

METODY STANOVENÍ CYTOTOXICITY CHEMOTERAPEUTIK KE 3D MODELŮM NÁDOROVÉ TKÁNĚ

Úloha 1

Příprava 3D modelů nádorové tkáně

Úvod:

3D modely nádorových buněk (sféroidy) byly zavedeny jako dokonalejší modely nádoru skutečně se vyskytujícího *in vivo*. Oproti 2D modelům se v rámci sféroidu přirozeně vytváří gradient kyslíku, živin a pH, ale i mezibuněčné kontakty a kontakty buněk s mimobuněčnou matrix. Všechny tyto veličiny mohou významně ovlivňovat efektivitu léčby. Z tohoto důvodu jsou sféroidy využívány pro testy účinnosti chemoterapeutik, analýzu změn exprese a aktivace klíčových signálních drah v nádorové buňce.

Bylo zavedeno několik metod pro efektivní přípravu sféroidů o reprodukovatelné velikosti a tvaru. Sféroidy je možné kultivovat v gelu (kolagen, Matrigel, agaróza) nebo v tekutém kultivačním médiu za využití speciálního plastiku s neadherentním povrchem. V této úloze bude pro tvorbu sféroidů využito plastiku, jehož dno bude ošetřeno vrstvou 1% agaru. Sféroidy budou připravovány v kapalném médiu s gradientem FBS po dobu pěti dní na orbitální třepačce.

Cíl práce:

Připravit 3D modely kolorektálního karcinomu z buněčné linie HCT-116 a v průběhu následujících tří dnů sledovat tvorbu agregátů a narůstající průměr sféroidu.

Postup:

1. Dno 12well plate ošetřit vrstvou 1% agaru v 1 x PBS.
2. K buňkám HCT-116 na 10 ml misce přidat trypsin (4 ml/miska), umístit na 5 min do 37 °C/5% CO₂, buňky v trypsinu přenést do 4 ml média s 10% FBS (inaktivace trypsinu), centrifugace 4 min/290g.
3. Buněčný pelet rozsuspendovat v 10 ml média DMEM + glutamin (1%), stanovit počet buněk/ml na přístroji CASYton.
4. Připravit 15 ml buněčné suspenze HCT-116 (5x10⁴ buněk/ml) v médiu DMEM + glutamin (1%).
5. Suspenzi rozpipetovat po 1 ml do jamek 12well plate, umístit do termoboxu na orbitální třepačku (75 rpm).
6. Po 4 hod přidat 1% FBS.
7. Po 24 hod přidat 10% FBS.

Úloha 2

Stanovení metabolické aktivity sféroidů v závislosti na indukci chemoterapeutikem

Úvod:

Sféroidy jsou modelem pro testy cytotoxicity chemoterapeutik, a to jak ve stádiu výzkumu, tak ve stádiu klinickém. Cytotoxické působení na buňky tvořící sféroid je možné stanovit několika metodami. Test MTT je založen na principu redukce žluté tetrazoliové soli (MTT) na fialový formazan. Redukce probíhá jen v metabolicky aktivních buňkách (NAD(P)H oxidoreduktázy). V případě 3D útvarů spolehlivost MTT testu limituje průnik MTT do vnitřních částí 3D útvaru. Proto budou sféroidy před samotným MTT testem disociovány trypsinem na jednobuněčnou suspenzi.

Cíl práce:

Stanovit metabolickou aktivitu buněk sféroidu indukovaných perifosinem (20 μ M), NaHCO_3 (80 mM) a jejich kombinací metodou MTT. Graficky znázornit změny aktivity buněk tvořících sféroid pomocí změn absorbance (570 nm).

Postup:

1. Sféroidy indukovat perifosinem (20 μ M), NaHCO_3 (80 mM) a jejich kombinací po dobu 48 hod.
2. Sféroidy promýt v 1xPBS, přidat 200 μ l trypsinu (5 min, 37 $^\circ$ C), rozsuspendovat, přidat 200 μ l kultivačního média s 10% FBS (inaktivace trypsinu), centrifugace 290g/4 min.
3. Buněčný pelet rozsuspendovat v 200 μ l 10% MTT v DMEM médiu (180 μ l kultivačního média s 20 μ l zásobního roztoku MTT (5 mg/ml)), kultivace 37 $^\circ$ C, 1 hod.
4. Centrifugace 290g/4 min.
5. Odsát směs kultivačního média a MTT, pelet lyzovat v DMSO (200 μ l).
6. Stanovit absorbanci při 570 nm.

Úloha 3

Stanovení viability sféroidů v závislosti na indukci chemoterapeutikem

Úvod:

Další metodou, která hodnotí vliv cytotoxického působení látek na sféroidy, je určení viability sféroidů pomocí fluorescenčního barviva Sytox Green. Toto barvivo živé buňky nepropouštějí, proto je vhodným indikátorem mrtvých buněk v populaci. Zastoupení živých a mrtvých buněk po působení chemoterapeutik bude hodnoceno s využitím průtokové cytometrie. Průtokový cytometr analyzuje pomocí dopadu a odrazu světla a přítomnosti fluorescence každou buňku jednotlivě. Sféroidy tedy budou před samotnou analýzou rozsuspendovány trypsinem.

Cíl práce:

Stanovit viabilitu buněk sféroidu indukovaných perifosinem (20 μ M), NaHCO_3 (80 mM) a jejich kombinací s využitím fluorescenčního barviva Sytox Green a následné detekce průtokovým cytometrem. Graficky znázornit změny v procentuálním zastoupení mrtvých a živých buněk ve sféroidu v závislosti na použitých látkách.

Postup:

1. Sféroidy indukovat perifosinem (20 μ M), NaHCO_3 (80 mM) a jejich kombinací po dobu 48 hod.
2. Sféroidy promýt v 1xPBS, přidat 200 μ l trypsinu (5 min, 37 $^\circ$ C), rozsuspendovat, přidat 200 μ l kultivačního média s 10% FBS (inaktivace trypsinu), centrifugace 400g/5 min.
3. Odsát médium s trypsinem, pelet rozsuspendovat v 50nM Sytox Green v 1x PBS.
4. Inkubovat ve tmě 10 min, RT.
5. Přemístit na led, analyzovat na průtokovém cytometru.

Úloha 4

Imunohistochemická analýza metabolických a apoptotických markerů na modelu sféroidů

Úvod:

Buňky sféroidů mohou reagovat na cytotoxické působení chemoterapeutik indukcí apoptózy, kterou je možné prokázat detekcí např. zvýšené hladiny štěpených kaspáz nebo proteinu PARP. Současně buňky sféroidu reagují na působení chemoterapeutik změnou hladiny, aktivity nebo prostorové distribuce proliferačních markerů (např. Ki67). V našem cvičení budeme apoptózu a metabolické změny sféroidů detekovat imunohistochemickou analýzou distribuce štěpené kaspázy 8 a Ki67. V důsledku výskytu hypoxie, acidózy a deplece živin v centrální oblasti sféroidů je středová oblast řezu sféroidu přirozeně pozitivní na apoptotické buňky a negativní na proliferující buňky. V důsledku působení chemoterapeutik se však jejich hladina a/nebo prostorová distribuce může měnit.

Za účelem analýzy prostorové distribuce štěpené kaspázy 8 a Ki67 budou sféroidy krájeny na kryostatů a ekvatoriální řezy umístěny na podložní sklíčko, fixovány a pomocí specifických protilátek bude na konfokálním mikroskopu zviditelněna lokalizace štěpené kaspázy 8 a Ki67.

Cíl práce:

Pomocí specifických protilátek stanovit změny prostorové lokalizace štěpené formy kaspázy 8 a Ki67 ve sféroidech indukovaných perifosinem, NaHCO_3 a jejich kombinací a porovnat je s kontrolními sféroidy. Distribuce uvedených markerů bude hodnocena pomocí LasX.

Postup:

Umístění sféroidu do želatiny

1. Sféroidy indukovat perifosinem (20 μM), NaHCO_3 (80 mM) a jejich kombinací po dobu 48 hod.
2. Promýt sféroid 1xPBS.
3. Rozpustit želatinu (175 mg/ml v 1x PBS), 40 °C.
4. 200 μl želatiny na dno kryomoldu, po ztuhnutí na želatinu umístit sféroid a zalít 200 μl želatiny.
5. Na ledu umístit do -80 °C.

Krájení sféroidů na zmrazovacím mikrotomu (kryostatu)

1. Před krájením ekvilibrovat sféroid a nůž kryotomu na -22 °C.
2. Řez ekvatoriální rovinou sféroidu umístit na podložní sklíčko, vysušit.

Imunohistochemie

1. Označit hranice řezů pomocí DAKO pen.
2. 20 min inkubace 4% PFA v 1x PBS, 4 °C.
3. Promýt 3x v 1xPBS (na ledu).
4. Inkubace v 0,1% Triton X-100 v 1xPBS, 6 min, RT.
5. Promýt 1xPBS (na ledu).
6. Blokace nespecifických vazebných míst 1% BSA v 1xPBS, 30 min, RT.
7. Inkubace s primárními protilátkami – roztok 1% BSA v 1xPBS (ředění 1:200), přes noc, 4 °C.
8. Promýt 3x v 1xPBS (na ledu).
9. Nanést sekundární protilátku – roztok 1% BSA v 1x PBS, 1 - 2 h, RT, ve tmě (ředění 1:600 pro sekundární protilátku), přidat Drug5 (1:2000).
10. Promýt 3x v 1xPBS.
11. Promýt 1x H_2O MiliQ, odstranit přebytek vody ze sklíčka.
12. Přikrytí řezů krycím sklíčkem pomocí montovacího média – uskladnit ve 4 °C, prvních 24 hod v horizontální pozici.

Úloha 5

Analýza vlivu chemoterapeutika na sféroidy detekcí štěpeného proteinu PARP a E-cadherinu v buňkách pomocí elektroforézy a immunoblottingu

Úvod:

Jak jsme ověřili v předešlé úloze, apoptózu je možné detekovat imunohistochemicky pomocí distribuce štěpené kaspázy 8. Obdobným případem stanovení cytotoxicity chemoterapeutika je sledování proteinové hladiny apoptotických markerů (v této úloze štěpený protein PARP) metodou western blottu v celkových buněčných lyzátech.

Chemoterapeutika však v mnoha případech nespouští pouze buněčnou smrt, ale v důsledku jejich působení může docházet k uvolnění nádorových buněk z masy nádoru a jejich migraci. Počáteční fází metastáze buněk je epiteliálně-mesenchymální tranzice (EMT), pro kterou je charakteristická snížená hladina E-cadherinu zodpovědného za buněčnou adhezi.

Cíl práce:

Ověřit vliv chemoterapeutika na indukci apoptózy v buňce detekcí štěpeného proteinu PARP a potenciální vliv na indukci EMT detekcí proteinové hladiny E-cadherinu.

Postup:

Příprava vzorků

1. *Sféroidy indukovat 20 μ M perifosinem, 80mM NaHCO₃ a v kombinaci po dobu 48 hod.*
2. *Sféroidy přenést do mikrozkmavek, přidat 200 μ l trypsinu (5 min, 37 °C), rozsuspendovat.*
3. *Přidat 200 μ l média DMEM, centrifugace 4 min/290g.*
4. *Odsát médium a buněčný pelet rozsuspendovat v 40 μ l 1x PBS.*
5. *Přidat 40 μ l 2x CSB, 5 min povařit.*

Měření koncentrace proteinů (DC Protein Assay Kit)

1. *Na mikrodestičku pipetovat 5 μ l každého vzorku ve dvou opakováních a koncentrační řadu BSA v 2x CSB jako standard.*
2. *Ke vzorkům přidat 25 μ l roztoku A' (obsahuje 20 μ l roztoku S na 1 ml roztoku A). Přidat 200 μ l roztoku B, zbavit vzorky bublin a ponechat 15 min stát.*
3. *Změřit absorbanci na ELISA readeru při 750 nm.*
4. *Vypočítat vhodné ředění vzorků tak, aby na SDS-PAGE bylo naneseno stejné množství proteinů od každého vzorku.*
5. *Ke vzorkům přidat modré 2x CSB s merkaptoethanolem v poměru 1:1.*

Příprava gelu

1. *Sestavit aparaturu pro vertikální elektroforézu.*
2. *Připravit roztok pro dolní gel, jemně promíchat a nalít mezi připravená skla asi do 2/3. Převrstvit gel slabou vrstvou destilované vody. Nechat polymerovat 20 minut.*
3. *Slít horní vrstvu destilované vody, připravit roztok pro horní gel, nalít jej na dolní gel, vsunout hřebínek a nechat polymerizovat 20 minut.*
4. *Gely umístit ve vlhkém ubrousku na noc do lednice.*

Nanášení vzorků a elektroforéza

1. Skla s gelem umístit do aparatury, dolít elektroforetický pufř a opatřně vytáhnout hřebinky.
2. Na gel nanést 4 μ l markeru a 10-20 μ l vzorku (množství závisí na koncentraci proteinů v buněčných lyzátech).
3. Připojit aparaturu ke zdroji. Pro průchod horním gelem aplikovat 80 V, poté zvýšit na 120 V.
4. Elektroforézu zastavit v momentě, když hrana barvičky opouští gel.

Sestavení blotovací aparatury

1. Nastřihat 4 kusy papíru Whatman 3 mm a PVDF membránu stejné velikosti jako je gel.
2. Navlhčit papíry Whatman a pórězní podložky v transferovém pufřu.
3. Plastikovou svorku umístit do vaničky s transferovým pufřem bílou plochou dolů, na ni položit pórězní podložku.
4. Na podložku umístit 2 navlhčené filtrační papíry Whatman.
5. Na papíry Whatman položit opatřně PVDF membránu a na ni gel.
6. Na membránu s gelem pak opěť položit dva navlhčené papíry Whatman, vytlačit bubliny a na ně druhou pórězní podložku. Opěť vytlačit bubliny.
7. Takto sestavený sendvič sevřít do plastikové svorky a umístit do vaničky s transferovým pufřem a chladítkem.
8. Blotovat 1 hod při 400 mA.

Detekce proteinů na membráně pomocí protilátek

1. Po skončení blottingu promýt PVDF membránu v 5% roztoku sušeného mléka v TBS-Tween po dobu 60 minut při RT.
2. Inkubovat membránu s primárními protilátkami proti štěpěnému proteinu PARP a E-cadherinu ředěnými 1:1000 v mléce/TBS-Tween přes noc při 4°C.
3. 3x promýt v TBS-Tween (asi 5 minut každé promytí).
4. Inkubovat membránu 1 hod se sekundární protilátkou s konjugovanou křenovou peroxidázou (anti-mouse, anti-rabbit, ředěná 1:15000 v mléce/TBS-Tween) při RT.
5. Promýt třikrát TBS-Tween a přemístit do TBS.
6. Na membránu nanést vyvolávací roztok a přemístit ji do dokumentovacího zařízení Vílber a detekovat proteiny.

Použité roztoky:

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 µl
TEMED 7,5 µl

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 µl
Ammonium persulfate 30 µl
TEMED 10 µl

2x CSB 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 µl beta-merkптоethanolu k 900 µl 2x CSB

Tris-glycin elektroforetický pufr (pH=8,3)

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

Transferový pufr

48 mM Tris
39 mM glycin
20% methanol
doplnit vodou do 1 litru

TBS

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

Barvicí roztok (barvení proteinů)

2,5 g Coomassie Blue na 1l odbarvovacího roztoku

1x PBS

80 g NaCl
2 g KCl
2 g KH₂PO₄
23,1 g Na₂HPO₄
rozpuštěno v 1 l H₂O