

# CVIČENÍ Z ANALYTICKÉ CYTOMETRIE 2023/2024

8.-10.1. 2024, BFÚ

Cvičení se uskuteční ve dnech 8-10.1.2024, každá skupina se dostaví na cvičení po dobu dvou dnů (skupina A+B: 8-9.1.2024, skupina C+D: 9-10.1.2024. Cvičení se uskuteční v laboratořích Biofyzikálního ústavu AV ČR.

## Protokol 1 – Mgr. Ondřej Vacek

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

## Protokol 2 – Ing. Michaela Chorvátová

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

## Protokol 3 – Mgr. et Mgr. Daniela Rubanová

Imunofenotypizace lidské krve - analýza vybraných subpopulací krevních buněk a jejich aktivace

| Den 1<br>8.1.2024 | A)   | B)  | C) | D) |
|-------------------|--|---|----|----|
| 9 - 12:30 hod     | <b>Úvod</b><br>1)Hela 8 Fucci založení experimentu – mikroskop<br><br>1)Hela 8 Fucci - cytometr (Souček lab) | <b>Úvod</b><br>3)Imunofenotypizace (Kubala lab)   |    |    |
| 12:30-13h         | pauza  | pauza   |    |    |
| 13- 17 hod        | 2)Proliferace a buněčný cyklus (419)   | 1)Hela 8 Fucci založení experimentu - mikroskop<br><br>1)Hela 8 Fucci - cytometr (Souček lab) |    |    |

| Den 2<br>9.1.2024 | A)   | B)   | C)  | D)   |
|-------------------|--|--|---|--|
| 9 – 10 hod        |  |  | Úvod<br>3)Imunofenotypizace<br>(Kubala lab)                             | Úvod<br>2)Proliferace a bun.<br>Cyklus<br>(419)                          |
| 10-11             | 1)Hela 8 Fucci -<br>analýza na<br>mikroskopu<br>(Souček lab) |  |   |  |
| 11-12             | pauza  | 1)Hela 8 Fucci -<br>analýza na<br>mikroskopu<br>(Souček lab) |   |  |
| 12-13hod          | 3)Imunofenotypizace<br>(Kubala lab)                          | pauza  | 1)Hela 8 Fucci -<br>založení experimentu -<br>mikroskop<br>(Souček lab) |  |
| 13-14h            |  | 2)Proliferace a bun.<br>Cyklus<br>(419)                      |   | pauza  |
| 14-15h            |  |  |   | 1)Hela 8 Fucci<br>založení<br>experimentu -<br>mikroskop<br>(Souček lab) |
| 15-17h            |  |  |   |  |

| Den 3<br>10.1.2023 | A) | B) | C)  | D)   |
|--------------------|----|----|---|--|
| 9 – 13 hod         |    |    | 2)Proliferace a buněčný<br>cyklus<br>(419)                | 1)Hela 8 Fucci - cytometr<br>1)Hela 8 Fucci - analýza<br>na mikroskopu<br>(Souček lab) |
| 13-13:30 hod       |    |    | pauza   | pauza  |
| 13:30-16:30h       |    |    | 1)Hela 8 Fucci - analýza<br>na mikroskopu<br>(Souček lab) | 3)Imunofenotypizace  |

## Rozdělení studentů:

| Skupina      | Datum              | Učo                    | Student               | Studium                         |
|--------------|--------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| <b>A) CZ</b> | <b>8-9.1.2023</b>  | 461725                 | Bajerová, Martina     | PřF N-EBZ IMUNO [sem 1, roč 1]  |
|              |                    | 500579                 | Blažková, Gabriela    | PřF N-EBZ IMUNO [sem 1, roč 1]  |
|              |                    | 499584                 | Bočková, Tami         | PřF N-EBZ VYBIO [sem 1, roč 1]  |
|              |                    | 509279                 | Böhmeová, Nina        | PřF N-EBZ FYZIO [sem 1, roč 1]  |
|              |                    | 509369                 | Foretová, Barbora     | PřF N-EBZ FYZIO [sem 1, roč 1]  |
| <b>B) CZ</b> | <b>8-9.1.2023</b>  | 506777                 | Chamrádová, Linda     | PřF N-EBZ IMUNO [sem 1, roč 1]  |
|              |                    | 499292                 | Chmelařová, Barbora   | PřF N-EBZ VYBIO [sem 1, roč 1]  |
|              |                    | 480090                 | Kolčáková, Nela       | PřF N-EBZ IMUNO [sem 1, roč 1]  |
|              |                    | 359042                 | Miléřová, Lenka       | PřF N-EBZ VYBIO [sem 1, roč 1]  |
|              |                    | 509199                 | Neumeisterová, Nikola | PřF N-EBZ IMUNO [sem 1, roč 1]  |
| <b>C) CZ</b> | <b>9-10.1.2023</b> | 505240                 | Straník, Jaroslav     | PřF N-EBZ FYZIO [sem 1, roč 1]  |
|              |                    | 506046                 | Streit, Pavel         | PřF N-EBZ IMUNO [sem 1, roč 1]  |
|              |                    | 484192                 | Šillerová, Zdeňka     | PřF N-EBZ IMUNO [sem 1, roč 1]  |
|              |                    | 506839                 | Voznicová, Simona     | PřF N-EBZ IMUNO [sem 1, roč 1]  |
| Group        | Date               | Personal ident. number | Student               | Studies                         |
| <b>D) EN</b> | <b>9-10.1.2023</b> | 498936                 | Bajusová, Erika       | PřF N-LGM BLDLGM [sem 1, roč 1] |
|              |                    | 538725                 | Goralija, Adna        | PřF N-MCBE MCBE [sem 3, roč 2]  |
|              |                    | 538717                 | Omerbegović, Sabina   | PřF N-MCBE MCBE [sem 3, roč 2]  |
|              |                    | 538713                 | Tomar, Ayushi         | PřF N-MCBE MCBE [sem 3, roč 2]  |
|              |                    | 538721                 | Yusuf, Abdulhaqem     | PřF N-MCBE MCBE [sem 3, roč 2]  |

---

## Protokol 1

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

---

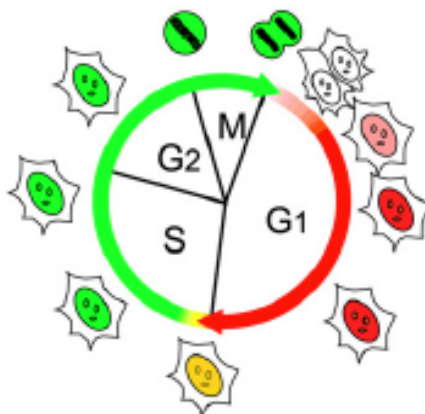
### Cíl

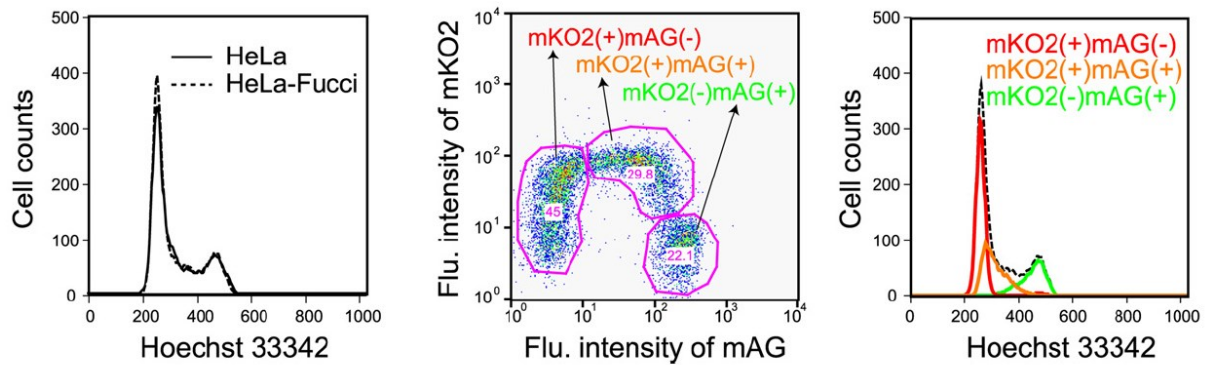
- cílem experimentu je seznámit se s modelovou buněčnou linií HeLa 8 Fucci, která umožňuje analýzu buněčného cyklu na živých buňkách bez potřeby fixace a značení
- měření proběhne na přístroji BD FACS Verse
- ukázka vyhodnocení dat bude provedena pomocí programu FlowJo
- analýza buněk na konfokálním 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  $\text{Ca}^{2+}$  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** (50 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)**

**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

---

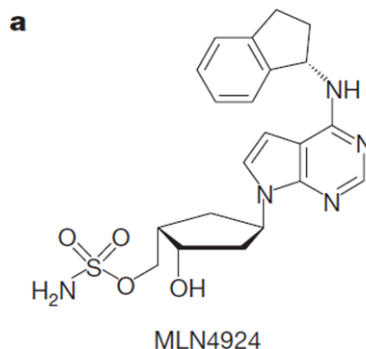
### Cíle

- 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

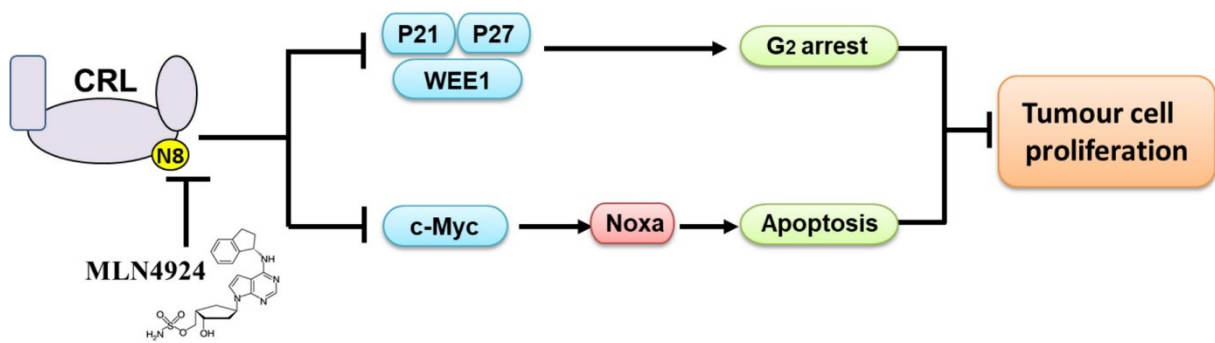
### Teorie

#### 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<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.



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

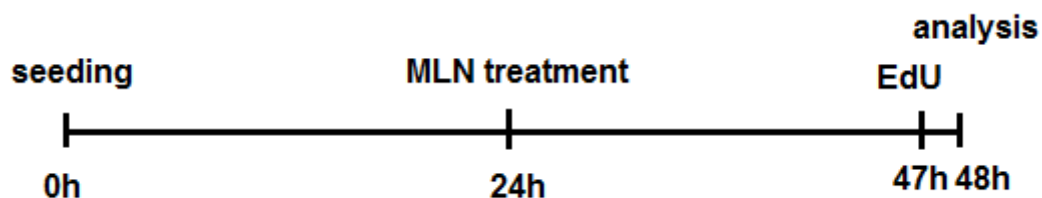


**Obrázek 2:** Schéma blokování neddylace a proliferace inhibítorem MLN-4924. (Wenjuan Zhang et. al., 2018, Cell proliferation)

## 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)



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

## 6. Značení buněčného cyklu

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

### Imunofenotypizace lidské krve

---

#### Cíl

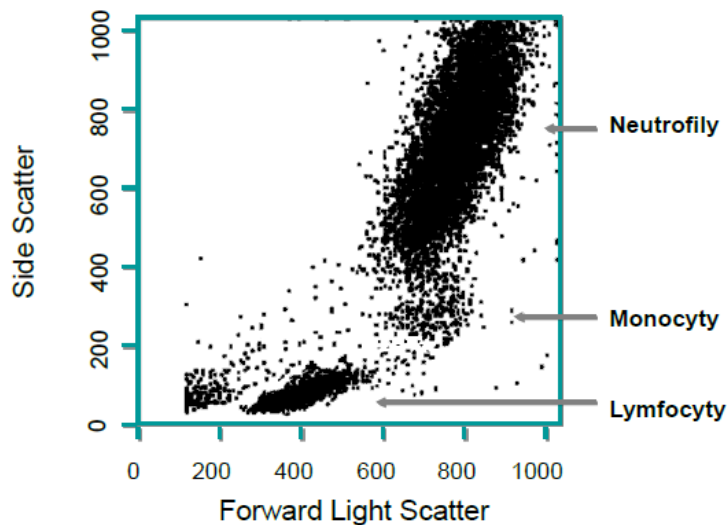
- Cílem experimentu je stanovit zastoupení jednotlivých populací buněk v krvi na základě granularity, velikosti či exprese, pro tyto buňky typických, povrchových markerů.
- Dále u neutrofilních granulocytů bude stanovena míra aktivace po stimulaci s G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), prozánětlivých 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  $\mu$ L heparinu/1 mL krve).
2. Krev rozdělit na dva vzorky, přičemž jeden vzorek stimulovat pomocí G-CSF minimálně 120 min (5  $\mu$ g/mL).
3. Po uplynulé době přidat do každé flow zkumavky po 100  $\mu$ L suspenze (1x zkumavka nebarvená + 1x izotyp + 2x barvená).
4. Buňky ve zkumavce zafixovat 3,2% formaldehydem 1:1 na 10 min, RT.
5. Následně zlyzovat erytrocyty přidáním 3 mL  $dH_2O$ , 5 min (nebo do vyčerení), RT.
6. Takhle připravené suspenze stočit (350 x g, RT, 5 min) a resuspendovat ve 100  $\mu$ L PBS s 1% BSA.
7. Přidat protilátky do zkumavek 2, 3 a 4 viz. Tab. 2 - inkubovat 15-20 min na ledu.
8. Přidat 3 mL PBS na promytí.
9. Stočit (350 x g, RT, 5 min) a resuspendovat ve 150  $\mu$ L PBS, uchovat na ledě.
10. Analýza na FACS.

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

| Zkumavka č.   | CD marker         | Fluoro-<br>chrom | Populace<br>buněk         | Ředění | Kat. č. | excitace/emise<br>(nm) |
|---------------|-------------------|------------------|---------------------------|--------|---------|------------------------|
| 1 (bez G-CSF) | nebarvená<br>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 -<br>aktivace   | 1:40   | 1106150 | 482/675                |
|               | CD3               | PE               | T lymfocyt                | 1:50   | 2324030 | 496/578                |
|               | CD4               | PE/Cy7           | Pomocný<br>T lymfocyt     | 1:50   | 2102560 | 496/785                |
|               | CD8               | APC/Cy7          | Cytotoxický<br>T lymfocyt | 1:50   | 2323570 | 650/785                |
|               | CD19              | APC              | B lymfocyt                | 1:50   | 2111060 | 650/660                |
| 4 (G-CSF)     | CD11b             | PerCP            | Neutrofil -<br>aktivace   | 1:40   | 1106150 | 482/675                |

## Výsledky

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