
Protokol 1

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

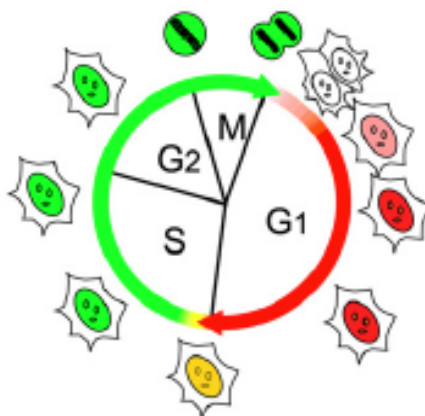
Cíl

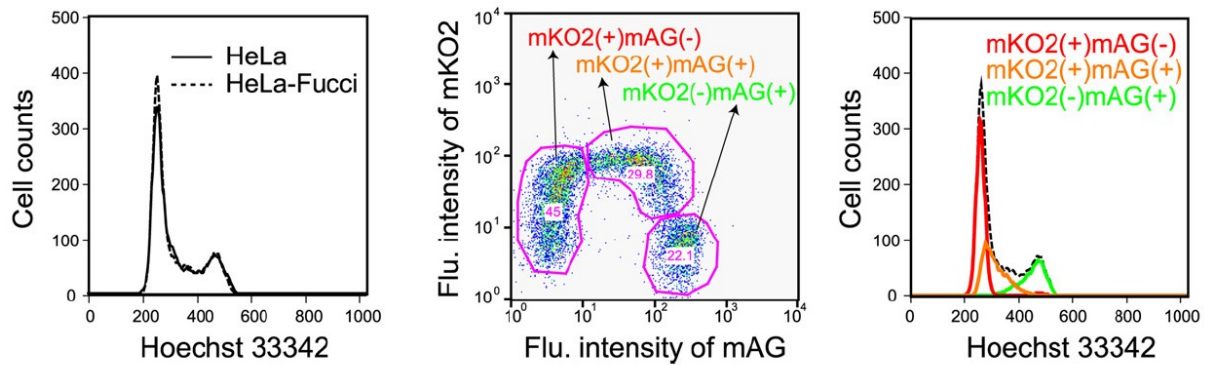
- cílem experimentu je seznámit se s modelovou buněčnou linií HeLa 8 Fucci, která umožňuje analýzu buněčného cyklu na živých buňkách bez potřeby fixace a značení
- měření proběhne na přístroji BD FACS Verse
- ukázka vyhodnocení dat bude provedena pomocí programu FlowJo
- analýza buněk na konfokálním 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)

Dopočtete 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.

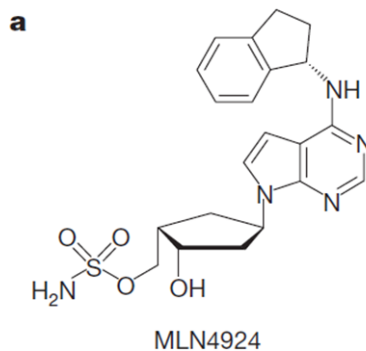


Figure 1: Struktura inhibitoru MLN-4924. (Soucy et al., 2009 Nature)

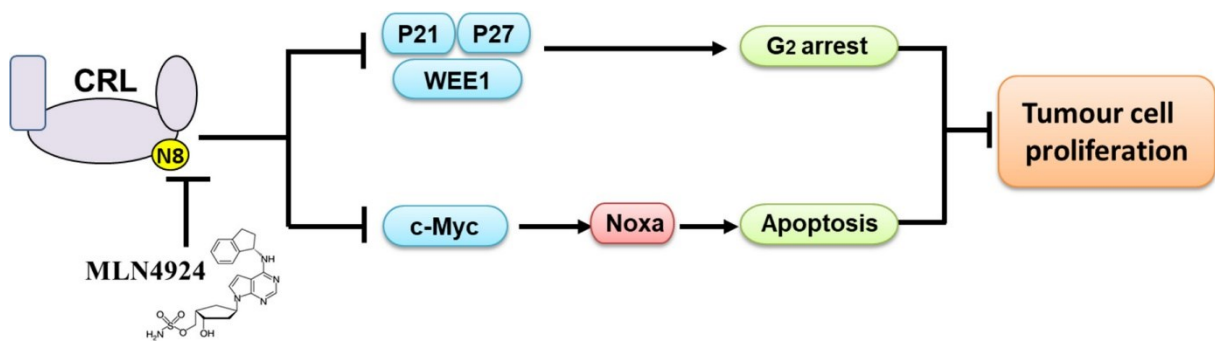


Figure 2: Schema blokování neddylace a proliferace inhibítorem MLN-4924. (Wenjuan Zhang et. al., 2018, Cell proliferation)

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 (Molecular Probes C10420)
- Fx cycle Violet (Theromofisher Scientific F10347)

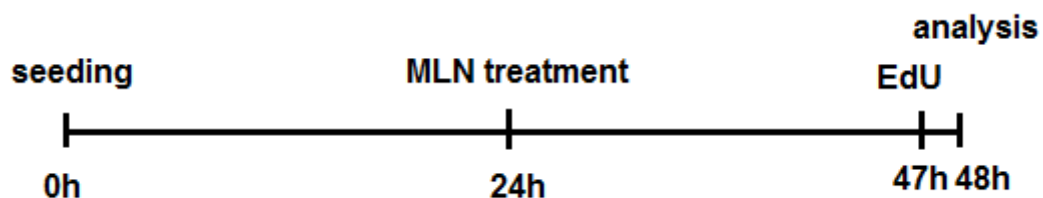


Figure 3: Design experimentu a časy ovlivnění buněk inhibítorem MLN-4924.

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 µl/vzorek, inkubovat 15 min, 4°C
- přidat 1 ml PBS + 1% BSA, stočit (200g, 5 min), odsát supernatant

3. Fixace

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

4. Permeabilizace

- rozsuspendovat buňky ve 100 µl 0,15% Tritonu X-100
- inkubovat 15 min, RT
- přidat 1 ml PBS + 1% BSA
- odpipetovat 250 µl z každého vzorku do nové zkumavky a nadepsat jako ISO kontrola
- stočit (200g, 5 min), odsát supernatant

5. Click-iT reakce

- připravit click-iT reakční směs dle rozpisu
- přidat 125 µl click iT směsi/vzorek nebo 125 µl PBS/ ISO kontrolu
- 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
<hr/>	
Total reaction volume	125 μ l

6. Značení buněčného cyklu

- naředit značku Fx cycle Violet v PBS (1:1000) a RNase (1:1000)
- přidat 500 μ 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

Imunofenotypizace lidské krve

Cíl

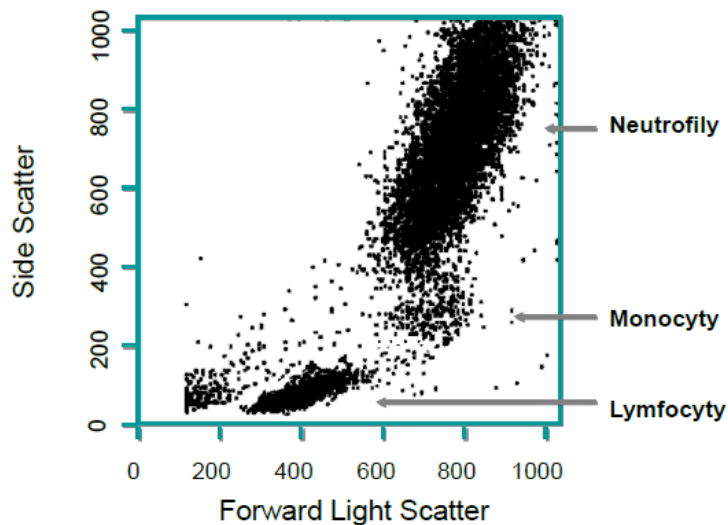
- Cílem experimentu je stanovit zastoupení jednotlivých populací buněk v krvi na základě granularity, velikosti či exprese, pro tyto buňky typických, povrchových markerů.
- Dále u neutrofilních granulocytů bude stanovena míra aktivace po stimulaci s G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), prozánětlivých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

Teorie

- Pojem imunofenotypizace představuje analýzu heterogenních populací buněk v krvi za účelem identifikace přítomnosti a podílu různých buněčných subpopulací.
- Identifikace probíhá na základě exprese vybraných povrchových CD antigenů (markerů), a to s použitím fluorescenčně značených monoklonálních protilátek proti těmto antigenům. CD antigeny jsou většinou receptory nezbytné pro funkci dané buňky (buněčná komunikace, adheze, metabolismus apod.).
- Na základě rozptylu světla mohou být hlavní populace rozděleny dle velikosti a granularity (Obr. 1).
- Tato metoda se využívá jak ve výzkumu, tak v klinických laboratořích při diagnostice hematologických malignit.

Tab. 1: Frekvence lidských buněk v periferní krvi člověka.

Buněčný typ	Množství (%)
T lymfocyty	10-25
B lymfocyty	3-10
Granulocyty (eos, bas, neu)	45-65
Monocyty	3-10
NK buňky	2-5
Dendritické buňky (DC)	0,5-1
Kmenové buňky	0,01-0,05



Obr. 1: FSC a SSC leukocytů získaných z plné krve po lyzaci erytrocytů

Postup

1. krev zdravého dobrovolníka bude odebrána zdravotní sestrou do antikoagulačního činidla (40 μ L heparinu/1 mL krve)
2. krev rozdělít na dva vzorky, přičemž jeden vzorek stimulovat pomocí G-CSF minimálně 120 min (1 μ g/mL)
3. připravit si mix protilátek – viz Tab. 2
4. po uplynulé době přidat do každé flow zkumavky po 100 μ L suspenze (2x zkumavka nebarvená + 1x izotyp + 2x barvená)
5. buňky ve zkumavce zafixovat 3,2% formaldehydem 1:1 na 10 min, RT
6. následně zlyzovat erytrocyty 4 mL dH_2O , 5 min, RT
7. takto připravené suspenze stočit (350 x g, RT, 5 min) a resuspendovat ve 120 μ L PBS s 1% FBS
8. přidat mix protilátek do zkumavek 2, 3 a 4 - inkubovat 15-20 min na ledu
9. přidat 4 mL PBS na promytí
10. stočit (350 x g, RT, 5 min) a resuspendovat ve 150 μ L PBS, uchovat na ledě
11. analýza na FACS

Tab. 2: Protilátky pro FACS (všechny od SONY Biotechnology).

zkumavka č.	CD marker	Fluoro- chrom	populace buňek	ředění	Kat. č.	excitace/emise (nm)
1A (bez G-CSF)	nebarvená ctrl	---	---	---	---	---
1B (G-CSF)	nebarvená ctrl	---	---	---	---	---
2 (bez G-CSF)	Izotyp	PerCP	---	1:40	2603150	482/675
	Izotyp	PE	---	1:50	2600565	496/578
	Izotyp	PE/Cy7	---	1:50	2600630	496/785
	Izotyp	APC/Cy7	---	1:50	2600635	650/785
	Izotyp	APC	---	1:50	2600705	650/660
3 (bez G-CSF)	CD11b	PerCP	Neutrofil - aktivace	1:40	1106150	482/675
	CD3	PE	T-lymfocyt	1:50	2324030	496/578
	CD4	PE/Cy7	Pomocný T lymfocyt	1:50	2102560	496/785
	CD8	APC/Cy7	Cytotoxický T lymfocyt	1:50	2323570	650/785
	CD19	APC	B-lymfocyt	1:50	2111060	650/660
4 (G-CSF)	CD11b	PerCP	Neutrofil - aktivace	1:40	1106150	482/675

Výsledky

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