



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

NANOTRANSPORTÉRY PRO TERANOSTICKÉ APLIKACE

NANOTRANSPORTERS FOR THERANOSTICS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. SIMONA DOSTÁLOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. RENÉ KIZEK, Ph.D.

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor
Biomedicínské inženýrství a bioinformatika

Studentka: Bc. Simona Dostálová

ID: 125018

Ročník: 2

Akademický rok: 2013/2014

NÁZEV TÉMATU:

Nanotransportéry pro teranostické aplikace

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši o současném stavu teranostického výzkumu a možnostech uplatnění virových kapsid a dalších nanočástic v tomto oboru. 2) Prostudujte možnosti virových kapsid, proteinů a anorganických sloučenin jako nanotransportérů léčiv. 3) Charakterizujte proteinovou architekturu virové kapsidy pomocí analytických a molekulárně-biologických metod. 4) Prakticky ověřte možnosti enkapsulace léčiva do vybraného nanotransportéru. 5) Porovnejte schopnosti virového a proteinového nanotransportéru enkapsulovat léčiva. 6) Proveďte diskusi a zhodnocení získaných výsledků.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] JANIB, S. M., MOSES, A. S., MACKAY, J. A. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010. 62(11): 1052-1063.
[2] LO, S.T., et al. Dendrimer Nanoscaffolds for Potential Theranostics of Prostate Cancer with a Focus on Radiochemistry. *Molecular Pharmaceutics*, 2013. 10(3): 793-812.

Termín zadání: 10.2.2014

Termín odevzdání: 23.5.2014

Vedoucí práce: prof. Ing. René Kizek, Ph.D.

Konzultanti diplomové práce: prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
Mgr. Markéta Vaculovičová, Ph.D.

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

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

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá využitím bakteriofága λ jako nanotransportéru léčiv v teranostice. Tímto termínem se označují v posledních letech velmi studované systémy, umožňující spojit diagnostiku, cílenou dopravu léčiv a monitorování odezvy pacienta na podanou léčbu. Tyto systémy jsou velmi vhodné zejména pro léčbu heterogenních onemocnění, jako je rakovina. Současné možnosti léčby jsou totiž často zatěžující pro celý organismus pacienta a snižují tak schopnost jeho boje s touto chorobou. Teoretická část práce je zaměřena na popis možností virových kapsid, proteinů a anorganických sloučenin jako nanotransportérů léčiv.

V praktické části jsou srovnány různé metody kultivace bakteriofága λ v tekutém i tuhém médiu a s různými koncentracemi cukru maltózy, na jehož receptory na hostitelské buňce se bakteriofág váže. Jako optimální byla zvolena kultivace v tuhém médiu s 0,2% maltózou. Praktická část je zaměřena zejména na využití bakteriofága λ jako nanotransportéru cytostatického léčiva doxorubicinu. Byla sledována enkapsulace léčiva po aplikaci 0; 12,5; 25; 50; 100 a 200 $\mu\text{g/ml}$ doxorubicinu s použitím fluorescenční detekce. Bakteriofág λ byl prokazatelně schopen enkapsulovat všechny aplikované koncentrace doxorubicinu. Byly sledovány různé doby enkapsulace léčiva (2; 4; 8 a 12 hodin), přičemž jako optimální byly zvoleny 2 hodiny, jelikož při delší době nebylo enkapsulováno větší množství léčiva. Na závěr byly porovnány schopnosti enkapsulace léčiva bakteriofága λ a proteinu apoferritinu. Bakteriofág λ byl schopen enkapsulovat 4 \times větší koncentrace doxorubicinu a ten z něj byl uvolňován během promývání 10 \times méně než v případě apoferritinu. V práci tak bylo potvrzeno, že bakteriofág λ je vhodnou platformou pro cílené dopravování léčiv v teranostice.

Klíčová slova

Bakteriofág λ , nanomedicína, nanotransportéry, teranostika, elektroforéza

Abstract

Master thesis deals with the use of bacteriophage λ as a theranostic drug nanocarrier. The term theranostics is used in recent years for systems that allow connecting of diagnostics, targeted drug delivery and monitoring of patient's response to administered treatment in a single modality. These systems are very suitable especially with heterogeneous diseases, such as cancer. Nowadays, the treatment of cancer has often severe side effects to the patient's body, which lowers his capability to fight the disease. Theoretical part of this work is focused on the properties of viral capsids, proteins and inorganic materials as drug nanocarriers.

In practical part of this work, different methods for cultivation of bacteriophage λ are compared, both in liquid and solid medium and with different concentrations of the maltose, through whose receptors bacteriophage λ is able to enter the host cell. Optimal was cultivation with 0.2% maltose in solid medium. Practical part is focused mainly on the use of bacteriophage λ as a nanocarrier for cytotoxic drug doxorubicin. Bacteriophage λ was able to encapsulate all applied concentrations of doxorubicin (0; 12.5; 25; 50; 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$), which was proved using fluorescent detection. Different times of encapsulation (2; 4; 8 and 12 hours) were studied. Optimal time was 2 hours. Encapsulation properties of bacteriophage λ were compared to apoferritin. Bacteriophage λ was able to encapsulate 4 \times higher concentrations of doxorubicin and its release during rinsing with water was 10 \times lower compared to apoferritin. This work concludes that bacteriophage λ is a very suitable platform for targeted drug delivery in theranostics.

Key words

Bacteriophage λ , nanomedicine, nanocarriers, theranostics, electrophoresis

Bibliografická citace

DOSTÁLOVÁ, S. Nanotransportéry pro teranostické aplikace. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2014. 81 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. René Kizek, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci na téma Nanotransportéry pro teranostické aplikace jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením tohoto projektu jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne 5. ledna 2014

.....

podpis autora



Tato práce vznikla v rámci projektu CEITEC - Středoevropského technologického institutu s pomocí výzkumné infrastruktury financované projektem CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu regionálního rozvoje.



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



Poděkování

Děkuji vedoucímu mojí diplomové práce prof. Ing. Renému Kizekovi, Ph.D. za to, že tehdy, před těmi 3 lety, dal té holce, která přišla a jen chtěla dělat vědu, šanci. Za to, že mi stále dává nové podněty se zlepšovat a dostane ze mě vždy i to, co jsem nevěděla, že v sobě mám. Ani na chvíli nelituji, že jsem sem přišla.

Chtěla bych také poděkovat celé pracovní skupině pod jeho vedením, především Markétě Vaculovičové za nedocenitelnou pomoc při vypracování mojí diplomové práce a všechny hodiny strávené „komunikací“.

Kristýně Šmerkové, Petrovi Michálkovi, Dagmar Chudobové, Dagmar Uhlířové, Ivě Blažkové, Lukášovi Nejdlovi, Zbyňkovi Hegerovi a Michalovi Žůrkovi, díky kterým jsem v práci radši než doma a díky kterým to jde i v ty špatné dny.

Kristýně Číhalové, Marcele Vlčnovské a Soni Křížkové za všechny rady a pomoc při měření.

Ditě Münzové, která je tou nejlepší studentkou, kterou bych si mohla přát.

Prof. Ing. Ivo Provazníkovi, Ph.D. děkuji za cenné rady i za podporu.

Lence Dvořákové, bez které bych nevystudovala ani první semestr. Adéle Čermákové, Tomášovi Holečkovi, Kláře Brabencové, Heleně Ferdusové, Michalovi Hrbáčkovi a Jakubovi Brandejsovi bez kterých bych si tu vysokou školu neuměla představit.

V neposlední řadě děkuji mým rodičům, prarodičům a sestře za podporu během celého studia.

Mému příteli Davidovi Kubíčkovi za to, že je a za těch 10 let, během kterých ze mě udělal lepšího člověka.

V Brně dne 22. května 2014

podpis autora

Obsah

SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK.....	15
1 ÚVOD	16
2 TERANOSTIKA.....	17
2.1 Nanomedicína.....	18
2.2 Nanotransportéry	20
2.2.1 Anorganické nanotransportéry	22
2.2.2 Proteinové nanotransportéry	24
2.2.3 Virové kapsidy jako nanotransportéry	25
3 VIRY	29
3.1 Struktura virionů.....	29
3.2 Virový genom	30
3.3 Reprodukce virů	31
3.3.1 Lytický cyklus	31
3.3.2 Virogenie.....	33
3.4 Bakteriofág λ	33
4 MATERIÁLY A METODY	35
4.1 Chemikálie.....	35
4.2 Přístrojové vybavení	36
4.3 Kultivace bakteriofága λ v tuhém médiu.....	36
4.4 Metoda růstových křivek	37
4.5 Časová analýza kultivace bakteriofága λ v <i>Escherichia coli</i> produkující bakteriofága λ	37
4.6 Amplifikace části genu <i>xis</i> a elektroforéza.....	38

4.7	Kultivace bakteriofága λ v indikační <i>E. coli</i> v tekutém médiu.....	38
4.8	Purifikace bakteriofága λ	39
4.9	Elektroforéza fágových proteinů	39
4.10	Enkapsulace doxorubicinu do bakteriofága λ	40
4.11	Enkapsulace doxorubicinu do apoferritinu	40
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	42
5.1	Kultivace bakteriofága λ v tuhém médiu.....	42
5.1.1	Vliv přítomnosti maltózy v kultivačním médiu na vznik fágových plaků.....	42
5.1.2	Vliv koncentrace maltózy v kultivačním médiu na vznik fágových plaků	43
5.2	Časová závislost růstu bakteriofága λ v tekutém médiu.....	45
5.2.1	Růstové křivky produkční <i>E. coli</i>	45
5.2.2	Analýza množství viru v kultuře produkční <i>E. coli</i> v časových intervalech.....	46
5.2.3	Amplifikace genu specifického pro genom bakteriofága λ	47
5.2.4	Růstové křivky indikační <i>E. coli</i> s bakteriofágem λ	48
5.3	Analýza proteinů virové kapsidy	50
5.3.1	Srovnání kultivace v tekutém a tuhém médiu	56
5.4	Enkapsulace léčiva do bakteriofága λ	57
5.4.1	Vliv koncentrace doxorubicinu na enkapsulaci do bakteriofága λ	57
5.4.2	Fluorescence doxorubicinu v izolované DNA bakteriofága λ	62
5.4.3	Vliv délky inkubace bakteriofága λ s doxorubicinem na enkapsulaci	65
5.5	Srovnání schopnosti dopravy léčiv bakteriofága λ a apoferritinu	66
5.5.1	Uvolňování léčiva z nanotransportérů.....	68
6	ZÁVĚR.....	70
	SEZNAM LITERATURY	71
	SEZNAM ZKRATEK.....	80

SEZNAM SYMBOLŮ 81

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Obecné působení nanotransportérů v organismu.....	21
Obrázek 2	Rozdělení nanotransportérů	22
Obrázek 3	Schéma enkapsulace léčiva do apoferritinu.....	25
Obrázek 4	Srovnání kapsid různých virů, které lze použít jako nanotransportéry.....	26
Obrázek 5	Průběh lyzogenního a lytického cyklu u bakteriofága.....	31
Obrázek 6	Kultivace produkční a indikační <i>E. coli</i> v médiu s přídavkem maltózy a bez něj..	43
Obrázek 7	Závislost počtu vzniklých plaků bakteriofága λ na koncentraci maltózy v médiu.	44
Obrázek 8	Růstová křivka produkční <i>E. coli</i>	45
Obrázek 9	Spektrofotometrické stanovení DNA bakteriofága λ . A Absorpční spektrum DNA. B Absorbance při vlnové délce 260 nm	46
Obrázek 10	Amplifikace genu <i>xis</i> ve vzorcích bakteriofága λ odebraných po 0 (řada 0), 5 (řada 5), 10 (řada 10) a 24 (řada 24) hodinách kultivace produkční <i>E. coli</i> ; v pozitivní kontrole (řada λ) a v indikační <i>E. coli</i> bez přídavku bakteriofága λ (řada <i>E.c</i>). Srovnání s markerem molekulové hmotnosti (řada <i>L</i>). B) Graf závislosti intenzity fluorescence amplikonů na době kultivace	48
Obrázek 11	Růstové křivky indikační <i>E. coli</i> a indikační <i>E. coli</i> s bakteriofágem λ	49
Obrázek 12	A) Amplifikace genu <i>xis</i> ve vzorcích bakteriofága λ odebraných po 0 (řada 0), 3 (řada 3), 6,5 (řada 6,5) a 24 (řada 24) hodinách kultivace v indikační <i>E. coli</i> . Srovnání s markerem molekulové hmotnosti (řada <i>L</i>). B) Graf závislosti intenzity fluorescence amplikonů na době kultivace.....	49
Obrázek 13	Analýza proteinů bakteriofága λ gelovou elektroforézou, gel obarvený coomassie modří. <i>L</i> Marker molekulové hmotnosti. Vzorek 1 Přímě odebrané médium <i>E. coli</i> kultivované s bakteriofágem λ . Vzorek 2 Supernatant po centrifugaci vzorku 1. Vzorek 3 Pelet vzniklý ultracentrifugací vzorku 2 a resuspendovaný ve fosfátovém pufru. 4 První frakce sacharózového gradientu po ultracentrifugaci vzorku 3. 5 Druhá frakce sacharózového gradientu (20% sacharóza). 6 Třetí frakce sacharózového gradientu (30% sacharóza). 7 Čtvrtá frakce sacharózového gradientu (40% sacharóza). 8 Pátá frakce sacharózového gradientu (60% sacharóza).	51

Obrázek 14 Analýza proteinů bakteriofága λ gelovou elektroforézou, gel obarvený stříbrem. <i>L</i> Marker molekulové hmotnosti. Vzorek 1 Přímou odebrané médium <i>E. coli</i> kultivované s bakteriofágem λ . Vzorek 2 Supernatant po centrifugaci vzorku 1. Vzorek 3 Pelet vzniklý ultracentrifugací vzorku 2 a resuspendovaný ve fosfátovém pufru. 4 První frakce sacharózového gradientu po ultracentrifugaci vzorku 3. 5 Druhá frakce sacharózového gradientu (20% sacharóza). 6 Třetí frakce sacharózového gradientu (30% sacharóza). 7 Čtvrtá frakce sacharózového gradientu (40% sacharóza). 8 Pátá frakce sacharózového gradientu (60% sacharóza).	52
Obrázek 15 Analýza proteinů bakteriofága λ gelovou elektroforézou, gel obarvený stříbrem s delší dobou expozice. <i>L</i> Marker molekulové hmotnosti. Vzorek 1 Přímou odebrané médium <i>E. coli</i> kultivované s bakteriofágem λ . Vzorek 2 Supernatant po centrifugaci vzorku 1. Vzorek 3 Pelet vzniklý ultracentrifugací vzorku 2 a resuspendovaný ve fosfátovém pufru. 4 První frakce sacharózového gradientu po ultracentrifugaci vzorku 3. 5 Druhá frakce sacharózového gradientu (20% sacharóza). 6 Třetí frakce sacharózového gradientu (30% sacharóza). 7 Čtvrtá frakce sacharózového gradientu (40% sacharóza). 8 Pátá frakce sacharózového gradientu (60% sacharóza).	54
Obrázek 16 Amplifikace genu <i>xis</i> pro ověření přítomnosti bakteriofága λ . <i>L</i> Marker molekulové hmotnosti. Vzorek 1 Přímou odebrané médium <i>E. coli</i> kultivované s bakteriofágem λ . Vzorek 2 Supernatant po centrifugaci vzorku 1. Vzorek 3 Pelet vzniklý ultracentrifugací vzorku 2 a resuspendovaný ve fosfátovém pufru. 4 První frakce sacharózového gradientu po ultracentrifugaci vzorku 3. 5 Druhá frakce sacharózového gradientu (20% sacharóza). 6 Třetí frakce sacharózového gradientu (30% sacharóza). 7 Čtvrtá frakce sacharózového gradientu (40% sacharóza). 8 Pátá frakce sacharózového gradientu (60% sacharóza).	55
Obrázek 17 Srovnání kultivace v tekutém (<i>T</i>) a tuhém médiu na Petriho miskách (<i>P</i>)	56
Obrázek 18 Absorpční spektrum různých koncentrací doxorubicinu enkapsulovaného v bakteriofágu.	58
Obrázek 19 Závislost absorbance při vlnové délce 480 nm na koncentraci aplikovaného doxorubicinu.	58
Obrázek 20 Fluorescenční spektrum různých koncentrací doxorubicinu enkapsulovaného v bakteriofágu.	59

Obrázek 21 Závislost fluorescence při vlnové délce 605 nm na koncentraci aplikovaného doxorubicinu.....	60
Obrázek 22 SDS-PAGE gel bakteriofága s enkapsulovaným doxorubicinem. A) Fluorescence po excitaci světlem o vlnové délce 312 nm. B) Proteiny bakteriofága λ obarvené coomassie blue	60
Obrázek 23 Amplifikace genu <i>xis</i> v bakteriofágovi λ s enkapsulovaným doxorubicinem o koncentracích 0; 12,5; 25; 50; 100 a 200 $\mu\text{g/ml}$)	61
Obrázek 24 Amplifikace genu <i>xis</i> v komerčně dostupné DNA bakteriofága λ po přidavku 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 1; 10; 100 a 1000 ng doxorubicinu do 25 μl PCR směsi	62
Obrázek 25 Absorpční (A) a emisní (B) spektrum izolované DNA bakteriofága λ s enkapsulovaným doxorubicinem	63
Obrázek 26 Emisní spektrum doxorubicinu ve vodě a v elučním roztoku automatického analyzátoru nukleových kyselin při excitační vlnové délce 480 nm.....	63
Obrázek 27 Emisní spektrum fluoreskaminu navázaného na doxorubicin interkalovaný do DNA bakteriofága λ	64
Obrázek 28 Závislost fluorescence fluoreskaminu na koncentraci aplikovaného doxorubicinu	65
Obrázek 29 Vliv délky inkubace bakteriofága λ s doxorubicinem na jeho enkapsulaci.....	66
Obrázek 30 Absorpční spektrum různých koncentrací doxorubicinu enkapsulovaného v apoferritinu	67
Obrázek 31 Fluorescenční spektrum různých koncentrací doxorubicinu enkapsulovaného v apoferritinu	67
Obrázek 32 Srovnání enkapsulace různých koncentrací doxorubicinu v bakteriofágovi λ a apoferritinu	68
Obrázek 33 Srovnání uvolňování léčiva z bakteriofága λ a apoferritinu v průběhu promývání	69

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Srovnání vlastností teranostických platforem	19
--	----

1 ÚVOD

Ve vyspělých státech umře každý čtvrtý člověk kvůli rakovinnému onemocnění. Tato čísla jsou naprosto děsivá, zejména při vědomí, kolik členů má průměrná rodina, zkušební komise nebo olympijský tým u kolektivních sportů. Problémem, se kterým si současná medicína stále nedokáže poradit, je obrovská heterogenita rakoviny. Kvůli tomu se musí využívat léčiva, která jsou zaměřena na velmi drobné rozdíly mezi rakovinnými a zdravými buňkami, nejčastěji to, že rakovinné buňky se rychleji množí. Tato léčiva jsou tak ale velmi toxická i pro zdravé buňky, což jen zatěžuje již tak oslabené tělo pacienta, který všechny síly potřebuje pro boj s touto zákeřnou nemocí.

Systémovou toxicitu léčiv by bylo možné snížit jejich uzavřením do vhodného nosiče, který je navíc jednoduše možné cílit na povrchové antigeny konkrétního typu rakoviny. Tento přístup se nazývá teranostika. V této práci je provedena literární rešerše o současném stavu teranostického výzkumu, jeho výhodách i problémech a platformách, které pro něj lze využít. Jsou také diskutovány možnosti jednotlivých typů nanotransportérů, ať již založených na anorganických sloučeninách, proteinech nebo virových kapsidách. Práce je zaměřena zejména na viry, konkrétně bakteriofága λ , což je lyzogenní fág napadající bakterii *Escherichia coli*.

Experimentální část této práce je zaměřena na využití bakteriofága λ jako nanotransportéru léčiva doxorubicinu, který je při volném podání velmi kardiotoxický. Pro získání velkého množství bakteriofága, které je nutné pro jeho následné využití jako nanotransportéru léčiv, bylo nutné nejdříve optimalizovat jeho kultivaci. Schopnosti enkapsulace léčiva do bakteriofága λ byly srovnány s běžně studovaným nanotransportérem, proteinem apoferritinem.

2 TERANOSTIKA

Termínem teranostika je označován systém, umožňující spojit diagnostiku i v raných stádiích onemocnění, cílenou dopravu léčiva, vysoce senzitivní zobrazování a monitorování odezvy pacienta na léčbu [1-3]. Umožňuje také znát přesné umístění onemocnění v těle pacienta, což je pro úspěšnou léčbu často velmi důležité [3]. Toto spojení diagnostiky a terapie je významné zejména u heterogenních onemocnění, jako je rakovina [2]. Proto se teranostika používá nejvíce právě v léčbě nádorových onemocnění [4-8], ale i zánětů [9], kardiovaskulárních onemocnění [10], aterosklerózy [11] a degenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba [12]. Jelikož rakovina představuje širokou skupinu heterogenních onemocnění a nádorové buňky si mohou vyvíjet rezistenci na aplikovanou léčbu, bylo by vhodné neustále modifikovat léčbu a strategii cílení nádoru a personalizovat tak terapii pro konkrétního pacienta. To by mohla umožnit právě teranostika [2].

Pro teranostiku je důležité použít vhodnou platformu, kterou může být nanomedicína [2,13] nebo proléčiva [3]. Na platformě mohou být pevně uchyceny diagnostické a terapeutické agens a také ligandy, které mohou zajistit cílení platformy na nějaký povrchový antigen nemocných buněk [3]. Je možné cílit na několik markerů onemocnění a dopravovat různá léčiva najednou [2]. Cílení může být realizováno pasivně nebo aktivně [14,15]. Pro aktivní cílení je možné použít například monoklonální protilátky [2]. Pro pasivní cílení se využívá unikátních vlastností nádorových buněk a jejich krevního řečiště [16]. Cílením terapie na nemocné buňky dojde ke snížení časté systémové toxicity léčiva [2].

Nejjednodušší teranostickou platformou jsou proléčiva, což jsou léčiva podaná v inaktivní formě, která se aktivizují v důsledku metabolických procesů v těle pacienta. V případě použití cílicích ligandů jsou ty konjugovány přímo na léčivo. U proléčiv se neobjevuje polydisperzita a je možné použít rozdílné koncentrace diagnostických a terapeutických složek. Problémem může být průchod proléčiv renální clearance a tím jejich rychlé odstranění z organismu [3]. Je možné spojit jednotlivé teranostické platformy a uzavřít proléčivo do nanomedicínského nosiče [17]. Léčivo nebo cílicí ligand je možné detekovat, nebo lze spojit proléčivo s detekovatelnou látkou, jako v případě (64-Cu-porfyrin)-peptid-folátové sondy [18].

2.1 Nanomedicína

Nanomedicína je přístup vědy a inženýrství k biologickým aplikacím na úrovni nanometrů, využívající nanokomponenty a nanosystémy [19,20]. Tyto materiály mohou totiž dosáhnout jiných a často unikátních vlastností oproti běžným materiálům stejného chemického složení [21], jelikož kvantově mechanické vlastnosti atomových interakcí jsou ovlivněny nanometrovou velikostí materiálů. Liší se i ve zcela základních vlastnostech, jako je teplota tání, magnetické vlastnosti nebo barva [1].

Cílem nanomedicíny je dopravit léčivo selektivně k cílovému místu, se zvýšenou efektivitou a sníženými vedlejšími účinky [21]. Díky tomuto přístupu je možné odhalit i velmi raná stádia onemocnění (zejména nádorových), cíleně léčit s minimální toxicitou pro zdravé buňky a simultánně sledovat a léčit onemocnění [2].

Rozmach nanomedicíny byl podpořen chováním nanočástic v tumorech myši, známým jako EPR efekt (Enhanced Permeability and Retention Effect) [21]. Jde o vlastnost některých molekul o vhodné velikosti (nanočástic, lipozomů a makromolekulárních léčiv) akumulovat v nádorové tkáni více než ve zdravé [16,22]. Tento fenomén se vysvětluje tím, že nádorové buňky stimulují angiogenezi pro zrychlení svého růstu. V angiogenezi se uplatňují vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a další růstové faktory. Již agregáty nádorových buněk o velikosti 150-200 μm jsou závislé na krevním zásobení pro výživu a dostatek kyslíku. Tyto nové cévy jsou často abnormální svojí formou i stavbou. Často jde o defektní, špatně propojené endoteliální buňky s velkými póry bez vrstvy hladkého svalstva nebo inervace a se širokým lumen. Mají také narušené receptory pro angiotensin II [23]. Navíc nádorové buňky často postrádají lymfatické cévy. Z těchto důvodů je v nádorech abnormální transportní dynamika molekul i tekutin, zejména pro makromolekulární léčiva [24]. EPR efekt může být zvýšen různými patofyziologickými faktory, které se podílí na zvýšení extravazace makromolekul v solidních nádorových tkáních. Mezi nimi je bradykinin, oxid dusnatý, prostaglandiny, VEGF, nádorový nekrotický faktor a další. Nedostatek lymfy v oblasti nádoru je také významným faktorem zvyšujícím retenci, jelikož lymfa za normálních okolností filtruje tyto částice [24].

Díky nanočásticím je možné vytvořit vodný roztok i špatně rozpustných léčiv pro intravenózní podání, a to bez použití nežádoucích rozpouštědel [25]. Použitím nanočástic

dochází ke zvýšení koncentrace léčiva v okolí nádoru o 100-400 % [21], ale celková aplikovaná dávka pacientovi je výrazně nižší [26]. Je to způsobeno tím, že nanočástice zůstávají v okolí nádoru déle, protože nedifundují zpět do krevního řečiště jako v případě volných molekul léčiva [21]. Povrch nanočástic je možné pokrýt peptidem nebo protilátkou a povaha tohoto cílicího ligandu ovlivňuje extravaskulární transport i cílení nanočástic na nádorové buňky [27]. Uzavřením do nanočástic se zvýší specifita a biokompatibilita [28], stejně jako doba skladovatelnosti [29].

Tabulka 1 Srovnání vlastností teranostických platform

Proléčiva	Nanomedicína
Cílení ligandem	Cílení ligandem
Vazba diagnostických látek	Vazba diagnostických látek
Monodisperzní	Polydisperzní
Odstraněny renální clearance	Neprojdou přes renální clearance
EPR	EPR
Aktivace vnějšími podmínkami	Uvolnění obsahu vnějšími podmínkami
Známa koncentrace léčiva	Nutno definovat obsah léčiva
Snížení toxicity léčiv pro zdravé buňky	Snížení toxicity léčiv pro zdravé buňky
Menší povrch	Větší povrch
Omezené možnosti vazby cílicích nebo diagnostických látek	Víc možností vazby cílicích nebo diagnostických látek
-	Enkapsulace proléčiv

Nanočástice mají stejnou velikost jako některé biologické prvky. Jsou menší než lidské buňky (průměr 10-20 μm) a orgány (0,2-1 μm) a podobně velké v porovnání s biologickými makromolekulami jako enzymy a receptory. Nanočástice menší než 50 nm mohou lehce vstupovat do buněk a ty, které jsou menší než 20 nm, mohou procházet stěnou cév. Díky tomu mohou nanočástice interagovat s biomolekulami na povrchu buněk i uvnitř

nich, často bez ovlivnění chování a biochemických vlastností těchto molekul [1]. Srovnání pozitivních a negativních vlastností jednotlivých teranostických platforem viz Tabulka 1.

2.2 Nanotransportéry

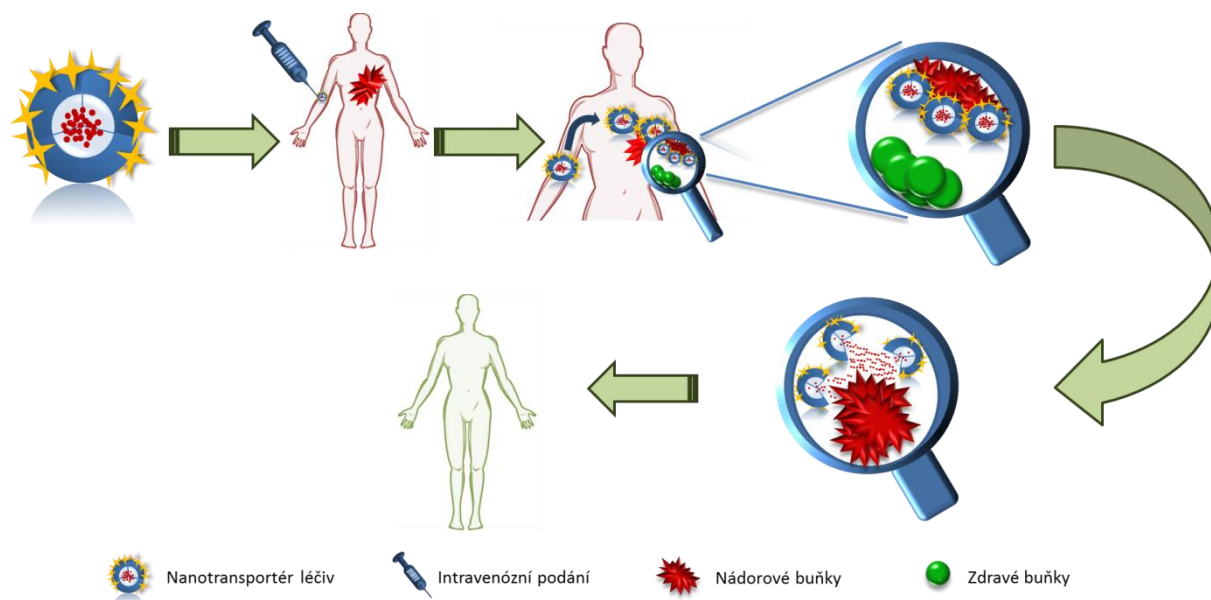
Nanomedicínský přístup k dopravě léčiv do buněk se soustředí na vyvíjení nanočástic označovaných jako nanotransportéry [5,30,31] zvyšujících dostupnost léčiva na specifických místech po určitou dobu v těle pacienta [32]. Jsou používány pro enkapsulaci nebo rozpouštění chemoterapeutických léčiv pro zvýšení cíleného dopravování *in vivo* nebo poskytnutí unikátních optických, magnetických a elektrických vlastností pro zobrazování [33]. Obecně lze říci, že je vhodné, aby léčivo v těle pacienta mělo co nejvyšší účinek [34] a nanotransportéry by v budoucnu měly sloužit jako multifunkční zařízení pro personalizovanou medicínu [35].

Biodistribuci, clearance, toxicitu, specifitu k cílovým buňkám, exkreci a efektivitu nanotransportérů je možné ovlivnit jejich velikostí, tvarem, povrchovou chemií a přítomností cílících ligandů [36-39]. Na stejný nanotransportér je možné připojit různé cílící peptidy nebo protilátky [2]. Je také možné kontrolované uvolňování léčiv až po dopravě k cílovým buňkám [2].

Ideální nanotransportér by měl mít velikost 20-100 nm (sférické nanočástice) [38,40,41]. Nanočástice s průměrem větším než 20 nm neprojdou renální clearance, jejíž práh je 8-10 nm [32]. Pokud jsou menší než 100 nm, vstupují do tumorů díky větším pórům v krevním řečišti nádoru (průměr více než 100 nm, u zdravých cév menší než 10 nm), mohou se vázat na povrchové buněčné receptory a vstupovat do buněk [42]. Dochází u nich k EPR efektu [3].

Nanotransportér by měl být schopný enkapsulovat vysoké koncentrace léčiva, efektivně cílit na nemocné buňky s minimálním příjmem zdravými buňkami a mít vhodný a spolehlivý mechanismus uvolňování léčiva, aby nedošlo k působení na zdravé buňky, ale zároveň se léčivo uvolnilo u nemocných buněk [2]. Mělo by díky němu být možné zlepšit dopravování léčiv, které jsou špatně rozpustné ve vodě, identifikovat maligní buňky na základě molekulární detekce a vizualizovat jejich umístění v organismu [43], napomáhat transcytóze léčiv skrz epiteliální a endoteliální bariéry [44] a umožnit monitorování léčby

v reálném čase [45]. Měl by také mít vysokou zobrazovací citlivost, aby bylo možné sledovat průběh léčby [2]. Nanotransportéry se většinou skládají ze 4 komponent – emitör signálu, terapeutický náklad, přenašeč nákladu a cílicí ligand [46]. Obecné působení nanotransportérů v organismu pacienta viz Obrázek 1.



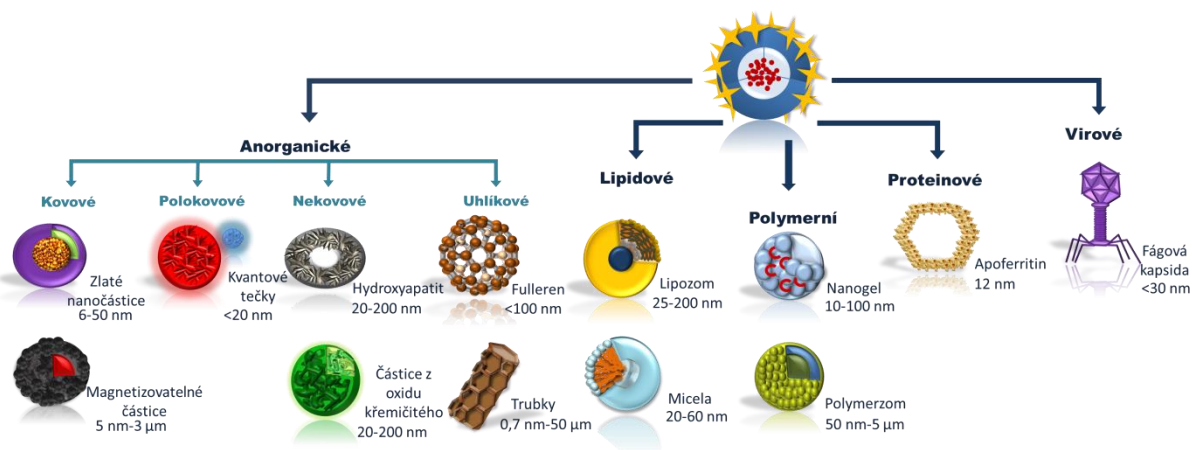
Obrázek 1 Obecné působení nanotransportérů v organismu

U nanotransportérů jsou požadavky na koncentraci a dobu oběhu nanotransportéru rozdílné z pohledu diagnostiky a terapie. Hlavním cílem diagnostiky je dopravit do těla co nejmenší množství zobrazovací látky po co nejkratší čas při současném získání dobrého poměru signálu a šumu. Proto jsou vhodné nízké koncentrace a rychlá renální clearance. Na druhou stranu terapie vyžaduje aplikaci co největšího množství léčiva po co nejdelší dobu pro získání vysokého terapeutického indexu. Pro vyřešení tohoto problému jsou možné 3 přístupy. První přístup chápe teranostiku jako proces, který má 2 kroky, kdy jsou identické nanotransportéry nejdříve naplněny diagnostickou látkou pro zobrazení akumulace v konkrétním pacientovi a následně se podají stejné nanotransportéry, tentokrát naplněné terapeutickou látkou [47]. Tímto postupem ale nejsou splněny požadavky na rozdílnou dobu oběhu v pacientovi. Druhý přístup využívá toho, že některá léčiva mohou sloužit zároveň pro diagnostiku a po spuštění i pro terapii. Tím by byly stejné podmínky pro koncentraci a dobu oběhu. Není ale mnoho léčiv, které by mohly být využity zároveň [48]. Třetí přístup pak

využívá spojení nanotransportéru s biokompatibilní diagnostickou látkou, která může setrvat v těle pacienta a nezpůsobí žádné vedlejší účinky, ani po uvolnění z nanotransportéru v důsledku jeho degradace, což je často nutným předpokladem pro uvolnění léčiva z nanotransportéru [18,49].

Další důležitou vlastností nanotransportérů je disperze obsahu mezi nimi. Je nutné dodržet nejen stejnou velikost nanotransportérů, ale i shodné naplnění léčivem. Náhodné fyzikální uzavření léčiva totiž často vede k velkým rozdílům. Tyto rozdíly mohou být ještě zvýšeny při náhodném pokrytí nanotransportéru cílicími ligandy. Ty totiž mohou ovlivnit povrchové složení a tím dobu cirkulace (zvýšena i více než $3\times$ [50]), stejně jako biodistribuci a příjem nanotransportérů nádorovými buňkami v závislosti na množství a hustotě pokrytí jejich povrchu [3].

Nanotransportéry mohou být sestaveny z různých materiálů, ať již organických nebo anorganických. Největší nanotransportéry jsou lipozomy (80-200 nm), následují polymerní nanočástice (40-100 nm), polymerní micely (20-60 nm) a nejmenší jsou dendrimery (menší než 10 nm). Je možné je rozdělit do několika skupin (viz Obrázek 2) – anorganické nanotransportéry, polymerní nanotransportéry, lipidové nanotransportéry a proteinové nanotransportéry, jejichž speciálním případem jsou virové kapsidy [31].



Obrázek 2 Rozdělení nanotransportérů

2.2.1 Anorganické nanotransportéry

Anorganické nanotransportéry je možné dále rozdělit na kovové, polokovové, nekovové a uhlíkové. Jako **kovové** nanotransportéry mohou být použity například zlaté, stříbrné,

platinové nebo železné nanočástice. *Zlaté* nanočástice (AuNPs) jsou v poslední době hojně studovány, zejména pro fototerapii [51]. Jejich velikost se pohybuje okolo 6-50 nm [52], mohou vázat mnoho organických molekul, mají nízkou toxicitu a silnou optickou absorpci [53]. Dopravování léčiv je většinou docíleno modifikací povrchu AuNPs tak, aby se mohly navázat na specifické cílené léčivo nebo další biomolekuly. AuNPs také snadno vstupují do buněk. AuNPs mohou být přímo konjugovány s antibiotiky nebo dalšími léčivy iontovou nebo kovalentní vazbou [54] nebo fyzikální absorpcí [55]. Uvolňování léčiv ze zlatých nanočástic může být inicializováno vnitřním stimulem jako je změna pH, nebo vnějším stimulem jako je působení světla [56]. Mají vysokou absorpci v blízké infračervené oblasti (700-900 nm), což je výhodné pro zobrazování ve tkáních nebo pro fototerapii [57].

Oxidy železa ve formě nanočástic jsou *magnetizovatelné* (MPs) a v dopravování léčiv se používají málo kvůli nízké biokompatibilitě [58]. Tu lze ale odstranit modifikací jejich povrchu různými materiály. Na druhou stranu je usnadněn jejich vstup do buněk působením magnetického pole. Jejich velikost se pohybuje od 5 nm do 3 μm [59].

Příkladem **polokovových** nanotransportérů jsou *kvantové tečky* (QDs), netoxické polovodiče o průměru menším než 20 nm, které slouží jako alternativa organických barviv a fluorescenčních proteinů. Mají široké absorpční spektrum, velmi úzké emisní spektrum, dlouhou dobu fluorescence a vysokou stabilitu vůči fotozchášení [60]. Mají také vysoký kvantový výtěžek, molární extinkční koeficient a Stokesův posun [61]. Zvýšení velikosti QDs způsobí červený posun emisního spektra [62].

Mezi **nekovové** nanotransportéry pak patří hydroxyapatit a nanočástice na bázi oxidu křemičitého. *Hydroxyapatit* je biokeramický minerál, který je přirozenou formou vápníku a fosforu. Jde o hlavní neorganickou složku kostí a zubů. Velikost nanočástic se pohybuje mezi 20-200 nm [63].

Nanočástice na bázi oxidu křemičitého pak umožňují systémovou nebo místní administraci fotosenzitivního léčiva. Vstup do buněk a cytotoxicita jsou ovlivněny velikostí částice (20-200 nm), tloušťkou křemičité skořápky a koncentrací nanočástic [64]. Mezoporézní křemičité nanočástice enkapsulující fotosenzitivní léčivo je možné pokrýt lipidovou vrstvou pro vytvoření biokompatibilního povrchu simulujícího buněčnou membránu [65].

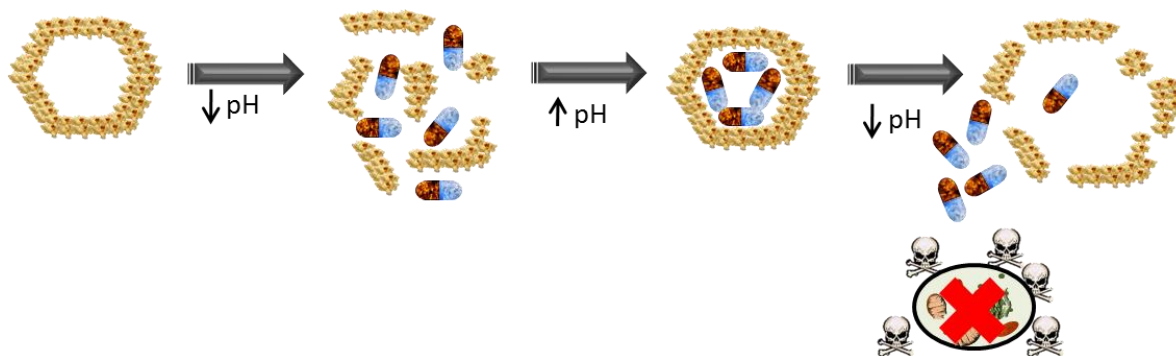
Uhlíkové nanotrúbky a fullereny také mohou být použity jako nanotransportéry. Mají unikátní elektrické, termální a strukturní charakteristiky [66]. Silně absorbují světlo v blízké infračervené oblasti a přeměňují jej velmi efektivně na teplo. Dají se tak využít pro hypertermickou léčbu [67]. Je možné modifikovat jejich povrch, čímž je snížena jejich toxicita a zvýšena biodostupnost protinádorových léčiv zvýšením rozpustnosti a doby cirkulace v oběhu pacienta [68].

2.2.2 Proteinové nanotransportéry

Jako nanotransportéry léčiv je možné použít i sebesestavné proteiny jako je apoferritin, albumin nebo chaperoniny. Ty tvoří tzv. proteinové klece, které mají uniformní velikost. V organismu jsou tyto proteinové klece využívány při přepravě minerálů nebo iontů kovů. Mohou být jednoduše chemicky nebo biologicky modifikovány [69]. Jejich nevýhodou je častá imunogenní odpověď organismu pacienta. Ta ale může být odstraněna pokrytím povrchu polyethylenglykolem [69].

Apoferritin (APO) je intracelulární protein tvořící duté sférické útvary, jejichž vnější průměr je 12 nm a který obsahuje vnitřní dutinu o rozměru 8 nm [70]. V těle slouží jako zásobní systém pro železné ionty [71] a skládá se z 24 podjednotek, které jsou uspořádány ve dvojicích podél 12 stěn. APO tak má strukturu kvazirombododekaedru [72]. V nádorových buňkách jsou vazebná místa pro APO [73] a byla u nich pozorována jeho endocytóza [74].

APO je možné rozložit a znovu sestavit v závislosti na pH roztoku, ve kterém se nachází. Acidifikací APO dojde k jeho rozpadu na podjednotky a po smíchání s léčivem a následné alkalizaci se APO opět sestaví a léčivo v něm zůstane enkapsulováno. Po opětovné acidifikaci se struktura APO opět rozruší, léčivo je z něj uvolněno a může interagovat s buňkou [75]. Schéma této enkapsulace viz Obrázek 3.



Obrázek 3 Schéma enkapsulace léčiva do apoferritinu

Dalším příkladem proteinových nanotransportérů může být **malý protein teplotního šoku** (sHsp – small heat shock protein), který tvoří klece s vnějším průměrem 12 nm a jeho vnitřní dutina má průměr 6,5 nm. Skládá se z 24 podjednotek uspořádaných podobně jako v případě APO, ale na rozdíl od něj obsahuje množství 3nm pórů, které umožňují výměnu látek mezi vnitřním a vnějším prostředím [70]. sHsp byl studován jako kontrastní látka pro MRI [76], pro dopravu a uvolňování doxorubicinu [77] a pro cílené dopravování zobrazovacích látek v diagnóze aterosklerózy [70].

2.2.3 Virové kapsidy jako nanotransportéry

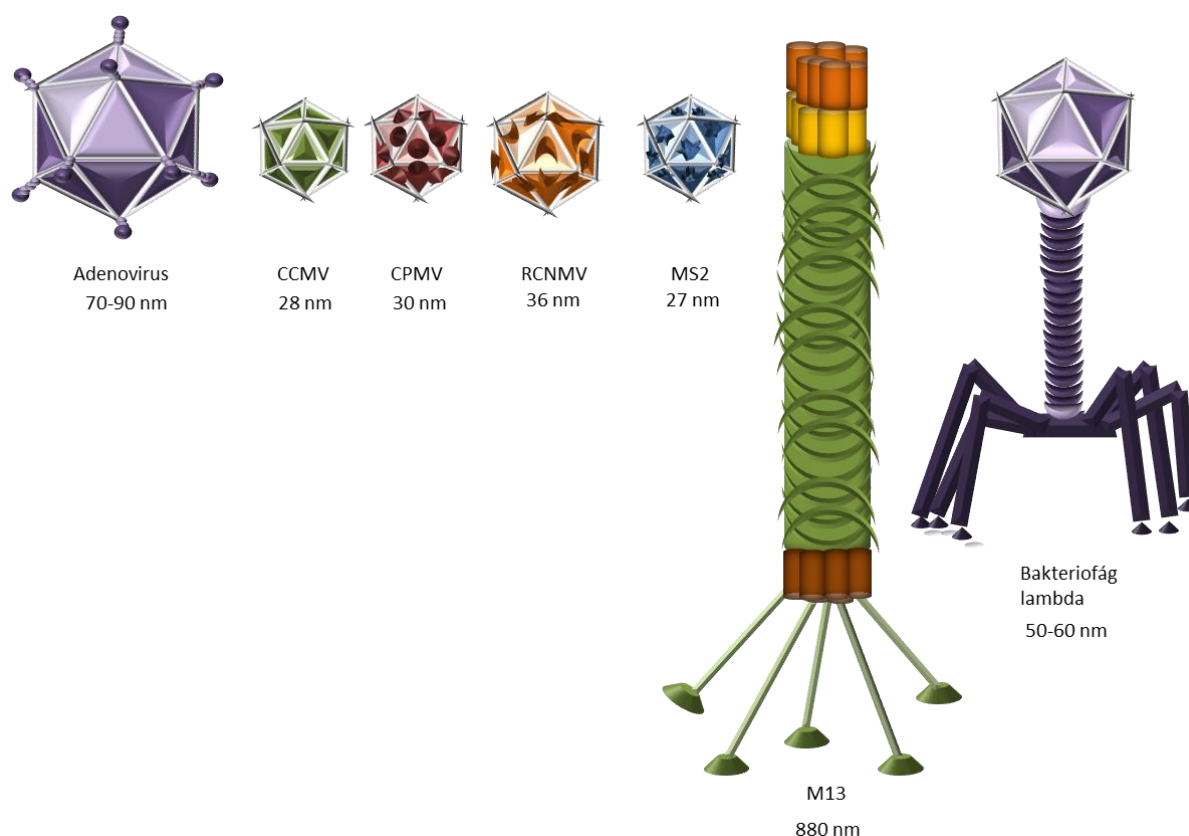
Virové kapsidy jsou často používaným typem proteinových klecí, ale vzhledem k jejich původu a vlastnostem jsou diskutovány v samostatné kapitole. Virová částice je obvykle tvořena několika stovkami až tisíci proteinových molekul, které jsou sebesestavující a tvoří dutou kostru pro nukleovou kyselinu. Jako nanotransportéry poskytují virové částice morfologickou uniformitu, biokompatibilitu a snadnou modifikaci funkčními skupinami. Jejich velikost se pohybuje od 10 nm až po 1 μm a mohou mít různý tvar, nejčastěji sférický nebo ikozahedrání (tvořený 20 trojúhelníkovými plochami a 12 rohy), ale i tyčinkovitý a další [69].

Velkou výhodou virových nanotransportérů je to, že jsou geneticky naprogramovány tak, aby byly sebesestavující a tvořily morfologicky uniformní struktury o přesně definované velikosti a tvaru. Struktura mnoha virů je navíc známa na atomární úrovni a je možné je na této úrovni modifikovat funkčními skupinami mnohem jednodušeji než syntetické nanočástice. Je také možné je relativně snadno geneticky modifikovat. Virové kapsidy v přírodě slouží právě pro dopravu nákladu, tedy genetické informace, do hostitelské buňky

[78]. V laboratorních podmínkách lze relativně snadno získat velké množství virionů. Jsou velmi stabilní a dají se snadno skladovat, přičemž mnoho virů je aktivních i po vysušení [79].

Problémem virových kapsid může být to, že, na rozdíl od některých nanotransportérů, které jsou tělu vlastní (například apoferritin), mohou způsobovat imunitní odpověď organismu pacientů. Tato odpověď je častá i v případě použití virů, jejichž hostitelem jsou rostlinné buňky nebo bakterie. Pokud je povrch viru pokryt polyethylenglycolem, je tato imunogenita snížena [80].

Viry používané jako nanotransportéry nejvíce jsou adenoviry, virus chlorotické skvrnitosti vigny, virus mozaiky vigny, virus nekrotické mozaiky jetele lučního, bakteriofágy MS2, M13 nebo Q β , nebo virus tabákové mozaiky. Velmi často se namísto dospělých virů používají prázdné, nedospělé, kapsidy transformované v bakteriálních plazmidech [69]. Obrázek 4 ukazuje srovnání kapsid různých virů, které je možné použít jako nanotransportéry léčiv.



Obrázek 4 Srovnání kapsid různých virů, které lze použít jako nanotransportéry

Adenovirus je savčí DNA virus z rodiny *Adenoviridae*. Kapsida adenovirů je neobalená, má ikozahedrání tvar a průměr 70-90 nm. Stěny ikozahedronu jsou tvořeny 12 kopiemi trimerů proteinu a každý vrchol je tvořen pentamery proteinu spojenými s trimery vláknitého proteinu [81]. Obsahuje 13 strukturních proteinů, které se podílejí na infekci a umožňují vstup viru do hostitelských buněk i jeho rozmnožování a indukují imunitní systém. Jeho genom je dlouhý 36 kb [82]. Prázdnou kapsidu adenoviru je možné získat expresí kapsidových proteinů v bakteriálním plazmidu). Průměr této prázdné kapsidy je o něco větší než v případě dospělého viru, za fyziologických podmínek 110 nm. V pH 4 se tento průměr zvětší až na 167 nm, a po návratu pH na fyziologickou hodnotu (7,4) se zmenší na 60 nm [83].

Nejčastěji používaným rostlinným virem je **virus chlorotické skvrnitosti vigny** (CCMV – cowpea chlorotic mottle virus), RNA virus z rodiny bromovirů [84]. Z infikovaných rostlin je možné získat velké koncentrace tohoto viru (1-2 mg/g) a expresí v kvasinkách je možné produkovat proteiny CCMV kapsidy, které jsou sebestavující do prázdných částic bez genetického materiálu [85]. CCMV se skládá ze 180 identických podjednotek kapsidy, které jsou uspořádány jako 20 hexamerů a 12 pentamerů, a tvoří ikozahedron o průměru 28 nm, s vnitřní dutinou o průměru 18 nm. Každý z proteinů virové kapsidy obsahuje 190 aminokyselin, jejichž N-konec je orientován směrem do nitra virové kapsidy. Na N-konci jsou převážně bazické skupiny z aminokyselin argininu a lyzinu, interagující se záporně nabitou RNA. Při zkrácení N-konce se vytvoří částice o průměru 18 nebo 22 nm a tvaru dvanáctistěnu. Struktura CCMV je dynamická, dochází u něj k reverzibilnímu jevu, kdy se za určitých podmínek (pH 7,5 nebo zvýšená iontová síla) zvětší průměr viru až o 10 % v důsledku vytvoření 60 2nm pórů ve virové kapsidě. Díky tomu může být jednoduše odstraněna virová RNA a díky kladně nabitému vnitřnímu povrchu kapsidy je možné do viru uzavřít především záporně nabitá léčiva [84]. Pro dopravu kladně nabitých léčiv je možné genetickou modifikací upravit vnitřní povrch CCMV kapsidy [86].

Dalším rostlinným RNA virem je **virus mozaiky vigny** (CPMV – cowpea mosaic virus) z rodiny *Comoviridae*, který také tvoří ikozahedron. Ve vysoké koncentraci je možné jej získat z listů nakažených rostlin (0,8-1 mg/g) [87]. Jeho průměr je 30 nm a obsahuje 60 asymetrických jednotek složených vždy z malé a velké podjednotky. Je stabilní v širokém rozsahu teplot (do 60 °C) a pH (3-9) i v přítomnosti některých organických rozpouštědel.

Virus má afinitu k vimentinu, který je ve zvýšené míře exprimován na povrchu nádorových buněk [88].

Často používaný je i **virus nekrotické mozaiky jetele lučního** (RCNMV – red clover necrotic mosaic virus), rostlinný RNA virus patřící do rodiny *Tombusviridae*. Skládá se ze 180 identických podjednotek (37 kDa) tvořících ikozahedron s vnějším průměrem 36 nm a dutinou o průměru 17 nm. V důsledku přítomnosti divalentních kationtů změni RCNMV svoji strukturu, vytvoří póry a uvolní genomovou RNA [89].

Z virů napadajících bakterie se jako možný nanotransportér studuje **MS2 bakteriofág**, jehož hlava tvoří ikozahedron o průměru 27 nm. Kapsida obsahuje 180 identických monomerů, které mohou nezávisle exprimovány v bakteriích a jsou sebesestavující. Při expresi je možné jednoduše odstranit genomovou RNA a vytvořit tak prázdné kapsidy, obsahující 32 pórů, jejichž průměr je 1,8 nm. Kapsida je stabilní v širokém rozsahu pH (3-10), teploty i okolního prostředí [69].

M13 bakteriofág je DNA virus, tvořící trubičkovité útvary o délce 880 nm a šířce 6,6 nm. Jednořetězcová DNA je obklopená 2700 kopiemi hlavního kapsidového proteinu P8, který je možné geneticky modifikovat, a 5 kopiemi 4 různých minoritních kapsidových proteinů. Konce viru je možné modifikovat cílicími peptidy. Není stabilní v nízkém pH [69].

3 VIRY

Viry mají klíčovou roli v biologických systémech a jde o nejvíc zastoupené biologické entity na planetě Zemi (zejména bakteriální viry zvané bakteriofágy) [90]. Kvůli své velmi jednoduché organizaci jsou řazeny do samostatné skupiny nebuněčných organismů. Liší se způsobem replikace i chováním vzhledem k okolí, kdy mimo hostitelské buňky vykazují stejnou stabilitu jako chemické molekuly.

Z hlediska složitosti jde o velmi heterogenní skupinu organismů. Nejjednodušší zástupci jsou tvořeni pouze jednou molekulou nukleové kyseliny se třemi geny a jedním typem proteinu, který má vždy podjednotky. Složitější viry mají proteinový obal tvořený více druhy, včetně enzymů, a dalšími molekulami, jako jsou lipidy.

Viry mají s buněčnými organismy ale i mnoho společného. Jsou tvořeny stejnými základními biopolymery jako buňky a vnější membrány složitějších virů mají podobnou stavbu jako membrány buněk, mohou totiž obsahovat polysacharidy i fosfolipidy. Používají také stejný genetický kód a podléhají stejným evolučním změnám. Díky těmto společným vlastnostem často viry slouží jako modelový systém při zkoumání procesů probíhajících v buňce [91]. Jako modelové organismy jsou vhodnější než některé eukaryotické organismy už kvůli své malé velikosti a velké rychlosti množení. Dají se také pěstovat na biochemicky přesně definovaných růstových médiích, jejichž jednotlivé složky jde dobře měnit a studovat tak jejich vliv na chemické nároky viru [92].

Viry vykazují vysokou druhovou a orgánovou specifitu k hostitelským buňkám, přičemž každý druh viru má svůj okruh hostitelských buněk. Na základě toho se viry rozdělují na viry rostlinné, živočišné, mykoviry (parazituji v houbách) a bakteriofágy (parazituji v bakteriích).

3.1 Struktura virionů

Viriony jsou jednotliví jedinci virového druhu. Jejich velikost a morfologie se liší, může jít o kulovitou, tyčinkovitou nebo vláknitou tělíska o rozměru 20-160 nm. Charakteristický tvar mají bakteriofágy, jejichž tělíska jsou tvořena hlavičkou, na kterou je zpravidla připojen bičík.

Struktura virionů je ale vždy podobná. Nukleová kyselina je u nich uzavřena do proteinového obalu zvaného kapsida, která je složená ze zpravidla identických podjednotek kapsomer. Daný druh virů má charakteristickou kvartérní strukturu kapsomer. Spojení nukleové kyseliny a kapsidy se označuje jako nukleokapsida [92].

Kapsomery mohou u některých virů obsahovat různé proteiny, ale všechny jsou vždy kódovány geny virového genomu. Prostorová struktura kapsidy se liší u virů vláknitých (helikálně uspořádané do cylindru) a kulovitých (pravidelný polyedr, nejčastěji ikozahedron). Kapsida z podjednotek vzniká autoorganizačním procesem, jsou tedy sebesestavující. K této autoagregaci dochází v buňce při tvorbě nových virionů. U virů se složitější strukturou, jako jsou bakteriofágy, se na tvorbě kapsidy podílejí pomocné proteiny kódované fágovými geny, které se ale ve struktuře zralých fágů neobjevují [92].

U obalených virů je nukleokapsida uzavřena do membrány podobné biomembránám buněk, která je těsně přiložena ke kapsidě. Lipidy v této membráně tvoří dvojité film, jsou syntetizovány buňkou, ale jsou charakteristické pro daný vir. Glykoproteiny jsou uloženy transmembránově, se sacharidovou částí orientovanou na povrch a proteinem vyčnívajícím ve formě hrotů. Proteiny vnějšího obalu jsou kódované virovými geny. Tvar kapsidy bývá polyedrický nebo helikální [92].

3.2 Virový genom

Genetická informace virů je tvořena jedinou molekulou nukleové kyseliny, které se někdy říká virový chromozom. Může být uložena ve formě ribonukleové kyseliny (RNA viry) nebo deoxyribonukleové kyseliny (DNA viry). U RNA virů je molekula RNA lineární jednovláknová nebo dvouvláknová s různou délkou (1000-6400 bp). Někdy je RNA molekula rozštěpena na několik segmentů [92].

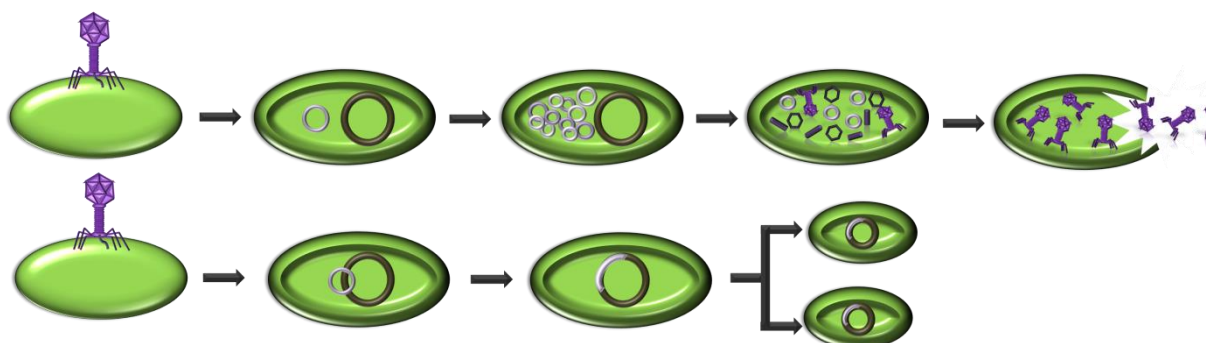
U DNA virů může být molekula DNA jednovláknová nebo dvouvláknová a lineární nebo cirkulární. U některých virů je na 5'konec každého vlákna kovalentně navázána molekula bílkoviny. Délka se může také lišit (5000-150000 bp) [92].

Určité nukleotidové sekvence fungují jako cistronické geny, které kódují virus specifické proteiny. Jiné sekvence fungují jako promotory (regulační oblasti). Smyslem produktů cistronických genů je zajistit replikaci virové nukleové kyseliny a ovlivnit syntézu

proteinů hostitelské buňky tak, aby tvořila všechny strukturní proteiny virionů nebo proteiny umožňující jejich uvolnění z buněk. Geny ve virovém genomu jsou sestaveny tak, že jejich postupným spouštěním se vytvářejí genové produkty potřebné pro daný krok reprodukce viru v buňce [92].

3.3 Reprodukce virů

Viry nejsou schopny autoreprodukce, jsou to parazité buněk, jejichž reprodukce je možná jen po vniknutí do hostitelské buňky. Ta poté svým metabolismem a proteosyntetickým aparátem syntetizuje všechny komponenty virionů a dojde tak k jejich pomnožení – vytvoření stovek až tisíců nových virů. Po pomnožení dochází k uvolnění virů z buněk a ty tak mohou infikovat další buňky. Tento proces se označuje jako lytický cyklus, jelikož vede k lýze hostitelské buňky. V některých případech se ale replikuje pouze virová nukleová kyselina bez tvorby zralých virionů nebo se virový genom začlení do genomu hostitelské buňky a replikuje se spolu s ním. Tento proces se označuje jako virogenie [92]. Obrázek 5 ukazuje rozdíl mezi průběhy virogenního (lyzogenního) a lytického cyklu.



Obrázek 5 Průběh lyzogenního a lytického cyklu u bakteriofága. Zpracováno podle [92].

3.3.1 Lytický cyklus

Tento cyklus se skládá ze 3 částí, a to adsorpce virů na buněčný povrch a proniknutí do buňky; reprodukce virionů; uvolnění virionů z buněk. Hostitelská buňka často při tomto cyklu hyne, a to buď degenerací v důsledku nevratné zástavy replikace nebo transkripce, nebo je smrt buňky naprogramována virem pro snadnější uvolnění virionů (například genem pro enzym podobný lysozymu) [92].

Adsorpce virů na povrch buněk je podmíněna přítomností receptorů na povrchu plazmatické membrány nebo ve vnější membráně buněčné stěny. To určuje hostitelskou specifitu viru k dané buňce. Přenos virů do buněk je uskutečněn různými mechanismy. U obalených virů může jejich membrána splynout s cytoplazmatickou membránou a nukleokapsida se tak dostat do cytoplazmy. U jiných virů dochází k receptory zprostředkované endocytóze, kdy se v membránovém váčku virion internalizuje a poté dojde ke splynutí obalu viru s ranými endozomy a nukleokapsida je uvolněna do cytoplazmy. U bakteriofágů je do cytoplazmy buněk injikována pouze nukleová kyselina, které v buněčné stěně vytvoří otvor lytický enzym bičíku [92].

Pro **reprodukcí virionů** jsou využívány buněčné metabolické procesy. Po internalizaci nukleokapsidy do buňky dojde k jejímu rozložení a uvolnění nukleové kyseliny. Hostitelská buňka poskytuje proteosyntetický aparát i energii pro syntézu virových bílkovin. Virová kyselina pouze dodává informaci, podle které jsou viriony vytvářeny, a některé viry vnášejí do buňky i enzym katalyzující některou z jednotlivých reakcí reprodukce. Jednotlivé části virionů jsou syntetizovány v buňce nezávisle na sobě a v různých buněčných kompartmentech a k jejich spojení dochází sekundárně [92].

Replikace virového genomu, syntéza virových mediátorových RNA (mRNA) a translace na proteiny se liší v závislosti na typu virové nukleové kyseliny [91]. Geny jsou exprimovány geneticky naprogramovanou posloupností událostí zvanou kaskády. Regulace časové kaskády probíhá na úrovni transkripce, kdy jsou produkty jedné sady genů zodpovědné za zapnutí další sady genů [92]. Rané proteiny zajišťují replikaci nebo transkripci nebo jde o regulační proteiny reprimující proteosyntézu hostitelské buňky [91]. Tyto geny jsou exprimovány nemodifikovanou hostitelskou RNA-polymerázou. Strukturální proteiny virionů jsou pozdní proteiny. Jsou přepisovány RNA-polymerázou kódovanou virovým genomem nebo hostitelskou RNA-polymerázou modifikovanou připojením virových proteinů [92].

K replikaci virového genomu dochází v jádře (DNA viry) nebo v cytoplazmě (RNA viry). Proteiny se tvoří na cytoplazmatických ribozomech, glykoproteiny na ribozomech vázaných na endoplazmatické retikulum [92]. Po syntéze dostatečného množství virové nukleové kyseliny a strukturálních proteinů dochází k maturaci viru. U strukturálně jednodušších jde o autoagregační proces determinovaný jen vlastnostmi komponent. U

složitějších (bakteriofágy) se jednotlivé komponenty skládají postupně a informace pro správný průběh této morfogeneze je dodávána pomocí templátových proteinů kódovaných virovým genomem. V případě virionů s vnější membránou se ty obalují při průchodu plazmatickou membránou hostitelské buňky, z membrány jaderného obalu, endoplazmatického retikula nebo Golgiho aparátu [92].

Zralé viriony se mohou **uvolnit z buňky** dvěma způsoby. Lytické enzymy fágů nebo autolytické procesy mohou způsobit lýzu buňky. Druhý způsob spočívá v postupné exocytóze virionů z buňky, realizované aktivitou cytoskeletu. Tím se z buněk vždy uvolňují obalené viry [92].

3.3.2 Virogenie

Virogenie je interakce virus-buňka, poprvé objevená u bakteriofágů, kde se nazývá lyzogenie. Virová DNA se kovalentně spojí s DNA chromozomu hostitelské buňky a dojde k její integraci do tohoto chromozomu. Integrovaná DNA se nazývá provirus. Replikuje se současně s DNA hostitelské buňky při jejím dělení, ale nedochází k její expresi. Vlivem induktorů může být virový genom aktivován a zahájí se reprodukční cyklus viru [92].

Bakteriofágy, jejichž infekce vede vždy k lytickému cyklu, se označují jako virulentní fágy. Infekce temperovanými fágy vede k lytickému cyklu jen v některých bakteriích, u ostatních se zahájí lyzogenní cyklus. DNA fága je při něm integrována do specifického místa chromozomu hostitelské bakterie (lyzogenizace) a bakterie se tím stává lyzogenní. Integrovaný vektor fága (profág) se replikuje spolu s chromozomem při každém buněčném dělení, čímž vzniká lyzogenní klon. Po uvolnění z chromozomu, ke kterému dochází spontánně u některých potomků nebo jde uměle vyvolat UV zářením nebo mitomycinem C, vstoupí fág do lytického cyklu [92].

3.4 Bakteriofág λ

Bakteriofág λ je kolifág (infikuje bakterii *Escherichia coli*) z rodiny *Siphoviridae*, který patří mezi temperované fágy. Jeho genom obsahuje asi 50 genů uložených v lineární dvouřetězcové DNA o délce 48 502 bp. Jeho kapsida má ikozahedrální tvar a průměr 50-60 nm. Molekula DNA je zabalena v hlavičce fága [92], obsahuje jednořetězcové komplementární konce (*cos*

místa) [93] a díky nim je brzy po injikaci do hostitele převedena za přítomnosti hostitelské ligázy do kružnicové formy. V buňce může vstoupit do lytické nebo lyzogenní dráhy [92].

Integrace chromozomu bakteriofága λ probíhá místně specifickou rekombinací mezi jeho kružnicovou DNA a kružnicovým chromozomem *E. coli*. Dochází k ní ve specifických připojovacích místech *attP* na λ chromozomu a *attB* na bakteriálním chromozomu a je zprostředkována λ integrázou, produktem genu *int* bakteriofága λ . V centrální oblasti připojovacích míst jsou stejné sekvence dlouhé 15 bp, zbytek sekvence je zcela odlišný. Tyto struktury také usnadňují pozdější excizi fága, která probíhá také místně specifickou rekombinací [92].

V lyzogenní bakterii se nesmí exprimovat jednotlivé geny profága, kódující proteiny lytického cyklu. Tyto geny jsou tak vypnuty jednoduchým obvodem represor-operátor-promotor. Gen *cI* bakteriofága λ kóduje represor, což je protein o velikost 27 kilodaltonů (kDa), který se ve formě dimeru váže na dvě operátorové oblasti kontrolující transkripci genů týkajících se lytického cyklu. Tyto operátorové oblasti se označují O_L (transkripce v levém směru) a O_R (transkripce v pravém směru) a překrývají se s promotorovou sekvencí, na kterou se váže RNA polymeráza. Tak nemůže být zahájena transkripce lytických genů fága [92].

Lyzogenní stav fága je poměrně stabilní, jeho geny jsou silně reprimovány a ke spontánnímu přepnutí do lytického cyklu dochází velmi zřídka (1 za 10^5 buněčných dělení). Tento přechod může být indukován ozářením UV světlem, což aktivuje proteázy hostitelské buňky, které štěpí vazebné oblasti λ -represoru. Proces vyčlenění je velmi přesný, vzniká stejný chromozom fága jako před začleněním. Pro vyčlenění je nutná činnost integrázy a excizázy (produkt genu *xis* bakteriofága). Při abnormálním vyčlenění může virus přenášet část bakteriální informace mezi bakteriemi [92].

Zda vstoupí fág λ do lytického nebo lyzogenního cyklu je dáno rovnovážným stavem mezi λ -represorem a Cro proteinem. Ten se také váže na O_L a O_R , ale jeho navázání spouští lytický cyklus [92].

Bakteriofág λ se může použít jako vektor pro klonování. Těchto vektorů je celá řada a liší se přítomností vhodných restričních míst, velikostí inzertu a tím, pro jaké účely má být vložená sekvence použita. Pro lytický cyklus je možné nahradit centrální třetinu genomu fága inzertem bez ovlivnění jeho reprodukce. Pokud se ale vložením inzertu zvětší genom na více než 105 % nebo zmenší na 78 %, klesá životnost fága [93].

4 MATERIÁLY A METODY

Tato část práce je věnována materiálu a metodám použitým pro vypracování experimentální části diplomové práce.

4.1 Chemikálie

Všechny použité chemikálie byly v ACS čistotě pořízeny od firmy Sigma-Aldrich Chemical Co. (USA), pokud není uvedeno jinak. Indikační *Escherichia coli* kmen GY 4015, produkční *Escherichia coli* kmen GY 5027 a bakteriofág λ byli pořízeni z České sbírky mikroorganismů (ČR). Složení Lysogeny broth (LB) média bylo následující: 1% trypton (Duchefa Biochemie B.V., Holandsko), 0,5% kvasniční extrakt (Duchefa Biochemie B.V., Holandsko) a 0,5% chlorid sodný. Složení LB agaru bylo následující: 1% trypton (Duchefa Biochemie B.V., Holandsko), 0,5% kvasniční extrakt (Duchefa Biochemie B.V., Holandsko), 0,5% chlorid sodný a 1,5% bakteriologický agar. Složení soft agaru bylo následující: 0,5% Pepton, 0,3% masový extrakt a 0,5% bakteriologický agar. Složení SM média bylo následující: 0,58% chlorid sodný, 0,2% heptahydrát síranu hořečnatého a 0,6057% Trisma báze (Tris) upravená pomocí kyseliny chlorovodíkové na pH 7,5.

Směs pro amplifikaci části genu *xis* bakteriofága λ byla připravena pomocí *Taq* PCR Kit firmy New England Biolabs Inc. (MA, USA). Primery pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) bakteriofága λ byly syntetizovány firmou Sigma-Aldrich Chemical Co. (MO, USA). Sekvence dopředného primeru byla následující: 5'-CCTGCTCTGCCGCTTCACGC-3'. Sekvence zpětného primeru byla následující: 5'-TCCGGATAAAAACGTCGATGACATTTGC-3'. Jako pozitivní kontrola při amplifikaci genu *xis* byla použita genomová DNA bakteriofága λ od firmy New England Biolabs Inc. (MA, USA).

250 ml 50× Tris-acetát-kyselina ethylendiamintetraoctová (TAE) pufru obsahovalo následující: 60,5 g Tris, 14,275 ml kyseliny octové a 25 ml 500·10⁻³M kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) pH 8. Složení nanášecího pufru GLS bylo následující: 50% glycerol, 0,1% bromfenolová modř. Složení nanášecího pufru PLB-R

bylo následující: 20% glycerol, 0,1% bromfenolová modř, $50 \cdot 10^{-3}$ M Tris-HCl, 2% SDS, 5% merkptoethanol.

Pro barvení polyakrylamidových gelů rychlým barvením Coomassie modří byly použity následující roztoky: *Roztok A*: 0,05% Coomassie Brilliant Blue R250 (CBR-250); 25% isopropanol a 10% kyselina octová. *Roztok B*: 0,005% CBR-250; 10% isopropanol a 10% kyselina octová. *Roztok C*: 0,002% CBR-250 a 10% kyselina octová. *Roztok D*: 10% kyselina octová.

Pro barvení polyakrylamidových gelů stříbrem byly použity následující roztoky: *Roztok B*: 50% metanol. *Roztok C*: 0,02% thiosíran sodný. *Roztok D*: 0,2% dusičnan stříbrný a 0,02812% formaldehyd. *Roztok E*: 6% uhličitan sodný; 0,0004% thiosíran sodný a 0,0185% formaldehyd. *Roztok F*: 6,4% metanol a 1,14% kyselina octová.

4.2 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy BAS 31(Boeco, Německo)
- Autokláv Tuttnauer 2540 el (Schoeller Instruments, s.r.o., ČR)
- Třepačka gelů WT17 (Biometra, Německo)
- Centrifuga 5417 R (Eppendorf, Německo)
- Ultracentrifuga CS 150 NX (Hitachi, Japonsko)
- Combi-spin FVL-2400 (Lotyšsko)
- Transiluminátor MULTIBAND TFX-26.MC (Vilber Lourmat, Francie)
- Elektroforéza Powder Pac Basic (Bio-Rad, USA)
- MagNA Pure Compact (Roche, Německo)
- Mastercycler® ep realplex 4 S (Eppendorf, Německo)
- Multiscan EX (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)
- Fluorimetr Infinite M200 Pro (Tecan, Švýcarsko)

4.3 Kultivace bakteriofága λ v tuhém médiu

Escherichia coli produkující bakteriofága λ i *Escherichia coli* indikující přítomnost bakteriofága λ byly ze zásobního roztoku naočkovány do 20 ml čistého LB média s 0,2%

obsahem maltózy v Erlenmayerových baňkách. Kultivace probíhala po dobu 24 hod při 37 °C a 600 rpm. Poté byla *Escherichia coli* produkující bakteriofága λ naočkována 5 vpichy do 20 ml LB agaru na Petriho misce a kultivována po dobu 24 hodin při 37 °C, přičemž došlo k vytvoření viditelných kultur v okolí vpichů. Produkční *E. coli* byla poté usmrcena chloroformem nasáknutou buničinou umístěnou na víčku Petriho misky. Inkubace s chloroformem probíhala 30 minut. Poté bylo víčko vyměněno za nové.

Petriho miska byla přelita 3 ml soft agaru s 1 ml bakterie *Escherichia coli* indikující přítomnost bakteriofága λ . Inkubace poté probíhala po dobu 12 hodin, kdy se již po 7 hodinách začaly vytvářet fágové plaky. Po 12 hodinách byly misky vyfoceny a spočítány plaky.

4.4 Metoda růstových křivek

Pro metodu růstových křivek bylo do mikrotitrační destičky naneseno 280 μ l kultury *Escherichia coli* naředěné na absorbanci 0,1 AU; 10 μ l zásobní fágové suspenze nebo čistého média v případě kontrolního vzorku a 10 μ l sledované látky s potenciální inhibiční aktivitou na růst mikroorganismu nebo viru nebo čistého média v případě kontrolního vzorku. Celkový objem v jamkách mikrotitrační destičky činil 300 μ l.

Měření probíhalo v čase 0, dále pak vždy v půlhodinových intervalech po dobu 24 hodin, při teplotě 37 °C a vlnové délce 620 nm na mikroskopickém analyzátoru Multiscan EX. Každý vzorek byl měřen ve 4 opakováních. Dosažené hodnoty byly vyneseny do grafické podoby ve formě růstových křivek.

4.5 Časová analýza kultivace bakteriofága λ v *Escherichia coli* produkující bakteriofága λ

Escherichia coli byla ze zásobního roztoku naočkována do 20 ml čistého LB média. Kultivace probíhala po dobu 24 hod při 37 °C a 600 rpm. Ihned a po 5, 10 a 24 hod naočkování bylo odebráno 400 μ l kultury a centrifugováno 10 minut při 20 °C a 6000 rpm.

Ze supernatantu byla izolována DNA bakteriofága λ na automatickém izolátoru nukleových kyselin MagNA Pure Compact, kitem Nucleic Acid Isolation I, protokolem

Plasma_NA, výchozí množství vzorku 400 μ l, eluce do 100 μ l. V případě izolace DNA *Escherichia coli* byl použit protokol DNA_Bacteria. Spektrofotometricky byla změřena koncentrace DNA a pro identifikaci byla provedena amplifikace části genu *xis* bakteriofága λ .

4.6 Amplifikace části genu *xis* a elektroforéza

Směs pro PCR byla připravena následovně: a) $1\times$ Taq pufr; b) $200\cdot 10^{-6}$ M dNTP; c) $0,2\cdot 10^{-6}$ M forward primeru; d) $0,2\cdot 10^{-6}$ M reverse primeru; e) 0,625 U Taq polymerázy; f) 5 μ l DNA. Všechny chemikálie byly před přidáním do reakční směsi protřepány a odstředěny, s výjimkou Taq polymerázy, která byla pouze odstředěna.

Vytvořená reakční směs byla promíchána a vložena do přístroje, na kterém byl nastaven následující teplotní profil: počáteční denaturace probíhala po dobu 2 minut při 95 °C, poté proběhlo 30 cyklů s denaturací po dobu 15 s při 95 °C, hybridizací po dobu 15 s při 64 °C a polymerací po dobu 45 s při 72 °C. Závěrečná polymerace probíhala po dobu 5 minut při 72 °C. PCR produkt byl následně krátkodobě skladován při teplotě 4 °C. Získaný ampikon měl délku 500 bp.

Na elektroforézu ampikonů *xis* genu byl použit 2% agarózový gel High melt/Medium fragments s $1\times$ TAE pufr. Gel byl při přípravě obarven Ethidium bromidem (5 μ l/100 ml gelu). 5 μ l vzorku bylo smícháno s 2 μ l nanášecího pufru GLS a nanášeno do jamky v gelu. Elektroforéza probíhala 60 min při 100 V.

4.7 Kultivace bakteriofága λ v indikační *E. coli* v tekutém médiu

Escherichia coli indikující bakteriofága λ byla naočkována do 20 ml čistého LB média. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin při 37 °C a 600 rpm. 500 μ l této kultury bylo smícháno s 50 μ l bakteriofága λ purifikovaného po kultivaci na Petriho miskách. Aby mohl být bakteriofág adsorbován na povrch hostitelských buněk, byly vzorky inkubovány 15 minut při 37 °C bez třepání. Poté bylo přidáno 20 ml LB média a kultivace probíhala po dobu 7 hod při 37 °C a 600 rpm.

4.8 Purifikace bakteriofága λ

Z kultivované kultury *Escherichia coli* (kmen GY 4015) s bakteriofágem λ na Petriho miskách byla kultivační kličkou odebrána vrchní vrstva soft agaru obsahující plaky do 3 ml SM média a 0,5 ml chloroformu. Vzorky byly ponechány 1 hod při 25 °C, aby došlo k uvolnění plaků do SM média. Následně byly centrifugovány po dobu 10 min při 6000 rpm a 4 °C pro usazení soft agaru a po dobu 6 minut při 20 °C a 7000 rpm pro usazení *E. coli*. Pelet obsahující *E. coli* a další nečistoty byl odstraněn a supernatant byl ultracentrifugován 3 hod při 4 °C a 34000 rpm. Pelet byl resuspendován ve fosfátovém pufru a přes noc inkubován při 4 °C. Následně byl vzorek separován ultracentrifugací na 30/60% sacharózovém gradientu po dobu 3 hod při 4 °C a 34000 rpm.

4.9 Elektroforéza fágových proteinů

Byl použit 12,5% SDS-PAGE gel. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit Experion Pro260 Ladder. 10 μ l vzorku bylo smícháno s 5 μ l nanášecího pufru PLB-R a naneseno do jamky gelu. 1 μ l žebříčku byl smíchán s 4 μ l vody ACS čistoty a 2,5 μ l nanášecího pufru PLB-R a nanesen do jamky v gelu. Elektroforéza probíhala 90 min při 80 V.

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

Stejný gel byl následně obarven stříbrem. Gel se inkuboval 10 min v roztoku B při 20 °C za současného třepání na 600 rpm. Následně probíhala inkubace 1 min v roztoku C a propláchnutí gelu v demineralizované vodě po dobu 20 s. Gel se pak inkuboval v roztoku D 20 min při 20 °C a 600 rpm a byl krátce propláchnut demineralizovanou vodou. Inkubace v roztoku E probíhala až do požadovaného zbarvení, načež byl gel ihned propláchnut destilovanou vodou a inkuboval se ve fixovacím roztoku F.

4.10 Enkapsulace doxorubicinu do bakteriofága λ

K 80 μ l bakteriofága λ bylo přidáno 80 μ l doxorubicinu o různých koncentracích (200; 100; 50; 25; 12,5 a 0 μ g/ml). Inkubace probíhala 2 hod v temnu při 25 °C bez třepání. Doxorubicin, který nebyl enkapsulován, byl následně dialyzován v kolonkách Amicon 3K (MERCK-Millipore, MA, USA) po dobu 15 min při 7000 rpm a 20 °C. Vzorek byl 2 \times promyt vodou. Objem byl poté doplněn na původní (160 μ l).

Bylo změřeno absorpční spektrum bakteriofága s enkapsulovaným doxorubicinem. Měřeny byly vlnové délky 200-800 nm. Následně bylo také změřeno emisní spektrum doxorubicinu s excitační vlnovou délkou 480 nm a emisní 515-815 nm. Vzorky byly separovány SDS-PAGE elektroforézou, gel byl následně vyfocen po excitaci UV světlem pro vizualizaci doxorubicinu a obarven coomassie blue barvením pro vizualizaci proteinů.

Byla provedena amplifikace genu *xis* za standardních podmínek z 2,5 μ l bakteriofága λ . Byla izolována DNA bakteriofága λ na automatickém izolátoru nukleových kyselin MagNA Pure Compact, kitem Nucleic Acid Isolation I, protokolem Plasma_NA, výchozí množství vzorku 100 μ l, eluce do 50 μ l. U izolované DNA bylo změřeno absorpční spektrum vlnových délek 200-800, její koncentrace a emisní spektrum s excitační vlnovou délkou 480 nm a emisní 515-815 nm.

Pro ověření přítomnosti doxorubicinu v DNA byla provedena deprivatizace fluoreskaminem. K 50 μ l izolované DNA bylo přidáno 30 μ l derivatizačního činidla fluoreskaminu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M, které se váže na primární -NH skupiny. Inkubace probíhala 5 minut a bylo změřeno emisní spektrum s excitační vlnovou délkou 390 nm a emisní 420-850 nm.

4.11 Enkapsulace doxorubicinu do apoferritinu

80 μ l apoferritinu o koncentraci 20 μ g/ml bylo smícháno s 80 μ l doxorubicinu o různých koncentracích (200; 100; 50; 25; 12,5 a 0 μ g/ml). Po přidání 1 μ l 1M kyseliny chlorovodíkové došlo k rozvolnění struktury apoferritinu vlivem pH nižšího než 3 a jeho části mohly být po protřepání smíchány s molekulami doxorubicinu. Inkubace probíhala 15 minut. Pro enkapsulaci byl následně přidán 1 μ l 1M hydroxidu sodného, který vytvořil neutrální pH.

Díky tomu byly opět sestaveny podjednotky apoferritinu a do jeho dutiny byl uzavřen doxorubicin. Vzorky se následně inkubovaly 2 hod při 600 rpm a 25 °C. Doxorubicin, který nebyl enkapsulován, byl následně dialyzován v kolonkách Amicon 3K po dobu 15 min při 7000 rpm a 20 °C. Vzorek byl 2× promyt vodou. Objem byl poté doplněn na původní (160 µl).

Bylo změřeno absorpční spektrum apoferritinu s enkapsulovaným doxorubicinem. Měřeny byly vlnové délky 200-800 nm. Následně bylo také změřeno emisní spektrum doxorubicinu s excitační vlnovou délkou 480 nm a emisní 515-815 nm. Vzorky byly separovány SDS-PAGE elektroforézou, gel byl následně vyfocen po excitaci UV světlem pro vizualizaci doxorubicinu a obarven coomassie blue barvením pro vizualizaci proteinů.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této části diplomové práce jsou uvedeny výsledky experimentů, při kterých byla studována časová závislost růstu bakteriofága λ a následně byl tento bakteriofág purifikován z hostitelské kultury bakterie *Escherichia coli* ultracentrifugací v sacharózovém gradientu. Proteiny bakteriofága byly poté zobrazeny po separaci gelovou elektroforézou. Do purifikovaného viru bylo enkapsulováno léčivo doxorubicin a jeho schopnosti enkapsulace byly srovnány s proteinovým nanotransportérem na základě apoferritinu.

5.1 Kultivace bakteriofága λ v tuhém médiu

Běžné postupy kultivace bakteriofága λ spočívají v kultivaci s bakterií *Escherichia coli* na bakteriálním agaru obsahujícím Trypton a chlorid sodný. *E. coli* produkující bakteriofága λ (dále jako produkční *E. coli*) je po 24hodinové kultivaci v tekutém médiu vpichy naočkována do LB agaru na Petriho misce. Po dalších 24 hodinách je přelita agarem obsahujícím bakterii *Escherichia coli* indikující přítomnost bakteriofága λ (dále jako indikační *E. coli*) tvorbou plaků. Ty vznikají lýzou indikační *E. coli* [94].

5.1.1 Vliv přítomnosti maltózy v kultivačním médiu na vznik fágových plaků

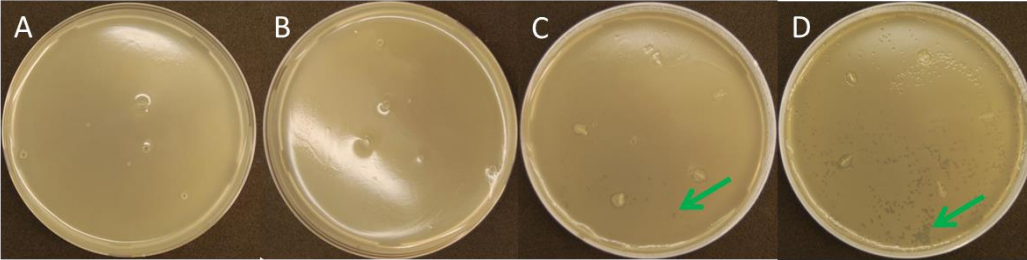
Povrchové proteiny bakterie *E. coli*, které slouží jako receptory zodpovědné za přichycení bakteriofága λ , slouží buňce jako přenašeče maltózy. Jejich syntéza je indukována maltózou, bakterie by tak měly být kultivovány v médiu, které ji obsahuje. Naopak inhibována je jejich syntéza přítomností sacharózy v okolí buňky [93].

Nutnost kultivace v médiu s obsahem maltózy obou *E. coli* potřebných pro namnožení bakteriofága λ a vytvoření plaků byla ověřena experimentem, kdy byly *E. coli* kultivovány v médiu bez přídavku maltózy a s ním (0,2%).

Chyba! Nenalezen zdroj odkazů. ukazuje závislost počtu vzniklých plaků na přítomnosti maltózy v médiu obou typů *E. coli*. Je vidět, že pro tvorbu plaků je přítomnost maltózy v médiu velmi důležitá. Žádné plaky nebyly pozorovány, pokud se maltóza nenacházela v médiu ani produkční, ani indikační *E. coli* (Obrázek 6A), ale ani v případě, že maltóza chyběla pouze v médiu produkční *E. coli*, ale indikační byla kultivována s jejím

přídavkem (Obrázek 6B). Malý počet plaků (26) vznikl, pokud byla produkční *E. coli* kultivována s přídavkem maltózy, ale indikační *E. coli* bez přídavku (Obrázek 6C). Nejlepších výsledků (692 vzniklých plaků) bylo dosaženo, pokud byly oba použité kmeny *E. coli* kultivovány v médiu s přídavkem maltózy (Obrázek 6D).

Z uvedených výsledků je vidět, že na tvorbu plaků má maltóza velký vliv. Zejména je nutné kultivovat v médiu s obsahem maltózy produkční *E. coli*, která je tak schopna produkovat dostatečný počet virionů bakteriofága λ . Pro účinné uchycení bakteriofága na indikační *E. coli*, jeho pomnožení v ní a vytvoření plaků je nutná přítomnost maltózy i při kultivaci indikační *E. coli*. Jsou tak vytvořeny receptory, kvůli kterým může bakteriofág λ vstoupit do hostitelských buněk.



Maltóza v médiu produkční <i>E.coli</i>	-	-	+	+
Maltóza v médiu indikační <i>E.coli</i>	-	+	-	+
Počet plaků	0	0	26	692

Obrázek 6 Kultivace produkční a indikační *E. coli* v médiu s přídavkem maltózy a bez něj

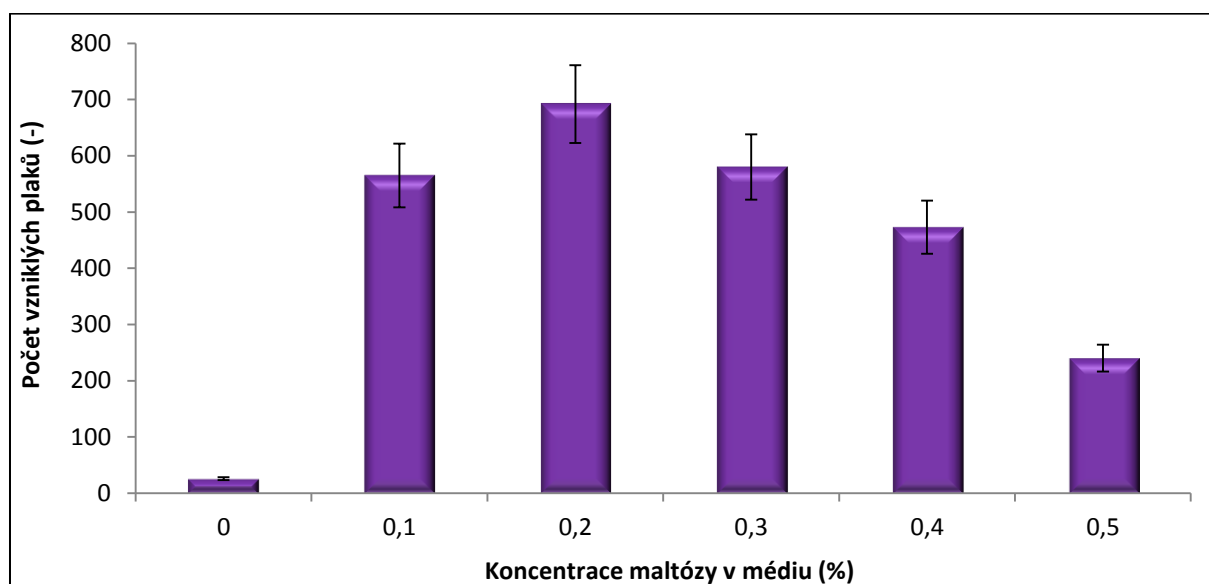
5.1.2 Vliv koncentrace maltózy v kultivačním médiu na vznik fágových plaků

Na základě výsledků předchozího experimentu byl následně testován vliv různých koncentrací maltózy v kultivačním médiu na počet vzniklých plaků bakteriofága λ v kultuře indikační *E. coli*. Při tomto experimentu byla produkční *E. coli* kultivována s přídavkem 0,2% maltózy a indikační *E. coli* s přídavkem 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5% maltózy. Byl proveden vpichový pokus a u jednotlivých misek byly spočítány vzniklé fágové plaky.

Obrázek 7 ukazuje závislost počtu vzniklých plaků bakteriofága λ na koncentraci maltózy v médiu. Je vidět, že se vzrůstající koncentrací maltózy roste počet plaků. Tato

závislost je však patrná jen do koncentrace maltózy 0,2%. Při vzrůstajících koncentracích počet vzniklých plaků klesá.

Z uvedených výsledků je zřejmé, že pro vytvoření plaků bakteriofága λ je vhodné kultivovat *E. coli* v médiu s 0,2% koncentrací maltózy. Stejného trendu bylo dosaženo i v případě různých koncentrací maltózy v kultivačním médiu produkční *E. coli*. To potvrzují i běžné postupy kultivace bakteriofága λ [94]. Při této koncentraci dochází k uchycení bakteriofága λ na povrch hostitelské bakterie v největší míře a je tak pomnoženo nejvíce virionů, které je poté možné dále využít. Proto jsme pro všechny následující experimenty kultivovali indikační i produkční *E. coli* vždy v médiu s obsahem 0,2% maltózy.



Obrázek 7 Závislost počtu vzniklých plaků bakteriofága λ na koncentraci maltózy v médiu

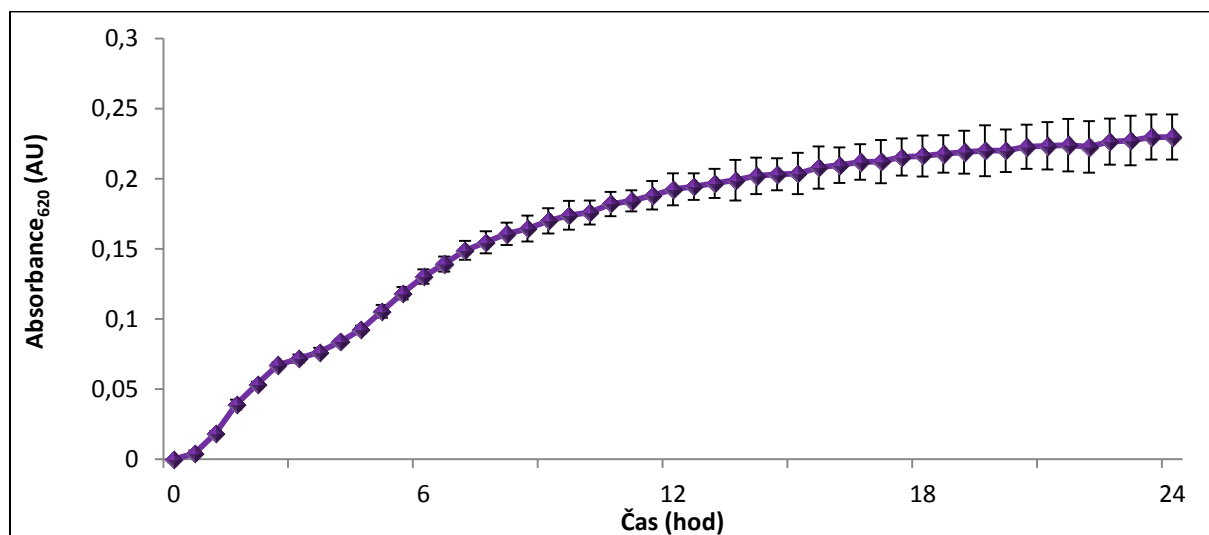
5.2 Časová závislost růstu bakteriofága λ v tekutém médiu

Bakteriofág λ je produkován během kultivace produkční *E. coli* v tekutém médiu. Po naočkování produkční *E. coli* do LB agaru na Petriho miskách je nutné misky nějakou dobu kultivovat do vytvoření viditelné bakteriální kultury. Abychom ověřili, jak dlouho je nutné produkční *E. coli* kultivovat, provedli jsme měření časové závislosti růstu bakteriofága λ v tekutém médiu.

5.2.1 Růstové křivky produkční *E. coli*

Nejdříve byl metodou růstových křivek změřen růst kultury produkční *E. coli*. Tato metoda probíhala měřením absorbance média obsahujícího bakteriální kulturu při vlnové délce 620 nm vždy po 30 minutách po dobu 24 hodin. Standardní postupy kultivují bakterie a viry nejvýše po dobu 24 hodin [94], proto jsme při našem experimentu také neprováděli delší kultivaci.

Obrázek 8 ukazuje růstovou křivku kultury produkční *E. coli* v průběhu 24 hodin. V průběhu času lze pozorovat zvyšující se absorbanci, což ukazuje na zvýšení počtu *E. coli* v médiu. Exponenciální fáze růstu produkční *E. coli* za daných podmínek probíhá prvních 10 hodin, poté dojde k vyčerpání živin a nastává stacionární fáze růstu, kdy se počet buněk *E. coli* příliš nemění. Vlivem vzniku různých toxických produktů je v této fázi zhoršena opakovatelnost měření.



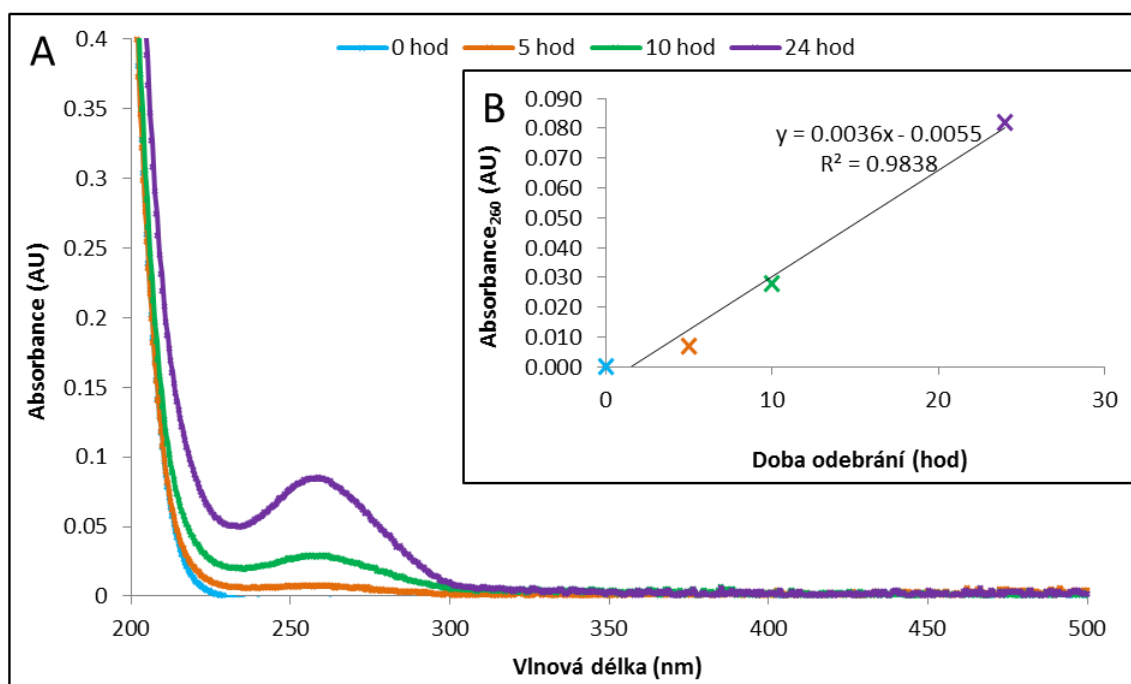
Obrázek 8 Růstová křivka produkční *E. coli*

5.2.2 Analýza množství viru v kultuře produkční *E. coli* v časových intervalech

Získané výsledky naznačují, že pro kultivaci bakteriofága λ v bakteriálním agaru na Petriho miskách před jeho přelitím indikační *E. coli* je dostatečný čas 10 hodin. Provedli jsme ale také analýzu množství viru v kultuře v různých časových intervalech. Ihned po naočkování média kulturou produkční *E. coli* a po 5, 10 a 24 hodinách kultivace jsme odebrali vzorek kultury a pomocí automatického izolátoru nukleových kyselin jsme izolovali DNA bakteriofága λ .

Bylo změřeno absorpční spektrum (Obrázek 9A) této bakteriofágové DNA a její absorbance při vlnové délce 260 nm byla vynesena do grafu (Obrázek 9B). Při této vlnové délce se běžně měří koncentrace DNA v roztoku [94]. Koncentrace DNA, a tím i množství bakteriofága v kultuře se v čase lineárně zvyšuje, přičemž nejvyšší koncentrace bylo dosaženo po 24 hod kultivace.

I přesto, že se již po 10 hodinách kultivace nezvyšuje počet produkční *E. coli*, z uvedených výsledků je patrné, že množství bakteriofága roste i po tomto čase. Z tohoto důvodu jsme při všech našich následujících experimentech kultivovali bakteriofága λ v produkční *E. coli* na Petriho miskách právě po dobu 24 hodin.



Obrázek 9 Spektrofotometrické stanovení DNA bakteriofága λ . A Absorpční spektrum DNA. B Absorbance při vlnové délce 260 nm

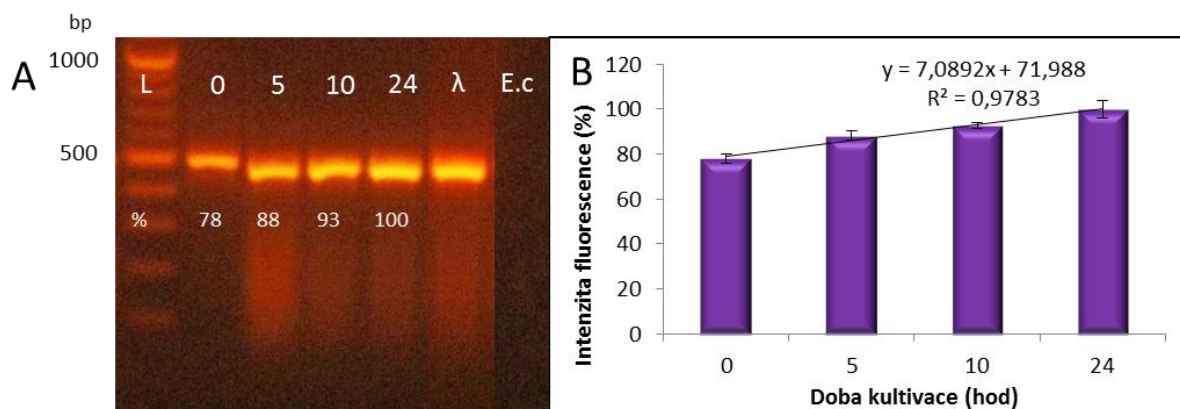
5.2.3 Amplifikace genu specifického pro genom bakteriofága λ

Podmínky izolace DNA na automatickém izolátoru nukleových kyselin při zvoleném protokolu by podle technických specifikací přístroje neměly být dostatečné pro izolaci bakteriální DNA kvůli bakteriální buněčné stěně, vzorky by tak měly odpovídat DNA bakteriofága λ . Pro bližší ověření jsme u DNA jednotlivých vzorků odebraných po určitém čase kultivace provedli amplifikaci genu *xis*, který se nachází v genomu bakteriofága λ .

Obrázek 10 ukazuje výsledky amplifikace genu *xis* po separaci na gelové elektroforéze. Při ní se nabitě molekuly pohybují v elektrickém poli, přičemž rychlost jejich pohybu je závislá na velikosti náboje a velikosti molekuly. Gel pro tuto elektroforézu byl vyroben z agarózy, jelikož jsme separovali DNA, což je relativně velká molekula. Pro separaci proteinů (viz dále) je vhodné použít polyakrylamidový gel (PAGE). Jelikož sledovaný amplicon má velikost přibližně 500 bp, použili jsme 2% gel. Pro separaci velkých molekul by se použil gel řidší, pro separaci menších úseků DNA gel hustší. Pro přesnější určení velikosti fragmentů byl použit komerčně dostupný marker molekulové hmotnosti. Jelikož fragmenty jsou okem neviditelné, použilo se pro jejich označení interkalační barvivo Ethidium bromid, které vykazuje fluorescenci po excitaci UV světlem [95].

Vzorky byly stejné jako v předchozím experimentu, tedy odebrané po 0, 5, 10 a 24 hodinách kultivace. Jako pozitivní kontrola byla použita komerčně dostupná DNA bakteriofága λ . Tento gen byl také amplifikován ve vzorku indikační *E. coli* bez přídavku bakteriofága λ , jejíž DNA byla na automatickém izolátoru nukleových kyselin izolována za podmínek sloužících právě k izolaci bakteriální DNA.

Intenzita fluorescence ampliconů na gelu (Obrázek 10A) byla vynesena do grafu (Obrázek 10B). Je vidět, že množství amplifikovaného produktu roste lineárně v závislosti na čase odběru vzorku, přičemž velikost ampliconu je stejná jako u kontrolní DNA (498 bp [96]). V případě amplifikace v kontrolní kultuře *E. coli* je vidět, že žádný produkt nevznikne. To potvrzuje, že izolovaná DNA je opravdu virového, nikoliv bakteriálního původu.



Obrázek 10 Amplifikace genu *xis* ve vzorcích bakteriofága λ odebraných po 0 (řada 0), 5 (řada 5), 10 (řada 10) a 24 (řada 24) hodinách kultivace produkční *E. coli*; v pozitivní kontrole (řada λ) a v indikační *E. coli* bez přídavku bakteriofága λ (řada *E.c*). Srovnání s markerem molekulové hmotnosti (řada *L*). B) Graf závislosti intenzity fluorescence ampliconů na době kultivace

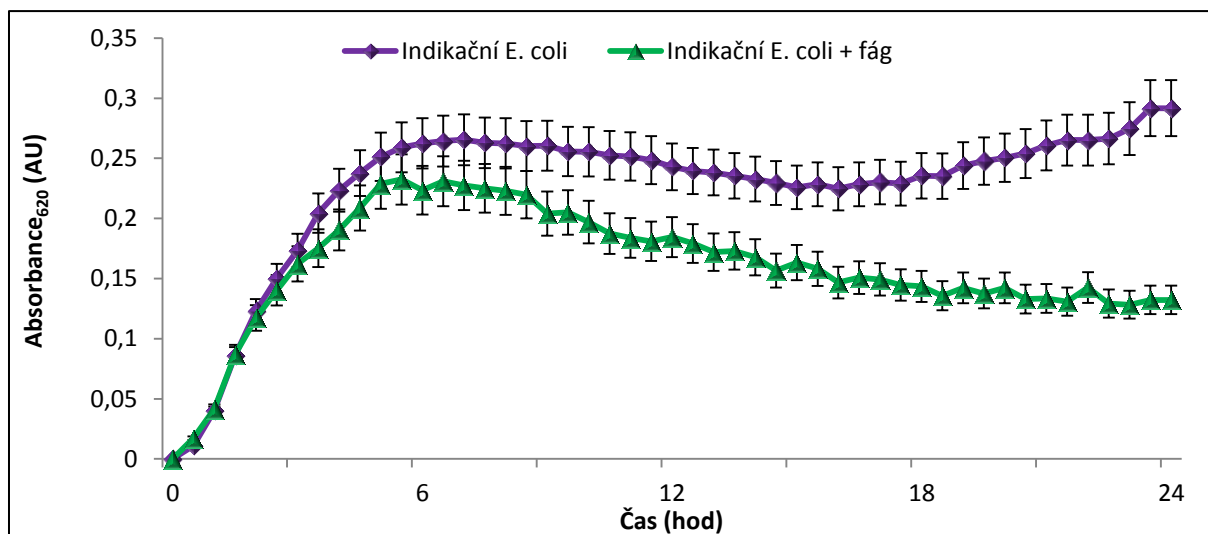
5.2.4 Růstové křivky indikační *E. coli* s bakteriofágem λ

Postup kultivace bakteriofága λ na Petriho miskách je relativně zdlouhavý. Je při něm nutné sterilizovat nejen živné médium pro *E. coli*, ale i bakteriální agar. Ten je poté nutné temperovat na potřebnou teplotu. Purifikace pak vyžaduje uvolnění bakterií a virionů z agaru, odstranění *E. coli*, odstranění dalších nečistot a separaci jednotlivých typů bakteriofága. Touto kultivací je také získán relativně malý objem bakteriofága z jedné Petriho misky, což může být problém při dalších experimentech [93]. Proto je někdy vhodné bakteriofága kultivovat s indikační *E. coli* v tekutém médiu.

To, že bakteriofág λ je schopen se přichytit na povrchu buněk *E. coli* a infikovat je i v tekutém médiu za stálého promíchávání, jsme ověřili metodou růstových křivek. Obrázek 11 ukazuje kulturu indikační *E. coli* kultivovanou s bakteriofágem λ ve srovnání s kulturou *E. coli* bez bakteriofága λ . U kontrolního vzorku obsahujícího samotnou *E. coli* (fialová linie) je možné v průběhu času pozorovat zvyšující se absorbanci, což ukazuje na zvýšení počtu *E. coli* v médiu. Exponenciální fáze růstu indikační *E. coli* probíhá v prvních 6 hodinách kultivace, poté nastává stacionární fáze.

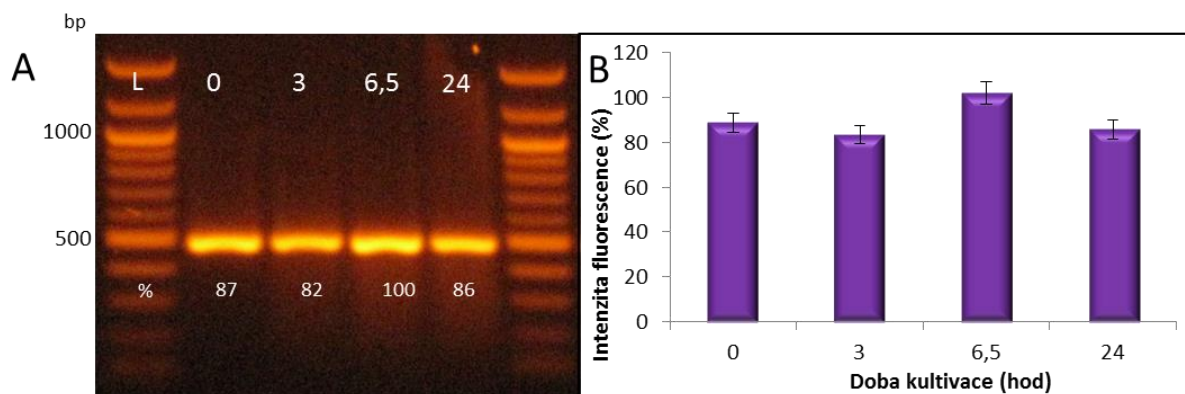
Nová generace bakteriofága λ se vytvoří po 5,5-6,5 hodinách od infikování hostitelské buňky *E. coli*. Z jednoho virionu se po lýze hostitelské buňky namnoží až 50 nových virionů [79]. Ve vzorku *E. coli* kultivované s bakteriofágem λ (zelená linie) je vidět exponenciální fáze růstu bakterie stejně jako v případě kontrolní kultury bez přídavku bakteriofága. Po

přibližně 6,5 hodinách však dochází k poklesu absorpance, který je způsoben lýzou indikační *E. coli* a uvolněním dospělých virionů do okolí.



Obrázek 11 Růstové křivky indikační *E. coli* a indikační *E. coli* s bakteriofágem λ

Provedli jsme také analýzu množství viru v této kultuře v různých časových intervalech podobně jako v případě produkční *E. coli*. Časové intervaly se však kvůli výsledku růstových křivek lišily. Ihned po naočkování média kulturou produkční *E. coli* a po 3, 6,5 a 24 hodinách kultivace jsme odebrali vzorek kultury a pomocí automatického izolátoru nukleových kyselin jsme izolovali DNA bakteriofága λ . U vzorků byl amplifikován gen *xis*, nacházející se v genomu bakteriofága λ (Obrázek 12A). Po separaci na gelové elektroforéze byla intenzita fluorescence vyhodnocena a vynesena do grafu (Obrázek 12B).



Obrázek 12 A) Amplifikace genu *xis* ve vzorcích bakteriofága λ odebraných po 0 (řada 0), 3 (řada 3), 6,5 (řada 6,5) a 24 (řada 24) hodinách kultivace v indikační *E. coli*. Srovnání s markerem molekulové hmotnosti (řada L). B) Graf závislosti intenzity fluorescence amplikonů na době kultivace

Z výsledků je patrné, že množství bakteriofága je 3 hodiny po začátku kultivace nižší než na jejím začátku. To je pravděpodobně způsobeno vstupem bakteriofága λ do hostitelských buněk, jejichž stěna není za daných podmínek zlyzovaná. Nejvyšší množství bakteriofága se objevuje po 6,5 hodinách, což odpovídá dostupné literatuře [94]. Po 24 hodinách je množství bakteriofága λ menší, pravděpodobně je opět částečně v hostitelských buňkách. Při kultivaci bakteriofága λ v indikační *E. coli* je tak vhodným časem 6,5 hodiny. Při kultivaci na Petriho miskách a tvorbě plaků je však v literatuře doporučený čas dvojnásobný, čili 12-16 hodin [94].

5.3 Analýza proteinů virové kapsidy

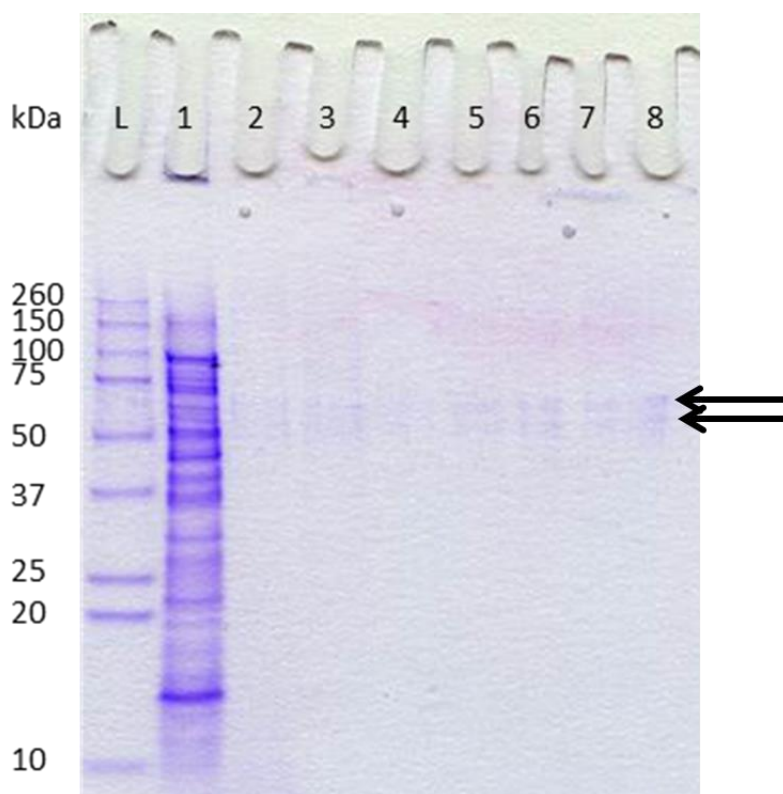
Předchozí experimenty sloužili k ověření způsobu, jakým je možné kultivovat bakteriofága λ . Byla v nich získána jeho DNA, jeho proteiny ale byly během postupu degradovány. Pokud bychom chtěli použít kapsidu bakteriofága λ jako nanotransportér léčiv, je nutné získat celého neporušeného bakteriofága, očištěného od zbytku *E. coli* a dalších nečistot. Toto přečištění většinou zahrnuje centrifugaci média obsahujícího *E. coli* a bakteriofága λ , při které se usadí *E. coli* ke dnu zkumavky, ale bakteriofág zůstane v supernatantu. Ten je posléze ultracentrifugován pro usazení bakteriofága λ na dně zkumavky, kde je resuspendován v malém objemu fosfátového pufru a inkubován přes noc při 4 °C. Poté se mohou jednotlivé typy fágové kapsidy a další proteiny separovat na sacharózovém gradientu [97].

V každém kroku této purifikace a z každé frakce gradientu jsme odebrali vzorek, u kterého jsme následně analyzovali proteiny v něm obsažené pomocí gelové elektroforézy a také jsme amplifikací genu *xis* sledovali, zda tyto proteiny opravdu patří kapsidě bakteriofága λ .

Proteiny jsme analyzovali na polyakrylamidovém gelu, jehož lineární molekuly vznikají kopolymerací akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu za přítomnosti katalyzátorů peroxydisíranu amonného (APS) a N,N,N',N'-tetrametyletylendiaminu (TEMED). Aby proteiny v elektrickém poli migrovaly, používá se dodecylsírán sodný (SDS), který se na ně naváže a udělí jim vysoký záporný náboj, který je přímo úměrný jejich hmotnosti (váže se v poměru 1,4 g SDS na 1 g proteinu). Díky zápornému náboji migrují proteiny k anodě a separují se v gelu na principu molekulárního síta podle hmotnosti (uděleného náboje). [95].

Jelikož proteiny jsou (stejně jako DNA) na gelu pouhým okem neviditelné, je nutné je obarvit. Je možné použít barvení coomassie modří nebo stříbrem. Coomassie modř je aniontové barvivo, které se na proteiny váže nespecificky v roztoku metanolu a kyseliny octové. Ta fixuje proteiny v gelu. Barvivo obarví i gel, je proto nutné tyto molekuly nenavázané na proteiny odstranit inkubací ve stejném roztoku bez přídavku coomassie modře [95].

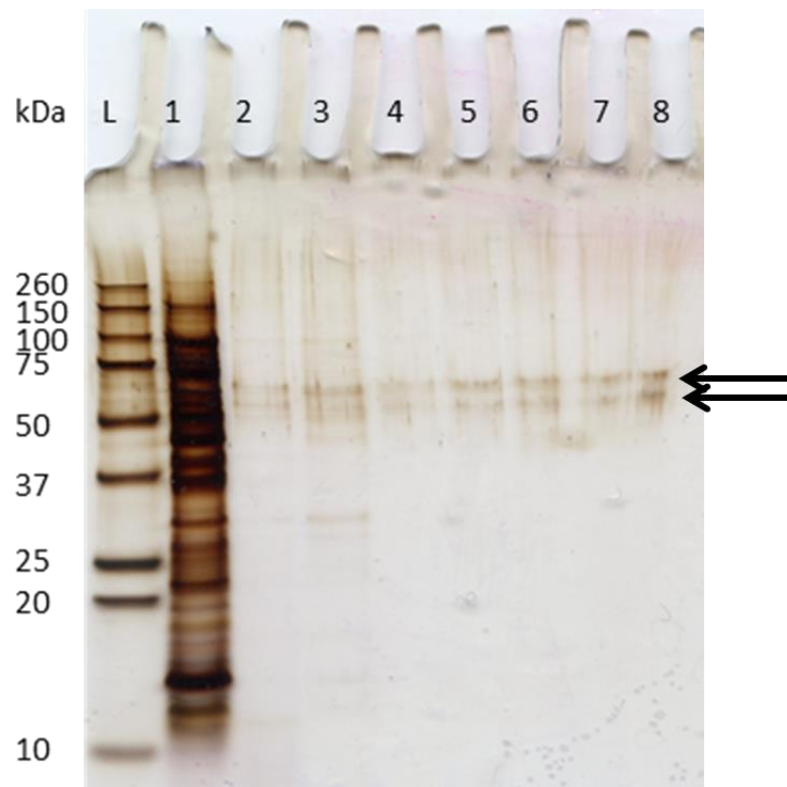
Obrázek 13 ukazuje výsledky analýzy proteinů jednotlivých vzorků PAGE elektroforézou po obarvení gelu coomassie modří. Je vidět, že ve vzorku, ve kterém bylo pouze odebráno kultivační médium obsahující *E. coli* i bakteriofága λ bez jakékoliv purifikace (řada 1) se nachází velké množství proteinů, převážně bakteriálního původu. Tímto postupem by tak nebylo možné získat fágovou kapsidu pro její využití jako nanotransportéru. Kvůli nízké citlivosti barvení coomassie modří jsou v ostatních vzorcích (řady 2-8) vidět pouze 2 proteiny, které ale prozatím nelze identifikovat.



Obrázek 13 Analýza proteinů bakteriofága λ gelovou elektroforézou, gel obarvený coomassie modří. *L* Marker molekulové hmotnosti. *Vzorek 1* Přímo odebrané médium *E. coli* kultivované s bakteriofágem λ . *Vzorek 2* Supernatant po centrifugaci vzorku 1. *Vzorek 3* Pelet vzniklý ultracentrifugací vzorku 2 a resuspendovaný ve fosfátovém pufru. *4* První frakce sacharózového gradientu po ultracentrifugaci vzorku

3. 5 Druhá frakce sacharózového gradientu (20% sacharóza). 6 Třetí frakce sacharózového gradientu (30% sacharóza). 7 Čtvrtá frakce sacharózového gradientu (40% sacharóza). 8 Pátá frakce sacharózového gradientu (60% sacharóza).

Jelikož po obarvení coomassie modří bylo kvůli jeho malé citlivosti možné vidět pouze 2 proteiny na gelu, obarvili jsme proteiny i stříbrem. Barvení stříbrem je více senzitivní než barvení coomassie modří. Při něm se proteiny nejdříve zafixují v gelu fixačním roztokem obsahujícím isopropanol a kyselinu octovou a následně se dusičnan stříbrný naváže na proteiny v gelu. K samotnému barvení dochází redukcí tohoto stříbra vlivem thiosíranu a uhličitanu sodného a po dostatečné době působení je proces barvení zastaven kyselinou octovou. Doba redukce se většinou volí tak, aby byly vidět proteiny zájmu i v malých koncentracích, ale zároveň aby nedošlo ke splynutí bandů proteinů, které se v gelu nacházejí ve velké koncentraci [95].



Obrázek 14 Analýza proteinů bakteriofága λ gelovou elektroforézou, gel obarvený stříbrem. *L* Marker molekulové hmotnosti. *Vzorek 1* Přímě odebrané médium *E. coli* kultivované s bakteriofágem λ . *Vzorek 2* Supernatant po centrifugaci vzorku 1. *Vzorek 3* Pelet vzniklý ultracentrifugací vzorku 2 a resuspendovaný ve fosfátovém pufru. *4* První frakce sacharózového gradientu po ultracentrifugaci vzorku 3. *5* Druhá frakce sacharózového gradientu (20% sacharóza). *6* Třetí frakce sacharózového gradientu

(30% sacharóza). 7 Čtvrtá frakce sacharózového gradientu (40% sacharóza). 8 Pátá frakce sacharózového gradientu (60% sacharóza).

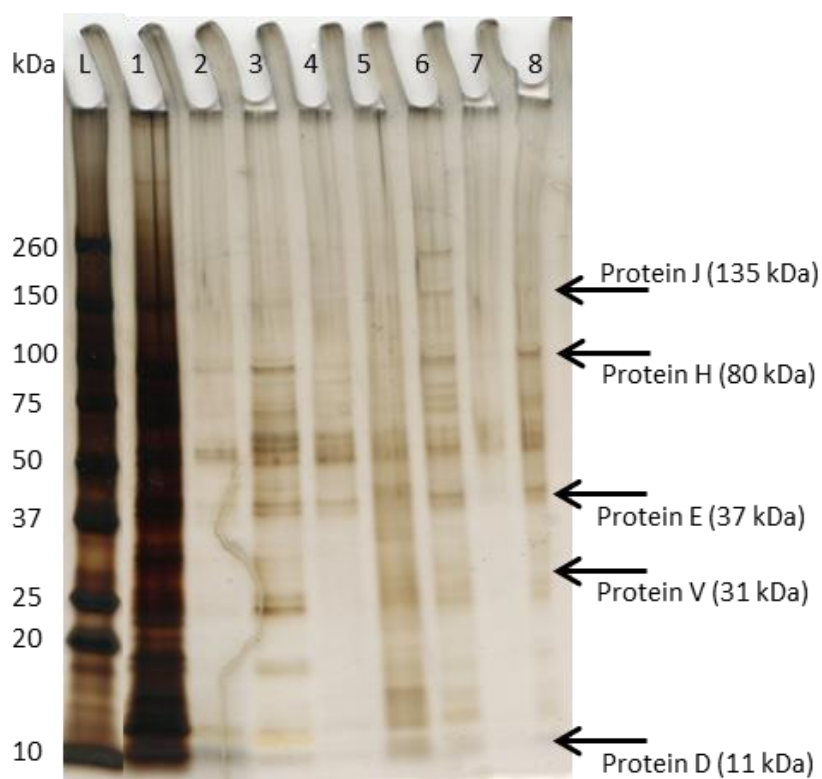
Obrázek 14 ukazuje výsledky po obarvení gelu stříbrem za standardních podmínek. Je vidět, že díky větší citlivosti barvení stříbrem splývají proteiny *E. coli* (řada 1). V ostatních vzorcích (řada 2-8) se začíná objevovat více proteinů, které jsou nejvíc patrné v řadě 3, ale barvení je stále málo citlivé na přesnější určení těchto proteinů. Není ani možné zjistit, jaké typy fágové kapsidy se nacházejí ve které frakci sacharózového gradientu, jelikož výsledky jsou u všech vzorků (řady 4-8) stejné.

Pro zvýšení citlivosti jsme gel nechali barvit stříbrem po delší dobu k obarvení i těch proteinů, jejichž koncentrace je velice nízká. Obrázek 15 ukazuje výsledky tohoto barvení. Kvůli delší době barvení velice splývají vzorky, ve kterých je mnoho proteinů o vysokých koncentracích (marker molekulové hmotnosti a řada 1, obsahující proteiny *E. coli*). Supernatant po centrifugaci *E. coli* obsahuje mnoho proteinů (řada 2), což je více patrné po zakoncentrování vzorku ultracentrifugací. Ultracentrifugací v sacharózovém gradientu byly získány rozdílné proteiny v jednotlivých frakcích. Je také vidět, že přítomnost sacharózy ve vzorku ovlivňuje elektroforetickou separaci, kdy se zvyšující se koncentrací sacharózy (vzorky 4-8) jsou získané bandy proteinů užší.

Průměr hlavičky bakteriofága λ je dle literatury 60 nm, průměr jednotlivých kapsomer 5,6 nm a vzdálenost mezi středy kapsomer je 7,4 nm. V každé kapsomeře se nacházejí 3 kapsidové proteiny. Protein E je hlavní protein kapsidy bakteriofága λ , jehož velikost je 38 188 Da. Tento protein tvoří hexamery, které jsou základem ikozahedrání struktury kapsidy bakteriofága λ . Tvoří také pentamery nacházející se na vrcholech ikozahedronu [98]. Protein C je minoritní protein kapsidy bakteriofága λ , jehož velikost je 45 940 Da. Pomáhá utvářet strukturu kapsidy [99]. Každá kapsida bakteriofága λ pravděpodobně obsahuje 420 kopií proteinů E a D [100]. Protein D, jehož velikost je 11 572 Da, stabilizuje strukturu kapsidy při uzavírání DNA. V mřížce kapsidy se nachází ve formě hexamerů a pentamerů. Pro polymeraci proteinu E a vytvoření struktury kapsidy slouží protein Nu3 o 20 811 Da, ale je v průběhu tvorby kapsidy degradován, takže se u dospělého fága neobjevuje [101]. Protein W zabraňuje uvolnění DNA z hlavičky a jeho velikost je 7 613 Da. Pro připojení ocásku bakteriofága pak slouží protein FII, jehož velikost je 12 761 Da [102]. Na místě, kde se

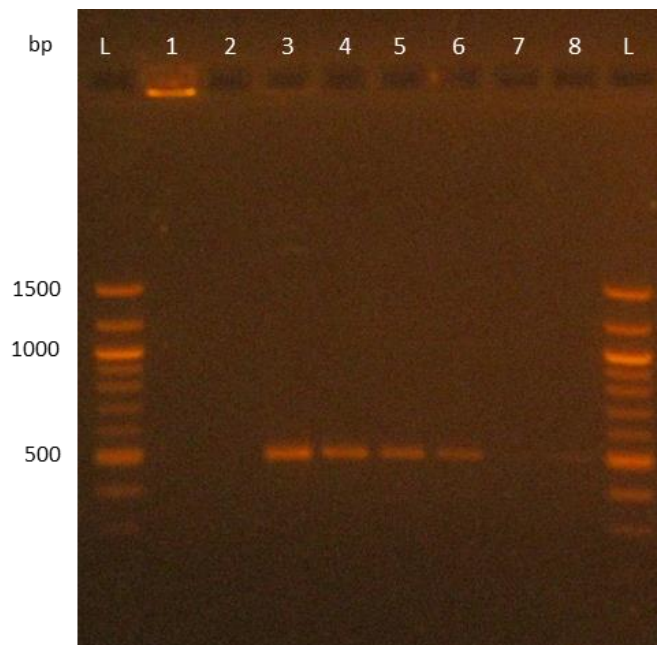
připojuje ocásek a odkud se injikuje DNA do hostitelské buňky, se nachází vrchol fága, který je tvořen proteinem B o velikosti 59 465 Da. Ocásek obsahuje 32 kroužků, přičemž každý z nich se skládá z 6 podjednotek majoritního proteinu ocásku V o velikosti 31 kDa. Minoritními proteiny ocásku jsou pak protein J o velikosti 135 kDa a protein H o velikosti 80 kDa [103].

Tyto proteiny se nejvíce nacházejí ve třetí frakci sacharózového gradientu (řada 6), předpokládáme tedy, že kapsidy bakteriofága λ se po ultracentrifugaci v sacharózovém gradientu nacházejí právě v této frakci. Ostatní frakce obsahují proteinů buď příliš málo (řada 4 a 7) nebo naopak obsahují nečistoty (řada 5). Třetí frakce sacharózového gradientu tak mohla být použita pro přípravu nanotransportéru léčiv založeného na kapsidě bakteriofága λ .



Obrázek 15 Analýza proteinů bakteriofága λ gelovou elektroforézou, gel obarvený stříbrem s delší dobou expozice. *L* Marker molekulové hmotnosti. *Vzorek 1* Přímě odebrané médium *E. coli* kultivované s bakteriofágem λ . *Vzorek 2* Supernatant po centrifugaci vzorku 1. *Vzorek 3* Pelet vzniklý ultracentrifugací vzorku 2 a resuspendovaný ve fosfátovém pufru. *4* První frakce sacharózového gradientu po ultracentrifugaci vzorku 3. *5* Druhá frakce sacharózového gradientu (20% sacharóza). *6* Třetí frakce sacharózového gradientu (30% sacharóza). *7* Čtvrtá frakce sacharózového gradientu (40% sacharóza). *8* Pátá frakce sacharózového gradientu (60% sacharóza).

Pro ověření, že proteiny opravdu patří bakteriofágu λ , jsme u všech vzorků provedli amplifikaci genu *xis*. Obrázek 16 ukazuje výsledky této amplifikace. Je vidět, že u vzorku, ve kterém se nachází proteiny *E. coli*, k amplifikaci v důsledku těchto nečistot nedošlo a je pouze vidět genomová DNA *E. coli* (řada 1). U posledních 2 frakcí sacharózového gradientu také téměř k amplifikaci nedošlo, to může být způsobeno jiným typem kapsidy (určitý podíl vzniklých kapsid je prázdný, neobsahuje tedy DNA [97]), což by potvrdzovalo i výsledky PAGE elektroforézy. Nejvíce fágové DNA obsahuje vzorek po ultracentrifugaci (řada 3), výsledky PAGE elektroforézy ale ukazují, že tento vzorek obsahuje i proteiny neodpovídající bakteriofágu λ . Třetí frakce (řada 6), která se na základě obsažených proteinů jeví jako nejslibnější pro následné aplikace, obsahuje DNA bakteriofága λ . V dalších experimentech tak byla použita právě třetí frakce sacharózového gradientu.

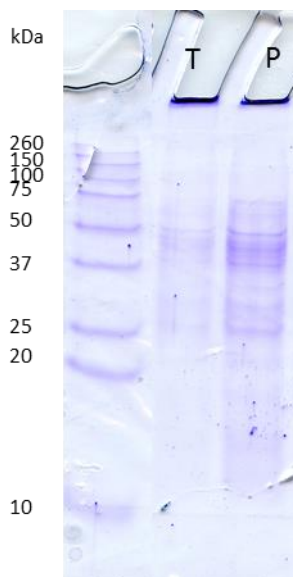


Obrázek 16 Amplifikace genu *xis* pro ověření přítomnosti bakteriofága λ . *L* Marker molekulové hmotnosti. *Vzorek 1* Přímě odebrané médium *E. coli* kultivované s bakteriofágem λ . *Vzorek 2* Supernatant po centrifugaci vzorku 1. *Vzorek 3* Pelet vzniklý ultracentrifugací vzorku 2 a resuspendovaný ve fosfátovém pufru. *4* První frakce sacharózového gradientu po ultracentrifugaci vzorku 3. *5* Druhá frakce sacharózového gradientu (20% sacharóza). *6* Třetí frakce sacharózového gradientu (30% sacharóza). *7* Čtvrtá frakce sacharózového gradientu (40% sacharóza). *8* Pátá frakce sacharózového gradientu (60% sacharóza).

5.3.1 Srovnání kultivace v tekutém a tuhém médiu

Následně bylo srovnáno množství bakteriofága λ , kterého je možné získat kultivací v tekutém médiu a na Petriho miskách. Pro tento experiment byl bakteriofág kultivován standardně na Petriho miskách vpichy produkční *E. coli*, následnou kultivací, přelitím indikační *E. coli* a kultivací pro vytvoření plaků. Plaky bylo poté odebrány do média, centrifugací byla odstraněna *E. coli* a ultracentrifugací byl získán bakteriofág λ . Takto získaným bakteriofágem je možné dále infikovat kultury *E. coli*, například v tekutém médiu. Tento postup byl zvolen na základě dostupné literatury [94]. Dalším vzorkem tak byl bakteriofág λ získaný z tekutého média s kulturou indikační *E. coli*, která byla infikována bakteriofágem získaným purifikací z Petriho misek.

Obrázek 17 ukazuje srovnání těchto kultivací. Je zřejmé, že ačkoliv z tekutého média (řada T) je možné získat snadněji velký objem bakteriofága λ , jeho koncentrace je významně menší než v případě kultivace na bakteriálním agaru v Petriho miskách (řada P). Také je pro infikování indikační *E. coli* v tekutém médiu nutná nejdříve kultivace a purifikace bakteriofága λ v tuhém médiu na Petriho miskách. Postup kultivace v tekutém médiu se tedy jako rychlejší jeví pouze zdánlivě. Proto byl při dalších experimentech bakteriofág λ vždy kultivován na Petriho miskách a purifikován přímo z jednotlivých plaků.



Obrázek 17 Srovnání kultivace v tekutém (T) a tuhém médiu na Petriho miskách (P)

5.4 Enkapsulace léčiva do bakteriofága λ

Bakteriofág lambda je vhodný vektor pro dopravu léčiv kvůli velké fyzikální stabilitě, kompatibilitě s rychlými a levnými produkčními a purifikačními metodami, snadnými postupy genetické modifikace a tomu, že je po vstupu do savčích buněk neškodný [79]. Jako léčivo byl pro další experimenty použit doxorubicin (DOX). Jde o antracyklinové antibiotikum, které inhibuje syntézu nukleových kyselin a používá se proto při léčbě různých maligních tumorů [104]. Toto léčivo má fluorescenční vlastnosti, s excitačním maximem při 480 nm a emisním maximem a emisním maximem při 605 nm. Díky těmto vlastnostem je možné DOX jednoduše vizualizovat a tím ověřit jeho přítomnost v nanotransportéru [105]. Pro testování jeho enkapsulace do nanotransportérů je toto léčivo vhodné i proto, že při léčbě má mnoho závažných vedlejších účinků, z nichž nejvýznamnější je jeho vysoká kardiotoxicita [106]. Tyto účinky mohou být sníženy právě enkapsulací do nanotransportérů, které primárně vstupují do okolí nádorů kvůli EPR efektu [16].

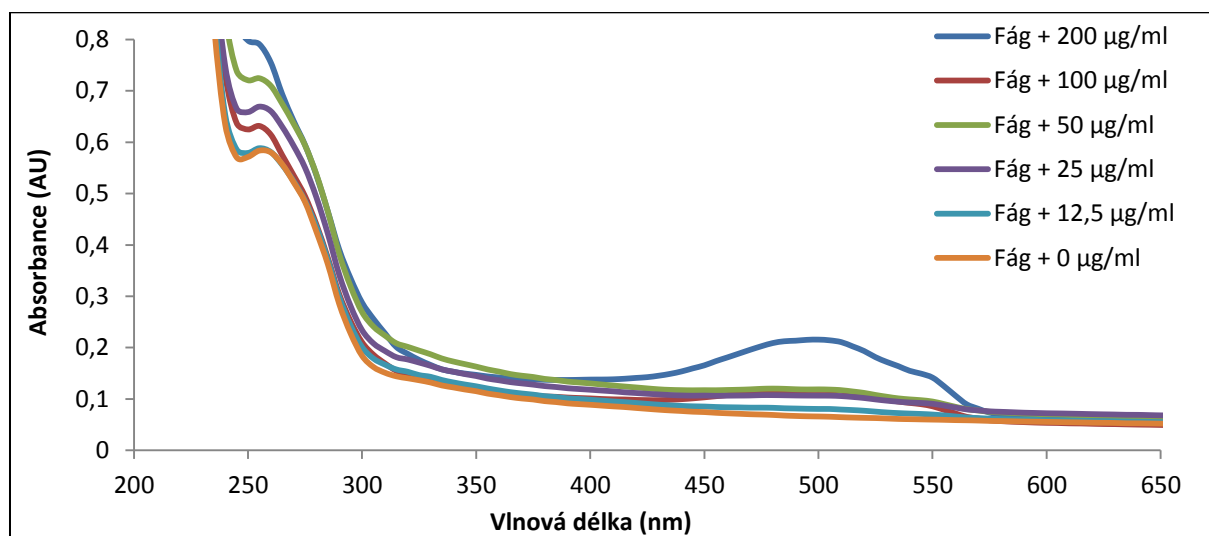
5.4.1 Vliv koncentrace doxorubicinu na enkapsulaci do bakteriofága λ

Pro enkapsulaci doxorubicinu do bakteriofága λ byla použita metoda odvozená z článku [107], tedy infuzní metoda enkapsulace. Není při ní nutná žádná povrchová modifikace proteinů bakteriofága, která může způsobit změnu jeho vlastností. Princip této metody spočívá v tom, že léčivo je schopno vstoupit do dutiny kapsidy póry v její struktuře a navázat se na nukleovou kyselinu viru. Je proto nutné použít kladně nabitě molekuly, které se mohou elektrostatickou interakcí navázat na záporně nabitou fosfátovou kostru nukleové kyseliny [107] nebo látky, které interkalují do DNA, jako je například právě doxorubicin [104].

Pro ověření, zda bakteriofág λ je schopen této enkapsulace byl proveden experiment, kdy byl bakteriofág o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ smíchán s doxorubicinem o různých koncentracích (0; 12,5; 25; 50; 100 a 200 $\mu\text{g/ml}$) a inkubován po dobu 2 hod v temnu kvůli zhášení doxorubicinu. Bakteriofág byl poté dialyzován a promyt od přebytečného doxorubicinu. Následně byly charakterizovány optické vlastnosti bakteriofága λ s enkapsulovaným doxorubicinem.

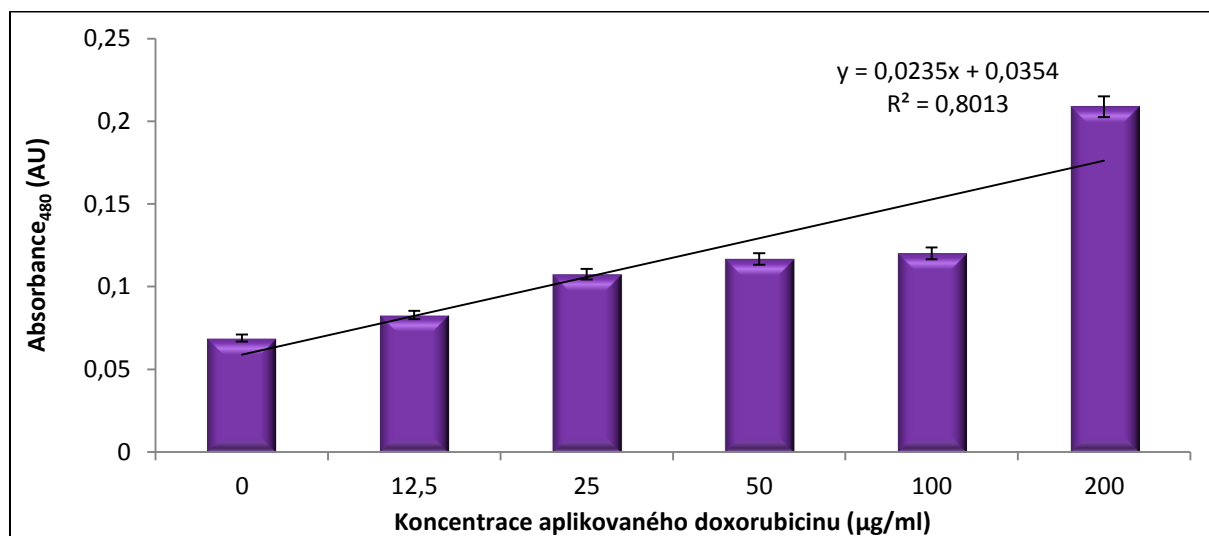
Obrázek 18 ukazuje naměřené absorpční spektrum bakteriofága λ se vzrůstajícími koncentracemi enkapsulovaného doxorubicinu. Absorpční spektrum bylo měřeno v rozsahu

vlnových délek 230-800 nm. V kontrolním vzorku bakteriofága λ bez přídavku doxorubicinu (oranžová linie) jsou vidět pouze absorpční maxima při 260 a 280 nm, odpovídající DNA bakteriofága a proteinům jeho kapsidy.



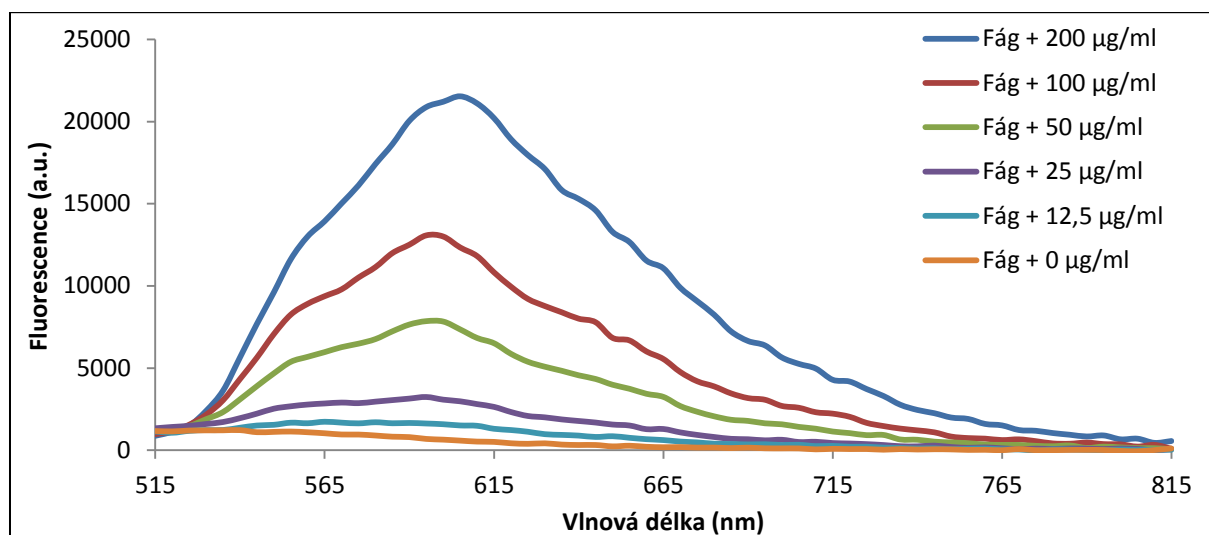
Obrázek 18 Absorpční spektrum různých koncentrací doxorubicinu enkapsulovaného v bakteriofágovi

Se vzrůstající koncentrací doxorubicinu se výrazně projevuje nové absorpční maximum při 480 nm, což odpovídá absorpčnímu maximu doxorubicinu. Po vynesení absorbance do grafu (Obrázek 19) je vidět přibližně lineární růst (s koeficientem determinace R^2 0,8013) v závislosti na koncentraci aplikovaného doxorubicinu.



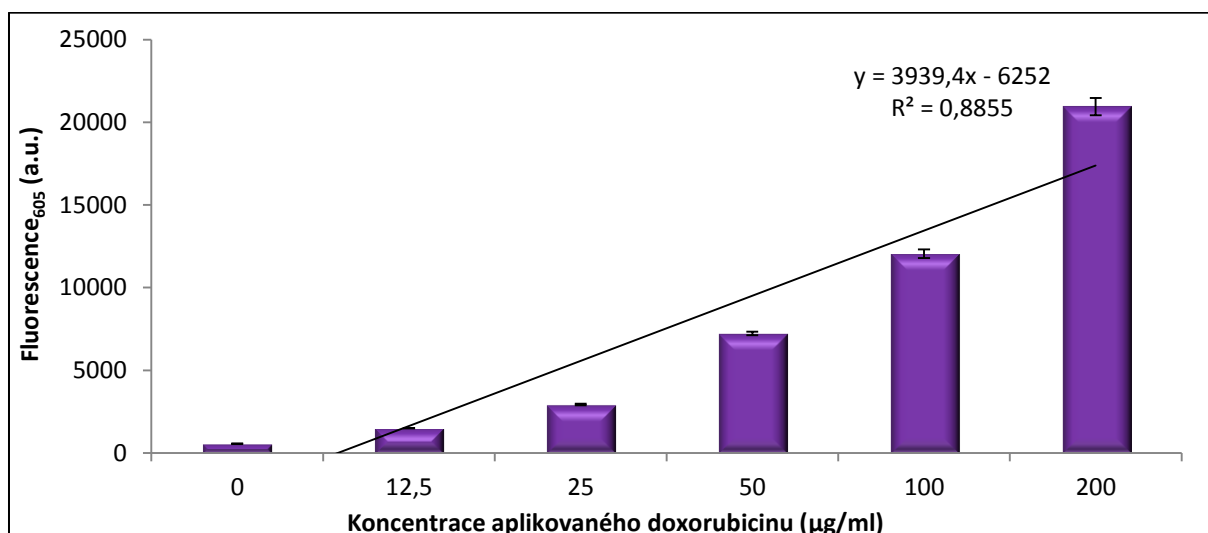
Obrázek 19 Závislost absorbance při vlnové délce 480 nm na koncentraci aplikovaného doxorubicinu

Obrázek 20 ukazuje naměřené emisní spektrum doxorubicinu enkapsulovaného v bakteriofágovi λ . Doxorubicin byl excitován na základě svého absorpčního maxima světlem o vlnové délce 480 nm. Emisní spektrum bylo naměřeno v rozsahu vlnových délek 515-815 nm. Je vidět, že kontrolní vzorek bakteriofága bez přídavku doxorubicinu (oranžová linie) nevykazuje fluorescenci za daných podmínek. U přídavku nejnižší koncentrace doxorubicinu (tyrkysová linie) není fluorescence průkazná, ale se zvyšující se koncentrací doxorubicinu dochází k výraznému zvyšování fluorescence.



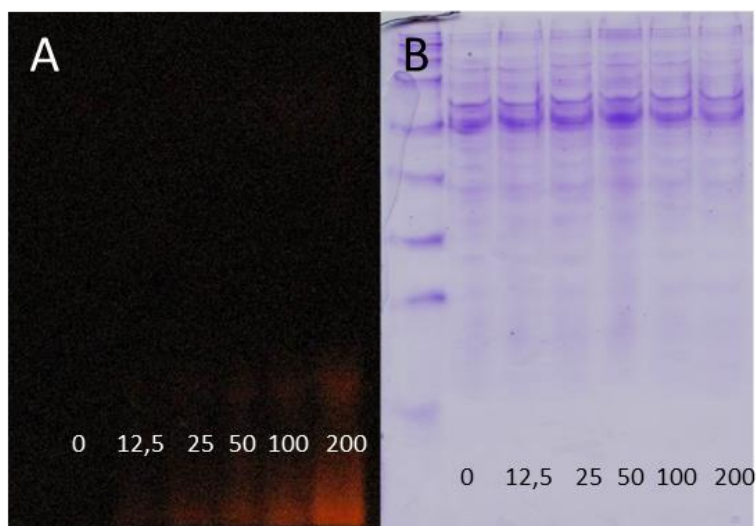
Obrázek 20 Fluorescenční spektrum různých koncentrací doxorubicinu enkapsulovaného v bakteriofágovi

Závislost fluorescence v emisním maximu doxorubicinu (605 nm) na jeho aplikované koncentraci byla vynesena do grafu (Obrázek 21). Z něj je jasně patrné, že fluorescence doxorubicinu roste s jeho vzrůstající aplikovanou koncentrací lineárně (s koeficientem determinace R^2 0,8855). Měření mělo také velmi dobrou opakovatelnost, jak je vidět ze získaných chybových úseček.



Obrázek 21 Závislost fluorescence při vlnové délce 605 nm na koncentraci aplikovaného doxorubicinu

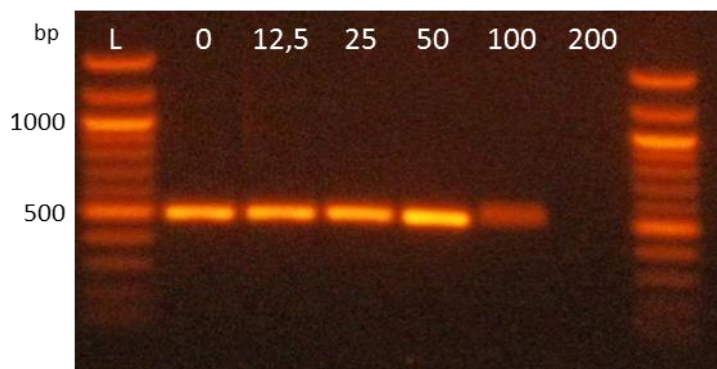
Vzorky byly následně separovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Po separaci byl gel vyfocen po excitaci UV světlem (Obrázek 22A). Proteiny bakteriofága byly následně obarveny coomassie blue barvením (Obrázek 22B). Z fluorescenčního měření je opět vidět vzrůstající fluorescence se vzrůstající aplikovanou koncentrací doxorubicinu, což odpovídá výsledkům získaným v předchozí části experimentu. Nelze zjistit, na které proteiny je doxorubicin navázán, jelikož po redukci proteinů merkaptetanolem putoval v gelu samostatně. Po obarvení SDS-PAGE gelu jsou vidět ve všech řadách proteiny odpovídající bakteriofágu λ . Nedošlo tak k jeho odstranění během procesu enkapsulace.



Obrázek 22 SDS-PAGE gel bakteriofága s enkapsulovaným doxorubicinem. *A)* Fluorescence po excitaci světlem o vlnové délce 312 nm. *B)* Proteiny bakteriofága λ obarvené coomassie blue

Pro další ověření přítomnosti bakteriofága λ pak sloužila amplifikace genu *xis* s následnou analýzou ampliconů agarózovou elektroforézou. Obrázek 23 ukazuje amplicony po obarvení ethidium bromidem. U vzorku s aplikovanou koncentrací doxorubicinu 100 $\mu\text{g/ml}$ je fluorescence ampliconu velmi nízká, u vzorku s aplikovanou koncentrací doxorubicinu 200 $\mu\text{g/ml}$ nedošlo k vytvoření ampliconu vůbec.

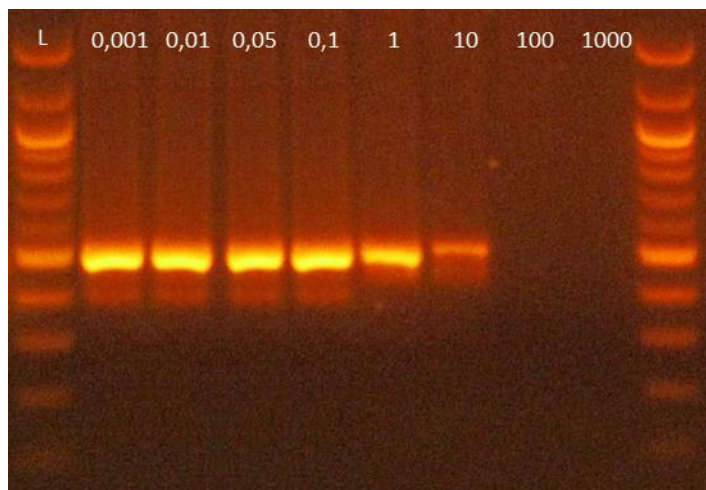
Tyto výsledky by ukazovaly na to, že u vzorků s velkými aplikovanými koncentracemi doxorubicinu se bakteriofág λ nachází ve velmi malých koncentracích nebo vůbec. Při srovnání s výsledky SDS-PAGE elektroforézy je ale vidět, že se ve vzorcích nacházejí proteiny bakteriofága λ .



Obrázek 23 Amplifikace genu *xis* v bakteriofágu λ s enkapsulovaným doxorubicinem o koncentracích 0; 12,5; 25; 50; 100 a 200 $\mu\text{g/ml}$)

Kvůli rozporům v identifikaci bakteriofága λ jeho proteiny a amplifikací genu *xis* byl následně testován vliv samotného doxorubicinu na amplifikaci genu *xis*. Pro tento experiment byl amplifikován gen *xis* v komerčně dostupné DNA bakteriofága λ . Do PCR směsi pak byl přidáván doxorubicin v různých koncentracích. Amplicony byly analyzované agarózovou elektroforézou (Obrázek 24). Je vidět, že velké koncentrace doxorubicinu inhibují PCR reakci a nevytváří se tak žádný amplicon. Nevytvoření ampliconu v případě bakteriofága λ v předchozím experimentu je tak pravděpodobně způsobeno velkou koncentrací doxorubicinu ve směsi, ne nepřítomností bakteriofága λ ve vzorku.

Ze získaných výsledků je možné říci, že bakteriofág λ je schopen enkapsulovat cytostatické léčivo doxorubicin, přičemž se vzrůstající aplikovanou koncentrací doxorubicinu je jej více enkapsulováno do tohoto nanotransportéru.



Obrázek 24 Amplifikace genu *xis* v komerčně dostupné DNA bakteriofága λ po přidavku 0,001; 0,01; 0,05; 0,1; 1; 10; 100 a 1000 ng doxorubicinu do 25 μ l PCR směsi

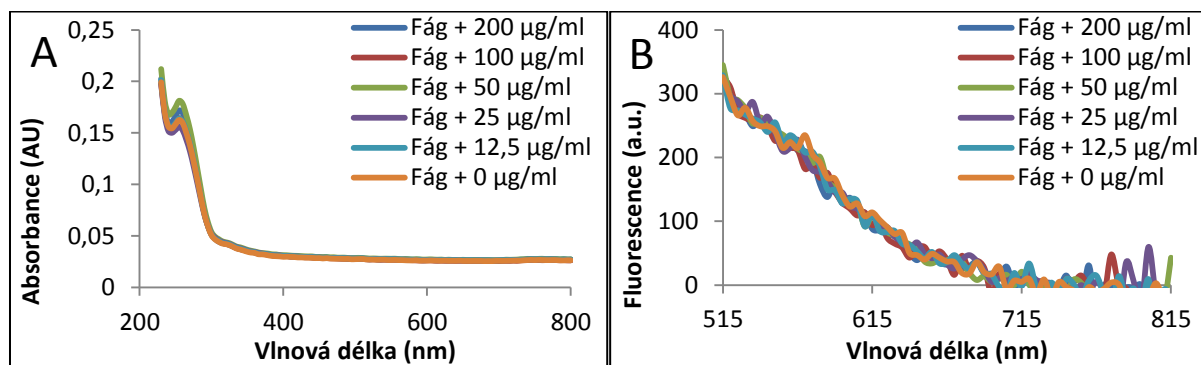
5.4.2 Fluorescence doxorubicinu v izolované DNA bakteriofága λ

V předchozích experimentech byla potvrzena schopnost bakteriofága λ enkapsulovat doxorubicin do své struktury. Nebylo z nich ale možné určit, zda jsou všechny molekuly doxorubicinu interkalovány do DNA nebo jsou navázány na proteiny fágové kapsidy. Z tohoto důvodu byla v následujícím experimentu ze vzorků bakteriofága λ s enkapsulovaným doxorubicinem pomocí automatického izolátoru nukleových kyselin izolována fágová DNA a byla změřena fluorescence doxorubicinu v ní.

Koncentrace izolované DNA byla 46 ± 4 μ g/ml. U této DNA byly změřeny její optické vlastnosti, tedy absorpční spektrum v rozsahu vlnových délek 230-800 nm (Obrázek 25A) a emisní spektrum s excitační vlnovou délkou 480 nm a emisními vlnovými délkami v rozsahu 515-815 nm (Obrázek 25B). Je vidět pouze jedno absorpční maximum při vlnové délce 260 nm, které odpovídá DNA bakteriofága λ . Absorpční maximum doxorubicinu při 480 nm se ve spektru neobjevuje. Také vzorky za daných podmínek nevykazují fluorescenci.

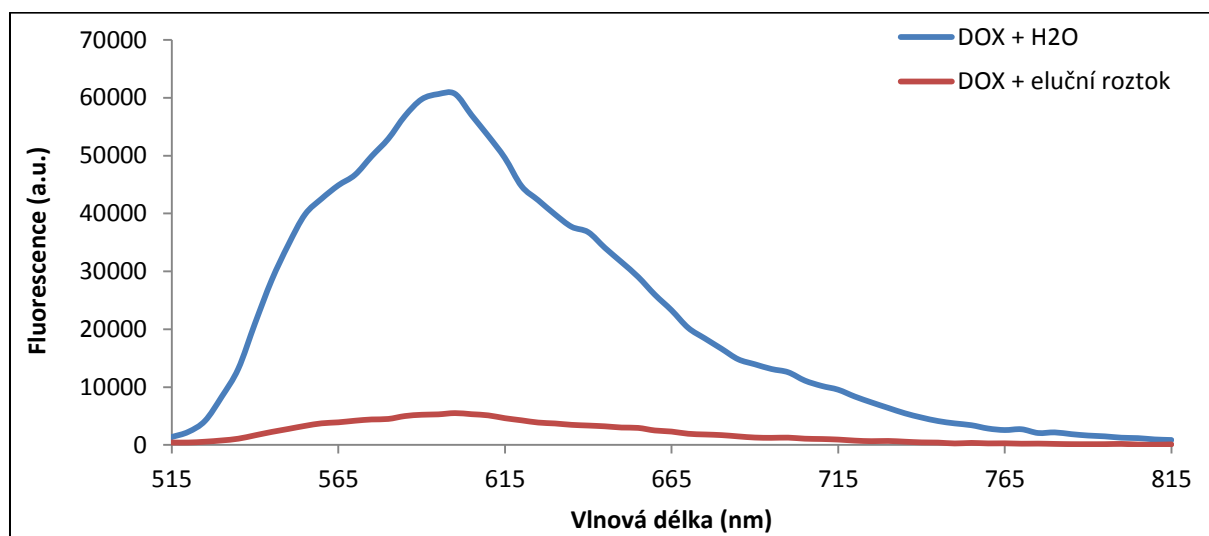
Tyto výsledky poukazují na to, že během enkapsulace nedochází k interkalaci doxorubicinu do DNA, ale je vázán spíše na fágové proteiny. Vzhledem k dostupné literatuře ([107]) byl ale proveden experiment, zda nezháší eluční roztok automatického izolátoru nukleových kyselin fluorescenci doxorubicinu. Stejně podmínky, které se používají pro izolaci DNA bakteriofága λ , byly použity v následujícím experimentu s ACS vodou. Do

elučního roztoku byl poté přidán doxorubicin o koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$. Jako kontrola sloužil doxorubicin o stejné koncentraci ve vodě.



Obrázek 25 Absorpční (A) a emisní (B) spektrum izolované DNA bakteriofága λ s enkapsulovaným doxorubicinem

Obrázek 26 ukazuje změřené emisní spektrum při excitační vlnové délce 480 nm a emisní 515-815 nm. Je vidět, že eluční roztok výrazně ($10,7\times$) zháší fluorescenci doxorubicinu. To je pravděpodobně důvod, proč nelze pozorovat fluorescenci v DNA izolované z bakteriofága λ s enkapsulovaným doxorubicinem.

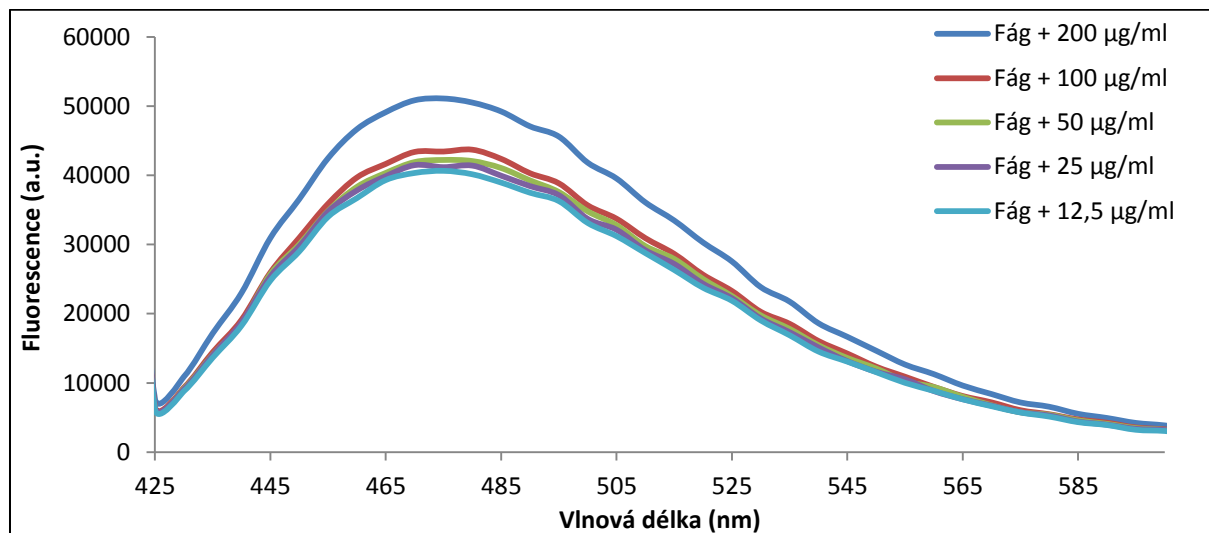


Obrázek 26 Emisní spektrum doxorubicinu ve vodě a v elučním roztoku automatického analyzátoru nukleových kyselin při excitační vlnové délce 480 nm

Pro vizualizaci doxorubicinu interkalovaného v DNA bakteriofága λ bylo proto použito derivatizační činidlo fluoreskamin. Toto činidlo se váže na primární $-\text{NH}_2$ skupiny, které doxorubicin obsahuje. Výhodou tohoto činidla je velmi rychlá reakční kinetika a degradace ve vodním prostředí, díky které bez přítomnosti $-\text{NH}_2$ skupin ve svém okolí

fluoreskamin nevykazuje fluorescenci [108]. Pro excitaci bylo použito absorpční maximum fluoreskaminu 390 nm a spektrum bylo měřeno v rozsahu vlnových délek 425-850 nm.

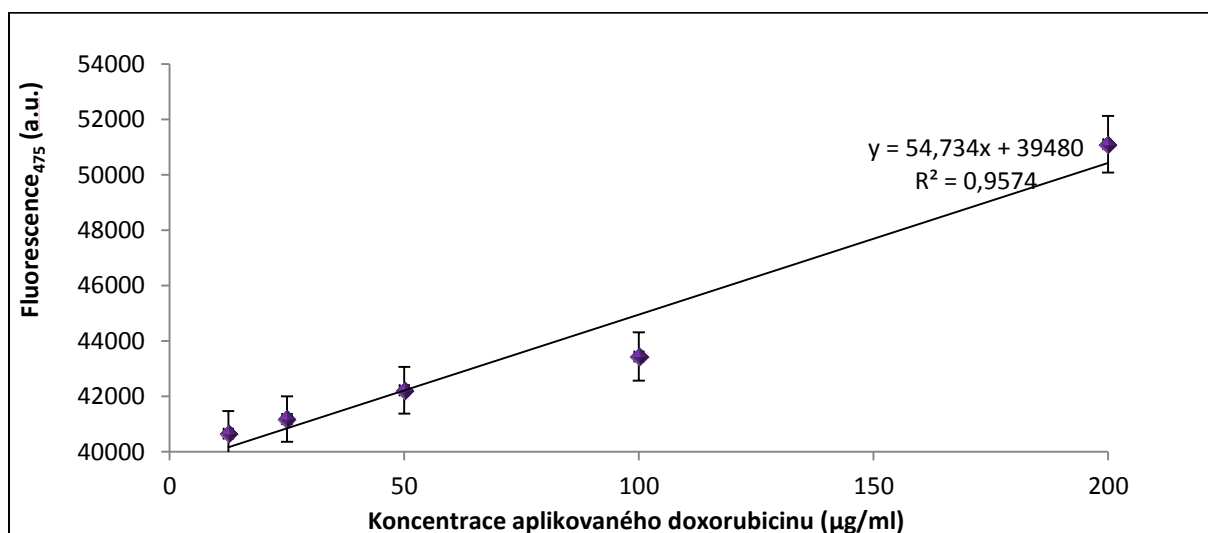
Obrázek 27 ukazuje emisní spektrum fluoreskaminu po navázání na DNA bakteriofága λ s enkapsulovaným doxorubicinem. Je vidět, že se vzrůstající koncentrací doxorubicinu roste fluorescence fluoreskaminu.



Obrázek 27 Emisní spektrum fluoreskaminu navázaného na doxorubicin interkalovaný do DNA bakteriofága λ

Fluorescenci v emisním maximu fluoreskaminu (475 nm) v závislosti na koncentraci aplikovaného doxorubicinu byla vynesena do grafu (Obrázek 28). Je vidět, že fluorescence roste v závislosti na doxorubicinu lineárně (s koeficientem determinace R^2 0,9574).

To prokazuje, že doxorubicin je interkalovaný v DNA bakteriofága λ . Jeho koncentrace je ale velmi nízká, není tedy možné jej detekovat jeho fluorescencí, ale je nutné použít derivatizační činidlo. Vzhledem k rozdílům fluorescence doxorubicinu v celém bakteriofágovi λ a v jeho DNA je velmi pravděpodobné, že doxorubicin se při enkapsulaci váže i na proteiny kapsidy bakteriofága λ podobně jako například v případě rotaviru [109].



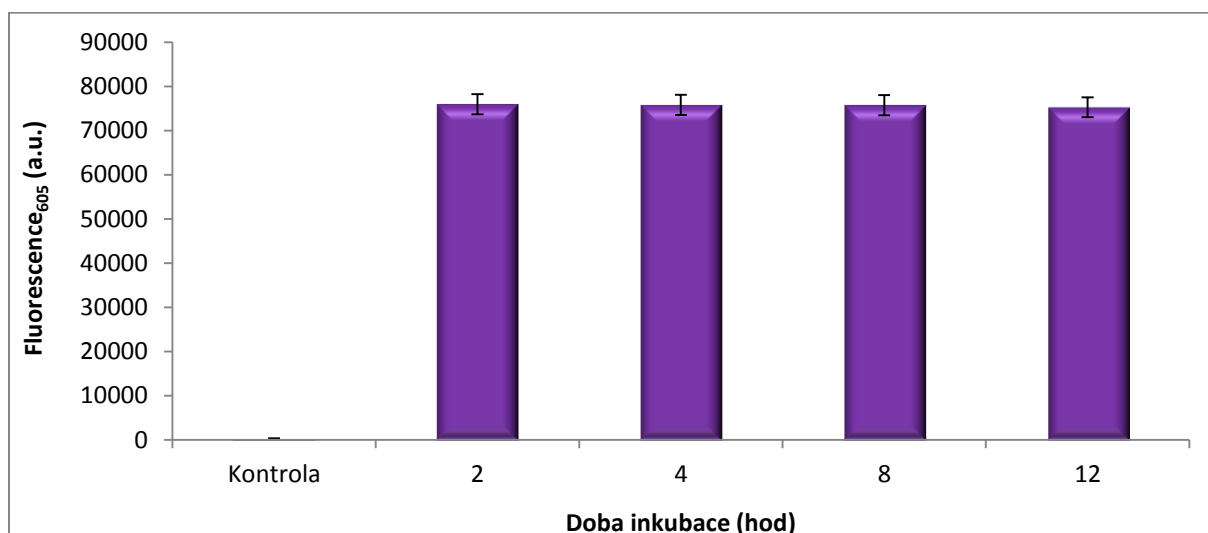
Obrázek 28 Závislost fluorescence fluoreskaminu na koncentraci aplikovaného doxorubicinu

5.4.3 Vliv délky inkubace bakteriofága λ s doxorubicinem na enkapsulaci

Doba inkubace viru s léčivem pro jeho úspěšnou enkapsulaci se liší v závislosti na použitém viru. V případě použití CPMV viru je dostatečná doba pro enkapsulaci 2 hod [107], v případě RCNMV viru je nutná inkubace s léčivem přes noc [110].

V následujícím experimentu byl sledován vliv délky inkubace bakteriofága λ s doxorubicinem na jeho enkapsulaci. Byl použit bakteriofág o koncentraci 20 µg/ml stejně jako v předchozích experimentech. Koncentrace doxorubicinu byla 200 µg/ml. Vzorky byly inkubovány po dobu 2; 4; 8 a 12 hodin s následnou dialýzou.

Obrázek 29 ukazuje emisi doxorubicinu enkapsulovaného v bakteriofágu λ při vlnové délce 605 nm po různých dobách inkubace. Je vidět, že infúze doxorubicinu do bakteriofága λ je rychlá, již po 2 hod je fluorescence enkapsulovaného doxorubicinu stejně vysoká jako po 12 hod. 2 hod jsou tedy pro enkapsulaci doxorubicinu do bakteriofága λ dostatečné.



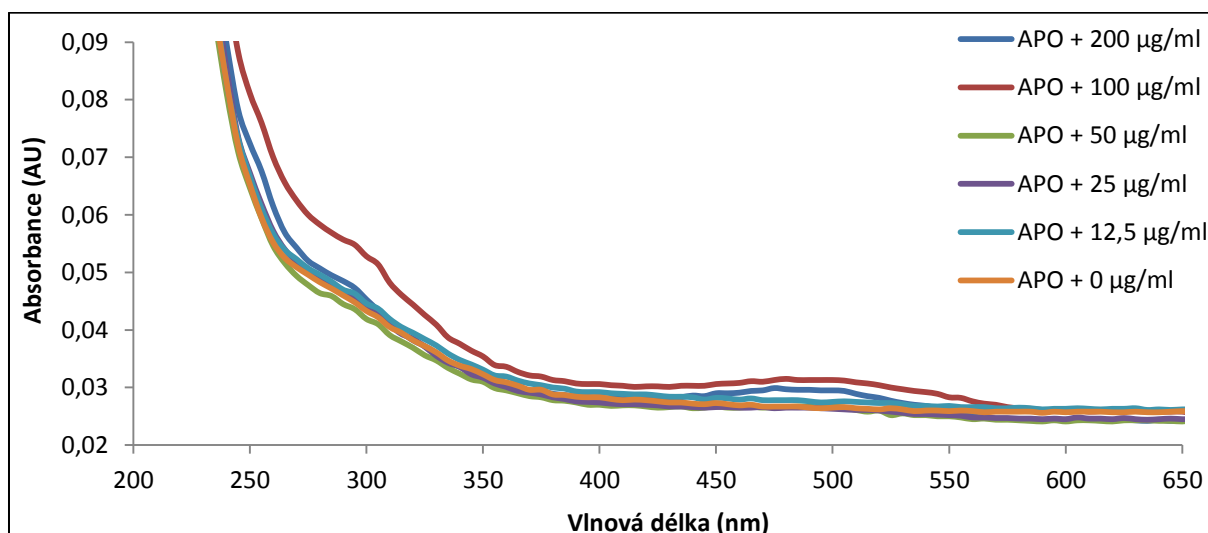
Obrázek 29 Vliv délky inkubace bakteriofága λ s doxorubicinem na jeho enkapsulaci

5.5 Srovnání schopnosti dopravy léčiv bakteriofága λ a apoferritinu

Aby bylo možné ohodnotit bakteriofága λ jako nanotransportéru léčiv, byla srovnána jeho schopnost enkapsulace léčiva s proteinem apoferritinem (APO), který byl v naší skupině dříve studován jako možný nanotransportér doxorubicinu. Do dutiny tohoto proteinu je léčivo enkapsulováno volně díky rozvolnění struktury APO v kyselém prostředí a jeho opětovnému sestavení v neutrálním pH [75,111].

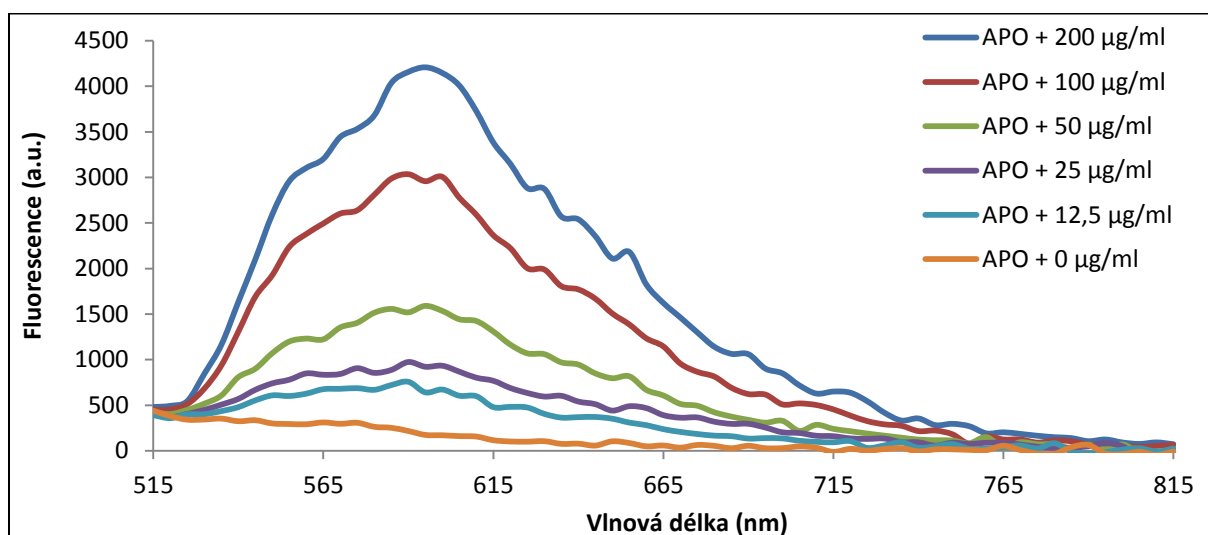
Byl připraven APO o koncentraci shodné s bakteriofágem λ , tedy 20 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrace doxorubicinu, který do něj byl uzavřen, byly také shodné s bakteriofágem λ , tedy 0; 12,5; 25; 50; 100 a 200 $\mu\text{g/ml}$. Přebytečný doxorubicin byl poté dialyzován a APO byl 2 \times promyt.

Obrázek 30 ukazuje naměřené absorpční spektrum apoferritinu se vzrůstajícími koncentracemi enkapsulovaného doxorubicinu. Absorpční spektrum bylo měřeno v rozsahu vlnových délek 230-800 nm. V kontrolním vzorku apoferritinu bez přídavku doxorubicinu (oranžová linie) je vidět pouze jedno absorpční maximum při 280 nm, odpovídající apoferritinu. Se vzrůstající koncentrací doxorubicinu se projevuje nové absorpční maximum při 480 nm, což odpovídá absorpčnímu maximu doxorubicinu.



Obrázek 30 Absorpční spektrum různých koncentrací doxorubicinu enkapsulovaného v apoferritinu

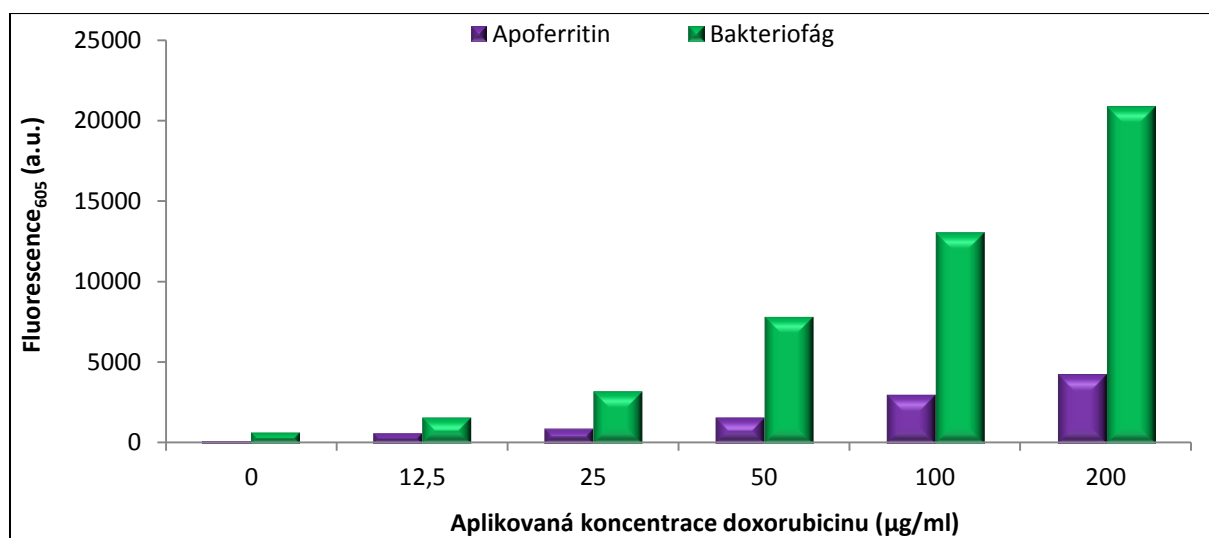
Obrázek 31 ukazuje naměřené emisní spektrum doxorubicinu enkapsulovaného v apoferritinu. Doxorubicin byl excitován na základě svého absorpčního maxima světlem o vlnové délce 480 nm. Emisní spektrum bylo naměřeno v rozsahu vlnových délek 515-815 nm. Je vidět, že kontrolní vzorek apoferritinu bez přídavku doxorubicinu (oranžová linie) nevykazuje fluorescence za daných podmínek. U přídavku nejnižší koncentrace doxorubicinu (tyrkysová linie) se objevuje fluorescence, a se zvyšující se koncentrací doxorubicinu dochází k lineárnímu zvýšení fluorescence.



Obrázek 31 Fluorescenční spektrum různých koncentrací doxorubicinu enkapsulovaného v apoferritinu

Závislost fluorescence v emisním maximu doxorubicinu (605 nm) na jeho aplikované koncentraci byla vynesena do grafu a porovnána s bakteriofágem λ (Obrázek 32). Je patrné, že podobně jako u bakteriofága λ (zelená řada), i u apoferritinu (fialová řada) roste fluorescence doxorubicinu s jeho vzrůstající aplikovanou koncentrací lineárně (s koeficientem determinace R^2 0,925 pro apoferritin a 0,886 pro bakteriofága λ).

Fluorescence doxorubicinu je ale v případě enkapsulace do apoferritinu signifikantně nižší (4×) než v případě enkapsulace do bakteriofága λ a to u všech aplikovaných koncentrací doxorubicinu. Samotný proces enkapsulace je u bakteriofága λ mnohem jednodušší než v případě apoferritinu, kde je vyžadováno několik kroků změny pH prostředí. Z hlediska schopnosti enkapsulace se tedy bakteriofág λ jeví jako vhodnější nanotransportér než apoferritin.



Obrázek 32 Srovnání enkapsulace různých koncentrací doxorubicinu v bakteriofágovi λ a apoferritinu

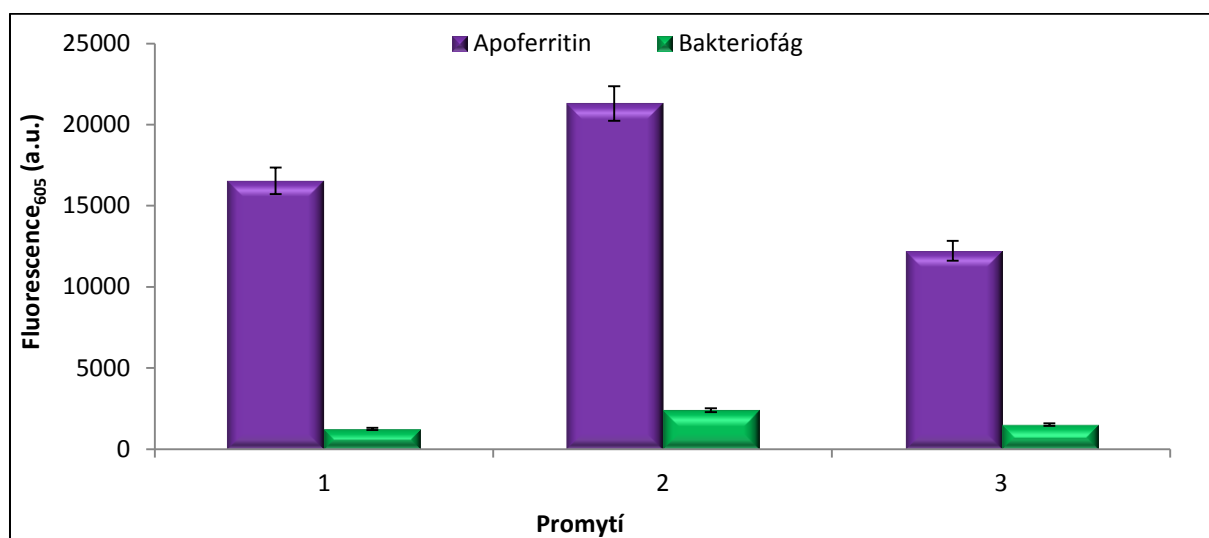
5.5.1 Uvolňování léčiva z nanotransportérů

Léčivo je ve virových kapsidách vázáno pevně, ať již díky supramolekulární chemii, kovalentní vazbě nebo elektrostatickým silám [69]. Nemělo by tak docházet k úniku léčiva póry ve struktuře nanotransportéru, jako v případě APO, kde se léčivo pouze volně nachází v jeho dutině [112].

V dalším experimentu tedy bylo studováno uvolňování doxorubicinu z nanotransportérů během promývání při dialýze. Byly použity stejné koncentrace

nanotransportérů jako v předchozích experimentech (20 $\mu\text{g/ml}$). Použitá koncentrace doxorubicinu byla 200 $\mu\text{g/ml}$.

Obrázek 33 ukazuje fluorescenci doxorubicinu v retentátu po promytí apoferritinu a bakteriofága λ . Je vidět, že z apoferritinu (fialová řada) je doxorubicin uvolňován mnohem více (10 \times) než z bakteriofága λ (zelená řada). Ten se tak jeví jako vhodnější nanotransportér léčiv i z hlediska stability a uvolňování léčiva z jeho struktury.



Obrázek 33 Srovnání uvolňování léčiva z bakteriofága λ a apoferritinu v průběhu promývání

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce je zaměřena na nanotransportéry v teranostice. Jedním z cílů této práce bylo provést literární rešerši o současném stavu teranostického výzkumu a možnostech uplatnění nejrůznějších nanočástic v této oblasti. Práce se zabývá popisem jednotlivých platforem pro teranostiku, se zaměřením na nanomedicínu. V práci byly srovnány možné typy nanotransportérů, ať již anorganického, proteinového a především virového původu.

Byla zde uvedena úspěšná metoda pro kultivaci bakteriofága λ v tekutém i tuhém kultivačním médiu, přičemž byla sledována časová závislost jeho růstu. Byl sledován vliv maltózy na kultivaci a byl porovnán výtěžek bakteriofága z jednotlivých způsobů kultivace. Byla také navržena metoda pro purifikaci bakteriofága λ ultracentrifugací v sacharózovém gradientu. Dalším cílem byla charakterizace proteinů virové kapsidy bakteriofága λ , která byla provedena separací v SDS-PAGE gelu.

Největší část diplomové práce je věnována využití bakteriofága λ jako nanotransportéru léčiva doxorubicinu. Detekce enkapsulace tak mohla být provedena fluorescenčním měřením nanotransportéru obsahujícího doxorubicin. Byly sledovány různé koncentrace doxorubicinu a různé doby inkubace bakteriofága s doxorubicinem. Separací proteinů v SDS-PAGE gelu a amplifikací genu nacházejícího se v genomu bakteriofága λ bylo potvrzeno, že bakteriofág se nedegraduje během procesu enkapsulace léčiva. Bylo prokázáno, že doxorubicin nejen interkaluje do DNA bakteriofága, ale váže se i na jeho proteiny.

V poslední části diplomové práce byly porovnány schopnosti dopravy léčiva bakteriofágem λ a apoferritinem. Sledovanými parametry byla míra enkapsulace léčiva a jeho uvolňování z nanotransportéru během promývání.

Na základě výsledků dosažených v této práci se bakteriofág λ jeví jako velmi vhodný nanotransportér léčiv v teranostice, který jde jednoduše produkovat i purifikovat, do jehož struktury je možné uzavřít vysoké koncentrace léčiva a který je možné jednoduše cílit do nádorů díky EPR efektu a do jednotlivých nádorových buněk například fágovým displejem.

SEZNAM LITERATURY

- [1] LEONARD, B. *Cancer nanotechnology: going small for big advances: Using nanotechnology to advance cancer diagnosis, prevention and treatment*, DIANE Publishing Company, 2009. 22 s. 9781437912722
- [2] SUMER, B. a GAO, J.M. Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine*, 2008, roč. 3, č. 2, s. 137-140. ISS 1743-5889.
- [3] SVENSON, S. Theranostics: Are we there yet? *Molecular Pharmaceutics*, 2013, roč. 10, č. 3, s. 848-856. ISS 1543-8384.
- [4] CHU, Z.T., ABU-BAKER, S., PALASCAK, M.B., AHMAD, S.A., FRANCO, R.S. a QI, X.Y. Targeting and cytotoxicity of SapC-DOPS nanovesicles in pancreatic cancer. *Plos One*, 2013, roč. 8, č. 10, s. 11. ISS 1932-6203.
- [5] LEE, H., LYTTON-JEAN, A.K.R., CHEN, Y., LOVE, K.T., PARK, A.I., KARAGIANNIS, E.D., SEHGAL, A., QUERBES, W., ZURENKO, C.S., JAYARAMAN, M., PENG, C.G., CHARISSE, K., BORODOVSKY, A., MANOHARAN, M., DONAHOE, J.S., TRUELOVE, J., NAHRENDORF, M., LANGER, R. a ANDERSON, D.G. Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted in vivo siRNA delivery. *Nature Nanotechnology*, 2012, roč. 7, č. 6, s. 389-393. ISS 1748-3387.
- [6] TARATULA, O., KUZMOV, A., SHAH, M., GARBUZENKO, O.B. a MINKO, T. Nanostructured lipid carriers as multifunctional nanomedicine platform for pulmonary co-delivery of anticancer drugs and siRNA. *Journal of Controlled Release*, 2013, roč. 171, č. 3, s. 349-357. ISS 0168-3659.
- [7] TSUGITA, M., YAMADA, N., NOGUCHI, S., YAMADA, K., MORITAKE, H., SHIMIZU, K., AKAO, Y. a OHNO, T. Ewing sarcoma cells secrete EWS/Fli-1 fusion mRNA via microvesicles. *Plos One*, 2013, roč. 8, č. 10, s. 9. ISS 1932-6203.
- [8] YEOM, J.H., RYOU, S.M., WON, M., PARK, M., BAE, J. a LEE, K. Inhibition of xenograft tumor growth by gold nanoparticle-DNA oligonucleotide conjugates-assisted delivery of BAX mRNA. *Plos One*, 2013, roč. 8, č. 9, s. 10. ISS 1932-6203.
- [9] KAUFMANN, B.A., SANDERS, J.M., DAVIS, C., XIE, A., ALDRED, P., SAREMBOCK, I.J. a LINDNER, J.R. Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis with targeted ultrasound detection of vascular cell adhesion molecule-1. *Circulation*, 2007, roč. 116, č. 3, s. 276-284. ISS 0009-7322.
- [10] TANG, J., LOBATTO, M., READ, J., MIESZAWSKA, A., FAYAD, Z. a MULDER, W.M. Nanomedical theranostics in cardiovascular disease. *Current Cardiovascular Imaging Reports*, 2012, roč. 5, č. 1, s. 19-25. ISS 1941-9066.
- [11] CARUTHERS, S.D., CYRUS, T., WINTER, P.M., WICKLINE, S.A. a LANZA, G.M. Anti-angiogenic perfluorocarbon nanoparticles for diagnosis and treatment of atherosclerosis. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2009, roč. 1, č. 3, s. 311-323. ISS 1939-5116.
- [12] CHOI, K.Y., SWIERCZEWSKA, M., LEE, S. a CHEN, X.Y. Protease-activated drug development. *Theranostics*, 2012, roč. 2, č. 2, s. 156-178. ISS 1838-7640.
- [13] DRBOHLAVOVA, J., CHOMOUCKA, J., ADAM, V., RYVOLOVA, M., ECKSCHLAGER, T., HUBALEK, J. a KIZEK, R. Nanocarriers for anticancer drugs -

- New trends in nanomedicine. *Current Drug Metabolism*, 2013, roč. 14, č. 5, s. 547-564. ISS 1389-2002.
- [14] DRBOHLAVOVA, J., ADAM, V., KIZEK, R. a HUBALEK, J. Quantum dots - Characterization, preparation and usage in biological systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, roč. 10, č. 2, s. 656-673. ISS 1661-6596.
- [15] DRBOHLAVOVA, J., HRDY, R., ADAM, V., KIZEK, R., SCHNEEWEISS, O. a HUBALEK, J. Preparation and properties of various magnetic nanoparticles. *Sensors*, 2009, roč. 9, č. 4, s. 2352-2362. ISS 1424-8220.
- [16] DUNCAN, R. a SAT, Y.N. Tumour targeting by enhanced permeability and retention (EPR) effect. *Annals of Oncology*, 1998, roč. 9, č., s. 39-39. ISS 0923-7534.
- [17] MI, Y., ZHAO, J. a FENG, S.-S. Prodrug micelle-based nanomedicine for cancer treatment. *Nanomedicine (London, England)*, 2013, roč. 8, č. 10, s. 1559-1562. ISS 1748-6963.
- [18] SHI, J.Y., LIU, T.W.B., CHEN, J., GREEN, D., JAFFRAY, D., WILSON, B.C., WANG, F. a ZHENG, G. Transforming a targeted porphyrin theranostic agent into a PET imaging probe for cancer. *Theranostics*, 2011, roč. 1, č., s. 363-370. ISS 1838-7640.
- [19] GILJOHANN, D.A. a MIRKIN, C.A. Drivers of biodiagnostic development. *Nature*, 2009, roč. 462, č. 7272, s. 461-464. ISS 0028-0836.
- [20] MISHRA, A.K. *Nanomedicine for drug delivery and therapeutics*, Scievers Publishing LLC, Beverly, MA, 2013. 530 s. 9781118414095
- [21] PARK, K. Facing the truth about nanotechnology in drug delivery. *ACS Nano*, 2013, roč. 7, č. 9, s. 7442-7447. ISS 1936-0851.
- [22] MAEDA, H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond. *Journal of Controlled Release*, 2012, roč. 164, č. 2, s. 138-144. ISS 0168-3659.
- [23] MATSUMURA, Y. a MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer-chemotherapy - mechanisms of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent Smancs. *Cancer Research*, 1986, roč. 46, č. 12, s. 6387-6392. ISS 0008-5472.
- [24] VASEY, P.A., KAYE, S.B., MORRISON, R., TWELVES, C., WILSON, P., DUNCAN, R., THOMSON, A.H., MURRAY, L.S., HILDITCH, T.E., MURRAY, T., BURTLES, S., FRAIER, D., FRIGERIO, E., CASSIDY, J. a CANC RES CAMPAIGN PHASE, I.I.C. Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin : First member of a new class of chemotherapeutic agents - Drug-polymer conjugates. *Clinical Cancer Research*, 1999, roč. 5, č. 1, s. 83-94. ISS 1078-0432.
- [25] KRATZ, F. a WARNECKE, A. Finding the optimal balance: Challenges of improving conventional cancer chemotherapy using suitable combinations with nano-sized drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 2012, roč. 164, č. 2, s. 221-235. ISS 0168-3659.
- [26] PATRA, C.R., BHATTACHARYA, R., MUKHOPADHYAY, D. a MUKHERJEE, P. Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010, roč. 62, č. 3, s. 346-361. ISS 0169-409X.
- [27] LU, W., XIONG, C.Y., ZHANG, R., SHI, L.F., HUANG, M., ZHANG, G.D., SONG, S.L., HUANG, Q., LIU, G.Y. a LI, C. Receptor-mediated transcytosis: A mechanism

- for active extravascular transport of nanoparticles in solid tumors. *Journal of Controlled Release*, 2012, roč. 161, č. 3, s. 959-966. ISS 0168-3659.
- [28] GU, F.X., KARNIK, R., WANG, A.Z., ALEXIS, F., LEVY-NISSENBAUM, E., HONG, S., LANGER, R.S. a FAROKHZAD, O.C. Targeted nanoparticles for cancer therapy. *Nano Today*, 2007, roč. 2, č. 3, s. 14-21. ISS 1748-0132.
- [29] CHOMOUCKA, J., DRBOHLAVOVA, J., HUSKA, D., ADAM, V., KIZEK, R. a HUBALEK, J. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research*, 2010, roč. 62, č. 2, s. 144-149. ISS 1043-6618.
- [30] PANYAM, J. a LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, roč. 55, č. 3, s. 329-347. ISS 0169-409X.
- [31] PEER, D., KARP, J.M., HONG, S., FAROKHZAD, O.C., MARGALIT, R. a LANGER, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, 2007, roč. 2, č. 12, s. 751-760. ISS 1748-3387.
- [32] ALLEN, T.M. a CULLIS, P.R. Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Science*, 2004, roč. 303, č. 5665, s. 1818-1822. ISS 0036-8075.
- [33] SVENSON, S. a PRUD'HOMME, R.K. *Multifunctional nanoparticles for drug delivery applications: Imaging, targeting, and delivery*, Springer, 2012. 373 s. 9781461423041
- [34] LAVAN, D.A., MCGUIRE, T. a LANGER, R. Small-scale systems for in vivo drug delivery. *Nature Biotechnology*, 2003, roč. 21, č. 10, s. 1184-1191. ISS 1087-0156.
- [35] SVENSON, S. Clinical translation of nanomedicines. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 2012, roč. 16, č. 6, s. 287-294. ISS 1359-0286.
- [36] AKINC, A., QUERBES, W., DE, S.M., QIN, J., FRANK-KAMENETSKY, M., JAYAPRAKASH, K.N., JAYARAMAN, M., RAJEEV, K.G., CANTLEY, W.L., DORKIN, J.R., BUTLER, J.S., QIN, L.L., RACIE, T., SPRAGUE, A., FAVA, E., ZEIGERER, A., HOPE, M.J., ZERIAL, M., SAH, D.W.Y., FITZGERALD, K., TRACY, M.A., MANOHARAN, M., KOTELIANSKY, V., DE FOUGEROLLES, A. a MAIER, M.A. Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Molecular Therapy*, 2010, roč. 18, č. 7, s. 1357-1364. ISS 1525-0016.
- [37] DE JONG, W.H. a BORM, P.J.A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 2008, roč. 3, č. 2, s. 133-149. ISS 1176-9114.
- [38] PETROS, R.A. a DESIMONE, J.M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, roč. 9, č. 8, s. 615-627. ISS 1474-1776.
- [39] WEISSLEDER, R., KELLY, K., SUN, E.Y., SHTATLAND, T. a JOSEPHSON, L. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nature Biotechnology*, 2005, roč. 23, č. 11, s. 1418-1423. ISS 1087-0156.
- [40] DAVIS, M.E., CHEN, Z. a SHIN, D.M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2008, roč. 7, č. 9, s. 771-782. ISS 1474-1776.
- [41] CHOI, H.S., LIU, W.H., LIU, F.B., NASR, K., MISRA, P., BAWENDI, M.G. a FRANGIONI, J.V. Design considerations for tumour-targeted nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 2010, roč. 5, č. 1, s. 42-47. ISS 1748-3387.

- [42] MOK, H., LEE, S.H., PARK, J.W. a PARK, T.G. Multimeric small interfering ribonucleic acid for highly efficient sequence-specific gene silencing. *Nature Materials*, 2010, roč. 9, č. 3, s. 272-278. ISS 1476-1122.
- [43] BHARALI, D.J. a MOUSA, S.A. Emerging nanomedicines for early cancer detection and improved treatment: Current perspective and future promise. *Pharmacology & Therapeutics*, 2010, roč. 128, č. 2, s. 324-335. ISS 0163-7258.
- [44] AL-JAMAL, W.T. a KOSTARELOS, K. Liposomes: From a clinically established drug delivery system to a nanoparticle platform for theranostic nanomedicine. *Accounts of Chemical Research*, 2011, roč. 44, č. 10, s. 1094-1104. ISS 0001-4842.
- [45] DUNCAN, R. a GASPAR, R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Molecular Pharmaceutics*, 2011, roč. 8, č. 6, s. 2101-2141. ISS 1543-8384.
- [46] FANG, C. a ZHANG, M.Q. Nanoparticle-based theragnostics: Integrating diagnostic and therapeutic potentials in nanomedicine. *Journal of Controlled Release*, 2010, roč. 146, č. 1, s. 2-5. ISS 0168-3659.
- [47] LEE, D.Y. a LI, K.C.P. Molecular theranostics: A primer for the imaging professional. *American Journal of Roentgenology*, 2011, roč. 197, č. 2, s. 318-324. ISS 0361-803X.
- [48] CHOI, K.Y., LIU, G., LEE, S. a CHEN, X.Y. Theranostic nanoplatfoms for simultaneous cancer imaging and therapy: current approaches and future perspectives. *Nanoscale*, 2012, roč. 4, č. 2, s. 330-342. ISS 2040-3364.
- [49] CACHERIS, W.P., QUAY, S.C. a ROCKLAGE, S.M. The relationship between thermodynamics and the toxicity of gadolinium complexes. *Magnetic Resonance Imaging*, 1990, roč. 8, č. 4, s. 467-481. ISS 0730-725X.
- [50] STOLNIK, S., DAUDALI, B., ARIEN, A., WHETSTONE, J., HEALD, C.R., GARNETT, M.C., DAVIS, S.S. a ILLUM, L. The effect of surface coverage and conformation of poly(ethylene oxide) (PEO) chains of poloxamer 407 on the biological fate of model colloidal drug carriers. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2001, roč. 1514, č. 2, s. 261-279. ISS 0005-2736.
- [51] WANG, S.T., CHEN, K.J., WU, T.H., WANG, H., LIN, W.Y., OHASHI, M., CHIOU, P.Y. a TSENG, H.R. Photothermal effects of supramolecularly assembled gold nanoparticles for the targeted treatment of cancer cells. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2010, roč. 49, č. 22, s. 3777-3781. ISS 1433-7851.
- [52] CHEN, J.Y., GLAUS, C., LAFOREST, R., ZHANG, Q., YANG, M.X., GIDDING, M., WELCH, M.J. a XIA, Y.N. Gold nanocages as photothermal transducers for cancer treatment. *Small*, 2010, roč. 6, č. 7, s. 811-817. ISS 1613-6810.
- [53] GILJOHANN, D.A., SEFEROS, D.S., DANIEL, W.L., MASSICH, M.D., PATEL, P.C. a MIRKIN, C.A. Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2010, roč. 49, č. 19, s. 3280-3294. ISS 1433-7851.
- [54] BHATTACHARYA, R., PATRA, C.R., EARL, A., WANG, S.F., KATARYA, A., LU, L., KIZHAKKEDATHU, J.N., YASZEMSKI, M.J., GREIPP, P.R., MUKHOPADHYAY, D. a MUKHERJEE, P. Attaching folic acid on gold nanoparticles using noncovalent interaction via different polyethylene glycol backbones and targeting of cancer cells. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 2007, roč. 3, č. 3, s. 224-238. ISS 1549-9634.

- [55] ROZENBERG, B.A. a TENNE, R. Polymer-assisted fabrication of nanoparticles and nanocomposites. *Progress in Polymer Science*, 2008, roč. 33, č. 1, s. 40-112. ISS 0079-6700.
- [56] PISSUWAN, D., NIIDOME, T. a CORTIE, M.B. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 2011, roč. 149, č. 1, s. 65-71. ISS 0168-3659.
- [57] HUANG, C.W., HAO, Y.W., NYAGILO, J., DAVE, D.P., XU, L.F. a SUN, X.K. Porous hollow gold nanoparticles for cancer SERS imaging. *Journal of Nano Research*, 2010, roč. 10, č., s. 137-148. ISS 1662-5250.
- [58] DUTTA, R.K., SHARMA, P.K. a PANDEY, A.C. Design and surface modification of potential luminomagnetic nanocarriers for biomedical applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 2010, roč. 12, č. 4, s. 1211-1219. ISS 1388-0764.
- [59] PLANK, C. NANOMEDICINE Silence the target. *Nature Nanotechnology*, 2009, roč. 4, č. 9, s. 544-545. ISS 1748-3387.
- [60] GALIAN, R.E. a DE LA GUARDIA, M. The use of quantum dots in organic chemistry. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2009, roč. 28, č. 3, s. 279-291. ISS 0165-9936.
- [61] XING, Y., XIA, Z.Y. a RAO, J.H. Semiconductor quantum dots for biosensing and in vivo imaging. *Ieee Transactions on Nanobioscience*, 2009, roč. 8, č. 1, s. 4-12. ISS 1536-1241.
- [62] MURCIA, M.J. a NAUMANN, C.A. Biofunctionalization of fluorescent nanoparticles, in: *Nanotechnologies for the Life Sciences*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007.
- [63] JUNQUEIRA, L.C. a CARNEIRO, J. *Basic histology: Text and atlas*, McGraw-Hill, 2005. 544 s. 9780071440912
- [64] ZHU, Y.F., IKOMA, T., HANAGATA, N. a KASKEL, S. Rattle-type Fe₃O₄@SiO₂ hollow mesoporous spheres as carriers for drug delivery. *Small*, 2010, roč. 6, č. 3, s. 471-478. ISS 1613-6810.
- [65] YANG, Y., SONG, W.X., WANG, A.H., ZHU, P.L., FEI, J.B. a LI, J.B. Lipid coated mesoporous silica nanoparticles as photosensitive drug carriers. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2010, roč. 12, č. 17, s. 4418-4422. ISS 1463-9076.
- [66] LIANG, F. a CHEN, B. A Review on biomedical applications of single-walled carbon nanotubes. *Current Medicinal Chemistry*, 2010, roč. 17, č. 1, s. 10-24. ISS 0929-8673.
- [67] GHOSH, S., DUTTA, S., GOMES, E., CARROLL, D., D'AGOSTINO, R., OLSON, J., GUTHOLD, M. a GMEINER, W.H. Increased heating efficiency and selective thermal ablation of malignant tissue with DNA-encased multiwalled carbon nanotubes. *ACS Nano*, 2009, roč. 3, č. 9, s. 2667-2673. ISS 1936-0851.
- [68] CHAUDHURI, P., SONI, S. a SENGUPTA, S. Single-walled carbon nanotube-conjugated chemotherapy exhibits increased therapeutic index in melanoma. *Nanotechnology*, 2010, roč. 21, č. 2, s., ISS 0957-4484.
- [69] MA, Y.J., NOLTE, R.J.M. a CORNELISSEN, J. Virus-based nanocarriers for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, roč. 64, č. 9, s. 811-825. ISS 0169-409X.
- [70] UCHIDA, M., KLEM, M.T., ALLEN, M., SUCI, P., FLENNIKEN, M., GILLITZER, E., VARPNESS, Z., LIEPOLD, L.O., YOUNG, M. a DOUGLAS, T. Biological

- containers: Protein cages as multifunctional nanoplatfoms. *Advanced Materials*, 2007, roč. 19, č. 8, s. 1025-1042. ISS 0935-9648.
- [71] THEIL, E.C. Ferritin - Structure, gene-regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annual Review of Biochemistry*, 1987, roč. 56, č., s. 289-315. ISS 0066-4154.
- [72] LAWSON, D.M., ARTYMIUK, P.J., YEWDALL, S.J., SMITH, J.M.A., LIVINGSTONE, J.C., TREFFRY, A., LUZZAGO, A., LEVI, S., AROSIO, P., CESARENI, G., THOMAS, C.D., SHAW, W.V. a HARRISON, P.M. Solving the structure of huma H-ferritin by genetically engineering intramolecular crystal contacts. *Nature*, 1991, roč. 349, č. 6309, s. 541-544. ISS 0028-0836.
- [73] SALIS, C., GOEDELMAAN, C.J., PASQUINI, J.M., SOTO, E.F. a SETTON-AVRUJ, C.P. HoloTransferrin but not ApoTransferrin prevents Schwann cell de-differentiation in culture. *Developmental Neuroscience*, 2002, roč. 24, č. 2-3, s. 214-221. ISS 0378-5866.
- [74] BRETSCHER, M.S. a THOMSON, J.N. Distribution of ferritin receptors and coated pits on giant HeLa-cells. *Embo Journal*, 1983, roč. 2, č. 4, s. 599-603. ISS 0261-4189.
- [75] BLAZKOVA, I., NGUYEN, H.V., DOSTALOVA, S., KOPEL, P., STANISAVLJEVIC, M., VACULOVICOVA, M., STIBOROVA, M., ECKSCHLAGER, T., KIZEK, R. a ADAM, V. Apoferritin modified magnetic particles as doxorubicin carriers for anticancer drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, roč. 14, č. 7, s. 13391-13402. ISS 1422-0067.
- [76] LIEPOLD, L.O., ABEDIN, M.J., BUCKHOUSE, E.D., FRANK, J.A., YOUNG, M.J. a DOUGLAS, T. Supramolecular protein cage composite MR contrast agents with extremely efficient relaxivity properties. *Nano Letters*, 2009, roč. 9, č. 12, s. 4520-4526. ISS 1530-6984.
- [77] FLENNIKEN, M.L., LIEPOLD, L.O., CROWLEY, B.E., WILLITS, D.A., YOUNG, M.J. a DOUGLAS, T. Selective attachment and release of a chemotherapeutic agent from the interior of a protein cage architecture. *Chemical Communications*, 2005, roč., č. 4, s. 447-449. ISS 1359-7345.
- [78] STEINMETZ, N.F. Viral Nanoparticles in Drug Delivery and Imaging. *Molecular Pharmaceutics*, 2013, roč. 10, č. 1, s. 1-2. ISS 1543-8384.
- [79] LANKES, H.A., ZANGHI, C.N., SANTOS, K., CAPELLA, C., DUKE, C.M.P. a DEWHURST, S. In vivo gene delivery and expression by bacteriophage lambda vectors. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, roč. 102, č. 5, s. 1337-1349. ISS 1364-5072.
- [80] KAISER, C.R., FLENNIKEN, M.L., GILLITZER, E., HARMSSEN, A.L., HARMSSEN, A.G., JUTILA, M.A., DOUGLAS, T. a YOUNG, M.J. Biodistribution studies of protein cage nanoparticles demonstrate broad tissue distribution and rapid clearance in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, 2007, roč. 2, č. 4, s. 715-733. ISS 1176-9114.
- [81] DOUGLAS, J.T. Adenoviral vectors for gene therapy. *Molecular Biotechnology*, 2007, roč. 36, č. 1, s. 71-80. ISS 1073-6085.
- [82] RUSSELL, W.C. Adenoviruses: update on structure and function. *Journal of General Virology*, 2009, roč. 90, č., s. 1-20. ISS 0022-1317.

- [83] RAO, V.R., UPADHYAY, A.K. a KOMPELLA, U.B. pH shift assembly of adenoviral serotype 5 capsid protein nanosystems for enhanced delivery of nanoparticles, proteins and nucleic acids. *Journal of Controlled Release*, 2013, roč. 172, č. 1, s. 341-350. ISS 0168-3659.
- [84] SPEIR, J.A., MUNSHI, S., WANG, G.J., BAKER, T.S. a JOHNSON, J.E. Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryoelectron microscopy. *Structure*, 1995, roč. 3, č. 1, s. 63-78. ISS 0969-2126.
- [85] BRUMFIELD, S., WILLITS, D., TANG, L., JOHNSON, J.E., DOUGLAS, T. a YOUNG, M. Heterologous expression of the modified coat protein of Cowpea chlorotic mottle bromovirus results in the assembly of protein cages with altered architectures and function. *Journal of General Virology*, 2004, roč. 85, č. 1, s. 1049-1053. ISS 0022-1317.
- [86] DOUGLAS, T., STRABLE, E., WILLITS, D., AITOUCHEN, A., LIBERA, M. a YOUNG, M. Protein engineering of a viral cage for constrained nanomaterials synthesis. *Advanced Materials*, 2002, roč. 14, č. 6, s. 415-+. ISS 0935-9648.
- [87] PORTA, C., SPALL, V.E., FINDLAY, K.C., GERGERICH, R.C., FARRANCE, C.E. a LOMONOSSOFF, G.P. Cowpea mosaic virus-based chimaeras - Effects of inserted peptides on the phenotype, host range, and transmissibility of the modified viruses. *Virology*, 2003, roč. 310, č. 1, s. 50-63. ISS 0042-6822.
- [88] SINGH, P., GONZALEZ, M.J. a MANCHESTER, M. Viruses and their uses in nanotechnology. *Drug Development Research*, 2006, roč. 67, č. 1, s. 23-41. ISS 0272-4391.
- [89] SHERMAN, M.B., GUENTHER, R.H., TAMA, F., SIT, T.L., BROOKS, C.L., MIKHAILOV, A.M., ORLOVA, E.V., BAKER, T.S. a LOMMEL, S.A. Removal of divalent cations induces structural transitions in Red clover necrotic mosaic virus, revealing a potential mechanism for RNA release. *Journal of Virology*, 2006, roč. 80, č. 21, s. 10395-10406. ISS 0022-538X.
- [90] *Bacteriophage: Biology and applications*, Crc Press-Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway Nw, Ste 300, Boca Raton, Fl 33487-2742 USA, 2005. s. 0-8493-1336-8(H)
- [91] NECAS, O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*, H&H, Praha, 2000. 555 s. 80-86022-46-3
- [92] SNUSTAD, D.P. a SIMMONS, M.J. *Genetika*, Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno, 2009. 894 s. 978-80-210-4852-2
- [93] RUML, T., RUMLOVÁ, M. a PAČES, V. *Genové inženýrství*, Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. 270 s. 9788070804995
- [94] MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. a SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 s. 9780879691363
- [95] BURDYCHOVA, R. a SLADKOVA, P. *Mikrobiologická analýza potravin*, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, 2007. s. 978-80-7375-116-6
- [96] SMERKOVA, K., DOSTALOVA, S., SKUTKOVA, H., RYVOLOVA, M., ADAM, V., PROVAZNIK, I. a KIZEK, R. Isolation of Xis Gen Fragment of lambda Phage from Agarose Gel Using Magnetic Particles for Subsequent Enzymatic DNA Sequencing. *Chromatographia*, 2013, roč. 76, č. 7-8, s. 329-334. ISS 0009-5893.

- [97] YANG, Q. a CATALANO, C.E. Biochemical characterization of bacteriophage lambda genome packaging in vitro. *Virology*, 2003, roč. 305, č. 2, s. 276-287. ISS 0042-6822 (Print)
0042-6822 (Linking).
- [98] SINGH, P., NAKATANI, E., GOODLETT, D.R. a CATALANO, C.E. A pseudo-atomic model for the capsid shell of bacteriophage lambda using chemical cross-linking/mass spectrometry and molecular modeling. *Journal of Molecular Biology*, 2013, roč. 425, č. 18, s. 3378-3388. ISS 1089-8638 (Electronic)
0022-2836 (Linking).
- [99] KAISER, D. a MASUDA, T. In vitro assembly of bacteriophage Lambda heads. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1973, roč. 70, č. 1, s. 260-264. ISS 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking).
- [100] BAYER, M.E. a BOCHAROV, A.F. The capsid structure of bacteriophage lambda. *Virology*, 1973, roč. 54, č. 2, s. 465-475. ISS 0042-6822.
- [101] MEDINA, E.M., ANDREWS, B.T., NAKATANI, E. a CATALANO, C.E. The bacteriophage lambda gpNu3 scaffolding protein is an intrinsically disordered and biologically functional procapsid assembly catalyst. *Journal of Molecular Biology*, 2011, roč. 412, č. 4, s. 723-736. ISS 1089-8638 (Electronic)
0022-2836 (Linking).
- [102] GAUSSIER, H., YANG, Q. a CATALANO, C.E. Building a Virus from Scratch: Assembly of an Infectious Virus Using Purified Components in a Rigorously Defined Biochemical Assay System. *Journal of Molecular Biology*, 2006, roč. 357, č. 4, s. 1154-1166. ISS 0022-2836.
- [103] HWANG, Y. a FEISS, M. A defined system for in vitro lambda DNA packaging. *Virology*, 1995, roč. 211, č. 2, s. 367-376. ISS 0042-6822 (Print)
0042-6822 (Linking).
- [104] HUSKA, D., ADAM, V., BABULA, P., HRABETA, J., STIBOROVA, M., ECKSCHLAGER, T., TRNKOVA, L. a KIZEK, R. Square-wave voltammetry as a tool for investigation of doxorubicin interactions with DNA isolated from neuroblastoma cells. *Electroanalysis*, 2009, roč. 21, č. 3-5, s. 487-494. ISS 1040-0397.
- [105] CHANGENET-BARRET, P., GUSTAVSSON, T., MARKOVITSI, D., MANET, I. a MONTI, S. Unravelling molecular mechanisms in the fluorescence spectra of doxorubicin in aqueous solution by femtosecond fluorescence spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2013, roč. 15, č. 8, s. 2937-2944. ISS 1463-9076.
- [106] ZHANG, S., LIU, X.B., BAWA-KHALFE, T., LU, L.S., LYU, Y.L., LIU, L.F. a YEH, E.T.H. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature Medicine*, 2012, roč. 18, č. 11, s. 1639-+. ISS 1078-8956.
- [107] YILDIZ, I., LEE, K.L., CHEN, K., SHUKLA, S. a STEINMETZ, N.F. Infusion of imaging and therapeutic molecules into the plant virus-based carrier cowpea mosaic virus: Cargo-loading and delivery. *Journal of Controlled Release*, 2013, roč. 172, č. 2, s. 568-578. ISS 0168-3659.
- [108] HOLLANDER, A. Labelling techniques for the chemical analysis of polymer surfaces. *Surface and Interface Analysis*, 2004, roč. 36, č. 8, s. 1023-1026. ISS 0142-2421.

- [109] CHEN, W.H., CAO, Y.H., LIU, M., ZHAO, Q.H., HUANG, J., ZHANG, H.L., DENG, Z.W., DAI, J.W., WILLIAMS, D.F. a ZHANG, Z.J. Rotavirus capsid surface protein VP4-coated Fe₃O₄ nanoparticles as a theranostic platform for cellular imaging and drug delivery. *Biomaterials*, 2012, roč. 33, č. 31, s. 7895-7902. ISS 0142-9612.
- [110] LOCKNEY, D.M., GUENTHER, R.N., LOO, L., OVERTON, W., ANTONELLI, R., CLARK, J., HU, M., LUFT, C., LOMMEL, S.A. a FRANZEN, S. The Red clover necrotic mosaic virus Capsid as a Multifunctional Cell Targeting Plant Viral Nanoparticle. *Bioconjugate Chemistry*, 2011, roč. 22, č. 1, s. 67-73. ISS 1043-1802.
- [111] TMEJOVA, K., HYNEK, D., KOPEL, P., DOSTALOVA, S., SMERKOVA, K., STANISAVLJEVIC, M., NGUYEN, H.V., NEJDL, L., VACULOVICOVA, M., KRIZKOVA, S., KIZEK, R. a ADAM, V. Electrochemical behaviour of doxorubicin encapsulated in apoferritin. *International Journal of Electrochemical Science*, 2013, roč. 8, č. 12, s. 12658-12671. ISS 1452-3981.
- [112] ZHEN, Z.P., TANG, W., CHEN, H.M., LIN, X., TODD, T., WANG, G., COWGER, T., CHEN, X.Y. a XIE, J. RGD-Modified Apoferritin Nanoparticles for Efficient Drug Delivery to Tumors. *Acs Nano*, 2013, roč. 7, č. 6, s. 4830-4837. ISS 1936-0851.

SEZNAM ZKRATEK

VEGF vaskulární endoteliální růstový faktor
MRI zobrazování magnetickou rezonancí
AuNPs zlaté nanočástice
MPs magnetické nanočástice
QDs kvantové tečky
APO apoferritin
sHsp malý protein teplotního šoku
CCMV virus chlorotické skvrnitosti vigny
CPMV virus mozaiky vigny
RCNMV virus nekrotické mozaiky jetele lučního
TMV virus tabákové mozaiky
RNA ribonukleová kyselina
DNA deoxyribonukleová kyselina
mRNA mediátorová ribonukleová kyselina
hfl vysoká frekvence lyzogenie
PAGE polyakrylamidová gelová elektroforéza
SDS dodecylsírán sodný
LB Lysogeny broth
Tris Trisma báze
EDTA kyseliny ethylendiamintetraoctové
TAE Tris-acetát-EDTA
CBR-250 Coomassie Brilliant Blue R250
APS peroxydisíran amonný
TEMED N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin
APCs antigen-prezentující buňky
DOX doxorubicin

SEZNAM SYMBOLŮ

μm mikrometrů

bp párů bází

kDa kilodaltonů

Da daltonů