

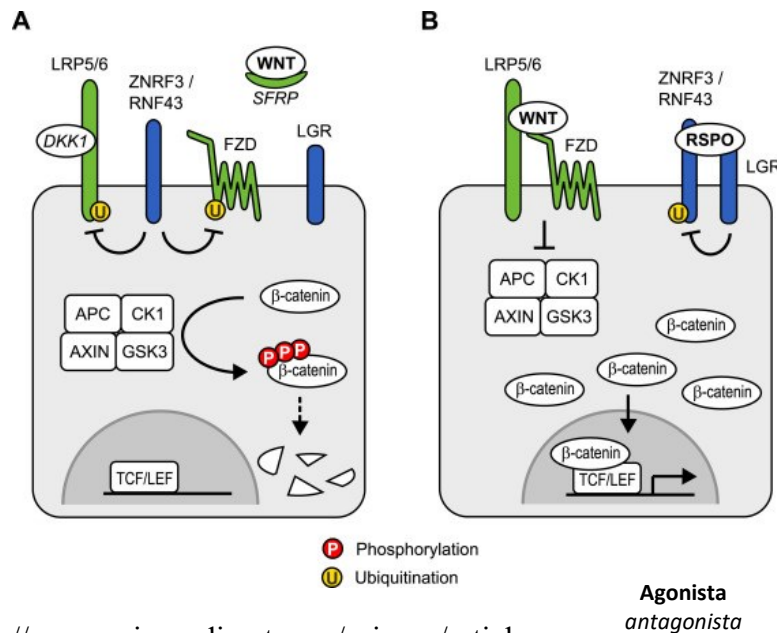
Jméno:

## Stanovení aktivity $\beta$ -cateninů

### Modelový systém:

HEK 293 – Human Embryonal Kidney – epiteliální charakter

[https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1573.aspx?geo\\_country=cz](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1573.aspx?geo_country=cz)

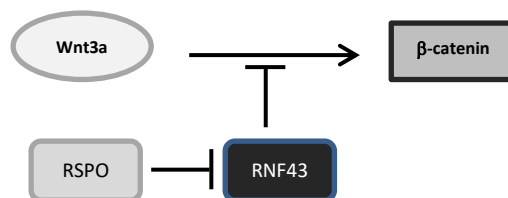


<https://www.sciencedirect.com/science/article>

A) V nepřítomnosti Wnt ligandů, nebo v případě zablokování dráhy (DKK1, SFRP) je cytosolický  $\beta$ -catenin konstitutivně fosforylován v destruktčním komplexu (APC, CK1, AXIN, GSK3), následně ubiquitován a degradován v proteasomu. ZNRF3 a RNF43 (E3 ubiquitin ligázy) ubiquitinují a tak destabilizují receptory Frizzled a LRP a tak inhibují Wnt signalizaci.

B) Vazba Wnt ligandů (Wnt3a) na jejich receptor inhibuje destruktční komplex,  $\beta$ -catenin se akumuluje, translokuje do jádra a umožňuje přepis genů, které mají v promotoru vazné místo pro TCF/LEF transkripční faktor, na který se  $\beta$ -catenin váže. R-spondin (RSPO) posiluje Wnt signalizaci, protože vytváří ternární komplex LGR proteinů s ZNRF3/RNF43, který indukuje autoubiquitinaci ZNRF3/RNF43, což vede k jeho degradaci v proteasomu.

Ve zkratce:



Vzorky:

1. CTR = catenin kontrolní hladina (450 ul DMEM)
2. WNT3a = catenin  $\uparrow$  (300 ul DMEM + 150 ul CM Wnt3a)
3. RSPO = catenin  $\uparrow\uparrow$  (300 ul DMEM + 150 ul CM RSPO)
4. WNT+ RSPO+ = catenin  $\uparrow\uparrow\uparrow$  (150 ul DMEM + 150 ul CM Wnt3a + 150 ul CM RSPO)

CM ... kondiciované médium – buňky produkující příslušný protein jej sekretují do média

## PROTOKOLY

### Transfekce buněk

Buňky vysejeme den předem (50x10<sup>3</sup> b na jamku v 24W desce - do 0,5 ml DMEM)

Zkontrolovat, jestli je konfluence 70 – 80 %

Příprava transfekčních směsí – na 1 jamku:

SS plazmidu 500ng/ul

1. 100 ul DMEM pure + 150 ng každého plazmidu (celkem 0,45 ug DNA) **výpočet:** 500 ng.... 1 ul

150 ng.... x ul

2. 100 ul DMEM pure + 1,8 ul PEI (poměr DNA : PEI = 1:4, tj. 0,45x4 = 1,8)

<b>Výpočet:</b>		pRLtkLuc	Super8X TOP Flash	pmax GFP	PEI
	DMEM pure	345	368	251	
1 jamka	100 ul				1,8 ul
5 jamek					

Připravené transfekční směsi důkladně zvertexujeme, krátce stočíme a necháme 10 minut inkubovat při RT.

Obě zkumavky smícháme, důkladně promícháme a opět 10 minut inkubujeme při RT.

Do každé jamky přidáme 210 ul výsledné transfekční směsi.

Po 3 hodinách odsajeme vše z jamek, přidáme DMEM a 150 ul kondiciovaného média (CM) s WNT3a (W+) nebo Respondinem (R+) (dle rozpisu vzorků).

Vše inkubujeme přes noc v inkubátoru.

### Stanovení účinnosti transfekce

**Mikroskopicky** - Fluorescenci vzorků způsobenou expresí plazmidu pMAX s GFP nafotíme na konfokálním fluorescenčním mikroskopu Leica kombinací zeleného filtru a průchozího světla, abychom byli schopni určit jak množství svítících buněk, tak počet všech buněk v zorném poli. Výsledek je poměr pozitivních buněk ku všem buňkám.

**Výsledek:** Účinnost transfekce PEI je přibližně %.

**Pomocí ELISA readeru** – lyzát vytvoření pro metodu TopFlash změříme na fluorimetru Hidex Sense při excitační vlnové délce 480 nm a emisi 535 nm. Srovnáme s netransfekovanou kontrolou.

**Výsledek:** Účinnost transfekce PEI je přibližně %.

### Metoda TopFlash = Dual Luciferase Assay (kit Promega)

Odsajeme médium

Přidáme opatrně 1 ml PBS, odsajeme, na sucho inkubujeme v -80 °C/ 5-10 min

Rozmrazíme pufr LAR II a Stop & glow buffer

Naředíme si **5x lyzační pufr** – 1 jamka 50 ul, 6 jamek 300 ul, tj. 240 ul MQ H<sub>2</sub>O + 60 ul 5x lysis buffer

Přidáme 50 ul 1x lyzačního pufru do každé jamky a inkubujeme 15 min/RT na třepačce

Naředíme si **100x Stop & glow reagent v Stop & glow buffer** (25 ul na jamku x 6 vzorků, tj. 150 ul)

**Výpočet:** ul Stop & glow buffer + ul Stop & glow reagent = 150 ul

Nachystáme si luminometr Hidex Sense a stripy na měření

Do stripu nakapeme 20 ul lyzátu z každého vzorku (důkladně zhomogenizovaného)

U luminometru velmi rychle přikápneme 25 ul LARII substrátu pro firefly (FF) luciferázu

Změříme chemiluminiscenci

Přidáme Stop & glow roztok pro renilla (R) luciferázu (inhibice aktivity FF luciferázy, substrát pro R luciferázu)

Změříme chemiluminiscenci

Výslednou hodnotu spočítáme jako podíl FF luciferázy a R luciferázy

### Výsledek:

-K (buňky bez plazmidu)

K

WNT3

RSPO

Wnt3a+RSPO

## qRT-PCR

### Izolace mRNA

Ve dni 0 vysejeme  $2 \times 10^5$  buněk a přidáme CM dle rozpisu.

Vzorky opatrně opláchneme PBS a poté přidáme 0,25 ml Trypsin/EDTA, 5 min inkubace v 37°C. Buňky přeneseme do eppendorfky, stočíme (200g/5 min), odstraníme supernatant. K peletu přidáme 350  $\mu$ l lyzačního pufru RLT s 1 % merkaptoethanolem (Sigma Aldrich), důkladně zvortexujeme, rychle stočíme a necháme inkubovat v RT 5 min.

**Výpočet:** 5 vzorků =                      ul RLT +                      ul merkaptoetanolu

K izolaci mRNA použijeme návod z komerčního kitu CatchGene - Cell and tissue kit.

Přidáme 350 ul pufru RB, důkladně zvortexujeme, rychle stočíme.

Vzorky přeneseme do kolonky vložené do 2 ml sběrné zkumavky.

Centrifugace 11000 g/1 min, vyměníme sběrnou zkumavku (RNA navázána na kolonku).

Přidáme 700 ul pufru RW1, centrifugace na max/1 min, vylejeme proteklou tekutinu (promývání)

Přidáme 700 ul pufru RW1, centrifugace na max /1 min, vylejeme proteklou tekutinu (promývání)

Přidáme 700 ul pufru RW2, centrifugace na max /1 min, vyměníme sběrací zkumavku.

Centrifugujeme na max /3 min

Vyměníme 2 ml zkumavku za 1,5 ml zkumavku, přidáme 30 ul RNase-free H<sub>2</sub>O, inkubace 2 min v RT

Centrifugujeme na max /1 min (eluze)

Eluát ještě jednou nanese do kolonky a znovu zcentrifugujeme na max /1 min

Naředíme si 1 ul vzorku + 9 ul RNase free H<sub>2</sub>O a změříme koncentraci vyizolované mRNA na spektrometru

NanoDrop® ND-1000 Spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Izolovanou celkovou RNA uchováváme v -80 °C.

### Přepis mRNA do cDNA = reverzní transkripce

Reverzní transkripce slouží k vytvoření templátu DNA (cDNA = complementary DNA), který bude vstupovat do polymerázové řetězové reakce (PCR). Celý proces je založen na použití reverzní transkriptázy, což je RNA dependentní DNA-polymeráza. Po celou dobu práce je nutné vzorky uchovávat na ledu kvůli jejich nestabilitě.

### PRÁCE NA LEDU!

Z celkové RNA odebereme 1  $\mu$ g (výpočet), který doplníme RNase free H<sub>2</sub>O do objemu 11,5 ul.

Přidáme 1  $\mu$ l 0,5  $\mu$ g/ulM Oligo(dT), inkubace vzorků 5 minut při 65 °C (PCR cykler).

Přidáme 4  $\mu$ l 5x RT reakčního pufru, 2  $\mu$ l 10 mM směsi nukleotidů dNTP, 0,5  $\mu$ l (20 U) RNázového inhibitoru RiboLock a 1  $\mu$ l (200 U) RevertAid reverzní transkriptázy (vše Thermo Fisher Scientific).

Zamícháme a krátce centrifugujeme, inkubace hodinu při 42 °C a dalších 10 minut při 70 °C pro denaturaci enzymu, čímž ukončíme reakci. Vzorky cDNA jsou skladovány při -20 °C.

### Výpočet:

Vzorek	koncentrace RNA	1 $\mu$ g RNA (ul)	H <sub>2</sub> O (do 11,5 ul)

### Reakční mix pro RT:

	1 vzorek	6 vzorků
5x RT reakční pufr	4 ul	
dNTP	2 ul	
RiboLock	0,5 ul	
RevertAid RT	1 ul	

**Real time PCR**

1. Do každé jamky (20 ul) patří:

1,5ul cDNA templátu

18,5 ul Master mixu:

3 ul 2xcc Roche - LighCycler 480 SYBR green I master kit (směs nukleotidů, FastStart Taq DNA polymeráza, SYBR green, MgCl<sub>2</sub>)

0,375 ul každého z primerů (SS 20 uM) vypočítej výslednou koncentraci:

1,7 ul MgCl<sub>2</sub> (SS 25 mM)

vypočítej výslednou koncentraci:

Doředit do 18,5 ul sterilní RNase-free MQ H<sub>2</sub>O

Detekované geny: HPRT, ZNRF3, Axin2, cyklin D1

	Sybr green	1. primer	2. primer	MgCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O
1 vzorek	3	0,375	0,375	1,7	13,05 ul
<b>10 vzorků</b>	<b>30</b>	<b>3,75</b>	<b>3,75</b>	<b>17</b>	<b>130,5 ul</b>

Do jamek na dno napipetovat v duplikátu (vedle sebe) master mix pro daný gen

Přidat 1,5 ul cDNA všech vzorků (podle rozpisu) na horní část jamky

Zcentrifugovat 5 min/4 °C, vložit do LC 480 (Roche)

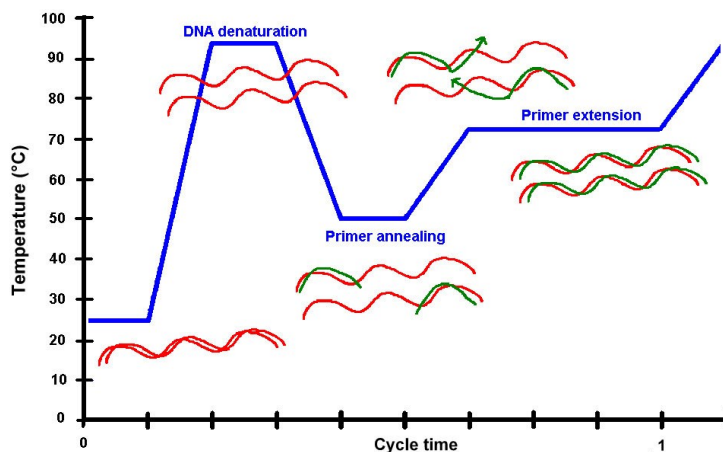
	HPRT		ZNRF3		Axin2		CD1				
A K	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B W											
C R											
D WR											
E K											
F											
G											
H											

Dopiš do obrázku teploty a dobu

pro jednotlivé fáze cyklu

40 cyklů

Vyhodnocení podle maxima 2. derivace křivky



**Výsledek:**

## Western blotting

### Příprava SDS lyzátů

Den předem bylo k 70 % konfluentním buňkám přidáno CM dle rozpisu.

Ze vzorků odsajeme médium a opatrně přidáme 1 ml PBS, které také odsajeme

Přidáme 100  $\mu$ l laemli lyzačního pufru (sodium dodecyl sulfate, 2 % SDS, 10 % glycerol a 100 mM TRIS pH 6,8, 0,05 % bromfenolová modř, 25% merkaptotetanol).

Inkubujeme 10 minut na ledu a následně přeneseme do zkumavek (vzorky je možné uchovávat v -20 °C).

**PRÁCE NA LEDU!**

Rozbití buněčných struktur a DNA provedeme sonikací a vařením na 95 °C/5 min v bločku.

### SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

2x polyakrylamidový gel 8 %, tloušťka 1,5 mm, 10 jamek

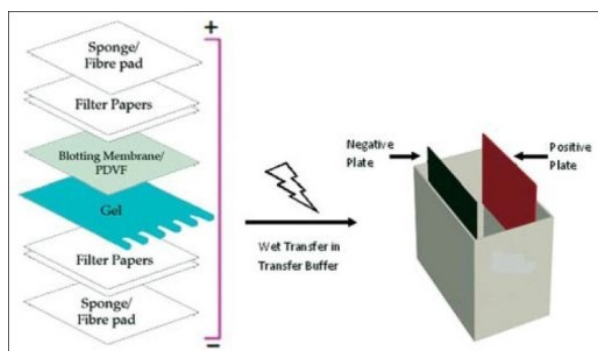
Před nanesením vzorků na gel je důkladně zvortexujeme.

Do každé jamky v gelu napipetujeme 20  $\mu$ l z každého vzorku (1-8) a do krajních jamek napipetujeme 1,5  $\mu$ l barevně značeného proteinového standardu (PagerRuler Plus Prestained Protein Ladder, ThermoScientific).

Elektroforéza 130 V 1 hodinu (proteiny, jež díky SDS získaly záporný náboj, migrují ke kladné elektrodě).

### Wet blotting

Přeneseme gely s proteiny rozseparovanými podle MW na metanolem aktivovanou PVDF (Polyvinylidene difluoride) membránu (Immobilon-P membrane, Merck, Kenilworth, USA), vyrobíme tzv. sandwich, důležité je myslet na to, že proteiny migrují ke + elektrodě a musí přitom přejít z gelu na membránu.



### Složení použitých roztoků:

	Dest. H <sub>2</sub> O	Glycin	TRIS
10x elektroforetický/transerový pufr	1 l	144 g	30,3 g
1x elektroforetický pufr	Dest. H <sub>2</sub> O	10x elektrofor./transfer. pufr	20 % SDS
	9 l	1 l	50 ml
1x transferový pufr	Dest. H <sub>2</sub> O	10x elektrofor./transfer. Pufr	Metanol
	1400 l	200 ml	400 ml
Promývací pufr (doplněn dest. H <sub>2</sub> O do 1 l)	NaCl SS: 5 M WS: 150 mM	TRIS pH 7,4 SS: 2 M WS: 20 mM	Tween SS: 20% WS: 0.06%
	30 ml	10 ml	3 ml

Transferujeme proteiny na PVDF 100 V/70 minut, membránu vyjmeme, opláchneme promývacím pufr.

Blokujeme nespecifické vazby protilátek pomocí inkubace 20 minut v blokačním pufru (5 % roztok netučného sušeného mléka rozpuštěného v promývacím pufru).

### Imunodetekce

Nařežeme membránu na proužky, kde předpokládáme výskyt hledaných proteinů podle barevných standardů.

Proužky vložíme do 50 ml falcon zkumavky, ve které jsou 3 ml roztoku blokačního pufru s příslušnými specifickými I. Ab protilátkami v příslušné koncentraci (viz obrázek).

Inkubujeme přes noc 4 °C, na rolleru

	kDa		kDa
pS1490-LRP6 150-250 kDa (cs-2568, 1:1 000) R	250	Total LRP6 150-250 kDa (1:1000)	250
	130		130
Aktivní $\beta$ catenin (ABC), 92 kDa (Millipore5665, 1:1000) M	100	DVL 3 90-95 kDa (SC8027, 1:1000) M	100
	72		72
	55		55
Tubulin alfa 55 kDa (cs-5335S, 1:1 000) R	35	Tubulin alfa 55 kDa (cs-5335S, 1:1 000) R	35

Membrány druhý den přemístíme do misky a třikrát opláchneme promývacím pufrem po dobu 10 minut (shaker). Připravíme nové falconky s 3 ml blokačního pufru se sekundárními protilátkami (II. Ab), konjugovanými s křenovou peroxidázou, ředěnými 1:5 000.

Do II. Ab vložíme opláchnuté membrány (dle druhové specifity I.Ab) a inkubujeme na rolleru 60 minut/RT.

Membrány přemístíme do misky a třikrát opláchneme promývacím pufrem po dobu 10 minut (shaker).

Nachystáme si substrát pro peroxidázu s obsahem peroxidu vodíku a luminolu (Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate, Merck Millipore) – smícháme obě složky v poměru 1 ml : 1 ml.

Membrány znovu seřadíme a zalijeme substrátem, který špičkou rovnoměrně rozmístíme a překryjeme fólií.

Detekci signálu provedeme pomocí programu FusionSL a zařízení s CCD kamerou (Fusion SL, Vilber), které detekuje chemiluminiscenci vzniklou oxidací luminolu po rozštěpení peroxidu vodíku peroxidázou.

Název sekundární protilátky	Katalogové číslo a výrobce
Anti-Mouse IgG Peroxidase antibody produced in sheep	A6782, Sigma
Anti-Rabbit IgG Peroxidase antibody produced in goat	A6667, Sigma
Anti-Goat IgG Peroxidase antibody produced in rabbit	A4174, Sigma

**Závěr:** Napište, jak odpovídají naše výsledky předpokladům