

Návštěva NÚVŘ

Cajthamlová, Dosoudilová, Hanzalová, Helebrantová, Jelenová,
Kovářová, Lacman

Úvod do nádorové imunity





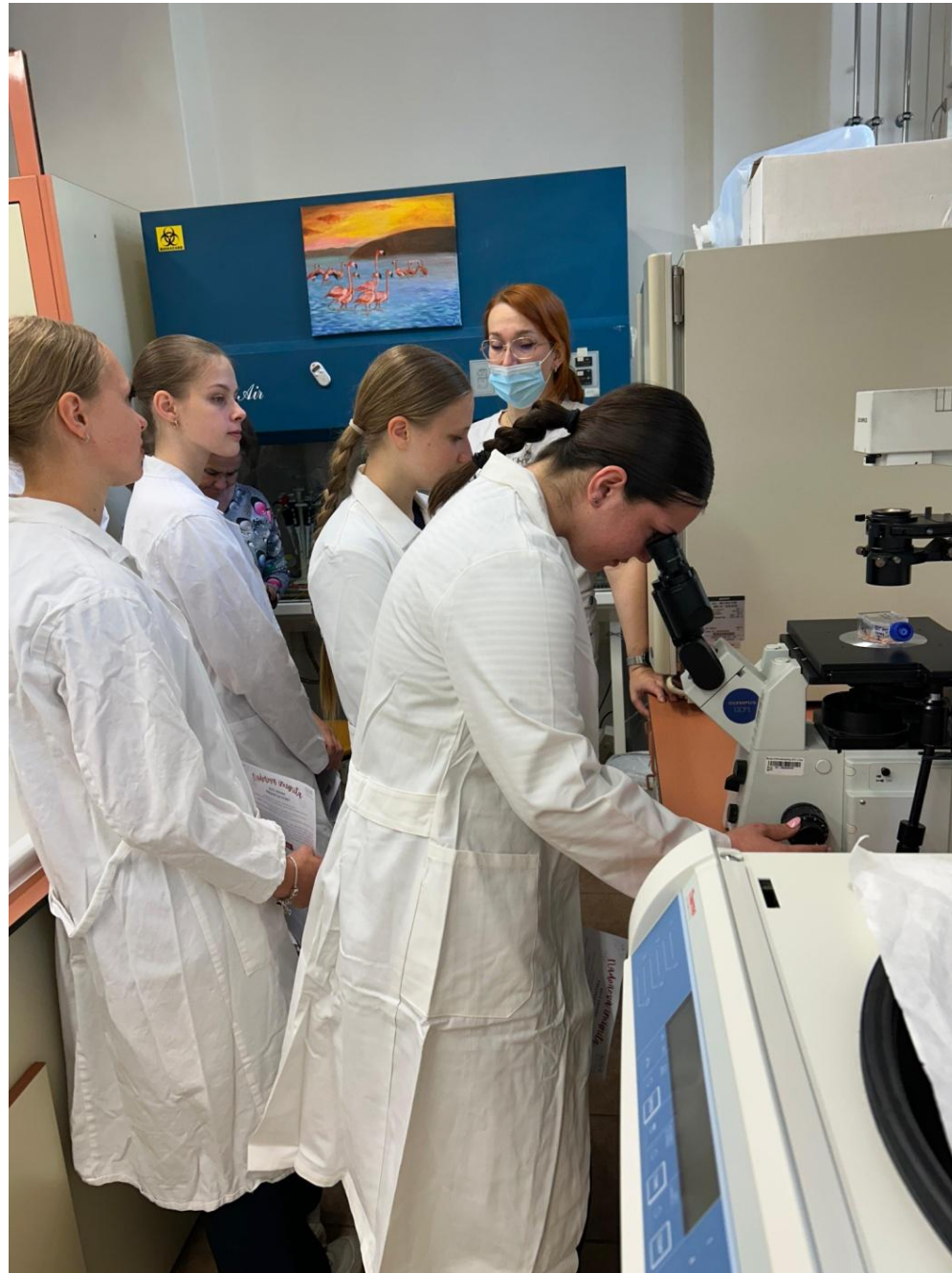
První část

- Úkol:
 - Určení počtu buněk v 10 μ l suspenze a jejich viabilitu (procento živých buněk) pomocí trypanové modři











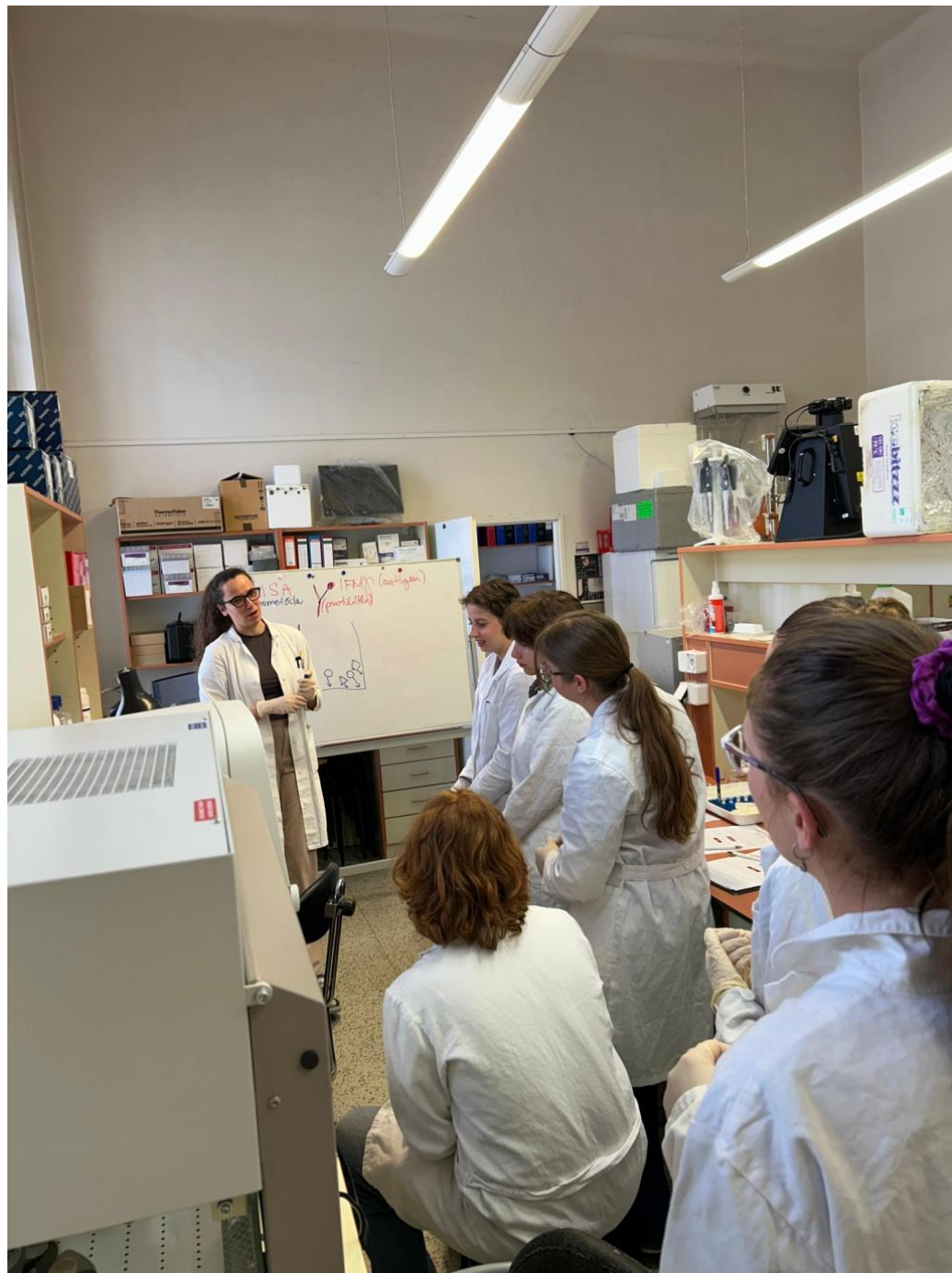


Druhá část

- Úkol:
- Imunometodou ELISA jsme měřili množství IFN – γ ve čtyřech vzorcích







ELISA imunometóda

S₁
S₄
+
-

IFN γ (antigen)
(protidatka) $\star$ - peroxidáza



Nádorová imunita

KDYŽ OBRANA PŘECHÁZÍ DO ÚTOKU

NÚVR
NÁRODNÍ ÚSTAV
PRO VÝZKUM RAKOVINY

WORKSHOP PRO STUDENTY STŘEDNÍCH ŠKOL
ORGANIZOVANÝ POD ZÁŠTITOU NÁRODNÍHO ÚSTAVU PRO VÝZKUM RAKOVINY

Lektoři: Magdalena Houdová Megová, Ivana Matrasová, Nikola Ternerová,
Tereza Šváblová, Soňa Gyönyörová

Institute: Laboratoř biologie nádorové buňky, Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK

Dnes vás vezmeme do fascinujícího světa nádorové imunity – světa, kde obranné buňky imunitního systému dokážou rozpoznat a ničit nádorové buňky. Podíváte se na to, co se v nádoru skutečně odehrává, a zjistíte, proč je imunita jedním z klíčových hráčů v boji proti rakovině. V praktické části si sami vyzkoušíte práci v laboratoři tkáňových kultur. Pomocí zobrazovacího systému BioTek Cytation 5 budete sledovat, jak si imunitní buňky poradí s buňkami nádorovými. Následně metodou ELISA změříte množství cytokinů - signálních molekul, které imunitní buňky používají ke komunikaci a koordinaci útoku.

OSOBNÍ info

JMÉNO A PŘÍJMENÍ: Cajthamlová, Dosoudilová, Hanzalová, Helebrantová, Jelenová, Kovářová, Lacman

TŘÍDA A ŠKOLA: VI.B Sportovní gymnázium Kladno

Úvod

Nádor není jen hromádka nekontrolovaně se dělících buněk. Představte si ji spíše jako velmi sobecké „město“, které si přetváří okolí k obrazu svému. Toto prostředí nazýváme nádorové mikroprostředí. Nádorové buňky v něm nežijí samy – jsou obklopeny tzv. stromálními buňkami (například fibroblasty, které normálně tvoří jizvy nebo drží tkáň pohromadě). Nádor tyto sousedy dokáže „přeprogramovat“ tak, aby mu pomáhali. Nutí je například podporovat angiogenezi (stavbu nových cév, kterými si nádor přivádí živiny) nebo vytvářet mechanickou bariéru, přes kterou se k němu nedostanou léky ani imunitní systém.

Do tohoto prostředí neustále vstupují různé buňky imunitního systému. Některé, jako jsou makrofágy, se snaží nepořádek uklidit, ale nádor je často dokáže zmást, aby ho ignorovaly. Naši největší naději jsou však cytotoxické T-lymfocyty (označované jako CD8⁺). Jsou to elitní jednotky naší imunity, které mají na svém povrchu specifické receptory, díky nimž dokážou poznat, že je buňka nádorová. Jakmile T-lymfocyt svůj cíl najde, pevně se k němu přichytí. V místě doteku vznikne tzv. imunologická synapse – je to neuvěřitelně těsná a organizovaná spojení dvou buněk, přes které T-lymfocyt do nádorové buňky „vstříkne“ smrtící balíček enzymů. Tyto enzymy uvnitř nádorové buňky spustí apoptózu, což je v podstatě buněčná sebevražda. Buňka se díky ní rozpadne bezpečným a čistým způsobem, aniž by došlo k poškození okolní tkáně.

Dnes se v medicíně používá imunoterapie, která se snaží tyto T-lymfocyty znovu aktivovat nebo je v laboratoři vylepšit, aby nádor lépe nacházely. Abychom ale věděli, zda takové vylepšení funguje, provádíme cytotoxickou assay. To je experiment, při kterém ve sterilním prostředí (v misce nebo destičce) smícháme T-lymfocyty s nádorovými buňkami a sledujeme, co se stane. Důležitým ukazatelem, že jsou T-lymfocyty připravené k akci,

Nádorová imunita

KDYŽ OBRANA
PŘECHÁZÍ DO ÚTOKU

je produkce interferonu gama (IFN γ). Je to signální molekula, kterou T-lymfocyty vypouštějí, když rozpoznají nepřítele. Tento protein nejen přímo brzdí růst nádoru, ale také dává ostatním složkám imunity vědět, kde se problém nachází. Abychom dokázali přesně změřit, kolik tohoto důležitého proteinu T-lymfocyty vyprodukovaly, využíváme metodu ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Tato technika funguje na principu „zámku a klíče“, kdy specifické protilátky v laboratorní destičce vyhledají a pevně zachytí molekuly IFN γ ve vzorku. Následná enzymatická reakce způsobí barevnou změnu roztoku, jejíž intenzita přesně odpovídá množství vyprodukovaného interferonu. Zatímco tedy pod mikroskopem vidíme samotný proces zabíjení nádorových buněk, metoda ELISA nám poskytuje exaktní biochemický důkaz o síle a aktivitě imunitní odpovědi.

Slovníček odborných pojmů

- Antigen: Specifická bílkovina na povrchu buňky, kterou imunitní systém identifikuje.
- Cytokin: Signální protein (např. IFN γ) sloužící k regulaci imunitní odpovědi.
- Glioblastom: Velmi agresivní nádor mozku, v našem experimentu reprezentovaný linií U373.
- In vitro: Experimentální postupy probíhající v laboratorním prostředí mimo živý organismus.
- Lýza: Proces nezvratného poškození a rozpadu buněčné membrány.
- Stroma: Podpůrná tkáň nádoru, která mu poskytuje ochranu a živiny.

Otázky pro zamyšlení k úvodní diskuzi:

1. Jaké překážky (např. v mozku) musí T-lymfocyt překonat při cestě k nádoru v organismu pacienta, které v naší laboratorní destičce nemusí řešit?

Hematoencefalickou bariéru („dvojitá“)

2. IFN- γ je klíčový aktivátor imunity. Jaké důsledky by však mohla mít jeho nekontrolovaná produkce v celém těle pacienta?

Mohl by ničit i ostatní buňky (včetně těch imunitních) a napáchat škody v těle

3. Proč je při přípravě cytotoxické assaye kritické dodržet přesnou koncentraci buněk a metodu sériového ředění?

Přesná koncentrace buněk zajišťuje stejné podmínky pro všechny vzorky a sériové ředění umožňuje správně určit účinek různých koncentrací látky. Obě věci jsou nutné pro přesné vyhodnocení cytotoxicity.

Nádorová imunita

KDYŽ OBRANA
PŘECHÁZÍ DO ÚTOKU

Zadání:

AKTIVITA 1: PŘÍPRAVA ELITNÍCH JEDNOTEK (POČÍTÁNÍ BUNĚK)

Než vyrazíme do boje, musíme přesně vědět, kolik „bojovníků“ (T-lymfocytů) máme k dispozici.

Postup:

1. Prohlédněte si buňky pod mikroskopem.
2. Smíchejte 10 μ l suspenze buněk s 10 μ l trypanové modři.
3. Spočítejte buňky pomocí automatického počítadla.
4. **Princip:** Živé buňky mají neporušenou membránu a zůstanou světlé. Mrtvé buňky se obarví tmavě modře.

Naměřená hodnota	Výsledek
Koncentrace (počet buněk/ml)	$4,05 \times 10^6$ $3,24 \times 10^5$
Viabilita (% živých buněk)	83% 77%

Otázka 1: Pokud v počítadle uvidíte buňku, která je celá modrá, co to o ní vypovídá?

Buňka je mrtvá

Otázka 2: Proč je při přípravě experimentu kritické dodržet přesnou koncentraci buněk?

Aby mohl být experiment replikovaný i při dalších experimentech

AKTIVITA 2: VÝCVIK PŘESNOSTI (SÉRIOVÉ ŘEDĚNÍ)

Abychom zjistili, jaká „přesila“ T-lymfocytů je potřeba k porážce nádoru, musíme připravit různé koncentrace (poměr E:T – Effector to Target).

Postup: Pro přípravu sériového ředění si nejprve nachystejte zkumavky S1-S4 s 500 μ l roztoku. V každém kroku přeneste 500 μ l T-lymfocytů do další zkumavky a promíchejte.

Otázka: Proč to děláme takto? (Otázka k zamyšlení: Proč nepřipravujeme každou zkumavku zvlášť?)

Abychom použili správnou koncentraci proti glioblastomům

AKTIVITA 3: SLEDOVÁNÍ BOJE V PŘÍMÉM PŘENOSU (CYTOTOXICITA)

Nyní smícháme T-lymfocyty s nádorovými buňkami glioblastomu (U373), které svítí zeleně (GFP).

Jak poznáme vítězství?

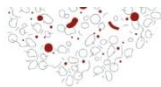
- Do směsi přidáme barvivo Propidium Jodid (PI).
PI vnikne pouze do buněk s narušenou membránou a obarví jejich jádro červeně.

Doplňte barvy podle stavu buňky:

- Živá nádorová buňka = zelená
- Mrtvá (poražená) nádorová buňka = červená

Otázka: Jak poznáme v reálném čase, že T-buňka úspěšně zlikvidovala buňku glioblastomu?

Shluk T-buněk se rozplyne po zlikvidování glioblastomu a glioblastom (mrtvý) je obarven červeně



Nádorová imunita

KDYŽ OBRANA
PŘECHÁZÍ DO ÚTOKU



Zadání:

AKTIVITA 4: BIOCHEMICKÝ DŮKAZ (METODA ELISA)

T-lymfocyty při boji vypouštějí signální molekulu – interferon gama (IFN γ). Metoda ELISA nám ho pomůže změřit na principu „zámku a klíče“.

Otázka 1: Co je ELISA a k čemu se používá?

Imunometoda, která zjišťuje, jestli jsou ve vzorku dané antigeny – využívá se pro svou citlivost a specifitu

Otázka 2: Co je antigen a co je protilátka?

Antigen – specifická bílkovina na povrchu buňky, kterou imunitní systém rozpozná jako cizí

Protilátka – protein, který se naváže na antigen a snaží se ho zneškodnit

Otázka 3: Proč je ELISA vhodná metoda pro měření IFN- γ v buněčných kulturách?

Jelikož dokáže dobře detekovat i velmi malé množství IFN- γ

Seřaďte kroky experimentu (1-4):

(4) Přidání substrátu (TMB) – pokud je IFN- γ přítomen, roztok zmodrá.

(1) Navázání antigenu IFN- γ na dno jamky.

(3) Přidání sekundární protilátky s enzymem (HRP).

(2) Přidání primární protilátky, která specificky vyhledá IFN- γ .

Reflexe:

A ZPĚTNÁ VAZBA

ZÁVĚREČNÁ REFLEXE:

Zamyslete se sami a/nebo s kamarádem a napište nebo nakreslete, co se Vám na dnešním workshopu líbilo, co Vás zaujalo nebo překvapilo.

- Slečny se nám hezky věnovaly, vše hezky vysvětlily. Porozuměla jsem více nádorovým buňkám a jejich vzniku/vývoji a jak ovlivňují celý organismus. + zlepšení pipetování
- Jak všechno srozumitelně vysvětlily, ukázali jak se co dělá, a pak si to vyzkoušeli my, že jsme tam jenom neseděli, ale i si to mohli zkusit, co třeba dělají přes den oni (např. to počítání buněk atd.)
- Na výletě do ústavu pro výzkum rakoviny se mi nejvíce líbila práce v laboratořích. Zajímavé bylo hlavně vyzkoušet si metodu ELISA a pozorovat buňky pod mikroskopem. Bavilo mě, že jsme si mohli některé věci sami prakticky vyzkoušet a vidět, jak pracují skuteční vědci. Celý program byl poučný i zábavný.
- Tento workshop byl velmi dobře vymyšlený, mohli jsme pracovat s pomůckami, ke kterým bychom se jinak vůbec nedostali a mohli přímo nahlédnout k práci profesionálů. Dozvěděli jsme se toho hodně jak v teorii tak i v praxi.