



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

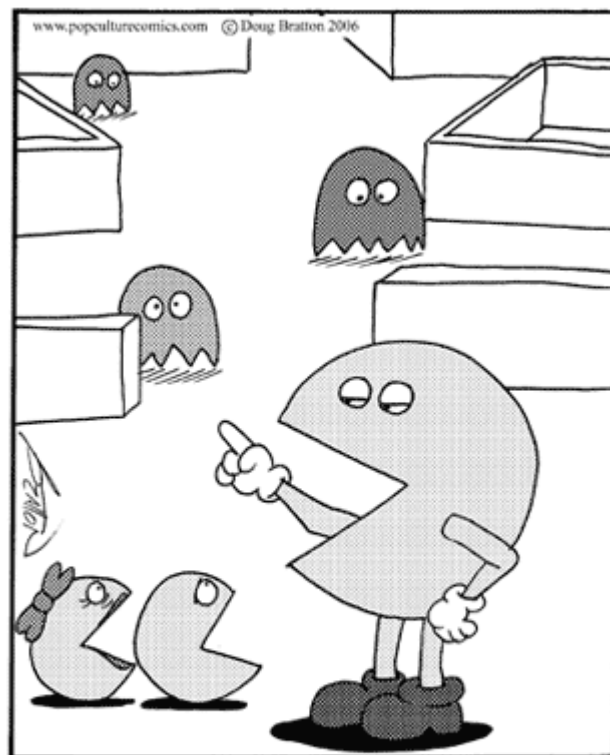
Studium buněk II Metody

Jiří Novák
Podzim 2016



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Cytotoxicita



"Hey, kids, see those ghosts?
They touch you, you die."



Metody stanovení životaschopnosti/cytotoxicity

- stav b. kultury
- hodnocení experimentálního zásahu

Sledované parametry životaschopnosti:

- **Mikroskopické pozorování**

- **Barvení**

- propidium jodid- fluor. barva- detekce mrtvých buněk (flow cytometrie, počítání v Buerkerově komůrce)
- trypanová modř – barví mrtvé buňky

- **Metabolismus** např. aktivita mitochondriálních enzymů

- MTT (XTT) – spektrofotometrické stanovení formazánu vznikajícího ze substrátu, nutnost lyzace buněk
- Alamar-blue – fluorescenční detekce přeměněného substrátu v živých buňkách
- detekce hladiny ATP – např. cytotoxGlo (Promega) - luminiscence

- **Integrita membrány**

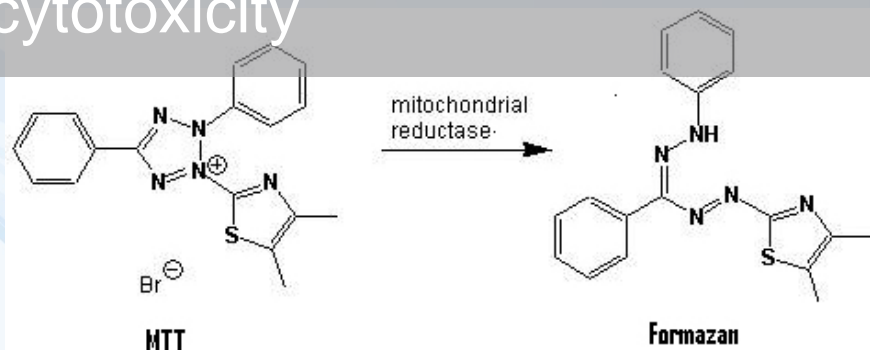
- Laktát dehydrogenáza (LDH) – detekce intracelulární LDH v médiu → marker propustné tj. porušené membrány
- CFDA-AM – substrát projde narušenou membránou → metabolizován na fluorescenční formu

- **Integrita/funkce lysozómů**

- Neutral red uptake (NRU) – neutrální červeň projde membránami → protonizace v lysozomech (kyselé prostředí) → kumulace, spektrofotometrická detekce po lyzaci

- **Sledování růstu b. v reálném čase**

- RTCA real time cell analysis (sledování adheze/růstu buněk)



Apoptóza

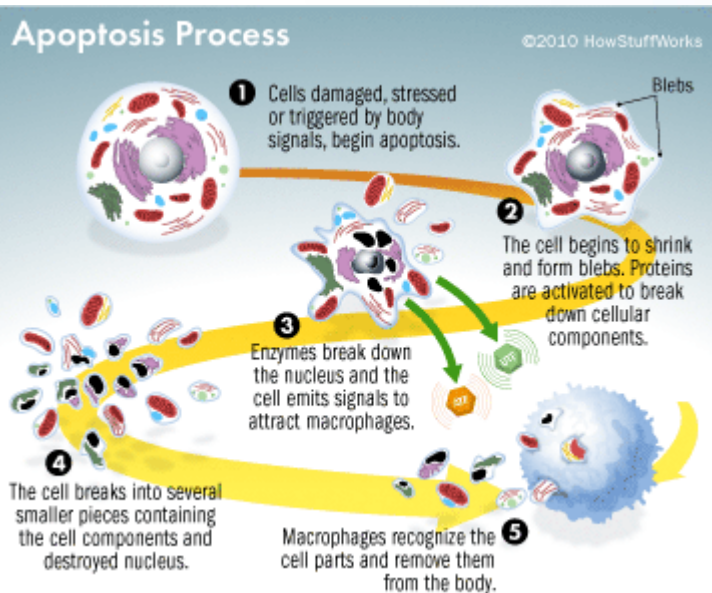
(Řízená buněčná smrt)

- Kondenzace jádra
- Rozrýhování membrány
- Fragmentace DNA (brzká, násobky 180bp)
- Apoptotická tělíska
- Fagocytóza tělísek
- Bez zánětu

Nekróza

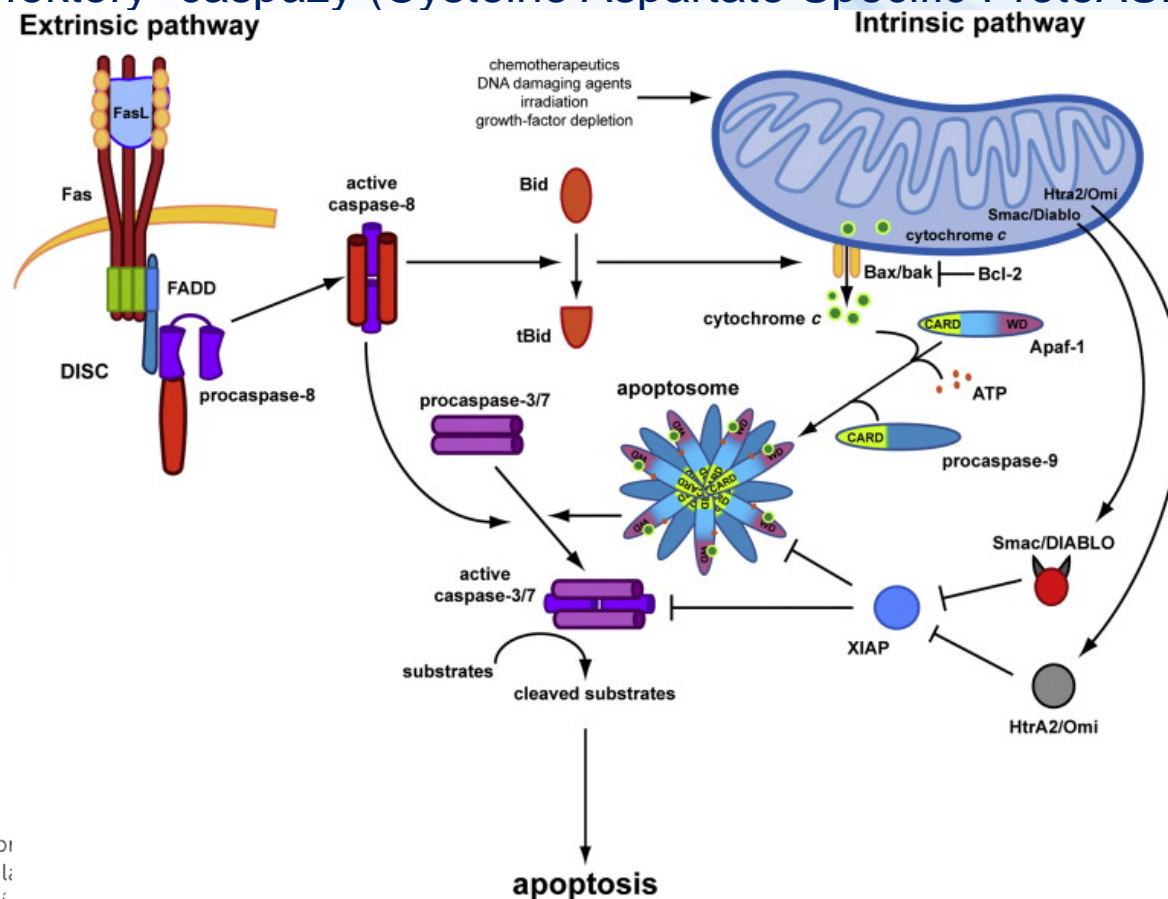
(Pathologická buněčná smrt)

- Buňky se zvětšují a lyzují
- Lyzát poškozuje okolí → zánět
- Nespecifická fragmentace DNA (pozdní, různorodá délka fragmentů)
- Rozšířený zánět



Apoptóza

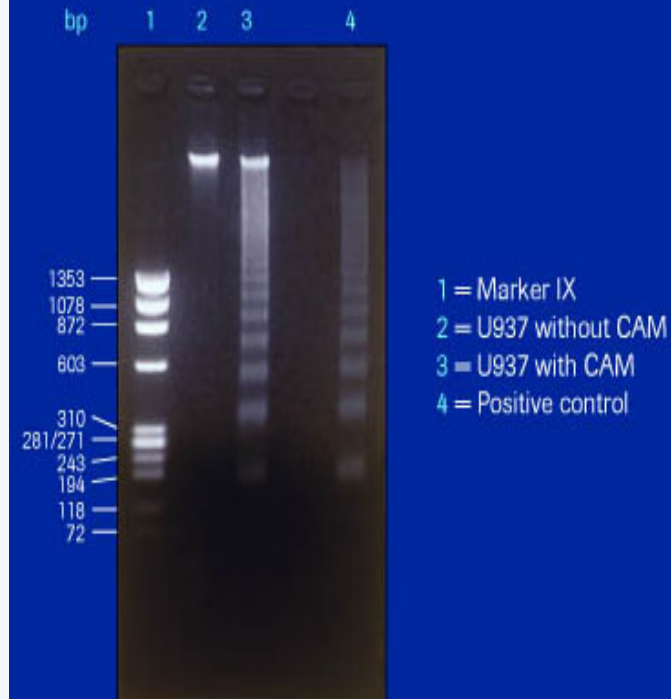
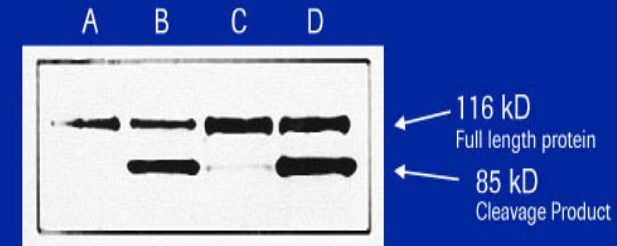
- Vnitřní cesta aktivace (intrinsic)- řízena mitochondriemi (uvolnění cytochromu C)
- Vnější cesta aktivace (extrinsic) – vyvolána extracelulárními faktory např. $\text{TNF}\alpha$, Fas ligandem
- Hlavní efektory- caspázy (Cysteine Aspartate Specific ProteASEs)



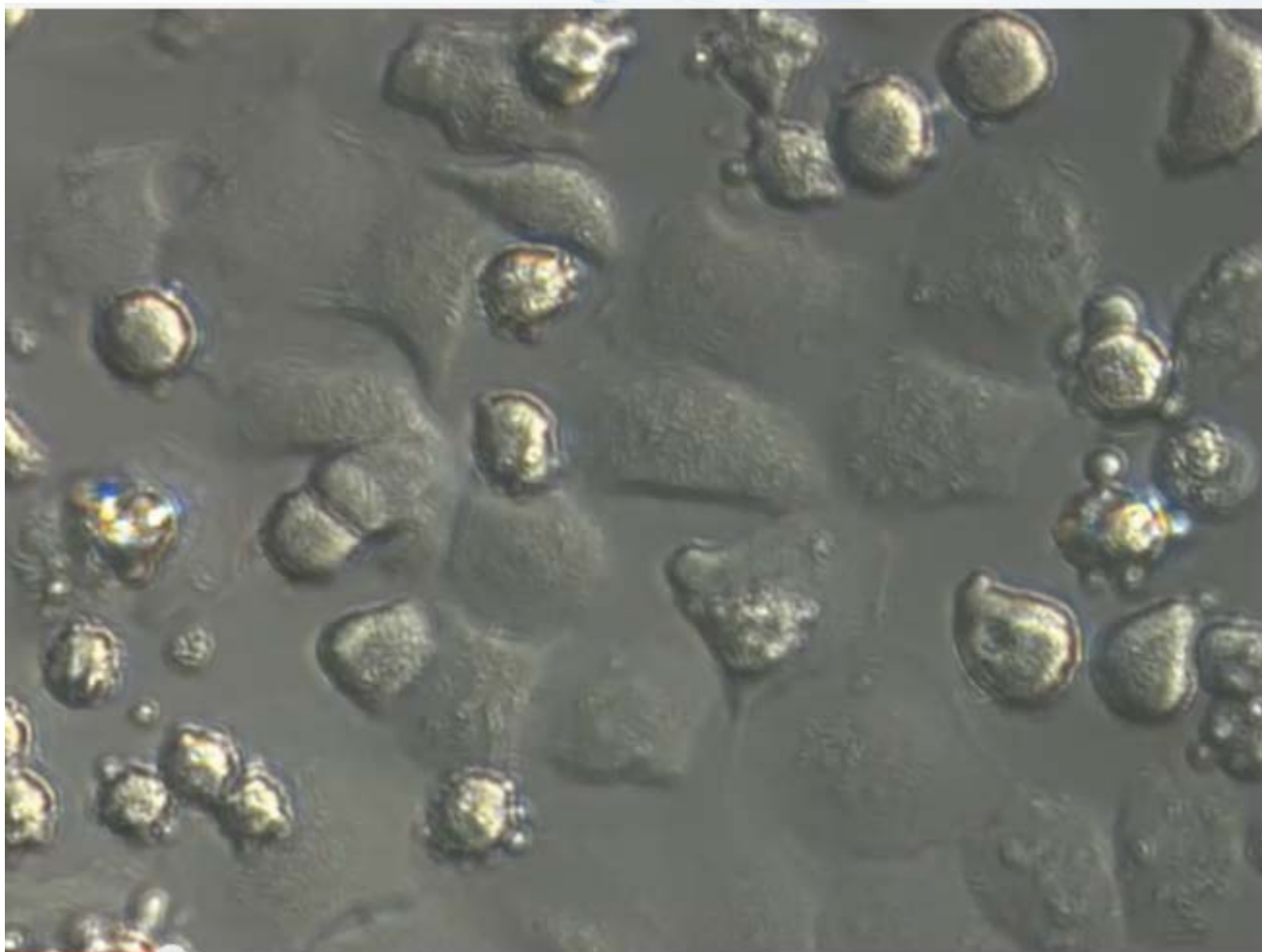
Detekce apoptózy

- Testy viability – nespecifické, zjistí pozdní fázi apoptózy
- caspázy (western blot, biochem. aktivita, immunostaining)
- Detekce změn v membráně (Annexin V – vazba na membránu apopt. b.)
- Detekce uvolnění Cyt C- ELISA, western blot v subcelulární frakci
- Kondenzace/fragmentace chromatinu- fluor. barvy DAPI, Hoechst (postupující apopt. zvyšuje propustnost membrány) mikroskopie, flow cytometrie, elektroforéza
- TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT) mediated dUTP nick end labeling), TDT naváže značený (fluorofor, biotin) dUDP na 3'-konce DNA

Anti-PARP Westernblot - Detection of PARP Cleavage by Caspases



Video apoptóza / nekróza



Buněčná smrt

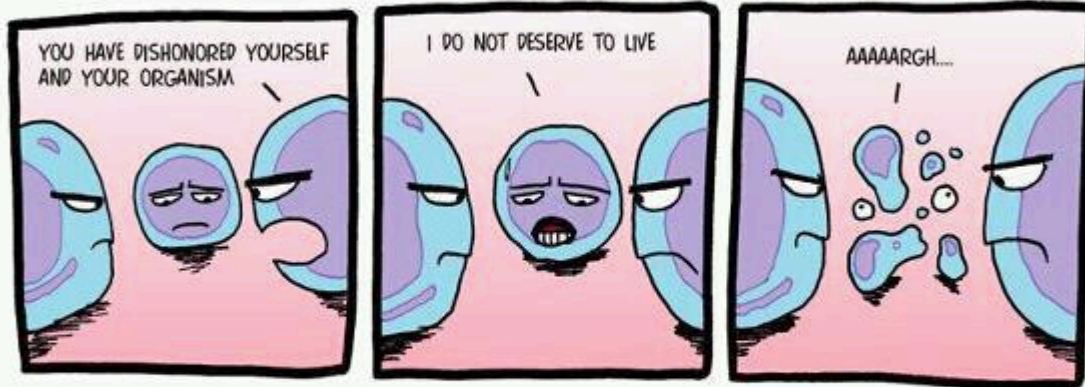
Table 1 | **Characteristics of different types of cell death**

Type of cell death	Morphological changes			Biochemical features	Common detection methods
	Nucleus	Cell membrane	Cytoplasm		
Apoptosis	Chromatin condensation; nuclear fragmentation; DNA laddering	Blebbing	Fragmentation (formation of apoptotic bodies)	Caspase-dependent	Electron microscopy; TUNEL staining; annexin staining; caspase-activity assays; DNA-fragmentation assays; detection of increased number of cells in subG1/G0; detection of changes in mitochondrial membrane potential
Autophagy	Partial chromatin condensation; no DNA laddering	Blebbing	Increased number of autophagic vesicles	Caspase-independent; increased lysosomal activity	Electron microscopy; protein-degradation assays; assays for marker-protein translocation to autophagic membranes; MDC staining
Mitotic catastrophe	Multiple micronuclei; nuclear fragmentation	–	–	Caspase-independent (at early stage) abnormal CDK1/cyclin B activation	Electron microscopy; assays for mitotic markers (MPM2); TUNEL staining
Necrosis	Clumping and random degradation of nuclear DNA	Swelling; rupture	Increased vacuolation; organelle degeneration; mitochondrial swelling	–	Electron microscopy; nuclear staining (usually negative); detection of inflammation and damage in surrounding tissues
Senescence	Distinct heterochromatic structure (senescence-associated heterochromatic foci)	–	Flattening and increased granularity	SA- β -gal activity	Electron microscopy; SA- β -gal staining; growth-arrest assays; assays for increased p53, INK4A and ARF levels (usually increased); assays for RB phosphorylation (usually hypophosphorylated); assays for metalloproteinase activity (usually upregulated)

CDK1, cycline-dependent kinase 1; MDC, monodansylcadaverine; MPM2, mitotic phosphoprotein 2; SA- β -gal, senescence-associated β -galactosidase; RB, retinoblastoma protein.

Okada and Mak, Nat. Rev. Cancer 4:592-603



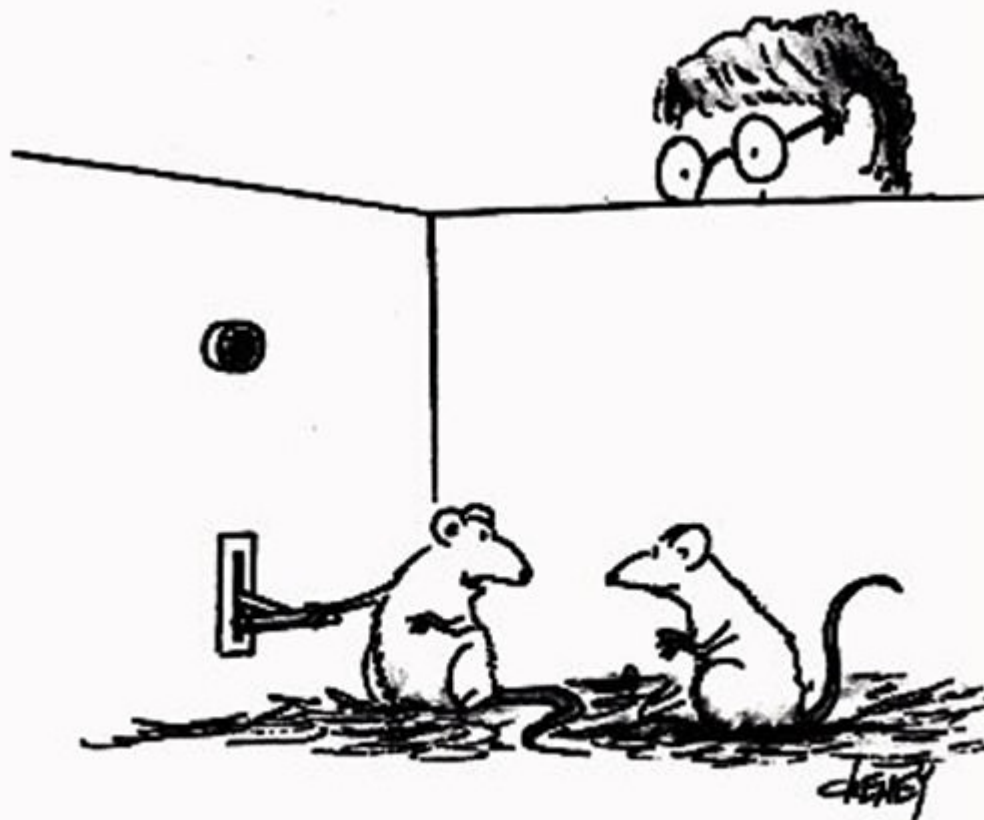


APOPTOSIS
cellular
harakiri

uLol



Metody

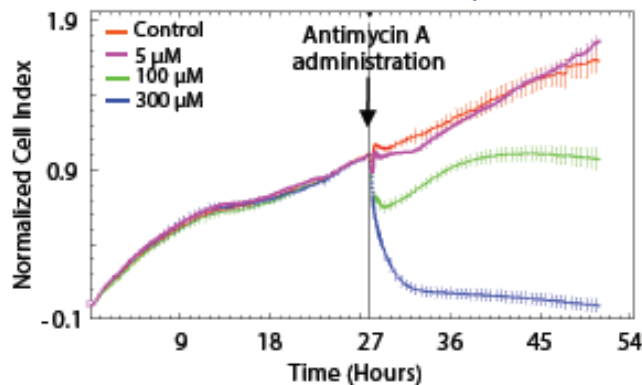


It's a rather interesting phenomenon. Every time I press this lever, that post-graduate student breathes a sigh of relief.



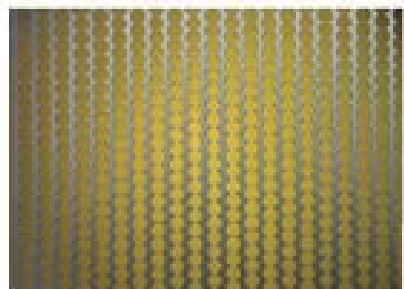
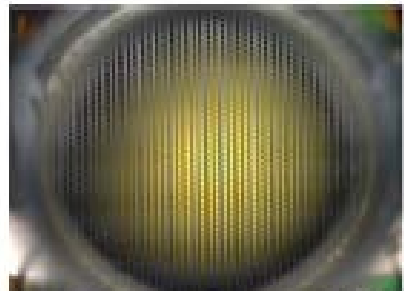
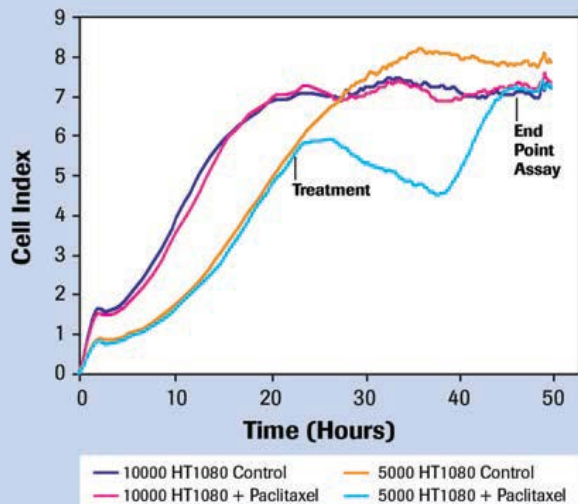
RTCA – real time cell analysis (xCelligence)

- Testy cytotoxicity – ? Stav buněk během experimentu?
- RTCA – informace o stavu buněk po celou dobu experimentu
 - Neinvazivní
 - Sledování impedance na zlatých elektrodách na dně jamky



Stanovení:

Cytotoxicita
Buněčná adheze/proliferace/diferenciace
Aktivace receptoru
Invaze/migrace
Vliv ko-kultivace

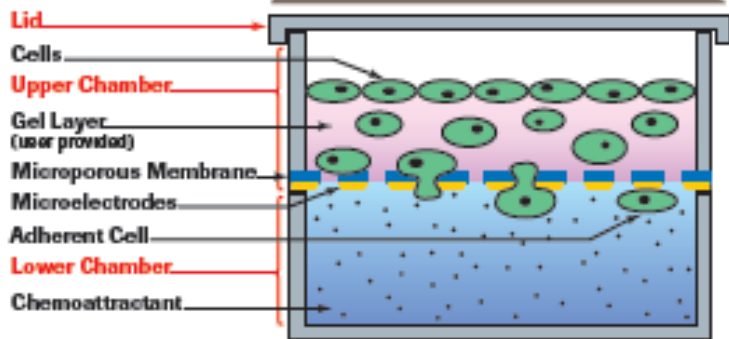
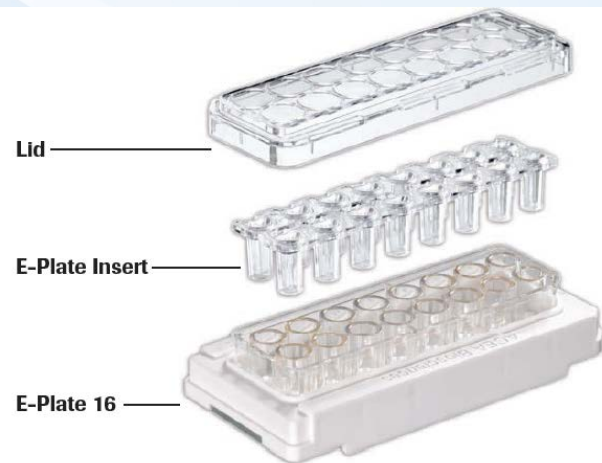


RTCA Control Unit



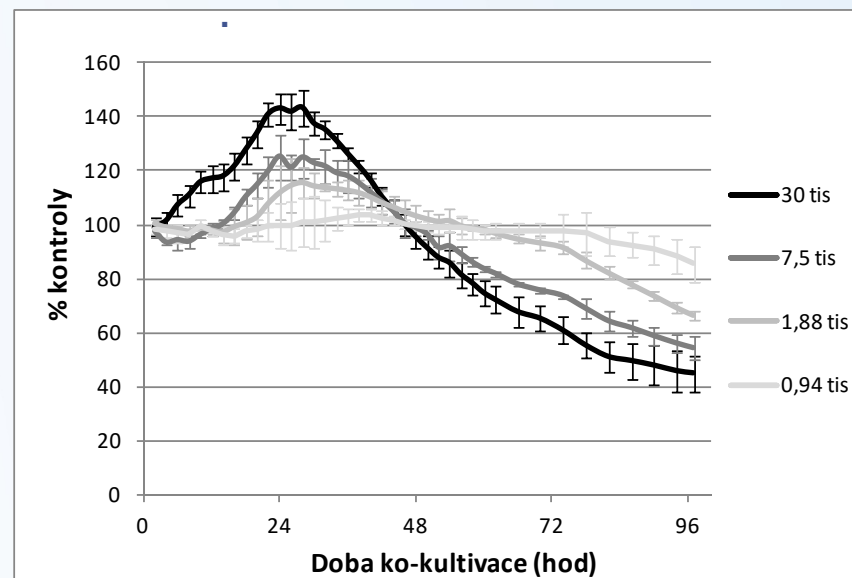
RTCA DP Analyzer

RTCA – real time cell analysis (xCelligence)



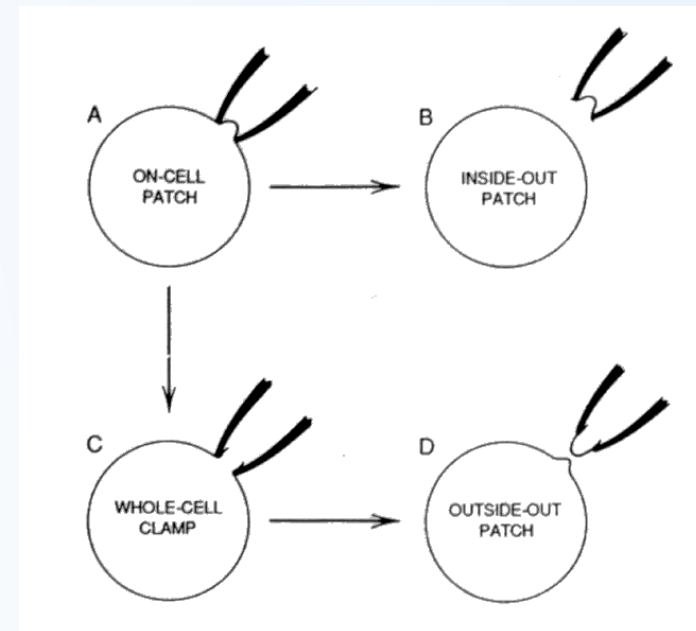
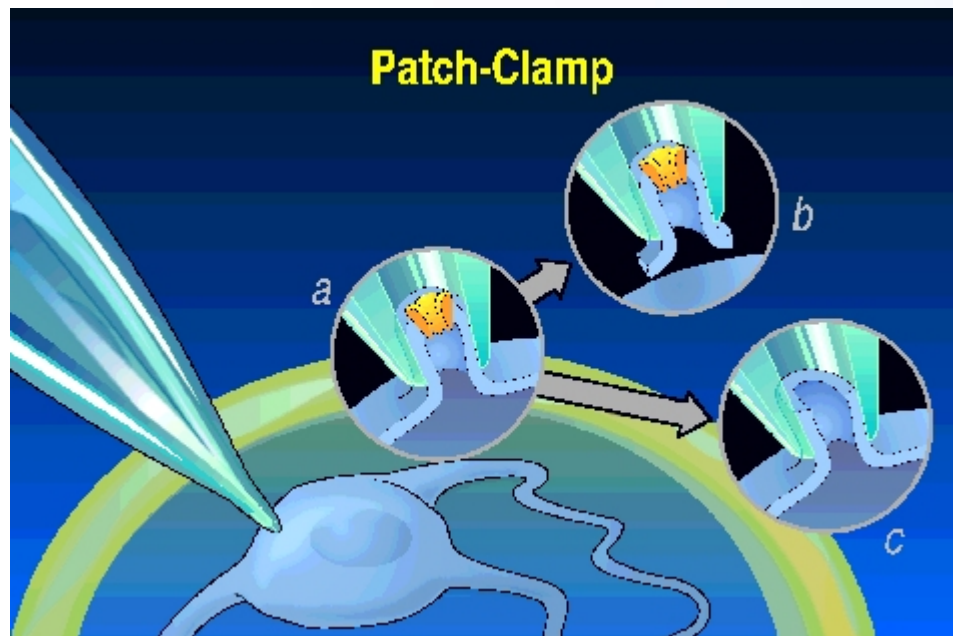
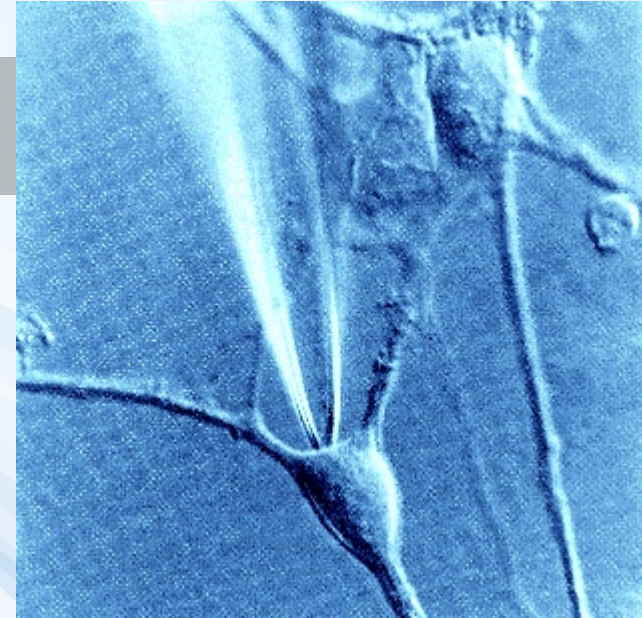
Migrace/invaze buněk

Vliv ko-kultivace na růst buněk



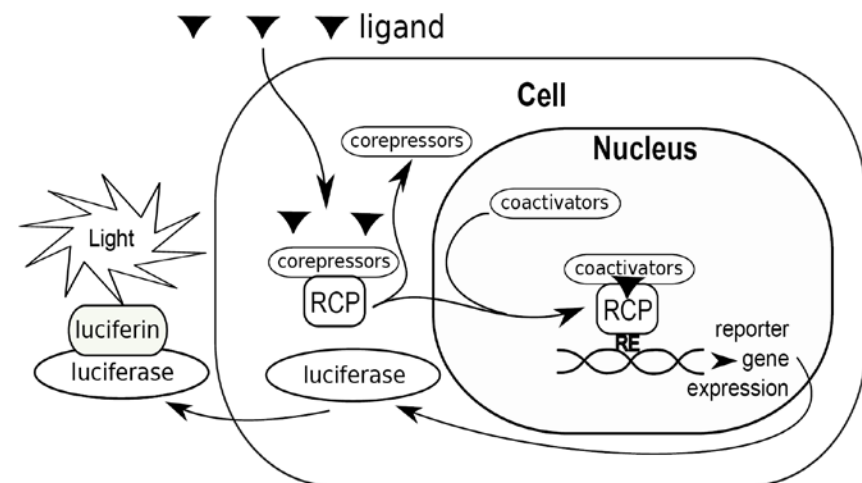
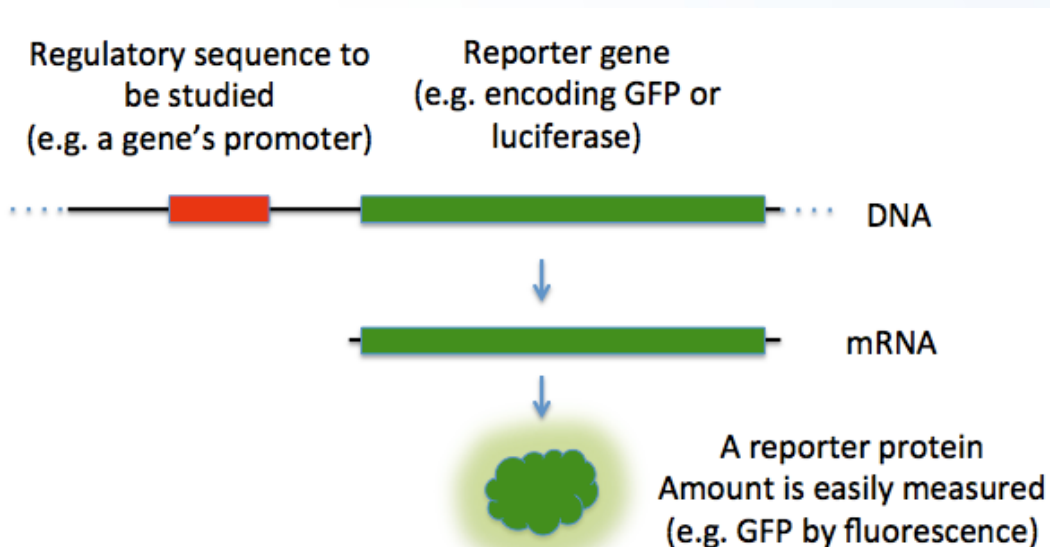
Elektrofyzologie

- Studium funkce iontových kanálů v buňce
- Základní metoda- **Patch clamp**
 - Mikromanipulační metoda separace oblasti plazmalemy a studia její elektroaktivity
 - Umožňuje studovat aktivity celé buňky nebo jediného kanálu v membráně

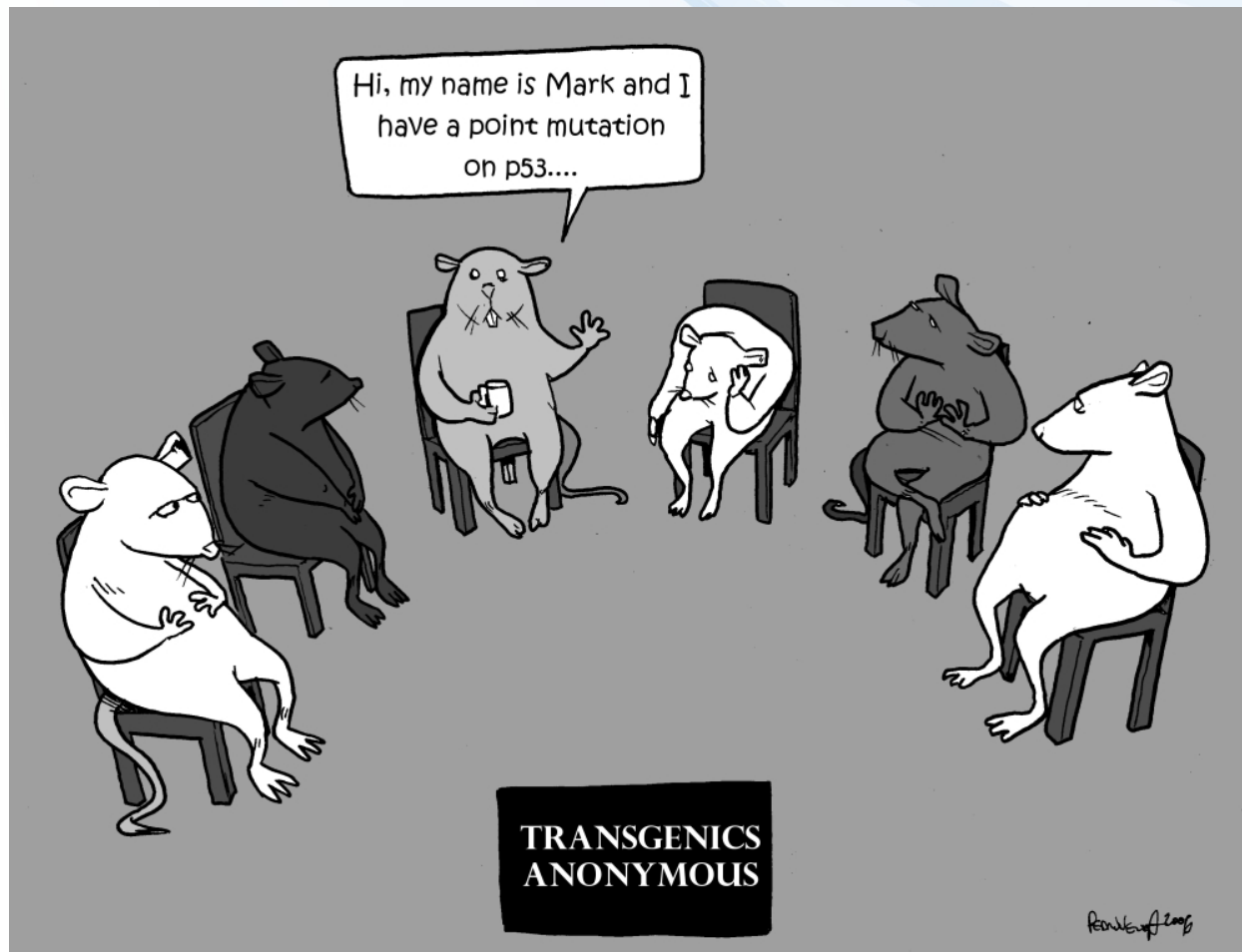


Metody založené na reportérových genech

- *Reporter gene assays*
- stanovení transkripční aktivity v rámci buněčné odpovědi na podnět (např. aktivace receptoru)
- Vložení gen. konstruktů – promotor- reportér- selekční gen (např. *neo* - rezistence ke geneticinu (G418))
- příklady reportérových genů: β -galaktozidáza; luciferáza; alkalická fosfatáza; zelený fluorescenční protein (GFP)



Transfekce



Transfekce

- Přenos cizí RNA nebo DNA do eukaryotické buňky (bez použití viru)
 - **Stabilní** – cizí DNA se zabuduje do genomu (selekční gen např. *neo* - rezistence k G418)- DNA se předává i potomkům
 - **Dočasná** (transientní) – DNA není v genomu, k expresi dochází po krátký čas (24-96 h)

Problém: dostat záporně nabitou molekulu DNA přes záporně nabitou membránu

Metody:

fyzikálně (mikroinjekce, elektroporace, na částicích)

chemicky (pomocí lipidů, solí, makromolekul)

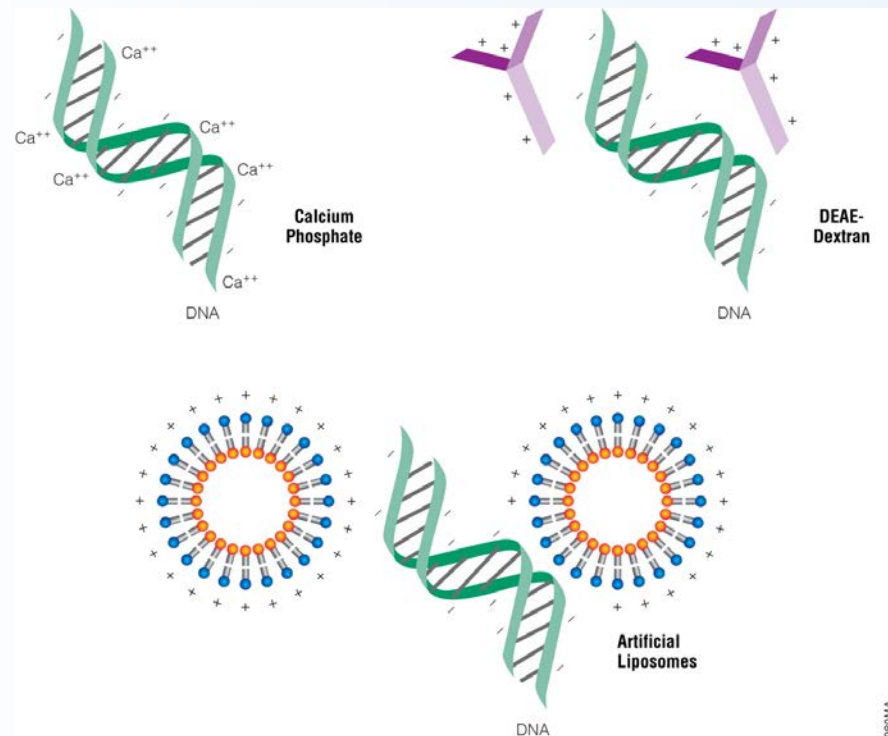
biologicky (viry- transdukce)



- Chemická cesta:

- -neutralizace náboje DNA,

- fosfát vápenatý- precipitát DNA nasorbovaný na buňky→inkorporace
 - Lipid nebo polymer- obalí DNA a je endocytován



Vápníková metoda

Solution A
Plasmid DNA
calcium solution

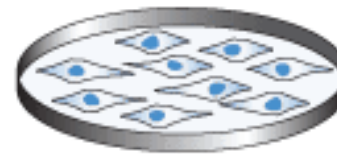


Add
Solution A
to Solution B
while
vortexing



Incubate 20 min

Apply
transfection
solution to
subconfluent
cell culture



Incubate 2–12 hr

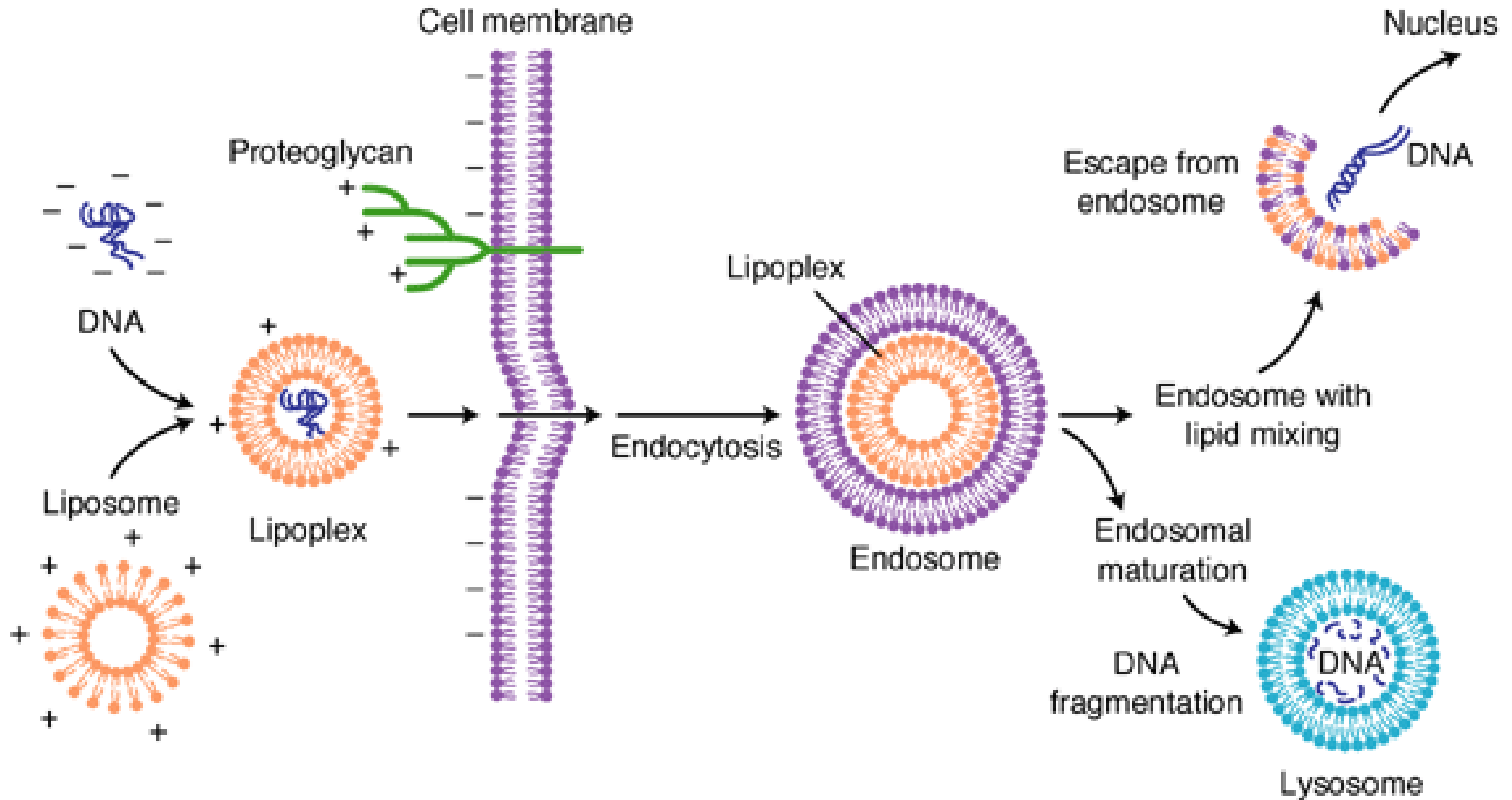
Replace
transfection
solution with
complete
growth medium

Assay for transient
gene expression
or
Begin selection for
stable transformants
(24–72 hr
post transfection)

Solution B
2X HBS



Lipozómová metoda



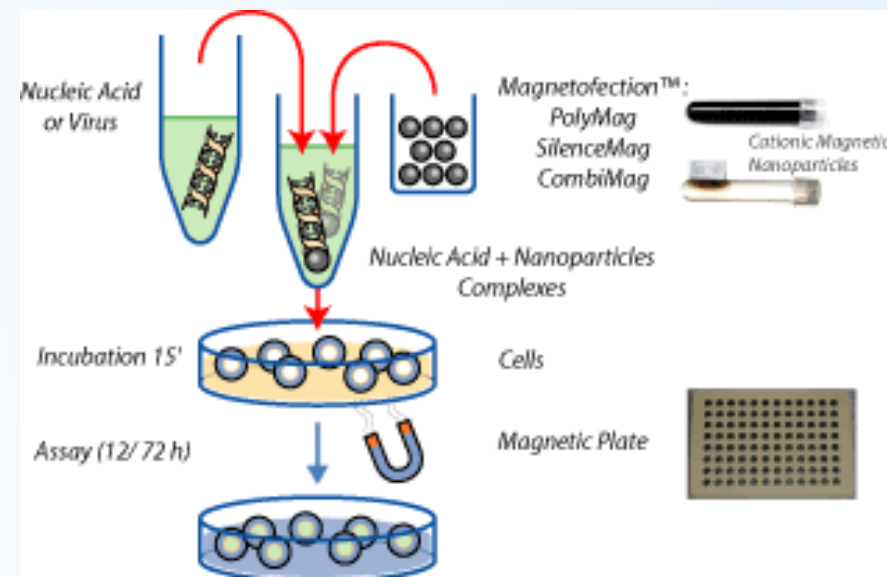
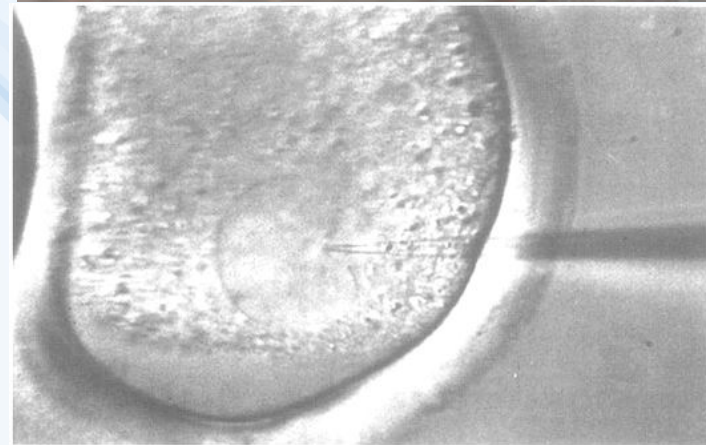
Lipoplex-mediated transfection and endocytosis

Expert Reviews in Molecular Medicine © 2003 Cambridge University Press



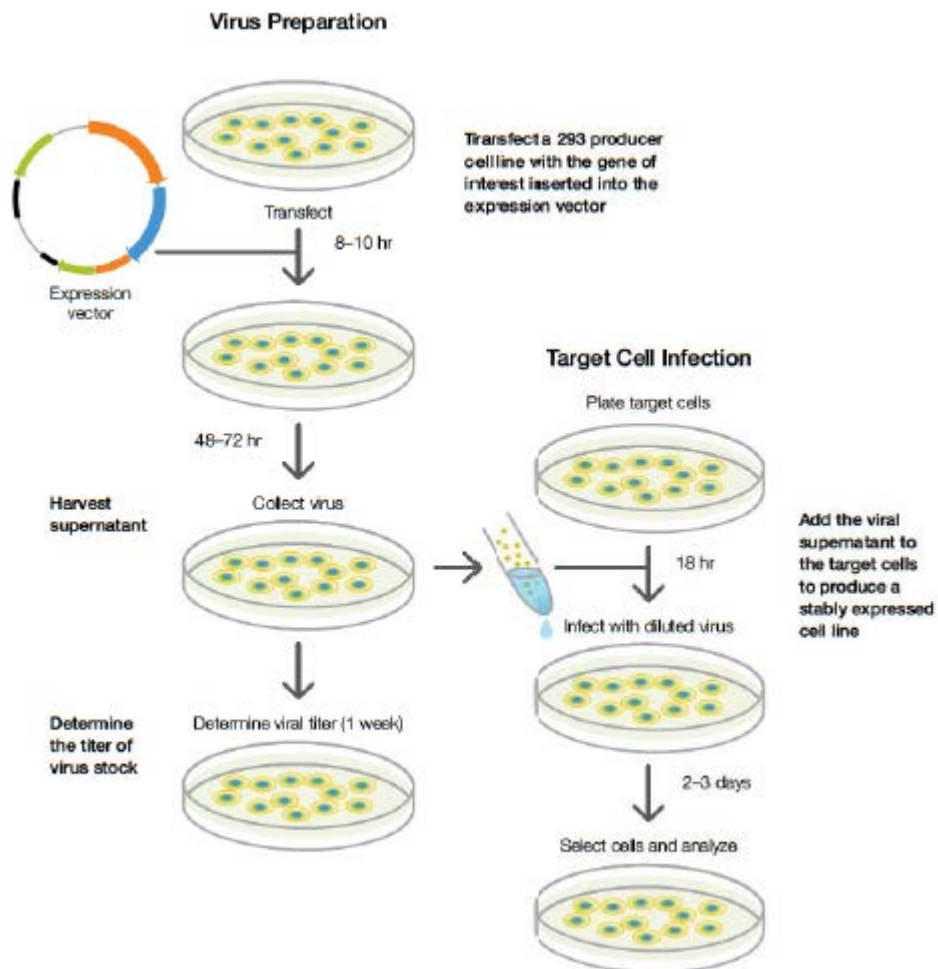
Fyzikální metody transfekce

- **Elektroporace** – pulzy vysokého napětí → krátkodobé póry v membráně → inkorporace DNA
- **Mikroinjekce** – transfekce embryonálních kmenových buněk
- **Biolistic particle delivery** – „nastřílení“ zlatých nebo wolframových částic s DNA do buněk pomocí genové pistole
- **Magnetické korálky** – DNA na magnetických částicích → přenos do buňky působením magnetu

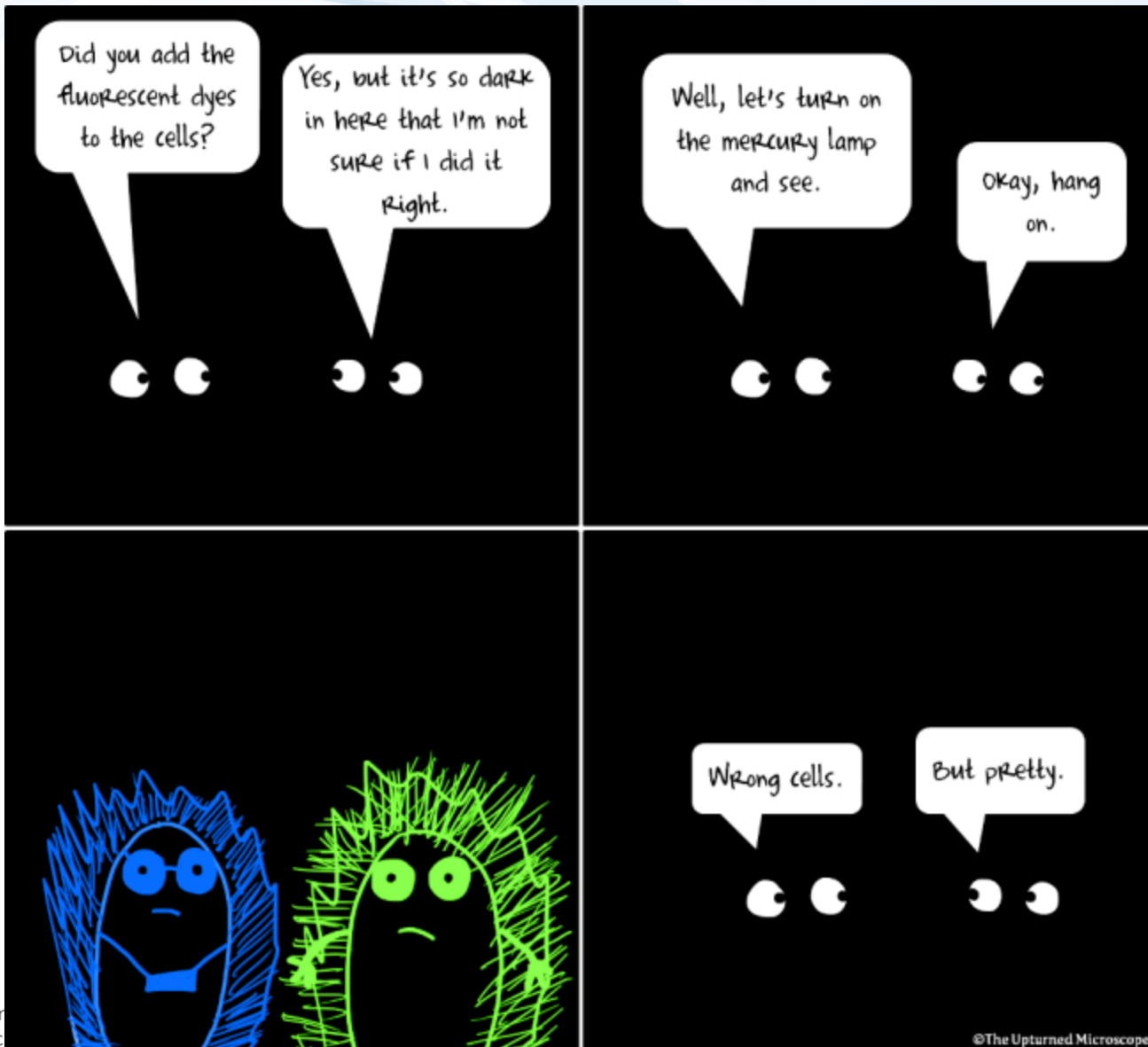


Transdukce

- Transfekce virem (transdukce)

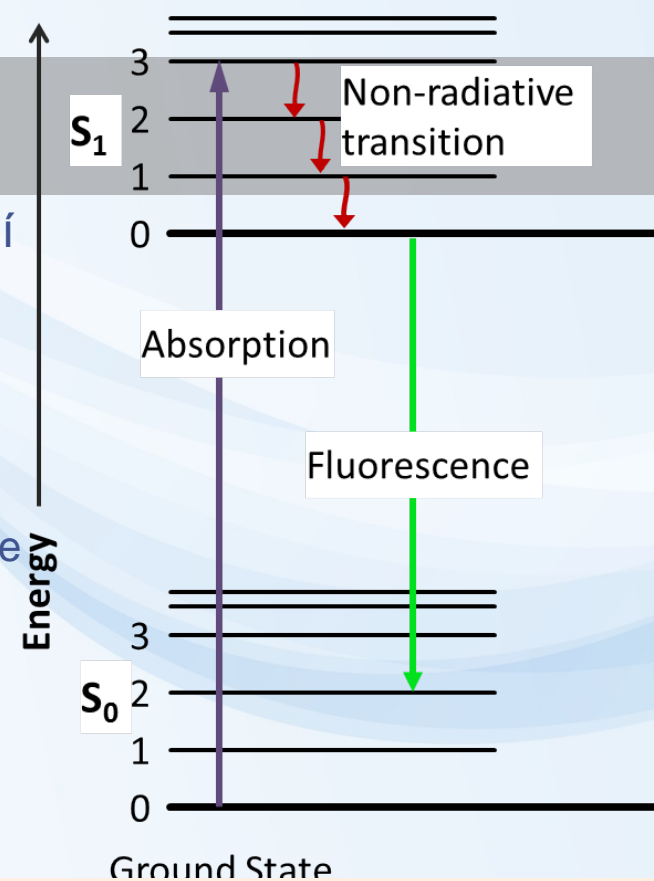


Fluorescence



Fluorescence

- emise světla po absorpci elektromagnetického záření
- Citlivá a levná detekční koncovka
- Problém:
 - fotobleaching „vysvícení“ – ztráta fluorescenčních vlastností na světle
 - „quenching“ – zhasínání fluorescence – místo emise se energie přenesla jinam
 - autofluorescence vzorku- fluoreskuje něco jiného než chceme
 - Vhodná kombinace fluoroforů



Differential Photobleaching in Multiply-Stained Tissues

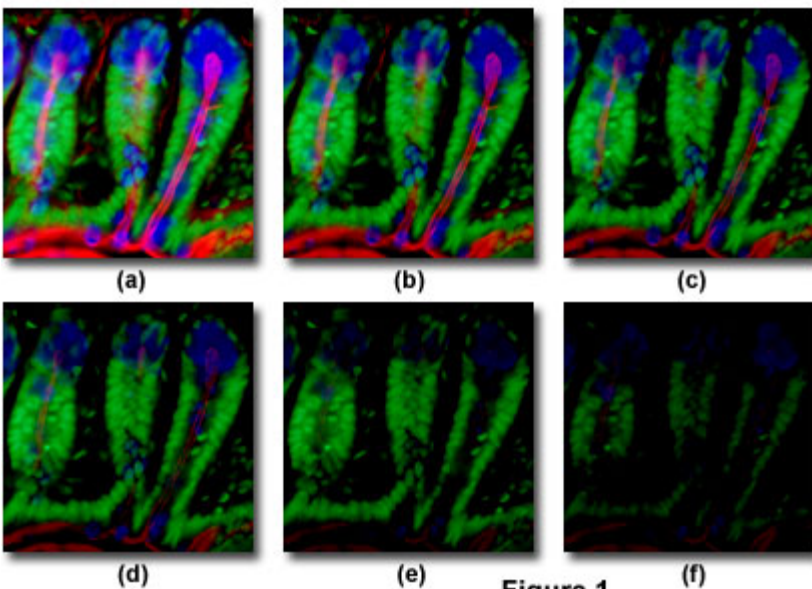
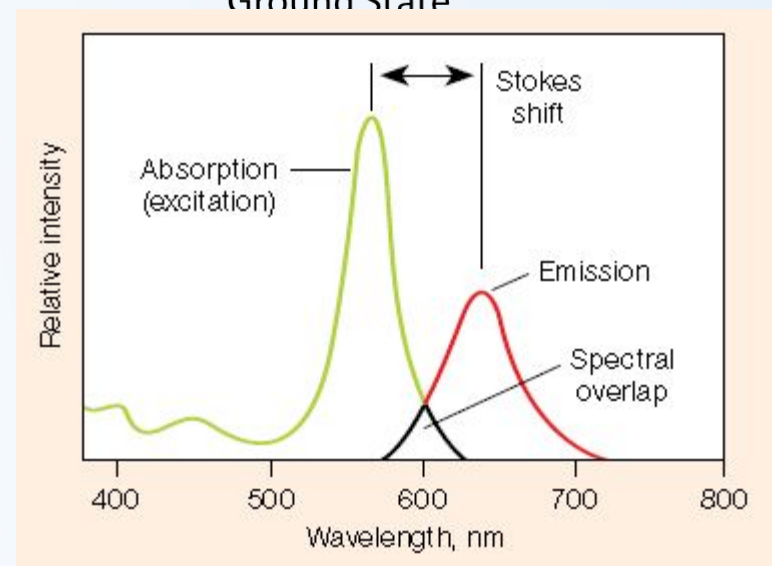


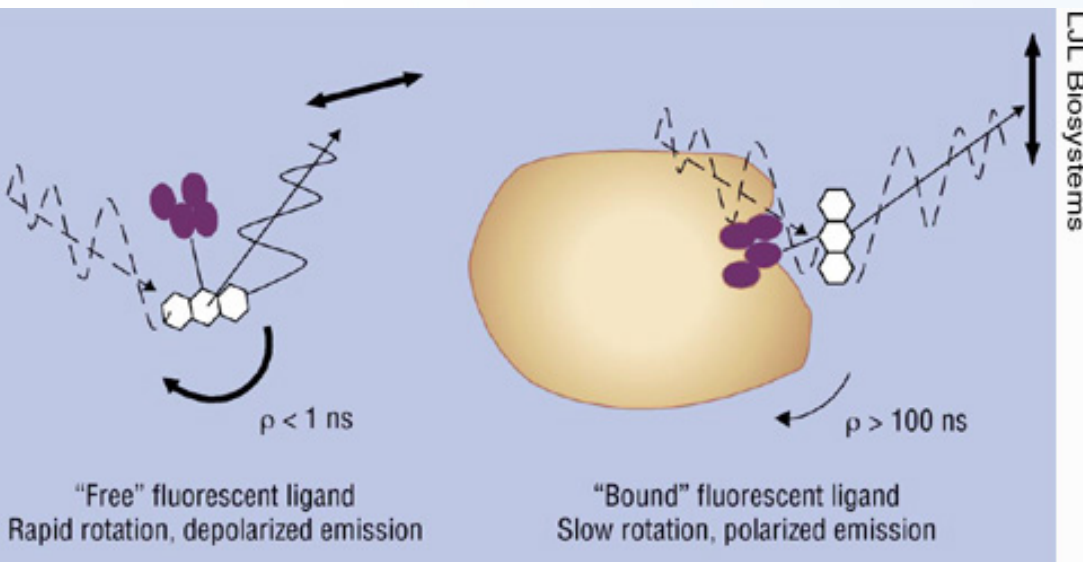
Figure 1



Řešení autofluorescence

– Fluorescenční polarizace –

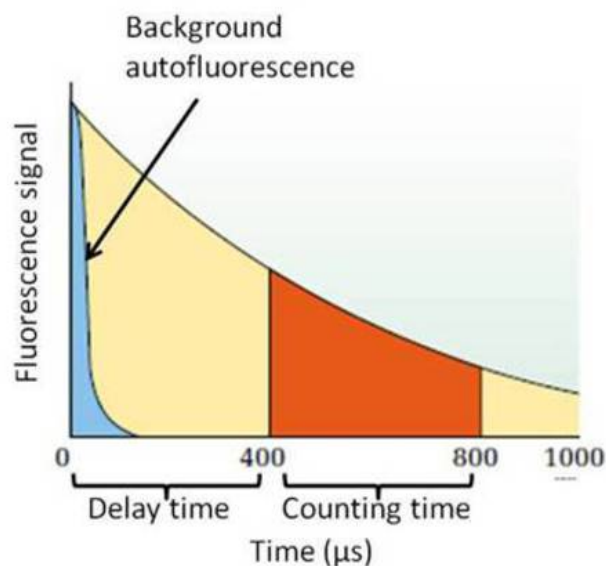
- Velký fluorofor (GFP)
- Malý fluorofor vázaný na makromolekulu (fluorofor vázaný na dextran)
- - excitace polarizovaným světlem
- velký fluorofor se mezi excitací a emisí nestihne otočit → emituje polarizované světlo
- porovnání intenzity polarizovaného a nepolarizovaného emisního kanálu odhalí signál studovaného fluoroforu



Řešení autofluorescence

– Časově rozlišená fluorescence (TRF)

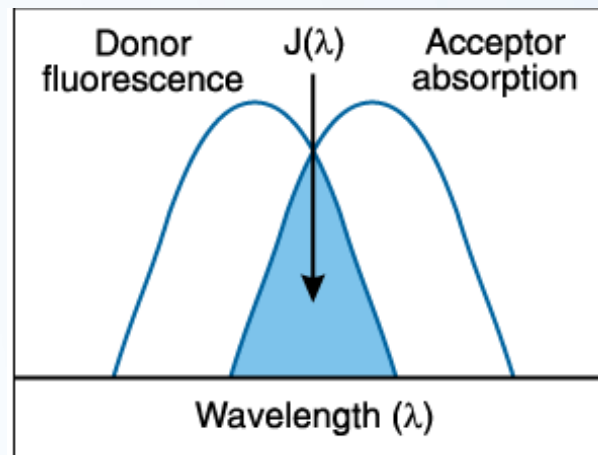
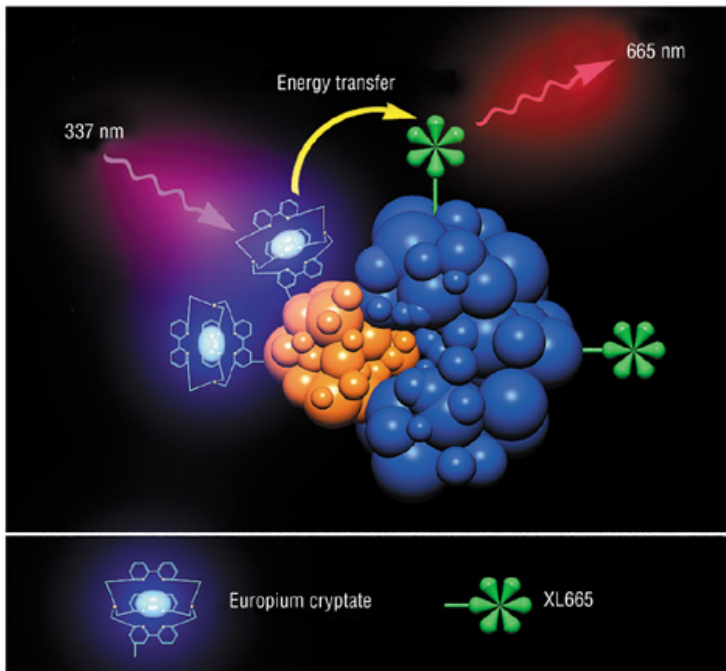
- Fluorimetr měří s časovým odstupem po excitaci → měření déletrvající fluorescence
- Většina kontaminantů emituje dříve → zvýšení citlivosti



fluorescence

– Fluorescence resonance energy transfer FRET

- detekce přiblížení dvou fluoroforů např. vazba ligandu na receptor
- Donor je excitován a přeneše energii na akceptor



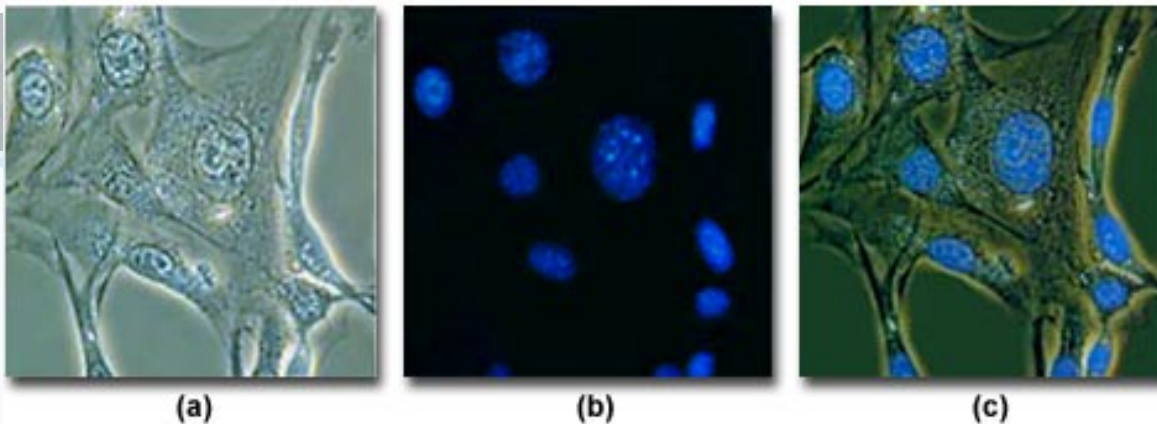


Figure 3

Pozorování b. kultur



- Invertovaný mikroskop
 - Pozorování v procházejícím světle
 - Pozorování v odraženém světle (často fluorescence)

Reflected/Transmitted Light Microscope Configuration

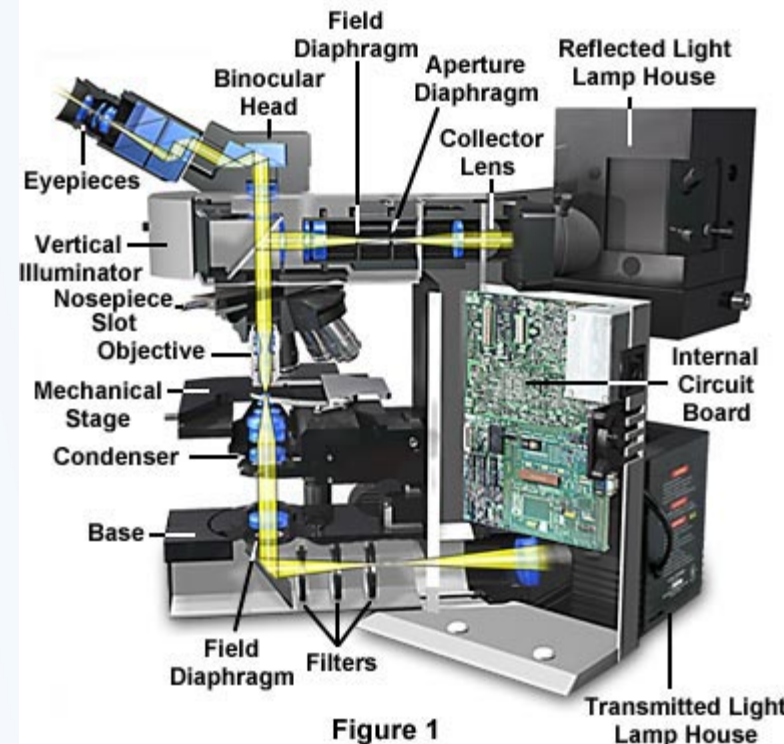
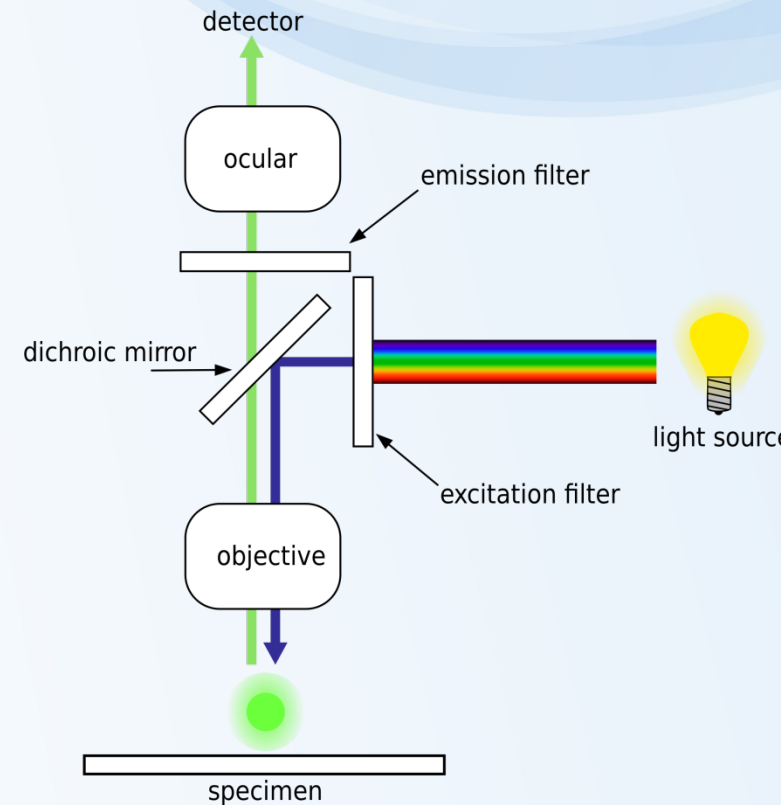
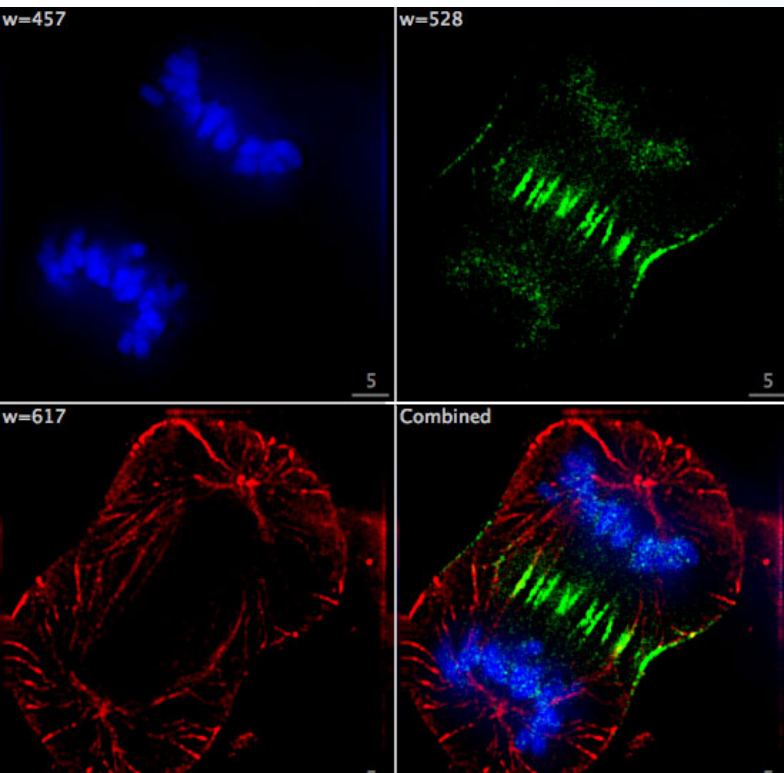


Figure 1



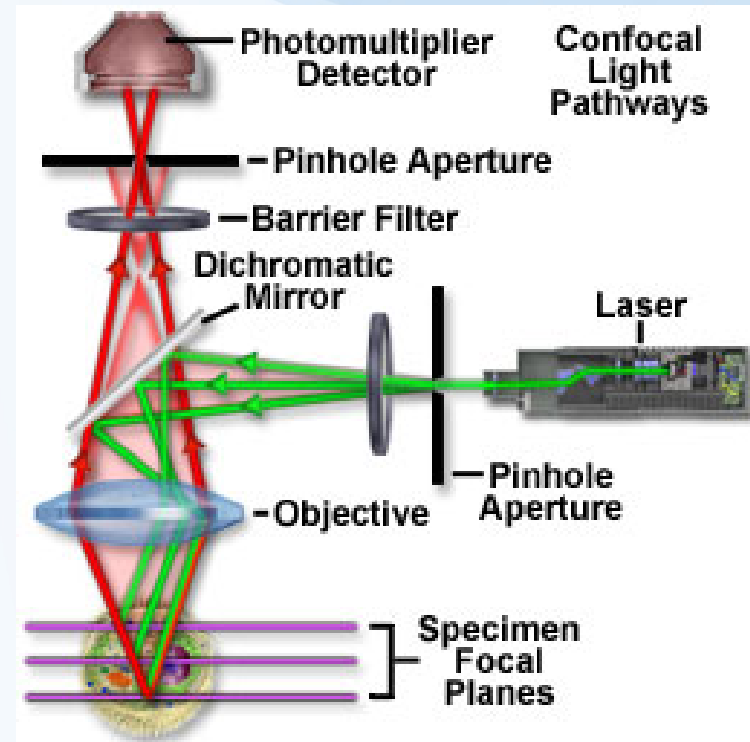
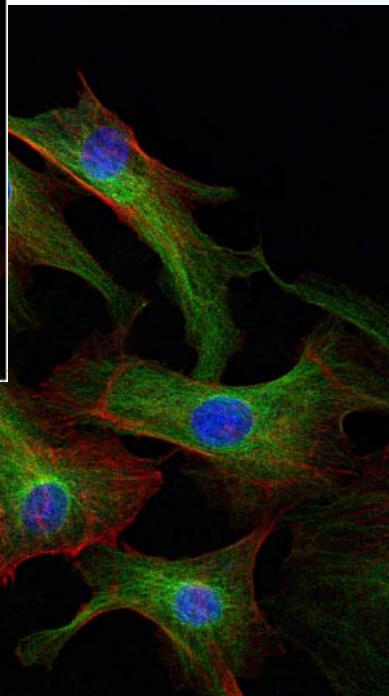
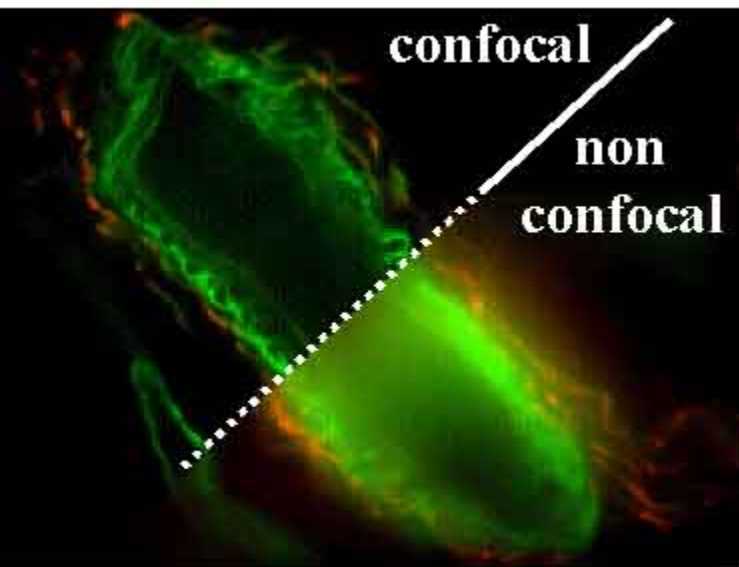
Fluorescenční mikroskop

- Využití vhodných fluoroforů (DAPI, GFP,...)
- Studium vnitřní struktury buněk
- immunostaining



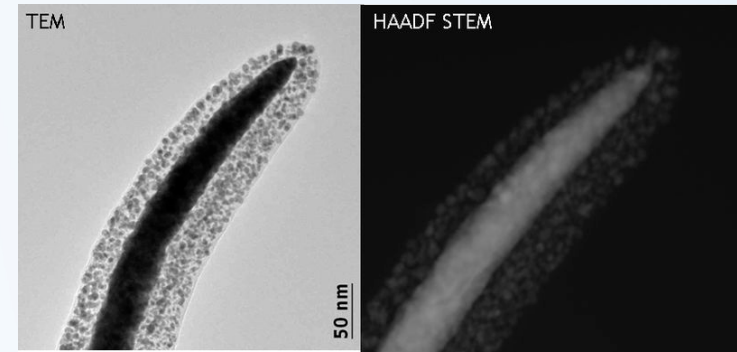
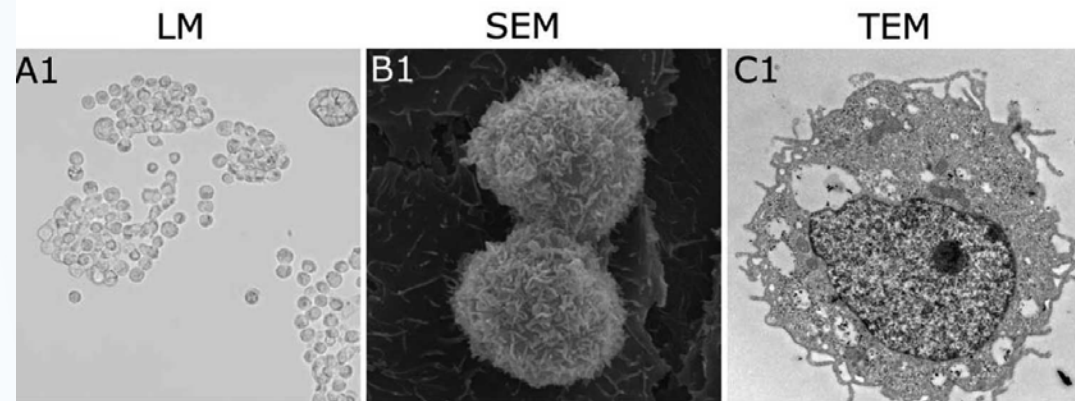
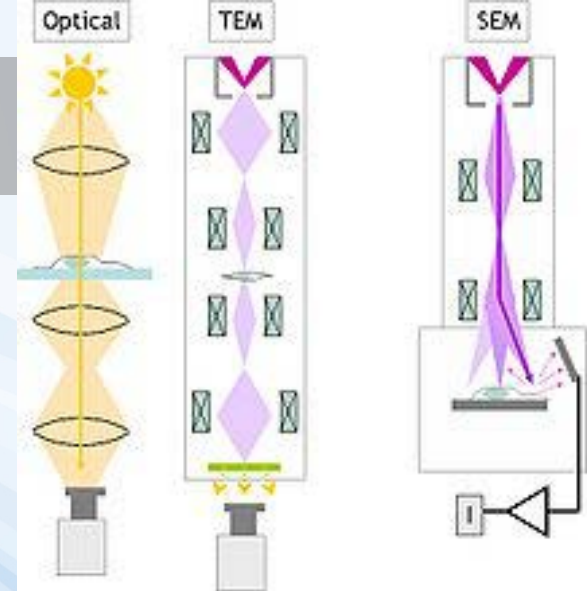
Konfokální mikroskopie

- Eliminuje zkreslení odraženým světlem od nezaostřených oblastí
- Umožňuje pozorovat materiál po „vrstvách“ a složit výsledný obraz



Elektronová mikroskopie

- Světlo (fotony) neumožňují pozorovat objekty s velikostí blízké jeho vlnové délce
- Příprava vzorků
 - Fixace, barvení těžkými kovy,... (biologický materiál je pro e- průhledný)
- Typy elektronové mikroskopie
 - **Transmisní** (TEM) – průchod svazku elektronů tenkým vzorkem
 - **Skenovací** (SEM) – skenování povrchu vzorku svazkem elektronů
 - **Skenovací- transmisní** (STEM) – podobné TEM ale obrázky vznikají skenováním



Immunostaining

- Barvení vzorku pomocí značených protilátek Identifikace/lokalizace zájmových molekul ve vzorku (kde, kdy, kolokalizace/koexprese)
- Nutnost mít specifickou protilátku proti žádanému antigenu

Typy značení protilátek

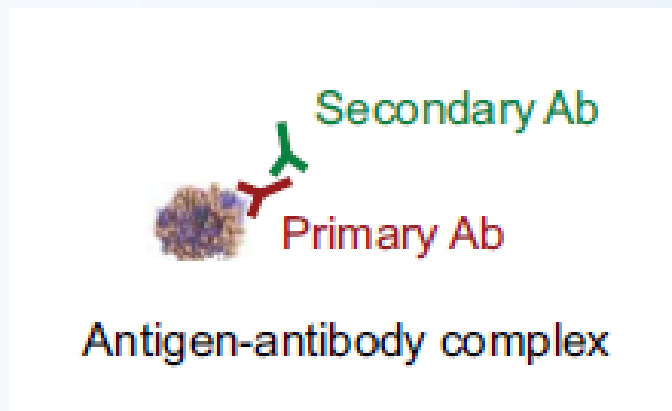
- Fluorescenční –fluoresceční mikroskopie- vyšší rozlišení
- Enzymatická (HRP)- western blot- vyšší citlivost
- biotin /avidin – nejsilnější nekovalentní interakce mezi proteinem a ligandem ($K_d=10^{-15}$ M; protilátky mají cca $K_d=10^{-7}$ M)

Typy barvení:

- Přímé – značená specifická protilátka
- Nepřímé- specifická protilátka + sekundární značená protilátka (zesílení signálu + ušetření za značení) např. primární myší protilátka proti tubulinu detekována sekundární anti-mouse kozí protilátkou

Vzorky

- Buňky
- Tkáně – anatomické preparáty
- Proteiny (Western blot)



Immunohistochemistry Process

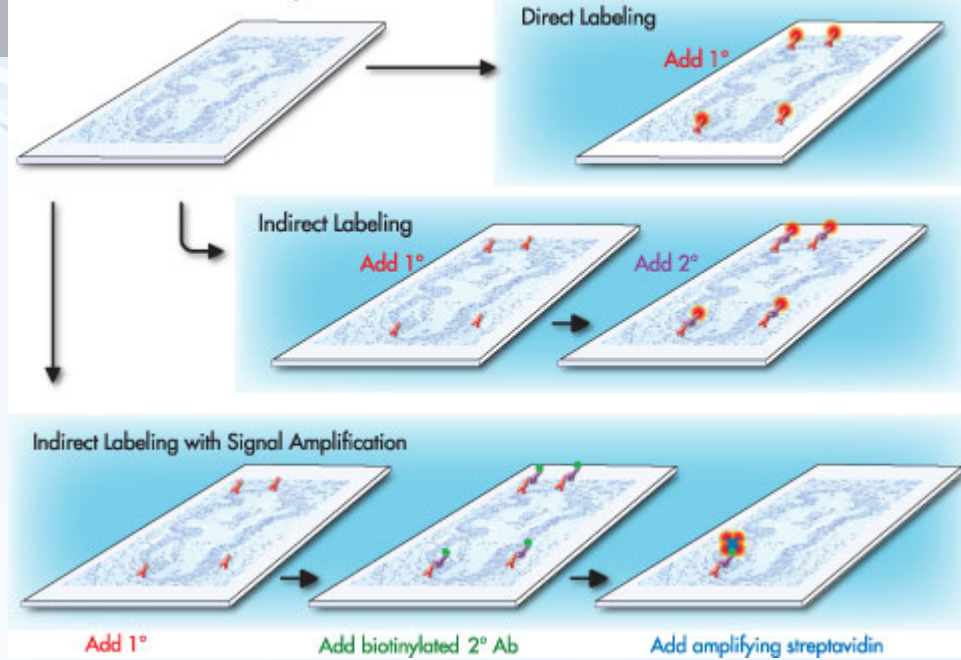
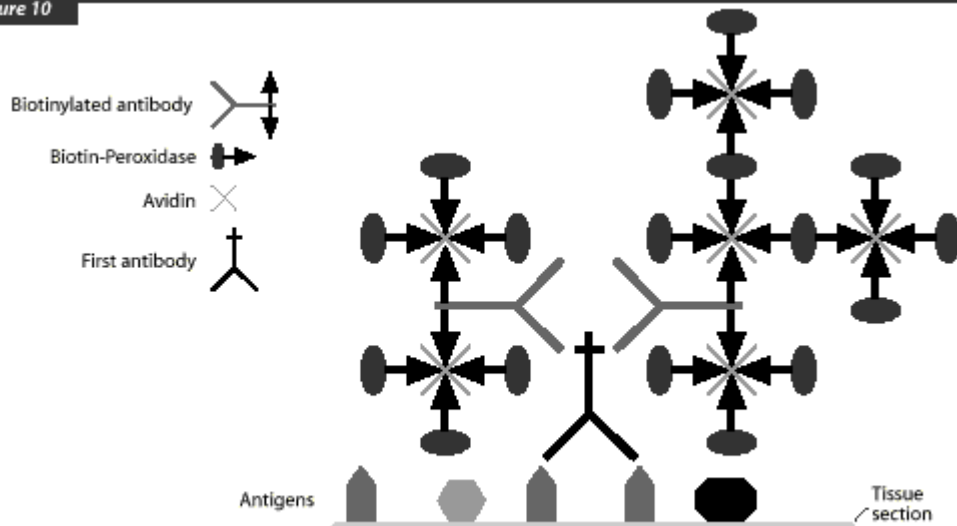


Figure 10

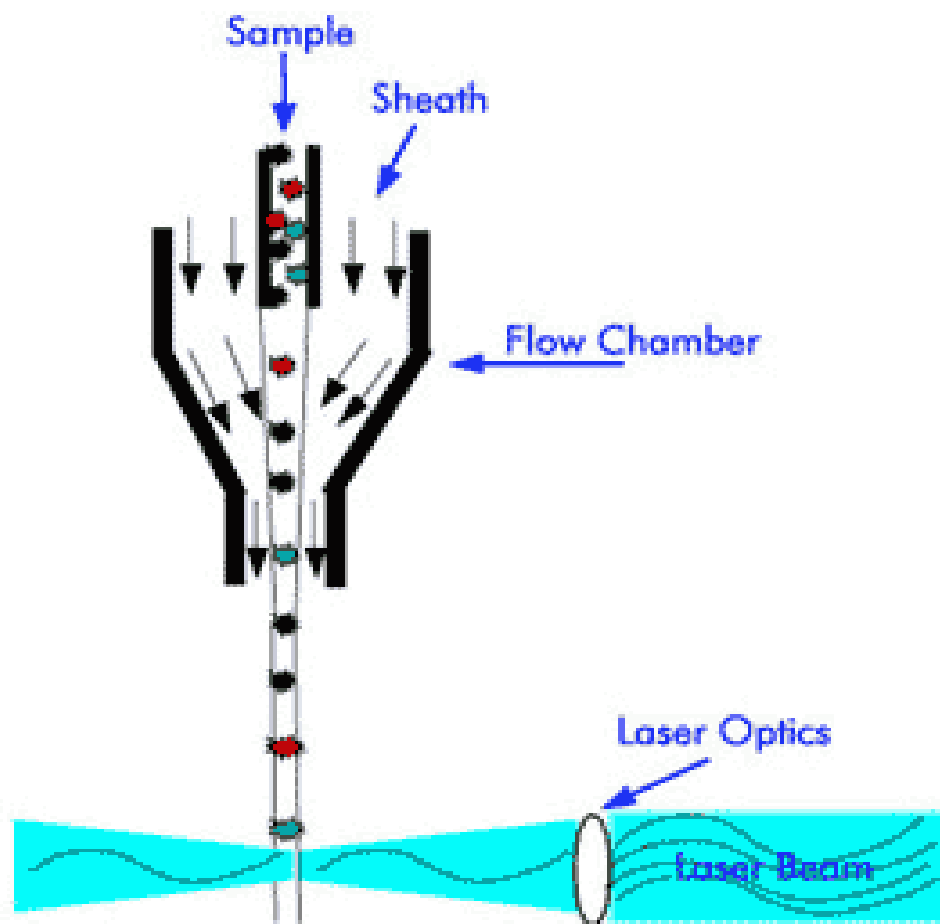
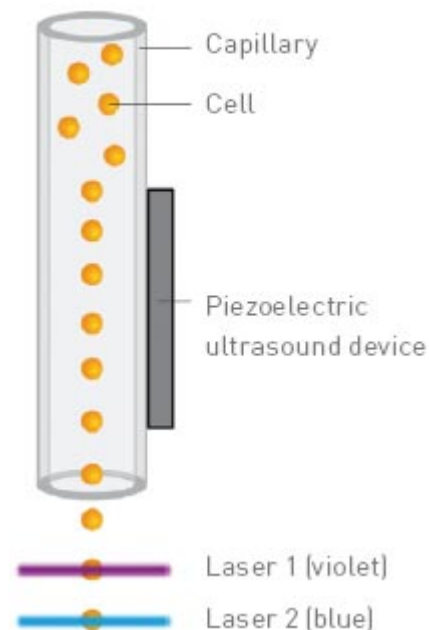


Avidin-biotin complex (ABC) method. The binding of the second layer of antibodies (biotinylated antibodies) to the avidin-biotin-peroxidase complex relies on the strong affinity between avidin and biotin

Flowcytometrie

- Studium suspenzních buněk
- Detekce povrchových markerů buněk
- Detekce intracelulárních faktorů
- Detekce obsahu DNA
- Možnost třídění do subpopulací

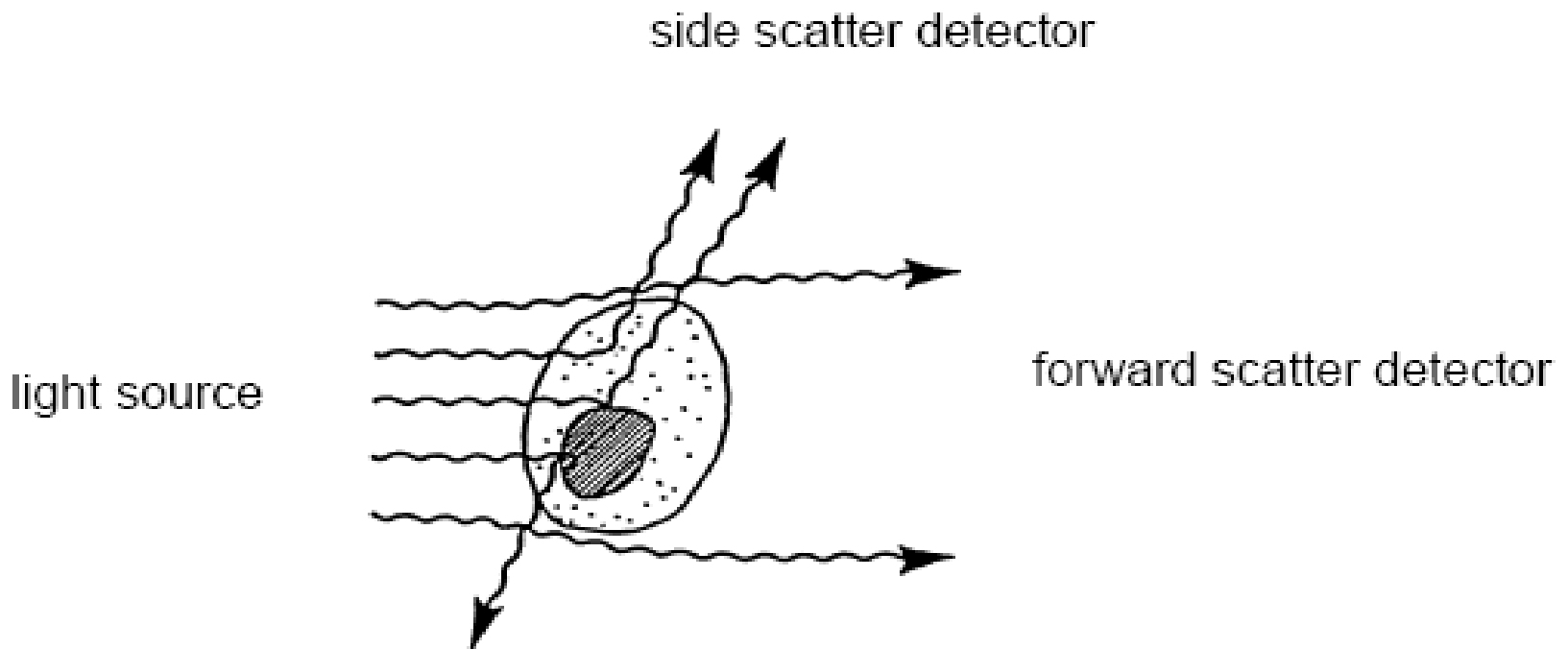
Acoustic focusing cytometry



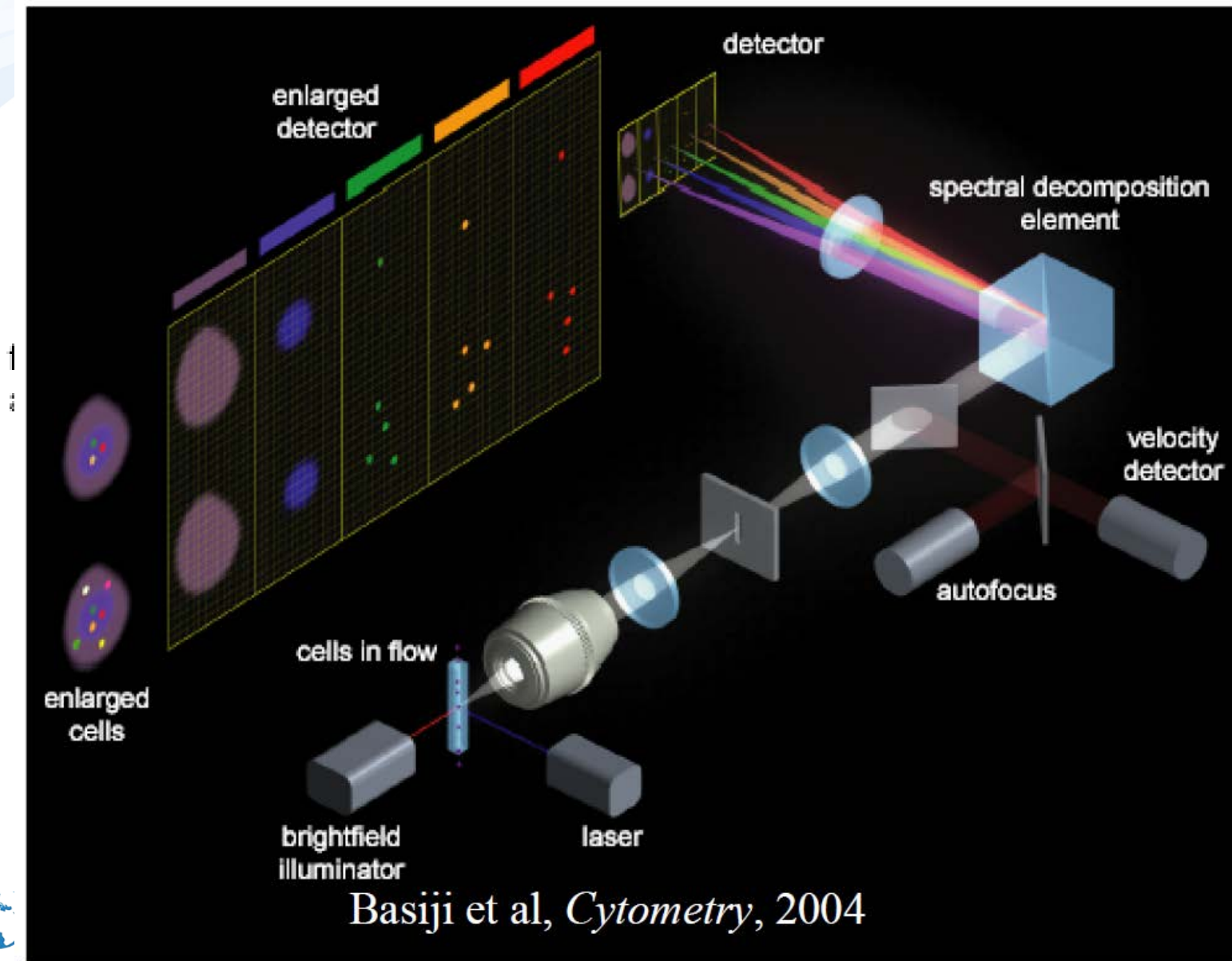
Detekce - flowcytometrie

Zdroj světla: laser

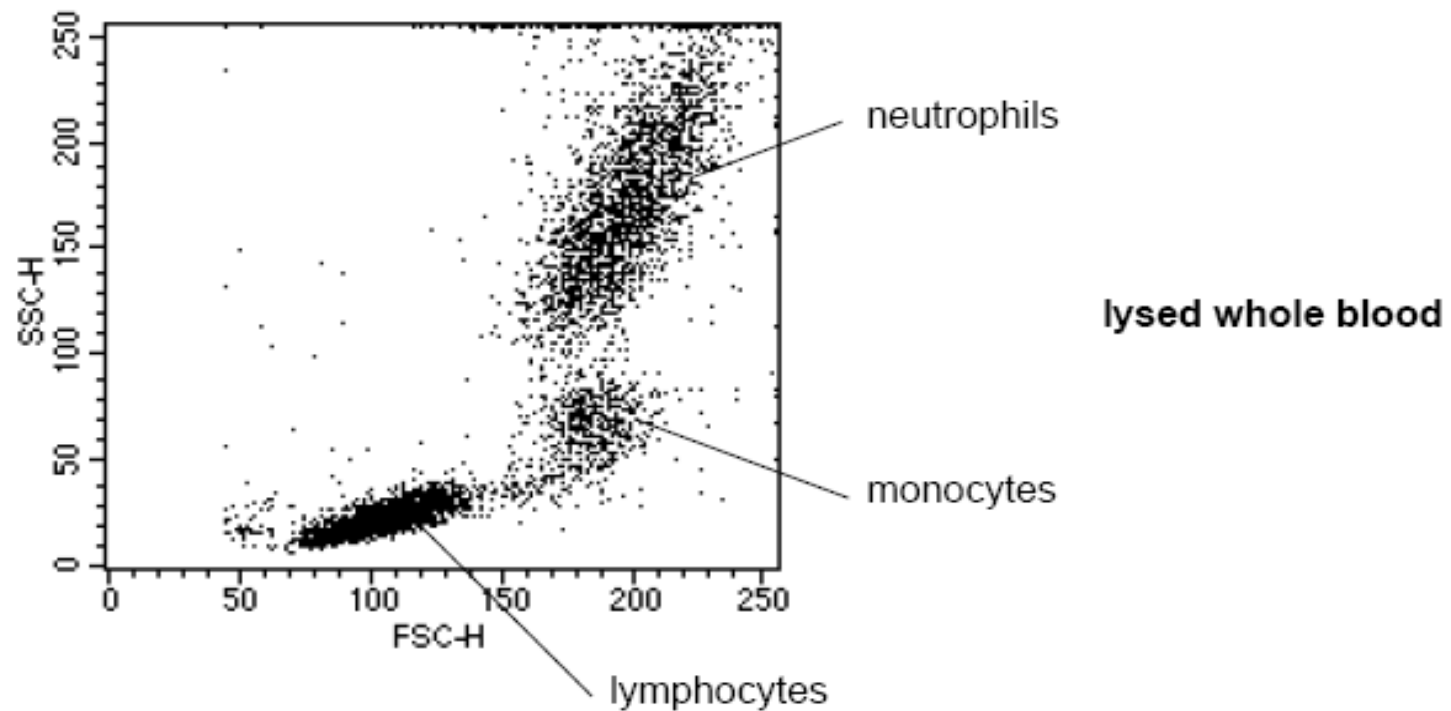
- Side scatter – detekce vnitřní komplexity
- Foreward scatter – detekce velikosti



Detekce fluorescence

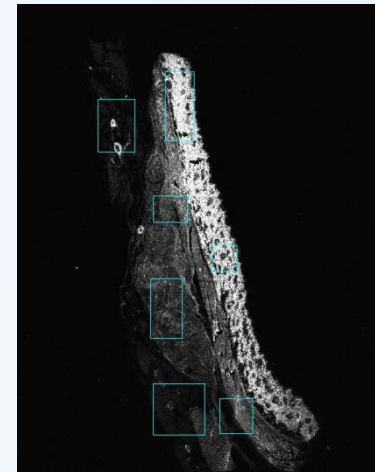
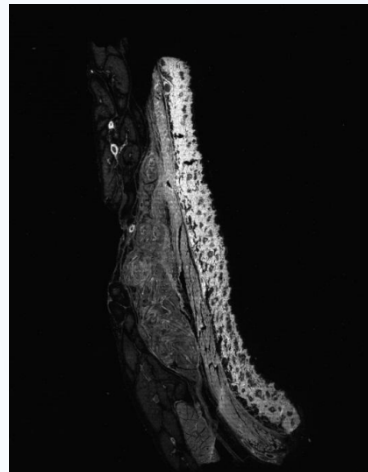


Populační analýza



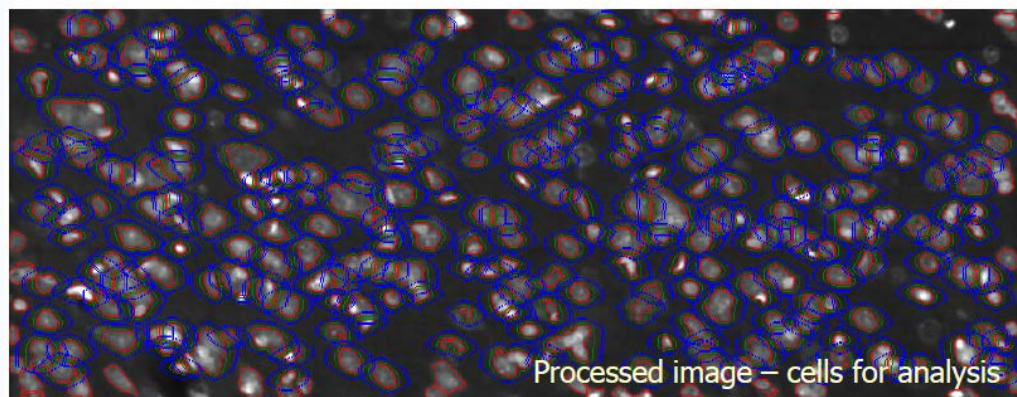
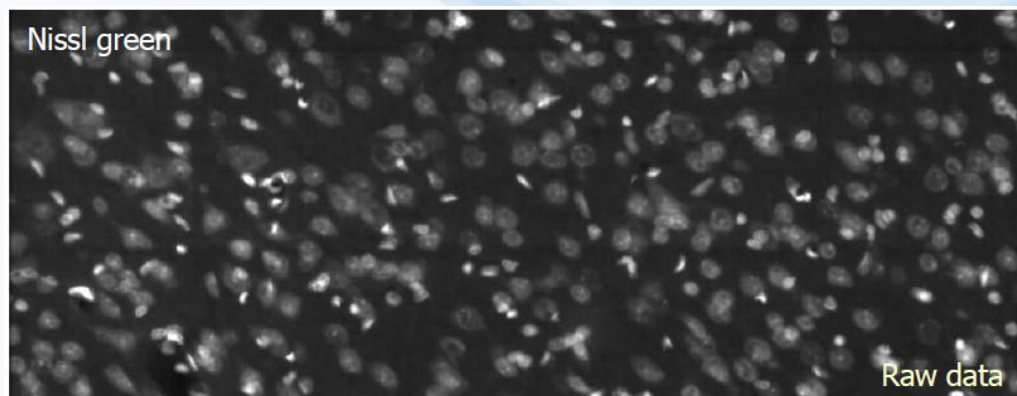
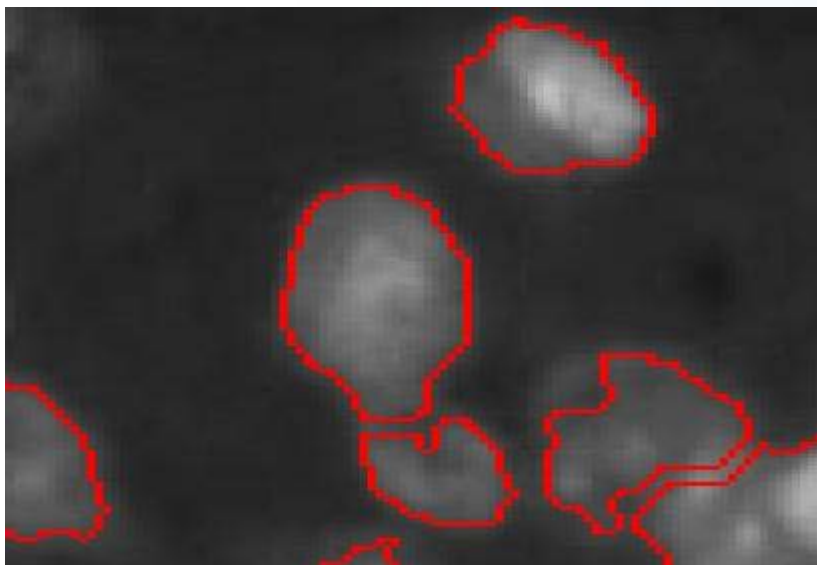
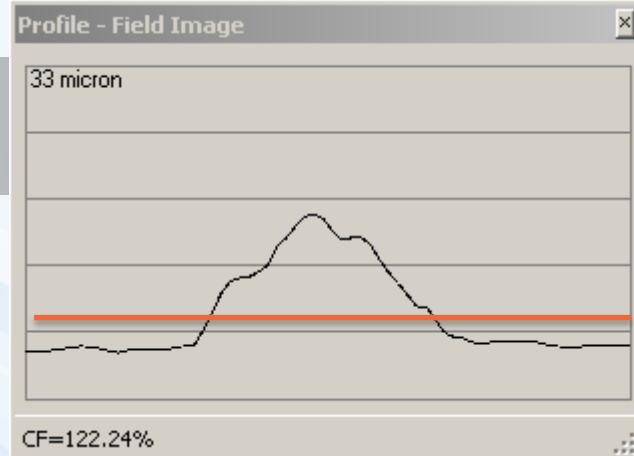
Skenovací cytometrie

- Použití metody flowcytometrie na přisedlé buňky
- Nafocení řady snímků v různých fluorescenčních kanálech
- Možnost sledování v čase (časově závislé děje, pohyb buněk)
- Sledovaný materiál (na sklíčku, na misce, v desce)
 - Části tkáně (histologické preparáty)
 - Adherentní buňky
 - Buněčné suspenze
- Získání dat
 - Předběžný sken
 - Výběr oblasti zájmu
 - Podrobné snímkování

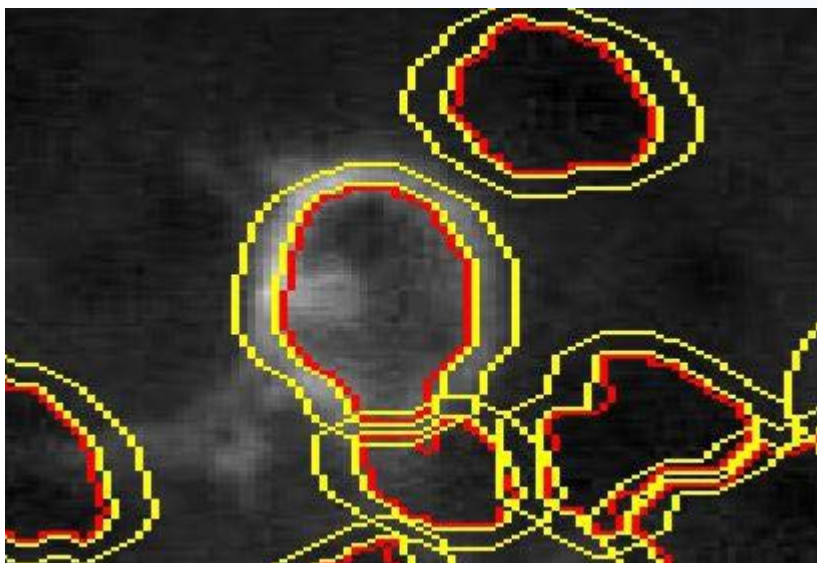
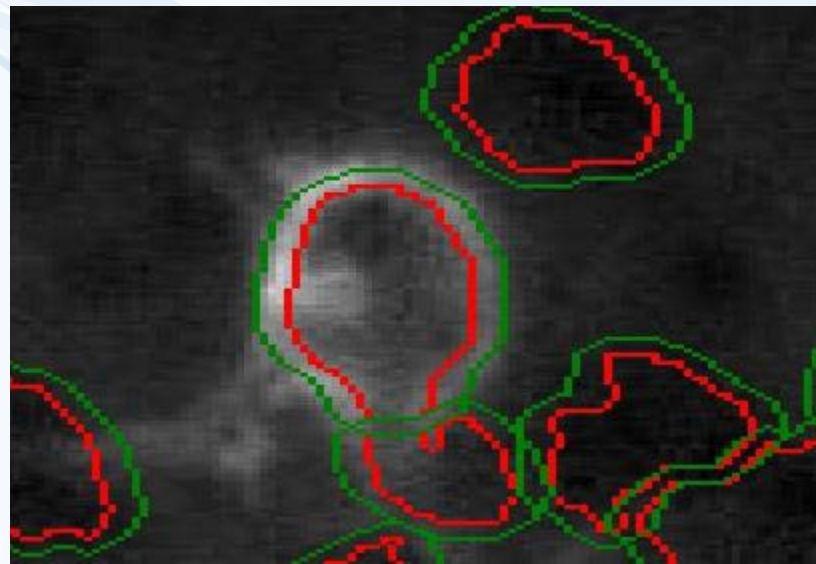
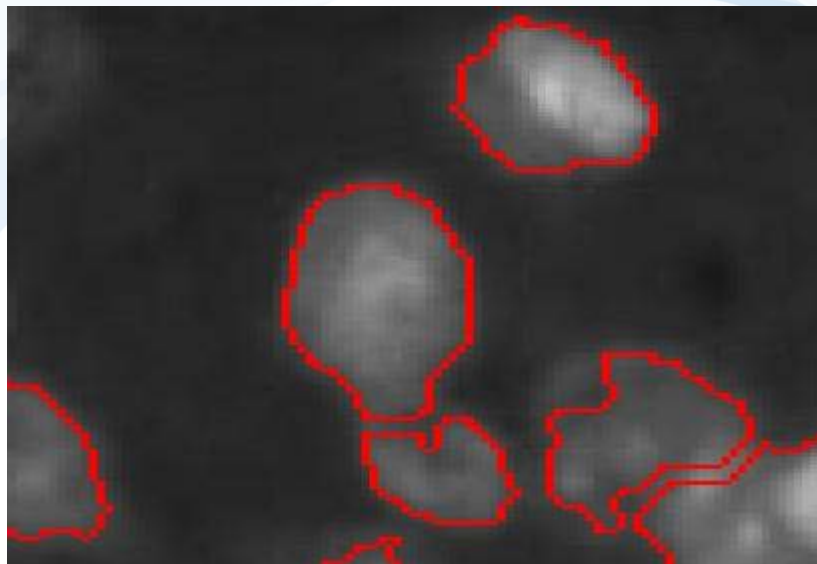


Analýza obrazu

- Identifikace buněk podle prahového signálu
- Často identifikace DNA
- Využití
 - Počítání buněk (proliferace, motilita)
 - Studium morfologie buněk
 - FISH



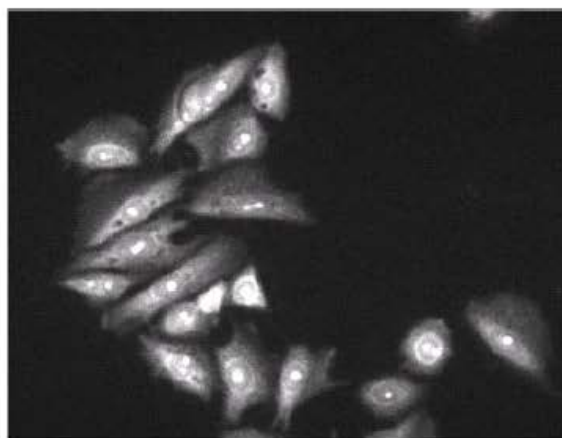
Analýza obrazu



- Rozšíření kontur – **analýza kontur** oblasti cytoplasmy
- **Periferní kontury** – zahrnutí signálu v oblasti povrchu buňky



- Vytvoření virtuálních kanálů
- Zahrnutí informací potřebných pro analýzu

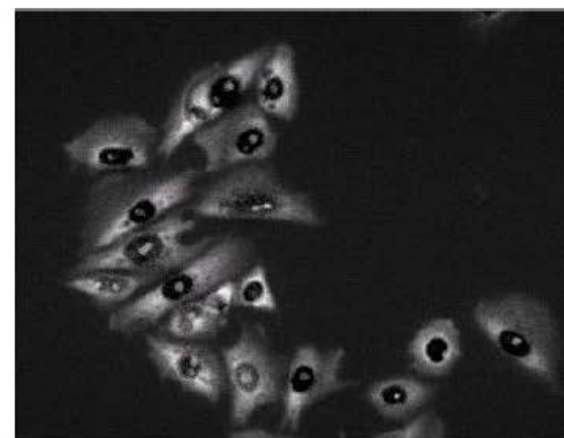


Green detector



Red detector

minus



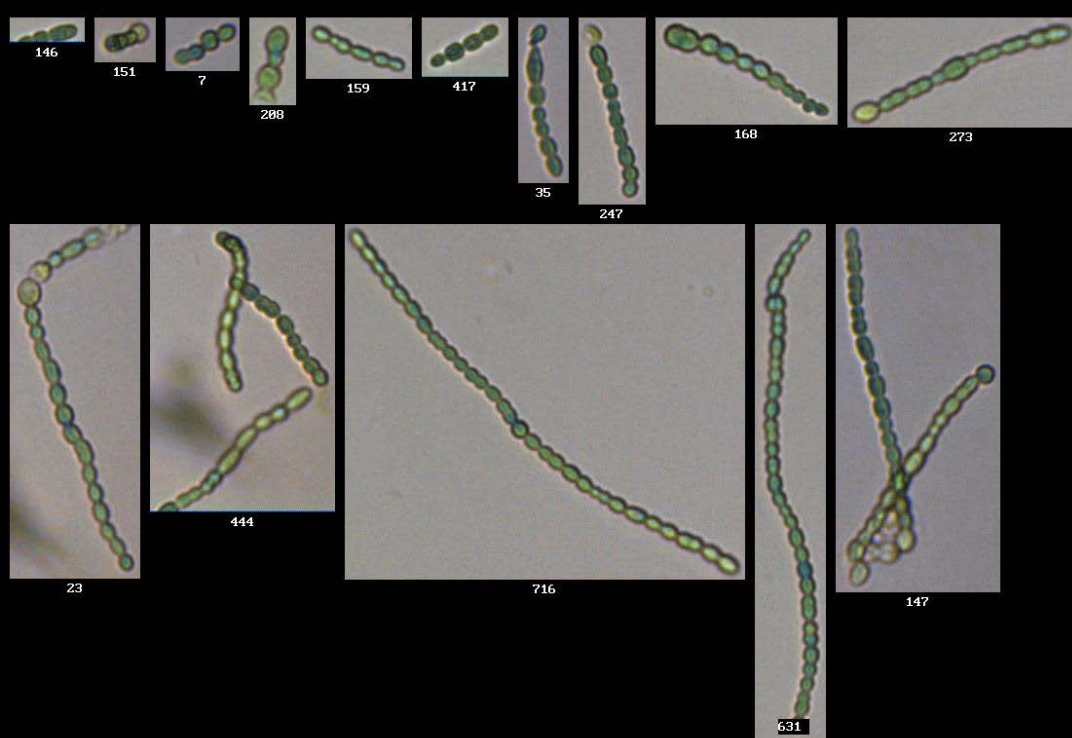
Virtual channel

=



Flowcam

- Analog flow cytometru-
- Vyfotí procházející částice
- Vytváří katalog
- Analýza obrazu



28 um

