

MODERNÍ METODY BIOLOGICKÉHO VÝZKUMU

(Speciální cvičení)

Oddělení molekulární cytologie a cytometrie
Oddělení patofyziologie volných radikálů
Oddělení cytokinetiky

Biofyzikální ústav AV ČR v.v.i., Brno

ODDĚLENÍ CYTOKINETIKY

<http://www.ibp.cz/cs/oddeleni/cytokinetika/informace-o-oddeleni>



těsná spolupráce s Odd. fyziologie a imunologie živočichů ÚEB, PŘF MU

Oddělení Cytokinetiky

okruhy výzkumu

- Regulace cytokinetických parametrů lipidovými složkami výživy
- Interakce lipidů a cytokinů
- Působení protinádorových léčiv
- Role růstových faktorů v signalizaci nádorových buněk
- Molekulární a buněčné mechanismy toxicity organických látek

TKÁŇOVÉ (BUNĚČNÉ) KULTURY *IN VITRO*

živočišné, rostlinné, hmyzí, rybí atd.

Živočišné buněčné kultury (získané z různých tkání např. hlodavců jako je myš, krysa, křeček nebo opic, člověka)

PRIMÁRNÍ KULTURY - buňky získané přímo z živočišných tkání, kousek tkáně, nutná disociace (rozvolnění) buněk a odstranění nežádoucích částí, omezená doba kultivace, specifické požadavky

BUNĚČNÉ LINIE - adaptované na dlouhodobý růst *in vitro*

diploidní - karyotyp identický s živočišným druhem, z něhož byly izolovány většinou omezený počet pasáží, stárnou a hynou (omezený tzv. "life-span")

heteroploidní - karyotyp a často i morfologie odlišné, dlouhodobá kultivace

Udržují se tzv. pasážováním - určitý počet buněk se po určité době přenese do čerstvého živného prostředí

ADHERENTNÍ kultury - rostou přichyceny k pevnému podkladu (kultivační nádoby, mikronosiče)

SUSPENZNÍ kultury - nevyžadují podklad, rostou volně v médiu

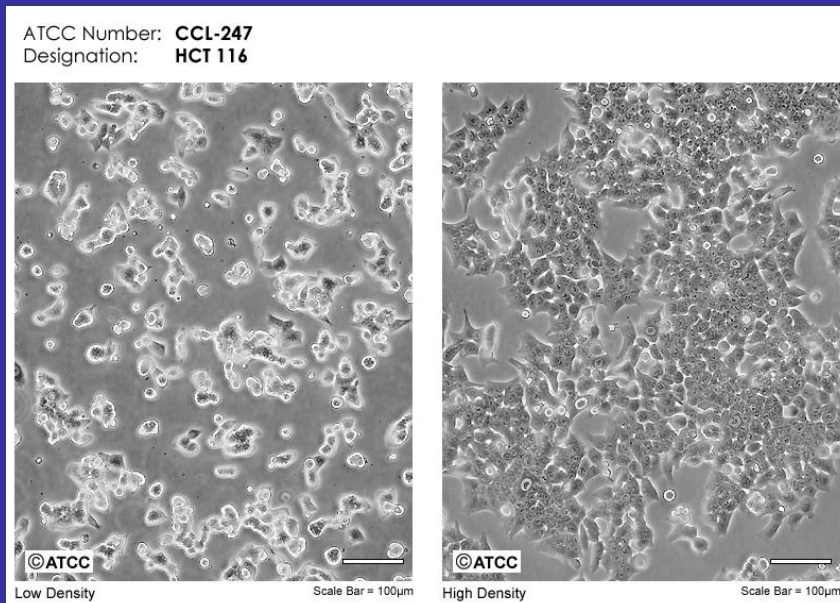
Hlavní komerční dodavatelé buněčných linií

- The American Type Culture Collection

www.atcc.com

- The European Collection of Cell Cultures

www.ecacc.org.uk



Organismus
Orgán a typ tkáně
Adherentní x neadherentní
Jaké medium a sérum
Způsob pasážování
Podrobnosti, literatura atd.

-
-
-

ECACC Cell Lines

Product	Product Number	Storage Conditions	Unit Size
<p>A2780 <i>Species:</i> human <i>Tissue:</i> ovary <i>Morphology:</i> epithelial <i>Subculture Methods:</i> Split sub-confluent cultures (70-80%) 1:3 to 1:6 i.e. seeding at $3\text{-}6 \times 10^4$ cells/cm² using 0.25% trypsin or trypsin/EDTA; 5% CO₂; 37 °C. <i>Medium:</i> RPMI 1640 + 2 mM L-Glutamine + 10% Fetal Bovine Serum (FBS). <i>Karyotype:</i> Not specified <i>Description:</i> The A2780 human ovarian cancer cell line was established from tumor tissue from an untreated patient. Cells grow as a monolayer and in suspension in spinner cultures. A2780 is the parent line to the cisplatin resistant cell line A2780 cis (ECACC catalog no. 93112517) and the adriamycin resistant cell line A2780 ADR (ECACC catalog no. 93112520). Shipped on dry ice</p>	93112519	-196°C	1 vial
<p>A2780cis <i>Species:</i> human <i>Tissue:</i> ovary <i>Morphology:</i> epithelial <i>Subculture Methods:</i> Split sub-confluent cultures (70-80%) 1:5 to 1:20 i.e. seeding at 1×10^3 to 1×10^4 cells/cm² using 0.25% trypsin or trypsin/EDTA; 5% CO₂; 37 °C. Cells will attach slowly after resuscitation and take up to 7 days to reach confluency. Recommendation: resuscitate cells in media without cisplatin. Add after subculture of attached cells. <i>Medium:</i> RPMI 1640 + 2 mM L-Glutamine + 1 µm cisplatinum + 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (cisplatinum only necessary every 2-3 passages). <i>Karyotype:</i> Modal no. 46 <i>Description:</i> This cisplatin-resistant cell line has been developed by chronic exposure of the parent cisplatin-sensitive A2780 cell line (ECACC catalog no. 93112519) to increasing concentrations of cisplatin. A2780cis is cross-resistant to melphalan, adriamycin and irradiation. An increased ability to repair DNA damage as well as cytogenetic abnormalities has been observed. In order to retain resistance cisplatinum has to be added to the media every 2-3 passages. In addition to this matched pair of drug-sensitive/resistant cell lines an adriamycin-resistant cell line, A2780adr (ECACC catalog no. 93112520), has been isolated from the same parental line A2780. Shipped on dry ice</p>	93112517	-196°C	1 vial
<p>A431 <i>Species:</i> human <i>Tissue:</i> skin <i>Morphology:</i> epithelial <i>Subculture Methods:</i> Split sub-confluent cultures (70-80%) 1:3 to 1:6 i.e. seeding at $2\text{-}4 \times 10^4$ cells/cm² using 0.25% trypsin or trypsin/EDTA; 5% CO₂; 37 °C. <i>Medium:</i> EMEM (EBSS) + 2 mM L-Glutamine + 1% Non Essential Amino Acids (NEAA) + 10% Fetal Bovine Serum (FBS). <i>Karyotype:</i> Hypertriploid <i>Description:</i> Derived from an 85 year old female with epidermal carcinoma. The cells carry large numbers of EGF binding sites and is an indicator cell for anti-TGF binding. Shipped on dry ice</p>	85090402	-196°C	1 vial

KULTIVACE BUNĚK

Speciální plastické lahvičky, misky různé velikosti – sterilní

Kultivace v živném médiu podle růstových a metabolických požadavků buněk v termostatu s řízenou atmosférou - 37⁰ C, 95% vlhkost, 5% CO₂.

Nutná přísná sterilita!!!! - sterilní roztoky, plastik. nádoby, sklo, pipety atd., sterilizace autoklávem (120 °C), nebo horkým vzduchem (180 °C)

Práce ve **sterilním laminárním boxu** (typ BioHazard – laminární proudění vzduchu, filtry -chrání i uživatele - práce s nebezpečnými viry apod.)

Základní médium je balancované chemické prostředí - zdroj pro energii a biosyntézu.

Doplňky: a) nedefinované složky - **zvířecí séra** (hovězí, telecí, fetální, koňské)

b) definované složky (růstové faktory, hormony atd.) - specializované podle typu buněk

Živočišná séra

nejdražší součást média - ze zvířat z ekologicky málo poškozených oblastí vhodné definované náhrady sér

Antibiotika a antimykotika

penicilin + streptomycin, gentamicin (i proti mykoplazmatům)

ZPŮSOB KULTIVACE

Suspenzní buňky - po spočítání buněk se část supenze doplní čerstvým kultivačním médiem


Adherentní (přisedlé) buňky - uvolnění od podkladu a rozvolnění shluků enzymy např. trypsinem, spočítání buněk, vysetí do čerstvého média. Některé buňky vyžadují tzv. feeder layer - vrstvu buněk inaktivovaných zářením nebo chemicky sloužící jako podklad pro růst specifických typů buněk

Kultivace ve sterilních plastických lahvičkách se šroubovacími uzávěry nebo v miskách různé velikosti.

Velkokapacitní kultivace - na mikročásticích ve velkých kontejnerech - automatická výměna média

Uchovávání buněk v hlubokozmrazeném stavu (-180 °C - mraznice, tekutý dusík) ve speciálních ampulích a kontejnerech několik let. Nutné kryoprotektivum (proti tvorbě krystalů vody) - většinou dimetylsulfoxid nebo glycerol. Zmrazování je pomalé (řízené po 1 °C), rozmrazování rychlé - ponoření ampulí do lázně 37 °C.

Kultivace buněk

- Udržování kultury – pasážování
 - určitý počet buněk se po určité době přenese do čerstvého živného prostředí
 - Adherentní
 - odsátí média
 - oplach EDTA/PBS
 - trypsin
 - Neadherentní
 - část kultury se přenese do nového média
- 

VYUŽITÍ BUNĚČNÝCH KULTUR

Buněčné kultury se staly nástrojem pro detekci a objasňování mechanismů účinků buněčných regulátorů a genů, které určují individuální aspekty chování buněk.

Tato technologie umožnila pokrok ve virologii, somatické buněčné genetice, endokrinologii, toxikologii, farmakologii, hematologii, imunologii i ve výzkumu karcinogeneze a stala se významným nástrojem vývojové biologie, komplexní tkáňové fyziologie a průmyslové výroby specifických buněčných produktů.

Výhody:

- lze sledovat účinky různých faktorů a mechanismy studovaných dějů bez nežádoucí interakce s buňkami jiných typů nebo tkání, účinku humorálních faktorů i celkového stavu organismu
- lze získat rozsáhlé populace buněk shodných vlastností a sledovat jejich reakce v kontrolovatelných podmínkách
- homogenita, reprodukovatelnost a množství materiálu umožňuje studovat a odhalovat základní mechanismy vybraných aspektů chování těchto buněk
- specifické buněčné kultury lze využít k produkci a získávání množství důležitých biologických látek (enzymy, hormony) - hybridomy
- etické hledisko - systém omezuje využívání laboratorních zvířat

Nevýhody:

- umělý zjednodušený systém
- poznatky nelze beze zbytku aplikovat na podmínky *in vivo*

Buňky nezralé (nediferencované nebo částečně diferencované)

- ▶ buňky kmenové (toti- nebo pluripotentní)
- ▶ buňky progenitorové

Jsou schopny sebeobnovy, mohou se dále dělit a diferencovat do zralejších stádií.

Charakteristické pro embryonální stadium a v dospělém organismu pro některé tkáně (krevní tkáň, střevní a kožní epitel, zárodečné buňky).

Schopné kultivace a dozrávání *in vitro* ve specifických podmínkách.

Buňky zralé - diferencované

Rozrůzněné podle typu tkáně se specifickými vlastnostmi. Nejsou schopny se dále dělit, stárnou a umírají apoptózou (nervové, jaterní buňky apod.)

Schopné kultivace *in vitro* omezený počet pasáží (diploidní stav) nebo se z nich vytvářejí heteroploidní permanentní linie.

Buněčné populace *in vitro*

Imortalizované – z normální tkáně i nádorové linie

asynchronní - buňky se nacházejí v různých fázích buněčného cyklu - přirozený stav

synchronní - buňky jsou ve stejné fázi buněčného cyklu - uměle navozené různými chemickými látkami, homogenní populace, stejné reakce

Využití:

při výzkumu dějů vázaných na určitou fázi buněčného cyklu
v praxi v nádorové terapii (léčba cytostatiky)

KREVNÍ BUŇKY

primární - z krve nebo kostní dřeně člověka a laboratorních zvířat
detekce jednotlivých typů a počtů na hemocytometru
kultivace progenitorů *in vitro* - BFU-E, CFU-S, GM-CFU - vyžadují specifické podmínky a specifické růstové faktory (erythropetin, GM-CSF, IL-3 apod.)
Využití při transplantacích – namnožení buněk

permanentní linie - z krve leukemických pacientů nebo lab. zvířat
HL-60 - lidská promyelocytární leukémie - promyelocyty schopné diferencovat *in vitro* - bipotentní, deficientní v p53
kys. retinová (RA), DMSO - diferenciaci do granulocytů
vit. D3., forbol ester (TPA), butyrát - diferenciaci do monocytů-makrofágů
Vhodný model pro

- ▶ studium regulace proliferace, diferenciaci a apoptózy myeloidních buněk
- ▶ studium příčin leukemických poruch
- ▶ studium účinků kyseliny arachidonové (AA), eikosanoidů a cytokinů (TGF- β a TNF α)

EPITELIÁLNÍ BUŇKY

z lidské tkáně kolonu - linie HT29, CaCO2, HCT116 - nádorové buňky , FHC – fetální střevo, NCM460 – nenádorové. Schopnost diferencovat *in vitro* po působení butyrátu sodného (NaBt):

- ▶ růst aktivity alkalické fosfatázy
- ▶ morfologické změny doprovázené polymerizací F-aktinu
- ▶ zvýšení exprese adhezivních molekul - E-kadherinu

Vhodný model

- ▶ pro studium regulace prolif., dif. a apoptózy epitelu střeva a mechanismů vzniku nádorů kolonu

z lidské tkáně prostaty – nádorové i nenádorové linie

- ▶ pro studium účinků nenasyc. MK a cytokinů

Pro ekotoxikologické studie jsou vhodné

- ▶ **játerní buňky:** primární hepatocyty (kryší), linie nádorových buněk hepatomu (lidského nebo hlodavců), kryší játerní fibroblasty
- ▶ **geneticky modifikované buněčné linie:**

Vnesený gen s luciferázou - intenzita odráží aktivaci příslušných vnitrobuněčných receptorů

pro detekci dioxinové aktivity (AhR), estrogenní aktivity (ER) či aktivace PPAR (peroxisome proliferator - activated receptors) studovaných látek a je detekována na luminometru.

Linie transfekované různými zkoumanými geny nebo je postrádající („knock-out“)

VYBAVENÍ LABORATOŘE PRO KULTIVACE BUNĚK

- ▶ **Sterilní prostředí** – speciální plastik, sklo, pipety (skleněné, automatické -různé objemy autokláv, horkovzdušná sterilizace (130 oC)
 - ▶ **Klimatizace, UV světlo**
 - ▶ **Destilační přístroj** na superčistou vodu
 - ▶ **Laminární box (Biohazard)** – laminární proudění vzduchu, filtry – sterilní prostředí pro práci, ochrana při práci
 - ▶ **Inkubátor** – 37 oC, 5% CO₂, 95% vlhkost
 - ▶ **Počítač částic** (buněk)
 - ▶ **Inverzní mikroskop**
 - ▶ **Centrifugy**
-

- ▶ **ELISA reader**
- ▶ **Cytocentrifuga**
- ▶ **Fluorescenční mikroskop**
- ▶ **Vysokoobrátková chlazená centrifuga** (výměnné rotory)
- ▶ **Průtokový cytometr** (FACSCalibur, Beckton Dickinson)

Několik laserů, stanovení několika parametrů současně u rozsáhlých buněčných populací

FACSVerse

- ▶ **Fluostar** – multifunkční přístroj – spektrofotometr, fluorimetr, chemiluminometr
- ▶ **Zařízení pro molekulární biologii**
- ▶ **Výkonná výpočetní technika**

„**Core facilities**“ (**Laboratoř molekulární biofyziky**)

FACS Aria Sorb (BD) – vysokorychlostní buněčný sorter

Unikátní konfokální mikroskop Leica s vysokým rozlišením

Průtoková cytometrie

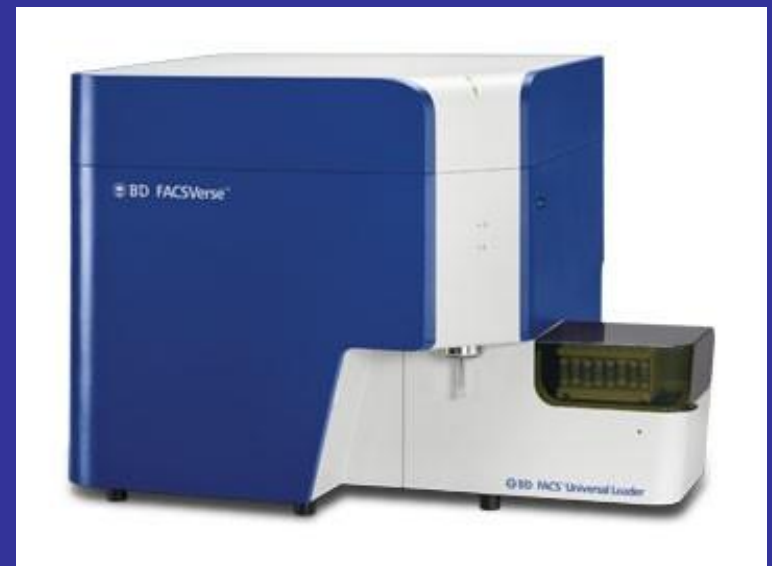
FACSCalibur



Jedna z hlavních používaných metodologií.

Měření řady buněčných parametrů v krátkém čase u 10 tis. buněk.

FACSCalibur
FACSVerse



MÉDIA

Řada druhů podle typu buněk (Eaglovo, Dulbecco, RPMI-1640), dodávají se kompletní tekutá, koncentráty, prášková - skladování 40 C.

Nutná kvalitní apyrogenní voda o vodivosti 0,2-0-1 μS a chemikálie nejvyšší čistoty.
Nutná sterilizace přes filtr 0,2 μm .

Základní složky:

Glukóza (nebo galaktóza) a glutamin - zdroj energie a uhlíku

Aminokyseliny - zdroj energie a dusíku

Vitamíny - kofaktory pro enzymatické reakce

Lipidy - esenciální mastné kyseliny, cholesterol, etanolamin apod.

Anorganické soli - zajišťují osmolalitu, tlumí aciditu, nutriční faktor

Pufrační solné směsi - Earlov roztok (fyziolog. roztok s vysokým obsahem NaHCO_3) - kultivace v řízené atmosféře s regulovaným obsahem 5% CO_2 zabraňuje rozpadu a alkalizaci média.

Požadované pH většinou 7,2 - 7,4 - úprava HCl a NaOH

Otevřený systém - Petriho misky nebo lahvičky s povoleným uzávěren

Optická kontrola - indikátor fenolová červeň

Organické pufrční systémy - HEPES 20mM

Cell Culture Media

Classic Media: Media Formulations

RPMI-1640 Medium

Component	R 0883 [1x] g/L	R 1145 [10x] g/L	R 1383 g/L	R 6504 g/L	R 8758 [1x] g/L
INORGANIC SALTS					
Calcium Nitrate • 4H ₂ O	0.1	1.0	0.1	0.1	0.1
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.04884	0.04884	0.04884	0.04884	0.04884
Potassium Chloride	0.4	4.0	0.4	0.4	0.4
Sodium Bicarbonate	2.0	—	6.0	—	2.0
Sodium Chloride	6.0	60.0	6.8	6.0	6.0
Sodium Phosphate Dibasic (anhydrous)	0.8	8.0	0.8	0.8	0.8
AMINO ACIDS					
L-Arginine	0.2	2.0	0.2	0.2	0.2
L-Asparagine (anhydrous)	0.05	0.5	0.05	0.05	0.05
L-Aspartic Acid	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
L-Cystine • 2HCl	0.0652	0.652	0.0652	0.0652	0.0652
L-Glutamic Acid	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
L-Glutamine	—	—	0.3	0.3	0.3
Glycine	0.01	0.1	0.01	0.01	0.01
L-Histidine	0.015	0.15	0.015	0.015	0.015
Hydroxy-L-Proline	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
L-Isoleucine	0.05	0.5	0.05	0.05	0.05
L-Leucine	0.05	0.5	0.05	0.05	0.05
L-Lysine • HCl	0.04	0.4	0.04	0.04	0.04
L-Methionine	0.015	0.15	0.015	0.015	0.015
L-Phenylalanine	0.015	0.15	0.015	0.015	0.015
L-Proline	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
L-Serine	0.03	0.3	0.03	0.03	0.03
L-Threonine	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
L-Tryptophan	0.005	0.05	0.005	0.005	0.005
L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.02883	0.2883	0.02883	0.02883	0.02883
L-Valine	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
VITAMINS					
D-Biotin	0.0002	0.002	0.0002	0.0002	0.0002
Choline Chloride	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
Folic Acid	0.001	—	0.001	0.001	0.001
myo-Inositol	0.035	0.35	0.035	0.035	0.035
Niacinamide	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001
p-Amino Benzoic Acid	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.00025	0.0025	0.00025	0.00025	0.00025
Pyridoxine • HCl	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001
Riboflavin	0.0002	0.002	0.0002	0.0002	0.0002
Thiamine • HCl	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001
Vitamin B ₁₂	0.000005	0.00005	0.000005	0.000005	0.000005
OTHER					
D-Glucose	2.0	20.0	—	2.0	2.0
Glutathione (reduced)	0.001	0.01	0.001	0.001	0.001
Phenol Red • Na	0.0053	0.053	0.0053	0.0053	0.0053
ADD					
L-Glutamine	0.3	0.3 at 1x	—	—	—
Sodium Bicarbonate	—	2.0 at 1x	2.0	2.0	—

Cell Culture Media

Classic Media: Media Formulations

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DME)

Component	D 5523 g/L	D 5546 [1x] g/L	D 5648 g/L	D 5671 [1x] g/L	D 5796 [1x] g/L
INORGANIC SALTS					
Calcium Chloride • 2H ₂ O	0.265	0.265	0.265	0.265	0.265
Ferric Nitrate • 9H ₂ O	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767	0.09767	0.09767	0.09767	0.09767
Potassium Chloride	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Sodium Bicarbonate	—	—	3.7	—	3.7
Sodium Chloride	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	—	0.109	0.109	0.109	0.109
AMINO ACIDS					
L-Arginine • HCl	0.084	0.084	0.084	0.084	0.084
L-Cystine • 2HCl	0.0626	0.0626	0.0626	0.0626	0.0626
L-Glutamine	0.584	0.584	—	0.584	0.584
Glycine	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042
L-Isoleucine	0.105	0.105	0.105	0.105	0.105
L-Leucine	0.105	0.105	0.105	0.105	0.105
L-Lysine • HCl	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146
L-Methionine	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
L-Phenylalanine	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066
L-Serine	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042
L-Threonine	0.095	0.095	0.095	0.095	0.095
L-Tryptophan	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016
L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.10379	0.10379	0.10379	0.10379	0.10379
L-Valine	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094
VITAMINS					
Choline Chloride	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
Folic Acid	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
myo-Inositol	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072
Niacinamide	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
Pyridoxal • HCl	0.004	0.004	—	0.004	—
Pyridoxine • HCl	—	—	0.004	—	0.004
Riboflavin	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004
Thiamine • HCl	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
OTHER					
D-Glucose	4.5	1.0	1.0	4.5	4.5
Phenol Red • Na	0.0159	0.0159	0.0159	0.0159	0.0159
Pyruvic Acid • Na	—	0.11	0.11	—	—
ADD					
L-Glutamine	—	—	0.584	—	—
Sodium Bicarbonate	3.7	3.7	—	3.7	—
Sodium Phosphate	0.109	—	—	—	—

Nejčastěji používané fetální bovinní (telecí) sérum

Animal Sera

Product Testing for Fetal Bovine Sera

	F 2442	F 0643	F 3885	F 4135	F 3018	F 0392
SOURCE	bovine	bovine	bovine	bovine	bovine	bovine
COUNTRY	USA	USA	USA	USA	USA	USA
STERILITY	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PERFORMANCE	✓	✓	✓	✓	✓	✓
CLONING ASSAY	✓	✓	✓	✓	✓	✓
VIRUS (raw material)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
MYCOPLASMA	✓	✓	✓	✓	✓	✓
BACTERIOPHAGE	✓	N/A	✓	✓	N/A	N/A
ENDOTOXIN (EU/ml)	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10	≤10
HEMOGLOBIN (mg %)	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20	≤20
TOTAL PROTEIN (g %)	3.0-4.5	3.0-4.5	3.0-4.5	3.0-4.5	3.0-4.5	3.0-4.5
ELECTROPHORECTIC PATTERN	✓	✓	✓	✓	✓	✓
IgG	✓	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
HORMONE TESTING	Report result	N/A	Report result	Report result	N/A	N/A
pH at RT	6.7-8.0	6.7-8.0	6.7-8.0	6.7-8.0	6.7-8.0	6.7-8.0
OSMOLALITY (mOsm/Kg H ₂ O)	260-340	260-340	260-340	260-340	260-340	260-340
CHEMICAL ANALYSIS	✓	N/A	✓	✓	N/A	N/A

✓ — Indicates testing is performed and product meets specification.

Metodologické přístupy



DETEKCE PROLIFERAČNÍ AKTIVITY BUNĚK

Růst buněk

- počty buněk (Bürkerova komůrka, Coulter Counter, Casy) v časových intervalech od vysetí určitého počtu - růstové křivky
- spektrofotometrické stanovení celkových proteinů - Amido black
- doba zdvojení populace (doubling time),
- generační doba (trvání buněčného cyklu)

Metabolicky aktivní část populace

- izotopové metody - stanovení podílu populace syntetizující DNA - inkorporace ³H-tymidinu do DNA - detekce hladiny radioaktivity autoradiograficky nebo scintilačně – detektor β záření
- spektrofotometrické metody - inkorporace bromdeoxyuridinu - detekce pomocí navázané protilátky - ELISA reader nebo průtoková cytometrie (FCM)
- metoda redukce MTT na formazan - založeno na aktivitě mitochondrií

Stanovení mitotického indexu

mikroskopické stanovení podílu buněk v mitóze na řezech z tkání či buněčných preparátech

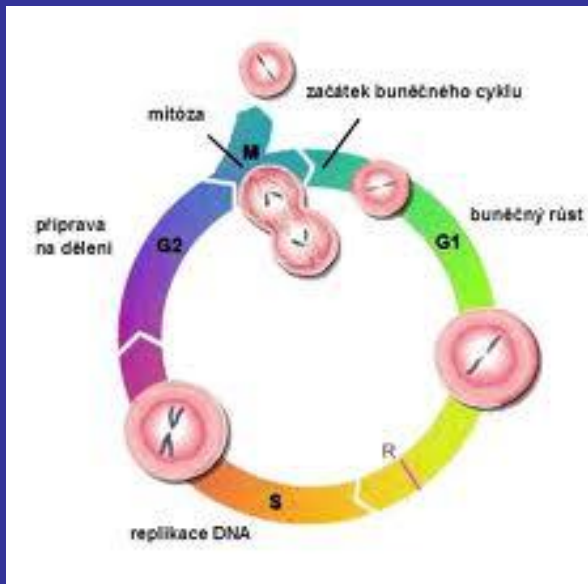
Testy cytotoxicity

- MTT (WST) test
- Stanovení viability - vitální barvení trypanovou modří nebo eosinem propidium jodid (flow cytometrie)

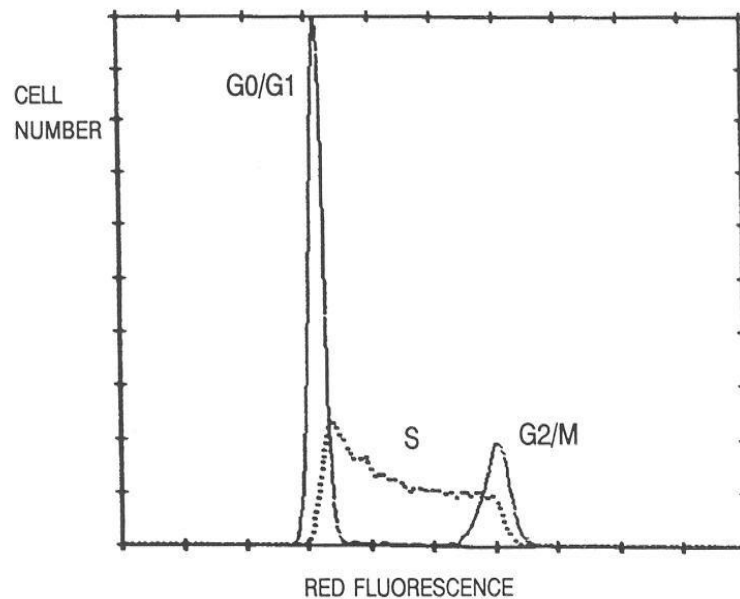
Detekce počtu buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu

Flow cytometrie - procento buněk v G0/G1, S a G2/M fázi (propidium iodid)

Stanovení délky fází buněčného cyklu - autoradiografické metody, BrDU

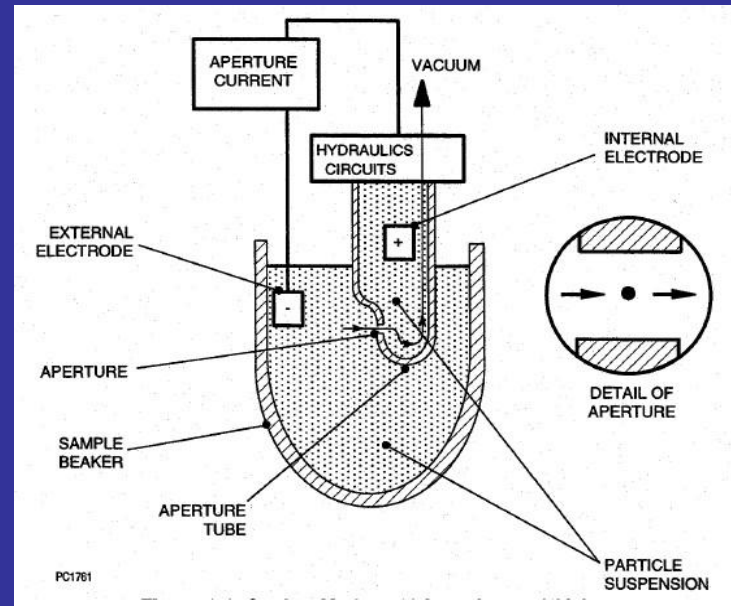


7: Analysis of DNA—general methods



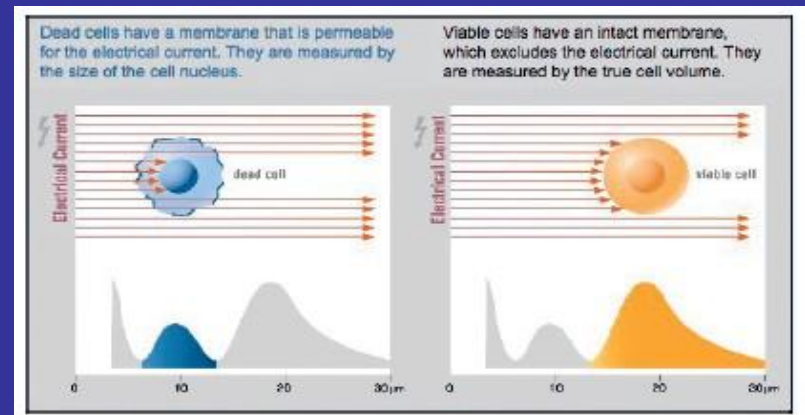
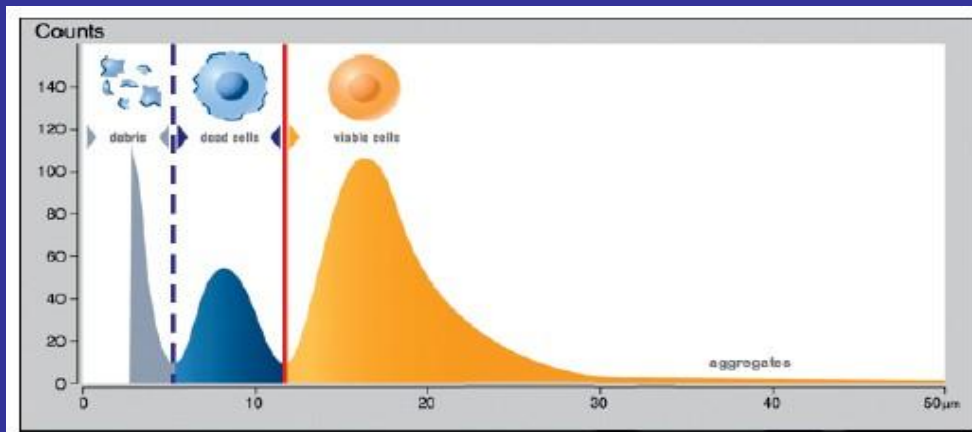
POČTY BUNĚK

- **Coulter Counter**
- Mezi elektrodou uvnitř trubice a zevní elektrodou protéká elektrický proud
 - Buňka procházející mezi elektrodami přerušuje tok proudu a vede k změně napětí
 - Změna napětí je úměrná objemu částice
 - Změna napětí musí mít určitou prahovou hodnotu, aby byla započítána
 - Suspenze buněk v elektrolytu je nasávána do trubice s malým otvorem



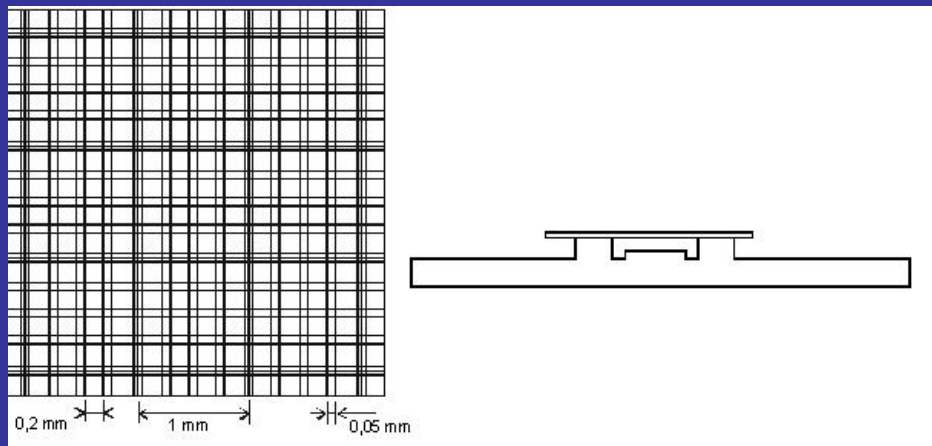
CASY

- Základní princip stejný jako u Coulter Counter
- Navíc analýza
 - Viability buněk
 - Objemu buněk
 - Agregátů
 - Debris - „rozbitých buněk“



Stanovení proliferace – další možnosti

- Bürkerova komůrka
 - nejjednodušší metoda
 - počítání pod mikroskopem



TRYPAN BLUE

**DIAGRAM I
STANDARD HEMOCYTOMETER CHAMBER**

The diagram shows a grid with a central circle. A 1 mm corner square is highlighted in the top right, and a middle square is highlighted in the center. The grid is used for counting cells.

The circle indicates the approximate area covered at 100x microscope magnification (10x ocular and 10x objective). Include cells on top and left touching middle line (O). Do not count cells touching middle line at bottom and right (Ø). Count 4 corner squares and middle square in both chambers (one chamber represented here).

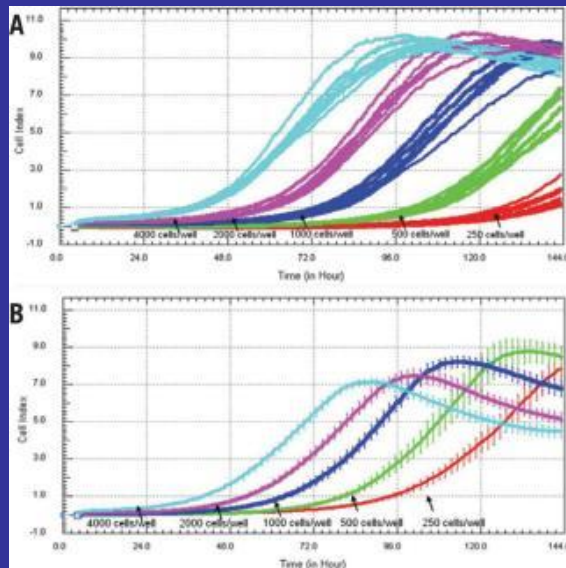
**DIAGRAM II
CORNER SQUARE (ENLARGEMENT)**

The diagram shows a 4x4 grid with circles at the corners and middle of the top and left sides. The circles represent cells to be counted.

Count cells on top and left touching middle line (O). Do not count cells touching middle line at bottom and right (Ø).

xCELLigence System

- Real-Time Cell Analyzer
- Měří tzv. cell index (růst, adheze, tvar buněk)

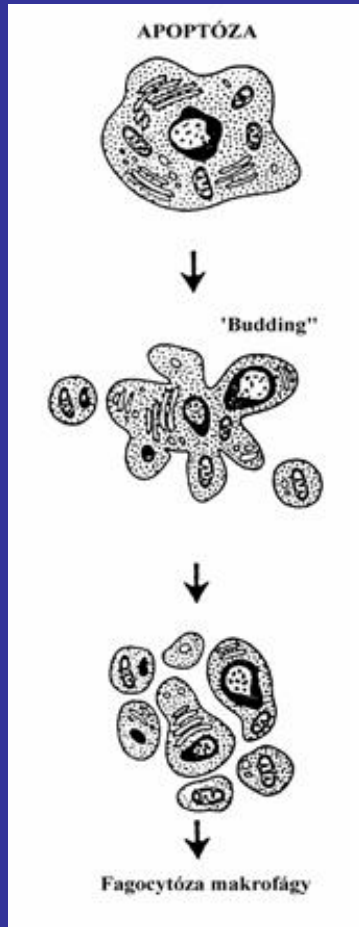


DETEKCE BUNĚČNÉ SMRTI

apoptózy/nekrózy/autofagie

- Morfologicky – světelný mikroskop
- Fluorescenční mikroskop
- Průtoková (flow) cytometrie
(TUNEL- barvení konců fragmentů DNA,
AnnexinV, subG0/G1 populace)
- Stanovení specifických markerů (proteinů –
western blotting) těchto procesů

Stanovení apoptózy



Aktivace kaspáz

Kondenzace buňky a organel

Kondenzace chromatinu

Ztráta asymetrie buněčné membrány

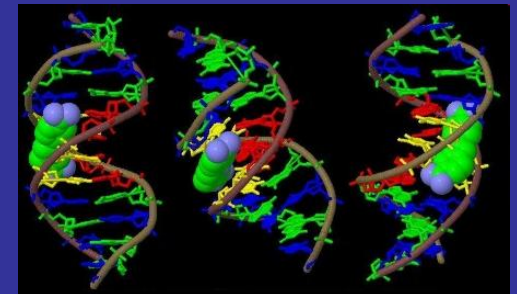
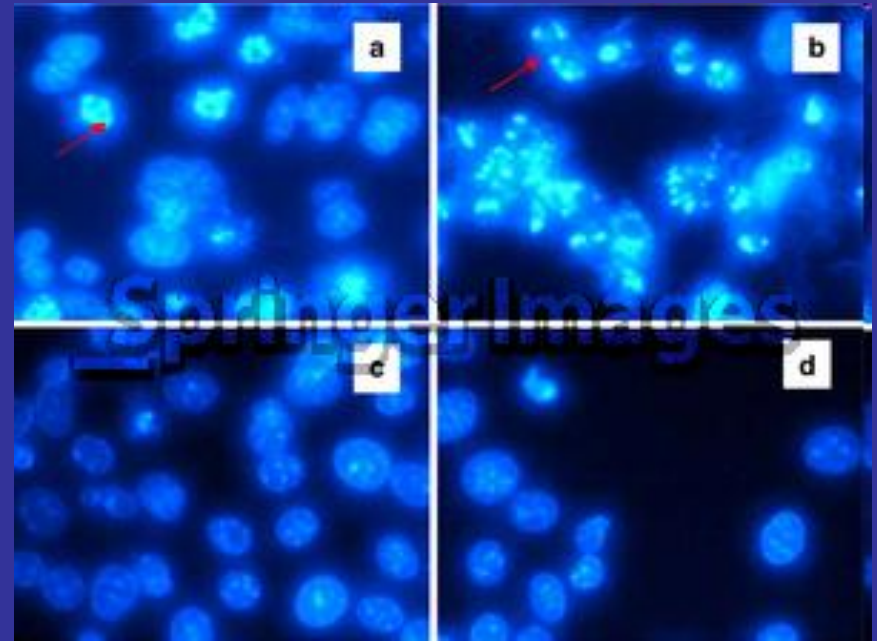
Zachování integrity buněčné membrány

Tvorba „bodies“ a jejich fagocytóza
okolními buňkami

Stanovení apoptózy na různých úrovních procesu...(aktivace kaspáz, uvolnění cytochromu c, štěpení cílových proteinů, DNA)

Morfologická detekce apoptózy barvení DAPI

- Během apoptózy – fragmentace DNA ~ 200 PB
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) prochází neporušenou cytoplazmatickou membránou
- DAPI se vmezeřuje do DNA – typické „rosety“ pod fluorescenčním mikroskopem
- Absorpční maximum ~358 nm (ultrafialová)
- Emisní maximum ~461 nm (modrá)



Stanovení apoptózy

další možnosti

- Substráty kaspáz

 - detekce štěpení PARP (poly-ADP ribose polymerase),
detekce exprese proteinů z rodiny Bcl-2 (western blot)

- Aktivita (štěpení) kaspázy-3 (-8, -9)

- Mitochondriální funkce

 - uvolňování cytochromu c (FACS)

 - pokles potenciálu mitochondriální membrány (TMRE,
Mitotracker; FACS)

- TUNEL

 - sledování fragmentace DNA (fluorescenční mikroskop,
FACS)

- Annexin V

 - váže se na fosfatidylseriny v membráně, které při
apoptóze mění orientaci

Jakou metodu použít?

- více než jednu
- principiálně odlišnou
- v závislosti na buněčném typu

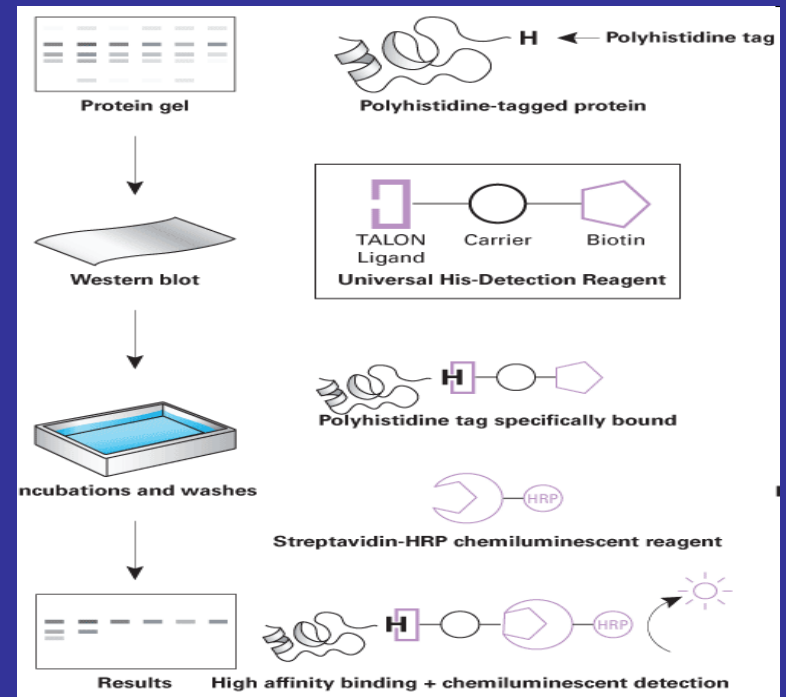
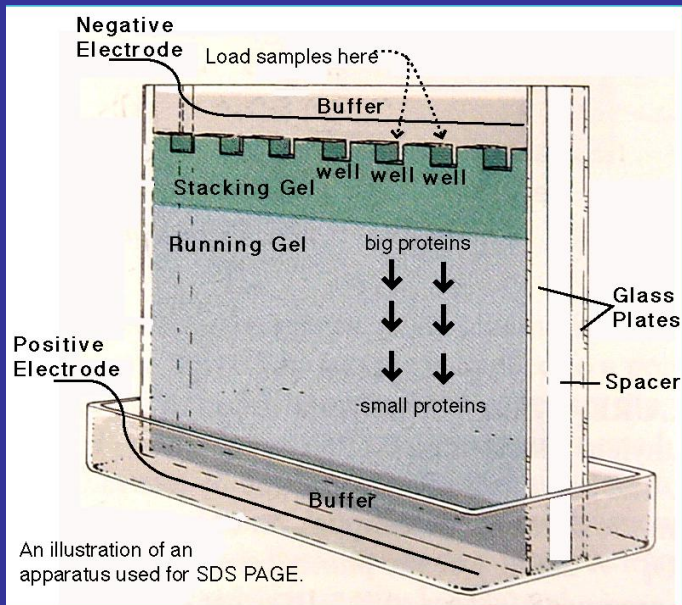
Mechanismy buněčné smrti, význam, metody – RNDr. Alena Hyršlová, Ph.D. (Bi8870)

Analytická cytometrie – Mgr. K. Souček, PhD. (Bi9393)

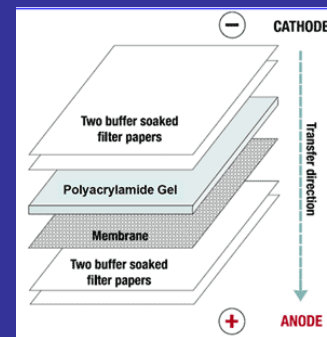
Fyziologie buněčných systémů (Bi7070), prof. A. Kozubík
Genotoxicita a karcinogeneze (Bi 8110), prof. J. Hofmanová
Zdravotní rizika (Bi3871), prof. J. Hofmanová
Molekulární fyziologie živočichů (Bi651)

SDS-PAGE gelová elektroforéza a Western blotting

- SDS-PAGE (polyakrylamid) elektroforéza – separace proteinů na základě jejich hmotnosti
- SDS denaturuje proteiny a obalí je – proteiny mají negativní náboj (úměrný jejich velikosti)
- Proteiny v gelu migrují ke kladné elektrodě



- Přenos vzorků z gelu na membránu a následná identifikace proteinů pomocí vazby protilátek
- Membrány PVDF, nitrocelulózo



DIFERENCIACE

- Rozrůznění buněk do odlišných typů (při vývoji, v dospělosti v některých tkáních – krevní, epiteliální)

Při diferenciaci

- se mění morfologie buněk
- stoupá aktivita specifických enzymů (např. alkalické fosfatázy)
- stoupá exprese specif. povrchových antigenů (CD11b, CD 14)
- vzniká schopnost fagocytózy a produkce kyslíkových radikálů (měření redukce NBT nebo chemiluminiscenčně)

Stanovení diferenciace

Změna enzymového vybavení buněk

- **Nespecifické esterázy** - Hydrolýza α -naftyl acetátu esterázami vede k vzniku hnědého zbarvení
- **Detekce myeloperoxidázy** - myeloperoxidáza štěpí peroxid kyslíku za vzniku kyslíkových radikálů, které pak oxidují o-dianisidin za vzniku barevných látek chinonového charakteru
- **Detekce alkalické fosfatázy** - alkalická fosfatáza štěpí bezbarvý substrát 4-p-nitrofenyl fosfát za vzniku žlutého zbarvení

Produkce reaktivních kyslíkových metabolitů (ROS) při oxidativním vzplanutí (monocyty)

- **Redukce NBT (nitroblue tetrazolium)** - NBT je redukován superoxidem produkovaným monocytami. Redukce vede k změně barvy ze žluté na modrou
- **Oxidace/redukce luminolu** - ROS produkované monocytami oxidují luminol při redukci – chemiluminiscence

Změna povrchových molekul

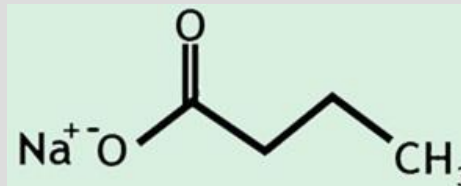
- **Exprese CD11b** (R pro C3b složku komplementu) a **CD14** (vazba LPS)

Změna morfologie Zvýšená adheze, pseudopodia, zástava proliferace



Psyllium

Butyrát sodný



MASTNÉ KYSELINY S KRÁTKÝM ŘETĚZCEM

Anaerobní mikrobiální fermentace **VLÁKNINY**

Fyziologický význam pro zdravou střevní tkáň

Specifické působení na

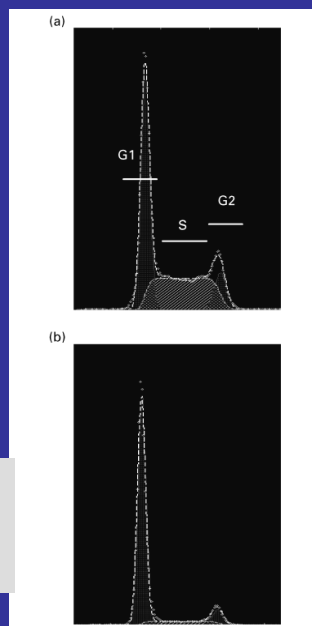
Normální kolonocyty

- zdroj energie
- zvýšená proliferace
- pokles apoptózy

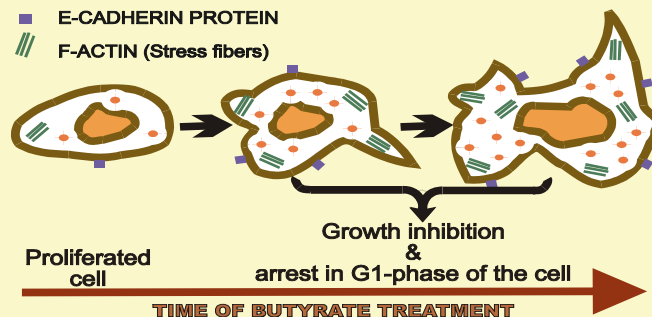
**Prevence a terapie
NÁDORŮ TLUSTÉHO STŘEVA ???**

Nádorové buňky kolonu

- snížená proliferace
 - indukce diferenciac
 - indukce apoptózy
 - změny genové exprese
- inhibitor histondeacetyláz**



- ALKALINE PHOSPHATASE
- E-CADHERIN PROTEIN
- /// F-ACTIN (Stress fibers)



Sřevní epitel - přechod adenom x karcinom

Buněčné linie

normální epitel
NCM460

fetální colon
FHC

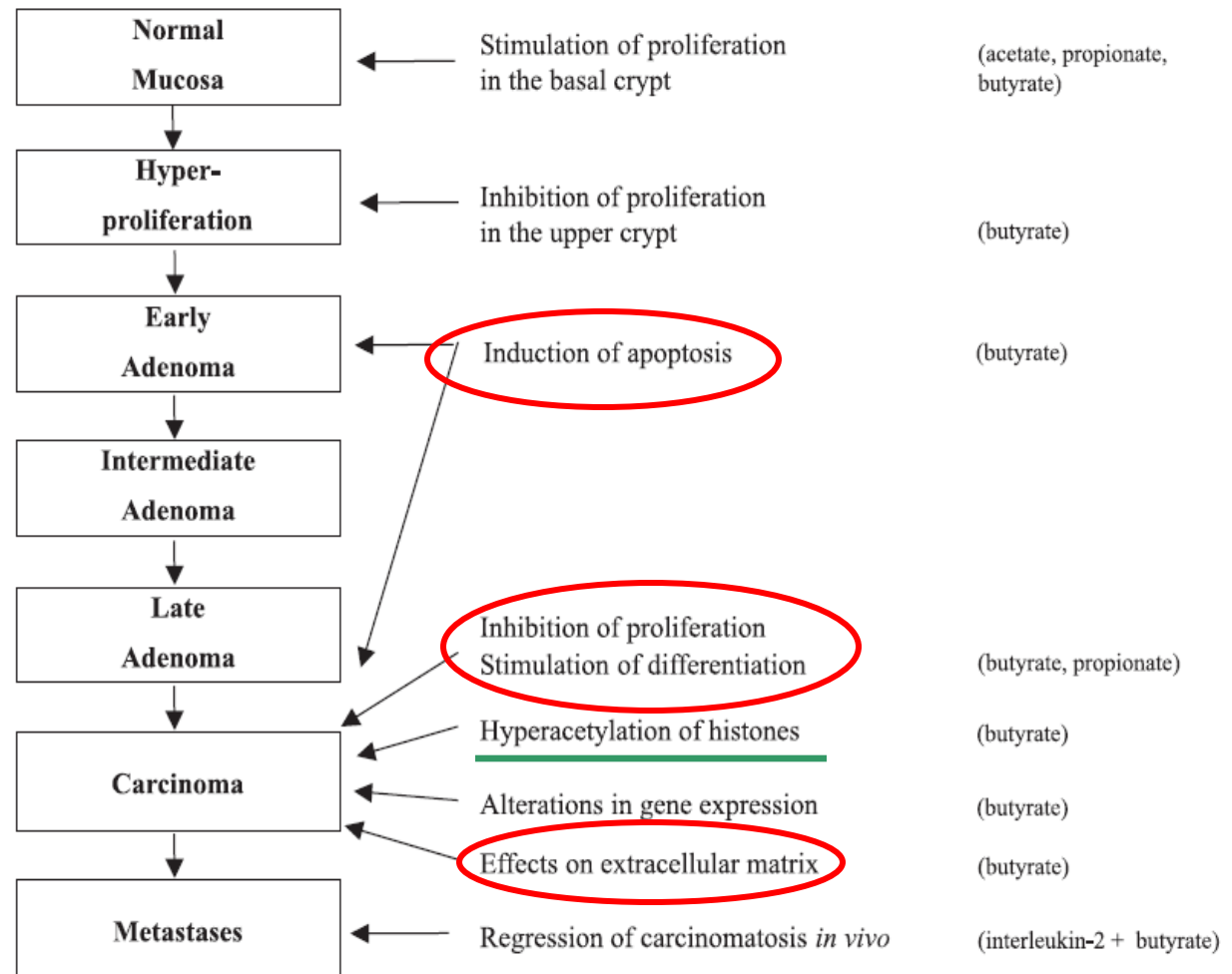
adenom
AA/C1
RG/C2

adenocarcinom
HT-29
DLD-1
HCT-116
SW480

lymf.
metastáza
SW-620

Carcinogenic potential

Účinky butyrátu



Stanovení diferenciacce buněk z adenokarcinomu kolonu (linie HT-29)

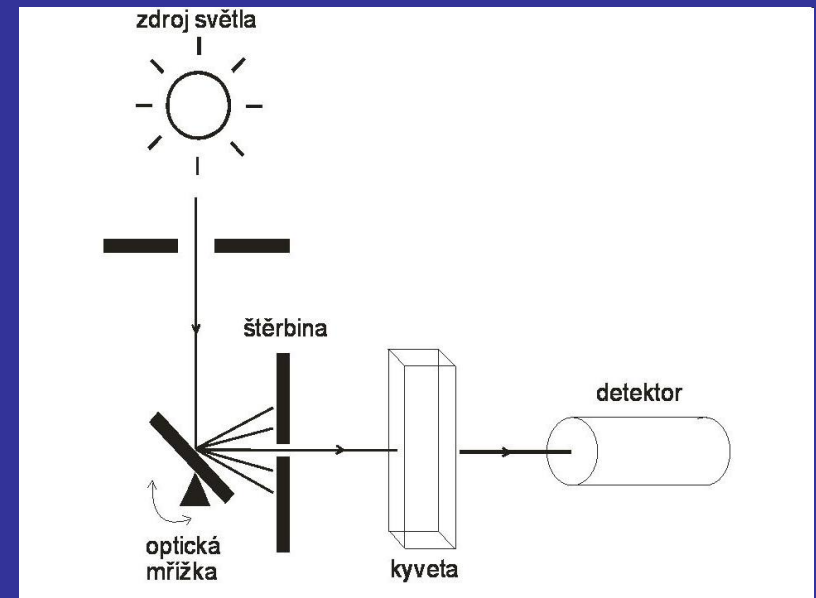
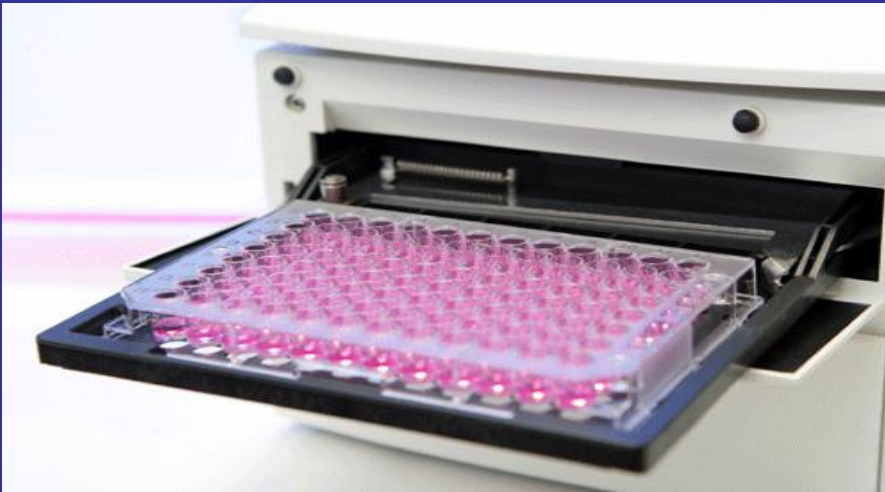
Buňky diferencují po působení butyrátu sodného (NaBt, 2-5 mM, 72 h).

Morfologické změny, adheze, zvýšená exprese E-kadherinu, polymerizace F-aktinu

Zvýšení aktivity alkalické fosfatázy

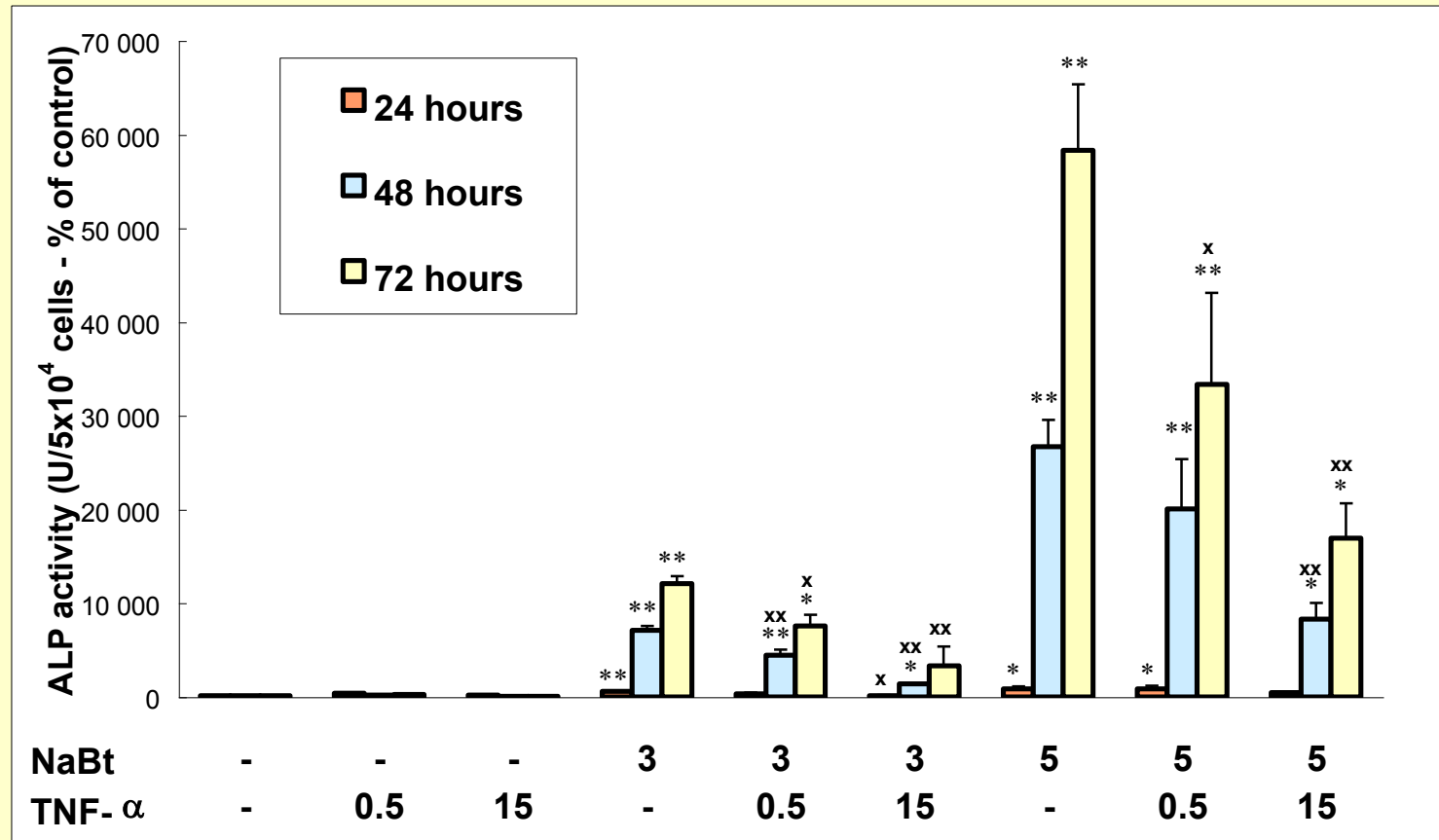
Metoda fluorimetrického stanovení - přístroj Fluostar (spektrofotometr, fluorimetr, chemiluminometr).

Spektrofotometrie = stanovování vlastností vzorku, např. koncentrace určité látky v roztoku, na základě pohlcování světla v různých vlnových délkách spektra.



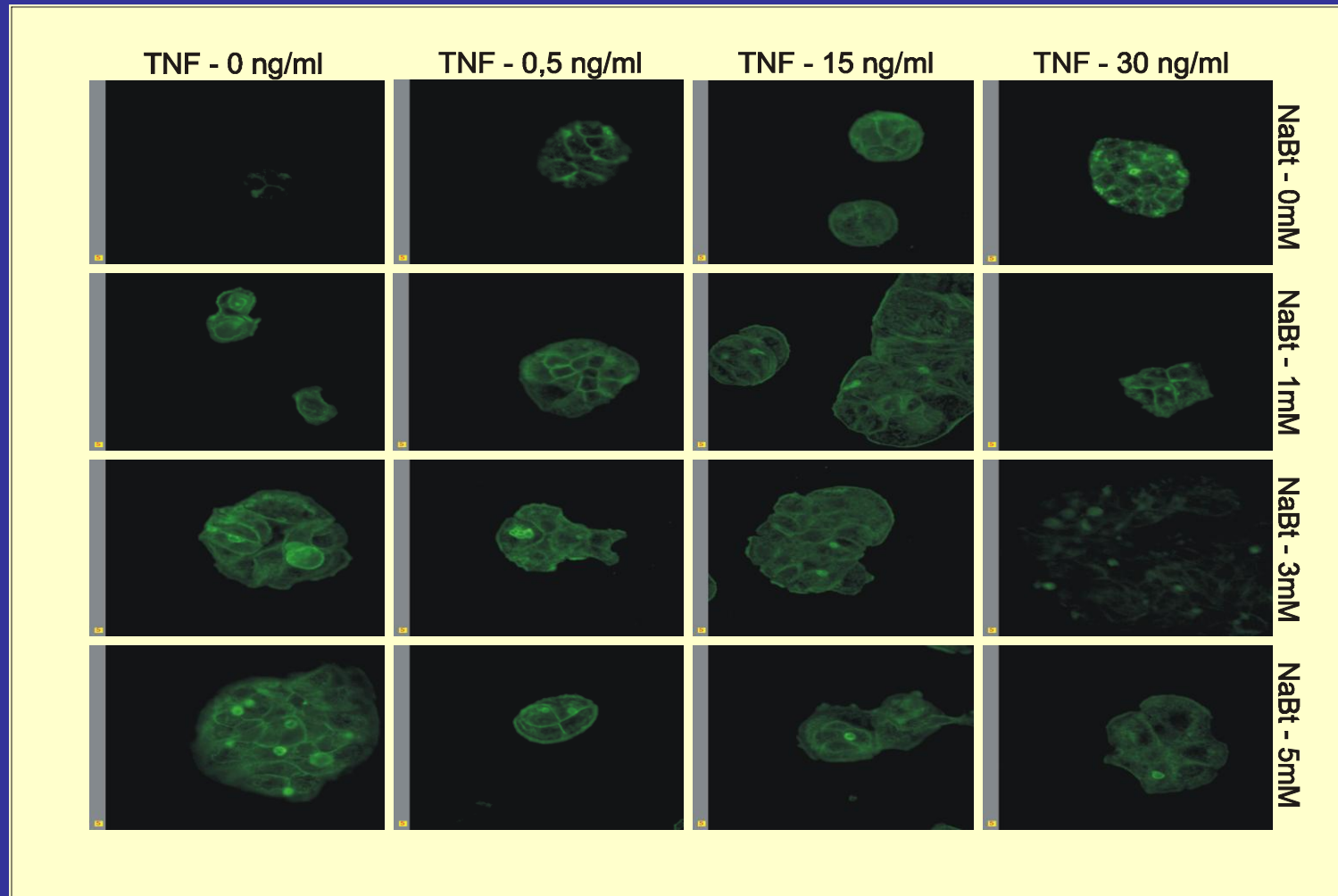
Detekce buněčné diferenciaci

(aktivita alkalické fosfatázy, spektrofotometrie)



Detekce buněčné diferenciace

(obsah F-aktinu FITC značený phalloidin- konfokální mikr.)



Metoda průtokové cytometrie

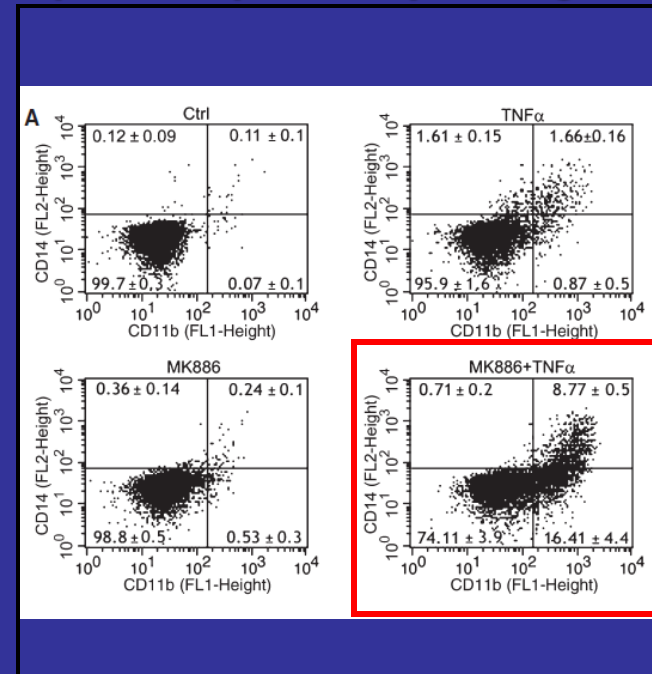
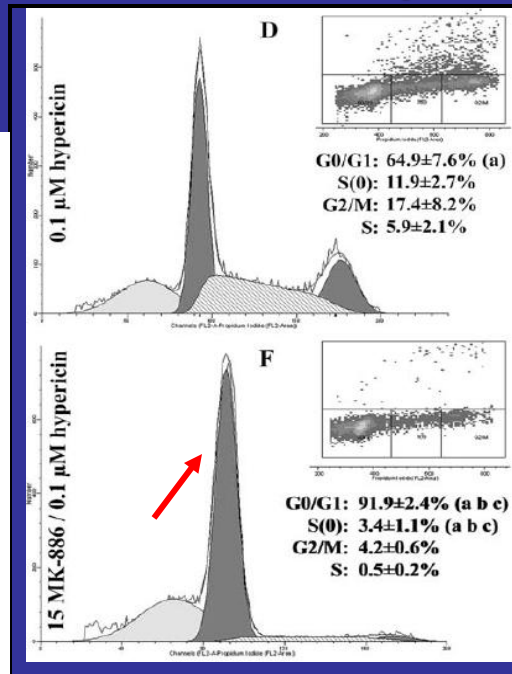
Specifická barviva - intenzita fluorescence

Parametry odrážející chování buněčných populací

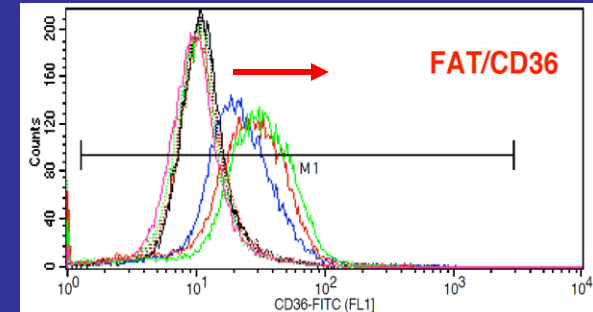
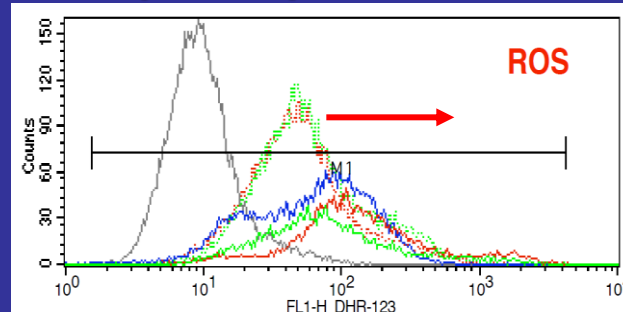
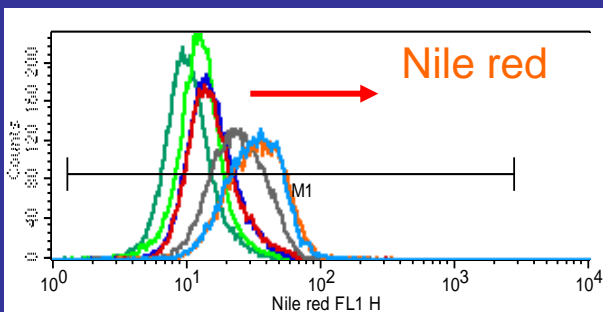
Fáze buněčného cyklu

Expres CD povrchových antigenů

FACSCalibur

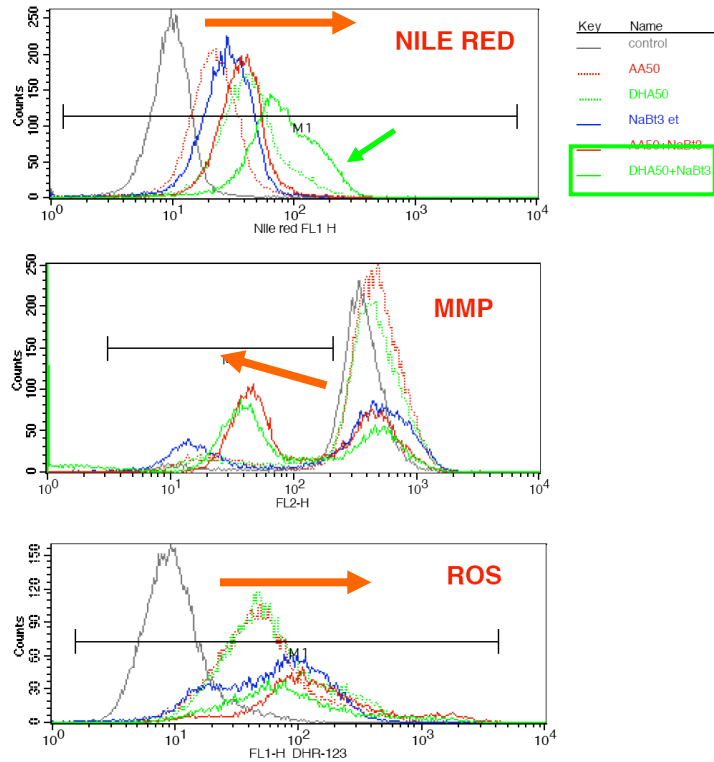


Expres a produkce vnitrobun. molekul

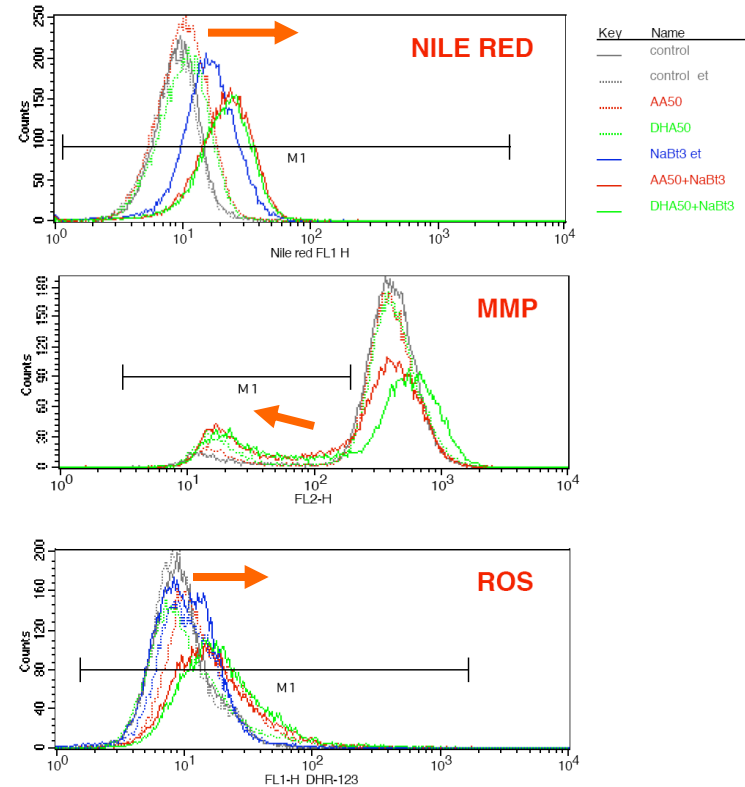


AKUMULACE LIPIDŮ v cytoplasmě (Nile red, FL-1)

FHC fetal



HT-29 adenocarcinoma



Zvýšená tvorba LD u FHC buněk posílená v kombinaci AA (DHA)/NaBt korelovala s % buněk se sníženým mit. membránovým potenciálem (MMP) a zvýšenou produkcí reakt. kyslíkových metabolitů (ROS)

Česká společnost pro analytickou cytometrii



Registered
participants:

65

137

180.....

Invited speakers:

0

3

7...

(Angl.)

Mezinárodní konference 2001, 2003, 2005, 2007, 2009, 2011

Analytická cytometrie VII, Mikulov

21.-24. září 2013



Příklady výsledků s využitím buněčných linií



Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

- ▶ Na počátku stojí pracovní hypotéza, kterou ověřujeme
- ▶ Důležité jsou časové a koncentrační závislosti (dose-response)
- ▶ Studium působení jednotlivých faktorů nebo jejich kombinací (multivariační analýzy)
- ▶ Souvislost proliferace, diferenciaci a apoptózy na buněčné úrovni
- ▶ Po stanovení základních cytotkinetických dat studium detailnějších mechanismů účinků na subbuněčné a molekulární úrovni
- ▶ Experimenty se opakují nezávisle nejméně 3x (v případě nejasností i vícekrát) a v mnoha případech zahrnují ještě paralelní měření, která upřesňují získanou hodnotu.
- ▶ Výsledky jsou vždy statisticky zhodnoceny a je určena významnost rozdílů.
- ▶ Výsledky jsou prezentovány formou tabulek, grafů nebo reprezentativních obrázků či fotografií.

Růstové křivky

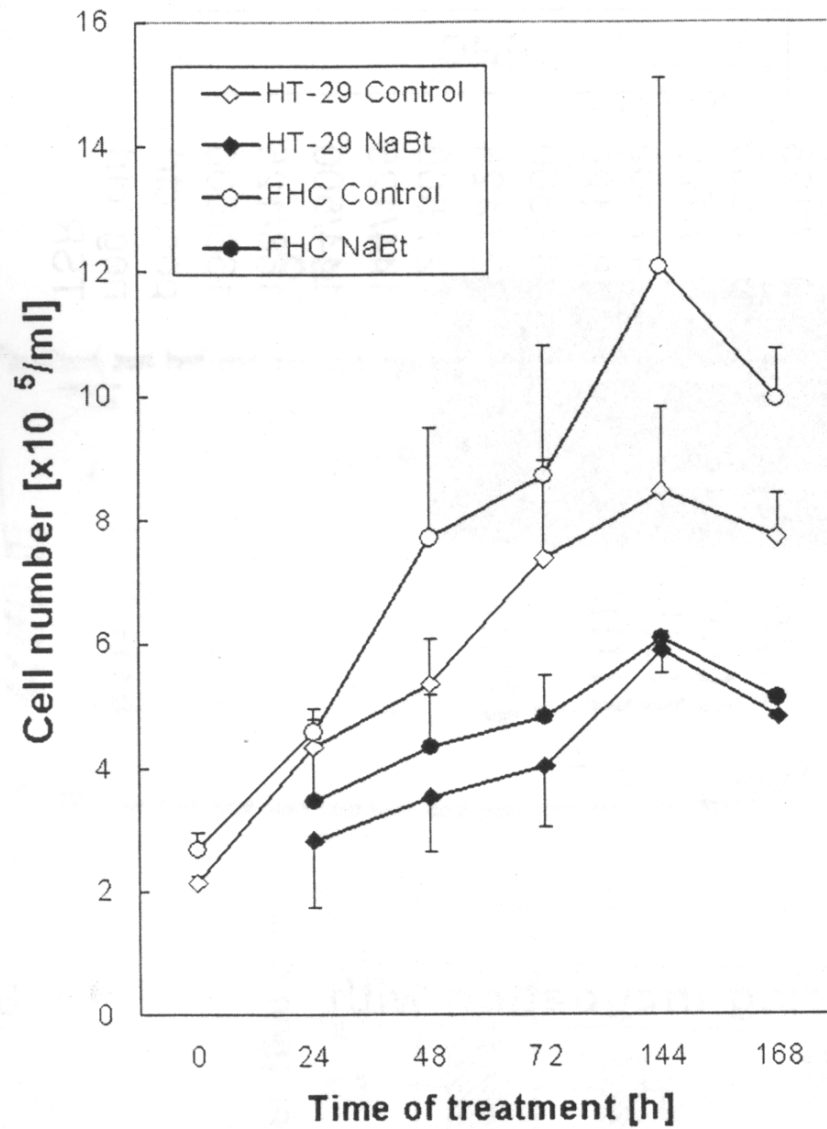


Figure 1. Effect of NaBt (5 mM) on growth of HT-29 and FHC cells (starting density $\times 10^5/\text{ml}$). The values are means \pm SEM of three independent experiments.

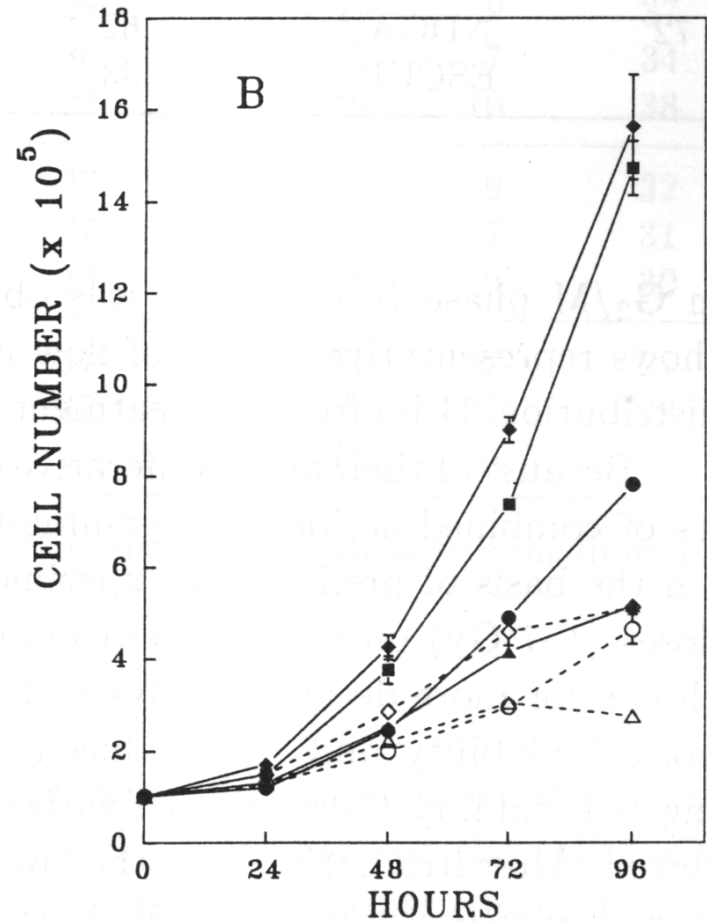
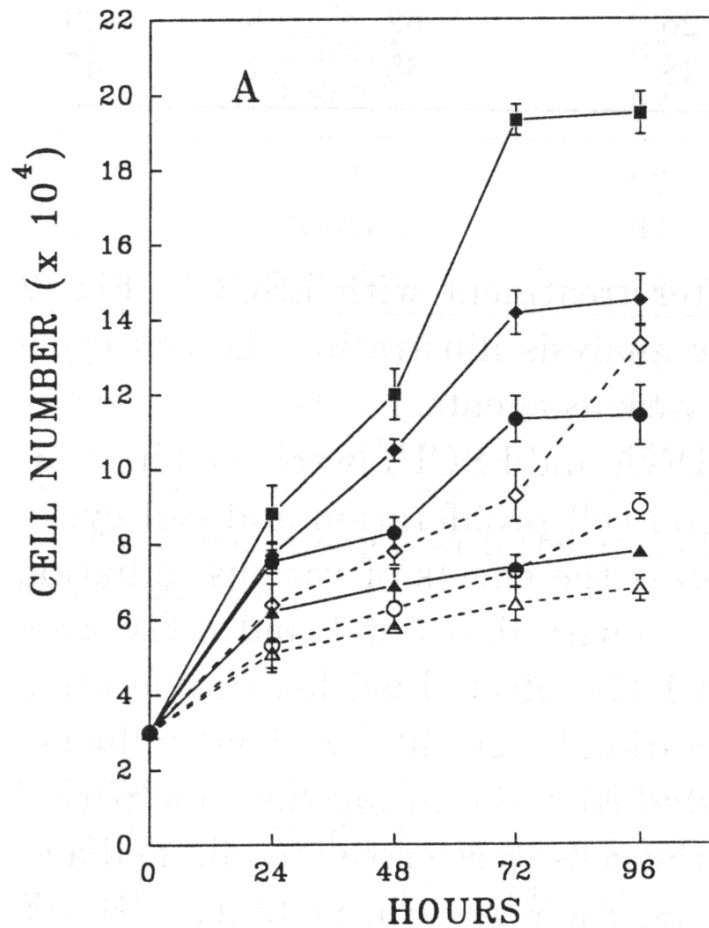


Figure 3. Growth of HS578T (A) and U937 (B) cells cultivated in the absence (diamonds) or in the presence of 50 $\mu\text{mol/l}$ PIROX (squares), 25 $\mu\text{mol/l}$ NDGA (circles) or 50 $\mu\text{mol/l}$ ESCUL (triangles). The solid lines and solid symbols represent nonirradiated cells. The dashed lines and open symbols represent cells irradiated with 5 Gy. The data are means \pm S.E.M. for three independent experiments performed in triplicates.

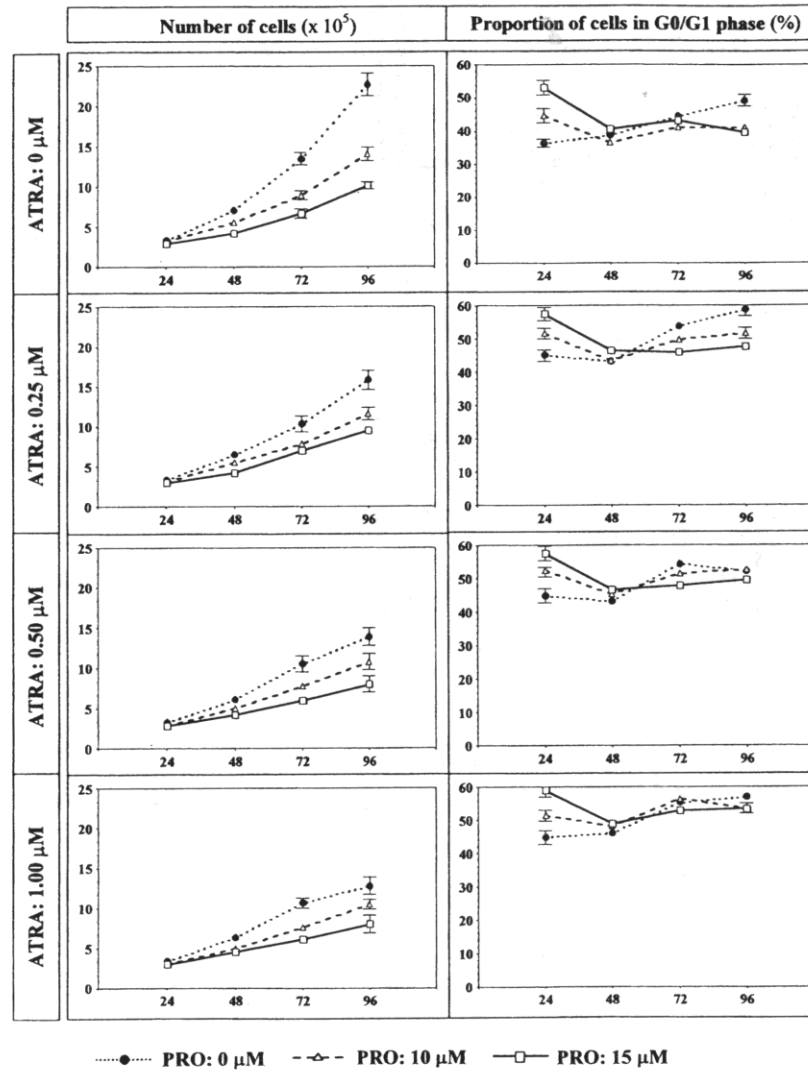


FIGURE 5. Number of cells and proportion of cells in cell cycle phases as influenced by combined all-*trans*-retinoic acid (ATRA) and proadifen (PRO) during the experimental 24- to 96-h period. The points represent the means of 3–8 independent experiments supplied with standard errors (error bars).

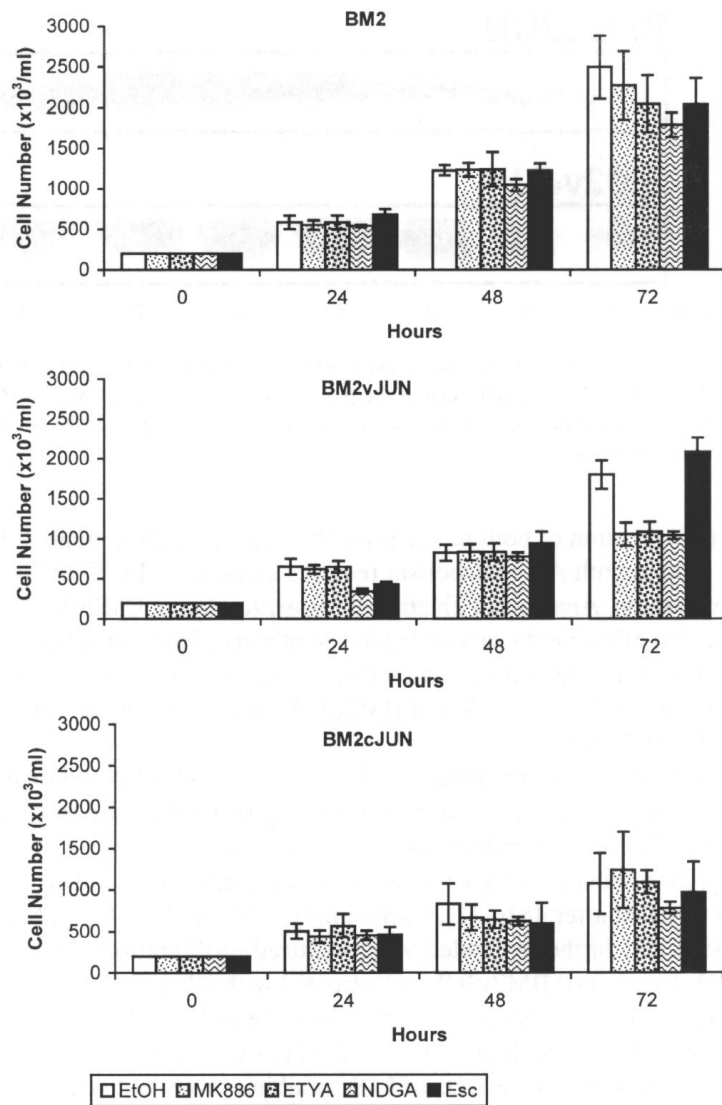


Fig. 4. Jun proteins and lipoygenase inhibitors slow down proliferation of BM2 cells. The same number of BM2, BM2vJUN and BM2cJUN cells was seeded and treated with zinc chloride (1.5×10^{-4} M). Four hours later, lipoygenase inhibitors MK886, ETYA, NDGA and esculetin (Esc) ($5 \mu\text{M}$) were added to cultivation media for indicated time. Total cell number was determined using cell counter. Columns represent the average values from three to six independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

Koncentrační závislosti (dose-response)

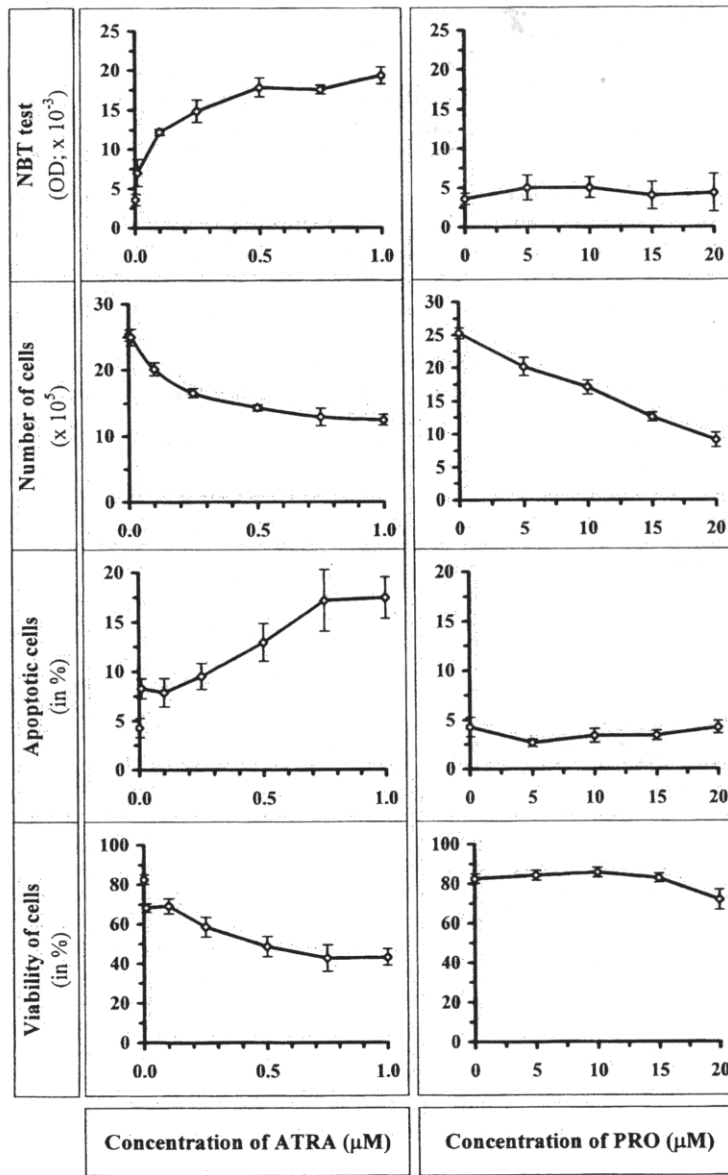


FIGURE 1. Dose-response profiles of the individual cell parameters based on concentration of all-*trans*-retinoic acid (ATRA) and proadifen (PRO) as independent variables. The points represent the means of 3–10 independent experiments supplied with standard errors (error bars). NBT = nitroblue tetrazolium.

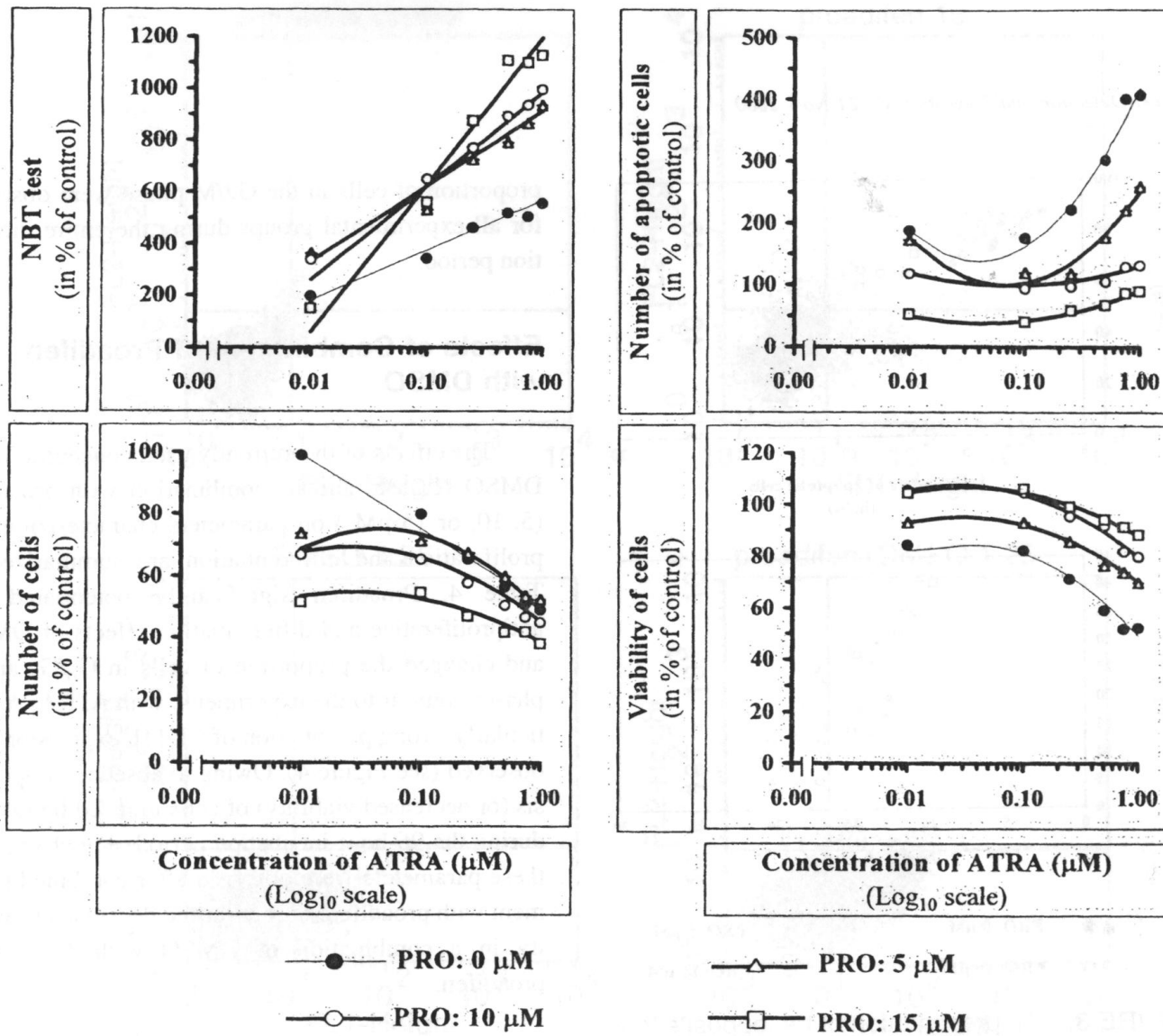
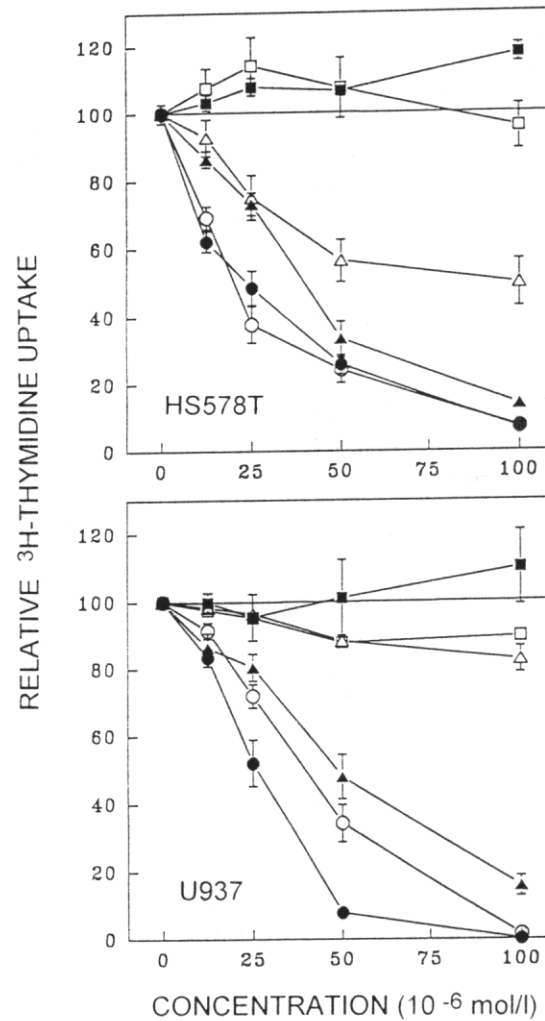


FIGURE 2. The effect of all-*trans*-retinoic acid (ATRA) and proadifen (PRO) on the studied cell parameters expressed as model predictions (*lines*) supplied with experimental points representing the means of 3–10 independent experiments. NBT = nitroblue tetrazolium.

Figure 1. Effects of various doses of PIROX (squares), NDGA (circles), or ESCUL (triangles) on ^3H -thymidine incorporation (% of nontreated control) in HS578T and U937 cells after 24 h (open symbols) or 72 h (solid symbols) cultivation. The data are means \pm S.E.M. for 3–4 independent experiments performed in six parallels.



vyjádření v % kontroly
(neovlivněná
populace=100%)

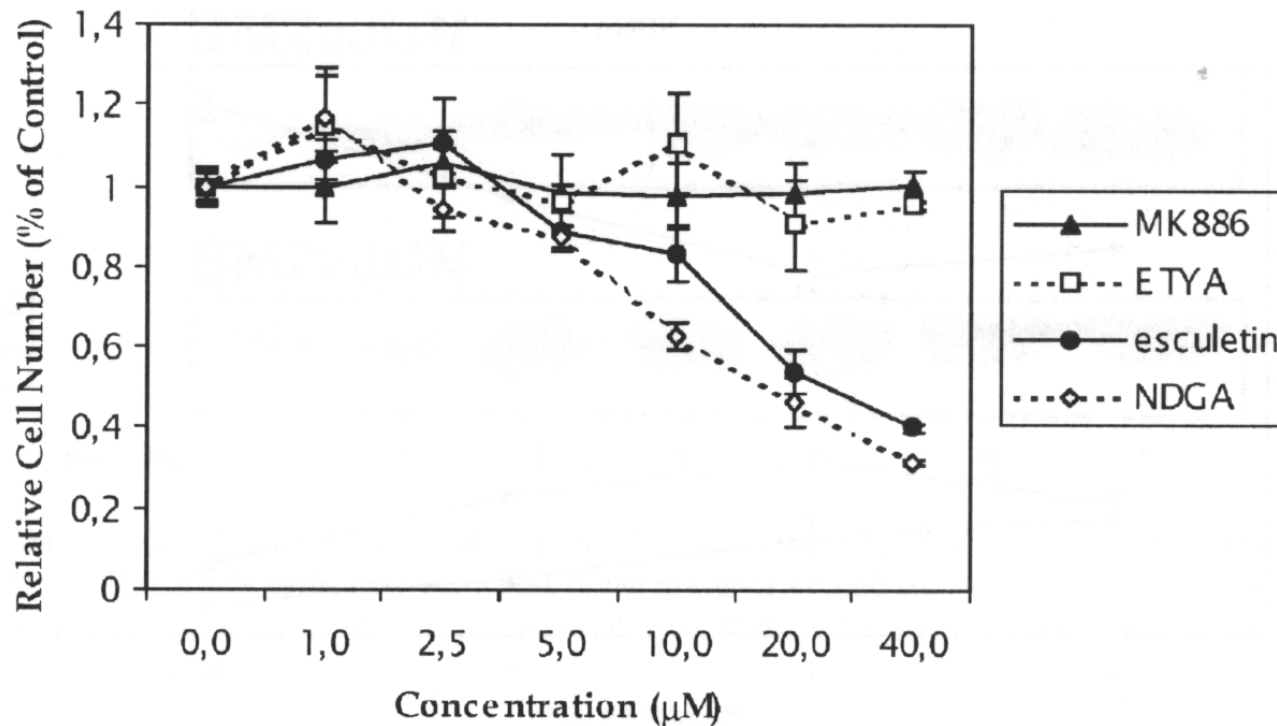


Fig. 1. Esculetin and NDGA negatively regulate growth of BM2 cells. The cells were cultivated in the presence of lipoxygenase inhibitors or ethanol solvent in indicated concentrations for 3 days. Total cell number in each sample was determined using cell counter. The curves represent the average numbers from three independent experiments. Error bars indicate standard deviations. BM2 cells treated with the amount of ethanol solvent corresponding to 40 µM concentration of inhibitor were used as a reference sample.

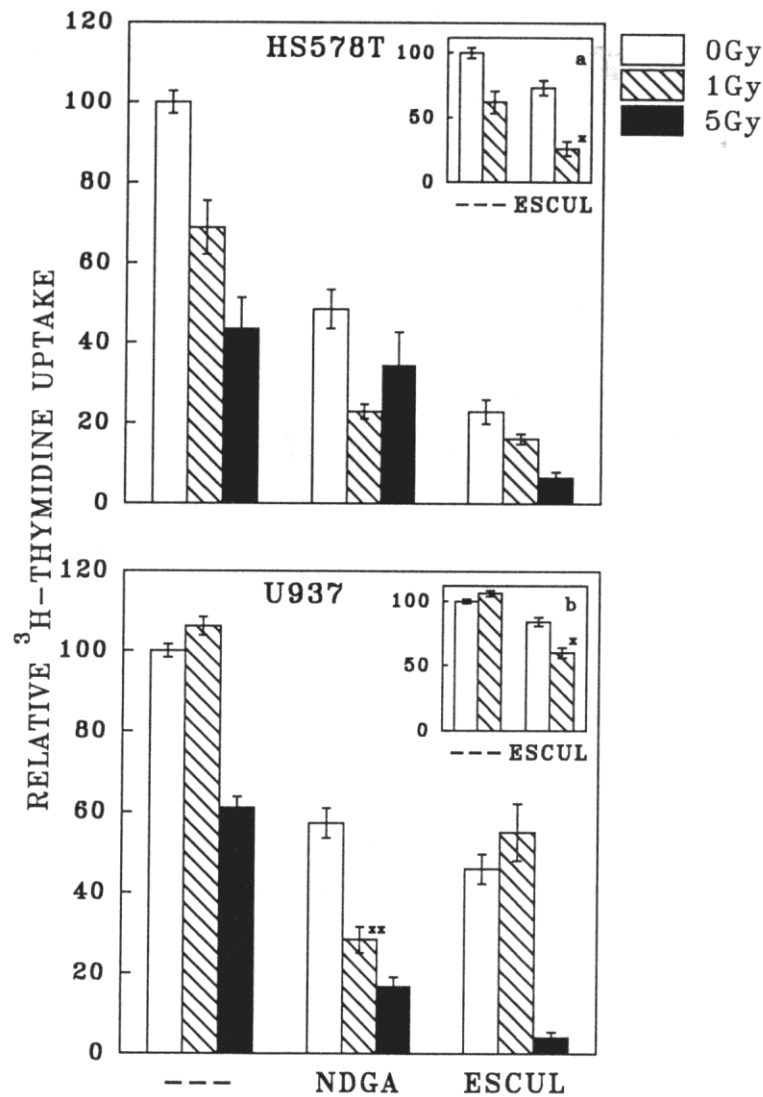


Figure 4. ³H-thymidine incorporation (% of nontreated control) in HS578T and U937 cells subjected to different treatment. The nonirradiated cells or cells irradiated with 1 or 5 Gy were cultivated in the presence of 25 μmol/l NDGA, 25 μmol/l ESCUL (inserts *a*, *b*) or 50 μmol/l ESCUL or without the agents (---) for 72 h. Data are means ± S.E.M. for three independent experiments performed in six parallels. * *p* < 0.05; ** *p* < 0.01 significance of the interactive component

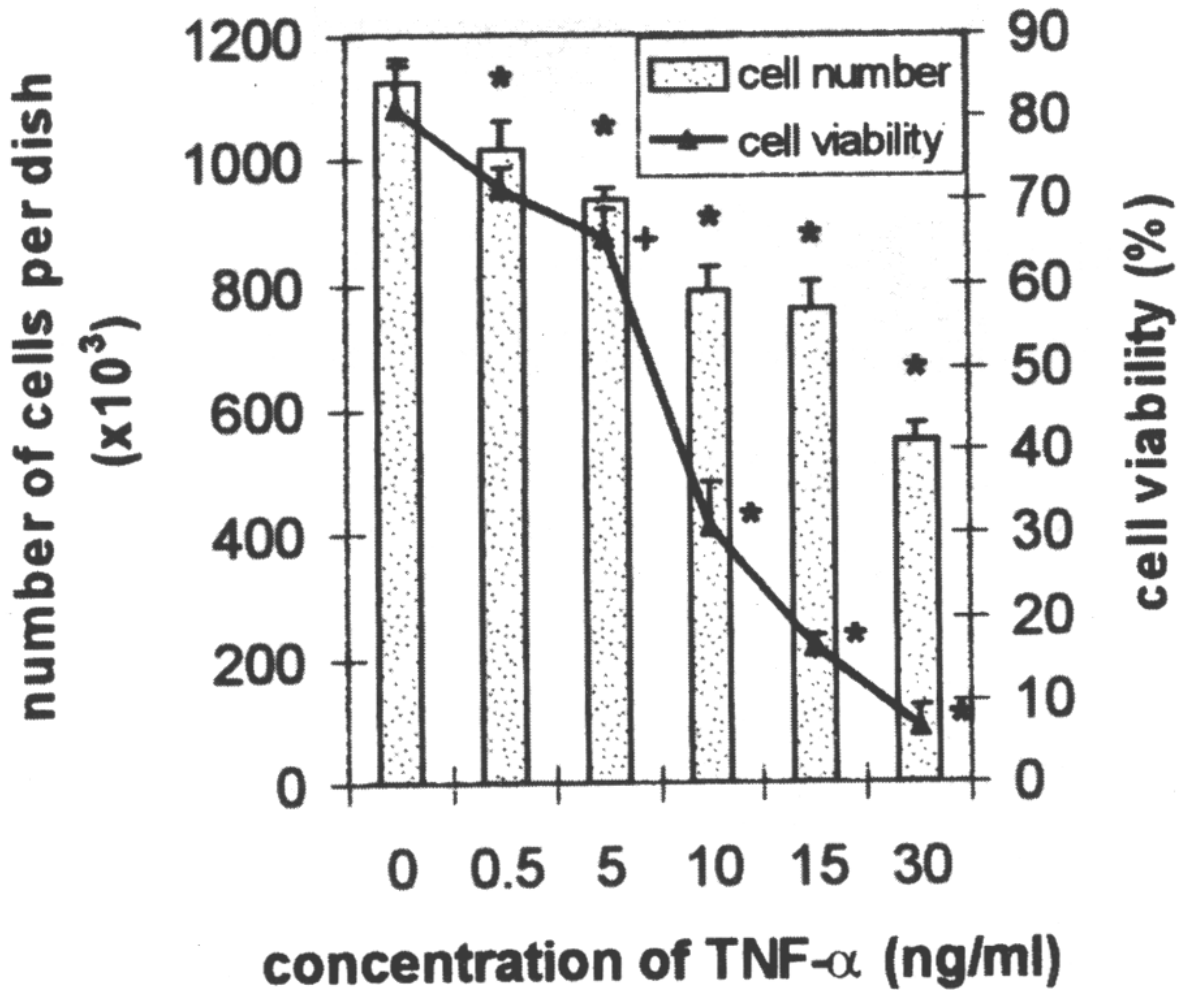


Figure 1. Growth and viability of HT-29 cells after 120-hour-treatment with TNF- α . $P < 0.05$ versus untreated control; (*) Tukey or (+) LSD test.

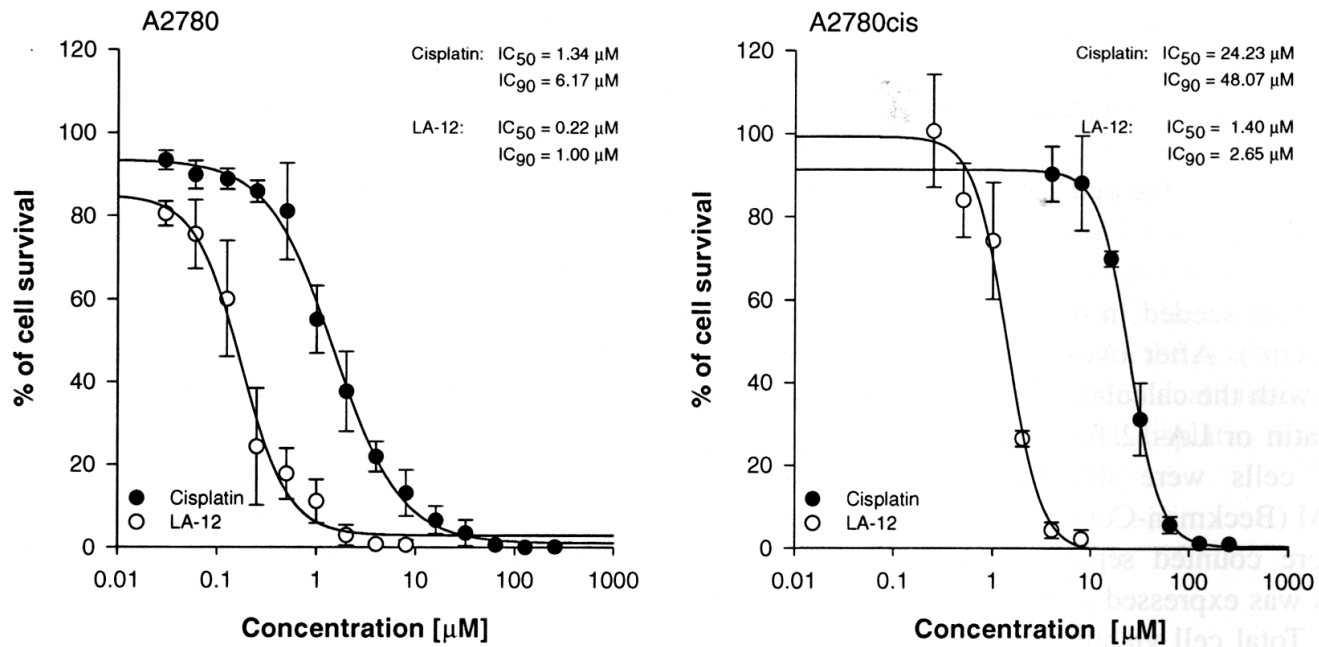


Fig. 2. Time- and dose-response effects on the survival of A2780 and A2780cis cancer cell lines. The effects after 72 h exposure to cisplatin or LA-12 in a concentration range between 0.3 μM and 256 μM were determined by MTT assay. The calculated drug concentrations inhibiting metabolic activity of cells by 50% (IC_{50}) and 90% (IC_{90}) are displayed for both derivatives. The results are expressed as mean \pm standard deviations (S.D.) of at least three independent experiments; all concentrations were tested in three replicates.

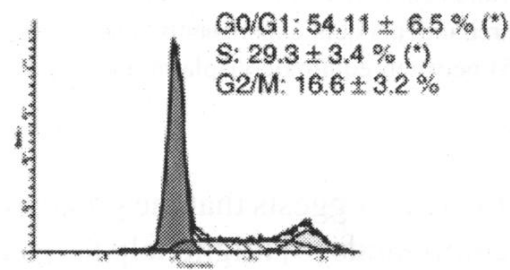
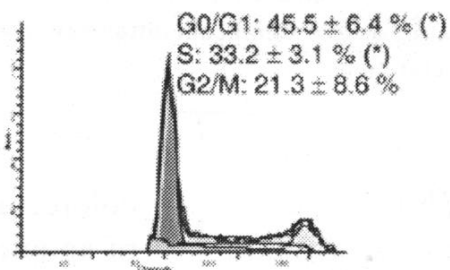
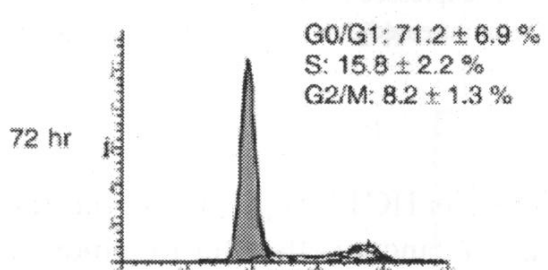
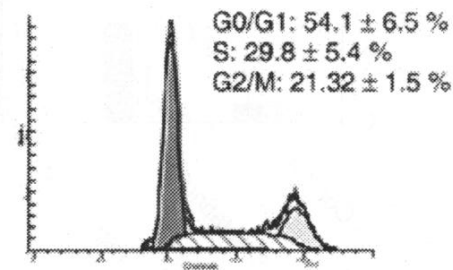
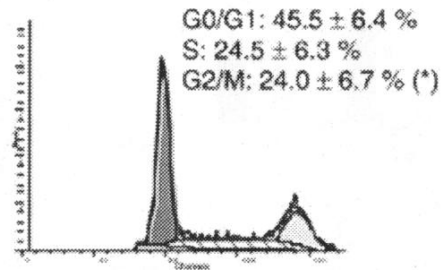
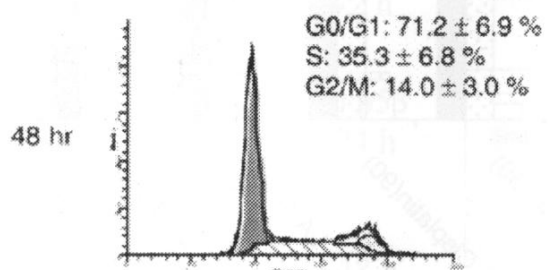
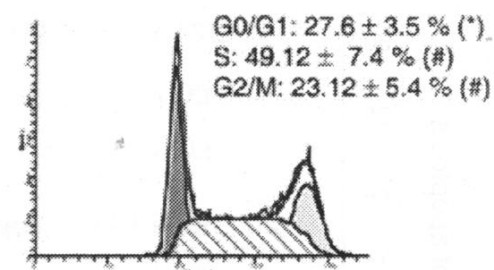
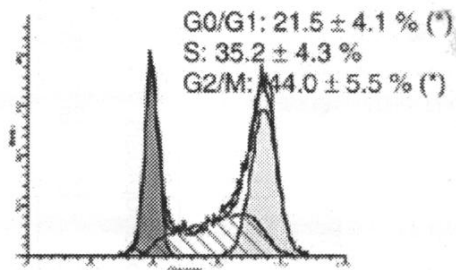
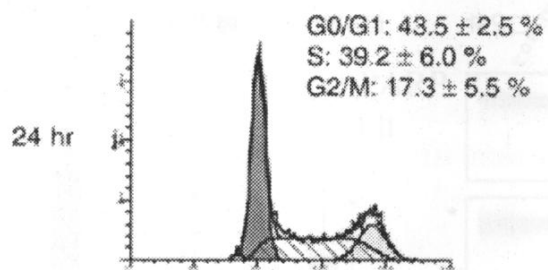
PARAMETRY BUNĚČNÉHO CYKLU

A2780

UNTREATED CONTROL

CISPLATIN(50)

LA-12(50)



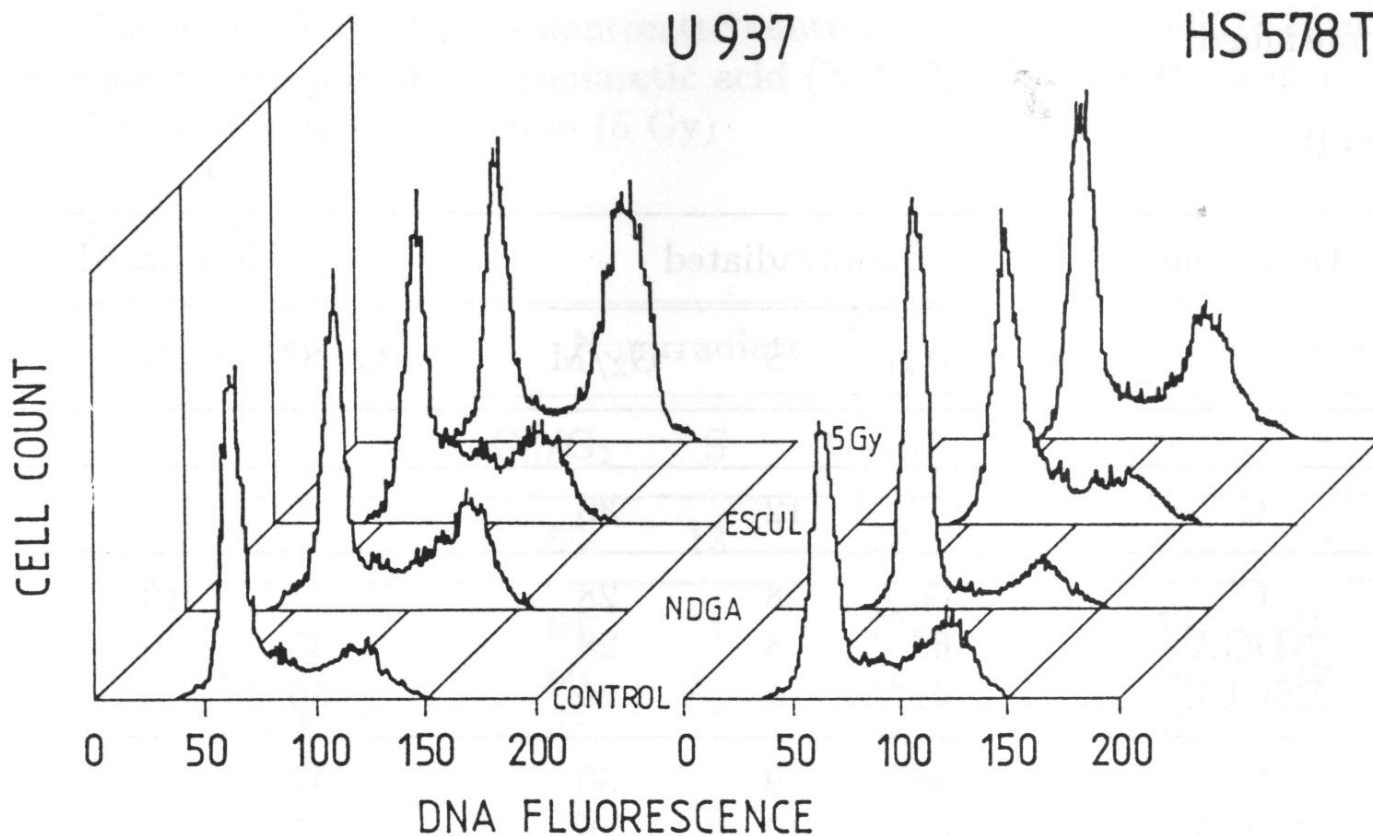


Figure 2. Representative results of flow cytometric analysis of the cell cycles of U937 and HS578T cell lines after 24 h of cultivation. Cells were treated with 25 $\mu\text{mol/l}$ NDGA, 50 $\mu\text{mol/l}$ ESCUL, or irradiated with 5 Gy.

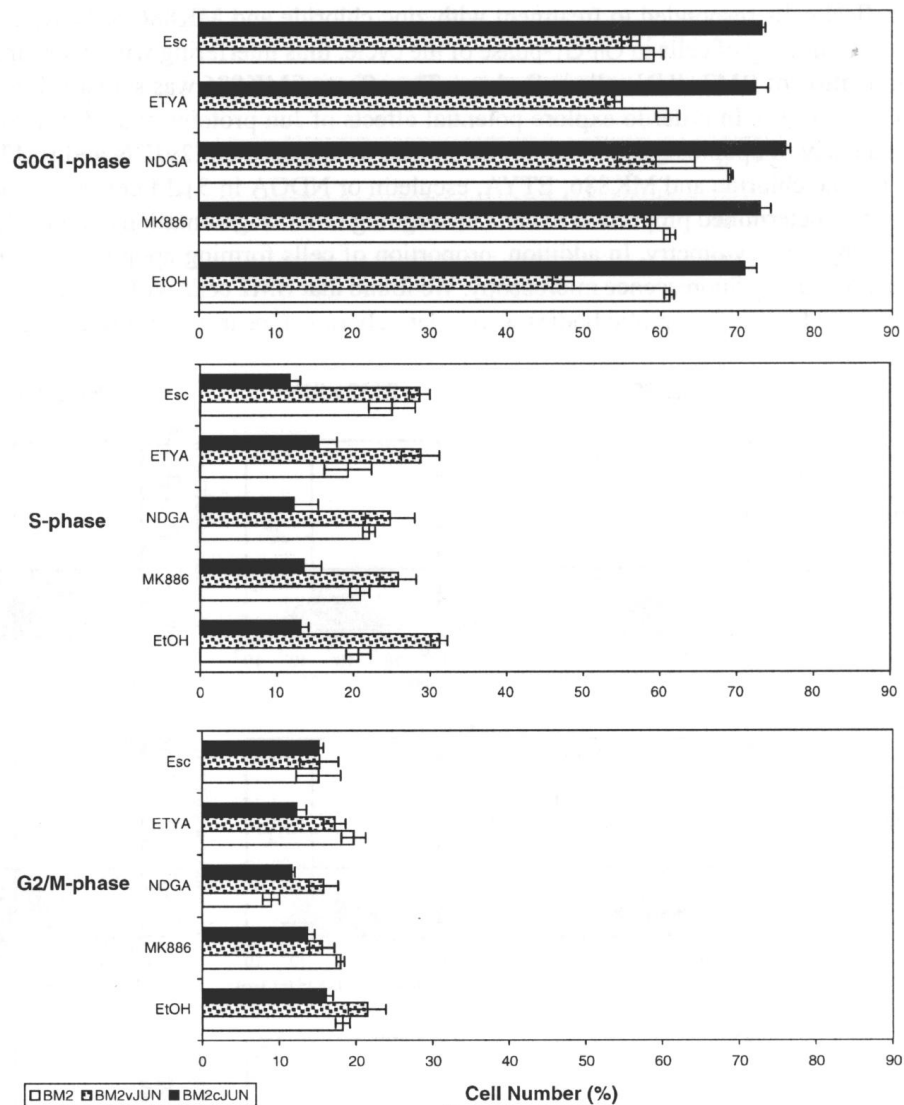


Fig. 5. The effects of lipoxygenase inhibitors on cell cycle of BM2 cells expressing *v-jun* or *c-jun*. BM2, BM2vJUN and BM2cJUN cells were treated with zinc chloride and lipoxygenase inhibitors ($5 \mu\text{M}$) or ethanol solvent (EtOH) for 1 day. Harvested cells were fixed and stained with propidium iodide. DNA content in individual cells was determined by flow cytometry. The bars represent the average values from three independent experiments. Error bars indicate standard deviations.

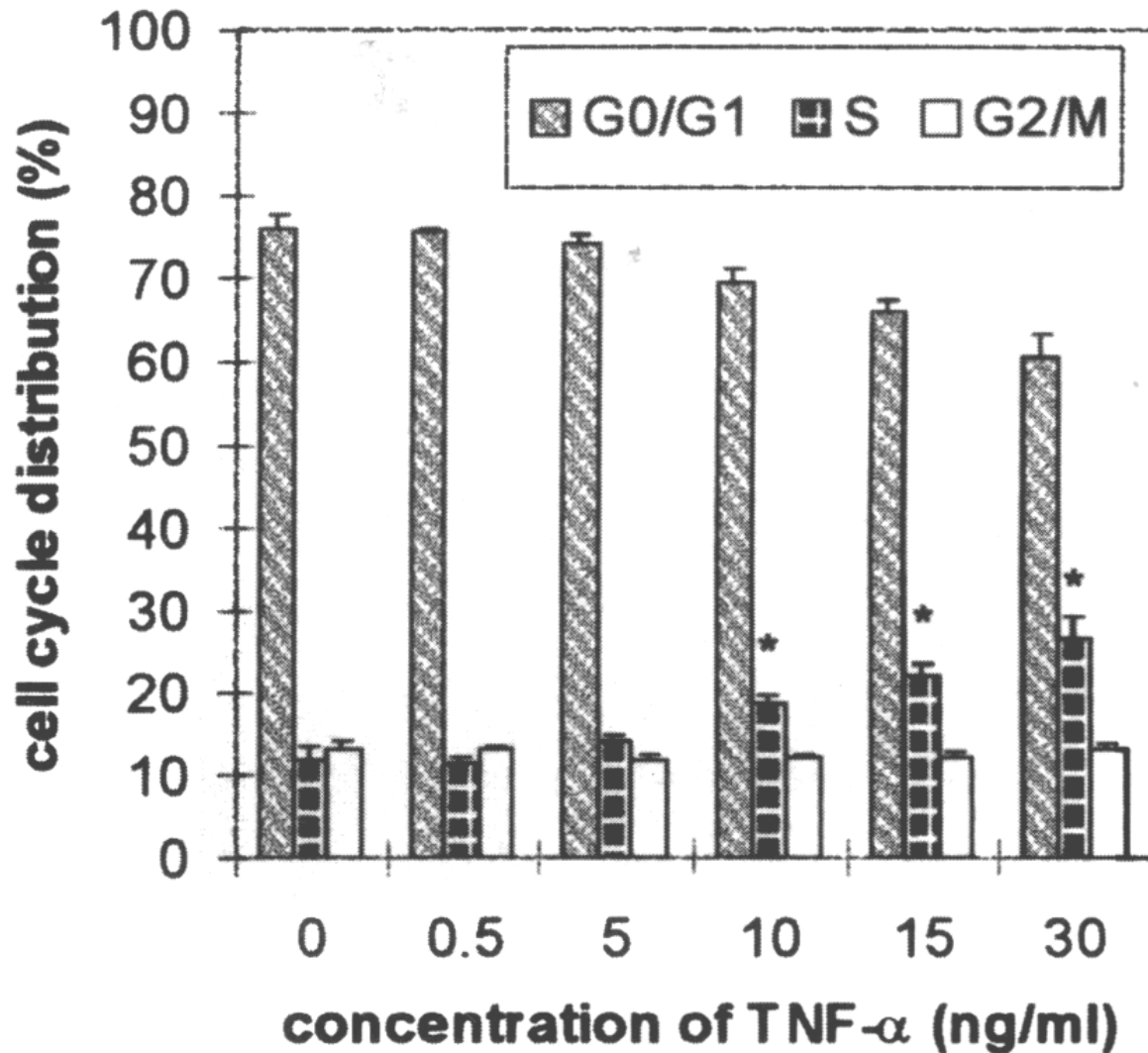


Figure 2. Cell cycle of HT-29 cells after 96-hour-treatment with TNF- α . (*) $P < 0.05$ versus untreated control for Tukey test.

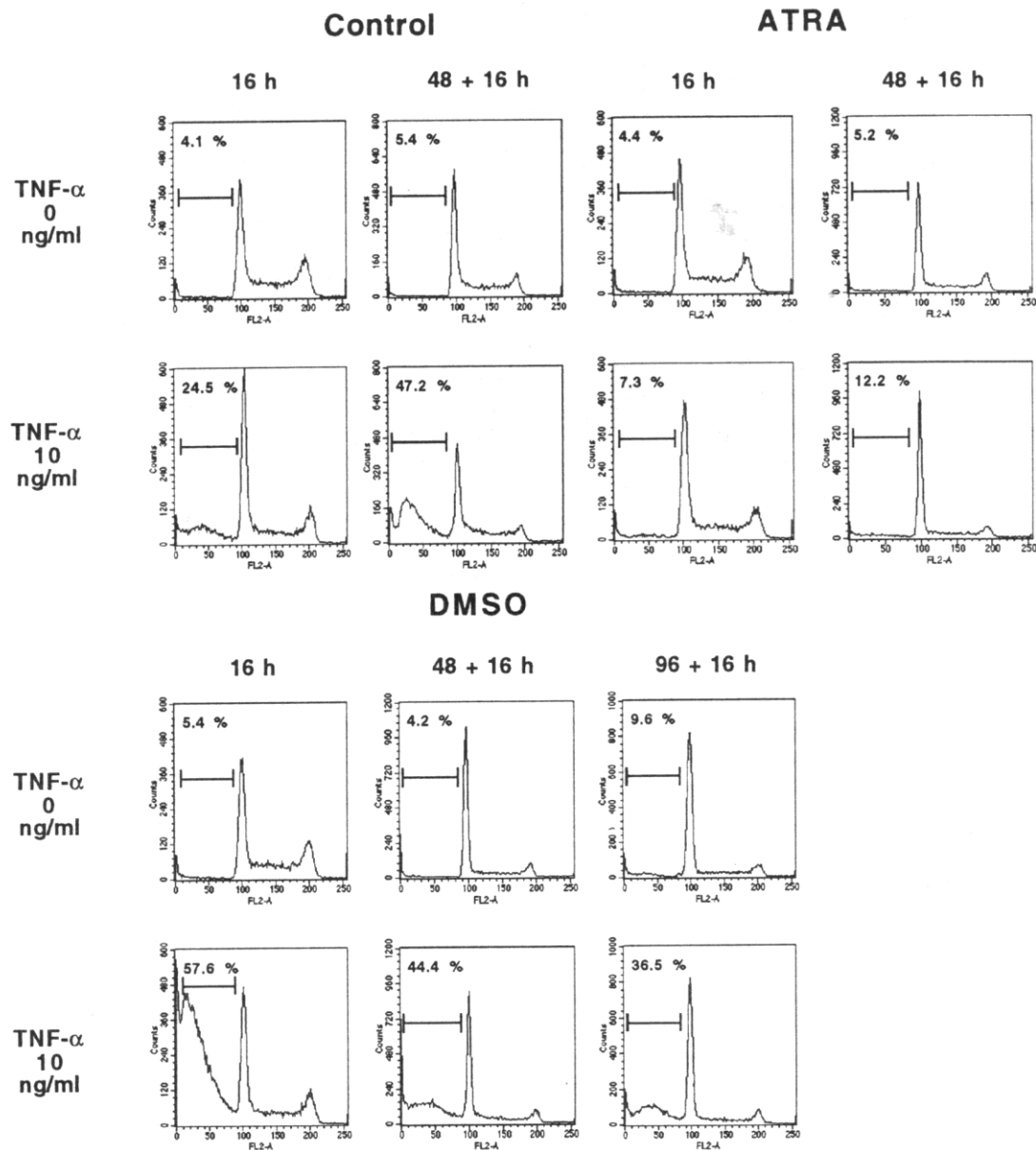
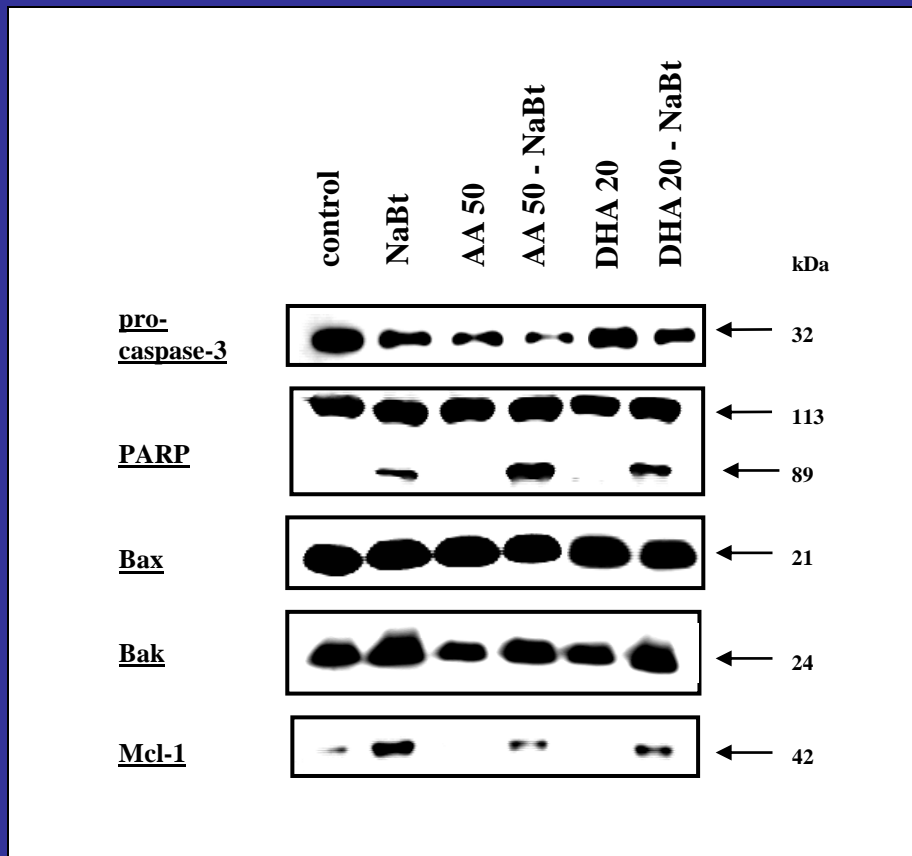


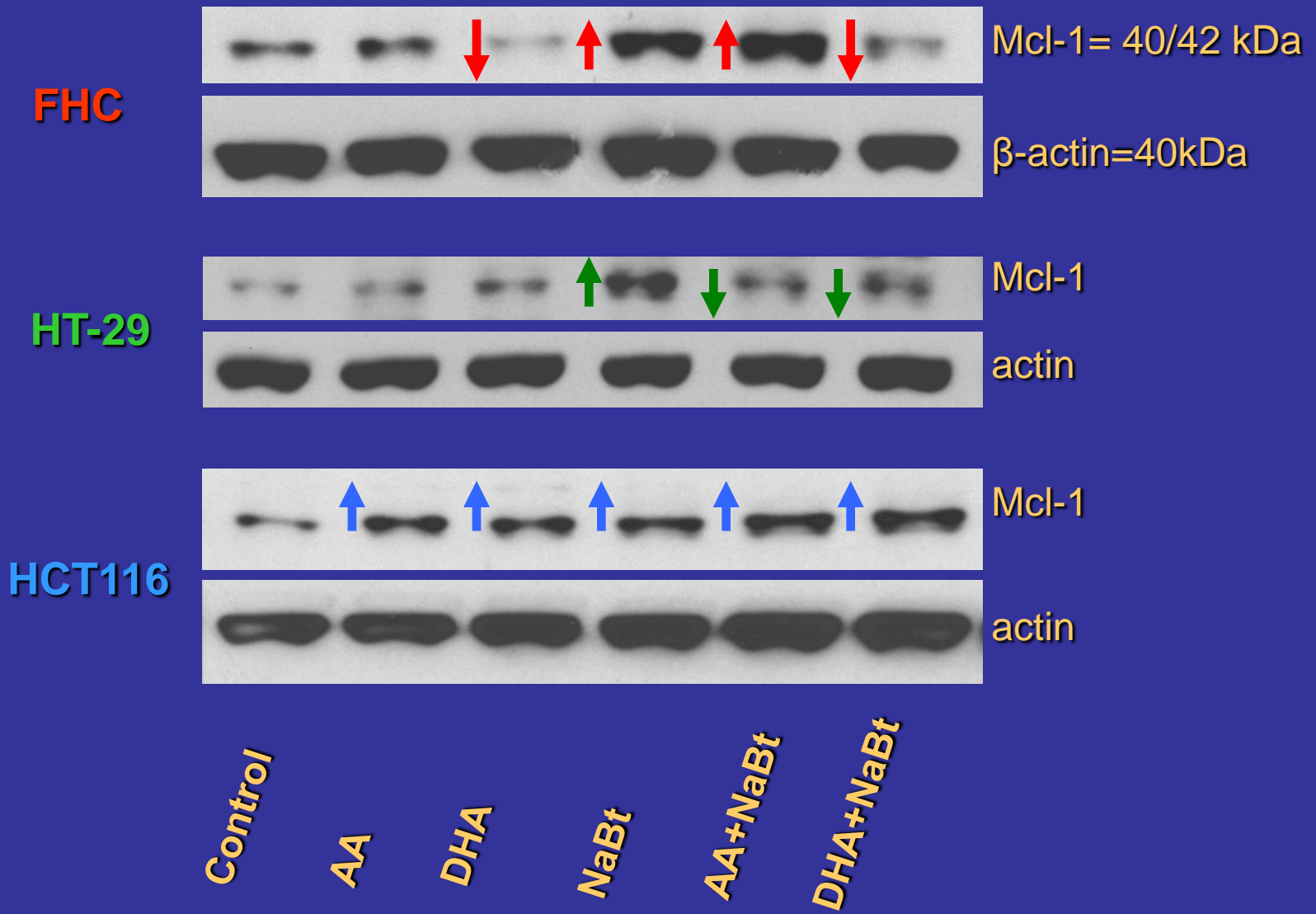
Fig. 2. Representative DNA content analyses ($n = 3$) for HL-60 cells treated with DMSO or ATRA, and TNF- α . Cells were stained and analyzed as described in Materials and Methods. y-axis, counts; x-axis, PI staining. Gates denote subdiploid fraction.

EXPRESE PROTEINU (WESTERN BLOTTING)

Interakce kys. arachidonové (AA) a dokosahexaenové (DHA) s butyrátem



Expresse antiapoptického proteinu Mcl-1



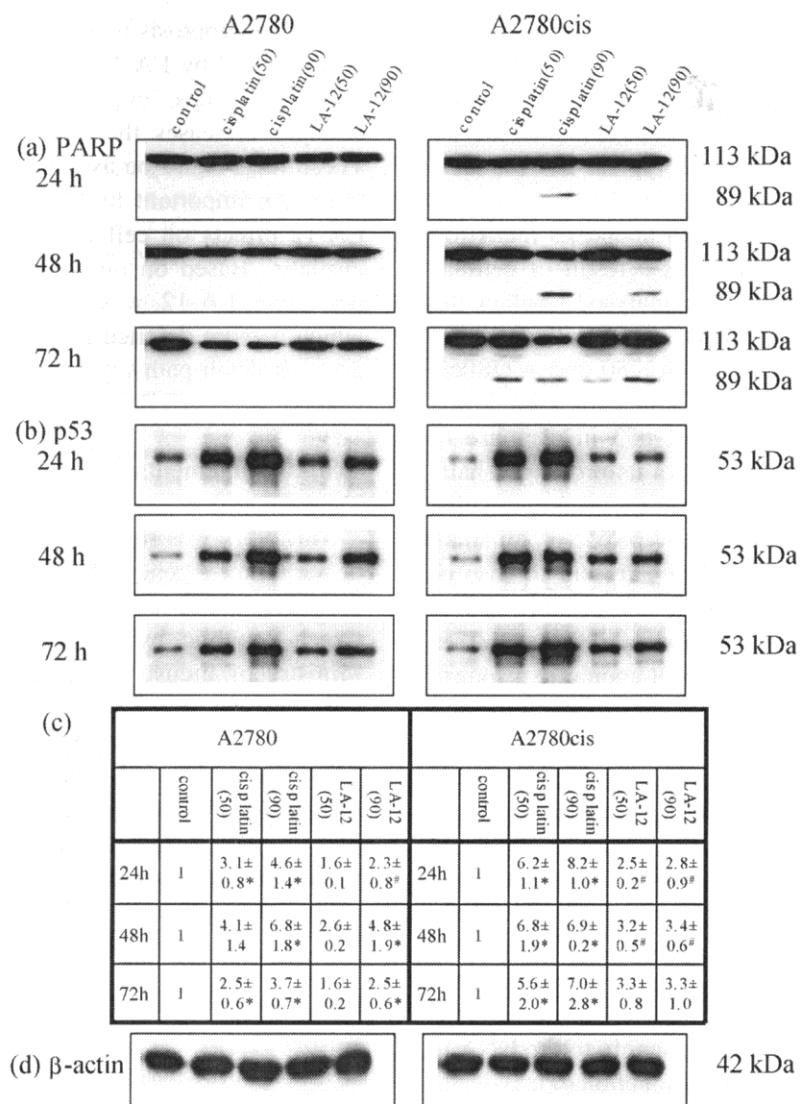


Fig. 8. Western blot analyses of (a) PARP (upper panel) and (b) p53 (middle panel) protein levels in A2780 (left panel) and A2780cis cells (right panel). The cells were not exposed (untreated controls) or exposed to IC₅₀ or IC₉₀ concentrations of cisplatin or LA-12 and harvested at 24 h, 48 h, and 72 h of sustained drug treatment. One representative experiment of at least three is presented. Table (c) contains values of p53 expression quantified by densitometry (mean ± S.D. of at least three independent experiments). The symbols (*) denote significant difference ($p < 0.05$) from untreated control; (#) denote significant difference ($p < 0.05$) between equitoxic cisplatin and LA-12 effects. Equal loading is documented by detection of (d) β-actin (bottom panel).

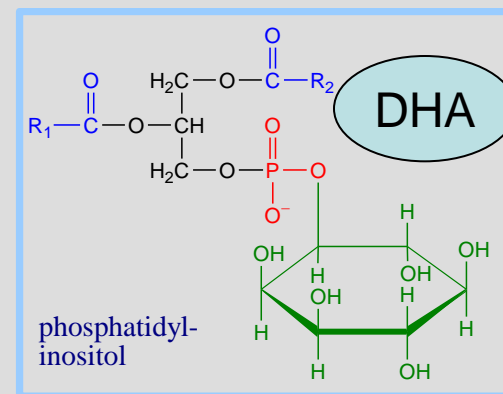
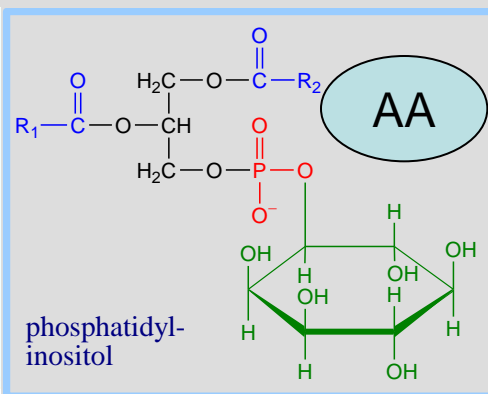
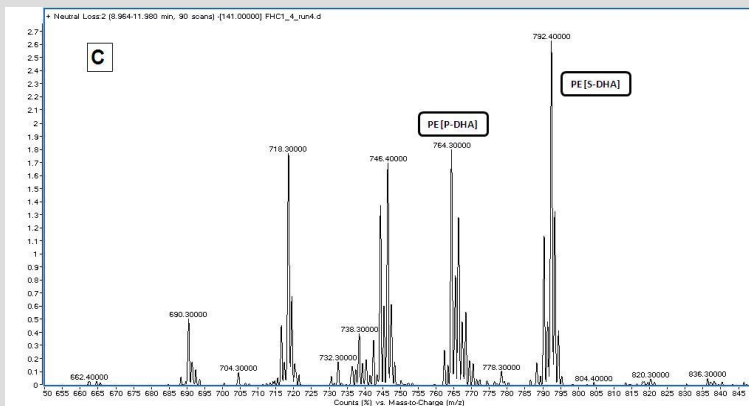
LIPIDOMICKÉ ANALÝZY (spolupráce s VÚVeL)

1) změny obsahu jednotlivých typů MK v celkových buněčných lipidech
GC-MS (gas chromatography – mass spectrometry)

2) změny obsahu AA, resp. DHA v jednotlivých skupinách fosfolipidů:
PC, PS, PI, PE, SM a v neutrálních lipidech

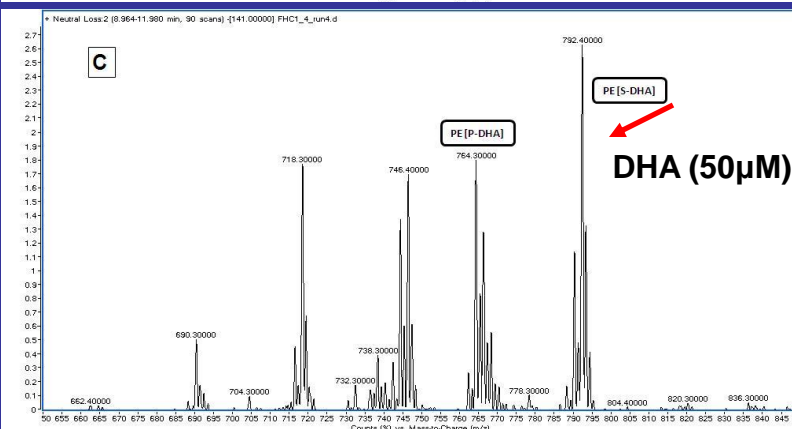
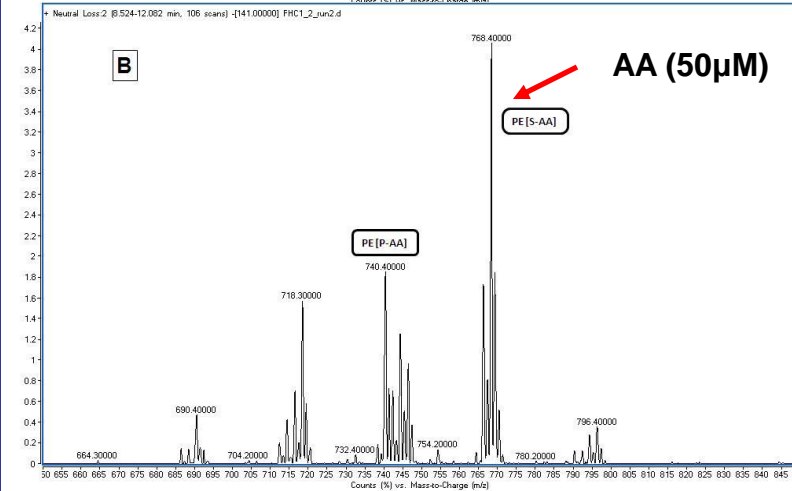
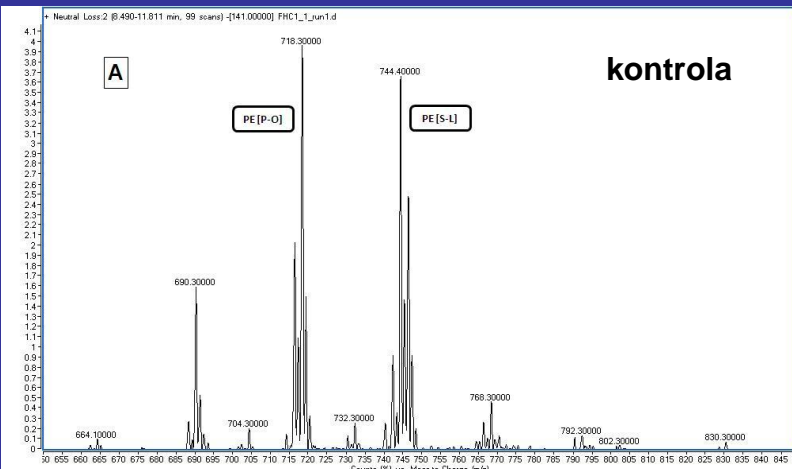
LC-MS-MS (high – performance liquid chromatography
– tandem mass spectrometry)

po působení AA, DHA, NaBt a kombinací AA/NaBt, DHA/NaBt)
u buněk FHC a HCT-116



ANALÝZY FOSFOLIPIDŮ

Příklad LC/MS/MS



Hmotnostní spektra fosfatidyletanolamin u buněk FHC po působení AA (DHA) 24h

Data hodnocena jako plochy píků (normalizované na 10^6 buněk)

Detekován snížený obsah typů obsahujících FA dominantní v kontrole a zvýšený obsah typů obsahujících AA (příp. DHA)

NaBt tyto změny dále významně neovlivnil

Doporučená literatura:

- Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures, Eds. A. Doyle, J. B. Griffiths, D. G. Newell, Wiley&Sons Inc., London 1995
- Culture of human tumor cells, Eds. R. Pfagner, R.I. Freshney, Wiley-Liss, Wiley&Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2004
- Current Protocols in Cytometry, Ed. J. P. Robinson et al., Wiley&Sons Inc., New York 1997
- T. Eckschlager a kol.: Průtoková cytometrie v klinické praxi
- The Handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies, 10th edition, R. P. Haugland, Invitrogen Corp. 2005
- R. A. Bradshaw, E. A. Dennis: Handbook of Cell Signaling (Vol. 1, 2, 3), Elsevier Science, Academic Press 2004
- Short Protocols in Molecular Biology (Vol. 1, 2) John Wiley & Sons, 2002
- K. M. Debatin, S. Fulda: Apoptosis and Cancer Therapy (Vol. 1, 2), WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim, 2006
- Methods of Enzymology, DNA Microarrays Part A and B, Vol. 410 and 411, Eds. J.N. Abelson, M.I. Simon, Elsevier Inc. 2006

Buněčné linie



Buňky epiteliálního původu

code	Lokalization	Organisms	Pahtology
A2780	ovárium	člověk	karcinom, Pt - citlivé
A2780cis	ovárium	člověk	karcinom, Pt - rezistentní
A549	plíce	člověk	karcinom
BEAS-2B	plíce	člověk	tranformované virem
CaCo2	kolon	člověk	adenokarcinom
CCL-64	plíce	norek	normální
CH-1	ovarium	člověk	karcinom, Pt- citlivé
COR-L23	plíce	člověk	karcinom
COR-L23/CP3	plíce	člověk	karcinom, Pt - rezistentní
COR-L23R	plíce	člověk	karcinom, doxorubicin - rezistentní
CT26	kolorectum	myš	karcinom
E10	plicní	myš	normální
FHC	kolon	člověk	embryonální
H4IIELuc	játra	krysa	karcinom

Buňky epiteliálního původu

code	Lokalization	Organisms	Pathology
HaCaT	epidermis	člověk	normální
HeLa	cervix	člověk	karcinom
Hepa1	játra	myš	karcinom
HepG2	játra	člověk	karcinom
HT-29	kolon	člověk	adenokarcinom
HT115	kolon	člověk	adenokarcinom
HUVEC	endotel	člověk	embryonální
LEP	plíce	člověk	embryonální (fibroblasty)
MCF-7	prs	člověk	adenokarcinom
MDA-MB-231	prs	člověk	adenokarcinom
MDCK	ledvina	pes	normální
MVLN	prs	člověk	adenokarcinom
SKOV-3	ovarium	člověk	adenokarcinom, Pt – primárně rezistentní
T47D	prs	člověk	karcinom
WB-F344	játra	krysa	normální

Buňky mesenchymálního původu

code	Lokalization	Organism	Pathology
G5:113		myš	fibrosarkom
HL-60	krev	člověk	leukemie
IMM	nervové		imortalizované
Jurkat	krev	člověk	leukemie (lymfoidní)
K562	krev	člověk	leukemie (erytroidní)
MOLT-4	krev	člověk	leukemie (lymfoidní)
ML-1	krev	člověk	leukemie (myeloidní)
NB4	krev	člověk	leukemie (myeloidní)
U937	krev	člověk	leukemie (monocytární)
V79	fibroblasty	křeček	normální (fibroblasty)
WEHI	krev	myš	leukemie (lymfoidní)

Metody používané v Oddělení Cytokinetiky BFÚ AV ČR v.v.i. Brno

Legenda: FACS – flow cytometry

FM - fluorescent microscopy

SM – light microscopy

WB - western blotting

FM - fluorimetry (FluoStar)

CM - colorimetry (FluoStar nebo Elisa reader)

LM - luminometry

PAGE - polyacrylamid electrophoresis

RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction

RG - radiography

ELFO – agarose electrophoresis

Detekce apoptózy

method, molecules	Princip, function, parameter	Legend
DAPI staining	Studium morfologických změn buněčného jádra apoptotických buněk	FM
Annexin V - FITC + propidium jodid (PI)	Externalizovaný fosfatidylserin apop. buněk + zachovaná semipermeabilita (detekce rané apoptózy)	FACS, FM
TUNEL + PI	Průkaz specifické fragmentace DNA (DNA zlomů - nicků – ss DNA breaks)	FACS, FM
SubG0/G1 peak v distribuci buněčného cyklu	Barvení buněčné DNA propidium jodidem s extrakcí nízkomolekulární DNA citrátovým pufrům	FACS
PI - Hoechst double - stain	Rozdělení buněk na mrtvé/živé, podle morfologie jádra identifikace apoptotických buněk	FM
DNA žebřík	Průkaz fragmentace DNA na 180 bp fragmenty (tzv. ladder)	ELFO
Kaspáza 1, 3, 7, 8, 9	Detekce exprese specifických proteáz	WB
Caspase assay (c-3, -6, -8, -9 subs.)	Důkaz aktivity specifických proteáz štěpením specifické sekvence na fluorescenční substrát	FM
cytokeratin 18 - protilátka M30	Neoepitop vytvořený štěpením cytokeratinu kaspázou	FACS,
Lamin B	Degradace Laminu B kaspázami	WB
PARP	Detekce štěpení proteinu PARP	WB
JC-1, TMRE, DiOC6, MitoTracker Red, Rh 123	Detekce změn mitochondriálního potenciálu $\Delta\Psi_m$	FACS
Hoechst + propidium jodid (PI)	Detekce apoptických, nekrotických a sekundárně nekrotických buněk (detekce i pozdní apoptózy)	FM
F-aktin	Detekce intenzity polymerizace a depolymerizace aktinu (pomocí konjugátu faloidin-FITC)	FCM, FM
Intracelulární pH	Průkaz poklesu intracelulárního pH vůči fyziol. hodnotě nutného k aktivaci enzymu DNA-ázy	
Izolace cytochromu c z cytos. frakce	Vylití Cyt. C z mitochondrií do cytosolu a formování komplexu s Apaf-1 a procasp-9 vytváří apoptosom	WB
OxPhos Complex IV subunit II	Studium funkce mitochondrií	WB

Proteiny a molekuly spojené s apoptózou

method, molecules	Princip, function, parameter	Legend
Bad, Bag-1, Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-X, Bcl-XL, Bid, Mcl-1	Bcl-2 rodina - regulátory průběhu apoptózy	WB
c-FLIP	Inhibitor kaspázy 8	WB
c-IAP1, XIAP	Rodina inhibitorů kaspáz	WB
Hydroethidin, 2',7' dichlorofluoresceindiacetát	Stanovení respiračního vzplanutí a produkce ROS provázející apoptózu	FACS
Dihydrorhodamin 123	Stanovení respiračního vzplanutí a produkce ROS provázející apoptózu	FACS
Lucigenin	Stanovení respiračního vzplanutí a produkce ROS provázející apoptózu	LM

Detekce proliferace, cytotoxicity a viability

method, molecules	Princip, function, parameter	Legend
Počítání buněk	Počítač částic založený na principu konduktivity	Coulter counter
Dye exclusion assay - eosin, trypanová modř	Barvení mrtvých buněk s permeabilizovanou membránou	SM
Dye exclusion assay - propidium jodid	Barvení mrtvých buněk s permeabilizovanou membránou	FACS
MTT, WST-1	Stanovení relativního množství buněk metabolizujících tetrazolové soli MTT, WST-1 na formazanové produkty	CM
CyQuant	Kit (Molecular Probes) pro značení DNA speciální fluorescenční barvou - proliferační assay	FM
PCNA	Marker proliferace - podjednotka DNA-polymerázy δ a ϵ	WB, SM
Inkorporace BrdU	Analog deoxyuridinu se inkorporuje během replikace DNA v proliferačních buňkách	FACS, FM
Inkorporace 3H-thymidinu (izotopová metoda)	Triciem značený thymidin se inkorporuje do buněk během replikace DNA - scintilační hodnocení	RG
Clonogenic assay	Ošetřované buňky rostou v médiu nebo na agaru, sleduje se schopnost vytvářet kolonie buněk	

Mehody pro analýzu buněčného cyklu

Methods, molecules	Princip, function, parameter	Legend
Barvení pomocí PI (např. Vindelův roztok)	Distribuce buněčné populace podle množství celkové buněčné DNA do jednotlivých fáz bun. Cyklu	FACS
Mouse anti-BrdU-FITC + PI	Sledování syntézy DNA na základě inkorporace BrdU do DNA proliferujících buněk	FACS
Pulse-chase BrdU labeling	Sledování průchodu buněk cyklem	FACS

Proteiny spojené s regulací buněčného cyklu

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
cyklin A	Řízení S - G2 fáze b. cyklu - asociuje s cdk 2	WB
cyklin D1	Řízení přechodu z fáze G1 do S - asociuje s cdk 4	WB
cdk 2 activity assay	Řízení S - G2 fáze b. cyklu - asociuje s cyklinem A	RG
cdk 4	Řízení přechodu z fáze G1 do S - asociuje s cyklinem D	WB
p15, 16	Rodina p16 - inhibující kinázy cdk 4 a 6	WB
p21/waf1/cip1/sdi1/pic1	Inhibitor cdk a DNA replikace, transaktivovaný pomocí p53	WB
p27/kip1	Inhibitor komplexů cyklin D-cdk 4, cyklin A-cdk 2	WB
Topoizomeráza II α	Replikační faktor - marker pozdní S/G2/M fáze b. cyklu	WB
pRb	Onkosupresor zastavující ve fosforylované formě b. cyklus v souvislosti s p21	WB
p53	Tumor supresorový gen - "Guardian of the genome" - downstream reguluje p21/waf	WB

Detekce buněčné diference

method, molecules	Princip, function, parameter	Legend
CD11b, CD14	Znaky monocytární diference lidských leukemických buněk	FACS
Nespecifické esterázy	Stanovení aktivity α -naftyl acetát esterázy (difer. leukemických buněk)	CM
Fagocytická aktivita	Znak monocytární diference leukem. buněk - pohlcení částic konjug. s FITC	FACS
NBT redukční test	Se zvyšující se úrovní diference roste počet reduk. formazanových zrn	CM
Aktivita alkalické fosfatázy	Znak diference kolonových buněk - disodná sůl 4-nitrofenyl fosfátu	CM
Nespecifické esterázy	Stanovení aktivity nespecifických esteráz pomocí štěpení fluorescenční sondy CFDA (karboxyfluorescein diacetát)	FACS
Intracelulární pH	Stanovení intracelulárního pH jako markru diference buněk pomocí fluorescenční sondy SNARF-1	FACS
Polymerizace aktinu	FITC značený faloidin	FM

Proteiny spojené a buněčnou diferenciací

method, molecules	Princip, function, parameter	Legend
RAR α	Receptor <i>all-trans</i> kyselina retinová indukující diferenciaci leukemických buněk	WB
RXR α	Receptor aktivovaný 9-cis-retinovou kyselinou	WB
VDR	Receptor vitamínu D, množství VDR moduluje růst a diferenciaci nádorových buněk	WB

Mezibuněčná komunikace, anoikis, motilita

method, molecules	Princip, function, parameter	Legend
FAK	Nereceptorová tyrosin kináza zapojená v přenosu signálů z ECM	WB
Cadheriny	Složka desmosomu, nachází se v komplexu s cateniny	WB, FM
γ -catenin	Složka desmosomu, nachází se v komplexu s cadheriny	WB
connexin 43	Složka gap junctions (GJIC)	WB
GJIC inhibition assay	Testování funkčnosti GJIC pomocí luciferové žluti	FM
Wound healing assay	Testování motility buněk	FM

Metabolismus kyseliny arachidonové

method, molecules	Princip, function, parameter	Legend
cytopl. fosfolipáza A2	Odštěpuje AA z membrán	WB
5-lipoxygenáza	Metabolizuje AA na leukotrieny	WB
Cyklooxygenáza 2	Metabolizuje AA na prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany	WB
Uvolňování AA	Uvolnění AA z buněk do media	HPLC (VUVEL)

Signální dráhy receptorů smrti

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Fas-L	Ligand Fas-R - signál smrti	WB
Fas-R (CD95)	Receptor smrti - aktivovaný navázáním Fas-L	WB,FACS
FADD	Adaptérová molekula - součást DISC komplexu	WB
Toso	Inhibitor Fas indukované apoptózy nacházející se na povrchu T lymfocytů	WB
TRAIL	Ligand TRAIL-R - signál smrti	WB
TRAIL-R1,2 (DRs)	Receptory smrti - aktivovány navázáním TRAIL-L	WB,FACS
TRAIL-R3,4 (DcRs)	Decoy receptory - vážou TRAIL, ale neaktivují proces apoptózy	WB,FACS

Kinázy a s nimi spojené proteiny

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Ras, N-Ras	Mebránový G-protein	WB
ERK 1/2	Imunochemické stanovení neaktivní a aktivní (fosforylované formy)	WB
p38	Imunochemické stanovení totální (na fosforylačním stavu nezávislé) hladiny p38	WB
JNK/SAPK activity assay	stanovení aktivity analýzou fosforylace substrátu (radioizotopová metoda)	RG
Akt/PKB	Serin/Threoninová protein kináza, může stimulovat Ras	WB
pTyr	Protilátka detekující fosforylovaný Tyrosin	WB
pSer	Protilátka detekující fosforylovaný Serin	WB

Signální dráha TGF β

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
TGF β 1	Růstový faktor	WB
TGF β R I, II	Receptor pro TGF β	WB
Smad 2, 4	Aktivace TGF R vede k translokaci těchto transkripčních faktorů do jádra	WB

Proteiny spojené s receptorem AhR

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
AhR	Ligand-dependentní transkripční faktor,	WB, RT-PCR EMSA, FM
Reporter gene assay for AhR	Metoda stanovení aktivity Ah R	LM
Stabilní transfekce mutantních variant AhR a ARNT pomocí plazmidových vektorů		
ARNT	Jaderný partner receptoru AhR umožňující jeho vazbu na XRE element	WB, RT-PCR
CYP1A1	Oxidáza se smíšenou funkcí patřící do rodiny cytochromů P450	WB, RT-PCR

Proteiny spojené s hormonální regulací

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
ER α , β	Receptory estrogenů	WB
Reporter gene assay for ER	Metoda stanovení aktivity estrogenních receptorů	LM
Cathepsin D	Endopeptidáza indukovaná estrogeny	WB
LRP/MVP	Ribonukleoproteinové částice ovlivněné hladinou estrogenů	WB
PPAR γ	Jaderný receptor pro hormony ovlivňovaný MAPK	WB

Transcripční faktory a s nimi spojené proteiny

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
NF- κ B	Aktivátor řady genů spojených s hematopoezou, apoptózou atd.	WB, EMSA
I κ B	Inhibitor NF- κ B, který jej zadržuje v cytoplazmě	WB
c-Myc	Po navázání heterodimerizačního partnera Max působí jako TF	WB
p53	Onkosupresor podílicí se na řízení oprav DNA lézí	WB
AP - 1 (Jun + Fos)	Homo- či heterodimerní transkripční faktor	WB, EMSA