

## **Metody detekce apoptózy indukované cytotoxickými látkami u nádorových buněk**

1. Detekce hladiny p-p53 (S15) pomocí elektroforézy a westernového přenosu
2. Měření hladiny superoxidových aniontů sondou DHE (dihydroethidium) průtokovou cytometrií
3. Měření hladiny kyslíkových radikálů (ROS) (peroxid vodíku, hydroxylových radikálů) sondou DCF průtokovou cytometrií
4. Měření membránového mitochondriálního potenciálu sondou JC1 průtokovou cytometrií
5. Stanovení subG0 fáze buněčného cyklu průtokovou cytometrií
6. Transfekce buněk lipofekcí a stanovení aktivity luciferázy a  $\beta$ -galaktozidázy z extraktů přechodně transfekovaných buněk
7. Monitorování cytotoxického účinku látek v reálném čase – xCelligence assay

### **1. Detekce hladiny p-p53 (S15) pomocí elektroforézy a westernového přenosu**

#### Úvod:

Apoptóza, neboli typ I programované buněčné smrti, slouží k eliminaci nepotřebných či poškozených buněk. Je součástí fyziologických i patologických dějů. Během apoptózy dochází ke kondenzaci chromatinu, fragmentaci DNA a rozpadu buněk na apoptotická tělíška, která jsou následně fagocytována. Apoptóza je charakteristická dvěma signálními drahami – vnitřní - řízená mitochondriemi a vnější - řízená aktivací receptorů smrti.

p53 patří mezi nádorové supresory a indukuje zástavu růstu nebo apoptózu v závislosti na fyziologických podmínkách a buněčném typu. DNA poškození indukuje fosforylaci p53 na Ser15 s následným snížením schopnosti interakce p53 s jeho negativním regulátorem Mdm2.

#### Cíl:

Zjistit, zda v buňkách MDA-MB-231 vystavených působení chemoterapeutika dochází k fosforylaci a aktivaci p-p53 (S15).

#### Postup a příprava vzorků:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 2ml misky v koncentraci  $0,2 \cdot 10^6$  b/2ml.
2. Inkubace buněk 24hod/37°C
3. Ošetřit chemoterapeutikem cisplatinou a doxorubicinem
4. Inkubace buněk 37°C
5. Buňky promýt 1xPBS a lyzovat v 2xCSB pufru neobsahujícím merkaptoethanol ani bromfenolovou modř, 4 minuty povařit a uchovávat při  $-20^\circ\text{C}$ . Změřit koncentraci proteinů ve vzorcích DC Protein Assay kitem (Biorad). Ke vzorkům přidat alespoň dvojnásobek kompletního 2xCSB pufru tak, aby výsledná koncentrace proteinů v takto naředěných vzorcích byla stejná.

#### Měření koncentrace proteinů (DC Protein Assay Kit):

Na mikrodestičku pipetovat 5ul každého vzorku ve třech opakováních. Ke vzorkům přidat 25 ul roztoku A (obsahuje 20 ul roztoku S na 1 ml roztoku A). Přidat 200 ul roztoku B, zbavit vzorky bublin a ponechat 15 minut stát. Poté změřit absorbanci na ELISA readeru při 750 nm. Vypočítat vhodné ředění vzorků tak, aby na SDS-PAGE bylo naneseno stejné množství proteinů od každého vzorku.

#### Příprava gelu:

1. S použitím rukavic vyčistit skla, promýt pod tekoucí vodou, umýt detergentem, propláchnout destilovanou vodou, opláchnout ethanolem a utřít.

2. Sestavit skla se spacersy a sevřít je svorkami.
3. Připravit roztok pro dolní gel, jemně promíchat a nalít mezi připravená skla asi do 2/3. Převrstvit gel slabou vrstvou destilované vody. Nechat polymerovat 30 minut.
4. Slít horní vrstvu destilované vody, připravit roztok pro horní gel, nalít jej na dolní gel, vsunout hřebínek a nechat polymerizovat 45 minut.

#### Nanášení vzorků a elektroforéza:

1. Skla s gelem umístíme do elektroforetické aparatury, dolijeme elektroforetický pufr a opatrně vytáhneme hřebínky.
2. Na gel nanášíme 10-20 ul vzorku (množství závisí na koncentraci proteinů v buněčných lyzátech).
3. Připojíme aparaturu ke zdroji. Pro průchod horním gelem aplikujeme 80V, poté zvýšíme napětí na 120V.
4. Elektroforézu zastavím v momentě, když hrana barvičky opouští gel.

#### Sestavení blotovací aparatury:

1. Nastříháme 4 kusy papíru Whatman 3MM a nitrocelulózovou membránu stejné velikosti jako je proteinový gel.
2. Navlhčíme papíry Whatman a pórezní podložky v transferovém pufru.
3. Plastikovou svorku umístíme do vaničky s transferovým pufrem černou plochou dolů. Na ní položíme pórezní podložku a vytlačíme bubliny.
4. Na podložku umístíme 2 navlhčené filtrační papíry Whatman a opět vytlačíme bubliny.
5. Na papíry Whatman položíme gel a na něj opatrně navlhčenou nitrocelulózovou membránu.
6. Na membránu pak opět položíme dva papíry Whatman, vytlačíme bubliny a na ně druhou pórezní podložku. Opět vytlačíme bubliny.
7. Takto sestavený sendvič sevřeme do plastické svorky a umístíme do vaničky s transferovým pufrem a chladítkem.
8. Blotujeme 1 hod při 400 mA.

#### Detekce proteinů na membráně pomocí protilátek:

1. Po skončení blotingu promyjeme nitrocelulózovou membránu v 5% roztoku sušeného mléka v TBS-Tween po dobu 30 minut při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C.
2. Inkubujeme membránu s primární protilátkou anti-p53 ředěnou 1:1000 v TBS-Tween 1 hod při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C.
3. 3x promyjeme v TBS-Tween (cca 5 minut každé promytí).
4. Inkubujeme membránu 1 hod se sekundární protilátkou s konjugovanou peroxidázou (anti-mouse IgG ředěná 1:15000 v TBS-Tween) při pokojové teplotě.
5. Promyjeme třikrát 5min TBS-Tween a dvakrát 2 min TBS.
6. Opláchneme membránu v destilované vodě.
7. Na membránu nakapeme substrát a inkubujeme 5 min při pokojové teplotě
8. Detekce signálu v temné komoře
9. Po vyvolání signálu membránu obarvíme v 0,2% roztoku amidoblack - nespecifické barvení proteinů, potvrzení srovnání hladiny celkových proteinů

#### Použité roztoky

##### Transferový pufr:TBS:

48 mM Tris  
39 mM glycín  
20%methanol

##### TBS-Tween:

50 ml 1M Tris-Cl pH=8.0  
57,6 ml 5M NaCl  
doplnit vodou do 2 litrů  
přidat 1,5 ml Tween 20 do 2 litrů TBS

##### Odbarvovací roztok:

500 ml metanolu  
400 ml destilované vody  
100 ml kyseliny octové

##### Tris-glycín elektroforetický pufr (ph=8,3):

25 mM Tris  
250 mM glycine  
0,1% (w/v) SDS

### Barvicí roztok: (barvení proteinů)

2,5 g Coomassie Blue na 1L odbarvovacího roztoku

### Dolní (dělicí) gel – 10% (10ml)    Horní (zaostřovací) gel – 4% (7,5ml)

H <sub>2</sub> O 4,9 ml	H <sub>2</sub> O 5,62 ml
40% Akrylamid 2,4 ml	40% Akrylamid 0,79 ml
1,5M Tris-Cl (pH=8,8) 2,5 ml	1,5M Tris-Cl (pH=6,8) 0,94 ml
10% SDS 0,1 ml	10% SDS 75 ul
Ammonium persulfate 75 ul	Ammonium persulfate 30 ul
TEMED 7,5 ul	TEMED 10 ul

### 2xCSB lyzační pufr

6,9 ml H<sub>2</sub>O

2 ml glycerol

1,2 ml 1M Tris pH=6,8

0,4 ml 0,2% Bromfenolová modř v 1M Tris pH=6,8

2 ml 20% SDS

+ před použitím přidat 100 ul beta-merkapt ethanolu k 900 ul 2x CSB

## **2. Měření hladiny superoxidových radikálů sondou DHE (dihydroethidium) průtokovou cytometrií**

### Úvod:

Oxidativní stres je důležitou charakteristikou nádorové buňky a také jednou z mnoha událostí, která může vyvolat vnitřní cestu aktivace apoptózy. Oxidativní stres je podmíněn přítomností kyslíkových radikálů, které vznikají při mnoha chemických reakcích probíhajících v těle. Radikál je chemické označení pro prvek nebo sloučeninu, která ve své molekule obsahuje jeden nebo více nespárovaných elektronů. Radikály bývají velmi nestabilní a vytrhávají elektrony z jiných sloučenin, tím pak poškozují buňky organismu. Poškození se týká povrchových membrán buněk i vnitrobuněčných struktur včetně buněčných jader.

DHE je fluorescenční sonda, které monitoruje přítomnost superoxidových aniontů. Reakcí DHE se superoxydy vzniká hydroxyethidium. Superoxydy detekujeme jako zelený fluorescenční signál při použití excitační/emisní vlnové délky 488/520 nm.

### Cíl:

Zjistit, zda-li použité chemoterapeutikum indukuje tvorbu superoxidových aniontů sondou DHE u buněk kolorektálního karcinomu

### Postup:

1. Adherentní buňky CT26 převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 24-jamkové destičky (0,5 ml média) v koncentraci  $0,5 \cdot 10^5 / 0,5 \text{ ml}$ .
2. Inkubace buněk 24h/37°C
3. Treatment buněk cisplatinou (5uM; 10uM; 20uM), doxorubicinem (0,1; 0,4ug/mL)
4. Inkubace buněk 24h/37°C
5. Sterilně odsát médium s buněk.
6. Namíchat si roztok média se sondou DHE o výsledné koncentraci 10uM (zásobní koncentrace DHE 50mM)
7. Promýt v 1xPBS
8. Napipetovat opatrně na buňky médium se sondou

9. Inkubace po tmě při 37°C/20 min
10. Odsát médium, dvakrát promýt v 1xPBS
11. Přenos buněk suspendovaných v 0,2 mL 1x PBS do FC zkušavek
12. Měření na průtokovém cytometru FACSVersé

### **3.Měření hladiny kyslíkových radikálů sondou DCF průtokovou cytometrií**

#### Úvod:

H<sub>2</sub>DCF-DA, buněčně permeabilní sonda, je konvertována do DCF-DA intracelulárními eserázami, a její oxidace má za následek vznik vysoce fluorescenční DCF.

DCF (dichlordihydrofluorescein) monitoruje přítomnost kyslíkových radikálů (primárně molekul peroxidu vodíku) (emise/excitace 488/520 nm).

#### Cíl:

Zjistit, zda-li použité chemoterapeutikum indukuje tvorbu kyslíkových radikálů sondou DCF u buněk kolorektálního karcinomu.

#### Postup:

1. Adherentní buňky CT26 převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 24-jamkové destičky (0,5 ml média) v koncentraci 0, 5\*10<sup>5</sup>/0,5ml.
2. Inkubace buněk 24h/37°C
3. Treatment buněk cisplatinou (5uM; 10uM; 20uM), doxorubicinem (0,1; 0,4ug/mL)
4. Inkubace buněk 24h/37°C
5. Sterilně odsát médium s buněk.
6. Namíchat si roztok média se sondou DCF o výsledné koncentraci 20uM (zásobní koncentrace DCF 5mM)
7. Promýt v 1xPBS
8. Napipetovat opatrně na buňky médium se sondou
9. Inkubace po tmě při 37°C/30 min
10. Odsát médium, dvakrát promýt v 1xPBS
11. Přenos buněk suspendovaných v 0,2 mL 1x PBS do FC zkušavek
12. Měření na průtokovém cytometru FACSVersé

### **4.Měření membránového mitochondriálního potenciálu sondou JC1 průtokovou cytometrií**

#### Úvod:

Mitochondrie, energeticky důležité organely, jsou mj také důležitým zdrojem signálů vedoucích k aktivaci vnitřní apoptotické cesty. Změny mitochondriálního membránového potenciálu (MMP) jsou časným znakem apoptózy.

Sondy pro detekci MMP jsou kladně nabitě a akumulují se v elektronegativním prostředí uvnitř mitochondrií. JC-1 je fluorescenční sonda, používaná na detekci apoptotické mitochondriální depolarizace a indikuje přechod ze zeleného (529 nm) do červeného (590 nm) spektra fluorescence.

#### Cíl:

Zjistit, zda-li dochází k mitochondriální depolarizaci u buněk kolorektálního karcinomu vystavených působení sledovaných chemoterapeutik

#### Postup:

6. Adherentní buňky CT26 převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 2ml misky v koncentraci  $0,15 \cdot 10^5$  b/2ml.
7. Kultivace buněk 24hod/37°C
8. Treatment buněk cisplatinou (5uM; 20uM), doxorubicinem (0,1; 0,4 ug/mL)
9. Kultivace buněk 48hod/37°C
10. Odsát médium z misek
11. 1x promýt v 1x PBS
12. Sklizení buněk
13. Stočit a odsát supernatant
14. Suspendovat pelet v médiu s JC-1 sondou (1 mL média = 1 uL sondy)
15. Inkubace po tmě, 37°C, 20 min
16. Stočit, odsát supernatant a buněčný pelet promýt jednou v 1x PBS
17. Suspendovat v 200 uL 1x PBS
18. Měření na průtokovém cytometru FACSVe

### **5. Stanovení subG0 fáze buněčného cyklu průtokovou cytometrií**

#### Úvod:

Ovlivnění nádorových buněk chemoterapeutiky může být doprovázeno změnami v regulaci buněčného cyklu. Tyto změny lze sledovat analýzou obsahu DNA v buňkách po obarvení propidium jodidem pomocí průtokového cytometru FACSVe. Propidium jodid je interkalující barvivo, které se váže k NK a po ozáření světlem o vlnové délce 488 nm emituje záření ( $> 560$  nm). Množství navázaného barviva je úměrné množství DNA v buňce. Z jednoparametrové analýzy fluorescenčního signálu propidium jodidu je možné určit obsah DNA v buňkách a tím i fázi buněčného cyklu, ve které se buňky nacházejí. Při indukci apoptózy můžeme buňky detekovat v subG0 fázi buněčného cyklu.

#### Cíl:

Zjistit, zda-li sledované chemoterapeutikum indukuje vstup buněk do subG0 fáze buněčného cyklu a vyhodnotit změny v distribuci ostatních fází buněčného cyklu

#### Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 5ml misky v koncentraci  $0,5 \cdot 10^6$ /5ml (bude nasazeno předem).
2. Následující den přidat k buňkám chemoterapeutikum cisplatina o koncentraci 20uM a doxorubicin o koncentraci 0,4ug/ml
3. Inkubace 37°C
4. Médium přepipetovat do 15ml zkumavek, sklídit buňky 1 mM EDTA v PBS, centrifugace 500g/5min
5. Buňky promýt 1xPBS
6. Pelet rozsuspendovat v 0,25 ml PBS a přikapat 2 ml vychlazeného 70% etanolu
7. Fixace min. 30 min v 4°C nebo v -20°C
8. Centrifugace 500g/5 min, odsát supernatant
9. Promýt 4 ml 1xPBS
10. Rozsuspendovat ve Vindelově roztoku (obsahuje propidium jodid a RNázu)
11. Barvit 30 min, 37°C, ve tmě
12. Analýza množství DNA průtokovým cytometrem

### **6. Transfekce nádorových buněk lipofekcí a stanovení aktivity luciferázy a aktivity $\beta$ -galaktozidázy z extraktů přechodně transfekovaných buněk transaktivačními testy**

#### Úvod:

Protein p53 jako transkripční faktor je ve funkci nádorového supresoru aktivovaný za různých stresových podmínek. Protein p53 se váže na specifické sekvence a ovlivňuje tak expresi svých cílových genů. Některé z cílových sekvencí, například *p21/waf1*, jsou zodpovědné za stresem indukované zastavení buněčného cyklu v přechodu z fáze G1 do S. Jiné, například *bax* nebo *puma*, indukují apoptózu.

Detekce aktivity p53 je možné pomocí přechodné transfekce metodou lipofekce, s použitím konstruktů pRGC-luc, který obsahuje syntetickou p53 vazebnou sekvenci RGC (ribosomal gene cluster) zařazenou před promotor tk-luc (Kern et al., 1991). Tento konstrukt umožňuje sledovat aktivitu p53 pomocí luciferázové aktivity.

Lipofekce je metoda při níž dochází k vytvoření komplexů záporně nabitě plazmidové DNA s kationickým lipidovým činidlem. Takto vytvořené komplexy jsou schopny pronikat přes lipidovou membránu do eukaryotických buněk.

#### Cíl:

Zjistit, zda sledované chemoterapeutikum aktivuje protein p53.

#### Postup- lipofekce:

1.  $2 \times 10^5$  buněk MDA-MB-231 inokulovat v 2 ml kultivačního média a kultivovat 24 hod při 37 °C/5% CO<sub>2</sub>
2. Do 200 µl média Opti-MEM přidat 2 µg transfekční plazmidové DNA a 2 µL Plus reagentu a lehce promíchat. Inkubovat 5 minut při pokojové teplotě
3. K naředěné DNA přidat 4 µL Lipofectamine™ LTX, lehce promíchat a inkubovat při laboratorní teplotě 30 minut
4. Transfekční směs nakapat na buňky a inkubovat 24 hod při 37°C/5% CO<sub>2</sub>
5. Výměnit médium, ošetřit buňky sledovaným chemoterapeutikem (CDDP 20µM, DOXO 0,4 ug/mL) a inkubovat 24 h při 37°C/5% CO<sub>2</sub>
6. Stanovit aktivitu β-galaktosidázy a aktivitu luciferázy z extraktů přechodně transfekovaných buněk transaktivačními testy

#### Roztoky:

##### Pufr 1 (pro aktivitu β-galaktosidázy):

100 × Mg roztok (0,1 M MgCl <sub>2</sub> /4,5 M β-merkaptóetanol)	4 µl
1 × ONPG (4 mg ONPG v 1 ml směsi fosforečnanů sodných, pH=7,5)	88 µl
0,1 M směs fosforečnanů sodných	268 µl

##### 0,1 M směs fosforečnanů sodných:

0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	41 ml
0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	9 ml
H <sub>2</sub> O	50 ml

##### Pufr 2 (pro aktivitu luciferázy):

25 mM gly-gly	0,5 ml
15 mM K-fosfátu	75 µl
15 mM MgSO <sub>4</sub>	75 µl
4 mM EGTA	50 µl
2 mM ATP	100 µl
1 mM DTT	5 µl
ddH <sub>2</sub> O	4,195 ml

#### Postup-stanovení aktivity β-galaktosidázy a aktivity luciferázy z extraktů přechodně transfekovaných buněk transaktivačními testy:

1. Odsát médium, promýt buňky v 1x PBS, sklídit a centrifugovat 5 min/500g/pokojová teplota.
2. Odsát supernatant, pelet suspendovat v 50 µl roztoku 0,25M Tris.Cl pH 7,5.

3. Lyzovat buňky třemi cykly prudkého zamražení v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a rozmražení. Extrakt zbytečně nevystavovat pokojové teplotě a světlu – ztráta aktivity luciferázy.
4. Centrifugace 5 min/4  $^{\circ}\text{C}$ /max. výkon.
5. Přenést supernatant do nové zkumavky, uchovat na ledu pro test nebo v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro uchování.

#### $\beta$ -galaktozidázová aktivita

6. Přidat 360  $\mu\text{l}$  pufru 1 k 10  $\mu\text{l}$  lyzátu a 30  $\mu\text{l}$  0,25 M Tris pH 7,5.
7. Inkubovat při 37  $^{\circ}\text{C}$  do žlutého zbarvení.
8. (Zastavit reakci přidáním 667  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .)
9. Změřit absorbanci při 420 nm na Elisa readeru (Bio Tek).

#### Aktivita luciferázy

1. 10  $\mu\text{l}$  lyzátu přenést do 90  $\mu\text{l}$  0,25 M Tris pH 7,5 a 360  $\mu\text{l}$  pufru 2.
2. Přenést zkumavky do luminometru, přidat 200  $\mu\text{l}$  roztoku luciferinu (1 mM luciferin s 10 mM DTT ředěný ve vodě v poměru 1:4).
3. Změřit aktivitu luciferázy.
4. Relativní luciferázovou aktivitu spočítat jako aktivita luciferázy/ $\beta$ -gal aktivita v 1  $\mu\text{l}$  lyzátu.

### **7. Monitorování cytotoxického účinku látek v reálném čase - xcelligence**

#### Úvod:

U buněk adherentních (přisedlých) je buněčná smrt doprovázena ztrátou adheze k podkladu. Tento účinek některých cytotoxických látek můžeme sledovat v reálném čase pomocí systému xCELLigence. Principem této metody je kontinuální zaznamenávání signálu, který vytvářejí buňky kontaktem s elektrodami na dně kultivační jamky. Čím více buněk je v kontaktu s elektrodami a čím silněji tyto buňky adherují, tím vyšší signál změříme. Po přidání cytotoxické látky buňky postupně ztrácejí kontakt s podkladem, což pozorujeme jako pokles signálu (buněčného indexu).

#### Cíl:

Sledovat závislost mezi koncentrací buněk a intenzitou signálu (buněčným indexem). Pozorovat změnu signálu po přidání induktoru buněčné smrti ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

#### Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Naředit buňky do výsledné koncentrace  $2 \times 10^5/\text{ml}$ ,  $4 \times 10^5/\text{ml}$  v médiu RPMI.
2. Do jamek destičky (E-plate) pipetovat 100  $\mu\text{l}$  média RPMI, změřit background.
3. Do jamek destičky (E-plate) přidat 50  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze o různé koncentraci. (Výsledný počet buněk na jamku bude 10 000, 20 000). Začátek měření.
4. Následující den přidat k vybraným jamkám induktory bun. smrti o vhodné koncentraci, naředěný v RPMI, v objemu 50  $\mu\text{l}$ . Pokračovat v měření buněčného indexu dalších 24-72 hod.
5. Vyhodnotit změnu buněčného indexu v čase v závislosti na počtu buněk, resp. přítomnosti (koncentraci) cytotoxické látky.