

Univerzita Palackého
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů PřF UP a AV ČR
Šlechtitelů 11
783 71 Olomouc

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA O ŘEŠENÍ PROJEKTU 1040/2012 FONDU ROZVOJE VYSOKÝCH ŠKOL

Název projektu:	Vytvoření nových laboratorních úloh pro cvičení z experimentální biologie
Řešitel:	Mgr. Iva Dolečková
I. spoluřešitel:	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
II. spoluřešitel:	Mgr. Eva Řezníčková
Další členové týmu:	Mgr. Ladislava Vymětalová Mgr. Jana Navrátilová
Pracoviště:	Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta
Tematický okruh:	G3
Dotace z FRVŠ:	100 tis. Kč
Příspěvek školy:	30 tis. Kč

V Olomouci dne 4. 1. 2013

Cíle řešení

Cílem řešeného projektu bylo zvýšení úrovně výuky studijního oboru Experimentální biologie tím, že budou vypracovány nové úlohy pro předmět Cvičení z experimentální biologie. Tyto úlohy měly být přitom vypracovány tak, aby názorně předvedly aplikaci vybraných laboratorních metod (průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie, fluorimetrie) při studiu apoptosy a zároveň byly proveditelné v určeném časovém rámci.

Jednalo se konkrétně o úlohy:

1. Fluorimetrické stanovení aktivity caspasy 3
2. Detekce fragmentu caspasy 3 pomocí fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie
3. Detekce štěpných fragmentů substrátů caspasy 3 pomocí fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie
4. Detekce částečné permeabilizace membrány pomocí fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie
5. Detekce translokace fosfatidylserinu v rané fázi apoptosy pomocí fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie
6. Detekce ztráty membránového potenciálu mitochondrií v průběhu apoptosy pomocí fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie

Dále bylo cílem řešení rozvíjet pracovní schopnosti a zkušenosti dalších studentů, kteří měli být do projektu také zapojeni, a také posílit týmovou spolupráci celého pracovního kolektivu.

Realizovaný postup a způsob řešení

Realizovaný postup, způsob řešení i výběr metod byl v souladu s plánem projektu.

1. Výběr buněčných linií, induktorů apoptosy a doby působení

V počáteční fázi řešení projektu byly vybrány buněčné nádorové linie citlivé na indukci apoptosy i vhodné, apoptosu indukující látky. Dále také byla testována nejvhodnější doba působení cytostatik.

Vybrané nádorové buněčné linie:

- K562 (chronická myelogenní leukémie)
- HeLa (karcinom děložního čípku)
- RPMI8226 (mnohočetný myelom)

Vybrané induktory apoptosy:

- TRAIL(syntetický ligand pro receptory smrti)
- roskovitin
- olomoucín II
- staurosporin
- flavopiridol
- tubulyzin

Vybraná doba působení: 24 h

2. Výběr metod

Vybrané metody zaměřené na klíčové znaky apoptosy jsou přehledně shrnuty v **Tabulce č. 1**.

Tabulka č. 1 Vybrané metody zaměřené na detekci klíčových znaků apoptosy

Sledovaný znak apoptosy	Metoda	Fluorescenční mikroskopie	Průtoková cytometrie	Fluorimetrie
Aktivace caspasy 3	Měření enzymatické aktivity caspasy 3	X	X	✓
	Detekce fragmentu caspasy 3	✓	✓	X
	Detekce štěpení PARPu (substrát caspasy 3)	✓	✓	X
Permeabilizace membrány	Duální značení Yo-pro a propidium jodidem	✓	✓	X
Translokace fosfatidylserinu	Duální značení annexinem V-FITC a propidium jodidem	✓	✓	X
Fragmentace DNA	Značení TUNEL	✓	✓	X
Snížení mitochondriálního membránového potenciálu	Značení TMRE	✓	✓	X

Fluorimetrický test aktivity caspasy 3

Buňky kultivované v Petriho miskách a ovlivněné cytostatikem byly sklizeny, lyzovány, změřila se koncentrace proteinů Bradfordovou metodou a byl proveden test aktivity caspasy 3 s využitím fluorogenního substrátu caspasy 3, jehož fluorescence byla měřena v 96ti-jamkovém panelu fluorimetrem. Vybrána byla nejkratší možná doba měření (1 h), při které již byl patrný rozdíl mezi vzorkem kontrolních buněk a vzorkem buněk ovlivněných cytostatikem.

Fluorescenční mikroskopie

Buňky kultivované na krycích sklíčkách a ovlivněné cytostatiky se inkubovaly s příslušnými próbami a byly vytvořeny mikroskopické preparáty. Ty se poté pozorovaly pomocí fluorescenčního mikroskopu a pomocí digitální kamery byly pořízeny fotografie, které byly dále upraveny a analyzovány. Ověřovány byly různé postupy, způsoby fixace, ředění prób, doby působení atd. s ohledem na jejich názornost i ekonomickou a časovou úspornost. K původně plánovaným metodám byla navíc přidána úloha Značení buněk metodou TUNEL detekující fragmentaci DNA během apoptosy.

Průtoková cytometrie

Buňky kultivované v Petriho miskách a ovlivněné cytostatiky byly sklizeny, inkubovány s próbami a analyzovány průtokovým cytometrem. Opět byly ověřovány různé postupy, ředění prób, doby působení atd. s ohledem na jejich názornost i ekonomickou a časovou úspornost.

Duální značení Yo-pro a propidium jodidem nebylo zařazeno mezi protokoly z důvodů neuspokojivých a obtížně interpretovatelných výsledků, které se i přes veškerou snahu nepodařilo optimalizovat. K původně plánovaným metodám byla navíc přidána úloha Značení buněk metodou TUNEL detekující fragmentaci DNA během apoptosy.

3. Tvorba protokolů a jejich zveřejnění

Na závěr byly vytvořeny protokoly jednotlivých úloh, které se vložily na webové stránky Laboratoře růstových regulátorů (<http://rustreg.upol.cz/FRVS.html>).

Změny v průběhu řešení

Vzhledem k ukončení doktorského studia II. spoluřešitele Ivy Protivánkové byla tato pozice nahrazena Evou Řezníčkovou, která byla původně také součástí řešitelského týmu. Chybějícího člena nahradila studentka Mgr. Ladislava Vymětalová, takže počet studentů zapojených do projektu zůstal stejný. Změna byla schválena Výborem FRVŠ.

Výsledky a výstupy

Výstupem projektu měly být vypracované protokoly dostupné na webu Laboratoře růstových regulátorů, což je v souladu s reálnými výstupy. Byly vytvořeny protokoly obsahující jednak teoretickou část, kde se studenti seznámí s procesem regulované buněčné smrti – apoptosou – a jejím významem z hlediska fyziologického či terapeutického. Dále jsou zde popsány základní metody používané pro detekci klíčových molekulárních znaků apoptosy s odkazem na odbornou literaturu. Následuje vlastní postup vybrané metody i s uvedením konkrétních výsledků a jejich interpretace.

Vytvořené protokoly:

1. Detekce aktivity caspasy 3 fluorimetricky
2. Fluorescenční mikroskopie: Detekce fragmentu caspasy 3
3. Fluorescenční mikroskopie: Detekce fragmentu PARP
4. Fluorescenční mikroskopie: Duální značení annexinem V-FITC a propidium jodidem
5. Fluorescenční mikroskopie: Duální značení Yo-pro a propidium jodidem
6. Fluorescenční mikroskopie: Značení TMRE
7. Fluorescenční mikroskopie: Značení TUNEL
8. Průtoková cytometrie: Detekce fragmentu caspasy 3
9. Průtoková cytometrie: Duální značení annexinem V-FITC a propidium jodidem
10. Průtoková cytometrie: Duální značení fragmentu PARP a DNA
11. Průtoková cytometrie: Značení TMRE
12. Průtoková cytometrie: Značení TUNEL

Zveřejnění protokolů: <http://rustreg.upol.cz/FRVS.html>

Dále bylo cílem řešení rozvíjet pracovní schopnosti a zkušenosti dalších studentů, kteří byli do projektu také zapojeni, a také posílit týmovou spolupráci celého pracovního kolektivu. Oba tyto cíle se také podařilo naplnit.

Výše finančních prostředků

Přidělená částka

V rámci předloženého projektu byla z prostředků Fondu rozvoje vysokých škol obdržena celková částka 100 000 Kč. K získanému projektu byla PřF UP v Olomouci přidělena navíc dotace ve výši 30 000 Kč. Veškeré získané finance (130 000 Kč) byly použity v souladu s původně předkládanými finančními požadavky.

Ostatní

Finance z položky ostatní byly čerpány pro biologický či spotřební materiál, chemikálie nebo na zákonné zdravotní pojištění, zákonné sociální zabezpečení či úrazové pojištění.

Stipendia a odměny

Za realizaci projektu bylo vyplaceno stipendium ve výši 20 000 Kč hlavnímu řešiteli Ivě Dolečkové (doktorandka oboru Biochemie PřF UP) a 10 000 Kč II. spoluřešiteli Evě Řezníčkové (doktorandka oboru Biochemie PřF UP). Vzhledem k poměrně velkému počtu metod, které bylo nutné optimalizovat, byly do projektu začleněny další dvě studentky, které se podílely na přípravě biologických vzorků i na ověřování metodiky jednotlivých úloh a kterým bylo vyplaceno naplánované stipendium ve výši 7500 Kč/os. (Ladislava Vymětalová, Jana Navrátilová, doktorandky oboru Biochemie PřF UP). Odměna za řešení projektu ve výši 5000 Kč byla vyplacena I. spoluřešiteli Vladimíru Kryštofovi.

Detailní přehled o čerpání přidělených financí poskytuje **Tabulka č. 2. V Příloze 1** závěrečné zprávy je poté přiložen potvrzený výkaz o hospodaření.

Tabulka č. 2: Výkaz o hospodaření s přidělenou dotací

Položka	Číslo ref. doložky	Cena
Ostatní		
96-jamkové panely	1310030831	3197,00
Ac-DEVD-AMC (substrát caspasy 3)	1310005451	4426,80
Annexin-V-FITC	1310004348	18930,00
Filter top 500 ml	1310025446	3413,00
Kultivační flašky 75 cm ²	1310025446	2660,00
NPE shutdown solution pro průtokovou cytometrii	1310032113	624,00
NPE shutdown solution pro průtokovou cytometrii	1310033789	261,76
Propidium jodid	1310003446	3837,70
Protilátka proti fragmentu PARP (Asp214)	1310005204	10442,00
TMRE	1310004263	6888,00
TRAIL	1310004348	6000,00
TUNEL	1310020037	12868,80
Úrazové pojištění	1100055442	21,00
Zákonné zdravotní pojištění	5643	449,94
Zákonné sociální zabezpečení	5643	1250,00
Zkumavky 14 ml s kulatým dnem	1310025446	4730,00
Celkem		80000,00
Stipendia		
Iva Dolečková	1100009965	4000,00
Iva Dolečková	1100023747	4000,00
Iva Dolečková	1100027487	4000,00
Iva Dolečková	1100031377	4000,00
Iva Dolečková	1100044771	4000,00
Eva Řezníčková	1100048181	10000,00
Jana Navrátilová	1100048184	7500,00
Ladislava Vymětalová	1100048185	7500,00
Celkem		45000,00
Odměny		
Vladimír Kryštof	5643	5000,00
Celkem		5000,00
Souhrn		130000,00