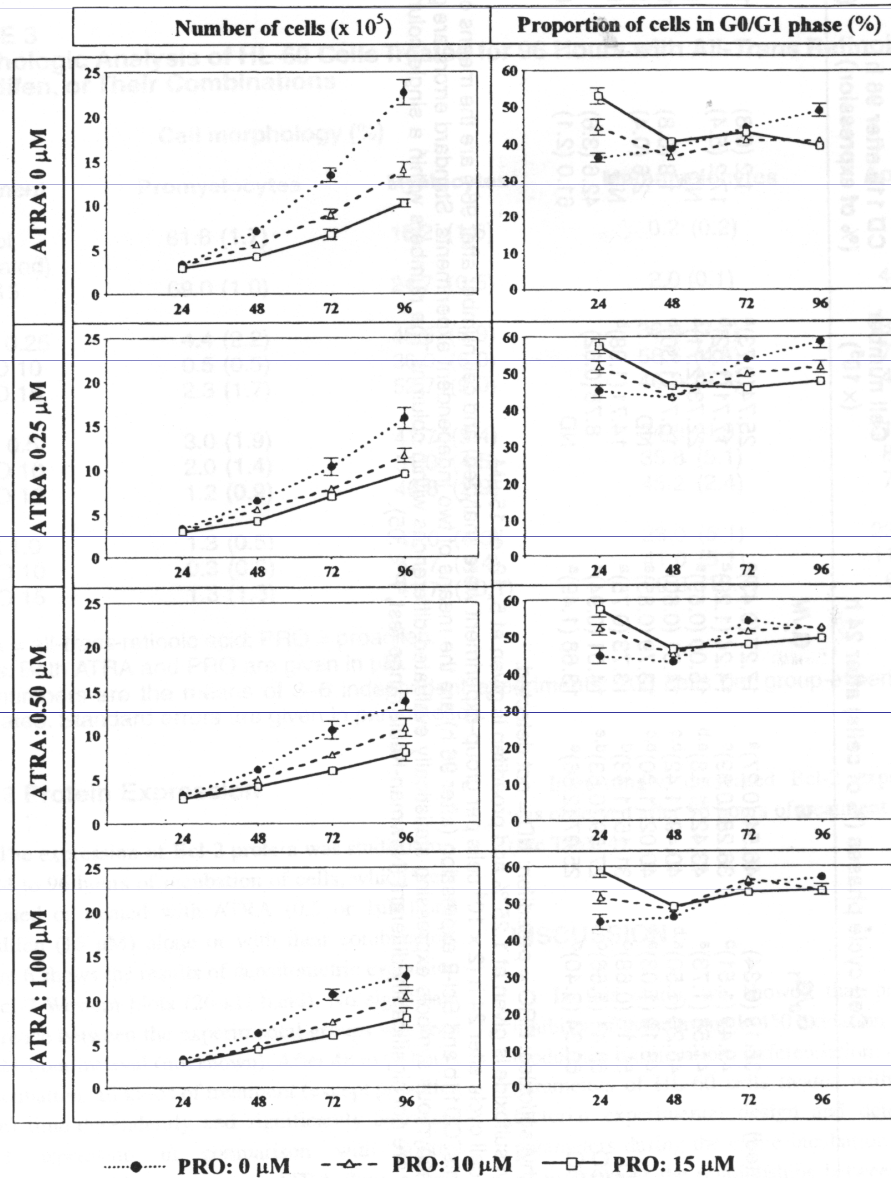


FIGURE 5. Number of cells and proportion of cells in cell cycle phases as influenced by combined all-*trans*-retinoic acid (ATRA) and proadifen (PRO) during the experimental 24- to 96-h period. The points represent the means of 3-8 independent experiments supplied with standard errors (error bars).

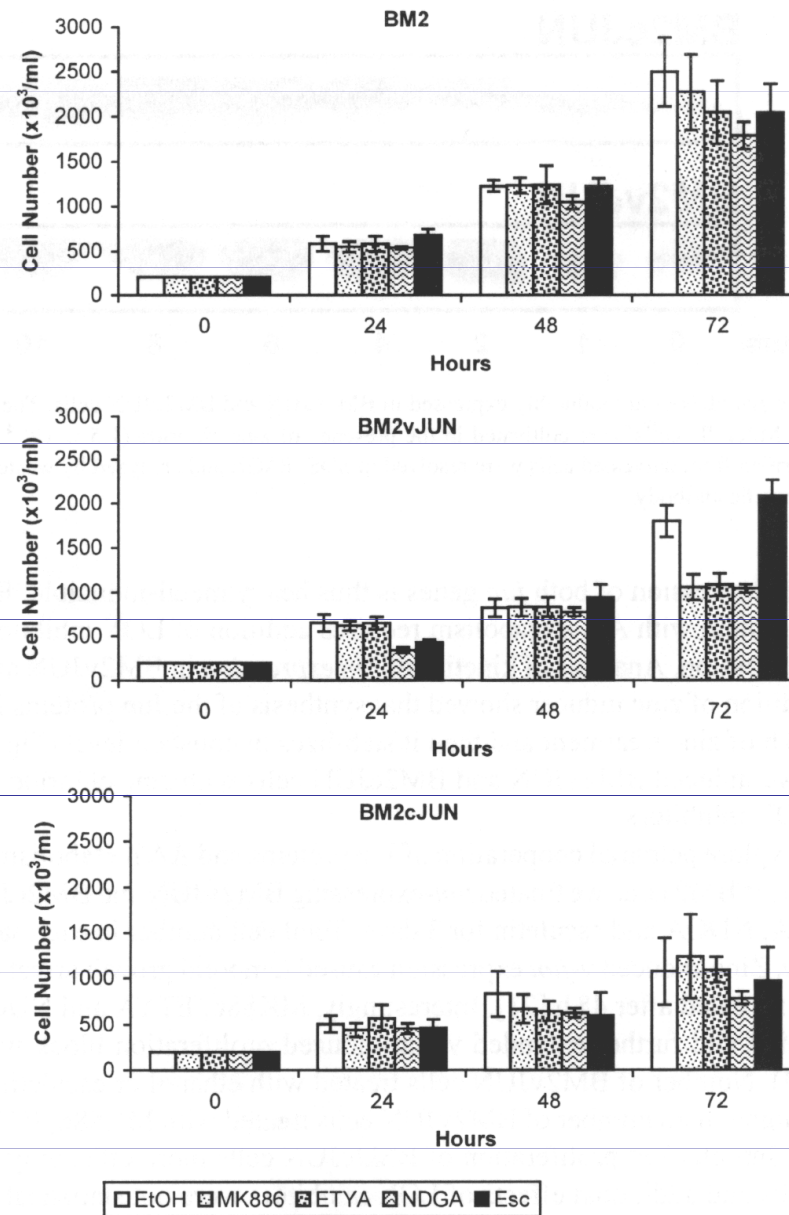


Fig. 4. Jun proteins and lipoxygenase inhibitors slow down proliferation of BM2 cells. The same number of BM2, BM2vJUN and BM2cJUN cells was seeded and treated with zinc chloride (1.5×10^{-4} M). Four hours later, lipoxygenase inhibitors MK886, ETYA, NDGA and esculetin (Esc) ($5 \mu\text{M}$) were added to cultivation media for indicated time. Total cell number was determined using cell counter. Columns represent the average values from three to six independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

Koncentrační závislosti (dose-response)

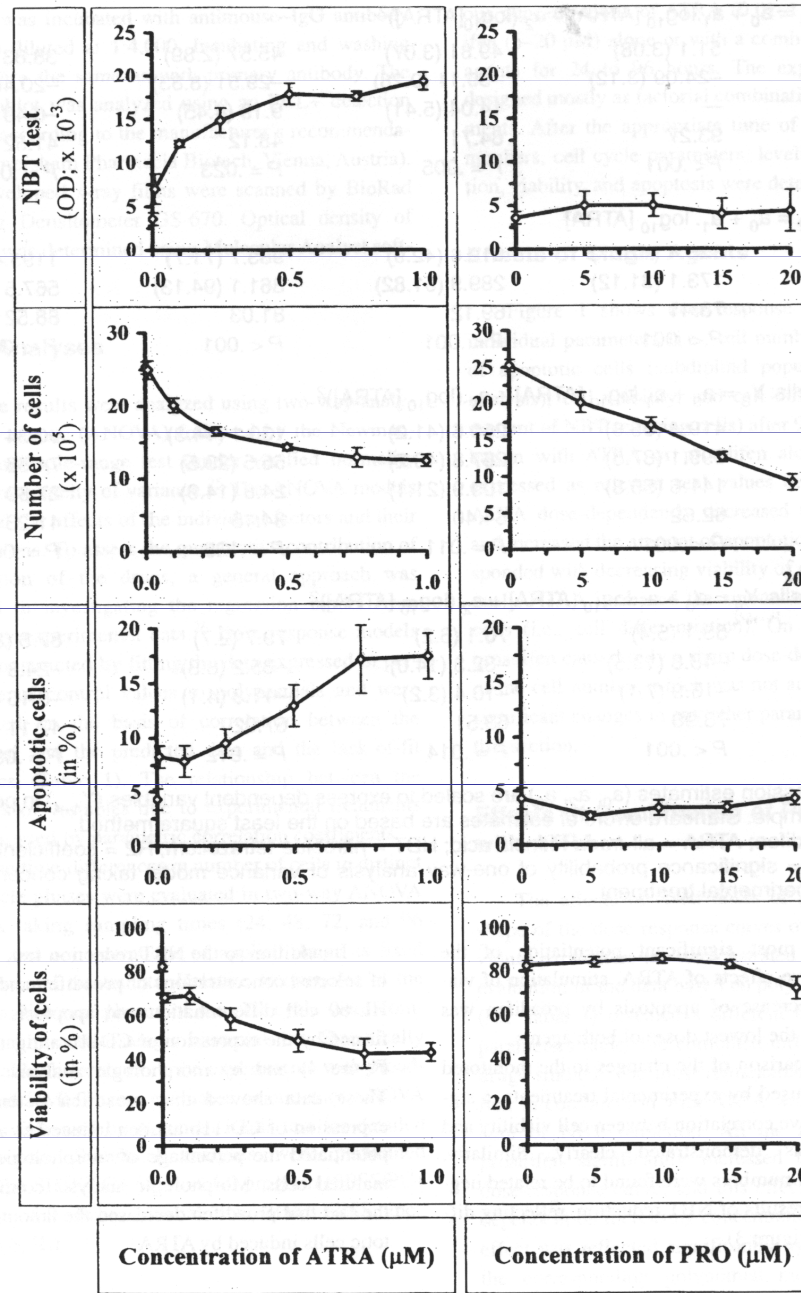


FIGURE 1. Dose-response profiles of the individual cell parameters based on concentration of all-*trans*-retinoic acid (ATRA) and proadifen (PRO) as independent variables. The points represent the means of 3–10 independent experiments supplied with standard errors (error bars). NBT = nitroblue tetrazolium.

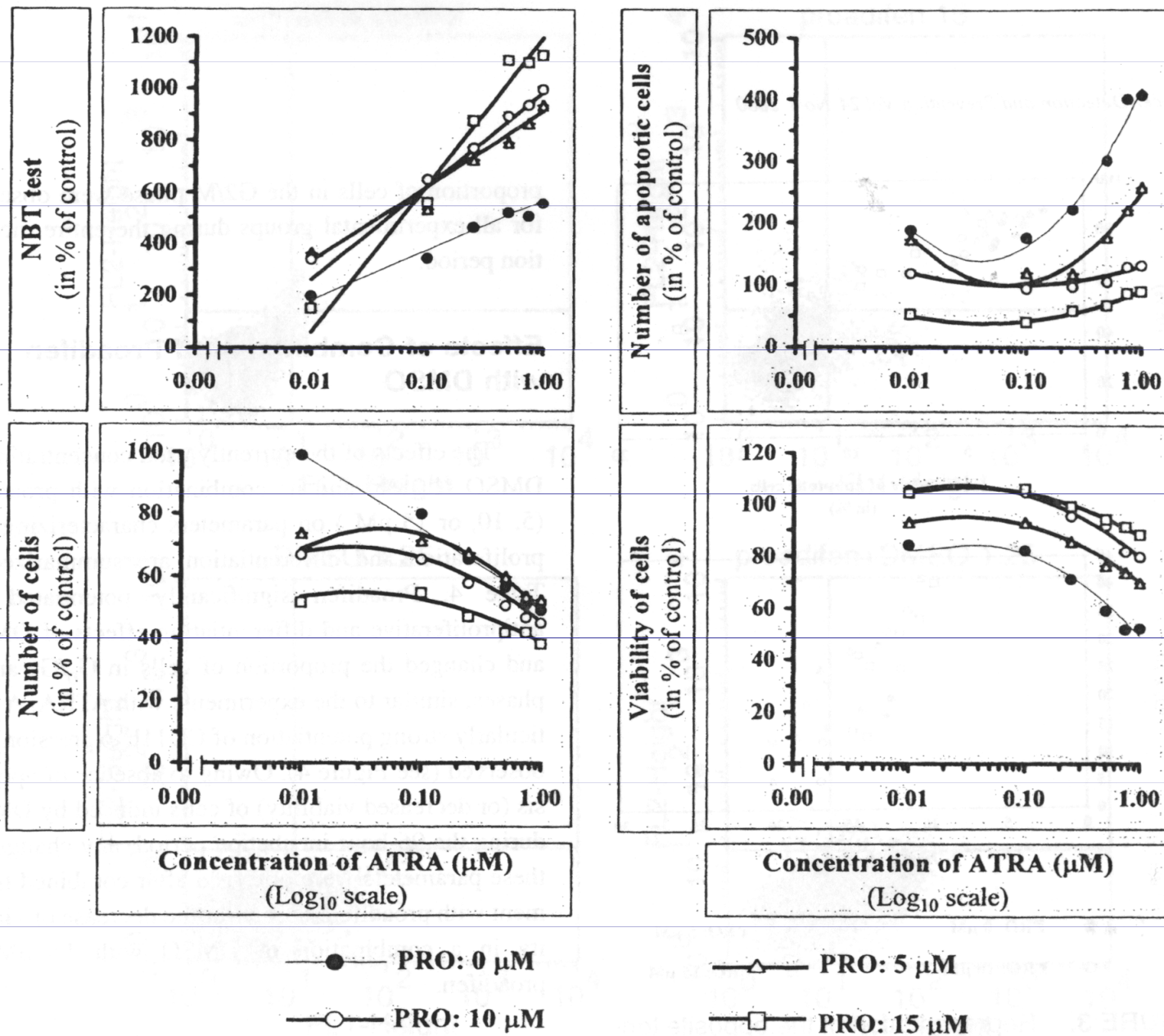
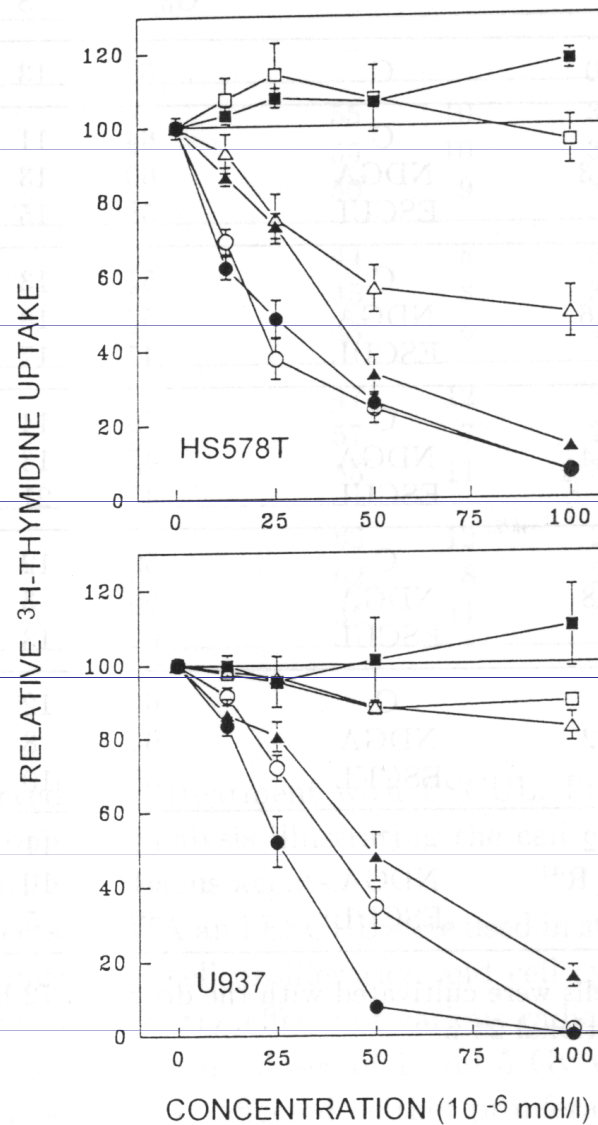


FIGURE 2. The effect of all-*trans*-retinoic acid (ATRA) and proadifen (PRO) on the studied cell parameters expressed as model predictions (*lines*) supplied with experimental points representing the means of 3–10 independent experiments. NBT = nitroblue tetrazolium.

Figure 1. Effects of various doses of PIROX (squares), NDGA (circles), or ESCUL (triangles) on ³H-thymidine incorporation (% of nontreated control) in HS578T and U937 cells after 24 h (open symbols) or 72 h (solid symbols) cultivation. The data are means ± S.E.M. for 3–4 independent experiments performed in six parallels.



vyjádření v % kontroly
(neovlivněná
populace=100%)

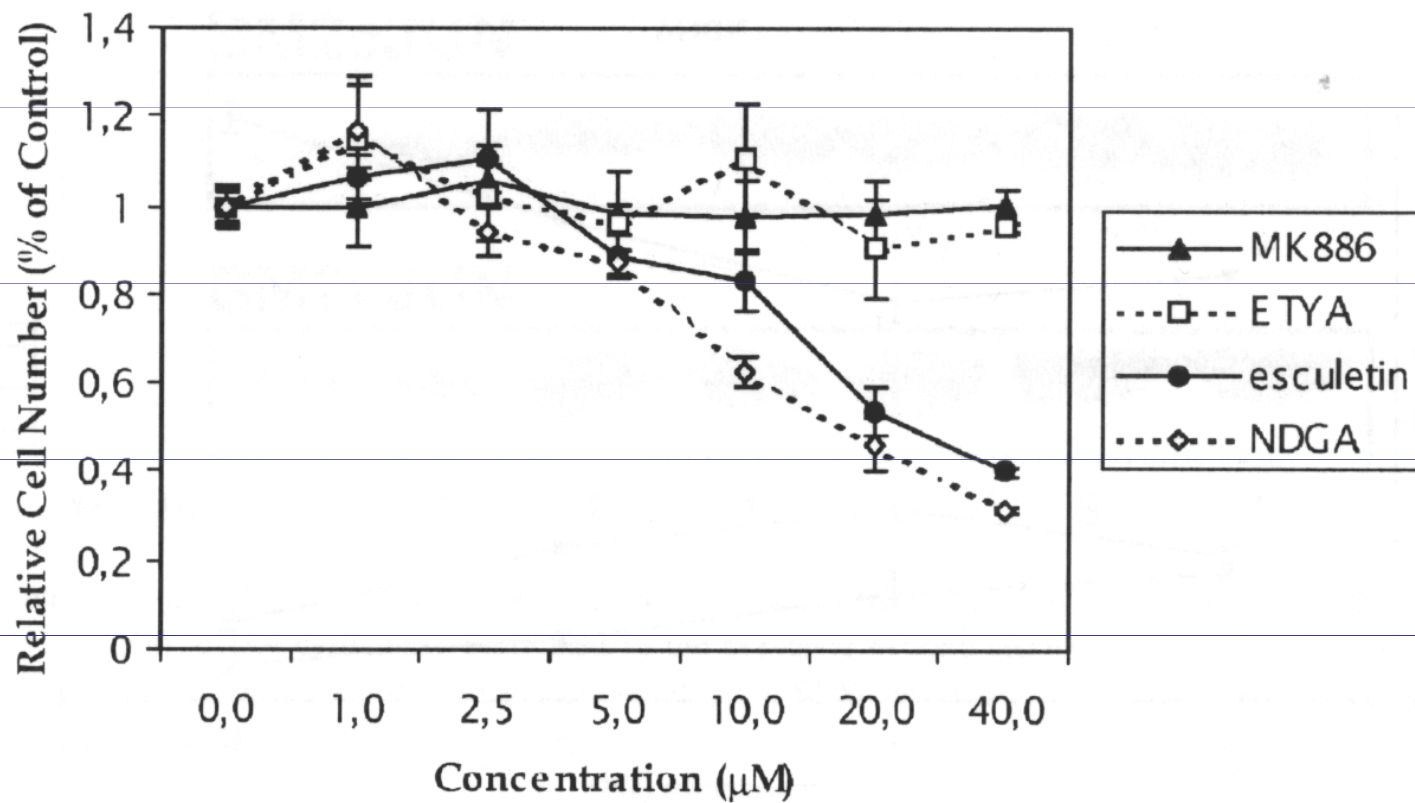


Fig. 1. Esculetin and NDGA negatively regulate growth of BM2 cells. The cells were cultivated in the presence of lipoxygenase inhibitors or ethanol solvent in indicated concentrations for 3 days. Total cell number in each sample was determined using cell counter. The curves represent the average numbers from three independent experiments. Error bars indicate standard deviations. BM2 cells treated with the amount of ethanol solvent corresponding to 40 µM concentration of inhibitor were used as a reference sample.

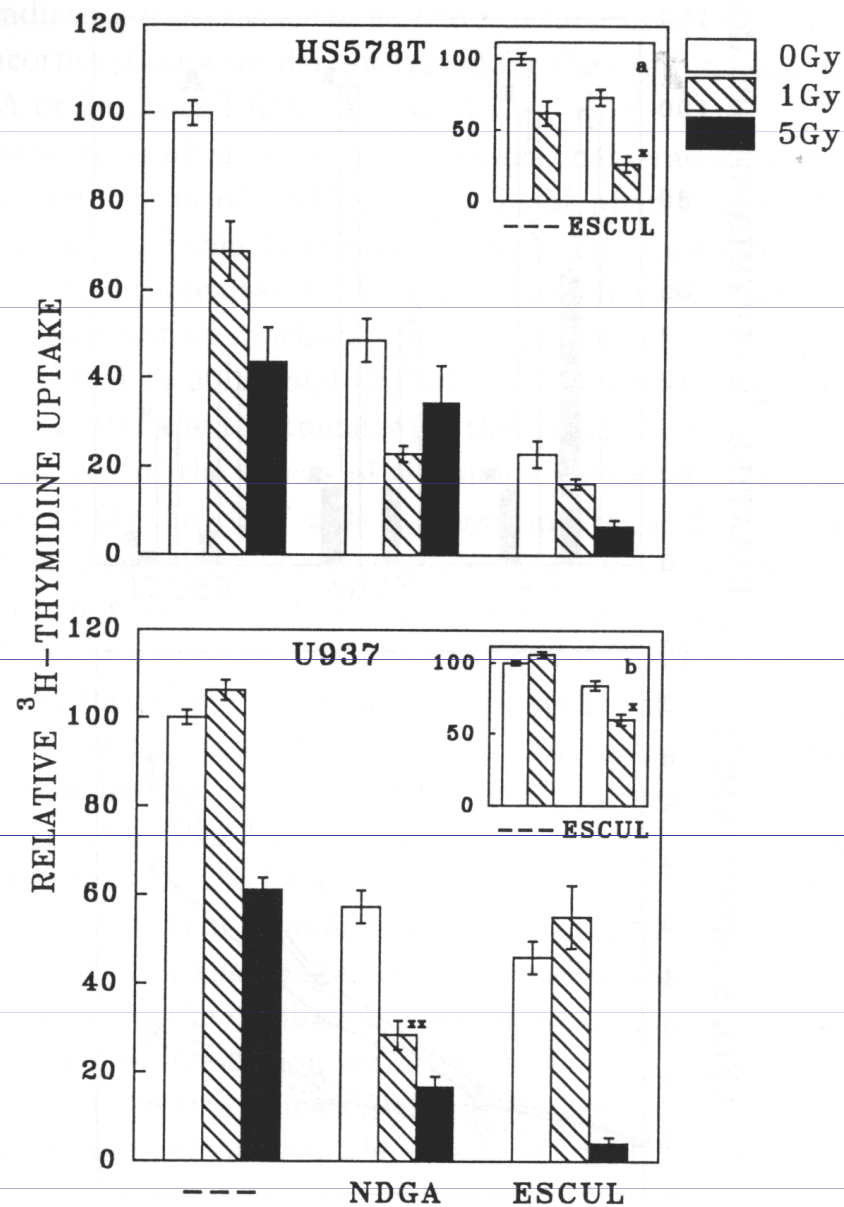


Figure 4. ^3H -thymidine incorporation (% of nontreated control) in HS578T and U937 cells subjected to different treatment. The nonirradiated cells or cells irradiated with 1 or 5 Gy were cultivated in the presence of 25 $\mu\text{mol/l}$ NDGA, 25 $\mu\text{mol/l}$ ESCUL (inserts 3 a, b) or 50 $\mu\text{mol/l}$ ESCUL or without the agents (---) for 72 h. Data are means \pm S.E.M. for three independent experiments performed in six parallels. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ significance of the interactive component

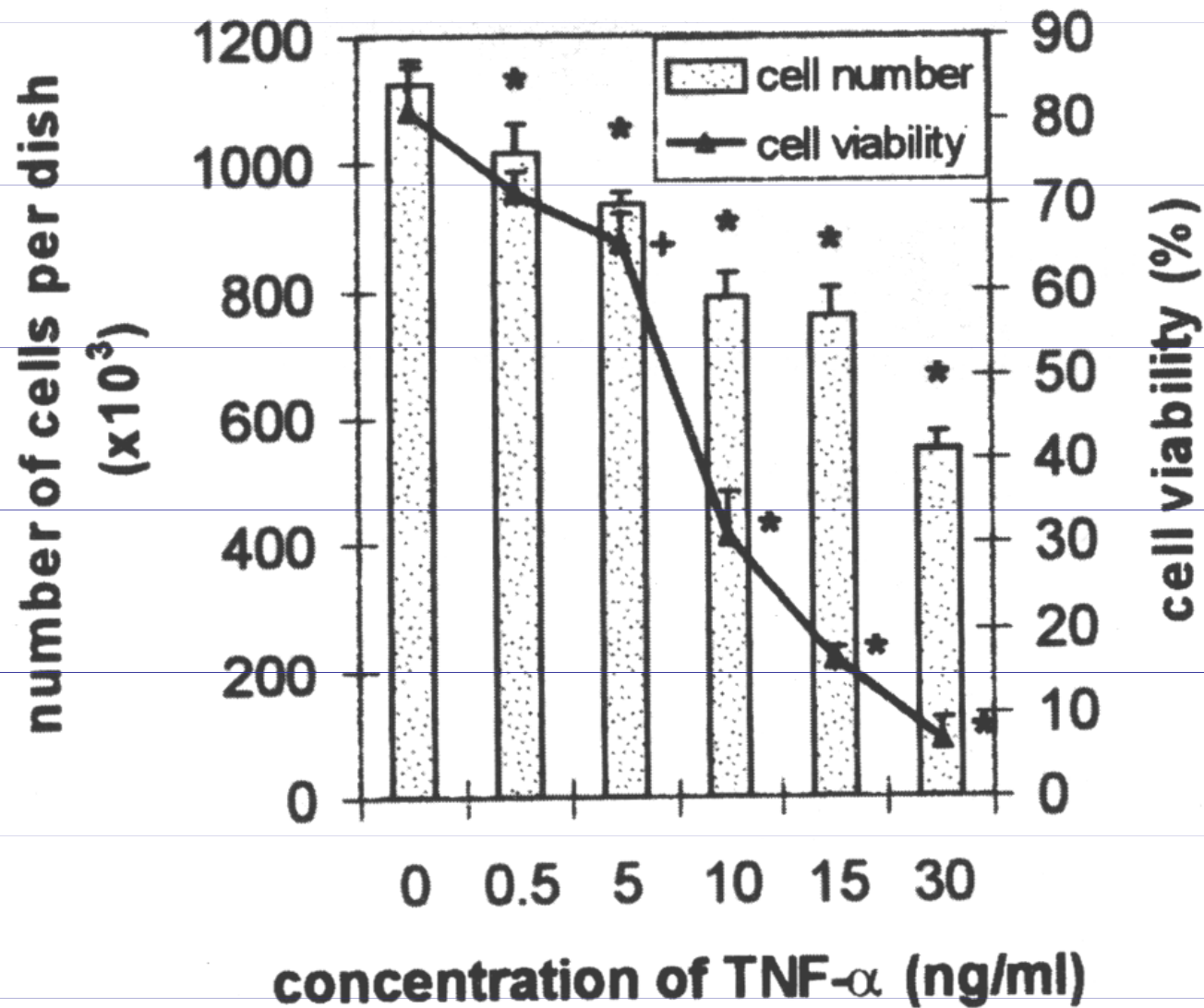


Figure 1. Growth and viability of HT-29 cells after 120-hour-treatment with TNF- α . $P < 0.05$ versus untreated control; (*) Tukey or (+) LSD test.

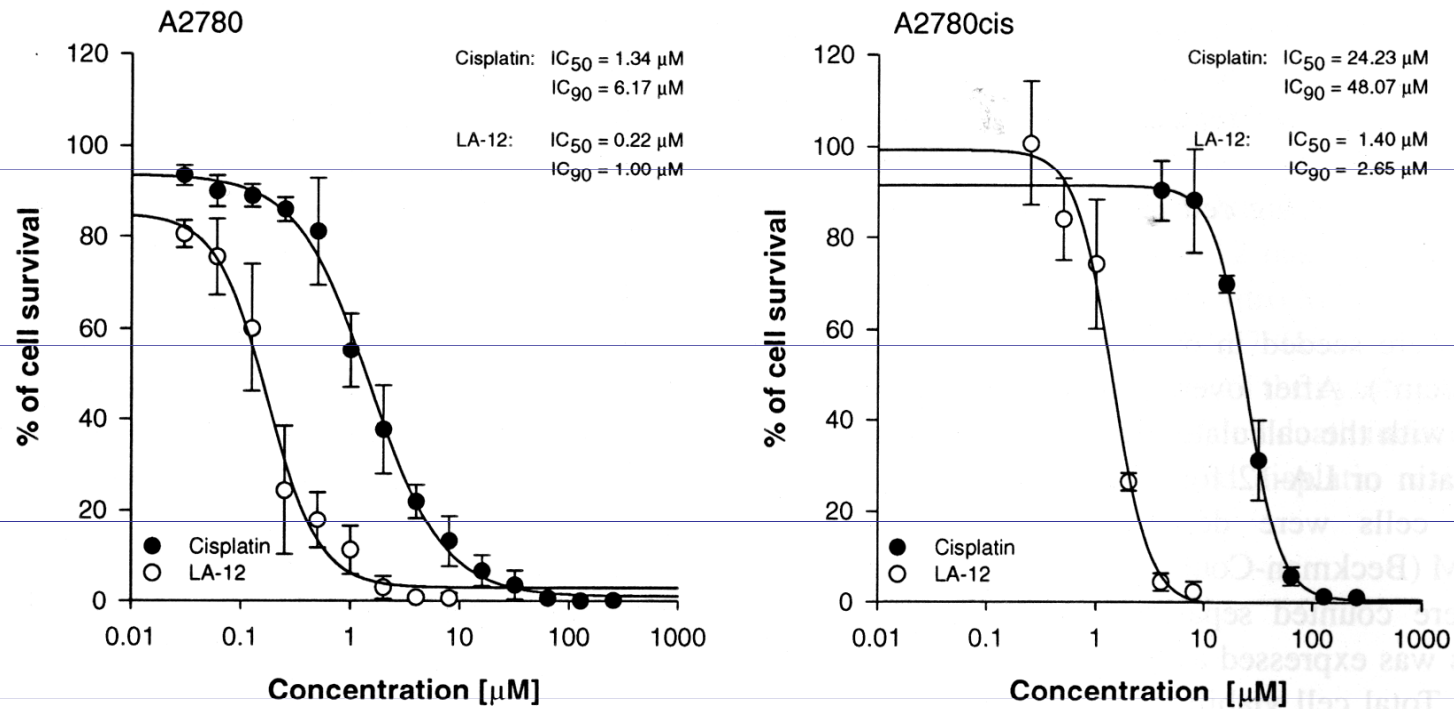


Fig. 2. Time- and dose-response effects on the survival of A2780 and A2780cis cancer cell lines. The effects after 72 h exposure to cisplatin or LA-12 in a concentration range between 0.3 µM and 256 µM were determined by MTT assay. The calculated drug concentrations inhibiting metabolic activity of cells by 50% (IC₅₀) and 90% (IC₉₀) are displayed for both derivatives. The results are expressed as mean ± standard deviations (S.D.) of at least three independent experiments; all concentrations were tested in three replicates.

PARAMETRY BUNĚČNÉHO CYKLU

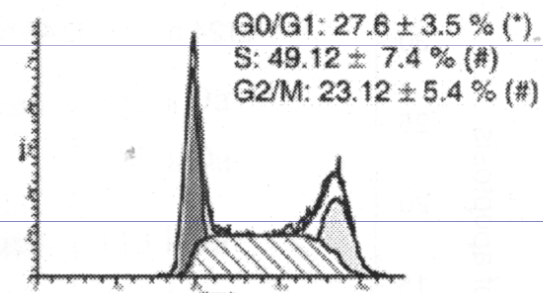
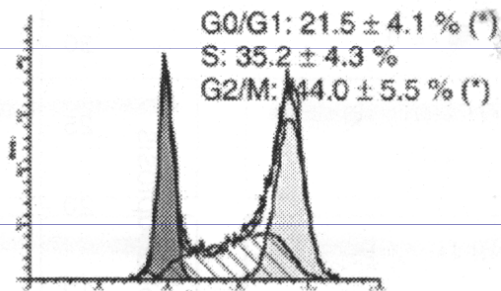
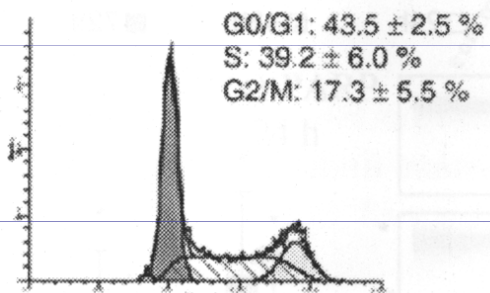
A2780

UNTREATED CONTROL

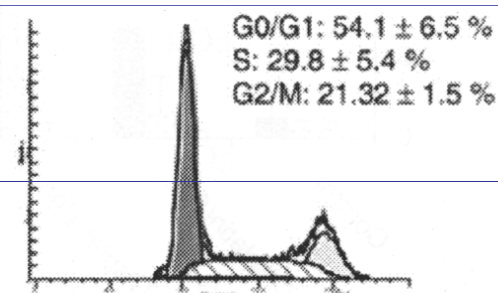
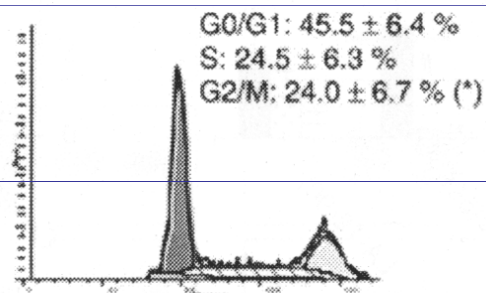
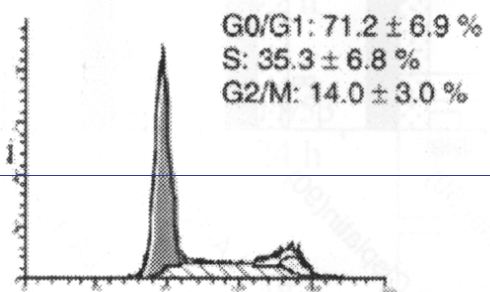
CISPLATIN(50)

LA-12(50)

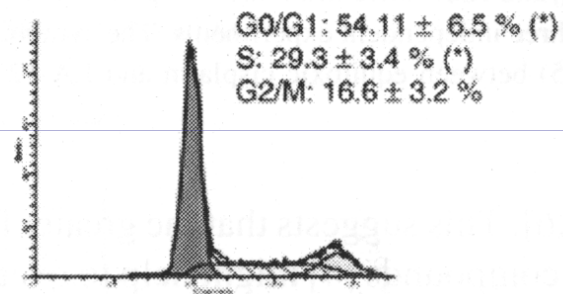
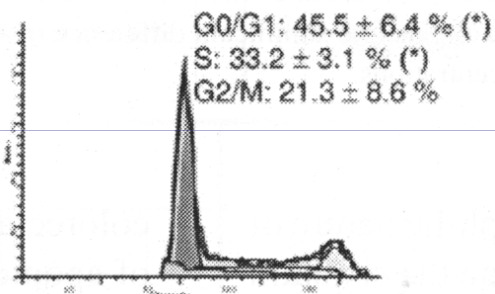
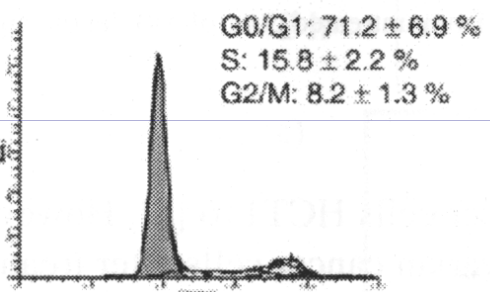
24 hr



48 hr



72 hr



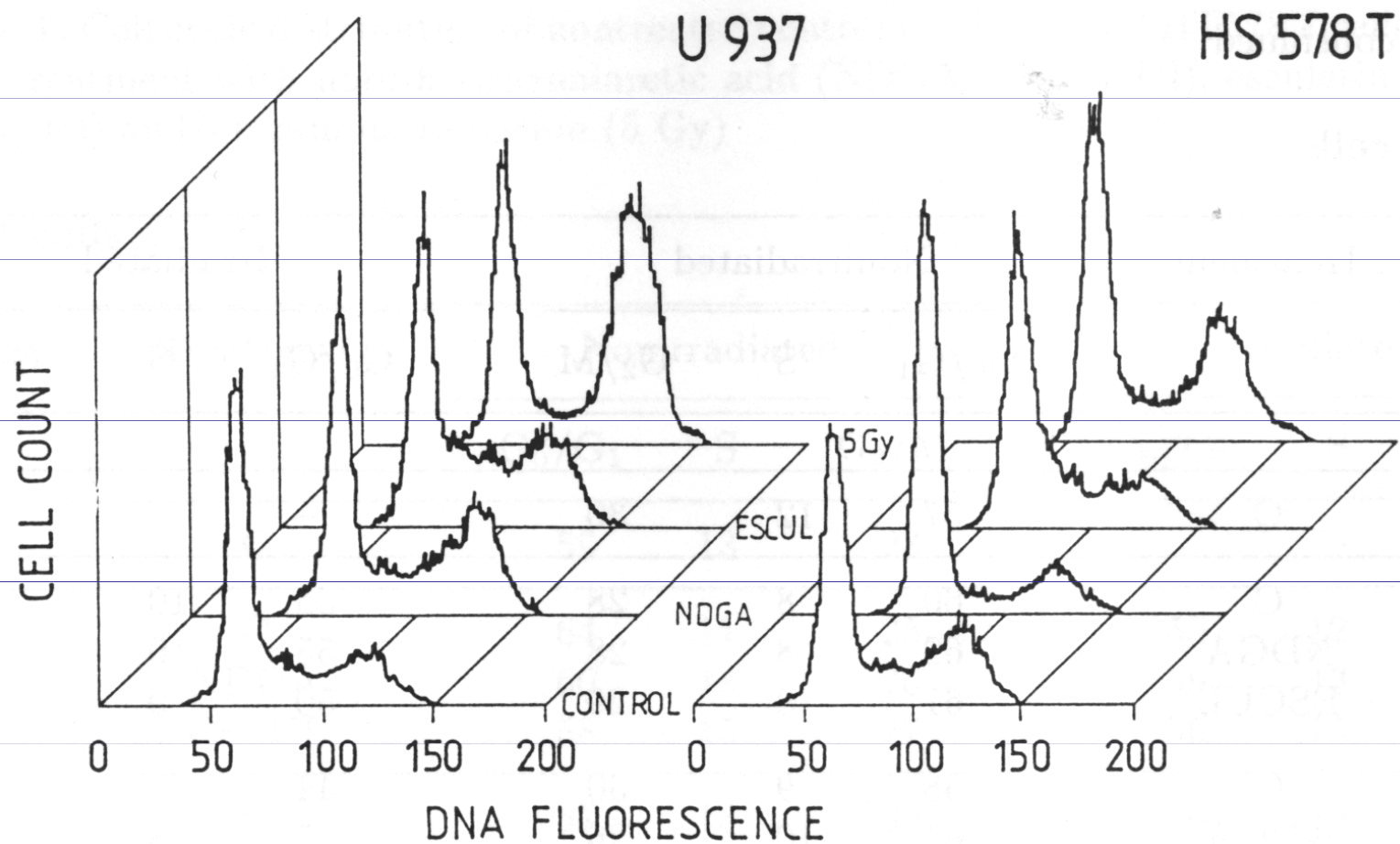


Figure 2. Representative results of flow cytometric analysis of the cell cycles of U937 and HS578T cell lines after 24 h of cultivation. Cells were treated with 25 $\mu\text{mol/l}$ NDGA, 50 $\mu\text{mol/l}$ ESCUL, or irradiated with 5 Gy.

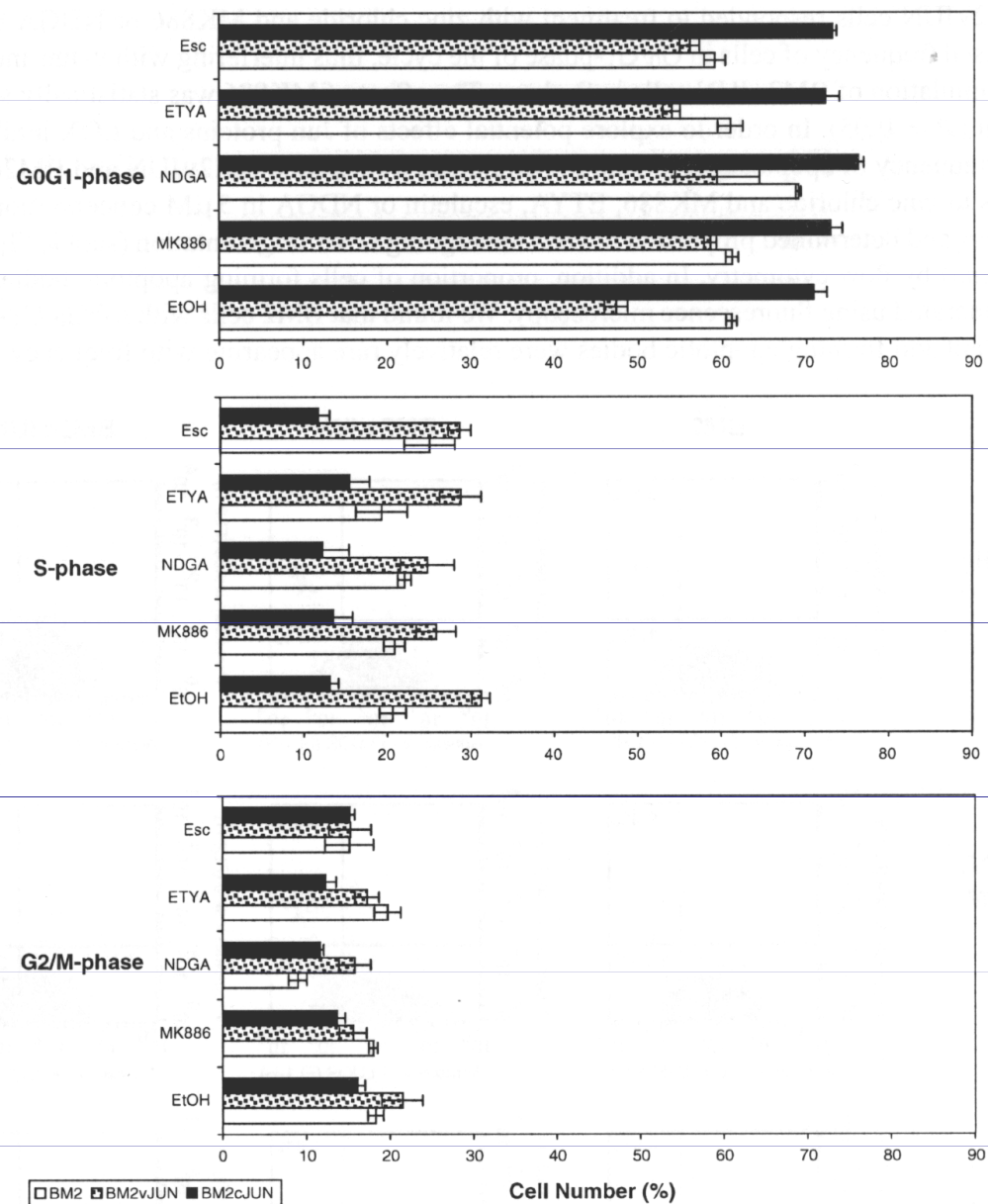


Fig. 5. The effects of lipoxygenase inhibitors on cell cycle of BM2 cells expressing *v-jun* or *c-jun*. BM2, BM2vJUN and BM2cJUN cells were treated with zinc chloride and lipoxygenase inhibitors (5 μ M) or ethanol solvent (EtOH) for 1 day. Harvested cells were fixed and stained with propidium iodide. DNA content in individual cells was determined by flow cytometry. The bars represent the average values from three independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

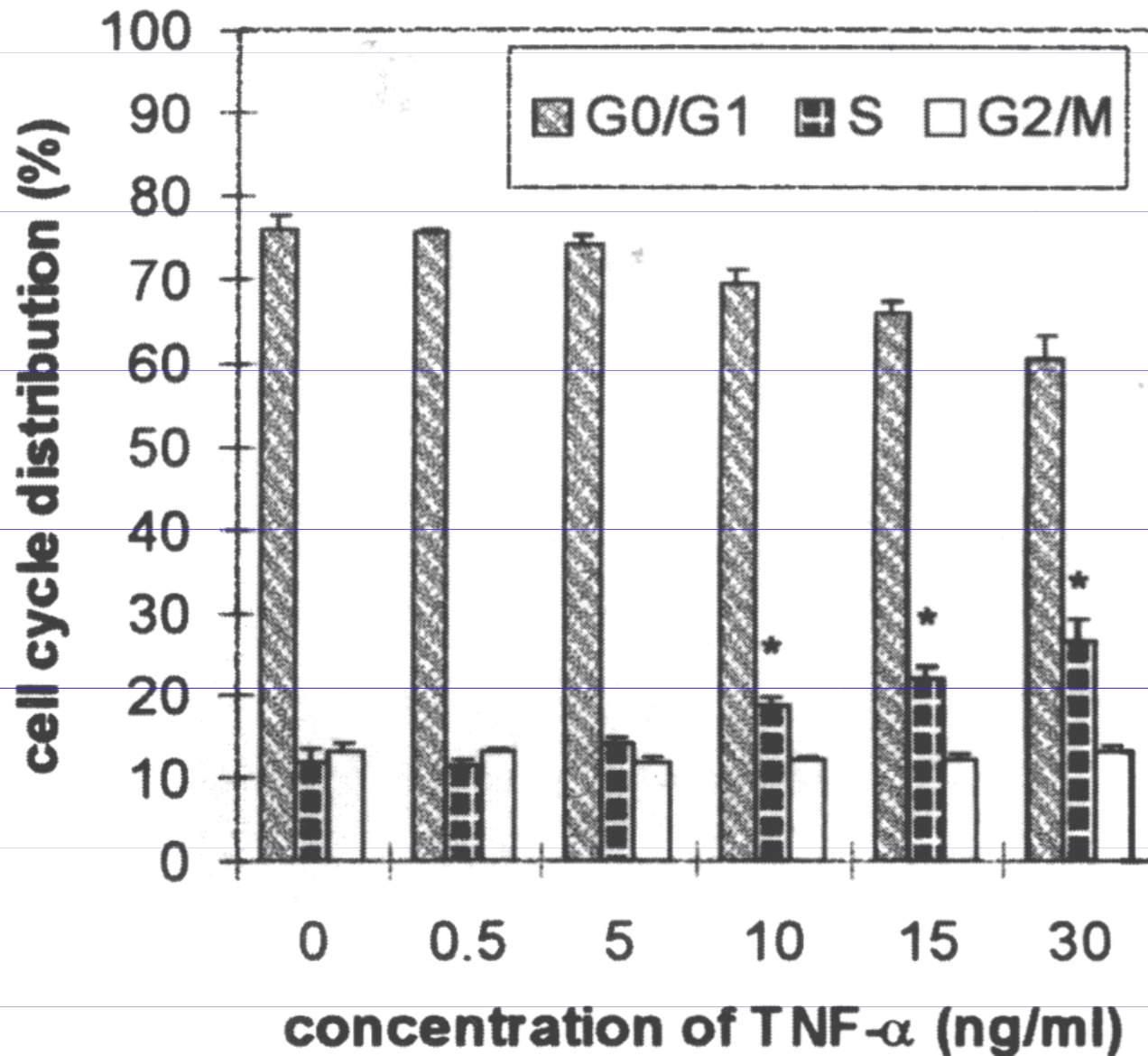


Figure 2. Cell cycle of HT-29 cells after 96-hour-treatment with TNF- α . (*) $P < 0.05$ versus untreated control for Tukey test.

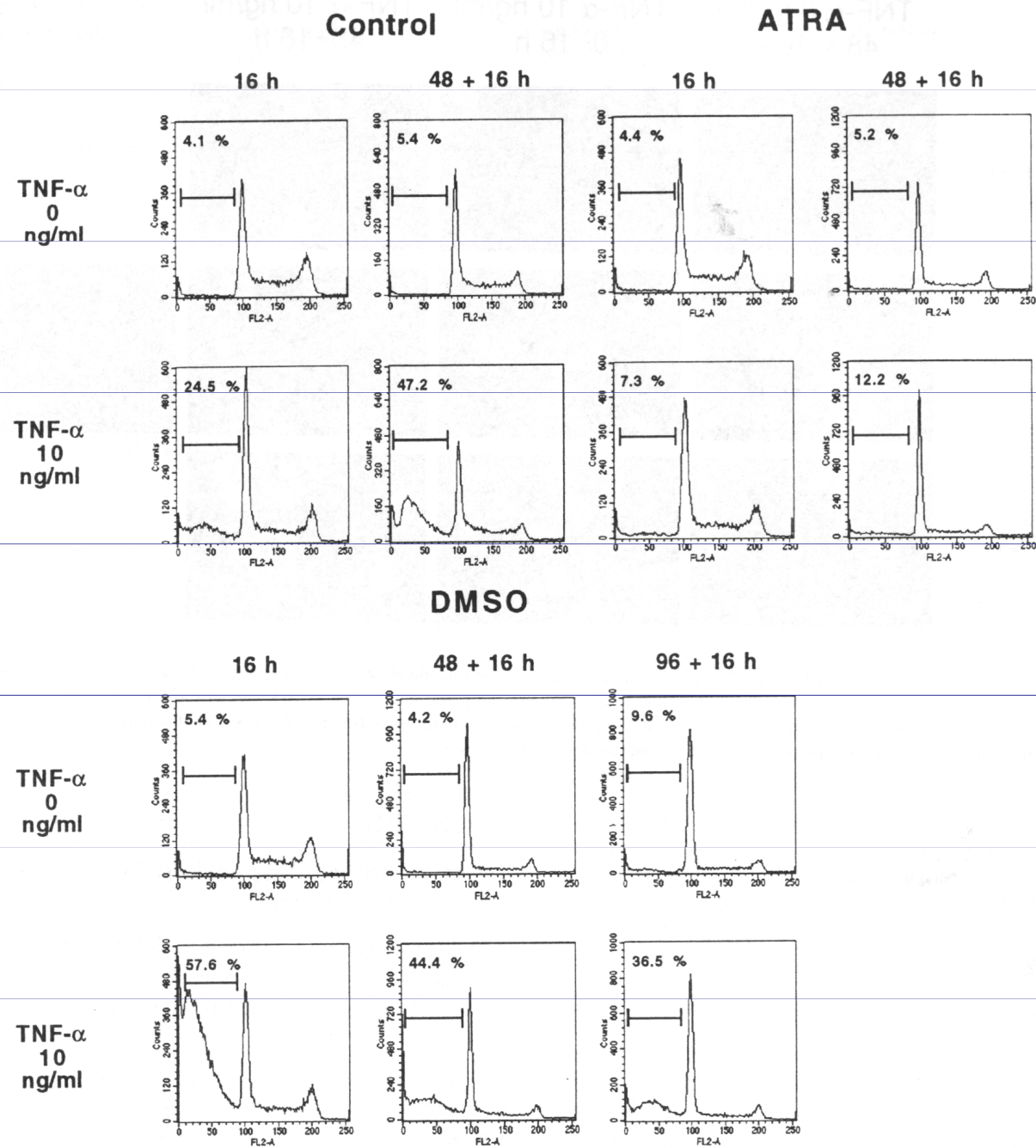
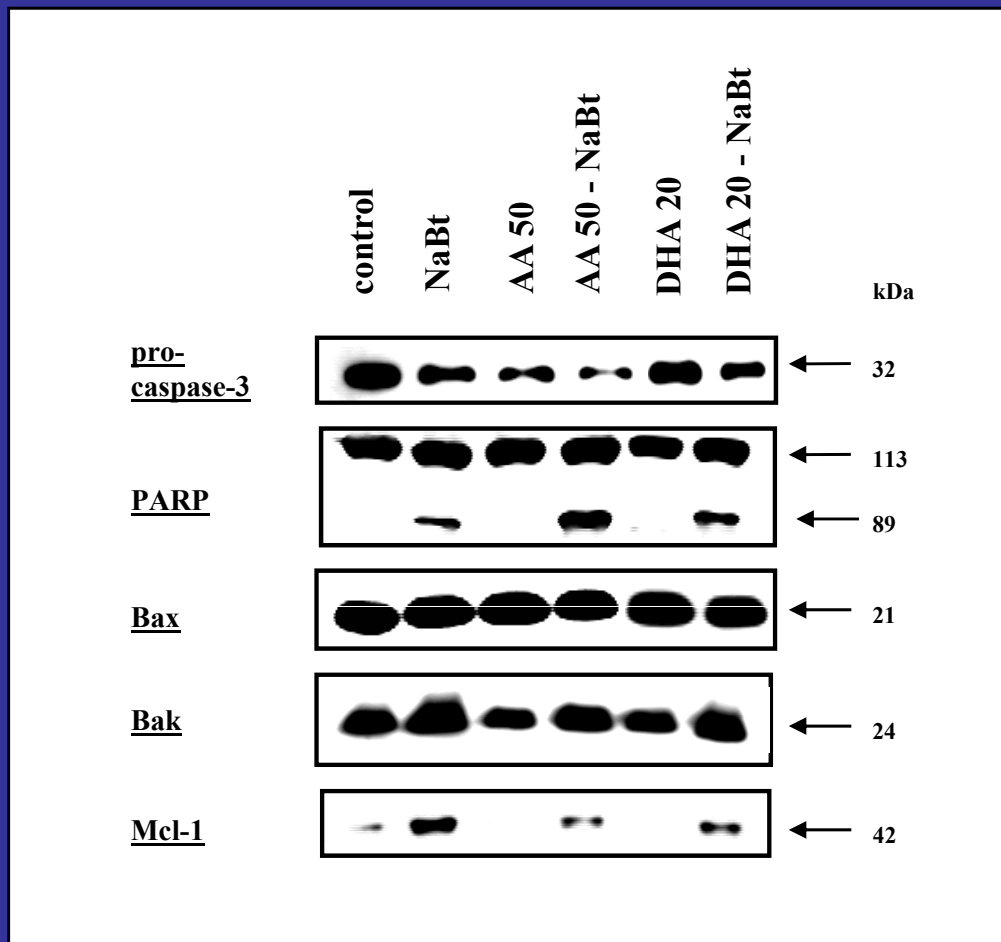


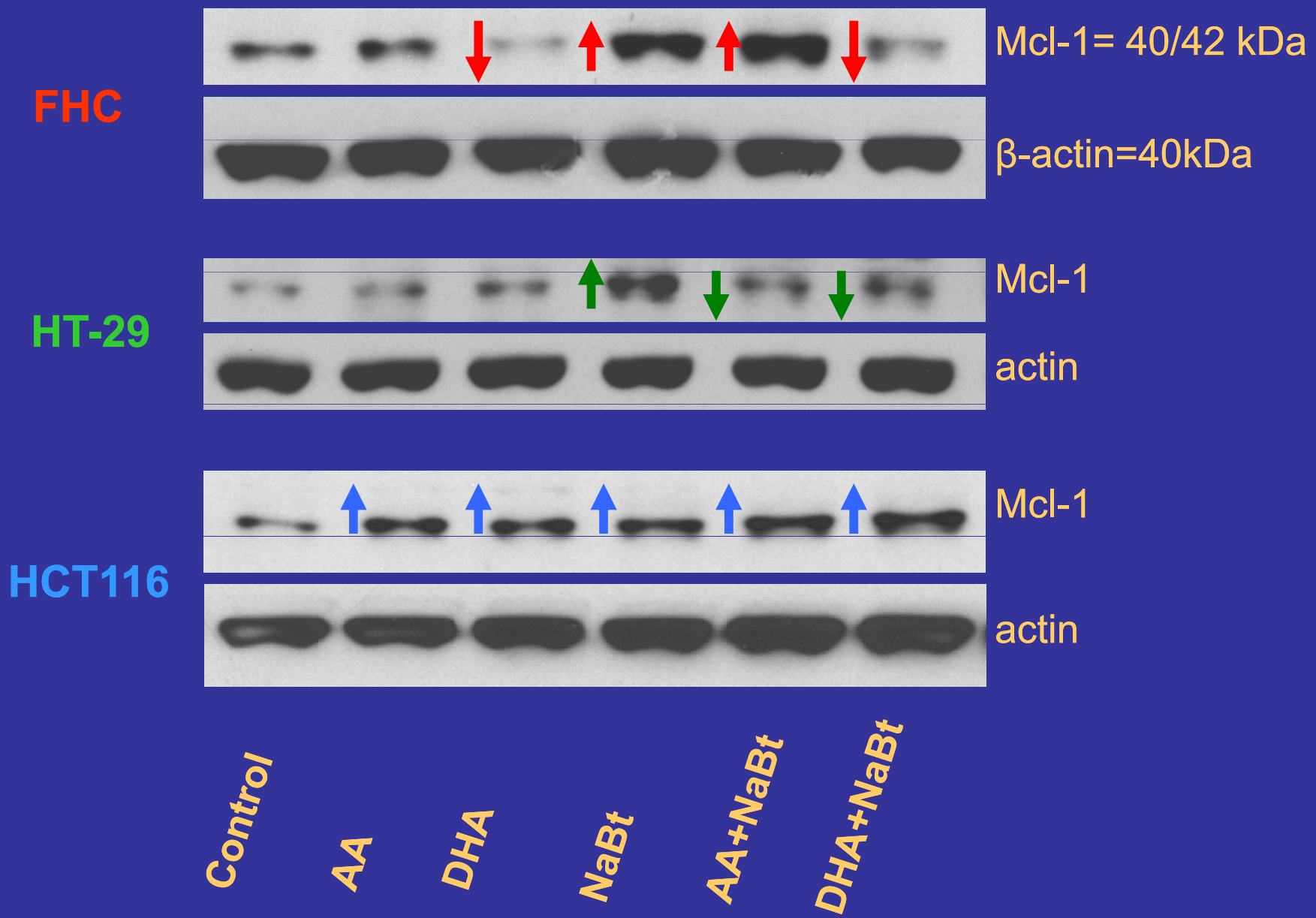
Fig. 2. Representative DNA content analyses ($n = 3$) for HL-60 cells treated with DMSO or ATRA, and TNF- α . Cells were stained and analyzed as described in Materials and Methods. y-axis, counts; x-axis, PI staining. Gates denote subdiploid fraction.

EXPRESE PROTEINU (WESTERN BLOTTING)

Interakce kys. arachidonové (AA) a dokosahexaenové (DHA) s butyrátem



Expresse antiapoptického proteinu Mcl-1



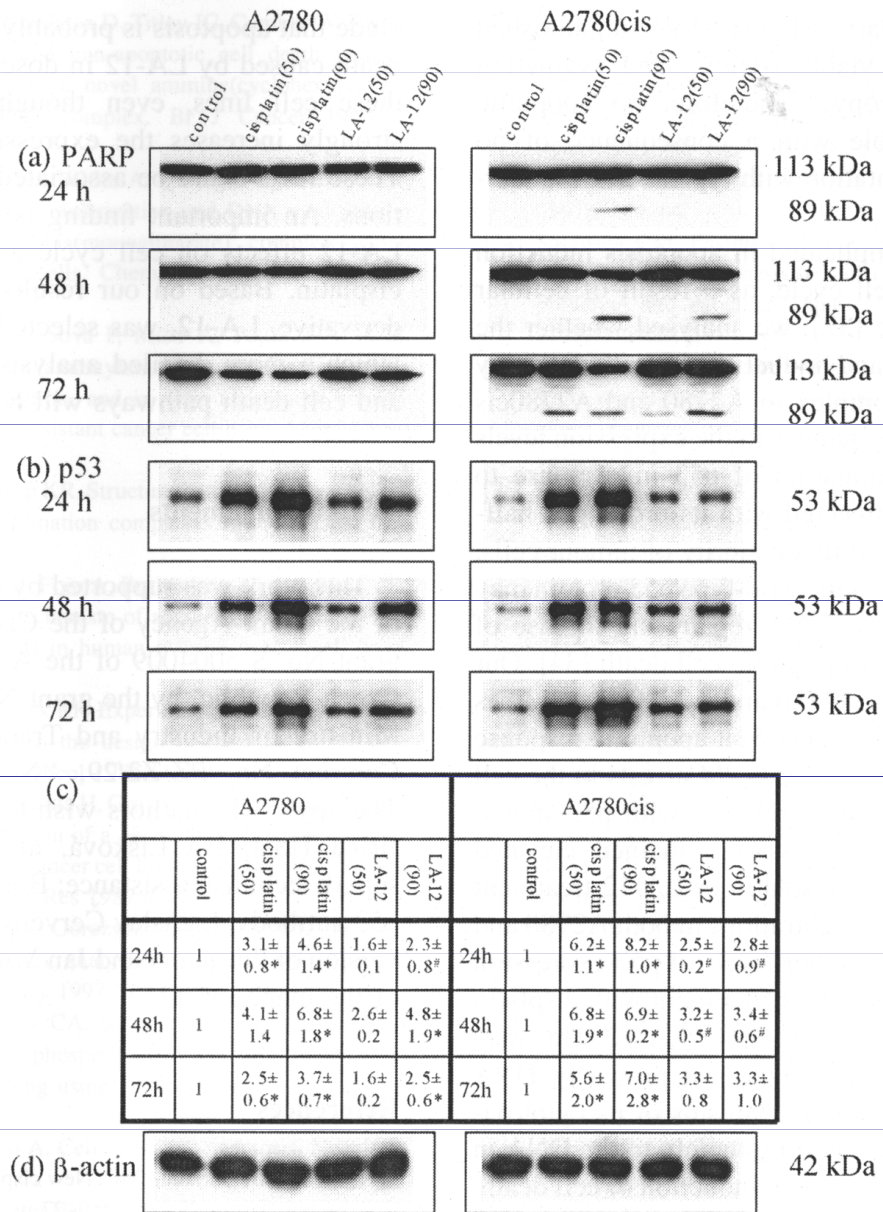
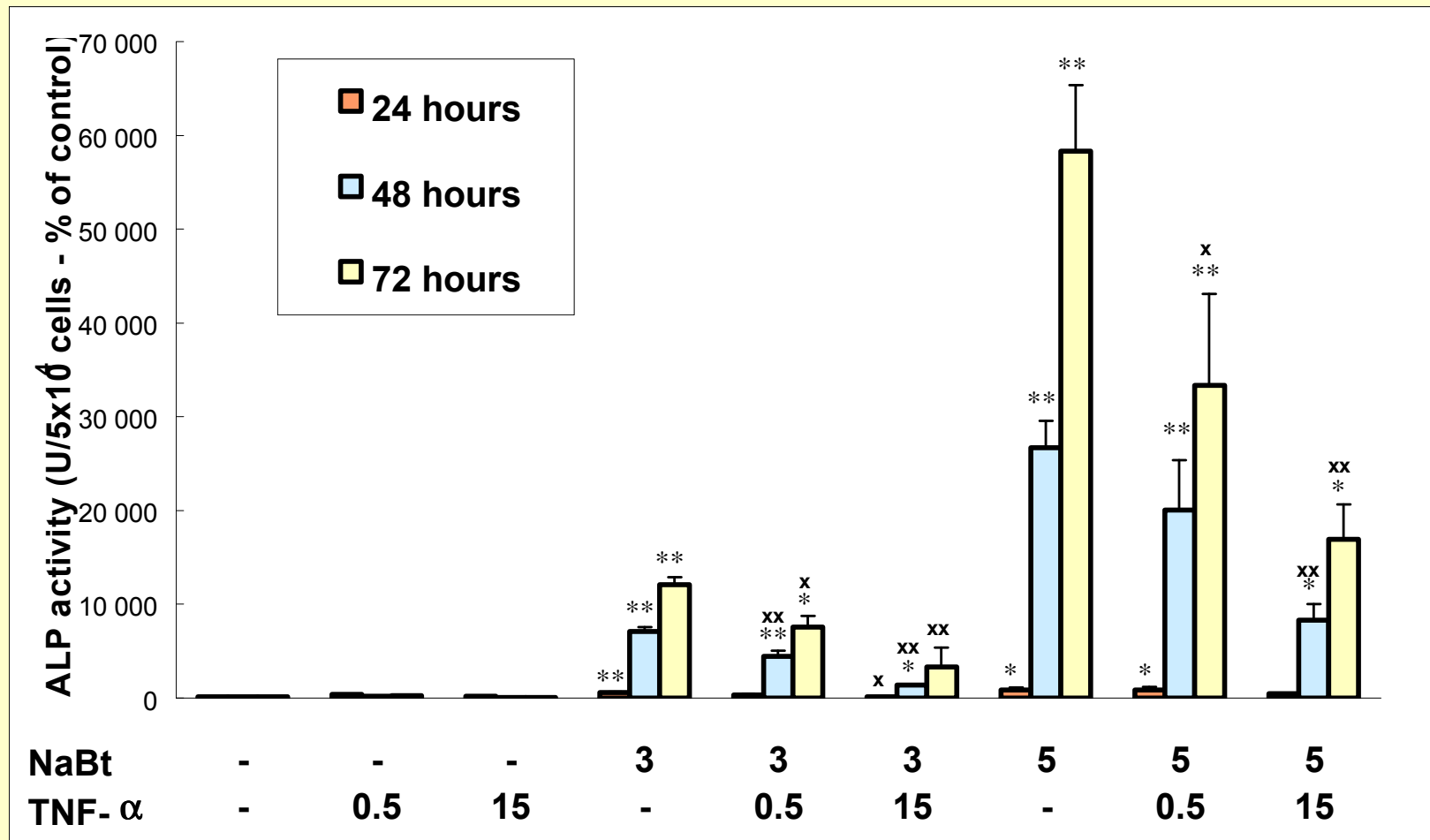


Fig. 8. Western blot analyses of (a) PARP (upper panel) and (b) p53 (middle panel) protein levels in A2780 (left panel) and A2780cis cells (right panel). The cells were not exposed (untreated controls) or exposed to IC₅₀ or IC₉₀ concentrations of cisplatin or LA-12 and harvested at 24 h, 48 h, and 72 h of sustained drug treatment. One representative experiment of at least three is presented. Table (c) contains values of p53 expression quantified by densitometry (mean ± S.D. of at least three independent experiments). The symbols (*) denote significant difference ($p < 0.05$) from untreated control; (#) denote significant difference ($p < 0.05$) between equitoxic cisplatin and LA-12 effects. Equal loading is documented by detection of (d) β-actin (bottom panel).

Detekce buněčné diferenciaci

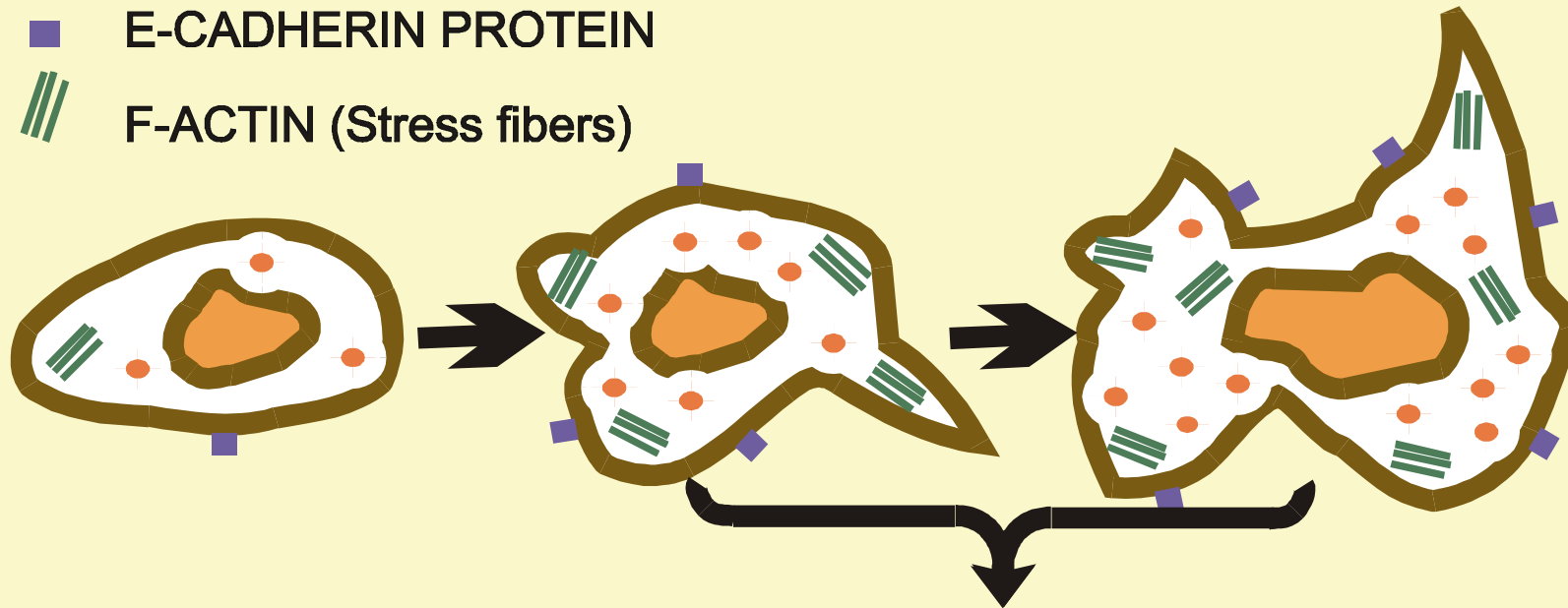
(aktivita alkalické fosfatázy, spektrofotometrie)



Znaky diferenciácie indukované butyrátom

- ALKALINE PHOSPHATASE
- E-CADHERIN PROTEIN
- /// F-ACTIN (Stress fibers)

EXPRESSE KARCINOEMBRYONÁLNIHO ANTIGENU



Proliferated cell

Growth inhibition & arrest in G1-phase of the cell

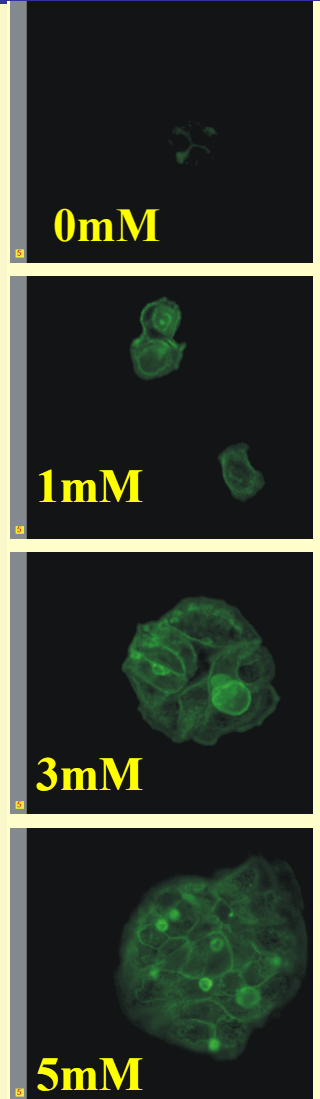
TIME OF BUTYRATE TREATMENT

0mM

1mM

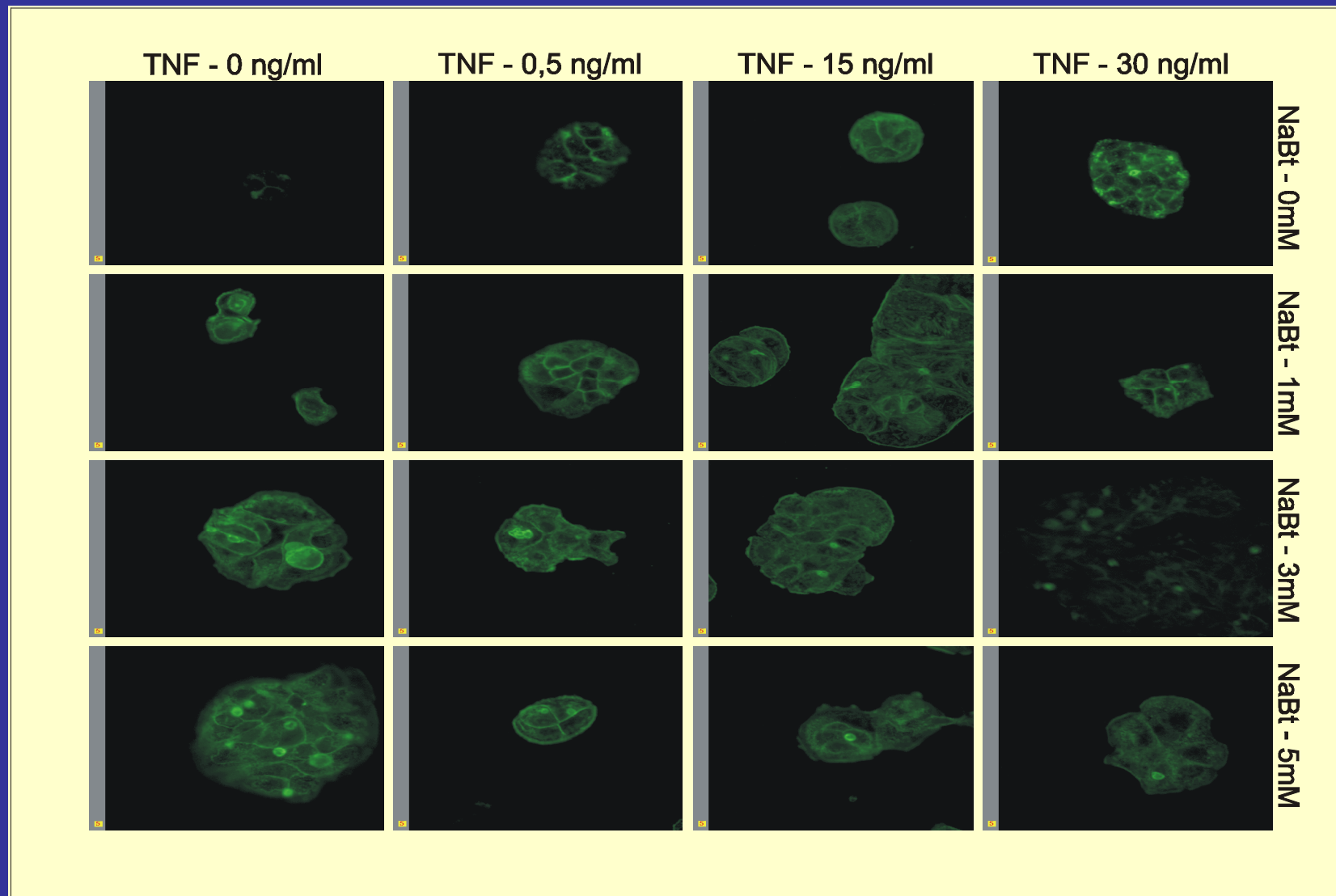
3mM

5mM



Detekce buněčné diferenciaci

(obsah F-aktinu FITC značený phalloidin- konfokální mikr.)



VÝZKUM V LABORATOŘI CYTOKINETIKY BFÚ AV ČR

Výzkum je zaměřen zejména na působení lipidových složek výživy a mechanismy působení látek lipidové povahy v kontextu jejich interakcí s fyziologickými regulátory růstu, environmentálními polutanty a vybranými farmaky.

Jsou studovány procesy vedoucí ke změnám regulace buněčné kinetiky a komunikace.

Získané výsledky mají význam jak pro obecné studium procesu karcinogeneze (negenotoxické mechanismy) tak pro oblast ekotoxikologie, nádorové prevence a hledání nových protinádorových terapeutických postupů.

Poznatky o úloze specifických lipidových složek výživy mohou být podkladem pro optimalizaci lipidové výživy (oblast prevence a podpůrné terapie) ve spolupráci s klinickými pracovišti a výrobní sférou.

Cílem je prohloubit poznání a nově definovat potenciální úlohu látek lipidové povahy zejména vysoce nenasycených mastných kyselin a jejich derivátů v mezi- a vnitrobuněčných komunikacích podílejících se na regulaci buněčného dělení, diferenciaci a apoptózy.

Používané metody a metodický potenciál (východiska)



Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

Zavedené modely a vybrané metodické možnosti (v kooperaci)

Modely	Studované parametry a metodické přístupy
<p style="text-align: center;">Buňky <i>in vitro</i></p> <p>Buněčné linie <i>in vitro</i> odvozené od různých typů <u>nádorových i nenádorových tkání</u>:</p> <ul style="list-style-type: none">• krvetvorné (HL-60, U937, lidské promelocytární linie)• střevní epitel (linie lidského adenokarcinomu kolonu HT-29, embryonální linie FHC)• jaterní tkáň (myši Hepa 1, nádorové krysí buňky WB-F344) <p><u>Fagocyty a lymfocyty</u>:</p> <ul style="list-style-type: none">• izolované z krve myší a zdravých lidských dobrovolníků• buněčná linie myších peritoneálních makrofágů RAW 264	<p>ÚROVEŇ BUNĚČNÁ Oxidační a antioxidační vlastnosti emulzí, změny spekter buněčných lipidů a mastných kyselin (<u>HPLC</u>, plynová <u>chromatografie</u>) Produkce superoxidového aniontu, peroxidu vodíku, hydroxylového radikálu, oxidu dusnatého a působení na PUFA, lipidy a buňky (luminometrie, fotometrie, elektrochemie)</p> <p>ÚROVEŇ MOLEKULÁRNÍ A BUNĚČNÁ Exprese buněčných <u>receptorů</u>, exprese a <u>aktivita specifických kináz</u> (ERK, JNK atd.) a <u>transkripčních faktorů</u> (PPAR, NFkB..), exprese <u>genů</u> a <u>proteinů</u> zapojených v <u>regulaci buněčného cyklu</u> (p21, cykliny, CDK atd.), <u>apoptózy</u> (proteiny Bcl2 rodiny atd.) a buněčné <u>adheze</u> (FAK, E-catherin, integriny atd.) - detekce pomocí elektroforetických metod, Western blottingu, PCR, fluorimetrie, multiparametrické flow cytometrie.</p>
<p style="text-align: center;">Laboratorní myši kmenů CBA, C57B1, nebo jejich kříženci (event.lab.potkani)</p> <ul style="list-style-type: none">• <u>změny krvinek</u>- pokusným myším s krvetvorbou normální nebo utlumenou ionizujícím <u>zářením</u> či aplikací <u>cytostatika</u> budou podávány testované substance• <u>nádorový růst</u>- u pokusných myší s experimentálně <u>implantovaným nádorem</u> budou sledovány efekty léčby testovanými substancemi na nádorový růst• <u>zánětlivý/septický model</u>- pokusným myším bude intraperitoneálně podáván endotoxin (10 mg/kg) rozpuštěný ve fyziologickém roztoku. Současně nebo následně budou podávány také studované lipidové emulze.	<p>ÚROVEŇ buněčných POPULACÍ A TKÁNÍ Změny cytokinetiky (proliferace, diferenciaci, apoptóza) a <u>oxidativního metabolismu</u> (flow cytometrie, fluorimetrie, fluorescenční mikroskopie) Extra- a intracelulární <u>tvorba reaktivních metabolitů kyslíku a dusíku</u> buňkami, <u>peroxidace lipidů</u> (luminometrie, flow cytometrie, fotometrie, Western blotting) <u>Akumulace triacylglycerolů v cytoplasmě buněk ovlivněných různými složkami lipidových emulzí, fluidita membrán</u> (HPLC, plynová chromatografie, fluorimetrie) <u>Komplexní analýza krvetvorby</u> pokusných myší - stanovení počtů jednotlivých typů buněk v periferní krvi a krvetvorných orgánech, vyhodnocení stavu poolu progenitorových buněk pro granulocyty, makrofágy (GM-CFC) a erytrocyty (BFU- E).</p>

FACSCalibur

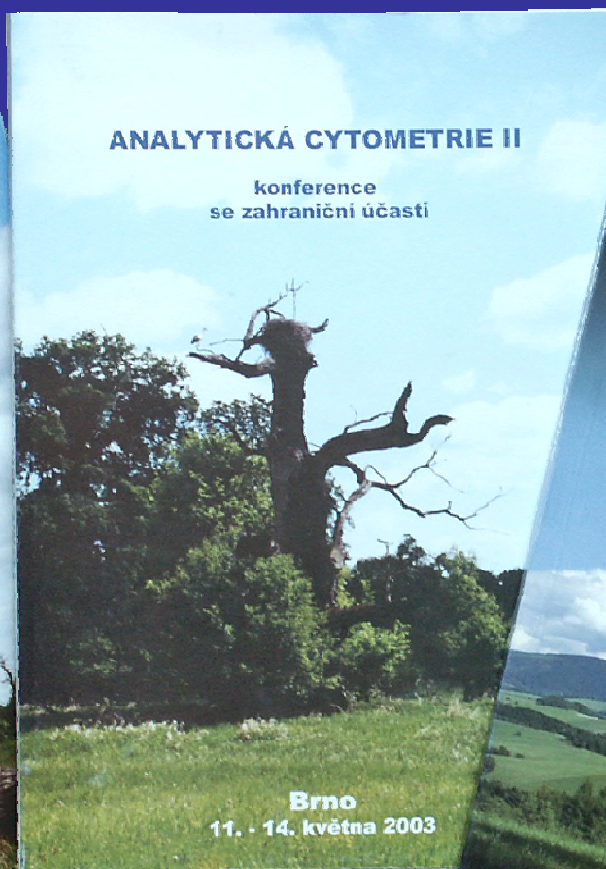
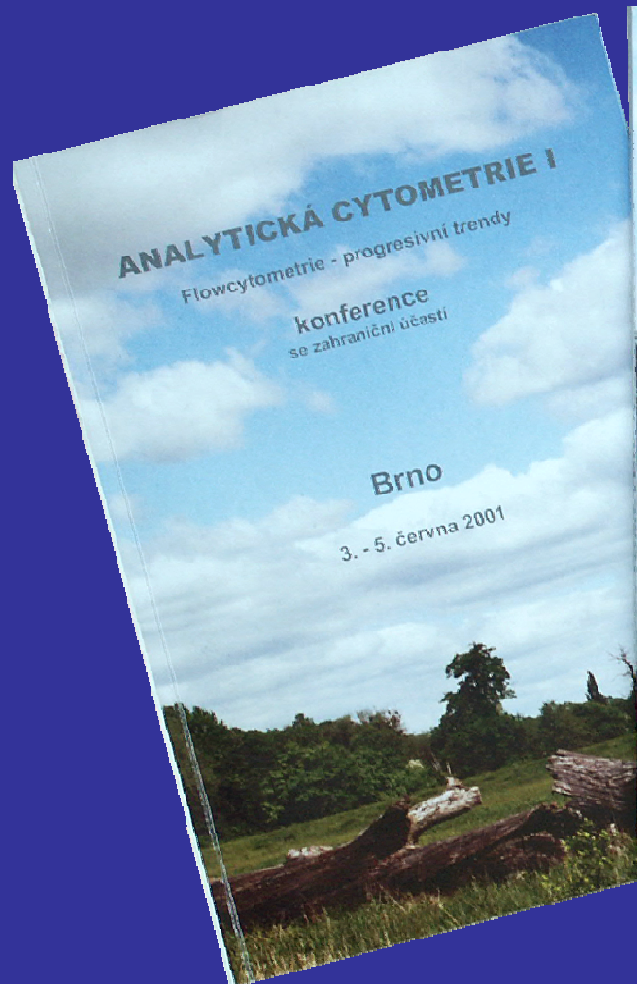


Flow cytometrie:

**jedna z hlavních
používaných
metodologií**

**Laboratory
of
cytokinetics**

**Institute of Biophysics, Brno
Academy of Sciences
Czech Republic**



Registrovaní
účastníci:

65

137

180

Zvaní zahraniční
odborníci:

0

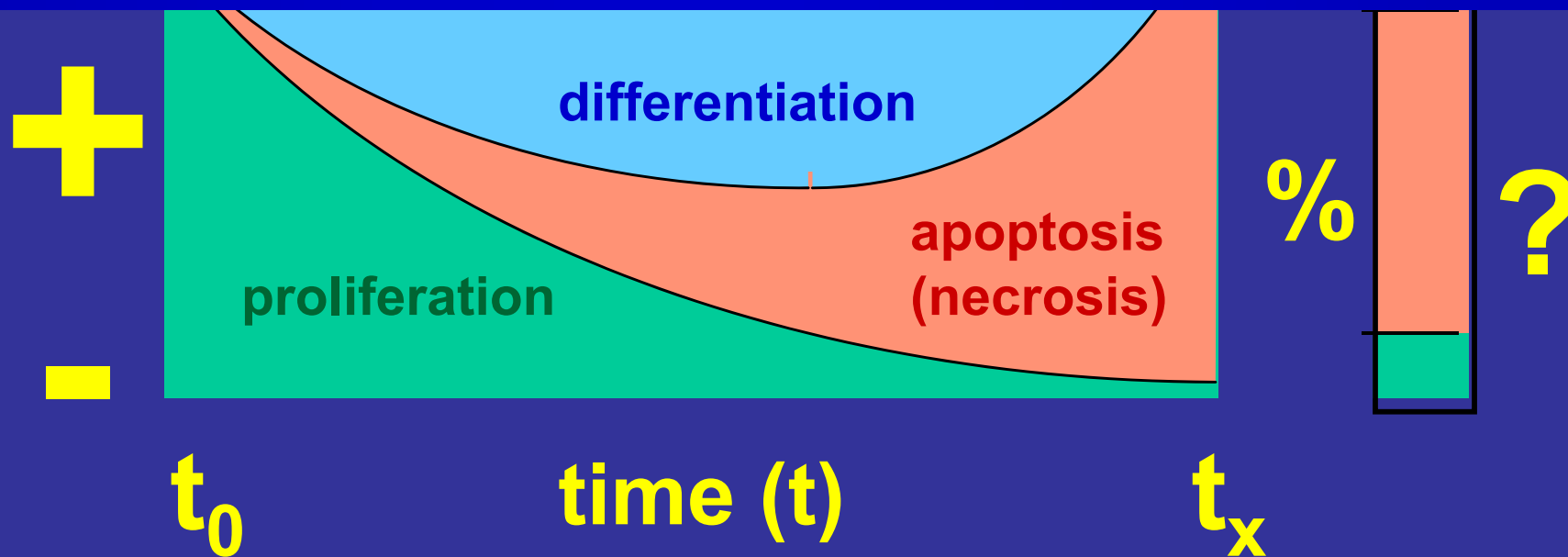
3

7

(Angl.)

Základní přístup k postižení cytokinetiky: detekce hlavních parametrů (dynamiky)

a jejich *ronováhy/nerovnováhy* v čase



Vhodnost volby modelu

Studie *in vivo*

– poskytují informaci o celkové (systémové) odpovědi organismu, relativně méně vhodné ke studiu mechanismu účinků na subbuněčné úrovni

Studie *in vitro*

- nelze z nich mechanicky zobecňovat závěry pro systémy *in vivo* (chybí zapojení vyšších regulačních systémů), ideální pro studium mechanismů účinků na subbuněčné úrovni

METODOLOGIE



CYTOKINETIKA

Detekce proliferace- regulace buněčného cyklu a zapojených proteinů,

diferenciace -buněčná morfolgie, aktivita specifických enzymů, exprese specifických proteinů

apoptózy -detekce charakteristických změn na úrovni jádra, mitochondrií, membrán, cytoskeletu, exprese regulačních proteinů, štěpení specifických enzymů a substrátů

ZMĚNY LIPIDOVÉHO METABOLISMU A VLASTNOSTÍ BUNĚČNÝCH MEMBRÁN

-změny spektra MK v bun. lipidech, „lipid packing“ v membránách, akumulace triglyceridů, detekce kardiolipinu, membránový potenciál

ZMĚNY OXIDATIVNÍHO METABOLISMU

- produkce reaktivních metabolitů kyslíku (ROS) a dusíku, lipidová peroxidace, účinky antioxidantů

Využití moderních metod průtokové cytometrie, fluorescenční mikroskopie, fluorimetrie, spektroskopie, metod molekulární biologie...

buněčné linie (tkáňové kultury)

Laboratoř
cytokinetiky

Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

Buňky epiteliálního původu

Označení	Lokalizace	Organismus	Patologie
A2780	ovárium	člověk	karcinom, Pt - citlivé
A2780cis	ovárium	člověk	karcinom, Pt - rezistentní
A549	plíce	člověk	karcinom
BEAS-2B	plíce	člověk	tranformované virem
CaCo2	kolon	člověk	adenokarcinom
CCL-64	plíce	norek	normální
CH-1	ovarium	člověk	karcinom, Pt- citlivé
COR-L23	plíce	člověk	karcinom
COR-L23/CP3	plíce	člověk	karcinom, Pt - rezistentní
COR-L23R	plíce	člověk	karcinom, doxorubicin - rezistentní
CT26	kolorectum	myš	karcinom
E10	plicní	myš	normální
FHC	kolon	člověk	embryonální
H4IIELuc	játra	krysa	karcinom

Buňky epiteliálního původu

Označení	Lokalizace	Organismus	Patologie
HaCaT	epidermis	člověk	normální
HeLa	cervix	člověk	karcinom
Hepa1	játra	myš	karcinom
HepG2	játra	člověk	karcinom
HT-29	kolon	člověk	adenokarcinom
HT115	kolon	člověk	adenokarcinom
HUVEC	endotel	člověk	embryonální
LEP	plíce	člověk	embryonální (fibroblasty)
MCF-7	prs	člověk	adenokarcinom
MDA-MB-231	prs	člověk	adenokarcinom
MDCK	ledvina	pes	normální
MVLN	prs	člověk	adenokarcinom
SKOV-3	ovarium	člověk	adenokarcinom, Pt – primárně rezistentní
T47D	prs	člověk	karcinom
WB-F344	játra	krysa	normální

Buňky mezenchymálního původu

Označení	Lokalizace	Organismus	Patologie
G5:113		myš	fibrosarkom
HL-60	krev	člověk	leukemie
IMM	nervové		imortalizované
Jurkat	krev	člověk	leukemie (lymfoidní)
K562	krev	člověk	leukemie (erytroidní)
MOLT-4	krev	člověk	leukemie (lymfoidní)
ML-1	krev	člověk	leukemie (myeloidní)
NB4	krev	člověk	leukemie (myeloidní)
U937	krev	člověk	leukemie (monocytární)
V79	fibroblasty	křeček	normální (fibroblasty)
WEHI	krev	myš	leukemie (lymfoidní)

Přehled metod a metodologií

 **Laboratoř
cytokinetiky**

Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

Metody používané v laboratoři cytokinetiky BFÚ AV ČR, Brno

Legenda: FACS - průtoková cytometrie

FM - fluorescenční mikroskop

SM - světelný mikroskop

WB - western blotting

FM - fluorimetrie (FluoStar)

CM - kolorimetrie (FluoStar nebo Elisa reader)

LM - luminometrie (VUVEL, Lojek)

PAGE - polyakrylamidová elektroforéza

RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction

RG - radiografie

ELFO – agarosová elektroforéza

Metody průkazu apoptotické formy buněčné smrti

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
DAPI staining	Studium morfologických změn buněčného jádra apoptotických buněk	FM
Annexin V - FITC + propidium jodid (PI)	Externalizovaný fosfatidylserin apop. buněk + zachovaná semipermeabilita (detekce rané apoptózy)	FACS, FM
TUNEL + PI	Průkaz specifické fragmentace DNA (DNA zlomů - nicků – ss DNA breaks)	FACS, FM
SubG0/G1 peak v distribuci buněčného cyklu	Barvení buněčné DNA propidium jodidem s extrakcí nízkomolekulární DNA citrátovým pufrem	FACS
PI - Hoechst double - stain	Rozdělení buněk na mrtvé/živé, podle morfologie jádra identifikace apoptotických buněk	FM
DNA žebřík	Průkaz fragmentace DNA na 180 bp fragmenty (tzv. ladder)	ELFO
Kaspáza 1, 3, 7, 8, 9	Detekce exprese specifických proteáz	WB
Caspase assay (c-3, -6, -8, -9 subs.)	Důkaz aktivity specifických proteáz štěpením specifické sekvence na fluorescenční substrát	FM
cytokeratin 18 - protilátka M30	Neoepitop vytvořený štěpením cytokeratinu kaspázou	FACS,
Lamin B	Degradace Laminu B kaspázami	WB
PARP	Detekce štěpení proteinu PARP	WB
JC-1, TMRE, DiOC6, MitoTracker Red, Rh 123	Detekce změn mitochondriálního potenciálu $\Delta\Psi_m$	FACS
Hoechst + propidium jodid (PI)	Detekce apoptických, nekrotických a sekundárně nekrotických buněk (detekce i pozdní apoptózy)	FM
F-aktin	Detekce intenzity polymerizace a depolymerizace aktinu (pomocí konjugátu faloidin-FITC)	FCM, FM
Intracelulární pH	Průkaz poklesu intracelulárního pH vůči fyziol. hodnotě nutného k aktivaci enzymu DNA-ázy	
Izolace cytochromu c z cytos. frakce	Vylití Cyt. C z mitochondrií do cytosolu a formování komplexu s Apaf-1 a procasp-9 vytváří apoptosom	WB
OxPhos Complex IV subunit II	Studium funkce mitochondrií	WB

Proteiny a molekuly spojené s procesem apoptózy

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Bad, Bag-1, Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-X, Bcl-XL, Bid, Mcl-1	Bcl-2 rodina - regulátory průběhu apoptózy	WB
c-FLIP	Inhibitor kaspázy 8	WB
c-IAP1, XIAP	Rodina inhibitorů kaspáz	WB
Hydroethidin, 2',7' dichlorofluoresceindiacetát	Stanovení respiračního vzplanutí a produkce ROS provázející apoptózu	FACS
Dihydrorhodamin 123	Stanovení respiračního vzplanutí a produkce ROS provázející apoptózu	FACS
Lucigenin	Stanovení respiračního vzplanutí a produkce ROS provázející apoptózu	LM

Metody stanovení úrovně proliferace, cytotoxicity, viability

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Počítání buněk	Počítač částic založený na principu konduktivity	Coulter counter
Dye exclusion assay - eosin, trypanová modř	Barvení mrtvých buněk s permeabilizovanou membránou	SM
Dye exclusion assay - propidium jodid	Barvení mrtvých buněk s permeabilizovanou membránou	FACS
MTT, WST-1	Stanovení relativního množství buněk metabolizujících tetrazolove soli MTT, WST-1 na formazanove produkty	CM
CyQuant	Kit (Molecular Probes) pro značení DNA speciální fluorescenční barvou - proliferační assay	FM
PCNA	Marker proliferace - podjednotka DNA-polymerázy δ a ϵ	WB, SM
Inkorporace BrdU	Analog deoxyuridinu se inkorporuje během replikace DNA v proliferujících buňkách	FACS, FM
Inkorporace ³ H-thymidinu (izotopová metoda)	Triciem značený thymidin se inkorporuje do buněk během replikace DNA - scintilační hodnocení	RG
Clonogenic assay	Otreatované buňky rostou v médiu nebo na agaru, sleduje se schopnost vytvářet kolonie buněk	

Metody analýzy buněčného cyklu

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Barvení pomocí PI (např. Vindelův roztok)	Distribuce buněčné populace podle množství celkové buněčné DNA do jednotlivých fáz bun. Cyklu	FACS
Mouse anti-BrdU-FITC + PI	Sledování syntézy DNA na základě inkorporace BrdU do DNA prolifерujících buněk	FACS
Pulse-chase BrdU labeling	Sledování průchodu buněk cyklem	FACS

Proteiny spojené s regulací buněčného cyklu

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
cyklin A	Řízení S - G2 fáze b. cyklu - asociuje s cdk 2	WB
cyklin D1	Řízení přechodu z fáze G1 do S - asociuje s cdk 4	WB
cdk 2 activity assay	Řízení S - G2 fáze b. cyklu - asociuje s cyklinem A	RG
cdk 4	Řízení přechodu z fáze G1 do S - asociuje s cyklinem D	WB
p15, 16	Rodina p16 - inhibující kinázy cdk 4 a 6	WB
p21/waf1/cip1/sdi1/pic1	Inhibitor cdk a DNA replikace, transaktivovaný pomocí p53	WB
p27/kip1	Inhibitor komplexů cyklin D-cdk 4, cyklin A-cdk 2	WB
Topoizomeráza II α	Replikační faktor - marker pozdní S/G2/M fáze b. cyklu	WB
pRb	Onkosupresor zastavující ve fosforylované formě b. cyklus v souvislosti s p21	WB
p53	Tumor supresorový gen - "Guardian of the genome" - downstream reguluje p21/waf	WB

Metody detekce diferencujících se buněk

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
CD11b, CD14	Znaky monocytární diferenciace lidských leukemických buněk	FACS
Nespecifické esterázy	Stanovení aktivity α -naftyl acetát esterázy (difer. leukemických buněk)	CM
Fagocytická aktivita	Znak monocytární diferenciace leukem. buněk - pohlcení částic konjug. s FITC	FACS
NBT redukční test	Se zvyšující se úrovní diferenciace roste počet reduk. formazanových zrn	CM
Aktivita alkalické fosfatázy	Znak diferenciace kolonových buněk - disodná sůl 4-nitrofenyl fosfátu	CM
Nespecifické esterázy	Stanovení aktivity nespecifických esteráz pomocí štěpení fluorescenční sondy CFDA (karboxyfluorescein diacetát)	FACS
Intracelulární pH	Stanovení intracelulárního pH jako markru diferenciace buněk pomocí fluorescenční sondy SNARF-1	FACS
Polymerizace aktinu	FITC značený faloidin	FM

Proteiny spojené s diferenciací buněk

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
RAR α	Receptor all-trans retinoic acid, indukující diferenciaci leukemických buněk	WB
RXR α	Receptor aktivovaný 9-cis-retinovou kyselinou	WB
VDR	Receptor vitamínu D, množství VDR moduluje růst a diferenciaci nádorových buněk	WB

Mezibuněčná komunikace, anoikis, motilita buněk

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
FAK	Nereceptorová tyrosin kináza zapojená v přenosu signálů z ECM	WB
Cadheriny	Složka desmosomu, nachází se v komplexu s cateniny	WB, FM
γ -catenin	Složka desmosomu, nachází se v komplexu s cadheriny	WB
connexin 43	Složka gap junctions (GJIC)	WB
GJIC inhibition assay	Testování funkčnosti GJIC pomocí luciferové žluti	FM
Wound healing assay	Testování motility buněk	FM

Metabolismus kyseliny arachidonové

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
cytopl. fosfolipáza A2	Odštěpuje AA z membrán	WB
5-lipoxygenáza	Metabolizuje AA na leukotrieny	WB
Cyklooxygenáza 2	Metabolizuje AA na prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany	WB
Uvolňování AA	Uvolnění AA z buněk do media	HPLC (VUVEL)

Signální dráhy receptorů smrti

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Fas-L	Ligand Fas-R - signál smrti	WB
Fas-R (CD95)	Receptor smrti - aktivovaný navázáním Fas-L	WB,FACS
FADD	Adaptérová molekula - součást DISC komplexu	WB
Toso	Inhibitor Fas indukované apoptózy nacházející se na povrchu T lymfocytů	WB
TRAIL	Ligand TRAIL-R - signál smrti	WB
TRAIL-R1,2 (DRs)	Receptory smrti - aktivovány navázáním TRAIL-L	WB,FACS
TRAIL-R3,4 (DcRs)	Decoy receptory - vážou TRAIL, ale neaktivují proces apoptózy	WB,FACS

Kinázy a proteiny s nimi asociované

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Ras, N-Ras	Mebránový G-protein	WB
ERK 1/2	Imunochemické stanovení neaktivní a aktivní (fosforylované formy)	WB
p38	Imunochemické stanovení totální (na fosforylačním stavu nezávislé) hladiny p38	WB
JNK/SAPK activity assay	stanovení aktivity analýzou fosforylace substrátu (radioizotopová metoda)	RG
Akt/PKB	Serin/Threoninová protein kináza, může stimulovat Ras	WB
pTyr	Protilátka detekující fosforylovaný Tyrosin	WB
pSer	Protilátka detekující fosforylovaný Serin	WB

Signální dráha TGFβ

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
TGF β1	Růstový faktor	WB
TGF β R I, II	Receptor pro TGF β	WB
Smad 2, 4	Aktivace TGF R vede k translokaci těchto transkripčních faktorů do jádra	WB

Proteiny asociované s AhR

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
AhR	Ligand-dependentní transkripční faktor,	WB, RT-PCR EMSA, FM
Reporter gene assay for AhR	Metoda stanovení aktivity Ah R	LM
Stabilní transfekce mutantních variant AhR a ARNT pomocí plazmidových vektorů		
ARNT	Jaderný partner receptoru AhR umožňující jeho vazbu na XRE element	WB, RT-PCR
CYP1A1	Oxidáza se smíšenou funkcí patřící do rodiny cytochromů P450	WB, RT-PCR

Proteiny spojené s hormonální regulací

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
ER α , β	Receptory estrogenů	WB
Reporter gene assay for ER	Metoda stanovení aktivity estrogenních receptorů	LM
Cathepsin D	Endopeptidáza indukovaná estrogeny	WB
LRP/MVP	Ribonukleoproteinové částice ovlivněné hladinou estrogenů	WB
PPAR γ	Jaderný receptor pro hormony ovlivňovaný MAPK	WB

Transkripční faktory a asociované proteiny

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
NF- κ B	Aktivátor řady genů spojených s hematopoezou, apoptózou atd.	WB, EMSA
I κ B	Inhibitor NF- κ B, který jej zadržuje v cytoplazmě	WB
c-Myc	Po navázání heterodimerizačního partnera Max působí jako TF	WB
p53	Onkosupresor podílející se na řízení oprav DNA lézí	WB
AP - 1 (Jun + Fos)	Homo- či heterodimerní transkripční faktor	WB, EMSA





FACSCalibur



**Průtoková
(flow) cytometrie:**

**jedna z hlavních
používaných
metodologií**

**Laboratory
of
cytokinetics**

**Institute of Biophysics, Brno
Academy of Sciences
Czech Republic**

