

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**VYUŽITÍ GENETICKY MODIFIKOVANÝCH  
BUNĚČNÝCH LINIÍ KE STUDIU  
TRANSPORTNÍCH PROCESŮ V LEDVINNÝCH *IN  
VITRO* MODELECH**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2022

Michaela Mužíková

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

.....

Michaela Mužíková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí své diplomové práce PharmDr. Lucii Smutné, PhD. za cenné rady, zkušenosti, ochotu a trpělivost, které mi věnovala při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat svojí rodině, která mě velmi podporovala.

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Michaela Mužíková

Školitelka: PharmDr. Lucie Smutná, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití geneticky modifikovaných buněčných linií ke studiu transportních procesů v ledvinných *in vitro* modelech

Transportní procesy v ledvinných buňkách z velké části zajišťují transportéry proximálních tubulů umožňující exkreci a reabsorpci různých endogenních i exogenních látek včetně xenobiotik. Z velkého množství transportních proteinů jsme pro studium zvolili glykoprotein megalin (LRP2), receptor účastnící se reabsorpce albuminu a dalších tělu vlastních látek, např. inzulinu nebo hemoglobinu. Mezi ligandy LRP2 z řad xenobiotik řadíme peptidová a aminoglykosidová antibiotika, zastoupená např. gentamicinem.

Diplomová práce se zabývá vývojem a využitím *LRP2* knockoutovaných buněčných linií v akumulačních studiích. Experimenty jsme prováděli na liniích přirozeně exprimujících LRP2, JEG-3 a HK-2. S využitím metody CRISPR/Cas9 bylo připraveno několik geneticky modifikovaných buněčných linií s nefunkčním LRP2 receptorem, a tedy i s narušenou schopností endocytovat modelové ligandy (jako je albumin nebo gentamicin), což potvrdily akumulační studie s užitím FITC-albuminu. Akumulace FITC-albuminu u modifikovaných linií prokazatelně poklesla.

Další část experimentů představují toxicitní studie zaměřující se na omezení buněčné toxicity gentamicinu založené na ovlivnění akumulace antibiotika v buňkách vlivem poškozené funkce LRP2 receptoru. Studie byly provedeny na modifikovaných buňkách a porovnány se základními nemodifikovanými liniemi JEG-3 a HK-2. Editované buňky se sníženou schopností internalizovat ligandy LRP2 vykazují prokazatelně vyšší viabilitu ve srovnání s nemodifikovanými liniemi.

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Michaela Mužíková

Supervisor: PharmDr. Lucie Smutná, PhD.

Title of diploma thesis: Using of genetically modified cells lines to study transport processes in *in vitro* kidney models

Transport processes in renal cells are mostly secured by proximal tubule transporters. These transporters mediate excretion and reabsorption of wide variety of endogenous and exogenous substances, including xenobiotics. Within the broad spectrum of many drug-transporting proteins, we have chosen the glycoprotein megalin (LRP2), a receptor involved in the reabsorption of albumin and other endogenous substances, such as insulin or hemoglobin. Peptide and aminoglycoside antibiotics represented by e.g., gentamicin and belongs between LRP2 ligands.

The diploma thesis deals with the development and utilization of the *LRP2* knockout cell lines in accumulation studies. The experiments were performed using human cell lines naturally expressing LRP2, the JEG-3 and HK-2. Several genetically modified cell lines expressing unfunctional LRP2 and consequently exerting harmed ability of model ligand internalization were prepared using the CRISPR/Cas9 technique. The effect was confirmed by accumulation studies with FITC-albumin. Significant decrease of FITC-albumin accumulation was detected in the modified cell lines.

Another part of the experiments is represented by toxicity studies based on reducing of cytotoxicity of gentamicin due to harmed *LRP2* gene resulting in harmed protein with harmed function and thus decreased accumulation of the antibiotic in the cells. The cytotoxicity studies were performed using modified cells compared to the parent JEG-3 and HK-2 cell lines. Edited cells with reduced ability to internalize LRP2 ligands showed significantly higher viability compared to unmodified cell lines.

## Obsah

1	Seznam zkratek.....	8
2	Úvod .....	10
3	Teoretická část.....	12
3.1	Ledvinný transport .....	12
3.1.1	ABC a SLC transportéry .....	12
3.1.2	Přenos látek přes membrány pomocí endocytózy .....	15
3.2	Megalin .....	17
3.2.1	Struktura a lokalizace .....	17
3.2.2	Funkce .....	19
3.2.3	Ligandy a jejich interakce s LRP2.....	21
3.2.4	Onemocnění ovlivněná megalinem .....	22
3.3	Cubilin.....	24
3.3.1	Výskyt a struktura.....	24
3.3.2	Funkce .....	25
3.4	Metody transfekce .....	28
3.4.1	Fyzikální metody .....	29
3.4.2	Biologické metody.....	30
3.4.3	Chemické metody .....	30
3.5	CRISPR-Cas9.....	32
3.6	Aminoglykosidová antibiotika .....	34
3.6.1	Gentamicin .....	35
4	Cíle práce.....	37
5	Experimentální část .....	38
5.1	Materiál .....	38
5.1.1	Přístroje a pomůcky .....	38
5.1.2	Chemikálie.....	38

5.2	Buněčné linie.....	39
5.2.1	HK-2.....	39
5.2.2	JEG-3.....	40
5.3	Příprava roztoků.....	40
5.3.1	Fosfátový pufr (PBS).....	40
5.3.2	Roztok DMSO 10%.....	40
5.3.3	Roztok gentamicinu 6 mg/ml.....	40
5.4	Transfekce.....	41
5.4.1	Pracovní postup.....	41
5.5	Akumulační studie.....	42
5.5.1	Pracovní postup.....	42
5.5.2	Stanovení množství proteinu.....	43
5.6	Testování viability.....	44
5.6.1	Pracovní postup.....	45
5.7	Statistická analýza.....	47
6	Výsledky.....	48
6.1	Výsledky akumulčních studií.....	48
6.2	Výsledky testování viability.....	51
7	Diskuse.....	56
8	Závěr.....	60
9	Literatura.....	61
	Webové reference.....	68

## 1 Seznam zkratek

ABC	ATP-binding cassette transportér
ApoE	apolipoprotein E
ApoJ	apolipoprotein J
BCA	Bicinchonic acid assay
BSA	bovinní sérový albumin
Cas-9	kaspáza 9
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	crispr RNA
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FITC	fluorescein isothiokyanát
GTP	guanosintrifosfát
HDL	high density lipoproteins
LDL	low density lipoproteins
LRP2	LDL receptor-related protein 2
MEM	Minimum essential medium
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)- -2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]
optiMEM	Opti-minimal essential medium
PBS	fosfátový pufr
PLB	pasivní lyzační pufr
RAAS	renin-angiotenzin-aldosteronový systém
sgRNA	single guide RNA



SLC	solute carrier
SNP	single nucleotide polymorphisms
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
tracrRNA	transaktivací crisper RNA

## 2 Úvod

Transport látek přes membrány je jedním ze základních složek buněčné komunikace uskutečňované všemi lidskými buňkami. Výměna látek v ledvinách hraje důležitou roli v absorpci, distribuci a eliminaci nejen živin, ale i endogenních látek, ke kterým se řadí i molekuly léčiv (Klaassen a Aleksunes 2010). Substráty mohou být přenášeny aktivně nebo pasivně různými transportními mechanismy, mezi které patří prostá difuze, transport iontovými kanály, aktivní transport, exocytóza a endocytóza. Difundovat dokážou látky s malou molekulou nebo dobrou rozpustností v tucích, proto objemné molekuly využívají transport pomocí vezikul. Velké molekuly, např. cholesterol a proteiny nemohou pro přenos využít ani difuzi ani transportní proteiny, a proto jsou transportovány pomocí endo/exocytózy (Trojan 2003).

Většina částic je přes membránu transportována pomocí transportérů, specializovaných proteinů nacházejících se v buněčné membráně zprostředkovávajících uptake nebo sekreci látek. Tyto proteiny jsou exprimovány v rozličných tkáních, např. střevních enterocytech, neuronech nebo buňkách ledvinných proximálních tubulů (Klaassen a Aleksunes 2010). V ledvinách funguje velkokapacitní transportní systém, který hospodaří s živinami a napomáhá vylučovat produkty metabolismu včetně léčiv (Inui *et al.* 2000).

Nejčastěji filtrované molekuly ledvinami mají charakter aniontů nebo kationtů, transportní systém pro kationty reabsorbuje nebo vylučuje endogenní substráty jako cholin, z léčiv např. verapamil, mezi vylučované tělu vlastní anionty patří kyselina močová, léčiva pak zastupuje methotrexát. Nezávisle na tom, jaké ionty vylučují, většina transportérů patří do rodiny ABC (ATP-binding cassette) nebo SLC (solute carrier), které se majoritně podílí na přenosu látek přes membrány (Inui *et al.* 2000).

Buňky proximálních tubulů exprimují na svém povrchu velké množství transportérů. Na apikální i basolaterální straně můžeme nalézt celou řadu ABC i SLC transportérů, příkladem může být URAT 1 (urate transporter 1), PEPT 1 (peptide transporter 1), OAT 1 (organic anion transporter 1) nebo receptor megalin kódovaný genem *LRP2*, významný protein, který zprostředkovává translokaci vysokomolekulárních látek, jako jsou např. hormony insulin a prolaktin nebo aminoglykosidová antibiotika (Klaassen a Aleksunes 2010, Marzolo a Farfán 2011). Studium receptorů s transportní funkcí, jako je megalin, může do budoucna přinést

důležité poznatky o vlivu přenosu vysokomolekulárních látek v proximálních tubulech na jejich farmakokinetiku, objasnit roli zmiňovaných receptorů v patogenezi ledvinných onemocnění nebo přinést nové informace o nežádoucích účincích studovaných léčiv.

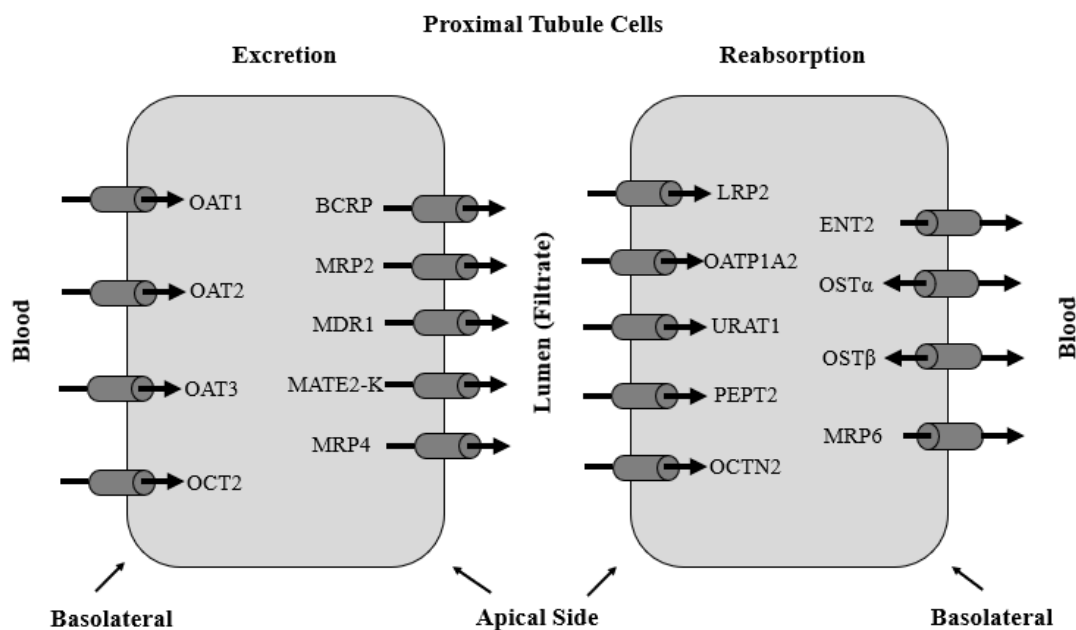
### 3 Teoretická část

#### 3.1 Ledvinný transport

Transportéry neboli proteiny zajišťující přenos látek přes membránu mají vysoce specifickou funkci a mohou zprostředkovávat transport pasivním nebo aktivním mechanismem za využití energie pro svou činnost (Klaassen a Aleksunes 2010). Ledvinné transportéry představují důležitou součást ledvinného hospodaření s nutrienty. Kromě eliminace různorodých látek, jako jsou odpadní metabolity, toxiny a léčiva, napomáhají snižovat ztráty živin a xenobiotik močí, k čemuž přispívá hojný výskyt transportérů po celé délce ledvinných tubulů. Mezi substráty ledvinných transportních proteinů lze řadit látky endogenní, jako je glukóza nebo aminokyseliny nebo xenobiotika, včetně léčiv (Inui *et al.* 2000).

##### 3.1.1 ABC a SLC transportéry

Většinu transportu substrátů přes membrány zajišťují dvě nadrodiny transportérů, a to solute carrier (SLC) a ATP-binding cassette (ABC) transportéry, přičemž většina SLC substráty internalizuje, zatímco ABC pracují efluxně. Mezi SLC transportéry řadíme organické anionty transportující polypeptidy (OATP), transportéry pro organické kationty (OCT), transportéry pro organické anionty (OAT), peptidické transportéry (PEPT), transportéry pro nukleosidy (CNT, ENT) a další. Do rodiny ABC řadíme transportéry podrodin Multidrug Resistance Proteins (MDR), Multidrug Resistance-Associated Proteins (MRP) a Breast Cancer Resistance protein (BCRP) (Klaassen a Aleksunes 2010).



Obrázek 1: Lokalizace nejvýznamnějších membránových transportérů v buňkách proximálních tubulů (Převzato z Klaassen a Aleksunes 2010)

Přesuneme-li se do buněk proximálních tubulů (Obrázek 1), na basolaterální straně buňky zajišťují příjem substrátu do buňky transportéry pro kationty, zejména OCT2 (organic cation transporter), zatímco za zachycení aniontů zodpovídají hlavně OAT1, OAT3 (organic anion transporters). Z aniontů pomáhají sekretovat antibiotika jako je ciprofloxacin nebo penicilin G, dále methotrexát, furosemid nebo thiolové konjugáty rtuti. Je tedy patrné, že dysfunkce OAT přispívá vzniku akutního renálního selhání v důsledku hromadění toxických metabolitů (Klaassen a Aleksunes 2010).

Pro transport kationtů má v ledvinách dominantní význam OCT2, mezi jehož substráty řadíme antidiabetikum metformin, antivirotikum lamivudin nebo antagonisty histaminových receptorů cimetidin a ranitidin (Koepsell a Daws 2019). Dále může OCT2 transportovat antineoplastikum cisplatinu, což může následně vyústit až k dosažení nefrotoxické koncentrace v ledvinných buňkách a tímto způsobem i limitovat terapii cisplatinou, případně vést k transplantaci ledvin (Klaassen a Aleksunes 2010). Zvýšená exprese OCT2 na membráně buněk proximálních tubulů toxicitu cisplatinu potencuje, naopak snížená až žádná exprese OCT2 působí z tohoto hlediska protektivně před renálním selháním. Dalším faktorem napomáhajícím snižování nefrotoxického působení cisplatinu u myši je míra exprese transportéru MATE1 (multidrug and toxin extrusion transporter 1), který se uplatňuje při tubulární sekreci cisplatinu do moči (Yokoo *et al.* 2007).

Basolaterální membrána obsahuje kromě uptakových i efluxní transportéry, zpět do krve přenášejí substráty OST $\alpha$ , OST $\beta$  (organic solutes transporters), ENT2 (equilibrative nukleoside transporter 2) a MRP6 (multidrug resistance protein 6) (Klaassen a Aleksunes 2010). OST $\alpha$  i OST $\beta$  lze zařadit mezi hlavní transportéry pro steroly včetně cholesterolu, žlučové kyseliny a konjugované steroly, jejich snížená funkce vede ke snížení reabsorpce a tím ke zvýšenému vylučování těchto sloučenin. Nedostatečná reabsorpce výše uvedených substrátů ovlivňuje krevní hladiny cholesterolu, triglyceridů a glukózy (Ballatori *et al.* 2008).

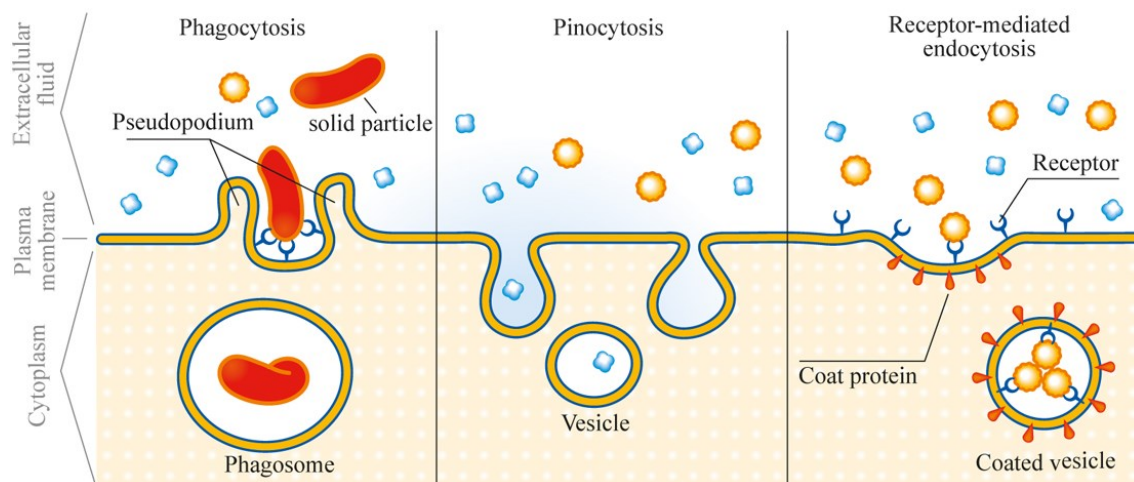
Zachycení látek z moče a transport do buňky zajišťují transportéry na apikální straně proximálních tubulů. Na buněčném povrchu je takových proteinů exprimovaná celá řada, například OAT1, OAT2 (organic anion transporters), OCT2 (organic cation transporter 2), OATP3A1 (organic anion transporting polypeptides), velmi dobře prostudované jsou také transportéry URAT1 (urate transporter 1), PEPT2 (peptide transporter 2) a OCTN2 (organic cation/carnitine transporter 2). URAT1 transportuje hlavně soli kyseliny močové a pokud by došlo k vyřazení transportéru z funkce, například mutací, snížilo by se množství reabsorbované kyseliny močové a tím i riziko krystalizace kyseliny močové ve tkáních (Klaassen a Aleksunes 2010). PEPT2 pomáhá udržet homeostázu peptidů, neboť silně váže všechny dipeptidy a tripeptidy, z léčiv lze jmenovat inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu nebo betalaktamová antibiotika. Pro jeho silnou afinitu k peptidovým substrátům se studují možnosti využití PEPT2 transportéru pro cílenou distribuci léčiv (Zhao a Lu 2015). OCTN2 transportuje řadu organických kationtů, příkladem lze uvést amisulprid nebo atropin (Koeppel a Daws 2019).

Na apikální membráně se nachází také efluxní transportéry a to MRP2, MRP4 (multidrug resistance-associated proteins), BCRP (breast cancer resistance protein), MATE1, MATE2-K (multidrug and toxin extrusion transporters) a MDR1 neboli P-glykoprotein, z nichž k nejprozkoumanějším patří právě MRP4, BCRP a MDR1. MRP4 a BCRP slouží jako transportéry pro diuretika hydrochlorthiazid a furosemid, které vystupují i jako inhibitory zmíněných transportérů, MRP4 je dále schopen přenášet i antivirotika adefovir a tenofovir (Klaassen a Aleksunes 2010, Fromm 2004). Mezi substráty BCRP, člena nadrodiny ABC transportérů, řadíme chemoterapeutika jako jsou deriváty kamptotecinu, inhibitor tyrosinkinázy imatinib nebo methotrexát a mnoho dalších léčiv, např. prazosin, cimetidin, nitrofurantoin nebo pantoprazol. Poslední jmenovaný vystupuje zároveň jako inhibitor přenašeče BCRP (Mao a Unadkat 2015).

MDR1 (P-glykoprotein) je považován za jeden z nejvýznamnějších ABC transportérů mající celou řadu substrátů, převážně léčiv. V ledvinách chrání buňky před toxickým působením léčiv a napomáhá jejich vylučování, substrátem je např. kardioglykosid digoxin, cytostatikum paklitaxel nebo antidysrytmikum verapamil (Fromm 2004). Zároveň znesnadňuje léčbu některých nemocí včetně rakoviny, HIV nebo cystické fibrózy. Nádorové buňky exprimují MDR1 několikanásobně více než buňky zdravé, což klade zvýšené nároky na vývoj léčiv, která musí nejen specificky cílit na buňky nádorové řady, ale i snižovat aktivitu MDR1 nebo být podávána ve zvýšených dávkách, popřípadě nebýt substrátem MDR1. Obdobně je tomu u HIV, avšak u cystické fibrózy se overexprese MDR1 jeví jako prospěšná, a to díky strukturální podobě proteinu CFTR (cystic fibrosis conductance transmembrane regulator). CFTR ovlivňuje iontovou rovnováhu a jeho mutace u nemocných cystickou fibrózou způsobuje zvýšenou tvorbu plicního sputa (Li *et al.* 2010).

### 3.1.2 Přenos látek přes membrány pomocí endocytózy

Endocytózou nazýváme proces, při kterém se transportovaná látka uzavírá do váčku vznikajícího odškrcením z plazmatické membrány a následně je přenesena přes membránu (Doherty a McMahon 2009).

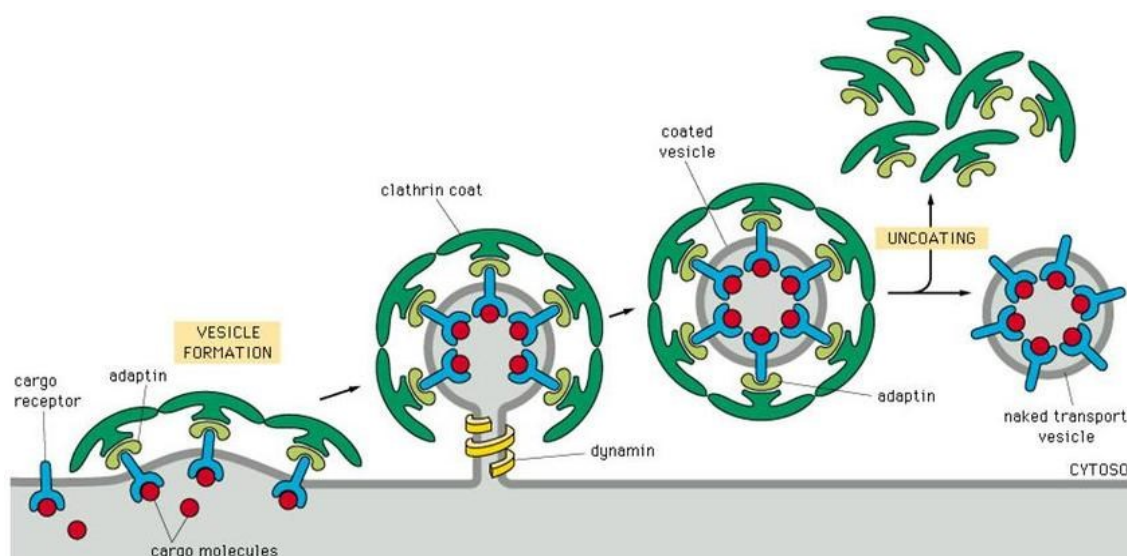


Obrázek 2: Schematické znázornění možností endocytózy (Převzato z Anonym 2011)

Existuje mnoho možností a cest, jak přenášet látky do buněk prostřednictvím endocytózy (Obrázek 2), které závisí jednak na vlastnostech endocytovaných látek, jednak proteinech spoluúčastnících se procesu a dále na specifitě buňky. V některých případech může jít o vysoce složitý a vysoce kontrolovaný proces, např. u synaptických neuronů může být v rámci jednoho vezikulu transportováno až 20 různých funkčně odlišných látek (Doherty a McMahon 2009). Jindy se může jednat pouze o nespecifický

přenos vysokomolekulárních látek, jako je tomu v případě lipoproteinového receptoru LRP2 (LDL receptor-related protein 2, megalin) (Marzolo a Farfán 2011).

Obecně nejlépe prostudovanou se jeví klatrinem zprostředkovaná endocytóza, tzn. molekuly jsou přenášeny přes buněčnou membránu ve formě váčků (Casartelli *et al.* 2008). Klatrin je díky svému uspořádání schopen překlenout místo, kde je na buněčné membráně vázaný komplex ligandu a receptoru, následně se na membráně pomocí regulačních proteinů vytvoří váček a dojde k pohlcení celého váčku do nitra buňky (Doherty a McMahon 2009). Intracelulárně se tato vezikula transformují do endozomů, ve kterých za pomoci specifických enzymů probíhá rozdělení obsahu a následně jsou jednotlivé látky přesunuty na specifická místa podle svého využití. Jedná se o velice specifický proces, kterého se účastní velké množství regulačních proteinů (Casartelli *et al.* 2008). Adaptor protein 2 (AP2) přispívá spojení internalizovaného substrátu s klatrinem, což v některých případech může vykonat i další pomocný protein, epsin, ten ale častěji napomáhá počáteční změně tvaru membrány a tvorbě receptorové jamky. Amphiphysin nebo SNX9 (sorting nexin 9) stabilizují zakřivení membrány, vážou se zároveň na AP2 a klatrin a odpovídají za vznik stabilního membránového váčku. Odpojení vezikula od membrány zajišťuje dynamin využitím energie vzniklé hydrolyzou GTP. Následný rozpad klatrinového koše zajišťuje auxilin spolu s chaperonem HSC70 (heat shock cognate) (Obrázek 3) (Doherty a McMahon 2009).

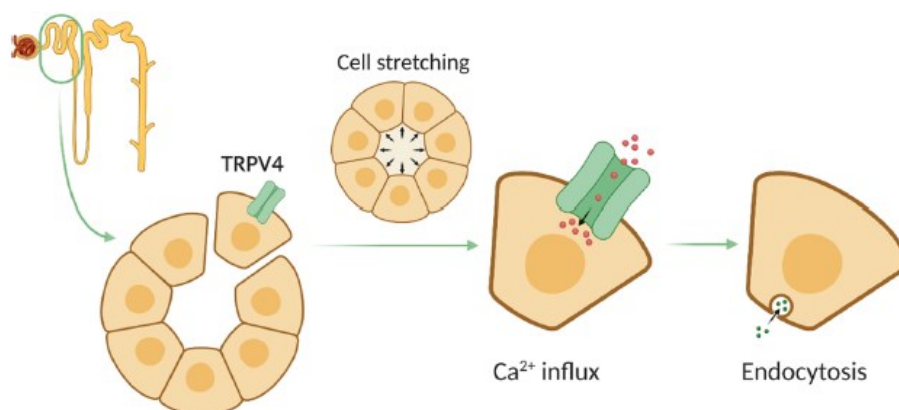


Obrázek 3: Zobrazení tvorby klatrinového koše spolu s vybranými pomocnými proteiny (Převzato z Pereira 2012)

Buňky proximálních tubulů se formují do specifického tvaru, který ovlivňuje schopnost endocytózy přes aktivaci iontového kanálu TRPV4 (transient receptor



potencial channel V4). Kanál, reagující nejen na specifické agonisty, ale i na protažení či smrštění buňky, zajistí spuštění endocytózy influxem  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (Obrázek 4)(Van Giel a Vennekens, 2021).



Obrázek 4: Schematické znázornění endocytózy za účasti TRPV4 (Převzato z Van Giel a Vennekens, 2021)

Kromě toho se v proximálních tubulech ve velké míře exprimují dva velké receptory, megalin a cubilin, jež patří do endolysosomálního systému proximálních tubulů a výrazně napomáhají internalizaci endocytózou (Polesel a Hall 2019).

### 3.2 Megalin

Megalin neboli Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 (LRP2) je transmembránový protein čítající 4655 aminokyselin o přibližné molekulové hmotnosti 522 kD (Casartelli *et al.* 2008). Jedná se o anionickou bílkovinu, jejíž izoelektrický bod byl stanoven na 4,6 (Moestrup *et al.* 1995). *LRP2* gen, který kóduje stejnojmenný protein, se v případě člověka nachází na chromozomu 2, konkrétně v lokusu 2q31.1. (De *et al.* 2014).

Megalin se řadí do rodiny LDL receptorů, která zahrnuje několik podrodin (Casartelli *et al.* 2008). Každá z těchto podrodin je charakterizovaná svou velikostí a výsledným tvarem proteinu. V hierarchii podrodin LDL receptorů můžeme megalin zařadit mezi obří lipoproteinové receptory (Andersen *et al.* 2013). Receptor umožňuje endocytózu velkého množství látek, mezi ligandy patří i široká škála látek, které jsou tělu vlastní včetně plasminogenu nebo prolaktinu (Marzolo a Farfán 2011).

#### 3.2.1 Struktura a lokalizace

Megalin se vykytuje u většiny živočichů od octomilek, přes hlísty až po člověka, z čehož lze vyvodit důležitost jeho fyziologické role v organismu (Casartelli *et al.* 2008). Po transkripci *LRP2* genu a následné translaci je LRP2 protein translokován na apikální

povrch epiteliálních buněk tkání ledvin, vnitřního ucha, očí, plic a štítné žlázy (Marzolo a Farfán 2011). Jeho role už v prenatálním vývoji je nezastupitelná, neboť již v období před narozením ovlivňuje vývoj mozku, plic, srdce a cév (Kukida *et al.* 2020). V morfologicky odlišných tkáních, například v mozkové tkáni (především v choroidálním plexu, astrocytech a neuronech), buňkách dělohy nebo folikulárních buňkách štítné žlázy, zastává specifické funkce vyplývající ze schopnosti proteinu přenášet pro výše uvedené tkáně specifické ligandy, největší význam má však pro ledviny, kde se po narození zároveň nejvíce vyskytuje (De *et al.* 2014).

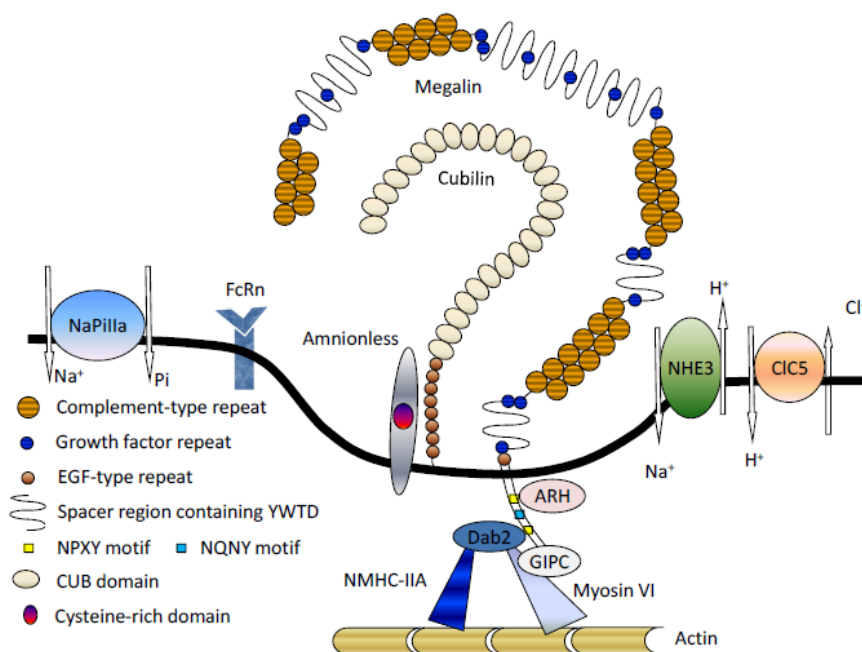
LDL receptory jsou glykoproteiny s velkou extracelulární a malou intracelulární částí (Obrázek 5) (Fisher a Howie 2006). Všechny členy rodiny lipoproteinových receptorů spojují jisté shodné strukturní znaky. První strukturní shodou jsou oblasti podobné komplementu (CR, complement type repeat), dále celky příbuzné epidermálnímu růstovému faktoru (EGF, epidermal growth factor) a nakonec  $\beta$ -šroubovice zahrnující sekvenci tyrosin – tryptofan – threonin – kyselina asparagová. U velké části receptorů se na vazbě ligandu podílí jak doména CR, tak  $\beta$ -šroubovice, avšak u obřích proteinů, včetně LRP2 zůstává význam  $\beta$ -šroubovice neobjasněn. Její funkce jsou u megalinu intenzivně zkoumány a předpokládá se, že se podílí na vazbě a uvolnění ligandů z receptoru uvnitř buňky (Andersen *et al.* 2013).

Struktura megalinu zahrnuje konkrétně 36 repetitiv podobných komplementu, které jsou bohaté na cystein, dále 16 částí růstových faktorů a 1 repetici pro EGF. Všechny celky se organizují do 3 domén: cytoplazmatické, jednoduché transmembránové a rozsáhlé extracelulární domény (Obrázek 5) (De *et al.* 2014). Extracelulární doména (ECD) zahrnuje 4400 aminokyselin, což představuje značnou část z celkové velikosti proteinu (4655 aminokyselin) (Saito *et al.* 1994). V ECD se nacházejí čtyři uskupení bohatá na cystein, která jsou od sebe oddělená  $\beta$ -šroubovicemi a zodpovídají za vazbu ligandů, kterými jsou vysokomolekulární látky, například thyreoglobulin, což je protein o molekulové hmotnosti 660 kDa (Marzolo a Farfán 2011, Rivolta a Targovnik 2006).

Transmembránová doména sestává z 23 aminokyselin, zodpovídá za ukotvení receptoru v membráně a stejně jako cytoplazmatická doména může být i tato doména štěpena  $\gamma$ -sekretázou (Marzolo a Farfán 2011, Nielsen *et al.* 2016).

LRP2 protein je zakončený sekvencí 209 aminokyselin, která tvoří relativně malou cytoplazmatickou doménu (CD). CD obsahuje značné množství motivů, které jsou

v přímé souvislosti s funkcí a regulací funkce LRP2 receptoru (Kukida *et al.* 2020). V cytoplazmatické doméně se nachází dileucinové místo a dva NPXY (asparagin – prolin – x – tyrosin) motivy (Marzolo a Farfán 2011). Ve struktuře lze nalézt také motiv NQNY (asparagin – glutamin – asparagin – tyrosin), který je obdobou NPMY (asparagin – prolin – methionin – tyrosin) a zodpovídá za výskyt megalinu na apikální straně membrány (De *et al.* 2014). NPMY motiv se u megalinu podílí na přesunu ligandu do nitra buňky. Kromě výše uvedených repetitiv obsahuje CD dvě sekvence bohaté na prolin odpovědné za interakci s cytoskeletem. V neposlední řadě lze jmenovat i části, které umožňují fosforylaci cytoplazmatické domény receptoru, tzv. PPPSP (prolin – prolin – prolin – serin – prolin) motiv nacházející se rovněž v CD receptoru, který megalinu propůjčuje na rozdíl od jiných LDL receptorů schopnost konstitutivní fosforylace (Marzolo a Farfán 2011). C-konec peptidu může být navíc odštěpen  $\gamma$ -sekretázou a takto vzniklý fragment se zapojuje do transkripce  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  výměníků, ale i megalinu samotného (Kukida *et al.* 2020).



Obrázek 5: Struktura megalinu včetně přidružených molekul (Převzato z De *et al.* 2014).

### 3.2.2 Funkce

Megalin ovlivňuje lidské tělo od početí, kde se účastní již nidace vajíčka v děloze, přes těhotenství až do dospělosti (Fisher a Howie 2006). Syntetizuje se již v raném vývoji neurální trubice a hraje důležitou roli při tvorbě mozkové tkáně (Marzolo a Farfán, 2011). Největší význam hraje v prenatálním vývoji ledvin, u ostatních orgánů se neprokázalo, že by přítomnost receptoru jako takového ovlivňovala jejich fyziologický vývin, přestože

studie uvádí, že pokud dojde k chybě činnosti megalinu v prenatalním období, mozek se nevyvíjí a zárodek roste se specifickým tvarem hlavy, krátkým nosem, plochým čelem a zakrnělými očima, a kromě mozku jsou významně postiženy i plíce a ledviny. U dospělých se významnou měrou podílí na udržení homeostázy organismu, a tudíž lze předpokládat, že správná produkce megalinu před narozením souvisí s normálním rozvojem ledvin po narození (Fisher a Howie 2006). Vyřazení receptoru z činnosti způsobuje proteinurii, která spolu s dalšími faktory, jako je užívání léčiv nebo diabetes, může progredovat až v zánět a selhání ledvin nebo poruchy kardiovaskulární soustavy v souvislosti se zvýšenou aterosklerozou (Kukida *et al.* 2020).

Doposud nejlépe jsou prostudovány a zmapovány funkce LRP2 v ledvinách (Fisher a Howie 2006). V proximálních tubulech vystupuje megalin jako nejvýznamnější transportér, vyskytuje se po celé jejich délce v hojném počtu, což spolu s vysokou koncentrací ligandů v moči umožňuje velké množství interakcí ligandů s receptorem. V důsledku toho jsou internalizovány i molekuly, které nemají tak vysokou afinitu k LRP2 (Moestrup *et al.* 1995). Receptor zachytává především vysokomolekulární látky z moči a vrací je zpět do krve, avšak nemá zde jen roli transportní, ale zapojuje se i do syntézy lysozomálních proteinů proximálních tubulů (Marzolo a Farfán 2011). Na stejném místě spolupracuje s  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpou a v závislosti na něm se vstřebává retinol, vitamin  $\text{B}_{12}$  a vápník (Fisher a Howie 2006).

Další z překvapivých funkcí představuje spoluúčast megalinu na vápníkové homeostáze. Na regulaci hladiny vápníku se podílí velkou měrou příštítná tělíska, která v reakci na množství vápníku v extracelulární tekutině uvolňují parathormon, a právě na povrchu buněk příštítných tělísek můžeme megalin nalézt. Aktivita ECD megalinu také závisí na hladině vápníku, neboť ve své struktuře obsahuje místa, kam se tento kation váže a umožňuje tak internalizaci ligandu. Studie na myších modelech prokázaly přítomnost megalinu v několika typech buněk, které vykazují citlivost na hladiny vápníku nebo se jejich citlivost předpokládá. Dále bylo zjištěno, že pokud je megalin knockoutován, pak má zvýšená hladina vápníku v extracelulární tekutině nižší vliv na sekreci parathormonu oproti situaci, kdy megalin inaktivován není. Z výše uvedeného vyplývá, že megalin ovlivňuje hladiny vápenatých iontů v organismu nejen na úrovni sekrece. (Fisher a Howie 2006).

Za zmínku stojí i propojení RAAS (renin-angiotenzin-aldosteronový systém) s megalinem, neboť receptor v proximálních tubulech reguluje reabsorpci angiotenzinogenu, reninu a angiotenzinu II, a tudíž hraje roli v ovlivnění krevního tlaku. Na rozdíl od výše uvedených ligandů však bylo prokázáno, že snížené hladiny angiotenzinu II snižují funkci megalinu, to znamená, že i angiotenzin II ovlivňuje megalin pozitivní zpětnou vazbou (Kukida *et al.* 2020).

Funkce a ligandy megalinu jsou do jisté míry zmapované, avšak o regulaci hladin tohoto proteinu se ví málo. Stejně jako v případě jiných receptorů, množství proteinu LRP2 na membráně je řízeno na úrovni transkripce a translace. Činnost megalinu je však ovládána i regulací přesunu receptoru na povrch buňky a stejně tak má vliv i počasí proteinu na membráně (Marzolo a Farfán 2011). Syntézu mRNA aktivuje vitamin D, žlučové kyseliny nebo kyselina retinová. Negativně tvorbu proteinu ovlivňuje TGF- $\beta$  (De *et al.* 2014). Přesun receptoru na povrch membrány řídí endoplazmatické retikulum, zatímco jeho internalizaci zpět do buňky ovládají cytosolické proteiny a GSK3 kináza (Marzolo a Farfán 2011).

Pokusy na myších poukázaly i na zcela novou schopnost LRP2, kterou je vychytávání selenoproteinů, neboli proteinů zahrnujících ve své struktuře aminokyselinu selenocystein, příkladem mohou být glutathionperoxidázy nebo thioredoxinreduktázy (Labunskyy *et al.* 2014). Myši, které měly zmutovanou a nefunkční extracelulární doménu, vykazovaly v souvislosti s nedostatkem selenu problémy s koordinací (Marzolo a Farfán 2011).

### 3.2.3 Ligandy a jejich interakce s LRP2

Megalín internalizuje především vysokomolekulární látky, mezi které patří plazmatické transportní proteiny pro vitaminy, enzymy, enzymové inhibitory, hormony, albumin, laktoferin, ale i látky strukturně odlišné od proteinů: animoglykosidová antibiotika, jejichž společnou vlastností je právě vysoká molekulová hmotnost (Fisher a Howie 2006, Casartelli *et al.* 2008, Andersen *et al.* 2013). Od počátku 21. století známe více než 50 různých ligandů megalinu. Mezi významné ligandy nepochybně patří i molekuly ApoJ a ApoE, které tento receptor pomáhá přenášet přes hematoencefalickou a hematolikorovou bariéru (Fisher a Howie 2006).

Ze studií vyplývá, že za vazbu ligand-receptor odpovídají negativně nabitá úseky megalinu, které mohou snadno reagovat s bazickými skupinami ligandů. Kationické

ligandy se naproti tomu vážou menšinově (Moestrup *et al.* 1995). Vazbu ligandů řídí hladina vápníku, neboť při pokusech, kdy byl vápník vázán v komplexech s EDTA, se ligandů navázalo jen poloviční množství oproti pokusům, kde EDTA použita nebyla (Moestrup *et al.* 1995, Casartelli *et al.* 2008).

Poté co je ligand navázán na receptor, začíná internalizace. Membrána se vchlipuje dovnitř, až na vnitřní straně vytvoří váček, který se přemění na endozom. Následný osud obsahu váčku se různí dle typu substrátu. Obsah vezikul splyne s lysozomem a může být rozložen nebo bez degradace recyklován a vrácen na membránu. Další možností zpracování je postupné zrání váčků do forem pozdních endozomů. Poté, co obsah endozomů zpracují pomocné enzymy, se megalin vrátí zpět na povrch buňky (De *et al.* 2014). Přirozeně se megalin nachází na apikální straně membrány, tato pozice lze změnit, a to pomocí transcytózy. Transcytóza je proces, při kterém je receptor přesunut na opačnou stranu membrány, aniž by byl předtím degradován (Marzolo a Farfán 2011).

$\beta$ -šroubovice ve struktuře megalinu jsou schopny se vázat na ligand pomocí svého shutter binding NxI (SBiN) motivu, což je sekvence aminokyselin komplementární k motivu NxI (asaparagin – x – izoleucin) objevující se u ligandů. Překvapivě dva NxI motivy lze nalézt i ve struktuře cubilinu, koreceptoru megalinu. Tyto motivy jsou odpovědné za specifickou vazbu receptor-ligand. Spojení s ligandem může být posíleno zapojením CR a EGF motivů, které ovlivňují afinitu. Nadto  $\beta$ -šroubovice dovolují vazbu ligandu v jeho pevné podobě (Andersen *et al.* 2013).

Megalin je schopen přenášet nejen živiny, ale i látky způsobující poškození buněk (De *et al.* 2014). Současně internalizuje nejen tělu vlastní, ale i syntetické sloučeniny s mnoha bazickými strukturami. Z léčiv lze uvést například aminoglykosidové antibiotikum gentamicin nebo polymyxin B (Casartelli *et al.* 2008). Za nefrotoxicitu aminoglykosidů, závažný nežádoucí účinek, kterému se předchází pečlivým dávkováním, zodpovídá právě reabsorpce v ledvinách (Lüllmann *et al.* 2007). Jejich molekuly jsou přes membránu přeneseny pomocí transportních vezikul a mohou s dalšími ligandy, například jinými antibiotiky, jako je polymyxin B, o receptor soutěžit. Kompetice o receptor umožňuje vznik i některým lékovým interakcím (Moestrup *et al.* 1995).

### 3.2.4 Onemocnění ovlivněná megalinem

Ligandy megalinu, jako je například angiotensin II nebo lipoproteinová lipáza, souvisí s onemocněními, např. diabetem mellitem, hypertenzí nebo obezitou, a proto se

dysfunkce receptoru přímo podílí na vzniku těchto onemocnění. Patologické procesy ovlivňují nejen ligandy, ale i proteiny s megalinem interagující, například  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pumpa. Tato pumpa je megalinem ovlivňována a její aktivita se v souvislosti se změnou činnosti LRP2 snižuje u pacientů trpících diabetem mellitem (Marzolo a Farfán 2011).

Výskyt megalinu na buněčných površích částečně definuje i vliv genetických mutací na chromozomu X, konkrétně u Loweho syndromu a Dentovy nemoci. U obou nemocí dochází k postupnému selhávání ledvin z důvodu špatné resorpce proteinů a minerálů. U Loweho syndromu se již od narození vyskytuje šedý zákal a mentální retardace. Dentovu nemoc naproti tomu charakterizuje proteinurie a acidóza, nemoc se dělí do dvou typů podle toho, ve které části chromozomu X k mutaci došlo. Typ jedna se vyznačuje mutací genu pro chloridový kanál  $\text{ClC-5}$  a typ dva mutací OCRL (oculocerebrorenal syndrome of Lowe), což je gen kódující enzym zodpovědný za udržení rovnováhy fosfolipidů v buněčné membráně. Pokusy na myších prokázaly, že obě mutace vznikají u jedinců, kteří mají narušenou expresi megalinu na apikální straně buněk proximálních tubulů (Marzolo a Farfán 2011, Anonym 2020a).

Díky hojnému zastoupení v ledvinných proximálních tubulech se LRP2 podílí i na patofyziologických stavech ledvin. Exozomy detekované v moči pacientů s renální dysfunkcí obsahují kromě LRP2 i cubilin, ale i transportní proteiny jako je například aquaporin nebo  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpu. Očekává se, že lepší prostudování těchto exozomů pomůže objasnit mechanismy vzniku renálních onemocnění a označí jejich důležité markery (De *et al.* 2014).

Je samozřejmostí, že jakožto receptor pro lipoproteiny, bude mít megalin významnou roli v internalizaci cholesterolu a s tím spojených nemocech. Svou roli v těchto onemocněních sehrává i koreceptor megalinu, cubilin. Megalin v souvislosti s cholesterolovou rovnováhou vystupuje jako receptor pro clusterin (apolipoprotein J) a lipoprotein (a) (Lp(a)). Clusterin, protein patřící do rodiny chaperonů regulujících buněčnou smrt, je krví přenášen navázán na HDL a Lp(a) a způsobuje aterogenezi (Sposito *et al.* 2019). Dále existuje významná souvislost s apolipoproteinem M, který je syntetizován v ledvinách za využití megalinu. Výzkumy stanovily, že různorodost variant exprimovaných receptorů v závislosti na heterogenitě genu pro megalin v lidské populaci má přímou souvislost s hladinou HDL částic, jejichž hladinu reguluje nejvýrazněji v rámci cholesterolové homeostázy (Marzolo a Farfán 2011).

Studie ukazují, že LRP2 vznikající v oční tkáni je nepostradatelný pro rozvoj očního bulbu a vizu. Existuje přímá souvislost mezi výskytem megalinu a krátkozrakostí u myši. Mutanti s knockoutovaným LRP2 genem se jeví jako krátkozrací, avšak mechanismus působení megalinu na sítnici nebyl doposud objasněn (Cases *et al.* 2017).

Megalin se spolu s cubilinem nachází i v epiteliálních buňkách žlučníku. Žluč obsahuje mnoho komponent, které jsou těmito proteiny vyvazovány, a proto má vliv i na žlučnicková onemocnění. Je možné, že megalin ovlivňuje pH žluči a tím se spolupodílí na vzniku žlučnickových kamenů. Kromě výše uvedených, je megalin významným činitelem pro rozvoj Alzheimerovy nemoci, neboť usnadňuje clearance  $\beta$ -amyloidu, peptidu hrajícím významnou roli v rozvoji onemocnění (Marzolo a Farfán 2011).

### 3.3 Cubilin

Cubilin je membránový protein vznikající přepisem *CUBN* genu lokalizovaném na desátém chromozomu, obsahující dvacet sedm domén označovaných CUB domény a amfifilní helikální sekvence. Tyto sekvence se nachází na N-konci, který je spojený s plazmatickou membránou. Cubilin představuje endocytický receptor s molekulovou hmotností 460 kDa a jedinečným uspořádáním, neboť ve své struktuře neobsahuje transmembránovou ani cytoplazmatickou doménu, a proto jeho internalizace zcela závisí na megalinu (Kozyraki 2001, Marzolo a Farfán 2011). Kromě lokalizace mají společné i některé ligandy, například albumin a myoglobin, které reabsorbují nestejně, neboť megalin zachytí většinu molekul (Nielsen *et al.* 2016).

Historicky prvním prokázaným ligandem cubilinu se stal komplex vnitřního faktoru a vitamínu B<sub>12</sub>. Projevem geneticky podmíněného onemocnění megaloblastické anémie je malabsorpce vitamínu B<sub>12</sub> a proteinurie, z nichž obě jsou pravděpodobně spojené s dysfunkcí cubilinu (Kozyraki 2001).

#### 3.3.1 Výskyt a struktura

Strukturu proteinu tvoří od N-konce řetězec 110 aminokyselin pokračující osmi EGF repeticemi, na něž se napojuje 27 CUB domén (Nielsen *et al.* 2016). Tyto domény tvoří 88 % hmotnosti celého proteinu a v prostoru jsou CUB domény a s nimi i celý protein orientovány do dvou vrstev složených z antiparalelních  $\beta$ -listů navzájem propojených  $\beta$ -šroubovicemi. CUB domény se mohou v prostoru různě natáčet a vytváří tak co nejvíce vhodnou polohu pro vazbu ligandu (Kozyraki 2001, Christensen *et al.* 2013).



Za ukotvení proteinu v membráně zodpovídá jeho N-konec, tato oblast netvoří klasickou transmembránovou doménu, ale šroubovicovou strukturu podobnou vlásence, která odpovídá za ukotvení v cytoplazmatické membráně (Kristiansen *et al.* 1999). Správná poloha cubilinu na membráně v prostoru extracelulárního prostředí závisí na proteinu zvaném amnionless (AMN), který interaguje s EGF repetitivy cubilinu a řídí tak jeho orientaci na cytoplazmatické membráně. V důsledku nepřítomnosti AMN proteinu cubilin zůstává otočen intracelulárně a stejně tak je důležitá přítomnost cubilinu pro správné určení polohy AMN (Nielsen *et al.* 2016).

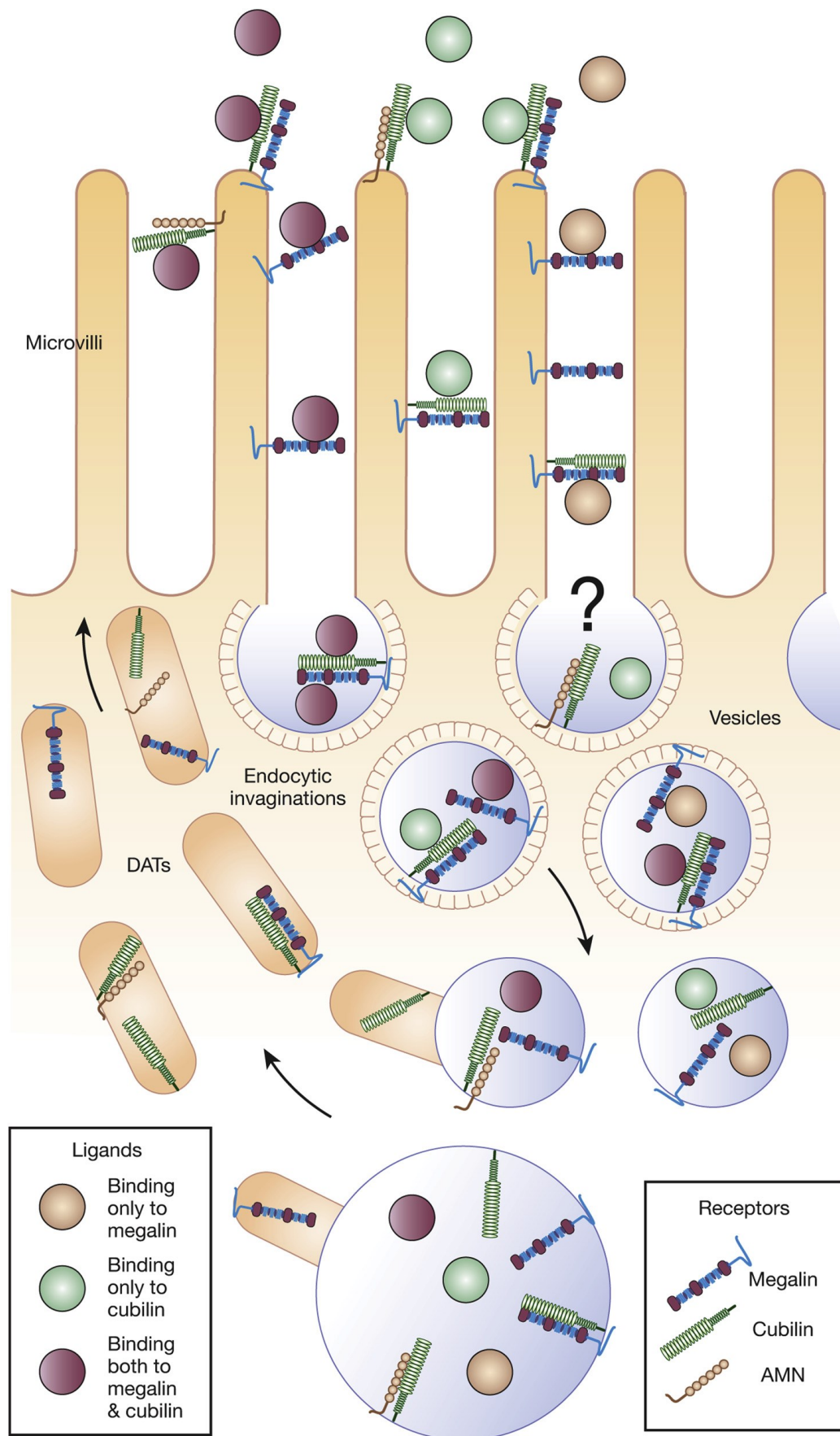
U dospělých jedinců je cubilin produkován buňkami proximálních tubulů, epitelu dělohy, nonepiteliálních stranách buněk sleziny, mozku, štítné žlázy a plic, na jejichž površích se vyskytuje, nejčastěji na těch místech cytoplazmatické membrány, kde probíhá klatrinem usnadněná internalizace substrátu (Kozyraki 2001). Spolu s megalinem se společně vyskytují v ledvinách a v tenkém střevě, kde jsou součástí kartáčového lemu a podílejí se na zachycení a přenosu kyanokobalaminu a kyseliny listové. (Casartelli *et al.* 2008).

### 3.3.2 Funkce

Receptor hraje rozmanité role u velkého množství živočichů od hlodavců přes nižší savce po člověka, u nichž se podílí na správném vývoji embrya, podílí se na organogenezi a účastní se výměny cholesterolových částic mezi matkou a plodem. Díky variabilitě umístění ve tkáních, např. proximální tubuly nebo epitel dělohy a velkému množství ligandů zastává cubilin vícero funkcí, jako jsou reabsorpce albuminu v proximálních tubulech nebo střevní absorpce vitamínu B<sub>12</sub> (Kozyraki 2001, Christensen *et al.* 2013).

Účast na střevní absorpci vitamínu B<sub>12</sub> patří mezi jednu z prvních popsaných funkcí, dysfunkce byla rozpoznána u pacientů trpících autozomálně recesivní megaloblastickou anémií (Nielsen *et al.* 2016). U nemocných se objevuje dysfunkce CUB domén 6 a 8 a v závislosti na lokalizaci mutace ve struktuře proteinu lze nemoc dělit na dva typy. Pozoruhodná může být i skutečnost, že mutace CUB domény 8 (typ 1) neovlivňuje reabsorpci dalšího ligandu, konkrétně apolipoproteinu A-I (apoA-I), zatímco mutanti s dysfunkční doménou 6 (typ 2) nejsou schopni apoA-I v proximálních tubulech efektně reabsorbovat (Kozyraki 2001). Onemocnění vzniká mutací *CUBN* nebo *AMN* genu, přičemž přesná funkce transmembránového proteinu AMN (amnionless) při vstřebávání vitamínu B<sub>12</sub> není doposud známa (Nielsen *et al.* 2016). Předpokládá se však, že absorpci

napomáhá spoluúčastí na biosyntetických procesech nebo ukotvením cubilinu v membráně. Po vazbě vitamínu B<sub>12</sub> v komplexu s intrinsic faktorem na cubilin dochází k napojení AMN na stericky nebráněné místo cubilinu a internalizaci ligandu. Cubilin spolu s AMN zřejmě utváří komplex známý též pod názvem cubam, který je schopen pracovat nezávisle na megalinu, proteinu obvykle nutném pro správnou činnost cubilinu (Fyfe *et al.* 2004).



Obrázek 6: Schematické znázornění tubulární reabsorpce za účasti megalinu, AMN a cubilinu (Převzato z: Nielsen et al. 2016)

V proximálních tubulech ledvin za spolupráce s megalinem (Obrázek 6) významně reabsorbuje proteiny jako je albumin, haptoglobin nebo výše zmíněný apoA-I. Albumin figuruje jako ligand obou receptorů, jak cubilinu, tak megalinu a jen díky hojnému zastoupení receptorů vystavených na apikální membráně tubulárních buněk se reabsorbuje většina albuminu, přestože se ligand k oběma receptorům váže nepříliš pevně (Kozyraki 2001). Samotná vazba na cubilin nestačí, neboť receptor sám není schopen internalizace a vystupuje ve vazbě albuminu jako koreceptor megalinu, tudíž reabsorpce albuminu zprostředkovaná cubilinem závisí na megalinu. Avšak studie prokazují, že největší podíl albuminu se reabsorbuje, pokud jsou oba proteiny funkční, pokusy s protilátkami proti albuminu a cubilinu ukázaly sníženou reabsorpci albuminu v případech, kdy byl jeden z receptorů vyřazen z funkce. Pro důležitost vzájemné kooperace svědčí i výskyt obou proteinů ve shodných tkáních (Zhai *et al.* 2000).

Cubilin, přestože sám není schopen vázat cholesterol nebo jiné lipidy, se významnou měrou podílí na regulaci lipidové rovnováhy, neboť je pravděpodobné, že váže a internalizuje přenašečový protein pro lipid v komplexu s lipidem (např. apoA-I spolu s triacylglyceroly). Naproti tomu, ale receptor nevyčytává lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL), ačkoliv se tyto částice formují právě z apoA-I a triacylglycerolů. HDL částice jsou tak objemné, že se do moči fyziologicky nedostávají a receptor je tudíž nezachytí. Vzhledem k množství ligandů z rodiny apolipoproteinů je patrné, že megalin spolu se svým koreceptorem jsou nedílnou součástí ledvinného systému zpětného vychytávání lipidů (Moestrup a Nielsen 2005).

### 3.4 Metody transfekce

Transfekce představuje technologickou metodu, kterou chápeme jako proces doručení cizí nukleové kyseliny do buňky se záměrem produkování geneticky upravených buněk. Dosažení modifikace buněk umožňují metody chemické, biologické a fyzikální, z nichž každá má své výhody a nevýhody, a proto se volba vhodné techniky odvíjí od množství doručované DNA, typu buňky, náročnosti provedení a dalších (Kim a Eberwine 2010).

Zmiňované rozdílné přístupy mezi jednotlivými transfekčními metodami se liší v několika rovinách, za které lze považovat schopnost transfekovat velké množství buněk, úspěšnost transfekce nebo toxické působení na transfekované buňky (Kaestner *et al.* 2015).

Před zahájením transfekce je nezbytně nutné optimalizovat proces v závislosti na typu transfekovaných buněk, které přestože projevují stejné vlastnosti, mohou vyžadovat odlišné transfekční podmínky. Naštěstí lze úspěšnost reakce vyhodnotit jednoduše, a to stanovením množství proteinu exprimovaného geneticky modifikovanými buňkami (Kingston *et al.* 2003).

Problémy s transfekcí mohou nastat hned v několika případech, z nichž k nejčastějším patří nízká úspěšnost transfekce. Nízký podíl úspěšně modifikovaných buněk lze především u chemických metod zvýšit vhodným skladováním reagensů v příslušných obalech a za požadované teploty (Kumar *et al.* 2019a).

### 3.4.1 Fyzikální metody

Fyzikálně lze transfekce dosáhnout pomocí mikroinjekcí, optické transfekce, elektroporace, sonoporace a dalšími metodami (Kaestner *et al.* 2015). Fyzikální metody obecně vykazují velmi vysokou úspěšnost, pokud hodnotíme začlenění vkládaného úseku DNA do genomu buňky a produkci požadovaného proteinu (Khantakova *et al.* 2018). Mikroinjekce a optické transfekce se využívá pro transfekci právě jedné buňky s velmi vysokou efektivitou. Další výhodou představuje nezávislost úspěchu transfekce na chemické výbavě a specializaci buněk, např. elektroporace se užívá pro modifikaci T-lymfocytů (Kaestner *et al.* 2015).

Elektroporace představuje metodu zaručující konstantní výsledky, čehož lze využít k transfekci buněk imunitního systému, ať už T-lymfocytů, makrofágů nebo dendritických buněk. Současně představuje jednu z nejčastěji užívaných nevirálních transfekčních metod. Úspěch této metody, kdy se k doručení kýženého úseku DNA do buňky využívá napětí rozrušující buněčnou membránu, závisí na napětí vloženém na elektrodu, době trvání a koncentraci vektorové DNA. Z popisu metody vyplývá, že buňky v průběhu genetické úpravy podstupují velkou zátěž, a proto se nutně zajišťují podmínky k podpoře regenerace buněk, včetně volby vhodného média (Khantakova *et al.* 2018).

Slibně se rozvíjející fyzikální metodu představují i mikroinjekce, jejichž hlavní výhoda oproti elektroporaci spočívá v možnosti transfekovat jednoduše všechny typy buněk. Současné technické vybavení umožňuje automatizaci této metody pomocí robotů, a tudíž její zrychlení a odstranění lidské chybovosti. Prakticky se jedná o vložení a předání přesně stanoveného objemu směsi činidel a DNA do buněk pomocí mikropipet (Chow *et al.* 2016).

### 3.4.2 Biologické metody

Hlavní biologickou metodu distribuce DNA představuje virová transdukcce (Kaestner *et al.* 2015). Přenos genetické informace pomocí viru se historicky využíval a v zásadě položil základy moderní transfekce, avšak postupem času ho vytlačily modernější metody, ať už fyzikální nebo chemické. Mezi nejčastěji užívané vektory pro transdukcce řadíme retroviry včetně lentivirů nebo adenoviry, přičemž používané virové vektory prokazují vysokou účinnost (Neshat *et al.* 2020).

S výhodou je tato metoda užívána především u rychle se dělících buněk, vykazuje totiž velmi vysokou účinnost, avšak mezi hlavní nevýhody patří vyvolání imunitní odpovědi u transfekce *in vivo* (Kaestner *et al.* 2015, Neshat *et al.* 2020). Pro odstranění imunogenicity se vyvinuly modifikace, jako je např. pokrytí virové částice polymerem nebo konjugace s polypeptidem (Neshat *et al.* 2020).

### 3.4.3 Chemické metody

Chemické metody transfekce zastupují techniky, kdy polykationty, fosforečnan vápenatý nebo dendrimery usnadňují přechod DNA přes buněčnou membránu. Někdy bývá k chemickým metodám řazena i lipofekce, fakticky však stojí na rozhraní metod chemických a biologických. Lipofekce se současně těší velké oblibě, ve srovnání s dalšími chemickými metodami vykazuje až stokrát vyšší úspěšnost (Kaestner *et al.* 2015).

K jedné z prvně užívaných chemických metod se řadí transfekce pomocí fosforečnanu vápenatého. Princip představuje mísení chloridu vápenatého, DNA a dalších reakčních činidel, přičemž sraženiny DNA s fosforečnanem vápenatým ulpívají na buněčných membránách a buňky je následně pohlcují pomocí endocytózy. Úspěšnost této technicky nenáročné metody závisí na množství DNA v precipitátu, době kontaktu reagentů s buněčnou membránou a použití pomocných činidel jakým je dimethylsulfoxid(DMSO). Zejména koncentrace DNA v precipitátu velmi předurčuje úspěch reakce, neboť ovlivňuje přijetí nového úseku DNA buňkou, a právě tato vlastnost specificky charakterizuje různé typy buněk. Stejně tak doba kontaktu a přidání DMSO se liší mezi různými typy buněk, zatímco některé požadují dlouhý kontakt s reakčním činidlem a přidání DMSO, jiné by tento postup usmrtil. Z důvodu stanovení co nejpriznivějších podmínek se před zahájením transfekce provádí série stanovení

zahrnující odlišné koncentrace DNA v precipitátu přidávané do média po různě dlouhou dobu (Kingston *et al.* 2003).

Nejnovější chemické metody zastupuje liposomální transfekce, velmi slibně se rozvíjející technika a v posledních letech intenzivně studovaná metoda genového inženýrství (Digiacomio *et al.* 2018). Lipoplexy neboli komplexy tvořené kladně nabitým lipidem a záporně nabitou nukleovou kyselinou byly objeveny již na konci dvacátého století (Audouy a Hoekstra 2001). Současnou lipofekci lze chápat jako spontánní reakci kationických lipidů spolu s DNA za tvorby vezikulů schopných splýnout s cytoplazmatickou membránou (Kumar *et al.* 2019b). Strukturu kationického lipidu tvoří polární hlava a na ni navazuje uhlovodíkový řetězec zakončený hydrofobním ocáskem (Audouy a Hoekstra 2001). Při tvorbě liposomu dochází k interakci kladně nabitě hlavy lipidu s negativní fosfátovou skupinou DNA (Kumar *et al.* 2019b). Po tvorbě liposomu následuje přichycení komplexu doručované DNA s lipidem na cytoplazmatickou membránu, po něm dochází k internalizaci pomocí endocytózy, uvnitř buňky dochází k uvolnění DNA z obalu a přenosu do jádra na nějž navazuje transkripce (Audouy a Hoekstra 2001). Vývoj této metody umožňuje přenos různých druhů nukleových kyselin do širokého spektra buněk (Kumar *et al.* 2019b).

O úspěchu transfekce rozhoduje mnoho faktorů, např. délka uhlovodíkového řetězce lipidové molekuly, ochota komplexu tvořit micely nebo velikosti lipoplexu (Audouy a Hoekstra 2001). Výsledek se odvíjí od koncentrace DNA, lipidu a době vzniku liposomu z výše uvedených reagensů. Rostoucí koncentrace lipidu obecně zvyšuje šanci na úspěch, ovšem příliš vysoké koncentrace se jeví toxické, stejně tak vysoká koncentrace DNA může působit jako inhibitor reakce, přičemž optimální množství reagensů závisí na konkrétním typu buňky (Kingston *et al.* 2003). Liposomální transfekci dále ovlivňují transfekční činidla, např.: Lipofectamin 2000, jenž se pro nízkou toxicitu a snadné zacházení často využívá. Zároveň je schopen transfekovat adherentní a suspenzní buněčné linie (Kumar *et al.* 2019a). Dalšímu rozvoji metody stojí v cestě mnohé překážky, které musí liposom překonat včetně úspěšného překonání cytoplazmatické membrány nebo přesunem do jádra. Důležité hledisko představuje syntéza efektivních a cytotoxické stránce nezávadných liposomů, neboť lipoplexy mohou působit toxicky, přestože vykazují dobrou transfekční účinnost (Digiacomio *et al.* 2018).

Transfekce pomocí kationických lipidů se hojně využívá zejména pro výhody jako jsou omezená toxicita, snadné strukturální obměny a nízká cena (Audouy a Hoekstra 2001). V lipoplexech se lipidy a vodná fáze buď rozdělují do vrstev, díky kterým celý komplex připomíná cibuli, nebo tvoří micely (Digiacomio *et al.* 2018). Micely se společně seskupují do struktur připomínajících včelí plástve, kdy každou molekulu DNA obklopuje molekula lipidu. Takto organizované molekuly vykazují vyšší transfekční účinnost než cibulovité komplexy (Kumar *et al.* 2019b).

Zatímco *in vitro* nabízí lipofekce uspokojivé výsledky, *in vivo* tvoří překážky hlavně nízká účinnost a nestabilita komplexů, aby mohly být tyto překážky odstraněny, je nutností uspokojivěji korelovat data z *in vitro* studií (Audouy a Hoekstra 2001).

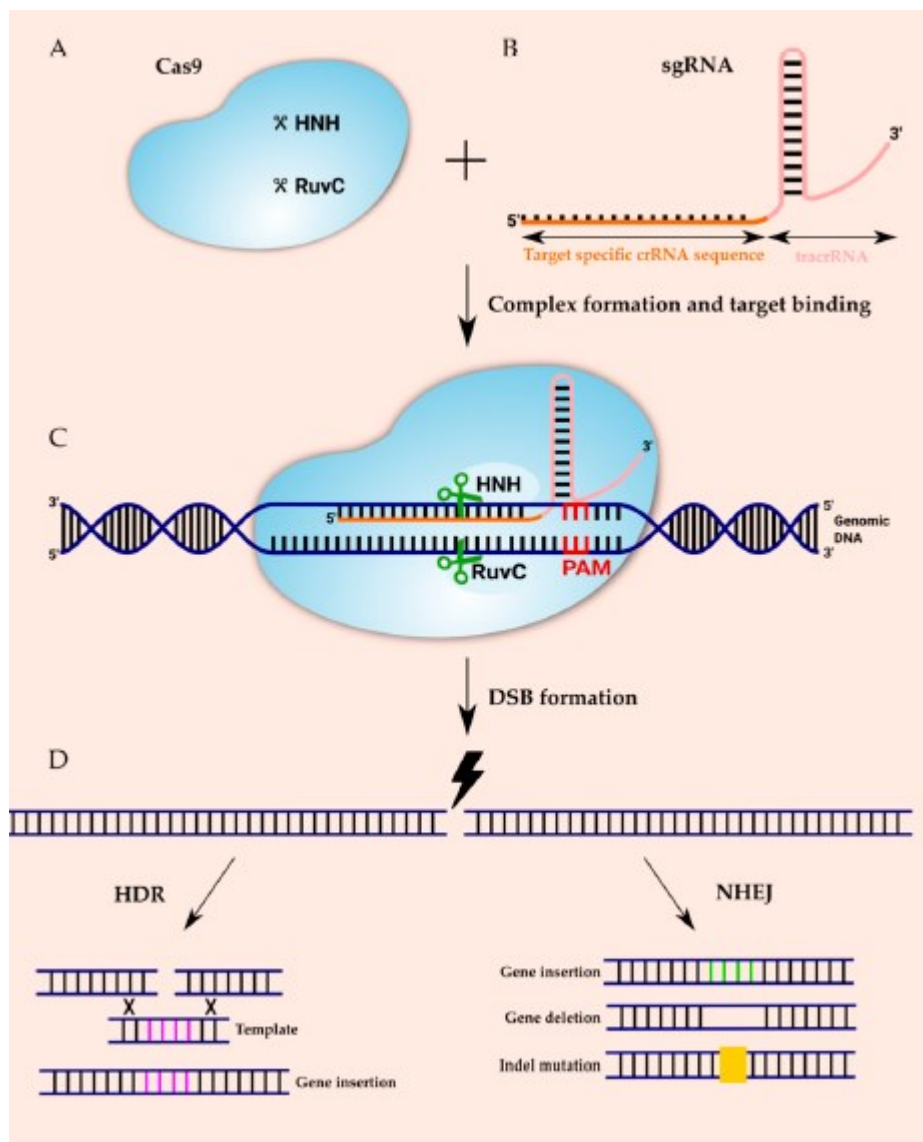
### 3.5 CRISPR-Cas9

Průlomem molekulární biologie tohoto století se stalo využití CRISPR-Cas9 systému v genetickém inženýrství (Janik *et al.* 2020). CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) asociované proteiny představující obranný systém bakterií se využívají nejen ve spojení s editací genomu, ale i pro screening genů, mapování genomu nebo léčení geneticky vázaných onemocnění (Gong *et al.* 2021). V předchozích letech byly provedeny studie na lidských embryích s cílem změnit DNA a vyléčit tak plod z dědičného onemocnění,  $\beta$ -thalasemie, ale došlo ke vzniku množství nechtěných mutací, tudíž se studie nesečkala s úspěchem. Avšak v případě, kdy se odebraly kmenové buňky nemocného pacienta, podařilo se je s úspěchem transfekovat, následně diferencovat na plně funkční prekurzory červených krvinek a využít při transplantaci nemocnému (Savić a Schwank 2016).

Spolu s novou možností léčit závažná onemocnění vyvstávají etické otázky týkající se úpravy lidského genomu. Metoda editace genetické informace pomocí CRISPR-Cas systému sice pravděpodobně umožní léčbu HIV, rakoviny, hemofilie a dalších vážných onemocnění, je však nezbytně nutné stanovit etické hranice užívání této metody, hrozí totiž, že příliš časté zásahy do DNA vyvolají genetický drift, který způsobí další nevyžádané mutace u budoucích generací (Janik *et al.* 2020). I přes výše uvedené etické otázky se však jedná o přesnou, efektivní, relativně jednoduchou na provedení a poměrně levnou metodu stabilní transfekce živočišných buněk (Bower *et al.* 2021).



CRISPR-Cas systém lze rozdělit do dvou tříd a následně na několik podtypů, přičemž struktura každého podtypu se liší, např. Cas9 (kaspáza 9) složená z HNH (His – Asn – His) a RuvC nukleázových domén je schopna rozpoznat a stříhat dvouvláknovou DNA obsahující specifickou sekvenci příslušící Cas9 (Gong *et al.* 2021, Janik *et al.* 2020). CRISPR-Cas9 (Obrázek 7) sestává z Cas9 nukleázy a single guide RNA (sgRNA), přičemž sgRNA zahrnuje transkripční crRNA (tracrRNA) a crRNA (crRNA) zahrnující úsek 20 nukleotidů vázících se na DNA a několik dalších nukleotidů komplementárních k tracrRNA. Tyto komplementární části spolu hybridizují a váží se na Cas9 za tvorby komplexu Cas9-sgRNA, který je schopen se pomocí volné části sgRNA navázat na dsDNA. Takto vzniklý komplex umožňuje HNH a RuvC doménám štěpit komplementární a nekomplementární vlákno DNA, čímž dochází ke vzniku dvouvláknového zlomu tři báze proti směru od naváděcí PAM (protospacer-adjacent motif) sekvence, bez které by ke štěpení DNA nedošlo. Oba konce upravené DNA jsou spojeny buď homologicky nebo nehomologicky pomocí DNA-ligázy (Janik *et al.* 2020). Homologní spojení vyžaduje sesterskou chromatidu využitelnou jako templátovou DNA, nehomologní naproti tomu pracuje s krátkými homologními sekvencemi, čímž se zvyšuje šance na vznik nepřesností a v místě štěpení tak může dojít k tvorbě mutace s posunem čtecího rámce. Posun čtecího rámce dále zapříčiňuje chybné čtení kodonu, kdy může dojít ke vzniku tiché mutace, strukturálně změněnému proteinu nebo zastavení syntézy bílkoviny během procesu (Bower *et al.* 2021).



Obrázek 7: Schematické znázornění principu metody CRISPR-Cas9 (Převzato z Janik *et al.* 2020) HDR – homologní spojení konců, NHEJ – nehomologní spojení konců, DSB – dvouvláknový zlom

Samotné vložení DNA lze vykonat poměrně rychle, ale je třeba předem provést sekvenaci cílového genu a vybrat tak vhodné naváděcí RNA sekvence. DNA lidských buněk obsahuje ve své struktuře SNPs (single nucleotide polymorphisms), které komplikují zacílení sgRNA na požadované místo genu, čemuž se lze vyvarovat precizním studiem DNA a zahrnutím SNPs do struktury naváděcí sgRNA. Tímto krokem dojde ke zvýšení úspěšnosti a omezení vzniku mutací, správně zhotovenou sgRNA charakterizuje vysoká účinnost a nízká specifita k jiným než cílovým sekvencím (Bower *et al.* 2021).

### 3.6 Aminoglykosidová antibiotika

Aminoglykosidová antibiotika řadíme k nejstarším antibiotikům vůbec, jedná se o sekundární metabolity bakterií a hub, které slouží k obraně před jinými bakteriemi. Celá

skupina vykazuje široké spektrum účinku, především proti gram-negativním bakteriím (Becker a Cooper 2013). Struktura je obecně tvořena inositolovým derivátem spojeným s minimálně jedním aminocukrem, v molekule je specifická volná hydroxylová a dvě amino skupiny zajišťující vazbu na malou podjednotku ribosomu. (Becker a Cooper 2013). Účinek se dostaví díky inhibici syntézy bakteriálních proteinů. Krátký životní cyklus bakterií umožňuje jejich rychlou adaptaci na změny prostředí a dochází k rozvoji antibiotické rezistence. U aminoglykosidů se rozlišují dva hlavní typy; buď dochází k aktivní efluxu molekul léčiva nebo k produkci aminoglykosidy-modifikujících enzymů, které léčivo inaktivují např. N-acetylací (Dozzo a Moser 2010).

S častějším užíváním vyšly najevo závažné nežádoucí účinky, jakými jsou ototoxicita a nefrotoxicita, kvůli kterým se od jejich užívání upustilo (Becker a Cooper 2013). Nefrotoxicitu způsobuje hromadění molekul léčiva v epiteliálních buňkách ledvin, existuje souvislost mezi aktivitou megalinu a toxicitou aminoglykosidových antibiotik, neboť nefrotoxicita byla zaznamenána ve stejných segmentech nefronu jako je exprimován megalin (Moestrup *et al.* 1995). Narůstající rezistence a častější nozokomiální infekce představují riziko, kvůli kterým se tato antibiotika znovu zkoumají se snahou odstranit závažné nežádoucí účinky, přičemž omezení těchto účinků lze napomoci přesným dávkováním a monitorováním plazmatické koncentrace látky v krvi (Becker a Cooper 2013).

### 3.6.1 Gentamicin

Poprvé byl gentamicin izolován z bakterie *Micromonospora purpurea* a stejně jako ostatní aminoglykosidová antibiotika vykazuje účinnost především proti gram-negativním bakteriím, především rodům *Pseudomonas*, *Proteus* a *Serratia*. Perorální podávání není možné, neboť se léčivo nevstřebává z trávicího traktu, a proto je pro systémovou terapii podáváno především intravenózně nebo intramuskulárně (Balakumar *et al.* 2010). Biologický poločas se pohybuje v rozmezí dvou až tří hodin a gentamicin se vylučuje glomerulární filtrací v nezměněné podobě močí (Ali 1995).

Nefrotoxicitu gentamicinu vyvolává akumulace v proximálním tubulu, která je spojená se zánětlivou imunitní reakcí vedoucí k apoptóze až nekróze a představuje závažný problém (Balakumar *et al.* 2010). Existuje více mechanismů vzniku toxické reakce v tubulárních buňkách, mezi nejhlavnější patří vznik hydroxyradikálů. Hydroxyradikály mohou oxidovat mnoho substrátů včetně nenasycených mastných

kyselin, a právě gentamicin se podílí na jejich zvýšené tvorbě. Další příčinou se jeví fosfolipidóza vznikající jako následek zničení inhibice fosfolipidového metabolismu gentamicinem. V neposlední řadě lze jmenovat inhibici funkce Na/K-výměníku, jehož dysfunkce vede k elektrolytovému rozvratu v buňce (Alli 1995). Toxická reakce se projevuje především zvýšením kreatininu v séru a albuminurií, což může ústít až ledvinným selháním (Balakumar *et al.* 2010).

Studie na myších modelech poukázaly na několik skupin látek z řad léčiv, které mají schopnost potenciál nefrotoxicity snižovat, jedná se především o látky schopné snižovat oxidační stres nebo látky snižující cytosolickou hladinu vápníku, která se s toxicitou gentamicinu úzce spojuje. Příkladem mohou být dihydropyridinové blokátory kalciových kanálů nifedipin a amlodipin,  $\beta$ -blokátor karvedilol nebo hypolipidemikum atorvastatin. Toxicitě naopak přispívá vyšší věk, existující onemocnění ledvin a z léčiv například furosemid, u něhož se spojuje se sníženým objemem filtrované krve díky diuréze (Balakumar *et al.* 2010).

## 4 Cíle práce

Posouzení vlivu modifikace *LRP2* v modelových lidských buněčných liniích přirozeně exprimujících *LRP2* na akumulaci a cytotoxické působení modelových ligandů *LRP2* na knockoutovaných a nemodifikovaných buňkách.

## 5 Experimentální část

### 5.1 Materiál

#### 5.1.1 Přístroje a pomůcky

24 a 96jamková kultivační plata (TPP, Švýcarsko)

Analytické váhy (Boeco, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, USA)

Box s laminárním prouděním TopSafe 1.8 (Bioar Instruments, Itálie)

Inkubátor (Sanyo, Japonsko)

Jednorázové pipety (TPP, Švýcarsko)

Kahan plynový

Kultivační lahve (TPP, Švýcarsko)

Latexové rukavice (VWR, USA)

Mikrozkumavky (Eppendorf, USA)

Odsávačka

Optický mikroskop (Optika Microscopes, Itálie)

Pasteurovy pipety (Sigma Aldrich, USA)

Spektrofotometr Infinite M 200 (Tecan, Německo)

Špičky (Eppendorf, USA)

Tecan Infinite M200 (Švýcarsko)

Tecan Spark® multimode microplate reader (Švýcarsko)

Vodní lázeň TW12 (Julabo, Německo)

#### 5.1.2 Chemikálie

Aminokyseliny neesenciální

Cas-9 (ThermoFisher Scientific, USA)

CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA)

DMSO (Sigma Aldrich, USA)

FITC-albumin (Sigma Aldrich, USA)

Fetální bovinní sérum (Sigma Aldrich, USA)

Gentamicin (Sigma Aldrich, USA)

KCl (Sigma Aldrich, USA)

Lipofectamin CRISPRMAX (ThermoFisher Scientific, USA)

L-glutamin (Sigma Aldrich, USA)

NaCl (Sigma Aldrich, USA)

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

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

NaOH (Sigma Aldrich, USA)

Pasivní lyzační pufr (PLB)

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

Pyruvát sodný (Sigma Aldrich, USA)

RNA-free voda (Sigma Aldrich, USA)

sgRNA (Synthego, USA)

Trypsin (Sigma Aldrich, USA)

Živné médium DMEM (ThermoFisher Scientific, USA)

Živné médium Opti-MEM (ThermoFisher Scientific, USA)

## **5.2 Buněčné linie**

### **5.2.1 HK-2**

Buněčná linie HK-2 (human kidney-2) představuje imortalizovanou linii lidských buněk ledvinného tubulu se zachovanými funkčními vlastnostmi specifickými pro tubulární epitel. Imortalizace buněk bylo dosaženo pomocí transdukce E6/E7 genem

lidského papilomaviru 16 (Ryan *et al.* 1994). Pro kultivaci buněk bylo použito živné médium DMEM obohacené o 10 % FBS (fetální bovinní sérum) a L-glutamin v koncentraci 2 mmol/l.

### 5.2.2 JEG-3

JEG-3 buňky prezentují buněčnou linii získanou z lidského choriokarcinomu se zachovalou schopností exprimovat látky běžně produkované trofoblastem v průběhu těhotenství, např. lidský choriogonadotropin (hCG), progesteron nebo placentární laktogen (Melsted *et al.* 2018, Anonym 2021). Pro kultivaci buněk bylo použito živné médium MEM obohacené o 10% FBS (fetální bovinní sérum), 1% neesenciální aminokyseliny, L-glutamin v koncentraci 2 mmol/l a pyruvát sodný v koncentraci 1 mmol/l.

## 5.3 Příprava roztoků

### 5.3.1 Fosfátový pufr (PBS)

Fosfátového pufru jsme připravovali 2 l, tudíž jsme dvojnásobné množství solí NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> než uvádí Tabulka 1 navážili do kádinky a rozpustili v destilované vodě. Po rozpuštění bylo pH roztoku upraveno pomocí NaOH na hodnotu 7,4. Nakonec byl roztok přeplněn do zásobních lahví a sterilizován v autoklávu.

Tabulka 1: Složení PBS

	Koncentrace (mol/l)	Navážka na 1 litr (g)
NaCl	0,137	8,01
KCl	0,0027	0,21
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,01	3,58
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,01	1,56

### 5.3.2 Roztok DMSO 10%

Ředěný roztok DMSO byl připraven pouhým naředěním čistého DMSO médiem (100 µl DMSO a 900 µl média), a to DMEM pro HK-2 a MEM pro JEG-3.

### 5.3.3 Roztok gentamicinu 6 mg/ml

Roztok gentamicinu byl připraven přesným navážením substance gentamicinu a rozpuštěním v médiu (6 mg gentamicinu a 1 ml média), a to DMEM pro HK-2 a MEM pro JEG-3.



## 5.4 Transfekce

Transfekce je metoda umožňující zanesení genetické informace do buňky a produkci geneticky modifikovaných buněk. V našem experimentu jsme měnili DNA u buněčných linií HK-2 a JEG-3, kdy byl gen *LRP2* modifikován pomocí transfekčního činidla Lipofectaminu CRISPRMAX přímo v buňkách. Lipofectamin slouží jako obal, který usnadňuje internalizaci přenášené sgRNA a nukleázy Cas-9 do buňky. Transfekované buňky mají zanesenou mutaci na třech různých místech megalinového genu. Konkrétně byly sgRNA navrženy tak, aby cílily do:

- PPPSP motivu umožňujícího fosforylaci,
- NPMY motivu, který je důležitý pro regulaci funkce receptoru a
- transmembránové domény.

### 5.4.1 Pracovní postup

Celý postup se provádí v boxu s laminárním prouděním třídy čistoty A za použití sterilních nástrojů. Uvedený postup byl opakován 3x, pokaždé za použití jiné sgRNA.

1. Připravili jsme suspenzi buněčných linií HK-2 a JEG-2 o koncentraci 300 000 buněk na 1 ml kultivačního média a pipetovali jsme 0,5 ml do každé jamky dvou 24jamkových plat. Pro buňky HK-2 představuje kultivační médium DMEM a pro linii JEG-3 MEM. Obě plata jsme nechali inkubovat 24 hodin při teplotě 37 °C.
2. Po uplynulé době jsme optickým mikroskopem zkontrolovali konfluentnost buněčných linií, která pro transfekci musí dosahovat 80 %.
3. Připravili jsme 2 mikrozkušavky a přidali jsme stanovené množství Opti-MEM (Opti-Minimal Essential Medium).
4. Do zkumavky č. 1 jsme zároveň pipetovali Cas9 Plus Reagent, nukleázu Cas9 a sgRNA a řádně promíchali.
5. Do mikrozkušavky č. 2 jsme přidali Lipofectamine a promísili.
6. Obsah mikrozkušavky č. 1 jsme znovu promíchali a celý převedli do mikrozkušavky č. 2, kde jsme ho nechali 5 minut inkubovat při pokojové teplotě.
7. Z inkubátoru jsme vzali obě plata s buňkami, stávající médium jsme odsáli a vyměnili za 350 µl nového kultivačního média v každé jamce. Do každé

jamky jsme zároveň přidali 150  $\mu$ l námi připraveného transfekčního činidla z mikrokumavky č. 2.

8. Obě plata s buňkami jsme vrátili do inkubátoru, po 24 hodinách jsme jim vyměnili médium.

## 5.5 Akumulační studie

Modifikací buněk se snížila transportní funkce LRP2, který zprostředkovává internalizaci albuminu. Akumulační studií lze stanovit jaké množství fluorescenčně značeného albuminu internalizovaly buňky transfekované (geneticky modifikované) ve srovnání s buňkami netransfekovanými. Akumulační studie byla prováděna v nesterilním prostředí.

Pro vyhodnocení akumulačních studií bylo využito měření absorbance a fluorescence. Nejprve jsme pomocí změření absorbance stanovili celkové množství proteinu každé jamce, čehož jsme využili při úpravě dat, kterou docílíme zpřesnění výsledků. Počet buněk napříč jamkami se může lišit a větší množství buněk v jamce je přímo úměrné většímu množství proteinu. Následným měřením fluorescence stanovíme množství fluorescenčně značeného akumulovaného albuminu.

### 5.5.1 Pracovní postup

1. Na dvě 24jamková plata jsme nasadili buňky tak, aby v každé jamce bylo 100 000 buněk, po třech jamkách od každé modifikované i parentní buněčné linie (pipetovali jsme 0,5 ml roztoku buněk v médiu o koncentraci 200 000 buněk/ml). Poté se buňky nechaly 48 hodin v inkubátoru, aby se zajistila konfluence.
2. Po 48 hodinách jsme buňky vyjmuli z inkubátoru, odsáli médium, opláchli dvakrát v 0,5 ml PBS (fosfátový pufr) zahřátém na 37 °C a nechali 10 minut inkubovat.
3. Mezitím jsme připravili roztok testované látky, a to smícháním 100  $\mu$ l FITC-albuminu rozpuštěného v PBS o koncentraci 0,12 mg/ml se 400  $\mu$ l Opti-MEM a vynásobením počtem jamek, celkem tedy 12,5 ml roztoku.
4. Po 10 minutách jsme z obou plat odsáli médium a do každé jamky přidali 0,5 ml roztoku FITC-albuminu. Buňky jsme následně nechali inkubovat 2 hodiny.
5. Za 2 hodiny jsme odstranili akumulační roztok, buňky 3x opláchli 1 ml nepředehřátého PBS a přidali 200  $\mu$ l PLB (pasivní lyzační pufr), který má za

úkol buňky lyzovat. Obě plata jsme vložili do mrazáku nechali 20 minut při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- Po vyjmutí jsme plata nechali rozmraznout, pak jsme pipetou řádně promísili obsah jamek a pipetovali  $130\text{ }\mu\text{l}$  z každé jamky na černé plato, následně jsme měřili fluorescenci. Na plato jsme kromě buněk umístili i pozitivní kontrolu tvořenou  $150\text{ }\mu\text{l}$  čistého akumulárního roztoku a změřili fluorescenci při excitační vlnové délce  $490\text{ nm}$  a emisní vlnové délce  $525\text{ nm}$ . Původní plata jsme ponechali pro stanovení množství proteinu.

### 5.5.2 Stanovení množství proteinu

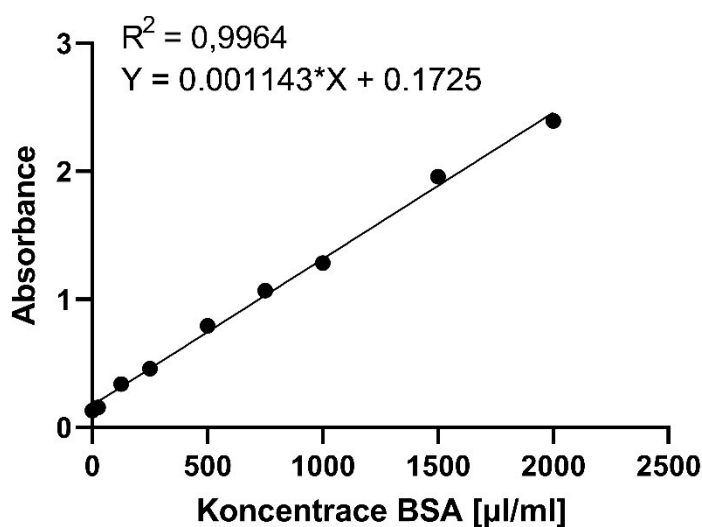
Stanovení množství proteinu se využívá ke zpřesnění výsledků, neboť množství proteinu v jednotlivých jamkách je úměrné počtu buněk v každé jamce. Množství proteinu ve všech vzorcích bylo provedeno pomocí metody Bicinchoninic Acid Assay (BCA), kdy se množství proteinu detekuje spektrofotometricky. Použit byl konkrétně Pierce™ BCA Protein Assay Kit.

- Nejprve jsme dle návodu výrobce naředili zásobní roztok bovinního sérového albuminu (BSA) o koncentraci  $2\ 000\text{ }\mu\text{g/ml}$  fosfátovým puftrem tak, abychom z nich po změření absorbance mohli sestavit kalibrační křivku. Ředění podrobně popisuje Tabulka 2.

Tabulka 2: Ředění zásobního roztoku BSA pomocí PBS (Převzato z Anonym 2020b)

Roztok	Objem PBS ( $\mu\text{l}$ )	Objem BSA $2\ 000\text{ }\mu\text{g/ml}$ ( $\mu\text{l}$ )	Výsledná koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )
A	0	300	2000
B	125	375	1500
C	325	325	1000
D	175	175 z roztoku B	750
E	325	325 z roztoku C	500
F	325	325 z roztoku E	250
G	325	325 z roztoku F	125
H	400	100 z roztoku G	25
I	400	0	0

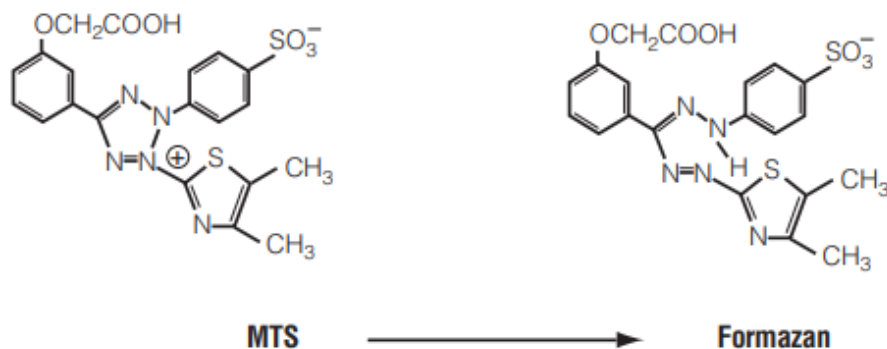
2. Na první dvě řádky 96jamkového plata jsme pipetovali v duplikátech 25  $\mu$ l od každého roztoku uvedeného v tabulce. Dále jsme na plato pipetovali 25  $\mu$ l našich stanovovaných vzorků.
3. Podle návodu výrobce jsme připravili roztok detekčního činidla smísením roztoků A a B v poměru 50:1. Do každé jamky jsme pak postupně přidali 200  $\mu$ l činidla a následně nechali plato 30 minut inkubovat při teplotě 37  $^{\circ}$ C.
4. Po vyjmutí z inkubátoru jsme na celém platě proměřili absorbanci při vlnové délce 562 nm. Z naměřených hodnot jsme sestrojili kalibrační křivku (Obrázek 8).



Obrázek 8: Příklad kalibrační křivky závislosti absorbance na koncentraci BSA

## 5.6 Testování viability

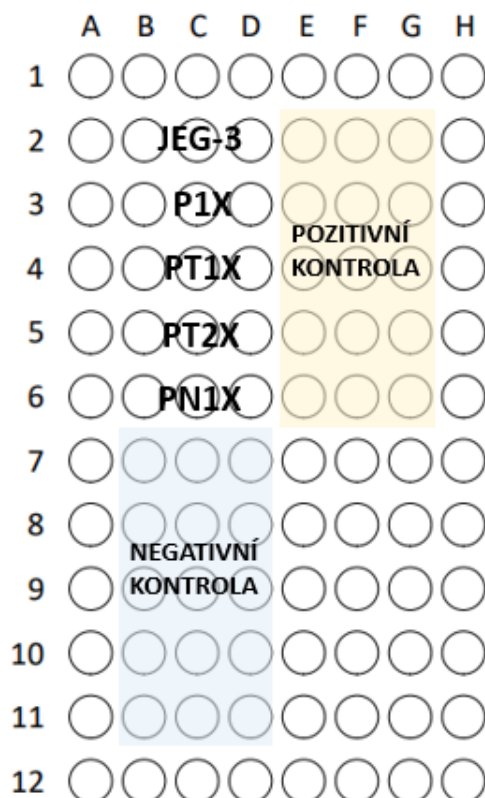
Transfekované buňky s nefunkčním receptorem LRP2 by neměly být schopné vůbec nebo jen částečně internalizovat testovaná antibiotika podávaná v toxických dávkách, a proto by se měl zvýšit počet živých buněk. Testování viability bylo provedeno sérií pokusů s aminoglykosidovým antibiotikem gentamicinem, které je známé svým toxickým působením. Po uplynutí inkubační doby je k buňkám přidán CellTiter neboli MTS sůl chemickým názvem [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]. Životoschopné buňky přeměňují MTS pomocí dehydrogenáz za spoluúčasti NADH nebo NADPH na barevný produkt formazan (Obrázek 9), který se následně detekuje spektrofotometricky (Anonym 2012).



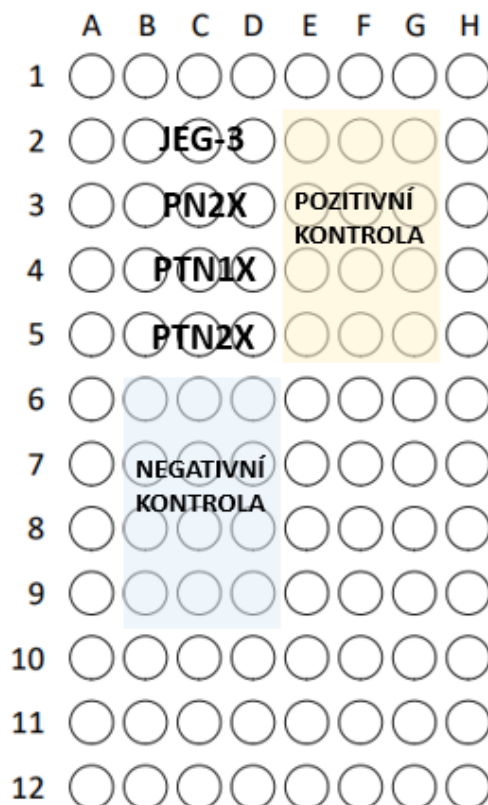
Obrázek 9: Schéma přeměny MTS na formazan (převzato z Anonym 2012)

### 5.6.1 Pracovní postup

1. Na čtyři 96jamková plata jsme nasadili buňky JEG-3 nebo HK-2 včetně modifikovaných linií, od každé linie tři trojice jamek a nechali je 24 hodin růst za standardních inkubačních podmínek, tj. v inkubátoru s vlhčenou atmosférou s 5 % CO<sub>2</sub> vyhříváním na 37 °C.
2. Po 24 hodinách jsme vyměnili médium a ke třetině buněk přidali 0,1 ml roztoku gentamicinu o koncentraci 6 mg/ml, ke druhé třetině buněk 0,1 ml 10 % DMSO (dimethylsulfoxid), který buňky usmrcuje a slouží jako negativní kontrola (Obrázek 10, Obrázek 11). U zbytku buněk bylo jen vyměněno médium a slouží jako pozitivní kontrola. Následně se buňky nechaly opět 48 hodin inkubovat při 37 °C.
3. Po 48hodinové inkubaci jsme ke všem jamkám přidali 20 µl cell-titeru a nechali další 2 hodiny inkubovat. Nakonec jsme změřili absorbanci při vlnové délce 562 nm.



Obrázek 10: Schematické znázornění rozmístění buněčných linií na 96jamkovém platu při akumulární studii



Obrázek 11: Schematické znázornění rozmístění buněčných linií na 96jamkovém platu při akumulární studii; obdobné rozložení buněčných linií bylo zvoleno i pro testované HK-2 buňky

## 5.7 Statistická analýza

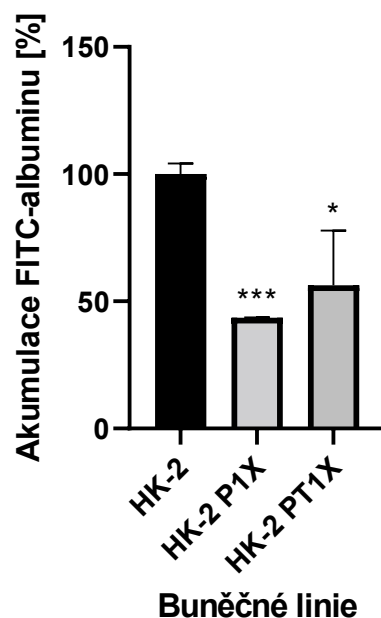
Statistická analýza dat byla provedena s využitím softwaru GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Software, USA). K vyhodnocení statistické významnosti byla použita jednosměrná ANOVA analýza. Veškeré experimenty byly prováděny v technických triplikátech, nicméně vzhledem k časově dynamické proměně poměru mezi modifikovanými a intaktními buňkami nebylo možné provést experimenty i v biologických triplikátech.

## 6 Výsledky

### 6.1 Výsledky akumulčních studií

Výsledky jsou zobrazeny jako procenta akumulovaného fluorescenčně značeného albuminu vztaženého na protein, přičemž poměr vypočítaný pro nemodifikovanou buněčnou linii HK-2 resp. JEG-3 byl stanoven jako 100 %.

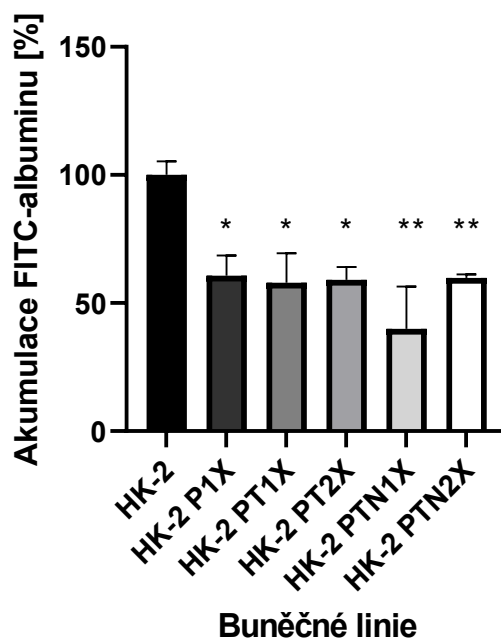
Označení modifikovaných linií v grafech reflektuje zacílení sgRNA, přičemž P označuje úpravu domény zodpovědnou za fosforylaci (PPPSP), T doménu transmembránovou a N část receptoru zodpovědnou za funkci (NPMY motiv). Číslo v názvu představuje násobnost transfekce.



Obrázek 12: Akumulace FITC-albuminu měřená u základní buněčné linie HK-2 a uvedených modifikovaných linií po 2 hodinách inkubace. \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$

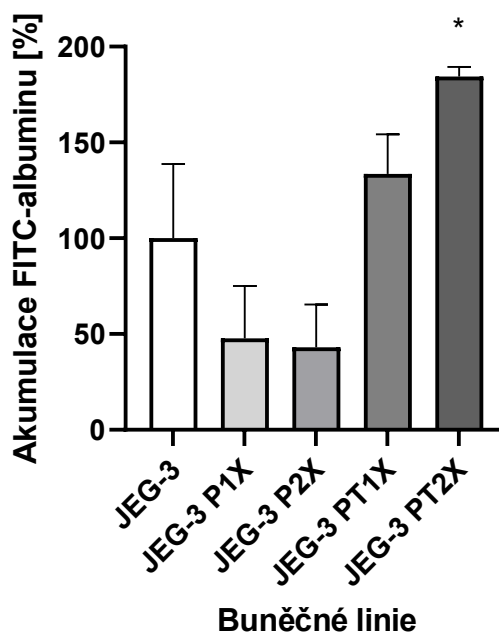
Data naměřená v prvním experimentu (Obrázek 12) zobrazují snížení akumulace FITC-albuminu u modifikovaných linií HK-2 ve srovnání s linií základní. I přes vyšší směrodatnou odchylku spočítanou pro data naměřená u linie PT1X, došlo ke statisticky významnému snížení internalizace standardního LRP2 ligandu.





Obrázek 13: Akumulace FITC-albuminu měřená u základní buněčné linie HK-2 a uvedených modifikovaných linií po 2 hodinách inkubace. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$

Následující pokus byl rozšířen o testování většího množství modifikovaných linií, graf (Obrázek 13) ukazuje, že modifikované buňky vykazují nižší akumulaci albuminu oproti základní linii HK-2. Akumulace neklesá v řadě, jak by se dalo očekávat, ale nepravidelně. Na základě statistické analýzy lze s jistotou tvrdit, že akumulace albuminu modifikovanými buněčnými liniemi se snížila oproti základní linii HK-2.

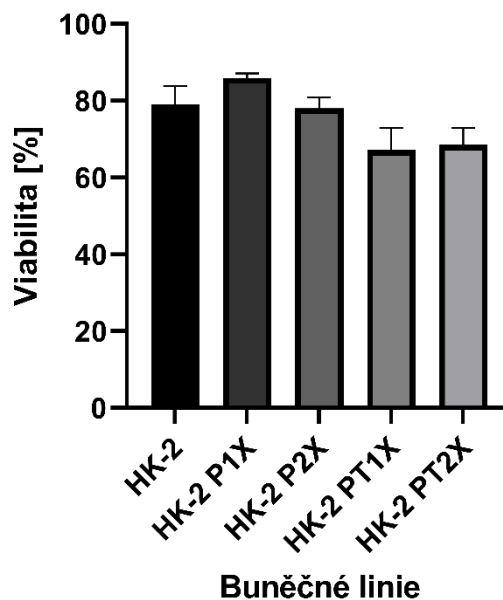


Obrázek 14: Akumulace FITC-albuminu měřená u základní buněčné linie JEG-3 a uvedených modifikovaných linií po 2 hodinách inkubace. \* $P < 0,05$

Akumulace albuminu byla provedena i s buňkami JEG-3 a stejně jako u předchozích stanovení jsou výsledky vztaženy k hodnotě změřené pro JEG-3 jakožto základní buněčnou linii, pro kterou je akumulace zobrazena na obrázku (Obrázek 14). Modifikované buněčné linie s označením JEG-3 P1X a JEG-3 P2X vykazují nižší schopnost akumulace fluorescenčně značeného albuminu, avšak vzhledem k širšímu rozptylu naměřených hodnot není tento pokles statisticky významný. Naopak u linie označené JEG-3 PT1X je patrný trend v nárůstu akumulace FITC-albuminu, který je dokonce významný v případě linie JEG-3 PT2X.

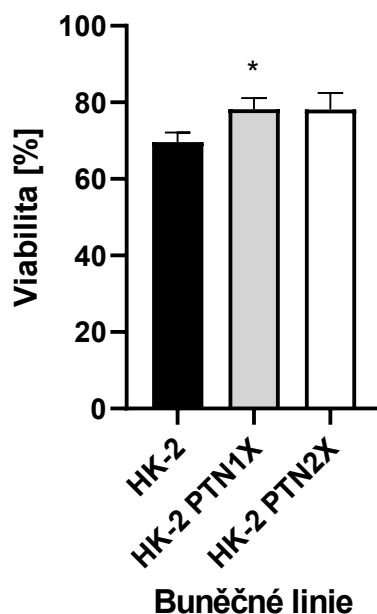
## 6.2 Výsledky testování viability

Pro vyhodnocení testování viability byla využita schopnost životaschopných buněk přeměňovat součást akumulčního činidla MTS na barevný produkt formazan, přičemž množství produkovaného formazanu bylo zjištěno změřením absorbance a vztaženo na konkrétní buněčnou linii s porovnáním výsledků k nemodifikované linii.



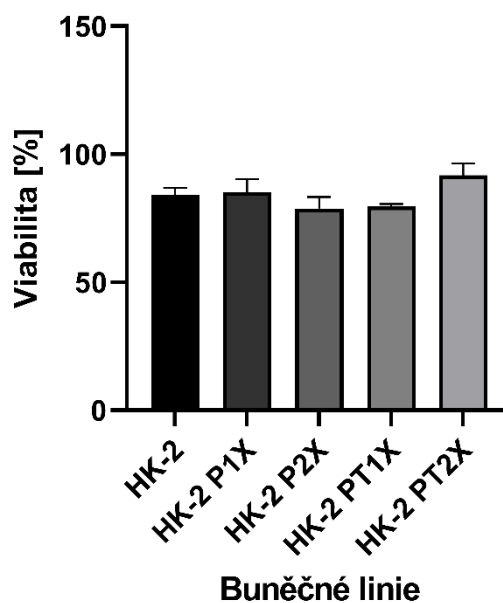
Obrázek 15: Viabilita buněk HK-2 vztažená na konkrétní buněčnou linii v médiu 48 h po přidání gentamicinu k testovanému souboru buněk

Graf (Obrázek 15) znázorňuje životaschopnost buněk po 48hodinovém vystavení testovaných buněk gentamicinu použitím v cytotoxické koncentraci a následnému přidavku MTS. Z obrázku je patrné, že modifikované linie s výjimkou linie označené HK-2 P1X vykazují oproti původní linii HK-2 sníženou tvorbu formazanu a tím i nižší viabilitu. Nejnižší akumulaci gentamicinu jsme zaznamenali u linie HK-2 P1X, což se projevilo nárůstem životaschopnosti, který jsme na začátku předpokládali u všech modifikovaných linií. U ostatních modifikovaných linií s označením HK-2 P2X, HK-2 PT1X a HK-2 PT2X došlo k mírnému poklesu viability, který však není statisticky významný a lze tedy hodnoty akumulace gentamicinu považovat za srovnatelné.



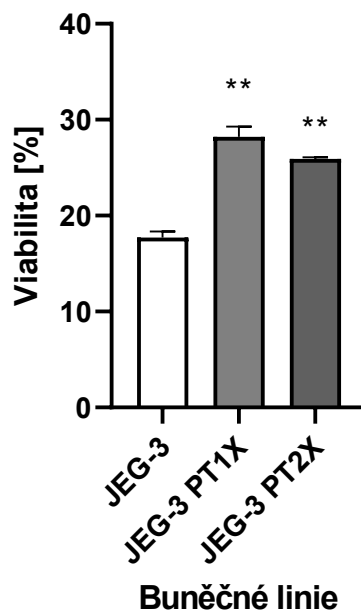
Obrázek 16: Viabilita buněk HK-2 vztažená na konkrétní buněčnou linii v médiu 48 h po přidání gentamicinu k testovanému souboru buněk. \* $P < 0,05$

Obrázek 16 ukazuje viabilitu dalších dvou námi modifikovaných buněčných linií, a to HK-2 PTN1X a HK-2 PTN2X testovaných za stejných experimentálních podmínek jako na předcházejícím obrázku. Jelikož se jedná o několikanásobně modifikované buněčné linie, měla by životaschopnost narůstat. Předpoklad se potvrdil zvýšením viability u obou linií ve srovnání s linií základní, což vyhovuje našim očekáváním. Nicméně pouze u buněčné linie s označením HK-2 PTN1X byl tento pokles statisticky významný.



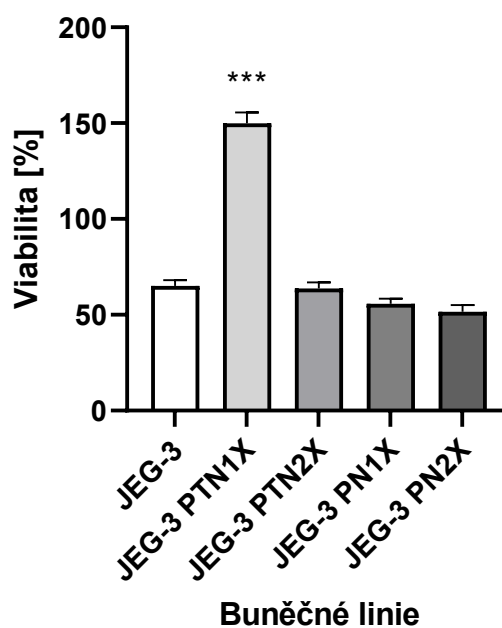
Obrázek 17: Viabilita buněk HK-2 vztažená na konkrétní buněčnou linii v médiu 48 h po přidání gentamicinu k testovanému souboru buněk

Obrázek 17 zobrazuje opakované testování viability transfekované linie HK-2. U všech buněčných linií byly naměřeny přibližně stejné hodnoty viability, přičemž nevyšších 91,82 % bylo změřeno u čtyřnásobně transfekované linie PT2X. Měřené hodnoty se pro všechny linie pohybují v rozmezí 78,75 – 91,82 %.



Obrázek 18: Viabilita buněk JEG-3 vztažená na konkrétní buněčnou linii v médiu 48 h po přidání gentamicinu k testovanému souboru buněk. \*\* $P < 0,01$

Obrázek 18 znázorňuje stav po aplikaci stejných podmínek, tzn. dvoudenní inkubaci s gentamicinem v cytotoxické koncentraci, následnému přidání MTS a měření absorbance po 2 hod u druhé námi studované buněčné linie JEG-3 ve srovnání s modifikovanými liniemi. Můžeme pozorovat zřetelný nárůst viability obou modifikovaných linií proti linii základní, na základě statistické analýzy lze tvrdit, že došlo ke statisticky významnému zvýšení viability oproti kontrolní nemodifikované linii.



Obrázek 19: Viabilita buněk JEG-3 vztažená na konkrétní buněčnou linii v médiu 48 h po přidání gentamicinu k testovanému souboru buněk. \*\*\* $P < 0,001$

Následující graf (Obrázek 19) zobrazuje porovnání modifikovaných buněčných linií, které byly čerstvě připravené (JEG-3 PTN1X) s liniemi připravenými před delší dobou, které zároveň prošly procesem zamrazení a rozmrazení. Dvojnásobný nárůst viability oproti základní linii JEG-3 byl zaznamenán u čerstvě připravené buněčné linie JEG-3 PTN1X. Všechny ostatní modifikované linie (po zamražení) vykazovaly nižší životaschopnost ve srovnání s linií základní, nikoliv však statisticky významnou.

## 7 Diskuse

Megalín (LRP2) představuje glykoprotein hojně exprimovaný na apikální straně buněk proximálních tubulů (Kukida *et al.* 2020). Receptor LRP2 se podílí na tubulární reabsorpci nejrůznějších substrátů včetně albuminu nebo inzulinu endocytózou (Marzolo a Farfán 2011). Kromě jiného je tento receptor schopný internalizovat bazická léčiva, např. aminoglykosidy (Moestrup *et al.* 1995). Gentamicin, aminoglykosidové antibiotikum, využívající se pro léčbu bakteriálních infekcí, může způsobovat ireverzibilní nefrotoxicitu, která je dávana do příčinné souvislosti s expresí LRP2 receptoru (Lüllmann *et al.* 2007). Tohoto faktu jsme se rozhodli využít v našich experimentech a pozorovat akumulaci gentamicinu v buňkách prostřednictvím změn v jejich viabilitě, kdy snížení akumulace gentamicinu v buňkách vede k nižšímu cytotoxickému působení a tím pádem pozorujeme nárůst viability.

Pro knockout genu *LRP2* byla využita metoda CRISPR/Cas9, kdy jsme pomocí běžně prováděné lipofekce editovali genetickou informaci v buňkách. sgRNA byly navrženy, aby cílily do tří různých míst *LRP2* genu, konkrétně se jedná o transmembránovou doménu, oblast nutnou pro fosforylaci receptoru (PPPSP motiv) a oblast nutnou pro regulaci funkce receptoru (NPMY motiv). Takto navržené sgRNA mají způsobit mutaci v cílových oblastech a tím poškodit funkci LRP2 a snížit schopnost internalizace ligandů tohoto receptoru. Pro tuto studii jsme vybrali dvě buněčné linie, které přirozeně exprimují vysoké množství *LRP2*, jmenovitě jde o immortalizované buňky proximálního tubulu ledvin HK-2 a nádorovou buněčnou linii JEG-3. JEG-3 buňky sice nepředstavují ledvinnou nýbrž placentární buněčnou linii, avšak splňují základní námi požadovaný parametr, a to je vysoká exprese *LRP2*. Navíc se jedná o buněčnou linii, která se snadněji transfekuje v porovnání s immortalizovanými tubulárními HK-2 buňkami.

Ve studii publikované Cui *et al.* (1996) bylo prokázáno, že albumin je ligandem megalínu, na což jsme navázali a v experimentech užívali fluorescenčně značený albumin (FITC-albumin). Akumulaci albuminu jsme hodnotili vždy po dvouhodinové inkubaci s FITC-albuminem. Obrázek 12 a Obrázek 13 zobrazují sníženou schopnost transfekovaných buněk HK-2 akumulovat FITC-albumin. V obou na sobě nezávislých experimentech jsme v případě HK-2 buněk detekovali statisticky významné snížení akumulace tohoto standardního ligandu. Stejným podmínkám jsme vystavili druhou buněčnou linii JEG-3, z Obrázku 14 je patrné, že modifikované linie JEG-3 P1X a JEG-3 P2X vykazují ve srovnání s mateřskými buňkami nižší akumulaci albuminu.



Nicméně vzhledem k příliš heterogenním výsledkům nevykazuje tento pokles statistickou významnost, ukazuje pouze jasný trend. U zbylých dvou testovaných linií byl zjištěn paradoxní nárůst akumulace albuminu daný patrně závažným zásahem do fyziologie buňky, který vedl k nadměrnému úhynu modifikovaných buněk.

Po sérii experimentů prověřujících akumulaci albuminu, jsme se přesunuli ke studiu viability buněk, kdy jsme navázali na již publikované poznatky. Nagai *et al.* (2001) se zabývali studiem gentamicinu, jakožto ligandu megalinu, jejich domněnku, že se LRP2 majoritně účastní internalizace aminoglykosidů potvrdil Akour *et al.* (2015) ve studii prováděné na BeWo buněčné linii. V našich experimentech jsme navázali předpokladem, že snížením schopnosti LRP2 endocytovat své ligandy, dojde ke snížení akumulace gentamicinu v buňkách. Schopnost akumulace cytotoxického léčiva by měla klesat úměrně s počtem provedených modifikací.

Obrázek 15 zobrazuje předpokládaný nárůst viability buněčné linie HK-2 P1X, ve srovnání s poklesem životaschopnosti ostatních sledovaných linií. Snížení viability několikanásobně modifikovaných linií může být způsobeno opakovanou zátěží buněk v podobě transfekce. V grafu (Obrázek 16) je zřetelné statisticky významné zvýšení viability linie HK-2 PTN1X, Obrázek 17 ukazuje mírný nárůst životaschopnosti u linie HK-2 PT2X. Předpoklad, že viabilita bude růst spolu s násobností transfekce, je těžké naplnit, neboť zanesením mutace do genomu buňky nelze přesně určit, jaká mutace vznikne. Proto u některých testovaných buněk mohlo dojít ke vzniku tichých mutací, kdy je při translaci do výsledného proteinu vložena tatáž aminokyselina jako u intaktních buněk a nedojde tak k omezení funkce proteinu. Zároveň nesmíme zapomenout, že ne u všech editovaných buněk dojde ke vzniku mutace.

Po testování viability buněk HK-2 jsme se přesunuli ke studiu placentárních buněk JEG-3, kdy první experiment (Obrázek 18) naplnil očekávání významného nárůstu životaschopnosti modifikovaných linií, proto jsme testování rozšířili o více modifikovaných linií (Obrázek 19), kdy došlo k markantnímu nárůstu viability linie JEG-3 PTN1X ve srovnání s liniemi, které byly připraveny před delší dobou a následně zamrazeny. U těchto linií nebyla pozorována významná změna viability vlivem cytotoxického působení gentamicinu ve srovnání s kontrolní nemodifikovanou buněčnou linií JEG-3. Rozdíly mohou být způsobeny delšími časovými prodlevami mezi experimenty, neboť příprava všech zkoumaných linií trvala déle než tři měsíce.

Vezmeme-li v úvahu, že LRP2 se účastní endocytózy převážně vysokomolekulárních látek, která je modifikací narušena, buňky nemusí být schopné internalizovat některé obsahové látky kultivačního média jako jsou peptidy a bílkoviny. Zároveň nikdy nelze předpokládat 100% úspěšnost transfekce, tudíž postupem času ve směsi buněk převáží nemodifikované buňky, které budou jednoduše lépe prosperovat ve srovnání s těmi modifikovanými. Tento fakt může hrát významnou roli v našich časově vzdálených experimentech, kdy není možné porovnávat experimenty prováděné v odstupu několika týdnů. Dalším zatěžujícím procesem je bezesporu vystavení teplotnímu šoku v podobě zamrazování a následně i rozmrazování buněk. Tento proces je náročný i pro intaktní buňky, lze tedy očekávat, že po opětovném rozmražení dojde k ještě většímu poklesu počtu modifikovaných buněk a postupem času ve všech liniích převáží nemodifikované buňky HK-2 a JEG-3.

Zároveň je třeba vzít v potaz, zda existuje pro vysokomolekulární látky ve zkoumaných buňkách i jiný transportér nebo receptor zprostředkovávající přenos těchto látek přes buněčné membrány, než je námi studovaný receptor LRP2. Z rodiny LRP receptorů v ledvinách nalezneme ještě LRP10, avšak u tohoto receptoru dosud nebyla popsána schopnost endocytovat námi vybrané substráty (Anonym 2022a). Naproti tomu LRP12 se na endocytóze podílí hojně, avšak nevyskytuje se v ledvinách (Anonym 2022b). Z toho důvodu žádný jiný receptor v experimentech neuvažujeme.

V budoucnu plánujeme experimenty rozšířit o sortování buněk pomocí průtokového cytometru. Pomocí FITC-albuminu a barviva rhodaminu bude možno odlišit buňky modifikované od nemodifikovaných. Buňky díky tomu mohou být odděleny a nasazeny na plato o hustotě 1 buňka na jamku. Následně se vyčká na pomnožení buněk a experimenty budou zopakovány, nyní už s jistotou, že zkoumané linie mají opravdu upravený *LRP2* gen.

O LRP2 je známo, že se podílí na internalizaci široké škály různých vysokomolekulárních látek, avšak do současné doby nebyl vyvinutý spolehlivý model pro toto testování. Je třeba si uvědomit, že LRP2 se nepodílí pouze na internalizaci peptidů a proteinů, ale rozhodujícím faktorem pro určení ligandů je jejich molekulová hmotnost. Z tohoto důvodu se jedná o perspektivní model, který umožní studium transportu např. monoklonálních protilátek, které v současné době představují trend v léčbě onkologických i mnohých jiných onemocnění.

Studium transportních procesů za účasti LRP2 přineslo významné výsledky ohledně omezení toxicity gentamicinu a endocytózy vysokomolekulárních látek a poskytuje tak velký potenciál pro další výzkum v oblasti nefrotoxického působení léčiv a studium ledvinných transportních funkcí.

## 8 Závěr

Cílem této diplomové bylo posoudit vliv modifikace *LRP2* v modelových lidských buňkách přirozeně exprimujících *LRP2* na internalizaci modelových ligandů pomocí akumulačních a toxicitních studií. Studie byly provedeny na nemodifikovaných a knockoutovaných buňkách JEG-3 a HK-2, na nichž jsme zkoumali transportní procesy.

V první části experimentů jsme pracovali s předpokladem, že knockoutováním *LRP2* v jednotlivých buněčných liniích dojde ke snížení internalizace albuminu, který je přirozeným ligandem zkoumaného receptoru *LRP2*. V opakovaně provedených experimentech na obou buněčných liniích se potvrdilo, že modifikované buňky internalizují FITC-albumin v menší míře oproti nemodifikovaným buňkám.

Následně jsme testovali předpokládaný nárůst viability modifikovaných linií po inkubaci s toxickým antibiotikem gentamicinem. Pro obě linie byly zaznamenány kolísavé nárůsty životaschopnosti jednotlivých transfekovaných linií, kdy docházelo k nárůstu životaschopnosti jen některých modifikovaných linií nebo se viabilita příliš nelišila napříč liniemi. Malé rozdíly viability mohly být zapříčiněny opětovným zmražením a rozmražením linií nebo vysokou zátěží buněčného aparátu v podobě transfekce. Nicméně i přesto jsme u vybraných linií zaznamenali zvýšení buněčné viability indikující vznik mutace v námi požadovaných místech, což zapříčinilo snížení funkce *LRP2*.

Výzkum přinesl slibné výsledky studovaných transportních procesů a bezesporu je vhodné v experimentech pokračovat. Námi vytvořené geneticky modifikované buňky s modifikovanou transmembránovou doménou *LRP2*, mutací zanesenou v PPPSP a NPMY motivu se jeví jako vhodný model pro studium endocytózy vysokomolekulárních látek, proto je třeba pokračovat sortrováním buněk s využitím průtokové cytometrie a následně i rozšířit spektrum látek, které budou použity k testování.

## 9 Literatura

1. AKOUR, Amal A., Mary Jayne KENNEDY a Phillip M. GERK. The Role of Megalin in the Transport of Gentamicin Across BeWo Cells, an In Vitro Model of the Human Placenta. *The AAPS Journal* [online]. 2015, **17**(5), 1193-1199 [cit. 2021-12-31]. ISSN 1550-7416. Dostupné z: doi:10.1208/s12248-015-9778-9
2. ALI, B.H. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: Some recent research. *General Pharmacology: The Vascular System* [online]. 1995, **26**(7), 1477-1487 [cit. 2021-11-20]. ISSN 03063623. Dostupné z: doi:10.1016/0306-3623(95)00049-6
3. ANDERSEN, Olav M., Robert DAGIL a Birthe B. KRAGELUND. New horizons for lipoprotein receptors: communication by  $\beta$ -propellers. *Journal of Lipid Research* [online]. 2013, **54**(10), 2763-2774 [cit. 2021-8-25]. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.M039545
4. AUDOUY, Sandrine a Dick HOEKSTRA. Cationic lipid-mediated transfection in vitro and in vivo. *Molecular Membrane Biology* [online]. 2001, **18**(2), 129-143 [cit. 2021-11-30]. ISSN 0968-7688. Dostupné z: doi:10.1080/09687680110057237
5. BALAKUMAR, Pitchai, Ankur ROHILLA a Arunachalam THANGATHIRUPATHI. Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? *Pharmacological Research* [online]. 2010, **62**(3), 179-186 [cit. 2021-11-20]. ISSN 10436618. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2010.04.004
6. BALLATORI, Nazzareno, Fang FANG, Whitney V. CHRISTIAN, Na LI a Christine L. HAMMOND. Ost $\alpha$ -Ost $\beta$  is required for bile acid and conjugated steroid disposition in the intestine, kidney, and liver. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* [online]. 2008, **295**(1), G179-G186 [cit. 2021-9-15]. ISSN 0193-1857. Dostupné z: doi:10.1152/ajpgi.90319.2008
7. BECKER, Bernd a Matthew A. COOPER. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. *ACS Chemical Biology* [online]. 2013, **8**(1), 105-115 [cit. 2021-11-17]. ISSN 1554-8929. Dostupné z: doi:10.1021/cb3005116
8. BOWER, Oliver J., Afshan MCCARTHY, Rebecca A. LEA, Gregorio ALANIS-LOBATO, Jasmin ZOHREN, Claudia GERRI, James M.A. TURNER a Kathy K. NIAKAN. Generating CRISPR-Cas9-Mediated Null Mutations and Screening

- Targeting Efficiency in Human Pluripotent Stem Cells. *Current Protocols* [online]. 2021, **1**(8) [cit. 2021-11-05]. ISSN 2691-1299. Dostupné z: doi:10.1002/cpz1.232
9. CASARTELLI, M., G. CERMENATI, S. RODIGHIERO, F. PENNACCHIO a B. GIORDANA. A megalin-like receptor is involved in protein endocytosis in the midgut of an insect ( *Bombyx mori* , Lepidoptera). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* [online]. 2008, **295**(4), R1290-R1300 [cit. 2021-8-25]. ISSN 0363-6119. Dostupné z: doi:10.1152/ajpregu.00036.2008
  10. CASES, Olivier, Antoine OBRY, Sirine BEN-YACOUB, et al. Impaired vitreous composition and retinal pigment epithelium function in the FoxG1::LRP2 myopic mice: Impaired vitreous composition and retinal pigment epithelium function in the FoxG1::LRP2 myopic mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2017, **1863**(6), 1242-1254 [cit. 2021-8-25]. ISSN 09254439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2017.03.022
  11. CUI, S., P. J. VERROUST, S. K. MOESTRUP a E. I. CHRISTENSEN. Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* [online]. 1996, **271**(4), F900-F907 [cit. 2021-12-31]. ISSN 1931-857X. Dostupné z: doi:10.1152/ajprenal.1996.271.4.F900
  12. DE, Shankhajit, Shoji KUWAHARA a Akihiko SAITO. The Endocytic Receptor Megalin and its Associated Proteins in Proximal Tubule Epithelial Cells. *Membranes* [online]. 2014, **4**(3), 333-355 [cit. 2021-8-25]. ISSN 2077-0375. Dostupné z: doi:10.3390/membranes4030333
  13. DIGIACOMO, Luca, Sara PALCHETTI, Daniela POZZI, Augusto AMICI, Giulio CARACCILO a Cristina MARCHINI. Cationic lipid/DNA complexes manufactured by microfluidics and bulk self-assembly exhibit different transfection behavior. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2018, **503**(2), 508-512 [cit. 2021-10-18]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2018.05.016
  14. DOHERTY, Gary J. a Harvey T. MCMAHON. Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2009, **78**(1), 857-902 [cit. 2021-9-16]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540

15. DOZZO, Paola a Heinz E MOSER. New aminoglycoside antibiotics. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [online]. 2010, **20**(10), 1321-1341 [cit. 2021-11-20]. ISSN 1354-3776. Dostupné z: doi:10.1517/13543776.2010.506189
16. FISHER, Carolyn E. a Sarah E.M. HOWIE. The role of megalin (LRP-2/Gp330) during development. *Developmental Biology* [online]. 2006, **296**(2), 279-297 [cit. 2021-8-25]. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/j.ydbio.2006.06.007
17. FROMM, Martin F. Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers. *Trends in Pharmacological Sciences* [online]. 2004, **25**(8), 423-429 [cit. 2021-9-20]. ISSN 01656147. Dostupné z: doi:10.1016/j.tips.2004.06.002
18. FYFE, John C., Mette MADSEN, Peter HØJRUP, Erik I. CHRISTENSEN, Stephan M. TANNER, Albert DE LA CHAPELLE, Qianchuan HE a Søren K. MOESTRUP. The functional cobalamin (vitamin B12)–intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. *Blood* [online]. 2004, **103**(5), 1573-1579 [cit. 2021-9-9]. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2003-08-2852
19. GONG, Shaohua, Shiqi ZHANG, Fei LU, Wei PAN, Na LI a Bo TANG. CRISPR/Cas-Based In Vitro Diagnostic Platforms for Cancer Biomarker Detection. *Analytical Chemistry* [online]. 2021, **93**(35), 11899-11909 [cit. 2021-10-26]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.1c02533
20. CHOW, Yu Ting, Shuxun CHEN, Ran WANG, Chichi LIU, Chi-wing KONG, Ronald A. LI, Shuk Han CHENG a Dong SUN. Single Cell Transfection through Precise Microinjection with Quantitatively Controlled Injection Volumes. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(1) [cit. 2021-11-04]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep24127
21. CHRISTENSEN, Erik I., Rikke NIELSEN a Henrik BIRN. From bowel to kidneys: the role of cubilin in physiology and disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* [online]. 2013, **28**(2), 274-281 [cit. 2021-9-13]. ISSN 1460-2385. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfs565
22. INUI, Ken-Ichi, Satoshi MASUDA a Hideyuki SAITO. Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney International* [online]. 2000, **58**(3), 944-958 [cit. 2021-9-20]. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00251.x
23. JANIK, Edyta, Marcin NIEMCEWICZ, Michal CEREMUGA, Lukasz KRZOWSKI, Joanna SALUK-BIJAK a Michal BIJAK. Various Aspects of a Gene

- Editing System—CRISPR–Cas9. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(24) [cit. 2021-11-04]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21249604
24. KAESTNER, Lars, Anke SCHOLZ a Peter LIPP. Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2015, **25**(6), 1171-1176 [cit. 2021-10-19]. ISSN 0960894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2015.01.018
25. KHANTAKOVA, Julia N., Alexander N. SILKOV, Valeriy P. TERESHCHENKO, Elena V. GAVRILOVA, Rinat A. MAKSYUTOV a Sergey V. SENNIKOV. Transfection of bone marrow derived cells with immunoregulatory proteins. *Cytokine* [online]. 2018, **108**, 82-88 [cit. 2021-11-02]. ISSN 10434666. Dostupné z: doi:10.1016/j.cyto.2018.03.028
26. KIM, Tae Kyung a James H. EBERWINE. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, **397**(8), 3173-3178 [cit. 2022-03-23]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-010-3821-6
27. KINGSTON, Robert E., Claudia A. CHEN a John K. ROSE. Calcium Phosphate Transfection. *Current Protocols in Molecular Biology* [online]. 2003, **63**(1) [cit. 2021-11-03]. ISSN 1934-3639. Dostupné z: doi:10.1002/0471142727.mb0901s63
28. KLAASSEN, Curtis D. a Lauren M. ALEKSUNES. Xenobiotic, Bile Acid, and Cholesterol Transporters: Function and Regulation. *Pharmacological Reviews* [online]. 2010, **62**(1), 1-96 [cit. 2021-9-13]. ISSN 0031-6997. Dostupné z: doi:10.1124/pr.109.002014
29. KOEPEL, Hermann a Lynette C. DAWS. Organic Cation Transporters in Health and Disease. *Pharmacological Reviews* [online]. 2019, **72**(1), 253-319 [cit. 2021-9-15]. ISSN 0031-6997. Dostupné z: doi:10.1124/pr.118.015578
30. KOZYRAKI, Renata. Cubilin, a multifunctional epithelial receptor: an overview. *Journal of Molecular Medicine* [online]. 2001, **79**(4), 161-167 [cit. 2021-8-31]. ISSN 0946-2716. Dostupné z: doi:10.1007/s001090100193
31. KRISTIANSEN, Mette, Renata KOZYRAKI, Christian JACOBSEN, Ebba NEXØ, Pierre J. VERROUST a Søren K. MOESTRUP. Molecular Dissection of the Intrinsic Factor-Vitamin B12 Receptor, Cubilin, Discloses Regions Important for Membrane Association and Ligand Binding. *Journal of Biological*



- Chemistry* [online]. 1999, **274**(29), 20540-20544 [cit. 2021-9-13]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.29.20540
32. KUKIDA, Masayoshi, Hisashi SAWADA, Alan DAUGHERTY a Hong S. LU. Megalin: A bridge connecting kidney, the renin-angiotensin system, and atherosclerosis. *Pharmacological Research* [online]. 2020, **151** [cit. 2021-8-25]. ISSN 10436618. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2019.104537
  33. KUMAR, Priti, Arvindhan NAGARAJAN a Pradeep D. UCHIL. DNA Transfection Mediated by Cationic Lipid Reagents. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2019a, **2019**(3) [cit. 2021-10-26]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot095414
  34. KUMAR, Priti, Arvindhan NAGARAJAN a Pradeep D. UCHIL. Lipofection. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2019b, **2019**(3) [cit. 2021-11-10]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.top096248
  35. LABUNSKYY, Vyacheslav M., Dolph L. HATFIELD a Vadim N. GLADYSHEV. Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiological Reviews* [online]. 2014, **94**(3), 739-777 [cit. 2021-8-29]. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00039.2013
  36. LI, Y., H. YUAN, K. YANG, W. XU, W. TANG a X. LI. The Structure and Functions of P-Glycoprotein. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2010, **17**(8) [cit. 2021-11-12]. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/092986710790514507
  37. LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Lutz HEIN. *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 3., české. Ilustroval Jürgen WIRTH. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1672-5.
  38. MAO, Qingcheng a Jashvant D. UNADKAT. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. *The AAPS Journal* [online]. 2015, **17**(1), 65-82 [cit. 2021-9-15]. ISSN 1550-7416. Dostupné z: doi:10.1208/s12248-014-9668-6
  39. MARZOLO, María-Paz a Pamela FARFÁN. New Insights into the Roles of Megalin/LRP2 and the Regulation of its Functional Expression. *Biological Research* [online]. 2011, **44**(1), 89-105 [cit. 2021-8-25]. ISSN 0716-9760. Dostupné z: doi:10.4067/S0716-97602011000100012
  40. MELSTED, Wenna Nascimento, Sara Hyldig MATZEN, Mads Hald ANDERSEN a Thomas Vauvert F. HVIID. The choriocarcinoma cell line JEG-3 upregulates regulatory T cell phenotypes and modulates pro-inflammatory cytokines through

- HLA-G. *Cellular Immunology* [online]. 2018, **324**, 14-23 [cit. 2021-11-21]. ISSN 00088749. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellimm.2017.11.008
41. MOESTRUP, S K, S CUI, H VORUM, C BREGENGÅRD, S E BJØRN, K NORRIS, J GLIEMANN a E I CHRISTENSEN. Evidence that epithelial glycoprotein 330/megalin mediates uptake of polybasic drugs. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1995, **96**(3), 1404-1413 [cit. 2021-8-25]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI118176
42. MOESTRUP, Søren K a Lars Bo NIELSEN. The role of the kidney in lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology* [online]. 2005, **16**(3), 301-306 [cit. 2021-9-6]. ISSN 0957-9672. Dostupné z: doi:10.1097/01.mol.0000169350.45944.d4
43. NAGAI, Junya, Hiroaki TANAKA, Naoki NAKANISHI, Teruo MURAKAMI a Mikihiisa TAKANO. Role of megalin in renal handling of aminoglycosides. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* [online]. 2001, **281**(2), F337-F344 [cit. 2021-12-31]. ISSN 1931-857X. Dostupné z: doi:10.1152/ajprenal.2001.281.2.F337
44. NESHAT, Sarah Y, Stephany Y TZENG a Jordan J GREEN. Gene delivery for immunoengineering. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2020, **66**, 1-10 [cit. 2021-11-02]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2020.05.008
45. NIELSEN, Rikke, Erik Ilsø CHRISTENSEN a Henrik BIRN. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney International* [online]. 2016, **89**(1), 58-67 [cit. 2021-9-8]. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1016/j.kint.2015.11.007
46. PEREIRA, Cláudia. *Cardosin A Molecular Determinants and Biosynthetic Pathways*. 2012, **227**. Paříž. Disertační práce. Université Paris Sud.
47. POLESEL, Marcello a Andrew M. HALL. Axial differences in endocytosis along the kidney proximal tubule. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* [online]. 2019, **317**(6), F1526-F1530 [cit. 2021-9-16]. ISSN 1931-857X. Dostupné z: doi:10.1152/ajprenal.00459.2019
48. RIVOLTA, Carina M. a Héctor M. TARGOVNIK. Molecular advances in thyroglobulin disorders. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2006, **374**(1-2), 8-24 [cit. 2021-8-29]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2006.05.043
49. RYAN, Michael J., Gretchen JOHNSON, Judy KIRK, Sally M. FUERSTENBERG, Richard A. ZAGER a Beverly TOROK-STORB. HK-2: An

- immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney International* [online]. 1994, **45**(1), 48-57 [cit. 2021-11-21]. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1038/ki.1994.6
50. SAITO, A., S. PIETROMONACO, A. K. LOO a M. G. FARQUHAR. Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1994, **91**(21), 9725-9729 [cit. 2021-9-23]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.91.21.9725
  51. SAVIĆ, Nataša a Gerald SCHWANK. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Translational Research* [online]. 2016, **168**, 15-21 [cit. 2021-11-05]. ISSN 19315244. Dostupné z: doi:10.1016/j.trsl.2015.09.008
  52. SPOSITO, Andrei C., José Carlos DE LIMA-JUNIOR, Filipe A. MOURA, et al. Reciprocal Multifaceted Interaction Between HDL (High-Density Lipoprotein) and Myocardial Infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 2019, **39**(8), 1550-1564 [cit. 2021-8-30]. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.119.312880
  53. TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5.
  54. VAN GIEL, Dorien a Rudi VENNEKENS. Putting the pressure on endocytosis in the kidney. *Cell Calcium* [online]. 2021, **94** [cit. 2021-9-16]. ISSN 01434160. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceca.2020.102338
  55. YOKOO, Sachiko, Atsushi YONEZAWA, Satohiro MASUDA, Atsushi FUKATSU, Toshiya KATSURA a Ken-Ichi INUI. Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2007, **74**(3), 477-487 [cit. 2021-9-15]. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2007.03.004
  56. ZHAI, Xiao Yue, Rikke NIELSEN, Henrik BIRN, et al. Cubilin- and megalin-mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney. *Kidney International* [online]. 2000, **58**(4), 1523-1533 [cit. 2021-9-8]. ISSN 00852538. Dostupné z: doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00314.x
  57. ZHAO, Dongxin a Kui LU. Substrates of the human oligopeptide transporter hPEPT2. *BioScience Trends* [online]. 2015, **9**(4), 207-213 [cit. 2021-9-15]. ISSN 1881-7815. Dostupné z: doi:10.5582/bst.2015.01078

## Webové reference

58. Anonym. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. *Promega* [online]. 2012 [cit. 2021-11-30]. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-mts/?catNum=G3582>
59. Anonym. OCRL gene. *MedlinePlus* [online]. U.S. National Library of Medicine, 2020a [cit. 2021-11-14]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/ocrl/#resources>
60. Anonym. Endocytosis. *Glossary* [online]. 2011 [cit. 2021-11-21]. Dostupné z: <https://eng.thesaurus.rusnano.com/wiki/article2025>
61. Anonym. JEG-3: HBT-36. *ATCC* [online]. USA, 2021 [cit. 2022-01-30]. Dostupné z: <https://www.atcc.org/products/htb-36>
62. Anonym. Pierce™ BCA Protein Assay Kit. *Thermo Fisher Scientific* [online]. USA, 2020b [cit. 2022-03-30]. Dostupné z: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011430\\_Pierce\\_BCA\\_Protein\\_Asy\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf)
63. Anonym. LRP10 – Low-density lipoprotein receptor-related protein 10. *UniProt: the universal protein knowledgebase in 2022a* [online]. 23.2.2022 [cit. 2022-04-17]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q7Z4F1>
64. Anonym. LRP12 – Low-density lipoprotein receptor-related protein 12. *UniProt: the universal protein knowledgebase in 2022b* [online]. 23.2.2022 [cit. 2022-04-17]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y561>