

Téma: Cytoskelet

Úvod:

Cytoskelet je vysoce dynamická proteinová struktura buňky, která je neustále reorganizována během změn tvaru buněk, buněčného dělení a reakcí na okolní podněty. Cytoskelet určuje nejen tvar buňky a rozmístění organel, ale odpovídá také za buněčný i vnitrobuněčný pohyb, jako je rozhod chromozomů během mitózy, pohyb organel, bičíků a řasinek a také svalový stah.

Cytoskelet je tvořen třemi typy vláken: mikrotubuly, mikrofilamenty a intermediálními filamenty. Mikrotubuly jsou tvořeny proteinem tubulinem a odpovídají za pohyb na intracelulární úrovni (měchýřkový transport) a také za tvorbu dělicího vřeténka během mitózy. Mikrofilamenta jsou tvořena bílkovinou aktinem a jsou spojena především s pohybem celé buňky. Intermediální filamenta jsou pak tvořena například keratinem ale i jinými proteiny. Intracelulární rozmístění jednotlivých cytoskeletálních složek se od sebe také liší. Mikrotubuly volně prostupují celou buňku, mikrofilamenta tvoří hustou síť těsně pod cytoplazmatickou membránou a intermediální filamenta se vyskytují hlavně v jádře, kde vytváří jadernou laminu. S cytoskeletem jsou navíc asociovány další proteiny, které jednak zajišťují jeho stabilitu či se podílejí na dynamice pohybu. Jako příklad proteinů asociovaných s cytoskeletem je možné jmenovat dynein a kinesin pro mikrotubuly a myosin pro aktinová mikrofilamenta.

Poznatky získané studiem cytoskeletu se uplatňují v medicíně při léčbě některých nádorových onemocnění, kdy se používají látky označované jako mikrotubulární inhibitory např. taxol, vinblastin, kolchicin, které blokují buněčné dělení. Mikrotubulární jed kolchicin se pevně váže k volným tubulinovým podjednotkám, a tím znemožňuje jejich polymeraci do mikrotubulárních vláken. Po ovlivnění buněk kolchicinem nedochází během mitózy k tvorbě dělicího vřeténka a segregaci chromozomů do dceřiných buněk, což vede k navození buněčné smrti.

Úkol č. 1: Kultivace buněk s inhibitorem mikrotubulárního systému kolchicinem

Materiál: buněčná linie HeLa

Chemikálie: 10 mM zásobní roztok kolchicinu v DMSO; standardní kultivační DMEM médium; DMSO

Pomůcky: flowbox; kultivační šesti jamkový panel

Postup:

1. *Pracujte ve sterilním prostředí (flowbox).*
2. *Kultivujte 150 000 buněk adherentní buněčné linie HeLa ve čtyřech jamkách šestijamkového panelu s 2,5 ml standardního kultivačního média DMEM, do kterých předtím vložte sterilní krycí sklíčko. Nechejte buňky*

adherovat do druhého dne v inkubátoru (37 °C, 100% vlhkost, obsah CO₂ 5 %).

3. Druhý den si ve flowboxu připravte dvě sterilní 15 ml zkumavky a připravte do nich 2,7 ml 0,01 a 0,1 µM roztoku kolchicinu v standardním kultivačním médiu DMEM, uzavřete víčkem a řádně promíchej na vortexu. Použij 10 mM zásobní roztok kolchicinu v DMSO.
4. Opatrně odsajte médium z prvních dvou kontrolních jamek sterilní pasteurovou pipetou napojenou na vakuovou pumpu.
5. Přidejte do každé 2,5 ml standardního kultivačního média DMEM.
6. Opatrně odsajte médium z dalších dvou jamek sterilní pasteurovou pipetou napojenou na vakuovou pumpu.
7. Přidejte do jedné 2,5 ml připraveného 0,01 µM roztoku kolchicinu a do druhé 2,5 ml 0,1 µM kolchicinu.
8. Inkubujte 24 hod v inkubátoru (37 °C, 100% vlhkost, obsah CO₂ 5 %).

Úkol č. 2: Fixace, permeabilizace, blokování, imunofluorescenční značení

Materiál: buněčná linie HeLa

Chemikálie: PBS; PBS-T; fixační směs methanol-aceton (1:1); standardní kultivační médium DMEM s 10% fetálním sérem; Primární protilátka anti-α tubulin-FITC; zásobní roztok DAPI 10 mg/ml

Pomůcky: vakuová pumpa, pinzeta, preparační jehla

Postup:

Promývání:

1. Nyní lze již s buňkami pracovat v nesterilním prostředí. Pozor na orientaci lícové strany sklíčka s buňkami!
2. Promyjte buňky: odsajte médium vakuovou pumpou, přidejte 2 ml PBS, nechejte 5 minut promývat a poté opět odsajte.
3. Opakujte krok promytí ještě 1x.

Fixace a permeabilizace buněk:

4. Přidejte opatrně po kapkách 1 ml ledově vychlazené fixační směsi methanol – aceton (1:1).
5. Inkubujte 30 min v -20 °C.
6. Odsajte fixační směs.
7. Pinzetou podeberte sklíčko a opřete ho o stěnu jamky, nechejte uschnout volně na vzduchu.
8. Suchá, zafixovaná sklíčka lze v tomto stavu uchovávat v -20 °C nebo přímo použít pro imunofluorescenční značení (viz. dále).

Rehydratace:

9. Přidejte 2 ml PBS a nechejte rehydratovat 10 min.
10. Opatrně odsajte PBS vakuovou pumpou nebo pipetou.

Blokování:

11. Přidejte 2,5 ml média DMEM s 10% fetálním sérem pro blokování nespecifických vazeb na 5 min.
12. Opatrně odsajte médium DMEM s 10% fetálním sérem vakuovou pumpou.

Primární protilátka anti-α tubulin-FITC

13. Nařed'te zásobní roztok anti- α tubulinu-FITC 10 $\mu\text{g/ml}$ 1 : 4 do média DMEM s 10% fetálním sérem (konečná koncentrace 2 $\mu\text{g/ml}$). Na 1 skl'íčko je potřeba 25 μl , nezapomeňte na několik μl rezervy, např. na 4 skl'íčka (105 μl i s rezervou) napipetujte 21 μl anti- α tubulinu 10 $\mu\text{g/ml}$ do 84 μl média DMEM s 10% fetálním sérem.
14. Naneste 25 μl takto připraveného roztoku anti- α tubulinu-FITC na destičku obalenou parafilmem, přiklopte krycí skl'íčko s buňkami na kapku roztoku a uložte vše do krabice s víkem zvlhčené uvnitř destilovanou vodou.
15. Inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě.

Promývání

16. Přeneste skl'íčko zpět do panelu.
17. Promyjte buňky přidáním 2 ml PBS, nechejte 3 minuty promývat a poté odsajte.
18. Promyjte buňky přidáním 2 ml PBS-T, nechejte 3 minuty promývat a poté odsajte.
19. Promyjte buňky přidáním 2 ml PBS, nechejte 3 minuty promývat.

DAPI

20. Nařed'te 2000x zásobní roztok DAPI 10 mg/ml do PBS (konečná koncentrace 5 $\mu\text{g/ml}$). Na 1 jamku je potřeba 1 ml, např. na 4 jamky (4 ml) napipetujte 2 μl zásobního roztoku DAPI 10 mg/ml do 4 ml PBS.
21. Přidejte 1 ml takto připraveného roztoku DAPI do každé jamky.
22. Inkubujte 10 min při laboratorní teplotě ve tmě.

Promývání

23. Promyjte buňky přidáním 2 ml H_2O , nechejte 2 minuty promývat a poté odsajte.

Vytvoření trvalého preparátu

24. Naneste na podložní skl'íčko 3 – 5 μl mowiolu, přiklopte skl'íčko buňkami na spodní straně a nechejte zatuhnout do druhého dne ve tmě při 4 °C. Pro lepší prevenci vyschnutí je možné navíc utěsnit okraje bezbarvým lakem na nehty.

Uchovávání preparátů

25. Skl'íčka jsou uchovávána ve tmě při 4 °C.

Úkol č. 3: Pozorování preparátu a fotografování

1. Pozorujte preparáty fluorescenčním mikroskopem.
2. Nejdříve zaostřete na jádra, kde je DNA nabarvená modře DAPI.
3. Poté pozorujte α -tubulin značený zeleně FITC a zakreslete do protokolu.

Otázky:

1. Zjistí, jaká je vlnová délka excitačního a emisního spektra pro FITC?
2. Srovnej, nejlépe v tabulce, jednotlivé typy cytoskeletálních vláken z hlediska jejich složení, velikosti, umístění a funkce v buňce.

Použitá literatura:

- AescuLab - systematické laboratorní vzdělávání studentů a pracovníků VaV v oblasti Life Sciences s podporou e-learningu, úloha číslo AE-211: Příprava buněk pro mikroskopickou analýzu, Dolečková a Hoffmannová.