

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



Optimalizace metodiky pro sledování krátkodobých efektů přírodních látek na fosforylaci Akt

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Denisa Padalíková**
Studijní program: B0512A130007 Biotechnologie a genové
inženýrství
Specializace: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Zdeněk Dostál, Ph.D.**
Rok: 2024

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....
Podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce, Mgr. Zdeňku Dostálovi, Ph.D. za odborné vedení, užitečné rady, trpělivost a pomoc jak při sepisování této práce, tak při experimentálních částech práce.

Zároveň bych chtěla poděkovat Ing. Haně Přichystalové, Ph.D., za pomoc a konzultace při experimentálních částech práce.

Na závěr bych ráda poděkovala mé matce, Mgr. Miroslavě Padalíkové, za trpělivost a finanční podporu nejen během vypracovávání této práce, ale také v průběhu celého studia.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Denisa Padalíková
Název práce: Optimalizace metodiky pro sledování krátkodobých efektů přírodních látek na fosforylaci Akt
Typ práce: Bakalářská
Pracoviště: Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařské fakulty Univerzity Palackého, Olomouc
Vedoucí práce: Mgr. Zdeněk Dostál, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2024

Abstrakt:

Signální dráha PI3K/Akt hraje klíčovou roli v buněčném růstu a proliferaci, čímž se stala jedním hlavních cílů studia ochrany srdeční tkáně před poškozením způsobeným infarktem myokardu. K aktivaci této dráhy může dojít vlivem působení apelinu-13 nebo 2,3-dehydrosilybinu, které způsobují fosforylaci/aktivaci Akt, což má pozitivní vliv na viabilitu buněk a na snížení apoptotické aktivity. Při studiu vlivu 2,3-dehydrosilybinu na aktivitu Akt stanovenou pomocí techniky western blot byly zaznamenány velké rozdíly mezi jednotlivými opakováními, které mohou ovlivňovat interpretaci získaných dat. Tato bakalářské práce je zaměřena na optimalizaci experimentálního postupu s cílem zvýšit reprodukovatelnost v rámci jednotlivých měření. V neposlední řadě byly provedeny prvotní experimenty s biosenzorem ExRai-AktAR2.

Klíčová slova: 2,3-dehydrosilybin, kináza Akt, apelin-13, biosenzory
Počet stran: 66
Počet příloh: 0
Jazyk: Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name

and Surname: Denisa Padalíková

Title: Optimization of a methodology for monitoring short-term effects of natural compounds.

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of medical chemistry and biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký university, Olomouc

Supervisor: Mgr. Zdeněk Dostál, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Abstract:

The PI3K/Akt signaling pathway plays a key role in cell growth and proliferation, making it one of the main targets for the study of cardioprotection against damage caused by myocardial infarction. The activation of this pathway can be induced by apelin-13 or 2,3-dehydrosilybin, which cause phosphorylation/activation of Akt, which has a positive effect on cell viability and on the reduction of apoptotic activity. When studying the effect of 2,3-dehydrosilybin on Akt activity determined using the western blot technique, large differences between individual repetitions were noted, which may affect the interpretation of the obtained data. This bachelor's thesis is focused on the optimization of the experimental procedure with the aim of increasing the reproducibility within individual measurements. Last but not least, initial experiments were performed with the ExRai-AktAR2 biosensor.

Keywords: 2,3-dehydrosilybin, Akt kinase, apelin-13, biosensors

Number of pages: 66

Number of appendices: 0

Language: Czech

OBSAH

CÍLE PRÁCE	4
1 ÚVOD	5
2 TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1 Fluorescenční protein.....	6
2.2 Geneticky kódované fluorescenční biosenzory	8
2.2.1 Struktura plazmidu	8
2.2.2 Faktory ovlivňující kvantifikaci signálů.....	9
2.3 Intenziometrické biosenzory.....	10
2.4 Ratiometrické biosenzory	11
2.5 Geneticky kódované sondy pro detekci aktivity/aktivace Akt.....	13
2.5.1.1 Aktus	13
2.5.1.2 BKAR.....	14
2.5.1.3 AktAR2	15
2.5.1.4 Akind.....	16
2.5.1.5 ExRai-AKAR2	16
2.5.1.6 ExRai-AktAR2	17
2.5.1.7 BAR	18
2.6 PI3K/Akt signální dráha	19
2.6.1 Fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K).....	19
2.6.2 Phosphatase And Tensin Homolog (PTEN)	21
2.6.3 Phosphoinositide-dependent kinase-1/2 (PDK1).....	22
2.6.4 Serin/threonin kináza (PKB/Akt)	22
2.6.5 Mechanistic target of rapamycin (mTOR).....	23
2.6.6 Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2).....	23
2.6.7 Komplex tuberózní sklerózy (TSC).....	23
2.7 Přírodní látky	24
2.7.1 Flavonoidy.....	25
2.7.2 Flavonolignany	25
2.8 Apelin-13	26
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1 Materiály a přístroje.....	27
3.1.1 Chemikálie	27
3.1.2 Roztoky	29
3.1.3 Přístroje a pomůcky.....	30
3.1.4 Biologický materiál	32
3.2 Metody.....	32
3.2.1 Kultivace buněčné linie H9c2	32
3.2.2 Stanovení cytotoxicity pomocí MTT testu	33

3.2.3	Optimalizace transfekčního protokolu	33
3.2.4	Transfekce buněčné linie H9c2 excitačně-ratiometrickou sondou ExRai-AktAR2	35
3.2.5	Příprava vzorků pro stanovení celkového množství proteinů metodou BCA a pro SDS-PAGE elektroforézu.....	35
3.2.6	SDS-PAGE elektroforéza.....	36
3.2.7	Izolace plazmidu nesoucí sondu ExRai-AktAR2.....	37
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
4.1	Stanovení cytotoxicity DHS pomocí MTT testu	38
4.2	Stanovení míry fosforylace proteinů Akt a Erk1/2 technikou western blot.....	39
4.3	Optimalizace transfekčního protokolu	40
4.4	Sledování aktivity Akt pomocí sondy ExRai-AktAR2.....	42
5	Závěr.....	45
6	LITERATURA.....	47
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	63

CÍLE PRÁCE

TEORETICKÁ ČÁST

1. Vypracování obecného přehledu o fluorescenčních sondách, rozšířených o sondy sledující aktivitu/fosforylaci proteinu Akt. Dále charakterizace vybraných vlastností a účinků o 2,3-dehydrosilybinu a apelinu-13.

PRAKTICKÁ ČÁST

1. Provedení experimentů na buněčné linii H9c2 s cílem ověřit vliv míry konfluence buněk na fosforylace proteinu Akt indukovanou apelinem-13 nebo 2,3-dehydrosilybinem.
2. Příprava lyzátů, stanovení celkového množství proteinů ve vzorcích a jejich analýza pomocí techniky western blot zakončenou imunodetekcí.
3. Využití metody transfekce pro vložení plasmidu kódujícího fluorescenční sondu a její následné využití pro mikroskopickou analýzu.

1 ÚVOD

Signální dráha PI3K/Akt je jednou z nejdůležitějších signálních drah hrající důležitou roli v regulaci buněčného růstu, proliferace a apoptózy. Tato dráha je studována pro své antioxidační, antiapoptické a proangiogenní účinky. Během infarktu myokardu dochází k nedostatečnému průtoku krve do srdečního svalu, což má za následek aktivaci mnoha signálních drah podporující apoptózu. Aktivací Akt, jakožto hlavního regulátoru downstream signálních drah, lze docílit potlačení programované buněčné smrti v kardiomyocytech a podpořit tak buněčné přežití. V rámci svých proangiogenních účinků se také podílí na tvorbě nových cév, čímž umožňuje lepší průtok krve (Walkowski et al., 2022). Tato signální dráha není však aktivně studována pouze pro své kardioprotektivní účinky, ale do centra zájmu se dostaly i mutace, které se v rámci této dráhy mohou vyskytovat. Mutace v signální dráze PI3K/Akt se nejčastěji vyskytují u nádorových buněk. Vznik těchto mutací vede k nadměrné fosforylaci Akt v důsledku čehož dochází k podpoře buněčné proliferace a zároveň k inhibici apoptózy, což vede ke zvýšené odolnosti těchto rakovinných buněk (J. Yang et al., 2019). Aktivaci PI3K/Akt může dojít pomocí působení přírodních látek, jako je 2,3-dehydrosilybin. Jedná se konkrétně o minoritní složku obsaženou v extraktu rostliny *Silybum marianum*, u které již dříve byl prokázán pozitivní vliv na aktivitu Akt. V navazujících experimentech, studujících vliv 2,3-dehydrosilybinu a především efekty jeho methylovaných derivátů, byly zaznamenány problémy s reprodukovatelností získaných výsledků, především díky vysokým odchylkám mezi jednotlivými měřeními. Hlavním cílem této práce bylo optimalizovat metody pro měření aktivity Akt se zaměřením na vliv míry konfluency buněčného modelu.

Běžnými vnějšími aspekty, podílejícími se na změnách aktivity signálních drah, jsou pH prostředí, teplota či buněčná konfluency. Proto je vhodné před vlastním výzkumem optimalizovat jednotlivé části protokolu tak, aby nedocházelo ke vznikům artefaktů nebo nereprodukovatelných výsledků. Během zvýšené konfluency dochází k nadměrnému kontaktu mezi sousedícími buňkami, čímž může dojít k inhibici některých signálních drah. Další možností je samotné médium, jehož pH v čase od přípravy do spotřebování postupně roste s každým otevřením lahve.

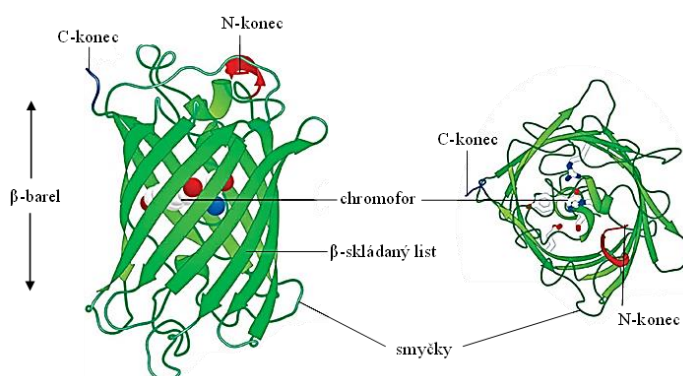
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fluorescenční protein

V roce 1961 profesor Osamu Shimomura s kolegy úspěšně extrahoval bioluminiscenční protein z medúzy *Aequorea victoria*, který následně pojmenovali aequorin. Během purifikace aequorinu byl objeven další protein, který vykazoval zelenou fluorescenci. Tento protein byl označen jako „green protein“. Své konečné jméno získal až v roce 1971, kdy jej ve své práci J. G. Morin a J. W. Hastings označili pod názvem „green fluorescent protein“ (GFP) (Shimomura, 2009).

Tento fluorescenční protein je využíván jako biologický marker v živých vzorcích. Díky své stabilitě a kompatibilitě lze GFP připojit k proteinu našeho zájmu a označit ho tak fluorescencí. Konkrétně je gen *Gfp* produkující zeleně fluoreskující protein kombinován s genem produkujícím protein zájmu pomocí technologie DNA rekombinace. Z pohledu uspořádání výše zmíněného komplexu je gen kódující GFP umístěn obvykle za gen produkující protein zájmu, což umožňuje lepší zpětnou kontrolu správné transkripce a translace komplexu. Při opačném uspořádání může docházet ke tvorbě GFP i za předpokladu, že dojde k chybnému/nekompletnímu přepisu druhého genu komplexu. Nakonec je tento komplex vložen do plazmidu, který zajišťuje transkripci genů v transformovaném organismu (Soboleski et al., 2005).

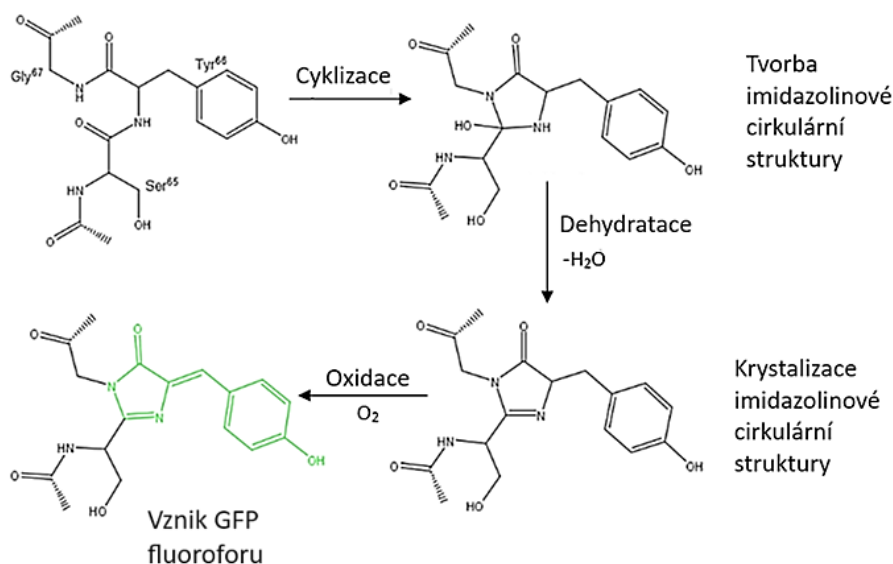
Struktura GFP odpovídá β -barelu složeného z celkem 11 β -skládaných listů v antiparalelním uspořádání, mezi kterými se nachází vodíkové vazby, což umožňuje vznik uzavřené struktury (Obr. 1). Ve své struktuře obsahuje specifickou sekvenci tří aminokyselin, která je nezbytná pro zajištění jeho fluorescenčních vlastností. Jedná se o Ser65-Tyr66-Gly67 u GFP a Thr65-Tyr66-Gly67 u EGFP. Po složení proteinového



Obrázek 1: Struktura GFP proteinu pocházející z *Aequorea victoria* (Craggs, 2009)

řetězce do struktury β -barelu dojde k přesunu zmíněné sekvence do jeho středu (Krasowska et al., 2021).

Pro vytvoření funkčního chromoforu podléhají zmíněné tři rezidua několika chemickým reakcím (Obr. 2). V průběhu těchto reakcí je vytvořena vazba mezi glycinem a serinem za vzniku uzavřeného kruhu, u kterého následně dochází ke spontánní dehydrataci. V důsledku přítomnosti kyslíku v okolním prostředí, dojde k oxidaci tyrozinu, což má za následek vznik nové dvojně vazby v molekule tyrosinu. Tyto chemické modifikace vedou k vytvoření chromoforu 4-(p-hydroxybenzylidene)-imidazolidin-5-on (Krasowska et al., 2021). Aniontová forma vzniklého chromoforu je schopna absorbovat excitační záření o vlnové délce 475 nm a posléze emituje záření v zelené oblasti spektra o vlnové délce 509 nm. Později vědci docílili vytvoření celé palety barev prostřednictvím modifikací na skeletu původního GFP, pomocí kterých dochází k posunu vlnové délky excitačního i emisního záření, což umožnilo vznik například RFP („red fluorescent protein“), OFP („orange fluorescent protein“) nebo YFP („yellow fluorescent protein“) (Jancsó et al., 2019). V současnosti tak fluorescenční proteiny představují klíčové součásti některých metodik a nástrojů pro sledování různých biologických procesů, především v oblastech molekulární a buněčné biologie (Nasu et al., 2021).



Obrázek 2: Katalýza, cyklizace a oxidace glycinu, serinu a threoninu za vzniku chromoforu GFP (podle Michal et al., 2013, upraveno)

2.2 Geneticky kódované fluorescenční biosenzory

Jedná se o analytický přístup používaný k detekci a kvantifikaci různých druhů analytů nebo aktivity enzymů v buněčných systémech. Jejich aplikace mohou být velice různorodé. Mohou sloužit například v medicíně pro screening léčiv nebo pro studium signálních drah a monitorování životního prostředí kvůli přítomnosti polutantů. (Chen et al., 2021).

Geneticky kódované biosenzory jsou sekvence nukleových kyselin, které kódují protein složený ze dvou základních částí, sensorové a reporterové. Sensorová část reaguje na změny v koncentraci sledovaného analytu nebo aktivity enzymu úpravou konformace senzoru. Indukovaná změna terciární struktury celého proteinu ovlivní reporterovou část, tvořenou jedním nebo více fluorescenčními proteiny. Výsledkem je změna v intenzitě fluorescence sondy, která představuje detekovaný biochemický signál (Ovechkina et al., 2021). Další důležitou složkou nejen fluorescenčních biosenzorů, ale všeobecně biosenzorů jako takových, může být uměle vložená signální sekvence na C- nebo N-konec, pomocí které lze biosenzor umístit do specifických subcelulárních struktur. Tyto geneticky modifikované sekvence nukleových kyselin jsou vpraveny do buněk, tkání či celých organismů pomocí plazmidové DNA nebo za využití transgenních metod (VanEngelenburg & Palmer, 2008).

2.2.1 Struktura plazmidu

Jedná se o kruhové, dvouvláknové, extrachromozomální molekuly DNA vyskytující se u bakterií a archeí replikující se nezávisle na chromozomech. Bakterie jsou schopné přenášet plazmidy vertikálně na dceřiné buňky a v některých případech je možný i horizontální přenos na jiné bakterie. Geny obsažené v plazmidech ovlivňují metabolické procesy jejich hostitelů (Dewan & Uecker, 2023). Díky schopnosti začleňování se do genomu hostitele jsou plazmidy často využívány pro zvýšení odolnosti rostlin a plodin na abiotický a biotický stres (Parmar et al., 2017). V medicíně jsou často plazmidy využívány pro genovou terapii nebo pro vývoj vakcín. Při výzkumu rakoviny a možném využití plazmidů pro léčbu byla zjištěna jejich schopnost stimulovat imunitní systém pro boj s rakovinnými buňkami. U genové terapie nádorových onemocnění lze pomocí plazmidů docílit exprese různých toxických, cytotoxických, proapoptických proteinů pro přímou inhibici rakovinných buněk (Martínez-Puente et al., 2022).

Plazmidy obsahují čtyři klíčové funkční části. Jedná se o „origin of replication“ (ori), oblast selekčního markeru, promotor a vícenásobné klonovací místo. Ori je konkrétní místo DNA sekvence sloužící k počátku procesu replikace. Většinou je tato část bohatá na A=T páry pro jednodušší oddělení vláken během procesu replikace. Oblast selekčního markeru nese jeden nebo více genů rezistence k antibiotikům. Na základě této oblasti lze po transformaci separovat buňky nesoucí plazmid obsahující rezistenci na určité antibiotikum od netransformovaných buněk, které plazmid postrádají. Separace probíhá pomocí pouhého přidání antibiotika do média. Další oblastí nacházející se na plazmidu je promotorová oblast, která řídí expresi klonované DNA, čímž umožňuje transkripci genu pomocí transkripčního aparátu transformované buňky (Dewan & Uecker, 2023). Pro vložení cílené sekvence DNA do plazmidu slouží vícenásobné klonovací místo. Tato oblast je umístěna za promotorem a obsahuje mnoho krátkých sekvencí specificky štěpených různými restrikčními enzymy. Proto lze snadno odstranit určitou sekvenci z původního plazmidu a namísto ní vložit sekvenci našeho zájmu. Může se jednat například o geny pro fluorescenci jako GFP (Clark et al., 2019). Vložené geny jsou na 3' a 5' konci ohraničeny místy pro nasedání primerů, což umožňuje amplifikaci či sekvenování. Cílem je ověřit, zda došlo ke správnému inkorporování klonované DNA (Dewan & Uecker, 2023).

Expresi genu v eukaryotických buňkách lze regulovat pomocí tzv. Cre-přepínače. Tento systém obsahuje dva páry rekombinantních míst označených LoxP, které ohraničují cílenou sekvenci či gen našeho zájmu a Cre specifickou rekombinázu původem z bakteriofága P1. Exprimovaná Cre rekombináza dokáže rozpoznat místa obsahující sekvence LoxP a zprostředkovávat aktivaci nebo inaktivaci lemovaného genu. Pomocí tohoto systému lze kontrolovat genovou expresi v savčích buňkách a docílit přesných delecí či insercí (H. Kim et al., 2018).

2.2.2 Faktory ovlivňující kvantifikaci signálů

Geneticky modifikované biosenzory jsou jednou z metod pro specifickou analýzu konkrétních analytů v buněčném systému na základě kvantifikace fluorescenčního signálu. Je ovšem za potřebí brát v potaz interference, které mohou negativně ovlivnit celkový signál. Jednou z hlavních problematik jsou faktory prostředí, konkrétně se jedná o pH a teplotu (Koveal, 2023).

Buněčné systémy potřebují ke svým biologickým funkcím specifické úrovně pH. Příkladem můžou být lysozomy, endozomy nebo Golgiho aparát, ve kterých je přirozeně kyselé pH. Dále může docházet ke změnám pH z důvodu výrazné změny rychlosti některých metabolických drahách tvořících kyselé metabolity. V tomto případě v buňce dochází ke kompenzaci poklesu pH přes transport proteinů mimo cytosol prostřednictvím membránových proteinů. Avšak i přes jejich funkci může dojít k narušení měření tvorbou artefaktů. Ke změnám pH dochází typicky v maligních buňkách, které využívají primárně fosforylaci ATP na substrátové úrovni, což vede k výrazně vyšší tvorbě kyselých látek a snížení pH v nádorových tkáních (Le Guern et al., 2020). V takovém prostředí dochází například k úplnému zhasnutí EGFP, proto je potřeba zhodnotit vhodnost biosenzoru pro zamýšlený experiment. Přestože se jedná obecně o negativní efekt na biosenzory, lze v praxi využít k měření organelového pH (Tsien, 1998).

V případě změn teploty dochází u biosenzorů ke změně jejich dynamického rozsahu, tedy maximální a minimální hodnoty intenzity fluorescence. Zvýšení teploty má za následek částečné rozvinutí struktury EGFP a zhasnutí fluorescenčního proteinu (Toca-Herrera et al., 2006).

Dalším problémem ovlivňující kvantifikaci výsledků je vliv jiných, chemicky podobných ligandů na protein v biosenzoru. Ve většině konstruktů biosenzorů je používán vysoce specifický protein pro analyt našeho zájmu. Ovšem ne pro všechny analyty jsou vysoce specifické proteiny dostupné. V těchto případech může docházet k aktivaci biosenzoru jiným ligandem, což vede k falešně pozitivním výsledkům. Je proto důležité před použitím biosenzoru uvážit možnou interferenci s chemicky podobnými ligandy a otestovat specifitu biosenzoru. K ovlivnění jiným, než cíleným ligandem může docházet také nepřímo prostřednictvím alosterické nebo kompetitivní inhibice. V těchto případech dochází ke snížení odezvy a citlivosti biosenzoru (Koveal, 2023).

2.3 Intenziometrické biosenzory

Intenziometrické geneticky kódované biosenzory obsahují pouze jeden fluorescenční protein, který mění po navázání analytu intenzitu fluorescence (Obr. 3) (Molina et al., 2019). U mnoha intenziometrických biosenzorů je fluorescenční protein spojen se sensorovou doménou přes nový C- a N-konec, které vznikají po vložení tzv. kruhově-permutovaného fluorescenčního proteinu (cpFP). Ke vzniku kruhově permutovaného fluorescenčního proteinu dochází prostřednictvím spojení originálního C-konce s N-

koncem pomocí peptidového linkeru. Po jeho vložení do fluorescenčního proteinu vznikají v jiné oblasti nové konce, přes které je navázána sensorová doména (Baird et al., 1999). K tomuto spojení dochází z pravidla v místě, kde je chromofor nejvíce přiblížen k obalu β -barelu fluorescenčního proteinu. U GFP se jedná konkrétně o oblast, která bezprostředně sousedí se zbytkem Tyr-145. Již dříve bylo zjištěno, že tato oblast GFP je velice tolerantní na inserce sensorových domén nebo na fúzi. Popisovaný konstrukt je typický pro fluorescenční proteiny, ovšem konkrétní oblast vhodná pro inserci či fúzi se u jednotlivých fluorescenčních proteinů liší (Nasu et al., 2021).

Výhodou intenziometrických biosenzorů je jejich vysoká citlivost, což umožňuje detekovat cílený analyt v nízkých koncentracích. S vysokou citlivostí se však pojí i problémy, které mohou při měření nastat. Jejich výkonnost může být ovlivněna změnami pH ve fyziologickém prostředí, kdy ve více bazickém prostředí dochází, zejména u některých modifikací GFP, ke zvýšené fluorescenci, což vede k nepřesným výsledkům. Dalším problémem je také dlouhé vystavení excitačnímu světlu. To způsobuje tzv. fotobleaching, vysvěcování fluoroforu, uvnitř fluorescenčního proteinu. Při fotobleachingu dochází k poklesu fluorescenčního, a to omezuje celkovou dobu trvání experimentu (Sadoine et al., 2021).

2.4 Ratiometrické biosenzory

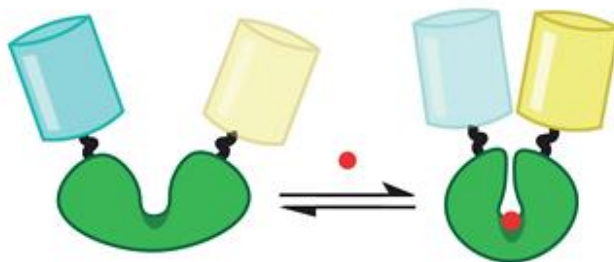
Tento typ biosenzorů byl navržen pro kompenzaci omezení, která se nacházejí u intenziometrických biosenzorů. Typická struktura ratiometrických biosenzorů obsahuje dva fluorescenční proteiny odlišné barvy, mezi kterými probíhá Försterův rezonanční přenos energie (FRET) (Obr. 3) (Koveal, 2023). Jedná se o fyzikální jev, při kterém dochází k neradiačnímu přenosu energie z excitovaného stavu donorového fluorescenčního proteinu na akceptorový fluorescenční protein prostřednictvím dipól-dipól interakce (VanEngelenburg & Palmer, 2008). Pokud dojde k detekci cílového analytu, dojde ke zpuštění či blokaci FRET. Na základě změn v poměru mezi intenzitou fluorescence donoru a akceptoru lze určit, jestli je cílový analyt ve vzorku přítomen či nikoliv (Yang et al., 2023). Páry fluorescenčních proteinů, které by mohly být potenciálně použity při aplikacích FRET, musí splňovat určitá kritéria. Jak jsem již zmiňovala výše, principem FRET je přenos energie z donoru na akceptor. Z toho důvodu musí být pár donor-akceptor umístěn ve vzájemné blízkosti, zpravidla 10–100 Å. Emisní spektra donoru by se měla zároveň překrývat s absorpčními spektry akceptoru. Celkově je

zapotřebí, aby emisní moment donoru, absorpční moment akceptoru a jejich orientace byly pro sebe navzájem výhodné (Wu et al., 2020).

Na rozdíl od intenziometrických biosenzorů, které fungují na principu měření intenzity fluorescence, využívají ratiometrické biosenzory ke kvantifikaci poměr odezvy dvou fluorescenčních proteinů. Výsledkem je omezení problémů vznikajících při změnách v koncentraci biosenzoru, fotobleachingu, při kolísání intenzity excitace a dalších artefaktů souvisejícími se změnami prostředí (Vu & Arai, 2023). Nevýhodou ratiometrických biosenzorů je jejich poměrně omezený dynamický rozsah, který může ovlivnit citlivost, přesnost a dobu odezvy biosenzoru (VanEngelenburg & Palmer, 2008). Faktor dynamického rozsahu zároveň dokáže ovlivnit konformační změny a vazby analytů, čímž dochází ke změně v přenosu signálu a v detekčním rozsahu biosenzoru. I u tohoto typu biosenzoru je zapotřebí zhodnotit vliv pH, teploty, koncentrace analytu nebo iontovou sílu, neboť i tyto faktory jsou schopné modulovat dynamický rozsah ratiometrických biosenzorů (Ast et al., 2017).

Za účelem zlepšení dynamického rozsahu biosenzoru lze modifikovat peptidové linkery nebo oblasti těchto linkerů mezi fluorescenčními proteiny a sensorovými doménami. Cílem úprav těchto oblastí je změna vzdálenosti a orientace samotných fluorescenčních proteinů, čímž dojde ke zvýšení efektivity FRET a dynamického rozsahu. Nejčastěji jsou využívány peptidové sekvence obsahující flexibilní a hydrofilní rezidua, především serin a glycin, opakující se v libovolném pořadí. Velkou výhodou takových linkerů je fakt, že neinteragují se skládáním proteinových domén (Evers et al., 2006).

Mimo využití peptidových linkerů lze zvýšit dynamický rozsah prostřednictvím cirkulární permutace fluorescenčních proteinů. V důsledku cirkulární permutace dojde ke vzniku nového N- a C-konce a ke změně prostorové orientace proteinu, aniž by došlo k narušení skládání daného proteinu. Vlivem cirkulární permutace zároveň dochází ke zvýšení pKa daných proteinů, což způsobuje vyšší fluorescenci chromoforů při $\text{pH} \geq 7$ nebo zvýšení stability fluorescenčních proteinů prostřednictvím snížení protonizace chromoforů. Tyto modifikace vedou k zabránění fotobleachingu a agregaci (Baird et al., 1999).



Obrázek 3: Princip ratiometrického biosenzoru se dvěma fluorescenčními proteiny (převzato od Kaczmariski et al., 2019)

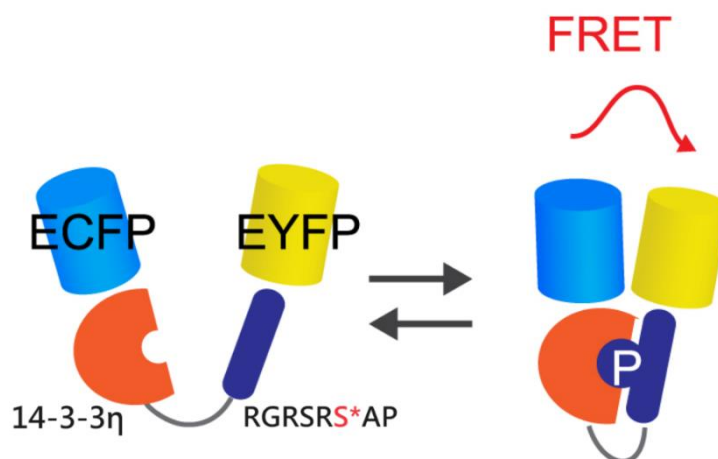
2.5 Geneticky kódované sondy pro detekci aktivity/aktivace Akt

2.5.1.1 Aktus

Pro dynamiku buněčné signalizace lze využít biosenzor Aktus, který může být vhodný pro měření aktivity Akt jak v cytosolu, tak různých typech organel, například Golgiho aparátu nebo mitochondrii. Jeho struktura je velmi podobná struktuře biosenzoru AKAR. Obsahuje fluorescenční proteiny ECFP a EYFP, mezi kterými je umístěna substrátová doména RGRSRSAP a doména 14-3-3 η , které jsou mezi sebou propojeny flexibilním linkerem skládajícím se z několika aminokyselin (Obr 4) (Sato & Umezawa, 2004).

Pokud je v blízkosti senzoru přítomné fosforylované/aktivní Akt fosforyluje serin v substrátové doméně. Doména 14-3-3 η následně slouží jako detekční úsek pro rozpoznání fosforylovaného serinu, ke kterému má vysokou afinitu. Tím dochází ke konformačním změnám biosenzoru, kdy se vzdálenost mezi koncovými fluorescenčními proteiny zúží na hodnotu 10 nm či menší. V tomto konformačním uspořádání proběhne energetický přechod mezi fluorescenčními proteiny, což je následně detekováno jako zvýšení hodnoty emise akceptorového FP a snížením intenzity fluorescence donorového FP (Sasaki et al., 2003).

Při porovnání biosenzoru Aktus s ostatními biosenzory sloužícími k detekci aktivity Akt je hlavní nevýhodou tohoto biosenzoru jeho nízká citlivost a omezený dynamický rozsah. Schopnost Aktus je totiž omezena na určité rozmezí fosforylace Akt. Nejčastěji slouží pro detekci při výrazně zvýšené expresi třeba u některých nádorových modelů. Pokud se jedná o měření nepatrných změn či nízkých hladin aktivity Akt, je zapotřebí zvolit citlivější biosenzor (Kunkel et al., 2005).



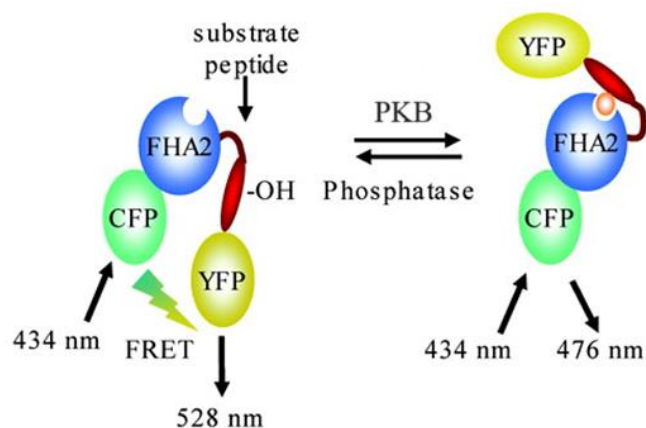
Obr. 4: Princip detekce aktivity Akt biosenzorem Aktus (podle Miura et al., 2014, upraveno)

2.5.1.2 BKAR

Dalším z ratiometrických biosenzorů specifických pro aktivitu Akt je biosenzor BKAR. Jeho strukturní aspekty jsou analogické s reportérovým biosenzorem CKAR, který je využíván k detekci aktivity PKC. BKAR obsahuje ve své struktuře dva fluorescenční proteiny mCFP a mYFP, FHA2 doménu a substrátovou sekvenci (Obr. 5). Tato konsenzuální substrátová sekvence RKRDLGTLGI obsahuje threonin jakožto fosfoakceptorová část sekvence (Kunkel et al., 2005).

Biosenzor BKAR využívá FRET uspořádání. Pokud se v intracelulární oblasti nenachází fosforylovaný protein Akt, dochází k excitaci akceptorového fluorescenčního proteinu (mYFP) donorovým fluorescenčním proteinem (mCFP) za vyzáření emisního záření o vlnové délce 528 nm. V případě, kdy je v dané oblasti přítomno fosforylované Akt, může posttranslačně modifikovat specifický threonin v substrátové sekvenci, čímž dojde ke konformačním změnám biosenzoru a FP se oddálí. Výsledkem je změna poměru intenzit emisní donorového a akceptorového FP (Belal et al., 2013).

Experimenty provedené s BKAR ukazují, že jej lze lokalizovat do různých buněčných struktur a je schopen v delším časovém horizontu odrážet i aktivitu intracelulárních fosfatáz (Kunkel et al., 2005).



Obr. 5: Strukturální uspořádání a aktivace biosenzoru BKAR (podle Violin et al., 2003, upraveno)

2.5.1.3 AktAR2

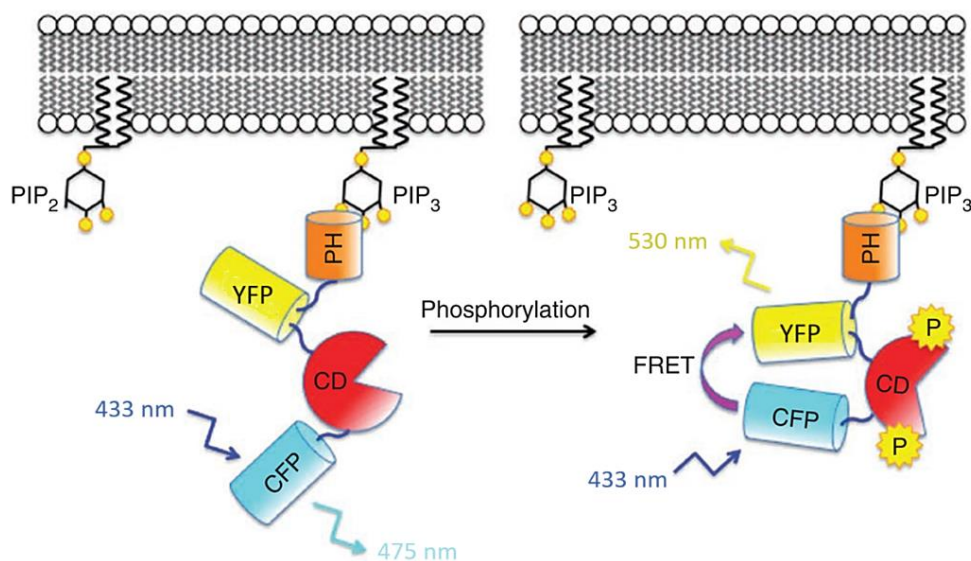
Jedná se o ratiometrický biosenzor vyvinutý pro sledování aktivity Akt kinázy v živočišných buňkách. Konkrétně dochází v rámci AktAR2 k převedení specifické fosforylace Akt na fluorescenční signál (FRET). Ve struktuře tohoto biosenzoru se nachází CFP (cyan fluorescent protein) a YFP (yellow fluorescent protein), mezi které byla vložena sekvence substrátového peptidu odvozeného od FoxO1 (Forkhead Box O1) a FHA1 doména vázající fosfoaminokyseliny. Fosforylace substrátové domény biosenzoru navyšuje její afinitu k doméně FHA1, což má za následek změnu konformace a vznik FRET mezi CFP a YFP. Experimentálně se změna projeví zvýšenou intenzitou emise YFP a sníženou intenzitou emise CFP (Zhou et al., 2022).

U předchozího typu biosenzoru AktAR bylo zjištěno, že nahrazením ECFP za Cerulean, což je jasnější azurový FP, dojde ke zlepšení odpovědi. Výrazné navýšení odpovědi biosenzoru bylo dosaženo i náhradou YFP za cirkulárně permutovaným fluorescenčním proteinem Venus, který má silnější fluorescenční odezvu (Gao & Zhang, 2008). Biosenzor je vhodný pro měření nejen základní kinázové aktivity Akt, ale také umožňuje pozorovat aktivitu Akt v živých buňkách před a po aplikaci léčiv ovlivňující PI3K/Akt signální dráhu (Zhou et al., 2022).

2.5.1.4 Akind

Tento typ biosenzoru dokáže detekovat aktivaci Akt opět na základě konformačních změn, avšak má odlišné strukturní uspořádání v porovnání s dříve zmíněnými biosenzory. Na svém C-terminálním konci má navázaný CFP. Směrem od N-terminálního konce je navázána PH doména Akt. Po PH doméně následuje YFP, které je k CFP navázáno přes detekční doménu Akt. Prostřednictvím přítomné PH domény dochází k interakci biosenzoru s fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfátem (PIP₃), který vzniká po interakci ligandu s receptorem a následnou aktivací PI3K. Po navázání na PIP₃ dojde k fosforylaci threoninového rezidua nacházejícího se v detekční doméně. Vlivem této fosforylace způsobí přiblížení FP do těsné blízkosti a k přenosu energie (FRET) z donorového fluoroforu na akceptorový, což povede ke zvýšení emise při 530 nm a snížení při 475 nm (Obr. 6) (Broussard et al., 2013; Yoshizaki et al., 2007).

Co se týče možnosti použití je Akind poměrně citlivý s širokou dynamikou, lze ho tedy použít pro monitorování aktivity Akt během buněčných procesů v reálném čase (Broussard et al., 2013).



Obr. 6: Strukturní uspořádání a aktivace biosenzoru Akind (převzato od Broussard et al., 2013, upraveno)

2.5.1.5 ExRai-AKAR2

V posledních letech došlo k vývoji ratiometrických biosenzorů obsahujících pouze jeden fluorescenční protein, který využívá dvě odlišná absorpční maxima protonovaného a deprotonovaného chromoforu. Výsledkem je zobrazení dvou excitačních nebo emisních

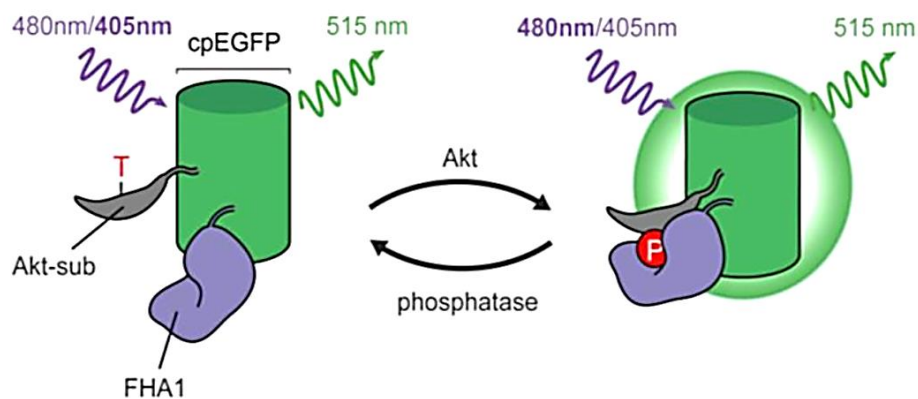
maxim s odlišnými změnami intenzity. Tento typ biosenzorů byl navrhnout na kompenzaci nedostatků intenziometrických biosenzorů, u kterých často dochází ke změnám úrovně exprese biosenzoru nebo fotobleachingu (Ast et al., 2017).

Jedním z těchto typů ratiometrických biosenzorů je ExRai-AKAR2 vycházející z kinázových biosenzorů KAR. Jedná se o velice citlivý, excitačně-ratiometrický biosenzor, který byl původně navržen pro detekci proteinkinázy A (PAK). Od svého předchůdce (ExRai-AKAR) se liší v páru linkerů FC-LL, které dokázaly zvýšit fluorescenční intenzitu a citlivost daného biosenzoru (J.-F. Zhang et al., 2021). Celý konstrukt obsahuje substrátovou doménu, FHA1 doménu (forkhead-associated domain) a cirkulárně permutovaný GFP (cpGFP). FHA1 doména slouží v konstruktu k rozpoznání fosforylace substrátové domény, ke které má mnohem vyšší afinitu. Fosforylace tak vyvolá konformační změny, na základě kterých dojde k posunu maximální excitační vlnové délky ze 405 nm na 480 nm (Zhou et al., 2020).

Jak již bylo v této práci zmíněno, biosenzory fungující na principu FRET jsou tolerantní, co se týče začleňování nových domén do jejich struktury. Na základě tohoto poznatku byla testována všestrannost ExRai-AKAR2 použitím různých substrátových domén a to pro PKA (proteinkináza A), Akt (proteinkináza B) nebo PKC (proteinkináza C). Jak ExRai-CKAR, tak ExRai-AktAR vykazovaly zvýšené excitační poměry a staly se tak biosenzory s nejvyšší odezvou pro detekci svých cílených kináz (Mehta et al., 2018).

2.5.1.6 ExRai-AktAR2

Pro pochopení celkové regulace a funkcí proteinkinázy B (Akt) je zapotřebí využít co nejpresnější a nejcitlivější metody. I přes to, že u ExRai-AktAR první generace byla prokázána zvýšená citlivost a intenzita fosforylace při měření aktivity Akt, stále zde přetrvával problém v omezeném dynamickém rozsahu. Pro zlepšení a zvýšení dynamického rozsahu byly nakonec navrženy určité páry linkerů, u kterých byl zkoumán vliv na odpověď biosenzoru. Na základě výsledků bylo zjištěno, že při použití linkerů LQ-LL vykazoval biosenzor největší odpověď. Tento biosenzor byl následně pojmenován ExRai-AktAR druhé generace (Obr. 7). Jeho efektivita detekce byla testována v jednotlivých buněčných kompartmentech. V porovnání s AktAR2 či jeho předchůdcem ExRai-AktAR první generace došlo k významnému zvýšení citlivosti a specificity, čímž se stal v současnosti nejcitlivějším excitačně-ratiometrickým biosenzorem (Chen et al., 2021).



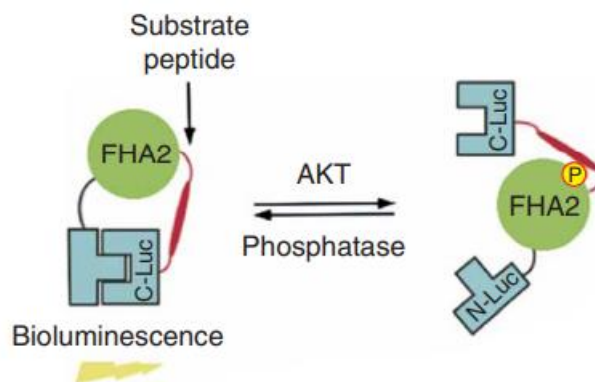
Obrázek 7: Struktura biosenzoru Ex-RaiAktAR2 (převzato od Chen et al., 2021)

2.5.1.7 BAR

Pokud by pracoviště nemělo dostupný vhodný fluorescenční mikroskop, existují biosenzory využívající bioluminiscenční detekci. Jedním z těchto představitelů určených k měření aktivity Akt je biosenzor BAR. Ten obsahuje ve své struktuře na N-konci (N-Luc) a C-konci (C-Luc) fragmenty luciferázy. Tyto fragmenty jsou propojeny přes substrátovou a FHA2 doménu, sloužící k rozpoznávání přítomnosti fosfátu na substrátové doméně (Obr. 8). Nefosforylovaná forma senzoru je uspořádaná tak, že fragmenty luciferázy tvoří kataliticky aktivní molekulu enzymu. Po fosforylaci substrátové domény aktivovaným Akt dochází k interakci s FHA2 doménou, v důsledku čehož dojde ke konformační změně a oddělení fragmentů luciferázy, čímž dochází k inhibici katalitické aktivity (Suchowski et al., 2017; L. Zhang et al., 2007).

Enzym luciferáza je jedním z hojně využívaných bioluminiscenčních značení. Principem mechanismu působení luciferázy je oxidace substrátu luciferinu za přítomnosti ATP. Touto reakcí dojde k emitaci světla o vlnové délce 560 nm (Suchowski et al., 2017).

V porovnání s biosenzory využívající fluorescenční signál jsou bioluminiscenční biosenzory stabilnější, co se týče světelného signálu. Z tohoto důvodu jsou vhodnými biosenzory pro časově náročnější experimenty a díky obvykle nižšímu pozadí, lze docílit lepší citlivosti. Ovšem samotný bioluminiscenční signál je, na rozdíl od fluorescenčního signálu, závislý na obsahu substrátu, čímž může být samotná citlivost negativně ovlivněna. Další nevýhodou může být nižší poměr samotného signálu k šumu či nemožnost využití barevných kanálů, v rámci kterých lze ve stejnou dobu pozorovat více buněčných dějů nebo analytů (Tung et al., 2016).



Obr. 8: Strukturní uspořádání bioluminiscenčního biosenzoru BAR (převzato od L. Zhang et al., 2007)

2.6 PI3K/Akt signální dráha

Signalizace fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K)/proteinkinázy B (Akt) je jednou z nejdůležitějších drah, která se podílí na regulaci mnoha buněčných procesů tím, že aktivuje konkrétní efektorové molekuly podílející se na regulaci buněčného cyklu, růstu, apoptózy či proliferace. Zároveň hraje signální dráha PI3K/Akt hlavní roli v regulaci funkce a přežití kardiomyocytů, což je významným aspektem pro snížení poškození způsobené infarktem myokardu. (Yao et al., 2014)

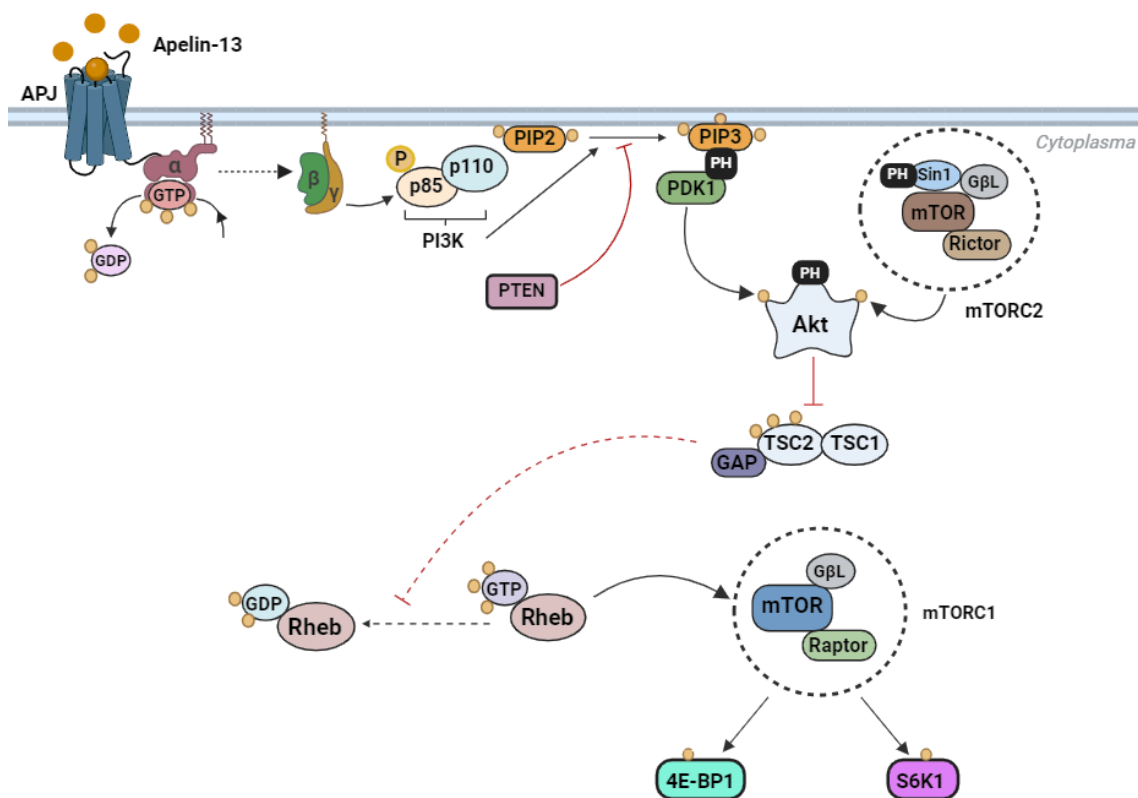
Současně se však jedná o signální dráhu, u které často dochází k nadměrné aktivaci vlivem mutací, genetických změn či jiných deregulací, což způsobuje její patologické vlastnosti. Narušení dráhy PI3K/Akt je základem pro různá onemocnění, mezi které patří určité typy rakoviny (prsů, plic, vaječníků, atd.) nebo diabetes (Shi et al., 2019).

2.6.1 Fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K)

Jedná se o rodinu lipidových kináz hrající důležitou roli v mnoha buněčných procesech, jako například při apoptóze, buněčném cyklu, angiogenezi, atd. PI3K je rozdělena do tří tříd, konkrétně se jedná o třídy I, II a III, přičemž PI3K třídy I se dále dělí na třídy IA a IB (J. Yang et al., 2019). Podle jejich funkcí a místa působení je můžeme rozdělit také na třídy podílející se na membránovém transportu (třída II, III) nebo podílející se na buněčné signalizaci (I, II). V souvislosti s Akt signalizací nás nejvíce zajímá PI3K třídy I, která jako jediná dokáže syntetizovat fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfát [PtdIns(3,4,5)P₃]. Tato fosforylovaná forma rekrutuje kinázu Akt k plazmatické membráně přes PH doménu (pleckstrin homology domain) (Jean & Kiger, 2014).

PI3K je heterodimerní proteinový komplex, který se skládá z aktivní podjednotky p110 a regulační podjednotky p85, přes kterou je komplex PI3K vázán na aktivovaný RTK nacházející se na plazmatické membráně. Plazmatická membrána obsahuje RTK monomery, u kterých po navázání ligandu (může se jednat o růstové faktory, hormony, cytokiny atd.) dochází k jejich dimerizaci a následné autofluorescenci. Následně dochází k navázání PI3K α na aktivovaný RTK prostřednictvím regulační podjednotky p85 (Vasan et al., 2019). Na aktivovaný receptor se váže současně i SH2 doména (Src homology domain 2) obsahující Grb2 protein (Growth factor receptor-bound protein 2), přes který následně dochází k navázání SOS proteinu (Son of Sevenless). SOS protein interaguje s neaktivovanou formou RAS-GDP za vzniku aktivované formy RAS-GTP, která následně aktivuje podjednotku p110 u PI3K nezávisle na podjednotce p85 (Castellano & Downward, 2011). Tento mechanismus následně katalyzuje fosforylaci fosfatidylinositol (4,5)-disfosfátu (PIP2) na fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfát (PIP3) (Obr. 9) (Long et al., 2021).

Samotná signalizace však může být aktivována i jinými membránovými receptory namísto RTK, jako například tzv. „G protein-coupled receptors“ (GPCR). Jedná se o velkou třídu membránových proteinů, které jsou složeny ze sedmi transmembránových α -helikáz (Manning & Toker, 2017). Příkladem GPCR, který způsobuje aktivaci Akt signalizace je například APJ („angiotensin-like-receptor 1“) (Liu et al., 2020). Po navázání ligandu na tento receptor dojde k jeho konformačním změnám. Tyto změny ve struktuře vedou k navázání heterotrimerního proteinu G, složeného z α , β a γ podjednotky, k intracelulární části receptoru. Jméno těchto proteinů je odvozeno od jejich schopnosti vázat GDP a GTP (García-Regalado et al., 2008). Aktivovaný receptor katalyzuje přeměnu GDP na GTP na α podjednotce, což způsobuje jeho disociaci od β a γ podjednotky. Samotný G $\beta\gamma$ komplex je schopen se přímo vázat na PI3K nacházející se přirozeně na plazmatické membráně a aktivovat je k následné fosforylaci na PIP3 prostřednictvím fosforylace PIP2 (Gulati et al., 2018).



Obrázek 9: Aktivace PI3K/Akt/mTORC1 prostřednictvím receptoru APJ; (vytvořeno v aplikaci Biorender podle nastudované literatury)

2.6.2 Phosphatase And Tensin Homolog (PTEN)

PTEN patří do skupiny tzv. tumor-supresorových proteinů, jehož hlavním úkolem je zastavení abnormálního buněčného růstu (Trotman et al., 2003). Jedná se také ovšem o nejčastěji mutovaný gen u rakovinných buněk. Jeho inaktivace vlivem mutace vede k nadměrné aktivaci proteinů podílejících se na PI3K/Akt signalizaci, což způsobuje nekontrolovatelný růst buněk. Za normálních okolností PTEN působí proti PI3K signalizaci pomocí defosforylace PIP3 zpět na PIP2 (Obr. 10), čímž dojde ke snížené aktivaci PDK1/Akt a ke snížení následné Akt/mTOR signalizace (Luongo et al., 2019).

Mutace PTEN mohou být velmi různorodé. Může se jednat například o mutace vedoucí k zavedení předčasného stop kodonu, což zapříčiní zkrácení a nefunkčnost proteinu. Jiné mutace zapříčiní zavedení či odstranění nukleotidů z genu, čímž dojde k posunu čtecího rámce. V důsledku tzv. missense mutace může dojít k záměně aminokyseliny v proteinu a tím změnit funkci proteinu či způsobit jeho inaktivaci (Leslie & Longy, 2016).

Struktura samotného PTEN je složena primárně z DUSP fosfatázové domény a C2 domény (Perevalova et al., 2022). Doména C2 slouží PTEN jako tzv. membránová

kotva. Ve své struktuře obsahuje aminokyseliny s kladným nábojem, což umožňuje stabilizaci PTEN na plazmatické membráně, která je záporně nabitá (Yasui et al., 2014). Fosfatázová doména je zásadní pro celkovou enzymatickou aktivitu. Ve struktuře fosfatázové domény se nachází několik smyček, přičemž jedna z těchto smyček je tzv. P-smyčka obsahující Cys124 a Arg130 (Perevalova et al., 2022). Tyto zbytky jsou nezbytné pro samotnou katalýzu a přenesení fosfátové skupiny z PIP3 na Cys124, čímž dochází k defosforylaci PIP3 na PIP2 (Jang et al., 2021).

2.6.3 Phosphoinositide-dependent kinase-1/2 (PDK1)

PDK1 je hlavním regulátorem rodiny AGC kináz, která autofosforyluje na zbytku Ser241 nacházejícím se v tzv. aktivační smyčce, čímž se stává konstitutivně aktivní (Barile et al., 2012). Prvním mechanismem vzájemné interakce Akt a PDK1 je prostřednictvím PIP3. Po fosforylaci PIP2 na PIP3 se Akt a PDK1 rekrutují k buněčné membráně, kde pomocí své PH domény interagují s PIP3 (obr. 10). PDK1 zde aktivuje Akt prostřednictvím fosforylace zbytku Thr308 v jeho struktuře (Castellano & Downward, 2011). Druhým mechanismem jejich vzájemné interakce je využití tzv. PIF-pocket nacházející se v kinázové doméně PDK1. Během PI3K/Akt signalizace dochází mimo jiné k fosforylaci zbytku Ser473 působením mTORC2. PDK1 je schopna se navázat na fosforylovaný zbytek Ser473 u Akt prostřednictvím PIF-pocket ve své struktuře. Tento mechanismus interakce Akt a PDK1 přes PIF-pocket je velice důležitý, neboť je v této části signalizace zapotřebí inhibovat nejen PDK1, ale zároveň mTORC2 (Xu et al., 2019).

2.6.4 Serin/threonin kináza (PKB/Akt)

Rodina AGC obsahuje přes 60 serin/threoninových proteinkináz, které mají podobné jak struktury, tak funkce. Mezi tyto proteinkinázy patří například již zmíněná PDK1 nebo Akt/PKB. Jméno této proteinkinázové rodiny pochází od 3 základních členů, konkrétně se jedná o PKA, PKG a PKC. Celkově se AGC kinázy podílejí na různých buněčných procesech, a proto se také stávají cílem nejen pro léčbu rakoviny, ale také diabetu, neurologických poruch virových infekcí a dalších onemocnění (Arencibia et al., 2013).

Základem struktury Akt je kinázová doména složená z N- a C-terminální části, která zároveň obsahuje zbytek Thr308 v tzv. aktivační smyčce, u kterého dochází během signalizace k fosforylaci prostřednictvím působení PDK1. Touto fosforylací dochází k částečné aktivaci PKB/Akt. Součástí N-terminální části je zároveň i PH doména, která je zodpovědná za interakci s PIP3 na plazmatické membráně (Chu et al., 2020). Pro

maximální aktivitu Akt je zapotřebí fosforylace jak zbytku Thr308 vlivem PDK1, tak zbytku Ser473, který se nachází v hydrofobním motivu (HM) na C-terminální kinázové doméně. K fosforylaci Ser473 dochází prostřednictvím mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) (Manning & Toker, 2017).

2.6.5 Mechanistic target of rapamycin (mTOR)

Jedná se o serin/threoninovou kinázu, která reguluje buněčný růst, proliferaci, metabolismus nebo autofázi, při které vlivem aktivace mTOR dochází k jejímu potlačení. Pokud dojde k nadměrné aktivaci mTOR vlivem např. zvýšené aktivity Akt, dojde k aktivaci nadměrného růstu nádorových buněk a jejich přesunu do zdravých tkání (Zou et al., 2020). mTOR se vyskytuje ve dvou odlišných komplexech, konkrétně ve formě mTORC1 a mTORC2 (Q. Yang et al., 2006).

2.6.6 Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2)

„Mammalian target of rapamycin complex 2“ je zodpovědný za fosforylaci HM motivu (Ser473) PKB/Akt přes mTOR doménu. Ve své struktuře obsahuje protein Rictor, mTOR kinázovou doménu, podjednotku GβL a Sin1-PH doménu (Bhaskar & Hay, 2007). K aktivaci mTORC2 dochází stejně jako u PI3K vlivem extracelulárních stimulů, nejsou však zatím známy konkrétní molekulární mechanismy jeho aktivace. Bylo však zjištěno, že doména Sin1 interaguje s mTOR katalytickou doménou přes PH doménu, čímž dochází k inhibici fosforylace PKB/Akt. Ovšem v případě, kdy vlivem PI3K dojde ke vzniku PIP3 na plazmatické membráně, dochází k soupeření mezi mTOR a PIP3 o vazbu na Sin1-PH doménu. V důsledku možnosti navázání mTORC2 na PIP3 přes PH doménu dochází k jeho přiblížení k plazmatické membráně, kde se zároveň nachází navázaný PKB/Akt. Právě v tuto chvíli dochází k fosforylaci Ser473 vlivem mTOR domény a ke kompletní aktivaci PKB/Akt (Obr. 10) (Yuan & Guan, 2015).

2.6.7 Komplex tuberózní sklerózy (TSC)

TSC neboli tumor supresorový heterodimer, se skládá ze dvou proteinů, jedná se o TSC1 (hamartin) a TSC2 (tuberin). Jméno komplexu tuberózní sklerózy je přímo odvozeno od genetického onemocnění, které vzniká mutací jednoho z dotyčných proteinů (Li et al., 2004). TSC1 a TSC2 vytvářejí komplex prostřednictvím svých domén nacházejících se v C-terminálních oblastech. TSC1 obsahuje tzv. C-terminal coiled-coil (CCT), přes který se váže na GAP doménu (Cai et al., 2006). Za normálních podmínek dochází k navázání komplexu TSC1/TSC2 přes GAP doménu na Rheb-GTP (Ras

homolog enriched in brain – guanosine triphosphate), kde komplex stimuluje GTP hydrolyzu. Dochází tak k přeměně aktivního GTP na neaktivní GDP a následná mTORC1 signalizace se prostřednictvím této dráhy neaktivuje (Inoki et al., 2003).

Pokud dojde k aktivaci Akt vlivem PI3K/Akt signalizace, dojde k fosforylaci proteinu TSC2 na Ser1086, Ser1088 and Thr1422, což zapříčiní jeho destabilizaci a narušení interakce s TSC1, čímž ztrácí svou regulační funkci (Li et al., 2004). Dojde k oddělení TSC2 od TSC1, který zůstává vázán na membránu, a celkové translokaci TSC2 do cytosolu, čímž dojde k akumulaci aktivních Rheb-GTP. Ty jsou hlavními aktivátory mTORC1 (Obr. 10) (Cai et al., 2006).

mTORC1 je velmi podobný mTORC2 po strukturní stránce. Stejně jako mTORC2 obsahuje mTORC1 mTOR kinázovou doménu a podjednotku GβL. Od mTORC2 se liší proteinem ve své struktuře, kdy se zde namísto Rictoru nachází protein Raptor a absencí Sin1-PH domény (Bhaskar & Hay, 2007). Po navázání Rheb na mTORC1 dochází ke zvýšení kinázové aktivity, na základě čehož je mTORC1 schopen dále fosforylovat protein v navazující regulaci (obr. 10). Konkrétně se může jednat o S6K1 nebo 4E-BP1 (Parmar & Tamanoi, 2010).

2.7 Přírodní látky

U rakovinných buněk se vyskytují mutace signálních drah, které vedou k nekontrolovatelnému buněčnému dělení a k narušení apoptózy, z tohoto důvodu je apoptóza častým terapeutickým cílem pro léčbu rakoviny (S.-H. Kim et al., 2019). Pro léčbu rakoviny se zpravidla využívají syntetická chemoterapeutická léčiva s vysokou cytotoxicitou. Problémem je postupné vybudování rezistence u pacientů, kvůli čemuž se hledají alternativní látky, které by podpořily efektivitu chemoterapeutických látek či by je dokázaly kompletně nahradit. V tomto kontextu se začaly zkoumat přírodní látky, které díky své nízké toxicitě, bezpečnosti, dostupnosti a rozsáhlé škále obsažených chemických látek by mohli sloužit jako potenciální látky pro prevenci a chemoterapii. V předchozích letech bylo zjištěno, že přírodní látky dokážou interagovat se signálními drahami, jako například s PI3K, MAPK/ERK, TLR či Akt, což jsou jedny z drah, u kterých dochází vlivem jejich dysregulace k nekontrolovatelné proliferaci rakovinných buněk (Naeem et al., 2022).

2.7.1 Flavonoidy

Flavonoidy lze zařadit do rostlinných sekundárních metabolitů, které mají pozitivní biochemické, antioxidační, prozánětlivé, antimutagenní a antikarcinogenní účinky. U rostlin hrají důležitou roli v obraně proti reaktivním formám kyslíku (ROS), mohou sloužit jako UV filtry či signální molekuly (Dias et al., 2021). Základní strukturou flavonoidů a jejich podskupin jsou dva benzenové kruhy (A, B) propojené s pyranovým kruhem. Podle lokalizace benzenového kruhu B na pyranovém centrálním kruhu a počtu či poloze hydroxyskupin v základní struktuře dochází k ovlivnění antioxidační schopnosti dotyčné skupiny flavonoidů. Na základě těchto odlišností lze flavonoidy rozdělit do několika podskupin, jako flavony, flavonoly, isoflavony, flavanony, antokyany atd. (Panche et al., 2016).

2.7.2 Flavonolignany

Do menší, specifické podskupiny flavonoidů patří zároveň i tzv. flavonolignany, které obsahují základní strukturu flavonoidů propojenou s fenylypropanoidem (Song et al., 2022). Nejznámějšími flavonolignany jsou ty obsažené v silymarinovém extraktu pocházející z perikarpu semen rostliny ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*), kde dochází k jejich akumulaci (AbouZid & Ahmed, 2013).

Silymarin je směsí několika izomerních flavonolignanů. Mezi hlavní flavonolignany obsažené v silymarinu patří silybinin, silychristin, silydianin a isosilybinin. Bylo zjištěno, že silymarin dokáže inhibovat produkci reaktivních forem kyslíku poškozujících DNA a buněčnou proliferaci prostřednictvím inaktivace PI3K/Akt a MAPK signálních drah, což vede k následné indukci apoptózy (Madhunapantula & Robertson, 2012). Kromě toho narušuje zánětlivé dráhy a inhibuje uvolňování prozánětlivých cytokinů, které se podílejí na progresi srdečních onemocnění. Silymarin rovněž vykazuje potenciál při regulaci hladiny cholesterolu, čímž podporuje příznivý lipidový profil. Zároveň přispívá k zachování funkce endotelu, která je zásadní pro udržení zdravých cév a prevenci endoteliální dysfunkce. Tyto mnohostranné mechanismy podtrhují pozitivní vliv silymarinu na kardiovaskulárního systému. (Rao & Viswanath, 2007)

Také bylo prokázáno, že silymarin má pozitivní účinky na zvyšování účinnosti léků, u kterých byla pacientem vybudována rezistence v rámci dlouhodobé konzumace, prostřednictvím inhibice dotyčné rezistence. Z tohoto hlediska byl silymarin označen jako potenciální látka pro podpůrnou léčbu rakovin či jiných onemocnění, u kterých

dochází k častému vybudování rezistence na předepsaná syntetická léčiva (Gillissen & Schmidt, 2020).

Jedním z nejvíce studovaných flavonolignanů obsažených v silymarinu je silybin jakožto jeho hlavní účinná složka (Bijak, 2017). Všeobecně se silybin hojně využívá jako doplněk stravy či jako protijed proti otravě houbou *Amanita phalloides*. I silybin obsahuje silnou antioxidační aktivitu, kdy je schopen zachytávat hydroxylové radikály a zabráňovat peroxidaci lipidů. Mimo zjištěnou antioxidační a hepatoprotektivní aktivitu silymarin oplývá zároveň i protirakovinnými a chemopreventivními účinky. Silybin má hydrofobní charakter, tudíž je nerozpustný ve vodě. Zároveň je také špatně rozpustný jak v polárních protických, tak nepolárních rozpouštědlech. Lze ho však rozpustit v aprotických rozpouštědlech, jako aceton či DMSO (Agarwal et al., 2013).

V mnoha studiích je spojována srdeční hypertrofie s nadměrnou produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS). S ROS souvisejí signální dráhy MAPK či PI3K/Akt. Bylo prokázáno, že silybin dokáže blokovat signální dráhy ERK1/2 MAPK a Akt za účelem cytoprotektivních účinků (Anestopoulos et al., 2013). Později byly na základě široké škály pozitivních účinků silybinu na lidské zdraví studovány i jeho deriváty, jako například 2,3-dehydrosilybin. Právě u 2,3-dehydrosilybinu byl zjištěn lepší antioxidační potenciál nebo zlepšená antiperoxidace lipidů. (Agarwal et al., 2013).

DHS neboli celým názvem 2,3-dehydrosilybin, je oxidovaná forma silybinu vykazující zvýšenou ochranu proti buněčné smrti. V porovnání s účinky silybinu DHS vykazuje kardioprotektivní účinky prostřednictvím aktivace signální dráhy PI3K/Akt během ischemie. Jeho schopností aktivovat tuto dráhu dochází k podpoře přežití buněk, proliferace a zároveň dochází k tlumení apoptózy. Dále dochází k usnadnění zachování integrity mitochondrií, zachovává produkci energie a zmírňuje poškození způsobené oxidačním stresem, které je pro životaschopnost buněk v ischemických podmínkách klíčové (Ghafouri-Fard et al., 2022).

2.8 Apelin-13

Mimo testování přírodních flavonolignanů na inhibici PI3K/Akt a MAPK signálních drah se věda zaměřuje i na studium vlivu nestabilní a nezralé vaskulatury rakovinných buněk. Aby mohly rakovinné buňky proliferovat a růst, potřebují dostatečný přívod živin a kyslíku, z tohoto důvodu se musí nacházet v určité vzdálenosti od prokrvených cév, které jim tyto nároky pro přežití dokážou zajistit. Angiogeneze u rakovinných buněk zde

hraje klíčovou roli. U nádorových buněk dochází k narušení rovnováhy angiogenních regulátorů prostřednictvím uvolňování proangiogenních regulátorů, jako VEGF a FGF. Vytvoření nových cévních kapilár zajišťuje rakovinným buňkám napojení na krevní řečiště, čímž získávají potřebné živiny (Forster et al., 2017). V rámci antiangiogenní terapie monoklonální protilátkou bevacizumab proti VEGF bylo zjištěno, že nedochází přímo k inhibičním účinkům, ale že antiangiogenní terapie napomáhá ke stabilitě narušené vaskulatury nádoru, to vede k vytvoření zdravé vaskulatury. Principem zdravé vaskulatury spolu se zvýšeným průtokem krve je zlepšené dodání protinádorových léčiv do nádorových buněk (Kidoya et al., 2012).

Apelin je endogenní ligand vázající se na svůj receptor APJ, který je propojený s G-proteinem. Jedná se o angiogenní látku, která podporuje jak proliferaci buněk prostřednictvím aktivace PI3K/Akt, ERK signalizací, tak zlepšuje rozšíření vaskulárních sítí (Chaves-Almagro et al., 2022). Samotná dráha apelin/APJ zprostředkovává také rezistenci na některé protirakovinné léky, které jsou mířeny na indukci apoptózy, a na antiangiogenní látky. Na základě tohoto zjištění byla dráha apelin/APJ navržena jako potenciální protirakovinný cíl (Masoumi et al., 2020).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály a přístroje

3.1.1 Chemikálie

2,3-dehydrosilybin (byl získán darem od Vladimíra Křena; připraven oxidací silybinu)

Akrylamid/N,N'-metylenbisakrylamid (29:1, 40% roztok) (Merck, kat. č. 1.00641.1000)

Aminokyseliny (50×) (ThermoFisher, kat. č. 11130051)

Bromfenolová modř (Sigma Aldrich, kat. č. B0126)

Chlorid sodný (Lach-Ner, kat. č. 30093-AP0-G1000-1)

Chlorid vápenatý (Lach-Ner, kat. č. 30096-AP1-G1000-1)

Chlorid hořečnatý hexahydrát (Lach-Ner, kat. č. 30080-AP0-G0500-1)

Chlorid draselný (Lach-Ner, kat. č. 30076)

Glukóza · 1 H₂O (Sigma Aldrich, kat. č. G7021)

Dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich, kat. č. D2650)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, kat. č. 30016-CP0-G0500-1)

Dodecylsulfát sodný 10% (SDS) (Sigma Aldrich, kat. č. L5750)
Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem (DMEM) (SERANA, kat. č. MCL-004)
ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent kit (GE Healthcare, kat. č. RPN2236)
Fetální bovinní sérum (FBS) (GE Healthcare Life Sciences, kat. č. SV 30160.03)
Fluorid sodný (Sigma Aldrich, kat. č. S7920)
Hydrogenuhličitan sodný (Lach-Ner, kat. č. 30320)
Hydrogenfosforečnan disodný (Penta, kat. č. 15150-31000)
L-glutamin (Serva, kat. č. 22942)
Lipofectamine® 3000 (ThermoFisher, L3000001)
MEM Vitamínový roztok (100×) (ThermoFisher, kat. č. 11120052)
Methanol (Sigma Aldrich, kat. č.322415)
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva, kat. č. 35930)
N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-etansulfonová kyselina (Hepes) (Sigma Aldrich, kat. č. H3375)
Octová kyselina 99% (Lach-Ner, kat. č. 10047-A99)
Opti-MEM® (ThermoFisher; kat. č. 11058021)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo scientific, kat. č. 2692467)
pcDNA4 EGFP (součástí kitu Cell Line Nucleofector® Kit V, kat. č. VCA-1003)
pcDNA3-ExRai-AktAR2 (Addgene, kat. č. 184047)
Penicillin-Streptomycin (Sigma Aldrich; kat. č. P4333)
Peroxodisíran amonný (Sigma Aldrich, kat. č. A3678)
PolyJet™ Reagent (SignaGen, kat. č. SL100688)
Ponceau S (Sigma Aldrich; kat. č. P3504)
Propanol (Sigma-Aldrich, kat. č. kat. č. 402893)
Protilátky primární od firmy Cell Signaling Technology:
Akt (kat. č. 9272)
p-Akt (kat. č. 9271)
GABDH (kat. č. 5174)
p-p44/42 MAPK (Erk1/2) (kat. č. 9106)
p44/42 MAPK (Erk1/2) (kat. č. 9102)
vinculin (Santa Cruz Biotechnology, kat. č. sc-25336)
Protilátky sekundární konjugované s křenovou peroxidázou (HRP) od firmy Cell Signaling Technology (kat. č. 7074, kat. č. 7076)
[Pyr]-Apelin-13 trifluoracetátová sůl (Sigma Aldrich, kat. č. SML2084)

SignalBoost™ Immunoreaction Enhancer Kit (Merck; kat. č. 407207)

Trans-Blot® Turbo™ 5× Transfer Buffer (BioRad; kat. č. 10026938)

tris(hydroxymethyl)aminometan (Tris) (Carl Roth; kat. č. 0188.4)

Triton X-100 (Sigma Aldrich, kat. č. T8787)

Trypanová modř 10× ředěná (Sigma Aldrich, kat. č. T8154)

Trypsin-EDTA, 0,25% roztok (ThermoFisher, kat. č. 25200056)

Tween® 20 (Sigma Aldrich; kat. č. P1379)

Ustalovač (AGFA, kat. č. G354)

Vanadičnan trisodný (Sigma Aldrich, kat. č. S6508)

Vývojka (AGFA, kat. č. G150)

Western blotting luminol reagent kit (ImmunoCruz, kat. č. sc-2048)

3.1.2 Rostoky

BCA pracovní činidlo: Pierce™ BCA Protein Assay reagent A (ThermoFisher, kat. č. 23228), Pierce™ BCA Protein Assay reagent B (ThermoFisher, kat. č. 23224) (Reagent A/reagent B– 50:1 v/v).

Lyzační pufr HUVEC: Tris ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), EGTA ($5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaCl ($150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), glycerolfosfát ($20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), Na_3VO_4 ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaF ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), Triton X-100 (1%, v/v), Tween 20 (0,1%, v/v), inhibitor proteas Complete™ (1 tableta v 50 ml), pH 7,5.

Koncentrovaný roztok PBS (10×): NaCl ($137 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), KCl ($2,68 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), Na_2HPO_4 ($8,96 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), KH_2PO_4 ($1,47 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH=7,4.

Roztok Tritonu: Triton X-100 (15% v/v) v PBS.

EHL pufr: CaCl_2 ($2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaCl ($135 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), MgCl_2 ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), KCl ($5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), Hepes ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaHCO_3 ($2,6 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), KH_2PO_4 ($0,44 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), Na_2HPO_4 ($0,34 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), aminokyseliny ($20 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$), vitamíny ($10 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$), glukóza ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), L-glutamin ($2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,45.

2NaCa: CaCl_2 ($2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaCl ($138 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), MgCl_2 ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), KCl ($5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), Hepes ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), glukóza ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,4.

Eagleovo médium modifikované Dulbeccoem (SERANA, kat. č. MCL-004): Kultivační médium bylo obohaceno o 10 % FBS a antibiotika (penicilin – $100 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$, streptomycin – $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

Roztoky pro SDS-PAGE a Western blot

Nanášecí pufr: Tris ($312,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 6,8; SDS (10%, m/v), glycerol (50%, v/v), DTT ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), bromfenolová modř (0,05%, m/v)

10% SDS polyakrylamidový migrační gel: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (24,7 %), deionizovaná voda (48,4 %), migrační pufr (24,7 %), 10% peroxodisíran amonný (0,9 %), tetramethylethyldiamin (0,09 %) a 10% SDS (0,9 %).

Zaostřovací pufr: Tris ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH=6,8.

Zaostřovací gel: 10% polyakrylamidový gel: 40% roztok akrylamidu/bisakrylamidu 29:1 (9,9 %), deionizovaná voda (63,4 %), zaostřovací pufr (24,7 %), 10% dodecylsulfát sodný (0,9 %), 10% peroxodisíran amonný (0,7 %), tetramethylethyldiamin (0,09 %).

Přenosový pufr: Tris ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), glycin ($192 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), methanol (20%, v/v), SDS (0,1%, m/v), pH 8,3. Migrační pufr: Tris/HCl ($1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 8,8.

Barvicí roztok: Kyselina octová (5%, v/v), Ponceau S (0,1% m/v).

TBS (tris-buffered saline): Tris ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), NaCl ($154 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), pH 7,5.

TBS/T: Tween 20 (0,1%, v/v) v TBS.

3.1.3 Přístroje a pomůcky

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Analytické váhy AX105 DeltaRange® (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Bloková třepačka Thermomixer comfort (Eppendorf, Německo)

Blotovací podložky (VWR, USA)

Blotovací systém Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, USA)

Buněčná škrabka (Biologix, USA)

Bürkerova komůrka (Marienfeld, Německo)

Chlazená centrifuga Mikro 22R (Hettrich Zentrifugen, Německo)

Chlazená centrifuga Rotina 380R (Hettrich Zentrifugen, Německo)

CO₂ inkubátor MCO-17AIC (Sanyo Electric Biomedical, Japonsko)

Digitální předvážky GX-600 (A&D, Japonsko)

Magnetická míchačka (IKA RH basic KT/C (Slabo, ČR)

Fotografický film Fuji medical x-ray (FujiFilm, Japonsko)

Fotometr pro měření absorbance/fluorescence v 96jamkových deskách Infinite M200 pro (Tecan, Švýcarsko)

Hlubokomrazící box Inova U535 (Eppendorf, Německo)

Laminární box Biohazard EF/S 4 BSC (Schoeller Instruments, Česká republika)

Kultivační lahve, kultivační desky, centrifugační kyvety (TPP, Švýcarsko)

Mikroskop CK40 (Olympus, Japonsko)

Mikroskop NIB-100 (Novel optics, Čína)

Mikroskop Axiovert 40 CFL (Zeiss, Německo)

Mikroskopická krycí sklička (Merienfeld, Německo)

Minicentrifuga Z 100 M (Hermle Labortechnik, Německo)

Mini-rocker třepačka typ MR-1 s kývavým pohybem (Biosan, Litva)

MiniSpin centrifuga vč. rotoru (Eppendorf, Německo)

Multikanálová pipeta Finnpiette® (Thermo Fisher Scientific, USA)

Odsávačka Gilson Safe Aspiration Station (Gilson, USA)

Plastové mikrozkuřavky (Eppendorf, Německo)

PVDF membrána Immun-Blot™ 0,2 μm (Bio-Rad Laboratories, USA)

Sérologické pipety (Capp, Dánsko)

Systém pro elektroforézu Mini-Protean® 3 Cell se zdrojem PowerPac 200 (Bio-Rad Laboratories, USA)

Špičky (Eppendorf, Německo)

3.1.4 Biologický materiál

Pro experimenty byla použita adherentní buněčná linie H9c2 odvozená od potkaních embryonálních kardiomyoblastů.

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace buněčné linie H9c2

Subkultivace buněk je základní technikou buněčné kultivace, která zahrnuje přenos buněk z jedné kultivační nádoby do druhé za účelem zachování jejich růstu a životaschopnosti. Zajišťuje nepřetržité množení homogenních buněk poskytováním čerstvých živin a prostoru pro množení. Jejich konfluence byla hodnocena mikroskopicky a subkultivace buněk byla prováděna v intervalech každé tři až čtyři dny na základě dostatečné konfluence, která dosahovala 80, maximálně 90 %.

Buňky byly kultivovány v CO₂ inkubátoru za konstantních podmínek – v 95% vlhkosti, 37 °C a v atmosféře 5% CO₂.

Před začátkem každé subkultivace bylo ve vodní lázni temperováno médium DMEM, PBS, trypsin a 10× ředěná trypanová modř po dobu 30 minut a 37 °C, aby u buněk nedošlo k teplotnímu šoku. Po vytemperování byly jednotlivé lahve a zkumavky ořeny dezinfekčním ubrouskem a přeneseny do laminárního boxu. Zároveň byly do laminárního boxu umístěny jednorázové serologické pipety o objemech 5 ml, 2× 10 ml, 25 ml a plastová falkona o objemu 50 ml. Následně byla přenesena kultivační láhev s buněčnou linií z inkubátoru do laminárního boxu.

Hrdla lahví byla před otevřením opálena pomocí lihového kahanu pro zajištění sterility. Hrdlo kultivační láhve bylo před otevřením taktéž ožehnuto. Po otevření a opálení hrdla kultivační láhve bylo staré médium vylito do odpadní nádoby a buňky byly 2× promyty 10 ml roztoku PBS pomocí 10 ml pipety pro odstranění zbytků média a séra. Následně byl k buňkám automatickou pipetou přidán 1 ml trypsinu za účelem uvolnění buněk od dna kultivační láhve. Po dvou minutách působení trypsinu bylo do kultivační láhve přidáno 9 ml média DMEM se sérem pomocí 10 ml pipety, které inhibuje přítomný trypsin. Stejnou pipetou byly buňky převedeny z kultivační láhve do 50 ml falkony a centrifugovány po dobu 3 minut při 1000 × g za laboratorní teploty (RT).

Od buněčného peletu bylo médium v laminárním boxu odlito a nahrazeno 5 ml média DMEM (10% FBS, 1% P/S, růstové médium) pro resuspendaci buněčného peletu. Do

sterilní 1,5 ml eppendorfovy zkumavky bylo sterilně převedeno 80 μ l trypanové modři (10 \times ředěné) a 20 μ l resuspendovaných buněk.

Eppendorfova zkumavka se vzorkem byla následně přemístěna mimo laminární box ke světelnému mikroskopu pro určení přibližného počtu buněk pomocí Bürkerovy komůrky při zvětšení objektivu 100 \times . Na základě zjištěného množství buněk v 1 ml suspenze byl patřičný objem vrácen do nové kultivační láhve tak, aby během následujících tří až čtyř dnů inkubace nedosáhli buňky 100% konfluence. Zbytek buněčné suspenze byl využit pro vlastní experimenty.

3.2.2 Stanovení cytotoxicity pomocí MTT testu

Metoda využívá schopnosti živých buněk redukovat žlutou trimethyl tetrazoliovou sůl (MTT) pomocí působení mitochondriálních dehydrogenáz uvnitř buněk na fialový formazan. Viabilita buněk je stanovena po rozpuštění formazanu spektrofotometricky na základě absorbancí stanovených při vlnové délce 540 nm.

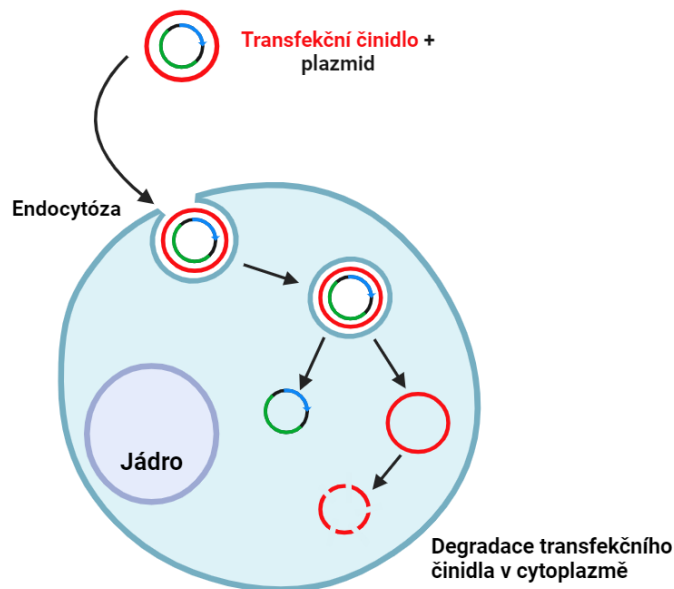
První den byla vyseta 96jamková deska tak, aby každá jamka obsahovala 15 000 buněk v celkovém objemu 200 μ l. Následující den byla na buňky aplikována koncentrační řada DHS připravená v růstovém médiu. Buňky byly s testovanými látkami inkubovány dalších 24 hodin. Poslední den bylo připraveno 8,5 ml roztoku MTT v poměru 1:10 (MTT:DMEM bez séra a antibiotik). Médium bylo z jednotlivých jamek odsáto a nahrazeno roztokem MTT tak, aby každá jamka obsahovala 100 μ l tohoto roztoku. Deska byla vrácena do inkubátoru na 30 minut, během kterých došlo ke vzniku fialového formazanu uvnitř buněk. Po uplynutí stanovené doby byl z jamek roztok MTT vyklepnut a nahrazen směsí dimethylsulfoxidu s 1% NH₃ (100 μ l/jamku). Vlivem působení tohoto roztoku došlo k uvolnění a rozpuštění fialového formazanu z přítomných živých buněk. Následně byla pomocí spektrofotometru změřena absorbance jednotlivých jamek při vlnové délce 540 nm.

3.2.3 Optimalizace transfekčního protokolu

Metodou transfekce se rozumí přímé vložení cizích nukleových kyselin do eukaryotických buněk s cílem změnit genetickou výbavu hostitelské buňky. Běžně je transfekce rozdělována na dva druhy. Stabilní, kdy dochází buď k integraci cizorodé DNA do genomu hostitele nebo je buňka nucena udržet si vložený plazmid pomocí selekčního tlaku vyvolaného vybranými antibiotiky. Výsledkem je konstitutivní exprese transgenu i v následujících generacích. Dalším typem transfekce je tzv. tranzientní

transfekce, při které nedochází k integraci cizorodých nukleových kyselin do genomu hostitelské buňky (Obr. 11). Efekty transfekce tak v průběhu dalších generací postupně vymizí.

Optimalizace podmínek transfekce je důležitým aspektem pro úspěšné pozorování intracelulárních jevů pomocí geneticky kódovaných biosenzorů.



Obrázek 11: Grafické znázornění transfekce plazmidu za využití transfekčního činidla (vytvořeno v aplikaci Biorender podle nastudované literatury)

Pro optimalizaci transfekčního protokolu bylo vyseto 10 jamek v 96jamkové destičce. Do každé jamky bylo napipetováno 200 μ l buněčné suspenze naředěné pomocí růstového média tak, aby bylo vyseto 10 000 buněk na jamku. Po vysetí byla 96jamková deska umístěna do inkubátoru na 24 hodin. Následující den proběhla transfekce buněk expresním plazmidem nesoucím GFP protein pomocí testovaných transfekčních činidel. Prvním z testovaných transfekčních činidel byl PolyJetTM v poměrech 1:3 a 1:4 (μ g DNA: μ l reagentu). Dalším transfekčním činidlem byl Lipofectamine 3000 testovaný v poměrech 1:2 a 1:3 (μ g DNA: μ l reagentu). Transfekce byla provedena v růstovém médiu. Poslední den bylo médium v jamkách nahrazeno roztokem 2CaNa, neboť fenolová červeň obsažená v médiu způsobuje autofluorescenci. Vyhodnocení bylo provedeno na epifluorescenčním mikroskopu při zvětšení objektivu 200 \times v programu AxioVision Rel. 4.8.

3.2.4 Transfekce buněčné linie H9c2 excitačně-ratiometrickou sondou ExRai-AktAR2

Při transfekci buněk excitačně-ratiometrickou sondou ExRai-AktAR2 bylo zapotřebí je nejprve vysít na 6jamkovou desku s vloženými kruhovými krycími skličky o průměru 30 mm, které jsou nezbytné pro mikroskopické vyhodnocení v perfuzní komůrce. Do každé jamky bylo vyseto 180 000 buněk ve 2 ml růstového média a deska byla ponechána v inkubátoru. Následující den byla provedena transfekce za použití reagentu Lipofectamine 3000 v poměru 1:3 ($\mu\text{g DNA}:\mu\text{l reagentu}$). Buňky byly ponechány s transfekčními komplexy v růstovém médiu do dalšího dne.

V den měření bylo médium z jednotlivých jamek odsáto, nahrazeno EHL pufrem a buňky byly ekvilibrovány ve tmě při RT 1 hodinu. Cílem byla stabilizace odezvy biosenzoru. Po ekvilibraci bylo provedeno mikroskopické měření v perfuzní komůrce za využití epifluorescenčního mikroskopu se zvětšením objektivu 200 \times . Při snímání byl využit program AxioVision Rel. 4.8. Časový průběh perfuze byl následující. V prvních dvou minutách perfuze bylo provedeno bazální měření v perfuzním roztoku. Následně byla perfuze přepnuta na zásobník obsahující perfuzní roztok s jednotlivými testovanými látkami a ponechána tak až do konce měření. Průtok perfuzním systémem byl nastaven na 1 ml/min.

3.2.5 Příprava vzorků pro stanovení celkového množství proteinů metodou BCA a pro SDS-PAGE elektroforézu

Buňky byly vysety do 6 jamkové desky tak, aby byla v době experimentu jedna polovina desky konfluentní ze 70 % (180 000 buněk/jamka) a druhá polovina dosáhla plné konfluence ještě před začátkem experimentu (317 000/jamka). Po dosažení požadované konfluence byly buňky vystaveny testovaným látkám po dobu 15 minut v inkubátoru. Po ukončení inkubace byly jamky 2 \times promyty roztokem vychlazeného PBS obsahujícího inhibitory NaF ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a Na_3VO_4 ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Všechny další operace byly prováděny vždy na ledu. Buňky byly seškrabány a přeneseny do 1,5 ml eppendorfových zkumavek. Eppendorfovy zkumavky s odebranými vzorky byly následně centrifugovány po dobu 5 minut při $1950 \times g$ a teplotě 4°C . Po odstranění supernatantu byly pelety buněk rozsuspendovány v 75 μl HUVEC lyzačního pufru. Vzorky byly 30 minut inkubovány na ledu, během čehož byly 3 \times vortexovány. Po 30 minutách byly vzorky propipetovány a centrifugovány při teplotě 4°C a $21\,000 \times g$ po dobu 13 minut. Odseparovaný supernatant byl následně přenesen do nových eppendorfových zkumavek.

Vzorky pro SDS-PAGE elektroforézu byly připraveny do nových eppendorfových zkumavek, do kterých bylo přeneseno 60 μ l buněčného lyzátu a 15 μ l nanášecího pufru. Po zvortexování byly vzorky zahřáty na 95 °C po dobu 5 min, zchlazeny a centrifugovány. Následně byly vzorky uschovány v mrazícím boxu při -80 °C.

Pro stanovení celkového množství proteinů ve vzorcích pomocí metody BCA bylo do nových eppendorfových zkumavek odebráno vždy 5 μ l buněčného lyzátu a přidáno 45 μ l PBS. Jednotlivé vzorky byly následně přeneseny do 96jamkové desky v tetrapletu o objemech 10 μ l/jamka. Následně bylo do každé jamky přidáno 200 μ l BCA reakční směsi obsahující Pierce™ BCA Protein Assay reagent A a Pierce™ BCA Protein Assay reagent B v poměru 50:1. Vzorky byly 30 min inkubovány při 37 °C, načež byla změřena absorbance jednotlivých vzorků při 562 nm pomocí destičkového spektrofotometru.

3.2.6 SDS-PAGE elektroforéza

Jednotlivé složky pro přípravu gelů o tloušťce 1,5 mm s obsahem 10 % akrylamidu byly smíchány ve zkumavce a následně přeneseny mezi předpřipravená sklíčka pro vytvoření separačního gelu. Nanesením vrstvy isopropanolu na separační gel bylo zabráněno vzniku bublin a možnému vyschnutí gelu. Po zatuhnutí gelu byl isopropanol odstraněn a nahrazen připravenou směsí pro zaostřovací gel, do kterého byl vložen hřebínek. Připravené vzorky byly rozmrazeny při pokojové teplotě a inkubovány 5 minut v termobloku při teplotě 45 °C. Následně byly vzorky krátce centrifugovány a přeneseny v patřičném množství do jednotlivých jamek v polyakrylamidovém gelu. Do poslední jamky byl aplikován předbarvený proteinový marker. Aparatura pro elektroforézu byla zapojena ke elektrickému zdroji nastaveném na konstantní proud 15 mA (pro jeden gel) pro zaostření vzorků a následně na konstantní proud 30 mA (pro jeden gel). V mezičase byla provedena rehydratace PVDF membrány ve 100% methanolu, načež byla ponechána v destilované vodě. Po ukončení elektroforézy byly gely a PVDF membrány ponechány 5 min v Transblot turbo pufru.

Dalším krokem v postupu byla příprava sendvičů pro Western blotting v elektroforetické kazetě. Před vlastním seskládáním sendviče byly všechny součásti navlhčeny transferovým pufrům. Při sestavení sendviče byly na sebe postupně pokládány následující součásti. Na spodní elektrodu byla umístěna papírová podložka, dále filtrační papír, PVDF membrána, gel s proteiny, filtrační papír, papírová podložka. Po každém přidání vrstvy byly vytlačeny zachycené bublinky vzduchu válečkem. Po uzavření kazety

horním dílem byla vložena do přístroje. Vlastní transfer proteinů na PVDF membránu byl proveden pomocí transferového systému Trans-Blot Turbo při požadovaném nastavení napětí 25 V a elektrického proudu 1 A po dobu 30 minut. Po 30 minutách byla membrána vyjmuta z transferového systému a opláchnuta v roztoku TBS/T (3×5 minut). Následně byla membrána obarvena v roztoku Ponceau S na laboratorní kývačce po dobu 5 minut. Po obarvení byla membrána přesunuta na filtrační papír pro uschnutí. Rehydratace membrány probíhala v methanolu po dobu 10 s a následně v roztoku TBS/T (3×5 minut). Membrána byla blokována v připraveném 5% roztoku mléka po dobu 1 hodiny.

Na jednotlivé části membrány byly nanесeny primární protilátky (Akt, p-Akt, Erk, p-Erk, vinculin) v roztoku zesilovače signálu (1:1 000). Membrány s nanесenými protilátkami byly inkubovány přes noc při 6 °C. Následující den byly jednotlivé membrány promyty v TBS/T (3×5 minut) a inkubovány s roztoky sekundárních protilátek značených křenovou peroxidázou. Sekundární protilátky pro Akt, p-Akt, Erk, p-Erk a vinculin byly opět nařaděny v zesilovači signálu (1:5 000). Inkubace membrán se sekundárními protilátkami probíhala při RT po dobu 1 hodiny.

K detekci byla použita činidla ImmunoCruz Western Blotting Luminol Reagent pro vinculin a ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent pro Akt, p-Akt, Erk a p-Erk. Obě činidla obsahují složky A a B, které se míchají v poměru 1:1. Membrány s detekčními činidly byly inkubovány při RT po dobu 1/5 minut (ImmunoCruz/ECL). Následně byly membrány přeneseny mezi fólie, byly vytlačeny přítomné bublinky vzduchu pomocí buničiny, umístěny do vyvolávací kazety a přeneseny do temné komory pro vlastní detekci.

Detekce byla provedena pomocí fotografických filmů Fuji medical x-ray. Vyvolávání filmů probíhalo pomocí standardního protokolu s vývojkou a ustalovačem. Nakonec byly filmy usušeny v laboratoři při RT, naskenovány při rozlišení 600 DPI a míra fosforylace jednotlivých vzorků byla vyhodnocena pomocí programu ImageJ.

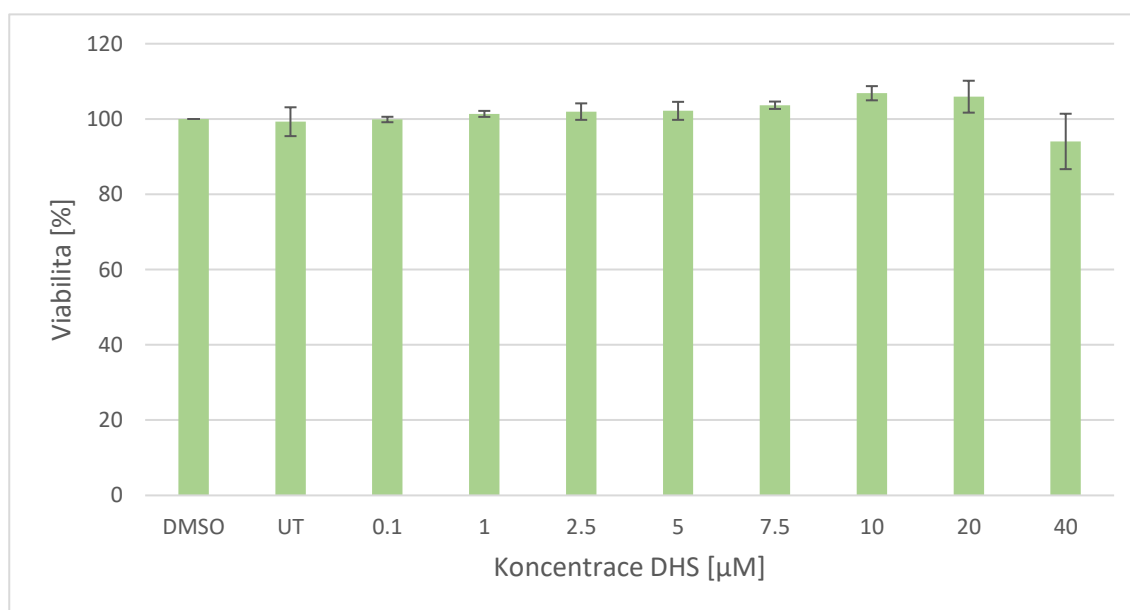
3.2.7 Izolace plazmidu nesoucí sondu ExRai-AktAR2

Pro izolaci plazmidu byl využit kit QIAfilter Plasmid Midi Kit od firmy Qiagen (kat. č. 12243) a pracovní postup pro purifikaci DNA plazmidu nacházející se na webových stránkách firmy.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení cytotoxicity DHS pomocí MTT testu

Stanovení cytotoxicity testovaných látek představuje vždy jeden z prvních kroků jakékoli studie, protože poskytuje nezbytné informace pro zvolení vhodné koncentrace v následujících experimentech. Životaschopnost buněčné linie H9c2 byla vyhodnocena po 24hodinové inkubaci s DHS pomocí MTT testu. Buňky byly vystaveny DHS v rozsahu koncentrací od 0,1 μM do 40 μM a 0,1% DMSO, ve kterém byl DHS rozpuštěn. Nakonec bylo použito čisté médium představující negativní kontrolu a 15% roztok Tritonu-X 100 v PBS jako pozitivní kontrola. Z výsledků MTT testu je patrné, že rozpouštědlo, ani žádná z testovaných koncentrací DHS, nevykazovaly statisticky významnou toxicitu. Pouze u nejvyšší koncentrace DHS lze pozorovat velmi mírný pokles viability. (Obr. 12) Na základě získaných dat a zkušenosti výzkumného týmu byla pro další experimenty zvolena koncentrace DHS 10 μM .

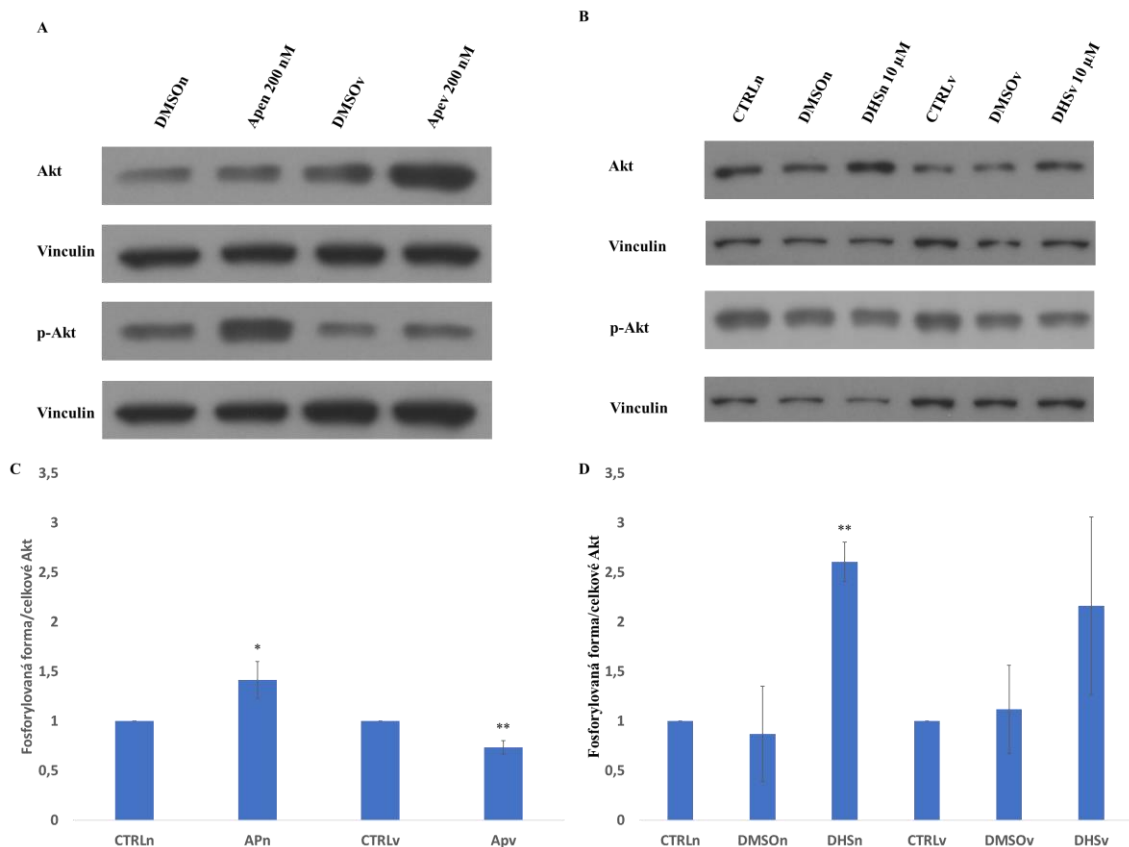


Obr. 12: Stanovení vlivu různých koncentrací DHS na viabilitu buněčné linie H9c2. Graf reprezentuje vliv různých koncentrací DHS na viabilitu buněk po 24hodinové inkubaci. Výsledky byly normalizovány na kontrolu obsahující pouze DMSO. Data představují průměr \pm směrodatnou odchylku čtyř nezávislých měření. Jednotlivé experimenty byly připraveny v hexapletu.

4.2 Stanovení míry fosforylace proteinů Akt a Erk1/2 technikou western blot

Technika western blot představuje už několik desítek let základní metodiku pro stanovování míry fosforylace proteinů. (Taylor & Posch, 2014) Na druhou stranu i zde může docházet k různým problémům, které způsobují nereprodukovatelnost dat. Příkladem mohou být výsledky Dominiky Čmielové, ve kterých lze pozorovat velkou nestabilitu dat při analýze vlivu DHS a jeho derivátů na míru fosforylace proteinu Akt v buněčné linii H9c2 (Čmielová, 2023). Důvodů způsobujících výrazné kolísání může být několik, například pH, složení média nebo míra konfluence (Lin, 2022). Tato práce měla za cíl zjistit, zda nesouvisí pozorovaná nestabilita právě s mírou konfluencí buněk. Pro testování hypotézy je potřeba zvolit vhodnou látku, která je schopná indukovat aktivaci proteinu Akt, tedy navýšit fosforylaci na serinu 473. Pro tyto účely se hodí peptid apelin-13, který u buněčné linie H9c2 indukuje přes apelinový receptor aktivaci PI3K/Akt dráhy, což bylo v literatuře opakovaně prokázáno. v našem experimentu proto hraje roli standardu a na základě dat z literatury byl použit v koncentraci 200 nM (Xie et al., 2015). Jako druhá srovnávací látka byl použit DHS, u kterého je podezření, že s apelinovým receptorem interaguje taktéž a byl aplikován v koncentraci 10 μ M. Z předchozích výsledků skupiny je patrné, že odezva jak na apelin-13 tak na DHS je relativně rychlá a maxima dosahuje v prvních 15 min od přidání testovaných látek (Opletalová, 2021). Z tohoto důvodu jsme zvolili dobu inkubace s testovanými látkami právě na 15 min.

Analýza technikou western blot prokázala výrazný vliv konfluencí na odezvu buněk H9c2 vyvolanou apelinem-13 (Obr. XA a XC). U experimentů provedených s nižší konfluencí, přibližně 70 % v době vytavení apelinu-13, lze pozorovat statisticky signifikantní navýšení fosforylace proteinu Akt. Výsledky jsou tedy ve shodě s publikovanými daty jiných výzkumných skupin (Li et al., 2017). Naopak u buněk, které dosáhly plné konfluencí ještě před vlastní přidávkou apelinu-13 tento efekt nejen že vymizel, dokonce došlo ke snížení o přibližně 25 %. U experimentů s DHS nebyl pozorován tak výrazný dopad konfluencí na fosforylaci, nicméně lze vypočítat, že



s rostoucí mírou konfluency buněk narůstá směrodatná odchylka výsledků, tedy dochází k vyšší nestabilitě získaných výsledků.

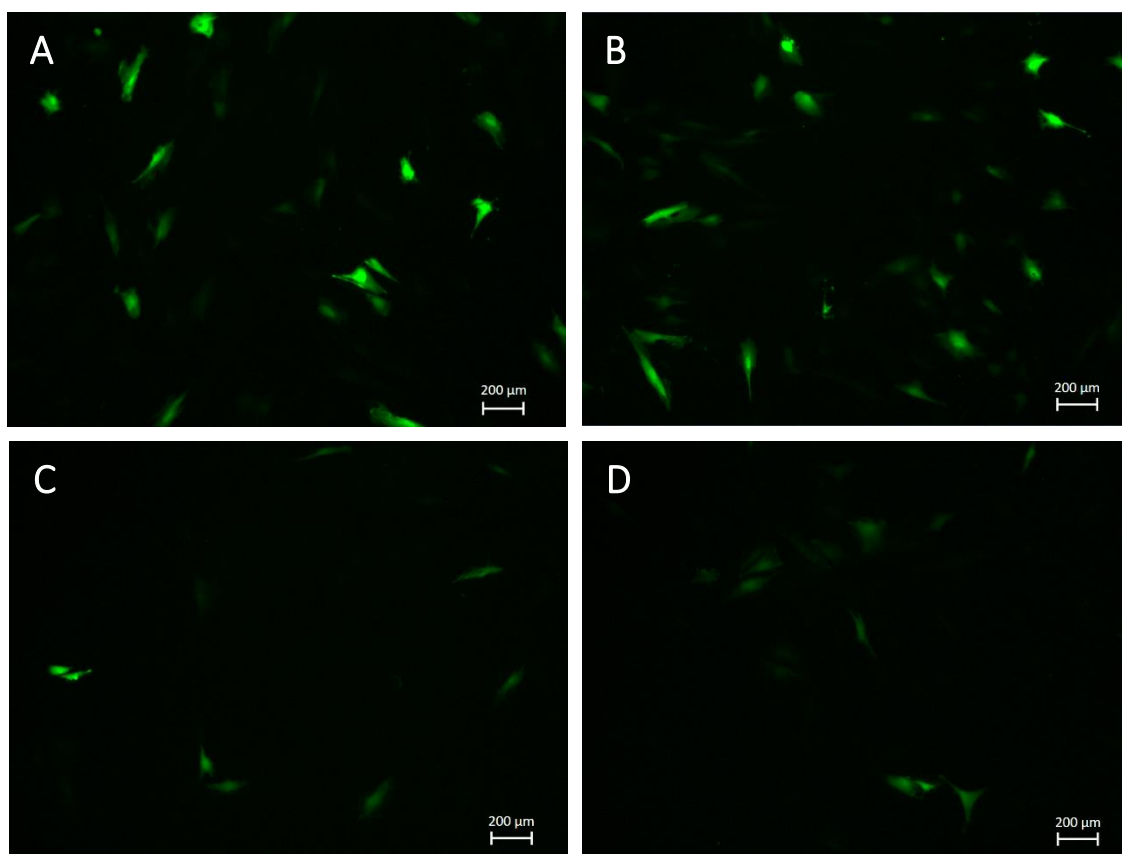
Obr. 13: Stanovení vlivu apelinu-13 a DHS na míru fosforylace proteinu Akt v buněčné linii H9c2. Zkratky: CTRLn = kontrola pro nízkou buněčnou konfluenci, APn = působení apelinu-13 při nízké buněčné konfluenci, CTRLv = kontrola pro vysokou buněčnou konfluenci, APv = působení apelinu-13 při vysoké buněčné konfluenci. Modul A: Reprezentativní western blot stanovení celkového a fosforylovaného Akt v přítomnosti apelinu-13. Modul B: Reprezentativní western blot stanovení celkového a fosforylovaného Akt v přítomnosti 10 μ M DHS. Modul C: Graf reprezentuje vliv různých koncentrací DHS na viabilitu buněk po 24hodinové inkubaci. Výsledky byly normalizovány na kontrolu obsahující pouze DMSO. Data představují průměr \pm směrodatnou odchylku tří nezávislých měření. Modul D: Graf reprezentuje vliv různých koncentrací DHS na viabilitu buněk po 24hodinové inkubaci. Výsledky byly normalizovány na kontrolu obsahující pouze DMSO. Data představují průměr \pm směrodatnou odchylku tří nezávislých měření. * $p < 0,05$ (** $p < 0,01$) proti kontrole. Vyhodnocení proběhlo denzitometricky v programu ImageJ.

4.3 Optimalizace transfekčního protokolu

Transfekce představuje metodiku vnesení cizorodé DNA do hostitelské buňky. Samotný postup pro vytvoření transfekčních komplexů a transfekce je relativně snadný,

nicméně efektivně natransfekovat některé buněčné linie může být velmi problematické (Chong et al., 2021). Pro efektivitu transfekce je klíčové zvolit správný transfekční reagent a najít jeho vhodný poměr vůči množství vnášeného plazmidu. Dalším úkolem optimalizace je vybalancování poměru mezi maximální expresí a minimální toxicitou transfekce. K tomuto účelu se nejčastěji používají expresní plasmidy kódující základní fluorescenční proteiny, jelikož vykazují silnou expresi, jsou buňkou dobře přijímány a obvykle nevyvolávají toxicitu (Mancinelli et al., 2021).

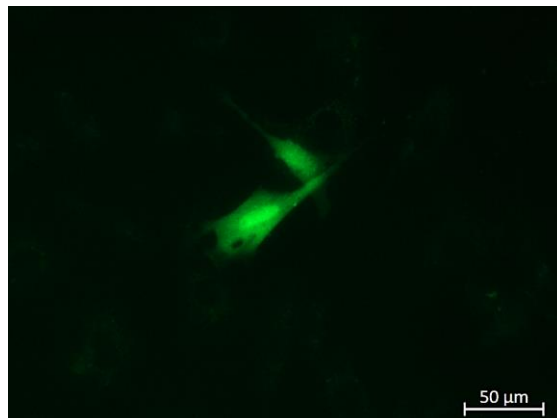
V průběhu optimalizace transfekčního protokolu buněčné linie H9c2 jsme testovali transfekční činidla PolyJet™ v poměru 1:3 a 1:4 a Lipofectamine 3000, jako zlatý standard, v poměru 1:2 a 1:3. Vnášenou DNA byl expresní plazmid pcDNA4 EGFP. Výsledky mikroskopické analýzy po 48 hodinách od transfekce jsou uvedeny na obrázku 14. Můžeme vidět, že do jisté míry došlo k vnesení expresního plasmidu oběma činidly (Obr. 14). Nicméně nejefektivnější byla transfekce zprostředkovaná Lipofectaminem 3000 bez ohledu na zvolený poměr (Obr. 14A a 14B). V případě transfekčního činidla PolyJet™ byla u poměru 1:4 pozorována zvýšená toxicita, což souvisí s již relativně vysokým množstvím transfekčního činidla. Pro následnou transfekci plazmidem nesoucím sondu ExRai-AktAR2 bylo zvoleno transfekční činidlo Lipofectamine 3000 v poměru 1:3. Kromě vhodného nastavení protokolu má na efektivitu transfekce vliv i čistota plazmidu a množství reziduálních endotoxinů po izolaci z bakteriální kultury. Z tohoto důvodu je doporučováno, obzvláště u velmi citlivých buněčných linií, transfekovat plasmidy izolovanými kity s efektivním odstraněním endotoxinů (Sousa et al., 2009).



Obr. 14: Optimalizace transfekčního protokolu buněčné linie H9c2. Buňky H9c2 byly transfekovány expresním plazmidem pcDNA4 EGFP. Detekce míry exprese EGFP byla hodnocena po 48 hodinách od transfekce. Modul A: Reprezentativní snímek po transfekci pomocí Lipofectamine 3000 v poměru 1:2. Modul B: Reprezentativní snímek po transfekci pomocí Lipofectamine 3000 v poměru 1:3. Modul C: Reprezentativní snímek po transfekci pomocí PolyJet v poměru 1:3. Modul D: Reprezentativní snímek po transfekci pomocí PolyJet v poměru 1:4. Pro mikroskopickou analýzu byl použit objektiv se zvětšením 200×, měřítko představuje vzdálenost 200 µm. Fotky byly pořízeny pomocí fluorescenčního mikroskopu Axiovert 40 CFL.

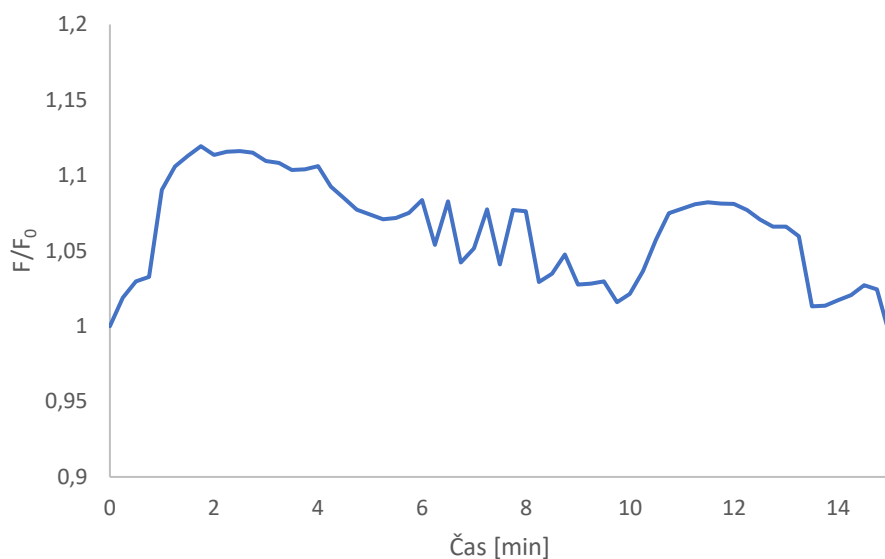
4.4 Sledování aktivity Akt pomocí sondy ExRai-AktAR2

Posledním provedeným experimentem bylo otestování nově pořízeného plazmidu kódujícího biosenzor ExRai-AktAR2. Cílem bylo vyzkoušet, zda je možné jeho použití na stávajících mikroskopech nebo bude pro využití biosenzoru potřeba jejich modifikace. Jak již bylo zmíněno výše při použití jiného plazmidu je možné, že buňky mohou reagovat odlišně, třeba z důvodu použití jiné bakterie pro namnožení plasmidu. Plasmid byl do buněčné linie vnesen pomocí lipofectaminu 3000 v poměru 1:3 a jeho vnesení mikroskopicky ověřeno po 24 hodinách od transfekce (Obr. 15).



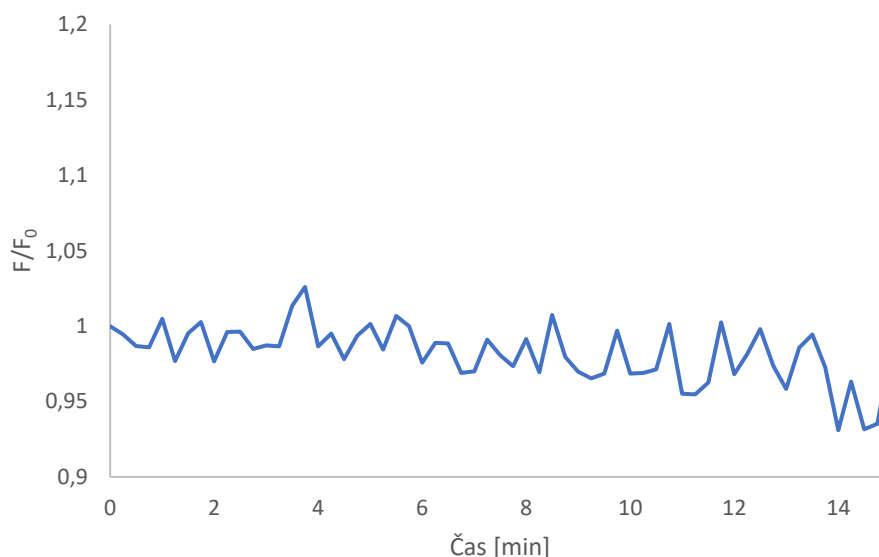
Obr. 15: Efektivita transfekce plazmidem ExRai-AktAR2 pomocí transfekčního činidla Lipofectamine 3000 v buněčné linii H9c2. Buňky H9c2 byly transfekovány plazmidem ExRai-AktAR2 pomocí transfekčního činidla Lipofectamine 3000 v poměru 1:3 (DNA:činidlo). Detekce míry exprese biosenzoru byla hodnocena mikroskopicky po 48 hodinách od transfekce. Pro mikroskopickou analýzu byl použit objektiv se zvětšením 400×, měřítko představuje vzdálenost 50 μm. Fotky byly pořízeny pomocí fluorescenčního mikroskopu Zeiss Observer Z1.

Po mikroskopické analýze byly buňky v perfuzní komůrce připojeny k perfuzi a byly provedeny experimenty s DMSO, 10 μM DHS a 200 nM apelinem-13. Tyto experimenty prokázaly, že ani jeden z testovaných mikroskopů není schopen stanovit aktivitu sondy v ratiometrickém módu, proto jsme dále měřili pouze v módu intenziometrickém. Prvotní naměřená data byly získána na buňkách čerstvě vytažených z inkubátoru a nebo ponechaných v médiu do doby měření. Z výsledků je patrná vysoká nestabilita fluorescence v průběhu celého měření, včetně prvních dvou minut, kdy jsou buňky vystaveny pouze perfuznímu roztoku za účelem stanovení bazální aktivity (Obr. 16). Délka experimentu byla stanovena na 15 minut na základě dat získaných technikou western blot a předchozích výsledků výzkumného týmu.



Obr. 16: Stabilita signálu generovaná geneticky kódovanou sondou ExRai-AktAR2 v buněčné linii H9c2. Buňky H9c2 byly transfekovány plazmidem ExRai-AktAR2 pomocí transfekčního činidla Lipofectamine 3000 v poměru 1:3 (DNA:činidlo). Vlastní měření odezvy sondy bylo provedeno v perfuzní komůrce 24 hodin po transfekci. Po dobu celého experimentu byly buňky vystaveny pouze čistému perfuznímu pufru. Pro mikroskopickou analýzu byl použit objektiv se zvětšením 200×, snímky byly pořizovány s frekvencí 4 snímky za minutu po dobu 15 minut na mikroskopu Zeiss Observer Z1. Analýza obrazu byla provedena pomocí programu ImageJ.

Pozorovaná nestabilita by mohla souviset s působením stresových faktorů, jako je změna teploty po vytažení z inkubátoru a změny v pH (Koveal et al., 2020). Proto byla při dalším měření provedena ekvilibrace buněk v EHL pufru po dobu 1 hodiny ve tmě. Naměřená data potvrdila pozitivní dopad ekvilibrace na stabilizaci signálu biosenzoru (Obr. 17). Další data v intenziometrickém módu s biosenzorem nebyly naměřeny. A v budoucnu, po pořízení vhodné sestavy filtrů a dalších optických prvků, bude potřeba dále pokračovat v optimalizaci měření s tímto biosenzorem.



Obr. 17: Stabilita signálu generovaná geneticky kódovanou sondou ExRai-AktAR2 v buněčné linii H9c2. Buňky H9c2 byly transfekovány plazmidem ExRai-AktAR2 pomocí transfekčního činidla Lipofectamine 3000 v poměru 1:3 (DNA:činidlo). Vlastní měření odezvy sondy bylo provedeno v perfuzní komůrce 24 hodin po transfekci. Po dobu celého experimentu byly buňky vystaveny pouze čistému perfuznímu puftru. Pro mikroskopickou analýzu byl použit objektiv se zvětšením 200×, snímky byly pořizovány s frekvencí 4 snímky za minutu po dobu 15 minut na mikroskopu Axiovert 40 CFL. Analýza obrazu byla provedena pomocí programu ImageJ.

5 Závěr

V rámci teoretické části této bakalářské práce byl vypracován přehled základních typů fluorescenčních sond rozšířený o fluorescenční sondy specifické pro detekci aktivace Akt. Dále byly podrobně popsány jednotlivé části a mechanismy signální dráhy PI3K/Akt/mTOR. Teoretická část zároveň obsahuje shrnutí vlastností a účinků peptidu apelinu-13 a 2,3-dehydrosilybinu, se kterými jsme následně pracovali v praktické části.

Hlavním cílem experimentální části bylo ověření vlivu míry konfluence buněčné linie H9c2 na fosforylaci proteinu Akt indukovanou apelinem-13 a 2,3-dehydrosilybinem. Primárně pomocí techniky western blot, rozšířenou o základní testování nově pořízené sondy ExRai-AktAR2:

- Na základě dat získaných MTT testem můžeme konstatovat, že ani jedna s testovaných koncentrací DHS nezpůsobuje statisticky významné navýšení toxicity.

- Z analýzy technikou western blot je patrné, že vysoká konfluencí negativně ovlivňuje signalizaci indukovanou apelinem-13.
- Experimenty s apelinem-13 provedené při nižší konfluenci jsou ve shodě s publikovanými daty.
- Při nízké konfluenci DHS indukuje fosforylaci Akt, což je v souladu s očekáváním.
- Vysoká konfluencí omezuje reprodukovatelnost fosforylace vyvolané DHS.
- Nejvyšší efektivita transfekce buněčné linie H9c2 byla dosažena s transfekčním činidlem Lipofectamine 3 000 v poměru 1:3 ($\mu\text{g DNA}:\mu\text{l činidla}$).
- Buňky použité čerstvě po vytažení z inkubátoru vykazovaly nestabilitu signálu biosenzoru ExRai-AktAR2.
- Provedení hodinové ekvilibrace v EHL při RT a ve tmě stabilizovalo signál biosenzoru ExRai-AktAR2.

6 LITERATURA

- AbouZid, S., & Ahmed, O. M. (2013). Chapter 14 - Silymarin Flavonolignans: Structure–Activity Relationship and Biosynthesis. In Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (Roč. 40, s. 469–484). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59603-1.00014-X>
- Agarwal, C., Wadhwa, R., Deep, G., Biedermann, D., Gažák, R., Křen, V., & Agarwal, R. (2013). Anti-Cancer Efficacy of Silybin Derivatives—A Structure-Activity Relationship. *PLOS ONE*, 8(3), e60074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060074>
- Anestopoulos, I., Kavo, A., Tentis, I., Kortsaris, A., Panayiotidis, M., Lazou, A., & Pappa, A. (2013). Silibinin protects H9c2 cardiac cells from oxidative stress and inhibits phenylephrine-induced hypertrophy: Potential mechanisms. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(3), 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.02.009>
- Arencibia, J. M., Pastor-Flores, D., Bauer, A. F., Schulze, J. O., & Biondi, R. M. (2013). AGC protein kinases: From structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834(7), 1302–1321. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.03.010>
- Ast, C., Foret, J., Oltrogge, L. M., De Michele, R., Kleist, T. J., Ho, C.-H., & Frommer, W. B. (2017). Ratiometric Matryoshka biosensors from a nested cassette of green- and orange-emitting fluorescent proteins. *Nature Communications*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00400-2>

- Baird, G. S., Zacharias, D. A., & Tsien, R. Y. (1999). Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(20), 11241–11246. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11241>
- Barile, E., De, S. K., & Pellicchia, M. (2012). 3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase-1 (PDK1) inhibitors: A review from patent literature. *Pharmaceutical patent analyst*, *1*(2), 145–163. <https://doi.org/10.4155/ppa.12.17>
- Belal, A. S. F., Sell, B. R., Hoi, H., Davidson, M. W., & Campbell, R. E. (2013). Optimization of a genetically encoded biosensor for cyclin B1-cyclin dependent kinase 1. *Molecular BioSystems*, *10*(2), 191–195. <https://doi.org/10.1039/C3MB70402E>
- Bhaskar, P. T., & Hay, N. (2007). The Two TORCs and Akt. *Developmental Cell*, *12*(4), 487–502. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.020>
- Bijak, M. (2017). Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)—Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, *22*(11), 1942. <https://doi.org/10.3390/molecules22111942>
- Broussard, J. A., Rappaz, B., Webb, D. J., & Brown, C. M. (2013). Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. *Nature Protocols*, *8*(2), 265–281. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.147>
- Cai, S.-L., Tee, A. R., Short, J. D., Bergeron, J. M., Kim, J., Shen, J., Guo, R., Johnson, C. L., Kiguchi, K., & Walker, C. L. (2006). Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *The Journal of Cell Biology*, *173*(2), 279–289. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507119>

- Castellano, E., & Downward, J. (2011). RAS Interaction with PI3K. *Genes & Cancer*, 2(3), 261–274. <https://doi.org/10.1177/1947601911408079>
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. R. (2019). Chapter 23—Plasmids. In D. P. Clark, N. J. Pazdernik, & M. R. McGehee (Ed.), *Molecular Biology (Third Edition)* (s. 712–748). Academic Cell. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813288-3.00023-9>
- Craggs, T. D. (2009). Green fluorescent protein: Structure, folding and chromophore maturation. *Chemical Society Reviews*, 38(10), 2865–2875. <https://doi.org/10.1039/B903641P>
- Čmielová, D. (2023). *Vliv methylovaných derivátů dehydrosilybinu na aktivaci Akt a ERK kinas v kardiomyocytech*. Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Dewan, I., & Uecker, H. (2023). A mathematician’s guide to plasmids: An introduction to plasmid biology for modellers. *Microbiology*, 169(7), 001362. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001362>
- Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., & Silva, A. M. S. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, 26(17), 5377. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
- Evers, T. H., van Dongen, E. M. W. M., Faesen, A. C., Meijer, E. W., & Merkx, M. (2006). Quantitative Understanding of the Energy Transfer between Fluorescent Proteins Connected via Flexible Peptide Linkers. *Biochemistry*, 45(44), 13183–13192. <https://doi.org/10.1021/bi061288t>
- Forster, J. C., Harriss-Phillips, W. M., Douglass, M. J., & Bezak, E. (2017). A review of the development of tumor vasculature and its effects on the tumor microenvironment. *Hypoxia*, 5, 21–32. <https://doi.org/10.2147/HP.S133231>

- Gao, X., & Zhang, J. (2008). Spatiotemporal Analysis of Differential Akt Regulation in Plasma Membrane Microdomains. *Molecular Biology of the Cell*, 19(10), 4366–4373. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-05-0449>
- García-Regalado, A., Guzmán-Hernández, M. L., Ramírez-Rangel, I., Robles-Molina, E., Balla, T., Vázquez-Prado, J., & Reyes-Cruz, G. (2008). G Protein-coupled Receptor-promoted Trafficking of Gβ1γ2 Leads to AKT Activation at Endosomes via a Mechanism Mediated by Gβ1γ2-Rab11a Interaction. *Molecular Biology of the Cell*, 19(10), 4188. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-10-1089>
- Ghafouri-Fard, S., Khanbabapour Sasi, A., Hussien, B. M., Shoorei, H., Siddiq, A., Taheri, M., & Ayatollahi, S. A. (2022). Interplay between PI3K/AKT pathway and heart disorders. *Molecular Biology Reports*, 49(10), 9767–9781. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07468-0>
- Gillessen, A., & Schmidt, H. H.-J. (2020). Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review. *Advances in Therapy*, 37(4), 1279–1301. <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01251-y>
- Gulati, S., Jin, H., Masuho, I., Orban, T., Cai, Y., Pardon, E., Martemyanov, K. A., Kiser, P. D., Stewart, P. L., Ford, C. P., Steyaert, J., & Palczewski, K. (2018). Targeting G protein-coupled receptor signaling at the G protein level with a selective nanobody inhibitor. *Nature Communications*, 9(1), 1996. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04432-0>
- Chaves-Almagro, C., Auriou, J., Dortignac, A., Clerc, P., Lulka, H., Deleruyelle, S., Projetti, F., Nakhlé, J., Frances, A., Berta, J., Gigoux, V., Fourmy, D., Dufresne, M., Gomez-Brouchet, A., Guillermet-Guibert, J., Cordelier, P., Knibiehler, B., Jockers, R., Valet, P., ... Masri, B. (2022). Upregulated Apelin Signaling in Pancreatic Cancer Activates Oncogenic Signaling Pathways to Promote Tumor

- Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10600.
<https://doi.org/10.3390/ijms231810600>
- Chen, M., Sun, T., Zhong, Y., Zhou, X., & Zhang, J. (2021). A Highly Sensitive Fluorescent Akt Biosensor Reveals Lysosome-Selective Regulation of Lipid Second Messengers and Kinase Activity. *ACS Central Science*, 7(12), 2009–2020.
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00919>
- Chong, Z. X., Yeap, S. K., & Ho, W. Y. (2021). Transfection types, methods and strategies: A technical review. *PeerJ*, 9, e11165. <https://doi.org/10.7717/peerj.11165>
- Chu, N., Viennet, T., Bae, H., Salguero, A., Boeszoermyeni, A., Arthanari, H., & Cole, P. A. (b.r.). The structural determinants of PH domain-mediated regulation of Akt revealed by segmental labeling. *eLife*, 9, e59151.
<https://doi.org/10.7554/eLife.59151>
- Inoki, K., Li, Y., Xu, T., & Guan, K.-L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & Development*, 17(15), 1829–1834. <https://doi.org/10.1101/gad.111003>
- Jancsó, A., Kovács, E., Cseri, L., Rózsa, B. J., Galbács, G., Csizmadia, I. G., & Mucsi, Z. (2019). Synthesis and spectroscopic characterization of novel GFP chromophore analogues based on aminoimidazolone derivatives. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 218, 161–170.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.03.111>
- Jang, H., Smith, I. N., Eng, C., & Nussinov, R. (2021). The mechanism of full activation of tumor suppressor PTEN at the phosphoinositide-enriched membrane. *iScience*, 24(5), 102438. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102438>
- Jean, S., & Kiger, A. A. (2014). Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *Journal of Cell Science*, 127(5), 923–928. <https://doi.org/10.1242/jcs.093773>

- Kaczmariski, J. A., Mitchell, J. A., Spence, M. A., Vongsouthi, V., & Jackson, C. J. (2019). Structural and evolutionary approaches to the design and optimization of fluorescence-based small molecule biosensors. *Current Opinion in Structural Biology*, *57*, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.01.013>
- Kidoya, H., Kunii, N., Naito, H., Muramatsu, F., Okamoto, Y., Nakayama, T., & Takakura, N. (2012). The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy. *Oncogene*, *31*(27), 3254–3264. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.489>
- Kim, H., Kim, M., Im, S.-K., & Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: General principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Laboratory Animal Research*, *34*(4), 147–159. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.147>
- Kim, S.-H., Choo, G.-S., Yoo, E.-S., Woo, J.-S., Han, S.-H., Lee, J.-H., & Jung, J.-Y. (2019). Silymarin induces inhibition of growth and apoptosis through modulation of the MAPK signaling pathway in AGS human gastric cancer cells. *Oncology Reports*, *42*(5), 1904–1914. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7295>
- Koveal, D. (2023). Functional principles of genetically encoded fluorescent biosensors for metabolism and their quantitative use. *Journal of Neurochemistry*, *00*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/jnc.15878>
- Koveal, D., Díaz-García, C. M., & Yellen, G. (2020). Fluorescent Biosensors for Neuronal Metabolism and the Challenges of Quantitation. *Current Opinion in Neurobiology*, *63*, 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.02.011>
- Krasowska, J., Pierzchała, K., Bzowska, A., Forró, L., Sienkiewicz, A., & Wielgus-Kutrowska, B. (2021). Chromophore of an Enhanced Green Fluorescent Protein Can Play a Photoprotective Role Due to Photobleaching. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 8565. <https://doi.org/10.3390/ijms22168565>

- Kunkel, M. T., Ni, Q., Tsien, R. Y., Zhang, J., & Newton, A. C. (2005). Časoprostorová dynamika signalizace proteinkinázy B/Akt odhalená geneticky kódovaným fluorescenčním reportérem * ♦. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5581–5587. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411534200>
- Le Guern, F., Mussard, V., Gaucher, A., Rottman, M., & Prim, D. (2020). Fluorescein Derivatives as Fluorescent Probes for pH Monitoring along Recent Biological Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/ijms21239217>
- Leslie, N. R., & Longy, M. (2016). Inherited PTEN mutations and the prediction of phenotype. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 52, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.01.030>
- Li, Y., Bai, Y.-J., & Jiang, Y.-R. (2017). Apelin induces the proliferation, migration and expression of cytoskeleton and tight junction proteins in human RPE cells via PI-3K/Akt and MAPK/Erk signaling pathways. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(11), 10711–10729. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6965848/>
- Li, Y., Corradetti, M. N., Inoki, K., & Guan, K.-L. (2004). TSC2: Filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.11.007>
- Lin, J. (2022). Effect of Culture Environment on Cell Development. *Journal of Biomedical Engineering and Medical Devices*, 7(10), 1–1. <https://doi.org/10.35248/2475-7586.22.07.242>
- Liu, W., Niu, F., Sha, H., Liu, L.-D., Lv, Z.-S., Gong, W.-Q., & Yan, M. (2020). Apelin-13/APJ system delays intervertebral disc degeneration by activating the PI3K/AKT signaling pathway. *European Review for Medical and*

Pharmacological Sciences, 24(6), 2820–2828.

https://doi.org/10.26355/eurrev_202003_20643

Long, H.-Z., Cheng, Y., Zhou, Z.-W., Luo, H.-Y., Wen, D.-D., & Gao, L.-C. (2021). PI3K/AKT Signal Pathway: A Target of Natural Products in the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 12.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.648636>

LoRusso, P. M. (2016). Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 34(31), 3803–3815.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.0018>

Luongo, F., Colonna, F., Calapà, F., Vitale, S., Fiori, M. E., & De Maria, R. (2019). PTEN Tumor-Suppressor: The Dam of Stemness in Cancer. *Cancers*, 11(8), 1076.

<https://doi.org/10.3390/cancers11081076>

Madhunapantula, S. V., & Robertson, G. P. (2012). Chapter Twelve—Chemoprevention of Melanoma. In K. S. M. Smalley (Ed.), *Advances in Pharmacology* (Roč. 65, s. 361–398). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397927-8.00012-9>

Mancinelli, S., Turcato, A., Kisslinger, A., Bongiovanni, A., Zazzu, V., Lanati, A., & Liguori, G. L. (2021). Design of transfections: Implementation of design of experiments for cell transfection fine tuning. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(11), 4488–4502. <https://doi.org/10.1002/bit.27918>

Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, 169(3), 381–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>

Martínez-Puente, D. H., Pérez-Trujillo, J. J., Zavala-Flores, L. M., García-García, A., Villanueva-Olivo, A., Rodríguez-Rocha, H., Valdés, J., Saucedo-Cárdenas, O.,

- Montes de Oca-Luna, R., & Loera-Arias, M. de J. (2022). Plasmid DNA for Therapeutic Applications in Cancer. *Pharmaceutics*, 14(9), 1861. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091861>
- Masoumi, J., Jafarzadeh, A., Khorramdelazad, H., Abbasloui, M., Abdolalizadeh, J., & Jamali, N. (2020). Role of Apelin/APJ axis in cancer development and progression. *Advances in Medical Sciences*, 65(1), 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2020.02.002>
- Mehta, S., Zhang, Y., Roth, R. H., Zhang, J., Mo, A., Tenner, B., Haganir, R. L., & Zhang, J. (2018). Single-fluorophore Biosensors for Sensitive and Multiplexed Detection of Signaling Activities. *Nature cell biology*, 20(10), 1215–1225. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0200-6>
- Michal, H., Wayne, D., Karsten, T., Eran, H., Laura, C., Karl, O., Mark, H., Joel L., S., Alexander, B., Jaime, P., Joseph M., S., & David, C. (2013). *Green Fluorescent Protein*. Proteopedia. <https://dx.doi.org/10.14576/100139.1834778>
- Miura, H., Matsuda, M., & Aoki, K. (2014). Development of a FRET Biosensor with High Specificity for Akt. *Cell Structure and Function*, 39(1), 9–20. <https://doi.org/10.1247/csf.13018>
- Molina, R. S., Qian, Y., Wu, J., Shen, Y., Campbell, R. E., Drobizhev, M., & Hughes, T. E. (2019). Understanding the Fluorescence Change in Red Genetically Encoded Calcium Ion Indicators. *Biophysical Journal*, 116(10), 1873–1886. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.04.007>
- Naeem, A., Hu, P., Yang, M., Zhang, J., Liu, Y., Zhu, W., & Zheng, Q. (2022). Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives. *Molecules*, 27(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/molecules27238367>

- Nasu, Y., Shen, Y., Kramer, L., & Campbell, R. E. (2021). Structure- and mechanism-guided design of single fluorescent protein-based biosensors. *Nature Chemical Biology*, 17(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00718-x>
- Opletalová, B. (2021). *Kardioprotektivní účinky dehydrosilybinu – srovnání s účinkem apelinu* [Diplomová práce]. Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Ovechkina, V. S., Zakian, S. M., Medvedev, S. P., & Valetdinova, K. R. (2021). Genetically Encoded Fluorescent Biosensors for Biomedical Applications. *Biomedicines*, 9(11), 1528. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111528>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Parmar, N., Singh, K. H., Sharma, D., Singh, L., Kumar, P., Nanjundan, J., Khan, Y. J., Chauhan, D. K., & Thakur, A. K. (2017). Genetic engineering strategies for biotic and abiotic stress tolerance and quality enhancement in horticultural crops: A comprehensive review. *3 Biotech*, 7(4), 239. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0870-y>
- Parmar, N., & Tamanoi, F. (2010). Rheb G-Proteins and the Activation of mTORC1. *The Enzymes*, 27, 39–56. [https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(10\)27003-8](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(10)27003-8)
- Perevalova, A. M., Kobelev, V. S., Sisakyan, V. G., Gulyaeva, L. F., & Pustyl'nyak, V. O. (2022). Role of Tumor Suppressor PTEN and Its Regulation in Malignant Transformation of Endometrium. *Biochemistry (Moscow)*, 87(11), 1310–1326. <https://doi.org/10.1134/S0006297922110104>
- Rao, P. R., & Viswanath, R. K. (2007). Cardioprotective activity of silymarin in ischemia-reperfusion-induced myocardial infarction in albino rats. *Experimental & Clinical Cardiology*, 12(4), 179–187. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2359609/>

- Sadoine, M., Ishikawa, Y., Kleist, T. J., Wudick, M. M., Nakamura, M., Grossmann, G., Frommer, W. B., & Ho, C.-H. (2021). Designs, applications, and limitations of genetically encoded fluorescent sensors to explore plant biology. *Plant Physiology*, *187*(2), 485–503. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab353>
- Sasaki, K., Sato, M., & Umezawa, Y. (2003). Fluorescenční indikátory pro Akt/Protein kinázu B a dynamiku aktivity Akt vizualizované v živých buňkách *. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(33), 30945–30951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212167200>
- Sato, M., & Umezawa, Y. (2004). Imaging protein phosphorylation by fluorescence in single living cells. *Methods*, *32*(4), 451–455. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.10.013>
- Shi, X., Wang, J., Lei, Y., Cong, C., Tan, D., & Zhou, X. (2019). Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*, *19*(6), 4529–4535. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10121>
- Shimomura, O. (2009). Discovery of Green Fluorescent Protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, *48*(31), 5590–5602. <https://doi.org/10.1002/anie.200902240>
- Soboleski, M. R., Oaks, J., & Halford, W. P. (2005). Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *19*(3), 440–442. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3180fje>
- Song, K., Li, M., Yang, Y., Zhang, Z., Zhu, Q., Liu, J., & Wang, A. (2022). Natural flavonolignans as potential therapeutic agents against common diseases. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *74*(3), 337–350. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgab159>

- Sousa, F., Prazeres, D. M. F., & Queiroz, J. A. (2009). Improvement of transfection efficiency by using supercoiled plasmid DNA purified with arginine affinity chromatography. *The Journal of Gene Medicine*, *11*(1), 79–88. <https://doi.org/10.1002/jgm.1272>
- Suchowski, K., Pöschinger, T., Rehemtulla, A., Stürzl, M., & Scheuer, W. (2017). Noninvasive Bioluminescence Imaging of AKT Kinase Activity in Subcutaneous and Orthotopic NSCLC Xenografts: Correlation of AKT Activity with Tumor Growth Kinetics. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *19*(4), 310–320. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.02.005>
- Taylor, S. C., & Posch, A. (2014). The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *BioMed Research International*, *2014*, e361590. <https://doi.org/10.1155/2014/361590>
- Toca-Herrera, J. L., Küpcü, S., Diederichs, V., Moncayo, G., Pum, D., & Sleytr, U. B. (2006). Fluorescence Emission Properties of S-Layer Enhanced Green Fluorescent Fusion Protein as a Function of Temperature, pH Conditions, and Guanidine Hydrochloride Concentration. *Biomacromolecules*, *7*(12), 3298–3301. <https://doi.org/10.1021/bm060661+>
- Trotman, L. C., Niki, M., Dotan, Z. A., Koutcher, J. A., Di Cristofano, A., Xiao, A., Khoo, A. S., Roy-Burman, P., Greenberg, N. M., Dyke, T. V., Cordon-Cardo, C., & Pandolfi, P. P. (2003). Pten Dose Dictates Cancer Progression in the Prostate. *PLoS Biology*, *1*(3), e59. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000059>
- Tsien, R. Y. (1998). The Green Fluorescent Protein. *Annual Review of Biochemistry*, *67*(1), 509–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>

- Tung, J. K., Berglund, K., Gutekunst, C.-A., Hochgeschwender, U., & Gross, R. E. (2016). Bioluminescence imaging in live cells and animals. *Neurophotonics*, 3(2). <https://doi.org/10.1117/1.NPh.3.2.025001>
- VanEngelenburg, S. B., & Palmer, A. E. (2008). Fluorescent biosensors of protein function. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.01.020>
- Vasan, N., Toska, E., & Scaltriti, M. (2019). Overview of the relevance of PI3K pathway in HR-positive breast cancer. *Annals of Oncology*, 30, x3–x11. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz281>
- Violin, J. D., Zhang, J., Tsien, R. Y., & Newton, A. C. (2003). A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *Journal of Cell Biology*, 161(5), 899–909. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302125>
- Vu, C. Q., & Arai, S. (2023). Quantitative Imaging of Genetically Encoded Fluorescence Lifetime Biosensors. *Biosensors*, 13(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/bios13100939>
- Walkowski, B., Kleibert, M., Majka, M., & Wojciechowska, M. (2022). Insight into the Role of the PI3K/Akt Pathway in Ischemic Injury and Post-Infarct Left Ventricular Remodeling in Normal and Diabetic Heart. *Cells*, 11(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/cells11091553>
- West, K. A., Sianna Castillo, S., & Dennis, P. A. (2002). Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resistance Updates*, 5(6), 234–248. [https://doi.org/10.1016/S1368-7646\(02\)00120-6](https://doi.org/10.1016/S1368-7646(02)00120-6)
- Wu, L., Huang, C., Emery, B. P., Sedgwick, A. C., Bull, S. D., He, X.-P., Tian, H., Yoon, J., Sessler, J. L., & James, T. D. (2020). Förster resonance energy transfer (FRET)-

- based small-molecule sensors and imaging agents. *Chemical Society reviews*, 49(15), 5110–5139. <https://doi.org/10.1039/c9cs00318e>
- Xie, F., Liu, W., Feng, F., Li, X., He, L., Lv, D., Qin, X., Li, L., Li, L., & Chen, L. (2015). Apelin-13 promotes cardiomyocyte hypertrophy via PI3K-Akt-ERK1/2-p70S6K and PI3K-induced autophagy. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 47(12), 969–980. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv111>
- Xu, X., Chen, Y., Fu, Q., Ni, D., Zhang, J., Li, X., & Lu, S. (2019). The chemical diversity and structure-based discovery of allosteric modulators for the PIF-pocket of protein kinase PDK1. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 361–374. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1553167>
- Yang, J., Nie, J., Ma, X., Wei, Y., Peng, Y., & Wei, X. (2019). Targeting PI3K in cancer: Mechanisms and advances in clinical trials. *Molecular Cancer*, 18(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0954-x>
- Yang, Q., Inoki, K., Ikenoue, T., & Guan, K.-L. (2006). Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes & Development*, 20(20), 2820–2832. <https://doi.org/10.1101/gad.1461206>
- Yang, X., Li, C., Li, P., & Fu, Q. (2023). Ratiometric optical probes for biosensing. *Theranostics*, 13(8), 2632–2656. <https://doi.org/10.7150/thno.82323>
- Yao, H., Han, X., & Han, X. (2014). The Cardioprotection of the Insulin-Mediated PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 14(6), 433–442. <https://doi.org/10.1007/s40256-014-0089-9>
- Yasui, M., Matsuoka, S., & Ueda, M. (2014). PTEN Hopping on the Cell Membrane Is Regulated via a Positively-Charged C2 Domain. *PLOS Computational Biology*, 10(9), e1003817. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003817>

- Yoshizaki, H., Mochizuki, N., Gotoh, Y., & Matsuda, M. (2007). Akt–PDK1 Complex Mediates Epidermal Growth Factor-induced Membrane Protrusion through Ral Activation. *Molecular Biology of the Cell*, 18(1), 119–128. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-05-0467>
- Yuan, H.-X., & Guan, K.-L. (2015). The Sin1 PH domain connects mTORC2 to PI3K. *Cancer discovery*, 5(11), 1127–1129. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1125>
- Zhang, J.-F., Liu, B., Hong, I., Mo, A., Roth, R. H., Tenner, B., Lin, W., Zhang, J. Z., Molina, R. S., Drobizhev, M., Hughes, T. E., Tian, L., Haganir, R. L., Mehta, S., & Zhang, J. (2021). An ultrasensitive biosensor for high-resolution kinase activity imaging in awake mice. *Nature Chemical Biology*, 17(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00660-y>
- Zhang, L., Lee, K. C., Bhojani, M. S., Khan, A. P., Shilman, A., Holland, E. C., Ross, B. D., & Rehemtulla, A. (2007). Molecular imaging of Akt kinase activity. *Nature Medicine*, 13(9), 1114–1119. <https://doi.org/10.1038/nm1608>
- Zhou, X., Mehta, S., & Zhang, J. (2020). Genetically Encodable Fluorescent and Bioluminescent Biosensors Light Up Signaling Networks. *Trends in Biochemical Sciences*, 45(10), 889–905. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.06.001>
- Zhou, X., Metha, S., & Zhang, J. (2022). AktAR and Akt-STOPS: Genetically Encodable Molecular Tools to Visualize and Perturb Akt Kinase Activity at Different Subcellular Locations in Living Cells. *Current protocols*, 2(5), e416. <https://doi.org/10.1002/cpz1.416>
- Zou, Z., Tao, T., Li, H., & Zhu, X. (2020). mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: Progress and challenges. *Cell & Bioscience*, 10(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00396-1>

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	DH	Dbl homology domain
		DHS	2,3-dehydrosilybin
		DMEM	Eagleovo médium
Akind	Akt indikátor		Modifikované
AktAR2	Akt activity reporter2		Dulbeccoem
APJ	Apelinový receptor	DMSO	dimethylsulfoxid
BAR	Bin/Amphiphysin/Rvs	DUSP	Dual-Specificity
BCA	kyselina bicinchoninová		Phosphatase
BKAR	B Kinase Activity Reporter	EGFP	Enhanced green fluorescent protein
CCT	C-terminal coiled-coil	EGTA	kyselina ethylenglykol
CDC25	cell Division Cycle 25 domain		di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
CK2	Casein kinase 2	EHL	Explicit Hierarchical Locking
CKAR	C Kinase Activity Reporter	Erk	Extracellular signal regulated kinase 1/2
cpGFP	cirkulární permutovaný GFP	ERK/MAPK	Mitogenem aktivovaná protein kináza
CR	konzervované oblasti	FBS	Fetální bovinní sérum
CRD	carbohydrate recognition domain	FGF	fibroblastový růstový faktor
C-TAK1	Cdc25C-asociovanou kinázou 1	FHA2	Forkhead-associated domain

FoxO1	Forkhead box protein O1	Hepes	kyselina N-(2-
FRET	Försterův rezonanční přenos energie		hydroxyethyl)piperazin- N'etansulfonová
GAP	GTPase-activating protein	HRP	křenová peroxidáza
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza	HUVEC	Endoteliální buňky lidské pupečnickové žíly
GDP	guanosin difosfát	mCFP	modrý monomerní fluorescenční protein
GEF	guanine exchange factor	MEK/MAPK	Mitogenem-aktivované protein kinázy 1/2
GFP	zelený fluorescenční protein	mTOR	mechanistic target of rapamycin
GPCR	G protein-coupled receptors	mTORC1	The mechanistic Target of Rapamycin 1
Grb2	growth factor receptor bound protein 2	mTORC2	The mechanistic Target of Rapamycin 2
Grb2	Growth factor receptor bound protein 2	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol- 2-yl)-2,5
GTP	guanosin trifosfát		diphenyltetrazolium bromide
GβL	G protein beta subunit like	mYFP	žlutý monomerní fluorescenční protejn
H9c2	buněčná linie odvozená od embryonální srdeční tkáně	OFP	oranžový fluorescenční protein
HD	Histone-like domain		

PAK	cAMP-dependent protein kinase		Homolog
		PVDF	polyvinylidenfluorid
PAK	proteinkináza A	Raptor	regulatory-associated protein of mTOR
PAK1	p21-aktivovaná kináza-1		
p-Akt	fosforylovaný protein Akt	RBD	receptor-binding domain
PDK1	Phosphoinositide dependent kinase-1/2	REM	Ras exchange motif
		REM	Ras exchanger motif
p-ERK	fosforylovaný protein ERK	RFP	červený fluorescenční protein
PH	pleckstrin homology domain	Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
PI3K	Fosfatidylinositol-3 kinasa	ROS	reaktivní formy kyslíku
		RT	pokojová teplota
PIF-pocket	PDK1 Interacting Fragment	RTK	receptor tyrosinkinázy
		S6K1	Ribosomal protein S6
PIP2	fosfatidylinositol (4,5) disfosfátu		kinase beta-1
		SDS	Dodecylsulfát sodný
PIP3	fosfatidylinositol (3,4,5) trisfosfát	Ser	Serin
		SH2	Src Homology 2 domain
PKC	protein kinase C	SH3	Src Homology 3 domain
PKC	proteinkináza C		
		Sin1-PH	Stress-activated protein kinase-interacting protein
PKG	cGMP-dependent protein kinase		
PP2A	proteinová fosfatáza 2A		
PTEN	Phosphatase And Tensin		

PH1	Pleckstrin Homology domain	Thr	Threonin
		TLR	Toll-like receptor
SOS	Son of Sevenless	Tris	tris-(hydroxymethyl)-
TBS	Tris-buffered saline		aminometan
		VEGF	vaskulární endoteliální
TBS/T	Tris-bufferedsaline/Tween		růstový faktor
		YRF	žlutý fluorescenční
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin		protein