

Téma: Cytoskelet

Úvod:

Cytoskelet je vysoce dynamická proteinová struktura buňky, která je neustále reorganizována během změny tvaru buněk, dělení a reakcí na okolní podněty. Cytoskelet určuje nejen tvar buňky a rozmístění organel, ale odpovídá také za buněčný i vnitrobuněčný pohyb, jako je rozchod chromozomů v mitóze, pohyb organel, bičků 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 cytoskeletárních složek se od 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 jsou uplatňovány v medicínské praxi. Při léčbě nádorových onemocnění se používají mikrotubulární inhibitory např. taxol, vinblastin, kolchicin, které blokují buněčné dělení. Mikrotubulární jed kolchicin se pevně váže k volným tubulinovým podjednotkám, a tím znemožňuje jeho 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 pasteuovou 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 pasteuovou pipetou napojenou na vakuovou pumpu.*
7. *Přidejte do jedné 2,5 ml připraveného 0,01 μ M roztoku kolchicinu a do druhé 2,5 ml 0,1 μ M kolchicinu.*
8. *Inkubujte 24 hod v inkubátoru (37 °C, 100% vlhkost, obsah CO₂ 5 %).*

PROVEDL VEDOUCÍ CVIČENÍ

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 nebo automatická pipeta + špičky; 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 10 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).*

PROVEDL VEDOUCÍ CVIČENÍ

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. *Nařeďte zásobní roztok anti- α tubulinu-FITC 10 μ g/ml 1 : 4 do média DMEM s 10% fetálním sérem (konečná koncentrace 2 μ g/ml). Na 1 sklíčko je potřeba 25 μ l, nezapomeňte na několik μ l rezervy, např. na 4 sklíčka (105 μ l i s rezervou)*

napipetujte 21 μ l anti- α tubulinu 10 μ g/ml do 84 μ l média DMEM s 10% fetálním sérem.

14. Naneste 25 μ l takto připraveného roztoku anti- α tubulinu-FITC na destičku obalenou parafilmem, přiklopte krycí sklíčko 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 sklíčko 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 μ g/ml). Na 1 jamku je potřeba 1 ml, např. na 4 jamky (4 ml) napipetujte 2 μ l 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 H₂O, nechejte 2 minuty promývat a poté odsajte.

Vytvoření trvalého preparátu

24. Naneste na podložní sklíčko 3 – 5 μ l mowiolu, přiklopte sklíčko 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. Sklípka jsou uchovávána ve tmě při 4 °C.

Úkol č. 3: Pozorování preparátu a fotografování

1. Pozorujte preparáty fluorescenčním mikroskopem (objektiv FL, 20 $\times$ nebo imerzní 40 $\times$).
2. Nejdříve zaostřete na jádra, kde je DNA nabarvená modře DAPI (filtr WU).
3. Poté pozorujte α -tubulin značený zeleně FITC (filtr WIY) a zakreslete do protokolu.

Otázky:

1. Zjisti, 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.