

# CVIČENÍ Z ANALYTICKÉ CYTOMETRIE 2018/2019

16. – 18. 1. 2019, BFÚ

**Vyučující:** Mgr. Stanislav Drápela, Mgr. Radek Fedr, Mgr. Karel Souček PhD.

## Skupina A

**Arcidiacono, Orazio Angelo**, učo 478852 [MBBI], 1 kr.,

**Fagherazzi, Paolo**, učo 490520 [FYZZ], 1 kr.,

**Kocandová, Veronika**, učo 395010 [SPBI], 1 kr.,

**Krchová, Michaela**, učo 423226 [SPBI], 1 kr.,

**Kvokačková, Barbora**, učo 487629 [FYZZ], 1 kr.,

## Skupina B

**Nevědělová, Kateřina**, učo 451592 [SPBI], 1 kr.,

**Pícková, Markéta**, učo 411211 [FYZZ], 1 kr.,

**Vacek, Ondřej**, učo 423268 [FYZZ], 1 kr.,

**Váňa, Petr**, učo 108420 [SPBI], 1 kr.,

Den 1 (16.1.)	A)	B)
9 - 14 hod	Úvod Hela 8 Fucci cells - analýza na průtokovém cytometru a CM MLN-4924 treatment	
13- 18 hod		Úvod Hela 8 Fucci cells - analýza na průtokovém cytometru MLN-4924 treatment

Den 2 (17.1.)	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 (18.1.)	A)	B)
9 - 13	Sběr buněk, Imunofenotypizace, analýza na průtokovém cytometru	
13 - 17		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 CD24/CD44, viability u buněk DU 145

---

## Protokol 1

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

---

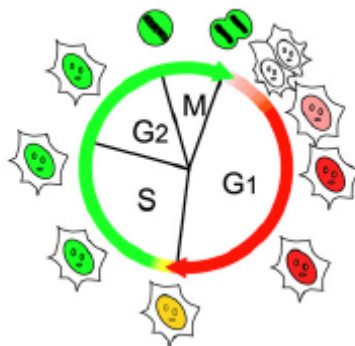
### Cíl

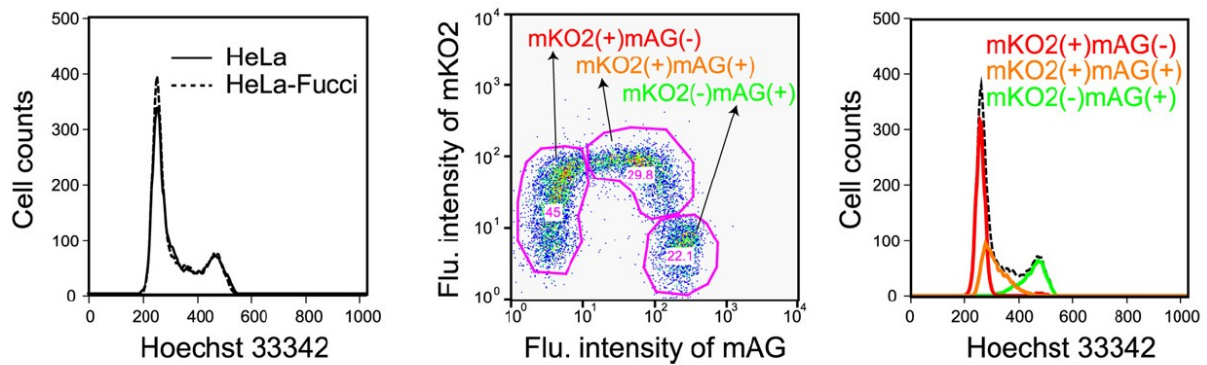
- cílem experimentu je seznámit se s modelovou buněčnou linií HeLa 8 Fucci, která umožňuje analýzu buněčného cyklu na živých buňkách bez potřeby fixace a značení
- tento experiment bude demonstrační – bude Vám názorně předvedeno, jak se zpracovávají buňky pro tento typ analýzy, což využijete při přípravě dalších experimentů během tohoto cvičení
- demonstrace měření proběhne na přístroji BD FACS Verse
- 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  $\text{Ca}^{2+}$  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 2 ml PBS+EDTA – 1-2 minuty nechat působit
- odsát PBS+EDTA
- přidat 0,5 ml trypsinu – nechat inkubovat v termostatu ( $37^{\circ}\text{C}$ ) 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  $\mu\text{l}$  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  $\mu$ M)

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

**Mitomycin** (zásobní koncentrace 1 mg/ml, výsledná koncentrace 1  $\mu$ 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 (Vcelk.=300uL)**

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

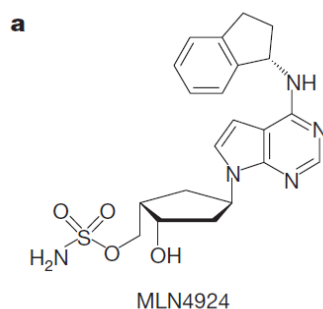
- cílem experimentu je ovlivnit buněčnou linii DU 145 inhibitorem neddylace (MLN-4924 – **0,11uM**) a vyšetřit účinky jeho působení
- působení MLN-4924 po dobu 24 hodin vede k deregulaci buněčného cyklu
- měření proběhne na přístroji BD FACS Verse

### Teorie

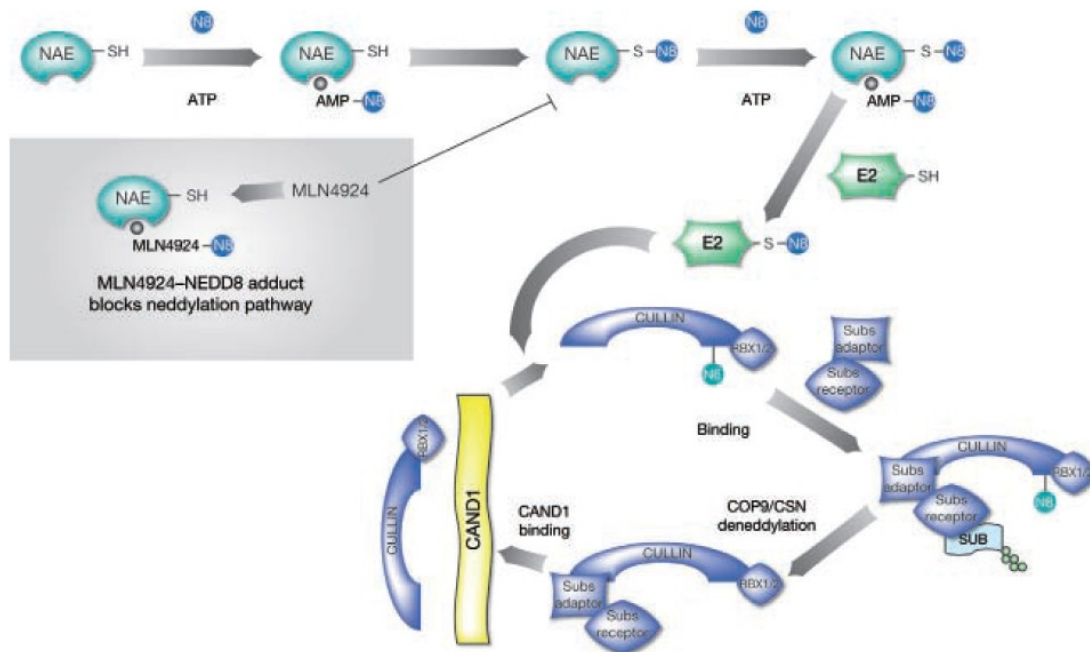
#### MLN-4924

- 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<sup>SCF</sup>, která se účastní regulace různých buněčných pochodů. Mezi její významné substráty patří proteiny řídící procesy, jako jsou buněčný cyklus (p27<sup>Kip1</sup>, p21<sup>cip1</sup>), buněčné replikace (Cdt1) a další.

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



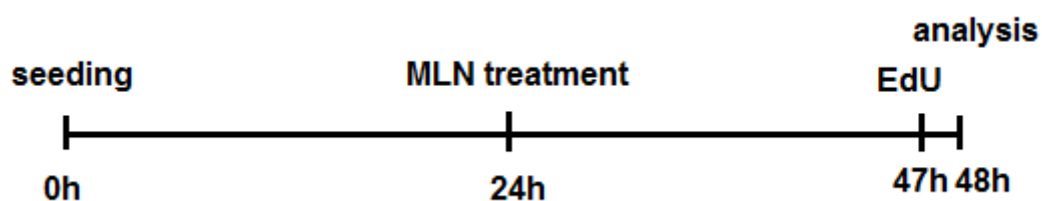
## Působení inhibitoru MLN-4924 na zastavení dráhy neddylace (Soucy et al., 2010)



## 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 – LD Green/LD Yellow

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

### 3. Fixace

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

### 4. Permeabilizace

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

### 5. 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  $\mu$ l 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 $\mu$ l
CuSO <sub>4</sub>	2,5 $\mu$ l
Fluorescent dye azide	0,625 $\mu$ l
Reaction buffer additive (diluted 10x)	12,5 $\mu$ l
<hr/>	
Total reaction volume	125 $\mu$ l



## **6. Značení buněčného cyklu**

- naředit značku PO-PRO-1 (s.s. 1mM) v PBS (1:10 000)
- přidat 500  $\mu$ l/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, diferenciaci, 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			1:20
CD44			1:100
viabilita			1:1000
IgG2a κ			1:20
IgG2b			1:100

## 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 in PBS
- zkumavku rozdělit na poloviny do dvou, určených pro měření na cytometru
- do každé zkumavky přidat 1 ml 1% BSA in PBS
- stočit 200g 5 minut
- odsát supernatant a přidat příslušné protilátky ředěné v 1% BSA in PBS

## **2. Značení protilátkami CD24 a CD44**

- do každého vzorku se přidat 100  $\mu$ l 1% BSA in PBS s příslušnými protilátkami nebo isotypovými kontrolami

### **Dopočítejte:**

#### **1. mikroskopická ISO – do 50 $\mu$ l 1% BSA in PBS přidáme**

$\mu$ l IgG

$\mu$ l IgG

#### **2. mikroskopická SP – do 50 $\mu$ l 1% BSA in PBS přidáme**

$\mu$ l CD44

$\mu$ 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  $\mu$ 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**