

DETEKCE EXPRESE CYKLINU A 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 vybraného buněčného regulátoru, cyklinu A, v buňkách chronické myeloidní leukémie K562 a odvozených od karcinomu prsu MFC-7 pomocí dvouparametrové průtokové cytometrie.

- [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 K562 (chronická myeloidní leukémie) nebo HCT-116 (kolorektální adenokarcinom)

LABORATORNÍ MATERIÁL A POMŮCKY

plastové zkumavky s víčky (15 ml); Bürkerova komůrka; vialky pro cytometr; sada automatických pipet; stojánek na zkumavky, krabice s ledem

PŘÍSTROJE

centrifuga Jouan-BR4i s rotorem S40 s adaptorem na 15 ml zkumavky; průtokový cytometr Cell Lab Quanta™ SC – MPL - Beckman Coulter; vakuová pumpa; vortex

CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

protilátka anti-cyklin A (klon BF683); protilátka goat-anti-mouse FITC (typ 115-095-146); protilátka anti-cyklin A2-FITC (klon 11B2G3); fosfátový pufr PBS; 90% methanol (v/v); 0,5% roztok hovězího sérového albuminu BSA v PBS, BSA/PBS (w/v); roztok propidium jodidu

(PI), 0,1 mg/ml; roztok RNAsy; 10 mg/ml; roztok 7-Aminoactinomycinu D (7-AAD), 1 mg/ml; 0,5% EGTA (w/v), pH = 7,2; roztok Trypsin/EGTA (0,1%/0,25%); standardní kultivační medium DMEM 10%

POSTUP

Kultivace a sklizení suspenzních buněk

1. Suspenzní kulturu (nejméně 500 000 buněk) převed'te z kultivační nádoby pomocí pipety do předem připravených 15 ml zkumavek
2. Přidejte PBS do kultivační nádoby pro oplach (~ 2 ml), převed'te roztok znovu do zkumavek
3. Vzorky zcentrifugujte 6 min při otáčkách $1000 \times g$ a teplotě 4 °C.
4. Pomocí vakuové pumpy odsajte supernatant (médiu) a k buňkám znovu přidejte PBS (2 × 1 ml), pelet promyjte resuspendováním.
5. Opakujte centrifugaci a znovu odsajte supernatant (PBS).

Kultivace a sklizení adherentních buněk

1. Adherentní kulturu buněk (nejméně 500 000) sklíd'te trypsinizací.
2. Buňky opláchněte 1 ml 0,5% roztoku EGTA, obsah následně převed'te do zkumavky.
3. Přidejte 1 ml roztoku trypsin/EGTA a umístěte láhev na 5 min do inkubátoru (37 °C).
4. Buňky spláchněte 5 ml standardního kultivačního média DMEM a obsah opět převed'te do připravené zkumavky.
5. Vzorky zcentrifugujte 6 min při otáčkách $1000 \times g$ a teplotě 4 °C.
6. Pomocí vakuové pumpy odsajte supernatant (médiu) a k buňkám znovu přidejte PBS (2 × 1 ml), pelet promyjte resuspendováním.
7. Opakujte centrifugaci a znovu odsajte supernatant (PBS).

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

Fixace a permeabilizace

1. Pelet buněk nejprve resuspendujte ve 100 µl PBS.
2. Poté za mírného vortexování přidejte po kapkách vychlazený 90% methanol (- 20 °C) (1 ml na 10^6 buněk).
3. Vzorky inkubujte na ledu po dobu minimálně 10 min.
4. Centrifugujte 6 minut při otáčkách $1000 \times g$ a teplotě 4 °C.

5. Pelet resuspendujte v roztoku PBS obsahující 0,5% BSA (BSA/PBS)
6. Znovu opakujte krok 4.

Barvení 1 - použití primární protilátky anti-cyklin A (klon BF683)

1. Po odsátí supernatantu resuspendujte pelet ve 100 μ l BSA/PBS
2. Přidejte primární protilátku anti-cyklin A (ředění 1:20), jemně promíchejte na mírném vortexu.
3. Inkubujte minimálně 1 h při laboratorní teplotě.
4. Přidejte roztok BSA/PBS (1 ml na 10^6 buněk), několikrát promyjte špičkou nasátím a vysátím.
5. Centrifugujte 6 minut při otáčkách $1000 \times g$ a teplotě 4 °C.
6. Po odsátí supernatantu resuspendujte pelet ve 100 μ l BSA/PBS.
7. Přidejte sekundární protilátku goat-anti-mouse FITC (ředění 1:50), jemně promíchejte na mírném vortexu.
8. Inkubujte minimálně 1 h při laboratorní teplotě ve TMĚ.
9. Přidejte roztok BSA/PBS (1 ml na 10^6 buněk), několikrát promyjte špičkou nasátím a vysátím.
10. Centrifugujte 6 minut při otáčkách $1000 \times g$ a teplotě 4 °C.
11. Odsajte supernatant, pelet resuspendujte v 1 ml BSA/PBS.
12. Přidejte 20 μ l roztoku RNasy a 10 μ l roztoku propidiumjodidu.
13. Inkubujte nejméně 30 min při laboratorní teplotě ve TMĚ.
14. Během inkubace pokračujte následujícím postupem až do bodu Start.
15. Po skončení inkubace přepipetujte obsah zkumavek do vialek pro průtokový cytometr a vložte je do podavače.
16. Pokud jste během inkubace nastavili vše pro měření na průtokovém cytometru (viz níže), můžete začít s měřením od bodu Start.

Barvení 2 - použití konjugované protilátky anti-cyklin A2-FITC (klon 11B2G3)

1. Po odsátí supernatantu resuspendujte pelet ve 100 μ l BSA/PBS
2. Přidejte protilátku anti-cyklin A2-FITC (10 μ l), jemně promíchejte na mírném vortexu.
3. Inkubujte minimálně 1 h při laboratorní teplotě.
4. Přidejte roztok BSA/PBS (1 ml na 10^6 buněk), několikrát promyjte špičkou nasátím a vysátím.
5. Centrifugujte 6 minut při otáčkách $1000 \times g$ a teplotě 4 °C.

6. Odsajte supernatant, pelet resuspendujte v 1 ml BSA/PBS.
7. Přidejte 20 μ l roztoku RNAsy a 2,5 μ l roztoku 7-Aminoactinomycinu D.
8. Inkubujte nejméně 30 min při laboratorní teplotě ve TMĚ.
9. Během inkubace pokračujte následujícím postupem až do bodu Start.
10. Po skončení inkubace přepipetujte obsah zkumavek do vialek pro průtokový cytometr a vložte je do podavače.
11. Pokud jste během inkubace nastavili vše pro měření na průtokovém cytometru (viz níže), můžete začít s měřením od bodu Start.

Analýza na průtokovém cytometru

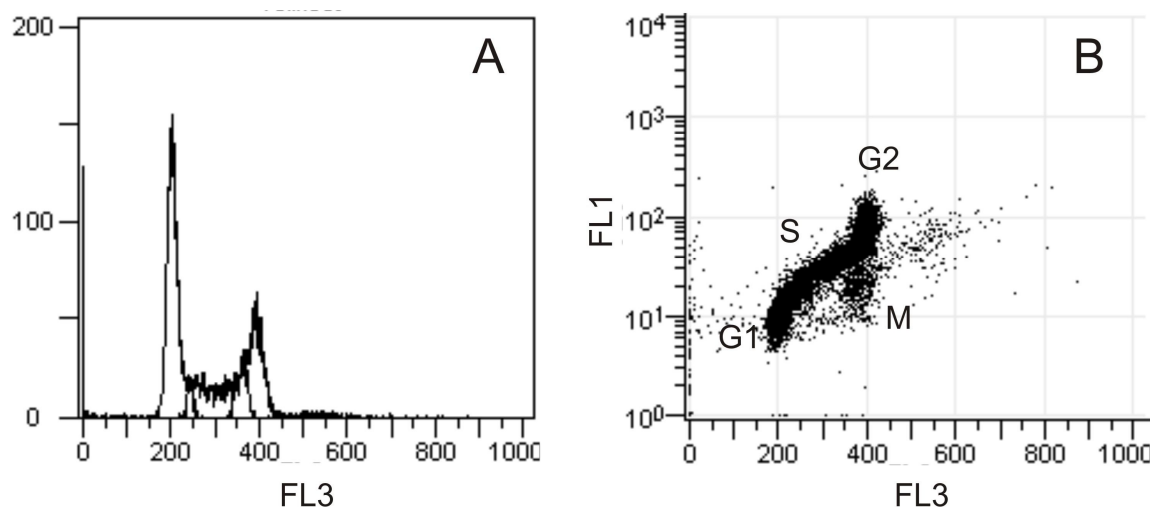
1. Pro analýzu na průtokovém cytometru spusťte program Quanta Analysis.
2. Použijte protokol Start up.
3. V položce Protocols zvolte protokol CYKLINY, načtěte jej pomocí Load protocol. Zobrazí se vám okno nastavené s parametry pro vaše měření
4. V položce Current Settings nastavte maximální počet měřených 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 Redisperse), 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), přidáte 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. Měření 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 (kvůli širokému emisnímu spektru PI pravděpodobně uvidíte nabarvené buňky i na kanále FL2). 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'ete program Quanta Analysis.
2. Zvolte Runs, jednotlivá měření jsou zde seřazeny shora dolů od nejnovějších po nejstarší. Zvolte svoje měření a otevřete 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 detekce cyklinu A v buňkách. (A) Kontrolní analýza rozložení buněčného cyklu v neovlivněných buňkách HCT-116. (B) Biparametrická detekce cyklinu A v HCT-116 buňkách, FL3 - signál propidiumjodidu, FL1 - signál anti-mouse FITC odpovídající hladině cyklinu A.



Obrázek 2. Vyhodnocení detekce cyklinu A v buňkách. (A) Kontrolní analýza rozložení buněčného cyklu v neovlivněných buňkách K562. (B) Biparametrická detekce cyklinu A v K562 buňkách, FL3 - signál 7-aminoactinomycinu, FL1 - signál anti-cyklin A2-FITC odpovídající hladině cyklinu A.

