

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor: 6. Zdravotnictví

**Vliv proteinu Trop-2 na citlivost cervikálních nádorových linií
k chemoterapii**

**Marie Nguyenová
Jihomoravský kraj**

Brno, 2017

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor: 6. Zdravotnictví

The role of Trop-2 in cervical cancer cell line sensitivity to chemotherapy

Autor: Marie Nguyenová

Škola: Gymnázium Brno, tř. Kpt. Jaroše 14

Kraj: Jihomoravský kraj

Vedoucí práce: Mgr. Tereza Nehybová

Brno, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne podpis:

Práce byla vypracována v Laboratoři buněčné diferenciaci - Ústav Experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Mgr. Tereze Nehybové za odborné vedení této práce. Oceňuji její obětavou pomoc, ochotu a profesionální přístup, který mi v průběhu psaní práce věnovala. Za cenné připomínky při psaní práce vděčím svojí profesorce RNDr. Ivě Kubištové, PhD.

Abstrakt

Ve své práci SOČ jsem se zabývala testováním vlivu proteinu Trop-2 na citlivost cervikálních nádorových linií k běžným chemoterapeutikům. Trop-2 je transmembránový glykoprotein kódovaný genem TACSTD2, který zprostředkovává signalizaci vápenatými ionty. Poprvé byl tento protein identifikován u trofoblastických buněk, invazivních buněk blastocysty. Trop-2 hraje významnou roli v tumorigenezi, ovlivňuje buněčnou proliferaci, migraci, sebeobnovu a integritu bazální laminy. Zvýšená exprese Trop-2 byla asociována se špatnou prognózou a zvýšeným metastázováním u několika typů nádorů, jeho role však zůstává kontroverzní. Zatímco u plicních adenokarcinomů a nádorů dlaždicových epitelů byla zjištěna negativní korelace mezi expresí Trop-2 a metastázováním, přesně opačné výsledky byly pozorovány u jiných epiteliálních nádorů jako například prostatických, střevních, ovariálních nebo prsních. Množství studií poukazuje na závislost mezi funkcí proteinu Trop-2 a mikroprostředím nádoru. Toto kontext-dependentní působení může vysvětlovat protichůdné výsledky v jednotlivých studiích. Porozumění mechanismu, jakým Trop-2 ovlivňuje vývoj nádoru, může vyústit k využití tohoto proteinu jako prognostického markeru nebo terapeutického cíle.

Klíčová slova

Protein Trop-2, cervikální karcinom, chemoterapeutika, proliferace

Annotation

In this thesis, we tested the role of Trop-2 protein in the sensitivity of a cervical cancer cell line to several chemotherapeutics. Trop-2 is a transmembrane glycoprotein, coded by TACSTD2 gene. It regulates calcium signalling. Firstly, this protein was identified in trophoblast cells, invasive cells in blastocyst. Trop-2 plays an important role in tumorigenesis, it influences proliferation, migration, self-renewal and basal lamine integrity. Trop-2 overexpression was associated with bad prognosis and upregulated metastasis in several carcinoma types, but its role stays controversial. While in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, a negative correlation between high expression of Trop-2 and metastasis was observed, exactly the opposite was documented in other epithelial cancer types, such as prostatic, colon, ovarian or breast. Number of studies stress that the function of Trop-2 is highly effected by tumor microenvironment. This contex-dependent function may explain contradictory results in different experimental set ups. Understanding the mechanism behind Trop-2 role in tumorigenesis, may result in its use as an prognostic marker on therapeutical target.

Keywords

Protein Trop-2, cervical carcinoma, chemotherapy, proliferation

Obsah

1.	ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	7
1.1	Cervikální karcinom	7
1.1.1	Rizikové faktory	7
1.1.2	Incidence a mortalita pacientek s cervikálním karcinomem	8
1.2	Základní výzkum cervikálních karcinomů	9
1.2.1	Cervikální buněčné linie.....	9
1.3	Trop -2	9
1.3.1	Trop-2 a nádory	10
1.4	Chemoterapeutika používaná v této práci	11
1.4.1	Cisplatina.....	11
1.4.2	Taxol.....	12
1.4.3	5 Fluorouracil	12
2	MATERIÁL A METODY	14
2.1	Kultivace / pasážování buněčných linií	14
2.2	Stabilní transfekce buněk C33A lipofekcí.....	14
2.3	Izolace jednotlivých klonů metodou limitního zředění	16
2.4	Analýza hladiny proteinu Trop-2	16
2.5	Stanovení proliferační aktivity – porovnání růstových křivek	17
2.6	Stanovení viability metodou průtokové cytometrie.....	17
2.7	Barvení buněk krystalovou violetí.....	18
2.8	Stanovení buněčného cyklu průtokovou cytometrií	18
3	VÝSLEDKY	20
3.1.	Příprava derivátů buněk C33A stabilně exprimujících Trop-2	20
3.2.	Detekce úrovně exprese Trop-2 v připravených klonech.....	20
3.3.	Stanovení vhodné koncentrace chemoterapeutických látek pro testování na linii C33A	22
3.4.	Stanovení vhodné koncentrace chemoterapeutických látek pro testování na linii C33A – hodnocení pomocí barvení krystalovou violetí.....	24
3.5.	Analýza vlivu proteinu Trop-2 na mortalitu po vybraných chemoterapeutických látkách	24
3.6.	Analýza vlivu proteinu Trop-2 na mortalitu po vybraných chemoterapeutických látkách – hodnocení pomocí barvení krystalovou violetí.....	25

3.7. Analýza vlivu proteinu Trop-2 na proliferaci buněk C33A	26
3.8. Analýza vlivu proteinu Trop-2 na distribuci buněk v buněčném cyklu	27
4 DISKUZE.....	30
5 ZÁVĚR.....	31
6 POUŽITÁ LITERATURA.....	32

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Nádorové onemocnění zvané cervikální karcinom je druhým nejčastějším nádorovým onemocněním u žen. Situace se výrazně zlepšila po zavedení očkování a plošného screeningu. V posledních letech proběhlo množství studií zabývajících se pozměněným mikroprostředím nádorových buněk za účelem zlepšení prevence a terapie tohoto onemocnění. Jedním z faktorů ovlivňujících pochody nejen v karcinomu děložního čípku, ale obecně v nádorových buňkách, je přítomnost glykoproteinu Trop-2. Jeho role se u různých typů karcinomů různí. Experimenty byly provedeny také s buňkami cervikálního karcinomu se zvýšenou expresí tohoto proteinu. Například při analýze vzorků pacientek s cervikálním karcinomem bylo zjištěno, že se stoupajícím stádiem nemoci přibývá proteinu Trop-2. A další studie ukázala, že potlačení exprese proteinu Trop-2 vede k inhibici proliferace buněk a ke zvýšení počtu buněk podstupujících buněčnou smrt.

Nejčastějším způsobem léčby rakoviny je chemoterapie. Hlavním cílem práce je proto otestovat citlivost buněk se zvýšenou hladinou proteinu působením běžně používaných chemoterapeutik. Vedle vlivu chemoterapie budeme ještě zjišťovat roli Trop-2 v proliferaci cervikální nádorové linie. Práce se bude dále zaměřovat na vliv proteinu na rychlost růstu buněk a na jejich distribuci v buněčném cyklu. Výsledky poslouží k objasnění kontroverzní role tohoto proteinu.

1.1 Cervikální karcinom

Cervikální karcinom, tedy karcinom děložního čípku, je nádorové onemocnění postihující děložní hrdlo a způsobující nekontrolované dělení povrchových buněk děložního čípku. Děložní hrdlo je označení pro nejspodnější část dělohy spojující dělohu s pochvou. Děložní hrdlo je úponem pochvy rozděleno na dvě části, jednou z nich je děložní čípek.

Stěna děložního hrdla je pokrytá sliznicí (*endocervix*), která produkuje hlen. Část čípku vyklenující se do pochvy se nazývá *ectocervix*. Oba typy buněk mohou být rakovinotvorné. Jako transformační zónu označujeme oblast s buňkami nejvíce náchylnými k rakovinnému bujení, jedná se o nejspodnější část děložního čípku, na které probíhá cervikální screening (Parkin et al., 2006).

1.1.1 Rizikové faktory

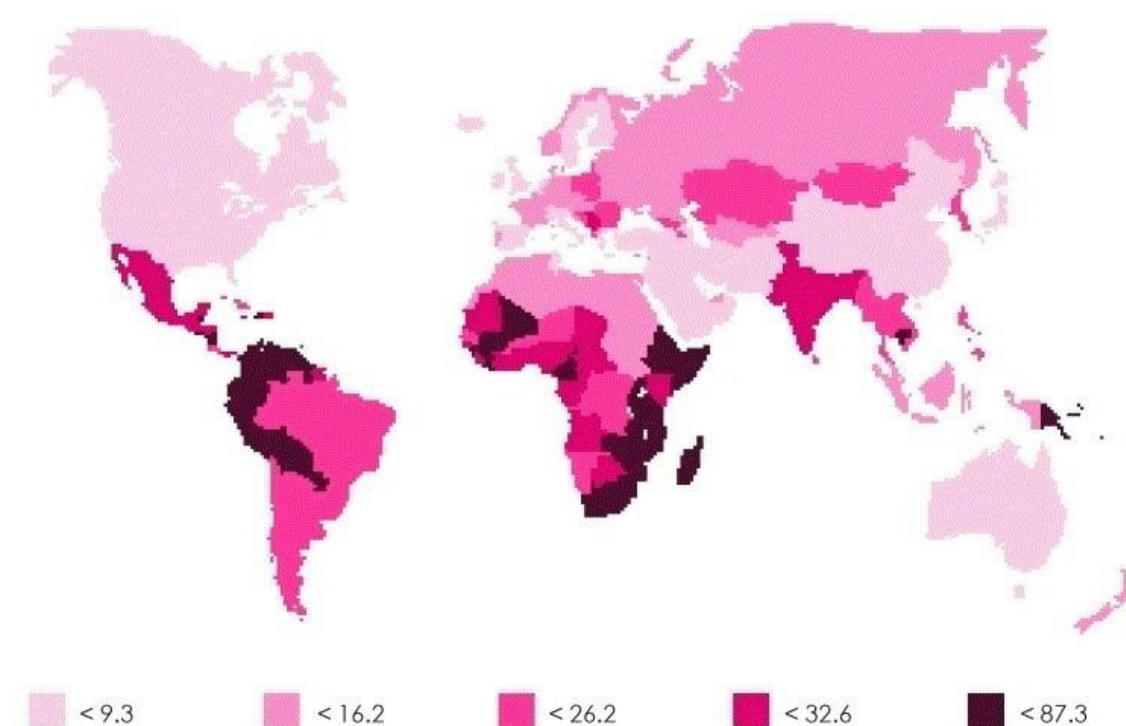
Příčinou vzniku rakoviny jsou onkogenní virové papilomaviry HPV (celkově jich existuje více než 100 typů, pohlavní orgány postihuje cca 40 typů). Virus je přenášen především pohlavním stykem, k infekci jsou nejnáchylnější mladé dívky. Pokud nedojde k eliminaci buněk nakažených HPV imunitním systémem, může se z nich vyvinout prekanceróza a poté zhoubný nádor (Lorintz et al., 2002). Plošný screening se ve vyspělých zemích světa provádí

během pravidelných preventivních prohlídek metodou PAP stěru/testu a výrazně snižuje incidenci i mortalitu (Holcomb et al., 2005).

K dalším rizikovým faktorům patří imunodeficience (HIV infekce, dlouhodobé užívání steroidů, transplantace), užívání hormonální antikoncepce, kouření nebo špatná výživa (Holcomb et al., 2005).

1.1.2 Incidence a mortalita patientek s cervikálním karcinomem

Celosvětově je nádor děložního krčku druhým nejčastějším nádorovým onemocněním u žen (Parkin et al., 2006). Dle statistik se až 80 % dívek a žen v průběhu života nakazí virem HPV. Ročně je v ČR diagnostikováno 1050 až 1100 případů rakoviny děložního čípku, přičemž zhruba 350 – 400 žen umírá. Situace se výrazně zlepšila po zavedení očkování proti rakovině děložního čípku, nejvyššího efektu dosahuje očkování před zahájením sexuálního života (Dušek et al., 2005). V rozvojových zemích tvoří karcinomy děložního hrdla 15 % všech diagnóz u patientek s nádorem na rozdíl od 3,6 % v rozvinutých zemích. V roce 2002 bylo diagnostikováno 493 tisíc nových případů této choroby, 83 % těchto patientek pocházelo z rozvojových zemí. Nejvyšší incidence byla pozorována v subsaharské Africe, Melanésii, Latinské Americe nebo v Karibských zemích (Obr. 1.1.) (Parkin et al., 2006).



Obr. 1.1. Incidence cervikálního karcinomu. Obrázek dokumentuje počet nově diagnostikovaných patientek v roce 2002 na světě. Číselný údaj odpovídá počtu těchto patientek na 100 000 žen (Parkin et al., 2006).

1.2 Základní výzkum cervikálních karcinomů

In vitro metody (mimo tělo, ve zkumavce) nevyužívají např. celá živá zvířata, ale pouze části organismů: některé buňky nebo tkáně. Z etického hlediska jsou tyto metody přijatelnější než práce s experimentálními zvířaty. Dále jsou časově méně náročné, pokud je pro testování potřeba více buněk, dají se snadno namnožit. Výhodou práce s tkáňovými liniemi je i možnost uchovávání/zamražení, což u celých organismů možné není. Metody *in vivo* vyžadují testování na zvířatech a jsou velice nákladné a v mnoha ohledech náročné. Nespornou výhodou metod *in vivo* však zůstává jejich klinická relevance. Výsledky získané metodami *in vitro* je vždy nutné ověřit *in vivo*, mají-li být zvažovány pro jejich klinický význam (Masters et al., 2000).

1.2.1 Cervikální buněčné linie

Buněčné linie představují téměř neomezený zdroj buněk se stejným fenotypem i genotypem. V experimentální praxi se tedy dají využít pro testování toxicity látek, významu genů ve vývoji nádoru nebo jeho progresi a mnoha dalšího (Masters et al., 2006).

První vytvořenou buněčnou linií byla linie HeLa, jednalo se o linii cervikálního karcinomu. HeLa je buněčná linie lidských epiteliálních buněk izolovaná v roce 1951 z nádoru děložního hrdla Henrietty Lacksové. Objevení těchto buněk naplno odstartovalo biomedicínský výzkum a už v roce 1954 byla s jejich pomocí vyvinuta vakcína proti dětské obrně. O rok později se staly prvními úspěšně naklonovanými lidskými buňkami, což znamenalo pro tehdejší dobu velký pokrok, avšak dnes už tento postup nazýváme spíše klonální expanzí, tedy dělením buňky za vzniku velkého množství identických buněk. Nově vytvořená tkáň se začala využívat k testování účinků radioaktivity, virů a léků. (Janáč M., 2016). Dodnes se využívá v mnoha oborech od molekulární biologie po studium vlivu vesmírného prostředí na lidské buňky. Buňky byly odebrány bez vědomí Henrietty Lacksové Georgem Geyem, který zjistil, že na rozdíl od normálních buněk, které po izolaci přežívají pouze několik dnů, se buňky HeLa chovají odlišně. Mají schopnost neustále se množit (dělí se rychleji i ve srovnání s ostatními nádorovými buňkami), což je způsobeno aktivací telomeráz (enzymy schopné zpětně prodloužit telomery) (King et al., 2006).

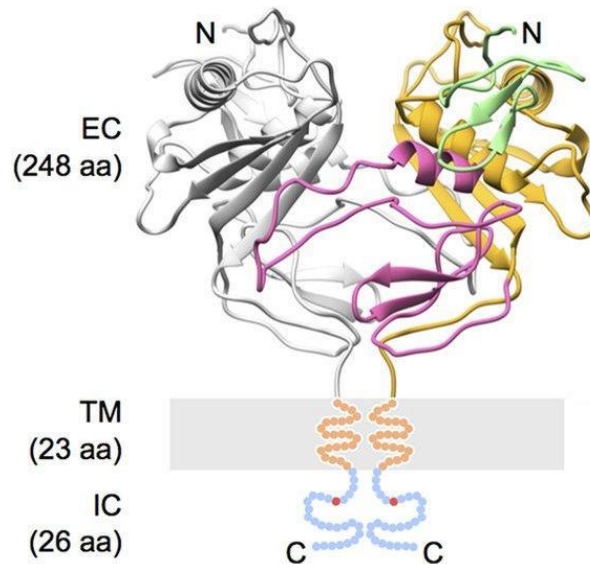
Buňky linie C33A, která byla použita pro přípravu této práce, patří mezi cervikální karcinomy s epiteliální morfologií. Pro práci byly zvoleny z důvodu nízké exprese proteinu Trop-2 (viz 3.1.).

1.3 Trop -2

Trop-2 je transmembránový glykoprotein kódovaný genem TACSTD2, procházející skrze membránu. Má extracelulární, transmembránovou a intracelulární doménu, která

zprostředkovává signalizaci uvnitř buňky (Pavšič et al., 2015). Protein trop-2 je zapojený do celé řady buněčných signalizací. Jedním z mechanismů, kterým zprostředkovává přenos signálu, je zvýšení koncentrace vápenatých iontů v cytosolu (Ripani et al., 1998). Jiný mechanismus zahrnuje regulovanou intramembránovou proteolýzu, kdy dochází ke štěpení proteinu Trop-2 za vzniku dvou produktů, odpovídajících extracelulární a intracelulární doméně, která se uvolňuje z membrány a akumuluje se v jádře buňky (Stoyanova et al., 2012).

Původně byl tento protein identifikován u trofoblastických buněk, tedy buněk zajišťujících výživu embrya a zahnízdění embrya do děložní stěny (Lipinski et al., 1981). Dnes je známo, že je Trop-2 zapojen do řady důležitých buněčných procesů a signálních drah, zásadně ovlivňuje procesy proliferace, přežívání a sebeobnovy, jak u normálních tak u nádorových buněk.



Obr. 1.2. Struktura proteinu Trop-2. Protein se skládá z extracelulární domény (EC), transmembránové (TM) a intracelulární domény (IC) (Pavšič et al., 2015).

1.3.1 Trop-2 a nádory

Byla zjištěna výrazně vyšší exprese proteinu Trop-2 u nádorů žaludku, plic, prsu, slinivky, pankreasu a dalších v porovnání s příslušnou normální tkání. V těchto studiích byl pozorován zrychlený buněčný růst a popsána korelace vysoké exprese proteinu Trop-2 se špatnou prognózou pacientů (Fong et al., 2008; Bignotti et al., 2010). U cervikálních nádorů také dochází k zvýšené expresi proteinu Trop-2, ale v porovnání s normální cervikální tkání není

nárůst markantní. I zde byl Trop-2 korelován s kratší dobou přežívání pacientů a obecně s horší prognózou (Stephan et al., 2011).

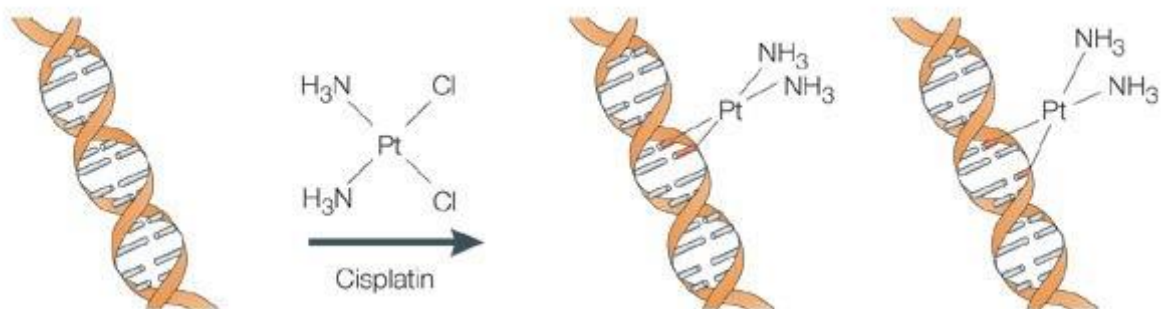
Výše popsané studie daly základ pro testování tohoto proteinu jako terapeutického cíle, specificky pro testování protilátek proti Trop-2. Trop-2 je vysoce exprimován v primárních nádorech a tato exprese ještě stoupá, pokud se jedná o metastázy, což z něj dělá atraktivní potenciální cíl pro zaměření protinádorové terapie i u nemocí ve vyšších klinických stádiích (Cubas et al., 2009).

Role Trop-2 však zůstává kontroverzní. Ukázalo se, že exprese proteinu Trop-2 může v některých případech tumorigenezi inhibovat, jak je tomu např. u buněk adenokarcinomu plic. Studie ukázala, že uměle navozená vysoká exprese Trop-2 v tomto případě oslabuje buněčnou proliferaci a potlačuje tvorbu kolonií (Lin et al., 2012). Kompletní porozumění mechanismu vlivu tohoto proteinu na tumorigenezi je zásadní pro jeho případné použití jako prognostického markeru nebo terapeutického cíle.

1.4 Chemoterapeutika používaná v této práci

1.4.1 Cisplatina

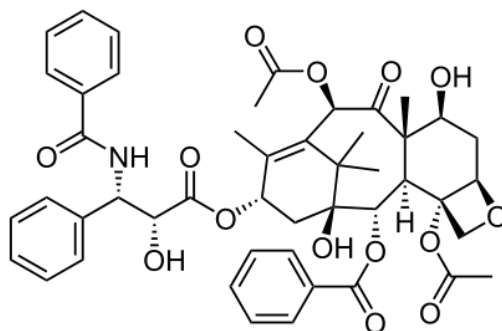
Cisplatina byla objevena v roce 1972 jako první z cytostatik obsahujících platinu, její obdobou jsou oxaliplatina a karboplatina. Tyto platinové komplexy reagují s DNA a zapříčiňují tvorbu meziřetězcových a vnitřetězcových vazeb, čímž blokují replikaci DNA, inhibují její syntézu DNA a tedy i další buněčný růst. Tyto děje vedou k apoptóze, tj. programované buněčné smrti. Cisplatina je nespecifická pro buněčný cyklus, může ovlivnit i buňky ve fázi G_0 . Platinová cytostatika se používají k terapii celé řady nádorových onemocnění, včetně ovarialních, cervikálních a testikulárních karcinomů, melanomů, lymfomů a dalších (Apps et al., 2015).



Obr. 1.3. Cisplatina (cis-diaminodichlorplatina) a její vazba na DNA (Wang et al., 2005).

1.4.2 Taxol

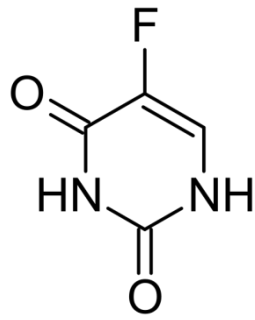
Taxol (obchodní název) neboli Paclitaxel se používá jako cytostatikum k terapii ovariálních, prsních, pankreatických a dalších nádorů. Taxol byl původně izolovaný z tisu západoamerického (*Taxus brevifolia*) a jedná se o mikrotubulární inhibitor. Jeho působením tedy dochází k narušení dynamické funkce dělicího vřeténka během dělení buňky, mikrotubuly nemohou depolymerizovat (tj. zkracovat se a přitahovat chromozomy k pólům buňky), což vede k blokadě přechodu mezi metafází a anafází během mitózy, inhibici mitózy a následně indukci apoptózy v širokém spektru nádorů. V současné době probíhá intenzivní snaha o zvýšení účinnosti taxolu kombinační léčbou. Testován je v kombinaci se silibrinem nebo etoposidem, látkami taktéž vykazujícími protinádorové účinky. Další strategií je výroba nanočástic, jejichž součástí je taxol (nebo jiné chemoterapeutikum). Výhoda těchto nanočástic spočívá v přesnější 'dopravě' léku k nádoru, větší efektivitě a méně závažným vedlejším účinkům (Priyadarshini et al., 2012).



Obr. 1.4. Taxol

1.4.3 5 Fluorouracil

5 fluorouracil (5FU) se používá při léčbě širokého spektra solidních nádorů. Je to pyrimidinový antimetabolit, přesněji analog uracilu. 5FU působí během S fáze buněčného cyklu, inhibuje DNA syntézu, což vede k zastavení buněčného dělení a růstu. Blokuje některé buněčné enzymy potřebné k vytváření stavebních kamenů DNA. Navíc zasahuje do syntézy DNA a RNA, zabudovává se totiž místo uracilu do RNA. Jako předešlé dvě látky je na WHO Model List of Essential Medicines. Podává se injekcí do žíly nebo infúzí (Focaccetti et al., 2014).



Obr. 1.5. 5 Fluorouracil

Popsaná tři chemoterapeutika byla pro práci vybraná pro jejich klinický význam, kdy všechny tři patří k hojně předepisovaným lékům na široké spektrum různých solidních nádorů. Druhým důvodem pro výběr těchto tří konkrétních látek, byl jejich rozličný mechanismus působení na nádorové buňky.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Kultivace/pasážování buněčných linií

Postup:

- Buněčné linie se kultivují v termostatu na kultivační misce při teplotě 37°C, pH musí být konstantní a 5 % CO₂ v atmosféře.
- Pasážování se provádí 3x týdně dle rychlosti růstu jednotlivých linií. Z kultivačních misek se odsaje růstové médium, buňky se promyjí roztokem 1xPBS.
- Od podkladu kultivační misky se buněčná kultura uvolňuje roztokem Trypsin-EDTA.
- Potřebná část uvolněné buněčné suspenze se přenesse do nové kultivační misky s čerstvým médiem.

2.2 Stabilní transfekce buněk C33A lipofekcí

Naším úkolem bylo začlenit plazmid se sekvencí Trop-2 do DNA nádorových buněk. Tento proces je velice násilný, v zásadě existují 2 způsoby, jak to provést:

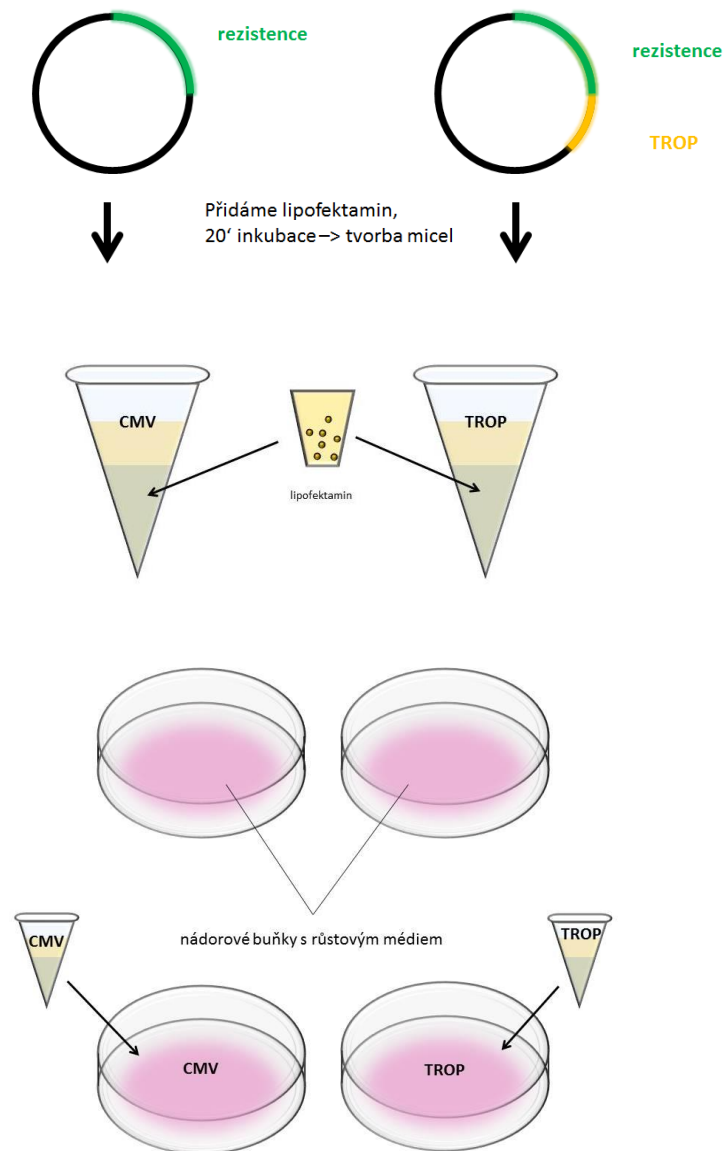
1. ELEKTROPORACE:

Buňky (např. nádorové) se smíchají s DNA – pustí se elektrický výboj o vhodné síle, který perforuje membrány buněk. Těmito otvory DNA vstoupí do buněk. Problém této metody spočívá ve velké úmrtnosti buněk, ale je velmi účinná.

2. LIPOFEKCE:

Během inkubační doby vytvoří lipofektamin a plazmidy ve směsi micely (lipofektamin obalí plazmidy). Vznikne tzv. transfekční směs, která je následně inkubována s buňkami. Lipofekci jsme vybrali, protože je šetrnější k buňkám.





Obr. 2.1. Transfekce buněk C33A

Roztoky:

Lipofectamine™ 2000 Transfection reagent (Invitrogen)
 Zásobní roztok G418 (Geneticin, Invitrogen) 100 mg/ml v PBS
 Opti-MEM (Gibco)

Postup:

- 1×10^6 buněk nasadíme na 5ml kultivační misky a kultivujeme 24 hodin při teplotě 37°C a 5 % obsahu CO₂ v atmosféře.
- Do 400 µl média Opti-MEM přidáme 4 µg plazmidové DNA, lehce promícháme.
- Do stejného objemu média Opti-MEM přeneseme 4 µl lipofekčního činidla LipofectamineTM2000, lehce promícháme.
- Smícháme obsahy obou zkumavek, získáme tak směs média, plazmidové DNA a lipofekčního činidla, lehce promícháme a inkubujeme při laboratorní teplotě 15 minut.
- Transfekční směs nakapeme na buňky a inkubujeme 24 hodin při 37°C v 5 % CO₂.
- Po 24 hodinách odsajeme médium s transfekční směsí, nahradíme ho čerstvým růstovým médiem a zahájíme selekci stabilních transfektantů pomocí antibiotika G418 (konečná koncentrace 600 µg/ml), tím se zbavíme buněk s nezačleněným plazmidem (= buněk, do kterých se nepodařilo začlenit Trop-2 nebo prázdný vektor CMV).

2.3 Izolace jednotlivých klonů metodou limitního zředění

Postup:

- Postupným ředěním si připravíme buněčnou suspenzi o koncentraci 2 buňky/ml.
- Do 96 jamkové klonovací destičky nakapeme 200 µl připravené suspenze (tj. 0,4 buněk/jamka).
- Inkubujeme při 37°C/5 % CO₂ a sledujeme růst jednotlivých klonů.
- Po 10-14-ti dnech (dle rychlosti růstu jednotlivých klonů) přeneseme rostoucí buňky na kultivační misky a přidáme selekční činidlo.

2.4 Analýza hladiny proteinu Trop-2

Postup:

- Nasadíme buňky o koncentraci $0,3 \times 10^5$ /ml 6well jamku do kompletního média. Buňky se kultivují při 37°C/5 % CO₂.
- Druhý den se buňky sklídí roztokem EDTA v PBS.
- Buňky se centrifugují 1200 rpm/5 min.
- Pelet rozsuspendujeme ve 40 µl PBS s primární protilátkou proti Trop-2 (ředí se 1:50). Inkubace 30 min/4°C

- Opláchneme 2x3ml roztoku 1xPBS, centrifugujeme
- Rozsuspendujeme pelet ve 100 μ l sekundární protilátky v PBS (1:500). Inkubace 30 min/44°C
- Opláchneme 2x3ml roztoku 1x PBS, centrifugujeme. Intenzitu fluorescence měříme v roztoku ledového 1xPBS na průtokovém cytometru.

2.5 Stanovení proliferační aktivity – porovnání růstových křivek

Postup:

- Nasadíme buňky o koncentraci $0,8 \times 10^4$ /ml 12well do kompletního média. Buňky se kultivují při 37°C/5 % CO₂.
- V intervalech 24h, 48h, 72h spočítáme počet buněk sklizených z jednotlivých misek pomocí Casy®RT. Počítáme buňky wt (wild type, bez vektoru), CMV (s prázdným vektorem), 3 klony nádorových buněk, označených 1, 10 a 12 (všechny se zvýšenou expresí Trop-2).

2.6 Stanovení viability metodou průtokové cytometrie

Roztoky:

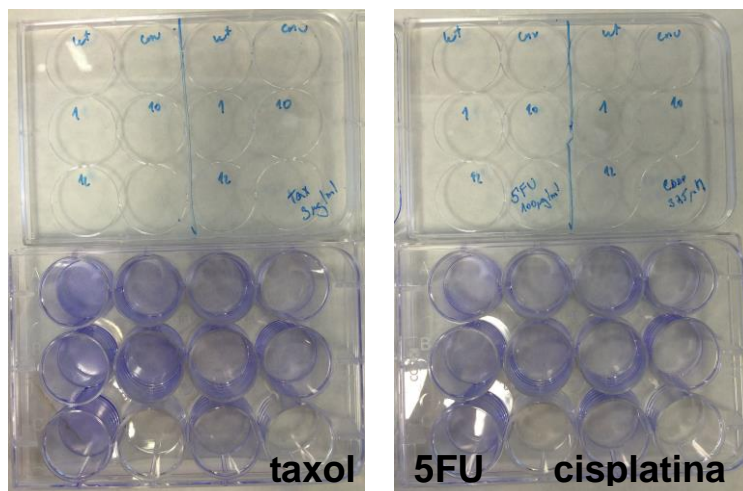
Propidium jodid (PI) – koncentrace 500 μ g/ml (Sigma Aldrich)

Postup:

- Na kulturační misky nasadíme 1×10^5 buněk/12ml well jamku, inkubujeme 24h/37°C/5 % CO₂.
- Přidáme příslušné varianty látek testované na schopnost indukovat buněčnou smrt. Inkubujeme při 37°C/5 % CO₂ potřebnou dobu.
- Buňky sklídíme roztokem trypsin-EDTA.
- Jelikož mrtvé buňky volně plavou a budeme je barvit fluorescenční látkou, centrifugujeme je 1200 rpm/5 min.
- Pelet resuspendujeme v 0,5 ml 1xPBS, přidáme PI (propidium jodid) do výsledné koncentrace 1 μ g.
- Četnost živých a mrtvých buněk stanovíme jako intenzitu fluorescence na průtokovém cytometru, analýzu dat provádí software BD FACSuite.

2.7 Barvení buněk krystalovou violetí

- Buňky připravené stejně jako v protokolu popsáném výše (2.6.) jsme zbavili média a fixovali je ledovým methanolem a převrstvili roztokem krystalové violeti.
- Barvení probíhalo 20 minut při pokojové teplotě.
- Poté byl roztok odpipetován a misky byly opláchnuty od zbytků krystalové violeti vodou.
- Po důkladném vyschnutí při laboratorní teplotě byly buňky lyzovány 10% kyselinou octovou a následně byl počet živých buněk hodnocen spektrofotometricky na ELISA readeru při vlnové délce 560 nm.



Obr. 2.2. 12-ti jamková destička

2.8 Stanovení buněčného cyklu průtokovou cytometrií

Změny v buněčném cyklu buněk 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.

Postup:

- Adherentní buňky CT26 převedeme trypsinizací do suspenze, spočítáme. Nasadíme na 5ml misky v koncentraci 1×10^5 /ml.
- Po 48 hodinách odsajeme médium, sklídíme buňky trypsinem, centrifugujeme 500g/5 min.

- Pelet rozsuspendujeme v 0,5 ml PBS a přikapeme 4 ml vychlazeného 70% etanolu, fixujeme min. 30 minut v 4°C.
- Centrifugujeme 500g/5 min, odsajeme supernatant, promyjeme 4 ml 1xPBS, rozsuspendujeme ve Vindelově roztoku (obsahuje proprium jodid a RNázu).
- Barvíme 30 min, 37°C, ve tmě.
- Množství DNA analyzujeme průtokovým cytometrem.

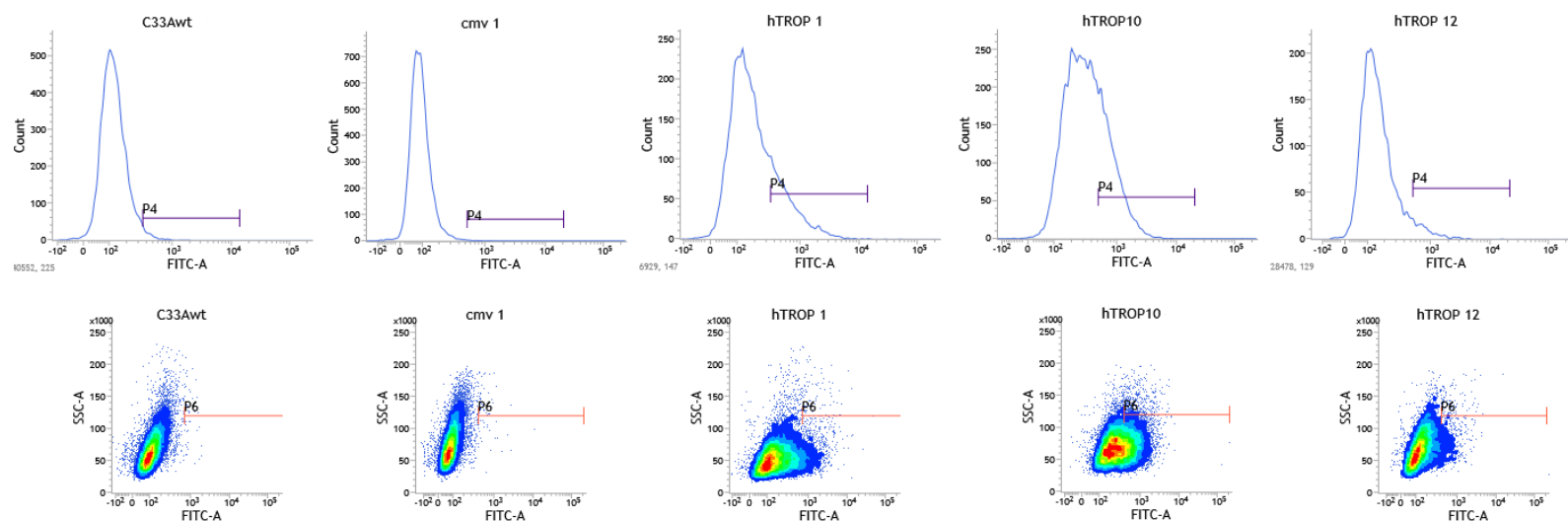
3 VÝSLEDKY

3.1. Příprava derivátů buněk C33A stabilně exprimujících Trop-2

Naším cílem bylo připravit deriváty linie C33A se zvýšenou hladinou proteinu Trop-2. Výchozí, mateřská linie (wt) vykazuje nízkou hladinu tohoto proteinu. Abychom dosáhli zvýšení exprese Trop-2, transfekovali jsme buňky C33A expresním vektorem hTrop-2 nebo prázdným vektorem CMV jako kontrolu, zda případný sledovaný efekt není důsledkem přípravy buněk. Oba vektory poskytují transfekovaným buňkám rezistenci ke geneticinu (G418). Po transfekci jsme buňky 14 dní selektovali v médiu obsahujícím G418 (600 µg/ml). Tímto způsobem jsme získali smíšenou populaci buněk stabilně exprimující Trop-2 nebo se stabilně začleněným prázdným vektorem. Metodou limitního ředění jsme získali několik klonů buněk C33A, ty byly potřeba otestovat na hladinu proteinu Trop-2 (3.2.). Důvodem pro přípravu klonů je fakt, že ve směsné populaci po selekci se mezi jednotlivými buňkami hladina proteinu našeho zájmu výrazně liší. Mohlo by se tedy stát, že z důvodu nerovnoměrného dělení buněk, by se postupem času exprese proteinu Trop-2 velmi změnila nebo dokonce vyředila.

3.2. Detekce úrovně exprese Trop-2 v připravených klonech

Změnu úrovně exprese jsme testovali na úrovni proteinu pomocí barvení primární protilátkou proti Trop-2, sekundární fluorescenčně značenou protilátkou a detekcí povrchového proteinu na průtokovém cytometru. Touto metodou jsme vybrali 3 klony s nejvyšší expresí proteinu Trop-2, které byly použity v dalších experimentech. U kontrolní linie cmv je hladina Trop-2 srovnatelná s výchozí linií C33A wt.



Obr. 3.1. Hladina proteinu Trop-2 měřená průtokovým cytometrem. Primární protilátka proti lidskému proteinu Trop-2 (FAB650A, R&D Systems) se váže na povrchový protein Trop-2. Po inkubaci s fluorescenční sekundární protilátkou můžeme nepřímo detekovat expresi tohoto proteinu. Mateřská linie C33Awt a linie s prázdným vektorem cmv1 téměř nevykazují vazbu s protilátkou proti Trop-2. V případě klonů hTROP1, 10 a 12 se podařilo dosáhnout zvýšení exprese cílového proteinu. Tyto klony byly vybrány pro další experimenty.

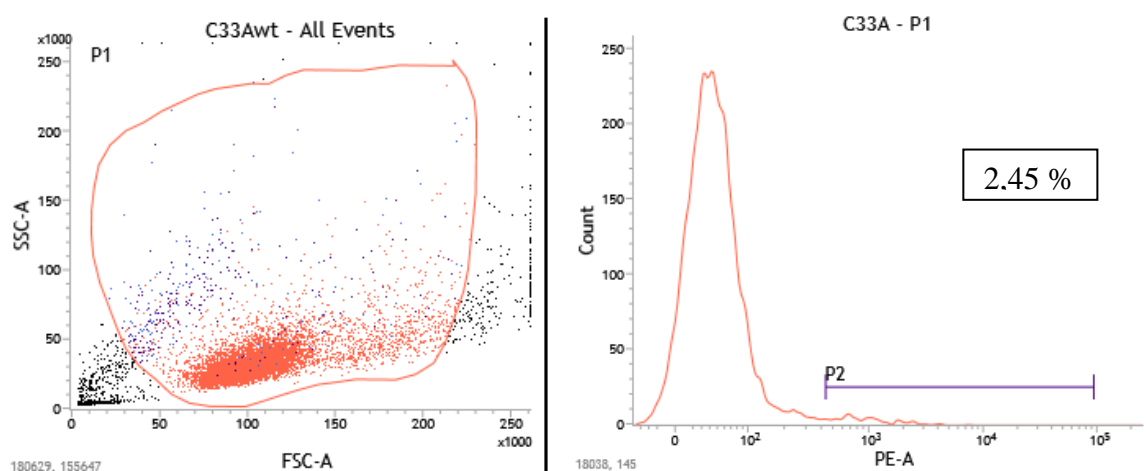
3.3. Stanovení vhodné koncentrace chemoterapeutických látek pro testování na linii C33A

Tento experiment sloužil k výběru správné koncentrace taxolu, 5FU a cisplatinu. Testované látky o různých koncentracích jsme inkubovali s buňkami C33A 48h/37°C/5% CO₂. Poté jsme buňky sklidili a obarvili propidium iodidem. Látkou, která proniká pouze do mrtvých buněk. Úmrtnost jsme stanovovali na průtokovém cytometru. Nejprve jsme pomocí parametrů velikosti (FSC) a granularity buněk (SSC) cytometr vhodně nastavili (Obr. 3.2.). Poté jsme pomocí fluorescenčního detektoru PE-A (Phycoerytrin-Area) hodnotili intenzitu propidium iodidového signálu, tedy množství mrtvých buněk. Signál živých a mrtvých buněk byl poté oddělen gatem P2, buňky intenzivněji svítící pod P2 jsou mrtvé (Obr. 3.3.).

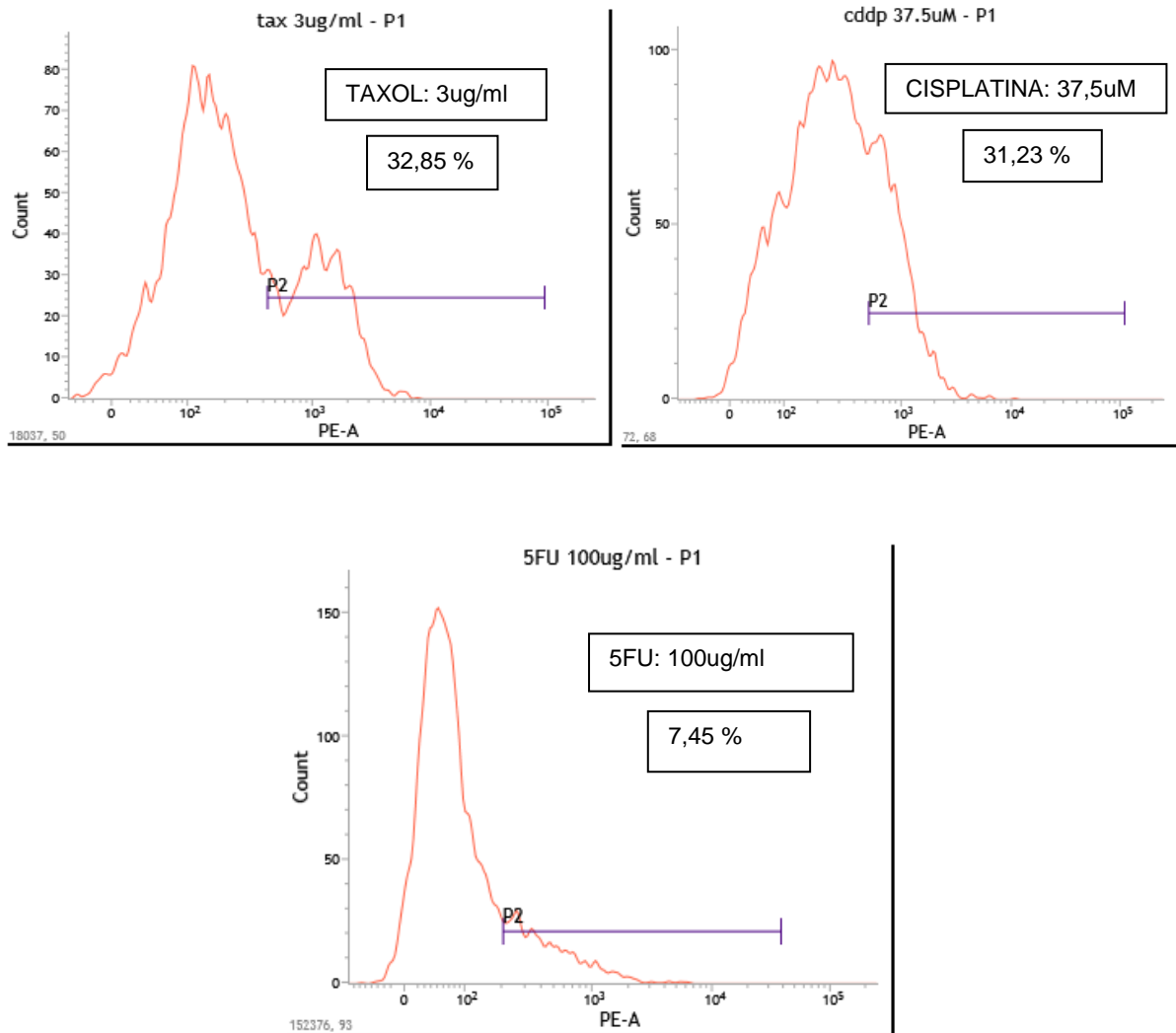
FSC ... přímý rozptyl

SSC ... boční rozptyl

PE-A ... fluorescence



Obr. 3.2. Nastavení cytometru pro měření mortality buněk C33A



Statistics						
Name	Events	% Parent	% Grandparent	% Total	FSC-A Mean	SSC-A Mean
C33A:P2	179	2.45	1.79	1.79	102,013	62,393
tax 1ug/ml:P2	1,526	28.21	15.26	15.26	97,168	88,182
tax 3ug/ml:P2	1,664	32.85	16.64	16.64	96,956	87,535
tax 5ug/ml:P2	1,919	39.46	19.19	19.19	98,522	105,701
5FU 50ug/ml:P2	350	6.88	3.50	3.50	82,488	73,198
5FU 100ug/ml:P2	389	7.45	3.89	3.89	82,170	69,624
5FU 150ug/ml:P2	463	9.07	4.63	4.63	83,940	67,134
5FU 200ug/ml:P2	488	9.32	4.88	4.88	81,469	65,915
cddp 10uM:P2	1,431	25.03	14.31	14.31	92,407	73,643
cddp 25uM:P2	1,817	28.06	18.17	18.17	92,576	72,037
cddp 37.5uM:P2	2,080	31.23	20.80	20.80	93,149	71,816
cddp 50uM:P2	2,649	36.81	26.49	26.49	96,248	70,634

Obr. 3.3. Grafy znázorňující mortalitu buněk C33A po vybraných koncentracích látek. Pro taxol byla zvolena koncentrace 3µg/ml, pro 5FU 100 µg/ml a pro cisplatinu (cddp) 37,5 µM. V případě 5FU nedošlo k výraznému ovlivnění viability ani jednou z použitých koncentrací, buněk však bylo o mnoho méně, rozhodli jsme se tedy proto pro jiný způsob detekce působení této látky (viz dále).

3.4. Stanovení vhodné koncentrace chemoterapeutických látek pro testování na linii C33A – hodnocení pomocí barvení krystalovou violetí

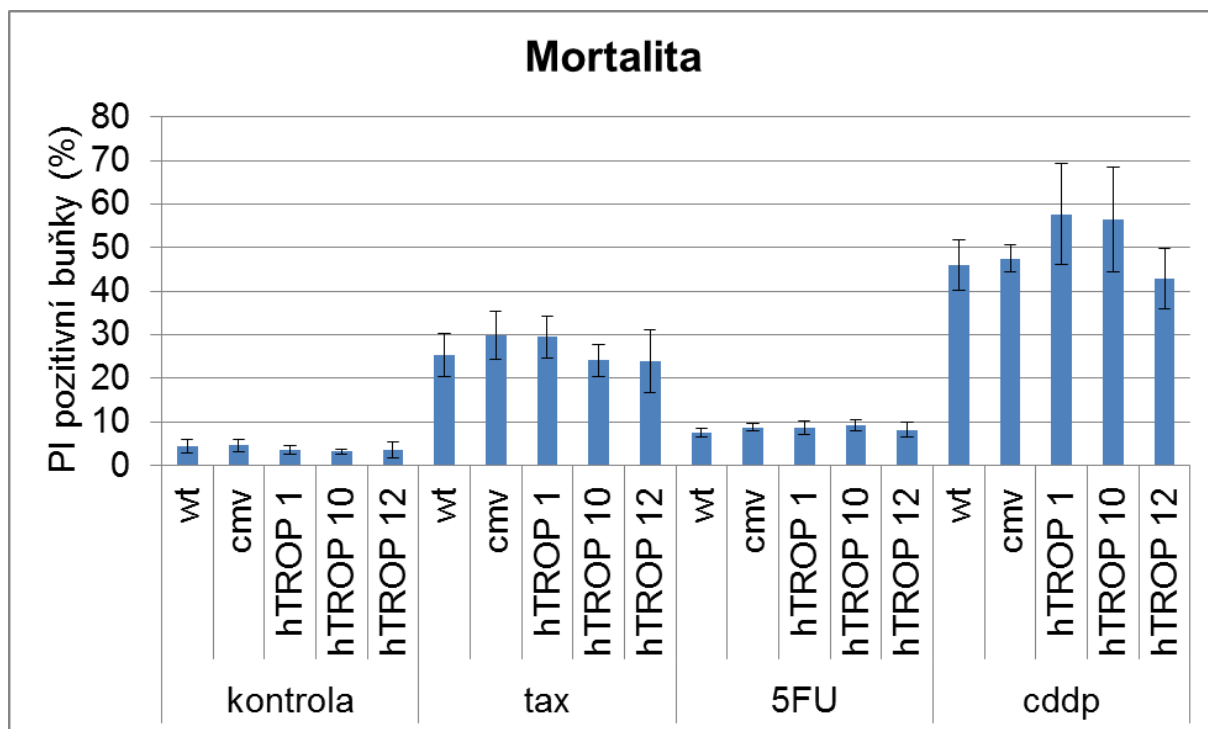
Toto hodnocení bylo zvoleno jako doplňkové, zejména pro hodnocení vlivu 5FU na nádorové buňky C33A (viz. 3.3).

C33A wt	detekce absorbance (570 nM)
kontrola	0,974
tax 1ug/ml	0,322
tax 3ug/ml	0,291
tax 5ug/ml	0,271
5FU 50ug/ml	0,424
5FU 100ug/ml	0,328
5FU 150ug/ml	0,247
5FU 200ug/ml	0,242
cddp 10uM	0,522
cddp 25uM	0,306
cddp 37,5uM	0,233
cddp 50uM	0,169

Obr. 3.4. Tabulka znázorňující koncentrace látek vybrané (žlutě zvýrazněné) pro testování krystalovou violetí.

3.5. Analýza vlivu proteinu Trop-2 na mortalitu po vybraných chemoterapeutických látkách

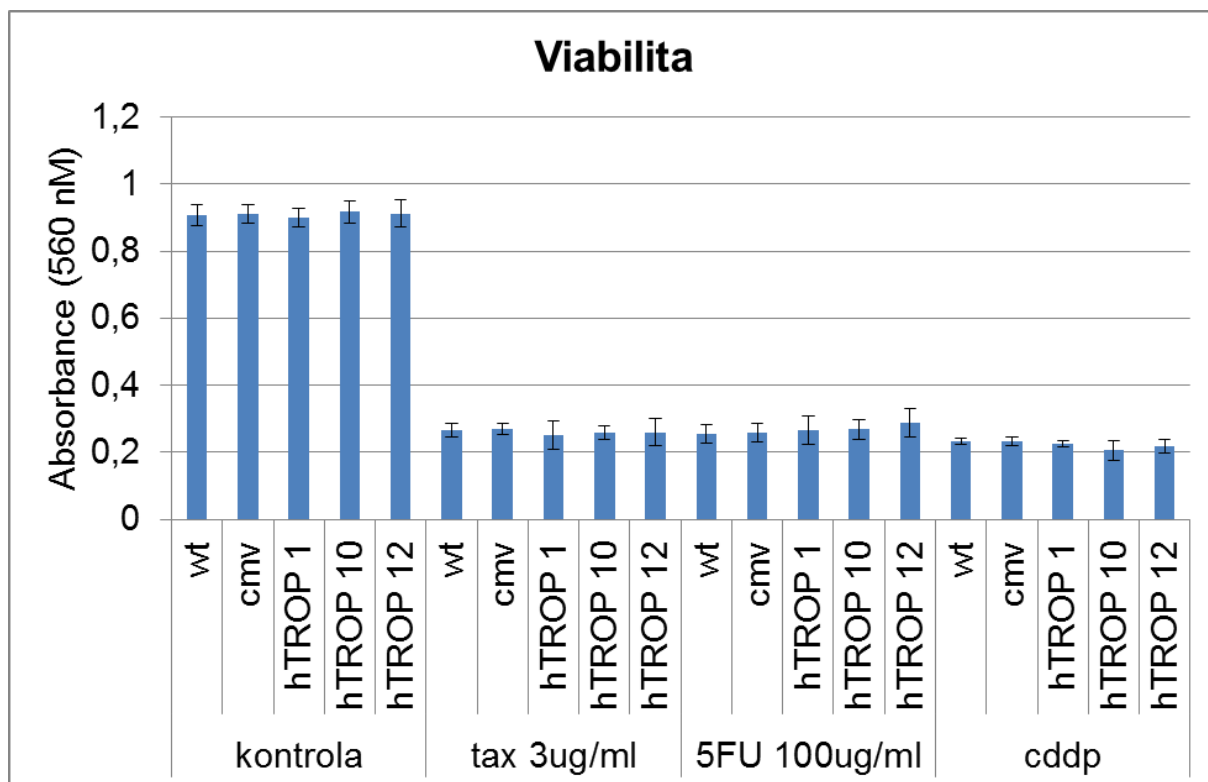
Cílem tohoto experimentu bylo stanovit úmrtnost jednotlivých klonů po přidání chemoterapeutik. Použili jsme linii C33A bez přidaného vektoru (wt), jeden klon s prázdným vektorem a zbylé tři s navýšenou hladinou proteinu Trop-2. Buňky byly inkubovány s látkami o koncentracích vybraných pomocí testu popsaného v kapitole 3.3. po dobu 48h, sklizeny a analyzovány na průtokovém cytometru. Průměrné hodnoty ze čtyř nezávislých měření jsou vyobrazeny v grafu 3.5.



Obr. 3.5. Mortalita buněk C33A po působení chemoterapeutik. Působení taxolu a cisplatiny jsme vyhodnotili prostřednictvím t testu, který nezaznamenal statisticky významné rozdíly působení vzhledem k hladině proteinu Trop-2 na hladině významnosti $p < 0,05$. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

3.6. Analýza vlivu proteinu Trop-2 na mortalitu po vybraných chemoterapeutických látkách – hodnocení pomocí barvení krystalovou violetí

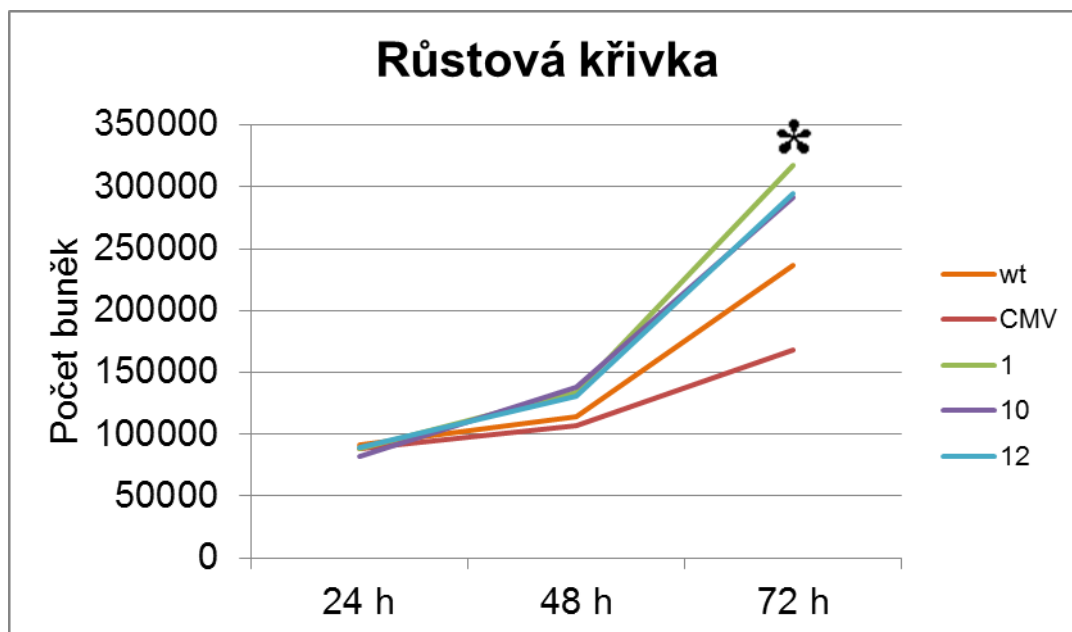
Tato jednoduchá metoda neumožňuje analyzovat přesný počet mrtvých buněk, pro naše potřeby v případě 5FU je však velice vhodná, protože pomocí ní můžeme změřit celkový počet živých buněk. Analyzuje tedy i změny v rychlosti růstu. Linie C33A patří mezi adherentní nádorové linie, živé buňky jsou tedy přilepené ke dnu kulturační misky, mrtvé plavou v médiu. Před samotným barvením bylo proto potřeba médium odsát a buňky fixovat. Počet živých buněk je hodnocen spektrofotometricky na ELISA readeru při vlnové délce 560 nm. Vyšší intenzita signálu odpovídá většímu počtu živých, sedících buněk. Průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování jsou zobrazeny v grafu 3.6.



Obr. 3.6. Množství živých buněk C33A po působení chemoterapeutik. Působení všech tří látek jsme vyhodnotili prostřednictvím t testu, který nezaznamenal statisticky významné rozdíly působení těchto látek vzhledem k hladině proteinu Trop-2 na hladině významnosti $p < 0,05$. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

3.7. Analýza vlivu proteinu Trop-2 na proliferaci buněk C33A

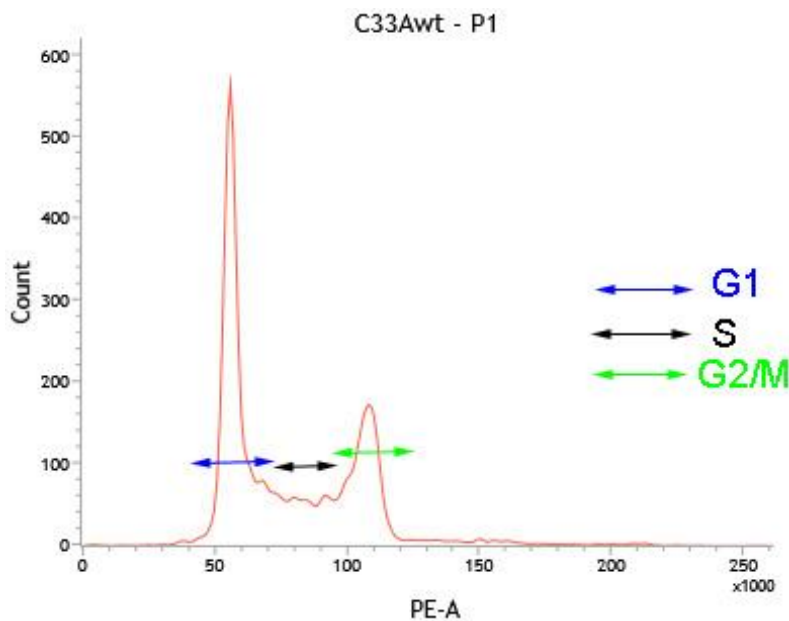
Tímto experimentem jsme chtěli ověřit, zda má protein Trop-2 vliv na rychlost růstu buněk C33A. Jednotlivé varianty linie C33A byly nasazeny o stejném počtu a růstová křivka byla připravena analýzou počtu buněk po 24, 48 a 72 hodinách. Průměrné hodnoty ze tří nezávislých experimentů jsou zobrazeny v grafu 3.7.



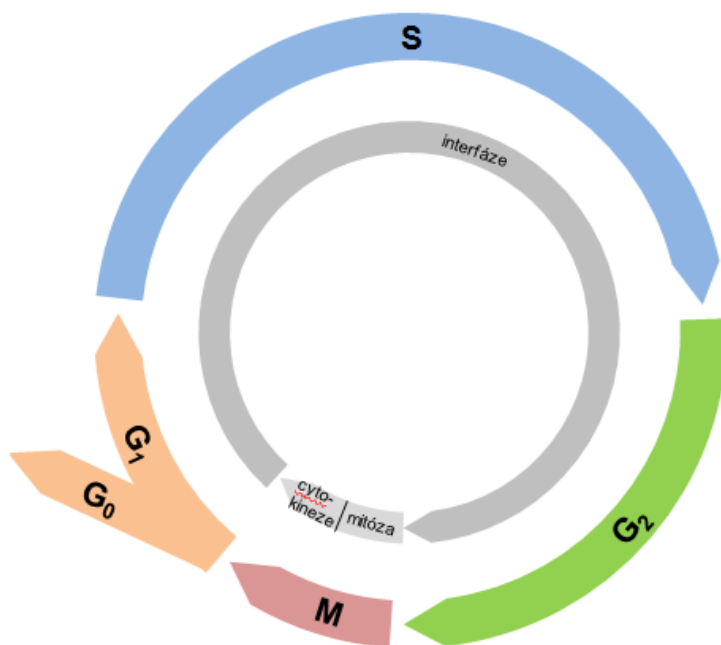
Obr. 3.7. Graf ukazuje počet buněk změřený v jednotlivých časových intervalech 24, 48 a 72 hodin. Největší změna v počtu byla pokaždé zaznamenána po 48 hodinách následně po 72 hodinách. Ukázalo se, že buňky se zvýšenou expresí proteinu Trop-2 mají tendenci růst rychleji. Vložení prázdného vektoru má spíše lehce negativní efekt na růst buněk. Statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$ je označen *.

3.8. Analýza vlivu proteinu Trop-2 na distribuci buněk v buněčném cyklu

Vzhledem ke zjištění, že buňky C33A se zvýšenou hladinou proteinu Trop-2 rostou rychleji, nás zajímalo, zda je tento rozdíl daný jinou distribucí buněk v buněčném cyklu. Buněčný cyklus se skládá z fáze G1, postmitotické fáze, kde je množství DNA 2n. Dále S fáze, kdy dochází k doreplikování DNA, ve fázi G2, která předchází samotné mitóze, je tedy množství DNA 4n. Pro detekci jednotlivých fází jsme využili fixace buněk, která umožní proniknutí barviva propidium jodid do všech buněk. Intenzita propidium jodidového signálu po obarvení tedy odpovídá množství DNA v buňkách. Pro samotnou analýzu jsme opět využili průtokový cytometr. Ukázka typické křivky buněčného cyklu jakož i průměrné hodnoty ze tří nezávislých opakování jsou uvedeny na obrázcích 3.8. a 3.10.

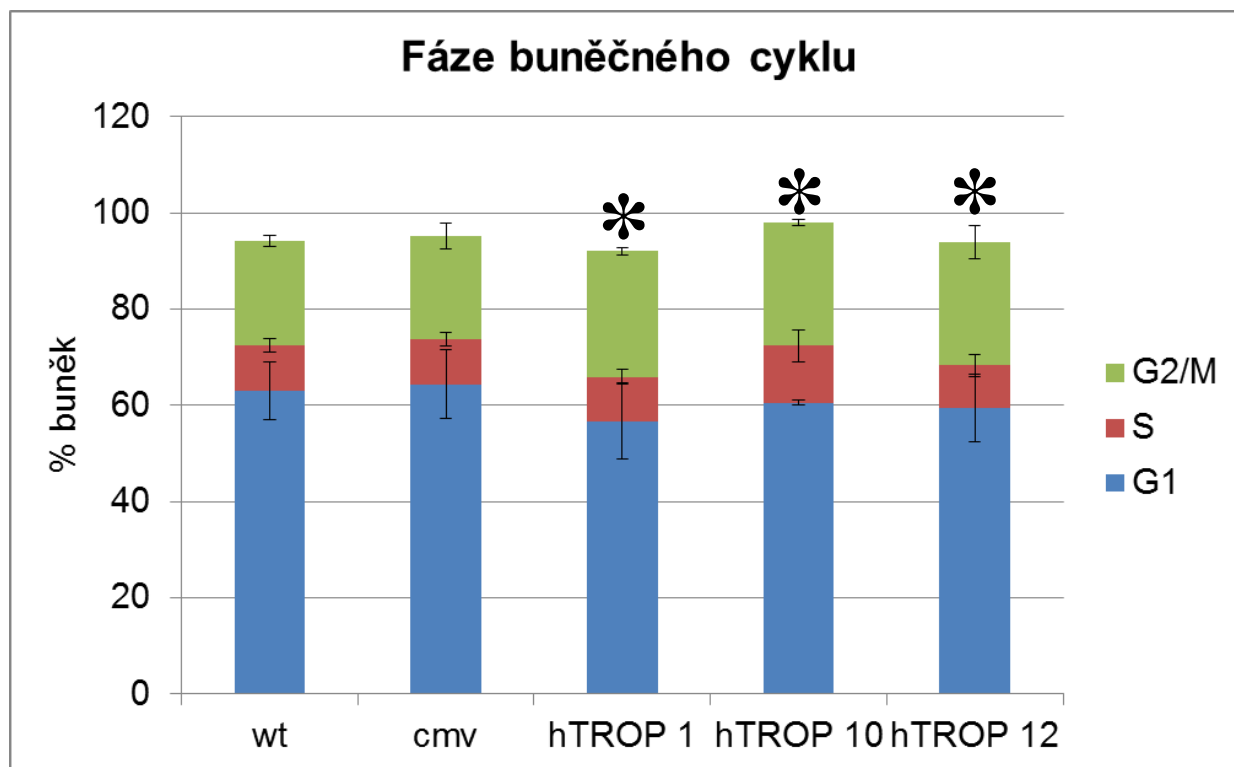


Obr. 3.8. Typická křivka buněčného cyklu po vizualizaci množství DNA na průtokovém cytometru ukazuje fázi G1 (2n), fázi S a fáze G2/M (4n), které od sebe nejsme schopni odlišit.



Buněčný cyklus má 4 fáze: G1, S a G2 (souhrnně označované jako interfáze) a M (mitotická fáze). Během M fáze dochází k buněčnému dělení: nejdříve se rozdělí jádro (mitóza) a poté celá buňka (cytokineze). Následuje G1 fáze (z angl. *gap* = mezera) během níž buňka buď roste nebo může přejít do klidové G0 fáze. V S (syntetické) fázi se zdvojuje DNA (počet chromozomů). V G2 fázi dokončuje buňka růst a připravuje se na dělení v M fázi.

Obr. 3.9. Schéma buněčného cyklu



Obr. 3.10. Graf znázorňuje počet buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Ukázalo se, že buňky se zvýšenou hladinou proteinu Trop-2 mají větší procento buněk ve fázi G2/M, což koresponduje se zjištěním, že tyto buňky rostou rychleji. Vložení prázdného vektoru nemá žádný efekt na rozložení buněk v buněčném cyklu. Statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$ je označen *.

4 DISKUZE

Řada vědeckých prací ukázala, že se Trop-2 chová jako onkogen, tedy jeho exprese vede k vyšší tumorigenitě a invazivitě nádorových buněk. Při analýze vzorků pacientek s cervikálním karcinomem bylo zjištěno, že se stoupajícím stádiem nemoci přibývá proteinu Trop-2 (Liu et al., 2013). Dále bylo zjištěno, že potlačením exprese Trop-2 u cervikální nádorové linie CaSki vede k inhibici proliferace těchto buněk a navýšení buněk podstupujících apoptózu. Hypoteticky by se tedy Trop-2 mohl stát v budoucnu vhodným cílem pro biologickou léčbu cervikálních nádorů (Liu et al., 2014).

V našich experimentech byla potvrzena role proteinu Trop-2 v proliferaci cervikální nádorové linie C33A. V porovnání s normální linií rostou buňky se zvýšenou expresí proteinu Trop-2 výrazně rychleji. Zajímavé bylo zjištění vlivu prázdného kontrolního vektoru na proliferaci buněk, kterou inhibuje. Náš výsledek byl potvrzen následujícím experimentem, kterým jsme zjišťovali, jestli je rychlejší růst buněk se zvýšenou hladinou proteinu Trop-2 dán jinou distribucí buněk v buněčném cyklu. Využitím barviva pronikajícího dovnitř každé buňky a vázícího se na molekuly DNA se ukázalo se, že tyto buňky opravdu obsahují více buněk v G₂/M fázi (u těchto buněk byl detekován nejsilnější PI signál) než buňky normální linie. Tato naše pozorování jsou ve shodě se zjištěním Liu a dalších (Liu et al., 2013). V jejich studii bylo popsáno, že vysoká exprese Trop-2 koreluje s vysokou mírou proliferace u cervikálních nádorových linií. Do budoucna by bylo velmi zajímavé objasnit mechanismus, jakým u těchto nádorů Trop-2 proliferaci ovlivňuje.

Léčba rakoviny se v dnešní době ve většině případů neobejde bez chemoterapie – vpravování toxických chemoterapeutik do organismu. Naším dalším cílem bylo proto otestovat citlivost buněk se zvýšenou hladinou proteinu Trop-2 na chemoterapii. Za účelem získání co nejobjektivnějších výsledků jsme vybrali tři velice často používaná chemoterapeutika s různým mechanismem působení na nádorové buňky. Prvním ze dvou provedených experimentů jsme stanovili mortalitu buněk. Protein Trop-2 zde po působení chemoterapeutik ani v jednom případě významně neovlivnil úmrtnost buněk. Protože jsme přidáním jednoho z chemoterapeutik nezaznamenali výraznou změnu v počtu buněk, provedli jsme analýzu vlivu proteinu měřením viability buněk metodou barvení krystalovou violetí. Výsledky tohoto experimentu však taktéž nevykazovaly rozdíl mezi množstvím živých buněk u vzorků se zvýšenou expresí Trop-2 a vzorků kontrolních. Obě metody ukázaly, že přítomnost proteinu Trop-2 nijak zásadně neovlivňuje chování buněk během působení těchto látek.

5 ZÁVĚR

Tato práce se věnovala analýze role proteinu Trop-2 na citlivost cervikálních nádorových buněk linie C33A k protinádorové terapii a vlivu na růst těchto buněk. Byly připraveny klony se stabilní vysokou expresí proteinu Trop-2, které posloužily jako vhodná platforma pro další analýzy. Ač nebyl pozorován signifikantní rozdíl v citlivosti buněk s nízkou a vysokou expresí Trop-2 na žádné použité cytostatikum, bylo pozorováno, že buňky s vyšší hladinou proteinu Trop-2 rostou výrazně rychleji. Do budoucna by bylo zajímavé naše měření zopakovat na dalších buněčných liniích, abychom předešli buněčně specifickému efektu (tj. naměřená data jsou platná pouze u daných buněk). Mohlo by tak být dosaženo potvrzení role Trop-2 v aktivaci proliferace a v rychlejším průchodu buněčným cyklem.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- Apps M. G., Choi E. H. Y., Wheate N. J.** 2015. The state-of-play and future of platinum drugs. *Endocrine-related Cancer* 22 (4): 219–233.
- Bignotti E., Todeschini P., Calza S., Falchetti M., Ravanini M., Tassi R. A., Ravaggi A., Bandiera E., Romani C., Zanotti L., et al.** 2010. Trop-2 overexpression as an independent marker for poor overall survival in ovarian carcinoma patients. *Eur J Cancer* 46: 944-953.
- Cubas R., Li M., Chen C., Yao Q.** 2009. Trop-2 - a possible therapeutic target for late stage epithelial carcinomas. *Biochim Biophys Acta* 1796: 309–314.
- Dušek L., Mužík J., Kubásek M., Koptíková J., Žaloudík J., Vyzula R.** Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2017-2-13]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.
- Focaccetti C., Bruno A., Magnani E., Bartolini D., Principi E., Dallaglio K., Bucci E. O., Finzi G., Sessa F., Noonan D. M., Albini A.** 2015. Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. *PLoS One*. 10(2): e0115686.
- Fong D., Moser P., Krammel C., Gostner J. M., Margreiter R., Mitterer M., Gastl G., Spizzo G.** 2008. High expression of Trop-2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 99: 1290-1295.
- Holcomb K., Runowitz C.D.** 2005. Cervical cancer screening. *Surg Oncol Clin N Am* 14: 777-799.
- Janáč M.** 2016. Nesmrtelná žena. *Vesmír* 95(146): 704 – 705.
- King R.C; Stansfield William D.; Mulligan Pamela K.** 2006. *A Dictionary of Genetics*, Seventh Edition. Oxford University Press: 1.
- Lin J. C., Wu Y. Y., Wu J. Y., Lin T. C., Wu C. T., Chang Y. L., Jou Y. S., Hong T. M., Yang P. C.** 2012. Trop-2 is epigenetically inactivated and modulates IGF-1R signalling in lung adenocarcinoma. *EMBO Mol Med*. 4(6): 472-485.
- Lipinski M., Parks D. R., Rouse R. V., Herzenberg L. A.** 1981. Human trophoblast cell-surface antigens defined by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 5147-5150.
- Liu T., Liu Y., Bao X., Tian J., Liu Y., Yang X.** 2013. Overexpression of Trop-2 Predicts Poor Prognosis of Patients with Cervical Cancer and Promotes the Proliferation and Invasion of Cervical Cancer Cells by Regulating ERK Signaling Pathway. *PLoS One*. 8(9): e75864.
- Liu X., Li S., Yi F.** 2014. Trop-2 gene: a novel target for cervical cancer treatment. *J Cancer Res Clin Oncol*. 140(8): 1331-1341.

- Lorincz AT et al.** 2002. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 360: 228–9.
- Masters J. R. W.** 2000. Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1: 233-236.
- Parkin, D. M. & Bray, F.** 2006. Chapter 2: the burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24 (Suppl. 3): 11–25.
- Pavšič M., Ilc G., Vidmar T., Plavec J., Lenarčič B.** 2015. The cytosolic tail of the tumor marker protein Trop-2 - a structural switch triggered by phosphorylation. *Scientific Reports* 5: article number 10324.
- Priyadarshini K., Aparajitha K. U.** 2012. Paclitaxel Against Cancer: A Short Review. *Med Chem.* 2: 7.
- Ripani E., Sacchetti A, Corda D., Alberti S.** 1998. Human Trop-2 is a tumor-associated calcium signal transducer. *Intl J Cancer* 76: 671-676.
- Stepan L. P., Trueblood E. S., Hale K., Babcook J., Borges L., Sutherland C. L.** 2011. Expression of Trop-2 cell surface glycoprotein in normal and tumor tissues: potential implications as a cancer therapeutic target. *J Histochem Cytochem* 59(7): 701-710.
- Stoyanova, T., Goldstein, A.S., Cai, H., Drake, J.M., Huang, J., Witte, O.N.** 2012. Regulated proteolysis of Trop-2 drives epithelial hyperplasia and stem cell self-renewal via β -catenin signaling. *Gene. Dev.* 26: 2271–2285.
- Wang D., Lippard S. J.** 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 4: 307-320.