

Využití imunofluorescenčního značení pro sledování vlivu hormonů na lokalizaci androgenových receptorů v nádorových buňkách.

Teoretický úvod

Imunofluorescenční značení

Metoda imunofluorescenčního značení patří mezi nejvýznamnější experimentálně biologické a biomedicínské techniky s širokým spektrem využití v praxi. Podstatou je vazba primární protilátky na antigen našeho zájmu. Následuje vazba sekundární protilátky konjugované s fluorochromem rozpoznávající imunoglobuliny organismu, z něhož pochází primární protilátka. Jinou možností je značení antigenu přímo primární protilátkou značenou fluorochromem. Po excitaci zářením příslušné vlnové délky ve fluorescenčním mikroskopu molekula fluorochromu emituje záření o vyšší vlnové délce (tedy nižší energii) ve viditelné oblasti spektra. Imunofluorescenční značení umožňuje takto vizualizovat například subcelulární lokalizaci vybraných struktur, relativní úroveň exprese proteinů, aktivací stav proteinů (například přes jejich fosforylační status) atd. Perspektiva této moderní metody spočívá v teoretické možnosti vizualizovat jakýkoliv genový produkt na buněčné úrovni.

Teorie vytvoření mikroskopického preparátu

Pro vytvoření mikroskopického preparátu jsou vhodné adherentní buněčné linie rostoucí přisedle na kultivační podložce, kterou může být i krycí sklíčko. Na ně je optimalizován i následující protokol. Buňky suspenzní, rostoucí v celém objemu media, vyžadují speciální přístup. Buňky jsou vysazovány do šestijamkových panelů, do kterých se předtím vloží sterilní krycí sklíčko. Přibližně po 24h inkubaci při 37 °C, 5 % CO₂ a 100% vlhkosti (pro každou linii je počet hodin nutných k adhezi nutné optimalizovat) jsou buňky ovlivněny inhibitory proliferace a kultivovány po požadovanou dobu v inkubátoru. Po promytí je nutné buňky zafixovat, což se provádí buď pomocí organických rozpouštědel nebo aldehydů. Organická rozpouštědla (alkoholy a aceton) odstraňují lipidy, dehydratují buňky a zároveň precipitují proteiny buněčné architektury. Aldehydy (např. paraformaldehyd, formaldehyd/gluteraldehyd) tvoří intra a zejména intermolekulární mosty mezi volnými aminoskupinami a vytváří kovalentní sítě antigenů. Aldehydy konzervují strukturu proteinů lépe než organická rozpouštědla, ale redukují antigenicitu některých složek buňky. Výběr fixativa závisí na detekovaném antigenu. Pro volný přístup protilátky k antigenu je nutná permeabilizace buněk. Fixování pomocí alkoholů a acetonu zároveň narušuje integritu membrán, permeabilizační krok tedy není nutný. Aldehydy však tuto vlastnost nemají, a proto je třeba permeabilizaci provést např. pomocí zředěných roztoků detergentů (0,5% Triton-X/PBS). Před vlastní aplikací protilátek je nutné sklíčko vyblokovat, tzn. zabránit nespecifické vazbě protilátek. Toho je obvykle dosaženo inkubací sklíček s roztokem BSA (hovězí sérový albumin) nebo s fetálním sérem, které BSA také obsahuje. Dále následuje inkubace s primárními, sekundárními protilátkami, popř. dalšími fluorescenčními próbami

(např. DAPI). Při aplikaci protilátek konjugovaných s fluorochromy je nutné inkubaci provádět ve tmě. Na závěr jsou ze sklíček s buňkami vytvořeny mikroskopické preparáty pomocí tzv. montovacích médií (50% glycerol, mowiol). Pozorování se provádí pomocí fluorescenčního mikroskopu pod různými filtry v závislosti na sledovaném fluorochromu.

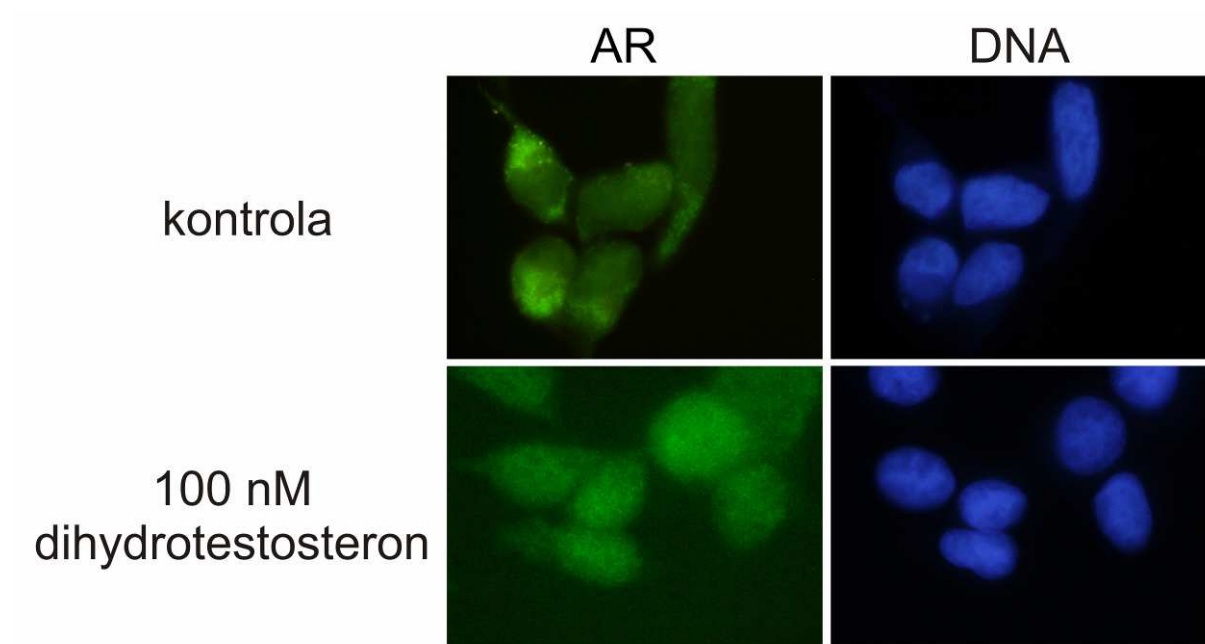
Steroidní receptory

Steroidní receptory se mohou nacházet v plazmatické membráně, cytosolu i jádru cílových buněk. Nejtypičtějším příkladem jsou tzv. nukleární receptory. V závislosti na steroidním hormonu, který vážou, mohou být lokalizovány v cytosolu nebo v jádře. Po vazbě hormonu na cytosolický receptor dochází ke konformačním změnám a receptor i s navázaným hormonem takto vstupuje do jádra, kde spouští transkripci. V případě receptorů nacházejících se v jádře je pro jejich aktivaci nutný průnik steroidního hormonu až do jádra. Příkladem cytosolických receptorů jsou estrogenové či androgenové receptory.

Androgenové receptory

Androgenové receptory jsou aktivovány vazbou androgenních hormonů testosteronem a dihydrotestosteronem, které kontrolují vývoj, diferenciaci a funkci reprodukčních pohlavních tkání jako jsou semenné vajíčky, nadvarlata či prostata. Ale také další tkáně a orgány jako jsou kůže, kosterní svalstvo, kostní dřeň, vlasové folikuly nebo i mozek jsou ovlivňovány těmito hormony. Kromě zmiňovaných androgenů mohou být androgenové receptory aktivovány celou řadou androgenům podobných látek. Aktivace ligandy probíhá v cytoplasmě, kde dochází nejprve k dimerizaci receptoru a následné translokaci do jádra, kde je spuštěna transkripce příslušných genů. Nadměrná aktivace androgenových receptorů je častou příčinou vzniku rakoviny prostaty. Mezi metody léčby patří jednak odstranění sérových androgenů pomocí chirurgické kastrace nebo podáváním tzv. antiandrogenů blokujících funkci androgenových receptorů.

Příklady výsledků:



Obrázek 1: Detekce translokace androgenových receptorů z cytoplasmy do jádra v buňkách karcinomu prostaty LNCP po vazbě dihydrotestosteronu.

Pracovní postup:

Biologický materiál

nádorové buňky karcinomu prostaty LNCaP (kontrolní či ovlivněné dihydrotestosteronem),

Vybavení a pomůcky

šestijamkový panel, pinzeta, podložní sklíčka, destička obalená parafilmem, fluorescenční mikroskop Olympus vybavený digitální kamerou CoolSnap, sada pipet a špiček

Chemikálie, roztoky a protilátky:

aceton

anti-AR-AlexaFluor488

DAPI (10 mg/ml)

DMEM/FS (kultivační médium DMEM s 10 % fetálním sérem)

methanol

mowiol

PBS (fosfátový pufr)

PBS-T (0,1%Tween/PBS)

Vlastní postup:

1. Buňky jsou kultivovány na krycích sklíčkách v šestijamkových panelech v inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂, 100% vlhkost).

Promývání:

2. **2x** 1 ml PBS, 2 min.

Fixace a permeabilizace buněk:

3. Odsaj PBS.
4. Opatrně přidej 1 ml **ledově vychlazené** fixační směsi methanol – aceton (1:1).
5. Inkubuj 10 min v -20 °C.
6. Pinzetou podeber sklíčko a opři ho o stěnu jamky, nechej na vzduchu uschnout.
7. Suchá, zafixovaná sklíčka lze v tomto stavu uchovávat v -20 °C.

Rehydratace:

8. 1 ml PBS, 10 min.

Blokování:

9. 1 ml DMEM/FS, 15 min

Primární protilátka anti-AR-AlexaFluor488

10. Nařed' zásobní roztok protilátky anti-AR-AF488 **10x** do DMEM/FS (na 1 sklíčko počítej 25 µl):

11. Nanes 25 µl roztoku primární protilátky na destičku obalenou parafilmem, přiklop krycí sklíčko s buňkami naspod a ulož vše do krabice s víkem zvlhčené uvnitř destilovanou vodou.
12. Inkubuj 1 hod při laboratorní teplotě ve tmě!!!.

Promývání

13. 1 ml PBS, 2 min
14. 1 ml PBS-T, 2 min
15. 1 ml PBS, 2 min.

DAPI

16. Nařed' **2000x** zásobní roztok DAPI 10 mg/ml do PBS (konečná koncentrace 5 µg/ml).
17. Přidej do každé jamky 1 ml roztoku DAPI.
18. Inkubuj 10 min při laboratorní teplotě ve tmě.

Promývání

19. 1 ml PBS, 2 min
20. 1 ml PBS, 2 min
21. 1 ml **H₂O**, 2 min.

Vytvoření trvalého preparátu

22. Nanes na podložní sklíčko 5 µl mowiolu a přiklop sklíčko buňkami na spodní straně.
23. Preparát lze ihned pozorovat, pro použití imerzního objektivu je však třeba nechat mowiol ztuhnout do druhého dne při 4 °C.

Uchovávání preparátů

24. Sklíčka jsou uchovávána ve tmě při 4 °C.