

UNIVERZITA KARLOVA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Jan Král

Možné přístupy k terapii cystické fibrózy

Possible approaches to the treatment of cystic fibrosis

Diplomová práce

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

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracoval samostatně pod odborným vedením RNDr. Lucie Bořek-Dohalské, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze, dne

.....

Bc. Jan Král

Poděkování:

Tímto bych rád poděkoval RNDr. Lucii Bořek-Dohalské, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady. Její trpělivost a vždy milý přístup mi byly velkou oporou nejen při psaní této práce.

Dále bych rád poděkoval RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D. za ochotu, s jakou mě uvedla do problematiky izolace buněčné RNA a kvantitativní PCR. A v neposlední řadě bych chtěl poděkovat Bc. Michaele Vaškové, Bc. Zuzaně Klusoňové a Bc. Sandře Jelínkové, které se mnou spolupracovaly a velice mi pomáhaly.

Abstrakt

Cystická fibróza je genetické onemocnění způsobené mutací v *CFTR* genu. To má za následek absenci či špatnou funkčnost CFTR chloridového kanálu, který je i zásadním regulátorem dalších iontových kanálů. Tato práce se zaměřila na studium genové terapie cystické fibrózy pomocí genového přenosu CFTR-mRNA. K určení exprese CFTR proteinu bylo použito metod nepřímé imunofluorescence a Western blot imunodetekce. Zároveň byla stanovena relativní míra genové exprese *CFTR* genu pomocí kvantitativní PCR. K experimentům byly použity buněčné linie zdravého plicního epitelu (NuLi-1), plicního epitelu s homozygotní mutací F508del (CuFi-1) a zárodečného ledvinného epitelu (HEK293S).

CFTR protein byl vizualizován uvedenými metodami pomocí šesti primárních protilátek (432, 450, 570, 596, 769, CF3). Pro detekci CFTR proteinu pomocí metody nepřímé imunofluorescence byly jako nejvhodnější vybrány primární protilátky 570 a CF3. V případě metody Western blot byla pro detekci uvedeného proteinu vhodná pouze protilátka CF3. Stanovením relativní míry genové exprese *CFTR* genu bylo zjištěno, že tento gen je exprimován u studovaných buněčných linií v malém množství, přičemž míra jeho exprese je v buněčné linii CuFi-1 přibližně šestkrát vyšší než v buněčné linii NuLi-1.

Byla zkoumána též účinnost transfekce buněčné linie CuFi-1 pomocí CFTR-mRNA. Buněčná linie byla transfekována dvěma druhy *in vitro* syntetizované CFTR-mRNA obsahující: a) nemodifikované nukleotidy, b) 25 % pseudouridinu a 25 % 5-methylcytidinu. Transfekce buněčné linie oběma druhy CFTR-mRNA vedla ke zvýšení množství CFTR proteinu v buňkách. Navíc bylo zjištěno, že CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy působila na buňky toxicky již v nízkých koncentracích (0,5 µg/ml). Oproti tomu CFTR-mRNA s modifikovanými nukleotidy působila toxicky až při koncentraci 2,0 µg/ml. Transfekce pomocí CFTR-mRNA tedy představuje teoreticky možný způsob terapie cystické fibrózy.

Klíčová slova:

Cystická fibróza, genová terapie, CFTR protein, nepřímá imunofluorescence, Western blot, kvantitativní PCR, přenos mRNA.

Abstract

Cystic fibrosis is a genetic disease caused by a mutation in the *CFTR* gene. This leads to an absence or a malfunction of CFTR chloride channel, which is also a crucial regulator of other ion channels. This thesis was aimed at gene therapy of cystic fibrosis using CFTR-mRNA gene transfer. To determine the expression of CFTR protein, methods of indirect immunofluorescence and Western blot immunodetection were utilized. Also relative gene expression levels of *CFTR* gene were assessed by quantitative PCR. Experiments were carried out on a healthy lung epithelial cell line (NuLi-1), a lung epithelial cell line with F508del mutation (CuFi-1) and an embryonic kidney epithelial cell line (HEK293S).

CFTR protein was visualized by previously mentioned methods using six primary antibodies (432, 450, 570, 596, 769, CF3). Primary antibodies 570 and CF3 were found as optimal for the detection of CFTR protein by the method of indirect immunofluorescence, whereas for the detection of this protein by the method of Western blot only the CF3 antibody was suitable. It was also determined that *CFTR* gene is expressed in overall small levels. Its relative gene expression in the CuFi-1 cell line was approximately six times higher than in the NuLi-1 cell line.

The efficiency of transfection of CuFi-1 cell line by CFTR-mRNA was also studied. The cell line was transfected by two types of *in vitro* synthesised CFTR-mRNA containing: a) unmodified nucleotides, and b) 25 % of pseudouridine and 25 % of 7-methylcytidine. Transfection of the cell line by both types of CFTR-mRNA resulted in increased levels of CFTR protein. CFTR-mRNA with unmodified nucleotides was found to be toxic even at small concentration (0,5 µg/ml). CFTR-mRNA with modified nucleotides was, however, found to be toxic only at concentration 2,0 µg/ml. In conclusion, transfection by CFTR-mRNA is a theoretically possible way of treatment of the cystic fibrosis.

Key words:

Cystic fibrosis, gene therapy, CFTR protein, indirect immunofluorescence, Western blot, quantitative PCR, mRNA transfer.

Obsah

Seznam použitých zkratek.....	9
1. Úvod.....	12
1.1. Cystická fibróza.....	12
1.2. CFTR protein.....	12
1.2.1 Struktura CFTR proteinu.....	13
1.2.2. Funkce CFTR proteinu.....	15
1.3. <i>CFTR</i> gen a CF.....	17
1.3.1. Mutace <i>CFTR</i> genu	17
1.3.2. Projevy CF.....	20
1.3.3. Patogenese plic	20
1.4. Farmakoterapie CF	22
1.4.1. Symptomatická léčba CF	22
1.4.2. Modulátory CFTR proteinu.....	24
1.4.3. Další formy farmakoterapie	25
1.5. Genová terapie CF.....	25
1.5.1. Přepis genu	26
1.5.2. Oprava mRNA.....	27
1.5.3. Genový přenos.....	27
2. Cíl práce	35
3. Materiál a metody.....	36
3.1. Použitý materiál a přístrojové vybavení.....	36
3.1.1. Přístrojové vybavení.....	36
3.1.2. Materiál a chemikálie	37
3.2. Práce s buněčnými liniemi	40
3.2.1. Kultivace buněčných linií.....	40
3.2.2. Příprava kultivačních lahví s povrchem potaženým kolagenem IV	40

3.2.3. Subkultivace buněčných linií	41
3.2.4. Stanovení počtu buněk v suspenzi a jejich viability	42
3.2.5. Zamražení buněčných linií	42
3.2.6. Rozmrazení buněčných linií	43
3.3. Metoda nepřímé imunofluorescence	43
3.4. Lyze buněčných linií	45
3.5. Stanovení koncentrace proteinů	46
3.6. SDS-PAGE elektroforéza.....	47
3.7. Metoda Western blot	48
3.8. Izolace RNA buněčných linií	50
3.9. RNA agarosová elektroforéza	50
3.10. Stanovení koncentrace a čistoty RNA.....	51
3.11. Reverzní transkripce.....	51
3.12. Kvantitativní PCR	52
3.13. Izolace CFTR-cDNA.....	53
3.14. <i>In vitro</i> syntéza CFTR-mRNA	54
3.15. Transfekce buněčných linií pomocí CFTR-mRNA	57
4. Výsledky.....	59
4.1. Optimalizace detekce CFTR proteinu pomocí metody nepřímé imunofluorescence	60
4.2. Optimalizace detekce CFTR proteinu pomocí metody Western blot	68
4.3. Charakterizace buněčných linií z hlediska relativní míry genové exprese <i>CFTR</i> genu.....	70
4.4. Stanovení účinnosti transfekce pomocí CFTR-mRNA.....	71
4.4.1. Stanovení účinnosti transfekce CFTR-mRNA pomocí metody nepřímé imunofluorescence	71

4.4.2. Stanovení účinnosti transfekce pomocí CFTR-mRNA metodou Western blot.....	76
5. Diskuze.....	77
6. Závěr.....	82
7. Seznam literatury.....	83

Seznam použitých zkratek

AV	adenovirus
AAV	adeno-asociovaný virus
AAV2	sérotyp 2 adeno-asociovaných virů
ABC	„ATP-binding cassette“
AMK	aminokyseliny
APS	peroxosíran amonný („Ammonium persulfate“)
ARCA	„Anti-reverse <i>cap</i> analog“
ASL	povrchová plicní kapalina („Airway surface liquid“)
ATP	adenosintrifosfát
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin („Bovine serum albumin“)
BCIP	„5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate“
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cDNA	komplementární DNA
Cas9	„CRISPR associated protein 9“
CaCC	„Calcium-activated chlorid channel“
CAR	„Coxsackie-adenovirus receptor“
CBB	„Coomassie brilliant blue“
CF	cystická fibróza
CFTR	„Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
CRISPR	„Clustered regulary interspaced short palindromic repeats“
Da	dalton
DABCO	1,4-diazabicyklo-[2,2,2]-oktan
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EMEM	„Eagle's Minimum Essential Medium“

ENaC	„Epithelial Na ⁺ channel“
F508del	absence fenylalaninu v pozici 508 CFTR proteinu
FBS	fetální hovězí albumin
GAPDH	glyceraldehydfosfátdehydrogenasa
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
kb	kilobáze (1 000 nukleových bází)
LHC	„Laboratory of human carcinogenesis“
mRNA	mediátorová RNA
NBD	nukleotid vázající doména („Nucleotide-binding domain“)
NBT	„4-Nitro blue tetrazolium chloride“
ORCC	„outwardly rectifying Cl ⁻ channel“
pre-mRNA	mRNA před sestřihem
pS	pikosiemens
PBS	fosfátový pufr („Phosphate buffered saline“)
PCL	meziřasinková kapalina („Periciliary liquid“)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykol
PEI	polyethylenimin
PKA	proteinkinasa A
PKC	proteinkinasa C
PKC2	proteinkinasa C2
PKG2	proteinkinasa G2
PLL	poly-L-lysine
PVDF	polyvinylidene difluorid
qPCR	kvantitativní PCR
R	regulační doména
RNA	ribonukleová kyselina

ROMK	„Renal outer medullary potassium channel“
RPM	otáčky za minutu
SecR	„Serpin-enzyme complex receptor“
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS
SMaRT	„Spliceosome-mediated RNA <i>trans</i> -splicing“
TALEN	„Transcription activator-like effector nuclease“
TEMED	tetramethylethylendiamin
TMD	transmembránová doména („Transmembrane domain“)
UV	ultrafialové záření
ZNF-HDR	„Zinc-finger nuklease homology directed repair“

1. Úvod

1.1. Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) byla poprvé popsána v roce 1938 a je nejčastěji se vyskytujícím smrtelným genetickým onemocněním [1]. Postihuje zejména příslušníky takzvané „kavkazské“ populace, tedy jedince původem z Evropy [2]. Udává se, že v celosvětovém měřítku této populace je incidence CF 1:2 500, což znamená, že na jedno dítě narozené s CF připadá 2 500 zdravých. V České republice je CF méně častá, na jedno dítě s CF se narodí 4 023 zdravých, což činí 30 nových pacientů ročně [3]. Pro obyvatele Blízkého a Dálného východu činí incidence CF přibližně 1:90 000 [4].

CF je autosomálně recesivní onemocnění, postihuje tedy všechny jedince, kteří mají defektní obě alely s příslušným genem, nehledě na jejich pohlaví. Heterozygotní jedinci nemocí postižení nejsou a nemají ani žádné jiné příznaky, slouží pouze jako přenašeči [4]. CF zasahuje zejména orgány pokryté epitelem, tedy mimo jiné plíce, slinivku břišní, potní žlázy, trávicí trakt a pohlavní orgány. Některé projevy CF jsou letální, zejména pak ty projevující se v plicích. Typickým znakem CF je nadměru sláný pot, poprvé popsáný v roce 1953 [5]. Dokud nebyla známa podstata tohoto onemocnění, bylo výjimečné, aby lidé narození s CF přežili první rok života. Nyní s pomocí neustále se rozvíjející léčby se pacienti s CF dožívají v průměru čtyřiceti let.

Ač byla nemoc CF známá již od roku 1938, její molekulární podstata byla popsána až v roce 1989, kdy byl identifikován gen zodpovědný za toto onemocnění [6]. Již dlouho bylo na základě různých projevů CF patrné, že daný gen musí kódovat protein, který nějakým způsobem ovlivňuje iontový přenos přes plasmatickou membránu a tím i transmembránovou vodivost. Tento gen byl tedy nazván zkratkou *CFTR* (z angl. Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), stejně jako jeho proteinový produkt [7].

1.2. CFTR protein

CFTR protein se nachází na apikální straně plasmatické membrány epiteliálních buněk [8]. Ještě než byla identifikována jeho pravá povaha, panovaly dvě základní představy o jeho funkci. První tvrdila, že CFTR protein je nejspíše chloridovým kanálem, neboť u pacientů s CF byla mimo jiné pozorována razantně snížená vodivost těchto

aniontů. Druhá hypotéza tvrdila, že by se mohlo jednat o protein, který svou aktivitou činnost iontových kanálů reguluje a že CFTR protein sám iontovým kanálem není. Této hypotéze nahrávala skutečnost, že primární aminokyselinová sekvence CFTR proteinu neodpovídala žádnému do té doby známému iontovému kanálu [8]. Jak se ukázalo později, obě hypotézy byly vlastně správné, neboť CFTR protein je chloridovým kanálem, který nicméně vykazuje schopnost regulovat činnost ostatních iontových kanálů.

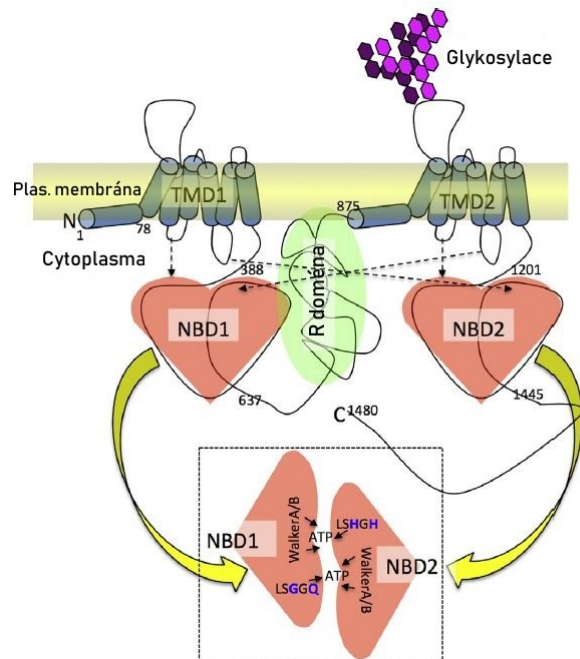
1.2.1 Struktura CFTR proteinu

CFTR protein patří do rodiny ABC (z angl. ATP-binding cassette) přenašečů, široké skupiny proteinových přenašečů nacházejících se napříč všemi živočišnými říšemi. Tyto proteiny využívají hydrolyzy ATP k transportu různorodých substrátů přes buněčnou membránu. Mezi takové substráty patří například cukry, anorganické ionty, aminokyseliny, proteiny a cizorodé látky [9]. Jejich funkce je využíváno mimo jiné v metabolismu, přenosu signálu a proteinové sekreci. ABC proteiny jsou také zodpovědné za bakteriální rezistenci na antibiotikum nebo neúčinnost chemoterapie [10, 11]. Význačným rysem eukaryotických ABC proteinů je, že se všechny domény nacházejí v rámci jednoho polypeptidového řetězce. V bakteriích a archebakteriích se domény vyskytují volně v cytoplasmě/membráně a fúzí pouze za potřeby tvorby přenašeče [12].

Z celé široké rodiny ABC proteinů však žádný nevykonává funkci iontového kanálu, pouze CFTR protein [13]. Stejně jako ostatní ABC proteiny i on sestává ze dvou transmembránových domén (TMD) a dvou domén vázajících nukleotid (NBD, z angl. nucleotide-binding domain). Oproti zbylým ABC přenašečům však CFTR protein disponuje ještě pátou, regulační (R) doménou [14].

Vzhledem k tomu, že je hlavní příčinou CF, CFTR protein je jedním z nejlépe probádaných ABC proteinů. Jeho strukturu tvoří 1480 aminokyselin (AMK), přičemž pořadí jeho domén je od N-konce následovně: TMD1, NBD1, R, TMD2 a NBD2. Další zvláštností oproti typickým eukaryotickým ABC proteinům jsou prodloužené terminální sekce proteinu: u N-konce o 80 AMK a u C-konce o 30 AMK [15].

V závislosti na glykosylaci se udávají tři molekulové velikosti CFTR proteinu: 127 kDa pro neglykosylovaný protein, 131 kDa pro částečně glykosylovaný a 168 kDa pro plně maturovaný CFTR protein [16].



Obrázek č. 1: *Struktura CFTR proteinu.* Skrze plasmatickou membránu prostupují dvě transmembránové domény (TMD1 a TMD2). Každá z nich disponuje šesti transmembránovými α -helixy. Dvě nukleotid vázající domény (NBD1 a NBD2) jsou prostorově blokovány regulační (R) doménou. První extracelulární smyčka TMD2 je glykosylována. Je-li aktivována, každá NBD doména váže ATP a následně spolu obě tvoří dimer (znázorněno v rámečku). Obrázek převzat a upraven z [17].

Pro ABC proteiny je charakteristické, že jejich NBD domény sdílí vysokou homologii (v průměru 80 %). NBD domény CFTR proteinu oproti tomu mají homologii pouhých 29 %, což způsobuje jeho netypické fungování jako iontový kanál (viz kapitola 1.2.2.1.) [18]. NBD domény jsou schopné vázat ATP, a pokud tak učiní, obě domény formují dimer hlava-ocas. Předpokládá se, že tvorbou dimeru NBD domén se otevírá pór CFTR kanálu.

Každá TMD doména CFTR proteinu prostupuje na šesti místech plasmatickou membránou, tvoří tedy tři extracelulární smyčky (obrázek č. 1). Obě domény dohromady formují iontový pór, skrze který probíhá samotný iontový transport [13]. První extracelulární smyčka TMD2 domény CFTR proteinu je N-glykosylována. Intracelulární smyčky TMD domén pravděpodobně slouží k přenosu signálu mezi NBD a TMD doménami [17, 19].

Regulační R doména, nacházející se uprostřed proteinu, není strukturována. Pouze 5 % jejího řetězce zaujímá tvar α -helixu. Předpokládá se, že R doména interaguje s oběma NBD doménami, s intracelulárními smyčkami TMD domén a s C-koncem CFTR proteinu [20]. R doména disponuje vysokým elektrickým nábojem a obsahuje 9 míst vhodných pro fosforylaci cAMP-dependentní proteinkinasou A (PKA), proteinkinasou C

(PKC) a jinými kinasami [21]. Fosforylace R domény je zásadní pro správnou funkci CFTR proteinu. Jakmile dojde k fosforylaci, R doména, která do té doby prostorově bránila formování dimeru NBD domén, odstupuje a umožňuje tak otevření iontového póru [17, 20].

1.2.2. Funkce CFTR proteinu

CFTR protein v organismu plní dvojí funkci: jednak vykonává úlohu iontového kanálu, jednak je schopen regulovat aktivitu dalších iontových kanálů.

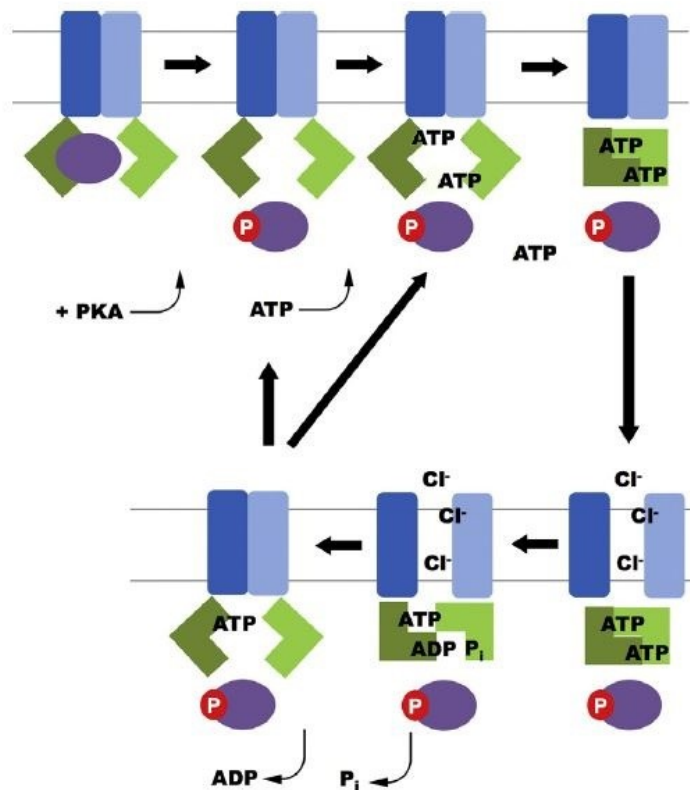
1.2.2.1. CFTR protein jako iontový kanál

CFTR protein funguje zejména jako Cl^- iontový kanál, ale díky nespecifitě svého iontového póru je schopen přenášet i HCO_3^- a některé organické ionty. Ionty jsou přenášeny samovolně dle elektrochemického gradientu [22].

Mezi charakteristické vlastnosti CFTR kanálu patří, že má nízkou jednokanálovou vodivost (6-10 pS), jeho závislost proudu na napětí (I-V) je lineární a jeho propustnost aniontů má poměrně netypické pořadí $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$. Aktivita CFTR proteinu je rovněž netypická závislostí na cAMP-dependentní fosforylaci a svým využitím ATP [4, 17, 23]. Právě ATP se váže na každou NBD doménu, čímž spolu obě domény vytvoří dimer. Tvorba dimeru způsobí otevření iontového póru. Nutno zmínit, že oproti běžným ABC proteinům, které k přenosu využívají hydrolýzy ATP, CFTR proteinu pro otevření stačí pouhé navázání ATP [24]. Energie hydrolýzy ATP je naopak využívána k uzavření iontového póru [25]. Je ale třeba dodat, že dle některých studií bylo možné pozorovat aktivitu CFTR kanálu i v prostředí bez ATP a i v případech, kdy byla z proteinu odstraněna sekvence pro NBD2 doménu. Aktivita kanálu byla ale údajně podstatně nižší, než je běžné [17, 24, 26, 27].

Pro zformování dimeru NBD domén CFTR proteinu je zapotřebí 2 molekul ATP. Kvůli rozdílným vlastnostem těchto domén probíhá hydrolýza ATP navázaného na NBD2 doméně snáze než ATP navázaného na NBD1 doméně. ATP navázané na NBD2 doméně je tak hydrolyzováno dříve než ATP na NBD1 doméně, čímž se narušuje dimerní struktura NBD domén a uzavírá se iontový pór. Ovšem ATP na NBD1 doméně zůstává stále navázáno. Naváže-li se na NBD2 nová molekula ATP, je tvorba dimeru NBD domén mnohem rychlejší, než kdyby každá z NBD domén musela přijmout novou molekulu ATP.

CFTR kanál je tím schopen buď běžného přenosu iontů, během něhož jsou mezi jednotlivými otevřenými stavy kanálu dlouhé prodlevy (na NBD doménách se hydrolyzují obě jednotky ATP) [28], nebo velice rychlého střídání otevřeného a uzavřeného stavu, kdy je interval mezi jednotlivými otevřenými stavy podstatně kratší a je tak umožněn mnohem rychlejší a intenzivnější přenos iontů (na NBD1 doméně zůstává navázáno ATP, hydrolyzuje se pouze ATP na NBD2 doméně) [13, 24]. Funkce CFTR jako iontového kanálu je schematicky znázorněna na obrázku č. 2.



Obrázek č. 2: *Funkce CFTR chloridového kanálu.* Tmavě modrý obdélník představuje TMD1 doménu, světle modrý obdélník TMD2 doménu. Tmavě zelená doména představuje NBD1 doménu, zatímco světle zelená NBD2 doménu. Fialový ovál představuje R doménu. Šedé čáry naznačují plasmatickou membránu. Bílé P v červeném kruhu značí fosfátový zbytek. Při výchozím stavu R doména prostorově brání tvorbě dimeru NBD domén. Pokud je fosforylována, ustupuje. Na každou NBD doménu se váže ATP a obě domény vzápětí formují dimer. Tím se otevírá iontový pór tvořený TMD doménami. Při hydrolýze ATP navázaného na NBD2, dochází k rozvolnění dimeru NBD domén a následnému uzavření póru. ATP na NBD1 doméně zůstává stále navázáno. Na NBD2 doménu se pak může vázat další ATP, což vede k novému otevření iontového póru. Případně je ATP na NBD1 doméně hydrolyzováno a CFTR protein se může vrátit do výchozího stavu. Převzato a upraveno z [17].

Aktivita CFTR kanálu je regulována fosforylací R domény [29, 30]. V klidovém stavu není R doména fosforylována a její působení inhibuje případnou aktivitu CFTR proteinu. Bylo zjištěno, že pokud je R doména odstraněna, CFTR kanál je aktivní neustále [31]. R doména má celkem 9 míst určených pro fosforylaci, ale pouze 7 z nich má stimulační účinky, zbylá 2 místa, jsou-li fosforylována, působí na aktivitu CFTR proteinu inhibičně [32]. Je důležité zmínit, že s přibývajícím fosforylací R domény se kumulativně zvyšuje afinita NBD domén k ATP. Žádné z fosforylačních míst nemá výsadní postavení. Fosforylaci R domény zajišťuje nejčastěji PKA. PKC, PKC2 a cGMP-dependentní proteinkinasa G2 (PKG2) jsou ale rovněž schopny CFTR protein aktivovat [17, 20, 33, 34].

1.2.2.2. Regulační funkce CFTR proteinu

I když se o přesném mechanismu regulace ostatních proteinů prostřednictvím CFTR proteinu diskutuje, je nesporné, že mnohé iontové kanály vykazují odlišné fungování, není-li CFTR protein přítomen nebo funguje-li chybně. Mezi tyto proteiny patří například sodíkový kanál ENaC (z angl. epithelial Na⁺ channel), jehož aktivitu CFTR protein inhibuje a který je zodpovědný za vážnou patogenezi v plicích. Dalším iontovým kanálem je například chloridový kanál ORCC [35] (z angl. outwardly rectifying Cl⁻ channel), jehož snížená aktivita v tkáních postižených CF byla natolik patrná, že byl po dlouhou dobu považován za původce CF [4]. Draslíkový kanál ROMK (z angl. renal outer medullary potassium channel) je pravděpodobně také ovlivňován CFTR proteinem, stejně jako Ca²⁺ regulovaný chloridový kanál CaCC (z angl. calcium-activated chlorid channel) [4].

CFTR protein je navíc schopen ovlivňovat aktivitu aquaporinů [36] a spekuluje se i o jeho vlivu na parakrinní/endokrinní funkci žláz a genovou expresi jiných proteinů [4].

1.3. CFTR gen a CF

1.3.1. Mutace CFTR genu

CFTR gen se nachází na dlouhém raménku chromosomu 7, sestává z 27 exonů a jeho délka činí přibližně 250 kb [6, 7]. Jeho RNA přepis je dlouhý 6,5 kb. V současnosti je popsáno přes 2 000 jeho mutací, přičemž naprostá většina z nich je vzácných a pouze 11 se vyskytuje u více než 100 pacientů [4, 37]. Nejrozšířenější mutací je delece tří kodónů pro

fenylalanin v pozici 508 (F508del), kterou má celosvětově přibližně 70 % pacientů s CF. Výskyt jednotlivých mutací je podmíněn geograficky. Například mutace F508del má 100% zastoupení na Faerských ostrovech, zatímco pouhých 18 % v Tunisku [4]. V České republice bylo zjištěno 91 různých mutací *CFTR* genu, přičemž F508del mutaci mělo 67 % pacientů [3].

Podle jejich vlivu na funkci CFTR proteinu lze mutace *CFTR* genu rozdělit do šesti tříd. Všechny třídy jsou znázorněny na obrázku č. 3 na straně 19.

Třída I

První třída zahrnuje takové mutace, které vedou k poruše syntézy CFTR proteinu. Patří sem mutace způsobující posunutí čtecího rámce a předčasné stop kodony. Mutace této třídy tvoří nejzávažnější formy CF [4].

Mezi tyto mutace patří například R553X, W1282X a G542X [38].

Třída II

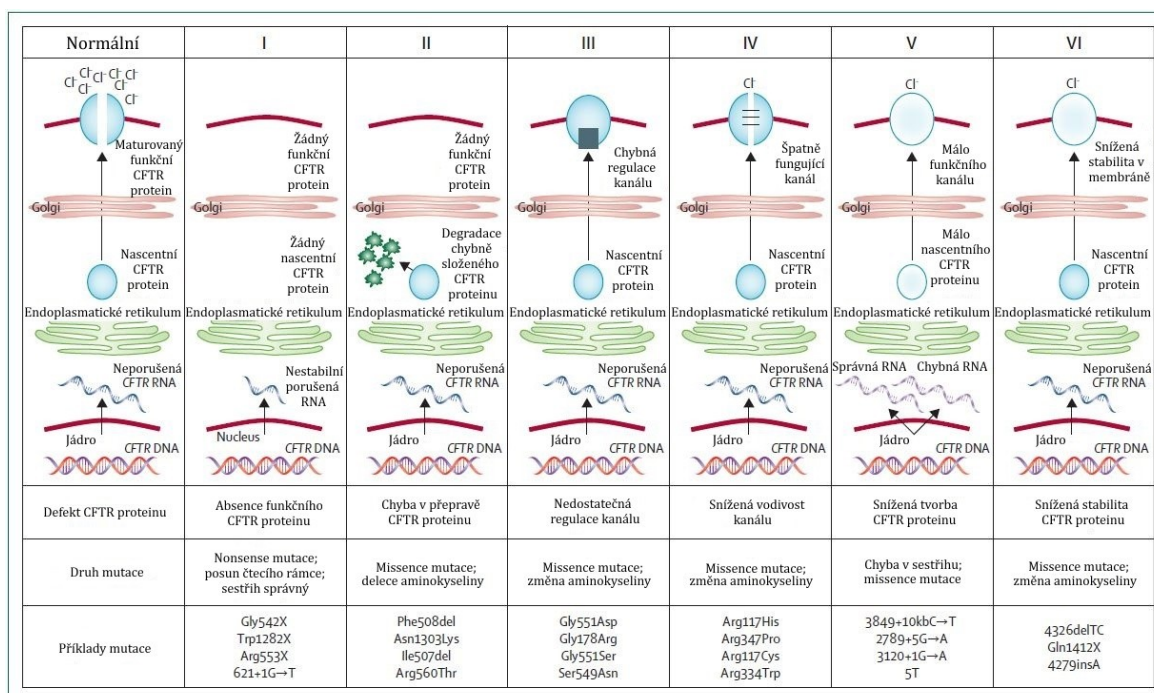
Do druhé třídy náleží takové mutace, které zapříčiňují chybné sbalení CFTR proteinu, což vede k jeho předčasné degradaci. Do této třídy patří mutace F508del. Vzhledem ke značné velikosti, a tedy i obtížnému sbalení CFTR proteinu, bývá fyziologicky degradováno přibližně 75 % vytvořeného proteinu, avšak v případě F508del-CFTR se jedná o více než 99 % proteinu [4].

Mimo F508del mutaci do této skupiny patří například N1303K mutace.

Třída III

Mutace třetí třídy nezasahují do procesu tvorby CFTR proteinu, ale znemožňují jeho funkci. CFTR protein je správně dopraven do plasmatické membrány, ale není citlivý vůči cAMP ani ATP, nemůže být proto aktivován [39]. Postižena bývá zejména R doména nebo NBD domény. Všechny tyto mutace znemožňují vazbu ATP a tím i funkci proteinu (obrázek č. 2, strana 16), což je do jisté míry společné i mutacím IV. třídy [33].

Mezi tyto mutace patří například G551D a Y569D [4].



Obrázek č. 3: *Třídy mutací CFTR genu.* Mutace *CFTR* genu se dělí na šest tříd. První až třetí třída tvoří nejzávažnější formy CF onemocnění, protože CFTR kanál buď chybí v plasmatické membráně, nebo je nefunkční. Čtvrtá až šestá třída mutací představují lehčí formy CF onemocnění. Převzato a upraveno z [40].

Třída IV

Čtvrtá třída mutací *CFTR* genu vede k syntéze proteinu, který je sice funkční, ale není schopen dostatečné vodivosti. Přenos Cl^- a HCO_3^- iontů přes membránu je tak snížen.

Mezi mutace čtvrté třídy patří R347P, R117H a D1152H [4].

Třída V

Pátá třída zahrnuje mutace způsobující nízkou produkci CFTR proteinu, který je ale plně funkční. Do této třídy patří mutace v promotoru genu a mutace ovlivňující RNA sestřih. Špatný sestřih CFTR pre-mRNA může vyústit například v částečné vystřížení exonu nebo začlenění intronu do sekvence.

Mezi mutace páté třídy patří 3849+10kb C→T, 3272-26 A→G anebo G576A [4].

Třída VI

Poslední třída mutací snižuje stabilitu CFTR proteinu v plasmatické membráně a vede tak k jeho zvýšené degradaci.

Mezi tyto mutace patří například 4326delTC a Gln1412X [40].

1.3.2. Projevy CF

Vzhledem k tomu, že se CFTR kanál nachází v epitelální tkáni mnohých orgánů, postihuje CF, jak již bylo řečeno, téměř celý lidský organismus. Mezi zasažené orgány patří slinivka břišní, střeva, játra, opěrná soustava, rozmnožovací soustava a především plíce.

Jedním z typických projevů CF je nezvykle slaný pot, způsobený špatnou reabsorpcí NaCl. Udává se, že množství soli v potu pacientů s CF je až pětkrát vyšší než u zdravých jedinců.

Dalším charakteristickým projevem CF je ztráta endokrinní funkce u slinivky břišní. Následkem je špatné trávení potravy a snížení příjmu živin, což způsobuje špatné prospívání a menší vzrůst [41]. Problémy trávicího ústrojí lze však dobře kompenzovat doplňky stravy [4].

U jater způsobuje CF cirhózu a zvýšenou viskozitu žluči. Ve střevech, stejně jako v dalších orgánech, je hlavním problémem chybný transport vody a elektrolytů, což může způsobit průjmy i zácpy [42].

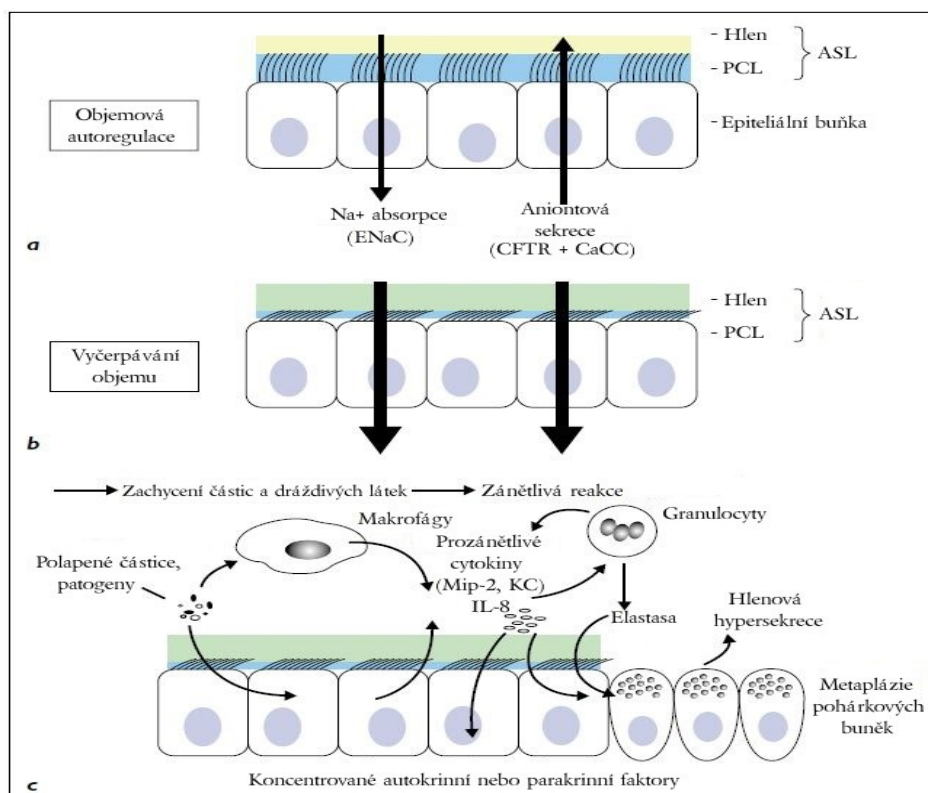
Rozmnožovací soustava je taktéž zasažena, třebaže u každého pohlaví jinak. Ženy mají zpožděné pohlavní dospívání, ale jsou schopné počít. Těhotenství je ovšem pro pacientky s CF značně rizikovou záležitostí. U mužů naproti tomu CF způsobuje takřka naprostou sterilitu, ačkoliv se najdou velice vzácné případy, kdy je muž s CF plodný [4, 43, 44].

Se stále se zvyšujícím věkem, kterého se pacienti s CF dožívají, se objevují i nové projevy CF, jako jsou poruchy opěrné soustavy. Mezi ně patří například artritida, vaskulitida a křehkost kostí, způsobená nízkým obsahem minerálů [4].

1.3.3. Patogenese plic

Symptomy CF v plicích zapříčiňují většinu úmrtí na toto genetické onemocnění, jsou proto označovány za nejzávažnější a velká část terapie CF se zaměřuje právě na ně. Prvotní projevy patogenese se objevují již v útlém věku, kdy se mohou zdánlivě zdraví kojenci nečekaně zadusit příliš hustým hlenem v plicích, který jim ucpe průdušinky [4].

Povrch dýchacích cest je pokryt tenkou vrstvou ochranné kapaliny, takzvané ASL (z angl. airway surface liquid). Tato kapalina se skládá ze dvou složek: vrchního viskózního hlenu a spodní, řidší, meziřasinkové kapaliny (PCL, z angl. periciliary liquid) [45].



Obrázek č. 4: Model patogenese CF v plicích. **a)** Povrch lidského plicního epitelu je pokryt tenkou vrstvou povrchové kapaliny (ASL). Objem ASL je regulován vyváženým iontovým přenosem. **b)** U buněk postižených CF dochází k nadměrné absorpci Na⁺ iontů a vody, což zmenšuje objem ASL a znemožňuje pohyb řasinek epitelu. **c)** V nepohyblivé ASL se usazují nečistoty a patogeny a způsobují chronickou zánětlivou odpověď. Zároveň dochází k nadměrné sekreci hlenu a k metaplázím pohárkových buněk. Převzato a upraveno z [4].

Viskózní hlen slouží k zachycení škodlivých a dráždivých látek, které jsou jím obaleny a následně transportovány ven z plic. Hlen tedy vykonává převážně mechanickou obrannou úlohu.

PCL, oddělující horní hlen od povrchu řasinkového epitelu, umožňuje volný pohyb řasinek a tím i postupné puzení hlenu ven. Tloušťka vrstvy PCL je v průměru přibližně 7 μm, což odpovídá délce natažené epitelální řasinky [46]. Je tedy velice důležité, aby rozměry PCL neklesly pod určitou hranici, kdy by se řasinky již nebyly schopné pohybovat. Tomu napomáhá i sám hlen, který se vyznačuje schopností zadržovat kapaliny. Udává se, že než se ztráta vody projeví na PCL, může povrchový hlen ztratit až polovinu svého objemu [47].

ASL navíc obsahuje vysoké množství látek zprostředkávajících ochranu, jako jsou například lysozymy, imunoglobuliny, muciny, laktoferriny, defensiny a jiné [48].

Velikost ASL je regulována epiteliální tkání a submukosálními žlázami. Chemicky je objem vody v ASL určován množstvím v ní rozpuštěné NaCl [49]. Hlavním faktorem, ovlivňujícím množství kapaliny v ASL, jsou tedy iontové kanály, zejména pak sodíkový kanál ENaC. Aktivita tohoto sodíkového kanálu je, jak bylo řečeno v kapitole 1.2.2., inhibována CFTR kanálem. Pokud tedy v buňce CFTR protein chybí nebo je nefunkční, dochází k razantnímu zvýšení aktivity ENaC kanálu a s tím i k nadměrné absorpci soli z ASL. Společně s NaCl je pomocí osmotického tlaku odčerpána i voda, což vede k vymizení kapaliny z povrchového hlenu, a následně i z PCL. Zahuštěný hlen přilehne na řasinkový epitel a znemožní jeho pohyb. ASL se tak stává nehybnou (obrázek č. 4, strana 21) [50].

Neschopnost odstranění vdechnutých patogenů vede k imunitní odpovědi, ústící v zánětlivou reakci, aniž by skutečně probíhala bakteriální infekce [51]. Zvýšená aktivita imunitního systému vede k zvýšené produkci mucinů, které dále zahušťují a zvětšují povrchový hlen. Jakmile tloušťka hlenu dosáhne 100 μm , přestane být prodyšný a ve spodních vrstvách dojde k vyčerpání kyslíku [52]. V nově vzniklém anaerobním prostředí přežívají bakterie jako *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a *Burkholderia cepacia*. Díky nepohyblivosti hlenu se v něm tyto bakterie mohou neomezeně šířit, čímž způsobují chronickou infekci. V případě bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, jakmile je přizpůsobená anaerobnímu prostředí, stává se až o dva řády méně citlivá k antibiotikům [53].

1.4. Farmakoterapie CF

Farmakoterapie CF představuje formu léčby, při níž jsou pomocí chemických látek kompenzovány defekty způsobené chybou v CFTR proteinu. Terapie je buď cílena na symptomy CF (hustá ASL, bakteriální infekce apod.), nebo se snaží zvýšit množství CFTR proteinu, případně podporuje jeho aktivitu.

1.4.1. Symptomatická léčba CF

Hlavním důvodem závažných plicních projevů CF je odčerpání vody z ASL. Pro obnovení objemu ASL, a tím umožnění odstranění nahromaděného hlenu, by bylo potřeba ASL znovu hydratovat. Možné řešení tohoto problému je relativně prosté - lze totiž využít

osmózy pro vytažení vody skrze plicní epitel. K tomu se využívá buď hypertonického roztoku soli, nebo ve vodě rozpustného prášku (mannitolu).

Terapie hypertonickým roztokem soli je velice rozšířená a tělem dobře tolerovaná. *In vivo* testy prokázaly, že se jejím působením stav plic skutečně zlepší, například u studie, kdy pacienti vdechovali dvakrát denně 4 ml 7% roztoku soli po dobu 48 týdnů [54]. I přes dobré výsledky je zjevnou nevýhodou této léčby fakt, že se jí musí pacienti podrobovat několikrát denně, což je může velice omezovat.

Za účelem vytvoření většího osmotického tlaku s delším účinkem byl místo hypertonického roztoku použit práškový mannitol (420 mg). Pacienti jej vdechovali dvakrát denně po dobu dvou týdnů [48, 55, 56].

Dalším přístupem ke kompenzaci projevů CF je inhibice ENaC kanálu, jehož nadměrná aktivita způsobená absencí CFTR proteinu je hlavním důvodem patogeneze plic. Pro tento účel byla navržena celá řada inhibitorů, z nichž první byl amilorid, jehož vlastnosti byly následně zdokonaleny v látkách P-680 a P-1037 od Parion Science. Zásadním rizikem inhibitorů ENaC proteinu je, že se tento sodíkový kanál nevyskytuje pouze v plicním epitelu, ale například i v distálním tubulu nefronu, jeho inhibice by tedy mohla vyvolat nejen plicní otoky, ale i hyperkalemii [33, 48, 57, 58].

Kromě inhibice ENaC kanálu se lze zaměřit na stimulaci aktivity jiných chloridových kanálů, které by tak kompenzovaly absenci či nedostatečnost CFTR kanálu. Zde je pozornost zaměřena hlavně na CaCC chloridový kanál. Denufosol, látka *in vitro* navyšující CaCC aktivitu, byla bohužel shledána neúčinnou v rámci 3. fáze klinické studie [59]. Za další farmakologický cíl je momentálně považován TMEM16A, chloridový kanál z CaCC rodiny [60].

Pacientům s CF rovněž velice pomáhá fyzioterapie, během níž je masáží vytláčován hustý hlen usazený v plicích.

Důležitým prvkem symptomatické léčby CF je terapie antibiotiky. Pacientům jsou pravidelně podávána různá antibiotika, která mají za úkol potlačit bakteriální infekci.

Plíce pacientů s CF jsou napadány velkým množstvím různých bakterií, nejnebezpečnější však jsou *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*. Velkým rizikem terapie antibiotiky je vytvoření rezistence, pacienti s CF by se tedy mezi sebou neměli stýkat, aby se zabránilo přenášení případných rezistentních kmenů [4, 53].

1.4.2. Modulátory CFTR proteinu

Další účinnou formu terapie CF představují takzvané modulátory CFTR proteinu. Společně se symptomatickou léčbou se jedná o zatím jediné dostupné formy léčby CF. Modulátor CFTR proteinu je souhrnný název pro dvě skupiny látek: korektory a potenciátory.

Korektory CFTR proteinu jsou farmakologické chaperony, které napomáhají správnému sbalení proteinu a tím i jeho „záchraně“ před degradací. Nejznámějším představitelem korektorů CFTR proteinu je VX-809, známý též jako lumacaftor. Lumacaftor se váže na TMD1 doménu a svým působením umožňuje až 15% obnovení funkce CFTR kanálu v lidských plicních epitelálních buňkách [61]. Samotný F508del-CFTR však nefunguje stejně jako CFTR protein nezasažený mutací. Léčba korektory CFTR proteinu tedy většinou probíhá v kombinaci s potenciátory.

Potenciátory CFTR proteinu jsou látky schopné navýšit aktivitu kanálu. Zatímco korektory se užívají zejména pro třídu II mutací *CFTR* genu, potenciátory jsou vhodné i pro mutace tříd III a IV, v nichž je zasažen iontový transport CFTR kanálu. Nejznámějším potenciátorem je VX-770, známý též jako ivacaftor. Jeho účinek byl nejprve testován u mutaci G551D a následně i u mutacích G1244E, G1349D, S1251N [33]. Třebaže je nejužívanější potenciátorem, mechanismus účinku ivacaftoru není dosud přesně znám. Pro jeho vysvětlení byly navrženy dva mechanismy. Podle jednoho ivacaftor stimuluje schopnost CFTR proteinu otevřít iontový pór, zatímco podle druhého udržuje iontový pór otevřený po delší dobu. Není vyloučeno, že ivacaftor působí oběma mechanismy a ne jen výlučně jedním z nich [33, 62].

Ivacaftor se nejčastěji používá v kombinaci s lumacaftorem, čímž vzniká lék nazvaný Orkambi. Touto kombinací korektoru s potenciátorem lze velice efektivně léčit i poruchy způsobené F508del mutací, vůči nimž byl samotný ivacaftor neúčinný.

V současné době se jedná o nejúčinnější léčbu, zaměřenou na opravu funkce samotného CFTR kanálu. I tak Orkambi nedosahuje tak vysoké účinnosti, jaká byla očekávána. Důvod této snížené účinnosti je neznámý, existují ovšem hypotézy, že interakcí s ivacaftorem dochází k destabilizaci F508del-CFTR kanálu v plasmatické membráně [63].

Dalšími modulátory CFTR proteinu jsou například QBW251 od firmy Novalis nebo GLPG1837 od firmy Galapagos. Firma Vertex Pharmaceuticals, která vyvinula jak

lumacaftor, tak ivacaftor, dále testuje vylepšenou verzi lumacaftoru (VX-661) a ivacaftoru (CTP-656) [33].

1.4.3. Další formy farmakoterapie

Velkým problémem u třídy I mutací *CFTR* genu jsou předčasné terminální kodony, které znemožňují tvorbu plnohodnotného CFTR proteinu. Na tento problém se zaměřila další skupina farmakoterapeutik, která svým účinkem zasahují do procesu translace a umožňují pomínutí předčasného stop kodonu dosazením aminokyseliny s podobným kodonem [64]. Proteosyntéza CFTR kanálu tak může probíhat až do vzniku plnohodnotného proteinu [65]. Mezi tyto látky patří zejména aminoglykosidická antibiotika, zejména pak gentamycin. Jak se ale ukázalo, gentamycin při dlouhodobém užívání způsoboval renální toxicitu a ototoxicitu. Byla proto navržena další léčiva, jmenovitě ataluren nebo syntetický aminoglykosid NB124. Klinické studie s atalurenem však byly zastaveny ve třetí fázi pro nedostatečný účinek [66]. NB124 oproti tomu vykazuje lepší vlastnosti než gentamycin, navíc umocněné přidáním ivacaftoru [67].

Za zmínku rovněž stojí látky, které obnovují funkci CFTR proteinu tím, že zasahují do buněčných procesů kontroly kvality proteinů. Mezi ně patří například látka cavosonstat, která ovlivňuje signalizační dráhy proteasomu a zabráňuje tak degradaci CFTR proteinu. Další postupy většinou cílí buď na chaperony (potlačení exprese proteinu Aha1), nebo se snaží snižovat míru ubiquitinilace proteinů (zvýšená exprese proteinu USP10) [33, 68, 69].

1.5. Genová terapie CF

Zatímco se většina léčby CF zaměřuje na symptomy vyvolané nedostatečností či absencí CFTR proteinu, popřípadě se pokouší o opravu již existujícího CFTR proteinu, genová terapie CF představuje způsob, jak vyřešit samotnou příčinu nemoci - mutaci v *CFTR* genu.

Genová terapie od svého počátku představovala ideální formu léčby genetických onemocnění, jakým jsou například CF nebo Duchennova muskulární dystrofie. Její potenciál se však v průběhu let podstatně rozrostl a genová terapie našla uplatnění i na mnoha dalších polích, takže dnes tvoří svébytnou a velice obsáhlou vědeckou oblast. Jako příklad uplatnění genové terapie lze uvést její využití pro léčbu rakoviny [70], diabetu [71]

či v boji proti virům, jako je HIV [72]. Genová terapie skrývá veliký potenciál, který dodnes čeká na své plné využití.

Přístupů ke genové terapii je několik. Nejnovější, a do budoucna pravděpodobně převratnou, formu genové terapie představuje cílený zásah do genomu buněk a s ním spojené přepisování genetické informace. Další formou genové terapie jsou snahy o zásah do splicingu pre-mRNA, případně hybridizace CFTR-mRNA pomocí krátkých oligonukleotidových sond. Třetí, a nejstarší, formou genové terapie je přenos genetické informace do cílové buňky/tkáně. Zatímco předchozí dvě formy představují buď relativně experimentální, nebo alespoň doposud ne tak hojně využívané odvětví genové terapie, genový přenos má za sebou již bohatou historii.

1.5.1. Přepis genu

Je-li jádrem problému genetického onemocnění porucha v genetickém kódu, je řešení zdánlivě nasnadě – opravit daný gen. Až do nedávné doby se však jednalo o téměř neproveditelnou záležitost. Přestože se v porovnání s genovým přenosem jedná o velice mladou formu terapie, přepis genu představuje zásadní nástroj v léčbě genových nemocí. Ovšem jako u každé formy terapie, i zde se nacházejí úskalí, zejména pak úskalí morální. Pokud by totiž cílem byla systémová oprava genetické poruchy, musel by se přepis daného genu provádět na úrovni oplodněného vajíčka.

V současné době existují tři nástroje pro přepis genů: ZNF-HDR (z angl. zinc-finger nuclelease homology directed repair), TALEN (z angl. transcription activator-like effector nuclelease) a CRISPR (z angl. clustered regulary interspaced short palindromic repeats), spojený s nukleasou Cas9. Všechny tři techniky využívají nukleasy, které jsou schopny na patřičném místě v genu rozštěpit obě vlákna DNA. Pokud má buňka k dispozici homologní sekvenci k místu, kde byl zlom proveden, opraví pomocí něho původní DNA. Za předpokladu, že je do buňky taková homologní sekvence vpravena, je umožněno cílené přepisování genomu [73].

ZNF-HDR byl použit v rámci genové terapie různých genetických onemocnění, jako jsou například srpková anemie a hemofilie [74, 75]. U CF byla provedena korekce mutace F508del v kultuře imortalizovaného plicního epitelu [76].

Metoda TALEN byla použita pro opravu pluripotentních kmenových buněk získaných od pacienta s F508del mutací. Modifikované buňky ale nebyly navráceny do těla pacienta [77].

Nejnovější, nejlevnější a nejsnazší technikou je metoda CRISPR/Cas9. Jedná se o využití přirozeného obranného systému prokaryotických buněk proti virové DNA. Na základě krátké RNA sekvence (s typickými palindromickými CRISPR motivy) identifikuje patřičná nukleasa (v tomto případě Cas9) „cizorodou“ DNA a štěpí ji. Pro cílený zásah do genomu je tedy potřeba pouze této nukleasy a RNA s CRISPR sekvencí.

CRISPR/Cas9 technika byla použita pro opravu *CFTR* genu ve střevních organoidech (zjednodušené laboratorní modely orgánu) s mutací F508del. Modifikované organoidy po genovém zásahu vykazovaly obnovení funkčnosti CFTR proteinu [78]. CRISPR/Cas9 byl zároveň použit pro funkční umlčení *CFTR* genu v Calu-3 buňkách, které mají za běžných podmínek vysokou expresi CFTR proteinu [79].

1.5.2. Oprava mRNA

Dalším způsobem jak opravit mutaci v *CFTR* genu je využití antisense krátkých oligonukleotidových sond nebo oligonukleotidových duplexů. Takové duplexy byly použity pro *in vitro* opravu CFTR-mRNA a následnou obnovu funkce CFTR proteinu [80].

Firma ProQR Therapeutics vyvinula látku QR-101, jednovláknový modifikovaný oligonukleotid, který při aplikaci *in vivo* údajně dosáhl dobrých výsledků u pacientů s F508del mutací [81].

Odlíšná strategie, která necílí přímo na mRNA, ale na sestřih pre-mRNA, se jmenuje SMaRT (z angl. spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing). Využívá RNA molekul komplementárních k pre-mRNA tím způsobem, že proběhne *trans*-sestřih, neboli že dojde k rekombinaci exonů ze dvou molekul pre-mRNA. Takto by mohly být opraveny poruchy v sestřihu CFTR pre-mRNA stejně jako případné mutace [82].

1.5.3. Genový přenos

Již od roku 1989, kdy byl identifikován *CFTR* gen [6], byla myšlenka genového přenosu pro terapii CF v popředí vědeckého zájmu. Jak se ale záhy ukázalo, genová terapie CF se musí potýkat s mnohými náročnými překážkami.

Genová terapie CF od svého vzniku cílila zejména na plicní projevy nemoci. Zároveň díky své relativně snadné přístupnosti tvoří plíce zdánlivě ideální cíl pro genovou terapii. Plicní (inhalační) podání má však několik úskalí. Prvním je hustý, málo propustný hlen, který představuje výraznou překážku pro virové i nevirové přenašeče. Virové přenašeče se navíc musejí potýkat s vysokou imunologickou aktivitou plic. Zároveň plicní epitel, na který je genová terapie CF zaměřena, neproliferuje, případná indukce CFTR exprese je tak nutně dočasná a vyvstává potřeba opakovatelnosti podání léku.

Hlavní forma genového přenosu byla pomocí CFTR-cDNA, v poslední době se však objevuje další, a sice přenos pomocí CFTR-mRNA. Níže zmíněné přenašeče se týkají zejména přenosu DNA, ale některé (především nevirové) lze použít i pro přenos RNA.

1.5.3.1. Virové přenašeče

Viry jsou životní formy, které se vyvinuly, aby pronikaly do hostitelských buněk a exprimovaly v nich svou genetickou informaci. V hledání genového přenašeče tak představují ideálního kandidáta. Pro terapii CF byly především použity adenoviry (AV) a adeno-asociované viry (AAV), ale i jiné, například lentiviry nebo sendai virus.

Adenoviry

AV patří mezi neobalené DNA viry. Jejich tělo má tvar dvacetistěnu, měří v průměru 60-90 nm a jeho molekulová velikost je přibližně 150 MDa [83]. Genetická informace ve formě lineární dvouřetězcové DNA o velikosti 30-40 kb je zakončená kovalentně napojeným proteinem na 5'-konci. AV se dělí do 7 druhů, přičemž více než 50 sérotypů je schopno infikovat člověka. Pro genovou terapii jsou nejvíce užívány sérotypy 2 a 5 [84, 85].

AV jsou známé pro infekce dýchací soustavy. Do buňky vstupují pomocí CAR receptoru (z angl. coxsackie-adenovirus receptor), následně unikají z endosomu a předávají svou genetickou informaci do buněčného jádra pomocí jaderných pórů. CAR receptor se typicky nachází na apikální straně epitelálních buněk. Výjimku ale tvoří zejména lidské plíce, kde je umístěn na straně basolaterální [86, 87]. Aby proto transfekce AV viry byla úspěšná, je nutné společně s rekombinantními viry podávat i látky pro rozvolnění těsných spojů plicního epitelu. Alternativně jsou AV vektory modifikovány α -lysofosfatidylcholinem, který plní stejnou funkci [86, 88]. Velkou nevýhodou rozvolnění

těsných spojů plicního epitelu u pacientů s CF však je skutečnost, že jejich plíce jsou kolonizovány velkým počtem patogenů, které tímto získávají přístup do hlubších vrstev plic. Zvyšuje se tak riziko systémového šíření bakterie a zhoršení celkového stavu pacienta.

AV vektory byly připraveny v několika generacích, v závislosti na tom, jak velká část jejich původního genomu byla vystřižena a nahrazena rekombinantní DNA. První generace AV vektorů měla vystřiženy jenom dva až tři geny (E1A, E1B a někdy i E3 [85]), zatímco třetí generace AV vektorů už představovala pouhou holou virovou „schránku“, do níž byla vložena DNA pro přenos [89]. Tato generace AV vektorů vyžadovala pomocné viry, aby byla schopna exprimovat nesenou DNA.

Pacienti s CF, kteří byli léčeni AV vektory, mnohdy trpěli příznaky podobným chřipce a zánětlivými reakcemi v plicích. Se snižujícím se množstvím virové DNA tyto projevy sice mizely, avšak samotná schránka viru se ukázala jako imunogenní [90]. S opakovaným podáním rekombinantního AV vektoru se kumulativně zvyšovalo množství protilátek proti němu, zatímco už tak nízká exprese CFTR proteinu se nezvyšovala [91].

Adeno-asociované viry

AAV jsou neobalené jednovláknové DNA viry s průměrem 18-25 nm [85]. Na rozdíl od AV vektorů nejsou prakticky vůbec imunogenní a jsou schopny transfekovat terminálně diferencované buňky [92]. AAV vektory zprostředkovaná genová exprese má také delší trvání než v případě AV. Velkou nevýhodou AAV však je jejich poměrně malá velikost. Jejich gen má pouhých 4,7 kb [85].

Proběhlo celkem 6 různých klinických studií s přenosem *CFTR* genu pomocí AAV vektorů (přesněji sérotypu 2 - AAV2). Ukázalo se, že třebaže terapie AAV2 přenašeči byla bez vedlejších účinků, jimi vyvolaná exprese CFTR proteinu byla proměnlivá. Pouze 2 z původních 6 klinických studií postoupily do fáze 2, v níž bylo testováno opětovné podání AAV2 rekombinantního vektoru. Třebaže transfekce byla úspěšná, neboť se vektor nacházel v cílových buňkách, CFTR-mRNA detekována nebyla [93]. Zároveň účinek léčby nebyl vůči placebo signifikantní. Také se ukázalo, že AAV2 vektor byl rozpoznán adaptivním imunitním systémem, neboť pacienti jím léčení měli proti němu až čtyřnásobné množství protilátek [86].

Ostatní virové vektory

Třebaže AV a AAV patří mezi nejužívanější virové přenašeče pro léčbu CF, nejsou jedinými. Jako další zástupce virových vektorů lze uvést například SV40 (z angl. simian vacuolation virus 40), RNA viry a lentiviry.

SV40 je DNA virus s cirkulární DNA, který svou genetickou informaci integruje do hostitelského genomu. Jeho použití pro terapii CF však způsobuje zánětlivou odpověď. Navíc jeho malá velikost neumožňuje přenos kompletní genové informace pro CFTR protein [94].

RNA viry nepronikají do buněčného jádra, místo toho zůstávají v cytoplasmě, kde přepisují svou RNA do cDNA. Mezi tyto viry patří například parainfluenza virus, respirační syncytiální virus nebo sendai virus. Přestože například sendai virus je schopen vysoce účinné transfekce, doba jeho účinku je velice krátká (řádově ve dnech, místo potřebných měsíců) a ve zvířecích modelech byla proti němu detekována řada protilátek [95].

Lentiviry jsou další RNA viry, které mají navíc schopnost integrovat svou genovou informaci i do nedělících se buněk. Podobně jako u AV vektorů je problematický vstup do plicního epitelu. Jimi zprostředkovaná exprese CFTR proteinu však trvala 12 až 18 měsíců po jediné dávce. Opětovná podání však byla neefektivní z důvodu imunitní odpovědi hostitele [96].

1.5.3.2. Nevirové přenašeče

Nevirové vektory představují různorodou skupinu látek, kterých je využíváno pro vnesení genetické informace do cílové buňky, aniž by při tom byla použita virová částice. Hlavním pozitivem nevirálních vektorů je, že na rozdíl od těch virových jsou podstatně bezpečnější, neboť s nimi není spojeno riziko mutagenity a imunogenních reakcí. Zároveň mohou mít vyšší tkáňovou specifitu a mohou přenášet i velké molekuly nukleové kyseliny. Rovněž jejich příprava je jednodušší a levnější. Jejich nevýhodou však bývá riziko toxicity a nízká míra transfekční účinnosti [97]. Z velkého množství nevirálních přenosů uvádím jen ty, pro něž je použito kationtových liposomů a kationtových polymerů.

Kationtové liposomy

Kationtové lipidy patří k nejhodněji používaných nevirových přenašečů. Jedná se o amfifilní molekuly složené z hydrofilní hlavičky, spojovače a hydrofobní kotvy.

Jako hydrofilní hlavička bývají použity zejména aminy, a to jak primární aminy, tak sekundární a terciální, včetně kvartérních amoniových solí. Jako další lze uvést například amidin, guanidin a sloučeniny na bázi imidazolu [98–100]. V závislosti na počtu nabitých skupin mohou být kationtové lipidy buď monovalentní, nebo multivalentní. Pro přenos záporně nabitě nukleové kyseliny se osvědčily zejména multivalentní kationtové lipidy [101].

Hydrofobní kotvu tvoří buď alifatické uhlovodíky, cholesterol nebo vitamín D [102]. Většina hydrofobních kotev sestává ze dvou uhlovodíkových řetězců, s délkou mezi 12-18 uhlíky. Řetězce mohou být nasycené i nenasycené [103].

Obě výše zmíněné části kationtového lipidu jsou spojeny spojovačem, jehož povaha zodpovídá zejména za možnost biodegradace a ovlivňuje tedy i případnou toxicitu kationtového lipidu [104].

Kationtové lipidy jsou velice často používány v kombinaci s pomocnými lipidy, které vylepšují jejich vlastnosti (DOPE, cholesterol) [105].

Kationtové lipidy díky své amfifilní povaze tvoří ve vodných roztocích kulovité útvary sestávající z lipidové dvojvrstvy, nazývané liposomy. V jádru liposomu a na jeho povrchu se nachází vysoká koncentrace kladných nábojů, které elektrostaticky interagují se záporně nabitou nukleovou kyselinou a ta pak s liposomem tvoří komplex označovaný jako lipoplex. Prvotní asociace liposomu s nukleovou kyselinou je spontánní a prudká, poté následuje pozvolnější změna struktury lipidů v komplexu [106]. Bylo popsáno několik uspořádání nukleové kyseliny-liposomu v lipoplexech. Nukleová kyselina byla nalezena jak sbalena uvnitř liposomu, tak i namotána na jeho povrchu [107–110]. Velikost lipoplexů se pohybuje mezi 100-500 nm.

Třebaže kationtové liposomy patří mezi nejprozkoumanější nevirová transfekční činidla, samotný mechanismus jejich průniku do buňky není zcela známý. Předpokládá se, že se jako lipoplexy váží na záporně nabitou plasmatickou membránu, s níž posléze buď fúzí, nebo jsou endocytovány. Z těchto dvou cest bývá častější endocytóza [111].

Pro klinickou terapii CF byly kationtové lipidy využívány zejména v devadesátých letech, kdy probíhalo hned osm klinických studií v 1. fázi. Tři z nich využívaly kombinaci lipidů DC-Chol/DOPE, jedna lipid DOTAP a jedna EDMPC. Zatímco těchto pět studií

ukázalo poměrně dobrou toleranci léku, jeho účinky byly příliš malé, aby bylo možné pokročit do další fáze. Ve většině případů nebyla detekována CFTR-mRNA. Dvě studie využívaly kationtový lipid GL67, který sice při inhalačním podání v myším modelu vykázal markantně vysokou transfekční účinnost (až 100x vyšší než u jiných kationtových liposomů), když byl ale zkoušen u lidí, většina testovaných pacientů prodělala závažné zánětlivé reakce a horečky [112]. Od té doby probíhají snahy o snížení toxicity GL67. Poslední, osmá studie z devadesátých let porovnávala účinnost transfekce GL67 vůči nechráněné plasmidové DNA. Z nedávné doby je třeba zmínit klinickou studii, zkoumající jednorázové podání modifikovaného GL67A (pGM169/GL67A). Její výsledky ukazují, že došlo k zlepšení nasálního rozdílu potenciálů v bronchiálních buňkách, a tedy i k obnově funkce CFTR proteinu. Horečky, typické pro podání původní formy GL67, nebyly pozorovány [113].

Kationtové polymery

Dalším transfekčním činidlem, které využívá elektrostatické interakce s nukleovou kyselinou a záporně nabitou plasmatickou membránou, jsou kationtové polymery. Jedná se o skupinu látek, která za fyziologického pH disponuje vysokým množstvím kladně nabitých funkčních skupin. Bylo vytvořeno velké množství různorodých kationtových polymerů, které lze rozdělit na čtyři charakteristické skupiny: přírodní polymery (chitosan), dendrimery (polyamidoamin PAMAM), polypeptidy (poly-L-lysin PLL) a ostatní polymery (polyetylenimin PEI). Pro zlepšení určitých vlastností je možné polymery různými způsoby modifikovat. Například pro genovou terapii CF bylo využito konjugace PLL s ligandem pro buněčný receptor SecR (z angl. serpin-enzyme complex receptor).

Kationtové polymery disponují zejména aminovými funkčními skupinami. Jejich komplexy s DNA či RNA se nazývají polyplexy. Jedná se o nanočástice, jejichž celková velikost klesá se zvyšující se molekulovou hmotností. Například polyplexy vytvořené pomocí 54kDa PLL mají průměr přibližně 25 nm, zatímco průměr polyplexů z 10kDa PLL činí 40 nm [114]. Se zvyšující se molekulovou hmotností se zároveň zvyšuje transfekční účinnost, roste ale i cytotoxicita [115].

Podobně jako u kationtových lipidů účinnost transfekce kationtovými polymery není vysoká. Třebaže se polyplexy úspěšně vážají na plasmatickou membránu a jsou snadno endocytovány, hlavní příčina jejich nízké transfekční účinnosti spočívá v neschopnosti

opustit endosom dřív, než je jeho vnitřek hydrolyzován. Toto je problém zejména pro PLL, který je jinak díky své peptidové podstatě vhodným transfekčním činidlem. Pro zvýšení účinnosti transfekce bývá PLL podáván společně s polyethylenglykolem (PEG) [116–118].

Za pravděpodobně nejúčinnější kationtový polymer je považován PEI, který je schopný kondenzovat i velké molekuly nukleových kyselin. PEI polyplexy jsou snadno endocytovány a jsou schopné úspěšně unikat z endosomu pomocí takzvaného „jevu protonové houby“ [119].

PEI není biodegradabilní a při velkých molekulových velikostech způsobuje závažnou cytotoxicitu. Pro transfekci se tedy využívají menší PEI polymery, zejména pak lineární 22kDa PEI nebo rozvětvený 25kDa PEI [115]. Pro získání vysoké transfekční účinnosti jsou malé PEI molekuly propojovány ve větší celky. Spoje jsou přitom biodegradabilní, snižuje se tak i riziko toxicity [120, 121].

Kationtové polymery mohou být rovněž použity v kombinaci s kationtovými lipidy. Komplex kationtového polymeru s nukleovou kyselinou je tak obsažen v kationtovém liposomu. Výsledná částice má menší velikost než lipoplex samotný [122]. Případně je možné využít kombinace polyplexu s aniontovými lipidy [123].

Jak bylo řečeno výše, pro účely terapie CF bylo využito PLL v kombinaci s ligandem SecR receptoru. Na tento ligand se však záhy utvořila imunitní odpověď a zamezila tak opětovnému podání komplexu. Byla rovněž použita kombinace PEG-PLL, stejně jako PEI, ale žádná z variant transfekčních činidel nebyla buď dostatečně účinná, nebo se projevovala toxicky [86].

1.5.3.3. Přenos mRNA

Tradiční přístup ke genovému přenosu sestává ze snahy vložit do cílové buňky molekulu DNA patřícího genu. Alternativou k přenosu DNA by mohl být přenos mRNA, která oproti přenosu DNA poskytuje několik výhod:

- mRNA je překládána přímo v cytosolu, nevyžaduje tedy přenos do buněčného jádra, čímž mizí jedna zásadní bariéra úspěšné transfekce;
- pomocí mRNA lze účinně transfekovat i neproliferující buňky;
- jedná se o menší molekulu než DNA;
- u přenosu mRNA nedochází k riziku mutagenese [124].

Oproti DNA je však mRNA nestabilnější molekulou a enzymy štěpící RNA, vzhledem ke své všudypřítomnosti, představují značné riziko. Předčasné degradaci přenášené mRNA lze zamezit dostatečně dlouhým polyadenylovým řetězcem na 3'-konci (100-200 A [125]), stejně jako připojením čepičky na 5'-konci.

RNA zároveň může být imunogenní, protože se savčí organismus evolučně naučil rozpoznávat svou RNA od bakteriální pomocí specifických modifikací nukleových bazí (např. methylace). Pokud je tedy daná RNA nemodifikována, je záhy rozpoznána imunitním Toll-like receptorem jako bakteriální.

Třebaže je přenos mRNA známý už od osmdesátých let dvacátého století, teprve nedávno se dostal do popředí zájmu. V současné době neustále roste množství prací zkoumajících možnost využití přenosu mRNA pro genovou terapii, včetně terapie CF [124, 126].

2. Cíl práce

Cílem této práce bylo charakterizovat zkoumané buněčné linie (NuLi-1, CuFi-1, HEK293S) na základě jejich exprese *CFTR* genu a CFTR proteinu. Na takto charakterizovaných buněčných liniích byla následně testována účinnost transfekce pomocí *in vitro* syntetizované CFTR-mRNA.

Hlavními úkoly práce bylo:

- optimalizovat detekci CFTR proteinu metodami nepřímé imunofluorescence a Western blot imunodetekce za použití šesti primárních protilátek;
- stanovit relativní míru genové exprese *CFTR* genu pomocí metody kvantitativní PCR;
- *in vitro* syntetizovat CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy a CFTR-mRNA s 25 % pseudouridinu a 25 % 5-methylcytidinu;
- transfekovat buněčné linie pomocí CFTR-mRNA;
- za použití metod nepřímé imunofluorescence a Western blot imunodetekce stanovit míru exprese CFTR proteinu po transfekci pomocí CFTR-mRNA.

3. Materiál a metody

3.1. Použitý materiál a přístrojové vybavení

3.1.1. Přístrojové vybavení

CO ₂ inkubátor MCO-170AIC	Panasonic, Japonsko
centrifuga Hettich Micro 220 R	Hettich Zentrifugen, Německo
centrifuga Hettich Universal 320 R	Hettich Zentrifugen, Německo
centrifuga Eppendorf 5418	Eppendorf, USA
centrifuga Eppendorf 5415 R	Eppendorf, USA
centrifuga vysokorychlostní	HWLAB, Čína
cycler Rotor-Gene 2000	Corbett research, Austrálie
cycler T-personal	Biometra, Německo
cycler Techgene	Techne, UK
fluometr Qubit	Invitrogen, UK
inkubátor mini Dry Bath MiniB-100	MIULAB, Čína
laminární box BIO 126	Labox, ČR
laminární box MB 120	Labox, ČR
mikroskop Motic AE31	Motic, Německo
mikroskop Nikon Eclipse TE2000-U	Nikon, Japonsko
spektrofotometr DS-11	DeNovix, USA
spektrofotometr Tecan Sunrise	Tecan, Švýcarsko
termoblok LS-1	VLM, Německo
Themormixer comfort	Eppendorf, USA
transluminátor Dark Reader	Clare Chemical Research, USA
vodní lázeň	Memmert, Německo
vortex VELP	Scientifica, Itálie
zamrazovací box Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, USA
zařízení pro Western blot	Biometra, Německo

3.1.2. Materiál a chemikálie

0,25% Trypsin + EDTA	Sigma-Aldrich, USA
2-merkapt ethanol	Fluka, Švýcarsko
agarosa	Invitrogen, UK
akrylamid, bisakrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Alexa Fluor 555	ThermoFisher Scientific, USA
antarktická fosfatasa	New England Biolabs, USA
anti-CFTR (CF3) myši Ab	ThermoFisher Scientific, USA
anti-CFTR 432 myši Ab	Cystic fibrosis foundation, USA
anti-CFTR 450 myši Ab	Cystic fibrosis foundation, USA
anti-CFTR 570 myši Ab	Cystic fibrosis foundation, USA
anti-CFTR 596 myši Ab	Cystic fibrosis foundation, USA
anti-CFTR 769 myši Ab	Cystic fibrosis foundation, USA
anti-GAPDH králičí Ab	Abcam, USA
anti-mouse IgG – Alkaline Phosphatase králičí	Sigma-Aldrich, USA
anti-rabbit IgG – Alkaline Phosphatase kozí	Sigma-Aldrich, USA
APS	Sigma-Aldrich, USA
bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, USA
BCIP	Sigma-Aldrich, USA
BSA	Sigma-Aldrich, USA
CBB	Sigma-Aldrich, USA
CuFi-1	ATCC®, USA
Complete inhibitor protease	Roche Diagnostics, Švýcarsko
DABCO	Sigma-Aldrich, USA
Direct-zol RNA MiniPrep	Zymo research, USA
DMSO	AppliChem GmbH, Německo
Donkey Serum	Jackson ImmunoResearch, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, USA
EMEM	ATCC®, USA
ethanol	Lach:NER, ČR

Fast Start Essential DNA Probes Master	Roche, Švýcarsko
FBS	Gibco™ Invitrogen , UK
gelatin from cold water fish skin	Sigma-Aldrich, USA
Geneticin	Gibco™ Invitrogen , UK
glycin	PENTA, ČR
HEK293S	ATCC®, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, USA
Hoechst 33258	ThermoFisher Scientific, USA
cholát sodný	Sigma-Aldrich, USA
IDT sonda pro CFTR	IDT, USA
kolagen IV	Sigma-Aldrich, USA
kyselina boritá	Lach:Ner, ČR
kyselina octová	Lach:Ner, ČR
LHC-9	Gibco™ Invitrogen , UK
Lipofectamine MessengerMAX	ThermoFisher Scientific, USA
MEGAclear	Life Technologies, USA
Microplate BCA™ Protein Assay Kit	Thermo sciences, USA
Mowiol	Sigma-Aldrich, USA
NaCl	Lach:Ner, ČR
Na ₂ HPO ₄	Lach:Ner, ČR
NaH ₂ PO ₄	Lach:Ner, ČR
NaN ₃	Lach:Ner, ČR
NBT	Sigma-Aldrich, USA
NuLi-1	ATCC®, USA
Optimem medium	Gibco™ Invitrogen , UK
PBS tablety	Gibco™ Invitrogen , UK
paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, USA
Poly(A)Polymerase, Yeast	affymetrix USB, USA
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Sigma-Aldrich, USA
PVDF membrána	Thermo sciences, USA
QIAfilter Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Nizozemsko
RNA Loading Dye (2x)	New England Biolabs, USA

RNA Loading Dye (6x)	New England Biolabs, USA
SDS	Sigma-Aldrich, USA
skalice modrá	Lach:NER, ČR
ssRNA Ladder	New England Biolabs, USA
sterilní vybavení tkáňové laboratoře	TPP, Švýcarsko
sušené mléko	Laktino, ČR
SYBR™ Green II	ThermoFisher Scientific, USA
T7 mScript™ Standard mRNA Production System	CELLSCRIPT™, USA
TaqMan sondy pro CFTR a GAPDH	ThermoFisher Scientific, USA
TEMED	Sigma-Aldrich, USA
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
trypanová modř 0,4%	Sigma-Aldrich, USA
Whatman filtrační papíry	Sigma-Aldrich, USA

3.2. Práce s buněčnými liniemi

Jako experimentální buněčné kultury byly využity tyto linie: CuFi-1, NuLi-1 a HEK293S. CuFi-1 je imortalizovaná buněčná linie lidského plicního epitelu, získaného od mladé pacientky trpící CF, homozygotní s mutací F508del. NuLi-1 je imortalizovaná buněčná linie zdravého plicního epitelu. HEK293S je zárodečná ledvinná epiteliální buněčná linie. Práce s buněčnými liniemi probíhala v laminárním boxu MB 120 (Labox) za použití sterilního vybavení.

3.2.1. Kultivace buněčných linií

Veškeré buněčné linie byly uchovávány v laboratoři pro kultivaci tkáňových kultur. Byly umístěny v CO₂ inkubátoru MCO-170AIC (Panasonic) za teploty 37°C při 5% nasycení CO₂. V inkubátoru byla udržována stálá vlhkost.

Buněčné linie CuFi-1 a NuLi-1 byly kultivovány v mediu LHC-9, vyvinutém speciálně pro plicní epiteliální buňky. K mediu LHC-9 bylo přidáváno antibiotikum Geneticin tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 50 µg/ml. Aby bylo docíleno adekvátního růstu, obě plicní buněčné linie byly kultivovány v kultivačních lahvích s povrchem potaženým kolagenem IV (viz kapitola 3.2.2.).

Buněčná linie HEK293S byla kultivována v mediu EMEM, do něhož bylo přidáváno fetální hovězí sérum (FBS), aby jeho výsledná koncentrace byla 10 % (v/v). Přídavkem FBS bylo zajištěno, že jinak suspenzní buněčná linie HEK293S adherovala na povrch kultivační lahve.

Všem buněčným liniím bylo dvakrát týdně měněno kultivační medium. Do kultivačních lahví s povrchem 75 cm² bylo přidáváno 15-16 ml kultivačního media, do kultivačních lahví s povrchem 25 cm² 5-10 ml kultivačního media.

3.2.2. Příprava kultivačních lahví s povrchem potaženým kolagenem IV

Buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 potřebují pro správný růst povrch potažený kolagenem IV. Lahve s takovým povrchem je možné buď zakoupit komerčně, nebo je

vyrobit pomocí komerčně dodávaného lyofilizovaného kolagenu IV, pocházejícího z lidské placenty.

Kolagen IV byl rozpuštěn v 0,25% (v/v) kyselině octové, aby jeho výsledná koncentrace činila 1,8 mg/ml. Takto získaný roztok sloužil jako zásobní a uchovával se ve skleněné nádobě v chladu za nepřístupu světla.

Zásobní roztok kolagenu IV byl ředěn fosfátovým pufrům (PBS) na konečnou koncentraci 60 µg/ml. Ředěný roztok byl následně filtrován přes 0,22µm filtr. Roztokem bylo převrstveno dno kultivačních lahví. Do lahví s kultivačním povrchem 25 cm² byly přidávány 2 ml tohoto roztoku, zatímco do nádob s povrchem 75 cm² bylo roztoku nanášeno 4-5 ml.

Kultivační nádoby s roztokem kolagenu IV byly inkubovány do druhého dne při laboratorní teplotě. Roztok byl následně slit a nádoby byly dvakrát promyty 4-5 ml PBS pufru. Poté byly nádoby obráceny dnem vzhůru a ponechány k vyschnutí s povolenými víčky. Suché lahve byly nakonec minimálně 2 hodiny sterilizovány UV zářením. Hrdla lahví byla zapečetěna pomocí parafilmu. Lahve byly skladovány v chladovém boxu při 4°C. Před použitím byl jejich vnitřek vymyt sterilním PBS pufrům.

3.2.3. Subkultivace buněčných linií

Subkultivace buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1

Subkultivace buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1 byla prováděna jednou týdně. Bylo odstraněno kultivační medium a k buňkám bylo přidáno 2-3 ml 0,25% roztoku trypsinu s 0,53mM EDTA (pro kultivační lahve s povrchem 25 cm² 1-2 ml). Buňky byly s roztokem inkubovány 8 minut při teplotě 37°C (inkubátor MCO-170AIC). Působení trypsinu bylo následně zastaveno přidávkem 1% (v/v) FBS v PBS pufru.

Buněčná suspenze byla 5 minut centrifugována (centrifuga Hettich, 1000 RPM). Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a buněčná peleta byla resuspendována v 1 ml LHC-9 kultivačního media, temperovaného na 37°C.

Do nové kultivační lahve se dnem pokrytým kolagenem IV bylo odměřeno kompletní LHC-9 medium (viz kapitola 3.2.1.). Do kultivačních lahví s povrchem 75 cm² bylo přidáno 0,6-1,0·10⁶ buněk. Do kultivačních lahví s povrchem 25 cm² 0,3-0,6·10⁶ buněk.

Subkultivace buněčné linie HEK293S

Pro kultivaci ledvinné buněčné linie HEK293S byly použity běžné kultivační lahve. Subkultivace linie HEK293S byla prováděna jednou týdně. Nejprve bylo odstraněno staré medium a buňky byly opláchnuty sterilním PBS pufrem. Poté byly k buňkám přidány 2-3 ml 0,25% trypsinu s EDTA. Buňky byly inkubovány 4-5 minut při 37°C (inkubátor MCO-170AIC), Aktivita enzymu byla zastavena přidávkem 1% (v/v) FBS v PBS pufru.

Buněčná suspenze byla následně 5 minut centrifugována (centrifuga Hettich, 1000 RPM). Supernatant byl odstraněn a buněčná peleta byla resuspendována ve 2 ml kompletního kultivačního média (viz kapitola 3.2.1.).

Do kultivační lahve s povrchem 75 cm² bylo přidáno 16 ml EMEM media a poté přidáno 0,6-1,0·10⁶ buněk.

3.2.4. Stanovení počtu buněk v suspenzi a jejich viability

Buněčný alikvot byl ředěn kultivačním médiem a následně 0,4% trypanovou modří v poměru 1:1. V případě buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1 vznikl celkově 10x ředěný roztok, zatímco linie HEK293S byla ředěna 20x. Trypanová modř obarvuje mrtvé a poškozené buňky.

Buněčná suspenze obarvená trypanovou modří byla nanesena do Bürkerovy komůrky. Tato komůrka obsahuje mřížku devíti velkých čtverců, z nichž každý je rozdělen na další čtverce. Pod mikroskopem Motic AE31 bylo počítáno množství buněk umístěných na pěti z devíti čtverců. Výsledný počet buněk byl získán ze vztahu uvedeného níže.

$$n = \frac{\text{spočítané množství buněk}}{\text{množství počítaných čtverců}} \cdot \text{ředění roztoku} \cdot 10\,000$$

3.2.5. Zamrazení buněčných linií

Stejně jako v případě subkultivace byly buněčné linie nejprve uvolněny působením 0,25% trypsinu s EDTA a po přidávku 1% FBS v PBS centrifugovány (viz kapitola 3.2.3.). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a buněčná peleta byla promyta 1 ml PBS pufru.

Vzniklá suspenze byla opět 5 minut centrifugována (centrifuga Hettich, 1000 RPM). Supernatant byl odstraněn a buněčná peleta byla resuspendována v zamrazovacím mediu (kultivační medium, 10% (v/v) DMSO, 30% (v/v) FBS). Objem přidaného zamrazovacího media byl úměrný množství buněk v suspenzi (na 10^6 buněk 1 ml media). Buněčná suspenze byla pipetována do kryozkumavek, které byly umístěny do zamrazovacího boxu Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container a ponechány přes noc v hluboko mrazicím boxu. Zamrazené buňky byly buď krátkodobě uchovány při teplotě -80°C , nebo dlouhodobě v tekutém dusíku (-196°C).

3.2.6. Rozmrazení buněčných linií

Kryozkumavka s 1ml zamrazeného alikvotu buněčné linie byla vnořena do vodní lázně o teplotě 37°C , dokud alikvot neroztál. K alikvotu bylo následně v rozmezích 1 minuty přidáváno temperované medium podle tabulky č. 1.

Tabulka č. 1 *Objem přídavek media k buněčné suspenzi*

Čas / min	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Objem přidávaného media / ml	0,10	0,12	0,15	0,19	0,26	0,36	0,52	0,86	1,69	4,75

Buněčná suspenze byla následně 5 minut centrifugována (centrifuga Hettich Universal 320 R, 1000 RPM). Supernatant byl odstraněn a buněčná peleta byla resuspendována v 1 ml odpovídajícího kultivačního media. Ze vzniklé buněčné suspenze byl odebrán alikvot pro stanovení buněčné viability (viz kapitola 3.2.4.) a zbytek suspenze byl převeden do kultivační lahve s povrchem 25 cm^2 do 8 ml kultivačního media.

3.3. Metoda nepřímé imunofluorescence

Použité roztoky

Fixační roztok: 4% (w/v) paraformaldehyd, PBS, pH 7,2-7,4

Blokovací roztok 1: 0,1 M glycin, 5% (v/v) Donkey serum, PBS, pH 7,2-7,4

Blokovací roztok 2: 0,1 M glycin, 5% (v/v) Donkey serum, 0,5% (v/v) Triton X-100, PBS, pH 7,2-7,4

Roztok pro ředění primární protilátky 1: 1% (w/v) BSA, 0,05% (w/v) azid sodný, 0,1% (w/v) „gelatine from cold water fish skin“, PBS, pH 7,2-7,4

Roztok pro ředění primární protilátky 2: 1% (w/v) BSA, 0,05% (w/v) azid sodný, 0,1% (w/v) „gelatine from cold water fish skin“, 0,5% (v/v) Triton X-100, PBS, pH 7,2-7,4

Roztok sekundární protilátky: 0,1 M glycin, 5% (v/v) Donkey serum, 0,5% (v/v) Triton X-100, 0,2% (v/v) Alexa Fluor 555, 0,1% (v/v) Hoechst 33258, PBS, pH 7,2-7,4

DABCO-Mowiol: Příprava: 2,4 g mowiolu (polyvinylalkohol), 6 g glycerolu, 6 ml destilované vody. Vše bylo 3 hodiny mícháno. Poté bylo přidáno 12 ml 0,2M Tris-Cl (pH 8,5). Roztok byl minimálně 10 minut míchán ve vodní lázni o teplotě 50°C, dokud nebyl čirým. Následně byl 15 minut centrifugován (centrifuga HWLAB, 5000 g). K supernatantu byl přidán DABCO, aby jeho výsledná koncentrace byla 2,5 % (w/w).

Princip

Pro stanovení přítomnosti CFTR proteinu přímo v buňkách zkoumané linie bylo využíváno metody nepřímé imunofluorescence. Tato metoda spočívá v označení hledaného proteinu specifickou primární protilátkou, která je vizualizována pomocí fluorescenčně značené sekundární protilátky. Jako sekundární protilátka byla použita Alexa Fluor 555 (excitace při 555 nm, emise při 565 nm) [127]. Pro značení buněčných jader byla použita fluorescenční barva Hoechst 33258 (excitace při 352 nm, emise při 461 nm).

Bylo testováno šest různých myších primárních protilátek proti CFTR proteinu, jejich názvy a místa vazby na CFTR protein jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2. *Protilátky proti CFTR proteinu použité pro nepřímou imunofluorescenci a označení místa interakce se specifickým epitopem CFTR proteinu.*

Název protilátky	432	450	570	596	769	CF3
Specifické místo (epitop)	R doména (762-770)	R doména (696-705)	R doména (731-742)	NBD2 doména (1204-1211)	NBD2 doména (1204-1211)	MSD1 doména (103-117)

Postup

Buněčné linie byly nasazeny do 96jamkové černé mikrotitrační destičky s plochým dnem v množství $4 \cdot 10^4$ buněk v 200 μ l kultivačního media na jamku. Po vytvoření konfluentní vrstvy bylo odsáto kultivační medium a buňky byly třikrát omyty 200 μ l PBS pufru. Následně bylo do jamek přidáno 100 μ l fixačního roztoku, s nímž byly buněčné linie inkubovány 20 minut při laboratorní teplotě. Fixační roztok byl vždy připravován čerstvý.

Po skončení inkubace byly buňky opět třikrát promyty 200 μ l PBS pufru a bylo k nim přidáno 100 μ l blokovacího roztoku. S blokovacím roztokem byly buňky inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě.

Po skončení inkubace byl blokovací roztok odstraněn a do jamek bylo pipetováno 100 μ l roztoku primární protilátky. Protilátky byly ředěny v poměrech 1:250, 1:500 nebo 1:1000. S primární protilátkou byly buněčné linie inkubovány přes noc na orbitální třepačce Mini Rocker MR-1 v chladovém boxu při teplotě 4°C.

Následně byl odsát roztok primární protilátky, buňky byly znovu třikrát promyty 200 μ l PBS pufru a bylo k nim přidáno 100 μ l roztoku fluorescenčně značené sekundární protilátky, s níž byly buněčné linie inkubovány po dobu 30 minut při teplotě 37°C. Poté byly buňky devětkrát promyty 200 μ l PBS pufru. Nakonec byly do každé jamky přidány dvě kapky DABCO-Mowiol (30-40 μ l). Buňky byly pozorovány na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U v programu NIS-Elements AR 2.30. Byla použita kamera MuTech s rozlišením LWD 10x/0,4. Pro červenou fluorescenci (Alexa Fluor 555) byl použit filtr 31002 Rdil C87702 a pro modrou fluorescenci (Hoechst 33258) byl použit filtr 31000 DAPI C80600.

3.4. Lyze buněčných linií

Pro účely separace CFTR proteinu pomocí diskontinuální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE elektroforéza) a následné imunodetekce bylo zapotřebí získat lyzát buněčných kultur.

Buňky určené k lyze byly nejprve vysety na sterilní Petriho misky o průměru buď 4 cm ($3 \cdot 10^5$ buněk, 2 ml kultivačního media), nebo 10 cm ($7 \cdot 10^5$ buněk, 10 ml kultivačního media).

Po vytvoření buněčné monovrstvy bylo odstraněno kultivační medium a buňky byly v závislosti na velikosti Petriho misky dvakrát omyty buď 1 ml PBS pufru, nebo 5 ml. Buňky byly lyzovány RIPA puftrem (150 mM NaCl; 50 mM Tris; 1% (v/v) Triton X-100; 0,5% (v/v) cholát sodný, 0,1% (v/v) SDS, pH 8) a to buď 100 µl, nebo 1 ml, podle velikosti Petriho misky. Pro minimalizaci proteolýzy byla v 15 ml RIPA pufru rozpuštěna čtvrtina tablety „Complete inhibitor protease“ a lyzační pufr byl držen na ledu.

Buněčný lyzát byl seškrabán stěrkou a převeden do mikrozkušavky, ihned dán na led a následně centrifugován 30 minut (centrifuga Eppendorf 5485 R, 13 000 RPM, 4°C). Supernatant byl převeden do nových, sterilních mikrozkušavek a zamrazen v tekutém dusíku. Vzorky byly skladovány při -80°C.

3.5. Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí bicinchoninové kyseliny (BCA). Ke stanovení bylo použito komerčního kitu Microplate BCATM Protein Assay Kit [128]. Do 96jamkové mikrotitrační destičky s plochým dnem bylo pipetováno 9 µl slepého vzorku (destilovaná voda) v triplikátu a poté proteinový standard (hovězí sérový albumin – BSA) v paralelním uspořádání. Koncentrace standardu pro sestavení kalibrační křivky byly následovné: 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 a 2,0 mg/ml. Vzorky lyzovaných buněk byly připraveny v minimálně dvou ředěních (2,5x; 5x a 10x) a nanášeny v triplikátním uspořádání. Do každé jamky byly následně pipetovány 4 µl „Compatibility reagent“ a 260 µl „Working reagent“. „Working reagent“ byl získán smícháním činidla A (2% (w/v) Na₂CO₃; 0,95% (w/v) NaHCO₃; 0,4% (w/v) NaOH; 0,16% (w/v) vlnan sodno-draselný; pH 11,25) s činidlem B (4% (w/v) CuSO₄·5H₂O) v poměru 50:1.

Mikrotitrační destička byla poté inkubována 30 minut při 37°C. Po skončení inkubace byla destička temperována na laboratorní teplotu a pak byla změřena absorbance při 562 nm na spektrofotometru Tecan Sunrise. Koncentrace proteinů byla vyhodnocena pomocí programu KIM 32.

3.6. SDS-PAGE elektroforéza

Použité roztoky

- 10% (w/v) APS
- 10% (w/v) SDS
- Pufř A:* 1,5 M Tris-HCl; pH 8,8
- Pufř B:* 1,0 M Tris-HCl, pH 6,8
- Polymerační roztok:* 29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) bisakrylamid
- Elektrodový pufř:* 0,192 M glycin; 0,025 M Tris-HCl; 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3
- Barvicí lázeň:* 9,2% (v/v) kyselina octová; 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB); 46% (v/v) ethanol
- Odbarvovací lázeň:* 10% (v/v) kyselina octová; 25% (v/v) ethanol
- Redukující vzorkový pufř 4x koncentrovaný:* 0,063 M Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 0,003% (w/v) bromfenolová modř, 5% (v/v) 2-merkapt ethanol, pH 6,8

Gely

- 4% zaostřovací gel:* 1,5 ml destilované vody; 267 μ l polymeračního roztoku; 250 μ l pufřu B; 20 μ l 10% SDS; 20 μ l 10% APS; 2 μ l TEMED
- 8% separační gel:* 2,3 ml destilované vody; 1,3 ml polymeračního roztoku; 1,3 ml pufřu A; 50 μ l 10% SDS; 50 μ l 10% APS; 3 μ l TEMED

Postup

Vzorky na SDS-PAGE elektroforézu byly připraveny následujícím způsobem: k buněčnému lyzátu byl přidán 4x koncentrovaný vzorkový pufř a destilovaná voda tak, aby do 10jamkového gelu bylo nanášeno stejné množství proteinů (25-50 μ g, maximálně 40 μ l). Připravené vzorky byly zahřáty v lázni mini Dry Bath MiniB-100 na 70°C po dobu 6 minut. Jako marker molekulových velikostí byl použit Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standards. Elektroforéza byla prováděna pomocí soupravy Bio-Rad při napětí 200 V po dobu 60-80 minut. Po skončení elektroforézy byl gel vyjmut z elektroforetických skel a použit buď pro Western blot elektropřenos, nebo byl ponechán na 1 hodinu v barvicí lázni a poté dán minimálně na tři hodiny do odbarvovací lázně.

3.7. Metoda Western blot

Použité roztoky

Přenosový pufr: 0,192 M glycin; 0,025 M Tris/HCl

Blokovací roztok: 5% (w/v) nízkotučné sušené mléko v PBS-Triton

Vyvolávací pufr: 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, pH 9

Vyvolávací roztok pro alkalickou fosfatasu: 10 ml vyvolávacího pufru; 66 µl NBT; 33µl BCIP

Ponceau červeně: 0,5% Ponceau; 1% kyselina octová

PBS-Triton: 1,38 mM Na₂PO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 0,134 M NaCl, 0,3% (w/v) Triton X-100

Primární protilátky:

CF3 – anti-CFTR myší Ab proti MBD1 doméně; 500x ředěná blokovacím roztokem

432 – anti-CFTR myší Ab proti R doméně; 500x ředěná blokovacím roztokem

450 – anti-CFTR myší Ab proti R doméně; 500x ředěná blokovacím roztokem

570 – anti-CFTR myší Ab proti R doméně; 500x ředěná blokovacím roztokem

596 – anti-CFTR myší Ab proti NBD2 doméně; 500x ředěná blokovacím roztokem

769 – anti-CFTR myší Ab proti NBD2 doméně; 500x ředěná blokovacím roztokem

anti-GAPDH králičí IgG; 5 000 x ředěná blokovacím roztokem

Sekundární protilátky:

anti-mouse IgG – Alkaline Phosphatase; 1 429x ředěná blokovacím roztokem

anti-rabbit IgG – Alkaline Phosphatase; 20 000x ředěná blokovacím roztokem

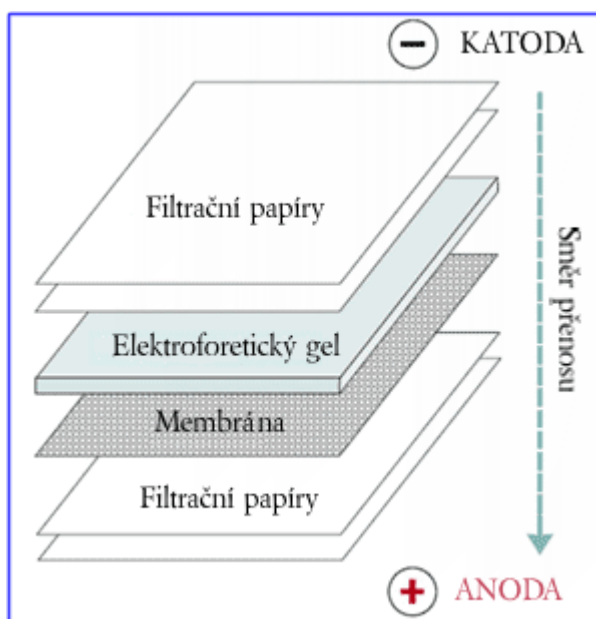
Princip

Western blot je přenosová metoda, při níž jsou proteiny z SDS-PAGE gelu přenášeny elektrickým proudem na čivou membránu [129]. Hledaný protein je na membráně identifikován pomocí primární protilátky, vůči níž je specifická sekundární protilátka, nesoucí enzymatickou sondu. Velikost maturovaného CFTR proteinu je 168 kDa, částečně maturovaného 131 kDa a nematurovaného 127 kDa. Pro kontrolu jednotného množství proteinů mezi vzorky byla mimo CFTR proteinu detekována glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH, 37 kDa), jejíž produkce je ve všech buněčných liniích konstantní (tzv. house-keeping protein).

Postup

Gel po SDS-PAGE elektroforéze byl ponechán 30 minut v přenosovém pufru za neustálého třepání na třepače. Polyvinylidenfluoridová (PVDF) membrána byla ponechána 30 sekund v methanolu, poté 1 minutu v destilované vodě a nakonec 5 minut v přenosovém pufru.

Na blotovací zařízení Biometra byly umístěny tři Whatman filtrační papíry namočené v přenosovém pufru, PVDF membrána, SDS-PAGE gel a další tři vlhké Whatman filtrační papíry. Schéma uspořádání je znázorněno na obrázku č. 5.



Obrázek č. 5: Schéma uspořádání pro Western blot elektropřenos. Převzato a upraveno z [130].

Elektropřenos probíhal 20 minut při nastavení elektrického proudu $0,8 \text{ mA/cm}^2$ membrány, poté 60 minut při $3,5 \text{ mA/cm}^2$ membrány.

Po skončení elektropřenosu byl SDS-PAGE gel umístěn na 1 hodinu do barvicí lázně a následně do odbarvovací lázně. Membrána byla obarvena roztokem Ponceau červeně. Po omytí destilovanou vodou byla membrána inkubována 1 hodinu v blokovacím roztoku. Poté byla vyndána a byl k ní přidán roztok primární protilátky. S protilátkou byla přes noc inkubována v chladovém boxu při 4°C na orbitální třepače Mini Rocker MR-1.

Následující den byla membrána čtyřikrát po 5 minutách promyta blokovacím roztokem. Po promytí byl k membráně přidán roztok sekundární protilátky, s níž byla membrána inkubována 1 hodinu. Následně byla membrána dvakrát po 5 minutách promyta

blokovacím roztokem, dvakrát po 5 minutách PBS-Triton pufrem a jedenkrát 5 minut destilovanou vodou. Byl připraven vyvolávací roztok, v němž byla membrána smáčena, dokud se nevizualizoval protein. Suchá membrána byla vyfocena/oskenována.

3.8. Izolace RNA buněčných linií

Pro izolaci RNA z buněčných linií byl použit komerční kit Direct-zol RNA MiniPrep od Zymo research [131]. Veškerá práce při izolaci RNA byla prováděna v laminárním boxu BIO 126 za použití sterilního materiálu bez nukleas.

Buněčné linie byly v tripletním uspořádání nasazeny na 6jamkovou destičku v množství $7 \cdot 10^5$ buněk v 5 ml kultivačního media na jamku. Po vytvoření souvislé monovrstvy bylo odsáto kultivační medium a buňky byly třikrát opláchnuty PBS pufrem. Poté bylo přidáno 950 μ l TRI-zol lyzačního činidla (100 μ l/cm² růstové plochy). Buňky byly lyzačním činidlem důkladně opláchnuty a 5 minut inkubovány při laboratorní teplotě.

Buněčný lyzát byl poté převeden do mikrozkušavek a 1 minutu centrifugován (centrifuga Eppendorf 5415 R, 12 000x g). Supernatant byl převeden do nových mikrozkušavek spolu s ekvivalentním množstvím čistého ethanolu a následně nanesen na Zymo-spin kolonku (maximální kapacita 700 μ l), která, umístěna ve sběrné zkumavce, byla 1 minutu centrifugována (centrifuga Eppendorf 5415 R, 16 000x g). Po přefiltrování celého objemu vzorků byla kolonka za stejných centrifugačních podmínek dvakrát promyta 400 μ l „RNA prewash“ pufru. Dále pak byla kolonka promyta 700 μ l „Wash“ pufru a ponechána k vyschnutí v termobloku LS-1 od VLM na 55°C. RNA, zachycená na kolonce, byla eluována 50 μ l destilované vody bez nukleas. Ze získaného roztoku eluované RNA byl odebrán alikvot na stanovení čistoty, koncentrace RNA a pro RNA agarosovou elektroforézu. Zásobní roztok RNA byl uchováván při -80°C.

3.9. RNA agarosová elektroforéza

Pro ověření správné izolace RNA byla použita agarosová elektroforéza s následnou vizualizací nukleových kyselin pomocí interkalačního barviva SYBRTM Green II. Separace izolované RNA (viz kapitola 3.8.) byla prováděna v 1% (w/v) agarosovém gelu, připraveném z 250 mg agarosy a 25 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru (5x koncentrovaný TBE – 445 mM Tris, 445 mM kyseliny borité, 10 mM EDTA, pH 8).

Vzorky pro agarosovou elektroforézu byly připraveny smícháním 2 μ l roztoku izolované buněčné RNA s 3 μ l ultračisté vody a 1 μ l 6x koncentrovaného vzorkového pufru „Loading dye“. Jako marker byl použit ssRNA ladder, jehož 2 μ l byly smíchány s 8 μ l 2x koncentrovaného pufru „Loading dye“. Roztok markeru byl následně zahříván 2 minuty při 90°C (inkubátor mini Dry Bath MiniB-100).

Agarosový gel, umístěný do horizontální elektroforetické soupravy, byl zalit 280 ml 0,5x koncentrovaného TBE pufru. Do jamek gelu byl následně pipetován celý objem připravených vzorků.

Elektroforéza probíhala 45 minut při napětí 110 V. Po jejím skončení byl agarosový gel třepán 30 minut v roztoku barvy SYBRTM Green II, připraveném smícháním 5 μ l SYBRTM Green II s 50 ml 1x koncentrovaného TBE pufru. Vizualizace gelu probíhala v temné komoře za použití transluminátoru Dark reader.

3.10. Stanovení koncentrace a čistoty RNA

Pro stanovení koncentrace a čistoty RNA byla využita UV spektroskopie. Čistota byla vypočítána podle následujícího vzorce [132].

$$\text{čistota} = \frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$$

A₂₆₀ – absorbance při 260 nm, A₂₈₀ – absorbance při 280 nm, A₃₂₀ – absorbance při 320 nm

Nukleové kyseliny absorbují při 260 nm tak, že koncentrace 40 μ g/ml vykazuje jednotkovou absorbanci. Hodnota absorbance při 260 nm je dále porovnávána s absorbancí při 280 nm (absorpční pás bílkovin) a s hodnotou pozadí při 320 nm. Vzorky byly měřeny na spektrofotometru DeNovix proti ultračisté vodě.

3.11. Reverzní transkripce

Pro reverzní transkripci bylo použito komerčně dostupného kitu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit od firmy Applied Biosystems [133].

Veškerá manipulace s RNA probíhala v laminárním boxu BIO 126 za použití sterilního materiálu bez nukleas. Vzorky získané izolací buněčné RNA (viz kapitola 3.8.)

byly po rozmrazení drženy na ledu. Byla připravena reakční směs pro reverzní transkripci o celkovém objemu 20 μ l a následujícím složení:

1 μ g RNA
2 μ l 10x koncentrovaného RT pufru
2 μ l 10x koncentrovaného roztoku náhodných primerů
0,8 μ l 25x koncentrované směsi deoxyribonukleotidů
1 μ l inhibitoru RNas
destilovaná voda bez nukleas pro doplnění objemu

Z každého vzorku byly odebrány 2 μ l jako negativní kontrola bez reverzní transkriptasy. Ke zbylým 18 μ l reakční směsi byl následně přidán 1 μ l roztoku reverzní transkriptasy. Všechny vzorky byly poté umístěny do thermocycleru Techgene. Reakce probíhala následovně:

25°C	10 min
37°C	120 min
85°C	5 min
4°C	---

Po skončení reakce byly vzorky skladovány při -80 °C.

3.12. Kvantitativní PCR

Pro qPCR byl použit kit Fast Start Essential DNA Probes Master od firmy Roche [134]. Pro stanovení CFTR-cDNA byly využity dvě různé sady primerů, jedna od firmy TaqMan a druhá od firmy IDT. Jako referenční gen byl zvolen *GAPDH* a primery k němu specifické byly zakoupeny od firmy TaqMan.

Celkový objem reakční směsi pro qPCR byl 20 μ l a jeho složení bylo:

10 μ l 2x koncentrovaného roztoku Master Mix
1 μ l roztoku primeru s fluorescenční sondou

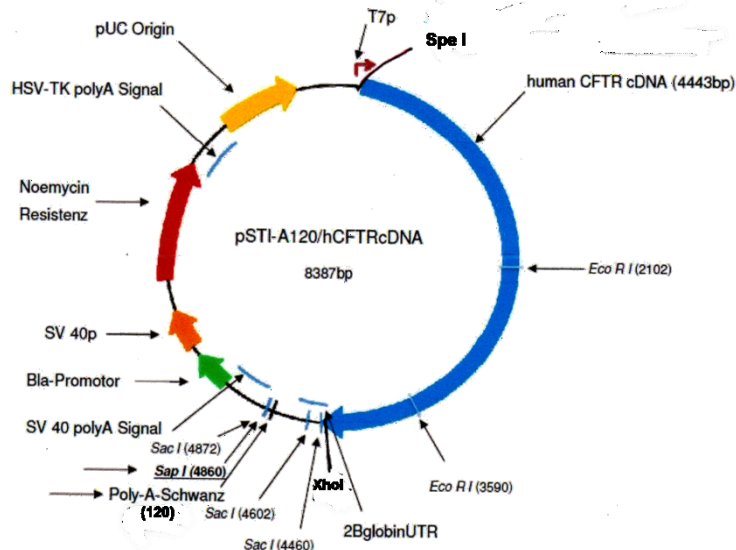
4 μ l vody určené k PCR
5 μ l 10x ředěného roztoku cDNA

qPCR byla prováděna v cycleru RotorGene 2 000 s rotorem na 36 vzorků. Reakce probíhala podle uvedeného nastavení:

95°C 10 min
95°C 15 min
60°C 60 s } 50 cyklů

3.13. Izolace CFTR-cDNA

Jedním z cílů této práce bylo studium vlivu transfekce buněčných linií pomocí *in vitro* syntetizované CFTR-mRNA. Za tímto účelem byl izolován plasmid s CFTR-cDNA, jímž byly transformovány bakterie *E. Coli*. Strukturu tohoto plasmidu ukazuje obrázek č. 6. K izolaci plasmidové DNA byl použit komerční kit QIAfilter Plasmid Midi Kit od firmy QIAGEN [135]. Všechny roztoky použité pro izolaci byly součástí tohoto kitu. Izolace byla prováděna na Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) na pracovišti RNDr. Tomáše Koblase, Ph.D..



Obrázek č. 6: Struktura plasmidu s CFTR-cDNA

Zamrazená peleta transformovaných bakterií *E. Coli* byla rozmrazena a resuspendována ve 4 ml lyzačního pufru P1, do něhož byl přidán roztok RNasy. Po kompletní bakteriální lyzi byly k lyzátu přidány 4 ml pufru P2. Zkumavka s lyzátem byla důkladně promíchána a inkubována při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Následně byly k lyzátu přidány 4 ml vychlazeného pufru PS. Lyzát byl převeden na QIAfilter kolonku, kde byl inkubován 10 minut, aby k němu mohly být přidány 4 ml pufru QBT. Lyzát byl následně pod tlakem přefiltrován přes kolonku, která byla dvakrát promyta 10 ml pufru QC. Po promytí byla zachycená DNA eluována 5 ml pufru QF. DNA byla ze získaného roztoku precipitována 3,5 ml isopropanolu, celý roztok byl promíchán a centrifugován po dobu 30 minut (centrifuga Hettich Micro 220 R, 15 000x g, 4°C). DNA peleta byla promyta 2 ml 70% ethanolu a 10 minut centrifugována za stejných podmínek. Peleta byla poté ponechána k vyschnutí v přístroji Thermomixer comfort (Eppendorf) a následně byla resuspendována v 10mM Tris-HCl pufru o pH 8,5. Koncentrace DNA byla změřena na spektrofotometru Qubit fluorometr (Invitrogen).

Z izolované DNA byl odebrán alikvot, k němuž byla přidána restriční endonukleasa pro naštěpení plasmidového kruhu a s nímž byla následně provedena agarosová elektroforéza (1% agarosový gel, 150 minut, 60 V). Tímto byl identifikován plasmid nesoucí CFTR-cDNA, který byl z gelu vyříznut a použit pro *in vitro* syntézu CFTR-mRNA.

3.14. *In vitro* syntéza CFTR-mRNA

In vitro syntéza CFTR-mRNA podle izolovaného plasmidu (viz kapitola 3.13) byla také prováděna v ústavu IKEM. Pro přepis plasmidové CFTR-cDNA do RNA byl použit komerčně dostupný kit T7 mScriptTM Standard mRNA Production System od firmy CELLSRIPTTM [136]. Veškerá práce probíhala se sterilním materiálem bez nukleas.

Byly syntetizovány dva typy CFTR-mRNA. První typ byl tvořen standardními, nemodifikovanými nukleotidy, druhý obsahoval 25 % pseudouridinu a 25 % 5-methylcytidinu.

Vytvářená CFTR-mRNA byla opatřena syntetickým analogem 7-methylguanosylové čepičky ARCA (z angl. anti-reverse cap analog) na 5'-konci a polyadenylovým řetězcem na 3'-konci.

Reakční směs pro syntézu CFTR-mRNA měla celkový objem 10 μ l a následovné složení:

1 μ g linearizovaného DNA plasmidu
1 μ l 100mM roztoku ATP
0,75 μ l 100mM roztoku ARCA
0,5 μ l 30mM roztoku GTP
0,6 μ l 100mM roztoku CTP / 100mM roztoku 25% 5mC/CTP
0,8 μ l 100mM roztoku UTP / 100mM roztoku 25% PU/UTP
1,1 μ l 100mM roztoku dithiotritolu (DTT)
0,5 μ l inhibitoru RNas
1,1 μ l 10x koncentrovaného reakčního pufru
0,5 μ l „mScript™ T7 Enzyme“ roztoku
0,125 μ l anorganické pyrofosfatasy (0,1U/ μ l)
destilovaná voda bez nukleas pro doplnění objemu

Směs byla zahřáta na 37°C (Biometra T-personal cycler), zatímco k ní bylo každých 30 minut doplňováno 1,5 μ l 30mM roztoku GTP. Plný objem roztoku GTP nebyl do směsi dán ihned proto, aby se zvýšila šance inkorporace ARCA na 5'-konec syntetizovaného řetězce.

K izolaci vzniklé RNA bylo použito 30K Nanosep kolonky. Na kolonku byl nanesen celý objem reakční směsi a 1 μ l 500mM EDTA s 400 μ l destilované vody bez nukleas. Kolonka se sběrnou mikrozkuřavkou byla centrifugována 25 minut (centrifuga Hettich 220 R, 5 000x g) a následně byla promyta 400 μ l destilované vody bez EDTA. RNA byla poté eluována do objemu 36 μ l a inkubována 5 minut při 65°C (Eppendorf Thermomixer comfort). Poté byla prudce ochlazená, aby se zamezilo vytvoření sekundární struktury.

Pro případ, že během transkripce vznikla RNA bez čepičky na 5'-konci, byla v tomto okamžiku provedena následující enzymatická reakce. Složení reakční směsi bylo:

36 μ l roztoku mRNA
2,5 μ l 20mM roztoku GTP
1,25 μ l 20mM SAM roztoku
5,0 μ l 10x koncentrovaného „ScriptCap™ Capping“ pufru

0,5 µl inhibitoru RNAs
2,0 µl „ScriptCap 2'-O-methyltransferasy“
2,0 µl „ScriptCap Capping“ enzymu

Reakce probíhala 30 minut při 37°C (Biometra T-personal cycler). Směs byla poté opět nanášena na 30K Nanosep kolonku spolu s 1 µl 500mM EDTA a 450 µl destilované vody. Kolonka byla následně 25 minut centrifugována (centrifuga Hettich 220 R, 5 000x g, 10°C) a pak dvakrát promyta 450 µl destilované vody. RNA byla eluována do objemu 38 µl. Roztok RNA byl zahřát na 65°C (Eppendorf Thermomixer comfort) a poté opět prudce zchlazen.

Jako další krok byl mRNA enzymaticky syntetizován polyadenylový řetězec na 3'-konci. K tomu byl použit kit Poly(A) Polymerase, Yeast od affymetrix USB. Reakční směs měla složení:

38 µl roztoku mRNA
2 µl destilované vody bez RNAs
0,75 µl 100mM roztoku ATP
10,0 µl 5x koncentrovaného reakčního pufru
0,5 µl inhibitoru RNAs
0,75 µl roztoku Poly(A) polymerasy

Reakce probíhala 2 hodiny při 37°C (Biometra T-personal cycler). Poté bylo do reakční směsi přidáno 5 µl roztoku antarktické fosfatasy s 5 µl AP reakčního pufru (součástí kitu od New England Biolabs). Antarktická fosfatasa se používá pro defosforylaci případných trifosfátů na 5'-konci.

Reakce s antarktickou fosfatasou probíhala 4 hodiny při 37°C a poté přes noc při 10°C (Biometra T-personal cycler). Směs byla znovu filtrována přes 30K Nanosep kolonku.

Pro konečnou izolaci *in vitro* syntetizované CFTR-mRNA a její přečistění byl použit kit MEGAClear od Life Technologies, jehož součástí byly všechny použité roztoky a kolonky.

Izolovaná CFTR-mRNA byla doplněna na 100 µl pomocí „Elution solution“ a následně bylo k roztoku pipetováno 350 µl „Binding solution“ a 250 µl čistého ethanolu. Roztok byl nanášen na kolonku a centrifugován 15 s – 1 min (centrifuga Hettich 220 R,

5 000x g). Kolonka byla dvakrát promyta 500 μ l „Washing solution“. Centrifugace probíhala za stejných podmínek. Na kolonku bylo nanášeno 75 μ l „Elution solution“ předehřátého na 95 °C. Kolonka byla následně dána na 10 minut na thermostrepačku (Eppendorf Thermomixer comfort, 600 RPM, 70°C). CFTR-mRNA byla poté eluována centrifugací (centrifuga Hettich 220 R, 10 000x g, 2 min). Koncentrace CFTR-mRNA byla změřena na spektrofotometru Qubit fluorometr (Invitrogen).

3.15. Transfekce buněčných linií pomocí CFTR-mRNA

Buněčné linie byly transfekovány dvěma různými typy CFTR-mRNA (viz kapitola 3.14.): a) CFTR-mRNA bez modifikovaných nukleotidů a b) CFTR-mRNA, která obsahovala 25 % pseudouridinu a 25 % 5-methylcytidinu. Transfekce buněčných linií probíhala ve sterilním prostředí za použití materiálu bez nukleas.

Pro vizualizaci CFTR proteinu pomocí metody nepřímé imunofluorescence byly buňky transfekovány na 96jamkové destičce. Pro vizualizaci tohoto proteinu prostřednictvím Western blot imunodetekce byly buňky transfekovány na Petriho miskách o průměru 4 cm. Na 96jamkovou mikrotitrační destičku byly buňky nanášeny v množství $4 \cdot 10^4$ buněk v 200 μ l kultivačního media na jamku. Na Petriho misky o průměru 4 cm bylo pipetováno $3 \cdot 10^5$ buněk ve 2 ml kultivačního media.

Po vytvoření monovrstvy bylo odsáto kultivační medium a k buňkám bylo pipetováno čerstvé kultivační medium v následujícím množství: 100 μ l na jamku 96jamkové destičky, 1 ml na Petriho misku.

Poté byla připravena transfekční směs. Na 100 μ l kultivačního media bylo použito 0,3 μ l transfekčního činidla (liposom Lipofectamine MessengerMAX, 300 ng/ μ l) s 5 μ l Opti-MEM media, temperovaném na 37°C. Tento roztok byl inkubován 10 minut při laboratorní teplotě. Během inkubace byl připraven roztok *in vitro* syntetizované CFTR-mRNA s Opti-MEM mediem tak, aby výsledná koncentrace CFTR-mRNA v jamce byla následující: 0,5 μ g/ml; 1,0 μ g/ml nebo 2,0 μ g/ml. K takto naředěným roztokům CFTR-mRNA bylo přidáno ekvivalentní množství roztoku transfekčního činidla v Opti-MEM mediu. Výsledný roztok byl inkubován 10 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl konečný roztok CFTR-mRNA s transfekčním činidlem přidán k buňkám do kultivačního media. Kontrolní vzorky obsahovaly pouze roztok transfekčního činidla. Transfekce probíhala 24 hodin. CFTR protein byl vizualizován pomocí metody nepřímé

imunofluorescence (viz kapitola 3.3.), nebo Western blot imunodetekce (viz kapitola 3.7.).
Byly použity primární protilátky 570 a CF3.

4. Výsledky

Pro experimentální část této práce byly využity tři komerčně dostupné buněčné linie: NuLi-1, CuFi-1 a HEK293S. NuLi-1 je imortalizovanou linií plicního epitelu, získanou od zdravého jedince. CuFi-1 je imortalizovanou linií plicního epitelu, která byla získána od pacientky nesoucí homozygotní mutaci F508del. Kvůli této mutaci nedochází ke správnému sbalení CFTR proteinu a ten je pak předčasně degradován. Buňky CuFi-1 linie tedy sice CFTR protein exprimují, ale jeho zastoupení v plasmatické membráně by mělo být minimální [4]. HEK293S je embryonální ledvinnou epiteliální linií postrádající schopnost vytvářet komplexní N-glykanové struktury. Podle již publikovaných studií by tato buněčná linie neměla produkovat CFTR protein, proto byla v této práci testována jako kontrolní skupina [137].

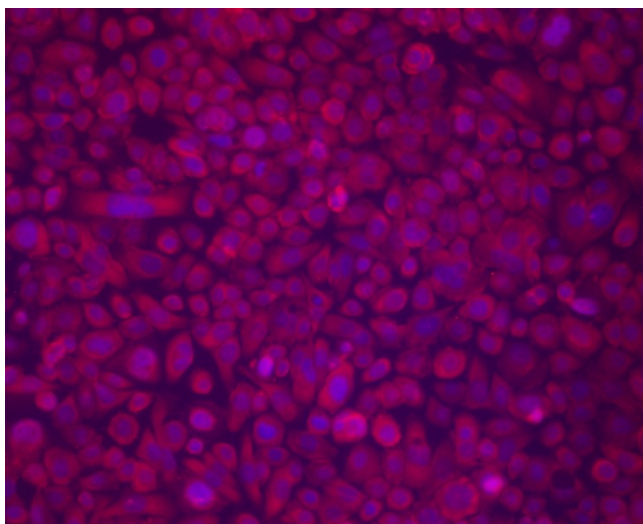
Nejprve byla optimalizována metodika detekce CFTR proteinu pomocí technik nepřímé imunofluorescence a Wester blot elektropřenosu, přičemž byly testovány různé monoklonální protilátky proti uvedenému proteinu. Zároveň byla provedena charakterizace buněčných linií z hlediska míry relativní genové exprese *CFTR* genu s využitím metody qPCR.

Optimalizovaná detekce CFTR proteinu byla následně využita ke studiu transfekce buněčných linií dvěma typy *in vitro* syntetizované CFTR-mRNA. Jako transfekční činidlo byl použit kationtový liposom Lipofectamine MessengerMAX.

4.1. Optimalizace detekce CFTR proteinu pomocí metody nepřímé imunofluorescence

Vizualizace CFTR proteinu pomocí metody nepřímé imunofluorescence probíhala na černých 96jamkových mikrotitračních destičkách (viz kapitola 3.3.). K detekci CFTR proteinu bylo testováno šest různých primárních myších monoklonálních protilátek: 432, 450 a 570, specifických proti R doméně; 596 a 769, specifických proti NBD2 doméně; a CF3, která je specifická proti extracelulárnímu epitopu MSD1 domény. S výjimkou CF3 protilátky bylo k buňkám přidáváno činidlo Triton X-100, aby mohly protilátky proniknout skrze plasmatickou membránu. Pomocí CF3 protilátky byl tedy stanovován CFTR protein integrovaný do plasmatické membrány, pomocí ostatních protilátek celkový obsah CFTR proteinu v buňce. Pro označení primární protilátky byla použita protilátka Alexa Fluor 555 nesoucí fluorescenční sondu. Buněčná jádra byla barvena fluorescenční sloučeninou Hoechst 33258. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U v programu NIS-Elements AR 2.30 kamerou MuTech s rozlišením LWD 10x/0,4. Pro detekci CFTR proteinu byl použit filtr 31002 Rdíl C87702 a pro detekci jaderné DNA byl použit filtr 31000 DAPI C80600.

Na obrázku č. 7 je ukázán modelový snímek buněčné linie NuLi-1. CFTR protein byl označen protilátkou 570, ředěnou v poměru 1:250 (červený signál).

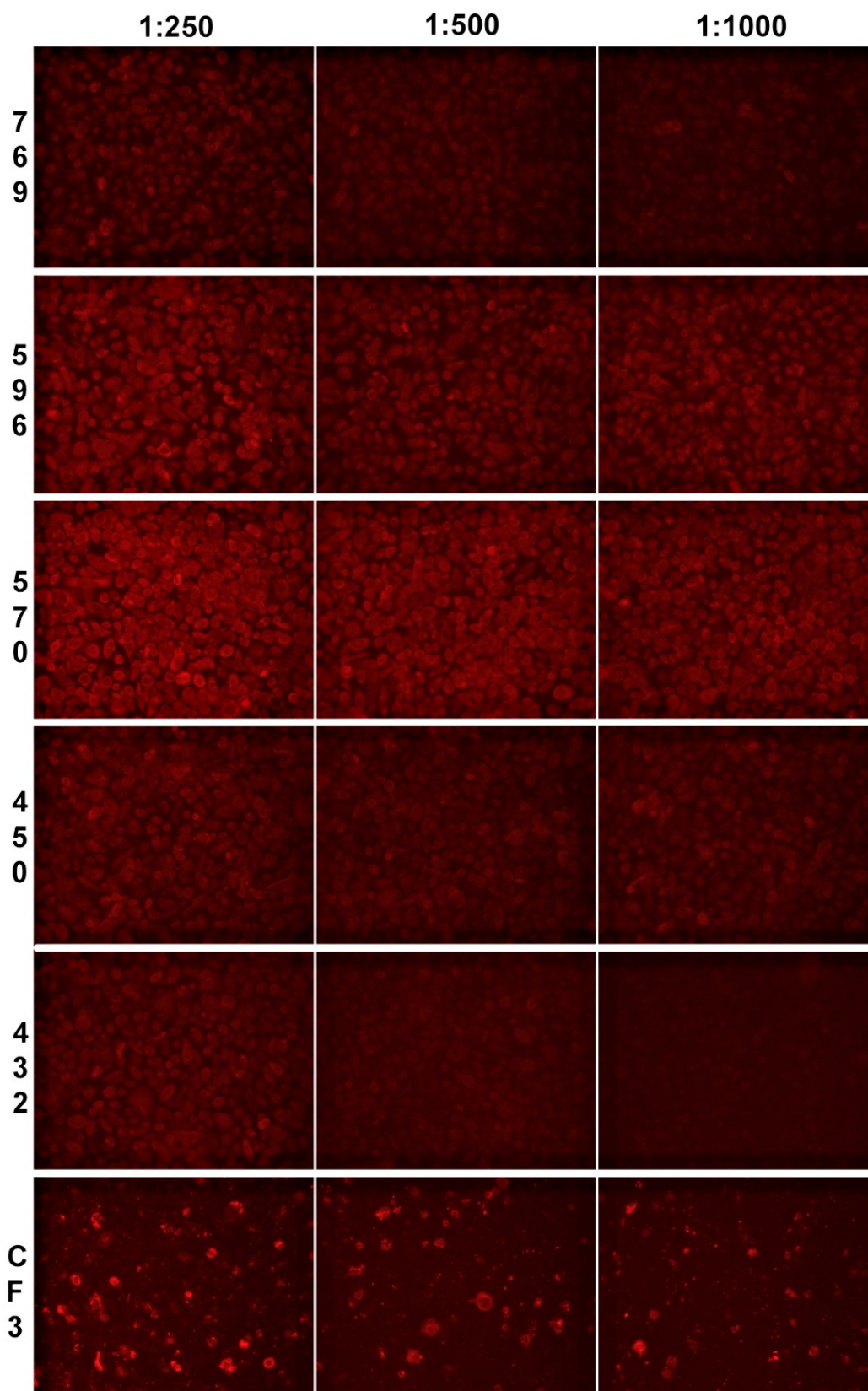


Obrázek č. 7: *Fluorescenčně značená linie NuLi-1.* Pro detekci CFTR proteinu byla použita primární protilátka 570 v ředění 1:250 a následně sekundární protilátkou Alexa Fluor 555 (červený signál). Modrý signál odpovídá jaderné DNA obarvené sloučeninou Hoechst 33258. Mikroskop Nikon Eclipse TE2002-U, program NIS-Elements AR 2.30, filtry 31002 Rdíl C87702 a 31000 DAPI C80600, rozlišení LWD 10x/0,4.

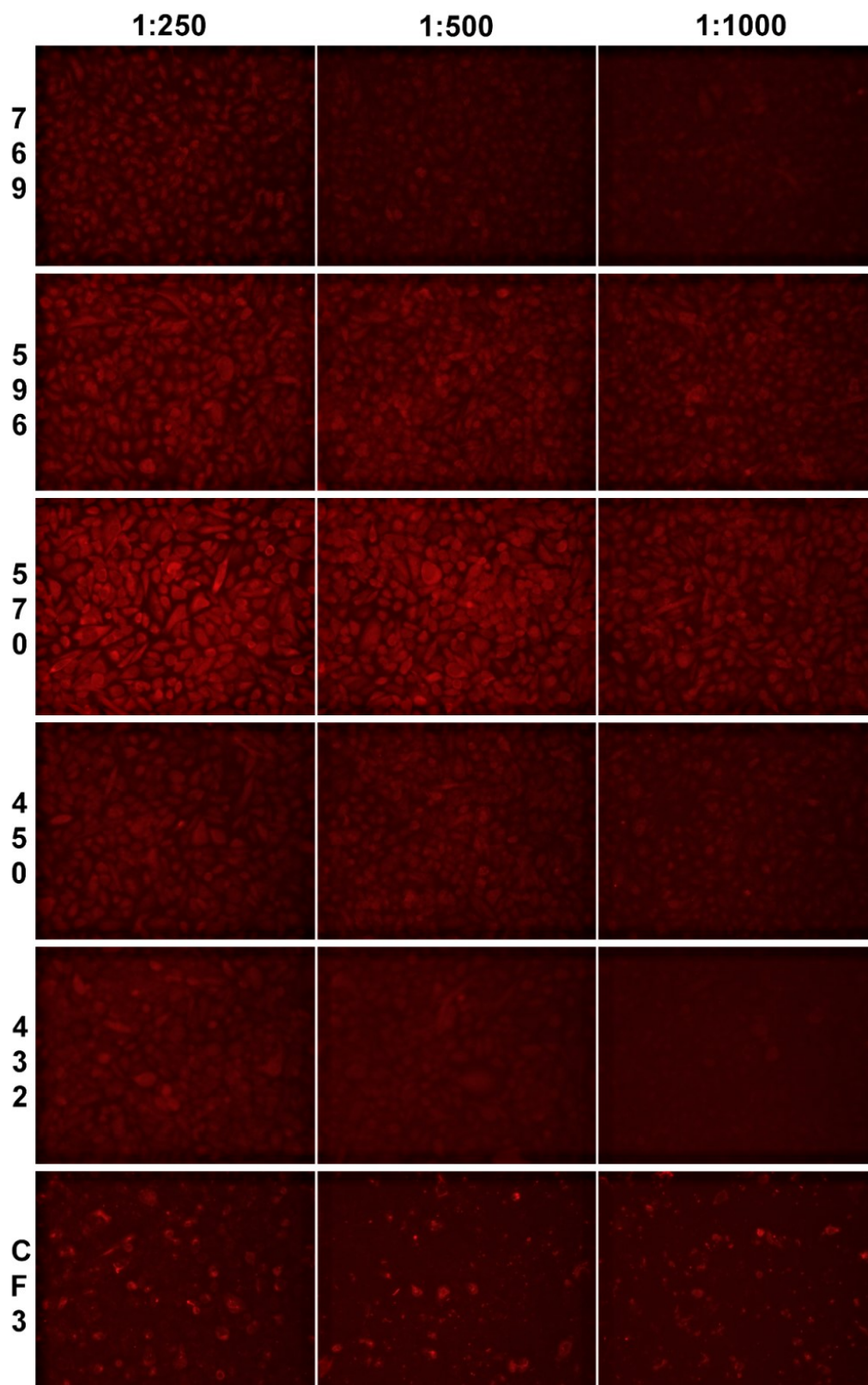
Účelem optimalizace detekce CFTR proteinu bylo nalézt vhodnou primární protilátku schopnou selektivně rozpoznávat tento protein. Nejprve byla studována metodou nepřímé imunofluorescence tři různá ředění výše uvedených protilátek proti CFTR proteinu (1:250, 1:500 a 1:1000).

Na obrázku č. 8 (strana 62) je shrnuta detekce CFTR proteinu v buněčné linii NuLi-1. Z obrázku je patrné, že nejintenzivnější signál odpovídající CFTR proteinu byl získán pomocí protilátek 570 a CF3. Odezva signálu byla úměrná ředění protilátky. Jako třetí nejzřetelnější byla detekce pomocí primární protilátky 596.

Obdobné výsledky byly získány při detekci CFTR proteinu v buněčné linii CuFi-1 (obrázek č. 9, strana 63).



Obrázek č. 8: *Detekce CFTR proteinu v buněčné linii NuLi-1.* Šest primárních protilátek (769, 596, 570, 450, 432, CF3) bylo ředěných v poměrech 1:250, 1:500 a 1:1000. Mikroskop Nikon Eclipse TE2002-U, program NIS-Elements AR 2.30, filtr 31002 Rdil C87702, rozlišení LWD 10×/0,4.

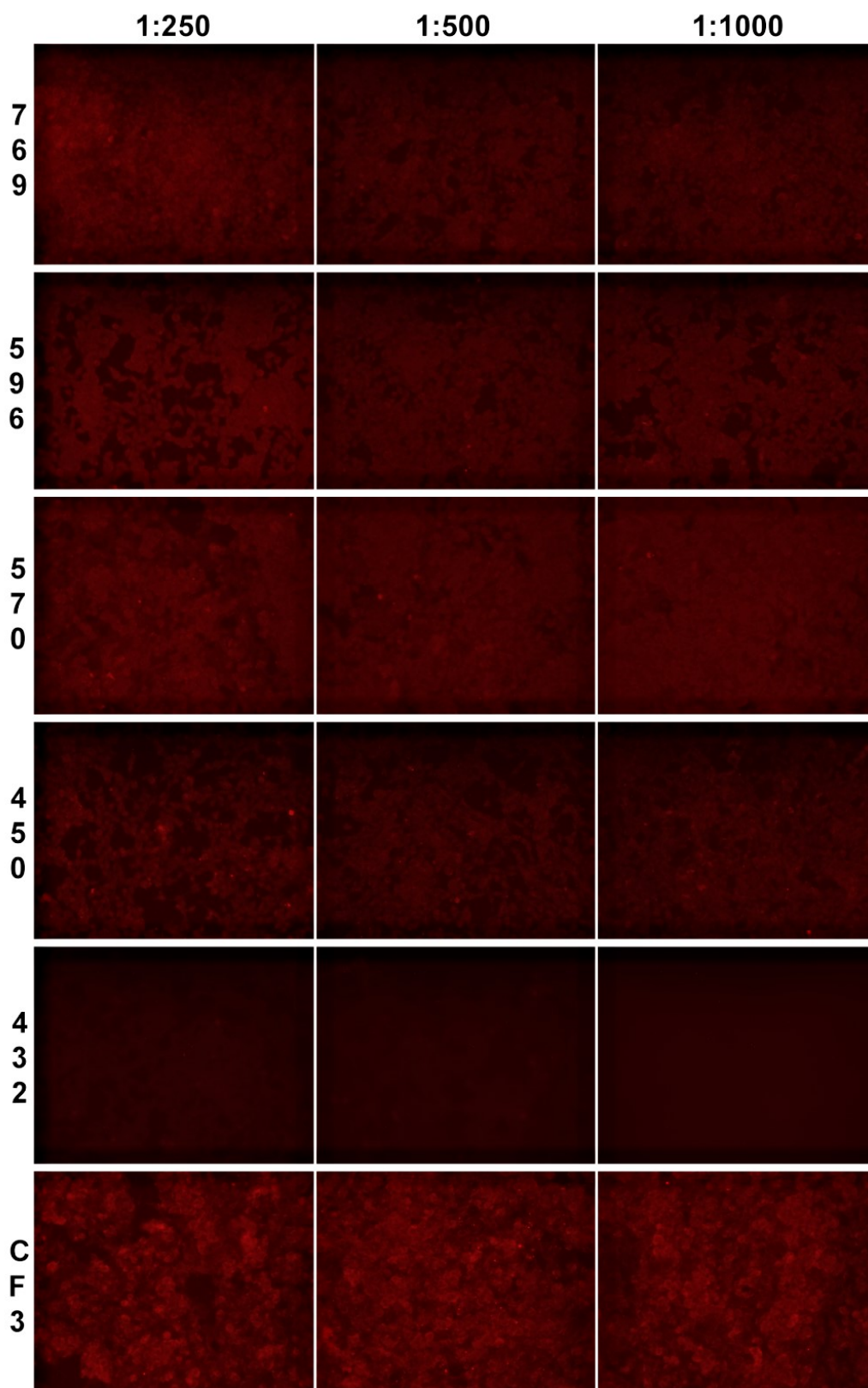


Obrázek č. 9: Detekce CFTR proteinu v buněčné linii CuFi-1. Šest primárních protilátek (769, 596, 570, 450, 432, CF3) bylo ředěných v poměrech 1:250, 1:500 a 1:1000. Mikroskop Nikon Eclipse TE2002-U, program NIS-Elements AR 2.30, filtr 31002 Rdil C87702, rozlišení LWD 10×/0,4.

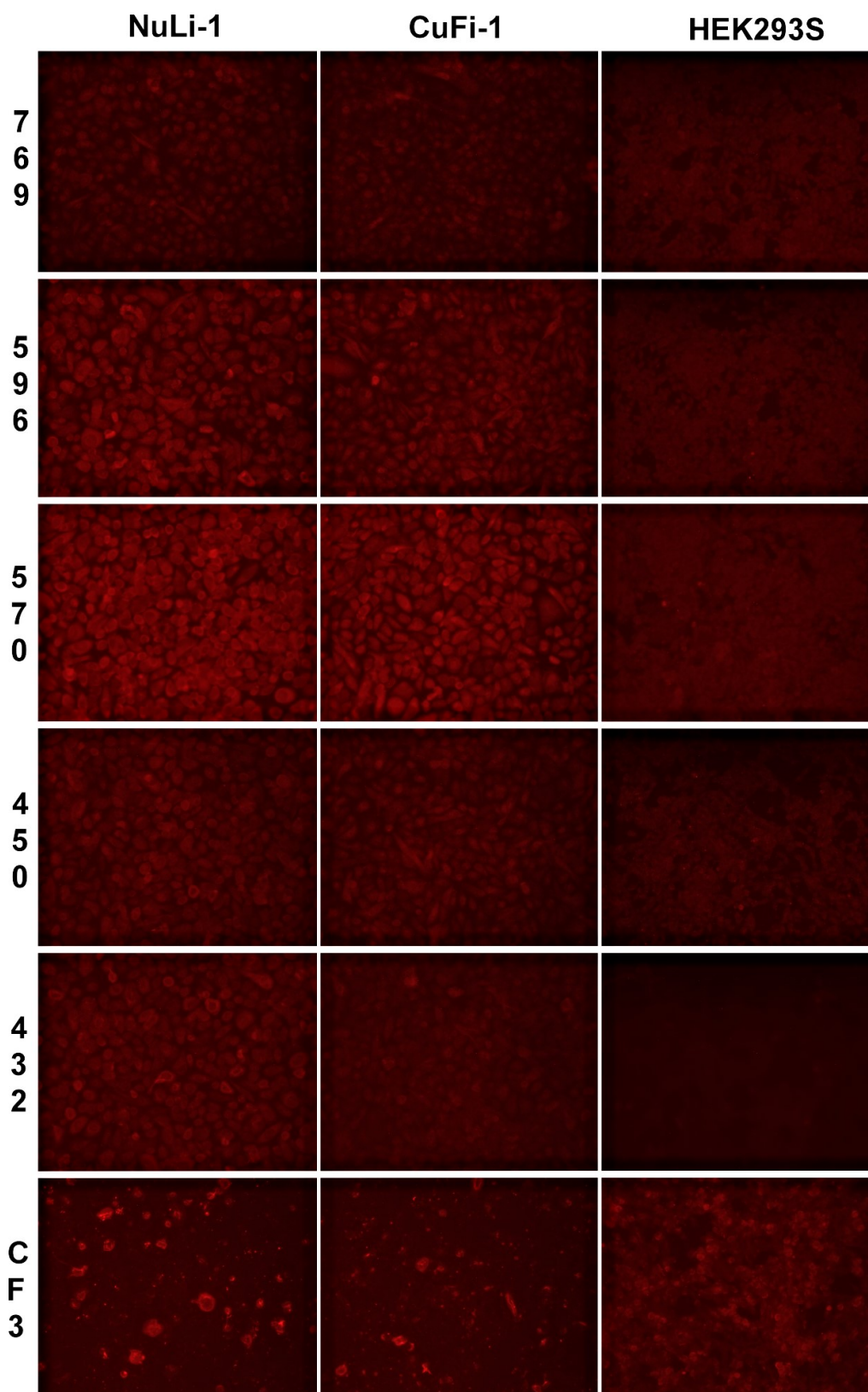
Na obrázku č. 10 (strana 65) je zobrazena detekce CFTR proteinu v buněčné linii HEK293S. Jak již bylo uvedeno, HEK293S je buněčnou linií, která by podle studií neměla produkovat CFTR protein [137]. Metodou nepřímé imunofluorescence by tedy neměl být získán žádný signál. Jak se však ukázalo, při detekci CFTR proteinu všemi primárními protilátkami lze pozorovat fluorescenci. U protilátky 432 se jedná o fluorescenci nepatrnou a zanedbatelnou. Naopak detekce protilátkou CF3 je oproti ostatním velice výrazná. Fluorescence u detekce ostatními protilátkami je patrná, a přestože nedosahuje intenzit jako u detekce CFTR proteinu v liniích NuLi-1 nebo CuFi-1 (obrázky 8 a 9, strany 62 a 63), nelze ji považovat za zanedbatelnou.

Podle výše uvedených výsledků bylo jako nejvhodnější ředění protilátek vybráno 1:500. Na obrázku č. 11 (strana 66) jsou srovnány jednotlivé buněčné linie v daném ředění. Při porovnání buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 je zřetelný rozdíl. Nejvíce je patrný u protilátky 570, ale lze ho pozorovat i u protilátek 432 a 596. Zatímco v případě buněčné linie NuLi-1 je fluorescenční signál nejvíce soustředěn po buněčném obvodu, v případě buněk linie CuFi-1 je signál rovnoměrně rozložen v rámci celé buňky. V případě protilátky CF3 je znatelný rozdíl v síle signálu v buněčných liniích NuLi-1 a CuFi-1. U buněčné linie HEK293S je fluorescenční signál slabší než u buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1, výjimkou je detekce pomocí CF3 protilátky, kdy je signál silnější.

Pro další experimenty byly vybrány dvě primární monoklonální protilátky – 570 a CF3.

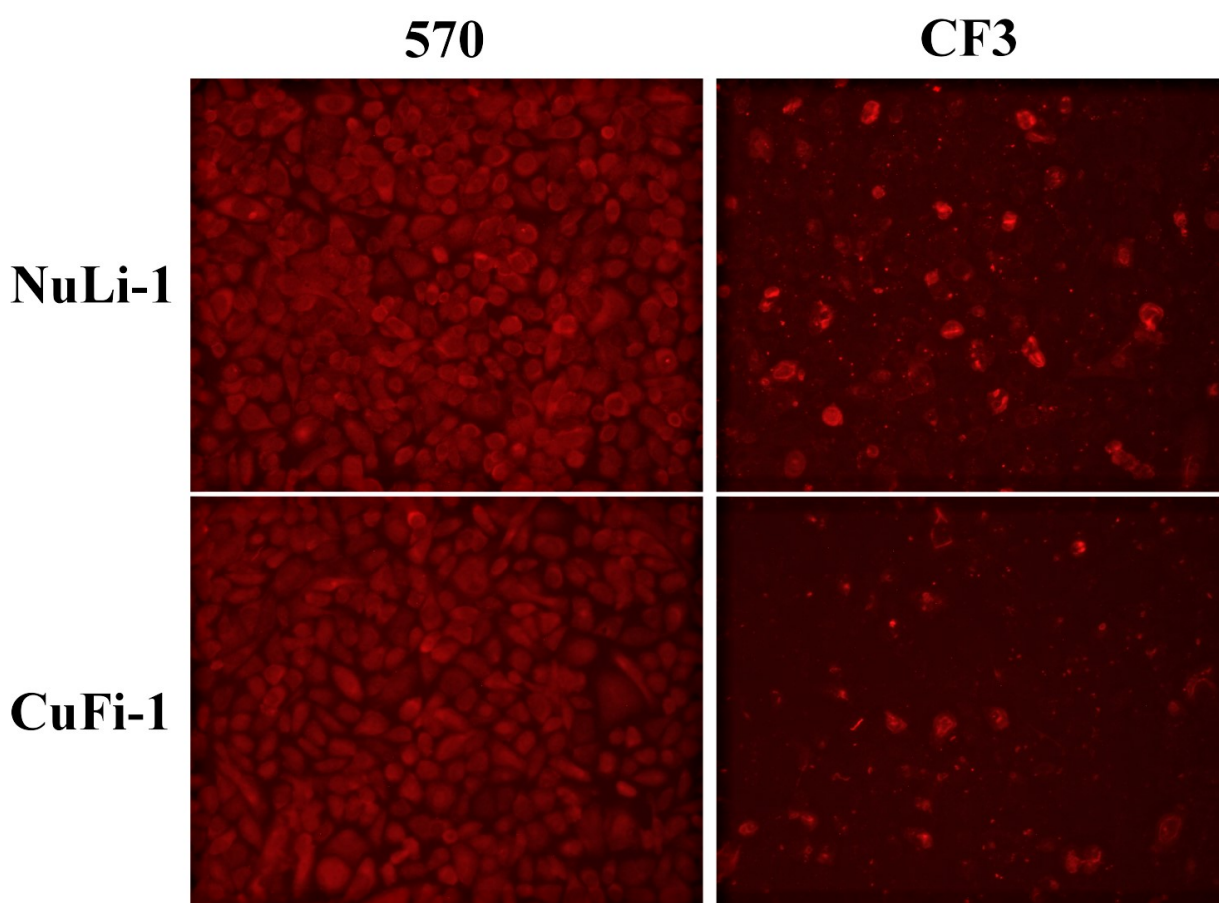


Obrázek č. 10: Detekce CFTR proteinu v buněčné linii HEK293S. Šest primárních protilátek (769, 596, 570, 450, 432, CF3) bylo řaděných v poměrech 1:250, 1:500 a 1:1000.. Mikroskop Nikon Eclipse TE2002-U, program NIS-Elements AR 2.30, filtr 31002 Rdl C87702, rozlišení LWD 10×/0,4.



Obrázek č. 11: Srovnání detekce CFTR proteinu buněčných linií NuLi-1, CuFi-1 a HEK293S. Protilátky 769, 596, 570, 450, 432 a CF3 byly ředěny v poměru 1:500. Mikroskop Nikon Eclipse TE2002-U, program NIS-Elements AR 2.30, filtr 31002 Rdil C87702, rozlišení LWD 10×/0,4.

Pro podrobnější porovnání studovaných buněčných linií je zde uveden obrázek č. 12 s detekcí CFTR proteinu pomocí protilátek 570 a CF3. Z obrázku je patrné, že je-li detekováno celkové množství CFTR proteinu pomocí protilátky 570, je ho v buněčných liniích NuLi-1 a CuFi-1 podobné množství. Rozdíl je však v rozložení CFTR proteinu, neboť v linii NuLi-1 se nachází zejména v membráně, zatímco v linii CuFi-1 je rovnoměrně rozprostřen po celém objemu buňky. U detekce protilátkou CF3, která vizualizuje pouze membránový CFTR protein, je fluorescenční signál buněčné linie NuLi-1 zřetelně vyšší než u linie CuFi-1.

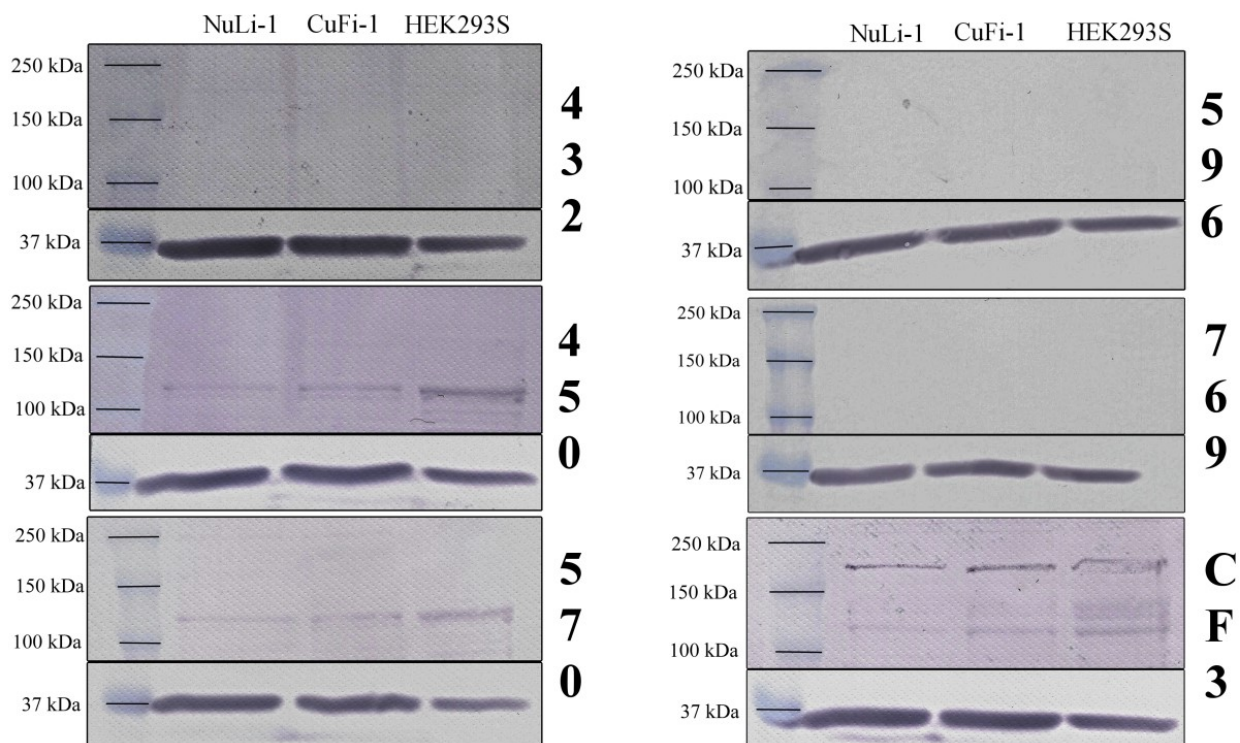


Obrázek č. 12: Srovnání detekce CFTR proteinu v buněčných liniích NuLi-1 a CuFi-1 metodou nepřímé imunofluorescence. Použité protilátky: 570 a CF3. Ředění 1:500. Mikroskop Nikon Eclipse TE2002-U, program NIS-Elements AR 2.30, filtr 31002 Rdil C87702, rozlišení LWD 10×/0,4.

4.2. Optimalizace detekce CFTR proteinu pomocí metody Western blot

Pro účely metody Western blot byly buněčné kultury lyzovány pomocí RIPA pufru s přídavkem inhibitoru proteas (viz kapitola 3.4.). CFTR protein byl opět detekován pomocí výše zmíněných monoklonálních primárních protilátek (432, 450, 570, 596, 769, CF3). Velikost maturovaného CFTR proteinu je 168 kDa, částečně maturovaného 131 kDa a nematurovaného 127 kDa. Postup, jakým byla prováděna SDS-PAGE elektroforéza a následný Western blot elektropřenos, je posán v kapitolách 3.6. a 3.7.

Na obrázku č. 13 na straně 69 je ukázán přehled imunodetekce CFTR proteinu za použití šesti primárních protilátek. Vzorky byly nanášeny v množství 35 μ g na jamku 10jamkového elektroforetického gelu. V případě použití protilátek 432, 596 a 769 nebyl detekován CFTR protein. V případě protilátek 450 a 570 lze pozorovat slabý signál v oblasti odpovídající ~130 kDa. Plně maturovaný CFTR protein byl detekován pomocí CF3 primární protilátky v oblasti molekulové velikosti ~170 kDa, jeho množství je však v porovnání s GAPDH proteinem malé. Signál CFTR proteinu získaný pomocí protilátek je u buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 srovnatelný. U buněčné linie HEK293S je rovněž patrný signál odpovídající CFTR proteinu.



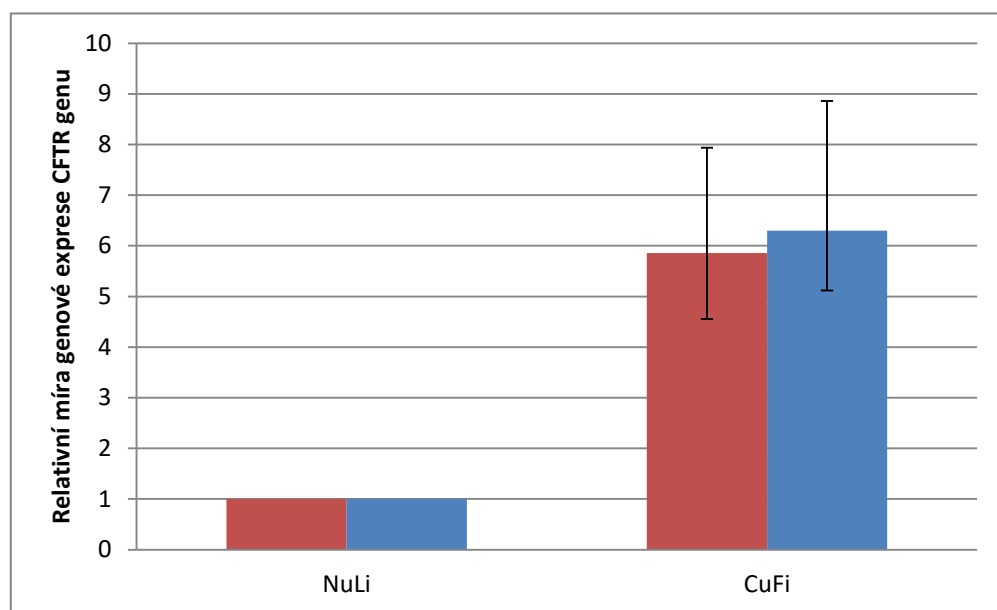
Obrázek č. 13: *Detekce CFTR proteinu metodou Western blot.* CFTR protein byl detekován pomocí šesti primárních protilátek (432, 450, 570, 596, 769, CF3) v buněčných liniích NuLi-1, CuFi-1 a HEK293S. Vzorky byly nanášeny v množství 35 μg /jamka. Byla provedena detekce GAPDH proteinu (37kDa) pro kontrolu nanesení stejného množství proteinů.

4.3. Charakterizace buněčných linií z hlediska relativní míry genové exprese *CFTR* genu

Pro stanovení relativní míry genové exprese *CFTR* genu byly použity dvě sady specifických fluorescenčních sond – první od firmy IDT, druhá od firmy TaqMan. Jako referenční gen byl určen *GAPDH*. Postup qPCR je popsán v kapitole 3.12.

Na obrázku č. 14 je zobrazena relativní míra genové exprese *CFTR* genu v buněčných liniích NuLi-1 a CuFi-1. Buněčná linie NuLi-1 byla brána za kontrolní skupinu.

Při použití jak fluorescenčních sond od firmy IDT (červené sloupce), tak od firmy TaqMan (modré sloupce) bylo zjištěno, že relativní míra genové exprese *CFTR* genu je v buněčné linii CuFi-1 přibližně šestkrát vyšší než v buněčné linii NuLi-1. V obou liniích bylo zjištěno velmi malé množství *CFTR*-mRNA.



Obrázek č. 14: Relativní míra genové exprese *CFTR* v buněčných liniích NuLi-1 a CuFi-1. Byly testovány dvě sady fluorescenčních sond: od firmy IDT (červené sloupce) a od firmy TaqMan (modré sloupce). Buněčná linie NuLi-1 byla brána za kontrolní skupinu.

4.4. Stanovení účinnosti transfekce pomocí CFTR-mRNA

4.4.1. Stanovení účinnosti transfekce CFTR-mRNA pomocí metody nepřímé imunofluorescence

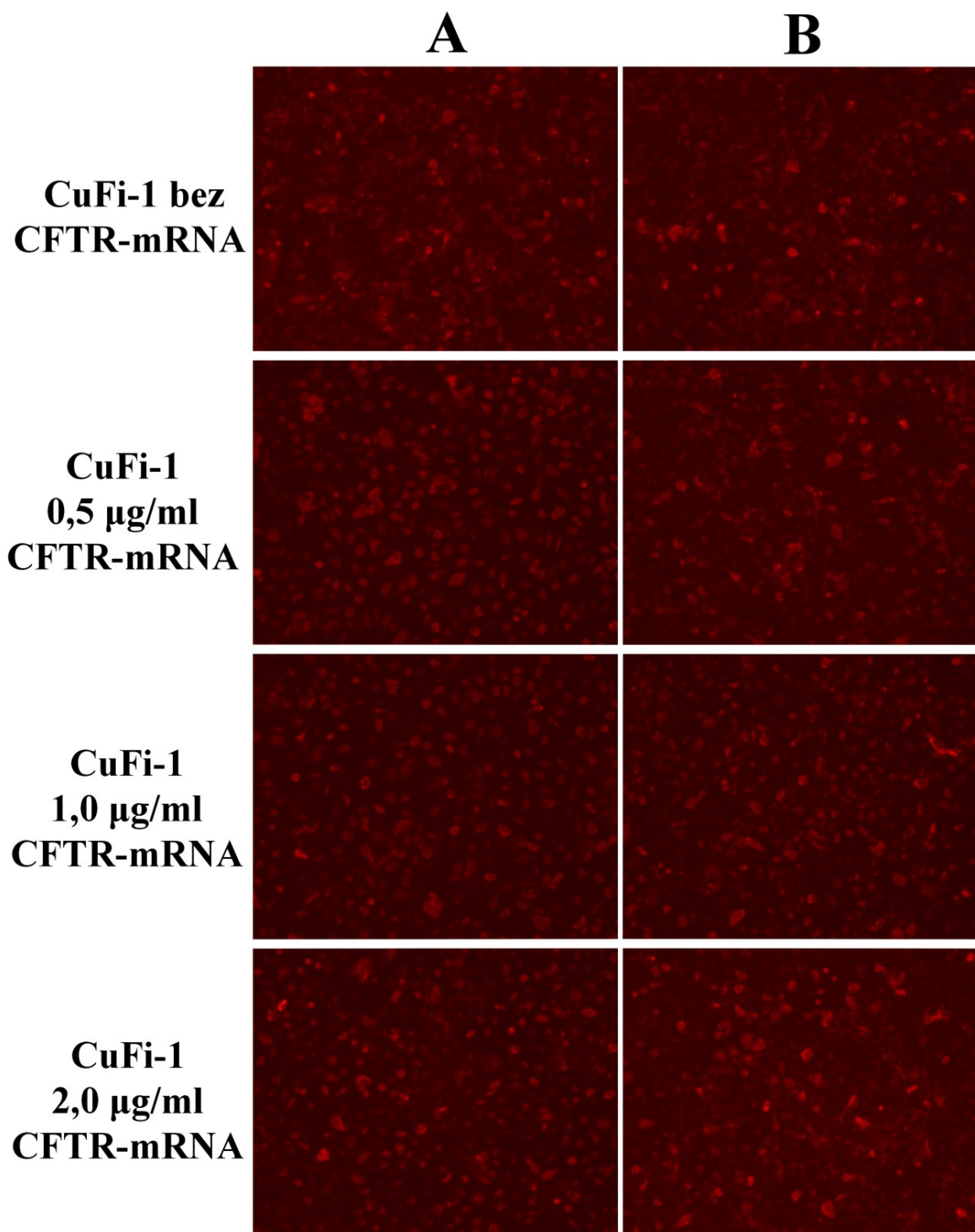
Buněčná linie CuFi-1 byla transfekována pomocí dvou typů CFTR-mRNA za použití transfekčního činidla Lipofectamine MessengerMAX. Postup transfekce byl popsán v kapitole 3.15.

Buněčná linie CuFi-1 byla transfekována následujícími typy CFTR-mRNA: a) CFTR-mRNA obsahující nemodifikované nukleotidy, b) CFTR-mRNA obsahující 25 % pseudouridinu a 25 % 5-methylcytidinu. Byly použity tři různé koncentrace CFTR-mRNA: 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml a 2,0 µg/ml. CFTR protein byl vizualizován pomocí primárních protilátek 570 a CF3. Protilátky byly ředěny v poměru 1:500.

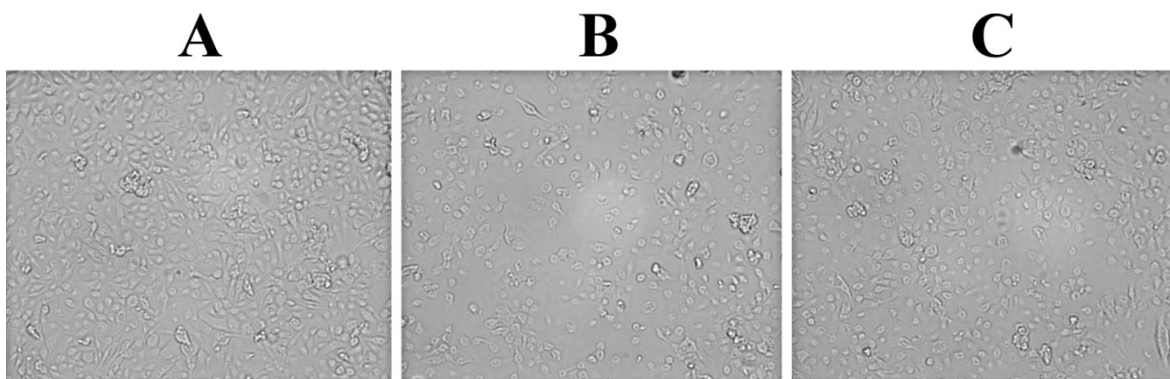
Na obrázku č. 15 (strana 72) je ukázána vizualizace CFTR proteinu pomocí CF3 protilátky po transfekci buněčné linie CuFi-1. Z obrázku je patrné, že se vzrůstající koncentrací působí CFTR-mRNA na buňky toxicky. Už při koncentraci 0,5 µg/ml se projevila určitá toxicita CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy. Oproti tomu při transfekci pomocí CFTR-mRNA s modifikovanými nukleotidy se toxický účinek začal projevovat až při koncentraci 2,0 µg/ml. Při této koncentraci lze zároveň pozorovat nejvyšší expresi CFTR proteinu.

Na obrázku č. 16 (strana 73) je porovnána morfologie buněk linie CuFi-1 před a po transfekci buďto 0,5 µg/ml CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy, nebo 2,0 µg/ml CFTR-mRNA s modifikovanými nukleotidy. Z obrázku je zřejmé, že po transfekci CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy je buněk mnohem méně než u buněk, ke kterým nebyla přidána CFTR-mRNA. Monovrstva buněk transfekovaných pomocí CFTR-mRNA s modifikovanými nukleotidy je jen místy porušena.

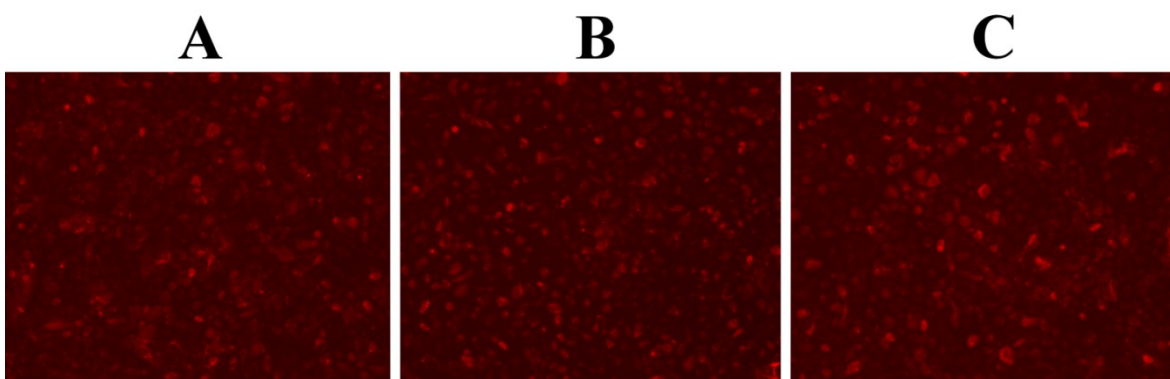
Na obrázku č. 17 (strana 73) je podrobnější srovnání buněk linie CuFi-1, ke kterým nebyla přidána CFTR-mRNA, s buňkami, které byly transfekovány buďto 0,5 µg/ml CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy, nebo 2,0 µg/ml CFTR-mRNA s modifikovanými nukleotidy. U transfekovaných buněk lze pozorovat zvýšenou expresi CFTR proteinu a navýšení jeho množství v plasmatické membráně.



Obrázek č. 15: *Transfekce buněčné linie CuFi-1 pomocí CFTR mRNA.* Buňky linie byly transfekovány pomocí CFTR-mRNA ve třech koncentracích (0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml a 2,0 µg/ml). Použité transfekční činidlo Lipofectamine MessengerMAX. Použitá CFTR-mRNA: **A)** s nemodifikovanými nukleotidy. **B)** s 25 % pseudouridinu a 25 % 5-methylcytidinu. Detekce pomocí primární protilátky CF3, ředění 1:500. Mikroskop Nikon Eclipse TE2002-U, program NIS-Elements AR 2.30, filtr 31002 Rdíř C87702, rozlišení LWD 10×/0,4.



Obrázek č. 16: Morfologie buněk linie CuFi-1 před a po transfekci pomocí CFTR-mRNA. **A)** Buňky bez přídavku CFTR-mRNA. **B)** Buňky transfekované 0,5 µg/ml CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy. **C)** Buňky transfekované 2,0 µg/ml CFTR-mRNA s 25 % pseudouridinu a 25 % 5-methylcytidinu. Použité transfekční činidlo Lipofectamine MessengerMAX. Mikroskop Nikon Eclipse TE2002-U, program NIS-Elements AR 2.30, viditelné světlo, rozlišení LWD 10×/0,4.

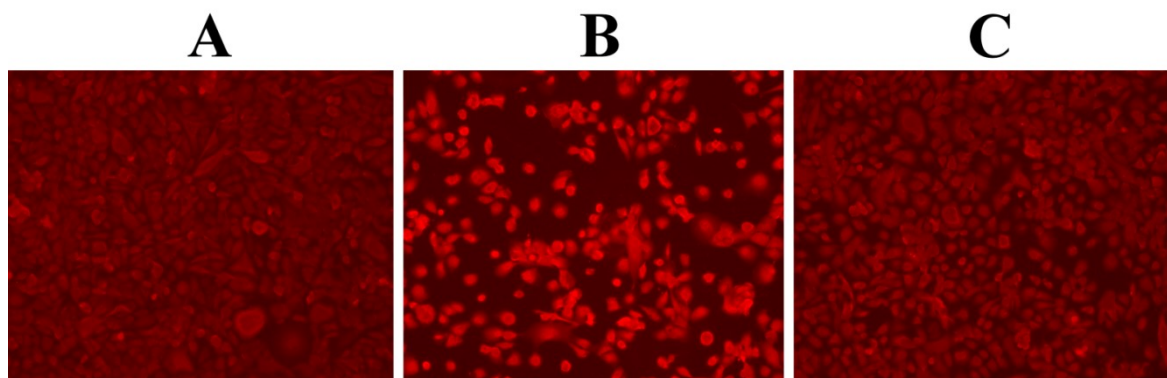


Obrázek č. 17: Detailní srovnání buněk linie CuFi-1 před a po transfekci CFTR-mRNA. **A)** Buňky bez přídavku CFTR-mRNA. **B)** Buňky transfekované 0,5 µg/ml CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy. **C)** Buňky transfekované 2,0 µg/ml CFTR-mRNA s 25 % pseudouridinu a 25 % 5-methylcytidinu. Detekce pomocí primární protilátky CF3, ředění 1:500. Použité transfekční činidlo Lipofectamine MessengerMAX. Mikroskop Nikon Eclipse TE2002-U, program NIS-Elements AR 2.30, filtr 31002 Rdil C87702, rozlišení LWD 10×/0,4.

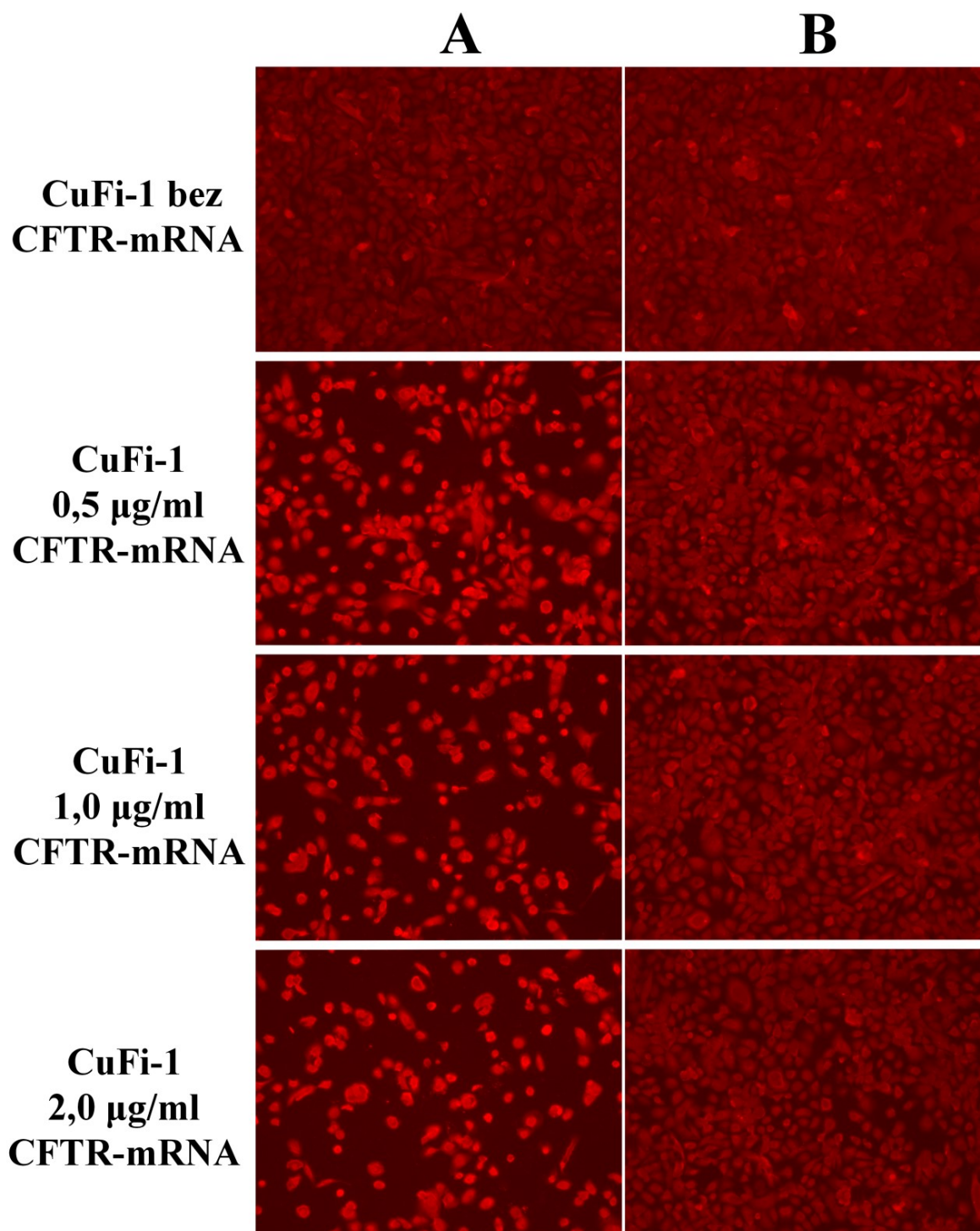
Na obrázku č. 19 (strana 75) je ukázána vizualizace CFTR proteinu pomocí primární protilátky 570 po transfekci buněčné linie CuFi-1. I v tomto případě byly získány obdobné výsledky jako při použití CF3 protilátky. Jako nejúčinnější a zároveň nejméně toxická pro buněčnou linii se ukázala CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy o koncentraci 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Intenzita signálu u přeživších buněk je mnohem větší než u buněk transfekovaných pomocí CFTR-mRNA s modifikovanými nukleotidy.

Obdobně jako u vizualizace CFTR proteinu pomocí CF3 protilátky při transfekci pomocí CFTR-mRNA s modifikovanými nukleotidy byl toxický účinek detekován při koncentraci 2,0 $\mu\text{g/ml}$.

Na obrázku č. 18 je podrobnější srovnání buněk linie CuFi-1 bez přítomnosti CFTR-mRNA s buňkami, které byly transfekovány buďto 0,5 $\mu\text{g/ml}$ CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy, nebo 2,0 $\mu\text{g/ml}$ CFTR-mRNA s modifikovanými nukleotidy. U buněk transfekovaných pomocí CFTR-mRNA s modifikovanými nukleotidy si lze povšimnout navýšení intenzity signálu po obvodu buněk.



Obrázek č. 18: *Detailní srovnání buněk linie CuFi-1 před a po transfekci CFTR-mRNA. A) Buňky bez přídavku CFTR-mRNA. B) Buňky transfekované 0,5 $\mu\text{g/ml}$ CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy. C) Buňky transfekované 2,0 $\mu\text{g/ml}$ CFTR-mRNA s 25 % pseudouridinu a 25 % 5-methylcytidinu. Detekce pomocí primární protilátky 570, ředění 1:500. Použité transfekční činidlo Lipofectamine MessengerMAX. Mikroskop Nikon Eclipse TE2002-U, program NIS-Elements AR 2.30, filtr 31002 Rdil C87702, rozlišení LWD 10 \times /0,4.*

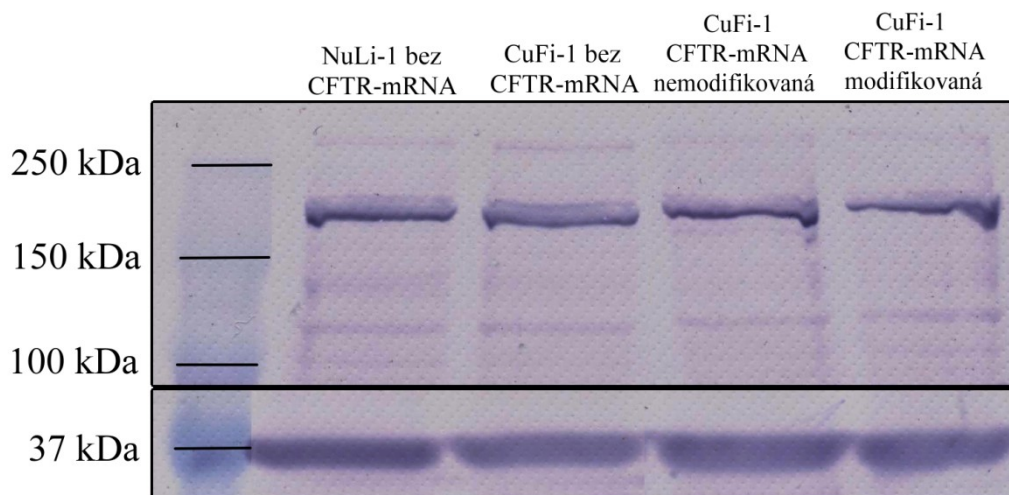


Obrázek č. 19: *Transfekce buněčné linie CuFi-1 pomocí CFTR-mRNA.* Buňky linie byly transfekovány pomocí CFTR-mRNA ve třech koncentracích (0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml a 2,0 µg/ml). Použité transfekční činidlo Lipofectamine MessengerMAX. Použitá CFTR-mRNA: **A)** s nemodifikovanými nukleotidy. **B)** s 25 % pseudouridinu a 25 % 5-methylcytidinu. Detekce pomocí primární protilátky 570, ředění 1:500. Mikroskop Nikon Eclipse TE2002-U, program NIS-Elements AR 2.30, filtr 31002 Rdil C87702, rozlišení LWD 10×/0,4.

4.4.2. Stanovení účinnosti transfekce pomocí CFTR-mRNA metodou Western blot

Účinnost transfekce pomocí CFTR-mRNA metodou Western blot byla stanovena vizualizací CFTR proteinu primární protilátkou CF3 (1:500). Buněčná linie CuFi-1 byla transfekována pomocí 1,0 µg/ml CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy a CFTR-mRNA s 25 % pseudouridinu a 25 % 5-methylcytidinu. Jako transfekční činidlo byl použit Lipofectamine MessengerMAX. Buněčná linie NuLi-1 sloužila jako kontrolní skupina. Vzorky byly na 10jamkový elektroforetický gel nanášeny v množství 30 µg na jamku. Pro kontrolu množství proteinů nanesených na elektroforetický gel byla použita detekce GAPDH proteinu (37 kDa).

Na obrázku č. 20 je ukázána detekce CFTR proteinu primární protilátkou CF3. U všech vzorků lze pozorovat signál v oblasti ~170 kDa a další slabší signál v oblasti ~130 kDa. Množství CFTR proteinu v buněčných liniích je však malé a metoda Western blot není natolik citlivá, aby byla schopna spolehlivě detekovat menší změny v proteinové expresi. Z obrázku tedy nelze s jistotou říci, zda došlo k navýšení množství CFTR proteinu.



Obrázek č. 20: *Transfekce pomocí CFTR-mRNA.* Detekce metodou Western blot za použití primární protilátky CF3. Buněčná linie CuFi-1 byla transfekována pomocí CFTR-mRNA v koncentraci 1,0 µg/ml. Použité transfekční činidlo Lipofectamine MessengerMAX. Byla použita CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy a CFTR-mRNA s 25 % pseudouridinu a 25 % 5-methylcytidinu. Vzorky byly nanášeny v množství 30 µg/jamka. Byla provedena detekce GAPDH proteinu (37kDa) pro kontrolu nanesení stejného množství proteinů.

5. Diskuze

CF je genetická choroba způsobená mutací v *CFTR* genu, který kóduje stejnojmenný protein. Projevy CF jsou závažné a postihují téměř celé lidské tělo. Některé projevy jsou pro pacienta smrtelné. I přes značnou různorodost léčebných postupů, cílených na jednotlivé prvky CF, neexistuje zatím forma terapie, která by poskytovala spolehlivý způsob, jak vyléčit samotné jádro nemoci – defektní CFTR protein. K tomu je momentálně nejzpůsobilejší genová terapie, která si klade za cíl buď opravit *CFTR* gen samotný, nebo stimulovat tvorbu funkčního CFTR kanálu vložím genové informace do buňky. V současné době, i po mnoha letech náročného výzkumu, je však genová terapie stále ještě pouze teoretickou formou léčby CF.

V této práci byla zkoumána detekce CFTR proteinu pomocí dvou metod: nepřímé imunofluorescence a Western blot imunodetekce. Zároveň s tím byla stanovena relativní míra genové exprese *CFTR* genu ve zkoumaných buněčných liniích. Optimalizovaná metodika byla použita pro kvalitativní stanovení účinnosti genového přenosu CFTR-mRNA a následné exprese CFTR proteinu.

V této práci byly využívány tři buněčné linie: zdravá plicní epiteliální buněčná kultura NuLi-1, plicní epiteliální buněčná kultura CuFi-1, která nese homozygotní F508del mutaci v *CFTR* genu, a HEK293S, embryonální ledvinná buněčná epiteliální linie, která by neměla produkovat CFTR protein.

V rámci optimalizace detekce CFTR proteinu metodami nepřímé imunofluorescence a Western blot imunodetekce bylo testováno šest primárních monoklonálních protilátek: dvě protilátky se specifickými místy na NBD2 doméně CFTR proteinu (769 a 596), tři protilátky se specifickými místy na R doméně (570, 450 a 432) a jedna se specifickým místem na MSD1 doméně (CF3).

První metodou, již byla charakterizována produkce CFTR proteinu ve zkoumaných buněčných liniích, byla metoda nepřímé imunofluorescence. Princip tohoto stanovení je založen na specifické detekci hledaného proteinu pomocí primární protilátky, která je následně vizualizována fluorescenčně značenou sekundární protilátkou. V této práci bylo využito sekundární protilátky Alexa Fluor 555. Pro obarvení jaderné DNA byla použita fluorescenční sloučenina Hoechst 33258 (viz kapitola 3.3.).

Za účelem optimalizace detekce CFTR proteinu touto metodou byly protilátky testovány ve třech různých ředících poměrech (1:250, 1:500, 1:1000). Z těchto poměrů byl

pro další experimenty vybrán poměr 1:500, neboť představoval dostatečné zředění, aby se minimalizovaly nespecifické interakce protilátky, a zároveň poskytoval dostatečnou míru fluorescence pro vhodnou detekci CFTR proteinu. Z testovaných protilátek byly z důvodů vysoké specifity k CFTR proteinu vybrány primární protilátky CF3 a 570.

Pomocí této metody bylo stanoveno, že zdravá buněčná epitelální linie NuLi-1 má v plasmatické membráně inkorporováno větší množství CFTR proteinu než buněčná linie CuFi-1 postižená CF. Toto bylo zjištěno pomocí protilátky CF3, jejíž specifický epitop se nachází v extracelulárním prostoru. Do roztoku této protilátky nebylo přidáváno permeabilizační činidlo Triton X-100, protilátka tedy nemohla vstoupit do buňky a detekovala tak pouze CFTR protein přítomný v plasmatické membráně.

Pomocí protilátky 570 bylo stanoveno, že buněčná linie CuFi-1 a buněčná linie NuLi-1 obsahují srovnatelné množství celkového CFTR proteinu, avšak jeho rozložení v buňce je rozdílné. CFTR protein se v buněčné linii CuFi-1 nachází téměř výhradně v cytoplasmě, kde je kvůli špatnému sbalení degradován rychleji, než je mu umožněno začlenit se do plasmatické membrány, zatímco u buněčné linie NuLi-1 je lokalizován po obvodu buněk [4].

U buněčné linie HEK293S, která by podle publikovaných studií neměla CFTR protein produkovat [137], byla za použití všech šesti primárních protilátek pozorována fluorescence. Z toho je tedy pravděpodobné, že buněčná linie HEK293S produkuje CFTR protein.

Druhou metodou, jíž byla prováděna detekce CFTR proteinu, byla metoda Western blot imunodetekce. Stejně jako u metody nepřímé imunofluorescence i zde bylo testováno všech šest primárních protilátek (432, 450, 570, 596, 769, CF3), a to v ředícím poměru 1:500. CFTR protein se vyskytuje ve třech molekulových velikostech: velikost 168 kDa odpovídá plně maturovanému proteinu, 131 kDa částečně glykosylovanému proteinu a 127 kDa neglykosylovanému proteinu.

Ze všech primárních protilátek se jako nejvhodnější pro detekci CFTR proteinu ukázala protilátka CF3. Jako jediná byla schopna detekovat plně maturovaný CFTR protein, zatímco protilátky 450 a 570 detekovaly pouze protein o velikosti ~130 kDa. Ostatní protilátky (432, 596 a 769) se ukázaly jako nevhodné pro detekci CFTR proteinu metodou Western blot.

Touto metodou nebylo možné poznat rozdíly v množství detekovaného CFTR proteinu mezi buněčnými liniemi NuLi-1 a CuFi-1. Ovšem v buněčné linii HEK293S byl

detekován protein o stejné molekulové velikosti jako v buněčných liniích NuLi-1 a CuFi-1. Ve spojení s výsledky danými nepřímou imunofluorescencí lze konstatovat, že buněčná linie HEK293S skutečně produkuje CFTR protein.

Jedním z možných důvodů neúčinnosti většiny testovaných primárních protilátek pro detekci metodou Western blot by mohla být skutečnost, že se CFTR protein nachází v denaturované formě, jeho antigenní místa tedy nemusí být kvůli změně prostorové konformace protilátkou rozpoznány.

Jako třetí technika k charakterizaci buněčných linií byla použita qPCR. Byla stanovena relativní míra genové exprese *CFTR* genu. Toto stanovení bylo prováděno pouze pro buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1. Byly testovány dvě sady fluorescenčně značených sond proti *CFTR* genu. Jako referenční gen byl použit lidský *GAPDH* gen. Celkové množství *CFTR*-mRNA obou buněčných liniích bylo velmi nízké. Ze stanovení relativní míry genové exprese *CFTR* genu oběma sadami fluorescenčních sond vyplynulo, že buněčná linie CuFi-1 exprimuje *CFTR* gen v šestkrát větší míře než buněčná linie NuLi-1. Tento nárůst exprese *CFTR* genu by mohl být zapříčiněn změnou genové exprese, kterou prodělává buňka postižená CF. Tuto možnost podporují již publikované studie, které ukázaly, že v tkáních s CF dochází ke zvýšené produkci faktorů, které podporují transkripci *CFTR* genu (*IL-1 β* a *NF- κ B*) [138, 139]. Samotná regulace exprese *CFTR* genu však dosud nebyla plně objasněna.

Po charakterizaci produkce CFTR proteinu a relativní genové exprese *CFTR* genu, byla buněčná linie CuFi-1 transfekována pomocí *CFTR*-mRNA. Transfekce pomocí *CFTR*-mRNA má oproti transfekci pomocí DNA tu výhodu, že se jedná o menší molekuly, podle nichž je navíc možné syntetizovat protein přímo v cytoplasmě. Z toho důvodu není vyžadován přenos přes jadernou membránu a nehrozí ani riziko případné mutagenese. Nedostatkem genového přenosu mRNA je, že tyto molekuly mohou vyvolávat toxický účinek. Jsou také méně stabilní než DNA a snáze podléhají degradaci [124, 126].

Za účelem transfekce byly *in vitro* syntetizovány dva druhy *CFTR*-mRNA: a) s nemodifikovanými nukleotidy, a b) obsahující 25 % pseudouridinu a 25 % 5-methylcytidinu. Modifikované nukleotidy byly do mRNA začleněny, aby více připomínaly přirozeně se vyskytující mRNA eukaryotických buněk. Eukaryotická buňka totiž modifikuje báze své RNA, aby rozeznala endogenní genovou informaci od cizorodé (např. virové), která modifikovaná nebývá [140]. Oba druhy *CFTR*-mRNA měly na 5'-konci místo obvyklé 7-methylguanosylové čepičky syntetický analog ARCA, který

zprostředkovává lepší translační vlastnosti [141]. Oba druhy CFTR-mRNA rovněž na 3'-konci disponovaly polyadenylovým řetězcem o přibližné délce 200 A. Jako transfekční činidlo byl použit kationtový liposom Lipofectamine MessengerMAX.

Byla studována účinnost transfekce buněčných linií pomocí CFTR-mRNA a následná translace CFTR proteinu detekovanáho metodami nepřímé imunofluorescence a Western blot imunodetekce. Byly použity tři různé koncentrace CFTR-mRNA: 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml a 2,0 µg/ml. Buňky byly transfekovány po dobu 24 hodin.

U buněk linie CuFi-1, transfekovaných pomocí CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy, se projevila značná toxicita. Ta byla patrná už při koncentraci 0,5 µg/ml, kdy byla zároveň i nejvyšší účinnost transfekce. Se vzrůstající koncentrací se zvyšovala toxicita CFTR-mRNA, aniž by se zvyšovalo množství CFTR proteinu. Oproti tomu, když byly buňky linie CuFi-1 transfekovány pomocí CFTR-mRNA s modifikovanými nukleotidy, toxický účinek nukleové kyseliny se začal projevovat až při koncentraci 2,0 µg/ml. Lze tedy konstatovat, že CFTR-mRNA s modifikovanými nukleotidy je mnohem lépe tolerována než ta s nemodifikovanými.

Při detekci CFTR proteinu oběma protilátkami bylo zřejmé, že v transfekovaných buňkách dochází ke zvýšené expresi CFTR proteinu. Bylo pozorováno zvýšení fluorescenčního signálu po obvodu buněk, což naznačuje, že dochází k tvorbě správně sbaleného CFTR proteinu, který je následně dopraven do plasmatické membrány. Buňky linie CuFi-1, které byly transfekovány pomocí CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy, exprimovaly CFTR protein v mnohem větším množství než buňky transfekované CFTR-mRNA s modifikovanými nukleotidy. Je možné, že pokud transfekovaná buňka odolá toxickému účinku mRNA s nemodifikovanými nukleotidy, probíhá následná translace snáze a rychleji, než pokud daná mRNA obsahuje modifikované nukleotidy.

Lze konstatovat, že i přes svou transfekční účinnost CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy není vhodná pro genový přenos v žádné z testovaných koncentrací. Pro genový přenos CFTR-mRNA s modifikovanými nukleotidy je nejvhodnější koncentrace mezi 1,0 a 2,0 µg/ml, kdy se ještě neprojevuje toxicky. Přesné určení vhodné koncentrace by vyžadovalo další testování.

Pro stanovení účinnosti transfekce buněčných linií pomocí CFTR-mRNA metodou Western blot imunodetekce byla použita primární protilátka CF3. Buňky byly 24 hodin inkubovány s oběma druhy CFTR-mRNA v koncentraci 1,0 µg/ml. I zde bylo možné

pozorovat toxický účinek CFTR-mRNA bez modifikovaných nukleotidů, zatímco u buněk transfekovaných pomocí CFTR-mRNA s modifikovanými nukleotidy pozorován nebyl.

Metoda Western blot je ovšem méně citlivá než metoda nepřímé imunofluorescence. Vzhledem k celkově nízkému množství CFTR proteinu v buněčných liniích nebylo pomocí této metody možné spolehlivě určit, zda po transfekci pomocí CFTR-mRNA došlo k navýšení proteinové exprese či nikoli.

6. Závěr

V této práci byla nejprve za použití metod nepřímé imunofluorescence a Western blot imunodetekce stanovena exprese CFTR proteinu v buněčných liniích NuLi-1, CuFi-1 a HEK293S. Byla porovnávána účinnost detekce šesti primárními monoklonálními protilátkami (432, 450, 570, 596, 769, CF3) proti tomuto proteinu. Ukázalo se, že pro detekci CFTR proteinu metodou nepřímé imunofluorescence jsou nejvhodnější protilátky CF3 a 570 v ředění 1:500. Pro detekci tohoto proteinu metodou Western blot je vhodná pouze protilátka CF3 v ředění 1:500.

Byla stanovena relativní míra genové exprese *CFTR* genu v buněčných liniích NuLi-1 a CuFi-1. Ukázalo se, že množství CFTR-mRNA bylo v daných liniích nízké. Exprese *CFTR* genu buněčné linie CuFi-1 je přibližně šestkrát vyšší než u buněčné linie NuLi-1.

Buněčná linie CuFi-1 byla transfekována dvěma druhy *in vitro* syntetizované CFTR-mRNA: a) s nemodifikovanými nukleotidy, b) s 25 % pseudouridinu a 25 % 5-methylcytidinu. Byly testovány 3 koncentrace CFTR-mRNA: 0,5 µg/ml; 1,0 µg/ml a 2,0 µg/ml.

Transfekce pomocí CFTR-mRNA s nemodifikovanými nukleotidy byla velice účinná, ovšem zároveň se projevila závažným toxickým účinkem. Pro její případné využití pro genovou terapii by tedy bylo nutné použít koncentrace nižší než 0,5 µg/ml.

Transfekce pomocí CFTR-mRNA s 25 % pseudouridinu a 25 % 5-methylcytidinu byla mnohem lépe tolerována a toxický účinek se začal projevovat až při koncentraci 2,0 µg/ml. Nejvhodnější koncentrace použitelná pro transfekci se tedy nachází v rozmezí 1,0-2,0 µg/ml.

Pro stanovení metodou Western blot byla buněčná linie CuFi-1 transfekována 1,0 µg/ml CFTR-mRNA. Tato metoda ovšem není tak citlivá jako metoda nepřímé imunofluorescence a není tedy v tomto případě vhodná pro stanovení účinnosti transfekce buněčných linií pomocí CFTR-mRNA.

7. Seznam literatury

- [1] Andersen D. H., „Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathologic study", *Am. J. Dis. Child.*, roč. 56, č. 2, s. 344–399, srp. 1938.
- [2] T. F. Boat, A. L. Beadet, a M. J. Welsh, *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, edited by CR Scriver. New York: McGraw–Hill, 1989.
- [3] P. Křenková *et al.*, „Distribution of CFTR mutations in the Czech population: Positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations", *J. Cyst. Fibros.*, roč. 12, č. 5, s. 532–537, zář. 2013.
- [4] A. Bush, *Cystic Fibrosis in the 21st Century*. Karger Medical and Scientific Publishers, 2006.
- [5] P. a. D. Sant'agnese, R. C. Darling, G. A. Perera, a E. Shea, „Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas: Clinical Significance and Relationship of the Disease", *Pediatrics*, roč. 12, č. 5, s. 549–563, lis. 1953.
- [6] J. M. Rommens *et al.*, „Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping", *Science*, roč. 245, č. 4922, s. 1059–1065, zář. 1989.
- [7] Riordan *et al.*, „Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA", *Science*, roč. 245, č. 4922, s. 1066–1073, zář. 1989.
- [8] M. J. Welsh *et al.*, „Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: A chloride channel with novel regulation", *Neuron*, roč. 8, č. 5, s. 821–829, kvě. 1992.
- [9] C. F. Higgins, „ABC Transporters: From Microorganisms to Man", *Annu. Rev. Cell Biol.*, roč. 8, č. 1, s. 67–113, 1992.
- [10] I. D. Kerr, E. D. Reynolds, a J. H. Cove, „ABC proteins and antibiotic drug resistance: is it all about transport?", *Biochem. Soc. Trans.*, roč. 33, č. 5, s. 1000–1002, říj. 2005.
- [11] A. K. Tiwari, K. Sodani, C.-L. Dai, C. R. Ashby, a Z.-S. Chen, „Revisiting the ABCs of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy", *Curr. Pharm. Biotechnol.*, roč. 12, č. 4, s. 570–594, dub. 2011.
- [12] K. Hollenstein, R. J. Dawson, a K. P. Locher, „Structure and mechanism of ABC transporter proteins", *Curr. Opin. Struct. Biol.*, roč. 17, č. 4, s. 412–418, srp. 2007.
- [13] D. C. Gadsby, P. Vergani, a L. Csanády, „The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis", *Nature*, 22-bře-2006. [Online]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nature04712>. [Viděno: 26-úno-2018].
- [14] J. R. Riordan, „Assembly of Functional Cftr Chloride Channels", *Annu. Rev. Physiol.*, roč. 67, č. 1, s. 701–718, 2005.
- [15] J. F. Hunt, C. Wang, a R. C. Ford, „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (ABCC7) Structure", *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, roč. 3, č. 2, s. a009514, úno. 2013.
- [16] C. R. O'Riordan, A. L. Lachapelle, J. Marshall, E. A. Higgins, a S. H. Cheng, „Characterization of the oligosaccharide structures associated with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator", *Glycobiology*, roč. 10, č. 11, s. 1225–1233, lis. 2000.
- [17] N. Cant, N. Pollock, a R. C. Ford, „CFTR structure and cystic fibrosis", *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, roč. 52, s. 15–25, čvc. 2014.

- [18] I. Klein, B. Sarkadi, a A. Váradi, „An inventory of the human ABC proteins", *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, roč. 1461, č. 2, s. 237–262, pro. 1999.
- [19] A. W. R. Serohijos *et al.*, „Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic–membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 105, č. 9, s. 3256–3261, bře. 2008.
- [20] Z. Bozoky *et al.*, „Regulatory R region of the CFTR chloride channel is a dynamic integrator of phospho-dependent intra- and intermolecular interactions", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 110, č. 47, s. E4427–E4436, lis. 2013.
- [21] S. H. Cheng, D. P. Rich, J. Marshall, R. J. Gregory, M. J. Welsh, a A. E. Smith, „Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel", *Cell*, roč. 66, č. 5, s. 1027–1036, zář. 1991.
- [22] P. M. Quinton, „Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis", *The Lancet*, roč. 372, č. 9636, s. 415–417, srp. 2008.
- [23] D. N. Sheppard a M. J. Welsh, „Structure and Function of the CFTR Chloride Channel", *Physiol. Rev.*, roč. 79, č. 1, s. S23–S45, led. 1999.
- [24] Aleksandrov Andrei A., Chang Xiu-bao, Aleksandrov Luba, a Riordan John R., „The non-hydrolytic pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ion channel gating", *J. Physiol.*, roč. 528, č. 2, s. 259–265, srp. 2004.
- [25] A. A. Aleksandrov, L. A. Aleksandrov, a J. R. Riordan, „CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel", *Pflug. Arch. - Eur. J. Physiol.*, roč. 453, č. 5, s. 693–702, úno. 2007.
- [26] S. G. Bompadre *et al.*, „CFTR Gating I: Characterization of the ATP-dependent Gating of a Phosphorylation-independent CFTR Channel (Δ R-CFTR)", *J. Gen. Physiol.*, roč. 125, č. 4, s. 361–375, dub. 2005.
- [27] M. Ikuma a M. J. Welsh, „Regulation of CFTR Cl⁻ channel gating by ATP binding and hydrolysis", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 97, č. 15, s. 8675–8680, čvc. 2000.
- [28] M. C. Winter, D. N. Sheppard, M. R. Carson, a M. J. Welsh, „Effect of ATP concentration on CFTR Cl⁻ channels: a kinetic analysis of channel regulation", *Biophys. J.*, roč. 66, č. 5, s. 1398–1403, kvě. 1994.
- [29] M. C. Winter a M. J. Welsh, „Stimulation of CFTR activity by its phosphorylated R domain", *Nature*, roč. 389, č. 6648, s. 294–296, zář. 1997.
- [30] F. S. Seibert, X.-B. Chang, A. A. Aleksandrov, D. M. Clarke, J. W. Hanrahan, a J. R. Riordan, „Influence of phosphorylation by protein kinase A on CFTR at the cell surface and endoplasmic reticulum", *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, roč. 1461, č. 2, s. 275–283, pro. 1999.
- [31] D. P. Rich, R. J. Gregory, M. P. Anderson, P. Manavalan, A. E. Smith, a M. J. Welsh, „Effect of deleting the R domain on CFTR-generated chloride channels", *Science*, roč. 253, č. 5016, s. 205–207, čvc. 1991.
- [32] D. J. Wilkinson *et al.*, „CFTR activation: additive effects of stimulatory and inhibitory phosphorylation sites in the R domain", *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, roč. 273, č. 1, s. L127–L133, čvc. 1997.
- [33] B. Dhooghe, J. B. Haaf, S. Noel, a T. Leal, „Strategies in early clinical development for the treatment of basic defects of cystic fibrosis", *Expert Opin. Investig. Drugs*, roč. 25, č. 4, s. 423–436, dub. 2016.
- [34] A. Venerando *et al.*, „Detection of Phospho-Sites Generated by Protein Kinase CK2 in CFTR: Mechanistic Aspects of Thr1471 Phosphorylation", *PLOS ONE*, roč. 8, č. 9, s. e74232, zář. 2013.

- [35] S. E. Gabriel, L. L. Clarke, R. C. Boucher, a M. J. Stutts, „CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship", *Nature*, roč. 363, č. 6426, s. 263–266, kvě. 1993.
- [36] M. M. Morales, D. Falkenstein, a A. G. Lopes, „The Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) in the kidney", *An. Acad. Bras. Ciênc.*, roč. 72, č. 3, s. 399–406, zář. 2000.
- [37] „Cystic Fibrosis Mutation Database: Statistics". [Online]. Dostupné z: <http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>. [Viděno: 25-bře-2018].
- [38] A. Hamosh, B. J. Rosenstein, a G. R. Cutting, „CFTR nonsense mutations G542X and W1282X associated with severe reduction of CFTR mRNA in nasal epithelial cells", *Hum. Mol. Genet.*, roč. 1, č. 7, s. 542–544, říj. 1992.
- [39] J. Logan *et al.*, „Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations that disrupt nucleotide binding.", *J. Clin. Invest.*, roč. 94, č. 1, s. 228–236, čvc. 1994.
- [40] J. S. Elborn, „Cystic fibrosis", *The Lancet*, roč. 388, č. 10059, s. 2519–2531, lis. 2016.
- [41] H. Kopelman, P. Durie, K. Gaskin, Z. Weizman, a G. Forstner, „Pancreatic Fluid Secretion and Protein Hyperconcentration in Cystic Fibrosis", *N. Engl. J. Med.*, roč. 312, č. 6, s. 329–334, úno. 1985.
- [42] T. Kelly a J. Buxbaum, „Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis", *Dig. Dis. Sci.*, roč. 60, č. 7, s. 1903–1913, čvc. 2015.
- [43] C. Barreto, L. M. Pinto, A. Duarte, J. Lavinha, a M. Ramsay, „A fertile male with cystic fibrosis: molecular genetic analysis.", *J. Med. Genet.*, roč. 28, č. 6, s. 420–421, čer. 1991.
- [44] L. M. Taussig, C. C. Lobeck, P. A. di Sant Agnese, D. R. Ackerman, a J. Kattwinkel, „Fertility in Males with Cystic Fibrosis", *N. Engl. J. Med.*, roč. 287, č. 12, s. 586–589, zář. 1972.
- [45] A. Wanner, M. Salathé, a T. G. O’Riordan, „Mucociliary clearance in the airways.", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, roč. 154, č. 6, s. 1868–1902, pro. 1996.
- [46] L. Joris, I. Dab, a P. M. Quinton, „Elemental composition of human airway surface fluid in healthy and diseased airways", *Am. Rev. Respir. Dis.*, roč. 148, č. 6 Pt 1, s. 1633–1637, pro. 1993.
- [47] R. C. Boucher, „New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease", *Eur. Respir. J.*, roč. 23, č. 1, s. 146–158, led. 2004.
- [48] A. Cuthbert, „New horizons in the treatment of cystic fibrosis", *Br. J. Pharmacol.*, roč. 163, č. 1, s. 173–183, kvě. 2011.
- [49] J. Widdicombe, „Regulation of the depth and composition of airway surface liquid", *J. Anat.*, roč. 201, č. 4, s. 313–318, říj. 2002.
- [50] H. Matsui *et al.*, „Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease", *Cell*, roč. 95, č. 7, s. 1005–1015, pro. 1998.
- [51] T. Fujii, S. Hayashi, J. C. Hogg, R. Vincent, a S. F. Van Eeden, „Particulate Matter Induces Cytokine Expression in Human Bronchial Epithelial Cells", *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, roč. 25, č. 3, s. 265–271, zář. 2001.
- [52] D. Worlitzsch *et al.*, „Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients", *J. Clin. Invest.*, roč. 109, č. 3, s. 317–325, úno. 2002.
- [53] T. R. D. Kievit *et al.*, „Multidrug Efflux Pumps: Expression Patterns and Contribution to Antibiotic Resistance in Pseudomonas aeruginosa Biofilms", *Antimicrob. Agents Chemother.*, roč. 45, č. 6, s. 1761–1770, čer. 2001.

- [54] M. R. Elkins *et al.*, „A Controlled Trial of Long-Term Inhaled Hypertonic Saline in Patients with Cystic Fibrosis", *N. Engl. J. Med.*, roč. 354, č. 3, s. 229–240, led. 2006.
- [55] A. Jaques *et al.*, „Inhaled Mannitol Improves Lung Function in Cystic Fibrosis", *CHEST*, roč. 133, č. 6, s. 1388–1396, čer. 2008.
- [56] M. Robinson *et al.*, „The effect of inhaled mannitol on bronchial mucus clearance in cystic fibrosis patients: a pilot study", *Eur. Respir. J.*, roč. 14, č. 3, s. 678–685, zář. 1999.
- [57] T. G. O’Riordan *et al.*, „Acute Hyperkalemia Associated with Inhalation of a Potent ENaC Antagonist: Phase 1 Trial of GS-9411", *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, roč. 27, č. 3, s. 200–208, srp. 2013.
- [58] A. J. Hirsh *et al.*, „Pharmacological Properties of N-(3,5-Diamino-6-chloropyrazine-2-carbonyl)-N'-4-[4-(2,3-dihydroxypropoxy)phenyl]butyl-guanidine Methanesulfonate (552-02), a Novel Epithelial Sodium Channel Blocker with Potential Clinical Efficacy for Cystic Fibrosis Lung Disease", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, roč. 325, č. 1, s. 77–88, dub. 2008.
- [59] F. Ratjen *et al.*, „Long term effects of denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis", *J. Cyst. Fibros.*, roč. 11, č. 6, s. 539–549, pro. 2012.
- [60] W. Namkung, Z. Yao, W. E. Finkbeiner, a A. S. Verkman, „Small-molecule activators of TMEM16A, a calcium-activated chloride channel, stimulate epithelial chloride secretion and intestinal contraction", *FASEB J.*, roč. 25, č. 11, s. 4048–4062, srp. 2011.
- [61] H. Y. Ren *et al.*, „VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain 1", *Mol. Biol. Cell*, roč. 24, č. 19, s. 3016–3024, srp. 2013.
- [62] K.-Y. Jih a T.-C. Hwang, „Vx-770 potentiates CFTR function by promoting decoupling between the gating cycle and ATP hydrolysis cycle", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 110, č. 11, s. 4404–4409, bř. 2013.
- [63] D. M. Cholon *et al.*, „Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of $\Delta F508$ CFTR in cystic fibrosis", *Sci. Transl. Med.*, roč. 6, č. 246, s. 246ra96, čvc. 2014.
- [64] S. M. Rowe a J. P. Clancy, „Pharmaceuticals Targeting Nonsense Mutations in Genetic Diseases", *BioDrugs*, roč. 23, č. 3, s. 165–174, čer. 2009.
- [65] M. Howard, R. A. Frizzell, a D. M. Bedwell, „Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations", *Nat. Med.*, roč. 2, č. 4, s. 467–469, dub. 1996.
- [66] E. Kerem *et al.*, „Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial", *Lancet Respir. Med.*, roč. 2, č. 7, s. 539–547, čvc. 2014.
- [67] X. Xue *et al.*, „Synthetic Aminoglycosides Efficiently Suppress Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Nonsense Mutations and Are Enhanced by Ivacaftor", *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, roč. 50, č. 4, s. 805–816, lis. 2013.
- [68] A. V. Koulov *et al.*, „Biological and Structural Basis for Aha1 Regulation of Hsp90 ATPase Activity in Maintaining Proteostasis in the Human Disease Cystic Fibrosis", *Mol. Biol. Cell*, roč. 21, č. 6, s. 871–884, led. 2010.
- [69] J. M. Bomberger, R. L. Barnaby, a B. A. Stanton, „The Deubiquitinating Enzyme USP10 Regulates the Post-endocytic Sorting of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Airway Epithelial Cells", *J. Biol. Chem.*, roč. 284, č. 28, s. 18778–18789, čvc. 2009.

- [70] E. Ravet, H. Lulka, F. Gross, L. Casteilla, L. Buscail, a P. Cordelier, „Using lentiviral vectors for efficient pancreatic cancer gene therapy", *Cancer Gene Ther.*, roč. 17, č. 5, s. 315–324, kvě. 2010.
- [71] S. L. Samson, E. V. Gonzalez, V. Yechoor, M. Bajaj, K. Oka, a L. Chan, „Gene Therapy for Diabetes: Metabolic Effects of Helper-dependent Adenoviral Exendin 4 Expression in a Diet-induced Obesity Mouse Model", *Mol. Ther.*, roč. 16, č. 11, s. 1805–1812, lis. 2008.
- [72] Asparuhova Maria B., Barde Isabelle, Trono Didier, Schranz Karin, a Schümperli Daniel, „Development and characterization of a triple combination gene therapy vector inhibiting HIV-1 multiplication", *J. Gene Med.*, roč. 10, č. 10, s. 1059–1070, čvc. 2008.
- [73] J. A. Doudna a E. Charpentier, „The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9", *Science*, roč. 346, č. 6213, s. 1258096, lis. 2014.
- [74] V. Sebastiano *et al.*, „In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases", *Stem Cells Dayt. Ohio*, roč. 29, č. 11, s. 1717–1726, lis. 2011.
- [75] H. Li *et al.*, „In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia", *Nature*, roč. 475, č. 7355, s. 217–221, čer. 2011.
- [76] C. M. Lee, R. Flynn, J. A. Hollywood, M. F. Scallan, a P. T. Harrison, „Correction of the $\Delta F508$ Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene by Zinc-Finger Nuclease Homology-Directed Repair", *BioResearch Open Access*, roč. 1, č. 3, s. 99–108, čer. 2012.
- [77] S. Ramalingam, N. Annaluru, K. Kandavelou, a S. Chandrasegaran, „TALEN-Mediated Generation and Genetic Correction of Disease-Specific Human Induced Pluripotent Stem Cells", *Curr. Gene Ther.*, roč. 14, č. 6, s. 461–472, pro. 2014.
- [78] G. Schwank *et al.*, „Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients", *Cell Stem Cell*, roč. 13, č. 6, s. 653–658, pro. 2013.
- [79] J. Bellec, M. Bacchetta, D. Losa, I. Anegon, M. Chanson, a T. Huy Nguyen, „CFTR Inactivation by Lentiviral Vector-mediated RNA Interference and CRISPR-Cas9 Genome Editing in Human Airway Epithelial Cells", *Curr. Gene Ther.*, roč. 15, č. 5, s. 447–459, říj. 2015.
- [80] P. C. Zamecnik, M. K. Raychowdhury, D. R. Tabatadze, a H. F. Cantiello, „Reversal of cystic fibrosis phenotype in a cultured $\Delta 508$ cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cell line by oligonucleotide insertion", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 101, č. 21, s. 8150–8155, kvě. 2004.
- [81] W. Beumer *et al.*, „WS01.2 QR-010, an RNA therapy, restores CFTR function using in vitro and in vivo models of $\Delta F508$ CFTR", *J. Cyst. Fibros.*, roč. 14, s. S1, čer. 2015.
- [82] Y. Yang a C. E. Walsh, „Spliceosome-Mediated RNA Trans-splicing", *Mol. Ther.*, roč. 12, č. 6, s. 1006–1012, pro. 2005.
- [83] Gonçalves Manuel A. F. V. a de Vries Antoine A. F., „Adenovirus: from foe to friend", *Rev. Med. Virol.*, roč. 16, č. 3, s. 167–186, kvě. 2006.
- [84] H. Haddada, L. Cordier, a M. Perricaudet, „Gene Therapy Using Adenovirus Vectors", in *The Molecular Repertoire of Adenoviruses III*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1995, s. 297–306.
- [85] O.-W. Merten a B. Gaillet, „Viral vectors for gene therapy and gene modification approaches", *Biochem. Eng. J.*, roč. 108, s. 98–115, dub. 2016.

- [86] C. Mueller a T. R. Flotte, „Gene Therapy for Cystic Fibrosis“, *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, roč. 35, č. 3, s. 164–178, čvc. 2008.
- [87] J. Zabner, L. A. Couture, R. J. Gregory, S. M. Graham, A. E. Smith, a M. J. Welsh, „Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis“, *Cell*, roč. 75, č. 2, s. 207–216, říj. 1993.
- [88] Koehler David R. *et al.*, „Aerosol delivery of an enhanced helper-dependent adenovirus formulation to rabbit lung using an intratracheal catheter“, *J. Gene Med.*, roč. 7, č. 11, s. 1409–1420, říj. 2005.
- [89] G. Toietta, D. R. Koehler, M. J. Finegold, B. Lee, J. Hu, a A. L. Beaudet, „Reduced inflammation and improved airway expression using helper-dependent adenoviral vectors with a K18 promoter“, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, roč. 7, č. 5 Pt 1, s. 649–658, kvě. 2003.
- [90] D. J. Palmer a P. Ng, „Helper-Dependent Adenoviral Vectors for Gene Therapy“, *Hum. Gene Ther.*, roč. 16, č. 1, s. 1–16, led. 2005.
- [91] B.-G. Harvey *et al.*, „Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus“, *J. Clin. Invest.*, roč. 104, č. 9, s. 1245–1255, lis. 1999.
- [92] T. R. Flotte *et al.*, „Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 90, č. 22, s. 10613–10617, lis. 1993.
- [93] R. B. Moss *et al.*, „Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis*: A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial“, *Chest*, roč. 125, č. 2, s. 509–521, úno. 2004.
- [94] T. Friedmann a R. Roblin, „Gene Therapy for Human Genetic Disease?“, *Science*, roč. 175, č. 4025, s. 949–955, bře. 1972.
- [95] U. Griesenbach *et al.*, „Validation of recombinant Sendai virus in a non-natural host model“, *Gene Ther.*, roč. 18, č. 2, s. 182–188, úno. 2011.
- [96] K. Mitomo *et al.*, „Toward Gene Therapy for Cystic Fibrosis Using a Lentivirus Pseudotyped With Sendai Virus Envelopes“, *Mol. Ther.*, roč. 18, č. 6, s. 1173–1182, čer. 2010.
- [97] W. Wang, W. Li, N. Ma, a G. Steinhoff, „Non-Viral Gene Delivery Methods“, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, roč. 14, č. 1, s. 46–60, led. 2013.
- [98] J. M. Ruyschaert *et al.*, „A Novel Cationic Amphiphile for Transfection of Mammalian Cells“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, roč. 203, č. 3, s. 1622–1628, zář. 1994.
- [99] I. Solodin *et al.*, „A Novel Series of Amphiphilic Imidazolinium Compounds for in-Vitro and in-Vivo Gene Delivery“, *Biochemistry (Mosc.)*, roč. 34, č. 41, s. 13537–13544, říj. 1995.
- [100] J. P. Vigneron *et al.*, „Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 93, č. 18, s. 9682–9686, zář. 1996.
- [101] E. R. Lee *et al.*, „Detailed Analysis of Structures and Formulations of Cationic Lipids for Efficient Gene Transfer to the Lung“, *Hum. Gene Ther.*, roč. 7, č. 14, s. 1701–1717, zář. 1996.
- [102] T. Ren, G. Zhang, F. Liu, a D. Liu, „Synthesis and evaluation of vitamin D-based cationic lipids for gene delivery in vitro“, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, roč. 10, č. 9, s. 891–894, kvě. 2000.

- [103] J. H. Felgner *et al.*, „Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations.", *J. Biol. Chem.*, roč. 269, č. 4, s. 2550–2561, led. 1994.
- [104] F. Tang a J. A. Hughes, „Introduction of a Disulfide Bond into a Cationic Lipid Enhances Transgene Expression of Plasmid DNA", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, roč. 242, č. 1, s. 141–145, led. 1998.
- [105] S. W. Hui, M. Langner, Y. L. Zhao, P. Ross, E. Hurley, a K. Chan, „The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer", *Biophys. J.*, roč. 71, č. 2, s. 590–599, srp. 1996.
- [106] M. C. Pedroso de Lima, S. Simões, P. Pires, H. Faneca, a N. Düzgüneş, „Cationic lipid–DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, roč. 47, č. 2, s. 277–294, dub. 2001.
- [107] N. S. Templeton, D. D. Lasic, P. M. Frederik, H. H. Strey, D. D. Roberts, a G. N. Pavlakis, „Improved DNA: liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression", *Nat. Biotechnol.*, roč. 15, č. 7, s. 647–652, čvc. 1997.
- [108] I. Koltover, T. Salditt, J. O. Rädler, a C. R. Safinya, „An Inverted Hexagonal Phase of Cationic Liposome-DNA Complexes Related to DNA Release and Delivery", *Science*, roč. 281, č. 5373, s. 78–81, čvc. 1998.
- [109] Sternberg Brigitte, Sorgi Frank L., a Huang Leaf, „New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze–fracture electron microscopy", *FEBS Lett.*, roč. 356, č. 2–3, s. 361–366, říj. 2001.
- [110] J. O. Rädler, I. Koltover, T. Salditt, a C. R. Safinya, „Structure of DNA-Cationic Liposome Complexes: DNA Intercalation in Multilamellar Membranes in Distinct Interhelical Packing Regimes", *Science*, roč. 275, č. 5301, s. 810–814, úno. 1997.
- [111] J. Zabner, A. J. Fasbender, T. Moninger, K. A. Poellinger, a M. J. Welsh, „Cellular and Molecular Barriers to Gene Transfer by a Cationic Lipid", *J. Biol. Chem.*, roč. 270, č. 32, s. 18997–19007, srp. 1995.
- [112] E. Alton *et al.*, „Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial", *The Lancet*, roč. 353, č. 9157, s. 947–954, bře. 1999.
- [113] G. Davies *et al.*, „T4 Safety and expression of a single dose of lipid-mediated CFTR gene therapy to the upper and lower airways of patients with Cystic Fibrosis", *Thorax*, roč. 66, č. Suppl 4, s. A2–A2, pro. 2011.
- [114] E. Wagner a J. Kloeckner, „Gene Delivery Using Polymer Therapeutics", in *Polymer Therapeutics I*, Springer, Berlin, Heidelberg, s. 135–173.
- [115] D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H.-P. Elsässer, a T. Kissel, „A Novel Non-Viral Vector for DNA Delivery Based on Low Molecular Weight, Branched Polyethylenimine: Effect of Molecular Weight on Transfection Efficiency and Cytotoxicity", *Pharm. Res.*, roč. 16, č. 8, s. 1273–1279, srp. 1999.
- [116] H. Lee, J. H. Jeong, a T. G. Park, „PEG grafted polylysine with fusogenic peptide for gene delivery: high transfection efficiency with low cytotoxicity", *J. Controlled Release*, roč. 79, č. 1, s. 283–291, úno. 2002.
- [117] D. Y. Kwoh *et al.*, „Stabilization of poly-l-lysine/DNA polyplexes for in vivo gene delivery to the liver", *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.*, roč. 1444, č. 2, s. 171–190, úno. 1999.
- [118] Kwok Kai Y., Park Youmie, Yang Yongsheng, Mckenzie Donald L., Liu Yahong, a Rice Kevin G., „In vivo gene transfer using sulfhydryl cross-linked PEG-peptide/glycopeptide DNA co-condensates", *J. Pharm. Sci.*, roč. 92, č. 6, s. 1174–1185, bře. 2003.

- [119] O. Boussif *et al.*, „A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 92, č. 16, s. 7297–7301, srp. 1995.
- [120] M. L. Forrest, J. T. Koerber, a D. W. Pack, „A Degradable Polyethylenimine Derivative with Low Toxicity for Highly Efficient Gene Delivery“, *Bioconjug. Chem.*, roč. 14, č. 5, s. 934–940, zář. 2003.
- [121] M. A. Gosselin, W. Guo, a R. J. Lee, „Efficient Gene Transfer Using Reversibly Cross-Linked Low Molecular Weight Polyethylenimine“, *Bioconjug. Chem.*, roč. 12, č. 6, s. 989–994, lis. 2001.
- [122] Y. Tan, M. Whitmore, S. Li, P. Frederik, a L. Huang, „LPD Nanoparticles-Novel Nonviral Vector for Efficient Gene Delivery“, in *Gene Therapy Protocols*, Springer, Totowa, NJ, 2002, s. 73–81.
- [123] R. J. Lee a L. Huang, „Folate-targeted, Anionic Liposome-entrapped Polylysine-condensed DNA for Tumor Cell-specific Gene Transfer“, *J. Biol. Chem.*, roč. 271, č. 14, s. 8481–8487, dub. 1996.
- [124] N. Bangel-Ruland *et al.*, „Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mRNA delivery: a novel alternative for cystic fibrosis gene therapy“, *J. Gene Med.*, roč. 15, č. 11–12, s. 414–426, lis. 2013.
- [125] G. K. Koski, K. Karikó, S. Xu, D. Weissman, P. A. Cohen, a B. J. Czerniecki, „Cutting Edge: Innate Immune System Discriminates between RNA Containing Bacterial versus Eukaryotic Structural Features That Prime for High-Level IL-12 Secretion by Dendritic Cells“, *J. Immunol.*, roč. 172, č. 7, s. 3989–3993, dub. 2004.
- [126] U. Sahin, K. Karikó, a Ö. Türeci, „mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs“, *Nat. Rev. Drug Discov.*, roč. 13, č. 10, s. 759–780, říj. 2014.
- [127] Verheugt F. W. A., Borne A. E. G., Décary F., a Engelfriet C. P., „The Detection of Granulocyte Alloantibodies with an Indirect Immunofluorescence Test“, *Br. J. Haematol.*, roč. 36, č. 4, s. 533–544, bře. 2008.
- [128] „Pierce Microplate BCA Protein Assay Kit - Reducing Agent Compatible - Thermo Fisher Scientific“. [Online]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23252>. [Viděno: 16-dub-2018].
- [129] B. T. Kurien a R. H. Scofield, „Western blotting“, *Methods*, roč. 38, č. 4, s. 283–293, dub. 2006.
- [130] „Bio-Resource: Western Blot / Protein Immunoblot“. [Online]. Dostupné z: <http://technologyinscience.blogspot.cz/2011/12/western-blot-protein-immunoblot.html#.Wtr4MohuZM0>. [Viděno: 21-dub-2018].
- [131] „Direct-zol“. [Online]. Dostupné z: <https://www.zymoresearch.com/direct-zol-isolation-kits>. [Viděno: 12-dub-2018].
- [132] T. Okamoto a S. Okabe, „Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution.“, *Int. J. Mol. Med.*, roč. 5, č. 6, s. 657–666, čer. 2000.
- [133] „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit - Thermo Fisher Scientific“. [Online]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4368814>. [Viděno: 16-dub-2018].
- [134] „FastStart Essential DNA Probes Master“. [Online]. Dostupné z: https://lifescience.roche.com/en_cz/products/faststart-essential-dna-probes-master.html. [Viděno: 16-dub-2018].

- [135] „QIAfilter Plasmid Kits - QIAGEN Online Shop". [Online]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/plasmid-dna/qiafilter-plasmid-kits/#orderinginformation>. [Viděno: 16-dub-2018].
- [136] „CELLSCRIPT | Kits for RNA transcription and mRNA production with modified nucleotides". [Online]. Dostupné z: <http://www.cellscript.com/products.aspx>. [Viděno: 16-dub-2018].
- [137] J. C. Domingue *et al.*, „HEK-293 cells expressing the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR): a model for studying regulation of Cl⁻ transport", *Physiol. Rep.*, roč. 2, č. 9, zář. 2014.
- [138] Y. Xu *et al.*, „Transcriptional Adaptation to Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Deficiency", *J. Biol. Chem.*, roč. 278, č. 9, s. 7674–7682, úno. 2003.
- [139] F. Brouillard, M. Bouthier, T. Leclerc, A. Clement, M. Baudouin-Legros, a A. Edelman, „NF- κ B Mediates Up-regulation of CFTR Gene Expression in Calu-3 Cells by Interleukin-1 β ", *J. Biol. Chem.*, roč. 276, č. 12, s. 9486–9491, bře. 2001.
- [140] K. Karikó *et al.*, „Incorporation of Pseudouridine Into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector With Increased Translational Capacity and Biological Stability", *Mol. Ther.*, roč. 16, č. 11, s. 1833–1840, lis. 2008.
- [141] J. Jemielity *et al.*, „Novel “anti-reverse” cap analogs with superior translational properties", *RNA*, roč. 9, č. 9, s. 1108–1122, zář. 2003.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka