

Detekce indukce reparačních mechanismů DNA a aktivace apoptózy indukované cytotoxickými látkami u nádorových buněk

Seznam plánovaných experimentů:

1. Sledování vlivu cytotoxické látky poškozující DNA na proliferaci buněk.
 2. Detekce indukce reparačních mechanismů DNA metodou nepřímé imunofluorescence.
 3. Detekce indukce reparačních mechanismů DNA a aktivace apoptózy průkazem štěpené formy kaspázy 3 a PARP za využitím elektroforózy a westernového přenosu.
 4. Měření četnosti mrtvých buněk pomocí barvení sytox green a analýzou na průtokovém cytometru.
 5. Stanovení subG₀ fáze buněčného cyklu průtokovou cytometrií.
 6. Transfekce nádorových buněk lipofekcí a stanovení aktivity transkripčního faktoru p53 transaktivačními testy.
-

1. 1. Sledování vlivu cytotoxické látky poškozující DNA na proliferaci buněk

Úvod:

V současné době se při léčbě pacientů s různými onkologickými onemocněními využívají chemoterapeutika, což jsou látky s cytotoxickým nebo cytostatickým účinkem, které působí na specifické procesy v nádorových buňkách. Jejich hlavním účinkem je zastavení růstu nádorových buněk. Jednou z těchto látek je i Cisplatina (cisdiamino-dichlor platnatý komplex, CDDP) řadící se mezi tzv. alkylační cytostatika. Mechanismus protinádorového účinku cisplatiny spočívá v její interakci s DNA a v tvorbě kovalentních vazeb mezi cytostatikem a purinovými bázemi, nejčastěji s guaninem. Což vede k zastavení replikace a indukci opravných mechanismů, mimo jiné k aktivaci proteinových kináz ATR nebo ATM a stabilizaci p53 nádorového supresoru. Cisplatina působí jako látka nespecifická pro buněčný cyklus a ovlivňuje tedy i buňky ve fázi G₀.

Cíl:

Sledovat efekt působení cytotoxické látky, Cisplatina, na proliferaci buněk MDA-MB-231.

Postup a příprava vzorků:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 budou použity do experimentů. Pokud se v protokolu objevuje věta „Adherentní buňky MDA-MB-231 trypsinizací převést do suspenze, spočítat.“ Má se tím na mysli následující postup.
 - a. Například pro buňky pěstované na 10 cm misce.
 - b. Nejprve odsát médium a buňky opláchnout 5 ml 1x PBS.
 - c. Přidat 2 ml Trypsinu na 10 cm kultivační misku a misku přenést do inkubátoru na 5 – 10 minut, dle typu a konfluence buněk.
 - d. Pak přidat 8 ml čerstvého média (DMEM, s 10% FCS (Foetal calf serum), antibiotiky a Glutminem L.
 - e. Odebrat 70 µl a přenést je do zkumavky na měření buněk. Přidat 7 ml PBS a změřit počet buněk na přístroji (Innovatis CASY Cell Counter and Analyzer TT + CASY).
2. Na 6ti-jamkovou kultivační destičku nasadit buňky v koncentraci 4*10⁵b/jamku/4ml (bude nasazeno předem).
3. Kultivace buněk 24 hod při 37°C v 5% atmosféře CO₂.
4. Přidání zvolené cytotoxické látky Cisplatina (CDDP) o finální koncentraci 100 µM.
5. Kultivace buněk 24 hod při 37°C v 5% atmosféře CO₂.
6. Ve zvoleném časovém intervalu (24, 48 a 72 hodin) buňky promyjeme 1xPBS, trypsinizací převedeme do suspenze a spočítáme.

1. 2. Sledování vlivu zvyšující se koncentrace cytotoxické látky poškozující DNA na proliferaci buněk

Cíl:

Sledovat efekt zvyšující se koncentrace cytotoxické látky, Cisplatiny, na proliferaci buněk MDA-MB-231 buněk.

Postup a příprava vzorků:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 5 ml kultivační misky v koncentraci $4 \cdot 10^5$ b/4ml (bude nasazeno předem).
 2. Kultivace buněk 24 hod při 37°C v 5% atmosféře CO₂.
 3. Přidání zvolené cytotoxické látky CDDP o koncentraci 0, 1, 5, 10, 50 a 100 µM.
 4. Kultivace buněk 24 - 48 hod při 37°C v 5% atmosféře CO₂.
 5. Buňky promyjeme 1xPBS, trypsinizací převedeme do suspenze a spočítáme.
-

2. Detekce aktivace reparačních mechanismů DNA metodou nepřímé imunofluorescence

Úvod:

Poškození DNA je proces, který vede k poškození DNA řetězce nebo k záměně daného nukleotidu za jiný, a tím pádem ke vzniku mutace. Poškození DNA může být způsobeno fyzikálními, chemickými a biologickými faktory. Mezi chemické faktory způsobující poškození DNA patří i Cisplatina, viz výše, a Doxorubicin, což je cytotoxické antracyklinové antibiotikum izolované z kultur bakterie *Streptomyces peuceotius*, var. *Caesius*. Obdobně jako Cisplatina, Doxorubicin se také váže na DNA, a to současně na oba řetězce. Tento proces se nazývá – interkalace, která znemožňuje replikaci DNA při dělení buňky a transkripci. Doxorubicin dále inhibuje enzym topoizomerázu II, která se významně podílí na replikaci DNA a re-ligaci DNA v průběhu oprav poškozené DNA, a tím dochází k endogennímu poškození DNA, a následně i zastavení buněčného cyklu.

V průběhu evoluce si buňky vytvořily reparační mechanismy (z anglického DNA damage repair pathways), které dokáží opravit DNA na různých úrovních. Savčí buňka disponuje nejméně pěti typy oprav DNA, a to: Přímá oprava, Excizní opravy (BER – base excision repair, NER – nucleotid excision repair), Mismatch repair, Homologní rekombinace a Nehomologní spojení konců DNA. Pro každou z oprav je typické zapojení specifických proteinů a signálních drah. Pro potřeby cvičení se zaměříme na proteiny, které se účastní procesu rozpoznání a oprav DNA, jako γ -H2A-X nebo Rad51. Protein Rad51 se účastní homologní rekombinace a jeho úloha spočívá v párování nepoškozené sekvence a sekvence s mutací a re-syntézu poškozeného úseku DNA. Protein γ -H2A.X patří do histonů z rodiny H2A a jeho fosforylace na Ser-139 asociuje s místy dvouřetězcových zlomů v DNA, po působení DNA interkalujících látek.

Nepřímá imunofluorescence - je metoda, která slouží k

- detekci množství, lokalizaci a strukturního uspořádání proteinů ve fixovaných buňkách nebo tkáních
- využívá specifické primární protilátky
- sekundární protilátky jsou značené fluorescenční molekulou (FITC, texas red, rhodamin, ...), která po excitaci zářením o určité vlnové délce emituje záření o jiné vlnové délce
- fluorescenční mikroskop – musí být osazen jak excitačním filtrem (záření dopadající na preparát) tak i emisním filtrem (filtruje záření vycházející z preparátu)

- umožňuje detekci více proteinů naráz (více fluorescenčních molekul)
- lze lokalizovat studovaný protein do buněčných organel pokud značené specifickými sondami.

Fixační média - Fixace je postup, který je prováděn za účelem zastavení všech procesů, probíhajících v buňce, a současného zachování co možná nejpřesnějšího stavu a struktury tkáně. Fixační činidlo je voleno podle řešeného diagnostického problému, typu a velikosti dostupného materiálu a podle zvolené zalévací a barvicí metody. Nejběžněji se používají roztoky formaldehydu, paraformaldehydu, glutaraldehydu, methanolu.

Montovací média - pro ochranné účely a následné optimální mikroskopické sledování jsou obarvené buňky montovány vhodnými montovacími činidly. Použitý typ závisí na daném protokolu. Jedním z nejdůležitějších parametrů montovacích médií je index lomu (nD); musí být okolo 1,5, čímž odpovídá indexu lomu skla. Glycerol, Mowiol (Calbiochem), Vectashield (Vector), Fluoromont-G (Sothern Biotechnology Associates).

Cíl:

Zjistit, zda v buňkách MDA-MB-231 nebo U2OS vystavených působení cytostatické látky dochází k aktivaci reparačních mechanismů DNA.

Postup a příprava vzorků:

1. Před vlastním vyšetím MDA-MB-231 buněk do jamky 6ti-jamkové kultivační destičky vlož krycí sklíčko opálené v 100% EtOH.
2. Adherentní buňky MDA-MB-231 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 6ti-jamkovou kultivační destičku v koncentraci $6 \cdot 10^5$ b/jamku/4ml (bude nasazeno předem).
3. Kultivace buněk 24 hod při 37°C v 5% atmosféře CO₂.
4. Přidání zvolené cytotoxické látky Cisplatina o koncentraci 100 µM a Doxorubicin 0,4 µg/ml.
5. Kultivace buněk 24 hod při 37°C v 5% atmosféře CO₂.
6. Buňky opláchnout PBS a fixovat 30 minut ve 4% paraformaldehydu při pokojové teplotě.
7. Buňky opláchnou 2xPBS.
8. Permeabilizace membrán roztokem PBS/Triton X-100 (0,2% Tritonem X-100 v PBS) po dobu 20 minut při pokojové teplotě a oplach 2xPBS.
9. Inkubace buněk s primární protilátkou naředěnou v PBS/BSA ve 4°C přes noc.
10. Oplach buněk 3x10 minut roztokem PBS/BSA/Tween.
11. Inkubace buněk se sekundární protilátkou, ředění 1:300, v PBS/BSA po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě.
12. Oplach buněk 3x10 minut roztokem PBS/BSA/Tween.
13. Obarvení jaderné DNA za pomoci PI (propidium jodid, koncentrace 10 µg/ml) naředěném v roztoku PBS/BSA/Tween po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Možná alternativa je, když montovací médium obsahuje barvičku, která je schopna barvit DNA? Jako například DAPI (4',6-diamidin-2-fenylyndol).
14. Nakonec sklíčka opláchneme destilovanou vodou. Na podloží sklíčko, na stranu fixovaných a obarvených buněk nanesu 3 ul Mowiolu (montovací medium od firmy Calbiochem). Opatrně otočím a pološím sklíčko s kapkou Mowiolu orientovanou směrem dolů na podložní sklo. Preparáty pozorujeme ve fluorescenčním mikroskopu s vhodným emisním a excitačním filtrem pro FITC.

Použité protilátky a roztoky:

PBS – fosfátový pufr, pH = 7,6

Navazte a smíchejte:

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 0,24 g KH₂PO₄
- 1,44 g Na₂HPO₄
- doplňte vodou do 800 ml a rozpust'ete za stálého míchání
- upravte pomocí HCl na požadované pH
- doplňte vodou do 1000 ml

PBS/Triton X-100

- Do 100 ml PBS přidejte 200 µl Tritonu X-100.
- Výsledná koncentrace Tritonu X-100 je 0,2%.

PBS/BSA

- Do 200 ml PBS přidejte 200 mg BSA.
- Výsledná koncentrace BSA je 1 mg/ml.

PBS/BSA/Tween

- Do 500 ml PBS/BSA přidejte 250 µl Tween-20.
- Výsledná koncentrace Tween-20 je 0,05%.

Fixační směs: 4% paraformaldehyd v PBS

Montovací médium: Mowiol s DAPI (Calbiochem)

Protilátky:

- myší monoklonální anti - H2A.X – P (Ser 139) protilátka, (cat.n.: 613402), (Biolegend)
- myší monoklonální anti-53BP1 protilátka, (cat.n.: SCT-4937), (Santa Cruz)
- anti-myší IgG konjugovaná s FITC (Invitrogen)

3. Detekce indukce reparačních mechanismů DNA a aktivace apoptózy průkazem štěpené formy kaspázy 3 a PARP za využitím elektroforézy a westernového přenosu.

Úvod:

Pokud buňka není schopna efektivně opravit poškozenou DNA, pak zpravidla aktivně zahájí proces apoptózy. Apoptóza, neboli typ I programované buněčné smrti, slouží k eliminaci nepotřebných či poškozených buněk. Je součástí fyziologických i patologických dějů. Během apoptózy dochází ke kondenzaci chromatinu, fragmentaci DNA a rozpadu buněk na apoptotická tělíška, která jsou následně fagocytována. Apoptóza je charakteristická dvěma signálními drahami – vnitřní - řízená mitochondriemi a vnější - řízená aktivací receptorů smrti.

Cíl:

Zjistit, zda v buňkách MDA-MB-231 vystavených působení chemoterapeutika dochází k indukci reparačních mechanismů DNA a aktivaci apoptózy.

Postup a příprava vzorků:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 trypsinizací převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 6ti-jamkovou kultivační destičku v koncentraci $6 \cdot 10^5$ b/jamku/4ml (bude nasazeno předem).
2. Po 24 hodinách buňky ovlivníme Cisplatinou o koncentraci 0 a 100 µM a Doxorubicin 0,4 µg/ml samostatně nebo společně.
3. Další den buňky převedeme trypsinizací do roztoku, stočíme centrifugací 4min/290g, odsajeme médium.
4. Promyjeme stočený pelet PBS jako v předchozím kroku.

5. Pelet lyzujeme v 50 μ l Lyzačním pufru (10 mM Tris pH=8,0; 25 mM EDTA; 1% SDS).
6. Měření koncentrace proteinů (DC™ Protein Assay Kit, Bio-Rad, kat.č.: 5000111):
 - a. Na mikrodestičku pipetovat 5ul každého vzorku ve třech opakováních.
 - b. Ke vzorkům přidat 25 ul roztoku A' (obsahuje 20 ul roztoku S na 1 ml roztoku A).
 - c. Přidat 200 ul roztoku B, zbavit vzorky bublin a ponechat 15 minut stát.
 - d. Poté změřit absorbanci na ELISA readeru při 750 nm.
 - e. Vypočítat vhodné ředění vzorků tak, aby na SDS-PAGE bylo naneseno stejné množství proteinů od každého vzorku.
7. Připravené lyzáty o dané koncentraci proteinů smícháme s odpovídajícím množstvím připraveného 3x Laemmli pufr a povaříme 5 minut při 100°C.

Příprava akrylamidového gelu:

1. S použitím rukavic vyčistit skla, promýt pod tekoucí vodou, umýt detergentem, propláchnout destilovanou vodou, opláchnout ethanolem a utřít.
2. Sestavit skla se spacersy a sevřít je svorkami.
3. Připravit roztok pro dolní (separační) gel, jemně promíchat a nalít mezi připravená skla asi do 2/3. Převrstvit gel slabou vrstvou destilované vody. Nechat polymerovat 30 minut.
4. Slít horní vrstvu destilované vody, připravit roztok pro horní (zaostřovací) gel, nalít jej na dolní gel, vsunout hřebínek a nechat polymerizovat 45 minut.

Nanášení vzorků a elektroforéza:

1. Skla s gelem umístíme do elektroforetické aparatury, dolijeme elektroforetický pufr a opatrně vytáhneme hřebínky.
2. Na gel nanášíme 10-20 ul vzorku (množství závisí na koncentraci proteinů v buněčných lyzátech).
3. Připojíme aparaturu ke zdroji. Pro průchod horním gelem aplikujeme 80V, poté zvýšíme napětí na 120V.
4. Elektroforézu zastavím v momentě, když čelo barvičky v gelu opouští gel.

Sestavení blotovací/transferové aparatury:

1. Nastříháme 4 kusy papíru Whatman 3MM a PVDF (polyvinylidene difluoride) membránu stejné velikosti jako je proteinový gel.
2. PVDF membránu aktivujeme MetOH.
3. Navlhčíme papíry Whatman a porézní podložky v transferovém pufru.
4. Plastikovou svorku umístíme do vaničky s transferovým pufrům černou plochou dolů. Na ní položíme porézní podložku a vytlačíme bubliny.
5. Na podložku umístíme 2 navlhčené filtrační papíry Whatman a opět vytlačíme bubliny.
6. Na papíry Whatman položíme gel a na něj opatrně navlhčenou PVDF membránu.
7. Na membránu pak opět položíme dva papíry Whatman, vytlačíme bubliny a na ně druhou porézní podložku. Opět vytlačíme bubliny.
8. Takto sestavený sendvič sevřeme do plastické svorky a umístíme do vaničky s transferovým pufrům a chladítkem.
9. Blotujeme 1 hod při 400 mA.

Detekce proteinů na membráně pomocí protilátek:

1. Po skončení blotingu/transferu promyjeme membránu v 5% roztoku sušeného mléka v TBS-Tween po dobu 30 minut při pokojové teplotě nebo přes noc při 4°C.
2. Inkubujeme membránu s primární protilátkou ředěnou 1:1000 v TBS-Tween 1 hod při pokojové teplotě nebo přes noc při 4°C.
3. 3x promyjeme v TBS-Tween (cca 5 minut každé promytí).
4. Inkubujeme membránu 1 hod se sekundární protilátkou s konjugovanou peroxidázou (anti-mouse IgG ředěná 1:5000 v TBS-Tween) při pokojové teplotě.
5. Promyjeme třikrát 5min TBS-Tween.
6. Opláchneme membránu v destilované vodě.
7. Na membránu nakapeme substrát a inkubujeme 5 min při pokojové teplotě.
8. Detekce signálu v temné komoře nebo za využití detekčního zařízení s citlivou kamerou.
9. Po vyvolání signálu membránu obarvíme v 0,2% roztoku amidoblack - nespecifické barvení proteinů, potvrzení srovnání hladiny celkových proteinů

Použité roztoky

<u>Transferový pufr:</u>	<u>TBS:</u>	<u>TBS-Tween:</u>
48mM Tris	50 ml 1M Tris-Cl pH=8.0	přidat 1,5 ml Tween 20 do 2 litrů TBS
39mM glycín	57,6 ml 5M NaCl	
20% methanol	doplnit vodou do 2 litrů	

<u>Odbarvovací roztok:</u>	<u>Tris-glycín elektroforetický pufr (ph=8,3):</u>
500 ml metanolu	25mM Tris
400 ml destilované vody	250mM glycine
100 ml kyseliny octové	0,1% (w/v) SDS

Barvicí roztok: (barvení proteinů na gelu)

2,5 g Coomassie Blue na 1L odbarvovacího roztoku
 - pro barvení proteinů na membráně:
 1g amidové černi na 1L odbarvovacího roztoku

<u>Dolní (dělicí) gel – 10% (10ml)</u>	<u>Horní (zaostřovací) gel – 4% (7,5ml)</u>
H ₂ O 4,9 ml	H ₂ O 5,62 ml
40% Akrylamid 2,4 ml	40% Akrylamid 0,79 ml
1,5M Tris-Cl (pH=8,8) 2,5 ml	1,5M Tris-Cl (pH=6,8) 0,94 ml
10% SDS 0,1 ml	10% SDS 75 ul
Ammonium persulfate 75 ul	Ammonium persulfate 30 ul
TEMED 7,5 ul	TEMED 10 ul

Lyzační pufr
 10 mM Tris pH=8,0; 25 mM EDTA; 1% SDS

4. Měření četnosti mrtvých buněk pomocí barvení sytox green na průtokovém cytometru.

Úvod:

Sytox green je barvivo, které se váže na nukleové kyseliny v buňce a po ozáření světlem o vlnové délce 488 nm emituje záření o vlnové délce 523 nm. Sytox green nedokáže procházet přes buněčné membrány živých buněk, jednom přes porušené membrány mrtvých buněk, je proto vhodným barvivem pro detekci buněčné smrti.

Cíl:

Zjistit, zda-li dochází k indukci buněčné smrti u buněk prsního karcinomu vystavených působení sledovaných chemoterapeutik.

Postup a příprava vzorků:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 2ml misky v koncentraci $3 \cdot 10^5$ /2ml.
 2. Kultivace buněk 24hod při 37°C.
 3. Ovlivnění buněk Cisplatinou o koncentraci 0 a 100 μ M a Doxorubicin 0,4 μ g/ml samostatně nebo společně.
 4. Kultivace buněk 48 hod při 37°C.
 5. Sklizení buněk včetně buněk plovoucích v médiu.
 6. Stočit a odsát supernatant.
 7. Suspendovat pelet v 0,2 ml 1x PBS se sytox green (ředění 1: 10 000).
 8. Měření na průtokovém cytometru FACSVerse.
-

5. Stanovení subG₀ fáze buněčného cyklu průtokovou cytometrií

Úvod:

Ovlivnění nádorových buněk chemoterapeutiky může být doprovázeno změnami v regulaci buněčného cyklu. Tyto změny lze sledovat analýzou obsahu DNA v buňkách po obarvení propidium jodidem pomocí průtokového cytometru FACSVerse. Propidium jodid (PI) je interkalující barvivo, které se váže k nukleové kyselině a po ozáření světlem o vlnové délce 488 nm emituje záření o frekvenci vyšší než 560 nm. Pro proniknutí do živých buněk je potřeba buňky nejdříve fixovat (nebo do barvicího roztoku přidat slabý detergent). Množství navázaného barviva je úměrné množství DNA v buňce. Z jednoparametrové analýzy fluorescenčního signálu propidium jodidu je možné určit obsah DNA v buňkách a tím i fázi buněčného cyklu, ve které se buňky nacházejí. Při indukci apoptózy můžeme buňky detekovat v subG₀ fázi buněčného cyklu.

Cíl:

Zjistit, zda-li sledované chemoterapeutikum indukuje vstup buněk do subG₀ fáze buněčného cyklu a vyhodnotit změny v distribuci ostatních fází buněčného cyklu.

Postup příprava vzorků:

1. Adherentní buňky MDA-MB-231 převést do suspenze, spočítat. Nasadit na 5ml misky v koncentraci $0,8 \cdot 10^6$ /5ml (bude nasazeno předem).
2. Následující den přidat k buňkám Cisplatinu o koncentraci 0 a 100 μ M a Doxorubicin 0,4 μ g/ml samostatně nebo společně.
3. Kultivace buněk 48 hod při 37°C v 5% atmosféře CO₂.
4. Buňky trypsinizovat a médium s buňkami pipetovat do 15ml zkumavek, sklídit buňky 1 mM EDTA v PBS, centrifugace 500g/5min.
5. Buňky promýt 1xPBS.
6. Pelet rozsuspendovat v 0,25 ml PBS a přikapat 2 ml vychlazeného 70% etanolu.
7. Fixace min. 30 min v 4°C nebo v -20°C.
8. Centrifugace 500g/5 min, odsát supernatant.
9. Promýt 4 ml 1xPBS.
10. Rozsuspendovat ve Vindelově roztoku (obsahuje propidium jodid a RNázu).
11. Barvit 30 min, 37°C, ve tmě.
12. Analýza množství DNA průtokovým cytometrem.

6. Transfekce nádorových buněk lipofekcí a stanovení aktivity transkripčního faktoru p53 transaktivačními testy

Úvod:

Protein p53 jako transkripční faktor je ve funkci nádorového supresoru aktivovaný různými stresovými podmínkami. Protein p53 se váže na specifické sekvence a ovlivňuje tak expresi svých cílových genů. Některé z cílových sekvencí, například *p21/waf1*, jsou zodpovědné za stresem indukované zastavení buněčného cyklu v přechodu z fáze G1 do S. Jiné, například *bax* nebo *puma*, indukují apoptózu.

Detekce aktivity p53 je možná pomocí přechodné transfekce metodou lipofekce, s použitím konstruktů pRGC-luc, který obsahuje syntetickou p53 vazebnou sekvenci RGC (ribosomal gene cluster) zařazenou před promotor tk-luc (Kern et al., 1991). Tento konstrukt umožňuje sledovat aktivitu p53 pomocí luciferázové aktivity.

Lipofekce je metoda při níž dochází k vytvoření komplexů záporně nabitě plazmidové DNA s kationickým lipidovým činidlem. Takto vytvořené komplexy jsou schopny pronikat přes lipidovou membránu do eukaryotických buněk.

Postup - lipofekce:

1. 4×10^5 buněk LM5 nasadit do 2 ml kultivačního média a kultivovat 24 hod při 37°C v 5% atmosféře CO₂.
2. Do 200 µl média Opti-MEM přidat 2 µg transfekční plazmidové DNA a 2 µL Plus reagentu a lehce promíchat. Inkubovat 5 minut při pokojové teplotě.
3. K naředěné DNA přidat 4 µL Lipofectamine 3000 připraveného v 200 µl média Opti-MEM, lehce promíchat a inkubovat při laboratorní teplotě 30 minut.
4. Transfekční směs nakapat na buňky a inkubovat 24 hod při 37°C v 5% atmosféře CO₂.
5. Vyměnit médium, ošetřit buňky Cisplatinou o koncentraci 0 a 100 µM, Doxorubicin 0,4 µg/ml samostatně nebo společně, a inkubovat 24 h při 37°C v atmosféře 5% CO₂.
6. Stanovit aktivitu luciferázy z extraktů přechodně transfekovaných buněk transaktivačním testem, stanovit koncentraci proteinů.

Použité roztoky:

Pufr (2) pro aktivitu luciferázy:

25 mM gly-gly - 0,5 ml
15 mM K-fosfátu - 75 µl
15 mM MgSO₄ - 75 µl
4 mM EGTA - 50 µl
2 mM ATP - 100 µl
1 mM DTT - 5 µl
ddH₂O - 4,195 ml

Postup-stanovení aktivity luciferázy z extraktů přechodně transfekovaných buněk transaktivačním testem:

1. Odsát médium, promýt buňky v 1x PBS, sklídit a centrifugovat 5 min/500g/pokojová teplota.
2. Odsát supernatant, pelet suspendovat v 50 µl roztoku 0,25M Tris.Cl pH 7,5.
3. Lyzovat buňky třemi cykly prudkého zamražení v – 80 °C a rozmražení. Extrakt zbytečně nevystavovat pokojové teplotě a světlu – ztráta aktivity luciferázy.
4. Centrifugace 5 min/4 °C/max. výkon.
5. Přenést supernatant do nové zkumavky, umístit na ledu pro provedení testu nebo v – 80 °C pro dlouhodobé uchování.

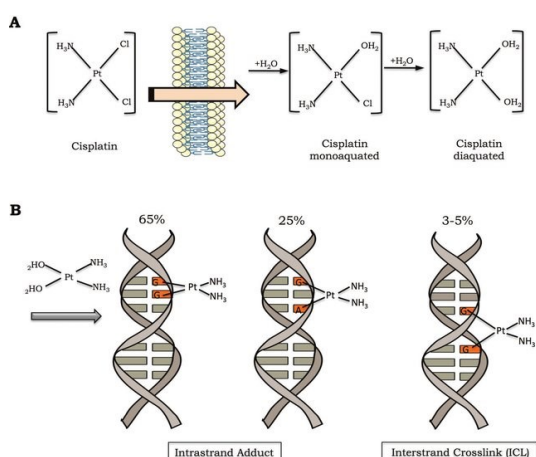
Postup – Měření aktivity luciferázy:

1. 10 µl lyzátu přenést do 90 µl 0,25 M Tris pH 7,5 a 360 µl pufru 2.
2. Přenést zkumavky do luminometru, přidat 200 µl roztoku luciferinu (1 mM luciferin s 10 mM DTT ředěný ve vodě v poměru 1:4).
3. Změřit aktivitu luciferázy.
4. Relativní luciferázovou aktivitu spočítat jako aktivita luciferázy na množství proteinu v lyzátu.

Stanovení koncentrace proteinů:

Koncentrace proteinů bude stanovena jako v úloze 3.
Působení Cisplatinu na buněčné procesy.

Informace k účinku cis-platiny.



Aktivace cisplatinu a indukce poškození DNA.

A) Proces aktivace cisplatinu probíhá výměnou jednoho nebo dvou jejích chloridů za molekuly vody (monoaquated a diaquated).

B) Cisplatin může vytvářet kovalentní vazby s DNA. Hlavní léze DNA jsou vnitřetřezcové adukty DNA a mezitřezcové křížové vazby (ICL). Procenta představují frekvenci každého typu poškození DNA vyvolaného cisplatinou.

Clinics (Sao Paulo). 2018 Sep 6;73(suppl 1):e478s. doi: 10.6061/clinics/2018/e478s.

Poškození DNA - určení zvýšeného počtu míst reparační pomocí γ HA2.X a RAD51 za využití nepřímé imunofluorescence. Přítomnost hladiny γ H2A.X pomocí western blotu.

Zjištění aktivity p53 za využití reportérového systému p53-dependenčních sekvencí a luciferázy.

Průkaz apoptózy detekcí štěpenou formou PARP a Kaspáza 3.

Vliv na buněčný cyklus hladina p21, počet mrtvých a živých buněk, množství DNA – Sytox green a propidium jodid.

Oncogene. 2003 Oct 20;22(47):7265-79. doi: 10.1038/sj.onc.1206933.

