

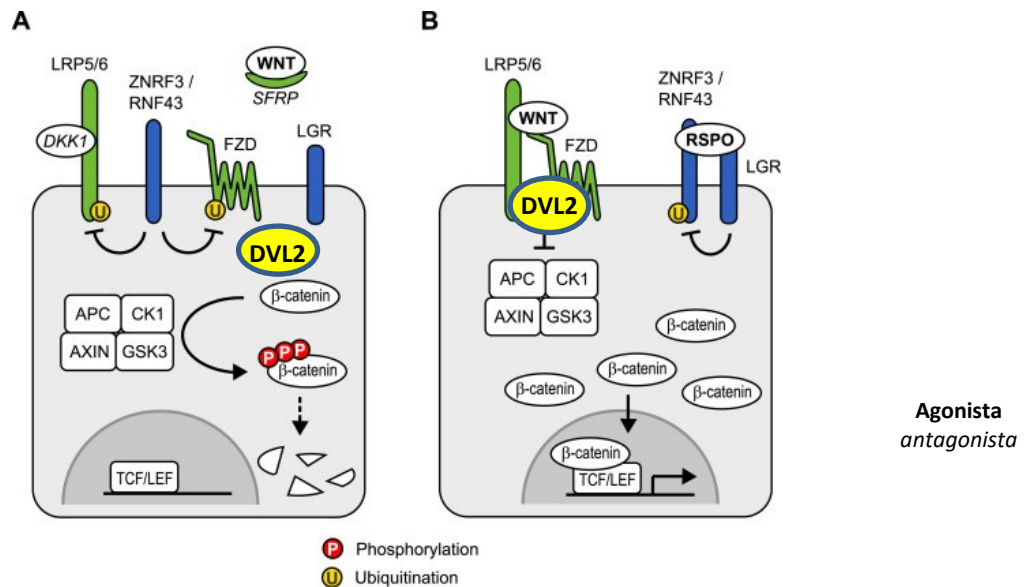
Jméno:

## 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)

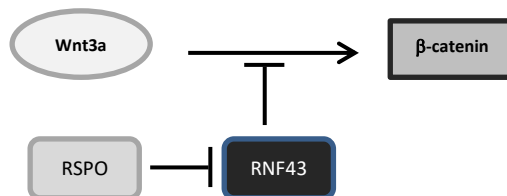


<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301468117300774>

A) V nepřítomnosti ligandů Wnt, nebo v případě zablokování dráhy (DKK1, SFRP) je cytosolický  $\beta$ -catenin konstitutivně fosforylován v destrukčním 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, čímž inhibují Wnt signalizaci.

B) Vazba ligandů Wnt (Wnt3a) na jejich receptory LRP5/6 a FZD vede k fosforylaci proteinu DVL2, inhibuje se destrukční komplex,  $\beta$ -catenin se akumuluje, translokuje do jádra a umožňuje přepis genů, které mají v promotoru vazebné 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, čímž indukuje autoubiquitinaci ZNRF3/RNF43, což vede k jeho degradaci v proteasomu. Celá reakce je zesílena použitím 1  $\mu$ M LGK-974 (Stock solution – SS: 1mM), inhibitoru acyltransferázy porcupine, která acetyluje Wnt v ER a umožňuje tak jeho sekreci. V přítomnosti LGK-974 není endogenní Wnt sekretován, proto buňky reagují lépe na exogenní Wnt stimulaci.

Ve zkratce:



Vzorky:

1. –CTR bez LGK-974 = catenin kontrolní hladina před ovlivněním exportu Wnt (450  $\mu$ l DMEM)
2. CTR = catenin kontrolní hladina (450  $\mu$ l DMEM + 0,45  $\mu$ l LGK)
3. WNT3a = catenin  $\uparrow$  (300  $\mu$ l DMEM + 150  $\mu$ l CM Wnt3a + 0,45  $\mu$ l LGK)
4. RSPO = catenin  $\uparrow\uparrow$  (300  $\mu$ l DMEM + 150  $\mu$ l CM RSPO + 0,45  $\mu$ l LGK)
5. WNT+ RSPO+ = catenin  $\uparrow\uparrow\uparrow$  (150  $\mu$ l DMEM + 150  $\mu$ l CM Wnt3a + 150  $\mu$ l CM RSPO + 0,45  $\mu$ l LGK)

## PROTOKOLY

### Transfekce buněk

Buňky vysejeme den předem ( $50 \times 10^3$  b na jamku v 24W desce - do 0,5 ml DMEM)

Zkontrolujeme, jestli je konfluence 70 – 80 %

Příprava transfekčních směsí – na 1 jamku:

- 100 ul DMEM pure + 150 ng každého plazmidu (celkem 0,45 ug DNA) **výpočet:** SS plazmidu 500ng/ul  
500 ng.... 1 ul  
150 ng.... 0,3 ul
- 100 ul DMEM pure + 1,35 ul PEI (poměr DNA : PEI = 1:3, tj.  $0,45 \times 3 = 1,35$ )

<b>Výpočet:</b>	DMEM pure	pRLtkLuc	Super8X TOP Flash	pmax GFP	PEI
1 jamka	100	0,3	0,3	0,3	1,35 ul
5+1 jamek	600	1,8	1,8	1,8	8,1 ul

Připravené transfekční směsi důkladně zvortexujeme, 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 203 ul výsledné transfekční směsi.

Po 3 hodinách odsajeme vše z jamek, přidáme do vzorků 150 ul DMEM s 0,45 ul LGK (2,25 ul LGK + 750 ul DMEM) a 150 ul kondicionovaného média (CM) s WNT3a (W+) nebo R-spondinem (R+) (dle rozpisu vzorků).

Doplníme do 450 ul DMEM. Do kontroly bez LGK přidáme jen 450 ul DMEM. Kontrolu označenou 0 vůbec nezpracováváme – je to kontrola bez ovlivnění.

Vše inkubujeme přes noc v inkubátoru 37°C.

### Stanovení účinnosti transfekce

**Mikroskopicky** - Fluorescenci vzorků způsobenou expresí plazmidu pMAX s GFP nafotíme na fluorescenčním mikroskopu kombinací modrého světla a zeleného filtru při zachování mírného osvětlení průchozím světlem, 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 509 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+1 jamek 350 ul, tj. 280 ul MQ H<sub>2</sub>O + 70 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, 6+2 vzorky tj. 200 ul)

**Výpočet:** ul Stop & glow buffer + ul Stop & glow reagent = 200 ul

Nachystáme si luminometr Hidex Sense a stripy na měření

Do jamek 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:**

## qRT-PCR

### Izolace mRNA

Den předem byly vysety buňky ( $150 \times 10^3$  v 150 ul) a k buňkám byla přidána CM a LGK dle rozpisu.

Vzorky opatrně opláchneme PBS a poté přidáme 0,5 ml Trypsin/EDTA, 5 min inkubace v 37 °C. Buňky přeneseme do eppendorfy, stočíme (200g/5 min), odstraníme supernatant. K peletu přidáme 350  $\mu$ l lyzačního pufru RLT s 1 % merkaptoethanolem (Sigma Aldrich), důkladně zvortexujeme 30 sec, rychle stočíme a necháme inkubovat v RT 5 min.

**Výpočet:** 5+1 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 30 sec, rychle stočíme a znovu inkubujeme 5 min v RT.

Vzorky přeneseme do kolonky vložené do 2 ml sběrné zkumavky.

Centrifugace na max/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 (promývání)

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 12 ul.

Přidáme 1  $\mu$ l 0,5 ug/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 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 ug RNA (ul)	H <sub>2</sub> O (do 12 ul)

### Reakční mix pro RT:

	1 vzorek	5+1 vzorků
5x RT reakční pufr	4 ul	
dNTP	2 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
10+4 vzorků	42	5,25	5,25	23,8	182,7 ul

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

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

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

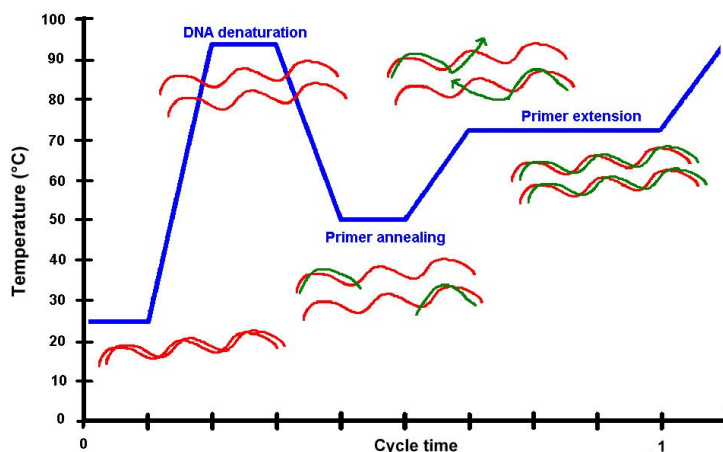
	HPRT		ZNRF3		Axin2		CD1					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A -CTR												
B CTR												
C W												
D R												
E W+R												
F												
G												
H												

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 byly vysety buňky ( $150 \times 10^3$  v 150 ul) a k buňkám byla přidána CM a LGK dle rozpisu.

Ze vzorků odsajeme médium a opatrně přidáme 0,5 ml PBS, které také odsajeme

Přidáme 100 ul Laemmli lyzačního pufru (sodium dodecyl sulfate, 2 % SDS, 10 % glycerol a 100 mM TRIS pH 6,8, 0,05 % bromfenolová modř, 25% merkptoetanol).

Inkubujeme 10 minut na ledu a následně přeneseme do zkumavek (vzorky je možné uchovávat v  $-20^\circ\text{C}$ ).

PRÁCE NA LEDU!

Rozbití buněčných struktur a DNA provedeme sonikací a vařením na  $95^\circ\text{C}/5$  min v bločku.

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

2x polyakrylamidový gel 8 %, tloušťka 1,5 mm, 15 jamek

Před nanesením vzorků na gel je důkladně zvortexujeme.

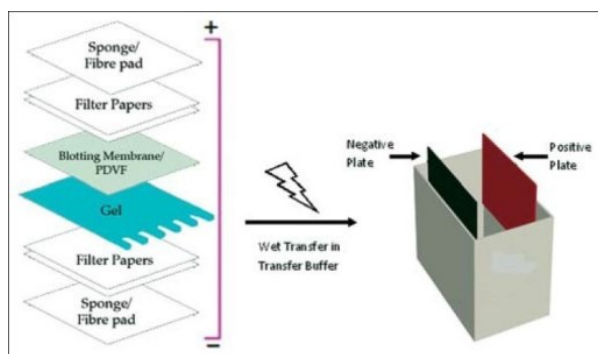
Do každé jamky v gelu napipetujeme 20  $\mu\text{l}$  z každého vzorku a do krajních jamek napipetujeme 1,5  $\mu\text{l}$  barevně značeného proteinového standardu (PagerRuler Plus Prestained Protein Ladder, ThermoScientific) dle rozpisu.

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.

7



### Složení použitých roztoků:

10x elektroforetický/transferový pufr	Dest. H <sub>2</sub> O	Glycin	TRIS
	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 (doplňn dest. H <sub>2</sub> O do 1 l)	NaCl	TRIS pH 7,4	Tween
	SS: 5 M	SS: 2 M	SS: 20%
	WS: 150 mM	WS: 20 mM	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

Nařezeme membránu na proužky podle markeru molekulární hmotnosti tam, kde předpokládáme výskyt hledaných proteinů podle barevných standardů.

Proužek 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  $4^\circ\text{C}$ , na rolleru

Studenti      Kontrola  
M TCL IgG Flag MTCL IgG FLAGM -K K W R WRM

pS1490-LRP6 150-250 kDa (cs-2568, 1:1 000) R	kDa	250
Aktivní $\beta$ catenin (ABC), 92 kDa (Millipore5665, 1:1000) M	kDa	130
CK1 45 kDa	kDa	72
	kDa	55
	kDa	35

Doplňte chybějící informace o výrobci Ab a ředění,

Total LRP6 150-250 kDa (1:1000)	kDa	250
DVL2 90-95 kDa	kDa	130
	kDa	100
	kDa	72
Tubulin alfa 55 kDa (cs-5335S, 1:1 000) R	kDa	55
	kDa	35

a druhové specifitě.

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 uspořádáme do původní podoby 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

**Výsledek** přiložte jako samostatnou přílohu

## **Imunofluorescenční analýza translokace beta-cateninu do jádra (IF)**

Buňky A375 GFP (melanom kůže) vysejeme dva dny předem (50x10<sup>3</sup> b) na krycí sklíčka. Den předem přidáme kondiciovaná média dle rozpisu a inkubujeme přes noc. Odsajeme média a třikrát propláchneme PBS (sklíčka leží na dně jamek). Přidáme 4 % paraformaldehyd, inkubujeme 10 min/RT. Opláchneme v PBS, přidáme 250 ul 1% BSA v PBS na 30 min/RT. Permeabilizujeme v 0,1 % Tritonu X-100 v PBS 10 min/RT, opláchneme v PBS. Přidáme 250 ul I. protilátky mouse anti-total β-cat (BD) ředěné 1:1000 v 1% BSA, inkubace 2h/RT nebo ON/4 °C. Oplach v PBS 3x. Přidáme 250 ul II. Protilátky anti-mouse-Alexa 568 ředěné 1:600 v 1% BSA+ DAPI 1:1000, inkubace 1 h/ RT. Oplach PBS a zamontování do DAKO media (bodově přilepit lakem na nehty). Na konfokálním mikroskopu Leica SP8 pozorujeme zeleně zbarvené buňky, modrá jádra a červeně označený beta catenin, který by se měl po stabilizaci kumulovat v jádře.

### **Výpočet:**

10 ml 1 % BSA (prášková forma) v PBS:

2 ml 1 % TRITON X-100 (viskózní tekutina) v PBS:

I. protilátka 5+1 vzorků =

II. protilátka + DAPI: 5+1 vzorků =

**Výsledek:**

## Imunoprecipitace vazebných partnerů Dvl

Dva dny předem vysejeme HEK na 10 cm misku, tak abychom druhý den dosáhli 80 % konfluence, druhý den ráno provedeme transfekci pomocí PEI (poměr DNA : PEI = 1:3).

1. Smícháme 5 ug plazmidu DVL2-Flag s 500 ul DMEM pure – vortex výpočet: SS plazmidu (300 ng/ul)
2. Smícháme 15 ul PEI s 500 ul DMEM pure - vortex
3. Počkáme 10 min
4. Smícháme obě připravené směsi – vortex
5. Počkáme 30 min

**PRACUJEME NA LEDU!!** Vychladíme předem centrifugu!

Výslednou směs přidáme po kapkách k buňkám a po 6 hodinách vyměníme médium za nové. Další den odsajeme médium, opláchneme buňky PBS a odsajeme PBS. Zamrazíme buňky na sucho v -80 °C (aspoň 10 min). Přidáme 2 ml IP lyzačního pufru, přeneseme lyzát do zkumavky, jemně sonikujeme. Následuje centrifugace 12 000 g/12 min, 4 °C. Odebereme 100 ul supernatantu jakožto celkového buněčného lyzátu na WB. Zbytek supernatantu rozdělíme na 2 části. Do části A přidáme 1 ug (SS 1 ug/ul) I. protilátky mouse anti-FLAG M2. Do části B přidáme 1 ug nespecifické protilátky mouse anti-IgG (SS 1 ug/ul). Inkubujeme na rolleru 4 °C/ ON. Další den připravíme kuličky Protein A beads tak, že pufr, ve kterém jsou uchované, vyměníme za lyzační pufr: Odebereme dobře protřepané kuličky - 1 vzorek = 20 ul suspenze kuliček (slurry) a přidáme do 1 ml IP lyzačního pufru, centrifugujeme 200g/2 min/ 4°C. Odsajeme supernatant, přidáme 1 ml IP lyzačního pufru a opět centrifugujeme 200g/2 min/ 4°C. Přidáme stejné množství beads do FLAG i kontrolní IgG IP reakce. Inkubace 6 h, 4 °C. Promýt 4x pomocí IP lyzačního pufru a centrifugace 200 g/1 min/ 4°C, po poslední centrifugaci odsát co nejvíce. Přidat 200 ul 2x Laemmli buffer. Detekce vazebných partnerů DVL2 pomocí WB.

### Výpočet:

#### Lyzační pufr (100 ml)

- |                   |                |
|-------------------|----------------|
| 50 mM Tris pH 7.4 | (SS 1M)        |
| 150 mM NaCl       | (SS 5M NaCl)   |
| 0,5 % NP40        | (SS 100% NP40) |
| 1 mM EDTA         | (0,1M EDTA)    |

#### přidat před použitím (10 ml):

1uM DTT (SS 1M)

PIC (protease inhibitors cocktail) 2 ul do 100 ul roztoku

**Výsledek viz Western blotting.**

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