

Sinkronizacija stanica

Sinkronizacija stanica

metode kojima se stanice u jednoj populaciji dovode u istu fazu ciklusa

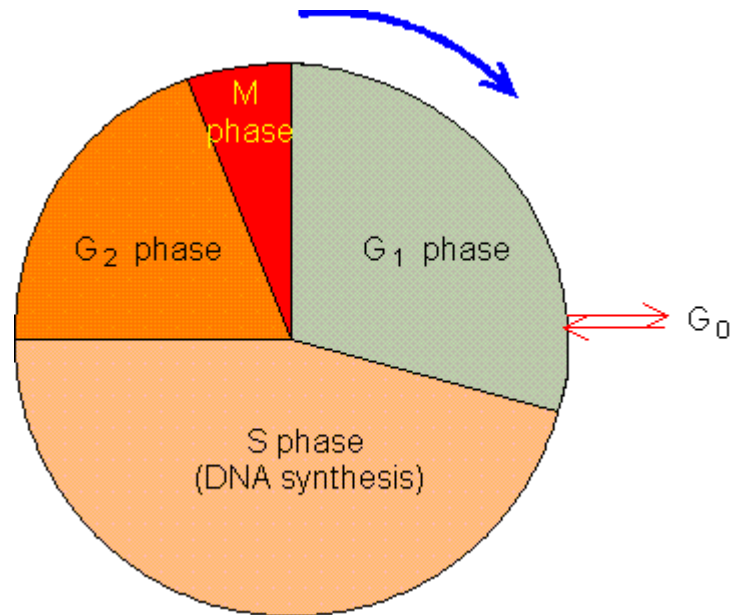
-ispitivanje pojedinih faza ciklusa

-ispitivanje djelovanja citostatika

Principi sinkronizacije

selekcija stanica u pojedinoj fazi ciklusa

zaustavljanja progresije ili inhibicija ciklusa



Mitotska selekcija

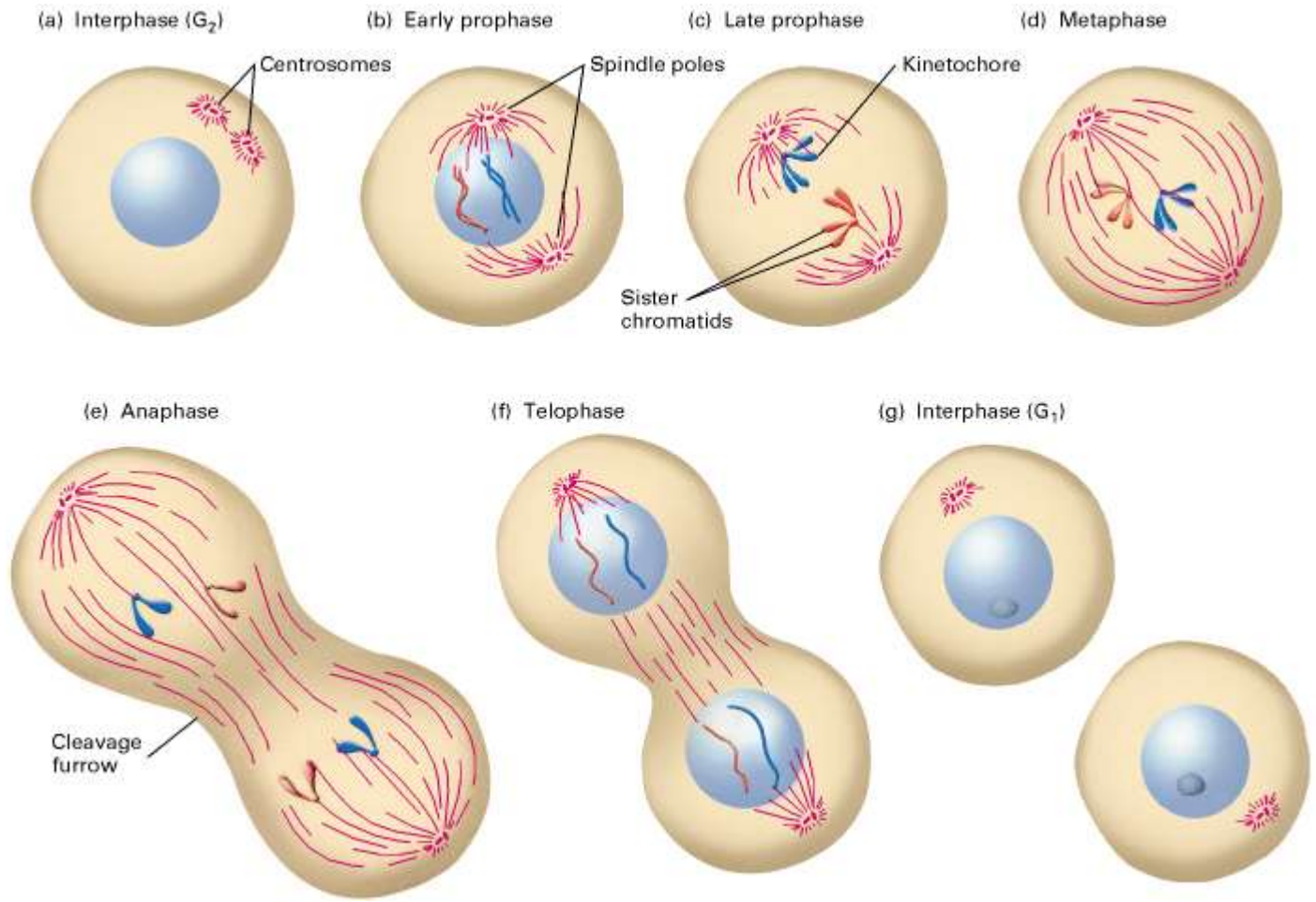


Mitoza u kulturi stanica

Mitoza je jedina faza ciklusa koja se može jasno razlikovati u staničnoj kulturi

Stanice su slabije pričvršćene za podlogu, pa se mogu odvojiti potresanjem posude

-fiziološki uvjeti, ali mali prinos stanica (1-5 % stanica)



Mitoza

Metode inhibicije

Dodavanjem specifičnog inhibitora stanice se zaustave u jednoj fazi ciklusa. Stanice u drugim fazama idu dalje kroz ciklus dok ne dođu do točke u kojoj će biti inhibirane. Uklanjanjem inhibitora nakon inkubacije sve stanice zajedno krenu dalje kroz ciklus.

-Inhibitori staničnog ciklusa za sinkronizaciju stanica

reverzibilni
ne oštećuju DNA

-metabolički i kemijski inhibitori

-mogućnost dobivanja veće stanične populacije

-kemijski inhibitori nisu “prirodna metoda”, dovode stanicu u “neravnotežu” staničnih procesa

Odabir metode sinkronizacije

stanična linija: adherentnost, toksičnost, kontrolne točke

zaustavljena faza ciklusa: ciljna faza ciklusa

stupanj uniformnosti stanica: vremenska specifičnost događaja

potreban broj stanica

vrijeme udvostručavanja

kemijski inhibitori: poremećaj normalne stanične regulacije
neuravnotežen rast i moguća apoptoza

nepoznate i višestruke mete u stanici

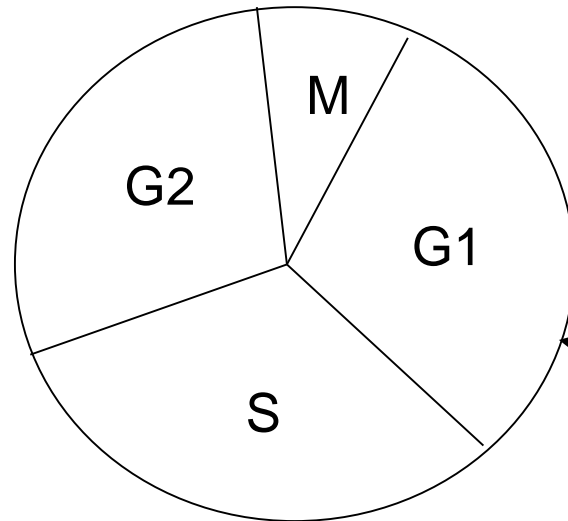
Metode inhibicije ciklusa

inhibitori
polimerizacije
mikrotubula



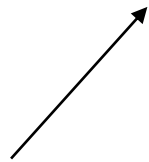
specifični inhibitori u G1:

nepogodni uvjeti za rast stanice
metabolički inhibitori



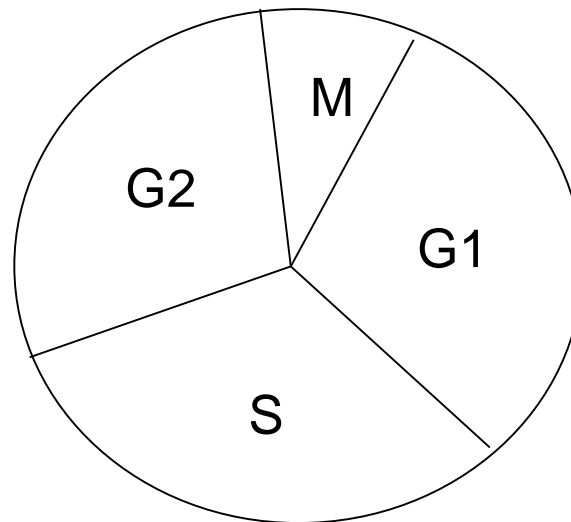
R točka

inhibitori sinteze DNA
metabolički inhibitori enzima potrebnih
za sintezu DNA ili nukleotida



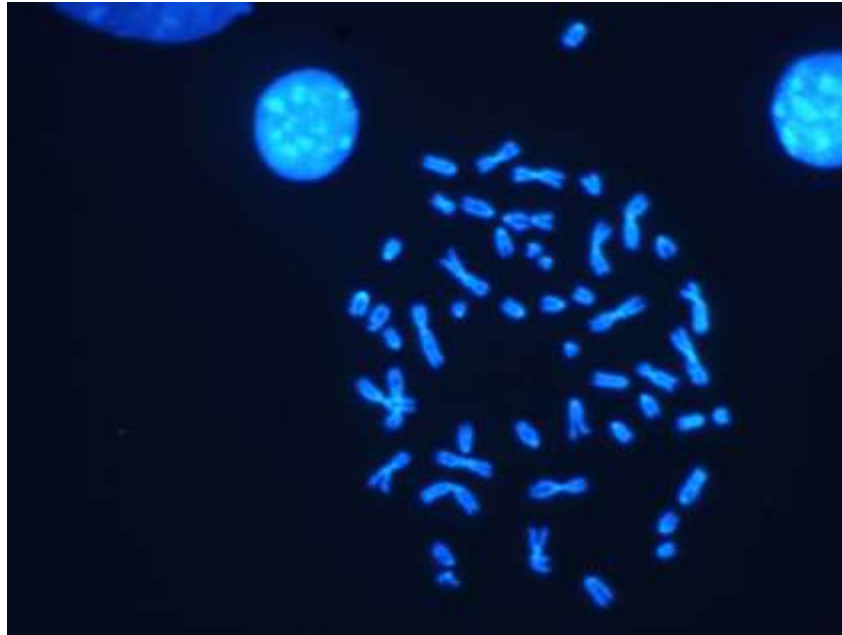
Metode inhibicije ciklusa

inhibitori polimerizacije mikrotubula



kolhicin i kolcemid
vinblastin
nokodazol (G2/M)
(depolimerizacija)

-kariogram
-FISH

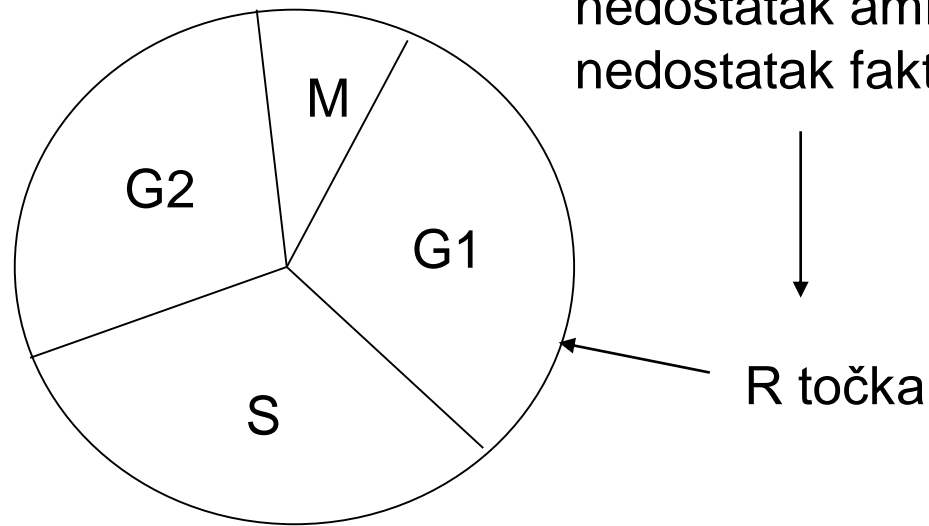


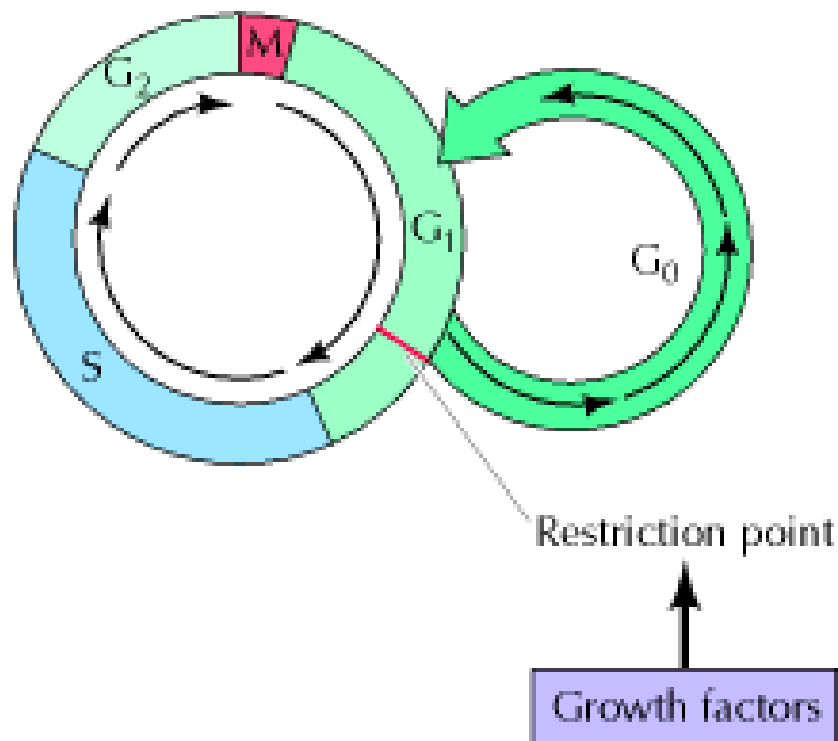
Kromosomi nakon tretiranja kolhicinom
(jezgre i kromosomi obojeni fluorescentnom bojom)

Metode inhibicije ciklusa

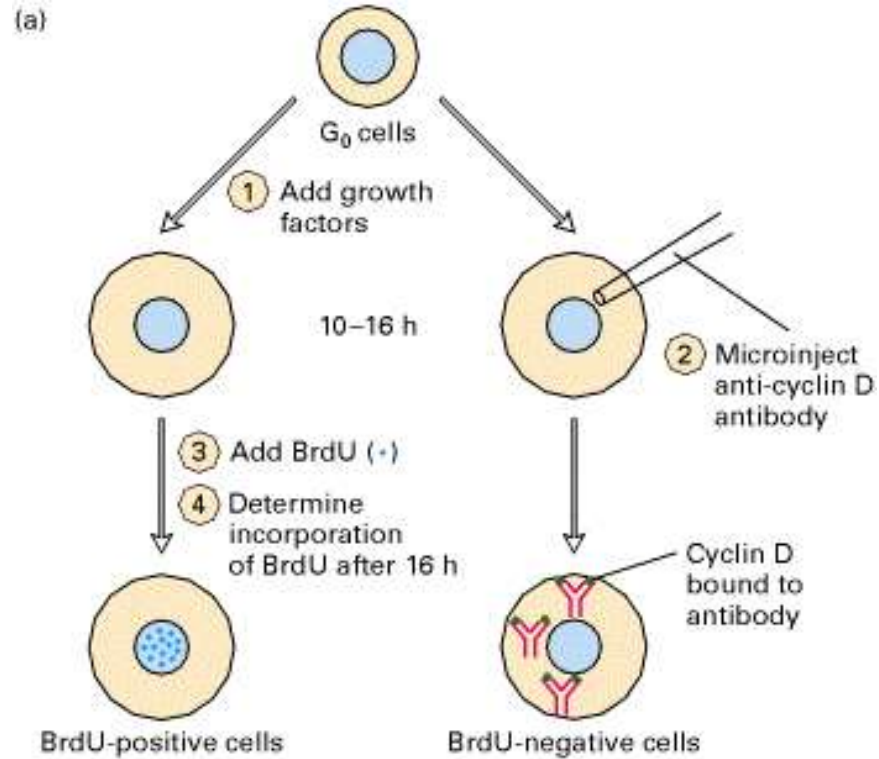
specifični inhibitori u G1

nepogodni uvjeti za rast stanice:
kontaktna inhibicija
nedostatak aminokiselina
nedostatak faktora rasta

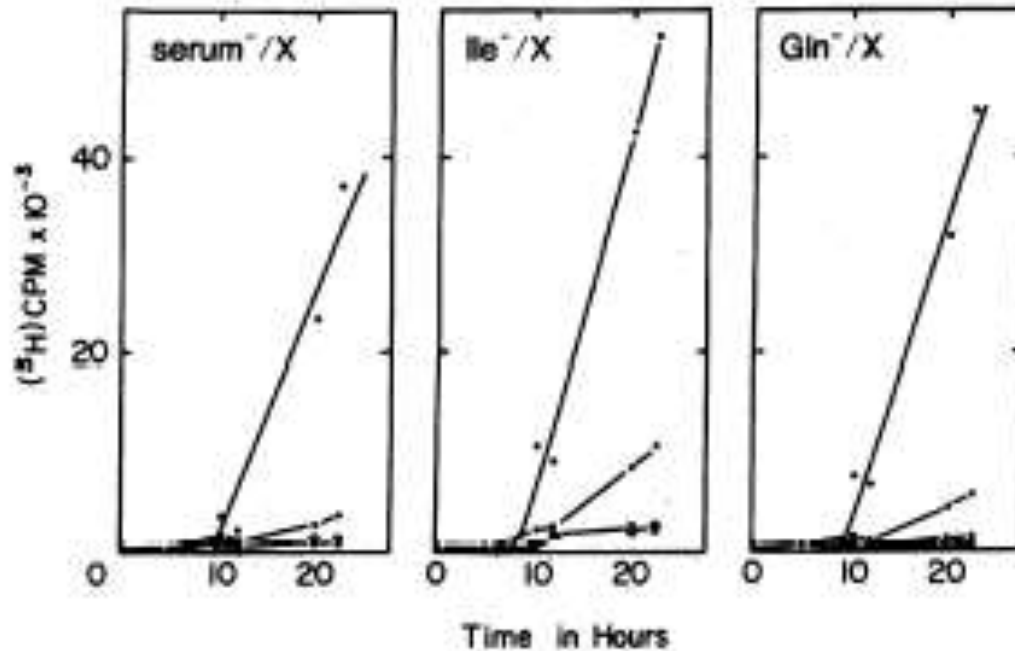




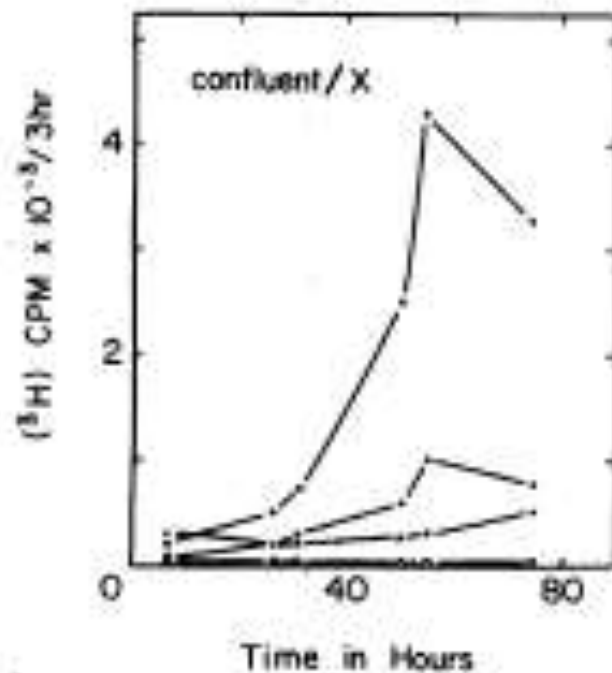
Restrikcijska točka
stanicama je "dozvoljeno" ući u S fazu ako prođu R točku



Ciklin D sudjeluje u restrikcijskoj točki



Stanice su inhibirane u mediju s 0,25% seruma (A), bez izoleucina (B) ili bez glutamina i nakon 20 sati im je dodan potpuni medij i praćena sinteza DNA: isti mehanizam zaustavljanja u restrikcijskoj točki Pardue (1975)



Inhibicija gustoćom: stanice su presađene pomoću struganja i pokazuju istu krivulju sinteze DNA kao i kod drugih načina zaustavljanja u R točki

izgladnjivanje (serum)

24-48 h

G0/G1 faza

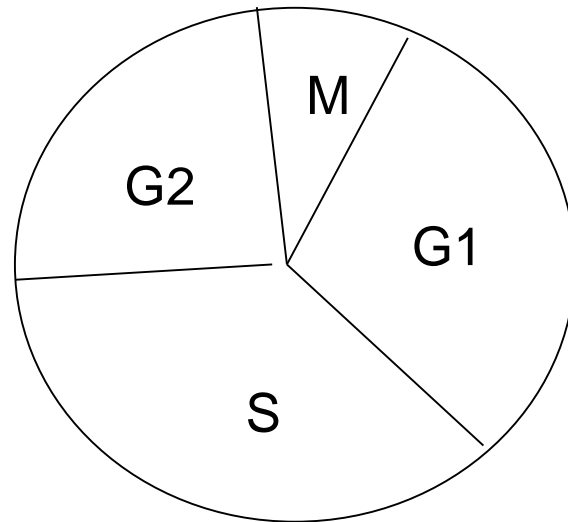
izgladnjivanje (aminokiseline)

36-42 h

G0/G1 faza

- tumorske stanice: poremećena kontrola ciklusa i nije uvijek moguća primjena ovih metoda

Metode inhibicije ciklusa



inhibitori sinteze DNA
metabolički inhibitori enzima potrebnih
za sintezu DNA ili nukleotida

visoka koncentracija timidina
fluordeoksiuridin
hidroksiurea
ametopterin (metotreksat)
afidikolin

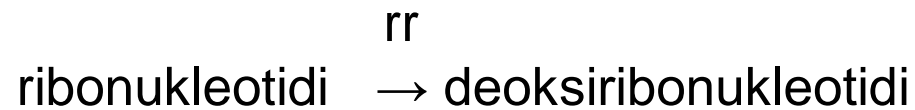
Način djelovanja pojedinih inhibitora staničnog ciklusa

Inhibitor

Inhibicija

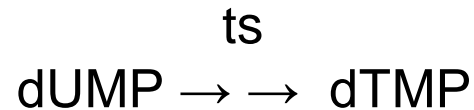
hidroksiurea

ribonukleotid reduktaza



5-fluordeoksiuridin

timidilat sintaza



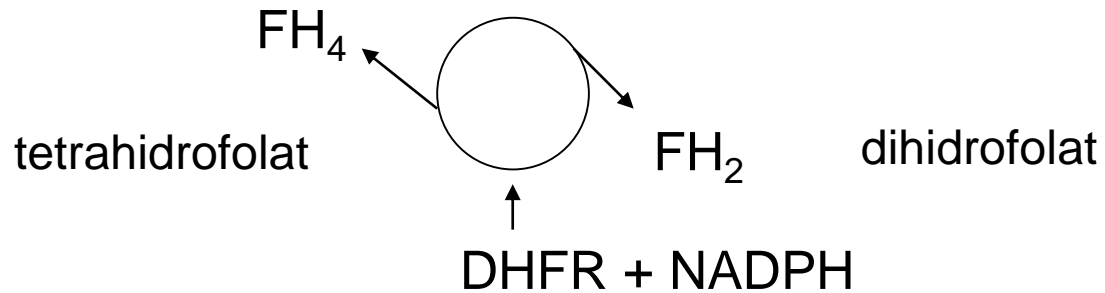
Način djelovanja pojedinih inhibitora staničnog ciklusa

Inhibitor

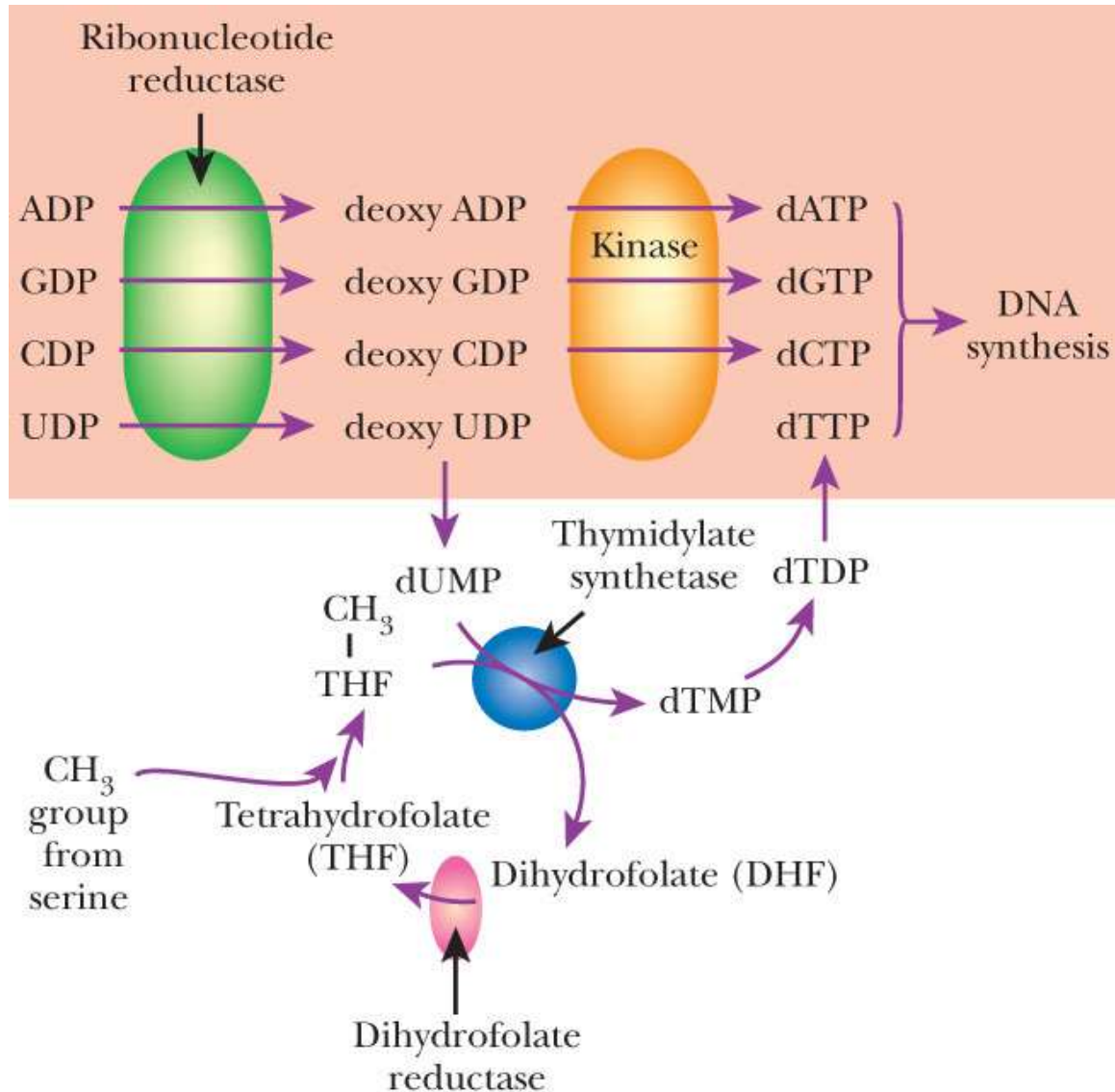
Inhibicija

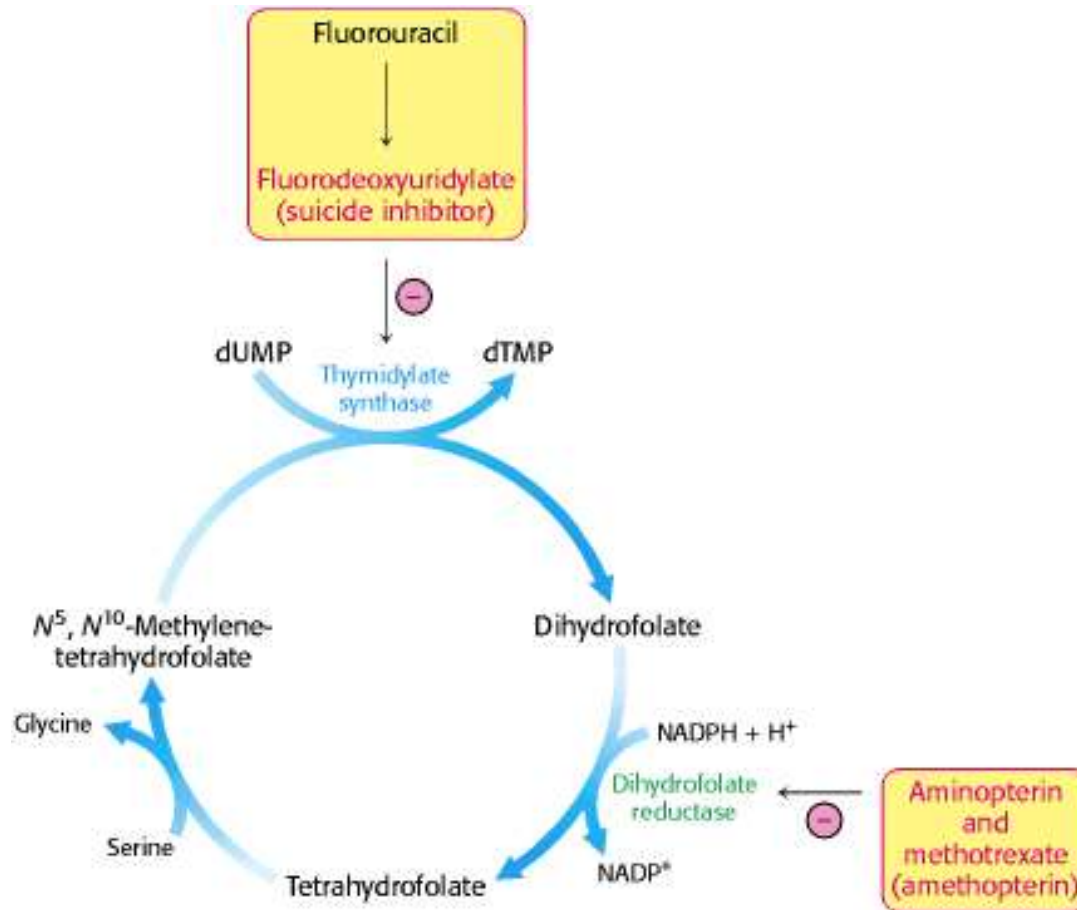
metotreksat (ametopurin)

dihidrofolat reduktaza



Biosinteza DNA





Inhibitori u sintezi deoksiribonukleotida

Način djelovanja pojedinih inhibitora staničnog ciklusa

Inhibitor

Inhibicija

afidikolin

DNA polimeraza alfa u sintezi DNA

visoka koncentracija timina

zaustavljanje sinteze nukleotida

-nakon postupka sinkronizacije moramo provjeriti jesmo li sinkronizirali stanice

Metode praćenja sinkronizacije

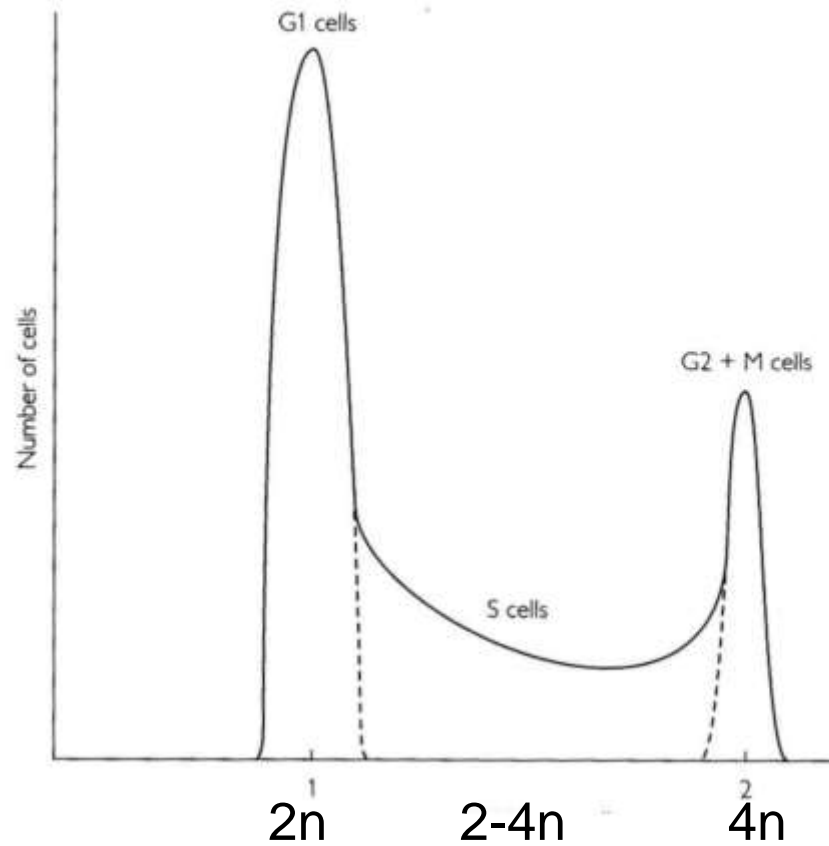
mitotski indeks (% stanica u mitozu)

sinteza DNA: **pulsna** ugradnja radioaktivnog timidina

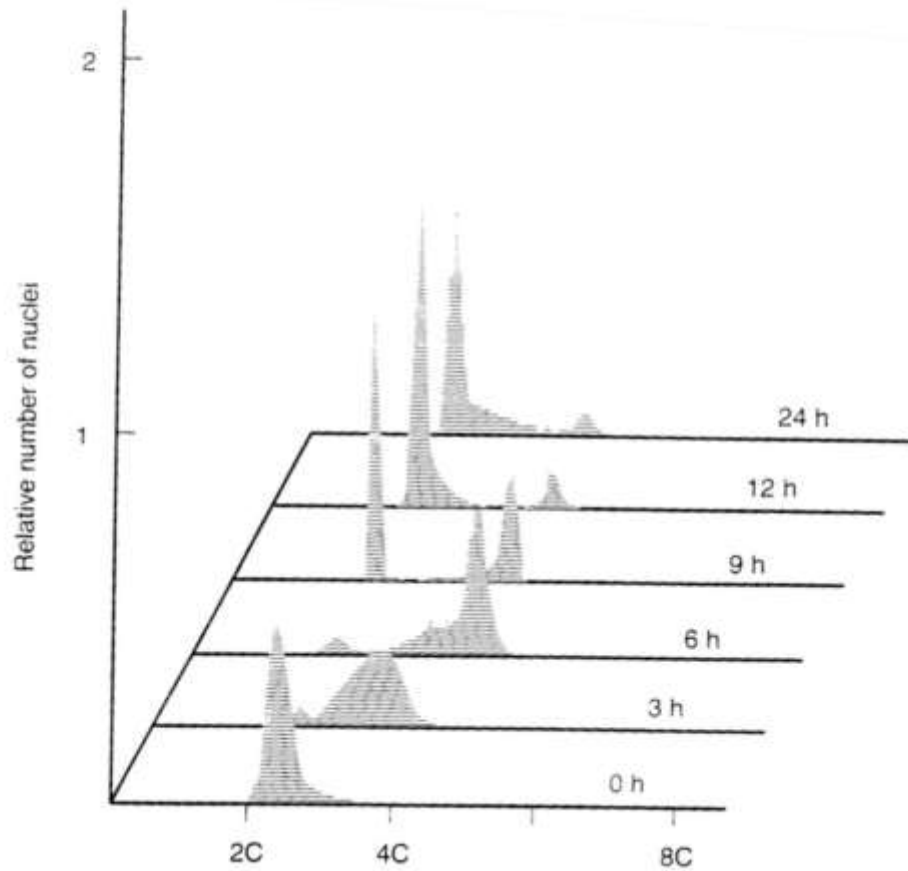
pulsna ugradnja bromodeoksiuridina BrdU
(detekcija obilježenim antitijelima)

fluorescencijski razvrstavač stanica: DNA

imunobojanje s antitijelima na cikline



Praćenje sinkronosti protočnim citometrom
 obilježavanje DNA propidij jodidom ili Hoechst 3342



Prolaz sinkronih stanice kroz ciklus od rane S faze (štakorski fibroblasti)

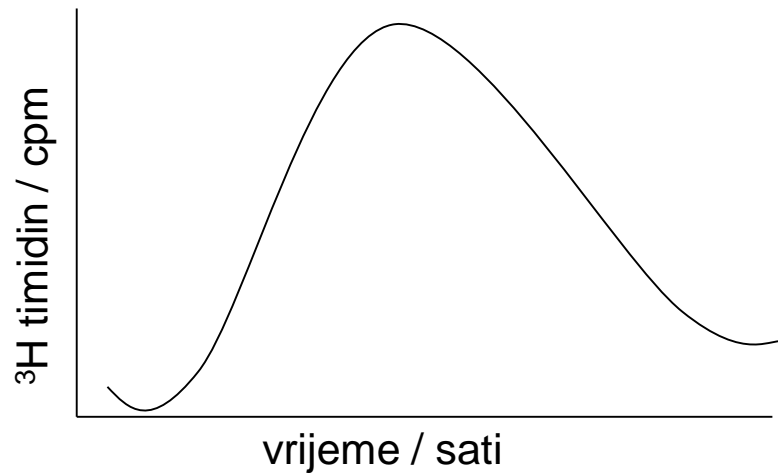
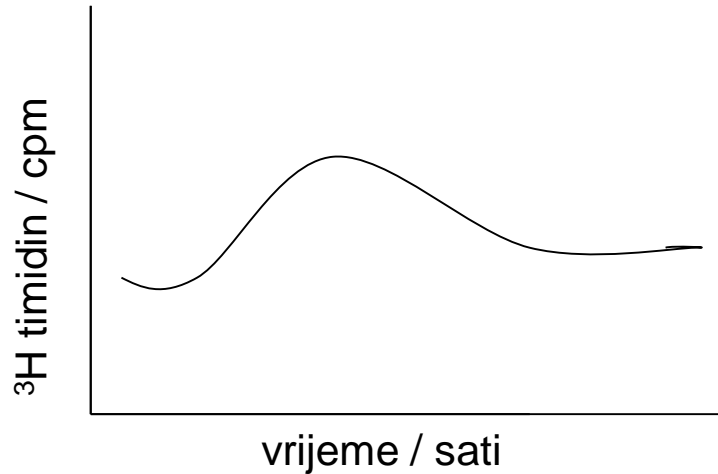
Stupanj sinkronizacije

Indeks obilježavanja stanica
labelling index = LI

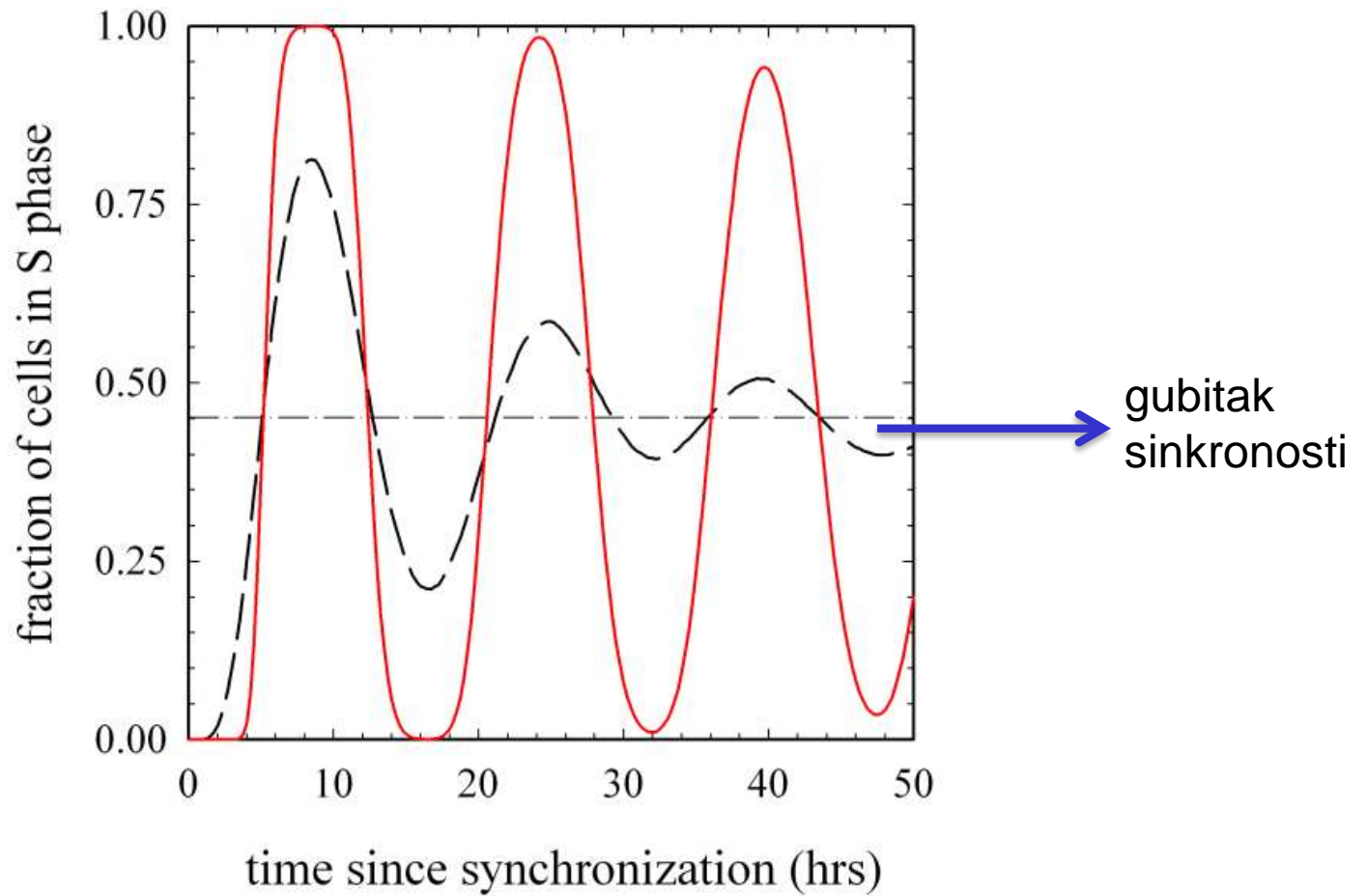
$$LI = L_{\max} - L_{\min}$$

ili
% obilježenih stanica

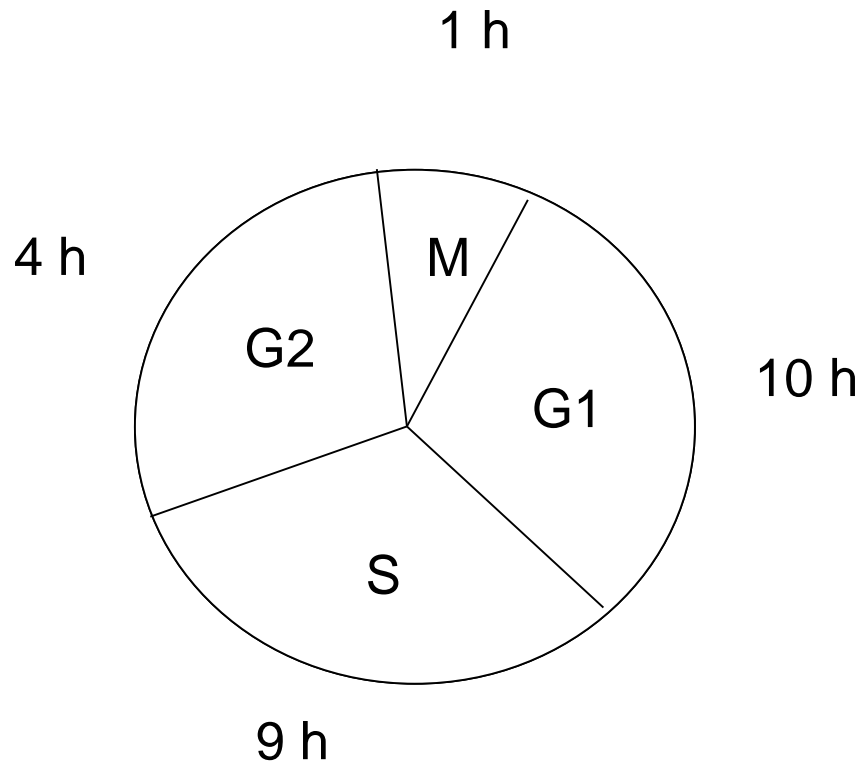
slabo sinkronizirane stanice
LI nizak



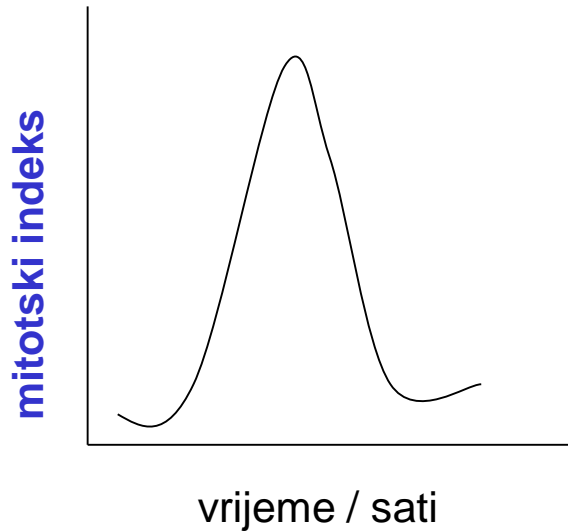
dobro sinkronizirane stanice
LI visok



Opadanje stupnja sinkronosti nakon prvog ciklusa



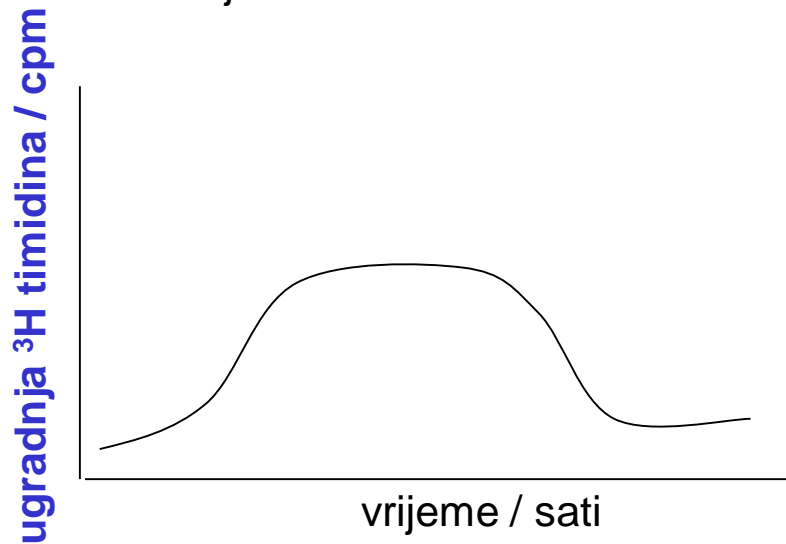
Okvirno trajanje faza ciklusa stanice



Usporedba krivulja sinkroniziranih stanica

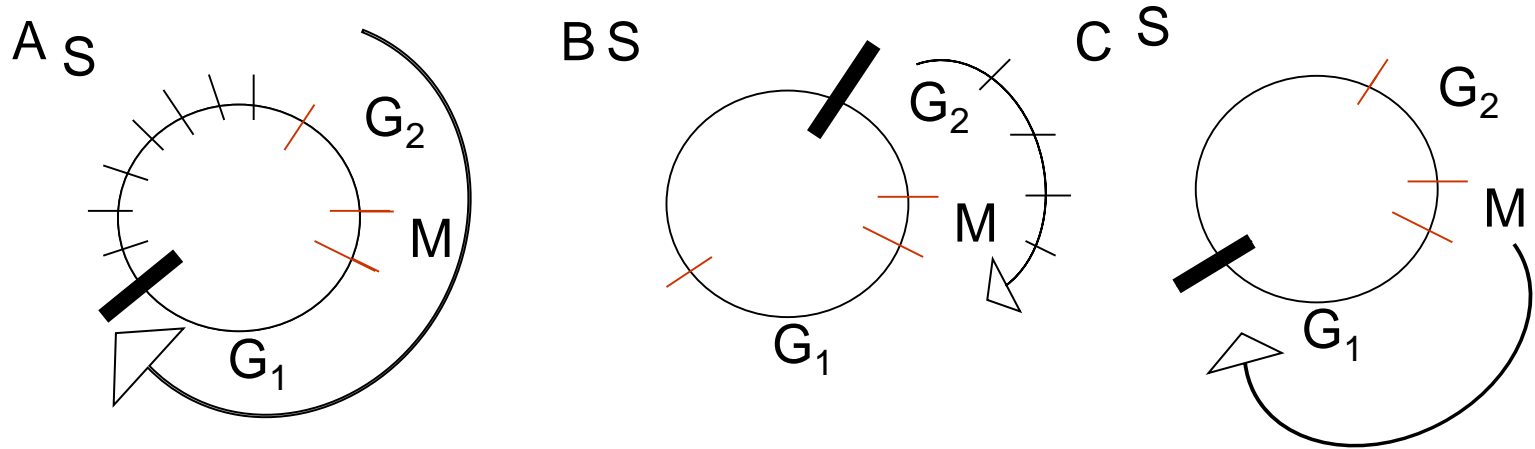
40 % visoko sinkronizirane

-ako se promatraju stanice u mitozu jer je vrijeme mitoze vrlo kratko



80 % visoko sinkronizirane

ako se promatraju stanice u fazi sinteze, jer kod nesinkrone kulture je 40 % stanica u sintezi
ako je duljina trajanja S faze ~8 sati



Dvostruki blok inhibitorom sinteze

Stanična distribucija nakon inhibitora sinteze

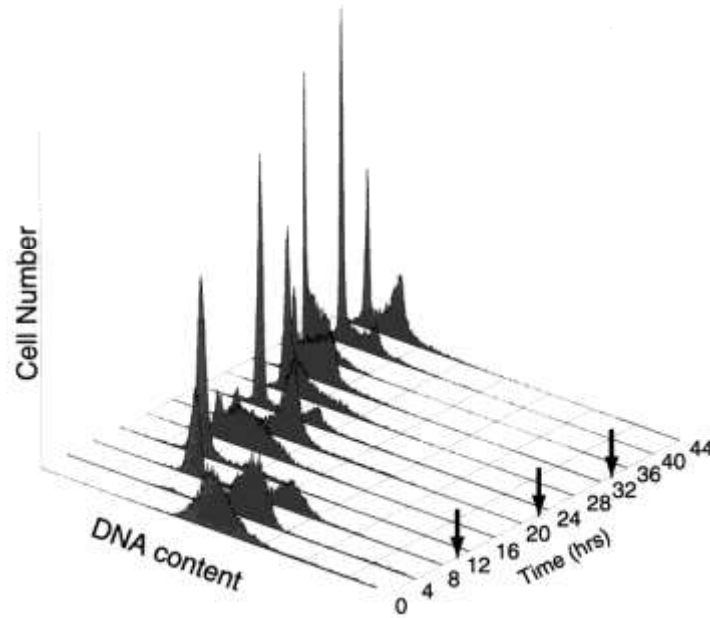
A Prvi blok inhibitorom sinteze

B Uklanjanje inhibitora u vremenu T_2-S ($>S$)

C Drugi blok inhibitorom sinteze

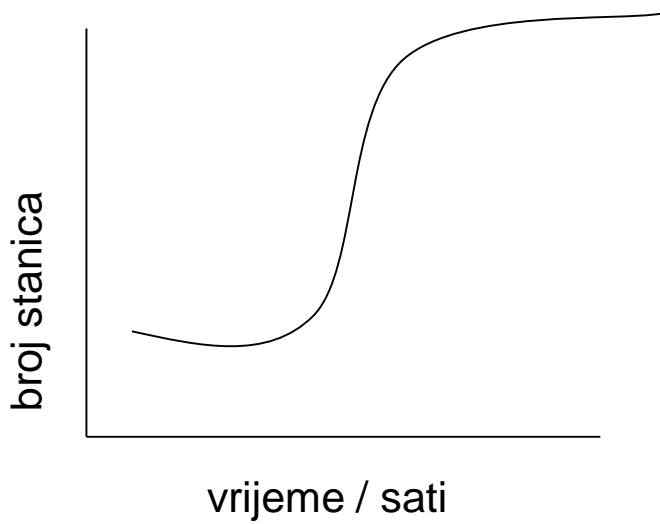
-ako stanice sinkroniziramo u S fazi, kako je razmjerno duga, stanice neće biti dovoljno sinkrone, pa je moguće napraviti “dvostruku inhibiciju”

A Double Thymidine



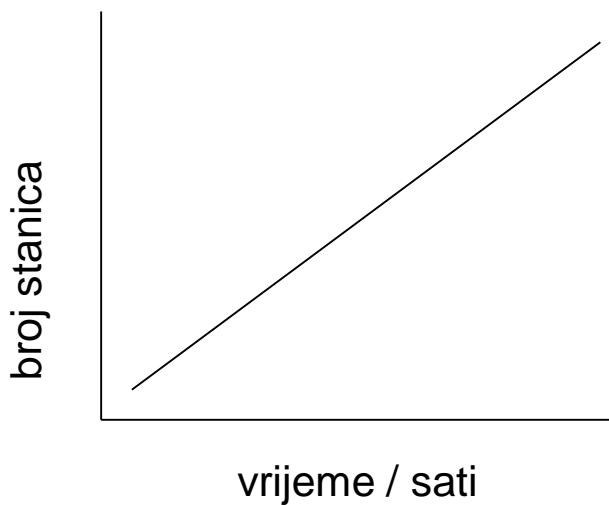
prvi ciklus inhibicije timidinom: 18 h za HeLa stanice
9 h bez inhibicije (duljina ciklusa - S)
drugi ciklus inhibicije timidinom: 17 h

- visoka koncentracija timidina inhibira sintezu dCTP povratnom spregom
- mogućnost kombinacija raznih inhibitora



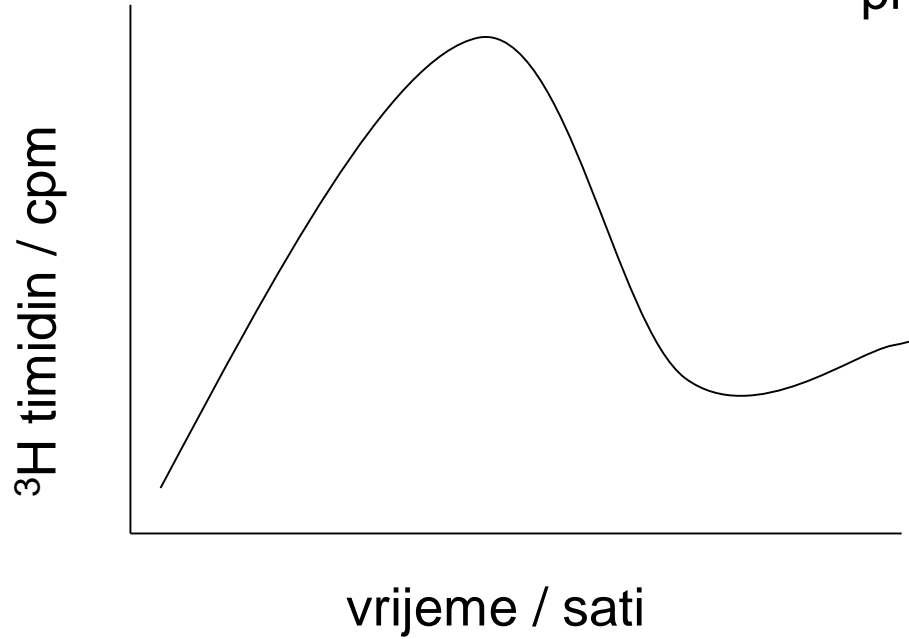
Porast broja stanica

sinkrone stanice



nesinkrone stanice

Ugradnja radioaktivnog timidina
praćenje sinteze DNA



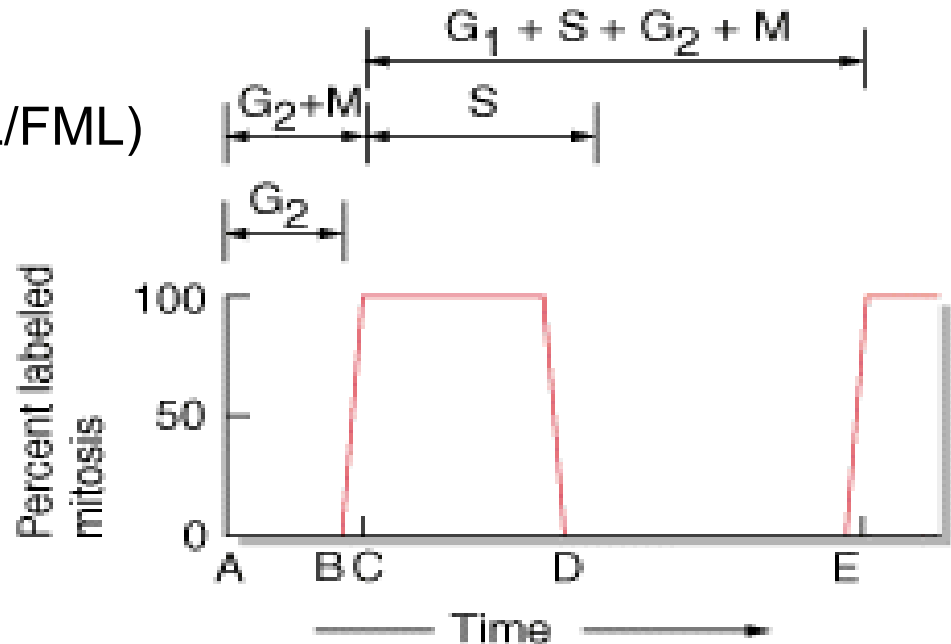
Određivanje pojedinih faza ciklusa kombinacijom obilježavanja DNA i analize mitotskih stanica

- metode prije protočnog citometra
- kod sinkrone i asinkrone populacije:

1. sinkrona populacija:

postotak obilježenih mitozâ (PML/FML)

-pulsno obilježavanje i autoradio grafija u određenim intervalima kroz ciklus: praćenje obilježenih stanica u funkciji vremena



vrijeme trajanja ciklusa: vrijeme između dviju dioba

$$T \text{ ciklusa} - T_S (\text{H3T}) - M - G_2 (\text{obilježene mitoze}) = G_1$$

Metoda određivanja duljine ciklusa nesinkrone populacije:

-uvjet: poznavanje duljine ciklusa

-autoradiografija – brojanje stanica u S fazi

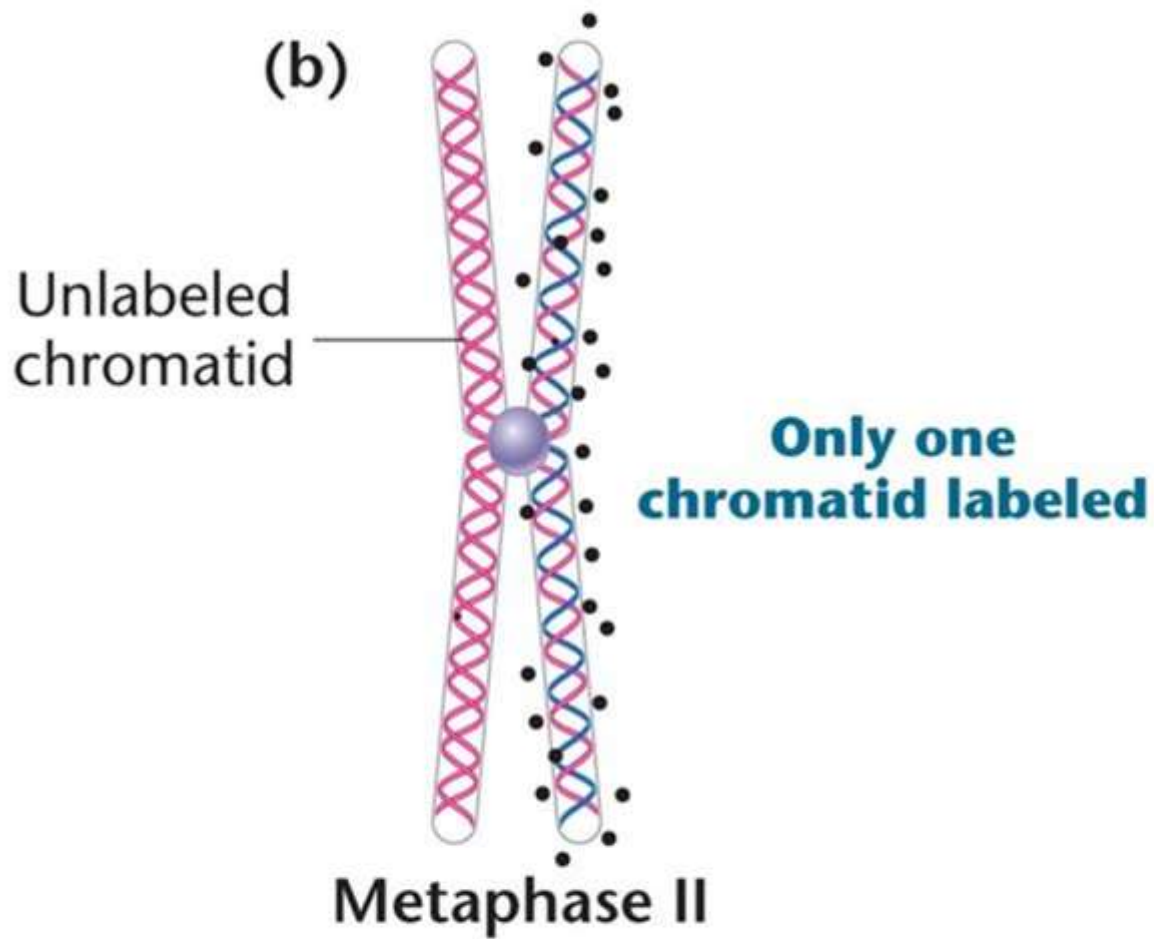
-udio (broj) stanica u sintezi (pulsno obilježene stanice s H3T) u odnosu na ukupni broj stanica
= duljina S faze u odnosu na cijeli ciklus

-udio (broj) stanica u mitozu (morfološki) u odnosu na ukupni broj stanica
= duljina M u odnosu na duljinu ciklusa

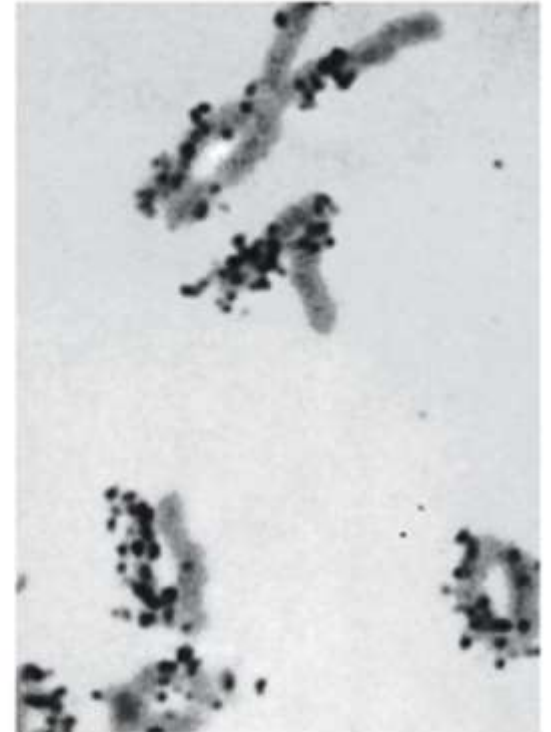
-udio obilježenih mitozu = G2 faza

$G1 = T - M - S - G2$

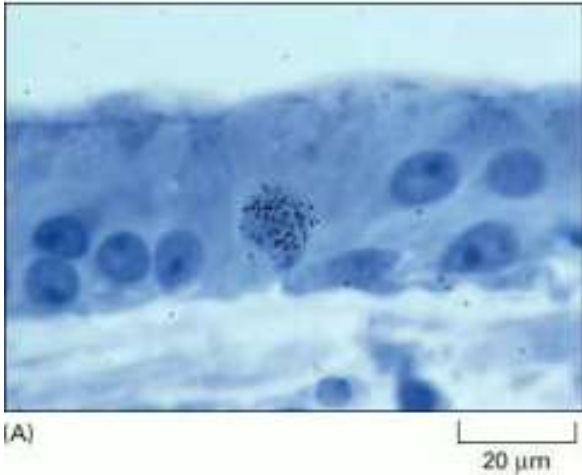
omjeri broja stanica u pojedinim fazama u odnosu na ukupni broj stanica jednaki su vremenskom trajanju tih faza u odnosu na trajanje cijelog ciklusa



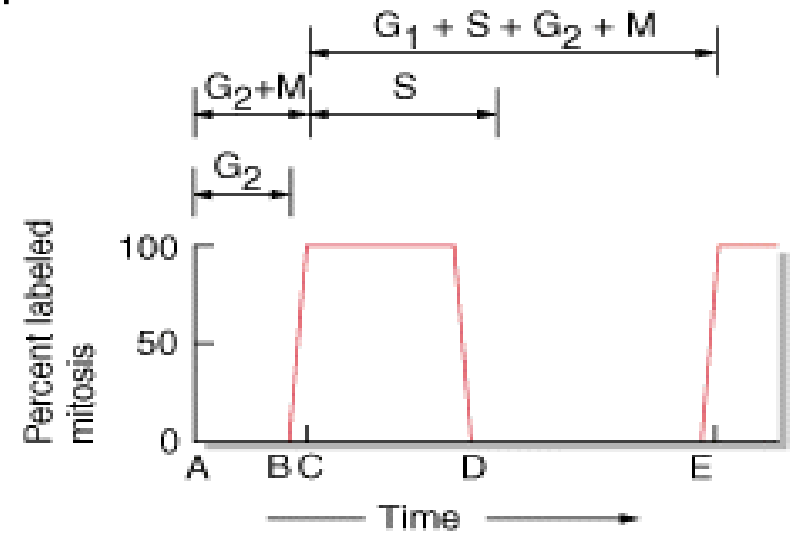
Replication II
Unlabeled thymidine



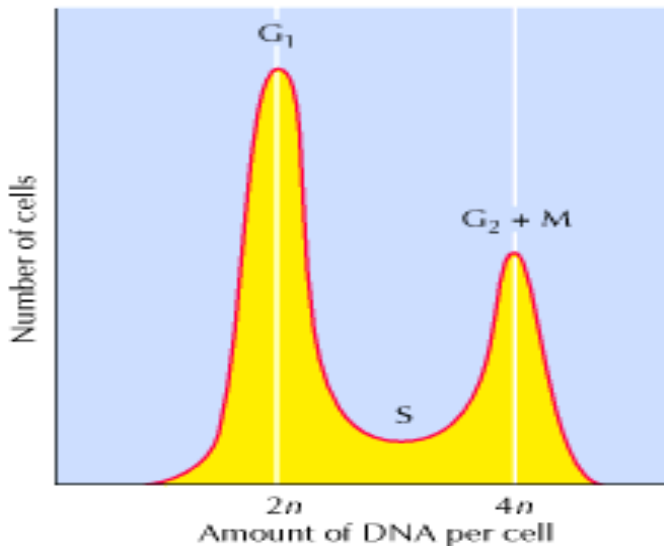
Osnovne metode praćenja sinkronosti



Identifikacija S faze ciklusa ugradnjom radioaktivnog timidina



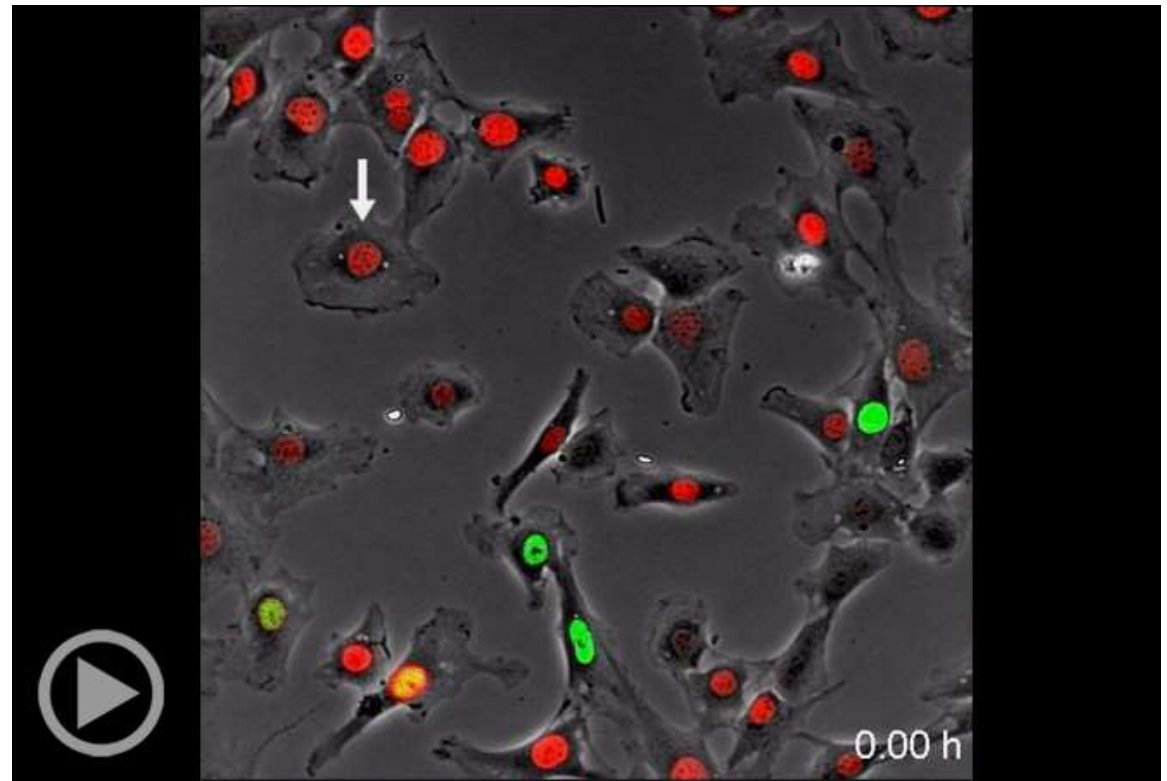
Određivanje pojedinih faza ciklusa kombinacijom obilježavanja DNA i analize mitotskih stanica



Određivanje faza ciklusa protočnim citometrom

Ready, Set, Replicate

By Teresa Davoli, Eros Lazzerini Denchi, and Titia de Lange, The Rockefeller University



Although biologists have been watching cells divide under the microscope for ~150 years, visualizing the steps of interphase in live cells has been difficult. In 2008 Sakaue-Sawano et al. developed a clever method, called Fucci imaging, to watch a critical decision during interphase - the choice to start replicating DNA.

Image: In Fucci imaging, red and green fluorescent proteins are fused to two interphase regulators, Cdt1 and Geminin, respectively. Cdt1 exists only during G1 and early S phase, whereas Geminin exists during S/G2. Thus, cells appear red in G1, yellow in early S, and green in late S and G2 phases. Here human fibroblasts are visualized by time-lapse live-cell imaging (phase-contrast and fluorescent images acquired every 15 min with 10X objective).

http://www.cell.com/cell_picture_show-cellcycle