

DETEKCE REPLIKACE DNA VE VYBRANÝCH NÁDOROVÝCH LINIÍCH

TEORETICKÝ ÚVOD

Cykliny společně s cyklin-dependentními kinasami (CDK) patří mezi významné proteiny podílející se na regulaci buněčného cyklu. Cykliny jsou exprimovány ve specifických fázích buněčného cyklu a následně i rychle degradovány. D a E-typy cyklinů aktivují CDK4, CDK6 a CDK2 ke konci G1 a v přechodu G1/S fáze a katalyzují fosforylaci retinoblastomového proteinu Rb. Dochází tím k jeho inaktivaci a uvolnění transkripčních faktorů E2F, což iniciuje replikaci DNA [1]. Cyklin A pak následně aktivuje CDK2 v průběhu S fáze až do ukončení replikace DNA. Na konci S fáze se cyklinem A aktivuje CDK1, která později v komplexu CDK1/cyklin B zahajuje mitózu a reguluje ji až do metafáze [1]. Cyklin E patří mezi klíčové regulátory buněčného cyklu, jeho hladina je maximální při přechodu G1/S fází buněčného cyklu a následně kontinuálně klesá v průběhu S fáze. V G2/M fázi je pak hladina cyklinu E minimální [2, 3]. Exprese cyklinu A progresivně roste v průběhu celé S fáze a dosahuje maxima v G2/M fázi buněčného cyklu. U buněk v G1 fázi buněčného cyklu je exprese cyklinu A minimální [2]. Díky zmiňované expresi cyklinů v různých fázích buněčného cyklu je jejich použití vhodným příkladem demonstrace aplikované dvouparametrové průtokové cytometrie. Dalším z příkladů užitečných markerů buněčného cyklu je například histon H3, k jehož fosforylaci dochází specificky od počátku profáze po anafázi. Mezi další význačné markery zařazujeme použití specifických deoxynukleosidů (5-bromo-2'-deoxyuridin, 5-ethynyl-2'-deoxyuridin), které se inkorporují do DNA a slouží tak nejen k označení aktivně proliferující buněčné populace, ale často též k přesné kvantifikaci buněk v S fázi [4].

Průtoková cytometrie patří mezi moderní bioanalytické techniky umožňující multiparametrickou analýzu fyzikálně-chemických vlastností až několika tisíců biologických částic procházejících jedna po druhé úzkým paprskem světla o definované vlnové délce. Mezi nejčastější aplikace průtokové cytometrie patří jednoparametrová analýza buněčného cyklu populace buněk využívající fluorescenční sondu vázající se na DNA. Při průchodu jednotlivých buněk kapilárou průtokového cytometru a ozáření paprskem světla o definované vlnové délce pak dochází k excitaci fluorochromu navázané DNA sondy a emisi záření, které stechiometricky odpovídá množství DNA. Tímto pak dochází k rozlišení zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu (od G1 po G2/M) v heterogenní populaci buněk.

Více-parametrová průtoková cytometrie je jednou z aplikací průtokové cytometrie užitečná pro simultánní analýzu fyzikálně-chemických vlastností biologických částic. Díky více

typům použitých fluorescenčních sond, které jsou při dané metodě použity, jsme schopni pozorovat hladiny daných biomolekul v různých fázích buněčného cyklu. Tato metoda našla v posledních letech uplatnění například při studiu průběhu buněčného dělení normálních a nádorových buněk nebo vlivu nízkomolekulárních látek na proliferaci. Při jednoparametrové analýze buněčného cyklu (DNA obsah) může docházet k nedostatečnému rozlišení typu buněčného bloku. Proto se velmi často pro přesnější stanovení a rozlišení příslušné fáze buněčného cyklu používá dvouparametrové stanovení s využitím některého ze specifických proteinových markerů jednotlivých fází.

Obsahem následujícího protokolu je detekce aktivně replikujících S-fázových buněk pomocí dvouparametrové průtokové cytometrie s využitím inkorporace 5-bromo-2'-deoxyuridinu do DNA.

- [1] Malumbres M, Barbacid M., Nat Rev Cancer. 2009 Mar;9(3):153-66
- [2] Qin J, Tao D, Shu D, Leng Y, Gong J., Chin Med J (Engl). 2001 Sep;114(9):967-71.
- [3] Tomasoni D, Lupi M, Brikci FB, Ubezio P., Exp Cell Res. 2003 Aug 1;288(1):158-67
- [4] Ormerod MG (2000) Flow Cytometry: A Practical Approach. Ed 3, Oxford University Press, USA.

BIOLOGICKÝ MATERIÁL

neovlivněná buněčná kultura MCF-7 (prsní adenokarcinom) či jiná vhodná adherentní či suspenzní nádorová buněčná linie

LABORATORNÍ MATERIÁL A POMŮCKY

plastové zkušavky s víčky (15 ml); Bürkerova komůrka; vialky pro cytometr; sada automatických pipet; stojánek na zkušavky; skleněné pipety; pipetovací nástavec na skleněné pipety; Pasteurova skleněná pipeta, krabice s ledem

PŘÍSTROJE

centrifuga Jouan-BR4i s rotorem S40 s adaptorem na 15 ml zkušavky; průtokový cytometr Cell Lab Quanta™ SC – MPL - Beckman Coulter; vakuová pumpa; vortex; flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48; vodní lázeň

CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU); 0,5% EGTA (w/v), pH = 7,2; roztok Trypsin/EGTA (0,1%/0,25%); standardní kultivační médium DMEM 10%; fosfátový pufr PBS; 70% ethanol (v/v); hovězí sérový albumin (BSA); roztok 1% BSA/PBS; roztok 2N HCl/Triton X-100 (0,5%); roztok 0,1M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ /pH 8,5; roztok BSA/PBS/T (PBS + 1% BSA + 0,5% v/v Tween 20); protilátka anti-BrdU-FITC; roztok propidiumjodidu, 0,1 mg/ml; roztok RNAsy; 10 mg/ml; protilátka anti-BrdU, klon MoBu-1; roztok 7-Aminoactinomycinu D (7-AAD) (1 mg/ml); protilátka goat-anti-mouse FITC (typ 115-095-146)

POSTUP

Kultivace a sklizení buněk

1. Přibližně 30 minut před sklizením, naznačte buňky 5-bromo-2'-deoxyuridinem (BrdU) (1000x ředění) pro označení aktivně replikujících buněk.
2. Odeberte kultivační médium do předem připravené 15 ml plastové zkumavky, následně sklidíte buňky trypsinizací.
3. Buňky opláchněte 1 ml 0,5% roztoku EGTA, obsah následně převeďte do zkumavky.
4. Přidejte 1 ml roztoku trypsin/EGTA a umístěte láhev na 5 min do inkubátoru (37 °C).
5. Buňky spláchněte 5 ml standardního kultivačního média DMEM a obsah opět převeďte do připravené zkumavky.
6. Vzorky zcentrifugujte 6 min při otáčkách $1000 \times g$ a teplotě 4 °C.
7. Pomocí vakuové pumpy odsajte supernatant (médium) a k buňkám znovu přidejte PBS (2 × 1 ml), pelet promyjte resuspendováním.
8. Opakujte centrifugaci a znovu odsajte supernatant (PBS).

Pozn. Pro orientační zjištění počtu sklizených buněk použijte počítací Bürkerovu komůrku.

Fixace

1. Pelet buněk resuspendujte ve 100 μl PBS.
2. Po kapkách přidejte vychlazený 70% ethanol (1 ml na $1 \cdot 10^6$ buněk) za neustálého mírného vortexování.
3. Minimální doba fixace je 30 minut na ledu, nicméně vzorky po fixaci mohou být uchovávány při -20 °C několik týdnů (doporučená doba je 2 týdny, ale vydrží i půl roku).

Barvení 1 - použití konjugované protilátky anti-BrdU-FITC

1. Vzorky zcentrifugujte 6 min při otáčkách $1000 \times g$ a teplotě 4°C .
2. Odsajte supernatant, poté pelet resuspendujte ve 100 μl 1% BSA/PBS.
3. Přidejte po kapkách 1 ml 2N HCl/Triton X-100 (0,5%) za neustálého mírného vortexování.
4. Inkubujte při pokojové teplotě s častým protřepáním 30 minut.
5. Vzorky zcentrifugujte 6 min při otáčkách $1000 \times g$ a teplotě 4°C .
6. Odsajte supernatant a resuspendujte buňky v 1 ml 0,1M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ /pH 8,5 kvůli neutralizaci kyseliny.
7. Vzorky zcentrifugujte 6 min při otáčkách $1000 \times g$ a teplotě 4°C .
8. V této fázi je možné uskladnit BrdU značené buňky po přidání 70% vychlazeného ethanolu (-20°C) k supernatantu.
9. Odsajte supernatant a resuspendujte buňky v 1 ml BSA/PBS/T, aby došlo k další permeabilizaci buněk a k urychlení vstupu protilátek a enzymů do buňky.
10. Vzorky zcentrifugujte 6 min při otáčkách $1000 \times g$ a teplotě 4°C .
11. Po odsátí supernatant a přidejte 70 μl protilátky anti-BrdU-FITC (30x ředěna v 1% BSA/PBS) a inkubujte při pokojové teplotě 30 minut ve tmě.
12. Vzorky 1x promyjte v 1 ml BSA/PBS/T, zcentrifugujte při $1000 \times g$ a teplotě 4°C a odsajte supernatant.
13. Přidejte 20 μl roztoku RNAsy a 10 μl roztoku propidiumjodidu.
14. Inkubujte nejméně 30 min při laboratorní teplotě ve TMĚ.
15. Během inkubace pokračujte následujícím postupem až do bodu Start.
16. Po skončení inkubace přepipetujte obsah zkumavek do vialek pro průtokový cytometr a vložte je do podavače.
17. Pokud jste během inkubace nastavili vše pro měření na průtokovém cytometru (viz níže), můžete začít s měřením od bodu Start.

Barvení 2 - použití primární protilátky anti-BrdU (klon MoBu-1)

1. Vzorky zcentrifugujte 6 min při otáčkách $1000 \times g$ a teplotě 4°C .
2. Odsajte supernatant, poté pelet resuspendujte ve 100 μl 1% BSA/PBS.
3. Přidejte po kapkách 1 ml 2N HCl/Triton X-100 (0,5%) za neustálého mírného vortexování.
4. Inkubujte při pokojové teplotě s častým protřepáním 30 minut.
5. Vzorky zcentrifugujte 6 min při otáčkách $1000 \times g$ a teplotě 4°C .
6. Odsajte supernatant a resuspendujte buňky v 1 ml 0,1M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ /pH 8,5 kvůli neutralizaci kyseliny.

7. Vzorky zcentrifugujte 6 min při otáčkách $1000 \times g$ a teplotě 4°C .
8. V této fázi je možné uskladnit BrdU značené buňky po přidání 70% vychlazeného ethanolu (-20°C).
9. Odsajte supernatant a resuspendujte buňky v 1 ml BSA/PBS/T, aby došlo k další permeabilizaci buněk a k urychlení vstupu protilátek a enzymů do buňky.
10. Vzorky zcentrifugujte 6 min při otáčkách $1000 \times g$ a teplotě 4°C .
11. Po odsátí supernatantu resuspendujte pelet ve 100 μl roztoku BSA/PBS.
12. Přidejte primární protilátku anti-BrdU (ředění 1:80), jemně promíchejte na mírném vortexu.
13. Inkubujte minimálně 1 h při laboratorní teplotě.
14. Vzorky 1x promyjte v 1 ml BSA/PBS/T, zcentrifugujte při $1000 \times g$ a teplotě 4°C a odsajte supernatant.
15. Po odsátí supernatantu resuspendujte pelet ve 100 μl BSA/PBS.
16. Přidejte sekundární protilátku goat-anti-mouse FITC (ředění 1:50), jemně promíchejte na mírném vortexu.
17. Inkubujte minimálně 1 h při laboratorní teplotě ve TMĚ.
18. Přidejte roztok BSA/PBS (1 ml na 10^6 buněk), několikrát promyjte špičkou nasátím a vysátím.
19. Centrifugujte 6 minut při otáčkách $1000 \times g$ a teplotě 4°C .
20. Odsajte supernatant, pelet resuspendujte v 1 ml BSA/PBS.
21. Přidejte 20 μl roztoku RNAsy a 2,5 μl roztoku 7-Aminoactinomycinu D.
22. Inkubujte nejméně 30 min při laboratorní teplotě ve TMĚ.
23. Během inkubace pokračujte následujícím postupem až do bodu Start.
24. Po skončení inkubace přepipetujte obsah zkumavek do vialek pro průtokový cytometr a vložte je do podavače.
25. Pokud jste během inkubace nastavili vše pro měření na průtokovém cytometru (viz níže), můžete začít s měřením od bodu Start.

Analýza na průtokovém cytometru

1. Pro analýzu na průtokovém cytometru spust'te program Quanta Analysis.
2. Použijte protokol Start up.
3. V položce Protocols zvolte protokol BRDU, načt'ete jej pomocí Load protocol. Zobrazí se vám okno nastavené s parametry pro vaše měření

4. V položce Current Settings nastavte maximální počet měřených buněk (Total Count) a maximální měřený objem (Run Volume) (cytometr po dosažení těchto hodnot automaticky zastaví měření a přejde na další vzorek).
5. Použijte tlačítko Worklist, zadejte název Worklistu, název projektu, z čeho bude vzorek nabírán, v tabulce Resuspend Settings nastavte typ resuspendování (nejlépe Redispende), intenzitu (Low), počet cyklů (6) a počet mikrolitrů vzorku v jamce (Důležité!). Vyberte, podle jakého protokolu budete měřit. Dále vymažte tlačítkem Delete All všechny z předchozího měření označené jamky a myší vyznačte, které jamky budou měřeny (jamky se označí žlutou barvou), přidejte je tlačítkem Add. Měřené vzorky se poté objeví ve spodní tabulce, kde je k nim možné dopsat detaily a to buď ručně (Sample ID, Tissue...), anebo v případě velkého množství vzorků v Microsoft Excelu (tlačítko Excel nad tabulkou vlevo). Zde vyplňte vámi žádané údaje, zkopírujte je a poté vložte pomocí tlačítka Paste, nebo soubor uložte a následně ho importujte pomocí tlačítka Import. Měřeny budou všechny vzorky uvedené v tabulce.
6. Zkontrolujte, aby v jednotlivých oknech byly zobrazeny tyto parametry a regiony (popř. je nastavte), zleva nahoře dolů doprava: EV – all datapoints; FL1 – velikost; FL3 – velikost; FL3/FL1 – velikost; FL3/SS – velikost.
7. Začněte měřit pomocí tlačítka Start.
8. Podle množství buněk protékajících cytometrem nastavte optimální průtok ($\sim 50 \mu\text{l}/\text{min}$) pohybem kurzoru doprava či doleva.
9. V horním levém okně je zobrazen jednoduchý histogram EV odpovídající relativní velikosti buněk. Kurzorem pro vyladění pozice signálu EV v levém spodním okně pohybujte doleva či doprava tak, aby byl pík v grafu (většinou odpovídá Gaussově křivce) dobře viditelný.
10. V okně FL3 jsou zobrazeny buňky obarvené PI nebo 7-AAD. Pohybujte jedním z kurzorů pro kanál FL3 v levém spodním okně: spodní kurzor PMT voltage je hrubší, horní Gain jemnější. Snažte se tímto uspořádat graf tak, aby průměrná hodnota G0/G1 píku ležela v pozici 200.
11. V okně FL1 jsou zobrazeny buňky značené fluorescenčním FITC. Pohybujte jedním z kurzorů pro kanál FL1 v levém spodním okně: spodní kurzor PMT voltage je hrubší, horní Gain jemnější. Snažte se tímto uspořádat graf tak, aby průměrná hodnota negativního píku ležela v pozici 10^1 a pozice pozitivního píku odpovídala pozici 10^2 .
12. V okně FL3/FL1 sledujte biparametrické vyhodnocení detekce zkoumaného proteinu a jeho redistribuci (signál FL1) v jednotlivých fázích buněčného cyklu (signál FL3).
13. Analýza se ukončí sama po dosažení hodnot maximálního počtu buněk nebo maximálního objemu (nastaveno v Current Settings). Pokud chcete ukončit měření dříve, zvolte Next Run,

počet naměřených buněk by však v tomto případě měl nabývat hodnot alespoň 10 000 pro dostatečnou důvěryhodnost dat

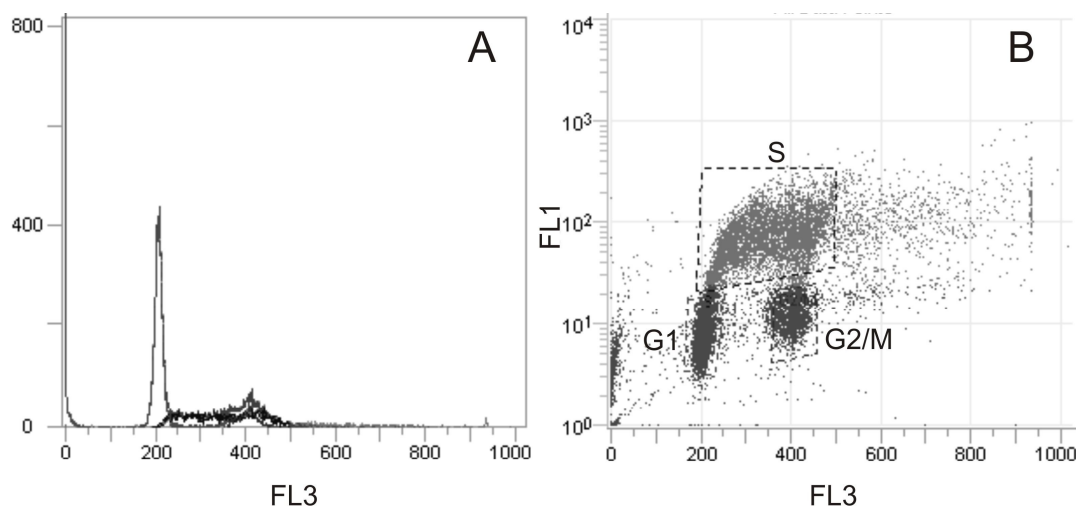
14. Vypněte cytometr volbou Instrument–Shut Down, řiďte se dle instrukcí programu.

15. Naměřená data vyhodnoťte (viz. níže).

Vyhodnocení

1. Spust'te program Quanta Analysis.
2. Zvolte Runs, jednotlivá měření jsou zde seřazeny shora dolů od nejnovějších po nejstarší. Zvolte svoje měření a otevři ho dvojitým kliknutím myši. Použijte tlačítko Excel Report.
3. Exportujte histogramu do formátu JPG: Zvolte Runs a otevřete svoje měření. Vyberte okno, které chcete převést na obrázek JPG, klikněte pravým tlačítkem a zvolte Copy Image a vložte ho do některého z mnoha dostupných grafických programů (např Corel Draw, Painting...) a dále upravte pro potřeby vyhodnocení. Graf lze kopírovat i v Excel Report.

Obrázek 1. Vyhodnocení replikace DNA. (A) Kontrolní analýza rozložení buněčného cyklu v neovlivněných buňkách MCF-7. (B) Biparametrická detekce BrdU v neovlivněných buňkách MCF-7, FL3 - signál propidiumjodidu nebo 7-AAD, FL1 - signál goat-anti-mouse FITC odpovídající hladině aktivně replikujícím S fázovým buňkám.



Obrázek 2. Vyhodnocení replikace DNA. (A) Kontrolní analýza rozložení buněčného cyklu v ovlivněných buňkách MCF-7. (B) Biparametrická detekce BrdU v ovlivněných buňkách MCF-7, FL3 - signál propidiumjodidu nebo 7-AAD, FL1 - signál anti-mouse FITC odpovídající hladině aktivně replikujícím S fázovým buňkám.

