

PROLIFERACE A MIGRACE

Úloha č.1

RŮSTOVÁ KŘIVKA

Úvod:

Účinek mnohých chemoterapeutik je založen na zástavě dělení nádorových buněk (cytostatika). Výzkum v oblasti protinádorové terapie se zaměřuje na hledání látek, které účinně blokují dělení nádorových buněk a nepůsobí na buňky nenádorové. Mechanismus účinku různých cytostatik je různý (inhibice syntézy nukleových kyselin, přímé poškození nukleových kyselin, poškození mikrotubulů, atd.). Růst/proliferaci buněk je možné kvantifikovat stanovením tzv. růstové křivky, to je počtu viabilních buněk v kultuře v závislosti na čase.

Cíl:

Zjistit, zda sledované chemoterapeutikum ovlivňuje proliferaci buněk karcinomu prsu MDA-MB-231.

Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 6-jamkové destičky (objem média v jamce 2 ml) v koncentraci $1 \cdot 10^5$ /ml.
2. Následující den přidat k buňkám do vybraných jamek chemoterapeutikum o cílové koncentraci 5 uM a 20 uM
3. Po dobu následujících tří dní každých 24 hod stanovit počet viabilních buněk na CASY Cell Counter (Roche), stanovit růstovou křivku

Úloha č.2

STANOVENÍ BUNĚČNÉ DENZITY KRYSTALOVOU VIOLETÍ

Úvod:

Pro získání kvantitativní informace o relativní hustotě přisedlých buněk lze využít jednoduché barvení krystalovou violetí. Krystalová violet se váže na DNA. Po solubilizaci lze intenzitu zbarvení buněk na misce kvantifikovat na spektrofotometru (ELISA reader). Jedná se o metodu alternativního stanovení růstu adherentních buněk.

Cíl:

Zjistit, zda sledované chemoterapeutikum ovlivňuje růst/hustotu buněk karcinomu prsu MDA-MB-231.

Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 6-jamkové destičky (objem média v jamce 2 ml) v koncentraci $1 \cdot 10^5$ /ml.
2. Následující den přidat k buňkám do vybraných jamek chemoterapeutikum o cílové koncentraci 5 uM a 20 uM
3. Buňky kultivovat 48 hod s chemoterapeutikem, poté odsát kultivační medium, buňky na misce promýt 1xPBS a zafixovat 1 ml ledového metanolu 20 min při -20°C
4. Přidat 1 ml krystalové violeti, nechat barvit 30 min při pokojové teplotě
5. Odstranit krystalovou violet, důkladně promýt misky vodou, usušit
6. Přidat 10% kyselinu octovou (1-3 ml), inkubovat 1 hod na třepačce při pokojové teplotě
7. Obarvený roztok přenést do mikrotitační destičky (200 ul), podle potřeby vhodně naředit vodou (lineární rozsah absorbance je 0,2 až 1,5)
8. Změřit absorbanci při 570 nm, stanovit relativní buněčnou denzitu

Úloha č.3

ANALÝZA BUNĚČNÉHO CYKLU POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

Úvod:

Zastavení proliferace nádorových buněk indukované mnohými chemoterapeutiky je doprovázeno změnami v regulaci buněčného cyklu. Tyto změny lze sledovat analýzou obsahu DNA v buňkách po obarvení propidium jodidem pomocí průtokového cytometru FACSVerse. 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.

Cíl:

Vyhodnotit změny v distribuci fází buněčného cyklu u buněk MDA-MB-231 po ovlivnění sledovaným chemoterapeutikem.

Postup:

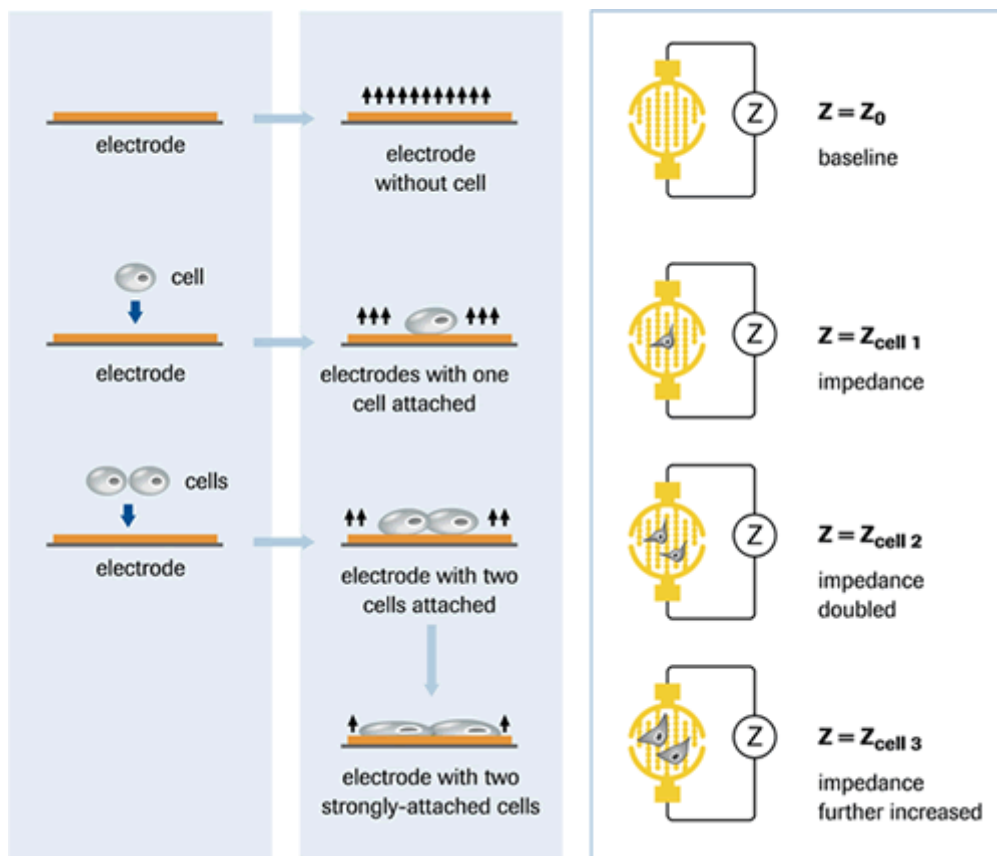
1. Adherentní buňky MDA-MB-231 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 6-jamkové destičky (objem média v jamce 2 ml) v koncentraci $1 \cdot 10^5$ /ml.
2. Následující den přidat k buňkám do vybraných jamek chemoterapeutikum o cílové koncentraci 1 uM a 5 uM
3. Po 48 hod působení, odsát médium, sklidit 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, ve tmě
11. Analýza množství DNA průtokovým cytometrem

Úloha č.4

MONITOROVÁNÍ PROLIFERACE/ADHEZE BUNĚK V REÁLNÉM ČASE - XCELLIGENCE

Úvod:

Růst buněk adherentních (přisedlých) je možné 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 chemoterapeutika se může zastavit buněčné dělení, buněčný index (signál) se na rozdíl od kontrolních proliferujících buněk nezvyšuje. Zástava buněčného cyklu může být doprovázena zvětšováním buněk a silnější adhezí k podkladu, což lze naopak pozorovat jako nárůst buněčného indexu. Pokud buňky působením chemoterapeutika umírají, postupně ztrácejí kontakt s pokladem, což pozorujeme jako pokles signálu. K rozlišení jednotlivých buněčných procesů (zástava buněčného cyklu/proliferace, zvýšená/snížená adheze, umírání) je nutné použít referenční metody.



Cíl:

Monitorovat růst/adherenci buněk v reálném čase v přítomnosti neznámého chemoterapeutika o různé koncentraci. Srovnat získaná data s růstovou křivkou naměřenou v úloze 1.

Postup:

9. Adherentní buňky MDA-MB-231 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Naředit buňky do výsledné koncentrace $1 \times 10^5/\text{ml}$ a $2 \times 10^5/\text{ml}$ v médiu RPMI.
10. Do jamek destičky (E-plate) pipetovat 100 ul růstového média, změřit background.
11. Do jamek destičky (E-plate) přidat 50 ul buněčné suspenze o různé koncentraci. (Výsledný počet buněk na jamku bude 5000 a 10 000.) Začátek měření.
12. Následující den přidat k vybraným jenkám neznámé chemoterapeutikum v cílové koncentraci 1 uM, 5uM a 20 uM, naředěné v RPMI médiu, v objemu 50 ul. Pokračovat v měření buněčného indexu dalších 24-72 hod.
13. Vyhodnotit změnu buněčného indexu v čase v závislosti na přítomnosti chemoterapeutika, příp. počtu buněk.

Úloha č.5

ANALÝZA BUNĚČNÉ SENESCENCE – SA- β -GAL BARVENÍ

Úvod:

Nenádorové somatické buňky (narozdí od nádorových) mají předem daný, omezený počet buněčných dělení, které mohou uskutečnit. Replikativní senescence je přirozený stav buněk, které vyčerpaly svůj proliferační potenciál. Senescentní buňky neproliferují, ale jsou metabolicky aktivní. Replikativní senescence je navozena zkrácením telomer. Nádorové buňky exprimují telomerázu a nevstupují tedy do replikativní senescence. Nádorové buňky však mohou vstoupit do předčasné

senescence, která je navozena jinak než kritickým zkrácením telomer, např. poškozením DNA (účinkem některých chemoterapeutik nebo záření), onkogeny nebo stresem. Indukce předčasné senescence je jednou ze strategií protinádorové terapie.

Senescentní buňky se morfologicky i funkčně liší od buněk proliferujících: jsou větší, mají vysoce granulární cytoplazmu (zvýšené množství lysozomů) a produkují lysozomální β -galaktosidázu, která je aktivní při pH 6 (v proliferujících buňkách je aktivní v pH 4) a bývá označována jako SA- β -gal, tj. „senescence-associated β -galaktosidase“. SA- β -gal lze detekovat histochemickým barvením.

Cíl:

Zjistit, zda sledované chemoterapeutikum indukuje předčasnou senescenci v buňkách karcinomu prsu MCF7 SA- β -gal barvením.

Postup:

1. K buňkám MCF7 (50% konfluence, 2 ml misky) přidat sledované chemoterapeutikum v cílové koncentraci 1 μ M, 5 μ M a 20 μ M (bude nachystáno předem)
2. Připravit si 10 ml barvicího roztoku (viz níže)
3. 72-96 hod po indukcii senescence buňky MCF7 promýt 1 \times PBS a fixovat 2% formaldehyd/0,2% glutaraldehyd (2 ml), 5 min, pokojová teplota
4. Před koncem fixace k barvicímu roztoku přidat X-gal v cílové koncentraci 1 mg/ml (zásobní koncentrace 20 mg/ml v dimetylformamidu)
5. Po fixaci buňky promýt 1 \times PBS, přidat barvicí roztok s X-gal (2 ml na 2 ml misku)
6. Inkubovat přes noc, 37 °C, bez CO₂

Barvicí roztok (10 ml):

2 ml kyselina citrónová/Na₂HPO₄ pH 6

0,3 ml 5 M NaCl

20 μ l 1 M MgCl₂

0,0165 g K₃Fe(CN)₆ (cílová koncentrace 5 mM)

0,0221 g K₄Fe(CN)₆·3H₂O (cílová koncentrace 5 mM)

7,18 ml H₂O

Úloha č.6

DETEKCE KATEPSINU D V SENESCENTNÍCH BUŇKÁCH POMOCÍ ELEKTROFORÉZY PROTEINŮ A IMMUNOBLOTINGU

Úvod:

Katepsin D je lysozomální proteáza identifikovaná jako potenciální biomarker předčasné senescence buněk. Senescence indukovaná některými chemoterapeutiky v buňkách MCF7 je doprovázená zvýšenou hladinou tohoto proteinu.

Research Article

Cathepsin D and Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 as Promising Markers of Cellular Senescence

Hae-Ok Byun,¹ Na-Kyung Han,^{1,4} Hae-June Lee,² Ki-Bum Kim,⁴ Young-Gyu Ko,⁴ Gyesoon Yoon,⁵ Yun-Sil Lee,² Seok-Il Hong,³ and Jae-Seon Lee¹

Cíl:

Zjistit, zda v buňkách MCF7 vystavených působení neznámého chemoterapeutika o různých koncentracích po dobu 4 dnů dochází k předčasné senescenci detekcí hladiny katepsinu D jako markeru senescentních buněk.

Postup:

Příprava vzorků:

Buňky MCF7 ošetřit chemoterapeutikem o koncentraci 1 uM, 5 uM a 20 uM, inkubovat 4 dny (bude nachystáno předem). Buňky promýt 1xPBS a lyzovat v 2xCSB pufru neobsahujícím merkaptoethanol ani bromfenolovou modř, 4 minuty povařit a uchovávat při -20°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 mikrotdestičku 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 min stát. Poté změřit absorbanci na ELISA readeru při 750 nm. Vypočítat vhodné ředění vzorků tak, aby na SDS-PAGE bylo nanášeno 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 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 nitrocelulóзовou 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 nitrocelulóзовou 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:

- 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.
- Inkubujeme membránu s primární protilátkou anti-katepsin D ředěnou 1:1000 v TBS-Tween 1 hod při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C.
- 3x promyjeme v TBS-Tween (cca 5 minut každé promytí).
- Inkubujeme membránu 1 hod se sekundární protilátkou s konjugovanou alkalickou fosfatázou (anti-mouse IgG ředěná 1:15000 v TBS-Tween) při pokojové teplotě.
- Promyjeme dvakrát TBS-Tween a dvakrát TBS.
- Opláchneme membránu v destilované vodě.
- Membránu inkubujeme ve vyvolávacím roztoku (10 ml AP pufru, 33 ul NBT, 83 ul BCIP)

Použité roztoky

Transferový pufr:

48 mM Tris
39 mM glycín
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-glycín 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 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-merkapt ethanolu k 900 ul 2x CSB

Úloha č.7

BUNĚČNÁ MIGRACE

Úvod:

Během progresu nádorů hraje významnou úlohu migrace/invazivita nádorových buněk. Aktivní pohyb a průnik mezibuněčnou hmotou je předpokladem lokální invaze nádoru a

metastatického rozšíření do jiných tkání/orgánů. Prevence buněčné migrace/invazivity nebo její omezení je jedním z cílů terapie nádorových onemocnění.

Migraci buněk lze *in vitro* sledovat s využitím tzv. „Boyden chamber“ systému. Jedná se o dvě komůrky oddělené porézní membránou. Do jedné části se přidá médium s chemoatraktantem (může být např. 10% fetální bovinní sérum), do druhé se nasadí buňky v médiu bez séra. Po několikahodinové inkubaci (doba migrace závisí na buněčném typu) se vyhodnotí počet buněk, které prošly póry membrány do komůrky s chemoatraktantem. Modifikace tohoto postupu umožňují sledovat invazi buněk různými složkami extracelulární matrix.

Cíl:

Zjistit, zda sledované chemoterapeutikum ovlivňuje migraci buněk karcinomu prsu MDA-MB-231.

Postup:

1. Buňky MDA-MB-231 sklídit pomocí 1 mM EDTA v PBS, rozsuspendovat v mediu bez přídavku FBS (fetal bovine serum) v koncentraci 1×10^6 /ml
2. Rozdělit do dvou zkumavek po 400 μ l, k jedné přidat chemoterapeutikum o cílové koncentraci 20 μ M
3. Přidat 50 μ l buněčné suspenze (5×10^4 buněk/jamku) s/bez chemoterapeutika do horní části jamek (nasadit v tetraplikátech, tj. 4 jamky s chemoterapeutikem, 4 bez)
4. Připravit si médium do dolní části jamek: dvakrát 400 μ l média s 10% FCS, do jedné zkumavky přidat chemoterapeutikum (20 μ M), druhou kontrolní nechat bez něj.
5. Pipetovat 150 μ l média s/bez chemoterapeutika do dolní části jamek
6. Inkubovat 16 hod 37 °C, 5% CO₂
7. Odsát médium z horní části jamky, promýt 100 μ l 1 \times PBS
8. Odsát médium z dolní části jamky, promýt 2 \times 200 μ l 1 \times PBS
9. Připravit 1 \times disociační pufr s Calceinem AM v cílové koncentraci 2 μ g/ml, pipetovat 100 μ l do dolní části jamky
10. Inkubovat destičku 30 min, 37 °C, 5% CO₂, poklepat po stranách destičky a inkubovat dalších 30 min, 37 °C, 5% CO₂
11. Odstranit horní část destičky, změřit fluorescenci v dolní části pomocí Synergy HT microplate reader (Bio-tek): excitace 485 nm, emise 520 nm, senzitivita 70