

Cvičení z AC 2011

5. – 7. 12. 2011, BFÚ

Vyučující: Mgr. Karel Souček, Ph.D.; Mgr. Zuzana Pernicová; Mgr. Radek Fedr

Č.	Učo	Student
Skupina A)		
1.	269310	Flössler, Jaromír
2.	323514	Lánová, Martina
3.	395833	Lauková, Jarmila
4.	322510	Rašovská, Tereza
5.	324476	Rodová, Markéta
Skupina B)		
6.	323515	Šeda, Václav
7.	323841	Šimečková, Šárka
8.	270162	Šrůtová, Klára
9.	323808	Zapletal, Ondřej
10.	211057	Zarbochová, Pavla

Den 1

hod	A)	B)
9-11	BD FACS Calibur & BD Aria II Sorp 4L, základy obsluhy a kalibrace	
11-13	- Fucci cells, sběr, měření, sorting, analýza - ovlivnění buněk pro analýzu buněčného cyklu	
13-15		BD FACS Calibur & BD Aria II Sorp 4L, základy obsluhy a kalibrace
15-17		- Fucci cells, sběr, měření, sorting, analýza - ovlivnění buněk pro analýzu buněčného cyklu

Den 2

hod	A)	B)
9-11		Sběr a fixace buněk pro analýzu buněčného cyklu
11-13	Sběr buněk a značení povrchových antigenů	Značení buněk, měření a analýza buněčného cyklu
13-15	Detekce analýza a separace na základě exprese povrchových znaků	

Den 3

	A)	B)
9-11	Sběr a fixace buněk pro analýzu buněčného cyklu	
11-13	Značení buněk, měření a analýza buněčného cyklu	Sběr buněk a značení povrchových antigenů
13-15		Detekce analýza a separace na základě exprese povrchových znaků

Protokol 1

Fucci 8 buňky, sběr, měření a analýza buněčného cyklu pomocí fluorescenčních proteinů
- pouze demonstrace

Protokol 2

Ovlivnění buněk PC3 pro analýzu buněčného cyklu
- každý sám zpracuje dva vzorky – 1) kontrola (vehicle) a 2) curcumin

Protokol 3

PC3 buňky, sběr, fixace, barvení Vindelovým roztokem, měření a analýza buněčného cyklu
- každý sám zpracuje 2 vzorky – 1) kontrola (vehicle) a 2) curcumin

Protokol 4

E2, cE2 buňky, sběr, multibarevné značení povrchových molekul CD133/CD44 a viability, měření a analýza fenotypu, sorting, kontrola kvality
- každý sám zpracuje 2 vzorky – E2, cE2 linie

Protokol 1 – model HeLa 8 Fucci cells – měření a analýza buněčného cyklu pomocí fluorescenční próby

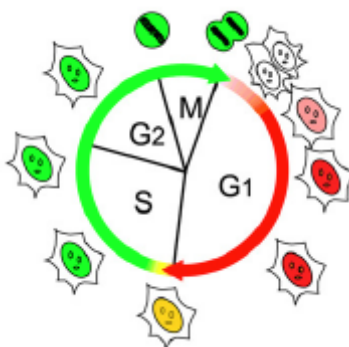
Cíl

- cílem experimentu je seznámit se s modelovou buněčnou linií HeLa 8 Fucci, která umožňuje analýzu buněčného cyklu na živých buňkách bez potřeby fixace a značení
- tento experiment bude demonstrační – bude Vám názorně předvedeno, jak se zpracovávají buňky pro tento typ analýzy, což využijete při přípravě dalších experimentů během tohoto cvičení
- demonstrace měření proběhne na přístroji BD FACS Aria II Sorp
- ukázka vyhodnocení dat bude provedena pomocí programu FlowJo

Teorie

Buněčná linie HeLa 8 Fucci

- buněčná linie HeLa – lidská permanentní buněčná linie odvozená z karcinomu děložního čípku
- nejstarší a jedna z nejčastěji používaných lidských buněčných linií
- Fucci próba (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) – umožňuje vizualizovat progresi buněčného cyklu u živých buněk
- buňky s Fucci ve fázi G1 emitují červené světlo, ve fázi S/G2/M zelené světlo
- více – viz pdf. souboru uložené ve studijních materiálech



<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867408000548> (viz studijní materiály)

Tento experiment bude pouze demonstrován cvičícími

Materiál

- připravená buněčná linie HeLa 8 Fucci
- roztok PBS+EDTA – EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) je chelatační činidlo, které mimo jiné vycytává Ca^{2+} ionty, čímž rozrušuje mezibuněčné spoje
- trypsin - pankreatický enzym (serinová proteáza), štěpí amidové a esterové vazby argininu a lysinu
 - působení trypsinu uvolňuje adherentní buňky od kulturačního povrchu

- nesterilní médium se sérem – inaktivace trypsinu
- PBS – oplach buněčné suspenze

Postup:

Sběr a příprava vzorků

- odsát médium z buněk
- přidat 3 ml PBS+EDTA – 1-2 minuty nechat působit
- odsát PBS+EDTA
- přidat 0,5 ml trypsinu – nechat inkubovat v termostatu (37°C) dokud se buňky neuvolní (cca 1-2 minuty)
- přidat 2,5 ml média se sérem (inaktivace trypsinu)
- misku opláchnout 1 ml PBS, přenést do zkumavky k buněčné suspenzi
- stočit 200g 5 minut
- odsát supernatant
- pelet rozsuspendovat v 1 ml PBS
- stočit 200g 5 min
- odsát supernatant
- pelet rozsuspendovat v 300 µl PBS a měřit

Výsledky

Popište postup měření buněčného cyklu u této linie + přiložte výsledky měření získané vyhodnocením v programu FlowJo

Protokol 2 – ovlivnění buněčné linie PC-3 látkou curcumin

Cíl

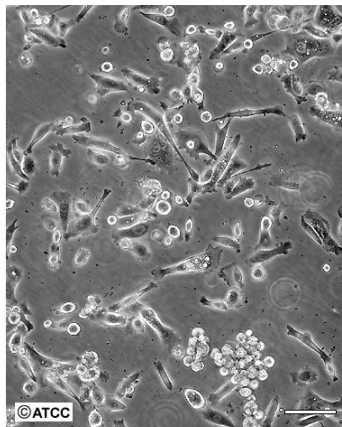
- cílem experimentu je ovlivnit buněčnou linii PC-3 látkou curcuminem
- působení curcuminu 24-48 hodin vede k indukci zástavy buněčného cyklu ve fázi G0/G1 a také k částečné indukci apoptózy
- ovlivněné buňky budou následovně zafixovány a nabarveny pro analýzu buněčného cyklu

Teorie

Buněčná linie PC3 – lidská permanentní buněčná linie odvozená z kostních metastáz adenokarcinomu prostaty

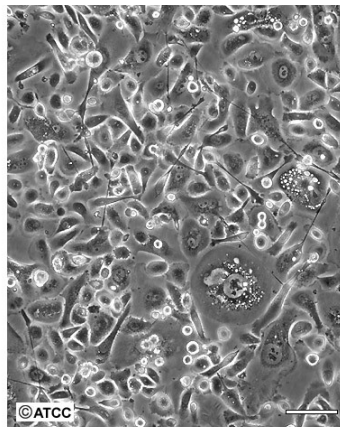
- původně izolovaná z 62 letého pacienta se stádiem IV karcinomu prostaty adaptovaná pro kultivaci *in vitro*
- jeden z častých modelů studia rakoviny prostaty v podmínkách *in vitro*

ATCC Number: **CRL-1435**
Designation: **PC-3**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Curcumin

- curcumin získaný z rostliny kurkuma (*Curcuma longa*) je zdrojem koření (turmeric), což je součást koření kari
- v současné době se výzkum soustředí především na jeho antioxidační, protizánětlivé a protinádorové vlastnosti
- curcumin a léčba nádorového onemocnění – curcumin cíleně a nevratně zastavuje růst a metastázování nádorových onemocnění, stejně tak působí protektivně proti vzniku nádorového onemocnění
- curcumin např. snižuje riziko vzniku rakoviny prostaty a rakoviny plic, působí supresivně na růst nádorových buněk u rakoviny prsu
- molekulární úroveň působení curcuminu:
 - působí jako antioxidant (vychytává volné radikály) a také inhibuje jejich produkci
 - inhibuje aktivitu cytochromu P-450 a aktivitu cyklooxygenázy 2 (COX-2)

Materiál

- zásobní roztok curcuminu o koncentraci 1mM rozpuštěný v DMSO
- sterilní DMSO
- sterilní špičky, pipety pro práci v laminárním boxu
- připravené 2 misky 60 mm s buněčnou linií PC-3 (CO₂ inkubátor)
- miska 1 – kontrola – ovlivněná pouze rozpouštědem (DMSO, vehicle) – přidá se stejný objem, jako objem přidávaného curcuminu
- miska 2 – ovlivnění curcuminem – výsledná koncentrace 10 μM

Výpočet

- zásobní koncentrace curcuminu = 1 mM
- výsledná koncentrace na buňkách = 10 μM
- objem média v buňkách = 5 ml
- **Dopočítejte, jaký objem zásobního roztoku curcuminu a DMSO budete přidávat:**

Práce probíhá sterilně v laminárním boxu, každý student pracuje se dvěma vzorky (kontrola, ovlivnění curcuminem)

Postup

- v laminárním boxu připravit sterilní špičky a pipety
- přeneste buňky z CO₂ inkubátoru do laminárního boxu
- do misky 1 (vehicle) přidat vypočítaný objem sterilního DMSO (mikrozkumavka 1)
- do misky 2 (ovlivnění curcuminem) přidat vypočítaný objem zásobního roztoku curcuminu (mikrozkumavka 2)
- médium v miskách opatrně a jemně promíchat
- misky s buňkami po ovlivnění uložit zpět do CO₂ inkubátoru
- inkubace s curcuminem 24 hodin (skupina B) nebo 48 hodin (skupina A)

Po příslušné době inkubace bude následovat nesterilní odběr vzorků, fixace a značení buněk na analýzu buněčného cyklu (viz. protokol 3)

Výsledky

Stručně popište vliv curcuminu na morfologii a viabilitu buněčné linie PC-3 v době odběru pro analýzu buněčného cyklu (mikroskopické pozorování).

Protokol 3

3.A Sběr, fixace a značení buněk PC3 po ovlivnění curcuminem pro analýzu buněčného cyklu

Cíl:

- cílem je připravit buňky PC-3 ovlivněné curcuminem pro analýzu buněčného cyklu
- buňky budou nesterilně odebrány, zafixovány a následně bude naznačena DNA pomocí barvicího roztoku s propidium jodidem
- vzorky budou analyzovány na přístroji BD Aria II Sorp
- výsledky budou vyhodnoceny pomocí programu FlowJo

Materiál:

- PC3 buňky - 1x 60 mm miska - kontrola
 - 1x 60 mm miska – curcumin 10 μ M, ovlivnění 24 hodin (skupina B) nebo 48 hodin (skupina A)
- roztok PBS+EDTA
- trypsin
- nesterilní médium se sérem
- PBS
- 70% EtOH – fixace buněk
- Vindelův roztok – značení pro buněčný cyklus (viz níže)
- zkumavky pro FACS
- nesterilní špičky, pipety

Příprava vzorků

Práce probíhá nesterilně, každý student pracuje s vlastními vzorky (kontrola, ovlivnění curcuminem)

Sběr vzorků

! před samotným odběrem si každý prohlédne své dva vzorky pod mikroskopem a doplní do protokolu č.2 výsledky pozorování!

- odsát médium z buněk
- přidat 3 ml PBS+EDTA – 1-2 minuty nechat působit
- odsát PBS+EDTA
- přidat 0,5 ml trypsinu – nechat inkubovat s termostatu (37°C) dokud se buňky neuvolní (cca 1-2 minuty)
- přidat 2,5 ml média se sérem (inaktivace trypsinu)
- celý objem misky přenést pipetou do připravené FACS zkumavky (zkumavka A = kontrola, zkumavka B = ovlivněné buňky)
- každou misku opláchnout 1 ml PBS, přenést do zkumavky k buněčné suspenzi

Fixace buněk

- stočit 200g 5 minut
- odsát supernatant
- pelet rozsuspendovat ve 2 ml PBS
- stočit 200g 5 minut
- odsát supernatant
- pelet **dobře** rozsuspendovat ve 200 μ l PBS
- přidat 3,5 ml 70% EtOH, **dobře promíchat několikanásobným převrácením** zavřené zkumavky
- fixace v EtOH – minimálně 30 min 4°C, může zůstat i několik dní ve 4°C

Barvení pomocí Vindelova roztoku

- buňky fixované v EtOH stočit 200g 5 min
- odsát supernatant
- pelet rozsuspendovat ve 3 ml PBS
- stočit 200g 5 minut
- odsát supernatant
- pelet rozsuspendovat ve 300 μ l Vindelova roztoku
- barvit 30 min 37°C a měřit

Vindelův roztok (Handbook of flowcytometry methods - *J.P. Robinson, Willey-Liss 1993*)

1M TRIS (pH 8)	1 ml
RNAse (Sigma R-5503)	1 mg
TRITON (nebo NP-40)	100 μ l
NaCl	60 mg
Propidium jodid	5 mg
doplnit destilovanou vodou do 100 ml	

uchovávat při 4°C

Pozn.

Vindelův roztok lze použít i bez fixace buněk – pak se v podstatě analyzují jen jádra.

V případě fixovaných buněk není nutné mít v roztoku detergent (stačí pouze roztok PI a RNAse).

3.B Měření a analýza buněčného cyklu

Popište postup vlastního měření a zhodnocení výsledků, přiložte výsledky vyhodnocené v programu FlowJo a interpretujte získaná data (srovnání mikroskopického pozorování v době odběru s výsledky analýzy cyklu,...).

Protokol 4. Vícebarevná analýza fenotypu u buněčné linie E2 a cE2, sorting

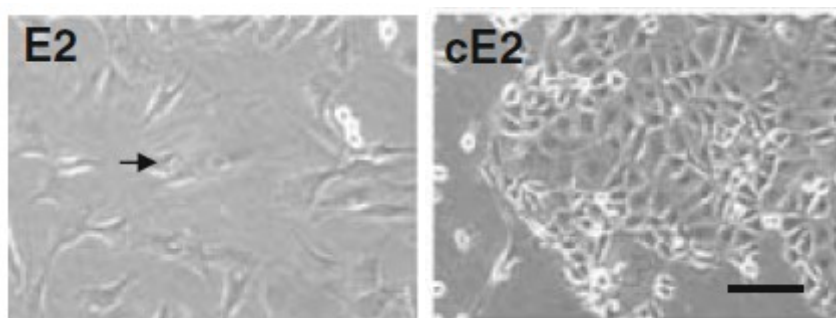
Cíl

- cílem experimentu je na živých buňkách značit povrchové molekuly CD133 a CD44 pomocí specifických primárních protilátek konjugovaných s fluorescenčními značkami
- je důležité detekovat expresi těchto povrchových molekul pouze na živých buňkách, proto současně se značením těchto dvou znaků bude detekována i viabilita pomocí speciálního fluorescenčního kitu
- celkem tedy budeme značit 3 znaky a detekovat 3 fluorescenční spektra

4.A Odběr buněk a značení specifickými protilátkami

Buněčné linie E2 a cE2

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2903072/?tool=pubmed> (viz studijní materiály)
- myší buněčné linie odvozené z adenokarcinomu prostaty
- izolované z myši s kondicionální delecí genu pro PTEN, což vede ke spontánnímu rozvoji adenokarcinomu prostaty
- linie E2 – závislá na androgenech
- linie cE2 – linie nezávislá na androgenech, izolovaná z myši po kastraci



Povrchové molekuly CD133 a CD44

- prokázány jako charakteristické znaky nádorových kmenových buněk (NKB) mimo jiné i u adenokarcinomu prostaty
- NKB - subpopulace nádorových buněk, které jsou pravděpodobně zodpovědné za progresi nádorového onemocnění a tvorbu metastáz
 - vlastnosti podobné kmenovým buňkám – schopnost sebeobnovy a tvorby jak dalších maligních buněk, tak i nemaligních prekursorových buněk
 - pomalu cyklující buňky, zvýšená exprese antiapoptotických molekul a také molekul zodpovědných za multilékovou rezistenci (ABC transportéry), proto jsou rezistentní k běžně aplikované chemoterapii
- CD44 - povrchová molekula zapojená do procesů proliferace, diferenciace, migrace, angiogeneze a dalších
 - u mnoha nádorových onemocnění je zvýšená exprese CD44 spojena s horší

prognózou

- má několik ligandů – osteopontin, fibronectin, collagen, hyaluronate
- u nádorových onemocnění prostaty je považován za marker jak nenádorových, tak nádorových kmenových buněk
- CD133 (Prominin-1)
 - 5x transmembránový glykoprotein
 - původně marker primitivních hematopietických kmenových a progenitorových buněk
 - bylo prokázáno, že CD133 je také markerem kmenových buněk v jiných tkáních, a také nádorových kmenových buněk

Použité protilátky

- primární protilátky - anti-mouse CD133 (Prominin-1) PE - BioLegend 141204
 - rat IgG2a kappa
 - anti-mouse CD44 APC-Cy7 - BioLegend 103028
 - rat IgG2b kappa
- izotypové kontroly - PE Rat IgG2a kappa isotype control – BioLegend 400508
 - APC/Cy7 rat IgG2b kappa isotype control – BioLegend 400624
- značení viability - LIVE/DEAD Blue fixable cell stain kit
- informační materiály k použitým protilátkám a kitu pro detekci viability – viz studijní materiály

Další materiál

- nesterilní PBS
- **nesterilní roztok 1% BSA – před začátkem odběru připravit 10 ml 1% BSA ředěného v PBS připraveného zředěním 20% zásobního roztoku BSA**

Dopočítejte:

pro získání 10 ml 1% BSA přidat ml 20 % BSA do ml PBS

- nesterilní FACS zkumavky, špičky, pipety

Vzorky:

- pracujeme se 2 buněčnými liniemi – E2 a cE2
- pro každou linii budou připraveny 2 vzorky - specifické značení (CD)
 - isotypová kontrola (ISO)
- vzorky: 1 – E2 ISO – IgG2a PE / IgG2b APC-Cy7 / blue viability
- 2 – E2 CD – CD133 PE / CD44 APC-Cy7 / blue red viability
- 3 – cE2 ISO – IgG2a PE / IgG2b APC-Cy7 / blue red viability
- 4 – cE2 CD – CD133 PE / CD44 APC-Cy7 / blue red viability

Práce probíhá nesterilně, každý student připraví celkem 4 vzorky.

Postup:

1. příprava vzorků

- 1x 60 mm miska E2 buněk
- 1x 60 mm miska cE2 buněk
- zpracovávejte obě misky zároveň
- odsát médium
- oplach 3 ml PBS+EDTA – inkubace 10 minut 37°C linie cE2, 1 min 37°C linie E2 (suchý termostat)
- odsát PBS+EDTA
- přidat 0,5 ml trypsinu – inkubace až 5 minut 37°C (suchý termostat, průběžně pozorovat, zda se již buňky uvolňují od kultivačního povrchu)
- přidat 2,5 ml média se sérem – inaktivace trypsinu
- celou suspenzi přenést do připravených nesterilních zkumavek
 - E2 buňky – zkumavka A
 - cE2 buňky – zkumavka B
- misky opláchnout 1 ml PBS – přenést do příslušné zkumavky
- zkumavky s buněčnou suspenzí stočit 200g 5 minut
- odsát supernatant
- pelet rozsuspendovat v 1 ml PBS s 1% BSA
- každou ze zkumavek A a B rozdělit na poloviny do dvou zkumavek určených pro měření na cytometru - zkumavka A (E2) – vzorky č. 1 a 2
 - zkumavka B (cE2) – vzorky č. 3 a 4
- do každé zkumavky přidat 1 ml 1% BSA
- stočit 200g 5 minut
- odsát supernatant a přidat příslušné protilátky ředěné v 1% BSA

2. Značení protilátkami CD133 a CD44

- do každého vzorku se přidá 100 µl 1% BSA s příslušnými protilátkami nebo isotypovými kontrolami
- celkem máme 4 vzorky, 2 pro specifické značení a 2 pro isotypovou kontrolu, nachystáme si tedy 200 µl od každého ředění
- ředění protilátek –

CD133 PE	1:100
CD44 APC/Cy7	1:50
IgG2a PE	1:100
IgG2b APC/Cy7	1:50

Dopočítejte:

- **1. mikrozkušavka ISO – do 210 µl 1% BSA přidáme**

..... µl IgG2a PE

..... µl IgG2b APC/Cy7

- **2. mikrozkušavka specifické značení – do 210 ul 1% BSA přidáme**

..... µl CD133 PE

..... µl CD44 APC/Cy7

- do zkumavky 1 a 3 přidáme 100 μ l z mikrozukavky 1 (izotypová kontrola, ISO)
- do zkumavky 2 a 4 přidáme 100 μ l z mikrozukavky 2 (specifické značení, CD)
- všechny vzorky důkladně propipetovat
- inkubace 30 min v lednici
- po 30 min přidat ke všem vzorkům 1 ml čistého PBS
- stočit 200g 5 minut
- odsát supernatant
- pelet ve všech mikrozukavkách rozsuspendovat ve 100 μ l PBS s naředěnou značkou pro viabilitu

3. značení viability

- ředění značky pro viabilitu – LIVE/DEAD blue cell stain kit – ředění 1:1000
- do každého vzorku se přidá 100 μ l naředěné značky, celkem máme 4 vzorky
- **vypočítat ředění značky pro viabilitu při ředění 1:1000**

do 450 μ l PBS přidat μ l značky na viabilitu

- vzorky dobře rozsuspendovat v 100 μ l naředěné značky
- inkubovat 20 min v lednici
- po 20 min přidat ke všem vzorkům 1 ml čistého PBS
- stočit 200g 5 min
- odsát supernatant
- vzorky rozsuspendovat v 300 μ l PBS a měřit/sortovat
- pokud vzorky nebudou hned měřeny, tak uložit na led nebo do lednice

Protokol 4B. Imunofenotypová analýza linie E2 a cE2, sorting, vyhodnocení výsledků

Popište způsob analýzy a sortingu, přiložte výsledky měření získané vyhodnocením v programu FlowJo, výsledky interpretujte.