



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VYUŽITÍ FLUORESCENČNÍCH METOD PRO STUDIUM PROTEINOVÝCH INTERAKCÍ

USE OF FLUORESCENCE METHODS FOR THE STUDY OF PROTEIN INTERACTIONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Klára Johaníková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Kristýna Pavelicová, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1673/2021
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Klára Johaníková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Kristýna Pavelicová, Ph.D.**

Akademický rok: 2021/22

Název diplomové práce:

Využití fluorescenčních metod pro studium proteinových interakcí

Zadání diplomové práce:

1. Vypracování literární rešerše na využití fluorescenčních metod pro studium proteinových interakcí.
2. Na základě rešerše zvolit fluorescenční látky s vhodnými optickými vlastnostmi pro Försterův rezonanční přenos energie (FRET).
3. Konjugace metallothioneinu s kvantovými tečkami a komerčními fluorofory pro FRET a charakterizace těchto vzniklých konjugátů.
4. Studium proteinových interakcí pomocí FRET prostřednictvím fluorescenční spektrofotometrie a kapilární elektroforézy s fluorescenční detekcí.
5. Zhodnocení dosažených výsledků z hlediska možností využití FRET při studiu interakcí proteinů.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Klára Johaníková
studentka

Ing. Kristýna Pavelicová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce s názvem „Využití fluorescenčních metod pro studium proteinových interakcí“ je zaměřená na využití fluorescenčních metod pro studium proteinových interakcí pomocí elektromigračních metod a Försterova rezonančního přenosu energie (FRET). Cílem této práce bylo vytvoření biokonjugátu proteinu metallothioneinu (MT) s kvantovými tečkami (QDs) a komerčními barvivy. Mezi těmito konjugáty byl následně studován FRET. QDs byly syntetizovány za působení UV záření a konjugace s MT byla provedena přes karbodiimidový zerolengthcrooss-linker (EDC/sulfo-NHS), který slouží k aktivaci karboxylových skupin a umožňuje biokonjugaci ligandu kovalentní vazbou. Díky vysokému podílu cysteinů v MT, má tento protein velmi vysokou afinitu ke kovům. Podílí se také na vychytávání volných radikálů a jsou i studie, které dokazují, že dochází ke zvýšené expresi MT v oblasti rakovinných buněk-nádorů. Pozornost byla věnována i studiu dimerizace MT, která vede k pochopení oxidativní dimerizace MT a tím může přispět k pochopení vzniku volných radikálů v těle a k prohloubení znalostí o neurodegenerativních poruchách jako je Parkinsonova nebo, Alzheimerova choroba či amyotrofická laterální skleróza. Vznik dimeru MT, byl potvrzen přenosem energie mezi donorem (QDs) a akceptorem (komerční barvivo-cyanin) skrze fyzikální jev FRET i pomocí MALDI-TOF-MS.

ABSTRACT

The diploma thesis "Use of fluorescence methods for the study of protein interactions" is focused on the use of fluorescence methods for the study of protein interactions using electromigration methods and Förster resonance energy transfer (FRET). The aim of this work was to create a bioconjugate of metallothionein (MT) protein with quantum dots (QDs) and commercial dyes. FRET was subsequently studied between these conjugates. QDs were synthesized under UV light and conjugation with MT was performed via a carbodiimide zerolengthcrooss-linker (EDC / sulfo-NHS), which serves to activate carboxyl groups and allows bioconjugation of the ligand by covalent bonding. Due to the high proportion of cysteines in MT, this protein has a very high affinity for metals. It is also involved in scavenging free radicals and there are studies that show that MT is overexpressed in cancer cells. Attention was also paid to the study of MT dimerization, which leads to an understanding of oxidative dimerization of MT and thus can contribute to understanding the formation of free radicals in the body and to deepen the knowledge about neurodegenerative disorders such as Parkinson's or Alzheimer's disease or amyotrophic lateral sclerosis. The formation of the MT dimer was confirmed by energy transfer between the donor (QDs) and the acceptor (commercial dye-cyanine) through the physical phenomenon of FRET and MALDI-TOF-MS.

Klíčová slova

Metallothionein, kvantové tečky, cyanin, cytostatika, FRET, kapilární elektroforéza

Keywords

Metallothionein, quantum dots, cyanine, cytostatics, FRET, capillary electrophoresis

JOHANÍKOVÁ, Klára. *Využití fluorescenčních metod pro studium proteinových interakcí*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138907>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Kristýna Pavelicová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce jež hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Kristýně Pavelicové Ph.D., za všestrannou pomoc, množství cenných a inspirativních rad, materiálů a připomínek. Především za její trpělivost a vstřícnost při měření diplomové práce a následném zpracování. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Lukášovi Nejdlovi, Ph.D. a panu doc. Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za jejich ochotu a umožnění této spolupráce. V poslední řadě patří velké poděkování mé rodině a nejbližším přátelům za jejich podporu.

CÍL PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše na využití fluorescenčních metod pro studium proteinových interakcí.
2. Na základě rešerše zvolit fluorescenční látky s vhodnými optickými vlastnostmi pro Försterův rezonanční přenos energie (FRET).
3. Konjugace metallothioneinu s kvantovými tečkami a komerčními fluorofory pro FRET a charakterizace těchto vzniklých konjugátů.
4. Studium proteinových interakcí pomocí FRET prostřednictvím fluorescenční spektrofotometrie a kapilární elektroforézy s fluorescenční detekcí.
5. Zhodnocení dosažených výsledků z hlediska možností využití FRET při studiu interakcí proteinů.

OBSAH

Úvod	9
1 Fluorescence	10
1.1 Princip.....	10
1.2 HOMO/LUMO interakce	13
2 Elektronové transfery - princip PET, BRET, FRET	14
2.1 Fluorescenční fotoindukovaný přenos (PET)	15
2.2 Bioluminiscenční rezonanční přenos energie (BRET)	15
2.3 Försterův rezonanční přenos energie (FRET)	18
2.3.1 Princip FRET	18
2.3.2 Donory a akceptory vhodné pro FRET	19
2.3.3 Aplikace FRET.....	27
3 Metallothionein (MT)	28
3.1 Izoformy MT	29
3.2 Role MT u rakoviny	30
3.3 Oligomerizace MT.....	32
4 Elektroforetické metody	33
4.1 Kapilární elektroforéza	34
4.1.1 Aplikace CE	35
5 Hmotnostní spektrometrické metody.....	36
5.1 MALDI–TOF–MS	37
6 Experimentální část	38
6.1 Materiály.....	38
6.2 Přístroje.....	38
6.3 Metody.....	38
6.3.1 Příprava QDs pomocí UV záření	38
6.3.2 Přечиštění QDs.....	39
6.3.3 Příprava konjugátu QDs s MT	39
6.3.4 Příprava konjugátu QDs s komerčními barvivy.....	39
6.3.5 Charakterizace QDs a Cy3,5	39
6.3.6 Ověření Försterova přenosu energie mezi konjugáty	39

6.3.7	Interakce proteinů s kadmíem	42
6.3.8	Interakce proteinů s cytostatiky	42
6.3.9	Ověření dimerizace/oligomerizace MTs pomocí MALDI-TOF-MS	42
7	Výsledky a diskuze	43
7.1	Příprava QDs pomocí UV záření.....	44
7.2	Příprava konjugátu MT a QDs.....	45
7.3	Příprava konjugátu MT s komerčními barvivy.....	46
7.4	Studium proteinových interakcí pomocí FRET	49
7.4.1	Fluorescenční spektrofotometrie	49
7.4.2	CE-LIF	53
7.4.3	Studium proteinových interakcí s kadmíem.....	54
7.4.4	Studium proteinových interakcí s cytostatiky	56
7.5	Studium proteinových oligomerů pomocí MALDI –TOF-MS	59
8	Závěr	61
9	Zdroje.....	63

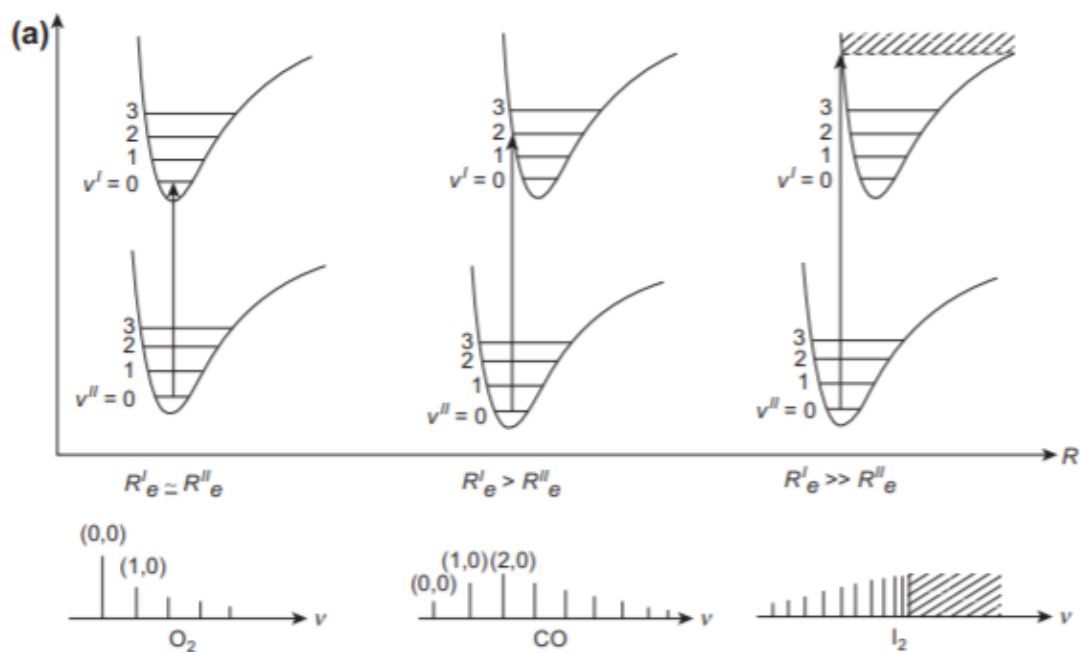
ÚVOD

Fluorescenční metody jsou stále více využívány v mnoha disciplínách. Nachází uplatnění pro studium struktury a vlastností polymerních materiálů, v analytické chemii se široce využívají především v environmentální analýze a bioanalýze. Fluorescenční metody lze použít pro stanovení autofluorescenčních sloučenin, ale i těch nefluorescenčních za použití vhodných fluorescenčních značek. Fluorescenční emise zahrnuje měření světla na tmavém pozadí a není založena na rozdílových měřeních jako většina absorpčních technik (např. IR spektroskopie, NMR spektroskopie, UV-VIS spektrofotometrie), a tak detekce může být dosaženo na velmi nízké úrovni. V poslední době byla dokonce publikována fluorescenční měření jednotlivých molekul. V chemické analýze se fluorescenční spektroskopie téměř výhradně používá pro kvantifikaci nízkých koncentrací ($<10^{-6}$ M) analytů v homogenních roztocích. Jsou-li přítomny vyšší koncentrace fluoroforů, může být kvantitativní aplikace této techniky ohrožena v důsledku intermolekulárních interakcí nebo optických efektů (např. efekt vnitřního filtru). Intenzita a spektrální vlastnosti fluorescence jsou velmi citlivé na interakci excitovaných molekul s jinými excitovanými molekulami, molekulami v základním stavu a s molekulami rozpouštědla. Všechny tyto interakce omezují kvantitativní aplikaci techniky, ale na druhou stranu poskytují možnosti ke studiu dalších aspektů zájmového systému [1]. Příkladem je fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET), který slouží k přenosu energie bez záření, přičemž energie vychází z excitovaného donoru na akceptor, který je výsledkem dipól-dipól interakcí mezi molekulami donoru a akceptoru. Pouze v případě těsné blízkosti těchto molekul je umožněn efektivní přenos energie mezi donorovými a akceptorovými skupinami. Kvantové tečky (QDs) a organické fluorofory, jako jsou cyaninová barviva, jsou široce využívány jako FRET sondy pro mnohé chemické a biologické aplikace, jako je studium strukturních změn proteinů nebo pro snímání a zobrazování molekulárních interakcí. Navíc bylo prokázáno, že FRET má silný potenciál v biosensingu, vývoji vícebarevných fluorescenčních sond, strukturní analýze makromolekul, studiu interakcí mezi molekulami a při detekci genů. V této práci byl pro zkoumání proteinových interakcí použit systém FRET a jako modelový protein byl zvolen metallothionein. Proces byl monitorován kapilární elektroforézou (CE) spojenou s laserem indukovanou fluorescenční detekcí. Metallothioneiny (MTs) jsou nízkomolekulární proteiny složené z 61 aminokyselin, z nichž 30 % tvoří cysteiny. Cysteiny hrají klíčovou roli v homeostáze kovů, neboť díky přítomnosti sulfhydrylových skupin vykazuje vysokou afinitu ke kovům. Díky disulfidovým vazbám mohou MT vytvářet dimery (a/nebo vyšší oligomery), které mohou být tvořeny buď v oxidačních (např. přítomnost NO nebo peroxidu vodíku) nebo neoxidačních podmínkách (přidání přebytek Cd^{2+}). Studium jejich strukturálního uspořádání může pomoci pochopit vývoj oxidačního stresu a mechanismu transportu toxických kovů. Kromě toho tvorba oligomerů (stejně jako jejich struktury) mohou hrát důležitou roli v řadě neurologických poruch jako je Alzheimerova choroba a amyotrofická laterální skleróza.

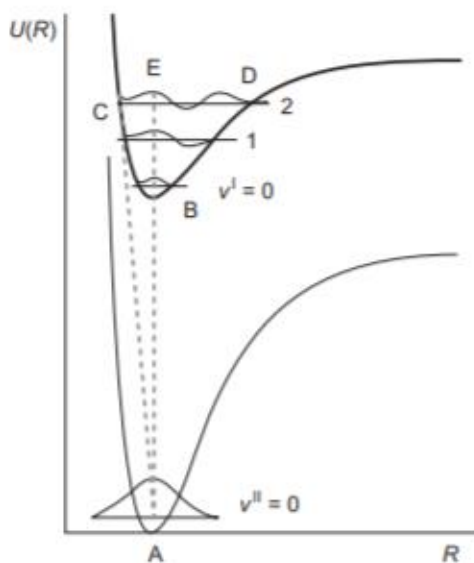
1 FLUORESCENCE

1.1 Princip

Fluorescence je jedním z projevů interakcí elektromagnetického záření s hmotou, kdy společně s fosforescencí přispívá k pochopení molekulární struktury a chemických interakcí. Faktorem ovlivňujícím fluorescence je chemická struktura. Dr. D. M. Hercules představil vztah mezi strukturou a luminiscencí, ve kterém prokázal, že fluorescence a fosforescence jsou konkurenční procesy. Těžké atomy v molekule mají tendenci snižovat výtěžek fluorescence a zvyšovat výtěžek fosforescence. Prostředí molekuly (teplota, viskozita a polarita rozpouštědla) hraje důležitou roli při určování povahy luminiscence a kvantového výtěžku. Bylo dokázáno, že ke zvýšení energie fluorescence při nízkých teplotách ve srovnání s energií při pokojové teplotě dochází díky emisím ze „stavu Franck-Condon“. Pokud je teplota dostatečně snížena, doba potřebná k přeorientování molekul rozpouštědla může být delší než životnost excitovaného stavu a budou pozorovány určité emise ze stavu Franck-Condon (FC) [2]. FC princip se vztahuje k interakci mezi elektronickými a vibračními pohyby. FC uvádí, že elektronické přechody jsou o tolik rychlejší než pohyby jaderné, že můžeme považovat jádra za pevná během přechodu. K elektronickému přechodu také pravděpodobně dojde, když jsou jádra v krajních polohách na potenciálové energetické křivce. Rozložení náboje v molekule, která následuje po elektronovém přechodu, má za následek změnu Coulombických sil na jádrech a způsobuje změny ve vibračním stavu molekuly. Společný výskyt elektronických a vibračních přechodů, nazývaných vibrační přechody, vede k vibrační struktuře elektronických pásem. FC princip pomáhá analyzovat tyto vibrační přechody a vysvětluje rozložení intenzity ve vibračních pásmech (Obrázek 1) [3]. Dalším důležitým faktorem, který určuje luminiscenční vlastnosti sloučeniny, je povaha nejnižšího excitovaného stavu. Jak zdůraznil Dr. D. M. Hercules, každá organická molekula má pouze jeden základní stav, ale má řadu excitovaných stavů. Ve většině případů může být první excitovaný stav označen jako stav τ_1 , π^* nebo π , $\tau\tau^*$. Faktory prostředí, jako je polarita rozpouštědla, mohou určit povahu nejnižšího excitovaného stavu singletu, a tedy luminiscenční charakteristiky [2].



(b)

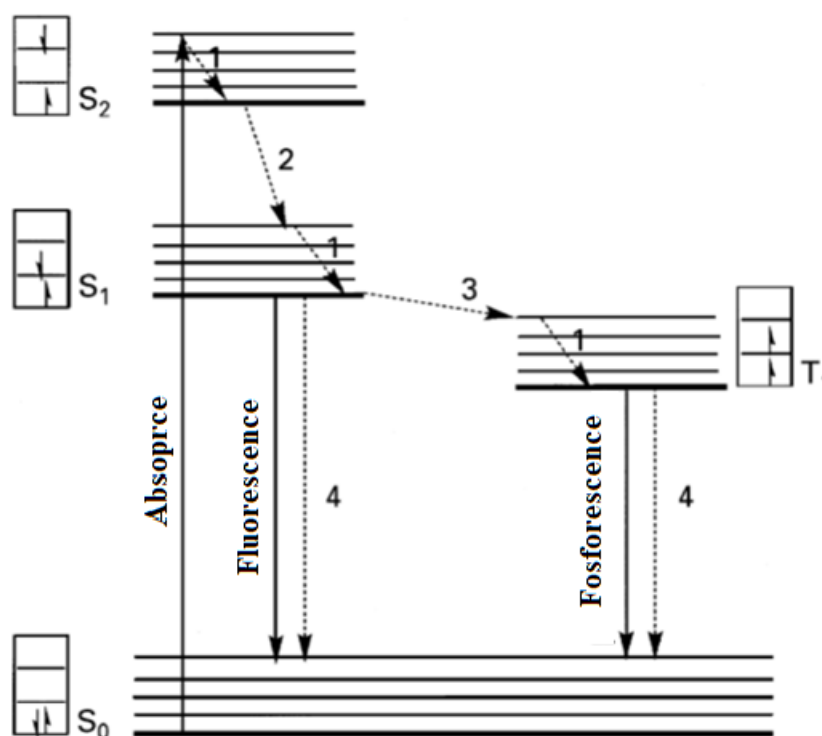


Obrázek 1: (a) Rozložení intenzity ve vibračních stavech podle Franck–Condonova principu, (b) Kvantově mechanické vysvětlení Franck–Condonova principu.

Při fluorescenci dochází k emisi fotonů z excitované molekuly beze změny multiplicity. Multiplicita vyjadřuje stav, ve kterém se elektron nachází, může být buď singletová (párové elektrony) nebo tripletová (nepárové elektrony). K fluorescenční emisi dochází nejčastěji z excitovaného elektronového stavu S_1 . Molekula v základním stavu S_0 absorbuje světlo, čímž dochází k přenosu elektronu do excitovaného stavu S_1 , který má stejnou multiplicitu spinu jako základní stav. Fluorescenční spektrum má kvůli ztrátě energie v excitovaném stavu nižší energii než absorpční spektrum. Nachází se tedy na vyšších vlnových délkách a dochází ke vzniku mezery mezi maximem prvního absorpčního pásma a maximem emisního pásma, což vyjadřuje Stokesův posun. Obecně jsou rozdíly mezi vibračními hladinami natolik podobné, že se

uplatňuje pravidlo „zrcadlového obrazu“. Excitované molekuly zůstávají po určitou dobu ve stavu S_1 a poté dochází k emitování fotonu nebo podstoupení jiných deexcitačních procesů (vnitřní konverze a křížení mezi systémy). Kromě fluorescence může docházet také k fosforescenci, při které dochází ke změně multiplicity spinu, obvykle z tripletu na singlet nebo naopak [4, 5]. Energetické přechody jsou znázorněny v Jablonského diagramu. Jablonského diagram vyjadřuje uspořádání energetických hladin do sloupců, kdy každý sloupec představuje specifickou spinovou multiplicitu. Jak lze vidět na obrázku 2, tučné vodorovné čáry znázorňují elektronový stav ($S_1, S_2, \dots$) přičemž jednoduché čáry vyjadřují vibrační energie, které jsou spojeny s elektronovým stavem.

Dle Jablonského diagramu existuje několik různých cest, jak může elektron přijmout a poté rozptýlit energii z fotonu určité vlnové délky. U většiny diagramů je prvním krokem absorpce fotonu vycházejícího ze základního elektronického stavu o určité energii a posledním krokem je přechod zpět do základního elektronického stavu. Absorbance je stav, při kterém je elektron excitován z nižší energetické úrovně na vyšší energetickou hladinu [6, 7].

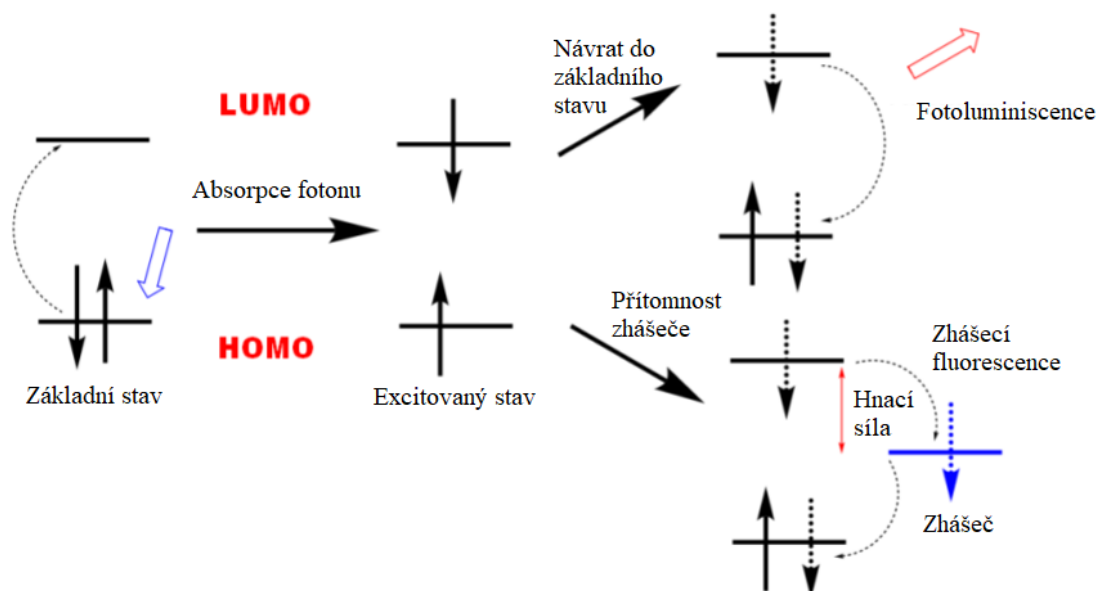


Obrázek 2: Schéma Jablonského diagramu. Přechod označený číslem 1 znázorňuje vibrační relaxace, přičemž molekula přechází na základní hladinu příslušného excitovaného stavu. Číslo 2 je vnitřní konverzí, jedná se o přechod z druhého excitovaného stavu (S_2) do prvního (S_1). Přechod mezi systémy představuje číslo 3. Dochází k přechodu ze singletového (energeticky vyššího) do tripletového (energeticky nižšího) stavu. Přechody bez účasti fotonu, tj. neradiační přechody vyobrazuje číslo 4.

1.2 HOMO/LUMO interakce

Při přechodech z excitovaného stavu či změně multiplicity spinu dochází ke ztrátám energie. Aby došlo k minimalizaci těchto ztrát, využívá se překryv nejvyššího obsazeného molekulového orbitalu zvaného HOMO, a nejnižšího neobsazeného molekulového orbitalu, LUMO. Běžná strategie minimalizace energie zahrnuje zavedení donorových a akceptorových skupin, které mohou oddělit nejvyšší obsazené a nejnižší neobsazené molekulární orbitály (HOMO, respektive LUMO) a snížit interakci výměny mezi jednotlivě obsazenými molekulovými orbitály (SOMO) v excitovaných stavech. Mechanismus interakce HOMO a LUMO vysvětluje obrázek 3. Taková strategie však zvyšuje strukturální relaxaci v excitovaných stavech a zvyšuje Stokesův posun, což vede k rozšíření maxim luminiscence. Toho lze dosáhnout kombinací donorových a akceptorových skupin se slabými interakcemi, které mají komplikovanou geometrii a nekonjugovaná spojení [8, 9].

Výměnná interakce je závislá na symetrii prostorové vlnové funkce LUMO a HOMO elektronů. Ve stavu singletu je prostorová dvoulektronová vlnová funkce symetrická (protože spinová vlnová funkce je antisymetrická) a ve stavu tripletů je antisymetrická. Velikost výměnné interakce je funkcí orbitálního překrytí. Typicky se ve fluorescenčních molekulách oba orbitály šíří po celé molekule, takže existuje velké orbitální překrytí [10]. Rozdíl energie mezi HOMO a LUMO je dán hnací silou procesu zhášení fluorescence. Při fotoexcitaci molekulového senzoru elektron přechází na vyšší energetickou dráhu. Při absenci zhášeče je reverzní přechod doprovázen fotoluminiscencí. Při kontaktu elektronu s zhášečí se excitovaný elektron molekulového senzoru vrací do základního stavu, který se neúčastní přechodu mezi jednotlivými energetickými stavy, což je pozorováno jako zhášení fluorescence [11].



Obrázek 3: Mechanismus zhášení fluorescence s kontaktem chemického senzoru za využití LUMO a HOMO fluorescence [11]

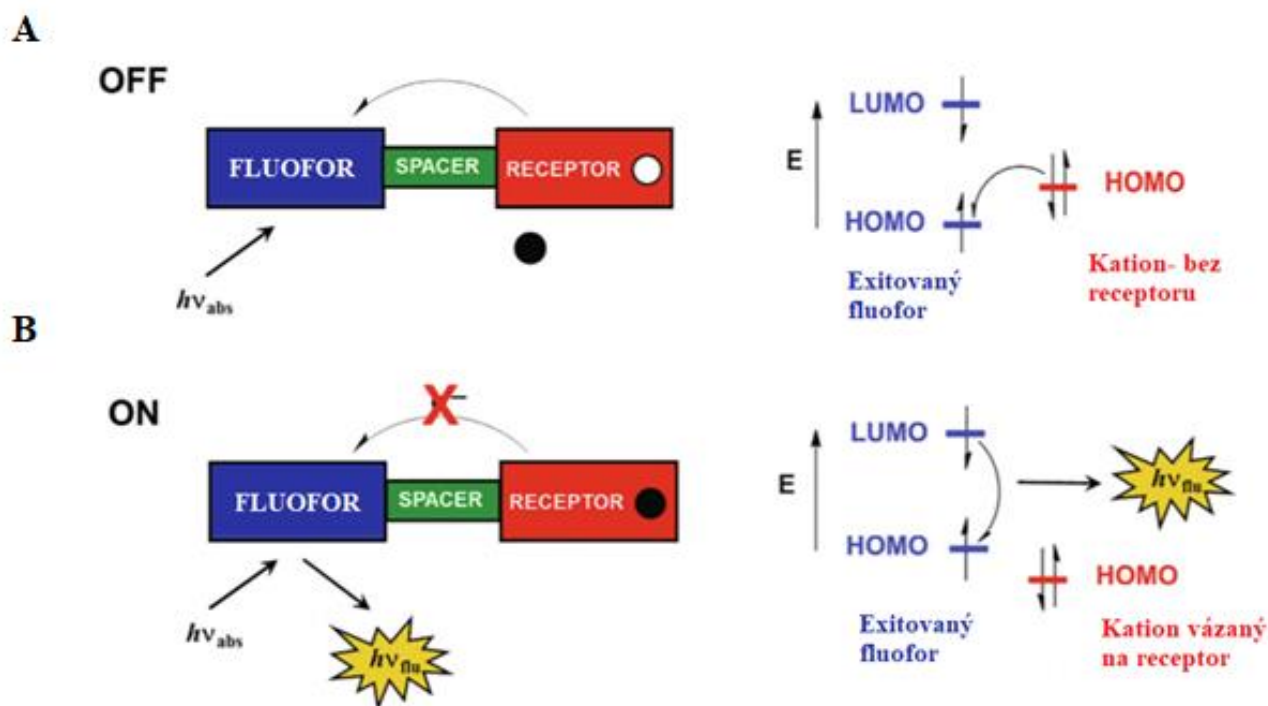
2 ELEKTRONOVÉ TRANSFERY - PRINCIP PET, BRET, FRET

Fluorescenční metody mají široké využití v biochemickém a biofyzikálním odvětví, ale i v klinické chemii nebo při genetických analýzách. Především umožňují sledování strukturních a konformačních změn, kdy využívají přenosu elektronové excitační energie mezi donorem a fluoreskujícím akceptorem. Na tomto principu můžeme studovat struktury proteinů, polynukleotidů, DNA, protein-protein interakce, DNA-protein interakce a fúze membrán. Poslední dobou fluorescenční metody nahrazují radionuklidové zářiče v lékařství, a to zejména v oblasti neurověd [13]. Jak již bylo zmíněno, vhodná kombinace donorů a akceptorů, přispívá k mechanismu HOMO/LUMO, který využívá právě zmiňovaný přenos energie. Při elektronových transferech dochází k přenosu elektronů mezi ionty a molekulami v roztoku. Teorie elektronových transferů byla nejdříve formulována tak, aby řešila reakce přenosu elektronů ve vnější sféře (outer sphere), při nichž dochází k přenosu elektronů z donoru a akceptoru, kdy tyto molekuly zůstávají nedotčené a pouze mění svůj náboj. Nedochází tak k velkým strukturálním změnám. K přenosu elektronů vnější sférou dochází u molekul, které netvoří kovalentní vazby, ligandové můstky a nepodléhají substituci. Vnější sféra vyžaduje menší množství energie, neboť nedochází k tvorbě či přeformování vazeb, ale pouze ke vzniku elektrostatických interakcí, van der Waalsových sil nebo vodíkových vazeb. Teorie později zahrnovala i přenosy elektronů vnitřní sférou (inner sphere), ve kterých se bere v úvahu změna vzdáleností nebo geometrie elektronových obalů donorů a akceptorů. Přenos elektronů je umožněn prostřednictvím komplexu ligandů, zejména tvorbou ligandových můstků, které lámou a tvoří nové vazby [14].

K elektronovým transferům dochází při redoxních reakcích, u nichž se jedná o neutrální molekuly, a tak mohou být elektrostatické síly ignorovány. Navíc lze považovat buď donor (D) nebo akceptor (A) za fotoexcitovaný (fotonem indukovaný elektronový přenos, PET). Kromě změny energií v počátečním stavu platí principy stejné jako pro přenos elektronů v základním i excitovaném stavu. Aby mohla reakce proběhnout, musí D a A společně difundovat. Tvoří komplex, obvykle kinetický, nestabilní, solvatovaný, který se elektronovým přenosem transformuje, a nakonec se oddělí difúzí [14]. Interakce donorů a akceptorů ve fotonovém poli dala vzniknout ne jednomu, ale několika důležitým jevům ve fotochemii- absorpci přenosu náboje, exciplexům (dimerní nebo heterodimerní krátkodobé komplexy, které mohou být generovány v excitovaném stavu, ale disociují v základním stavu) a fotoindukovanému přenosu elektronů. Kromě jevu PET mezi elektronové transfery patří bioluminiscenční rezonanční přenos energie (BRET) i Försterův přenos rezonanční energie (FRET) [15].

2.1 Fluorescenční fotoindukovaný přenos (PET)

Za fluorescenční fotoindukovaný přenos elektronů (PET) se považují molekulární systémy, kde vazba iontů vede k narušení konkurence mezi deexcitačními cestami fluorescence a elektronovým přenosem. PET při dostatečně velkých interakcích s fluorescencí soupeří o deaktivaci excitované fluoroforové skupiny. Aby mohlo dojít k deaktivaci, musí nejdříve dojít k navázání na vazebné místo (receptor), kde dochází k interakci fotonů [15]. Předpokladem pro přenos je dostatečný zdroj energie, díky kterému dojde k excitaci fluoroforu a přechodu elektronu na nejnižší obsazený molekulární orbital (LUMO). Princip PET je znázorněn na obrázku 4. Tento jev umožňuje přenos elektronů z nevázaného receptoru do excitovaného fluoroforu nebo naopak, tak aby přenos elektronů byl termodynamicky i kineticky příznivý. Vazba cílových molekul (tj. proton, kation, anion, organický substrát) na receptor mění termodynamiku tak, že PET již není proveditelný. Úroveň energie analytu, vázaného v nejvýše obsazeném orbitalu, klesá a vzniká mechanismus pro přepínání mezi stavem ON/OFF [16].



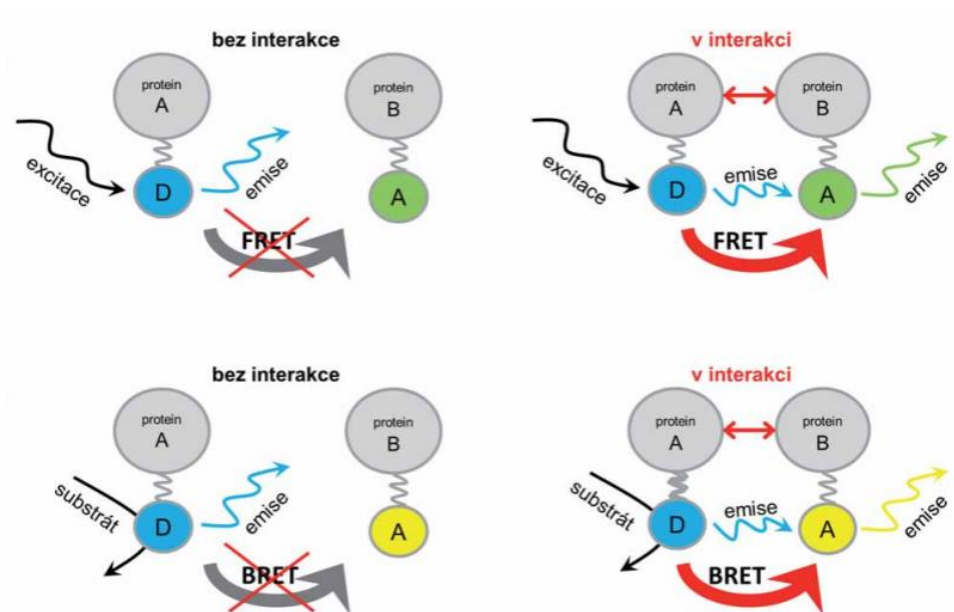
Obrázek 4: Fotoindukovaný elektronový přenos. Jsou znázorněny dvě termodynamické situace. Po excitaci světlem: (A) PET z donoru elektronů do excitovaného stavu fluorescence ve stavu OFF; (B) střídavá oxidace donoru elektronů na radikální kation způsobuje pokles energetické hladiny vedoucí k emisi světla (fluorescence ve stavu ON) [16].

2.2 Bioluminiscenční rezonanční přenos energie (BRET)

BRET zahrnuje přenos rezonanční energie mezi bioluminiscenčním dárce a fluorescenčním akceptorem. Jedná se o jev široce využívaný pro studium interakcí protein-protein [17]. Proteiny jsou nejprve geneticky modifikovány za vzniku fúzních proteinů buď s luciferázovou značkou nebo fluorescenční značkou, například GFP (zelený fluorescenční protein) [18]. Stejně

jako u metody FRET musí být splněny podmínky, tj. dostatečná vzdálenost a překryv emisního a excitačního spektra, což znázorňuje obrázek 5 [19]. BRET se přirozeně vyskytuje u některých mořských druhů (například u *Renilla reniformis*), kdy výsledkem je neradiační přenos energie mezi luminiscenčním dárce (*Renilla luciferase- Rluc*) a fluorescenčním akceptorovým proteinem GFP [20]. V případě BRET je dárce luciferáza, která přímo emituje fotony, takže externí excitace není nutná. Tato luminiscence katalyzovaná luciferázou využívá substrát a může excitovat akceptorový fluorofor přenosem rezonanční energie, pokud jsou luciferáza a fluorofor v těsné blízkosti a pokud luminiscenční emisní spektrum luciferázy vhodně překrývá absorpční spektrum akceptorového fluoroforu. BRET nezahrnuje optické buzení, veškeré světlo musí být emitované fluoroforem. Z tohoto důvodu je BRET teoreticky lepší než FRET pro kvantifikaci přenosu energie. Jednou z nejdůležitějších výhod BRET oproti FRET je, fakt, že relativní úrovně exprese donorových a akceptorových partnerů lze kvantifikovat nezávisle (dárce pomocí luminiscence a akceptor pomocí fluorescence) [21].

U BRET, na rozdíl od FRET, může nastat absence signálu mezi dvěma receptory, což nutně neznamená, že tyto receptory spolu neinteragují [14]. Potenciální výhodou BRET je možnost absence použití excitačního zdroje světla. BRET je proto výhodnější pro buňky, které jsou buď fotoresponzivní (např. sítnice nebo jakákoli fotoreceptivní tkáň) nebo mohou být poškoditelné vlnovou délkou světla použitého k excitaci [17, 21]. BRET se využívá zejména pro tkáně, které mají silnou autofluorescenci kvůli všudypřítomným fluorescenčním molekulám, jako je NADH, kolagen a flaviny. V rostlinných buňkách je BRET obzvláště slibný, protože vysoce fluorescenční fotosyntetické pigmenty a sloučeniny buněčné stěny převládající v rostlinách mohou interferovat s testy založenými na FRET [21]. BRET využívá jako akceptory fluorescenční proteiny, organická barviva nebo nanočástice (kvantové tečky-QDs). Výhodou QDs je nastavitelná emise v závislosti na velikosti, vynikající jas a vysoká fotostabilita. Kombinace QDs s bioluminiscenčními proteiny poskytl příležitosti pro zobrazování *in vivo* [22].



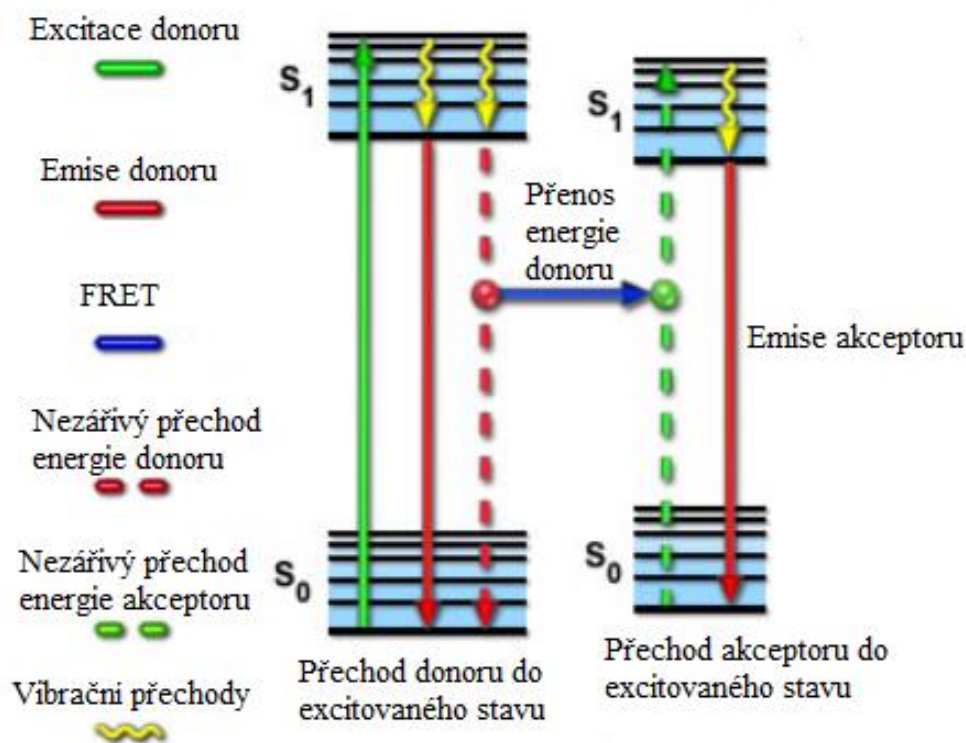
Obrázek 5: Znázornění mechanismu rezonančního přenosu energie mezi proteiny v interakci a bez interakce [20]

2.3 Försterův rezonanční přenos energie (FRET)

Jedná se o fluorescenční technologii, která se díky své vysoké citlivosti a selektivitě, široce využívá v lékařské diagnostice, při monitorování životního prostředí i v oblasti bezpečnosti potravin. Díky vysoké citlivosti, specifitě a rychlé odezvě jsou fluorescenční technologie využívány jako biosenzory. Biosenzory založené na FRET mají jedinečné výhody, jako je jednoduchost a homogenní analýza, čímž umožňují kvantitativní měření *in vitro* a také *in vivo* v buňkách. Jsou ale také vhodné pro diagnostiku onemocnění, ověřování čistoty léků a hrají prominentní roli v nanomateriálech a dalších biologických aplikacích. Fluorescenční signál snadno interferuje s mnoha faktory, zejména s okolním prostředím (pH a teplota). Nicméně poměrně široké fluorescenční spektrum ztěžuje přesné stanovení poměru dvou fluorescenčních maxim, což může částečně vyřešit FRET, protože jediná excitace ve FRET může vést k delší emisi [23].

2.3.1 Princip FRET

Principem Försterova přenosu rezonanční energie je přenos energie mezi částicemi molekul citlivých na světlo. Donorem je fluorofor, který je zpočátku ve svém elektronicky excitovaném stavu a až po absorpci energie dochází k přenosu energie do akceptorového chromoforu. Účinnost FRET závisí na několika faktorech, tj. spektrální překryv emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru, vzdálenost mezi donorem a akceptorem (<10 nm) a na orientaci dipólového momentu emise donoru a absorpčního dipólového momentu akceptoru. V tradičním FRET dochází k přenosu energie mezi jedním donorem a jedním akceptorem [23]. Přenos energie mezi emisí donoru a absorpcí akceptoru je znázorněn v Jablonského diagramu na obrázku 6 [24]. U páru donor-akceptor je účinnost FRET nepřímo úměrná šesté mocnině jejich vzdálenosti. Z toho vyplývá, že fluorescenční metoda FRET je extrémně citlivá na vzdálenost mezi donorem a akceptorem. Ve studiích se ukázalo, že FRET je efektivní cestou pro přenos energie v jednotlivých molekulách, kvantových tečkách, proteinech a jejich derivátech, enzymech a systémech v řádech nano-rozměrů nebo nanomateriálech. Tyto studie rovněž ukázaly, že jakmile jsou molekuly dostatečně blízko tak, aby docházelo k vazbě, může být excitační energie přenášena mezi molekulami v roztoku, v polymerech s chromoforickými skupinami, v krystalických materiálech a v rozhraních mezi vrstvami. Nedávno byl navržen model pro FRET na bázi nanomateriálů, které by zahrnovaly páry donoru (D) a více akceptorů (A), nebo obráceně. Jinými slovy, docházelo by k přenosu energie z více donorů na jeden akceptor [23, 25].



Obrázek 6: Schéma přenosu rezonanční energie v Jablonského diagramu. Absorpční a emisní přechody jsou zaznamenány plnými svislými šipkami (zelenými a červenými), zatímco vibrační relaxace je označena žlutými vlnovkami. Nezářivé přechody jsou nakresleny přerušovanými čarami. V přítomnosti vhodného akceptoru dochází k přenosu energie z excitovaného donoru fluoroforu na akceptor bez emitování fotonu [24].

2.3.2 Donory a akceptory vhodné pro FRET

Jako u většiny jevů i FRET upřednostňuje donory a akceptory, které umožňují zvýšení fluorescence, široké absorpční spektrum či vysoký extinkční koeficient. Nejžádanější jsou fluorescenční molekuly s největším Stokesovým posunem, protože zřetelně oddělují excitační a emisní vlnové délky.

2.3.2.1 Organické fluorofory

Mezi vhodné donory z ultrafialové oblasti (UV) se řadí barviva, jako jsou kumariny, pyreny a naftaleny. Z infračervené oblasti spektra (NIR) to jsou cyaniny (Cy3; Cy3,5; Cy5,5) a rhodamin. Akceptory FRET mohou být organické látky, jako je kyselina 4- (4'-dimethylaminofenylazo) benzoová (Dabcyl) a 4- dimethylaminoazobenzen-4'-sulfonyl (Dabsyl), barviva ATTO, zhašeče „černé díry“ (BHQ-3, BHQ-5) a kovové materiály, například nanočástice zlata v důsledku širokého absorpčního spektra [23, 26]. V poslední době, s přijetím intraoperačního a endoskopického fluorescenčního zobrazování, se indocyaninová zeleň (ICG) používá v onkologických postupech pro lokalizaci lymfatických uzlin pro biopsii a vedení resekce rakovinné tkáně. Cyaninová barviva se obecně snadno syntetizují, ladí vlnovou délku a jsou biokompatibilní. Proto se většina komerčních fluorescenčních sond pro zobrazování *in*

vivo skládá z NIR cyaninových barviv. Typická cyaninová barviva se skládají ze dvou aromatických heterocyklů obsahujících dusík jako nabitě chromofory, které působí jako donory i akceptory elektronů. Dva aromatické kruhy jsou spojeny lichým počtem methinových skupin, ve kterých jsou π -elektrony rozmístěny po atomech, které produkují delokalizovaný kation v methinovém řetězci. V závislosti na délce methinového řetězce absorbují cyaninová barviva ve viditelném infračervené oblasti elektromagnetického spektra. Většina těchto cyaninových barviv vykazuje úzké absorpční pásy a vysoké extinkční koeficienty (součet koeficientu absorpce a rozptylu daného prostředí), ale nízké kvantové výtěžky. Ke zlepšení jasu cyaninových barviv se do cyklohexenylových skupin zavedou methinového řetězce s funkčními modifikátory, jako jsou karboxylové a sulfonátové skupiny. Kromě zlepšené rozpustnosti ve vodě, fotostability a kvantového výtěžku tyto změny zvyšují všestrannost a umožňují konjugaci barviv na cílové skupiny, jako jsou peptidy a protilátky [27].

Cyaniny jsou široce používány pro vývoj NIR sond, včetně modifikace nanomateriálů, nebo vykazování multifunkčního chování, díky čemuž je cyanin důležitým fluoroforem pro *in vivo* zobrazování. Nejběžnější struktury pro cyaninové látky obsahují heptamethinový skelet. Molekulární struktura poskytuje cyaninovému činidlu mnoho výhod:

1) Dlouhá excitační (650 nm ~ 750 nm) a emisní (700 nm ~ 800 nm) vlnová délka, díky čemuž jsou cyaninové fluorofory vhodné pro proniknutí do tkáně během experimentů *in vivo*. Kromě toho může modifikace cyaninu vést k posunu emise do oblasti NIR-II. Optické vlastnosti cyaninových barviv jako takové činí z fluoroforu vynikající volbu při navrhování sond.

2) Cyaninová struktura obsahuje 6 míst, která jsou snadno modifikována pro vývoj přepínatelných fluorescenčních systémů, zacílení analytu, umožňujících variaci fyzikálních vlastností a usnadnění dodávání léčiva. Navíc se mohou cyaniny nacházet v symetrických či asymetrických strukturách.

3) Cyaniny vykazují vynikající vlastnosti, včetně vytváření tepla a singletového kyslíku za vhodných podmínek, lze je tedy použít pro fotodynamickou terapii (PDT) a fototermální terapii (PTT). S těmito mnoha strukturálními výhodami se cyanin používá k přípravě molekulárních činidel nebo kompozitních materiálů pro diagnostiku i léčbu *in vivo*, což usnadňuje jeho použití pro biologický a lékařský výzkum [28].

2.3.2.2 Fluorescenční proteiny

Další možností donorů a akceptorů jsou fluorescenční proteiny (FP), jako jsou Cayn FP, Green FP, Blue FP a Yellow FP. Fluorescence je obvykle způsobena aromatickými aminokyselinami nebo vazbou prostetických skupin (NADH, FAD nebo pyridoxalfosfát). Nicméně několik tříd proteinů vykazují vnitřní fluorescenci při delších vlnových délkách. Mezi FP patří fykobiliproteiny, což jsou intenzivně fluoreskující proteiny z modrozelených a červených řas. Tyto proteiny jsou obsaženy ve fykobilizomech, které pohlcují světlo, jež není absorbováno chlorofylem. Fykobilizomy silně absorbují od 470 do 650 nm. Po odstranění z fykobilizomů se však fykobiliproteiny stávají vysoce fluoreskujícími, vykazují vysoké výtěžky a jsou až 20x jasnější než fluorescein [29]. Velikost všech FP, nehledě na typ nebo vliv genetické manipulace, se pohybuje v rozmezí 25 kDa. FP jsou mnohem větší ve srovnání s organickými fluorofory např. fluoresceinem nebo Texas Red, které mají průměrnou velikost kolem 1 kDa. Navzdory své poměrně velké velikosti jsou prospěšné pro mnoho aplikací, zejména pro zobrazování živých buněk a celých zvířat. FP jsou genetické značky a lze je tedy „zabudovat“ pomocí

transgenních přístupů. Protože se v buňce vytváří interakce protein-protein nebo dochází ke konformačním změnám jednotlivých proteinů v živých buňkách, není nutné značení exogenními látkami ani postupy fixace a permeabilizace, které jsou vyžadovány pro imunofluorescenci. Jedním z nejdůležitějších bodů týkajících se FP je, že celá proteinová struktura je nezbytná pro vývoj a udržování jeho fluorescence. Struktura FP sestává z polárních aminokyselin, které vážou molekuly vody a uzavírají se za vzniku imidazolového kruhu [30].

2.3.2.3 Lanthanoidové fluorofory

Lanthanoidové fluorofory je možné využívat jako barviva s dlouhou životností. Jedná se především o kationty lanthanoidů, jako je terbijum, cer, prazeodym a europium, které vykazují jednotlivá spektra atomů. Změna spektra nezávisí na polaritě a nedochází ke zhášení kyslíkem. Při excitaci lanthanoidů dochází nejdříve k navázání iontů na chelátory, které obsahují fluorofor. Poté je excitační energie přenesena na lanthanoidy, avšak tato energie musí být optimální, tak aby byl lanthanoid vyexcitován, tedy vybuzen do excitovaného stavu. Důvodem vzniku chelátorového komplexu je zvýšení kvantového výtěžku fluorescence přemísťováním molekul vody, což snižuje zhášení a umožňuje navázání lanthanoidu na jiné molekuly [30]. Lanthanoidy jsou v pigmentech přítomny ve dvou formách. V prvním případě lanthanoidy plní pouze funkci chromoforů. U druhého typu jsou lanthanoidy přítomny ve sloučeninách ve formě donoru tak i ve formě akceptoru. Do první skupiny se řadí široká skupina pyrochlorových sloučenin, zejména titaničitany lanthanoidů s pyrochlorovou strukturou $\text{Ln}_2\text{Ti}_2\text{O}_7$. Z dosud provedených studií, bylo zjištěno, že tyto sloučeniny umožňují žluté, oranžové a také fialové zbarvení. Rovněž studovanou skupinou sloučenin jsou také perovskity, odvozené od minerálu CaTiO_3 . Druhou skupinou, kde lanthanoidy jsou přítomny jak v donoru, tak i v akceptoru, jsou sloučeniny, jejichž podstatou je fluoritová mřížka CeO_2 a chromoforem jsou ionty prazeodymu. Pigment vzniká vysokoteplotní kalcinací roztoku oxidu ceru a praseodymu. Zbarvení závisí na množství praseodymu, které tvoří širokou paletu odstínů od růžově oranžového, přes cihlovou až po hnědou. Ionty různých lanthanoidů, zejména terbia (Tb), dysprosia (Dy), itria (Y) a europia (Eu), které působí jako chromofory, jsou nanášeny na fluoritovou mřížku, díky čemuž vykazují vysokou termickou stabilitu ($>1500\text{ }^\circ\text{C}$) a také chemickou odolnost. Jedná se o sloučeniny popsané vzorcem $\text{Ce}_{1-x}\text{Ln}_x\text{O}_2$. Nejpoužívanější jsou ionty terbia, které ve funkci chromoforu poskytují sytě oranžové odstíny i po aplikaci do keramických glazur či ionty Eu^{3+} poskytující modrý odstín [31].

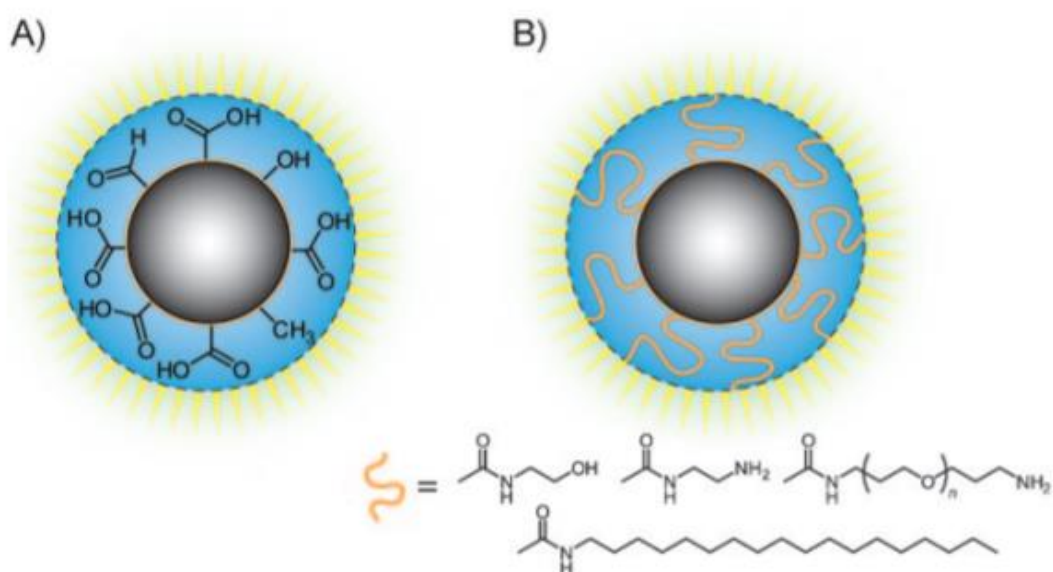
2.3.2.4 Kvantové a uhlíkové tečky

Mezi další donory a akceptory patří fluorescenční nanočástice jako jsou kvantové a uhlíkové tečky (CDs) [23].

2.3.2.4.1 Uhlíkové tečky

Uhlíkové tečky (CDs) jsou kvazisférické nanočástice s velikostí menší než 10nm. Obsahují na svém povrchu velké množství karboxylových skupin (Obrázek 7), což umožňuje rozpustnost ve vodě a interakce s organickými, anorganickými, polymerními či biologickými molekulami [32]. CDs mají jedinečné optické vlastnosti, například laditelné a na excitaci závislé vícebarevné emise. Tyto vlastnosti vyplývají z kvantového nebo konjugovaného omezení π -domény. Ve srovnání s organickými sondami či QDs typu CdSe vykazují lepší biokompabilitu,

propustnost buňkami a nízkou toxicitu. CDs se rovněž používají k detekci analytů, bio-zobrazování a transportu léků. Tyto aplikace jsou založeny na principu interakce mezi analyty a CDs, kdy dochází buď ke snížení fluorescence (zhašení), anebo ke zvýšení fluorescence. K přenosu energie mezi jednotlivými analyty může docházet pomocí metod FRET, Dexterova přenosu energie (DET) nebo Povrchového přenosu energie (SET). DET je jev založený na přenosu elektronů, nikoli přenosu fotonů, a proto vyžaduje shodu mezi redoxními potenciály donoru a akceptoru. SET je poměrně nový proces. Nejčastěji se pozoruje u kovových nanočástic (nanočástice stříbra či zlata) nebo u nanočástic zahrnujících kovový povrch a molekulární dipól [32].



Obrázek 7: Schéma C-teček A) po povrchové oxidační úpravě a B) po pasivaci povrchu.

Uhlíkové kvantové tečky mohou být syntetizovány různými způsoby, tj. elektrochemickou karbonizací, laserovou ablací, mikrovlnným zářením či hydro/solvotermální úpravou. Uhlíkové tečky můžeme dělit na několik typů v závislosti na charakteru a množství přítomného uhlíku (fullerény, nanodiamanty, uhlíkové nanotrubičky) [32]. Základem všech grafitových forem je grafen, který tvoří jednu vrstvu atomů uhlíku ve dvojrozměrné mřížce. Mřížka připomíná plástev s velkou plochou přístupnou z obou stran pro adsorpci molekul [34]. Oproti QDs, je obrovskou výhodou uhlíkových teček, že nejsou toxické, což umožňuje využití jako fluorescenčních značek v lidském organismu. CDs prokázaly účinnost v různých aplikacích, neboť vykazují fotoluminiscenci připomínající vlastnosti QDs a povrchově oxidovaných křemičitých nanokrystalů. Uhlíkové tečky byly objeveny náhodně při čištění uhlíkových nanotrubiček (SWCNTs) vyrobených metodami obloukového výboje. Při gelové elektroforéze došlo k rozdělení suspenze SWCNTs na tři různé skupiny nanomateriálů, které se jevíly rozdílnými fluorescenčními vlastnostmi v závislosti na velikosti částic [32].

Nevýhodou uhlíkových teček je, že vykazují špatnou stabilitu, pouze několik týdnů. Je tedy obtížné dlouhodobě kontrolovat vlastnosti CDs. Techniky používané k výrobě CDs, jako je karbonizace a pyrolýza, vedou ke složitým molekulárním strukturám, které může být obtížné

interpretovat pomocí charakterizačních technik, jako je nukleární magnetická rezonance (NMR) a IR spektroskopie. Různé zdroje uhlíku, struktury a povrchové ligandy používané při výrobě CDs také ovlivňují jejich chemické, elektrické a optické vlastnosti. Různé povrchové skupiny způsobují i odlišné reakce na hodnotu pH. Další nevýhodou je velká spotřeba energie a složitost provozu při syntéze uhlíkových teček [35].

Nanodiamanty

Kromě materiálů známých jako uhlíkové tečky neboli uhlíkové nanočástice, byly objeveny další nanomateriály na bázi uhlíku, které mají podobnou velikost i povrchovou funkčnost jako CDs. Jedná se o nanodiamanty (NDs). Struktura obsahuje přibližně 98 % uhlíku a zbylá procenta tvoří vodík, kyslík a dusík [32]. Jejich velikost a složení jim umožňuje fungovat jako terapeutické nosiče. ND byly také hodnoceny *in vivo* pro hlubší posouzení bezpečnosti nanočástic. Díky těmto vlastnostem jsou zvláště užitečné v oblasti léčby rakoviny, kdy prokázaly schopnost zprostředkovat dodávku léků, které jsou jinak nerozpustné ve vodě. Kromě využívání NDs jako nosičů léčiv se využívají pro genetickou terapii pro dodávání sloučenin, jako je plazmidová DNA a siRNA. NDs se využívají jako fluorescenční sondy, neboť vykazují vysokou fotostabilitu, nanodisperzi a biokompatibilitu [36].

Uhlíkové nanotrubičky

Uhlíkové nanotrubičky (CNTs) jsou pravidelné a symetrické struktury skládající se výhradně z kovalentně vázaných atomů uhlíku sestavených do válcového tvaru s nanometrickými rozměry. CNTs jsou buď uhlíkové nanotrubice s více stěnami (MWCNTs), nebo uhlíkové nanotrubice s jednou stěnou (SWCNTs), které se uplatňují v moderních nanotechnologiích. CNT jsou nepolární povahy s vysokými poměry délky/ průměru a jsou rozpustné pouze v několika organických rozpouštědlech, jako jsou dimethylformamid, dimethylacetamid a dimethylpyrrolidon [34]. SWCNTs se využívají při biologickém zobrazování a optoelektronice [37].

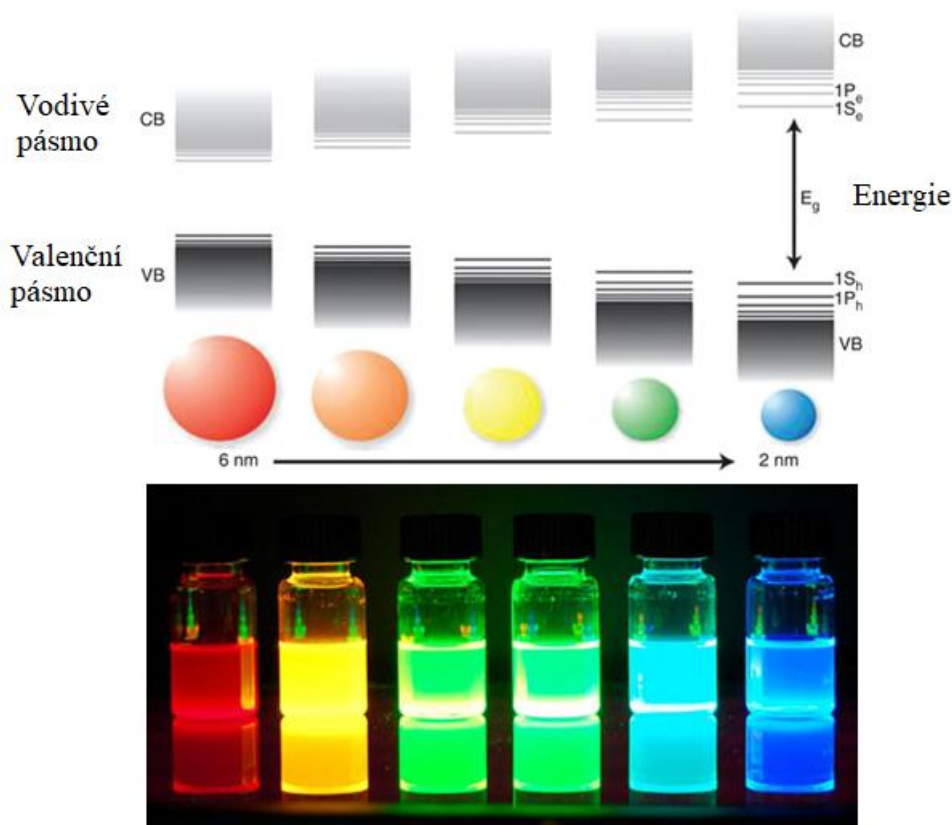
Fullereny

Fullereny (FLNs) jsou stabilní shluky skládající se z atomu uhlíku o hybridizaci typu sp^2 , které jsou uspořádány do trojrozměrných struktur s tvary uzavřených do pětiúhelníkových a šestihranných cyklu. FLNs mají mnohé výhody, díky tepelné stabilitě, hydrofobitě, obtížné oxidovatelnosti, schopnosti interakce akceptor-dárce a mají velký poměr povrch/objem [34]. Fullereny díky charakteristickým rysům, velikosti, sférickému tvaru, elektronové struktuře, vysoké symetrii a polarizovatelnosti působí jako akceptory při přenosu energie. K FRETu dochází nejčastěji s aromatickými látkami bohatými na elektrony (donor) nebo interakcemi prostřednictvím elektronového páru z nevázaného orbitalu heteroatomu.

Existuje výzkum, který studuje přenos energie z kumarinu C_{440} na fulleren C_{60} s různými koncentracemi a dobou jejich rozpadu. Bylo zjištěno, že se zvyšujícím se množstvím fullerenu dochází ke vzniku dimerů a trimeru, jejich životnost je krátkodobá, účinnost přenosu energie je maximální na hranici tvorby dimeru. Výzkumy jsou zaměřeny zejména na možný účinek přenosu fluorescenční rezonanční energie (FRET) C_{60} s kumarinem C_{440} [38].

2.3.2.5 Kvantové tečky

Kvantové tečky jsou částice nebo nanokrystaly polovodičového charakteru v rozmezí 2 až 10 nm. Velikost QDs se odvíjí od způsobu jejich syntézy, teploty, času přípravy a typu ligandu. Vykazují jedinečné vlastnosti, díky kterým mají využití v biologii a analytické chemii a uplatňují se jako fluorescenční sondy. Některé optické a chemické vlastnosti QDs jsou však zcela výjimečné, což umožňuje navrhovat nové analytické metody pro detekci iontů, bakterií, virů, nukleotidových sekvencí, proteinů a jiných analytů. Velkou roli hrají ve fluorescenční mikroskopii při zobrazování specificky zvýrazněných biologických objektů a struktur. Elektrony QDs jsou uzavřeny ve kvantových slupkách, protože poloměry těchto nanokrystalů jsou menší než Bohrov poloměr. Bohrov poloměr vyjadřuje nejpravděpodobnější vzdálenost elektronů od protonu v atomu vodíku. Obecně u QDs platí, že se zmenšující velikostí krystalu se zvyšuje rozdíl v energii mezi valenčními pásy. K excitaci QDs je za potřebí více energie, nicméně po návratu do základního stavu se uvolní ještě víc energie, což způsobuje posun vlnových délek vyzařovaného světla.



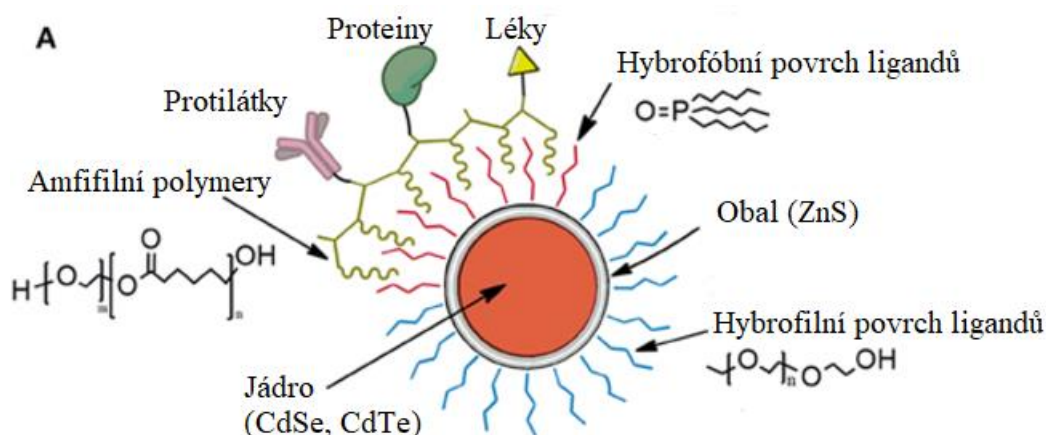
Obrázek 8: Rozložení energetických hladin v QDs [39]

Z toho důvodu mohou QDs stejného typu vyzařovat různou barvu, právě v závislosti na velikosti krystalů. QDs s velikostí okolo 2 nm vykazují modré záření (380 až 440 nm), zatímco částice o velikosti 6 nm vykazují červenou emisi o vlnové délce 605 až 630 nm [39, 40].

Na základě složení a struktury můžeme QDs rozdělit do tří skupin:

- QDs typu „core“
- „core-shell“
- legované QDs

„Core“ jsou kvantové tečky s jedním typem polovodiče, který tvoří jádro (core), například: CdTe, CdSe, CdS, ZnS (CdSe a CdS patří k nejvíce prozkoumaným nanočásticím) [39]. „Core/shell“ jsou kvantové tečky tvořené jádrem a obalem např.: CdTe/ZnS, CdSe/ZnS, CdTe/CdS/ZnS. Jádro je tvořeno polovodičem (např. CdTe), které určuje toxicitu QDs. Strukturu, morfologii a spektrální vlastnosti kvantových teček lze ovlivnit obalem, jenž může být tvořen několika vrstvami atomů jiného typu polovodiče (často ZnS kvůli nízké toxicitě a snadné syntéze). Veškeré změny struktury „core/shell“ ovlivňují emisní maximum struktury, a tím mění jeho optické vlastnosti. Obal ZnS může nejen zlepšit fluorescenční vlastnosti kvantových teček, snížit jejich toxicitu, ale také zabránit interakci mezi kovovým jádrem a médiem nebo tvorbě volných iontů [41]. Rovněž obal kvantových teček poskytuje funkční skupiny (volné -COOH a volné -NH₂ skupiny), které umožňují interakce například s molekulami léčiva. Povrchová modifikace je zprostředkována pomocí kovalentní a/nebo nekovalentní vazby a mění vlastnosti molekul léčiv. Dodání léčiv je zprostředkováno pasivním, usnadněným a aktivním transportem. Povrch může být potažen hydrofilními, hydrofobními a amfifilními ligandy, které mohou být dále spojeny s proteiny, léky, protilátkami a dalšími sloučeninami (Obrázek 9). Prostřednictvím vnějšího polovodičového materiálu dochází ke konjugaci, čímž poskytuje vazbu léčiva s cílenou molekulou. Díky struktuře „core/shell“ se mohou QDs využívat ve farmaceutické oblasti, pro zobrazování, transportu léčiv a diagnostice, neboť právě obal snižuje toxicitu QDs. První klinické studie technologie kvantových teček u lidí byly schváleny v roce 2011 a využívají se především u chemoterapeutik a cytotoxických léků pro lepší farmakologický účinek [42].



Obrázek 9: Povrchové interakce QDs [42]

Legované QDs jsou polovodičové nanomateriály s homogenním složením, u kterých může docházet ke změnám optických a elektronických vlastností pouze změnou struktury nebo složení bez změny velikosti. Tyto polovodičové kvantové tečky vytvořené legováním dvou polovodičů s různými energiemi zakázaného pásu vykazují zajímavé vlastnosti odlišné od vlastností jejich mateřských polovodičů. Legované QDs se od kvantových teček typu „core“

liší ve složení, neboť do legovanových QDs jsou včleněny další kompozity např. Zn do nanokrystalů CdSe ($\text{Zn}_x\text{Cd}_{1-x}\text{Se}$) Legované nanokrystaly tedy mají nové a další vlastnosti laditelné složením [43].

2.3.2.5.1 Aplikace QDs

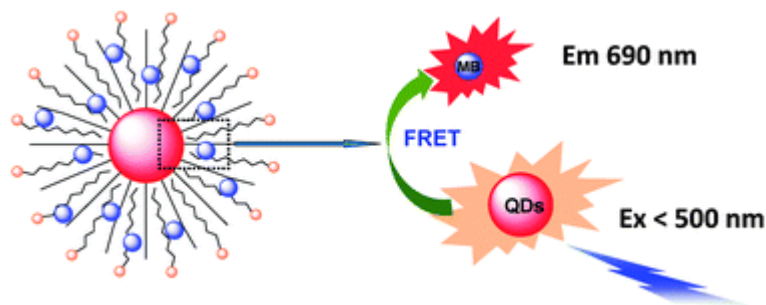
Nejúspěšnější aplikací koloidních QDs je jejich použití jako biologických značek. Díky struktuře jádro/obal mohou být QDs fotostabilnější než fluorescenční barviva. Vykazují také užší luminiscenci, širší a spojitější absorpční spektrum a mohou být naladěny na blízkou infračervenou oblast se stále vysokou kvantovou účinností. Ze všech těchto důvodů existuje mnoho možností pro modifikaci povrchu kvantových teček, což je činí specifickými pro zobrazování konkrétních biologických cílů.

Tradičnější oblastí použití polovodičů jsou elektrooptická zařízení, jako jsou světelné diody (LED), fotovoltaika a lasery. Koloidní povaha QDs otevírá cestu k levnému a rozsáhlému zpracování tenkých polovodičových filmů pomocí stříkacích nebo tiskových metod. Výzvou je spojit jejich dobré optické vlastnosti se stejně dobrými elektronickými vlastnostmi [44]. Emisní vlastnosti QDs, kterým se žádná třída organických chromoforů nevyrovná, vedou k vytvoření hybridních organických/anorganických LED diod obsahujících QDs. Zkoumání výkonu QD-LED odhalil i jejich potenciál stát se technologickou platformou pro vytváření světelných zářičů. QD-LED se využívají v obrazovkách a televizorech, kdy zásadní roli má modrá vrstva, která emituje světlo (slouží jako zdroj podsvícení obrazovek). Modré QDs umožňují vyzařovat méně škodlivého světla a zároveň zlepšit pokrytí pozorovacích úhlů a barev [45, 46].

Koloidní kvantové tečky mají také jedinečné vlastnosti v infračervené oblasti. Ve viditelném a UV spektrálním rozsahu mohou mít molekuly organického barviva téměř 100% účinnost fotoluminiscence, nicméně v blízké infračervené oblasti dosahují QDs mnohem vyšších intenzit fluorescence. Je to proto, že molekuly organického barviva mají vysokofrekvenční vibrace, které se silně spojují s elektronickými přechody. Anorganické kvantové tečky vyrobené z polovodičových materiálů s těžkými atomy a mezerami v infračerveném pásmu mají velmi nízké vibrační frekvence a některé, jako jsou PbSe, mohou být vynikajícími zářiči v blízké infračervené oblasti [47].

2.3.3 Aplikace FRET

V rámci biologických aplikací jsou QDs široce využívány s Försterovými sondami a senzory pro přenos rezonanční energie. Ačkoli QDs mohou fungovat jako akceptory pro vybrané donorové molekuly, jako jsou luminiscenční lanthanidové komplexy a bioluminiscenční nebo chemiluminiscenční substráty, fungují i jako donorové molekuly pro akceptory fluorescenčních barviv a proteinů (Obrázek 10). Výhodou QDs, jako donorů FRET, je flexibilita excitace QDs při vlnových délkách, které minimalizují přímé buzení akceptorového barviva a mají schopnost optimalizovat spektrální překrytí QDs mezi emisí a absorpcí akceptorového barviva bez zavedení problematického překryvu mezi jejich emisemi [48].



Obrázek 10: Schematické znázornění přenosu energie QD na molekulu barviva (MB) v NIR[48]

FRET se rovněž objevuje mezi CDs a zhášecem v základním stavu, kdy se emisní spektrum CDs překrývá s absorpčním spektrem zhášече. FRET se vyskytuje na velké vzdálenosti i bez přítomnosti fotonů díky interakcím dipól-dipól mezi CDs a zhášecem. Vzdálenost mezi CDs a zhášecem se pohybuje v rozmezí 10 Å– 100 Å. Při překrytí fluorescenčního spektra CDs a absorpčního spektra zhášече dochází ke snížení životnosti až zhasnutí fluorescence CDs, což odpovídá teorii FRET, kdy dochází k přenosu energie [33]. Metoda FRET má široké využití ve fluorescenční mikroskopii, zejména při studiu proteinových interakcí v buňkách. Díky fluorescenčním proteinům lze zmapovat a kvantifikovat interakce v živých buňkách a uchovat informace týkající se distribuce molekul [49].

Díky vzájemným interakcím proteinů dochází ke vzniku oligomerů. Oligomerní proteiny se skládají z více podjednotek (polypeptidové řetězce), které mohou být stejné (homo-oligomerní protein) nebo odlišné (hetero-oligomerní protein) a představují významnou část buněčných proteinů. Většina oligomerních proteinů a v podstatě všechny homo-oligomerní proteiny jsou symetrické. Důležitou roli při oligomeraci zastávají van der Waalovy síly, vodíkové i solné můstky a hydrofobní interakce [50]. Nadále se v této práci budu zabývat proteinem metallothioneinem, který dle dostupné literatury může tvořit dimery a/nebo vyšší oligomery.

3 METALLOTHIONEIN (MT)

Metallothioneiny (MT) jsou skupinou nízkomolekulárních intracelulárních proteinů (6–7 kDa) bohatých na cystein (30 %), tvořící typické sekvence: Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys, kdy X představuje jinou aminokyselinu než cystein, které jsou u člověka kódovány rodinou genů obsahujících alespoň 10 funkčních izoform [51, 52]. Cysteiny hrají klíčovou roli v homeostáze kovů, neboť přítomnost sulfhydrydových skupin vykazuje vysokou afinitu ke kovům, zejména zinku a mědi [53, 54]. Všechny organismy obsahují regulační mechanismy, které řídí homeostázu kovových iontů. Právě metallothionein z velké části zprostředkována přebytek iontů zinku v savčích buňkách, tím že chelatuje a izoluje přebytečný kov z buněčného prostředí. Syntéza metallothioneinu je indukována přebytkem zinku a je regulována prostřednictvím prvku metal-response element (MRE) transkripčním faktorem MTF-1 (MRE-binding transcription factor 1), který obsahuje šest Cys₂His₂ zinkových prstů. MTF-1 se podílí na reakcích oxidačního stresu, hypoxie a tvorbě aminokyselin. Rovněž je citlivý na kovy, kdy při nedostatku zinku dává impuls k regulaci transkripčního aktivátoru. Dochází tak k uvolnění zinku z C-terminálního konce proteinu MT [55].

MT je také typický pro buněčnou proliferaci, chrání buňky před cytotoxickými účinky reaktivních forem kyslíku, ionizujícím zářením, elektrofilními protirakovinovými léky, mutageny a těžkými kovy. Působí jako antioxidant, zásobník kovů pro syntézu enzymů, je citlivý na změny v redoxním stavu buněk a na oxidační místa v MT, a také umožňuje transport zinku z MT na místa s nízkou afinitou k jiným proteinům [53]. Zinek je důležitým stopovým prvkem, který je vyžadován více než 300 enzymy a transkripčními faktory. Studie ukázaly, že zvýšení zinku (prostřednictvím suplementace nebo geneticky podporující syntézu MT) v pankreatu zabraňuje rozvoji diabetu [56]. Nedávno bylo zjištěno, že MT při stárnutí přednostně váže zinek než měď, a proto je biologická dostupnost zinku nízká. Při zánětu a u Downova syndromu je MT přítomen ve vysokých koncentracích oproti nízkému počtu iontů zinku. Naopak při stárnutí dochází k snížení obsahu MT a uspokojivé biologické dostupnosti iontů zinku. Proto zinek vázaný na MT má zásadní význam pro imunokompetenci, což vede k snížení imunity a výskytu chorob souvisejících s věkem [53]. Již od 1957, kdy byl metallothionein (MT) objeven, byly známy jedinečné vlastnosti tohoto proteinu [57]. Expres a indukce těchto proteinů jsou rovněž spojovány s ochranou proti poškození DNA, oxidačním stresem a apoptózou. Navíc MT může potenciálně aktivovat určité transkripční faktory darováním zinku. Ačkoli MT je cytosolický protein, může být přechodně translokován do buněčného jádra během buněčné proliferace a diferenciace. Řada studií prokázala zvýšenou expresi MT v různých lidských nádorech prsu, tlustého střeva, ledvin, jater, plic, nosohltanu, vaječníků, prostaty, slinných žláz, varlat, štítné žlázy a močového měchýře. Expres MT tedy není univerzální pro všechny lidské nádory, ale může záviset na stavu diferenciace a proliferativním indexu nádorů spolu s dalšími tkáňovými faktory a genovými mutacemi. U určitých nádorů, jako je karcinom zárodečných buněk, expres MT úzce souvisí se stupněm nádoru a proliferací aktivitou. Expres MT tedy může být potenciálním prognostickým markerem pro určité nádory [52].

Metallothionein se dělí podle své primární struktury a organismu, z kterého pocházejí. Struktura MT je složená ze dvou polynukleárních domén. Domény jsou označovány jako alfa

(α) a beta (β). Doména α obsahuje o dva sulfhydrylové zbytky více než β doména, což způsobuje rozdílný počet vázajících se iontů (sedm atomů Cd nebo Zn a dvanáct atomů Cu). Afinita, stechiometrie a specifita různých kovů vázaných na MT jsou důležité vlastnosti charakterizující fyziologické vlastnosti tohoto proteinu. Odlišné struktury izoform MT mají různé funkce ve stejném organismu, tkáni nebo buňce. Kromě neobvyklé charakteristiky vázání kovů vykazují izoformy také neočekávaně velké rozdíly ve srovnání s tím, pokud je na MT navázán Zn, Cd či Cu [58, 59].

3.1 Izoformy MT

V lidském těle se metallothionein vyskytuje ve čtyřech hlavních izoformách- MT-1, MT-2, MT-3 a MT-4, které jsou kódovány geny umístěnými na chromozomu 16q13. Jednotlivé izoformy se liší délkou řetězce aminokyselin, molekulární hmotností či navázanými kovy. Z těchto čtyř izoform jsou MT-1 a MT-2 všudypřítomné v různých tkáních, zatímco MT-3 a MT-4 jsou minoritní izoformy s omezenou expresí ve specializovaných buňkách a tkáních, jako je mozek, reprodukční orgány a vrstvený dlaždicový epitel. MT-1 obsahuje osm známých funkčních (sub)izoform (MT-1A, MT-1B, MT-1E, MT-1F, MT-1G, MT-1H, MT-1M a MT-1X). Nejvíce rozšířenou formou MT v lidském organismu je MT-2. Izoformy MT-1 a MT-2 mají jedinečné struktury, díky kterým regulují atomy dvojmocných kovů (Zn a Cd), podílejí se na buněčné transkripci, detoxikují těžké kovy a posilují imunitní funkci. MT-3 byl nejprve purifikován a charakterizován jako růstový inhibiční faktor (GIF) v lidském mozku až později byl označen jako třetí izoforma MT. Hlavní funkcí izoformy MT-3 je programování smrti mozkových buněk. MT-4 byl objeven ve stratifikovaném dlaždicovém epitelu v kůži, jícnu a jazyku. Kromě rozdílů ve strukturách a ve výskytu jednotlivých izoform je i rozdíl v jejich reakcích. MT-1 a MT-2 jsou bazálně exprimovány a vysoce indukovány řadou stimulů včetně kovů, hormonů, cytokinů, růstových faktorů, oxidantů, stresu a ozáření, zatímco MT-3 a MT-4 jsou konstitutivně exprimovány navzdory změnám signálu *in vitro* nebo *in vivo* [60, 61]. Další rozdíly lze nalézt na úrovni exprese a lokalizace jednotlivých (sub)izoform MT, které se liší na intracelulární úrovni (cytosol, jádro, mitochondrie a lysozomy) a také v jednotlivých tkáních.

S rostoucími znalostmi vyvstávají otázky týkající se účelu vysokého počtu (sub)izoform a genů MT. I když byly nalezeny rozdíly mezi afinitou k zinku a dalším kovům mezi jednotlivými izoformami, stejně jako citlivost k antioxidantům, tyto rozdíly neospravedlňují tak vysoký počet izoform. Ve většině savčích genomů je přítomna jedna kopie MT-2, MT-3, MT-4 a více kopií MT-1. Konkrétně v lidském genomu je přítomno třináct genů MT-1, z nichž 5 jsou pseudogeny. Nové genové funkce vznikají z mutací, které mění sekvenci genového produktu nebo ovlivňují genovou expresi [62]. Při diagnostice a terapii nádorů je důležité o jakou konkrétní izoformu se jedná, neboť každá izoforma či (sub)izoforma je přítomna u jiného typu rakoviny. Například dle studií bylo dokázáno, že MT-2A reguluje progresi nádoru u rakoviny žaludku a kolorektálního karcinomu, snížená exprese MT-1E má za následek rakovinu prostaty, MT-1G se nachází u karcinomu štítné žlázy, rakoviny prostaty, jícnu a hepatocelulárního karcinomu. U karcinomu žaludku se prokázala snížená exprese MT-3 atd.[60].

3.2 Role MT u rakoviny

Jak již byly zmíněny mnohé funkce MT, jak související s jejich vysokou afinitou k těžkým kovům, tak s řízením buněčné homeostázy zinku/mědi (nezbytná pro buněčnou proliferaci a diferenciaci), působí také jako antioxidanty k ochraně buněk před volnými radikály a oxidačním stresem generovaným mutageny, antineoplastickými léky a zářením. MT se mohou také vázat na kadmium, rtuť, platinu nebo jiné podobné těžké kovy, aby chránily buňky a tkáně před toxicitou těžkých kovů. Navíc MT hrají ochrannou roli proti poškození DNA a apoptóze. Hromadné studie naznačují, že tyto funkce MT mají důležitou roli v karcinogenezi a léčbě rakoviny. MT se účastní procesu karcinogeneze a hrají kritickou roli v růstu nádoru, progresi, metastázování a rezistenci vůči lékům. Pro pochopení komplikovaného vztahu mezi rakovinou a MT je nutné poskytnout komplexní pohled na expresi a funkce izoform MT v různých nádorových tkáních.

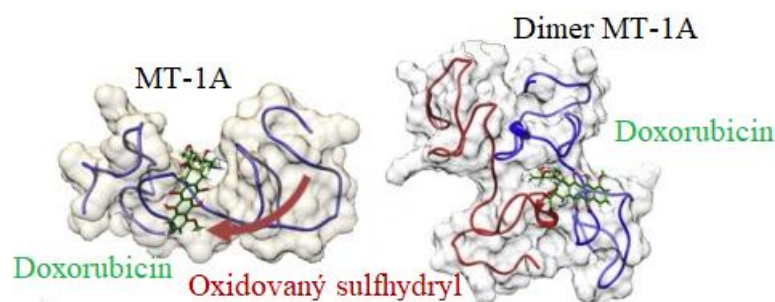
Mnohé studie prokázaly, že změny v expresi MT jsou spojeny s procesem karcinogeneze a progresu rakoviny. Karcinogeneze je proces tvorby nádorů přeměnou normálních buněk na buňky rakovinné. Tyto změny ať už na buněčné, genetické anebo epigenetické úrovni narušují rovnováhu mezi proliferací a apoptózou (např. mutacemi a epimutacemi) a přispívají tak k rozvoji rakoviny. Exprese MT však není univerzální u všech lidských zhoubných nádorů. Studie ukázaly, že zvýšená regulace exprese MT je typická pro rakovinu prsu, nosohltanu, vaječníků, močového měchýře a melanomu, zatímco u jiných nádorů, jako je hepatocelulární karcinom, rakovina prostaty a papilární karcinom štítné žlázy, je regulace exprese MT snížena. Diferenciální exprese MT závisí na typu a diferenciálním stavu nádorů, stejně jako na dalších environmentálních stimulech a/nebo genových mutacích. Nicméně lepší pochopení změn v expresi konkrétních izoform MT u různých typů nádorů může pomoci identifikovat specifické terapeutické cíle a zvrátit progresi nádoru. Například cytoplazmatický MT dosáhl maximální hladiny během přechodu buněčného cyklu G1/S, což je období, kdy se buňky připravují na syntézu DNA, čímž prokázaly fyziologickou roli MT v proliferaci nádorových buněk. Studie ukázaly, že zinek je nutný pro fázový přechod G1/S. MT může přenášet Zn^{2+} na transkripční faktory, jako je HIF-1 α a nádorové supresory (p53). Nadměrná exprese MT je konzistentně spojena s přítomností mutantního p53 u rakoviny prsu, antiapoptotickými účinky, diferenciací, proliferací, progresí a špatnou prognózou. Kromě toho může exprese MT také chránit rakovinné buňky před řadou proapoptotických stimulů, jako jsou chemoterapeutika, těžké kovy, oxidační stres a záření. Lze tedy předpokládat, že MT reguluje dodávku zinku pro proteiny a aktivitu transkripčních faktorů závislých na zinku k modulaci růstu a proliferace nádorových buněk [60, 63].

Dále bylo zjištěno, že snížená regulace exprese MT-2A v buňkách rakoviny prsu by mohla vyvolat zastavení buněčného cyklu ve fázi G1, aby se inhiboval růst rakovinných buněk. MT se také účastní buněčné proliferace. MT taky může působit jako donor zinku pro transkripční faktory. P53 je transkripční faktor vázající zinek, který může inhibovat progresi buněčného cyklu a indukovat apoptózu v reakci na poškození DNA. MT mohou odstraňovat zinkové ionty z molekul proteinu p53, což vede ke změnám v prostorové struktuře p53, což vede k jeho inaktivaci a tím k nekontrolované proliferaci buněk [60].

V poslední době, s popularitou terapeutik na bázi kovů, se staly předmětem zájmu MT detoxikační vlastnosti kovů. To se děje zejména u protirakovinných léčiv na bázi platiny, jako je cisplatina, u které se MT podílí na své známé lékové rezistenci. Pochopení vazebných vlastností MT s kovy proto může vést k návrhu účinnějších terapeutických přístupů a lepšímu pochopení poškození ledvin způsobeného kovy [57]. Platinové léky, včetně cisplatiny, karboplatiny a oxaliplatiny, jsou dobře známá chemoterapeutika. Používají se k léčbě mnoha lidských nádorových onemocnění, po celá desetiletí. Jsou také účinné proti různým typům rakoviny, včetně lymfomů a sarkomů. Jejich prostředek působení byl spojen se schopností zesíťovat reaktivní centrum purinových zbytků (N_7) a tím způsobit poškození DNA v rakovinných buňkách, blokovat buněčné dělení a následně indukovat apoptózu. Intracelulární hladina MT může hrát důležitou roli v modulaci buněčné odezvy na cílená antineoplastická činidla DNA. Předpokládá se, že protinádorová aktivita cisplatiny je způsobena její interakcí s chromozomální DNA. Stále není jisté, které izoformy MT jsou zvýšené v buňkách se získanou rezistencí k platinovým lékům. Avšak hladiny MT korelují s citlivostí lidských nádorů a buněčných linií na platinové léky. Rezistence na cisplatinu zůstává hlavní překážkou účinné léčby mnoha typů rakoviny. Buněčná inaktivace cisplatiny a následná sekvestrace mohou být zprostředkovány MT, které chelatují platinu a zabraňují interakci s DNA nádorových buněk [63].

Oxaliplatina a karboplatinové deriváty cisplatiny mají podobný mechanismus účinku, liší se však strukturou a toxicitou. Dříve bylo pozorováno, že intracelulární mechanismy, kterými se buňky stávají odolnými vůči karboplatině, zahrnují zvýšené množství léčiva detoxifikace thiolovými skupinami MT a zlepšená tolerance k poškození jádra, což vede k současnému snížení apoptózy a snížené akumulaci intracelulární karboplatiny. Dále je známo, že opakované podávání cisplatiny při léčbě lidských nádorů močového měchýře vyvolává letální a renální toxicitu. Chemoterapie s použitím cisplatiny se sloučeninami na bázi bismutu s tkáňově specifickými induktory MT, vykazují velmi nízkou nežádoucí toxicitu proti pokročilému karcinomu močového měchýře. Chang a spol. navíc prokázali, že citrát bismutitý Zn^{2+} potenciálně snižuje toxicitu vyvolanou cisplatinou [63].

Ačkoli platinové léky jsou velmi účinné při likvidaci rakovinných buněk, jejich použití je omezeno závažnými vedlejšími účinky při chemoterapii. Nežádoucí účinky jsou způsobeny především nespecifičností léčiva, protože postihuje zdravé buňky, a přitom ničí buňky nádorové. Tyto nežádoucí vedlejší účinky omezují dávkování platinových léků a také jejich terapeutickou aplikaci. Inhibici léků interakcí s MTs znázorňuje obrázek 11. Proto je důležité vyvinout činidla zacílená na nádor, která dokážou překonat související omezení [64].



Obrázek 11: Inhibice léků přímou interakcí s MT. Reaktivní meziproducty doxorubicinu (zelené) interagují s mono- a dimerem MT-1A prostřednictvím sulfhydrylové oxidace [64].

3.3 Oligomerizace MT

V úvodu kapitoly bylo uvedeno, že MT je z 30% tvořen cysteinem. Díky reaktivitě cysteinových postranních řetězců mohou MTs vytvářet dimery. Dimery mohou vznikat buď oxidativním (např. NO) nebo neoxidativním způsobem (přídavek přebytku Zn^{2+} a/nebo Cd^{2+}). Vznik dimeru neoxidativním způsobem byl potvrzen nízkoteplotní nukleární magnetickou rezonancí založenou na detekci intermolekulárních signálů vznikajících sdílením protonů na rozhraní dimeru, kde kovové ionty byly rozmístěny mezi dvěma molekulami MT. Existuje i řada studií, které charakterizovaly stabilní dimery MT–2 a MT–3 pomocí oxidace, ale přesný význam dimerizace MT oxidativním způsobem není jasný [65, 66]. Avšak byl pozorován rozdíl mezi plně metalovaným a částečně demetalovaným MT. Asymetrická distribuce iontů zinku navázaných na MT poukázala, že beta-domény MT ve větší míře tvoří meziřetězcové vazby ligandů než ionty ve stabilnější alfa-doméně a jsou tedy snadněji přenášeny mezi polypeptidy. Vzniklá disulfidová vazba přispívá k vyšší pravděpodobnosti srážky a díky uvolnění energie dochází k dimerizaci [67].

Oligomery mohou být jednotky složené ze stejných proteinových podjednotek (homooligomery), nebo z různých proteinů značených heterooligomery. Stabilita oligomeru závisí na koncentraci, pH, teplotě a počtu podjednotek. Aby oligomerizace mohla proběhnout, musí buňky obsahovat regulační faktory, které způsobují změny v struktuře a tím ovlivňují vlastnosti jednotlivých oligomerů. Regulační faktory mohou být inhibitory anebo naopak aktivátory vzniku oligomerů. Inhibovat oligomerizaci je možné za použití kompetitivních molekul, které se vážou přímo na oligomerizační místa proteinů, čímž zabraňují jejich vzájemné interakci. Ke stabilizaci oligomerních molekul jsou využívány ligandy, které tvoří vazby

(„mosty“) mezi podjednotkami oligomeru a tím ji upevňují, nebo se vážou na jednotlivé monomery a cestou alosterických strukturních změn proteinů zvyšují jejich afinitu [68]. Tvorba dimerů může být důležitá pro funkci metallothioneinů jako oxidoredukčních mediátorů v signálních drahách. Proto byly zkoumány mechanismy dimerizace, protože mohou pomoci pochopit roli oxidačního stresu nebo transportu toxických kovů při rozvoji řady onemocnění a poruch (např. rakoviny nebo neurologických onemocnění včetně Parkinsonovy choroby a amyotrofické laterální sklerózy [65, 68]. V této práci byla využita k ověření vzniku oligomeru MT kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (CE-LIF) a hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým hmotnostním analyzátozem (MALDI-TOF-MS).

4 ELEKTROFORETICKÉ METODY

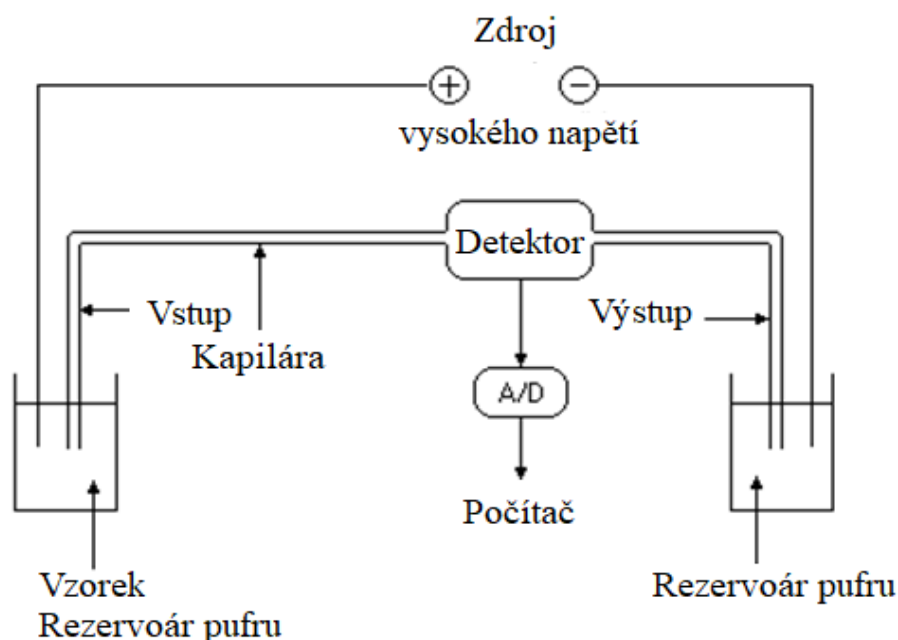
Elektroforetické metody jsou skupina analytických technik, které lze použít pro analýzu komplexních směsí a čištění malých množství materiálu. Za vhodných podmínek lze elektroforézu použít ke studiu téměř jakékoliv třídy molekul od jednoduchých anorganických solí po nukleové kyseliny, viry a dokonce i větší částice, agregáty a celé buňky. Jako analytický nástroj je elektroforéza nekomplikovaná a relativně rychlá technika. Používá se především pro analýzu a čištění velmi velkých molekul, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny, ale může být také aplikována na jednodušší molekuly včetně nabitých sacharidů, aminokyselin, peptidů, nukleotidů, organických kyselin a zásad, léků, pesticidů a anorganických iontů (tj. vše, co může nést náboj). Pro monitorování a analýzu elektroforetických separací byly vyvinuty vysoce citlivé detekční metody. Hlavními oblastmi použití jsou proto biologický a biochemický výzkum, farmakologie, soudní lékařství, klinické výzkumy, veterinární věda, molekulární biologie a kontrola potravin (včetně otázek autentizace potravin).

Elektroforéza znamená migraci nabitých molekul a částic pod vlivem elektrického pole. Popisuje pohyb nabitých molekul/částic v roztoku prostřednictvím elektrického pole napříč směsí, přičemž pohyb je produktem náboje na částici a použité intenzity pole. Za podmínek konstantní rychlosti je tato hnací síla vyvážena třecí silou (odpor viskózního prostředí) separačního média. Protože se molekuly v elektrickém poli pohybují rychlostí, která závisí na jejich náboji, tvaru a velikosti, byla v mnoha oblastech vyvinuta elektroforéza pro molekulární separace. Během tohoto procesu jsou látky obvykle ve vodném roztoku a nabitě molekuly migrují ve směru elektrody s opačným nábojem (tj. kationty ke katodě a anionty k anodě). Kvůli jejich měnícím se nábojům a hmotnostem budou různé molekuly a částice směsi migrovat různou rychlostí a následně budou rozděleny do jednotlivých frakcí. Elektroforetická pohyblivost je charakteristickým a rozhodujícím parametrem každé nabitě molekuly. Závisí na hodnotách pK (logaritmická míra disociační konstanty kyseliny) nabitých skupin a velikosti molekuly/částice. Elektroforetická mobilita je významně ovlivněna různými parametry (např. typem, koncentrací a hodnotou pH pufru, teplotou a intenzitou pole během elektroforetické separace a povahou nosného materiálu použitého pro elektroforézu). V závislosti na pH systému jsou aminokyseliny kladně nabitě, nemají žádný čistý náboj nebo jsou nabitě záporně. To je způsobeno skutečností, že karboxylové postranní skupiny aminokyselin jsou neutrální při nízkých hodnotách pH (pod izoelektrickým bodem, pI), ale jsou záporně nabitě při vysokých

hodnotách pH (nad pI sloučeniny). Biomolekuly, jako jsou peptidy a proteiny, které se skládají z mnoha aminokyselin, nesou čistý kladný náboj při pH pod jejich pI a záporný náboj nad hodnotami jejich pI. Při určité hodnotě pH (odpovídající jejich pI) nebudou mít tyto amfoterní molekuly žádný náboj a nebudou dále migrovat. U kompozitních proteinů (např. glyko-, nukleo- a fosfoproteinů) je čistý náboj také ovlivněn cukernými nebo nukleovými kyselinami a stupněm fosforylace. Elektroforetické separace se provádějí buď ve volném roztoku (jako v kapilárních a volně průtokových systémech) nebo v nosných matricích (např. agarózové nebo polyakrylamidové gely) [69].

4.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je analytická technika, která odděluje ionty na základě jejich elektroforetické mobility s použitím přiloženého napětí. Elektroforetická pohyblivost je závislá na náboji molekuly, viskozitě a poloměru atomu. Rychlost, kterou se částice pohybuje, je přímo úměrná použitému elektrickému poli, čím větší je intenzita pole, tím rychlejší je pohyblivost. Neutrální částice nejsou ovlivněny elektrickým polem, ale pohybují se s elektroosmotickým tokem. Kapilární elektroforéza se hojně využívá, neboť poskytuje rychlé výsledky a separaci s vysokým rozlišením [70]. Mezi primární prvky základního CE přístroje patří úzká křemenná kapilára, dvě lahvičky s pufrem a dvě elektrody připojené k vysokonapěťovému napájecímu zdroji. Základní schéma CE je na obrázku 12. CE systémy mohou obsahovat laserový excitační zdroj, fluorescenční detektor, autosampler pro držení zkumavek nebo tácu se vzorky a počítač pro řízení vstřikování a detekce vzorku. CE kapiláry jsou vyrobeny z oxidu křemičitého a jsou potaženy polyamidem, vyjma malé oblasti zvané detekční okno, díky čemuž jsou kapiláry odolnější a lze s nimi lépe manipulovat [71].



Obrázek 12: Základní schéma kapilární elektroforézy [72]

Mezi metody používané k zavedení vzorků do kapiláry patří proces známý jako elektrokinetické dávkování, kdy je konec kapiláry ponořen do kapalného vzorku po definované době a do vzorku se přivede napětí. Elektrokinetické dávkování vzorku spočívá

v aplikaci dávkovacího napětí po stanovenou dobu. Při elektrokinetickém dávkování závisí nadávkované množství na elektromigračním i elektroosmotickém toku. Pokud má vzorek nižší pohyblivost než elektrolyt, který se nachází v kapiláře, lze elektrokinetické dávkování využít k účinnému zakoncentrování iontů vzorku. Elektrokinetické dávkování vykazuje zpravidla nižší reprodukovatelnost. Nejpoužívanějším procesem je hydrodynamické zavádění vzorku. Proces spočívá ve vytvoření přetlaku na vstupu či podtlakem na výstupu separační kapiláry. Změnu tlaku lze uskutečnit pomocí stlačeného plynu, vývěvy nebo prostým zvýšením polohy nádoby se vzorkem oproti nádobce s elektrolytem na výstupu. Poblíž katodového konce kapiláry je umístěn detektor. Vzdálenost od anodového konce kapiláry k detektoru se nazývá efektivní délka kapiláry. Množství vzorku musí být udržováno nižší než 3-4 % objemu kapiláry, aby byla separační účinnost vysoká. Detekce zahrnuje UV-VIS nebo laserem indukovanou fluorescenci (LIF), elektrochemickou, vodivostní a hmotnostně spektrometrickou (MS) detekci. Ačkoli jsou MS a LIF preferovány kvůli vyšší selektivitě a citlivosti, spektrofotometrie je nejpoužívanějším detekčním systémem. Mohou být použity různé principy separace; umožňující separaci nabitých, neutrálních, polárních nebo hydrofobních analytů v závislosti na typu kapilární kolony a separačního pufru [73, 74].

4.1.1 Aplikace CE

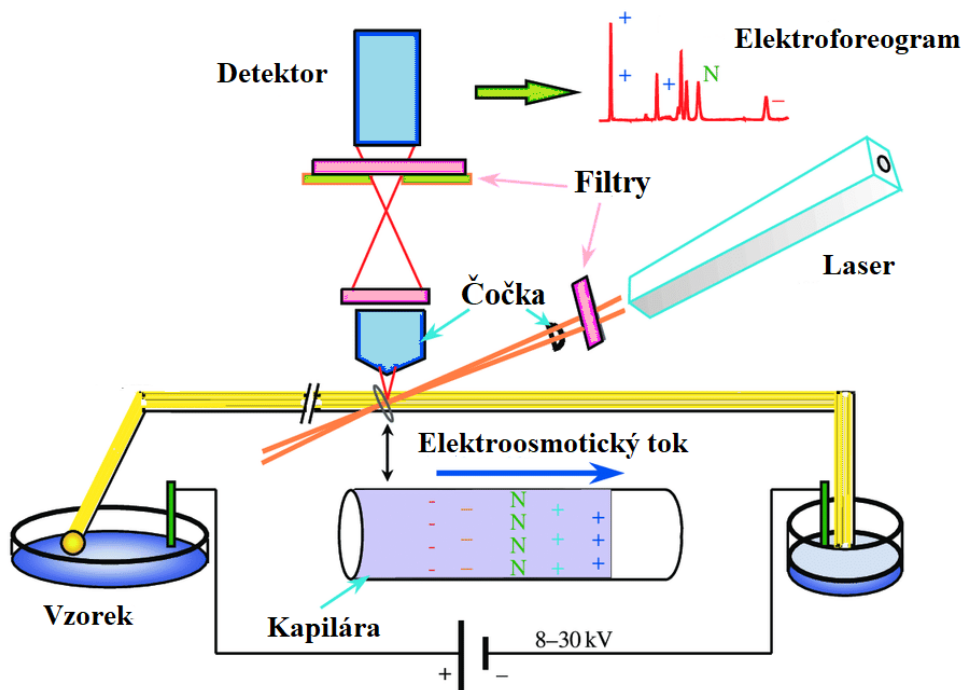
Elektroforéza je jednou z nejpobulárnějších metod separace, identifikace a čištění vzorků proteinů a nukleových kyselin. Počáteční techniky papírové elektroforézy, acetátem celulózy a škrobovým gelem byly později nahrazeny pokročilými chemikáliemi, jako je polyakrylamid a agaróza, což umožnilo vzniku metod jako je gelová elektroforéza, gradientová gelová elektroforéza, imuno elektroforéza, izoelektrická fokusace a dvourozměrná (2D) gelová elektroforéza [75]. CE se používá k separaci proteinů a peptidů. CE separace je založena na několika elektroforetických parametrech. Výsledky separace jsou založeny na základě čistoty vzorku a znalostí o daném proteinu. Znalost izoelektrického bodu proteinu umožňuje výběr vhodného pufru a fokusaci pH gradientu, který je generován uvnitř kapiláry během elektroforézy. Při detekci proteinů může nastat, že jsou proteiny adsorbovány povrchem kapiláry (silanolové skupiny SiO^-). Přídavkem iontového detergentu, jako je SDS (dodecylsírán sodný), získají proteiny záporný náboj a tím se zabrání adsorpci.

Kapilární elektroforéza rovněž slouží k rychlé diagnostice některých onemocnění na základě charakteristických profilů biologicky aktivních látek, sledování léčiv v biologických tekutinách, stanovení čistoty farmaceutických produktů a hledání biomarkerů různých onemocnění (např. mikroalbuminurie, Parkinsonova a Alzheimerova choroba, feochromocytom, neuroblastom, močové kameny). Kapilární elektroforéza je úspěšná i při identifikaci léků a markerů onemocnění, když je spojena s hmotnostní spektrometrickou detekcí. Nedávný výzkum vyvinul kapilární elektroforézu spojenou s detekcí hmotnostní spektrometrie pro použití při určování metabolických a biochemických profilů, proteomických profilů, profilů moči a elektroforetických a chromatografických profilů [76].

Mezi aplikace techniky CE patří i forenzní chemie a toxikologie. Výjimečná síla separace a rozlišení, rychlá doba analýzy, jednoduchost, všestrannost, nízké hmotnostní limity

detekce (LOD), minimální požadavky na vzorek a možnost přímého vstřikování vzorku bez složité předúpravy vzorku činí CE atraktivní metodologií pro forenzní analýzy [77].

V rámci této diplomové práce byla využita CE Beckman Capillary Electrophoresis PACE MDQ, jejichž schéma je znázorněno na obrázku 13.



Obrázek 13: Princip kapilární elektroforézy Beckman PACE MDQ [78]

V kapilární elektroforéze Beckman lze použít různé emisní a excitační filtry. Nejvíce se používají „Long pass“ filtry pro emisi a „Short pass“ pro excitaci, kdy filtry propouštějí vlnové délky nad (LP) nebo pod (SP) určitou vlnovou délku. Právě díky možnosti využití různých optických filtrů, je tato CE vhodná pro studium FRET

V rámci diplomové práce byly pomocí kapilární elektroforézy Beckman PACE MDQ studovány proteinové interakce MT s QDs a komerčními barvivými.

5 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRICKÉ METODY

Spektrometrické metody jsou založeny na interakci hmoty a záření. Hmotnostní spektrometrie interaguje ionty v plynné fázi podle jejich poměru hmotnosti a náboje s elektrickým či magnetickým polem. Výstupem je hmotnostní spektrum, kde osa x zobrazuje poměr m/z (hmotnost/náboj) a osa y intenzitu signálu.

Principiálně u spektrometrických metod dochází nejprve k ionizaci v iontovém zdroji, následuje transport iontů do analyzátoru, kde dochází k separaci. Nakonec ionty dorazí k detektoru, kde je intenzita iontového svazku převedena na elektricky měřitelnou veličinu. Spektrometrické metody se používají pro určení hmotnosti částic, či stanovení elementárního složení vzorku nebo molekuly, a pro objasnění chemické struktury molekul, jako jsou peptidy a jiné chemické sloučeniny. V posledních desetiletích jsou rozvíjeny techniky umožňující desorpci a ionizaci termolabilních vysokomolekulárních látek.

5.1 MALDI–TOF–MS

MALDI–TOF–MS neboli Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight. Obecným principem je produkce, separace a detekce iontů v plynné fázi. Tradičně se k přenosu molekul do plynné fáze používají metody tepelného odpařování. Klasickými metodami ionizace jsou elektronová ionizace (EI) a chemická ionizace (CI). Až do vynálezu „měkkých“ ionizačních technik, jako je hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI-MS) a MALDI-MS, nebyly hmotnostní spektrometrické nástroje široce zvažovány pro rutinní aplikace v biologických vědách. MALDI–TOF–MS je označována jako „měkká“ ionizační technika, protože způsobuje minimální nebo žádnou fragmentaci a umožňuje identifikaci molekulárních iontů analytů i ve složitých směsích biopolymerů. Princip metody spočívá v aplikaci vzorku do krystalické struktury malých organických sloučenin (matrice) a vložení na vodivou kovovou destičku. Krystaly jsou ozařovány nanosekundovým laserovým paprskem. Energie laseru způsobuje strukturální rozklad ozařovaného krystalu a vytváří „oblak“ částic, ze kterého jsou ionty extrahovány elektrickým polem. Mechanismus procesu desorpce není zcela objasněn. Nejlépe se dá popsat jako přeměna laserové energie na vibrační oscilaci molekul krystalu. To má za následek rozpad krystalu. Po zrychlení elektrickým polem se ionty pohybují cestou bez pole, a nakonec dopadnou na detektor (např. násobiče sekundárních elektronů nebo kanálové desky). Hmotnosti iontů (poměry hmotnosti k náboji [m/z]) se typicky vypočítávají měřením jejich TOF (detektor doby letu), který je delší pro větší molekuly než pro menší (za předpokladu, že jejich počáteční energie jsou identické) [79, 80]. MALDI–TOF–MS má široké využití ve výzkumu peptidů a proteinů a stále více ve výzkumu nukleových kyselin. Detekovatelné hmotnosti se pohybují od 400 Da do více než 350 kDa, což z ní činí velmi užitečnou techniku ve výzkumu proteomu. Při výzkumu peptidů je MALDI–TOF–MS velmi nápomocná při objasňování struktury, protože k fragmentaci dochází v peptidech přednostně na peptidových vazbách [81]. Využití metody MALDI–TOF–MS v této práci spočívalo v ověření vzniku dimeru, popř. trimerů a vyšších oligomerů metallothioneinu.

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Materiály

Borohydrid sodný	Sigma Aldrich (USA)	99,9 %
Octan kademnatý	Sigma Aldrich (USA)	99,9 %
Octan zinečnatý	Sigma Aldrich (USA)	99,0 %
Kyselina merkaptosukcinová (MSA)	Sigma Aldrich (USA)	99,0 %
Dodecylsulfát sodný	Sigma Aldrich (USA)	99,0 %
Dexahydrát tetraboritu sodného	Sigma Aldrich (USA)	99,5 %
Dihydrogen fosforečnan sodný	Sigma Aldrich (USA)	
Hydrogen fosforečnan sodný	Sigma Aldrich (USA)	
N-Hydroxysulfosuccimide sodium (Sulfo-NHS)	Sigma Aldrich (USA)	98%
Hydroxid sodný	Sigma Aldrich	
Kyselina chlorovodíková (HCl)	Sigma Aldrich (USA)	
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride EDC	Sigma Aldrich (USA)	
Amoniak (NH ₃)	Lach-Ner, s.r.o (CZ)	25%
MT-1F human	University of Wrocław	
MT- 2A human	University of Wrocław	
MT-3 human	University of Wrocław	
Cyanin 3.5	Sigma Aldrich (USA)	

6.2 Přístroje

- Microplate Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (BioTek, USA)
- Beckman Capillary Electrophoresis PACE MDQ
- MALDI-TOF/TOF hmotnostní spektrometr ultrafleXtreme

6.3 Metody

6.3.1 Příprava QDs pomocí UV záření

QDs byly připraveny smícháním jednotlivých komponentů, tj. 43μl 6mM octanu zinečnatého, 7μl 6mM octanu kademnatého, 25μl 0,1mM fosfátového pufru o pH 7 a 25 μl kyseliny merkaptosukciniové (MSA) o koncentraci 16mM. Roztoky byly přidávány v uvedeném pořadí, pipetovány do jamek mikrotitračních UV destiček. Po přípravě požadovaného množství QDs (počtu zaplněných jamek) byla mikrotitrační UV destička se vzorky ozářena v transiluminátoru při vlnové délce 254 nm po dobu 5 minut.

6.3.2 Přechištění QDs

Pro získání čistých QDs je nutné se zbavit nežádoucích interferentů. Postup přechištění QDs byl následující: do čisté, suché a zvážené mikrozkušavky byl napipetován roztok QDs, ke kterému byl přidán isopropanol ve dvojnásobném množství. Směs byla protřepávána při laboratorní teplotě po dobu 10 minut a následně zcentrifugována 10 minut při 9000 otáčkách. Ze vzniklého roztoku byl odebrán supernatant a zbylý pelet QDs byl vložen do termobloku při 30°C po dobu 12 hodin. Poté byla stanovena hmotnostní koncentrace jednotlivých QDs a vysušený pelet byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru.

6.3.3 Příprava konjugátu QDs s MT

Pro vznik konjugátu je nejdříve zapotřebí aktivovat příslušné skupiny (NH_2 a COOH), prostřednictvím karbodiimidového zero-lengthcross linkeru (EDC/sulfo-NHS). Linker je složen ze dvou roztoků. Prvním roztokem je 0,6 mM EDC, který byl připraven smícháním 6 μl 20 mM EDC a 194 μl MiliQ vody. Druhým roztokem je NHS o koncentraci 1,2 mM. Byl připraven naředěním z 50 mM a to v poměru 4,8 μl 50 mM NHS a 195,2 μl MiliQ vody. Z obou připravených roztoků bylo napipetováno 10 μl do roztoku přechištěných QDs, které byly rozpuštěny ve 300 μl fosfátového pufru, a směs byla třepána 20 minut při laboratorní teplotě. Poté byly k roztoku přidány různé isoformy MT (MT-1F, MT-2A a MT-3 o koncentracích 1 mg/ml) v objemu 150 μl a dalších 60 minut se směs protřepávala při laboratorní teplotě.

6.3.4 Příprava konjugátu QDs s komerčními barvivy

Komerční barvivo Cyanin 3,5 bylo rozpuštěno v 1 ml fosfátového pufru (PB) o pH 9. Do jednotlivých eppendorf zkumavek bylo napipetováno 245 μl roztoků barviv (koncentrace barviv nebyla výrobcem uvedena) a přidány různé isoformy MT (MT-1F, MT-2A a MT-3 o koncentracích 1 mg/ml) o objemu 250 μl . Konjugát vznikl po 20 minutách třepání při laboratorní teplotě (25°C).

6.3.5 Charakterizace QDs a Cy3,5

Pro ověření optimálních optických vlastností donoru (QDs) a akceptoru (Cy3,5) byl využit přístroj Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek, USA). 100 μl vzorku bylo analyzováno v 96-jamkové mikrotitrační destičce s plochým dnem CoStar (Corning, USA). Na přístroji byly zaznamenány absorpční a emisní spektra pro QDs (max. λ_{ex} = 350 nm, max. λ_{em} = 470 nm) a pro Cyanin 3,5 (max. λ_{ex} = 570 nm, max. λ_{em} = 590 nm). Rovněž byl experimentálně ověřen nutný spektrální překryv mezi emisním spektrem QDs a absorpčním spektrem Cy3,5. Všechna měření byla provedena při standardní laboratorní teplotě 25 °C.

6.3.6 Ověření Försterova přenosu energie mezi konjugáty

1) Fluorescenční spektrofotometrie

Analýza byla provedena na přístroji Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek, USA). 100 μl vzorku bylo analyzováno v 96-jamkové mikrotitrační destičce s plochým dnem CoStar (Corning, USA). Na přístroji byla zaznamenána emisní spektra pro komplex donoru (QDs-MT) s akceptorem (Cy3,5MT), při excitaci λ_{ex} = 350 nm, a emisi λ_{em} = 400-700nm. Všechna měření byla provedena při standardní laboratorní teplotě 25 °C.

2) CE-LIF

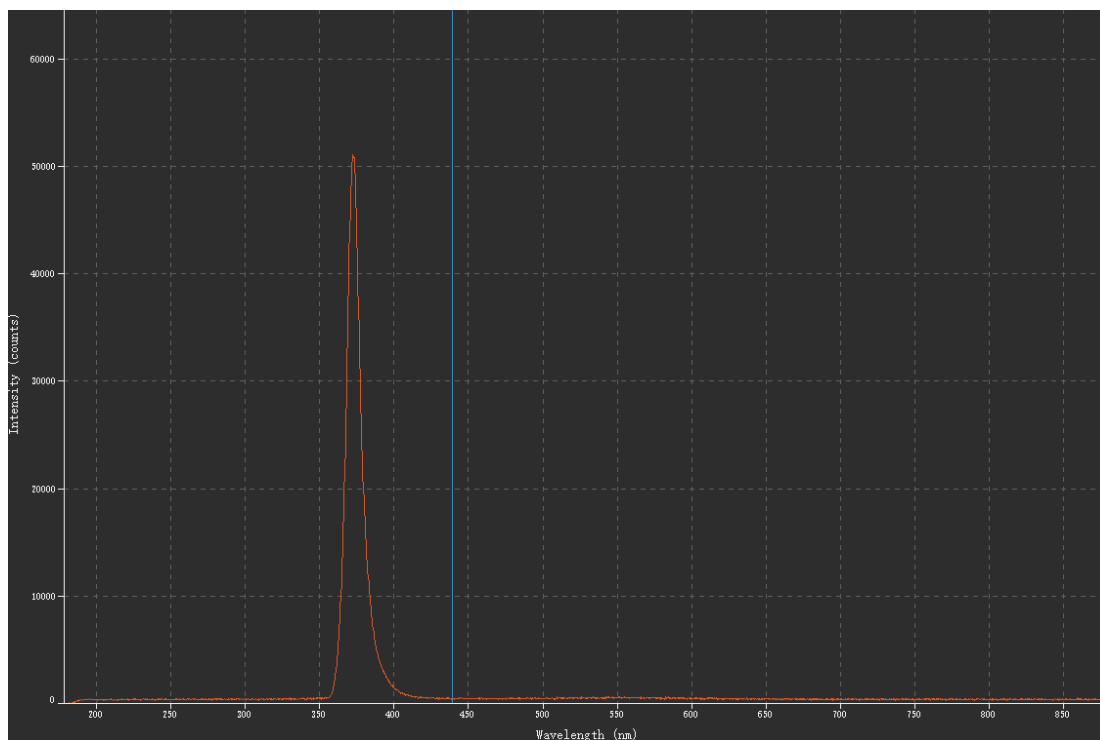
Na zařízení Beckman Capillary Electrophoresis PACE MDQ bylo ověřeno, zda mezi jednotlivými konjugáty dochází k přenosu energie neboli k FRET. Jak již výše v této práci bylo uvedeno, FRET funguje na principu přenosu energie mezi donorem a akceptorem. V tomto případě je konjugát MT s QDs považován za donor a konjugát MT s komerčními barvivý za akceptor. Aby mohlo dojít k přenosu energie, musí být QDs vyexcitovány vhodnou vlnovou délkou, což umožnila zkonstruovaná LED o vlnové délce 375 nm. Následně, aby bylo možné zaznamenat pouze signál akceptoru, nikoliv donoru, byl použit emisní LP filtr 550 nm. Podmínky CE analýzy jsou uvedeny v tabulce 2

Tabulka 1: Specifikace LED

vysoce účinná LED H2A1-H375-E	
Elektrický výkon	1 Watt
Vlnová délka	375 nm
Výstupní výkon	200 mW
Napětí	350 mA
Proud	3,7 V
Úhel pohledu ϕ	+/- 75°
velikost čipu	1x1 mm ²
Průměr	20 mm
Lambertova vysoká kupolová čočka	
Mechanicky kompatibilní s mnoha kolimačními čočkami	

Tabulka 2: Podmínky CE

Kapilára	Délka 48 cm Efektivní délka 37,5 cm
Proplach	120 s BGE 20 psi (20mM borátový pufr o pH 9)
Dávkování	1psi 4 s
Napětí	20 kV



Obrázek 14: Závislost výstupního výkonu LED na vlnové délce

6.3.7 Interakce proteinů s kadmíem

Ke konjugátu MT-1F s QDs (výsledná koncentrace MT-1F 0.33 mg/ml a QDs 0,77 mg/ml) a ke konjugátu MT-1F s Cy3,5 (výsledná koncentrace MT-1F 0.5 mg/ml) bylo přidáno 0,05 mM Cd^{2+} a následně byl vzorek ponechán po dobu 30 dní při teplotě 4 °C. Následně bylo provedeno ověření FRET interakce na zařízení Beckman Capillary Electrophoresis PACE MDQ.

6.3.8 Interakce proteinů s cytostatiky

Ke konjugátu MT-3 s QDs (výsledná koncentrace MT-3 0.33 mg/ml a QDs 0,53 mg/ml) a konjugátu MT-3 s Cy3,5 (koncentrace MT-3 0.5 mg/ml) byl přidán 0.015 mg/ml roztok cisplatinu a následně byl vzorek třepán po dobu 2 hodin při pokojové teplotě 25 °C. Následně bylo provedeno ověření FRET interakce pomocí fluorescenční spektrofotometrie a CE-LIF.

6.3.9 Ověření dimerizace/oligomerizace MTs pomocí MALDI-TOF-MS

MT-1F(1 μl , 0.1 mg/ml) a MT-1F s Cd^{2+} (0.12 mg/ml) byly měřeny bezprostředně po přípravě a navíc vzorek MT-1F s Cd^{2+} byl změřen po týdenní a měsíční inkubaci při 4 °C. Vzorky byly pipetovány na MALDI destičku z nerezové oceli za pomoci matrice (Bruker Daltonik GmbH, Brémy, Německo). Po vysušení při laboratorní teplotě byl ke každému vzorku přidán 1 μl roztoku matrice (10 mg kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové v 1 ml 3:7 acetonitril/voda a 0,1% kyselina trifluoroctová) a destička byla ponechána k zaschnutí při laboratorní teplotě 25 °C. Tvorba dimeru MT-1F byla dále potvrzena analýzou MALDI TOF-MS za použití přístroje ultrafleXtreme (Bruker Daltonik GmbH, Brémy, Německo) vybaveného laserem (pracujícím při vlnové délce 355 nm, s napětím 25 kV, maximální energie 43,2 μJ a opakovací frekvence 2000 Hz) v lineárním režimu kladných iontů. Externí kalibrace pomocí proteinové standardní směsi I a II (Bruker Daltonik, Brémy, Německo) byla aplikována v rozsahu m/z 1–30 kDa. Pro každý vzorek bylo sečteno celkem 3000 spekter pomocí rastrového vzoru Random Walka data byla následně analyzována pomocí softwaru Flex Analysis.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

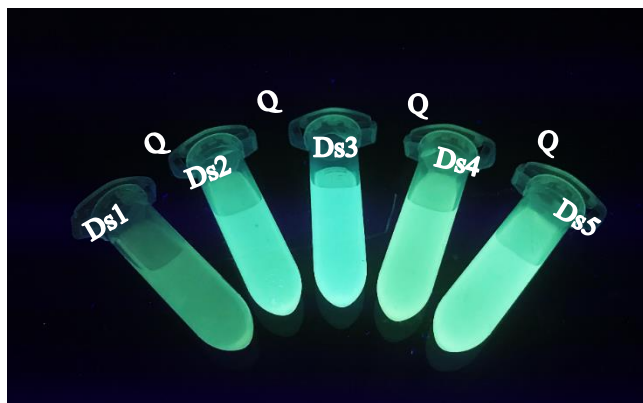
Detekce protein-proteinové interakce dovoluje hlouběji prozkoumat strukturu a řadu variabilních a komplexních dějů, převážně v rámci biologických funkcí. Signály jsou přenášeny pomocí proteinových interakcí signálních molekul. Přínos nových informací o těchto interakcích zlepši pochopení různých onemocnění a může být základem pro nové terapeutické přístupy. Velké množství proteinů je zapojeno v procesech buněčné signalizace a transdukce signálu z vnějšího prostředí do nitra buňky. Od objevení primární struktury zeleného fluorescenčního proteinu se v posledních 20. letech fluorescenční proteiny a jejich různorodé aplikace stávají nepostradatelnými při zkoumání a popisování molekulárních buněčných dějů, buněčné fyziologie, buněčných interakcí a signalizací v živých buňkách a malých organizmech [82].

Fluorescenční značky je možné konjugovat nebo fúzovat s nejrůznějšími molekulami a je tak možné studovat různé typy vazeb – od protein-proteinových interakcí (antigen-protilátka, ligand-receptor), přes DNA nebo RNA hybridizaci až po vazby proteinu s DNA anebo RNA. Mezi fluorescenční sondy se řadí i QDs, které emitují při různých vlnových délkách, a tím lze stanovit několik analytů v jednom kroku. QDs se rovněž používají jako sondy pro FRET, kdy dochází k přenosu energie mezi excitovaným donorem na akceptor. Tím že QDs emitují i při nízkých vlnových délkách mohou předat energii organickým barvivům, která jsou excitována při vyšších vlnových délkách. Díky protein-proteinové interakci metallothioneinů a snadné biokonjugaci s fluorescenčními značkami, je možné pozorovat fyzikální jev FRET. Tento rezonanční přenos energie byl už mnohokrát studován v rámci proteinů, a dokonce byl také již využit ke zkoumání struktury MTs a jeho funkci v živých buňkách pomocí fluorescenčních sond zvaných Alexa, inkorporovaných do struktury MTs [23, 83, 84].

Navíc konjugáty MTs s fluorofory umožňují pochopit oxidativní dimerizace MTs. Oligomerizace MTs je obecně dosud velmi málo prostudovaný jev, který ale hraje zásadní roli v rámci biologických dějů. Jelikož MTs ovlivňují mnoho biologických pochodů, širší studium oligomerizace tohoto proteinu by napomohla k pochopení dalších úloh metallothioneinu v organismech. Ať už se jedná o neurodegenerativní onemocnění nebo lékové resistance při léčbě nádorových onemocnění. Právě v tomto kontextu je nutné zmínit, že existují studie, které dokazují, že dochází ke zvýšené expresi MT v oblasti rakovinných buněk nádorů [85]. Díky velkému počtu sulfhydrylových skupin v proteinu, je MT atraktivním místem pro reakce různých kovových iontů a elektrofilních činidel, včetně komplexů platiny, která je součástí cytostatik. Metallothioneiny hrají významnou roli při transportu a při detoxikaci organismu vystaveného působení těžkých kovů v toxických koncentracích. Míra exprese metallothioneinů a jejich schopnost vázat kovy může být mimo jiné narušena změnami na úrovni DNA. Nadměrná exprese MT může vést k ochraně buněk a být cenným markerem pro včasnou diagnostiku nádorových onemocnění [82].

7.1 Příprava QDs pomocí UV záření

QDs byly připraveny smícháním jednotlivých komponentů uvedených v kapitole 6.3.1. Bylo připraveno pět roztoků QDs o různých koncentracích. Jednotlivé koncentrace jsou uvedeny v Tabulka 3. Po ozáření v transiluminátoru, bylo zřejmé (Obrázek 15), že připravené QDs emitují modrozelené záření a koncentrace QDs má vliv na intenzitu záření.

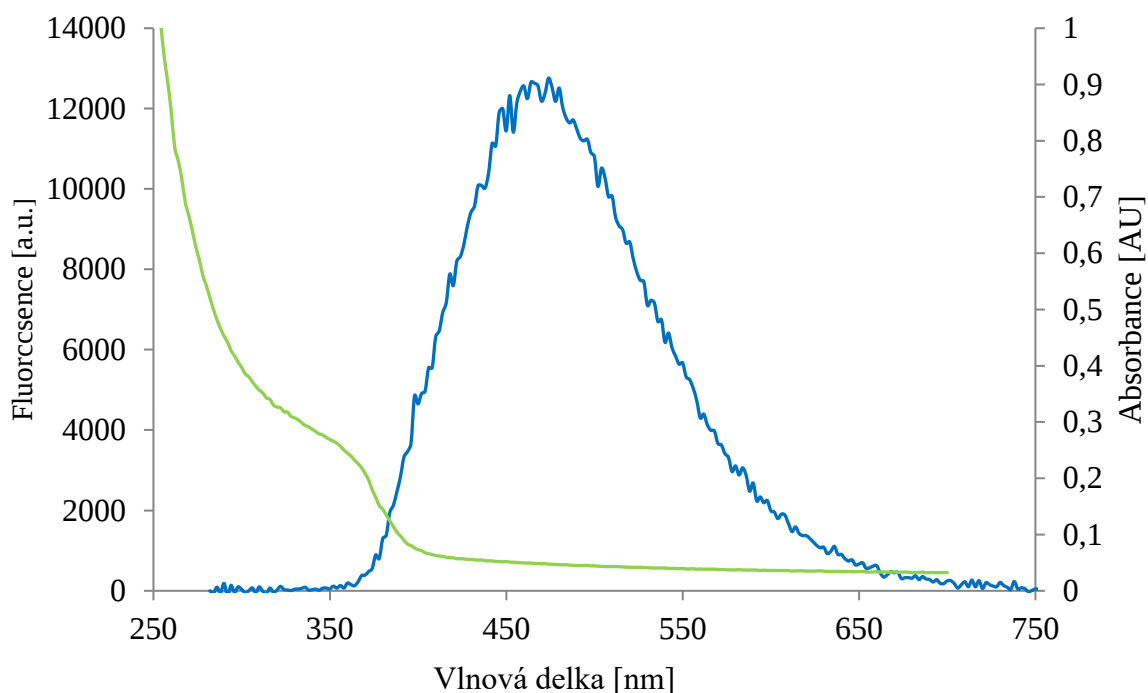


Obrázek 15: ZnCd QDs o různé koncentraci

Tabulka 3: Koncentrace QDs

Kvantové tečky	Koncentrace [mg/ml]
QDs 1	0,2
QDs 2	0,42
QDs 3	0,79
QDs 4	0,94
QDs 5	1,15

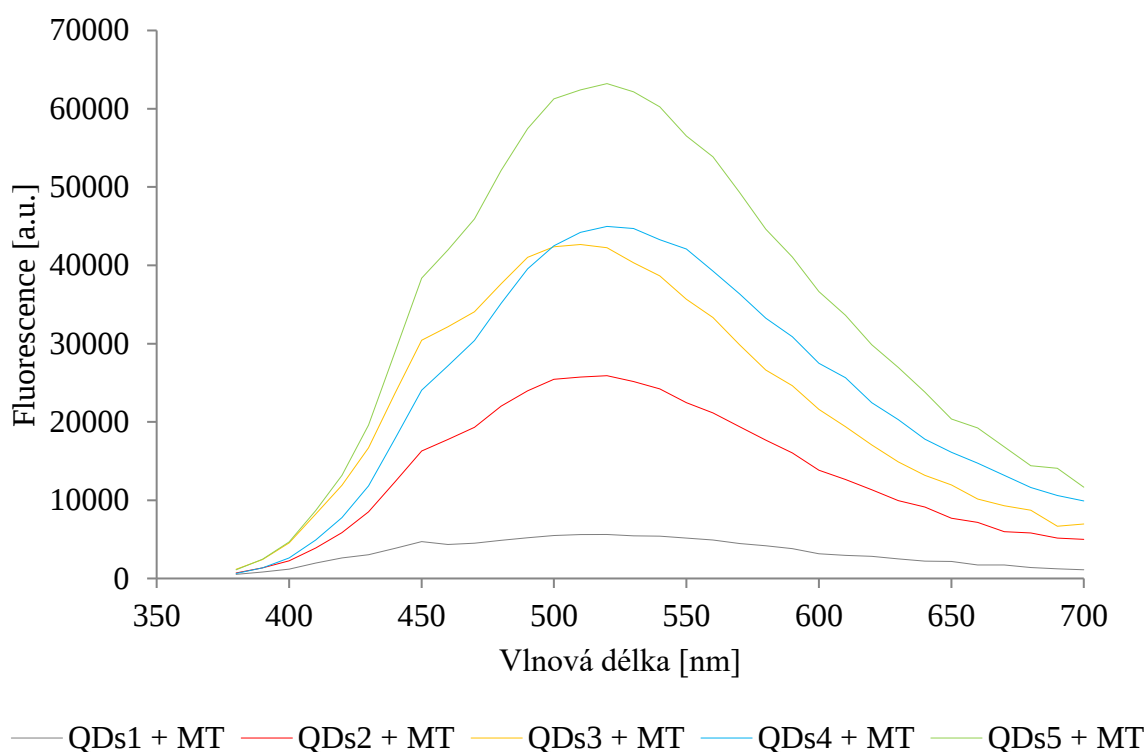
Pomocí multifunkčního modulárního readeru bylo změřeno absorpční a emisní spektrum QDs (Obrázek 16). Z grafu je patrné, že QDs absorbují při vlnové délce 340-380nm. Emisní maximum QDs bylo při 470 nm.



Obrázek 16: Spektrofotometrické stanovení absorpčního a emisního spektra ZnCd QD

7.2 Příprava konjugátu MT a QDs

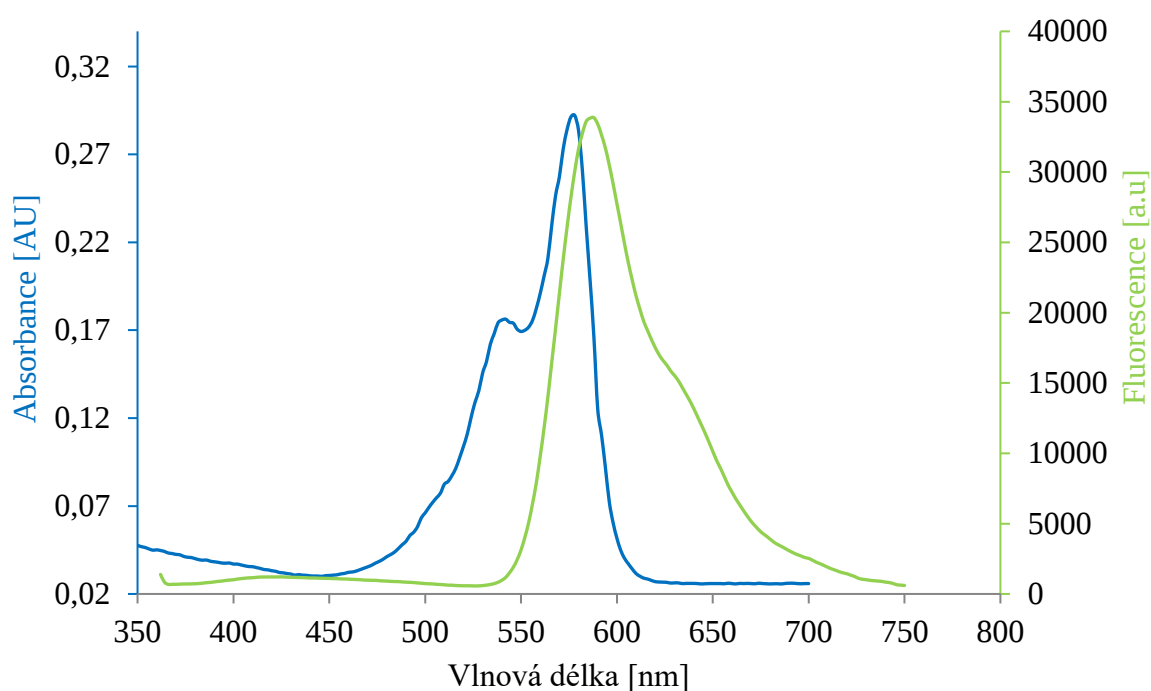
Vznik konjugátu spočívá ve využití karbodiimidového zero-lengthcross linkeru (EDC/sulfo-NHS). Karbodiimidy se používají při vytváření konjugátů ke zprostředkování vazeb mezi dvěma molekulami proteinu, mezi peptidem a proteinem, mezi oligonukleotidem a proteinem, mezi biomolekulou a povrchem nebo částicí nebo jakoukoli kombinací. EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimidhydrochlorid) je nejpoužívanější karbodiimid pro konjugaci biologických látek obsahujících karboxyláty a aminy. EDC v kombinaci se sulfo-NHS (N-hydroxysulfosukcinimid), který aktivuje karboxylové kyseliny, tvoří stabilní esterový meziprodukt, jenž umožňuje účinnou konjugaci s primárními aminy při fyziologickém pH [86]. Dochází tedy k aktivaci karboxylových skupin obsažených v QDs a aminových skupin obsažených v MT. Z dosavadních studií vyplývá, že interakce kvantových teček a metallothioneinů jsou závislé především na velikosti zvolených QDs. Rovněž je pravděpodobné, že tvorba komplexů mezi QDs a MTs vychází především ze strukturálních a konformačních změn MTs, které jsou následně zodpovědné za stabilizaci a tvorbu komplexu [87]. Z obrázku 17 je patrné, že QDs s nejvyšší koncentrací vykazovaly i nejvyšší intenzitu fluorescence.



Obrázek 17: Emisní spektrum Zn Cd QDs a různých koncentracích

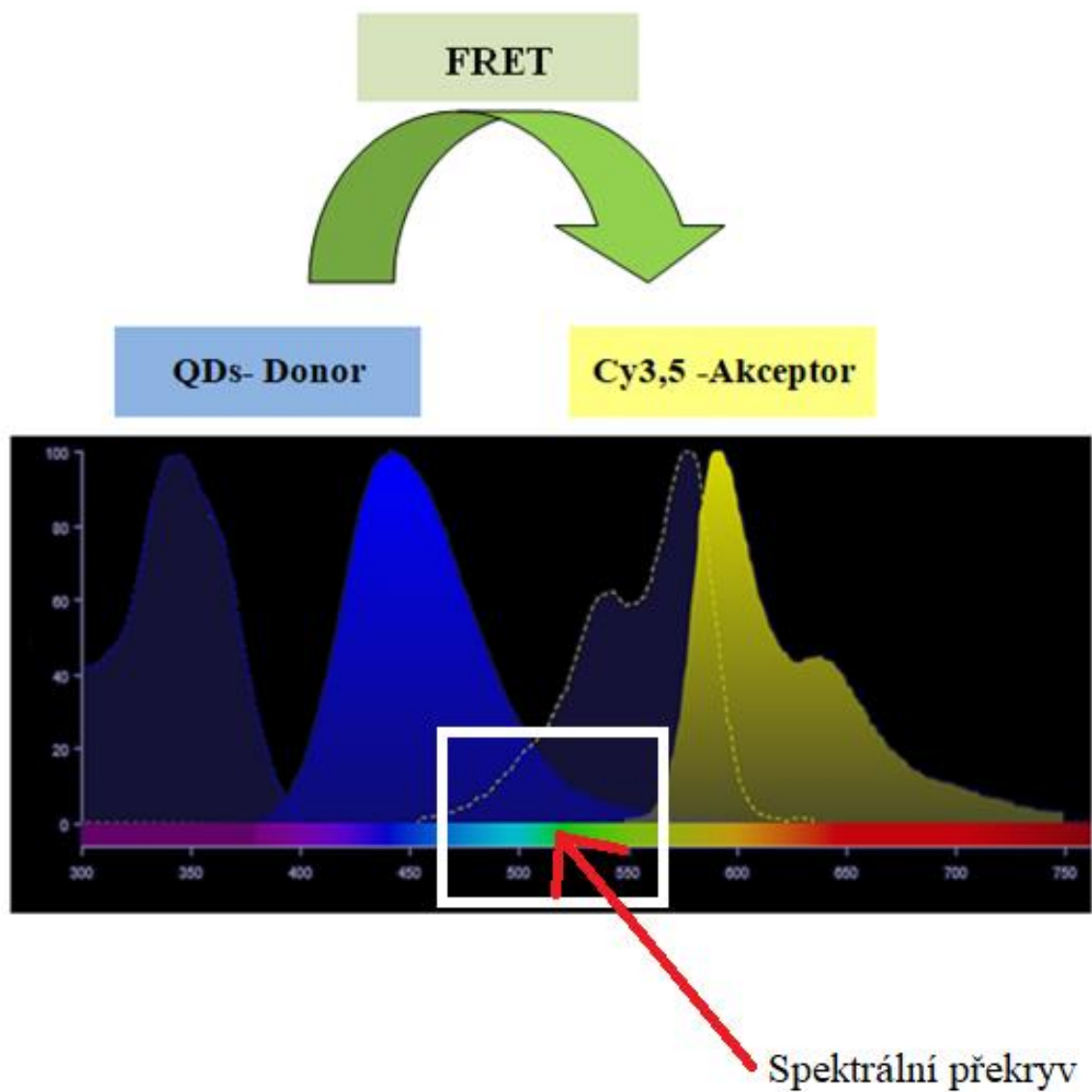
7.3 Příprava konjugátu MT s komerčními barvivy

Ke konjugaci s MT bylo jako komerční barvivo vybráno Cyanin 3,5. Jedná se o syntetické barvivo, které je obvykle tvořeno dusíkem a částí konjugovaného řetězce heterocyklického systému, jako je imidazol, pyridin, pyrrol, chinolin a thiazol. Cyaninová barviva se používají ke značení proteinů, protilátek, peptidů, sond nukleových kyselin a jakéhokoli druhu dalších biomolekul, které se používají v různých technikách detekce fluorescence. Excitační maximum cyaninu 3,5 je při vlnové délce 570 nm a emisní maximum při 590 nm, což dokazují získaná spektra (Obrázek 18).



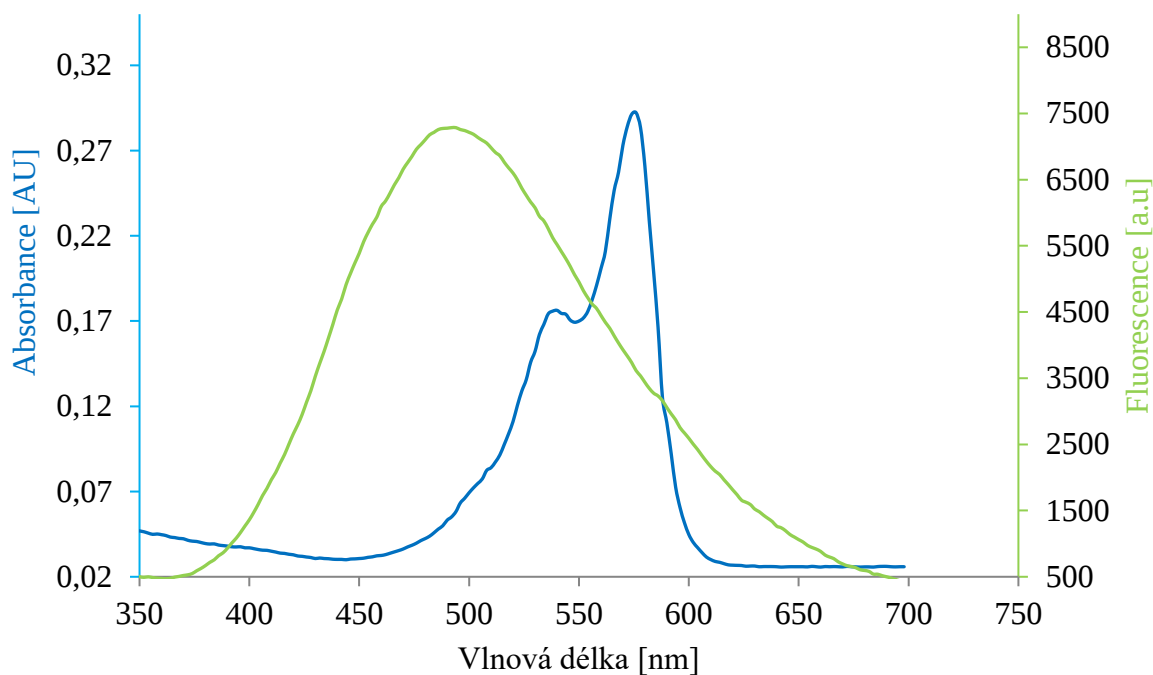
Obrázek 18: Spektrofotometrické stanovení absorpčního a emisního spektra Cy3,5

Jak již dříve bylo zmíněno, FRET potřebuje vhodnou kombinaci akceptoru a donoru. Nejžádanější jsou fluorescenční molekuly s největším Stokesovým posunem, protože zřetelně oddělují excitační a emisní vlnové délky, což splňují spektra cyaninů tak i QDs. Účinnost FRET závisí převážně na spektrálním překryvu emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru a vzdáleností mezi donorem a akceptorem (<10 nm). Z absorpčních a emisních spekter vyplývá, že se může jednat o vhodnou kombinaci donoru (QDs) a akceptoru (cyaniny). Teoretický spektrální překryv emisního spektra QDs a absorpčního spektra cyaninu 3,5 znázorňuje obrázek 19.



Obrázek 19: Schéma spektrálního překryvu donoru (QDs) a akceptoru (Cy3,5)

Obrázek 20 naopak znázorňuje experimentálně potvrzený spektrální překryv mezi absorpčním spektrem akceptoru (Cy 3.5) a emisním spektrem donoru (QDs). Z grafu je patrné, že spektrální překryv je maximální.



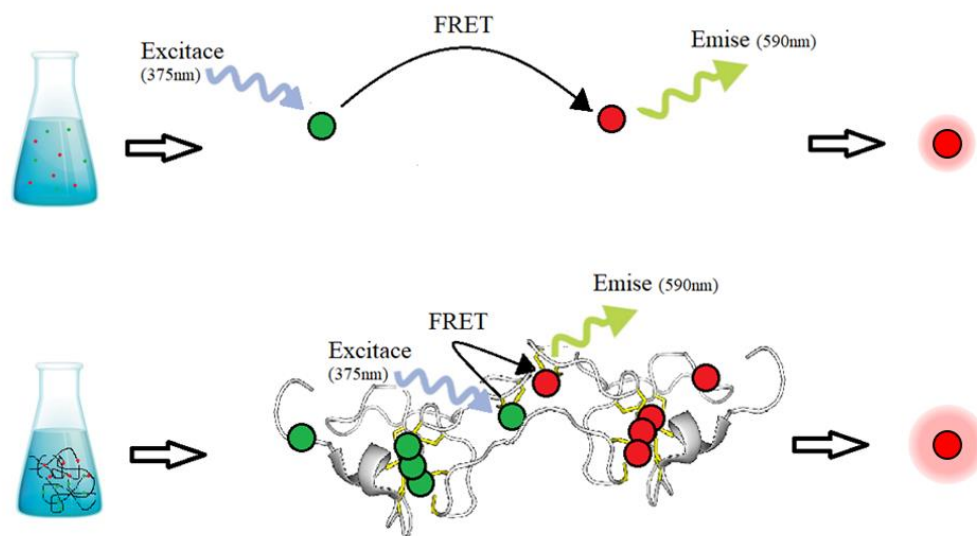
Obrázek 20: Emisní spektrum donoru (QDs) a absorpční spektrum akceptoru (Cy3,5)

7.4 Studium proteinových interakcí pomocí FRET

7.4.1 Fluorescenční spektrofotometrie

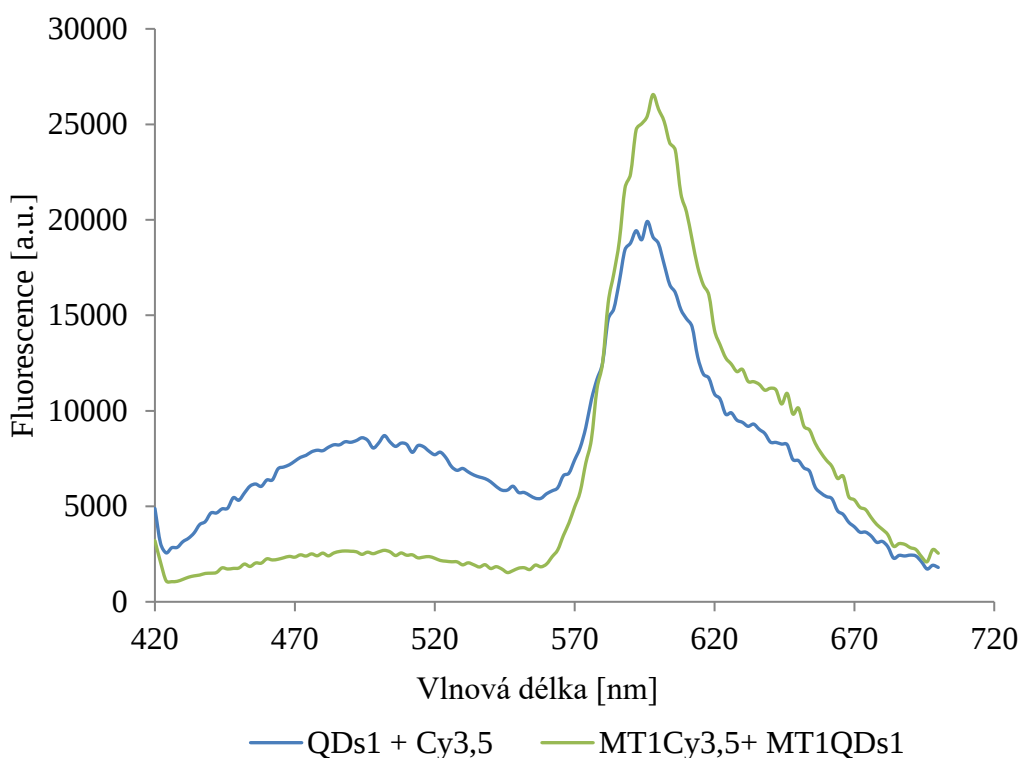
Pouze v případě, že mezi emisním spektrem QDs (donoru) a absorpčním spektrem Cy3,5 (akceptoru) je dostatečný spektrální překryv, dochází k účinnému přenosu energie z donoru na akceptor. Na základě předchozích experimentů bylo potvrzeno, že QDs s MT mohou být použity jako donor a Cy3,5 s MT jako akceptor. Další podmínkou je dostatečná blízkost fluorescenčních sond donoru a akceptoru. Pokud jsou QDs a Cy3,5 volně v roztocích, je pozorována nižší intenzita fluorescence, neboť částice libovolně migrují. V případě navázání QDs a Cy3,5 na MTs, dochází následně k interakci proteinů a díky tomu jsou molekuly QDs a Cy3,5 blíže u sebe. Lze tedy pozorovat vyšší signál intenzity fluorescence způsobené

přenosem energie mezi donorem a akceptorem. Schematické znázornění této situace představuje obrázek 21.



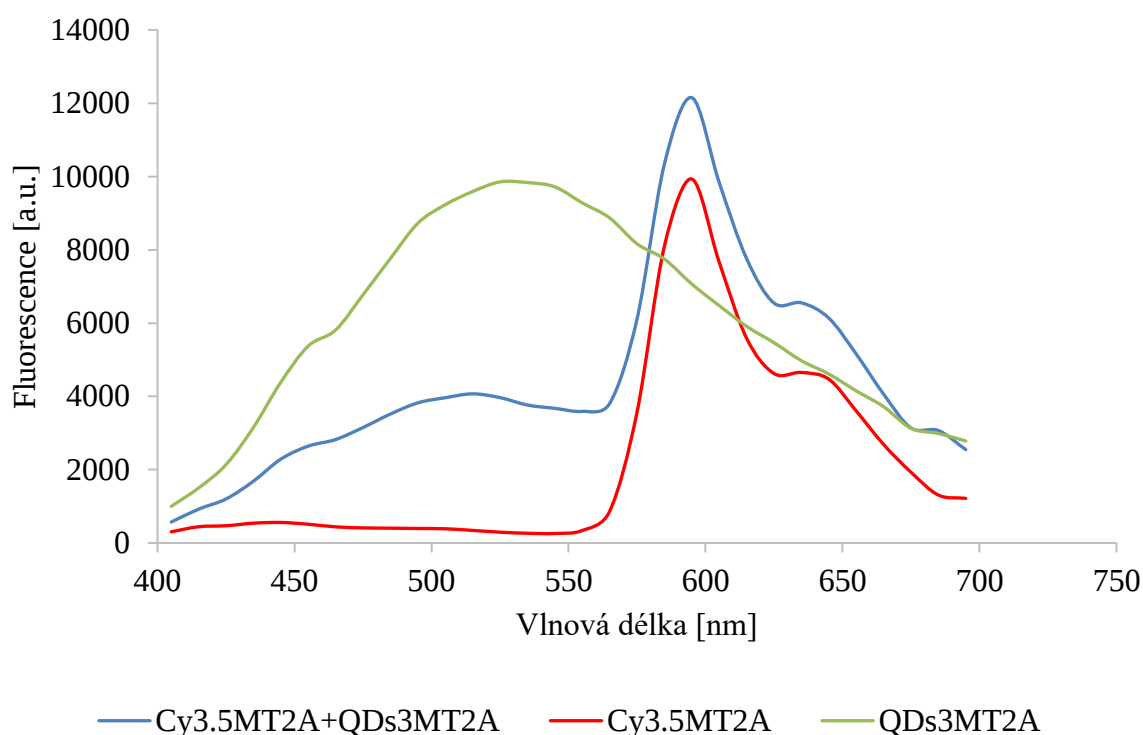
Obrázek 21: Schéma přenosu energie mezi donorem a akceptorem

Experimentální znázornění výše popsané situace je znázorněno na obrázku 21. V případě MT oligomerizace dojde tedy k FRET kvůli těsné blízkosti donorových a akceptorových fluoroforů. Na druhou stranu, pokud nedojde k oligomerizaci, vzdálenost fluoroforů je větší, než je požadováno pro FRET, a signál tak dosahuje nižších intenzit fluorescence. Na obrázku 22 je patrný rozdíl mezi konjugátem samotných QDs s Cy3,5 a konjugátem donoru (QDs-MT) a akceptoru (Cy3,5-MT). V případě konjugátů s metallothioneinem je pravděpodobný výše zmíněný mechanismus oligomerizace, který zvyšuje signál akceptoru při emisi 590 nm a naopak snižuje intenzitu fluorescence při emisi 470 nm, což je oblast emise donoru. Při smíchání QDs s Cy3,5 bez metallothioneinu nedochází k oligomerizaci proteinu a fluorofory nejsou proto tak v těsné blízkosti, protože v roztoku libovolně migrují.



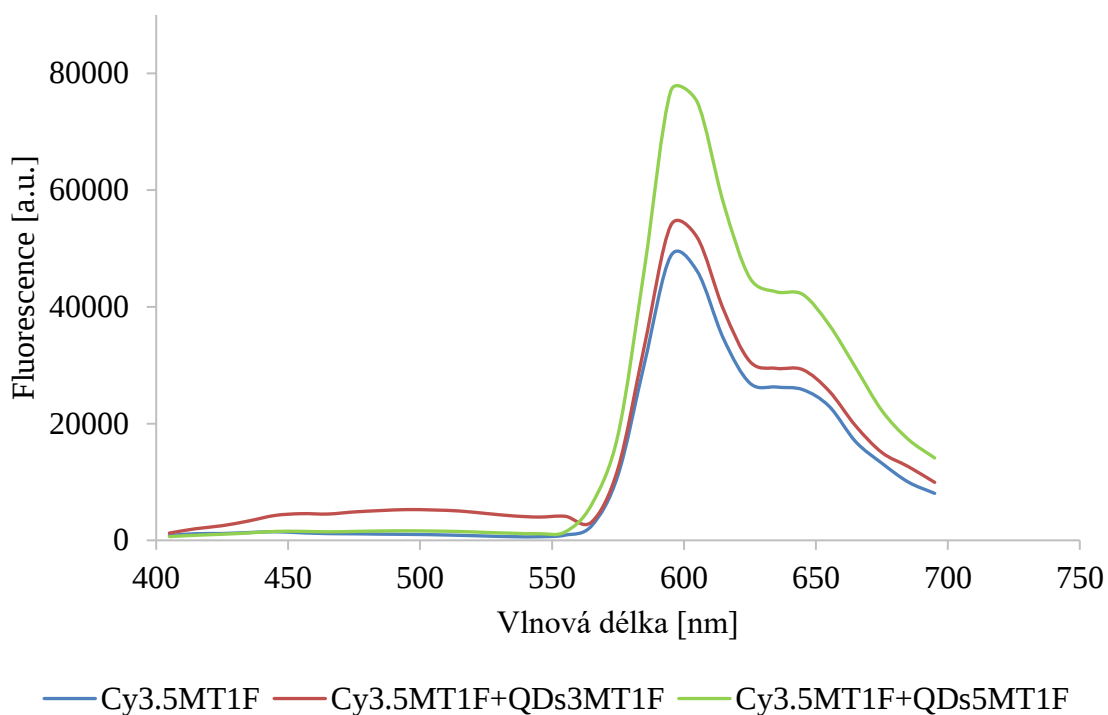
Obrázek 22: Emisní spektrum konjugátu QDs a Cy3,5 a konjugátu akceptoru (Cy3,5-MT) a donoru (QDs-MTs)

Fakt, že mezi donorovými a akceptorovými molekulami dochází k FRET, potvrzuje i obrázek 23. Konjugát je tvořen akceptorem (MT-2 s cyaninem 3,5) a donorem (MT-2 s QDs, přičemž koncentrace QDs 3 činí 0,79mg/ml). Zelená křivka představuje konjugát donoru, tedy QDs3 a MT-2A a červená křivka akceptor, tj. konjugát Cy3,5 a MT-2A. Na modré křivce můžeme pozorovat spojení konjugátu přenos energie mezi nimi, kdy v oblasti 500 nm se objevuje emisní spektrum QDs, které se 2,5x snížilo v porovnání samotného konjugátu (zelené křivky). Nicméně došlo k nárůstu intenzity fluorescence při emisi akceptoru 590 nm, což potvrzuje úspěšný přenos energie mezi jednotlivými konjugáty. Důvodem je pravděpodobně vznik dimeru mezi molekulami MT. Vznikem dimeru došlo k pevnějšímu spojení molekul, díky čemuž jsou akceptor a donor v bližším kontaktu, a tím pozorujeme vyšší signál FRET.



Obrázek 23: Emisní spektrum akceptoru, donoru a jejich konjugátu

Vyšší koncentrace QDs má rovněž za následek zvýšení intenzity fluorescence cyaninu. Čím větší množství QDs je v roztoku přítomných, tím pravděpodobně dochází k většímu množství uvolňované energie molekulou donoru. Jak znázorňuje obrázek 24, konjugát s QDs o koncentraci 1,15 mg/ml (QDs5) způsobil značný nárůst intenzity fluorescence při emisi akceptoru 590 nm a naopak snížení intenzity fluorescence při emisi donoru 470 nm, na rozdíl od konjugátu s QDs o koncentraci 0,79 mg/ml (QDs3).

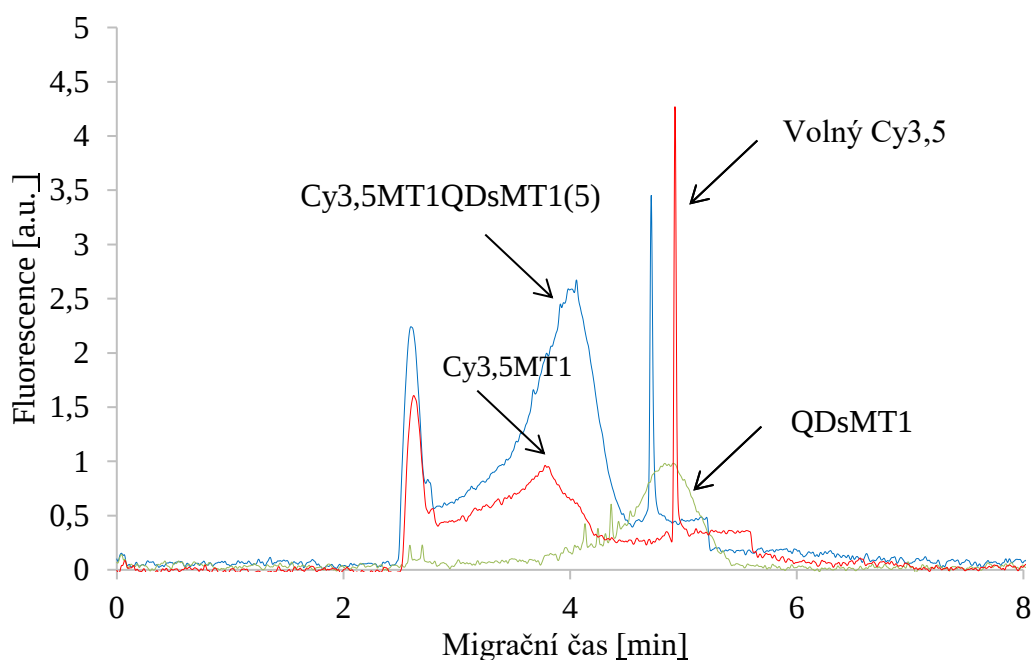


Obrázek 24 Emisní spektrum konjugátu a jejich směsí s různými koncentracemi QDs

7.4.2 CE-LIF

Protože zvýšení signálu akceptoru detekované fluorescenční spektroskopií je sice potvrzení FRET, nicméně nikoliv dimerizace metallothioneinu, byla pro analýzu využita rovněž CE-LIF k prokázání stabilního spojení dvou molekul MT.

Pomocí kapilární elektroforézy (Obrázek 25) byl ověřen vznik vazeb mezi jednotlivými konjugáty i směsí konjugátů. Jelikož byla použita LED 375 nm a emisní filtr Long pass 550 nm, tak by v ideálním případě neměl být detekován signál donoru a ani akceptoru v nepřítomnosti donoru. Nicméně na obrázku 25 můžeme vidět, že donor (QDs-MT) migruje v čase 5 minut a signál je tedy detekovatelný. Cy3,5-MT (akceptor) migruje v 3,9 minutě, tedy o něco dříve než donor, neboť QDs dodávají donoru silně záporný náboj a dojdou tak k detektoru později. Patrný signál akceptoru lze vysvětlit tím, že kromě svého absorpčního maxima 590 nm, absorbuje nepatrně také v oblasti 350-400 nm. A ZnCd QDs, které byly nasyntetizovány, mají široké emisní pásy, a tak jsou na detektoru zachyceny navzdory emisnímu filtru 550 LP. Po smíchání konjugátů donoru a akceptoru (Cy3,5MT+QDs-MT), však dochází k absenci signálu donoru a je patrná vyšší intenzita fluorescence akceptoru (2,5x vyšší signál oproti signálu akceptoru v absenci donoru). Rovněž došlo k nepatrnému posunu v migračním čase (4. minuta) konjugátu Cy3,5MT + QDs-MT.



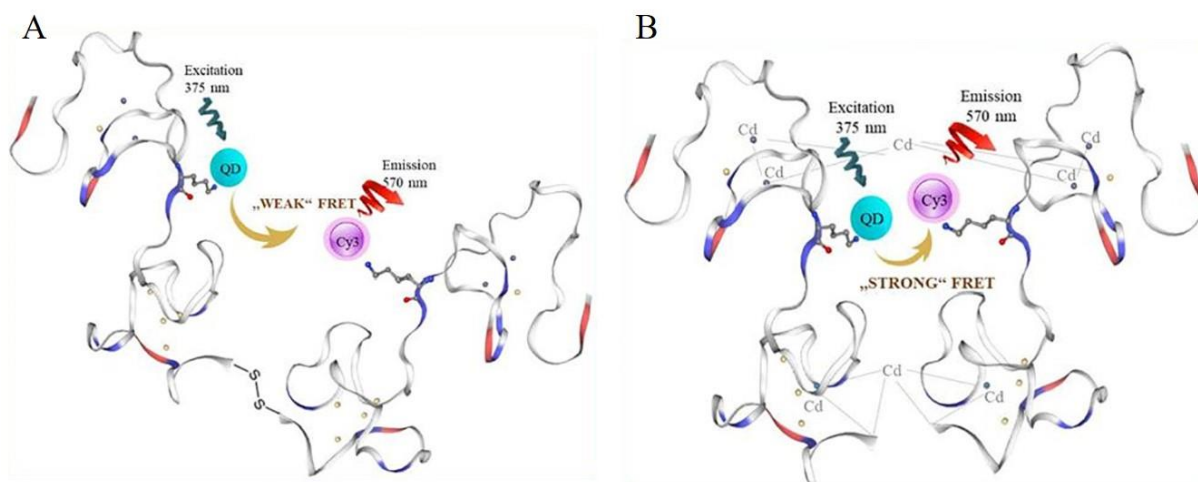
Obrázek 25: Elektroferogram zobrazující proteinové interakce konjugátů MT s QDs a Cy3,5

7.4.3 Studium proteinových interakcí s kadmíem

Kadmium (Cd) je extrémně toxický prvek, přičemž jeho přítomnost může způsobit karcinogenitu, teratogenitu, mutagenitu a endokrinní a reprodukční poškození. Cd nelze biotransformovat, a proto biologické mechanismy musí mít jinou povahu, než rozklad na méně toxické nebo snadněji vylučované produkty. Mechanismy pro homeostázu kovů, dostupných pouze ve stopovém množství, jsou nutné pro zachování transportu a skladování těchto kovů v netoxické formě. Za tyto mechanismy jsou často zodpovědné proteiny. Cd v biologickém systému sleduje dráhy zinku (Zn), v menší míře mědi (Cu), a tak se bude nacházet ve spojení s proteiny, které se účastní metabolismu esenciálních stopových prvků. Metallothionein je nejznámější z těchto proteinů a jeho nedostatek v savcích tkáních, způsobuje zvýšení citlivosti na toxické účinky Cd. Mnohé studie prokazují, že při expozici metalotioneinu kadmiu dochází převážně ke spojení, za vzniku komplexu, který je relativně biologicky inertní. Předpokládá se, že systém MT detoxikuje Cd prostřednictvím indukované vazby s vysokou afinitou, a nedostatek či nízké hladiny cysteinu v proteinu mohou snižovat afinitu a také kapacitu pro sekvestraci Cd v cílových tkáních. To může umožnit Cd lepší přístup ke specifickým molekulárním cílům. V případě karcinogeneze Cd se předpokládá, že molekulárním cílem je DNA [88].

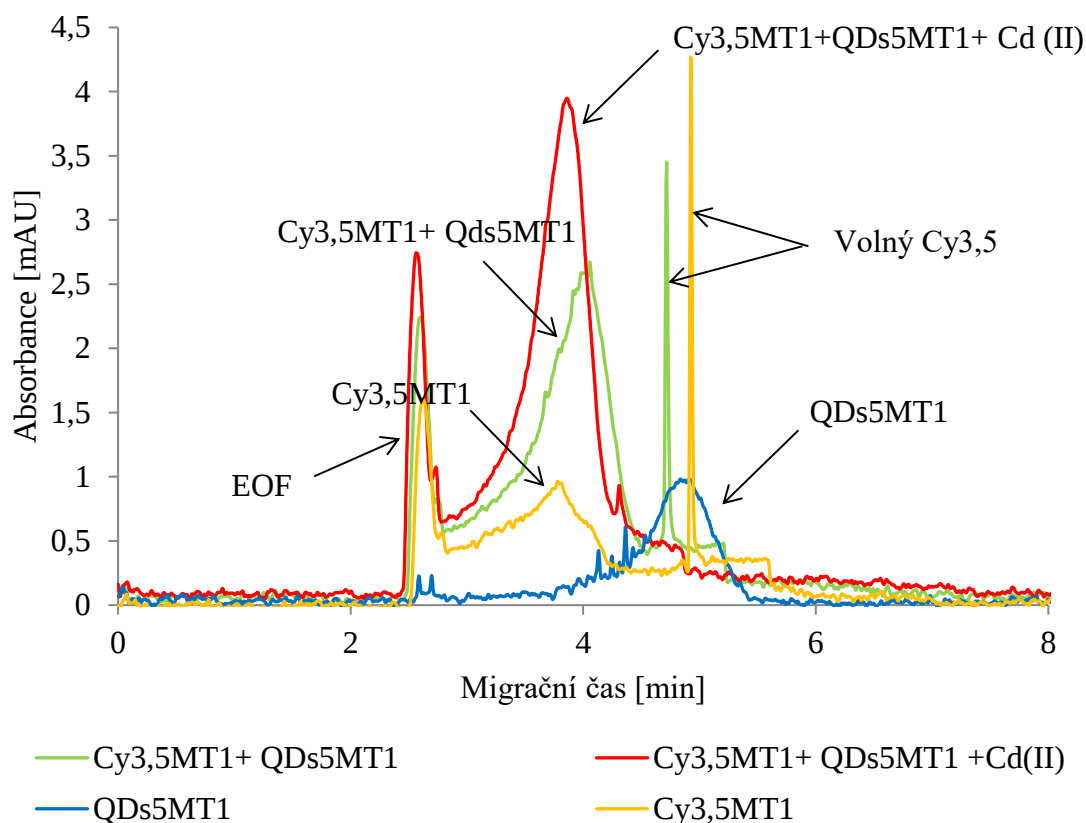
Kadmium potenciálně způsobuje mutace a chromozomální delece. Jeho toxicita zahrnuje vyčerpání redukováného glutathionu (GSH) a způsobuje zvýšení produkce reaktivních druhů kyslíku (ROS), jako jsou superoxidové ionty, peroxid vodíku a hydroxylové radikály. Tím že, metallothionein obsahuje velké množství cysteinu (sulfhydrylových skupin) působí jako lapač volných radikálů. Zachycuje hydroxylové a superoxidové radikály. Proto buňky, které obsahují metallothioneiny, jsou obecně odolné vůči toxicitě kadmia. Nicméně kadmium může indukovat produkci ROS a vést k oxidačnímu stresu. Tento mechanismus může vyjadřovat roli kadmia v orgánové toxicitě, karcinogenitě a apoptotické buněčné smrti [89].

Z biologického hlediska je dimerizace/oligomerizace proteinů zodpovědná za určité vitální funkce, protože selhání správné interakce může dokonce vést k rozvoji onemocnění. Cílem bylo ověřit, zda se zvýší tvorba dimerů MT jako proteinu potenciálně souvisejícího s rozvojem celé řady onemocnění, po inkubaci tohoto proteinu s ionty Cd^{2+} . Studie poskytují důkazy o tvorbě neoxidativní dimerní formy MT při vystavení volným iontům Cd, kdy dochází k rychlému přeskupení monomerní struktury. Lze předpokládat, že kovem změněné monomerní formy MT se nesírné ligandy, např. kyslík, účastní koordinace kovů [90]. Oxidativní dimerizace a vytvoření disulfidových můstků by oproti tomu mohla být o něco méně stabilní. Na obrázku 26 je ukázáno schematické znázornění oxidativní a neoxidativní dimerizace a tvorbu takzvaných „kovových můstků“ mezi jednotlivými proteiny pomocí iontů Cd^{2+} [65].



Obrázek 26: Schematické znázornění oxidativní dimerizace (A) a neoxidativní dimerizace (B) metallothioneinu

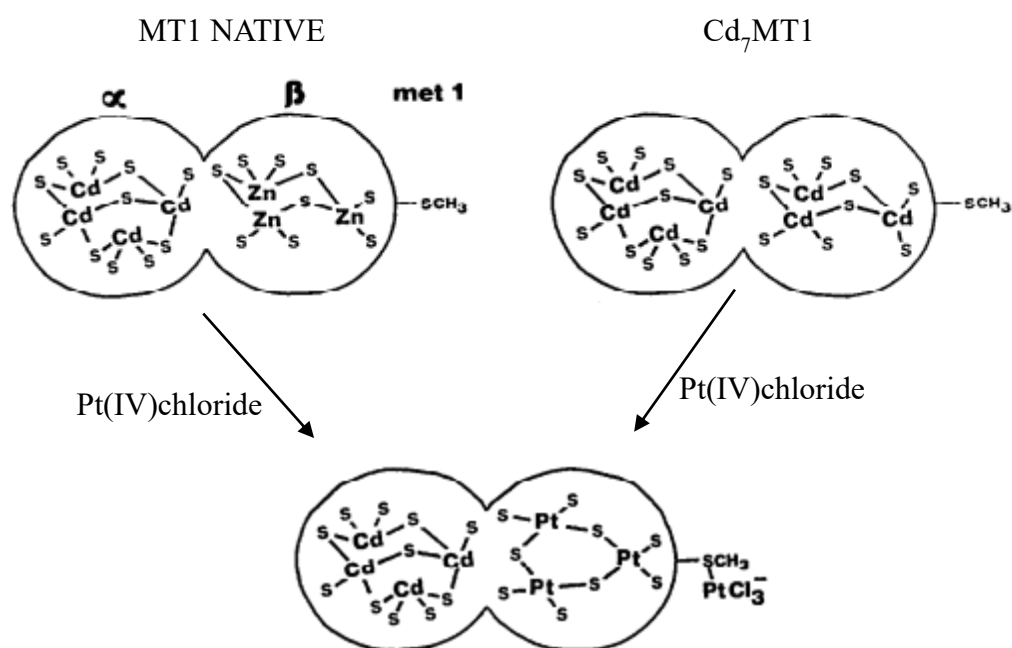
Zvýšená tvorba dimerů MT po inkubaci s Cd^{2+} byla ověřena na CE-LIF, kdy opět došlo znatelnému nárůstu signálu MT, v tomto případě konjugátu Cy3,5-MT-1 a QDs-MT-1 (Obrázek 27). Přídavkem kadmia došlo pravděpodobně ke vzniku kadmiových můstků, které spojují MT, a následně ke zvýšení intenzity fluorescence. Vznik takzvaných kovových můstků po inkubaci MTs s ionty kadmia a tím zvýšené oligomerizaci MTs, byl již dříve potvrzen [91]. Lze také vidět, že došlo ke snížení množství volného barviva Cy3,5, které se s největší pravděpodobností navázalo na metallothionein. Po přídavku kadmia se snížil i migrační čas konjugátu, což je jen další důkaz zvýšeného množství MT.



Obrázek 27: Charakterizace interakce konjugátů s kadmíem pomocí CE

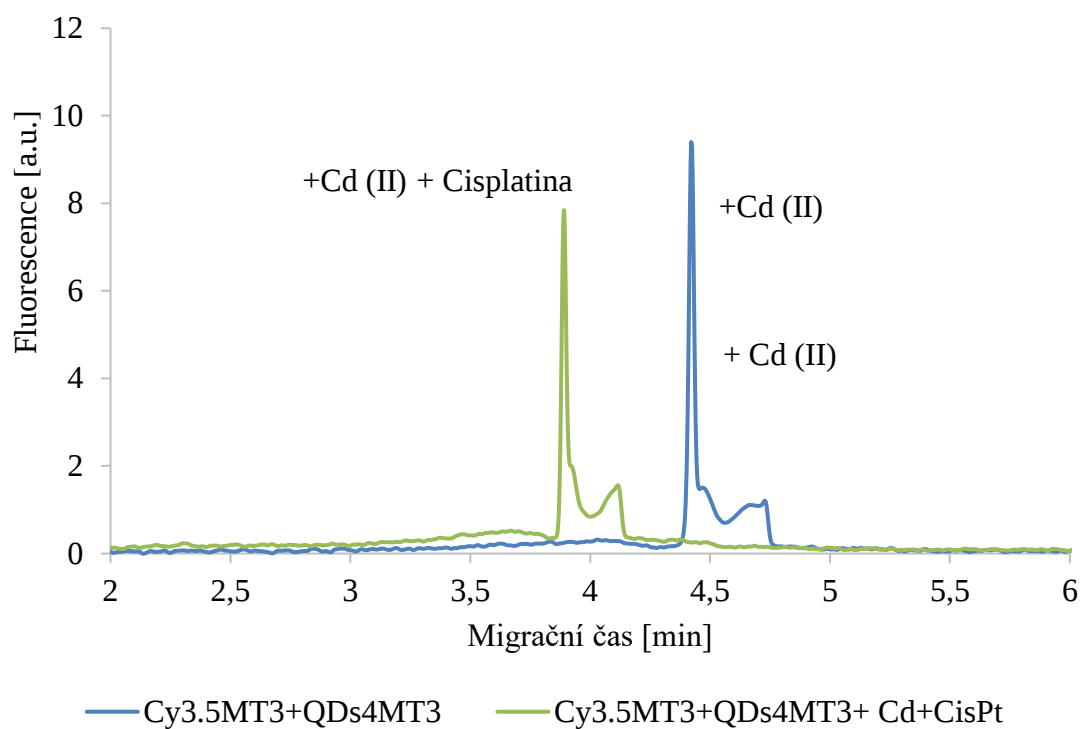
7.4.4 Studium proteinových interakcí s cytostatiky

Platinová protinádorová léčiva se široce používají k léčbě různých typů nádorových onemocnění. Nicméně v průběhu úspěšné léčby je překážkou nefrotoxicita (poškození tkáně ledvin, zejména u ledvin oslabených nějakým chorobným procesem nebo i řadou léků a kontrastních látek) a rozvoj nádorové rezistence k lékům. MT je atraktivním místem pro reakce různých kovových iontů a elektrofilních činidel, včetně komplexů platiny. Tvorbou Pt-MT je zvažováno snížení nefrotoxicity, ale může naopak docházet k rozvoji lékové rezistence, a tedy neúspěšné léčbě. Bylo provedeno mnoho výzkumů reakcí Pt (II) komplexů, zejména cis-dichlordiamin platiny (II) (CDDP), s MTs *in vivo* a *in vitro*. Zdá se, že Pt_7MT nebo $Pt_{10}MT$ může vzniknout, když komplexy Pt (II) reagují se Zn_7MT , Cd_7MT nebo apoMT *in vitro* a Pt (II) má tetrathiolátovou koordinaci v MT. Ve studii bylo zjištěno, že ionty Pt mají vysokou afinitu k MT, a tak jejích reakcí vznikají komplexy monomerního či oligomerního produktu [92]. Protinádorový efekt cis-platiny je dán jeho vazbou do DNA, čímž dochází k zabránění replikace DNA. Předpokládá se, že cisplatina může pravděpodobně stimulovat transkripci MT genu.

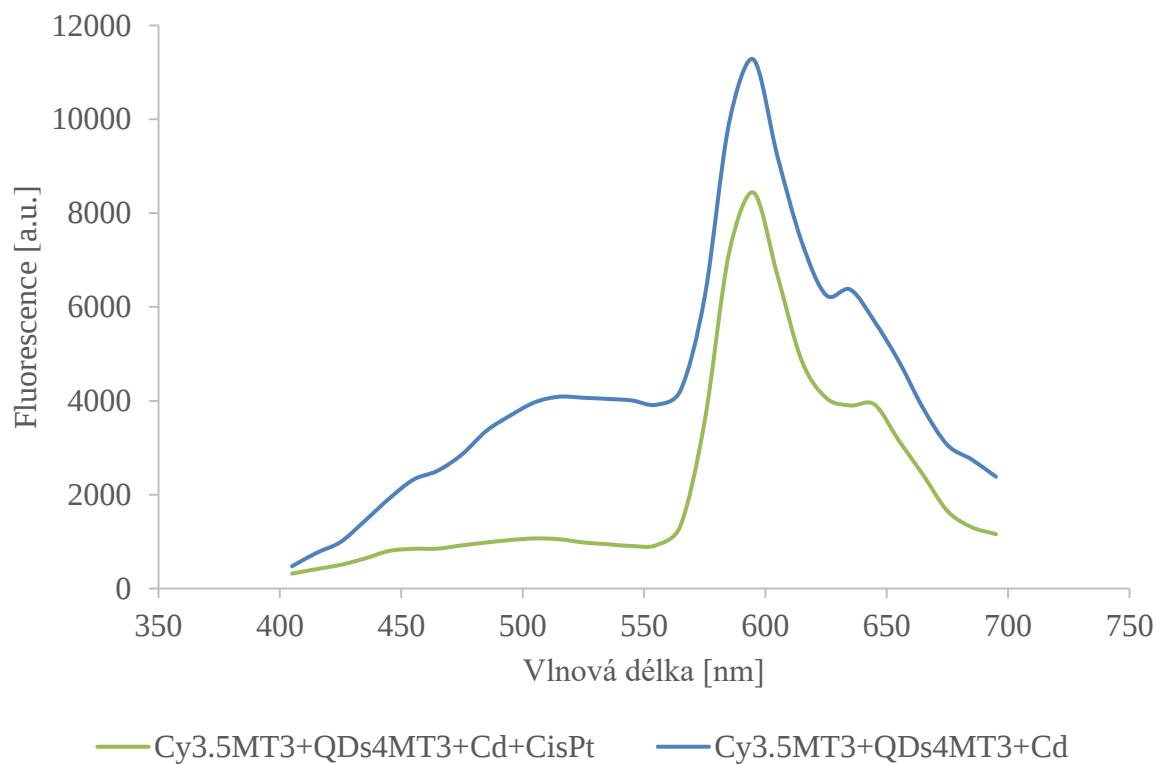


Obrázek 28: Nahrazení Zn nebo Cd ze struktury MT [93]

Obrázek 29 a obrázek 30 potvrzují, že přidáním cisplatiny do komplexu konjugátů MT s QDs a MT s Cy3,5 dochází k vytlačení kadmia nebo zinku ze struktury kvůli vyšší afinitě, přičemž se s největší pravděpodobností naruší kadmiové můstky a může dojít k rozpadu dimeru. Důkazem je posun píku v migračním čase a rovněž snížení intenzity fluorescence konjugátů. Nicméně studium interakce s cytostatiky bude vyžadovat další experimenty a výzkum.



Obrázek 29: Elektroforegram konjugátu MT-QDs s MT-Cy3,5 po interakci s Cd^{2+} a Cisplatinou

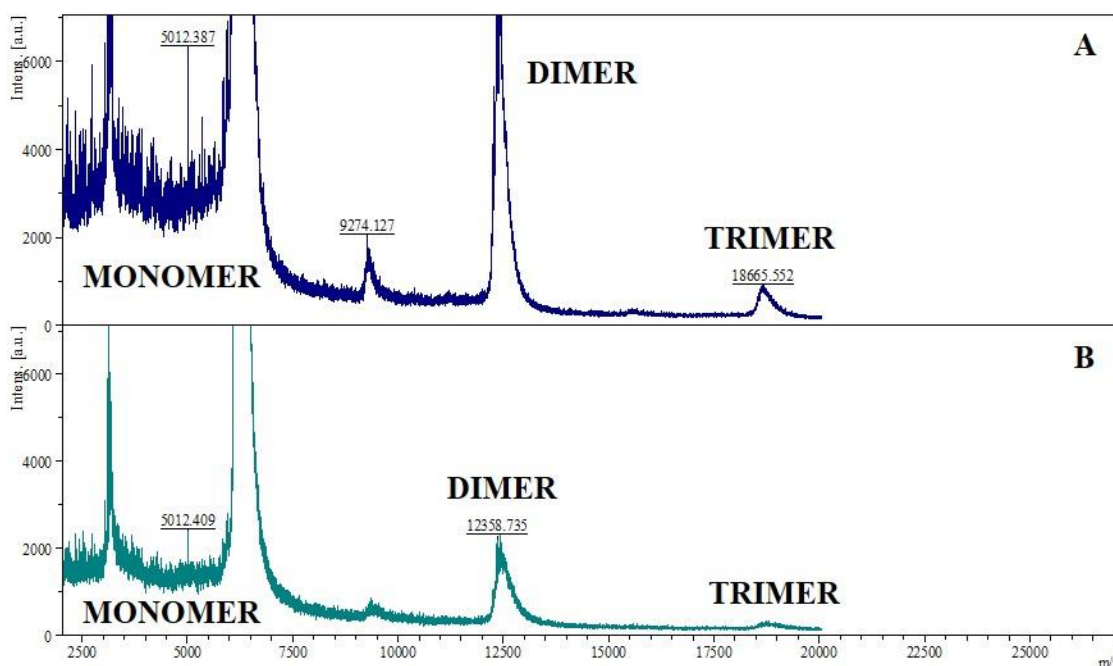


Obrázek 30: Emisní spektrum konjugátu MT-QDs s MT-Cy3,5 po interakci s Cd^{2+} a Cisplatinou

7.5 Studium proteinových oligomerů pomocí MALDI –TOF-MS

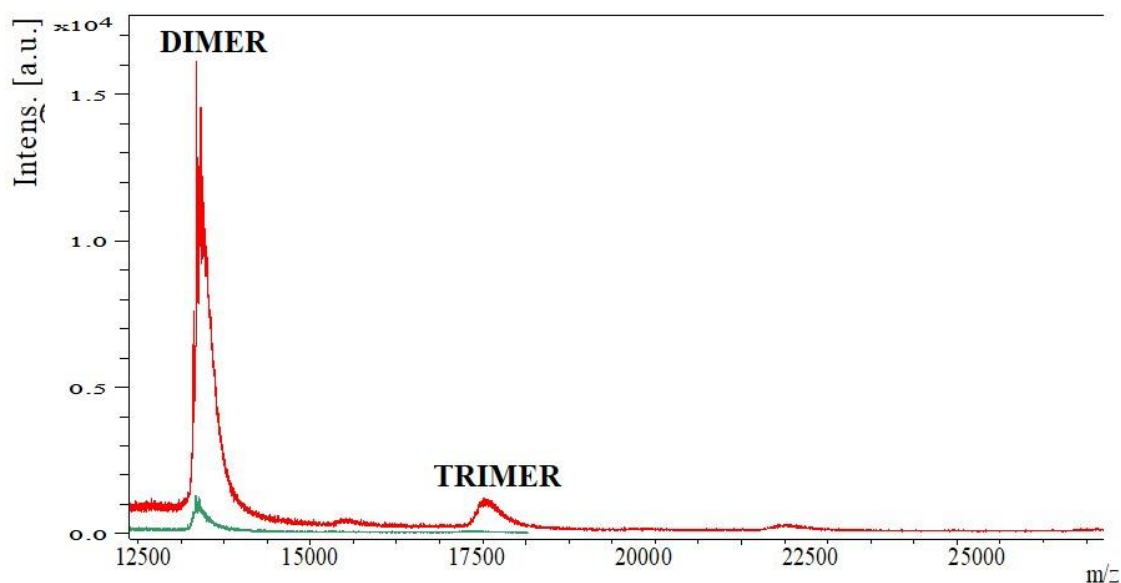
Kromě vzniku konjugátu detekovaných kapilární elektroforézou, byl pomocí MALDI-MS ověřen i vznik dimeru metallothioneinu. Připravený roztok MT byl nadávkován na vodivou MALDI destičku společně s příslušným roztokem matrice.

Za účelem ověření tvorby dimeru nebo vyššího oligomeru po inkubaci MT s Cd^{2+} , byla provedena hmotnostně spektrometrická analýza. Jak je vidět na obrázku 31, intenzita signálu v m/z 12000 (což odpovídá molekule dimeru metallothioneinu, se významně zvýšila ve vzorku MT po 1 týdnu skladování s Cd^{2+} za anerobních podmínek (Obrázek 31 A). Dokonce byla pozorována tvorba vyšších oligomerů, jako jsou trimery (m/z 18000).



Obrázek 31: MALDI-TOF-MS profil metallothioneinu měřený ihned (B) a po týdnu inkubace s Cd^{2+} (A)

Obrázek 32 zobrazuje záznam z MALDI-TOF-MS, kdy byl vzorek MT inkubován s Cd^{2+} po dobu jednoho měsíce (červená křivka). V tomto případě je z grafu patrné, že došlo jak k mnohonásobnému nárůstu dimerů, tak i vyšších oligomerů. To potvrzuje teorii, že po dlouhodobé inkubaci metallothioneinu s ionty kadmia, dochází ke vzniku tzv. inter- a intramolekulárních „kovových můstků“ a následné oligomerizaci [91].



Obrázek 32: MALDI-TOF-MS profil metallothioneinu měřený po měsíční inkubaci s Cd^{2+}

8 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na studium proteinových interakcí pomocí Försterova rezonančního přenosu energie (FRET) studovaném fluorescenční spektrometrií kapilární elektroforézou s laserem indukovanou fluorescenční detekcí.

V teoretické části byla vypracována rešerše zaměřená na metallothionein, kvantové tečky, jejich využití v oblasti značení proteinů a diagnostiky, elektronové transferu, zejména Försterův přenos rezonanční energie. Část literární rešerše byla rovněž věnována metallothioneinu, cytostatikům a vlivu MT na nádorová onemocnění.

Experimentální část byla soustředěna na vytvoření konjugátů metallothioneinu s kvantovými tečkami a konjugátů metallothioneinu s organickými cyaninovými fluorofory. Mezi konjugáty byla studována interakce metallothioneinu pomocí FRET. Přenos energie byl umožněn díky excitaci ZnCd QDs námi nasyntetizovaných a navázaných na MT čili donoru. Přijetí energie excitovaného donoru akceptorem, bylo umožněno pomocí cyaninů navázaných na MTs. Kvantové tečky byly připraveny v pěti různých koncentracích. Koncentrace QDs měla vliv na intenzitu konjugátu vzniklého mezi MT a QDs. Čím vyšší koncentrace QDs, tím více energie bylo předáno a byl vykazován vyšší signál akceptoru. Konjugace mezi QDs a MTs byla zprostředkována pomocí karbodiimidového zero-lengthcross-linkeru (EDC/sulfo-NHS), který slouží k aktivaci karboxylových skupin a tím umožňuje biokonjugaci ligandu kovalentní vazbou. Dále byl připraven konjugát MT s komerčními barvivý. S použitím těchto konjugátů byly studovány interakce MT. Bylo ověřeno, že MT tvoří dimery. Díky vzniklým dimerům, tedy vazbám mezi molekulami MT, mohlo dojít k daleko intenzivnějšímu přenosu energie mezi donorem a akceptorem. Tvorba dimerů a vyšších oligomerů byla ověřena i na MALDI-TOF-MS, která dokázala přítomnost jak dimeru metallothioneinu, tak i trimeru. Změřením vzorku po měsíční inkubaci s kadmíem došlo k zřetelným nárůstům oligomerů MT.

K vytvořeným konjugátům byl přidán 0,05 mM roztok kadmia za účelem interakce s MT. Kromě roztoků kadmia, byly přidány i roztoky cytostatik, konkrétně cisplatinu. Cílem bylo prohloubit pochopení vlastností reakce komplexů platiny (II) s metallothioneinem a role, kterou může metallothionein hrát v buněčné rezistenci vůči této třídě léčiv a v ochraně hostitele před toxicitou cytostatik. Přidáním cisplatinu do konjugátů metallothioneinu došlo k vytlačení kadmia ze struktury, rozpadu vzniklých dimerů a začlenění platiny do struktury. V předchozích publikacích bylo zjištěno, že u nádorů a nádorových onemocnění je zvýšená exprese MT. Navázáním cytostatik přímo do struktur konjugátů MT by možná umožnilo zavedení cytostatik přímo na místo určení a snížení jejich toxicity na okolní nenádorové tkáň. Otázkou však stále zůstává vliv MTs na snížení účinnosti cytostatik a tím menší úspěšnost léčby.

FRET se používá v řadě aplikací (analýza struktury a konformace proteinů, zkoumání interakcí receptor-ligand). Výhodou FRET je, že ho lze použít v kombinaci s mikroskopií a tím jej lze provádět v buňce za fyziologických podmínek. V porovnání s ostatními metodami studia proteinových interakcí, poskytuje FRET mikroskopie navíc také informace o lokalizaci interagujících proteinů v buňce. Spojuje tak v sobě výhody několika různých metod, např. afinitní chromatografie, charakterizující vzájemné interakce proteinů a imunochemického

signálu, a také pro zjištění přítomnosti dvou studovaných proteinů na stejném místě v buňce [94].

9 ZDROJE

- [1] HOFSTRAAT, JOHANNES W., 2000. POLYMER CHARACTERIZATION BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY. *Applied Polymer Science: 21st Century*. Elsevier, 2000, 829-850. ISBN 9780080434179. Dostupné z: doi:10.1016/B978-008043417-9/50041-6
- [2] *Biotechnology and its Applications*, 2022. Elsevier. ISBN 9780128177266. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128177266000083>
- [3] GUPTA, V.P., 2016. Interaction of Radiation and Matter and Electronic Spectra. *Principles and Applications of Quantum Chemistry*. Elsevier, 2016, 291-337. ISBN 9780128034781. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803478-1.00009-1
- [4] Valeur, Bernard (2003). digital Encyclopedia of Applied Physics || Molecular Fluorescence. , (), – . doi:10.1002/3527600434.eap684
- [5] OMARY, Mohammad A. a Howard H. PATTERSON, 2017. Luminescence, Theory. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry. Elsevier, 2017, 636-653. DOI: 10.1016/B978-0-12-803224-4.00193-X. ISBN 9780128032244
- [6] Jablonski diagram. (2020, August 15). Retrieved April 28, 2021, from <https://chem.libretexts.org/@go/page/1769>
- [7] Jablonski diagram <https://chem.libretexts.org/@go/page/1769> (accessed Oct 20, 2021)
- [8] CHEN, Jia-Xiong, Ya-Fang XIAO, Kai WANG, et al., 2020. Origin of thermally activated delayed fluorescence in a donor–acceptor type emitter with an optimized nearly planar geometry. *Journal of Materials Chemistry C*. 8(38), 13263-13269. ISSN 2050-7526. Dostupné z: doi:10.1039/D0TC03747H
- [9] HATAKEYAMA, Takuji, Kazushi SHIREN, Kiichi NAKAJIMA, et al., 2016. Ultrapure Blue Thermally Activated Delayed Fluorescence Molecules: Efficient HOMO-LUMO Separation by the Multiple Resonance Effect. *Advanced Materials*. 28(14), 2777-2781. ISSN 09359648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201505491
- [10] *Physics Today*, 2013. 66. ISSN 0031-9228. Dostupné také z: <http://physicstoday.scitation.org/doi/10.1063/PT.3.1871>
- [11] BARANOVA, A A a K O KHOKHLOV, 2014. Portable device for the detection of nitro-explosives based on optical properties of sensor's material. *Journal of Physics: Conference Series*. 552. ISSN 1742-6588. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/552/1/012034
- [12] CHIRAGWANDI, Z. G., K. GILLESPIE, Q. X. ZHAO, M. WILLANDER a I. PANAS, 2006. Ultraviolet driven negative current and rectifier effect in self-assembled green fluorescent protein device. *Applied Physics Letters*. 89(16). ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.2357893
- [13] LAKOWICZ, Joseph R., 1999. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2nd Ed. New York: Kluwer Academic Publishers. ISBN 03-064-6093-9.
- [14] Electron Transfer Reactions. (2020, October 27). Retrieved April 20, 2021, from <https://chem.libretexts.org/@go/page/204727>
- [15] BISSELL, Richard A., A. PRASANNA DE SILVA, H. Q. NIMAL GUNARATNE, P. L. MARK LYNCH, Glenn E. M. MAGUIRE, Colin P. MCCOY a K. R. A. SAMANKUMARA SANDANAYAKE, 1993. Fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensors. Photoinduced Electron Transfer V. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1993-5-29, 223-264. Topics in Current Chemistry. ISBN 978-3-540-56746-2. Dostupné z: doi:10.1007/3-540-56746-1_12
- [16] MAGRI, David C., 2021. Logical sensing with fluorescent molecular logic gates based on photoinduced electron transfer. *Coordination Chemistry Reviews*. 426. ISSN 00108545. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2020.213598
- [17] XIE*, Qiguang, Mohammed SOUTTO*, Xiaodong XU*, Yunfei ZHANG a Carl Hirschie JOHNSON, 2011. Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) Imaging in Plant Seedlings and Mammalian Cells. *Molecular Imaging*. Totowa, NJ: Humana Press, 2011-9-18, 3-28. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-60761-900-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-901-7_1
- [18] MOUSTAKIM, Moses, Suet Ling FELCE, Nancy ZAAROUR, Gillian FARNIE, Fiona E. MCCANN a Paul E. BRENNAN, 2018. Target Identification Using Chemical Probes. *Modern Approaches in Drug*

- Discovery. Elsevier, 2018, 27-58. *Methods in Enzymology*. ISBN 9780128153833. Dostupné z: doi:10.1016/bs.mie.2018.09.013
- [19] MATOULKOVÁ, Eva a Bořivoj VOJTĚŠEK, 2014. Detection of Protein-protein Interactions by FRET and BRET Methods. *Klinická onkologie*. 27(Suppl 1), S82-S86. ISSN 0862495X. Dostupné z: doi:10.14735/amko20141S82
- [20] BORROTO-ESCUELA, Dasiel O., Marc FLAJOLET, Luigi F. AGNATI, Paul GREENGARD a Kjell FUXE, 2013. Bioluminescence Resonance Energy Transfer Methods to Study G Protein-Coupled Receptor–Receptor Tyrosine Kinase Heteroreceptor Complexes. *Receptor-Receptor Interactions*. Elsevier, 2013, 141-164. *Methods in Cell Biology*. ISBN 9780124081437. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-408143-7.00008-6
- [21] SOUTTO, MOHAMMED, YAO XU a CARL H. JOHNSON, 2005. Bioluminescence Resonance Energy Transfer: Techniques and Potential. *Molecular Imaging*. Elsevier, 2005, 260-271. ISBN 9780195177206. Dostupné z: doi:10.1016/B978-019517720-6.50023-7
- [22] HWANG, Eugene, Jisu SONG a Jin ZHANG, 2019. Integration of Nanomaterials and Bioluminescence Resonance Energy Transfer Techniques for Sensing Biomolecules. *Biosensors*. 9(1). ISSN 2079-6374. Dostupné z: doi:10.3390/bios9010042
- [23] ZHANG, Xiaojing, Yue HU, Xiaotong YANG, et al., 2019. Förster resonance energy transfer (FRET)-based biosensors for biological applications. *Biosensors and Bioelectronics*. 138. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2019.05.019
- [24] Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy. OLYMPUS CORPORATION: Life Science Solutions [online]. [cit. 2021-5-6]. Dostupné z: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/fret/fretintro/>
- [25] WANG, Yunsheng, Jie YANG, Manman FANG, et al., 2020. Förster Resonance Energy Transfer: An Efficient Way to Develop Stimulus-Responsive Room-Temperature Phosphorescence Materials and Their Applications. *Matter*. 3(2), 449-463. ISSN 25902385. Dostupné z: doi:10.1016/j.matt.2020.05.005
- [26] TEVFIK DORAK, Michael, 2007. Real-time PCR [online]. New York: Taylor & Francis Group [cit. 2021-04-08]. ISBN 0-203-96731-3.
- [27] BLACK, K., R. TANG, C. EGBULEFU, S.-W.D. TSEN, W.J. AKERS a S. ACHILEFU, 2017. Fluorescence Cancer Imaging. *Comprehensive Supramolecular Chemistry II*. Elsevier, 2017, 469-490. ISBN 9780128031995. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.12619-8
- [28] FEI, Guiqiang, Siyue MA, Chao WANG, et al., 2021. Imaging strategies using cyanine probes and materials for biomedical visualization of live animals. *Coordination Chemistry Reviews*. 447. ISSN 00108545. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2021.214134
- [29] LAKOWICZ, Joseph R., 1999. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2nd Ed. New York: Kluwer Academic Publishers. ISBN 03-064-6093-9.
- [30] KREMERS, G.-J., S. G. GILBERT, P. J. CRANFILL, M. W. DAVIDSON a D. W. PISTON, 2010. Fluorescent proteins at a glance. *Journal of Cell Science*. 124(2), 157-160. ISSN 0021-9533. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.072744
- [31] ŠULCOVÁ, Petra, 2019. LANTHANOIDY JAKO PIGMENTY? Chemické listy [online]. Pardubice, 2019(113), 219–222 [cit. 2021-04-08].
- [32] BAKER, Sheila N. a Gary A. BAKER, 2010. Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights. *Angewandte Chemie International Edition*. 49(38), 6726-6744. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200906623
- [33] ZU, Fanlin, Fanyong YAN, Zhangjun BAI, Jinxia XU, Yinyin WANG, Yicun HUANG a Xuguang ZHOU, 2017. The quenching of the fluorescence of carbon dots: A review on mechanisms and applications. *Microchimica Acta*. 184(7), 1899-1914. ISSN 0026-3672. Dostupné z: doi:10.1007/s00604-017-2318-9
- [34] NAGESWARA RAO, Ramiseti a Saeed S. ALBASEER, 2018. Nanomaterials in Chromatographic Sample Preparations. *Nanomaterials in Chromatography*. Elsevier, 2018, (7), 201-231. ISBN 9780128127926. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-812792-6.00007-8

- [35] MISHRA, Vijay, Akshay PATIL, Sourav THAKUR a Prashant KESHARWANI, 2018. Carbon dots: emerging theranostic nanoarchitectures. *Drug Discovery Today*. 23(6), 1219-1232. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2018.01.006
- [36] MAN, Han B., Kangyi ZHANG, Erik ROBINSON, Edward K. CHOW a Dean HO, 2012. Engineering Nanoparticulate Diamond for Applications in Nanomedicine and Biology. *Ultrananocrystalline Diamond*. Elsevier, 2012, 493-518. ISBN 9781437734652. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4377-3465-2.00015-3
- [37] ROQUELET, C., D. GARROT, J. S. LAURET, C. VOISIN, V. ALAIN-RIZZO, Ph. ROUSSIGNOL, J. A. DELAIRE a E. DELEPORTE, 2010. Quantum efficiency of energy transfer in noncovalent carbon nanotube/porphyrin compounds. *Applied Physics Letters*. 97(14). ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.3496470
- [38] QAISER, Darakhshan, Mohd. Shahid KHAN, R.D. SINGH, Zahid H. KHAN a Santa CHAWLA, 2010. Förster's resonance energy transfer between Fullerene C60 and Coumarin C440. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 77(5), 1065-1068. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2010.08.074
- [39] Quantum dots. Sigma aldrich [online]. [cit. 2018-11-15]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/quantumdots.html>
- [40] HLAVÁČEK, Antonín a Petr SKLÁDAL, KVANTOVÉ TEČKY: PŘÍPRAVA, KONJUGACE A VYUŽITÍ V BIOANALYTICKÉ CHEMII A BIOLOGII. *Chemické listy*. (105), 611-615. DOI: 10.1016/j.nantod.2011.06.001
- [41] SRIVASTAVA, Siddharth, Vansh MALIK a Mohit VISHNOI, 2021. Study on effects of quantum dots in optoelectronics and hydrogen evolution: A review. *Materials Today: Proceedings*. ISSN 22147853. Dostupné z: doi:10.1016/j.matpr.2021.02.467
- [42] GIDWANI, Bina, Varsha SAHU, Shiv Shankar SHUKLA, Ravindra PANDEY, Veenu JOSHI, Vikas Kumar JAIN a Amber VYAS, 2021. Quantum dots: Prospectives, toxicity, advances and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 61. ISSN 17732247. Dostupné z: doi:10.1016/j.jddst.2020.102308
- [43] CHAND, Subhash, A. DAHSHAN, Nagesh THAKUR, Vineet SHARMA a Pankaj SHARMA, 2020. Alloyed Ag₂SexS_{1-x} quantum dots with red to NIR shift: The band gap tuning with dopant content for energy harvesting applications. 105. ISSN 13504495. Dostupné z: doi:10.1016/j.infrared.2019.103162
- [44] CHAN, Warren C. W. a Shuming NIE, 1998. Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science*. 281(5385), 2016-2018. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.281.5385.2016
- [45] COE, Seth, Wing-Keung WOO, Mounqi BAWENDI a Vladimir BULOVIĆ, 2002. Electroluminescence from single monolayers of nanocrystals in molecular organic devices. *Nature*. 420(6917), 800-803. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature01217
- [46] Samsung Display | Products/Technology – QD Display. SAMSUNGDISPLAY [online]. Copyright © SAMSUNG DISPLAY All rights reserved. [cit. 23.04.2022]. Dostupné z: <https://www.samsungdisplay.com/eng/tech/quantum-dot.jsp>
- [47] SHIM, Moonsub a Philippe GUYOT-SIONNEST, 2000. N-type colloidal semiconductor nanocrystals. *Nature*. 407(6807), 981-983. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35039577

- [48] CONROY, Erin M., Jia Jun LI, Hyunki KIM a W. Russ ALGAR, 2016. Self-Quenching, Dimerization, and Homo-FRET in Hetero-FRET Assemblies with Quantum Dot Donors and Multiple Dye Acceptors. *The Journal of Physical Chemistry C*. 120(31), 17817-17828. ISSN 1932-7447. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcc.6b05886
- [49] MARGINEANU, Anca, Jia Jia CHAN, Douglas J. KELLY, et al., 2016. Screening for protein-protein interactions using Förster resonance energy transfer (FRET) and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Scientific Reports*. 6(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep28186
- [50] ALI, Mayssam H. a Barbara IMPERIALI, 2005. Protein oligomerization: How and why. 13(17), 5013-5020. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2005.05.037
- [51] TMEJOVÁ, Kateřina, David HYNEK, Kristýna ČÍHALOVÁ, Renata KENŠOVÁ, René KIZEK a Vojtěch ADAM, 2014. Monitorování hladiny metallothioneinu u biologických organismů vystavených působení kovových prvků a sloučenin. *LABORATORY REPORTS* [online]. 42-45 [cit. 2019-12-08]. Dostupné z: web2.mendelu.cz › af_239_nanotech › J_Met_Nano › pdf › jmn3-10
- [52] CHERIAN, M, 2003. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 533(1-2), 201-209. ISSN 00275107. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.07.013
- [53] MOCCHIGIANI, Eugenio, Robertina GIACCONI, Elisa MUTI, Mario MUZZIOLI a Catia CIPRIANO, 2004. Zinc-Binding Proteins (Metallothionein and α -2 Macroglobulin) as Potential Biological Markers of Immunosenesence. *The Neuroendocrine Immune Network in Ageing*. Elsevier, 2004, 23-40. *NeuroImmune Biology*. ISBN 9780444516176. Dostupné z: doi:10.1016/S1567-7443(04)80004-8
- [54] GAN, Yabing, Guoxing YIN, Ting YU, Youyu ZHANG, Haitao LI a Peng YIN, 2020. A novel fluorescent probe for selective imaging of cellular cysteine with large Stokes shift and high quantum yield. *Talanta*. 210. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120612. ISSN 00399140.
- [55] LAITY, John H, Brian M LEE a Peter E WRIGHT, 2001. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology*. 11(1), 39-46. ISSN 0959440X. Dostupné z: doi:10.1016/S0959-440X(00)00167-6
- [56] WANG, Yonggang, Xiao MIAO, Jian SUN a Lu CAI, 2016. Oxidative Stress in Diabetes. *Molecular Nutrition and Diabetes* [online]. Elsevier, 2016, s. 65-72 [cit. 2021-5-10]. ISBN 9780128015858. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801585-8.00006-3
- [57] WONG, Daisy L. a Martin J. STILLMAN, 2021. Metallothioneins. *Comprehensive Coordination Chemistry III*. Elsevier, 2021, 157-199. ISBN 9780081026892. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14927-3
- [58] BERGER, Burkhard, Reinhard DALLINGER, Peter GEHRIG a E. Peter HUNZIKER, 1997. Primary structure of a copper-binding metallothionein from mantle tissue of the terrestrial gastropod *Helix pomatia* L. *Biochemical Journal*. 328(1), 219-224. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj3280219
- [59] Capillary electrophoresis of metallothionein, 2015. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. 15-22
- [60] SI, Manfei a Jinghe LANG, 2018. The roles of metallothioneins in carcinogenesis. 11(1). ISSN 1756-8722. Dostupné z: doi:10.1186/s13045-018-0645-x
- [61] THIRUMOORTHY, N, A SHYAM SUNDER, KT MANISENTHIL KUMAR, M SENTHIL KUMAR, GNK GANESH a Malay CHATTERJEE, 2011. A Review of Metallothionein Isoforms and their Role

- in Pathophysiology. *World Journal of Surgical Oncology*. 9(1). DOI: 10.1186/1477-7819-9-54. ISSN 1477- 7819. Dostupné také z: <https://wjso.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7819-9-54>
- [62] KRIZKOVA, Sona, Marta KEPINSKA, Gabriella EMRI, Tomas ECKSCHLAGER, Marie STIBOROVA, Petra POKORNA, Zbynek HEGER a Vojtech ADAM, 2018. An insight into the complex roles of metallothioneins in malignant diseases with emphasis on (sub)isoforms/isoforms and epigenetics phenomena. 183, 90-117. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2017.10.004
- [63] MERLOS RODRIGO, Miguel Angel, Ana Maria JIMENEZ JIMEMEZ, Yazan HADDAD, Khaldon BODOOR, Pavlina ADAM, Sona KRIZKOVA, Zbynek HEGER a Vojtech ADAM, 2020. Metallothionein isoforms as double agents – Their roles in carcinogenesis, cancer progression and chemoresistance. *Drug Resistance Updates*. 52. ISSN 13687646. Dostupné z: doi:10.1016/j.drug.2020.100691
- [64] LI, Li, Yang ZHU, Manman LIU, Duo JIN, Lei ZHANG, Junjie CHENG a Yangzhong LIU, 2021. Conjugation of oxaliplatin with PEGylated-nanobody for enhancing tumor targeting and prolonging circulation. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 223. ISSN 01620134. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinorgbio.2021.111553
- [65] PAVELICOVA, Kristyna, Lucie VANICKOVA, Yazan HADDAD, et al., 2021. Metallothionein dimerization evidenced by QD-based Förster resonance energy transfer and capillary electrophoresis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 170, 53-60. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.105
- [66] HATHOUT, Yetrib, Kristy J REYNOLDS, Zoltan SZILAGYI a Catherine FENSELAU, 2002. Metallothionein dimers studied by nano-spray mass spectrometry. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 88(2), 119-122. ISSN 01620134. Dostupné z: doi:10.1016/S0162-0134(01)00375-0
- [67] AFONSO, Carlos, Yetrib HATHOUT a Catherine FENSELAU, 2004. *International Journal of Mass Spectrometry*. 231(2-3). ISSN 13873806. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijms.2003.10.007
- [68] COUFALOVÁ, Dominika, Bořivoj VOJTĚŠEK a Lenka HERNYCHOVÁ, 2015. What Can Study of Oligomerization of Proteins in the Process of Oncogenesis Bring Us? *Klinická onkologie*. 28(Suppl 2), 2S6-2S10. ISSN 0862495X. Dostupné z: doi:10.14735/amko20152S6
- [69] MAYER, Helmut K. a Gregor FIECHTER, 2013. *Electrophoretic Techniques. Food Protected Designation of Origin - Methodologies and Applications*. Elsevier, 2013, 251-278. *Comprehensive Analytical Chemistry*. ISBN 9780444595621. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-59562-1.00010-4
- [70] Li, Sam. *Capillary Electrophoresis: Principles, Practice, and Applications*. *Journal of Chromatography Library*; Elsevier Science Publishers: The Netherlands, 1992; Vol 52
- [71] BUTLER, John M., 2012. *Capillary Electrophoresis. Advanced Topics in Forensic DNA Typing*. Elsevier, 2012, 141-165. ISBN 9780123745132. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374513-2.00006-3
- [72] Elektroforéza. 2004. *Biochemie* [online]. Rowan Design. Available at: <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm>
- [73] RÁLOVÁ, Blanka, RAUCH, Pavel, ed., 1993. *Bioanalytické metody*. Praha: Vysoká škola chemickotechnologická. ISBN 80-708-0177-8
- [74] FEKETE, Agnes a Philippe SCHMITT-KOPPLIN, 2007. *Capillary electrophoresis. Food Toxicants Analysis*. Elsevier, 2007, 561-597. ISBN 9780444528438. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044452843-8/50016-X

- [75] MAITY, Apratim, Shyam Sundar KESH, Santwana PALAI a Chukwuebuka EGBUNA, 2022. Electrophoretic techniques. *Analytical Techniques in Biosciences*. Elsevier, 2022, 59-72. ISBN 9780128226544. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-822654-4.00007-5
- [76] KARTSOVA, L A a E A BESSONOVA, 2015. Biomedical applications of capillary electrophoresis. *Russian Chemical Reviews*. 84(8), 860-874. ISSN 0036-021X. Dostupné z: doi:10.1070/RCR4492
- [77] CRUCES-BLANCO, C., L. GÁMIZ-GRACIA a A.M. GARCÍA-CAMPAÑA, 2007. Applications of capillary electrophoresis in forensic analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 26(3), 215-226. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2006.12.007
- [78] MOROZ, L.L., R. GILLETTE a J.V. SWEEDLER, 1999. Single-cell analyses of nitroergic neurons in simple nervous systems. *Journal of Experimental Biology*. 202(4), 333-341. ISSN 1477-9145. Dostupné z: doi:10.1242/jeb.202.4.333
- [79] CALDERARO, Adriana, Maria-Cristina ARCANGELETTI, Isabella RODIGHIERO, et al., 2015. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Scientific Reports*. 4(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep06803
- [80] JURINKE, Christian, Paul OETH a Dirk VAN DEN BOOM, 2004. MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Versatile Tool for High-Performance DNA Analysis. *Molecular Biotechnology*. 26(2), 147-164. ISSN 1073-6085. Dostupné z: doi:10.1385/MB:26:2:147
- [81] WELKER, Martin, Jutta FASTNER, Marcel ERHARD a Hans VON DÖHREN, 2002. Applications of MALDI-TOF MS analysis in cyanotoxin research. *Environmental Toxicology*. 17(4), 367-374. ISSN 15204081. Dostupné z: doi:10.1002/tox.10073
- [82] RAUDENSKÁ, M, K ŠMERKOVÁ, V TANHAUSEROVÁ, J GUMULEC a M HLAVNA, 2012. Metallothionein a jeho role v detoxikaci těžkých kovů a predispozici k chorobám. *Praktický lékař [online]*. 2012(6), 322-326 [cit. 2022-03-09]. Dostupné z: https://www2.med.muni.cz/masariklab/wp-content/uploads/2016/02/Raduenska-et-al_2012_PL.pdf
- [83] OKUMOTO, Sakiko, Hitomi TAKANAGA a Wolf B. FROMMER, 2008. Quantitative imaging for discovery and assembly of the metabo-regulome. *New Phytologist*. 180(2), 271-295. ISSN 0028-646X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02611.x
- GUSZPIT, Ewelina, Sona KRIZKOVA, Marta KEPINSKA, Miguel Angel Merlos RODRIGO, Halina MILNEROWICZ, Pavel KOPEL a Rene KIZEK, 2015. Fluorescence-tagged metallothionein with CdTe quantum dots analyzed by the chip-CE technique. *Journal of Nanoparticle Research [online]*. 17(11) [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1007/s11051-015-3226-8. ISSN 1388-0764. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11051-015-3226-8>
- [84] MARET, Wolfgang, 2009. Fluorescent probes for the structure and function of metallothionein. *Journal of Chromatography B*. 877(28), 3378-3383. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2009.06.014
- [85] GUSZPIT, Ewelina, Sona KRIZKOVA, Marta KEPINSKA, Miguel Angel Merlos RODRIGO, Halina MILNEROWICZ, Pavel KOPEL a Rene KIZEK, 2015. Fluorescence-tagged metallothionein with CdTe quantum dots analyzed by the chip-CE technique. *Journal of Nanoparticle Research [online]*. 17(11) [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1007/s11051-015-3226-8. ISSN 1388-0764. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11051-015-3226-8>
- [86] HERMANSON, Greg T., 2008. Zero-Length Crosslinkers. *Bioconjugate Techniques*. Elsevier, 2008, 213-233. ISBN 9780123705013. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-370501-3.00003-5

- [87] GUSZPIT, Ewelina, Pavel KOPEL, Soňa KŘÍŽKOVÁ a Halina MILNEROWICZ, 2018. Preliminary analysis of the interactions between CdTe quantum dots and human metallothionein. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 170, 447-453. ISSN 09277765. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfb.2018.06.045
- [88] WAALKES, Michael P.; GOERING, Peter L. Metallothionein and other cadmium-binding proteins: recent developments. *Chemical research in toxicology*, 1990, 3.4: 281-288.
- [89] Rafati Rahimzadeh M, Rafati Rahimzadeh M, Kazemi S, Moghadamnia AA. Cadmium toxicity and treatment: An update. *Caspian J Intern Med*. 2017 Summer;8(3):135-145. doi: 10.22088/cjim.8.3.135. PMID: 28932363; PMCID: PMC5596182.
- [90] PALUMAA, Peep; MACKAY, Elaine A.; VASAK, Milan. Nonoxidative cadmium-dependent dimerization of cadmium-metallothionein from rabbit liver. *Biochemistry*, 1992, 31.7: 2181-2186.
- [91] ZANGGER, Klaus, Gong SHEN, Gülin ÖZ, James D. OTVOS a Ian M. ARMITAGE. Oxidative dimerization in metallothionein is a result of intermolecular disulphide bonds between cysteines in the α -domain. *Biochemical Journal*. 359(2). ISSN 02646021. Dostupné z: doi:10.1042/0264-6021:3590353
- [92] ZHONG, Weiqing, Qi ZHANG, Yuan YAN, Sheng YUE, Baolin ZHANG a Wenxia TANG, 1997. Reaction of a platinum(IV) complex with native Cd, Zn-metallothionein in vitro. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 66(3), 179-185. ISSN 01620134. Dostupné z: doi:10.1016/S0162-0134(96)00201-2
- [93] Lemkuil DC, Nettesheim D, Shaw CF 3rd, Petering DH. Reaction of Cd7-metallothionein with cis-dichlorodiammine platinum (II). *J Biol Chem*. 1994;269(40):24792-24797.
- [94] WILDOVÁ, Marcela a Michaela RUMLOVÁ, January 2008. Methods of study of protein-protein interactions. *Chemické listy* [online]. 2008(102 (1), 28-34 [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/287470105_Methods_of_study_of_protein-protein_interactions

SEZNAM ZKRATEK

FRET	Försterův rezonanční přenos energie
MT	Metallothionein
MTs	Metallothioneiny
QDs (quantum dots)	Kvantové tečky
Cys	Cystein
MRE- metal responsive element	Prvek reagující s kovem
MTF-1- metal regulatory transcription factor-1	Regulační transkripční faktor- kovu
MALDI-TOF–MS	Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace
IR	Infračervená oblast
NMR	Nukleární magnetické rezonance
HOMO	Nejvyšší obsazený molekulární orbital
LUMO	Nejnižší obsazený molekulární orbital
PET	Fluorescenční fotoindukovaný přenos
BRET	Bioluminiscenční rezonanční přenos energie
A	Akceptor
D	Donor
GFP (GFP)	Zelený fluorescenční protein
CDs	Uhlíkové tčky
FP	Fluorescenční proteín
DET	Dexterův přenos energie
SET	Povrchový přenos energie
ND	Nanodiamanty
CNT	Uhlíkové nanotrubičky
SWNT	Uhlíkové nanotrubičky s jednou stěnou
MWNT	Uhlíkové nanotrubičky s více stěnami
EET	Přenos excitační energie
FLN	Fullereny
GIF	Růstový inhibiční faktor
LP	Long pass- „dlouhý filtr“
SP	Short pass- „krátký filtr“
EOF	Elektroosmotický tok
CE	Kapilární elektroforéza
FC princip	Franck-Condonův princip
LIF	Laserem indukovaná fluorescence
ESI	Ionizace elektrosprejem
UV-VIS	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie
MS	Hmotnostní detekce
HCl	Kyselina chlorovodíková
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
NH ₃	Amoniak

MSA
Sulfo-NHS
 μ l
mg
ml
mM
M
mbar
s
kV
nm
 μ A
mV

Kyseliny mercaptosukciniové
N-Hydroxioulfosuccimide sodium
Mikrolitr
Miligram
Mililitr
Milimol
Mol
Milibar
Sekunda
Kilovolt
Nanometr
Mikroampér
Milivolt