

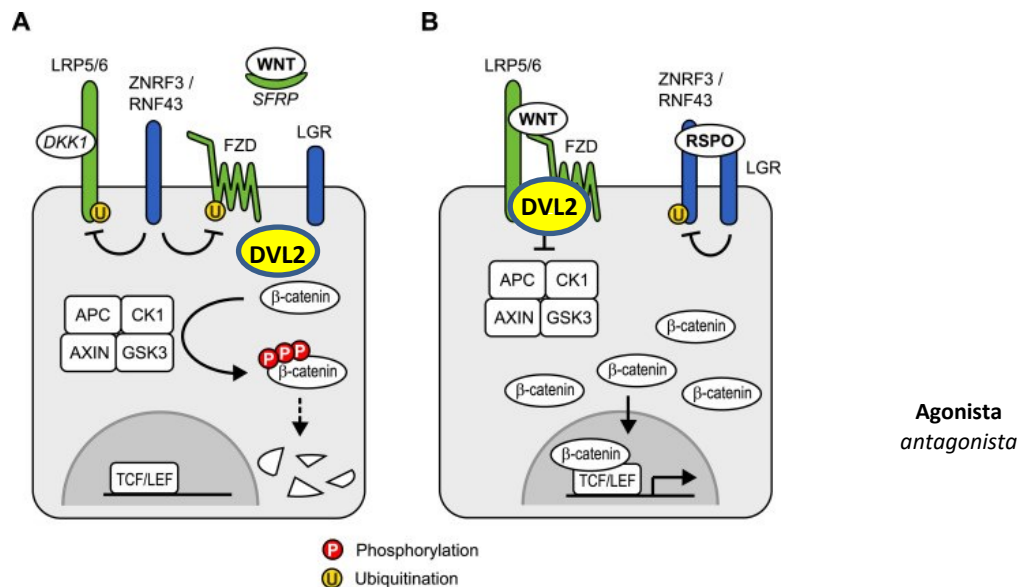
Jméno:

Stanovení aktivity β -cateninů

Modelový systém:

HEK 293 T-REx™-293 – Human Embryonal Kidney – epiteliální charakter

(Odkaz: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1573.aspx?geo_country=cz)

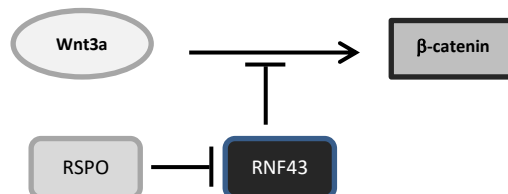


<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301468117300774>

A) V nepřítomnosti Wnt ligandů nebo při zablokování dráhy (např. v extracelulárním prostoru pomocí DKK1 nebo SFRP) je cytosolický β -catenin konstitutivně fosforylován v destrukčním komplexu, který zahrnuje proteiny APC, CK1, AXIN a GSK3. Tento fosforylovaný β -catenin je následně ubiquitinován a degradován v proteasomu. E3 ubiquitin ligázy ZNRF3 a RNF43 přidávají ubiquitinové značky na receptory Frizzled a LRP, což vede k jejich destabilizaci a inhibici Wnt signalizace.

B) Po vazbě Wnt ligandů (např. Wnt3a) na jejich receptory LRP5/6 a Frizzled dochází k fosforylaci proteinu DVL2, což vede k inhibici destrukčního komplexu. β -catenin se hromadí v cytosolu, následně se translokuje do jádra, kde se váže na transkripční faktor TCF/LEF, a umožňuje tak transkripci cílových genů této signální dráhy. R-spondin (RSPO) posiluje Wnt signalizaci vytvořením ternárního komplexu s LGR proteiny a ZNRF3/RNF43, což indukuje autoubiquitinaci ZNRF3/RNF43, vedoucí k jejich degradaci v proteasomu. Tento proces je dále zesílen přítomností 1 μ M LGK-974 (*Stock solution – SS: 1 mM*), inhibitoru acyltransferázy porcupine, která normálně acetyluje Wnt v endoplazmatickém retikulu a umožňuje jeho sekreci. V přítomnosti LGK-974 není endogenní Wnt sekretován, což zvyšuje citlivost buněk na exogenní Wnt stimulaci.

Ve zkratce:



Vzorky:

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

PROTOKOLY

Transfekce buněk

Buňky vysejeme den předem (50×10^3 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. **0,45x3 = 1,35**)

Výpočet:	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 všechno médium z jamek a přidáme do nich 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 při 37°C.

Stanovení účinnosti transfekce

- Mikroskopicky** – Fluorescenci vzorků, vyvolanou expresí plazmidu pMAX s GFP, budeme snímat pomocí fluorescenčního mikroskopu. K tomu použijeme kombinaci modrého excitačního světla a zeleného emisního filtru, přičemž udržujeme mírné osvětlení v průchozím světle, abychom mohli identifikovat nejen fluorescenční (pozitivní) buňky, ale také celkový počet buněk v zorném poli. Výsledná účinnost transfekce je dána poměrem počtu pozitivních buněk k celkovému počtu buněk.

Výsledek: Účinnost transfekce PEI je přibližně %.

- Pomocí ELISA readeru** – lyzát vytvořený 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 H₂O + 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: Zde napište stručné shrnutí výsledků, výpočty zpracujte do samostatné přílohy.

qRT-PCR

Izolace mRNA

Den předem byly vysety buňky ($1,50 \times 10^5$ 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 eppendorfky, stočíme (200g/5 min), odstraníme supernatant. K peletu přidáme 350 μ 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 H₂O, inkubace 2 min v RT

Centrifugujeme na max /1 min (eluce)

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

Naředíme si 1 ul vzorku + 9 ul RNase free H₂O 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 templátové 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 μ g** (výpočet), který doplníme RNase free H₂O do **objemu 12 ul**.

Přidáme **1 μ l (0,5 μ g/ul) Oligo(dT)**, inkubace vzorků 5 minut při 65 °C (PCR cykler).

Přidáme **4 μ l 5x RT** reakčního pufru, **2 μ l** 10 mM směsi nukleotidů **dNTP** a **1 μ l (200 U) RevertAid** reverzní transkriptázy (vše Thermo Fisher Scientific).

Zamícháme a krátce centrifugujeme, inkubace v cykleru 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 μ g RNA (ul)	H ₂ 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, MgCl₂)

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

1,7 ul MgCl₂ (SS 25 mM) vypočítej výslednou koncentraci:

Doředit do 18,5 ul sterilní RNase-free MQ H₂O

Detekované geny: HPRT, ZNRF3, Axin2, cyklin D1

	Sybr green	1. primer	2. primer	MgCl ₂	H ₂ 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

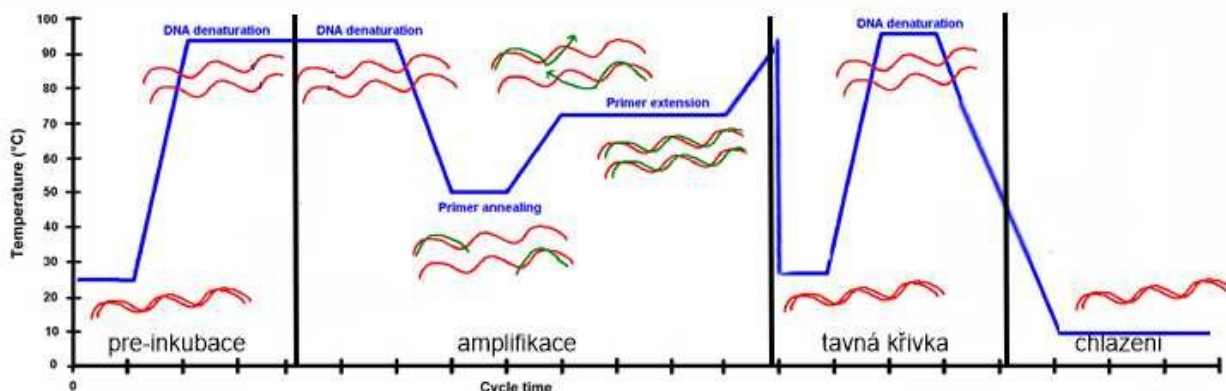
Do jamek na dno napipetovat v duplikátu (vedle sebe) master mix pro daný gen

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 časy 40 cyklů Vyhodnocení podle maxima 2. derivace křivky



Výsledek:

Zde napište stručné shrnutí výsledků, výpočty zpracujte do samostatné přílohy.

Western blotting

Příprava SDS lyzátů

Den předem byly vysety buňky ($1,5 \times 10^5$ 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 (2 % SDS (sodium dodecyl sulfate), 10 % glycerol a 100 mM TRIS pH 6,8, 0,005 % bromfenolová modř, 5% merkptoetanol).

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

PRÁCE NA LEDU!

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

SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

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

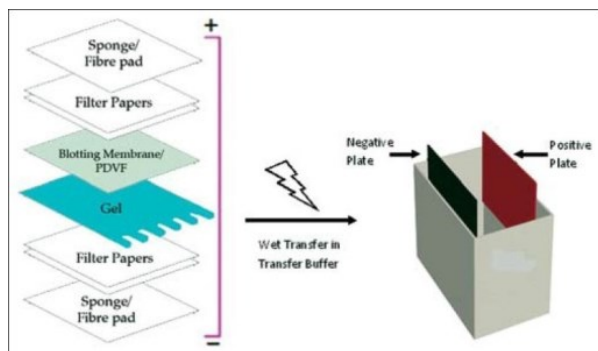
Před nanesením vzorků na gel je důkladně zvortexujeme.

Do každé jamky v gelu napipetujeme 20 μl z každého vzorku a do krajních jamek napipetujeme 1,5 μl 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). Při vytváření tzv. sandwiche důležité je myslet na to, že proteiny migrují ke + elektrodě a musí přitom přejít z gelu na membránu.



Složení použitých roztoků:

10x elektroforetický/transferový pufr	Dest. H ₂ O	Glycin	TRIS
	1 l	144 g	30,3 g
1x elektroforetický pufr	Dest. H ₂ O	10x elektrofor./transfer. pufr	20 % SDS
	9 l	1 l	50 ml
1x transferový pufr	Dest. H ₂ O	10x elektrofor./transfer. Pufr	Metanol
	1400 l	200 ml	400 ml
Promývací pufr (doplňn dest. H ₂ 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 $4\text{ }^\circ\text{C}$, na rolleru

Studenti Kontrola
- M -K K W R WR M -K K W R WR M -

pS1490-LRP6 150-250 kDa (cs-2568, 1:1 000) R	kDa
	250
Aktivní β catenin (ABC), 92 kDa (Millipore5665, 1:1000) M	130
	100
	72
Actin beta, 42 kDa	55

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

Doplňte chybějící informace o výrobci Ab a ředění a druhové specifitě.

Membrány druhý den přemístíme do misky a třikrát opláchneme promývacím pufrem po dobu 10 minut (shaker). Připravíme nové 50 ml falcony 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:

Zde napište stručné shrnutí výsledků, zpracujte do samostatné přílohy.

Závěr:

Celkové zhodnocení všech výsledků