

CVIČENÍ Z ANALYTICKÉ CYTOMETRIE 2015/2016

6. – 8. 1. 2016, BFÚ

Vyučující: Mgr. Karel Souček, Ph.D.; Mgr. Šárka Šimečková; PhDr. Ján Remšík

Skupina A

1. Deván, Ján (učo 423129); PŘF B-EXB BIMG [sem 5, roč 3]
2. Fedorová, Veronika (učo 436702); PŘF B-EXB BIMG [sem 3, roč 2]
3. Chochola, Václav (učo 423006); PŘF B-EXB BIMG [sem 5, roč 3]
4. Lešundák, Pavol (učo 393768); PŘF N-EXB SPBI (EBZI) [sem 3, roč 2]
5. Moudrá, Jana (učo 399998); PŘF N-EXB SPBI (EBZI) [sem 1, roč 1]

Skupina B

6. Řičánková, Nikola (učo 409172); PŘF N-EXB SPBI (EBZI) [sem 1, roč 1]
7. Skříčková, Lucie (učo 408495); PŘF N-EXB SPBI (EBZI) [sem 1, roč 1]
8. Švejdová, Barbora (učo 408224); PŘF N-EXB SPBI (EBZI) [sem 1, roč 1]
9. Vilášková, Kateřina (učo 408700); PŘF N-EXB SPBI (EBZI) [sem 1, roč 1]
10. Zvalo, Marek (učo 375608); PŘF D-BI4 FYZZ [sem 1, roč 1]

Den 1	A)	B)
9 - 14 hod	Úvod Hela 8 Fucci cells - analýza na průtokovém cytometru a CM MLN-4924 treatment	
14- 18 hod		Úvod Hela 8 Fucci cells - analýza na průtokovém cytometru MLN-4924 treatment

Den 2	A)	B)
9 - 12	Sběr a fixace buněk pro analýzu BC a ROS	
12-15	Analýza na průtokovém cytometru	Hela 8 Fucci cells - analýza na CM
14-18		Sběr a fixace buněk pro analýzu BC a ROS Analýza na průtokovém cytometru

Den 3	A)	B)
9 - 13.30	Sběr buněk, Imunofenotypizace, analýza na průtokovém cytometru	
13. 30 - 18		Sběr buněk, Imunofenotypizace, analýza na průtokovém cytometru

Protokol 1

Fucci 8 buňky - sběr, měření a analýza buněčného cyklu pomocí fluorescenčních proteinů, analýza na CM

Protokol 2

Detekce ROS, buněčného cyklu a buněčné životnosti po ovlivnění buněk HCT-116 inhibátorem neddylace a menadionem

Protokol 3

Značení povrchových molekul EpCAM/CD44, viability u buněk

Protokol 1

Model HeLa 8 Fucci cells – měření a analýza buněčného cyklu pomocí fluorescenčních proteinů

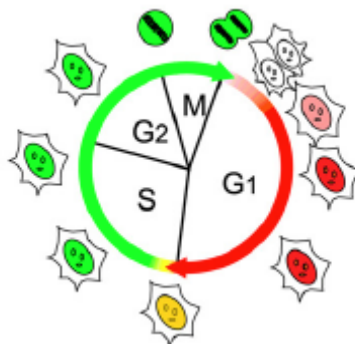
Cíl

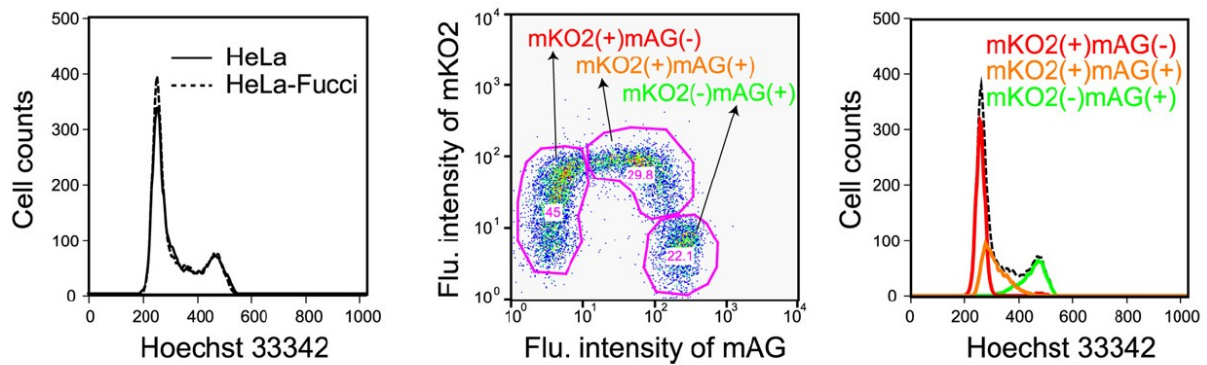
- cílem experimentu je seznámit se s modelovou buněčnou linií HeLa 8 Fucci, která umožňuje analýzu buněčného cyklu na živých buňkách bez potřeby fixace a značení
- tento experiment bude demonstrační – bude Vám názorně předvedeno, jak se zpracovávají buňky pro tento typ analýzy, což využijete při přípravě dalších experimentů během tohoto cvičení
- demonstrace měření proběhne na přístroji Attune® Flow Cytometer
- ukázka vyhodnocení dat bude provedena pomocí programu FlowJo
- analýza buněk na konfokálním mikroskopu po ovlivnění různými látkami

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





(Sakaue-Sawano et al., 2008; viz studijní materiály)

1) ANALÝZA NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU

Materiál

- připravená buněčná line **HeLa 8 Fucci**
- **roztok PBS+EDTA** (kyselina ethylendiamintetraoctová). EDTA 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

2) ANALÝZA NA KONFOKÁLNÍM MIKROSKOPU

Postup:

den 1: Výsev buněk HeLa 8 Fucci na mikroskopickou analýzu

den 2: Ovlivnění látkami

MLN-4924 (zásobní koncentrace 10 mM, výsledná koncentrace 1 μ M)

TRAIL (100 ug/ml zásobní koncentrace, 50 ng/ml výsledná koncentrace)

Mitomycin (zásobní koncentrace 1 mg/ml, výsledná koncentrace 1 μ g/ml)

Doplňte poznámky k látkám TRAIL a Mitomycin (co to je za látky, co způsobují a k čemu se používají), viz poznámky u MLN-4924 v protokolu č. 2

Dopočtěte množství látek, které se bude k buňkám přidávat

den 2-3: Analýza buněk na mikroskopu

Popište postup analýzy na mikroskopu a změny, které jste pozorovali u buněk ovlivněných látkami.

Protokol 2

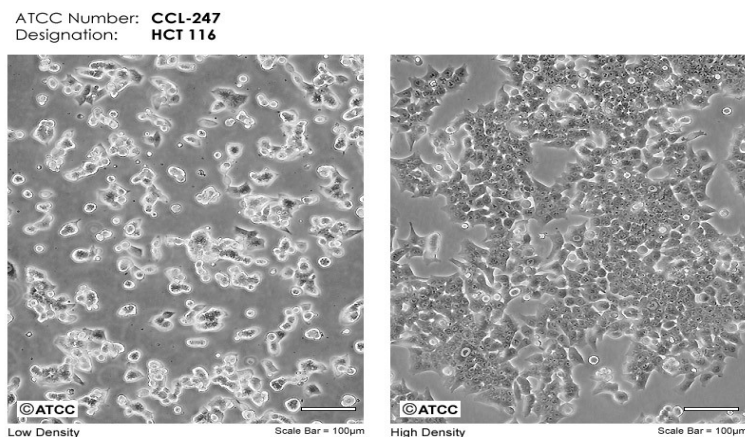
Detekce ROS, buněčného cyklu a buněčné životnosti po ovlivnění buněk HCT-116 inhibítozem neddylace

Cíle

- cílem experimentu 1 je ovlivnit buněčnou linii HCT-116 inhibítozem neddylace (MLN-4924) a vyšetřit účinky jeho působení
- působení MLN-4924 po dobu 24 hodin vede k deregulaci buněčného cyklu
- cílem experimentu 2 je indukovat produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) menadionem
- měření proběhne na přístroji Attune® Flow Cytometer

Teorie

Buněčná linie HCT-116 - buněčná linie odvozená z karcinomu tlustého střeva

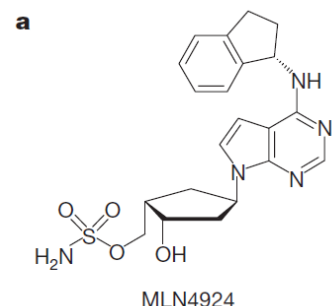


<http://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/6/C/D/4/1762.ashx>

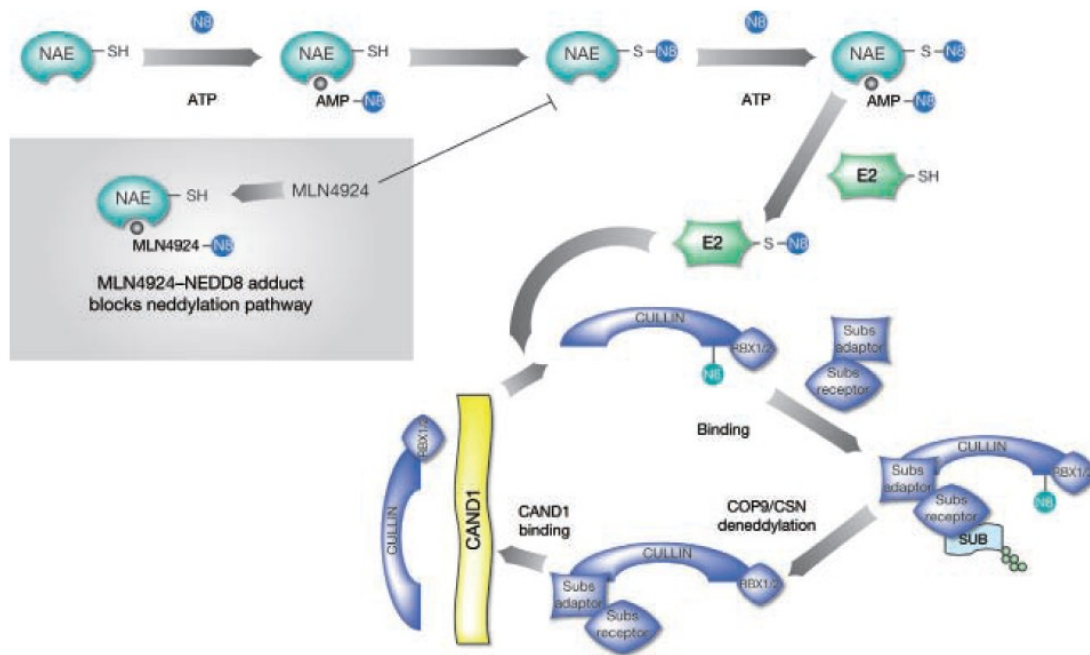
MLN-4924

- ATP kompetitivní inhibitor
- I. fáze klinického testování pro lymfom, mnohočetný myelom, AML, ALL, melanom a další nehematologické nádory
- Tvoří velmi stabilní adukt mezi NEDD8 a MLN-4924 vede k zastavení dráhy neddylace (viz obrázek). Dráha neddylace je nezbytná pro aktivitu ubikvitin ligázy Skp2^{SCF}, která se účastní regulace různých buněčných pochodů. Mezi její významné substráty patří proteiny řídící procesy, jako jsou buněčný cyklus (p27^{Kip1}, p21^{cip1}), buněčné replikace (Cdt1) a další.

Struktura inhibitoru MLN-4924 (Soucy et al., 2009)

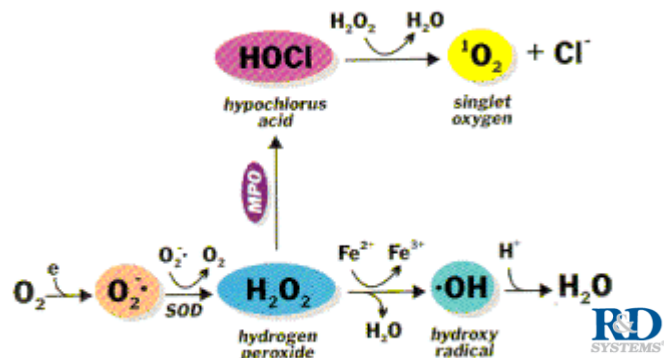


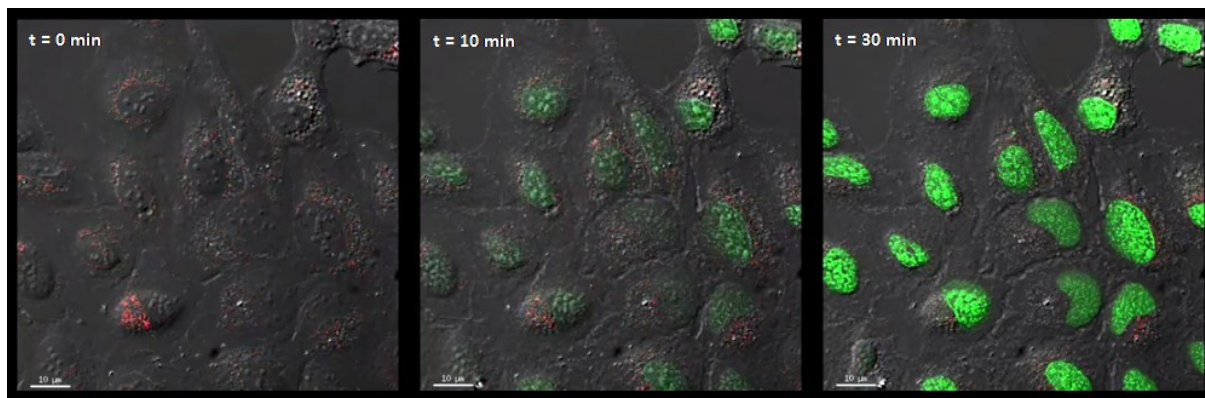
Působení inhibitoru MLN-4924 na zastavení dráhy neddylace (Soucy et al., 2010)



Reaktivní formy kyslíku (ROS)

- buňka generuje ROS v mitochondriích jako vedlejší produkt metabolismu kyslíku během oxidativní fosforylace. Takto produkované radikály hrají důležité úlohy v buněčné signalizaci a udržování homeostázy (indukce exprese proapoptotických proteinů příp. indukce ochranných mechanismů, aktivace transportních systémů pro ionty,...)
- v případě nerovnováhy mezi tvorbou a vylučováním ROS antioxidanty dochází k indukci oxidativního stresu, což vede k poškození DNA, peroxidaci lipidů a inaktivaci kofaktorů některých enzymů; oxidativní stres je možné indukovat UV zářením, ionizujícím zářením, tepelným šokem, inhibicí buněčného cyklu, hypoxií, nedostatkem séra v kulturačním médiu, syntetickými sloučeninami, např. menadionem
- CellROX Green (Invitrogen) je fluorogenní sonda v redukováném stavu, určená na detekci produkce ROS v živých buňkách; působením ROS se kvantitativně oxiduje na fluorochrom emitující zelené světlo a váže se na DNA, v tomto případě tedy detekujeme tvorbu ROS v mitochondriích a v jádře.



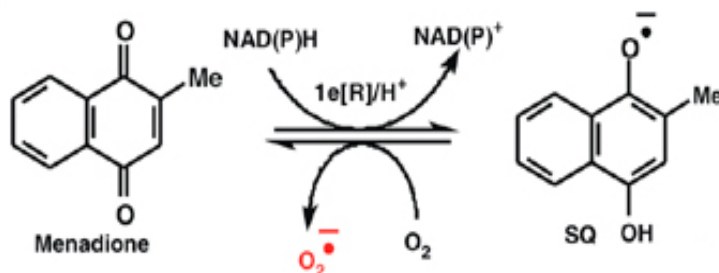


Detekce produkce ROS kitem CellROX Green pod fluorescenčním mikroskopem po vyvolání oxidativního stresu přidáním 100 uM menadiónu (buněčná linie U2-OS, Invitrogen).

Menadion

Menadion je syntetický analog vitamínu K (vitamín K₃), chinonové struktury. Chinony jsou v buňce metabolizované mikrozomální NADPH-cytochrom P450 reduktázou a mitochondriální NADH-ubichinon oxidoreduktázou

jednoelektronovými redukcemi na nestabilní semichinony, které v přítomnosti molekulárního kyslíku vstupují do redoxního cyklu a zpětně se oxidují na stabilní chinon za tvorby ROS.



1) OVLIVNĚNÍ BUNĚK INHIBITOREM MLN-4924

Materiál

- zásobní roztok MLN-4924 o koncentraci 1 mM rozpuštěný v DMSO
- sterilní DMSO
- sterilní špičky, pipety pro práci v laminárním boxu
- připravené 2 misky 60 mm s buněčnou linií HCT-116, (objem média 5 ml - důležité pro výpočet)
- miska 1 – kontrola – ovlivněná pouze rozpouštědlem (DMSO) – přidá se ve stejném poměru jako MLN-4924
- miska 2 – ovlivnění MLN-4924 – výsledná koncentrace 0,04 µM

Výpočet

- Nejprve se připraví 100 μM zásobní roztok inhibitoru MLN-4924, který se použije na ovlivnění buněk (ředění 100x v kultivačním médiu)
- výsledná koncentrace inhibitoru na misce: 0,04 μM , objem média na misce: 5 ml
- **Dopočítejte, jaký objem zásobního roztoku MLN-4924 a DMSO budete přidávat:**

Práce probíhá sterilně v laminárním boxu, každý student pracuje se dvěma vzorky (kontrola, ovlivnění MLN-4924)

Postup

- v laminárním boxu připravit sterilní špičky, pipety a zásobní roztoky DMSO a MLN-4924
- přeneste buňky z CO_2 inkubátoru do laminárního boxu
- do misky 1 přidat vypočítaný objem sterilního DMSO
- do misky 2 přidat vypočítaný objem zásobního roztoku MLN-4924
- médium v miskách opatrně a jemně promíchat
- misky s buňkami po ovlivnění uložit zpět do CO_2 inkubátoru
- inkubace 24 hodin

Po příslušné době inkubace bude následovat nesterilní odběr vzorků, značení buněk na buněčného cyklu a životnosti buněk

2) MĚŘENÍ PRODUKCE ROS A BUNĚČNÉHO CYKLU

Materiál

- buněčná linie HCT-116 (kontrola a ovlivněné buňky)
- roztok PBS+EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová).
- trypsin
- nesterilní médium se sérem – inaktivace trypsinu
- PBS – oplach buněčné suspenze
- CellROX Green kit
- FxCycle Violet
- Live Dead Yellow kit
- nesterilní FACS zkumavky, špičky, pipety
- nesterilní roztok 1% BSA – před začátkem odběru připravit 10 ml 1% BSA ředěného v PBS připraveného zředěním 20% zásobního roztoku BSA

Postup

1.1. 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

1.2. Detekce ROS a značení viability

- Přichystat barvicí roztok s CellROX Green (výsledná koncentrace **5 μ M**, zásobní koncentrace **2,5 mM**). Životnost buněk určíme pomocí propidium iodidu, který se ředí v PBS v poměru 1:100. Dopočtete, kolik CellROX Green je potřeba přidat do 100 μ l PBS:

je potřeba přidat μ l CellROX

- **pelet rozsuspendovat ve 100 μ l PBS s rozpustným CellROX Green**
- **inkubovat 30 min, 37 °C**
- oplach PBS, stočit 200g 5 minut

1.3. Indukce produkce ROS

- významného nárůstu produkce ROS dosáhneme pomocí působení menadionu (syntetický vitamín K₃)
- připravit naředěný roztok menadionu 1:10 (1 μ l zásobního roztoku menadionu s koncentrací 100 mM a 9 μ l PBS)
- buňky rozsuspendujeme ve 100 μ l PBS a přidáme 1 μ l naředěného roztoku menadionu
- inkubujeme 10 min, RT
- přidat propidium iodid v poměru 1:100

2.1. Sběr a příprava vzorků

- odsát médium z buněk
- přidat 3 ml PBS+EDTA – 1 min 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

2.2. Značení DNA - na měření buněčného cyklu

- fixace vzorku pelet rozsuspendovat ve 100 µl 4% roztoku paraformaldehydu
- inkubovat 15 min RT, oplach PBS, stočit 200g 5 minut
- permeabilizace vzorku: pelet rozsuspendovat ve 100 µl 0,15% Tritonu X-100
- inkubovat 15 min, RT
- oplach PBS, stočit 200g 5 minut
- pelet rozsuspendovat v 300 µl FxCycle Violet v PBS (1:1000)
- inkubace 30 min RT
- měřit na průtokovém cytometru

Výsledky

Popište postup měření a vyhodnocování buněk na průtokovém cytometru + přiložte výsledky měření získané vyhodnocením v programu FlowJo

Protokol 3

Analýza fenotypu u buněčné linie HCT-116

Cíl

- cílem experimentu je na živých buňkách značit povrchové molekuly EpCAM 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

Teorie

Povrchové molekuly EpCAM a CD44

- prokázány jako charakteristické znaky nádorových kmenových buněk (NKB) mimo jiné i u adenokarcinomu tlustého střeva
- 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 prekurzorových 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 nenádorových i nádorových kmenových buněk

EpCAM

- transmembránový glykoprotein
- vysoce exprimován u karcinomů, kmenových a nádorových kmenových buňkách
- EpCAM se podílí na buněčné adhezi, proliferaci, udržování pluripotentního stavu buněk, regulaci diferenciace,..
- popsána zvýšená exprese u některých druhů rakovin - prsu, vaječníků, prostaty....

Materiál

- buněčné linie: HCT-116
- roztok PBS+EDTA
- trypsin
- nesterilní médium se sérem – inaktivace trypsinu
- PBS – oplach buněčné suspenze
- nesterilní FACS zkumavky, špičky, pipety
- nesterilní roztok 1% BSA – před začátkem odběru připravit 10 ml 1% BSA ředěného v PBS připraveného zředěním 20% zásobního roztoku BSA
- protilátky, viz tabulka níže

Dopočítejte:

na přípravu 10 ml 1% BSA přidat ml 20 % BSA do ml PBS

použité protilátky:

protilátka	fluorochrom	výrobce, katalogové číslo	ředění
EpCAM			
CD44			
viabilita			
IgG2b			
IgG2b			

Vzorky:

- budou připraveny 2 vzorky:
 - specifické značení (CD)
 - isotypová kontrola (ISO)

Postup:

1. příprava vzorků

- 1x 60 mm miska HCT-116
- odsát médium
- oplach 3 ml PBS+EDTA
- odsát PBS+EDTA
- přidat 0,5 ml trypsinu – inkubace 2 minuty 37°C (suchý termostat)
- přidat 2,5 ml média se sérem – inaktivace trypsinu
- celou suspenzi přenést do připravených nesterilních zkumavek
- 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 rozdělit na poloviny do dvou zkumavek určených pro měření na cytometru
- 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 EpCAM a CD44

- do každého vzorku se přidá 100 μ l 1% BSA s příslušnými protilátkami nebo isotypovými kontrolami

Dopočítejte:

1. mikrozkušavka ISO – do 50 μ l 1% BSA přidáme

μ l IgG

μ l IgG

2. mikrozkušavka specifické značení – do 50 μ l 1% BSA přidáme

μ l CD44

μ l EpCAM

- do jedné zkumavky přidáme 50 μ l z mikrozkušavky 1 (ISO)
- do druhé zkumavky přidáme 50 μ l z mikrozkušavky 2 (CD)
- všechny vzorky důkladně propipetovat
- inkubace 20 min v lednici
- po 20 min přidat ke všem vzorkům 1 ml čistého PBS
- stočit 200g 5 minut
- odsát supernatant
- pelet ve všech mikrozkušavkách rozsuspendovat ve 100 μ l PBS s naředěnou značkou pro viabilitu

3. značení na rozlišení živých a mrtvých buněk

- k buňkám přidáme propidium iodid (neprojde přes buněčnou membránu živých buněk) a ihned měříme

Výsledky

Popište postup měření a vyhodnocování buněk na průtokovém cytometru + přiložte výsledky měření získané vyhodnocením v programu FlowJo

Imunofenotypová analýza