

Metody detekce apoptózy a poškození DNA indukované cytotoxickými látkami u nádorových buněk

1. Detekce hladiny štěpeného a neštěpeného proteinu PARP (poly (ADP-ribóza) polymeráza) pomocí elektroforézy a westernového přenosu
2. Měření četnosti mrtvých buněk pomocí barvení sytox green a analýzou na průtokovém cytometru
3. Barvení nukleových kyselin propidium iodidem – detekce apoptotických jader.
4. Stanovení subG0 fáze buněčného cyklu průtokovou cytometrií.
5. Detekce fragmentované DNA po působení chemoterapeutik na buňky karcinomu prsu.

1. Detekce hladiny štěpeného a neštěpeného proteinu PARP (poly (ADP-ribóza) polymeráza) pomocí elektroforézy a westernového přenosu

Úvod:

Apoptóza, neboli typ I programované buněčné smrti, slouží k eliminaci nepotřebných či poškozených buněk. Je součástí fyziologických i patologických dějů. Během apoptózy dochází ke kondenzaci chromatinu, fragmentaci DNA a rozpadu buněk na apoptotická tělíska, která jsou následně fagocytována. Apoptóza je charakteristická dvěma signálními drahami – vnitřní - řízená mitochondriemi a vnější - řízená aktivací receptorů smrti. V průběhu apoptózy aktivované efektorové kaspázy (kaspáza 3, 6, a 7) štěpí v buňkách velké množství různých proteinů. Jedním z cílů efektorových kaspáz je i PARP, což je enzym o velikosti 116 kDa, který je během apoptózy štěpen na fragmenty o velikostech 89 a 25 kDa. Tento enzym, který se za normálních okolností podílí na procesu opravy poškozené DNA, lze tedy využít k detekci apoptózy.

Cíl:

Zjistit, zda v buňkách MDA-MB-231 vystavených působení chemoterapeutika dochází ke štěpení proteinu PARP.

Postup a příprava vzorků:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 5mlisky v koncentraci $8 \cdot 10^5$ b/5ml.
2. Inkubace buněk 24hod/37°C
3. Ošetřit chemoterapeutikem
4. Inkubace buněk 72 hod/ 37°C
5. Buňky promýt 1xPBS a lyzovat v 2xCSB pufru neobsahujícím merkptoethanol 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 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. 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 destilovanou 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 PVDF membránu stejné velikosti jako je proteinový gel.
2. PVDF membránu aktivujeme MetOH.
3. Navlhčíme papíry Whatman a pórezní podložky v transferovém pufru.
4. Plastikovou svorku umístíme do vaničky s transferovým pufrům 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 navlhčenou PVDF membránu.
7. Na membránu pak opět položíme dva papíry Whatman, vytlačíme bubliny a na ně druhou pórezní podložku. Opět vytlačíme bubliny.
8. Takto sestavený sendvič sevřeme do plastické svorky a umístíme do vaničky s transferovým pufrům a chladítkem.
9. Blotujeme 1 hod při 400 mA.

Detekce proteinů na membráně pomocí protilátek:

1. Po skončení blotingu promyjeme 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-štěpená kaspáza 3 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 peroxidázou (anti-mouse IgG ředěná 1:15000 v TBS-Tween) při pokojové teplotě.
5. Promyjeme třikrát 5min TBS-Tween a dvakrát 2 min TBS.
6. Opláchneme membránu v destilované vodě.
7. Na membránu nakapeme substrát a inkubujeme 5 min při pokojové teplotě
8. Detekce signálu v temné komoře
9. Po vyvolání signálu membránu obarvíme v 0,2% roztoku amidoblack - nespecifické barvení proteinů, potvrzení srovnání hladiny celkových proteinů

Použité roztoky

Transferový pufr:TBS:

48 mM Tris
39 mM glycin

20%methanol

TBS-Tween:

50 ml 1M Tris-Cl pH=8.0
57,6 ml 5M NaCl

doplnit vodou do 2 litrů

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

Barvicí roztok: (barvení proteinů)

2,5 g Coomassie Blue na 1L odbarvovacího roztoku

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

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

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

2. Měření četnosti mrtvých buněk pomocí barvení sytox green a analýzou na průtokovém cytometru.

Úvod:

Sytox green je barvivo, které se váže na nukleové kyseliny a po ozáření světlem o vlnové délce 488 nm emituje záření (523 nm). Sytox green nedokáže procházet přes buněčné membrány živých buněk, jedním přes porušené membrány mrtvých buněk, je proto vhodným barvivem pro detekci buněčné smrti.

Cíl:

Zjistit, zda-li dochází k indukci buněčné smrti u buněk prsního karcinomu vystavených působení sledovaných chemoterapeutik.

Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 2ml misky v koncentraci $3 \cdot 10^5$ b/2ml.
2. Kultivace buněk 24hod/37°C
3. Treatment buněk chemoterapeutikem
4. Kultivace buněk 48 hod/37°C
5. Sklizení buněk včetně buněk plovoucích v médiu.
6. Stočit a odsát supernatant
7. Suspendovat pelet v 0,2 ml 1x PBS se sytox green (ředění 1: 10 000).
8. Měření na průtokovém cytometru FACSVersé

3. Barvení nukleových kyselin propidium iodidem

Buňky se po inkubaci s daným cytotoxickým agens 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 buněčného jádra, stupeň kondenzace chromatinu, přítomnost fragmentace jádra a apoptotických tělísek. **Tímto testem identifikujeme formu buněčné smrti, konkrétně detekujeme frekvenci apoptotické buněčné smrti.**

Postup:

1. Indukovat buněčnou smrt buněk MDA-MB-231 inkubací s testovanými látkami (na 2 ml miskách, $3 \cdot 10^5$ 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.
7. Centrifugovat při 150g/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 μ l propidium iodidu o koncentraci 10 μ g/ml
11. Přikrýt krycím sklíčkem, vyhodnotit pod fluorescenčním mikroskopem procento jader s apoptotickou morfologií.

4. Stanovení subG0 fáze buněčného cyklu průtokovou cytometrií

Úvod:

Ovlivnění nádorových buněk chemoterapeutiky může být 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 NK a po ozáření světlem o vlnové délce 488 nm emituje záření (> 560 nm). Pro proniknutí do živých buněk je potřeba buňky nejdříve fixovat (nebo do barvicího roztoku přidat slabý detergent). 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 buňky nacházejí. Při indukci apoptózy můžeme buňky detekovat v subG0 fázi buněčného cyklu.

Cíl:

Zjistit, zda-li sledované chemoterapeutikum indukuje vstup buněk do subG0 fáze buněčného cyklu a vyhodnotit změny v distribuci ostatních fází buněčného cyklu

Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 10ml misky v koncentraci $1 \cdot 10^6/10$ ml (bude nasazeno předem).
2. Následující den přidat k buňkám chemoterapeutikum
3. Inkubace 48 hod, 37°C.
4. Médium přepipetovat do 15ml zkumavek, sklidit buňky 1 mM EDTA v PBS, centrifugace 500g/5min
5. Buňky promýt 1xPBS
6. Pelet rozsuspendovat v 0,25 ml PBS a přikapat 2 ml vychlazeného 70% etanolu
7. Fixace min. 30 min v 4°C nebo v -20°C
8. Centrifugace 500g/5 min, odsát supernatant
9. Promýt 4 ml 1xPBS
10. Rozsuspendovat ve Vindelově roztoku (obsahuje propidium jodid a RNázu)
11. Barvit 30 min, 37°C, ve tmě
12. Analýza množství DNA průtokovým cytometrem

5. Detekce fragmentované DNA po působení chemoterapeutik na buňky karcinomu prsu.

Úvod:

Degradace jaderné DNA na nukleosomální jednotky je klíčovým rysem apoptózy. Proces je řízen enzymem CAD (Caspázou Aktivovaná DNAza), jehož aktivita je pod kontrolou inhibitoru ICAD. V průběhu apoptózy dochází k štěpení inhibitoru ICAD aktivovanou kaspázou 3 vedoucí k aktivaci CAD. CAD štěpí DNA na internukleosomálních linkerových místech mezi nukleosomy, které se vyskytují v chromatinu v zhruba 180 bp intervalech. Na agarozovém gelu lze proto detegovat fragmenty velké zhruba 180 pb a jejich násobky (360, 540 atd.).

Cíl:

Zjistit jestli u sledovaných buněk dochází k fragmentaci genomové DNA po působení zvolených chemoterapeutik.

Postup:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 10ml misky v koncentraci $1 \cdot 10^6/10\text{ml}$. (bude nasazeno předem)
2. Následující den přidat k buňkám chemoterapeutikum
3. Inkubace 72 hod, 37°C.
4. Médium přepipetovat do 15ml zkumavek, sklídit buňky trypsinem, centrifugace 400g/4min.
Izolace genomové DNA pomocí GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep kit:
5. Pelet rozsuspendovat v 200 ul pufru Resuspend solution, přidat 20 ul RNÁzy. Inkubace 2 min při pokojové teplotě.
6. Lyze buněk: Přidat 20 ul proteinázy K, následně přidat 200 lyzačního roztoku (Lysis solution C), důkladně vortexovat (cca 15 sek) a inkubovat 10 min při 70°C (dokud nevznikne homogenní směs).
7. Aktivace kolonky: Kolonku s červeným proužkem vsadit do sběrné zkumavky, nanést 500 ul roztoku Column Preparation Solution a centrifugovat 12 000g/1 min. Odstranit roztok.
8. Příprava vzorku před nanesením na kolonku: Po úspěšné lyzi buněk přidat 200 ul 95% EtOH, vortexovat.
9. Celý objem vzorku nanést na aktivovanou kolonku, centrifugovat 6 500g/1 min. Odstranit přeteklou směs.
10. Promytí kolonky: na kolonku nanést 500 ul promývacího roztoku (Wash solution), centrifugovat 6 500g/1 min.
11. Druhé promytí kolonky: znovu přidat 500 ul promývacího roztoku, centrifugovat na maximální otáčky/3 min.
12. Eluce DNA: Kolonku přenést do čisté sběrné zkumavky, nanést 200 ul elučního roztoku (Elution solution), inkubace 5 min při pokojové teplotě, centrifugace 6 500g/1 min. Změřit koncentraci DNA.
Příprava 2% agarózového gelu
13. 2,4 g agarózy rozvařit v 120 ul 1xTAE pufru, po jemném ochlazení přidat 6 ul barvičky nukleových kyselin GelRed. Roztok nalít do sestavené aparatury, nechat utuhnout (cca 20 min).
Nanesení vzorečků na gel:
14. Před nanesením na gel smíchat 50 ul každého vzorku o stejné koncentraci s 8 ul nanášejícího pufru.
15. Do jedné dráhy nanést 4 ul roztoku řebříčku (DNA ladder 2 log, 0,1-10 kb).
16. Elektroforéza 100 V/1 hod.
17. Gel vložíme do UV transluminátoru s kamerou a vyfotíme.