

CVIČENÍ Z ANALYTICKÉ CYTOMETRIE 2021/2022

17. – 20. 1. 2022, BFÚ

Vyučující: Mgr. Barbora Kvokačková, Mgr. Markéta Pícková, Mgr. Ondřej Vacek, Ing. Michaela Chorvátová, Mgr. Radek Fedr, Mgr. Karel Souček PhD.

Skupina A

Briediková, Kristína, učo 445297 [FYZIO]

Janská, Libuše, učo 528115 [IMUNO]

Kopecký, Martin, učo 478193 [IMUNO]

Krchová, Michaela, učo 423226 [FYZIO]

Machů, Michaela, učo 484116 [IMUNO]

Skupina B

Maljarová, Eliška, učo 484310 [FYZIO]

Mokráčková, Nina, učo 528111 [VYBIO]

Nepovímová, Lucie, učo 528100 [IMUNO]

Pospíchalová, Kateřina, učo 481519 [IMUNO]

Raptová, Petra, učo 451811 [FIVBZ]

Skupina C

Seifertová, Petra, učo 486749 [VYBIO]

Šošolíková, Tereza, učo 528103 [IMUNO]

Tokár, Filip, učo 478457 [IMUNO]

Tomášiková, Zuzana, učo 484175 [VYBIO]

Voňková, Adéla, učo 484364 [VYBIO]

Zelenák, Štefan, učo 410571 [FYZIO]

| Den 1 (17.1.) | A) | B) | C) |
|---------------|---|---|----|
| 9 - 12 hod | <ul style="list-style-type: none">▪ Úvod, HeLa 8 Fucci - cytometer▪ MLN-4924 treatment | | |
| 13- 16 hod | | <ul style="list-style-type: none">▪ Úvod, HeLa 8 Fucci - cytometer▪ MLN-4924 treatment | |

| Den 2 (18.1.) | A) | B) | C) |
|---------------|---|--|--|
| 9 – 12 hod | <ul style="list-style-type: none">▪ Proliferace a bun. cyklus | | <ul style="list-style-type: none">▪ Úvod▪ Imunofenotypizace |
| 12-15 hod | <ul style="list-style-type: none">▪ HeLa 8 Fucci - mikroskop | <ul style="list-style-type: none">▪ HeLa 8 Fucci - mikroskop | |
| 15-18 hod | | <ul style="list-style-type: none">▪ Proliferace a bunkový cyklus | |

| Den 3 (19.1.) | A) | B) | C) |
|----------------------|---------------------|---------------------|---|
| 9 – 13 hod | ▪ Imunofenotypizace | | ▪ HeLa 8 Fucci- cytometer ▪ MLN-4924 treatment |
| 13 – 17 hod | | ▪ Imunofenotypizace | |

| Den 4 (20.1.) | A) | B) | C) |
|----------------------|-----------|-----------|--|
| 9 – 15 hod | | | ▪ HeLa 8 Fucci – mikroskop ▪ Proliferace a bunkový cyklus |

Protokol 1

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

Protokol 2

Detekce proliferace, buněčného cyklu a buněčné životnosti po ovlivnění buněk DU-145 inhibitorem neddylace

Protokol 3

Imunofenotypizace lidské krve

Protokol 1

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

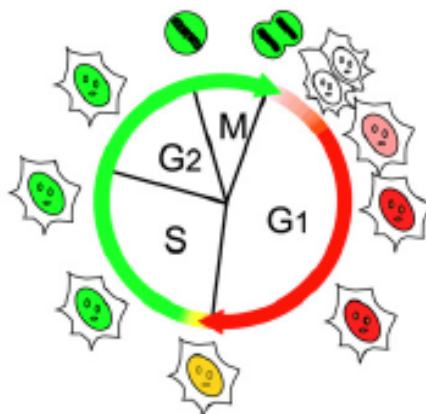
Cíl

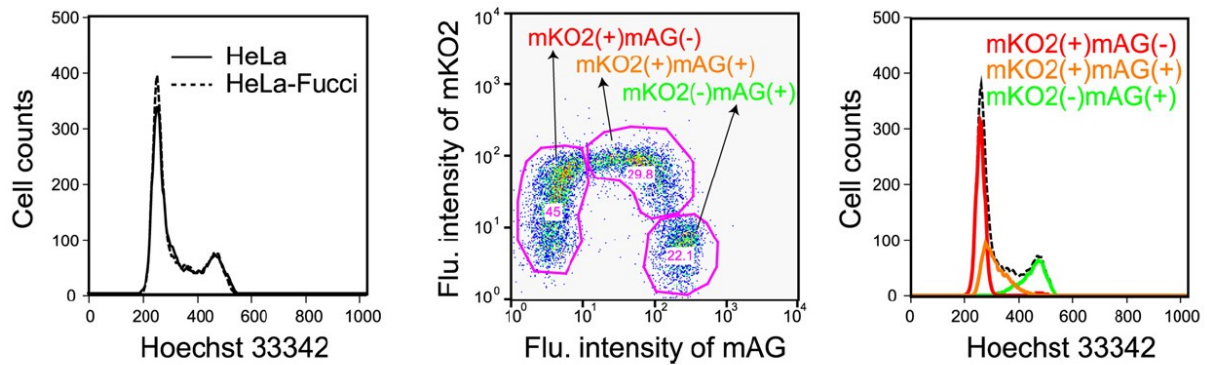
- cílem experimentu je seznámit se s modelovou buněčnou linií HeLa 8 Fucci, která umožňuje analýzu buněčného cyklu na živých buňkách bez potřeby fixace a značení
- měření proběhne na přístroji BD FACS Verse
- ukázka vyhodnocení dat bude provedena pomocí programu FlowJo
- analýza buněk na konfokálním 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 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°C) dokud se buňky neuvolní (cca 1-2 minuty)
- přidat 2,5 ml média se sérem (inaktivace trypsinu)
- misku opláchnout 1 ml PBS, přenést do zkumavky k buněčné suspenzi
- stočit 200g 5 minut
- odsát supernatant
- pelet rozsuspendovat v 1 ml PBS
- stočit 200g 5 min
- odsát supernatant
- pelet rozsuspendovat v 300 μl PBS a měřit

Výsledky

Popište postup měření buněčného cyklu u této linie + přiložte výsledky měření získané vyhodnocením v programu FlowJo

2) ANALÝZA NA KONFOKÁLNÍM MIKROSKOPU

Postup:

den 1: Výsev buněk HeLa 8 Fucci na mikroskopickou analýzu

den 2: Ovlivnění látkami

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

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

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

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

Dopočítejte množství látek, které se bude k buňkám přidávat (V celk.= 300uL)

den 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

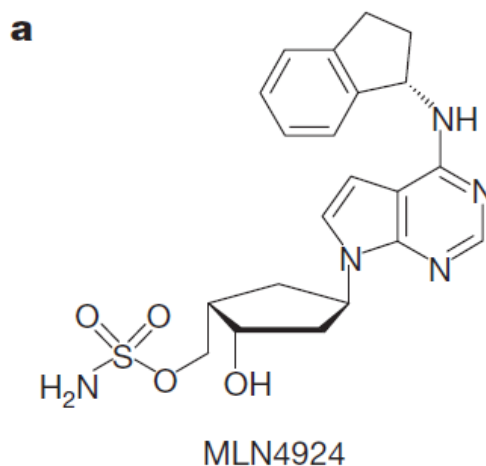
- cílem experimentu je ovlivnit buněčnou linii DU-145 inhibitorem neddylace (MLN-4924 – **0,11uM**) a vyšetřit účinky jeho působení
- působení MLN-4924 po dobu 24 hodin vede k deregulaci buněčného cyklu
- měření proběhne na přístroji Attune Flow Cytometer

Teorie

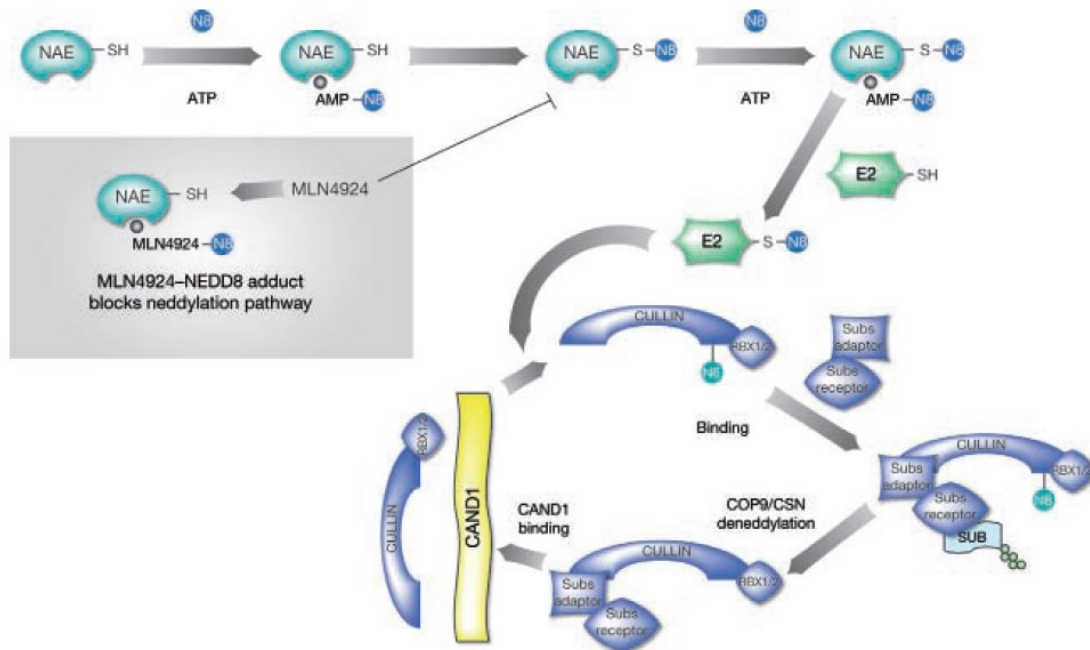
MLN-4924

- 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):



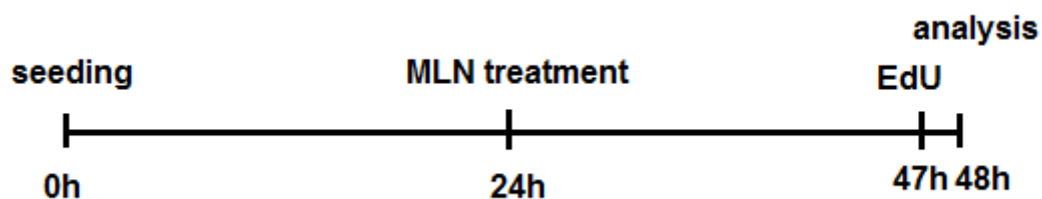
Působení inhibitoru MLN-4924 na zastavení dráhy neddylace (Soucy et al., 2010):



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 – LD Green/LD Yellow

- naředit značku pro viabilitu v PBS (1:1000)
- přidat 100 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ l |
| CuSO ₄ | 2,5 μ l |
| Fluorescent dye azide | 0,625 μ l |
| Reaction buffer additive (diluted 10x) | 12,5 μ l |
| Total reaction volume | 125 μ l |

6. Značení buněčného cyklu

- naředit značku PO-PRO-1 (s.s. 1mM) 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

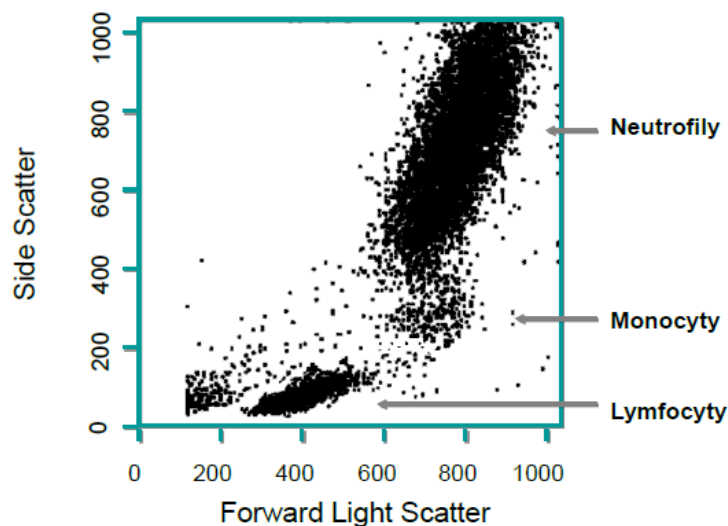
Imunofenotypizace lidské krve

Cíl

- Cílem experimentu je stanovit zastoupení jednotlivých populací buněk v krvi na základě exprese, pro tyto buňky typických, povrchových markerů.
- Dále u neutrofilních granulocytů bude stanovena míra aktivace po stimulaci s G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), prozánětlivým cytokinem, který aktivuje buňky myeloidní řady.
- Měření proběhne na průtokovém cytometru SONY SP6800 s následným vyhodnocení ve FlowJo.

Teorie

- Pojem imunofenotypizace představuje stanovení jednotlivých subpopulací buněk (primárně leukocytů) na základě exprese vybraných povrchových CD antigenů (markerů), a to s použitím fluorescenčně značených monoklonálních protilátek proti daným antigenům.
- Na základě rozptylu světla jsou populace rozděleny dle velikosti a granularity (Obr. 1).
- CD antigeny jsou povrchové molekuly buněk, které mají stejný epitop, identifikovatelný stejnou protilátkou umožňující rozpoznávání buněčných populací při imunofenotypizaci. Většinou jsou to receptory nezbytné pro funkci dané buňky.



Obr. 1: FS a SS leukocytů získaných z plné krve po lyzaci erytrocytů

Postup

- krev zdravého dobrovolníka bude odebrána zdravotní sestrou do antikoagulačního činidla (40 µl heparinu/1 ml krve)
- krev rozdělit na dva vzorky, přičemž jeden vzorek otreatovat s G-CSF na 120 min
- připravit si mix protilátek – viz Tab. 1
- po uplynulé době ze suspenze přidat do každé flow zkumavky po 100 µl (1. zkumavka nebarvená + 2. izotyp + 3. barvená)
- buňky ve zkumavce zafixovat 3,2% formaldehydem 1:1 na 15 min, RT
- následně zlyzovat erythrocyty s dH₂O 5 min, RT
- takto připravené suspenze stočit (400g, RT, 7 min) a resuspendovat ve 120 µl PBS s 0,1 % BSA
- přidat mix protilátek do zkumavek 2 a 3 a inkubovat 15-20 min, led
- přidat 4 ml PBS na přemytí
- stočit (400g, RT, 7 min) a resuspendovat ve 120 PBS µl, led
- analýza na FC

Tab. 1: Použité protilátky pro FC

| zkumavka č. | CD marker | fluorochrom | populace buňek | ředění | excitace/emise (nm) |
|-------------|----------------|-------------|------------------------|--------|---------------------|
| 1 | nebarvená ctrl | --- | --- | --- | --- |
| 2 | Izotyp | PerCP | --- | 1:40 | 482/675 |
| | Izotyp | PE | --- | 1:40 | 496/578 |
| | Izotyp | PE/Cy7 | --- | 1:40 | 496/785 |
| | Izotyp | APC/Cy7 | --- | 1:40 | 650/785 |
| | Izotyp | APC | --- | 1:40 | 650/660 |
| 3 | CD11b | PerCP | Neutrofil - aktivace | 1:40 | 482/675 |
| | CD3 | PE | T-lymfocyt | 1:40 | 496/578 |
| | CD4 | PE/Cy7 | Pomocný T lymfocyt | 1:40 | 496/785 |
| | CD8 | APC/Cy7 | Cytotoxický T lymfocyt | 1:40 | 650/785 |
| | CD19 | APC | B-lymfocyt | 1:40 | 650/660 |

Výsledky

Popište postup měření a „gatování“ jednotlivých populací + přiložte výsledky měření vyhodnoceny pomocí programu FlowJo.