



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra biomedicínské techniky

**Experimentální analýza mechanických vlastností modelových
buněčných linií hepatocelulárního karcinomu**

**Experimental analysis of model hepatocellular carcinoma cell
lines**

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu

Vedoucí práce: Ing. Martin Otáhal, Ph.D.

Bc. Bibiana Kvasnicová



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Kvasnicová** Jméno: **Bibiana** Osobní číslo: **465416**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra přírodovědných oborů**
Studijní program: **Biomedicínská a klinická technika**
Studijní obor: **Přístroje a metody pro biomedicínu**

II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

Experimentální analýza mechanických vlastností modelových buněčných linií hepatocelulárního karcinomu

Název diplomové práce anglicky:

Experimental analysis of model hepatocellular carcinoma cell lines

Pokyny pro vypracování:

Na základě kritické rešerše literatury student navrhne metodiku experimentálního měření mechanických vlastností buněk hepatocelulárního karcinomu (HCC) pomocí AFM. K optimalizaci metodiky budou použity HCC linie HUH7 a SNU745. Student vypracuje komparativní analýzu mechanických vlastností HCC linií 1) s vnesenými mutacemi pro cytoskeletární protein plektin 2) během epitelialne-mesenchymalni tranzice indukované TGFb-1

Seznam doporučené literatury:

[1] Xin Wu, Mariappan Muthuchamy and Doodipala Samba Reddy, Atomic Force Microscopy Protocol for Measurement of Membrane Plasticity and Extracellular Interactions in Single Neurons in Epilepsy, Front. Aging Neurosci., ročník 8, číslo 88, 2016

Jméno a příjmení vedoucí(ho) diplomové práce:

Ing. Martin Otáhal, Ph.D.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) diplomové práce:

Mgr. Markéta Jiroušková, Ph.D.

Datum zadání diplomové práce: **15.02.2021**

Platnost zadání diplomové práce: **31.10.2022**

prof. RNDr. MUDr. Petr Maršálek, Ph.D.
podpis vedoucí(ho) katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
podpis děkana(ky)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Experimentální analýza mechanických vlastností modelových buněčných linií hepatocelulárního karcinomu“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 21. 5. 2021

.....

Bc. Bibiana Kvasnicová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych se vší upřímností poděkovala svému vedoucímu diplomové práce, Ing. Martinovi Otáhalovi, Ph.D. za veškerou odbornou pomoc, čas a trpělivost. Dále bych ráda poděkovala celému Oddělení integrativní biologie ÚMG AV ČR, zejména jeho vedoucímu RNDr. Martinovi Gregorovi, Ph.D. a Mgr. Markétě Jirouškové, Ph.D. za odborné konzultace a veškerou materiální podporu (číslo grantu: GACR 21-21736S). Také děkuji Ing. Haně Kalábové za pomoc v laboratoři tkáňových kultur.

ABSTRAKT

Experimentální analýza mechanických vlastností modelových buněčných linií hepatocelulárního karcinomu:

Analýza elastických vlastností nádorových buněk nabízí nový úhel pohledu v oblasti patologie a patofyziologie buňky. Elasticita buněk je dána zejména složením a organizací cytoskeletu, který se skládá ze tří typů vláken a doprovodných proteinů. Cílem této práce je pomocí mikroskopie atomárních sil provést experimentální analýzu modulu pružnosti jednotlivých buněk dvou linií hepatocelulárního karcinomu (SNU475 a HuH7), dále analyzovat modul pružnosti těchto buněk s vnesenými mutacemi pro cytoskeletální protein plektin, a nakonec změřit modul pružnosti při procesu epiteliálně-mesenchymální tranzice (EMT) indukované TGF- β 1 (u nemutovaných i mutovaných buněk obou linií). V úvahu je bráno i rozložení modulu pružnosti v jádře a v cytoplazmě. Výsledky ukazují, že absence plektinu v buňkách obou linií má za následek signifikantní snížení modulu pružnosti v jádře i v cytoplazmě, oproti tomu proces EMT je zodpovědný za růst modulu pružnosti v oblasti cytoplazmy.

Klíčová slova

plektin, epiteliálně-mesenchymální tranzice, hepatocelulární karcinom, modul pružnosti

ABSTRACT

Experimental analysis of model hepatocellular carcinoma cell lines:

Elastic properties analysis of cancerous cells provides different perspective in pathology and pathophysiology of a cell. Cell's elasticity is defined by composition and organization of the cytoskeleton, which consists of three types of fibers and associated proteins. The aim of the thesis is to perform an experimental analysis of the elastic modulus via AFM, measuring single cells of two different hepatocellular carcinoma cell lines (SNU475 and HuH7). The analysis of elastic modulus includes wildtype cells (WT), cells with introduced mutations for cytoskeletal protein plectin (KO) and finally both WT and KO during epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TGF- β 1. Distribution of the elastic modulus in nuclear and cytoplasmic region is also considered. Results show that plectin-deficient cells have significantly lower elastic modulus in both regions, unlike cells during EMT, which is responsible for increased elastic modulus in cytoplasm.

Keywords

plectin, epithelial-mesenchymal transition, hepatocellular carcinoma, elastic modulus

Obsah

Seznam symbolů a zkratk.....	9
1 Úvod	10
2 Přehled současného stavu.....	11
2.1 Buňka	11
2.2 Cytoskelet jako hlavní biomechanická struktura	14
2.2.1 Mikrofilamenta	15
2.2.2 Intermediální filameta	16
2.2.3 Mikrotubuly	17
2.2.4 Doprovodné proteiny	18
2.3 Rakovinná buňka.....	21
2.4 Hepatocelulární karcinom	23
2.4.1 Buněčná linie HuH-7	25
2.4.2 Buněčná linie SNU745	26
2.5 Epiteliálně-mesenchymální tranzice	27
2.5.1 EMT I	29
2.5.2 EMT II	29
2.5.3 EMT III.....	30
2.6 AFM – měření mechanických vlastností.....	32
2.6.1 Základní součásti AFM	33
2.6.2 Módy AFM.....	34
2.6.3 Měření mechanických vlastností pomocí AFM	37
2.6.4 Modely pro vyhodnocování naměřených dat	39
3 Cíle práce a hypotézy.....	43
3.1 Cíle práce.....	43
3.2 Hypotézy	43
4 Metody	44
4.1 Příprava buněk.....	44
4.1.1 Přístrojové vybavení, pomůcky a chemikálie.....	44
4.1.2 Udržování buněčné kultury	45
4.1.3 Příprava WT a KO na měření mikroskopem atomárních sil	46

4.1.4	Příprava buněk při EMT indukovanou TGF- β 1	46
4.2	Měřené vzorky.....	47
4.3	Měření na AFM.....	47
4.3.1	Přístroje a vybavení:	47
4.3.2	Postup měření a vyhodnocení.....	47
5	Výsledky.....	50
6	Diskuse.....	56
7	Závěr	58
	Seznam použité literatury	59

Seznam symbolů a zkratk

Seznam symbolů

Symbol	Jednotka	Význam
F	N	Síla
k	N/m	Konstanta tuhosti
d	m	deformace
f	Hz	Rezonanční frekvence
R_p	m	Poloměr zakřivení hrotu
E	Pa	Modul pružnosti
E_{cyt}	Pa	Modul pružnosti cytoplazmy
E_{nu}	Pa	Modul pružnosti jádra
δ	m	Hloubka indentace
ν	-	Poissonova konstanta
a	m	Poloměr zakřivení kontaktní plochy
α	°	Polovina otvorového úhlu kužele
S	m/V	Senzitivita

Seznam zkratk

Zkratka	Význam
AFM	Mikroskopie atomárních sil (<i>Atomic force microscopy</i>)
EMT	Epiteliálně-mesenchymální tranzice
HCC	Hepatocelulární karcinom
WT	Původní buňka bez mutací (<i>Wildtype</i>)
KO	Buňka s vnesenými mutacemi (<i>Knock-out</i>)
IF	Intermediální filamenta
HBV	Virus žloutenky typu B (<i>Hepatitis B Virus</i>)
HCV	Virus žloutenky typu C (<i>Hepatitis C Virus</i>)
TNM	Tumor Nodus Metastáze klasifikační systém
BCLC	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i>
TGF- β	Transformující růstový faktor beta (<i>Transforming Growth Factor beta</i>)
SNU	Národní univerzita Soul (<i>Seoul National University</i>)
HuH	Zhoubný nádor jater (<i>Human Hepatoma</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
FBS	Fetální bovinní sérum
ECM	Extracelulární matrix
MET	Mesenchymálně-epiteliální tranzice
FSP1	Fibroblast specifický protein 1
HGF	Růstový faktor hepatocytů (<i>Hepatocyte Growth Factor</i>)
EGF	Epidermální růstový faktor (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
SPM	Skenovací mikroskopie (<i>Scanning probe microscopy</i>)
JKR	Johnson-Kendall-Robertsův kontaktní mechanický model
DMT	Derjagin-Muller-Toropovův kontaktní mechanický model
ATB	Antibiotika
SEM	Střední odchylka od průměru (<i>Standard Error of the Mean</i>)

1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou světově druhou nejčastější příčinou úmrtí a hepatocelulární karcinom je nejčastějším primárním nádorem jater, navíc jen malé procento HCC je diagnostikováno zavčasu a terapie tak nebývá úspěšná. Analýza mechanických vlastností jednotlivých nádorových buněk přináší nový pohled na intracelulární procesy a patofyziologii rakovinné buňky a současně nabízí nové přístupy v diagnostice a cílené terapii zhoubných onemocnění.

Při měření mechanických vlastností buněk, v tomto případě mikroskopii atomárních sil (AFM), vystupuje celá řada faktorů, avšak stěžejní částí buňky z hlediska biomechaniky je její cytoskelet, který se skládá ze tří typů filament a doprovodných proteinů, které mají za úlohu filamenta organizovat, propojovat a funkcionalizovat. Cytoskeletární doprovodný protein plektin připojuje cytoskelet k buněčným spojům plazmatické membrány, přispívá k mechanické integritě buňky a ovlivňuje její viskoelastické vlastnosti.

Cílem této práce je provést komparativní analýzu tuhosti dvou linií hepatocelulárního karcinomu *in vitro*, SNU475 a HuH7, přičemž předmětem zkoumání jsou nezměněné linie (WT), dále plektin-deficientní linie (KO) a konečně oba typy obou linií při epiteliálně-mesenchymální tranzici (EMT) indukovanou růstovým faktorem TGF-beta1, což je proces spojený s metastatickou aktivitou nádorových buněk. Z výsledků měření měl být zřejmý vliv plektinu na uspořádání cytoskeletu a tuhost v běžném i metastatickém stavu nádorové buňky.

2 Přehled současného stavu

2.1 Buňka

Buňka je základním stavebním a funkčním prvkem živých organismů, pro který platí postuláty buněčné teorie podle T. Schwanna, M. Schleidena a R. L. K. Virchowa doplněné o moderní poznatky [1]:

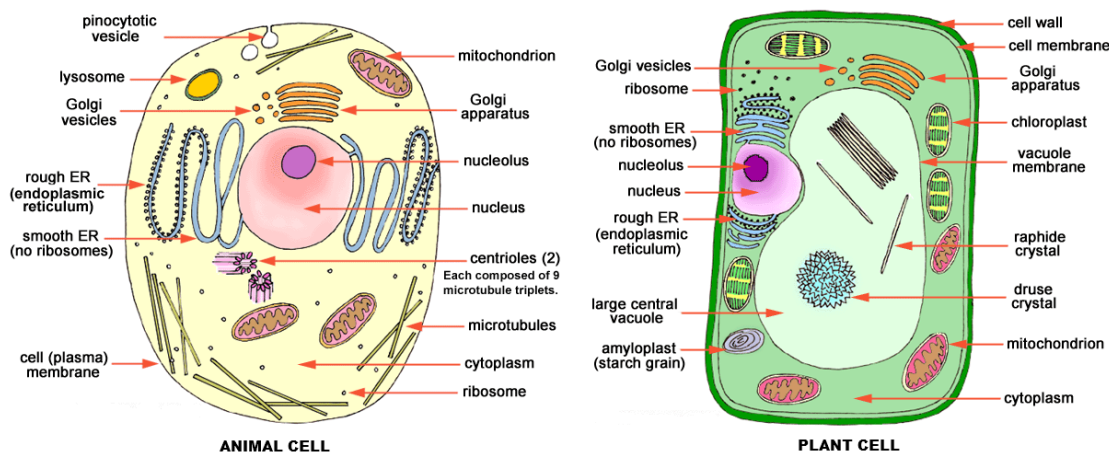
1. Všechny živé organismy se skládají z jedné nebo více buněk nebo jsou na buňkách závislé
2. Buňka je základní strukturní a funkční jednotkou všech živých organismů
3. Nové buňky vznikají z již existujících buněk buněčným dělením
4. Buňky nesou genetický materiál a při dělení jej předávají dceřiným buňkám
5. Chemické složení buněk je v zásadě neměnné
6. Uvnitř buněk se odehrávají v zásadě stejné metabolické, energetické, biochemické aj. procesy

Obecně rozeznáváme dva základní typy buněk, které se od sebe liší strukturou, avšak nalézáme u nich četné analogie a předpokládá se, že jeden typ dal vzniknout druhému. Jedná se o rozdělení buněk na prokaryotní a eukaryotní. Prokaryotické buňky jsou typické pro bakterie, vyznačují se např. menšími rozměry, vně plazmatické membrány mohou mít buněčnou stěnu, jejich DNA neobsahuje histony a není od cytoplazmy oddělena jadernou membránou a zpravidla neobsahují membránové organely. Eukaryotické buňky se vyznačují většími rozměry, najdeme u nich jádro ohraničené jadernou membránou, jejich DNA obsahuje histony a v cytoplazmě se nacházejí i další membránové organely, jako jsou mitochondrie, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, lysozomy a peroxizomy. [2] Souhrn nejdůležitějších rozdílů obsahuje následující tabulka:

Tabulka 2.1: Přehled rozdílů mezi prokaryotickou a eukaryotickou buňkou [1]

	Prokaryotní buňka	Eukaryotní buňka
velikost	0,3–6 μm	5 μm až jednotky cm
organely	pouze nemembránové	membránové i nemembránové
jádro	nepřítomné	prítomné
chromozom	jeden kruhový	různý počet, lineární
geny	bez intronů	obsah intronů i exonů
počet genů	6 až 8 tisíc	více než 10 tisíc
ploidie	haploidní	diploidní i haploidní
jadérko	není	je
nejaderná DNA	plazmidy	mitochondrie či plastidy
jaderné proteiny	bez histonů	obsahují histony

Eukaryotní buňky dále dělíme na živočišné a rostlinné. I zde je celá řada rozdílů – rostlinné buňky mají na rozdíl od živočišných buněčnou stěnu, plastidy, vakuolu, naopak postrádají lyzozomy a jejich hlavní zásobní látkou je škrob, u živočišných buněk jsou hlavní zásobní látky glykogen a lipidy [1]. Tato práce se zabývá studiem dvou buněčných linií lidského hepatocelulárního karcinomu, tudíž další detailní popis problematiky se bude týkat výhradně buněk živočišných.



Obrázek 2.1: Schéma živočišné a rostlinné buňky. [3]

Při analýze mechanických vlastností buněk je třeba brát v úvahu jejich vnitřní strukturu, přičemž lze vytyčit tři nejdůležitější součásti pro jejich popis (nejen) z hlediska biomechaniky [4]:

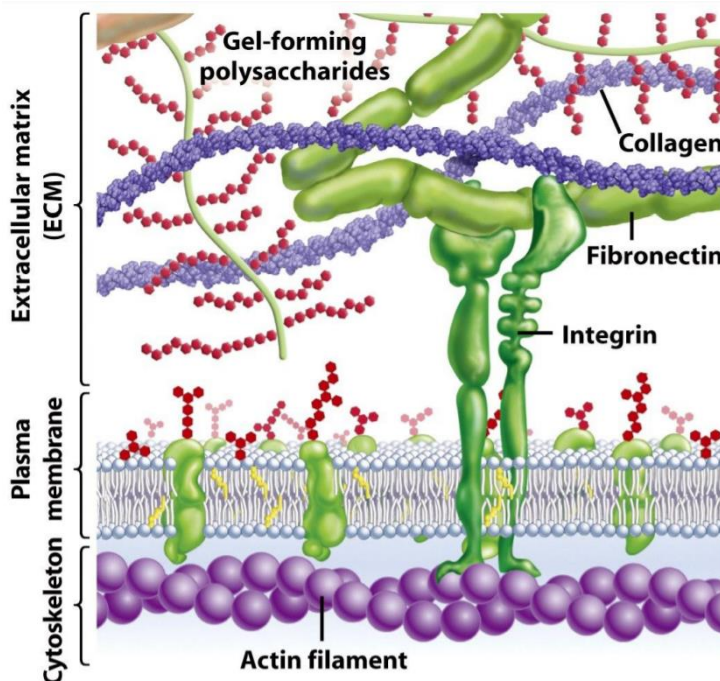
plazmatická membrána – fosfolipidová dvojvrstva s množstvím proteinů a glykolipidů, jenž primárně odděluje obsah buňky od okolí a funguje jako selektivní permeabilní membrána

jádro – organela obalená vlastní jadernou membránou obsahující chromatin, jadérko a jadernou matrix

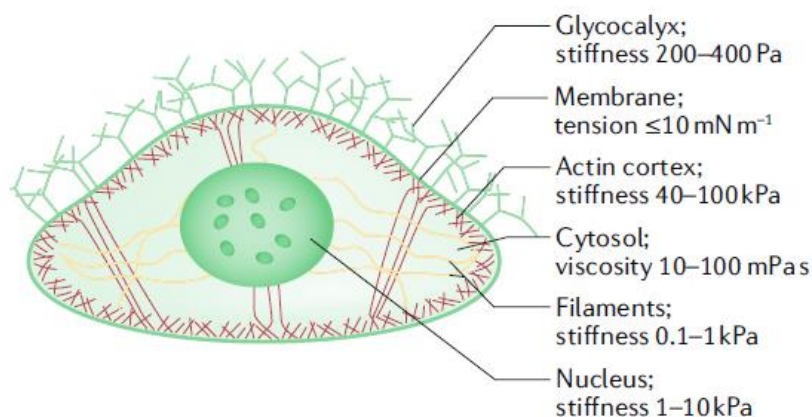
cytoplazma – skládá se z matrix, jenž obsahuje tři základní skupiny struktur: buněčné organely, cytoskelet a inkluze

Plazmatická membrána je sama o sobě málo odolná vůči externímu mechanickému působení, proto je z vnitřní strany vyztužena tzv. endoskeletem (cell cortex) a ze strany vnější funguje extracelulární matrix jako exoskelet. Endoskelet je v některé literatuře vnímán coby součást cytoskeletu [5], jinde se o něm pojednává jako o složce plazmatické membrány [1]. V každém případě ho lze popsat jako specializovanou vrstvu tvořenou F-aktinem, aktin vázajícími proteiny, myozinovými motorovými proteiny a spektrinem. Ovlivňuje chování plazmatické membrány, vlastnosti jejího povrchu a podílí se na buněčné adhezi, jednak na mezibuněčné úrovni, jednak na úrovni buňky a substrátu. [1][5]

V extracelulárním prostoru se pak nachází vnější opěrná soustava buňky (exoskelet), která je tvořena prvky extracelulární matrix a k plazmatické membráně je připojena skrze tzv. integriny, speciální membránové integrální proteiny. V extracelulární matrix nacházíme kolagen, elastin, fibronektin, laminin, glykoproteiny a proteoglykany. [5]



Obrázek 2.2: Schéma připojení extracelulární matrix k aktinovému endoskeletu skrze integriny [6]



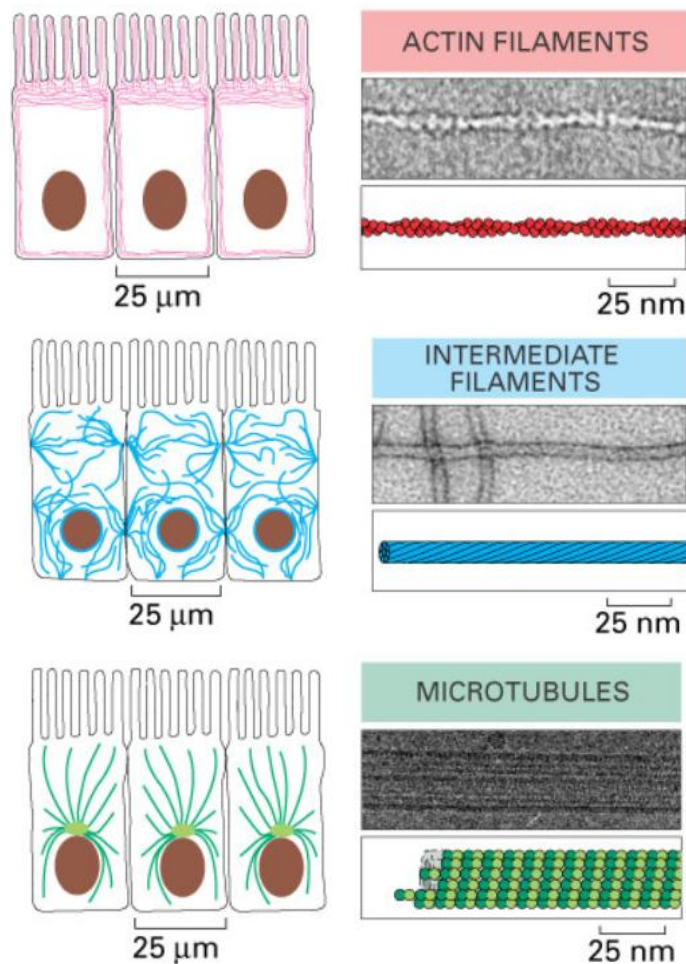
Obrázek 2.3: Schematická reprezentace adherentní savčí buňky a významných struktur z hlediska biomechaniky [7]

V této práci je hlavním biomechanickým parametrem modul pružnosti. U jednotlivých lidských buněk se typické hodnoty modulu pružnosti pohybují v řádech desetin až stovek kilopascalů. [8]

2.2 Cytoskelet jako hlavní biomechanická struktura

Mechanické vlastnosti buněk, které jsou hlavním tématem této práce, jsou velkou měrou ovlivněny strukturou a vlastnostmi cytoskeletu. Ten tvoří trojrozměrnou opěrnou síť rozprostřenou skrz celý cytosol buňky. Má zásadní vliv na tvar, mechanickou stabilitu a tuhost (potažmo modul pružnosti) buněk, ale také na pohyblivost. Pohyblivost je zprostředkována specializovanými povrchovými strukturami, jako jsou řasinky, bičíky, buněčné adheze apod. S rozsáhlejším studiem cytoskeletu se zjišťuje, že se jedná o strukturu dynamickou – účastní se cytoplazmatického transportu, buněčné signalizace, umožňuje vytvořit mezibuněčná spojení či naopak buňku izolovat v mezibuněčné hmotě. Jeho další stěžejní funkcí je tvorba dělicího vřeténka při mitóze. [1][4]

Obecně se cytoskelet skládá ze tří typů filament, vláknitých struktur, které se rozlišují dle plošného průřezu. Uspořádání prostorové i časové a funkční dynamiku filament ovlivňují zejména doprovodné, též asociované, proteiny, jako např. plectin, kterému je vzhledem k tématu diplomové práce věnována samostatná podkapitola. [4]



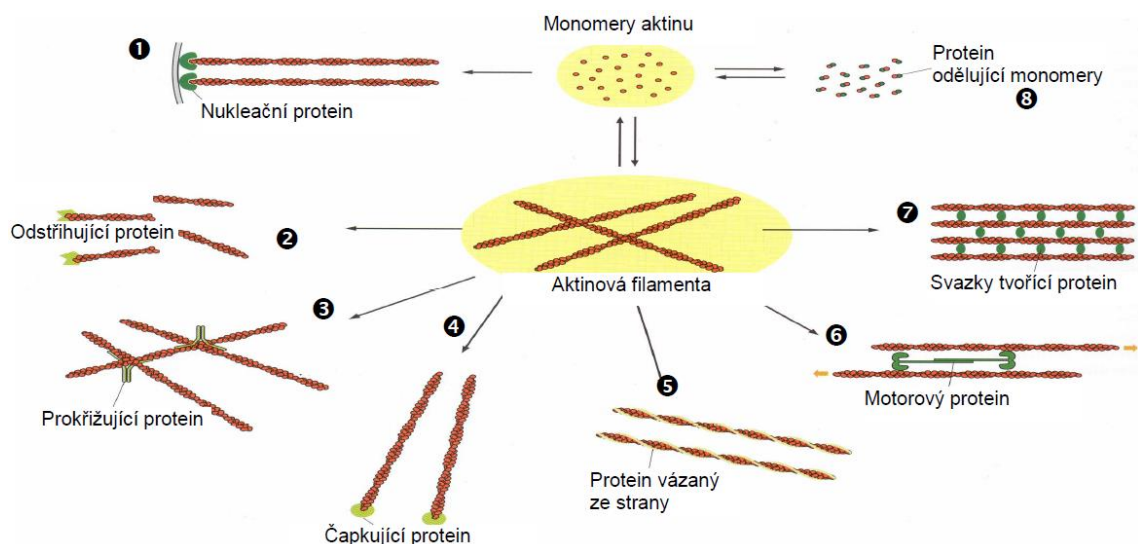
Obrázek 2.4: Srovnání morfologie a rozmístění filament v buňce. [9]

2.2.1 Mikrofilamenta

Mikrofilamenta jsou tvořena aktinem, proteinem, jehož molekula je tvořena 375 aminokyselinami. Jedná se o nejtenčí z filament cytoskeletu, příčný průměr je 5–7 nm. Základní stavební složkou aktinových mikrofilament jsou globulární jednotky G-aktinu, které následnou polymerizací tvoří vláknitý F-aktin. Dvojitá šroubovice F-aktinu pak tvoří výsledné mikrofilamentum. Pod pojmem aktin je zahrnuto mnoho typů, které se mohou lišit i jedinou změnou aminokyseliny v molekule – tyto změny mají za následek spektrum funkčních a strukturálních modifikací v jednotlivých typech buněk. [4]

Aktinová mikrofilamenta nacházíme v nesvalových i svalových buňkách. Ve svalových buňkách tvoří společně s vlákny myozinu kontraktilní element, který lze označit jako stabilní strukturu. Oproti tomu v buňkách nesvalových jsou mikrofilamenta struktury labilní a vysoce dynamické, kdy neustále dochází k disociaci a opětovné polymerizaci aktinu, a to v reakci na změny koncentrace iontů vápníku v cytoplazmě. Právě v nesvalových buňkách tvoří mikrofilamenta základ cytoskeletu, tzv. difuzní síť. Větší koncentrace mikrofilament se u většiny buněk dále nachází pod cytoplazmatickou membránou, kde tvoří tzv. terminální síť. V neposlední řadě tvoří součást povrchových struktur, např. v mikroklcích, jak je patrné i na obrázku 2.4. [4][5]

Rozmanitost aktinu také umožňují četné doprovodné aktin vázící proteiny, z nichž nejdůležitější jsou např.: alfa-aktinin, vinkulin, tropomyozin, fodrin. Na obrázku níže jsou ilustrovány funkce doprovodných proteinů v interakci s aktinem. [5]



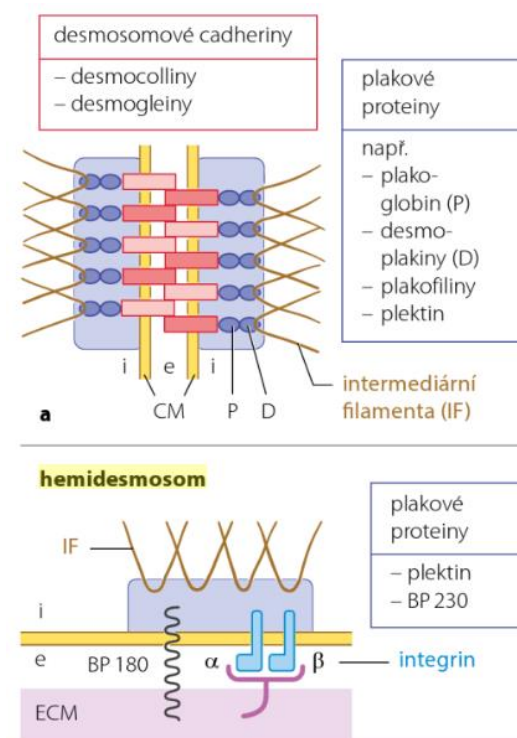
Obrázek 2.5: Hlavní třídy aktin-vázajících proteinů [5]

2.2.2 Intermediální filamenta

Jsou tvořena dlouhými vláknitými strukturami a jejich název je odvozen od skutečnosti, že jejich průřez, 10–12 nm, je tenčí než u mikrotubulů, ale tlustší než u mikrofilament, jsou tedy rozměrově „uprostřed“. Základní podjednotkou je monomer, dva monomery se pak za pomoci globulárních konců spojují do dimerů. Dva posunuté dimery se dále spojují paralelně a tvoří tetramery, které se následně opět paralelně spojují a vytvářejí stočenou strukturu intermediálního filamenta. Hlavními vlastnostmi IF jsou: stabilita, pevnost, opěrná funkce pro ostatní buněčné struktury. [4]

Intermediální filamenta (IF) jsou tvořena různými proteiny, podle kterých se dají IF rozdělit do několika skupin [4]:

- a) Keratinová IF – nacházejí se v buňkách epitelového původu. Keratiny představují skupinu cca 20 fibrilárních polypeptidů, které jsou nataženy přes celou cytoplazmu a jsou nepřímo propojeny se sousedními buněčnými filamenti pomocí specializovaných buněčných adhezí – desmozomů. Keratinová vlákna, přímo zakotvená v desmozomech, mají velký mechanický význam, protože jsou velmi odolná proti přetržení. Genetická porucha jejich tvorby zapříčiňuje onemocnění zvané epidermolysis bullosa (křehká kůže). Asociované (doprovodné) proteiny důležité pro funkce a morfologii IF jsou zejména plektin, filagrin a dermoplakin. Uplatnění nacházejí IF i v hemidesmozomech (typ I), kde jde o ukotvení epithelů na bazální laminu a pod ní ležící vazivo. [4][10]

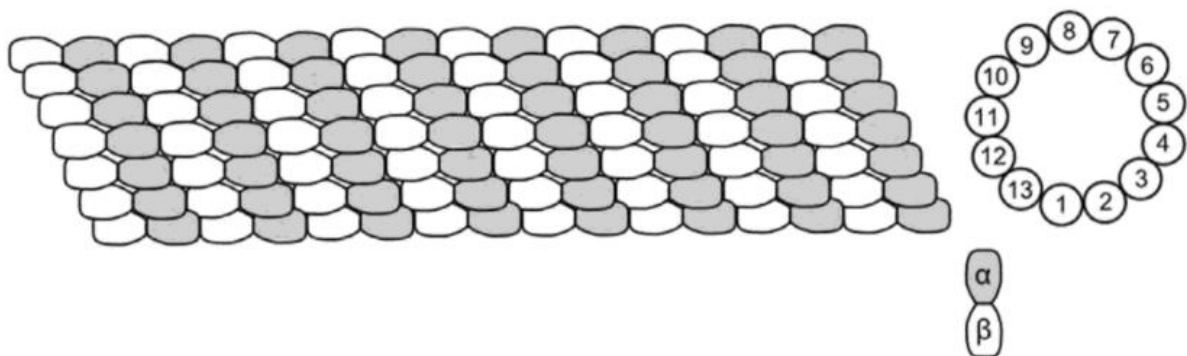


Obrázek 2.6: ilustrace uspořádání desmozomu a hemidesmozomu [4]

- b) Vimentinová IF – nacházejí se v buňkách mesenchymálního původu, některých embryonálních a nediferencovaných buňkách. Ve velké míře se nacházejí ve fibroblastech, chondroblastech a buňkách endotelu.
- c) Desminová IF – nalézáme je ve svalových strukturách, zejména v okolí Z-linie příčně pruhovalých vláken svalů, kardiomyocytů i u svaloviny hladké.
- d) Neurofilamenta – nacházejí se v cytoplazmě neuronů, jejich funkce ještě nebyla přesně objasněna.
- e) Gliová IF – jsou tvořena kyselými proteiny fibrilární povahy a vyskytují se zejména v astrocytech, v podpůrných gliových buňkách.

2.2.3 Mikrotubuly

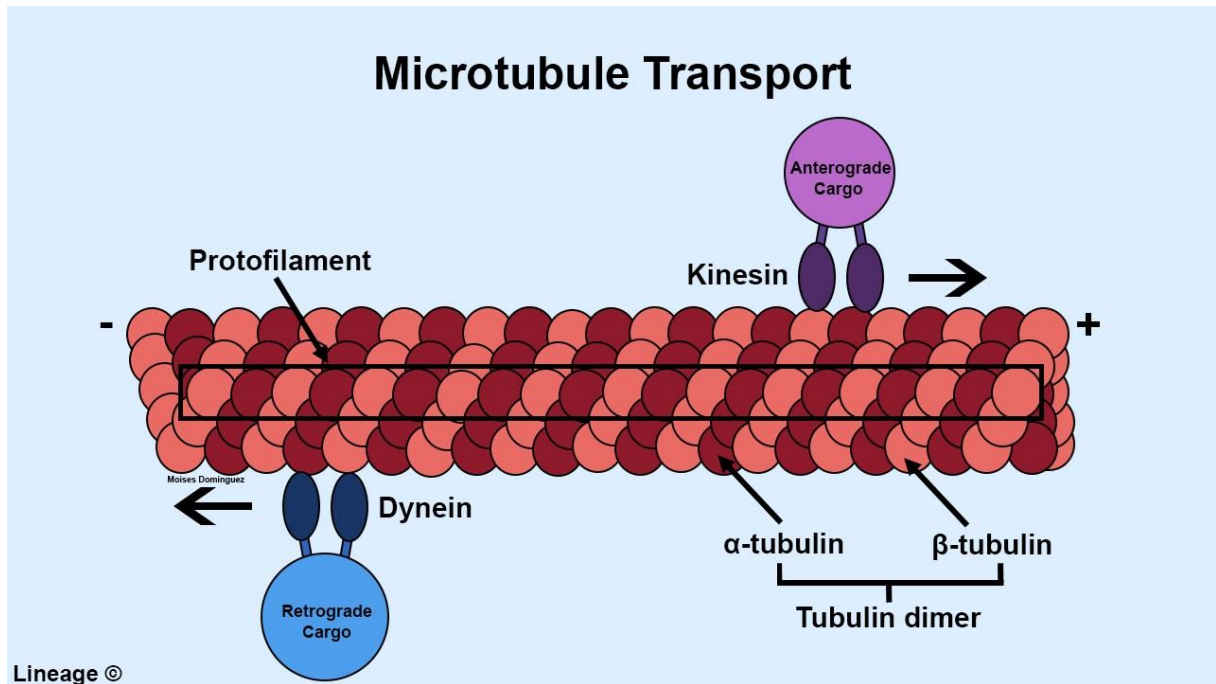
Mikrotubuly jsou tubulární struktury tvořené proteinem tubulinem a jedná se o nejtlustší typ filament cytoskeletu. Jejich vnější průměr je asi 24 nm a jsou různě dlouhé. Typicky se jedná o přímé nevětvené struktury. Stěnu tvoří 13 paralelně souběžných protofilament. Základní stavební jednotkou mikrotubulů jsou heterodiméry tubulinu, což jsou dvě polarizované molekuly tubulinu, též označované jako tubulin α a β , které se liší malou nuancí v uspořádání aminokyselin. Tyto heterodiméry pak polymerizují a vytváří protofilamenta. [4][11]



Obrázek 2.7: Schéma stavby mikrotubulů [11]

Mikrotubuly jsou dynamické struktury zodpovědné např. za výměnu polymerizovaných molekul za látky rozpuštěné v okolní cytoplazmě. Jedná se o labilnější struktury než mikrofilamenta a jejich polymerizace je řízena speciálními organizujícími centry. Tvorbu, růst a funkci mikrotubulů významně ovlivňují jejich doprovodné proteiny, přičemž některé mohou mikrotubuly stabilizovat a jiné zprostředkovávat transport. Mikrotubuly se v cytoplazmě vyskytují buď difuzně, kdy udržují specializovaný tvar buněk, nebo tvoří organizované struktury dělicího vřeténka a „kolejnice“ pro pohyb různých struktur. Velký význam mikrotubulů spočívá právě v intracelulárním transportu různých komponent cytoplazmy, mitochondrií,

cytoplazmatických vezikul, transportu látek v drobných vezikulách mezi endoplazmatickým retikulem a Golgiho komplexem apod. Pro všechny transporty jsou esenciální doprovodné proteiny – kinesin a dynein, které na sebe váží transportované struktury a fungují jako nosiče, které „kráčí“ po mikrotubulech s nákladem. [11][12]



Obrázek 2.8: Asociované proteiny mikrotubulů, kinesin a dynein, zprostředkovávající intracelulární transport [12]

2.2.4 Doprovodné proteiny

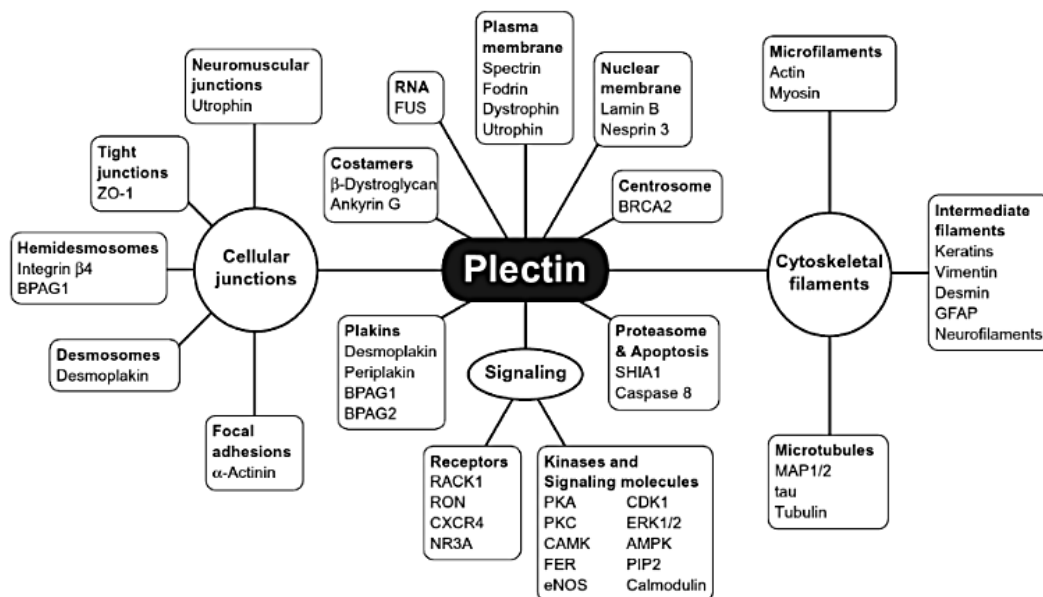
Kromě výše zmíněných tří druhů filament se v cytoskeletu uplatňují doprovodné (asociované) proteiny, které mají zásadní úlohu ve funkcionalizaci, organizaci, reorganizaci, odbourávání a připojování filament k dalším strukturám. Každý typ filament má své charakteristické doprovodné proteiny. Již byly zmíněny kinesin a dynein u mikrotubulů, u intermediálních filament plektin a dermoplakin a v případě aktinových mikrofilament nalézáme např. tropomyozin či vinkulin. [4]

Plektin

Plektin je velký cytoskeletální protein (>500 kDa), jenž náleží do skupiny proteinů zvané plakiny, které mají spojující funkci, též se nazývají „cytolinkery“ [13]. Plektin má multidoménovou strukturu, která umožňuje vzájemné propojení intermediálních filament s dalšími buněčnými strukturami, včetně zmíněných aktinových mikrofilament a mikrotubulů, které společně organizuje [14]. Tím má zásadní vliv na:

- mechanickou stabilizaci buněk a mezibuněčné interakce, protože umožňuje zakotvení a propojení cytoskeletálních IF jednak uvnitř buňky, jednak k desmozomům (kotvicím spojům na mezibuněčné úrovni)
- regulaci cytoskeletální dynamiky, jelikož plektin funguje jako dráha pro signální molekuly, které za tuto dynamiku odpovídají.

Protein plektin se vyznačuje velkým počtem různých isoform, v jakých může být exprimován, a to díky alternativnímu sestřihu prvního exonu. [14][15]

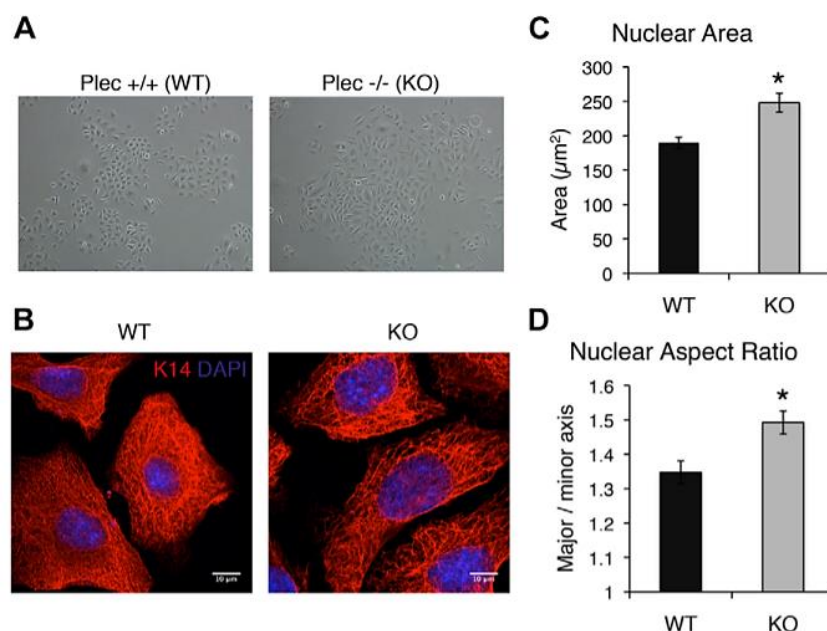


Obrázek 2.9: Výskyt a funkce plektinu [15]

Úplná deficiencie plektinu je pro živé organismy neslučitelná se životem, alespoň pro to svědčí studie z roku 1997 [16], která studovala funkce plektinu na plektin-deficientním myším modelu. Všechny myši zahynuly do tří dnů od narození, přičemž jejich kůže vykazovala hojnou tvorbu puchýřů zapříčiněnou degenerací keratinocytů, hlavních pokožkových buněk. Podobný kožní fenotyp je známý u pacientů, kteří trpí nemocí zvanou epidermolysis bullosa, též nemoc motýlích křídel, jenž je způsobena mutací některého z genů jako je právě plektin, laminin, integrin či keratin, které se podílejí na stavbě pokožky. Taktéž byly pozorovány abnormality u skeletálního svalstva a dezintegrace interkalárních disků, tj. buněčných spojů kardiomyocytů. [16]

Jiné studie zabývající se funkcí plektinu na buněčné úrovni poukazují na jeho vliv na mechanickou odolnost buněk, morfologii, prostorové uspořádání buněk, organizaci cytoskeletu, mezibuněčných spojů, na buněčnou motilitu apod. U některých plektin-deficientních buněk, např. u myoblastů, byla prokázána menší tuhost, větší tolerance k mechanickému působení a nižší míra adheze. Oproti tomu u již zmíněných keratinocytů byly plektin-deficientní buňky tužší, více kontraktilní, hůře snášely vnější mechanické působení a měly větší motilitu. [17]

Plektin je též zodpovědný za prostorovou organizaci kleci podobné sítě IF okolo jádra buňky [18]. S tím souvisí vliv absence plektinu na morfologii buňky a její prostorové uspořádání, kdy byl u plektin-deficientních keratinocytů (KO) pozorován větší poměr velikosti jádra ku celkové velikosti buňky, než tomu bylo u buněk bez vnesené mutace pro plektin (WT) – viz obrázek níže. [19]



Obrázek 2.10: Vliv plektinu na tvar buňky a deformaci jádra. (A) Reprezentativní snímky buněčné morfologie WT a KO keratinocytů z optického mikroskopu. (B) Snímek z fluorescenčního mikroskopu zobrazující keratinovou síť a morfologii jádra (barveno DAPI) u WT a KO. (C) Kvantifikovaná plocha jádra u WT a KO. (D) Poměr velikosti jádra ku rozměru buňky pro WT a KO keratinocyty. [19]

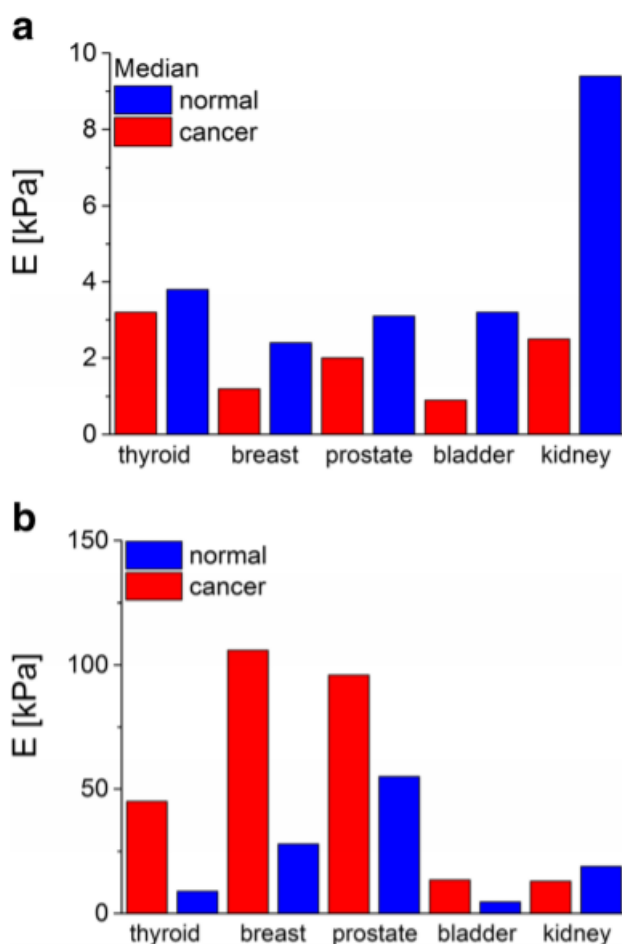
2.3 Rakovinná buňka

Rakovinné buňky se od zdravých liší v mnoha ohledech. Tyto rozdíly jim umožňují nekontrolovatelně růst a stát se invazivními. Jedna ze základních odlišností je fakt, že rakovinné buňky jsou méně specializované než ty normální, takže zatímco zdravá lidská buňka dozraje pro specifickou funkci, kterou má zastávat na určitém místě a regulovaným způsobem, rakovinné buňky se nepřetržitě dělí. Jsou schopné ignorovat signály pro zastavení buněčného dělení či navození apoptózy, kterou se organismus zbavuje nepotřebných buněk. Dále jsou nádorové buňky schopné ovlivňovat své okolí tak, aby zajistily vhodné nádorové mikroprostředí. [20] Nádorovým mikroprostředím se rozumí vlastní nádorová masa, veškeré další buněčné (leukocyty, fibroblasty) i nebuněčné složky (signální molekuly, složky extracelulární matrix) nádorové tkáně, bezprostřední okolí nádoru a dynamické interakce, které probíhají na různých úrovních. [21] Pro lepší přehlednost jsou nejdůležitější rozdíly uvedeny v tabulce níže.

Tabulka 2.2: Rozdíly mezi normálními a rakovinnými buňkami [20]

Znak	Normální buňky	Rakovinné buňky
Růstové faktory (RF)	Při dosažení limitu dělení či míry růstu produkce ustává	Méně závislé na okolních RF, mohou produkovat vlastní
Inhibice růstu v závislosti na hustotě	Při dosažení dané hustoty v prostředí	Růst a dělení pokračuje bez ohledu na hustotu
Specializace a dozrávání	Dozrávání ve specializované buňky; buněčné dělení ustává u plně diferencovaných buněk	Bez specializace a diferenciaci, rychle se dělí
Kontaktní inhibice	Odpověď na signál od okolních buněk k inhibici růstu	Bez odezvy na signály od okolních buněk, dále neorganizovaně rostou a pronikají do okolní tkáně
Apoptóza	Je-li buňka nepotřebná, stará nebo má nevratně poškozenou DNA	Neprovádí opravné procesy DNA, nespouští se apoptóza, žijí déle
Proto-onkogeny	Napomáhají růstu a dělení	Zmutované proto-onkogeny se stávají onkogeny a aktivují nekontrolovatelné dělení
Tumor-supresorové geny	Zpomalují buněčné dělení a růst, opravují DNA a spouští apoptózu	Neaktivní, nemůže pustit apoptózu v případě poškození či stárání
Morfologie	Uniformní v dané tkáni	Rozdílné tvary a velikost
Imunitní odpověď organismu	Odstraněny lymfocyty v případě poškození	Schopnost inaktivovat imunitní odpověď organismu
Počet chromozomů	Normální	Abnormální
Telomery	Zkracují se	Regenerace telomer, neomezené dělení

Z dosavadního výzkumu mechanických vlastností, zejména tuhosti a modulu pružnosti, vyplývá, že většina typů jednotlivých rakovinných buněk vykazuje menší tuhost než buňky původní zdravé tkáně, což se zdá jako paradoxní zjištění vzhledem k faktu, že nádorové masy mají naopak větší tuhost než okolní tkáň, viz obr. 2.11. Vyšší tuhost nádorů je zapříčiněna zejména složkami extracelulární matrix a nádorovým mikroprostředím, u jednotlivých buněk se tyto faktory nemohou plně uplatnit. Navíc byly pozorovány změny v uspořádání cytoskeletu – např. byl zjištěn menší počet stresových aktinových vláken a změny v uspořádání a organizaci intermediálních filament. Dále byly pozorovány změny v expresi lamininu v obalu jader některých nádorových buněk, které mají za následek deformaci jaderného obalu. Také objem jádra je u maligních buněk větší a tvar je nepravidelný, viz obr. 2.10. [22]



Obrázek 2.11: Porovnání modulu pružnosti pro různé typy rakoviny na úrovni **a** jednotlivých buněk **b** celé tkáně [23]

2.4 Hepatocelulární karcinom

Hepatocelulární karcinom (HCC) je zhoubné nádorové onemocnění jater, které má svůj původ v epitelových buňkách. Podle dat Global Cancer Statistics k roku 2018 se HCC řadí mezi šest nejčastějších typů rakoviny obecně, je to čtvrtá nejvíce letální forma a mezi zhoubnými onemocněními jater se jedná o nejčastější typ onemocnění [24]. Celkově častěji postihuje muže než ženy. Nejvíce případů HCC se vyskytuje ve východní a jihovýchodní Asii – zejména v Mongolsku (93,7/100 000 obyvatel), Vietnamu, Kambodži, Laosu, Thajsku a Číně, dále se na předních příčkách objevuje Egypt a mnohé státy rovníkové Afriky [25]. V České republice jde o méně častý typ zhoubného onemocnění, incidence k roku 2017 byla 9,14/100 000 obyvatel. [26] Rizikovými faktory pro vznik HCC jsou virové nákazy žloutenkami typu B a C (HBV, resp. HCV) rozvinuté do chronické formy onemocnění, v jejichž důsledku se funkční tkáň jater mění na cirhotickou tkáň. V tomto ohledu je riziková i alkoholická hepatopatie nebo nealkoholická steatohepatitida. Necirhotická příčina vzniku HCC může být pak dlouhodobá expozice aflatoxinu. [27]

Diagnostiku lze provést sonograficky, výpočetní tomografií (CT), magnetickou rezonancí (MR), PET/CT skenem či zjištěním hladiny alfa-fetoproteinu (AFP). Sonografie je obvykle první volbou díky své nenáročnosti, malým nákladům a dobré specifitě a senzitivitě. Dokáže zachytit nádory velikosti 3 cm a výše. S výhodou lze intravenózně aplikovat kontrastní látku SonoVue. CT a MR techniky slouží k pokročilejšímu studiu charakteru ložisek, zjištění jejich počtu a vztahu k cévnímu systému. PET/CT je užitečné pro určení stádia onemocnění, zejména se používá v individuálních případech u operabilních nádorů. Na konec zmíněné laboratorní vyšetření hladiny AFP z krve pacienta může při zvýšení indikovat cirhózu jater, při vysokých hladinách nad 250 ng/ml indikuje toto onemocnění až v 90 % případů. [26]



Obrázek 2:12: sonografický nálezní HCC [28]

Při stanovování prognózy se vyhodnocují tři základní faktory [26]:

- a) pokročilost nádoru – zahrnuje TNM klasifikaci a lokalizaci ložisek, přičemž TNM klasifikace popisuje anatomický rozsah nemoci a hodnotí se tři komponenty [29]

T: rozsah primárního nádoru

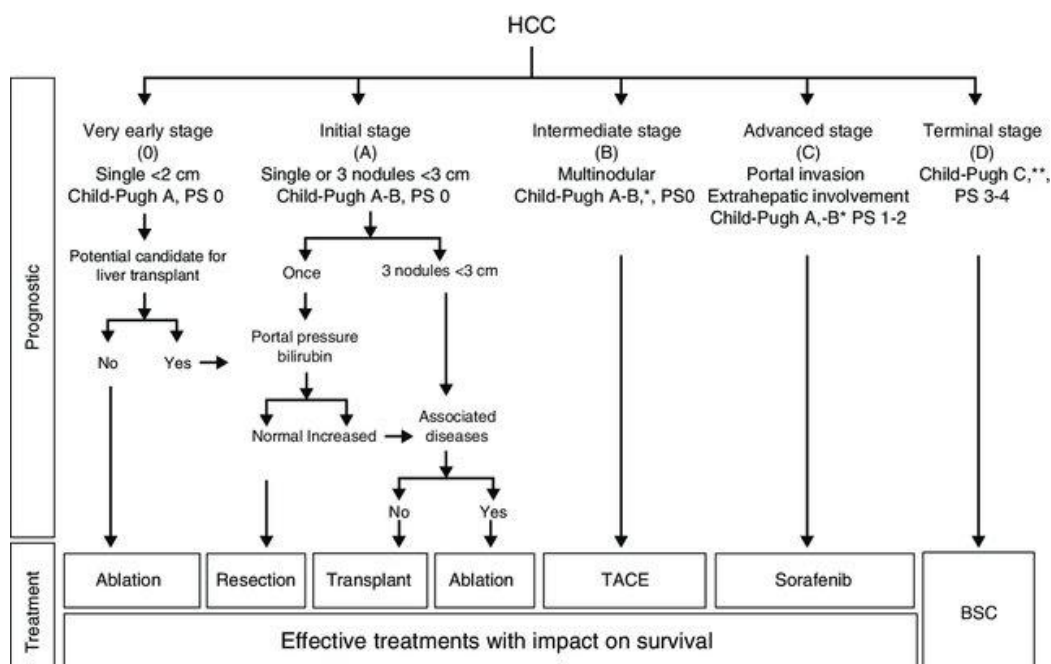
N: nepřítomnost/přítomnost metastáz s mízních uzlinách a jejich rozsah

M: nepřítomnost/přítomnost vzdálených metastáz

- b) performance status pacienta (PS) – jak pacient zvládá běžné činnosti a jak ho onemocnění limituje v každodenním životě

- c) funkční stav jater – je možné použít Child-Pugh skóre, které se běžně určuje u chronických pacientů s jaterní cirhózou a u pacientů čekajících na transplantaci

Tyto faktory pak slouží pro zařazení stádia v rámci Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC), což je mezinárodně uznávaná a využívaná klasifikační metoda, která každému stádiu přiřazuje prognózu a ideální léčebný postup. HCC je tak rozdělen do 5 stádií – 0: velmi časná stádium, A: časná stádium, B: středně pokročilé stádium, C: pokročilé stádium, D: terminální stádium. [30]



Obrázek 2.13: BCLC klasifikační diagram pro HCC a jeho léčbu [30]

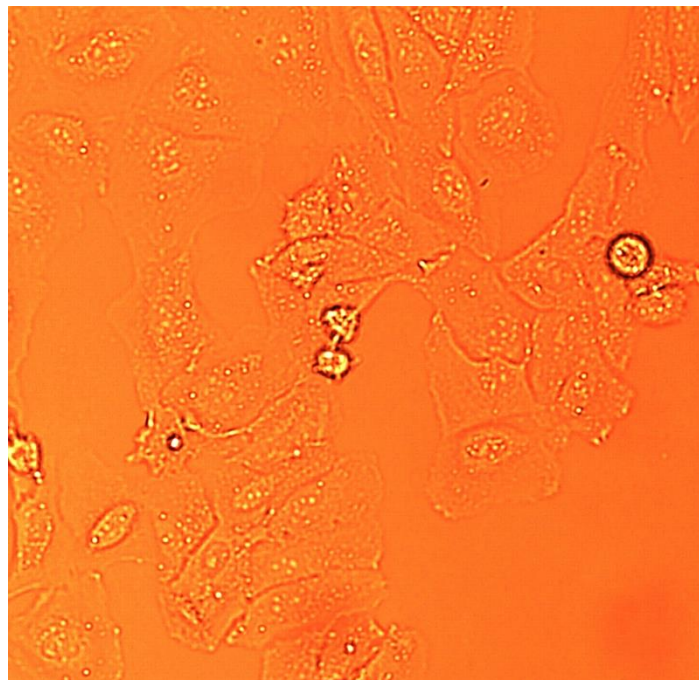
Dle diagramu BCLC je pro stádium 0 indikována ablace, pro stádium A resekce, ablace či transplantace, pro stádium B je doporučena trans-arteriální chemoablace (TACE), pro stádium C chemoterapeutika (např. Sorafenib) a ve stádiu D je možná jen podpůrná léčba. [30]

Ve vědeckém výzkumu rakoviny in vitro se využívají izolované buněčné linie, které byly původně získány z nádorových mas skutečných pacientů. Tyto linie mají definované vlastnosti (tvar, rychlost dělení) a jsou dobře popsány vhodné podmínky kultivace (ideální médium, teplota, konfluence, povrch kultivační nádoby). Pro tuto práci byly zvoleny dvě buněčné linie hepatocelulárního karcinomu, a sice HuH7 a SNU475.

2.4.1 Buněčná linie HuH-7

Zkratka HuH vychází z anglického názvu „Human Hepatoma“. HuH7 je permanentní buněčná linie, která byla izolována v roce 1982 z diferencovaného hepatocelulárního karcinomu 57letého pacienta mužského pohlaví japonské národnosti. Pacient nebyl infikován virem HBV ani HCV. Buňky HuH7 mají 55 až 63 chromozomů a vyznačují se velkou heterogenitou. Typicky se využívají jako konvenční náhrada primárních hepatocytů a s výhodou se používají pro studium viru hepatitidy typu C, ke kterému je tento typ buněk vnímavý a HCV se v něm dobře množí. [31]

Buňky žijí adhezaně a tvoří souvislou monovrstvu. Doporučené kultivační médium je DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) s 10% FBS (fetálním bovinním sérem) a přísadkou antibiotik. Buňky by měly být umístěny v termoboxu s teplotou 37 °C a 5% koncentrací CO₂. Doba potřebná ke zdvojení buněk je 24 až 32 hodin a je vhodné udržovat konfluenci 30-90 %. [32]

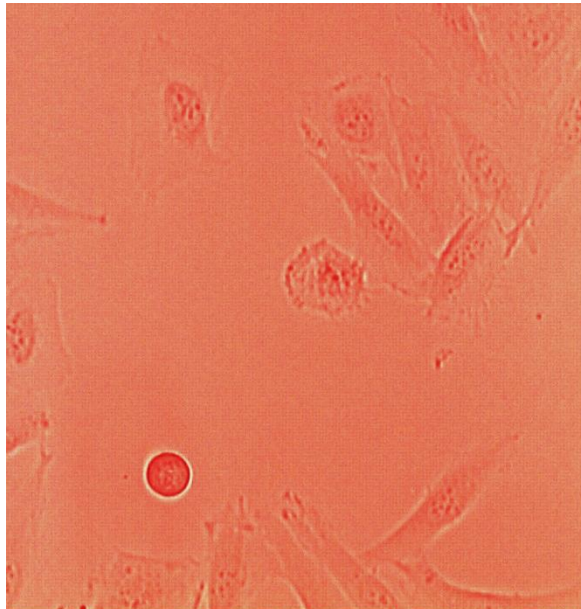


Obrázek 2.14: Snímek HuH7 z optického mikroskopu (vlastní)

2.4.2 Buněčná linie SNU745

Buněčné linie s označením SNU je název pro 109 různých linií rakovinných buněk původem ze Seoul National University získaných od korejských pacientů počínaje rokem 1982. Tyto linie byly uloženy do Korejské banky buněčných linií, odkud se dají zakoupit. Celkem bylo izolováno dvanáct linií HCC, naše použitá linie nese označení SNU475. Byla získána od 47letého Korejce, který byl HBV pozitivní. SNU475 jsou vhodné ke studiu exprese HBV, ke studiu methylace genů a dalším výzkumům v oblasti zhoubných nádorů jater. [33]

Tento typ buněk též adhezuje ke dnu kultivační nádoby, tvoří souvislou monovrstvu vřetenovitých protáhlých buněk, kultivační médium je stejné jako u HuH7, tedy DMEM s 10% FBS a antibiotiky. Stejně jsou i podmínky kultivace při 37 °C s 5% obsahem oxidu uhličitého. Doubling time, tedy čas zdvojení buněk je cca 35 hodin. [33]

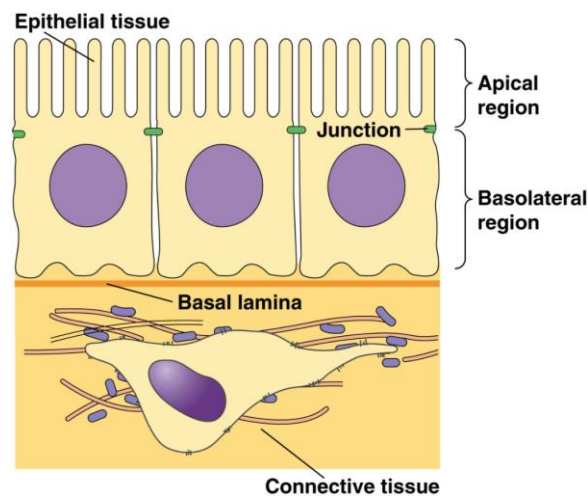


Obrázek 2.15: Snímek SNU475 z optického mikroskopu (vlastní)

2.5 Epiteliálně-mesenchymální tranzice

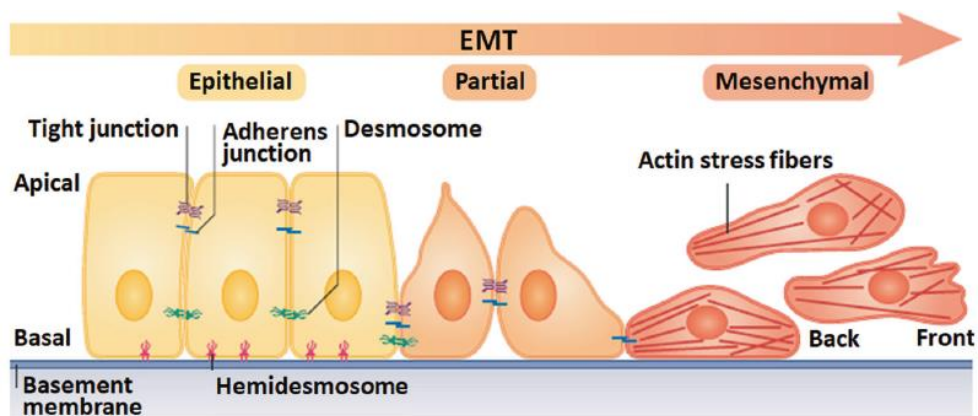
Epiteliálně-mesenchymální tranzice (EMT) je reverzibilní proces, kdy se nepohyblivá epiteliální buňka fenotypově transformuje do buňky mesenchymální, která není polarizovaná a není vázána na bazální laminu ani mezibuněčnými spoji, na rozdíl od buňky epitelu. Tím je umožněna motilita mesenchymální buňky. Kromě pohyblivosti a migrační schopnosti je tento fenotyp charakterizován změnou tvaru na vřetenovitý, zvýšenou tvorbou extracelulární matrix (ECM), vyšší mechanickou odolností a vyšší odolností vůči apoptóze. [34]

Epiteliální buňky jsou základní stavební jednotky epitelových tkání. Tyto tkáně mají základní funkci krýt volné povrchy a vystýlat dutiny orgánů. Epitely mohou být funkcionalizované, např. žlázami či řasinkami. V neposlední řadě tvoří bariéru mezi jednotlivými kompartmenty v organismu, které se liší prostředím. Pro jednotlivé buňky je tedy charakteristická polarita (rozlišuje se apikální a bazální pól buňky), dále mezibuněčné spoje a přilehlost k bazální lamině (membráně). Bazální membrána je tenká vrstva extracelulárního materiálu, která tvoří rozhraní epitel-vazivo a ukotvuje buňky epitelu. Ty se k membráně připojují bazolaterálním pólem, viz obrázek níže. [4]



Obrázek 2.16: Schéma epitelové tkáně a polarity epitelových buněk [35]

Mesenchymální buňky mají oproti epitelovým jednodušší stavbu, postrádají polaritu i pevná buněčná spojení. Dále je pro ně typická silně rozvinutá cytoskeletální síť, která propůjčuje mesenchymálním buňkám větší mechanickou odolnost, velký význam zde zaujímají intermediální filamenta vimentinu. Schopnost vytvářet látky pro remodelaci extracelulární matrix jim umožňuje procházet mezi kompartmenty. Za změny v expresi bílkovin cytoskeletu, schopnost degradovat či přestavovat ECM a také změny v expresi specifických mikroRNA jsou zodpovědné transkripční faktory, což jsou bílkoviny, které se podílejí na iniciaci transkripce. Tyto bílkoviny se aktivují intracelulárně. [34]



Obrázek 2.17: Změna epitelových buněk na mesenchymální [7]

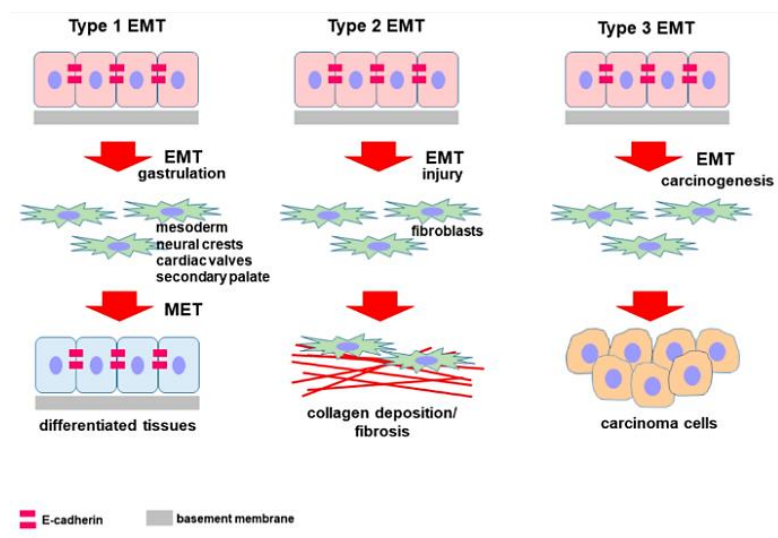
EMT hraje důležitou úlohu v mnohých procesech lidského vývoje, zejména v embryonálním stádiu. Dále se uplatňuje při hojení ran a regeneraci tkání. Na druhou stranu, pokud dojde k poruše tohoto mechanismu, hrozí vznik fibróz a nádorového bujení. EMT je jedním z mechanismů, který stojí za diseminací nádorových onemocnění, zejména karcinomů, což jsou zhoubné nádory vznikající z epitelových buněk. V literatuře se často objevuje pojem „metastatická kaskáda“, na jejímž počátku stojí právě EMT. Pozměněné mesenchymální buňky se aktivně dostávají do cévního řečiště, kterým jsou následně unášeny do vhodného místa pro nidaci, kde adherují k endotelu cév a diapedézou prostupují do tkáně – typicky se jedná o parenchymové orgány, jako jsou játra, ledviny či plíce. V cílovém orgánu pak probíhá opačný proces, tedy mezenchymálně-epiteliální tranzice (MET), nádorové buňky dále proliferují a mohou tvořit sekundární nádory (metastáze). [34] [36]

Jako důkaz procesu EMT slouží charakteristické markery. Epiteliální a mesenchymální fenotypy mají markery odlišné, viz následující tabulka:

Tabulka 2.3: Markery epiteliálního a mesenchymálního fenotypu [36]

Markery epiteliálního fenotypu	Markery mesenchymálního fenotypu
E-kadherin	N-kadherin
Cytokeratin	Fibroblast specifický protein 1 (FSP1)
Kolagen 4 alfa I	Vimentin
Laminin	Snail
Desmoglein-3	Slug
Mucin-1	Alfa hladkosvalový aktin
Syndecan-1	Desmin

V současné době rozeznáváme tři typy EMT, označují se římskými číslicemi, jedná se tedy o EMT I, EMT II a EMT III.



Obrázek 2.18: Přehled typů EMT [37]

2.5.1 EMT I

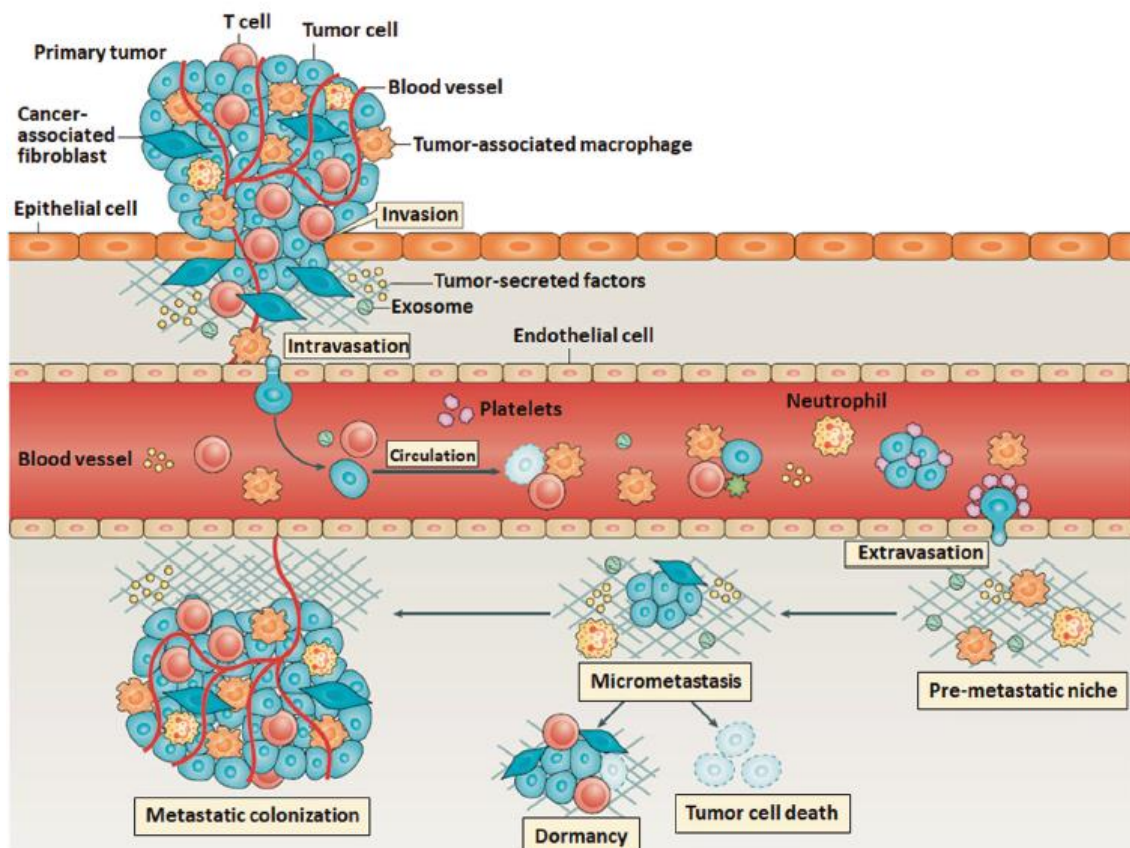
EMT I, též označovaná jako vývojová EMT, je souhrn všech procesů tranzice, které probíhají v embryonálním vývoji. Nejčasněji je EMT pozorovatelná při gastrulaci, což je embryonální proces spadající do třetího týdnu vývoje lidského jedince, na jehož konci jsou vytvořeny tři zárodečné listy (ektoderm, mezoderm, entoderm), ze kterých se dále vyvíjí diferencované tkáně, viz obr. 2.18. Proces EMT I je provázen změnami některých transmembránových proteinů, zejména kadherinů, které se podílejí na tvorbě mezibuněčných spojení. Další příklad vývojové EMT je proces zakládání neurální trubice, formování srdečních chlopní a srdečního skeletu. [34]

2.5.2 EMT II

Druhý typ tranzice se uplatňuje při hojení ran, regeneraci tkání a bohužel je spojen i s fibrózou tkání, kdy dochází k nahromadění vazivové tkáně na úkor funkční tkáně. EMT II se spouští při poškození orgánů nebo zánětlivé reakci a jejím důsledkem je tvorba fibroblastů, viz obr. 2.18. V ideálním případě je po odeznění zánětlivé reakce proces EMT II ukončen. Pokud zánětlivá reakce neutichá (stav přešel do chronického stádia), dochází k hromadění zánětlivých buněk a fibroblastů, zdravá funkční tkáň je ničena a nahrazuje ji vazivo. Tvoří se jizvy, zvyšuje se tuhost a klesá fyziologická funkčnost daného orgánu. Důkazem EMT II jsou jednak specifické markery mesenchymálního typu, jako např. vimentin, desmin nebo fibroblast specifický protein 1, jednak jsou přítomny i markery epiteliálního fenotypu – např. E-kadherin a cytokeratiny. Tvorba fibróz spojená s EMT II byla prokázána v zažívací trubici, ledvinách, játrech a plicích. [34]

2.5.3 EMT III

Třetí typ epiteliálně-mesenchymální tranzice je spojen s diseminací nádorových onemocnění a počátkem metastatické kaskády, viz obr. 2.19. Jelikož tranzice probíhá z epiteliálního fenotypu, týká se tento fenomén šíření zejména karcinomů, které mají svůj původ právě v epitelové tkáni, jak bylo zmíněno již výše. EMT je zodpovědná za prvotní změny na primární nádorové tkáni v počátku diseminace. I epitelové buňky karcinomu adherují k bazální membráně a jsou vzájemně propojeny buněčnými spoji, proto je EMT výhodný způsob získání motility a migrační schopnosti. Nejprve se buňky zbavují závislosti na bazální membráně a až poté na sousedních buňkách. Dále získávají schopnost infiltrovat se přes bazální laminu – v tomto stádiu je možné stanovit mesenchymální markery (vimentin, alfa hladkosvalový aktin, fibroblastový specifický protein 1) a to zejména v okrajových částech primární masy. Dochází k tzv. tumor buddingu – jedná se o histologický nález, kdy se identifikují klastry či jednotlivé nádorové buňky, které opustily vlastní parenchym karcinomu a uvolnily se do okolního stromatu. Tyto buňky jsou již mechanicky odolné – aby odolaly tlakům v cévách, schopné dostat se do cévního řečiště (intravazace), migrovat a dostat se z cév do sekundární lokality (extravazace). [34]



Obrázek 2.19: Průběh diseminace nádorových buněk z primárního karcinomu a vznik metastáze [7]

Signální dráhy v procesu EMT u metastáz jsou stále předmětem výzkumu. Jsou známy konkrétní signální molekuly, které spouštějí program tranzice, avšak přesný mechanismus objasněn není. Byly identifikovány růstové a transformační faktory pocházející ze stromatu karcinomu (např. HGF, EGF, TGF- β), které následně indukovaly faktory transkripční (Snail, Slug, Twist). Transkripční faktory pak mohou spouštět program EMT, přičemž nejčastěji se jedná o multifaktoriální proces. Samotný průběh EMT je dále závislý na intracelulárních signálech, kdy se do procesu zapojuje celá řada transdukčních a membránových proteinů. Nejdůležitějšími membránovými proteiny jsou zejména integriny, které se podílejí na uvolňování mezibuněčných spojů a oddělení buňky od extracelulární matrix. [34] [36]

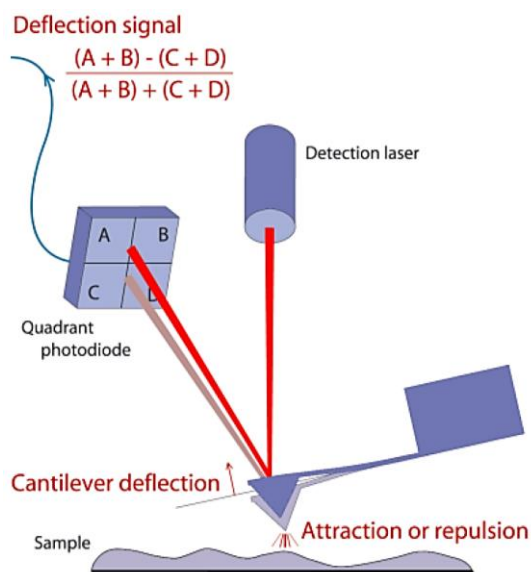
Indukce signálním proteinem TGF- β 1

V této práci se zabývám studiem buněk hepatocelulárního karcinomu v procesu EMT, která byla indukována růstovým faktorem – TGF- β . Jedná se o skupinu transformujících růstových faktorů, z biochemického hlediska jde o proteiny složené ze 112 až 114 aminokyselin. Rodina TGF- β spadá do skupiny indukčních faktorů, kterými obecně rozumíme látky uvolněné ze signalizačního centra a které působí na určitou skupinu buněk. Jsou známy dvě signální dráhy pro aktivaci EMT prostřednictvím TGF- β , avšak obě končí aktivací transkripčních faktorů Snail, Slug, Twist, ZEB1 a TCF3, která má za následek inhibici exprese epiteliálních markerů (zejména E-kadherinu) a naopak podporuje expresi mesenchymálních markerů (N-kadherinu, vimentinu). [38]

2.6 AFM – měření mechanických vlastností

Mikroskopie atomárních sil (AFM) je neoptická metoda, která se řadí do skupiny technik mikroskopie se skenovací sondou (SPM). Samotné zařízení ani nepřipomíná klasický mikroskop, jeho hlavní částí je vysoce citlivé mechanické zařízení, které je schopné zaznamenávat velmi malé síly, jenž působí na atomární či molekulové úrovni – z této skutečnosti plyne i samotný název metody. Zobrazení AFM je založené na snímání deflektce ostrého nanohrotu umístěného na cantileveru (ploché pružině s definovanou konstantou tuhosti), který je v kontaktu s analyzovaným objektem. [39]

Ke snímání ohybu a polohy sondy se využívá laser, který pomocí optické páky dokáže i malé změny ohybového úhlu či polohy převést na dobře měřitelnou informaci v místě dopadu laseru (viz obrázek 1). Většina systémů AFM využívá detektoru se čtyřmi kvadranty, kdy lze současně zaznamenávat jednak vertikální deflektce porovnáním signálu z horní a dolní poloviny detektoru, jednak laterální posun porovnáním signálu z levé a pravé části detektoru. [39]



Obrázek 2.20: Princip optické páky [40]

Metoda AFM se s výhodou používá pro studium biologických struktur, protože umožňuje jejich analýzu v nativním stavu za fyziologických podmínek. Není potřeba žádného složitého procesu přípravy preparátů jako barvení, odvodňování či zalévání do média, ani nejsou kladeny požadavky na elektrickou vodivost vzorku, jako např. u elektronové mikroskopie. Ohledně rozlišení metody AFM platí, že je lepší než u optických metod, u nejlepších přístrojů se udává až 10^{-10} m, tudíž je možné analyzovat povrch na molekulární úrovni. Z naměřených dat, jejich následnou analýzou a zpracováním ve vhodném softwaru je dále možné získat další informace o vzorku, jako např.: topografický profil, pružnost, tuhost, adhezi apod., je tedy možné vyhodnocovat

jak strukturální, tak i funkční parametry, a to relativně jednoduše a rychle, vzhledem k robustnosti metody. [39]

Komplikace při AFM může nastat při výběru cantileveru s hrotem, kdy je nutné vhodně zvolit zejména tvar hrotu a konstantu tuhosti cantileveru tak, aby bylo možné zaznamenat požadované informace, navíc i výsledné rozlišení je ovlivněno zejména těmito parametry. U členitých struktur s vysoce nepravidelnou topografií je pak větší riziko ulomení hrotu cantileveru a měření je tím znehodnoceno. Metoda je také náchylná na šum, zejména z okolních vibrací či hluku, a na jakékoli znečištění. [39]

2.6.1 Základní součásti AFM

Přístroj pro AFM můžeme rozčlenit na sérii nejdůležitějších prvků [41]:

Cantilever nesoucí hrot – jde o plochý pružný čip či nosník, který se na jedné straně pevně mechanicky připevní k držáku a druhá strana s hrotem je volně ponechána tak, aby mohl hrot přijít do kontaktu se vzorkem. Síly, které působí na hrot, jsou pak dány ohybem nosníku a konstantou tuhosti nosníku dle Hookeova zákona, kde F je síla, k je konstanta tuhosti a d je deformace cantileveru:

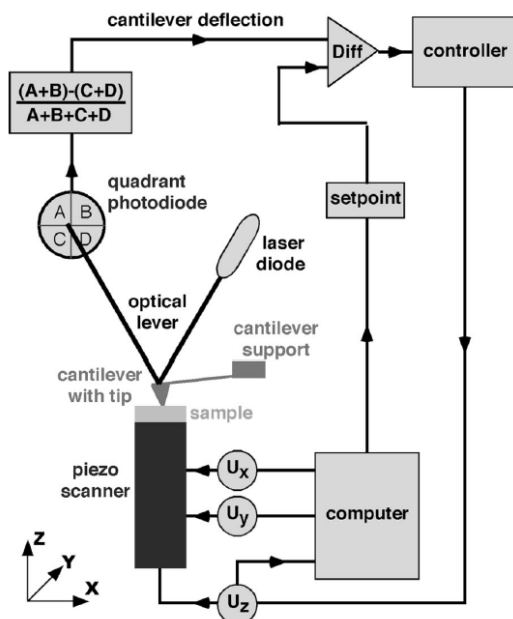
$$F = -k \cdot d \quad (2.1)$$

Při nastavování kontaktu mezi hrotem a vzorkem se využívá optického mikroskopu, protože rozměry hrotu jsou v řádech desítek nanometrů. Cantilever musí mít známé mechanické parametry, které by měly být uvedeny výrobcem, nejdůležitější z nich jsou konstanta tuhosti k , rezonanční frekvence f , tvar a velikost hrotu.

Laser – slouží ke snímání deformace cantileveru. Využívá principu optické páky, jak bylo zmíněno výše. V praxi se nastavuje pomocí zrcátek tak, aby zisk signálu na detektoru byl co možná největší a aby laser směřoval na hrot cantileveru.

Elektronika – velmi citlivá soustava zesilovačů, převodníků, zpětnovazebných členů a piezoskenneru, která jednak zaznamenává signál v podobě elektrického napětí, pružně reaguje na měřené parametry změnou polohy piezo členu, na kterém je umístěn vzorek.

Mechanická část – soustava citlivých lineárních piezomotorů určených k jemnému polohování měřicí hlavy, potažmo vzorkem

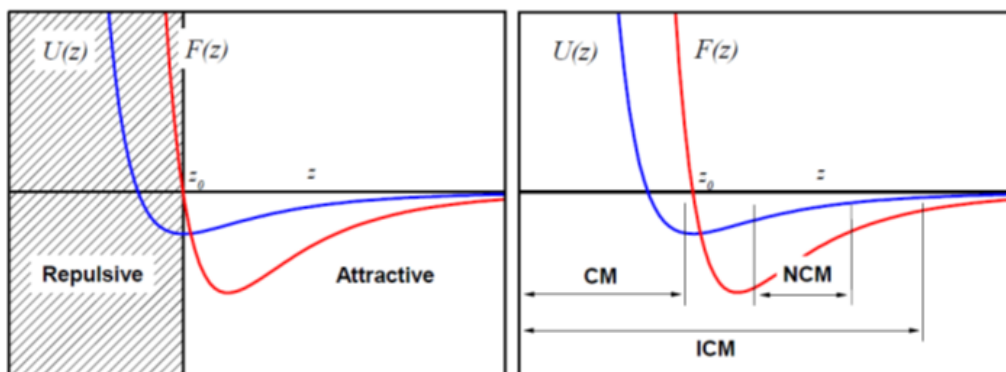


Obrázek 2.21: Schéma AFM [42]

2.6.2 Módy AFM

Existují tři základní módy použití AFM ve smyslu kontaktu hrotu a vzorku. Existuje mód kontaktní, bezkontaktní a dynamický, tzv. tapping mód. Uvažujeme-li přitažlivé a odpudivé síly mezi dvěma objekty, platí, že ve větší vzdálenosti mezi objekty existují síly přitažlivé, typicky Van der Waalsovy či kapilární, od jistého bodu přiblížení ovšem existují síly odpudivé, kdy se začínají překrývat elektronové orbitály. Platí následující vztah, jenž dává do závislosti výslednou sílu $F(z)$ na potenciálu $U(z)$ a vzdálenosti z . [39]

$$F(z) = -\nabla U(z) = -\frac{dU(z)}{dz} \quad (2)$$

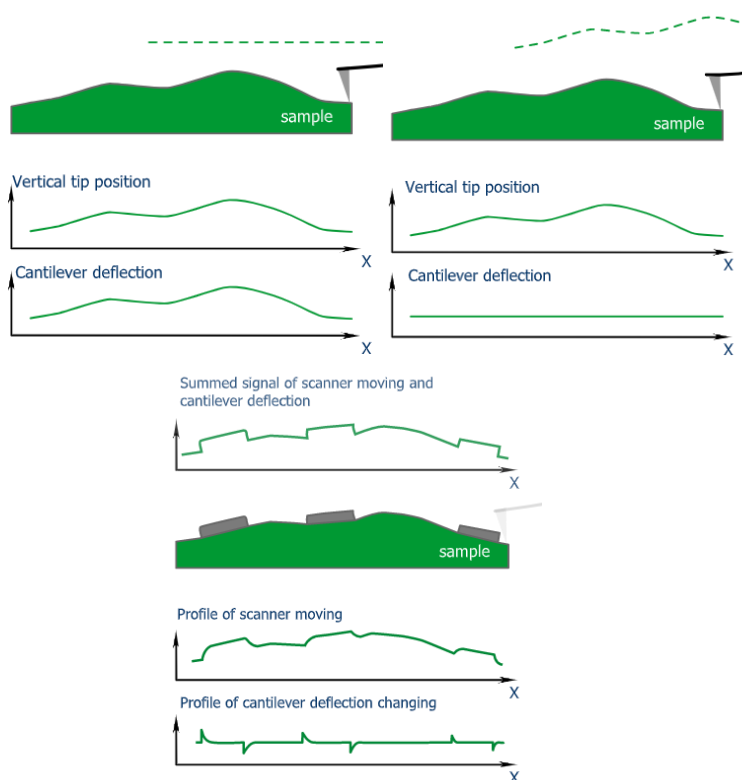


Obrázek 2.22: Lennard-Joensův potenciál. Vlevo: Závislost síly a její povahy na vzdálenosti mezi dvěma objekty; Vpravo: Znárodnění použití jednotlivých módů AFM. (CM = kontaktní mód, NCM = nekontaktní mód, ICM = intermitentní či tapping mód) [39]

Při pohledu na křivku Lennard-Jonesova potenciálu (obr. 2) lze vymezit módy AFM, kde kontaktní mód využívá část křivky odpudivých sil, nekontaktní se pohybuje výhradně v části sil přitažlivých a tapping mód využívá celé oblasti.

Kontaktní mód

Z názvu plyne, že sonda je v přímém kontaktu se vzorkem. Je založen na detekci deflektce cantileveru při skenování vzorku. V zásadě existují tyto přístupy kontaktního módu – s konstantní výškou, s konstantní silou a tzv. error mód. První jmenovaný lze použít pouze u vzorků téměř dokonale rovných a více než v biologických aplikacích se využívá při studiu materiálů a jejich nedokonalostí, je zde velké nebezpečí zničení hrotu cantileveru. Technika konstantní síly je v tomto ohledu vhodnější a více používaná. Je založená na interakci sondy a zpětnovazebního členu, který má za úkol udržovat neměnnou hodnotu síly mezi hrotem a povrchem vzorku s ohledem na veškeré jeho nerovnosti. Na začátku se volí hodnota deflektce cantileveru, která má být udržována. Error mód vnímá jako hlavní zpětnovazební parametr deflektci cantileveru.



Obrázek 2.23: Zleva: mód s konstantní výškou, mód s konstantní silou, error mód.

[43]

Při použití kontaktního módu je velmi důležité správně zvolit cantilever o vhodné konstantě tuhosti a s vhodným hrotem. Dvakrát důležitější jsou tyto parametry u analýzy buněk. Je třeba brát v úvahu namáhání hrotu a cantileveru, ale také je třeba brát ohled na samotnou buňku, nechceme ji nikterak mechanicky poškodit. Volí se měkčí cantilevery, např. s konstantou tuhosti okolo 90 mN/m, a zaoblené hroty, nikoli špičaté. [40][41]

Bezkontaktní mód

Využití bezkontaktního módu minimalizuje riziko poškození vzorku i hrotu. Využívá Van der Waalsových sil, což jsou slabé síly (10^{-12} N) s dosahem zhruba 1-10 nm. Lze použít buď pružný nosník nebo kmitající nosník, který se nechá rozkmitat v okolí první rezonanční frekvence. Metoda je složitější na nastavení, zejména s ohledem na nastavení amplitudy kmitu, kdy nesmí dojít ke kontaktu se vzorkem. Bezkontaktní režim AFM je založen na změně rezonance a poklesem amplitudy kmitů při vstupu do oblasti gradientu sil nad vzorkem. Zpětnovazební člen pak může upravit výšku nosníku tak, aby amplituda kmitů byla konstantní (sledujeme tedy křivku konstantního silového gradientu), nebo zpětnou vazbu vyřadíme a soustředíme se na klesající amplitudu. Amplituda kmitů se pohybuje okolo 1 nm. [39][40]

Výhodou bezkontaktního módu je velká šetrnost vůči měřenému vzorku a nejlepší dosažitelné rozlišení v rámci AFM, avšak vzhledem ke slabým silám, jež jsou základem metody, je nutné používat ultra vysoké vakuum, což znemožňuje použití u živých objektů. Bezkontaktní mód je též více časově náročný. [40]

Tapping mód

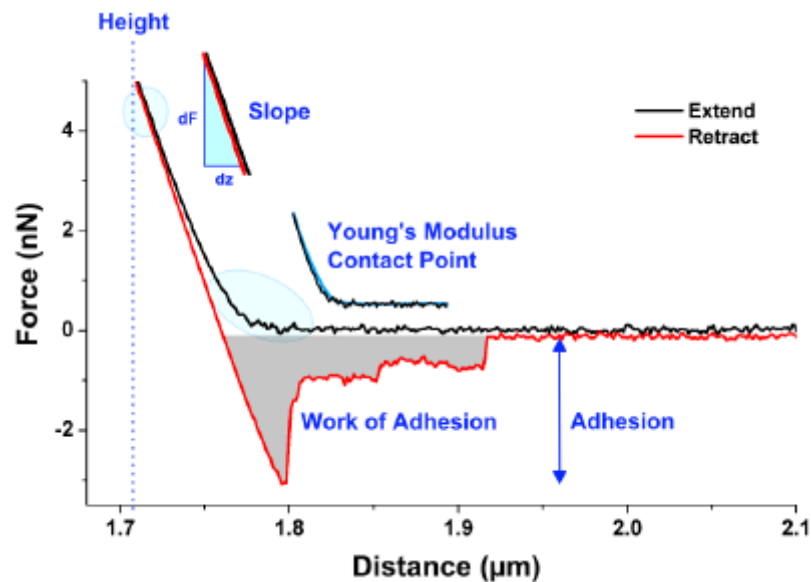
Tapping či pokleповý mód je hojně využívaný dynamický režim. Cantilever kmitá v blízkosti nebo přesně v bodě své rezonanční frekvence a jemně poklepává povrch vzorku (s amplitudou až 100 nm). Zpětná vazba, která kontroluje vzdálenost mezi hrotem a vzorkem, buď udržuje konstantní amplitudu kmitání, nebo udržuje neměnnou fázi oscilační frekvence cantileveru. Pokleповý mód nabízí lepší rozlišení než kontaktní mód a hodí se pro jemné struktury, které špatně adherují na podklad. Nevýhodou je složitá interpretace výsledků, jelikož do snímání vstupuje více sil, a také analýza měkkých vzorků je zatížena větším množstvím artefaktů, zejména z důvodu obtížného určení, kdy přesně se hrot povrchu dotknul a jak velké bylo zarytí do vzorku. [40]

2.6.3 Měření mechanických vlastností pomocí AFM

Force spectroscopy

Vzhledem k principu AFM lze tuto metodu využít pro měření mechanických vlastností pomocí indentace, kdy vtlačujeme hrot do měřeného materiálu. V rámci indentace získáme závislost síly na hloubce indentace. Díky nano rozměrům hrotu je možné detailně analyzovat velmi malé oblasti s vysokou senzitivitou.

Výstup silové spektroskopie je silová zatěžovací křivka, která zaznamenává fázi přiblížení i fázi odtahování cantileveru. Vynáší se jako závislost deflektce nosníku na jeho vzdálenosti od vzorku. Z fáze přiblížení v kladné části osy-y je možné ze směrnice přímky nafitované vhodným modelem získat informace o modulu pružnosti vzorku, z fáze retrakce se pak získávají informace o adhezi. [40]



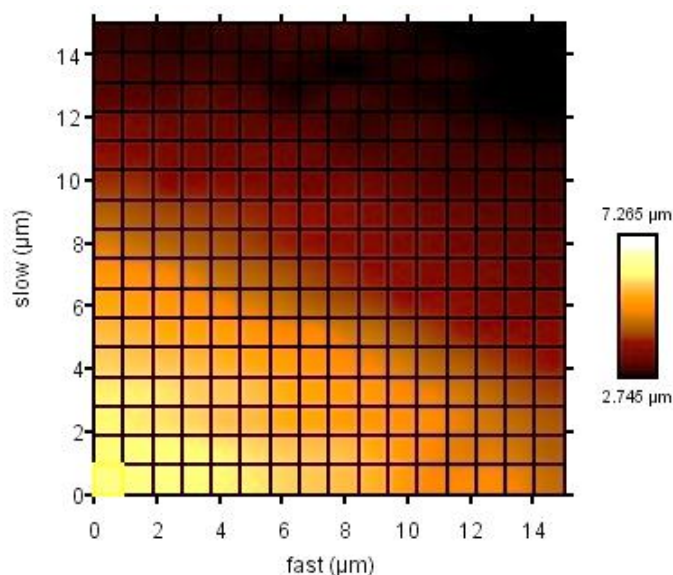
Obrázek 2.24: Modelová zatěžovací křivka [40]

Tabulka 2.4: Interakce sonda-vzorek v závislosti na vzdálenosti a fázi [40]

Fáze získávání zatěžovací křivky	Interakce
Fáze přibližování	
Vzdálenost hrotu >10 μm	Žádná interakce
Vzdálenost hrotu $10^0 \mu\text{m}$	Elektrostatické síly
Hrot v těsné blízkosti	Van der Waalsovy síly
	Kapilární síly
	Chemický potenciál
	Magnetické síly, aj.
Fáze kontaktu	
Indentace vzorku	Stiffness (Youngův modul pružnosti, elastická odpověď)
	Viskoelastická odpověď
Fáze retrakce	
< 10^0 nm	Adheze
< 10^2 nm	Natažené molekuly mezi hrotem a povrchem
Větší vzdálenost	Žádná interakce

Force mapping

Potřebujeme-li zjistit tuhost, adhezi aj. na větší ploše sledovaného vzorku, lze použít režim force mapping. V zásadě jde o mnohonásobně aplikovanou force spectroscopy na mřížce definované velikosti a hrubosti. Zvolíme-li např. čtvercovou mřížku o délce strany $15 \times 15 \mu\text{m}$ a hrubost (rozlišení) 16×16 , dostaneme celkem 256 zátěžových křivek na ploše $225 \mu\text{m}^2$.



Obrázek 2.25: Mřížka pro force mapping v programu JPK $15 \times 15 \mu\text{m}$ s rozlišením 16×16 (vlastní)

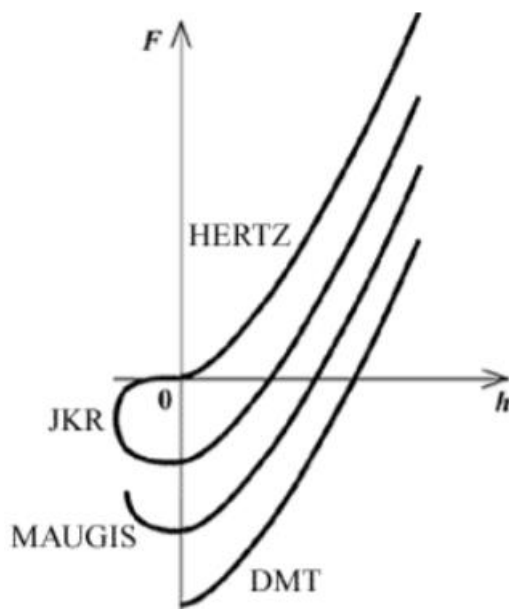
2.6.4 Modely pro vyhodnocování naměřených dat

Pomocí indentace hrotu do měřeného vzorku je možné určit elastické vlastnosti daného objektu. Pro tyto účely se využívají matematické modely, které berou v potaz geometrii a velikost hrotu, geometrii a tloušťku vzorku, materiálové vlastnosti vzorku, hloubku indentace a další parametry. [41]

V biologických aplikacích se pro indentaci nejčastěji používají měkké cantilevery s hodnotou konstanty tuhosti od 10 do 100 mN/m a přednostně se volí zaoblené hroty – kulové či parabolické [40]. Nejvíce využívaným modelem je Hertzův (či Hertz-Sneddonův), další modely jsou např. Johnson-Kendall-Robertsův model (JKR), Derjagin-Muller-Toropovův model (DMT) či Maugisův model. V následující tabulce jsou uvedeny základní rozdíly a předpoklady použití jednotlivých modelů, nejvíce pozornosti pak bude věnováno Hertzově modelu, který je aplikován pro vyhodnocení dat v této diplomové práci. [41]

Tabulka 2.5: Přehled používaných mechanických modelů [41]

Model	Předpoklad	Aplikace
Hertz	Žádné povrchové síly	Můžeme-li povrchové síly zanedbat
DMT	Povrchové síly dalekého dosahu působí jen vně, nikoli v místě kontaktu	Pouze pro malé adhezní síly
JKR	Povrchové síly malého dosahu (Van der Waals) působí pouze v místě kontaktu	Pouze pro velké adhezní síly
Maugis	Rozhraní hrot-vzorek je modelováno jako prstenec	Bez omezení pro všechny adhezní síly

**Obrázek 2.26:** Graf závislosti síla vs. hloubka indentace [44]

Hertz-Sneddon

Pro potřeby měření můžeme adhezní síly zanedbat a soustředit se pouze na určení modulu pružnosti. Hertzův model vnímá vzorek jako nekonečný poloprostor, který je izotropní a lineárně elastický. Dále předpokládá, že se hrot při indentaci nedeformuje a že nepůsobí žádné okolní síly na rozhraní hrot-vzorek. [40] Model se dá použít pro různé geometrie hrotů, viz obrázek xy. Pro kónický hrot a jeho vztah se v literatuře též objevuje pojem Sneddonův model a setkáme se i s označením „Hertz-Sneddonův model“ jako synonymum pro Hertzův model obecně, pokud nehovoříme o konkrétní geometrii. [45]

Níže jsou uvedeny některé vztahy Hertzova modelu pro dané geometrie hrotu [41]:

Parabolický hrot

$$F = \frac{4\sqrt{R_p}}{3} \frac{E}{1-\nu^2} \delta^{\frac{3}{2}}, \quad (2.2)$$

kde F je síla, R_p je poloměr zakřivení hrotu, E je modul pružnosti vzorku, δ je hloubka indentace a ν je Poissonovo číslo, které se pro biologické struktury udává s hodnotou 0,5. [JPK]

Sférický hrot

$$F = \frac{E}{1-\nu^2} \left[\frac{a^2+R^2}{2} \ln \left(\frac{R+a}{R-a} \right) - aR \right], \quad (2.3)$$

kde F je síla, R je poloměr zakřivení sférického hrotu, E je modul pružnosti vzorku, a je poloměr zakřivení kontaktní plochy a ν je Poissonovo číslo ($\nu = 0,5$).

Hloubka indentace δ se dá vyjádřit jako

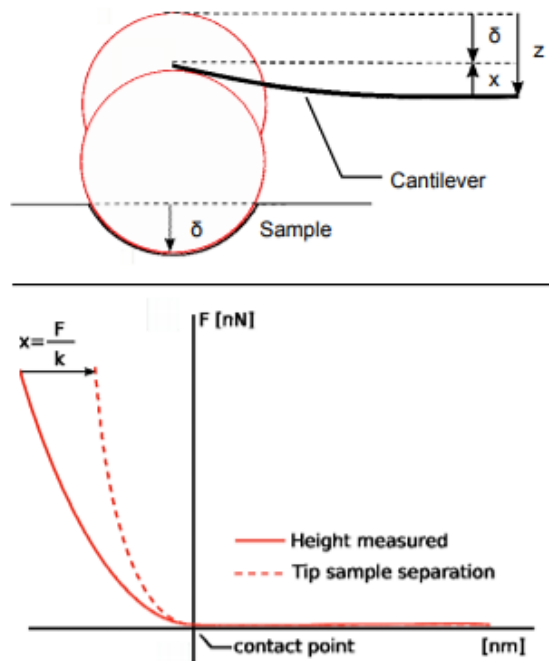
$$\delta = \frac{a}{2} \ln \left(\frac{R+a}{R-a} \right), \quad (2.4)$$

Kónický hrot

$$F = \frac{2 \tan \alpha}{\pi} \frac{E}{1-\nu^2} \delta^2, \quad (2.2)$$

kde F je síla, E je modul pružnosti, ν je Poissonovo číslo ($\nu = 0,5$), δ je hloubka indentace a α je polovina otvorového úhlu kužele.

Při silové spektroskopii získáváme záznam závislosti síly F na změně polohy piezoelementu ve svislém směru z , na obrázku xy „Height measured“. Pro použití Hertzova modelu potřebujeme tuto křivku v post-processingu upravit, jak naznačuje obrázek níže se zátěžovou křivkou – místo snímání výšky piezoelementu chceme křivku zobrazující závislost síly na poloze hrot-vzorek. Ve výsledku se do rovnice nezahrnuje indentační hloubka δ v celém rozsahu, nýbrž jen 5-10 % výšky buňky (Hertzův model funguje jen pro malé deformace, které jsou zanedbatelné v porovnání s tloušťkou vzorku). [41]



Obrázek 2.27: Nahoře – znázornění vzorku jako nekonečného poloprostoru v kontaktu se sférickým hrotem, kde z je změna polohy piezoelementu ve svislém směru, x představuje deformaci cantileveru a δ je hloubka indentace; Dole – zátěžová křivka zobrazující závislost síly na pozici piezoelementu (Height measured), resp. na pozici hrot-vzorek (Tip-sample separation) [40]

3 Cíle práce a hypotézy

3.1 Cíle práce

Prvním cílem práce dle zadání je navrhnout metodiku experimentálního měření mechanických vlastností buněk hepatocelulárního karcinomu pomocí mikroskopie atomárních sil. K tomuto účelu se využívají dvě modelové buněčné linie HCC, SNU475 a HuH7, které je nejprve potřeba na měření připravit. Dílčím cílem je tedy i naučit se udržovat buněčné linie běžnými postupy v laboratoři tkáňových kultur, jako je pasážování, a následně biologické vzorky nasadit na pokus tak, aby se při měření daly analyzovat jednotlivé buňky. K tomu je zapotřebí vhodná konfluence buněk ve vzorku a časová organizace, aby se buňky nezačaly dělit. Pro potřeby prvotního nastavení měření se využívají neošetřené a nemutované buňky, tzv. „wildtypy“ (WT).

Po přípravě vzorků následuje vytváření a optimalizace metodiky při měření na AFM, kdy je nutné zvolit správný hrot s odpovídající konstantou tuhosti a tvarem pro biologické aplikace, ale hlavně nastavit vhodné parametry pro měření. Zde je třeba vytvářet kompromis mezi delším, detailnějším měřením a životností buněk ve vzorku.

Dalším úkolem je změřit mechanické vlastnosti, konkrétně tuhost, obou linií s vnesenými mutacemi pro cytoskeletární protein plektin, tyto zmutované buňky nazýváme „knock-outy“ (KO), a následně aplikovat růstový faktor TGF- β 1 na WT i KO obou buněčných linií, které se tak dostanou do stavu EMT. Po získání hodnot z měření na AFM je třeba výsledky statisticky vyhodnotit a vypracovat komparativní analýzu mechanických vlastností.

3.2 Hypotézy

Pro účely této práce byly zformulovány následující hypotézy:

- Modul pružnosti jádra buňky bude vyšší než modul pružnosti cytoplazmy
- Plektin-deficientní buněčné linie (KO) budou mít menší modul pružnosti než WT
- Při procesu EMT bude docházet k přestavbě cytoskeletu a změně modulu pružnosti
- Proces EMT vyvolá jiné změny modulu pružnosti u KO a WT

4 Metody

4.1 Příprava buněk

4.1.1 Přístrojové vybavení, pomůcky a chemikálie

Přístrojové vybavení

- Termobox (37 °C, 5% CO₂)
- Mikroskop
- Laminární box
- Centrifuga
- Vodní lázeň 37 °C

Pomůcky

- Automatický pipeta Pipetman
- Pipety 100–1000 µl, 20–200 µl, 2–20 µl
- Zkumavky 14 ml
- Sklíčka kulatá (ø25 mm)
- Pasteurova pipeta
- Petriho misky TC treated
- Špičky
- Počítací komůrka

Chemikálie

- DMEM + 10% FBS + 1% ATB
- PBS
- Trypsin
- Fibronektin
- Hepes 1M
- TGF-β1 0,1 mg/ml

4.1.2 Udržování buněčné kultury

Obě linie (SNU475 i HuH7) vyžadují stejná média, prostředí i postup kultivace a žijí adhezočně na povrchu kultivačních nádob. Buňky byly poskytnuty Akademií Věd, Ústavem molekulární genetiky, a převzaty byly v kultivačních lahvích, následně se buňky pěstovaly na Petriho miskách a byly udržovány následujícím způsobem:

1. Kontrola buněk pod mikroskopem, odhad konfluence, zahřátí všech roztoků na teplotu 37 °C.
2. Odstranění starého média z Petriho misky.
3. Omytí několika mililitry PBS a odsátí.
4. Aplikace 1 ml trypsinu pro narušení adhezních spojů.
5. Inkubace 5 minut v termoboxu při standardních podmínkách.
6. Aplikace 1 ml kultivačního média (DMEM).
7. Omytí buněk z povrchu pomocí pipety a přepipetování obsahu do označené zkumavky.
8. Centrifugace – RPM = 1100 min⁻¹, RCF = 193G, 5 minut.
9. Odsátí objemu ve zkumavce na 1 ml (bez porušení pelety).
10. Rozsuspendování pelety v obsahu zkumavky.
11. Nasát 10 µl suspenze a aplikovat do počítací komůrky, spočítat buňky pod mikroskopem.
12. Nasadit 200 000 až 300 000 buněk do 10cm Petriho misky s 10 ml média.

4.1.3 Příprava WT a KO na měření mikroskopem atomárních sil

Buňky byly měřeny na coatovaném sklíčku v médiu namíchaném s pufrem hepes o výsledné koncentraci 20mM. Příprava na pokus zahrnovala přípravu coatovaných skel (pokrytí fibronectinem) a přípravu média s pufrem, které bylo aplikováno 30 minut před měřením na AFM. Buňky byly na sklíčko nasazeny vždy ve stejný čas (16 hodin před měřením) tak, aby se nestihly rozdělit a bylo možné měřit jednotlivé buňky.

Příprava skel a buněk (WT, KO) na pokus

1. Aplikace fibronektinu na sklíčko položené v 35mm Petriho misce.
2. Inkubace 2 hodiny v termoboxu.
3. Odsátí fibronektinu Pasteurovou pipetou.
4. 3x oplach PBS.
5. Aplikace 2 ml kultivačního média do Petriho misky se sklíčkem.
6. Nasazení 20 000 buněk z buněčné suspenze.
7. Při měření na AFM přemístit sklíčko do skleněné misky s vyhřátým médiem a pufrem.

4.1.4 Příprava buněk při EMT indukovanou TGF- β 1

Aby se u buněk spustil proces EMT, je třeba ponechat působit růstový faktor TGF- β 1 48 hodin. Pro tyto účely byl první den proveden pre-treatment buněk v 6cm Petriho misce se standardním médiem smíchaným s TGF- β 1 tak, aby výsledná koncentrace TGF- β 1 v médiu byla 10 ng/ml, další den byly buňky zpasážovány a nasazeny na sklíčko. Detailnější postup viz níže:

1. Nasazení 70 000 buněk do 6cm Petriho misky se 4 ml média.
2. Po 3 hodinách vyměnit médium za médium s TGF- β 1 o dané koncentraci.
3. Další den provést standardní pasáž (jako v podkapitole 4.1.2 bez bodu 12) a nasadit buňky na předem připravené sklíčko, viz podkapitola 4.1.3.
4. Po 3 hodinách opět vyměnit médium za médium s TGF- β 1.

4.2 Měření vzorky

V první fázi experimentu byly měřeny WT obou buněčných linií, na kterých byl zkoušen a upravován měřicí protokol. Po finálních úpravách byl naměřen reprezentativní vzorek populace buněk tak, aby v každé naměřené skupině, WT SNU475 a WT HuH7, bylo alespoň 20 buněk. Dalším krokem bylo měření reprezentativního vzorku populace plektin-deficientních KO. Opět bylo naměřeno nejméně 20 buněk z každé skupiny, tj. KO SNU475 a KO HuH7. Třetí část měření zahrnovala aplikaci TGF- β 1 k indukci EMT, a to na všechny skupiny doposud měřených buněk, tj. WT a KO buněčné linie SNU475, WT a KO buněčné linie HuH7. Pro každou jednotlivou skupinu bylo též naměřeno nejméně 20 buněk. V konečném součtu šlo tedy do vyhodnocení 8x20 buněk.

Objekt zájmu byly jednak elastické vlastnosti jádra a cytoplazmy u WT, dále jak se liší WT a KO a jak se projeví EMT na modulu pružnosti WT i KO obou buněčných linií. Konkrétně nás zajímaly jednak průměrné hodnoty modulu pružnosti cytoplazmy a jádra u všech osmi skupin, jednak změny modulu pružnosti v normálním stavu a při EMT – k tomu slouží vynesení absolutního rozdílu modulů pružnosti do jednoho grafu a následné vynesení poměru, tj. vydělení modulu pružnosti cytoplazmy a jádra, do grafu druhého.

4.3 Měření na AFM

4.3.1 Přístroje a vybavení:

- AFM Nanowizzard 3 od firmy JPK Instruments AG
- Optický mikroskop Olympus
- Stolní počítače 2x
- Cantilevery AppNano, HYDRA-6R-200NG SiO₂, sférický indenter 5,2 μ m
- Pinzeta a šroubovák
- Skleněná Petriho miska s nízkým okrajem

4.3.2 Postup měření a vyhodnocení

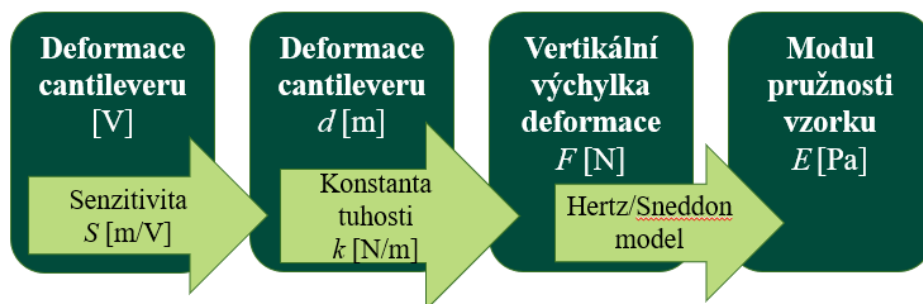
1. Umístění cantileveru do měřicí hlavy pomocí pinzety, narovnání hrotu a připevnění pomocí křížového šroubováku. Nutno postupovat velmi opatrně, aby nedošlo k poškození hrotu.
2. Umístění měřicí hlavy s cantileverem do hlavního modulu AFM, nutno zaaretovat a připojit kabel.
3. Umístění trojnohého modulu AFM do soustavy optického mikroskopu do přesně definovaných, stabilních míst pro každou nohu, viz obr. 4.2 a 4.3.

4. Seřízení soustavy laseru, zrcadla a detektoru danými ovládacími prvky na hlavním modulu AFM.
5. Spuštění AC mode pro zjištění frekvenční charakteristiky cantileveru.
6. Kalibrace cantileveru na skle v kontaktním módu a režimu force spectroscopy pro zjištění hodnot senzitivity S (nm/V) a konstanty tuhosti k (N/m) cantileveru.
7. Měření vzorků vždy se stejnými uloženými parametry měření, viz tabulka 4.1.

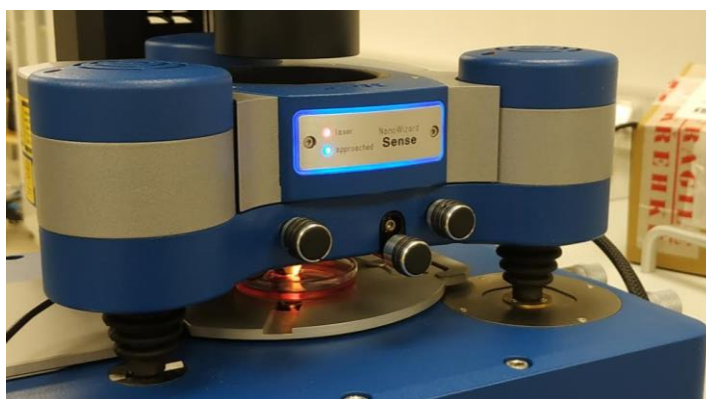
Tabulka 4.1: Parametry měření v režimu force mapping

Parametr	Hodnota
Velikost skenované oblasti [$\mu\text{m} \times \mu\text{m}$]	16x16
Rozlišení silové mapy	8x8
Senzitivita [nm/V]	76
Konstanta tuhosti [mN/m]	30,13
Kontaktní síla [nN]	4,186
Vzorkovací frekvence [Hz]	2046
Max délka v ose z [μm]	5
Čas [s]	5

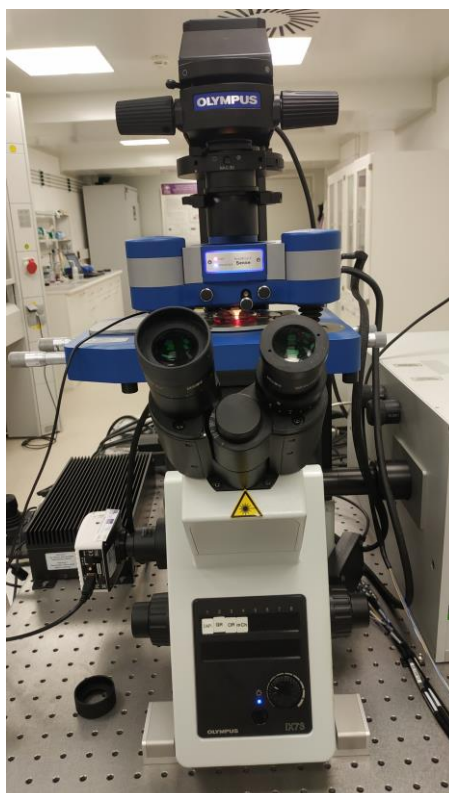
8. Zpracování naměřených dat v programu JPKSPM Data Processing – provádějí se korekční úpravy a vyhlazování jednotlivých silových křivek. V konečné fázi se naměřená data vkládají do Hertz-Sneddonova modelu, viz kap. 2.6.4. Nutno definovat tvar hrotu a velikost.
9. Vyhodnocení modulu pružnosti na úrovni jádra a cytoplazmy. K odlišení oblastí se využívá výšková mapa měřicí hlavy, která kopíruje profil buňky při skenování. Jako jádro byla vnímána oblast nad 80 % celkové výšky buňky, oblasti nižší (bez substrátu, tj. skla) byly vnímány jako cytoplazma.
10. Zpracování výsledných průměrných hodnot v grafickém a statistickém programu GraphPad Prism 9. Ověření normality dat a provedení oboustranného t-testu (párového u stejné populace buněk, nepárového u testování mezi různými populacemi).



Obrázek 4.1: Diagram získávání výsledné hodnoty tuhosti vzorku (vlastní)



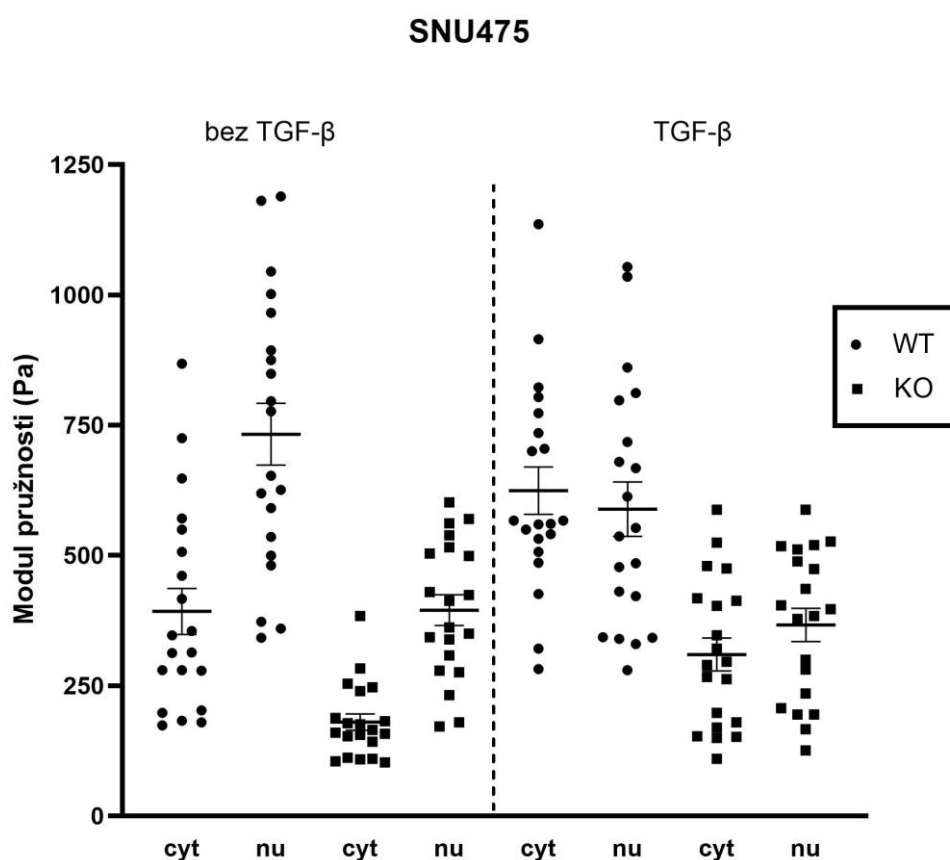
Obrázek 4.2: Hlavní modul AFM (vlastní)



Obrázek 4.3: Měřicí soustava optického mikroskopu a modulu AFM (vlastní)

5 Výsledky

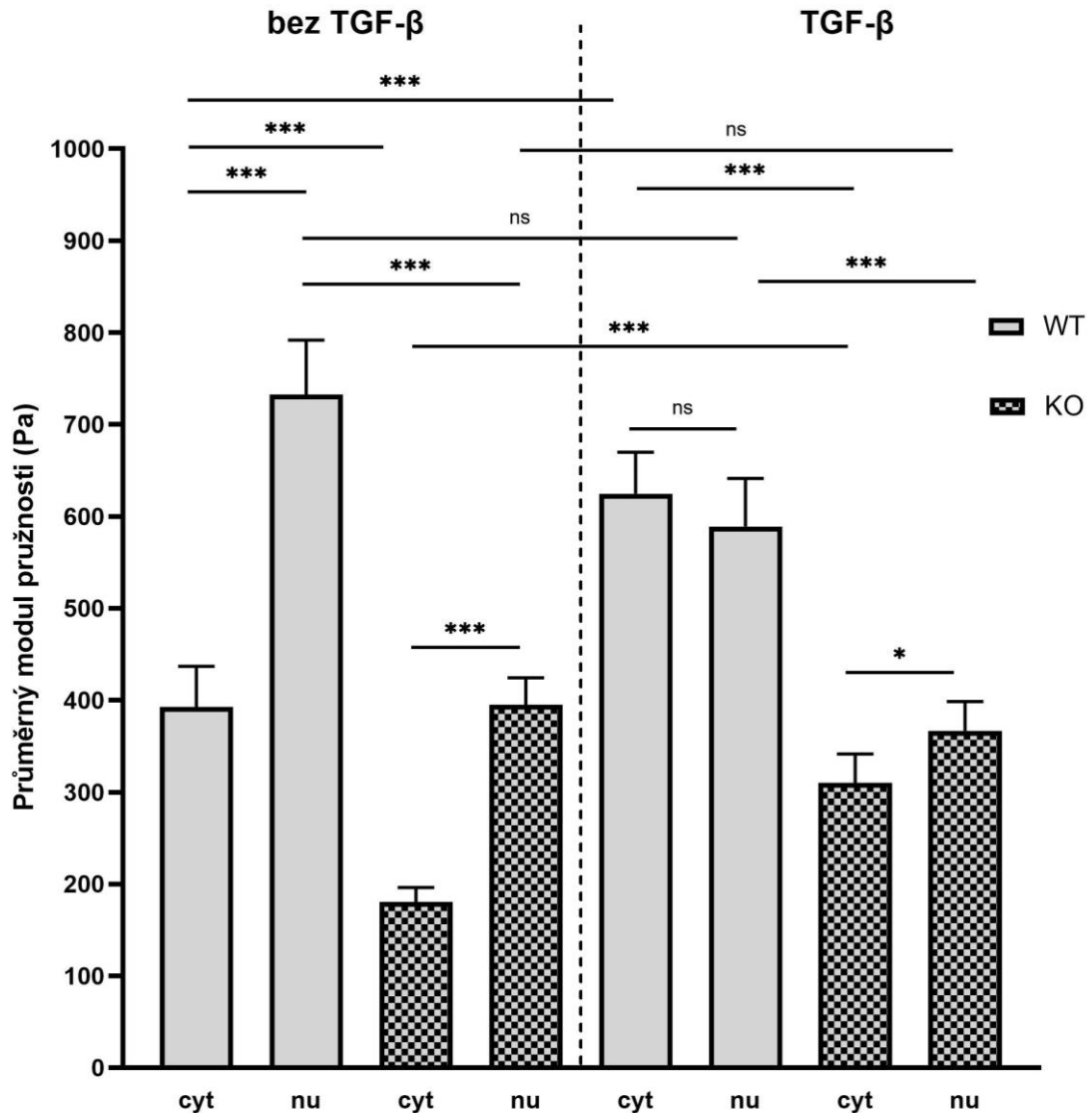
Pro reprezentaci výsledků mechanických vlastností buněk je zohledněna vždy tuhost jádra (nu) a tuhost cytoplazmy (cyt). Srovnávají se výsledné tuhosti jednotlivých buněk pro danou buněčnou linii, a to jak WT, tak i KO postrádající plectin. Dále se analyzují změny v tuhosti po aplikaci růstového faktoru TGF- β 1 (v koncentraci 10 ng/ml), jenž indukuje EMT. Každý soubor, tj. WT, KO, WT_{TGF- β 1} a KO_{TGF- β 1}, obsahuje 20 analyzovaných buněk.



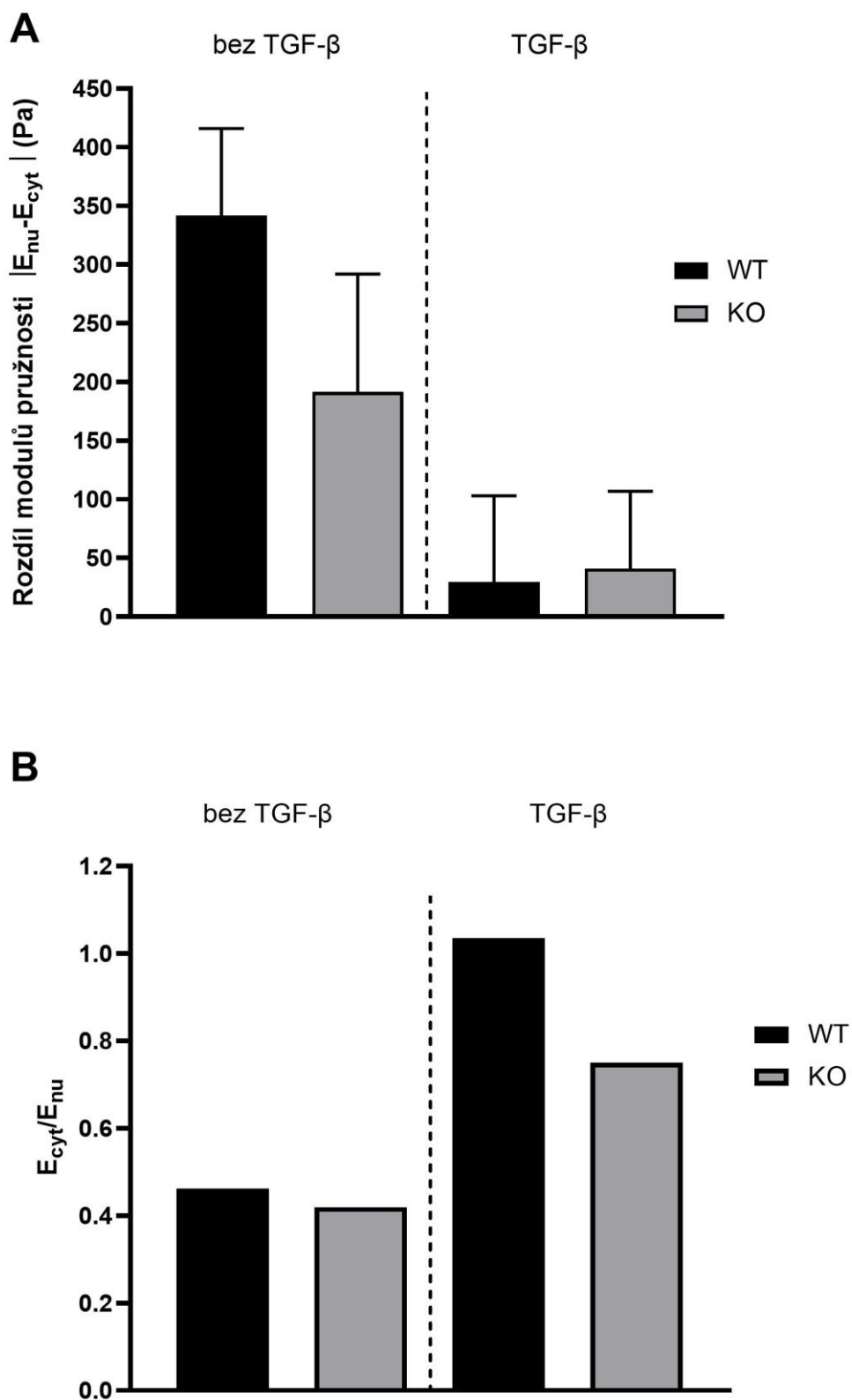
Obrázek 5.1: Bodové rozložení tuhostí jednotlivých buněk buněčné linie SNU475. Pro statistické vyhodnocení je použit aritmetický průměr \pm SEM (střední chyba průměru).

Tabulka 5.1: Výsledné tuhosti jádra a cytoplazmy buněk pro buněčnou linii SNU475; data prezentována ve formě aritmetický průměr \pm SEM

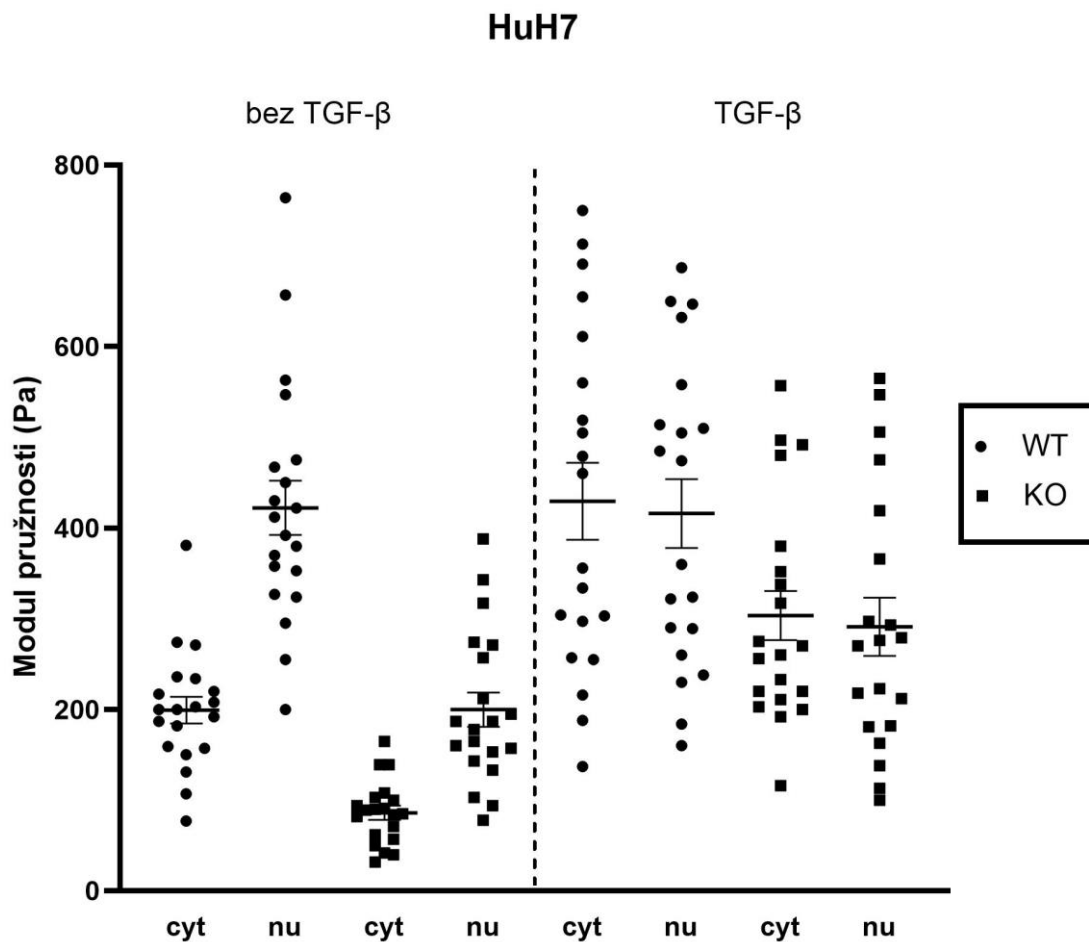
SNU475	E_{cyt} (Pa)	E_{nu} (Pa)
WT	393 \pm 44	733 \pm 59
KO	180 \pm 16	395 \pm 29
WT _{TGF-β}	625 \pm 45	589 \pm 52
KO _{TGF-β}	310 \pm 32	367 \pm 32



Obrázek 5.2: Srovnání průměrných tuhostí mezi jádrem a cytoplazmou pro jednotlivé modifikace buněk v rámci buněčné linie SNU475. Byla ověřena normalita dat. Pro vyhodnocení statistické významnosti rozdílu mezi tuhostí jádra a cytoplazmy buněk stejné populace byl použit oboustranný párový t-test, v ostatních případech byl použit oboustranný nepárový t-test. Hodnoty jsou reprezentovány ve formě aritmetický průměr ± SEM. (Hladiny významnosti: ns – nevýznamná, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)



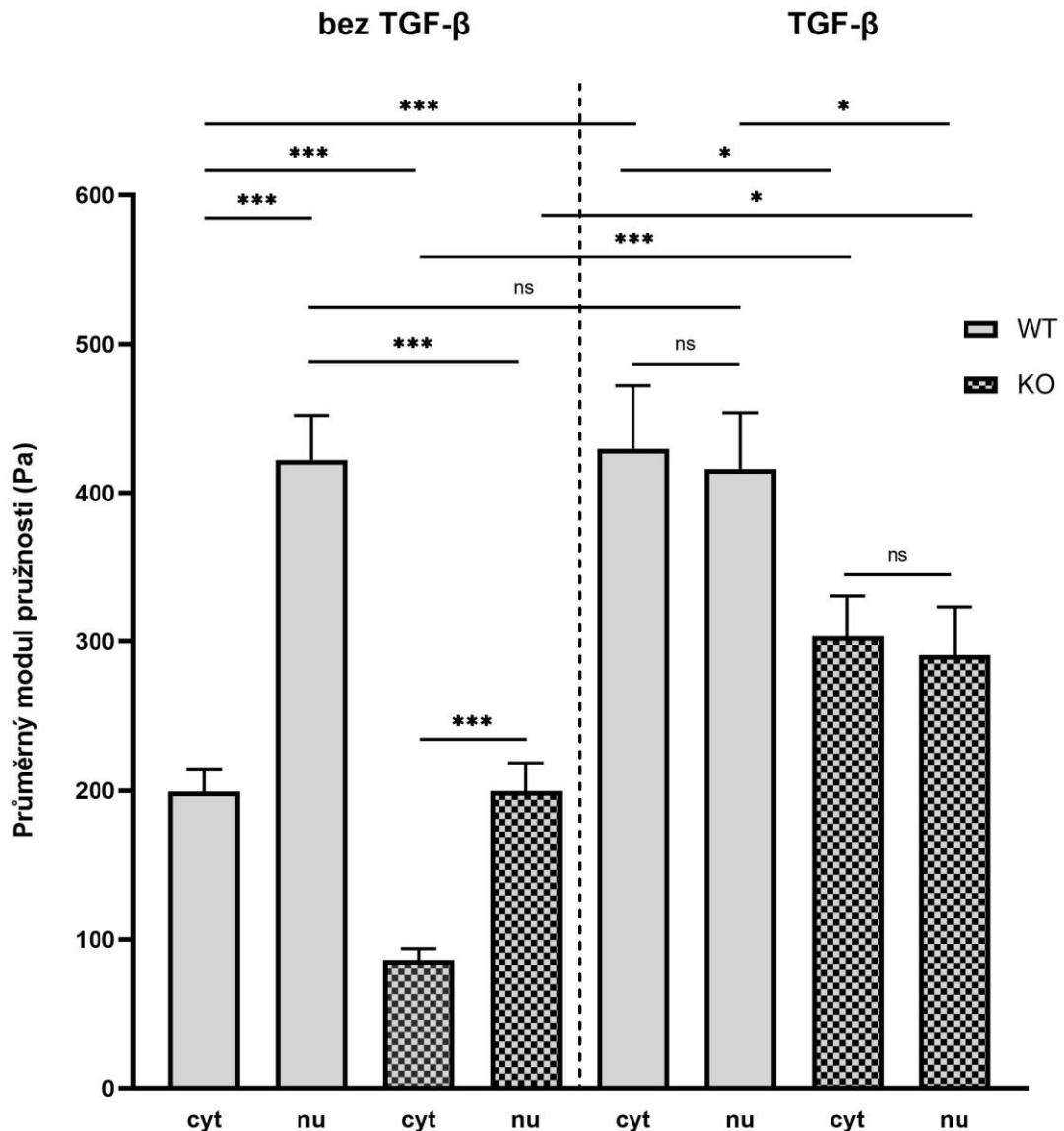
Obrázek 5.3: Změny rozdílů tuhosti mezi cytoplazmou a jádrem buněk SNU475;
A – porovnání absolutních rozdílů mediánů tuhosti pro jednotlivé modifikace
B – poměr mediánů tuhosti mezi cytoplazmou a jádrem



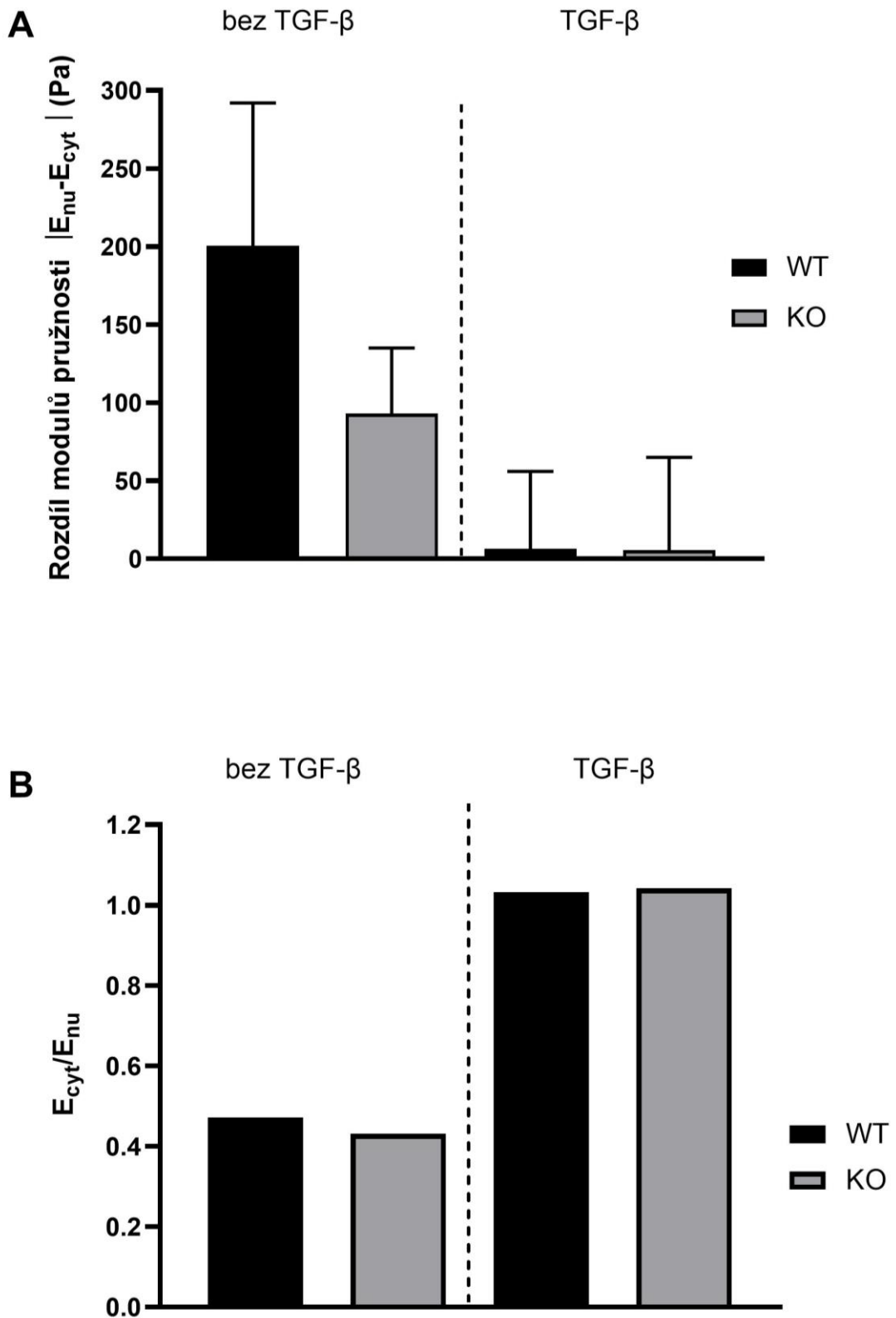
Obrázek 5.4: Bodové rozložení tuhostí jednotlivých buněk buněčné linie HuH7. Pro statistické vyhodnocení je použit aritmetický průměr \pm SEM (střední chyba průměru).

Tabulka 5.2: Výsledné tuhosti jádra a cytoplazmy buněk pro buněčnou linii HuH7; data prezentována ve formě aritmetický průměr \pm SEM

HuH7	E_{cyt} (Pa)	E_{nu} (Pa)
WT	199 \pm 15	422 \pm 30
KO	86 \pm 8	200 \pm 19
WT _{TGF-β}	430 \pm 42	416 \pm 38
KO _{TGF-β}	304 \pm 27	291 \pm 32



Obrázek 5.5: Srovnání průměrných tuhostí mezi jádrem a cytoplazmou pro jednotlivé modifikace buněk v rámci buněčné linie HuH7. Byla ověřena normalita dat. Pro vyhodnocení statistické významnosti rozdílu mezi tuhostí jádra a cytoplazmy buněk stejné populace byl použit oboustranný párový t-test, v ostatních případech byl použit oboustranný nepárový t-test. Hodnoty jsou reprezentovány ve formě aritmetický průměr ± SEM. (Hladiny významnosti: ns – nevýznamná, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)



Obrázek 5.6: Změny rozdílů tuhosti mezi cytoplazmou a jádrem buněk HuH7;
A – porovnání absolutních rozdílů mediánů tuhosti pro jednotlivé modifikace
B – poměr mediánů tuhosti mezi cytoplazmou a jádrem

6 Diskuse

V této práci jsem se zabývala analýzou elastických vlastností buněk pomocí AFM dvou buněčných linií HCC. Hlavním přínosem této práce je zjištění, že vnesené mutace pro plektin i proces EMT mají zásadní vliv na rozložení modulu pružnosti v buňce. Experimentální analýza WT obou buněčných linií, SNU475 i HuH7, odhalila statisticky významný rozdíl v hodnotách modulu pružnosti jádra a cytoplazmy, viz obr. 5.2 a 5.5. Jádro buňky vykazuje výrazně vyšší modul pružnosti než cytoplazma, u SNU475 tento rozdíl činí více jak 40 %, u HuH7 skoro 50 %, viz tab. 5.1 a 5.2. Toto zjištění je v souladu se známým rozložením modulu pružnosti, potažmo tuhosti, v jednotlivých částech a organelách buňky [7]. Můžeme tedy potvrdit první vyslovenou hypotézu v kap. 3.2, tedy že modul pružnosti jádra buňky bude vyšší než modul pružnosti cytoplazmy.

Rozdíl v elasticitě jádra a cytoplazmy se obdobně zachovává i v případě KO plektin-deficientních buněk, to opět platí pro obě analyzované buněčné linie, viz tab. 5.1 a 5.2. Je však důležité poukázat na skutečnost, jaký má vnesená mutace pro plektin vliv na celkové elastické vlastnosti buňky. Z již zmíněných tabulek hodnot, stejně tak z obr. 5.2 a 5.5, lze vyčíst, že vyřazení exprese a funkce plektinu mělo za následek 45–55% snížení modulu pružnosti u jádra i cytoplazmy oproti WT, a to jak u SNU475, tak u HuH7. Snížení modulu pružnosti buněk, potažmo tuhosti buněk, bylo prokázáno v důsledku inaktivace genu pro plektin i v rámci některých jiných výzkumů [16] [17] a potvrzujeme tak druhou vyslovenou hypotézu v kap. 3.2, která se taktéž logicky shoduje s poznatky o funkčních vlastnostech plektinu [13] [14] [15].

Dále byl analyzován vliv stavu EMT indukované růstovým faktorem TGF- β 1. Výsledky ukazují statisticky významné změny zejména v cytoplazmě buněk (obr. 5.2 a 5.5). EMT měla za následek zvýšení modulu pružnosti cytoplazmy u WT i KO obou buněčných linií: modul pružnosti cytoplazmy vzrostl o 160–170 % u SNU475 (WT i KO), u buněčné linie HuH7 byly změny ještě výraznější – u WT došlo k nárůstu o více než 200 %, u KO dokonce o 350 %. V případě jádra buněk SNU 475 nebyl u WT ani KO statisticky významný rozdíl v modulech pružnosti, viz obr. 5.2. Pro WT buněčné linie HuH7 rovněž nebyl rozdíl v modulu pružnosti jader statisticky významný, na rozdíl od jader plektin-deficientních KO, kde byla signifikance $P < 0,05$, viz obr. 5.5.

Průběh změn modulu pružnosti pro WT a KO při procesu EMT dobře ilustrují obr. 5.3 a 5.6, které v horní části (A) zobrazují absolutní rozdíl modulů pružnosti mezi jádrem a cytoplazmou WT a KO v normálních podmínkách a ve stavu EMT, zatímco dolní část grafu (B) zobrazuje poměrové zastoupení modulu pružnosti cytoplazmy ku modulu pružnosti jádra, taktéž v normálních podmínkách a ve stavu EMT. Z těchto výsledků je zjevné, že proces EMT „maže rozdíly“ mezi moduly pružnosti jádra a cytoplazmy: u buněčné linie HuH7 (KO i WT) ztratil tento rozdíl statistickou významnost, viz obr. 5.5,

v případě SNU475 se statistická významnost rozdílů mezi jádrem a cytoplazmou neprokázala u WT, u KO se ukázala menší statistická významnost ($P < 0,05$), viz obr. 5.2.

Změny elastických vlastností buněk v průběhu EMT jsou zapříčiněny zejména přestavbou aktinového cytoskeletu a aktomyozinu. Z výsledků jsou změny dobře patrné, avšak pro ucelené informace by bylo vhodné porovnat výsledné hodnoty modulů pružnosti buněk i s jejich morfologií – např. zobrazením aktinových struktur, sítě IF a jader pomocí fluorescenční mikroskopie. V každém případě lze potvrdit i třetí vyslovenou hypotézu (viz kap. 3.1), že proces EMT bude mít za následek změnu modulu pružnosti.

Poslední hypotéza, jestli se WT a KO jednotlivých buněčných linií budou lišit při procesu EMT se potvrzuje částečně. KO si zachovávají menší moduly pružnosti oproti WT stejně jako za normálních podmínek, ale změny při EMT jsou konzistentní – roste modul pružnosti cytoplazmy a modul pružnosti jádra vzrostl jen u KO linie HuH7, jinak se moduly pružnosti jader konzistentně neměnily. Z míry změn modulů pružnosti lze ještě vyvodit, že linie HuH7 je vnímavější k působení TGF- β 1 než druhá linie SNU475 (viz obr. 5.2 a 5.5), jejíž buňky jsou již značně dediferencované a mají blíže k mesenchymálnímu fenotypu, i bez ošetření TGF- β 1. Proto u nich přestavba cytoskeletu není tak robustní.

Na obr. 5.1 a 5.4 jsou znázorněny jednotlivé bodové hodnoty modulů pružnosti, takže si lze udělat představu o míře rozptylu jeho hodnot pro jednotlivé buňky v oblasti jádra a cytoplazmy. Při měření a následném zpracování výsledků se zohledňoval vliv délky měření na výsledné hodnoty modulu pružnosti. Buňky totiž byly měřeny při pokojové teplotě a bez 5% CO₂, avšak médium, ve kterém měření probíhalo, bylo obohacené o pufr HEPES (v koncentraci 20 mM), které by mělo prodloužit životnost buněk o několik hodin i bez ideálních podmínek. Vliv délky měření na výslednou tuhost buněk patrný nebyl.

Při celkovém zhodnocení výsledků můžeme říci, že hodnoty modulů pružnosti buněk řádově odpovídají hodnotám nalezeným v literatuře pro jiné buňky [23]. Za úvahu ovšem stojí použitý Hertz-Sneddonův model, který se využívá jako standard, a to i v biologických aplikacích. Tam ale naráží na určité limitace: Hertz-Sneddonův model pracuje s teorií kontinua, avšak buňka není homogenní kontinuum, dále model zjednodušuje geometrii kontaktní plochy (buňky) a posledně model nereflektuje povrchové síly [41].

Pro budoucí výzkum v oblasti mechanických vlastností buněk HCC by bylo vhodné stejným způsobem zanalyzovat i zdravé jaterní epitelové buňky a výsledky doplnit snímky z fluorescenční mikroskopie, které by dokumentovaly morfologii buňky, zejména rozložení cytoskeletu a jádra. Dalším zajímavým experimentem by bylo využití myšího xenograftového modelu, na kterém by se dala ověřit míra malignity jednotlivých modifikací obou buněčných linií HCC.

7 Závěr

Vytvořila jsem metodiku experimentálního měření mechanických vlastností buněk HCC pomocí AFM. Metodiku jsem vypracovala na WT, nemodifikovaných modelových buněčných liniích HCC, SNU475 a HuH7. Současně s tím jsem vytvořila jednotné postupy přípravy buněk pro potřeby měření a osvojila jsem si postupy pro udržování buněčných kultur.

Zanalyzovala jsem moduly elasticity reprezentativních výběrů populací buněk obou buněčných linií, a sice WT, dále KO s vnesenými mutacemi pro protein plektin a posléze WT i KO v procesu EMT. Následně jsem vypracovala komparativní analýzu modulů pružnosti v rámci každé buněčné linie.

Splnila jsem všechny zadané cíle a podařilo se mi ověřit všechny hypotézy. Hlavním výstupem mé práce je, že absence plektinu má zásadní vliv na snížení modulu pružnosti buněk a že proces EMT významně mění rozložení modulu pružnosti v buňce. Tyto buněčné linie doposud nebyly studovány z hlediska mechanických vlastností, proto je práce přínosem.

Seznam použité literatury

- [1] NEČAS, Oldřich. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. Jinočany, 2000. ISBN 80-860-2246-3
- [2] JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY. *Základy histologie*. Jinočany, 1997. ISBN 80-857-8737-7.
- [3] *LECTURE NOTES: CELL BIOLOGY: (BIOMEDICAL LABORATORY SCIENCE STUDENTS)* [online]. Indore, 2018 [cit. 2021-04-22]. ISBN 978-93-86675-40-8. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/324543378_LECTURE_NOTES_CELL_BIOLOGY_BIOMEDICAL_LABORATORY_SCIENCE_STUDENTS
- [4] LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-802-4737-294.
- [5] JANÍČEK P.: *Biomechanika člověka a biomateriálové inženýrství*, učební texty z připravované publikace
- [6] FREEMAN, Scott. *Biological Science*. 2nd. Pearson Prentice Hall, 2005. ISBN 0131410504.
- [7] LI, Mi, Ning XI, Yue-chao WANG a Lian-qing LIU. Atomic force microscopy for revealing micro/nanoscale mechanics in tumor metastasis: from single cells to microenvironmental cues. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2021, **42**(3), 323-339. ISSN 1671-4083. Dostupné z: doi:10.1038/s41401-020-0494-3
- [8] MOEENDARBARY, Emad a Andrew R. HARRIS. Cell mechanics: principles, practices, and prospects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2014, **6**(5), 371-388. ISSN 19395094. Dostupné z: doi:10.1002/wsbm.1275
- [9] ALBERTS, Bruce, Karen HOPKIN, Alexander JOHNSON, David Owen MORGAN, Martin C. RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER. *Essential cell biology*. Fifth edition. New York, [2019]. ISBN 978-039-3680-393.
- [10] KONRÁDOVÁ, Václava. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany, 2000. ISBN 80-860-2280-3.
- [11] VAJNER, Luděk, Jiří UHLÍK a Václava KONRÁDOVÁ. *Lékařská histologie I.: cytologie a obecná histologie*. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1860-9.
- [12] HARDIN, Jeff a Greg BERTONI. *Becker's World of the Cell*. 9th edition. University of Wisconsin, Madison: Pearson, 2016. ISBN 9780321934925.

- [13] BOUAMEUR, Jamal-Eddine, Bertrand FAVRE a Luca BORRADORI. Plakins, a Versatile Family of Cytolinkers: Roles in Skin Integrity and in Human Diseases. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014, **134**(4), 885-894. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2013.498
- [14] CASTAÑÓN, Maria J., Gernot WALKO, Lilli WINTER a Gerhard WICHE. Plectin–intermediate filament partnership in skin, skeletal muscle, and peripheral nerve. *Histochemistry and Cell Biology*. 2013, **140**(1), 33-53. ISSN 0948-6143. Dostupné z: doi:10.1007/s00418-013-1102-0
- [15] REZNICZEK, Günther A., Lilli WINTER, Gernot WALKO a Gerhard WICHE. Functional and Genetic Analysis of Plectin in Skin and Muscle. *Intermediate Filament Associated Proteins*. Elsevier, 2016, 2016, , 235-259. Methods in Enzymology. ISBN 9780128034699. Dostupné z: doi:10.1016/bs.mie.2015.05.003
- [16] ANDRA, K., H. LASSMANN, R. BITTNER, S. SHORNY, R. FASSLER, F. PROPST a G. WICHE. *Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture*. 1997, **11**(23), 3143-3156. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.11.23.3143
- [17] BONAKDAR, Navid, Achim SCHILLING, Marina SPÖRRER, et al. Determining the mechanical properties of plectin in mouse myoblasts and keratinocytes. *Experimental Cell Research*. 2015, **331**(2), 331-337. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1016/j.yexcr.2014.10.001
- [18] BURGSTALLER, Gerald, Martin GREGOR, Lilli WINTER, Gerhard WICHE a M. BISHR OMARY. Keeping the Vimentin Network under Control: Cell–Matrix Adhesion–associated Plectin 1f Affects Cell Shape and Polarity of Fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell*. 2010, **21**(19), 3362-3375. ISSN 1059-1524. Dostupné z: doi:10.1091/mbc.e10-02-0094
- [19] ALMEIDA, F. V., G. WALKO, J. R. MCMILLAN, J. A. MCGRATH, G. WICHE, A. H. BARBER a J. T. CONNELLY. The cytolinker plectin regulates nuclear mechanotransduction in keratinocytes. *Journal of Cell Science*. 2015, **128**(24), 4475-4486. ISSN 0021-9533. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.173435
- [20] Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. *The Development and Causes of Cancer*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
- [21] Frances R. Balkwill, Melania Capasso, Thorsten Hagemann; The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* 1 December 2012; **125** (23): 5591–5596. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.116392>

- [22] Alibert C, Goud B, Manneville JB. Are cancer cells really softer than normal cells? *Biol Cell*. 2017 May;109(5):167-189. doi: 10.1111/boc.201600078. Epub 2017 Apr 6. PMID: 28244605.
- [23] Lekka M. Discrimination Between Normal and Cancerous Cells Using AFM. *Bionanoscience*. 2016;6:65-80. DOI: 10.1007/s12668-016-0191-3.
- [24] KO, Kwan-Lung, Lung-Yi MAK, Ka-Shing CHEUNG a Man-Fung YUEN. Hepatocellular carcinoma: recent advances and emerging medical therapies. *F1000Research*. 2020, **9**. ISSN 2046-1402. Dostupné z: doi:10.12688/f1000research.24543.1
- [25] RAWLA, Prashanth, Tagore SUNKARA, Pradhyumna MURALIDHARAN a Jeffrey Pradeep RAJ. Update in global trends and aetiology of hepatocellular carcinoma. *Współczesna Onkologia*. 2018, **22**(3), 141-150. ISSN 1428-2526. Dostupné z: doi:10.5114/wo.2018.78941
- [26] TOMÁŠEK, J. Diagnosticko-léčebné protokoly: Karcinom jater. *Masarykův onkologický ústav* [online]. Brno, 1. 11. 2016 [cit. 2021-4-24]. Dostupné z: <https://www.mou.cz/3-4-karcinom-jater/f81>
- [27] SANYAL, Arun J., Seung Kew YOON a Riccardo LENCIONI. The Etiology of Hepatocellular Carcinoma and Consequences for Treatment. *The Oncologist*. 2010, **15**(S4), 14-22. ISSN 1083-7159. Dostupné z: doi:10.1634/theoncologist.2010-S4-14
- [28] *Medical Ultrasonography*. 16. 2014. ISSN 18444172. Dostupné také z: <http://www.medultrason.ro/ultrasound-screening-for-hepatocellular-carcinoma-in-patients-with-advanced-liver-fibrosis-an-overview/>
- [29] O'SULLIVAN, Brian, James BRIERLEY, David BYRD, et al. The TNM classification of malignant tumours—towards common understanding and reasonable expectations. *The Lancet Oncology*. 2017, **18**(7), 849-851. ISSN 14702045. Dostupné z: doi:10.1016/S1470-2045(17)30438-2
- [30] FORNER, Alejandro, María REIG, María VARELA, et al. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Update consensus document from the AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI and SETH. *Medicina Clínica (English Edition)*. 2016, **146**(11), 511.e1-511.e22. ISSN 23870206. Dostupné z: doi:10.1016/j.medcle.2016.07.013
- [31] KAWAMOTO, Masaki, Toshiyuki YAMAJI, Kyoko SAITO, et al. Identification of Characteristic Genomic Markers in Human Hepatoma HuH-7 and Huh7.5.1-8 Cell Lines. *Frontiers in Genetics*. 2020, **11**. ISSN 1664-8021. Dostupné z: doi:10.3389/fgene.2020.546106

- [32] *Huh-7 Cell Line Origins and Characteristics: Cell Culture Information for HuH-7* [online]. [cit. 2021-4-24]. Dostupné z: <https://huh7.com/general-information/cell-culture-information/>
- [33] KU, Ja-Lok a Jae-Gahb PARK. Biology of SNU Cell Lines. *Cancer Research and Treatment*. 2005, **37**(1). ISSN 1598-2998. Dostupné z: doi:10.4143/crt.2005.37.1.1
- [34] MATĚJKA, Vít Martin, Jindřich FÍNEK a Milena KRÁLÍČKOVÁ. Epithelial-mesenchymal Transition in Tumor Tissue and Its Role for Metastatic Spread of Cancer. *Klinická onkologie*. 2017, **30**(1), 20-27. ISSN 0862495X. Dostupné z: doi:10.14735/amko201720
- [35] Epithelial tissue. *Principles of Cell Biology (BIOL2060)* [online]. Memorial University of Newfoundland [cit. 2021-4-24]. Dostupné z: http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-17/17_01.jpg
- [36] RIBATTI, Domenico, Roberto TAMMA a Tiziana ANNESE. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Translational Oncology*. 2020, **13**(6). ISSN 19365233. Dostupné z: doi:10.1016/j.tranon.2020.100773
- [37] SOMMARIVA, Michele a Nicoletta GAGLIANO. E-Cadherin in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Multifaceted Actor during EMT. *Cells*. 2020, **9**(4). ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9041040
- [38] KATSUNO, Yoko, Samy LAMOUILLE a Rik DERYNCK. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Current Opinion in Oncology*. 2013, **25**(1), 76-84. ISSN 1040-8746. Dostupné z: doi:10.1097/CCO.0b013e32835b6371
- [39] FREWIN, L.C. *Atomic Force Microscopy Investigations into Biology - From Cell to Protein*. IntechOpen, 2012. ISBN 978-953-51-0114-7.
- [40] *JPK Instruments NanoWizard® Handbook Version 6.0*. Berlin, Germany.
- [41] KRIEG, Michael, Gotthold FLÄSCHNER, David ALSTEENS, et al. Atomic force microscopy-based mechanobiology. *Nature Reviews Physics*. 2019, **1**(1), 41-57. ISSN 2522-5820. Dostupné z: doi:10.1038/s42254-018-0001-7
- [42] SCHITTER, G., P. MENOLD, H. F. KNAPP, F. ALLGÖWER a A. STEMMER. High performance feedback for fast scanning atomic force microscopes. *Review of Scientific Instruments*. 2001, **72**(8), 3320-3327. ISSN 0034-6748. Dostupné z: doi:10.1063/1.1387253
- [43] AFM modes. *NT-MDT Spectrum Instruments* [online]. [cit. 2021-5-19]. Dostupné z: https://www.ntmdt-si.com/data/media/files/SPM_Principles/Constant_Force_mode_en.zip
- [44] BHUSHAN, Bharat, ed. *Handbook of Micro/Nano Tribology*. 2nd Edition. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1999. ISBN 0-8493-8402-8.

- [45] CÁRDENAS-PÉREZ, Stefany, José Jorge CHANONA-PÉREZ, Juan Vicente MÉNDEZ-MÉNDEZ, Israel ARZATE-VÁZQUEZ, Josué David HERNÁNDEZ-VARELA a Norma Güemes VERA. *Recent advances in atomic force microscopy for assessing the nanomechanical properties of food materials*. 2019, **87**, 59-72. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2018.04.01