

# Abstrakt

Cystická fibróza je onemocnění, u kterého dochází k mutaci *CFTR* genu kódujícího stejnojmenný protein, jehož hlavní funkcí je přenos chloridových iontů. K napravení tohoto defektu byla v rámci diplomové práce vybrána genová terapie. Byly syntetizovány dva typy stabilní mRNA obsahující minimálně 200 adeninů na 3' konci, 25 % pseudouridinu, 25 % 5-methylcytidinu a na 5' konci buďto klasickou čepičku (enzymová mRNA) nebo analog čepičky 3'-O-Me-m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G (tzv. ARCA mRNA). Byly použity buněčné linie od zdravých jedinců (NuLi-1) a pacientů trpících cystickou fibrózou s mutací F508del (CuFi-1).

Vizualizace CFTR proteinu pomocí optimalizované metody nepřímé imunofluorescence potvrdila zvýšení exprese CFTR proteinu u obou buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1, a to jak při použití ARCA mRNA tak při použití enzymové mRNA.

Funkčnost CFTR proteinu byla stanovena prostřednictvím fluorescenčního barviva *N*-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxychinolinu (MQAE), kterým byly buněčné linie předem obarveny a které je specificky zhášeno halogenovými ionty. Transport iontů skrze tento kanál byl ověřen použitím CFTR(inh)-172, který specificky tento kanál inhibuje svou vazbou na R doménu. Po 24h transfekci ARCA mRNA buněčné linie CuFi-1 došlo k obnově jeho funkce.

V neposlední řadě byla studována adheze bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, které by se měly díky změně vlastností buněčného povrchu snadněji vázat na buněčnou linii CuFi-1. Po 24h transfekci ARCA mRNA je zřejmé, že u buněčné linie CuFi-1 dochází ke snížení adheze bakterií až na úroveň adheze na buněčnou linii NuLi-1.

Lze tedy shrnout, že uvedené modifikované CFTR-mRNA jsou stabilní a díky jejich transfekci do buněčné linie CuFi-1 s mutací F508del dochází ke zvýšení exprese CFTR proteinu, který je zabudován do membrány a je funkční, neboť skrze něj dochází k transportu iontů. Navíc po transfekci této linie CFTR-mRNA dochází ke snížení bakteriální adheze.

***Klíčová slova***

Cystická fibróza, epiteliální buňky, CFTR protein, mRNA, fluorescenční značení, nepřímá imunofluorescence, MQAE, CFTR(inh)-172, bakteriální adheze, *Pseudomonas aeruginosa*