

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program – Biochemie

Studijní obor – Biochemie



Kateřina Pecková

Vývoj modelového systému pro studium transportu chloridových iontů u  
buněk plicního epitelu pacientů trpících cystickou fibrózou

The development of a model system for studying chloride ion transport  
in the epithelial cells of patients with cystic fibrosis

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Lucie Bořek Dohalská, Ph. D.

Praha, 2014

## **Prohlášení:**

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Lucie Bořek Dohalské, Ph. D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

V Praze dne 12. 8. 2014

Kateřina Pecková

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Lucii Bořek Dohalské, Ph.D. za odborné vedení této bakalářské práce, rady a připomínky při jejím zpracování.

Dále bych ráda poděkovala za spolupráci a rady během experimentální činnosti Mgr. Libuši Noskové a Bc. Lucii Vaškové.

## Abstrakt

U onemocnění zvaného cystická fibróza dochází k narušení fungování proteinu CFTR, jehož hlavní funkcí je transport chloridových iontů z buňky. Stanovení schopnosti CFTR kanálu transportovat chloridové ionty je považováno za jediný způsob, jak stanovit jeho aktivitu. V této práci byl transport chloridových iontů prostřednictvím CFTR kanálu studován u buněčných linií plicního epitelu zdravých pacientů (NuLi-1) a pacientů trpících cystickou fibrózou (CuFi-1). Pro studium byla vybrána a optimalizována metoda fluorescenčního značení za použití fluorescenčního barviva *N*-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxychinolinu (MQAE), které poskytuje fluorescenci v modré oblasti spektra a je nejcitlivější fluorescenční sloučeninou vůči chloridovým iontům, která byla doposud navržena. V rámci vývoje optimální metody byly pomocí fluorescenčního značení testovány dva způsoby měření transportu chloridových iontů a to stanovení jejich množství uvolněných buňkou do pufru obsahujícího MQAE a stanovení jejich množství v buňce přímo obarvené MQAE. Druhé stanovení se ukázalo jako vhodnější a reprodukovatelnější metoda pro prokázání transportu chloridových iontů. Zároveň byl sledován vliv sloučeniny forskolinu, která zvyšuje intracelulární koncentraci cAMP a tím urychluje otevírání CFTR kanálu, díky čemuž může být ověřeno, zda měřený transport chloridových iontů probíhá prostřednictvím tohoto kanálu. Vliv této sloučeniny se však nepodařilo jednoznačně prokázat a bude to předmětem dalšího studia.

## Klíčová slova

Cystická fibróza, epiteliální buňky, CFTR kanál, fluorescenční značení, MQAE, forskolin

## **Abstract**

Cystic fibrosis is caused by a genetic defect in the CFTR protein, whose main function is chloride transport across epithelial cells. The measurement of CFTR ability to transport chloride is considered a good, and perhaps, the only practical method to assess its activity. In this thesis, the transport of chloride ions across the CFTR channel was studied using airway epithelial cell lines of healthy patients (NuLi-1) and patients with cystic fibrosis (CuFi-1). A fluorescent method using a fluorescent chloride-sensitive probe N-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium (MQAE) was chosen and optimized. This compound is providing fluorescence in the blue part of the spectrum and has the greatest sensitivity to chloride ions. In the development of an optimal method two approaches of chloride transport measurement were used. In the first experiment the secretion of the chloride ions to the buffer containing MQAE was measured. In the second one the dye had to be loaded into cells before performing experiment. Then, the MQAE fluorescence quenched by intracellular chloride was monitored by a change in the fluorescence intensity of the probe. The second method was considered as a useful and more reproducible to study chloride transport across cell membranes. Moreover, the influence of the CFTR modulator forskolin was studied. Forskolin increases intracellular concentration of cAMP, which stimulates CFTR activity. Forskolin-stimulated Cl<sup>-</sup> loss is a direct approach to assess whether CFTR Cl<sup>-</sup> channel activity could be measured. However, influence of forskolin was not clearly demonstrated and it will be a subject of the further studies.

## **Key word**

Cystic fibrosis, epithelial cells, CFTR channel, loading of a fluorescent probe, MQAE, forskolin

# Obsah

Seznam použitých zkratek.....	3
1. Úvod.....	4
1.1 Cystická fibróza.....	4
1.1.1 Projevy a příznaky CF .....	5
1.2 CFTR protein.....	6
1.2.1 Mutace CFTR proteinu.....	10
1.2.2. Modulátory CFTR proteinu .....	11
1.3 Metody stanovení sekrece chloridových iontů prostřednictvím CFTR proteinu v buňkách.....	15
1.3.1 Měření iontového proudu.....	15
1.3.2 Radioaktivní izotopy.....	17
1.3.3 Fluorescenční chloridové senzory .....	18
2. Cíl práce.....	22
3. Materiál a metody.....	23
3.1 Použité přístroje a materiál .....	23
3. 1.1 Použité přístroje.....	23
3.1.2 Použitý materiál .....	23
3.2 Práce s buněčnými liniemi.....	25
3.2.1 Kultivace buněčných linií.....	25
3.2.2 Rozmrazení buněčných linií .....	26
3.2.3 Subkultivace buněčných linií .....	26
3.2.4 Zamrazení buněčných linií .....	27
3.2.5 Stanovení počtu a viability buněk pomocí barvení trypanovou modří .....	28
3.2.6 Příprava kultivačních nádob potažených kolagenem.....	28
3.3 Studium transportu chloridových iontů u buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 .....	29
3.3.1 Stanovení chloridových iontů sekretovaných buněčnými liniemi NuLi-1 a CuFi-1 do pufru obsahujícího MQAE.....	30
3.3.2 Studium transportu chloridových iontů buněčnými liniemi obarvenými MQAE.....	33
4. Výsledky a diskuze.....	37
4.1 Studium transportu chloridových iontů u buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 .....	38

4.1.1 Stanovení chloridových iontů uvolněných buněčnými liniemi NuLi-1 a CuFi-1 do pufru obsahujícího MQAE.....	39
4.1.2 Studium transportu chloridových iontů buněčnými liniemi obarvenými MQAE.....	48
5. Shrnutí .....	57
6. Seznam použité literatury.....	58

## **Seznam použitých zkratek**

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CF – cystická fibróza

CFTR – „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“

DMSO – dimethylsulfoxid

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

FBS – fetální hovězí sérum

HEPES - 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonová kyselina

MQAE - *N*-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium

NBD – nukleotid-vázající doména („nucleotide binding domain“)

PBS – fosfátový pufr („phosphate buffered saline“)

RPM – počet otáček a minutu

RD – regulační doména („regulatory domain“)

UV – ultrafialové záření

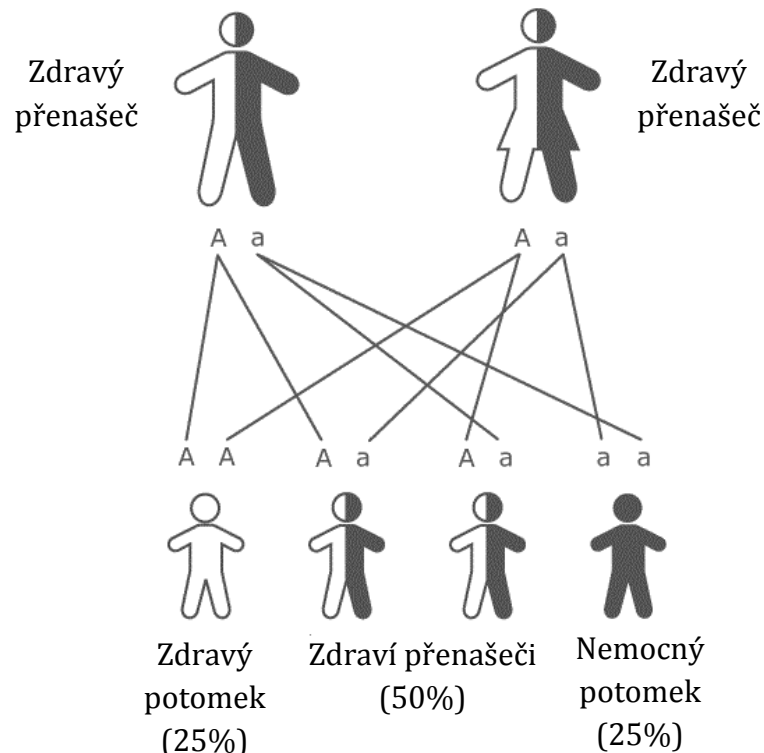
# 1. Úvod

## 1.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) je jedno z nejčastěji se vyskytujících genetických onemocnění, u indoevropské populace postihuje přibližně jedno dítě z 2500 – 4500 novorozenců. V České republice je výskyt CF stanoven na 1:2736 novorozenců, v současné době je evidováno přibližně 500 pacientů s CF v České republice. V neevropských populacích je výskyt CF podstatně nižší [1, 2].

CF patří mezi monogenní autozomálně recesivní onemocnění. Monogenní onemocnění je dáno mutací v jediném genu [1]. Recesivní onemocnění se projeví, pokud jedinec získá od každého z rodičů, který je přenašečem dané mutace genu, alelu s touto mutací způsobující toto onemocnění. Pravděpodobnost projevu nemoci u novorozence je 1:4. Může se vyskytovat pouze u somatických buněk a to pouze na autosomech, což jsou nepohlavní chromosomy [3]. Dědičnost onemocnění je znázorněna na obrázku č. 1.1 na straně 5.

CF se vyskytovala pravděpodobně již ve středověku. Avšak poprvé byla popsána v roce 1938 D. Andersonovou jako „cystická fibróza pankreatu“ [1, 4]. Byla rozeznána u dítěte, které se jako první s CF dožilo více než 10 let. Vyskytovalo se u něj respirační onemocnění a pankreatická insuficience, která byla zjištěna na základě vyšetření duodenální šťávy. V té době většina dětí s CF umírala do jednoho roku života. Později byla CF nazývána jako „mukoviscidosa“, aby se upozornilo na charakter hlenu. Chtělo se tím také poukázat na to, že se nejedná pouze o postižení slinivky břišní. Velký význam mělo objevení nadměrného množství solí v potu pacientů s CF, které se využívá k diagnostice. Pacienti s CF upadali z horka do oběhového šoku a trpěli dehydratací. To vedlo k výzkumu jejich potu a v roce 1953 P. di Sant' Agnese spolu s kolegy zjistil, že pacienti s CF vylučují potem mnohem více solí, než zdraví lidé. Gibson a Cook zveřejnili práci, kde popsali metodu studia potu za využití pilokarpinové iontoforézy. P. M. Quinton po dlouholetém studiu objevil, že příčinou CF je neprůchodnost buněčných membrán pro chloridové ionty. Díky tomu byl gen CF v roce 1987 lokalizován a v roce 1989 identifikován [1].



**Obrázek č. 1.1:** Dědičnost CF - autozomálně recesivní dědičnost. Při křížení dvou zdravých přenašečů nemoci, kdy každý má jednu zdravou a jednu postiženou alelu, je 25% pravděpodobnost, že bude potomek nemocný, 25% pravděpodobnost zdravého potomka a 50% pravděpodobnost potomka, který bude opět přenašečem [3, 5].

### 1.1.1 Projevy a příznaky CF

Při CF dochází k poruše funkce kanálu, který se podílí na transportu chloridů z buňky (viz dále). Pro CF je charakteristická vysoká koncentrace elektrolytů v potu pacienta, tzv. „slaný pot“. Pot pacientů s CF obsahuje asi 5× více solí, než pot zdravých osob. Zároveň se však vyskytují i vzácné případy pacientů trpících CF, které mají normální hladinu solí v potu [1, 2].

U pacientů s CF se od kojeneckého věku objevuje postižení dýchacích cest a plic. Bývá to nejčastější příčinou úmrtí (až 90% nemocných CF) [2]. U pacientů se od raného dětství často opakují respirační onemocnění, která se s věkem postupně zhoršují a mohou vést až k úmrtí [4, 6].

Kvůli poruše transportu chloridů z buňky nedochází v organismu k aktivaci defenzinů, které mají antimikrobiální funkci. To vede k rozvoji infekcí. Pacienti jsou nejčastěji infikováni bakteriemi *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* [1, 4, 6]. Nejhůře však probíhají nemoci, které jsou způsobeny bakterií *Burkholderia cepacia*. Tato bakterie se velice špatně diagnostikuje a je rezistentní na antibiotika [1]. Kvůli nedostatečné produkci protizánětlivých cytokinů (zejména interleukinu IL-10) a zvýšené koncentraci prozánětlivých cytokinů (zejména interleukinů IL-6 a IL-8) dochází i k rozvoji zánětu. Zánět u pacientů s CF je charakteristický hlavně zvýšeným množstvím neutrofilů. Kromě toho dochází také ke zvýšenému přenosu sodíkových iontů spolu s vodou do buňky, a tím k zahuštění okolního hlenu [2, 7].

Častým znakem CF bývá i pankreatická insuficience. Při těžkých mutacích genu, které způsobují cystickou fibrózu, dochází k poruše funkcí slinivky břišní, hlavně k nedostatečné zevní sekreci, tzv. insuficienci. Následně může dojít k její fibrotizaci a zmenšení. U lehkých mutací zůstává zevní sekrece slinivky břišní zachována, avšak insuficience se může později rozvinout [1, 2].

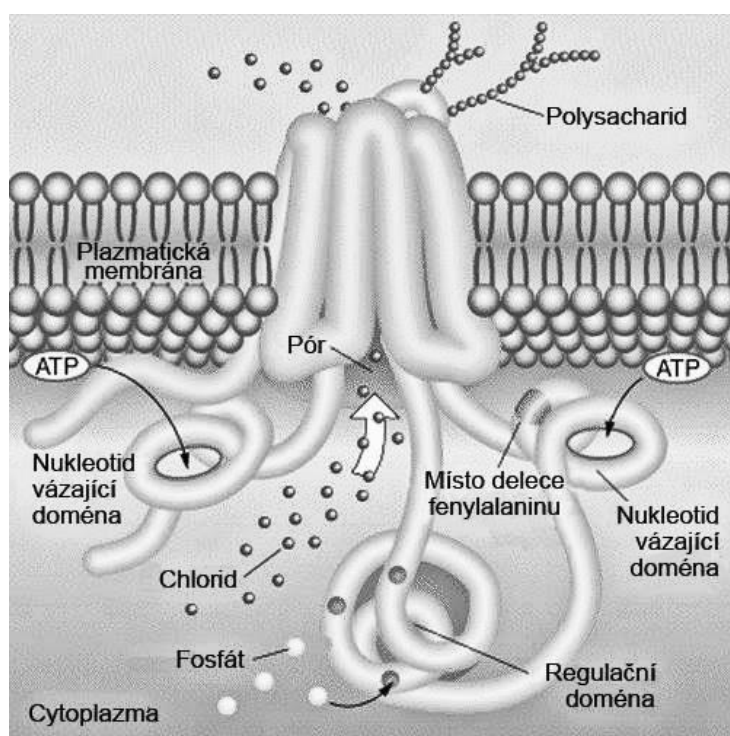
Dalším typickým příznakem CF je sterilita. U mužů může docházet k obstrukční azoospermii, která se vyznačuje neprůchodností vývodných cest. Také se u nich může vyskytnout vrozená absence chámovodů. U žen vzniká v pohlavních cestách vazký hlen, a proto nemůže dojít k oplodnění [1, 4, 8].

## 1.2 CFTR protein

CF je způsobena mutací v genu, který se nazývá „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR), což by se dalo přeložit jako regulátor transmembránové vodivosti iontů. Podle nového názvosloví je označován též jako ABCC7. Nachází se na dlouhém raménku chromozomu 7, skládá se z 27 exonů. Kóduje expresi proteinu, který je nazýván stejně jako daný gen a obsahuje 1480 aminokyselin [1, 8].

Tento protein se vyskytuje na apikální straně plazmatické membrány epitelálních buněk, např. buněk pankreatu, dýchacích cest, střev nebo ledvin, u potních žláz se vyskytuje i na straně basolaterální [1, 8, 9]. Nachází se však i u buněk, které mezi

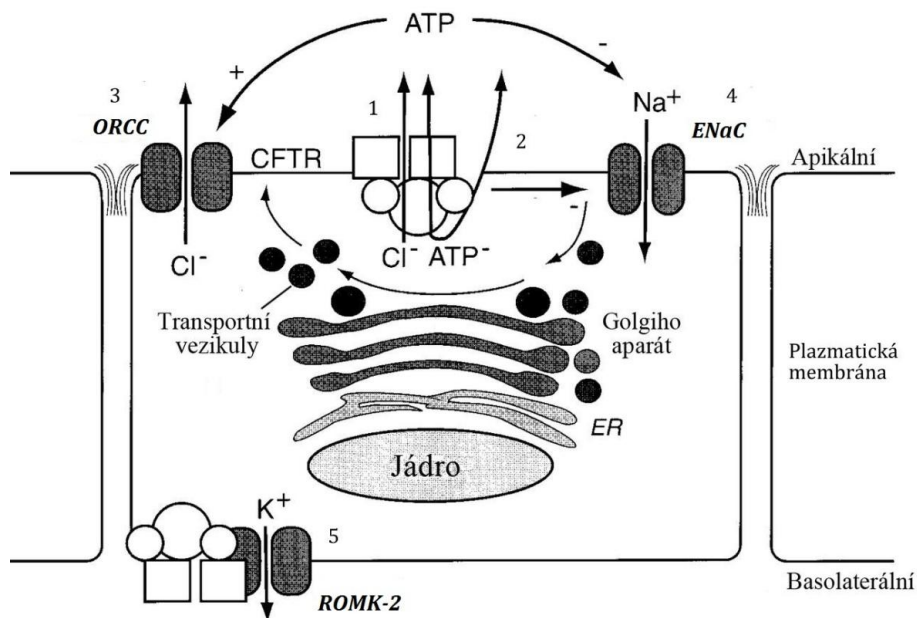
epiteliální nepatří, jako jsou např. mozkové buňky, buňky srdce, jater nebo ledvin [10]. CFTR protein se skládá z několika domén, a to dvou tzv. membránu prostupujících domén (MSD1, MSD2 – „membrane-spanning domain“, nazývané též TM1, TM2 – „transmembrane domain“), dvou nukleotid vázajících domén (NBD1, NBD2 – „nucleotide-binding domains“) a centrální, nabité, regulační domény (RD – „regulatory domain“) [8, 11]. Regulační doména a obě nukleotid vázající domény se nacházejí v cytoplasmě. Nukleotid vázající domény mohou měnit konformaci a tím regulovat otevírání a zavírání kanálu pomocí posunu regulační domény [1, 8]. Schéma CFTR proteinu je znázorněno na obrázku č. 1.2 na straně 7.



**Obrázek č. 1.2:** Schéma CFTR proteinu [12].

Z uvedeného vyplývá, že CFTR protein je transmembránovým proteinem a patří do rodiny transportních proteinů ABC (ATP-binding cassette). Kromě toho, že funguje jako kanál pro přenos chloridových iontů, je také schopen transportovat hydrogenuhličitan, glutathion nebo ATP [8, 9, 10, 13]. Navíc se tento protein účastní i regulace dalších iontových kanálů, což je znázorněno na obrázku č. 1.3 na straně 8 [8]. Mezi tyto kanály patří např. epiteliální kanál ENaC („epithelial Na<sup>+</sup> channel“) přenášející sodné ionty dovnitř buňky nebo ledvinový kanál ROMK-2 („renal outer medullary K<sup>+</sup> channel“) pro přenos draselných iontů z buňky ven. Kanál ORCC („outwardly rectifying

Cl<sup>-</sup> channel“) přenášející chloridové ionty z buňky ven je závislý na extracelulární koncentraci ATP, kterou zajišťuje právě CFTR protein tím, že ATP z buňky ven transportuje.



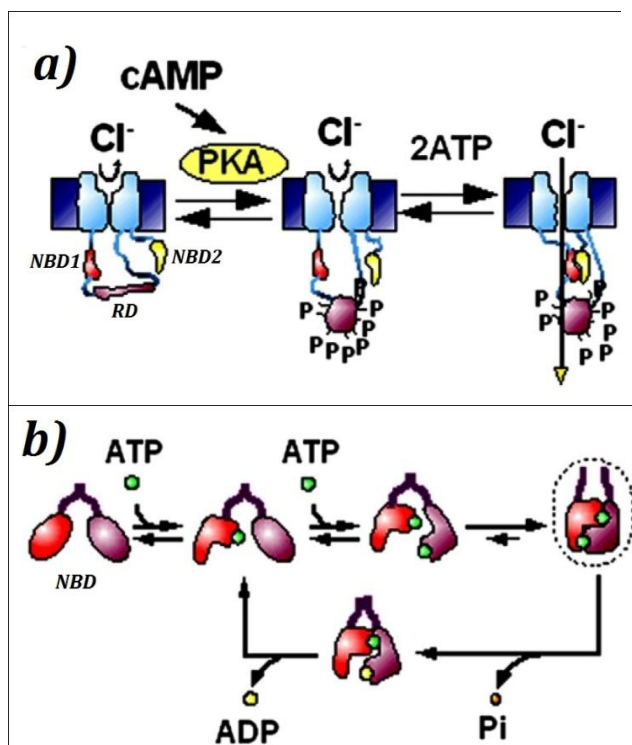
**Obrázek č. 1.3:** Schéma multifunkčnosti CFTR proteinu. Přenos Cl<sup>-</sup> iontů (1), usnadnění přenosu ATP do extracelulárního prostoru (2), ovlivnění kanálů ENaC, ORCC a ROMK-2 (3, 4, 5). ORCC - kanál přenášející Cl<sup>-</sup> ionty ven z buňky; ENaC – epiteliální kanál pro Na<sup>+</sup> ionty; ROMK-2 – ledvinový kanál nacházející se mimo dřeň ledvin a přenášející K<sup>+</sup> ionty; ER – endoplazmatické retikulum [13, 15].

CFTR protein dále reguluje aktivitu aquaporinů, které ovlivňují tok vody přes membránu [13, 14, 16] a ovlivňuje také intracelulární pH, zánětlivou imunitní odpověď nebo apoptózu [8, 9, 13, 16]. Tento protein má vliv i na CFTR-dependentní geny (MUC1, SRC, CISD1, MT-ND4, RANTES), jejichž produkty pak dále regulují činnost dalších buněčných organel [10].

Pohyb chloridových iontů přes otevřený kanál tvořený CFTR proteinem probíhá pouze díky elektrochemickému potenciálu. Tento potenciál závisí na absorpci sodných iontů přes ENaC kanál a probíhá dvěma způsoby. Nejprve jsou chloridové ionty vychytávány a přenášeny přes basolaterální membránu výměnou za hydrogenuhličitanové ionty nebo kotransportem s Na<sup>+</sup> a K<sup>+</sup> ionty (protein NKCC1 – Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter). Poté jsou chloridové ionty přenášeny ven z buňky přes

apikální membránu pomocí CFTR proteinu nebo přes kanál, který je závislý na intracelulární koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů („ $\text{Ca}^{2+}$ -dependent channel“) [14, 17].

Aktivita CFTR proteinu je navíc závislá na koncentraci cyklického AMP (cAMP). Tento druhý posel aktivuje enzym protein-kinasy A, který zajišťuje fosforylaci regulační domény CFTR proteinu [11, 16, 17, 18]. Otevření CFTR kanálu je poté spuštěno navázáním dvou molekul ATP na cytoplazmatické nukleotid-vázací domény (NBDs), které díky tomu dimerizují (obrázek č. 1.4, strana 9) [18, 19]. Kromě protein-kinasy A je aktivita CFTR proteinu ovlivňována protein-kinasou C nebo tyrosin-kinasami Src [10].



**Obrázek č. 1.4:** Schéma otevírání CFTR kanálu. a) Cyklické AMP (cAMP) ovlivňuje aktivitu enzymu protein-kinasy A (PKA), která zajišťuje fosforylaci regulační domény (RD) CFTR proteinu. Navázání ATP na nukleotid-vázací domény (NBDs) následně způsobí další konformační změnu, dojde k otevření CFTR kanálu. b) Dvě molekuly ATP se naváží na nukleotid-vázací domény, které díky tomu dimerizují. To umožňuje otevření CFTR kanálu. Na NBDs následně dochází k hydrolýze jedné molekuly ATP, což způsobí uzavření kanálu a uvolnění ADP [20].

### 1.2.1 Mutace CFTR proteinu

Za normálních okolností je CFTR gen transkribován a translatován na CFTR protein, který je poté transportován na apikální stranu buněčné membrány, kde slouží, jak už bylo řečeno, jako kanál pro přenos chloridových iontů. Při onemocnění CF dochází k mutacím tohoto genu, které mohou ovlivňovat produkci proteinu, jeho aktivitu a stabilitu [16]. Na apikální straně membrány se pak může vyskytovat méně funkční nebo i zcela nefunkční CFTR protein [8, 17]. Exprese CFTR proteinu je u pacientů s CF nižší než u zdravých jedinců [6].

U mutací CFTR genu nejčastěji dochází k záměnám aminokyselin (42% mutací). Další možnostmi jsou mutace, které způsobují změnu čtecího rámce vložením jednoho nebo několika nukleotidů do původní sekvence (23% mutací). Může také dojít k tvorbě stop kodonu z původního kodonu dané aminokyseliny (17% mutací) nebo k abnormálnímu sestřihu exonů (12% mutací). Nejméně často dochází k vynechání nebo přidání násobků tří párů bazí DNA, kdy ale nedochází ke změně čtecího rámce genu (6% mutací) [1].

V současnosti je zaznamenáno přes 1900 mutací CFTR proteinu (podle databáze [www.genet.sickkids.on.ca/cftr](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr)). Mutace CFTR genu se dělí na lehké a těžké podle funkční aktivity *in vitro* buněčných modelech. Tyto mutace se rozdělují do pěti tříd podle efektu, který mají na syntézu a funkci CFTR proteinu. Později byly přidány další 2 třídy mutací, které jsou ale považovány za nadstavbové [1, 6]. Základní rozdělení do pěti tříd podle typu mutace je uvedeno v tabulce č. 1.1 na straně 11.

První odhalenou mutací CFTR genu u Kavkazské populace byla mutace F508del, označována též jako mutace  $\Delta F508$ . Jedná se o nejčastější mutaci CFTR genu, která se nachází přibližně u 70% všech pacientů s CF [2, 8, 9]. Vyznačuje se vynecháním fenylalaninu v pozici 508 proteinu CFTR v exonu 10 CFTR genu [6, 8]. K delecí dochází na nukleotid-vázající doméně NBD1 [11]. Dochází tak ke špatnému sbalení proteinu a jeho zadržení v endoplazmatickém retikulu [6]. Protein není dopraven k apikální straně plazmatické membrány a bývá degradován v proteazomu [9, 16].

**Tabulka č. 1.1:** Klasifikace CFTR mutací [1, 16, 21].

Třída mutace	Příklady mutací	Změny oproti správně fungujícímu CFTR proteinu
I	G542X, W1282X, R553X, 3950delT	Syntéza CFTR proteinu je narušena, vzniká nefunkční nebo špatně sbalený protein, který se nedostane k apikální straně membrány. Jedná se o mutace způsobující vznik stop kodonů nebo mutace způsobené abnormálním sestřihem exonů.
II	F508del, N1303K	CFTR protein je špatně sbalen a později degradován v proteazomu kvůli abnormální glykosylaci.
III	G551D, G178R, G551S,	CFTR protein je syntetizován a dopraven k plazmatické membráně, avšak nefunguje jeho regulace pomocí ATP nebo cAMP a chloridové ionty nejsou přepravovány ven z buňky.
IV	R334W, R117H, G314E, R347P, D1152H	CFTR protein je syntetizován, avšak je omezena vodivost chloridových iontů přes membránu.
V	3849+10 kb C→T, 3272-26 A→G	Syntéza CFTR proteinu je částečně poškozena, množství CFTR proteinu na apikální membráně je sníženo.

## 1.2.2. Modulátory CFTR proteinu

Modulátory CFTR proteinu ovlivňují jeho aktivitu, a tím přenos chloridových iontů z buňky ven. Tyto modulátory mohou být rozděleny na inhibitory, které CFTR kanál uzavírají, a aktivátory, které zajišťují jeho rychlejší otevírání [22].

### 1.2.2.2 Inhibitory CFTR proteinu

CFTR inhibitory jsou často látky mající lipofilní povahu a záporný náboj díky svým postranním skupinám. Inhibice aktivity CFTR kanálu může probíhat dvěma způsoby a to blokováním již otevřeného kanálu, kdy dochází k přerušení otevírání

kanálu, anebo alosterickou inhibicí, kdy je otevírání kanálu výrazně zpomaleno. Blokování otevřeného kanálu je, na rozdíl od alosterické inhibice, závislé na elektrochemickém potenciálu membrány [25].

CFTR inhibitory mohou být využívány při léčbě různých onemocnění. Protože se CFTR protein podílí na transepiteliálním transportu tekutin, mohou být tyto sloučeniny využity pro léčbu průjemových onemocnění, jako je např. cholera. Tyto inhibitory se zároveň podílí na zpomalení růstu cyst při polycystickém onemocnění ledvin [23]. V laboratorních podmínkách jsou CFTR inhibitory často využívány při studiu transportu aniontů prostřednictvím tohoto kanálu, při studiu jeho otevírání a zavírání a také pro studium vztahu mezi tímto kanálem a jinými CFTR-dependentními kanály [24].

Mezi CFTR inhibitory patří např. glibenklamid ze skupiny sulfonylureas nebo arylaminobenzoáty (např. NPPB – 5-nitro-2(3-fenylpropyl-amino)benzoát nebo DPC – dipeptidyl-peptidasa). Tyto látky blokují transport  $\text{Cl}^-$  iontů z buňky, avšak jsou účinné pouze při vyšších koncentracích, kdy ovlivňují i jiné iontové kanály [24].

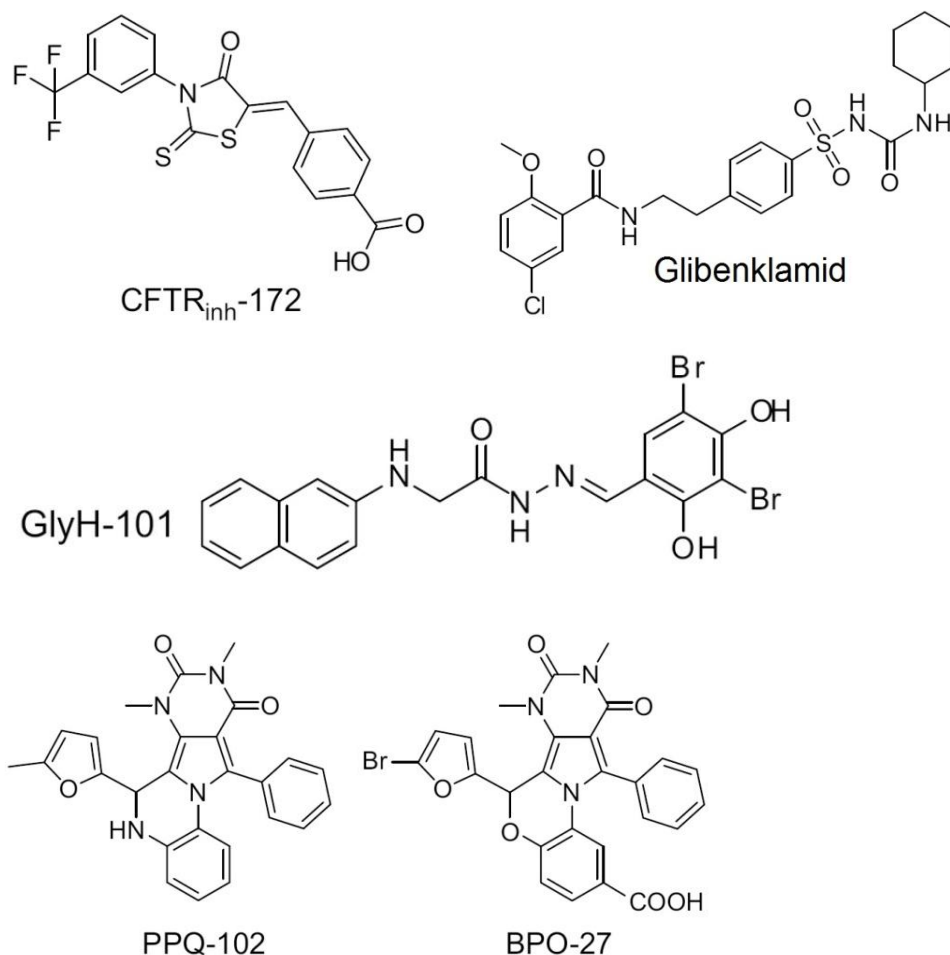
Dalšími inhibitory CFTR proteinu jsou sloučeniny, které patří mezi thiazolidinony, glycinové hydrazidy nebo chinoxalindiony [23].

Jedním z nejúčinnějších CFTR inhibitorů je CFTR<sub>inh</sub>-172 (obrázek č. 1.5 na straně 13) právě z již zmíněné třídy thiazolidinonů, který působí jako reverzibilní inhibitor stabilizující uzavřený stav kanálu pravděpodobně svým navázáním na NBD doménu. Tento inhibitor se v klinické praxi používá jak při léčbě průjemových onemocnění, tak při zpomalení růstu cyst u onemocnění ledvin [23 – 29].

Mezi glycinové hydrazidy patří např. inhibitor GlyH-101 (obrázek č. 1.5 na straně 13), který je dobře rozpustný ve vodě a rychle inhibuje vodivost chloridových iontů. Tento inhibitor se váže na extracelulární část CFTR proteinu a může být využitelný při léčbě průjemových onemocnění [23, 28, 29].

Do poslední skupiny chinoxalindionů, patří inhibitory PPQ-102 (pyrimidin-pyrrol-chinoxalindion) a BPO-27 (benzopyrimidin-pyrrol-oxazindion), které zajišťují úplné uzavření CFTR kanálu. PPQ-102 je však v buňce nestabilní a je málo rozpustný ve vodě. V porovnání s PPQ-102 je lepším inhibitorem BPO-27, který je rozpustnější ve vodě, v buňce je stabilnější a jeho inhibice není závislá na

elektrochemickém potenciálu membrány. Tyto inhibitory mohou být využity při léčbě polycystického onemocnění ledvin [23, 28]. Struktury těchto inhibitorů jsou zobrazeny na obrázku č. 1.5 na straně 13.

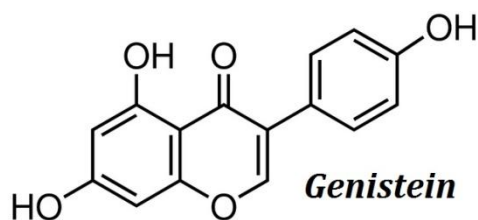


**Obrázek č. 1.5:** Chemické struktury CFTR inhibitorů [30].

### 1.2.2.1 Aktivátory CFTR proteinu

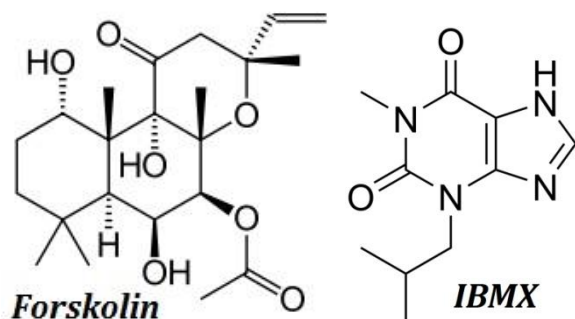
Aktivátory CFTR proteinu mohou být využity při léčbě cystické fibrózy. CFTR aktivátory působí dvěma způsoby, buďto nepřímo ovlivňují protein-kinasy, popřípadě fosfatasy, které kontrolují fosforylaci CFTR proteinu, nebo přímo interagují s CFTR proteinem, s jeho NBD nebo RD doménou, a tak ovlivňují otevírání CFTR kanálu [22, 25].

Mezi CFTR aktivátory patří např. flavonoidy genistein a apigenin. Nevýhodou genisteinu je, že reaguje s jinými látkami v buňce a jeho zvýšená koncentrace inhibuje CFTR kanál [31]. Jeho struktura je zobrazena na obrázku č. 1.6 na straně 14.



**Obrázek č. 1.6:** Chemická struktura CFTR aktivátoru genisteinu [32].

V laboratorních podmínkách se ke studiu aktivity CFTR kanálu často využívají další dva jeho aktivátory, forskolin a 3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX). Jejich chemické struktury jsou zobrazeny na obrázku č. 1.7 na straně 14. Jedná se o agonisty cAMP, díky nimž dochází ke zvýšené produkci tohoto druhého posla uvnitř buněk a tím k rychlejší aktivaci protein-kinasy A a následné fosforylaci NBD domén a otevření CFTR kanálu [4]. IBMX ovlivňuje CFTR kanál jak přímo, tak nepřímo [33]. Jeho nevýhodou je, že není selektivní a je potřeba použít vysokou koncentraci této látky, která by byla efektivní [22]. Forskolin je derivát terpenu rostlinného původu, který stimuluje enzym adenylát cykласu regulující intracelulární koncentraci cAMP. Vysoké koncentrace forskolinu (>20  $\mu\text{M}$ ) však mohou také vést k nespecifickým interakcím [34, 35]. Forskolin se proto někdy používá v kombinaci s IBMX, protože tato sloučenina ovlivňuje CFTR kanál přímo, a tím se zamezí poklesu aktivity CFTR kanálu způsobené poklesem cAMP, který je v buňce postupně odbouráván fosfodiesterasami [35]. Při plánování experimentu, ve kterém je studována modulace CFTR kanálu pomocí forskolinu, je nutno dát pozor na bazální aktivitu CFTR, neboť někdy je hladina cAMP nutná k aktivaci protein-kinasy A dostatečně vysoká a tím pádem se vliv forskolinu neprojeví. V těchto případech je možné použít ke stanovení bazální aktivity inhibitor CFTR<sub>inh</sub>-172 [35].



**Obrázek č. 1.7:** Chemické struktury CFTR aktivátorů forskolinu a IBMX [36].

## **1.3 Metody stanovení sekrece chloridových iontů prostřednictvím CFTR proteinu v buňkách**

Stanovení schopnosti CFTR kanálu transportovat ionty je považováno za jediný vhodný způsob, jak stanovit jeho aktivitu. Pro stanovení sekrece chloridových iontů prostřednictvím CFTR proteinu se používá několik metod. Mezi ně patří měření proudu, který je generován na základě průchodu iontů přes membránu, nebo měření elektrochemického potenciálu. Průtok iontů přes membránu může být také stanoven pomocí radioizotopů nebo fluorescenčního značení [35].

### **1.3.1 Měření iontového proudu**

Pro stanovení průchodu iontů přes CFTR kanál se používají iontově selektivní elektrody, které detekují chloridové ionty ve stanovovaném roztoku. Nejčastěji se používají skleněné elektrody naplněné elektrolytickým roztokem. Často dochází i k detekci jodidových iontů, které také procházejí přes CFTR kanál. Pro tyto ionty je elektroda senzitivnější [37, 38].

U velkých buněk je možno iontově selektivní elektrodu a referenční elektrodu přivést do kontaktu s buňkou. U menších buněk se referenční elektroda umísťuje do okolního roztoku, ve kterém se buňka nachází [38]. V obou případech se používají intracelulární mikroelektrody. Elektroda je umístěna v mikropipetě, která má velice malý hrot o průměru přibližně 1  $\mu\text{m}$  a méně. Díky svému jemnému hrotu jsou k buňce šetrné a zachovávají její fyziologické prostředí [35, 39]. Nevýhodou je, že práce s mikroelektrodami je náročná, a je velmi těžké proniknout mikroelektrodou do buňky bez jejího poškození [40].

Mikroelektrody, pomocí nichž se může měřit iontový proud, mohou být použity v následujících uspořádáních – „Voltage-clamp“, „Patch-clamp“ a „Ussing chamber“ [40].

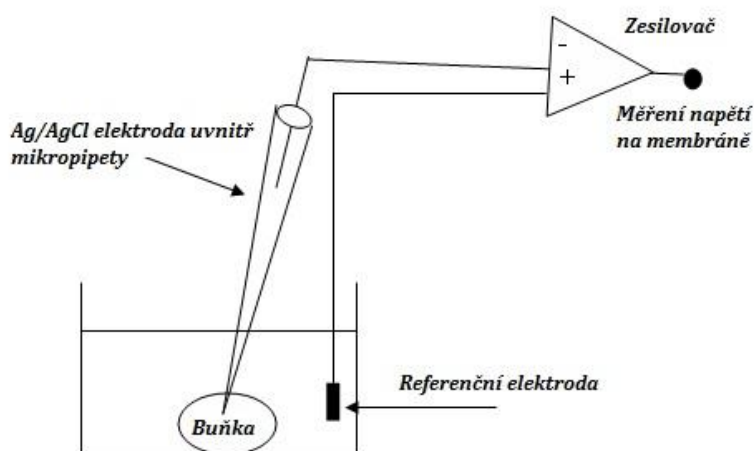
#### **1.3.1.1 „Voltage-clamp“ uspořádání**

Toto uspořádání se používá pro přímé stanovení průtoku iontů přes semipermeabilní membránu. Technika „voltage-clamp“ zajišťuje stálé napětí na elektrodách umístěných intra- a extracelulárně k membráně buňky, které je stejné jako

řídící napětí posílané ze signálního generátoru. To je zajišťováno membránovým a zpětnovazebným zesilovačem. Právě negativní zpětná vazba zajišťuje stabilitu napětí na elektrodách. Zvýší-li se napětí na výstupu membránového zesilovače, negativní zpětná vazba sníží proporcionálně napětí na vstupu tohoto zesilovače, aby napětí na výstupu bylo stále konstantní a ve shodě s napětím řídícím. Tím je zajištěno, že proud, který protéká přes buněčnou membránu, není ovlivňován změnami napětí na membráně, ale je úměrný pouze průchodu iontů přes tuto membránu [35, 41].

### 1.3.1.2 „Patch-clamp“ uspořádání

Rozšířením metody „Voltage-clamp“ vzniklo uspořádání „Patch-clamp“. Schéma této metody je zobrazeno na obrázku č. 1.8 na straně 16. Výhodou této metody je, že se dá použít u velmi malých buněk. Ke stanovení se používá mikropipeta, která zároveň slouží jako Ag/AgCl elektroda. Tato mikropipeta je přivedena do kontaktu s povrchem membrány buňky. Mikropipetou je nutno opatrně nasát membránu, dokud nepraskne. Díky tomu se špička pipety, a tedy i mikroelektroda, dostane do kontaktu s vnitřním prostředím buňky. Poté může být měřena aktivita všech studovaných iontových kanálů najednou. Nevýhodou této metody ale je, že dochází ke změně vnitřního prostředí buňky v důsledku dialýzy, ke které při této metodě dochází. Zároveň práce s mikropipetou přináší řadu problémů – mikropipeta nemusí dobře těsnit s membránou nebo nedojde k prasknutí membrány při nasátí mikropipetou a tím mikroelektroda nepřijde do kontaktu s vnitřním prostředím buňky [35, 41].



Obrázek č. 1.8: Schéma metody „Patch-clamp“ [42].

### **1.3.1.3 „Ussing chamber“**

Dalším uspořádáním je tzv. „Ussing chamber“, které bylo pojmenováno podle svého objevitele Hanse Ussinga r. 1950 [43]. Proud (nebo napětí) je měřen mezi dvěma polovinami komory oddělenými permeabilní částí, která je porostlá epiteliálními buňkami. Tyto buňky jsou polarizovány a díky tomu je možné studovat basolaterální a apikální část membrány. Obě poloviny komory jsou naplněny stejným množstvím roztoku, aby se zamezilo jakýmkoli chemickým, mechanickým nebo elektrickým hnacím silám, které by mohly způsobit porušení epiteliální vrstvy. Iontový transport vytváří na epitelu rozdíl napětí. Takto vzniklý rozdíl napětí se dá měřit pomocí dvou elektrod, které jsou umístěny v blízkosti epitelu. Toto napětí je možno vyrušit „vstříkovaním“ proudu pomocí dalších dvou elektrod, které jsou umístěny ve větší vzdálenosti od epitelu. Tento přiváděný proud se nazývá „short-circuit“ (zkratkový) a je přímo úměrný iontovému transportu přes membránu [35, 43].

### **1.3.2 Radioaktivní izotopy**

Radioaktivní látky („radiotracers“) jsou velmi často používány ke stanovení aktivity iontových kanálů, protože téměř všechny iontové kanály mohou být zkoumány právě pomocí těchto sloučenin. Pro stanovení přenosu chloridových iontů se používají izotopy  $^{36}\text{Cl}$  nebo  $^{125}\text{I}$  [35, 37]. Pro správné určení aktivity iontového kanálu pomocí radioizotopů je důležité oddělit intracelulární a extracelulární radioaktivitu. Radioaktivní látky mají ale nízkou specifitu a dají se použít jen u sledování přenosů iontů, které jsou pomalé (trvají déle než 1 s) [44]. Nevýhodou také je, že se musí pracovat s radioaktivitou, což přináší jistá rizika.

Jednou z vhodných modifikací metody pro sledování průchodu iontů přes membránu s využitím radioizotopů je použití proteoliposomů, které jsou často používány jako modelový systém pro studium membrány. Pokud tedy dochází k sekreci chloridů z proteoliposomu, změní se jeho vnitřní potenciál a dojde k vychytávání  $^{36}\text{Cl}$ -iontů z okolí buňky. Tím je možno stanovit vodivost chloridových iontů a množství aktivních CFTR kanálů [37].

### 1.3.3 Fluorescenční chloridové senzory

Pomocí fluorescenčních barviv může být průtok chloridových iontů přes CFTR kanál měřen dvěma způsoby a to buď stanovením množství těchto iontů v buňce, nebo jejich množství uvolněné z buňky [35]. Výhodou fluorescenčních indikátorů je jejich neinvazivnost, velmi jednoduchá manipulace a možnost měření rychlých iontových transportů přes membránu [27].

Aby mohl být fluorescenční indikátor použit v biologickém systému, musí splňovat následující požadavky: (a) musí být senzitivní ke změně intracelulární koncentrace daného iontu v rozmezí 0-60 mM, (b) odpověď na tuto změnu musí nastat přibližně do 1 ms, (c) musí být selektivní, (d) jeho fluorescence se musí měnit na základě změny koncentrace daného iontu a neměla by být ovlivněna jinými kationty, anionty ani změnou pH a (e) indikátor by pro buňku neměl být toxický a invazivní. Buňka by měla být indikátorem obarvena neinvazivní metodou a neměl by z ní být snadno vyplavován. Mělo by být možné stanovit absolutní koncentraci stanovovaného iontu z naměřené fluorescence bez potřeby znát koncentraci indikátoru [44].

Fluorescenční barviva je možno rozdělit do skupin, které jsou uvedeny v následujících kapitolách. Používají se fluorescenční barviva na bázi chinolinu, dále zelené fluorescenční proteiny nebo fluorescenční látky na bázi FRET [45].

#### 1.3.3.1 Fluorescenční látky na bázi chinolinu

Použití těchto fluorescenčních sloučenin při studiu transportu chloridových iontů je založeno na dynamickém zhášení fluorescence vlivem halogenidů, tzv. zhášedel. Při srážce halogenidu s fluorescenčním indikátorem dochází ke zhášení fluorescence dusíkatého heterocyklu indikátoru v závislosti na koncentraci tohoto halogenidu. Jodidové a bromidové ionty jsou účinnější zhášedla než ionty chloridové, a protože CFTR kanál může transportovat také tyto ionty, často se ke studiu aktivity CFTR kanálu právě tyto ionty využívají [35, 40, 46].

Vztah mezi zhášením fluorescence a koncentrací zhášedla je dán Stern-Volmerovou rovnicí (1):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q], \quad (1)$$

kde  $F_0$  je fluorescence bez přítomnosti zhášedla,  $F$  je fluorescence v přítomnosti zhášedla,  $[Q]$  je koncentrace zhášedla udávaná v mol/dm<sup>3</sup> a  $K_{SV}$  je Stern-Volmerova konstanta udávaná v (mol/dm<sup>3</sup>)<sup>-1</sup>. Stern-Volmerova konstanta je tedy převrácenou hodnotou koncentrace zhášedla, která způsobí 50% pokles fluorescence [40, 47].

Použití těchto fluorescenčních barviv je omezeno difúzí iontů přes membránu buňky. Tato barviva jsou navíc citlivá k silnému ozáření a jejich excitace v UV oblasti může poškodit buňku [45, 4].

V rámci experimentu jsou většinou fluorescenční barviva nejprve inkubována s buňkami, které jsou díky tomu obarveny. Tato barviva jsou velmi polární, a proto jsou jimi buněčné kultury obarveny pomalou difúzí. Barvivo, které nepronikne dovnitř buňky, je poté spolu s extracelulárními chloridovými ionty odebráno. Čím vyšší je tedy koncentrace chloridových iontů uvnitř buňky, tím více je fluorescence barviva zhášena. Proto je sekrece iontů z buňky doprovázena zvýšením fluorescence tohoto barviva uvnitř buňky. Při použití fluorescenčních barviv je důležité brát ohled na možné interference vzniklé změnou intracelulárního pH nebo fluorescencí jiných látek v roztoku. S časem navíc dochází ke snížení intenzity fluorescence barviva [4, 35, 48].

Mezi nejpoužívanější fluorescenční barviva patří sloučeniny SPQ (6-methoxy-*N*-(3-sulfopropyl) chinolin), MEQ (6-methoxy-*N*-ethyl-1,2-dihydrochinolin) nebo MQAE (*N*-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxychinolin) [35]. Chemické struktury chinolinu a fluorescenčních látek od něj odvozených jsou zobrazeny na obrázku č. 1.9 na straně 20. Některé vlastnosti těchto fluorescenčních barviv jsou uvedeny v tabulce č. 1.2 na straně 19 [47].

**Tabulka č. 1.2:** Některé vlastnosti fluorescenčních barviv na bázi chinolinu [47].

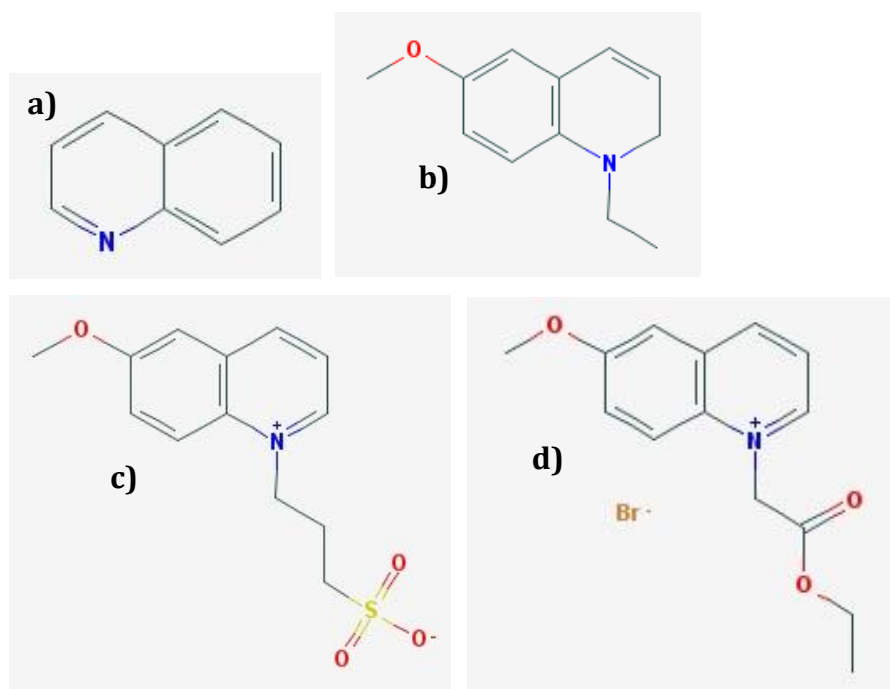
	Molekulová hmotnost / (g/mol)	Excitační vlnová délka / nm	Emisní vlnová délka / nm	Stern-Volmerova konstanta / (mol/dm <sup>3</sup> ) <sup>-1</sup>
SPQ	281	344	443	118
MQAE	326	350	460	200
MEQ	315	344	442	145

Sloučeninou SPQ jsou buňky nejčastěji barveny přechodným hypotonickým šokem. Fluorescenci barviva neovlivňují fosfáty, sulfáty nebo změna pH, avšak

např. thiokyanáty, dusitany nebo hydrogenuhlíčanové ionty mohou tuto fluorescenci zhaset. Zhášení SPQ fluorescence chloridy není tak účinné uvnitř buněk ( $K_{SV} = 12 \text{ M}^{-1}$ ) jako ve vodném roztoku ( $K_{SV} = 118 \text{ M}^{-1}$ ) [4, 47].

Sloučenina MQAE je vůči chloridovým iontům nejcitlivější fluorescenční sloučeninou ( $K_{SV} = 200 \text{ M}^{-1}$ ), která byla doposud navržena. Oproti SPQ tato sloučenina lépe proniká do buněk a zároveň je v buňce lépe zadržována. Fluorescence tohoto barviva není ovlivňována hydrogenuhlíčitany, dusičnany nebo sulfáty, avšak dihydrogenfosforečnany a  $\text{RCOO}^-$  ionty ji mohou zhaset. Určitou nevýhodou MQAE je, že jeho esterová skupina může být v buňce po čase hydrolyzována a tím dochází ke změně fluorescence [4, 41, 47].

Sloučenina MEQ se může snadno přeměnit na lipofilní dihydro-MEQ a volně prostupovat do buněk. Avšak dihydro-MEQ není senzitivní pro chloridové ionty. Sloučeninou dihydro-MEQ mohou být neinvazivně obarveny buňky, ve kterých dochází ke zpětné oxidaci této látky na sloučeninu MEQ, která neprochází volně membránou. Zhášení fluorescence barviva MEQ chloridy ( $K_{SV} = 145 \text{ M}^{-1}$ ) je vyšší, než je tomu u barviva SPQ [47].



**Obrázek č. 1.9:** Chemické struktury fluorescenčních barviv [49]. a) chinolin b) MEQ, c) SPQ, d) MQAE

### **1.3.3.2 Fluorescenční proteiny**

Alternativní metodou k výše uvedeným fluorescenčním barvivům je použití endogenního zeleného fluorescenčního proteinu („green fluorescent protein“ – GFP), který je zaveden do buňky. Jeho exprese v cílových buňkách poté indukuje fluorescenci. Výhodou GFP je jeho velmi nízká toxicita, jeho stabilita a neinvazivní vstup do buňky [22].

GFP byl mutován, díky čemuž vznikly proteiny se změněnými spektrálními vlastnostmi, které se s výhodou dají použít pro stanovení aktivity CFTR kanálu [35, 36]. Mezi takovéto proteiny patří například protein YFP („yellow fluorescent protein“). K vazbě halogenidů na YFP dochází v blízkosti chromoforu, což způsobuje snížení fluorescence. Díky tomu může být tento protein použit i ke studiu otevírání a zavírání CFTR kanálu. Nevýhodou této metody je, že je senzitivní ke změně pH. Výhodou je naopak to, že je neinvazivní a buňky nemusí být inkubovány s fluorescenčním barvivem. K excitaci dochází ve viditelné části spektra [24, 35, 41, 45].

### **1.3.3.3 FRET indikátory**

FRET („Förster/fluorescence resonance energy transfer“) indikátory se skládají ze dvou fluorescenčních proteinů, donoru a akceptoru, které jsou propojeny polypeptidovým řetězcem a mezi kterými dochází k přenosu energie. Tyto chloridové indikátory jsou geneticky kódovány v buňce a byly syntetizovány, aby bylo možno určit absolutní koncentraci chloridů [41, 50]. Příkladem může být tzv. „Clomeleon“, který je složen z CFP („Cyan fluorescent protein“) a varianty YFP, tzv. TFP („Topaz fluorescent protein“). Zatímco TFP je k chloridovým iontům senzitivní, CFP k těmto iontům senzitivní není. Po navázání chloridu na TFP dochází ke snížení jeho fluorescence. Tento proces může být pozorován jako změna v poměru fluorescence TFP donoru a fluorescence CFP akceptoru. Změna emisního spektra poté dokazuje, že intenzita fluorescence závisí na koncentraci chloridů [4, 41].

## 2. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout vhodný modelový systém pro studium transportu chloridových iontů u buněk plicního epitelu. Tato metoda by mohla být využitelná pro studium aktivity CFTR kanálu u pacientů trpících cystickou fibrózou. Proto byla nejprve vypracována literární rešerše zaměřená především na metody, kterými je možno studovat přenos chloridových iontů tímto kanálem.

Pro dosažení hlavního cíle práce bylo třeba splnit následující dílčí úkoly:

- Optimalizovat práci s buněčnými liniemi NuLi-1 a CuFi-1, která zahrnovala kultivaci a subkultivaci buněk, přípravu vhodných kultivačních nádob a stanovení viability buněk.
- Vybrat a optimalizovat vhodný modelový systém pro studium transportu chloridových iontů u buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1.
- Pomocí agonisty cyklického AMP forskolinu, který aktivuje CFTR kanál, ověřit, zda měřený průtok chloridových iontů probíhá prostřednictvím tohoto kanálu.

## 3. Materiál a metody

### 3.1 Použité přístroje a materiál

#### 3.1.1 Použité přístroje

Analytické váhy 40 SM	PESA, Švýcarsko
Autokláv Varioklav®	H+P Labortechnik GmbH, Německo
Centrifuga Micro Star 12	VWR, Labogene Aps, Dánsko
Centrifuga Hettich Universal 320 R	Hettich Zentrifugen, Německo
CO <sub>2</sub> inkubátor	ShellLab, ČR
Laminární box BIO 126	Labox, ČR
Mikroskop Motic AE31	Motic, Německo
Mikroskop Nikon ECLIPSE TE2002-U	Nikon, Japonsko
- S programem NIS-Elements AR 2.30	
Spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro	Tecan, Švýcarsko
- S programem i-control 1.8	
Vodní lázeň	Memmert, Německo

#### 3.1.2 Použitý materiál

15ml, 50ml plastové zkumavky Falcon	TPP, Švýcarsko
Buněčné linie NuLi-1, CuFi-1	ATCC® (American Type Culture Collection), USA
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Sigma, USA
CaCl <sub>2</sub>	Sigma, USA
Collagen type IV from human placenta	Sigma, USA
D-glukosa	Sigma, USA
Destičky CellBind® 24 a 96 jamek	Corning, USA
Destička CellStar®	Greiner bio-one, Rakousko
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Aplichem, Německo
FBS	Lonza Biotec s.r.o., Švýcarsko
Forskolin	Sigma, USA
Geneticin	Gibco™ Invitrogen, UK

HEPES	Sigma, USA
KCl	Sigma, USA
KNO <sub>3</sub>	Sigma, USA
Kultivační lahve 25, 75 cm <sup>2</sup>	Corning, USA
LHC-9 médium	Gibco™ Invitrogen, UK
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Sigma, USA
MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	Sigma, USA
MQAE	Sigma, USA
NaCl	Sigma, USA
NaNO <sub>3</sub>	Sigma, USA
Parafilm	Bemis, USA
PBS tablety	Gibco™ Invitrogen, UK
Peha-Soft nitrilové rukavice (bez pudru)	Hartmann, ČR
Plastové sterilní pipety 1 – 25ml na jedno použití	Corning, USA
Sterilní mikrofiltry 0,22 μm	Merck Milipore, Německo
Špičky	Biohit, UK
Trypsin-EDTA (10× koncentrovaný roztok)	PAA Laboratories, Rakousko

## 3.2 Práce s buněčnými liniemi

Pro studium CF, zejména aktivity iontových kanálů, terapeutického využití a imunity, jsou využívány tkáňové a buněčné kultury. Pro tuto práci byly použity buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1.

### 3.2.1 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie NuLi-1 (ATCC® CRL-4011) a CuFi-1 (ATCC® CRL-4013) jsou komerčně dostupné preparáty. Jedná se o imortalizované linie plicních epitelálních buněk. NuLi-1 je buněčná linie od zdravých pacientů. Doba zdvojení je okolo 43 hodin. CuFi-1 je buněčná linie od pacientů trpících CF s mutací F508del, doba zdvojení je přibližně 26 hodin. Transport chloridových iontů u buněčné linie CuFi-1 je omezený, protože nedochází k expresi CFTR proteinu [51, 52].

Tyto buněčné linie vyžadují pro svůj růst specifický povrch, který je potažen kolagenem (viz kapitola 3.2.6). Pro jejich kultivaci bylo použito médium LHC-9, které obsahuje růstové faktory, avšak neobsahuje fetální hovězí sérum (FBS). Výhodou při této kultivaci je, že stačí relativně malé množství buněk pro vznik monovrstvy [53, 54]. Kromě růstových faktorů obsahuje médium LHC-9 také fenolovou červeň, která slouží jako indikátor změny pH [54]. Jako antibiotikum byl do média LHC-9 přidáván Geneticin (G418) o výsledné koncentraci 50 µg/ml [55].

Veškeré buněčné linie byly inkubovány v inkubátoru při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Aby bylo zabráněno kontaminaci, bylo s buněčnými liniemi pracováno pouze v místnosti pro tkáňové kultury v laminárním boxu BIO 126. Pro práci byl používán sterilní materiál pro jednorázové použití (pipety, zkumavky Falcon, kultivační lahve) nebo materiál, který byl nejdříve sterilizován v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut (špičky k automatickým pipetám).

### 3.2.2 Rozmrazení buněčných linií

Buněčné linie se dlouhodobě uchovávají zamražené v  $-80^{\circ}\text{C}$  nebo v tekutém dusíku. Jako kryoprotektant se používá DMSO. Tato látka je pro buňky částečně toxická, a proto se při rozmrazování buněk musí pracovat co nejrychleji.

Nejprve bylo připraveno kultivační médium LHC-9, do kterého bylo přidáno odpovídající množství Geneticinu, aby jeho výsledná koncentrace v kultivačním médiu byla  $50\ \mu\text{g/ml}$ . Připravené kultivační médium LHC-9 bylo temperováno na  $37^{\circ}\text{C}$  ve vodní lázni.

Buňky v kryozkumavce z hlubokomrazícího boxu byly rozmrazeny ve vodní lázni ( $37^{\circ}\text{C}$ ) a poté převedeny do sterilní zkumavky Falcon. Objem buněčné suspenze byl 1 ml. Postupně byl po 1 minutě přidáván vzrůstající objem temperovaného média LHC-9 podle tabulky č. 3.1 na straně 26. Díky tomu se buňky mohly adaptovat na změnu osmolality a pH.

**Tabulka č. 3.1:** *Objem přidávaného média do 1 ml buněčné suspenze.*

Čas /min	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Objem přidávaného média /ml	0,1	0,12	0,15	0,19	0,26	0,36	0,52	0,86	1,69	4,75

Buněčná suspenze byla centrifugována při 1000 RPM 5 minut (centrifuga Hettich Universal 320R). Vzniklá peleta byla resuspendována v odpovídajícím množství připraveného kultivačního média LHC-9 a převedena do kultivační nádoby (s povrchem  $25/75\ \text{cm}^2$ ) potažené kolagenem (viz kapitola 3.2.6). Kultivační nádoba byla uložena do inkubátoru. Malý alikvot buněčné suspenze byl odebrán pro určení počtu buněk a stanovení jejich viability pomocí trypanové modři (viz kapitola 3.2.5).

### 3.2.3 Subkultivace buněčných linií

Subkultivace, neboli „pasáž“, buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 byla provedena vždy po 7 dnech kultivace buněk. To odpovídá době, kdy buňky pokryjí celý kultivační povrch kultivační nádoby a vytvoří konfluentní vrstvu. Každé 2 – 3 dny bylo vyměněno kultivační médium, aby měly buňky dostatečný přísun živin. Kultivační médium LHC-9 bylo připraveno stejným způsobem, který je uveden v kapitole 3.2.2. Před přidávkem do kultivační nádoby bylo nejprve toto médium temperováno na  $37^{\circ}\text{C}$ .

Z konfluentní vrstvy buněk bylo tedy nejprve odebráno kultivační médium LHC-9. Následně byly buňky převrstveny 2 – 3 ml 0,25% trypsinu s EDTA (0,53 mM). Trypsin s EDTA byl s buňkami ponechán po dobu 5-10 minut při 37°C v inkubátoru. Působení trypsinu bylo zastaveno přidávkem 1% FBS, které bylo přidáno ve stejném množství jako trypsin s EDTA, přibližně tedy 2 – 3 ml. Povrch kultivační nádoby byl několikrát opláchnut, aby došlo k uvolnění veškerých buněk.

Suspenze buněk byla převedena do 15ml zkumavky Falcon a centrifugována při 1000 RPM 5 minut (centrifuga Hettich Universal 320R). Po odstranění supernatantu byla vzniklá peleta resuspendována v 1 ml nově připraveného kultivačního média LHC-9. Z této buněčné suspenze bylo odebráno pro další kultivaci 75 – 150  $\mu$ l (přibližně  $5 \cdot 10^5$  buněk) do nových kultivačních nádob potažených kolagenem, do kterých bylo předem umístěno odpovídající množství kultivačního média LHC-9. Z buněčné suspenze byl dále odebrán malý alikvot pro určení počtu buněk a stanovení jejich viability, viz kapitola 3.2.5.

Pro následnou kultivaci buněčné linie NuLi-1 je vhodné odebrat větší množství buněčné suspenze, přibližně o 15 – 20  $\mu$ l více, než pro kultivaci buněčné linie CuFi-1, protože buněčná linie NuLi-1 má delší dobu zdvojení (viz kapitola 3.2.1). Vhodný objem kultivačního média v kultivační nádobě s povrchem 25 cm<sup>2</sup> je 5 – 10 ml, pro kultivační nádobu s povrchem 75 cm<sup>2</sup> je to pak 15 – 16 ml tohoto média.

### **3.2.4 Zamrazení buněčných linií**

Jak již bylo řečeno, buněčné linie se dlouhodobě uchovávají zamrazené v -80°C nebo v tekutém dusíku. Kromě uchování buněčné linie zajišťuje zamrazení také uchování genetického vybavení buněk.

Buněčné linie byly „pasážovány“ klasickým způsobem, který je popsán v kapitole 3.2.3. Vzniklá peleta byla centrifugačně promyta při 1000 RPM 5 minut (centrifuga Hettich Universal 320R) pomocí fosfátového pufru (PBS). Pufry PBS byl připraven rozpuštěním 1 tablety PBS v 0,5 l destilované vody. Konečná peleta buněk byla resuspendována v zamrazovacím médiu, které obsahovalo médium LHC-9, 30% roztok FBS (v/v) a 10% roztok DMSO (v/v). Tato buněčná suspenze byla poté alikvotována po 1 ml do připravených a řádně označených kryozkumavek. Uzavřené kryozkumavky byly

umístěny do zamrazovacího boxu Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container, který má garantované postupné ochlazování 1°C za minutu. Přes noc byly kryozkumavky umístěny do hlubokomrazícího boxu.

### **3.2.5 Stanovení počtu a viability buněk pomocí barvení trypanovou modří**

Pro určení počtu buněk v suspenzi bylo využito barvení trypanovou modří. Pro toto stanovení byla využita Bürkerova komůrka, neboli hemocytometr, která byla umístěna pod mikroskop Motic. Buněčná suspenze získaná z „pasáže“ byla smíchána v poměru 1:1 s 0,4% (w/v) trypanovou modří (20 µl buněčné suspenze a 20 µl trypanové modří). Z obarvené suspenze bylo odebráno 20 µl a toto množství bylo pipetováno na čtvercovou mřížku Bürkerovy komůrky. Tato komůrka byla umístěna pod mikroskop a buňky byly počítány. Vždy bylo počítáno 5 velkých čtverců z celkových 9, kde se každý velký čtverec skládá z dalších 16 malých čtverců (4×4). U těchto malých čtverců byly počítány pouze buňky na horním a pravém okraji, aby nebyly některé z buněk počítány vícekrát. Počítány byly pouze živé buňky, tedy ty, které nebyly obarveny na modro.

Ředění bylo prováděno tak, aby celkové množství počítaných buněk v 5 čtvercích bylo přibližně 50-100, což vede k přesnějšímu výsledku.

Pro stanovení celkového počtu buněk  $n$  byl použit vztah:

$$n = \text{počet buněk ve velkém čtverci} \times \text{ředění} \times 10\,000$$

### **3.2.6 Příprava kultivačních nádob potažených kolagenem**

Buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 vyžadují pro svou kultivaci specifický povrch potažený kolagenem. Je to z toho důvodu, že na tento povrch buňky lépe přisednou. Byl použit kolagen typu IV z lidské placenty. Zásobním roztokem byl roztok kolagenu IV v 0,25% kyselině octové (v/v) s výslednou koncentrací 1,8 mg/ml. Tento zásobní roztok byl uchováván v chladu ve skleněné lahvičce.

Zásobní roztok byl ředěn pufrům PBS tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 60 µg/ml. Připravený roztok byl přefiltrován přes 0,22µm filtr. Přefiltrovaný roztok byl

poté nanášen do nádob určených pro kultivaci buněk. Do kultivační nádoby s povrchem 25 cm<sup>2</sup>, resp. 75 cm<sup>2</sup> byly nanášeny 2 ml, resp. 4-5 ml roztoku kolagenu o koncentraci 60 µg/ml. Takto připravené nádoby byly inkubovány přes noc, tedy přibližně 12 – 18 hodin, za laboratorní teploty v laminárním boxu. Bylo nutno zajistit, aby byl roztokem kolagenu pokryt celý kultivační povrch nádoby.

Po inkubaci byl roztok kolagenu odebrán a kultivační nádoby byly ponechány vyschnout v laminárním boxu. Poté byly kultivační nádoby promyty 2 – 3 × pufrům PBS a ponechány v laminárním boxu při pokojové teplotě vyschnout dnem vzhůru. Je nutno ponechat kultivační nádoby obrácené dnem vzhůru, aby se na kultivačním povrchu nevytvářely krystalky PBS. Vysušené kultivační nádoby byly sterilizovány v laminárním boxu pod UV osvětlením minimálně 2 hodiny, lépe však přes noc.

Kultivační nádoby byly po sterilizaci přes víčko zataženy parafilmem a skladovány v chladu. Před dalším použitím byly vždy jednou promyty pufrům PBS.

### **3.3 Studium transportu chloridových iontů u buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1**

Jako fluorescenční indikátor bylo v této práci vybráno barvivo MQAE, neboli *N*-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxychinolin. MQAE je vhodné barvivo ke stanovení koncentrace chloridových iontů, jehož fluorescence je těmito ionty zhasena a ke kterým je citlivější než barvivo SPQ [56].

Transport chloridových iontů byl měřen dvěma způsoby. V prvním případě bylo stanovováno množství uvolněných chloridových iontů buněčnými liniemi NuLi-1 a CuFi-1 do pufru obsahujícího MQAE. V druhém případě byly uvedené buněčné linie přímo obarveny MQAE a byl stanovován úbytek chloridových iontů uvnitř buňky.

Fluorescence byla ve všech případech měřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro v programu i-control 1.8. Pro inkubaci buněk byl využit CO<sub>2</sub> inkubátor ShellLab s teplotou 37°C.

### 3.3.1 Stanovení chloridových iontů uvolněných buněčnými liniemi NuLi-1 a CuFi-1 do pufru obsahujícího MQAE

Sloučenina MQAE patří mezi fluorescenční barviva na bázi chinolinu. Její excitační a emisní vlnová délka je 350 nm, resp. 460 nm, jedná se tedy o modře fluoreskující sloučeninu [47]. Pro měření na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro byly excitační a emisní vlnová délka optimalizovány. Měření byla prováděna při excitační vlnové délce 362 nm a emisní vlnové délce 452 nm při horním čtení destičky (bez víčka).

Princip tohoto stanovení je následující: buněčné linie jsou inkubovány s pufrům SR<sup>+</sup> (složení uvedeno v kapitole 3.3.1.1) s vysokým obsahem chloridových iontů, aby došlo k nasycení buněk těmito ionty. Po inkubaci je tento pufr nahrazen pufrům SR<sup>-</sup> (složení uvedeno v kapitole 3.3.1.1), u něhož jsou místo chloridových iontů přítomny ionty dusičnanové, které nezhášejí fluorescenci barviva MQAE obsaženého v tomto pufru. Dochází k uvolnění chloridových iontů z buněk do pufru SR<sup>-</sup>, kde tyto ionty zhášejí fluorescenci MQAE, která je poté měřena na spektrofluorimetru v různých časových intervalech.

#### 3.3.1.1 Složení pufrů použitých pro studium transportu chloridových iontů

Oba tyto pufrы byly připraveny v destilované vodě. Složení pufru SR<sup>+</sup> je uvedeno v tabulce č. 3.2 na straně 30, složení pufru SR<sup>-</sup> je uvedeno v tabulce č. 3.3 na straně 31. Výsledné pH u obou pufrů mělo hodnotu 7,4 [57].

**Tabulka č. 3.2:** Složení pufru SR<sup>+</sup> – pufr obsahující chloridové ionty („Chloride containing standard ringer“).

	M (g/mol)	c (mM)
NaCl	58,44	140
KCl	74,55	5
CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	146,98	1,5
MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	203,30	1
HEPES	238,30	5
D-glukosa	198,17	5

**Tabulka č. 3.3:** Složení pufru SR – pufr bez chloridových iontů („Chloride free standard ringer“).

	M (g/mol)	c (mM)
NaNO <sub>3</sub>	84,99	140
KNO <sub>3</sub>	101,10	5
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	164,09	1,5
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	256,41	1
HEPES	238,30	5
D-glukosa	198,17	5

### 3.3.1.2 Určení Stern-Volmerovy konstanty

Pro stanovení Stern-Volmerovy konstanty ve vodném roztoku bylo využito měření zhášení fluorescence MQAE v závislosti na známé koncentraci chloridů [34].

Na destičku CellStar (Greiner) s 96 jamkami byly pipetovány do sloupců 1 – 12 ředící řadou vodné roztoky NaCl tak, aby jejich konečná koncentrace byla v rozsahu 0 – 4000 μM. Poté byly pipetovány do řad A – H vodné roztoky MQAE tak, aby jejich konečná koncentrace byla v rozsahu 0 – 300 μM, které byly připraveny též ředící řadou. Výsledné koncentrace obou látek v jamkách destičky jsou uvedeny v tabulce č. 3.4 na straně 31. Výsledný objem v jamkách byl 200 μl.

**Tabulka č. 3.4:** Výsledné koncentrace MQAE a NaCl v roztoku.

Koncentrace MQAE /μM	0	4,7	9,4	19	38	75	150	300				
Koncentrace NaCl /μM	0	3,9	7,8	16	31	63	125	250	500	1000	2000	4000

Fluorescence MQAE na destičce byla měřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200. Pro určení Stern-Volmerovy konstanty byla použita následující rovnice:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q], \quad (1)$$

kde  $F_0$  je fluorescence bez přítomnosti zhášedla,  $F$  je fluorescence v přítomnosti zhášedla,  $[Q]$  je koncentrace zhášedla udávaná v mol/dm<sup>3</sup> a  $K_{SV}$  je Stern-Volmerova konstanta udávaná v (mol/dm<sup>3</sup>)<sup>-1</sup>. Ze směrnice grafu závislosti  $(F_0/F - 1)$  na koncentraci Cl<sup>-</sup> iontů byla určena Stern-Volmerova konstanta [47].

### **3.3.1.3 Vliv koncentrace buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 na fluorescenci MQAE**

V rámci optimalizace metody bylo potřeba pro další experimenty stanovit vhodnou koncentraci buněk v jamkách destičky.

Byla použita destička CellBind (Corning) s 96 jamkami. Byly zvoleny tři různé koncentrace buněk, a to  $2 \cdot 10^3$ ,  $2 \cdot 10^4$  a  $2 \cdot 10^5$  buněk na jamku. Kontrolní skupina obsahovala pouze kultivační médium bez buněk. Každá testovaná skupina obsahovala 2 jamky.

Do jamek destičky byly nasazeny buněčné linie o dané koncentraci. V každé jamce bylo 200  $\mu$ l kultivačního média. Po 3 dnech bylo kultivační medium odstraněno a buňky dvakrát promyty 200  $\mu$ l pufru SR<sup>+</sup>, jehož složení je uvedeno v kapitole 3.3.1.1, potřetí bylo 200  $\mu$ l pufru SR<sup>+</sup> s buňkami inkubováno po dobu 20 minut. Po této inkubaci byly buňky třikrát promyty 200  $\mu$ l pufru SR<sup>-</sup>, jehož složení je také uvedeno v kapitole 3.3.1.1. Při třetím promytí bylo do pufru SR<sup>-</sup> přidáno barvivo MQAE tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 37,5  $\mu$ M v 200  $\mu$ l pufru (přidáno 22  $\mu$ l 0,34mM zásobního roztoku MQAE ke 178  $\mu$ l pufru SR<sup>-</sup>). Ihned byla měřena fluorescence MQAE na spektrofluorimetru při optimálním nastavení v různých časových intervalech.

### **3.3.1.4 Vliv forskolinu na transport chloridových iontů u buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1**

Forskolin patří mezi agonisty cAMP, zvyšuje jeho koncentraci v buňkách a tím ovlivňuje otevírání kanálu CFTR [4, 34, 35]. Forskolin byl vybrán pro ověření, zda jsou chloridové ionty uvolňovány z buňky prostřednictvím CFTR kanálu.

Forskolin patří mezi nepolární látky. Může být rozpuštěn v některých organických rozpouštědlech, jako je např. DMSO [58]. Proto byl nejprve forskolin rozpuštěn v DMSO (koncentrace forskolinu byla 3,2 mM) a poté zředěn SR<sup>-</sup> puftrem, aby nedošlo k narušení životaschopnosti buněk, výsledná koncentrace DMSO v jamkách byla 0,3 % (v/v).

Buněčné linie byly vysety v koncentraci  $2 \cdot 10^4$  buněk na jamku. Objem kultivačního média v každé jamce byl 200  $\mu$ l. Každá testovaná skupina obsahovala dvě jamky. Po vytvoření konfluentní vrstvy bylo kultivační médium odebráno a buňky byly

promyty stejným způsobem, který je popsán v kapitole 3.3.1.3. U každé buněčné linie o dané koncentraci byla první skupina promyta 200  $\mu\text{l}$  pufru  $\text{SR}^-$  obsahujícím 37,5 $\mu\text{M}$  MQAE a druhá skupina 200  $\mu\text{l}$  pufru  $\text{SR}^-$  obsahujícím mimo 37,5 $\mu\text{M}$  MQAE také forskolin o výsledné koncentraci 10  $\mu\text{M}$  (přidáno 6,3  $\mu\text{l}$  0,32mM zásobního roztoku forskolinu k 193,7  $\mu\text{l}$  pufru  $\text{SR}^-$  obsahujícímu 37,5 $\mu\text{M}$  MQAE). Kontrolní testovaná skupina byla zpracována stejným způsobem, ale neobsahovala buňky. Fluorescence MQAE byla měřena na spektrofluorimetru v různých časových intervalech.

### **3.3.1.5 Zpracování dat**

Při zpracování naměřených dat byla uváděna relativní fluorescence, která byla počítána jako rozdíl naměřené hodnoty fluorescence a hodnoty fluorescence pozadí (autofluorescence pufru). Pro kontrolu, zda se fluorescence MQAE nemění s časem a jako porovnání ovlivnění fluorescence MQAE chloridovými ionty uvolněnými z buňky, byla v celém časovém úseku měřena fluorescence 37,5 $\mu\text{M}$  MQAE v pufru  $\text{SR}^-$  v jamkách destičky kontrolní skupiny neobsahující buňky. Získaná data v rámci každé skupiny byla zprůměrována a byla určena směrodatná odchylka průměrné hodnoty.

## **3.3.2 Studium transportu chloridových iontů buněčnými liniemi obarvenými MQAE**

Při této metodě bylo fluorescenční barvivo MQAE před vlastním experimentem inkubováno s buňkami, aby došlo k jejich obarvení touto sloučeninou. Fluorescenční barvivo, které neproniklo do buňky, bylo odstraněno spolu s kultivačním médiem. Buňky byly po inkubaci promyty pufrům  $\text{SR}^+$  a následně pufrům  $\text{SR}^-$  (složení viz kapitola 3.3.1.1). Principem tohoto stanovení je, že by následné uvolnění chloridových iontů z buněk mělo způsobit zvýšení fluorescence obarvených buněk vlivem snížení koncentrace chloridových iontů. Tato metoda byla upravena a dále optimalizována na základě již dříve popsané metody [59].

### **3.3.2.1 Vliv koncentrace MQAE na obarvení buněčné linie CuFi-1**

Byly zvoleny různé koncentrace MQAE – 0, 2, 5, 10 a 15 mM. Každá testovaná skupina obsahovala 3 jamky.

Buněčná linie CuFi-1 byla nasazena na 96jamkovou destičku v koncentraci  $2 \cdot 10^4$  buněk v 200  $\mu$ l kultivačního média na jamku. Po vytvoření konfluentní vrstvy bylo původní kultivační médium vyměněno za nové, ve kterém byla obsažena vždy daná koncentrace MQAE. Takto připravené buněčné linie byly s barvivem MQAE inkubovány přes noc. Fluorescenční barvivo, které neproniklo do buňky, bylo odstraněno spolu s kultivačním médiem. Buňky byly promyty třikrát 200  $\mu$ l pufru SR<sup>+</sup>, ve kterém byly následně inkubovány 5 minut při 37°C. Poté byly jamky promyty třikrát 200  $\mu$ l pufru SR<sup>-</sup> a ihned byla měřena fluorescence buněk v různých časových intervalech.

### **3.3.2.2 Obarvení buněčné linie CuFi-1 10mM MQAE v závislosti na čase**

Byly určeny následující časové intervaly – 0, 2, 4, 6, 8, 12 a 24 hodiny. Buněčná linie CuFi-1 byla nasazena na 24jamkovou destičku CellBind (Corning) v koncentraci  $5,5 \cdot 10^5$  buněk v 750  $\mu$ l kultivačního média na jamku. Po vytvoření konfluentní vrstvy bylo buňkám vyměněno původní kultivační médium za nové, ve kterém bylo obsaženo barvivo MQAE v koncentraci 10 mM. Fluorescenční barvivo, které neproniklo do buňky, bylo odstraněno spolu s kultivačním médiem. V uvedených časových intervalech byla po promytí buněk 750  $\mu$ l PBS měřena fluorescence MQAE a provedeno stanovení viability buněk, viz kapitola 3.3.2.3.

### **3.3.2.3 Stanovení viability buněk**

Stanovení viability buněk bylo provedeno současně s měřením časové závislosti vlivu obarvení buněčné linie CuFi-1 10mM MQAE, které je uvedeno v kapitole 3.3.2.3.

Buněčné linie CuFi-1 byly „pasážovány“ stejným způsobem, který je uveden v kapitole 3.2.3 s následující modifikací: objem přidaného trypsinu s EDTA na jamku byl 150  $\mu$ l a objem 1% FBS byl 250  $\mu$ l. Viabilita buněk byla stanovena po jejich obarvení barvou Trypan Blue za použití Bürkerovy komůrky způsobem uvedeným v kapitole 3.2.5. Byly počítány jak živé, tak mrtvé buňky a poté byla stanovena viabilita buněk.

#### **3.3.2.4 Stanovení transportu chloridových iontů u buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 obarvených MQAE**

Buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 byly nasazeny v obvyklé koncentraci  $2 \cdot 10^4$  buněk na jamku. Každá jamka obsahovala 200  $\mu$ l kultivačního média. Po vytvoření konfluentní vrstvy bylo vyměněno původní kultivační médium za nové, ve kterém bylo obsaženo barvivo MQAE v koncentraci 10 mM. Buňky byly s MQAE inkubovány přes noc. Každá testovaná skupina obsahovala 3 jamky.

Aby bylo prokázáno, že je stanovován transport chloridových iontů, byly testovány následující skupiny: (a) první skupina obsahovala buněčné linie obarvené MQAE, které byly promyty způsobem uvedeným v kapitole 3.3.2.1, (b) druhá skupina obsahovala buněčné linie obarvené MQAE promyté pouze 200  $\mu$ l pufru SR<sup>+</sup>. Kontrolní skupina obsahovala buňky, které nebyly obarveny MQAE (autofluorescence buněk).

Po promytí buněk byla ihned na spektrofluorimetru měřena fluorescence MQAE v různých časových intervalech.

#### **3.3.2.5 Stanovení vlivu forskolinu na transport chloridových iontů u buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 obarvených MQAE**

Buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 byly nasazeny a inkubovány s barvivem MQAE stejným způsobem, jako v předchozí kapitole. Každá testovaná skupina obsahovala 3 jamky. Kontrolní skupina obsahovala buňky, které nebyly obarveny MQAE (autofluorescence buněk).

Byly testovány skupiny obsahující buněčné linie obarvené MQAE, které byly promyty následujícími způsoby: (a) první skupina byla třikrát promyta 200  $\mu$ l pufru SR<sup>+</sup>, 5 minut s tímto pufrům inkubována a následně třikrát promyta 200  $\mu$ l pufru SR<sup>-</sup>; (b) druhá skupina byla třikrát promyta 200  $\mu$ l pufru SR<sup>+</sup>, 5 minut s tímto pufrům inkubována a následně třikrát promyta 200  $\mu$ l pufru SR<sup>-</sup>, který při třetím promytí obsahoval 10  $\mu$ M forskolin (přidáno 6,3  $\mu$ l 0,32mM zásobního roztoku forskolinu k 193,7  $\mu$ l pufru SR<sup>-</sup>), (c) třetí skupina byla třikrát promyta 200  $\mu$ l pufru SR<sup>+</sup> obsahujícím 10  $\mu$ M forskolin, 5 minut s tímto pufrům inkubována a následně třikrát promyta 200  $\mu$ l pufru SR<sup>-</sup>, který při třetím promytí obsahoval 10  $\mu$ M forskolin. Ihned poté byla na spektrofluorimetru měřena fluorescence MQAE v různých časových intervalech.

### **3.3.2.6 Vliv různých koncentrací forskolinu na buněčné linie NuLi-1 obarvené 10 mM MQAE**

Byly použity následující koncentrace forskolinu obsaženém v pufru SR<sup>-</sup> – 0, 0,5, 1, 5 a 10 μM. Byla použita destička CellBind s 96 jamkami. Každá testovaná skupina obsahovala 8 jamek.

Bylo postupováno stejným způsobem uvedeným v kapitole 3.3.2.1. Při posledním promytí buněk již byl v pufru SR<sup>-</sup> přítomen forskolin v dané koncentraci. Následně byla měřena fluorescence MQAE na spektrofluorimetru v různých časových intervalech.

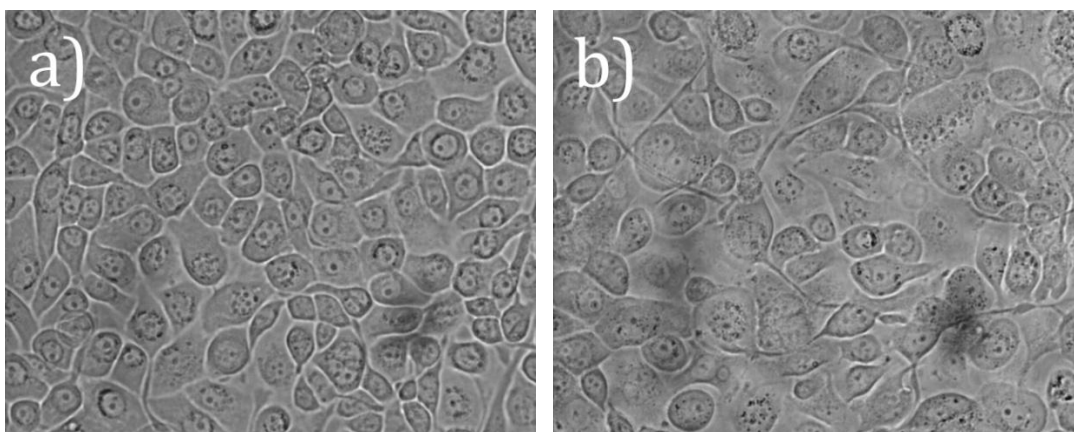
### **3.3.2.7 Zpracování dat**

Při zpracování naměřených hodnot byla vždy fluorescence pozadí (autofluorescence buněk) odečtena od naměřené hodnoty fluorescence. Data jsou dále prezentována jako přírůstek fluorescence dané rozdílem fluorescence  $F_t$  naměřené v čase  $t$  a počáteční fluorescence  $F_0$  naměřené v čase 0 min. Získaná data v rámci každé skupiny byla zprůměrována a byla určena směrodatná odchylka průměrné hodnoty.

## 4. Výsledky a diskuze

Cystická fibróza patří mezi geneticky podmíněná onemocnění. Podstatou nemoci je chybné fungování proteinu CFTR, jehož hlavní funkcí je sekrece chloridových iontů z buňky. Optimalizace vybraného modelového systému pro studium transportu chloridových iontů je proto přínosná pro studium aktivity tohoto kanálu a tím i pro studium cystické fibrózy.

V předkládané práci byly použity buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1. Tyto buněčné linie jsou komerčně dostupné (firma ATCC®). Jedná se o immortalizované buněčné linie z plicního epitelu. Buněčná linie NuLi-1 je od zdravých pacientů, doba zdvojení buněk je přibližně 43 hodin. Buněčná linie CuFi-1 je od pacientů trpících cystickou fibrózou s nejběžnější mutací F508del, doba zdvojení buněk je přibližně 26 hodin. Jak již bylo zmíněno dříve, u buněčné linie CuFi-1 nedochází k expresi CFTR proteinu a proto je transport chloridových iontů omezen [51, 52]. Po rozmražení byla viabilita obou těchto linií přibližně 70%, avšak po následujících dvou subkultivacích byla jejich viabilita už téměř vždy 100%. Důležité je také zmínit, že počet subkultivací obou těchto buněčných linií by neměl přesáhnout patnáct, protože poté může dojít ke změně vlastností a viability těchto buněčných linií. Se stářím buněčné kultury může být ovlivněn např. počet nebo aktivita iontových kanálů, tedy i CFTR kanálu [59]. S buněčnými liniemi bylo pracováno v okamžiku, kdy vytvořily konfluentní vrstvu. Konfluentní vrstva uvedených buněčných linií je zobrazena na obrázku č. 4.1 na straně 38. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U, filtr 31001 FITC C87701, kamera PixelLINK, rozlišení LWD 40×/0,4, v programu NIS-Elements AR 2.30.



**Obrázek č. 4.1:** Mikroskopické snímky konfluentní vrstvy buněčných linií a) NuLi-1 a b) CuFi-1. Fotografie byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U, filtr 31001 FITC C87001, kamera PixelLINK, rozlišení LWD 40×/0,4, v programu NIS-Elements AR 2.30, byl použit.

## 4.1 Studium transportu chloridových iontů u buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1

Stanovení schopnosti CFTR kanálu transportovat chloridové ionty je považováno za jediný vhodný způsob, jak stanovit jeho aktivitu. Pro toto stanovení byla v předkládané práci vybrána metoda fluorescenčního značení, která byla optimalizována. Tato metoda byla zvolena díky následujícím výhodám fluorescenčních indikátorů: snadná manipulace ve srovnání s voltametričnými metodami, neinvazivnost a nízká toxicita vůči buňkám a možnost měření rychlých transportů chloridových iontů přes membránu. Jako fluorescenční indikátor bylo zvoleno barvivo MQAE, neboli *N*-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxychinolin, které je nejcitlivější fluorescenční sloučeninou vůči chloridovým iontům, která byla doposud navržena [35, 42, 48].

Barvivo MQAE poskytuje fluorescenci v modré části spektra, která je měřena při excitační vlnové délce 350 nm a emisní vlnové délce 460 nm [47]. Fluorescence tohoto barviva byla měřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro v programu i-control 1.8, pro který bylo nastavení vlnových délek v rámci této práce optimalizováno. Z naměřených maxim fluorescenčních spekter barviva MQAE byla určena excitační vlnová délka při 362 nm a emisní vlnová délka při 452 nm. Destička CellBind (Corning),

resp. Cellstar, byla vždy čtena shora bez víčka, hodnota „gain“ (velikost zesílení) byla optimalizována pro každé měření zvlášť.

V rámci vývoje optimální metody pro studium transportu chloridových iontů u buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 pomocí fluorescenčního barviva MQAE byly testovány dva způsoby měření tohoto transportu a to stanovení množství chloridových iontů uvolněných z buňky a stanovení jejich množství přímo v buňce.

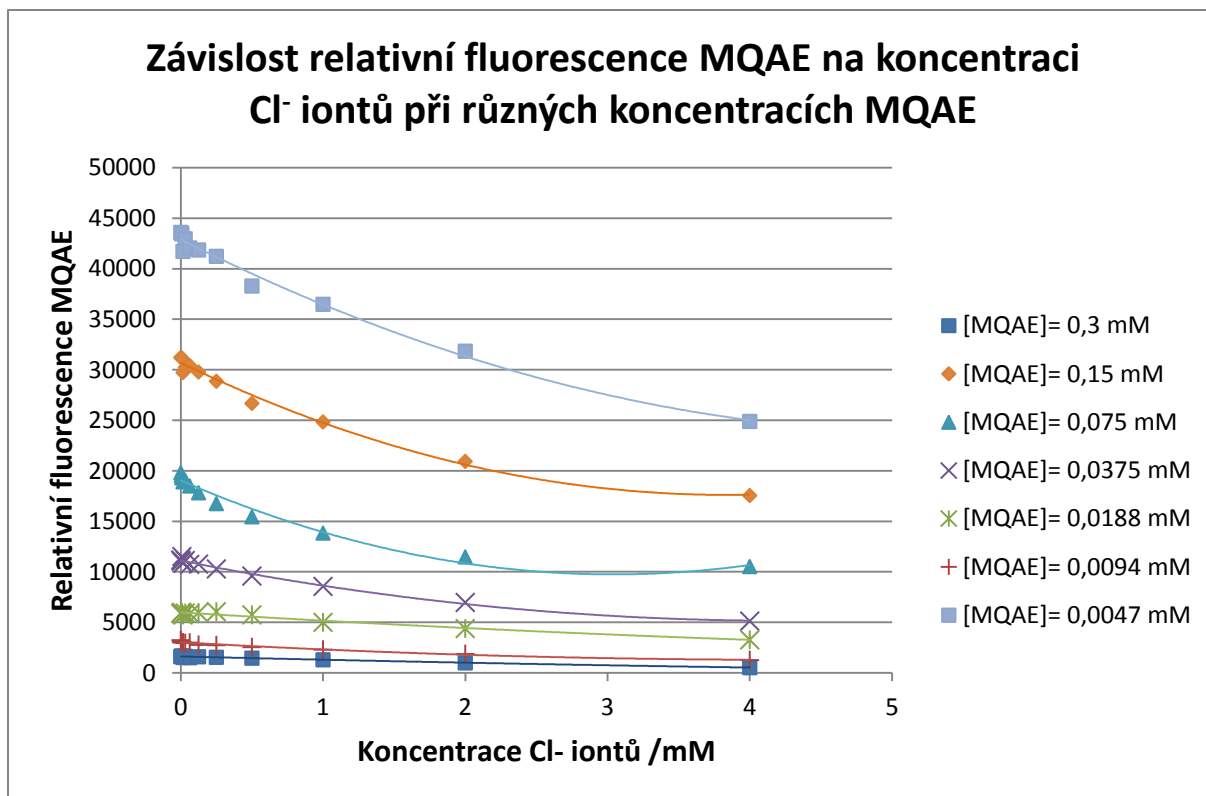
#### **4.1.1 Stanovení chloridových iontů uvolněných buněčnými liniemi NuLi-1 a CuFi-1 do pufru obsahujícího MQAE**

V prvním případě byly nejprve buněčné linie promyty a inkubovány s pufrům SR<sup>+</sup> s vysokým obsahem chloridových iontů. Díky tomu došlo k nasycení buněk těmito ionty. Následně byl pufr SR<sup>+</sup> vyměněn za pufr SR<sup>-</sup>, který místo chloridových iontů obsahuje ionty dusičnanové, které nezhášejí fluorescenci barviva MQAE, které je do tohoto pufru přidáno. Uvolnění chloridových iontů buňkou do pufru SR<sup>-</sup>, který obsahuje MQAE, by mělo zhaset fluorescenci tohoto barviva. Tato hypotéza byla v následujících experimentech testována.

##### **4.1.1.1 Výběr vhodné koncentrace MQAE a určení Stern-Volmerovy konstanty**

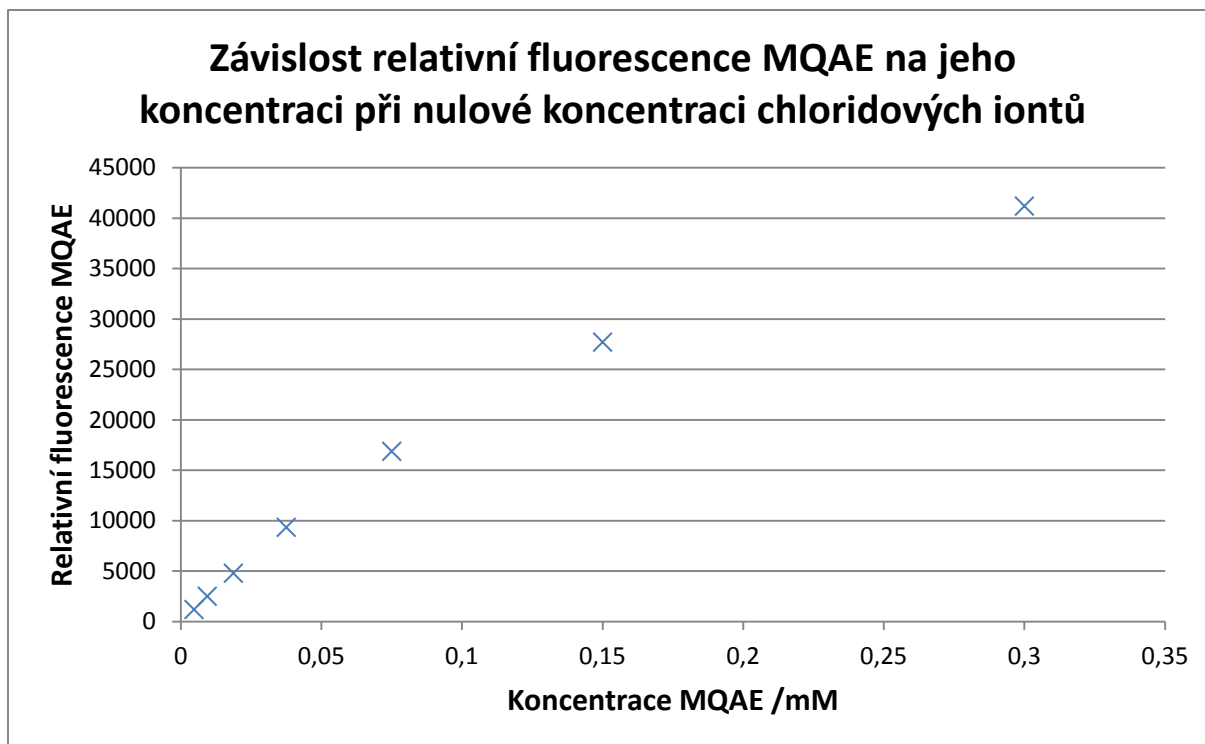
Nejprve byla testována citlivost fluorescenčního barviva MQAE vůči různým koncentracím chloridových iontů, aby mohla být vybrána vhodná koncentrace MQAE reagující na nízké koncentrace těchto iontů uvolněných buněčnou kulturou.

Na obrázku č. 4.2 na straně 40 je zobrazena závislost relativní fluorescence MQAE na koncentraci chloridových iontů při různých koncentracích tohoto barviva ve vodném prostředí. Měření bylo provedeno na spektrofluorimetru při hodnotě „gain“ 52. Z obrázku je patrné, že se vzrůstající koncentrací chloridových iontů dochází k hyperbolickému poklesu fluorescence MQAE způsobené zhasením těmito ionty.



**Obrázek č. 4.2:** Závislost relativní fluorescence MQAE na koncentraci chloridových iontů při různých koncentracích tohoto barviva ve vodném prostředí. Měření fluorescence bylo provedeno na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro při excitační vlnové délce 362 nm a emisní vlnové délce 452 nm. Destička CellBind byla čtena shora bez víčka při hodnotě „gain“ 52.

Ze závislosti relativní fluorescence MQAE na jeho koncentraci při nulové koncentraci chloridových iontů, která je znázorněna na obr. 4.3 na straně 41, je patrné, že tato závislost je lineární přibližně do hodnoty koncentrace MQAE 37,5  $\mu$ M. Tato koncentrace byla také nejnižší koncentrací, při které toto barvivo citlivě reagovalo na změnu koncentrace chloridových iontů. Proto byla tato koncentrace MQAE vybrána pro další experimenty.



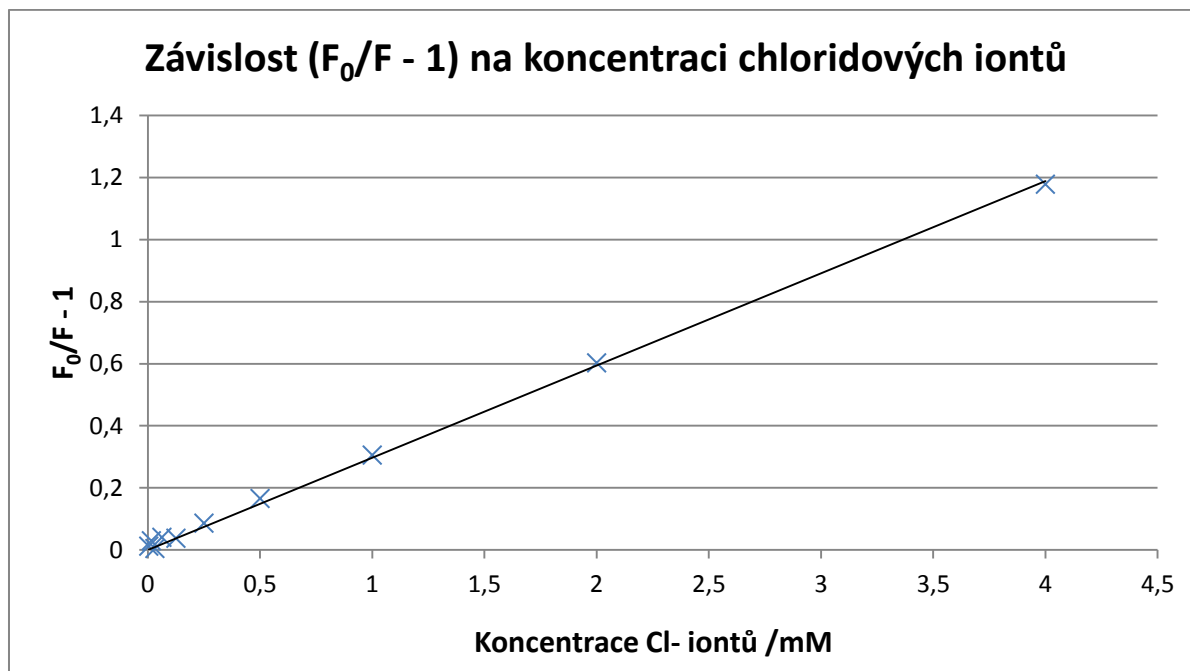
**Obrázek č. 4.3:** Závislost relativní fluorescence MQAE na jeho koncentraci při nulové koncentraci chloridových iontů ve vodném prostředí. Měření fluorescence bylo provedeno na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro při excitační vlnové délce 362 nm a emisní vlnové délce 452 nm. Destička CellBind byla čtena shora bez víčka při hodnotě „gain“ 52.

Pro zvolenou koncentraci barviva MQAE byla stanovena Stern-Volmerova konstanta. Pro určení Stern-Volmerovy konstanty byla použita následující rovnice:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q], \quad (1),$$

kde  $F_0$  je fluorescence bez přítomnosti zhášedla,  $F$  je fluorescence v přítomnosti zhášedla,  $[Q]$  je koncentrace zhášedla udávaná v  $\text{mol/dm}^3$  a  $K_{SV}$  je Stern-Volmerova konstanta udávaná v  $(\text{mol/dm}^3)^{-1}$ . Jak již bylo zmíněno, tato rovnice popisuje vztah mezi zhášením fluorescence barviva a koncentrací zhášedla, v tomto případě chloridových iontů. Stern-Volmerova konstanta je tedy převrácenou hodnotou koncentrace zhášedla, která způsobí 50% pokles ve fluorescenci [40, 47]. Graf závislosti  $(F_0/F - 1)$  na koncentraci chloridových iontů je zobrazen na obrázku č. 4.4 na straně 42. Z literatury je pro MQAE známa hodnota Stern-Volmerovy konstanty  $200 \text{ M}^{-1}$  [47]. Ze směrnice rovnice

uvedené přímky byla určena Stern-Volmerova konstanta, která má hodnotu  $213 \pm 6 \text{ M}^{-1}$ . Stanovená hodnota Stern-Volmerovy konstanty MQAE se liší od hodnoty, která je uvedena v literatuře. Tato chyba mohla být pravděpodobně způsobena nepřesným pipetováním.



**Obrázek č. 4.4:** Závislost ( $F_0/F-1$ ) na koncentraci chloridových iontů v roztoku. Měření fluorescence bylo provedeno na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro při excitační vlnové délce 362 nm a emisní vlnové délce 452 nm. Destička CellBind byla čtena shora bez víčka při hodnotě „gain“ 52.

#### 4.1.1.2 Vliv koncentrace buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 na fluorescenci MQAE

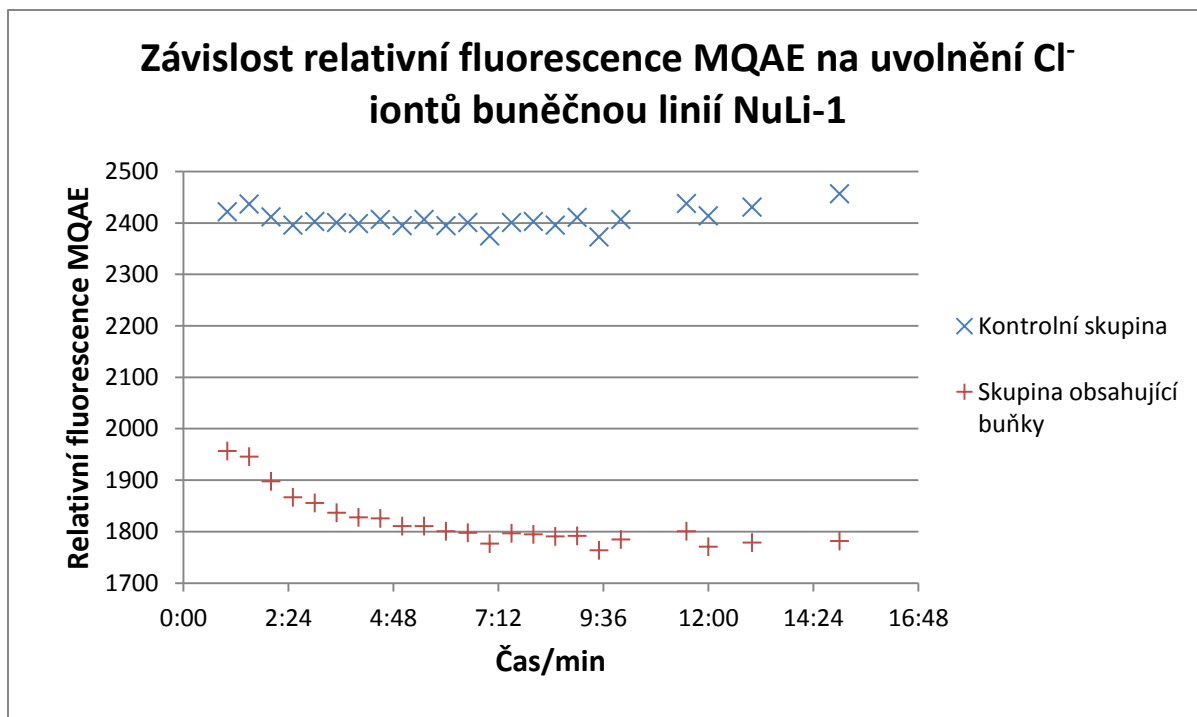
V dalším kroku byla optimalizována vhodná koncentrace buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 pro studium transportu chloridových iontů. Byly zvoleny tři různé koncentrace buněk a to  $2 \cdot 10^3$ ,  $2 \cdot 10^4$  a  $2 \cdot 10^5$  buněk na jamku v destičce CellBind s 96 jamkami. Fluorescence MQAE byla měřena na spektrofluorimetru při hodnotě „gain“ 49.

Při koncentraci  $2 \cdot 10^3$  buněk na jamku nedošlo k dostatečnému pokrytí povrchu jamky ani po sedmi dnech a tím pádem nebylo získáno dostatečné množství chloridových iontů, které by ovlivnily fluorescenci MQAE. Při koncentraci  $2 \cdot 10^4$  buněk na jamku se konfluentní vrstva buněk vytvořila přibližně po třech dnech. Při nejvyšší koncentraci  $2 \cdot 10^5$  buněk na jamku bylo naopak v jamce přítomno příliš mnoho buněk,

buňky byly tzv. „přerostlé“. Některé z těchto buněk nepřisedaly ke dnu jamky a byly odmyty při promytí pufrům. Pro následující měření byla proto zvolena koncentrace buněk  $2 \cdot 10^4$  buněk na jamku v destičce s 96 jamkami, doba kultivace buněčných linií do vytvoření konfluentní vrstvy byla přibližně tři dny.

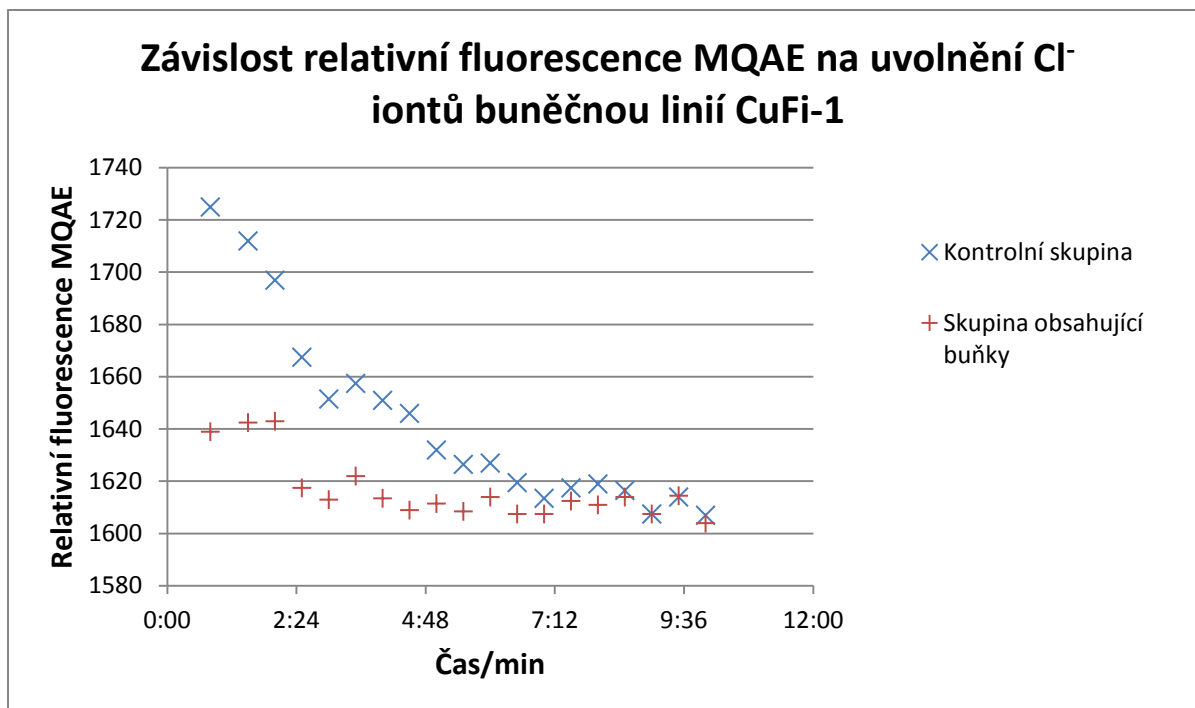
Obrázek č. 4.5a, resp. 4.5b na straně 44, resp. 45 zobrazuje stanovení množství uvolněných chloridových iontů buněčnými liniemi NuLi-1, resp. CuFi-1 ( $2 \cdot 10^4$  buněk na jamku) do pufru obsahujícího MQAE.

Z grafu na obrázku č. 4.5a je patrné, že fluorescence MQAE v pufru  $SR^-$  bez přítomnosti buněk, která sloužila jako kontrola, se s časem nemění. Naopak v přítomnosti buněk linie NuLi-1 docházelo k poklesu fluorescence vlivem uvolňovanými chloridových iontů z buňky do pufru obsahujícího  $37,5 \mu M$  MQAE, což by potvrdilo zmíněnou hypotézu. Avšak při tomto stanovení docházelo k řadě problémů. Nebylo možno měřit více vzorků najednou, neboť záleželo na tom, aby ihned po promytí pufrům  $SR^-$  byla změřena fluorescence, nedocházelo k časové prodlevě a byla zachycena dynamika uvolnění chloridových iontů. Měření bylo bohužel v mnoha případech nereprodukovatelné. V řadě případů docházelo k poklesu fluorescence MQAE s časem i u kontrolních vzorků. Při této metodě se stanovují chloridové ionty vně buňky, kde je v pufru obsaženo MQAE, a proto koncentrace a tím i fluorescence MQAE mohla být ovlivněna mnoha faktory; (a) při promývání jamek záleží na tom, aby byl důkladně odebrán veškerý pufr  $SR^+$ , protože chloridové ionty v tomto pufru mohou následně ovlivňovat stanovení, (b) fluorescence barviva může být také ovlivněna např. molekulami kyslíku nebo jinými cizorodými látkami, se kterými toto barvivo, resp. pufr  $SR^-$ , přichází do styku při promývání jamek nebo při pipetování [60], (c) samotná sloučenina MQAE proniká do buněk, takže může dojít ke změně fluorescence během spektrofluorimetrického měření, kdy jsou buňky společně s MQAE. Tento vliv by se dal odstranit přenesením pufru obsahujícího MQAE s uvolněnými chloridovými ionty do jiné destičky po daných časových intervalech, avšak z časových důvodů nebyl tento experiment proveden.



**Obrázek č. 4.5a:** Závislost relativní fluorescence MQAE na uvolnění chloridových iontů buněčnou linií NuLi-1 o koncentraci  $2 \cdot 10^4$  buněk na jamku. Zvolená koncentrace MQAE byla  $37,5 \mu\text{M}$ . Měření fluorescence bylo provedeno na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro. Excitační vlnová délka měla hodnotu 362 nm, emisní vlnová délka byla 452 nm. Destička CellBind byla čtena shora bez víčka při hodnotě „gain“ 49.

Z grafu na obrázku č. 4.5b je vidět, že u buněčné linie CuFi-1 nastal již zmíněný problém klesající fluorescence MQAE v kontrolní skupině neobsahující buňky. Navíc díky tomu nebylo možné jednoznačně rozhodnout, jestli dochází k uvolňování chloridových iontů touto buněčnou linií či nikoli.



**Obrázek č. 4.5b:** Závislost relativní fluorescence MQAE na uvolnění chloridových iontů buněčnou linií CuFi-1 o koncentraci  $2 \cdot 10^4$  buněk na jamku. Zvolená koncentrace MQAE byla  $37,5 \mu\text{M}$ . Směrodatná odchylka nepřesáhla hodnotu 6% průměru. Měření fluorescence bylo provedeno na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro. Excitační vlnová délka měla hodnotu 362 nm, emisní vlnová délka byla 452 nm. Destička CellBind byla čtena shora bez víčka při hodnotě „gain“ 49.

#### 4.1.1.3 Vliv forskolinu na transport chloridových iontů u buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1

Pro potvrzení sekrece chloridových iontů prostřednictvím CFTR kanálu byla v předkládané práci použita sloučenina forskolin. Tento aktivátor CFTR proteinu patří mezi agonisty cyklického AMP. Stimuluje enzym adenylát cyklastu, která zvyšuje intracelulární koncentraci cAMP. Díky tomu dochází k rychlejší aktivaci protein-kinasy A a následně otevírání CFTR kanálu. Je však nutno dát pozor na vyšší koncentrace forskolinu ( $>20 \mu\text{M}$ ), které mohou vést k nescifickým interakcím [4, 34, 35].

Při studiu vlivu forskolinu byl při posledním promytí buněk puforem  $\text{SR}^-$  k tomuto pufru přidán kromě  $37,5 \mu\text{M}$  MQAE také  $10 \mu\text{M}$  forskolin. Ihned poté byla měřena

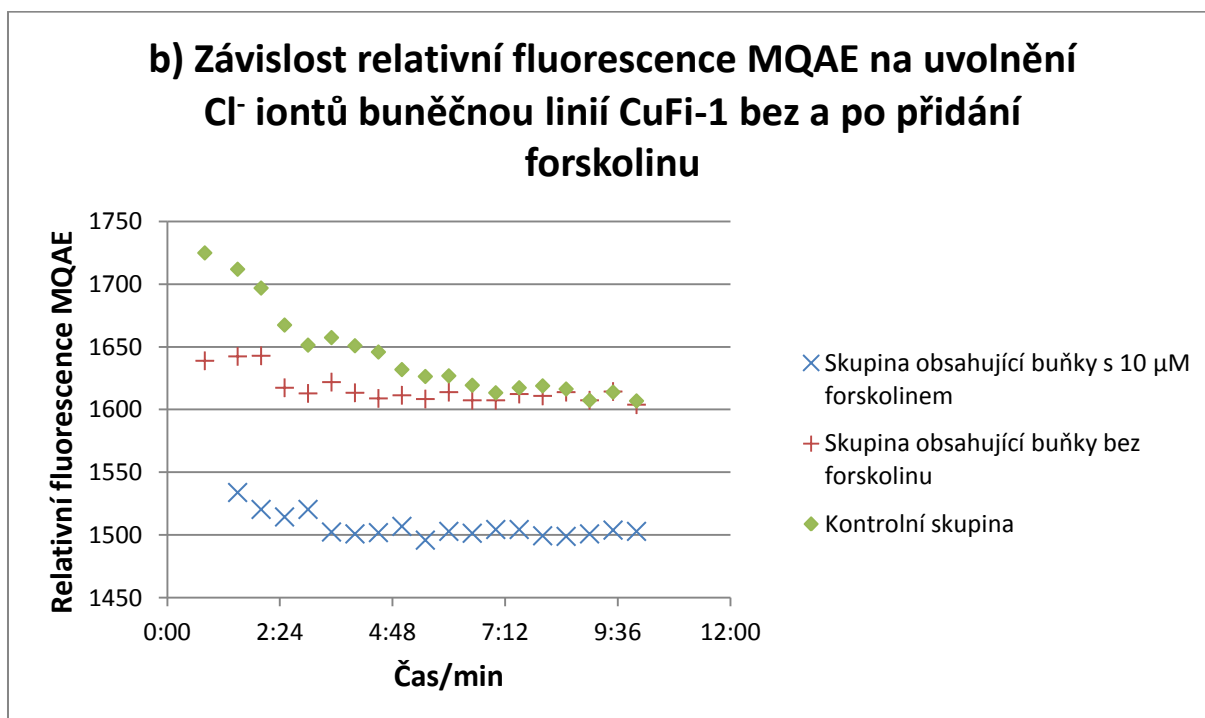
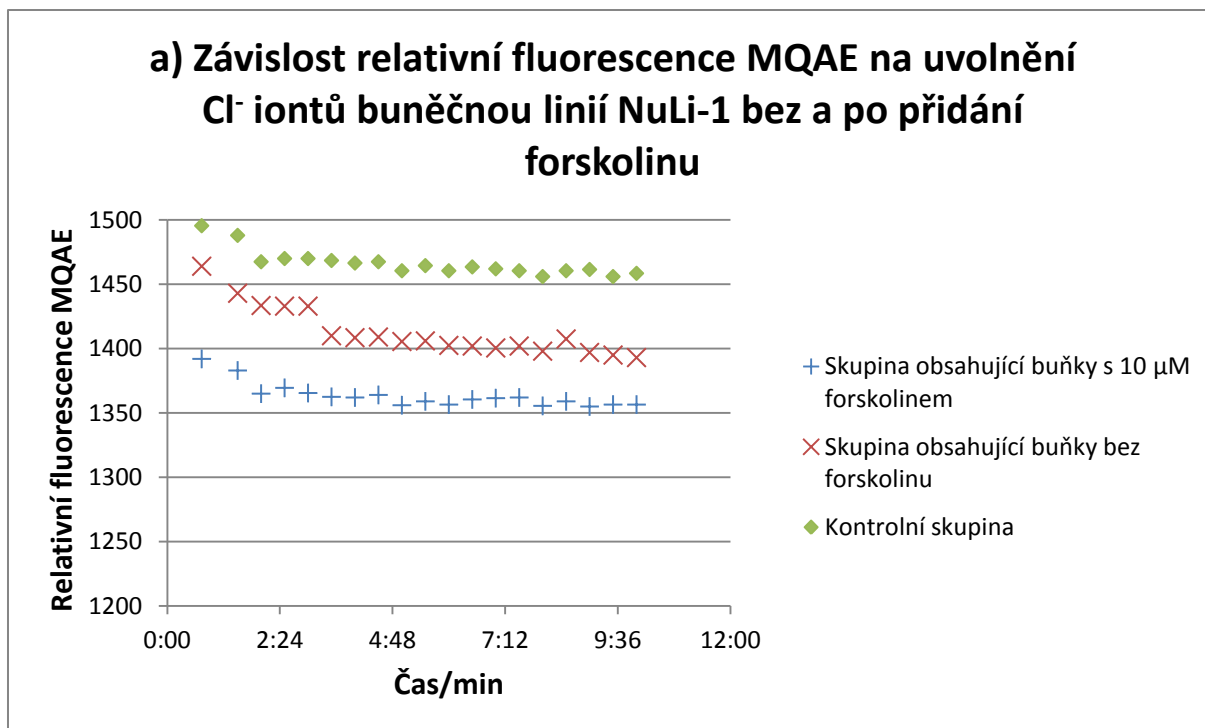
fluorescence MQAE na spektrofluorimetru v závislosti na čase. Díky forskolinu by mělo docházet k vyšší sekreci chloridových iontů z buněk a tím také ke zvýšení zhášení fluorescence MQAE.

Závislosti relativní fluorescence MQAE na čase bez a po přidání 10 $\mu$ M forskolinu pro jednotlivé buněčné linie jsou zobrazeny na následujících obrázcích v této kapitole.

Z grafu na obrázku č. 4.6 (a) na straně 47 je patrné, že pokud je u buněčné linie NuLi-1 k pufru SR<sup>-</sup> přidán forskolin, dochází ke snížení fluorescence MQAE oproti případu, kdy forskolin k tomuto pufru přidáván není. To by potvrdilo zvýšenou sekreci chloridových iontů prostřednictvím CFTR kanálu. Avšak tato měření nebyla reprodukovatelná, což mohlo být způsobeno již zmíněnými faktory. Navíc došlo vždy k čtyřminutové časové prodlevě mezi promytím buněk puftrem SR<sup>-</sup> a měřením fluorescence, proto pokles fluorescence MQAE ve skupinách obsahujících buňky nemusí být příliš patrný. Zároveň je nutno pracovat velmi přesně a také velmi rychle. Je tedy zřejmé, že toto stanovení není vhodné pro studium většího množství vzorků najednou, což je i jeho nevýhodou.

V případě studia vlivu forskolinu na buněčnou linii CuFi-1 nastal již zmíněný problém poklesu fluorescence MQAE i v kontrolní skupině, která neobsahovala buňky, jak je zřejmé z grafu 4.6 (b) na straně 47. Z uvedeného grafu je dále patrné, že fluorescence MQAE kontrolní skupiny a skupiny obsahující buňky, se kromě počátečních bodů příliš neliší. U této buněčné linie nedochází k expresi CFTR proteinu a tudíž by forskolin neměl ovlivňovat sekreci chloridových iontů prostřednictvím CFTR kanálu. Není jasné, proč k danému poklesu fluorescence MQAE v přítomnosti forskolinu došlo.

Lze tedy říci, že byla prokázána možnost stanovení uvolněných chloridových iontů ze zvolených buněčných linií prostřednictvím této nepřímé metody. Avšak toto stanovení nebylo reprodukovatelné a není vhodné k měření více vzorků najednou.



**Obrázek č. 4.6:** Závislost relativní fluorescence MQAE na uvolnění chloridových iontů buněčnou linií a) NuLi-1, b) CuFi-1 o koncentraci  $2 \cdot 10^4$  buněk na jamku v různých časových intervalech bez a po přidání  $10 \mu\text{M}$  forskolinu. Koncentrace MQAE byla  $37,5 \mu\text{M}$ . Směrodatná odchylka nepřesáhla hodnotu 4% průměru. Měření fluorescence bylo provedeno na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro. Excitační vlnová délka měla hodnotu 362 nm, emisní vlnová délka je 452 nm. Destička CellBind byla čtena shora bez víčka při hodnotě „gain“ 49.

### **4.1.2 Studium transportu chloridových iontů buněčnými liniemi obarvenými MQAE**

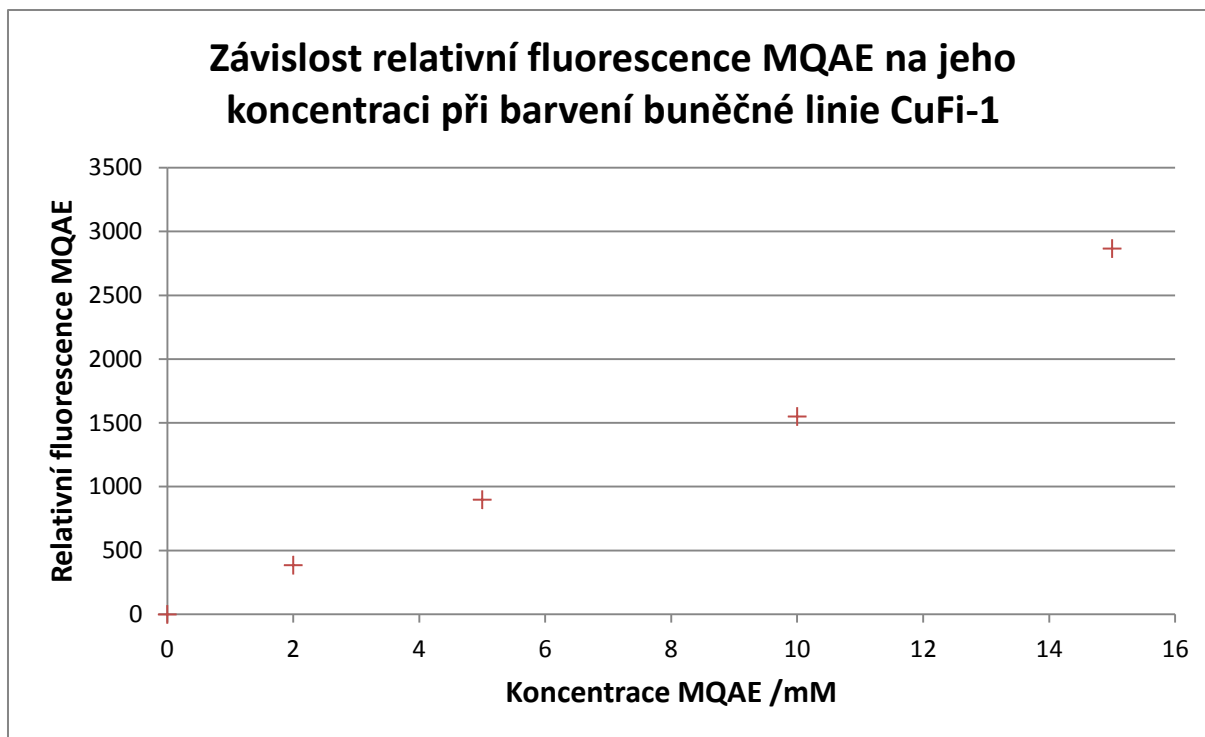
Ve druhém případě byly před vlastním experimentem nejprve buněčné linie inkubovány s fluorescenčním barvivem MQAE, aby došlo k průniku tohoto barviva do buněk a tudíž k jejich obarvení. Následně byly buněčné linie inkubovány stejným způsobem jako v předchozím případě, tedy s pufrům SR<sup>+</sup> s vysokým obsahem chloridových iontů, aby došlo k nasycení buněk těmito ionty, a poté byly promyty pufrům SR<sup>-</sup> bez přítomnosti chloridových iontů. Po promytí buněk pufrům SR<sup>-</sup> by mělo dojít, jak již bylo zmíněno, k uvolnění chloridových iontů do tohoto pufru. Vlivem snížení koncentrace chloridových iontů uvnitř buněk by mělo dojít k nárůstu fluorescence buněčných linií obarvených MQAE. Tato hypotéza byla opět testována.

#### ***4.1.2.1 Vliv koncentrace MQAE na obarvení buněčné linie CuFi-1***

Pro výběr vhodné koncentrace barviva MQAE pro obarvení buněčné linie byly testovány následující koncentrace MQAE: 0, 2, 5, 10 a 15 mM. Po 24hodinové inkubaci této buněčné linie s barvivem MQAE byly jamky promyty tak, jak je popsáno v metodách v kapitole 3.3.2.1. Následně byla měřena fluorescence MQAE na spektrofluorimetru v různých časových intervalech.

Závislost relativní fluorescence barviva MQAE na jeho koncentraci při barvení buněčné linie CuFi-1 je uvedena na obrázku č. 4.7 na straně 49. Fluorescence MQAE je přímo úměrná dané koncentraci tohoto barviva.

Na základě linearitě závislosti a literárních údajů [59] byla pro další experimenty vybrána hodnota koncentrace MQAE 10 mM.



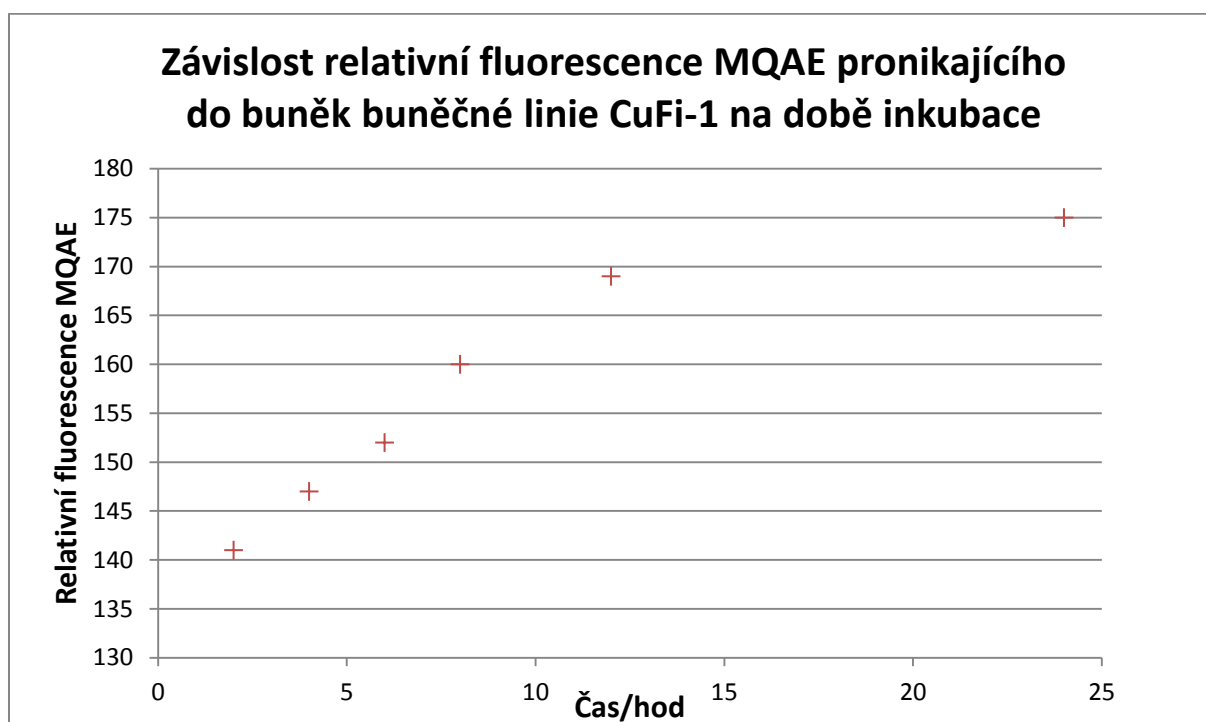
**Obrázek č. 4.7:** *Závislost relativní fluorescence MQAE na jeho koncentraci při barvení buněčné linie CuFi-1.* Relativní směrodatná odchylka nepřesáhla hodnotu 6% průměru. Měření fluorescence bylo provedeno na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro. Excitační vlnová délka měla hodnotu 362 nm, emisní vlnová délka 452 nm. Destička CellBind byla čtena shora bez víčka při hodnotě „gain“ 81.

#### **4.1.2.2 Časová závislost obarvení buněčné linie CuFi-1 10mM MQAE a určení viability buněk**

V dalším kroku byla zjišťována optimální doba pro obarvení buněčné linie 10mM MQAE jak z hlediska fluorescence, tak z hlediska toxicity tohoto barviva pro buňky. Vliv barviva MQAE na obarvení a viabilitu buněčné linie CuFi-1 byl pozorován v různých časových intervalech (0 – 24 hodiny). Pro toto stanovení byla použita destička CellBind s 24 jamkami. Fluorescence MQAE byla na spektrofluorimetru v daných časových intervalech měřena po odebrání kultivačního média z jamek a po promytí těchto jamek pufrem PBS. Relativní fluorescence tedy odpovídá množství barviva, které proniklo do buněk. Graf závislosti relativní fluorescence MQAE, tedy průniku tohoto barviva do buněk, na době inkubace je znázorněn na obrázku č. 4.8 na straně 50. Znázorněná závislost je lineární až do 12 hodin inkubace této sloučeniny s buněčnou linií.

Spolu s tímto experimentem bylo zjišťováno, jestli 10mM MQAE není pro buňky toxická. Buněčné linie byly „pasážovány“ a následně počítány v Bürkerově komůrce. Vždy byly počítány živé i mrtvé buňky a poté byla procentuálně stanovena jejich viabilita, což je shrnuto v tabulce č. 4.1 na straně 50. I po 24hodinové inkubaci buněčné linie CuFi-1 s barvivem MQAE byla viabilita buněk vyšší než 90% a zdá se tedy, že není pro buňky v této koncentraci a při této době inkubace toxické.

Z uvedených výsledků byla proto zvolena doba inkubace buněčné linie s barvivem MQAE 12 hodin (přes noc), aby došlo k dobrému průniku MQAE do buněk.



**Obrázek č. 4.8:** Závislost relativní fluorescence 10 mM MQAE, které proniká do buněčné linie CuFi-1, na době inkubace. Měření fluorescence bylo provedeno na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro. Excitační vlnová délka měla hodnotu 362 nm, emisní vlnová délka je 452 nm. Destička CellBind byla čtena shora bez víčka při hodnotě „gain“ 60.

**Tabulka č. 4.1:** Viabilita buněčné linie CuFi-1 po inkubaci s MQAE.

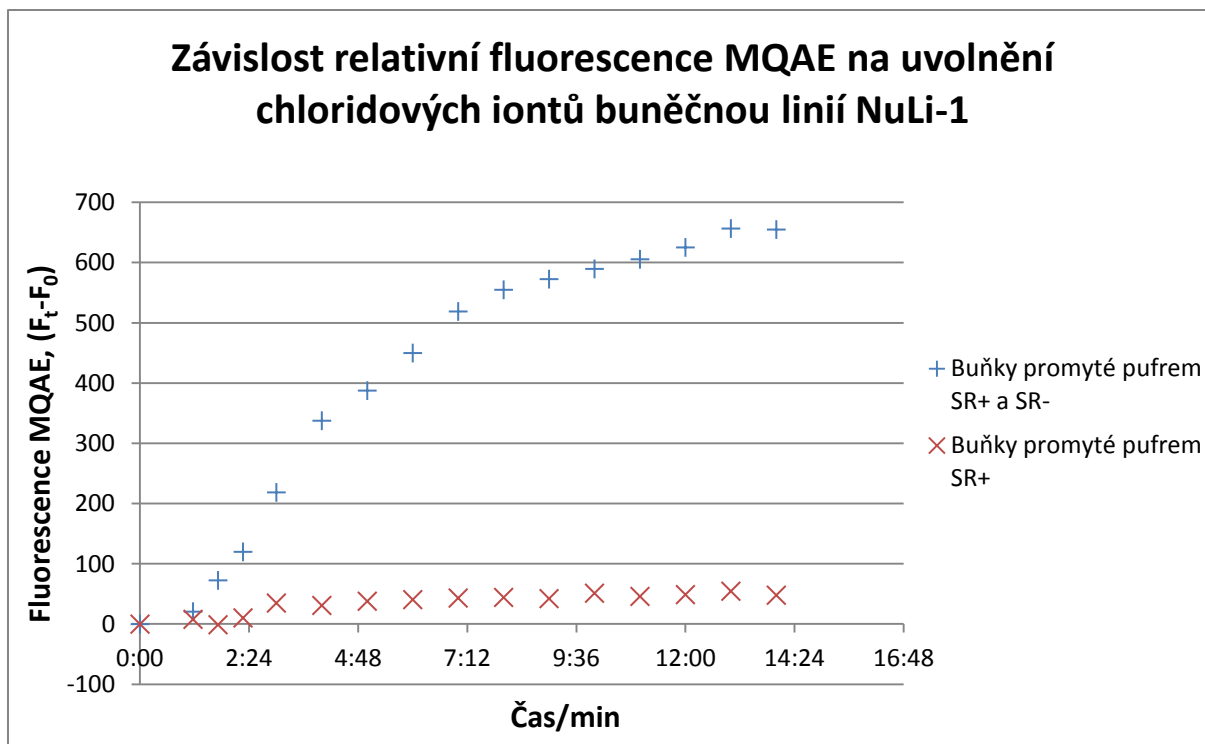
Doba inkubace buněk s MQAE /hod	0	2	4	6	8	12	24
Viabilita buněk /%	97,14	96,7	93,75	96,7	94,6	94,9	90,6

#### **4.1.2.3 Stanovení transportu chloridových iontů u buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 obarvených 10 mM MQAE**

Pro stanovení transportu chloridových iontů byly zvoleny následující skupiny: (a) první skupina obsahující buněčnou linii obarvenou MQAE byla promyta a inkubována pouze s pufrům SR<sup>+</sup>, (b) druhá skupina obsahující buněčnou linii obarvenou MQAE byla promyta a inkubována s pufrům SR<sup>+</sup> a nakonec promyta pufrům SR<sup>-</sup>. Graf závislosti relativní fluorescence buněčné linie NuLi-1 obarvené MQAE na sekreci chloridových iontů je zobrazen na obrázku č. 4.9 na straně 52.

Z grafu je zřejmé, že u skupiny buněk obarvených 10mM MQAE, která byla promyta pouze pufrům SR<sup>+</sup>, nedochází ke zvýšení jejich fluorescence s časem, protože nedochází ke změně koncentrace chloridových iontů uvnitř buňky. U druhé skupiny, která byla promyta nejprve pufrům SR<sup>+</sup> a následně pufrům SR<sup>-</sup>, dochází ke zvýšení fluorescence s časem, protože po výměně pufru dochází k uvolnění chloridových iontů z buňky do pufru SR<sup>-</sup>. Tato metoda je reprodukovatelná, tedy prokazuje transport chloridových iontů u buněčné linie NuLi-1.

Obdobná závislost byla získána i pro buněčnou linii CuFi-1 (graf neuveden), kde je ale transport chloridových iontů prostřednictvím CFTR kanálu omezen a proto by nemělo docházet k výraznému zvýšení fluorescence této buněčné linie obarvené MQAE s časem. Není jasné, proč k tomu docházelo. Je možné pouze spekulovat, že dochází k uvolnění chloridových iontů prostřednictvím jiných kanálů, které umožňují jejich přenos. Navíc i stáří buněčné linie, jak již bylo zmíněno [59], může ovlivnit množství a vlastnosti iontových kanálů. Proto byl v dalším experimentu podrobně sledován transport chloridových iontů prostřednictvím CFTR kanálu vlivem jeho aktivátoru forskolinu.



**Obrázek č. 4.9:** Závislost relativní fluorescence MQAE na uvolnění chloridových iontů buněčnou linií NuLi-1 o koncentraci  $2 \cdot 10^4$  buněk na jamku na čase. Koncentrace MQAE byla 10 mM, směrodatná odchylka nepřesáhla hodnotu 7% průměru.  $F_0$  je počáteční hodnota fluorescence, která je odečítána od fluorescence  $F_t$  v daném čase  $t$ . Měření fluorescence bylo provedeno na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro. Excitační vlnová délka měla hodnotu 362 nm, emisní vlnová délka je 452 nm. Destička CellBind byla čtena shora bez víčka při hodnotě „gain“ 81.

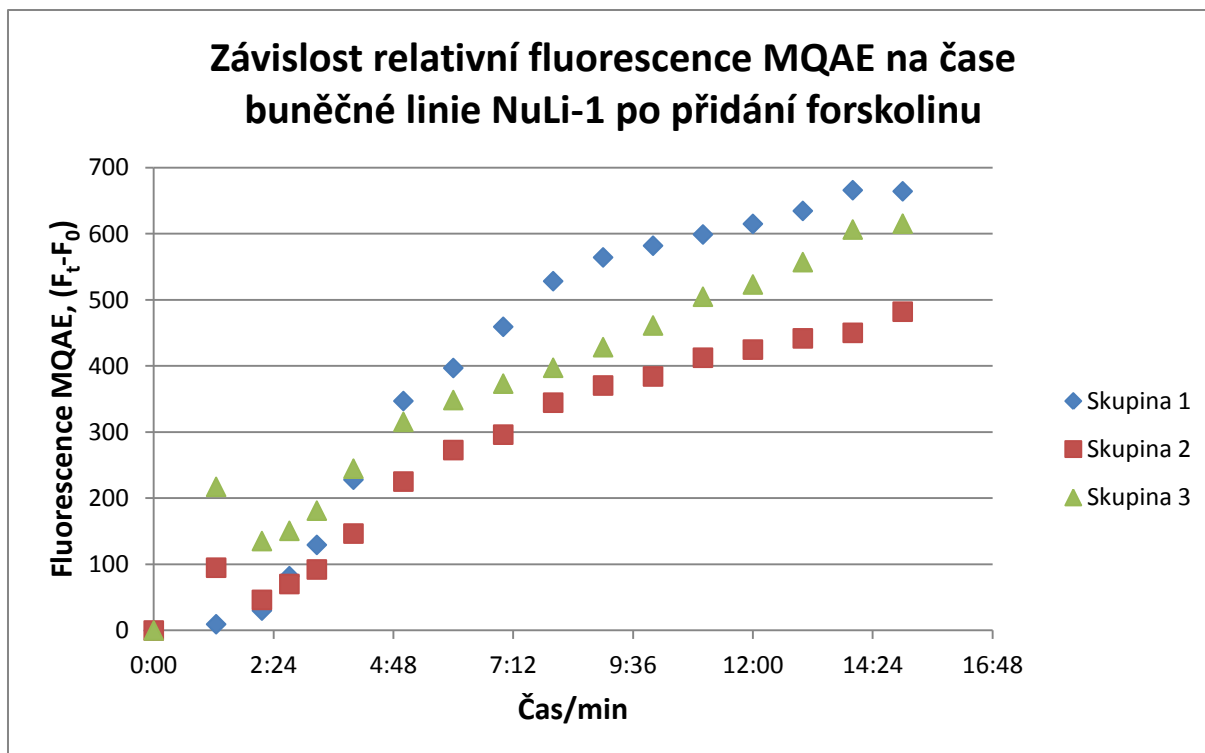
#### 4.1.2.4 Stanovení vlivu forskolinu na transport chloridových iontů u buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 obarvených MQAE

Pro studium sekrece chloridových iontů prostřednictvím CFTR kanálu byl zvolen 10  $\mu$ M forskolin. Tato koncentrace byla vybrána na základě publikace, podle které byla tato metoda modifikována [59].

Pro stanovení vlivu forskolinu na buněčné linie byly testovány čtyři skupiny vzorků. V první skupině nebyly buněčné linie obarveny MQAE. Toto pozadí (autofluorescence buněk) bylo poté odečteno od získaných hodnot fluorescence MQAE. V druhé skupině byly buněčné linie obarveny MQAE, promyty a inkubovány s pufrem

SR<sup>+</sup> a nakonec promyty pufrům SR<sup>-</sup>. V tomto případě došlo k hyperbolickému nárůstu fluorescence buněčných linií obarvených MQAE v závislosti na snížení koncentrace chloridových iontů uvnitř buněk. Ve třetí skupině byly buněčné linie obarveny MQAE, promyty a inkubovány s pufrům SR<sup>+</sup> a následně promyty pufrům SR<sup>-</sup> obsahujícím forskolin. Ve čtvrté skupině byly buněčné linie obarveny MQAE, promyty jako v předchozím případě, avšak při třetím promytí byl v pufru SR<sup>+</sup> obsažen forskolin, který byl přítomen i v následujícím promývacím pufru SR<sup>-</sup> při třetím promytí. Po přidání forskolinu k buněčné linii NuLi-1 obarvené MQAE byl očekáván vyšší nárůst fluorescence MQAE, oproti tomu, kdy k buněčným liniím přidáván nebyl. To mělo nastat, pokud by transport chloridových iontů probíhal prostřednictvím CFTR kanálu. Tento jev ovšem není z grafu č. 4.10 na straně 54 příliš patrný. To by mohlo být způsobeno tím, že buňky mají vyšší bazální aktivitu CFTR kanálu, což znamená, že je v buňkách přítomno dostatečné množství cAMP. Přídavek forskolinu proto tuto hladinu neovlivní a tím neovlivní ani otevírání CFTR kanálu, a proto nedojde k vyššímu uvolnění chloridových iontů. Ke zjištění bazální aktivity CFTR kanálu se používá, jak již bylo zmíněno v úvodu [35], jeho inhibitor CFTR<sub>inh</sub>-172. Avšak toto nebylo v rámci předkládané práce zkoumáno. Také stáří buněčné linie by mohlo hrát roli, což by mělo být předmětem dalších studií [35, 59].

U buněčné linie CuFi-1 se vliv forskolinu neprojevil (data neuvedena), avšak opět došlo k již zmíněnému uvolnění chloridových iontů z buněk, které forskolinem ovlivněny nebyly, což bylo diskutováno již v předchozí kapitole.

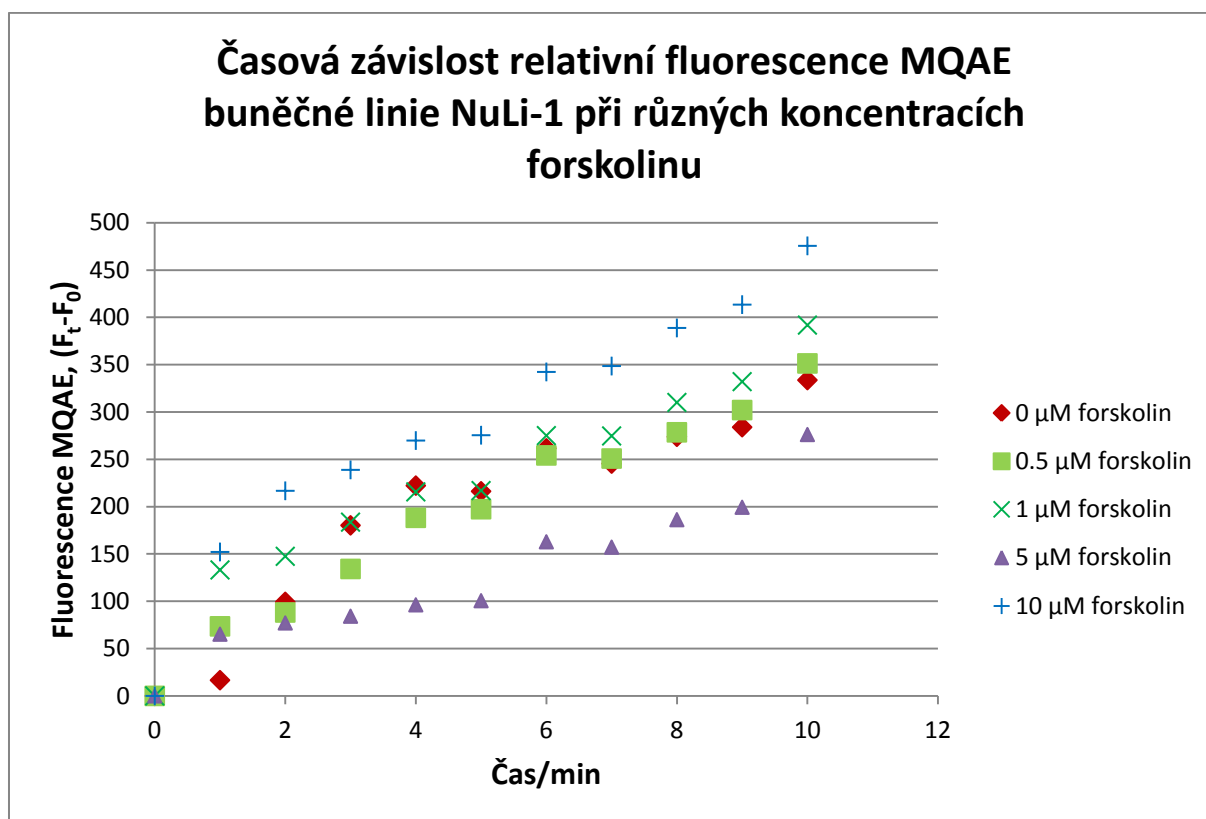


**Obrázek č. 4.10:** Závislost relativní fluorescence MQAE na čase buněčné linie NuLi-1 o koncentraci  $2 \cdot 10^4$  buněk na jamku po přidání forskolinu.  $F_0$  je počáteční hodnota fluorescence, která je odečítána od fluorescence  $F_t$  v daném čase  $t$ . Měření fluorescence bylo provedeno na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro. Excitační vlnová délka měla hodnotu 362 nm, emisní vlnová délka 452 nm. Destička CellBind byla čtena shora bez víčka při hodnotě „gain“ 81. Skupina 1 – buněčná linie obarvená MQAE, promyta a inkubována s puforem SR<sup>+</sup> a nakonec promyta puforem SR<sup>-</sup>; skupina 2 – buněčná linie obarvená MQAE, promyta a inkubována s puforem SR<sup>+</sup> a nakonec promyta puforem SR<sup>-</sup> obsahujícím forskolin, skupina 3 – buněčná linie obarvená MQAE, promyta a inkubována s puforem SR<sup>+</sup> obsahujícím forskolin a nakonec promyta puforem SR<sup>-</sup> také obsahujícím forskolin.

#### 4.1.2.5 Vliv různých koncentrací forskolinu na buněčnou linii NuLi-1 obarvenou 10mM MQAE

Jelikož vliv 10 $\mu$ M forskolinu nebyl průkazný, byl sledován vliv různých koncentrací tohoto modulátoru (0 – 10  $\mu$ M) na sekreci chloridových iontů buněčnými liniemi NuLi-1. Bylo popsáno, že při vyšších koncentracích tohoto modulátoru může docházet k nescifickému ovlivnění jiných látek v buňce a tím k nejednoznačnému působení forskolinu [4, 34, 35].

Na obrázku č. 4.11 na straně 55 je zobrazen graf závislosti relativní fluorescence MQAE buněčné linie NuLi-1 na koncentraci forskolinu. Z tohoto grafu je patrné, že vliv forskolinu na uvolnění chloridových iontů není koncentračně závislý. U buněčné linie CuFi-1 nebyla koncentrační závislost forskolinu z časových důvodů studována.



**Obrázek č. 4.11:** Časová závislost relativní fluorescence MQAE při různých koncentracích přidaného forskolinu buněčné linie NuLi-1. Koncentrace MQAE byla 10 mM, směrodatná odchylka nepřesáhla hodnotu 23% průměru.  $F_0$  je počáteční hodnota fluorescence, která je odečítána od fluorescence  $F_t$  v daném čase  $t$ . Měření fluorescence bylo provedeno na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro. Excitační vlnová délka měla hodnotu 362 nm, emisní vlnová délka je 452 nm. Destička CellBind byla čtena shora bez víčka při hodnotě „gain“ 81.

Závěrem lze říci, že tato metoda stanovení úbytku chloridových iontů je oproti předcházející metodě reprodukovatelnější. Toto přímé stanovení do značné míry neovlivňují vnější faktory (např. průnik kyslíku nebo cizorodých látek do pufru SR<sup>-</sup> při promývání jamek tímto pufrům, nedostatečné odstranění chloridových iontů vně buněk) a je možno stanovit více vzorků najednou. Nevýhodou je vyšší spotřeba MQAE, nutnost

obarvení buněk a tedy delší doba provedení experimentu. Vliv forskolinu je nutno objasnit v dalších experimentech a to např. (a) použitím modulátoru CFTR kanálu CFTR<sub>inh</sub>-172 nebo (b) použitím různě starých buněčných kultur.

## 5. Shrnutí

Byla vypracována literární rešerše zabývající se geneticky podmíněným onemocněním zvaným cystická fibróza, jejíž podstatou je chybné fungování proteinu CFTR, jehož hlavní funkcí je transport chloridových iontů z buňky. Hlavní důraz byl kladen na metody, kterými je možno tento transport studovat.

Byla optimalizována práce s buněčnými liniemi NuLi-1 a CuFi-1 zahrnující kultivaci a subkultivaci buněk, jejich rozmražení a zamražení, příprava vhodných kultivačních lahví a stanovení počtu a viability buněk.

Bylo prokázáno uvolňování chloridových iontů zvolenými buněčnými liniemi pomocí přímé i nepřímé metody za použití fluorescenčního barviva MQAE. Stanovení jejich množství v buňce přímo obarvené MQAE se ukázalo, na rozdíl od stanovení jejich množství uvolněných buňkou do pufru obsahujícího MQAE, jako vhodnější a reprodukovatelnější metoda.

Byl testován vliv sloučeniny forskolinu, která zvyšuje intracelulární koncentraci cAMP a tím urychluje otevírání CFTR kanálu, díky čemuž může být ověřeno, zda měřený transport chloridových iontů probíhá prostřednictvím CFTR kanálu. Vliv tohoto modulátoru se však zatím nepodařilo jednoznačně prokázat a bude to předmětem dalšího studia.

## 6. Seznam použité literatury

1. V. Vávrová a kolektiv; *Cystická fibróza*; Grada Publishing, a. s., 2006
2. P. Jakubec; *Cystická fibróza*; Interní medicína 2006; 5; 235 – 239
3. N. A. Campbell, J. B. Reece; *Biologie*; Computer Press, a. s., 2006
4. A. Bush, E. W. F. W. Alton, J. C. Davies, U. Griesenbach, A. Jaffe; *Cystic fibrosis in the 21st Century*; Karger, 2006
5. Převzato a upraveno podle  
„[http://www.discern-genetics.org/discern\\_quality\\_criteria.php?q=5](http://www.discern-genetics.org/discern_quality_criteria.php?q=5)“
6. M. A. van Meegen, S. W. J. Terheggen-Lagro, K. J. Koymans, C. K. van der Ent, J. M. Beekman; *Apical CFTR expression in human nasal epithelium correlates with lung disease in CF*; Plos One 2013; 8; 1 – 8
7. B. Dhooghe, et al; *Lung inflammation in cystic fibrosis: Pathogenesis and novel therapies*; Clinical Biochemistry 2014; 47; 539 – 546
8. J. Zielenski; *Genotype and phenotype in cystic fibrosis*; Respiration 2000; 67; 117 – 133
9. B. D. Moyer, J. Denton, K. H. Karlson, D. Reynolds, S. Wang, J. E. Mickle, M. Milewski, G. R. Cutting, W. B. Guggino, M. Li, B. A. Stanton; *A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal*; Journal of Clinical Investigation 1999; 104; 1353 – 1361
10. A. G. Valdivieso, T. A. Santa-Coloma; *CFTR activity and mitochondrial function*; Redox Biology 2013; 1; 190 – 202
11. M. Dorwart, P. Thibodeau, P. Thomas; *Cystic Fibrosis: Recent structural insights*; Journal of Cystic Fibrosis 2004; 3; 91 – 94
12. Převzato a upraveno podle „<http://massgenomics.org/2011/02/a-promising-new-drug-for-cystic-fibrosis.html>“
13. E. M. Schwiebert, D. J. Benos, M. E. Egan, M. J. Stutts, W. B. Guggino; *CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel*; Physiological reviews 1999; 79; 145 – 166
14. M. M. Morales, D. Falkenstein, A. Gil Lopes; *The cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) in the kidney*; Annals of the Brazilian Academy of Sciences 2000; 72; 399 – 406

15. Převzato a upraveno z článku „E. M. Schwiebert, D. J. Benos, M. E. Egan, M. J. Stutts, W. B. Guggino; *CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel*; *Physiological reviews* 1999; 79; 145 – 166“
16. B. Lubamba, B. Dhooghe, S. Noel, T. Leal; *Cystic Fibrosis – Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy*; *Clinical Biochemistry* 2012; 45; 1132 – 1144
17. T. okiyoneda, G. L. Likacs; *Cell surface dynamics of CFTR: The ins and outs*; *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1773; 476 – 479
18. L. Zhang, L. A. Aleksandrov, Z. Zhao, J. R. Birtley, J. R. Riordan, R. C. Ford; *Architecture of the CFTR protein and structural changes associated with phosphorylation and nucleotide binding*; *Journal of Structural Biology* 2009; 167; 242 – 251
19. I. Kogan, M. Ramjeesingh, CH. E. Bear; *ATPase assay of purified, reconstituted CFTR protein*; *Journal of Cystic Fibrosis* 2004; 3; 133 – 134
20. Převzato a upraveno z článku „O. Moran, O. Zegarra-Moran; *On the measurement of the functional properties of the CFTR*; *Journal of Cystic Fibrosis* 2008; 7; 483 – 494“
21. K. De Boeck, A. Zolin, H. Cuppens, H. V. Olesen, L. Viviani; *The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis*; *Journal of Cystic Fibrosis* 2014; 13(14); 403 – 409
22. A. S. Verkman, P. M. Haggie, L. J. V. Galietta; *Application of green fluorescence protein-based chloride indicators for drug discovery by high-throughput screening*; *Reviews in fluorescence* 2004; 1; 85 – 98
23. A. S. Verkman, D. Synder, L. Tradtrantip, J. R. Thiagarajah, M. O. Anderson; *CFTR inhibitors*; *Current Pharmaceutical Design* 2013; 19; 3529 – 3541
24. L. J. V. Galietta, O. Moran; *Identification of CFTR activators and inhibitors: chance or design?*; *Current Opinion in Pharmacology* 2004; 4; 497 – 503
25. Z. Cai, T. S. Scott-Ward, H. Li, A. Schmidt, D. N. Sheppard; *Strategies to investigate the mechanism of action of CFTR modulators*; *Journal of Cystic Fibrosis* 2004; 3; 141 – 147
26. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c2992?lang=en&region=CZ> (červen 2014)

27. J. R. Thiagarajah, Y. Song, P. M. Haggie, A. S. Verkman; *A small molecule CFTR inhibitor produces cystic fibrosis-like submucosal gland fluid secretions in normal airways*; *The FASEB Journal* 2004; 18; 875 – 877
28. J. R. Thiagarajah, A. S. Verkman; *CFTR inhibitors for treating diarrheal disease*; *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2012; 92(3); 287 – 290
29. B. Yang, N. D. Sonawane, D. Zhao, S. Somlo, A. S. Verkman; *Small-molecule CFTR inhibitors slow cyst growth in polycystic kidney disease*; *Journal of American Society of Nephrology* 2008; 19; 1300 – 1310
30. Převzato a upraveno z článku „A. S. Verkman, D. Synder, L. Tradtrantip, J. R. Thiagarajah, M. O. Anderson; *CFTR inhibitors*; *Current Pharmaceutical Design* 2013; 19; 3529 – 3541“
31. T-C. Hwang, D. N. Sheppard; *Molecular pharmacology of the CFTR Cl<sup>-</sup> channel*; *Trends in Pharmacological Sciences*; 1999; 20; 448 – 453
32. Převzato a upraveno podle  
 „<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g6649?lang=en&region=CZ>“
33. J. R. Thiagarajah, A. S. Verkman; *CFTR pharmacology and its role in intestinal fluid secretion*; *Current Opinion in Pharmacology* 2003; 3; 594 – 599
34. D. A. F. D. Mahlangu, J. A. Dix; *Halide fluxes in epithelial cells measured with an automated cell plate reader*; *Analytical Biochemistry* 2004; 325; 28 – 34
35. O. Moran, O. Zegarra-Moran; *On the measurement of the functional properties of the CFTR*; *Journal of Cystic Fibrosis* 2008; 7; 483 – 494
36. Převzato a upraveno podle „<http://en.wikipedia.org/wiki/Forskolin>“ a „<http://en.wikipedia.org/wiki/IBMX>“
37. C. Norez, G. D. Heda, T. Jensen, I. Kogan, L. K. Hughes, C. Auzanneau, R. Dérand, L. Bulteau-Pignoux, C. Li, M. Ramjeesingh, H. Li, D. N.; *Determination of CFTR chloride channel activity and pharmacology using radiotracer flux methods*; *Journal of Cystic Fibrosis* 2004; 3; 119 – 121
38. H. E. Spiegel; *Advances in Clinical Chemistry (Volume 25)*; Academic Press, inc.; 1986
39. M. J. Hug; A. Edelman, M. Chanson; *Microelectrodes and their use to assess ion channel function*; *Journal of Cystic Fibrosis* 2004; 3; 113 – 117

40. Bregestovski P., Waseem T., Mukhtarov M.; *Genetically encoded optical sensors for monitoring of intracellular chloride and chloride-selective channel activity*; *Frontiers in molecular neuroscience* 2009; 2; 1 – 13
41. <http://www.ionchannel.ku.dk/research/electrophysiology/> (červen 2014)
42. Převzato a upraveno podle  
„<http://www.ionchannel.ku.dk/research/electrophysiology/>“
43. H. Li, D. N. Sheppard, M. J. Hug; *Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber*; *Journal of Cystic Fibrosis* 2004; 3; 123 – 126
44. A. S. Verkman; *Development and biological applications of chloride-sensitive fluorescent indicators*; *Invited review*; 1990; 375 – 388
45. [http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescent\\_chloride\\_sensors](http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescent_chloride_sensors) (červen 2014)
46. F. J. Alvarez-Leefmans, E. Delpire; *Physiology and pathology of chloride transporters and channels in the nervous system: From molecules to diseases*; Elsevier, 2009
47. <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp00440.pdf>  
(červenec 2014)
48. F. Munkonge, E. W. F. W. Alton, C. Andersson, H. Davidson, A. Dragomir, A. Edelman, R. Farley, L. Hjelte, G. McLachlan, M. Stern, G. M. Roomans; *Measurement of halide efflux from cultured and primary airway epithelial cells using fluorescence indicators*; *Journal of Cystic Fibrosis* 2004; 3; 171 – 176
49. Převzato a upraveno podle „[pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)“
50. [http://en.wikipedia.org/wiki/Förster\\_resonance\\_energy\\_transfer](http://en.wikipedia.org/wiki/Förster_resonance_energy_transfer) (červen 2014)
51. [http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4011.aspx?geo\\_country=cz#generalinformation](http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4011.aspx?geo_country=cz#generalinformation) (červenec 2014)
52. [http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4013.aspx?geo\\_country=cz#generalinformation](http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4013.aspx?geo_country=cz#generalinformation) (červenec 2014)
53. L. J. V. Galiotta, S. Lantero, A. Gazollo, O. Sacco, L. Romano, G. A. Rossi, O. Zegarra-Moran; *An improved method to obtain highly differentiated monolayers of human bronchial epithelial cells*; *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 1998; 34; 478 – 481
54. <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/12680013?CID=searchproduct%2C> (červenec 2014)

55. <http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/cell-culture/transfection/selection/g418.html> (červenec 2014)
56. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/E3101> (červenec 2014)
57. I. Oliynyk, G. Varelogianni, G.M. Roomans and M. Johannesson; *Effect of duramycin on chloride transport and intracellular calcium concentration in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis epithelia*; Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica 2010; 118; 982 – 990
58. <http://en.wikipedia.org/wiki/Forskolin> (červenec 2014)
59. M. R. West, C. R. Molloy; *A microplate assay measuring chloride ion channel activity*; Analytical Biochemistry 1996; 241; 51 – 58
60. <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm> (červenec 2014)

