

**UNIVERZITA KARLOVA**  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmakologie a toxikologie

**STUDIUM TRANSPORTU PROTEINOVÝCH MOLEKUL PŘES  
BUNĚČNÉ MEMBRÁNY**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Lucie Hyršová, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Aneta Hornová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“.

V Hradci Králové, dne 15.5.2019

Aneta Hornová

## **Poděkování**

Ráda bych zde poděkovala své školitelce PharmDr. Lucii Hyřové, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné rady, ochotu, trpělivost, její čas a zkušenosti, které mi předávala při zpracovávání této diplomové práce.

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Aneta Hornová

Školitelka: PharmDr. Lucie Hyršová, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium transportu proteinových molekul přes buněčné membrány

Transportéry v ledvinách se nachází především v proximálních tubulech a podílejí se na sekreci a reabsorpci endogenních i exogenních látek. Existuje velké množství ledvinných transportérů, nicméně tato diplomová práce je zaměřena především na megalin. Konkrétně jsme se zabývali stanovením transportu peptidů přes tento renální transportér v buněčných liniích HK-2 a JEG-3.

Megalín je glykoprotein, jehož hlavní funkcí je tubulární reabsorpce glomerulárně filtrovaného albuminu a dalších vysokomolekulárních látek. Mezi endogenní substráty megalinu dále patří např. transkobalamin – vitamin B<sub>12</sub>, inzulin nebo lehké řetězce imunoglobulinů. Je také schopen transportovat některá léčiva, jako jsou aminoglykosidová a peptidová antibiotika.

V rámci této práce jsme zkoumali vliv snížení exprese megalinu na transport albuminu a anti-VEGFR2 aptameru. Snížení exprese bylo dosaženo transfekcí buněk pomocí siRNA proti *LRP2* genu. Nižší exprese *LRP2* vede ke snížení transportu albuminu a anti-VEGFR2 aptameru, což bylo následně stanoveno pomocí akumulačních studií. Akumulace použitých peptidů sice narůstá s časem, ale v menší míře ve srovnání s kontrolními buňkami.

V další části práce jsme sledovali viabilitu buněčných linií HK-2 a JEG-3 po jejich vystavení zvyšující se koncentraci albuminu a anti-VEGFR2 aptameru, aby se vyloučil potencionální toxický účinek studovaných látek na buňky. Koncentrace testovaných látek použité v první části experimentu jsou pro obě buněčné linie naprosto netoxické, hodnoty  $IC_{50}$  převyšují testovanou koncentraci o dva řády.

## Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Aneta Hornová  
Supervisor: PharmDr. Lucie Hyřšová, Ph.D.  
Title of diploma thesis: Study of transport of protein molecules across cell membranes

Kidney transporters are found mainly in the proximal tubules, they participate in the secretion and reabsorption of endogenous and exogenous substances. Plenty of kidney transporters have been identified, however this diploma thesis is focused on megalin. Specifically, we dealt with determination of transport of peptides via this renal transporter in HK-2 and JEG-3 cell lines.

Megalyn is a glycoprotein whose main function is tubular reabsorption of albumin filtered in glomerules and other high molecular weight substances. Another endogenous substrates of megalin are e.g. transcoblamine – vitamin B<sub>12</sub>, insulin or light chains of immunoglobulins. It is also able to transport some drugs like aminoglycoside and polypeptide antibiotics.

Within this work, we investigated the influence of reduced expression of megalin on the transport of albumin and anti-VEGFR2 aptamer. Reduction of expression was achieved by transfection of cells with siRNA against the *LRP2* gene. Lower expression of *LRP2* led to reduction of transport of albumin and anti-VEGFR2 aptamer into cells, which was subsequently determined by accumulation studies. Although the accumulation of used peptides increased with time, it was in lower extent compared to control cells.

In the next part of the thesis, viability of the cell lines HK-2 and JEG-3 was examined after their exposure to increasing concentration of albumin and anti-VEGFR2 aptamer to exclude potential toxic effect of studied substances on the cells. The concentrations of tested substances, which were used in the first part of the experiment, are not toxic for both cell lines,  $IC_{50}$  values exceed tested concentration by two orders of magnitude.

## Obsah

1	Seznam zkratk .....	1
2	Úvod.....	3
3	Teoretická část .....	5
3.1	Transportéry v ledvinách .....	5
3.2	Megalin.....	7
3.2.1	Funkce megalinu a jeho lokalizace v organismu.....	9
3.2.2	Substráty megalinu .....	10
3.2.3	Cubilin .....	11
3.3	Peptidické transportéry .....	12
3.4	Albumin.....	15
3.5	Aptamery .....	16
3.5.1	Anti-VEGFR2 aptamer.....	17
3.6	Metody buněčné transfekce .....	17
3.6.1	Biologické metody.....	18
3.6.2	Fyzikální metody .....	18
3.6.3	Chemické metody .....	19
3.7	RNA interference.....	21
3.7.1	Krátké interferující RNA .....	24
3.7.2	Dicer .....	25
3.7.3	Argonaut .....	26
3.7.4	Zdroje prekurzorů siRNA.....	27
3.7.5	Posttranskripční tlumení pomocí siRNA.....	28
4	Cíle práce .....	29
5	Experimentální část.....	30
5.1	Materiál.....	30

5.1.1	Pomůcky, přístroje a spotřební materiál .....	30
5.1.2	Reagencie .....	31
5.1.3	Buněčné linie .....	31
5.2	Příprava roztoků .....	33
5.2.1	Fosfátový pufr .....	33
5.2.2	Desintegrační roztok.....	33
5.2.3	STOP roztok .....	34
5.3	Transfekce .....	34
5.3.1	Princip metody.....	34
5.3.2	Pracovní postup .....	35
5.4	Akumulační studie.....	36
5.4.1	Princip.....	36
5.4.2	Pracovní postup .....	37
5.4.3	Měření množství proteinu.....	38
5.4.4	Měření fluorescence .....	40
5.5	Viabilita buněk .....	40
5.5.1	Princip.....	40
5.5.2	Postup práce.....	40
6	Výsledky .....	43
6.1	Vyhodnocení akumulačních studií .....	43
6.1.1	Vyhodnocení akumulace albuminu .....	43
6.1.2	Vyhodnocení akumulace anti-VEGFR2 aptameru .....	47
6.2	Vyhodnocení buněčné viability .....	48
7	Diskuze .....	51
8	Závěr .....	54
9	Literatura.....	55

## 1 Seznam zkratek

ABC	ATP-binding cassette transportéry
ATP	adenosintrifosfát
BCA	„bicinchoninic acid“
BCRP	„breast cancer resistance protein“
BSA	bovinní sérový albumin
CUB	„complement subcomponents C1r / C1s, Uegf and bone morphogenic protein-1“
DMEM	„Dulbecco´s Modified Eagle Medium“
DNáza	enzym deoxyribonukleáza
dsRNA	dvouvláknová RNA
endo-siRNA	endogenní siRNA
FBS	fetální bovinní sérum
FITC	fluorescein isothiokyanát
HSA	humánní sérový albumin
LDL	„low density lipoprotein“
LRP2	„lipoprotein receptor-related protein-2“
MEM	„Minimum Essential Medium Eagle“
mRNA	messengerová RNA
miRNA	mikro RNA
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát

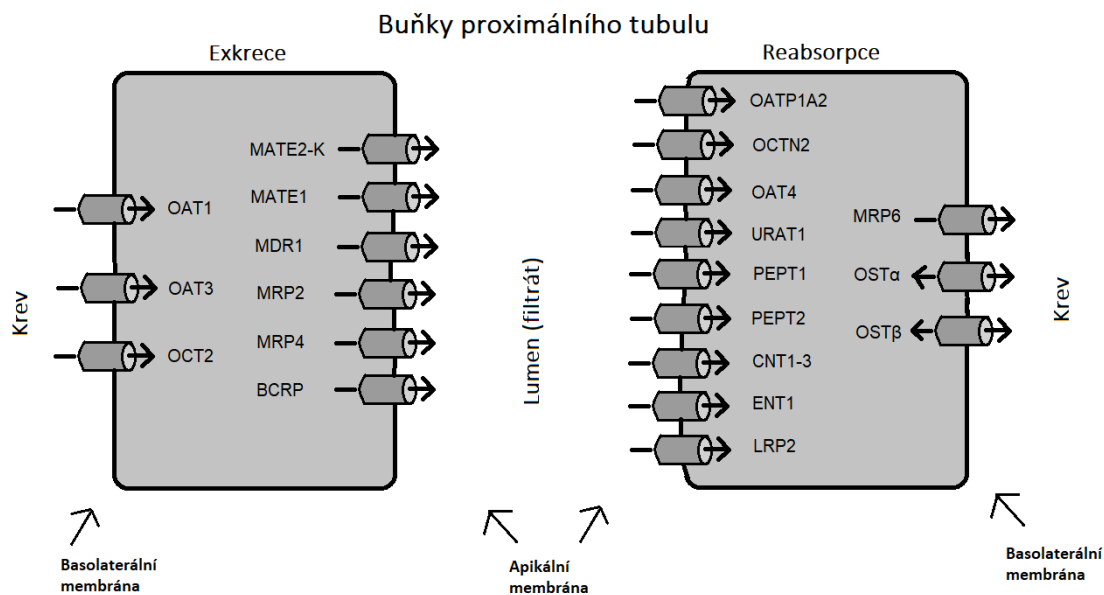
Opti-MEM	„Opti-Minimal Essential Medium“
PBS	fosfátový pufr („phosphate buffered saline“)
PEG	polyethylenglykol
PLB	pasivní lyzovací pufr („passive lysis buffer“)
RdRP	RNA dependentní RNA polymeráza
RISC	RNA-indukovaný tlumící komplex
RNAi	RNA interference
RNáza	ribonukleáza
SELEX	„systematic evolution of ligands exponential enrichment“
shRNA	krátká vlásenková RNA („short hairpin RNA“)
siLRP2	siRNA proti genu <i>LRP2</i>
siRNA	krátká interferující RNA („short interfering RNA“)
siSc	náhodná RNA („scrambled RNA“)
SLC	transportéry nadrodiny solute carrier
VEGFR2	receptor pro cévní endoteliální růstový faktor 2

## 2 Úvod

Přechod látek přes membránu buňky může být zprostředkován mnoha způsoby. Jednou z možností je využití prosté difúze po koncentračním gradientu, tento způsob transportu však není možný pro všechny látky bez rozdílu. Některé látky potřebují k přestupu přes membrány speciální proteiny, které nazýváme transportéry. Ty jsou umístěny ve fosfolipidové dvojvrstvě membrány, pro činnost některých z nich je nezbytná hydrolýza ATP jako zdroj energie (Klaassen a Aleksunes 2010).

Transportéry mohou být influxní (přenáší látky směrem do buňky) nebo efluxní (zprostředkovávají transport látek směrem ven z buňky). Obecně je lze rozdělit do dvou základních skupin, na solute carrier (SLC) a ATP-binding cassette (ABC) transportéry (Klaassen a Aleksunes 2010).

Transportéry v ledvinách se primárně nachází v proximálních tubulech a podílejí se na sekreci a reabsorpci látek obsažených v krvi. Bazolaterální influx organických kationtů a aniontů pomocí transportérů OAT1, OAT3 (organic anion transporters) a OCT2 (organic cation transporters) je prvním krokem při renální sekreci. Efluxní transportéry na apikální membráně buněk proximálního tubulu, zahrnující MRP2, MRP4 (multidrug resistance-associated proteins), MATE1, MATE2-K (multidrug and toxin extrusion transporters), MDR1 (multidrug resistance proteins) a BCRP (breast cancer resistance protein), vylučují chemikálie do moči. Reabsorpce chemických látek v ledvinách může být provedena apikálními transportéry CNT1-3 (concentrative nucleoside transporters), OAT4 (organic anion transporters), URAT1 (urate transporter 1), OATP1A2 (organic anion transporting polypeptides), PEPT1 a PEPT2 (peptide transporters), OCTN2 (organic cation/carnitine transporters), ENT1 (equilibrative nucleoside transporters) a LRP2 (lipoprotein receptor-related protein-2) a následně přes bazolaterální membránu pomocí MRP6 (multidrug resistance-associated proteins), OST $\alpha$  a OST $\beta$  (organic solute transporters) (Klaassen a Aleksunes 2010, Fisher a Howie 2006). Lokalizace transportérů v proximálních tubulech je znázorněna na Obr. 1.



**Obr. 1** Schématické znázornění subcelulární lokalizace influxních a efluxních transportních proteinů v renálních proximálních tubulárních buňkách.

Upraveno dle: (Klaassen a Aleksunes 2010)

K reabsorpci di- a tripeptidů v proximálních tubulech na apikální straně membrány slouží PEPT1 a PEPT2 transportéry. Mohou v podstatě přepravovat všechny možné di- a tripeptidy (ale nikoliv aminokyseliny nebo tetrapeptidy). Mezi další substráty těchto transportérů patří např. inhibitory angiotenzin-konvertujícího enzymu (kaptopril, enalapril a fosinopril), fotosenzitizační činidlo kyselina 5-aminolevulová nebo cytostatikum bestatin (Klaassen a Aleksunes 2010).

Megalin (LRP2) je primárně exprimován na apikální straně polarizovaných epiteliálních buněk (Fisher a Howie 2006). V ledvinách se nachází především v glomerulech a proximálních renálních tubulech. Mezi jeho hlavní funkce patří tubulární reabsorpce glomerulárně filtrovaného albuminu a dalších nízkomolekulárních proteinů (De et al. 2014). Megalin váže širokou škálu substrátů, včetně endogenních látek a některých xenobiotik (Mahadevappa et al. 2013).

### 3 Teoretická část

#### 3.1 Transportéry v ledvinách

Jak již bylo zmíněno v úvodu této práce, přechod látek přes membránu buňky může být zprostředkován mnoha způsoby. Některé látky mohou přecházet přes buněčné membrány prostřednictvím prosté difúze po koncentračním gradientu. Jiné, kvůli své velikosti, náboji nebo hydrofilní povaze, potřebují k přestupu speciální proteiny, které nazýváme transportéry (Klaassen a Aleksunes 2010).

Transportéry lze obecně rozdělit do dvou základních skupin, na solute carrier (SLC) a ATP-binding cassette (ABC) transportéry. Existují však i transportéry, které nespadají ani do jedné nadrodiny, např. LRP (lipoprotein receptor-related protein), kam náleží i člen LRP2, megalin (Klaassen a Aleksunes 2010, Farquhar et al. 1994).

SLC transportéry zprostředkovávají především uptake (příjem) látek do buňky. Existují ovšem i případy, kdy tyto transportéry zajišťují obousměrný přenos. Převážně přes biologické membrány velmi různorodé látky, jak endogenního původu (např. peptidy) tak i xenobiotika, včetně léčiv a různých rostlinných sekundárních metabolitů (Bai et al. 2018).

ABC transportéry se nacházejí na apikální i bazolaterální straně buněčných membrán. Jejich hlavní funkce je eflux (vyučování) látek ven z buňky nebo z organel (Klaassen a Aleksunes 2010).

Transportéry v ledvinách (viz Obr. 1) se primárně nachází v proximálních tubulech a podílejí se na sekreci a reabsorpci endogenních i exogenních látek. Na bazolaterální membráně jsou primárními influxními aniontovými transportéry OAT1 a OAT3 (organic anion transporters), zatímco kationtovým transportérem je primárně OCT2 (organic cation transporters). Bazolaterální uptake pomocí těchto transportérů je prvním krokem při renální sekreci. OAT transportéry zajišťují přenos řady organických aniontů s malou molekulou, včetně antivirotik (aciklovir, adefovir), antibiotik (penicilin G, tetracyklin) a konjugátů rtuť-thiol do ledvin. Z toho vyplývá, že tyto transportéry jsou důležitým počátečním prvkem při akutním poškození ledvin v důsledku akumulace toxických látek v nefronu. OCT2 zprostředkovává transport některých antidiabetik (metformin), antivirotik (lamivudin), cisplatinu, memantinu a dalších látek (Klaassen a Aleksunes 2010).

Efluxní transportéry na apikální membráně buněk proximálního tubulu, včetně MRP2, MRP4 (multidrug resistance-associated proteins), MATE1, MATE2-K (multidrug and toxin extrusion transporters), MDR1 (multidrug resistance proteins) a BCRP (breast cancer resistance protein), vylučují látky do moči. Nejvíce prozkoumané *in vitro* jsou MRP4 a BCRP transportéry. Například diuretika jako hydrochlorothiazid a furosemid se řadí současně mezi substráty a kompetitivní inhibitory těchto dvou transportérů. MRP4 je také důležitý pro renální sekreci antivirových léčiv, jako jsou například adefovir a tenofovir. BCRP se v *in vitro* studiích prokázal jako důležitý transportér při renální sekreci urátu. MATE1 a MATE2-K slouží k efluxu organických kationtů. Z léčiv přepravují například antivirotika (aciklovir, ganciklovir), antidiabetika (metformin) a platinové cytostatikum oxaliplatinu (Klaassen a Aleksunes 2010).

Reabsorpce xenobiotik v ledvinách může být provedena apikálními transportéry CNT1-3 (concentrative nucleoside transporters.), OAT4 (organic anion transporters), URAT1 (urate transporter 1), OATP1A2 (organic anion transporting polypeptides), PEPT1 a PEPT2 (peptide transporters), OCTN2 (organic cation/carnitine transporters), ENT1 (equilibrative nucleoside transporters) a LRP2 (lipoprotein receptor-related protein-2) a následně přes bazolaterální membránu pomocí MRP6 (multidrug resistance-associated proteins), OST $\alpha$  a OST $\beta$  (organic solute transporters) (Klaassen a Aleksunes 2010).

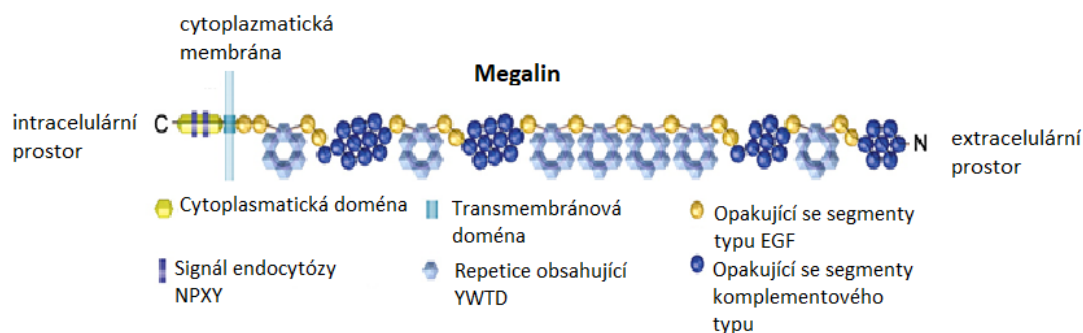
OATP1A2 transportuje široké spektrum substrátů, včetně endogenních sloučenin a léčiv. Zprostředkovává transport žlučových solí, hormonů štítné žlázy, konjugátů steroidů a prostaglandinů (Franke et al. 2009). Z léčiv se jedná například o inhibitory HMG-CoA (hydroxymethylglutaryl-CoA) reduktázy (např. rosuvastatin), antihistaminikum fexofenadin a cytostatikum metotrexát. OCTN2 slouží jako transportér především pro karnitin, dále například pro diuretikum spironolakton, blokátor vápníkových kanálů verapamil a antiepileptikum kyselinu valproovou. OAT4 přepravuje především sulfátové konjugáty (estron sulfát, dihydroepiandrosteron sulfát). URAT1 může ovlivnit reabsorpci a tím i množství urátu v organismu. V případě akumulace urátu v těle dochází k jeho krystalizaci v kloubech, což vede ke vzniku dnavého záchvatu. CNT1 je transportér pro pyrimidiny a nukleosid adenosin, CNT2 pro puriny a nukleosid uridin a CNT3 transportuje pyrimidiny i puriny. ENT1 přenáší endogenní nukleosidy a cytostatická a antivirová analoga nukleosidů po koncentračním gradientu (Klaassen a Aleksunes 2010).

Efluxní transportéry na bazolaterální membráně proximálních renálních tubulů zůstávají z velké části neprobádané a jsou oblastí výzkumu (Klaassen a Aleksunes 2010). OST $\alpha$  a OST $\beta$  hrají ústřední roli při transportu žlučových kyselin, konjugovaných steroidů a strukturně příbuzných molekul. V závislosti na koncentračním gradientu zprostředkovávají jejich transport dovnitř i ven z buňky (Ballatori 2011).

### 3.2 Megalin

Megalin je také známý jako glykoprotein 330 nebo lipoprotein receptor related protein-2 (LRP2). Jde o člen rodiny receptorů, která má strukturní podobnost s LDL receptorem. Megalin je kódovaný genem *LRP2*, který se nachází na 2. chromozomu, konkrétně se jedná o polohu *2q31.1* (Farquhar et al. 1994).

*LRP2* kóduje velký glykoprotein o molekulové hmotnosti kolem 600 kDa. Struktura megalinu je znázorněna na Obr. 2. Skládá se z velké extracelulární domény, malé transmembránové domény a intracelulární domény, která je shodná s doménou členů nadrodiny LDL receptoru (De et al. 2014).



**Obr. 2** Schématické znázornění struktury megalinu.

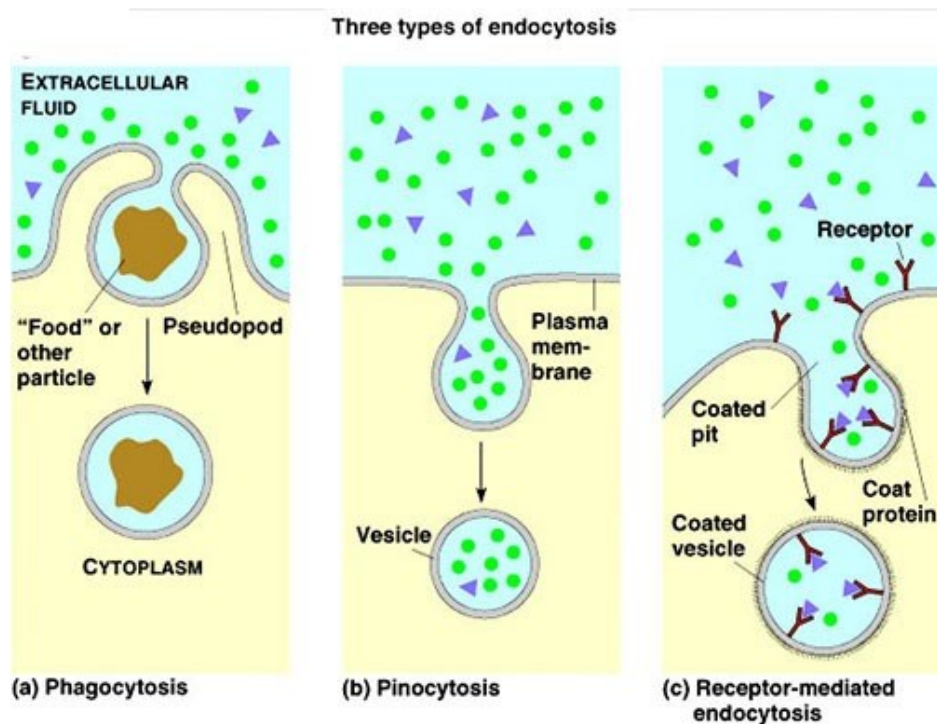
Megalin se skládá z velké extracelulární domény zakončené aminoskupinou (N-konec), malé transmembránové domény a intracelulární domény na C-konci. Extracelulární doména obsahuje 36 na cystein bohatých repetice segmentů komplementového typu obsahující 4 segmenty nezbytné pro vazbu substrátu, dále 16 opakujících se segmentů typu EGF (epidermální růstový faktor) a 8 segmentů typu YWTD, které jsou důležité pro uvolňování substrátu v endozomálních kompartmentech v závislosti na pH (McCarthy 2003). YWTD segmenty obsahují repetice Tyr (tyrosin) - Trp (tryptofan) - Thr (threonin) - Asp (kyselina asparágová) (Andersen et al. 2013).

Upraveno dle: (McCarthy 2003)

Megalin je receptor, který hraje roli při internalizaci svých substrátů do buněk (Suzuki et al. 2013). U LRP2 jde o odlišný proces transportu látek dovnitř buňky, než v případě transportérových nadrodin SLC a ABC. LRP2 využívá transport pomocí endocytózy, což je jednoduchý proces, při kterém buňky přijímají živiny a molekuly dovnitř buňky. Jedná se o koordinovaný proces, který hraje klíčovou roli v buněčné signalizaci a homeostáze (De et al. 2014). Endocytózu lze rozdělit na 3 hlavní skupiny: pinocytózu (mechanismus pro ukládání a internalizaci extracelulární tekutiny a v ní rozpuštěných látek), fagocytózu (mechanismus pohlcování částic, mikrobů a poškozených či odumřelých buněk) a receptorem zprostředkovanou endocytózu, což je případ LRP2 (viz Obr. 3) (Buckley a King 2017, Cossart a Helenius 2014).

Nejlépe studovaným mechanismem pro receptorem zprostředkovanou endocytózu je endocytóza zprostředkovaná klatrinem. Receptory jsou soustředěny v jamkách, kde se na

jejich cytosolové straně nachází protein klatrin a další s ním asociované proteiny. Tyto jamky se po vazbě substrátu na receptor invaginují a vytvoří endocytické vezikuly, ze kterých se po ztrátě klatrinového pláště stanou endosomy. Endosomy dodávají látky v nich obsažené k jejich správnému cíli (Casartelli et al. 2008).



**Obr. 3** Grafické znázornění tří různých typů endocytózy: A) fagocytóza, B) pinocytóza, C) receptorem zprostředkovaná endocytóza.

Převzato z: (Anonym 2014a)

### 3.2.1 Funkce megalinu a jeho lokalizace v organismu

Megalin je primárně exprimován na apikální straně polarizovaných epiteliálních buněk, v organismu ho můžeme nalézt v celé řadě tkání (Fisher a Howie 2006). Jelikož je hlavní funkcí megalinu tubulární reabsorpce, najdeme tento protein především v ledvinách, a to konkrétně v glomerulech a proximálních renálních tubulech. Kromě ledvin se také nachází ve vnitřním uchu, neurální trubici, dýchacích cestách plic, epididymis, žloutkovém vaku, v choroidním plexu, endometriu, štítné žláze, v očích a střevech (Farquhar et al. 1994, Mahadevappa et al. 2013).

Tento glykoprotein hraje klíčovou roli při tubulární reabsorpci glomerulárně filtrovaného albuminu a dalších nízkomolekulárních proteinů (De et al. 2014). Dále slouží k vychytávání filtrovaných molekul v proximálním tubulu, včetně nefrotoxinů, cytokinů a dalších (Mahadevappa et al. 2013).

Megalin je dále důležitý pro správnou funkci oka (Storm et al. 2014). Jeho přítomnost v oční tkáni je nezbytná pro vidění a normální vývoj očí. Bylo zjištěno, že odstranění *LRP2* genu z oční tkáně myši má za následek vznik krátkozrakosti. Přesný mechanismus působení megalinu v oku však není znám (Cases et al. 2017).

LRP2 můžeme také nalézt v embryu, kde zajišťuje výživu vyvíjejícímu se plodu a může mít roli v samotném implantačním procesu (uhnízdění oplozeného vajíčka v děložní sliznici). Dále má důležitou úlohu při vývoji reprodukčních orgánů, především díky své schopnosti internalizovat pohlavní steroidy navázané na nosiče, jako je globulin vázající sexuální hormony (SHBG), a specificky je přenášet do cílových tkání. Při vývoji plodu je obecně považovaný za důležitý faktor pro správný rozvoj předního mozku a proximálního tubulu ledvin (Fisher a Howie 2006).

U lidí je mutace genu pro megalin spojována s Donnai Barrow/facio-ocular-acustico-renálním syndromem. Tento syndrom je extrémně vzácný stav spojený s charakteristickými rysy obličeje, ztrátou sluchu, krátkozrakostí a proteinurií bílkovin s nízkou molekulovou hmotností (Mahadevappa et al. 2013). Proteinurie je způsobená dysfunkcí megalinu při reabsorpci filtrovaných proteinů v ledvinách (Storm et al. 2014).

### 3.2.2 Substráty megalinu

Endocytóza zprostředkovaná pomocí LRP2 je důležitá pro účinnou reabsorpci několika vitaminů a hormonů vázaných na jejich nosné proteiny. Tato funkce je nezbytná pro udržení homeostázy vitaminů a živin. Například se jedná o zpětné vychytávání vitamínu D (silného regulátoru homeostázy vápníku a kostního obratu) a retinolu (vitamin A) z primární moči, dále se uplatňuje i při vychytávání androgenů a estrogenů (Farquhar et al. 1994, Kur et al. 2014). Je zapotřebí také pro reabsorpci vitamínu B<sub>12</sub> a vápníku (Fisher a Howie 2006).

Megalin váže širokou škálu látek, včetně nosičových proteinů, peptidů, hormonů, signalizačních molekul, enzymů, imunologicky příbuzných proteinů atd. Známé substráty megalinu, které jsou normálně filtrované v glomerulech, zahrnují retinol-vazebný protein, vitamín B<sub>12</sub>, inzulin, 1- a 2-mikroglobulin, epidermální růstový faktor, albumin, lysozym, cytochrom c, cystatin C, β-amylázu, prolaktin, myoglobin, hemoglobin a lehké řetězce imunoglobulinů (Mahadevappa et al. 2013).

Mnoho substrátů megalinu jsou aniontové proteiny, což naznačuje, že vazba závisí spíše na distribuci náboje než na celkovém izoelektrickém bodě (Mahadevappa et al. 2013).

Kromě zmiňovaných endogenních látek jsou i látky exogenního původu substráty LRP2, včetně léčiv a toxinů. Z léčiv je třeba zmínit aminoglykosidová antibiotika (gentamicin, tobramycin, streptomycin, neomycin, kanamycin), polypeptidové antibiotikum polymyxin B a antifibrinolytikum aprotinin. Toxiny, které patří mezi substráty LRP2, jsou např. kyselina aristolochová (sekundární metabolit rostlin rodu *Aristolochia*) a trichosanthin (protein deaktivující ribozom, který je získáván z hlíz rostliny *Trichosanthes kirilowii*) (Mahadevappa et al. 2013, Fang et al. 2012).

Ačkoli je transportérem pro širokou škálou látek, jeho primární role spočívá ve vychytávání lipoproteinových složek, zejména cholesterolu (Fisher a Howie 2006).

### 3.2.3 Cubilin

Cubilin je multiligandový, endocytický membránový glykoprotein (Christensen a Birn 2002). Byl poprvé identifikován jako receptor pro komplex vnitřní faktor – vitamín B<sub>12</sub> (De et al. 2014).

Spolu s megalinem je exprimován na apikálních epiteliálních buňkách několika tkání, včetně ledvin, střeva, plic, mozku, smyslových orgánů a pohlavního systému (De et al. 2014). Cubilin patří mezi asociované molekuly megalinu. Nemá transmembránovou doménu a je proto závislý na megalinu pro endocytózu určitých látek. Pro funkci megalinu však přítomnost cubilinu není nezbytná, dochází pouze ke kooperaci mezi těmito proteiny (Fisher a Howie 2006). Mezi substráty cubilinu patří například albumin, transferin, apolipoprotein A-I a protein vázající vitamín D (De et al. 2014).

Cubilin je kódovaný genem *CUBN*. Skládá se z 27 CUB (complement subcomponents C1r / C1s, Uegf and bone morphogenic protein-1) domén (ty slouží pro vazbu substrátu), 8 EGF (epidermal grow factor) opakování a krátké 110-aminokyselinové N-koncové sekvence, která je důležitá pro asociaci s membránou (Fisher a Howie 2006).

### 3.3 Peptidické transportéry

Peptidické transportéry 1 a 2 (PEPT1 a PEPT2) patří mezi SLC transportéry. Zprostředkovávají transport di- a tripeptidů dovnitř buněk. Primárně byly identifikovány jako klíčové peptidové nosiče v tenkém střevě a ledvinách. PEPT1 byl dále detekován v lysozomech a v menší míře je exprimován také v plicích, tlustém střevě, pankreatu a játrech. PEPT2 je lokalizován podél apikální membrány epiteliálních buněk choroidního plexu, v enterickém nervovém systému, tlustém střevě, játrech, pankreatu, plicích, nosní sliznici a mléčné žláze. Dále je PEPT2 exprimován ve specifických typech buněk mozku, jako jsou astrocyty, subependymální a ependymální buňky (Klaassen a Aleksunes 2010).

Jedním z výrazných rysů savčích peptidových transportérů je jejich zdánlivá promiskuita, protože oba transportéry mohou v podstatě přepravovat všechny možné di- a tripeptidy (ale nikoliv aminokyseliny nebo tetrapeptidy). To znamená, že existuje alespoň 400 různých dipeptidů a 8 000 různých tripeptidů, které mohou sloužit jako substráty peptidových transportérů. Tyto peptidy se značně liší velikostí molekuly, nábojem a polaritou. Transport je především enantioselektivní (peptidy odvozené od  $\alpha$ -L-aminokyseliny), ale di- a tripeptidy obsahující  $\alpha$ -D-aminokyselinu, zvláště když jsou umístěny na  $\text{NH}_2$ -konci, jsou také akceptovány jako substráty, i když s nižší afinitou (Daniel a Rubio-Aliaga 2003).

PEPT1 a PEPT-2 transportují své substráty proti koncentračnímu gradientu. Hnací silou transportu je elektrochemický protonový gradient a rozdíl negativního transmembránového potenciálu. Transport peptidů přes tyto transportéry je vždy spojen s kotransportem protonů. Přenos substrátu silně závisí na extracelulárním pH a membránovém potenciálu. Optimální pH je 4,5 – 6,5, v závislosti na celkovém náboji substrátu. Vzhledem k tomu, že prostředí na okraji membrány je poměrně stabilní a mírně kyselé (pH  $\sim$  6,5), je příjem peptidů a látek s podobnou strukturou optimální pro sloučeniny, které při tomto pH nabitě nejsou (Rubio-Aliaga a Daniel 2002).

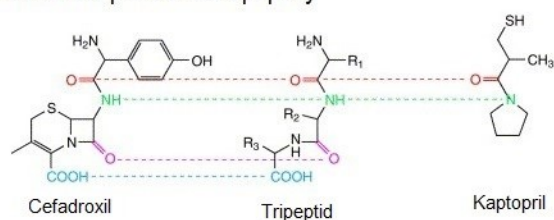
Přestože PEPT1 a PEPT2 mají podobnou funkci, vykazují velké rozdíly v substrátové specifitě, afinitě a transportní kapacitě. PEPT1 má nízkou afinitu (milimolární rozsah), ale velkou kapacitu a PEPT2 má vyšší afinitu (mikromolární rozsah), ale nižší transportní kapacitu (Rubio-Aliaga a Daniel 2002).

Předpokládá se, že přítomnost peptidové vazby (vazeb) je důležitým faktorem při rozpoznávání substrátů peptidovými transportéry. Avšak i substráty bez peptidové vazby mohou být přenášeny (např. kyselina 5-aminolevulová a valaciklovir) (viz Obr. 4) (Terada a Inui 2004).

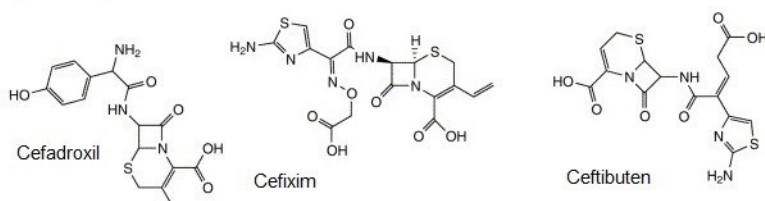
Mezi substráty těchto transportérů patří řada léčiv, včetně  $\beta$ -laktamových antibiotik (např. cefadroxil, cefixim, ceftibuten) (Klaassen a Aleksunes 2010). Základní struktura těchto antibakteriálních léčiv připomíná hlavní řetězec tripeptidu s C-koncovou peptidovou vazbou zabudovanou do  $\beta$ -laktamového kruhu. Transportéry rozlišují mezi  $\beta$ -laktamovými antibiotiky, přičemž PEPT2 má vyšší afinitu než PEPT1 u všech  $\beta$ -laktamů tvořících amfoterní ionty (celkový náboj je neutrální). V případě aniontových sloučenin, jako je cefixim a ceftibuten, je afinita pro PEPT1 mnohem vyšší než u PEPT2. Jak PEPT1, tak PEPT2 hrají roli ve farmakokinetice  $\beta$ -laktamů. PEPT2 odstraňuje  $\beta$ -laktamy z oběhu transportem do cílových buněk a společně s PEPT1 zprostředkovává jejich reabsorpci do tubulárních buněk po glomerulární filtraci (Rubio-Aliaga a Daniel 2002).

Mezi další substráty těchto transportérů patří inhibitory angiotenzin-konvertujícího enzymu (ACE). Kaptopril a enalapril jsou substráty PEPT1. Fosinopril patří mezi substráty obou těchto transportérů. Dalšími substráty jsou například fotosenzitizační činidlo kyselina 5-aminolevulová a cytostatikum bestatin (Rubio-Aliaga a Daniel 2002).

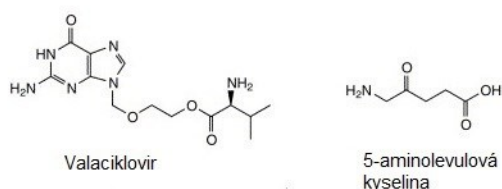
### Strukturní podobnost s peptidy



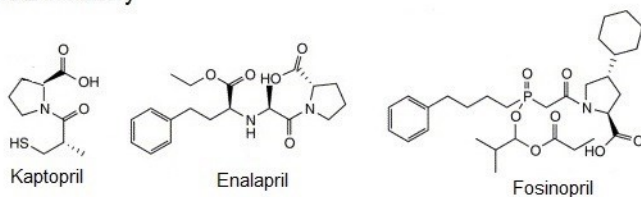
### β-laktámy



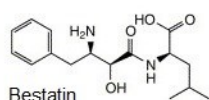
### Látky bez peptidické struktury



### ACE inhibitory



### Ostatní



**Obr. 4** Chemické struktury nepeptidových substrátů PEPT1 a PEPT2.

Upraveno dle: (Rubio-Aliaga a Daniel 2002)

Jak již bylo zmíněno výše, na transportu peptidických látek se podílejí i další transportéry, tzv. lipoprotein receptor-related proteiny (LRP) (Klaassen a Aleksunes 2010). Do této skupiny s transportní funkcí lze zahrnout LRP1, LRP2, LRP5, LRP6, LRP8, LRP10 a LRP12.

LRP1 se nachází v mozku a má významnou roli při degradaci  $\beta$ -amyloidu, což je hlavní složka amyloidních plaků nacházejících se u pacientů s Alzheimerovou chorobou (Kang et al. 2000).

LRP5 hraje klíčovou roli v kosterní homeostáze (Foer et al. 2017). Spolu s LRP6 fungují jako koreceptory pro transdukcii signálu pomocí Wnt (Wingless/Integrated) proteinů a hrají tak úlohu v signalizaci Wnt dráhy, která je důležitá v širokém spektru biologických procesů během pre- a postnatálního života u bezobratlých a obratlovců (regulace buněčné diferenciaci a proliferace) (Kokubu 2004).

LRP8 (také apolipoprotein E receptor 2) je důležitý pro rozvoj mozku v embryonálním stádiu a po narození pro jeho správnou funkci (Qiu et al. 2006).

Funkce LRP10 není zatím přesně známa. Podle studií na myších se předpokládá, že LRP10 zprostředkovává absorpci lipoproteinů obsahujících apolipoprotein E (Sugiyama et al. 2000).

LRP12 slouží k přenosu signálu a endocytóze. Jeho gen je exprimován v mnoha nádorových buňkách (Battle et al. 2003).

### **3.4 Albumin**

Albumin je nejhojnějším a nejdůležitějším proteinem zastoupeným v krevní plazmě, kde slouží k udržování onkotického tlaku (tlaku, který brání úniku tekutiny mimo cévy) a funguje zde jako nosič mnoha endogenních a exogenních sloučenin (Fanali et al. 2012). Albumin je syntetizován a vylučován z jater. Konečná molekulová hmotnost humánního sérového albuminu (HSA) je přibližně 66 700 Da. Jedná se o jediný neglykosylovaný protein krevní plazmy (Lee a Wu 2015).

Mezi látky, které se vážou na albumin v plazmě, patří například volné mastné kyseliny, hormony (trijodtyronin, tyroxin a steroidní hormony) a nekonjugovaný bilirubin (Fanali et al. 2012). Dále albumin slouží jako nosič pro některé anorganické ionty, například vápenaté, zinečnaté, měďnaté a hořečnaté (Handing et al. 2016). Léčiva, která se vážou na albumin, jsou například antikoagulans warfarin, penicilinová antibiotika, benzodiazepin diazepam, inzulín detemir, analog kyseliny listové metotrexát, nesteroidní antiflogistika (např. ibuprofen), sulfonamidy a další. Léčivé látky tedy existují v krevní

plazmě ve dvou formách – vázané a nevázané na plasmatické proteiny. Pouze nenavázaná léčiva mohou pasivně difundovat přes membrány buněk do orgánů, kde mohou vyvolat terapeutický účinek nebo může docházet k jejich metabolizaci (Yasseen a El Ghossain 2016, Ghuman et al. 2005).

Albumin je klinicky široce používán k léčbě různorodých stavů, jako jsou např. hypovolémie, šok, popáleniny, krvácení a chirurgické ztráty krve. Mezi jeho další indikace patří např. akutní selhání jater, chronické onemocnění jater, podpora výživy, hypoalbuminemie a další (Fanali et al. 2012).

Albumin je monomer skládající se ze tří homologních domén I, II a III, které zprostředkovávají vazbu HSA s různými endogenními a exogenními látkami. Bylo prokázáno (i přes jejich podobnou strukturu), že každá doména je schopna vázat jiné látky (Lee a Wu 2015).

Přítomnost albuminu v moči (albuminurie) indikuje onemocnění ledvin, jeho reabsorpce v ledvinách je zprostředkována megalinem (Fanali et al. 2012, Zhai et al. 2000).

### 3.5 Aptamery

Aptamery jsou jednovláknové molekuly deoxyribonukleové kyseliny (DNA), ribonukleové kyseliny (RNA) nebo malé proteiny. S vysokou afinitou se specificky vážou na proteinové cíle díky své specifické trojrozměrné struktuře. Mají schopnost své cíle specificky inhibovat (Nimjee et al. 2017, Reverdatto et al. 2015).

Aptamery jsou nejčastěji izolovány metodou, která se nazývá SELEX (systematic evolution of ligands exponential enrichment). Jedná se o opakující se proces, ve kterém se sekvence nukleových kyselin inkubují s cílovými proteiny. Molekuly nukleové kyseliny, které se vážou na protein, se oddělí, amplifikují pomocí metody PCR (polymerase chain reaction) a celý proces se opakuje 8-12 krát, dokud nejsou izolovány aptamery s vysokou afinitou pro cílový protein (Nimjee et al. 2017).

Jedná se o atraktivní alternativu k protilátkám. Na rozdíl od protilátek jsou aptamery méně imunogenní, menší (10-50 kDa), mohou být zcela vyrobeny *in vitro* a mohou být pro zvýšení stability snadno modifikovány během a po chemické syntéze. Největší výhodou je jejich vysoká stabilita a rychlost *in vitro* generování. Díky těmto

výhodám jsou dnes aptamery široce používány v terapii, diagnostice a cíleném podávání léků (Reverdatto et al. 2015).

### 3.5.1 Anti-VEGFR2 aptamer

Anti-VEGFR2 aptamer patří do skupiny proteinových aptamerů, je schopný se specificky vázat na receptor pro cévní endoteliální růstový faktor 2 (vascular endothelial growing factor receptor 2, VEGFR2) (Kim et al. 2013). Jedná se o receptor, který je exprimován na vaskulárních endotelových buňkách. Je důležitý pro vývoj cév v embryu (vaskulogeneze) a novotvorbu cév z již existujících cév (angiogeneze). Angiogeneze hraje fyziologickou roli např. při hojení ran nebo při zánětech. Význam má i při patologických stavech, jako je růst nádorové tkáně (Holmes et al. 2007).

Anti-VEGFR2 aptamer se jeví jako slibná látka, která by mohla nalézt uplatnění v terapii nádorových onemocnění, doposud jsou terapeuticky využívány látky ze skupiny inhibitorů tohoto receptoru. Mezi jeho inhibitory patří například nízkomolekulární látky sorafenib a sunitinib a lidská monoklonální protilátka ramucirumab, které jsou schváleny pro léčbu nádorových onemocnění. Sorafenib je schválený pro léčbu nádorů ledvin, jater a štítné žlázy, sunitinib pro léčbu nádorů ledvin, slinivky břišní a gastrointestinálních nádorů a ramucirumab pro nádory žaludku a plic (Holmes et al. 2007, Fuchs et al. 2014).

## 3.6 Metody buněčné transfekce

Transfekce je metoda, která slouží k zanesení genetické informace do eukaryotických buněk. Lze ji provádět buď *in vivo*, na živém organismu, nebo *in vitro*, za laboratorních podmínek (Kaestner et al. 2015).

Metody transfekce je obtížné rozdělit do jednotlivých skupin. Lze je rozdělit např. na virové a neviróvé, avšak nejčastěji se rozdělují na fyzikální, chemické a biologické metody. Jako první byla úspěšná transfekce pomocí chemických metod a to metoda precipitace fosforečnanem vápenatým, která byla provedena na počátku sedmdesátých let Grahamem a Van der Ebem (Kaestner et al. 2015, Palchetti et al. 2017).

Je nutné zmínit, že ne všechny transfekční metody lze aplikovat na všechny typy buněk. Je třeba především brát ohled na dosaženou životaschopnost buněk a úroveň exprese daného genu. Určení nejvhodnějších transfekčních metod závisí na několika faktorech, jako je typ buňky nebo adhezní schopnost buněk (Basiouni et al. 2012).

### **3.6.1 Biologické metody**

K biologickým metodám patří přenos genetické informace pomocí viru. Transfekce za použití virových vektorů se nazývá transdukce. Používá se především Semliki Forest virus, lentivirus a adenovirus. Při použití viru Semliki Forest je možné detekovat expresi genu během několika hodin od transdukce. Naproti tomu transfer lentivirových genů vyžaduje přibližně jeden týden k dosažení detekovatelných hladin, ale typicky se projevuje až za několik měsíců. Avšak transdukce prostřednictvím těchto virových vektorů má vyšší účinnost. U adenovirů se detekovatelných hladin dosáhne během 24 hodin. Expresi zprostředkovaná adenovirem je poměrně stabilní po dobu alespoň jednoho týdne a nežádoucí reakce (schopnost vyvolat imunitní odpověď, genetické mutace) způsobené virovou transdukcí nebo indukovanou genovou expresí během tohoto období se obvykle nepozorují. Proto se genový přenos zprostředkovaný adenovirem jeví jako nejvhodnější způsob pro expresi proteinů v kultivovaných primárních buňkách, které nedosahují optimálních výsledků při transfekci pomocí lipofekce (Kaestner et al. 2015).

Systémy přenosu genů zprostředkované viry jsou obecně výhodné vzhledem k jejich vysoké transdukční účinnosti a jednoduchému mechanismu infekce. Virové vektory jsou ale náhodně integrovány do genomů hostitele a neočekávané integrace mohou způsobit abnormální imunogenní odezvu a mutagenézi (Han et al. 2015).

### **3.6.2 Fyzikální metody**

Fyzikální metody zahrnují elektroporaci, magnetofekci, mikroinjekci, optickou transfekci, částicové pistole (ballistic gene delivery) a sonoporaci (Kaestner et al. 2015).

Výhodou fyzikální transfekce je to, že nezávisí na konkrétních chemických a biologických vlastnostech buňky, a proto mohou být takto transfekovány buňky, které jsou

obtížně transfekovány jinými metodami, například buňky imunitního systému (Kaestner et al. 2015).

Fyzikální metody, jako sonoporace na bázi ultrazvuku, magnetofekce založené na magnetickém poli a elektroporace na bázi elektrického pole, mohou transfekovat velké množství buněk tím, že vytvoří přechodné otvory v buněčné membráně, které umožňují průchod nukleových kyselin (Chow et al. 2016)

Elektroporace k vytvoření přechodných pórů v plazmatické membráně využívá elektrických pulsů. Přes přechodné póry mohou nukleové kyseliny přímo vstoupit do cytoplazmy. Hlavní výhodou této metody je její univerzálnost, jelikož parametry elektroporace mohou být efektivně optimalizovány pro určitý typ a velikost molekuly, která má být zachycena, dále pro daný typ buňky, atd. Mezi významné nedostatky této metody patří vysoké náklady na pořízení elektroporátoru a potenciálně může dojít k trvalé permeabilizaci plazmatické membrány, což následně může vést k usmrcení transfekovaných buněk (Han et al. 2015).

Mikroinjekce (dodání biologického materiálu vložení mikropipety do živých buněk v kultuře) a optická transfekce (proces internalizace nukleových kyselin do buněk za použití laseru) jsou metody, kdy je obvykle transfekována pouze jedna buňka. Je zde jistota, že daná buňka je skutečně transfekována. Proto jsou tyto metody oblíbené při přenosu genů, pokud je k dispozici jen omezený počet buněk. Například při tvorbě transgenních zvířat, kdy je DNA přímo vstříkována do samčího pronukleu (jádra zralé pohlavní buňky) (Kaestner et al. 2015, Stevenson et al. 2010).

### 3.6.3 Chemické metody

Metody chemické transfekce zahrnují techniky, které katalyzují transmembránový přenos DNA pomocí fosforečnanu vápenatého, polykationů nebo dendrimerů (Kaestner et al. 2015). Dendrimery jsou syntetické polymery s pravidelnou a vysoce rozvětvenou strukturou (Palmerston Mendes et al. 2017). Transfekce pomocí fosforečnanu vápenatého je jedním z nejméně nákladných, a proto se využívá především tehdy, pokud je potřeba současně transfekovat velké množství buněk, například pro produkci (a pozdější purifikaci) určitých proteinů nebo viru. Metoda je účinná u mnoha různých typů kultivovaných buněk (Kaestner et al. 2015).

### 3.6.3.1 Lipofekce

Lipofekce je metoda, která se někdy zařazuje mezi chemické metody a někdy mezi metody biologické. Jde o velmi populární metodu transfekce, která ve srovnání s jinými chemickými metodami vede k 5 až 100 násobnému zvýšení transfekční rychlosti (Kaestner et al. 2015).

Tato metoda je založena na kationtových lipidech, které se skládají z kladně nabitě části a jednoho nebo dvou uhlovodíkových řetězců. Kladně nabitá skupina interaguje s negativně nabitým fosfátovým řetězcem nukleových kyselin, čímž dochází k vytvoření kompaktní struktury. Spolu s dalšími pomocnými neutrálními lipidy tvoří transfekční unilamelární (tvořen jednou lipidovou dvojrůstvou) komplex - liposomální strukturu s kladným povrchovým nábojem ve vodných roztocích. Tento pozitivní náboj pak zprostředkovává interakci liposomu s buněčnou membránou (obsahující negativně nabitě zbytky kyseliny křemičité) (Kaestner et al. 2015).

Obecně lze říci, že kationtové lipidy mají tři segmenty: skupinu interagující s DNA s čistým pozitivním nábojem ve fyziologických podmínkách nebo při nižším pH, jaké se nachází v prostředí endosomu; hydrofobní skupinu pro ukotvení lipidů, jako jsou řetězce cholesterolu nebo mastné kyseliny; a spojovací skupinu, která váže polární skupinu na lipidovou skupinu. Pozitivně nabitě polární skupiny jsou různé typy, zahrnující: kvartérní amoniové ionty, polykationy (např. spermin) nebo kationtové polymerní sloučeniny (např. polyethylenimin, polylysin nebo jejich deriváty) (Kaestner et al. 2015).

Liposomy jsou jedním z nejvíce zkoumaných nosičů pro dodávání siRNA. Povrchové vlastnosti liposomálních nosičů, včetně povrchového náboje, PEGylace a modifikace ligandu, mohou významně ovlivnit efektivitu tlumení genové exprese. Kationtové formulace dominují pro dodávání siRNA. Neutrální mají také dobrý účinek, ale aniontové formulace obecně nejsou pro dodávání siRNA vhodné (Xia et al. 2016).

Byla syntetizována řada kationtových lipidů, včetně monovalentních a polyvalentních kationtových lipidů, derivátů cholesterolu nebo sloučenin obsahujících guanidin. Některá tato transfekční činidla jsou komerčně dostupná, jiná se vlastnoručně připravují přímo v laboratořích před transfekcí (Kaestner et al. 2015).

Lipofectamine (Life Technologies), FuGene 6 (Promega) nebo Nanojuice (Merck Millipore) jsou příklady komerčně dostupných transfekčních formulací, které se běžně používají v biomedicínském výzkumu k transfekci buněčných linií (Kaestner et al. 2015).

Lipofectamin je tzv. zlatý standard mezi transfekčními činidly. Navzdory intenzivnímu úsilí a syntéze stovek různých kationtových lipidů, žádný lipidový systém nemůže soutěžit s účinností transfekce jakou má Lipofectamin. Transfekční činidla na bázi Lipofectaminu se staly nejpoužívanějšími po celém světě (Palchetti et al. 2017).

Přenos genetické informace lipofekcí je však ve většině terminálně diferencovaných (dále se nedělících) buněk nedostatečný, jako jsou například dospělé srdeční monocyty. Pak se může uplatnit metoda „reálné“ biologické transfekce, jako je přenos virového genu (Kaestner et al. 2015).

I přes dvacetiletý výzkum je účinnost transfekce dosažitelná kationtovými liposomy stále velmi neuspokojivá. Závisí to především na tom, že lipofekce je složitý proces, který ovlivňují různé překážky transfekce (tj. buněčné vychytávání, endosomální únik, vstup do jádra). Kationtové liposomy však vykazují několik výhod, včetně toho, že nejsou imunogenní, nejsou toxické a biologicky odbouratelné (Palchetti et al. 2017).

Obecně je použití transfekčních činidel výhodné, jelikož jsou levná a transfekce je snadno proveditelná při porovnání s fyzikálními metodami buněčné transfekce (Han et al. 2015).

Ve srovnání s virovými vektory jsou ty neviróvé obecně méně účinné při dodávání genetické informace a iniciování genové exprese, zejména při použití *in vivo*. Navíc je dobře známo, že transfekční účinnost je značně odlišná mezi různými buněčnými liniemi. Proto je důležité pro transfekci vybírat vhodné buněčné linie (Horibe et al. 2013).

### **3.7 RNA interference**

RNA interference (RNAi) je proces tlumení genů, který hraje zásadní roli v různých funkcích eukaryotických buněk, včetně obrany proti virům, remodelaci chromatinu, přeskupení genomu, vývojového časování, morfogeneze mozku a údržbě kmenových buněk (MacRae et al. 2006).

RNAi byla poprvé pozorována rostlinnými biology v osmdesátých letech 20. století, ale mechanismus na molekulární úrovni zůstal nejasný až do konce devadesátých let, kdy práce zabývající se nematodou *Caenorhabditis elegans* ukázala, že RNAi je evolučně zachovaný mechanismus tlumení genů. Sekvenčně specifické posttranskripční tlumení genů pomocí dvouvláknové RNA je zachováno v řadě organismů, včetně rostlin, *Neurospora*, *Drosophila*, *C. elegans* a savců (Leung a Whittaker 2005).

Obecně se v procesu RNAi štěpí dlouhé transkripty dvouvláknové RNA (dsRNA) na malé interferující RNA neboli short interfering RNA (siRNA) nebo na mikro RNA (miRNA) pomocí endoribonukleázy dicer. Výsledná molekula siRNA je potom vnesena do RNA-indukovaného tlumícího komplexu (RISC) za vzniku komplexu RISC-siRNA, kde dochází k duplexnímu odvíjení řetězců siRNA. To je zakončeno stabilním spojením pouze jednoho z obou řetězců (vedoucího řetězce) s argonaut efektorovým proteinem. Tento vedoucí řetězec řídí rozpoznávání cílů pomocí Watson-Crickova párování bází, zatímco druhý řetězec originální dsRNA je vyřazen. Pomocí krátkých jednovláknových řetězců jsou proteiny argonaut vedeny k jejich cílům, kde způsobí rozštěpení cílové mRNA, čímž klesá exprese odpovídajícího proteinu. Tento postup je vysoce účinný a velmi specifický, protože jen jeden nukleotidový nesoulad mezi cílovou mRNA a siRNA může zabránit rozpoznávání, a tudíž procesu tlumení (Carthew a Sontheimer 2009, Wu et al. 2013).

RNAi může být indukována v savčích buňkách zavedením syntetických dvouřetězcových malých interferujících RNA (siRNA) o délce 21-23 párů bází (bp) nebo plazmidovými a virovými vektorovými systémy, které exprimují dvouřetězcové krátké vlásečkové RNA (shRNA) (ty jsou následně na siRNA přeměněny) (Leung a Whittaker 2005).

V savčích buňkách je na tlumení genů pomocí RNAi možné užít jen malé interferující RNA o velikosti 20-30 bází, jelikož dsRNA s počtem bází více než 30 aktivují imunitní systém (Leung a Whittaker, 2005).

Vzhledem ke svým specifickým vlastnostem nemohou být však siRNA přímo použity v terapii nukleovými kyselinami. siRNA nejsou stabilní a mohou se štěpit endonukleázou v séru (s poločasem asi jen 15 minut). Většina siRNA je záporně nabitá a tudíž poměrně málo proniká do buněk v důsledku jejich elektrostatického odpuzování proti negativně nabitým buněčným membránám. Chemické modifikace však mohou částečně vyřešit výše uvedené problémy (Xia et al. 2016).

Pro úspěšné klinické využití RNAi je důležité mít účinné a bezpečné vektory, které dopraví siRNA do cílových buněk. Existuje několik klíčových požadavků na siRNA vektory:

- měly by chránit siRNA před degradací během systémového cirkulace;
- dále by měly transportovat siRNA do cílových míst a zabránit nespecifickému dodání;
- nosiče genů by také měly mít dostatečně vysoké buněčné vychytávání a efektivní endosomální únik, aby umožnily uvolnění siRNA z endosomu;
- měly by uvolnit siRNA a zajistit snadný přístup siRNA pro buněčné RNAi, aby se dosáhlo účinného tlumení genů;
- ideální nosič by měl být dostatečně stabilní v séru (např. rezistentní na endonukleázy) (Wu et al. 2013, Xia et al. 2016).

RNAi se stala důležitou strategií jak v základním výzkumu, tak při vývoji efektivních léčebných postupů pro genovou terapii. Jedná se o potenciální nástroj pro zvládnutí závažných onemocnění, jako jsou nádorová a genetická onemocnění, ke kterým není běžná léčba účinná (Wu et al. 2013).

Jelikož se siRNA může měnit podle sekvence cílové mRNA, má možnost po správném návrhu utlumit určité cílové geny. Mnoho funkčních siRNA bylo navrženo tak, aby se zaměřily jak na onkogeny, tak na další klíčové geny, které se podílejí na proliferaci nádorových buněk, přežití, invazi, angiogenezi, metastázách a rezistenci na chemoterapii či radioterapii. Kromě toho siRNA mixy, které obsahují více typů terapeutických siRNA, jsou účinnější než jednotlivé siRNA při inhibici funkcí cílových mRNA a proteinů, protože mohou současně snížit expresi více genů (Xia et al. 2016).

Během posledního desetiletí se krátké RNA projeví jako jedny z nejdůležitějších regulátorů exprese a funkce eukaryotických genomů. Existují dvě primární kategorie těchto malých RNA – short interfering RNA (siRNA) a mikro RNA (miRNA). Působí jak v somatické, tak v zárodečné linii buněk v širokém spektru eukaryotních druhů, aby regulovaly endogenní geny a bránily genom od invazivních nukleových kyselin (Carthew a Sontheimer 2009).

miRNA jsou endogenní malé nekódující RNA o délce 18–25 nukleotidů, které regulují expresi genu sekvenčně specifickým způsobem prostřednictvím degradace cílových mRNA nebo inhibice translace proteinu (Zhong et al. 2016). miRNA jsou

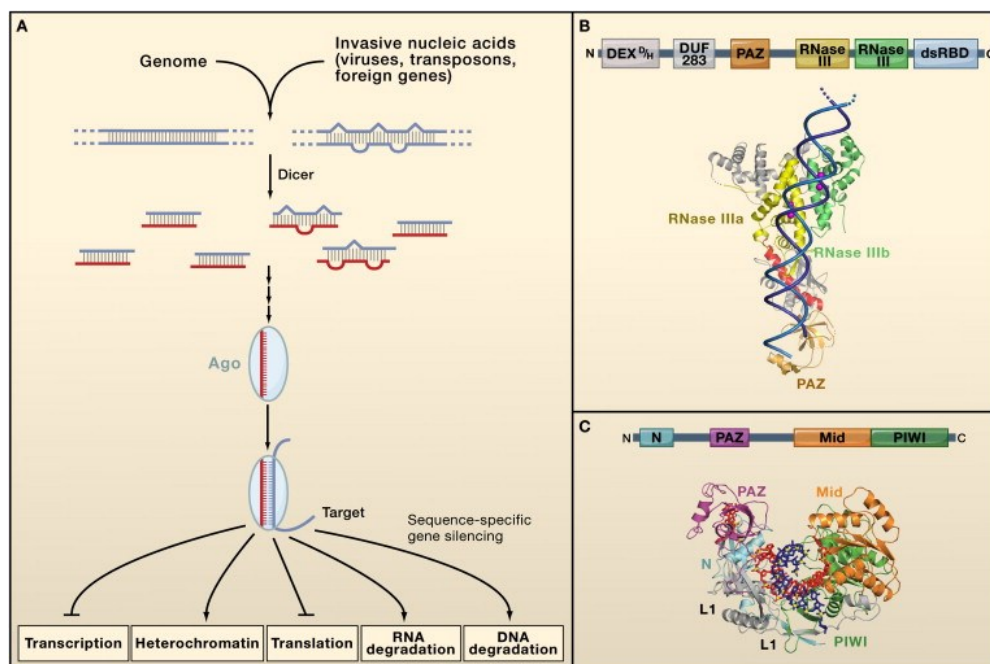
produkovány endogenně z nekódujících RNA a využívají tedy dva mechanismy působení. První je stejný, jako v případě siRNA (viz níže). U druhého mechanismu se miRNA také naváže na mRNA, nedojde však k její degradaci, ale způsobí to, že neproběhne translace (Carthew a Sontheimer 2009).

### 3.7.1 Krátké interferující RNA

Krátké interferující RNA (siRNA) jsou malé, dvouvláknové a nekódující RNA, skládající se z 21-23 bp. Hrají důležitou roli v procesu RNA interference, kde ovlivňují expresi určitého genu. Účinky malých RNA na genovou expresi jsou obecně inhibiční a příslušné regulační mechanismy jsou proto společně zahrnuty pod společným názvem RNA silencing (tlumení) (Carthew a Sontheimer 2009).

siRNA a miRNA jsou rozdílné, mají však podobnou velikost a sekvenčně specifické inhibiční funkce, takže mají příbuznost v mechanismu působení. U obou tříd ncRNA (non-coding) bylo také zjištěno, že závisí na stejných dvou rodinách proteinů: dicerových enzýmech, které je štěpí z prekurzorů, a Ago proteinech na podporu tlumení efektorových funkcí (viz Obr. 5 A) (Carthew a Sontheimer 2009).

siRNA směřují vázané efektorové proteiny na cílové molekuly nukleové kyseliny prostřednictvím Watson-Crickova párování bází. Jádrová složka efektorového proteinu je členem nadrodiny proteinů argonaut. Mechanismus působení je takový, že se vážou na 3'UTR-konec (untranslated region) mRNA a tím způsobí její degradaci. 3'UTR-konec je regulační oblast, která se do proteinu nepřekládá (Carthew a Sontheimer 2009).



**Obr. 5** Hlavní vlastnosti tlumení pomocí siRNA a miRNA.

(A) Dvouřetězcové prekurzory RNA různých druhů jsou zpracovány dicerovým proteinem na krátké (20-30 nukleotidů) fragmenty. Jeden řetězec zpracovaného duplexu je vložen do proteinu argonaut, což umožňuje rozpoznání cílové RNA pomocí Watson-Crickova párování bází. Jakmile je cíl rozpoznán, dochází k jeho ovlivnění jedním ze znázorněných mechanismů, v závislosti na biologickém kontextu.

(B) Struktura dicerového enzymu.

(C) Struktura proteinu argonaut.

Převzato z: (Carthew a Sontheimer 2009)

### 3.7.2 Dicer

Dicer je ribonukleáza, která štěpí dvouvláknovou RNA (dsRNA) na malé fragmenty a tím v podstatě zahajuje celý proces interference. Délka těchto fragmentů je dostatečná na to, aby poskytla komplexní sekvenci požadovanou pro jednoznačnou identifikaci jednoho genu v eukaryotickém genomu (MacRae et al. 2006).

Dicer patří do rodiny RNázy III, která je charakterizována několika doménami ve specifickém pořadí od amino ke karboxy konci:

- ATPázová doména DExD/H (DEAD-like and helicase domain), která má helikázovou aktivitu (rozvinutí dvoušroubovice),
- doména DUF283 (domain of unknown function), jejíž funkce není zatím zcela objasněna, ale nedávno se ukázalo, že je schopna vázat jednovláknovou nukleovou kyselinu,
- doména PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille), která váže dsRNA,
- dvě domény RNázy III, které štěpí dsRNA na charakteristicky dlouhé miRNA nebo siRNA,
- dsRNA-vazebná doména (dsRBD), která má pouze pomocnou úlohu pro vazbu a štěpení dsRNA (viz Obr. 5 B) (Carthew a Sontheimer 2009, Song and Rossi 2017).

### 3.7.3 Argonaut

Argonaut je rodina proteinů, které jsou přítomny v určité formě u všech forem pozemského života a které tvoří součást tzv. RISC komplexu, kde slouží k rozštěpení cílové mRNA. Vážou malé RNA - siRNA, miRNA, piRNA (PIWI-interacting RNA), které pak tyto proteiny vedou k jejich cílům. Rodina argonaut proteinů se dále může dělit na podrodiny Ago. U lidí se vyskytuje 8 podrodin Ago, avšak štěpící aktivitu cílové mRNA má pouze podrodina Ago2 (Carthew a Sontheimer 2009, Höck a Meister 2008).

Argonaut proteiny mají čtyři domény:

- PAZ doménu, kterou sdílejí s dicerem,
- PIWI (P-body-induced wimpy testes) doménu, která je jedinečná pro argonaut proteiny a má nukleázovou aktivitu (je schopná štěpit nukleové kyseliny) díky strukturní podobnosti s RNázou H ,
- N-terminální doménu,
- Mid (middle) doménu, která spolu s PAZ doménou váže RNA řetězec (Carthew a Sontheimer 2009, Sheu-Gruttadauria a MacRae 2017).

Celková struktura proteinu je znázorněna na Obr. 5 C. Struktura je tvořena ze dvou laloků, přičemž jeden lalok se skládá z domény PAZ a druhý lalok se skládá z domény PIWI ohraničené N-terminální (N) a střední (Mid) doménou (Carthew a Sontheimer 2009).

#### 3.7.4 Zdroje prekurzorů siRNA

Prekurzor siRNA je dlouhá, lineární, dokonale párová dsRNA, nacházející se přímo v cytoplazmě nebo dodaná z vnějšího prostředí. Tato dsRNA je zpracovávána dicerovým enzymem do siRNA. Zdroje siRNA mohou být tedy exogenní i endogenní. Exogenní prekurzory pocházejí nejčastěji z virů. Původně tyto prekurzory byly nalezeny u rostlin, kde RNA interference slouží jako obranný mechanismus. V letech 2002 a 2003 byly odhaleny endogenní prekurzory siRNA. Patří mezi ně například centromery (oblast chromozomu spojující obě chromatidy), transpozony (mobilní úseky DNA, které jsou schopny měnit své pozice v genomu) a další repetitivní sekvence. Krátce poté funkční studie v rostlinách vedly k objevení trans-působících siRNA (ta-siRNAs), které jsou vystřiženy ze specifických genomických transkriptů a regulují určité skupiny cílových genů (Carthew a Sontheimer 2009).

Endogenní siRNA (endo-siRNA) jsou podobné miRNA, liší se však biogenní cestou. Na rozdíl od savců a much, kde produkce endo-siRNA závisí pouze na činnosti enzymu dicer, červy (*Caenorhabditis elegans*) a rostliny (*Arabidopsis thaliana*) produkují řadu endo-siRNA pomocí diceru ve spojení s RNA-dependentní RNA polymerázou (RdRP). Enzym dicer zajišťuje štěpení dsRNA na primární siRNA. RdRP má pak za úkol spojení siRNA s proteinem argonaut a interakci s cílovou mRNA (Röther a Meister 2001).

U savců byly endo-siRNA dříve považovány za nepravděpodobné, protože přítomnost dlouhých prekurzorů dsRNA by vyvolala odpověď interferonu uvnitř buňky. Tato odpověď se však nevyskytuje u oocytů a embryonálních kmenových buněk a ve zmiňovaných buněčných typech byla skutečně popsána přítomnost endo-siRNA (Röther a Meister 2001).

### 3.7.5 Posttranskripční tlumení pomocí siRNA

Během RNAi komplex RISC-siRNA rozpozná mRNA pomocí komplementární siRNA. Po rozpoznání dojde k rozštěpení mRNA. Následně se funkční RISC-siRNA komplex regeneruje, zatímco fragmenty mRNA se dále degradují. Díky tomu dochází k tzv. posttranskripčnímu umlčení daného genu. Gen se tedy přepisuje, ale mRNA je poté rozštěpena a bílkovina se tudíž nemůže vytvářet. Byly také odhaleny způsoby, kdy siRNA blokuje samotnou transkripci (transkripční umlčení), jelikož navozuje vznik heterochromatinu, který není přepisován (Carthew a Sontheimer 2009).

Chromozomální materiál může být buď euchromatický nebo heterochromatický, v závislosti na kondenzaci během interfáze (fáze mezi dvěma děleními buňky). Euchromatin je dekonenzovaný a má oblasti, které jsou transkripčně aktivní. Heterochromatin je kondenzovaný a transkripčně inaktivní. Přesný mechanismus, kterým je heterochromatin tvořen během RNAi, není přesně znám (Locke a Martienssen 2006).

## 4 Cíle práce

1. Stanovení transportu proteinových a peptidických látek pomocí ledvinného transportéru megalinu v modelových buněčných liniích HK-2 a JEG-3.
2. Stanovení potenciální cytotoxicity použitých látek na buněčných liniích HK-2 a JEG-3.

## 5 Experimentální část

### 5.1 Materiál

#### 5.1.1 Pomůcky, přístroje a spotřební materiál

24, 96 jamková kultivační plata (TPP, Švýcarsko)

Analytické váhy (Boeco, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, USA)

Centrifugační zkumavka se šroubovacím uzávěrem (TPP, Švýcarsko)

Destičkový analyzátor Synergy 2 BioTek (USA)

Destičkový spektrofotometr Infinite M200 Tecan (Německo)

Inkubátor (Sanyo, Japonsko)

Jednorázové pipety (TPP, Švýcarsko)

Kultivační lahve (TPP, Švýcarsko)

Laminární box (TopSafe 1.8 Bioair Instruments, Itálie)

Mikrozkumavky (Eppendorf, USA)

Pasteurovy pipety (Sigma Aldrich, USA)

pH metr Oakton pH510 (Eutech Instruments, Singapur)

Plynový kahan

Světelný mikroskop (Optika Microscopes, Itálie)

Špičky (Eppendorf, USA)

Vakuová odsávačka

Vodní lázeň TW12 (Julabo, Německo)

### 5.1.2 Reagencie

Anti-VEGFR2 aptamer značený FITC (Generi Biotech, Česká republika)

CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA)

FITC-albumin (Sigma Aldrich, USA)

HEPES (kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazethansulfonová) (Sigma Aldrich, USA)

KCl (Sigma Aldrich, USA)

Kultivační médium DMEM (Sigma Aldrich, USA)

Kultivační médium MEM (Sigma Aldrich, USA)

Lipofectamin (ThermoFisher Scientific, USA)

NaCl (Sigma Aldrich, USA)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, USA)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, USA)

NaOH (Sigma Aldrich, USA)

Opti-MEM Medium (Gibco, USA)

Passive Lysis Buffer (PLB) (Promega, USA)

Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, USA)

siLRP2 (ThermoFisher Scientific, USA)

siSc (scrambled RNA) (ThermoFisher Scientific, USA)

Triton X (Sigma Aldrich, USA)

### 5.1.3 Buněčné linie

Buňky jsou kultivovány v kultivačních lahvích spolu s příslušným médiem. Pokud jsou buňky v jedné láhvi už příliš namnožené, je potřeba je přesadit a nasadit do nových lahví. Při přesazování se odsaje staré médium a přidá se PBS, které slouží k opláchnutí buněk od zbytku média. Pomocí PBS chvíli buňky oplachujeme a poté se také odsaje.

Přidáme trypsin, který se jako jediný pipetuje přímo na buňky, slouží k rozštěpení peptidických vazeb a uvolnění buněk přilnutých k povrchu kultivační lahve. Poté se do lahve přidá médium k neutralizaci působení trypsinu. Do nové kultivační lahve se nejprve přidá nové médium a poté rozsuspendované buňky. PBS, médium a trypsin musí být předehřátý na 37 °C, aby měly stejnou teplotu, jako je teplota buněk, které jsou inkubovány při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a ve vlhčené atmosféře.

U obou buněčných linií bylo použito maximálně 25 pasáží od zakoupení a rozmrazení dané buněčné linie.

### **5.1.3.1 JEG-3**

Jedná se o buněčnou linii, která byla izolována z epitelálních buněk lidské placenty, konkrétně z lidského choriokarcinomu. Buňky linie JEG-3 mají zachovanou produkci lidských placentárních hormonů: choriového gonadotropinu (hCG) a choriového somatomotropinu (hCS) (Kohler 2016).

Jako kultivační médium bylo použito MEM médium (Minimum Essential Medium Eagle) doplněné o 2 mM glutamin, 1 % neesenciální aminokyseliny (NEAA), 1 mM pyruvát sodný (NaP) a 10 % fetální bovinní sérum (FBS).

### **5.1.3.2 HK-2**

Jedná se o lidské epitelální buňky, které pochází z kůry a proximálního tubulu ledvin. Buňky byly immortalizovány transdukcí genem E6 / E7 lidského papilomaviru 16 (HPV-16). HK-2 buňky si zachovávají funkční charakteristiky proximálního tubulárního epitelu (Zager 2016).

Použitým typem média pro kultivaci této buněčné linie bylo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) doplněné o 2 mM L-glutamin a 10 % FBS.

## 5.2 Příprava roztoků

### 5.2.1 Fosfátový pufr

V destilované vodě byly rozpuštěny následující soli: NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Navážky na 1 l pufru jsou uvedeny v Tab. 1. Po úplném rozpuštění všech solí, bylo upraveno pH roztoku na 7,4 pomocí NaOH. Následně byl pufr rozdělen do skleněných lahví a autoklávován, aby byla zajištěna sterilita připravovaného roztoku.

**Tab.1** Složení fosfátového pufru (PBS)

	Koncentrace (mM)	Navážka (g)	Molekulová hmotnost (g/mol)
NaCl	137	8,01	58,44
KCl	2,7	0,21	77,55
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10	3,58	358,14
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10	1,56	156,01

### 5.2.2 Desintegrační roztok

Tento roztok má za úkol buňky rozpustit, jedná se o roztok NaOH a Tritonu X ve vodě (Tab. 2). Triton X je detergent, který slouží k rozpuštění membrán a celé buňky.

**Tab 2.** Složení desintegračního roztoku

	Množství	Molekulová hmotnost (g/mol)
NaOH	0,8 g	39,997
Triton X	1 ml	624

### 5.2.3 STOP roztok

STOP roztok je vodný roztok 137 mM NaCl a pufrovacího činidla 10 mM HEPES (kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazethansulfonová). Navážky na jeden litr roztoku jsou uvedeny v Tab. 3. I tento roztok se musí upravit na hodnotu pH 7,4 pomocí NaOH.

**Tab. 3** Složení STOP roztoku

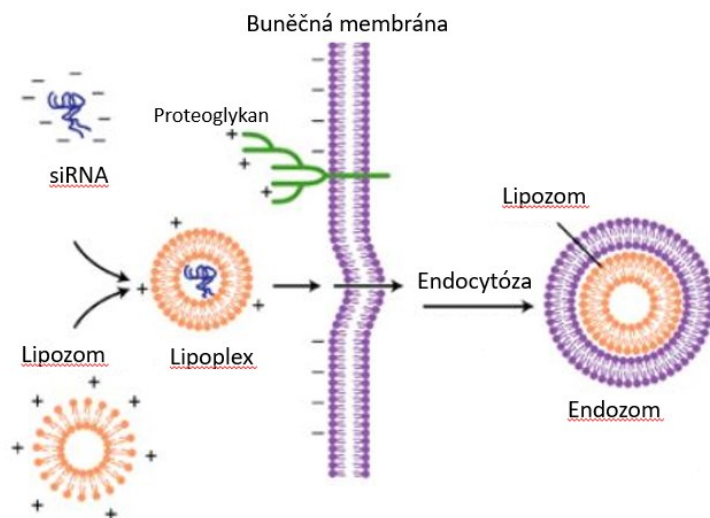
	Koncentrace (mM)	Navážka (g)	Molekulová hmotnost (g/mol)
NaCl	137	8,01	58,44
HEPES	10	2,38	238,31

## 5.3 Transfekce

### 5.3.1 Princip metody

Transfekce je metoda, která slouží k zanesení genetické informace do eukaryotických buněk, v našem případě šlo o vpravení siRNA do buněčných linií JEG-3 a HK-2. Lipofectamin jako transfekční činidlo má za úkol obalit siRNA a tím umožní internalizaci siRNA do buňky. V buňce se pak siRNA dostává do jádra, kde způsobí snížení exprese genu (viz Obr. 6), který kóduje určitý protein, v našem případě sníží expresi *LRP2*.

## LIPOFEKCE



**Obr. 6** Průběh lipofekce.

Upraveno dle: (Anonym 2014b)

### 5.3.2 Pracovní postup

Vše se musí provádět ve sterilním prostředí laminárního boxu a za použití sterilních pomůcek. Obě kultivační média a Opti-MEM se musí nejprve přehřát na 37 °C.

Veškeré experimenty byly na obou buněčných liniích 2-3x opakovány.

1. Připravili jsme si suspenzi buněk o požadované koncentraci 170 000 buněk na 1 ml a na 24 jamkové plato jsme do každé jamky přidali 0,5 ml této suspenze. V případě HK-2 buněk jsme použili médium DMEM, které mělo stejné složení jako to použité pro kultivaci HK-2 buněk, resp. MEM pro JEG-3 buněčnou linii.
2. Obě plata s buněčnými liniemi jsme nechali 24 hodin inkubovat při 37 °C ve vlhčené atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub>.
3. Po uplynulé době jsme vyměnili médium. Pro buněčnou linii HK-2 jsme médium odsáli a přidali čerstvý DMEM tak, aby výsledný objem média i s transfekčním roztokem byl 0,5 ml, pro buněčnou linii JEG-3 jsme použili médium MEM. Poté jsme provedli první transfekci.
4. Do 4 mikrozkušavek jsme si připravili médium Opti-MEM (Opti-Minimal Essential Medium). Do první jsme pak přidali siLRP2 (siRNA proti genu *LRP2*), do

druhé siSc (scrambled siRNA) a do třetí a čtvrté odměřené množství Lipofectaminu přesně podle pokynů výrobce.

siSc slouží jako negativní kontrola, tedy úsek bez shody s jakýmkoliv lidským genem, což znamená, že sice dojde k transfekci buněk, ale nesníží se exprese žádného genu. Jako další kontrolu jsme použili pouze Opti-MEM, tedy netransfekované buňky.

5. Směs s siLRP2 jsme přidali do jedné mikrozkušavky s Lipofectaminem a stejně tak směs s siSc jsme přidali do druhé předem připravené mikrozkušavky s Lipofectaminem. Je důležité, aby se roztok, ve kterém je siRNA, přidával k roztoku s Lipofectaminem, ne obráceně. Pořádně jsme roztoky promíchali a nechali 5 minut stát.
6. Rozdělili jsme si plato s buňkami na dvě poloviny a do 1. poloviny plata jsme pipetovali směs siLRP2 s Lipofectaminem a na druhou polovinu směs siSc s Lipofectaminem. Nechali jsme plato inkubovat 48 hodin při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.
7. Po uplynulém čase jsme pouze vyměnili na platě médium. Staré jsme odsáli a přidali 0,5 ml nového média.
8. Další den jsme provedli druhou transfekci. Za další 3 dny se opět jen vyměnilo médium a následující den se provedla třetí transfekce. Plata se nechala 48 hodin inkubovat před provedením akumulární studie.

## 5.4 Akumulační studie

### 5.4.1 Princip

Transfekcí buněk došlo ke snížení exprese genu kódující LRP2, který zprostředkovává endocytózu mj. i albuminu. Pomocí akumulární studie (prováděné u transfekovaných a netransfekovaných buněk) zjistíme, v jaké míře se u transfekovaných buněk změnilo hromadění albuminu v buňce.

Pomocí akumulární studie stanovíme, zda je i anti-VEGRF2 aptamer substrátem tohoto transportéru.

### 5.4.2 Pracovní postup

Akumulace se vzhledem k rychlé realizaci provádí v nesterilním prostředí.

1. Buňky jsme 2x propláchli 0,5 ml Opti-MEMu předehřátého na 37 °C. Nejprve se musí odsát staré médium, přidat 0,5 ml Opti-MEMu, opět odsát a zopakovat. K buňkám bez média jsme poté přidali 500 µl Opti-MEMu a nechali je 10 minut preinkubovat.
2. Mezitím jsme si připravili roztok Opti-MEMu s FITC-albuminem o koncentraci 25 µg/ml. Tento roztok jsme získali smícháním 15 ml Opti-MEMu a 3,75 ml FITC-albuminu o koncentraci 125 µg/ml.
3. Rozdělili jsme si plato na 4 řádky. Do každého řádku (jak ke kontrolním buňkám, tak k buňkám transfekovaným siLRP2) jsme přidali v určitých časových intervalech 0,5 ml roztoku Opti-MEM + FITC-albumin. Nejprve jsme roztok nechali inkubovat 90 minut. U dalšího pokusu 60 a 30 minut. Poté 90, 30, 10 a 0 minut. U posledních experimentů jsme přidávali roztok v časových intervalech 10, 5, 2 a 0 minut před ukončením pokusu.

U akumulační studie anti-VEGFR2 aptameru jsme použili stejný postup jako v případě albuminu. Pouze v tomto kroku jsme místo roztoku Opti-MEM + FITC-albumin přidali roztok FITC-anti-VEGFR2 aptameru naředěného vodou o koncentraci 100 pmol/µl a roztok nechali inkubovat v časových intervalech 10, 5, 2 a 0 minut.

4. Poté jsme všechny roztok na platě odsáli a 2x propláchli 1 ml STOP roztoku vychlazeného na 4 °C. STOP roztok jsme si připravili předem do zkumavek zapuštěných do plata, abychom současně zastavili všechny jamky.
5. Po propláchnutí jsme všechny jamky pomocí odsávačky vysáli do sucha a napipetovali jsme do každé 200 µl desintegračního roztoku a nechali 60 minut působit.

Desintegrační roztok způsobil to, že struktura vzorků byla moc gelovitá a kvůli tomu nebylo pipetování příliš přesné. Takže jsme použili i jiné způsoby desintegrace buněk, a to včetně lýzy mrazem za použití pouze PBS. Takto připravené vzorky jsme dali zmrazit a data vyhodnotili až po 6 dnech. U ostatních pokusů jsme místo desintegračního roztoku použili pasivní lyzovací pufr (PLB) vychlazený na 4 °C, plata byla následně také zmrazena.

U pokusu s FITC-anti-VEGFR2 aptamerem jsme pro desintegraci buněk použili kombinaci PLB a působení mrazu.

- Poté jsme si připravili dvě 96 jamkové destičky pro měření absorbance a fluorescence. Průhlednou destičku jsme použili na změření množství proteinu (absorbance) a černou na změření fluorescence.

### 5.4.3 Měření množství proteinu

Množství proteinu v jednotlivých vzorcích bylo stanoveno pomocí standardní metody Bicinchoninic Acid Assay (BCA) používané v molekulární biologii. Konkrétně byl použit Pierce™ BCA Protein Assay Kit.

- Nejprve jsme si připravili 7 roztoků bovinního sérového albuminu tak, že jsme naředili standard bovinního sérového albuminu (BSA) o koncentraci 2000 µg/ml pomocí PBS, abychom mohli vytvořit kalibrační křivku. Ředění jsme prováděli podle Tab. 4.

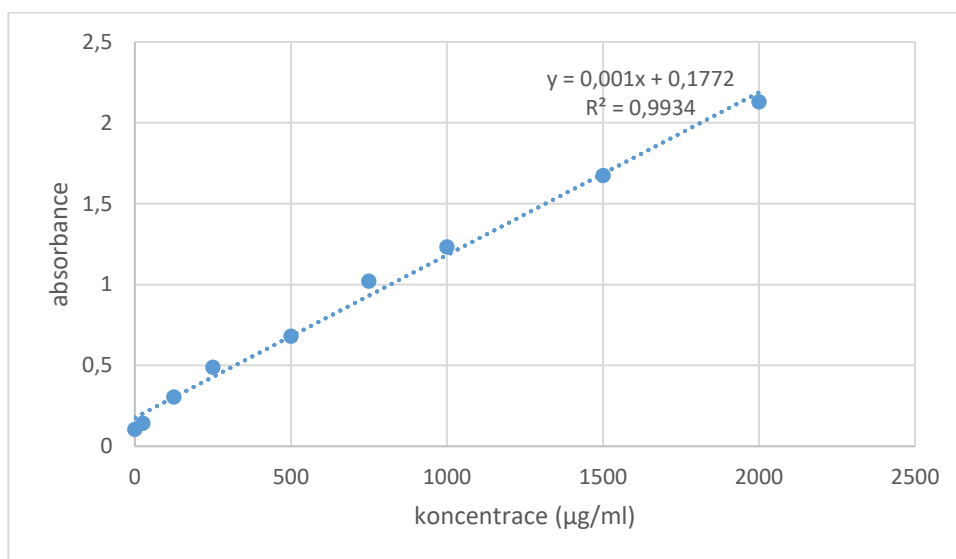
**Tab. 4** Ředění BSA pomocí PBS

Roztok	Objem PBS (µl)	Objem BSA 2000 µg/ml (µl)	Výsledná koncentrace (µg/ml)
A	0	300	2000
B	125	375	1500
C	325	325	1000
D	175	175 z roztoku B	750
E	325	325 z roztoku C	500
F	325	325 z roztoku E	250
G	325	325 z roztoku F	125
H	400	100 z roztoku G	25
I	400	0	0

- Na první dva řádky 96 jamkového plata jsme napipetovali 25 µl z každého roztoku A-I. Na další řádky jsme přidali 10 µl vzorku z každé jamky 24 jamkového plata.

Vzorky buněk před pipetováním musí být dobře promíchané. K testovaným vzorkům jsme přidali 15  $\mu\text{l}$  PBS, abychom měli ve všech jamkách stejné objemy.

3. Dále jsme si podle návodu BCA Protein Assay Kitu připravili pracovní roztok smísením reagentů A a B předepsaným způsobem (v poměru 50:1). Do každé jamky jsme dali 200  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku a nechali plato 30 minut inkubovat při 37  $^{\circ}\text{C}$ . Po vychladnutí jsme měřili absorbanci při 562 nm. Na základě naměřených hodnot byla následně sestavena kalibrační křivka (viz Obr. 7).



**Obr. 7** Kalibrační křivka závislosti koncentrace BSA na absorbanci.

Výše znázorněná kalibrační křivka zobrazuje závislost koncentrace BSA na absorbanci. Z rovnice  $y = 0,001x + 0,1772$ , kde  $y$  je hodnota naměřené absorbance a  $x$  je koncentrace, vypočítáme koncentraci proteinu v  $\mu\text{g/ml}$ .  $R^2$  je korelační koeficient, který udává míru lineární závislosti mezi proměnnými, čím je dané číslo bližší 1, tím je vyšší míra spolehlivosti kalibrační křivky. Množství proteinu stanovujeme proto, abychom na něj mohli poté vztáhnout výsledky měření fluorescence, kterým zjistíme množství naakumulované testované látky.

#### 5.4.4 Měření fluorescence

Změřením fluorescence zjistíme, jaké množství fluorescenčně značeného albuminu (FITC-albuminu) a FITC-anti-VEGFR2 aptameru se naakumulovalo v buňkách.

Na 96 jamkové černé plato jsem napipetovali 100  $\mu$ l vzorku z každé jamky 24 jamkového plata (plata s buněčným lyzátem). Vzorky buněk musí být před pipetováním dobře rozpuštěny a promíchány. Poté jsme změřili fluorescenci (excitace 485 nm, emise 528 nm).

### 5.5 Viabilita buněk

Pro určení případné cytotoxicity použitých peptidických látek jsme ověřovali životaschopnost buněk při různých koncentracích FITC-albuminu a anti-VEGFR2 aptameru. Experiment jsme prováděli u obou buněčných linií (JEG-3 i HK-2).

#### 5.5.1 Princip

K určení viability se používá kolorimetrický test CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. Roztok CellTiter 96® obsahuje tetrazolovou sloučeninu označovanou jako MTS. Chemicky se jedná o [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium. MTS je přeměňován živými buňkami na barevný rozpustný produkt formazan. Při této reakci dochází k redukci MTS, které je dosaženo pomocí NADPH nebo NADH produkovaných dehydrogenázami v metabolicky aktivních buňkách. Probíhá tedy jen v životaschopných buňkách a míra zbarvení kultivačního média je přímo úměrná životaschopnosti buněk (Anonym 2018).

#### 5.5.2 Postup práce

1. Připravili jsme si suspenzi buněk o koncentraci  $1,5 \cdot 10^5$  na 1 ml. Takto připravenou suspenzi buněk je potřeba pořádně promíchat a poté napipetovat 100  $\mu$ l do každé

jamky 96 jamkového plata. Počet buněk, které se nasazují na jednu jamku, je tedy  $1,5 \cdot 10^4$ . Buňky jsme nechali 24 hodin inkubovat při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

- Další den jsme ze všech jamek odsáli médium a přidali jsme 100 µl nového média. Do jednotlivých jamek jsme přidali různé koncentrace albuminu (ředěného vodou) a Triton X (toxická kontrola) podle Obr. 8. Podle Obr. 9 jsme přidali různé koncentrace anti-VEGFR2 aptameru (ředěného vodou) a opět Triton X. Poté jsme dali plata inkubovat po dobu 24 hodin.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	500 µg/ml	○	○	○	5 µg/ml	○	○	○	○	○	○
C	○	250 µg/ml	○	○	○	1 µg/ml	○	○	○	○	○	○
D	○	100 µg/ml	○	○	○	Triton X	○	○	○	○	○	○
E	○	50 µg/ml	○	○	○	UT=rozpouštědlo	○	○	○	○	○	○
F	○	25 µg/ml	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	10 µg/ml	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

**Obr. 8** Rozložení 96 jamkového plata pro stanovení případné cytotoxicity albuminu.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	50 µg/ml	○	○	○	Triton X	○	○	○	○	○	○
C	○	25 µg/ml	○	○	○	UT=rozpouštědlo	○	○	○	○	○	○
D	○	10 µg/ml	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	5 µg/ml	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	2,5 µg/ml	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	1 µg/ml	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

**Obr. 9** Rozložení 96 jamkového plata pro stanovení případné cytotoxicity anti-VEGFR2 aptameru.

3. Po uplynutí této doby jsme do každé jamky přidali 20  $\mu$ l CellTiteru 96<sup>®</sup> a nechali jsme buňky inkubovat 90 minut. Poté jsme změřili absorbanci při 490 nm a vyhodnotili jsme získaná data.

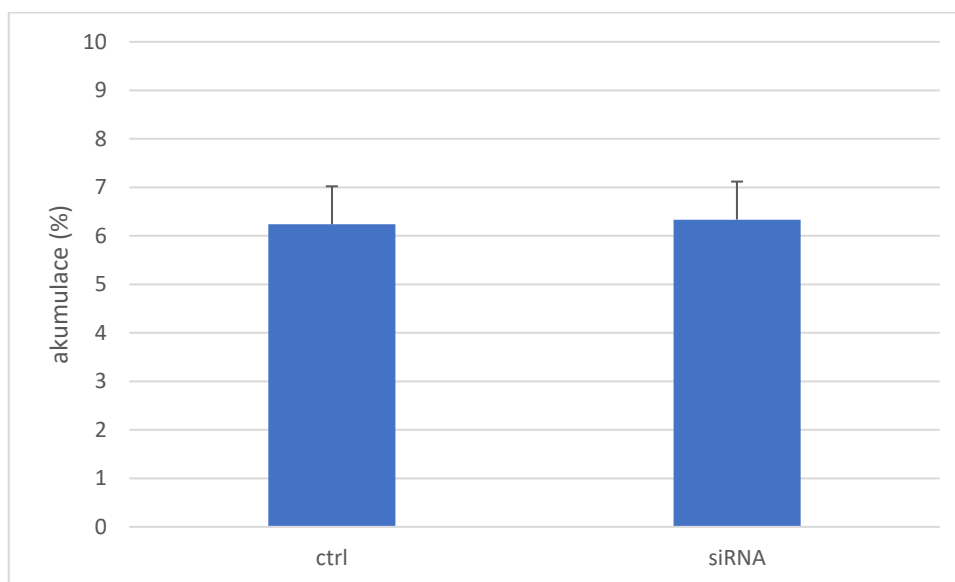
## 6 Výsledky

### 6.1 Vyhodnocení akumulčních studií

K vyhodnocení akumulčních studií jsme použili změření absorbance a fluorescence. Změřením absorbance jsme zjistili celkové množství proteinu v jednotlivých jamkách, abychom mohli následně výsledky měření fluorescence vztáhnout na množství proteinu v jednotlivých jamkách. Je to potřeba pro eliminaci chyby z toho důvodu, že by v některé jamce bylo více buněk a tím pádem i větší množství proteinu. Změřením fluorescence zjistíme množství naakumulované fluorescenčně značené látky.

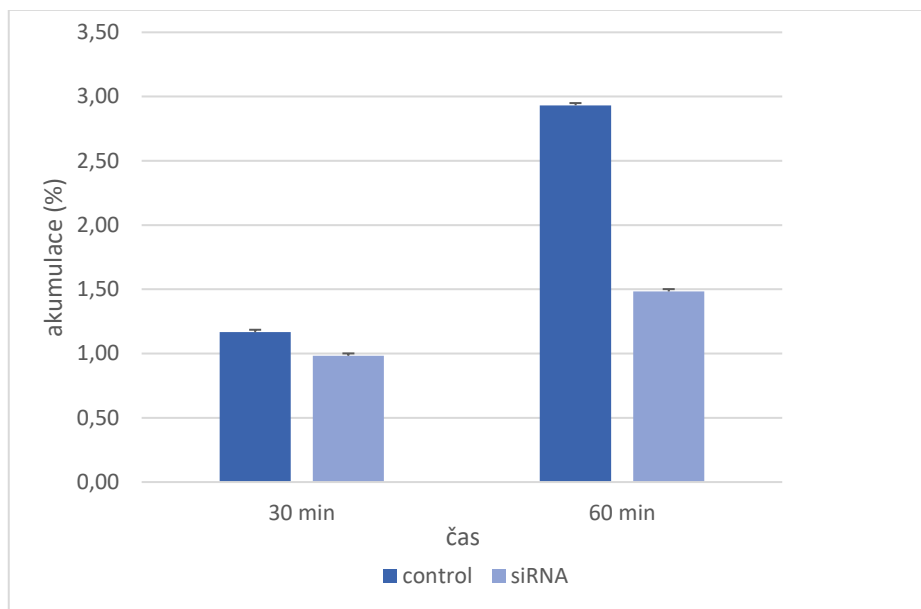
Pro vyhodnocení akumulace FITC-albuminu i FITC-anti-VEGFR2 aptameru postupujeme stejným způsobem. Výsledky jsou znázorněny jako procentuální akumulace původního roztoku, který byl použit k akumulčním studiím.

#### 6.1.1 Vyhodnocení akumulace albuminu



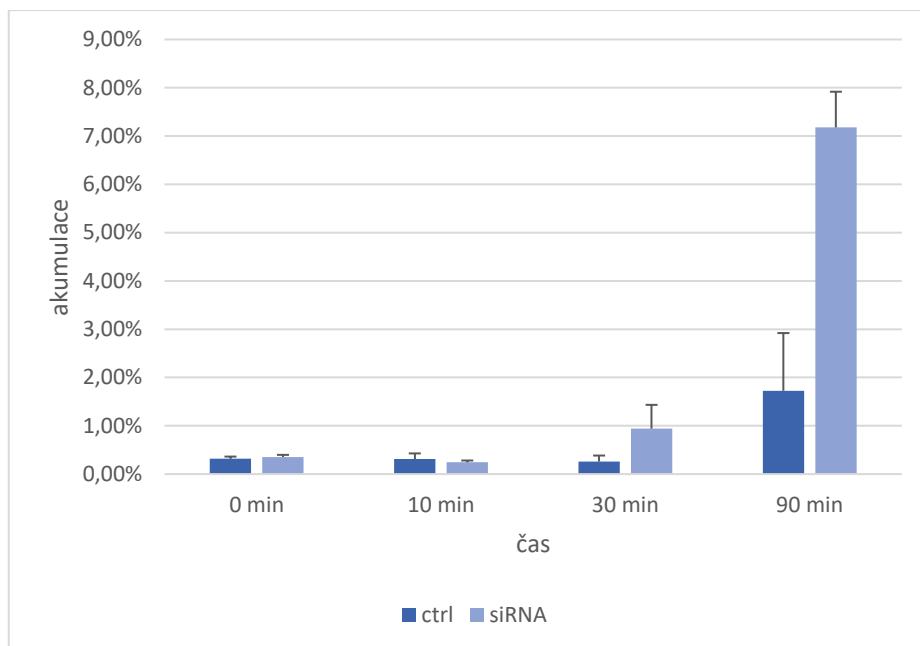
**Obr. 10** Akumulace FITC-albuminu u buněčné linie JEG-3 po 90 minutách inkubace.

Z prvního experimentu, jehož výsledky jsou znázorněny na Obr. 10, vidíme, že u transfekovaných buněk vychází akumulace o něco vyšší, ačkoliv téměř neznatelně. Ovšem výsledky jsou zatíženy větší chybou, než je velikost rozdílu, takže můžeme předpokládat, že v tomto případě nedošlo k žádné změně v akumulaci.



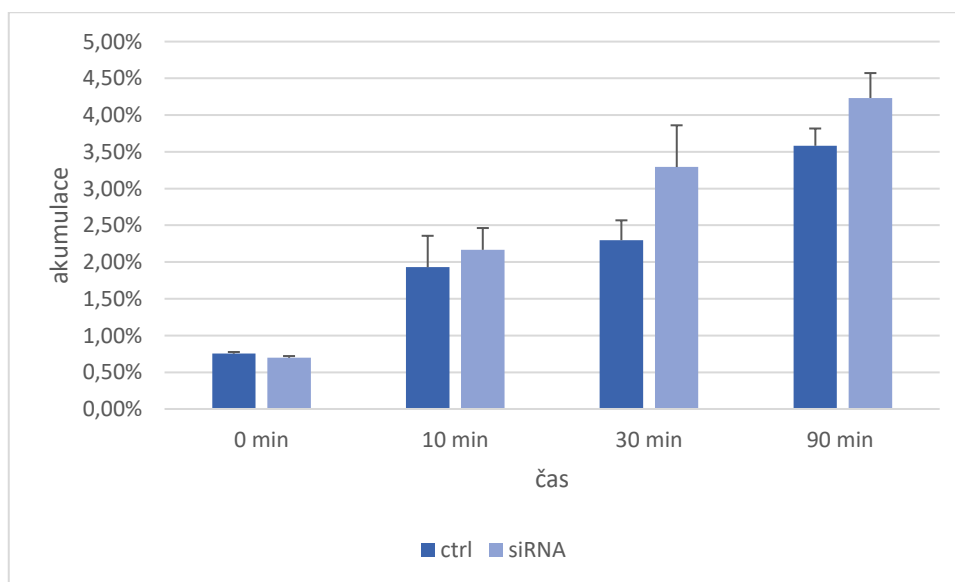
**Obr. 11** Akumulace FITC-albuminu u buněčné linie JEG-3.

Následně jsme se zaměřili na testování kratších intervalů. Obr. 11 nám ukazuje, že se akumulace albuminu u buněk transfekovaných siLRP2 (po inkubaci 60 a 30 minut) snížila oproti kontrolním buňkám.



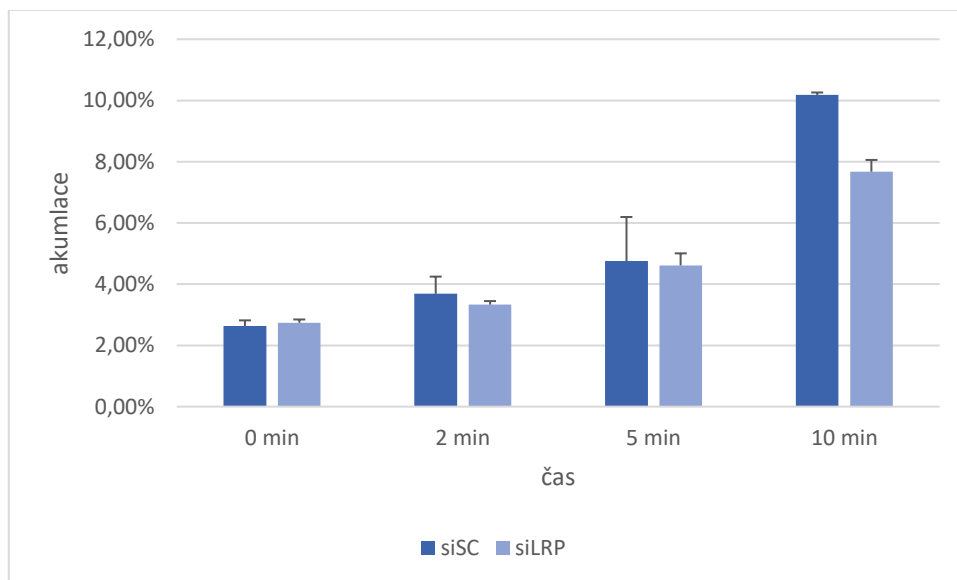
**Obr. 12** Akumulace FITC-albuminu u buněčné linie JEG-3.

Na Obr. 12 vidíme, že akumulace u transfekovaných buněk se snížila pouze v 10. minutě. U časů inkubace 30 a 90 minut se albumin dostává do buněk v podstatně větším množství než u kontrolních buněk.



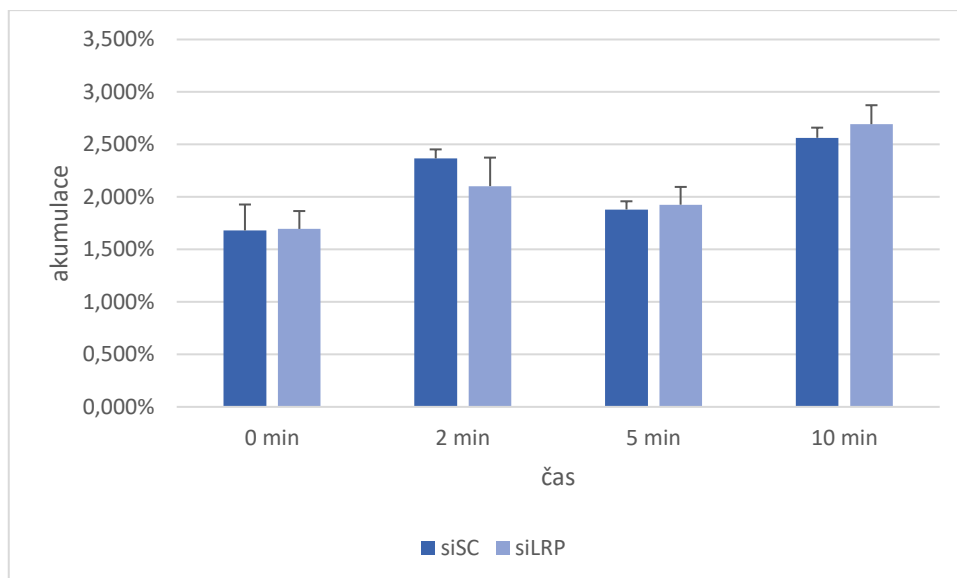
**Obr. 13** Akumulace FITC-albuminu u buněčné linie HK-2.

Z Obr. 13 je patrné, že akumulace postupně narůstá. Pouze v prvním časovém intervalu je u buněk transfekovaných nižší než u kontrolních. Od 10. minuty se však akumulace albuminu u transfekovaných buněk zvyšuje oproti akumulaci u kontrolních buněk.



**Obr. 14** Akumulace FITC-albuminu u buněčné linie JEG-3.

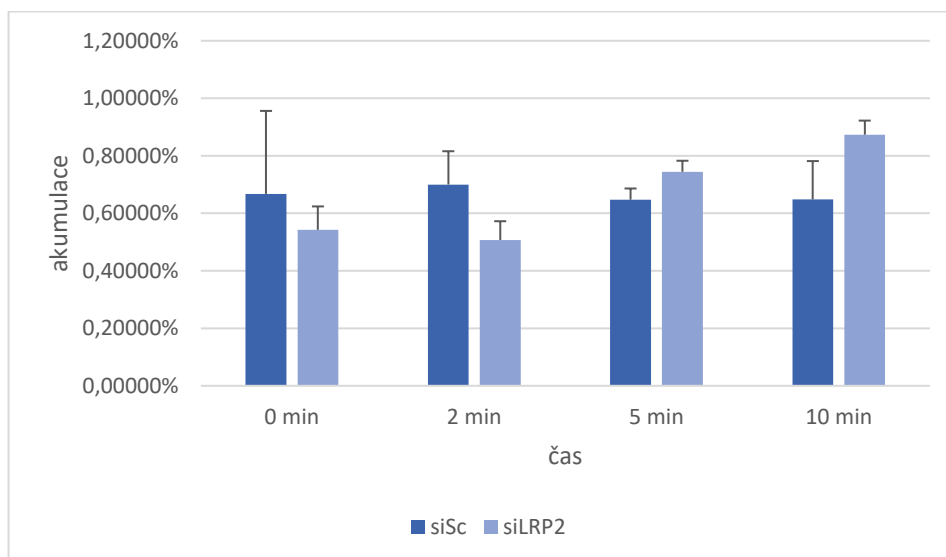
U následujících pokusů jsme pro eliminace efektu transfekce změnili způsob přípravy kontrolních buněk, a to za použití transfekce pomocí siSc, která slouží jako negativní kontrola. Na Obr. 14 vidíme, že akumulace postupně narůstá v závislosti na čase inkubace. U transfekovaných buněk pomocí siLRP2 je však akumulace albuminu nižší než u kontrolních buněk transfekovaných pomocí siSc.



**Obr. 15** Akumulace FITC-albuminu u buněčné linie HK-2.

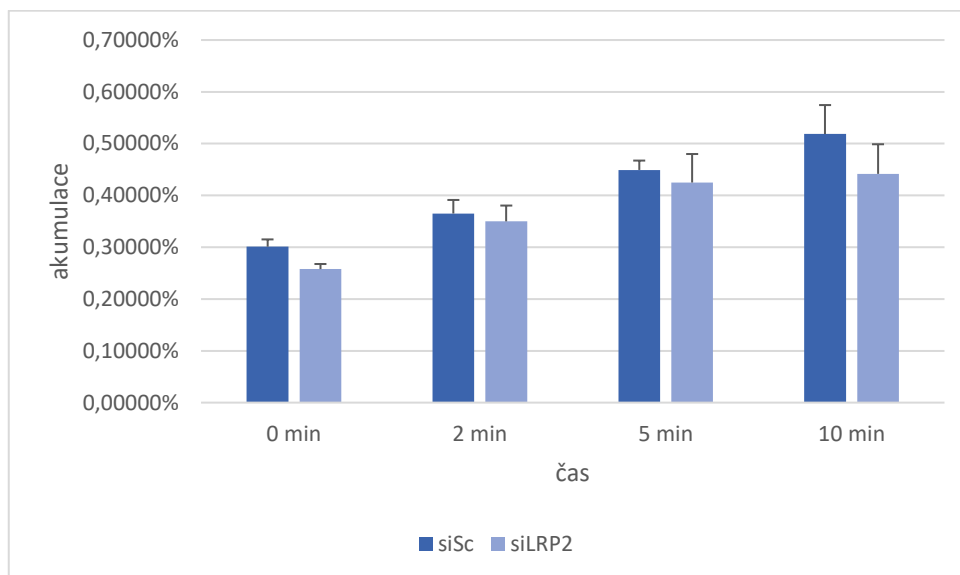
Obr. 15 nám ukazuje kolísání akumulace albuminu. Pouze ve 2. minutě byla pozorována mírně nižší akumulace albuminu u buněk transfekovaných siLRP2. V ostatních případech nebyl pozorován žádný rozdíl v akumulaci.

### 6.1.2 Vyhodnocení akumulace anti-VEGFR2 aptameru



**Obr. 16** Akumulace FITC-anti-VEGFR2 aptameru u buněčné linie JEG-3.

Na Obr. 16 vidíme, že množství naakumulovaného anti-VEGFR2 aptameru se u kontrolních buněk nijak zvlášť nemění s časem. U transfekovaných buněk pomocí siLRP2 se akumulace od druhé minuty s časem zvyšuje.

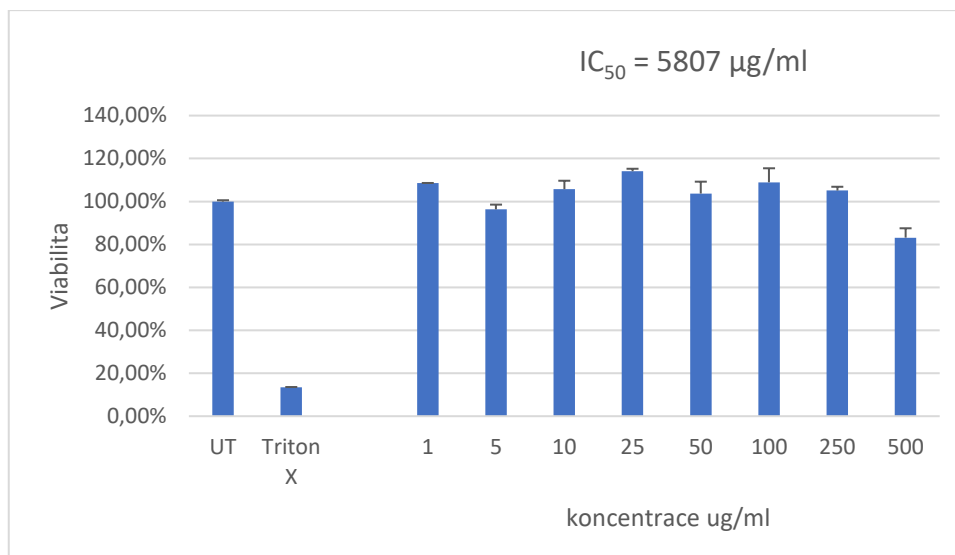


**Obr. 17** Akumulace FITC-anti-VEGFR2 aptameru u buněčné linie HK-2.

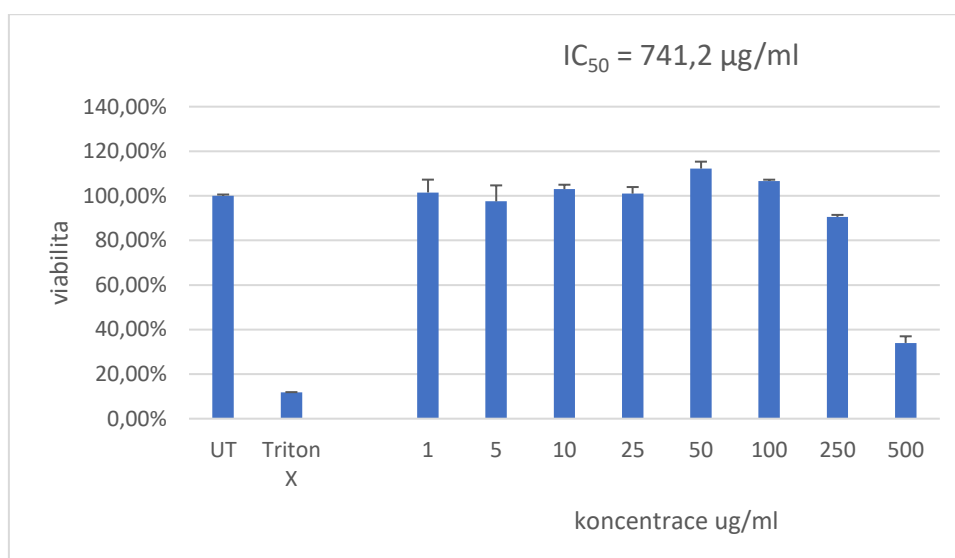
Z Obr. 17 je patrné, že akumulace anti-VEGFR2 aptameru se s časem zvyšuje. U kontrolních buněk transfekovaných pomocí siSc je akumulace anti-VEGFR2 aptameru vyšší než u transfekovaných pomocí siLRP2.

## 6.2 Vyhodnocení buněčné viability

K vyhodnocení viability jsme opět použili změření absorbance, z kterého zjistíme množství životaschopných buněk při použití jednotlivých koncentrací testovaných peptidických látek. Pro eliminaci toxického efektu rozpouštědla na něj byly všechny výsledky vztaženy. Hodnoty  $IC_{50}$  (koncentrace látky, která je schopná snížit viabilitu buněk o 50 %) byly stanoveny s využitím počítačového programu GraphPad Prism 8.

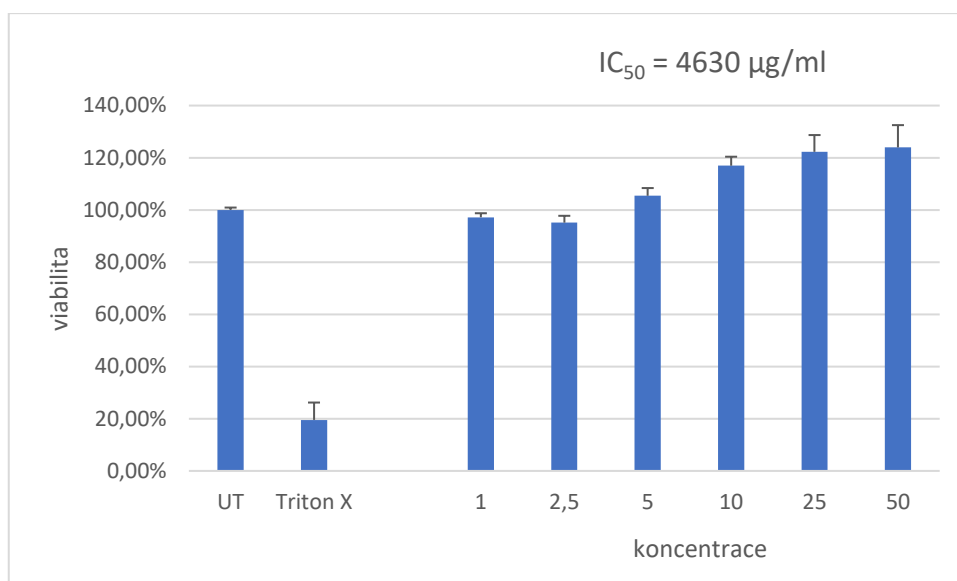


**Obr. 18** Určení viability u buněčné linie JEG-3 po 48 hodinovém působení albuminu.

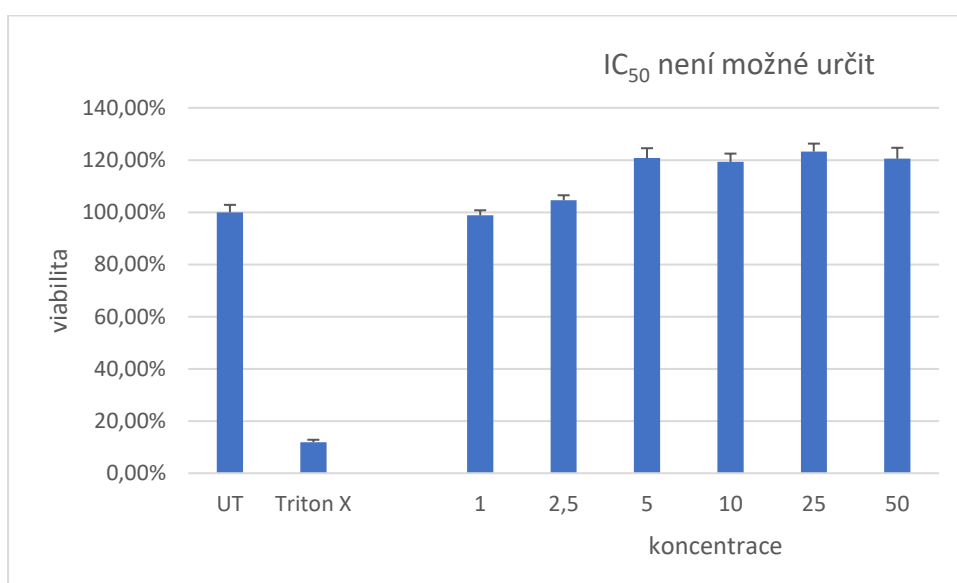


**Obr. 19** Určení viability u buněčné linie HK-2 po 48 hodinovém působení albuminu.

Triton X je pro buňky toxický a slouží tedy jako negativní kontrola. Z Obr. 18 a Obr. 19 můžeme vidět, že pro tyto buňky začíná být albumin toxický až v koncentraci 500 µg/ml. Námi používaná koncentrace v akumulčních studiích 25 µg/ml je jak pro buněčnou linii JEG-3, tak pro buněčnou linii HK-2 naprosto netoxická.



**Obr. 20** Určení viability u buněčné linie JEG-3 po 48 hodinovém působení anti-VEGFR2 aptameru.



**Obr. 21** Určení viability u buněčné linie HK-2 po 48 hodinovém působení anti-VEGFR2 aptameru.

Na Obr. 20 a Obr. 21 slouží opět jako negativní kontrola Triton X. Žádná koncentrace anti-VEGFR2 aptameru použitá v tomto pokusu není pro buňky toxická. Námí používaná koncentrace v akumulčních studiích 25 µg/ml je tedy pro obě buněčné linie naprosto netoxická.

## 7 Diskuze

Megalin (LRP2) je glykoprotein, který je primárně exprimován na apikální straně polarizovaných epiteliálních buněk (Fisher a Howie 2006). Jedná se o receptor, který zprostředkovává internalizaci svých substrátů do buněk pomocí endocytózy (Suzuki et al. 2013). Mezi jeho hlavní fyziologické funkce patří tubulární reabsorpce glomerulárně filtrovaného albuminu a dalších nízkomolekulárních proteinů v ledvinách (De et al. 2014). Albumin je nejhojněji zastoupeným proteinem v krevní plazmě, kde slouží k udržování onkotického tlaku (tlaku, který brání úniku tekutiny mimo cévy) a funguje zde jako nosič mnoha endogenních a exogenních sloučenin (Fanali et al. 2012).

Metodou transfekce (konkrétně lipofekce) pomocí siRNA proti *LRP2* jsme se snažili snížit expresi genu, který kóduje tento glykoprotein. Snížení exprese *LRP2* jsme zkoumali pomocí změny akumulace albuminu u transfekovaných a kontrolních buněk. Jako kontrola nám sloužily jednak buňky netransfekované a jednak buňky transfekované siSc (scrambled siRNA).

Nejprve jsme se zabývali vlivem snížení exprese transportéru *LRP2* na schopnost buněk akumulovat standardní substrát megalinu, fluorescenčně značený albumin (FITC-albumin). Tento efekt byl zkoumán na dvou buněčných liniích exprimujících *LRP2*, a to na ledvinné HK-2 linii a na placentárních buňkách JEG-3.

Akumulaci jsme prováděli v různých časových intervalech. V prvním pokusu jsme nechali buňky s FITC-albuminem inkubovat 90 minut. Z Obr. 10 je patrné, že akumulace u transfekovaných buněk vychází mírně vyšší než u kontrolních. Avšak vzhledem k velikosti odchylek je jisté, že pokus byl zatížen značnou chybou. Lze tedy předpokládat, že v tomto případě nedošlo k žádné změně v akumulaci. V dalších pokusech jsme se zaměřili na testování kratší intervalů. Inkubaci jsme prováděli 30 a 60 minut. Na Obr. 11 můžeme vidět, že se akumulace u buněk transfekovaných siLRP2 oproti kontrolním buňkám snížila, což potvrdilo naše očekávání, že vlivem sníženého množství megalinu v buňkách bude docházet k nižší akumulaci jeho substrátu.

Následně jsme zkoušeli i další časové intervaly inkubace 90, 30, 10 a 0 minut. Obr. 12 nám ukazuje, že se akumulace u transfekovaných JEG-3 buněk snížila pouze v 10. minutě. U ostatních časů inkubace se albumin dostává do buněk v podstatně větším množství než u kontrolních buněk. Podobné je to na Obr. 13 (HK-2 buněčná linie), kde se

od 30. minuty akumulace albuminu u transfekovaných buněk razantně zvyšuje oproti akumulaci u kontrolních buněk. Zvýšení akumulace u buněk transfekovaných pomocí siLRP2 mohlo být způsobeno vlivem transfekčního činidla. Jako kontrola byl v tomto experimentu použit pouze Opti-MEM.

Abychom eliminovali efekt transfekce, u dalších pokusů jsme změnilí přípravu kontrolních buněk. V prvních pokusech jsme u metody transfekce jako kontrolu používali pouze doplnění objemu médiem Opti-MEM. V dalších pokusech jsme jako kontrolu použili siSc (scrambled). Jedná se o úsek siRNA bez shody s jakýmkoliv lidským genem, což znamená, že sice dojde k transfekci buněk, ale nesníží se exprese žádného genu. Při použití siSc jako kontroly a časových intervalů 10, 5, 2 a 0 minut inkubace je z Obr. 14 patrné, že je akumulace u transfekovaných JEG-3 buněk pomocí siLRP2 nižší než u kontrolních.

Na Obr. 15 můžeme vidět kolísání akumulace albuminu u HK-2. Pouze ve 2. minutě dochází k mírně snížené akumulaci albuminu. V ostatních případech nebyl pozorován žádný významný rozdíl v akumulaci. V tomto případě jsme však použili linii HK-2, což může také ovlivnit studovaný efekt, protože buněčná linie HK-2 obsahuje větší množství megalinu, ani účinnost transfekce nemusí být u obou stejná. Rozdíly v akumulaci u obou linií nebyly příliš výrazné, což může být způsobeno např. stále dostatečně vysokou expresí *LRP2* nebo i v důsledku dlouhodobé životnosti a rychlé obnovy tohoto lipoproteinového receptoru (Perez Bay et al. 2016).

Výsledky nám mohl ovlivnit i pracovní postup v bodě, kdy jsme nejprve k buňkám přidávali desintegrační roztok, který je pro tento druh experimentů obecně doporučován. Dezintegrační roztok způsobil to, že struktura vzorků byla moc gelovitá a z toho důvodu nebylo pipetování přesné. Navíc je použití desintegračního roztoku nevhodné také z toho důvodu, že fluorescence může být ovlivněna i hodnotou pH, kterou desintegrační roztok mění kvůli obsahu NaOH (Fišar 2009). Proto jsme u dalšího pokusu zkoušeli jiné způsoby desintegrace buněk. Nejprve jsme použili pouze PBS a vzorky poté nechaly zmrazit, zde došlo k lýze mrazem. U ostatních pokusů jsme místo desintegračního roztoku použili pasivní lyzovací pufr (PLB) vychlazený na 4 °C a vzorky nechali přejít mrazem. Jako nejlepší se prokázal přístup využívající PLB, jelikož vzorky pak měly nejlepší konzistenci na pipetování a při jeho použití jsme naměřili nejvíce konzistentní hodnoty.

Nejprve jsme tedy pomocí známého substrátu megalinu zjistili, jaké budou nejlepší podmínky pro akumulaci a poté jsme testovali, zda je substrátem i anti-VEGFR2 aptamer. Na Obr. 16 vidíme, že u transfekovaných JEG-3 buněk pomocí siLRP2 se akumulace anti-VEGFR2 aptameru s časem zvyšuje. U kontrolních buněk transfekovaných pomocí siSc se akumulace s časem nemění. U tohoto pokusu jsme však nemohli vztáhnout množství naakumulovaného anti-VEGFR2 aptameru na celkový protein, jelikož množství proteinu nešlo určit, protože nebylo možné buněčný lyzát zhomogenizovat. Z tohoto důvodu je tedy experiment zatížen značnou chybou. Obr. 17 nám ukazuje, že akumulace anti-VEGFR2 aptameru narůstá s časem. U HK-2 buněk transfekovaných pomocí siLRP2 je akumulace nižší než u kontrolních buněk transfekovaných pomocí siSc. Tento pokus nám potvrzuje, že anti-VEGFR2 aptamer je zřejmě také substrátem pro megalin, ačkoliv je třeba ještě získané výsledky potvrdit pomocí další metody.

Námi zavedená metoda stanovování akumulace proteinových a peptidických látek do buněk přirozeně exprimujících lipoproteinový receptor megalin se jeví jako slibná pro další zkoumání, což je vzhledem k poměrně malému rozsahu doposud publikovaných informací o LRP2 transportéru velmi důležité.

V následující části práce jsme se zabývali případnou toxicitou použitého albuminu a anti-VEGFR2 aptameru na námi studované buněčné linie JEG-3 a HK-2. Na Obr. 18 a Obr. 19 můžeme pozorovat, že mírně toxická je pro buněčné linie až koncentrace albuminu 500  $\mu\text{g/ml}$ . Z Obr. 20 a Obr. 21 je vidět, že žádná použitá koncentrace anti-VEGFR2 aptameru není pro buněčné linie toxická. V našich experimentech jsme (jak u stanovení akumulace albuminu, tak i anti-VEGFR2 aptameru) použili koncentraci pouze 25  $\mu\text{g/ml}$ . Z toho vyplývá, že snížení akumulace není vyvoláno toxickým působením těchto látek.

## 8 Závěr

V této diplomové práci jsme zkoumali transport albuminu a anti-VEGFR2 aptameru pomocí ledvinného transportéru megalinu. V první části experimentu jsme se zaměřili na snížení exprese tohoto transportéru metodou transfekce pomocí siRNA proti *LRP2* genu a tím i snížení akumulace peptidických látek v buňce. Pomocí několika pokusů provedených za různých podmínek jsme stanovili ty optimální, kde se snížení exprese megalinu na funkční úrovni nejlépe potvrzuje. Akumulace použitých peptidů sice narůstá s časem, ale je menší než u kontrolních netransfekovaných buněk. Nejprve jsme tedy zjišťovali optimální podmínky pro akumulaci albuminu (známého substrátu megalinu) a poté jsme zkoušeli, zda je substrátem také anti-VEGFR2 aptamer, což se nám potvrdilo.

Ve druhé polovině experimentu jsme zjišťovali, zda použité koncentrace albuminu a anti-VEGFR2 aptameru nejsou toxické pro buněčné linie JEG-3 a HK-2. Pro buněčnou linii JEG-3 byly všechny námi použité koncentrace obou látek netoxické. U buněčné linie HK-2 se prokázala toxicita pouze u albuminu o koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$ . Námi použité koncentrace pro první část experimentu jsou pro obě buněčné linie naprosto netoxické.

## 9 Literatura

1. ANDERSEN, Olav M., Robert DAGIL a Birthe B. KRAGELUND. New horizons for lipoprotein receptors: communication by  $\beta$ -propellers. *Journal of Lipid Research* [online]. 2013, **54**(10), 2763-2774 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1194/jlr.M039545. ISSN 0022-2275. Dostupné z: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M039545>
2. BAI, Xiaoyun, Trevor F. MORAES a Reinhart A. F. REITHMEIER. Structural biology of solute carrier (SLC) membrane transport proteins. *Molecular Membrane Biology* [online]. 2018, **34**(1-2), 1-32 [cit. 2018-12-16]. DOI: 10.1080/09687688.2018.1448123. ISSN 0968-7688. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09687688.2018.1448123>
3. BALLATORI, Nazzareno. Pleiotropic Functions of the Organic Solute Transporter Ost  $\alpha$  -Ost  $\beta$  . *Digestive Diseases* [online]. 2011, **29**(1), 13-17 [cit. 2019-03-03]. DOI: 10.1159/000324123. ISSN 1421-9875. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/324123>
4. BASIOUNI, Shereen, Herbert FUHRMANN a Julia SCHUMANN. High-efficiency transfection of suspension cell lines. *BioTechniques* [online]. 2012 [cit. 2018-11-12]. DOI: 10.2144/000113914. ISSN 07366205. Dostupné z: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000113914>
5. BATTLE, Michele A., Veronica M. MAHER a J. Justin MCCORMICK. ST7 Is a Novel Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (LRP) with a Cytoplasmic Tail that Interacts with Proteins Related to Signal Transduction Pathways † . *Biochemistry*[online]. 2003, **42**(24), 7270-7282 [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.1021/bi034081y. ISSN 0006-2960. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi034081y>
6. BUCKLEY, Catherine M. a Jason S. KING. Drinking problems: mechanisms of macropinosome formation and maturation. *The FEBS Journal* [online]. 2017, **284**(22),

- 3778-3790 [cit. 2019-03-04]. DOI: 10.1111/febs.14115. ISSN 1742464X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.14115>
7. CARTHEW, Richard W. a Erik J. SONTHEIMER. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* [online]. 2009, **136**(4), 642-655 [cit. 2018-11-12]. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.035. ISSN 00928674. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286740900083X>.
  8. CASARTELLI, M., G. CERMENATI, S. RODIGHIERO, F. PENNACCHIO a B. GIORDANA. A megalin-like receptor is involved in protein endocytosis in the midgut of an insect ( *Bombyx mori* , Lepidoptera). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* [online]. 2008, **295**(4), R1290-R1300 [cit. 2019-03-04]. DOI: 10.1152/ajpregu.00036.2008. ISSN 0363-6119. Dostupné z: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00036.2008>
  9. CASES, Olivier, Antoine OBRY, Sirine BEN-YACOUB, et al. Impaired vitreous composition and retinal pigment epithelium function in the FoxG1::LRP2 myopic mice: Impaired vitreous composition and retinal pigment epithelium function in the FoxG1::LRP2 myopic mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2017, **1863**(6), 1242-1254 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.03.022. ISSN 09254439. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443917301096>
  10. COSSART, P. a A. HELENIUS. Endocytosis of Viruses and Bacteria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2014, **6**(8), a016972-a016972 [cit. 2019-03-04]. DOI: 10.1101/cshperspect.a016972. ISSN 1943-0264. Dostupné z: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a016972>
  11. DANIEL, Hannelore a Isabel RUBIO-ALIAGA. An update on renal peptide transporters. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* [online]. 2003, **284**(5), F885-F892 [cit. 2019-03-07]. DOI: 10.1152/ajprenal.00123.2002. ISSN 1931-857X. Dostupné z: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.00123.2002>
  12. DE, Shankhajit, Shoji KUWAHARA a Akihiko SAITO. The Endocytic Receptor Megalin and its Associated Proteins in Proximal Tubule Epithelial Cells. *Membranes* [online]. 2014, **4**(3), 333-355 [cit. 2018-12-30]. DOI:

10.3390/membranes4030333. ISSN 2077-0375. Dostupné z:  
<http://www.mdpi.com/2077-0375/4/3/333>

13. FANALI, Gabriella, Alessandra DI MASI, Viviana TREZZA, Maria MARINO, Mauro FASANO a Paolo ASCENZI. Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2012, **33**(3), 209-290 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1016/j.mam.2011.12.002. ISSN 00982997. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299711000896>
14. FANG, Evandro Fei, Chris Zhi Yi ZHANG, Lin ZHANG, et al. Trichosanthin Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation in Both Cell Lines and Nude Mice by Promotion of Apoptosis. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(9) [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1371/journal.pone.0041592. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0041592>
15. FARQUHAR, MARILYN G., DONTSCHO KERJASCHKI, MARITA LUNDSTROM a ROBERT A. ORLANDO. Gp330 and RAP: The Heymann Nephritis Antigenic Complex. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 1994, **737**(1 Biology of 2-), 96-113 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb44304.x. ISSN 0077-8923. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1994.tb44304.x>
16. FISHER, Carolyn E. a Sarah E.M. HOWIE. The role of megalin (LRP-2/Gp330) during development. *Developmental Biology* [online]. 2006, **296**(2), 279-297 [cit. 2018-12-06]. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.06.007. ISSN 00121606. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160606009067>
17. FOER, D., M. ZHU, R. L. CARDONE, et al. Impact of gain-of-function mutations in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) on glucose and lipid homeostasis. *Osteoporosis International* [online]. 2017, **28**(6), 2011-2017 [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.1007/s00198-017-3977-4. ISSN 0937-941X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00198-017-3977-4>
18. FRANKE, Ryan M, Lisa A SCHERKENBACH a Alex SPARREBOOM. Pharmacogenetics of the organic anion transporting polypeptide 1A2. *Pharmacogenomics* [online]. 2009, **10**(3), 339-344 [cit. 2019-03-18]. DOI:

10.2217/14622416.10.3.339. ISSN 1462-2416. Dostupné z:  
<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/14622416.10.3.339>

19. FUCHS, Charles S, Jiri TOMASEK, Cho Jae YONG, et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* [online]. 2014, **383**(9911), 31-39 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61719-5. ISSN 01406736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673613617195>
20. GHUMAN, Jamie, Patricia A. ZUNSZAIN, Isabelle PETITPAS, Ananyo A. BHATTACHARYA, Masaki OTAGIRI a Stephen CURRY. Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2005, **353**(1), 38-52 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.07.075. ISSN 00222836. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283605008855>
21. HAN, Na Rae, Hyun LEE, Song BAEK, Jung Im YUN, Kyu Hyun PARK a Seung Tae LEE. Delivery of episomal vectors into primary cells by means of commercial transfection reagents. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2015, **461**(2), 348-353 [cit. 2018-11-12]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.04.037. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X15007032>
22. HANDING, Katarzyna B., Ivan G. SHABALIN, Omar KASSAAR, Siavash KHAZAIPOUL, Claudia A. BLINDAUER, Alan J. STEWART, Maksymilian CHRUSZCZ a Wlodek MINOR. Circulatory zinc transport is controlled by distinct interdomain sites on mammalian albumins. *Chemical Science* [online]. 2016, **7**(11), 6635-6648 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1039/C6SC02267G. ISSN 2041-6520. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6SC02267G>
23. HORIBE, Tomohisa, Aya TORISAWA, Ryutaro AKIYOSHI, Yoko HATTA-OHASHI, Hirobumi SUZUKI a Koji KAWAKAMI. Transfection efficiency of normal and cancer cell lines and monitoring of promoter activity by single-cell bioluminescence imaging. *Luminescence* [online]. 2014, **29**(1), 96-100 [cit. 2018-11-12]. DOI: 10.1002/bio.2508. ISSN 15227235. Dostupné z:

<http://doi.wiley.com/10.1002/bio.2508> moter activity by single-cell bioluminescence imaging. *Luminescence* **29**:96-100

24. HÖCK, Julia a Gunter MEISTER. The Argonaute protein family. *Genome Biology* [online]. 2008, **9**(2) [cit. 2019-03-13]. DOI: 10.1186/gb-2008-9-2-210. ISSN 1465-6906. Dostupné z: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2008-9-2-210>
25. HOLMES, Katherine, Owain LI ROBERTS, Angharad M. THOMAS a Michael J. CROSS. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular Signalling* [online]. 2007, **19**(10), 2003-2012 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1016/j.cellsig.2007.05.013. ISSN 08986568. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656807001532>
26. CHOW, Yu Ting, Shuxun CHEN, Ran WANG, Chichi LIU, Chi-wing KONG, Ronald A. LI, Shuk Han CHENG a Dong SUN. Single Cell Transfection through Precise Microinjection with Quantitatively Controlled Injection Volumes. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1) [cit. 2019-03-11]. DOI: 10.1038/srep24127. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/srep24127>
27. CHRISTENSEN, Erik Ilso a Henrik BIRN. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2002, **3**(4), 258-267 [cit. 2019-02-28]. DOI: 10.1038/nrm778. ISSN 1471-0072. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrm778>
28. KAESTNER, Lars, Anke SCHOLZ a Peter LIPP. Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2015, **25**(6), 1171-1176 [cit. 2018-11-12]. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.01.018. ISSN 0960894X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X1500030X>
29. KANG, David E., Claus U. PIETRZIK, Larry BAUM, et al. Modulation of amyloid  $\beta$ -protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2000, **106**(9), 1159-1166 [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.1172/JCI11013. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/11013>

30. KIM, Bongjune, Jaemoon YANG, Myeonghwan HWANG, et al. Aptamer-modified magnetic nanoprobe for molecular MR imaging of VEGFR2 on angiogenic vasculature. *Nanoscale Research Letters* [online]. 2013, **8**(1) [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1186/1556-276X-8-399. ISSN 1556-276X. Dostupné z: <http://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-399>
31. KLAASSEN, C. D. a L. M. ALEKSUNES. Xenobiotic, Bile Acid, and Cholesterol Transporters: Function and Regulation. *Pharmacological Reviews* [online]. 2010, **62**(1), 1-96 [cit. 2018-12-16]. DOI: 10.1124/pr.109.002014. ISSN 0031-6997. Dostupné z: <http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/pr.109.002014>
32. KOKUBU, C. Skeletal defects in ringelschwanz mutant mice reveal that Lrp6 is required for proper somitogenesis and osteogenesis. *Development* [online]. 2004, **131**(21), 5469-5480 [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.1242/dev.01405. ISSN 0950-1991. Dostupné z: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.01405>
33. KUR, Esther, Nora MECKLENBURG, Robert M. CABRERA, Thomas E. WILLNOW a Annette HAMMES. LRP2 mediates folate uptake in the developing neural tube. *Journal of Cell Science* [online]. 2014, **127**(10), 2261-2268 [cit. 2018-11-12]. DOI: 10.1242/jcs.140145. ISSN 0021-9533. Dostupné z: <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.140145>.
34. LEE, Philbert a Xiaoyang WU. Review: Modifications of Human Serum Albumin and their Binding Effect. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2015, **21**(14), 1862-1865 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.2174/1381612821666150302115025. ISSN 13816128. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1381-6128&volume=21&issue=14&spage=1862>
35. LEUNG, Ray K.M. a Paul A. WHITTAKER. RNA interference: From gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2005, **107**(2), 222-239 [cit. 2018-11-12]. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2005.03.004. ISSN 01637258. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725805000628>
36. LOCKE, S.M. a R.A. MARTIENSSEN. Slicing and Spreading of Heterochromatic Silencing by RNA Interference. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* [online]. 2006, **71**, 497-503 [cit. 2019-03-13]. DOI: 10.1101/sqb.2006.71.062.

ISSN 0091-7451. Dostupné z:  
<http://symposium.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/sqb.2006.71.062>

37. MACRAE IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD and Doudna JA (2006) Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science* **311**:195 -198 [cit. 2019-05-12]. DOI: 10.1126/science.1121638. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1121638>
38. MAHADEVAPPA, Ravikiran, Rikke NIELSEN, Erik Ilsø CHRISTENSEN a Henrik BIRN. Megalin in acute kidney injury: foe and friend. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* [online]. 2014, **306**(2), F147-F154 [cit. 2018-12-06]. DOI: 10.1152/ajprenal.00378.2013. ISSN 1931-857X. Dostupné z: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajprenal.00378.2013>
39. MCCARTHY, R. A. Megalin and the neurodevelopmental biology of sonic hedgehog and retinol. *Journal of Cell Science* [online]. 2003, **116**(6), 955-960 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1242/jcs.00313. ISSN 00219533. Dostupné z: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.00313>
40. NIMJEE, Shahid M., Rebekah R. WHITE, Richard C. BECKER a Bruce A. SULLENGER. Aptamers as Therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [online]. 2017, **57**(1), 61-79 [cit. 2019-04-13]. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558. ISSN 0362-1642. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558>
41. PALCHETTI, Sara, Daniela POZZI, Cristina MARCHINI, et al. Manipulation of lipoplex concentration at the cell surface boosts transfection efficiency in hard-to-transfect cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* [online]. 2017, **13**(2), 681-691 [cit. 2018-12-06]. DOI: 10.1016/j.nano.2016.08.019. ISSN 15499634. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963416301319>
42. PALMERSTON MENDES, Livia, Jiayi PAN a Vladimir TORCHILIN. Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy. *Molecules* [online]. 2017, **22**(9) [cit. 2019-03-01]. DOI: 10.3390/molecules22091401. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/9/1401>

43. PEREZ BAY, Andres E., Ryan SCHREINER, Ignacio BENEDICTO, Maria PAZ MARZOLO, Jason BANFELDER, Alan M. WEINSTEIN a Enrique J. RODRIGUEZ-BOULAN. The fast-recycling receptor Megalin defines the apical recycling pathway of epithelial cells. *Nature Communications* [online]. 2016, **7**(1) [cit. 2019-05-14]. DOI: 10.1038/ncomms11550. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ncomms11550>
44. QIU, Shenfeng, Kimberly M. KORWEK a Edwin J. WEEBER. A fresh look at an ancient receptor family: Emerging roles for low density lipoprotein receptors in synaptic plasticity and memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory* [online]. 2006, **85**(1), 16-29 [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.1016/j.nlm.2005.08.009. ISSN 10747427. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074742705000766>
45. REVERDATTO, Sergey, David BURZ a Alexander SHEKHTMAN. Peptide Aptamers: Development and Applications. *Current Topics in Medicinal Chemistry* [online]. 2015, **15**(12), 1082-1101 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.2174/1568026615666150413153143. ISSN 15680266. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=15&issue=12&spage=1082>
46. RÖTHER, Susanne a Gunter MEISTER. Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. *Biochimie* [online]. 2011, **93**(11), 1905-1915 [cit. 2018-12-06]. DOI: 10.1016/j.biochi.2011.07.032. ISSN 03009084. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908411002902>
47. RUBIO-ALIAGA, Isabel a Hannelore DANIEL. Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery. *Trends in Pharmacological Sciences* [online]. 2002, **23**(9), 434-440 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1016/S0165-6147(02)02072-2. ISSN 01656147. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614702020722>
48. SHEU-GRUTTADAURIA, Jessica a Ian J. MACRAE. Structural Foundations of RNA Silencing by Argonaute. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2017, **429**(17), 2619-2639 [cit. 2019-03-11]. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.07.018. ISSN 00222836. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283617303686>

49. SONG, Min-Sun a John J. ROSSI. Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *Biochemical Journal* [online]. 2017, **474**(10), 1603-1618 [cit. 2019-03-11]. DOI: 10.1042/BCJ20160759. ISSN 0264-6021. Dostupné z: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BCJ20160759>
50. STEVENSON, David J., Frank J. GUNN-MOORE, Paul CAMPBELL a Kishan DHOLAKIA. Single cell optical transfection. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2010, **7**(47), 863-871 [cit. 2019-03-11]. DOI: 10.1098/rsif.2009.0463. ISSN 1742-5689. Dostupné z: <http://www.royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsif.2009.0463>
51. STORM, Tina, Steffen HEEGAARD, Erik I. CHRISTENSEN a Rikke NIELSEN. Megalin-deficiency causes high myopia, retinal pigment epithelium-macromelanosomes and abnormal development of the ciliary body in mice. *Cell and Tissue Research* [online]. 2014, **358**(1), 99-107 [cit. 2018-12-06]. DOI: 10.1007/s00441-014-1919-4. ISSN 0302-766X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00441-014-1919-4>
52. SUGIYAMA, Takuya, Hidetoshi KUMAGAI, Yoshihiro MORIKAWA, et al. A Novel Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Mediating Cellular Uptake of Apolipoprotein E-Enriched  $\beta$ -VLDL in Vitro † , ‡ . *Biochemistry* [online]. 2000, **39**(51), 15817-15825 [cit. 2019-03-23]. DOI: 10.1021/bi001583s. ISSN 0006-2960. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi001583s>
53. SUZUKI, Takahiro, Hiroaki YAMAGUCHI, Jiro OGURA, Masaki KOBAYASHI, Takehiro YAMADA a Ken ISEKI. Megalin Contributes to Kidney Accumulation and Nephrotoxicity of Colistin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2013, **57**(12), 6319-6324 [cit. 2018-12-06]. DOI: 10.1128/AAC.00254-13. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.00254-13>
54. TERADA, Tomohiro a Ken-ichi INUI. (Section A: Molecular, Structural, and Cellular Biology of Drug Transporters) Peptide Transporters. *Current Drug Metabolism* [online]. 2004, **5**(1), 85-94 [cit. 2019-03-08]. DOI: 10.2174/1389200043489153. ISSN 13892002. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2002&volume=5&issue=1&spage=85>

55. WU, Jiangyu, Weizhe HUANG a Ziyang HE. Dendrimers as Carriers for siRNA Delivery and Gene Silencing: A Review. *The Scientific World Journal* [online]. 2013, **2013**, 1-16 [cit. 2018-12-06]. DOI: 10.1155/2013/630654. ISSN 1537-744X. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/630654/>
56. XIA, Yuqiong, Jie TIAN a Xiaoyuan CHEN. Effect of surface properties on liposomal siRNA delivery. *Biomaterials* [online]. 2016, **79**, 56-68 [cit. 2018-11-26]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.056. ISSN 01429612. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961215009667>
57. YASSEEN, Zeyad J a Maher O EL GHOSAIN. Studies on Binding of Widely used Drugs with Human Serum Albumin at Different Temperatures and pHs. *Journal of Biomedical Sciences* [online]. 2016, **5**(3) [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.4172/2254-609X.100033. ISSN 2254609X. Dostupné z: <http://www.jbiomed.com/biomedical-sciences/studies-on-binding-of-widely-used-drugs-with-human-serum-albumin-at-different-temperatures-and-phs.php?aid=9467>
58. ZHAI, Xiao Yue, Rikke NIELSEN, Henrik BIRN, et al. Cubilin- and megalin-mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney. *Kidney International* [online]. 2000, **58**(4), 1523-1533 [cit. 2019-03-24]. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.00314.x. ISSN 00852538. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815472515>
59. ZHONG, Xiaomin, Dongmei ZHANG, Minmin XIONG a Lin ZHANG. Noncoding RNA for Cancer Gene Therapy. WALTHER, Wolfgang, ed. *Current Strategies in Cancer Gene Therapy* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016, 2016-01-19, s. 51-60 [cit. 2019-03-13]. Recent Results in Cancer Research. DOI: 10.1007/978-3-319-42934-2\_4. ISBN 978-3-319-42932-8. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-42934-2\\_4](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-42934-2_4)

## WEBOVÉ REFERENCE

60. Anonym. CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS). In: *Promega Corporation* [online]. 2018. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and->

cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-  
\_mts\_/?catNum=G3582. Přístup 13.5.2019

61. Anonym. Endocytosis. In: *BioEdu* [online]. 2014a. Dostupné z: <https://biologicalmembranetransport.weebly.com/endocytosis.html#>. Přístup 6.5.2019
62. Anonym. Transgenoze a klonování živočichů. In: *Slide Serve* [online]. 2014b. Dostupné z: <https://www.slideserve.com/duaa/transgenoze-a-klonov-n-ivo-ich>. Přístup 25.3.2019
63. FIŠAR, Zdeněk. *FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH: Principy fluorescenční spektroskopie* [online]. 2009. ISSN 1803-6619. Dostupné z <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>. Přístup 5.5.2019
64. KOHLER G. JEG-3 (ATCC® HTB-36™). In: *ATCC-LGC Standards Partnership* [online]. 2016. Dostupné z: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-36.aspx#characteristics> Přístup 25.3.2019
65. ZAGER RA. HK-2 (ATCC® CRL-2190™). In: *ATCC-LGC Standards Partnership* [online]. 2016. Dostupné z: [http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2190.aspx?geo\\_country=cz#generalinformation](http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2190.aspx?geo_country=cz#generalinformation). Přístup 25.3.2019