

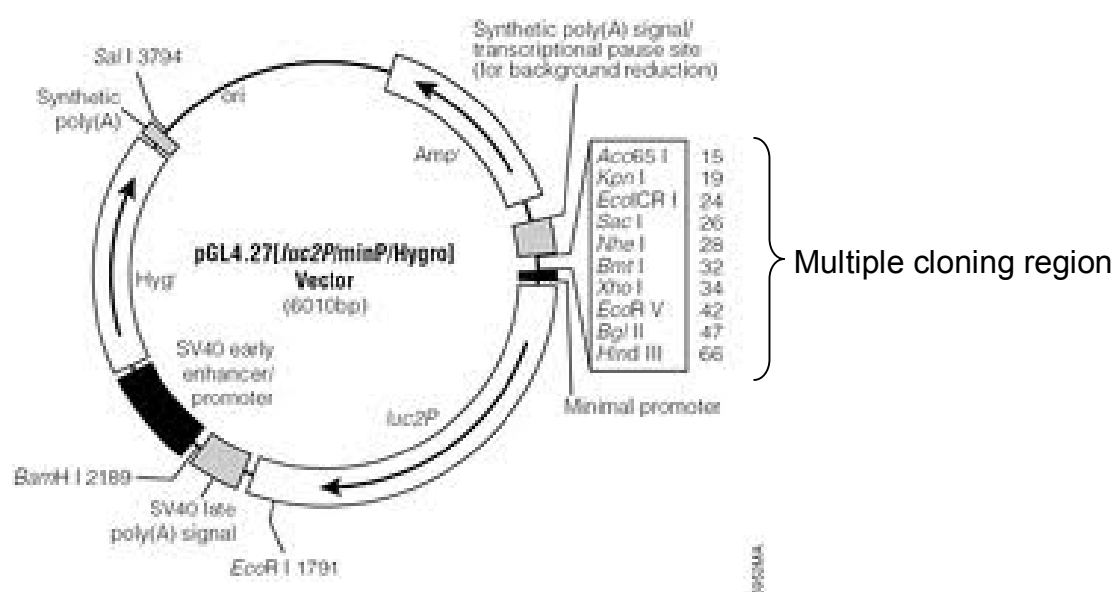
Praktická cvičení z moderních technik studia buňky KBB/PCMTSB

GENE REPORTER ASSAY

TEORETICKÝ ÚVOD

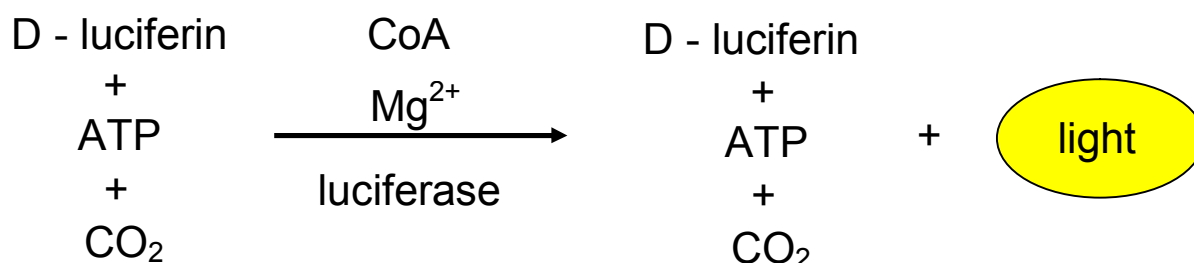
Regulace genové exprese v eukaryotních buňkách je v rámci buněčné signalizace ultimátně zajišťována prostřednictvím vazby transkripčních faktorů nebo receptorů do tzv. promotorové (regulační) oblasti genu, kdy dojde k spuštění či potlačení exprese tohoto genu (transkripce do RNA). Z nejrůznějších důvodů je v praxi žádoucí sledovat ovlivnění či průběh genové exprese. Jako nejjednodušší přístup se volí často kvantifikace finálního produktu genu, tj. mRNA či proteinu, příslušnými technikami molekulární biologie. Tento přístup má ovšem řadu limitací, kupříkladu nízkou specificitu, kdy předpokladem je, že receptor R řídí expresi genu G. Často, však exprese genu G bude řízena více receptory či transkripčními faktory. Další limitací klasického sledování genové exprese může být nákladné experimentální vybavení, např. přístroj pro RT-PCR, či časová náročnost zpracování velkého množství vzorků. Zmíněné nedostatky klasického přístupu sledování genové exprese lze eliminovat využitím molekulárně biologické techniky, tzv. *gene reporter assays*. Jak již název napovídá, jedná se o systém, který nás informuje (reportuje) o genové expresi. Tyto systémy představují rozsáhlý soubor nástrojů ke studiu regulačních sekvencí promotorů, enhancerů a transkripčních faktorů. Nejčastěji se jedná o eukaryotní nádorové buněčné linie, které jsou transientně (přechodně) či stabilně (trvale) transfekovány reportérovým plasmidem. Vlastní reportérový plasmid obsahuje ve své struktuře specifickou vazebnou promotorovou sekvenci pro studovaný receptor, která je zaklonovaná těsně před reportérovým genem. Pokud je reportérový systém správně designován, pak hladina exprese reportérového genu koreluje s transkripční aktivitou sledovaného receptoru či transkripčního faktoru. Požadavky kladené na reportérový gen jsou především: (i) inertnost vůči hostitelské buňce – není toxický, neinterferuje zásadně s buněčnými funkcemi; (ii) cizost vůči hostitelské buňce – exprese tohoto genu je tedy nezaměnitelná a nevyhnutelně pochází právě z plasmidu a nikoliv z genomické DNA; (iii) snadná kvantifikace exprimovaného genu – jedná se často o enzymy (např. světlušková luciferasa, chloramfenikol acetyl transferasa, beta-galaktosidasa) nebo o fluoreskující proteiny (např. GFP). Reportérový plasmid se do buňky vkládá různými technikami, např. teplotním šokem, elektroporací nebo pomocí lipofekčních činidel. Pokud je plasmid vložen *ad hoc* pro daný experiment, hovoříme o transfekci transientní. V plasmidu může být rovněž přítomen gen pro resistenci vůči antibiotiku (např. hygromycin,

gentamycin), kdy selekčním tlakem pomocí daného antibiotika v kultivačním médiu lze připravit buněčnou linii stabilně transfekovanou daným plasmidem. Konstrukce takovéto buněčné linie je časově náročný proces, ale po úspěšném zavedení nakonec velmi užitečná, jelikož není zapotřebí pokaždé buňky transfekovat. V naší laboratoři (Laboratoř molekulární toxikologie a farmakologie) byla konstruována stabilně transfekovaná reporterová buněčná linie AZ–AhR odvozená od lidských hepatomových buněk HepG2, umožňující stanovení aktivátorů AhR receptoru (Novotna et al., 2011). Buněčnou linii AZ–AhR využijeme v experimentech pro porovnání s transientně transfekovanými buňkami.



Obr.1: Schématické znázornění komerčního plasmidu

Stanovení enzymové aktivity světluškové luciferasy

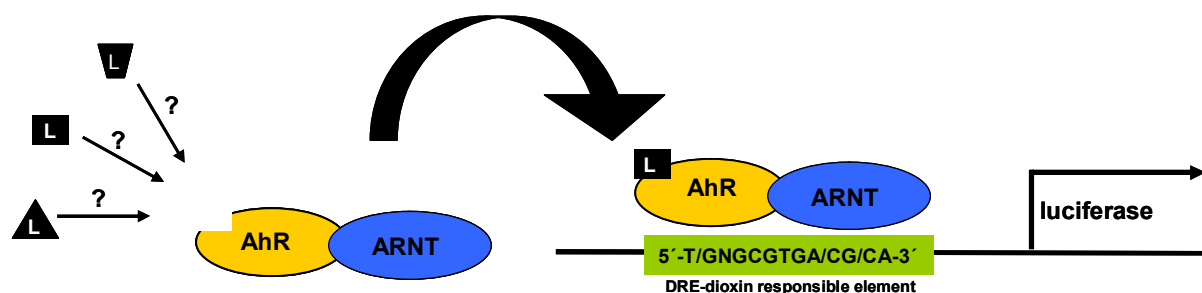


Enzymy z rodiny luciferáz vytváří bioluminiscenční signály prostřednictvím monooxygenace luciferinu za využití co-substrátů O₂ a ATP. Nejčastěji používané luciferázy používané při

reporter gene assays jsou odvozeny ze světlušky (*Photinus pyralis*) a mořské macešky (*Renilla reniformis*). V našem cvičení budeme pracovat se reportérovým plasmidem kódujícím světluškovou luciferázou, což je 61 kDa monomerní protein, u kterého není zapotřebí posttranslačních modifikací k dosažení plné funkčnosti (enzymatické aktivity). Katalytické schopnosti je dosaženo ihned po uvolnění z ribozomu, proto luciferázový test poskytuje téměř okamžitou odezvu. Vlnové délky světla vyzařovaného při reakci katalyzované světluškovou luciferasou leží v oblasti od zelené k žluté, tj. v rozmezí 550 – 570 nm. Intenzita emitovaného světla je přímo úměrná koncentraci luciferázy.

AhR receptor

Aryluhlovodíkový receptor neboli dioxinový receptor je ligandy – aktivovaný transkripční faktor. Jeho aktivace je spuštěna různými exogenními ligandy (polyaromatické aminy, polyaromatické uhlovodíky, polychlorované aromatické sloučeniny, dioxiny), přírodními sloučeninami (resveratrol, berberin, flavonoidy) a léky (omeprazol, lansoprazol). Mezi endogenní ligandy AhR patří bilirubin, biliverdin, deriváty tryptofanu a eikosanoidy. AhR hraje důležitou roli jak v regulaci genů zahrnutých do metabolismu léčiv (např. CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1), tak v regulaci buněčného cyklu a proliferaci, imunitní odpovědi a nádorovém bujení. Je-li AhR v tzv. neaktivní formě, tzn., že na něj není navázán žádný ligand, vyskytuje se převážně v cytoplasmě buňky v komplexu s chaperonovými proteiny. Po vazbě ligandu dochází k disociaci chaperonů, k translokaci AhR do jádra a následuje tvorba heterodimeru AhR-ARNT (ARNT = AhR nuclear translocator), který se váže do specifických promotorových sekvencí a spouští expresi cílových genů. Vazebná místa v DNA pro heterodimer AhR-ARNT se nazývají dioxin-responsive elements (DRE).



Praktická část

Cílem praktické části je sledovat kvantitativní vliv látek aktivujících AhR receptor pomocí techniky gene reporter assay.

Kultivace buněk

K testování daných látek budou použity 2 buněčné linie: HepG2 – hepatocelulární nádorová linie (ECACC No. 85011430) pro transientní transfekci a AZ–AhR stabilně transfekovaná buněčná linie odvozená od linie HepG2. Obě linie patří mezi tzv. adherentní buněčné linie, kde kultivace rutinně probíhá v plastových nádobách. Buňky rostou v ostrůvkovitém uspořádání a tvoří v konfluenci monovrstvu dlaždicovitěho vzhledu. Kultivační médium je komerčně dodáváno pod názvem Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), do kterého se přidávají antibiotika (penicilin, streptomycin) a 10% FBS – fetální bovinní sérum. Kultivace buněk probíhá v termostatovaném inkubátoru při 37°C a v atmosféře syčené 5% oxidu uhličitého.

Trypsinizace a pasážování buněk

Buněčný cyklus buněk HepG2 trvá v rozmezí 24-48 hod. Buňky se nesmí nechat narůst do 100% konfluenci, kdy díky kontaktní inhibici může docházet k umírání buněk. Konfluenci se hodnotí mikroskopicky, při cca 90% konfluenci se kultura tzv. pasážuje. Jedná se o rozrušení mezibuněčných kontaktů a kontaktů buněk s kultivačním povrchem pomocí proteasy trypsinu.

Návod:

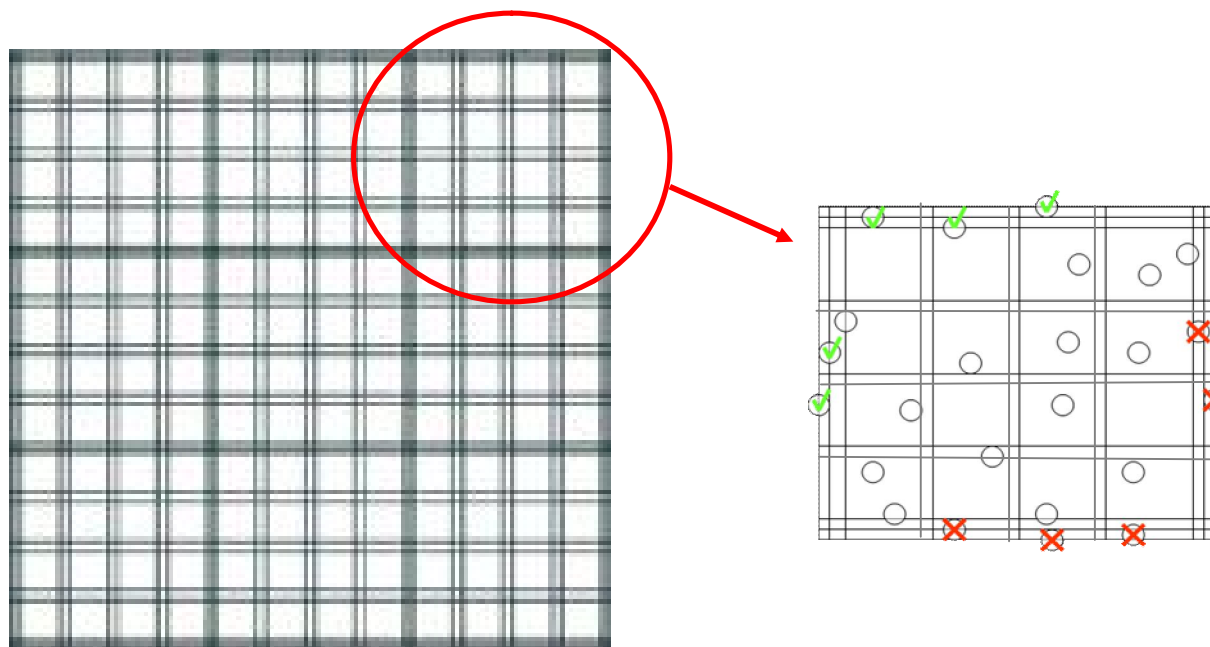
1. Z kultivační láhve s konfluentní kulturou HepG2 odsajeme za sterilních podmínek kultivační médium.
2. Kulturu opláchneme sterilním roztokem 1x PBS a tento roztok následně odsajeme.
3. Na kulturu aplikujeme 1 ml trypsinu, láhev uzavřeme a opatrným nakláněním láhve docílíme rovnoměrného rozprostření roztoku trypsinu po celé ploše kultivační láhve.
4. Láhev vložíme do termostatovaného inkubátoru na 3-5 min.
5. Poté vytáhneme láhev a poklepáváním docílíme uvolnění buněk od kultivačního podkladu.
6. Působení trypsinu zastavíme přidávkem 9 ml kultivačního média opakovaným promícháváním suspenze pomocí nasávání do pipety a zpětným vypouštěním.
7. Buněčnou suspenzi přepipetujeme do 10 ml falkony, nyní jsou buňky připraveny na počítání.

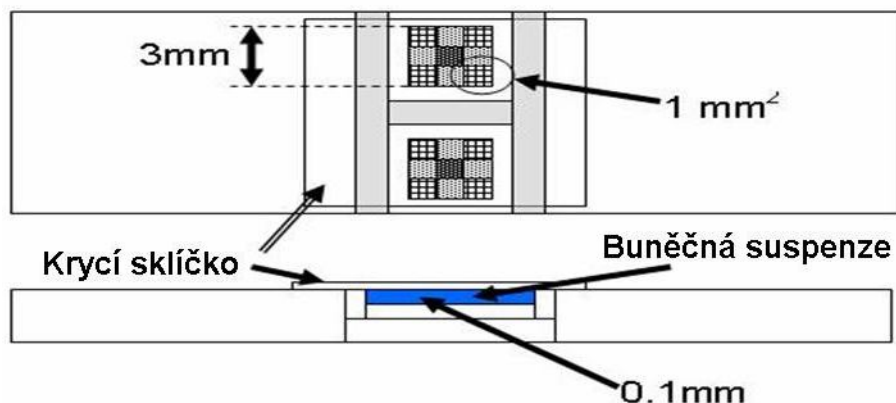
Trypan Blue Exclusion Assay – počítání buněk, stanovení viability, vyšetí buněk

V buněčné suspenzi získané při pasážování je třeba stanovit koncentraci (počet buněk na 1 ml) a životnost buněk. Trypan Blue Exclusion test je založen na skutečnosti, že **živá** buňka **nevpustí** do svého intracelulárního prostoru barvivo, kterému je vystavena, díky integritě buněčné membrány a funkčnosti transportních systémů, tzn., že ve výsledku vidíme bílé (žluté) buňky na modrém pozadí. Naopak buňky **mrtvé či poškozené** se Trypanovou modří **nabarví**. Buněčnou suspenzi v roztoku Trypanové modří hodnotíme mikroskopicky pomocí tzv. Bürkerovy komůrky, kdy určíme koncentraci buněk v celkové buněčné populaci.

Návod:

1. Smísíme 10 μ l dostatečně promíchané buněčné suspenze s 90 μ l roztoku trypanové modří.
2. Přichystáme si Bürkerovu komůrku, kterou překryjeme krycím sklíčkem.
3. Na hranu krycího sklíčka aplikujeme obarvenou suspenzi pipetou takovým způsobem, že se suspenze dostane do prostoru pod krycí sklíčko kapilárními silami.
4. Spočítáme buňky v 5 náhodně vybraných velkých čtvercových polích na obou stranách sklíčka.





5. Bürkerova komůrka má přesně definovaný objem. Systémem trojitých čar je rozdělena na 9 velkých čtvercových polí (3 x 3) a každé velké pole je rozděleno systémem dvojitých čar na 16 malých čtvercových polí (4 x 4). Výslednou koncentraci buněk získáme tak, že vypočítáme průměr buněk napočítaných v 10 velkých čtvercích a vynásobíme faktorem 10^5 .

ÚKOL č. 1:

Transientní transfekce a vyšetí buněk

Nyní máme k dispozici koncentrovanou buněčnou suspenzi HepG2 buněk, u nichž známe hodnoty koncentrace. Do buněk vpravíme plasmid obsahující promotorovou sekvenci pro CYP1A1, dioxin responsivní elementy a enzym luciferázu pomocí techniky lipofekce (liposome transfection) s využitím komerčních licencovaných reagensů. Pro přenos nukleových kyselin přes buněčnou membránu jsou využívána různá komerční agens (Lipofectamine, jetPEI, LT-1, PromoFectine, FuGene6 apod.). V praktickém cvičení využijeme produkt FuGeneHD dodávaný firmou Roche.

Návod:

1. Nachystáme si buněčnou suspenzi:
1 jamka 75 000 buněk, $V = 500 \mu\text{l}$
Celkový počet jamek: 18 (bude testováno 6 látek v tripletech)
2. Připravíme si potřebné množství reagens k transfekci:
reporter vektor ($c = 1,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$): 1 jamka $0,3 \mu\text{g}$
médiu OPTIMEM: 1 jamka $20 \mu\text{l}$
FuGeneHD: 1 jamka poměr FuGene (μl):DNA (μg) = 3:1

3. Za sterilních podmínek opatrně smísíme transfekční médium OPTIMEM a transfekční agens FuGene. Postupujeme tak, že do plastové zkumavky pipetujeme nejprve médium a do média opatrně ponoříme špičku a pomalu vypustíme FuGene. Směsí netřepeme a necháme volně 5 minut stát ve sterilním boxu.
4. Do další plastové zkumavky opatrně napipetujeme reportérový vektor (1,4 µg/µl) Pipetujeme tak, že se špičkou dotýkáme stěny zkumavky cca 1 cm od dna a kapka roztoku zůstává na stěně zkumavky.
5. Opatrně smísíme roztoku FuGene a OPTIMEM s roztokem reportérového vektoru. Postupujeme tak, že do modré špičky nasajeme roztok FuGene v OPTIMEM a tento roztok pomalu po kapkách vypouštíme do zkumavky s kapkou vektoru přímo na tuto kapku. Výslednou směs opatrně promísíme pomocí pipety a necháme 20 minut inkubovat.
6. Připravenou buněčnou suspenzi HepG2 buněk smísíme se směsí Fugene a CYP1A1, opatrně promícháme a aplikujeme 0,5 ml výsledné suspenze na každou kultivační jamku 24 - jamkové desky.
7. Kultivační desku vložíme do inkubátoru, kde při 37°C a v atmosféře 5% CO₂ buňky inkubujeme 24 hod (do příštího dne a následného bloku praktika).

Aplikace látek na buňky HepG2 v 24 jamkové desce po transfekci

K testování aktivity CYP1A1 budou použity následující látky: TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin), RVT (resveratrol), IND (indirubin), 3MC (3-methylcholanthren), OME (omeprazol), DMSO (dimethylsulfoxid). Uvedené látky jsou ligandy AhR, DMSO je negativní kontrola, jsou v něm rozpuštěné všechny testované sloučeniny.

<u>látk</u>	<u>koncentrace</u>
TCDD	5 µM
RVT	5 mM
IND	10 mM
3MC	10 mM
OME	100 mM

Návod:

1. Po 24 h inkubaci nasadíme testované látky na transfekované buňky.
Ředění látek: 1:1000
1 jamka.....0,5 ml média
2. Staré médium odsajeme a připravené látky aplikujeme na buňky:

	1	2	3	4	5	6
A	TCDD	TCDD	TCDD	OME	OME	OME
B	DMSO	DMSO	DMSO	3MC	3MC	3MC
C	RVT	RVT	RVT			
D	IND	IND	IND			

3. Kulturační desku vložíme do inkubátoru, kde při 37°C a v atmosféře 5% CO₂ buňky inkubujeme 24 hod (do příštího dne a následného bloku praktika).

Lýze buněk po transfekci, měření aktivity světluškové luciferázy

Během předchozích 2 dnů proběhla transfekce a treatment buněk. V následujícím cvičení se dovíme, jak aplikované látky působily na aktivitu světluškové luciferázy, tzn., jak byl ligandem aktivovaný transkripční faktor AhR aktivní. Pro vyhodnocení bude zapotřebí substrát obsahující D-luciferin, ATP, CoA, DTT, Tris – acetát, EDTA, MgSO₄·7H₂O. Komponenty obsažené v substrátu jsou kofaktory luciferázy, což v důsledku způsobuje monoxygenaci luciferinu a následně emisi světla, které je přímo úměrné aktivitě luciferázy.

Návod:

1. 24 jamkové desky s buňkami zkontrolujeme pod mikroskopem.
2. Médium vylijeme do výlevky a buňky následně opláchneme nesterilním roztokem 1x PBS. Obsah desky opět vylijeme do výlevky a zbylé kapky ulpěné na okrajích jamek odstraníme osušením buničinou.
3. K buňkám přidáme 100 µl lyzačního pufru, desky slepíme páskou a dáme na 20 min do mrazáku (-80°C).
4. Během 20 min rozmrazíme substrát pro luciferázu na 37°C.
5. Desky s buňkami vytáhneme z mrazáku, necháme rozmrazit, poté buňky homogenizujeme a přepipetujeme 7 µl do 96 - ti jamkové černé destičky.
6. Vedoucí cvičení nastaví správné parametry pro měření fluorescence.
7. K buňkám napipetujeme 70 µl připraveného substrátu a měříme aktivitu luciferázy.
8. Získaná data graficky vyhodnotíme.

ÚKOL č. 2:

Vysetí buněk AZ – AhR, aplikace látek na buňky

Pro porovnání úspěšnosti transfekce použijeme stabilně transfekovanou repoterovou buněčnou linii AZ-AhR.

Návod:

1. K práci budeme potřebovat 96 jamkovou desku. Nachystáme si buněčnou suspenzi:

1 jamka.....20 000 buněk, V = 200 µl

Počet testovaných látek.....6

Počet koncentrací testovaných látek.....5

Celkem budeme aplikovat 6 látek stejně jako v předchozím experimentu. Všechny látky (kromě DMSO) budeme mít v pěti koncentracích. Každý vzorek testujeme 3x. Nejprve buňky vysejeme a následující den provedeme treatment podle tabulky:

	c1	c2	c3	c4	c5
TCDD	0.1 µM	1 µM	2.5 µM	10 µM	50 µM
3MC	0.1 mM	1 mM	5 mM	10 mM	
IND	0.1 mM	1 mM	5 mM	10 mM	
OME	1 mM	5 mM	10 mM	0.25 M	0.5 M
RVT	1 mM	5 mM	10 mM	40 mM	50 mM

Lýze buněk, měření aktivity světluškové luciferázy

Návod:

1. 96-ti jamkové desky s buňkami zkontrolujeme pod mikroskopem.
2. Médium vylijeme do výlevky a buňky následně opláchneme nesterilním roztokem 1x PBS 35 µl/jamka. Obsah desky opět vylijeme do výlevky a zbylé kapky ulpěné na okrajích jamek odstraníme osušením buničinou.
3. K buňkám přidáme 35 µl lyzačního pufru, desky slepíme páskou a dáme na 20 min do mrazáku (-80°C).
4. Během 20 min rozmrazíme substrát pro luciferázu na 37°C.
5. Desky s buňkami vytáhneme z mrazáku, necháme rozmrazit, poté buňky homogenizujeme a přepipetujeme 3µl do 96-ti jamkové černé destičky.
6. Vedoucí cvičení nastaví správné parametry pro měření fluorescence.
7. K buňkám napipetujeme 30 µl připraveného substrátu a změříme aktivitu luciferázy.
8. Získaná data graficky vyhodnotíme, vypočítáme EC50 pro jednotlivé látky (vysvětlí vedoucí cvičení).