

Moderní metody biologického výzkumu

Oddělení cytokinetiky

Oddělení patofyziologie volných radikálů

Oddělení molekulární cytologie a cytometrie

Biofyzikální ústav AV ČR v.v.i., Brno

Co vás dnes čeká?

- Krátká prezentace
- Přestavení nejčastěji používaných metod v naší laboratoři

Oddělení Cytokinetiky

- Regulace cytokinetických parametrů lipidovými složkami výživy
- Interakce lipidů a cytokinů
- Působení protinádorových léčiv
- Role růstových faktorů v signalizaci nádorových buněk
- Molekulární a buněčné mechanismy toxicity organických látek

Tkáňové (buněčné) kultury *in vitro*

- živočišné, rostlinné, hmyzí, rybí atd.
- Dělení buněčných kultur:
 - **Primární buněčné kultury** - vznikají enzymatickým rozvolněním ([trypsin](#), [kolagenáza](#)) buněk tkání (bovinní fétus, myší tkáň apod.). Tyto buňky jsou následně kultivovány v kultivačních láhvích v prostředí [kultivačního média](#). Mají diploidní sadu chromozómů a zpravidla jde o směs různých typů buněk původní tkáň (epiteloidní, [fibroblasty](#)).
 - **Sekundární buněčné kultury (diploidní)** - jedná se o více než jednu pasážované primární kultury. Mají rovněž diploidní chromozomovou výbavu, ale oproti primárním kulturám obsahují pouze jeden vyselektovaný typ buněk. Lze je pasážovat 30x - 50x, zhruba po dobu jednoho roku. Toto omezení je především kvůli zkracování [telomer](#).
 - **Buněčné linie (heteroploidní)** - získávají se cílenou selekcí z primárních kultur pomocí fyzikálních či chemických mutagenů nebo se získávají přímo z nádorových buněk (např. buněčná linie [HeLa](#) pocházející z buněk nádoru [děložního hrdla](#)). Jsou [heteroploidní](#) a lze je pasážovat bez omezení.
- ADHERENTNÍ kultury - rostou přichyceny k pevnému podkladu (kultivační nádoby, mikronosiče)
- SUSPENZNÍ kultury - nevyžadují podklad, rostou volně v médiu

Využití buněčných kultur

Výhody:

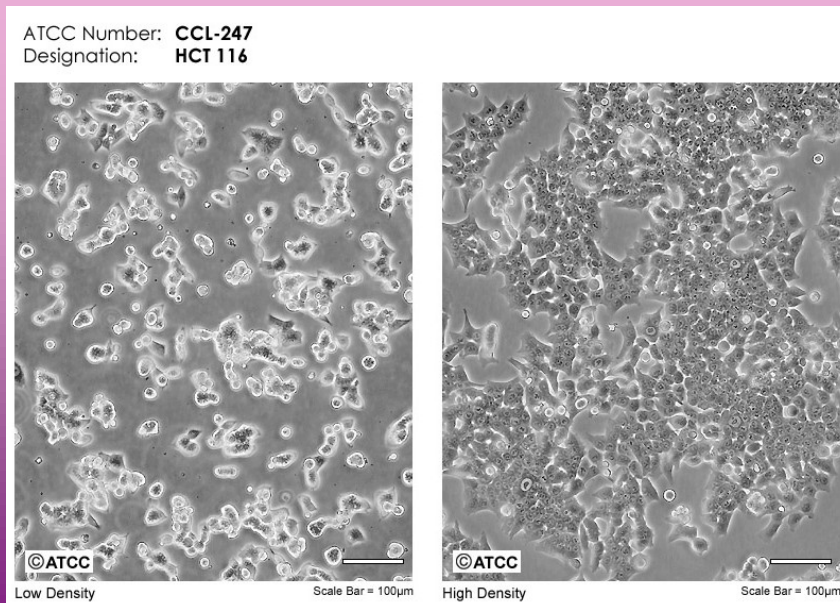
- lze sledovat účinky různých faktorů a mechanismy studovaných dějů bez nežádoucí interakce s buňkami jiných typů nebo tkání, účinku humorálních faktorů i celkového stavu organismu
- lze získat rozsáhlé populace buněk shodných vlastností a sledovat jejich reakce v kontrolovatelných podmínkách
- homogenita, 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*

Hlavní komerční dodavatelé buněčných linií

- The American Type Culture Collection
www.atcc.com
- The European Collection of Cell Cultures
www.ecacc.org.uk



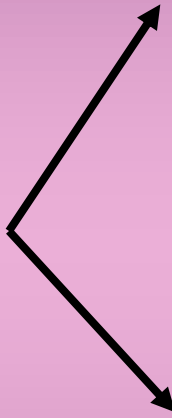
jaké medium a sérum
adherentní x neadherentní
organismus
jejich obrázek
jaké jsou to buňky
jak je psát

-
-
-

Kultivace buněk

- Přísná sterilita
 - práce ve flowboxu, sterilní přístroje a roztoky
- CO₂ inkubátory
 - udržení specifických podmínek (95% vlhkost, 5% CO₂, 37°C)
- Speciální plastik
 - coating proteiny extracelulární matrix
- Kultivační média (glukóza, aminokyseliny, vitamíny, lipidy, anorganické soli)
 - specifické složení pro danou buněčnou linii
- Sérum
- Hormony, růstové faktory...
- Antibiotika

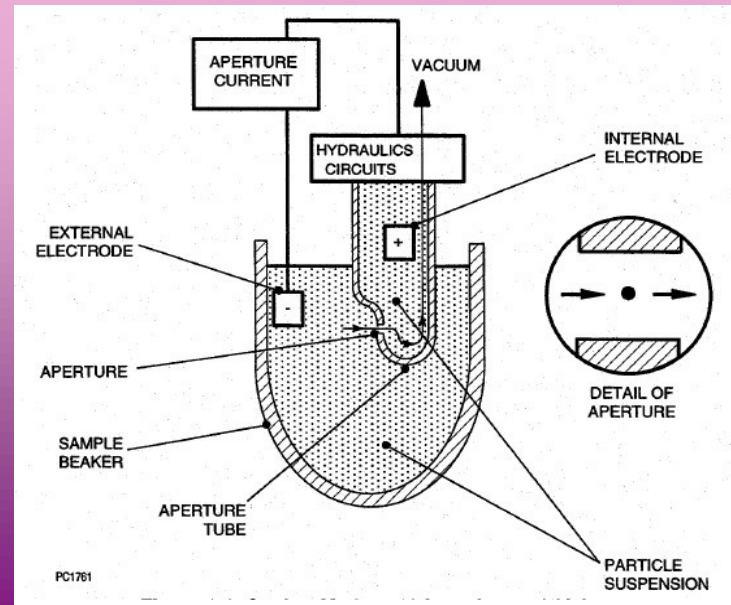
Kultivace buněk

- Udržování kultury – pasážování
 - určitý počet buněk se po určité době přenese do čerstvého živného prostředí
 - Adherentní
 - odsátí média
 - oplach EDTA/PBS
 - trypsin
 - Neadherentní
 - část kultury se přenese do nového média
- 

Stanovení proliferace

• Coulter Counter

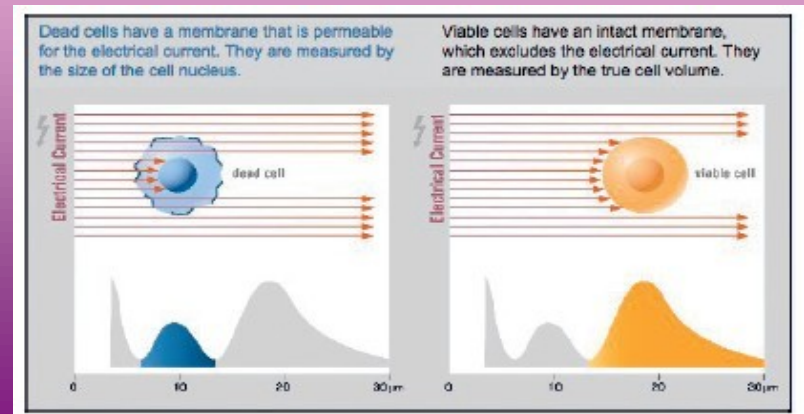
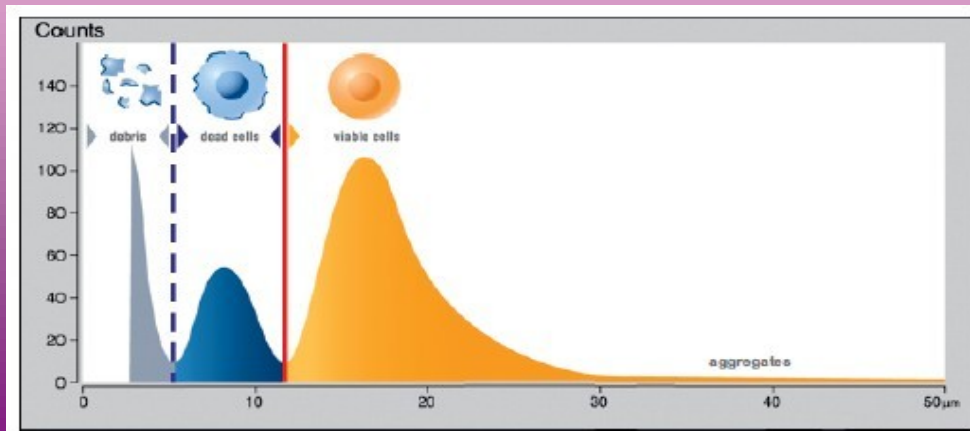
- Suspenze buněk v elektrolytu je nasávána do trubice s malým otvorem
- Mezi elektrodou uvnitř trubice a zevní elektrodou protéká elektrický proud
- Buňka procházející mezi elektrodami přeruší tok proudu a vede k změně napětí
- Změna napětí je úměrná objemu částice
- Změna napětí musí mít určitou prahovou hodnotu, aby byla započítána



Stanovení proliferace

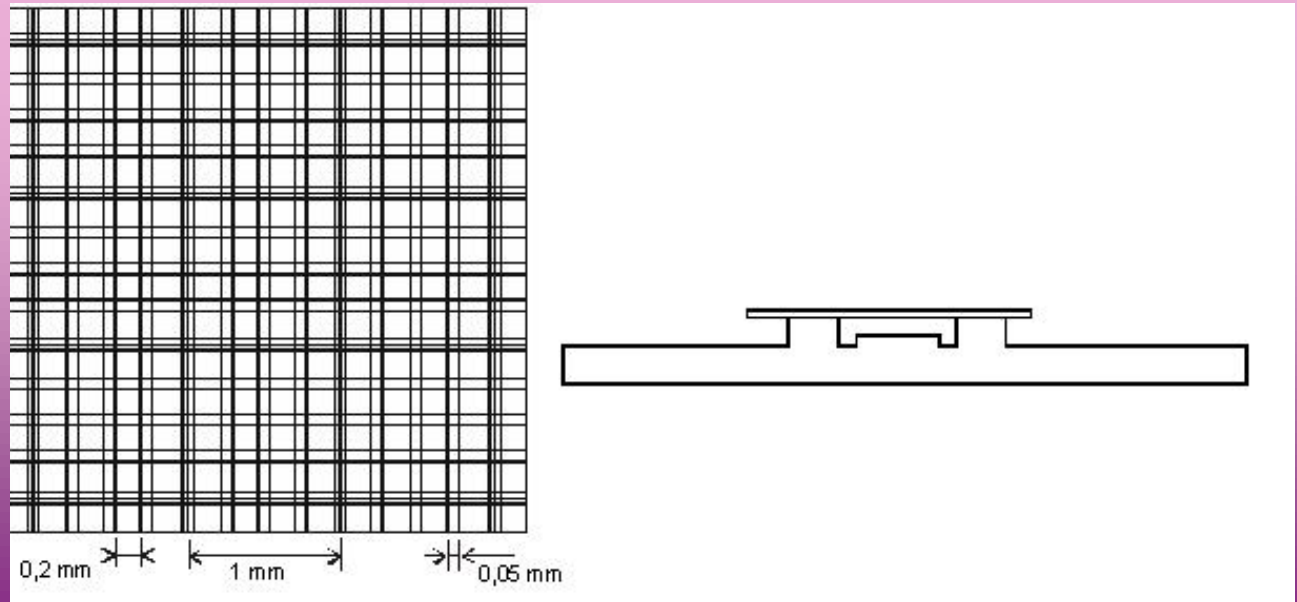
- **CASY**

- Základní princip stejný jako u Coulter Counter
- Navíc analýza
 - Viability buněk
 - Objemu buněk
 - Agregátů
 - Debris - „rozbitých buněk“

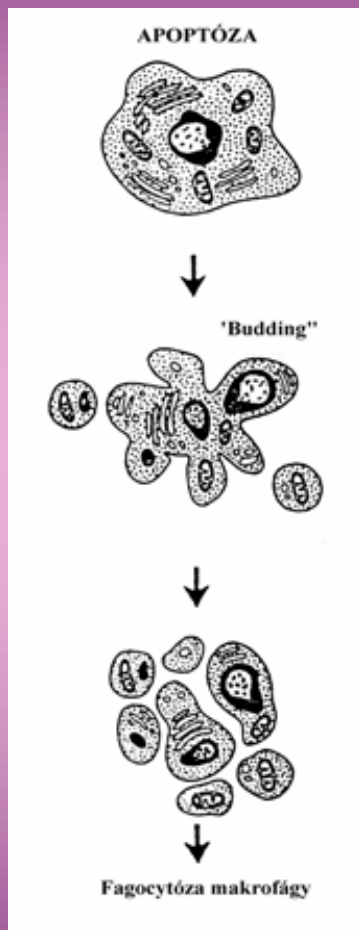


Stanovení proliferace – další možnosti

- Bürknerova komůrka
 - nejjednodušší metoda – počítání pod mikroskopem



Stanovení apoptózy



Aktivace kaspáz

Kondenzace buňky a organel

Kondenzace chromatinu

Ztráta asymetrie buněčné membrány

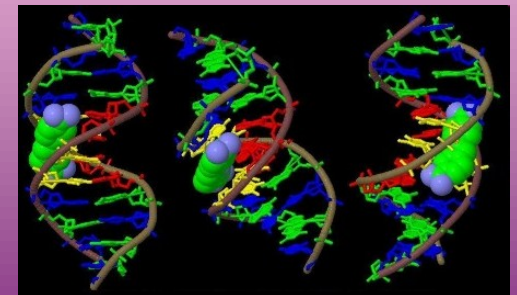
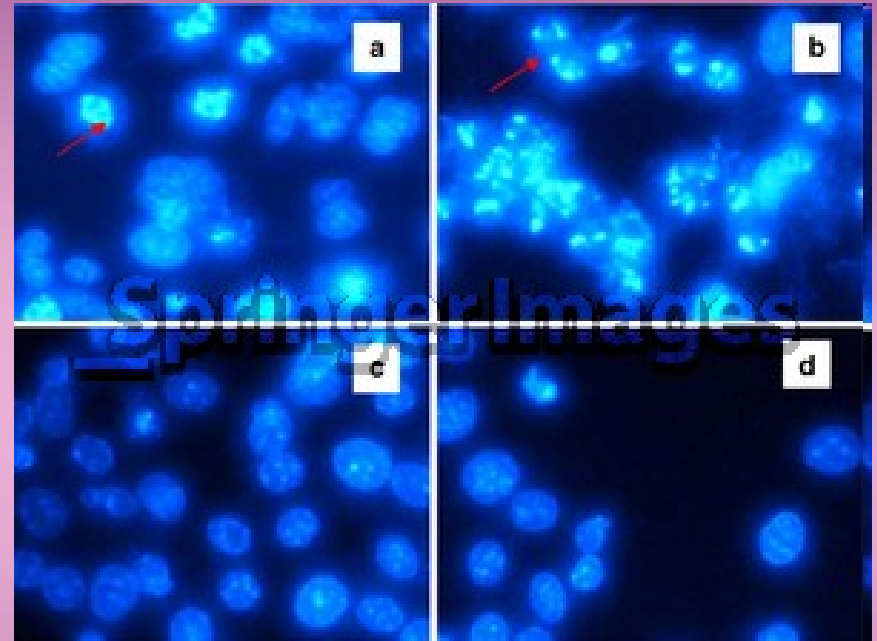
Zachování integrity buněčné membrány

Tvorba „bodies“ a jejich fagocytóza okolními buňkami

Stanovení apoptózy na různých úrovních procesu...

Apoptosis detection using DAPI staining

- Během apoptozy – fragmentace DNA ~ 200 PB
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) prochází neporušenou cytoplazmatickou membránou
- DAPI se interkaluje do DNA – typické „rosety“ pod fluorescenčním mikroskopem
- Absorpční maximum ~358 nm (ultrafialová)
- Emisní maximum ~461 nm (modrá)



Stanovení apoptózy – další možnosti

- Substráty kaspáz
 - detekce štěpení PARP, proteinů z rodiny Bcl (western blot)
- Aktivita kaspáz
- Mitochondriální funkce
 - uvolňování cytochromu c (FACS)
 - změny membránového potenciálu mitochondriální membrány (rhodamin 123, Mitotracker; FACS)
- TUNEL
 - sledování fragmentace DNA (fluorescenční mikroskop, FACS)
- Annexin V
 - váže se na fosfatidilseriny

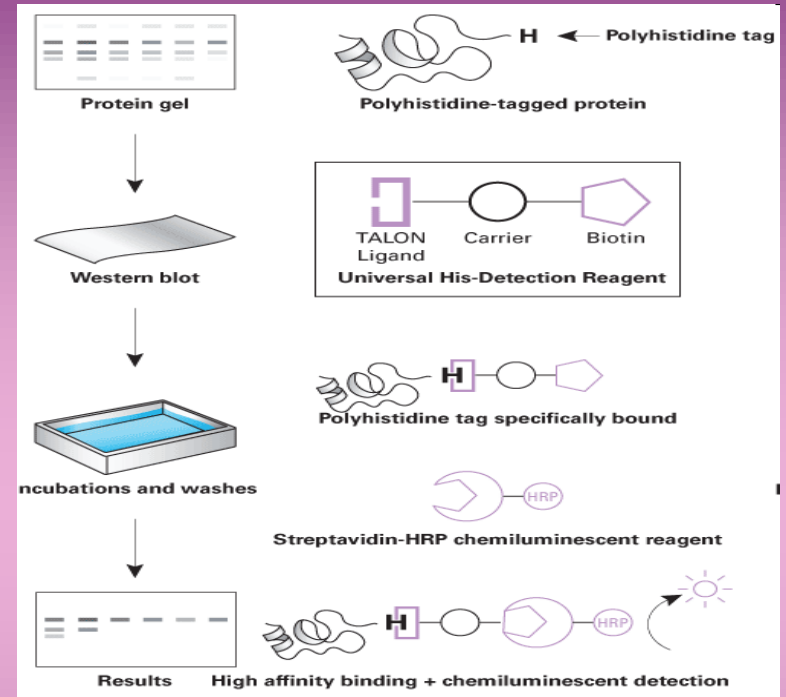
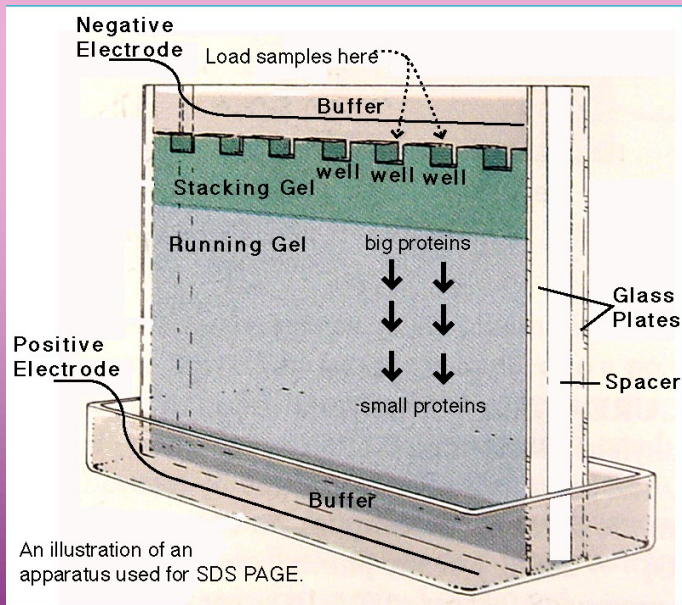
- Mechanizmy buněčné smrti, význam, metody – RNDr. Alena Hyršlová, Ph.D. (Bi8870)

Jakou metodu použít?

- více než jednu
- principiálně odlišnou
- v závislosti na buněčném typu

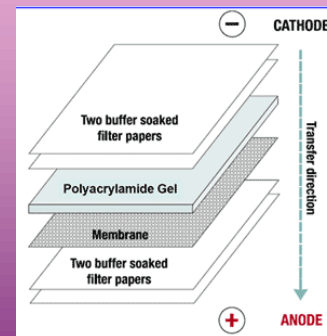
SDS-PAGE gel electrophoresis and Western blotting

- SDA-PAGE elektroforéza - separace proteinů na základě jejich hmotnosti
- SDS denaturuje proteiny a obalí je - proteiny mají negativní náboj (úměrný jejich velikosti)
- Proteiny v gelu migrují ke kladně elektrodě

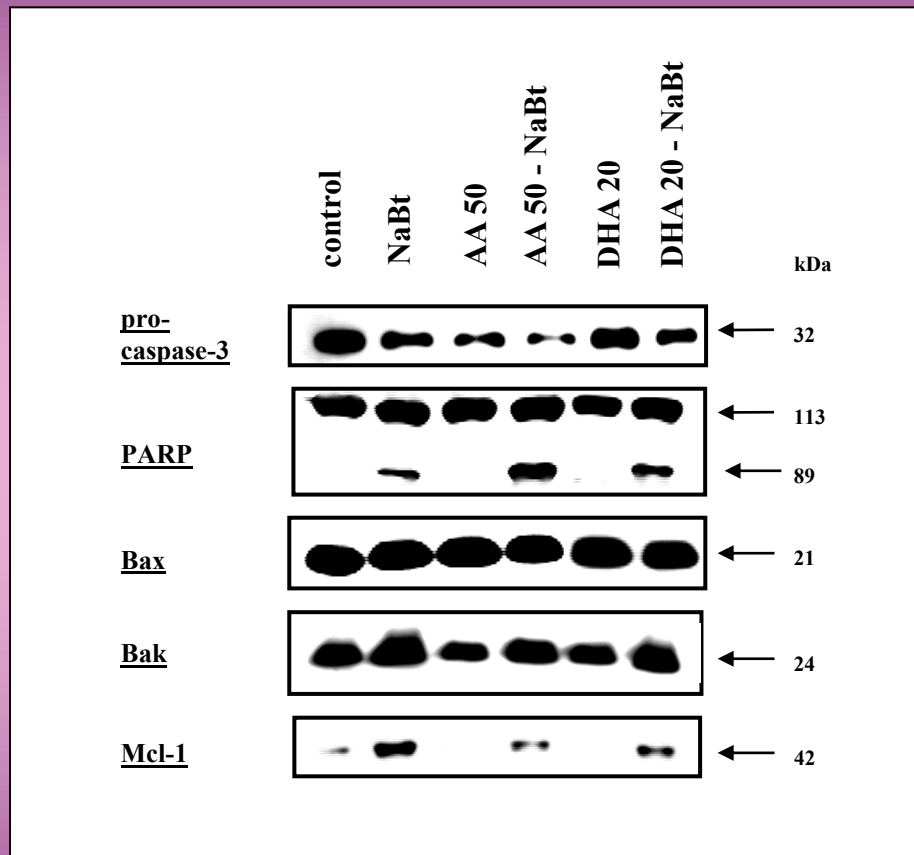


•Přenos vzorků z gelu na membránu a následná identifikace proteinů pomocí protilátek

•Membrány PVDF, nitrocelulózo



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



Diferenciace

- Rozrůznění buněk vlivem faktorů okolního prostředí

Při diferenciaci

- se mění morfologie buněk
- stoupá aktivita specifických enzymů (např. alkalické fosfatázy)
- stoupá exprese specif. povrchových antigenů (CD11b, CD 14)
- vzniká schopnost fagocytózy a produkce kyslíkových radikálů (měření redukce NBT nebo chemiluminiscenčně)

Stanovení diferenciace

Změna enzymového vybavení buněk

- **Nespecifické esterázy** - Hydrolýza α -naftyl acetátu esterázami vede k vzniku hnědého zbarvení
- **Detekce myeloperoxidázy** - myeloperoxidáza štěpí peroxid kyslíku za vzniku kyslíkových radikálů, které pak oxidují o-dianisidin za vzniku barevných látek chinonového charakteru
- **Detekce alkalické fosfatázy** - alkalická fosfatáza štěpí bezbarvý substrát 4-p-nitrofenyl fosfát za vzniku žlutého zbarvení

Produkce ROS při oxidativním vzplanutí (monocyty)

- **Redukce NBT (nitroblue tetrazolium)** - NBT je redukován superoxidem produkovaným monocytami. Redukce vede k změně barvy ze žluté na modrou
- **Oxidace/redukce luminolu** - ROS produkované monocytami oxidují luminol při redukci – chemiluminiscence

Změna povrchových molekul

- **Exprese CD11b** (R pro C3b složku komplementu) a **CD14** (vazba LPS)

Změna morfologie Zvýšená adheze, pseudopodia, zástava proliferace

Stanovení diference buněk nádoru kolonu (linie HT-29) po působení butyrátu sodného (NaBt) metodou fluorimetrického stanovení aktivity alkalické fosfatázy na přístroji Fluostar (spektrofotometr, fluorimetr, chemiluminometr).

Spektrofotometrie = stanovování vlastností vzorku, např. koncentrace určité látky v roztoku, na základě pohlcování světla v různých vlnových délkách spektra.

