

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2020

Eliška Hladíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Použití lentivirových reportérových
systémů pro fluorescenční
vizualizaci subcelulárních struktur**

Bakalářská práce

Eliška Hladíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: Mgr. Jarmila Stanková

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora	Eliška Hladíková
Název práce	Použití lentivirových reportérových systémů pro fluorescenční vizualizaci subcelulárních struktur
Typ práce	bakalářská
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Jarmila Stanková
Rok obhajoby práce	2020
Klíčová slova	fluorescenční mikroskopie, lentivirový vektor, buněčné struktury, fluorescenční značení
Počet stran	52
Počet příloh	0
Jazyk	český

SOUHRN

Fluorescenční mikroskopie v kombinaci s obrazovou analýzou představuje účinný nástroj pro analýzu morfologie i funkce buněčných organel a kompartmentů. Jednou z četných metod pro vizualizaci specifických molekul až struktur je použití fluorescenčních fúzních proteinů. V této práci byly připraveny reportérové buněčné linie s fluorescenčními fúzními proteiny jako subcelulárními markery, za použití komerčně dostupných lentivirových systémů. Připravené linie byly dále použity k mikroskopii živých buněk a následně charakterizovány pomocí MTS testu. Použitím testu bylo zjištěno, že citlivost buněk na cytotoxický účinek látek se značením fúzními proteiny se nemění a transdukce tedy neovlivňuje životaschopnost buněk ani jejich proliferaci. V rešeršní části je vypracován přehled studovaných buněčných organel a kompartmentů.

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Eliška Hladíková
Title	Lentiviral reporter systems for fluorescent visualization of subcellular structures
Type of thesis	bachelor
Department	Department of cell biology and genetics, Faculty of science, Palacký University Olomouc
Supervisor	Mgr. Jarmila Stanková
The year of presentation	2020
Keywords	fluorescent microscopy, lentiviral vector, cellular compartments, fluorescent labeling
Number of pages	52
Number of appendices	0
Language	czech

SUMMARY

Fluorescence microscopy in combination with image analysis is an effective tool for analysing morphology and function of cellular organelles and compartments. One of the common methods for visualizing specific molecules to structures is the use of fluorescent fusion proteins. In this work, reporter cell lines were prepared with fluorescent fusion proteins as subcellular markers using commercially available lentiviral systems. The prepared lines were further used for live cell microscopy and then characterized using MTS test. Using the assay it was found that the sensitivity of cells to the cytotoxic effect of fusion protein-labelled substances does not alter and because of that transduction does not affect cell viability or proliferation. In the research part, an overview of studied cellular organelles and compartments is elaborated.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně za pomoci vedoucí práce
Mgr. Jarmily Stankové a za pomoci uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

Podpis:

Eliška Hladíková

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce Mgr. Jarmile Stankové za ochotu, trpělivost a čas, který mi byla ochotna věnovat a za odborné vedení a rady při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Anně Janošťákové a Bc. Renatě Buriánové za jejich pomoc a umožnění práce v laboratoři.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Fluorescenční mikroskopie	3
3.2	Reportérové lentivirové vektory	5
3.3	Golgiho aparát	7
3.4	Endoplazmatické retikulum	9
3.5	Cytoplazmatická membrána	11
3.6	Jádro	13
3.7	Mitochondrie	15
3.8	Aktin	17
4	MATERIÁL A METODY	19
4.1	Biologický materiál	19
4.2	Použité chemikálie, soupravy a roztoky	19
4.2.1	Použité chemikálie	19
4.2.2	Použité soupravy	20
4.2.3	Použité roztoky a jejich příprava	20
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	20
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	21
4.4.1	Kultivace	21
4.4.2	Transdukce	21
4.4.3	Zamražení buněk	24
4.4.4	Mikroskopie živých buněk	24
4.4.5	Stanovení hodnoty IC50 testovaných látek použitím MTS testu	25
5	VÝSLEDKY	27
5.1.1	Mikroskopie živých buněk	27
5.1.2	Stanovení hodnoty IC50 testovaných látek použitím MTS testu	30
6	DISKUZE	42
7	ZÁVĚR	46
8	LITERATURA	47

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABP	Actin-binding proteins
ATP	Adenosintrifosfát
CoA	Koenzym A
COPI	Coatamer protein I
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
ERS	Endoplasmic reticulum stress
FAD	Flavinadenindinukleotid
GFP	Green fluorescent protein
GPI	Glykosylfosfatidylinositol
IP3R	Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor
IRES	Internal ribosome entry site
LTR	Long terminal repeats
mRNA	Messengerová RNA
MTOC	Mikrotubuly organizující centrum
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
rDNA	Ribozomální DNA
RFP	Red fluorescent protein
SFC	Splicing-factor compartments
SRP	Signal recognition particle
UPR	Unfolded protein response

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1: Schématické znázornění virového genomu HIV-1 (převzato a upraveno z Sakuma *et al.*, 2012)
- Obrázek 2: Schématické znázornění životního cyklu viru HIV-1 (převzato z Shukla *et Chauhan*, 2019)
- Obrázek 3: Struktura Golgiho aparátu (převzato z Bishopkingdom, 2020)
- Obrázek 4: Struktura endoplazmatického retikula (převzato z Britannica, 2020)
- Obrázek 5: Struktura a jednotlivé složky cytoplazmatické membrány (převzato z Mapping Ignorance, 2020)
- Obrázek 6: Struktura jádra (převzato z Biology web page, 2020)
- Obrázek 7: Přehled průběhu metabolismu v mitochondrii (převzato z Sims *et Myuderman*, 2010)
- Obrázek 8: Dynamika aktinu (převzato z Spinal Muscular Atrophy, 2020)
- Obrázek 9: Schématická mapa expresních kazet obsažených v částicích pro značení jednotlivých subcelulárních struktur s RFP mCherry (převzato z Takara Bio, 2020)
- Obrázek 10: Schématické znázornění 384 jamkového panelu s jednotlivými koncentracemi ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
- Obrázek 11: Fluorescenčně značené jádro, Golgiho aparát a mitochondrie v buňkách HeLa
- Obrázek 12: Fluorescenčně značené endoplazmatické retikulum a cytoplazmatická membrána v buňkách HeLa
- Obrázek 13: Fluorescenčně značené jádro, Golgiho aparát a mitochondrie v buňkách U-2 OS
- Obrázek 14: Fluorescenčně značené endoplazmatické retikulum a aktin v buňkách U-2 OS

SEZNAM GRAFŮ

- Graf 1: Závislost viability buněk na logaritmu koncentrace testované látky daunorubicinu
- Graf 2: Závislost viability buněk na logaritmu koncentrace testované látky etoposidu
- Graf 3: Závislost viability buněk na logaritmu koncentrace testované látky topotekanu
- Graf 4: Závislost viability buněk na logaritmu koncentrace testované látky bortezomibu
- Graf 5: Závislost viability buněk na logaritmu koncentrace testované látky cykloheximidu
- Graf 6: Závislost viability buněk na logaritmu koncentrace testované látky kyseliny betulinové
- Graf 7: Závislost viability buněk na logaritmu koncentrace testované látky cyklosporinu A
- Graf 8: Závislost viability buněk HeLa na logaritmu koncentrace testované látky mitoxantronu
- Graf 9: Závislost viability buněk U-2 OS na logaritmu koncentrace testované látky mitoxantronu
- Graf 10: Závislost viability buněk U-2 OS na logaritmu koncentrace testované látky daunorubicinu

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Naměřené hodnoty IC50 u transdukovaných a parentálních buněčných liniích HeLa a jejich průměrné hodnoty se směrodatnými odchylkami

Tabulka 2: Naměřené hodnoty IC50 u transdukovaných a parentálních buněčných liniích U-2 OS a jejich průměrné hodnoty se směrodatnými odchylkami

1 ÚVOD

Nezbytným nástrojem pro studium nádorových buněk a jejich léčby je mikroskopie živých buněk. Díky této technice je možné sledovat růst a vývoj jednotlivých buněčných organel a vliv potencionálních léčiv na tyto struktury. Aby bylo možné struktury pod mikroskopem pozorovat, je nutné jejich označení. Jednou z nejpoužívanějších metod je značení fluorescenčními fúzními proteiny, kdy je možné značit i více objektů různými fluorescenčními proteiny. Jednou z možností, jak tyto fúzní proteiny do buňky vpravit, je transdukce lentivirovými vektory. Ty nesou v nukleové kyselině geny exprimující fluorofory cílené na určitou buněčnou strukturu. Sekvence je po transdukci integrována do hostitelského genomu, což způsobí fluorescenci dané organely. Takto připravené buněčné linie poté mohou být použity k vizualizaci subcelulárních struktur a dalším experimentům.

2 CÍLE PRÁCE

Příprava buněčných linií HeLa a U-2OS s fluorescenčně značenými subcelulárními strukturami prostřednictvím lentivirových vektorů pro následné testování účinku potencionálních nádorových léčiv.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je jedním z hlavních nástrojů používaných ke sledování fyziologie a dynamiky buněk. Hraje totiž důležitou roli při určování aktivity buněk od velmi rychlého zhodnocení živých buněk jednoduchým mikroskopem, až po podrobnosti o buněčných událostech pomocí řady současných zobrazovacích systémů (Sanderson *et al.*, 2014). Ty obsahují organely a jiné struktury zajišťující komplexní biologické procesy. Správná regulace těchto funkcí zabezpečuje transport makromolekul do cílových organel buňky (Mehta *et al.*, 2007). Většina organel není statická, ale vysoce dynamická vzhledem k jejich organizaci a funkci. Navíc některé buněčné kompartmenty se zde vyskytují pouze přechodně, tj. sestavují se za určitých fyziologických podmínek, když buňka vyžaduje specifické funkce. Tato schopnost přizpůsobit a modulovat buněčné procesy na subcelulární úrovni je zvláště důležitá, pokud je homeostáza ohrožena stresem vyvolaným podmínkami prostředí nebo chorobou. Kvantitativní měření organel a buněčných kompartmentů je zásadní pro pozorování molekulárních mechanismů, které regulují buněčnou fyziologii. Fluorescenční mikroskopie tedy představuje efektivní způsob pro analýzu organizace a funkce buněk (Kodiha *et al.*, 2014).

Aby bylo možné studovat organely a jejich proteinové struktury pod fluorescenčním mikroskopem, musí být tyto proteiny označeny. Značkou může být buď geneticky kódovaná značka, která často vyžaduje funkcionalizovaný fluorofor, nebo syntetický fluorofor, který je kovalentně konjugován *in vitro* na protein nebo na proteinově specifickou protilátku. Výhoda první z nich je, že experimentování může být provedeno v živých buňkách, zatímco druhá vyžaduje mikroinjekci do živých buněk nebo chemickou manipulaci pro fixaci buněk a permeabilizaci. Fluorescenční proteiny se používají při fluorescenčním mikroskopickém zobrazování z několika důvodů. Za prvé, chromofor vytvořený uvnitř struktury fluorescenčního proteinu umožňuje dlouhodobou vizualizaci daného značeného proteinu. A za druhé, kódování fluorescenčního proteinu minimálně narušuje chod buňky ve srovnání s alternativními strategiemi značení proteinů využívajících *in vitro* (Kodiha *et al.*, 2014). Objev GFP (Green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein) a jeho následných analogů způsobil revoluci ve studiu proteinů a jejich intracelulární dynamiky. Vědci izolovali a charakterizovali desítky fluorescenčních proteinů z medúzy a korálů, jejichž výsledkem je repozitář fluorescenčních proteinů lišících se v barvě a stabilitě.

Narozdíl od bioluminiscence, kde enzymem katalyzovaná reakce zahajuje excitaci luminiscenční molekuly, se fluorescence spustí, když fotony z vnějšího zdroje excitují pigmenty absorbující světlo. Prvním fluorescenčním proteinem byl GFP, který byl objeven u medúz, konkrétně u druhu *Aequorea victoria*. GFP je protein o velikosti 26,9 kDa, který excituje v rozmezí 395 a 475 nm a emituje při 509 nm (Kodiha *et al.*, 2014). Za účelem zvýšení intenzity fluorescence a stability bylo provedeno několik modifikací GFP, jako například v roce 1995, kdy Cubitt *et al.* zavedli jednobodovou mutaci, která vedla ke zvýšené fluorescenci při stejném emisním spektru, ale s posunem excitace od 395 nm do 488 nm (Kodiha *et al.*, 2014).

Červený fluorescenční protein (Red fluorescent protein, RFP) byl poprvé izolován z korálnatců s excitací 558 a emisí 583 nm. Hlavní výhodou RFP oproti GFP je jejich delší excitační vlnová délka, která způsobuje menší poškození buněk a mnohem menší autofluorescenci v červeném spektru. Původní RFP měl tu nevýhodu, že tvořil tetramery, které měly občas tendenci agregovat se v buňkách (Kodiha *et al.*, 2014).

V dnešní době je pro zobrazování živých buněk více používaným fluoroforem mCherry. Tento fluorescenční protein byl izolován z houbových korálů rodu *Discosoma* (Shen *et al.*, 2017). Díky své vysoké rychlosti zrání, fotostabilitě a vysoké toleranci vůči pH je mCherry široce využívaným fluorescenčním proteinem s vyšší vlnovou délkou. Je považován za nejjasnější RFP se zvýšenou fotostabilitou (Kodiha *et al.*, 2014).

Pokrok v optických metodách, kultivačních systémech *in vitro* a molekulární biologii vedl k nástupu technik mikroskopie živých buněk. Tato neinvazivní technika poskytuje lepší představu o biologické roli cílových molekul tím, že umožňuje vědcům zkoumat dynamické procesy probíhající v živých buňkách v reálném čase (Salipalli *et al.*, 2014). Nejvýznamnější výhodou mikroskopie živých buněk spočívá v tom, že intracelulární pohyby proteinů lze měřit v reálném čase s vysokým prostorovým a časovým rozlišením. Po příchodu GFP pomohla mikroskopie živých buněk k velkému skoku v porozumění komplexní buněčné dynamiky (Kodiha *et al.*, 2014). Fluorescenční mikroskopie tak představuje důležitý prostředek pro vizualizaci specifických buněčných struktur použitím fluorescenčních fúzních proteinů.

3.2 Reportérové lentivirové vektory

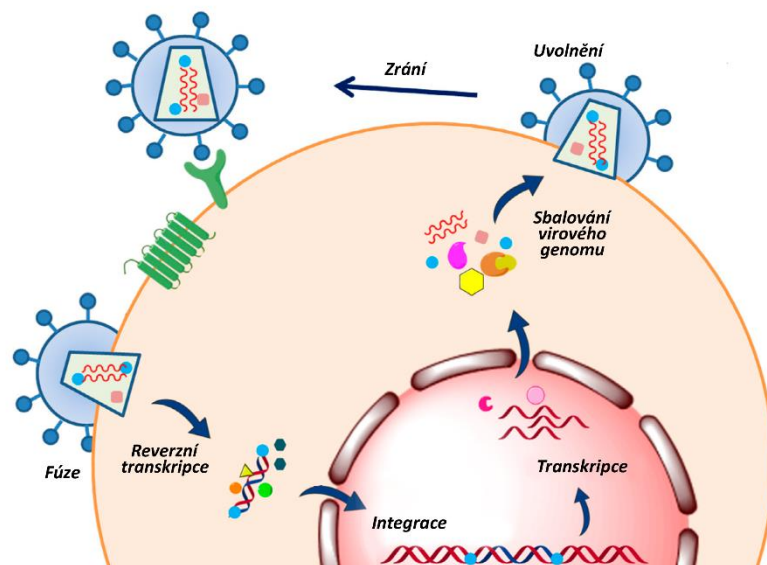
Viry z rodu *Lentivirus* jsou savčí viry z čeledi *Retroviridae*, které jsou charakteristické používáním virové reverzní transkriptázy a integrázy pro stabilní inzerci virové genetické informace do hostitelského genomu (Freed a Martin, 1994; Bukrinsky *et al.*, 1993). Ve srovnání s jinými viry mají lentiviry silné výhody v důsledku jejich přirozené účinnosti. Lentiviry jsou ze své podstaty nejúčinnějšími infekčními činiteli, které přenášejí genetický materiál na své hostitele. Přirozené výhody lentivirových vektorů jsou přenos genu do dělicích i nedělicích se buněk, snadná inkorporace od transdukce *in vitro* po injekci *in vivo* a stabilní exprese určitého genu díky jeho integraci do hostitelské DNA, a tedy do genomu hostitele (Sakuma *et al.*, 2012; Vectalys, 2019). Lentivirové vektory jsou nástroje pro přenos genů odvozené z virů. Při jejich výrobě jsou všechny patogenní a replikační vlastnosti virů odstraněny a zachovávají se pouze schopnosti přenosu genů. Lentivirové vektory se mohou integrovat do dělicích se i do nedělicích se buněk. Počet kopií sekvence, která se integruje do hostitelské DNA, se může lišit, ale řídí se množstvím lentivirových vektorů aplikovaných na cílové buňky. Integrace vybraného genetického materiálu do hostitelského genomu je vždy náhodná a stabilní (Vectalys, 2019).

Od prvního přenosu genu pomocí viru, konkrétně viru HIV z rodu *Lentivirus*, uplynulo již téměř 30 let. V dnešní době už jsou tyto lentivirové vektory účinnější a bezpečnější, a nabízejí mnoho zajímavých vlastností, jako například trvalé začlenění genů nebo relativně snadný systém pro manipulaci a výrobu vektorů. Většina lentivirových vektorů je založena na viru HIV-1. Virus HIV-1 je virus obsahující jednovláknovou RNA s pozitivní polaritou o délce okolo 9 kb, který kóduje 9 virových proteinů. Jak je možné vidět na Obrázku 1, tři největší čtecí rámce viru HIV-1 kódují tři hlavní strukturální proteiny: *gag*, *pol* a *env*. Gen *gag* kóduje virové jaderné proteiny, gen *pol* kóduje enzymy potřebné pro replikaci viru a gen *env* kóduje glykoprotein na povrchu viru.

Kromě těchto hlavních proteinů virový genom kóduje také regulační proteiny *tat* a *rev*, které aktivují transkripci viru, kontrolují sestřih a export virových transkriptů z jádra. Virový genom



Obrázek 1: Schématické znázornění virového genomu HIV-1 (převzato a upraveno z Sakuma *et al.*, 2012)



Obrázek 2: Schématické znázornění životního cyklu viru HIV-1 (převzato z Shukla *et* Chauhan, 2019)

je lemován LTR (Long terminal repeats, dlouhé repetitivní sekvence), které jsou potřebné pro virovou transkripci, reverzní transkripci a integraci (Sakuma *et al.*, 2012).

Při infekci virem HIV-1 dochází k rozeznání virové domény T-lymfocyt, makrofágem nebo dendritickou buňkou. Následně dochází ke sloučení virové membrány s membránou hostitelské buňky a následnému vstupu viru do buňky. Po vstupu do buňky jsou kapsidové proteiny holé a uvolňují virový genom s proteiny do cytoplazmy. Vlákno RNA s pozitivní polaritou se reverzní transkriptázou převede na dvouřetězcovou DNA, která je přenesena do jádra a pomocí virové integrázy je integrována do genomu hostitelské buňky. Po integraci do nukleové kyseliny LTR uzavírají konce virového genomu a regulují transkripci a polyadenylaci virové mRNA. Exportované virové genomy se shromažďují v cytoplazmatické membráně hostitelské buňky. Po uvolnění z buňky dochází ke spojení proteinů gag a komplexu gag-pol, což aktivuje virové proteázy, které převádí nezralé viriony na zralé infekční viry. Celý životní cyklus je možné vidět na Obrázku 2.

V historii byly nejprve nejčasnějšími lentivirovými vektory replikačně kompetentní viry nesoucí transgeny. Aby byly ale vektory bezpečnější, bylo zapotřebí oddělit virové sekvence používané pro balení a produkci od sekvencí kódujících virové proteiny. Později byly vytvořeny sofistikovanější vektory nesoucí prvky pro balení genomu, reverzní transkripce

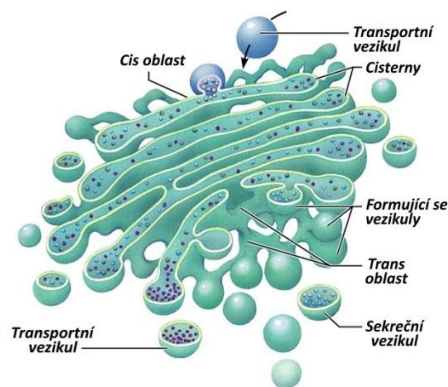
a integrace, jako je například LTR.

Vektory HIV-1 první generace pro replikaci jsou produkovány ze tří samostatných elementů: obalový konstrukt, plazmid env kódující virový glykoprotein a konstrukt genomového transferového vektoru. Pro další zvýšení bezpečnosti byly modifikací pomocných genů v systému vyvinuty vektory druhé generace. Vektory třetí generace používají regulační proteiny tat a rev pro transkripci viru a jaderný export transkriptů obsahujících intron. U lentivirových vektorů první a druhé generace může být místo integrace nepředvídatelné, což může vést k nežádoucím sekundárním účinkům, jako je například onkogeneze. Riziko nepříznivých sekundárních účinků je však při použití lentivirových vektorů třetí generace velmi nízké (Sakuma *et al.*, 2012).

V současnosti mají lentivirové vektory široké využití především při umlčování genů, imunizaci, modifikaci kmenových buněk, tvorbě transgenních zvířat atd. Transdukce stabilního genu zprostředkovaná lentivirovým vektorem pak může být využita pro živé zobrazování buněk infikovaných vektorem. U rakovinových buněk, které jsou konstruovány tak, aby exprimovaly reportérové geny lentivirovými vektory, může být monitorován růst nebo metastázy *in vivo*. Transdukce buněk pomocí vektoru umožňuje vytváření buněčných linií různých druhů rakoviny při transdukcí vektory cílených na různé orgány nádorové buňky (Vectalys, 2019). Součástí této bakalářské práce byla právě transdukce nádorových buněk lentivirovými vektory, které exprimují fluorescenční proteiny cílené na specifické buněčné struktury. V následujících kapitolách jsou tyto orgány detailně popsány.

3.3 Golgiho aparát

Golgiho aparát neboli Golgiho systém je jednou z důležitých organel endomembránového systému buňky pojmenované podle italského patologa Camilla Golgiho, který jej objevil v roce 1898 v Purkyňových buňkách (Dröschler, 1998). Tato organela hraje klíčovou roli především při endocytóze, exocytóze a regulaci vezikulárního transportu (Wortzel *et al.*, 2017). Probíhá zde zpracovávání nově nasyntetizovaných proteinů, jenž jsou sem dopraveny z endoplazmatického retikula, následně jsou zde štěpeny nebo glykosylovány a rozříděny do vezikul (Mowbrey a Dacks, 2009). Poté mohou být tyto proteiny transportovány do cílových oblastí buňky, kterými mohou být lysozomy nebo plazmatická membrána (Cooper, 2000). Kromě modifikace proteinů probíhá v Golgiho aparátu také iniciace signálních drah nebo



Obrázek 3: Struktura Golgiho aparátu (převzato a upraveno z Bishopkingdom, 2020)

biosyntéza různých molekul, kterými jsou v případě živočišné buňky glykolipidy a sřingomyeliny, a v případě rostlinné buňky polysacharidy, které se podílí na výstavbě buněčné stěny (Wilson *et al.*, 2011; Cooper, 2000; Mowbrey a Dacks, 2009).

Golgiho aparát tvoří váčky a zplořtělé cisterny ohraničené membránou, kde probíhá úprava a syntéza buněčných složek. Tyto složky jsou při procházení Golgiho aparátem kromě upravování také tříděny, k čemuž dochází v různých částech tohoto komplexu. Z tohoto důvodu se předpokládá, že je Golgiho aparát sestaven do více samostatných oblastí: *cis* oblasti, střední oblasti, která se skládá ze dvou částí a *trans* oblasti. Příjem vezikul s proteiny z endoplazmatického retikula probíhá v *cis* oblasti Golgiho aparátu, která je směřuje k jádru. Následuje postup do střední oblasti komplexu, kde probíhá většina reakcí (Cooper, 2000). Jakmile jsou polysacharidy, proteiny a lipidy modifikované, přecházejí do třídící *trans* oblasti komplexu regulující jejich přenos a distribuci do cílových částí buňky. Proteiny odtud mohou být transportovány buď k cytoplazmatické membráně, kde dochází k jejich začlenění do membrány, exkreci, anebo do ostatních organel, kterými mohou být v případě živočišných buněk lysozomy nebo vakuoly v kvasinkách nebo rostlinných buňkách. Struktura Golgiho aparátu je popsána na Obrázku 3.

Mechanismus, kterým jsou proteiny přepravovány v rámci Golgiho aparátu, zatím není zcela znám. Existují dva modely, jak k těmto procesům může docházet. První model předpokládá, že proteiny jsou přepravovány mezi cisternami Golgiho aparátu pomocí vezikulárních systémů COPI (coatamer protein I, obalový protein I). Jelikož ale nemohou být příliš velké molekuly obaleny vezikulárním systémem COPI, převládá v dnešní době model druhý, který tvrdí, že proteiny se nachází ve stále stejné cisterně, která se ale složením enzymů postupně mění z *cis*

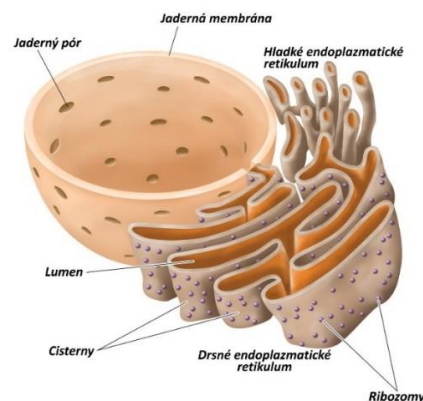
na *trans* oblast Golgiho aparátu za současného pohybu směrem od jádra (Wilson *et al.*, 2011).

Proteiny se v Golgiho aparátu nacházejí častěji na membráně než v jeho lumenu, jako je tomu například u endoplazmatického retikula. V membráně tohoto komplexu se také vyskytují specifické signály, které řídí uchovávání proteinů v Golgiho aparátu. V přítomnosti těchto signálů totiž nedochází k zabalení proteinů do transportních vezikul a proteiny tak nemohou opustit *trans* oblast Golgiho aparátu.

Jak již bylo řečeno, Golgiho aparát je základní organela, která se podílí na přežití nebo smrti buněk. Funkce Golgiho aparátu byla zkoumána u buněk různých typů nádorů, včetně rakoviny prostaty. Bylo zjištěno, že společným znakem maligního nádoru je aberantní glykosylace a vznik a vývoj nádoru je tudíž na glykosylaci závislý. U rakoviny prostaty byla zjištěna abnormální glykosylace, její význam však ještě není znám. Pokud jde o léčbu rakoviny v budoucnosti, je důležitá identifikace nádorově specifických proteinů Golgiho aparátu a jejich funkce, jelikož léky cílené na Golgiho aparát mohou ovlivnit jeho funkci i v normálních buňkách a způsobit tak závažné vedlejší účinky (Migita *et Inoue*, 2012).

3.4 Endoplazmatické retikulum

Endoplazmatické retikulum je jednou z největších organel v buňce. Hlavní význam této organely spočívá v syntéze, transportu a skládání bílkovin, dále v syntéze lipidů a steroidů a ukládání vápníku. Tato organela zahrnuje endoplazmatické retikulum na jaderném obalu a periferní endoplazmatické retikulum (Cooper, 2000). Dále existují dva typy endoplazmatického retikula: drsné a hladké. Drsné endoplazmatické retikulum nese na svém povrchu ribozomy (Obrázek 4), na kterých probíhá syntéza proteinů. Hladké endoplazmatické



Obrázek 4: Struktura endoplazmatického retikula (převzato a upraveno z Britannica, 2020)

retikulum nacházející se u jádra neobsahuje ribozomy a je místem syntézy lipidů.

Endoplazmatické retikulum je tvořeno zploštělými váčky a sítí větvících se cisteren obsahujících lumen, který je od okolního cytosolu oddělen jednou membránou (Oakes a Papa, 2015). Endoplazmatické retikulum je tvořeno několika strukturními doménami, z nichž každá vykonává specifické funkce. Tvar a distribuce těchto domén jsou regulovány řadou integrálních membránových proteinů a interakcemi s ostatními organelami nebo cytoskeletem. Organizace těchto subdomén i to, jakým způsobem přecházejí do různých struktur, však zatím není zcela známa (Cooper, 2000).

Jak již bylo zmíněno, jednou z důležitých funkcí této organely je syntéza více než třetiny všech proteinů vytvořených v buňce, ať už se jedná o sekretované nebo integrální proteiny, nebo proteiny cílené do cytosolu (Oakes a Papa, 2015). Aby k syntéze proteinu mohlo dojít, musí se na cytosolickém endoplazmatickém retikulu nacházet ribozom. Cesta syntézy sekrečních a integrálních proteinů začíná na ribozomu v cytosolu, kde dochází k translaci (Cooper, 2000). Následuje transport ribozomu na membránu endoplazmatického retikula, kde dochází k rozpoznání a navázání N–koncové signální sekvence vznikajícího polypeptidu na SRP (signal recognition particle, Signál rozpoznávající částice), zatímco je polypeptid stále syntetizován na ribozomu (Oakes a Papa, 2015). Komplex mRNA (messengerová RNA), ribozomu, vznikajícího polypeptidu a SRP se na membráně váže na receptor SRP, kde pokračuje translace (Cooper, 2000). Vznikající polypeptid se může kotranslačně translokovat do lumenu endoplazmatického retikula přes translokon Sec6, což je kanál skládající se z trimeru proteinů přenášející sekreční a membránové proteiny (Becker *et al.*, 2009). Během nebo v některých případech po dokončení translace je signální sekvence odštěpena proteázou, což umožňuje volnému proteinu vstupovat do lumenu endoplazmatického retikula (Oakes a Papa, 2015). Po dokončení translace se mRNA translatovaná na ribozomech uvolňuje a ribozomy mohou zůstat navázané na membráně a účastnit se další translace. V případě membránového proteinu dojde k zastavení translokace, protein je posunut po membráně a zakotven ve fosfolipidové dvojvrstvě, odkud může být později pomocí vezikul transportován na cílovou membránu (Cooper, 2000).

Kromě syntézy bílkovin dochází v endoplazmatickém retikulu také k syntéze membránových lipidů. Lipidy a fosfolipidy, jež jsou hlavními složkami membrán, jsou transportovány do části endoplazmatického retikula, která se nazývá ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment,

intermediální kompartment ER–GA). V tomto oddílu, který je v těsné blízkosti Golgiho aparátu a je bohatý na tubuly a vezikuly, probíhá biochemická modifikace lipidů. Po úpravě jsou lipidy transportovány pomocí sekrečních váčků po buňce nebo do Golgiho aparátu.

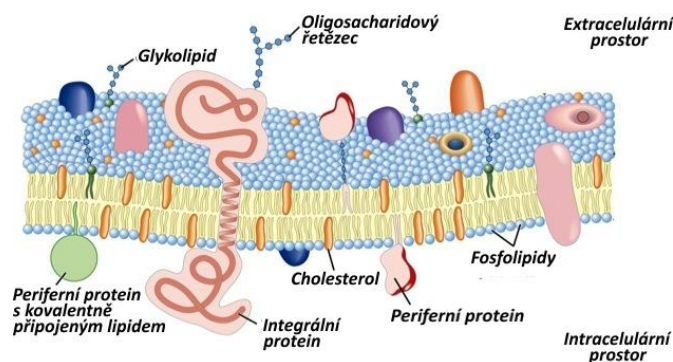
Endoplazmatické retikulum je také zásobním místem intracelulárního vápenatého kationtu. Za uvolňování vápenatých iontů z a do cytosolu při nízké hladině vápníku jsou zodpovědné především vápenaté kanály a s nimi spojené ryanodinové receptory a IP3R (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, inositol–1,4,5–trisfosfátový receptor) (Cooper, 2000).

Buněčný stres vážně narušuje funkci endoplazmatického retikula. To vede k abnormálnímu výskytu rozložených nebo špatně složených proteinů v endoplazmatickém retikulu a intracelulární nerovnováze v ustáleném stavu. Tento stav vede k rozvoji ERS (endoplasmic reticulum stress, stres endoplazmatického retikula) a spuštění signálních drah, které se souhrnně označují jako UPR (unfolded protein response, odpověď na nesložené proteiny). Tyto dva faktory se u klasických buněk podílí na jejich ochraně, ale u buněk nádorových mohou indukovat tumorigenezi a podporovat tak jejich přežití a vývoj. Pochopení ERS a znalost jeho role při tvorbě metastáz je v dnešní době omezená a bude rozhodující pro inhibici metastáz nádorových buněk, která se stala hlavním cílem nádorové terapie (Han *et* Wan, 2018).

3.5 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána je stejně jako všechny membrány v buňce tvořena lipidy a proteiny. Její základní strukturou je fosfolipidová dvojvrstva, která vytváří bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím buňky (Cooper, 2000). Do této dvojvrstvy jsou zabudované proteiny zodpovědné za specifické funkce cytoplazmatické membrány, jelikož napomáhají udržovat celistvost a organizaci membrány. Na extracelulární straně membrány se vyskytují sacharidy, které jsou kovalentními vazbami vázány na některé lipidy a proteiny.

V cytoplazmatické membráně lze nalézt tři typy lipidů a to fosfolipidy, glykolipidy a cholesterol. Fosfolipidy jsou tvořeny dvěma řetězci mastných kyselin navázanými na glycerol a fosfát. Díky tomuto složení mají amfipatický charakter, což znamená, že obsahují jak hydrofobní, tak hydrofilní části. Tato vlastnost membránových lipidů zajišťuje jejich formaci do dvojvrstvy, ve které hydrofilní část fosfolipidů směřuje ven k vodnímu prostředí a hydrofobní část dovnitř (Watson, 2015).



Obrázek 5: Struktura a jednotlivé složky cytoplazmatické membrány (převzato a upraveno z Mapping Ignorance, 2020)

Pro funkci membrány jsou důležité dva obecné rysy fosfolipidových dvojvrstev. Prvním je struktura fosfolipidů, která je zodpovědná za základní funkci membrán jakožto bariéry. Jelikož vnitřek fosfolipidové dvojvrstvy je tvořen hydrofobními řetězci mastných kyselin, membrána je nepropustná pro molekuly rozpustné ve vodě, včetně iontů a většiny biologických molekul. Druhým je, že dvojvrstvy jsou viskózní tekutiny, nikoli pevné látky. Dlouhé uhlovodíkové řetězce mastných kyselin se volně pohybují uvnitř membrány, takže samotná membrána je měkká a ohebná (Cooper, 2000). Tato vlastnost membrán byla v roce 1972 Jonathanem Singerem a Garthem Nicolsonem pojmenována termínem fluidní mozaika (Watson, 2015).

Glykolipidy jsou svou strukturou podobné fosfolipidům, ale namísto fosfátu je na glycerol navázaný sacharidový řetězec (Watson, 2015). Glykolipidy se nacházejí výhradně na vnější straně cytoplazmatické membrány (viz Obrázek 5) a jejich zastoupení je poměrně malé. Cholesterol je naproti tomu hlavní membránovou složkou živočišných buněk, která je přítomna v přibližně stejném množství jako fosfolipidy. Jeho struktura se od ostatních lipidů nacházejících se v membráně poměrně liší. Vzhledem ke své pevné kruhové struktuře hraje cholesterol v membránové struktuře výraznou roli. Cholesterol sám o sobě nevytváří membránu, ale vtěsnává se do dvojvrstvy fosfolipidů s polární hydroxylovou skupinou. Cholesterol má výrazný vliv na tekutost membrány (Cooper, 2000).

Zatímco lipidy jsou základní strukturální prvky membrán, za specifické funkce membrány jsou zodpovědné proteiny. Bez membránových proteinů by fosfolipidová dvojvrstva zajišťovala pouze oddělení vnějšího a vnitřního prostředí (Watson, 2015). Singer a Nicolson rozlišili dvě třídy membránových proteinů, které nazvali periferními a integrálními membránovými proteiny. Periferní proteiny nejsou vloženy do hydrofobní části lipidové dvojvrstvy, ale jsou

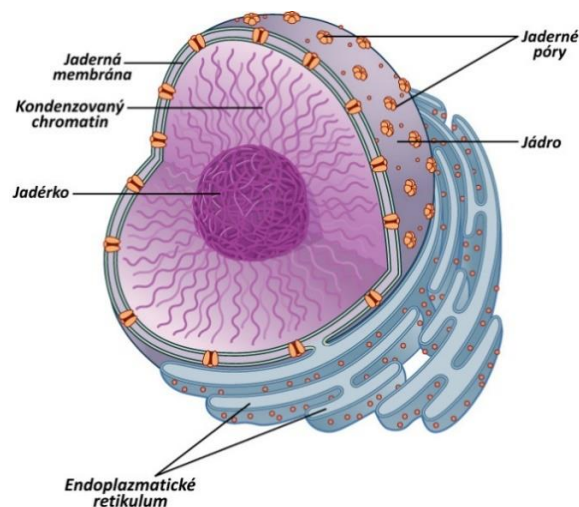
nepřímo spojeny s membránami prostřednictvím interakcí protein–protein často prostřednictvím iontové vazby. Některé z těchto proteinů mohou být také v cytoplazmatické membráně ukotveny kovalentně připojenými lipidy nebo glykolipidy. Takové proteiny jsou buď ukotveny do vnější vrstvy cytoplazmatické membrány pomocí GPI (glykosylfosfatidylinositolových) kotev, anebo ve vnitřní vrstvě cytoplazmatické membrány kovalentně připojenými lipidy. Za to u integrálních membránových proteinů jsou jejich části vloženy přímo do lipidové dvojvrstvy (Cooper, 2000).

Příležitost k léčbě a prevenci rakoviny je potřeba znalost složení membránových lipidů a zejména změna ve struktuře lipidů nacházející se v nádorové buňce oproti lipidům v buňce klasické. Složení a funkce membrány u nádorových buněk totiž může být klíčové v léčbě rakoviny buď v kombinaci s chemoterapeutiky, nebo některými molekulami, které jsou v současné době vyvíjeny. Těmito změnami a jejich aplikací se v současnosti zabývají například některá odvětví lipidomiky (Zalba *et ten* Hagen, 2017).

3.6 Jádro

Jádro je membránová organela zajišťující řídicí hlavní pochody v buňce. Jak je možné vidět na Obrázku 6, jde o membránovou organelu vyplněnou nukleoplazmou neboli karyoplazmou. Uvnitř nukleoplazmy se nachází DNA ve formě chromatinu a jadérko. Jaderná membrána poté obsahuje velké množství pórů sloužících k transportu molekul z jádra a do jádra.

Tato organela byla první objevenou intracelulární strukturou, původně popsána Franzem



Obrázek 6: Struktura jádra (převzato a upraveno z Biology web page, 2020)

Bauerem v roce 1802 a později popularizována Robertem Brownem. V 80. letech použití fluorescenční mikroskopie umožnilo studium konkrétních proteinů v jádře a byla jasně prokázána existence několika morfologicky odlišitelných struktur. V poslední době bylo vyvinuto velké úsilí o pochopení specifických funkcí těchto domén. Tyto studie byly ještě urychleny objevem fluorescenčních značek, které nyní umožňují vizualizaci a kvantitativní analýzu chromatinu, mRNA a proteinů v živých buňkách (Dundr *et* Misteli, 2001). Vzhledem k tomu, že v jádře je umístěn genom buňky, slouží tato organela především jako úložiště genetické informace a také jako kontrolní středisko buňky. Oddělením genomu od cytoplazmy umožňuje jadernému obalu regulovat expresi genu pomocí mechanismů jedinečných pro eukaryotické buňky. Zatímco prokaryotická mRNA je translatována již během transkripce, eukaryotická mRNA ještě před transportem z jádra podléhá posttranskripčním úpravám. Přítomnost jádra tak umožňuje regulovat expresi genů pomocí posttranskripčních mechanismů (Cooper, 2000).

Podobně jako jiné organely i jádro obsahuje mnoho domén se specializovanými funkcemi. Nejvíce viditelnými, a proto také nejčastěji studovanými strukturami jádra jsou chromozomy a jadérko. Jádro však obsahuje celou řadu dalších struktur, ale pochopení jejich funkce je stále ještě v plenkách (Handwerger *et* Gall, 2006). Struktury buněčného jádra sice nemají membrány, které by tyto oblasti vymezovaly, ale jsou považovány za “kompartmenty“ z několika důvodů. Kromě toho, že obsahují odlišné typy rezidentních proteinů, mohou být také morfologicky odděleny pomocí světelné a elektronové mikroskopie, přičemž většina z nich již byla vizualizována v živých buňkách pomocí technologie GFP. Nejvíce prostudovanými jadernými kompartmenty je jadérko, SFC (‘splicing-factor compartments’) a Cajalovo tělíčko (Dundr *et* Misteli, 2001).

Jadérko je kromě chromatinu nejvýznamnější jaderná struktura. Nachází se kolem shluků tandemových repetice rDNA (ribosomální DNA) genů, které jsou transkribovány RNA polymerázou I. Regiony obsahující tandemové repetice rDNA jsou základem organizace jadérka a shromažďování složek potřebných pro biosyntézu ribozomu. Jadérko je morfologicky rozděleno do tří různých oblastí, které jsou zodpovědné za proces biogeneze ribozomu. Fibrilární centra jsou obklopena hustými fibrilárními složkami, ze kterých se šíří granulované komponenty.

Jak se v posledních letech ukázalo, funkcí SFC je ukládání složek, které jsou součástí

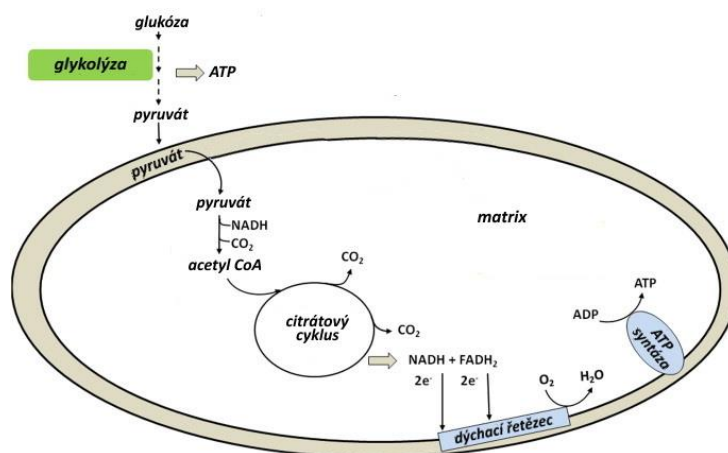
spliceozomu. Po expresi genů obsahující introny se složky účastníci se sestřihu šíří z SFC do transkripčních míst. Cajalovo tělísko je pravděpodobně místem sestavení transkripční aparatury jádra. Některé studie naznačují, že Cajalovo tělísko může fungovat také jako místo sestavení transkriptomů (Dundr *et* Misteli, 2001).

Jádra nádorových buněk mohou být jádra nepravidelná nebo eliptická se shluky heterochromatinu. U těchto buněk je také častý výskyt fragmentace nebo pučení jader, jader ve tvaru prstenců nebo děr v jádrech. U nádorů vysokého stupně se pak nachází značná anizonukleóza, tedy variabilita ve velikosti a tvaru jader (Nandini, 2017). V současné době ale není dostatečně prozkoumána patologie jádra nádorových buněk a vyžaduje tak další studia. Existuje možnost, že pokud v budoucnosti dojde k identifikaci specifické struktury jádra nádorových buněk a k jejich použití jako biomarker, bude možné vyvinout personalizovaný lék založený na architektuře jádra, který bude využíván při klinickém rozhodování (Mai, 2019).

3.7 Mitochondrie

Mitochondrie je důležitou organelou v buňce, kde je hlavním poskytovatelem energie. Je zodpovědná za vytváření většiny energie získané z rozkladu sacharidů a mastných kyselin, které se během oxidativní fosforylace přeměňují na ATP. Kromě produkce energie mitochondrie uchovávají vápník využívaný při signalizaci buněk, generují teplo a hrají roli během stresových reakcích (Kühlbrandt, 2015). Většina mitochondriálních proteinů je po translaci do organely importována pomocí specifických signálů. Mitochondrie je jedinečnou organelou také proto, že obsahuje vlastní DNA, která kóduje tRNA, rRNA a některé mitochondriální proteiny. Mitochondrie ve své struktuře tedy zahrnuje jak proteiny kódované jejím vlastním genomem a převedené do organely, tak proteiny kódované jaderným genomem a importované z cytosolu (Cooper, 2000).

Mitochondrie jsou ohraničeny vnitřní a vnější membránou oddělené intermembránovým prostorem. Vnitřní membrána tvoří četné záhyby nazývané se křisty, které vybíhají do vnitřního prostoru organely označované jako matrix. Vnější mitochondriální membrána obsahuje poriny a volně jí tak prochází ionty a malé nenabitě molekuly. Jakékoli větší molekuly musí být do mitochondrie transportovány pomocí přenašečů (Kühlbrandt, 2015). Oproti tomu vnitřní membrána je pro většinu iontů a malých molekul nepropustná. Právě matrix a vnitřní membrána představují nejdůležitější části mitochondrií, jelikož obsahují důležité enzymy



Obrázek 7: Přehled průběhu metabolismu v mitochondrii (převzato a upraveno z Sims *et Myuderman*, 2010)

zodpovědné za reakce metabolismu (Cooper, 2000).

Počáteční fáze rozkladu glukózy, tzv. glykolýza, probíhá v cytosolu, kde je glukóza přeměněna na pyruvát. Pyruvát je pak transportován právě do matrix mitochondrií, kde jeho oxidace až na CO₂ poskytuje většinu využitelné energie v podobě ATP (adenosintrifosfát). Tento proces zahrnuje oxidaci pyruvátu na acetyl CoA (koenzym A), který se pak vstupuje do citrátového cyklu, kde se rozkládá na CO₂ (Obrázek 7).

Oxidace mastných kyselin také vede k rozkladu na acetyl CoA, který je v mitochondriích metabolizován stejným způsobem. Enzymy citrátového cyklu se nachází v matrix mitochondrií a jsou nezbytnou součástí rozkladu sacharidů a mastných kyselin (Cooper, 2000). Oxidace acetylu CoA na CO₂ je spojena s redukcí NAD⁺ (nikotinamidadeninukleotid) a FAD (flavinadeninukleotid) na NADH a FADH₂. Vysokoenergetické elektrony z NADH a FADH₂ jsou přenášeny řadou nosičů umístěných ve vnitřní membráně na molekulární kyslík.

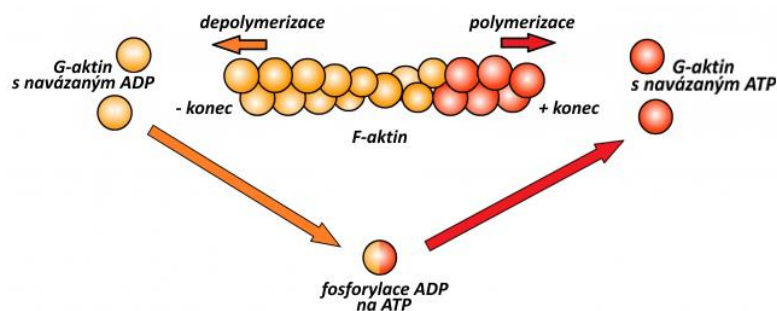
Tento proces se nazývá elektron–transportní někdy také dýchací řetězec. Energie vzniklá elektronovým transportem je využívána při oxidativní fosforylaci, kdy dochází k pumpování vodíkových kationtů z matrix do intramembránového prostoru. Tím vzniká elektrochemický gradient, kterého využívá ATP syntáza. Ta pumpuje protony zpět do matrix za současné fosforylace ADP (adenosindifosfát) na ATP. Vnitřní mitochondriální membrána tedy představuje hlavní místo tvorby ATP (Spinelli *et Haigis*, 2018).

Mitochondriální dysfunkce je spojena s mnoha chorobami a patofyziologickými jevy včetně rostoucího počtu neurodegenerativních onemocnění. Vzhledem k tomu, že jsou klíčové regulátory buněčné smrti, jsou mitochondrie také hlavním cílem výzkumu rakoviny a centrem vývoje léčiv (Stochaj *et al.*, 2015).

3.8 Aktin

Aktin je nejhojnějším proteinem ve většině eukaryotických buněk a účastní se více interakcí protein-protein než jakýkoli jiný známý protein (Dominguez *et Holmes*, 2011). Aktin v buňce polymerizuje za vzniku aktinových filamentů. Tyto filamenty jsou tenká, pohyblivá vlákna o průměru přibližně 7 nm a délce až několika mikrometrů (Cooper, 2000). Tato schopnost spolu s možností přecházet mezi globulárním G–aktinem a fibrilárním F–aktinem dělají z aktinu jeden z klíčových článků buňky. Aktin spolu s ABP (actin-binding proteins, proteiny vázající aktin) zajišťuje mnoho funkcí od pohyblivosti a udržování tvaru buňky jakožto součást cytoskeletu až po regulaci transkripce. Kromě těchto funkcí je také aktin spolu s myozinem základem svalové kontrakce (Dominguez *et Holmes*, 2011). Pod plazmatickou membránou aktinová vlákna tvoří síť, která poskytuje buňce mechanickou podporu.

Jednotlivé aktinové molekuly G–aktinu jsou kulovitého tvaru, tvořené polypeptidovým řetězcem s 375 aminokyselinami, kdy každý řetězec je složen z α a β domén. Každý aktinový monomer má vazebná místa, která zprostředkovávají vzájemné interakce s dvěma dalšími G–aktiny, čímž tyto monomery polymerizují za vzniku F-aktinu. Protože jsou všechny aktinové monomery orientovány stejným směrem, lze na aktinovém filamentu rozlišit plus a minus konce, viz Obrázek 8. Tato polarita aktinových vláken je důležitá jak při jejich sestavování, tak při směru pohybu myozinu vzhledem k aktinu (Cooper, 2000).



Obrázek 8: Dynamika aktinu (převzato a upraveno z Spinal Muscular Atrophy, 2020)

Při aktinové polymerizaci je v prvním kroku vytvořen malý agregát sestávající ze tří aktinových monomerů. Na oba konce aktinového vlákna se poté mohou přidávat další monomery, přičemž plus konec se prodlužuje asi pětkrát až desetkrát rychleji než minus konec. Stabilní aktinové monomery se přitom váží na ATP, který je po sestavení vlákna hydrolyzován na ADP a aktin se tak stává nestabilním. ATP sice není pro polymerizaci nutný, ale aktinové monomery s navázaným ATP polymerizují rychleji než ty, ke kterým je vázán ADP (Cooper, 2000).

Jak již bylo řečeno, polymerizace i depolymerizace aktinových vláken je regulována i ABP. Klíčovým proteinem zodpovědným za rozklad aktinového vlákna v buňce je kofilin, který se váže na aktinová vlákna a zvyšuje tak rychlost disociace aktinových monomerů od minusového konce. Od aktinu se odděluje spolu s navázaným ADP, čímž brání jeho znovunavázání na filamenta. Další ABP, profilin, ale může změnit účinek kofilinu a stimulovat začlenění aktinových monomerů do filamentů (Cooper, 2000).

Aktinová vlákna se v nejvyšší koncentraci nachází pod cytoplazmatickou membránou, kde jsou aktinová vlákna uspořádána do sítě a k membráně jsou ukotvena prostřednictvím ABP (Lodish *et al.*, 2000). Tato síť aktinových vláken a aktin vázajících proteinů se nazývá kortex. Tato struktura určuje tvar buněk a podílí se na různých procesech, které probíhají na buněčném povrchu včetně pohybu buňky. Na cytoplazmatické membráně většiny buněk se navíc vyskytují oblasti, které zajišťují spojení se sousedními buňkami, tkáňovými složkami nebo jinými substráty, jimiž může být třeba povrch kultivační láhve (Cooper, 2000).

Bylo zjištěno, že některé z proteinů, které jsou součástí aktinového cytoskeletu, úzce souvisí se schopností některých nádorů metastazovat. Nedávné studie začaly objasňovat molekulární funkce těchto proteinů při migraci nádorových buněk *in vitro*. *In vivo* ale tyto invazivní nádorové buňky exprimují skupiny proteinů ve více signálních drahách, které spolupracují, a tak zesilují aktivitu komplexů podílejících se na vzniku metastáz (Yamaguchi *et Condeelis*, 2007). Nyní je nutné prozkoumat tyto molekulární dráhy a zjistit hlavní regulátory exprese a aktivity těchto proteinů, na které by mohly být cíleny potenciální nádorová léčiva (Absi *et al.* 2018).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

K experimentům byla použita adherentní buněčná linie HeLa odvozená z nádoru děložního hrdla člověka (*Homo sapiens sapiens*) a buněčná linie U-2 OS odvozená z osteosarkomu člověka (*Homo sapiens sapiens*). Obě tyto buněčné linie byly zakoupeny z American tissue culture collection.

Při transdukcii buněčných linií byly použity následující lentivirové vektory:

- rLV.EF1.mCherry-Actin-9 (Vectalys, kat. č. 0020VCT)
- rLV.EF1.mCherry-ER-9 (Vectalys, kat. č. 0025VCT)
- rLV.EF1.mCherry-Golgi-9 (Vectalys, kat. č. 0022VCT)
- rLV.EF1.mCherry-Mem-9 (Vectalys, kat. č. 0026VCT)
- rLV.EF1.mCherry-Mito-9 (Vectalys, kat. č. 0024VCT)
- rLV.EF1.mCherry-Nuc-9 (Vectalys, kat. č. 0023VCT)

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- DMSO (dimethylsulfoxid) (ITW Reagents, kat. č. A3672.0250)
- FCS (Fetální telecí sérum) (Gibco, kat. č. 16010159)
- Kultivační médium McCoy's 5A (Lonza, kat. č. 12-688F)
- Kultivační médium EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (Lonza, kat. č. 12-611F)
- Polybren Transfection Reagent (EMD Millipore, kat. č. TR-1003-G)
- TrypLE (Gibco, kat. č. 12604054)

Testované látky

- Aktinomycin D (Sigma-Aldrich, kat. č. 50-76-0)
- Bortezomib (Sigma-Aldrich, kat. č. 179324-69-7)
- Cykloheximid (Sigma-Aldrich, kat. č. 66-81-9)
- Cyklosporin A (Sigma-Aldrich, kat. č. 59865-13-3)
- Daunorubicin hydrochlorid (Sigma-Aldrich, kat. č. 23541-50-6)

- Etoposid (Sigma-Aldrich, kat. č. 33419-42-0)
- Kyselina betulinová (Sigma-Aldrich, kat. č. 472-15-1)
- Mitomycin (Sigma-Aldrich, kat. č. 50-07-7)
- Mitoxantron dihydrochlorid (Sigma-Aldrich, kat. č. 70476-82-3)
- Topotekan hydrochlorid hydrát (Sigma-Aldrich, kat. č. 123948-87-8)

4.2.2 Použité soupravy

- CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, kat. č. G5421)

4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

- 1x PBS: 10x PBS 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ · 2H₂O, 2 g KH₂PO₄, rozpuštěno v 800 ml destilované vody a doplněno do 1 l; příprava: 50 ml 10x PBS doplním destilovanou vodou do 500 ml)
- kultivační médium EMEM (500 ml): k 500 ml média EMEM přidat 50 ml FCS, přefiltrovat
- kultivační médium McCoy's (500 ml): k 500 ml média McCoy's přidat 50 ml FCS, přefiltrovat
- zamrazovací médium (40 ml): 38 ml FCS smíchat s 2 ml DMSO, přefiltrovat

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga 5810 R (Eppendorf)
- Echo Liquid Handler (Labcyte)
- EnVision HTS Multilabel Plate Reader with AlphaScreen Microplate reader (PerkinElmer)
- Flow box MSC-Advantage (Thermo Scientific)
- Fluorescenční mikroskop CellObserver SD (Zeiss)
- Fluorescenční mikroskop Cell Voyager CV7000 (Yokogawa)
- Inkubátor CO₂ innova CO-170 (New Brunswick Scientific)
- Multidrop (Thermo Scientific)
- Software Adobe Photoshop
- Software GraphPad Prism 8
- Software ImageJ

- Screeningový systém Cell Voyager CV7000 (Yokogawa)
- Světelný mikroskop IX51 (Olympus)
- Vi-Cell XR (Beckman Coulter)
- Vodní lázeň WNB (Mettler)
- Výrobník ledové drtě (N.F.T.)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Kultivace

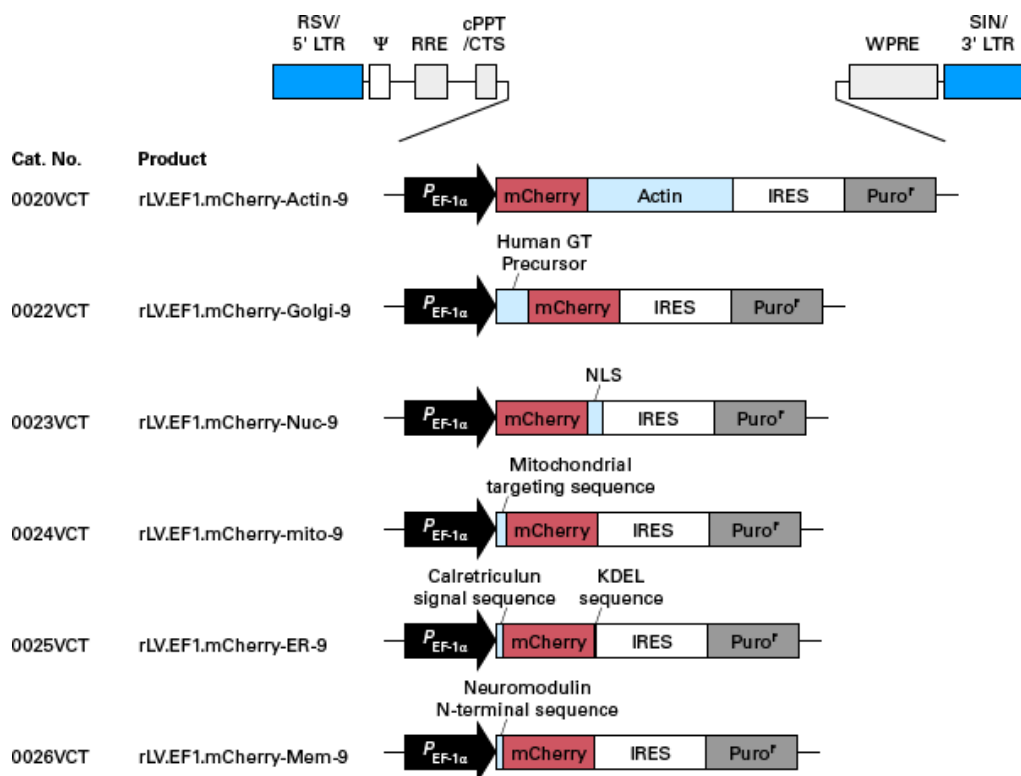
Buněčná linie HeLa byla kultivována v kultivačním médiu EMEM s 10 % fetálního telecího séra. Buněčná linie U-2 OS byla kultivována v kultivačním médiu McCoy's s 10 % fetálního telecího séra. Tyto buněčné linie byly kultivovány ve středních kultivačních lahvích obsahujících příslušné médium. Kultivace probíhala v inkubátoru ve 37 °C, atmosféře obohacené o 5 % CO₂ a relativní vlhkosti 90 %.

Třikrát týdně byla ve sterilním prostředí flowboxu prováděna pasáž buněk.

1. Po vylití média z kultivační láhve byly buňky promyty 15 ml PBS pro odstranění zbytků média.
2. Do střední kultivační láhve byl napipetován 1 ml tryplu, který v inkubátoru působil po dobu 5 minut.
3. Pro zastavení trypsinizace bylo do kultivační láhve přidáno 5 ml kultivačního média.
4. Buňky byly v kultivačním médiu propipetovány a v kultivační láhvi byla ponechána jedna šestina z celkového objemu buněčné suspenze.
5. Do střední kultivační láhve bylo poté přidáno 15 ml příslušného kultivačního média.

4.4.2 Transdukce

Pro fluorescenční vizualizaci subcelulárních struktur byly použity lentivirové reportérové vektory, což jsou předbalené lentivirové částice exprimující fluorescenční proteinové geny pro transdukcí savčích buněk. K dispozici byly systémy pro vizualizaci aktinu, Golgiho aparátu, jádra, mitochondrie, endoplazmatického retikula a cytoplazmatické membrány. Každý z těchto vektorů obsahuje genové sekvence zajišťující přímou vizualizaci konkrétních subcelulárních struktur. Každá lentivirová částice obsahuje sekvenci IRES (internal ribosome entry site, vnitřní ribozomální vstupní místo) umožňující translaci mRNA v hostitelské buňce. Dále každá částice



Obrázek 9: Schématická mapa expresních kazet obsažených v částicích pro značení jednotlivých subcelulárních struktur s RFP mCherry (převzato z Takara Bio, 2020)

obsahuje sekvence genu rezistence vůči puromycinu, aby byla zajištěna následná selekce a v poslední řadě sekvence genu pro RFP. Každá lentivirová částice ještě obsahuje specifickou sekvenci zajišťující označení dané organely. Například lentivirový vektor cílený na Golgiho aparát obsahuje sekvenci zajišťující syntézu galaktosyltransferázy, což je enzym přenášející galaktózu. Galaktosyltransferáza se v buňce vyskytuje pouze se v membráně Golgiho aparátu. Proto je tento enzym použit k fluorescenčnímu označení Golgiho aparátu. Ostatní specifické sekvence pro označení jednotlivých organel lze vidět na Obrázku 9.

Buňky byly nasazeny na 24 jamkovou kultivační destičku po 10 000 buňkách na jamku a do druhého dne inkubovány v inkubátoru při 37 °C, atmosféře 5% CO₂ a 90% relativní vlhkosti. Bylo předpokládáno, že počet buněk se během 24 h zdvojnásobí a v jamce kultivační desky tak bude 20 000 buněk. Byl proto vypočítán objem koktejlu lentivirových vektorů. Podle pokynů výrobce byla zvolena hodnota MOI (Multiplicity of infection, Multiplicita infekce) – 20.

Výpočet objemu lentivirových vektorů použitého při transdukci:

Počet buněk v jamce = 20 000

Titr = $1 \cdot 10^6$

MOI = 20

$$V = \frac{\text{počet buněk v jamce}}{\text{titr}} \cdot MOI$$

$$V = \frac{20\,000}{1 \cdot 10^6} \cdot 20 = 0,4 \mu\text{l}$$

Následující den byla provedena transdukce buněk.

1. Z jamek kultivační destičky bylo odsáto médium a poté přidány lentivirové vektory o vypočítaném objemu, 15 μl příslušného kultivačního média a 0,4 μl polybrenu. Buňky byly takto inkubovány 5 min při pokojové teplotě.
2. Po této době bylo do každé jamky napipetováno 984,2 μl příslušného kultivačního média. Kultivační destička s transdukovanými buňkami byla inkubována 14-16 h při 37 °C, atmosféře 5% CO₂ a 90% relativní vlhkosti.
3. Po uplynuté době bylo v jamkách kultivační destičky vyměněno médium za nové.
4. Po 72 h od transdukce bylo pod fluorescenčním mikroskopem zkontrolováno, zda byla transdukce provedena úspěšně a zároveň byla zahájena selekce puromycinem. Z jamek kultivační destičky bylo staré médium vyměněno za médium nové obsahující puromycin v poměru 10 000 : 1.
5. Postupně po dosažení dostatečné konfluence byly buňky přesunuty z 24 jamkové kultivační destičky na 6 jamkovou a následně na střední kultivační láhev.

4.4.3 Zamražení buněk

Transdukované buněčné linie byly dále kultivovány pro použití při dalších experimentech a částečně zamraženy.

1. Po vylití média z kultivační láhve byly buňky promyty 15 ml PBS pro odstranění zbytků média.
2. Do střední kultivační láhve byl napipetován 1 ml tryplu, který v inkubátoru působil po dobu 5 minut.
3. Pro zastavení trypsinizace bylo do kultivační láhve přidáno 5 ml kultivačního média. Buněčná suspenze byla centrifugována 5 min při 1 500 rpm.
4. Supernatant byl odsát a sediment resuspendován v zamrazovacím médiu.
5. Buněčná suspenze byla po 1,5 ml rozpipetována do kryozkumavek, které byly přesunuty do -80 °C.

4.4.4 Mikroskopie živých buněk

Mikroskopie živých buněk je technika umožňující okamžité zobrazení buněk *in vivo* po určité době. Při této metodě je nejčastěji využívána fluorescenční mikroskopie, která umožňuje sledovat lokalizaci fluorescenčních proteinů v buňkách.

Do 384 jamkového panelu určeného k mikroskopii bylo do každé jamky napipetováno 30 μ l buněčné suspenze po 3 000 buněk. Panel s buňkami byla do druhého dne inkubována při 37 °C, atmosféře obohacené o 5 % CO₂ a relativní vlhkosti 90 %.

Po 24 hodinách byl panel s buňkami vložen do screeningového systému.

1. Metodou konfokální fluorescence s akvizicí BP595/20, expozičním časem 200 ms, objektivem pro vodní imerzi se zvětšením 60x a 50% zdrojem světla o vlnové délce 561 nm byly pořízeny fotografie značených buněk z fluorescenčního mikroskopu CV7000, Yokogawa.
2. Po zhotovení fotografií byla automaticky provedena maximum intensity projection.
3. Korekce pozadí na fotografiích byla provedena pomocí programu ImageJ a pro zachování pixelové kvality byly fotografie upraveny v programu Adobe Photoshop.

4.4.5 Stanovení hodnoty IC50 testovaných látek použitím MTS testu

MTS test je metoda používaná pro kvantitativní stanovení životaschopnosti buněk. Metoda se obvykle používá ke zjištění citlivosti buněk vůči různým látkám pomocí IC50. Tato hodnota stanovuje koncentraci, která vyvolá 50% úmrtnost buněk.

Test je založen na tom, že dehydrogenázy živých a metabolicky aktivních buněk způsobují redukci tetrazoliové soli, která je součástí MTS, na hnědý formazan. Míra zbarvení je poté přímo úměrná množství živých buněk. Toto zbarvení je možné kvantifikovat změřením absorbance při 490 nm.

1. Do každé jamky 384 jamkového panelu bylo napipetováno 30 μl buněčné suspenze po 800 buněk, přičemž první a třináctý sloupec obsahoval pouze médium. Tyto sloupce sloužily jako blank. Panel s buňkami byl do druhého dne inkubován při 37 °C, atmosféře obohacené o 5 % CO₂ a relativní vlhkosti 90 %.
2. Následující den byly k buňkám přidány testované roztoky látek v DMSO. Dané látky byly přidány v 7 koncentracích (v některých případech v 9 koncentracích) v triplikátu, přičemž nejvyšší koncentrace byla 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a faktor ředění 4x.
3. Panel s buňkami byl 72 hodin inkubován při 37 °C, atmosféře obohacené o 5 % CO₂ a relativní vlhkosti 90 %.
4. Po 72 hodinách byly do každé jamky přidány 4 μl MTS a panel s buňkami byl asi 2 h inkubován při 37 °C.
5. Jakmile byla v jamkách pozorována viditelná změna zbarvení, byla v každé jamce pomocí spektrofotometru změřena absorbance při 490 nm. Použitím programu GraphPad byla stanovena hodnota IC50.

Schéma pipetování látek v jednotlivých koncentracích do 384 jamkového panelu je znázorněno na obrázku 10.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	Blank	Blank	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO				Blank	Blank	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO				
B	Blank	Actinomycin											Blank	Actinomycin										
C	Blank	Actinomycin											Blank	Actinomycin										
D	Blank	Actinomycin											Blank	Actinomycin										
E	Blank	Actinomycin											Blank	Actinomycin										
F	Blank	Actinomycin											Blank	Actinomycin										
G	Blank	Actinomycin											Blank	Actinomycin										
H	Blank	Actinomycin											Blank	Actinomycin										
I	Blank	Mitomycin											Blank	Mitomycin										
J	Blank	Mitomycin											Blank	Mitomycin										
K	Blank	Mitomycin											Blank	Mitomycin										
L	Blank	Mitomycin											Blank	Mitomycin										
M	Blank	Mitomycin											Blank	Mitomycin										
N	Blank	Mitomycin											Blank	Mitomycin										
O	Blank	Mitomycin											Blank	Mitomycin										
P	Blank	Mitomycin											Blank	Mitomycin										

↓

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO			
B	Blank	Actinomycin	50,000 0	12,500 0	3,125 0	0,781 3	0,195 3	0,048 8	0,012 2			
C	Blank	Actinomycin	50,000 0	12,500 0	3,125 0	0,781 3	0,195 3	0,048 8	0,012 2			
D	Blank	Actinomycin	50,000 0	12,500 0	3,125 0	0,781 3	0,195 3	0,048 8	0,012 2			
E	Blank	Actinomycin										
F	Blank	Actinomycin	50,000 0	12,500 0	3,125 0	0,781 3	0,195 3	0,048 8	0,012 2			
G	Blank	Actinomycin	50,000 0	12,500 0	3,125 0	0,781 3	0,195 3	0,048 8	0,012 2			
H	Blank	Actinomycin	50,000 0	12,500 0	3,125 0	0,781 3	0,195 3	0,048 8	0,012 2			
I	Blank	Mitomycin										
J	Blank	Mitomycin	50,000 0	12,500 0	3,125 0	0,781 3	0,195 3	0,048 8	0,012 2			
K	Blank	Mitomycin	50,000 0	12,500 0	3,125 0	0,781 3	0,195 3	0,048 8	0,012 2			
L	Blank	Mitomycin	50,000 0	12,500 0	3,125 0	0,781 3	0,195 3	0,048 8	0,012 2			
M	Blank	Mitomycin										
N	Blank	Mitomycin	50,000 0	12,500 0	3,125 0	0,781 3	0,195 3	0,048 8	0,012 2			
O	Blank	Mitomycin	50,000 0	12,500 0	3,125 0	0,781 3	0,195 3	0,048 8	0,012 2			
P	Blank	Mitomycin	50,000 0	12,500 0	3,125 0	0,781 3	0,195 3	0,048 8	0,012 2			

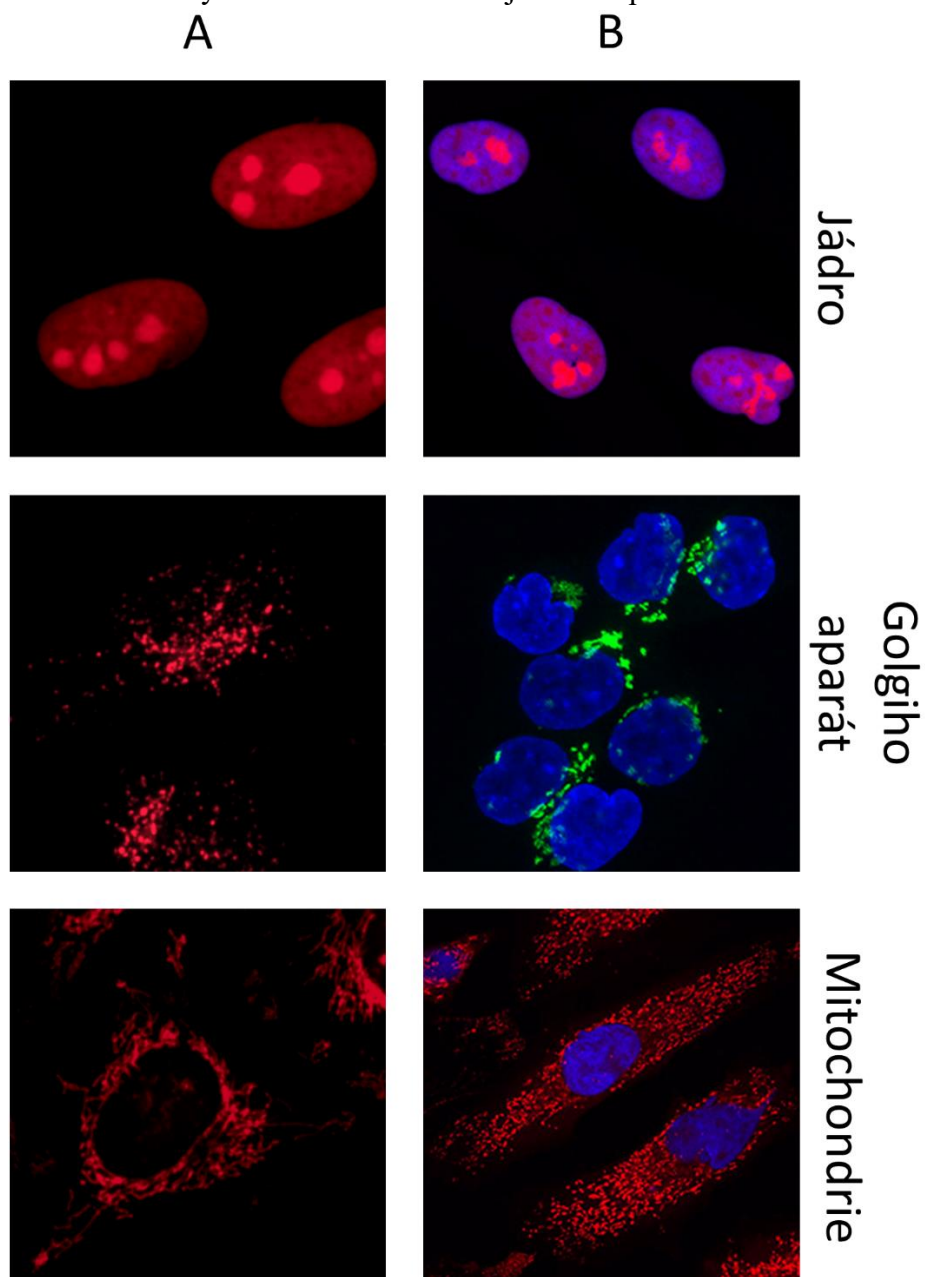
Obrázek 10: Schématické znázornění 384 jamkového panelu s jednotlivými koncentracemi ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Legenda: žluté zbarvení – testované látky, oranžové zbarvení – blank, červené zbarvení – DMSO, modré zbarvení – aktinomycin, zelené zbarvení – mitomycin

5 VÝSLEDKY

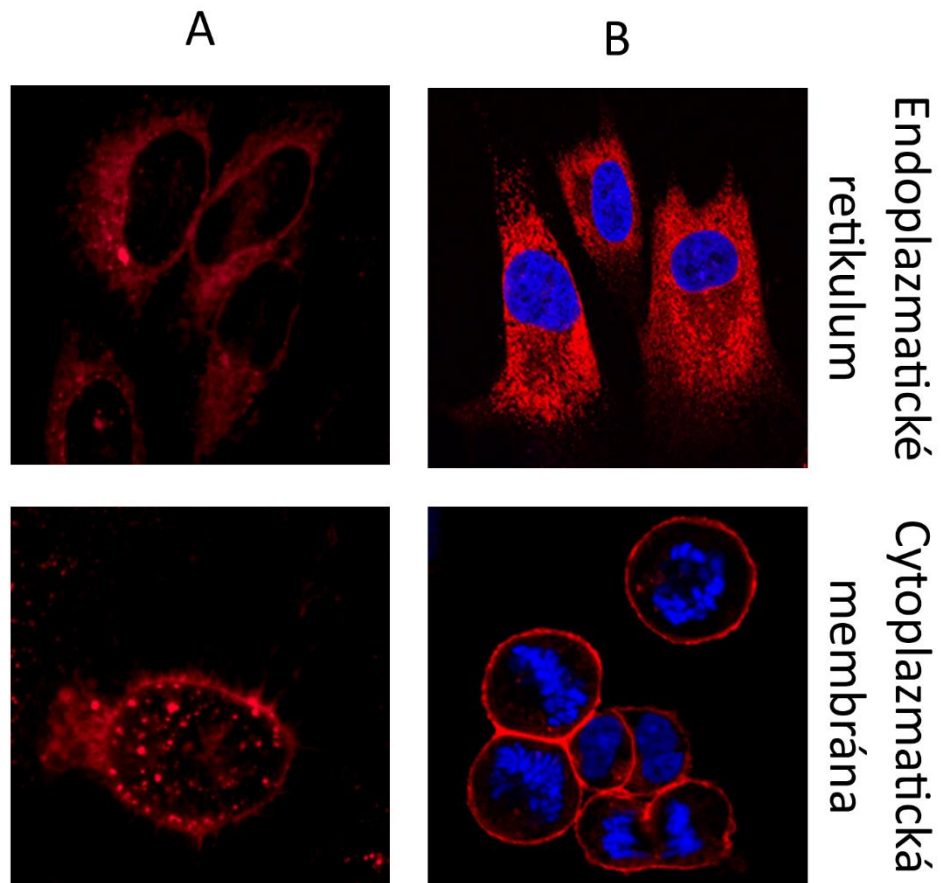
5.1.1 Mikroskopie živých buněk

Označené buněčné struktury byly použitím fluorescenčního mikroskopu vizualizovány. Výsledné fotografie buněčných organel buněk HeLa lze vidět na obrázku 11 a 12. Fluorescenčně značené struktury buněčné linie U-2 OS je možné pozorovat na obrázku 13 a 14.



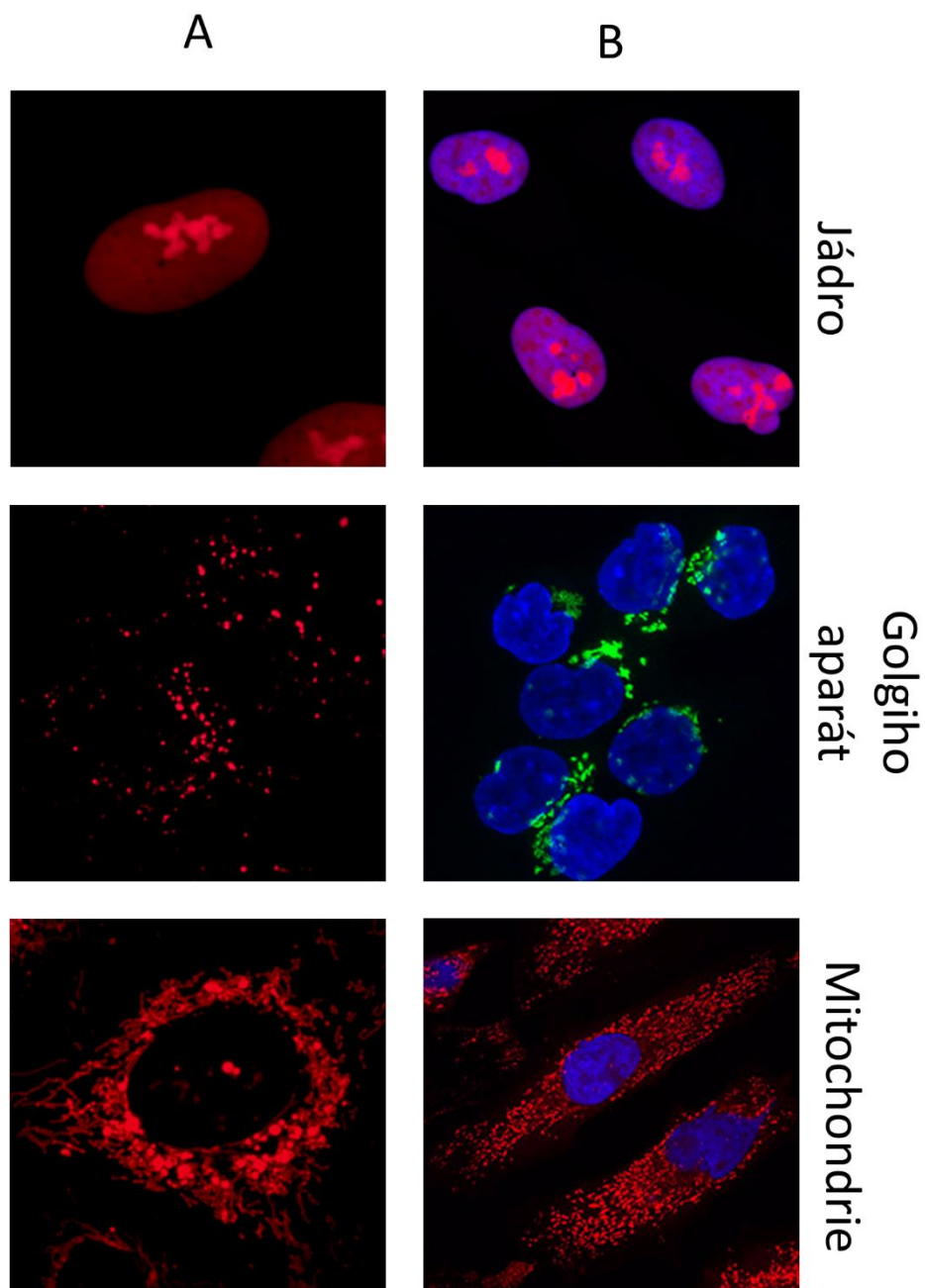
Obrázek 11: Fluorescenčně značené jádro, Golgiho aparát a mitochondrie v buňkách HeLa

Legenda: A – fotografie pořízena autorem bakalářské práce, B – fotografie z odborného zdroje, červený signál – buňky značené fluorescenčním barvivem mCherry použitím lentivirových vektorů, modrý signál – jádra značená fluorescenčním barvivem Hoechst 33342, zelený signál – buňky značené fluorescenčním barvivem GFP použitím lentivirových vektorů

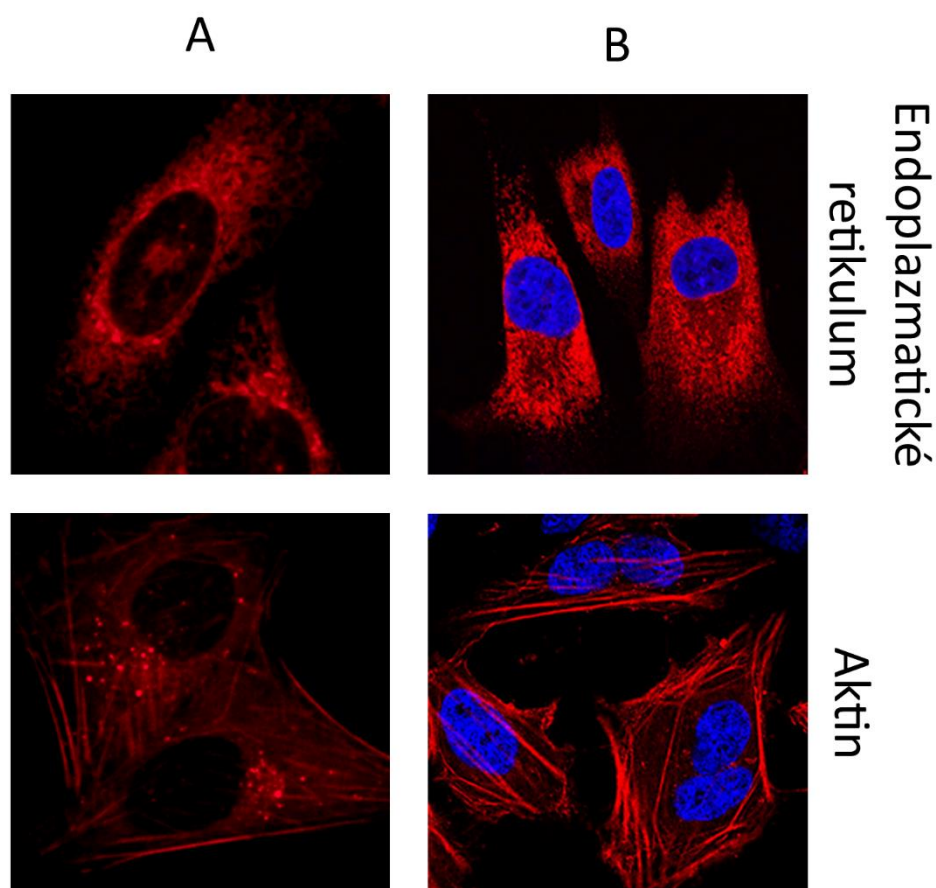


Obrázek 12: Fluorescenčně značené endoplazmatické retikulum a cytoplazmatická membrána v buňkách HeLa

Legenda: A – fotografie pořízena autorem bakalářské práce, B – fotografie z odborného zdroje, červený signál – buňky značené fluorescenčním barvivem mCherry použitím lentivirových vektorů, modrý signál – jádra značená fluorescenčním barvivem Hoechst 33342



Obrázek 13: Fluorescenčně značené jádro, Golgiho aparát a mitochondrie v buňkách U-2 OS
 Legenda: A – fotografie pořízena autorem bakalářské práce, B – fotografie z odborného zdroje,
 červený signál – buňky značené fluorescenčním barvivem mCherry použitím lentivirových
 vektorů, modrý signál – jádra značená fluorescenčním barvivem Hoechst 33342, zelený signál
 – buňky značené fluorescenčním barvivem GFP použitím lentivirových vektorů



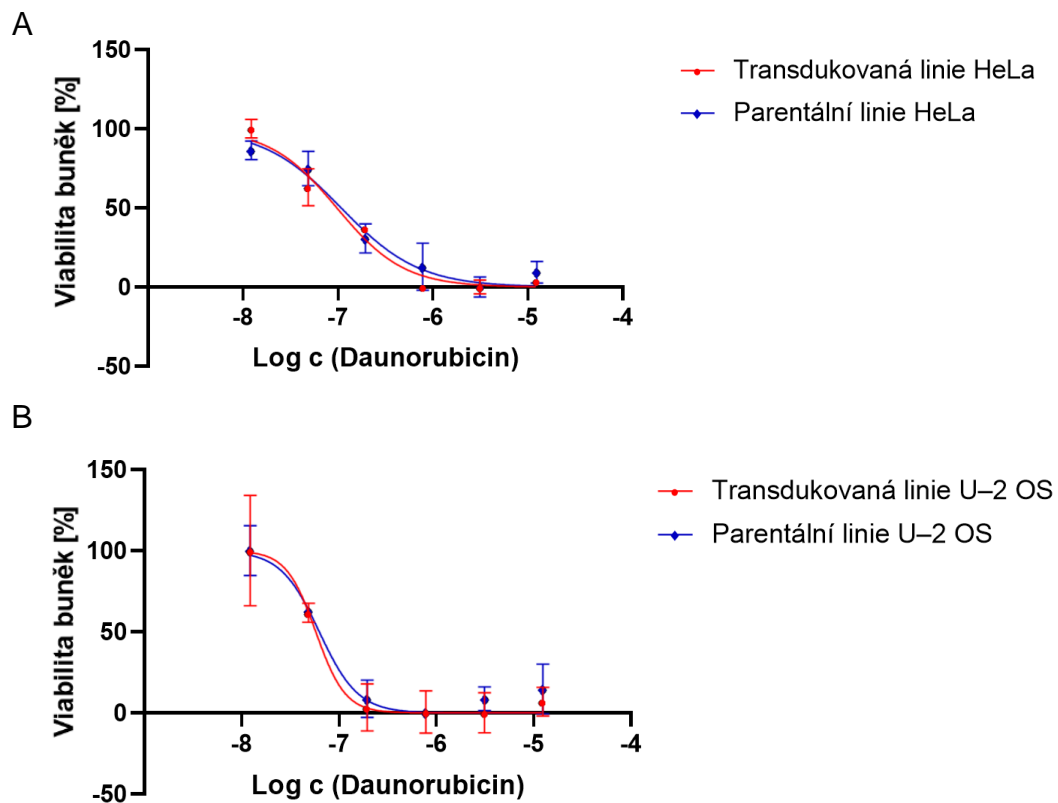
Obrázek 14: Fluorescenčně značené endoplazmatické retikulum a aktin v buňkách U-2 OS
 Legenda: A – fotografie pořízena autorem bakalářské práce, B – fotografie z odborného zdroje, červený signál – buňky značené fluorescenčním barvivem mCherry použitím lentivirových vektorů, modrý signál – jádra značená fluorescenčním barvivem Hoechst 33342

5.1.2 Stanovení hodnoty IC50 testovaných látek použitím MTS testu

MTS test byl použit ke stanovení hodnoty IC50 u testovaných látek na transdukovaných a parentálních buněčných liniích HeLa a U-2 OS. U jednotlivých transdukovaných linií byly použity látky, jenž působí na buněčné struktury značené fluorescenčním proteinem. Z látek byly připraveny roztoky v DMSO o koncentraci 10, 1 a 0,1 mmol·l⁻¹. Z těchto látek byla připravena koncentrační řada o 7 koncentracích (v některých případech v 9 koncentracích) v triplikátu, přičemž nejvyšší koncentrace byla 50 μmol·l⁻¹ a faktor ředění 4x. Test proběhl ve třech opakováních. Po přidání MTS byla změřena absorbance při 490 nm. Získané hodnoty absorbancí byly v programu GraphPad zlogaritmovány, normalizovány a následně jimi byla vynesena křivka nelineární regrese. Programem poté byly stanoveny hodnoty IC50.

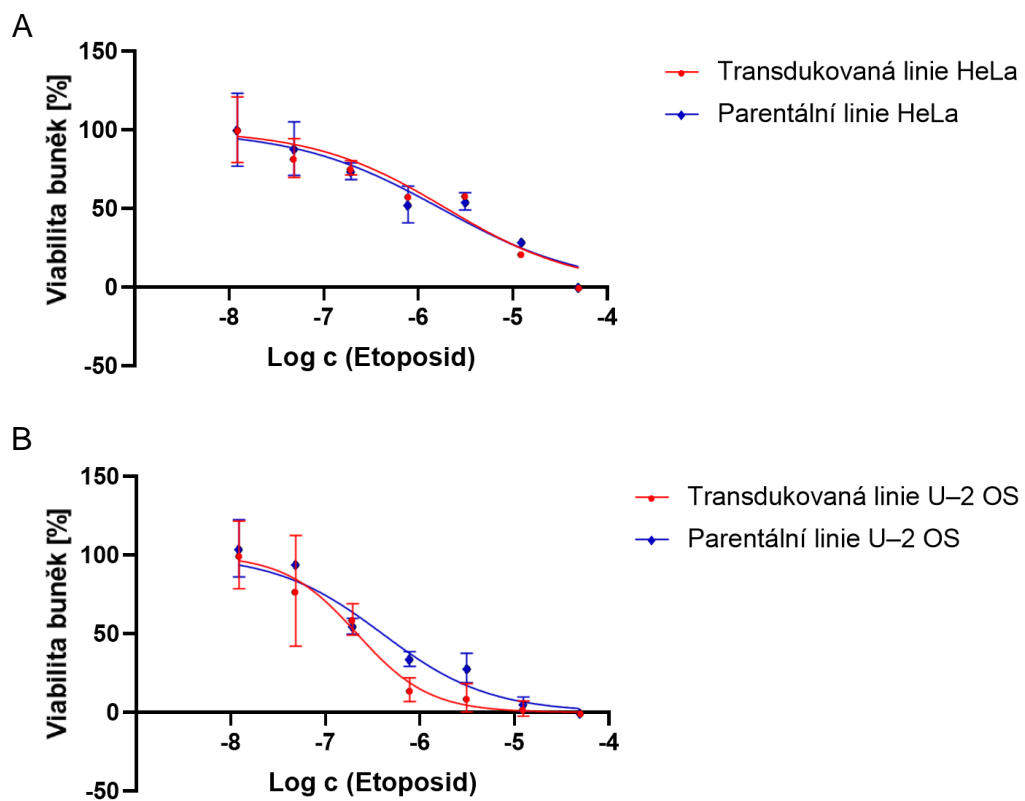
U buněčných linií, které byly transdukovány lentivirovými vektory cílenými na jádro, byly ke zjištění IC₅₀ použity protinádorová léčiva daunorubicin, topotekan a etoposid. Na grafech 1, 2 a 3 lze vidět závislost viability buněk na logaritmu koncentrace jednotlivých látek.

Jak je možné vidět na grafech 1 a 2, hodnoty absorbancí při koncentraci 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byly vyřazeny, jelikož vykazovaly falešně pozitivní viabilitu.



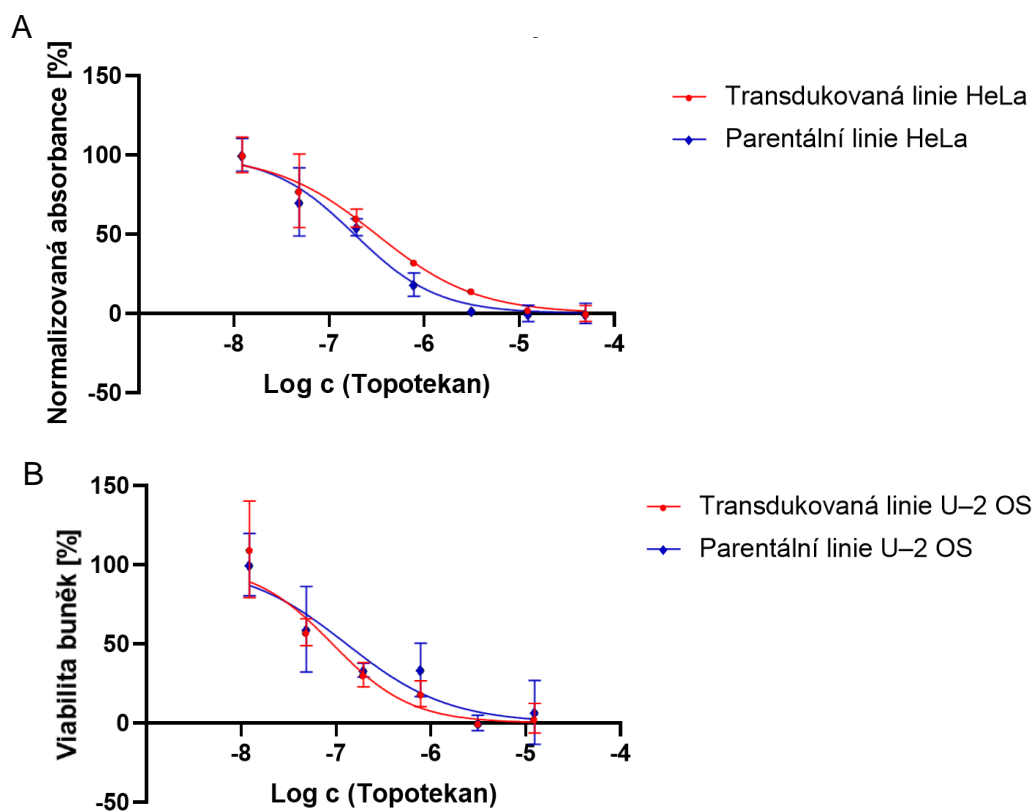
Graf 1: Závislost viability buněk na logaritmu koncentrace testované látky daunorubicinu

Legenda: A – linie HeLa, B – linie U-2 OS



Graf 2: Závislost viability buněk na logaritmu koncentrace testované látky etoposidu

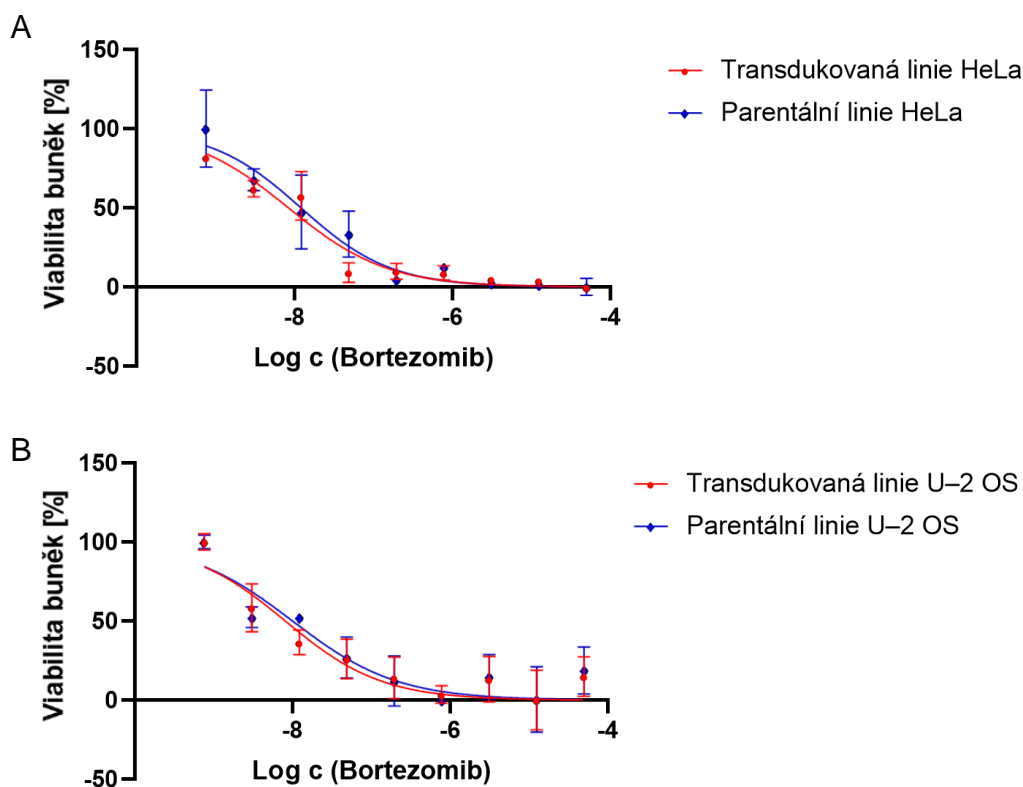
Legenda: A – linie HeLa, B – linie U-2 OS



Graf 3: Závislost viability buněk na logaritmu koncentrace testované látky topotekanu
 Legenda: A – linie HeLa, B – linie U-2 OS

U buněčných linií transdukovanými lentivirovými vektory cílenými na Golgiho aparát byla ke zjištění IC50 použita látka bortezumib. Ten byl k buněčným liniím přidán v 9 koncentracích, jelikož koncentrace $0,78 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ způsobovala v předchozích testech příliš vysokou úmrtnost buněk.

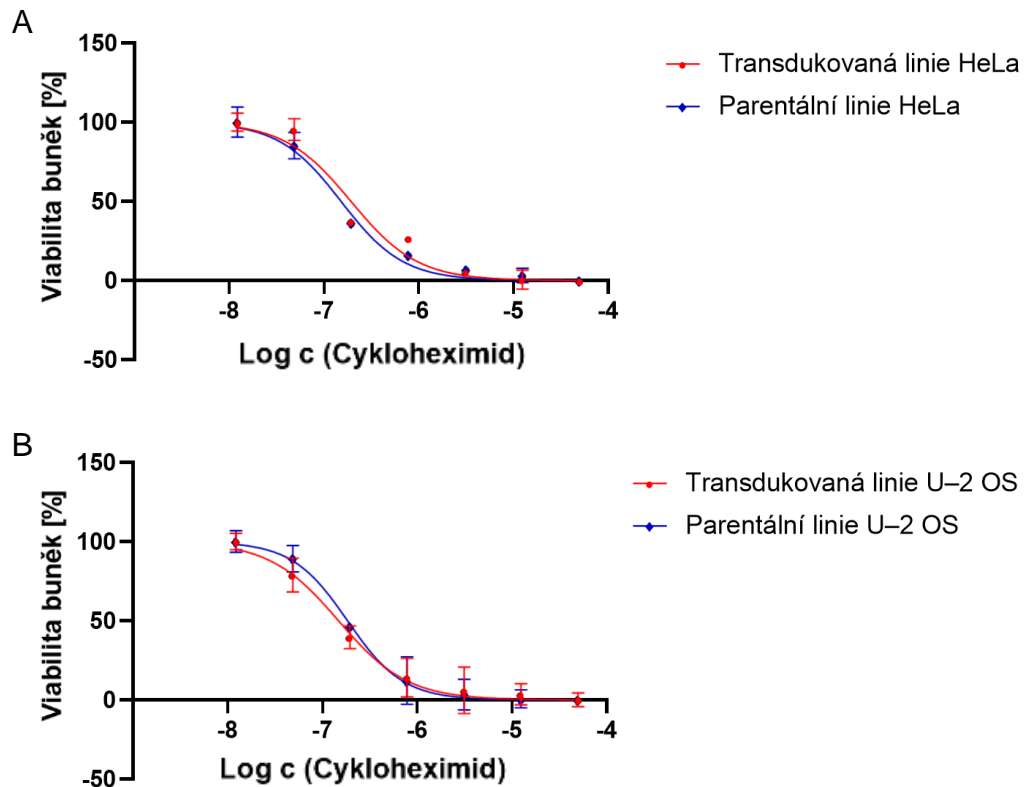
Na grafu 4 lze vidět závislost viability buněk na logaritmu koncentrace bortezumibu.



Graf 4: Závislost viability buněk na logaritmu koncentrace testované látky bortezumibu

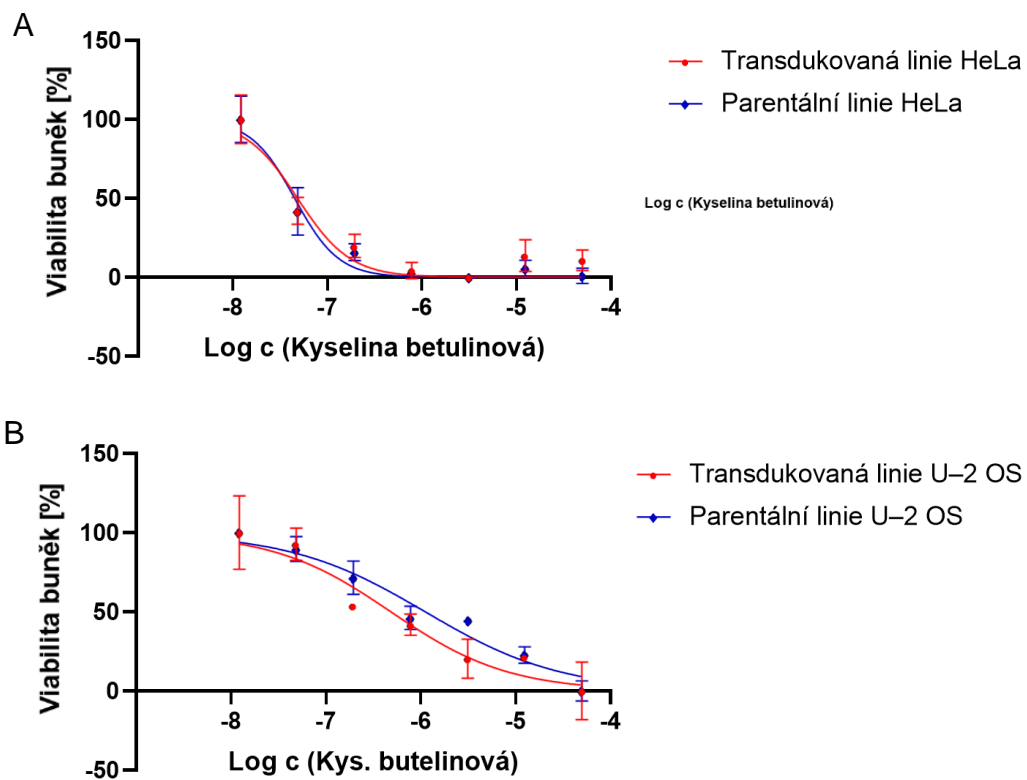
Legenda: A – linie HeLa, B – linie U-2 OS

K testování IC50 u linií transdukovaných lentivirovými vektory cílených na mitochondrie byly použity látky cykloheximid a kyselina betulinová. Na grafech 5 a 6 lze vidět závislost viability buněk na logaritmu koncentrace těchto dvou látek.



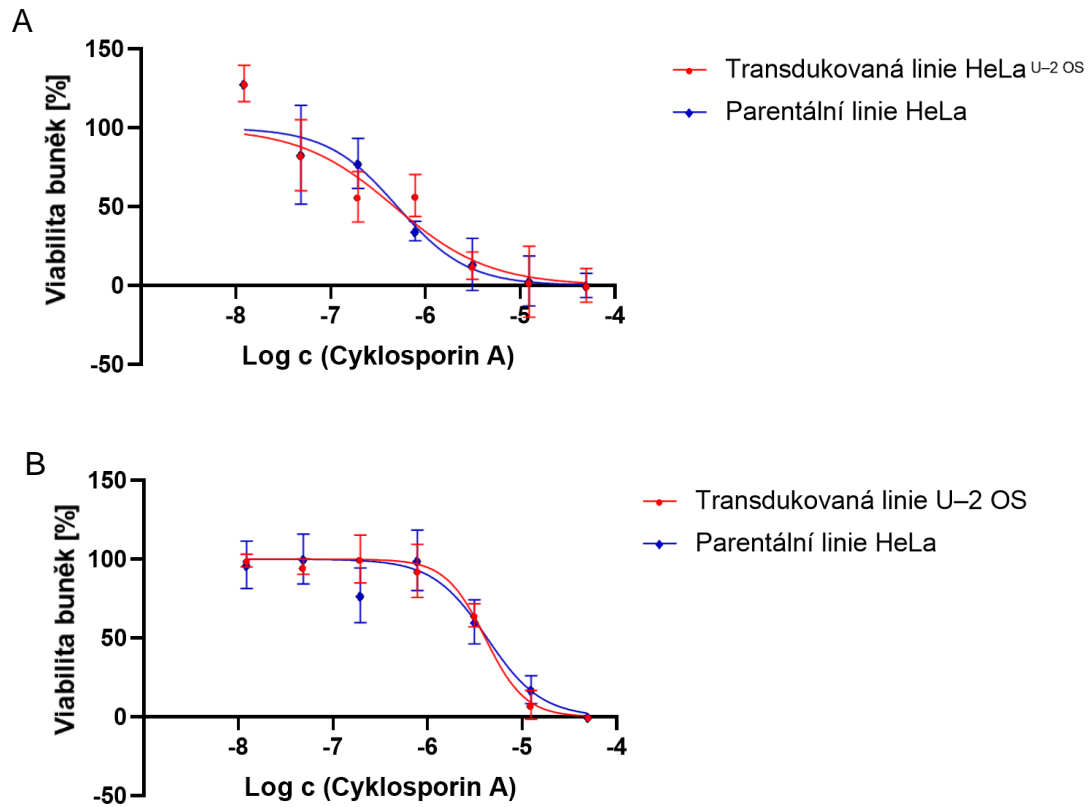
Graf 5: Závislost viability buněk na logaritmu koncentrace testované látky cykloheximidu

Legenda: A – linie HeLa, B – linie U-2 OS



Graf 6: Závislost viability buněk na logaritmu koncentrace testované látky kyseliny betulinové
 Legenda: A – linie HeLa, B – linie U-2 OS

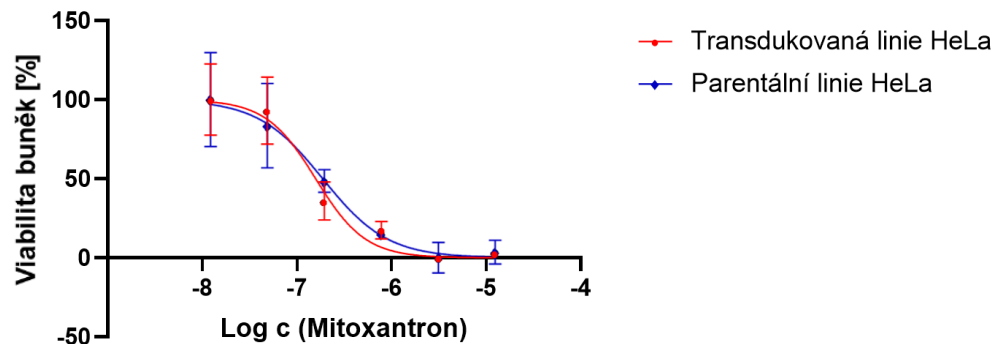
U linií transdukovaných lentivirovými vektory cílených na endoplazmatické retikulum bylo ke zjištění hodnoty IC₅₀ použito protinádorové léčivo cyklosporin A. Na grafu 7 lze vidět závislost viability buněk na logaritmu koncentrace této látky.



Graf 7: Závislost viability buněk na logaritmu koncentrace testované látky cyklosporinu A

Legenda: A – linie HeLa, B – linie U-2 OS

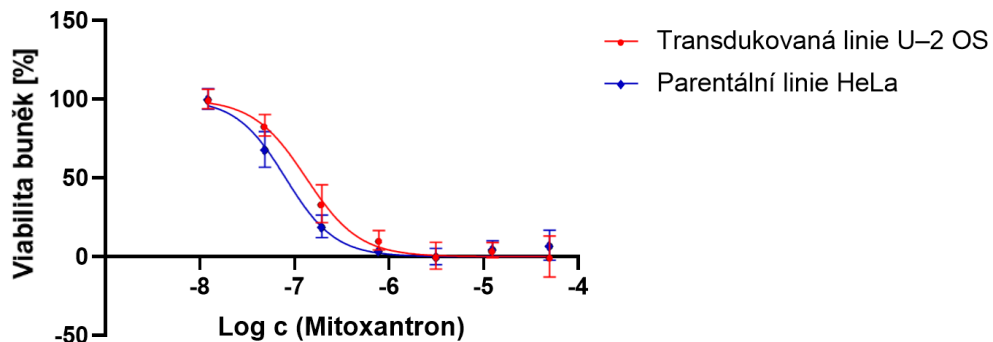
K transdukcii lentivirovými vektory cílenými na cytoplazmatickou membránu došlo pouze u buněčných linií HeLa. Pro stanovení hodnoty IC₅₀ použita látka mitoxantron. V následujícím grafu 8 lze pozorovat závislost viability buněk na logaritmu koncentrace této látky.



Graf 8: Závislost viability buněk HeLa na logaritmu koncentrace testované látky mitoxantronu

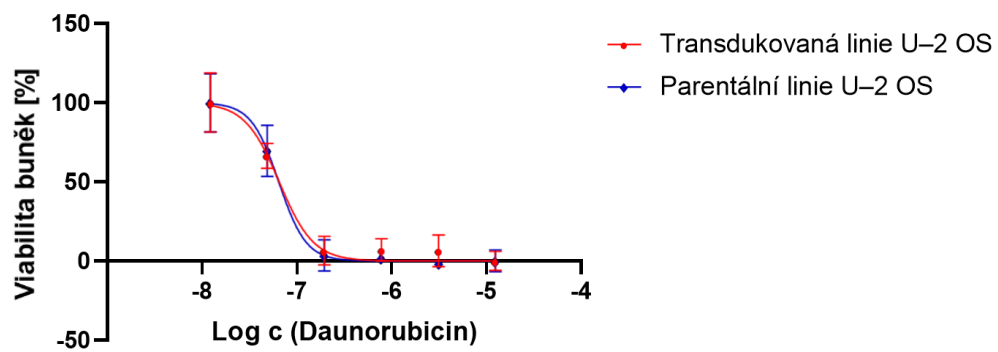
Transdukce lentivirovými vektory cílenými na aktin proběhla pouze u buněčných linií U-2 OS. Ke zjištění hodnoty IC₅₀ byly použity dvě látky, a to mitoxantron a daunorubicin.

Na grafu 9 a 10 je možné pozorovat závislost viability buněk na logaritmu koncentrace této látky.



Graf 9: Závislost viability buněk U-2 OS na logaritmu koncentrace testované látky mitoxantronu

Jak je možné vidět na grafu 9 hodnoty absorbancí při koncentraci 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ nebyly do grafu zahrnuty, protože vykazovaly falešně pozitivní viabilitu.



Graf 10: Závislost viability buněk U-2 OS na logaritmu koncentrace testované látky daunorubicinu

Získané hodnoty IC50 pro jednotlivé látky byly zprůměrovány a byla vypočítána směrodatná odchylka. V tabulce 1 a 2 jsou uvedeny hodnoty IC50 se směrodatnými odchylkami pro jednotlivé buněčné linie HeLa a U-2 OS.

Tabulka 1: Naměřené hodnoty IC50 u transdukovaných a parentálních buněčných liniích HeLa a jejich průměrné hodnoty se směrodatnými odchylkami

Testované látky	Hodnoty IC50	Průměrná hodnota IC50	Směrodatná odchylka	Hodnoty IC50	Průměrná hodnota IC50	Směrodatná odchylka
	[$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	[$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]		[$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	[$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	
Transdukovaná linie			Parentální linie			
HeLa jádro			HeLa			
Daunorubicin	1,131 10	1,116 93	0,014 16	1,113 50	1,105 23	0,008 29
	1,122 10			1,093 90		
	1,097 58			1,108 30		
Topotekan	0,383 70	0,358 77	0,031 38	0,227 40	0,231 90	0,040 18
	0,378 10			0,283 20		
	0,314 50			0,185 10		
Etoposid	2,015 00	2,071 00	0,093 69	1,252 00	1,658 33	0,304 77
	2,203 00			1,986 00		
	1,995 00			1,737 00		
HeLa Golgiho aparát			HeLa			
Bortezomib	0,010 11	0,008 90	0,000 91	0,011 33	0,011 18	0,001 69
	0,007 90			0,013 17		
	0,008 69			0,0090 41		
HeLa mitochondrie			HeLa			
Cykloheximid	0,212 20	0,191 20	0,018 02	0,164 00	0,175 93	0,026 06
	0,168 20			0,212 10		
	0,193 20			0,151 70		
Kyselina betulínová	0,048 48	0,043 58	0,010 48	0,045 18	0,046 53	0,012 72
	0,053 24			0,031 67		
	0,029 01			0,062 73		
HeLa endoplazmatické retikulum			HeLa			
Cyklosporin A	0,524 20	0,503 47	0,022 87	0,525 00	0,511 67	0,009 55
	0,471 60			0,506 90		
	0,514 60			0,503 10		
HeLa cytoplazmatická membrána			HeLa			
Mitoxantron	0,151 50	0,137 13	0,024 98	0,152 00	0,176 63	0,017 46
	0,102 00			0,190 40		
	0,157 90			0,187 50		

Tabulka 2: Naměřené hodnoty IC50 u transdukovaných a parentálních buněčných liniích U-2 OS a jejich průměrné hodnoty se směrodatnými odchylkami

Testované látky	Hodnoty IC50 [μmol·l ⁻¹]	Průměrná hodnota IC50 [μmol·l ⁻¹]	Směrodatná odchylka	Hodnoty IC50 [μmol·l ⁻¹]	Průměrná hodnota IC50 [μmol·l ⁻¹]	Směrodatná odchylka
	Transdukované linie			Parentální linie		
	U-2 OS jádro			U-2 OS		
Daunorubicin	0,056 05	0,059 93	0,004 34	0,057 61	0,057 55	0,004 26
	0,057 75			0,062 74		
	0,065 98			0,052 31		
Topotekan	0,160 90	0,187 03	0,046 75	0,244 10	0,226 40	0,018 12
	0,252 70			0,233 60		
	0,147 50			0,201 50		
Etoposid	0,166 50	0,120 82	0,032 88	0,175 40	0,169 20	0,013 32
	0,105 50			0,181 50		
	0,090 47			0,150 70		
	U-2 OS Golgiho aparát			U-2 OS		
Bortezomib	0,023 90	0,024 71	0,000 58	0,023 24	0,019 79	0,002 46
	0,025 15			0,017 69		
	0,025 09			0,018 45		
	U-2 OS mitochondrie			U-2 OS		
Cykloheximid	0,148 00	0,155 43	0,036 67	0,184 10	0,201 50	0,049 25
	0,114 70			0,268 60		
	0,203 60			0,151 80		
Kyselina betulínová	0,485 10	0,531 07	0,033 13	0,511 80	0,534 57	0,023 85
	0,561 90			0,567 50		
	0,546 20			0,524 40		
	U-2 OS endoplazmatické retikulum			U-2 OS		
Cyklosporin A	4,529 00	4,365 67	0,204 71	3,913 00	4,287 00	0,315 62
	4,077 00			4,263 00		
	4,491 00			4,685 00		
	U-2 OS aktin			U-2 OS		
Daunorubicin	0,065 77	0,066 28	0,001 25	0,060 70	0,060 70	0,003 00
	0,065 08			0,064 37		
	0,068 00			0,057 03		
Mitoxantron	0,083 29	0,085 12	0,002 85	0,081 61	0,080 85	0,001 08
	0,089 15			0,079 32		
	0,082 93			0,081 61		

6 DISKUZE

Pomocí lentivirových vektorů byla úspěšně provedena transdukce nádorových buněk lentivirovými vektory, pomocí kterých byly fúzními proteiny fluorescenčně označeny jednotlivé buněčné struktury, jejichž struktura a vývoj bylo možné následně pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem. Jednotlivé fluorescenčně značené struktury vykazovaly podobnost se strukturami na fotografiích z odborných zdrojů.

Pro následné testování cytotoxicity parentálních a transdukovaných linií byly použity látky cílené pro konkrétní značenou buněčnou strukturu.

Při stanovení hodnot IC₅₀ byly nádorové buňky vystaveny účinku různých látek. Každá buněčná linie byla inkubována s jinou látkou na základě toho, která buněčná struktura byla u konkrétní buněčné linie značena fluorescenčním proteinem. Tyto látky byly zvoleny tak, aby ovlivňovaly funkci značené buněčné struktury konkrétní buněčné linie.

U buněčných linií transdukovaných lentivirovými vektory cílenými na jádro byly použity daunorubicin, topotekan a etoposid. Daunorubicin je antracyklinové antibiotikum odvozeno od aktinobaktérií *Streptomyces peucetius*. Daunorubicin v menší koncentraci způsobuje zvětšení jádra, marginaci a kondenzaci chromatinu, při zvýšeném množství dochází ke smršťování, lobulaci, až rozpadu jádra (Wang *et al.*, 2002). Oproti tomu topotekan a etoposid jsou specifickými inhibitory topoizomerázy I a II, což jsou jaderné enzymy, které se účastní replikace a transkripce DNA (Huber *et al.* 2006). Inhibicí tohoto enzymu dochází k poškození DNA, zastavení buněčného cyklu následovaného apoptózou (Seiter, 2005).

Hodnota IC₅₀ daunorubicinu u buněk HeLa byla 1,105 23 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tato hodnota se shoduje i s hodnotami IC₅₀ uváděnými různými zdroji, které taktéž uvádí hodnoty kolem 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Gül Özcan *et Nazli*, 2005; Iida *et al.*, 2001). Testováním však bylo zjištěno, že daunorubicin vykazuje u buněk U-2 OS vyšší toxicitu (0,057 55 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), jelikož hodnoty IC₅₀ jsou přibližně 20krát nižší než u buněčných linií HeLa.

Jyoti *et al.* (2015) uvádí hodnoty IC₅₀ topotekanu u HeLa buněk 130 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Uvedená hodnota se nepatrně odchyluje od hodnoty naměřené autorem této práce, která je 231,9 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tato IC₅₀ je taky přibližně stejná jako hodnota IC₅₀ topotekanu u buněčných linií U-2 OS (226,4 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Topotekan tedy má stejnou toxicitu pro buněčné linie HeLa i U-2 OS, i když Pratesi *et al.* (2005) uvádějí hodnotu pro buňky U-2 OS 155 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, což by naznačovalo, že

pro tyto buňky je topotekan méně toxický než pro buněčné linie HeLa.

Při porovnání cytotoxicity etoposidu u buněčných linií HeLa a U-2 OS je etoposid pro buňky U-2 OS ($169,2 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) asi 10krát toxičtější než pro buněčné linie HeLa ($1\,658,33 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). V porovnání s literaturou je hodnota IC50 pro U-2 OS menší přibližně o $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, jelikož Adamski *et al.* (2013) uvádějí hodnotu $0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Hodnota IC50 pro buňky HeLa je dle Locka *et Stribinskieneho* (1996) $0,95 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, což je hodnota odlišná opět o zhruba $0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ než hodnota naměřená autorem bakalářské práce.

Pro testování cytotoxicity buněčných linií transdukovaných lentivirovými vektory cílenými na Golgiho aparát byl použit Bortezomib, inhibitor proteazomu. Inhibicí dochází mimo jiné k zastavení syntézy genu ftp105 kódujícího protein lokalizovaný v Golgiho aparátu. Výsledkem je buněčná smrt v důsledku akumulace degradovaných proteinů v cytoplazmě a narušení dráhy z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu (Takeda *et al.*, 2011).

Hodnoty IC50 bortezomibu $11,18 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ u buněčných linií HeLa byly v porovnání s hodnotami Miyamota *et al.* (2013), který uvádí hodnotu $100 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, asi 10krát nižší. Při srovnání IC50 buněčné linie HeLa a U-2 OS je možné vidět, že hodnoty cytotoxicity bortezomibu jsou velice podobné, jelikož IC50 u buněk U-2 OS je $19,79 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Při stanovení hodnoty IC50 u buněčných linií transdukovaných lentivirovými vektory cílenými na mitochondrie byly zvoleny látky cykloheximid a kyselina betulinová. Cykloheximid je inhibitorem translace a narušuje tak syntézu aminokyselin cílených do vnější membrány mitochondrií, což vede k narušení průběhu dýchacího řetězce a následné apoptóze (Peng *et al.*, 2015). Kyselina betulinová indukuje apoptózu v nádorových buňkách několika způsoby. Jedním z mechanismů této indukce je stimulace vzniku ROS, které přispívají k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a narušení homeostázy (Nedopekina *et al.*, 2017).

Při zjištění cytotoxicity cykloheximidu u buněčných linií HeLa byla stanovena hodnota IC50 $175,93 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, která se shoduje s hodnotou uváděnou v literatuře (Abdulkhair, 2018). U buněčných linií U-2 OS ($201,5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) je hodnota IC50 totožná s hodnotou u HeLa buněk, z čehož vyplývá, že cykloheximid vykazuje u těchto dvou typů buněk stejnou cytotoxicitu.

Zaměříme-li se na hodnoty IC50 kyseliny betulinové pro buněčnou linii HeLa ($46,53 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a U-2 OS ($534,57 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$), vidíme, že pro buňky HeLa tato látka vykazovala desetinásobně vyšší cytotoxicitu než pro buněčnou linii U-2 OS. Karan *et al.* (2019), ale uvádí hodnotu IC50

kyseliny betulinové pro buněčnou linii HeLa $12,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, což je hodnota velmi rozdílná od hodnoty naměřené. Navíc by to znamenalo, že je tato látka naopak toxičtější pro buňky U-2 OS. Tato odchylka hodnot může být způsobena příliš krátkým působením MTS na buněčnou linii, v důsledku čehož nebylo přeměněno dostatečné množství tetrazoliové soli, které by odpovídalo příslušnému množství buněk.

Pro zjištění hodnoty IC₅₀ u buněčných linií transdukovaných lentivirovými vektory cílenými na endoplazmatické retikulum byl zvolen cyklosporin A. Tato látka je imunosupresivum způsobující stres endoplazmatického retikula, v jehož důsledku dochází k poškození buněk a ve vyšších koncentracích k buněčné smrti (Pallet *et al.*, 2008, Bouvier *et al.*, 2009).

Porovnáním hodnot IC₅₀ cyklosporinu A u jednotlivých buněčných linií bylo zjištěno, že tato látka je asi 10krát toxičtější pro buňky HeLa, jejichž hodnota IC₅₀ byla $511,67 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, než pro buněčné linie U-2 OS ($4,287 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Navíc hodnoty, které udává Song *et al.* (2018) pro HeLa buňky, tedy $40,3 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, jsou ještě desetkrát nižší než hodnoty naměřené autorem této práce.

Při testování cytotoxicity buněčných linií transdukovaných lentivirovými vektory cílenými na membránu se používal mitoxantron. Jde o antracenedionové antibiotikum, které se používá v chemoterapeutické léčbě. Kromě inhibice DNA a RNA dochází také k cytotoxicitě na úrovni různých buněčných struktur, mimo jiné také na úrovni cytoplazmatické membrány a aktinu (Homolya *et al.*, 2011).

Hodnota IC₅₀ mitoxantronu pro buněčnou linii HeLa byla stanovena na $176,63 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tato hodnota se odchyluje od hodnoty $15,7 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, jenž udává Takara (2011). U buněčných linií U-2 OS nebyla připravena linie transdukovaná lentivirovými vektory cílenými na cytoplazmatickou membránu. Mitoxantron však byl použit pro testování cytotoxicity u buněčných linií transdukovaných lentivirovými vektory cílenými na aktin, viz níže. Naměřená hodnota IC₅₀ byla v tomto případě $80,85 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, což je o více než polovinu nižší než u buněčné linie HeLa, z čehož vyplývá, že mitoxantron byl toxičtější pro buněčnou linii HeLa než pro linii U-2 OS.

Pro určení hodnoty IC₅₀ u buněčných linií transdukovaných lentivirovými vektory cílenými na aktin byla použita již zmíněná protinádorové léčiva mitoxantron a daunorubicin. Srovnání cytotoxicity mitoxantronu a daunorubicinu mezi jednotlivými buněčnými liniemi již bylo

zmíněno výše.

Porovnáním naměřených hodnot IC50 jednotlivých látek u buněčných linií HeLa bylo zjištěno, že nejnižší cytotoxicitu vykazuje etoposid. Naopak nejvíce toxická pro buněčnou linii HeLa se zdá být látka bortezomib, která je zároveň nejtoxičtější také pro buněčnou linii U-2 OS. Nejvyšší cytotoxicitu pro tuto buněčnou linii vykazuje cyklosporin A použitý ke stanovení hodnoty IC50 u buněčných linií transdukovaných lentivirovými vektory cílenými na endoplazmatické retikulum.

Stanovením hodnot IC50 bylo zjištěno, že citlivost parentálních a transdukovaných buněčných linií na cytotoxický účinek látek je téměř totožná. Transdukce tedy neovlivnila životaschopnost buněk ani jejich proliferaci. V případě některých metod, které jsou používány k přenosu genetické informace, totiž dochází ke zvýšení citlivosti buněk na cytotoxický účinek látek, což je u těchto technik velkým nedostatkem. Mezi tyto metody patří například mechanické nebo chemické postupy využívající například proteiny (Luo *et* Saltzman, 2000). Testováním cytotoxicity bylo dokázáno, že transdukce lentivirovými vektory je jedním z efektivních nástrojů přenosu DNA do eukaryotické buňky.

7 ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce bylo pomocí lentivirových vektorů připraveno celkem pět nádorových buněčných linií HeLa a pět buněčných linií U-2 OS. U těchto linií byly fúzními proteiny fluorescenčně označeny jednotlivé buněčné struktury, kterými byly jádro, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie, cytoplazmatická membrána a aktin. Buněčné linie a jejich kompartmenty byly poté pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem. Následně byla vybrána různá protinádorová léčiva narušující funkci značené buněčné struktury pro zjištění cytotoxicity buněk. Toxicita těchto látek byla porovnána i mezi buněčnými liniemi HeLa a U-2 OS. Při testování cytotoxicity bylo zjištěno, že cytotoxicita parentálních a transdukovaných buněčných linií je téměř totožná. Transdukce buněk lentivirovými vektory tedy neovlivňuje jejich životaschopnost, na rozdíl od některých metod používaných k přenosu genetické informace, u kterých po transdukci dochází ke zvýšení cytotoxicity buněk.

8 LITERATURA

- Abdulkhair W. M. H. (2018): The Yeast Role in Medical Applications. BoD – Books on Demand.
- Absi A. A., Wurzer H., Guerin C., Hoffmann C., Moreau F., Mao X., Brown-Clay J., Petrolli R., Casellas C. P., Dieterle M., Thiery J. P., Chouaib S., Berchem G., Janji B., Thomas C. (2018): Actin Cytoskeleton Remodeling Drives Breast Cancer Cell Escape from Natural Killer–Mediated Cytotoxicity. *Cancer Res* 78: 5631–5643.
- Adamski J., Price A., Dive C., Makin G. (2013): Hypoxia–Induced Cytotoxic Drug Resistance in Osteosarcoma Is Independent of HIF-1Alpha. *PLOS ONE* 8(6): e65304.
- Becker, T., Bhushan, S., Jarasch, A., Armache, J. –P., Funes, S., Jossinet, F., Gumbart, J., Mielke, T., Berninghausen, O., Schulten, K., Westhof, E., Gilmore, R., Mandon, E., Beckmann, R. (2009): Structure of Monomeric Yeast and Mammalian Sec61 Complexes Interacting with the Translating Ribosome. *Science* 326: 1369-1373.
- Bouvier, N., Flinois, J.P., Gilleron, J., Sauvage, F.-L., Legendre, C., Beaune, P., Thervet, E., Anglicheau, D., Pallet, N. (2009): Cyclosporine triggers endoplasmic reticulum stress in endothelial cells: a role for endothelial phenotypic changes and death. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 296: F160–F169.
- Bukrinsky, M.I., Haggerty, S., Dempsey, M.P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M., Stevenson, M. (1993): A nuclear localization signal within HIV–1 matrix protein that governs infection of non–dividing cells. *Nature* 365: 666-669.
- Cooper, G.M., (2000): *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd Edition.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., Tsien, R.Y. (1995): Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 20: 448-455.
- Dominguez, R., Holmes, K.C. (2011): Actin Structure and Function. *Annu Rev Biophys* 40: 169–186.
- Dröscher, A. (1998): Camillo Golgi and the discovery of the Golgi apparatus. *Histochem. Cell Biol.* 109: 425-430.

- Dundr, M., Misteli, T. (2001): Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem. J.* 356: 297.
- Freed, E.O., Martin, M.A. (1994): HIV-1 infection of non-dividing cells. *Nature* 369: 107–108.
- Gül Özcan A., Nazli N. S. (2005): Effects of epirubicin and daunorubicin on cell proliferation and cell death in HeLa cells. *Journal of Cell and Molecular Biology* 4: 47–52.
- Han, C., Wan, F. (2018): New Insights into the Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Breast Cancer Metastasis. *J Breast Cancer* 21: 354–362.
- Handwerger, K.E., Gall, J.G. (2006): Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends in Cell Biology* 16: 19–26.
- Homolya, L., Orbán, T.I., Csanády, L., Sarkadi, B. (2011): Mitoxantrone is expelled by the ABCG2 multidrug transporter directly from the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808: 154–163.
- Huber, R.M., Reck, M., Gosse, H., Pawel, J. von, Mezger, J., Saal, J.G., Kleinschmidt, R., Steppert, C., Stepling, H. (2006): Efficacy of a toxicity-adjusted topotecan therapy in recurrent small cell lung cancer. *European Respiratory Journal* 27: 1183–1189.
- Iida, N., Takara, K., Ohmoto, N., Nakamura, T., Kimura, T., Wada, A., Hirai, M., Sakaeda, T., Okumura, K. (2001): Reversal Effects of Antifungal Drugs on Multidrug Resistance in MDR1-Overexpressing HeLa Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 24: 1032–1036.
- Jyoti, A., Fugit, K.D., Sethi, P., McGarry, R.C., Anderson, B.D., Upreti, M. (2015): An in vitro assessment of liposomal topotecan simulating metronomic chemotherapy in combination with radiation in tumor-endothelial spheroids. *Sci Rep* 5.
- Karan, B.N., Maity, T.K., Pal, B.C., Singha, T., Jana, S. (2019): Betulinic Acid, the first lupane-type triterpenoid isolated via bioactivity-guided fractionation, and identified by spectroscopic analysis from leaves of *Nyctanthes arbor-tristis*: its potential biological activities in vitro assays. *Nat. Prod. Res.* 33: 3287–3292.
- Kodiha, M., Mahboubi, H., Stochaj, U. (2015): Exploring Subcellular Organization and Function with Quantitative Fluorescence Microscopy 11.
- Kühlbrandt, W. (2015): Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol* 13.

- Lock, R.B., Stribinskiene, L. (1996): Dual Modes of Death Induced by Etoposide in Human Epithelial Tumor Cells Allow Bcl-2 to Inhibit Apoptosis without Affecting Clonogenic Survival'. *Cancer Research* 56: 4006–4012.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000): *The Actin Cytoskeleton. Molecular Cell Biology*. 4th edition.
- Luo, D., Saltzman, W.M. (2000): Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* 18: 33–37.
- Mai, S. (2019): The three-dimensional cancer nucleus. *Genes, Chromosomes and Cancer* 58: 462–473.
- Mehta, I.S., Figgitt, M., Clements, C.S., Kill, I.R., Bridger, J.M. (2007): Alterations to Nuclear Architecture and Genome Behavior in Senescent Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1100: 250-263.
- Migita, T., Inoue, S. (2012): Implications of the Golgi apparatus in prostate cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44: 1872–1876.
- Miyamoto, Y., Nakagawa, S., Wada-Hiraike, O., Seiki, T., Tanikawa, M., Hiraike, H., Sone, K., Nagasaka, K., Oda, K., Kawana, K., Nakagawa, K., Fujii, T., Yano, T., Kozuma, S., Taketani, Y. (2013): Sequential effects of the proteasome inhibitor bortezomib and chemotherapeutic agents in uterine cervical cancer cell lines. *Oncology Reports* 29: 51–57.
- Mowbrey, K., Dacks, J.B. (2009): Evolution and diversity of the Golgi body. *FEBS Letters* 583: 3738-3745.
- Nandini, D.B. (2017): Cancer Cell Nucleus: An Insight. *J Mol Biomark Diagn* 8.
- Nedopekina, D.A., Gubaidullin, R.R., Odinokov, V.N., Maximchik, P.V., Zhivotovsky, B., Bel'skii, Y.P., Khazanov, V.A., Manuylova, A.V., Gogvadze, V., Spivak, A.Yu. (2017): Mitochondria-targeted betulinic and ursolic acid derivatives: synthesis and anticancer activity Electronic supplementary information (ESI) available. *Medchemcomm* 8: 1934–1945.
- Oakes, S.A., Papa, F.R. (2015): The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annu Rev Pathol* 10: 173-194.
- Pallet, N., Bouvier, N., Legendre, C., Gilleron, J., Codogno, P., Beaune, P., Thervet, E., Anglicheau, D. (2008): Autophagy protects renal tubular cells against cyclosporine toxicity. *Autophagy* 4: 783–791.

- Peng, M., Ostrovsky, J., Kwon, Y.J., Polyak, E., Licata, J., Tsukikawa, M., Marty, E., Thomas, J., Felix, C.A., Xiao, R., Zhang, Z., Gasser, D.L., Argon, Y., Falk, M.J. (2015): Inhibiting cytosolic translation and autophagy improves health in mitochondrial disease. *Hum Mol Genet* 24: 4829–4847.
- Pratesi, G., Cesare, M.D., Carenini, N., Perego, P., Righetti, S.C., Cucco, C., Merlini, L., Pisano, C., Penco, S., Carminati, P., Vesce, L., Zunino, F. (2005): Pattern of Antitumor Activity of a Novel Camptothecin, ST1481, in a Large Panel of Human Tumor Xenografts. *Clinical Cancer Research* 8: 3904–3909.
- Sakuma, T., Barry, M.A., Ikeda, Y. (2012): Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochemical Journal* 443: 603–618.
- Salipalli, S., Singh, P., Borlak, J. (2014): Recent advances in live cell imaging of hepatoma cells. *BMC Cell Biol* 15: 26.
- Sanderson, M.J., Smith, I., Parker, I., Bootman, M.D. (2014): Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols* 2014: pdb.top071795–pdb.top071795.
- Seiter, K. (2005): Toxicity of the topoisomerase I inhibitors. *Expert Opinion on Drug Safety* 4: 45–53.
- Sims, N.R., Muyderman, H. (2010): Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, Mitochondrial Dysfunction* 1802: 80–91.
- Singer, S.J., Nicolson, G.L. (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720–731.
- Shen, Y., Chen, Y., Wu, J., Shaner, N.C., Campbell, R.E. (2017): Engineering of mCherry variants with long Stokes shift, red-shifted fluorescence, and low cytotoxicity. *PLoS ONE* 12: e0171257.
- Shukla, E., Chauhan, R. (2019): Host-HIV-1 Interactome: A Quest for Novel Therapeutic Intervention. *Cells* 8: 1155.
- Song, Z.-T., Zhang, L.W., Fan, L.-Q., Kong, J.-W., Mao, J.-H., Zhao, J., Wang, F.-J. (2018): Enhanced anticancer effect of MAP30–S3 by cyclosporin A through endosomal escape: *Anti-Cancer Drugs* 1.

- Spinelli, J.B., Haigis, M.C. (2018): The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol* 20: 745–754.
- Takara, K. (2011): Differential effects of calcium antagonists on ABCG2/BCRP-mediated drug resistance and transport in SN-38-resistant HeLa cells. *Mol Med Report*.
- Takeda, K., Mori, A., Yanagida, M. (2011): Identification of Genes Affecting the Toxicity of Anti-Cancer Drug Bortezomib by Genome-Wide Screening in *S. pombe*: *PLoS One* 6.
- Wang, Y. S., Hui, Y.-N., Wiedemann, P. (2002): Role of Apoptosis in the Cytotoxic Effect Mediated by Daunorubicin in Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 18: 377–387.
- Watson, H., (2015): Biological membranes. *Essays Biochem* 59: 43–69.
- Wilson, C., Venditti, R., Rega, L.R., Colanzi, A., D'Angelo, G., De Matteis, M.A. (2011): The Golgi apparatus: an organelle with multiple complex functions. *Biochem. J.* 433: 1-9.
- Wortzel, I., Koifman, G., Rotter, V., Seger, R., Porat, Z. (2017): High Throughput Analysis of Golgi Structure by Imaging Flow Cytometry. *Sci Rep* 7: 788.
- Yamaguchi, H., Condeelis, J. (2007): Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta* 1773: 642–652.
- Zalba, S., ten Hagen, T.L.M. (2017): Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 52: 48–57.
- Biology web page [online] [navštíveno 29.1.2020] Dostupné z <https://biologywebpage.weebly.com/organelles.html>
- Bishopkingdom [online] [navštíveno 8.1.2020] Dostupné z <http://www.bishopkingdom.com/aichatbox/id/706/>
- Britannica [online] [navštíveno 8.1.2020] Dostupné z <https://www.britannica.com/science/endoplasmic-reticulum>
- Mapping Ignorance [online] [navštíveno 8.1.2020] Dostupné z <https://mappingignorance.org/2013/02/21/how-to-tear-the-cell-membrane-and-do-not-kill-it-trying-a-door-to-a-new-in-vivo-biochemistry/>

Spinal Muscular Atrophy [online] [navštíveno 27.1.2020] Dostupné z

<http://smauk.org.uk/blog/treatments-research/plastin-3-is-a-potential-therapeutic-target-for-sma>

Takara Bio [online] [navštíveno 7.2.2020] Dostupné z

<https://www.takarabio.com/products/gene-function/viral-transduction/lentivirus/premade-lentiviral-particles/organelle-labeling?catalog=0020VCT>

Vectalys [online] [navštíveno 30.10.2019] Dostupné z

<https://www.vectalys.com/web/vectalys/16-lentiviral-vectors-essentials.php>