

CVIČENÍ Z ANALYTICKÉ CYTOMETRIE 2017/2018

10. – 12. 1. 2018, BFÚ

Vyučující: Mgr. Karel Souček, Ph.D.; Mgr. Šárka Šimečková; Mgr. Stanislav Drápela

Skupina A

Gospořová Eva **LF** D-FA4 LFAR [sem 3, roč 2]
Michalec Lukáš **PřF** B-EXB SPBI (EBŽI) [sem 7, roč 4]
Novotná Simona **PřF** N-EXB SPBI (EBZI) [sem 1, roč 1]
Ondřišová Laura **PřF** N-EXB BIMG [sem 1, roč 1]

Skupina B

Potrok Adam **PřF** N-EXB SPBI (EBZI) [sem 1, roč 1]
Vymazal Ondřej **PřF** N-EXB BIMG [sem 3, roč 2]
Závacká Kristýna **PřF** N-EXB BIMG [sem 1, roč 1]

Den 1 (10.1.)	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 (11.1.)	A)	B)
9 - 12	Sběr a fixace buněk pro analýzu proliferace a BC	
12-15	Analýza na průtokovém cytometru	Hela 8 Fucci cells - analýza na CM
14-18		Sběr a fixace buněk pro analýzu proliferace a BC Analýza na průtokovém cytometru

Den 3 (12.1.)	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 proliferace, buněčného cyklu a buněčné životnosti po ovlivnění buněk DU 145 inhibitorem nedylace

Protokol 3

Značení povrchových molekul EpCAM/CD44, viability u buněk DU 145

Protokol 1

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

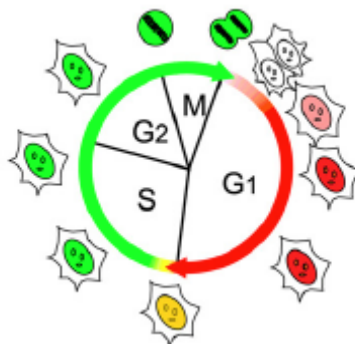
Cíl

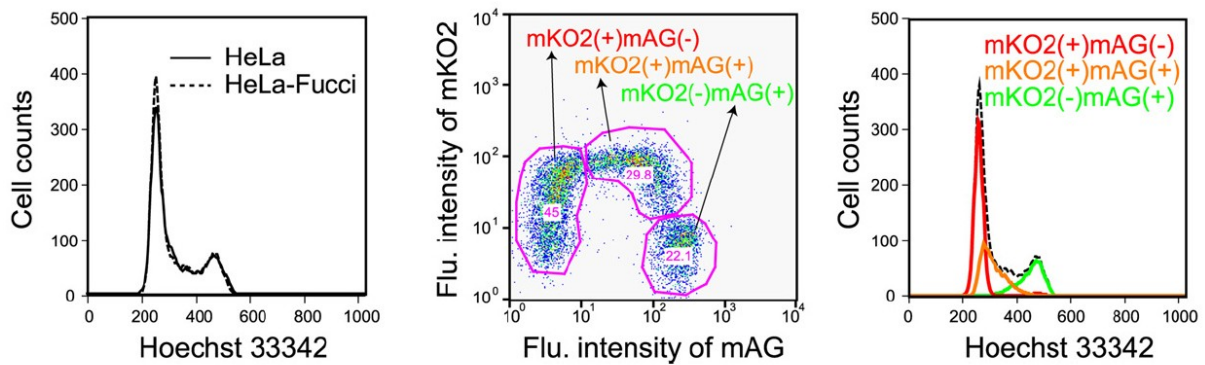
- cílem experimentu je seznámit se s modelovou buněčnou linií HeLa 8 Fucci, která umožňuje analýzu buněčného cyklu na živých buňkách bez potřeby fixace a značení
- tento experiment bude demonstrační – bude Vám názorně předvedeno, jak se zpracovávají buňky pro tento typ analýzy, což využijete při přípravě 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 μ g/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 proliferace, buněčného cyklu a buněčné životnosti po ovlivnění buněk DU 145 inhibitorem neddylace

Cíle

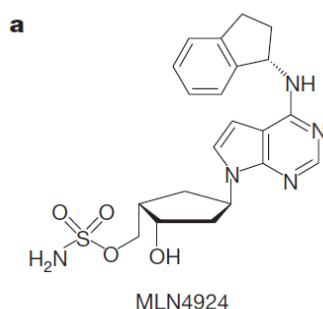
- cílem experimentu je ovlivnit buněčnou linii DU 145 inhibitorem neddylace (MLN-4924) a vyšetřit účinky jeho působení
- působení MLN-4924 po dobu 24 hodin vede k deregulaci buněčného cyklu
- měření proběhne na přístroji Attune® Flow Cytometer

Teorie

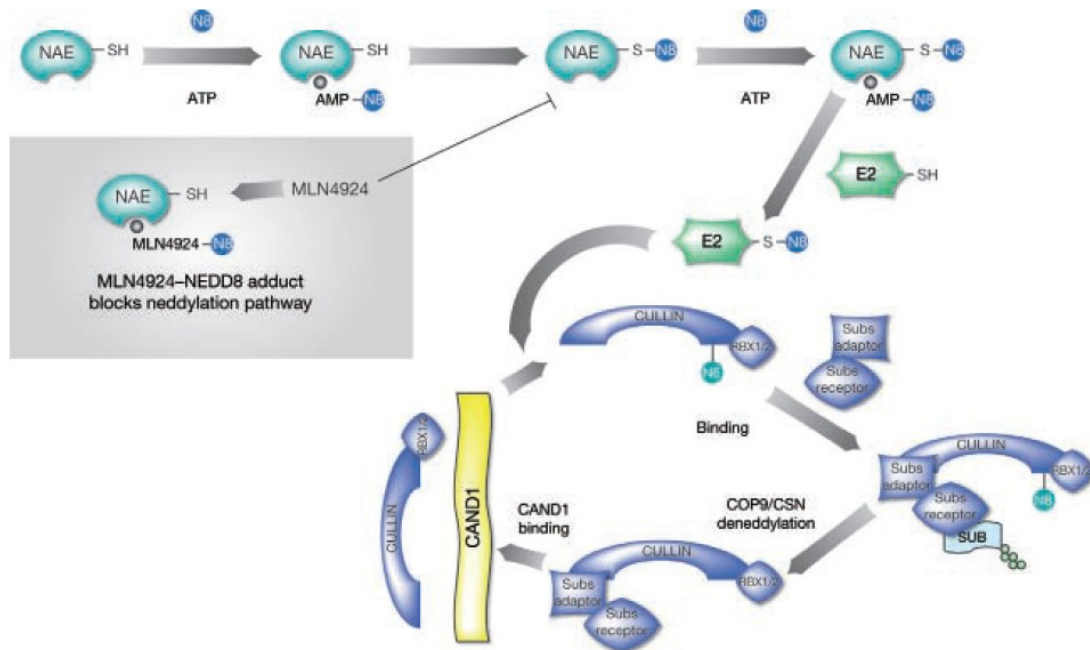
MLN-4924

- 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)



MĚŘENÍ PROLIFERACE A BUNĚČNÉHO CYKLU

Materiál

- buněčná linie DU 145 (kontrola a ovlivněné buňky)
- roztok PBS+EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová).
- trypsin
- nesterilní médium se sérem – inaktivace trypsinu
- nesterilní FACS zkumavky, špičky, pipety
- PBS + 1% BSA
- Live Dead Fixable stain kit Red
- Edu click-iT AF488 kit
- PO-PRO-1

Postup

1. Sběr a příprava vzorků

- odsát médium z buněk
- přidat 3 ml PBS+EDTA – nechat 2 minuty působit
- odsát PBS+EDTA
- přidat 0,5 ml trypsinu – nechat inkubovat v termostatu (37°C) dokud se buňky neuvolní (cca 2 minuty)
- přidat 2,5 ml média se sérem (inaktivace trypsinu)
- stočit 200g 5 minut, odsát supernatant

2. Značení viability

- naředit značku pro viabilitu v PBS (1:1000)
- přidat 100 µl/vzorek, inkubovat 15 min, 4°C
- přidat 1 ml PBS + 1% BSA, stočit (200g, 5 min), odsát supernatant

2. Fixace

- rozsuspendovat buňky ve 100 µl 4% PFA
- inkubovat 15 min, RT
- přidat 1 ml PBS + 1% BSA, stočit (200g, 5 min), odsát supernatant

2. Permeabilizace

- rozsuspendovat buňky ve 100 µl 0,15% Tritonu X-100
- inkubovat 15 min, RT
- přidat 1 ml PBS + 1% BSA, stočit (200g, 5 min), odsát supernatant

2. Click-iT reakce

- rozdělit vzorky do dvou zkumavek, do jedné přidat pouze PBS + 1% BSA, do druhé připravenou click-iT reakční směs
- připravit click-iT reakční směs dle rozpisu
- přidat 125 µl směsi/vzorek
- inkubovat 30 min, RT ve tmě
- do obou zkumavek přidat 1 ml PBS + 1% BSA, stočit (200g, 5 min), odsát supernatant

	1 reakce
PBS	109,5 µl
CuSO ₄	2,5 µl
Fluorescent dye azide	0,625 µl
Reaction buffer additive (dilluted)	12,5 µl
<hr/>	
Total reaction volume	125 µl

2. Značení buněčného cyklu

- naředit značku PO-PRO-1 v PBS (1:10 000)
- přidat 500 µl/vzorek
- inkubovat 30 min, RT ve tmě

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 DU-145

Cíl

- cílem experimentu je na živých buňkách značit povrchové molekuly CD24 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

Teorie

Buněčná linie DU-145 má epiteliální charakter a je odvozená z mozkové metastázy karcinomu prostaty.

Povrchové molekuly CD24 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 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

CD24

- povrchová molekula
- znak nediferencovaných hematopoetických buněk
- podílí se na buněčné adhezi, je receptorem pro P-selektin
- popsána zvýšená exprese u některých druhů rakovin - prsu, vaječníků, prostaty....

Materiál

- buněčné linie: DU-145
- roztok PBS+EDTA
- trypsin
- nesterilní médium se sérem – inaktivace trypsinu
- nesterilní FACS zkumavky, špičky, pipety
- PBS + 1% 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
CD24			
CD44			
viabilita			
IgG2a κ			
IgG2b			

Vzorky:

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

Postup:

1. příprava vzorků

- odsát médium
- oplach 3 ml PBS+EDTA – inkubace 3minuty/10 minut 37°C linie (suchý termostat)
- odsát PBS+EDTA
- přidat 0,5 ml trypsinu – inkubace 2 minuty 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
- 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 CD24 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 CD24

- všechny vzorky důkladně propipetovat
- inkubace 20 min v lednici
- po 20 min přidat ke všem vzorkům 1 ml PBS + 1% BSA
- stočit 200g 5 minut
- odsát supernatant

3. značení viability

- vzorky rozsuspendovat v 500 μ l PBS
- přidat Propidium iodid (1:200) a měřit

Výsledky

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

Imunofenotypová analýza linie DU 145 vyhodnocení výsledků: