

**Cvičení z AC 2011**

12. – 14. 12. 2011, BFÚ

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

Č.	Učo	Student
<b>Skupina A)</b>		
1.	151062	Nešporová, Kristina
2.	324025	Bezděková, Renata
3.	356432	Bogorová, Jana
4.	184431	Bujoková, Barbora
5.	270568	Machát, Radek
<b>Skupina B)</b>		
6.	386873	Menšíková, Markéta
7.	356874	Potočková, Hana
8.	269877	Pyszková, Michaela
9.	381745	Toporcerová, Veronika
10.	323468	Vrbiniaková, Jana

Den 1 – středa 12.12.2012

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

Den 2 – čtvrtek 13.12.2012

hod	A)	B)
9-11	Sběr buněk a značení povrchových antigenů	
11-13	Detekce, analýza a separace na základě exprese povrchových znaků	Sběr a fixace buněk pro analýzu buněčného cyklu
13-14	Demonstrace přístroje MUSE od firmy Merc/Millipore – obě skupiny dohromady – detekce buněčné viability	
14-16		Značení buněk, měření a analýza buněčného cyklu

Den 3 – pátek 14.12.2012

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

#### Protokol 1

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

#### Protokol 2

Ovlivnění buněk LAPC-4 pro analýzu buněčného cyklu

- každý sám zpracuje dva vzorky – 1) kontrola (vehicle) a 2) cdk2 inhibitor III CVT-313

#### Protokol 3

LAPC-4 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**

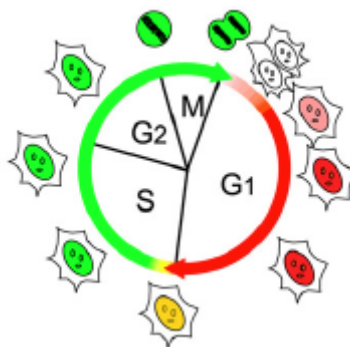
### **Cíl**

- 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 vychytává  $Ca^{2+}$  ionty, čímž rozrušuje mezibuněčné spoje
- trypsin - pankreatický enzym (serinová proteáza), štěpí amidové a esterové vazby argininu a lysinu
  - působení trypsinu uvolňuje adherentní buňky od kultivačního 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 LAPC-4 inhibítorem cdk2 CVT-313

### Cíl

- cílem experimentu je ovlivnit buněčnou linii LAPC-4 inhibítorem cyklin dependentní kinázy II (cdk2) CVT-313
- působení inhibítora 24-48 hodin vede k deregulaci buněčného cyklu (změna distribuce buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu)
- ovlivněné buňky budou následně zafixovány a nabarveny pro analýzu buněčného cyklu

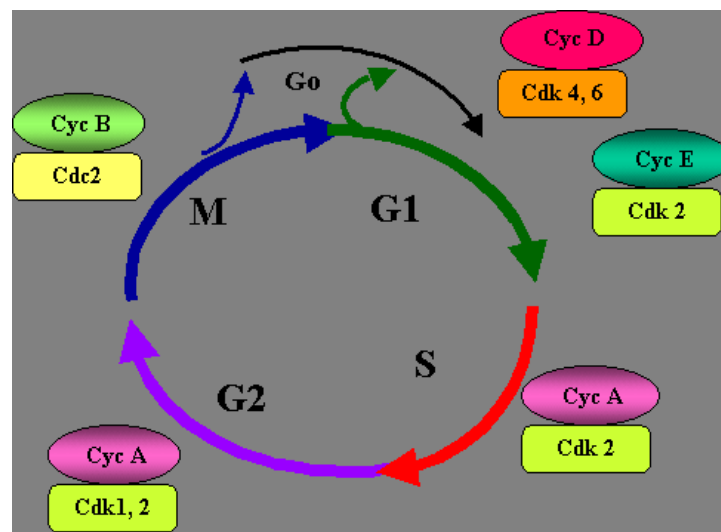
### Teorie

**Buněčná linie LAPC-4** - lidská permanentní buněčná linie ustanovená z myšičího xenograftu

- buňky izolované metastáz v lymfatických uzlinách pacienta s karcinomem prostaty
- přímá subkutánní injekce nádorových buněk získaných z pacienta s pokročilým stádiem karcinomu prostaty do myši (Drs. Robert Reiter and Charles Sawyers)
- produkují PSA, mají wt androgenní receptor
- růst nádorů a metastázování závislé na hormonech

### Cdk2 a její inhibice

- **cdk2 – cyklin-dependentní kináza 2**
  - regulace buněčného cyklu se účastní komplexy cyklinů a cyklin-dependentních kináz
  - serin/threoninová protein kináza
  - aktivita cdk2 je nejvyšší během S fáze a G2 fáze buněčného cyklu
  - cdk2 je aktivována interakcí s cyklinem E během rané fáze syntézy DNA (buňka může projít z G1 fáze do fáze S)
  - následně je aktivována cyklinem A během pozdní fáze replikace DNA – řídí přechod z S fáze do G2 fáze (mitózy)
  - inhibovaná inhibítorem cyklin-dependentních kináz p21<sup>Cip1/Waf</sup>



- **CVT-313, cdk2 inhibitor III** (238803, Merck) – analog purinu
  - silný, selektivní, reversibilní, ATP-dependentní inhibitor Cdk2 (inhibuje její aktivitu)
  - *in vitro* indukuje zástavu buněčného růstu
  - primární cíl – komplexy Cdk2/cyklin A, Cdk2/cyklin E
  - rozpustný v DMSO

### **Materiál**

- zásobní roztok inhibitoru o koncentraci 10mM rozpuštěný v DMSO
- sterilní DMSO
- sterilní špičky, pipety pro práci v laminárním boxu
- připravené 2 misky 60 mm s buněčnou linií LAPC-4 (CO<sub>2</sub> inkubátor)
- miska 1 – kontrola – ovlivněná pouze rozpouštědem (DMSO, vehicle) – přidá se stejný objem, jako objem přidávaného curcuminu
- miska 2 – ovlivnění curcuminem – výsledná koncentrace 2.5 μM / 10 μM

### **Výpočet**

- zásobní koncentrace inhibitoru CVT-313 = 10 mM
- výsledná koncentrace na buňkách:
  - **skupina A** – 48 hodin treatment – koncentrace inhibitoru **2.5 μM**
  - **skupina B** – 24 hodin treatment – koncentrace inhibitoru **10 μM**
- objem média v miskách = 4 ml
- **Dopočítejte, jaký objem zásobního roztoku inhibitoru CVT-313 a DMSO budete přidávat:**

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

### **Postup**

- v laminárním boxu připravit sterilní špičky a pipety
- přeneste buňky z CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> inkubátoru

- inkubace s inhibitorem 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 inhibitoru na morfologii a viabilitu buněčné linie PLAPC-4 v době odběru pro analýzu buněčného cyklu (mikroskopické pozorování).**

## **Protokol 3**

### **3.A Sběr, fixace a značení buněk LAPC-4 po ovlivnění inhibitorem cdk2 pro analýzu buněčného cyklu**

#### **Cíl:**

- cílem je připravit buňky LAPC-4 ovlivněné inhibitorem cdk2 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:**

- LAPC-4 buňky - 1x 60 mm miska - kontrola  
- 1x 60 mm miska – cdk2 inhibitor 2.5  $\mu$ M / 10  $\mu$ M, ovlivnění 24/48 h
- 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 inhibitorem)**

#### **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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\mu$ 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

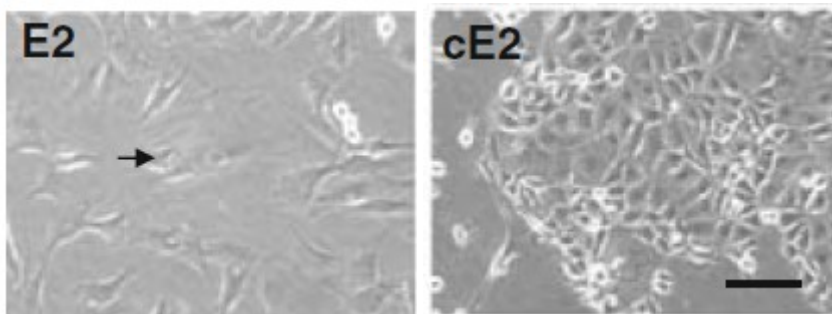
### Cíl

- 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 detekovaná 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 nádorových, 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 Yellow 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 / yellow viability
- 2 – E2 CD – CD133 PE / CD44 APC-Cy7 / yellow viability
- 3 – cE2 ISO – IgG2a PE / IgG2b APC-Cy7 / yellow viability
- 4 – cE2 CD – CD133 PE / CD44 APC-Cy7 / yellow 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 (inkubátor)
- 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 1% BSA přidáme**

.....  $\mu$ l IgG2a PE

.....  $\mu$ l IgG2b APC/Cy7

- **2. mikrozkušavka specifické značení – do 210  $\mu$ l 1% BSA přidáme**

.....  $\mu$ l CD133 PE

.....  $\mu$ l CD44 APC/Cy7

- do zkumavky 1 a 3 přidáme 100  $\mu$ l z mikrozkušavky 1 (izotypová kontrola, ISO)
- do zkumavky 2 a 4 přidáme 100  $\mu$ l z mikrozkušavky 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 mikrozukmavkách rozsuspendovat ve 100  $\mu$ l PBS s naředěnou značkou pro viabilitu

### 3. značení viability

- ředění značky pro viabilitu – LIVE/DEAD yellow cell stain kit – ředění 1:500
- do každého vzorku se přidá 100  $\mu$ l naředěné značky, celkem máme 4 vzorky
- **vypočítat ředění značky pro viabilitu při ředění 1:1000**

**do 450  $\mu$ l PBS přidat .....  $\mu$ l značky na viabilitu**

- vzorky dobře rozsuspendovat v 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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.**