

Téma: **Analýza cytotoxických účinků chemoterapeutických látek na karcinomy**

Úvod:

Základní výzkum v oblasti protinádorové terapie se často zaměřuje na hledání způsobů, jak indukovat terminální diferenciaci, programovanou buněčnou smrt nebo zastavit proliferaci nádorových buněk. Například při hledání nových léčiv je prvním, nejjednodušším a nejlevnějším krokem sledování vlivu studovaných agens na základní fenotypové vlastnosti nádorových buněčných linií, jakými jsou právě míra proliferace, viabilita a morfologie. V tomto cvičení se zaměříme na metody používané ke stanovení viability buněk a typu buněčné smrti.

Chemoterapeutika, která budeme používat:

5'fluorouracil je pyrimidinový analog patřící mezi antimetabolity. Fluorouracil inhibuje thymidylát syntázu a inkorporuje se do RNA místo uracilu. Maximální účinnost látky je pozorována v tkáních s rychlým dělením buněk (kostní dřev, kůže, sliznice).

Cis-platina (CDDP, cis-diamindichlorplatina) je tradičním chemoterapeutikem v léčbě různých typů nádorů. Vazba CDDP na DNA vyvolává vznik vnitřetězcových a meziřetězcových křížových vazeb, které brání replikaci DNA.

Doxorubicin patří mezi antracyklinová antibiotika a je běžně používán jako chemoterapeutikum i jako imunosupresivní činidlo. Intarkaluje se do DNA, inhibuje funkci reverzní transkriptázy a RNA polymerázy.

Úloha č. 1

STANOVENÍ DENZITY BUNĚK BARVENÍM KRYSTALOVOU VIOLETÍ

Působením toxických látek dochází k zástavě buněčného dělení případně k indukci smrti buněk, která je spojena se ztrátou kontaktu s podkladem. Nejjednodušším testem toxicity je barvení krystalovou violetí, kdy dojde k obarvení buněk, které zůstaly přisedlé na podkladu.

1. Nasadit buňky MDA-MB-231 o hustotě (8×10^5 buněk / 2 ml = jamku) na 6-jamkové destičky.
2. Přidat testované látky
3. Inkubace při 37°C/10% CO₂
4. Odsát médium, buňky jemně opláchnout 1xPBS.
5. Jemně napipetovat ledový MeOH tak aby byla pokryta celá plocha misky
6. Fixace 10 min./-20°C
7. Odsát methanol, napipetovat 0,4% roztok krystalové violeti v metanolu, tak aby byla pokryta celá plocha misky
8. Barvit 1 hod. při pokojové teplotě
9. Odsát krystalovou violet' a důkladně odstranit zbytky barvy, vysušit
10. Lyzovat roztokem 10% kyseliny octové, 1h
11. Měřit na spektrofotometru při 570nm

Úloha č. 2

STANOVENÍ VIABILITY PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ

1. Nasadit buňky MDA-MB-231 o hustotě (8×10^5 buněk / 2 ml = jamku) na 6-jamkové destičky.
2. Přidat testované látky
3. Inkubace při 37°C/10% CO₂
4. Odsát médium, buňky jemně opláchnout 1xPBS.

5. Buňky z pokusné misky centrifugovat (400g/5 min)
6. Odsát supernatant, pelet resuspendovat v 0,5 ml 1Xpbs, přidat 1ul roztoku PI (500ug/ml)
7. Analyzovat na cytometru.

Úloha č.3

FIXACE BUNĚK A BARVENÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN PROPIDIUM IODIDEM

Buňky se po inkubaci s daným cytotoxickým agens fixují ve směsi metanolu s kyselinou octovou, čímž se permeabilizuje jejich buněčná membrána a barvivo může proniknout dovnitř buněk. Po přidání propidium iodidu dojde k obarvení nukleových kyselin. Vyhodnocuje se morfologie buněčného jádra, stupeň kondenzace chromatinu, přítomnost fragmentace jádra a apoptotických tělísek. **Tímto testem identifikujeme formu buněčné smrti, konkrétně detekujeme frekvenci apoptotické buněčné smrti.**

Postup:

1. Indukovat buněčnou smrt buněk MDA-MB-231 inkubací s testovanými látkami (v 5 ml miskách, 2×10^6 buněk)
2. Předem připravit směs složenou z metanolu a ledové kyseliny octové v poměru 3:1, směs uchovávat v -20°C a používat vychlazenou.
3. Buňky z pokusné misky centrifugovat (400g/5 min)
4. Odsát supernatant, pelet resuspendovat v 0,5 ml 1xPBS
5. Za současného míchání na vortexu pomalu přikapat 5 ml ledové směsi
6. Inkubovat v -20°C minimálně 30 minut (optimálně přes noc)
7. Centrifugovat při 150g/5 min (fixované buňky jsou křehké, nepoužívat při centrifugaci vyšší otáčky!)
8. Odsát supernatant, pelet resuspendovat ve 100 μl ledové směsi
9. Kápnout jednu kapku na podložní sklíčko a nechat zaschnout
10. Obarvit 10 μl propidium iodidu o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$
11. Přikrýt krycím sklíčkem, vyhodnotit pod fluorescenčním mikroskopem procento jader s apoptotickou morfologií

Úloha č.4

DETEKCE ŠTĚPENÍ PROTEINU PARP POMOCÍ ELEKTROFORÉZY PROTEINŮ A IMMUNOBLOTINGU

V průběhu apoptózy dochází k aktivaci efektorových kaspáz, jejichž substrátem je mimo jiné poly(ADP-ribose) polymeráza (PARP). **V apoptotických buňkách** vzniká specifický fragment proteinu PARP (89 kDa).

Postup:

Příprava vzorků:

Indukovat buněčnou smrt buněk MDA-MB-231 testovanými látkami. Buňky promýt 1xPBS a lyzovat v 2xCSB pufru s přísadkou merkaptoethanolu, 4 minuty povařit a uchovávat při -20°C .

Příprava gelu:

1. S použitím rukavic vyčistit skla, promýt pod tekoucí vodou, umýt detergentem, propláchnout vodou, opláchnout ethanolom 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 polyvinylidifluoridovou (PVDF) membránu stejné velikosti jako je proteinový gel.
2. Polyvinylidifluoridovou (PVDF) membránu dehydratujeme 5min v metanolu.
3. Navlhčíme papíry Whatman a pórezní podložky v transferovém pufru.
4. Plastikovou svorku umístíme do vaničky s transferovým pufrem černou plochou dolů. Na ní položíme pórezní podložku a vytlačíme bubliny.
5. Na podložku umístíme 2 navlhčené filtrační papíry Whatman a opět vytlačíme bubliny.
6. Na papíry Whatman položíme gel a na něj opatrně dehydratovanou PVDF membránu.
7. Na membránu pak opět položíme dva papíry Whatman, vytlačíme bubliny a na ně druhou pórezní podložku. Opět vytlačíme bubliny.
8. Takto sestavený sendvič sevřeme do plastické svorky a umístíme do vaničky s transferovým pufrem a chladítkem.
9. Blotujeme 1,5 hod při 400 mA.

Detekce proteinů na membráně pomocí protilátek:

1. Po skončení blotingu promyjeme PVDF 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-PARP ředěnou 1:2000 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 alkalickou fosfatázou (anti-rabbit IgG ředěná 1:15000 v TBS-Tween) při pokojové teplotě.
5. Promyjeme dvakrát TBS-Tween (5min) a dvakrát TBS (2min).
6. Opláchneme membránu v destilované vodě.
7. Membránu inkubujeme ve vyvolávacím roztoku (10 ml AP pufru, 33 ul NBT, 83 ul BCIP)

Použité roztoky

<u>Transferový pufr:</u>	<u>TBS:</u>	<u>TBS-Tween:</u>
48 mM Tris	50 ml 1M Tris-Cl pH=8.0	přidat 1,5 ml Tween 20 do 2 litrů TBS
39 mM glycín	57,6 ml 5M NaCl	
20% methanol	doplnit vodou do 2 litrů	

<u>Odbarvovací roztok:</u>	<u>Tris-glycín elektroforetický pufr (ph=8,3):</u>
500 ml metanolu	25 mM Tris
400 ml destilované vody	250 mM glycine

100 ml kyseliny octové

0,1% (w/v) SDS

Pufr pro alkalickou fosfatázu:

1ml 1M Tris-CL, pH=9, 200 ul 5M NaCl
50 ul 1M MgCl₂
doplnit destilovanou vodou do 10ml

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 ₂ O 4,9 ml	H ₂ 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 H₂O
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-merkaptoethanolu k 900 ul 2x CSB

Úloha č.5

MĚŘENÍ HLADINY KYSLÍKOVÝCH RADIKÁLŮ SONDOU DHE PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ

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. Superoxidy detekujeme jako zelený fluorescenční signál při použití excitační/emisní vlnové délky 488/520 nm.

1. Adherentní buňky T47D převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 6-jamkové destičky v koncentraci $0,15 \cdot 10^5 / 2\text{ml}$.
2. Inkubace buněk 24h/37°C
3. Vystavení buněk cisplatině, doxorubicinu
4. Inkubace buněk 24h/37°C
5. Sterilně odsát médium od buněk.
6. Namíchat si roztok média se sondou DHE o výsledné koncentraci 10uM (zásobní koncentrace DHE 50mM)
7. Dvakrát promýt v 1xPBS

8. Napipetovat opatrně na buňky médium se sondou
9. Inkubace v temnu při 37°C/20 min
10. Odsát médium, dvakrát promýt v 1xPBS
11. Přenos buněk suspendovaných v 0,5 mL 1x PBS do FC zkumavek
12. Měření na průtokovém cytometru FACSVe

Úloha č.6

STANOVENÍ ZMĚN V DISTRIBUCI BUNĚK V BUNĚČNÉM CYKLU

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 DNA 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 nacházejí. Při indukci apoptózy můžeme buňky detekovat v subG0 fázi buněčného cyklu.

Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 5ml misky v koncentraci $1 \cdot 10^5$ /ml.
2. Následující den přidat k buňkám chemoterapeutikum
3. Po 48 hod působení, odsát médium, sklídit buňky 1 mM EDTA v PBS, centrifugace 500g/5min
4. Buňky promýt 1xPBS
5. Pelet rozsuspendovat v 0,5 ml PBS a přikapat 4 ml vychlazeného 70% etanolu
6. Fixace min. 30 min v 4°C
7. Centrifugace 500g/5 min, odsát supernatant
8. Promýt 4 ml 1xPBS
9. Rozsuspendovat ve Vindelově roztoku (obsahuje propidium jodid a RNázu)
10. Barvit 30 min, 37°C, v temnu
11. Analýza množství DNA průtokovým cytometrem

Úloha č.7

ANALÝZA INTEGRITY DNA *in vitro*

Pufr:

0,1 M roztok fosforečnanů draselných, pH 7,4: 80,2 μ l 1 M K_2HPO_4
19,8 μ l 1 M KH_2PO_4
900 μ l H_2O

Pracovní postup:

1. Připravit roztok fosforečnanů draselných a rozdělit do testovacích mikrozkuvek po 100 μ l.
2. Do každé mikrozkuvky přidat 1 μ g plazmidu puC18.

3. Do mikroskopavek přidat varianty testovaných látek a/nebo induktory oxidativního stresu.
4. Inkubovat 90 minut při laboratorní teplotě.
5. Vhodné množství vzorku nanášet na agarózovou elektroforézu a ověřit integritu plazmidu.

Agarózová elektroforéza

1. Agarózu v roztoku zcela rozvařit v mikrovlnné troubě.
2. Za občasného míchání nechat roztok zchladit na cca 60°C.
3. Do roztoku pipetovat 5 µl etidium bromidu.
4. Roztok nalít do vaničky a zasunout hřebínky. Gel nechat nejméně 30 minut polymerizovat.
5. Vaničku s gelem přesunout do elektroforetické aparatury naplněné 1xTAE pufrem, do jamek nanášet vhodné množství vzorků smíchaných s 1 µl nanášecího pufru.
6. Elektroforézu spustit při konstantním napětí 80 V.
7. Gel přesunout do systému na dokumentaci a vizualizaci gelů (SynGene) a štěpení vzorků odečíst pomocí programu GeneSnap (SynGene) na PC.