Téma: **APOPTÓZA**

Úvod:

Protinádorové výzkumy se často zaměřují 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 studování jejich vlivu na základní fenotypové vlastnosti nádorových buněčných linií, jakými jsou především míra proliferace, viabilita a morfologie.

Použitím některých metod pro sledování cytotoxického účinku protinádorových agens můžeme odlišit typ buněčné smrti (např. morfologie jader po fixaci a barvení propidium jodidem, detekce štěpení proteinu PARP nebo detekce externalizace fosfatidylserinu). Jiné metody odlišit apoptózu od nekrotické buněčné smrti neumožňují (eosin exclusion assay, monitorování cytotoxicity pomocí xCELLigence) a používají se zejména pro stanovení IC50, či LC50, dávky cytotoxické látky, která způsobí 50% inhibici nebo mortalitu.

Materiál:

Buněčná linie: *U937* – lidské, lymfom myeloidního původu; suspenzní
MDA-MB-231 – lidské, prsní karcinomové buňky, adherentní

Induktory buněčné smrti:

camptothecin - ireverzibilně se váže na DNA v komplexu s topoizomerázou I a inhibuje tak opravu DNA po jejím neštěpení topoizomerázou I)

TRAIL (Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand) – indukuje apoptózu přes transmembránové receptory smrti

peroxid vodíku – způsobuje oxidativní stres a tvorbu ROS

Úloha č.1

MTT TEST – TEST CYTOTOXICITY A METABOLICKÉ AKTIVITY

Úvod:

MTT je test metabolické aktivity. Oxidací na mitochondriích metabolicky aktivních buněk vzniká po přidání MTT Regentu nerozpustná tetrazoliová sůl, která se následně extrahuje a měří se absorbance dosaženého zabarvení. Čím déle buňky žijí (a metabolizují) tím více barvy vyrobí; snížení množství detekované tetrazoliové soli v buňkách je tedy přímo úměrné snížení jejich viability. MTT test lze použít jak na stanovení cytotoxicity látek, tak také např. na určení proliferační aktivity buněk.

Cíl:

V buňkách linie U937 může být buněčná smrt indukována např. camptothecinem (CAM). Určete vhodnou koncentraci camptothecinu pro indukci buněčné smrti u buněk MDA-MB-231 při 24-hodinové kultivaci, konkrétně, jakou koncentraci CAM musíme použít, abychom dosáhli hodnoty LC50, tedy 50% mrtvých buněk po 24 hodinách?

Postup:

1. Vyberte koncentrační řadu CAM k otestování (cca 6 koncentrací)
2. Nařeďte buňky U937 v médiu (RPMI 1640) do výsledné koncentrace $8x10^5$/ml

3. Napipetujte buněčnou suspenzi po 50 μl do 96-jamkové destičky, každý vzorek v triplikátu. Nutné kontroly: neovlivněné buňky a čisté médium (blank)
4. Přidejte k buňkám zvolená množství induktoru (CAM)
5. Inkubujte při 37°C/10% CO_2 po dobu 24 hodin
6. Přidejte ke každému vzorku 10 μl MTT Reagentu a inkubujte 2-4 hodiny při 37°C/10% CO_2
7. Buňky pravidelně sledujte, dokud se v nich neobjeví fialový precipitát
8. Poté přidejte 100 μl Detergent Reagentu a destičku inkubujte ve tmě a pokojové teplotě nejméně 2 hodiny (nebo i přes noc). Inkubace při 37°C urychluje solubilizaci.
9. Odejměte víko destičky a změřte absorbanci při 570 nm s referenční vlnovou délkou 650 nm.
10. Stanovte průměrnou hodnotu z triplikátů, odečtěte blank. Vyneste absorbanci na osu Y versus koncentrace CAM na ose X a určete koncentraci, při které se metabolická aktivita buněk snížila oproti kontrole o 50%.

Úloha č. 2

EOSIN EXCLUSION ASSAY – TEST VIABILITY

Úvod:

Viabilitu buněk je možné stanovit optickou mikroskopií po obarvení buněk eosinem. Do mrtvých buněk barvivo prochází narušenou cytoplazmatickou membránou, živé buňky zůstávají nezbarveny. Tímto testem nelze odlišit formu buněčné smrti.

Cíl:

V buňkách linie U937 může být buněčná smrt indukována např. camptothecinem (CAM). Určete vhodnou koncentraci camptothecinu pro indukci buněčné smrti u buněk U937 při 24-hodinové kultivaci, konkrétně, jakou koncentraci CAM musíme použít, abychom dosáhli 50% mrtvých buněk po 24 hodinách?

Postup:

1. Vyberte koncentrační řadu CAM k otestování (cca 6 koncentrací)
2. Nařeďte buňky U937 v médiu (RPMI 1640) do výsledné koncentrace $4x10^5$/ml
3. Napipetujte buněčnou suspenzi po 2 ml do 6-jamkové destičky. Nutná kontrola: neovlivněné buňky. ($8x10^5$buněk / 2 ml = jamku)
4. Přidejte k buňkám zvolená množství induktoru (CAM)
5. Inkubujte při 37°C/10% CO_2 po dobu 24 hodin
6. Ke 20 μl vzorku (buněčné suspenze) přidejte 20 μl eosinu (pracovat v rukavicích), inkubujte 5 min při RT.
7. Spočítejte podíl mrtvých (zbarvených) buněk v jednotlivých vzorcích.
8. Určete koncentraci, při které se viabilita buněk snížila oproti kontrole o 50%.

Úloha č.3

FIXACE BUNĚK A BARVENÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN PROPIDIUM IODIDEM

Úvod :

Buňky se 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 jádra, stupeň kondenzace chromatinu, přítomnost apoptotické fragmentace a apoptotických tělísek.

Cíl:

Přesvědčit se o změně jaderné morfologie myeloidních buněk v průběhu programované buněčné smrti pomocí fluorescenční mikroskopie. Určit typ buněčné smrti indukované v buňkách U937 camptothecinem a peroxidem vodíku.

Postup:

1. Indukovat buněčnou smrt buněk U937 inkubací s camptothecinem, resp. s peroxidem vodíku. (v 5 ml miskách, $2x10^6$ 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 200g/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 μg/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

Úvod :

V průběhu apoptózy dochází k aktivaci efektorových kaspáz, jejichž substrátem je mimo jiné poly(ADP-ribosa) polymeráza (PARP). Specifický fragment proteinu PARP (89 kDa) vznikající štěpením kaspázami lze detekovat westernovým přenosem pouze v apoptotických buňkách.

Cíl:

Potvrdit hypotézu o typu buněčné smrti indukované v buňkách U937 camptothecinem a peroxidem vodíku. Použít vhodné koncentrace CAM a peroxidu vodíku k indukci buněčné smrti a ověřit, zda

v buňkách dochází k apoptotickému štěpení proteinu PARP (kromě neštěpené formy o hmotnosti 116 kDa, lze detekovat také 89 kDa fragment).

Postup:

Příprava vzorků:
Indukovat buněčnou smrt buněk U937 vhodnou koncentrací CAM a H2O2. Buňky promýt 1xPBS a lyzovat v 2xCSB pufru neobsahujícím merkaptoethanol ani bromfenolovou modř, 4 minuty povařit a uchovávat při –20 ^{o}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 ve tmě. 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 vodou, opláchnout ethanolem a utřít.
2. Sestavit skla se spacery 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 polyvinyldifluoridovou (PVDF) membránu stejné velikosti jako je proteinový gel.
2. Polyvinyldifluoridovou (PVDF) membránu dehydratujeme 5min v metanolu.
3. Navlhčíme papíry Whatman a pórézní 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 pórézní podložku. Opět vytlačíme bubliny.
8. Takto sestavený sendvič sevřeme do plastikové svorky a umístíme do vaničky s transferovým pufrem a chladítkem.
9. Blotujeme 1 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 ^{o}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 ^{o}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

Transferový pufr:
48 mM Tris
39 mM glycin
20%methanol

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

TBS-Tween:
přidat 1,5 ml Tween 20 do 2 litrů TBS

Odbarvovací roztok:
500 ml metanolu
400 ml destilované vody
100 ml kyseliny octové

Tris-glycin elektroforetický pufr (ph=8,3):
25 mM Tris
250 mM glycine
0,1% (w/v) SDS

Pufr pro alkalickou fosfatázu:
1ml 1M Tris-CL, pH=9, 200 ul 5M NaCl
50 ul 1M $MgCl_2$
doplnit destilovanou vodou do 10ml

Barvící roztok: (barvení proteinů)
2,5 g Coomassie Blue na 1L odbarvovacího roztoku

Dolní (dělící) gel – 10% (10ml)	Horní (zaostřovací) gel – 4% (7,5ml)
H_2O 4,9 ml	H_2O 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_2O
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

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 pokladem, což pozorujeme jako pokles signálu (buněčného indexu).

Cíl:

Sledovat závislost mezi koncentrací buněk a intenzitou signálu (buněčným indexem). Pozorovat změnu signálu po přidání induktoru apoptózy (TRAIL).

Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Naředit buňky do výsledné koncentrace $4x10^4$/ml, $1x10^5$/ml, $2x10^5$/ml, $4x10^5$/ml v médiu RPMI bez glutaminu.
2. Do jamek destičky (E-plate) pipetovat 100 ul média RPMI bez glutaminu, změřit background.
3. Do jamek destičky (E-plate) přidat 50 ul buněčné suspenze o různé koncentraci. (Výsledný počet buněk na jamku bude 2000, 5000, 10 000, 20 000). Začátek měření.
4. Následující den přidat k vybraným jamkám TRAIL o vhodné koncentraci, naředěný v RPMI bez glutaminu, v objemu 50 ul. Pokračovat v měření buněčného indexu dalších 24-72 hod.
5. Vyhodnotit změnu buněčného indexu v čase v závislosti na počtu buněk, resp. přítomnosti cytotoxické látky.

Úloha č.6

ZNAČENÍ BUNĚK ANNEXINEM-V FITC A PROPIDIUM JODIDEM PRO STANOVENÍ FREKVENCE APOPTÓZY PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ

Úvod :

V průběhu apoptózy dochází ke změnám v plazmatické membráně buňky. Za normálních podmínek je složení vnitřní a vnější lipidové vrstvy plazmatické membrány asymetrické. Cytosolický (vnitřní) list převážně obsahuje fosfolipidy s volnou NH_2- skupinou (fosfatidylethanolamin a zejména negativně nabitý fosfatidylserin), necytosolický (vnější) list obsahuje fosfatidylcholin (a glykolipidy). U buněk procházejících apoptózou se tato asymetrie ztrácí a dochází k externalizaci fosfatidylserinu na buněčný povrch. Externalizovaný fosfatidylserin lze detekovat pomocí fluorescenčně (FITC) značeného annexinu. Nekrotické buňky s permeabilní membránou odlišíme současným barvením propidium jodidem, který do buněk s intaktní plazmatickou membránou neproniká.

Cíl:

Ověřit typ buněčné smrti po indukci buněk MDA-MB-231 TRAILem a peroxidem vodíku za použití fluorescenčního značení a flowcytometru.

	živé buňky	apoptóza	sekundární nekróza	nekróza
Annexin-V FITC	-	+	+	-
Propidium jodid	-	-	+	+

Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 trypsinizací převést do suspenze a spočítat.
2. Nasadit buňky do 6ti-jamkové kultivační destičky o hustotě $0{,}8 \times 10^5$ buněk na ml tzn. $1{,}6 \times 10^5$ buněk na jamku. Nechat přisednout.
3. Indukovat buněčnou smrt buněk inkubací s TRAILem, resp. s peroxidem vodíku.
4. Médium z kultivačních misek přenést do 15ml zkumavek.
5. Přisedlé buňky uvolnit pomocí roztoku 1M EDTA v 1 x PBS a suspenzi přidat k médiu.
6. Centrifugovat 5 min/250 g.
7. Připravit 1×Annexin-V pufr (200 µl/vzorek)
8. Odsát supernatant, pelet promýt v 1 ml 1xPBS
9. Centrifugovat 5 min/250 g.
10. Naředit Annexin-V FITC (1 µl zásobního roztoku/vzorek) v 1×Annexin-V pufr
11. Naředit propidium jodid (0,5 µl zásobního roztoku/vzorek) v celkovém objemu 100 µl/vzorek 1xPBS
    (Zásobní roztok propidium jodidu (Sigma), ředěno v H_2O (1 mg/ml))
12. Odsát supernatant, pelet resuspendovat v 200 µl v 1×Annexin-V pufru s Annexin-V FITC
13. Inkubovat 10 minut na ledu bez přístupu světla.
14. Smíchat buněčnou suspenzi se 100 µl připraveného roztoku propidium jodidu v 1xPBS.
15. Intenzitu fluorescence stanovit průtokovou cytometrií