

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2019

Bc. Kateřina Krausová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

STUDIUM MECHANISMŮ DISOCIACE A REASOCIACE FERITINOVÝCH PROTEINOVÝCH KLEČÍ A JEJICH VYUŽITÍ V NANOMEDICÍNĚ

STUDY OF DISASSEMBLY/REASSEMBLY MECHANISMS OF FERRITIN PROTEIN CAGES AND THEIR
UTILIZATION IN NANOMEDICINE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kateřina Krausová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Zbyněk Heger, Ph.D.

BRNO 2019

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Bc. Kateřina Krausová

ID: 164211

Ročník: 2

Akademický rok: 2018/19

NÁZEV TÉMATU:

Studium mechanismů disociace a reasociace feritinových proteinových klecí a jejich využití v nanomedicině

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši použití feritinových proteinových klecí v nanomedicině se zaměřením na nanomedicínu nádorových onemocnění. 2) Pomocí dostupných databází proveďte bioinformatickou analýzu rozdílů mezi feritiny z vybraných organismů (člověk, kůň, myš, archea...). 3) Navrhněte vhodnou metodu pro experimentální sledování disociace a reasociace feritinových podjednotek. Pomocí této metody najdete vhodné podmínky disociace a reasociace feritinových proteinových klecí z různých organismů a využijte tyto podmínky pro enkapsulaci vybraného cytostatického léčiva. 4) Sledujte disociace a reasociace feritinů a změny jejich struktury po enkapsulaci léčiva pomocí transmisní elektronové mikroskopie. 5) Ověřte internalizaci a cytotoxicitu feritinů z různých organismů pro vybrané buněčné linie s rozdílnou expresí receptorů pro feritin. 6) Proveďte statistické zpracování a diskuzi získaných výsledků a zhodnoťte reálnou využitelnost feritinů v nanomedicině.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] HEGER, Zbyněk., et al. Apoferritin applications in nanomedicine. *Nanomedicine* 2014, 9, s. 2233-2245. ISSN 1743-5889.

[2] DOSTALOVA, Simona, et al. Site-directed conjugation of antibodies to apoferritin nanocarrier for targeted drug delivery to prostate cancer cells. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2016, 23, s. 14430-14441. ISSN 1944-8244.

[3] DOSTALOVA, Simona, et al. Apoferritin as an ubiquitous nanocarrier with excellent shelf life. *International Journal of Nanomedicine* 2017, 12, s. 2265-2278. ISSN 1178-2013.

Termín zadání: 4.2.2019

Termín odevzdání: 17.5.2019

Vedoucí práce: Mgr. Zbyněk Heger, Ph.D.

Konzultant:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá studiem disociace a reasociace ferritinových proteinových klecí a jejich využitím v nanomedicíně. Většina prací, které se věnují cílené dopravě léčiv pomocí ferritinových klecí, pracuje s ferritinem izolovaným z koňské sleziny. Je to ale jeho původ, který vede k čím dál častějším otázkám o možné imunogenicitě v organismu pacienta, což poskytuje i hlavní motivaci k testování možnosti enkapsulace nízkomolekulárních léčiv do ferritinů pocházejících z alternativních organismů. V praktické části byla experimentálně určena metoda pro studium disociace. Nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza byla použita pro studium disociace koňského ferritinu o různém složení podjednotek, lidského ferritinu a archeálního *Pyrococcus furiosus* ferritinu. Získané výsledky o disociaci podjednotek byly použity pro enkapsulaci nízkomolekulárního chemoterapeutika doxorubicinu a následnou charakterizaci vzniklého komplexu ferritin-doxorubicin. Účinnost navržených nanoformulací byla ověřena při terapii maligních karcinomů prsu. Jako optimální se jeví lidský ferritin. Jeho složení z těžkých podjednotek koresponduje s nižší stabilitou proteinu, dochází tedy k efektivnějšímu rozpadu struktury a následné enkapsulaci cytostatika. Se svou enkapsulační výtěžností doxorubicinu 60 %, nízkou hodnotou polydisperzního indexu, efektivní cytotoxicitou ferritin-doxorubicin komplexu a minimálním rizikem imunitní odpovědi organismu pacienta dosahuje lidský ferritin lepších výsledků než běžně používaný ferritin izolovaný z koňské sleziny.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ferritin, disociace, reasociace, nativní PAGE, doxorubicin, karcinom prsu

ABSTRACT

Diploma thesis deals with the study of dissociation and reassociation of ferritin protein cages and their use in nanomedicine. Most studies that are focused on targeted transport of pharmaceuticals using ferritin cages work with horse spleen ferritin. It is, however, its origin, which leads to increasingly frequent questions about possible immunogenicity in the patient's organism, which also provides the main motivation to test the possibility of encapsulation of low-molecular drugs into ferritins originating from alternative organisms. In the practical part the method for the study of dissociation was experimentally designed. Native polyacrylamide gel electrophoresis was used to study dissociation of equine ferritin composed of different subunit, human ferritin, and archeal *Pyrococcus furiosus* ferritin. The obtained subunit dissociation results were used to encapsulate the low molecular chemotherapeutic drug doxorubicin and for further characterization of the ferritin-doxorubicin complex. The efficacy of the designed nanoformulations has been verified in the treatment of malignant breast cancer. Human ferritin proves to be the optimal one. Its composition of heavy subunits corresponds to a lower protein stability, thus a more efficient opening of the structure and consequent encapsulation of the cytostatics occurs. With its 60% encapsulation efficiency of doxorubicin, low polydispersity index, effective cytotoxicity of ferritin-doxorubicin complex and minimal risk of immune response to the patient's organism, human ferritin achieves better results than commonly used horse spleen ferritin.

KEYWORDS

Ferritin, dissociation, reassociation, native PAGE, doxorubicin, breast cancer

KRAUSOVÁ, Kateřina. *Studium mechanismů disociace a reasociace feritinových proteinových klecí a jejich využití v nanomedicíně*. Brno, 2019, 72 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav biomedicínského inženýrství. Vedoucí práce: Mgr. Zbyněk Heger, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma „Studium mechanismů disociace a reasociace feritinových proteinových klecí a jejich využití v nanomedicině“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této diplomové práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

Brno

.....

podpis autorky

PODĚKOVÁNÍ

Upřímný dík patří vedoucímu práce Mgr. Zbyňku Hegerovi, Ph.D.

Zvláštní zmínku si zasluhuje má konzultantka Ing. Simona Dostálová, Ph.D. Byla pro mne cenným zdrojem informací a dělila se se mnou o své názory. Její rady byly inspirativní. Vážím si její podpory.

Při práci na bioinformatické analýze mi velmi pomohl Yazan Haddad, Ph.D.; u obrazové analýzy jsem ocenila připomínky Ing. Tomáše Vičara.

Poděkování za vstřícnou spolupráci náleží celému kolektivu Výzkumné skupiny molekulární biologie a nanomedicíny.

Brno

.....

podpis autorky

Obsah

Úvod	13
1 Využití nanočástic v medicíně	14
2 Ferritin	16
2.1 Funkce v organismu	16
2.2 Struktura	17
2.2.1 Tvar, velikost a náboj	17
2.2.2 Vlastnosti podjednotek a složení aminokyselin	17
2.2.3 Kanály v plášti ferritinu	19
2.2.4 Spojení podjednotek a vliv prostředí na strukturu ferritinu . .	19
2.2.5 Typy ferritinů	21
2.3 Internalizace ferritinu do buněk	22
3 Materiály a metody	23
3.1 Chemikálie a roztoky	23
3.2 Zarovnání aminokyselinových sekvencí	24
3.3 Příprava gelů pro denaturační polyakrylamidovou gelovou elektrofo- rézu (PAGE)	25
3.4 Určení velikosti proteinu	25
3.5 Příprava gelů pro nativní PAGE	25
3.6 Enkapsulace doxorubicinu do apoferritinu	26
3.7 Transmisní elektronová mikroskopie	26
3.8 Uvolňování doxorubicinu	27
3.9 Exprese TfR1 a SCARA5 receptorů	27
3.10 Princip detekce asociace ferritinů s buňkami prsních linií	27
3.11 Test metabolické aktivity buněk	28
3.12 Princip detekce cytotoxicity	28
3.13 Princip scratch testu	29
4 Bioinformatická analýza	30
5 Návrh metody pro experimentální sledování disociace a reasociace ferritinových podjednotek	33
5.1 SDS PAGE	33
5.2 Velikost proteinu	34
5.3 Nativní PAGE	35
5.3.1 Iontová síla roztoku	36

5.3.2	Hodnota pH roztoku	37
5.3.3	Reasociace	40
5.4	Snímky z TEM	41
6	Enkapsulace cytostatického léčiva	43
6.1	Kolokalizace doxorubicinu s proteiny ferritinu na nativní PAGE . . .	43
6.2	Charakterizace	45
7	Využití komplexů ferritin-doxorubicin pro terapii maligních karcinomů prsu	48
7.1	Expresní profil SCARA5 a TfR1 u maligních a nemaligních prsních linií	49
7.2	Citlivost prsních linií na léčbu doxorubicinem	50
7.3	Asociace ferritinů s buňkami prsních linií	51
7.4	Vliv komplexů ferritin-doxorubicin na životaschopnost buněk	53
7.4.1	MTT test apodox komplexů	53
7.4.2	Mechanismus cytotoxicity	55
7.4.3	Scratch test	55
8	Automatická obrazová analýza pro scratch test	59
9	Závěr	61
	Literatura	63
	Seznam symbolů, veličin a zkratk	70
	Seznam příloh	71
A	Obsah příloh	72

Seznam obrázků

2.1	Struktura nativního ferritinu izolovaného z koňské sleziny [29].	17
2.2	Struktura lidského mitochondriálního ferritinu [54].	21
4.1	Vícenásobné zarovnání aminokyselinových sekvencí ferritinů z různých organismů. Označení Koňský H Q8MIP0 odpovídá H podjednotce koňského ferritinu s ID Q8MIP0 proteinové sekvence získané z NCBI, podobně pro ostatní typy ferritinů. Zde * (hvězdička) indikuje pozice, které jsou zcela zakonzervované; znak : (dvojtečka) indikuje konzervaci mezi skupinami silně podobných vlastností a znak . (tečka) označuje konzervaci mezi skupinami slabě podobných vlastností.	31
4.2	Fylogenetický strom aminokyselinových sekvencí ferritinů z různých organismů získaný metodou Neighbor-joining. Označení Koňský H Q8MIP0 odpovídá H podjednotce koňského ferritinu s ID Q8MIP0 proteinové sekvence získané z NCBI, podobně pro ostatní typy ferritinů. Měřítko délky větví uvedeno vpravo pod stromem.	32
5.1	SDS PAGE pro koňský ferritin izolovaný ze sleziny obsahující 22 L + 2 H podjednotky; pH citrátového roztoku v rozmezí 3,0-6,0 s inkrementem 0,5. Vlevo žebříček pro srovnání velikostí (kDa).	34
5.2	Nativní PAGE koňského ferritinu izolovaného ze sleziny obsahujícího 22 L + 2 H podjednotky; pH roztoku v rozmezí 1,0-13,0 s inkrementem 0,5.	36
5.3	Nativní PAGE pro roztoky o různé iontové síle. A) komerční ferritin izolovaný z koňské sleziny; B) koňský ferritin obsahující pouze L podjednotky; C) lidský ferritin bohatý na H podjednotky; D) PFU ferritin. Iontová síla: 1) 50mM HEPES + 1 000mM NaCl; 2) 50mM HEPES + 500mM NaCl; 3) 50mM HEPES + 400mM NaCl; 4) 50mM HEPES + 300mM NaCl; 5) 50mM HEPES + 200mM NaCl; 6) 50mM HEPES + 150mM NaCl; 7) 50mM HEPES + 100mM NaCl; 8) 50mM HEPES + 50mM NaCl; 9) 50mM HEPES + 25mM NaCl; 10) 50mM HEPES + 10mM NaCl; 11) 50mM HEPES + 5mM NaCl; 12) 50mM HEPES + 2,5mM NaCl; 13) 50mM HEPES + 1mM NaCl; 14) miliQ voda.	37
5.4	Nativní PAGE koňského L ferritinu; pH roztoku v rozmezí 1,0-13,0 s inkrementem 0,5.	38
5.5	Nativní PAGE lidského H ferritinu; pH roztoku v rozmezí 1,0-13,0 s inkrementem 0,5.	39

5.6	Nativní PAGE ferritinu PFU; pH roztoku v rozmezí 1,0-13,0 s inkrementem 0,5.	39
5.7	Reasociace ferritinu. 1) nativní forma koňského 22 L + 2 H ferritinu; 2) reasociovaná forma koňského 22 L + 2 H ferritinu; 3) nativní forma koňského L ferritinu; 4) reasociovaná forma koňského L ferritinu; 5) nativní forma lidského H ferritinu; 6) reasociovaná forma lidského H ferritinu; 7) nativní forma PFU ferritinu; 8) reasociovaná forma PFU ferritinu.	40
5.8	Nativní forma ferritinu izolovaného z koňské sleziny.	41
5.9	Ferritin izolovaný z koňské sleziny disociován v pH 2,0 (vlevo nahoře) a reasociován (vpravo nahoře); disociován v pH 4,0 (vlevo dole) a reasociován (vpravo dole).	42
6.1	Reasociace ferritinových klecí po částečné disociaci – 6% nativní PAGE po obarvení coomassie modří: 1) koňský ferritin 22 L + 2 H podjednotky; 2) koňský ferritin 22 L + 2 H podjednotky po disociaci a reasociaci; 3) koňský L ferritin; 4) koňský L ferritin po disociaci a reasociaci; 5) lidský H ferritin; 6) lidský H ferritin po disociaci a reasociaci; 7) PFU ferritin; 8) PFU ferritin po disociaci a reasociaci.	44
6.2	Enkapsulace doxorubicinu – fluorescence doxorubicinu: 1) koňský ferritin 22 L + 2 H podjednotky; 2) koňský ferritin 22 L + 2 H podjednotky s doxorubicinem; 3) koňský L ferritin; 4) koňský L ferritin s doxorubicinem; 5) lidský H ferritin; 6) lidský H ferritin s doxorubicinem; 7) PFU ferritin; 8) PFU ferritin s doxorubicinem.	45
6.3	Graf množství uvolněného doxorubicinu v závislosti na čase, hodnoty získané ze supernatantu.	47
7.1	Expresní profil receptoru SCARA5 u buněčných linií.	49
7.2	Expresní profil receptoru TfR1 u buněčných linií.	50
7.3	Vliv koncentrace doxorubicinu na životaschopnost buněk u vybraných prsních linií.	51
7.4	Intenzita fluorescence korespondující s mírou asociace ferritinů s buněčnými liniemi, bez FBS.	52
7.5	Intenzita fluorescence korespondující s mírou asociace vybraných dvou ferritinů bez FBS a s FBS.	53
7.6	Vliv apodox komplexů na životaschopnost buněčné linie. A) doxorubicin; B) koňský 22 L + 2 H apodox; C) koňský L apodox; D) lidský H apodox; E) PFU apodox. Symbol * označuje statisticky signifikantní nárůst, vztaženo k volnému doxorubicinu.	54

7.7	Míra apoptózy vyvolaná u buněčných linií vlivem použitého léčiva. Symbol * označuje statisticky signifikantní nárůst apoptózy, symbol ** označuje statisticky signifikantní pokles apoptózy, vztaženo na kontrolu.	55
7.8	Časový vývoj volné plochy po vytvoření umělého zranění v buněčné linii HBL-100. Symbol * označuje statisticky signifikantní nárůst volné plochy, vztaženo na kontrolu.	56
7.9	Časový vývoj volné plochy po vytvoření umělé rány v buněčné linii HBL-100, kde A) lidský H apodox; B) PFU apodox.	57
7.10	Časový vývoj volné plochy po vytvoření umělé rány v buněčné linii T-47D. Symbol ** označuje statisticky signifikantní pokles volné plochy, vztaženo na kontrolu.	58
8.1	Ukázka implementace metody: originální snímek (vlevo nahoře); obraz po předzpracování morfologickými operacemi (vpravo nahoře); narahovaný obraz (vlevo dole) a výsledná segmentace geometrickými konturami pro výpočet obsahu volné plochy (vpravo dole).	60
8.2	Grafické uživatelské rozhraní pro analýzu snímků získaných ze scratch testu.	60

Seznam tabulek

5.1	Velikost ferritinu z koňské sleziny v roztocích o různém pH. PDI označuje index polydisperzity vzorku.	35
6.1	Zhodnocení apodox komplexů z hlediska velikosti, PDI, ζ -potenciálu a enkapsulační výtěžnosti doxorubicinu.	46
7.1	Charakteristika maligních karcinomů prsu pro terapii. ER – estrogenový receptor; PR – progesteronový receptor; HER2 – lidský epidermální růstový faktor 2; negativní (-); pozitivní (+) [70].	48
7.2	Koncentrace doxorubicinu, při které je životaschopnost buněk 50 % pro vybrané buněčné linie.	51

Úvod

Mnohé vedlejší účinky spojené s léčbou nádorových onemocnění negativně ovlivňují nejen fyzickou, ale i psychickou stránku života pacientů. Dodání léčiv pomocí nanočástic je jednou z možností, jak tyto vedlejší účinky eliminovat. Nanomedicína tak patří mezi neustále se vyvíjející disciplíny a nadále se snaží najít strukturu s perfektními vlastnostmi, kterou by bylo možné použít jako multifunkční transportér.

Na téma využití vhodného nanotransportéru je v práci provedena literární rešerše. Kromě obecných vlastností je teoretická část hlavně zaměřena na specifický popis ferritinu, jak z pohledu funkce v organismu, tak detailní popis struktury vedoucí k rozlišení několika typů ferritinů. V bioinformatické analýze jsou srovnány aminokyselinové sekvence ferritinů z různých organismů, jelikož se tato práce nezaobývá pouze nejčastěji používaným ferritinem izolovaným z koňské sleziny, ale pracuje i s alternativními typy.

V praktické části byla optimalizována metoda pro studium disociace a následné reasociace ferritinových proteinových klecí. Pomocí navržené metody byla ověřena enkapsulační výtěžnost chemoterapeutického léčiva – doxorubicinu. Po detailní charakterizaci vytvořených komplexů ferritin-doxorubicin byly tyto nanoformulace použity pro terapii maligních karcinomů prsu. Faktory ovlivňující úspěšnost terapie, stejně jako stanovení optimálního typu ferritinu jsou diskutovány ve výsledkové části. Nechybí ani návrh programu pro automatické vyhodnocení snímků získaných pomocí světelné mikroskopie.

1 Využití nanočástic v medicíně

Transport léčiv pomocí nanočástic je důležitou a relativně novou oblastí nanotechnologie. V minulosti se vývoj nového léčiva soustředil především na jeho účinnost, zatímco vedlejším účinkům na tělo pacienta se nepřikládal důraz. V dnešní době je značná pozornost věnována právě odstranění těchto negativních vedlejších dopadů [1].

Toho lze dosáhnout cílením léčiva přímo do nádorové tkáně. Jedná-li se však o léčivo nízkomolekulární, jeho cílení je obtížné a ne zcela specifické. Proto je vhodné využít enkapsulaci do nanotransportérů, které lze povrchově modifikovat snadněji, a tím je zacílení k nemocné tkáni přesnější [2]. Vzhledem ke svojí velikosti nanočástice více akumulují ve tkáni solidních malignit, což je výhoda, kterou tento přístup nazývaný nanomedicína poskytuje [3]. Toto pasivní cílení solidních malignit je umožněno díky efektu zvýšené permeability a retence – EPR efekt [4], kdy jsou nanočástice s dlouhou dobou oběhu přijímány přednostně do nádorové tkáně přes penetrovaný endotel nádorového cévního zásobení a jsou pak akumulovány uvnitř nádoru v důsledku snížené lymfatické drenáže [5]. Pro zajištění EPR efektu by nanotransportéry měly mít velikost menší než 100 nm [6]. Zdravé krevní cévy mají póry o velikosti 10 nm, což je důvod požadavku, aby nanotransportéry byly větší [7]. Oproti tomu rychle vzniklá nádorová neovaskulatura obsahuje póry o velikosti 20-100 nm.

Nanomedicína patří mezi neustále se vyvíjející disciplíny a nadále se snaží najít strukturu s perfektními vlastnostmi, kterou by bylo možné použít jako multifunkční transportér. Velký potenciál je připisován syntetickým materiálům, jako jsou například fullereny, porézní duté nanočástice na bázi oxidu křemičitého, ale také jednovrstvé nanotrubičky [2].

Nanotransportéry pro cílenou dopravu léčiva mohou být vyrobeny pomocí celé řady materiálů, jak organických (polymerních, lipidových, proteinových nebo virových), tak i anorganických [8]. Dle velikosti je lze klasifikovat jako lipozomy, které mají průměr 80-200 nm [9], polymerní nanočástice 40-100 nm nebo micely 20-60 nm [10] a nejmenší dendriméry s méně než 10 nm v průměru [11]. Výběr vhodných nanotransportérů může významně snížit negativní vedlejší účinky léčby a zvýšit biologickou kompatibilitu, specifitu, skladovatelnost a rozpustnost léčiva ve vodě. Další výhodou je také možnost kombinace diagnostiky a terapie – teranostický přístup, kdy diagnostická značka může být zapouzdřena uvnitř nanotransportéru [12].

Anorganické nanotransportéry se dají snadno vyrobit, jsou však často imunogenní nebo dokonce toxické pro zdravé buňky. Lipozomy, patřící mezi organické nanotransportéry, sice zvýšeně akumulují v nádorové tkáni, ale jejich pozitivní povrchový náboj vede k nespecifickým interakcím s aniontovými částicemi v krvi, což vede k rychlému uvolňování z cirkulace retikuloendoteliálním systémem nebo

interagují s negativně nabitými membránami zdravých necílových buněk [13]. Jejich využití je tedy také limitováno. Atraktivní v oblasti výzkumů se stávají materiály pro lidské tělo vlastní. Jako přirozené nanotransportéry mohou sloužit exozomy, albumin, transferrin nebo ferritin [14].

2 Ferritin

Jedná se o protein, který je odpovědný za skladování a přenos železa ve většině organismů [15]. Když je železo z vnitřní dutiny odstraněno, vytvoří dutou klec nazývanou apoferritin, známou již od roku 1942 [16]. První zmínka o apoferritinu jako kleci pro enkapsulaci protinádorových léků vyšla v roce 2005 [17].

2.1 Funkce v organismu

Ferritin je hlavním intracelulárním proteinem, který se podílí na skladování a uvolňování intracelulárního železa; a protože je železo zapotřebí v různých buněčných funkcích, není překvapením, že ferritin je exprimován ve všech studovaných buňkách [18]. Buněčnými funkcemi, kdy je železo nezbytné, mohou být: přenos kyslíku, přenos elektrolytů, fixace dusíku, syntéza DNA a tvorba hemoproteinů (hemoglobinu a myoglobinu) [19]. Ne všechny typy buněk však využívají železo pro stejné účely nebo ve stejném rozsahu, a proto se úloha ferritinu v řízení intracelulárního železa liší. Ferritin může hrát roli i ve specializovaných funkcích, jako je recyklace železa v makrofázích a krátkodobé a dlouhodobé skladování železa u hepatocytů [20]. Snad stejně důležitá pro jeho funkci při skladování a uvolňování železa je úloha, kterou plní ferritin při ochraně buněk proti škodlivým účinkům železa.

Železo existuje ve dvou snadno zaměnitelných redoxních stavech. Při fyziologickém pH a napětí kyslíku je Fe^{2+} snadno oxidován na Fe^{3+} , následuje hydrolyza Fe^{3+} a tvorba nerozpustného hydroxidu železitého a oxyhydroxidových polymerů [21]. Kromě toho Fe^{2+} může katalyzovat produkci škodlivých kyslíkových radikálů v Haber-Weissově reakci, což vede k peroxidačnímu poškození buněčných struktur [19]. V buňkách železo pravděpodobně existuje krátkodobě i v nízkomolekulární, redox-aktivní formě, a to zejména v lysozomech [22]. Lysozomální inhibitory mohou blokovat degradaci ferritinu při současné akumulaci proteinových klecí se železem v organelách. Intralysozomální degradace ferritinu chrání buněčné složky před potenciální toxicitou železa, což umožňuje řízení uvolňování kovu do cytosolu, kde vyvolá expresi ferritinu [23].

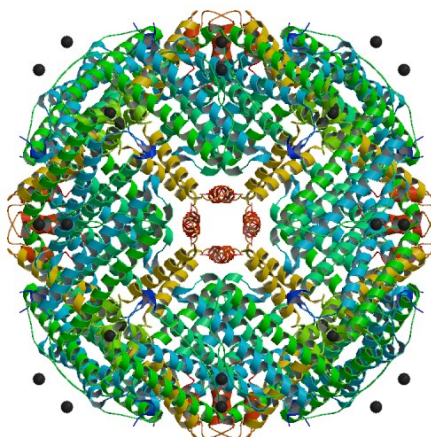
Lysozomy jsou však zvláště zranitelné vůči oxidativnímu stresu a mohou lyzovat v důsledku intralysozomální Fentonovy reakce s následnou peroxidační destabilizací lysozomálních membrán. To může mít za následek vznik leukózních lysozomů a indukci buněčného poškození nebo dokonce apoptotickou či nekrotickou smrt v důsledku uvolnění řady silných hydrolytických enzymů do cytosolu [22].

Mnoho organismů, od člověka po mikroorganismy, má obranné mechanismy, které přeměňují železné ionty na nerozpustnou železitou formu [24]. Jedním z těchto detoxikačních faktorů je právě ferritin [15].

2.2 Struktura

2.2.1 Tvar, velikost a náboj

Ferritin je velký protein o průměru 12,0 nm Obr. 2.1. Proteinová klec tvořená ferritinem má tloušťku asi 1,0 nm a hmotnost 450-480 kDa [25]. Do jádra může být zahrnuto až 4 500 atomů železa spolu s různým množstvím fosfátu [26]. Rozhraní železo-protein vzniká kontaktem vnitřního povrchu s jádrem obsahujícím železo [27]. Je tak definováno místo nukleace jádra a může být lokalizováno tam, kde interagují dimery proteinové podjednotky [28].



Obr. 2.1: Struktura nativního ferritinu izolovaného z koňské sleziny [29].

Apoferritiny mají charakteristickou převahu kyselých zbytků nad bazickými, relativně vysoký obsah nepolárních skupin a nepřítomnost disulfidových můstků (jak by se u intracelulárních proteinů očekávalo), ačkoli může být přítomen cystein [25].

Povrchový náboj je stejně jako imunoreaktivita variabilní v závislosti na poměru jednotlivých typů podjednotek apoferritinu. Rozdíly se vyskytují u normálních typů buněk, ale i při patologických stavech, jako je hemochromatóza, transfuzní nebo experimentální přetížení železa, talasemie, leukémie a záněty [20].

2.2.2 Vlastnosti podjednotek a složení aminokyselin

Studium podjednotek apoferritinu z lidského srdce a jaterního ferritinu ukázalo, že podjednotky z každé tkáně se liší v mobilitě během elektroforézy v denaturačních gelech. Tyto podjednotky byly označeny jako H (Heart – anglicky srdce) a L (Liver – anglicky játra); později se našly oba typy podjednotek v téže buňce a ukázala se podobná variabilita v mobilitě, terminologie se posunula na H (Heavy – anglicky

těžký) a L (Light – anglicky lehký) typ podjednotek ferritinu [30]. Liší se molekulovou hmotností: 21 kDa pro H podjednotku a 19 kDa pro L podjednotku [31]. Délka zhruba válcovité podjednotky ferritinu je 5,5 nm, šířka pak 2,5 nm [1].

Sekvence H a L podjednotek jsou velmi heterogenní mezi ferritiny z různých tkání u stejného zvířecího druhu s pouze 40-50% homologií. Sekvence ze stejné tkáně různých druhů jsou naopak velmi homologní (85-90%) [31].

H podjednotky jsou zodpovědné hlavně za oxidaci železa z Fe^{2+} na Fe^{3+} ; L podjednotky pak za nukleaci a mineralizaci železa [32]. Železo tedy obsahují ferritiny bez ohledu na složení podjednotek [1]. Díky strukturálním vlastnostem je ferritin bohatý na L podjednotky mnohem stabilnější než ferritin bohatý na H podjednotky [31].

Fenomén ferritinového reverzibilního ukládání železa je podporován mechanismy, které se podílejí na regulaci jejich exprese, a to jak na transkripční, tak na translační úrovni [33]. *FTH1* gen je závislý na regulačních proteinech železa a obsahuje jeden element reagující na železo. Při nízkém obsahu železa v buňkách je aktivován a dojde k potlačení translace. Jako odpověď na vysoký obsah železa v buňce regulační proteiny degradují, což translaci naopak podpoří, a to jak *FTH1* gen, tak *FTL* gen [34]. Regulovaná exprese se jeví jako zvláště důležitá pro buněčnou adaptaci na přetížení železem [33]. Transkripční mechanismy jsou striktně zapojeny do určení poměru H a L podjednotek specifického pro konkrétní tkáň. V případě oxidativního stresu může být dosaženo významného zvýšení exprese ferritin kódující mRNA. V mnoha ohledech může být také H ferritin považován za faktor reagující na zánět [35].

Podmíněná inaktivace H ferritinu v ledvinách činí tkáň citlivější na oxidační poškození. H ferritin má tedy důležitou ochrannou úlohu, zatímco L ferritin nikoli – jeho nedostatek neovlivní homeostázu železa ani oxidační poškození [36].

Obecně je ferritinová podjednotka téměř válcová, tvořena čtyřmi α šroubovicemi s paralelní a antiparalelní orientací (označované jako H1-H4), které vykazují levostranný zákrut [1]. H podjednotka (21 kDa) obsahuje 178 aminokyselin, zatímco L podjednotka (19 kDa) pouze 174 aminokyselin [19]. Délka šroubovic H1, H2 a H3 je asi 4,3 nm; H4 je dlouhá 5,2 nm. H1-H4 α šroubovice jsou spojeny smyčkami a krátká pátá α šroubovice (H5; 1,6 nm) je umístěna na C konci, orientovaná téměř v úhlu 60° vůči hlavnímu řetězci [24]. Sekundární struktura H a L podjednotek je velmi podobná, a to i přesto, že sdílí pouze 55% aminokyselinovou sekvenci homologii [18].

V každé podjednotce existuje řada interakcí s postranním řetězcem. Mnoho postranních řetězců interaguje a vytváří hydrofobní jádra na obou koncích spirálového svazku. Velké množství polárních a hydrofilních zbytků tvořících síť vodíkových vazeb se nachází ve středu podjednotky. Tato část je nejvíce diferencovaná mezi H a L podjednotkami [1].

2.2.3 Kanály v plášti ferritinu

Železo prochází do jádra a ven z jádra jak v *in vivo*, tak v *in vitro* podmínkách pravděpodobně přes kanály v proteinu [37]. Přístup do vnitřku molekuly ferritinu je důležitý pro mineralizaci a demineralizaci jádra železa. Obal ferritinových proteinů obsahuje dva hlavní typy kanálů s výrazně odlišnými fyzikálními vlastnostmi.

První typ zahrnuje šest hydrofobních kanálů s čtyřnásobnou symetrií (12 Å dlouhých a 3 až 4 Å širokých), které jsou lemovány dvanácti leucinovými postranními řetězci v L podjednotce; a osmi leuciny plus čtyřmi histidinovými postranními řetězci v H podjednotce. Druhý typ kanálu zahrnuje osm hydrofilních kanálů s trojnásobnou symetrií (šířka 3 až 4 Å), z nichž každý je lemován šesti karboxylovými skupinami, třemi aspartátovými zbytky (na straně dutiny pláště) a třemi zbytky glutamátu [24].

Karboxylové skupiny tří hydrofilních kanálů jsou nezbytné pro rychlou přepravu železa přes plášť ferritinu [38]. Naopak hydrofobní charakter šesti dalších kanálů ukazuje proti jejich možné roli při transportu iontů $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ do vnitřní části molekuly ferritinu. Tyto hydrofobní kanály jsou nepropustné pro všechny kationty s možnou výjimkou protonů. Přenos protonů je důležitý pro udržení elektroneutrality během ukládání železa [39]. Změna aminokyselinových zbytků hydrofobních kanálů má malý vliv na rychlost a specifitu reakce, zatímco modifikace karboxylových skupin lemuujících hydrofilní kanály snižuje rychlost absorpce železa přibližně dvojnásobně [32].

Kromě hydrofobních a hydrofilních kanálků přítomných v plášti ferritinu existuje specifický kanál H podjednotky, který spojuje místo feroxidasy ve středu H podjednotky s vnějším povrchem proteinu [40]. I když je přenos železa tímto kanálem obecně méně účinný, tento alternativní přenos Fe^{3+} iontů na povrch ferritinu může být za určitých podmínek důležitý.

2.2.4 Spojení podjednotek a vliv prostředí na strukturu ferritinu

Vysoce konzervované aminokyselinové zbytky se podílejí na interakcích mezi vnitřními a vnějšími částmi podjednotek [40]. Různé typy interakcí mezi postranními řetězci uvnitř podjednotky a mezi podjednotkami samotnými jsou důležité pro skládání a stabilitu ferritinu. Zahrnují vodíkové vazby, solné můstky a hydrofobní interakce [20]. Příspěvky těchto typů interakcí se liší pro H a L podjednotku.

V H podjednotce je zastoupení vnitřních vodíkových vazeb přibližně o polovinu vyšší než v L podjednotce, přičemž solné můstky jsou naopak důležitější pro stabilizaci L podjednotky a tvoří asi třetinu její stabilizační energie [41]. Díky vysokému počtu solných můstků je molekula ferritinu stabilní vůči tepelné a chemické denaturaci [25].

Rozdíly v interakcích uvnitř podjednotky mezi L a H typem vedou k lineárnímu zvýšení rezistence k denaturaci, přičemž homopolymery a heteropolymery obsahující

vysoký podíl L podjednotek jsou signifikantně odolnější než homopolymery H podjednotky [41]. Jedním z hlavních rozdílů, který přispívá k tomu, že L podjednotky jsou stabilnější, je lysin a glutamová kyselina, jež nahrazují centrum peroxidasy H podjednotky [42].

Interakce mezi podjednotkami odpovědnými za sestavení ferritinu jako celku zahrnují asi 50 % povrchu podjednotky H a L [24]. Kvartérní struktura apoferritinové klece zajišťuje vysokou rozpustnost a termostabilitu [43]. Molekula tak může odolat širokému rozsahu pH a stále si zachovat svou dutou strukturu o průměru 12 nm. Denaturace ferritinu nastává při hodnotách pH pod 1,0 nebo vyšších než 12,0. Mezi pH 1,0 a 3,4 se apoferritin podrobuje některým strukturálním změnám. Co se teploty týče, denaturace nastává po 10 min zahřívání nad 80 °C [44].

Při neutrálním pH má vnější povrch apoferritinu čistě záporný náboj. Jak vnější, tak vnitřní povrch molekuly může být modifikován různými skupinami [43] nebo genetickými a chemickými úpravami. Některé látky se mohou na povrch ferritinu vázat vodíkovými vazbami (neiontovými molekulami) nebo elektrostatickými interakcemi (iontovými molekulami) [45]. Molekuly menší než 2,0 nm mohou vstupovat do dutiny ferritinu kanály ve struktuře prostou difúzí [46].

Při hodnotách pH vyšších než 3,4 má ferritin nativní strukturu. Pod pH 3,4 se stane nestabilní a jeho struktura se rozevívá. Asociace ferritinu probíhá postupně prostřednictvím strukturálních meziproduktů [44]. Začíná v nejslabším místě, trojnásobné ose [47]. Především při pH v rozmezí 3,4 až 2,4 má ferritin celkový dutý sférický tvar se změnami konstrukčních detailů. Při rozložení se vytvoří dva otvory o průměru 6,5 nm. Po postupném rozpadu jednotlivých podjednotek nakonec při pH 1,96 dochází k významným změnám, kdy se vytváří struktura složená z oligomerů, většinou trimerů. Je-li pH pod 0,8, podjednotky spolu začínají agregovat, což je přisuzováno denaturaci a van der Waalovým silám, stejně jako nespecifickým vodíkovým vazbám. Apoferritin v tak vysoce kyselém prostředí je nehomogenní, polydisperzní a nemá žádnou určitou velikost [44].

Proces opětovného sestavení ferritinu do značné míry závisí na procesu jeho rozložení. Nikdy však nedojde ke znovusestavení do původního neporušeného tvaru. Pokud byla asociace provedena při pH 1,96 nebo nižším, strukturální zotavení je omezeno na strukturu tvořenou dvanácti podjednotkami. Při rozložení struktury v pH 3,4 až 2,0 má výsledný reasociovaný ferritin strukturu se dvěma otvory o velikosti 6,5 nm na severním a jižním pólu a je tvořen dvaceti podjednotkami. Rozdíl v obnově opětovného uspořádání je pravděpodobně způsoben nesprávnými kontaktními úhly mezi dimerovými a monomerními složkami struktury, takže výsledný konstrukt nemůže přijmout více trimerů nebo monomerů k dokončení procesu reasociace [44].

Intenzivní studium o poznacích mechanismů pH senzitivních vektorů [48] je

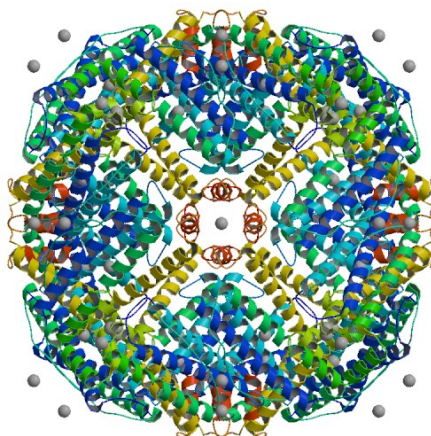
důležité především kvůli rozdílným hodnotám pH v nádorech a jiných patologických tkáních. Znovu sestavená struktura ferritinu s dvěma defektními otvory může být užitečná pro výrobu pH senzorkého nanotransportéru pro dodávání léků. Enkapsulace léčiv do ferritinu nevyžaduje žádnou modifikaci jak léčivých, tak nosičových molekul, protože využívá chování apoferritinu v okolním prostředí [49].

2.2.5 Typy ferritinů

Výše popsaný typ ferritinu se vyskytuje u rostlin i zvířat. Prokaryota jsou omezena na hem obsahující bakterioferritin tvořený 24 podjednotkami a ferritin tvořený pouze 12 monomery s nižší skladovací kapacitou železa [50].

Ferritinové geny byly nalezeny i u některých virů, pravděpodobně pocházejících z horizontálního přenosu z hostitele [51]. Houby se liší od jiných eukaryot, jelikož obsahují ferritinu málo. Možným důvodem je použití vakuoly jako alternativního depozitního systému. Houby s více než dvěma geny pro ferritin mohou infikovat zvířata i rostliny, což naznačuje, že ferritin může být užitečný pro parazity [52].

Specifický typ ferritinu je také přítomen v mitochondriích Obr. 2.2. Mitochondrie je konfrontována s velkým množstvím metabolicky aktivního železa, a přestože většina buněčných typů obsahuje pouze velmi malé množství mitochondriálního ferritinu, za určitých podmínek je specifický ferritin translokován do mitochondrie, aby se izolovalo nežádoucí množství železa [53]. Mitochondriální ferritinový gen (*FTMT*) neobsahuje žádné introny.



Obr. 2.2: Struktura lidského mitochondriálního ferritinu [54].

Regulace distribuce ferritinu v různých částech cytosolu a buněčných organel je částečně řízena různými mechanismy, které se podílejí na absorpci ferritinu z buněčných organel. Ferritin se také váže na mikrotubuly, což může přispět k transportu

ferritinu na specifická místa a organely v buňce. Depolymerizace mikrotubulů zvyšuje sekreci ferritinu a podporuje pravděpodobnou úlohu mikrotubulů při regulaci intracelulární koncentrace a distribuce krve v různých fyziologických prostředích [55].

2.3 Internalizace ferritinu do buněk

Vzhledem k velikosti ferritinu (průměr 12 nm) může pro vstup do tkáně solidního nádoru využít pasivního cílení pomocí EPR efektu [5], případně transcytózy přes buňky nádorové neovaskulatury [56]. S ohledem na jeho přirozený výskyt v pacientově organismu je také velmi malá pravděpodobnost jeho opsonizace a vycytání retikuloendoteliálním systémem. Přesto by mohly být částice o průměru 12 nm nežádoucím způsobem z těla odstraněny renální clearance, proto je vhodné zvýšit velikost apoferritinu mírnou modifikací povrchu [57].

Vstup ferritinu dovnitř buněk je možný přes přirozené specifické receptory nacházející se na membránách většiny buněk v těle [58]. Ferritin bohatý na L podjednotky je do buněk internalizován pomocí scavenger receptoru typu 5 třídy a (SCARA5) [59], zatímco H ferritin se váže na TIM-2 [60] a transferrinový receptor 1 (TfR1) [33]. Tyto receptory však lze nalézt nejen na membránách nádorových buněk, ale také na povrchu mnoha zdravých buněk; příkladem může být TfR1 v ledvinných buňkách. Proto je vhodnější povrch apoferritinu modifikovat pomocí ligandů specificky cílících receptory nádorových buněk, čímž se zaručí aktivně cílená doprava obsahu ferritinu do vybraných buněk [57].

3 Materiály a metody

3.1 Chemikálie a roztoky

Všechny chemikálie použité v práci byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), pokud není uvedeno jinak. pH roztoků bylo měřeno za použití pH metru WTW inoLab (Weilheim, Německo). Ferritin izolovaný z koňské sleziny, obsahující 22 L + 2 H podjednotky (A3660) byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich. Ostatní ferritiny použité v této práci, tedy koňský ferritin obsahující 24 L podjednotek, lidský ferritin obsahující 24 H podjednotek a ferritin archea PFU byly poskytnuty od Dr. Vladimíra Pekaříka (Fyziologický ústav, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně).

Pro testování disociací a reasociací ferritinů byly použity pufrы o různých pH a iontových silách:

- pH 1,0 – 150mM KCl, pro úpravu pH použita HCl;
- pH 1,5 – 150mM KCl, pro úpravu pH použita HCl;
- pH 2,0 – 150mM KCl, pro úpravu pH použita HCl;
- pH 2,5 – 150mM KCl, pro úpravu pH použita HCl;
- pH 3,0 – 150mM octan sodný, pro úpravu pH použita kyselina octová;
- pH 3,5 – acetát sodný-roztok kyseliny octové (200mM);
- pH 4,0 – acetát sodný-roztok kyseliny octové (200mM);
- pH 5,5 – acetát sodný-roztok kyseliny octové (200mM);
- pH 6,0 – Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ roztok (200mM);
- pH 6,5 – Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ roztok (200mM);
- pH 7,0 – Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ roztok (200mM);
- pH 7,5 – Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ roztok (200mM);
- pH 8,0 – Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ roztok (200mM);
- pH 8,5 – 150mM glycin, pro úpravu pH použit NaOH;
- pH 9,0 – 150mM glycin, pro úpravu pH použit NaOH;
- pH 9,5 – uhličitan sodný-hydrogenuhlíčan sodný (100mM);
- pH 10,0 – uhličitan sodný-hydrogenuhlíčan sodný (100mM);
- pH 10,5 – uhličitan sodný-hydrogenuhlíčan sodný (100mM);
- pH 11,0 – 100mM NaHCO₃, pro úpravu pH použit NaOH;
- pH 11,5 – 100mM NaHCO₃, pro úpravu pH použit NaOH;
- pH 12,0 – 150mM KCl, pro úpravu pH použit NaOH;
- pH 12,5 – 150mM KCl, pro úpravu pH použit NaOH;
- pH 13,0 – 150mM KCl, pro úpravu pH použit NaOH;
- citrátové roztoky o pH 3 až pH 6: 200mM kyselina citrónová-citrát trisodný;
- 50mM HEPES + 1 000mM NaCl;

- 50mM HEPES + 500mM NaCl;
- 50mM HEPES + 400mM NaCl;
- 50mM HEPES + 300mM NaCl;
- 50mM HEPES + 200mM NaCl;
- 50mM HEPES + 150mM NaCl;
- 50mM HEPES + 100mM NaCl;
- 50mM HEPES + 50mM NaCl;
- 50mM HEPES + 25mM NaCl;
- 50mM HEPES + 10mM NaCl;
- 50mM HEPES + 5mM NaCl;
- 50mM HEPES + 2,5mM NaCl;
- 50mM HEPES + 1mM NaCl;
- miliQ voda.

Pro denaturační elektroforézu byly použity:

- denaturační nanášecí pufr (PLB): 20% glycerol, 0,1% bromfenolová modř, 50mM Tris-HCl a 2% dodecylsírán sodný (SDS);
- separační gel: 12,5% akrylamid/bisakrylamid (29:1), 375mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,083% N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED) a 0,05% peroxidisírán amonný (APS);
- zaostřovací gel: 4,5% akrylamid/bisakrylamid (29:1), 135mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,083% TEMED a 0,05% APS;
- separační pufr: 25mM Tris, 192mM glycin, 0,1% dodecylsírán sodný, pH 8,3.

Pro barvení denaturačních a nativních gelů byly použity:

- coomassie roztok A: 0,05% Coomassie Brilliant Blue R250 (CBR-250); 25% 2-propanol a 10% kyselina octová;
- coomassie roztok B: 0,005% CBR-250; 10% 2-propanol a 10% kyselina octová;
- coomassie roztok C: 0,002% CBR-250 a 10% kyselina octová;
- coomassie roztok D: 10% kyselina octová.

Pufrovaný fyziologický roztok (PBS): 137mM KCl spolu s 1,4mM KH_2PO_4 a 4,3mM Na_2HPO_4 , pH 7,4. PBS-T: 500 μl Tween-20 v 1 l PBS.

3.2 Zarovnání aminokyselinových sekvencí

Sekvence proteinů ve fasta formátu byly získány z NCBI, včetně jejich ID (PFU I6V0I9; koňský ferritin H podjednotka Q8MIP0; myší ferritin H podjednotka P09528; lidský ferritin H podjednotka P02794; myší ferritin L podjednotka P29391; koňský ferritin L podjednotka P02791; lidský ferritin L podjednotka P02792). Vícenásobné zarovnání bylo provedeno pomocí CLUSTAL vícenásobné sekvenční zarovnání

MUSCLE (3.8). Pro vizualizaci fylogenetického stromu byl použit ETE Toolkit s využitím newick formátu a metody Neighbor-joining.

3.3 Příprava gelů pro denaturační polyakrylamidovou gelovou elektroforézu (PAGE)

Pro separaci proteinů byla použita denaturační PAGE s SDS. Byl použit diskontinuální 12,5% separační SDS-PAGE gel s 4,5% zaostřovacím SDS-PAGE gelem. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit Unstained Protein Ladder, Broad Range 10-250 kDa (New England Biolabs, MA, USA). Vzorky byly připraveny smícháním 0,5 μ l ferritinu (o koncentraci 6 mg/ml) s 7,63 μ l roztoků o různých hodnotách pH nebo iontových silách a inkubací po dobu 15 min při 20 °C a 600 rpm. 1 μ l takto připraveného vzorku byl odebrán na měření velikosti a zbytek vzorku bylo smícháno s 5 μ l denaturačního PLB. Vzorky byly nanášeny do jednotlivých jamek gelu. Žebříčku bylo nanášeno 5 μ l. Elektroforéza probíhala 35 min při 200 V a 4 °C.

Gel byl obarven rychlým barvením coomassie modří. U rychlého barvení coomassie modří je nejdříve gel v roztoku A zahříván do varu na vysoký výkon v mikrovlnné troubě. Poté je v tomto roztoku třepán 5 min při 20 °C a 600 rpm. Gel je propláchnut demineralizovanou vodou a zahříván v roztoku B. Následuje propláchnutí a zahřívání v roztoku C. Po něm se již gel neoplachuje, ale je umístěn do odbarvovacího roztoku D, zahříván a posléze třepán 5 min při 20 °C a 600 rpm. Toto odbarvení je možné opakovat podle potřeby.

3.4 Určení velikosti proteinu

Průměrná velikost proteinu byla určena pomocí kvazielastického dynamického rozptylu světla na přístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Velká Británie). 1 μ l vzorku připraveného v bodu 3 byl smíchán s 99 μ l roztoku o dané hodnotě pH nebo iontové síly. 50 μ l roztoku bylo nanášeno do jednorázové polystyrenové kyvety Zen0040 (Brand GmbH, Wertheim, Německo). Parametry měření byly následující: úhel detektoru 173°, vlnová délka 633 nm, teplota 25 °C, ekvilibrační čas 120 s, počet měření každého vzorku 6, index lomu vzorku 1,450; index lomu rozpouštědla 1,333.

3.5 Příprava gelů pro nativní PAGE

Pro separaci proteinů v nativní konformaci byl použit diskontinuální 6% separační nativní PAGE gel s 4,5% zaostřovacím nativním PAGE gelem. Vzorky byly

připraveny stejně jako pro SDS PAGE, ale byly smíchány s 5 μl PLB pro nativní elektroforézu. Vzorčky byly nanесeny do jednotlivých jamek gelu. Elektroforéza probíhala 35 min při 200 V a 4 °C. Gely byly obarveny rychlým barvením coomassie modří stejně jako v případě SDS PAGE.

3.6 Enkapsulace doxorubicinu do apoferritinu

Alikvot 200 μl 1 mg/ml doxorubicinu byl přidán ke 20 μl 26 mg/ml ferritinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 100 μl vody. U koňského ferritinu 22 L + 2 H podjednotky bylo přidáno 0,450 μl 1M kyseliny chlorovodíkové za účelem snížení pH roztoku (pH 4,0) (WTW inoLab, Weilheim, Německo) a disociaci podjednotek ferritinu. Roztok byl míchán po dobu 15 min. Poté bylo přidáno 0,4 μl 1M hydroxidu sodného za účelem zvýšení pH (pH 6,3) a enkapsulace doxorubicinu dovnitř ferritinu (vytvoření apodox). Pro koňský L ferritin bylo použito 1,9 μl 1M kyseliny chlorovodíkové (pH 3,5) a 1,47 μl 1M hydroxidu sodného (pH 6,5); lidský H ferritin: 1,034 μl 1M kyseliny chlorovodíkové (pH 4,0) a 0,6 μl 1M hydroxidu sodného (pH 7,0); PFU ferritin: 3,45 μl 1M kyseliny chlorovodíkové (pH 3,0) a 3,07 μl 1M hydroxidu sodného (pH 6,9). Směs byla udržována při 20 °C po dobu 15 min a následně 2× promyta vodou s použitím Amicon Ultra – 0,5 ml 3K (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Vzorčky byly nanесeny na nativní PAGE gel. Absorpční a emisní spektrum apodox bylo následně měřeno za použití Tecan Infinite 200 PRO (Tecan, Männedorf, Švýcarsko, excitační vlnová délka 480 nm a emisní vlnové délky 515-815 nm). Fluorescence doxorubicinu byla proložena s bandy proteinu získanými po separaci proteinu na gelu a obarvení pomocí coomassie blue barvení.

3.7 Transmisní elektronová mikroskopie

Příprava vzorku: 300 μl miliQ vody, 20 μl ferritinu izolovaného z koňské sleziny o koncentraci 50 mg/ml, 1M HCl – pro pH 2,0 přidáno 8,7 μl ; pro pH 4,0 přidáno 0,9 μl . Po 15 min rotaci přidáno 1M NaOH – pro pH 2,0 přidáno 6,7 μl ; pro pH 4,0 přidáno 0,4 μl NaOH; 15 min rotace. Vizualizace disociace a reasociace ferritinu byla provedena pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) s negativním barvením roztokem uranyl acetátu pro vzorčky ferritinu disociovaného na pH 2,0 a pH 4,0; organowolframovou sloučeninou Nano-W (Nanoprobes, Yaphank, NY, USA; pH 6,8) pro vzorčky ferritinu reasociovaného z pH 2,0 nebo pH 4,0 na hodnotu pH 7,0. Takto vzniklého vzorku byly 4 μl nanесeny na měděnou mřížku pokrytou uhlíkovou vrstvou. Po zaschnutí vzorku byl vzorek vizualizován pomocí přístroje Tecnai F20 (FEI, Hillsboro, OR, USA) při 80 000 \times zvětšení.

3.8 Uvolňování doxorubicinu

Apodox komplexy byly inkubovány při teplotě 37 °C a v časových bodech 0; 1,5; 3; 6; 24; 48; 72 hod byly vzorky centrifugovány 6 000 g po dobu 15 min a teplotě 4 °C. Vzniklý supernatant byl odebrán a byly změřeny optické vlastnosti spektrofotometricky. Absorbance byla měřena v rozmezí 230-850 nm a fluorescence s excitací 480 nm v rozmezí 515-815 nm. Množství uvolněného doxorubicinu v supernatantu odpovídá poměru hodnoty absorbance při 480 nm po centrifugaci vztažené na hodnotu před centrifugací.

3.9 Exprese TfR1 a SCARA5 receptorů

Adherentní buněčné linie o konfluenci 80 % byly odebrány z kultivační lahve pomocí enzymu accutasy. Buňky byly následně centrifugovány při 400 g a 4 °C po dobu 5 min. Pelet byl resuspendován v PBS (4 °C) a opět centrifugován pro odmytí zbytků média a accutasy. 400 000 buněk bylo resuspendováno v 50 μ l 10% FBS v PBS (4 °C) a k této suspenzi bylo přidáno 50 μ l anti-TfR1 protilátky (ab38171, Abcam, Cambridge, Velká Británie) naředěné 1:1 000 nebo 50 μ l anti-SCARA5 protilátky (MA5-24303, Thermo Fisher Scientific) v poměru 1:10 v 3% FBS v PBS (4 °C). Inkubace probíhala 1 hod při 4 °C. Následně byly buňky 3 \times promyty PBS (4 °C), vždy s centrifugací při 400 g a 4 °C po dobu 5 min. Pelet byl poté resuspendován ve 100 μ l anti-myší sekundární protilátky značené CFL64 (sc-362287, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) naředěné 1:500 pomocí 3% FBS v PBS (4 °C). Inkubace probíhala 30 min při 4 °C ve tmě. Následně byly buňky 3 \times promyty PBS (4 °C), vždy s centrifugací při 400 g a 4 °C po dobu 5 min. Pelet byl poté resuspendován ve 300 μ l 3% FBS v PBS (4 °C) a fluorescence byla analyzována pomocí průtokového cytometru Accuri C6 (BD Biosciences, California, USA) s rychlostí průtoku 35 μ l/min. Jako kontrola sloužily buňky zpracované stejným postupem bez přidavku anti-TfR1 a anti-SCARA5 protilátky. Od mediánu intenzity fluorescence vzorku označeného primární a sekundární protilátkou byla odečtena hodnota vzorku označeného pouze sekundární protilátkou a výsledek byl vyneseno do grafu.

3.10 Princip detekce asociace ferritinů s buňkami prsních linií

Pro určení míry asociace ferritinů s buňkami prsu byly ferritiny označeny pomocí Cyanine5 NHS esteru (Lumiprobe, Hannover, Německo). 40 μ l ferritinu o koncentraci 12 mg/ml bylo smícháno s 4 μ l (400 pmol) Cyanine5 NHS esteru a 500 μ l 0,05M

borátového pufru o pH 8,5. Inkubace probíhala při 600 rpm a 20 °C po dobu 1 hod. Nenavázané molekuly Cyanine5 NHS esteru byly odstraněny 5× diafiltrací přes diafiltrační kolonky Amicon 100K, vždy při 6 000 g a 4 °C po dobu 15 min, s výměnou rozpouštědla za čerstvý 0,05M borátový pufr o pH 8,5.

150 000 buněk v 250 μ l média bylo naneseno do každé jamky 24-jamkové destičky. Po 24 hod bylo médium vyměněno za 250 μ l čerstvého média obsahujícího 150 μ l/ml ferritinu označeného pomocí Cyanine5 NHS esteru. Po 24 hod kultivaci byly adherentní buňky odebrány z kultivační destičky pomocí enzymu accutasy. Buňky byly následně centrifugovány při 400 g a 4 °C po dobu 5 min. Pelet byl resuspendován v PBS (4 °C) a opět centrifugován pro odmytí zbytků média a accutasy. Poté byl pelet resuspendován ve 300 μ l 3% FBS v PBS (4 °C) a fluorescence byla analyzována pomocí průtokového cytometru Accuri C6 (BD Biosciences, California, USA) s rychlostí průtoku 35 μ l/min. Jako kontrola sloužily buňky zpracované stejným postupem bez přídavku ferritinu. Od mediánu intenzity fluorescence vzorku inkubovaného s ferritinem byla odečtena hodnota vzorku inkubovaného pouze s médiem a výsledek byl vyneseno do grafu.

3.11 Test metabolické aktivity buněk

50 μ l média obsahujícího 5 000 buněk bylo naneseno do každé jamky 96-jamkové destičky a inkubováno po dobu 24 hod. Poté bylo k médiu přidáno 50 μ l obsahujících různé koncentrace doxorubicinu pro určení jeho 50% inhibiční koncentrace po 24 hod (24hIC₅₀, nejvyšší testovaná koncentrace 250 μ M) nebo 25 μ M doxorubicin ve volné formě nebo ve formě apodox komplexů. Po kultivační době 24 hod bylo přidáno 10 μ l MTT (5 mg/ml v PBS). Po inkubační době 3 hod, kdy se vytvořily krystaly modrého formazanu, se médium obsahující doxorubicin odsálo a buňky se rozpustily v DMSO. Metabolická aktivita buněk a tím i jejich životaschopnost byla stanovena spektrofotometricky měřením absorpance při 570 nm. Neošetřené buňky kultivované pouze v médiu byly pozitivní kontrolou. Výsledky jsou vypočteny jako procento životaschopnosti ve vztahu k neošetřeným buňkám.

3.12 Princip detekce cytotoxicity

Do 6-jamkových destiček bylo nasazeno 600 000 buněk na jamku. Po 24 hod inkubaci bylo médium vyměněno za 1 000 μ l čerstvého média obsahujícího 25 μ M doxorubicin ve volné formě nebo ve formě apodox komplexů. Následovala inkubace po dobu 6 hod, po níž bylo odebráno médium obsahující mrtvé buňky do zkumavek. Adherentní buňky byly 2× promyty PBS a byl přidán 1 ml accutasy do každé jamky.

Po odsednutí buněk byla accutasa inhibována 2 ml média obsahujícího FBS a výsledná suspenze byla přidána do zkumavek s médiem odebraným z jamek v předchozím kroku. Vzorky byly centrifugovány po dobu 5 min při 400 g, 4 °C. Následně byly buňky 2× promyty PBS (4 °C), vždy s centrifugací při 400 g a 4 °C po dobu 5 min. Pelet byl resuspendován ve 200 μ l Annexin V pufru a rozdělen na poloviny. 100 μ l bylo smícháno s 5 μ l roztoku FITC Annexin V. Vzorek byl inkubován ve tmě a 20 °C po dobu 15 min. Po smíchání s 200 μ l Annexin V pufru byl vzorek analyzován na průtokovém cytometru Accuri C6 (BD Biosciences, California, USA) s rychlostí průtoku 35 μ l/min a analýzou minimálně 200 000 buněk. Druhá polovina resuspendovaného peletu byla smíchána pouze s 200 μ l Annexin V pufru bez barvení a změřena stejným způsobem. Fluorescence na kanále FITC Annexin V přímo odpovídá míře apoptózy. Jako negativní kontrola byly použity buňky inkubované pouze v přítomnosti média.

3.13 Princip scratch testu

Do každé jamky 12-jamkových destiček bylo nasazeno 250 000 buněk na jamku. Každých 48 hod bylo měněno médium až do dosažení 100 % konfluence. Poté byla v každé jamce vytvořena umělá rána na několika místech buněčné monovrstvy a buněčné zbytky byly odstraněny 2× promytím PBS. Do jamky bylo přidáno 1 000 μ l média obsahujícího 25 μ M doxorubicin ve volné formě nebo ve formě apodox komplexů, což bylo stanoveno jako čas 0 hod. Destička byla vyfocena na mikroskopu s využitím fázového kontrastu, zvětšení 40 \times . Zarůstání uměle vytvořené rány bylo sledováno v časových intervalech 2, 4, 8, 24 a 48 hod, kdy po 24 hod bylo médium vyměněno za čerstvé neobsahující doxorubicin.

Získané obrázky byly vyhodnoceny v Matlab GUI pro kvantifikaci růstu buněk. Pro automatickou obrazovou analýzu byly zvoleny geometrické kontury level-set. Byl použit Chan-Vese model [61] včetně metody Sparse-Field level set, podobnou metodě popsané v [62], pro implementaci aktivního vývoje kontury. Výsledkem analýzy je procento bílých pixelů odpovídající obsahu volné plochy.

4 Bioinformatická analýza

Praktická část diplomové práce bude věnována experimentálnímu testování disociace a reasociace ferritinových klecí pocházejících z různých organismů. Většina prací, které se věnují cílené dopravě léčiv pomocí ferritinových klecí, pracuje s ferritinem izolovaným z koňské sleziny [25],[46],[49],[51],[57]. Tento ferritin je tvořen 22 L + 2 H podjednotkami. I přes příznivé vlastnosti (velká enkapsulační výtěžnost, vysoká stabilita enkapsulace nebo velikost 12 nm [63]) jeho původ vede k čím dál častějším otázkám o možné imunogenicitě v organismu pacienta. Tato skutečnost je jedním z důvodů, proč je v práci testována možnost enkapsulace nízkomolekulárních léčiv do ferritinů pocházejících z různých organismů. Druhým důvodem je pak skutečnost, že dle literatury dochází ke kompletní disociaci klece ferritinu izolovaného z koňské sleziny až při pH 2,5 [44], což je ale příliš nízká hodnota pH, která se například v endozomech nevyskytuje, tam dosahuje pH kolem 4. Přitom právě prostředí endozomů nádorových buněk jako cílové místo, kde by se ferritin rozložil a uvolnil obsah dutiny, je pro zkoumání nádorových onemocnění klíčové. Tyto limitace vedly k začátku testování alternativních typů ferritinů včetně organismu vlastního lidského ferritinu bohatého na těžké podjednotky, koňského ferritinu s převahou lehkých podjednotek a v neposlední řadě ferritinu archea *Pyrococcus furiosus* (PFU).

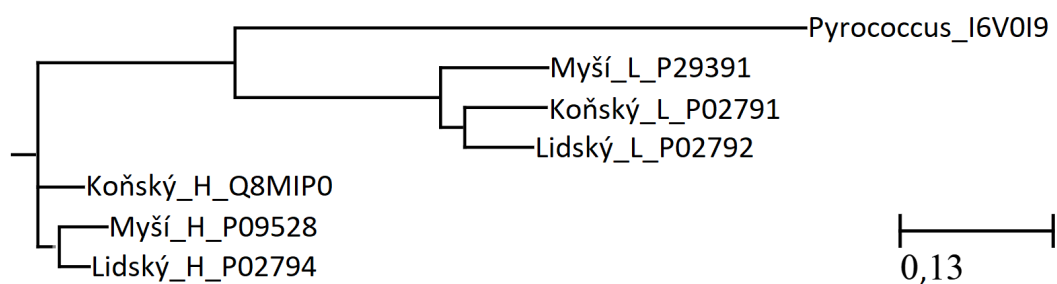
Pro uspokojení otázek týkajících se případné imunogenicity ferritinů, ať již pro humánní medicínu nebo preklinické *in vivo* testování pomocí myších xenograftních modelů, bylo provedeno vícenásobné zarovnání dostupných sekvencí L a H podjednotek ferritinů lidských, koňských a myších, stejně jako archea PFU.

V zarovnání Obr. 4.1 se vyskytuje pouze 26 zakonzervovaných pozic z celkových 199, což odpovídá přibližně 7% shodě. To je způsobeno především velkou odlišností archeálního typu ferritinu od ostatních organismů. L řetězce a H řetězce z myšího, lidského a koňského ferritinu vykazují velmi vysokou homologii, přičemž většina aminokyselinových změn má za následek změnu aminokyseliny se stejným nábojem a pouze velmi malé změny struktury.

Na základě vícenásobného zarovnání byl ze sekvencí sestaven fylogenetický strom. Zatímco by se dalo očekávat, že k sobě budou mít geneticky blíže ferritiny s převahou těžkých nebo lehkých podjednotek z jednoho organismu, z fylogenetického stromu vyplývá opak Obr. 4.2. Nejblíže (0,06594) k sobě mají lidský a myší ferritin tvořený těžkými podjednotkami, evolučně blízký (0,04945) je jim i koňský ferritin obsahující těžké podjednotky. Co se týče proteinu z lehkých podjednotek, blízké jsou si lidský a koňský ferritin (0,12572), myší vzorek je oddělen. PFU je geneticky blíže skupině ferritinů obsahujících lehké podjednotky (0,6504), i přesto je jeho sekvenční podobnost minimální. Následky této odlišnosti mezi jednotlivými typy ferritinů budou diskutovány v experimentální části v souvislosti se získanými daty *in vitro*.



Obr. 4.1: Vícenásobné zarovnání aminokyselinových sekvencí ferritinů z různých organismů. Označení Košský H Q8MIP0 odpovídá H podjednotce koňského ferritinu s ID Q8MIP0 proteinové sekvence získané z NCBI, podobně pro ostatní typy ferritinů. Zde * (hvězdička) indikuje pozice, které jsou zcela zakonzervované; znak : (dvojtečka) indikuje konzervaci mezi skupinami silně podobných vlastností a znak . (tečka) označuje konzervaci mezi skupinami slabě podobných vlastností.



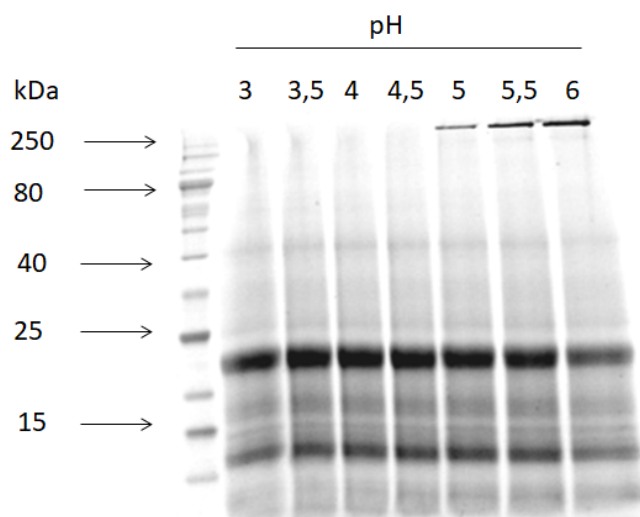
Obr. 4.2: Fylogenetický strom aminokyselinových sekvencí ferritinů z různých organismů získaný metodou Neighbor-joining. Označení Koňský H Q8MIP0 odpovídá H podjednotce koňského ferritinu s ID Q8MIP0 proteinové sekvence získané z NCBI, podobně pro ostatní typy ferritinů. Měřítko délky větví uvedeno vpravo pod stromem.

5 Návrh metody pro experimentální sledování disociace a reasociace ferritinových podjednotek

V této části diplomové práce budou uvedeny metody pro experimentální sledování disociace a reasociace ferritinových podjednotek. Ze srovnání aminokyselin různých typů ferritinů Obr. 4.1 je patrné, že jejich složení se liší. Zatímco sekvence proteinů jsou známé, podmínky disociace a reasociace jejich struktury nikoli. Standardně se struktura zjišťuje pomocí TEM, případně maloúhlového rozptylu rentgenového záření. Jedná se ale o časově náročné metody, které navíc vyžadují vyškolenou obsluhu, proto byla tato práce věnována návrhu alternativní metody sledování disociace a reasociace ferritinových klecí.

5.1 SDS PAGE

Disociace ferritinu izolovaného z koňské sleziny – jako nejběžněji používaného typu ferritinu, jehož struktura je nejdětalněji popsána a jeho chování známé – byla nejdříve sledována na SDS PAGE. Výsledek gelové elektroforézy je na obrázku 5.1. Disociace ferritinu byla sledována v pufrch o pH v rozmezí 3,0-6,0. Ve vyšších hodnotách pH byl pozorován protein o velikosti 250+ kDa. Podjednotky o velikosti přibližně 20 kDa jsou však viditelné v celé škále pH, z čehož vyplývá, že ferritin alespoň částečně disocioval ve všech testovaných roztocích. To je pravděpodobně způsobeno jeho denaturací vlivem dodecylsírany sodného [64]. Ačkoliv je tak SDS PAGE vhodnou metodou pro sledování proteinového zastoupení vzorků, nelze použít pro sledování disociací a reasociací ferritinových klecí.



Obr. 5.1: SDS PAGE pro koňský ferritin izolovaný ze sleziny obsahující 22 L + 2 H podjednotky; pH citrátového roztoku v rozmezí 3,0-6,0 s inkrementem 0,5. Vlevo žebříček pro srovnání velikostí (kDa).

5.2 Velikost proteinu

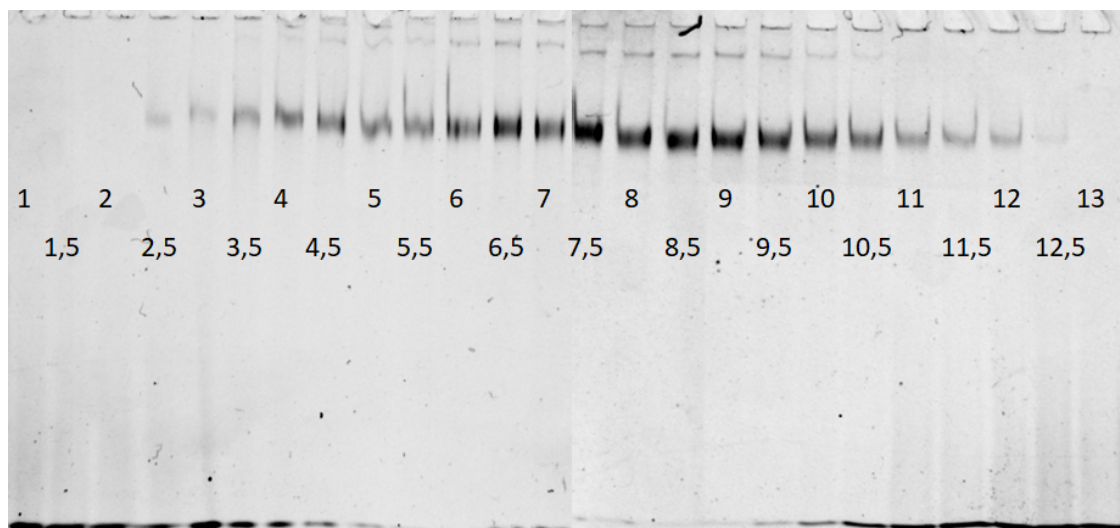
Další testovanou metodou bylo měření velikosti proteinu pomocí dynamického rozptylu světla. Z tabulky 5.1 je však zřejmé, že ani tato metoda není vhodná. V neutrálním pH tvoří ferritin monodisperzní částice (PDI 0,579) o průměrné velikosti 10 nm. Během disociace ferritinu ale dochází pravděpodobně k vytvoření agregátů uvolněných proteinových podjednotek a vzorek se stává vysoce polydisperzní (PDI > 0,300), a tedy nevhodný pro měření velikosti pomocí dynamického rozptylu světla. Příkladem je pH 3,0, při kterém dochází k vytvoření agregátů o průměrné velikosti 825 nm (s PDI 0,151) a není možné detekovat disociované podjednotky. Tvorba agregátů byla pozorována i u vysokých hodnot pH (712 nm při pH 13,0 s PDI 0,308).

Tab. 5.1: Velikost ferritinu z koňské sleziny v roztocích o různém pH. PDI označuje index polydisperzity vzorku.

pH	velikost (nm)	PDI (-)
1,0	11,696	0,633
1,5	4,187	1,000
2,0	58,771	0,582
2,5	8,721	0,489
3,0	824,992	0,151
3,5	11,696	0,623
4,0	13,545	0,954
4,5	0,621	0,475
5,0	13,545	0,426
5,5	11,696	0,410
7,0	10,100	0,579
12,5	615,139	0,570
13,0	712,370	0,308

5.3 Nativní PAGE

Pro sledování disociace ferritinu byla tedy následně použita 6% nativní PAGE. Pro koňský ferritin izolovaný ze sleziny lze vidět, že v neutrálním pH je jeho struktura sestavena, což lze pozorovat jako band separovaný přibližně v 1/3 gelu Obr. 5.2. Při snižujících a zvyšujících se hodnotách pH intenzita bandu odpovídajícího sestavenému ferritinu klesá, přičemž se ve spodní části gelu objevují disociované podjednotky. V souladu s literaturou [44] je při pH 2,5 jeho struktura rozložena kompletně. Zajímavé však je, že k částečnému rozkladu dochází už při pH 4,0, kdy se poprvé objeví výrazné podjednotky. K částečné disociaci také dochází u hodnot pH nad 10,5 a v pH 13,0 je ferritin kompletně rozložen.

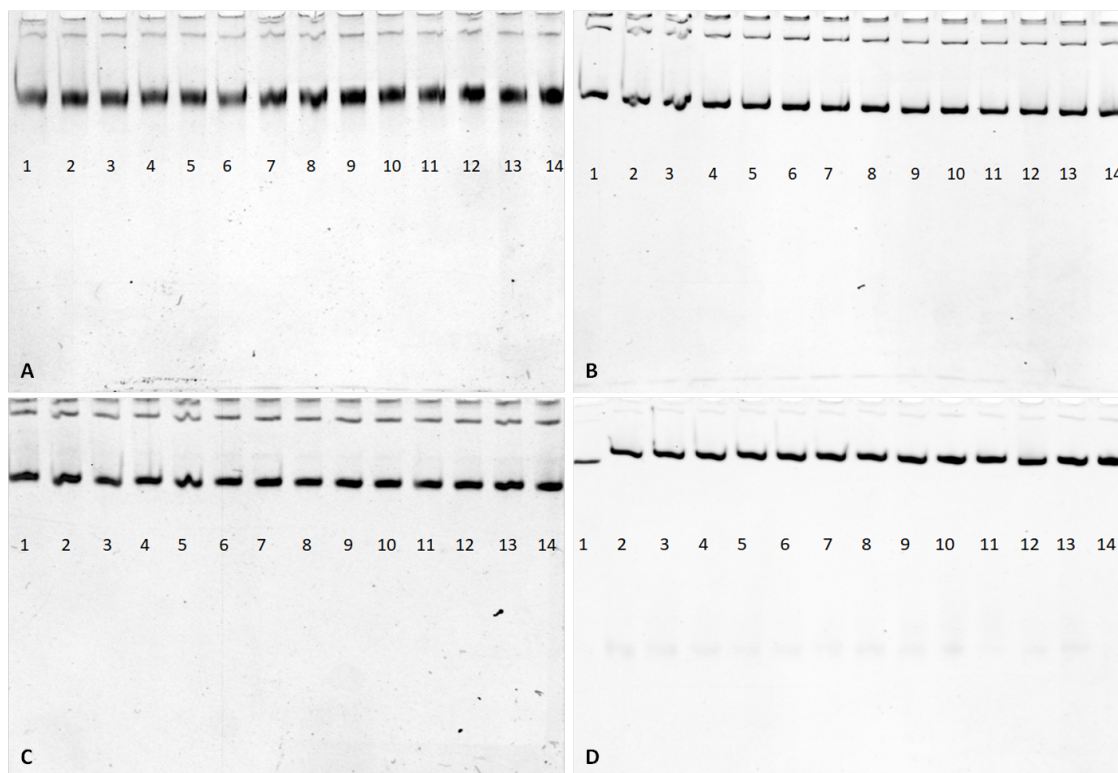


Obr. 5.2: Nativní PAGE koňského ferritinu izolovaného ze sleziny obsahujícího 22 L + 2 H podjednotky; pH roztoku v rozmezí 1,0–13,0 s inkrementem 0,5.

5.3.1 Iontová síla roztoku

Jelikož další vlastností endozomů je kromě pH také nízká iontová síla [65], byla ověřena i závislost disociace struktury ferritinů na iontové síle roztoku. V tomto experimentu byly sledovány komerční ferritin izolovaný z koňské sleziny Obr. 5.3, koňský ferritin tvořený L podjednotkami, lidský ferritin tvořený pouze H podjednotkami a PFU ferritin.

Z výsledků vyplývá, že žádný z testovaných ferritinů není závislý na iontové síle. U všech ferritinů byly v celém rozsahu iontové síly pozorovány pouze sestavené proteinové klece, bez disociovaných podjednotek. U ferritinů byla tedy dále sledována pouze jejich disociace vlivem pH.



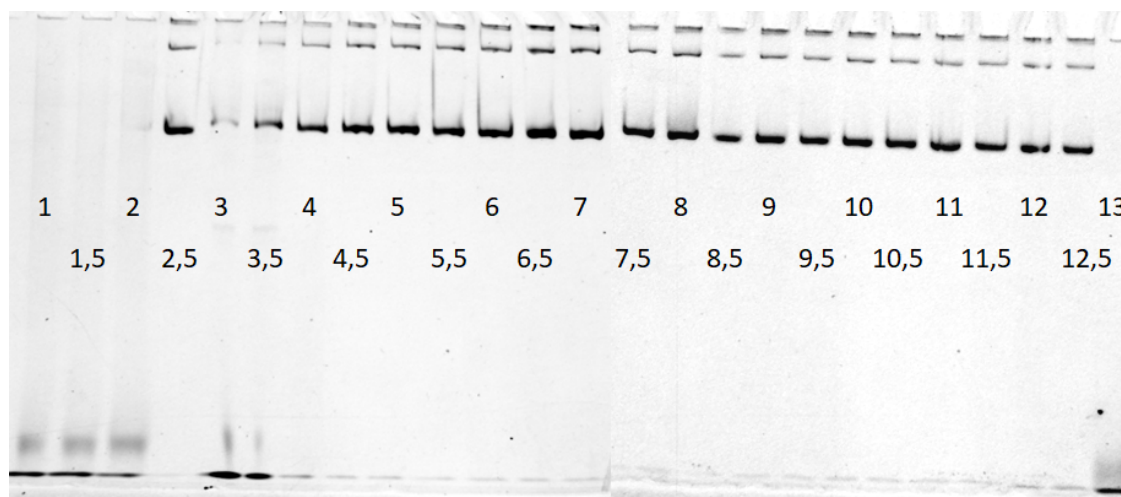
Obr. 5.3: Nativní PAGE pro roztoky o různé iontové síle. A) komerční ferritin izolovaný z koňské sleziny; B) koňský ferritin obsahující pouze L podjednotky; C) lidský ferritin bohatý na H podjednotky; D) PFU ferritin. Iontová síla: 1) 50mM HEPES + 1 000mM NaCl; 2) 50mM HEPES + 500mM NaCl; 3) 50mM HEPES + 400mM NaCl; 4) 50mM HEPES + 300mM NaCl; 5) 50mM HEPES + 200mM NaCl; 6) 50mM HEPES + 150mM NaCl; 7) 50mM HEPES + 100mM NaCl; 8) 50mM HEPES + 50mM NaCl; 9) 50mM HEPES + 25mM NaCl; 10) 50mM HEPES + 10mM NaCl; 11) 50mM HEPES + 5mM NaCl; 12) 50mM HEPES + 2,5mM NaCl; 13) 50mM HEPES + 1mM NaCl; 14) miliQ voda.

5.3.2 Hodnota pH roztoku

Po vyloučení závislosti ferritinů na iontové síle roztoku byla již sledována závislost pouze na pH roztoku, ve kterém je ferritin disociován. Proces rozložení proteinové klece do podjednotek byl testován také pomocí nativní PAGE, kdy jsou výsledky pro všechny typy ferritinů popsány níže.

Z gelu pro koňský L ferritin Obr. 5.4 je patrné, že na rozdíl od komerčního koňského ferritinu, obsahujícího 22 L + 2 H podjednotky Obr. 5.2, je koňský ferritin tvořený pouze L podjednotkami více stabilní. K částečné disociaci dochází při pH 3,5, kdy se poprvé objeví výrazné podjednotky ve spodní části gelu. Koňský L ferritin je kompletně disociován v pH 2,0, kdy už není viditelná sestavená klec v horní části

gelu, jako je tomu u vyšších hodnot pH. Podobně jako v případě ferritinu z koňské sleziny, v prostředí roztoku o pH 13,0 dochází i u koňského L ferritinu ke kompletnímu rozpadu. Tyto hodnoty pH se ale fyziologicky v organismu nevyskytují a nejsou ani vhodné pro následnou reasociaci ferritinové klece.



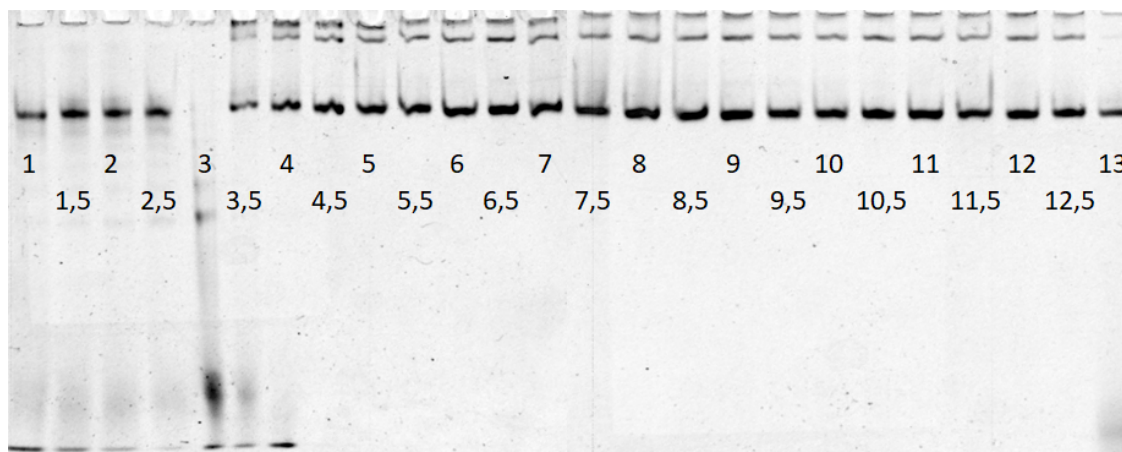
Obr. 5.4: Nativní PAGE koňského L ferritinu; pH roztoku v rozmezí 1,0-13,0 s inkrementem 0,5.

U lidského vzorku ferritinu bohatého na H podjednotky je zřejmý částečný rozpad v pH 4,0, kdy se ve spodní části objevuje výrazný band Obr. 5.5. Ke kompletnímu rozpadu proteinové klece nedojde ani při extrémních hodnotách pH roztoku, ať už kyselých, tak zásaditých. Zajímavý artefakt byl pozorován v pH 3,0, kdy došlo k blíže nespecifikované reakci rozpadu. Tento jev byl pozorován u různých typů ferritinů v tomto konkrétním prostředí. Byla tedy testována různá chemická složení pufru o pH 3,0 (citrátový pufr a fosfátový pufr), přičemž k artefaktu docházelo nezávisle na chemickém složení pufru.

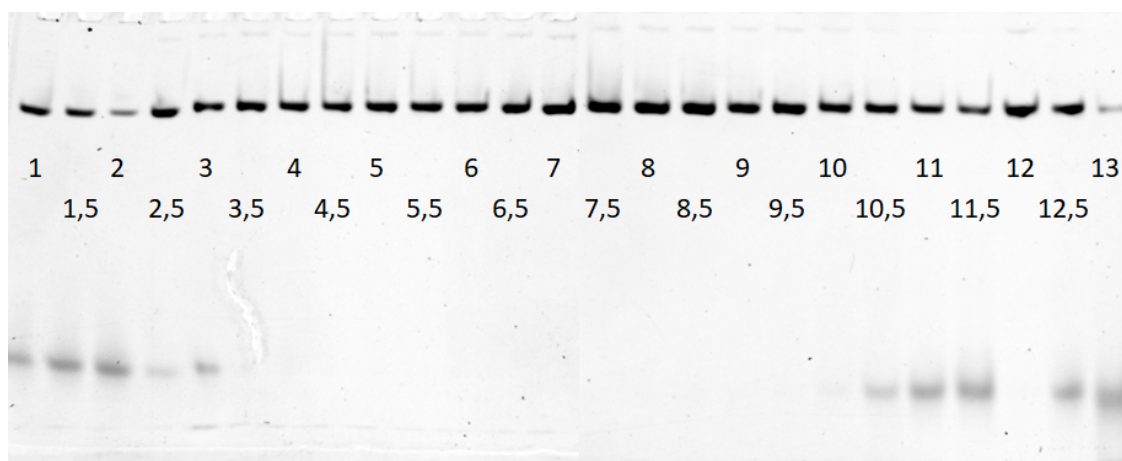
Poslední testovaný byl archeální ferritin PFU, kdy ke kompletnímu rozpadu struktury nedochází při žádné hodnotě pH, ale podjednotky jsou viditelné jak v kyselém $\text{pH} \leq 3,0$, tak v zásaditém prostředí o $\text{pH} \geq 10,5$ Obr. 5.6. Částečná disociace struktury tedy nastává za 2 možných podmínek.

Ze získaných výsledků vyplývá, že nejstabilnější je koňský L ferritin (struktura sestavená v pH 4,0-12,5, čemuž odpovídá band v horní části gelu a žádné viditelné podjednotky Obr. 5.4) a lidský H ferritin (struktura sestavená v pH 4,5-12,5 Obr. 5.5).

Naopak jako nestabilní se jeví vzorek koňského ferritinu izolovaného ze sleziny, kdy jsou viditelné podjednotky v celé škále s výjimkou pH 7,0-9,0, kdy je band v horní části gelu výrazný a pouze v tomto rozmezí je struktura sestavená Obr. 5.2. Podobně je tomu i u PFU ferritinu, který je také nestabilní jak v kyselém, tak



Obr. 5.5: Nativní PAGE lidského H ferritinu; pH roztoku v rozmezí 1,0-13,0 s inkrementem 0,5.



Obr. 5.6: Nativní PAGE ferritinu PFU; pH roztoku v rozmezí 1,0-13,0 s inkrementem 0,5.

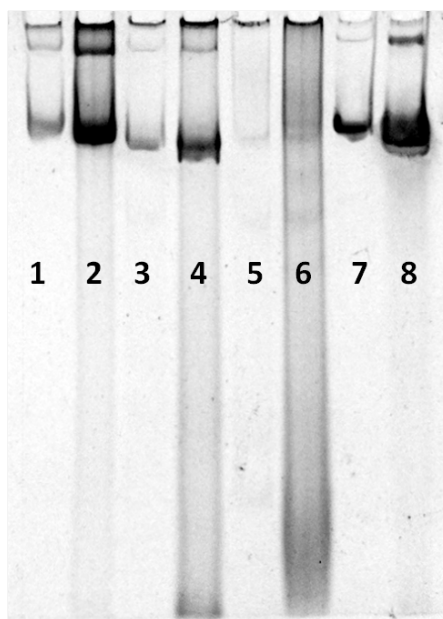
v zásaditém prostředí. Sestavenou strukturu si uchovává v roztocích o pH 3,5-10,0 Obr. 5.6.

Ke kompletnímu rozložení struktury dochází pouze u koňských ferritinů (Obr. 5.2, Obr. 5.4), kdy ve vysoce kyselém prostředí zcela zmizí band v horní části gelu – tzn. protein je kompletně disociován na podjednotky, které jsou viditelné ve spodní části gelu (s odkazem na jejich malou velikost). U lidského ferritinu (Obr. 5.5) ani u PFU (Obr. 5.6) k rozložení struktury pouze na podjednotky nedochází nikdy. V celé škále pH roztoků je alespoň částečně viditelný band v horní části gelu.

Dosažené výsledky o disociačních mechanismech ferritinů neodpovídají přesně literatuře [44], podle které by se ferritin měl zachovat v nativní struktuře při pH vyšším než 3,4 a naopak struktura se rozevřít pouze v pH pod 3,4.

5.3.3 Reasociace

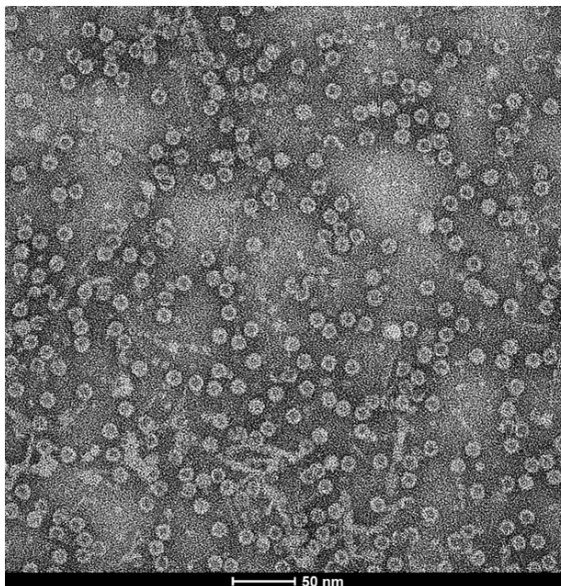
Na nativní PAGE byla testována i reasociace ferritinů Obr. 5.7. Z literatury [44] je zřejmé, že schopnost reasociace je omezená, kdy nedochází ke kompletnímu sestavení všech 24 podjednotek do sférického tvaru ferritinové proteinové klece. Tento předpoklad byl ověřen u všech testovaných proteinů. Nejefektivnější reasociace probíhá u koňského 22 L + 2 H ferritinu a PFU ferritinu, u kterých lze pozorovat band ve stejném místě jako u nativní formy vzorku bez parazitního signálu mimo tuto oblast. U koňského L reasociovaného vzorku jsou patrné podjednotky ve spodní části gelu, stejně jako je tomu u lidského reasociovaného ferritinu. To je způsobeno tím, že některé z celkových 24 podjednotek struktury se nedokázaly navrátit do původního seskupení a vytvořit sférickou proteinovou klec, zůstaly volně v roztoku. Obsah pouze H podjednotek v lidském ferritinu zřejmě způsobil tento jev. Nižší stabilita H podjednotek má za následek, že při disociaci dojde k uvolnění více podjednotek, které nemají tak vysoký počet solných můstků zajišťujících stabilitu podjednotky [41], a proto je následná reasociace méně efektivní. U koňského L ferritinu naopak mohlo dojít k vytvoření agregátů uvolněných podjednotek, které se již nebyly schopny reasociovat do původní struktury.



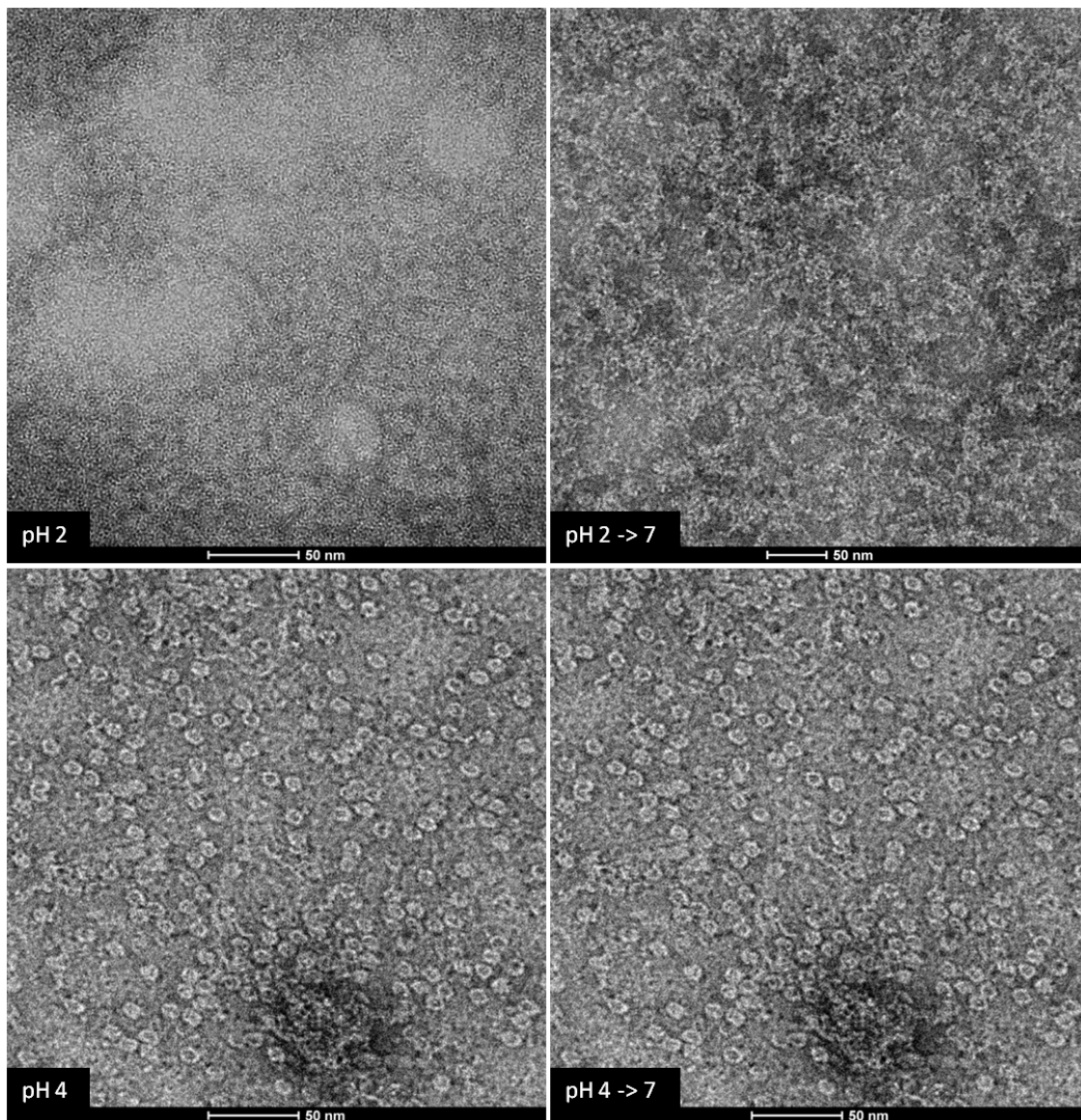
Obr. 5.7: Reasociace ferritinu. 1) nativní forma koňského 22 L + 2 H ferritinu; 2) reasociovaná forma koňského 22 L + 2 H ferritinu; 3) nativní forma koňského L ferritinu; 4) reasociovaná forma koňského L ferritinu; 5) nativní forma lidského H ferritinu; 6) reasociovaná forma lidského H ferritinu; 7) nativní forma PFU ferritinu; 8) reasociovaná forma PFU ferritinu.

5.4 Snímky z TEM

Disociační a reasociační mechanismy získané nativní PAGE byly ověřeny na TEM pro komerčně dostupný ferritin složený z 22L + 2H podjednotek. Nejdříve byl vyfocen snímek nativní formy proteinu Obr. 5.8. Na obrázku lze vidět, že při pH 7,0 je proteinová klec sestavená do dutého sférického tvaru o velikosti 12 nm. U pH 4,0 Obr. 5.9 lze sledovat částečné rozvolnění struktury, kdy je sférický tvar nekompletní, což odpovídá částečnému rozkladu na podjednotky, který byl pozorován na nativní PAGE. Kompletní rozložení proteinové klece je pozorovatelné u vzorku o pH 2,0; na snímku vidíme podjednotky válcovitého tvaru, zatímco sférický tvar odpovídající sestavené struktuře se zde nenachází. Jedná se však o nevratný proces, kdy pH 2,0 je příliš nízká hodnota, než aby byl možný proces opětovného sestavení do nativní podoby proteinu při pH 7,0. Ferritinové podjednotky prochází částečnou denaturací a strukturálními změnami [44], které nejsou slučitelné se zachováním schopnosti úspěšné reasociace. Jinak je tomu u zpětného sestavení struktury z pH 4,0. Na snímku 5.9 jsou viditelné jak struktury plně sférického tvaru, tak ty, u kterých nedošlo ke kompletnímu procesu reasociace, některé podjednotky zůstaly volně. Mechanismy disociace a reasociace bez výjimky odpovídají teoretickým předpokladům, zároveň však korespondují s výsledky získanými nativní PAGE, čímž je potvrzena možnost použití této alternativní metody.



Obr. 5.8: Nativní forma ferritinu izolovaného z koňské sleziny.



Obr. 5.9: Ferritin izolovaný z koňské sleziny disociován v pH 2,0 (vlevo nahoře) a reasociován (vpravo nahoře); disociován v pH 4,0 (vlevo dole) a reasociován (vpravo dole).

6 Enkapsulace cytostatického léčiva

Výsledky získané pomocí nativní PAGE vedly k získání informací o procesu disociace ferritinových podjednotek. Poznatky o pH roztoku, ve kterém se ferritin rozpadá, byly otestovány spolu s návratem na neutrální pH o hodnotě 7,0, kdy se struktura proteinu opět sestavuje a lze do jeho dutiny enkapsulovat nízkomolekulární léčivo.

V této práci byl testován doxorubicin. Jedná se o jedno z nejčastěji používaných chemoterapeutik pro léčbu nádorových onemocnění [66]. Ačkoli jeho schopnost inhibice rychle se dělících buněk je známa již několik desetiletí, terapeutická dávka je limitována vysokou toxicitou pro zdravé buňky, především jeho kumulativní kardiotoxicitou [67].

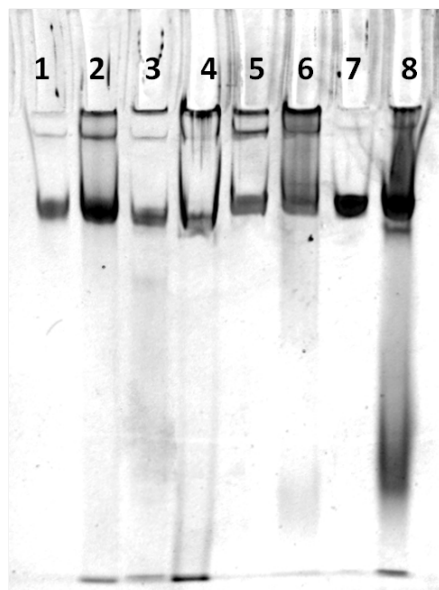
Směs ferritinových podjednotek a molekuly doxorubicinu vytváří základní roztok pro proces enkapsulace. Zvýšením hodnoty pH tohoto roztoku je struktura apoferritinu reasociována, přičemž molekuly doxorubicinu jsou zapouzdřeny uvnitř dutiny.

6.1 Kolokalizace doxorubicinu s proteiny ferritinu na nativní PAGE

Proces disociace a reasociace byl sledován u ferritinu izolovaného z koňské sleziny obsahujícího 22L + 2H podjednotky pro pH 4,0, kdy dochází k částečnému rozpadu struktury; u koňského L ferritinu pro pH 3,5; lidského ferritinu obsahujícího H podjednotky pro pH 4,0 a také u PFU pro pH 3,0 Obr. 6.1.

Po separaci reasociovaných ferritinů na nativní PAGE a následném obarvení gelu pomocí rychlého barvení coomassie modří pak lze potvrdit, zda došlo k návratu struktury do nativní podoby. Z obrázku 6.1 lze potvrdit úspěšnou reasociaci u všech sledovaných vzorků na základě porovnání reasociované formy (jamky gelu číslo 2, 4, 6 a 8) s nativní podobou proteinu (jamky 1, 3, 5 a 7). Lze však vidět, že ani u jednoho z ferritinů nebyla reasociace kompletní, jelikož jsou u všech pozorovány uvolněné podjednotky. Nejhorších výsledků bylo dosaženo u PFU ferritinu, kde je i po reasociaci stále možné pozorovat výrazné disociované podjednotky. Výsledky lidského a obou koňských ferritinů jsou pak velice podobné a množství stále disociovaných podjednotek je u těchto 3 typů malé.

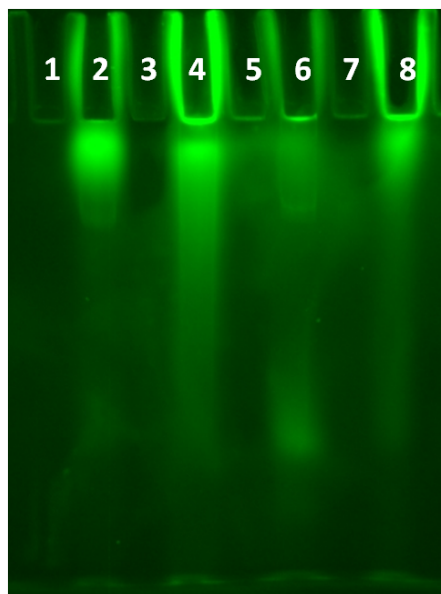
S využitím fluorescence doxorubicinu (po excitaci při 480 nm) bylo na nativní PAGE možné pozorovat, zda byl během procesu disociace a reasociace doxorubicin enkapsulován do dutiny ferritinu nebo se ve vzorku nacházel ve volné formě Obr. 6.2. Doxorubicin, který fluoreskuje zelenou barvou, je ve vzorcích přítomen. U kontrolních vzorků samotných ferritinů v jamkách gelu s čísly 1, 3, 5 a 7 se doxorubicin



Obr. 6.1: Reasociace ferritinových klecí po částečné disociaci – 6% nativní PAGE po obarvení coomassie modří: 1) koňský ferritin 22L + 2H podjednotky; 2) koňský ferritin 22L + 2H podjednotky po disociaci a reasociaci; 3) koňský L ferritin; 4) koňský L ferritin po disociaci a reasociaci; 5) lidský H ferritin; 6) lidský H ferritin po disociaci a reasociaci; 7) PFU ferritin; 8) PFU ferritin po disociaci a reasociaci.

nevyskytuje, a není tak vidět jeho fluorescence. Naopak po enkapsulaci doxorubicinu do jednotlivých ferritinů (jamky gelu číslo 2, 4, 6 a 8) lze pozorovat silnou fluorescenci, jejíž lokalizace se liší v závislosti na typu ferritinu.

U komerčního koňského apoferritinu s enkapsulovaným doxorubicinem (apodox) v jamce číslo 2 lze vidět, že ne všichni doxorubicin se enkapsuloval do proteinové klece, ale fluoreskuje i volný doxorubicin v řasinkách gelu. Většina molekul doxorubicinu je ale kolokalizována s reasociovanou klecí ferritinu v horní části gelu. Tento apodox je složen z 22L + 2H podjednotek. Koňský apodox složený pouze z L podjednotek (jamka 4) také vykazoval kolokalizaci doxorubicinu s proteinovou klecí, ale s nižší úspěšností enkapsulace, jak lze usuzovat z vyššího množství fluoreskujícího doxorubicinu v řasinkách.



Obr. 6.2: Enkapsulace doxorubicinu – fluorescence doxorubicinu: 1) koňský ferritin 22 L + 2 H podjednotky; 2) koňský ferritin 22 L + 2 H podjednotky s doxorubicinem; 3) koňský L ferritin; 4) koňský L ferritin s doxorubicinem; 5) lidský H ferritin; 6) lidský H ferritin s doxorubicinem; 7) PFU ferritin; 8) PFU ferritin s doxorubicinem.

6.2 Charakterizace

K efektivní enkapsulaci (60 %) došlo v případě apodox lidského vzorku bohatého na H podjednotky, což by mohlo korespondovat právě se složením podjednotek ferritinu Tab. 6.1. Díky strukturálním vlastnostem je apoferritin bohatý na L podjednotky mnohem stabilnější než apoferritin bohatý na H podjednotky [41]. V případě ferritinů bohatých na L podjednotky tedy zřejmě nedojde k dostatečnému rozvolnění struktury, aby se mohl všechen doxorubicin úspěšně enkapsulovat, zatímco lidský ferritin bohatý na H podjednotky se rozložil úspěšně a doxorubicin byl zapouzdřen ve vyšší míře. Tomu odpovídá i rozdíl mezi koňskými vzorky, kdy ferritin obsahující 22 L + 2 H podjednotky (jamka gelu číslo 2, enkapsulační výtěžnost 63 %) má méně doxorubicinu v řasinkách v porovnání s ferritinem pouze z L podjednotek (jamka gelu číslo 4, enkapsulační výtěžnost 42 %). PFU ferritin je svým složením blíže L ferritinům, což odpovídá podobnému množství rezidua doxorubicinu v řasinkách gelu. Co se týče enkapsulační výtěžnosti, překvapivě dosahuje nejvyšší hodnoty ze všech testovaných vzorků (85 %). Z vícenásobného zarovnání aminokyselinových sekvencí ferritinů Obr. 4.1 je však zřejmý velký rozdíl ve složení oproti ostatním testovaným ferritinům. I přesto, že je svým složením blíže L ferritinům, je jim evolučně velmi vzdálený (0,6504 Obr. 4.2). Pravděpodobně je tak schopnost PFU enkapsulovat cytostatické léčivo ovlivněna i jinými faktory.

Vlivem enkapsulace nebyla překročena hranice velikosti 200 nm, což je limit pro úspěšnost nanotransportéru, u žádného z ferritinů. Nádory mají ve srovnání se zdravou tkání cévy s narušeným endotelem, což způsobuje jejich netěsnost. Nanočástice jsou přijímány přednostně do nádorové tkáně přes penetrovaný endotel nádorového cévního zásobení a jsou zde akumulovány v důsledku snížené lymfatické drenáže – EPR efekt [5]. Všechny apodox komplexy mají záporný náboj, stejně jako v nativní formě.

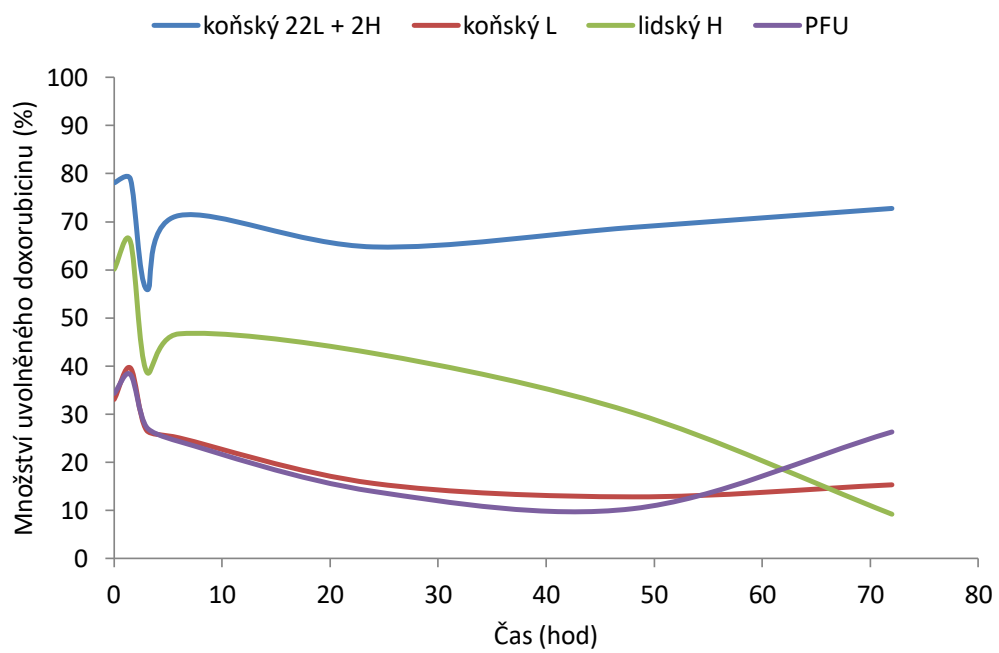
Kombinací všech zjištěných vlastností se jako optimální jeví lidský H ferritin. Nízká hodnota PDI (0,260 dle Tab. 6.1) koresponduje se systémem obsahujícím částice o velikostech, které se od sebe příliš neliší. Nedochází tedy k rozsáhlé fragmentaci ani agregaci podjednotek. Pro lidského pacienta představuje použití lidského ferritinu minimální riziko imunitní odpovědi organismu. Se svou enkapsulační výtěžností a diskutovanými vlastnostmi se tedy lidský H ferritin jeví jako nejvhodnější z testovaných ferritinů.

Tab. 6.1: Zhodnocení apodox komplexů z hlediska velikosti, PDI, ζ -potenciálu a enkapsulační výtěžnosti doxorubicinu.

typ apodox	velikost (nm)	PDI (-)	ζ -potenciál (mV)	enkapsulační výtěžnost doxorubicinu (%)
koňský 22 L + 2 H	68	0,226	-22,1	63
koňský L	44	0,762	-16,7	42
lidský H	106	0,260	-15,0	60
PFU	33	0,343	-21,0	85

Vzhledem k tomu, že intravenózní podání je hlavním způsobem administrace cytostatických léčiv, jedním z důležitých parametrů účinného nanotransportéru léčiv je stabilita enkapsulace přenášených molekul v prostředí krve [74]. Proto byla studována dlouhodobá (až 72 hod) stabilita získaných apodox komplexů v roztoku simulujícím krevní plasmu Obr. 6.3.

Pro koňský 22 L + 2 H ferritin je množství uvolněného doxorubicinu do roztoku 80 %, což znamená, že pouze 20 % zůstalo enkapsulováno, a tento ferritin tak dosahuje nejhorších výsledků. U koňského L ferritinu a PFU ferritinu se v čase asi 2 hod uvolní 40 % doxorubicinu, ten je ale později opět asociován a komplex je poměrně stabilní na hodnotě blízké 15 % uvolněného doxorubicinu. Po 48 hod u PFU ferritinu dochází ke zvýšené míře uvolňování doxorubicinu (až na 26 % po 72 hod). Lidský H ferritin má sice v čase 2 hod uvolněno 65 % doxorubicinu, důležitou vlastností je ale časová stabilita, kdy se s prodlužující se dobou komplex stává stabilnějším a množství uvolněného chemoterapeutika volně do roztoku klesá na 10 % po 72 hod Obr. 6.3.



Obr. 6.3: Graf množství uvolněného doxorubicinu v závislosti na čase, hodnoty získané ze supernatantu.

7 Využití komplexů ferritin-doxorubicin pro terapii maligních karcinomů prsu

Karcinom prsu je hlavní příčinou úmrtí na nádorová onemocnění u žen po celém světě. Studie založené na profilech genové exprese identifikovaly různé molekulární subtypy nádorů prsu, jako jsou lumenální A a B buňky a nádorové buňky. Jejich charakteristikou jsou pozitivita nebo negativita na estrogenový receptor (ER), progesteronový receptor (PR) a lidský epidermální růstový faktor 2 (HER2) [68].

Nejběžněji diagnostikovaný subtyp karcinomu prsu je subtyp pozitivní na estrogenový receptor (ER +). Přibližně dvě třetiny pacientů s karcinomem prsu jsou diagnostikovány s nádory pozitivními na hormonální receptor. U pokročilých onemocnění prokázala endokrinní terapie účinnost u více než poloviny pacientů. Bohužel se často objevuje rezistence, a to jak *de novo*, tak získaná později, což činí výzkum zvláště relevantním pro inovativní léčbu [69].

Pro terapii apodox komplexu byly vybrány následující karcinomy prsu, které kombinují různé subtypy nádorů Tab. 7.1. Tyto rozdíly pak ovlivňují senzitivitu na léčbu. Jako kontrolní buněčná linie byla zvolena HBL-100, jež byla získána z primárních kultur buněk odvozených ze vzorku časně laktace lidského mléka. U dárce mléka nebyl prokázán výskyt prsní léze. Jedná se tak o zdravé buňky prsní tkáně [70].

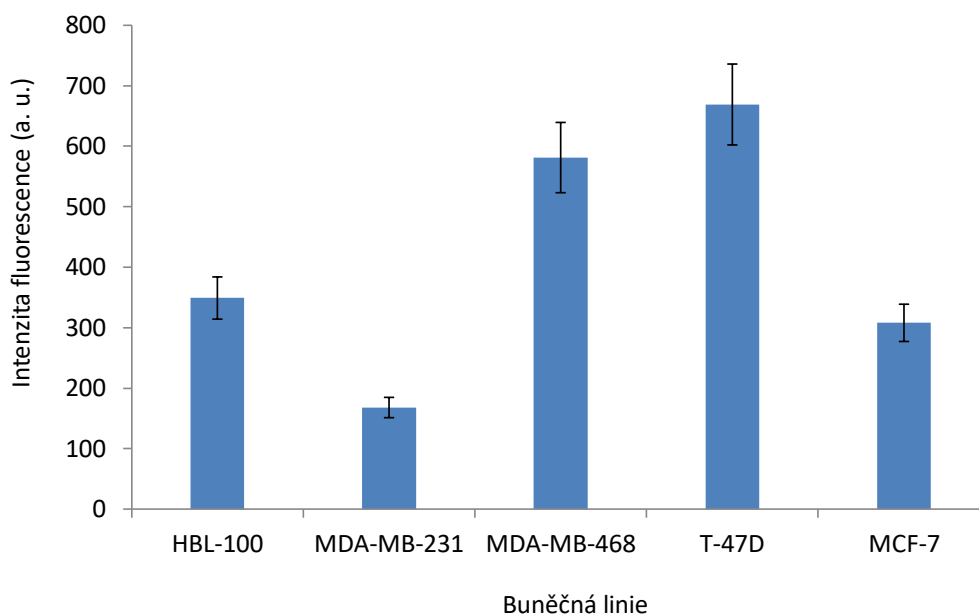
Tab. 7.1: Charakteristika maligních karcinomů prsu pro terapii. ER – estrogenový receptor; PR – progesteronový receptor; HER2 – lidský epidermální růstový faktor 2; negativní (-); pozitivní (+) [70].

název	ER	PR	HER2
MDA-MB-231	-	-	-
MDA-MB-468	-	-	-
T-47D	+	+	-
MCF-7	+	+	-

Z tabulky vyplývá, že MDA-MB-231 a MDA-MB-468 jsou histologicky shodné, stejně jako T-47D a MCF-7. MDA-MB-231 linie je ideálním modelem chemoresistentních karcinomů, MDA-MB-468 často na chemoterapii velice dobře reaguje, MCF-7 je většinou perfektním modelem pro hormonální terapii.

7.1 Expresní profil SCARA5 a TfR1 u maligních a nemaligních prsních linií

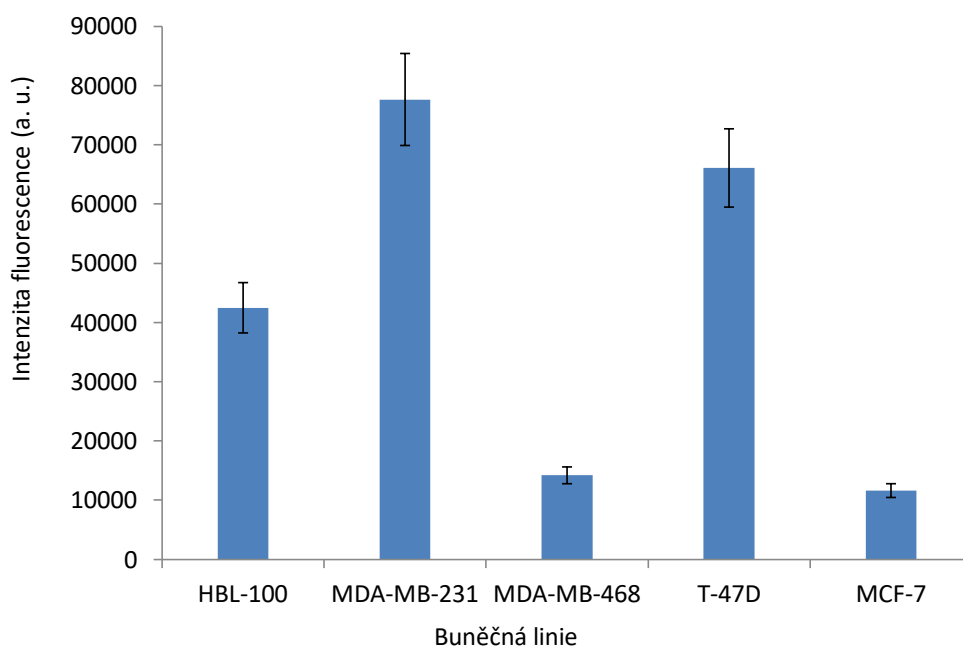
U maligních karcinomů prsu, stejně jako u kontrolní zdravé tkáně prsu byla sledována exprese dvou typů receptorů: SCARA5 a TfR1. Zatímco ferritin bohatý na L podjednotky je do buněk internalizován pomocí SCARA5 [59], ferritin s převahou H podjednotek se váže na TfR1 [33]. Expresní profily těchto dvou receptorů se mezi buněčnými liniemi liší. Vysoké míry exprese SCARA5 dosahuje MDA-MB-468 a T-47D; MDA-MB-231 spolu s MCF-7 mají dokonce nižší expresi než zdravé buňky HBL-100 Obr. 7.1.



Obr. 7.1: Expresní profil receptoru SCARA5 u buněčných linií.

U TfR1 dosahuje nejvyšší míry exprese MDA-MB-231 a T-47D, naopak linie MDA-MB-468 a MCF-7 mají čtyřnásobně nižší expresi než zdravé buňky HBL-100 Obr. 7.2. Tyto rozdíly jsou jednou z motivací výběru více buněčných linií, protože ačkoli jsou dvojice MDA-MB-231 a MDA-MB-468; T-47D a MCF-7 histologicky totožné, v jiných aspektech se liší.

Z expresních profilů obou typů receptorů vyplývá, že u linie T-47D by mělo docházet k úspěšné internalizaci ferritinů jak s převahou L podjednotek, tak H podjednotek; expresní profil SCARA5 i TfR1 je totiž vysoký. Naopak je tomu u linie MCF-7, která obsahuje nejméně receptorů ze všech studovaných linií, dokonce méně než kontrolní zdravé buňky HBL-100. Nízká míra exprese SCARA5, vysoká míra exprese TfR1 u MDA-MB-231 by měla odpovídat úspěšné internalizaci H podjednotek (lidského H ferritinu, případně koňského 22 L + 2 H ferritinu) a nízké internalizaci



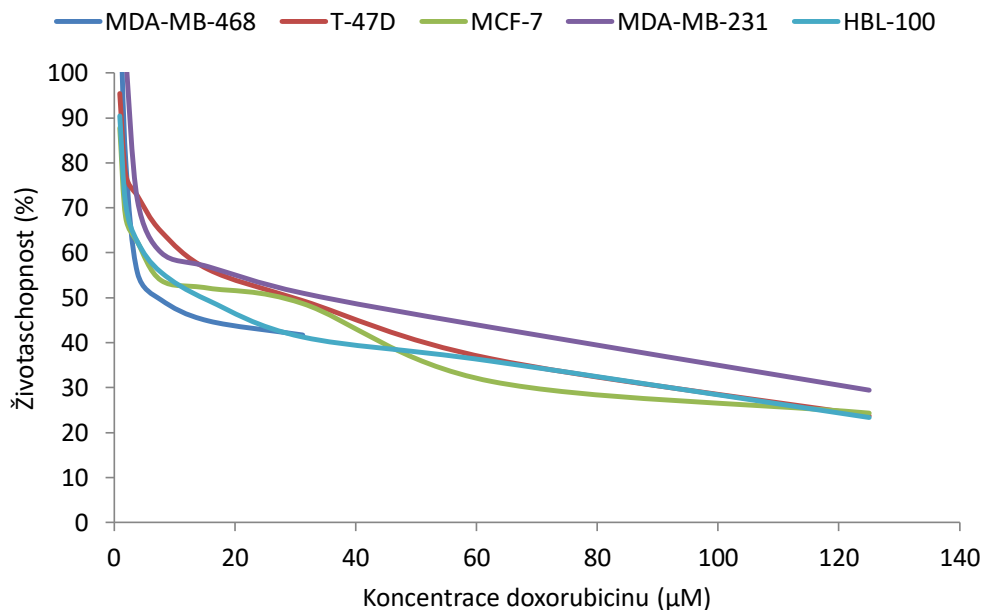
Obr. 7.2: Expresní profil receptoru Tfr1 u buněčných linií.

podjednotek L (koňského L ferritinu). Přesně naopak by tomu mělo být u druhé tripl negativní linie MDA-MB-231.

7.2 Citlivost prsních linií na léčbu doxorubicinem

Citlivost prsních linií na léčbu doxorubicinem byla ověřena MTT testem. Jedná se o kolorimetrický test, který měří metabolickou aktivitu buněk a je vhodný pro analyzování jejich proliferace, životaschopnosti a cytotoxicity materiálu. Termínem životaschopnost se rozumí určení poměru živých a mrtvých buněk v populaci. Test je založen na redukci žluté solubní tetrazoliové soli MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-difenylyltetrazolium bromid) na nerozpustný formazan, který je ve formě modrých krystalků. Reakce probíhá na mitochondriální membráně vlivem mitochondriálních dehydrogenas živých buněk. Počet živých buněk je tedy indikován množstvím redukovaného MTT. Formazanové krystalky se následně rozpustí přidáním okyseleného izopropanolu a spektrofotometricky se stanoví hodnota absorpance roztoku. Protože transformace je možná pouze v životaschopných buňkách, množství modrého formazanu je úměrné počtu těchto buněk [71].

Pro možnost sledování cytotoxicity apodox komplexů bylo nejdříve nutné zjistit cytotoxicitu samotného doxorubicinu na vybrané prsní linie. Z grafu 7.3 je zřejmé, že všechny prsní linie reagují na doxorubicin podobně (s výjimkou MDA-MB-468 a HBL-100 linie, které jsou na doxorubicin citlivější), proto následující experimenty



Obr. 7.3: Vliv koncentrace doxorubicinu na životaschopnost buněk u vybraných prsních linií.

nebudou tímto faktorem ovlivněny. V tabulce 7.2 jsou uvedeny koncentrace doxorubicinu, při kterých byla právě polovina buněk životaschopná. Jako optimální koncentrace doxorubicinu pro následující experimenty byla zvolena koncentrace $25\mu\text{M}$.

Tab. 7.2: Koncentrace doxorubicinu, při které je životaschopnost buněk 50 % pro vybrané buněčné linie.

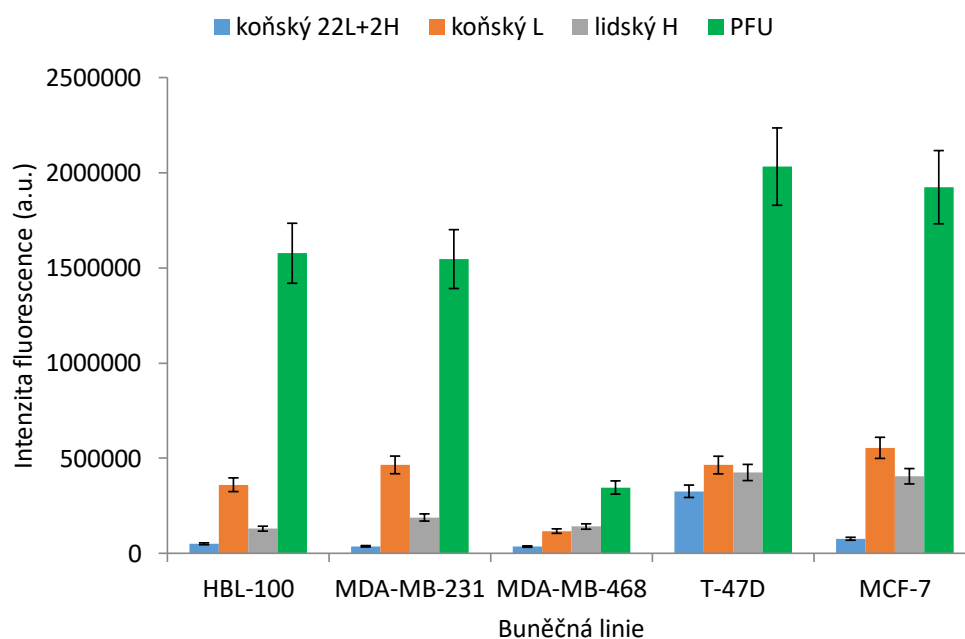
buněčná linie	koncentrace doxorubicinu (μM)
HBL-100	14
MDA-MB-231	30
MDA-MB-468	8
T-47D	30
MCF-7	27

7.3 Asociace ferritinů s buňkami prsních linií

V tomto experimentu byla sledována asociace jednotlivých ferritinů s použitými buňkami, která je nutným předpokladem pro jejich internalizaci do těchto buněk. U všech prsních linií je patrná nejvyšší míra asociace PFU ferritinu. Jelikož z literatury není známý žádný mechanismus internalizace tohoto archeálního ferritinu

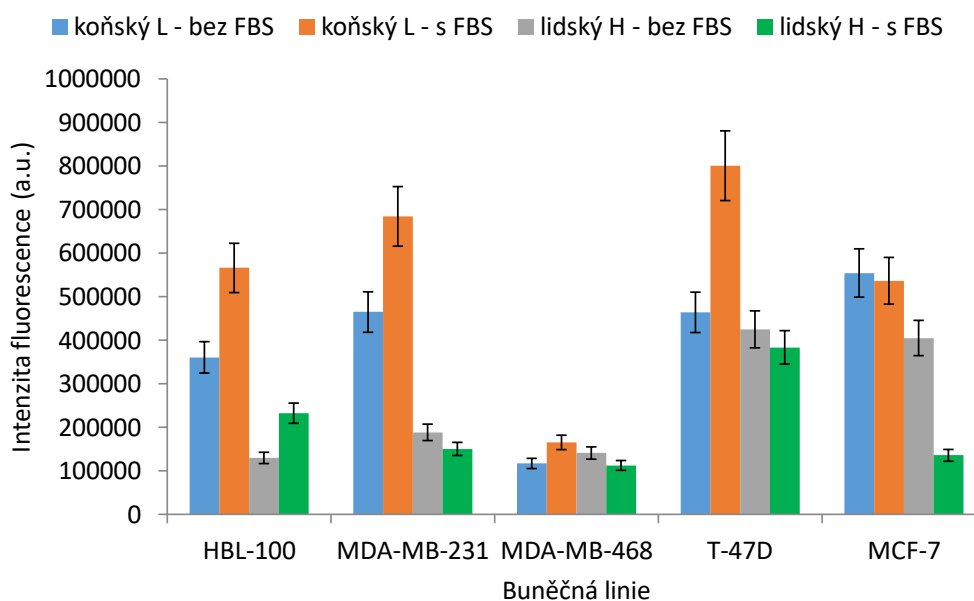
do eukaryotických buněk, nelze říct, čím je tento trend způsoben. Zajímavých výsledků bylo dosaženo i u linie MCF-7. Ačkoli obsahuje nejmenší množství SCARA5 a TfR1 receptorů, asociace všech ferritinů je vysoká. Zřejmě se jedná o jinou formu internalizace, která v literatuře zatím nebyla popsána.

Linie T-47D obsahuje nejvíce SCARA5 i TfR1, což odpovídá velice podobné asociaci všech ferritinů, bez rozdílu složení jejich podjednotek Obr. 7.4. Ačkoli výsledky korelují s expresními profily, nutno zmínit, že průtokový cytometr nerozlišuje mezi internalizací dovnitř buněk a asociací s povrchem buněčné membrány. Výsledkem fluorescenčního měření je informace o přítomnosti fluorescenčně označeného ferritinu, nikoli o jeho lokalizaci.



Obr. 7.4: Intenzita fluorescence korespondující s mírou asociace ferritinů s buněčnými liniemi, bez FBS.

Asociace ferritinů s buňkami prsních linií byla zkoumána za dvou podmínek: přítomnost nebo absence fetálního bovinního séra (FBS), které obsahuje proteiny, hormony a růstové faktory pro podporu růstu buněk. Přítomnost FBS znamená vyšší pravděpodobnost tvorby proteinových korun na povrchu ferritinů. Tím by mohla být nanočástice ovlivněna jak z hlediska schopnosti internalizace z důvodu změny její biologické identity vedoucí k nerozpoznání receptorem, tak z důvodu velikosti [72]. Obsah média byl zkoumán u všech prsních linií, rozdíl v internalizaci mezi FBS pozitivním a FBS negativním prostředím byl sledován pouze u koňského L ferritinu a lidského H ferritinu Obr. 7.5. Přítomnost FBS má u lidského H ferritinu za následek nižší míru internalizace do buněčných linií, u koňského L ferritinu je tomu naopak.



Obr. 7.5: Intenzita fluorescence korespondující s mírou asociace vybraných dvou ferritinů bez FBS a s FBS.

7.4 Vliv komplexů ferritin-doxorubicin na životaschopnost buněk

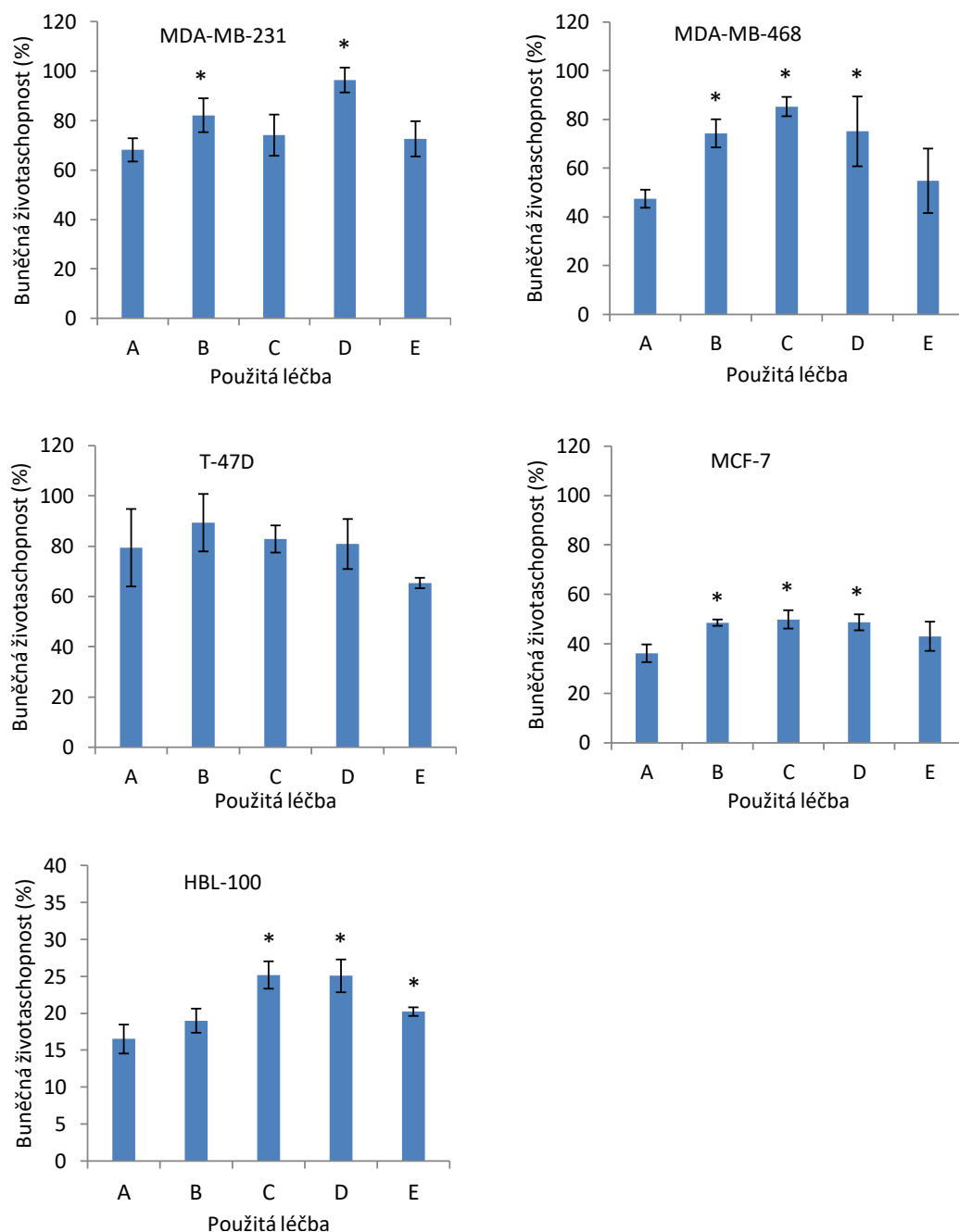
Pro zjištění vlivu komplexů ferritin-doxorubicin na životaschopnost buněk byly provedeny následující experimenty: MTT test apodox komplexů, vypovídající o metabolické aktivitě buněk; mechanismus cytotoxicity, vypovídající o množství buněk procházejících apoptózou; scratch test, který odpovídá vlivu na proliferaci buněk.

7.4.1 MTT test apodox komplexů

Cílem MTT testu je ověření vlivu apodox komplexů na životaschopnost buněčných linií po 24 hod inkubaci. T-47D nevykazuje u žádné nanoformulace statisticky signifikantní rozdíl v porovnání s léčbou volným doxorubicinem, u všech ostatních linií jsou však rozdíly patrné Obr. 7.6.

Zdravá linie HBL-100 je v porovnání s léčbou doxorubicinem chráněna všemi navrženými apodox komplexy. Například koňský L ferritin tuto linii chrání nejvíce, obecně je ale málo toxický pro všechny buněčné linie (vysoká hodnota životaschopnosti buněk), proto pro terapii vhodný není. Lidský H ferritin a PFU ferritin chrání zdravé buňky HBL-100 linie, ale úspěšně snižují životaschopnost nádorových buněk (s výjimkou MDA-MB-231).

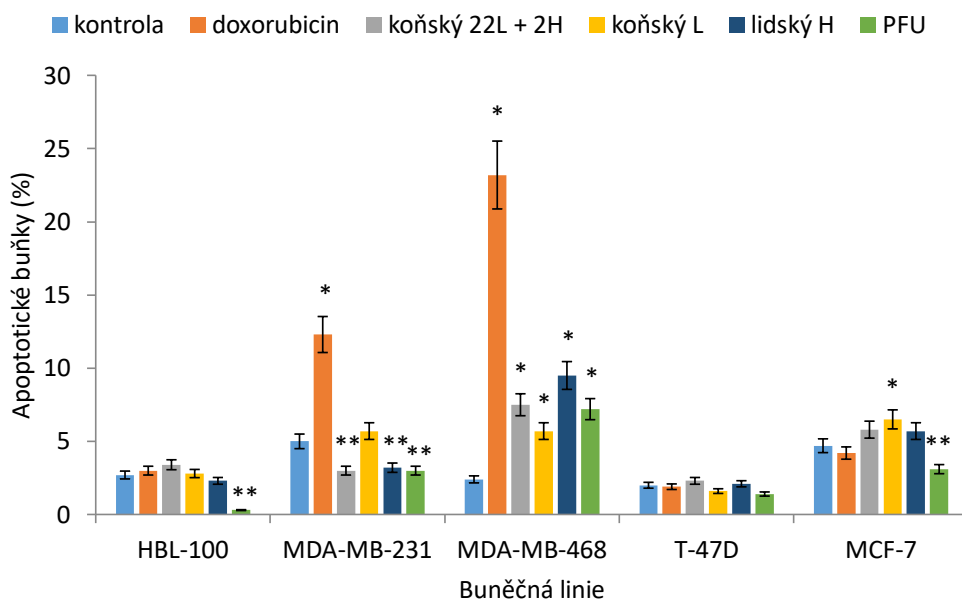
Obecně dosahují zdravé buňky HBL-100 maximálně 30% životaschopnosti buněk, což je poměrně nízká hodnota. Nutno podotknout, že ferritin v této formulaci je pouze základním materiálem a bylo by vhodné modifikovat jeho povrch pro aktivní cílení, které dosahuje uspokojivějších výsledků a zdravé buňky ochrání lépe [73].



Obr. 7.6: Vliv apodox komplexů na životaschopnost buněčné linie. A) doxorubicin; B) koňský 22 L + 2 H apodox; C) koňský L apodox; D) lidský H apodox; E) PFU apodox. Symbol * označuje statisticky signifikantní nárůst, vztaženo k volnému doxorubicinu.

7.4.2 Mechanismus cytotoxicity

Pro zjištění mechanismu cytotoxicity použitých nanoformulací byla testována míra indukce apoptózy ve sledovaných buňkách. Množství apoptotických buněk odpovídá cytotoxicitě navržených apodox komplexů. Z grafu 7.7 je patrné, že nejlepších výsledků dosahují lidský H ferritin a PFU ferritin, které nejvíce chrání zdravé HBL-100, zároveň ale na některé buňky působí ještě lépe než volný doxorubicin (např. MCF-7). Zajímavá je citlivost prsních linií MDA-MB-468 a MDA-MB-231, kdy jsou sice nejvíce rezponzivní na doxorubicin, nanoformulace apodox u nich však dosahují jen necelé poloviny míry apoptózy. Terapie apodox komplexy u těchto linií tedy není úspěšná. Naopak u T-47D a MCF-7 dosahuje terapie apodox komplexy srovnatelných nebo dokonce lepších výsledků v porovnání s volným doxorubicinem. Možným vysvětlením je histologická specifikace těchto linií.



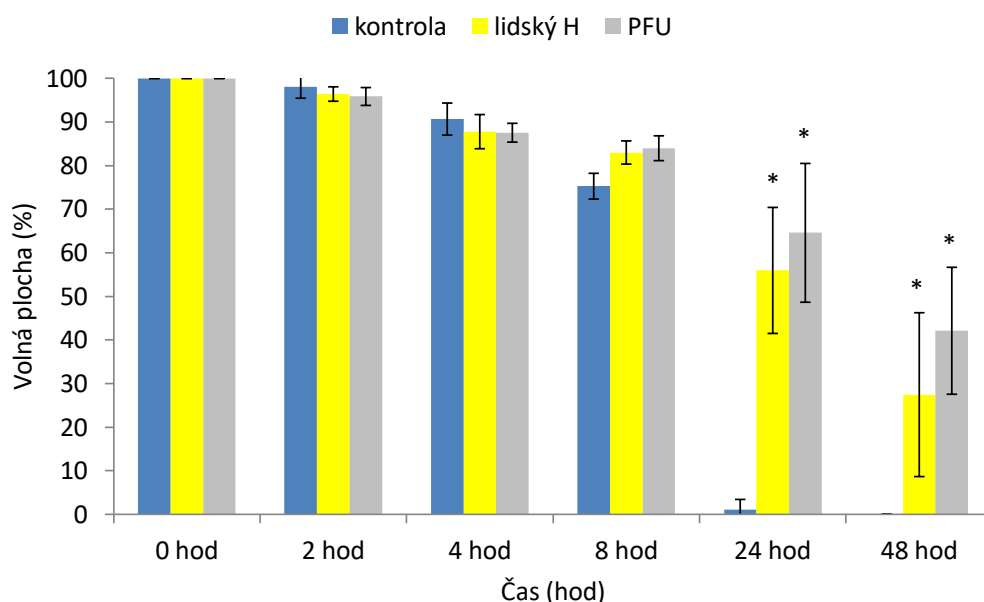
Obr. 7.7: Míra apoptózy vyvolaná u buněčných linií vlivem použitého léčiva. Symbol * označuje statisticky signifikantní nárůst apoptózy, symbol ** označuje statisticky signifikantní pokles apoptózy, vztaženo na kontrolu.

7.4.3 Scratch test

Zatímco výše uvedené experimenty vypovídaly o schopnosti apodox komplexů internalizovat do buněk a jejich následné cytotoxicitě, výstupem scratch testu je schopnost migrace buněk a jejich proliferační potenciál. Protokol je následující: kompaktnost buněčné linie je narušena vytvořením umělého zranění (čas 0 hod) a takto vytvořená plocha je označena jako 100 %. V následujících časových bodech měření je

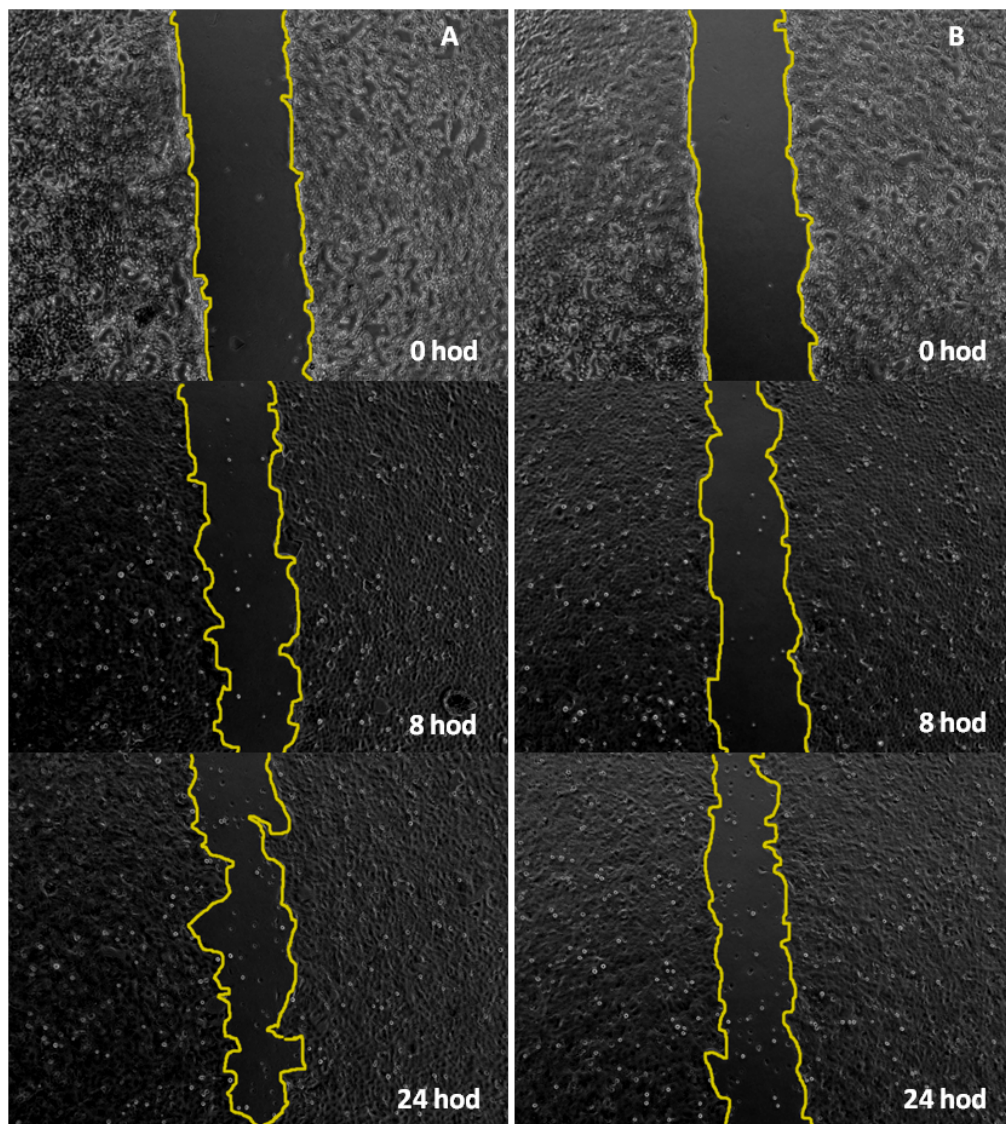
vypočteno, kolik procent z původní volné plochy zůstává. Číslo 0% znamená, že celá plocha znovu zarostla a zranění už v obraze není detekovatelné. V ideálním případě by se zranění v případě nádorových buněk po léčbě apodox komplexu nemělo časem měnit – buňky by neměly mít schopnost proliferovat [74]. U žádné z prsních linií tomu tak nebylo. Z toho lze usuzovat, že pokud po odstranění nádorové tkáně z těla pacienta nějaké nádorové buňky v organismu zůstanou, existuje možnost znovuvytvoření maligní nádorové tkáně. Schopnost migrace a proliferace zůstává u buněk zachována i přes prokázanou toxicitu nanoformulací.

Jako příklad jsou níže uvedeny dvě linie – zdravá prsní tkáň HBL-100 a karcinom prsu T-47D. Z grafu 7.8 je vidět, že lidský H ferritin a PFU ferritin vykazují po 8 hod schopnost zabránit zarůstání volné plochy v porovnání s kontrolními neléčenými buňkami. Směrodatné odchylky po 24 hod, respektive 48 hod dosahují velkých hodnot, z čehož lze usuzovat velké rozdíly mezi jednotlivými místy zarůstání destičky. Zarůstání volné plochy je demonstrováno i na snímcích z mikroskopu Obr. 7.9.

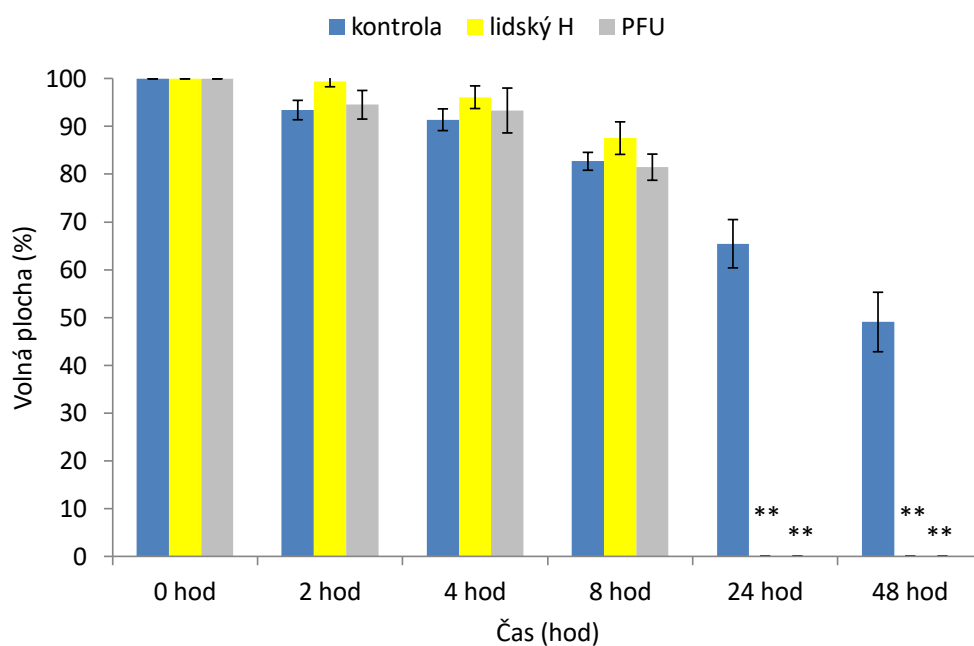


Obr. 7.8: Časový vývoj volné plochy po vytvoření umělého zranění v buněčné linii HBL-100. Symbol * označuje statisticky signifikantní nárůst volné plochy, vztaženo na kontrolu.

Časový vývoj volné plochy po vytvoření umělého zranění v nádorové linii T-47D je uspokojivý do času 8 hod. Neléčené buňky pokrývají menší plochu než buňky léčené lidským H a PFU apodox. Po uplynutí 24 hod však dojde ke kompletnímu zacelení rány, což by znamenalo schopnost znovuvytvoření nádorové tkáně v místě předchozího odstranění Obr. 7.10.



Obr. 7.9: Časový vývoj volné plochy po vytvoření umělé rány v buněčné linii HBL-100, kde A) lidský H apodox; B) PFU apodox.



Obr. 7.10: Časový vývoj volné plochy po vytvoření umělé rány v buněčné linii T-47D. Symbol ** označuje statisticky signifikantní pokles volné plochy, vztaheno na kontrolu.

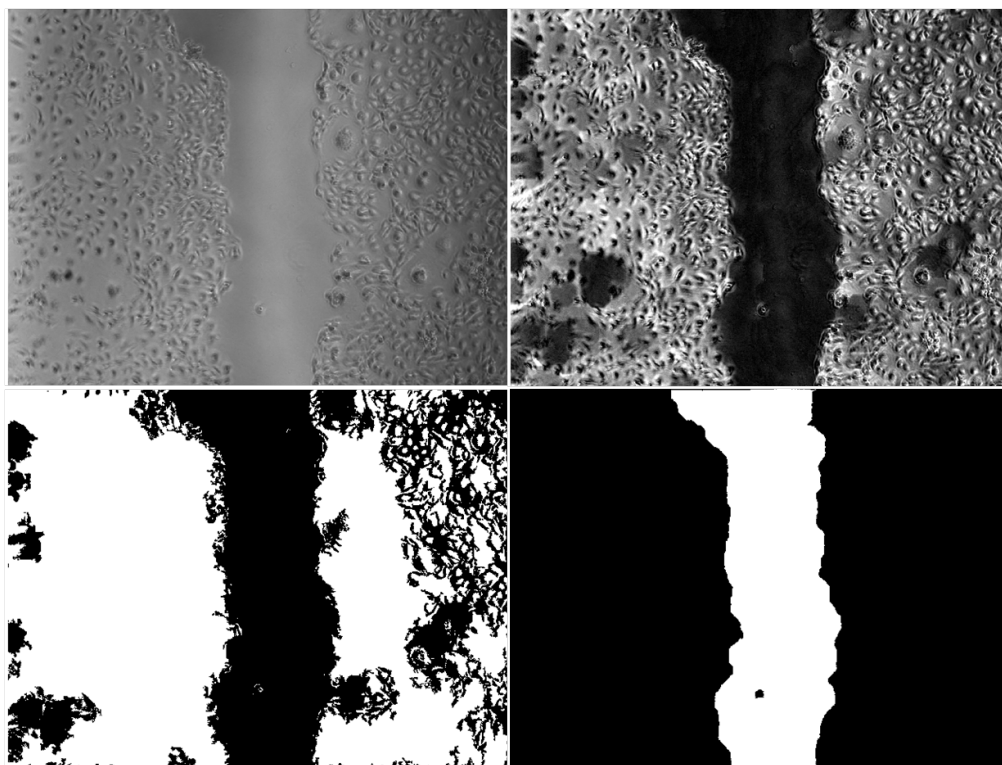
8 Automatická obrazová analýza pro scratch test

Jelikož cílem analýzy obrazů získaných ze scratch testu je oddělení volné plochy (rány) od oblasti porostlé buňkami, tedy výrazně rozdílných částí, byl zvolen přístup prahování. Obraz byl naprahován, kde práh byl nalezen automaticky pomocí Otsu metody [75].

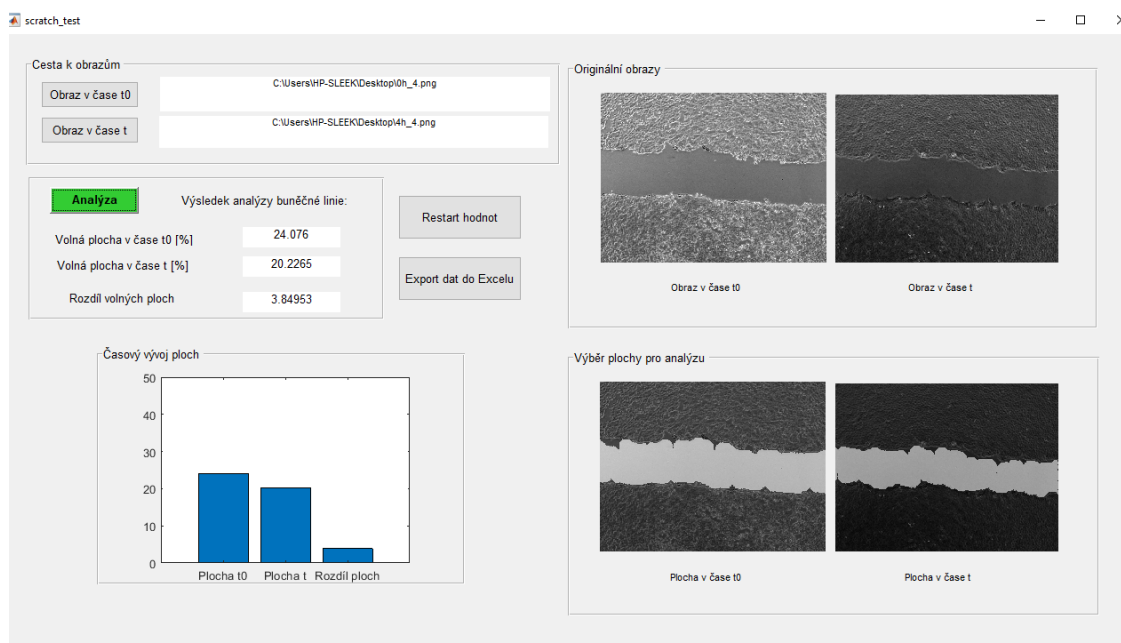
Cílem je najít konturu objektu, která leží na hranách mezi buňkami porostlou částí a ránou uprostřed. U geometrických kontur level-set byl použit Chan-Vese model [61] včetně metody Sparse-Field level set, podobnou metodě popsané v [62], pro implementaci aktivního vývoje kontury. Výsledkem automatické obrazové analýzy je pak počet bílých pixelů, který odpovídá obsahu volné plochy.

Mezi počáteční úpravy obrazu patří převod snímku na šedotónový, dále konverze původního intervalu hodnot na interval $<0,1>$. Problémová jsou ta místa v obraze, kde buňkami zarostlá plocha není kompaktní nebo dochází k postupnému otevírání ploch vlivem migrace buněk. Do předzpracování obrazu byly proto zahrnuty šedotónové morfologické operace otevření a uzavření. Ve finálním binárním obraze byly odstraněny malé objekty a byla vyplněna prázdná místa mezi buňkami. Tím jsou ošetřeny případné změny morfologie buněk mimo zájmovou oblast detekce způsobené například nekrotizací buněk, časovým vývojem viability buněčné linie nebo nekompatním zarůstáním plochy. V každém snímku je určena inicializační maska pro geometrickou konturu. Výsledek analýzy lze vidět na obrázku 8.1, kdy je pro porovnání předložen originální snímek, obraz po předzpracování morfologickými operacemi, automatické nalezení prahu Otsu metodou a segmentace geometrickými konturami level-set.

Implementace metody pro sledování časového vývoje zarůstání plochy v obraze využívající geometrické kontury level-set byla provedena v programovacím prostředí Matlab. Pro snadné ovládání programu bylo navrženo uživatelské rozhraní Obr. 8.2 s možností analýzy obrazu v čase 0 (tedy ihned po vytvoření umělé rány) a v libovolném časovém bodě měření t . Výstupem zpracování obrazů je obsah volné plochy vyjádřený procentuálně vůči celkové ploše obrazu k dispozici jak numericky, tak graficky. Nechybí možnost restartu hodnot nebo exportu získaných dat do Excelu.



Obr. 8.1: Ukázka implementace metody: originální snímek (vlevo nahoře); obraz po předzpracování morfologickými operacemi (vpravo nahoře); naprahovaný obraz (vlevo dole) a výsledná segmentace geometrickými konturami pro výpočet obsahu volné plochy (vpravo dole).



Obr. 8.2: Grafické uživatelské rozhraní pro analýzu snímků získaných ze scratch testu.

9 Závěr

V této práci byla popsána struktura ferritinu jako vhodného nanotransportéru pro cílenou dopravu nízkomolekulárního léčiva k nádorové tkáni. Poznatky získané z literatury byly ověřeny na TEM předložením snímků poskytujících detailní vizualizaci strukturálních změn ferritinů v průběhu procesu disociace a následné reasociace.

Mechanismy disociace a reasociace ferritinových klecí byly sledovány i pomocí alternativních metod: SDS PAGE, měřením dynamického rozptylu světla a nativní PAGE. Jako optimální byla stanovena nativní PAGE, která jako jediná dosahuje stejných výsledků jako TEM, avšak za nesrovnatelně kratší čas. Disociační podmínky byly stanoveny pro komerčně dostupný a běžně používaný koňský ferritin složený z 22L + 2H podjednotek, ale i pro ferritiny dosud pro terapii nikdy nepoužité: koňský L ferritin, lidský H ferritin a PFU ferritin.

Získané výsledky o disociaci podjednotek byly použity pro enkapsulaci nízkomolekulárního chemoterapeutika doxorubicinu do proteinové klece ferritinu, a to v pH roztoku, kdy poprvé došlo k částečnému rozkladu struktury ferritinu. Mezi ferritiny byly zjištěny rozdíly jak na úrovni disociace, tak při zpětné asociaci a zapouzdření doxorubicinu do komplexu apodox. To může být způsobeno odlišným složením podjednotek ferritinů, kdy některé mají převahu L a jiné H podjednotek. Převaha H podjednotek koresponduje s nižší stabilitou, dochází tedy k efektivnějšímu rozpadu proteinu a následné enkapsulaci cytostatika. Naopak ferritiny s majoritní skupinou L podjednotek vykazují vyšší stabilitu a lze usuzovat, že to je důvodem nižší enkapsulační výtěžnosti, kdy více molekul doxorubicinu zůstalo mimo reasociovanou strukturu.

Všechny apodox komplexy byly použity pro terapii maligních karcinomů prsu, stejně jako kontrolní zdravé prsní tkáně. Nejdříve byly získány expresní profily receptorů, pomocí kterých ferritiny do buněk internalizují. Mezi prsními liniemi byly zjištěny rozdíly v expresi receptorů jak pro L, tak pro H podjednotky. Po následné korelaci expresních profilů s výsledky asociací ferritinů s buňkami bylo dosaženo zajímavých výsledků jak mezi testovanými ferritiny, tak v rámci histologicky odlišných prsních linií. Zatímco PFU ferritin dosahoval nejvyšší míry asociace, jeho cytotoxicita způsobující apoptózu byla nejnižší. Podobných výsledků dosahoval i koňský L ferritin, který se vyznačuje druhou nejvyšší mírou asociace, úspěšně ochránil zdravé buňky před toxicitou enkapsulovaného doxorubicinu, byl však minimálně toxický i pro všechny nádorové linie. Těmito vlastnostmi se PFU ferritin spolu s koňským L ferritinem řadí mezi nevhodné pro terapii.

Naopak pozitivních výsledků bylo dosaženo u lidského H ferritinu. Dlouhodobá časová stabilita apodox komplexu – enkapsulační výtěžnost se v čase téměř nemění – je jednou z důležitých vlastností. Patří mezi ně i schopnost chránit zdravé

buňky, avšak úspěšné snížení životaschopnosti nádorových buněk. Nejlepších účinků dosahoval i při testování migrace buněk a jejich proliferačního potenciálu. Ačkoli u všech nádorových prsních linií zůstala schopnost migrace i proliferace zachována, v porovnání s kontrolními neléčenými buňkami dosahuje terapie lidským H apodox komplexem slibných výsledků. V neposlední řadě je důležitým parametrem i jeho původ z lidského organismu, pro pacienta tedy hrozí minimální riziko imunogenicity.

Součástí předložené diplomové práce je i funkce spolu s grafickým uživatelským rozhraním implementovaná v programovacím prostředí Matlab umožňující automatickou analýzu obrazů scratch testu z mikroskopu. Je tak dosaženo přesnější detekce volné plochy na desítkách analyzovaných snímků, samotné vyhodnocení je rychlejší v porovnání s běžně používaným manuálním výpočtem.

Literatura

- [1] CRICHTON, R. *Intracellular iron storage and biomineralisation*. In: Iron Metabolism (Eds). John Wiley and Sons Ltd, NY, USA, 183–222, ISBN: 978-1-118-92561-4 (2009).
- [2] YANG, Z. et al. *Nanomedicine: de novo design of nanodrugs*. *Nanoscale*, 6(2):663-677 (2014). doi: 10.1039/C3NR04535H.
- [3] NG, K. et al. *Lipoprotein-inspired nanoparticles for cancer theranostics*. *Acc Chem Res*, 44(10):1105-13 (2011). doi: 10.1021/ar200017e.
- [4] PARK, K. *Facing the truth about nanotechnology in drug delivery*. *ACS Nano*. USA, 7442-7447 (2013). doi: 10.1021/nm404501g.
- [5] MAEDA, H. *Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects*. *Bioconjugate Chemistry*, 21(5):797-802, ISSN 1043-1802 (2010). doi: 10.1021/bc100070g.
- [6] DAVIS, M. et al. *Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer*. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7, 777-82 (2008). doi: 10.1038/nrd2614.
- [7] SUMER, B. et al. *Theranostic nanomedicine for cancer*. *Nanomedicine (Lond)*, 3, 137-40 (2008). doi: 10.2217/17435889.3.2.137.
- [8] PEER, D. et al. *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. *Nat Nanotechnol*, 2, 751-60 (2007). doi: 10.1038/nnano.2007.387.
- [9] ZHANG, H. et al. *Fabrication of colloidal crystal heterostructures free of interface imperfection*. *Journal of Colloid and Interface Science*, vol 434, 40-47 (2014).
- [10] CERNAT, A. et al. *Surface modeling of nanopatterned polymer films obtained by colloidal templated electropolymerization*. *J Nanosci Nanotechnol.*, 15, 3359-64 (2015).
- [11] ALANAGH, H. et al. *The effect of pH and magnetic field on the fluorescence spectra of fluorescein isothiocyanate conjugated SPION- dendrimer nanocomposites*. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, 27, 2337-2345 (2014). doi: 10.1007/s10948-014-2598-9.
- [12] LEONARD, B. *Cancer nanotechnology: going small for big advances: using nanotechnology to advance cancer diagnosis, prevention and treatment*. DIANE Publishing, Darby, PA (2009).

- [13] KOBAYASHI, H. et al. *Nano-sized MRI contrast agents with dendrimer cores*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(15):2271-2286, ISSN 0169-409 (2005).
- [14] PANYAM, J. et al. *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*. *Adv Drug Deliv Rev.*, 55, 329-47 (2003). doi: 10.1016/S0169-409X(02)00228-4.
- [15] SMITH, J. *The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria*. *Crit Rev Microbiol.*, 30, 173-85 (2004). doi: 10.1080/10408410490435151.
- [16] KOPP, R. et al. *Free apoferritin and apoferritin obtained by reduction of iron-containing ferritin*. *Nature*, 202, 1211-2 (1964).
- [17] SIMSEK, E., KILIC, M. *Magic ferritin: a novel chemotherapeutic encapsulation bullet*. *Magn. Magn. Mater*, 293, 509-513 (2005). doi: 10.1016/j.jmmm.2005.01.066.
- [18] WORWOOD, M. *Ferritin*. *Blood Rev* 4, 259-69 (1990).
- [19] PONKA, P. et al. *Function and regulation of transferrin and ferritin*. *Sem Hematol*, 35(1):35-54 (1998).
- [20] THEIL, E. *The ferritin family of iron storage proteins*. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 63, 421-49 (1990).
- [21] FINCH, C. et al. *Storage iron*. In: Albertini A, Arosio P, Chiancone E, Drysdale J, editors. *Ferritins and isoferritins as biochemical markers*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 3-21 (1984).
- [22] PERSSON, H. et al. *Novel cellular defences against iron and oxidation: ferritin and autophagocytosis preserve lysosomal stability in airway epithelium*. *Redox Report*, 6(1):57-63 (2001). doi: 10.1179/135100001101536049.
- [23] ASANO, T. et al. *Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells*. *Mol Cell Biol.*, 31(10):2040-52 (2011). doi: 10.1128/MCB.01437-10.
- [24] FORD, G. et al. *Ferritin: design and formation of an iron-storage molecule*. *Phil Trans R Soc Lond*, 304, 551-65 (1984).
- [25] HARRISON, P. et al. *Ferric oxyhydroxide core of ferritin*. *Nature* 216, 1188-1190 (1967).

- [26] MANN, S. et al. *Structure and composition of ferritin cores isolated from human spleen, limpet (*Patella vulgata*) hemolymph and bacterial (*Pseudomonas aeruginosa*) cells.* J Mol Biol, 188, 225-32 (1986).
- [27] MASSOVER, W. et al. *The ultrastructure of ferritin macromolecules. The lattice structure of the core crystallites.* Proc Natl Acad Sci, USA, 70(12):3847-51 (1973).
- [28] YANG, C. et al. *Iron chelation in plants and soil microorganisms.* Biochemistry 26, 497-503 (1987).
- [29] PDB: 1IER, *Cubic crystal structure of native horse spleen ferritin* [online]. Comparison of the structures of the cubic and tetragonal forms of horse-spleen apoferritin. Acta Crystallogr., Sect. D 53:580-587 (1997). Dostupné z URL: <<http://www.rcsb.org/structure/1IER>>.
- [30] DRYSDALE, J. et al. *Ferritinaemia in cancer.* Ciba Found. Symp. 51, 41-57 (1977).
- [31] GALLOIS, B. et al. *Metal ions in biological systems.* J. Biol. Inorg. Chem., 2, 360-367 (1997).
- [32] LEVI, S. et al. *Evidence of H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin.* Biochemical Journal, 288, 591-596 (1992).
- [33] TORTI, F. *Regulation of ferritin genes and protein.* Blood, 99(10):3505-16 (2002). doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3505>.
- [34] HENTZE, M. et al. *Identification of the iron-responsive element for the translational regulation of human ferritin mRNA.* Science, 238(4833):1570-3 (1987).
- [35] HINTZE, K. et al. *DNA and mRNA elements with complementary responses to hemin, antioxidant inducers, and iron control ferritin-L expression.* PNAS, 102(42):15048-15052 (2005). doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0505148102>.
- [36] DARSHAN, D. et al. *Conditional deletion of ferritin H in mice induces loss of iron storage and liver damage.* Hepatology, 50(3):852-60 (2009). doi: [10.1002/hep.23058](https://doi.org/10.1002/hep.23058).
- [37] BANYARD, S. et al. *Electron density map of apoferritin.* Nature 271, 282-284 (1978).

- [38] BOU-ABDALLAH, F. et al. *Ferrous iron binding to recombinant human H-chain. An isothermal titration calorimetry study.* Biochem, 41, 11184–91 (2002). doi: 10.1021/bi020215g.
- [39] TAKAHASHI, T. et al. *Functional properties of threefold and fourfold channels in ferritin deduced from electrostatic calculations.* Biophys J., 84(4):2256–2263 (2003). doi: 10.1016/S0006-3495(03)75031-0.
- [40] BOYD, D. et al. *Structural and functional relationships of human ferritin H and L chains deduced from cDNA clones.* J Biol Chem, 260(21):11755–61 (1985).
- [41] MARTSEV, S. et al. *Distinct stability of recombinant L and H subunits of human ferritin: calorimetric and ANS binding studies.* Protein Eng, 11(5):377–81 (1998).
- [42] WADE, V. et al. *Influence of site-directed modifications on the formation of iron cores in ferritin.* J Mol Biol, 221, 1443–52 (1991).
- [43] THEIL, E. et al. *Coordinating subdomains of ferritin protein cages with catalysis and biomineralization viewed from the C₄ cage axes.* J Biol Inorg Chem, 19(0):615–622 (2014). doi: 10.1007/s00775-014-1103-z.
- [44] KIM, M. et al. *pH-dependent structures of ferritin and apoferritin in solution: disassembly and reassembly.* Biomacromolecules, 12(5):1629–1640 (2011). doi: 10.1021/bm200026v.
- [45] LIU, F. et al. *Binding properties of apoferritin to nicotinamide and calcium.* Eur. Food Res. Technol., 235(5):893–899 (2012).
- [46] YANG, D. et al. *Permeation of small molecules into the cavity of ferritin as revealed by proton nuclear magnetic resonance relaxation.* Biochem J., 307(1):253–256 (1995).
- [47] GRANIER, T. et al. *Comparison of the structures of the cubic and tetragonal forms of horse-spleen apoferritin.* Acta Crystallographica, 53(5):580–87 (1997).
- [48] BOTTINI, M. et al. *Targeted nanodrugs for cancer therapy: prospects and challenges.* J Nanosci Nanotechnol, 14(1):98–114 (2014). doi: 10.1166/jnn.2014.9010.
- [49] KILIC, M. et al. *A novel protein-based anticancer drug encapsulating nanosphere: apoferritin-doxorubicin complex.* J Biomed Nanotechnol, 8(3):508–14 (2012). doi: 10.1166/jbn.2012.1406.

- [50] ANDREWS, S *The ferritin-like superfamily: evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor*. *Biochim Biophys Acta*, 1800(8):691-705 (2010). doi: 10.1016/j.bbagen.2010.05.010.
- [51] THEIL, E *Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms*. *Annual Review of Biochemistry*, 56(1):289-315 (1987).
- [52] KHARE, G. et al. *Differential roles of iron storage proteins in maintaining the iron homeostasis in mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 12(1):0169545 (2017). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169545>.
- [53] LEVI, S., AROSIO, P. *Mitochondrial ferritin*. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(10):1887-9 (2004). doi: 10.1016/j.biocel.2003.10.020.
- [54] PDB: 1R03, *Crystal structure of a human mitochondrial ferritin* [online]. Crystal structure and biochemical properties of the human mitochondrial ferritin and its mutant ser144ala. *J Mol Biol* 340, 277-293 (2004). Dostupné z URL: <<http://www.rcsb.org/structure/1R03>>.
- [55] HASAN, M. et al. *Identification of a 250 kDa putative microtubule-associated protein as a bovine ferritin; evidence for a ferritin-microtubule interaction*. *FEBS J*, 272:822–31 (2005). doi: 10.1111/j.1742-4658.2004.04520.x.
- [56] FLORENCE, A., HUSSAIN, N. *Transcytosis of nanoparticle and dendrimer delivery systems: evolving vistas*. *Adv Drug Deliv Rev*, 50(1):69-89 (2001).
- [57] MAKINO, A. et al. *Effective encapsulation of a new cationic gadolinium chelate into apoferritin and its evaluation as an MRI contrast agent*. *Nanomedicine*, 7(5):638-46 (2011). doi: 10.1016/j.nano.2011.01.015.
- [58] LU, W. et al. *Receptor-mediated transcytosis: a mechanism for active extravascular transport of nanoparticles in solid tumors*. *Journal of Controlled Release*, 161(3):959-966 (2012). doi: 10.1016/j.jconrel.2012.05.014.
- [59] BENYAMIN, B. et al. *Novel loci affecting iron homeostasis and their effects in individuals at risk for hemochromatosis*. *Nat Commun*, 5:4926 (2014).
- [60] BULVIK, B. et al. *Cardiac protection by preconditioning is generated via an iron-signal created by proteasomal degradation of iron proteins*. *PLOS ONE*, 7(11):48947 (2012). doi: 10.1371/journal.pone.0048947.
- [61] CHAN, T.; VESE, L. *Active contours without edges*. *IEEE Transactions on Image Processing*, 10(2):266-277 (2001). doi: 10.1109/83.902291.

- [62] WHITAKER, R. T. *A level-set approach to 3d reconstruction from range data*. International Journal of Computer Vision, 29, 203, ISSN 1573-1405 (1998).
- [63] DOSTALOVA, S. et al. *Apoferitin as an ubiquitous nanocarrier with excellent shelf life*. International Journal of Nanomedicine, 12, 2265-2278, ISSN 1178-2013 (2017).
- [64] MICHAUX, C. et al. *Protecting role of cosolvents in protein denaturation by SDS: a structural study*. BMC Struct Biol, 8, 29 (2008). doi: 10.1186/1472-6807-8-29.
- [65] SCOTT, C., GRUENBERG, J. *Ion flux and the function of endosomes and lysosomes: pH is just the start: the flux of ions across endosomal membranes influences endosome function not only through regulation of the luminal pH*. Bioessays, 33(2):103-110 (2011). doi: 10.1002/bies.201000108.
- [66] ERKEKOL, F., et al. *Hypersensitivity reactions due to chemotherapy drugs: what are the choices?*. Allergy, 66, 382-382, ISSN 0105-4538 (2011). doi: 10.1155/2010/207084.
- [67] CARVALHO, C., et al. *Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect*. Current Medicinal Chemistry, 16(25):3267-3285, ISSN 0929-8673 (2009).
- [68] DE LIMA MOTA, A., et al. *Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers*. Oncol Lett., 13(6):4708–4712 (2017). doi: 10.3892/ol.2017.6093.
- [69] MATUTINO, A., et al. *Hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer: redrawing the lines*. Curr Oncol., 25(1):S131-S141 (2018). doi: 10.3747/co.25.4000.
- [70] DAI, X., et al. *Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping*. J Cancer., 8(16):3131-3141 (2017). doi: 10.7150/jca.18457.
- [71] MOSMANN, T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 65(1-2):55-63 (1983).
- [72] WALCZYK, D., et al. *What the cell “sees” in bionanoscience*. J. Am. Chem. Soc., 132(16):5761–5768 (2010). doi: 10.1021/ja910675v.
- [73] DOSTALOVA, S., et al. *Site-directed conjugation of antibodies to apoferitin nanocarrier for targeted drug delivery to prostate cancer cells*. ACS Appl. Mater. Interfaces, 8(23):14430–14441 (2016). doi: 10.1021/acsami.6b04286.

- [74] BUCHTELOVÁ, H., et al. *Ruthenium-based core-shell nanoparticles with exceptional in vitro biocompatibility*. MendelNet, 837-842, ISBN 978-80-7509-529-9 (2017).
- [75] JAN, J. *Medical image processing, reconstruction and restoration: concepts and methods*. CRC Press, ISBN 9780824758493 (2005).

Seznam symbolů, veličin a zkratek

apodox	apoferritin s enskapsulovaným doxorubicinem
APS	peroxidisíran amonný – Ammonium Persulfate
CBR-250	Coomassie Brilliant Blue R250
EPR	zvýšená permeabilita a retence – Enhanced Permeability and Retention
FBS	fetální bovinní sérum
H	těžký – Heavy
ID	identifikátor – Identifier
kDa	kilodalton
L	lehký – Light
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-difenyltetrazolium bromid
NCBI	národní centrum biotechnologických informací – National Center for Biotechnology Information
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PBS	pufrovaný fyziologický roztok – Phosphate Buffered Saline
PDI	polydisperzní index
PFU	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PLB	nanášecí pufr pro proteiny – Protein Loading Buffer
SDS	dodecylsíran sodný – Sodium Dodecyl Sulfate
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TfR1	transferrinový receptor 1
Å	angstrom

Seznam příloh

A Obsah příloh

72

A Obsah příloh

V příloze je vložena elektronická verze diplomové práce, hlavní program pro automatickou analýzu obrazů a grafické uživatelské rozhraní.

```
/..... kořenový adresář přílohy
├── Diplomová práce Kateřina Krausová
│   ├── Diplomová práce Kateřina Krausová.pdf ..... elektronická verze DP
│   ├── scratch_test.zip..... komprimované soubory s programem
│   │   ├── aktivni_kontura.m ..... hlavní funkce programu
│   │   ├── scratch_test.fig ..... grafické uživatelské rozhraní
│   │   └── scratch_test.m ..... hlavní program
```