

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, agaróza) nebo v tekutém kultivačním médiu za využití speciálního plastiku s neadherentním povrchem. V této úloze bude pro tvorbu sféroidů využít plastik, jehož dno bude ošetřené 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.

Perifosin je látka cílené terapie. Jedná se o inhibitor kinázy Akt. Deregulace této kinázy je spojena s nádorovou progresí nejen nádoru tlustého střeva, ale i mnoha jiných malignit. Aktivita perifosinu je závislá na pH prostředí, ve kterém se nádorová buňka nachází. V acidickém prostředí je perifosin méně účinný, pro jeho optimální protinádorové působení je tedy vhodné pH kultivačního média zvýšit, např. pomocí NaHCO₃.

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%CO₂, 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 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. 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. Nefluorescenční 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. Sféroid 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 μM), NaHCO_3 (80 mM) 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 μM), NaHCO_3 (80 mM) 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 μl kultivačního média s 10% FBS (inaktivace trypsinu), centrifugace (290g, 4 min.) Do paralelních vzorků trypsin nepřidávat.
3. Buněčný pelet suspendovat v 450 μl kultivačního média se 50 μl 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 μl)
6. Stanovit absorbanci při 570 nm (v rozmezí 0,2 – 1)

test ATP:

1. Sféroidy buněk HCT116 indukovat perifosinem (20 μM), NaHCO_3 (80 mM) 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 $\mu\text{l}/\text{ml}$). Připravit si 1x Detection Assay Buffer. Naředit 5x koncentrovaný pufr sterilní vodou a přidat DTT (17 $\mu\text{l}/\text{ml}$).
3. Sféroidy promýt 1xPBS a lyzovat v 1x ATP Detection Sample Buffer (50 $\mu\text{l}/\text{sféroid}$, zachovat i 50 μl Detection Sample Buffer jako blank). Lyžu buněk urychlit zamražením a následným rozmražením na ledu. Centrifugace (10 000g/5 min/4°C). Supernatant do čisté epinky.
4. Připravit si Reakční směs (50 $\mu\text{l}/\text{vzorek}$):
1 ml 1x Detection Assay Buffer, 5 μl D-luciferinu, 10 μl luciferázy
NEVORTEXOVAT
5. Připravit si 96 jamkovou destičku. Na dno jamek pipetovat kalibrační křivku: 5 μl standardů o koncentraci 10 μM ; 1 μM ; 325 nM; 105,6 nM. Do dalších jamek pipetovat 5 μl buněčného lyzátu. Stanovit hladinu ATP i v blankovém vzorku (5 μl 1x ATP Detection Sample Buffer). Nakonec do všech jamek přidat čerstvě připravenou Reakční směs (50 $\mu\text{l}/\text{jamka}$).
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 μM), NaHCO_3 (80 mM) a jejich kombinací po dobu 48 hod.
2. Sféroidy indukovat calcein-AM (konečná koncentrace 1 μM) a propidium jodid (konečná koncentrace 3 μM) po dobu 1 hod.
3. Sféroidy promýt 1xPBS a v kapce 1xPBS umístit na podložní skličko. 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 sféroиду 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 skličko, 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/ NaHCO_3 a porovnat ji s kontrolním vzorkem. Distribuce uvedených markerů bude hodnocena pomocí LasX.

Postup:

Indukce

1. Sféroidy indukovat kombinací perifosin 20 $\mu\text{M}/\text{NaHCO}_3$ 80 mM po dobu 48 hod., pro porovnání do experimentu zařadit i neindukované kontroly

Umístění sféroidu do želatiny

1. Promýt sféroid 1xPBS
2. Rozpustit želatinu (175 mg/ml 1x PBS) 40°C
3. 200 μL želatiny na dno kryomolds, po ztuhnutí na želatinu umístit sféroid a zalít 200 μl 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 skličko, 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 H₂O 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 sféroidu 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 sféroidu.

Cíl:

Zjistit, zda ve sféroidech vytvořených z buněčné limie HCT116 vystavených působení perifosinu, NaHCO₃ a jejich kombinace po dobu 2 dnů dochází k indukci apoptózy, porovnání s kontrolním vzorkem.

Postup:

Příprava vzorků:

Sféroidy HCT116 ošetřit perifosinem, NaHCO₃ a jejich kombinací (výše uvedené koncentrace), inkubovat 2 dny. Buňky promýt 1xPBS a lyzovat v 2xCSB puftru neobsahujícím merkaptoethanol 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 puftru 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 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 pufrém 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 pufrém a chladítkem.
8. Blotujeme 1 hod při 400 mA.

Detekce proteinů na membráně pomocí protilátek:

1. Po skončení blotingu promyjeme nitrocelulóзовou 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:
48 mM Tris

TBS:
50 ml 1M Tris-Cl pH=8.0

TBS-Tween:
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)
H₂O 4,9 ml H₂O 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

Vývojka: 500 ml roztoku G-150 (Agfa)
1500 ml dH₂O

Ustalovač: 500 ml roztoku G-354 (Agfa)
1500 ml dH₂O

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 pufrem.

Cíl:

Vyhodnotit distribuci fází buněčného cyklu v buňkách HCT116 tvořících sféroid a porovnat je s buňkami tvořícími monovrstvu. Rozlišit apoptotickou frakci buněk ve sféroidu a v monovrstvách pomocí extrakce nízkomolekulární DNA citrátovým pufrem.

Indukce

1. *Sféroidy i buněčné monovrstvy indukovat kombinací perifosin 20 μ M/NaHCO₃ 80 mM po dobu 48 hod., pro porovnání do experimentu zařadit i neindukované kontroly*

Postup:

1. *Médium dát do zkumavky (15 ml), k buňkám přidat trypsin (37°C, 10 min.), buňky v tryptsinu přidat k médiu ve zkumavce, centrifugace 200g/4min*
2. *Buňky promýt 1xPBS*
3. *Pelet rozsuspendovat v 500 μ l PBS a přikapat 4 ml vychlazeného 70% etanolu*
4. *Fixace min. 30 min v 4°C*
5. *Centrifugace 500g/5 min, odsát supernatant*
6. *Promýt 800 μ l 1xPBS*
7. *Suspendovat v 1 ml 1xPBS*
8. *Přidat 0,5 ml 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, RT, ve tmě*
13. *Analýza množství DNA průtokovým cytometrem*