

BIOLOGIA KOMÓRKI

WZROST KLONALNY KOMÓREK ZWIERZĘCYCH

Wstęp

Większość prawidłowych komórek zwierzęcych hodowanych *in vitro* podejmuje syntezę DNA i proliferację tylko po przyczepieniu się do podłoża. Zjawisko to określane jest jako **zależność wzrostu od przyczepienia** (*ang. anchorage dependence of growth*). Komórki wykazujące taką właściwość, hodowane w warunkach braku kontaktu z podłożem nie syntetyzują DNA i pozostają zatrzymane w fazie G1 cyklu komórkowego.

Zależności wzrostu od przyczepienia do podłoża a nie wykazuje większość komórek nowotworowych. Komórki te, zdolne do wzrostu w zawieszynie lub na podłożach półpłynnych, charakteryzuje zmieniona architektura cytoszkieletu aktynowego. Ich oderwanie od podłoża często nie prowadzi do zahamowania proliferacji.

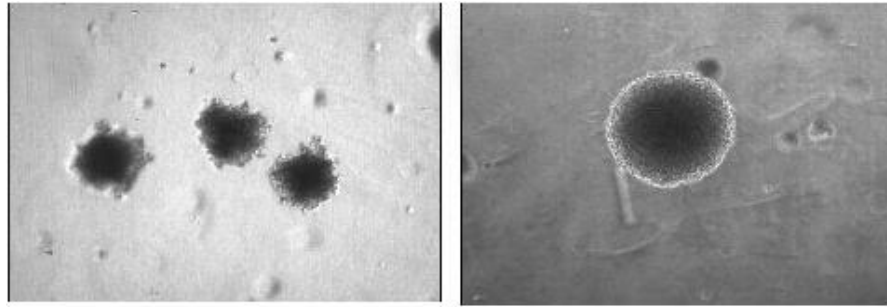
Pożywki stosowane do hodowli komórek w oderwaniu od podłoża, obok standardowych składników stosowanych dla kultur komórkowych, zawierają czynnik żelujący w postaci agaru, agarozy lub metylocelulozy. W wyniku zastosowania tych czynników medium hodowlane staje się półpłynne. W takich warunkach komórki nie opadają na dno naczynia hodowlanego, a w wyniku częściowego unieruchomienia nie mają możliwości tworzenia agregatów z komórkami sąsiednimi. Jeśli w takich warunkach komórka podejmuje proliferację, to wynikiem tego jest powstanie łatwo rozpoznawalnego klonu komórek powstałych z podziałów jednej komórki wyjściowej.

Czynniki kontrolujące zdolność komórek nowotworowych do formowania koloni w pożywkach półpłynnych są do dzisiaj nie do końca poznane. Ponieważ jednak wzrost w półpłynnych pożywkach stanowi prostą w obserwacji fenotypową właściwość komórek transformowanych nowotworowo, zjawisko to jest często wykorzystywane w testach obecności komórek nowotworowych w krótkoterminowych hodowlach ludzkich komórek oraz w badaniach stopnia ich inwazyjności. Dodatkową zaletą omawianej techniki jest łatwość uzyskania pojedynczych klonów, które następnie mogą być izolowane i poddane dalszej hodowli. Służy to badaniu heterogenności populacji komórek nowotworowych i znajduje zastosowanie w analizie wrażliwości nowotworów na różne terapie lecznicze.

Opracowano różnorodne techniki hodowli komórek na podłożach półpłynnych. Jedną z nich opiera się na zastosowaniu dwóch warstw agaru. W pierwszej kolejności na dno szalki Petriego wylewa się warstwę podstawową powstałą przez zmieszanie agaru (temp. ok. 45°C) z medium hodowlanym. Proporcje dobrane są w taki sposób, aby stężenie agaru wynosiło około 0.5%. Po schłodzeniu do temperatury ok. 37°C warstwa ta traci właściwości płynu. Warstwa podstawowa z jednej strony stanowi źródło składników odżywczych wspomagających wzrost komórek, z drugiej – uniemożliwia komórkom adhezję do dna naczynia hodowlanego. Na stężoną warstwę podstawową wylewa się właściwą warstwę półpłynnego agaru w płynie hodowlanym (0.3%) zawierającego komórki. Ilość komórek, które się wysiewa zależy od użytej linii i waha się ona w granicach $10^1 - 10^5$ komórek/ml. Hodowle umieszcza się w cieplarni i inkubuje od kilku do kilkunastu dni. Gdy kolonie komórek stają się widoczne pod mikroskopem (składają się z kilkuset komórek, Rys.1), przenosi się je za pomocą cienkiej pipety do nowego naczynia hodowlanego zawierającego świeżą pożywkę. Komórki delikatnie się rozpipetowuje i dalej namnaża.

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest założenie półpłynnej hodowli komórek szczurzego mięsaka XC, a następnie obserwacja powstałych koloni.



Rys 1. Kolonie transformowanych nowotworowo komórek NIH3T3 hodowane w agarze.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Przygotować 30 ml 0.5% agaru w płynie hodowlanym. Do ciepłego (ok. 40 °C) płynu hodowlanego MEM z 5% FBS dodać (jałowo!!) odpowiednią ilość gorącego (prosto z łaźni wodnej) 2.5% agaru. Po wymieszaniu wylać roztwór na 3 szalki Petriego. Pozostałą część roztworu umieścić w łaźni wodnej. Szalki pozostawić do czasu zestalenia się agaru.
2. Wykonać pasaż komórek XC:
 - a. zlać z naczynia płyn hodowlany, po czym natychmiast delikatnie zalać komórki ok. 2 ml roztworu PBS (37 °C), przepłukać, roztwór usunąć;
 - b. szybko zalać komórki ok. 0,5 ml roztworu 0.25% trypsyny (37 °C) na ok. 1-2 minuty, komórki inkubować w obecności trypsyny od 20 sekund do 2 minut, kontrolując stopień ich odrywania się od podłoża;
 - c. natychmiast po oderwaniu się komórek od podłoża zawiesić je w 2 ml pożywki hodowlanej celem inaktywacji trypsyny;
 - d. uzyskaną zawiesinę przenieść pipetą do probówki, zakręcić, wirować 5 min. przy 1000 obr./min.
 - e. komórki zawiesić w 2 ml płynu hodowlanego i policzyć w komorze Bürkera (UWAGA: komórki nie mogą być w agregatach!).
3. Do 3 probówek odpipetować odpowiednio: 10, 50 i 100 tysięcy komórek/ml, uzupełnić pożywką do 2 ml, a następnie dodać 3 ml uprzednio świeżo przygotowanego 0.5% agaru. Wymieszać i płynnym ruchem wylać na szalki z zestalonym 0.5% agarem.
4. Szalki z komórkami ostrożnie przenieść do cieplarki, inkubować 7 dni w 37°C w atmosferze 5% CO₂.
5. Policzyć liczbę koloni o średnicy większej niż 100 µm oraz wydajność klonowania (stosunek ilości koloni do ilości wysianych komórek).

Zakres materiału obowiązujący do ćwiczeń:

1. Molekularne podstawy transformacji nowotworowej i tworzenia przerzutów.
2. Hodowle komórek *in vitro*.

-
3. Oddziaływanie komórek z podłożem i sąsiednimi komórkami, wzrost komórek na podłożach stałych i półpłynnych.

Zalecana literatura:

- B. Alberts. Podstawy biologii komórki. PWN 2005. rozdz. 21.
J. Kawiak i in. Podstawy cytofizjologii. PWN 1995, rozdz. 29.
B. Alberts. Molecular Biology of the cell. Garland Science 2002, rozdz. 23.