

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

Využití 3D organoidů pro výzkum mozkových nádorů

**Zuzana Zelenková
Jihomoravský kraj**

Brno 2024

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 5: Molekulární biologie

Využití 3D organoidů pro výzkum mozkových nádorů

Application of 3D organoids for brain tumor research

Autor: Zuzana Zelenková
Škola: Gymnázium Brno-Řečkovice,
Terezy Novákové 2, Brno, 621 00
Kraj: Jihomoravský
Konzultanti: Mgr. Dáša Boháčiová, Ph.D., LF MU
Mgr. Veronika Fedorová, Ph.D., LF MU
RNDr. Kateřina Cibulková,
Gymnázium Brno-Řečkovice

Brno 2024

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze literaturu a další odborné zdroje uvedené v seznamu bibliografických záznamů. U metod, které jsem neprovedla osobně, ale za pomoci kolegů z laboratoře mé školitelky nebo v centrálních laboratořích CEITECu Masarykovy univerzity, je to v textu explicitně uvedeno.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem 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 Brně dne 15. února 2024

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé práce na Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity **Mgr. Dáše Bohačiové, Ph.D.** za to, že mi umožnila pracovat v její výzkumné skupině a poskytovala mi cenné rady a podporu. Obrovské poděkování patří především mé konzultantce **Mgr. Veronice Fedorové, Ph.D.** za to, jak mě zasvětila do tajů vědy, trpělivě zodpovídala moje dotazy i za to, že jsem se na ni mohla kdykoliv a s čímkoliv obrátit.

Velice děkuji i dalším členům kolektivu výzkumné skupiny Mgr. Dáši Bohačiové, Ph.D., za rady a pomoc se složitými experimentálními metodami i za vytvoření přátelské a milé atmosféry, jmenovitě Mgr. Jiřímu Sedmíkovi, Ph.D., Mgr. Kateřině Amruz Černé, Ph.D., Mgr. Janě Slováčkové, Ph.D., Mgr. Veronice Pospíšilové, Ph.D. a Bc. Kláře Plešingrové. Děkuji také vedoucímu pracoviště – přednostovi Ústavu histologie a embryologie Lékařské fakulty MU **doc. MVDr. Aleši Hamplovi, CSc.**, za možnost působení na jeho pracovišti.

Také děkuji za možnost využití centrálních laboratoří („Core Facilities“) v CEITECu MU pro náročné experimentální analýzy, konkrétně CF Buněčné zobrazování (Dr. Milan Ešner), CF Genomika (Dr. Boris Tichý, Mgr. Terézia Kurucová) a CF Bioinformatika (Dr. Vojtěch Bystrý, Dr. Jakub Hynšt). Poděkování patří i RNDr. Janu Mužíkovi, Ph.D. za poskytnutí aktuálních dat z Národního onkologického registru.

Děkuji též své školní konzultantce **RNDr. Kateřině Cibulkové** za cenné rady při sepisování práce.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory Jcmm (Jihomoravské centrum pro mezinárodní mobilitu) a JmK (Jihomoravský kraj).

MUNI
LÉKAŘSKÁ
FAKULTA



 **CEITEC**

Jihomoravský kraj



ANOTACE

Tato práce SOČ se zabývá využitím mozkových organoidů, trojrozměrných buněčných struktur napodobujících strukturu lidského mozku, pro vytvoření modelu glioblastomu, nejčastějšího a nejagresivnějšího lidského primárního nádoru mozku. Interakcí mozkových organoidů, derivovaných z indukovaných pluripotentních kmenových buněk, se sféroidy vzniklými z glioblastomových buněčných linií jsme vytvořili tzv. GLICO modely mozkových nádorů.

Pro experimenty jsme použili nádorové buněčné linie odvozené od 4 konkrétních pacientů s glioblastomy, které jsme charakterizovali z hlediska genové exprese na úrovni RNA a vybraných proteinů. Pomocí Light sheet fluorescenční mikroskopie jsme analyzovali jejich schopnost migrace zdravou tkání mozkového organoidu. Detekovali jsme významně rozdílné biologické vlastnosti nádorových buněčných linií od jednotlivých pacientů a ukázali, že individualizované GLICO modely mohou být užitečným nástrojem pro výzkum a charakterizaci mozkových nádorů.

GLICO modely jsme také úspěšně využili pro testování nových možností cílené protinádorové terapie, konkrétně pro sledování efektu inhibitorů kasein kinázy 1 (CK1). Porovnali jsme efekt dvou různých inhibitorů CK1 (výrobci Pfizer a MU) a prokázali jejich významný vliv na zpomalení růstu nádoru po 30denní kultivaci s GLICO modelem (po kultivaci s inhibitorem Pfizer se objem nádoru snížil na 59 %, po kultivaci s inhibitorem MU na 55 % kontrolního vzorku bez inhibitoru). Získané výsledky tak ukázaly velký potenciál 3D mozkových organoidů pro vývoj individualizovaných modelů mozkových nádorů a pro testování nových typů protinádorových léčiv.

Klíčová slova

Glioblastom; Organoidy; Kmenové buňky; GLICO model; Inhibitor CK1;

ANNOTATION

This Students' Professional Activities ("SOČ") thesis deals with the application of brain organoids, three-dimensional cellular structures imitating the structure of the human brain, to create a model of glioblastoma, the most common and most aggressive human primary brain tumor. Through interaction of brain organoids, derived from induced pluripotent stem cells, with spheroids formed from glioblastoma cell lines, we created so-called GLICO models of brain tumors.

For the experiments, we used tumor cell lines derived from 4 individual patients with glioblastoma, which we characterized in terms of gene expression at the level of RNA and selected proteins. Using Light sheet fluorescence microscopy, we analyzed their ability to migrate through healthy tissue of the brain organoid. We detected significantly different biological properties of tumor cell lines derived from individual patients and showed that individualized GLICO models can be a useful tool for brain tumor research and characterization.

We have also successfully applied GLICO models for testing new options for targeted antitumor therapy, specifically for monitoring of the effect of Casein Kinase 1 (CK1) inhibitors. We compared the effect of two different CK1 inhibitors (manufactured by Pfizer and MU) and demonstrated their significant impact on an inhibition of tumor growth after 30-day cultivation with the GLICO model (after cultivation with the Pfizer and MU inhibitors, the tumor size decreased to 59% and 55%, respectively, in comparison the control non-treated sample). The obtained results thus showed the great potential of 3D brain organoids for the development of individualized models of brain tumors and for testing of novel types of antitumor drugs.

Keywords

Glioblastoma; Organoid; Stem cells; GLICO model; CK1 Inhibitor;

OBSAH

Prohlášení.....	2
Poděkování.....	3
Anotace	4
Annotation	5
Seznam zkratk	8
1 Úvod.....	10
2 Cíle práce	12
3 Teoretická část	13
3.1. Glioblastoma multiforme	13
3.2. Epidemiologie a etiologie GBM	15
3.3. Léčba GBM.....	15
3.4. Biologická léčba glioblastomu.....	15
3.5. Kmenové buňky	16
3.5.1. Embryonální kmenové buňky	16
3.5.2. Dospělé kmenové buňky	17
3.5.3. Indukované pluripotentní kmenové buňky	18
3.5.4. Glioblastomové buněčné linie	19
3.6. 3D buněčné modely	20
3.6.1. Sféroidy.....	20
3.6.2. Organoidy	21
3.6.2.1. Mozkové organoidy	22
3.7. Modelování Glioblastoma multiforme pomocí mozkových organoidů.....	24
3.7.1. GLICO model – 3D model glioblastomu vytvořený pomocí mozkového organoidu	24
4 Materiál a metody	25
4.1. Materiál.....	25
4.1.1 Buněčné linie glioblastomu	25
4.1.2 Buněčná linie indukovaných pluripotentních kmenových buněk použitá pro přípravu organoidů	27
4.2. Kultivace glioblastomových buněčných linií	27
4.2.1. Rozmrazování buněčných linií	28
4.2.2. Pasážování buněčných linií.....	28

4.3.	Analýza transkriptomu pomocí sekvenování nové generace (NGS)	29
4.4.	Bioinformatická analýza transkriptomických dat	30
4.5.	Analýza exprese vybraných proteinů pomocí metody Western blot	31
4.6.	Tranfekce buněčných linií U3047 a U3118	33
4.7.	Transdukce buněčné linie U3013	34
4.8.	Sortovací fluorescenční průtoková cytometrie (FACS).....	35
4.9.	Příprava sféroidů z glioblastomových linií.....	36
4.10.	Příprava mozkových organoidů	36
4.11.	Vytvoření 3D modelů onemocnění Glioblastoma multiforme (GLICO) ...	37
4.12.	Příprava GLICO modelů pro Light sheet fluorescenční mikroskopii.....	37
4.12.1.	Fixace GLICO modelů.....	37
4.12.2.	Metoda CUBIC Clearing.....	37
4.13.	Analýza migrace glioblastomových buněk v GLICO modelu.....	38
4.14.	Aplikace inhibitorů ke GLICO modelům	38
5	Výsledky	40
5.1.	Charakterizace glioblastomových buněčných linií z hlediska exprese významných proteinů.....	40
5.2.	Analýza transkriptomu glioblastomových buněčných linií pomocí sekvenování nové generace	41
5.3.	Fluorescenční značení glioblastomových buněk	47
5.4.	Srovnání schopnosti migrace glioblastomových buněk mozkovým organoidem	48
5.5.	Aplikace inhibitorů ke GLICO modelům	51
6	Diskuse.....	58
	Závěr	61
	Seznam literatury	62
	Seznam obrázků.....	68
	Seznam tabulek	70

SEZNAM ZKRATEK

2D	z angl. Two-Dimensional (dvojrozměrný)
3D	z angl. Three-Dimensional (trojrozměrný)
APS	z angl. Ammonium persulfate (persulfát amonný)
ASCs	z angl. Adult Stem Cells (dospělé kmenové buňky)
BCP	1-bromo-3-chlorpropan
BPB	z angl. Brom-Phenol Blue (bromfenolová modř)
BSA	z angl. Bovine Serum Albumine (bovinní sérový albumin)
CK1	z angl. Casein Kinase 1 (Kasein Kináza 1)
CNS	centrální nervová soustava
DC	z angl. Detergent Compatible (kompatibilní s detergenty)
DMEM/F12	z angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (Dulbekovo modifikované médium/směs živin F-12)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matrix
EGF	z angl. Epidermal Growth Factor (epidermální růstový faktor)
ESCs	z angl. Embryonic Stem Cells (embryonální kmenové buňky)
FACS	z angl. Fluorescence-Activated Cell Sorting (fluorescencí aktivované třídění buněk)
FBS	z angl. Fetal Bovine Serum (fetální bovinní sérum)
FGF2	z angl. Fibroblast Growth Factor 2 (fibroblastový růstový faktor 2)
GBM	Glioblastoma Multiforme
GFAP	z angl. Glial Fibrillary Acidic Protein (gliový fibrilární kyselý protein)
GFP	z angl. Green Fluorescent Protein (zelený fluorescenční protein)
GLICO	Glioblastoma Cerebral Organoid
HRP	z angl. Horseradish Peroxidase (křenová peroxidáza)
iPSCs	z angl. Induced Pluripotent Stem Cells (indukované pluripotentní kmenové buňky)
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
KCl	chlorid draselný
KH ₂ PO ₄	dihydrogenfosforečnan draselný
LSFM	Light sheet fluorescenční mikroskopie

MCTS	multicelulární sféroid
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	dihydrát hydrogenfosfátu disodného
NaCl	chlorid sodný
NeuroCult	z angl. Neural Stem Cell Culture Media (médium pro neurální kmenové buňky)
NF-L	z angl. Neurofilament Light Polypeptide (neurofilamentový lehký polypeptid)
NGS	z angl. Next Generation Sequencing (sekvenování nové generace)
NGS	z angl. Normal Goat Serum (normální kozí sérum)
OLIG2	z angl. Oligodendrocyte Transcription Factor (oligodendrocytový transkripční faktor)
PBS	z angl. Phosphate Buffered Saline (fosfátový pufr)
PCA	z angl. Principal Component Analysis (analýza hlavních komponent)
Poly-Hema	z angl. Polyhydroxyethylmethacrylate (polyhydroxyetylmetakrylát)
PVDF	z angl. Polyvinylidene Difluoride (polyvinyliden fluoridová membrána)
RNA	ribonukleová kyselina
RNA-seq	z angl. RNA Sequencing (sekvenování RNA)
RCF	z angl. relative centrifugation force (relativní centrifugační síla)
rpk	z angl. reads per kilobase milion (počet čtení na milion kilobází)
SDS	z angl. Sodium-dodecyl-sulfate (dodecylsulfát sodný)
SOX1	SRY-Box Transcription Factor 1 (SRY-Box transkripční faktor 1)
SOX2	SRY-Box Transcription Factor 2 (SRY-Box transkripční faktor 2)
TBS	z angl. Tris Buffered Saline (trisový pufr)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
tpkm	z angl. transcript per milion (počet transkriptů na milion)
Tris	Trisaminomethan
Tris-HCl	Trisaminomethan-hydroxychlorid
TUJ	z angl. The Beta-tubulin III Protein (beta-tubulinový protein III)
TWEEN	polyoxyetylen-20-sorbitan monolaurát polysorbát 20 neiontový detergent
UMI	z angl. Unique Molecular Identifiers (jedinečné molekulární identifikátory)

1 ÚVOD

Biomedicínský výzkum patří mezi nejrychleji se rozvíjející vědecké oblasti, protože přispívá nejenom k poznání biologie a patofyziologie závažných onemocnění, ale také přináší nové možnosti lékařské diagnostiky, účinné moderní léčby i personalizované medicíny. K určení co nejvhodnější terapie pro konkrétní pacienty a objevení nových potenciálních léčiv je velmi důležité nalezení vhodných biologických modelů onemocnění, které by co nejpřesněji napodobovaly odpovídající lidské tkáně.

Klíčovou technologií, která se pro tento účel v posledních letech začíná využívat, jsou tzv. organoidy – trojrozměrné (Three-Dimensional, 3D) buněčné struktury napodobující strukturu orgánů *in vivo*. První 3D buněčné organoidy byly vyvinuty z dospělých kmenových buněk a napodobovaly tkáň tenkého střeva [1]. Následoval vývoj organoidů modelujících další lidské tkáně a orgány, například mozek, plíce, sítnice, žaludek a mnohé další. Organoid mozku, který byl poprvé vytvořen v roce 2013 Lancaster et al. [2], je vynikajícím nástrojem pro výzkum fyziologických procesů v mozku, pro výzkum neurodegenerativních onemocnění i pro výzkum mozkových nádorů. Ve své práci jsem se zaměřila na vývoj 3D mozkových organoidů, které by modelovaly lidskou mozkovou tkáň s nádorovým onemocněním – glioblastomem.

Glioblastoma multiforme (GBM, glioblastom) je nejčastějším primárním nádorem mozku a v České republice jím podle údajů z Národního onkologického registru ročně onemocní až 500 lidí. Celosvětově je to více než 300 tisíc lidí a incidence stále narůstá [3]. Vzniká v gliových buňkách, které jsou společně s neurony klíčovými složkami nervového systému. Vzhledem vysoké agresivitě glioblastomu je průměrné přežití pacientů jen velmi krátké. Pokud je nádor včas diagnostikován a lze ho odstranit radikálním chirurgickým zásahem s následnou radioterapií a chemoterapií, je průměrné přežití 14 měsíců od diagnózy, u neléčených pacientů pouze 3 měsíce a pouze 5 % pacientů žije déle než 5 let od stanovení diagnózy [4,5]. Z těchto důvodů je zřejmá akutní potřeba dalšího výzkumu tohoto fatálního onemocnění a nutnost intenzivního hledání nových možností léčby. Vzhledem k obtížnému výzkumu primárního materiálu lidské mozkové tkáně za účelem studia onemocnění a testování nových léčiv se organoidy jednoznačně stávají nejlepším biologickým modelem pro studium vlastností nádorů, charakterizaci jejich biologických vlastností i vývoj nových terapeutických možností cílených na konkrétní pacienty.

V rámci mé výzkumné práce jsem se podílela na vytvoření trojrozměrného modelu mozkové tkáně s nádorem glioblastomem. Tento model vznikl spojením mozkového organoidu odvozeného z indukovaných pluripotentních kmenových buněk a sféroidu tvořeného glioblastomovými buňkami, poprvé byl tento typ modelu vytvořen v roce 2019 v USA (48). V našem výzkumu jsme experimenty prováděli s různými glioblastomovými buněčnými liniemi odvozenými z primárních nádorů konkrétních pacientů, pro které dosud 3D modely nebyly nikdy vytvořeny. U těchto nových „GLICO“ modelů jsme charakterizovali míru migrace glioblastomových buněk do mozkového organoidu a tím získali informaci o agresivitě nádoru z dané buněčné linie. Funkčnost vzniklých modelů jsme vyzkoušeli pomocí testování potenciálních nových léčiv – inhibitorů kasein kinázy 1 (Casein Kinase 1, CK1) PF-670462 (Pfizer) a MU (Masarykova Univerzita), které ovlivňují Wnt signální dráhu regulující buněčnou migraci [6, 7].

2 CÍLE PRÁCE

Cílem práce byl vývoj 3D modelu mozkového nádoru glioblastomu za využití interakce mozkových organoidů derivovaných z indukovaných pluripotentních kmenových buněk, které simulovaly zdravou mozkovou tkáň, a z glioblastomových buněk derivovaných z nádorů konkrétních pacientů.

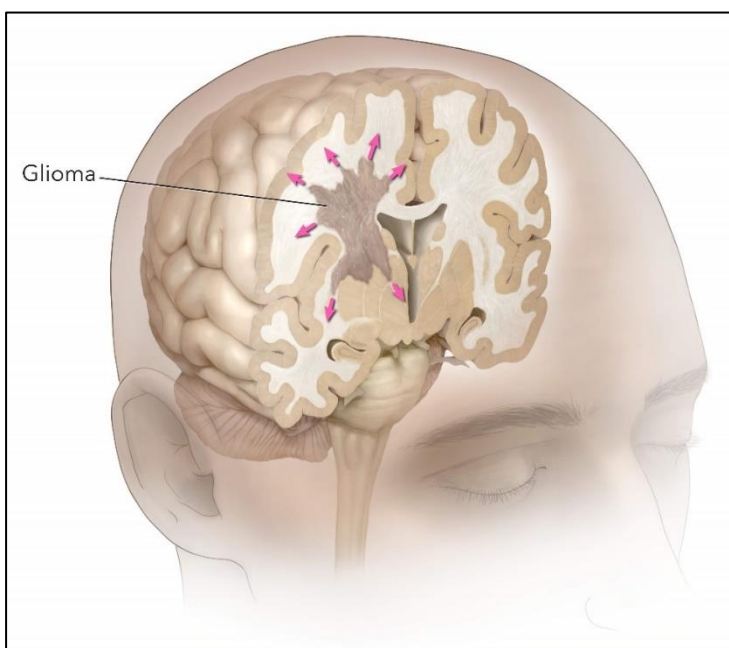
Specifické dílčí cíle práce byly:

- Charakterizace a srovnání několika glioblastomových buněčných linií derivovaných od pacientů s glioblastomovými mozkovými nádory, včetně srovnání jejich genové exprese pomocí analýzy transkriptomu metodami sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing, NGS) a analýzy exprese vybraných proteinů pomocí imunochemických metod (Western blot)
- Vytvoření 3D modelu glioblastomu (tzv. GLICO modelu) pomocí interakce mozkových organoidů se sféroidy z glioblastomových buněčných linií
- Analýza proliferace vybraných glioblastomových buněčných linií a jejich schopnosti migrovat přes zdravou tkáň mozkového organoidu
- Použití GLICO modelu k testování nových cílených léčiv potenciálně využitelných pro léčbu pacientů s glioblastomy (tzv. kinázových inhibitorů) a sledování jejich vlivu na chování glioblastomových buněk v rámci vytvořeného GLICO modelu

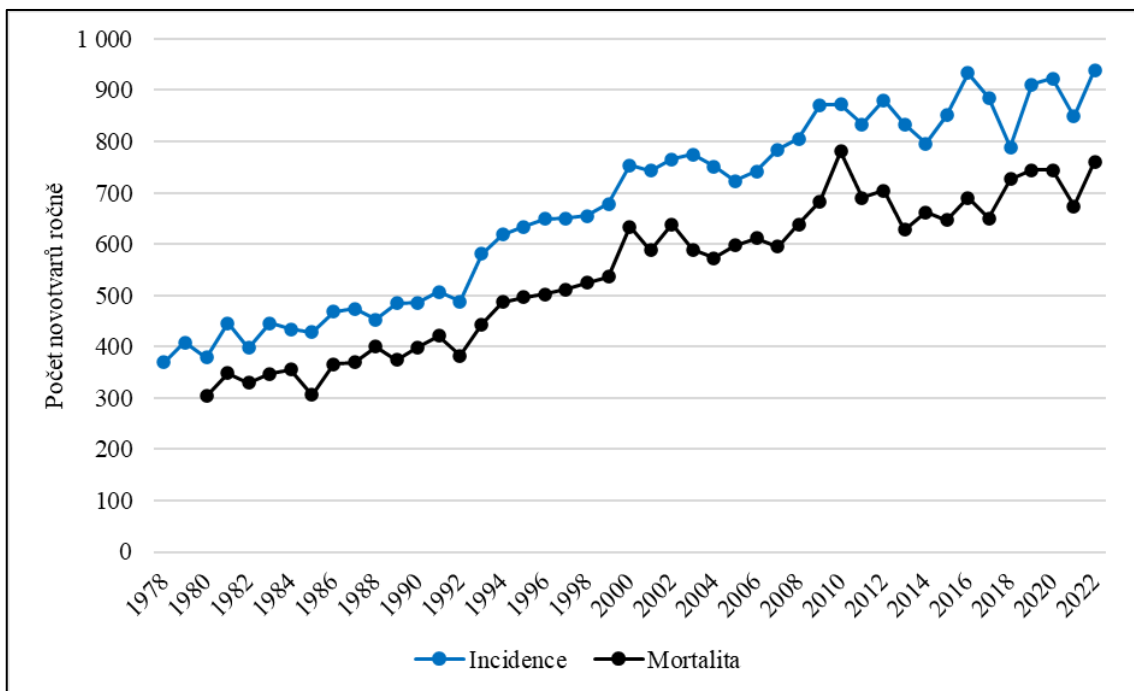
3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Glioblastoma multiforme

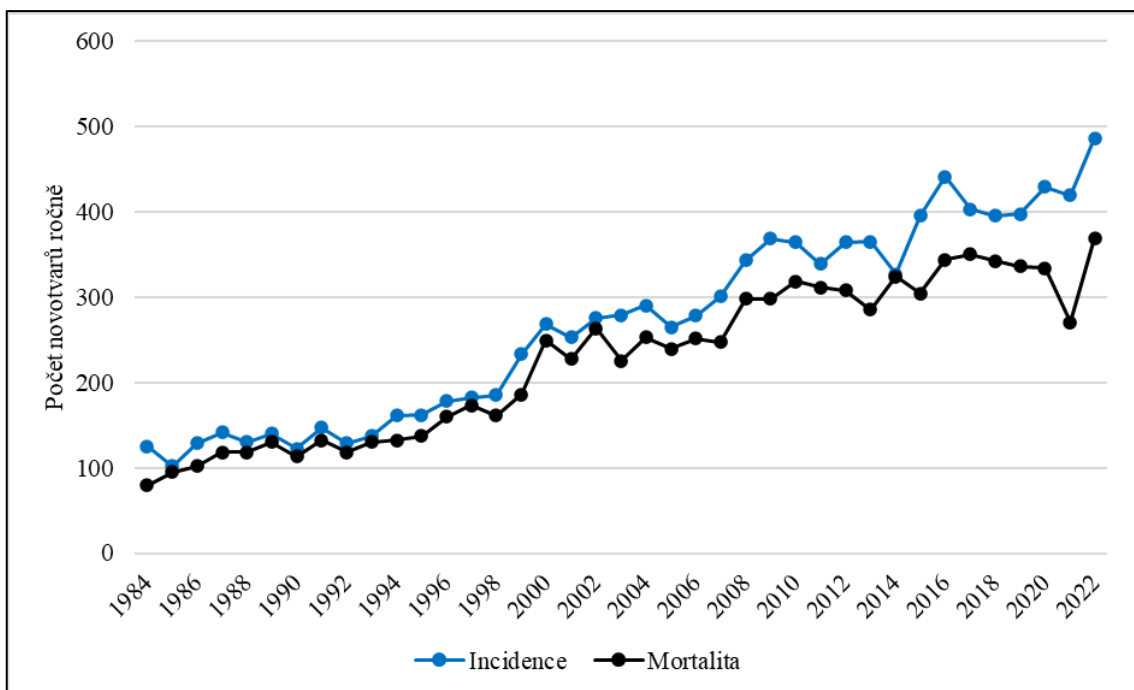
Glioblastoma multiforme (GBM, glioblastom) je nejčastější primární mozkový nádor dospělých. Tvoří přibližně 45 % maligních primárních nádorů mozku a centrální nervové soustavy (CNS) a díky své vysoké heterogenitě má velmi špatnou prognózu [4]. Dělí se na primární, kterých je až 80 % všech GBM a vyskytují se především u starších pacientů s průměrným věkem při diagnóze 62 let, a sekundární, které vznikají jako metastázy jiných nádorů a vyskytují hlavně u mladších pacientů s průměrným věkem 45 let [3]. Dále se podle typu genových mutací a transkripční aktivity určitých genů dělí na tři subtypy – proneurální, mesenchymální a klasický [8], což taktéž ukazuje na heterogenitu těchto nádorů. Medián přežití dospělých pacientů s glioblastomem po chirurgické resekci, radioterapii a chemoterapii protinádorovým léčivem temozolomidem je v současnosti 14 měsíců a 5leté přežití je méně než 5 % [4, 5]. To, že přežití pacientů se již po několik desetiletí významně nezlepšuje a je stále velmi nízké [9], ukazuje na akutní potřebu zavádění nových léčebných strategií. Ty vycházejí z vylepšených biologických modelů pro studium glioblastomu a nových analytických přístupů ke studiu jeho biologie a invazivity [10]. Schéma onemocnění Glioblastoma multiforme je zobrazeno na obrázku 1, celková zátěž nádory mozku a glioblastomy v ČR je zobrazena na obrázcích 2 a 3.



Obrázek 1: Schéma lidského mozkového nádoru Glioblastoma multiforme (<https://www.aaroncohen-gadol.com/en/patients/glioma/types/overview>)



Obrázek 2: Celková zátěž nádory mozku v ČR (Národní onkologický registr, Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR)



Obrázek 3: Celková zátěž glioblastomy v ČR (Národní onkologický registr, Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR)

3.2. Epidemiologie a etiologie GBM

Bylo zjištěno, že incidenci glioblastomu ovlivňuje několik různých faktorů. Incidence glioblastomu se například zvyšuje s věkem, například v roce 2012 bylo ve Spojených státech amerických nejvíce pacientů ve věkové skupině 75 až 84 let [11]. Incidence je také vyšší u mužů než u žen a u evropské populace ve srovnání s jinými [12]. Bylo také prokázáno, že vystavení centrálního nervového systému ionizujícímu záření zvyšuje riziko vzniku glioblastomu [13]. Latence mezi ozářením a rozvojem GBM se však pohybuje od několika let po několik desetiletí [14]. Studie dále prokázaly, že jedinci s alergiemi nebo atopickými onemocněními mají menší riziko vzniku glioblastomu. Vyšší riziko vzniku glioblastomu ve spojení s faktory životního stylu jako je kouření, konzumace alkoholu nebo užívání drog nebylo prokázáno [15].

3.3. Léčba GBM

Standardní terapií onemocnění GBM je chirurgická resekce nádoru následovaná radioterapií a chemoterapií pomocí prolinádorového léčiva temozolomidu. I přes maximální resekci nádoru a agresivní terapii ale téměř všechny glioblastomové nádory po léčbě recidivují [16]. To může být způsobeno vysokou heterogenitou nádoru, která způsobuje rozdílnou odpověď buněk glioblastomu na léčiva, hematoencefalickou bariérou mozku, která brání kompletnímu doručení léčiv k nádoru, imunosupresivním mikroprostředím nebo neúplnou resekci nádoru [17]. Také se ví, že glioblastomové buňky si v průběhu léčby vytváří rezistenci k radioterapii i chemoterapii a dále pokračují v růstu [18].

3.4. Biologická léčba glioblastomu

Léčba nádorů mozku stále zůstává velkou výzvou. Většinu pacientů jsou tak kromě standardní léčby nabízeny i různé nové léčebné strategie, jako například inovace v radioterapii pro lepší zacílení na nádor, různé techniky pro lokální destrukci nádoru, imunoterapie, inhibitory růstu nádoru nebo buněčná/genová terapie. Další návrhy na zlepšení terapie glioblastomu zahrnují například i dodávání léčiv přímo do mozku skrz hematoencefalickou bariéru pomocí nanočástic a monoklonálních protilátek nebo

zavedení geneticky modifikovaných bakterií do mozku, kde selektivně ničí rakovinné buňky, ale jsou zároveň šetrné ke zdravé mozkové tkáni. Uplatňuje se také použití vylepšených zvířecích modelů pro preklinické testování léčiv a personalizovanou léčbu [19]. Výzkumu těchto nových léčebných strategií je věnováno velké úsilí a stále se vyvíjejí různé nové terapeutické přístupy a techniky. Mezi nadějně protinádorové léky v současnosti patří inhibitory Kasein Kinázy 1. Tento enzym fosforyluje řadu substrátů a ovlivňuje také Wnt signální dráhu regulující buněčnou migraci [6, 7].

3.5. Kmenové buňky

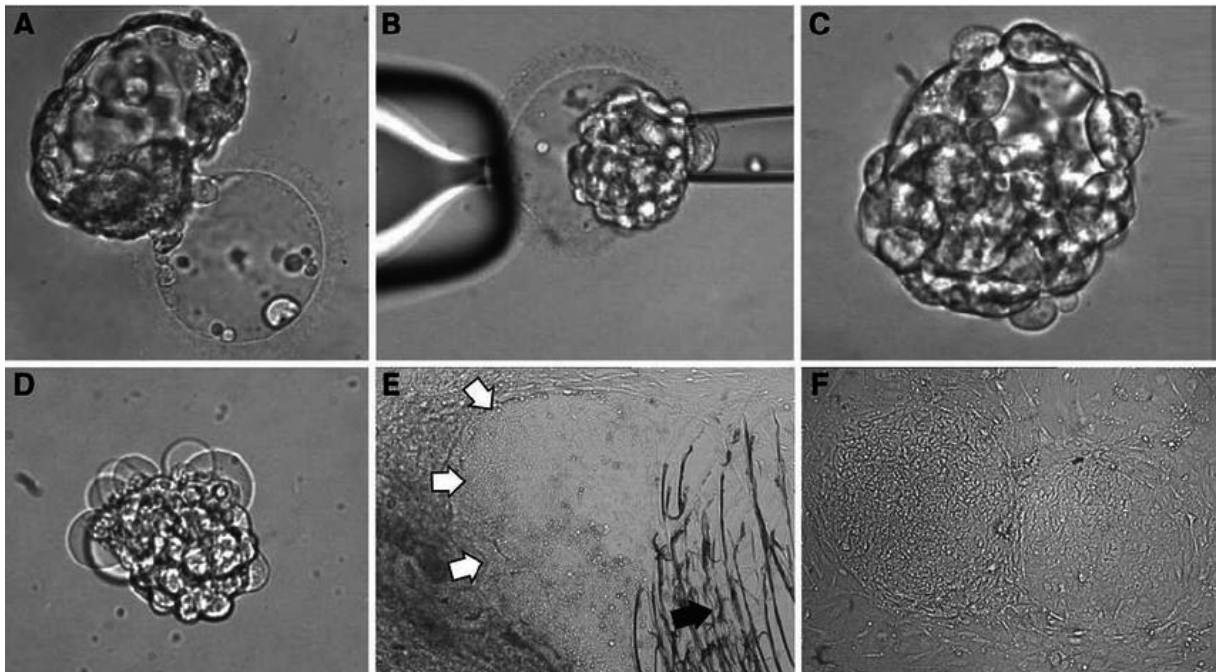
Kmenové buňky jsou nediferencované buňky se schopností se dělit (proliferovat), které mají jedinečnou schopnost diferencovat (přeměnit se) do jiných typů buněk v lidském těle (například do neuronů nebo svalových buněk) [20]. Tato jejich schopnost umožňuje organismu vytvářet buňky nové, specializované pro různé typy tkání. Podle původu se kmenové buňky dělí na dva typy – embryonální kmenové buňky (Embryonic Stem Cells, ESCs) a dospělé kmenové buňky (Adult Stem Cells, ASCs). Třetím typem jsou indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs, Induced Pluripotent Stem Cells), které se vytvářejí v laboratoři a svými vlastnostmi jsou velmi podobné ESCs.

Kmenové buňky se podle míry schopnosti diferenciace dělí na buňky pluripotentní (mohou diferencovat v jakékoliv buňky kromě trofoblastu), multipotentní (mohou diferencovat v jakýkoli typ buněk, ale pouze v rámci jedné tkáně) a totipotentní (mohou diferencovat v jakýkoliv typ buněk) [21].

3.5.1. Embryonální kmenové buňky

Embryonální kmenové buňky jsou pluripotentní buňky, ze kterých v embryu vznikají všechny ostatní somatické buňky. Díky tomu, že mohou diferencovat na jakékoliv specializované tělní buňky, jsou ESCs významným nástrojem pro *in vitro* studium mechanismů vytváření různých typů tkání, tvorby orgánů a také lidského vývoje. Díky své schopnosti proliferace jsou i velkým příslibem pro regenerativní medicínu [22]. První myší embryonální kmenové buňky byly z myšího embrya izolovány v roce 1981 Evans & Kaufman [23] a Martin [24]. První lidské embryonální kmenové buňky byly izolovány v letech 1998 a 2000 ze 3-5 dní starých embryí vzniklých při *in vitro* fertilizaci (IVF) [25, 26]. Generování ESCs však vyžaduje kompletní destrukci embrya, což již po jejich první

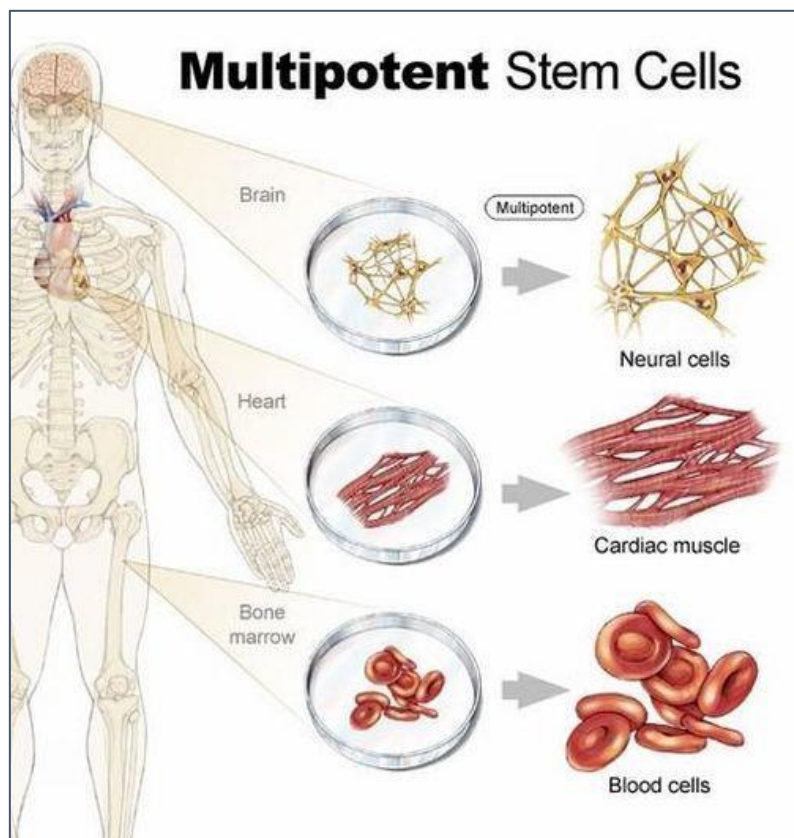
izolaci vyvolalo zásadní etické otázky. Z těchto důvodů se tak vědci zaměřili na vývoj buněk, které by se svými vlastnostmi podobaly ESCs, ale zároveň by jejich použití nebylo kontroverzní. Průběh extrakce embryonálních kmenových buněk z 5–7 dní starého embrya je zobrazen na obrázku 4.



Obrázek 4: Extrakce embryonálních kmenových buněk z 5–7 dní starého embrya (blastocysty)(https://www.researchgate.net/profile/Michael_Telias2/publication/41579199/figure/fig1/AS:277263997259779@1443116296860/Blastocysts-and-early-HESC-colonies-derived-from-PGD-embryos-A-Day-7-expanded.png)

3.5.2. Dospělé kmenové buňky

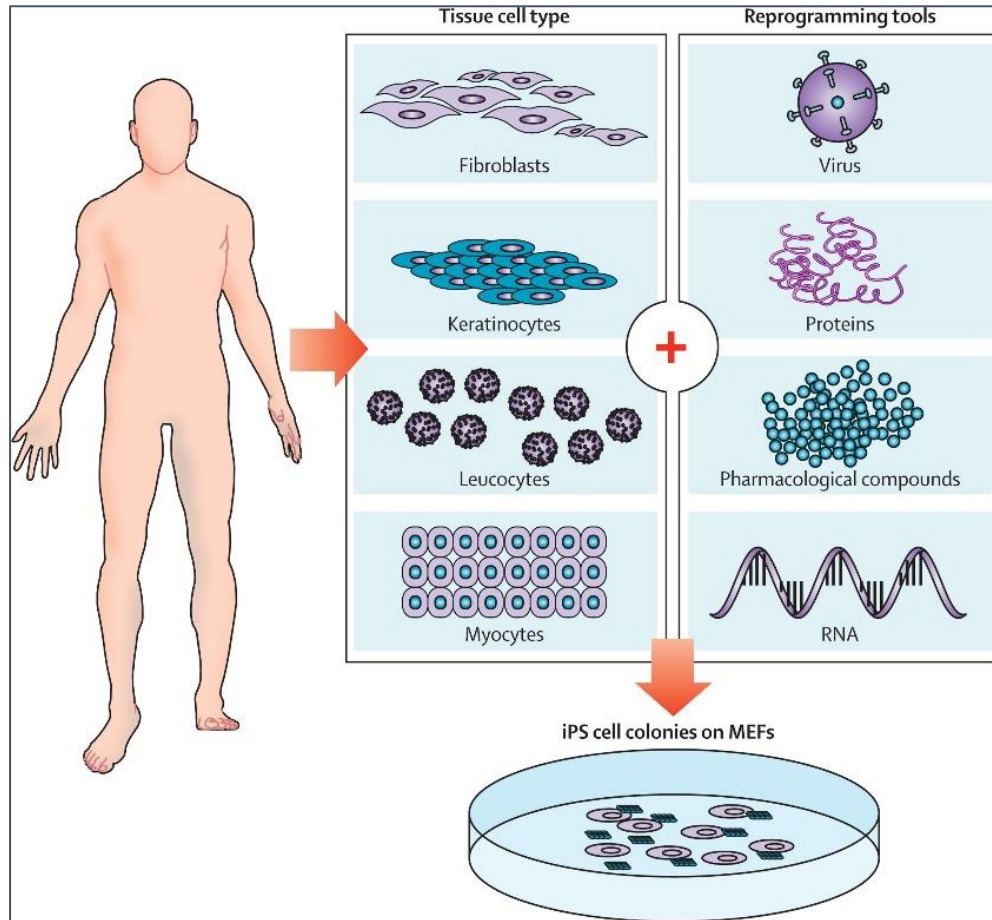
Dospělé kmenové buňky jsou multipotentní nediferencované buňky nacházející se v mnoha tkáních v lidském těle. V případě potřeby mohou proliferovat a diferencovat a nahradit tak přirozeně umírající buňky ve své tkáni nebo v případě zranění opravit vzniklé rány. Některé, jako například buňky vlasových folikulů, se dělí neustále. Díky těmto svým schopnostem mají kmenové buňky potenciál léčit řadu degenerativních onemocnění. Jsou však považovány za častý zdroj maligních (zhoubných) nádorů a pochopení mechanismů jejich proliferace by tak mohlo přispět i k vytvoření nových léčebných strategií využitelných pro léčbu nádorových onemocnění [20]. Na obrázku 5 jsou zobrazeny hlavní zdroje multipotentních kmenových buněk v lidském těle.



Obrázek 5: Hlavní zdroje multipotentních kmenových buněk v lidském těle (<https://www.sciencelearn.org.nz/images/2441-adult-stem-cells>)

3.5.3. Indukované pluripotentní kmenové buňky

V této práci byly využívány indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs), a to pro tvorbu mozkových organoidů. Indukované pluripotentní kmenové buňky jsou typ pluripotentních kmenových buněk odvozených z dospělých somatických buněk. Tyto dospělé somatické buňky byly pomocí genetické manipulace přeprogramovány do stavu, kdy jsou velmi podobné ESCs [27]. Tvorbu iPSCs z myších fibroblastů v roce 2006 představili Takahashi a Yamanaka. Ve stejné laboratoři se jim poté v roce 2007 podařilo odvodit iPSCs i z lidských fibroblastů (základní buňky vazivové tkáně, jsou rozptýleny v různých částech těla) [28, 29]. iPSCs mohou být vytvořeny téměř z jakéhokoliv typu tkáně, podařilo se je vytvořit například z periferní krve [30], pupečnickové krve [31], ústní sliznice [32] nebo kožních fibroblastů [27]. Objev iPSCs tak vědcům umožnil jednoduše získávat pluripotentní kmenové buňky bez nutnosti kontroverzního použití embryí [33]. Buňky jsou navíc téměř totožné s buňkami dárce, což je velmi důležitý faktor při modelování různých onemocnění a testování léčiv, na což jsou iPSCs v současnosti hojně využívány [27]. Jejich příprava je popsána na obrázku 6.



Obrázek 6: Příprava iPSCs buněčných linií
 (https://www.thelancet.com/cms/attachment/db82ed51-84e8-463b-9872-c04a05a37f0b/gr1_lrg.jpg)

3.5.4. Glioblastomové buněčné linie

Pro studium GBM se ve výzkumných experimentech často používají glioblastomové buněčné linie. V této práci jsem použila buněčné linie izolované přímo z vyoperovaných primárních nádorů pacientů s glioblastomy léčenými v Univerzitní nemocnici v Uppsale ve Švédsku. Bylo prokázáno, že glioblastomové buněčné linie si zachovávají specifické biologické vlastnosti původního nádoru [34]. Po více než 30 let se pro výzkum používaly převážně linie U87, U251 a T98G, které se kultivovaly v médiu obsahujícím fetální bovinní sérum (Fetal Bovine Serum, FBS). Bylo ale prokázáno, že přítomnost FBS v médiu vede k diferenciaci nádorových kmenových buněk (ty jsou schopné přeměnit se na jakýkoliv typ buněk v nádoru) a dá se proto očekávat, že se v těchto liniích už původní nádorové kmenové buňky nevyskytují, a tím se méně podobají původním nádorům, z nichž byly izolovány [35]. Všechny novější glioblastomové buněčné linie jsou tedy

kultivovány v médiu neobsahujícím FBS. Do těchto kultivačních médií se navíc pro podporu růstu nádorových buněk přidávají růstové faktory – fibroblastový růstový faktor 2 (Fibroblast Growth Factor 2, FGF2) a epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor, EGF).

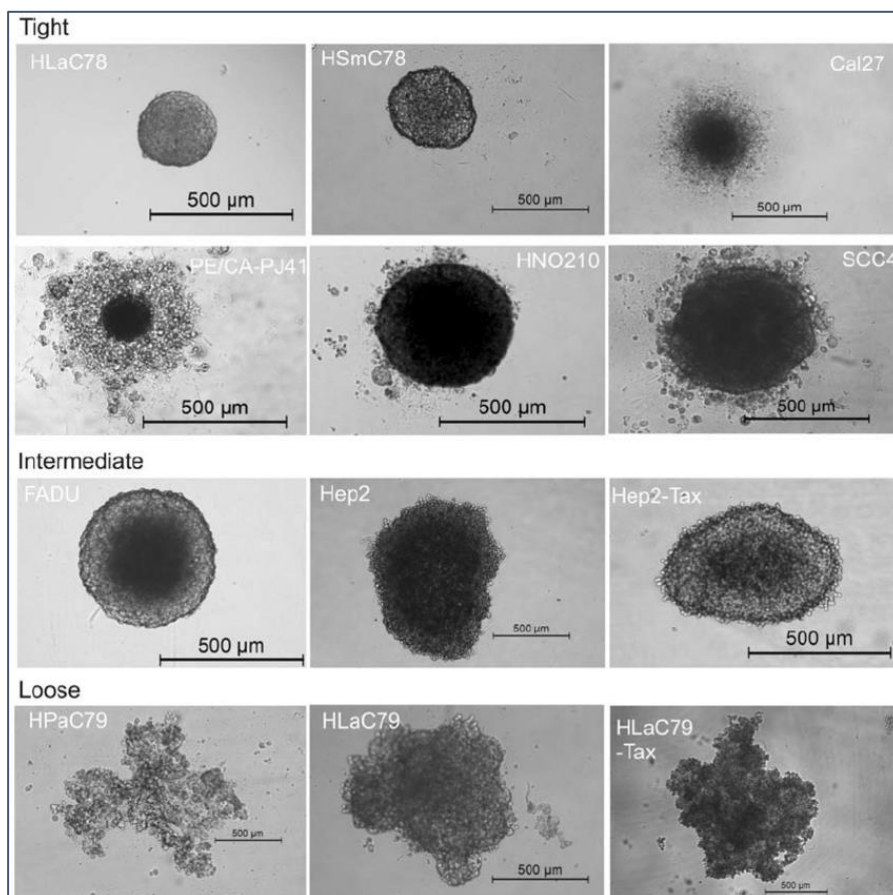
3.6. 3D buněčné modely

Ve většině experimentů v biologickém a lékařském výzkumu jsou využívány 2D buněčné kultury, tedy takové, u kterých jsou buňky přisedlé na dně Petriho misky (adherentní buněčné kultury), případně buňky volně plavou v médiu (suspenní buněčné kultury). Při dvojrozměrné (Two-Dimensional, 2D) kultivaci lze buňky dobře pozorovat a také se s nimi poměrně snadno manipuluje, avšak nemají vlastnosti trojrozměrné tkáně a tedy nemohou vytvářet reálné modely orgánů. Ve formě 2D buněčných kultur lze kultivovat také různé typy kmenových buněk.

Výzkum onemocnění Glioblastoma multiforme se v podmínkách *in vitro* donedávna také zaměřoval především na studium zavedených buněčných linií odvozených z primárních nádorů kultivovaných ve 2D podmínkách jako adherentní buněčné kultury. Tento způsob kultivace však věrně nerekapituluje strukturu nádoru *in vivo*, a proto jsou pro studium vhodnějším modelem 3D nádorové sféroidy.

3.6.1. Sféroidy

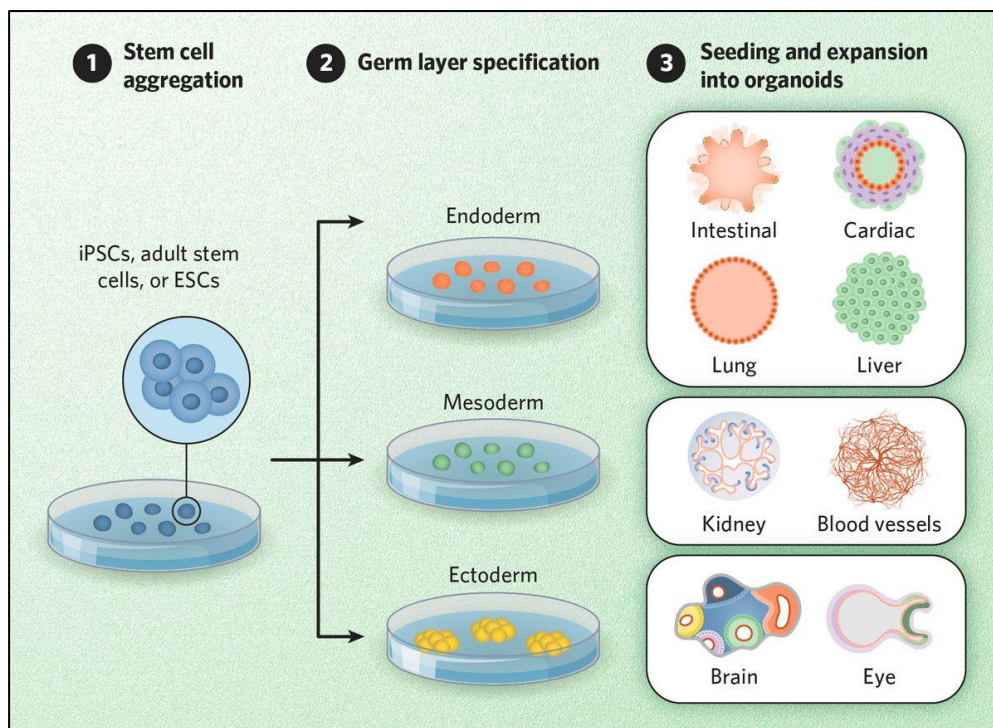
Sféroidy jsou jednoduché sférické shluky buněk bez jasné struktury a organizace tkáně, které se používají převážně jako základní nádorové modely. Vytvářejí se samovolným shlukováním buněk v kultivačním médiu, které pomocí mezibuněčných spojů tvoří kompaktní sféroidy [36]. K jejich kultivaci se někdy využívá i tzv. buněčné lešení, které buňkám pomáhá se lépe shlukovat – tím může být například extracelulární matrix (ECM). Nejčastěji se však sféroidy kultivují jinými metodami, například v nádobách pokrytých nepřílnavým substrátem. K nejznámějším sféroidům patří multicelulární sféroid (MCTS), který vzniká kultivací nádorové buněčné linie v miskách s nepřílnavým povrchem. Histologicky se sice příliš nepodobá mateřské tkáni, ale zachovává si metabolickou a proliferační aktivitu a chemorezistenci [37]. Dále se mezi sféroidy řadí například neurosféry, embryoidní tělíska nebo hepatosféry [38]. Příklady sféroidů jsou zobrazeny na obrázku 7.



Obrázek 7: Příklady sféroidů z buněčných linií HLaC78, HSmC78, Cal27, PE/CA-PJ41, HN0210, SCC4, FADU, Hep2, Hep2-Tax, HPaCT9, HLaC79 a HLaC79.
<https://www.researchgate.net/profile/Marianne-Schmidt-2/publication/291367840/figure/fig1/AS:323131437797377@1454051946790/Spheroids-of-10-different-HNSCC-cell-lines-established-from-5-000-cells-in-ULA-96-well.png>

3.6.2. Organoidy

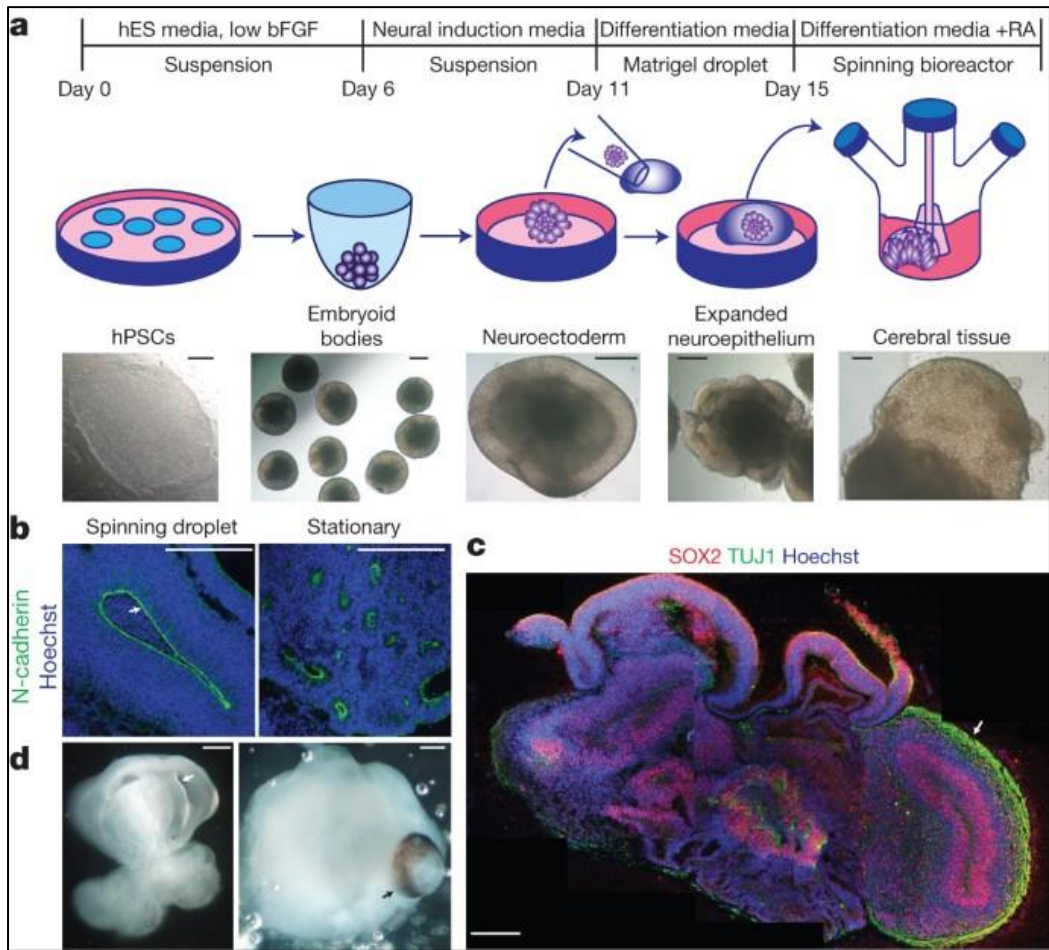
Organoidem nazýváme buňky rostoucí v definovaném 3D prostředí *in vitro*, které kopírují strukturu a funkci určitého orgánu *in vivo*. Organoidy mohou být tvořeny buď z embryonálních kmenových buněk, indukovaných pluripotentních kmenových buněk, nebo dospělých kmenových buněk, a také z nádorových buněk [39, 2]. Správné uspořádání buněk v organoidu je zprostředkováno signálními drahami aktivovanými například mezibuněčnou hmotou či kultivačními médii [40]. Organoidy jsou díky své podobnosti původním lidským tkáním velkým příslibem pro biomedicínský výzkum a preklinické testování léků, některé již byly dokonce transplantovány zvířatům. V současnosti se hojně využívají například pro vývoj léčiv nebo modelování a studium genetických onemocnění [41]. Příprava různých typů organoidů je zobrazena na obr. 8.



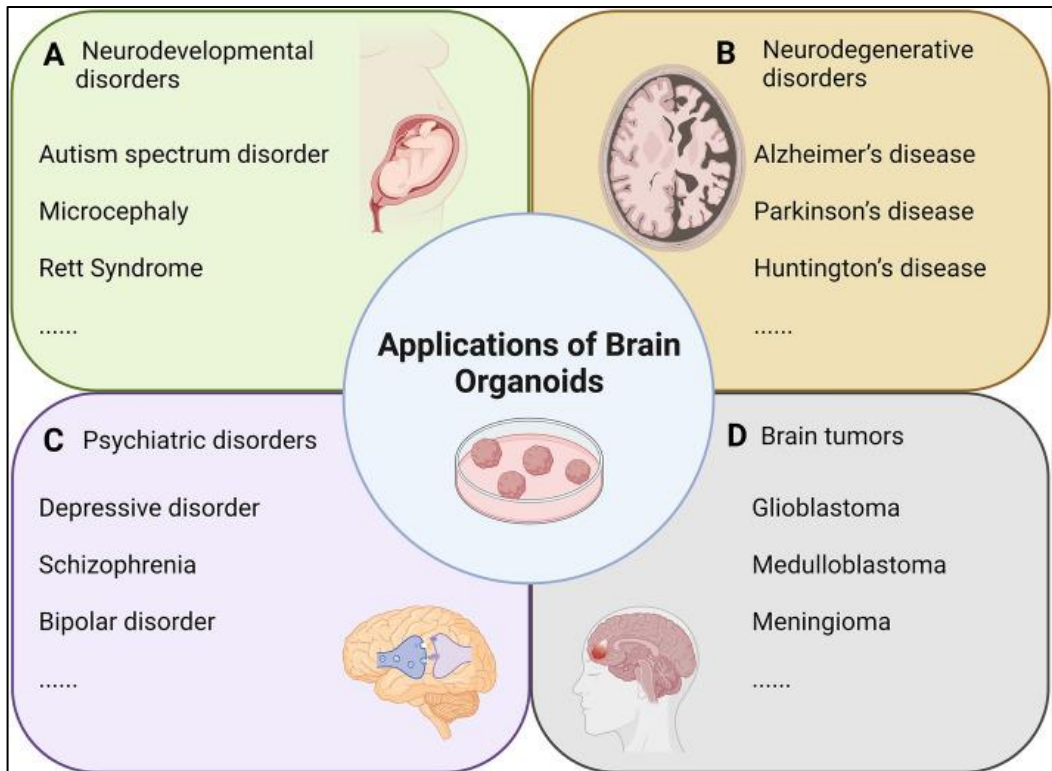
Obrázek 8: Příprava různých typů organoidů
<https://cdn.the-scientist.com/assets/articleNo/70354/iImg/51163/123-1.jpg>

3.6.2.1. Mozkové organoidy

Pluripotentní vlastnosti ESCs a iPSCs umožňují generování organoidů ze všech tří zárodečných vrstev, což je nesmírně užitečné pro studium raných stádií embryonálního vývoje a různých jiných orgánů, kde je získávání primárního lidského materiálu značně obtížné [42]. Organoidy lidského mozku byly poprvé vyvinuty v roce 2013 Lancaster et al. [2]. Vytvořili je z iPSCs, které byly kultivačním médiem navedeny na neurální zárodečnou dráhu. Aby se buňky mohly dále diferencovat do zralých buněčných typů, které se v mozkové tkáni nachází (neurony a glie), bylo jim poskytnuto buněčné lešení v podobě ECM. Pro správnou difúzi živin do již relativně velké tkáně se celá kultura provzdušňovala mícháním. Lancaster et al. [2] vzniklou tkáň nazvali mozkovým (cerebrálním) organoidem. Pro studium specifických onemocnění a jejich léčby lze mozkové organoidy generovat i z iPSCs přímo od konkrétních pacientů, čímž se zachová specifické mikroprostředí mozku jedince a vytvoří se tak velmi věrný model onemocnění [43]. Tvorba mozkových organoidů a jejich využití jsou popsány na obrázcích 9 a 10.



Obrázek 9: Tvorba mozkového organoidu [2]



Obrázek 10: Možnosti využití mozkových organoidů [44]

3.7. Modelování Glioblastoma multiforme pomocí mozkových organoidů

Onemocnění Glioblastoma multiforme lze studovat několika různými způsoby. Ve 3D prostředí byla vyvinuta například metoda studia takzvaných mozkových tumoroidů, neboli vzorků nádorové tkáně získané přímo z nádoru. Studium tumoroidů se tak zaměřuje na nádorovou tkáň, což však nepostihne jinak přítomné mikroprostředí okolní zdravé mozkové tkáně. Další možností je umělé navození vzniku glioblastomu přímo v mozkovém organoidu mutováním buněk vedoucí ke vzniku nádoru [45, 46, 47]. V takovém případě však nemusí být postihnuta heterogenita nádoru do stejné míry, jako k tomu dochází u patientských nádorů. Další způsob představuje metoda spojování glioblastomového sféroidu (odvozeného přímo z nádorové buněčné linie) nebo tumoroidu s mozkovým organoidem do tzv. GLICO modelu [48, 10]. Právě touto metodou jsem se zabývala ve své práci.

3.7.1. GLICO model – 3D model glioblastomu vytvořený pomocí mozkového organoidu

GLICO model je model onemocnění GBM, který vznikl spojením mozkového organoidu a glioblastomového sféroidu nebo tumoroidu a byl poprvé vytvořen v roce 2019 Linkous et al. [48]. Glioblastomový sféroid či tumoroid v modelu nejen napodobuje původní nádor, ale také udržuje klíčové genetické aberace původního nádoru pacienta a jeho specifické mikroprostředí [48]. Mozkový organoid v modelu představuje zdravou mozkovou tkáň a mikroprostředí mozku.

Vyvinutou metodologii GLICO modelu nedávno úspěšně zavedenou v laboratoři mé školitelky, viz protokol Fedorová et al., 2023 [10], jsme uplatnili pro studium nových glioblastomových linií, ze kterých GLICO modely nebyly ještě nikdy vytvořeny. GLICO modely představující 3D modely nádorů konkrétních pacientů byly následně využitelné pro testování nových léčiv, konkrétně inhibitorů kasein kinázy 1. Tyto inhibitory ovlivňující fosforylaci řady důležitých proteinů s regulačními funkcemi mají velký potenciál v léčbě různých typů nádorů [6, 7].

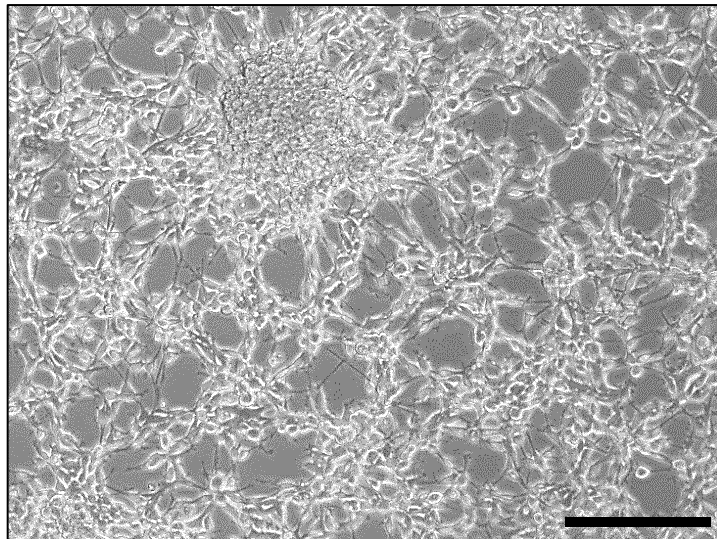
4 MATERIÁL A METODY

4.1. Materiál

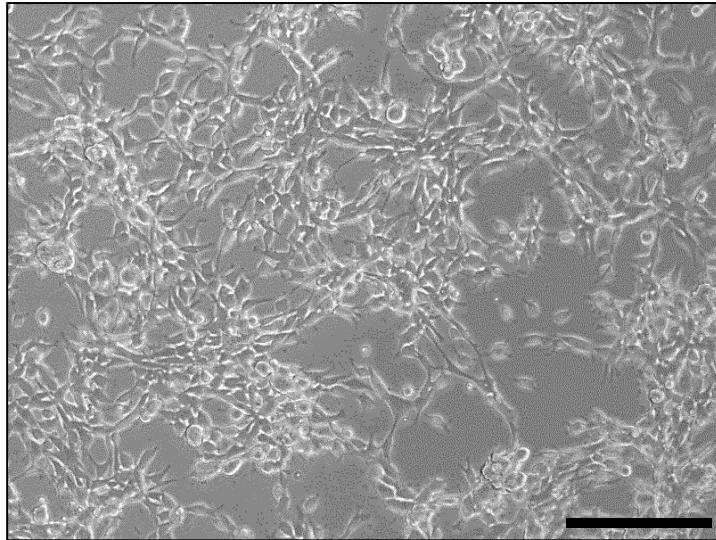
4.1.1. Buněčné linie glioblastomu

Pro experimentální práci bylo používáno několik buněčných linií nádorových lidských glioblastomových buněk: U-87MG ATCC (RRID: CVCL_0022), U3047MG (RRID: CVCL_IR79), U3013MG (RRID: CVCL_IR61) a U3118MG (RRID: CVCL_IS01). Všechny tyto buněčné linie byly derivovány z primárních nádorů pacientů s diagnózou Glioblastoma multiforme po jejich chirurgické resekci v Univerzitní nemocnici v Uppsale ve Švédsku.

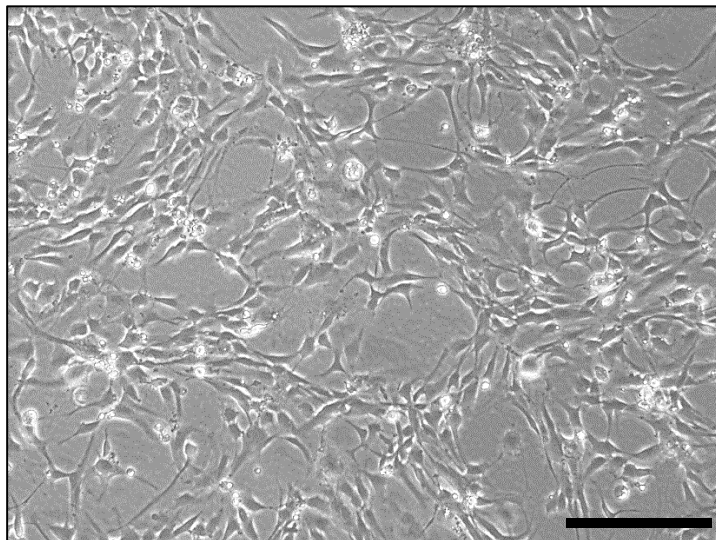
Glioblastomová linie U3013 byla derivována z nádoru 78leté pacientky, U3047 z nádoru 66leté pacientky, U3118 z nádoru 57letého pacienta (všichni tři pacienti měli glioblastomy proneurálního typu) a linie U87 z mesenchymálního glioblastomového nádoru 44leté pacientky (<http://www.hgcc.se/#>). Morfologie buněčných linií je zobrazena na obrázku 11.



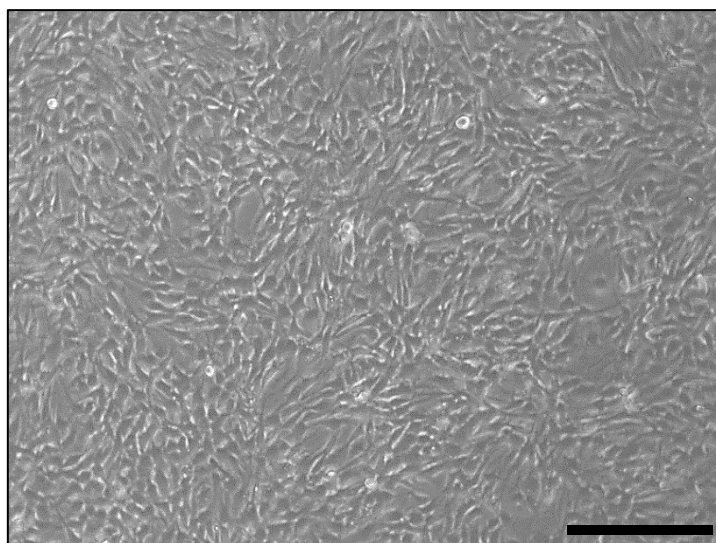
Obrázek 11: Glioblastomová linie U87 (LEICA, Z=100×), měřítko=200 μm



Obrázek 12: Glioblastomová linie U3013 (LEICA, Z=100×), měřítko=200 μm



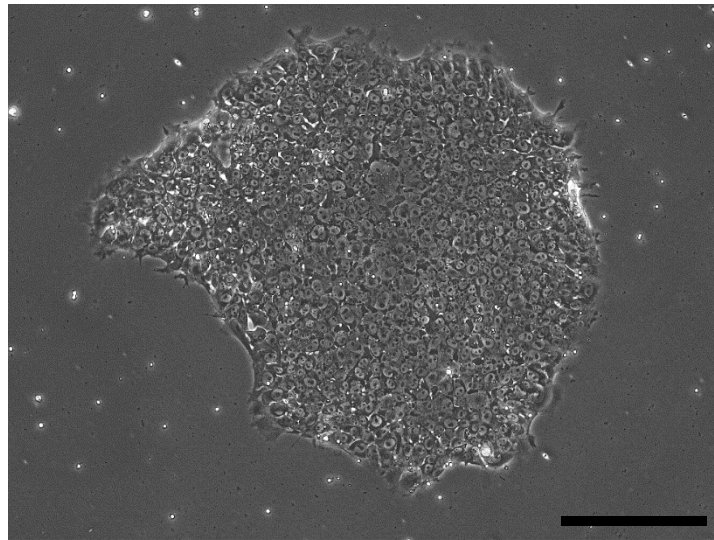
Obrázek 13: Glioblastomová linie U3047 (LEICA, Z=100×), měřítko=200 μm



Obrázek 14: Glioblastomová linie U3118 (LEICA, Z=100×), měřítko=200 μm

4.1.2. Buněčná linie indukovaných pluripotentních kmenových buněk použitá pro přípravu organoidů

Pro přípravu mozkových organoidů byla použita linie iPSCs MUNli008 izolovaná v roce 2021 Janem Raškou a kol. v laboratoři její školitelky Dr. Bohačiakové. Buněčná linie se kultivovala v komerčně dostupném mTeSR médiu (STEMCELL Technologies) na Petriho miskách s vrstvou Matrigelu® (Corning). Morfologie této buněčné linie je zobrazena níže.



Obrázek 15: iPSCs linie MUNli008 (LEICA, Z=100×), měřítko=200 μm

4.2. Kultivace glioblastomových buněčných linií

Buňky se kultivují ve statickém prostředí v inkubátoru Esco (ESCO) za teploty 37 °C při 5% koncentraci CO₂. Kultivace těchto adherentních (přisedlých) buněčných linií probíhá na sterilním kultivačním plastu, jehož povrch je pro správný růst a uchycení buněčných linií U3118, U3013 a U3047 ošetřen vrstvou Poly-L-Ornithinu (Sigma-Aldrich) a Lamininu (Thermo Fisher Scientific).

Buněčné linie U3118, U3013 a U3047 byly kultivovány v médiu obsahujícím tyto složky: NeuroCult (Neural Stem Cell Culture Media, STEMCELL Technologies), 1% HEPES (Thermo Fisher Scientific), 1% GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific), 1% N-2 supplement (Thermo Fisher Scientific), 1% B-27 supplement bez vitamínu A (Thermo Fisher Scientific), 5 mg/ml ZellShield (Minerva Biolabs), 10 ng/ml FGF2 (Sigma-Aldrich) a 10 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich).

Kontrolní buněčná linie U87 byla kultivována v médiu obsahujícím tyto složky: DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, Dulbeccovo modifikované médium/směs živin F-12, Thermo Fisher Scientific), 10% FBS (Thermo Fisher Scientific), 1% GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific), 1% neesenciální aminokyseliny (Thermo Fisher Scientific) a 0,5% Penicilin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific).

Výměnu média jsme prováděli u všech použitých buněčných linií vždy po 48 hodinách, ve všech případech se vyměnil celý objem média v kultivační misce.

4.2.1. Rozmrazování buněčných linií

Během práce byly buněčné kultury v rámci plánování jednotlivých experimentů několikrát zamražovány a rozmražovány. Pro rozmražení buněčné linie před kultivací byla zkumavka se zamraženými buňkami vyjmutými z kontejneru s tekutým dusíkem nejprve temperována na pokojovou teplotu a poté byly buňky pipetou přeneseny do 15 ml plastové zkumavky (Falcon). K buňkám se postupně přikapávalo 5 ml příslušného média. Zkumavka se vzniklou buněčnou suspenzí se poté centrifugovala v centrifuze při RCF 200 g po dobu 3 min a následně se zkontroloval vzniklý buněčný pelet. Bez narušení peletu se odsál supernatant a přidal se 1 ml kultivačního média. Buňky se v něm resuspendovaly a nasadily na připravenou sterilní kultivační misku. Buňky se dále kultivovaly v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% koncentraci CO₂.

4.2.2. Pasážování buněčných linií

Pro udržení kultivace buněčných linií je třeba buňky, jakmile zaplní cca 90% povrchu kultivační misky, přenést do nových misek, aby měly dostatek prostoru pro další růst. Pro toto pasážování buněk bylo z kultivační misky s buňkami odsáto médium a přidán dostatek enzymu TrypLE (Thermo Fisher Scientific) tak, aby pokryl celý povrch kultivační misky. Vyčkalo se, než se buňky začaly oddělovat od povrchu, a poté byl enzym TrypLE odsát. K buňkám se dále přidalo příslušné médium a buňky se v něm resuspendovaly. Vzniklá buněčná suspenze se přenesla do 15 ml zkumavky Falcon. Zkumavka s buněčnou suspenzí byla centrifugována v centrifuze při RCF 200 g po dobu 3 min a následně se zkontroloval vzniklý buněčný pelet. Bez narušení peletu byl odsát supernatant a přidal se 1 ml příslušného média. Buňky se v něm resuspendovaly a část

buněčné suspenze byla přenesena do nově připravených misek s médiem. Buňky se kultivovaly v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% koncentraci CO₂.

4.3. Analýza transkriptomu pomocí sekvenování nové generace (NGS)

Sekvenování je proces, při němž se určuje primární struktura dané biomakromolekuly. Výsledkem sekvenování je lineární kód zvaný sekvence, který popisuje uspořádání sekvenované molekuly. Nejčastěji se sekvenuje DNA, ale lze sekvenovat i RNA, proteiny nebo polysacharidy. V této práci bylo pro podrobnou charakterizaci linií využito RNA sekvenování nové generace (NGS RNA-seq), tedy transkriptomu, což je soubor RNA transkriptů dané buňky či buněčné populace. Pro analýzu transkriptomu bylo nejdříve třeba z jednotlivých testovaných glioblastomových buněčných linií izolovat mRNA, což je typ RNA, který vzniká během transkripce DNA a následně slouží jako „předpis“ k syntéze bílkoviny během translace. Soubor přepisovaných mRNA tedy poskytuje informaci o tom, které geny jsou v buňkách exprimovány a v jaké míře.

Analýzu transkriptomu pomocí NGS jsme prováděli v Centrální genomické laboratoři v CEITECu Masarykovy univerzity, která poskytuje sekvenační služby laboratořím v kampusu Masarykovy univerzity (Dr. B. Tichý, Mgr. T. Kurucová). Naše vzorky RNA vyizolované z glioblastomových buněčných linií jsme pro sekvenaci připravili ve třech biologických replikátech lýzou buněk v 1 ml RNA Blue roztoku (Top-Bio). Dále bylo k vzorkům přidáno 200 µl 1-bromo-3-chlorpropanu (BCP, Molecular Research Center, Inc.) a směs byla vortexována a stočena v centrifuze při 12 000 rpm o teplotě 4 °C po dobu 16 min. 450 µl supernatantu se poté přeneslo do nové 1.5 ml „RNase Free“ zkumavky. Bylo přidáno 450 µl 96% ethanolu (Sigma-Aldrich), směs byla promíchána a přenesena do speciální zkumavky. Další purifikace RNA byla provedena pomocí kitu Direct-zol™ RNA Miniprep (Zymo Research). Tato metodika je určena pro purifikaci RNA z různých typů biologického materiálu včetně buněčných kultur. Využívá tzv. Zymo-Spin™ Column, ve kterém probíhá promývání a eluce RNA. Podrobný protokol, který jsme použili, je uveden na webu výrobce kitu – viz https://files.zymoresearch.com/protocols/_r2050_r2051_r2052_r2053_direct-zol_rna_miniprep.pdf. Kontrola kvality RNA vzorků byla ověřena v Genomické laboratoři CEITEC MU pomocí technologie Agilent RNA ScreenTape Assay na přístroji 4200 TapeStation System (Agilent Technologies, Inc., Germany).

Takto purifikované vzorky RNA z glioblastomových buněčných linií byly připraveny pro vytvoření tzv. knihovny RNA fragmentů pro sekvenační analýzu pomocí NGS. „RNA-seq“ knihovna byla připravená pomocí kitu QuantSeq 3' mRNA-Seq FWD with UDI 12 nt Kit (v.2) (Lexogen). Pro vlastní sekvenaci byly použity molekulární identifikátory, tzv. UMI (Unique Molecular Identifiers), s využitím kitu UMI Second Strand Synthesis Module for QuantSeq FWD (Lexogen) podle originálního protokolu od výrobce, přičemž se do vstupu použilo 500 ng celkové RNA. Koncentrace výsledných sekvenačních knihoven a distribuce jejich délky byla stanovena pomocí kitů QuantiFluor dsDNA System (Promega) a High Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit (Agilent Technologies). Pool knihoven byl sekvenovaný formou servisu v Centrální genomické laboratoři CEITEC MU na přístroji NovaSeq 6000 (Illumina) za použití kitu S2 Reagent Kit v1.5 300 cycles (Illumina).

4.4. Bioinformatická analýza transkriptomických dat

Data, která byla vyprodukována po sekvenování vzorků RNA izolovaných z buněčných linií patientských buněk metodou NGS, byla následně analyzována bioinformatickými postupy. Tato bioinformatická analýza transkriptomových dat byla provedena v Centrální laboratoři Bioinformatika CEITEC MU (Dr. Vojtěch Bystrý a kol.). Bioinformatický postup (také workflow nebo pipeline) analýzy exprese jednotlivých genů pro každý jeden vzorek zahrnoval (1) mapování sekvenačních čtení (tzv. readů) ke genomické referenci (příp. přímo k referenci transkriptomové), (2) odhad relativní genové exprese z dat po mapování a (3) normalizaci dat relativní genové exprese na velikost sekvenační knihovny. K normalizaci dat jsou nejčastěji využívány funkce *rpk*m („reads per kilobase milion“) nebo *tpm* („transcript per milion“). Geny s nulovou nebo velmi nízkou expresí jsou z následující analýzy diferenciální genové exprese vyřazeny.

Po zpracování dat podle výše zmíněného postupu se přistoupilo k detekci diferenciálně exprimovaných genů mezi vzorky nebo skupinami vzorků, v tomto případě různými buněčnými liniemi. Tyto skupiny se mezi sebou z pravidla odlišují různými expresními profily určitých genů. Párové nebo vícečetné porovnání exprese genů mezi těmito skupinami se provádělo pomocí statistických metod, především metodami lineární regrese nebo negativního binominálního rozdělení. Statisticky významné výsledky ($p < 0,05$) lze považovat za diferenciálně exprimované geny v dané skupině.

Bioinformatická analýza sekvenovaných dat byla u našich vzorků provedena v Bioinformatické centrální laboratoři CEITEC následujícím způsobem. Kvalita hrubých sekvenačních dat ve formátu fastq byla zkontrolována pomocí nástrojů FastQC, MinION a BioBloom. Sekvence adaptérů byly odstraněny pomocí nástroje Trimmomatic. Sekvenační čtení byla namapována na referenční genom GRCh38 pomocí nástroje STAR. Kvalita mapovaných dat byla zkontrolována z hlediska obsahu rRNA, množství PCR duplikátů, funkčního dělení mapovaných oblastí a dalších kontrol kvality pomocí nástrojů FastQ Screen, Picard Tools, DupRadar a RSeQC. Množství mapovaných čtení pro jednotlivé geny, reprezentující jejich měřenou expresi, bylo spočítáno pomocí nástroje FeatureCounts. Relativní diferenciální exprese genů mezi jednotlivými vzorky byla spočítána pomocí nástroje DESeq2. Vizualizace byly vytvořeny pomocí balíčku ggplot2 v programovacím jazyce R.

4.5. Analýza exprese vybraných proteinů pomocí metody Western blot

Pro charakterizaci glioblastomových linií U3013, U3047, U3118 a U87 byla provedena analýza exprese vybraných proteinů pomocí metody Western blot. Ta využívá gelovou elektroforézu k separaci proteinů podle jejich velikosti. Po gelové elektroforéze jsou proteiny přeneseny z gelu na povrch membrány, kde je detekují specifické protilátky. Naše vzorky z glioblastomových buněčných linií byly ve třech biologických replikátech připraveny lýzou buněk v 1% dodecylsulfátovém (Sodium-dodecyl-sulfate, SDS) pufru (50 mM Trisaminomethan-hydroxychlorid (Tris-HCl) pH=6,8, 1% SDS a 10 % glycerol). Dále byla změřena proteinová koncentrace vzorků pomocí DC (Detergent Compatible, kompatibilní s detergenty) Protein Assay kitu (Bio-Rad Laboratories). Pro zjištění koncentrace vzorků byla použita kalibrační řada vzorků o známé koncentraci, výsledná koncentrace vzorků byla upravena na 1 µg/µl. Vzorky byly poté smíchány s LAEMMLI pufrém (0,5M Tris-HCl pH=6,8, 2 ml glycerolu, 4 ml 10% SDS, 0,5 ml 0,1% bromfenolové modři (Brom Phenol Blue, BPB), 0,5 ml merkaptoethanolu a 10 ml destilované vody). 10 µg proteinů bylo následně nanášeno na 10% polyakrylamidový gel (**Tabulka 1**). Proteiny se zde separovaly pomocí gelové elektroforézy a následně byly přeneseny na polyvinylidenfluoridovou membránu (PVDF, Millipore). Složení elektroforetického a transferového pufru je popsáno v **Tabulce 2**. Membrána byla dále vložena do 5% roztoku mléka v trisovém pufru (Tris Buffered Saline, TBS, Sigma-

Aldrich) (10 ml 2M Tris-HCl pH=7,4 (10 mM), 11,79 g chloridu sodného (NaCl) (100 mM), 1 ml 0,05% polyoxyethylenu-20-sorbitan monolaurát polysorbát 20 neiontového detergentu (TWEEN) a 2 l destilované vody). V tomto roztoku byly následně rozpuštěny i primárními protilátky proti jednotlivým proteinům. Do nádoby s roztokem a příslušnou protilátkou se poté vložila část membrány určená pro detekci konkrétního proteinu. Membrána se následně inkubovala přes noc při teplotě 4 °C.

Další den se membrány 3× opláchly roztokem TBS, ve kterém se nechaly promývat vždy 15 min. Dále se k nim přidaly konjugované sekundární protilátky křemové peroxidázy (Horseradish Peroxidase, HRP) rozpuštěné v 5% roztoku mléka v TBS. S těmito sekundárními protilátkami se membrány inkubovaly po dobu 1 h při pokojové teplotě, po inkubaci byly membrány 4× opláchnuty TBS. Na vizualizaci proteinů byl použit substrát Biorad Clarity ECM (Bio-Rad Laboratories), který se aplikoval přímo na membrány. Pro kontrolu nanesení stejného množství proteinu do všech vzorků byla detekována i hladina β-aktinu, jehož hladina je ve všech srovnávaných vzorcích stejná. Všechny použité protilátky jsou shrnuty v **Tabulce 3**.

Separační gel (1 gel)		Zaostřující gel (1 gel)	
H ₂ O	2,17 ml	H ₂ O	1,75 ml
30% akrylamid	2,5 ml	30% akrylamid	417,5 µl
	2,8 ml		312,5 µl
1,5 M Tris-HCl pH=8,8		1M Tris-HCl pH=6,8	
20% SDS	37,5 µl	20% SDS	12,5 µl
10% persulfát amonný (Ammonium Persulfate, APS) v H ₂ O	20 µl	10% APS	12,5 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	5 µl	TEMED	2,5 µl

Tabulka 1: Složení 10% separačního gelu a zaostřujícího gelu pro SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézu

Elektroforetický pufr 2l		Transferový pufr 2l	
Glycin	28,84 g	Glycin	28,84 g
Tris (Trisaminomethan)	6,06 g	Tris	6,06 g
20% SDS	10 ml	Methanol	400 ml
H ₂ O	1 990 ml	H ₂ O	1 600 ml

Tabulka 2: Složení elektroforetického a transferového pufru používaných při Western blotu

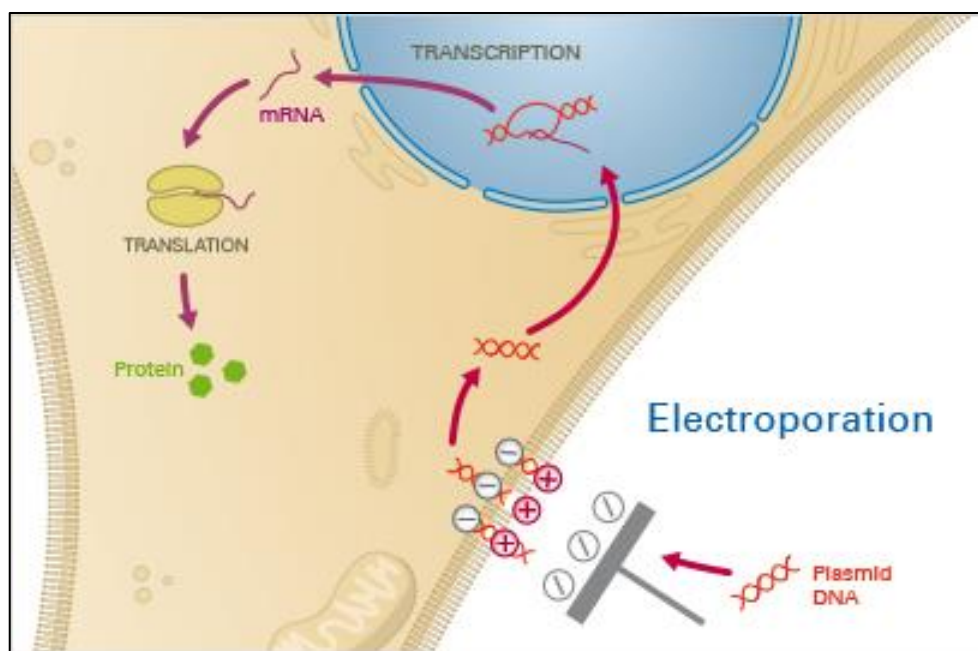
Název	Katalogové číslo/klon	Výrobce
Anti β -actin	3700S	Cell Signaling
Anti p53	DO-1	Dr. Vojtěšek, MOU
Anti GFAP	12389	Cell Signaling
Anti SOX2	4900S	Cell Signaling
Anti C-MYC	5605S	Cell Signaling
Anti TUJ	5568S	Cell Signaling
Anti NF-L	2837	Cell Signaling
Anti OLIG2	HPA003254	Millipore

Tabulka 3: Použité protilátky při Western blotu

4.6. Transfekce buněčných linií U3047 a U3118

Pro účel odlišení buněk glioblastomu od buněk mozkového organoidu během kokultivace bylo potřeba glioblastomové linie fluorescenčně označit. Pro tento účel byla použita metoda transfekce, což je proces, při kterém je do jádra eukaryotických buněk pomocí plazmidového vektoru zavedena cizí nukleová kyselina, v tomto případě gen kódující zelený fluorescenční protein (Green Fluorescent Protein, GFP). Pro vnesení tohoto GFP proteinu do buněčných linií byl použit jako vektor plazmid pEGFP-C1 (Addgene) nesoucí gen pro GFP. Optimalizace transfekce byla velmi náročná a bylo nutné provést řadu testovacích experimentů pro nalezení vhodného plazmidu pro efektivní transfekci plazmidového vektoru do glioblastomových buněk. Postup transfekce byl následující: Z kultivační misky s přisedlými buňkami bylo nejprve odstraněno médium a následně jsme přidali dostatek enzymu TrypLE (Thermo Fisher Scientific) tak, aby pokryl celý povrch nádoby. Jakmile se buňky začaly oddělovat od povrchu nádoby, byl enzym TrypLE odsát. K buňkám jsme poté přidali příslušné kultivační médium a buňky se v něm resuspendovaly. 10 μ l buněčné suspenze jsme následně vložili do Bürkerovy komůrky a spočítali jejich množství. 300 000 buněk pak bylo přeneseno do 15 ml zkumavky Falcon. Zkumavka s buněčnou suspenzí se následně centrifugovala při zrychlení 200 g po dobu 3 min. Poté jsme zkontrolovali vzniklý buněčný pelet. Bez narušení buněčného peletu byl odsát supernatant a přidáno 15 μ l R pufru (Thermo Fisher Scientific), ve kterém jsme buňky rozsuspendovali. Ve zkumavce Eppendorf se dále smíchalo 15 μ l této suspenze a 3 μ l plazmidu pEGFP-C1. 10 μ l této tekutiny se následně opatrně nasálo elektrotransfekční pipetou. Elektrotransfekční pipeta se poté nasadila na kyvetu, která obsahovala 3 ml E pufru (Thermo Fisher Scientific). Následně byla v přístroji Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) provedena transfekce při napětí 1 100 V,

1 puls trval 30 ms. Transfektované buňky se poté přenesly do nově připravené kultivační misky s médiem, v níž byly homogenně rozsuspendovány a dále kultivovány při 37 °C. Pro selekci úspěšně transfekovaných buněk bylo použito fluorescencí aktivované třídění buněk (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS). Tímto způsobem byly připraveny linie U3047 a U3118. Linie U87 byla fluorescenčně označena již dříve (stabilně transfekovaná). Obecné schéma transfekce buňky pomocí elektroporace je zobrazeno na obrázku 16.



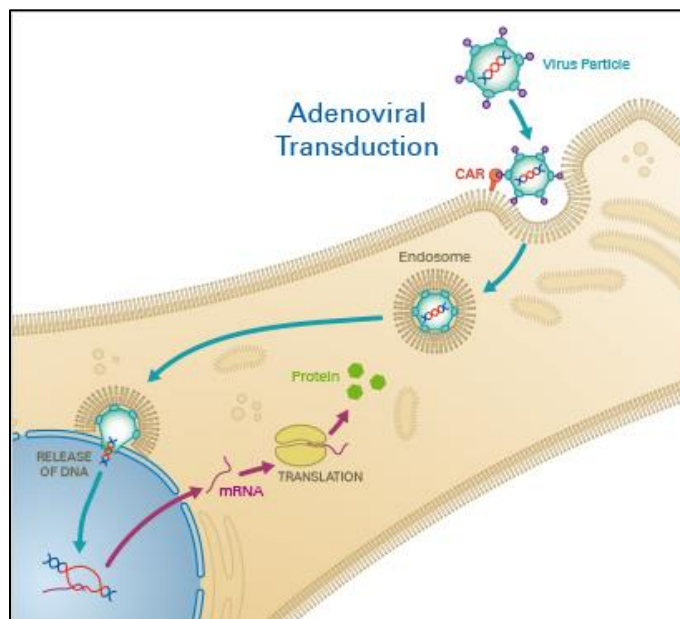
Obrázek 16: Obecné schéma transfekce buňky pomocí elektroporace (https://ibidi.com/img/cms/applications/transfection/TR_M_Electroporation.jpg)

4.7. Transdukce buněčné linie U3013

V případě glioblastomové linie U3013 byla i přes dlouhodobou optimalizaci účinnost transfekce velmi nízká, a proto jsme pro inkorporaci fluorescenčně značeného proteinu GFP do buněk zvolili jinou techniku. Použili jsme metodu transdukce, která pro vnesení vektoru nesoucího cizorodou DNA využila virové vektory nesoucí gen kódující GFP protein (eGFP Adenovirus, Vector Biolabs).

Postup transdukce byl následující: K buněčné linii se nejdříve přidaly virové vektory a buňky se s nimi následně inkubovaly po dobu 72 hodin. Poté byly buňky 5× opláchnuty ve fosfátovém pufru (Phosphate Buffered Saline, PBS) (40 g NaCl, 1 g KCl, 4,3 g Na₂HPO₄·2H₂O, 1 g KH₂ PO₄ a destilovaná voda do objemu 500 ml) a dále kultivovány

v příslušném médiu. Pro selekci úspěšně transdukovaných buněk byla použita metoda FACS. Obecné schéma adenovirové transdukce buňky je zobrazeno na obrázku 17.



Obrázek 17: Obecné schéma adenovirové transdukce buňky (https://ibidi.com/img/cms/applications/transfection/TR_M_Adenoviral.jpg)

4.8. Fluorescencí aktivované třídění buněk (FACS)

Průtoková cytometrie je metoda využívaná k analyzování velkých populací buněk. Tato metoda může být využívána také pro separaci buněk z dané buněčné populace podle určitého kritéria, například podle přítomnosti fluorescenčně značeného proteinu v buňkách. Pro odlišení buněk glioblastomu od buněk mozkového organoidu během kokultivace byly glioblastomové linie pomocí metod transfekce a transdukce fluorescenčně označeny. Pro následné oddělení fluorescenčně označených buněk (tedy buněk obsahujících GFP) od ostatních buněk, do kterých nebyl vektor úspěšně vnesen, byla použita metoda FACS. Postup byl takový, že buňky všech používaných glioblastomových linií byly nejprve odděleny od povrchu kultivační misky pomocí enzymu TrypLE (Thermo Fisher Scientific). Pak byly centrifugovány a analyzovány pomocí BD FACS ARIA III sortovacího průtokového cytometru (Becton Dickenson). Tato analýza byla provedena ve spolupráci s laboratoří průtokové cytometrie v Centru molekulární medicíny CEITEC MU (Dr. Tomáš Loja).

4.9. Příprava sféroidů z glioblastomových linií

Sféroidy byly při experimentech použity jako základní nádorové modely. Byly vytvořeny z glioblastomových linií U3013, U3047, U3118 a U87. Byly spojeny s mozkovými organoidy, se kterými vytvořily GLICO model onemocnění GBM, viz kap. 4.11.

Pro vytvoření sféroidů se aplikoval následující postup: Z kultivační misky s přisedlými buňkami bylo odstraněno médium a přidán dostatek enzymu TrypLE (Thermo Fisher Scientific) tak, aby pokryl celý povrch nádoby. Jakmile se buňky začaly oddělovat od povrchu nádoby, byl enzym TrypLE odsát. K buňkám se poté přidalo příslušné kultivační médium a buňky se v něm rozsuspendovaly. 10 μ l buněčné suspenze se následně vložilo do Bürkerovy komůrky a spočítalo. Z buněčné linie U87 se pak podle požadovaného počtu sféroidů vpravilo vždy 2 000 buněk do jedné jamky neadherentní 96 jamkové destičky, která se následně centrifugovala při RCF 200 g po dobu 2 min. Z buněčných linií U3013, U3047 a U3118 se pak podle požadovaného počtu sféroidů vpravilo vždy 20 tis. buněk do jedné jamky neadherentní 96 jamkové destičky, která se následně centrifugovala při RCF 200 g po dobu 2 min. Vzniklé sféroidy byly pro kultivační experimenty použity po 72 hodinách.

4.10. Příprava mozkových organoidů

Mozkové organoidy byly připraveny z MUNli008 linie iPSCs izolované v roce 2021 Raškou et al. v laboratoři její školitelky Dr. Bohačiakové dle protokolu publikovaného ve Váňová et al., 2023 [49]. Organoidy se následně kultivovaly po dobu 55 dní a po této době byly použity k vytvoření GLICO modelu – viz kap. 4.11. Byly kultivovány v médiu obsahujícím tyto složky: 50% DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) a 50% Neurobasal (Thermo Fisher Scientific) s přidávanými složkami = 0,5% N-2 supplement (Thermo Fisher Scientific), 0,00025% Insulin (Thermo Fisher Scientific), 0,01% GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific), 0,005% neesenciální aminokyseliny (Thermo Fisher Scientific), 0,01% ZellShield (Minerva Biolabs), 0,01% 2-merkapt ethanol (Sigma-Aldrich) a 0,01% B-27 supplement (Thermo Fisher Scientific). K výměně média u organoidů docházelo vždy po 48 hodinách, ve všech případech se vyměnil celý objem média v kultivační misce.

4.11. Vytvoření 3D modelů onemocnění Glioblastoma multiforme (GLICO)

Spojením nádorového sféroidu a mozkového organoidu byly vytvořeny 3D modely onemocnění GBM (GLICO) viz kap. 4.11.

Postup byl takový, že ve 12 jamkové kultivační destičce, jejíž povrch byl ošetřen Poly-Hemou (Polyhydroxyethylmethacrylate, Sigma-Aldrich), aby se na něj buňky nemohly přichytit, byl do několika jamek (dle požadovaného počtu modelů) přidán vždy jeden mozkový organoid a jeden sféroid dané glioblastomové linie. Kultivační destička se poté naklonila, aby se organoid a sféroid lépe spojily, což se stalo přibližně po 72 hodinách. Tyto modely jsme následně kultivovali po dobu 30 dní, kdy byly použity k dalším experimentům. Modely byly kultivovány na neadherentních kultivačních miskách na orbitální třepače v médiu, ve kterém se kultivují mozkové organoidy. Výměna média probíhala po 48 hodinách. Kultivace modelů probíhala bez přidání ECM.

4.12. Příprava GLICO modelů pro Light sheet fluorescenční mikroskopii (LSFM)

4.12.1. Fixace GLICO modelů

Pro mikroskopickou analýzu GLICO modelů bylo potřeba vzorky zafixovat. Při fixaci dochází k perforaci buněčné membrány a usmrcení všech buněk ve vzorku. Pro fixaci jsme použili 3,7 % roztok formaldehydu, který byl přidán ke GLICO modelům po 30 dnech kultivace. GLICO modely v něm zůstaly po dobu 1 hodiny a poté byly 2× opláchnuty v PBS a dále uchovávány ve sterilním PBS při teplotě 4 °C.

4.12.2. Metoda CUBIC Clearing

Aby bylo možné GLICO modely pod mikroskopem správně analyzovat, bylo nutné je pomocí histologické metody CUBIC clearing takzvaně zprůhlednit. Tato metoda byla provedena ve spolupráci s Mgr. Veronikou Pospíšilovou, Ph.D. z laboratoře mojí školitelky. Zafixované GLICO modely byly inkubovány v reagentu CUBIC1 = 25% močovina (Sigma-Aldrich), 25% N,N,N',N'-Tetrakis(2-Hydroxypropyl)ethylen (Sigma-Aldrich, 122262-11) a 15% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) na třepače při teplotě 37 °C po dobu 5–7 dnů s jednou výměnou reagentu CUBIC1 (po 3 dnech). GLICO modely byly následně 3× omyty v promývacím pufru = PBS (Sigma-Aldrich) a 0,5% Triton X-100

(Sigma-Aldrich). Dále byl přidán „blocking“ pufr = PBS (Sigma-Aldrich), 5% normální koží sérum (Normal Goat Serum, NGS, Sigma-Aldrich) nebo 5% bovinní sérový albumin (Bovine Serum Albumine, BSA, Sigma-Aldrich) a 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). GLICO modely se v tomto pufru inkubovaly na třepačce po dobu 3 až 6 hodin (čas záležel na velikosti modelu). Po této inkubaci byly vzorky 3× omyty promývacím pufrům a dále po dobu 24 h při teplotě 4 °C ve tmě na třepačce inkubovány s barvivem Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific). GFP signál v glioblastomových buňkách byl natolik silný, že ho nebylo potřeba dále posilovat pomocí specifických protilátek. Buňky byly nakonec 3× omyty promývacím pufrům a po 24–36 h ve tmě na třepačce inkubovány s reagentem CUBIC2 = 50% sacharóza (Sigma-Aldrich), 25% močovina (Sigma-Aldrich), 10% Triethanolamin (Sigma-Aldrich, 90279) a 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich).

4.13. Analýza migrace glioblastomových buněk v GLICO modelu

Analýza migrace glioblastomových buněk do mozkového organoidu byla provedena pomocí Light sheet fluorescenční mikroskopie (LSFM) - mikroskopické techniky, při které dochází k detekci signálu pouze z roviny ostrosti. Vše proběhlo ve spolupráci s Dr. Slováčkovou z laboratoře mé školitelky, dle protokolu Fedorová et al., 2023 [10]. Připravené organoidy byly vizualizovány mikroskopem ZEISS Lightsheet 7 (Carl Zeiss AG) ve Sdílené laboratoři buněčného zobrazování (CELLIM) v CEITEC MU. Na zhodnocení migrace buněk byl použit komerčně dostupný software IMARIS 10.0 (Bitplane, South Windsor, USA).

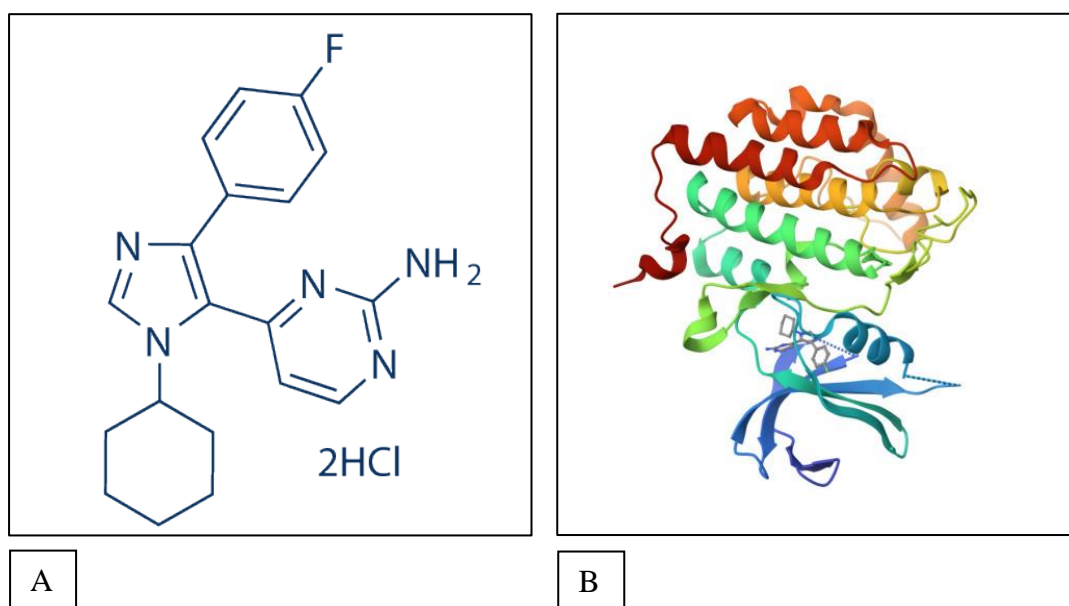
4.14. Aplikace inhibitorů ke GLICO modelům

Kinázy jakožto enzymy provádějící fosforylaci mnoha buněčných substrátů silně ovlivňují signální transdukcii v buňkách [50, 54], a staly se důležitým nástrojem pro biologickou léčbu různých typů nádorů. Stále však není jasné, zda by mohly být efektivně využity i k léčbě glioblastomů a jiných nádorů mozku, a jakou biologickou roli v nich přesně mají [51].

V této práci byl ke GLICO modelům aplikován inhibitor kasein kinázy 1, zejména subtypů delta a epsilon, označený PF-670462 (Pfizer, Obr. 18), který byl již využíván například pro výzkum *in vitro* modelů idiopatické plicní fibrózy [52]. Tento inhibitor byl

porovnán s nově syntetizovaným inhibítor CK1 (MU) vyvinutým na ústavu chemie Přírodovědecké fakulty MU. Podrobné informace o tomto novém inhibítoru nemohou být zveřejněny z důvodu plánované patentové ochrany.

Nejdříve bylo třeba stanovit optimální koncentrace inhibítoru PF-670462 pro aplikaci ke GLICO modelům, koncentrace inhibítoru MU byla stanovena na 0,3 μM . Pro tento účel tak byla připravena ředící řada inhibítoru PF-670462. Ke sféroidům a organoidům se přidávaly různé koncentrace inhibítoru a pak se sledovalo, která koncentrace je pro buňky nejméně toxická. Kontrolním vzorkem bylo samotné rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO), dále jsme testovali koncentrace inhibítoru 0,3 μM , 1,0 μM a 3,0 μM . GLICO modely byly inkubovány s inhibitory o vybrané koncentraci po dobu 14 a 30 dní (v inkubátoru zn. Esco, při teplotě 37 °C při 5% CO_2). Ve dnech 14 a 30 byla provedena analýza proliferace vzorků pomocí LSMF stejným způsobem jako bylo popsáno v kap. 4.12. Chemická struktura inhibítoru PF-670462 je zobrazena na obrázku 18.



Obrázek 18:

A: Chemická struktura CK1 inhibítoru PF-670462 (4-[3-cyclohexyl-5-(4-fluorophenyl)imidazol-4-yl]pyrimidin-2-amine)

(<https://file.selleckchem.com/downloads/struct/pf-670462-chemical-structure-s6734.gif>)

B: Krystalová struktura CK1delta s inhibítor PF670462

(zdroj PDB – Protein Data Bank, <https://doi.org/10.2210/pdb3UZP/pdb>)

5 VÝSLEDKY

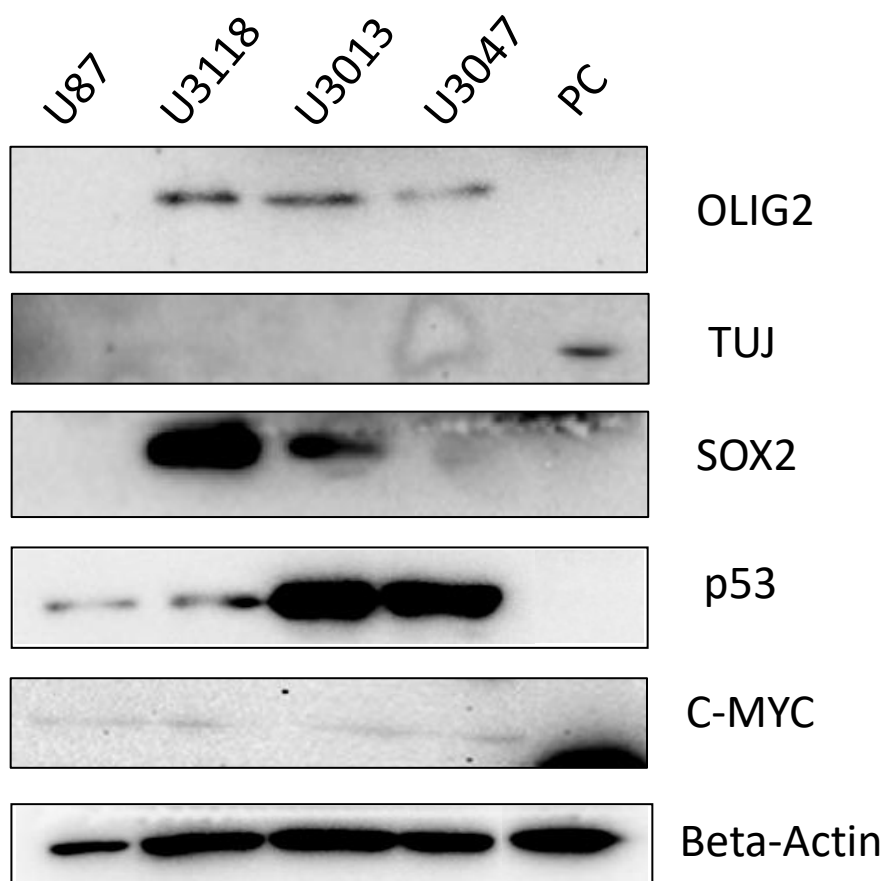
5.1. Charakterizace glioblastomových buněčných linií z hlediska exprese významných proteinů

Glioblastomy jsou nádory vyznačující se vysokou heterogenitou. Ta má za následek, že každá glioblastomová linie, vzniklá z buněk jednotlivých pacientů, může mít jiné biologické vlastnosti. V této práci byly používány 4 buněčné linie glioblastomu derivované od jednotlivých pacientů, konkrétně linie U87 mezenchymálního subtypu a linie U3013, U3047 a U3118 proneurálního subtypu. Pro analýzu exprese vybraných proteinů charakterizujících vlastnosti glioblastomových buněk byla u všech linií použita metoda Western blot – viz kap. 4.5. Jako pozitivní kontrola (Positive Control, PC) sloužil vzorek mozkového organoidu (Obrázek 19).

V glioblastomových liniích byla analyzována přítomnost těchto neurálních proteinů: OLIG2 – marker oligodendrocytů (buněk, které na axonech neuronů vytvářejí myelinové pochvy), TUJ – marker neuronů, SOX2 – marker neurálních kmenových buněk. Dále byly analyzovány proteiny asociované s vlastnostmi nádorových buněk, podílející se na regulaci buněčné proliferace: p53 – tumor supresorový protein a C-MYC – onkogen.

Vzhledem k tomu, že linie U87 je z glioblastomu mezenchymálního subtypu, tak neexprimuje neurální markery. Protein SOX2 jsme detekovali především v liniích proneurálního subtypu U3013 a U3118, což dokazuje přítomnost neurálních kmenových buněk. Ve všech třech proneurálních liniích byl dále detekován OLIG2 naznačující přítomnost nádorových buněk vzniklých z oligodendrocytů. Marker neuronů TUJ nebyl detekován, protože nebyly přítomné zralé neurony. Zvýšená hladina tumor supresorového proteinu p53, kterou jsme detekovali u linií U3013 a U3047, souvisí s jeho mutovanou formou. Deregulace p53 dráhy byla popsána u 84 % pacientů s glioblastomy a u 94 % glioblastomových buněčných linií [53] a může korelovat s agresivitou nádoru.

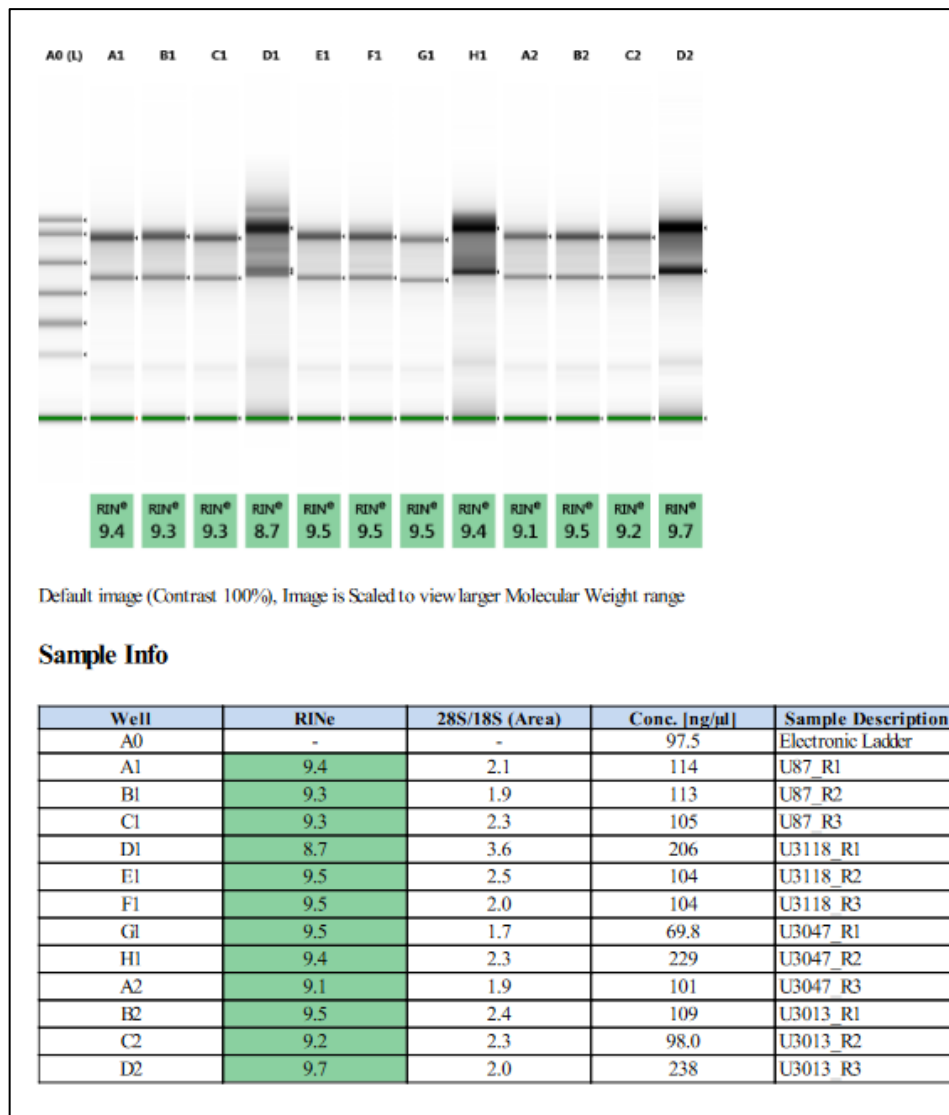
Dále jsme sledovali hladinu známého onkogenu C-MYC, jehož tvorba je spojována s nádory mozku a jeho hladina byla srovnatelná u všech linií. Z charakterizace exprese vybraných proteinů je tedy patrné, že glioblastomové linie mezi sebou mají významné rozdíly, které mohou mít vliv na jejich další vlastnosti.



Obrázek 19: Analýza exprese různých neurálních markerů a dalších proteinů v glioblastomových liniích U87, U3118, U3013 a U3047. Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek proteinů z mozkového organoidu. Jako kontrola rovnoměrného nanášení proteinů sloužil protein β -aktin.

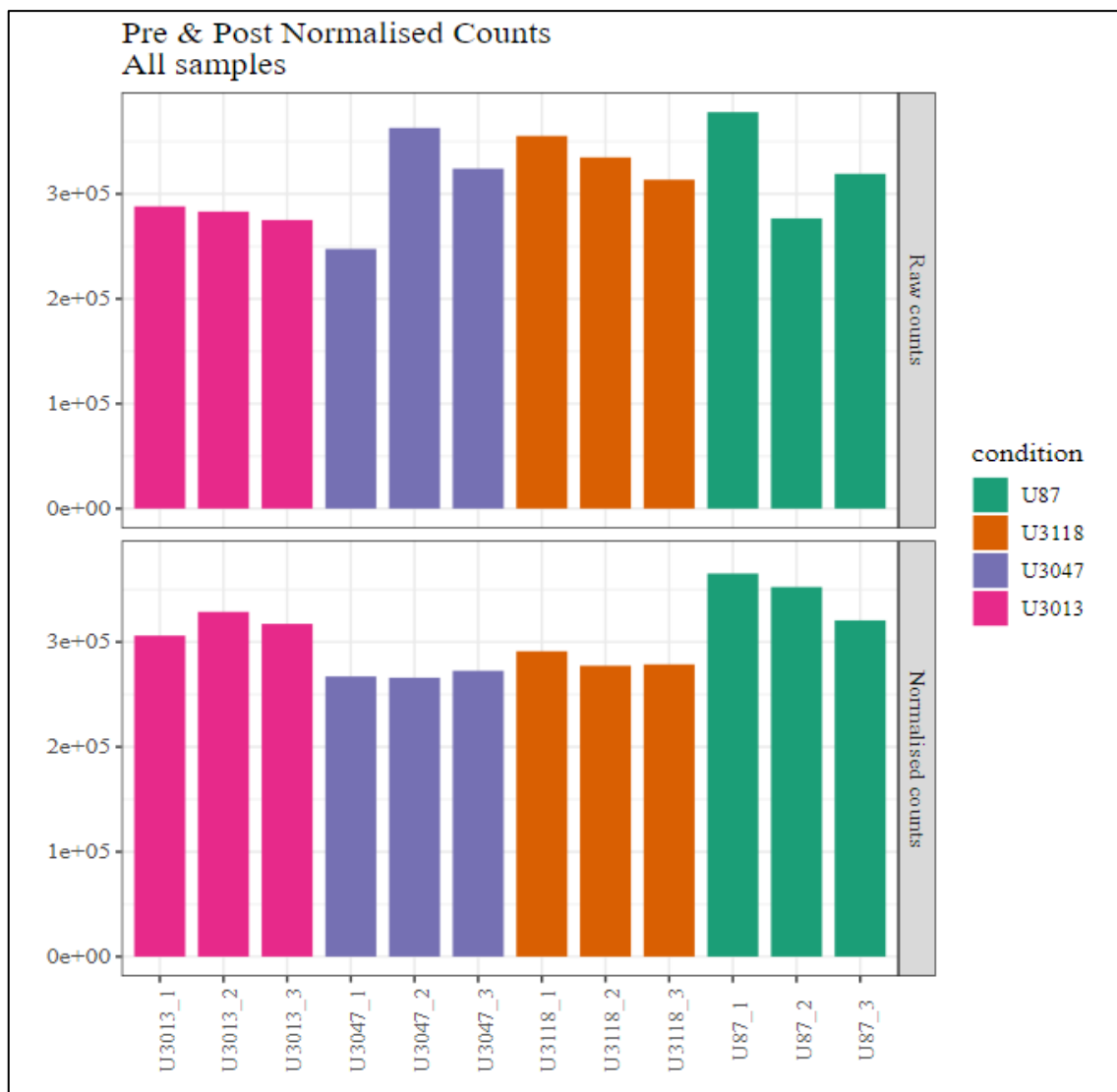
5.2. Analýza transkriptomu glioblastomových buněčných linií pomocí sekvenování nové generace

Pro porovnání míry genové exprese glioblastomových buněčných linií na úrovni transkriptomu jsme ze všech 4 studovaných linií izolovali RNA. Izolaci jsme provedli v biologických triplikátech, tedy ze 3 různých vzorků každé buněčné linie (celkově jsme tedy získali 12 vzorků RNA). Kontrolu kvality získané RNA jsme provedli pomocí přístroje TapeStation (Agilent) v Centrální genomické laboratoři CEITEC MU (ve spolupráci s Dr. K. Amruz Černou), u každého vzorku byla stanovena koncentrace, integrita (tzv. RNA integrity Number neboli „RIN“) a další parametry charakterizující čistotu vzorku – viz obrázek 20. Všechny vzorky RNA měly dostatečnou kvalitu pro přípravu sekvenační knihovny pro NGS.



Obrázek 20: Výsledky kontroly kvality vzorků RNA – výstupy z přístroje TapeStation

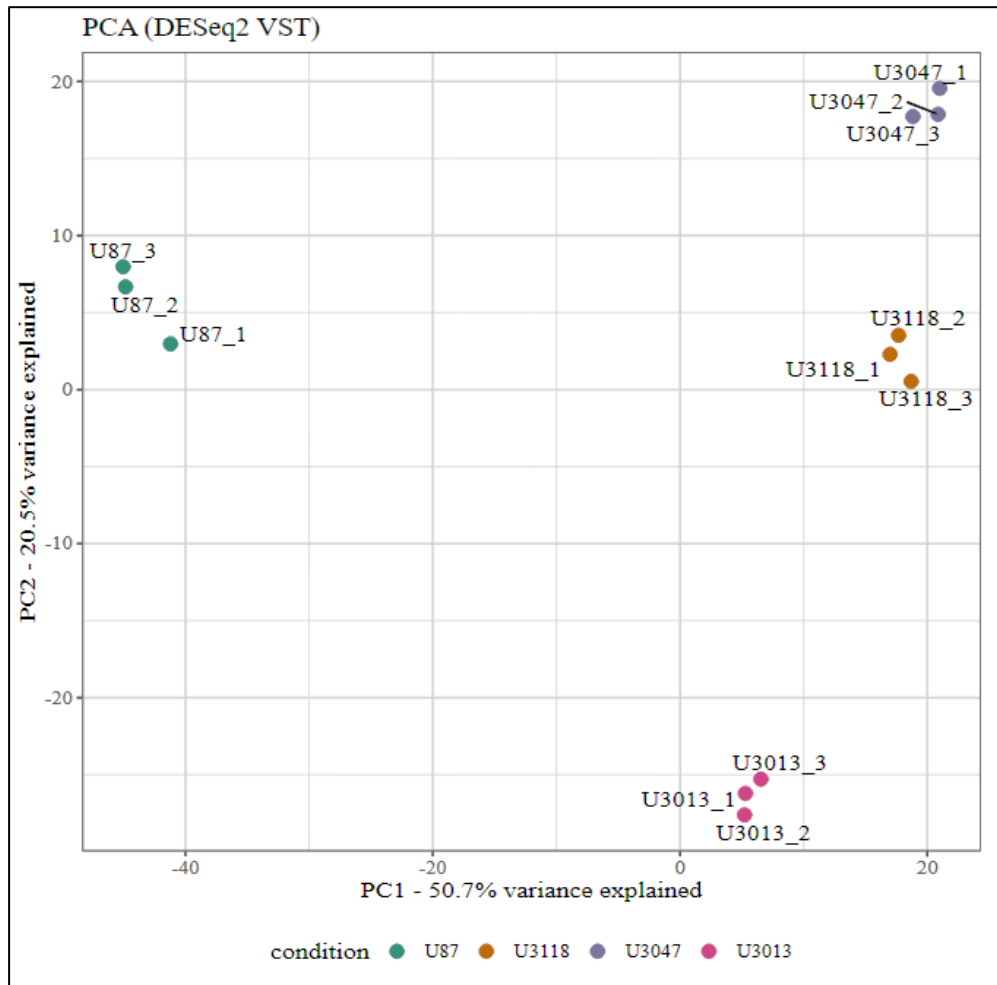
Při vlastní sekvenaci vzorků provedené v Centrální genomické laboratoři CEITEC MU se podařilo analyzovat průměrně 7 milionů čtení (tzv. „readů“) u každého vzorku, přičemž procento čtení mapovaných k referenčnímu genomu GRCh38-p10 bylo poměrně vysoké (celkově ~74 %, z toho ~68 % „jedinečně-mapované“ a ~6 % „multi-mapované“, tedy přibližně 5 milionů mapovaných čtení). Kontaminace ribozomální RNA (rRNA) byla do 3 %, což je velmi nízká hodnota. Následně bylo provedeno přiřazení jednotlivých čtení ke známým genům kódujícím proteiny v databázi. Počty přiřazených čtení z analyzovaných vzorků jsou uvedeny na obrázku 21, výsledky u jednotlivých buněčných linií jsou vyrovnané a pohybují se kolem 300 tis. čtení.



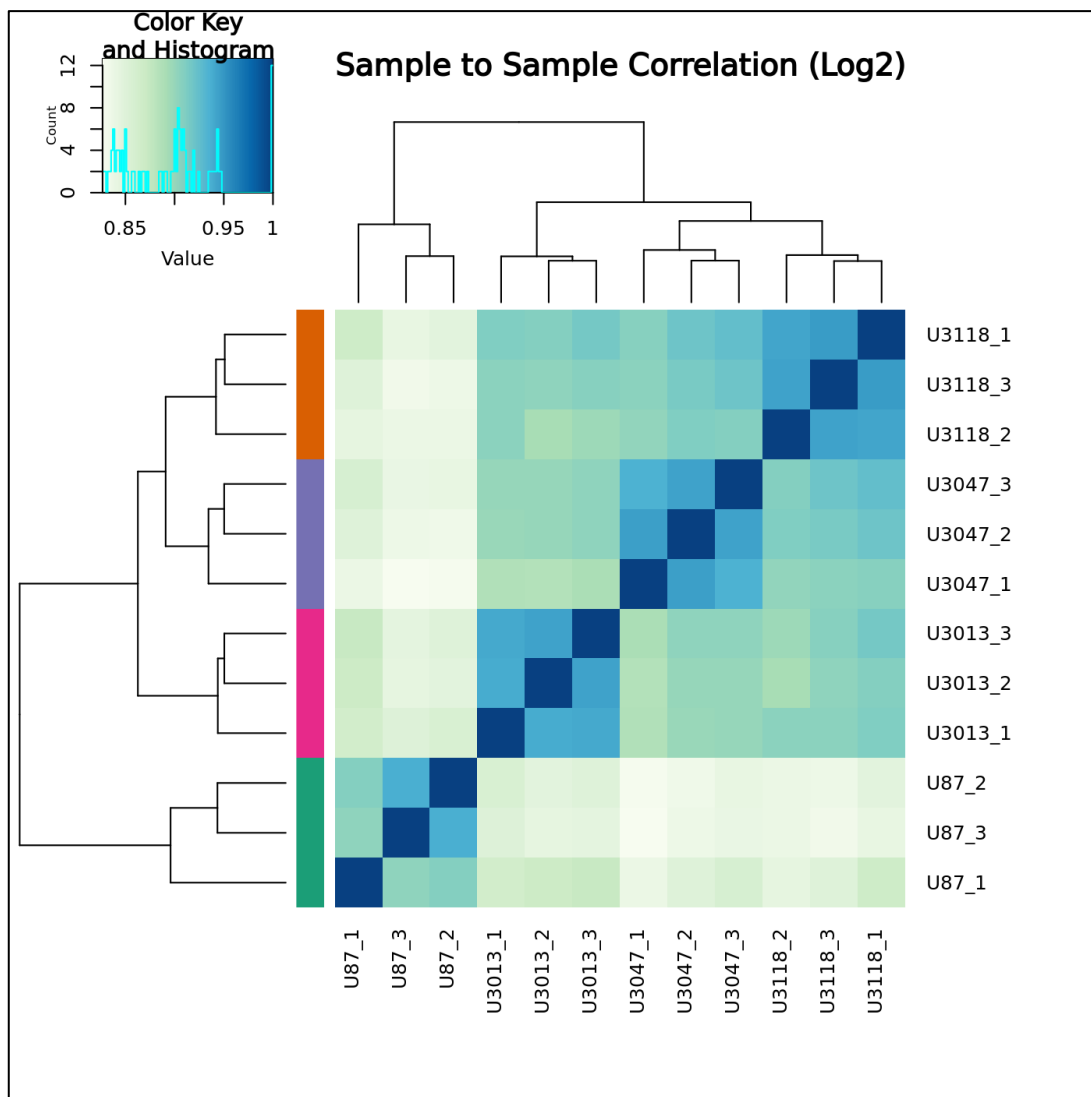
Obrázek 21: Počty čtení přiřazených ke kódujícím genům pro 4 analyzované buněčné linie před normalizací („raw counts“) a po normalizaci („normalized counts“) (analýzu provedl Dr. V. Bystrý, Centrální laboratoř Bioinformatika CEITEC MU)

Výsledky analýzy transkriptomu byly dále zpracovány několika bioinformatickými metodami s cílem získat co největší spektrum dat pro porovnání vlastností studovaných buněčných linií (analýzu provedl Dr. V. Bystrý z Centrální laboratoře Bioinformatika CEITEC MU). Zřejmé rozdíly v genové expresi jednotlivých linií jsou viditelné v grafickém výsledku metody „Principal Component Analysis“ (analýza hlavních komponent, PCA) zobrazujícím shluky („clustery“) vzorků s podobnou expresí genů – viz obrázek 22. Důležité je, že vzorky triplikátů jednotlivých buněčných linií mají expresi velmi podobnou, což dokládá přesnost provedených analýz.

Naopak je patrné, že genová exprese u jednotlivých buněčných linií je významně rozdílná. Nejvíce se liší genová exprese linie U87, což lze zdůvodnit jejím mezenchymálním původem. Ostatní tři linie proneurálního původu mají genovou expresi podobnější (zejména U3047 a U3118), přesto však mezi nimi existují významné jasné diferencované rozdíly.



Obrázek 22: PCA vizualizace diferenciální exprese všech 12 sekvenovaných vzorků (analýzu provedl Dr. V. Bystrý, Centrální laboratoř Bioinformatika CEITEC MU)

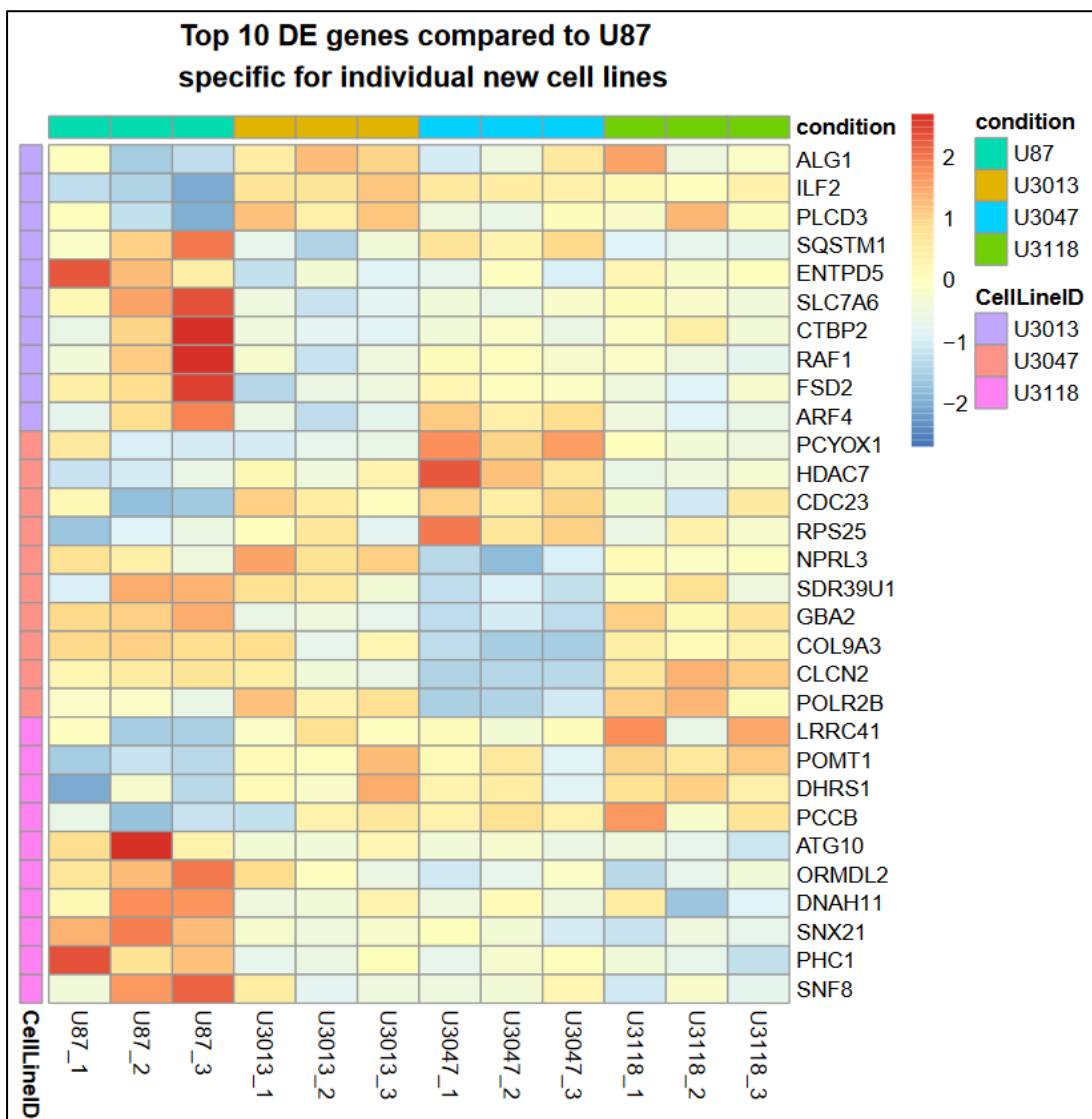


Obrázek 23: Teplotní mapa („heat-map“) výsledků shlukové analýzy buněčných linií podle jejich genové exprese (analýzu provedl Dr. V. Bystrý, Centrální laboratoř Bioinformatika CEITEC MU)

Obdobné výsledky charakterizující podobnost buněčných linií z hlediska genové exprese ukazuje také teplotní mapa na obrázku 23. Nejpodobnější jsou si vždy vzorky stejné buněčné linie (v modré úhlopříčce). Opět je také jasně vidět podobnost linií U3118 a U3047, následované linií U3013. Linie U87 vykazuje největší rozdíly v genové expresi ve srovnání v ostatními liniemi.

Obrázek 24 pak ukazuje ve formě teplotní mapy diferenciálně exprimované geny u jednotlivých proneurálních glioblastomových linií ve srovnání s mezenchymální linií U87 (vždy 10 nejvíce rozdílně exprimovaných genů). Jde tedy zejména o geny, jejichž genová exprese je specifická pro jednotlivé proneurální linie. Je zřejmé, že přestože všechny studované buněčné linie pocházejí z pacientů se shodnou diagnózou

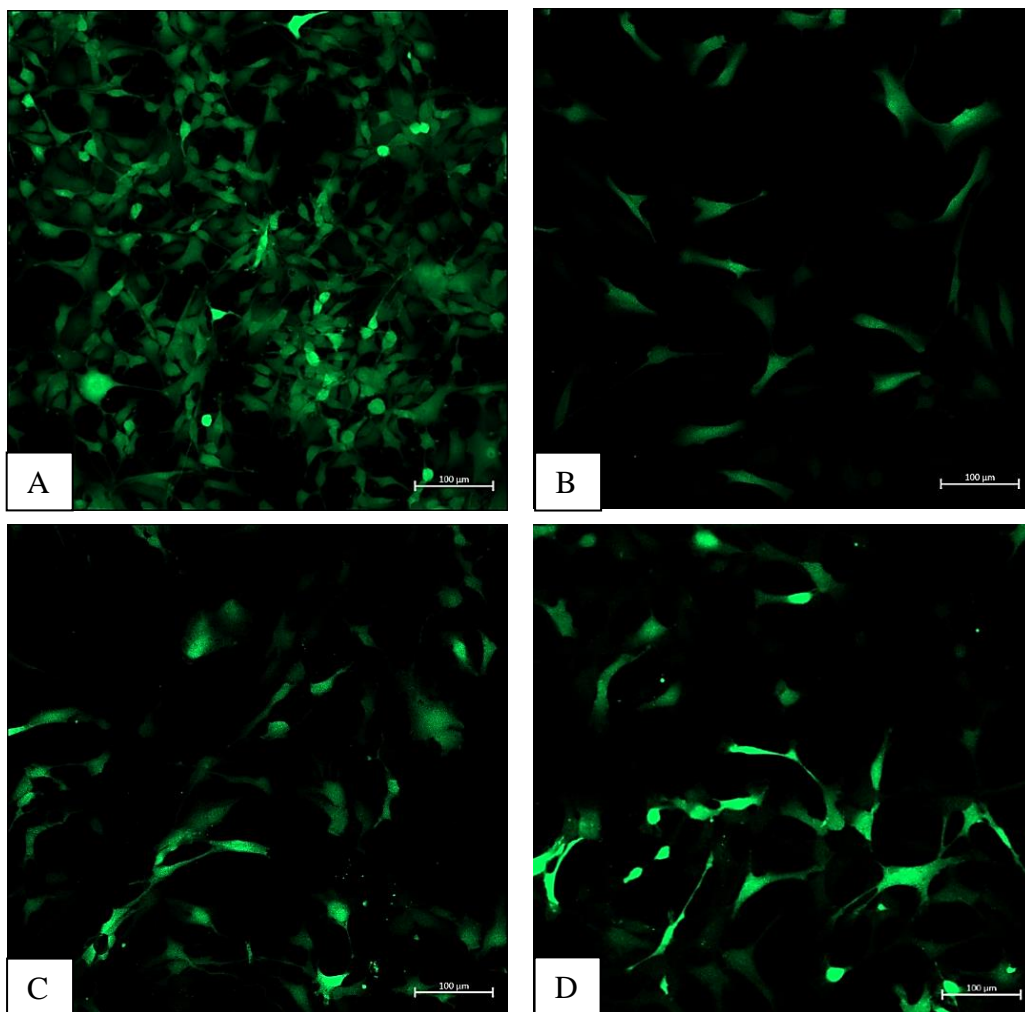
Glioblastoma multiforme, jejich genová exprese se významně liší. Mnohé z nejrozdílněji exprimovaných genů se účastní významných buněčných procesů včetně regulace buněčného cyklu. Například rozdílně exprimovaný gen RAF1 je součástí RAS/MAPK signální dráhy zabezpečující buněčnou signalizaci, CDC23 se podílí na regulaci buněčného cyklu, další rozdílně exprimované geny se také významně podílejí na důležitých buněčných procesech. Analýzy genové exprese tedy ukazují rozdílné vlastností nádorových buněk u pacientů se stejnou diagnózou a naznačují potřebu individualizované léčby pacientů na základě biologických vlastností nádorových buněk.



Obrázek 24: Teplotní mapa („heat-map“) výsledků shlukové analýzy 3 proneurálních buněčných linií ve srovnání s linií U87 podle jejich rozdílné genové exprese (analýzu provedl Dr. V. Bystrý, Centrální laboratoř Bioinformatika CEITEC MU)

5.3. Fluorescenční značení glioblastomových buněk

Pro zviditelnění glioblastomových buněk v GLICO modelu byly glioblastomové buněčné linie fluorescenčně označeny pomocí transfekce (U3118 a U3047) a transdukce (U3013) fluorescenčně značeného vektoru – viz kap. 4.6. a 4.7. Pro transfekci bylo vyzkoušeno několik plazmidů nesoucích gen pro GFP, některým glioblastomovým liniím se však plazmid do genomu buď nedařilo stabilně začlenit nebo svou fluorescenci postupně ztrácely umlčováním genu pro GFP. Jako nejstabilnější se ukázal plazmid pEGFP-C1 (Addgene). Linie U3013 však měla nízkou účinnost transfekce a musela u ní tak být provedena metoda transdukce virových vektorů (Vector Biolabs). Buňky s úspěšně vneseným GFP jsme od těch neobarvených oddělili pomocí FACS a jsou zobrazeny na Obrázku 25. Fluorescenčně značené linie jsme dále používali pro tvorbu sféroidů a jejich následné spojování s mozgovými organoidy do GLICO modelu.

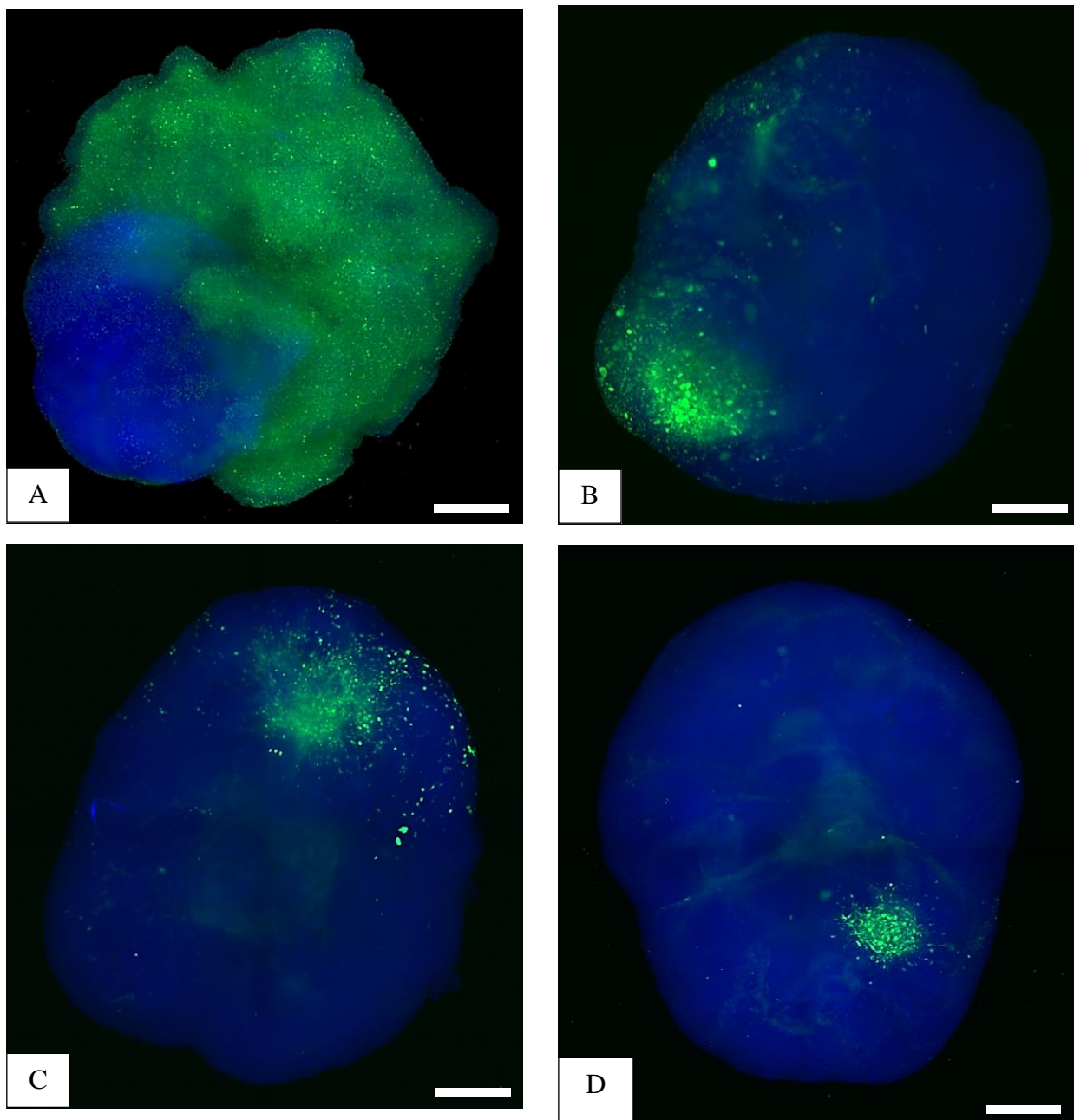


Obrázek 25: Fluorescenčně značené glioblastomové linie U87 (A), U3013 (B), U3047 (C), U3118 (D) (použit mikroskop ZEISS LSM 800, Z=100×), měřítko=100 µm

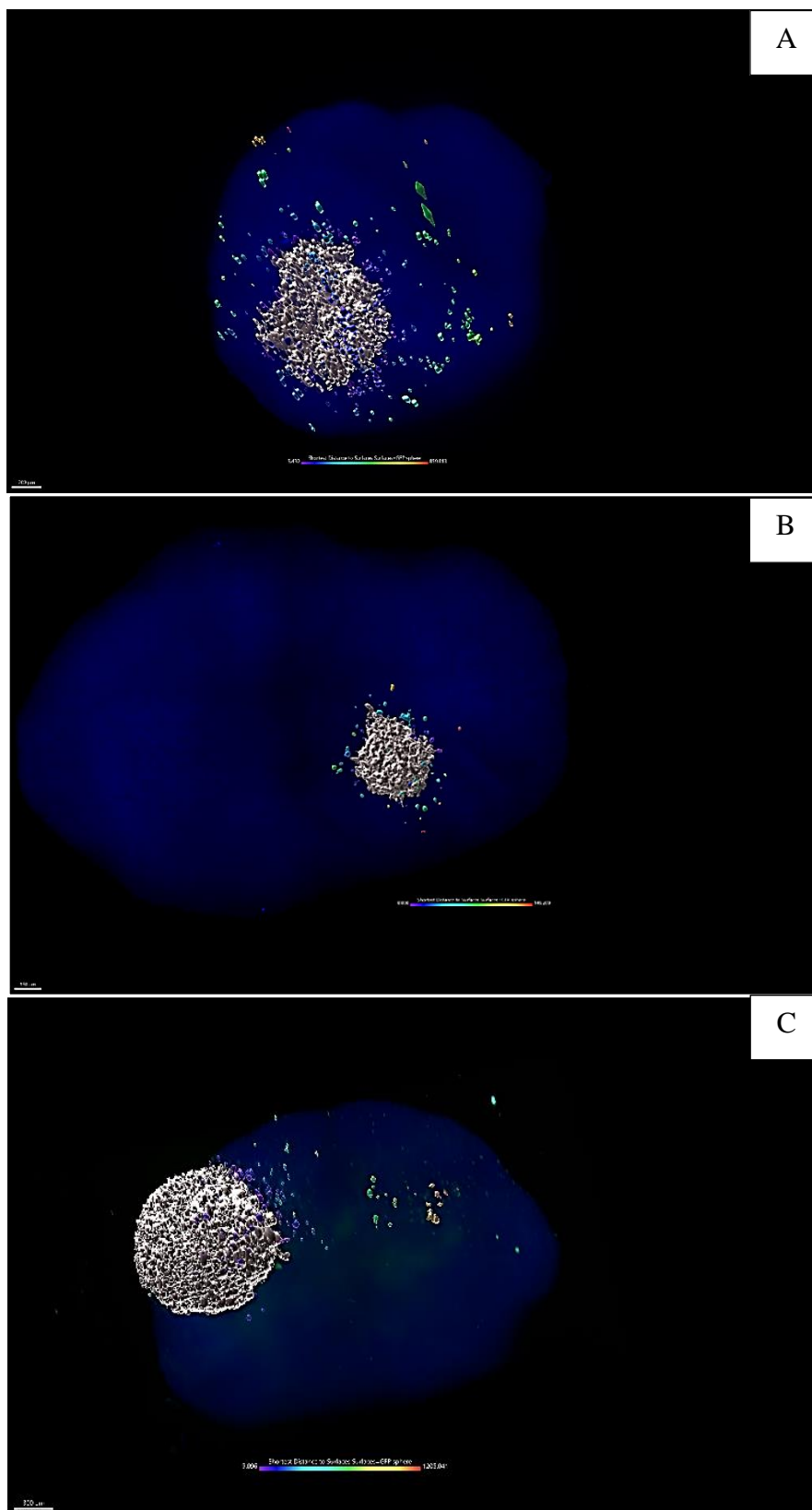
5.4. Srovnání schopnosti migrace glioblastomových buněk mozkovým organoidem

Schopnost migrace různých glioblastomových buněčných linií mozkovým organoidem byla studována v tzv. GLICO modelu – viz kap. 4.11. a obrázek 26. Pro tvorbu GLICO modelu jsme použili sféroid tvořený glioblastomovými buňkami dané linie. Sféroid jsme nechali přichytit k mozkovému organoidu a vzniklý GLICO model kultivovali po dobu 30 dní. Po 30 dnech jsme provedli fixaci GLICO modelů a jejich zpracování pro fluorescenční mikroskopii. Mozkový organoid (na snímku viditelný modře díky barvivu Hoechst barvicím jádra buněk) v tomto modelu simuluje zdravou mozkovou tkáň, zatímco sféroid z glioblastomové linie (obarvený zeleně pomocí GFP) představuje nádor. Na obrázku 26 jsou vidět GLICO modely vizualizované pomocí LSM. Z obrázků je patrné, že buněčná linie U87 (obrázek 26 A) rostla nejrychleji a mozkový organoid z velké části obrostla. Buněčné linie U3013 (obrázek 26 B) a U3118 (obrázek 26 C) měly míru migrace do mozkového organoidu podobnou, zatímco linie U3047 (obrázek 26 D) do mozkového organoidu migrovala nejméně.

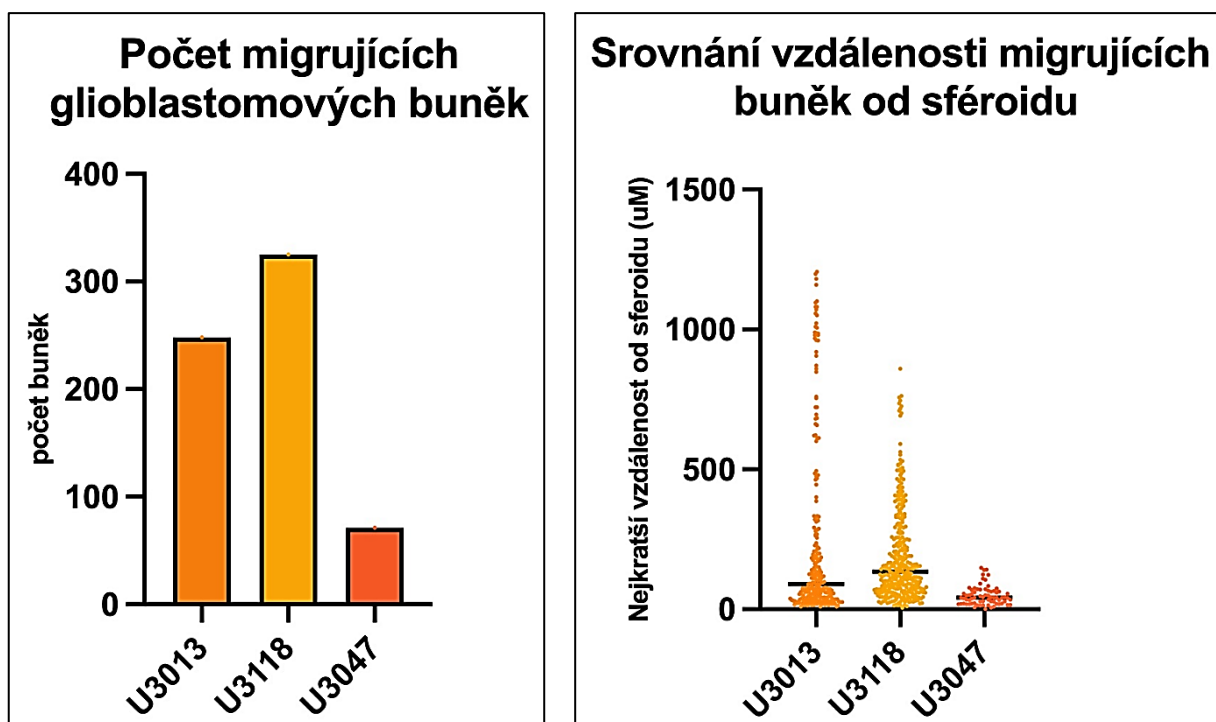
Glioblastomové linie U3013, U3047 a U3118 byly navíc analyzovány pomocí speciálního softwaru IMARIS 10.0, který umožnil lepší vizualizaci migrace glioblastomových buněk do mozkového organoidu. Modře byl obarvený organoid, migrující glioblastomové buňky jsou zobrazeny v barevné škále od fialové po červenou v závislosti na vzdálenosti, kterou migrovaly od původního sféroidu vyobrazeného šedě (obrázek 27). Jednotlivé buněčné linie se liší schopnostmi migrovat do zdravé mozkové tkáně, v našem modelu reprezentované modře zbarveným organoidem, což značí jejich rozdílný potenciál infiltrovat zdravou tkáň. Buněčné linie U3013 a U3118 vykazují podobně vysokou schopnost migrace (u linie U3013 bylo detekováno 248 migrujících buněk a u linie U3118 325 migrujících buněk, viz graf na obrázku 28) a buňky navíc migrují do větších vzdáleností od původního sféroidu (střední vzdálenost u linie U3013 je 90,6 μm , u linie U3118 je 134 μm), naopak linie U3047 má schopnost migrace výrazně nižší (71 migrujících buněk, střední vzdálenost je pouze 42 μm , viz grafy na obrázku 28). Tato zjištění dobře korelují s přežitím pacientů, z jejichž nádorů byly buněčné linie vytvořeny. Pacientka s nádorem, ze kterého byla vytvořena buněčná linie U3013, přežila jen 122 dní od diagnózy, zatímco pacientka s méně agresivními nádorovými buňkami U3047 se dožila 496 dní od diagnózy. U pacienta s buňkami linie U3118 není celkové dožití známo (<http://www.hgcc.se/#>).



Obrázek 26: GLICO modely vizualizované pomocí LSFM (A) U87 (B) U3013, (C) U3118, (D) U3047 (použit mikroskop ZEISS Lightsheet 7, Z=50×), měřítko=1 mm



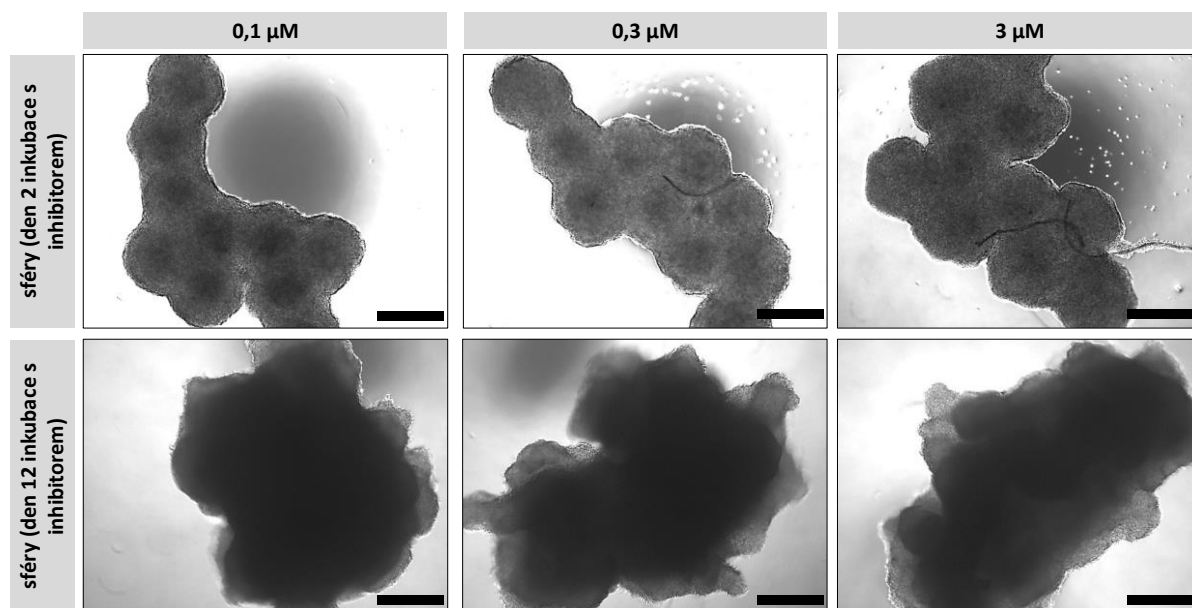
Obrázek 27: Migrace glioblastomových linií do mozkového organoidu (A) U3013 (B) U3047 a (C) U3118 (LSFM, použit software IMARIS 10.0), měřítko=320 μm



Obrázek 28: Grafy počtu migrujících glioblastomových buněk do mozkového organoidu a srovnání vzdálenosti migrujících glioblastomových buněk od sféroidu

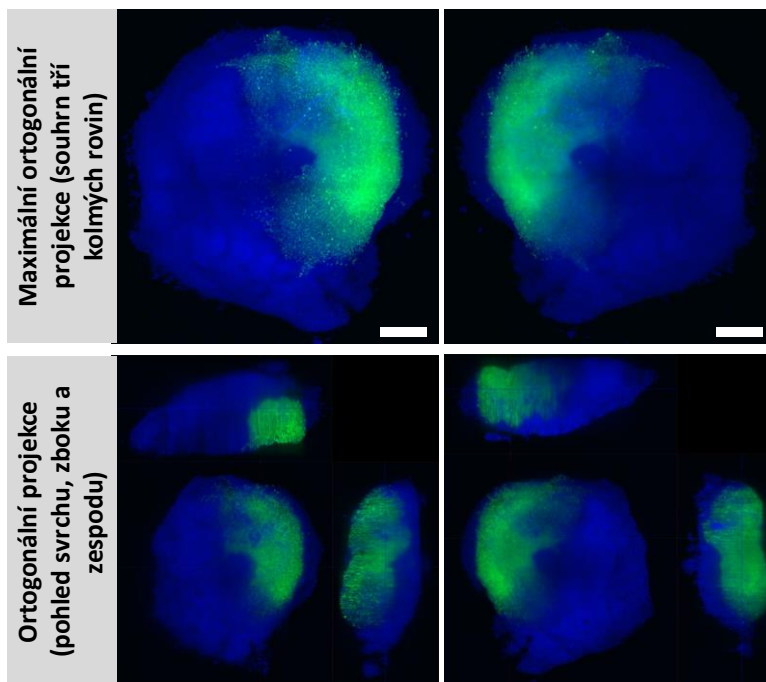
5.5. Aplikace inhibitorů ke GLICO modelům

Pro ověření vhodnosti použití GLICO modelu ve funkčních studiích účinků léčiv jsme vyzkoušeli aplikaci inhibitorů PF-670462 a MU ke GLICO modelům – viz 4.12. Nejdříve bylo potřeba stanovit vhodnou koncentraci inhibitoru pro inkubaci s GLICO modelem. Testovali jsme koncentrace 0,3 μM, 1 μM a 3 μM. Inhibitor PF-670462 nevykazoval na buňky toxický účinek ani při nejvyšší použité koncentraci, a proto byla pracovní koncentrace inhibitoru PF-670462 stanovena na 3 μM. Účinky inhibitoru PF-670462 jsme pro nalezení optimální koncentrace testovali na sféroidech vytvořených z glioblastomové linie U87. Na obrázku 29 jsou zachycené shluky glioblastomových sféroidů ve dni 2 a dni 12 inkubace s PF-670462. Koncentrace inhibitoru MU byla stanovena na 0,3 μM.

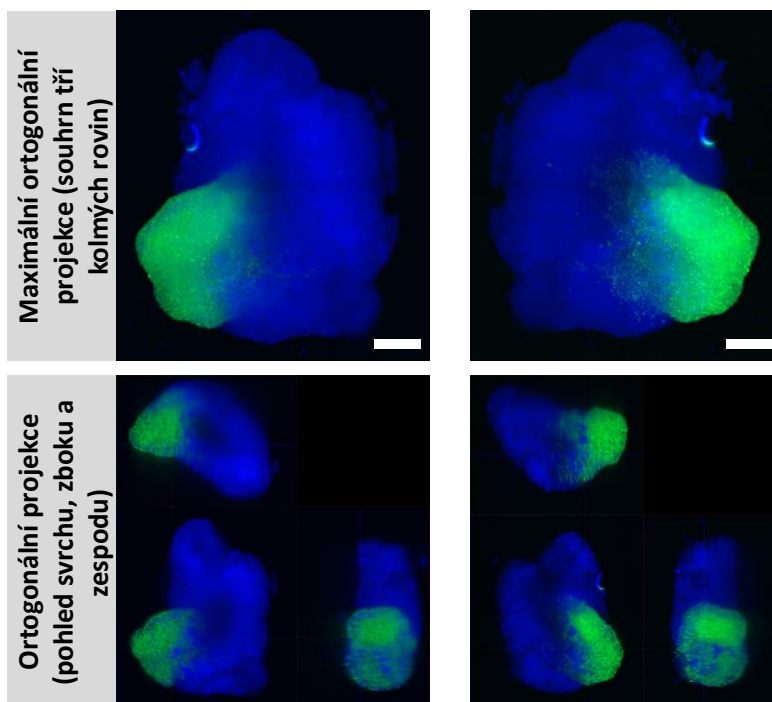


Obrázek 29: Testování vhodné koncentrace inhibitoru PF-670462 na přidání ke GLICO modelům z glioblastomové linie U87 (použit mikroskop LEICA, $Z=50\times$), měřítko=200 μm

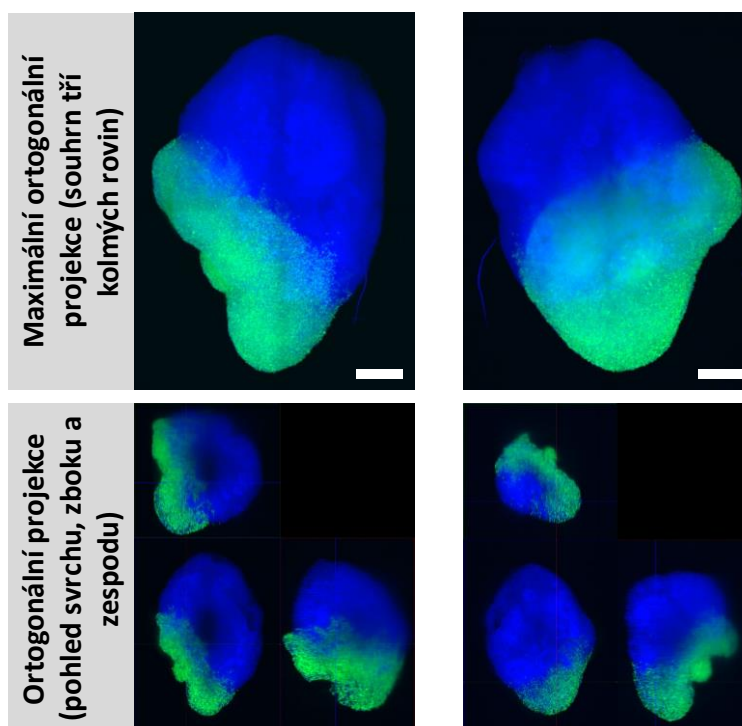
Po výběru vhodné koncentrace inhibitorů jsme začali přidávat inhibitory do kultivačního média ke GLICO modelům glioblastomové linie U87. Inhibitor PF-670462 byl přidáván rozpuštěný v DMSO o koncentraci 3 μM a jeho efekt byl analyzován ve 2 časových intervalech. Jako kontrola sloužila kultivace GLICO modelu pouze v rozpouštědle (DMSO). Takto připravené modely byly zafixovány po 14denní inkubaci (viz obrázky 30 a 31) a po 30denní inkubaci. Vzorke byly vizualizovány pomocí Light sheet fluorescenční mikroskopie (LSFM). Obdobně byl ke GLICO modelům přidán a analyzován také inhibitor MU o koncentraci 0,3 μM .



Obrázek 30: GLICO model z glioblastomové linie U87 po 14denní kultivaci s DMSO (kontrola) vizualizovaný pomocí LSFM v různých projekcích (použit mikroskop ZEISS Lightsheet 7, Z=50×), měřítko=1 mm

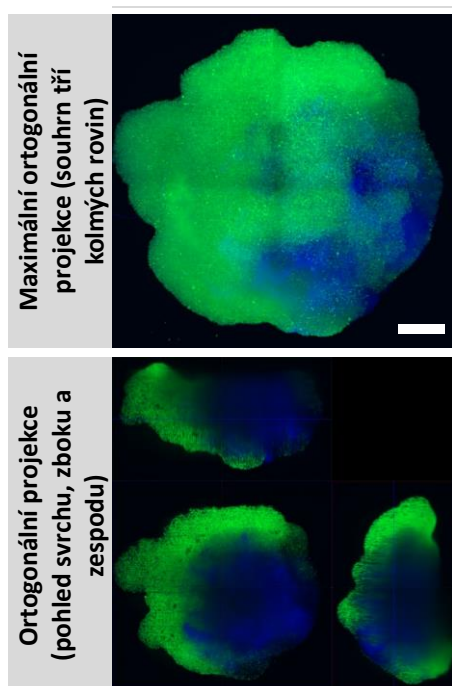


Obrázek 31: GLICO model z glioblastomové linie U87 po 14denní kultivaci s 3 μM inhibitorem PF-670462 vizualizovaný pomocí LSFM v různých projekcích (použit mikroskop ZEISS Lightsheet 7, Z=50×), měřítko=1 mm

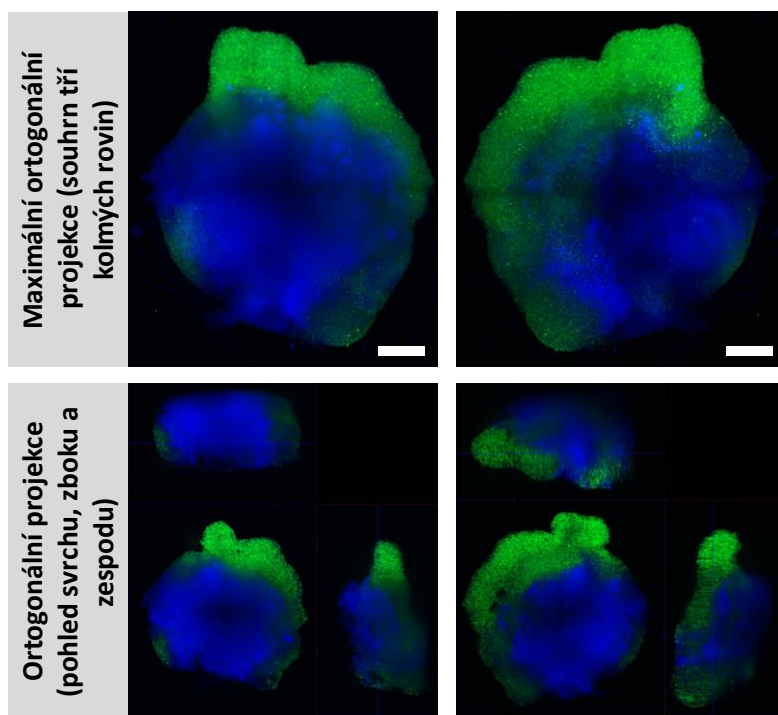


Obrázek 32: GLICO model z glioblastomové linie U87 po 14denní kultivaci s 0,3 μM inhibitorem MU vizualizovaný pomocí LSFM v různých projekcích (použit mikroskop ZEISS Lightsheet 7, $Z=50\times$), měřítko=1 mm

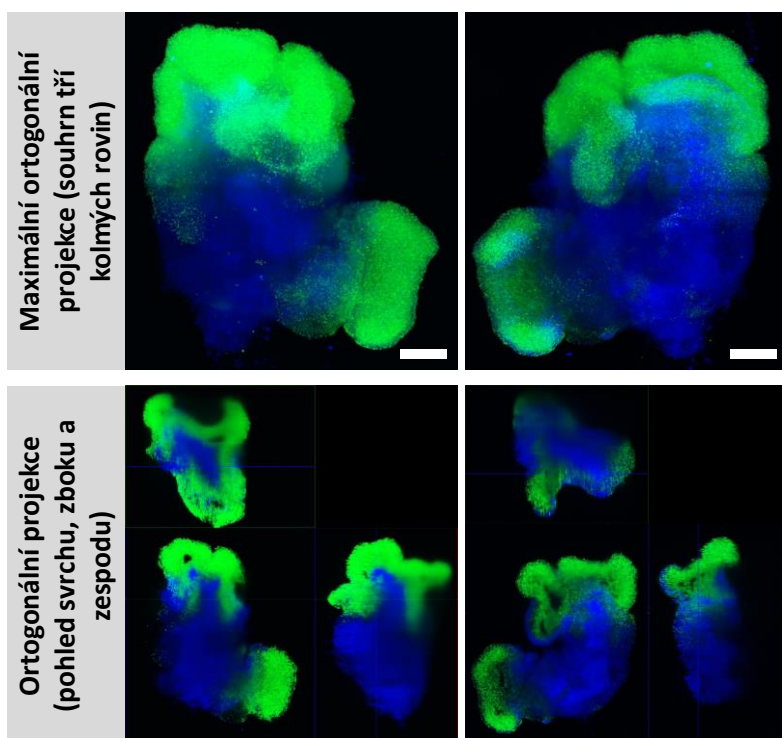
Obdobně jako v předchozím případě, obrázky 33, 34 a 35 ukazují GLICO modely po kultivaci v DMSO (kontrola), po kultivaci s inhibitorem PF-670462 o koncentraci 3 μM a po kultivaci s inhibitorem MU o koncentraci 0,3 μM vizualizované Light sheet fluorescenční mikroskopií, všechny po 30denní kultivaci.



Obrázek 33: GLICO model z glioblastomové linie U87 po 30denní kultivaci s DMSO (kontrola) vizualizovaný pomocí LSFM v různých projekcích (použit mikroskop ZEISS Lightsheet 7, $Z=50\times$), měřítko=1 mm



Obrázek 34: GLICO model z glioblastomové linie U87 po 30denní kultivaci s 3 μM inhibitorem PF-670462 vizualizovaný pomocí LSFM v různých projekcích (použit mikroskop ZEISS Lightsheet 7, $Z=50\times$), měřítko=1 mm



Obrázek 35: GLICO model z glioblastomové linie U87 po 30denní kultivaci s 0,3 μM inhibitorem MU vizualizovaný pomocí LSFM v různých projekcích (použit mikroskop ZEISS Lightsheet 7, $Z=50\times$), měřítko=1 mm

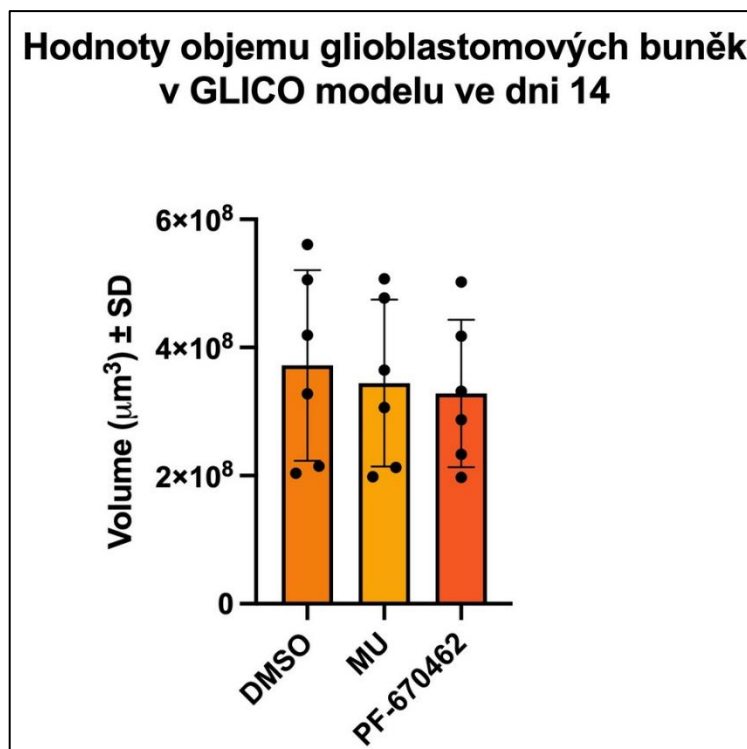
V Tabulce 4 jsou uvedeny průměrné hodnoty objemů glioblastomů v GLICO modelech (hodnoty byly vypočteny jako aritmetické průměry objemů u 3 nezávislých GLICO modelů). Tyto hodnoty, graficky znázorněné na obrázku 36, ukazují, že po 14denní kultivaci nepozorujeme velké rozdíly v množství glioblastomových buněk mezi kontrolou a použitými inhibitory. K výraznému zpomalení růstu glioblastomových buněk však jednoznačně došlo po 30denní kultivaci GLICO modelu s oběma inhibitory – viz graf na obrázku 37. Konkrétně, po kultivaci s inhibitory po dobu 30 dní dosáhl objem glioblastomových buněk zhruba poloviny v porovnání s kontrolou (v případě PF-670462 1,2 mm³, u MU 1,1 mm³ oproti 2,1 mm³ v případě kontroly).

Ve srovnání s kontrolním vzorkem bez inhibitoru tedy došlo ke snížení objemu nádoru na 59,14 % po 30denním působení inhibitoru PF-670462 a na 54,98 % po 30denním působení inhibitoru MU.

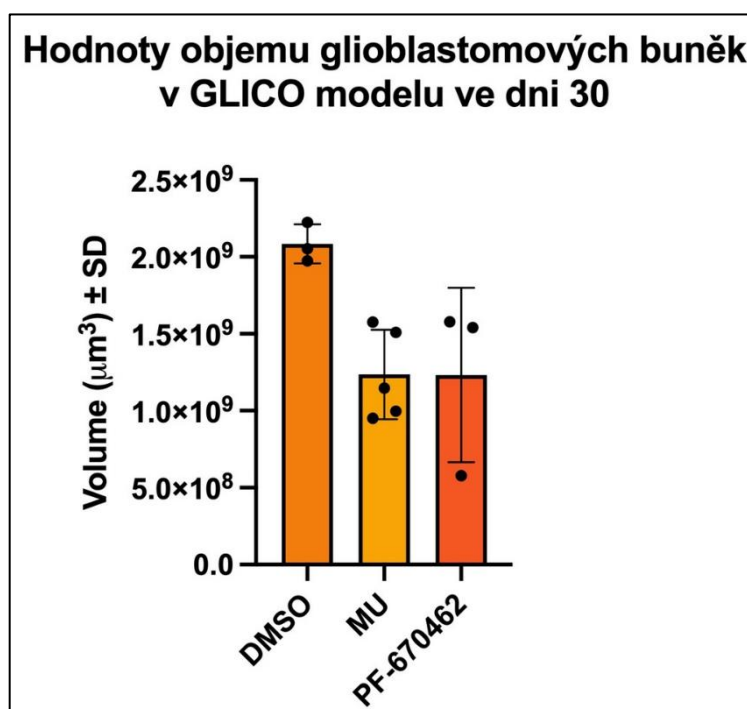
Nový MU inhibitor tedy prokázal účinnost ve zpomalení růstu nádoru a redukci jeho objemu ve srovnání s kontrolou, a navíc byl aplikován v řádově nižší koncentraci než inhibitor PF-670462. Jde tedy o výborný výsledek naznačující velký potenciál inhibitorů CK1 pro další testování pro léčbu pacientů s glioblastomy v budoucnu.

Doba inkubace	Inhibitor CK1	Objem glioblastomu v GLICO modelu (μm ³)
14 dní	Kontrola – DMSO	379 835 841
	PF-670462	300 735 517
	MU inhibitor	356 738 559
30 dní	Kontrola – DMSO	2 084 114 404
	PF-670462	1 232 529 461
	MU inhibitor	1 145 928 623

Tabulka 4: Hodnoty objemu glioblastomových buněk v GLICO modelu po inkubaci 14 a 30 dní s různými CK1 inhibitory



Obrázek 36: Srovnání celkového počtu glioblastomových buněk v GLICO modelu po 14denní kultivaci s DMSO a inhibitory, hodnoty udávají průměrný objem v μm^3 spolu s odpovídající směrodatnou odchylkou



Obrázek 37: Srovnání celkového počtu glioblastomových buněk v GLICO modelu po 30denní kultivaci s DMSO a inhibitory, hodnoty udávají průměrný objem v μm^3 spolu s odpovídající směrodatnou odchylkou

6 DISKUSE

Hlavním cílem mojí práce bylo **vytvoření trojrozměrných buněčných modelů glioblastomu**, nejčastějšího primárního nádoru mozku a jednoho z nejmalignějších mozkových nádorů i nádorových onemocnění vůbec, s průměrným přežitím léčených pacientů pouze 14 měsíců od stanovení diagnózy. Mortalita pacientů s glioblastomem je i přes stávající možnosti intenzivní léčby stále velmi vysoká (dle údajů z Národního onkologického registru UZIS) a šanci na zlepšení by mohlo přinést zavedení nových cílených biologických terapií, které by doplnily, případně časem i nahradily klasickou chemoterapii a radioterapii. Tento trend zavádění biologické léčby se už řadu let objevuje u mnoha dalších nádorů, avšak u nádorů mozku je zatím ve stádiu výzkumu.

Důvodem mohla být i absence vhodných buněčných modelů pro testování nových typů biologických terapií. Nový posun v této oblasti nepochybně znamenají **organoidy**, 3D buněčné struktury věrně napodobující tkáň určitého orgánu v lidském těle, které mohou vzniknout z kmenových buněk (embryonálních, dospělých nebo indukovaných). V případě studia glioblastomu jsme použili 3D organoidy vytvářející strukturu lidského mozku, jde tedy o jakési „minimozky ve zkumavce“, reálně spíše „minimozky“ v médiu na kultivační misce.

Ve své práci jsem se věnovala studiu **interakce nádorových buněk glioblastomu a zdravé mozkové tkáně**, konkrétně vývoji buněčného modelu interakce 3D sféroidů glioblastomových buněk a mozkových organoidů derivovaných z indukovaných pluripotentních kmenových buněk. Navazujícími cíli mé práce byla charakterizace a srovnání několika glioblastomových linií derivovaných z nádorů konkrétních pacientů a sledování jejich schopnosti migrace zdravou tkání mozkového organoidu. V rámci této práce **SOČ se podařilo poprvé vytvořit tři nové 3D modely glioblastomových nádorů** (z linií U3013, U3047 a U3118) a charakterizovat jejich vlastnosti z hlediska rychlosti migrace do zdravé tkáně mozku.

Vzniklé 3D modely glioblastomových nádorů jsme také **využili pro testování léčiv potenciálně použitelných pro terapii pacientů** a ke sledování jejich vlivu na chování glioblastomových buněk v rámci vytvořeného 3D buněčného modelu glioblastomu (tzv. **GLICO model**). Jako vhodné látky s potenciálním terapeutickým účinkem byly pro testování vybrány dva kinázové inhibitory, konkrétně **inhibitory kasein kinázy 1 (CK1)**. Tato kináza v buňce fosforyluje celou řadu proteinů, které jsou zapojeny do regulace buněčného cyklu, transkripce a translace nebo signální transdukce [50, 54]. Signální

dráhy regulované CK1 inhibitory se podílí na regulaci nádorového bujení a progresi růstu nádorů [55], a proto je inhibice této kinázy možným nástrojem pro zastavení či omezení expanze nádorových buněk. Inhibitory CK1 se již začaly testovat na myších modelech pro možnou léčbu Alzheimerovy choroby [56] nebo idiopatické plicní fibrózy [52] a velké naděje jsou do nich vkládány v souvislosti s léčbou některých typů leukémií i solidních nádorů [7].

V práci byly **analyzovány vlastnosti čtyř glioblastomových buněčných linií** U3013, U3047 a U3118 a linie U87, které vznikly kultivací primárních nádorových buněk konkrétních pacientů s mozkovým nádorem. Úvodní charakterizace linií na úrovni proteinů odhalila rozdíly v přítomnosti různých neurální markerů, což poukazuje na heterogenitu glioblastomových linií i v rámci jednoho subtypu glioblastomu. Významné rozdíly mezi glioblastomovými liniemi byly identifikovány také na úrovni transkriptomu. Tyto rozdíly mohou být podstatou různých vlastností těchto linií, včetně analyzované schopnosti migrace.

Pro zviditelnění glioblastomových buněk při mikroskopii vytvořeného GLICO modelu bylo nutno do nádorových buněk inkorporovat zelený fluorescenční protein (GFP). Vzhledem k různé účinnosti transfekce u buněčných linií byla kromě metody transfekce plazmidu pEGFP-C1 (u linií U3047 a U3118) použita také virová transdukce (u linie U3013). Po vnesení zeleného fluorescenčního proteinu do buněk byly vytvořeny glioblastomové sféroidy a ty byly inkubovány s mozkovými organoidy. Pomocí Light sheet fluorescenční mikroskopie jsme detekovali rozdílné vlastnosti jednotlivých buněčných linií ve schopnosti prorůstání do mozkového organoidu, měřené jednak počty migrujících buněk a jednak vzdáleností migrujících buněk od sféroidu.

Výsledky ukazují, že **nádorové buňky různých pacientů mají různou schopnost migrace do zdravé mozkové tkáně**, a tedy i rozdílnou agresivitu. Nejdále a nejvíce migrovala buněčná linie U3118, poté U3013 a nejméně U3047. S těmito výsledky jsme porovnali s přežitím pacientů, ze kterých byly tyto buňky získány (<http://www.hgcc.se/#>). Pacientka s nádorem, ze kterého byla vytvořena buněčná linie U3013, přežila jen 122 dní od diagnózy, zatímco pacientka s méně agresivními nádorovými buňkami U3047 se dožila 496 dní od diagnózy. U pacienta s buňkami linie U3118 není celkové dožití známo. Lze tedy uvažovat, zda by bylo možné takového analýzy migrace využít pro predikci agresivity onemocnění a doby dožití pacientů s nádory mozku.

Vyvinuté GLICO modely byly dále využity pro testování vlivu inhibitorů kasein kinázy1 jako potenciálních léčiv glioblastomových nádorů. Byly použity dva různé CK1

inhibitory, jeden z nich komerčně dostupný od firmy Pfizer (PF-670462) a druhý nově vyvinutý s označením MU. Oba tyto **inhibitory CK1 byly v naší práci poprvé testovány pro potenciální využití u nádorů mozku**. Naše analýzy ukázaly, že **oba použité inhibitory mají prokazatelný efekt na zpomalení růstu nádoru**. Ve srovnání s kontrolním vzorkem bez inhibitoru také došlo ke snížení objemu nádoru po 30denní kultivaci s GLICO modelem ve zdravé mozkové tkáni téměř na polovinu. Nový inhibitor MU dokonce dosáhl stejného efektu v redukci růstu nádoru při 10x nižší koncentraci ve srovnání s inhibitorem Pfizer.

V práci se nám tedy podařilo úspěšně vytvořit 3D model glioblastomu s využitím mozkového organoidu (GLICO model). Tuto technologii jsme využili pro analýzu buněčných linií glioblastomových buněk získaných od jednotlivých pacientů a charakterizovali jejich schopnost migrovat do zdravé mozkové tkáně organoidu. GLICO model jsme také využili pro testování nových potenciálních léčiv – inhibitorů CK1. Tyto výsledky ukazují **velký potenciál 3D organoidů pro vznik nádorových modelů a jejich možné využití pro testování léčiv**. Také přináší nové poznatky o možném využití CK1 inhibitorů pro léčbu glioblastomů.

ZÁVĚR

Práce nazvaná „*Využití 3D organoidů pro výzkum mozkových nádorů*“ si kladla za cíl studium možností aplikace trojrozměrných mozkových organoidů pro modelování nádoru glioblastomu, nejčastějšího primárního nádoru mozku a jednoho z neagresivnějších lidských nádorů s průměrným přežitím pacientů přibližně rok od diagnózy. Pro výzkum jsem použila mozkové organoidy derivované z indukovaných pluripotentních kmenových buněk, které si lze představit jako „minimozky ve zkumavce“. Ty jsem nechala interagovat se sféroidy vytvořenými z glioblastomových buněčných linií vzniklých z buněk konkrétních pacientů s diagnózou glioblastomu. Tento model mozkového nádoru, nazvaný GLICO, se v rámci této práce podařilo poprvé připravit ze 3 různých buněčných linií odvozených z nádorů pacientů s glioblastomy.

Jednotlivé buněčné linie jsem charakterizovala z hlediska genové exprese na úrovni RNA (analýza transkriptomu) a také jsem detekovala expresi klíčových proteinů pomocí Western blotu. Jednotlivé buněčné linie se lišily v expresi řady genů a proteinů, ale také ve schopnosti migrovat přes zdravou tkáň reprezentovanou mozkovým organoidem, což ukazuje rozdílné vlastnosti nádorů u jednotlivých pacientů související také s délkou jejich dožití.

Provedené analýzy ukazují, že GLICO modely vyvinuté pro jednotlivé pacienty mohou být výborným nástrojem pro testování individualizované protinádorové léčby. GLICO modely jsem použila pro testování nových cílených léčiv, konkrétně inhibitorů kasein kinázy 1, které jsou potenciálně použitelné pro léčbu pacientů s glioblastomy. Získané výsledky ukazují, že inhibitory CK1 mají po 30denní kultivaci s GLICO modelem významný vliv na zpomalení růstu nádoru a jeho velikost (objem nádoru byl po aplikaci jednotlivých inhibitorů výrazně menší a tvořil přibližně 55–59 % objemu kontrolního vzorku bez aplikace inhibitoru). Tyto poznatky jasně ukazují významné uplatnění organoidů pro vznik individualizovaných 3D modelů mozkových nádorů a také velký potenciál těchto nádorových modelů pro testování nových protinádorových léčiv.

SEZNAM LITERATURY

1. SATO, Toshiro; VRIES, Robert G.; SNIPPERT, Hugo J.; VAN DE WETERING, Marc; BARKER, Nick et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Online. *Nature*. 2009, roč. 459, č. 7244, s. 262-265. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nature07935>. [cit. 2024-02-11].
2. LANCASTER, Madeline A.; RENNER, Magdalena; MARTIN, Carol-Anne; WENZEL, Daniel; BICKNELL, Louise S. et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. Online. *Nature*. 2013, roč. 501, č. 7467, s. 373-379. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nature12517>. [cit. 2024-01-31].
3. THAKKAR, Jigisha P.; DOLECEK, Therese A.; HORBINSKI, Craig; OSTROM, Quinn T.; LIGHTNER, Donita D. et al. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. Online. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2014, roč. 23, č. 10, s. 1985-1996. ISSN 1055-9965. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275>. [cit. 2024-01-31].
4. OSTROM, Quinn T.; GITTLEMAN, Haley; XU, Jordan; KROMER, Courtney; WOLINSKY, Yingli et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. Online. *Neuro-Oncology*. 2016, roč. 18, č. suppl_5, s. v1-v75. ISSN 1523-5866. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/neuonc/now207>. [cit. 2024-01-31].
5. STUPP, Roger; HEGI, Monika E; MASON, Warren P; VAN DEN BENT, Martin J; TAPHOORN, Martin JB et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Online. *The Lancet Oncology*. 2009, roč. 10, č. 5, s. 459-466. ISSN 14702045. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7). [cit. 2024-01-31].
6. NĚMEC, Václav; KHIRSARIYA, Prashant; JANOVSÁ, Pavlína; MOYANO, Paula Martín; MAIER, Lukáš et al. Discovery of Potent and Exquisitely Selective Inhibitors of Kinase CK1 with Tunable Isoform Selectivity. Online. *Angewandte Chemie International Edition*. 2023, roč. 62, č. 11. ISSN 1433-7851. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/anie.202217532>. [cit. 2024-02-11].
7. JANOVSÁ, Pavlína; NORMANT, Emmanuel; MISKIN, Hari a BRYJA, Vítězslav. Targeting Casein Kinase 1 (CK1) in Hematological Cancers. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, roč. 21, č. 23. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21239026>. [cit. 2024-01-31].
8. WANG, Qianghu; HU, Baoli; HU, Xin; KIM, Hoon; SQUATRITO, Massimo et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. Online. *Cancer Cell*. 2017, roč. 32, č. 1, s. 42-56.e6. ISSN 15356108. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.06.003>. [cit. 2024-01-31].
9. POON, Michael T. C.; SUDLOW, Cathie L. M.; FIGUEROA, Jonine D. a BRENNAN, Paul M. Longer-term (≥ 2 years) survival in patients with glioblastoma in population-based studies pre- and post-2005: a systematic review and meta-

- analysis. Online. *Scientific Reports*. 2020, roč. 10, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68011-4>. [cit. 2024-01-31].
10. FEDOROVA, Veronika; POSPISILOVA, Veronika; VANOVA, Tereza; AMRUZ CERNA, Katerina; ABAFFY, Pavel; SEDMIK, Jiri; RASKA, Jan; VOCHYANOVA, Simona; MATUSOVA, Zuzana; HOUSEROVA, Jana; VALIHRACH, Lukas; HODNY, Zdenek a BOHACIAKOVA, Dasa. Glioblastoma and cerebral organoids: development and analysis of an *in vitro* model for glioblastoma migration. Online. *Molecular Oncology*. 2023, roč. 17, č. 4, s. 647–663. PMID 36744875. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13389>. [cit. 2024-01-31].
 11. OSZVALD, Ági; GÜRESIR, Erdem; SETZER, Matthias; VATTER, Hartmut; SENFT, Christian et al. Glioblastoma therapy in the elderly and the importance of the extent of resection regardless of age. Online. *Journal of Neurosurgery*. 2012, roč. 116, č. 2, s. 357-364. ISSN 0022-3085. Dostupné z: <https://doi.org/10.3171/2011.8.JNS102114>. [cit. 2024-01-31].
 12. DAVIS, Mary. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. Online. *Clinical Journal of Oncology Nursing*. 2016, roč. 20, č. 5, s. S2-S8. ISSN 1092-1095. Dostupné z: <https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8>. [cit. 2024-01-31].
 13. BRAGANZA, M. Z.; KITAHARA, C. M.; BERRINGTON DE GONZALEZ, A.; INSKIP, P. D.; JOHNSON, K. J. et al. Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: a systematic review. Online. *Neuro-Oncology*. 2012, roč. 14, č. 11, s. 1316-1324. ISSN 1522-8517. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos208>. [cit. 2024-01-31].
 14. HANIF, Farina; MUZAFFAR, Kanza; PERVEEN, Kahkashan; MALHI, Saima M. a SIMJEE, Shabana U. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. Online. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2017, roč. 18, č. 1, s. 3-9. PMID 28239999. Dostupné z: <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>. [cit. 2024-01-31].
 15. TAMIMI, AHMAD FALEH a JUWEID, MALIK. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. Online. In: DE VLEESCHOUWER, Steven (ed.). *Glioblastoma*. Codon Publications, 2017, s. 143-153. ISBN 9780994438126. Dostupné z: <https://doi.org/10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch8>. [cit. 2024-01-31].
 16. RINGEL, Florian; PAPE, Haiko; SABEL, Michael; KREX, Dietmar; BOCK, Hans Christoph et al. Clinical benefit from resection of recurrent glioblastomas: results of a multicenter study including 503 patients with recurrent glioblastomas undergoing surgical resection. Online. *Neuro-Oncology*. 2015, roč. 18, č. 1, s. 96-104. ISSN 1522-8517. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov145>. [cit. 2024-01-31].
 17. WU, Wei; KLOCKOW, Jessica L.; ZHANG, Michael; LAFORTUNE, Famyrah; CHANG, Edwin et al. Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. Online. *Pharmacological Research*. 2021, roč. 171. ISSN 10436618. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105780>. [cit. 2024-01-31].
 18. DYMOVA, Maya A.; KULIGINA, Elena V. a RICHTER, Vladimir A. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Glioblastoma. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 12. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22126385>. [cit. 2024-01-31].

19. JAIN, Kewal K. A Critical Overview of Targeted Therapies for Glioblastoma. Online. *Frontiers in Oncology*. 2018, roč. 8. ISSN 2234-943X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00419>. [cit. 2024-01-31].
20. POLIWODA, Salomon; NOOR, Nazir; DOWNS, Evan; SCHAAF, Amanda; CANTWELL, Abigail et al. Stem cells: a comprehensive review of origins and emerging clinical roles in medical practice. Online. *Orthopedic Reviews*. 2022, roč. 14, č. 3. ISSN 2035-8164. Dostupné z: <https://doi.org/10.52965/001c.37498>. [cit. 2024-02-02].
21. TABANSKY, Inna a STERN, Joel N. H. Basics of Stem Cell Biology as Applied to the Brain. In: PFAFF, Donald a CHRISTEN, Yves (ed.). Online. *Stem Cells in Neuroendocrinology*. Cham (CH): Springer. ISBN 978-3-319-41602-1. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK435799/> [cit. 2024-01-31].
22. VAZIN, Tandis a FREED, William J. Human embryonic stem cells: Derivation, culture, and differentiation. Online. *Restorative Neurology and Neuroscience*. 2010, roč. 28, č. 4, s. 589-603. ISSN 09226028. Dostupné z: <https://doi.org/10.3233/RNN-2010-0543>. [cit. 2024-01-31].
23. EVANS, M. J. a KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Online. *Nature*. 1981, roč. 292, č. 5819, s. 154-156. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/292154a0>. [cit. 2024-01-31].
24. MARTIN, G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981, roč. 78, č. 12, s. 7634-7638. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>. [cit. 2024-01-31].
25. THOMSON, James A.; ITSKOVITZ-ELDOR, Joseph; SHAPIRO, Sander S.; WAKNITZ, Michelle A.; SWIERGIEL, Jennifer J. et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. Online. *Science*. 1998, roč. 282, č. 5391, s. 1145-1147. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>. [cit. 2024-01-31].
26. REUBINOFF, Benjamin E.; PERA, Martin F.; FONG, Chui-Yee; TROUNSON, Alan a BONGSO, Ariff. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Online. *Nature Biotechnology*. 2000, roč. 18, č. 4, s. 399-404. ISSN 1087-0156. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/74447>. [cit. 2024-01-31].
27. YE, Lei; SWINGEN, Cory a ZHANG, Jianyi. Induced Pluripotent Stem Cells and Their Potential for Basic and Clinical Sciences. Online. *Current Cardiology Reviews*. 2013, roč. 9, č. 1, s. 63-72. ISSN 1573403X. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/157340313805076278>. [cit. 2024-01-31].
28. TAKAHASHI, Kazutoshi; TANABE, Koji; OHNUKI, Mari; NARITA, Megumi; ICHISAKA, Tomoko et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Online. *Cell*. 2007, roč. 131, č. 5, s. 861-872. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>. [cit. 2024-01-31].
29. YU, Junying; VODYANIK, Maxim A.; SMUGA-OTTO, Kim; ANTOSIEWICZ-BOURGET, Jessica; FRANE, Jennifer L. et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. Online. *Science*. 2007, roč. 318, č. 5858, s. 1917-1920. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.1151526>. [cit. 2024-01-31].

30. LOH, Yuin-Han; AGARWAL, Suneet; PARK, In-Hyun; URBACH, Achia; HUO, Hongguang et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. Online. *Blood*. 2009, roč. 113, č. 22, s. 5476-5479. ISSN 0006-4971. Dostupné z: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-204800>. [cit. 2024-01-31].
31. TAKENAKA, Chiemi; NISHISHITA, Naoki; TAKADA, Nozomi; JAKT, Lars Martin a KAWAMATA, Shin. Effective generation of iPS cells from CD34+ cord blood cells by inhibition of p53. Online. *Experimental Hematology*. 2010, roč. 38, č. 2, s. 154-162.e2. ISSN 0301472X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.11.003>. [cit. 2024-01-31].
32. PANOPOULOS, Athanasia D.; RUIZ, Sergio; YI, Fei; HERRERÍAS, Aída; BATCHELDER, Erika M. et al. Rapid and Highly Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Online. *PLoS ONE*. 2011, roč. 6, č. 5. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019743>. [cit. 2024-01-31].
33. MALJJAUSKAITE, Sigita; MULVIHILL, John J.E.; GRABRUCKER, Andreas M. a MCGOURTY, Kieran. iPSC-derived intestinal organoids and current 3D intestinal scaffolds. Online. In: *iPSCs in Tissue Engineering*. Elsevier, 2021, s. 293-327. ISBN 9780128238097. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823809-7.00011-6>. [cit. 2024-01-31].
34. XIE, Yuan; BERGSTRÖM, Tobias; JIANG, Yiwen; JOHANSSON, Patrik; MARINESCU, Voichita Dana et al. The Human Glioblastoma Cell Culture Resource: Validated Cell Models Representing All Molecular Subtypes. Online. *EBioMedicine*. 2015, roč. 2, č. 10, s. 1351-1363. ISSN 23523964. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.08.026>. [cit. 2024-01-31].
35. LEE, Jeongwu; KOTLIAROVA, Svetlana; KOTLIAROV, Yuri; LI, Aiguo; SU, Qin et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. Online. *Cancer Cell*. 2006, roč. 9, č. 5, s. 391-403. ISSN 15356108. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.030>. [cit. 2024-01-31].
36. LIN, Ruei-Zeng; CHOU, Li-Fang; CHIEN, Chi-Chen Michael a CHANG, Hwan-You. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and β 1-integrin. Online. *Cell and Tissue Research*. 2006, roč. 324, č. 3, s. 411-422. ISSN 0302-766X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0148-2>. [cit. 2024-01-31].
37. DURAND, Ralph E. a OLIVE, Peggy L. Resistance of tumor cells to chemo- and radiotherapy modulated by the three-dimensional architecture of solid tumors and spheroids. Online. In: *Cytometry: Part B. Methods in Cell Biology*. Elsevier, 2001, s. 211-233. ISBN 9780125441674. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(01\)64015-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(01)64015-9). [cit. 2024-01-31].
38. BIAŁKOWSKA, Kamila; KOMOROWSKI, Piotr; BRYSZEWSKA, Maria a MIŁOWSKA, Katarzyna. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, roč. 21, č. 17. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21176225>. [cit. 2024-01-31].

39. HUCH, Meritxell a KOO, Bon-Kyoung. Modeling mouse and human development using organoid cultures. Online. *Development*. 2015, roč. 142, č. 18, s. 3113-3125. ISSN 1477-9129. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/dev.118570>. [cit. 2024-02-09].
40. TANG, Xiao-Yan; WU, Shanshan; WANG, Da; CHU, Chu; HONG, Yuan et al. Human organoids in basic research and clinical applications. Online. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022, roč. 7, č. 1. ISSN 2059-3635. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01024-9>. [cit. 2024-01-31].
41. CORRÒ, Claudia; NOVELLASDEMUNT, Laura a LI, Vivian S.W. A brief history of organoids. Online. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2020, roč. 319, č. 1, s. C151-C165. ISSN 0363-6143. Dostupné z: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2020>. [cit. 2024-01-31]
42. VIVES, Joaquim a BATLLE-MORERA, Laura. The challenge of developing human 3D organoids into medicines. Online. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020, roč. 11, č. 1. ISSN 1757-6512. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13287-020-1586-1>. [cit. 2024-01-31].
43. EICHMÜLLER, Oliver L. a KNOBLICH, Juergen A. Human cerebral organoids — a new tool for clinical neurology research. Online. *Nature Reviews Neurology*. 2022, roč. 18, č. 11, s. 661-680. ISSN 1759-4758. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00723-9>. [cit. 2024-01-31].
44. LI, Yang; ZENG, Peng-Ming; WU, Jian a LUO, Zhen-Ge. Advances and Applications of Brain Organoids. Online. *Neuroscience Bulletin*. 2023, roč. 39, č. 11, s. 1703-1716. ISSN 1673-7067. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12264-023-01065-2>. [cit. 2024-01-31].
45. OGAWA, Junko; PAO, Gerald M.; SHOKHIREV, Maxim N. a VERMA, Inder M. Glioblastoma Model Using Human Cerebral Organoids. Online. *Cell Reports*. 2018, roč. 23, č. 4, s. 1220-1229. ISSN 22111247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.105>. [cit. 2024-01-31].
46. MARIAPPAN, Aruljothi; GORANCI-BUZHALA, Gladiola; RICCI-VITIANI, Lucia; PALLINI, Roberto a GOPALAKRISHNAN, Jay. Trends and challenges in modeling glioma using 3D human brain organoids. Online. *Cell Death & Differentiation*. 2021, roč. 28, č. 1, s. 15-23. ISSN 1350-9047. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00679-7>. [cit. 2024-01-31].
47. PINE, Allison R.; CIRIGLIANO, Stefano M.; NICHOLSON, James G.; HU, Yang; LINKOUS, Amanda et al. Tumor Microenvironment Is Critical for the Maintenance of Cellular States Found in Primary Glioblastomas. Online. *Cancer Discovery*. 2020, roč. 10, č. 7, s. 964-979. ISSN 2159-8274. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0057>. [cit. 2024-01-31].
48. LINKOUS, Amanda; BALAMATSIAS, Demosthenes; SNUDERL, Matija; EDWARDS, Lincoln; MIYAGUCHI, Ken et al. Modeling Patient-Derived Glioblastoma with Cerebral Organoids. Online. *Cell Reports*. 2019, roč. 26, č. 12, s. 3203-3211.e5. ISSN 22111247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.063>. [cit. 2024-01-31].
49. VANOVA, Tereza; SEDMIK, Jiri; RASKA, Jan; AMRUZ CERNA, Katerina; TAUS, Petr et al. Cerebral organoids derived from patients with Alzheimer's disease with PSEN1/2 mutations have defective tissue patterning and altered development. Online.

- Cell Reports*. 2023, roč. 42, č. 11. ISSN 2211247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113310>. [cit. 2024-02-09].
50. KNIPPSCHILD, Uwe; GOCHT, Andreas; WOLFF, Sonja; HUBER, Nadine; LÖHLER, Jürgen et al. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. Online. *Cellular Signalling*. 2005, roč. 17, č. 6, s. 675-689. ISSN 08986568. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.12.011>. [cit. 2024-01-31].
51. GAO, Hua-Song; LIN, She-Yu; HAN, Xi; XU, Hong-Zhi; GAO, Yi-Lu et al. Casein kinase 1 (CK1) promotes the proliferation and metastasis of glioma cells via the phosphatidylinositol 3 kinase-matrix metalloproteinase 2 (AKT-MMP2) pathway. Online. *Annals of Translational Medicine*. 2021, roč. 9, č. 8, s. 659-659. ISSN 23055839. Dostupné z: <https://doi.org/10.21037/atm-21-935>. [cit. 2024-01-31].
52. KEENAN, Christine R.; LANGENBACH, Shenna Y.; JATIVA, Fernando; HARRIS, Trudi; LI, Meina et al. Casein Kinase 1 δ/ϵ Inhibitor, PF670462 Attenuates the Fibrogenic Effects of Transforming Growth Factor- β in Pulmonary Fibrosis. Online. *Frontiers in Pharmacology*. 2018, roč. 9. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00738>. [cit. 2024-01-31].
53. ZHANG, Ying; DUBE, Collin; GIBERT, Myron; CRUICKSHANKS, Nichola; WANG, Baomin et al. The p53 Pathway in Glioblastoma. Online. *Cancers*. 2018, roč. 10, č. 9. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers10090297>. [cit. 2024-02-15].
54. SCHITTEK, Birgit a SINNBERG, Tobias. Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis. Online. *Molecular Cancer*. 2014, roč. 13, č. 1. ISSN 1476-4598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-231>. [cit. 2024-01-31].
55. JIANG, Shaojie; ZHANG, Miaofeng; SUN, Jihong a YANG, Xiaoming. Casein kinase 1 α : biological mechanisms and theranostic potential. Online. *Cell Communication and Signaling*. 2018, roč. 16, č. 1. ISSN 1478-811X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0236-z>. [cit. 2024-01-31].
56. SUNDARAM, S.; NAGARAJ, S.; MAHONEY, H.; PORTUGUES, A.; LI, W. et al. Inhibition of casein kinase 1 δ/ϵ improves cognitive-affective behavior and reduces amyloid load in the APP-PS1 mouse model of Alzheimer's disease. Online. *Scientific Reports*. 2019, roč. 9, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50197-x>. [cit. 2024-01-31].

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Glioblastoma multiforme.....	13
Obrázek 2: Celková zátěž nádory mozku v ČR.....	14
Obrázek 3: Celková zátěž glioblastomy v ČR.....	14
Obrázek 4: Extrakce embryonálních kmenových buněk z 5–6 dní starého embrya – blastocysty.....	17
Obrázek 5: Příprava iPSCs buněčných linií.....	18
Obrázek 6: Hlavní zdroje multipotentních kmenových buněk v lidském těle.....	19
Obrázek 7: Příklady sféroidů z buněčných linií HLaC78, HSmC78, Cal27, PE/CA-PJ41, HN0210, SCC4, FADU, Hep2, Hep2-Tax, HPaCT9, HLaC79 a HLaC79.....	21
Obrázek 8: Příprava různých typů organoidů.....	22
Obrázek 9: Tvorba mozkového organoidu.....	23
Obrázek 10: Možnosti využití mozkových organoidů.....	23
Obrázek 11: Glioblastomová linie U87.....	25
Obrázek 12: Glioblastomová linie U3013.....	26
Obrázek 13: Glioblastomová linie U3047.....	26
Obrázek 14: Glioblastomová linie U3118.....	26
Obrázek 15: iPSCs linie MUNli008.....	27
Obrázek 16: Obecné schéma transfekce buňky pomocí elektroporace.....	34
Obrázek 17: Obecné schéma adenovirové transdukce buňky.....	35
Obrázek 18: Chemická struktura inhibitoru PF-670462.....	39
Obrázek 19: Analýza exprese různých neurálních markerů v glioblastomových liniích U87, U3118, U3013 a U3047.....	41
Obrázek 20: Výsledky kontroly kvality vzorků RNA – výstupy z přístroje TapeStation.....	42
Obrázek 21: Počty čtení přiřazených ke kódujícím genům pro 4 analyzované buněčné linie před normalizací („raw counts“) a po normalizaci („normalized counts“).	43
Obrázek 22: PCA vizualizace diferenciální exprese všech 12 sekvenovaných vzorků.....	44

Obrázek 23: Tepelná mapa („heat-map“) výsledků shlukové analýzy buněčných linií podle jejich genové exprese.....	45
Obrázek 24: Tepelná mapa („heat-map“) výsledků shlukové analýzy 3 proneurálních buněčných linií ve srovnání s linií U87 podle jejich rozdílné genové exprese.....	46
Obrázek 25: Fluorescenčně označené glioblastomové linie U87 (A), U3013 (B), U3047 (C), U3118 (D) (použit mikroskop ZEISS LSM 800, Z=100x), měřítko=100 μ m.....	47
Obrázek 26: GLICO modely vizualizované pomocí Light sheet fluorescenční mikroskopie (A) U87 (B) U3013, (C) U3118, (D) U3047.....	49
Obrázek 27: Migrace glioblastomových linií do mozkového organoidu (A) U3013 (B) U3047 a (C) U3118 (Light sheet fluorescenční mikroskopie).....	50
Obrázek 28: Grafy počtu migrujících glioblastomových buněk do mozkového organoidu a srovnání vzdálenosti migrujících glioblastomových buněk od sféroidu.....	51
Obrázek 29: Testování vhodné koncentrace inhibitoru PF-670462 na přidání ke GLICO modelům z glioblastomové linie U87 (použit mikroskop LEICA, Z=50x).....	52
Obrázek 30: GLICO model z glioblastomové linie U87 po 14denní kultivaci s DMSO (kontrola) vizualizovaný pomocí LSFM v různých projekcích	53
Obrázek 31: GLICO model z glioblastomové linie U87 po 14denní kultivaci s 3 μ M inhibitorem PF-670462 vizualizovaný pomocí LSFM v různých projekcích	53
Obrázek 32: GLICO model z glioblastomové linie U87 po 14denní kultivaci s 0,3 μ M inhibitorem MU vizualizovaný pomocí LSFM v různých projekcích.....	54
Obrázek 33: GLICO model z glioblastomové linie U87 po 30denní kultivaci s DMSO (kontrola) vizualizovaný pomocí LSFM v různých projekcích.....	54
Obrázek 34: GLICO model z glioblastomové linie U87 po 30denní kultivaci s 3 μ M inhibitorem PF-670462 vizualizovaný pomocí LSFM v různých projekcích	55
Obrázek 35: GLICO model z glioblastomové linie U87 po 30denní kultivaci s 0,3 μ M inhibitorem MU vizualizovaný pomocí LSFM v různých projekcích	55
Obrázek 36: Srovnání celkového počtu glioblastomových buněk v GLICO modelu po 14denní kultivaci s DMSO a inhibitory.....	57
Obrázek 37: Srovnání celkového počtu glioblastomových buněk v GLICO modelu po 30denní kultivaci s DMSO a inhibitory.....	57

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení 10% separačního gelu a zaostřujícího gelu pro SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézu.....	32
Tabulka 2: Složení elektroforetického a transferového pufru používaných při Western Blotu.....	32
Tabulka 3: Použité protilátky při Western blotu.....	33
Tabulka 4: Hodnoty objemu glioblastomových buněk v GLICO modelu po inkubaci 14 a 30 dní s různými CK1 inhibitory.....	56