

## 3D MODELY NÁDOROVÉ TKÁNĚ

### Úloha č.1

#### **PŘÍPRAVA MNOHOBUNĚČNÝCH AGREGÁTŮ NÁDOROVÝCH BUNĚK – SFÉROIDŮ**

##### Úvod:

3D kultury nádorových buněk (sféroidy) jsou dokonalejším modelem nádoru vyskytujícího se v *in vivo* podmínkách než běžněji používané 2D monovrstvy. Z tohoto důvodu jsou využívány i pro testy efektivity chemoterapeutik a analýzu změn exprese a aktivace klíčových signálních drah v nádorové buňce. V rámci sféroidu se přirozeně vytváří gradient kyslíku, živin a pH, mezibuněčné kontakty a kontakty buněk s mimobuněčnou matrix. Všechny tyto veličiny mohou významně ovlivňovat efektivitu chemoterapie.

Bylo zavedeno několik metod pro efektivní přípravu sféroidů o reprodukovatelné velikosti a tvaru. Sféroidy je možné kultivovat v gelu (kolagen, Matrigel) 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. Pro rychlejší agregaci budou buňky kultivovány na orbitální třepačce v médiu se sníženou hladinou séra po dobu 24 hod a vzniklé agregáty budou růst po dobu následujících 5 dnů v kultivačním médiu s 10% hladinou séra.

##### Cíl:

Připravit sféroidy z buněčné linie odvozené od kolorektálního karcinomu HCT116. Po dobu 3 dnů sledovat růst agregátů pomocí světelné mikroskopie. Stanovení průměru vznikajících sféroidů v závislosti na čase.

##### Postup:

1. Dno 12ti jamkové destičky ošetřit vrstvou 1% agaru v 1 x PBS.
2. K buňkám HCT116 na 10 ml misce přidat trypsin (2 ml/miska), umístit na 5 min do 37°C/5%CO<sub>2</sub>, buňky v trypsinu přenést do 2 ml média s 10% FBS (inaktivace trypsinu), centrifugace 4 min/290 g.
3. Buněčný pelet promýt EDTA/PBS, centrifugace 4 min/290 g.
4. Buněčný pelet suspendovat v 10 ml média DMEM + Glutamin (2 mM), stanovit počet buněk/ml.
5. Připravit 15 ml buněčné suspenze HCT116 (50 000 buněk/ml) v médiu DMEM + Glutamin (2 mM)
6. Přidat do jamek 12ti jamkové destičky (1ml/jamka), umístit na orbitální třepačku (75 rpm)
7. Po 4 hod. přidat 1% FBS
8. Po 24 hod. přidat 10% FBS

### Úloha č.2

#### **STANOVENÍ VIABILITY SFÉROIDŮ test MTT, ATP assay, viabilní barvení propidium jodid/calcein-AM**

##### Úvod:

Sféroidy jsou modelem pro testy cytotoxicity již klinicky používaných chemoterapeutik, ale i chemoterapeutik ve stadiu klinického výzkumu. V našem cvičení stanovíme toxicitu perifosinu, ABT-737 a jejich kombinace vůči sféroidům vytvořených z buněčné linie HCT116. Perifosin je inhibitor kinázy Akt, ABT-737 potlačuje funkci anti-apoptotických proteinů Bcl-2 a Bcl-xL.

Cytotoxické působení na buňky tvořící sféroid je možné stanovit několika metodami. Jedním z těchto testů viability je 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. Výsledky budou porovnány s výsledky testu MTT získanými na nedisociovaných sféroidech.

Mezi testy viability buněk patří i stanovení hladiny intracelulárního ATP. Po přidání enzymu luciferázy a jejího substrátu luciferinu k buněčnému lyzátu obsahujícího ATP dochází k chemické reakci, jejímž produktem je oxyluciferin a vývoj světelné energie (luminiscence). Intenzita luminiscence je úměrná množství ATP v buněčném lyzátu.

Dalším testem viability je barvení propidium jodid (PI)/calcein-AM. Calcein-AM proniká do buněk, pouze živé buňky jej činností esteráz hydrolyzují na zeleně fluoreskující calcein. Mrtvé buňky jsou barveny PI, který do živých buněk neproniká. Sfěroid značený PI/calcein-AM bude umístěn na podložní sklíčko a poměr calcein-AM/PI bude stanoven metodou konfokální fluorescenční mikroskopie (LSCM) a vyhodnocen pomocí programu LasX.

#### Cíl:

Stanovit viabilitu buněk sféroidu indukovaných perifosinem (20  $\mu$ M), ABT-737 (20  $\mu$ M) a jejich kombinací metodou MTT, testem ATP a viabilním barvením PI/calcein-AM. Graficky znázornit změny viability buněk tvořících sféroid, v případě testu MTT pomocí absorbance (570 nm), v případě testu ATP pomocí množství ATP v buněčném lyzátu (nM), v případě testu PI/calcein-AM jako poměru intenzity fluorescence PI/calcein.

#### Postup:

##### test MTT:

1. Sféroidy buněk HCT116 indukovat perifosinem (20  $\mu$ M), ABT-737 (20  $\mu$ M) a jejich kombinací po dobu 48 hod. Indukovat vždy 2 sféroidy od každého treatmentu.
2. Sféroidy promýt v 1xPBS, přidat trypsin (10 min., 37 °C), 200  $\mu$ l kultivačního média s 10% FBS (inaktivace trypsinu), centrifugace (290g, 4 min.) Do paralelních vzorků trypsin nepřidávat.
3. Buněčný pelet suspendovat v 450  $\mu$ l kultivačního média se 50  $\mu$ l zásobního roztoku MTT (5 mg/ml), kultivace 37 °C, 1 hod.
4. Centrifugace (290g, 4 min.)
5. Odsát směs kultivačního média a MTT, pelet lyzovat v DMSO (200  $\mu$ l)
6. Stanovit absorbanci při 570 nm (v rozmezí 0,2 – 1)

##### test ATP:

1. Sféroidy buněk HCT116 indukovat perifosinem (20  $\mu$ M), ABT-737 (20  $\mu$ M) a jejich kombinací po dobu 48 hod.
2. Připravit si 1x ATP Detection Sample Buffer. Naředit 2x koncentrovaný pufr sterilní vodou a přidat DTT (1  $\mu$ l/ml). Připravit si 1x Detection Assay Buffer. Naředit 5x koncentrovaný pufr sterilní vodou a přidat DTT (17  $\mu$ l/ml).
3. Sféroidy promýt 1xPBS a lyzovat v 1x ATP Detection Sample Buffer. Lýzu buněk urychlit zamražením a následným rozmražením na ledu. Centrifugace (10 000g/5 min/4°C). Supernatant do čisté epinky.
4. Připravit si Reakční směs:  
1 ml 1x Detection Assay Buffer, 5  $\mu$ l D-luciferinu, 10  $\mu$ l luciferázy  
NEVORTEXOVAT
5. Připravit si 96 jamkovou destičku. Na dno jamek pipetovat kalibrační křivku: 5  $\mu$ l standardů o koncentraci 10  $\mu$ M; 1  $\mu$ M; 325 nM; 105,6 nM; 34,3 nM; 11,2 nM; 3,6 nM; 1,2 nM. Do dalších jamek pipetovat 5  $\mu$ l buněčného lyzátu. Stanovit hladinu ATP i v blankovém vzorku (5  $\mu$ l 1x ATP Detection Sample Buffer). Nakonec do všech jamek přidat čerstvě připravenou Reakční směs (50  $\mu$ l/jamka).
6. Inkubovat při pokojové teplotě 15-20 minut.
7. Odečíst luminiscenci, stanovit množství ATP v buněčném lyzátu.

test PI/calcein-AM:

1. Sféroidy buněk HCT116 indukovat perifosinem (20  $\mu$ M), ABT-737 (20  $\mu$ M) a jejich kombinací po dobu 48 hod.
2. Sféroidy indukovat calcein-AM (konečná koncentrace 1  $\mu$ M) a propidium jodid (konečná koncentrace 3  $\mu$ M) po dobu 1 hod.
3. Sféroidy promýt 1xPBS a v kapce 1xPBS umístit na podložní sklíčko. Ihned analyzovat LSCM. (sekvence 1: laser 488 nm, detektor 500-560 nm)  
(sekvence 2: laser 552 nm, detektor 600-700 nm)

**Úloha č.3**

**IMUNOHISTOCHEMICKÁ ANALÝZA APOPTOTICKÝCH A PROLIFERAČNÍCH  
MARKERŮ NA MODELU SFÉROIDŮ**

Úvod:

Ve sféroidech se vytváří přirozený gradient živin, kyslíku a pH. V důsledku tohoto gradientu v okrajových částech sféroidu můžeme detekovat proliferující buňky exprimující protein Ki-67. Naopak v hlouběji položené části sféroidu se nacházejí buňky adaptující se na nedostatek kyslíku indukcí glykolýzy a příjmu glukózy. V centrální části sféroidu pak můžeme detekovat buňky apoptotické nebo nekrotické.

Buňky sféroidů mohou reagovat na cytotoxické působení chemoterapeutik indukcí apoptózy, kterou je možné prokázat detekcí zvýšené hladiny štěpené kaspázy 8, kaspázy 3 nebo proteinu PARP. Tyto oblasti se zvýšenou apoptózou v důsledku působení chemoterapeutik je možné očekávat v okrajových i centrálních oblastech sféroidu.

V našem cvičení budeme proliferaci a apoptózu sféroidů detekovat imunohistochemickou analýzou distribuce Ki-67 a štěpené kaspázy 8.

Sféroidy budou krájeny na kryostatu a ekvatoriální řezy umíštěny na podložní sklíčko, fixovány a pomocí specifických protilátek bude zviditelněna lokalizace Ki-67 a štěpené kaspázy 8.

Cíl:

Pomocí specifických protilátek stanovit prostorovou lokalizace Ki-67 a štěpené formy kaspázy 8 ve sféroidech indukovaných kombinací perifosin/ABT-737 a porovnat ji s kontrolním vzorkem. Distribuce uvedených markerů bude hodnocena pomocí LasX.

Postup:

Umístění sféroidu do želatiny

1. Promýt sféroid 1xPBS
2. Rozpustit želatinu (175 mg/ml 1x PBS) 40°C
3. 200  $\mu$ L želatiny na dno kryomolds, po ztuhnutí na želatinu umístit sféroid a zalít 200  $\mu$ L želatiny
4. Na ledu zanést do -80°C

Krájení sféroidů na zmrazovacím mikrotomu (kryostatu)

1. Před krájením ekvilibrovat sféroid a nůž na - 22°C.
2. Řez ekvatoriální rovinou sféroidu umístit na podložní sklíčko, vysušit
3. Zamrazit na - 20°C (krátkodobé uskladnění).

Imunohistochemie

1. Temperovat řezy na pokojovou teplotu (~30min)
2. Označit hranice řezů pomocí DAKO pen

3. Rehydratace řezů 15 min v 1xPBS/RT
4. 20 min inkubace 4% PFA v 1x PBS, 4°C
5. Promýt 3x v 1xPBS (na ledu)
6. Inkubace v 0,1% Triton X-100 v 1xPBS, 6 min, RT
7. Promýt 1xPBS (na ledu)
8. Blokace nespecifických vazebných míst 1% BSA in 1xPBS, 30 min, RT
9. Inkubace s primárními protilátkami – roztok v 1% BSA v 1xPBS, přes noc, 4°C
10. Promýt 3 x v 1xPBS (na ledu)
11. Nanést sekundární protilátku – roztok v 1% BSA v 1x PBS, 1 - 2 h, RT, ve tmě!!!! (ředění 1:600 pro sekundární protilátku), přidat TO PRO (1:1000)
12. Promýt 3 x v 1xPBS
13. Promýt 1 x H<sub>2</sub>O MiliQ
14. Odstranit přebytek vody ze sklíčka
15. Aplikace montovacího média, přikrytí řezů krycím sklíčkem – uskladnit ve 4° C, prvních 24 hod v horizontální pozici

#### Úloha č.4

### ANALÝZA APOPTÓZY V 3D MODELECH NÁDOROVÉ TKÁNĚ POMOCÍ IMUNOBLOTU

#### Úvod :

Apoptóza buněk je tradičně detekovatelná pomocí zvýšené hladiny štěpených forem kaspáz a proteinu PARP. Ve sféroиду se přirozeně vyskytují apoptotické oblasti vznikající s důsledku nedostatku živin a kyslíku. V důsledku působení chemoterapeutik nicméně můžeme očekávat zvýšení apoptózy i v ostatních oblastech sféroиду.

#### Cíl:

Zjistit, zda ve sféroidech vytvořených z buněčné linie HCT116 vystavených působení perifosinu, ABT-737 a jejich kombinace po dobu 2 dnů dochází k indukci apoptózy, porovnání s kontrolním vzorkem.

#### Postup:

##### Příprava vzorků:

Sféroidy HCT116 ošetřit perifosinem, ABT-737 a jejich kombinací (výše uvedené koncentrace), inkubovat 2 dny. Buňky promýt 1xPBS a lyzovat v 2xCSB pufru neobsahujícím merkptoethanol ani bromfenolovou modř, 4 minuty povařit a uchovávat při -20 oC. 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 minu 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 hřebíčky.
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 nitrocelulózovou membránu stejné velikosti jako je proteinový gel.
2. Navlhčíme papíry Whatman a pórézní podložky v transferovém pufru.
3. Plastikovou svorku umístíme do vaničky s transferovým pufrem černou plochou dolů. Na ní položíme pórézní 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 pórézní podložku. Opět vytlačíme bubliny.
7. Takto sestavený sendvič sevřeme do plastikové 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 specifickou vůči štěpené formě kaspázy 8 ředěnou 1:1000 v TBS-Tween 1 hod při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C. Jako kontrolu množství proteinů použijeme protilátku specifickou vůči alfa-tubulinu (ředění 1:1000).
3. 3x promyjeme v TBS-Tween (cca 5 minut každé promytí).
4. Inkubujeme membránu 1 hod se sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidázou (anti-mouse/anti-rabbit 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 s chemiluminiscenčním substrátem (Pierce ECL, Thermo Scientific) po dobu 5 minut či supersubstrátem (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific) 1 minutu. Chemiluminiscenci detekujeme v temné komoře použitím fotografického papíru.

Použité roztoky

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

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

100 ml kyseliny octové

0,1% (w/v) SDS

Barvicí roztok: (barvení proteinů)

2,5 g Coomassie Blue na 1L odbarvovacího roztoku

doplnit destilovanou vodou do 10ml

Dolní (dělicí) gel – 10% (10ml) Horní (zaostřovací) gel – 4% (7,5ml)

H<sub>2</sub>O 4,9 ml H<sub>2</sub>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 H<sub>2</sub>O

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

Vývojka: 500 ml roztoku G-150 (Agfa)

1500 ml dH<sub>2</sub>O

Ustalovač: 500 ml roztoku G-354 (Agfa)

1500 ml dH<sub>2</sub>O

## Úloha č.5

### **ANALÝZA BUNĚČNÉHO CYKLU V 3D MODELECH NÁDOROVÉ TKÁNĚ**

#### Úvod:

Buňky tvořící sféroid mohou být v důsledku nedostatku živin, kyslíku a změn pH zastaveny v některé z fází buněčného cyklu nebo je u nich indukována apoptóza. U buněčných monovrstev tuto zástavu buněčného cyklu a indukci apoptózy nepředpokládáme. 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. Tento protokol může být modifikován i pro detekci fragmentace DNA (provázející apoptózu) přidáním kroku extrakce nízkomolekulární DNA citrátovým pufrům.

#### Cíl:

Vyhodnotit distribuci fází buněčného cyklu v buňkách HCT116 tvořících sféroid a porovnat je s buňkami tvořícími monovrstvu..

#### Postup:

1. Odsát médium, sklídit buňky v 1x PBS, centrifugace 290g/4min
2. Buňky promýt 1xPBS

3. Pelet rozsuspendovat v 50  $\mu$ l PBS a přikapat 400  $\mu$ l vychlazeného 70% etanolu
4. Fixace min. 30 min v 4°C
5. Centrifugace 500g/5 min, odsát supernatant
6. Promýt 800  $\mu$ l 1xPBS
7. Suspendovat 400  $\mu$ l 1xPBS
8. Přidat 400  $\mu$ l citrátového pufru
9. Inkubace 5 min. při pokojové teplotě
10. Stočit 200 g/5 min
11. Rozsuspendovat ve Vindelově roztoku (obsahuje propidium jodid a RNázu)
12. Barvit 30 min, 37°C, ve tmě
13. Analýza množství DNA průtokovým cytometrem