

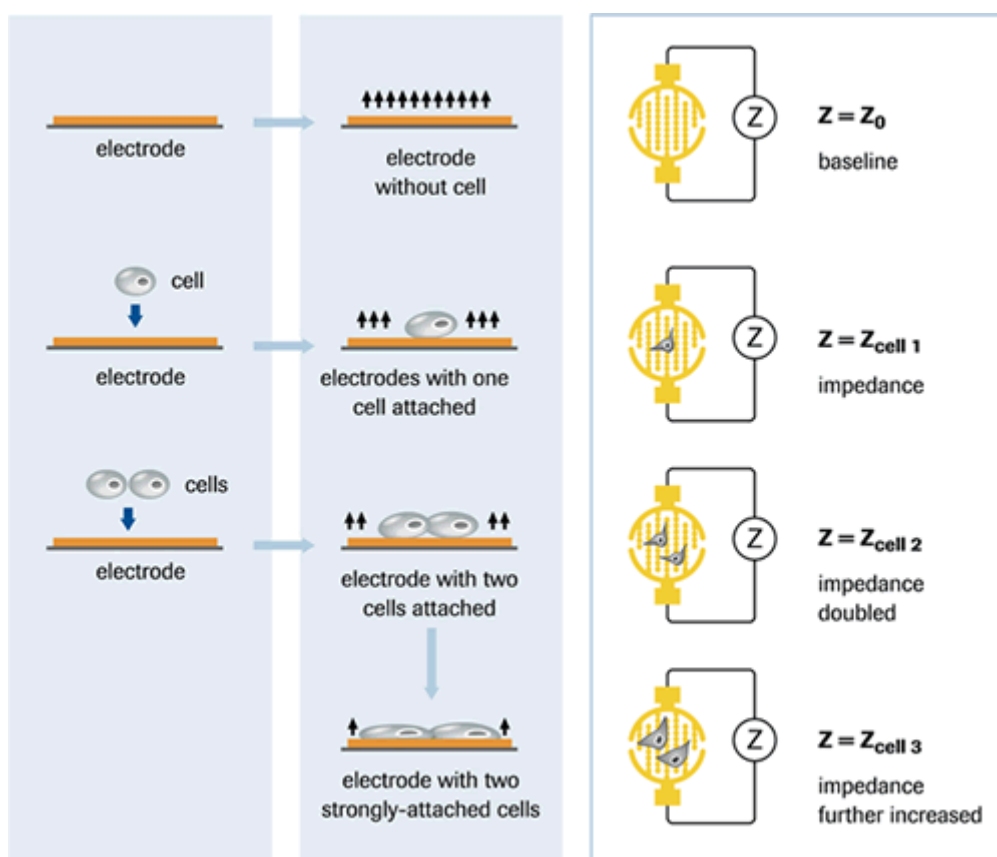
PROLIFERACE A MIGRACE

Úloha č.1

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, nebo čím jsou buňky větší a čím silněji adherují k podkladu, tím vyšší signál změříme. K rozlišení jednotlivých buněčných procesů (rychlost proliferace, zvýšená/snížená adheze, změny morfologie, umírání) je nutné použít referenční metody (viz další úloha).



Cíl:

Monitorovat růst/adhezi buněk linií odvozených z prsních karcinomů MDA-MB-231 a MCF7 v reálném čase. Porovnat tyto linie z hlediska rychlosti růstu buněčného indexu v čase.

Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 a MCF7 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Naředit do výsledné koncentrace $1 \times 10^5/\text{ml}$ a $2 \times 10^5/\text{ml}$ v médiu RPMI.
2. Do jamek destičky (E-plate) pipetovat 100 ul růstového média, změřit background.
3. Do jamek destičky (E-plate) přidat 100 ul buněčné suspenze o různé koncentraci. (Výsledný počet buněk na jamku bude 5000 a 10 000.) Začátek měření.
4. Pokračovat v měření buněčného indexu dalších 24-72 hod.

5. Vyhodnotit změnu buněčného indexu v čase v závislosti na typu buněčné linie, příp. počtu buněk.

Úloha č.2

RŮST BUNĚK NA 2D POVRCHU

Úvod:

Jako referenční metoda k screeningovému měření impedance se pro stanovení rychlosti buněčné proliferace používá tzv. růstová křivka, to je počet viabilních buněk v kultuře v závislosti na čase. Buňky se v časových intervalech 24 hod převádějí do suspenze, spočítají, případně se změří jejich velikost. To umožňuje rozlišit, zda nárůst buněčného indexu při měření impedance odráží zvyšující se počet buněk, nebo jejich rozdílnou velikost.

Cíl:

Porovnat rychlost růstu nádorových linií odvozených z prsního karcinomu (MDA-MB-231, MCF7) v 2D kultivačních podmínkách v normoxii (21% kyslíku) i hypoxii (1% kyslíku). Zjistit průměrnou velikost buněk těchto linií. Srovnat získaná data se změnou buněčného indexu v čase naměřenou v úloze 1.

Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231, MCF7 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Nasadit do 6-jamkové destičky (objem média v jamce 2 ml) v koncentraci $1 \cdot 10^5$ /ml. Kultivovat 37°C, 5% CO₂, 21% O₂ (resp. 1% O₂).
2. Po dobu následujících tří dní každých 24 hod stanovit počet viabilních buněk na CASY Cell Counter (Roche), stanovit růstovou křivku

Úloha č.3

STANOVENÍ DENZITY ADHERENTNÍCH BUNĚK NA 2D POVRCHU 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 na 2D povrchu.

Cíl:

Porovnat relativní buněčnou denzitu nádorových linií odvozených z prsního karcinomu (MDA-MB-231 a MCF7) v 2D kultivačních podmínkách v normoxii (21% kyslíku) i hypoxii (1% kyslíku).

Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231, MCF7 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 6-jamkové destičky (objem média v jamce 2 ml) v koncentraci $1 \cdot 10^5$ /ml. Kultivovat 37°C, 5% CO₂, 21% O₂ (resp. 1% O₂)
2. Buňky kultivovat 48-72 hod, poté odsát kultivační medium, buňky na misce promýt 1xPBS a fixovat/obarvit směsí
0.5 g Crystal Violet (0.05% w/v)
27 ml 37% Formaldehyde (1%)

100 mL 10X PBS (1X)
10 mL Methanol (1%)
863 dH2O to 1L

3. Barvit 30 min při pokojové teplotě
4. Odstranit krystalovou violet, důkladně promýt misky vodou, usušit
5. Přidat lyzační směs 10% kyselinu octovou (1-3 ml), inkubovat 1 hod na třepačce při pokojové teplotě
6. Obarvený roztok přenést do mikrotitační destičky (200 ul), podle potřeby vhodně naředit vodou (lineární rozsah absorbance je 0,2 až 1,5)
7. Změřit absorbanci při 570 nm, stanovit relativní buněčnou denzitu

Úloha č.4

RŮST BUNĚK V 3D PODMÍNKÁCH

Úvod:

Nádorové buňky *in vitro* můžeme kultivovat v 2D nebo 3D podmínkách. Adherentní buňky buď přisedají v povrchu kultivační misky a rostou v jedné vrstvě (2D), nebo se „zalévají“ do speciálních substrátů, které po ztuhnutí ukotvují buňky v nepolarizovaném stavu a ve kterých buňky rostou ve formě kolonií (3D). 2D kultury jsou běžnější, ale 3D kultury lépe simulují situaci *in vivo*, kdy se nádorové buňky obecně vyskytují v trojrozměrném prostředí, obklopeny extracelulární matrix nebo jinými buňkami. 3D kultury se od 2D kultur liší v genové expresi, morfologii, rychlosti buněčného dělení, citlivosti k vnějším stimulům a v dalších vlastnostech. V kulturách 3D nestanovujeme počet buněk v čase, ale určujeme konečný počet kolonií, případně jejich velikost.

Cíl:

Zjistit, jak sledované buněčné linie odvozené z prsních karcinomů (MDA-MB-231 a MCF7) rostou v 3D matrix a určit, zda počet/velikost kolonií jednotlivých linií odpovídá rychlosti proliferace těchto linií v podmínkách 2D.

Postup:

1. Připravit základovou matrix: navážit 0,5 g agaru, smíchat s 50 ml sterilní deionizované vody, rozvařit, nechat zchladnout na 40°C. Smíchat 1:1 s 2x kultivačním médiem obsahujícím 20% FCS (fetální bovinní sérum), ihned pipetovat 1 ml do jamky 6-well kultivační destičky, nechat ztuhnout při pokojové teplotě.
2. Připravit horní matrix: navážit 0,35 g agarózy, smíchat s 50 ml sterilní deionizované vody, rozvařit, nechat zchladnout na 40°C.
3. Adherentní buňky linií MDA-MB-231, MCF7 trypsinizací převést do suspenze, centrifugovat 1200 ot 5 min, spočítat. Naředit do kultivačního média na hustotu $1 \cdot 10^5$ buněk/ml.
4. Odebrat z buněčné suspenze 100 ul ($1 \cdot 10^4$ buněk) do 15 ml zkumavky, přidat 2 ml kultivačního média s 20% FCS a 2 ml roztoku agarózy o teplotě 40°C, zamíchat a ihned pipetovat 1 ml na vrstvu základového agaru.
5. Nechat ztuhnout horní matrix s buňkami v 37°C, potom přidat 500 ul kultivačního média.
6. Kultivace požadovanou dobu, následně obarvit kolonie 0,005% krystalovou violetí 1 hod, spočítat kolonie

Úloha č.5

BUNĚČNÁ MIGRACE - „WOUND HEALING“ = „SCRATCH“ ASSAY

Úvod:

Způsobem testování buněčné motility *in vitro* je tzv. „wound-healing“ nebo také „scratch“ assay. V tomto případě se buňky pohybují směrem k bezbuněčné zóně, která je vytvořena ve vrstvě adherentních buněk seškrábnutím („scratch“). Hodnotí se rychlost zaplnění rýhy, nebo také zacelování zranění („wound-healing“). Pro sledování migrace se k buňkám může pro vyloučení účinků proliferace přidávat mitomycin C

Cíl:

Porovnat motilitu buněk MDA-MB-231 a MCF7 scratch testem.

Postup:

1. Buňky MDA-MB-231 a MCF7 nasadit na 5 ml misky, kultivovat dostatečnou dobu pro dosažení 100% konfluence
2. Špičkou seškrábnout buňky v několika místech monovrstvy
3. Několikrát propláchnout čerstvým médiem
4. Přidat mitomycin C v cílové koncentraci 3 μ M
5. Během následujících hodin až dnů sledovat zarůstání rýhy, fotit v různých časových intervalech, vyhodnotit „wound-healing“ aktivitu

Úloha č.6

ANALÝZA BUNĚČNÉ SENESCENCE – SA- β -GAL BARVENÍ

Úvod:

Nenádorové somatické buňky (na rozdíl 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 morfoloicky i funkčně liší od buněk proliferujících: jsou větší, mají vysoce granulární cytoplazmu (zvýšené množství lyzozomů) a produkují lyzozomální 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 doxorubicin a/nebo etoposid indukují předčasnou senescenci v buňkách karcinomu prsu MCF7 SA- β -gal barvením.

Postup:

1. K buňkám MCF7 (50% konfluence, 2 ml misky) přidat doxorubicin v cílové koncentraci 75 ng/ml a etoposid v cílové koncentraci 30 μ M (bude nachystáno předem)
2. 72-96 hod po indukci senescence buňky MCF7 promýt 1 \times PBS a fixovat 2% formaldehyd/0,2% glutaraldehyd (2 ml), 5 min, pokojová teplota
3. Připravit si 10 ml barvicího roztoku (viz níže)
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× PBS, přidat barvicí roztok s X-gal (2 ml na 2 ml miskou)
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 µl 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.7

ANALÝZA BUNĚČNÉ SENESCENCE – VIZUALIZACE LYZOZOMŮ

Úvod:

Mezi morfologické a funkční charakteristiky senescentních buněk patří zvýšený počet lysozomů. K vizualizaci lysozomů lze použít různé metody, např. fluorescenční sondy specifické pro organely s kyselým pH. Sondy LysoSensor se akumulují v lysozomech, kde dochází k jejich protonaci, a tím k zvýšení fluorescence.

Cíl:

Srovnat množství lysozomů v senescentních a dělicích se buňkách po obarvení sondou LysoSensor Green.

Postup:

1. Buňky MCF7 nasadit na misky s krycími sklíčky. Po přisednutí buněk a nárůstu do cca 50% konfluence přidat doxorubicin/etoposid v požadované koncentraci (bude nachystáno předem)
2. 72-96 hod po indukci senescence k buňkám MCF7 přidat médium s LysoSensorem Green v cílové koncentraci 1µM (1 ul/ml)
3. Inkubace při 37°C, 30 min
4. Oplach PBS, přenesení sklíčka na podložní sklo, pozorování fluorescenčním mikroskopem

Úloha č.8

ANALÝZA BUNĚČNÉ SENESCENCE - DETEKCE KATEPSINU D V SENESCENTNÍCH BUŇKÁCH POMOCÍ ELEKTROFORÉZY PROTEINŮ A IMMUNOBLOTINGU

Úvod:

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

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 doxorubicinu a/nebo etoposidu po dobu 4 dnů dochází k předčasné senescenci detekcí hladiny katepsinu D jako markeru senescentních buněk.

Postup:

Příprava vzorků:

Buňky MCF7 ošetřit doxorubicinem a etoposidem (výše uvedené koncentrace), 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 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 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 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 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-katepsin D 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 alkalickou fosfatázou (anti-mouse IgG ředěná 1:15000 v TBS-Tween) při pokojové teplotě.
5. Promyjeme dvakrát TBS-Tween a dvakrát TBS.
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 MgCl₂
doplnit destilovanou vodou do 10ml

Barvicí roztok: (barvení proteinů)

2,5 g Coomassie Blue na 1L odbarvovacího roztoku

Dolní (dělicí) gel – 10% (10ml)

H₂O 4,9 ml
40% Akrylamid 2,4 ml
1,5M Tris-Cl (pH=8,8) 2,5 ml
10% SDS 0,1 ml
Ammonium persulfate 75 ul
TEMED 7,5 ul

Horní (zaostřovací) gel – 4% (7,5ml)

H₂O 5,62 ml
40% Akrylamid 0,79 ml
1,5M Tris-Cl (pH=6,8) 0,94 ml
10% SDS 75 ul
Ammonium persulfate 30 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.9

ANALÝZA BUNĚČNÉ SENESCENCE - BUNĚČNÝ CYKLUS

Úvod:

U senescentních buněk nedochází k progresi buněčného cyklu. I v přítomnosti mitogenních a růstových faktorů jsou zastaveny v buněčném dělení. Zástavu nebo změnu buněčného cyklu 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 v buňkách MCF7, u nichž byla indukována senescence, a v buňkách kontrolních.

Postup:

1. Indukovat senescenci v buňkách MCF7 (viz výše)
2. Po 72-96 hod působení, odsát médium, sklídit buňky 1 mM EDTA v PBS, centrifugace 500g/5min
3. Buňky promýt 1xPBS
4. Pelet rozsuspendovat v 0,5 ml PBS a přikapat 4 ml vychlazeného 70% etanolu
5. Fixace min. 30 min v 4°C
6. Centrifugace 500g/5 min, odsát supernatant
7. Promýt 4 ml 1xPBS
8. Rozsuspendovat ve Vindelově roztoku (obsahuje propidium jodid a RNázu)
9. Barvit 30 min, 37°C, ve tmě
10. Analýza množství DNA průtokovým cytometrem

Úloha č.10

ANALÝZA ZMĚN SPOTŘEBY KYSLÍKU A pH KULTIVAČNÍHO MÉDIA

Úvod:

V průběhu kultivace buněk v in vitro podmínkách dochází k dynamickým změnám obsahu kyslíku a pH kultivačního média. Tyto změny jsou výsledkem probíhajícího metabolismu buněk, aktivované/inhibované mitochondriální respirace a glykolýzy např. export laktátu z buněk vede k poklesu pH kultivačního média, tento jev je posílen inhibicí mitochondriální respirace (rotenon, antimycin A)

Cíl: stanovit změny hladiny kyslíku a pH média buněk MCF-7 kultivovaných po dobu 3 dnů v přítomnosti rotenonu

Postup:

1. 500ul kultivačního média/ jamka OXO, pH plate
2. 1 hod. ekvilibrace 37stupňů Celsia, 5% CO₂
3. 500 ul buněčné suspenze 100 tis. buněk/ml
4. indukce rotenonem
5. stanovit změny pH, obsahu kyslíku v médiu po dobu 3 dnů