

Ćwiczenie 1.

Metody izolacji komórek macierzystych

Wstęp

Komórki macierzyste (KM) dzięki zdolności do samoodnawiania oraz jednocześnie do różnicowania się w komórki ukierunkowane do określonych linii rozwojowych stanowią materiał pożądaný z punktu widzenia medycyny regeneracyjnej. Jednym z najważniejszych wyzwań wynikających z wykorzystania KM w medycynie regeneracyjnej jest opracowanie optymalnego protokołu ich izolacji oraz ekspansji. Do metod izolacji KM należą m. in. sortowanie MACS (*ang. Magnetic Assisted Cell Sorting*) oraz FACS (*ang. Fluorescence Activated Cell Sorting*), a także –w przypadku np. mezenchymalnych KM- zdolność do adhezji do ujemnie naładowanych powierzchni naczyń hodowlanych.

W sortowaniu magnetycznym MACS komórki inkubowane są z kuleczkami paramagnetycznymi sprzęgniętymi z przeciwciałami skierowanymi przeciwko określonym antygenom KM. Populacje komórek są następnie izolowane w polu magnetycznym jako dwie subpopulacje: pozytywna oraz negatywna pod względem ekspresji określonego antygenu. Sortowanie MACS wykorzystywane jest głównie jako etap selekcji wstępnej poprzedzający izolację w oparciu o profil wieloantygenowy.

W sortowaniu FACS wykorzystuje się przeciwciała wyznakowane barwnymi fluorochromami. Sortery komórkowe (w przeciwieństwie do klasycznych cytometrów przepływowych) powodują rozbicie wiązki laminarnego przepływu cieczy na małe kropelki, zawierające pojedyncze komórki. Następnie komórki naświetlane są zogniskowaną wiązką światła laserowego. Powstałe sygnały mierzone są za pomocą odpowiednich detektorów, przemieniane na impulsy elektryczne, wzmacniane i przesyłane do komputera. W zależności od tego czy komórki wykazują określoną fluorescencję, kropelki są następnie obdarzane określonym ładunkiem. Następnie kropelki te docierają do pola elektrostatycznego, a ich trajektoria jest uginana w zależności od posiadanego ładunku. Dzięki temu możemy wysortować subpopulacje komórek o różnych profilach antygenowych. W tabeli poniżej zawarto porównanie metody izolacji MACS oraz FACS.

MACS	FACS
Sortowanie oparte o właściwości magnetyczne komórek	Sortowanie oparte o właściwości fluorescencyjne komórek
Sortowanie najczęściej w oparciu o jeden marker komórkowy	Sortowanie najczęściej w oparciu o profil wieloantygenowy
Występowanie markera- selekcja pozytywna Brak markera- deplecja (selekcja negatywna)	Równoczesne występowanie danego markera/ów lub jego/ich brak
Stosunkowo niska czystość	Wysoka czystość
Metoda wykorzystywana do wzbogacenia przed sortowaniem FACS	Metoda wykorzystywana do ostatecznego sortowania populacji KM

Analiza komórek w cytometrii przepływowej dostarcza informacji na temat wielkości (FSC- *ang. forward scatter*) oraz ziarnistości komórek (SSC- *ang. side scatter*), a także fluorescencji emitowanej przez komórki. Wyniki pomiarów uzyskane w cytometrze przepływowym można przedstawić w postaci dokładnych danych liczbowych, jak również w postaci wykresów. Najczęściej wyniki są prezentowane w postaci histogramów lub cytogramów (wykres na którym komórki są

odzwierciedlone w postaci kropek, których położenie w układzie współrzędnych jest proporcjonalne do wielkości mierzonego parametru). Wszystkie komórki, które mają taki sam model rozpraszania światła, ukazują się na cytogramie jako pojedyncza kropka. Jedna kropka może zatem reprezentować pojedynczą komórkę lub kilka tysięcy komórek. Jeżeli w badanej próbce oznacza się więcej niż jeden antygen, wówczas używa się dwu lub więcej przeciwciał monoklonalnych wyznakowanych różnymi barwnikami. Sygnały emitowane przez te barwniki mogą zachodzić na siebie, dlatego też należy stosować kompensację w celu prawidłowej analizy sygnałów fluorescencji.

Najważniejszym źródłem mezenchymalnych KM (MSC) jest szpik kostny. Komórki te stanowią frakcję adherentną szpiku, którą otrzymuje się poprzez odpłukanie komórek nieadherentnych po 72h od momentu wysiania pełnego szpiku na naczynie hodowlane. Do hodowli pierwotnych dedykowane są naczynia hodowlane typu Primaria wykonane z modyfikowanego polistyrenu, które wzmacniają adhezję komórek do podłoża.

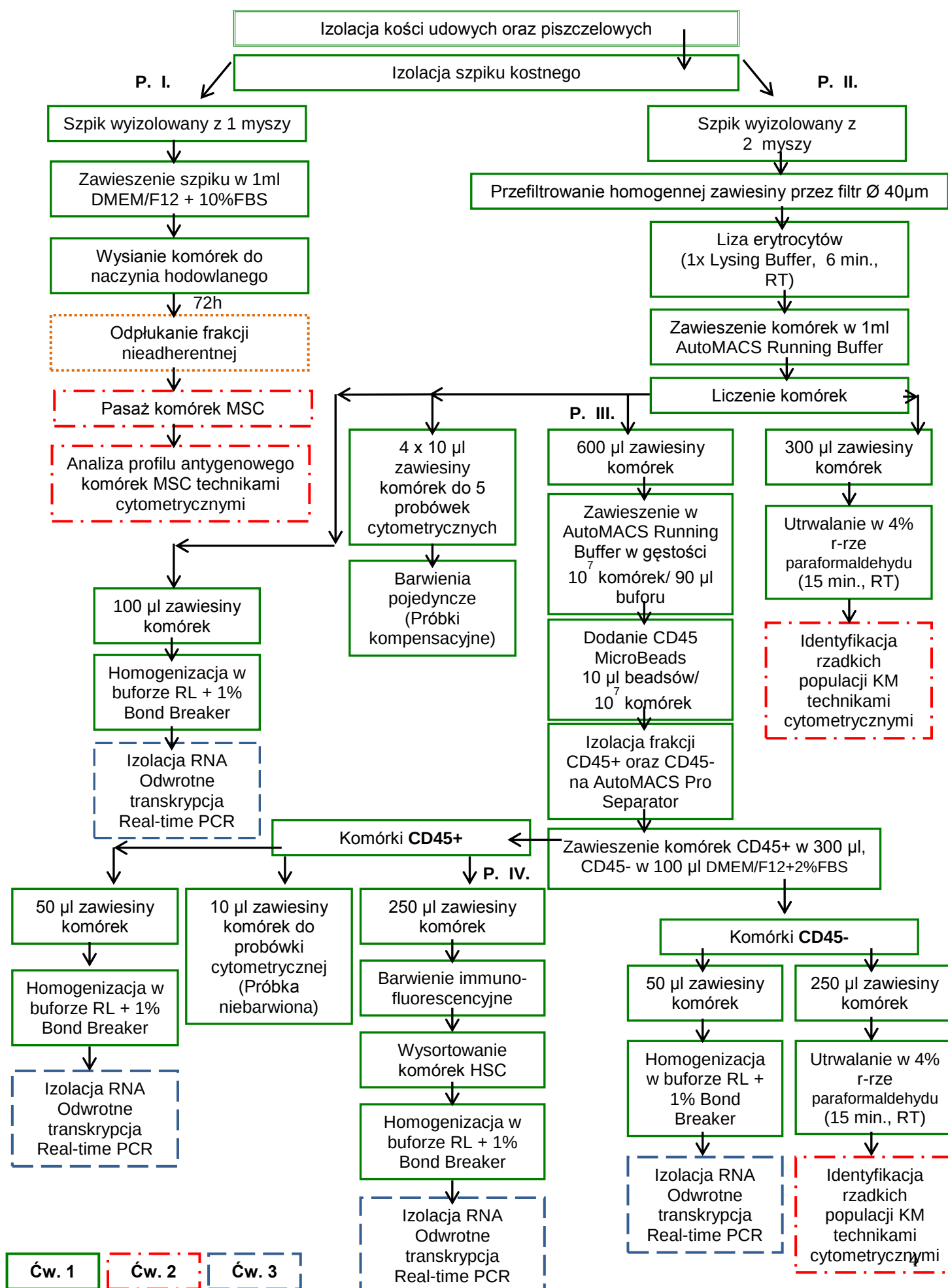
Cel doświadczenia:

Celem ćwiczenia jest izolacja komórek macierzystych w oparciu o profil antygenowy z zastosowaniem technologii MACS oraz FACS oraz oddziaływań z podłożem hodowlanym (poprzez adhezję).

Przebieg doświadczenia:

Praca w zespołach trzyosobowych. Na każdy zespół przypadają trzy myszy, które wykorzystane zostaną zgodnie z tabelą zamieszczoną poniżej.

Nr myszy	Przeznaczenie
1.	Założenie hodowli komórek MSC
2 i 3.	Izolacja oraz analiza KM metodą MACS oraz FACS



P. I. Założenie hodowli komórek MSC

1. Z jednej myszy wyizolować z kończyn dolnych kości udowe oraz piszczelowe. Kości umieścić na szalce (60mm) w 5 ml medium DMEM/F12.
2. Po odcięciu nasad kości, za pomocą strzykawki 1 ml z igłą, wypłukać szpik kostny do nowej szalki (60mm) zawierającej 5 ml medium DMEM/F12. Po zakończeniu wypłukiwania szpiku z kości, rozdrobnić szpik poprzez kilkukrotne wciągnięcie i wyciągnięcie go do/z strzykawki.
3. Otrzymaną zawiesinę komórek przenieść do probówki 15 ml.
4. Probówkę z komórkami zwirować (1800 rpm., 7 min., RT).
5. Zlać nadsącz, natomiast pelet rozpipetować w 1 medium hodowlanego DMEM/F12+10%FBS.
6. Do butelki hodowlanej typu Primaria (25cm²) nalać 4 ml medium hodowlanego DMEM/F12+10%FBS oraz dodać całkowitą objętość zawiesiny komórek.
7. Naczynie hodowlane umieścić w inkubatorze hodowlanym (37°C, 5% CO₂).
8. Po 72h odpłukać frakcję nieadherentną. Dodać 5ml DMEM/F12+10%FBS.
9. Na następnych zajęciach wykonać pasaż komórek.

P. II. Przygotowanie mysiego szpiku kostnego do izolacji hematopoetycznych oraz niehematopoetycznych KM metodą sortowania MACS oraz FACS

1. Z dwóch myszy wyizolować z kończyn dolnych kości udowe oraz piszczelowe. Kości umieścić na szalce (60mm) w 5 ml medium DMEM/F12.
2. Po odcięciu nasad kości, za pomocą strzykawki 1 ml z igłą, wypłukać szpik kostny do nowej szalki (60mm) zawierającej 5 ml medium DMEM/F12. Po zakończeniu wypłukiwania szpiku z kości, rozdrobnić szpik poprzez kilkukrotne wciągnięcie i wyciągnięcie go do/z strzykawki.
3. Otrzymaną zawiesinę komórek przefiltrować przez filtr o średnicy porów 40 µm do probówki o objętości 15 ml. Dopełnić medium do objętości 10 ml.
4. Probówkę z komórkami zwirować (1800 rpm., 7 min., RT).
5. Zlać nadsącz, natomiast pelet rozpipetować w 1 ml Lysing Buffer (1x BD PharmLyse). Dodać 1 ml Lysing Buffer.
6. Lizę erytrocytów prowadzić przez 6 min. w RT.
7. Dopełnić medium do objętości 10 ml.
8. Probówkę z komórkami zwirować (1800 rpm., 7 min., RT).
9. Zlać nadsącz, natomiast pelet rozpipetować w 1 ml AutoMACS Running Buffer.
10. Policzyc komórki w komorze Burkera.

UWAGA! Kolejne kroki mają na celu również zabezpieczenie materiału na Ćw 2 i 3!

11. 100 µl zawiesiny komórek przenieść do probówki typu Eppendorf. Dodać 100 µl buforu RL zawierającego 1% Bond Breaker (β-merkaptotanol). Zworteksować. Homogenizować przy użyciu strzykawki 1 ml z igłą. Przechowywać w -80°C. **(materiał na Ćw. 3)**
12. 300 µl zawiesiny komórek przenieść do nowej probówki cytometrycznej. Dodać 200 µl DPBS oraz 500 µl 4% roztworu p-formaldehydu. Utrwalać 15 min. w RT. Dodać 2 ml DPBS. Probówkę

z komórkami zwirować (1800 rpm., 7 min., RT). Zlać nadsącz, natomiast pelet rozpipetować w 0,5 ml DPBS. Przechowywać w lodówce. (materiał na Ćw. 2)

13. Do 4 probówek cytometrycznych dodać po 100 μ l DMEM/F12+2%FBS oraz po 10 μ l zawiesiny komórek (próbki kompensacyjne; patrz p. IV.2.). Probówki z komórkami trzymać na lodzie.

P. III. Izolacja frakcji CD45- oraz CD45+ ze szpiku kostnego - Sortowanie MACS:

1. Pozostałą objętość zawiesiny komórek szpiku kostnego (ok. 600 μ l) zawiesić w takiej objętości AutoMACS Running Buffer (+4°C) aby w 90 μ l buforu znajdowało się 10^7 komórek.
2. Dodać 10 μ l CD45 MicroBeads na każde 10^7 komórek, a następnie delikatnie przepipetować. Inkubować 15 min. na lodzie.
3. Przepłukać komórki 1 ml AutoMACS Running Buffer na każde 10^7 komórek.
4. Probówkę z komórkami zwirować (1400rpm, 8 min.).
5. Zawiesić komórki w 1,5 ml AutoMACS Running Buffer.
6. Rozdzielić komórki CD45- od CD45+ przy pomocy AutoMACS Pro Separator (Program Possels).
7. Po separacji komórki zwirować 1800 rpm., 7 min., RT.
8. Pelety komórek CD45+ oraz CD45- zawiesić odpowiednio w 300 μ l oraz 100 μ l medium DMEM/F12+2%FBS.
9. Przenieść do probówek typu Eppendorf po 50 μ l frakcji CD45+ oraz CD45-. Dodać po 100 μ l buforu lizującego zawierającego 1% Bond Breaker. Zworteksować. Homogenizować przy użyciu strzykawki 1 ml z igłą. Przechowywać w -80°C. (materiał na Ćw. 3)
10. 50 μ l zawiesiny komórek CD45- przenieść do nowej probówki cytometrycznej. Dodać 450 μ l DPBS oraz 500 μ l 4% roztworu p-formaldehydu. Utrwalać 15 min. w RT. Dodać 2 ml DPBS. Probówkę z komórkami zwirować (1800 rpm., 7 min., RT). Zlać nadsącz, natomiast pelet rozpipetować w 0,5 ml DPBS. Przechowywać w lodówce. (materiał na Ćw. 2)

P. IV. Izolacja frakcji KM hematopoetycznych (HSC) - Sortowanie FACS:

1. Do dwóch probówek cytometrycznych dodawać po 100 μ l DMEM/F12 + 2% FBS.
2. Komórki CD45+ (po izolacji MACS) wybrać immunofluorescencyjnie przeciwciałami wymienionymi w tabeli, zgodnie z poniższym schematem:

Nazwa Próbkki	Rodzaj komórek	Przeciwciało znakowane fluorescencyjnie
CD45+	CD45+	1. Panel markerów linii hematopoetycznych (Lin): PE Rat anti-mouse Ly-6G and Ly-6C; PE Rat anti- mouse CC11b; PE Rat anti- mouse CD45R/B220; PE Rat anti- mouse Ter-119; PE Hamster anti- mouse $\gamma\delta$ T- Cell Receptor; PE Hamster anti- mouse TCR β Chain) <u>po 1,5 μl każdego = 9 μl/ próbkę</u> 2. PE/Cy5 anti- mouse Ly-6A/E (Sca-1) = 6 μl/ próbkę 3. FITC Rat anti-mouse CD45 = 10 μl/ próbkę

CD45+/ Empty	CD45+	Próbka niebarwiona
Komp./ Empty	Szpik kostny po lizie erytrocytów	Próbka niebarwiona
Komp./ PE		Panel markerów linii hematopoetycznych Lin = 2 μ l
Komp./ PE-Cy5		PE/Cy5 anti- mouse Ly-6A/E (Sca-1) = 2 μ l
Komp./ FITC		FITC Rat anti-mouse CD45 = 2 μ l

3. Barwić 20 min., na lodzie, bez dostępu światła.
4. Po zakończeniu barwienia do każdej próbki dodawać po 2 ml DPBS (bez Mg^{2+} , Ca^{2+}).
5. Probówki z komórkami zwirować (1800 rpm., 7 min., RT).
6. Odciągnąć nadsącz, pelet zawiesić w 400 μ l DMEM/F12 + 2% FBS, rozpipetować.
7. Wysortować komórki HSC (CD45+/Lin-/Sca-1+) przy użyciu sortera komórek BD FACS Aria III.

Zakres materiału, który należy przygotować do ćwiczeń:

1. Zasada działania cytometru przepływowego.
2. Immunobarwienie komórek w celu ich analizy w mikroskopii fluorescencyjnej i cytometrii przepływowej.
3. Cechy charakterystyczne komórek macierzystych.

Zalecana literatura:

1. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Analysis/Flow-Cytometry/Flow-Cytometry-Technical-Resources.html?icid=fr-flow-4>
2. Lin KK, Goodell MA. Detection of hematopoietic stem cells by flow cytometry. *Methods Cell Biol.* 2011;103:21-30.
3. Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Machalinski B, Kucia M. Bone-marrow-derived stem cells--our key to longevity? *J Appl Genet.* 2007;48(4):307-19.
4. Zuba-Surma EK, Ratajczak MZ. Analytical capabilities of the ImageStream cytometer. *Methods Cell Biol.* 2011;102:207-30.