

## IDENTIFIKACE BUNĚČNÝCH CÍLŮ AKTIVNÍCH LÁTEK POMOCÍ MIKROSKOPICKÝCH METOD A FLUORESCENČNÍCH SOND

JARMILA STANKOVÁ, MARIÁN HAJDÚCH a PETR DŽUBÁK

Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc 9, Česká republika  
jarmila.stankova@upol.cz a petr.dzubak@upol.cz

Došlo 3.11.23, přijato 3.1.24.

Identifikace buněčných cílů aktivních látek má zásadní význam pro optimalizaci léčiv a minimalizaci jejich nežádoucích vedlejších účinků. Komplexní povaha biologických systémů ztěžuje tuto identifikaci, ale mikroskopické metody, zejména fenotypové testování, reprezentované metodou „Cell Painting“, představují cenný nástroj pro pochopení vlivu látek na úrovni buněk a organel. Tyto metody umožňují rychlé testování rozsáhlých knihoven látek a nabízejí unikátní pohled na mechanismus jejich účinku pozorováním chování buněk, pomocí hodnocení jejich morfologie, pohyblivosti, dělení a migrace. Mikroskopie živých buněk čelí výzvám, jako je fototoxicita, což vyžaduje pečlivý výběr fluorescenčních značek a optimalizaci podmínek. Mezi syntetickými fluorescenčními sondami pro mikroskopii živých buněk vynikají BODIPY barviva se svou syntetickou univerzálností a fotofyzikálními vlastnostmi, které zajišťují minimální poškození vzorku během biozobrazování.

Klíčová slova: buněčný cíl, mechanismus účinku, mikroskopie, fluorofory, BODIPY

### Obsah

1. Úvod
2. Fenotypové testování
  - 2.1. Fluorescenční sondy používané při fenotypovém testování
3. Mikroskopie živých buněk
  - 3.1. Fluorescenční sondy vhodné pro mikroskopii živých buněk
4. Závěr

### 1. Úvod

Objevení molekulárního cíle aktivních látek je „svatým grálem“ a mnohdy zásadním krokem ve vývoji léčiv, přičemž v důsledku vede k pochopení jejich mechanismu účinku. Tyto informace jsou nezbytné pro optimalizaci účinnosti léků a minimalizaci nežádoucích vedlejších účinků. Znalost cíle umožňuje lepší terapeutické zacílení léčiva, optimalizaci klinických studií a vede k ideálu personalizované medicíny. Kromě toho, identifikace nových molekulárních cílů pro existující léčiva může vést k jejich použití v nových terapeutických indikacích, a to v mnohem kratším časovém horizontu než při zcela novém vývoji léčiva. Zacílením vývoje léčiva také dochází ke zefektivnění celého procesu, a tím i ke snížení nákladů na čas a zdroje potřebné k uvedení konkrétního léku na trh<sup>1</sup>. Do

vývoje léčiv se přitom investují nemalé prostředky. Bez ohledu na dostupné finanční zdroje může být identifikace molekulárního cíle v kontextu vývoje léčiv náročná z několika objektivních důvodů. Biologické systémy jsou složité a často zahrnují síť vzájemně propojených drah a molekul. Potenciální lék může v různé míře, s různou specificitou a afinitou, interagovat s více cíli, jak žádoucími, tak i nežádoucími (off-target), v různých tkáních nebo buněčných kontextech. Mnoho cílů jsou proteiny, které fungují jako součást větších komplexů nebo nepřímo interagují s jinými proteiny v buněčných drahách. Některá léčiva fungují prostřednictvím nekonvenčních mechanismů, jako je modulace konformace proteinů a interakce s DNA a RNA, jejichž identifikace pomocí tradičních metod může být náročná<sup>2</sup>. Mikroskopické metody, které jsou klíčové pro zobrazování buněk a subcelulárních organel, hrají zásadní roli při identifikaci cílů biologicky aktivních látek. Tyto metody, včetně technik jako fluorescenční a elektronová mikroskopie, jsou neocenitelnými nástroji pro studium účinků látek na buněčné struktury a organel<sup>3</sup>. Tyto látky totiž mohou vyvolat velmi specifické změny jak na buněčné úrovni, tak na úrovni organel. Mohou například způsobit kondenzaci chromatinu a fragmentaci jádra, změnit distribuci cytoplasmy a vést k nabobtnání a přestavbě mitochondrií. Podle těchto změn můžeme usuzovat na specifický mechanismus účinku látky<sup>4</sup>.

## 2. Fenotypové testování

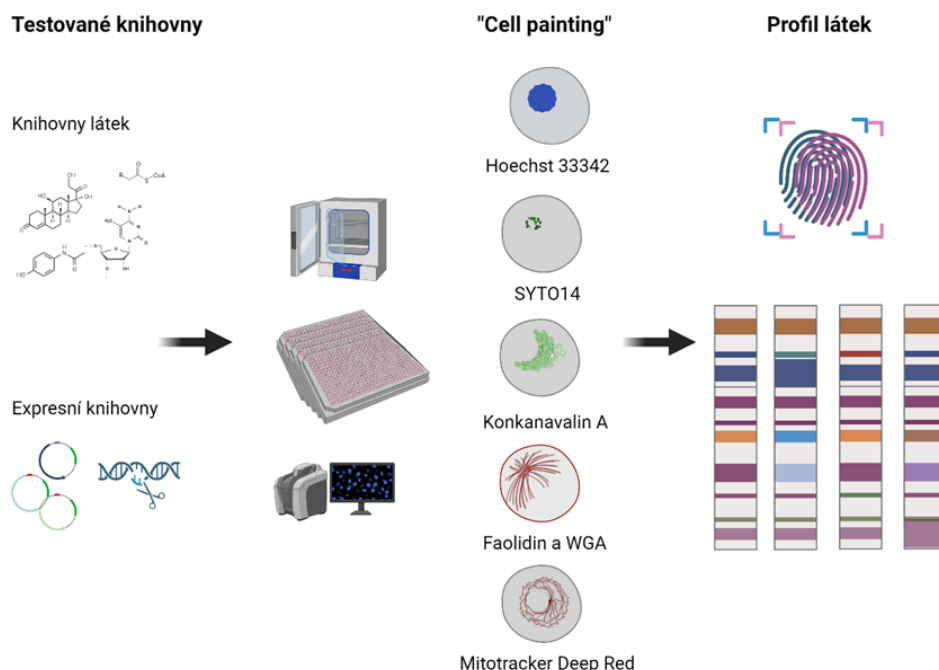
Velmi zajímavým přístupem pro hledání mechanismu účinku a molekulárního cíle je fenotypové testování, které analyzuje sloučeniny z hlediska jejich účinku na fenotyp, a to jak na buněčné úrovni, tak i na úrovni celého organismu<sup>5</sup>. Takové testování často začíná výběrem vhodného buněčného modelu a testovacího systému. Většinou jsou potom buňky vystaveny knihovně malých molekul, přírodních produktů nebo jiných aktivních látek a potom pozorujeme a analyzujeme změny jejich fenotypu. Fenotypem se rozumí změny buněčné morfologie, růstu, expresních vzorů, nebo přítomnost specifických markerů<sup>6</sup>. Schéma fenotypového testování je uvedeno na obr. 1.

Při zapojení platformy pro vysokopropustné testování do fenotypového testování<sup>7</sup> (High-Throughput Screening, HTS) můžeme v relativně krátkém čase sledovat/detekovat účinek velkého souboru potenciálních sloučenin (knihoven), přičemž testy probíhají v miniaturizovaných podmínkách a automatických režimech. Jedním z nejrychlejších a nejméně invazivních způsobů fenotypového hodnocení stavu buněk je automatická mikroskopie<sup>4,8</sup>. Celý proces může být robotizován a produkovat obrovské množství mikroskopických obrazů buněk ovlivněných konkrétními látkami v různých časových bodech. Takový přístup poskytuje velmi komplexní data pro identifikaci cíle. Stávající metody jsou obvykle založeny na fluorescenční mikroskopii, která poskytuje velmi přehledné

snímky, které lze snadno segmentovat a automaticky vyhodnocovat relativně jednoduchými metodami<sup>9</sup>.

Nejrozšířenější fenotypovou HTS metodou je „Cell Painting“<sup>10</sup> vyvinutý výzkumnou skupinou Anne Carpenterové v roce 2016. Tato metoda je založena na barvení buněk kombinací specifických fluorescenčních barviv pro zachycení detailních informací o různých buněčných strukturách a procesech. Takový multiparametrický přístup poskytuje holistický pohled na morfologii a funkci buňky. Po ošetření buněk testovanými látkami dochází k jejich fixaci a barvení. V originálním protokolu je fluorescenčně barveno jádro a jadérko, cytoskelet, endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie a plasmatická membrána. Výběr jiného setu fluorescenčních sond dle požadavku na testování určitého cíle je možný, ale pak přicházíme o výhodu porovnatelnosti s původními daty. Na získaných snímcích se následně provádí výpočetní analýza, která generuje kvantitativní data číselně vyjadřující různé obrazové charakteristiky analyzovaných buněk, se kterými je možné dále pracovat. Výstupem je sestavení pomyslných otisků prstů specifických pro testované látky, tedy jejich profilů, které se dále porovnávají s profily získanými testováním standardů nebo látek s požadovanými vlastnostmi. Pokud je v nich významná shoda, můžeme usuzovat na společný mechanismus biologického účinku.

Nedávným příkladem úspěšného fenotypového testování je studie Baillache a spol.<sup>11</sup>, kde byly identifikovány



Obr. 1. Schéma fenotypového testování

pyrazolopyrimidiny, které selektivně inhibují CSF-1R kinasu u glioblastomových buněk.

### 2.1. Fluorescenční sondy používané při fenotypovém testování

Fluorescenční sondy jsou relativně malé molekuly, které obsahují skupiny detekovatelné na základě vnitřní chemické vlastnosti – fluorescence. Fluorescenční molekuly mají schopnost absorbovat energii fotonů v jedné vlnové délce a následně ji vyzářit v jiné vlnové délce. Dále sondy obsahují reaktivní skupinu schopnou se vázat na funkční biomolekuly. Používané fluorescenční sondy by měly dosahovat vysokých kvantových výtěžků a také mít dostatečně posunuté emisní spektrum, aby byla zajištěna izolace detekovaného signálu<sup>12</sup>. Většina používaných fluoroforů obsahuje systém aromatických kruhů a přítomnost donátorových skupin nejčastěji v *ortho*- a *para*-polohách může zvýšit kvantový výtěžek. Naopak přítomnost elektronegativní skupiny kvantový výtěžek snižuje. Dalším potenciálním substituentem s velkým vlivem na fluorescenci jsou těžké atomy. Aromatické kruhy obsahující těžké atomy mají typicky nižší kvantový výtěžek<sup>13</sup>. Nejčastěji používané fluorescenční struktury jsou ve vodě rozpustné deriváty cyaninu, fluoresceinu, rhodaminu a kumarinu<sup>14</sup>. Fluorescenční sondy jsou klíčové pro fenotypové testování a mohou být vhodné k barvení fixovaných buněk s permeabilizovanou membránou<sup>15</sup>, nebo je možné použít kombinovaný přístup, kdy se barví živé buňky, které jsou následně fixovány a dobarvovány dalšími barvivy, které by bez fixace nepronikly buněčnou membránou<sup>16</sup>. Důležitou součástí původního protokolu dle Carpenterové<sup>10</sup> je použití specifických fluorescenčních barviv, jejichž charakteristiky jsou podrobněji popsány níže a shrnuty v tab. I.

**Hoechst 33342** patří do rodiny bisbenzimidových barviv a používá se k značení buněčných jader. Specificky se váže na DNA, zejména do míst bohatých na adenin a thymin<sup>17</sup>. Název „Hoechst“ pochází od německého výrobce barviv Hoechst AG, který tato barviva původně vyvinul a prodával. Hoechst 33342 proniká přes buněčnou

a jadernou membránu, což znamená, že může snadno proniknout i do živých buněk a díky tomu je použitelný pro barvení jader fixovaných i živých buněk. Kromě mikroskopických metod ho lze použít i pro průtokovou cytometrii<sup>18</sup>.

**Konkanavalin A (ConA)** je lektin, tedy typ proteinu, který se může vázat na specifické sacharidové struktury. ConA pochází ze semen tropické bobovité rostliny *Canavalia ensiformis* a je široce používán v buněčné biologii díky své schopnosti selektivně se vázat na  $\alpha$ -mannosylové a  $\alpha$ -glukosylové zbytky na glykoproteinech a glykolipidech, včetně buněčných membrán endoplasmatického retikula<sup>19</sup>. Tato vazba je závislá na iontech  $\text{Ca}^{2+}$  a vazebné místo je na každé ze čtyř podjednotek tetrameru tohoto lektinu. ConA je aktivní mitogen a v buněčné a molekulární biologii se používá ke stimulaci lymfocytů<sup>20</sup>. Může být konjugován s fluorofory a poté se používá pro metody fluorescenční mikroskopie<sup>21</sup> nebo průtokové cytometrie<sup>22</sup>, kdy značí buňky na základě složení povrchových glykoproteinů. ConA se také používá v biochemických purifikačních a chromatografických technikách<sup>23</sup>, může být imobilizován na pevných nosičích a použit k separování a izolaci glykoproteinů nebo glykolipidů z komplexních směsí. Vazebná afinita lektinu může být ovlivněna různými typy glykosylace přítomnými na buněčném povrchu.

**SYTO 14** patří do rodiny barviv SYTO, což jsou buněčná permeabilní barviva, vázající se na nukleové kyseliny. Tato barviva se často používají k detekci apoptózy u živých buněk, protože jsou netoxická. Při snížené fluorescenci sledujeme rozklad nukleových kyselin a detekce mikroparticulí značí poškození membrány u aktivovaných a apoptických buněk<sup>24–26</sup>. SYTO 14 barví konkrétně RNA a může být použito jak ve fluorescenční mikroskopii<sup>25</sup>, tak v průtokové cytometrii<sup>26</sup>.

**Faloidin** je cyklický heptapeptid patřící do skupiny falotoxinů, který pochází ze smrtelně jedovaté houby muchomůrky zelené (*Amanita phalloides*). Faloidin se selektivně váže na filamentární aktin (F-aktin), hlavní složku eukaryotického cytoskeletu. Po navázání zabraňuje depolymeraci aktinových filamentů a stabilizuje jejich strukturu<sup>27</sup>. Faloidin je často konjugován s fluorofory (jako jsou barviva FITC nebo AlexaFluor) za účelem vizualizace

Tabulka I  
Fluorescenční barviva používaná pro „cell painting assay“<sup>10</sup>

Barvivo	Filtr pro excitaci [nm]	BP Filtr pro emisi [nm]	Buněčná struktura
Hoechst 33342	405	447/60	DNA, značení buněčných jader
ConA Konjugát s AlexaFluor 488	488	536/40	endoplazmatické retikulum
SYTO 14	488	593/40	jadérka, cytoplazmatická RNA
Faloidin Konjugát s AlexaFluor 568	561	624/40	F-aktin a cytoskelet
WGA Konjugát s AlexaFluor 555	561	624/40	Golgiho aparát a cytoplazmatická membrána
Mitotracker Deep Red	640	692/40	mitochondrie

aktinového cytoskeletu pomocí fluorescenční mikroskopie<sup>28</sup>. Zatímco faloidin se typicky používá ve fixovaných buňkách, existují deriváty, které byly vyvinuty pro zobrazování živých buněk<sup>29</sup>. Tyto deriváty jsou méně toxické a umožňují pozorovat dynamické změny v aktinovém cytoskeletu v průběhu času. Kromě mikroskopie lze faloidin použít v průtokové cytometrii ke kvantifikaci a analýze obsahu F-aktinu v buňkách<sup>30</sup>.

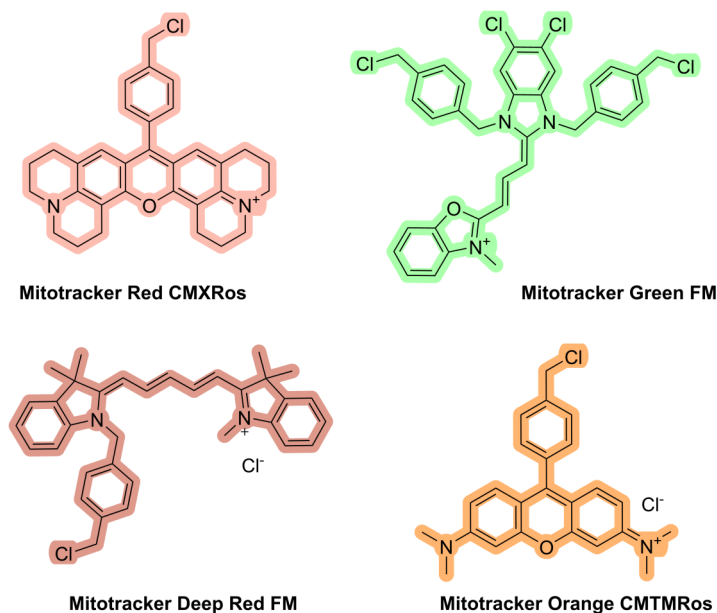
**WGA** (Wheat Germ Agglutinin) pochází z pšeničných klíčků a je široce používán v biologickém a biochemickém výzkumu pro svou schopnost selektivně se vázat na rezidua *N*-acetylglukosaminu a kyseliny sialové na glykoproteinech a glykolipidech<sup>31</sup>. Pokud je konjugován s fluoroforem, může být použit k vizualizaci a studiu buněčné membrány ve fluorescenční mikroskopii<sup>32</sup>. Dále ho lze použít v průtokové cytometrii k selektivnímu značení a třídění buněk na základě obsahu povrchových glykoproteinů<sup>33</sup>. WGA se používá v biochemických a molekulárně biologických technikách pro afinitní čištění glykoproteinů<sup>34</sup>. Využitím jeho vazebné specifity lze izolovat glykoproteiny pro další analýzu<sup>35</sup>.

**Mitotracker** barviva jsou skupinou fluorescenčních sond používaných v buněčné biologii k značení a sledování mitochondrií v živých buňkách, přičemž některá z nich jsou stabilní i po jejich fixaci<sup>36</sup>. Tato barviva jsou užitečná ke studiu morfologie, dynamiky a funkce mitochondrií prostřednictvím různých zobrazovacích technik, jako je fluorescenční mikroskopie a průtoková cytometrie<sup>37</sup>. Mitotracker barviva jsou navržena tak, aby se selektivně akumulovala v aktivních mitochondriích. Jejich selektivní akumulace je závislá na potenciálu mitochondriální mem-

brány a tato vlastnost je neocenitelná pro hodnocení změn v mitochondriálním membránovém potenciálu, který je klíčovým indikátorem mitochondriální funkce<sup>38</sup>. Mitotracker barviva díky své dostupnosti v různých barvách (např. červená – Mitotracker Red CMXRos, zelená – Mitotracker Green FM, tmavě červená – Mitotracker Deep Red FM a oranžová – Mitotracker Orange CMTMRos; chemické struktury zobrazeny na obr. 2) poskytují vysokou flexibilitu při přípravě vícebarevných fluorescenčních experimentů.

### 3. Mikroskopie živých buněk

Zobrazení živých buněk je zásadní pro studium dynamických procesů v reálném čase, což umožňuje detailní sledování účinků látky na chování buněk, včetně vlivu na buněčnou motilitu, dělení, migraci, změny tvaru a organel. Některé aktivní látky mají rychlé a dynamické účinky na buněčné procesy<sup>39</sup>. Časoběrná mikroskopie nabízí možnost dlouhodobého sledování, čímž odhaluje časovou dynamiku buněčných změn, funkce a morfologie subcelulárních struktur vyvolaných působením studované látky. Na druhou stranu má mikroskopie živých buněk několik výzev, mezi které patří fototoxicita a díky tomu i omezení frekvence snímání v čase. Proto je důležité věnovat pozornost volbě vhodných fluorescenčních značek a optimalizaci experimentálních podmínek<sup>40</sup>. Studium kolokalizace látky s buněčnými složkami nebo organelami, případně proteinovými komplexy pomocí FRET (Försterův rezonanční přenos energie) techniky, může poskytnout cenné informace o potenciálních interakcích s cíli<sup>41</sup>. Označením



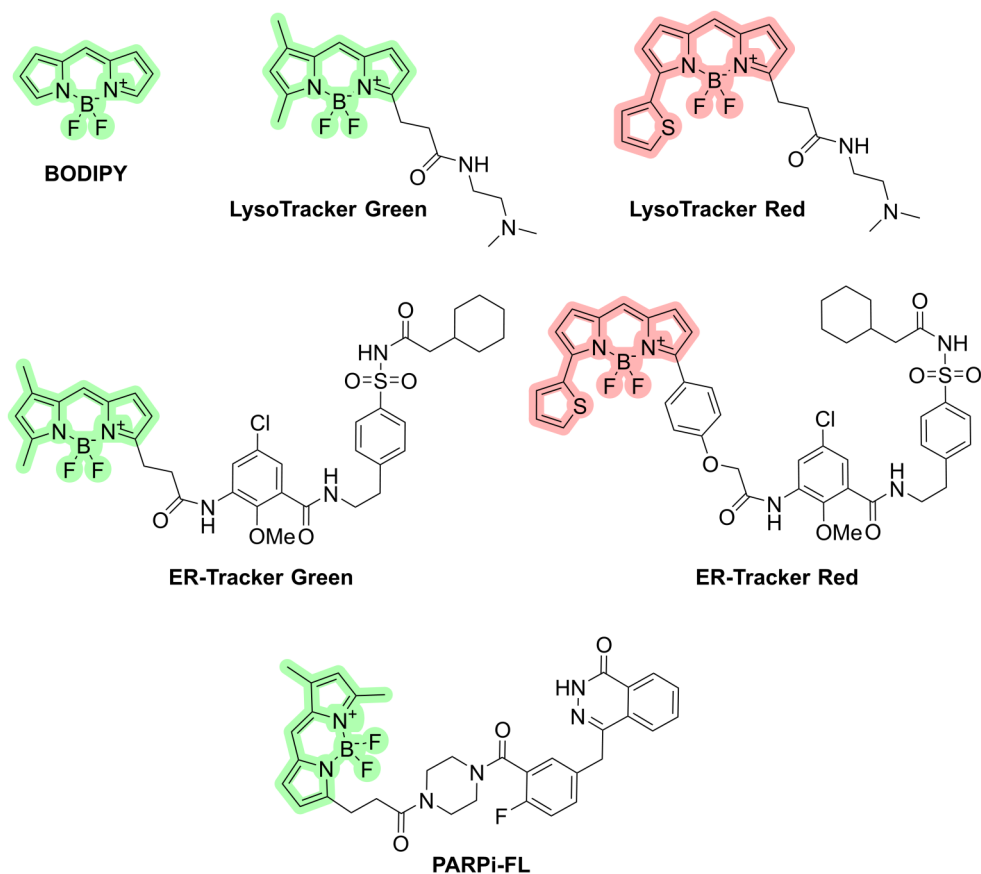
Obr. 2. Molekulární struktury Mitotracker barviv

látky a potenciálního cílového proteinu fluorofory, z nichž jeden je aktivovaný pouze při přenosu energie, můžeme při změně ve fluorescenčním signálu usuzovat na jejich těsnou blízkost, a tedy vzájemnou interakci<sup>42</sup>.

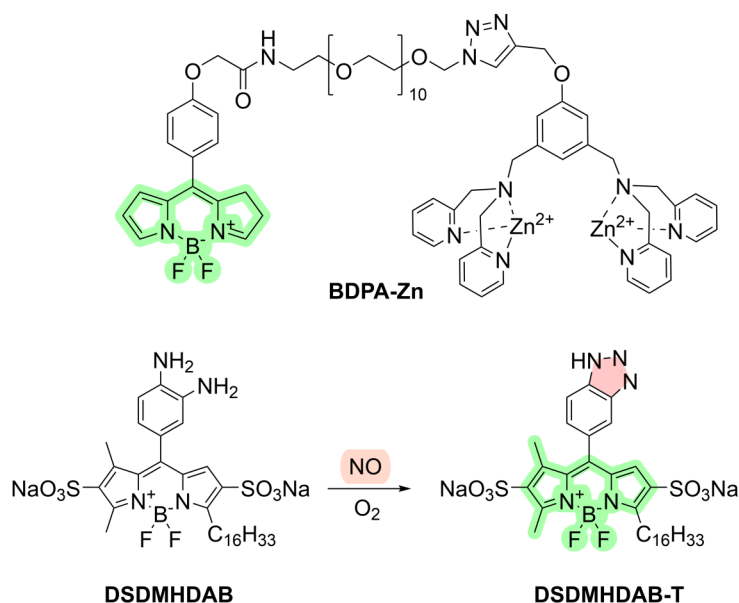
### 3.1. Fluorescenční sondy vhodné pro mikroskopii živých buněk

Pro mikroskopii živých buněk se často používají různé fluorescenční sondy. Tradičně používané fluorescenční proteiny, spojené s cílovými proteiny nebo peptidy, mohou negativně ovlivnit funkci takto fúzovaného proteinu. Proto se k překonání těchto problémů využívají syntetické sondy založené na malých chemických molekulách, které nabízejí menší velikost, možnosti jednoduchých syntetických úprav i optimalizaci a využití různých spektrálních charakteristik<sup>43</sup>. Mezi ideální luminofory pro tyto účely patří BODIPY (z angl. boron-dipyromethene) barviva, jejichž intenzivní a zářivé barvy, vysoká molární absorptivita a široký rozsah fluorescenční emise jsou ideální pro fluorescenční mikroskopii, průtokovou cytometrii a biovizualizaci *in vivo*. BODIPY barviva jsou často využívána pro detekci a monitorování biologických procesů, včetně interakcí protein-protein, enzymové aktivity, případně buněčné

lokalizace. Strukturální modifikace těchto barviv umožňuje regulaci jejich klíčových charakteristik<sup>44</sup>. Prvním komplexem, který byl publikován v roce 1968, je 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen<sup>45</sup> (struktura uvedena na obr. 3). Mimo experimentálně připravené sondy s BODIPY je několik dostupných i komerčně, například **LysoTracker** a **ER-Tracker**<sup>43</sup>. Struktury komerčních sond jsou zobrazeny na obr. 3. Příkladem využití komerční BODIPY sondy je **PARPi-FL**, fluorescenční sonda založená na BODIPY a olaparibu (inhibitor poly(ADP-ribosa) polymerasy 1 (PARP1), která se ukázala jako slibná při detekci a hodnocení chirurgických okrajů epiteliálních karcinomů v klinických podmínkách<sup>46,47</sup>. Fluorescenční vlastnosti BODIPY lze navíc rozšířit do téměř infračervené oblasti zavedením atomů dusíku do pyrrolové kostry (aza-BODIPY)<sup>48</sup>, nebo rozšířením konjugovaného systému<sup>49</sup>. V poslední době přitahují takové fluorofory pozornost díky tomu, že umožňují biovizualizaci se sníženou autofluorescencí a rozptylem světla, navíc snižují poškození či ztrátu fluorescence (photobleaching) způsobené excitací fluoroforu<sup>50</sup>. BODIPY sondy mohou být využívány i pro pokročilé mikroskopické techniky, jako je superrezoluční mikroskopie. Ve studii Adhikari a spol.<sup>51</sup>, byla využita tvorba dimerů s posunem emitujícího světla do



Obr. 3. Molekulární struktura 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu a komerčních sond LysoTracker, ER-Tracker a PARPi-FL



Obr. 4. Molekulární struktury experimentálních sond BDPDA-Zn a DSDMHDAB

červené oblasti spektra. Takto byly ve vysokém rozlišení lokalizována jednotlivá analoga mastných kyselin v membráně živých kvasinek pomocí mikroskopické metody lokalizace jednotlivých molekul (Single Molecule Localization Microscopy – SMLM). Další práce využila BODIPY sondy pro super-rezoluční techniku fotoaktivní lokalizační mikroskopie (PhotoActivated Localization Microscopy, PALM). Tato metoda se opírá o stochastickou excitaci fluorescenčních molekul, kdy je aktivována jen malá podmnožina fluorescenčních značek, což umožňuje jejich individuální lokalizaci s vysokým rozlišením. Po nasnímání velkého množství snímků jsou tyto snímky kombinovány do jednoho vysokorozlišovacího obrazu, kdy po obrazové rekonstrukci můžeme dosáhnout zobrazení biologických vzorků v rozlišení až téměř na molekulární úrovni 10 nm (cit.<sup>52</sup>). Kromě toho mohou být do výsledných fotoaktivovatelných fluoroforů začleněny cílené ligandy pro označení vybraných subcelulárních složek v živých buňkách<sup>53–55</sup>. Díky svému lipofilnímu charakteru se BODIPY uplatňuje při syntéze sond pro značení plasmatických membrán<sup>56</sup>. Struktury experimentálně připravených sond jsou na obr. 4. Například sonda **BDPDA-Zn** byla vytvořena na základě BODIPY a zinkového komplexu, který specificky váže fosfatidylserin v plasmatické membráně. Slouží k rozlišení stupně apoptózy, protože se selektivně váže na membránu časných apoptotických buněk a internalizuje se do pozdních apoptotických buněk<sup>57</sup>. Dále byla vytvořena amfifilní sonda **DSDMHDAB** pro vizualizaci extracelulárního uvolňování oxidu dusnatého na membráně pomocí *in situ* cyklizační reakce BODIPY obsahujícího 3,4-diaminofenylovou skupinu<sup>58</sup>.

#### 4. Závěr

Využití pokročilých technologií, jako jsou HTS a fenotypové testování, zásadně usnadnilo objevování cílů biologicky aktivních látek<sup>2</sup>. Je však důležité si uvědomit, že proces identifikace cílů těchto látek zůstává komplexním a neustále se vyvíjejícím aspektem výzkumu a vývoje léčiv, zejména v kontextu nových terapeutických přístupů a personalizované medicíny. Jako každý technologický přístup, mikroskopické metody přinášejí řadu výhod, včetně přímé vizualizace buněčných struktur, sledování procesů v reálném čase a určení prostorové subcelulární lokalizace cílových míst působení testovaných látek. Pokročilé mikroskopické techniky s vysokým rozlišením nabízí detailní snímky, které umožňují odhalit i velmi jemné nuance interakcí mezi látkami a jejich molekulárními cíli<sup>3,59</sup>. Na druhou stranu, tyto metody mohou být technicky náročné<sup>3,59</sup>, vyžadují specializované vybavení a odborné znalosti v oblasti přípravy vzorků a zejména analýzy dat. Mikroskopie může vést k falešně pozitivním nebo negativním výsledkům, zejména pokud procesy značení a barvení nejsou pečlivě optimalizovány a pokud použitá barviva nejsou dostatečně selektivní a specifická. BODIPY barviva jsou ideální pro mikroskopii, nabízejí intenzivní barvy a různé spektrální charakteristiky. Možnost modifikace struktury BODIPY umožňuje regulaci klíčových vlastností. Jejich využití v mikroskopických technikách super-rezoluce, jako je SMLM nebo PALM, umožňuje biozobrazování s vysokým prostorovým rozlišením. BODIPY sondy jsou významným nástrojem pro studium živých buněk s minimalizací poškození vzorku.

Tento výzkum byl podpořen infrastrukturním grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (EATRIS-CZ – LM2023053 a CZ-OPENSSCREEN LM2023052), programem EXCELES, ID projektu č. LX22NPO5102, státní podporou Technologické agentury ČR v rámci programu Národní centra kompetence (TN02000109) a interním grantem Univerzity Palackého v Olomouci (IGA\_LF\_2023\_025).

## LITERATURA

- Davis R. L.: *iScience* 23, 101487 (2020).
- Tautermann C. S., v knize: *Quantum Mechanics in Drug Discovery* (Heifetz A., ed.), kap. 1, str. 1. Humana New York, NY 2020.
- Bullen A.: *Nat. Rev. Drug Discovery* 7, 54 (2008).
- Wang Y., Zhao X. P., Gao X. M., Nie X. J., Yang Y. X., Fan X. H.: *Anal. Chim. Acta* 702, 87 (2011).
- Stossi F., Singh P. K., Safari K., Marini M., Labate D., Mancini M. A.: *Biochem. Pharmacol.* 216, 115770 (2023).
- Isgut M., Rao M., Yang C. H., Subrahmanyam V., Rida P. C. G., Aneja R.: *Med. Res. Rev.* 38, 504 (2018).
- Menduti G., Boido M.: *Int. J. Mol. Sci.* 24, 14689 (2023).
- Abu-Abied M., Avisar D., Belausov E., Holdengreber V., Kam Z., Sadot E.: *Protoplasma* 236, 3 (2009).
- Lang P., Yeow K., Nichols A., Scheer A.: *Nat. Rev. Drug Discovery* 5, 343 (2006).
- Bray M. A., Singh S., Han H., Davis C. T., Borgeson B., Hartland C., Kost-Alimova M., Gustafsdottir S. M., Gibson C. C., Carpenter A. E.: *Nat. Protoc.* 11, 1757 (2016).
- Baillache D. J., Valero T., Lorente-Macías Á., Bennett D. J., Elliott R. J. R., Carragher N. O., Unciti-Broceta A.: *RSC Med. Chem.* 14, 2611 (2023).
- Jiang X. a 10 spoluautorů: *J. Fluoresc.* (2023). doi: 10.1007/s10895-023-03344-7.
- Hermanson G. T., v knize: *Bioconjugate Techniques* (Hermanson G. T., ed.), 3. vyd., str. 395. Academic Press, Boston 2013.
- Gao P., Pan W., Li N., Tang B.: *Chem. Sci.* 10, 6035 (2019).
- Abdelfatah S., Berg A., Böckers M., Efferth T.: *J. Adv. Res.* 16, 145 (2019).
- Abu-Elheiga L., Brinkley W. R., Zhong L., Chirala S. S., Woldegiorgis G., Wakil S. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1444 (2000).
- Sando S., Narita A., Aoyama Y.: *ChemBioChem* 8, 1795 (2007).
- Lin K. K., Goodell M. A., v knize: *Methods in Cell Biology* (Darzynkiewicz Z., Holden E., Orfao A., Telford W., Wlodkowic D., ed.), 103. díl, str. 21. Academic Press, Amsterdam 2011.
- Pickup J. C., Hussain F., Evans N. D., Rolinski O. J., Birch D. J. S.: *Biosens. Bioelectron.* 20, 2555 (2005).
- Hardman K. D., Ainsworth C. F.: *Biochemistry* 11, 4910 (1972).
- Gnerucci A., Faraoni P., Romano G., Fusi F.: *Acta Histochem.* 121, 248 (2019).
- Leipold M. D., Ornatsky O., Baranov V., Whitfield C., Nitz M.: *Anal. Biochem.* 419, 1 (2011).
- Gil J., Passalacqua G., Deloche A., Vidal F. X., Dugas V., Demesmay C.: *Separations* 10, 437 (2023).
- Ullal A. J., Pisetsky D. S., Reich C. F.: *Cytometry, Part A* 77, 294 (2010).
- Knowles R. B., Sabry J. H., Martone M. E., Deerinck T. J., Ellisman M. H., Bassell G. J., Kosik K. S.: *J. Neurosci.* 16, 7812 (1996).
- Poot M., Gibson L. L., Singer V. L.: *Cytometry* 27, 358 (1997).
- Steinmetz M. O., Stoffler D., Hoenger A., Bremer A., Aebi U.: *J. Struct. Biol.* 119, 295 (1997).
- Gilloteaux J., Jamison J. M., Arnold D., Neal D. R., Summers J. L.: *Anat. Rec.* 288A, 58 (2006).
- Barak L. S., Yocum R. R., Webb W. W.: *J. Cell Biol.* 89, 368 (1981).
- Miller Y. I., Chang M.-K., Funk C. D., Feramisco J. R., Witztum J. L.: *J. Biol. Chem.* 276, 19431 (2001).
- Balciunaite-Murziene G., Dzikaras M.: *Appl. Sci.* 11, 884 (2021).
- Kataoka H., Ushiyama A., Kawakami H., Akimoto Y., Matsubara S., Iijima T.: *Microsc. Res. Tech.* 79, 31 (2016).
- Stern A. D., Rahman A. H., Birtwistle M. R.: *Cytometry, Part A* 91A, 14 (2017).
- Cartellieri S., Hamer O., Helmholz H., Niemeyer B.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35, 83 (2002).
- Mellado M. C. M., Curbelo D., Nobrega R., Castilho L. R.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 636 (2007).
- Ning P., Wang W. J., Chen M., Feng Y., Meng X. M.: *Chin. Chem. Lett.* 28, 1943 (2017).
- Sim P. F., Wan Mohamad Noor W. N. I., Inaba T., Suetsugu S., v knize: *Plasma Membrane Shaping* (Suetsugu S., ed.), str. 7. Academic Press, Cambridge 2023.
- Buckman J. F., Hernández H., Kress G. J., Votyakova T. V., Pal S., Reynolds I. J.: *J. Neurosci. Methods* 104, 165 (2001).
- Gao B. B., Gao L., Wang F.: *J. Innovative Opt. Health Sci.* 16, (2023).
- Ropraz P., Imhof B. A., Matthes T., Wehrle-Haller B., Sidibé A.: *J. Visualized Exp.* e58509 (2018).
- Dunn M. a 13 spoluautorů: *ACS Chem. Neurosci.* 9, 673 (2018).
- Hardebeck S., Schreiber S., Adick A., Langer K., Jose J.: *Int. J. Mol. Sci.* 24, 11858 (2023).
- Kowada T., Maeda H., Kikuchi K.: *Chem. Soc. Rev.* 44, 4953 (2015).
- Loudet A., Burgess K.: *Chem. Rev.* 107, 4891 (2007).
- Treibs A., Kreuzer F. H.: *Liebigs Ann. Chem.* 718, 208 (1968).
- Kossatz S. a 22 spoluautorů: *Nat. Biomed. Eng.* 4, 272 (2020).

47. Irwin C. P., Portorreal Y., Brand C., Zhang Y., Desai P., Salinas B., Weber W. A., Reiner T.: *Neoplasia* 16, 432 (2014).
48. Shi Z., Han X., Hu W., Bai H., Peng B., Ji L., Fan Q., Li L., Huang W.: *Chem. Soc. Rev.* 49, 7533 (2020).
49. Qi S., Kwon N., Yim Y., Nguyen V.-N., Yoon J.: *Chem. Sci.* 11, 6479 (2020).
50. Dai M., Yang Y. J., Sarkar S., Ahn K. H.: *Chem. Soc. Rev.* 52, 6344 (2023).
51. Adhikari S., Moscatelli J., Smith E. M., Banerjee C., Puchner E. M.: *Nat. Commun.* 10, 3400 (2019).
52. Zhang Y., Zheng Y., Tomassini A., Singh A. K., Raymo F. M.: *Molecules* 28, 2447 (2023).
53. Kobayashi T., Komatsu T., Kamiya M., Campos C., González-Gaitán M., Terai T., Hanaoka K., Nagano T., Urano Y.: *J. Am. Chem. Soc.* 134, 11153 (2012).
54. Loredó A., Tang J., Wang L., Wu K. L., Peng Z., Xiao H.: *Chem. Sci.* 11, 4410 (2020).
55. Wijesooriya C. S., Peterson J. A., Shrestha P., Gehrmann E. J., Winter A. H., Smith E. A.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 57, 12685 (2018).
56. Collot M., Pfister S., Klymchenko A. S.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 69, 102161 (2022).
57. Ashokkumar P., Ashoka A. H., Collot M., Das A., Klymchenko A. S.: *Chem. Commun.* 55, 6902 (2019).
58. Yao H. W., Zhu X. Y., Guo X. F., Wang H.: *Anal. Chem.* 88, 9014 (2016).
59. Razansky D., Deliolanis N. C., Vinegoni C., Ntziachristos V.: *Curr. Pharm. Biotechnol.* 13, 504 (2012).

**J. Stanková, M. Hajdúch, and P. Džubák** (*Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*): **Identification of Cellular Targets of Active Substances Using Microscopic Methods and Fluorescent Probes**

Target identification of active substances is critical in optimizing drugs and minimizing side effects. The complex nature of biological systems presents challenges; to meet them, however, microscopic methods, particularly phenotypic screening, represented by "Cell Painting" method and fluorescent probes, can be used as valuable tools for understanding the impact of various substances at the cellular and organelle levels. These methods enable rapid testing of large libraries of compounds and offer unique insights into their mechanism of action by observing cell behavior, assessing cell morphology, motility, division, and migration. However, live cell microscopy faces challenges like phototoxicity, requiring a careful selection of fluorescent labels and optimized conditions. Among synthetic probes for live cell microscopy, BODIPY dyes stand out for their synthetic versatility and photophysical properties, providing minimal sample damage during bioimaging.

**Keywords:** drug target, mechanism of action, microscopy, fluorophores, BODIPY

#### *Acknowledgements*

*This research was supported by an infrastructure grant Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (EATRISCZ – LM2023053 and CZ-OPENSREEN LM2023052), by the EXCELES program, project ID No. LX22NPO5102, state support of the Technology Agency of the Czech Republic within the program of the National Center of Competence (TN02000109) and an internal grant from the Palacký University in Olomouc (IGA\_LF\_2023\_025).*



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.