

## **PRAKTIČNA VAJA: DOLOČANJE CITOTOKSIČNOSTI TPCK NA MIŠJI CELIČNI LINIJI WEHI231**

### **Namen vaje**

TPCK je ketonski inhibitor serinskih proteinaz in je citotoksičen v nižjem mikromolarnem območju, saj povzroča apoptozo. Vaša naloga je: (1) ugotoviti, če mehanizem sprožitve apoptoze poteče preko mitohondrijske poti ali ne; (2) določiti odstotek pro-apoptotičnih in mrtvih celic po dodatku TPCK.

### **1. Označevanje mitohondrijev**

Izvedli boste označevanje aktivnih mitohondrijev v celicah WEHI231, ki so bile izpostavljene citotoksični koncentraciji TPCK. Uporabili boste fluorescenčno barvilo MitoTracker CMXRos, ki se veže le v aktivne mitohondrije, ki imajo intakten membranski potencial. Pri mitohondrijskem mehanizmu sprožitve apoptoze pride do zmanjšanja mitohondrijskega potenciala, kar pomeni, da v takih celicah zaznamo nižjo fluorescenco barvila. Pripravili boste vzorce za pretočno citometrijo, ki jih boste demonstrativno analizirali s pretočnim citometrom.

### **Reagenti**

TPCK

MitoTracker CMXRos

Medij za kultiviranje celic (RPMI z 10% FBS)

4 % paraformaldehid

PBS

### **Aparature**

Pretočni citometer BD FACSCalibur s sistemom dveh laserjev (488 in 633 nm) in štirih fluorescenčnih detektorjev (FL1: 530 nm; FL2: 585nm; FL3: 670nm; FL4: 661 nm).

### **Izvedba**

Predhodna priprava: Celice WEHI231 smo 24h pred začetkom vaje inkubirali s 100 $\mu$ M TPCK. Hkrati smo gojili kontrolne celice brez dodatka in kontrolne celice, ki jih ne bomo obarvali z barvilom. Tako moramo pripraviti 3 vzorce (neoznačene, kontrolne in TPCK).

1. Razredčite osnovno raztopino MitoTracker (1mM) v mediju za kultiviranje. Končna koncentracija naj bo 200 nM. Potrebujete 1 ml delovne raztopine na vzorec.

2. Iz koncentracije celic, ki vam jo pove asistent, preračunajte volumen, ki ga potrebujete za en vzorec (celic naj bo  $5 \times 10^5$ ). Centrifugirajte celice ( $5 \times 10^5$ ), da dobite pelete (1300 rpm, 5 min). Delajte v rumenih falkonkah (15 ml). Odstranite supernatant.

3. Resuspendirajte celice v 1 ml vnaprej pripravljene raztopine MitoTracker (korak 1) in jih dajte v sterilno posodo za kultiviranje (12-well). Inkubirajte približno 30 min pri 37 C, 5% CO<sub>2</sub>.

4. Odpipetirajte celice v falkonke in ponovno centrifugirajte celice (1300 rpm, 5 min). Odstranite supernatant in resuspendirajte v 1 ml PBS.

5. Ponovno centrifugirajte celice (1300 rpm, 5 min). Resuspendirajte v 1 ml 4 % PFA in inkubirajte 15 min.

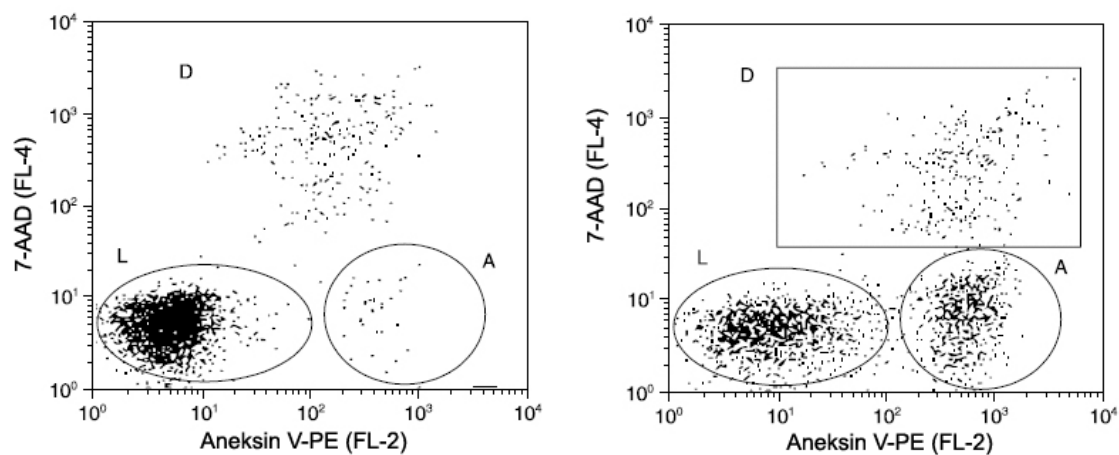
6. Ponovno centrifugirajte celice (1300 rpm, 5 min). Resuspendirajte v 0,5 ml PBS.

7. Celice analizirajte s pretočnim citometrom. Na podlagi FSC/SSC diagrama ločimo populacijo WEHI231 celic ter jih lahko izberemo za nadaljnjo analizo. Na podlagi histograma FL-2/Counts spremljamo fluorescenco aktivnih mitohondrijev v celici. Fluorescenco primerjamo glede na neoznačene celice. V primeru, da je apoptoza preko TPCK sprožena preko mitohondrijske poti, mora biti povprečje fluorescence nižje kot v kontrolnem vzorcu.

## 2. Označevanje celic z aneksinom V in propidijevim iodidom

Izvedli boste označevanje pro-apoptotičnih in mrtvih celic WEHI231, ki so bile izpostavljene citotoksični koncentraciji TPCK. Uporabili boste reagenčni komplet PE Annexin V Apoptosis detection kit (BD), ki vsebuje rekombinantni aneksin V, konjugiran s fikoeritrinom (PE), ter 7-Amino-actinomycin D (7-AAD), označevalec nukleinskih kislin.

Aneksini spadajo v skupino homolognih proteinov, ki se v prisotnosti kalcijevih ionov vežejo na fosfolipide. Apoptoza je programirana celična smrt, pri kateri v zgodnji fazi pride tudi do izgube fosfolipidne asimetrije. Fosfatidilserin je pri nepoškodovanih celicah del notranjega dela celične membrane, pri procesu apoptoze pa pride do translokacije na eksterni del, tako da se obrne v zunajcelični prostor. Na ta način je v prisotnosti kalcijevih ionov omogočena vezava konjugata aneksin V-PE na fosfatidilserin v apoptotičnih celicah. Pomembno je, da se aneksin V-PE veže tako na pro-apoptotične, ki so še žive, a bodo napredovale z apoptotičnimi procesi in na koncu umrle, prav tako pa se veže tudi na mrtve celice. 7-AAD se veže le v mrtve celice, katerih membrana je močno poškodovana. Z uporabo obeh označevalcev lahko torej ločimo med pro-apoptotičnimi ( $\text{AnnV}^+/\text{7-AAD}^-$ ) in mrtvimi celicami ( $\text{AnnV}^+/\text{7-AAD}^+$ ).



Slika: WEHI231 celice, izpostavljene 100uM TPCK za 2h (desno) in kontrolne celice (levo). A – pro-apoptotične celice ( $\text{AnnV}^+/\text{7-AAD}^-$ ); L – žive celice ( $\text{AnnV}^-/\text{7-AAD}^-$ ); D – mrtve celice ( $\text{AnnV}^+/\text{7-AAD}^+$ ). Pri vzorcu celic, ki so bile izpostavljene TPCK (desno), opazimo večji odstotek pro-apoptotičnih celic.

### Reagenti

PBS

Aneksin V-PE

7-AAD

10x vezalni pufer

voda

## Izvedba

Predhodna priprava: Celice WEHI231 smo 24h pred začetkom vaje inkubirali s 100 $\mu$ M TPCK. Hkrati smo gojili kontrolne celice brez dodatka. Pripravimo 4 vzorce: kontrolne (ctrl) celice brez TPCK, TPCK celice obarvane z Ann in 7-AAD, TPCK celice obarvane samo z Ann in TPCK celice obarvane samo z 7-AAD.

1. Iz koncentracije celic, ki vam jo pove asistent, preračunajte volumen, ki ga potrebujete za en vzorec (celic naj bo  $5 \times 10^5$ ). Centrifugirajte celice ( $5 \times 10^5$ ), da dobite pelete (1300 rpm, 5 min). Delajte v rumenih falkonkah (15 ml).
2. Celice resuspendirajte v 1ml PBS. Centrifugirajte celice ( $5 \times 10^5$ ), da dobite pelete (1300 rpm, 5 min) in odstranite supernatant.
3. Ponovite korak 2.
4. Vezalni puffer 10x razredčimo z vodo do 1x koncentracije (za vsak vzorec potrebujemo 1 ml 1x vezalnega pufra). Celice resuspendiramo v 0,5 ml 1x vezalnega pufra.
5. 100  $\mu$ l suspenzije celic prenesemo v plastično epruveto za pretočno citometrijo.
6. Dodamo 5  $\mu$ l Aneksin V-PE konjugata in 5  $\mu$ l 7AAD v vsak vzorec. Kratko vorteksiramo in inkubiramo 15 min pri sobni temperaturi zaščiteno pred svetlobo.
7. Dodamo 400  $\mu$ l 1x vezalnega pufra. in s pomočjo pretočnega citometra določimo fluorescenco celic pri različnih valovnih dolžinah (FL-2 in FL-4).

## **Naloga**

1. Opis vzorcev, materiala in opreme:

## **2. Sheme histogramov:**

Skiciraj dobljene histograme in označi posamezne populacije celic ter njihove deleže!

### **3. Rezultati:**

#### **Vprašanja**

Komentirajte sheme ter rezultate fluorescenčnih meritev in poskušajte interpretirati rezultat!

---

Pregledal-a:

Datum:

Ocena: