

**ODDĚLENÍ CYTOKINETIKY
BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV, AV ČR, v.v.i.**

Vedoucí: doc. RNDr. Alois Kozubík, CSc.

Vedoucí skupinek:

Doc. RNDr. Jiřina Hofmanová, CSc.

Mgr. Karel Souček, Ph.D..

RNDr. Jan Vondráček, Ph.D.

RNDr. Alena Vaculová, Ph.D.

<http://www.ibp.cz/labs/LC/>



P1220013.JPG

Laboratory
of **cytokinetics**

**Institute of Biophysics, Brno
Academy of Sciences
Czech Republic**

**Oddělení živočišné fyziologie a imunologie
Ústav experimentální biologie, PŘF MU**

**Možnosti vypracovávání bakalářských a diplomových prací
Postgraduální studium**

Scientific interests:

- ▶ Lipid dietary compounds in regulation of cytokinetics
- ▶ Growth regulators in cancer cell signalling
- ▶ Interaction of lipids and cytokines
- ▶ Effects of anticancer drugs
- ▶ Molecular and cellular mechanisms of toxicity of organic compounds

VÝZKUM V LABORATOŘI CYTOKINETIKY BFÚ AV ČR

je zaměřen zejména na přenos buněčných signálů a patofyziologické změny vztahující se k **nádorovým onemocněním** (zejména kolonu a prostaty) v kontextu mechanismů působení

- ▶ **lipidových složek výživy** (esenciální vysoce nenasycené mastné kyseliny - VNMK, butyrát z vlákniny)
- ▶ **endogenních regulátorů růstu, diferenciaci a apoptózy** (rodina tumor necrosis factor – TNF zejména TRAIL, tumor growth factor beta (TGF), fibroblast growth factor (FGF) a signální dráha Wnt/beta katenin)
- ▶ **environmentálních chemických org. látek** (PAH, PCB, dioxiny)
- ▶ **vybraných protinádorových léčiv** (deriváty platiny)

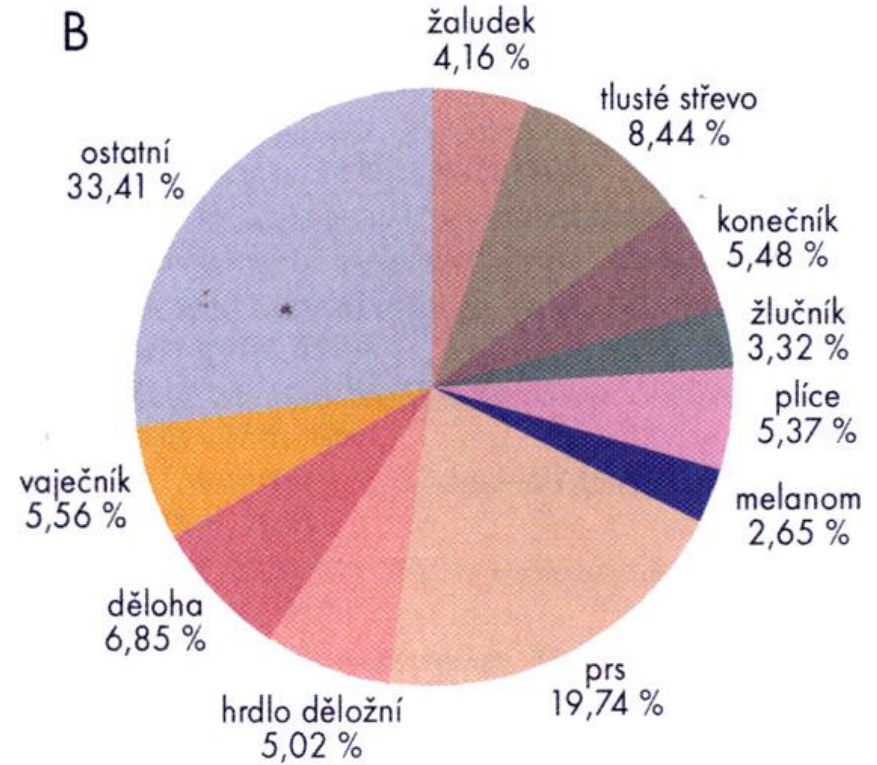
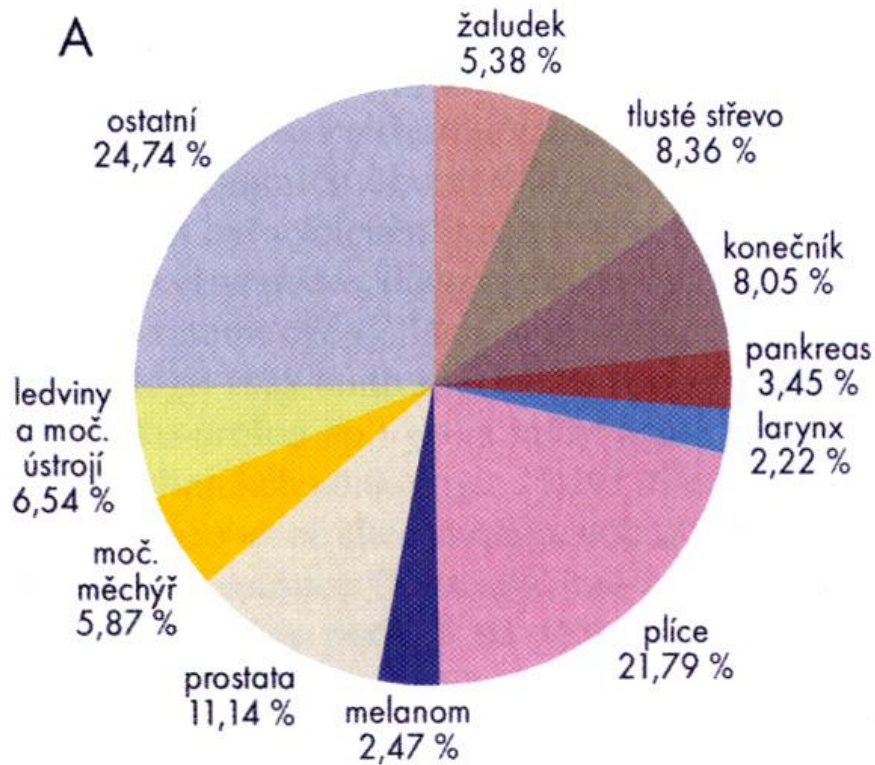
Jsou zkoumány

- ▶ procesy vedoucí ke **změnám regulace buněčné kinetiky** (proliferace, diferenciace, apoptózy) **a komunikace**
- ▶ důsledky **interakce vybraných faktorů** (VNMK a butyrát, VNMK a TRAIL, TRAIL a cytostatika, PAH a TNF)
- ▶ rozdíly v odpovědi **nádorových a nenádorových buňčných populací**

Získané výsledky mají význam jak pro obecné studium **procesu karcinogeneze** (genotoxické i negenotoxické mechanismy)

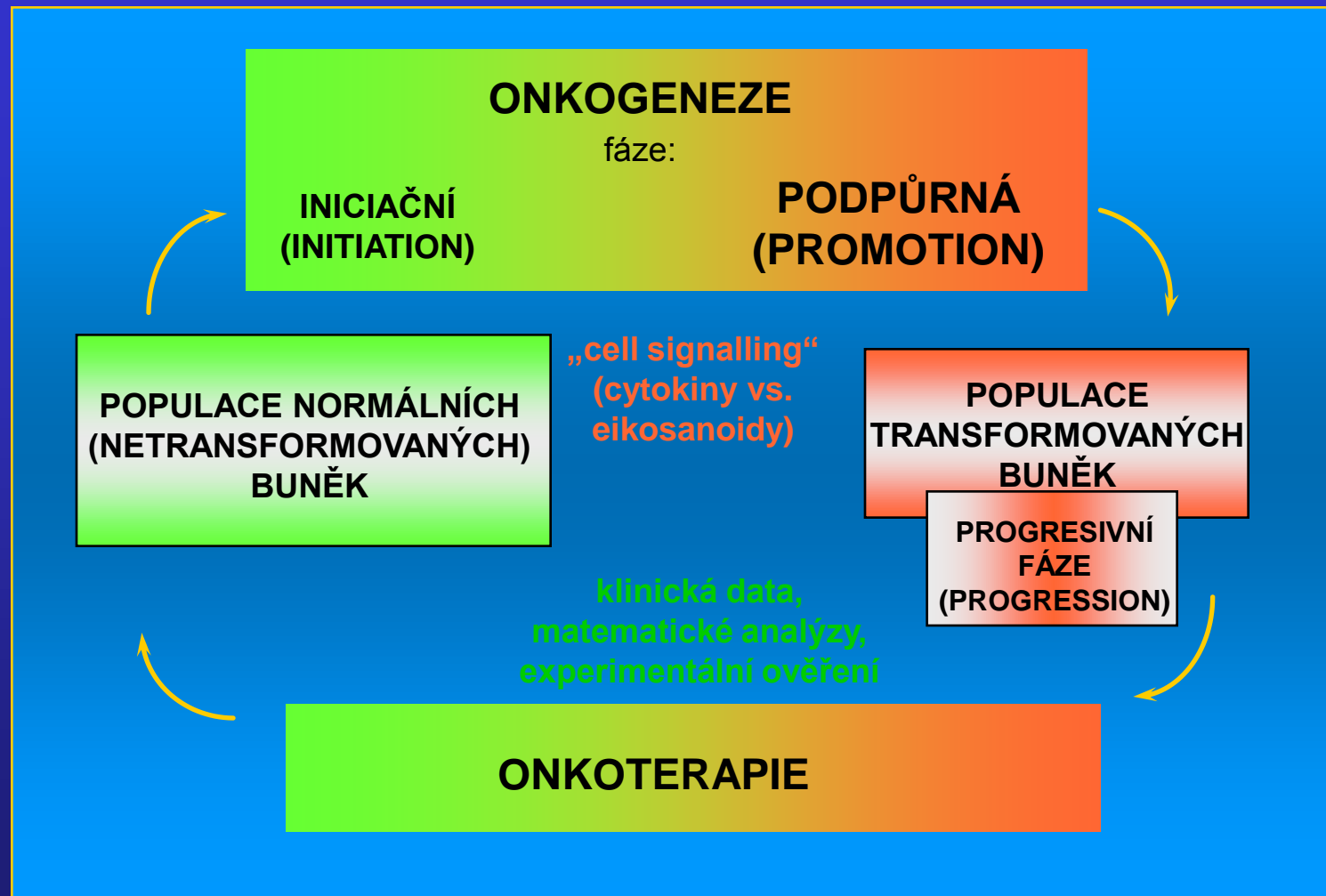
tak pro oblast **(eko)toxikologie**, **nádorové prevence** a hledání **nových protinádorových terapeutických postupů**.

Poznatky o úloze specifických lipidových složek výživy mohou být podkladem pro **optimalizaci lipidové výživy** (oblast prevence a podpůrné terapie) ve spolupráci s klinickými pracovišti a výrobní sférou.



Struktura hlášených onemocnění novotvary bez dg. C44. A – muži; B – ženy (podle ÚZIS)

VÝZKUMNÉ CÍLE A OBLASTI PRAKTICKÉHO VYUŽITÍ



<http://www.ibp.cz/labs/LFRP/>

Department of Free Radical Pathophysiology

Head of the department:

Antonín Lojek

Scientific interest:

Modulation of mechanisms leading to the generation of reactive oxygen and nitrogen metabolites by phagocytes

Effects of polyunsaturated fatty acids and products of their peroxidation on the metabolic activity of phagocytes

Mutual interactions of phagocytes with other cell types and extracellular matrix components

Antioxidative properties of body fluids, drugs and natural compounds

Role of myeloperoxidase in the regulation of vascular physiology

Redox regulation of intracellular signaling

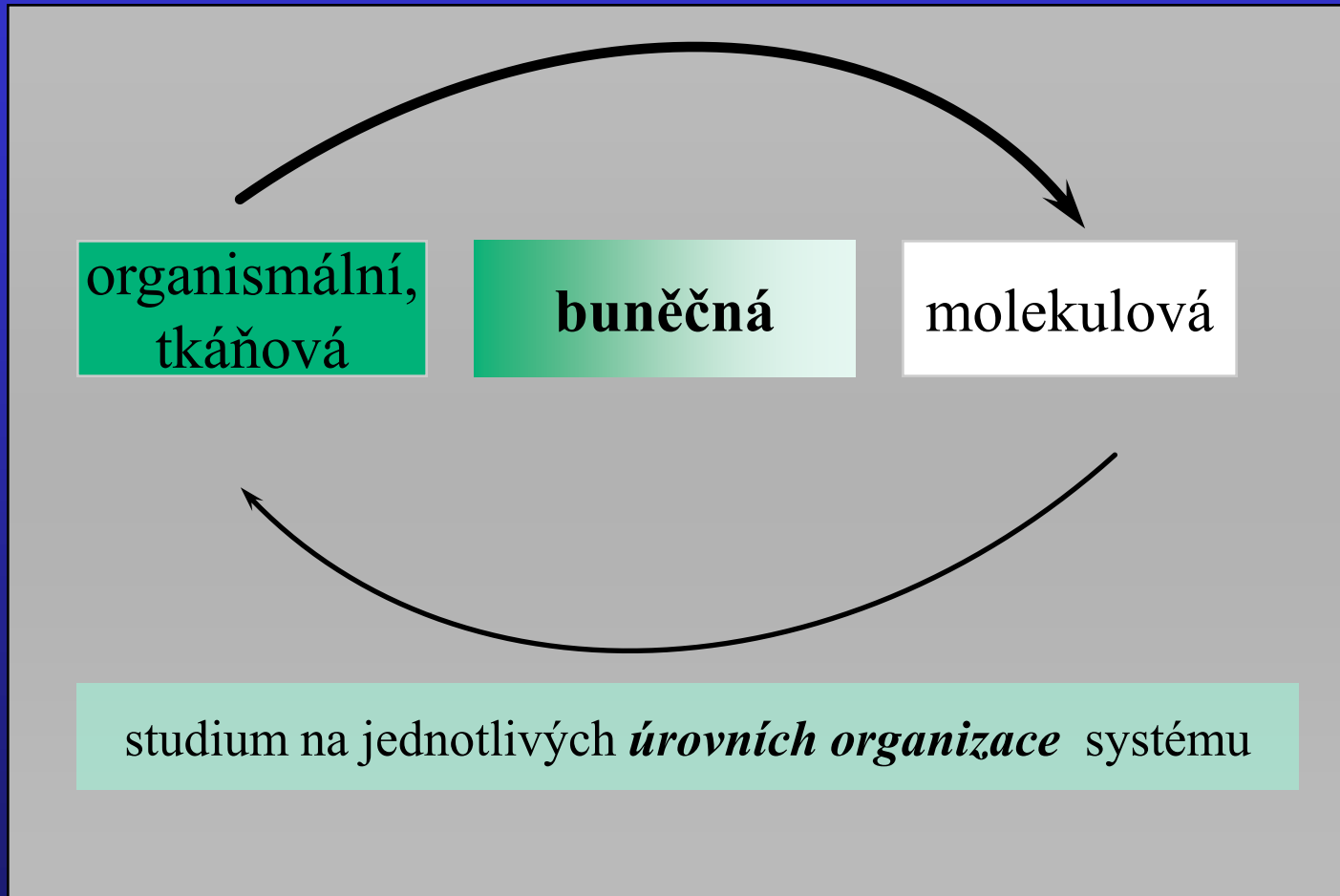
Role of NADPH oxidases in the physiology of non-phagocytic cells

Oddělení cytokinetiky BFÚ
(hlavní oblasti výzkumu
a odborného směřování)

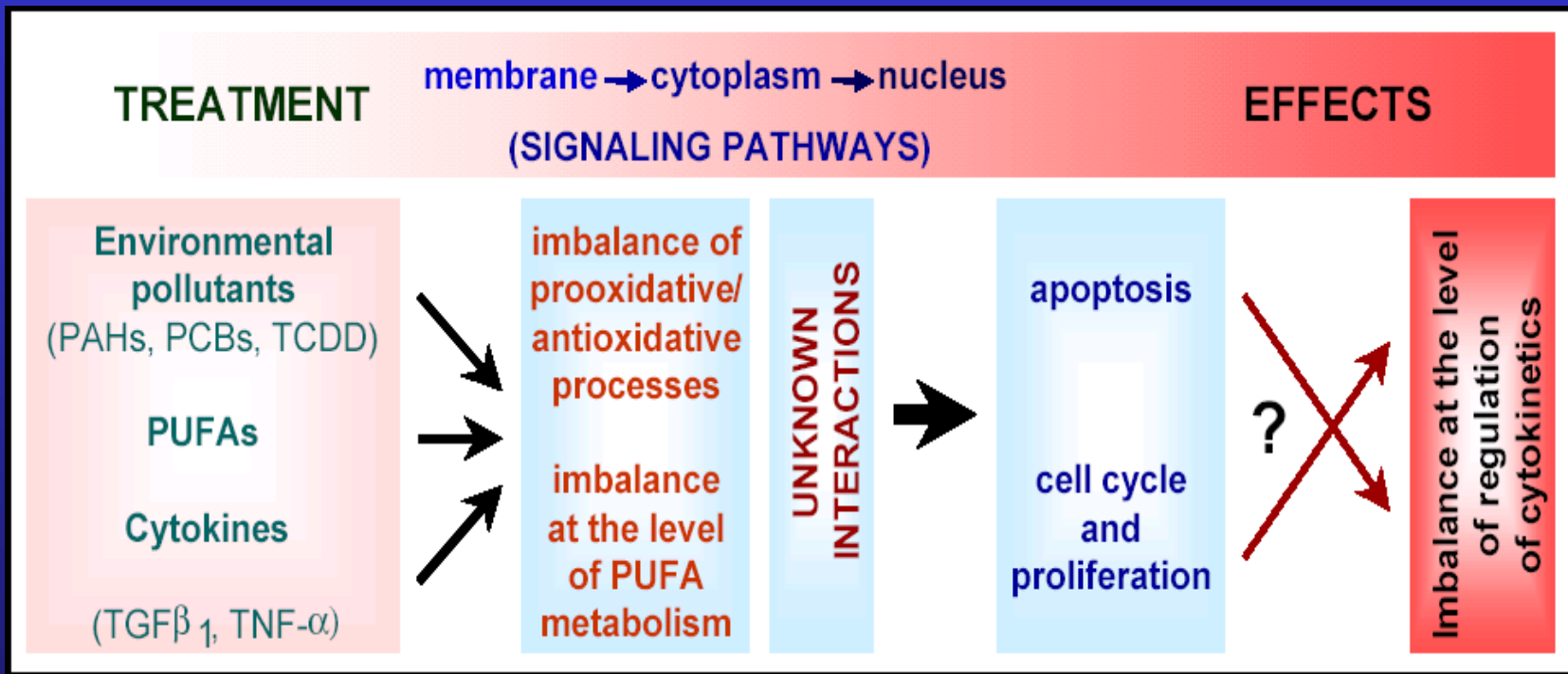


Používané modely a metodický potenciál

Komplexní povaha biologických systémů vyžaduje komplexní přístupy k jejich studiu



Obecné schéma působení studovaných látek a jejich dopad

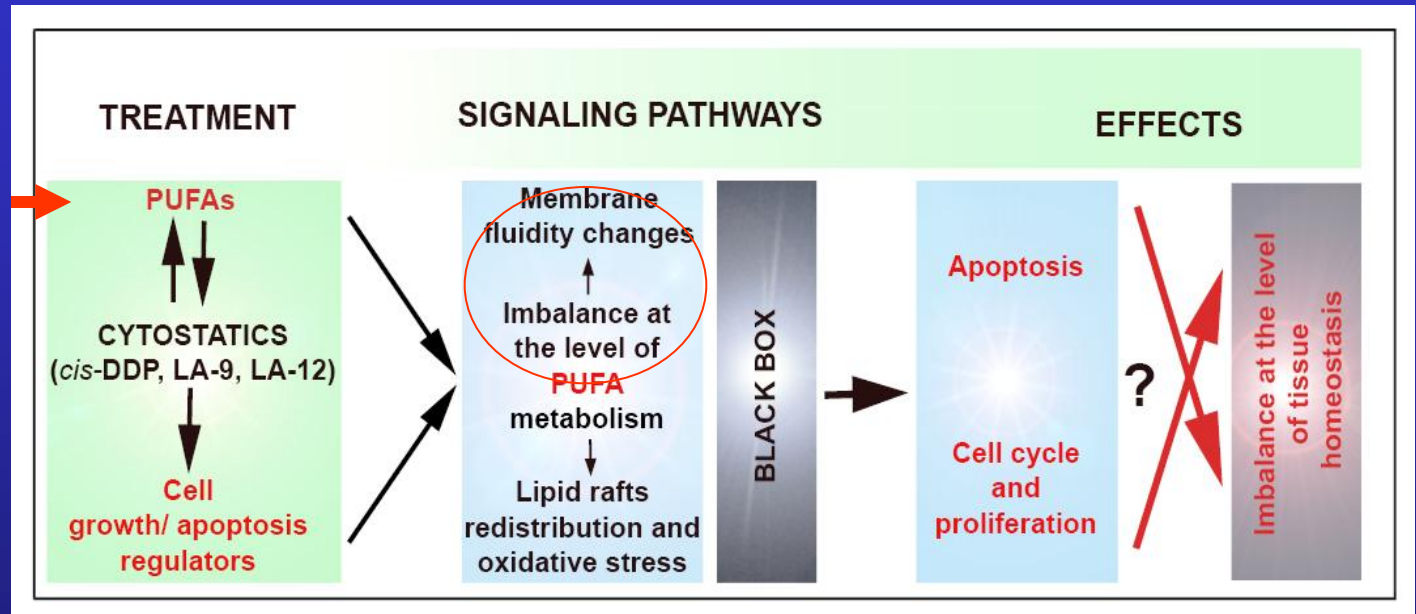


Targeted modulation of phospholipid metabolism, (e.g. based on lipid nutr.) might be a possible innovative strategy leading to increasing of Pt-based cytotoxicity.

Increasing of therapeutic effects ? →

Lipid nutrition of appropriate composition

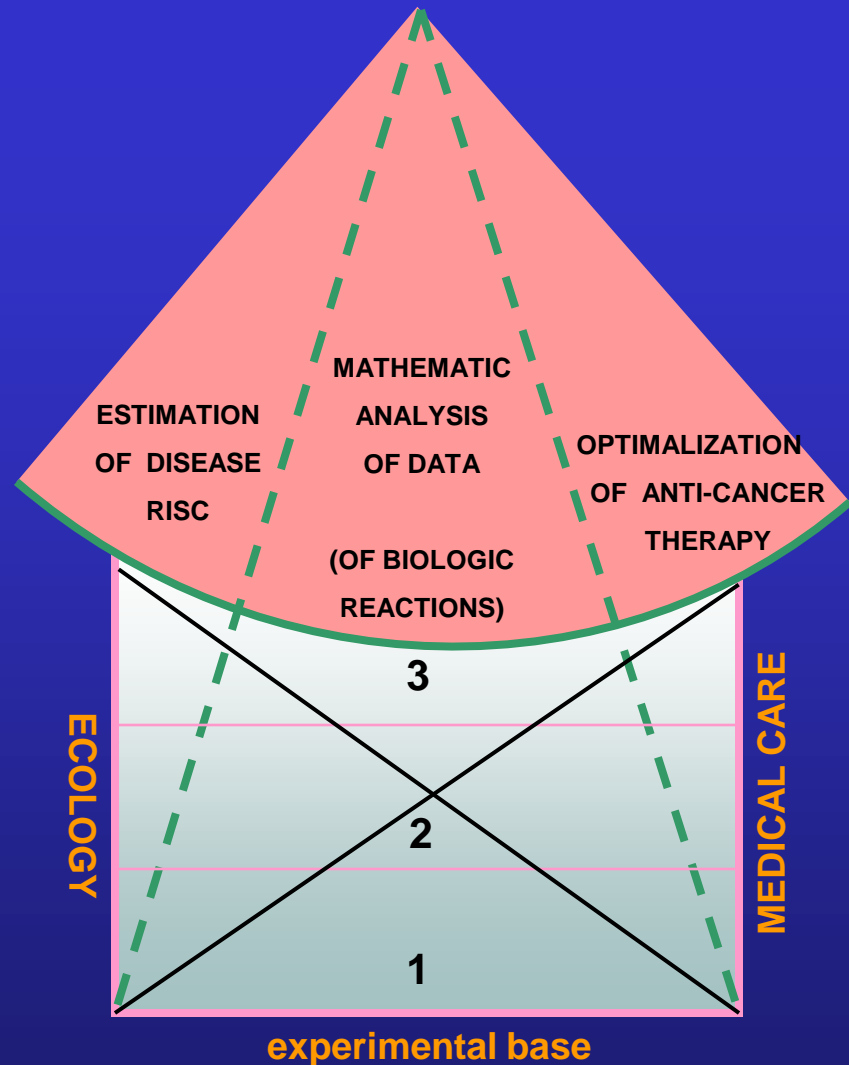
Combined Treatment with



TOXICOLOGY



ECOTOXICOLOGY ←



REGULATION OF CELL KINETICS
(PROLIFERATION, DIFFERENTIATION, APOPTOSIS)

- 1 - molecular level
- 2 - cellular level
- 3 - systemic level (organism, population, ecosystem)

**„Multifaktoriální povaha“
odpovědi
biologických (živých) systémů**

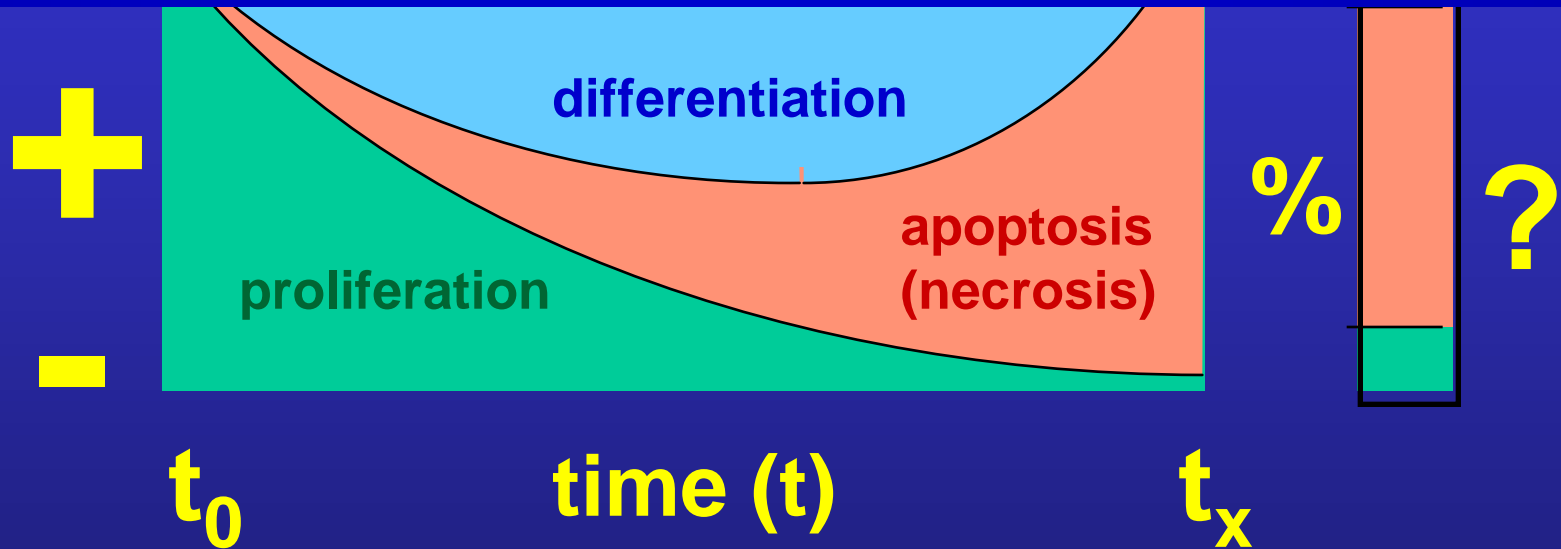
**na působení přirozených regulátorů „růstu“
(toxických látek, farmak)**



Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

Základní přístup k postižení cytokinetiky: detekce hlavních parametrů (dynamiky)

a jejich *ronováhy/nerovnováhy* v čase



Vhodnost volby modelu

Studie *in vivo*

– poskytují informaci o celkové (systémové) odpovědi organismu, relativně méně vhodné ke studiu mechanismu účinků na subbuněčné úrovni

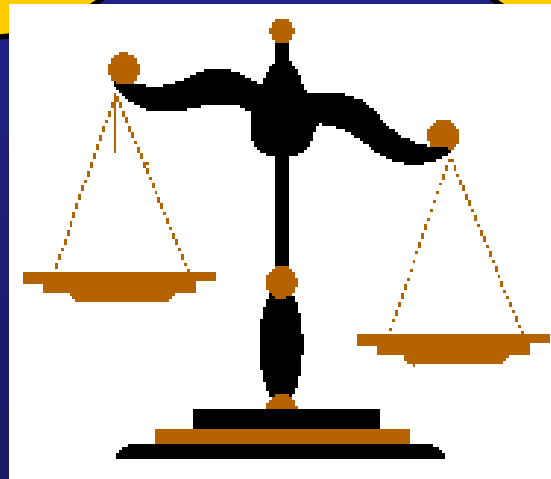
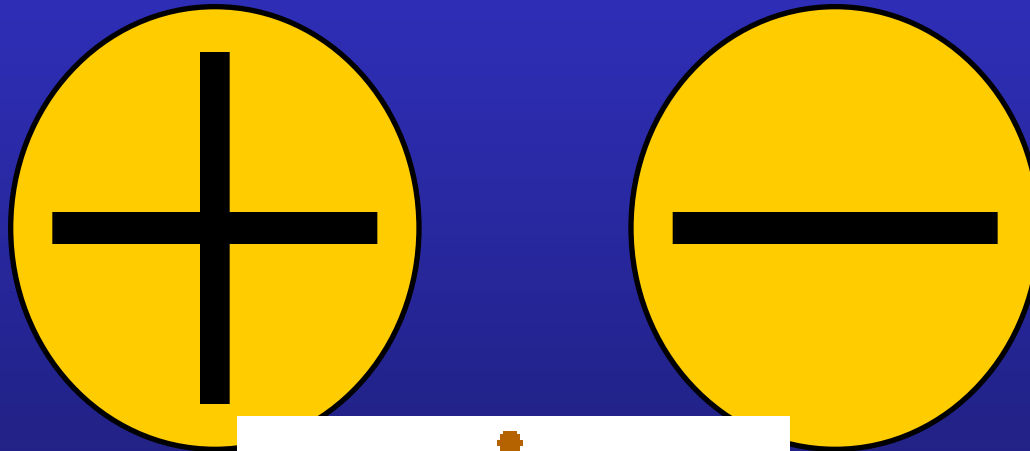
Studie *in vitro*

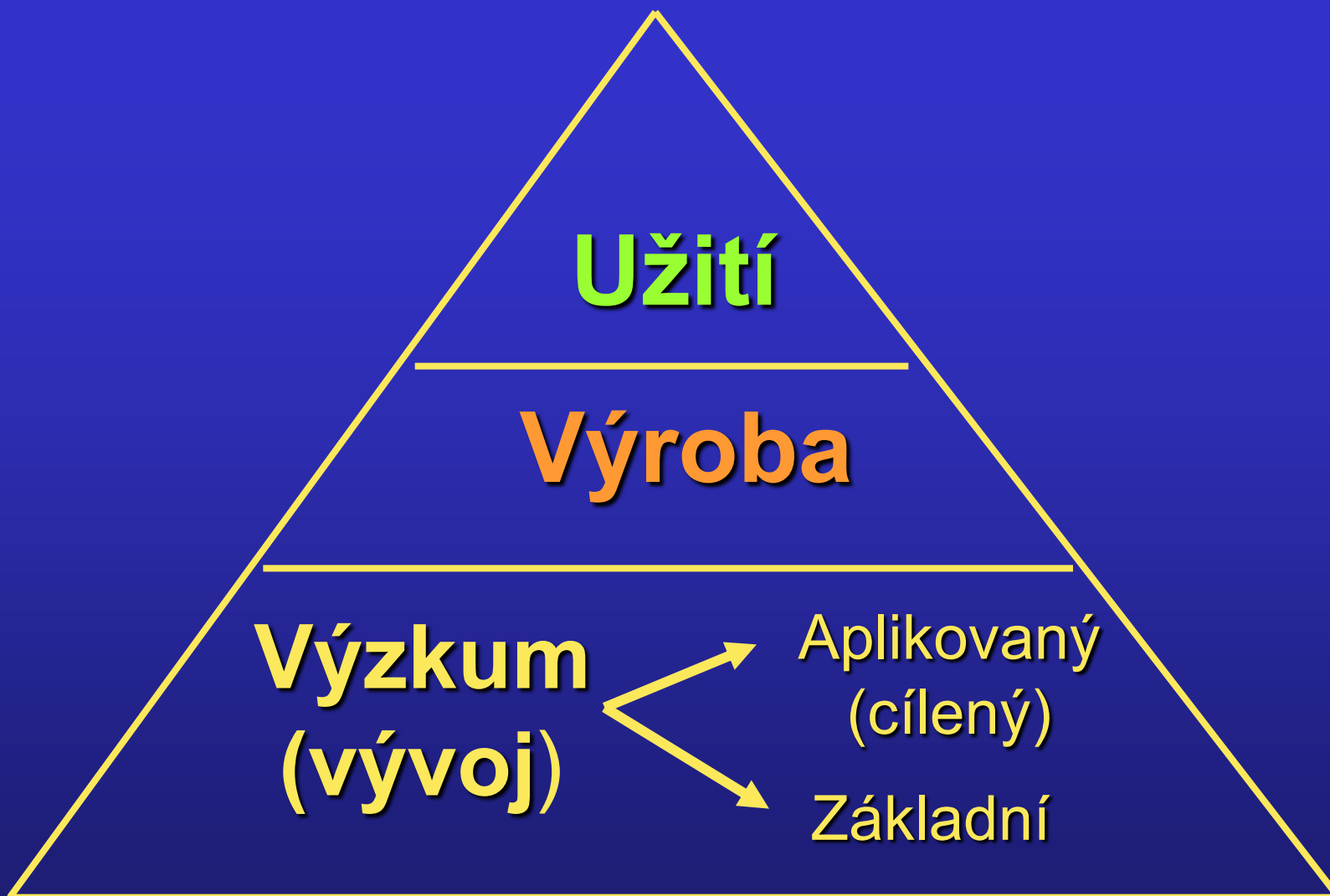
- nelze z nich mechanicky zobecňovat závěry pro systémy *in vivo* (chybí zapojení vyšších regulačních systémů), ideální pro studium mechanismů účinků na subbuněčné úrovni

ROVNOVÁHA – HOMEOSTÁZA

Je výsledkem mnoha zpětnovazebných účinků

Poruchy vedou k patofyziologickým stavům vč nádorového onemocnění





Snaha o naplnění cyklu
a důsledky pro finanční zajištění

Používané metody a metodický potenciál (východiska)

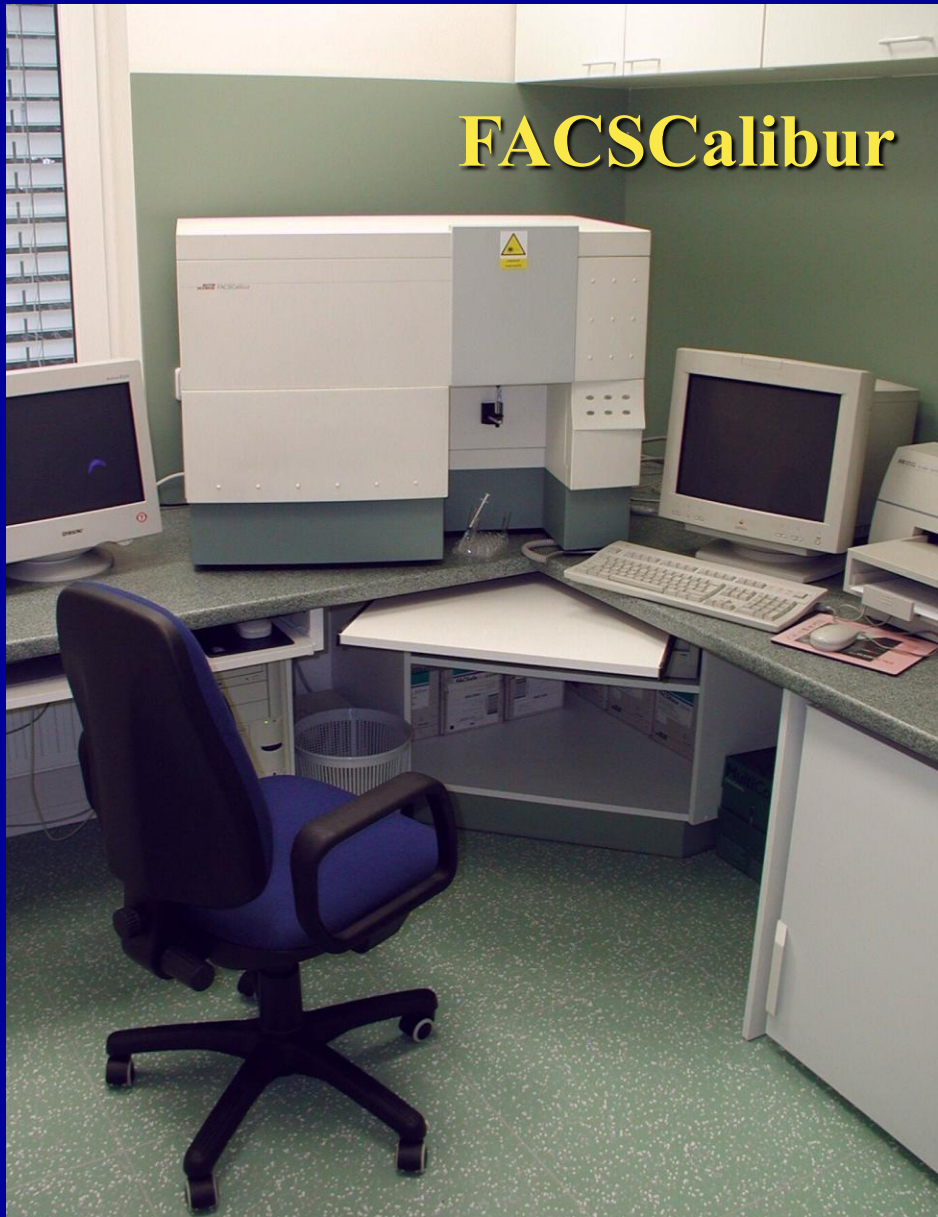


Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

Zavedené modely a vybrané metodické možnosti (v kooperaci)

Modely	Studované parametry a metodické přístupy
<p style="text-align: center;">Buňky <i>in vitro</i></p> <p>Buněčné linie <i>in vitro</i> odvozené od různých typů <u>nádorových i nenádorových tkání</u>:</p> <ul style="list-style-type: none">• krvetočrnné (HL-60, U937, lidské promyelocytární linie)• střevní epitel (linie lidského adenokarcinomu kolonu HT-29, embryonální linie FHC)• jaterní tkáň (myši Hepa 1, nádorové krysí buňky WB-F344) <p><u>Fagocyty a lymfocyty</u>:</p> <ul style="list-style-type: none">• izolované z krve myši a zdravých lidských dobrovolníků• buněčná linie myších peritoneálních makrofágů RAW 264	<p>ÚROVEŇ BUNĚČNÁ</p> <p>Oxidační a antioxidační vlastnosti emulzí, změny spekter buněčných lipidů a mastných kyselin (<u>HPLC</u>, plynová <u>chromatografie</u>)</p> <p>Produkce superoxidového aniontu, peroxidu vodíku, hydroxylového radikálu, oxidu dusnatého a působení na PUFA, lipidy a buňky (luminometrie, fotometrie, elektrochemie)</p> <p>ÚROVEŇ MOLEKULÁRNÍ A BUNĚČNÁ</p> <p>Exprese buněčných <u>receptorů</u>, <u>expres</u>e a <u>aktivita specifických kináz</u> (ERK, JNK atd.) a <u>transkripčních faktorů</u> (PPAR, NFkB.), <u>expres</u>e <u>genů</u> a <u>proteinů</u> zapojených v <u>regulaci buněčného cyklu</u> (p21, cykliny, CDK atd.), <u>apoptózy</u> (proteiny Bcl2 rodiny atd.) a buněčné <u>adheze</u> (FAK, E-catherin, integriny atd.) - detekce pomocí <u>elektroforetických metod</u>, <u>Western blottingu</u>, <u>PCR</u>, <u>fluorimetrie</u>, <u>multiparametrické flow cytometrie</u>.</p>
<p style="text-align: center;">Laboratorní myši kmenů CBA, C57B1, nebo jejich kříženci (event.lab.potkani)</p> <ul style="list-style-type: none">• <u>změny krvetvorby</u>- pokusným myším s krvetvorbou normální nebo utlumenou ionizujícím <u>zářením</u> či <u>aplikací cytostatika</u> budou podávány testované substance• <u>nádorový růst</u>- u pokusných myši s experimentálně <u>implantovaným nádorem</u> budou sledovány efekty léčby testovanými substancemi na nádorový růst• <u>zánětlivý/septický model</u>- pokusným myším bude intraperitoneálně podáván endotoxin (10 mg/kg) rozpuštěný ve fyziologickém roztoku. Současně nebo následně budou podávány také studované lipidové emulze.	<p>ÚROVEŇ buněčných POPULACÍ A TKÁNÍ</p> <p>Změny cytokinetiky (proliferace, diferenciace, apoptóza) a <u>oxidativního metabolismu</u> (<u>flow cytometrie</u>, <u>fluorimetrie</u>, <u>fluorescenční mikroskopie</u>)</p> <p>Extra- a intracelulární <u>tvorba reaktivních metabolitů kyslíku a dusíku</u> buňkami, <u>peroxidace lipidů</u> (<u>luminometrie</u>, <u>flow cytometrie</u>, <u>fotometrie</u>, <u>Western blotting</u>)</p> <p><u>Akumulace triacylglycerolů</u> v cytoplasmě buněk ovlivněných různými složkami lipidových emulzí, <u>fluidita membrán</u> (<u>HPLC</u>, <u>plynová chromatografie</u>, <u>fluorimetrie</u>)</p> <p><u>Komplexní analýza krvetvorby</u> pokusných myši - stanovení počtů jednotlivých typů buněk v periferní krvi a krvetočrnných orgánech, vyhodnocení stavu poolu progenitorových buněk pro granulocyty, makrofágy (GM-CFC) a erythrocyty (BFU- E).</p>

FACSCalibur

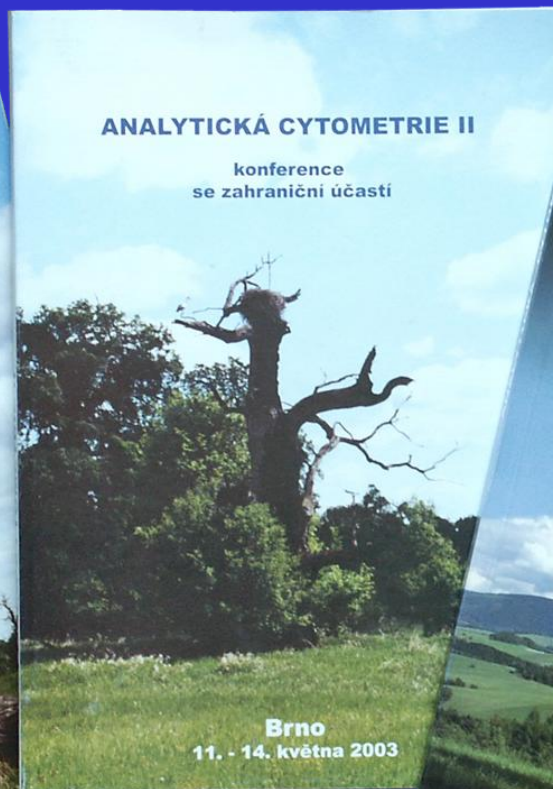
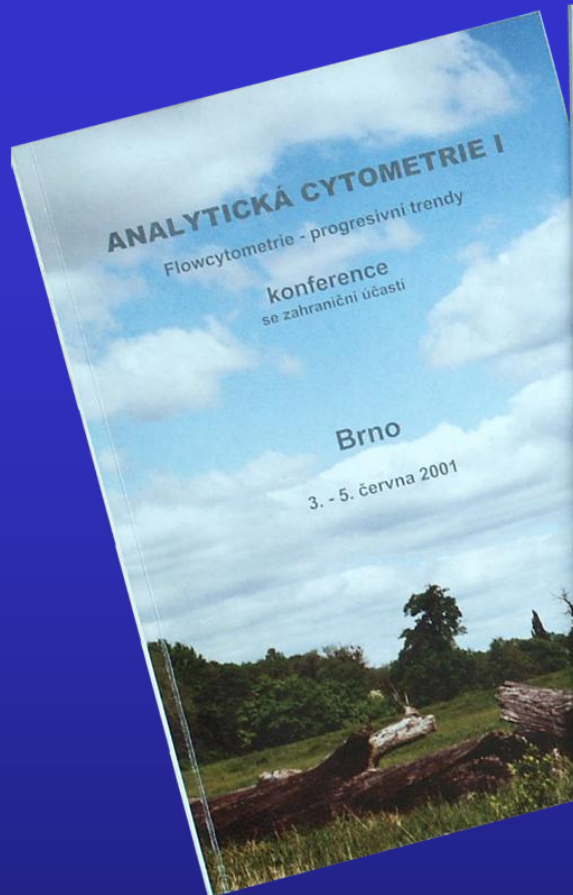


Flow cytometrie:

**jedna z hlavních
používaných
metodologií**

**Laboratory
of cytokinetics**

**Institute of Biophysics, Brno
Academy of Sciences
Czech Republic**



Registrovaní
účastníci:

65

137

180

Zvaní zahraniční
odborníci:

0

3

7

(Angl.)

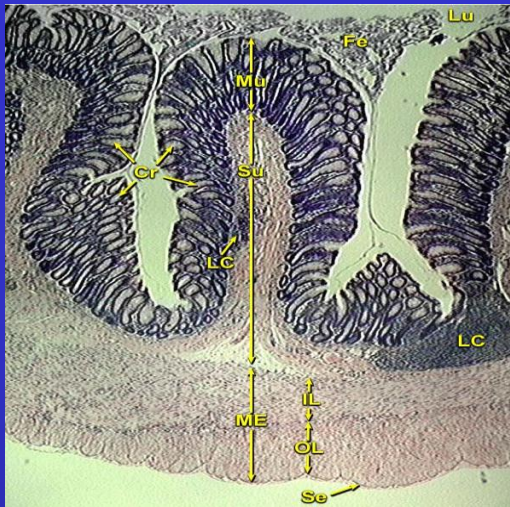
Výzkum mechanismů působení VNMK (omega-3 a omega-6) a butyrátu (NaBt) a navíc

- ▶ jejich vzájemné interakce
- ▶ interakce s endogenními regulátory růstu, diferenciace a apoptózy (cytokiny, růstové faktory, induktory apoptózy - zejména vliv na cytokinetiku, odhalování mechanismů) - terapeutické aplikace, lipidové výživy

Cílem je prohloubit poznání a nově definovat úlohu látek lipidové povahy zejména VNMK a jejich derivátů v mezi- a vnitrobuněčných komunikacích podílejících se na regulaci buněčného dělení, diferenciace a apoptózy – úloha v karcinogenezi (kolon, prostata)

Potenciální preventivní působení a terapeutické aplikace (výživa – funkční potraviny, disease-specific nutrition)

Epitel tlustého střeva



◆ kontinuálně se obnovující tkáň s řadou kritických fyziologických funkcí v organismu

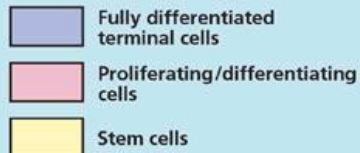
◆ dynamická rovnováha mezi přírůstkem buněk na bázi a úbytkem buněk na povrchu střevních krypt

DIFFERENTIATION



PROLIFERATION

APOPTOSIS (anoikis)



APOPTOSIS

(damaged cells)



REPLICATION STAGES



Endogenní regulátory

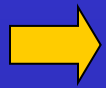
+

Exogenní dietetické faktory

◆ přesně regulována endogenními faktory (hormony a cytokiny), ale může být rovněž modulována dietetickými faktory přítomnými v lumen střeva

TUKY a VLÁKNINA

Nejen zdroj energie!!!

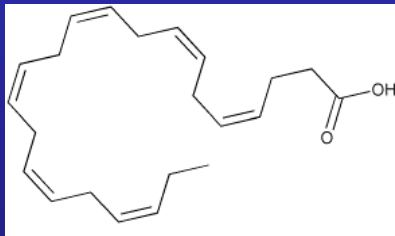


Důležitá strukturální a regulační funkce s dopadem na strukturu a funkce membrán a fyziologické funkce organismu

Patofyziologické podmínky - artherosclerosis, zánět, nádory

Esenciální polynenasycené mastné kyseliny

omega-3 (k. α -linolenová)



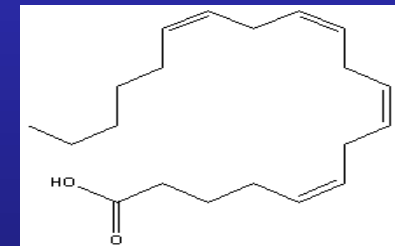
DHA
(22:6)

k. dokosaheptaenová
rybí olej

prekurzory

důležitý
poměr

omega-6 (k. linoleová)



AA
(20:4)

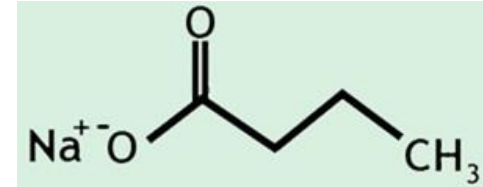
k. arachidonová
rostlinné oleje





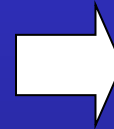
Psyllium

Butyrát sodný



- vzniká anaerobní mikrobiální fermentací vlákniny ve střevě

Specifické působení na



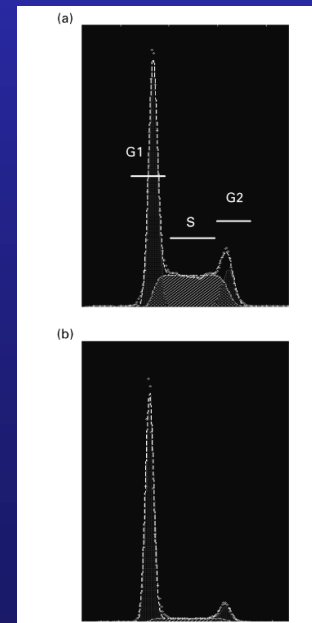
Nádorové buňky kolonu



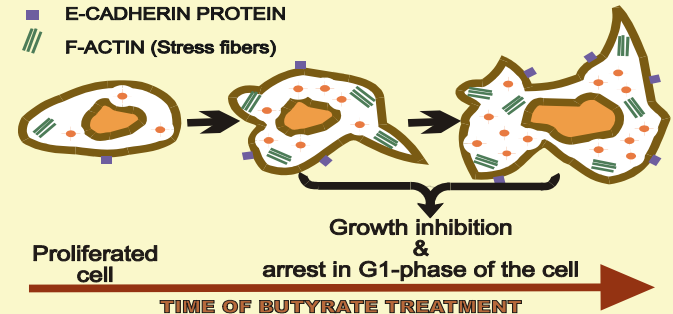
Normální kolonocyty

- Zdroj energie
- zvýšená proliferace
- pokles v apoptóza

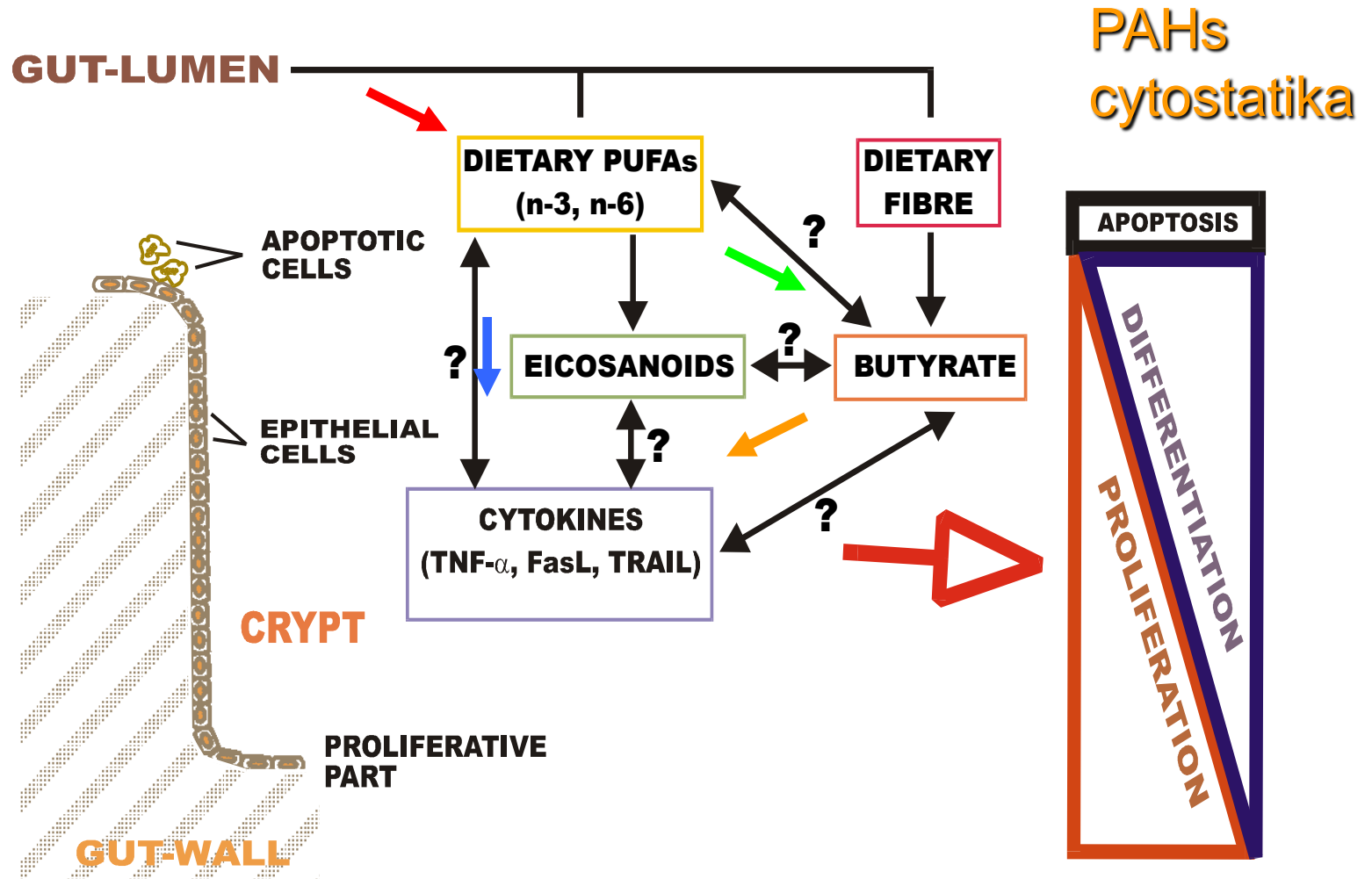
- snížená proliferace
- indukce diferenciacie
- indukce apoptózy
- změny genové exprese



- ALKALINE PHOSPHATASE
- E-CADHERIN PROTEIN
- /// F-ACTIN (Stress fibers)



INTERACTIONS OF DIETARY FACTORS AND ENDOGENOUS REGULATORS SUPPOSED TO AFFECT CYTOKINETICS OF COLONIC EPITHELIAL CELLS

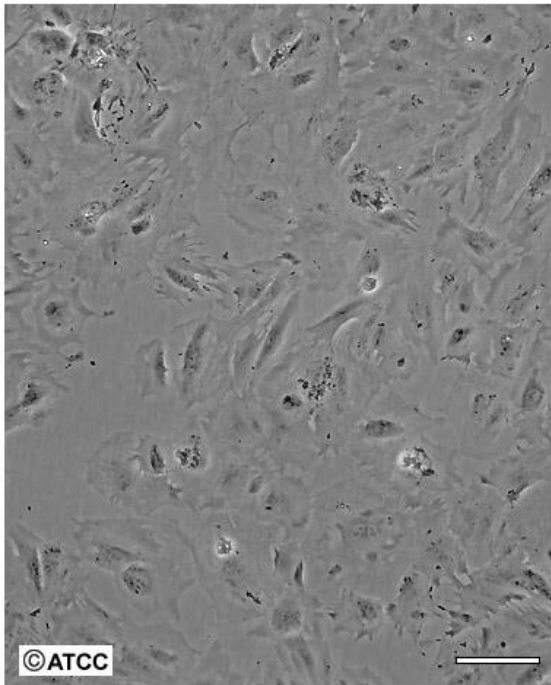


PAHs
cytostatika

Lidské epiteliální linie kolonu

FHC

normální
fetální kolon



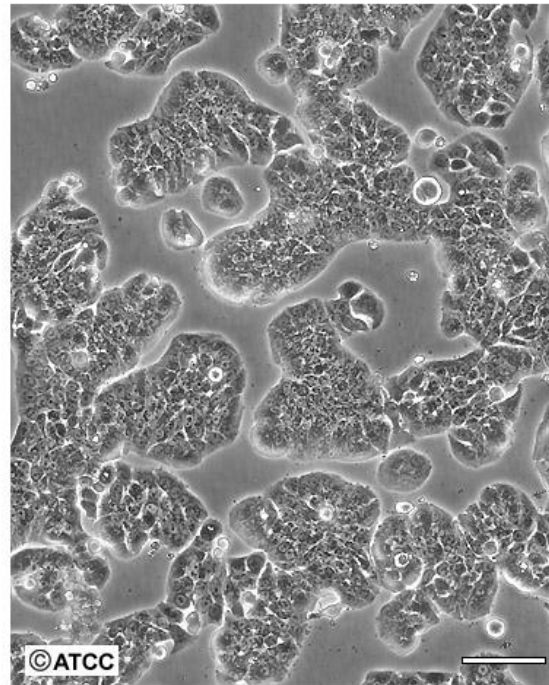
©ATCC

Scale Bar = 100µm

HT-29

diferencovaný
neinvazivní

adenokarcinom



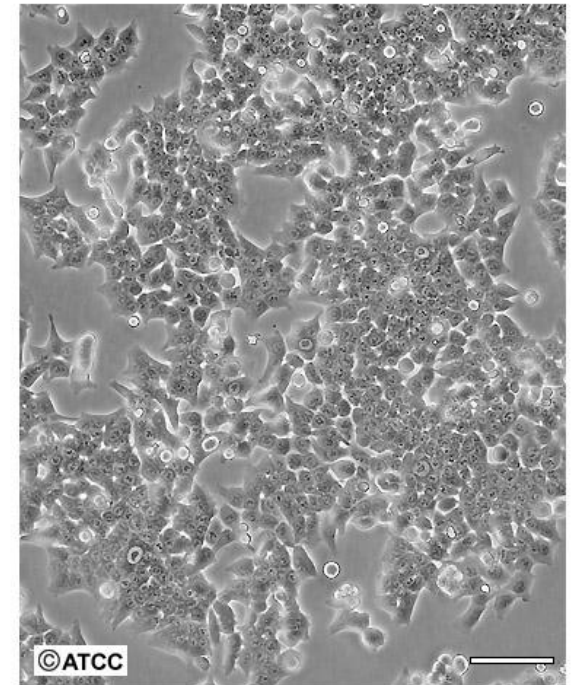
©ATCC

High Density

Scale Bar = 100µm

HCT-116

nediferencovaný
invazivní



©ATCC

High Density

Scale Bar = 100µm

Sekvence adenom x karcinom

FHC

AA/C1

RG/C2

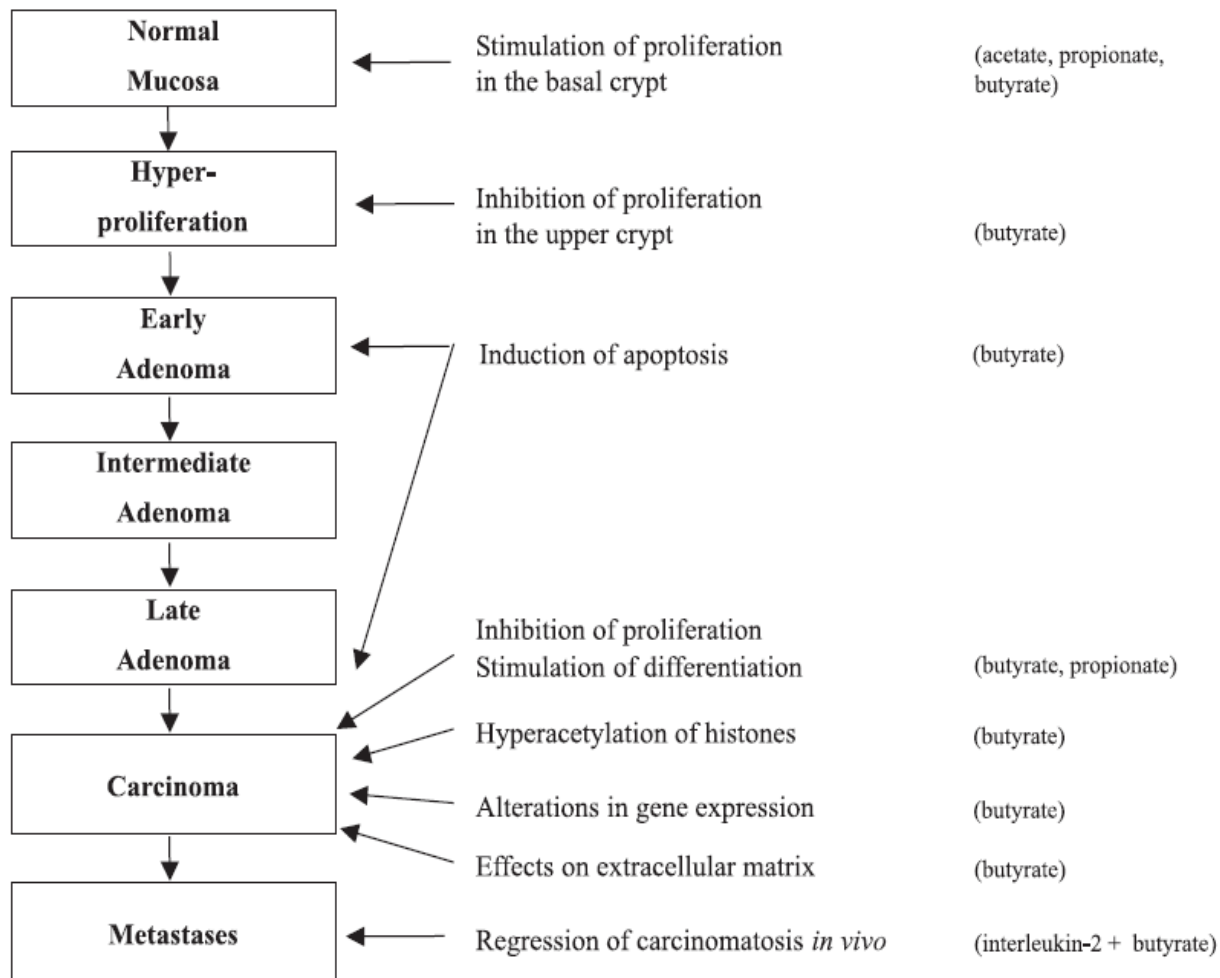
AA/C1/SB10

HT-29

HCT116

SW-620

Stupeň transformace



buněčné linie (tkáňové kultury)

**Laboratoř
cytokinety**

Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

Buňky epiteliálního původu

Označení	Lokalizace	Organismus	Patologie
A2780	ovárium	člověk	karcinom, Pt - citlivé
A2780cis	ovárium	člověk	karcinom, Pt - rezistentní
A549	plíce	člověk	karcinom
BEAS-2B	plíce	člověk	tranformované virem
CaCo2	kolon	člověk	adenokarcinom
CCL-64	plíce	norek	normální
CH-1	ovarium	člověk	karcinom, Pt- citlivé
COR-L23	plíce	člověk	karcinom
COR-L23/CP3	plíce	člověk	karcinom, Pt - rezistentní
COR-L23R	plíce	člověk	karcinom, doxorubicin - rezistentní
CT26	kolorectum	myš	karcinom
E10	plicní	myš	normální
FHC	kolon	člověk	embryonální
H4IIELuc	játra	krysa	karcinom

Buňky epiteliálního původu

Označení	Lokalizace	Organismus	Patologie
HaCaT	epidermis	člověk	normální
HeLa	cervix	člověk	karcinom
Hepa1	játra	myš	karcinom
HepG2	játra	člověk	karcinom
HT-29	kolon	člověk	adenokarcinom
HT115	kolon	člověk	adenokarcinom
HUVEC	endotel	člověk	embryonální
LEP	plíce	člověk	embryonální (fibroblasty)
MCF-7	prs	člověk	adenokarcinom
MDA-MB-231	prs	člověk	adenokarcinom
MDCK	ledvina	pes	normální
MVLN	prs	člověk	adenokarcinom
SKOV-3	ovarium	člověk	adenokarcinom, Pt – primárně rezistentní
T47D	prs	člověk	karcinom
WB-F344	játra	krysa	normální

Buňky mezenchymálního původu

Označení	Lokalizace	Organismus	Patologie
G5:113		myš	fibrosarkom
HL-60	krev	člověk	leukemie
IMM	nervové		imortalizované
Jurkat	krev	člověk	leukemie (lymfoidní)
K562	krev	člověk	leukemie (erytroidní)
MOLT-4	krev	člověk	leukemie (lymfoidní)
ML-1	krev	člověk	leukemie (myeloidní)
NB4	krev	člověk	leukemie (myeloidní)
U937	krev	člověk	leukemie (monocytární)
V79	fibroblasty	křeček	normální (fibroblasty)
WEHI	krev	myš	leukemie (lymfoidní)

Přehled metod a metodologií



Biofyzikální ústav AVČR, BRNO

Metody používané v laboratoři cytokinetiky BFÚ AV ČR, Brno

Legenda: FACS - průtoková cytometrie

FM - fluorescenční mikroskop

SM - světelný mikroskop

WB - western blotting

FM - fluorimetrie (FluoStar)

CM - kolorimetrie (FluoStar nebo Elisa reader)

LM - luminometrie (VUVEL, Lojek)

PAGE - polyakrylamidová elektroforéza

RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction

RG - radiografie

ELFO – agarosová elektroforéza

Metody průkazu apoptotické formy buněčné smrti

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
DAPI staining	Studium morfologických změn buněčného jádra apoptotických buněk	FM
Annexin V - FITC + propidium jodid (PI)	Externalizovaný fosfatidylserin apop. buněk + zachovaná semipermeabilita (detekce rané apoptózy)	FACS, FM
TUNEL + PI	Průkaz specifické fragmentace DNA (DNA zlomů - nicků – ss DNA breaks)	FACS, FM
SubG0/G1 peak v distribuci buněčného cyklu	Barvení buněčné DNA propidium jodidem s extrakcí nízkomolekulární DNA citrátovým pufrem	FACS
PI - Hoechst double - stain	Rozdělení buněk na mrtvé/živé, podle morfologie jádra identifikace apoptotických buněk	FM
DNA žebřík	Průkaz fragmentace DNA na 180 bp fragmenty (tzv. ladder)	ELFO
Kaspáza 1, 3, 7, 8, 9	Detekce exprese specifických proteáz	WB
Caspase assay (c-3, -6, -8, -9 subs.)	Důkaz aktivity specifických proteáz štěpením specifické sekvence na fluorescenční substrát	FM
cytokeratin 18 - protilátka M30	Neoepitop vytvořený štěpením cytokeratinu kaspázou	FACS,
Lamin B	Degradace Laminu B kaspázami	WB
PARP	Detekce štěpení proteinu PARP	WB
JC-1, TMRE, DiOC6, MitoTracker Red, Rh 123	Detekce změn mitochondriálního potenciálu $\Delta\Psi_m$	FACS
Hoechst + propidium jodid (PI)	Detekce apoptických, nekrotických a sekundárně nekrotických buněk (detekce i pozdní apoptózy)	FM
F-aktin	Detekce intenzity polymerizace a depolymerizace aktinu (pomocí konjugátu faloidin-FITC)	FCM, FM
Intracelulární pH	Průkaz poklesu intracelulárního pH vůči fyziol. hodnotě nutného k aktivaci enzymu DNA-ázy	
Izolace cytochromu c z cytos. frakce	Vylití Cyt. C z mitochondrií do cytosolu a formování komplexu s Apaf-1 a procasp-9 vytváří apoptosom	WB
OxPhos Complex IV subunit II	Studium funkce mitochondrií	WB

Proteiny a molekuly spojené s procesem apoptózy

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Bad, Bag-1, Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-X, Bcl-XL, Bid, Mcl-1	Bcl-2 rodina - regulátory průběhu apoptózy	WB
c-FLIP	Inhibitor kaspázy 8	WB
c-IAP1, XIAP	Rodina inhibitorů kaspáz	WB
Hydroethidin, 2',7' dichlorofluoresceindiacetát	Stanovení respiračního vzplanutí a produkce ROS provázející apoptózu	FACS
Dihydrorhodamin 123	Stanovení respiračního vzplanutí a produkce ROS provázející apoptózu	FACS
Lucigenin	Stanovení respiračního vzplanutí a produkce ROS provázející apoptózu	LM

Metody stanovení úrovně proliferace, cytotoxicity, viability

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Počítání buněk	Počítač částic založený na principu konduktivity	Coulter counter
Dye exclusion assay - eosin, trypanová modř	Barvení mrtvých buněk s permeabilizovanou membránou	SM
Dye exclusion assay - propidium jodid	Barvení mrtvých buněk s permeabilizovanou membránou	FACS
MTT, WST-1	Stanovení relativního množství buněk metabolizujících tetrazolové soli MTT, WST-1 na formazanové produkty	CM
CyQuant	Kit (Molecular Probes) pro značení DNA speciální fluorescenční barvou - proliferační assay	FM
PCNA	Marker proliferace - podjednotka DNA-polymerázy δ a ϵ	WB, SM
Inkorporace BrdU	Analog deoxyuridinu se inkorporuje během replikace DNA v proliferujících buňkách	FACS, FM
Inkorporace 3H-thymidinu (izotopová metoda)	Triciem značený thymidin se inkorporuje do buněk během replikace DNA - scintilační hodnocení	RG
Clonogenic assay	Otreatované buňky rostou v médiu nebo na agaru, sleduje se schopnost vytvářet kolonie buněk	

Metody analýzy buněčného cyklu

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Barvení pomocí PI (např. Vindelův roztok)	Distribuce buněčné populace podle množství celkové buněčné DNA do jednotlivých fáz bun. Cyklu	FACS
Mouse anti-BrdU-FITC + PI	Sledování syntézy DNA na základě inkorporace BrdU do DNA proliferujících buněk	FACS
Pulse-chase BrdU labeling	Sledování průchodu buněk cyklem	FACS

Proteiny spojené s regulací buněčného cyklu

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
cyklin A	Řízení S - G2 fáze b. cyklu - asociuje s cdk 2	WB
cyklin D1	Řízení přechodu z fáze G1 do S - asociuje s cdk 4	WB
cdk 2 activity assay	Řízení S - G2 fáze b. cyklu - asociuje s cyklinem A	RG
cdk 4	Řízení přechodu z fáze G1 do S - asociuje s cyklinem D	WB
p15, 16	Rodina p16 - inhibující kinázy cdk 4 a 6	WB
p21/waf1/cip1/sdi1/pic1	Inhibitor cdk a DNA replikace, transaktivovaný pomocí p53	WB
p27/kip1	Inhibitor komplexů cyklin D-cdk 4, cyklin A-cdk 2	WB
Topoizomeráza II α	Replikační faktor - marker pozdní S/G2/M fáze b. cyklu	WB
pRb	Onkosupresor zastavující ve fosforylované formě b. cyklus v souvislosti s p21	WB
p53	Tumor supresorový gen - "Guardian of the genome" - downstream reguluje p21/waf	WB

Metody detekce diferencujících se buněk

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
CD11b, CD14	Znaky monocytární diferenciacie lidských leukemických buněk	FACS
Nespecifické esterázy	Stanovení aktivity α -naftyl acetát esterázy (difer. leukemických buněk)	CM
Fagocytická aktivita	Znak monocytární diferenciacie leukem. buněk - pohlcení částic konjug. s FITC	FACS
NBT redukční test	Se zvyšující se úrovní diferenciacie roste počet reduk. formazanových zrn	CM
Aktivita alkalické fosfatázy	Znak diferenciacie kolonových buněk - disodná sůl 4-nitrofenyl fosfátu	CM
Nespecifické esterázy	Stanovení aktivity nespecifických esteráz pomocí štěpení fluorescenční sondy CFDA (karboxyfluorescein diacetát)	FACS
Intracelulární pH	Stanovení intracelulárního pH jako markru diferenciacie buněk pomocí fluorescenční sondy SNARF-1	FACS
Polymerizace aktinu	FITC značený faloidin	FM

Proteiny spojené s diferenciací buněk

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
RAR α	Receptor all-trans retinoic acid, indukující diferenciaci leukemických buněk	WB
RXR α	Receptor aktivovaný 9-cis-retinovou kyselinou	WB
VDR	Receptor vitamínu D, množství VDR moduluje růst a diferenciaci nádorových buněk	WB

Mezibuněčná komunikace, anoikis, motilita buněk

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
FAK	Nereceptorová tyrosin kináza zapojená v přenosu signálů z ECM	WB
Cadheriny	Složka desmosomu, nachází se v komplexu s cateniny	WB, FM
γ -catenin	Složka desmosomu, nachází se v komplexu s cadheriny	WB
connexin 43	Složka gap junctions (GJIC)	WB
GJIC inhibition assay	Testování funkčnosti GJIC pomocí luciferové žluti	FM
Wound healing assay	Testování motility buněk	FM

Metabolismus kyseliny arachidonové

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
cytopl. fosfolipáza A2	Odštěpuje AA z membrán	WB
5-lipoxygenáza	Metabolizuje AA na leukotrieny	WB
Cyklooxygenáza 2	Metabolizuje AA na prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany	WB
Uvolňování AA	Uvolnění AA z buněk do media	HPLC (VUVEL)

Signální dráhy receptorů smrti

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Fas-L	Ligand Fas-R - signál smrti	WB
Fas-R (CD95)	Receptor smrti - aktivovaný navázáním Fas-L	WB,FACS
FADD	Adaptérová molekula - součást DISC komplexu	WB
Toso	Inhibitor Fas indukované apoptózy nacházející se na povrchu T lymfocytů	WB
TRAIL	Ligand TRAIL-R - signál smrti	WB
TRAIL-R1,2 (DRs)	Receptory smrti - aktivovány navázáním TRAIL-L	WB,FACS
TRAIL-R3,4 (DcRs)	Decoy receptory - vážou TRAIL, ale neaktivují proces apoptózy	WB,FACS

Kinázy a proteiny s nimi asociované

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
Ras, N-Ras	Mebránový G-protein	WB
ERK 1/2	Imunochemické stanovení neaktivní a aktivní (fosforylované formy)	WB
p38	Imunochemické stanovení totální (na fosforylačním stavu nezávislé) hladiny p38	WB
JNK/SAPK activity assay	stanovení aktivity analýzou fosforylace substrátu (radioizotopová metoda)	RG
Akt/PKB	Serin/Threoninová protein kináza, může stimulovat Ras	WB
pTyr	Protilátka detekující fosforylovaný Tyrosin	WB
pSer	Protilátka detekující fosforylovaný Serin	WB

Signální dráha TGF β

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
TGF β 1	Růstový faktor	WB
TGF β R I, II	Receptor pro TGF β	WB
Smad 2, 4	Aktivace TGF R vede k translokaci těchto transkripčních faktorů do jádra	WB

Proteiny asociované s AhR

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
AhR	Ligand-dependentní transkripční faktor,	WB, RT-PCR EMSA, FM
Reporter gene assay for AhR	Metoda stanovení aktivity Ah R	LM
Stabilní transfekce mutantních variant AhR a ARNT pomocí plazmidových vektorů		
ARNT	Jaderný partner receptoru AhR umožňující jeho vazbu na XRE element	WB, RT-PCR
CYP1A1	Oxidáza se smíšenou funkcí patřící do rodiny cytochromů P450	WB, RT-PCR

Proteiny spojené s hormonální regulací

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
ER α , β	Receptory estrogenů	WB
Reporter gene assay for ER	Metoda stanovení aktivity estrogenních receptorů	LM
Cathepsin D	Endopeptidáza indukovaná estrogeny	WB
LRP/MVP	Ribonukleoproteinové částice ovlivněné hladinou estrogenů	WB
PPAR γ	Jaderný receptor pro hormony ovlivňovaný MAPK	WB

Transkripční faktory a asociované proteiny

Název metody, stanovované molekuly	Princip, funkce, parametr	Legenda
NF- κ B	Aktivátor řady genů spojených s hematopoezou, apoptózou atd.	WB, EMSA
I κ B	Inhibitor NF- κ B, který jej zadržuje v cytoplazmě	WB
c-Myc	Po navázání heterodimerizačního partnera Max působí jako TF	WB
p53	Onkosupresor podílející se na řízení oprav DNA lézí	WB
AP - 1 (Jun + Fos)	Homo- či heterodimerní transkripční faktor	WB, EMSA



Děkujeme za pozornost

Laboratoř
cytokinety

Biofyzikální ústav AVČR, BRNO