



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY

A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKEHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

## BIOKOMPATIBILNÍ PROTEINOVÉ KLECE JAKO NÁSTROJ PRO ENKAPSULACI A INTERNALIZACI MALÝCH INTERFERUJÍCÍCH RNA

BIOCOMPATIBLE PROTEIN CAGES AS A TOOL FOR ENCAPSULATION AND INTERNALIZATION OF  
SMALL INTERFERING RNA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

MICHAL MOKRÝ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MGR. ZBYNĚK HEGER, PH.D.

BRNO 2018

# Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

**Student:** Michal Mokřý

**ID:** 189521

**Ročník:** 3

**Akademický rok:** 2018/19

**NÁZEV TÉMATU:**

## **Biokompatibilní proteinové klece pro enkapsulaci a internalizaci malých interferujících RNA**

**POKyny PRO VYPRACOVÁNÍ:**

1) Proveďte literární rešerši na téma proteinové nanotransportéry a jejich využití pro cílený transport siRNA se zaměřením na nádorová onemocnění. 2) Proveďte optimalizaci podmínek pro enkapsulaci fluorescenčně značené kontrolní siRNA do kavity apoferritinu. 3) Proveďte fyzikálně-chemickou charakterizaci vzniklého nanotransportéru. 4) Proveďte mikroskopickou analýzu interakce vzniklého nanotransportéru s nádorovými buňkami in vitro. 5) Proveďte enkapsulaci siRNA navrženou pro down-regulaci anti-apoptického proteinu Bcl-2. 6) Proveďte analýzu efektu expozice nanotransportéru na expresi Bcl-2 u nádorových buněk. 7) Proveďte statistické zpracování dat a diskutujte výsledky a možnou využitelnost nanotransportéru pro kombinační léčbu chemoresistentních nádorů.

**DOPORUČENÁ LITERATURA:**

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

[2] DOSTALOVA, 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] ZUCKERMAN, E., et al. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 2015, 14, s. 843-856. ISSN 1474-1784.

**Termín zadání:** 4.2.2019

**Termín odevzdání:** 24.5.2019

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

**Konzultant:**

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

**UPOZORNĚNÍ:**

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské 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**

Práca sa zaoberá vytváraním apoferritínového nanotransportéru s enkapsulovanou malou interferujúcou RNA. Prvá časť práce popisuje teoretické vedomosti potrebné pre pochopenie tematiky práce. Druhá polovica práce obsahuje metódy použité na realizáciu práce a zhodnotenú výsledky. Predmetom sú optimalizácia pH, množstva siRNA pri enkapsulácii siRNA do apoferritínu, fyzikálno-chemická charakterizácia vzniknutého nanotransportéru a jeho vplyv na expresiu proteínu Bcl-2. Vytvorené nanočastice mali optimálnu veľkosť, dokázali úspešne dopraviť siRNA navrhnutú na reguláciu expresie proteínu Bcl-2 do buniek a znížiť expresiu tohoto antiapoptického proteínu o 54%.

## **Kľúčové slová**

Nanočastica, nanotransportér apoferritín, siRNA, RNA interferencia, multi-lieková rezistencia, nádorové ochorenie, enkapsulácia.

## **Abstract**

This thesis is focused on creation of apoferritin nanocarrier with encapsulated small interfering RNA. First part deals with theoretical knowledge necessary for understanding the concept of this thesis. Second part describes used methods and evaluated results. Main objectives are optimization of pH and amount of siRNA encapsulated into apoferritin cavity, physicochemical characteristics of created nanocarrier and his effects on expression of protein Bcl-2. Apoferritin nanocarriers created in this thesis were optimal in size, able to transport siRNA designed to down-regulate expression of Bcl-2 protein into cell line, and successfully knock down expression of this antiapoptotic protein by 54%.

## **Keywords**

Nanoparticle, nanocarrier, apoferritin, siRNA, RNA interference, multi drug resistance, cancer, encapsulation.

## **Bibliografická citácia**

MOKRÝ, M. *Biokompatibilní proteinové klece pro enkapsulaci a internalizaci malých interferujících RNA*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2019. 69 s. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Zbyněk Heger, Ph.D.



## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že svoju záverečnú prácu na tému „Biokompatibilné proteínové kliečky ako nástroj pre enkapsuláciu a internalizáciu malých interferujúcich RNA“ som vypracoval samostatne pod vedením vedúceho bakalárskej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov ktoré sú všetky citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce.

Ako autor uvedenej záverečnej práce ďalej prehlasujem, že v súvislosti s vytvorením tejto záverečnej práce som neporušil autorské práva tretích osôb, hlavne som nezasiahol nedovoleným spôsobom do cudzích autorských práv osobnostných a som si plne vedomý následkov porušenia ustanovenia § 11 a následkoch autorského zákona č. 121/2000 Zb., vrátane možných trestnoprávných dôsledkov vyplývajúcich z ustanovenia druhej časti, hlavy VI. Díel 4 Trestného zákonníku č. 40/2009 Zb.

V Brne dňa .....

.....

podpis autora

## **Pod'akovanie**

Rád by som sa pod'akoval môjmu vedúcemu Mgr. Zbyňkovi Hegerovi Ph.D. za umožnenie práce pod jeho vedením. Taktiež by som sa chcel veľmi pod'akovať Ing. Markéte Charousovej a Ing. Simone Dostálovej Ph.D. za veľkú pomoc pri vypracovaní mojej práce, za všetok čas, ktorý obetovali a hlavne za všetky odpovede na moje hlúpe otázky. Veľká vďaka patrí aj Mgr. Zbyňkovi Šplíchalovi Ph.D. za pomoc pri vyhodnocovaní RNA výsledkov a Dr. Vladimírovi Pekaříkovi za poskytnutie apoforitínov.

V Brne dňa .....

.....

podpis autora

# OBSAH

Zoznam Obrázkov.....	viii
Zoznam tabuliek.....	ix
Úvod .....	1
<b>1 Nádorové ochorenia .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Dôvody vzniku nádorových ochorení .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Interné faktory vedúce k vzniku nádorových ochorení.....	3
1.1.2 Environmentálne faktory, a faktory životosprávy vedúce k vzniku nádorových ochorení..	4
<b>1.2 Možnosti liečby.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Operačné zákroky.....	5
1.2.2 Rádioterapia .....	5
1.2.3 Chemoterapia.....	5
1.2.4 Nové smery liečby nádorových ochorení.....	6
<b>1.3 Multi-lieková rezistencia .....</b>	<b>6</b>
<b>2 Utlmovanie génov.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1 RNA interferencia .....</b>	<b>8</b>
2.1.1 RNAi s použitím miRNA .....	8
2.1.2 RNAi s použitím siRNA.....	9
2.1.3 Stabilita siRNA .....	10
<b>3 Nanotransportéry .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Proteínové nanotransportéry .....</b>	<b>12</b>
3.1.1 Albumín .....	12
3.1.2 Želatína .....	12
3.1.3 Apoferitín .....	12
<b>4 Kombinačná liečba.....</b>	<b>14</b>
<b>5 Materiály a metódy .....</b>	<b>15</b>
5.1 Chemikálie.....	15
5.2 Kyslá enkapsulácia siRNA do apoferritínu .....	16
5.3 Charakterizácia vzniknutých nanočastíc.....	17
5.4 Bunková línia .....	18
5.5 Internalizácia EcaLHsiRNA do buniek .....	18
5.6 Internalizácia EcaLH, HsaH a HsaH-RK do buniek.....	19
5.7 Zásaditá enkapsulácia siRNA do apoferritínov.....	19
5.8 Schopnosť EcaLH, HsaH a HsaH-RK enkapsulovať siRNA .....	20
5.9 Internalizácia EcaLH, HsaH a HsaH-RK s enkapsulovanou siRNA do buniek.....	20
5.10 Optimalizácia koncentrácie chlorokvinu .....	21
5.11 Charakterizácia HsaH-RK s enkapsulovanou siRNA.....	21
5.12 Transfekcia s anti-Bcl-2 siRNA.....	22

5.13	Izolácia RNA.....	23
5.14	Čistota a koncentrácia izolovanej RNA.....	23
5.15	Reverzná transkripcia.....	24
5.16	Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia.....	24
5.17	Kontrola produktov.....	25
5.18	Izolácia proteínov .....	25
5.19	Koncentrácia proteínov.....	26
5.20	SDS Polyakrilamidová gélová elektroforéza (PAGE) .....	26
5.21	Western blot .....	26
5.22	Použité programy .....	27
6	Výsledky .....	29
6.1	Optimalizácia pH pre kyslú enkapsuláciu siRNA do kavity konského apoferitínu .	29
6.2	Optimalizácia množstva siRNA pre kyslú enkapsuláciu do kavity EcaLH .....	32
6.3	Stabilita vytvorených EcaLHsiRNA .....	33
6.4	Internalizácia EcaLHsiRNA do buniek .....	34
6.5	Internalizácia EcaLH, HsaH a HsaH-RK do buniek.....	35
6.6	Schopnosť EcaLH, HsaH a HsaH-RK enkapsulovať siRNA .....	36
6.7	Internalizácia EcaLH, HsaH a HsaH-RK s enkapsulovanou siRNA.....	37
6.8	Optimalizácia koncentrácie chlorokvinu .....	39
6.9	Optimalizácia enkapsulácie siRNA do HsaH-RK.....	41
6.10	Charakterizácia HsaH-RK s enkapsulovanou siRNA.....	42
6.11	Regulácia génovej expresie na úrovni RNA.....	43
6.12	Kontrola produktov qPCR.....	44
6.13	Regulácia génovej expresie na úrovni proteínov .....	44
7	Diskusia .....	46
8	Záver .....	50
	Literatúra.....	52
	Zoznam symbolov, veličín a skratiek .....	58
	Zoznam príloh .....	59

# ZOZNAM OBRÁZKOV

OBRÁZOK 1: SCHEMATICKE ZOBRAZENIE RNA INTERFERENCIE. PREPRACOVANÉ PODĽA [46] .....	9
OBRÁZOK 2: SCHEMATICKE ZOBRAZENIE SIRNA. PREPRACOVANÉ PODĽA [47] .....	10
OBRÁZOK 3: 1% AGARÓZOVÝ GÉL SO VZORKAMI FERITÍNOV S ENKAPSULOVANOU SIRNA. S RNÁZOU (R+), ALEBO BEZ RNÁZY (R-). FOTKA SPRAVENÁ POMOCOU FLUORESCENČNEJ ZNAČKY FAM (A), FOTKA SPRAVENÁ POMOCOU INTERKALAČNÉHO FARBIVA ETBR. BANDY 1 OZNAČUJÚ POLOHU ZNAČKY FAM NA SIRNA, BANDY 2 POLOHU VOĽNÝCH FAM ZNAČENÝCH SIRNA A BANDY 3 ZASE POLOHU ZAFARBENÝCH APOFERITÍNOV. ....	37
OBRÁZOK 4: NA OBRÁZKOCH JE MOŽNÉ VIDIEŤ ROZMIESTNENIE CY5 ZNAČENÉHO APOFERITÍNU HSAH-RK 8 HODÍN PO PRIDANÍ RÔZNYCH KONCENTRÁCIÍ CQ. (A) VZORKA S HSAH-RK BEZ CQ, (B) VZORKA S HSAH-RK A 25 $\mu$ M CQ, (C) VZORKA S HSAH-RK A 50 $\mu$ M CQ A (D) HSAH-RK SO 100 $\mu$ M CQ. ....	40
OBRÁZOK 5: 1% AGARÓZOVÝ GÉL SO VZORKAMI OPTIMALIZÁCIE ZOBRAZOVANÝ POMOCOU FLUORESCENČNEJ ZNAČKY FAM NA SIRNA. POPIS VZORIEK JE V TABUĽKE 8. BAND 1* ZNAČÍ POZÍCIU HSAH-RKSIRNA A 2* VOĽNÚ SIRNA. ....	41
OBRÁZOK 6: VĽAVO PRODUKTY <i>GAPDH</i> , VPRAVO PRODUKTY <i>BCL2</i> . K – KONTROLA, M – METAFECTENE, F – HSAH-RKSIRNA, F25 – HSAH-RKSIRNA + 25 $\mu$ M CQ, F50 - HSAH-RKSIRNA + 50 $\mu$ M CQ, S – SIRNA. ....	44
OBRÁZOK 7: ZOBRAZENÉ WESTERN BLOTY. VĽAVO <i>GAPDH</i> , VPRAVO <i>BCL-2</i> . K – KONTROLA, M – METAFECTENE, RK – HSAH-RKSIRNA, RK 25 - HSAH-RKSIRNA $\mu$ M CQ, RK 50 - HSAH-RKSIRNA $\mu$ M CQ, S – KONTROLA SIRNA. ....	45

# ZOZNAM TABULIEK

TABUĽKA 1: SEKVENCIE POUŽITÝCH PRIMEROV .....	24
TABUĽKA 2 : TABUĽKA HODNÔT ZVÝŠENIA A ZNÍŽENIA PH PRI ENKAPSULÁCII A VEĽKOSTI ENKAPSULAČNEJ VÝŤAŽNOSTI. ....	30
TABUĽKA 3 : NAJVYŠŠÍ POČET ČASTÍC V ZÁVISLOSTI NA VEĽKOSTI A POLYDISPERZNÝ INDEX.....	30
TABUĽKA 4 : TABUĽKA POPISUJÚCA POUŽITÉ OBJEMY, ENKAPSULAČNÚ VÝŤAŽNOSŤ A ENKAPSULOVANÝ OBJEM SIRNA V ECALH. ....	32
TABUĽKA 5 : NAJVYŠŠÍ POČET ČASTÍC V ZÁVISLOSTI NA VEĽKOSTI A POLYDISPERZNÝ INDEX.....	33
TABUĽKA 6 MNOŽSTVO UVOĽNENEJ SIRNA Z ECALH V RÔZNYCH ČASOVÝCH INTERVALOCH. ....	34
TABUĽKA 7: NAJVYŠŠÍ POČET ČASTÍC V ZÁVISLOSTI NA VEĽKOSTI A POLYDISPERZNÝ INDEX PRE ECALHSIRNA V RINGROVOM ROZTOKU.....	34
TABUĽKA 8: OBJEMY POUŽITÉ PRI OPTIMALIZÁCII MNOŽSTVA HSAH-RK PRE ENKAPSULÁCIU SIRNA..	41
TABUĽKA 9: PERCENTÁ UVOĽNENEJ SIRNA ZO VZORKY S RNÁZOU PROTI KONTROLE.....	42
TABUĽKA 10: NAJVYŠŠÍ POČET ČASTÍC V ZÁVISLOSTI NA VEĽKOSTI A POLYDISPERZNÝ INDEX PRE HSAH-RKSIRNA V RINGROVOM ROZTOKU. ....	42

# ÚVOD

Nádorové ochorenia sú jednými z ochorení s celosvetovo najvyššou mortalitou. Podľa Svetovej Zdravotníckej Organizácie bude v roku 2018 odhadovaný počet úmrtí spôsobených nádorovými ochoreniami približne 9,6 milióna [1]. Nádory pľúc, prs, prostaty, žalúdka, hrubého čreva, pažeráka a pečene majú z pomedzi všetkých najvyššiu incidenciu. Z toho najväčší počet úmrtí je spojených s nádorovými ochoreniami pľúc (až 1,76 milióna), nasledujúce sú nádory žalúdka a pečene s približne 780 000 úmrtiami a na štvrtom mieste karcinóm prs so 627 000 úmrtiami. Všetky hodnoty sú štatisticky odhadované na rok 2018 [2].

Najpoužívanejšie metódy na liečbu nádorových ochorení sú chemoterapia, rádioterapia a chirurgická resekcia nádoru [3]. Najhlavnejšou z nich je chemoterapia, ktorá spočíva vo využití cytotoxických látok. Tie nádorové bunky zabíjajú alebo znemožňujú ich proliferáciu [4].

Najčastejším dôvodom zlyhania liečby pacientov s nádorovými ochoreniami je schopnosť nádorových buniek vytvoriť si multi-liekovú rezistenciu (MDR). Tá spôsobuje, že nádorové bunky sú imúnne voči spektru chemoterapeutických liečiv [6]. Existujú dva najhlavnejšie mechanizmy, ktorými si nádorové bunky vytvárajú MDR. Prvým z týchto mechanizmov je zvyšovanie počtu efluxných púmp v bunkovej membráne nádorovej bunky. Efluxné pumpy sú kanály závislé na energii dodanej z ATP, ktoré aktívne transportujú liečivá von z bunky a tým znižujú intracelulárnu koncentráciu liečiva, čím znemožňujú chemoterapeutickú liečbu [5], [7]. Druhým mechanizmom je aktivácia bunkových antiapoptických mechanizmov, ktoré znemožňujú programovanú bunkovú smrť. Komerčné chemoterapeutické liečivá sú robené tak aby bojovali proti nádoru aktiváciou apoptózy, čo spôsobuje, že nádorové bunky využijú svoje vlastné obranné mechanizmy MDR a zabraňujú liečbe. Riešením je vytvoriť kombináciu liečiv, ktorá by dokázala naraz deaktivovať efluxové pumpy a antiapoptické mechanizmy [8].

Mnohobunkové organizmy sa potrebujú zbavovať buniek, ktoré sú nepotrebné alebo by mohli narušiť homeostázu organizmu. Mechanizmus apoptózy zabezpečuje schopnosť organizmu presne regulovať množstvo buniek, a ochraňovať tkanivá pred mutáciami [9]. Lenže, nádorové bunky sa chovajú presne

naopak, ich cieľom je deliť sa na čo najvyšší počet. To znamená, že potrebujú zastaviť programovanú bunkovú smrť. Bcl-2 je proteín kódovaný *BCL-2* génom [10]. Zvýšená expresia génu *BCL-2* znemožňuje bunkám dosiahnuť apoptózu, čo sa priamo odzrkadľuje na prežívaní nádorových buniek a na MDR [5].

Antiapoptické cesty by sa dali potenciálne deaktivovať pomocou utlmovania génov (gene silencing), presnejšie pomocou RNA interferencie (RNAi). Je to metóda, ktorá dokáže regulovať transkripciu génu. Utlmovanie génov zahrňuje viacero mechanizmov. V tomto prípade je najlepšie využiteľný práve RNAi mechanizmus. RNAi funguje tak, že biolátky zložené z krátkych úsekov dvojreťazcovej RNA, napríklad malé interferujúce RNA (siRNA), dokážu vďaka svojej špecificite regulovať expresiu mutantných nádorových génov. [11], [12].

Využitie čistej siRNA *in vivo* má ale veľké nevýhody. Čistá siRNA má veľmi malú úspešnosť prechodu cez bunkovú membránu. Problematický je aj jej transport v tele, pretože je kvôli svojej malej veľkosti filtrovaná renálnym systémom. siRNA je taktiež veľmi náchylná na degradáciu endo- a exonukleázami buniek v tele [12], [13].

Vďaka svojej malej veľkosti je siRNA vhodným kandidátom na využitie nanotransportérov využívaných v cielej doprave liečiv. siRNA je možné na takýto transportér naviazať alebo ju enkapsulovať do jeho vnútra. Povrch nanotransportérov sa dá pomocou ligandov upraviť na cielenie receptorov špecifických pre nádorové bunky. Takto vytvorený nanotransportér by nielen ochránil siRNA pred prostredím tela ale zlepšil jej internalizáciu do buniek a taktiež by mal znížiť cytotoxicitu pre okolité tkanivá [13].



# 1 NÁDOROVÉ OCHORENIA

Nádorové ochorenia postihujú každoročne veľké množstvo ľudí. Je to skupina viac ako 100 ochorení spôsobených bunkami, ktoré prešli morfológickou transformáciou, stratili reguláciu apoptózy a proliferácie. Mnohobunkové organizmy využívajú bunkovú proliferáciu, čiže delenie, na rozvoj tkaniva, jeho údržbu a taktiež opravy. Proliferácia ale môže byť veľmi nebezpečný mechanizmus, ktorý musí byť regulovaný, akékoľvek genetické mutácie v mechanizme proliferácie alebo jeho regulácie dávajú možnosť vzniku nádorových buniek [14].

## 1.1 Dôvody vzniku nádorových ochorení

Tieto ochorenia nie sú spôsobené len internými faktormi ako dedičné genetické mutácie. Vznik nádorových ochorení primárne ovplyvňuje prostredie, v ktorom postihnutí jedinci žijú, a ich životospráva [15].

### 1.1.1 Interné faktory vedúce k vzniku nádorových ochorení

V severských krajinách Európy prebehol výskum na takmer 45 000 dvojčatách, ktorého cieľom bolo zistiť, ako ovplyvňujú dedičné faktory vznik nádorových ochorení. Výsledkom štúdie bolo zistenie, že dedičné faktory majú minimálny vplyv na prejavenie nádorových ochorení [16].

Imunitný systém hrá dôležitú rolu pri boji proti nádorovým ochoreniam. Ochraňuje organizmus pred vírusmi, ktoré môžu spôsobiť nádorové ochorenia, taktiež ničí zápalové ložiská, ktoré môžu byť miestom vzniku nádorových ochorení. Bunková imunita zdravého jedinca by mala byť schopná odstrániť aj neoplastické bunky. Tento proces sa nazýva imunitný dohľad (immune surveillance), ale kvôli vysokej schopnosti nádorových buniek adaptovať sa na zmenu podmienok nemá imunitný dohľad vysokú úspešnosť [17], [18].

### **1.1.2 Environmentálne faktory, a faktory životosprávy vedúce k vzniku nádorových ochorení**

Je všeobecne známe, že niektoré faktory zlej životosprávy môžu priamo do tela privádzať karcinogénne látky. Fajčenie tabaku je primárnou príčinou nádorových ochorení pľúc čo je zo všetkých nádorových ochorení ochorenie s najvyššou mortalitou. Dym z tabaku a decht obsahujú viac ako 50 karcinogénnych látok ako napríklad polycyklické uhľovodíky a nitrosamíny [15], [19].

Alkohol nie je priamo karcinogénny, ale spája sa ako faktor, ktorý môže spôsobiť vznik nádorových ochorení hlavne v oblasti horného tráviaceho traktu, pečene a pankreasu. Oxidáciou etanolu v pečeni vzniká acetaldehyd a voľné mutagénne radikály, ktoré karcinogénne byť môžu [19].

Jedným možným faktorom je aj stres, pretože je dokázané, že stres dokáže ovplyvniť spoluprácu medzi nervovým a imunitným systémom, čím priamo ovplyvňuje funkciu B a T lymfocytov podieľajúcich sa na imunite organizmu [20]. Obmedzená funkcia imunity zvyšuje vnímavosť organizmu na vírusové infekcie ako ľudský papilomavírus (HPV), vírus hepatitídy B resp. C (HBV, HCV), alebo vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti (HIV). Všetky tieto vírusy môžu byť priamo mutagénne [15], [18].

Znečistenie životného prostredia je tiež spojené s výskytom nádorových ochorení. Hlavne v mestskom prostredí obsahuje ovzdušie produkty spaľovania ako polycyklické uhľovodíky, acetaldehyd, benzo[a]pyrén. Všetko sú to mutagénne látky spôsobujúce nádorové ochorenia. V minulosti sa ako požiarna izolácia v stavbách používal materiál azbest, ktorý je taktiež veľmi silný karcinogén. Dusičnany, ktoré sa využívajú ako hnojivá, síce nie-sú priamo karcinogénne, ale dostávajú sa do rastlín a spodnej vody. V tele sa dusičnany môžu transformovať na nitrosamíny, ktoré karcinogénne sú [15], [19], [21].

## **1.2 Možnosti liečby**

Liečbou nádorových ochorení sa výskumné strediská zaberajú už desiatky rokov. Aj keď neustále prebieha výskum nových metód na liečbu nádorových ochorení, tak

najvyššiu úspešnosť v zneškodnení nádorov majú tie, ktoré sú známe už od konca druhej svetovej vojny [22].

### **1.2.1 Operačné zákroky**

Operácie nádorových ochorení sa vyvíjali od začiatku 20teho storočia. Do roku 1960 boli aj s rádioterapiou základom liečby nádorových ochorení. Táto liečba nemala veľkú úspešnosť, pretože nedokonalosť zobrazovacích modalít tej doby neumožňovala zobrazovať mikrometastázy, ktoré sa pred chirurgickým odstránením primárneho nádoru vytvorili v tele. Tieto metastázy spôsobili to, že sa už vyliečenému pacientovi nádorové ochorenie vrátilo. Úspešnosť chirurgickej liečby je teda veľmi závislá na skorom odhalení tvorby primárneho nádoru [3], [22].

### **1.2.2 Rádioterapia**

Rádioterapia je spôsob liečby nádorových ochorení s využitím ionizujúceho žiarenia. Hlavným cieľom radiačnej terapie je poškodenie DNA nádorovej bunky do takej miery, že vyvolá apoptózu alebo znemožní ďalšie delenie buniek. Pri kontakte ionizačného žiarenia, napríklad Röntgenového žiarenia, sa z atómov buniek uvoľňujú voľné vysoko energetické elektróny, ktoré interagujú s vodou a produkujú voľné radikály ako hydroxylový radikál. Tieto radikály môžu vytvoriť zmeny v DNA poškodzovaním väzieb medzi nukleovými kyselinami. Rádioterapia sa môže prejaviť aj negatívne. Je šanca, že nádorové bunky nezareagujú na liečbu, alebo môže dôjsť k ešte väčším mutáciám genetickej informácii nádorových buniek. Taktiež je šanca, že pri rádioterapii budú zasiahnuté aj zdravé bunky, čo môže spôsobiť ich transformáciu na karcinogénne [23].

### **1.2.3 Chemoterapia**

Operácie a rádioterapie sú dobré možnosti liečby pre primárne pevné nádory, ale problém nastane keď nádor metastázuje, alebo sa nachádza na mieste neprístupnom pre tieto metódy. Chemoterapia sa podáva taktiež pred chirurgickým odstránením nádoru, po operáciách ako prevencia vzniku druhotných nádorov a na odstránenie zhubných buniek, ktoré ostali po odstránení nádoru. Chemoterapia je typ liečby, ktorá využíva cytotoxických liečiv na zastavenie nekontrolovateľného delenia nádorových buniek a ich smrť. Problémom je podobnosť nádorových buniek

s tými zdravými. Hlavným cieľom chemoterapie je maximálna úmrtnosť nádorových buniek, pričom sa musí akceptovať aj čiastočná toxicita k zdravým bunkám. Najviac ohrozené sú rýchlo sa deliace bunky ako vlasové folikuly, kostná dreň, sliznica gastrointestinálneho traktu alebo pohlavné bunky. Hlavnými príznakmi sú potlačenie tvorby červených krviniek, zvracanie, nevoľnosť a strata vlasov [24], [25]

#### **1.2.4 Nové smery liečby nádorových ochorení**

Sľubná sa zdá byť imunoterapia, ktorá využíva imunitný systém na boj proti nádorom [26]. Vírusy si počas evolúcie vytvorili množstvá mechanizmov na infekciu, replikáciu v ľudských bunkách a ich zabíjanie. V minulosti už výskum viroterapie prebiehal, ale upustilo sa od neho kvôli vysokej toxicite pre zdravé tkanivo. Z rozvojom genetického inžinierstva sa otvárajú možnosti navrhovania vírusov, ktoré by sa replikovali len v rámci nádorových buniek a pacientovi by spôsobili minimálne zdravotné problémy [27]. Ďalšou možnosťou liečby je génová terapia, ktorá sa pokúša upravovať genóm nádorových buniek pre terapeutické účely. Patrí sem napríklad pokus o obnovenie funkcie tumor supresorových génov ako *p53*, ktoré sú kvôli mutácii v nádorových bunkách deaktivované. Potom je tu možnosť využitia RNA interferencie na ovplyvnenie transkripčných a translačných procesov tvorby proteínov [26] čomu sa táto práca venuje.

### **1.3 Multi-lieková rezistencia**

Vďaka početným mutáciám, ktoré v nádorových bunkách existujú, majú tieto bunky veľmi vysokú schopnosť vytvárať si imunitu na lieky využívané v chemoterapii. Mechanizmy imunity sa môžu prejaviť ako napríklad strata receptorov na povrchu alebo transportérov v membráne bunky, upravený metabolizmus liečiva a mnoho iných. V takomto prípade sa využíva kombinácia liečiva, ktoré napadajú nádorové bunky rôznymi so sebou nesúvisiacimi spôsobmi. Využitím tejto metódy sa zvyšuje úspešnosť liečby nádorových ochorení [28]. Nádorové bunky majú častokrát schopnosť brániť sa aj kombinácii liečiv, túto vlastnosť spôsobuje MDR. MDR sa prejavuje pomocou takzvanej pumpovej a nepumpovej rezistencie [8], [22].

Pumpová rezistencia je spôsobená proteínmi nachádzajúcimi sa v cytoplazmatickej membráne, ktoré tvoria aktívne efluxné pumpy. Tieto pumpy sú poháňané adenozintrifosfátom (ATP). Ich úlohou je aktívne transportovať molekuly cytostatík ale aj iných látok von z bunky, čím znižujú koncentráciu liečiv v intracelulárnom priestore a znemožňujú ich správnu funkciu. Najdôležitejším proteínmi podieľajúcimi sa na pumpovej rezistencii sú membránové proteíny P-glykoproteín (Pgp) s veľkosťou 170 kDa a MRP (multidrug resistance associated protein, proteíny asociované s multi-liekovou rezistenciou) s veľkosťou 190 kDa [6], [7], [8].

Nepumpová rezistencia sa prejavuje zneškodnením apoptických ciest, čiže znemožnením programovanej bunkovej smrti. Prejavuje sa napríklad zvýšenou expresiou antiapoptického proteínu Bcl-2 [8], proteínu Mcl-1 [5], alebo inaktiváciou tumor supresorového proteínu p53 [22].

## 2 UTLMOVANIE GÉNOV

Utlmovanie génov zabezpečuje prirodzenú reguláciu génovej expresie. Utlmovanie môže prebiehať počas transkripcie, vtedy hovoríme o transkripčnom utlmovaní génov, alebo počas translácie, to sa nazýva post-transkripčné utlmovanie génov [29].

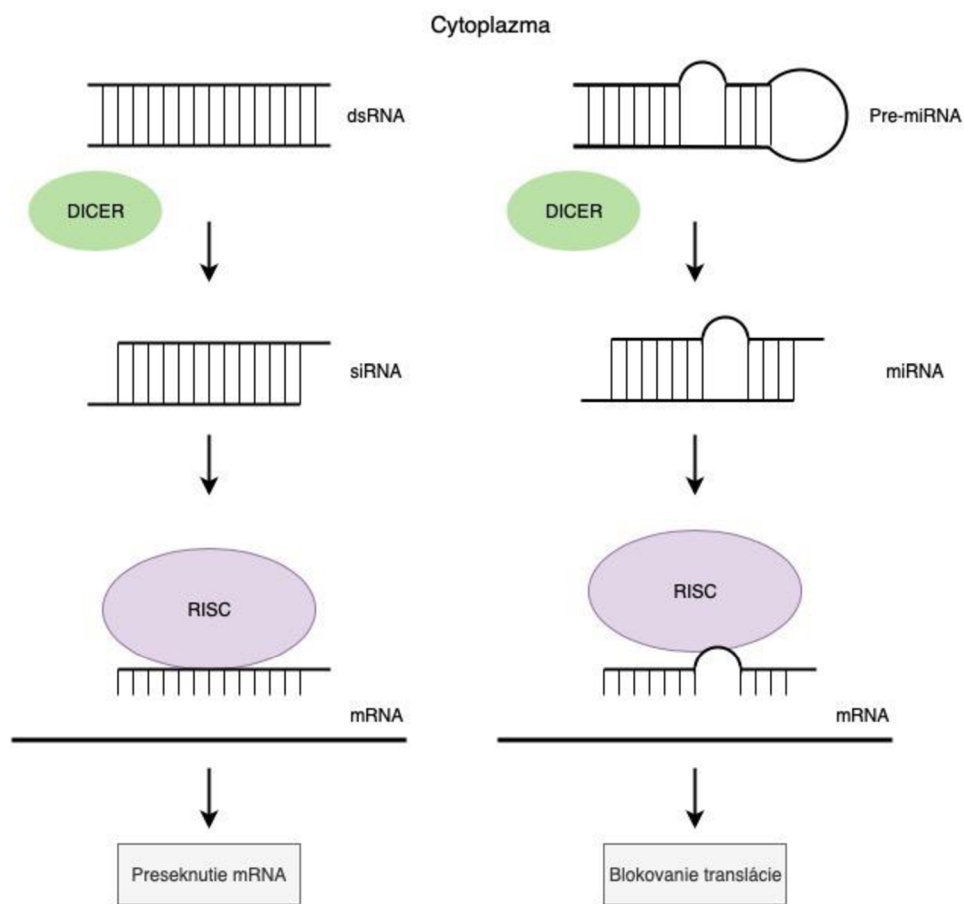
### 2.1 RNA interferencia

RNA interferencia patrí do skupiny post-transkripčného utlmovania génov. V posledných rokoch sa RNAi považuje za jednu z najslubnejších metód v terapii nádorových ochorení. Je to prirodzený mechanizmus, kedy eukaryotické bunky využívajú dvojvláknové RNA na reguláciu zvýšenej expresie niektorých génov. Rastliny využívajú RNAi aj ako dôležitú súčasť imunitnej ochrany pre vírusmi [30]. Na RNAi sa primárne využívajú dva druhy dvojvláknových RNA a to malé intererujúce RNA (siRNA) a mikro RNA (miRNA) [12]. miRNA je syntetizovaná priamo v tele a siRNA je možné vytvárať v laboratórnych podmienkach a aplikovať do buniek, čo neumožňuje liečiť len nádorové ochorenia ale aj iné, ktoré sú konvenčnými metódami neliečiteľné [11], [31].

#### 2.1.1 RNAi s použitím miRNA

Mikro RNA sú krátke úseky dvojvláknovej RNA s dĺžkou približne 21-25 nukleotidov. Na 5' konci majú fosfátovú skupinu a na 3' konci dva voľné nukleotidy. Jednotlivé vlákna nie sú úplne komplementárne [27].

Pre-miRNA sa syntetizuje v jadre bunky odkiaľ je následne vypustená do cytoplazmy (Obrázok 1). V cytoplazme reaguje s nukleázou RNáza III nazývaná aj DICER a ktorá z nej vytvorí miRNA. miRNA sa spojí s niekoľkými enzýmami do komplexu RISC (RNA induced silencing complex, RNA indukovaný tmiaci komplex), čo je ribonukleoprotein, ktorý z miRNA odstráni druhé vlákno a ostane iba naviazané vodiace vlákno. Takto vytvorený RISC je aktívny a môže blokovat' transláciu [31].

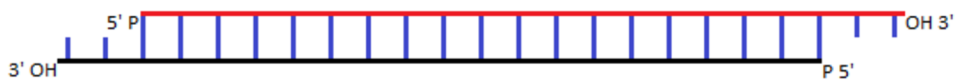


Obrázok 1: Schematické zobrazenie RNA interferencie. Prepracované podľa [46]

### 2.1.2 RNAi s použitím siRNA

Malé interferujúce RNA sú dvojvláknové a dlhé 19-23 nukleotidov, jednotlivé vlákna sú komplementárne a na každom 3' konci sú dva voľné nukleotidy nespárované s opačným vláknom, 3' konce sú ukončené hydroxylovou skupinou. Na 5' konci majú obe vlákna fosfátovú skupinu (Obrázok 2) [32].

V organizme vzniká siRNA z dlhých dvojvláknových RNA (dsRNA), ktoré sú väčšinou exogénneho pôvodu, môžu mať taktiež vírusový pôvod [33], alebo môžu byť do bunky pridané aj experimentálne [34]. dsRNA reagujú s enzýmom DICER (Obrázok 1), ktorý z dlhej dvojvláknovej RNA spraví krátke siRNA, tvorba komplexu RISC prebieha tak isto ako pri miRNA. Rozdiel medzi nimi je ale v tom, že siRNA je komplementárna k cieľovej mRNA a transláciu neblokuje, ale dôjde priamo k preseknutiu cieľovej mRNA [31].



Obrázok 2: Schematické zobrazenie siRNA. Prepracované podľa [47]

### 2.1.3 Stabilita siRNA

Za fyziologických podmienok je siRNA veľmi nestabilná. Pri priamom transporte čistej siRNA krvou, je siRNA veľmi rýchlo enzymaticky degradovaná sérovými nukleázami [34]. A kvôli svojej malej veľkosti (približne 13 kDa) je z krvi odfiltrovaná renálnou filtráciou [35].



### 3 NANOTRANSPORTÉRY

Kvôli svojej malej životnosti je pre využitie siRNA v liečbe nádorových ochorení nevyhnutné využiť na jej transport častice, ktoré by ju dokázali ochrániť pred pôsobením nepriaznivého prostredia organizmu.

Ako všetky bunky tak aj tie nádorové potrebujú živiny pre svoju existenciu. Malé nádory do 2 mm<sup>3</sup> dokážu prežiť zo získavania živín difúziou. Nádory, ktoré túto veľkosť prerastú, stávajú sa hypoxickými a začnú vysielat' angiogénne faktory a potláčať angiogénne inhibítory. Takto vzniknuté cievne siete sú nedokonalé a kvôli medzerám medzi bunkami endotélia zvyšujú permeabilitu svojho obsahu do intersticiálneho priestoru nádorov. Veľkosť týchto dier sa pohybuje od 100 do 780 nm, kontraste k normálnym rozmerom endotéliových pórov, ktoré sú od 10 do 50 nm [36], [37].

Z tohoto pohľadu najlepším riešením využitie nanočastíc na transport siRNA. Nanočastice sú dostatočne malé na to aby sa dokázali dostať cez diery v cievach zásobujúcich nádorové tkanivo a akumulovať sa v priestoroch nádorov. Tento jav sa volá pasívne cieleňá doprava [38]. Aby mohlo byť pasívne cieleňie zabezpečené, nanočastice by mali byť menšie ako 100 nm ale väčšie ako 10 nm, čo je približná veľkosť pórov v zdravých bunkách. Výhodou je aby boli nanočastice väčšie ako 20 nm pretože, 20 nm je maximálny rozmer častíc odstraňovaných glomerulárnou filtráciou [43].

Okrem pasívneho cieleňia je výhodou možnosť úpravy povrchu nanočastice na aktívne cieleňú dopravu. Niektoré receptory na povrchu nádorov je možno využiť na cieleňú dopravu nanočastíc. Stačí pritom upraviť povrch nanočastice pomocou receptorových ligandov. Nanočastice upravené ligandami sa viažu na receptory na nádorových bunkách a internalizujú sa pomocou receptormi sprostredkovanej endocytózy. Po internalizácii je obsah nanočastice vypustený či už do cytoplazmy alebo v jadre. Vďaka rozmanitosti receptorov na povrchoch buniek môžu byť týmito ligandami peptidy, vitamíny, protilátky ale aj mnohé iné biologické zlúčeniny [39].

## **3.1 Proteínové nanotransportéry**

### **3.1.1 Albumín**

Albumín je nanotransportér, ktorý sa dá ľahko získať z mnohých zdrojov napríklad vaječné bielko, hovädzí sérový albumín alebo ľudský sérový albumín. Albumín je vo vode rozpustný proteín, ktorý sa podieľa na udržiavaní osmotického tlaku a transportu živín do bunky. Je stabilný v rozsahu pH od 4 do 9 a dokáže vydržať teplotu 60 °C po dobu 10 hodín bez akejkoľvek známky denaturácie. Je často využívaný na konštrukciu nanokapsúl. Nanotransportéry vytvorené z albumínu sú biodegradovateľné, ľahko sa vytvárajú a majú na povrchu funkčné miesta (thio-, amino- a karboxyskupiny) na ktoré sa môžu viazať ligandy pre ciele dopravy. Uvoľnenie liečiva z albumínového nanotransportéru je dosiahnuté pomocou enzýmu proteázy [40], [41].

### **3.1.2 Želatína**

Je to jeden z najpoužívanejších zvieracích proteínov získavaných kontrolovanou hydrolyzou kolagénu, ktorý je najväčšou zložkou kože, kostí a chrupaviek. Želatína je považovaná za bezpečnú na použitie pre medicínske účely a dlhú dobu sa používa na výrobu liekových kapsúl. Je biodegradovateľná a ľahko chemicky upraviteľná, čiže je perfektným kandidátom na využitie ako nanotransportér. Ďalšie výhodné vlastnosti sú, že je lacná, nepyrogenická, a nevyvoláva reakcie imunitného systému. Obsahuje mnoho ionizovateľných skupín ako karboxylové alebo amino skupiny, ktoré môžu slúžiť ako potenciálne miesta pre ligandy alebo iné chemické úpravy. Taktiež sa pridávajú do želatíny zosieťovacie činidlá ako glutaraldehyd, ktorý dodáva surovej želatíne stabilitu, tvar znižuje rozpustnosť pri vysokých teplotách a taktiež zvyšuje cirkulačný čas *in vivo*. Uvoľnenie obsahu želatíny závisí na úrovni zosieťovania [40], [41].

### **3.1.3 Apoferritín**

Feritíny je skupina proteínov, ktoré sú hlavnými skladovateľmi železa v tele. Nachádzajú sa v takmer všetkých organizmoch od tých najkomplikovanejších až po jednoduché mikroorganizmy. Úlohou feritínov je predísť nebezpečnej akumulácii železa v organizme tým, že ho uskladnia pre neskoršie použitie. V normálnom stave

sú feritíny naplnené iónmi železa, ale po jeho odstránení majú štruktúru dutej gule do ktorej je možné uzatvárať organické alebo anorganické látky. Feritín, ktorý neobsahuje železo sa nazýva apoferitín [42].

Apoferitín má veľmi stabilnú a odolnú štruktúru, je schopný ustáť teplotu až do 70 °C, a široký rozsah pH od 3,4 po 10 po relatívne dlhý čas bez toho aby sa jeho štruktúra poškodila. Má molekulovú hmotnosť 450 až 475 kDa a tvorí schránku s vonkajším priemerom 12–13 nm a vnútorným priemerom 7–8 nm v tvare kosoštvorcového dvanásťstenu s 4-3-2 symetriou. Apoferitín stavovcov je tvorený dvadsiatimi štyrmi podjednotkami, pričom vždy dve podjednotky spojené nekovalentnými väzbami tvoria jednu stenu. Existujú v ňom dva druhy podjednotiek: ťažké (H) a ľahké (L) s rozdielnymi molekulovými hmotnosťami 21 respektíve 19 kDa a majú 53% podobnosť. Každá podjednotka je tvorená piatimi alfa helixami, pričom prvé štyri majú paralelnú a anti-paralelnú orientáciu a piaty je otočený o približne 60 stupňov smerom dovnútra molekuly apoferitínu. Na transport atómov železa slúžia úzke kanály zakomponované do štruktúry schránky [42], [43].

Veľkou výhodou apoferitínu pre použitie ako nanotransportér je závislosť jeho štruktúry na okolitých podmienkach. Dokáže sa svojvoľne rozložiť a zložiť v závislosti na pH. Nad pH 3,4 je apoferitín stabilný a má dutý guľovitý tvar, pod 3,4 a stáva nestabilným a začína sa rozpadáť. Pokiaľ je pH znížené pod 0,8 tak sa jednotlivé podjednotky začínajú denaturovať a nenávratne tvoriť agregáty. Proces spätného skladania sa zahajuje zvýšením pH a závisí na podmienkach rozkladu. Apoferitín sa nikdy nedokáže zložiť do originálnej podoby. Pokiaľ pri rozklade pH dosiahlo hodnotu 1.96 a nižšie výsledná štruktúra zloženého apoferitínu je tvorená dvanástimi podjednotkami. Pokiaľ bolo pH v rozmedzí 2 až 3,4 tak má guľovitú štruktúru s dvomi 6.5 nm veľkými dierami na póloch a je tvorený 24 podjednotkami [42], [43].

Apoferitín dokáže dosiahnuť cieľových buniek pomocou pasívneho ale aj aktívneho cieleného transportu. Jeho pasívny transport do nádorového tkaniva zabezpečujú nedokonalé cievy zásobujúce nádory. Do buniek sa prirodzene dostáva receptormi sprostredkovanou endocytózou. Existujú dva receptory pre apoferitín a to SCARA5 (pre apoferitín bohatý na ľahké podjednotky) a TfR1 (pre apoferitín

bohatý na ťažké podjednotky). Počas internalizácie dochádza k acidifikácii endozómu a tým aj k uvoľňovaniu obsahu apoforitínu. Povrch apoforitínu sa dá upraviť protilátkami, proteínmi, peptidmi, vitamínmi, aptamérmi DNA alebo RNA a mnohými inými látkami. Úpravami sa rozširujú možnosti cieleného transportu, ale aj zväčšujú rozmery apoforitínu z pôvodných 12-13 nm, čím sa zlepšuje pasívne cielenie a taktiež sa predchádza glomerulárnej filtrácii [42], [43].

## **4 KOMBINAČNÁ LIEČBA**

MDR je veľkým problémom pri liečbe nádorových ochorení, tvorí ju pumpová rezistencia, ktorá je poháňaná ATP dependentnými pumpami v membránach buniek a transportuje molekuly chemoterapeutických liečiv von z bunky. Ďalšou je pumpová rezistencia, ktorej hlavným princípom je aktivácia bunkových antiapoptických mechanizmov sprostredkovaných hlavne proteínom Bcl-2. Väčšina liečiv na liečbu nádorových ochorení spôsobuje apoptózu, čím aktivujú obidva spôsoby obrany buniek, ktoré znemožňujú bunkovú smrť. Pokiaľ chceme dosiahnuť zlepšenie v efektivite chemoterapie, tak je nevyhnutné inhibovať obidva pumpové aj nepumpové mechanizmy MDR. Možným riešením je vytvorenie kombinačnej liečby za použitia RNA interferencie sprostredkovanej siRNA alebo miRNA, ktoré by sa postarali o inhibíciu MDR a chemoterapeutických liečiv, ktoré by dosiahli apoptózu nádorových buniek. Pre takto vytvorené liečivo by bolo potrebné vytvoriť nanočasticu, ktorá by bola schopná transportovať hydrofilné dvojitláknové RNA ale aj prevažne hydrofóbne chemoterapeutické lieky [8].

# 5 MATERIÁLY A METÓDY

## 5.1 Chemikálie

Všetky chemikálie použité v tejto práci boli kúpené od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), pokiaľ to nie je inak uvedené. Na meranie pH bol použitý pH meter pH 50+ DHS (XS Instruments, Carpi, Taliansko).

V tejto práci sú použité tri druhy apoforitínu. Konský apoforitín izolovaný zo sleziny a zložený z 22 ľahkých a 2 ťažkých podjednotiek (ďalej menovaný ako EcaLH), Ľudský apoforitín zložený z 24 ťažkých podjednotiek (ďalej HsaH) a ľudský apoforitín s modifikáciou aminokyselín tvoriacich alfa helix smerujúci do vnútra, za sekvenciu tvorenú kladne nabitými aminokyselinami arginín a lyzín (ďalej HsaH-RK). Apoforitíny HsaH a HsaH-RK boli produkované rekombinantne a poskytnuté od Dr. Vladimíra Pekaříka (Fyziologický ústav, Lekárska fakulta Masarykovej univerzity, Brno, Česká Republika).

Pre charakterizáciu vplyvu apoforitínu na bunky bola vybraná bunková línia HEK 293 kultivovaná v médiu DMEM. Pri všetkej práci boli bunky umiestnené v inkubátore Galaxy 170 R (Eppendorf, Hamburg, Nemecko) pri teplote 37 °C, 5% koncentrácii CO<sub>2</sub> a vlhkosti 100%.

Zloženia roztokov a chemikálií použitých v práci:

- Všeobecne používané roztoky:
  - Fosfátový pufor: (PBS) 137mM KCL, 1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 4,43mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pri pH 7,4
  - Ringerov roztok: chlorid sodný 7,2 mg/mL, chlorid vápenatý 0,17 mg/mL a chlorid draselný 0,37 mg/mL
- Agarózová elektroforéza:
  - Separačný pufor (TAE): 40mM Tris, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA
  - Nanášací pufor (GLS): 30% glycerol, 0,25% bromfenolová modrá
  - Gél: agaróza (1%, 2%), 50 mL TAE pufor, 1 µL etídium bromid (10 mg/mL)

- Denaturačná (SDS) elektroforéza:
  - Nanášací pufo (PLB max): 20% glycerol, 0,1% bromfenolová modrá, 50mM Tris/HCl pH 6,8, 2% dodecylsírán sodný (SDS)
  - Nanášací pufo (PLB-R): 87% PLB max, 13% merkaptoetanol
  - Nanášací gél: akrylamid/bisakrylamid (29:1), 0,625M Tris/HCl pH 8,8, , Milli-Q, N,N,N',N' – tetramethylethylendiamin (TEMED), persírán amónny (APS), 0,5% SDS
  - Separačný gél 12,5%: akrylamid/bisakrylamid (29:1), 1,88 M Tris/HCl pH 8,8, Milli-Q, N,N,N',N' – tetramethylethylendiamin (TEMED), Persírán amónny (APS), 0,5% SDS
  - Separačný pufo: 25mM Tris, 192mM glycín, 0,1% SDS, pH 8,3
- Coomassie Blue roztoky pre farbenie gélov:
  - Roztok A: 0,05% Coomassie Brilliant Blue R250 (CBR 250), 25% 2-propanol, 10% kyselina octová
  - Roztok B: 0,005% CBR 250, 10% 2-propanol, 10% kyselina octová
  - Roztok C: 0,002% CBR 250, 10% kyselina octová
  - Roztok D: 10% kyselina octová
- Western Blot:
  - Blotovací pufo 2x: 150mM glycín, 25 mM Tris, 10% metanol
  - Blokovací roztok: 5% sušené mlieko v PBS
  - Protilátkový pufo: 1 mg/mL hovädzieho sérového albumínu (BSA) v PBS
  - PBS-T: 500  $\mu$ L Tween<sup>®</sup> 20 v 1 L PBS

## 5.2 Kyslá enkapsulácia siRNA do apoferritínu

Enkapsulačný protokol kyslej enkapsulácie (KE) siRNA do kavity konského apoferritínu EcaLH zahŕňa pridanie 10  $\mu$ L fluorescenčne značenej siRNA s koncentráciou 10 $\mu$ M do zmesi 20  $\mu$ L 50 mg/mL Apo a 290  $\mu$ L Milli-Q vody. 0,75  $\mu$ L 1M kyseliny chlorovodíkovej bolo pridaných na zníženie pH roztoku a rozloženie EcaLH na podjednotky. Roztok bol následne 15 minút premiešavaný na rotátore Multi RS-60 (BioSan, Riga, Lotyšsko). 0,6  $\mu$ L 1M hydroxidu sodného bolo použitých

na zvýšenie pH a enkapsuláciu siRNA do EcaLH a vytvorenie EcaLHsiRNA. Výsledný roztok bol premiešavaný 15 minút na rotátore Multi RS-60. Na odstránenie prebytočnej siRNA a podjednotiek EcaLH ktoré sa nezložili bola využitá diafiltrácia za pomoci filtrov Amicon® Ultra (0,5 ml 50K; Merck Millipore, Billerica, MA, USA) v centrifúge 5424R (Eppendorf, Hamburg, Nemecko) na 6 000 g 4 °C a 15 minút. Diafiltrácia sa opakovala 3×, po prvých dvoch diafiltráciách bol vzniknutý sediment na spodnej časti filtru resuspendovaný v Milli-Q vode. Po poslednej diafiltrácii bol resuspendovaný na pôvodných 320 µL a presunutý do čistej skúmavky.

### **5.3 Charakterizácia vzniknutých nanočastíc**

Pre vzorky EcaLHsiRNA bola zisťovaná enkapsulačná výťažnosť, priemerná veľkosť nanočastíc, test dlhodobej stability a internalizácie EcaLHsiRNA do buniek pomocou fluorescenčnej značky na siRNA.

Enkapsulačná výťažnosť bola zisťovaná hneď po vytvorení EcaLHsiRNA. Použitá siRNA je fluorescenčne značená farbivom Cy3 s excitačnou vlnovou dĺžkou 554 nm a emisnou vlnovou dĺžkou 570-580 nm. Vzorka EcaLHsiRNA bola diafiltrovaná cez Amicon Ultra 0,5 mL 50K. 50 µL roztoku bolo napipetovaných do UV transparentnej doštičky (Corning, Corning, NY, USA). Fluorescencia bola meraná pomocou spektrofotometru Infinite 200 Pro (Tecan, Männedorf, Švajčiarsko). Vzhľadom k limitácii spektrofotometra, neumožňujúceho excitáciu pri vlnovej dĺžke 554 nm za súčasného snímania emisie pri vlnových dĺžkach od 570 nm, bolo nutné pre excitáciu použiť svetlo s vlnovou dĺžkou 540 nm. Enkapsulačná výťažnosť bola vypočítaná z fluorescence pred filtráciou a po diafiltrácii. Výsledné hodnoty boli prevedené na percentá. Na porovnanie výsledkov bolo zisťované aj absorpčné spektrum od 230 nm po 850 nm. Všetky hodnoty fluorescence a absorbancie boli určené ako priemer piatich meraní.

Priemerná veľkosť nanočastíc bola zisťovaná dynamickým rozptylom svetla v prístroji Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Spojené Kráľovstvo). Vzorky boli pred meraním riedené 200× Milli-Q vodou. 50 µL vzorky bolo pridaných do jednorazovej polystyrénovej kyvety Zen0040 (Brand GmbH, Wertheim, Nemecko). Merania prebiehali pri detektorovom uhle 173° a vlnovej dĺžke 633 nm.

Refrakčný index disperznej fázy bol 1,46 a index disperzného prostredia 1,333. Vyrovnávací čas bol 120 sekúnd. Každé meranie bolo opakované 6×.

siRNA enkapsulovaná do EcaLH by sa mala svojvoľne uvoľňovať v čo najmenšom množstve, preto bola testovaná stabilita nanočastíc EcaLHsiRNA. Pripravená bola vzorka EcaLHsiRNA podľa postupu KE (kap. 5.2) v Ringrovom roztoku, ktorý má napodobňovať správanie sa EcaLHsiRNA v krvnej plazme. Test bol vykonaný meraním fluorescence pred diafiltráciou v Amicon® Ultra 0,5 mL 50K a meraním fluorescence po diafiltrácii. Merania sa opakovali v časových intervaloch 0; 0,5; 1,5; 6; 24 hodín. V tých istých časoch bola meraná aj priemerná veľkosť nanočastíc.

## **5.4 Bunková línia**

Pre túto prácu bola vybratá nemalígna bunková línia HEK 293 kultivovaná v médiu DMEM so zmesou antibiotík Pen-Strep (100 U/mL penicilin, 0,1 mg/mL streptomycin). Pre potreby internalizácie apoforitínov boli bunky kultivované v 12 jamových doštičkách (Corning, Corning, NY, USA). Pre funkčnú transfekciu boli bunky kultivované v 6 jamkových doštičkách (Corning, Corning, NY, USA). V obidvoch prípadoch boli doštičky umiestnené v inkubátore.

## **5.5 Internalizácia EcaLHsiRNA do buniek**

Médium použité na kultiváciu buniek bolo odstránené. Potom bolo do štyroch jamiek pridaných 500 µL roztoku EcaLHsiRNA pripraveného podľa postupu KE v kapitole 5.2 zmiešaného s médiom DMEM (70 µL EcaLHsiRNA + 440 µL DMEM). Do ďalších štyroch jamiek bolo pridaných 500 µL DMEM, tieto jamky slúžili ako kontrola. Zber buniek prebiehal v časových bodoch 12, 24, 48 a 72 hodín. Médium bolo odpipetované do uzatvárateľných skúmaviek pre prípad, že by boli niektoré bunky odsadnuté. Jamky boli dvakrát premyté pomocou 500 µL PBS. Po premytí bolo pridaných 250 µL akutázy. Doštička bola umiestnená do inkubátora na približne 5 minút, pokiaľ nebolo viditeľné odsadnutie buniek od dna doštičky. Účinky akutázy boli inhibované pridaním 500 µL DMEM. Odsadnuté bunky



s médiom a akutázou boli premiestnené do príslušných skúmaviek a centrifugované pri 400 g a teplote 4 °C po dobu 5 minút. Vzniknutý supernatant bol odstránený, pelet na spodku skúmavky bol resuspendovaný v 500 µL PBS s teplotou 4 °C a centrifugovaný pri rovnakých podmienkach. Po druhej centrifugácii bol supernatant opäť odstránený a finálny pelet resuspendovaný v 300 µL 3% FBS v PBS s teplotou 4 °C. Kvantifikácia internalizácie EcaLHsiRNA prebiehala pomocou merania na prietokovom cytometri BD Accuri C6 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Prietok cytometrom bol nastavený na 35 µL/min, analýza prebiehala na 100 000 bunkách, alebo maximálne 250 µL vzorky.

## **5.6 Internalizácia EcaLH, HsaH a HsaH-RK do buniek**

80 µL apoforitínu EcaLH, HsaH alebo HsaH-RK s koncentráciou 35 mg/mL bolo zmiešaných s 8 µL fluorescenčnej farby Cy5 NHS ester (Lumiprobe, Hanover, Nemecko) a doplnené do objemu 500 µL 0,05M borátovým pufrom s pH 8,5. Vzniknuté roztoky sa nechali inkubovať hodinu pri teplote 25 °C. Vzorky boli 5 krát diafiltrované cez Amicon Ultra 100K pri 6 000 g a teplote 4 °C po dobu 15 minút, po centrifugácii boli vždy resuspendované v 500 µL borátového pufru.

Médium bolo odstránené z jamiek a nahradené 26 µL vzoriek doplnených médiom DMEM do objemu 500 µL. Ku každej vzorke bola vytvorená kontrola s 500 µL čistého média. Inkubácia s bunkami prebiehala po dobu 12, 24 a 48 hodín. Zber buniek a príprava vzoriek a meranie na prietokovom cytometri prebiehali podľa postupu v kapitole 5.5.

## **5.7 Zásaditá enkapsulácia siRNA do apoforitínov**

Protokol zásaditej enkapsulácie (ZE) je pre všetky tri druhy apoforitínu EcaLH, HsaH a HsaH-RK rovnaký. 40 µL apoforitínu s koncentráciou 35 mg/mL bolo zmiešaných s 30 µL Milli-Q vody, pridaných bolo 10 µL 1M roztoku NaOH, vzniknutý roztok bol premiešaný pipetou a uložený na 5 minút do stojanu. Počas tejto doby roztok NaOH disocioval štruktúru apoforitínu. Po piatich minútach bolo pridaných 10 µL fluorescenčne značenej siRNA (karboxyfluorescein - FAM) s 10µM koncentráciou.

Roztok bol dobre premiešaný pipetou a odložený na dobu 15 sekúnd. Posledným krokom bolo pridanie 10  $\mu\text{L}$  1M roztoku HCl a dôkladné premiešanie. Výsledný roztok sa nechal 5 minút stáť v stojane, pričom sa štruktúra apoforitínu skladala naspäť.

## **5.8 Schopnosť EcaLH, HsaH a HsaH-RK enkapsulovať siRNA**

Schopnosť enkapsulácie siRNA do EcaLH, HsaH, a HsaH-RK bola overená elektroforeticky pomocou agarózovej elektroforézy. Vzorky boli pripravené duplicitne podľa postupu ZE v kapitole 5.7. Do jedného z duplikátov bola pridaná RNáza na odstránenie voľnej siRNA. Ku vzorkám boli taktiež pripravené kontroly siRNA v Milli-Q s rovnakou koncentráciou siRNA ako vo vzorkách, pričom do jednej z nich bola pridaná RNáza.

10  $\mu\text{L}$  každej vzorky bolo zmiešaných s 5  $\mu\text{L}$  nanášacieho pufru (GLS) a napipetovaných do jamiek 1% agarózového gélu s etídium bromidom (EtBr). Separácia prebiehala 30 minút pri napätí 90 V. Fluorescencia FAM a interkalovaného EtBr bola zobrazená pomocou azure c600 (Azure Biosystems, Dublin, CA, USA). Proteíny boli zafarbené pomocou Coomassie Blue a fluorescencia Coomassie Blue bola zobrazená pri excitácii svetlom s vlnovou dĺžkou 700 nm na Azure c600.

## **5.9 Internalizácia EcaLH, HsaH a HsaH-RK s enkapsulovanou siRNA do buniek**

Médiom bolo odsaté z jamiek a nahradené 70  $\mu\text{L}$  vzoriek pripravených postupom z kapitoly 5.7 zmiešaných s 440  $\mu\text{L}$  kultivačného média DMEM. Vytvorená bola taktiež kontrola s čistým médiom a kontrola s rovnakým množstvom FAM značenej siRNA ako vo vzorkách feritínov. Inkubácia prebiehala po dobu 12 a 24 hodín. Zber buniek a príprava pre meranie na prietokovom cytometri prebiehali podľa rovnakého postupu ako v kapitole 5.5. Prietok vzoriek cytometrom bol nastavený na 35  $\mu\text{L}/\text{min}$ , analyzovalo sa 120 000 buniek alebo 250  $\mu\text{L}$  vzorky.

## 5.10 Optimalizácia koncentrácie chlorokvinu

Na bunky bolo nanesených 35  $\mu\text{L}$  HsaH-RK značeného fluorescenčným farbivom Cy5 doplneného do objemu 250  $\mu\text{L}$  médiom DMEM. Ku každej jamke prislúchala kontrola s médiom DMEM. Po 1 a pol hodine od začiatku inkubácie bol ku jamkám obsahujúcim HsaH-RK pridaný chlorokvin (CQ) s výslednými koncentraciami 25, 50 a 100  $\mu\text{M}$ . Čas 1,5 hodiny bol vybraný z dôvodu, že pri predošlých experimentoch bolo zistené, že 1,5 hodiny je čas, v ktorom sú bunky na prítomnosť apoforitínov už pozitívne. Subcelulárna lokalizácia HsaH-RK boli fotená na mikroskope EVOS FL Auto (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) v časových bodoch 0, 1, 2, 4 a 8 hodín.

## 5.11 Charakterizácia HsaH-RK s enkapsulovanou siRNA

Pre charakterizáciu nanotransportéru HsaH-RKsiRNA bola zisťovaná enkapsulačná výťažnosť, stabilita v rozmedzí 0 až 72 hodín a veľkosť častíc.

Enkapsulačná výťažnosť bola zisťovaná pomocou elektroforézy v 1% agarózovom géle s EtBt kde bolo napipetovaných 10  $\mu\text{L}$  kontrolnej vzorky pripravenej podľa postupu ZE (5.7) zmiešaných s 5  $\mu\text{L}$  nanášacieho pufru GLS. Rovnaké objemy a postup boli vytvorené pre vzorku, ktorej enkapsulačná výťažnosť bola zisťovaná, s tým rozdielom, že bol do nej pridaný 1  $\mu\text{L}$  RNázy na odstránenie voľnej siRNA. Pred pipetovaním do gélu boli vzorky 30 minút inkubované pri 37 °C. Separácia prebiehala 30 minút pri 90 V.

$$\%_{\text{uvoľnené}} = 100 - \frac{AUC_1}{AUC_2 + AUC_3} \times 100 \quad (5.11.1)$$

Vyššie uvedená rovnica popisuje výpočet percenta siRNA uvoľnenej z HsaH-RK. Kde  $AUC_1$  je plocha pod krivkou bandu feritínu, ktorého výťažnosť bola zisťovaná,  $AUC_2$  je plocha pod krivkou feritínu z kontrolnej vzorky,  $AUC_3$  je plocha pod krivkou voľnej siRNA z kontrolnej vzorky.

Ako pri stabilite EcaLHsiRNA, tak aj pri HsaH-RK so siRNA sa očakáva, že samovoľné uvoľňovanie siRNA v Ringrovom roztoku simulujúcom prostredie

krvnej plazmy by malo byť minimálne. Pripravené boli dve vzorky HsaH-RK s enkapsulovanou siRNA podľa protokolu ZE (kap. 5.7). Po príprave boli obidve vzorky spojené do jedného celku a diafiltrované pomocou Amicon® Ultra (0,5 mL 100K; Merck Millipore, Billerica, MA, USA) v centrifúge 5424R (Eppendorf, Hamburg, Nemecko) na 6 000 g pri 4 °C a po dobu 15 minút. Pri diafiltrácii sa odstránila siRNA ktorá sa neuzavrela do HsaH-RK, a taktiež podjednotky, ktoré sa nepodarilo zapojiť pri spätnom skladaní štruktúry HsaH-RK. Sediment vo filtri bol resuspendovaný na pôvodný objem 200 µL Ringrovým roztokom. Do roztoku bol pridaný 1 µL RNázy. RNáza slúži na štiepenie uvoľnenej siRNA. Vzorky boli po celú dobu inkubované v termoboxe pri teplote 37 °C. Vyhodnocovanie uvoľňovania siRNA prebiehalo elektroforézou na 1% agarózovom géle s EtBr s rovnakými podmienkami ako v kapitole 5.7. Elektroforéza sa opakovala v časových bodoch 0; 0,5; 1,5; 6; 24 hodín. Hodnotenie gélov prebiehalo ako pri určovaní enkapsulačnej výťažnosti. V rovnakých časových bodoch bola meraná aj priemerná veľkosť častíc podľa postupu vysvetleného v kapitole 5.3.

## 5.12 Transfekcia s anti-Bcl-2 siRNA

Transfekcia prebehla so vzorkami HsaH-RK s enkapsulovanou siRNA navrhnutou na down-reguláciu expresie génu *BCL2* (Ambion, ID-214532) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Funkčnosť siRNA bola overená transfekciou pomocou komerčného transfektančného činidla Metafectene (Biontix, Mníchov, Nemecko) založeného na báze lipidov. S Metafectene boli vzorky pripravené podľa protokolu výrobcu. Vzorky obsahujúce HsaH-RKsiRNA boli pripravené pomocou protokolu zásaditej enkapsulácie podľa kap. 5.7 a rozdelené do troch alikvót po 140 µL. Prvá vzorka bola doplnená do objemu 1 mL médiom DMEM. Do vzorky 2 a 3 bolo pridaných 835 µL resp. 810 µL média. Vzorky boli aplikované do jamiek s bunkami, pri vzorke 2 a 3 bol po jeden a pol hodine pridaný CQ. Vytvorené boli aj dve kontroly, jedna s čistým médiom a druhá s médiom zmiešaným so 14 µL samotnej anti-Bcl-2 siRNA. Všetky vzorky boli pripravené duplicitne, pre evaluáciu na úrovni RNA a úrovni proteínov. Inkubácia prebiehala po dobu 48 hodín.

### **5.13 Izolácia RNA**

RNA bola izolovaná 48 hodín po transfekcii pomocou High Pure RNA Isolation Kitu (Roche, Bazilej, Švajčiarsko). Z jamiek bolo odstránené médium a bunky boli premyté s PBS. Do jamiek bolo pridaných 400  $\mu$ L lyzačného pufru, následne boli bunky zoškrabané pomocou škrabky a presunuté do čistej skúmavky. Každá vzorka bola približne 15 sekúnd vortexovaná a presunutá do pripravenej izolačnej kolony so zbernou skúmavkou. Vzorky boli centrifugované pri 8 000 g a 20 °C po dobu 1 minúty. Supernatant bol zo zbernej skúmavky odstránený, a do kolony bolo pridaných 10  $\mu$ L DNázy zmiešanej s 90  $\mu$ L DNázového pufru. Roztok bol inkubovaný 20 minút pri 20 °C. Po inkubácii bolo pridaných 500  $\mu$ L premývacieho pufru I. Kolony boli znova centrifugované pri rovnakých podmienkach. Supernatant bol odstránený a do kolony bolo pridaných 500  $\mu$ L premývacieho pufru II. Centrifugácia prebehla za rovnakých podmienok. Zberná kolona bola vyprázdnená a pridaných bolo 200  $\mu$ L pufru II, vzorky boli centrifugované pri 12 000 g a 20 °C po dobu 5 minút. Po tomto centrifugovaní bola kolona premiestnená do sterilnej skúmavky zbavenej RNáz. Pridaných bolo 50  $\mu$ L elučného pufru. vzorky boli inkubované 2 minúty pri 20 °C a centrifugované pri 8 000 g po dobu 2 minút.

### **5.14 Čistota a koncentrácia izolovanej RNA**

Čistota a koncentrácia RNA bola zisťovaná spektrofotometricky pomocou doštičky NanoQuant Plate (Tecan, Männedorf, Švajčiarsko) a spektrofotometru. Najprv boli napipetované 2  $\mu$ L elučného pufru použitého na izoláciu RNA. Cieľom bolo zistiť bazálne absorbancie. Elučný pufr bol odstránený a napipetované boli 2  $\mu$ L každej vzorky. Všetko pipetovanie prebehlo v duplikátoch. Čistota vzoriek bola vyhodnotená ako pomer absorbancií na vlnových dĺžkach 260 a 280 nm. Ideálne čistá RNA má pomer absorbancií rovný 2, ale použiteľné sú hodnoty v obore 1,8 až 2,2.

## 5.15 Reverzná transkripcia

Izolovaná RNA bola prepísaná na cDNA za použitia Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kitu (Roche, Bazilej, Švajčiarsko). Ako primere boli zvolené náhodné hexaméry. 11  $\mu\text{L}$  (500 ng RNA) vzorky bolo zmiešaných s 9  $\mu\text{L}$  mastermixu pripraveného podľa postupu výrobcu a umiestnených do termocykléru Mastercycler Nexus (Eppendorf, Hamburg, Nemecko), s teplotnými a časovými nastaveniami 25 °C/10 minút pre nasadenie primerov, 55 °C/30 minút pre polymerizáciu cDNA a 85 °C/5 minút pre deaktiváciu reverznej transkriptázy. Po skončení boli vzorky 20× nariadené vodou bez RNáz.

## 5.16 Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia

Na kvantitatívnu polymerázovú reťazovú reakciu (Real-time PCR, qPCR) bol použitý Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Pre každú vzorku bolo zmiešaných 9  $\mu\text{L}$  2× riedeného mastermixu, 0,5  $\mu\text{L}$  dopredného, 0,5  $\mu\text{L}$  spätného primeru a 10  $\mu\text{L}$  (25 ng RNA) produktu reverznej transkripcie. 5  $\mu\text{L}$  každej vzorky bolo napipetovaných do qPCR doštičky (Eppendorf, Hamburg, Nemecko) triplikátach. Doštička bola prekrytá fóliou a umiestnená do termocykléru Mastercycler EP (Eppendorf, Hamburg, Nemecko). Nastavenie termocykléru použitého pre qPCR bolo: 90 °C/5 minút pre počiatočnú denaturáciu, 95 °C/20 sekúnd pre denaturáciu a 60 °C/20 sekúnd pre elongáciu. Cyklus denaturácia elongácia sa opakoval 40×, 60-95 °C/20 minút pre vyhodnotenie kriviek topenia a nakoniec schladenie na 4 °C. Sekvencie a charakteristika použitých primerov sú uvedené v tabuľke 1.

Názov	Gén	Sekvencia	T <sub>m</sub> [°C]	Primer (Bp)	Produkt (Bp)
GAPDH F	Glyceraldehyd-3- fosfát dehydrogenáza	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT	64,3	21	206
GAPDH R		CCCCACTTGATTTTGGAGGGA	64,5		
BCL2 F	BCL2 regulátor apoptózy	AGGATTGTGGCCTTCTTTGA	61,8	20	115
BCL2 R		GCCGGTTCAGGTACTCAGTC	63,8		

Tabuľka 1: Sekvencie použitých primerov

Hodnota génovej expresie bola vypočítaná pomocou upravenej Livakovej metódy, pričom na získanie hodnôt  $C_T$  (hodnota v ktorej amplifikačná krivka prekročila stanovenú hranicu) bol využitý softvér Realplex (Eppendorf, Hamburg, Nemecko), presnejšie algoritmus CalQplex (Eppendorf, Hamburg, Nemecko).

Hodnota  $\Delta C_T$  bola vypočítaná podľa nižšie uvedeného vzorca kde,  $C_{Tr}$  je hodnota referenčného génu *GAPDH* a  $C_{Te}$  je hodnota *BCL2*.

$$\Delta C_T = C_{Tr} - C_{Te} \quad (5.16.1)$$

$\Delta\Delta C_T$  bola vypočítaná ako rozdiel hodnôt  $\Delta C_T$  jednotlivých vzoriek a  $\Delta C_{Tk}$  kontroly.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T - \Delta C_{Tk} \quad (5.16.2)$$

Nakoniec bola vypočítaná veľkosť relatívnej génovej expresie (Fold change) ako exponent  $\Delta\Delta C_T$  so základom 2 pre každú vzorku.

$$Fold\ change = 2^{\Delta\Delta C_T} \quad (5.16.3)$$

## 5.17 Kontrola produktov

Produkty qPCR boli kontrolované pomocou agarózovej elektroforézy. Pripravený bol 2% agarózový gél s EtBr. Do prvej jamky boli napipetované 3  $\mu$ L 100 bp rebričku (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) nasledované 5  $\mu$ L amplifikovanej cDNA. Separácia vzoriek prebiehala pri napätí 85 V po dobu 55 minút.

## 5.18 Izolácia proteínov

Bunky pre izoláciu proteínov boli zbierané 48 hodín od transfekcie. Médium z jamiek bolo presunuté do čistých sterilných jednorazových skúmaviek. Bunky v jamkách boli odsadnuté 250  $\mu$ L trypsínu pri 37 °C. Pridaných bolo 500  $\mu$ L kultivačného média DMEM na inhibíciu účinkov trypsínu. Celý objem bol presunutý do príslušných skúmaviek. Od tohoto bodu bolo nutné držať bunky na ľade aby sa zabránilo degradácii proteínov. Následne boli centrifugované pri 200 g a 4 °C 10 minút. Supernatant bol odstránený, bunky resuspendované v 200  $\mu$ L PBS (4 °C)

a centrifugované pri rovnakých podmienkach. Supernatant bol odstránený a nahradený 99  $\mu\text{L}$  lyzačného roztoku RIPA s 1  $\mu\text{L}$  inhibítora proteáz. Každá vzorka bola vortexovaná aspoň 15 sekúnd a umiestená do chladničky v ľade na 15-30 minút. Vzorky boli nakoniec centrifugované na 15 000 g pri teplote 4 °C po dobu 45 minút. Supernatant premiestnený do sterilnej skúmavky sa buď ďalej spracovával, alebo bol uložený do -80 °C.

## **5.19 Koncentrácia proteínov**

Roztok BSA s koncentráciou 0,5 mg/mL bol nariadený na koncentrácie 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625, 0 (čisté Milli-Q). Tieto roztoky slúžili ako referenčné roztoky pre kalibračnú krivku. Reagencia Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) bola zriedená v pomere 1:4 s Milli-Q vodou. Vzorky lyzátov boli zriedené 20 $\times$ . 10  $\mu\text{L}$  každej vzorky bolo napipetovaných v triplikátoch do doštičky (Greiner Bio-lab, Kremsmünster, Rakúsko) do každej jamky bolo pridaných 200  $\mu\text{L}$  Bio-Rad Protein Assay. Meraná bola absorbanca na vlnovej dĺžke 595 nm. Z priemerov absorbancií roztokov PBS bola zostrojená kalibračná krivka a podľa jej rovnice vypočítané koncentrácie proteínov v lyzátach.

## **5.20 SDS Polyakrilamidová gélová elektroforéza (PAGE)**

Na separáciu proteínov pre western blot bol použitý 12,5 % SDS gél. 10  $\mu\text{L}$  bunkového lyzátu bolo zmiešaných s 5  $\mu\text{L}$  nanášacieho pufru PLB-R a denaturovaných 5 minút pri 95 °C. Do gélu boli napipetované 3  $\mu\text{L}$  rebríčku Precision Plus Protein Dual Xtra standards (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a 15  $\mu\text{L}$  každej vzorky. Gél bol separovaný 35 minút pri 200 V.

## **5.21 Western blot**

Blotovacia membrána bola 30 sekúnd aktivovaná v metanole a umiestnená s filtračným papierom a gélom do blotovacieho roztoku. Po piatich minútach bol zostrojený blotovací sendvič (tri vrstvy filtračného papiera, gél, membrána a tri vrstvy filtračného papiera.) bubliny spomedzi vrstiev boli odstránené pomocou



valčeka. Prenos proteínov na membránu prebiehal 50 minút pri 0,9 mA na 1 cm<sup>2</sup> membrány. Membrána bola hodinu blokována v blokovacom pufri na trepačke. Potom premytá od zbytku blokovacieho pufru pomocou PBS-T a umiestnená do primárnej protilátky pri 20 °C na 1 hodinu na rotátor. Primárne protilátky boli z monoklonálnych myších protilátok proti GAPDH (1:700, ID: sc-365062) a Bcl-2 (1:200, ID: sc-7382), obe protilátky boli od výrobcu (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Protilátky boli riedené protilátkovým pufrom. Membrána bola premytá pomocou PBS-T 4× po 15 minút a umiestnená na hodinu do sekundárnej zajačej anti-myšej protilátky značenej avidin-peroxidázou (Dako North America, Santa Clara, CA, USA) riedenou protilátkovým pufrom bez azidu sodného v pomere 1:5 000. Po inkubácii so sekundárnou protilátkou bola membrána premytá 4× po 15 minút s PBS-T. Na membránu s GAPDH bol aplikovaný chemiluminiscenčný substrát Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) membrána so substrátom bola inkubovaná 5 minút v plastovej fólii. Pre vyvolanie membrány s Bcl-2 musel byť z dôvodu nízkej expresie proteínu Bcl-2 použitý silnejší substrát Immobilon Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Membrána bola inkubovaná so substrátom vo fólii jednu minútu. Chemiluminiscencia membrán bola zobrazovaná pomocou Azure c600.

Zo zobrazených membrán bola zisťovaná plocha pod krivkou jednotlivých bandov zodpovedajúcich vzorkám. Na vyjadrenie relatívnej expresie bolo treba najprv vyčíslit' podiel plôch pod krivkou.

$$\text{podielAUC} = \frac{AUC_{BCL2}}{AUC_{GAPDH}} \quad (5.21.1)$$

Porovnávaná bola vždy plocha pod krivkou rovnakej vzorky. (napr.  $AUC_{kontrola\ Bcl2} / AUC_{kontrola\ GAPDH}$ ). Vyjadrenie relatívnej expresie (fold change) bolo podľa nižšie uvedeného vzorca.

$$\text{fold change} = \frac{\text{podielAUC}_{vzorka}}{\text{podielAUC}_{kontrola}} \quad (5.21.2)$$

## 5.22 Použité programy

Všetky fotky v tejto práci boli spracovávané vo fotografickom programe Affinity Photo (Serif, West Bridgford, UK), pre denzitometrické vyhodnocovanie fotiek bol

použitý program ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA,). Dáta boli štatisticky spracovávané na online platforme GraphPad (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 Optimalizácia pH pre kyslú enkapsuláciu siRNA do kavity konského apoforitínu

Enkapsulácia siRNA do EcaLH, ale aj jeho spätné uvoľnenie sú závislé na pH. Pri znížení pH roztoku obsahujúceho EcaLH dochádza k štrukturálnym zmenám proteínu. V nízkom pH disociuje. Po zvýšení pH sa skladá napäť, ale jeho štruktúra sa neobnoví na 100 %.

Bolo vytvorených 5 vzoriek. Prvá vzorka bola kontrolná 300  $\mu\text{L}$  Milli-Q vody s 20  $\mu\text{L}$  apoforitínu z konskej sleziny. Pre vzorky 2-5 bolo použitých 100  $\mu\text{L}$  Milli-Q vody a 20  $\mu\text{L}$  EcaLH. Do vzorky 3 a 5 bolo pridaných 200  $\mu\text{L}$  oligonukleotidu  $\lambda$ -cap, ktorý nahrádzal siRNA. Potom bolo do vzorky 3 pridaných 2,5  $\mu\text{L}$  1M roztoku HCl a do vzorky 5 0,75  $\mu\text{L}$  1M HCl. Do vzorky 2 a 4 bolo pridaných 2,5  $\mu\text{L}$  resp. 0,75  $\mu\text{L}$  1M HCl. Vzorky sa 15 minút premiešavali na rotátore. Zmerané bolo pH roztokov 2 až 4 (tab. 2). Na zvýšenie pH bol použitý 1M roztok NaOH. Pre vzorku 2 bolo zmiešaných 2,5  $\mu\text{L}$  NaOH s 200  $\mu\text{L}$   $\lambda$ -cap a pridaných do vzorky 2. Do vzorky 3 bolo pridaných 2,5  $\mu\text{L}$  NaOH. Do vzorky 4: 200  $\mu\text{L}$   $\lambda$ -cap, následne 0,6  $\mu\text{L}$  NaOH a do vzorky 5: 0,6  $\mu\text{L}$  NaOH. Vzorky sa premiešavali 15 minút na rotátore a potom bolo zmerané pH (tab. 2). Vzorky sa 4× diafiltrovali v centrifúge za použitia diafiltračných kolon Amicon Ultra 50K. Pred a po filtrácii bolo merané absorpčné spektrum od 230nm po 850 nm a fluorescencia s excitáciou pri 540 nm a emisiou 570 nm. Hodnoty fluorescencie boli použité na výpočet enkapsulačnej výťažnosti (tab. 2). Pre všetkých 5 vzoriek bola zistená priemerná veľkosť vzniknutých nanočastíc pomocou Zetasizer Nano ZS (tab. 3).

Vzorka	pH -	pH +	Enkapsulačná výťažnosť [%]
1	-	-	0
2	2,9	8	30
3	3	7,3	51
4	4,15	6,5	62
5	4,53	6,5	100

**Tabuľka 2 : Tabuľka hodnôt zvýšenia a zníženia pH pri enkapsulácii a veľkosti enkapsulačnej výťažnosti.**

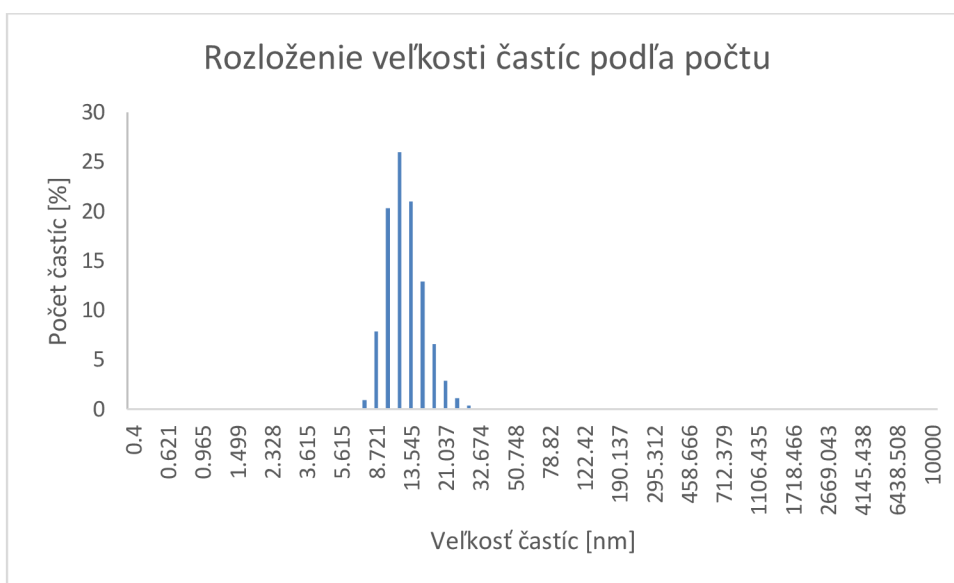
Vzorka	Veľkosť [nm]	Počet [%]	PdI
1	8,72	23,89	0,21
2	21,04	20,99	0,3
3	18,17	16,45	0,45
4	10,1	22,24	0,9
5	11,69	25,95	0,7

**Tabuľka 3 : Najvyšší počet častíc v závislosti na veľkosti a polydisperzný index.**

Z biochemických vlastností apoforitínu je známe, že optimálna hodnota pH pre rozklad na podjednotky je v rozmedzí 3,4 až 2. Pri zvyšovaní pH nie sú udané presné optimálne hranice, iba maximálna hranica pH 10 po ktorej prekročení sa nemusí štruktúra apoforitínu zložiť správne. Čistý apoforitín je dutý vnútorný priemer má 7-8 nm a vonkajší priemer 12-13 nm [43]. Polydisperzný index (PdI) (tab. 3) udáva rozmanitosť veľkostí častíc, čím vyššie je PdI, tým rozdielnejšie veľkosti častíc sa v roztoku nachádzajú (polydisperzný), čím je nižší, tým viac roztok monodisperzný. PdI môže mať rozsah od 0 po 1, ale pre medicínske účely je použiteľné PdI maximálne 0,3 pre anorganické nanočastice a maximálne 0,6.

Z pohľadu pH najlepšie vychádzajú vzorky 2 a 3 s 2,5  $\mu$ L HCl, lenže keď sa pozrieme na enkapsulačnú výťažnosť týchto dvoch postupov tak je vidieť, že je príliš nízka 30 resp. 51 %, čo znamená, že sa do vnútra EcaLH kľetky dostalo len veľmi málo siRNA. Pokiaľ berieme do úvahy aj veľkosť vzniknutých nanočastíc, tak je možné vidieť, že vzorka 2 mala najvyšší počet častíc vo veľkosti približne 21 nm. Táto veľkosť značí, že sa pri spätnom skladaní EcaLH nezložili správne, čo mohlo zapríčiniť aj malú enkapsulačnú výťažnosť. Vzorka 3 na tom bola podobne ako

vzorka 2. EcaLH sa taktiež pravdepodobne nezložili správne pretože najvyšší počet častíc mal veľkosť 18 nm. Pri vzorkách 4 a 5 nebola dosiahnutá optimálna hodnota pH, ale enkapsulačnú výťažnosť mali vyššiu 62 resp. 100 %. Vzorka 4 mala najvyšší počet častíc veľkosti 10 nm čo by mohlo značiť, že sa EcaLH zložili správne, ale vysoké PDI, čiže zvyšné častice mali veľmi veľké rozdiely veľkostí. Vzorka 5 mala štvrtinu častíc veľkosti 12 nm. Čo je podľa literatúry [43] optimálna veľkosť apofertínu. Vzorka číslo 5 mala zvýšené PDI, ale z grafu 1 vidno, že veľká väčšina častíc mala veľkosti od 10,1 po 13,5 nm a príliš malé a príliš veľké častice sa vyskytovali v malých množstvách.



**Graf 1: Graf zobrazujúci rozloženie veľkostí vzniknutých nanočastíc podľa percentuálneho počtu pre vzorku 5.**

Z výsledkov je možné vidieť, že pri vzorkách 2 a 3 bolo použité príliš veľa HCl a NaOH, čo spôsobilo nesprávne skladanie EcaLH. Taktiež pridanie oligonukleotidu až po rozpadnutí väzieb medzi podjednotkami EcaLH (postupy 2 a 4) spôsobilo zníženie enkapsulačnej výťažnosti. Po zhodnotení výsledkov sa ako najlepšia ukazuje metóda použitá na vytvorenie vzorky č. 5, čiže pridať nukleotidové reťazce do EcaLH miešaného s Milli-Q vodou a čo najskôr pridať 0,75  $\mu\text{L}$  1M HCl premiešať 15 minút na rotátore a pridať 0,6  $\mu\text{L}$  1M NaOH a znova miešať 15 minút.

## 6.2 Optimalizácia množstva siRNA pre kyslú enkapsuláciu do kavity EcaLH

Pre optimalizáciu množstva siRNA boli vytvorené 4 vzorky s rozdielnou koncentráciou siRNA. Jednotlivé koncentrácie v objeme 320  $\mu\text{L}$  boli 39,06 78,13 156,25 a 312,5nM pri objemoch siRNA 1,25, 2,5, 5 a 10  $\mu\text{L}$ . Všetky vzorky boli pripravené podľa postupu 5 z kapitoly 6.1. Chýbajúce objemy boli dorovnané do 320  $\mu\text{L}$  Milli-Q vodou. Pred a po diafiltrácii bola meraná fluorescencia s excitačnou vlnovou dĺžkou 540 nm a emisiou 570 nm. Merané bolo takisto aj absorpčné spektrum od 230 po 850 nm. Takisto bola meraná priemerná veľkosť vzniknutých nanočastíc na Zetasizer Nano ZS a merania boli opakované pre všetky vzorky.

V tabuľke 4 je možné vidieť výsledky enkapsulácie rôznych objemov siRNA, v tabuľke 5 priemerné veľkosti vzniknutých nanočastíc v závislosti na percentuálnom počte častíc a PDI. V prvej vzorke bolo použitých 1,25  $\mu\text{L}$  siRNA, enkapsulačná výťažnosť bola 87 %, a výsledná koncentrácia 33,82nM. 23,14 % nanočastíc malo veľkosť 10,1 nm, čo značí, že sa EcaLH zložili správne, ani polydisperzný index nebol príliš vysoký 0,38. Vzorka 2 mala enkapsulačnú výťažnosť 82 %, 23,5 % častíc malo veľkosť 10.1 nm a mierne zvýšený PDI. Vo vzorke 3 bola enkapsulačná výťažnosť 75 % a 22,89 % častíc malo veľkosť 10,1 nm. Zo Všetkých štyroch vzoriek mala najvyšší PDI 0,65, značiaci najvyšší počet agregovaných častíc. Posledná vzorka číslo 4 mala nižšiu enkapsulačnú výťažnosť 76 %, ale spomedzi štyroch vzoriek mala najvyšší počet častíc s veľkosťou 10,1 nm, PDI bolo 0,57.

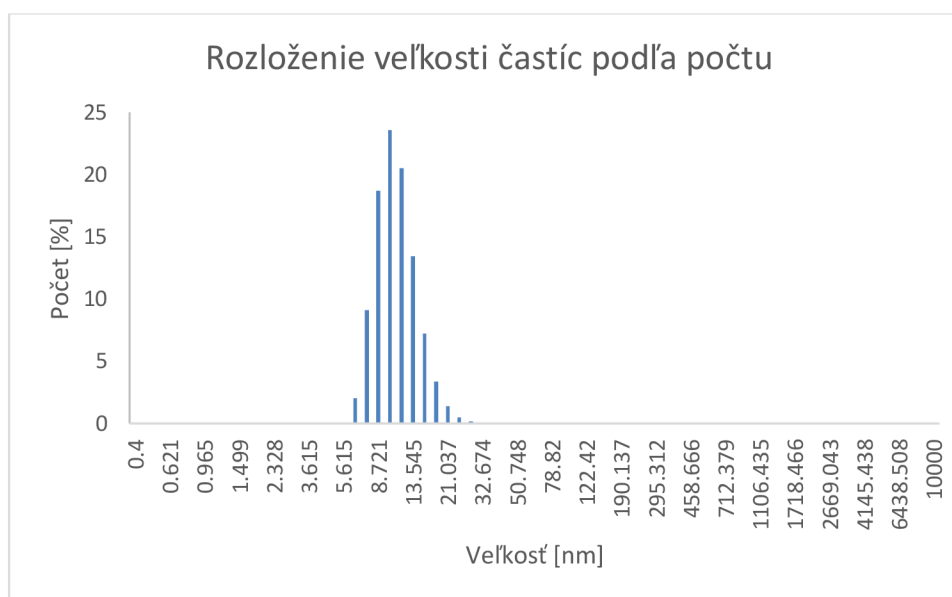
Vzorka	Objem [ $\mu\text{L}$ ]	Koncentrácia [nM]	Enkapsulačná výťažnosť [%]	Enkapsulačná koncentrácia [nM]
1	1,25	39,06	87	33,82
2	2,5	78,13	82	64,41
3	5	156,25	76	117,09
4	10	312,50	76	236,05

**Tabuľka 4 : Tabuľka popisujúca použité objemy, enkapsulačnú výťažnosť a enkapsulovaný objem siRNA v EcaLH.**

Vzorka	Veľkosť [nm]	Počet [%]	PdI
1	10,1	23,14	0,38
2	10,1	23,5	0,56
3	10,1	22,89	0,65
4	10,1	23,57	0,57

**Tabuľka 5 : Najvyšší počet častíc v závislosti na veľkosti a polydisperzný index.**

Z výsledkov je vidno že enkapsulačná výťažnosť má tendenciu klesať so zvyšujúcim sa objemom siRNA, ale aj pri zníženej výťažnosti má objem 10  $\mu\text{L}$  siRNA najvyššiu výslednú koncentráciu. 4 vzorka mala taktiež najlepší výsledok veľkosti častíc. Má mierne vyšší PdI, ale podľa grafu 2 je vidno že väčšina vzniknutých nanočastíc má veľkosti okolo hodnoty 10 nm. Bolo rozhodnuté že na ďalšie experimenty sa bude používať objem 10  $\mu\text{L}$  10 $\mu\text{M}$  siRNA.



**Graf 2: Graf zobrazujúci rozloženie veľkostí vzniknutých nanočastíc podľa percentuálneho počtu pre vzorky 4.**

### 6.3 Stabilita vytvorených EcaLHsiRNA

Pre test stability bola vytvorená vzorka podľa postupu opísanom v kapitole 5.3. Okrem fluorescencie a absorbancie bola pre vzorku v každom časovom intervale meraná aj priemerná veľkosť nanočastíc na prístroji Zetasizer Nano ZS. Vzorka

EcaLHsiRNA vyrobená v Ringrovom roztoku bola podrobené testu stability po dobu 24 hodín pri teplote 37 °C.

Čas [h]	0	0,5	1,5	6	24
Uvoľnilo sa [%]	0	55,91	23,95	9,08	5,16

**Tabuľka 6** Množstvo uvoľnenej siRNA z EcaLH v rôznych časových intervaloch.

Čas [h]	Veľkosť [nm]	Počet [%]	Pdl
0	10,1	27,4	0,45
0,5	10,1	25,84	0,41
1,5	10,1	20,3	0,42
6	11,7	29,05	0,38
24	11,7	30,53	0,42

**Tabuľka 7:** Najvyšší počet častíc v závislosti na veľkosti a polydisperzný index pre EcaLHsiRNA v Ringrovom roztoku.

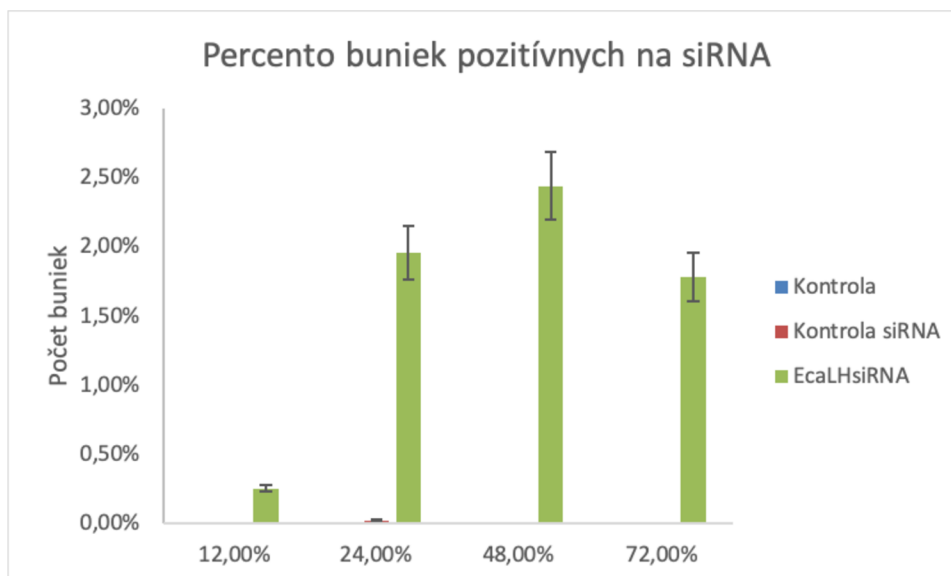
Čas [h]	0	0,5	1,5	6	24
Uvoľnilo sa [%]	0	55,91	23,95	9,08	5,16

**Tabuľka 6** V Ringrovom roztoku sa počas prvej pol hodiny uvoľnilo 55,91 % obsahu (tab. 6), počas ďalšej hodiny 23,95 %. Za 24 hodín sa uvoľnilo viac ako 94 % obsahu siRNA. Veľkosť častíc bola stabilná (tab. 7) počas celých 24 hodín. Vzorka mali najvyšší počet častíc s veľkosťou 10,1 resp. 11,7 nm .

## 6.4 Internalizácia EcaLHsiRNA do buniek

Aj keď vytvorené nanočastice EcaLHsiRNA neboli veľmi stabilné, tak bola testovaná ich schopnosť transportovať siRNA do buniek pomocou snímania fluorescencie siRNA FAM.



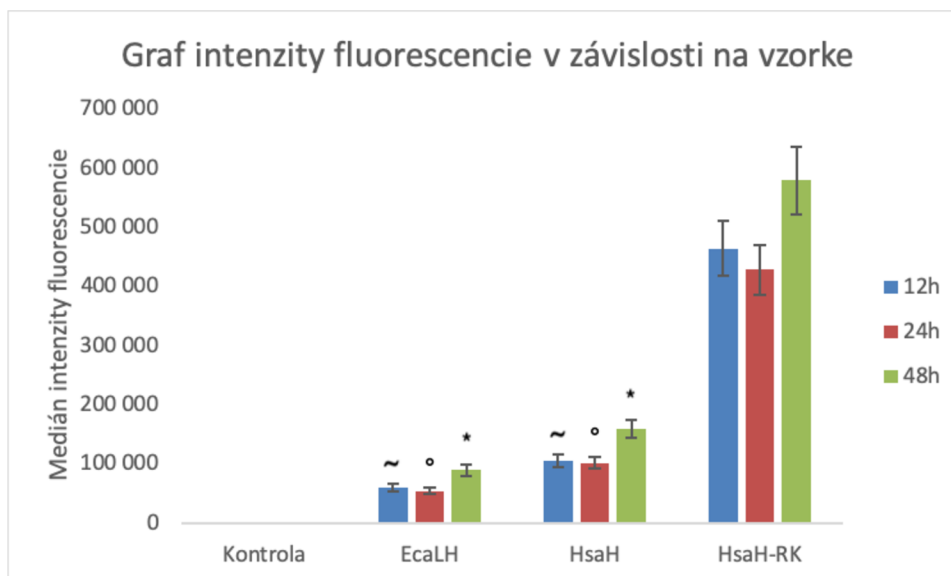


**Graf 3: Percento buniek pozitívnych na siRNA po internalizácii EcaLHsiRNA v časových bodoch 12, 24, 48 a 72 hodín.**

Z grafu 3 je možné vidieť, že nanotransportér EcaLHsiRNA bol schopný dopraviť do buniek minimálne množstvo siRNA. Po dvanástich hodinách bolo len 0,3 % buniek pozitívnych na prítomnosť siRNA. V bodoch 24, 48 a 72 hodín bola pozitivita v rozmedzí 2-3 % s maximom v čase 48 hodín a to 2,53 %. Kontrola siRNA je len FAM siRNA bez transfekčnej reagentie, čiže sa od nej neočakáva žiadna internalizácia.

## 6.5 Internalizácia EcaLH, HsaH a HsaH-RK do buniek

Vzhľadom k tomu, že sa pomocou komerčného konského apofertínu EcaLH a z neho pripraveného nanotransportéru EcaLHsiRNA nepodarilo dostať do buniek takmer žiadnu siRNA, boli následne testované alternatívne apofertíny. Jedným z nich bol ľudský feritín bohatý na ťažké podjednotky (HsaH), ďalším HsaH v ktorom došlo k zámene aminokyselín tvoriacich 5. helix za kladne nabitú aminokyselinu arginín a lyzín (HsaH-RK). Všetky feritíny boli označené fluorescenčnou farbou Cy5 a v rovnakej koncentrácii aplikované na bunky. Miera internalizácie bola testovaná pomocou prietokovej cytometrie. Pri všetkých apofertínoch bolo v každom časovom bode pozitívnych na prítomnosť siRNA viac ako 94% analyzovaných buniek.

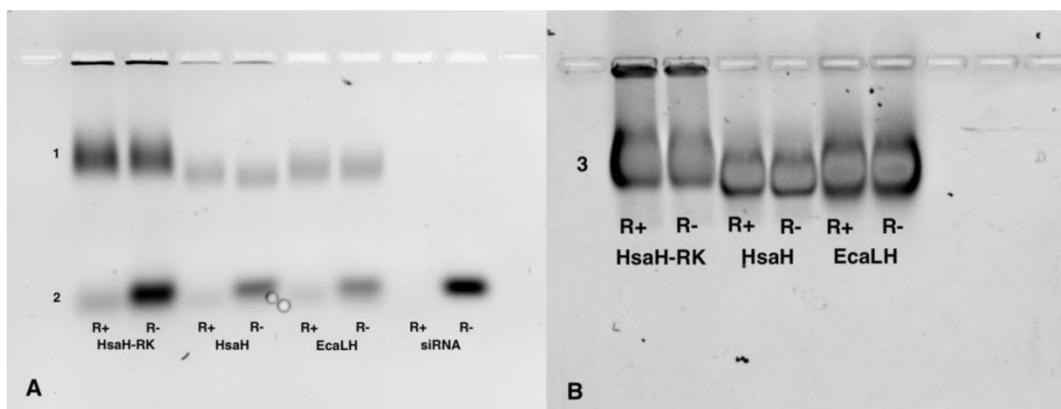


**Graf 4: Zobrazenie závislosti mediánu intenzity fluorescence na vzorek v časoch 12, 24 a 48 hodín. Vyššia intenzita znamená, že sa do buniek dostalo viac apoferitínov značených Cy5. Signifikantný rozdiel ( $p < 0,05$ ) medzi vzorkami HsaH-RK a ostatnými apoferitínami v rôznych časoch je v grafe (~) pre 12 hodín, (°) pre 24 hodín a (\*) pre 48 hodín.**

V grafe 4 je zobrazená závislosť mediánu intenzity fluorescence na jednotlivých vzorkách. Čím vyššia je jeho hodnota, tým viac jednotiek apoferitínu sa dostalo do buniek. Štatistickým vyhodnotením pomocou nepárového t-testu sa ukázalo, že v každom časovom bode je signifikantný rozdiel v intenzite fluorescence medzi HsaH-RK a ostatnými feritínmi. Z výsledkov je možné usúdiť, že aj keď mali ostatné apoferitíny vysoké percento buniek pozitívnych na ich prítomnosť, tak sa do buniek nedostávali v takej miere ako HsaH-RK.

## 6.6 Schopnosť EcaLH, HsaH a HsaH-RK enkapsulovať siRNA

Vytváranie nanotransportérov pomocou kyslej enkapsulácie (kap. 5.2) nemalo veľmi úspešné výsledky. Z toho dôvodu bol zvolený iný enkapsulačný postup, a to zásaditá enkapsulácia (kap. 5.7). Overovaná bola schopnosť apoferitínov enkapsulovať siRNA podľa tohoto postupu.

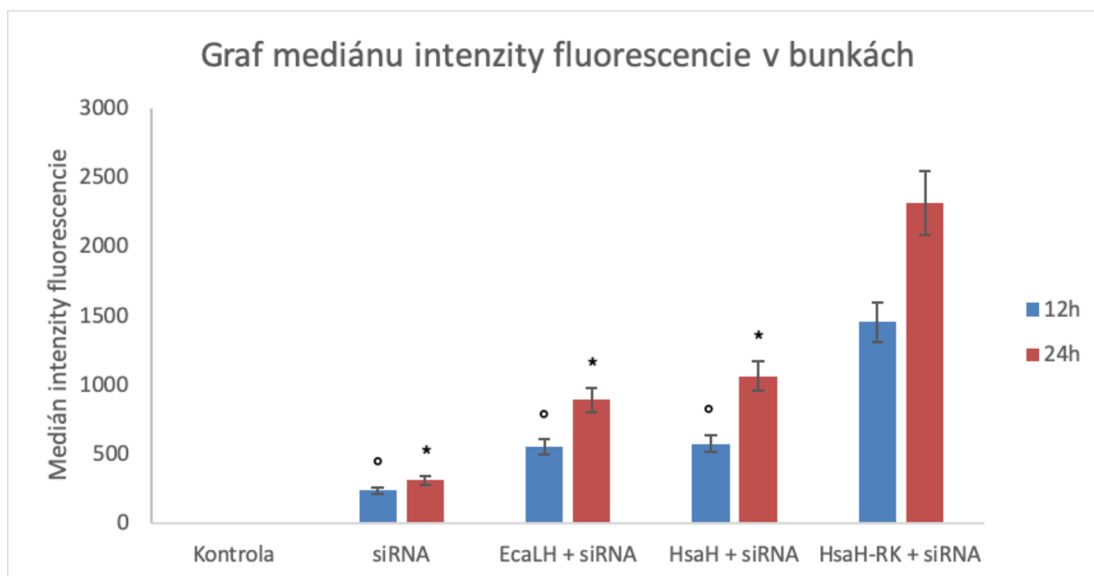


**Obrázok 3: 1% agarózový gél so vzorkami feritínov s enkapsulovanou siRNA. S RNázou (R+), alebo bez RNázy (R-). Fotka spravená pomocou fluorescenčnej značky FAM (A), fotka spravená pomocou interkalačného farbiva EtBr. Bandy 1 označujú polohu značky FAM na siRNA, bandy 2 polohu voľných FAM značených siRNA a bandy 3 zase polohu zafarbených apoferitínov.**

Na obrázku 3 je zobrazený 1% agarózový gél so vzorkami apoferitínov s enkapsulovanou siRNA. Vzorka naľavo vždy obsahuje RNázu a vzorka napravo nie. Číslom 1 sú na obrázku 3 (A) označené bandy feritínu s enkapsulovanou siRNA a číslom 2 bandy voľnej siRNA v roztoku. Na obrázku 3 (B) je ten istý agarózový gél po farbení Coomassie Blue. Číslom 3 sú označené bandy zafarbených nukleových kyselín feritínov. Dôvodom tohoto duálneho zobrazenia je určenie toho, že bandy FAM fotka (A) a bandy feritínov fotka (B) sú na rovnakom mieste. Rovnaká pozícia bandov znamená, že fluorescenčne značená siRNA je vo feritínoch uzavretá a fluorescenčná značka FAM sa z nej počas procesu enkapsulácie neuvolnila. Ako vidieť z obrázkov tak, bandy sa nachádzajú na rovnakých pozíciách a značka FAM sa zo siRNA neodtrhla. Toto zistenie značí, že bude možná detekcia prítomnosti siRNA v bunkách pomocou fluorescencie značky FAM.

## **6.7 Internalizácia EcaLH, HsaH a HsaH-RK s enkapsulovanou siRNA**

Po dokázaní, že apoferitíny dokážu enkapsulovať siRNA pomocou zásaditej enkapsulácie, bolo treba zistiť, ako dokážu siRNA do buniek transportovať. Výsledky z prietokového cytometra sú zobrazené v grafe 5 a 6.

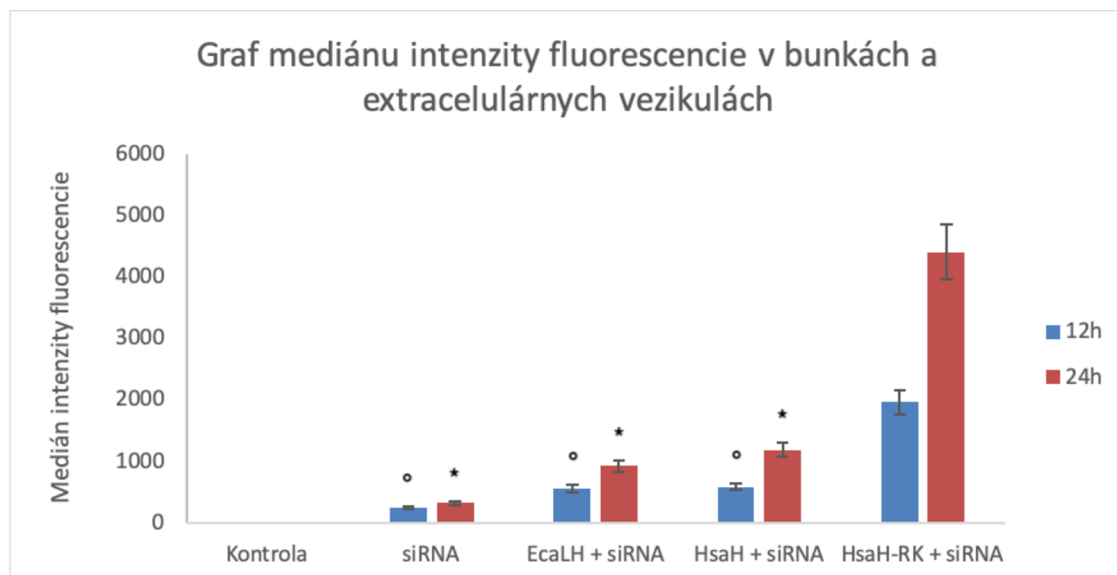


**Graf 5: Graf závislosti mediánu intenzity fluorescence na vzorke v bunkách pri časoch inkubácie 12 a 24 hodín. Vyššia intenzita znamená, že sa v bunkách nachádzalo viac FAM značenej siRNA. Štatisticky významné rozdiely ( $p < 0,05$ ) medzi vzorkami HsaH-RK a ostatnými apofertínami v rôznych časoch sú v grafe označené (°) pre 12 hodín a (\*) pre 24 hodín.**

V grafe 5 je možné vidieť, že štatisticky najlepší bol v doprave FAM značenej siRNA nanotransportér HsaH-RKsiRNA. V oboch časoch 12 aj 24 hodín mali bunky inkubované s týmto nanotransportérom najvyššiu intenzitu, ale len 2,5 % meraných buniek bolo pozitívnych na prítomnosť FAM značenej siRNA po 12 hodinách. Po 24 hodinách to bolo 5,8 %. Vzorky inkubované s nanotransportérmi EcaLHsiRNA a HsaHsiRNA mali maximálny počet buniek pozitívnych na siRNA menej ako 2 %.

Na prietokovom cytometri boli merané okrem buniek aj extracelulárne vezikuly, apoptické telieska a zbytky buniek. Výsledky tohoto nastavenia sú zobrazené v grafe 6. V tomto prípade je možno vidieť zase štatisticky významný rozdiel medzi mediánom intenzity fluorescence buniek inkubovaných s HsaH-RKsiRNA v oboch časových bodoch. Pri meraní buniek a extracelulárnych vezikúl bola zmena aj v počte objektov pozitívnych na siRNA. Pri HsaH-RKsiRNA to bolo 22,6 % po 12 hodinách a 36,6 % po 24 hodinách. Hodnoty s EcaLHsiRNA a HsaHsiRNA nepresiahli 1,5 %.

Prítomnosť siRNA v časticiach a aj mimo buniek môže značiť to, že aj keď sa HsaH-RKsiRNA do bunky dostane tak je veľmi rýchlo z bunky odstránený, alebo sa pravdepodobne pri transporte do bunky neuvolňuje z endocytov [49].

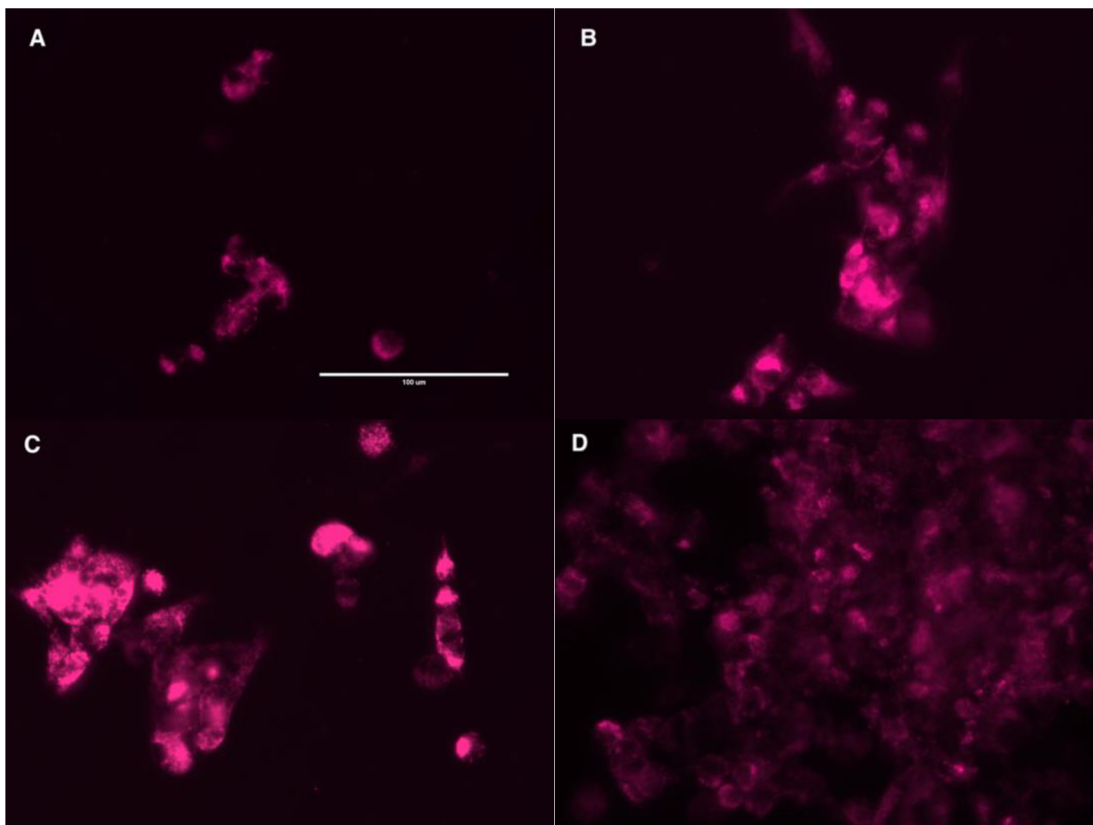


**Graf 6: Graf závislosti mediánu intenzity fluorescencie na vzorke v bunkách a extracelulárnych vezikulách pri časoch inkubácie 12 a 24 hodín. Vyššia intenzita znamená, že sa v bunkách nachádzalo viac FAM značenej siRNA. Štatisticky významné rozdiely ( $p < 0,05$ ) medzi vzorkami HsaH-RK a ostatnými apoforitínami v rôznych časoch sú v grafe označené (°) pre 12 hodín a (\*) pre 24 hodín.**

Vzhľadom k tomu, že EcaLH a HsaH boli úspešné v doprave siRNA do buniek iba v malej miere, bolo rozhodnuté, že pre funkčnú transfekciu bude ako nanotransportér použitý iba apoforitín HsaH-RK.

## 6.8 Optimalizácia koncentrácie chlorokvinu

Chlorokvin (CQ) je látka, ktorá je známa svojou schopnosťou narúšať transportné organely v bunke [48]. Táto vlastnosť CQ by mala byť schopná zlepšiť uvoľňovanie HsaH-RKsiRNA do cytoplazmy a tým aj zvýšiť efektivitu transfekcie.



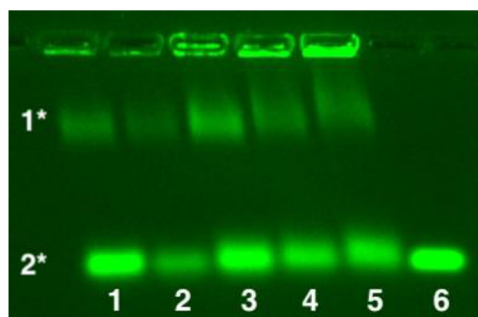
**Obrázok 4:** Na obrázkoch je možné vidieť rozmiestnenie Cy5 značeného apoferitínu HsaH-RK 8 hodín po pridaní rôznych koncentrácií CQ. (A) Vzorka s HsaH-RK bez CQ, (B) vzorka s HsaH-RK a 25 $\mu$ M CQ, (C) vzorka s HsaH-RK a 50 $\mu$ M CQ a (D) HsaH-RK so 100 $\mu$ M CQ.

Na obrázku 4 je vidieť vplyv rozdielnych koncentrácií CQ na uvoľňovanie Cy5 značeného HsaH-RK v čase 8 hodín od pridaní CQ. Po aplikácii 25 a 50 $\mu$ M chlorokvinu je možné pozorovať rovnomernejšiu subcelulárnu lokalizáciu značeného apoferitínu v cytoplazme buniek. Táto zmena by mala značiť, že chlorokvin napomáha uvoľňovaniu HsaH-RK z transportných organel do cytoplazmy buniek. Tento jav sa pri koncentrácii 100 $\mu$ M neprejavil, čo pravdepodobne vyplýva z cytotoxicity tejto koncentrácie [50].

## 6.9 Optimalizácia enkapsulácie siRNA do HsaH-RK

1	2	3	4	5	6
2 $\mu$ L HsaH-RK	2 $\mu$ L HsaH-RK	4 $\mu$ L HsaH-RK	6 $\mu$ L HsaH-RK	8 $\mu$ L HsaH-RK	
5,5 $\mu$ L Milli-Q	5 $\mu$ L Milli-Q	3 $\mu$ L Milli-Q	1 $\mu$ L Milli-Q	0 $\mu$ L Milli-Q	9 $\mu$ L Milli-Q
1 $\mu$ L 1M NaOH	1 $\mu$ L 1M NaOH	1 $\mu$ L 1M NaOH	1 $\mu$ L 1M NaOH	1 $\mu$ L 1M NaOH	
0,5 $\mu$ L siRNA	1 $\mu$ L siRNA	1 $\mu$ L siRNA	1 $\mu$ L siRNA	1 $\mu$ L siRNA	1 $\mu$ L siRNA
1 $\mu$ L 1M HCl	1 $\mu$ L 1M HCl	1 $\mu$ L 1M HCl	1 $\mu$ L 1M HCl	1 $\mu$ L 1M HCl	

**Tabuľka 8: Objemy použité pri optimalizácii množstva HsaH-RK pre enkapsuláciu siRNA**



**Obrázok 5: 1% agarózový gél so vzorkami optimalizácie zobrazovaný pomocou fluorescenčnej značky FAM na siRNA. Popis vzoriek je v tabuľke 8. Band 1\* značí pozíciu HsaH-RKsiRNA a 2\* voľnú siRNA.**

Vzorky boli pripravené zmiešaním HsaH-RK s Milli-Q a pridaním 1M NaOH. Následne sa nechali stáť 5 minút. Po piatich minútach bola pridaná FAM značená siRNA a roztok bol dôkladne prepipetovaný. Po 15 sekundách bola pridaná 1M HCl a roztok sa nechal stáť. Vzorka 6 z obrázku 8 bola 1  $\mu$ L siRNA zmiešaný s 9  $\mu$ L Milli-Q.

Z obrázku je viditeľné, že najvyššiu intenzitu spomedzi vrchných bandov (1\*) zodpovedajúcich HsaH-RKsiRNA (intenzitu určuje množstvo siRNA enkapsulovanej do HsaH-RK) mala vzorka 3, kde boli použité 4  $\mu$ L HsaH-RK. Z čoho bolo určené, že pre enkapsuláciu siRNA do HsaH-RK sa budú používať 4  $\mu$ L HsaH-RK a 1  $\mu$ L 10 $\mu$ M siRNA na 10  $\mu$ L vzorky.

## 6.10 Charakterizácia HsaH-RK s enkapsulovanou siRNA

Diafiltrácia nanočastíc apoforitínov s enkapsulovanou siRNA nie je vhodná na odstraňovanie voľnej siRNA v roztoku, pretože sa pri vysokých otáčkach centrifúgy uvoľňuje siRNA zo vnútra apoforitínových nanotransportérov. Diafiltrácia bola nahradená pridaním enzýmu RNázy ktorá sa postarala o odstránenie prebytočnej a uvoľnenej siRNA.

Vyhodnocovanie výsledkov enkapsulačnej výťažnosti a stability prebiehalo tak, že sa porovnávala intenzita bandov (plocha pod krivkou) medzi vzorkami apoforitínu v rámci jedného gélu.

Enkapsulačná výťažnosť siRNA pri zásaditej enkapsulácii vyšla 79 %. Výsledná koncentrácia siRNA v roztoku je 0,78 $\mu$ M. Výťažnosť tohoto postupu je približne rovnaká ako pri kyslej enkapsulácii kde jej hodnota bola 76 %.

Čas [h]	0,5	1,5	6	24
% uvoľnenej siRNA	34,24	36,36	21,04	2,76

Tabuľka 9: Percentá uvoľnenej siRNA zo vzorky s RNázou proti kontrole.

Čas [h]	Veľkosť [nm]	Počet [%]	PdI
0	13,55	24,73	0,88
0,5	15,69	29,60	0,76
1,5	37,84	20,99	0,67
6	37,84	21,68	0,52
24	37,84	24,91	0,86

Tabuľka 10: Najvyšší počet častíc v závislosti na veľkosti a polydisperzný index pre HsaH-RKsiRNA v Ringrovom roztoku.

V tabuľke 9 sú zobrazené percentuálne hodnoty uvoľnenej siRNA. Porovnávané boli vždy hodnoty v rámci jedného gélu. Medzi každým časovým bodom sa uvoľnilo priemerne 26,9 % siRNA z komplexu HsaH-RKsiRNA.

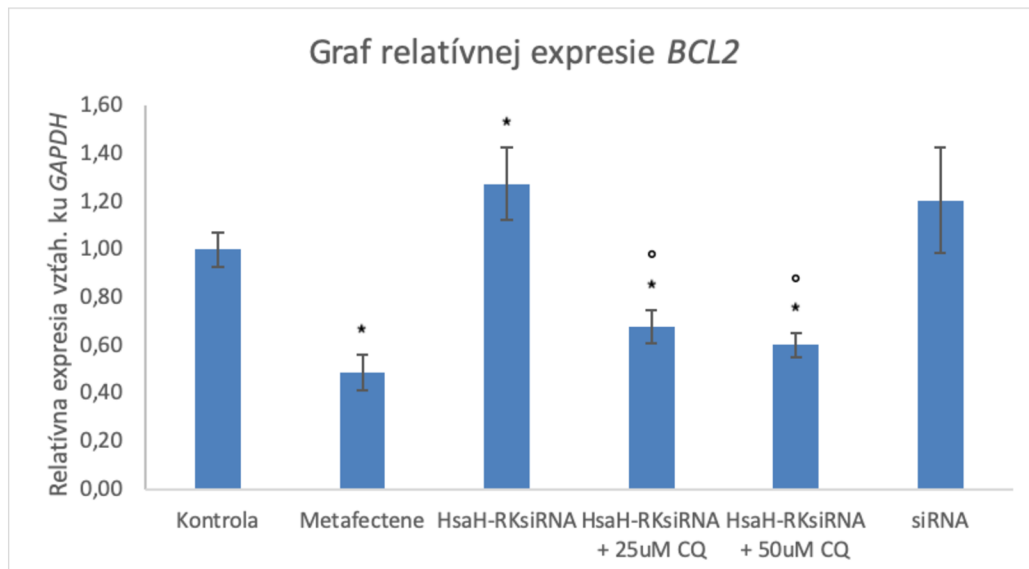
Veľkosť najvyššieho počtu častíc sa behom 24 hodín zväčšila z 13,5 nm na 37,8 nm polydisperzný index bol pri všetkých meraniach celkom vysoký, čo značí, že v roztokoch sa nachádzali častice s veľa rozdielnymi veľkosťami.



## 6.11 Regulácia génovej expresie na úrovni RNA

Optimalizovaným protokolom bola do HsaH-RK enkapsulovaná siRNA a transfekcia prebiehala po dobu 48 hodín. Úspešnosť regulácie expresie *BCL2* bola zhodnotená pomocou kvantitatívnej PCR (qPCR). Hodnotená bola relatívna zmena génovej expresie *BCL2* vzoriek s Metafectene, HsaH-RKsiRNA, HsaH-RKsiRNA + 25 $\mu$ M CQ, HsaH-RKsiRNA + 50 $\mu$ M CQ a samotnou anti-*BCL2* siRNA v Milli-Q. Najprv bola porovnávaná kontrola bez siRNA s transfekovanými vzorkami. Hodnoty  $\Delta C_T$  boli porovnávané pomocou dvojvýberového t-testu a signifikantný rozdiel ( $p < 0,05$ ) bol v grafe označený (\*).

Zisťovaný bol aj vplyv CQ na reguláciu relatívnej expresie *BCL2*. Porovnávaná bola vzorka HsaH-RKsiRNA so vzorkami s rôznymi koncentraciami chlorokvinu. Príslušné hodnoty  $\Delta C_T$  boli porovnávané pomocou dvojvýberového t-testu a signifikantný rozdiel ( $p < 0,05$ ) bol v grafe označený (\*\*).

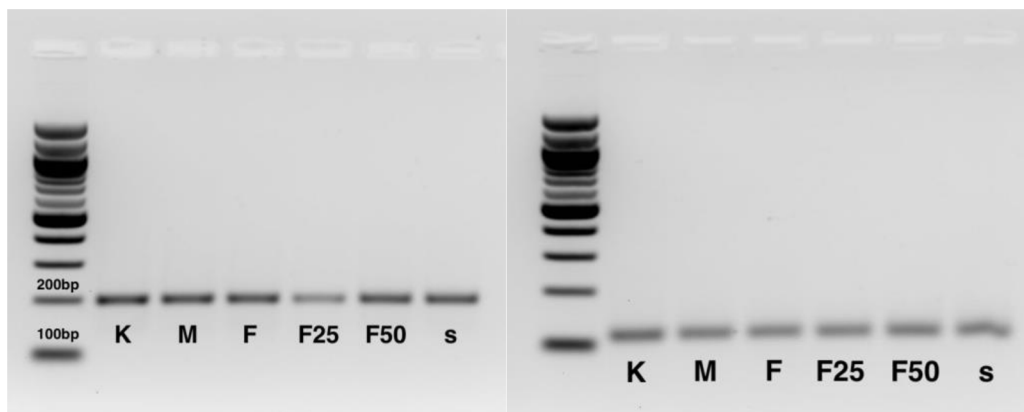


**Graf 7: Zmena relatívnej génovej expresie 48 hodín od transfekcie. Štatisticky bola porovnávaná kontrola bez siRNA so všetkými vzorkami, signifikantný rozdiel ( $p < 0,05$ ) je v grafe vyznačený (\*), ďalej bola porovnávaná vzorka HsaH-RKsiRNA so vzorkami HsaH-RKsiRNA s CQ. Signifikantný rozdiel ( $p < 0,05$ ) je v grafe vyznačený (°).**

Metafectene mal spomedzi všetkých vzoriek najvyššiu mieru regulácie expresie 58%. Tento výsledok bol očakávaný, pretože je to komerčne používané transfekčné činidlo. Druhá najvyššia regulácia bola viditeľná pri vzorke HsaH-RKsiRNA + 50 $\mu$ M

CQ (40 %) a o kúsok nižšia (32 %) pri HsaH-RKsiRNA + 25 $\mu$ M CQ. Vzorka HsaH-RKsiRNA mala zvýšenú expresiu mRNA o 27 %.

## 6.12 Kontrola produktov qPCR



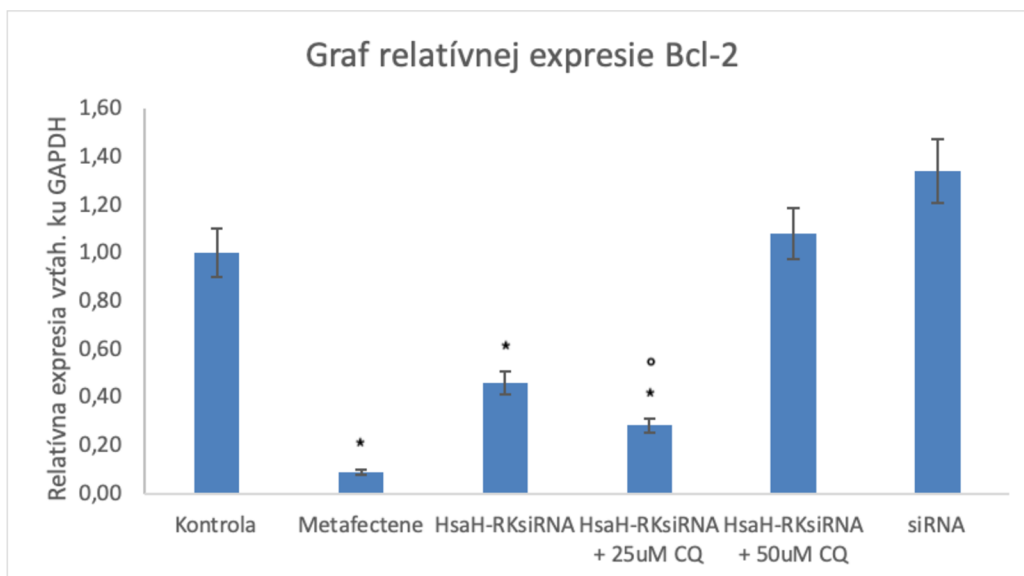
Obrázok 6: Vľavo produkty *GAPDH*, vpravo produkty *BCL2*. K – kontrola, M – Metafectene, F – HsaH-RKsiRNA, F25 – HsaH-RKsiRNA + 25 $\mu$ M CQ, F50 – HsaH-RKsiRNA + 50 $\mu$ M CQ, s – siRNA.

Pre overenie správnosti qPCR bola overená veľkosť produktov pomocou agarózovej elektroforézy. Veľkosť produktov po separácii bola porovnávaná s očakávanými veľkosťami produktov *GAPDH* (206 bp) a *BCL2* (116 bp). Z obrázkov je vidno že veľkosti produktov qPCR zodpovedajú očakávaným veľkostiam.

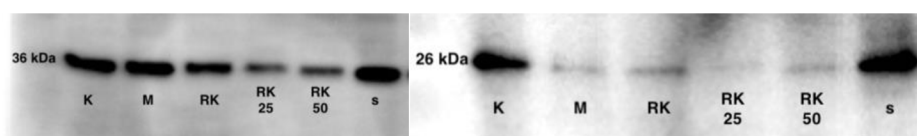
## 6.13 Regulácia génovej expresie na úrovni proteínov

Relatívna expresia bola hodnotená pre vzorky transfekované s Metafectene, HsaH-RKsiRNA, HsaH-RKsiRNA + 25 $\mu$ M CQ, HsaH-RKsiRNA + 50 $\mu$ M CQ, a anti-*BCL2* siRNA. Porovnávaná bola hodnota podielAUC (kap. 5.21) kontroly s hodnotami vzoriek. Porovnávané boli pomocou nepárového t-testu a signifikantné rozdiely ( $p < 0,05$ ) boli označené v grafe (\*).

Následne boli porovnávané zmeny expresie medzi vzorkami HsaH-RKsiRNA a HsaH-RKsiRNA s chlorokvinom. Tieto hodnoty boli taktiež porovnávané nepárovým t-testom a signifikantné rozdiely ( $p < 0,05$ ) boli označené v grafe (\*\*).



**Graf 8:** Relatívna zmena expresie Bcl-2 na proteínovej úrovni 48 hodín od začiatku transfekcie. Štatisticky bola porovnávaná kontrola bez siRNA so všetkými vzorkami, signifikantný rozdiel ( $p < 0,05$ ) je v grafe vyznačený (\*), ďalej bola porovnávaná vzorka HsaH-RKsiRNA so vzorkami HsaH-RKsiRNA s CQ. Signifikantný rozdiel ( $p < 0,05$ ) je v grafe vyznačený (°).



**Obrázok 7:** Zobrazené western bloty. Vľavo GAPDH, vpravo Bcl-2. K - kontrola, M - Metafectene, RK - HsaH-RKsiRNA, RK 25 - HsaH-RKsiRNA  $\mu\text{M}$  CQ, RK 50 - HsaH-RKsiRNA  $\mu\text{M}$  CQ, s - kontrola siRNA.

Rovnako ako aj pri zmene expresie na úrovni RNA tak aj na úrovni proteínov mal Metafectene najlepšie účinky 91 % zníženie hladiny proteínu Bcl-2. HsaH-RKsiRNA + 25  $\mu\text{M}$  CQ dokázal znížiť expresiu Bcl-2 o 72 % a HsaH-RKsiRNA o 54 %. Pri HsaH-RKsiRNA + 50  $\mu\text{M}$  CQ nebol signifikantný rozdiel ani pri porovnaní s kontrolou a ani s HsaH-RKsiRNA expresia proteínu Bcl-2 bola približne rovnaká ako v kontrole.

## 7 DISKUSIA

Hlavným cieľom tejto práce bolo zistiť vplyv apoferitínových nanotransportérov s enkapsulovanou siRNA navrhnutou na zníženie expresie Bcl-2 proteínu.

Vybratý bol komerčný apoferitín z konskej sleziny s 22 ľahkými a 2 ťažkými podjednotkami, do ktorého bola enkapsulovaná fluorescenčne značená siRNA. Roztok nanotransportéru EcaLHsiRNA bol pridaný na bunky, lenže ani po 72 hodinách od aplikácie nebolo na prítomnosť siRNA pozitívnych viac ako 2 % buniek.

Do úvahy prišli ďalšie dva ľudské apoferitíny, obidva zložené z 24 ťažkých podjednotiek, HsaH a HsaH-RK. Pričom HsaH-RK mal v podjednotkách upravený a kladne nabitý piaty alfa helix. Takmer všetky merané bunky boli pri inkubácii s Cy5 značenými apoferitínami pozitívne na jeho prítomnosť, ale najvyšší meraný medián intenzity Cy5 v bunkách bol pri HsaH-RK. Tento výsledok značí, že HsaH-RK sa dostal do buniek v najvyššom množstve. Po neúspechu protokolu kyslej enkapsulácie bol testovaný iný postup. Všetky tri apoferitíny boli schopné enkapsulovať siRNA do svojho vnútra podľa nového protokolu. Po pridaní všetkých troch apoferitínov s enkapsulovanou siRNA k bunkám bolo zistené, že EcaLH nie je ani s novým protokolom schopná dopraviť siRNA do buniek, HsaH nebol v doprave úspešný taktiež. Pri HsaH-RK bol nameraný najvyšší medián intenzity FAM zmačenej siRNA v bunkách a po 24 hodinách bolo pozitívnych na prítomnosť siRNA 5,8 % buniek. Po tom, ako boli okrem buniek zarátané do výsledkov aj extracelulárne vezikuly, apoptické telieska a časti mŕtvych buniek, bolo pri HsaH-RK pozitívnych na prítomnosť siRNA 36,6% objektov nameraná bola pri ňom aj najvyššia intenzita. Toto zistenie vyvolalo otázku, čo sa vlastne s bunkami po internalizácii HsaH-RKsiRNA deje. Do úvahy pripadá viacero možností, buď sa pri internalizácii nevoľnia nanočastice z endozómov a sú odstraňované z bunky [49], alebo internalizácia a transfekcia siRNA niektorým bunkám veľmi nepospela a došlo k bunkovej smrti [51].

Pre prípad prvých dvoch možností bol testovaný vplyv chlorokvinu, ktorý je známy tým, že je schopný narušovať štruktúru transportných vezikúl [48]. Testované boli tri koncentrácie: 25, 50 a 100 $\mu$ M. Kvôli nízkej schopnosti transportu

siRNA do buniek bolo rozhodnuté, že sa apoferitíny EcaLH a HsaH pre účely tejto práce ďalej nebudú používať. Na bunky bol aplikovaný fluorescenčne označený apoferitín HsaH-RK po jeden a pol hodine boli pridané na bunky tri koncentrácie chlorokvinu. Čas 1,5 hodiny bol zvolený pretože pri experimente s internalizáciou prázdnych apoferitínov bolo zistené, že bunky sú na ich prítomnosť pozitívne už v tomto čase. Bunky s rôznymi koncentraciami chlorokvinu boli zobrazované v priebehu 8 hodín na fluorescenčnom mikroskope. Z fotiek buniek bolo zistené, že chlorokvin s koncentraciami 25 a 50 $\mu$ M mal účinok na transportné vezikuly a po ôsmich hodinách bol apoferitín viditeľne lepšie rozmiestnený vnútri buniek. Účinky chlorokvinu s koncentraciou 100 $\mu$ M sa na bunkách viditeľne nepreukázali.

Ďalej bola zisťovaná enkapsulačná výťažnosť a stabilita nanočastíc HsaH-RKsiRNA. Enkapsulačná výťažnosť pomocou zásaditej enkapsulácie bola 79%. Čo zodpovedalo približne 0,78 $\mu$ M koncentracii siRNA v 100  $\mu$ L roztoku nanočastíc. Enkapsulačná výťažnosť ZE a KE sa veľmi nelíšila (79 % oproti 76 %). Rozdiel bol v koncentraciách pretože pri KE bol pripravovaný 3 krát väčší výsledný objem s tým istým objemom a koncentraciou siRNA ako pri ZE. Domnienka bola, že zlé výsledky stability nanočastice EcaLHsiRNA (pripravované KE) boli spôsobené diafiltráciou roztoku cez filtre Amicon. Z toho dôvodu bola diafiltrácia pri ZE a stabilite HsaH-RKsiRNA nahradená pridaním RNázy ktorá voľnú a uvoľnenú siRNA rozložila. Zlé výsledky stability HsaH-RKsiRNA túto domnienku vyvracajú a jedinou logickou možnosťou je, že sa použitá fluorescenčne značená siRNA dokáže uvoľniť z apoferitínu cez defekty, ktoré vznikajú v štruktúre pri disociácii a následnom spätnom zložení apoferitínu [43]. Priemerná veľkosť častíc sa z 13 nm behom 24 hodín takmer stonásobila. Dôvod zvýšenia veľkosti nie je presne známy, pretože HsaH-RK je nový opravený apoferitín a jeho vlastnosti nie sú ešte presne charakterizované.

Vplyv HsaH-RK s enkapsulovanou anti-*BCL2* siRNA bol zisťovaný na úrovni expresie RNA a proteínov. Na úrovni RNA mal najvyššie zníženie expresie génu *BCL2* podľa očakávania komerčne používaný Metafectene, do ktorého bola uzavretá siRNA. Zo skúmaných vzoriek apoferitínu HsaH-RK s siRNA vyšiel najlepšie HsaH-RK s 50 $\mu$ M CQ, nasledovaný HsaH-RK s 25 $\mu$ M CQ so znížením hladiny mRNA o 40

resp. 32 %. Pri vzorke HsaH-RK bez použitia CQ bola hladina mRNA zvýšená o 27% oproti kontrole. Tento výsledok by bolo možné odôvodniť tým, že ku zníženiu mRNA vo vzorke s HsaH-RK dôjsť mohlo, ale časové okno 48 hodín bolo príliš veľké na a zachytenie výsledkov a bunky stihli odpovedať na zníženie hladiny mRNA jej syntézou a teda aj zvýšenou hladinou vo výsledkoch.

Ku zníženiu hladiny proteínu Bcl-2 došlo vo vzorkách s Metefectene, HsaH-RK a HsaH-RK s 25 $\mu$ M CQ s uzavretými siRNA. 91 % zníženie bolo pri Metefectene, 54 % pri HsaH-RK a 72 % s HsaH-RK 25 $\mu$ M CQ. Pri porovnaní výsledkov hladín mRNA a proteínov je vidieť, že na proteínovej úrovni je viditeľne väčší pokles, čo dával väčší zmysel myšlienke, že bunky si začali syntetizovať novú mRNA pre proteín Bcl-2. Zvlášť je, že HsaH-RK s 50 $\mu$ M CQ mal zníženie expresie mRNA, ale na proteínovej úrovni bola hladina Bcl-2 približne rovnaká ako pri kontrole. Vysvetlenie tohoto fenoménu sa nepodarilo nájsť ani v odborenej literatúre.

Z výsledkov tejto práce je možné usúdiť, že pre transfekciu siRNA navrhnutú na zníženie hladiny expresie génu *BCL2* či už na úrovni mRNA alebo proteínov je okrem Metafectene najlepší apoforitín HsaH-RK s 25 $\mu$ M CQ. Rozdiel utlmovania medzi týmito dvomi transfekčnými činidlami bol na oboch úrovniach 19 %.

Spoločný transport siRNA a chemoterapeutických liečiv by bol veľmi prínosný v liečbe nádorových ochorení. Chemoterapeutiká fungujú na princípe indukcie apoptózy v nádorových bunkách [44]. Jednou z hlavných zbraní nádorových buniek proti chemoterapii je zvýšiť hladinu antiapoptického proteínu Bcl-2 [5]. Veľkou výhodou spoločného transportu by bolo aj zníženie cytotoxicity zdravých buniek vďaka možnosti pasívneho a aktívneho cielenia nanočastíc do nádorových buniek [38], [39].

V tejto práci sa podarilo dokázať, že apoforitín je schopný dopraviť siRNA navrhnutú pre zníženie hladiny proteínu Bcl-2 a znížiť hladiny proteínu Bcl-2 a taktiež mRNA pre syntézu tohoto proteínu.

V publikácii [45] Dostálová a ost. (2017) zistili, že apoforitín je schopný uzavrieť chemoterapeutické liečivo doxorubicín a internalizovať ho do buniek. Apoforitín bol taktiež schopný stabilne v sebe udržať toto liečivo po dobu 12 týždňov.

Spoločná doprava chemoterapeutík a siRNA bola riešená v publikácii [8] kde Chen a ost. (2009) použili mezoporózne nanočastice SiO<sub>2</sub> na spoločný transport doxorubicínu a anti-*BCL2* siRNA s vynikajúcimi výsledkami podarilo sa im znížiť expresiu mRNA proteínu Bcl-2 a úspešne zvýšiť efektivitu doxorubicínu.

Výsledky tejto bakalárskej práce a práce Dostálovej a ost. značia, že apofertín by mohol byť teoreticky použiteľný na spoločnú dopravu siRNA a chemoterapeutík do buniek.

## 8 ZÁVER

Cieľom tejto práce bolo určiť efekt apoforitínového nanotransportéru s enkapsulovanou siRNA na expresiu antiapoptického proteínu Bcl-2. Najprv bolo treba optimalizovať postup enkapsulácie siRNA do apoforitínu, určiť jeho fyzikálno-chemické vlastnosti a zistiť ako účinne dokáže takto vytvorený nanotransportér dopraviť siRNA do nádorových buniek. Počas experimentov bolo zistené, že apoforitín z konskej sleziny (EcaLH) nie je schopný transportovať siRNA do buniek v signifikantnom množstve. Z toho dôvodu boli testované dva iné apoforitíny, z ktorých bol úspešný len jeden, a to HsaH-RK. Je to ľudský apoforitín zložený z ťažkých podjednotiek, ktorý má upravený piaty helix v podjednotkách tak, aby bol kladne nabitý. Pri oboch apoforitínoch (EcaLH aj HsaH-RK) bol problém so signifikantným uvoľňovaním uzavretej siRNA v Ringrovom roztoku. Tento jav môže byť spôsobený únikom enkapsulovanej siRNA z dutiny apoforitínu. Pri zisťovaní schopnosti dopravy siRNA do buniek pomocou apoforitínu HsaH-RK bolo zistené, že veľké percento siRNA je odstraňované z bunky pomocou extracelulárnych vezikúl. Z tohoto dôvodu boli testované viaceré koncentrácie chlorokvinu ktorý je známy svojou schopnosťou narúšať membránu týchto vezikúl a tým zlepšiť uvoľňovanie ich obsahu do priestoru bunky.

Chlorokvin bol použitý aj pri transfekcii siRNA navrhutej na down-reguláciu expresie génu *BCL2*. Vyhodnocované boli vplyvy nanotransportéru na expresiu mRNA proteínu Bcl-2 a aj samotného proteínu. Bunky boli transfekované 48 hodín po tomto čase bola izolovaná RNA a proteíny z buniek. Zmena expresie mRNA bola zisťovaná pomocou qPCR a proteínu pomocou western blotov.

Najvyšší pokles v mRNA 40% mala vzorka s transportérom HsaH-RK s 50  $\mu$ M CQ, nasledovaná HsaH-RK s 25 $\mu$ M CQ. Vzorka s HsaH-RK bez CQ mala zvýšenú expresiu mRNA o 27%. Na proteínovej úrovni to bola vzorka s HsaH-RK s 25 $\mu$ M CQ 72% a HsaH-RK bez CQ dosiahol zníženie hladiny Bcl-2 o 54%. Vzorka s HsaH-RK a 50  $\mu$ M CQ nemala zmenenú expresiu proteínu Bcl-2. Z výsledkov je možné usúdiť že najúspešnejší z apoforitínových transportérov v regulácii expresie génu *BCL2* bol HsaH-RK s 25 $\mu$ M CQ.



Táto bakalárska práca poskytla zaujímavé výsledky v zmene expresie génu *BCL2*. Pre ideálne výsledky je, ale potrebné zlepšiť stabilitu apoforitínového nanotransportéru s enkapsulovanou siRNA a optimalizovať transfekčný proces tak, aby nemusel byť používaný chlorokvin, ktorý môže byť pre bunky toxický.

# Literatúra

- [1] Cancer. *World Health Organization* [online]. Geneva, c2018 [cit. 2018-12-14]. Dostupné z: <https://www.who.int/cancer/en/>
- [2] BRAY, Freddie, Jacques FERLAY, Isabelle SOERJOMATARAM, Rebecca L. SIEGEL, Lindsey A. TORRE a Ahmedin JEMAL. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [online]. 2018, 68(6), 394-424 [cit. 2018-11-19]. DOI: 10.3322/caac.21492. ISSN 00079235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>
- [3] ARRUEBO, Manuel, Nuria VILABOA, Berta SÁEZ-GUTIERREZ, Julio LAMBEA, Alejandro TRES, Mónica VALLADARES a África GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ. Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies. *Cancers* [online]. 2011, 3(3), 3279-3330 [cit. 2018-11-19]. DOI: 10.3390/cancers3033279. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6694/3/3/3279>
- [4] MÉNARD, Cédric, François MARTIN, Lionel APETOH, Florence BOUYER a François GHIRINGHELLI. Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity. *Cancer Immunology, Immunotherapy* [online]. 2008, 57(11), 1579-1587 [cit. 2018-11-19]. DOI: 10.1007/s00262-008-0505-6. ISSN 0340-7004. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-008-0505-6>
- [5] CREIXELL, Mar a Nicholas A. PEPPAS. Co-delivery of siRNA and therapeutic agents using nanocarriers to overcome cancer resistance. *Nano Today* [online]. 2012, 7(4), 367-379 [cit. 2018-11-19]. DOI: 10.1016/j.nantod.2012.06.013. ISSN 17480132. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748013212000795>
- [6] LARSEN, Annette K., Alexandre E. ESCARGUEIL a Andrzej SKLADANOWSKI. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacology & Therapeutics*[online]. 2000, 85(3), 217-229 [cit. 2018-11-28]. DOI: 10.1016/S0163-7258(99)00073-X. ISSN 01637258. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016372589900073X>
- [7] LESLIE, Elaine M., Roger G. DEELEY a Susan P.C. COLE. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*[online]. 2005, 204(3), 216-237 [cit. 2018-11-20]. DOI: 10.1016/j.taap.2004.10.012. ISSN 0041008X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X0400482X>
- [8] CHEN, Alex M., Min ZHANG, Dongguang WEI, Dirk STUEBER, Oleh TARATULA, Tamara MINKO a Huixin HE. Co-delivery of Doxorubicin and Bcl-2 siRNA by Mesoporous Silica Nanoparticles Enhances the Efficacy of Chemotherapy in Multidrug-Resistant Cancer Cells. *Small* [online]. 2009, 5(23), 2673-2677 [cit. 2018-11-20]. DOI: 10.1002/smll.200900621. ISSN 16136810. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/smll.200900621>

- [9] HENGARTNER, Michael O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* [online]. 2000, 407(6805), 770-776 [cit. 2018-11-20]. DOI: 10.1038/35037710. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/35037710>
- [10] ADAMS, J M a S CORY. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*[online]. 2007, 26(9), 1324-1337 [cit. 2018-11-20]. DOI: 10.1038/sj.onc.1210220. ISSN 0950-9232. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/1210220>
- [11] SLEDZ, C. A. RNA interference in biology and disease. *Blood* [online]. 2005, 106(3), 787-794 [cit. 2018-11-21]. DOI: 10.1182/blood-2004-12-4643. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2004-12-4643>
- [12] GANDHI, Nishant S., Rakesh K. TEKADE a Mahavir B. CHOUGULE. Nanocarrier mediated delivery of siRNA/miRNA in combination with chemotherapeutic agents for cancer therapy: Current progress and advances. *Journal of Controlled Release* [online]. 2014, 194, 238-256 [cit. 2018-11-20]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.09.001. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365914006191>
- [13] BARTLETT, D. W., H. SU, I. J. HILDEBRANDT, W. A. WEBER a M. E. DAVIS. Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2007, 104(39), 15549-15554 [cit. 2018-11-24]. DOI: 10.1073/pnas.0707461104. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0707461104>
- [14] SHIVAPURKAR, Narayan, Jyotsna REDDY, Preet M. CHAUDHARY a Adi F. GAZDAR. Apoptosis and lung cancer: A review. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2003, 88(5), 885-898 [cit. 2018-11-25]. DOI: 10.1002/jcb.10440. ISSN 0730-2312. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.10440>
- [15] ANAND, Preetha, Ajaikumar B. KUNNUMAKARA, Chitra SUNDARAM, Kuzhuvilil B. HARIKUMAR, Sheeja T. THARAKAN, Oiki S. LAI, Bokyung SUNG a Bharat B. AGGARWAL. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research* [online]. 2008, 25(9), 2097-2116 [cit. 2018-11-25]. DOI: 10.1007/s11095-008-9661-9. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-008-9661-9>
- [16] LICHTENSTEIN, Paul, Niels V. HOLM, Pia K. VERKASALO, et al. Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland. *New England Journal of Medicine* [online]. 2000, 343(2), 78-85 [cit. 2018-11-26]. DOI: 10.1056/NEJM200007133430201. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200007133430201>
- [17] COHEN, Sheldon a Bruce S. RABIN. Psychologic Stress, Immunity, and Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [online]. 1998, 90(1), 3-4 [cit. 2018-11-26]. DOI: 10.1093/jnci/90.1.3. ISSN 0027-8874. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/90.1.3>

- [18] SWANN, Jeremy B. a Mark J. SMYTH. Immune surveillance of tumors. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2007, 117(5), 1137-1146 [cit. 2018-11-26]. DOI: 10.1172/JCI31405. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <http://www.jci.org/cgi/doi/10.1172/JCI31405>
- [19] IRIGARAY, P., J.A. NEWBY, R. CLAPP, L. HARDELL, V. HOWARD, L. MONTAGNIER, S. EPSTEIN a D. BÉLPOUME. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [online]. 2007, 61(10), 640-658 [cit. 2018-11-26]. DOI: 10.1016/j.biopha.2007.10.006. ISSN 07533322. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332207002296>
- [20] GODBOUT, Jonathan P. a Ronald GLASER. Stress-Induced Immune Dysregulation: Implications for Wound Healing, Infectious Disease and Cancer. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* [online]. 2006, 1(4), 421-427 [cit. 2018-11-26]. DOI: 10.1007/s11481-006-9036-0. ISSN 1557-1890. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11481-006-9036-0>
- [21] MALPAS, J.S. Chapter 3 Environmental causes of cancer. *Some Aspects of Oncology* [online]. Elsevier, 1996, 1996, s. 61-78 [cit. 2018-11-26]. Advances in Oncobiology. DOI: 10.1016/S1569-254X(96)80005-7. ISBN 9780762301461. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1569254X96800057>
- [22] WEINBERG, Robert A. *The biology of cancer*. Second edition. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, [2014]. ISBN 978-0815342199.
- [23] PODGORŠAK, E. B. *Radiation oncology physics: a handbook for teachers and students*. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2005. ISBN 92-0-107304-6.
- [24] CORRIE, Pippa G. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine* [online]. 2008, 36(1), 24-28 [cit. 2018-12-15]. DOI: 10.1016/j.mpmed.2007.10.012. ISSN 13573039. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357303907003490>
- [25] How does chemotherapy work?. *Informedhealth.org* [online]. Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care, 2012 [cit. 2018-12-15]. Dostupné z: <https://www.informedhealth.org/how-does-chemotherapy-work.2280.en.html>
- [26] RAMPLING, R. The present and future management of malignant brain tumours: surgery, radiotherapy, chemotherapy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* [online]. 2004, 75(suppl\_2), ii24-ii30 [cit. 2018-12-15]. DOI: 10.1136/jnnp.2004.040535. ISSN 0022-3050. Dostupné z: <http://jnnp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jnnp.2004.040535>
- [27] KIRN, David, Robert L. MARTUZA a James ZWIEBEL. Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. *Nature Medicine* [online]. 2001, 7(7), 781-787 [cit. 2018-12-15]. DOI: 10.1038/89901. ISSN 1078-8956. Dostupné z: [http://www.nature.com/articles/nm0701\\_781](http://www.nature.com/articles/nm0701_781)
- [28] GOTTESMAN, Michael M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annual Review of Medicine* [online]. 2002, 53(1), 615-627 [cit. 2018-11-30]. DOI:

- 10.1146/annurev.med.53.082901.103929. ISSN 0066-4219. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.med.53.082901.103929>
- [29] Gene silencing. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2018-12-14]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Gene\\_silencing](https://en.wikipedia.org/wiki/Gene_silencing)
- [30] GU, Wenyi. RNAi-Induced Immunity. ABDURAKHMONOV, Ibrokhim Y., ed. *RNA Interference* [online]. InTech, 2016, 2016-04-06 [cit. 2018-11-30]. DOI: 10.5772/61632. ISBN 978-953-51-2272-2. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/rna-interference/rnai-induced-immunity>
- [31] DE FOUGEROLLES, Antonin, Hans-Peter VORNLOCHER, John MARAGANORE a Judy LIEBERMAN. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2007, 6(6), 443-453 [cit. 2018-11-21]. DOI: 10.1038/nrd2310. ISSN 1474-1776. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrd2310>
- [32] DAKA, Ala a Dan PEER. RNAi-based nanomedicines for targeted personalized therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, 64(13), 1508-1521 [cit. 2018-11-21]. DOI: 10.1016/j.addr.2012.08.014. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X1200258X>
- [33] CARTHEW, Richard W. a Erik J. SONTHEIMER. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* [online]. 2009, 136(4), 642-655 [cit. 2018-11-21]. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.035. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286740900083X>
- [34] XU, Cong-fei a Jun WANG. Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2015, 10(1), 1-12 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1016/j.ajps.2014.08.011. ISSN 18180876. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1818087614000646>
- [35] AKHTAR, Saghir a Ibrahim F. BENTER. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2007, 117(12), 3623-3632 [cit. 2018-12-02]. DOI: 10.1172/JCI33494. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <http://content.the-jci.org/articles/view/33494>
- [36] NISHIDA, Naoyo, Hirohisa YANO, Takashi NISHIDA, Toshiharu KAMURA a Masamichi KOJIRO. Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management* [online]. 2006, 2(3), 213-219 [cit. 2018-12-30]. DOI: 10.2147/vhrm.2006.2.3.213. ISSN 1176-6344. Dostupné z: <http://www.atypon-link.com/DMP/doi/abs/10.2147/vhrm.2006.2.3.213>
- [37] HALEY, Barbara a Eugene FRENKEL. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* [online]. 2008, 26(1), 57-64 [cit. 2018-12-30]. DOI: 10.1016/j.urolonc.2007.03.015. ISSN 10781439. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1078143907000907>

- [38] BAZAK, Remon, Mohamed HOURI, Samar El ACHY, Wael HUSSEIN a TAMER REFAAT. Passive targeting of nanoparticles to cancer: A comprehensive review of the literature. *Molecular and Clinical Oncology* [online]. 2014, 2(6), 904-908 [cit. 2018-12-30]. DOI: 10.3892/mco.2014.356. ISSN 2049-9450. Dostupné z: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mco.2014.356>
- [39] ASLAN, Burcu, Bulent OZPOLAT, Anil K. SOOD a Gabriel LOPEZ-BERESTEIN. Nanotechnology in cancer therapy. *Journal of Drug Targeting* [online]. 2013, 21(10), 904-913 [cit. 2018-12-30]. DOI: 10.3109/1061186X.2013.837469. ISSN 1061-186X. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1061186X.2013.837469>
- [40] LOHCHAROENKAL, Warangkana, Liying WANG, Yi Charlie CHEN a Yon ROJANASAKUL. Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy. *BioMed Research International* [online]. 2014, 2014, 1-12 [cit. 2018-12-30]. DOI: 10.1155/2014/180549. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/180549/>
- [41] VERMA, Deepali, Neha GULATI, Shreya KAUL, Siddhartha MUKHERJEE a Upendra NAGAICH. Protein Based Nanostructures for Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutics* [online]. 2018, 2018, 1-18 [cit. 2018-12-30]. DOI: 10.1155/2018/9285854. ISSN 2090-9918. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/jphar/2018/9285854/>
- [42] HEGER, Zbynek, Sylvie SKALICKOVA, Ondrej ZITKA, Vojtech ADAM a Rene KIZEK. Apoferritin applications in nanomedicine. *Nanomedicine* [online]. 2014, 9(14), 2233-2245 [cit. 2018-12-30]. DOI: 10.2217/nnm.14.119. ISSN 1743-5889. Dostupné z: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nnm.14.119>
- [43] DOSTALOVA, Simona, Zbynek HEGER, Jiri KUDR, Marketa VACULOVICOVA, Vojtech ADAM a Marie STIBOROVA. Apoferritin: protein nanocarrier for targeted delivery. NAIK, Jitendra, ed. *Nano based drug delivery* [online]. IAPC Publishing, 2015, 2015-07-21, s. 218-238 [cit. 2018-12-26]. DOI: 10.5599/obp.8.8. ISBN 9789535694229. Dostupné z: [http://iapc-obp.com/assets/files/117087\\_08\\_NBDD\\_08.pdf](http://iapc-obp.com/assets/files/117087_08_NBDD_08.pdf)
- [44] WAHBA, John, Marina NATOLI, Lynsey M. WHILDING, et al. Chemotherapy-induced apoptosis, autophagy and cell cycle arrest are key drivers of synergy in chemo-immunotherapy of epithelial ovarian cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy* [online]. 2018, 67(11), 1753-1765 [cit. 2019-05-18]. DOI: 10.1007/s00262-018-2199-8. ISSN 0340-7004. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00262-018-2199-8>
- [45] DOSTALOVA, Simona, Katerina VASICKOVA, David HYNEK, et al. Apoferritin as an ubiquitous nanocarrier with excellent shelf life. *International Journal of Nanomedicine* [online]. 2017, 12, 2265-2278 [cit. 2019-05-18]. DOI: 10.2147/IJN.S130267. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://www.dovepress.com/apoferritin-as-an-ubiquitous-nanocarrier-with-excellent-shelf-life-peer-reviewed-article-IJN>

- [46] KIM, Daniel H. a John J. ROSSI. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2007, 8(3), 173-184 [cit. 2019-05-20]. DOI: 10.1038/nrg2006. ISSN 1471-0056. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrg2006>
- [47] LI, Jinming, Shanshan XUE a Zong-Wan MAO. Nanoparticle delivery systems for siRNA-based therapeutics. *Journal of Materials Chemistry B* [online]. 2016, 4(41), 6620-6639 [cit. 2019-05-20]. DOI: 10.1039/C6TB01462C. ISSN 2050-750X. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6TB01462C>
- [48] TEMPLETON, Nancy Smyth. *Gene and cell therapy: therapeutic mechanisms and strategies*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, c2009. ISBN 978-0849387685.
- [49] LECHER, Julia C., Scott J. NOWAK a Jonathan L. MCMURRY. Breaking in and busting out: cell-penetrating peptides and the endosomal escape problem. *Biomolecular Concepts* [online]. 2017, 8(3-4) [cit. 2019-05-22]. DOI: 10.1515/bmc-2017-0023. ISSN 1868-503X. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/bmc.2017.8.issue-3-4/bmc-2017-0023/bmc-2017-0023.xml>
- [50] JAMSHIDZADEH, Akram, Hossein NIKNAHAD a Hamed KASHAFI. Cytotoxicity of chloroquine in isolated rat hepatocytes. *Journal of Applied Toxicology* [online]. 2007, 27(4), 322-326 [cit. 2019-05-23]. DOI: 10.1002/jat.1194. ISSN 0260437X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jat.1194>
- [51] FEDOROV, Y. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA* [online]. 2006, 12(7), 1188-1196 [cit. 2019-05-23]. DOI: 10.1261/rna.28106. ISSN 1355-8382. Dostupné z: <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.28106>

# Zoznam symbolov, veličín a skratiek

MDR	multi lieková rezistencia (multidrug resistance)
dsRNA	dvojreťazcová RNA
siRNA	malá interferujúca RNA
AposiRNA	apoferitín so siRNA
EcaLHsiRNA	apoferitín EcaLH s enkapsulovanou siRNA
HsaHsiRNA	apoferitín HsaH s enkapsulovanou siRNA
HsaH-RKsiRNA	apoferitín HsaH-RK s enkapsulovanou siRNA
ATP	adenozíntrifosfát
Apo	apoferitín
BSA	bovinný sérový albumín
FBS	fetálne bovinné sérum
PBS	fosfátový pufor
PdI	polydisperzný index
EV	enkapsulačná výťažnosť
CQ	chlorokvin



# Zoznam príloh

Príloha 1: CD