

# Oddělení cytokinetiky BFÚ AVČR



*Studium signálních drah zapojených do následujících procesů:*

- Regulace cytokinetiky lipidickými složkami potravy
- Role růstových faktorů (TGFbeta) v regulaci procesu rakoviny prostaty
- Interakce lipidů (PUFAs) a cytokinů (TRAIL)
- Účinky protinádorových látek (LA12)
- Molekulární a buněčné mechanismy (Ahr, P450) toxicity organických sloučenin (PCB)

# CYTOKINETICKÉ PARAMETRY



**PROLIFERACE**  
**VIABILITA**  
**DIFERENCIACE**  
**(APOPTÓZA)**

# PROLIFERACE



- Množení buněk mitózou
- Dostatek živin, růstových faktorů, pH a teplota prostředí (kultivační techniky) + ovlivnění?
- Metody stanovení počtu buněk:
  - nespecifické barvení všech proteinů/DNA (metylenová modř, neutrální červeň, tetrazoliové soli MTT, WST1/ CyQuant)
  - Bürkerova komůrka
  - Počítač částic (Coulter counter)
    - Postup: 20  $\mu$ l b. suspenze do 10 ml hemasolu ... 500 x ředěno
    - Counter nasaje 0,5 ml
    - Přepočet:  $1 \cdot 10^3$  b. .... 0,5 ml /x2
    - $2 \cdot 10^3$  b. .... 1 ml /x500
    - $1 \cdot 10^6$  b/ml

# Viabilita



- Životnost buněk (vs. mortalita)
- Živé buňky – semipermeabilní cytoplazmatická membr.
- Mrtvé buňky – permeabilní cytoplazmatická membr.
- DYE EXCLUSION ASSAYS

- ✦ Živá buňka je schopna zabránit průniku barviva dovnitř

Barviva: eosin, trypanová modř, propidium iodid, 7 amino actinomycin, acridin orange, Hoechst 33258

**EOSIN:** SS 1 mg/ml smíchat 1:1 s buněčnou suspenzí – kápnout do Bürkerovy komůrky ... hodnotit 100 buněk – kolik z nich je mrtvých = oranžových

**7AAD,PI:** SS 1 mg/ml; WS 1  $\mu\text{g}$ /ml ... inkubace 1 minutu, hodnocení FACS

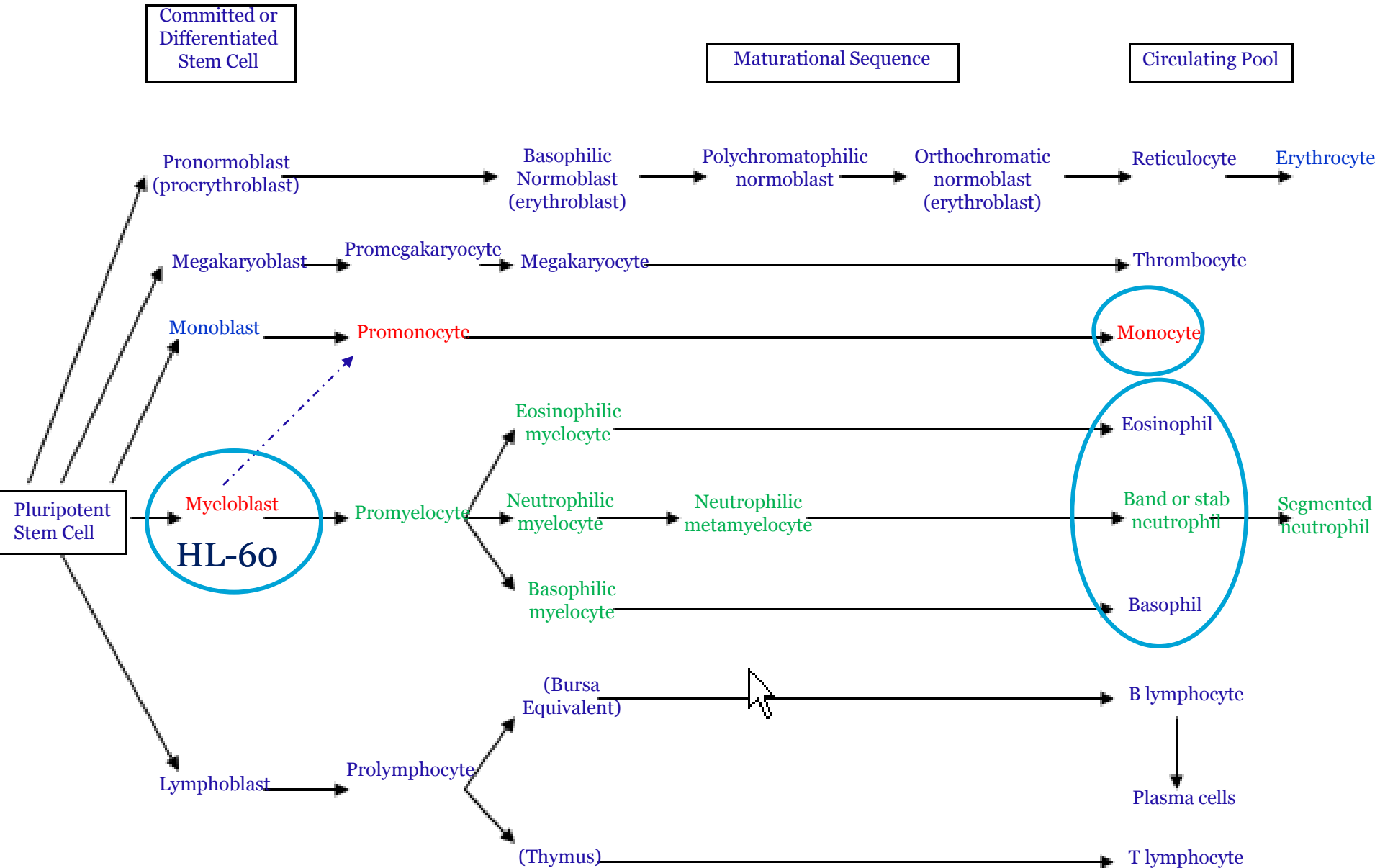
živé buňky nenabarvené x **mrtvé** fluoreskují v FL2

# Diferenciace



- Rozrůznění buněk vlivem faktorů okolního prostředí
- **Změna** biochemických procesů
  - expresního profilu (mRNA, DNA, proteiny)
  - morfologie
  - povrchových antigenů
- **Detekce těchto změn** biochemie
  - molekulární biologie
  - histologie/cytologie
  - imunologie

# HEMATOPOIESIS



# Diferenciační látky – princip účinku



- **Vitamín D<sub>3</sub>** (VD<sub>3</sub>, kalcitriol) – aktivace kinázových kaskád, translokace do jádra, aktivace VDR, ovlivnění transkripce
- **Phorbolmyristate acetate/12-O-tetradecanyl phorbol 13-acetate** (PMA/TPA) – vazba na receptor asociovaný s protein kinázou C – PI3K – cAMP - pokles cMyc – zástava proliferace
- **Dimetyl sulfoxid 1,3 %** (DMSO) – široké spektrum účinků – zvýšení fluidity membrány, aktivace kinázových kaskád, zvýšení Ca<sup>2+</sup>, vazba na DNA - ovlivnění transkripce, demetylace

Souběh drah ovlivňující kinázové kaskády, transkripční faktory (např. PU.1) a pak G/M/GM-CSF

# Metody detekce diferencovaných buněk



## Změna enzymového vybavení buněk

- *Nespecifické esterázy*

*Hydrolyza  $\alpha$ -naftyl acetátu esterázami vede k vzniku hnědého zbarvení*

- *Detekce myeloperoxidázy*

*Myeloperoxidáza štěpí peroxid kyslíku za vzniku kyslíkových radikálů, které pak oxidují o-dianisidin za vzniku barevných látek chinonového charakteru*

## Produkce ROS při oxidativním vzplanutí (monocyty)

- *Redukce NBT (nitroblue tetrazolium)*

*NBT je redukován superoxidem produkovaným monocytou. Redukce vede k změně barvy ze žluté na modrou*

- *Redukce luminolu*

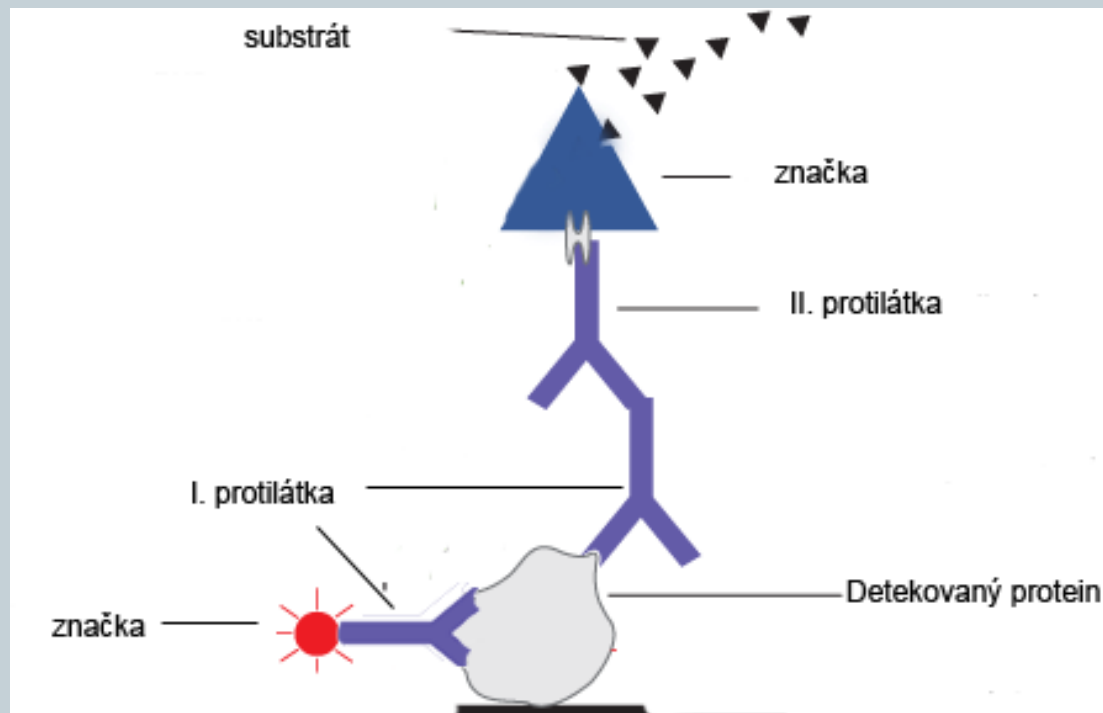
## Změna povrchových molekul

- Exprese CD11b (R proC3b složku komplementu) a CD14 (vazba LPS)

**Změna morfologie** Zvýšená adheze, pseudopodia, zástava proliferace



# Imunokomplex



Přímá – jednostupňová (silný Ag)

Nepřímá – vícešupňová (velká multiplikace signálu) - slabší Ag