UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program – BIOCHEMIE

Studijní obor – BIOCHEMIE

KATEŘINA PECKOVÁ

CFTR-mRNA: alternativa pro genovou terapii cystické fibrózy

CFTR-mRNA: alternative for gene therapy of cystic fibrosis

Diplomová práce

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

Praha, 2016

Prohlášení:

„Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod odborným vedením RNDr. Lucie Bořek Dohalské, Ph. D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.“

V Praze dne 1. 8. 2016

Kateřina Pecková

Poděkování:

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

Dále bych ráda poděkovala za spolupráci a rady během experimentální činnosti RNDr. Michaele Moserové, Ph.D., Mgr. Boženě Kubíčkové, Mgr. Lucii Vaškové, Bc. Janu Královi a Anně Ammerové.

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-m7G(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*

Abstract

Cystic fibrosis is a genetic disease caused by mutation of the *CFTR* gene coding homonymous protein, whose main function is transport of chloride ions. In this thesis, gene therapy was used for correction of this defect. Two types of stable mRNA was synthetised – both contained at least 200 adenines on the 3‘ end, 25 % of pseudouridine, 25 % of 5-methylcytidine and classical cap (enzyme mRNA) or cap analogue 3‘-O-Me-m7G(5‘)ppp(5‘)G (ARCA cap) on the 5‘ end. Cell lines isolated from healthy volunteer (NuLi-1) and those from patient suffering from cystic fibrosis with F508del mutation (CuFi-1) were used.

The mRNA transfection efficiency was determined using different methods. Increased expression of the CFTR protein was confirmed by visualization of this protein by optimized immunofluorescence method in both cell lines while using both ARCA mRNA and enzyme mRNA.

CFTR protein function was studied using fluorescent probe *N*-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinoline (MQAE), which is quenched by halogen ions. CFTR channel ion transport was verified using CFTR(inh)-172. This inhibitor specifically inhibits this channel through binding on the R domain of the CFTR protein. CFTR protein function was restored after 24h transfection of the CuFi-1 cell line by ARCA mRNA.

The bacterial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* was the last studied method. The adhesion of *P. aeruginosa* on the CuFi-1 cell line should be higher due to their changed cell surface. After 24h transfection of CuFi-1 cells with ARCA mRNA, the adherence of *P. aeruginosa* strain tested was markedly reduced up to the level of NuLi-1 cells.

In conclusion, the transfection with synthesized CFTR-mRNAs is a promising approach for the gene therapy of CF disorder.

Key words

Cystic fibrosis, epithelial cells, CFTR protein, mRNA, loading of fluorescent probe, indirect immunofluorescence, MQAE, CFTR(inh)-172, bacterial adhesion, *Pseudomonas aeruginosa*

Obsah

Abstrakt ... 4
Abstract ... 6
1. Seznam použitých zkratek ... 10
2. Úvod ... 13
2.1 Cystická fibróza ... 13
2.1.1 Historie onemocnění ... 14
2.1.2 Projevy a příznaky CF ... 15
2.2 Struktura a výskyt CFTR proteinu ... 20
2.2.1 Funkce CFTR proteinu ... 22
2.2.2 Mutace *CFTR* genu ... 24
2.3 Genová terapie CF ... 26
2.3.1 Genová terapie prostřednictvím DNA ... 27
2.3.2 Genová terapie prostřednictvím mRNA ... 34
2.3.3 Další metody genové terapie CF ... 34
3. Cíl práce ... 38
4. Materiál a metody ... 39
4.1 Použité přístroje ... 39
4.2 Použitý materiál ... 40
4.3 Práce s buněčnými liniemi ... 43
4.3.1 Rozmražení buněčných linií ... 44
4.3.2 Subkultivace buněčných linií ... 44
4.3.3 Zamražení buněčných linií ... 45
4.3.4 Stanovení viability a počtu buněk ... 45
4.3.5 Příprava kultivačních lahví potažených kolagenem ... 46
4.4 Syntéza mRNA ... 47
4.5 Transfekce buněčných linií CFTR-mRNA ... 49
4.6 Ověření účinnosti transfekce ... 50
4.6.1 Vizualizace CFTR proteinu transfekovaných buněk ... 50
4.6.2 Studium transportu iontů prostřednictvím CFTR kanálu ... 52

4.6.3 Studium adheze bakterií *Pseudomonas aeruginosa* u plicních buněčných linií....56
5. Výsledky....59
5.1 Studium transfekce buněčných linií CFTR-mRNA....60
5.1.1 Detekce CFTR proteinu....61
5.1.2 Studium transportu iontů prostřednictvím CFTR proteinu transfekovaných buněk....71
5.1.3 Ověření účinnosti transfekce prostřednictvím změny adheze bakterií *Pseudomonas Aeruginosa*....76
6. Diskuze....79
7. Shrnutí....84
8. Literatura....85

1. Seznam použitých zkratek

AAV	Adeno-asociované viry
Ab	Protilátka
ABC	„ATP-binding cassette“
Ad	Adenovirus
AD	„Antibody Diluent“
AMK	Aminokyselina
ARCA	„Anti-reverse cap analog!
ASL	„Airway surface liquid“
ATCC	„American type culture collection“
BSA	Hovězí sérový albumin
cAMP	Cyklický adenosin monofosfát
CAR	„Coaxie virus and adenoviral receptor“
cDNA	Komplementární DNA
CF	Cystická fibróza
CFRD	„Cystic fibrosis related diabetes“
CFTR	„Cystic fibrosis transmembrane regulator“
CFU	„Colony-forming-unit“
CO_2	Oxid uhličitý
CpG	Sekvence cytosin-pyrimidin-guanin
ČR	Česká republika
DABCO	1,4-diazabicyklo-[2,2,2]-oktan
DIDS	„4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid“
DIOS	Distální intestinální obstrukční syndrom
DMEM	„Dulbecco’s modified eagle’s medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	Dvouřetězcová DNA
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ENaC	„Epithelial Na^+ channel“
FBS	Fetální bovinní sérum
FIV	„Feline immunodeficiency virus“
GL	Glykolipid

GP	Glykoprotein
GTA	„Gene transfer agent“
HEPES	„N-2-hydroxyethylpiperazine-N‘-2-ethanesulfonic acid“
HIV	„Human immunodeficiency virus“
HSPC	„Hematopoietic stem and progenitor cells“
ICAM	Intercelulární adhezní molekula
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
IL	Interleukin
ITR	„Inverted terminal repeats“
IVT	*In vitro* transkripce
L-M-MAX	„Lipofectamine™ MessengerMAX™“
LHC	„Laboratory of human carcinogenesis“
LV	Lentivirus
MQAE	„*N*-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium“
mRNA	Messengerová ribonukleová kyselina
MSD	Membránu prostupující doména
NBD	Nukleotid-vázající doména
NF	Nukleární faktor
NK	Nukleová kyselina
NKCC	„$Na^+/K^+/2Cl^-$ cotransporter“
NTP	Nukleosid trifosfát
ORCC	„Outwardly rectifying Cl^- channel“
PBS	„Phosphate buffered saline“
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PKA	Protein kinasa A
PKC	Protein kinasa C
PNA	„Peptide nucleic acid“
Poly(A)	Polyadenylát
Poly-K	Poly-L-lysin
PTM	Pre-terapeutická RNA molekula
rAAV	Rekombinantní AAV

RD	Regulační doména
ROMK	„Renal outer medullary K^+ channel“
RPM	Otáčky za minutu
SAM	A-adenosylmethionin
Sec-R	„Serpin-enzyme complex receptor“
SFHR	„Small fragment homologous replacement“
ssDNA	Jednořetězcová DNA
TB	Trypanová modř
TLR	„Toll-like“ receptor
TM	Transmembránový segment
TNF	Tumor nekrotizující faktor
UV	Ultrafialové záření

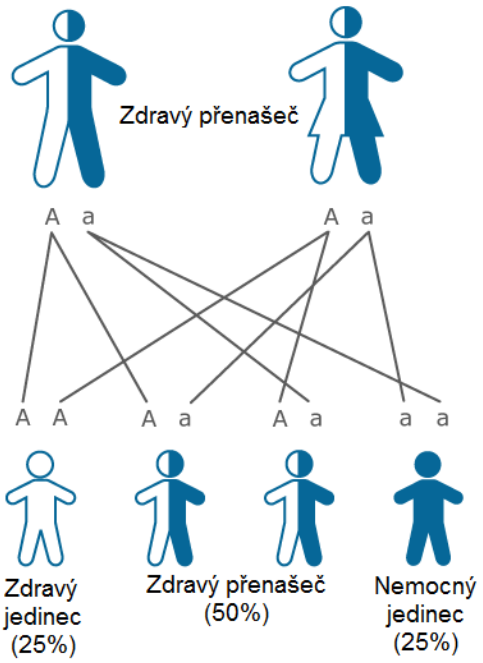
2. Úvod

Cystická fibróza je dědičné onemocnění, které je způsobeno mutací v genu kódujícím CFTR protein (z angl. „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“). Pokud dojde k mutaci daného genu, je ovlivněna produkce, ale i funkce tohoto proteinu na membráně, kterou je transport chloridových iontů přes membránu buňky. Z tohoto důvodu se u takových jedinců následně rozvíjejí vážné zdravotní komplikace. Tato práce se zabývá možnou opravou CFTR proteinu v buňce pomocí genové terapie.

2.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) patří mezi nejčastější geneticky podmíněná onemocnění, v rámci indoevropské populace se ročně udává výskyt jednoho dítěte s CF na 2 500 – 4 500 novorozenců, v neevropských populacích je výskyt výrazně nižší. Od roku 2009 je v České republice zaveden celoplošný novorozenecký screening tohoto onemocnění, díky čemuž byl stanoven jeho výskyt na 1:6330, což odpovídá spíše vzácnému onemocnění. V roce 2014 byl počet registrovaných pacientů v ČR přes 580 [1, 2, 3].

Toto onemocnění je způsobeno mutací pouze v jediném genu, je tedy monogenní. Jedná se o autozomálně recesivní typ dědičnosti, tato dědičnost je znázorněna na obrázku č. 2.1 na straně 14. CF nastává, pokud pacient, homozygot, od každého z rodičů, kteří jsou heterozygoty, získá alelu s danou mutací způsobující toto onemocnění. Mutace se může vyskytovat pouze na autosomech somatických buněk, tedy na jejich nepohlavních chromosomech. Pravděpodobnost, že se CF u novorozence objeví, je 1:3. Přibližně každý 27. člověk v ČR je zdravým přenašečem mutace v CFTR genu [1, 3, 4].



Obrázek č. 2.1: *Dědičnost CF – autozomálně recesivní typ dědičnosti.* Při křížení dvou zdravých jedinců, kteří jsou přenašeči nemoci a každý z nich má jednu normální a jednu mutovanou alelu, bude potomek buď zdravý (25% pravděpodobnost), nemocný CF (25% pravděpodobnost) nebo bude opět zdravým přenašečem nemoci (50% pravděpodobnost) [1, 4]. Převzato a upraveno z [5].

2.1.1 Historie onemocnění

První příznaky CF byly popisovány již ve středověku, a to zejména slaná chuť potu dětí. V roce 1595 sepsal P. Pauw první zprávu o jedenáctileté dívce s těžkými patologickými změnami pankreatu. Dalšími zmínkami, které mohou být spojovány s CF, jsou pak např. steatorea, mekoniový ileus a bronchopneumonie. V roce 1938 byly poprvé přesně definovány příznaky D. Andersonovou, která toto onemocnění nazvala cystickou fibrózou pankreatu. V tomto roce byla CF také poprvé rozpoznána u dítěte, které se dožilo 11 let – v této době většina dětí s tímto onemocněním umírala během prvního roku života [1, 6].

Po skončení druhé světové války se více objevují zmínky o pacientech s onemocněním plic, průjmy a pankreatickou insuficiencí, a proto S. Farber zavedl označení „mukoviscidosa“, aby upozornil na to, že se nejedná pouze o onemocnění slinivky, ale i dalších orgánů s tvorbou hustého hlenu. Během dalších let P. Di Sant‘

Agnese zjistil, že pacienti mohou mít při tomto onemocnění i normální exokrinní funkci slinivky. Mimo to také zjistil, že děti s CF jsou náchylní na horké podnebí, ve kterém mohou upadat do teplotního šoku a být těžce dehydratované. Proto začal studovat jejich pot, ve kterém se vyskytuje mnohem více soli, než u zdravých jedinců, což mělo velký význam pro diagnostiku tohoto onemocnění. Vznikl díky tomu potní test, neboli pilokarpinová ionoforéza, při které dochází ke stimulaci potních žláz a ke stanovení množství chloridů v potu. Díky zlepšujícím se znalostem týkajících se CF dochází během let k postupnému prodlužování života pacientů. Dnes se pacienti s CF dožívají i více než 35 let [1, 7, 8].

Prof. M. Quinton, který sám trpěl CF, objevil, že permeabilita buněčných membrán pro chloridové ionty je při tomto onemocnění defektní, což byl další zásadní krok ve výzkumu CF. Gen kódující CFTR protein byl lokalizován roku 1987 a v roce 1989 identifikován [1, 9–12].

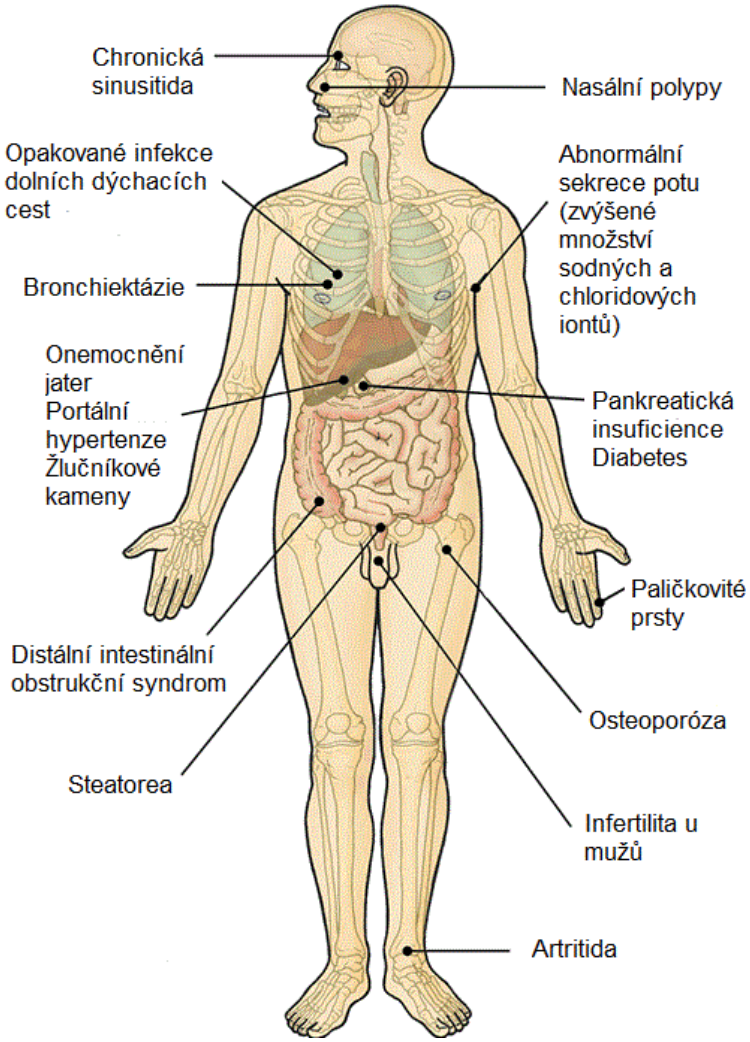
2.1.2 Projevy a příznaky CF

CF je multiorgánové onemocnění, při kterém jsou postiženy zejména dýchací cesty a pankreas, dále pak gastrointestinální trakt, pohlavní žlázy a další orgány. V těchto orgánech často dochází k tvorbě hustého hlenu, který zhoršuje jejich funkci. Nejčastější příčinou smrti je kardiovaskulární a respirační selhání spolu s poškozením plic [1, 2, 13]. Projevy typické pro CF jsou zobrazeny na obrázku č. 2.2 na straně 16.

Téměř všichni pacienti mají slanou chuť potu, dochází k vylučování zvýšeného množství chloridů a sodných iontů a to až 5x více než u zdravých jedinců. S věkem se koncentrace chloridů v potu zvyšuje, na kůži pacientů se mohou tvořit i krystalky soli. Pokud je koncentrace u dítěte vyšší než 60 mmol/l, u dospělého 70 mmol/l, jedná se s velkou pravděpodobností o CF. Pokud je koncentrace nižší, přibližně 40 – 60 mmol/l, může se jednat o mírnou formu CF, tedy tzv. mírnou mutaci genu CFTR [1, 2, 9, 13, 14].

U novorozenců je nejčastějším projevem mekoniový ileus. Mekonium, neboli smolka, je první obsah střev novorozence. Je tvořeno hlenem, který je u novorozenců s CF velmi hustý. Může tak dojít k ucpání dolní části tenkého střeva, mekonium

nemůže být vyloučeno, dítě zvrací a velmi rychle se zhoršuje jeho stav. Dalšími projevy bývají déle trvající novorozenecká protrahovaná žloutenka vyvolaná cholestázou a malnutrice jedince [1, 2, 13].

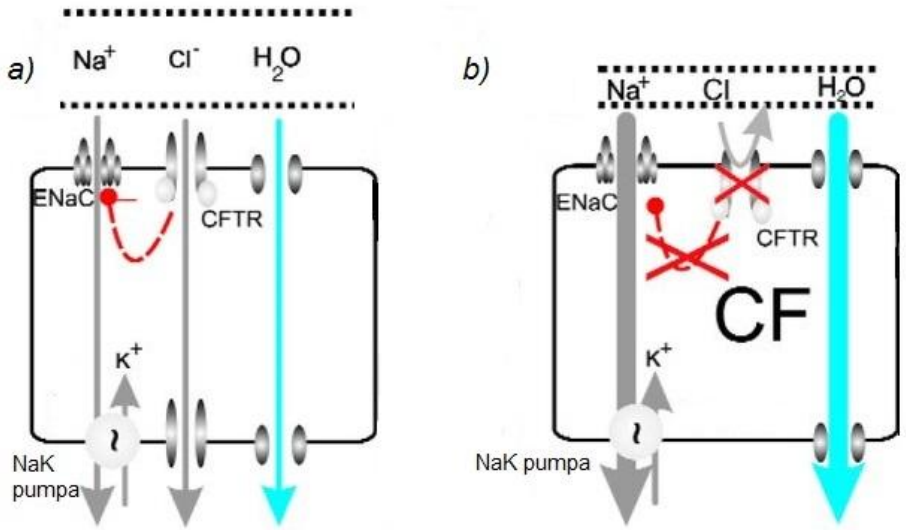


Obrázek č. 2.2: *Typické projevy související s CF*. Převzato a upraveno z [15].

2.1.2.1 CF a dýchací cesty

Nejzávažnějším projevem CF je postižení plic a dýchacího ústrojí, což je i nejčastější příčinou úmrtí (asi 90 % pacientů). Nejčastěji se vyskytují výrůstky – nosní polypy, sinusitidy (záněty vedlejších nosních dutin), záněty průdušek nebo plic. Na povrchu horních a dolních dýchacích cest se vyskytuje tzv. povrchová plicní tekutina (ASL, z angl. airway surface liquid“), která se při CF zásadně mění. Absence CFTR proteinu způsobuje hyperabsorpci Na^+ iontů skrze kanál ENaC (viz níže), a tím i vody

z ASL do buněk. Tím se snižuje množství ASL, která slouží zejména jako mechanická ochrana plic před nečistotami. Dochází tak ke zhoršení mukociliární clearance, neboli odstraňování nečistot hlenem směrem ven z těla, a endogenní antimikrobiální funkce ASL. Vytváří se zde velmi hustý hlen, který se na sliznici hromadí a zabraňuje pohybu řasinek, které mají na starost prvotní obranu dýchacích cest. Bakterie se zde z tohoto důvodu snáz usazují, dochází k infekci a následnému zánětu. Rozdíl zdravých a CF plic je znázorněn na obrázku č. 2.3 [1, 2, 6, 13, 16–9].



Obrázek č. 2.3: *Rozdíl složení a objemu povrchové plicní tekutiny (ASL) ve zdravých a CF plicích*. a) U zdravého člověka dochází k normálnímu transportu Na^+ a Cl^- iontů – CFTR kanál redukuje funkci ENaC kanálu. b) U pacienta s CF je CFTR kanál nefunkční a funkce ENaC kanálu je tak zvýšená – dochází k hyperabsorpci Na^+ iontů a vody z ASL, díky čemuž je její objem redukován. ENaC – epiteliální Na^+ kanál. Převzato a upraveno podle [20].

2.1.2.2 Imunitní systém a infekce dýchacích cest u pacientů s CF

Při CF je obrana imunitního systému nedostatečná, je omezena fagocytóza a účinnost defensinů je snížena. Je zvýšena produkce prozánětlivých cytokinů, jako jsou např. interleukiny IL-1, IL-6, IL-8 nebo tumor nekrotizující faktor TNF-α, což je způsobeno zvýšenou aktivitou transkripčního nukleárního faktoru NF-B. Naopak produkce protizánětlivých cytokinů, zejména IL-10, je snížena. Dochází ke zvýšení množství neutrofilů v dýchacích cestách, ty pak produkují nadměrné množství prozánětlivých faktorů (IL-8, leukotrieny) a kyslíkových radikálů a je u nich potlačena

apoptóza. Mimo to dochází k nadprodukci prozánětlivého faktoru ICAM-1, který přispívá k perzistenci zánětu. Produkty leukocytů ničí stěny dýchacích cest a přispívají ke vzniku bronchiektázií (výdutě na průduškách). Z odumřelých leukocytů se také uvolňuje jejich DNA, která zapříčiňuje další zahuštění hlenu. Vlivem zánětu a hlenu dochází k zúžení dýchacích cest, což může vést až k jejich obstrukci, může nastat i fibrotizace plicního parenchymu [21–25].

Při infekci dýchacích cest nejprve dochází k napadení virem, který naruší dýchací sliznice, díky čemuž se zde snadněji usazují bakterie. Nejrozšířenější mikroby typické pro CF jsou *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* a *Pseudomonas aeruginosa,* méně pak *Burkholderia cepacia*. Mimo to se u starších pacientů vyskytují i fungi *Aspergillus fumigatus* nebo *Candida albicans*. Jako první bakterie se u mladých pacientů objevuje *S. aureus* a *H. influenzae,* která je nejčastější bakterií vyskytující se v dolních dýchacích cestách. *P. aeruginosa* se objevuje až v pozdějším věku. U pacientů s CF, na rozdíl od zdravých jedinců, způsobuje závažné infekce s poruchou imunity. Chronická infekce touto bakterií způsobuje zhoršení funkce plic a poškození dýchacích cest s rozvojem bronchiektázií. *B. cepacia* je pravděpodobně nejnebezpečnější bakterií u pacientů s CF, zdravé jedince nepostihuje. Je rezistentní na antibiotika a velmi špatně se diagnostikuje. Může způsobit rapidní zhoršení stavu s příznaky otravy krve a poškození dýchacích cest, které je závažnější než to způsobené bakterií *P. aeruginosa* [1, 2, 6, 13, 16, 21, 22, 24].

Respirační epithelium je pokryto kontinuálním filmem, tzv. mukus, který u zdravých jedinců slouží jako prvotní obrana proti infekcím. U pacientů trpících CF je jeho složení a objem změněn, a tak je usnadněna adheze bakterií na epiteliální buňky. Při bakteriální adhezi dochází k vazbě povrchových struktur mikroorganismů a proteinů nebo sacharidů na povrchu plazmatické membrány buněk. V submukózních žlázách průdušek jsou produkovány glykoproteiny muciny, které slouží jako receptory, na které se bakterie vážou prostřednictvím adhezinů, především lektinů. U pacientů trpících CF dochází k abnormální glykosylaci (změna sulfatace, fukosylace, sializace) sekretovaných a v membráně vázaných mucinů, a tím ke zvýšení bakteriální adheze. *P. aeruginosa* a další patogeny obsahují specifické glykosidasy, které jsou

schopné změnit glykosylaci mucinů hostitelských buněk a následně se na ně snadněji navázat [26–28].

Bakterie Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa patří mezi gram-negativní tyčinkovité bakterie dlouhé 1,5 – 3 μm, které způsobují nemoci u rostlin i zvířat. Tato všudypřítomná aerobní bakterie je rezistentní k většině antibiotik a vyskytuje se u mnoha závažných onemocnění, jako je např. pneumonie, zánět močových cest a středního ucha, popáleniny, autoimunitní onemocnění nebo CF. Mimo to je schopná tvořit biofilm, díky kterému je chráněna před fagocyty a antibiotiky. Jako virulenční faktor používá exotoxin A, který inaktivuje eukaryotický elongační faktor 2, díky čemuž nedochází k proteosyntéze. Uvnitř těla se vyskytuje v anaerobních podmínkách – syntetizuje vyšší množství alginátu a mění strukturu své vnější membrány, čímž se stává ještě více rezistentní. Produkuje také vyšší množství extracelulárních proteas, které ničí okolní tkáně, a 2 pigmenty – fluorescenční pyoverdin a modrý pyocyanin [27, 29–31].

2.1.2.3 CF a trávicí ústrojí

Kromě dýchacícho ústrojí bývá ovlivněno i trávicí ústrojí, zejména pankreas, střeva, játra a žlučník. S těmito problémy také často souvisí neprospívání, hypoproteinémie a deficit vitaminů. U pacientů s CF často dochází k gastroezofageálnímu refluxu, kdy není dostatečně sevřen svěrač mezi jícnem a žaludkem, což způsobuje návrat obsahu žaludku – tzv. pálení žáhy. Velmi často je porušeno trávení vlivem pankreatické insuficience, kdy nejsou vylučovány enzymy (trypsin, lipasa, amylasa) a bikarbonát kvůli výskytu hlenu ve vývodech pankreatu. Nedostatečnost může být způsobena poruchou zevní sekrece pankreatu, pankreatitidou nebo diabetem souvisejícím s CF (CFRD – z angl. „cystic fibrosis related diabetes“), kdy je postupně snižována produkce inzulinu. Insuficience se může objevit až v pozdějším věku, u lehčích mutací bývá zevní sekrece pankreatu zachována. S CF také souvisí výskyt distálního intestinálního obstrukčního syndromu (DIOS), při kterém nastává ucpání střeva hustým hlenem. Prolaps rekta a steatorea se mohou objevit už u kojenců a batolat. Stolice je častá, zapáchá a dochází k vylučování většího množství lipidů z důvodu jejich špatného nebo nedostatečného vstřebávání.

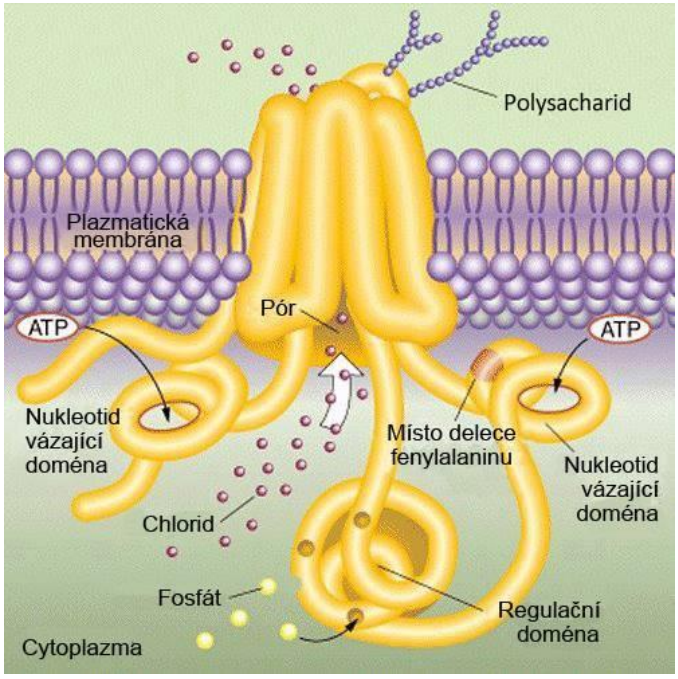
Jak už bylo zmíněno, u novorozenců se často objevuje mekoniový ileus, při kterém může dojít k ucpání střev novorozence. Toto postižení je třeba řešit velmi rychle, nejčastěji operativně. Další poruchou trávicího ústrojí může být postižení jater a žlučových cest, mohou se objevovat i žlučníkové kameny (10 – 20 % nemocných). Ve žlučovodech je žluč více zahušťována, což vede k zánětu jaterních buněk a k tvorbě vaziva, následně může dojít až k cirrhóze [1, 2, 13].

2.1.2.4 Další postižené orgány

U 98 % mužů se projevuje infertilita, která je způsobena obstruktivní azoospermií, kdy chybí vývody nadvarlat. U žen může být plodnost vlivem výskytu hustého hlenu v pohlavních cestách snížena. U pacientů s CF se také mimo jiné může rozvíjet osteoporóza a artritida. Typickým projevem CF jsou také paličkovité prsty. Pacient má zaoblenější nehty (tvar hodinového sklíčka) a klouby, což pravděpodobně souvisí s nedostatečným okysličováním krve [1, 2, 6, 13, 32–34].

2.2 Struktura a výskyt CFTR proteinu

Jak již bylo řečeno, CF je způsobena mutací v *CFTR* genu, který kóduje stejnojmenný protein. Volně by se název dal přeložit jako regulátor transmembránové vodivosti iontů. Gen je uložen na dlouhém raménku 7. chromozomu (konkrétně 7q31.2) a skládá se z 27 exonů. Výsledný protein je složen z 1480 aminokyselin a molekulová hmotnost plně maturovaného proteinu je přibližně 170 kDa [1, 6, 35]. Struktura CFTR proteinu je znázorněna na obrázku č. 2.4 na straně 21.

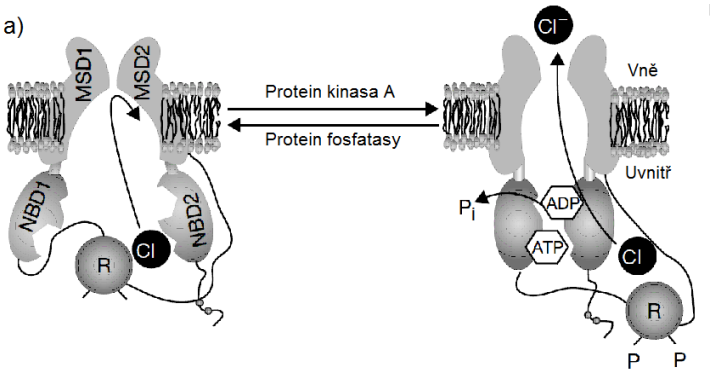


Obrázek č. 2.4: *Schéma CFTR proteinu* [36].

Vyskytuje se na apikální straně plazmatické membrány epiteliálních buněk, např. dýchacích cest, pankreatu nebo střev. U buněk potních žláz se vyskytuje i na basolaterální straně. Mimo to se nachází i u orgánů, které nepatří mezi epiteliální, jako jsou např. buňky srdce, mozku, jater a ledvin [1, 35, 37, 38]. Obsahuje 5 domén – 2 membránu prostupující domény (MSD1 a MSD2 – z angl. „membrane-spanning domain“), každá je složena z šesti transmembránových segmentů (TM1 – TM12 – z angl. „transmembrane segment“) tvořících kanál pro transport iontů, 2 nukleotid vázající domény (NBD1 a NBD2 – z angl. „nucleotide-binding domain“), které jsou schopné hydrolyzovat ATP, a 1 regulační doménu (RD – z angl. „regulatory domain“), která obsahuje několik fosforylačních míst. RD a obě NBD se nacházejí v cytoplazmě buňky. CFTR protein je součástí ATP-vázajících transportních proteinů (ABC – z angl. „ATP-binding cassette“), je označován jako ABCC7, které využívají ATP pro transport daného substrátu přes membránu [1, 6, 35, 39–41].

Pro aktivaci kanálu je klíčová fosforylace serinových zbytků na RD prostřednictvím protein kinasy A (PKA), která je regulována koncentrací cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) v buňce [6, 39, 42, 43–45]. Fosforylace může být zprostředkována i jinými kinasami, např. protein kinasou C (PKC) a tyrosin kinasami

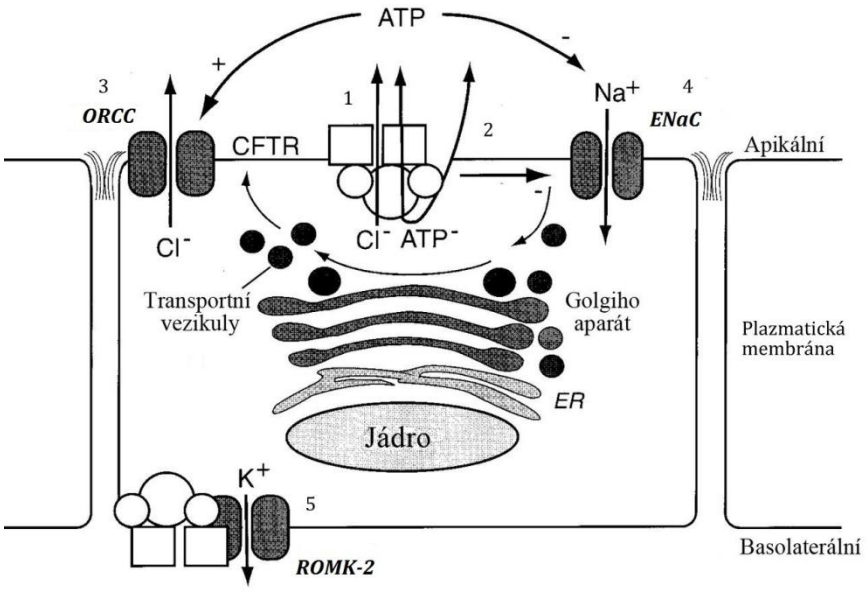
Src [38]. Zároveň je nutná hydrolýza ATP doménami NBD. Následně dochází k dimerizaci NBD domén, posunu regulační domény a tím k otevření kanálu pro průchod chloridů podle elektrochemického gradientu [6, 40, 44–46]. Popsané procesy jsou znázorněny na obrázku č. 2.5.



Obrázek č. 2.5: *Schéma otevírání CFTR kanálu. a)* Pro otevření kanálu je nutná fosforylace regulační domény a zároveň hydrolýza ATP prostřednictvím domén NBD, které následně dimerizují. Dochází k posunu R domény a otevření kanálu pro průchod chloridových iontů. Převzato a upraveno z [6]. R – regulační doména, NBD – nukleotid-vázající doména, MSD – membránu prostupující doména, Pi – anorganický fosfát, R-P – fosforylovaná regulační doména.

2.2.1 Funkce CFTR proteinu

CFTR protein hraje velmi důležitou roli v transepiteliálním transportu tekutin a transportu elektrolytů – funguje jako iontový kanál a zároveň ovlivňuje funkci dalších iontových kanálů a transportérů na membráně epiteliálních buněk. Jeho hlavní funkcí je přenos chloridových iontů přes membránu. U potních žláz stimuluje reabsorpci solí, zatímco u intestinálních, pankreatických a respiračních epiteliálních buněk stimuluje sekreci chloridů (Cl^-) a hydrogenuhličitanových iontů (HCO_3^-). Mimo to je schopen transportovat také glutathion a ATP [6, 35, 37, 38, 47]. Zmíněné procesy jsou zobrazeny na obrázku č. 2.6 na straně 23. Mezi další funkce tohoto proteinu patří regulace aktivity akvaporinů, které ovlivňují transport vody skrze membránu buněk, regulace intracelulárního pH, zánětlivé odpovědi nebo apoptózy [35, 37, 42, 47, 48].



Obrázek č. 2.6: *Schéma multifunkčnosti CFTR proteinu*. (1) Přenos chloridů, (2) usnadnění přenosu ATP do extracelulárního prostoru, (3, 4, 5) ovlivnění kanálů ENaC, ORCC, ROMK-2. ENaC – epiteliální Na^+ kanál, ER – endoplazmatické retikulum, ORCC – kanál přenášející Cl^- z buňky, ROMK-2 – renální kanál nevyskytující se v dřeni ledvin a přenášející K^+ ionty. Převzato a upraveno z [47].

Mezi kanály, které CFTR protein ovlivňuje, patří zejména epiteliální kanál ENaC (z angl. „epithelial Na^+ channel“), kanál ROMK (z angl. „renal outer medullary K^+ channel“) a kanál ORCC (z angl. „outwardly rectifying Cl^- channel“). Transport sodných a chloridových iontů spolu silně souvisí, a proto je první zmíněný kanál velice důležitý pro vyrovnání elektrochemického potenciálu – CFTR protein inhibuje funkci ENaC kanálu, který transportuje Na^+ ionty do buňky. ROMK kanál má několik izoforem vyskytujících se jak v ledvinách, tak v plicích. Vyskytuje se na basolaterální straně membrány a podílí se na homeostázi K^+ iontů, které sekretuje z buňky ven. Hraje také významnou roli v udržování rovnováhy mezi Cl^- a Na^+ ionty v dýchacích cestách. Prostřednictvím kanálu ORCC dochází k sekreci Cl^- iontů z buňky. Tento kanál je stimulován cAMP-dependentní PKA a PKC, regulace kinasami závisí na extracelulární koncentraci ATP, která je zajišťována právě CFTR proteinem, jenž transportuje ATP z buňky ven [6, 47].

Pohyb chloridů skrze CFTR kanál probíhá pouze díky elektrochemickému potenciálu, který závisí na absorpci Na^+ iontů přes kanál ENaC. Chloridové ionty jsou

nejprve transportovány přes basolaterální membránu výměnou za HCO_3^- ionty nebo kotransportem, který zprostředkovává protein NKCC1 („$Na^+/K^+/2Cl^-$ cotransporter“) – 2 ionty Cl^- jsou vyměněny za Na^+ a K^+ ion. Chloridy jsou následně sekretovány z buňky ven přes apikální membránu skrze CFTR kanál nebo kanál, který je závislý na intracelulární koncentraci vápenatých iontů („Ca^{2+}-dependent channel“) [43, 48].

2.2.2 Mutace *CFTR* genu

Jak již bylo řečeno, CF je způsobena mutací v genu *CFTR*, který je za normálních okolností exprimován na CFTR protein a transportován na membránu, kde slouží jako kanál pro přenos chloridů. Pokud však dojde k mutaci zmíněného genu, je ovlivněna produkce, aktivita i stabilita proteinu, který může být v membráně méně funkční nebo i zcela nefunkční [35, 42, 43]. Zároveň je protein CFTR u pacientů s CF exprimován v menší míře než u zdravých jedinců [21].

V současnosti je identifikováno více než 2000 mutací *CFTR* genu, podle databáze *www.genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage*. Nejčastější příčinou mutací bývá záměna aminokyselin (42%), dále může být vložen jeden nebo několik nukleotidů do původní sekvence (23%), čímž nastane změna čtecího rámce. Může také dojít k vytvoření stop kodonu z původního kodonu dané aminokyseliny (17%) nebo k abnormálnímu sestřihu exonů (12%). Nejméně pak dochází k vynechání nebo k přidání násobku 3 párů bazí DNA, při které ale nedochází ke změně čtecího rámce (6%). Mutace jsou nejčastěji lokalizovány v první polovině proteinu, zejména v MSD1 a NBD1, zatímco např. na R doméně se téměř nevyskytují [1, 6].

2.2.2.1 Třídy mutací genu CFTR

Mutace *CFTR* genu se obecně dělí na těžké (I., II., III. třída) a lehké (IV., V. třída) podle funkční aktivity v *in vitro* buněčných modelech. Existuje 5 základních tříd mutací rozdělených podle efektu, který mají na syntézu a funkci CFTR proteinu. Rozdělení do těchto tříd je shrnuto v tabulce č. 2.1 na straně 26. Později byly třídy rozšířeny o další dvě (snížená tvorba plně funkčního proteinu a snížení funkce

ostatních iontových kanálů), které jsou ale považovány za nadstavbové [1, 6, 21, 25, 49, 50].

Třída I

Produkce CFTR proteinu je snížena nebo je zcela defektní. Vzniká nefunkční nebo špatně sbalený protein, který není dopraven na membránu. Nejčastěji dochází k vytvoření stop kodonu z původního kodonu aminokyseliny, a tedy k dřívějšímu ukončení přepisu [6, 50, 51].

Třída II

Dochází ke špatnému zpracování proteinu během jeho sbalování. Mutace mohou být nalezeny v kterékoli doméně CFTR proteinu. Protein je nadměrně glykosylován, tudíž špatně sbalen, zadržen v endoplazmatickém retikulu, translokován do cytoplasmy, označen ubikvitinem a degradován v proteazomu [6, 50].

Třída III

Tyto mutace se často vyskytují v ATP-vázajících doménách (NBDs) a jedná se o mutace související s otevíráním kanálu. Protein je dopraven na membránu v normálním množství, avšak není regulován prostřednictvím proteinkinasy A, respektive ATP/cAMP, a nedochází k přenosu chloridů přes membránu [6, 50, 52].

Třída IV

Tyto mírnější mutace se většinou nacházejí v MSD, které tvoří pór kanálu. Protein je dopraven na membránu v normálním množství, zajišťuje cAMP-dependentní přenos chloridů přes membránu, avšak se sníženou vodivostí. Uvnitř kanálu totiž chybí záporně nabité aminokyseliny a ionty proto interagují s kladně nabitým proteinem [6, 50, 53].

Třída V

U poslední skupiny mutací, které se také řadí mezi mírné, je snížené množství funkčního proteinu CFTR v membráně. Většinou je ovlivněn pre-mRNA sestřih, kdy je celkově nebo částečně vystřižen exon a C-konec proteinu je nestabilní. V jiném případě je zachována produkce normální mRNA, avšak v menší míře[6, 50].

Tabulka č. 2.1: *Klasifikace mutací CFTR proteinu* [1, 6, 42, 49].

Třída mutace	Příklady mutací	Změny oproti správně fungujícímu proteinu
I	G542X, R553X, W1282X	Defektní syntéza proteinu.
II	**F508del**, N1303K	Defektní sbalení proteinu.
III	G178R, G551D, G551S	Defektní regulace proteinu.
IV	G314E, R117H, R334W	Snížený přenos chloridů přes membránu.
V	3849+10 kb C→T, 3272-26 kb A→G	Snížené množství proteinu na membráně.

Nejčastější a vůbec první odhalenou mutací genu *CFTR* je delece 3 bazí v 10. exonu, která způsobuje ztrátu fenylalaninu v pozici 508, konkrétně na NBD1. Doména je špatně sbalena a energeticky a kineticky nestabilní. Tato mutace je označována jako F508del, nebo také ΔF508, a nachází se přibližně u 70% pacientů trpících CF, a to jak celosvětově, tak v České republice. Protein není dopraven na membránu – je špatně sbalen a zadržen v endoplasmatickém retikulu a posléze je degradován v proteazomu [2, 21, 36, 38, 42, 43, 50, 54]. V České republice se ve vyšší míře vyskytují ještě mutace typu G551D a CFTRdel21kb. Ostatní mutace jsou spíše vzácné a jen některé byly identifikovány u více než 100 pacientů. Tyto vzácné mutace mají však vysokou incidenci u izolovaných populací [6, 55].

2.3 Genová terapie CF

Cílem genové terapie CF je izolovat CFTR gen, dopravit ho v dostatečném množství do postižených buněk a využít genovou transfekci pro jeho expresi v cílových buňkách tak, aby u výsledného proteinu byla zachována jeho normální funkce. Exprese CFTR komplementární DNA (cDNA) může být sledována molekulárními nebo elektrofyziologickými technikami. Nejčastěji postiženým orgánem u CF jsou dýchací cesty, a proto se genová terapie zaměřuje právě na epiteliální buňky tohoto orgánu. Výhodou je, že případně vyvinutá léčiva mohou být podávána inhalačně [56–61].

Po identifikaci CFTR genu se zdála CF jako ideální onemocnění, které by se dalo léčit genovou terapií – mutace je pouze v jediném genu a plíce jsou snadno přístupné. Avšak žádné klinické studie zatím neprokázaly úplné napravení defektů této nemoci [56–61].

2.3.1 Genová terapie prostřednictvím DNA

V případě genové terapie pomocí DNA je pro transfekci epiteliálních buněk využívána synteticky připravená CFTR cDNA, která je uvnitř buňky dopravena do jádra. Při použití „holé“ cirkulární plazmidové DNA bylo dosaženo pouze nízkého stupně transfekce, v plicích je neúčinná a zároveň je uvnitř buňky degradována endonukleasami. Proto se začaly využívat nosiče (GTA, z angl. „gene transfer agents“) virové i nevirové povahy [56–61].

Takové nosiče musí být schopné pojmout DNA, která obsahuje opravený gen a regulační elementy, a musí být cíleny do respiračních epiteliálních buněk. Mimo to je nutné, aby exprese opraveného proteinu trvala po celý život pacienta. To může být zajištěno vybráním takového nosiče, u kterého je možné opakované podání, nebo transfekcí kmenových buněk, což je ale velice obtížné a náročné [56–61].

2.3.1.1 Virové genové nosiče

První volbou genové terapie pro přenos požadovaného genu do cílových buněk byly virové nosiče. Mají tu schopnost, že snadno infikují dýchací cesty, pronikají do buněk a exprimují v nich svou genetickou informaci. Jako první byly použity adenoviry (Ad) a adeno-asociované viry (AAV), jejichž receptory se však vyskytují na basolaterální membráně a proto nemohou být použity *in vivo*. Z tohoto důvodu byly jejich povrchy modifikovány, aby byl možný kontakt s apikální membránou. Také byly použity jiné sérotypy viru [57–59, 61, 62].

Obě formy vektorů však vyvolávají odpovědi imunitního systému, zánět nebo cytotoxicitu, což může vést k anafylaktickému šoku až smrti pacienta. Nevýhodou

AAV je také neschopnost pojmout velkou CFTR cDNA. Proto byly využity např. dva různé vektory, které byly spojeny až *in vivo* [57–59, 61, 62].

Adenovirální vektory

Adenovirus (Ad) je neobalený dsDNA virus s genomem o velikosti přibližně 40 kb. Virální kapsida nejprve interaguje s CAR receptorem (z angl. „Coaxie virus and adenoviral receptor“) a následně i s integrinovými koreceptory. Po vstupu do buňky uniká endosomu a vstupuje do jádra prostřednictvím mikrotubulů, resp. nukleárních pórů, kterými dovnitř vpravuje svůj genom. Tento virus napadá široké spektrum buněk včetně respiračních epiteliálních buněk, makrofágů, hepatocytů nebo gliových buněk. Způsobuje infekce dýchacích cest, jater, ledvin a močových cest [57, 58, 61– 64].

U první generace Ad vektorů došlo k deleci určité části genomu, díky čemuž došlo ke snížení množství proteinů na membráně a zároveň ke snadnějšímu sbalení vektoru. Bohužel nebylo tento vektor možné použít plicní cestou. Jedním z důvodů byla, jak již bylo řečeno, přítomnost Ad-receptoru na basolaterální straně respiračních epiteliálních buněk. Mimo to vektor způsobil reakce imunitního systému, zánět a cytotoxicitu. Proto byla vyvinuta druhá generace Ad vektorů, u kterých došlo k deleci dalších částí genomu, aby byla snížena toxicita. Exprese CFTR byla ale pouze dočasná (30 – 45 dní) a stále docházelo k humorální i adaptivní reakci imunitního systému pacientů. Další modifikace Ad vektorů vedly ke zvýšení exprese, která byla zároveň dlouhotrvající (15 týdnů), a snížení toxicity delecí všech virových proteinů. Pro průnik Ad skrze basolaterální membránu byl připojen k molekule lysofosfatidylcholin, který způsobil narušení těsných spojů mezi buňkami a zároveň dopravení vektoru na dané místo. Transfekce však byla nízká a kvůli narušení těsných spojů hrozil průnik patogenů na basolaterální membránu buněk. Zároveň byla stále zvýšená adaptivní humorální odpověď imunitního systému. Z toho důvodu byl následně Ad vektor stericky obalen polyethylenglykolem (PEG), což snížilo imunitní odpověď protilátek a T-buněk [57, 58, 62–64].

AAV vektory

Adeno-asociované viry (AAV) jsou malé neobalené ssDNA viry, které patří k rodině *Parvoviridae* o velikosti genomu 4,7 kb s pozitivní i negativní polaritou vlákna DNA. Vektor je složen z promotoru transgenu s polyadenylačním signálem obklopeným sekvencemi ITR (z angl. „inverted terminal repeats“) a ze separovaného plasmidu obsahujícího AAV a pomocné virové proteiny. Rekombinantní AAV (rAAV) je možno použít pro transfekci nedělících se buněk (např. bronchiální epiteliální buňky), nezpůsobuje toxicitu ani není patogenní. AAV se mohou dělit na několik sérotypů (AAV1, AAV2, ...), které se liší svými antigenními vlastnostmi. Při použití AAV2 je nevýhodou, že množství receptorů na apikální membráně je malé a detekce mRNA je nízká. Opět dochází k adaptivní odpovědi imunitního systému. Při modifikaci povrchu pomocí PEG je zvýšena účinnost AAV2 a je možné opakované dávkování. Při použití AAV1 je vektor účinněji dopraven do epiteliálních buněk. AAV6 a AAV9 lépe pronikají do dýchacích epiteliálních buněk. Speciálně upravený vektor (AAV5-CB-Δ264CFTR), u kterého byl zkrácen úsek genomu kódující TM doménu a použit silný hybridní slepičí beta-aktinový promotor, vykazuje vysokou míru exprese a zlepšení průchodnosti chloridových iontů skrze kanál. AAV čekají klinické testy, avšak lze dopředu usuzovat, že terapeutické účinky budou pouze dočasné [56–58, 61–63, 65].

Další virové nosiče

Lentiviry (LV) odvozené od HIV typu 1 (z angl. „human immunodeficiency virus) a FIV (z angl. „feline immunodeficiency virus“) by mohly být využity pro genovou terapii CF díky své schopnosti integrace do nedělících se buněk. Zároveň mají delší dobu exprese, pokud je použit například obalový glykoprotein GP-64 viru chřipky. Mimo to je možné opakované podávání. Avšak existují obavy z jejich možné rekombinace [56, 58, 61, 63, 65, 66].

Respirační viry, jako např. Sendai virus, respirační syncytiální virus nebo lidský parainfluenza virus, jsou velmi účinné, co se týče transfekce epiteliálních buněk dýchacích cest – dochází k vazbě na kyselinu sialovou a cholesterol, které jsou přítomné na apikální straně plazmatické membrány. Tyto viry se replikují

v cytoplazmě, a tak nehrozí inzerční mutageneze, tedy inzerce určité sekvence viru do genu hostitele. Je ale třeba stanovit, jestli je možné opakované dávkování [56, 58, 61, 63, 65, 66].

2.3.1.2 Nevirové genové nosiče

Aby se předešlo problémům a obavám spojeným s virovými vektory, byly vyvinuty vektory nevirové povahy. Byly vytvořeny komplexy DNA s lipidy (lipoplexy) nebo s molekulárními konjugáty (polyplexy). Oproti virovým vektorům jsou však méně účinné a způsobují cytotoxickou odpověď imunitního systému [56–58, 61–63].

Kationtové liposomy

Tyto nevirové vektory se skládají z kationtových lipidů, které jsou doplněny o cholesterol a dioleoylfosfatidylethanolamin. S DNA interagují prostřednictvím elektrostatických interakcí a tvoří pozitivně nabité lipoplexy o velikosti v průměru 100 – 500 nm, které účinně fúzují s membránou a prostupují do buněk. Jejich výhodou je, že v buňce nepodléhají nukleasové degradaci a nezáleží na velikosti dopravované DNA na rozdíl od virových vektorů. Nevýhodou je naopak nízká účinnost v nedělících se buňkách epitelu a pomalá disociace lipidů z DNA, která brzdí transkripci.

Byl však připraven glykolipid GL-67, díky němuž dochází až k stonásobně vyšší expresi DNA oproti ostatním používaným liposomům. Avšak bylo prokázáno, že tento lipid způsobuje *in vivo* cytotoxickou odpověď, infiltraci plic neutrofily a zvýšení množství prozánětlivých cytokinů. Cytotoxická odpověď je spojena s bakteriálními nemethylovanými sekvencemi cytosin-pyrimidin-guanin (CpG), které jsou přítomny v plazmidech DNA. Reakci lze zabránit odstraněním neesenciálních CpG sekvencí nebo inhibicí jejich signalizační dráhy. Methylace CpG může snížit zánětlivou odpověď, avšak snižuje i expresi daného genu [57, 58, 61, 62, 67].

Kationtové polymery

Poslední skupinou transfekčních nosičů používaných pro genovou terapii CF jsou kationtové polymery, jako např. dendrimery obsahující poly-L-lysin (poly-K), polyethylenimin (PEI) nebo polyamidoamin. Reakcí s DNA vzniká částice, která je stejně jako u liposomů pozitivně nabitá, a proto snadno reaguje s negativně nabitou membránou a zároveň je rezistentní vůči intracelulárním nukleasam. Mimo to mohou být tyto nanočástice účinně transfekovány do nedělících se buněk [57–59, 61, 62, 67].

PEI-DNA polyplexy jsou pozitivně nabité částice, které váží negativně nabité ionty, čímž snižují osmotický potenciál. Způsobují tak bobtnání a následně i praskání endosomů. Při intravenózním podání u myší byly PEI vektory lokalizovány preferenčně v plicích a to blízko alveolám, ale ne v epiteliálních buňkách. Naopak při použití aerosolu byly zejména v epiteliálních buňkách. Kvůli velké molekulové hmotnosti bohužel PEI polymery nejsou biodegradovatelné, 5-10násobně zvyšují množství prozánětlivých cytokinů a kvůli jejich schopnosti ničit endosomy zároveň způsobují toxicitu *in vitro* i *in vivo* [57–59, 61, 62, 67].

Polymery obsahující aminokyseliny (např. poly-K) mohou být modifikovány tak, aby byly následně cíleny na specifické buňky. Konjugace poly-K s ligandy pro membránové receptory, např. sec-R (z angl. „serpin-enzyme complex receptor“) nebo polymerní imunoglobulinový receptor, zprostředkovává účinný *in vivo* přenos genu do dýchacích epiteliálních buněk. Pro modifikaci postranních řetězců byl použit PEG, který stabilizuje polymery ve fyziologickém prostředí, brání reakci imunitního systému na CpG sekvence a zároveň neprokazuje žádnou toxicitu *in vivo*. PEG-poly K polyplexy s DNA mohou být podávány opakovaně, aniž by došlo ke snížení účinnosti vlivem imunitního systému. U myší bylo pozorováno částečné opravení transportu chloridových iontů u nosních epiteliálních buněk. Z těchto důvodů jsou prováděny klinické studie těchto polymerů [57–59, 61, 62, 67].

Tabulka č. 2.2: *Genové nosiče používané pro terapii CF.* Převzato a upraveno z [58].

Typ GTA	Degradace *in vivo*	Účinnost v dělících se buňkách	Účinnost v nedělících se buňkách	Průnik do jádra v nedělících se buňkách	Účinnost při opakovaném dávkování
Adenoviry	Chráněno	Vysoká	Vysoká	Vysoký	Omezená
Adeno-asociované viry	Chráněno	Vysoká	Vysoká	Vysoký	Omezená
„Holá" plazmidová DNA	Vysoce náchylné	Nízká	Nízká v plicích, vysoká v játrech a svalech	Neúčinný	Vysoká
Lipoplexy	Chráněno	Vysoká	Nízká v plicích	Nízký	Vysoká
Polyplexy	Chráněno	Vysoká	Vysoká v plicích	Vysoký	Vysoká

2.3.1.3 Překážky genové terapie při přenosu DNA

Pro úspěšné dopravení proteinu na plazmatickou membránu epiteliálních buněk je nutno překonat jak mechanickou bariéru danou hustým hlenem vyskytujícím se v plicích pacientů s CF, tak i bariéru, která je způsobena imunitním systémem reagujícím na cizorodé látky [56, 57, 61, 67, 68].

Hustý hlen v dýchacích cestách slouží k odstranění cizorodých látek, tedy i vektorů, které jsou inhalovány. Viskozita hlenu může být snížena použitím lidských DNas, transport vektoru je tím usnadněn. Vně buněk se vyskytuje také glykokalyx, který může bránit vazbě vektoru na buněčný receptor. Jsou využívány enzymy, např. neuraminidasy, které odstraňují složky glykokalyxu, a tím zvyšují citlivost k virovým vektorům. Největším problémem je však nedostatek virových receptorů na apikální straně membrány buněk. Mezi epiteliálními buňkami jsou těsné spoje, které jsou dobře průchozí pro ionty, avšak pro větší látky prostupné nejsou, což zabraňuje prostupu vektorů z lumen do intersticia [56, 57, 61, 68].

Dalším problémem je diferenciace epiteliálních buněk dýchacích cest. Epiteliální buňky jsou diferencovány jednou za několik měsíců a jejich možná buněčná smrt negativně ovlivňuje účinnost GTA. Z tohoto důvodu se nyní výzkum zaměřuje na identifikaci plicních kmenových buněk, díky kterým by mohla být zajištěna dlouhotrvající exprese CFTR proteinu. Aby došlo k nápravě transportu chloridových iontů, je potřeba 6 – 10 % buněk se správně fungujícím CFTR proteinem. Avšak k opravě kanálů přenášejících sodné ionty toto množství nestačí, a proto zůstává zachována jejich hyperfunkce [57, 61].

Imunitní systém je další výraznou překážkou při využití genové terapie. Makrofágy fagocytují GTA, a snižují tak jejich množství. Dochází ke zvýšení odpovědi cytotoxických T lymfocytů, které ničí transfekované buňky, a k tvorbě protilátek a tzv. Toll-like receptorů [57, 61, 67, 68].

Po proniknutí vektoru do buňky nastávají další problémy. První z nich je endozomální, resp. lysozomální degradace vektoru. Předejít tomu lze použitím pH-senzitivních protonovaných vektorů, které nejsou degradovány. Kromě toho jsou některé viry schopné se této degradaci vyhnout. Např. Sendai virus fúzuje s membránou a genetický materiál vypouští přímo do cytoplazmy. Syntetické vektory, tedy např. plazmidová DNA, mají nízkou účinnost kvůli rychlé degradaci cytoplazmatickými Ca^{2+}-senzitivními nukleasami. Mimo to jsou některé virové vektory označeny ubikvitinem a degradovány v proteasomu [61, 58, 67].

Poslední překážkou je průnik skrze jadernou membránu. Při použití nevirového vektoru dochází ke vstupu DNA pouze při dělení buněk, proto je u epiteliálních buněk velmi nízká účinnost transfekce. Zároveň skrze jaderné póry prochází pouze menší sloučeniny, než je DNA. Rozvoj peptidových nukleových kyselin (PNA, z angl. „peptide nucleic acid“), u kterých jsou sacharidy a fosfáty nukleových kyselin nahrazeny syntetickými peptidy, napomáhá vyřešení tohoto problému. PNA jsou schopné navázat DNA-specifické sekvence a zároveň jaderný lokalizační signál, díky čemuž dochází k jejich přenosu do jádra. Import do jádra však není limitující pro viry, jejichž replikace i transkripce probíhá v cytoplazmě [61, 67, 68].

2.3.2 Genová terapie prostřednictvím mRNA

Další možností opravy poškozeného CFTR proteinu v cílových buňkách je kromě přenosu DNA také přenos messengerové RNA (mRNA) spojené s PEG. Tato relativně nová metoda má oproti použití plazmidové DNA několik podstatných výhod: (1) účinnost exprese záleží pouze na procesu odehrávajícím se v cytoplazmě, nemusí tak být překonána překážka transportu genu do jádra, (2) nedochází k inzerční modifikaci genomu pacienta, (3) exprese je účinná u nedělících se savčích buněk a tkání; (4) je použito nevirové činidlo, a tak by nemělo docházet k tak velké reakci imunitního systému; (5) mRNA je podstatně menší než DNA a (6) může být podávána opakovaně [69].

Tato metoda má i svá úskalí. Molekula mRNA je poměrně nestabilní a kvůli tomu dochází k odpovědi imunitního systému. Zánětlivá odpověď je pravděpodobně zprostředkována prostřednictvím Toll-like receptorů (TLR). Nestabilitě mRNA a následnému spuštění imunitní odpovědi lze předejít použitím uměle syntetizované molekuly, která by měla mít dostatečně dlouhý 3‘ poly-A konec (100 a více adenosinů) a zároveň 5‘ N7-methylguanosinovou čepičku. Dále je možno báze mRNA upravit a použít např. 5-methylcytidin nebo N6-methyladenosin [56, 69, 70–75].

Další nevýhodou použití mRNA je snížení exprese, ke kterému dochází jak *in vitro,* tak i *in vivo* a je nutné časté opakované podání, které může opět vyvolat negativní odpověď imunitního systému [56, 69, 71–75].

Pro přenos mRNA do buňky se využívají jak virová GTA, např. Sendai virus, tak nevirová transfekční činidla, zejména pak lipofektamin a lipofektin (kationtové lipidy) nebo větvený PEI o velikosti 25 kDa, respektive lineární o velikosti 22 kDa (kationtové polymery) [76, 77].

2.3.3 Další metody genové terapie CF

Kvůli problémům týkajících se průniku GTA do epiteliálních buněk dýchacích cest a díky snaze získat permanentní expresi proteinu bylo vyvinuto několik dalších strategií. Mezi ně patří např. využití oligonukleotidů a kmenových buněk, dále pak metoda CRISPR a SMaRT a fyzikální metody nebo fetální genová terapie.

2.3.3.1 Využití oligonukleotidů

Díky své velikosti jsou oligonukleotidy, neboli krátké úseky DNA, schopné snazšího průniku do buněk a jádra. Specifická sekvence je nahrazena krátkými fragmenty exogenní DNA, které jsou homologní k cílové endogenní DNA sekvenci kromě těch párů bazí, které je třeba modifikovat, aby měl výsledný protein normální funkci. Metoda se nazývá „small fragments homologous replacement" (SFHR) a její výhodou je, že nedochází k reakci imunitního systému a exprese je dlouhotrvající a tkáňově specifická [63, 78].

Oligonukleotidy mohou být použity také jako „antisense" molekuly, které hybridizují s komplementární mRNA. Dochází díky nim k opravě sestřihu CFTR nebo ke zvýšení množství normálně fungujícího CFTR proteinu. Tato metoda by mohla být využita pro zlepšení některých problémů týkajících se CF, jako je např. produkce mucinů nebo hyperabsorbce sodných iontů [68, 79].

2.3.3.2 „Spliceosome-mediated RNA trans-splicing" (SMaRT)

V této metodě je využit endogenní aparát sestřihu pro modifikaci pre-mRNA. Jsou využity pre-terapeutické RNA molekuly (PTM), které jsou navrženy tak, aby byly komplementární k intronu cílové pre-mRNA. Zamezují *cis*-sestřihu a naopak posilují *trans*-sestřih mezi PTM a cílovou pre-mRNA. *Cis*-sestřih probíhá v rámci jedné molekuly, zatímco *trans*-sestřih spojuje exony dvou různých molekul pre-mRNA [80]. Cílem je oprava mutované molekuly pre-mRNA a získání opravené mRNA, která je translatována a upravena na správně fungující CFTR protein [68, 81–83].

2.3.3.3 Využití kmenových buněk

Objev změn u cirkulujících buněk imunitního systému při CF vedlo k možnosti genové terapie za využití hematopoietických kmenových a progenitorových buněk (HSPCs, z angl. „hematopoietic stem and progenitor cells"). Polymorfonukleární leukocyty exprimují funkční CFTR protein, který následně reguluje funkci fagolysozomu. U alveolárních makrofágů kontroluje acidifikaci fagosomu a usmrcení bakterií. Krevní destičky hrají roli při zánětu – u CF uvolňují lipoxiny, které jsou

mediátory zánětlivé odpovědi. HSPCs jsou schopné se dělit, obnovovat se a zároveň produkovat diferencované dceřiné buňky. Cílem je transplantovat kmenové buňky k postiženým kmenovým buňkám pacienta, aby došlo k diferenciaci na epiteliální buňky. Kmenové buňky by měly být získány od pacienta, *ex vivo* upraveny o sekvence wild-type *CFTR* genu a znovu lokálně podávány do plic pacienta, aby došlo k nahrazení postižených buněk buňkami funkčními. Tímto způsobem by nemělo docházet k reakci imunitního systému ani k vývoji zánětu. Systematické intratracheální podávání kmenových buněk kostní dřeně u myší způsobilo nárůst epiteliálních buněk a jejich transplantaci zejména do alveol a přívodních dýchacích cest. Celkově se však zatím jedná o neúčinnou metodu – pouze malé množství (<0,01–0,025%) plicních epiteliálních buněk je získáno z transplantovaných kmenových buněk kostní dřeně, stejně jako při použití embryonálních kmenových buněk, mezenchymových kmenových buněk pupečníkové krve i kmenových buněk z plodové vody. Avšak aby bylo dosaženo terapeutického účinku kmenových buněk, musí dojít k výrazné obnově dýchacích epiteliálních buněk. Transplantace kmenových buněk kostní dřeně do plic myší má ale vliv na snížení infekce bakteriemi *P. aeruginosa* (snížení mortality bylo až 50%). Dalším předmětem studia by mohly být mezenchymové kmenové buňky kostní dřeně vzhledem k jejich schopnosti stát se epiteliálními buňkami (*in vitro* studie) a schopnosti opravit tkáně uvolněním rozpustných faktorů blokujících apoptózu, zánět a další odpovědi imunitního systému [56, 57, 61, 84, 85].

2.3.3.4 Fetální genová terapie

Další alternativou genové terapie může být prenatální přenos genu do plně vyvinutých plic. Výhodou může být zacílení na tkáně nebo orgány dříve, než se objeví jejich poškození. Touto metodou může být dosaženo permanentní exprese proteinu u kmenových buněk použitím integrujících se vektorů a zároveň může být vyvolána tolerance k tomuto vektoru a výslednému proteinu. Tento způsob terapie byl zkoumán u hlodavců a byl prokázán efektivní přenos a exprese genu ve všech tkáních, které mohou být následně postiženy CF. Zároveň byla zjištěna postnatální tolerance daného proteinu a transfekce kmenových buněk. Exprese byla účinná při použití LV a AAV vektorů. Zde však hrozí riziko onkogeneze. Dalšími nevýhodami je vnesení

bakterií a dalších cizorodých částic a také toxicita transgenního proteinu. Metodu je nutno nadále studovat kvůli těmto a dalším možným problémům, jako je např. vliv na pre- a postnátální vývoj nebo risk onkogenetických a degenerativních procesů [56].

2.3.3.5 Fyzikální metody

Mezi používané fyzikální metody genové terapie patří např. elektroporace nebo využití magnetismu a ultrazvuku pro zvýšení genové transfekce. Např. aplikace magnetického pole na epiteliální buňky dýchacích cest, které byly nejprve transfekovány DNA plazmidem smíchaným se superparamagnetickými nanočásticemi, způsobila více než stonásobné zvýšení genové transfekce [68].

2.3.3.6 Metoda CRISPR/Cas9

Systém CRISPR/Cas9 je relativně novou metodou a slouží k upravení cíleného genomu. Jedná se o prokaryotický systém, který slouží jako obrana proti útočícím virům a plazmidovým DNA. Pomocí něho dochází k ukládání krátkých sekvencí plazmidové DNA do genomu hostitele, díky čemuž dochází k „zapamatování" dané infekce – vzniká místo CRISPR (z angl. „clustered regularly interspaced short palindromic repeats"). Následně dochází k transkripci na CRISPR-RNA (crRNA), navázání nosičových proteinů a CRISPR-asociované nukleasy (Cas). Opakovaná infekce způsobuje spojení komplementární sekvence s crRNA a tracrRNA (z angl. „trans-activating crRNA"), Cas9 nukleasa následně štěpí cizorodou dsDNA na specifickém úseku. Proces lze naprogramovat i na endogenní DNA díky použití specifického úseku RNA, který je komplementární k danému genu. Díky tomu dochází k inaktivaci, resp. vyštěpení např. mutovaného genu *CFTR* a jeho nahrazení např. homologní rekombinací [86–88].

3. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo studium možného využití *in vitro* syntetizované mRNA kódující CFTR protein v buňkách plicního epitelu.

V rámci této práce byly řešeny následující úkoly:

- Práce s buněčnými liniemi NuLi-1 a CuFi-1, která zahrnovala rozmražení a subkultivaci buněk, stanovení jejich viability a přípravu vhodných kultivačních lahví.
- Transfekce zmíněných buněčných linií *in vitro* syntetizovanou mRNA kódující CFTR protein.
- Ověření účinnosti transfekce buněčných linií prostřednictvím detekce CFTR proteinu pomocí nepřímé imunofluorescence za využití specifických protilátek.
- Ověření funkčnosti CFTR proteinu po transfekci buněčných linií syntetizovanou mRNA pomocí sledování transportu chloridových/jodidových iontů.
- Sledování vlivu transfekce na adhezi bakterií *Pseudomonas aeruginosa* u studovaných buněčných linií.

4. Materiál a metody

4.1 Použité přístroje

Analytické váhy 40 SM	PESA, Švýcarsko
Autokláv Varioklav®	H+P Labortechnik GmbH, Německo
Centrifuga Eppendorf 5415 R	Eppendorf, USA
Centrifuga Eppendorf 5430	Eppendorf, USA
Centrifuga Micro Star 12	VWR, Labogene Aps, Dánsko
Centrifuga Hettich Universal 320 R	Hettich Zentrifugen, Německo
CO_2 inkubátor	ShellLab, ČR
Laminární box BIO 126	Labox, ČR
Laminární box MB 20	Labox, ČR
Magnetická míchačka s ohřevem Lavat-MM4	Lavat, ČR
Mikroskop Motic AE31	Motic, Německo
Mikroskop Nikon ECLIPSE TE2002-U - Program NIS-Elements AR 2.30	Nikon, Japonsko
Mini Rocker MR-1	Biosan, Lotyšsko
Minicentrifuga Spectrafuge™	Labnet, USA
pH metr HI 2211	Hanna Instruments, ČR
Pipetovací nástavec MidiPlus	Biohit, UK
Pipety	Biohit, UK; Nichiryo, USA
Multikanálová pipeta (8, 12 kanálů)	Socorex, Švýcarsko
Spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro - Program i-control 1.8	Tecan, Švýcarsko
Spektrofotometr Spectronic Helios alpha	Thermo Scientific, USA
Vodní lázeň	Memmetr, Německo
Vortex	IKA, Německo; GVLab, Itálie; GILSON, USA
Box pro zamražení Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, USA

4.2 Použitý materiál

96-jamkové destičky Černé s průhledným dnem	Corning (CellBind®), USA; Techno Plastic Products, Švýcarsko
Alexa Fluor® 555 barvivo	Thermo Scientific, USA
AquaClean	Chemos, ČR
Azid sodný (NaN_2)	Sigma, USA (Fluka)
BSA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo
CFTR Antibody CF3	Thermo Scientific, USA
Chlorid draselný (KCl)	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid sodný (NaCl)	Sigma-Aldrich, USA; Lach-ner, ČR
Cold fish skin gelatin	Sigma-Aldrich, USA
Collagen type IV from human placenta	Sigma-Aldrich, USA
D-glukosa	Sigma-Aldrich, USA
DABCO® 33-LV	Sigma-Aldrich, USA
Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)	Lach-ner, ČR
Dihydrát chloridu vápenatého ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	Sigma-Aldrich, USA
DMEM kultivační médium	Lonza Biotech s.r.o., Švýcarsko; PAA Laboratories GmbH, Rakousko
Dimethylsulfoxid (DMSO) Cell culture grade	AppliChem GmbH, Německo
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	Lach-ner, ČR
Donkey Serum	Sigma-Aldrich, USA
Dusičnan draselný (KNO_3)	Sigma-Aldrich, USA
Dusičnan hořečnatý ($Mg(NO_3)_2$)	Sigma-Aldrich, USA
Dusičnan sodný ($NaNO_3$)	Sigma-Aldrich, USA
Dusičnan vápenatý ($Ca(NO_3)_2$)	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	Lachema, ČR
Fetální bovinní sérum (FBS)	Lonza Biotech s.r.o., Švýcarsko
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, USA
Geneticin	Gibco™ Invitrogen, UK

Gentamicin	Biochrom AG, Německo
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
Hexahydrát chloridu hořečnatého ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	Sigma-Aldrich, USA
Human CFTR C Terminus Antibody	R&D systems, USA
Human CFTR R Domain Antibody	R&D systems, USA
Hydrát jodidu vápenatého	Sigma-Aldrich, USA
Jodid draselný	Sigma-Aldrich, USA
Jodid hořečnatý	Sigma-Aldrich, USA
Jodid sodný	Sigma-Aldrich, USA
KIT PKH67 (MINI67-1KT) Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling	Sigma-Aldrich, USA
KIT PKH26 (MINI26-1KT) Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling	Sigma-Aldrich, USA
Kryozkumavky	Nunc InterMed, Dánsko; Corning, USA
Kultivační lahve (25 cm^2, 75 cm^2)	Corning, USA; Techno Plastic Products, Švýcarsko
Kyselina octová	Lachema, ČR
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Rakousko
LHC-9 kultivační médium	Gibco™ Invitrogen, UK
Lipofectamine™ MessengerMAX™ Reagent	Thermo Scientific, USA
Mowiol	Sigma-Aldrich, USA
MQAE	Sigma-Aldrich, USA
Opti-MEM™ Serum Reduced Medium	Gibco™ Invitrogen, UK
Parafilm	Bemis, USA
Peha Soft nitrilové rukavice (bez pudru)	Hartmann, ČR
Plastové sterilní pipety (1 – 25 ml)	Corning, USA
Plastové sterilní zkumavky Falcon (15 ml, 50 ml)	Sigma-Aldrich, USA; Techno Plastic Products, Švýcarsko
RNA free špičky ExpellPLUS™	CAPP, Dánsko

Sterilní mikrofiltry (0,22 μm)	Corning, USA; Merck Laboratories, Rakousko
Stříkačky	Chirana T. Injecta, Slovensko
Špičky	Biohit, UK
Tablety PBS (Phosphate Buffered Saline)	Gibco™ Invitrogen, UK
Triton® X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo
Trypanová modř 0,4%	Sigma-Aldrich, USA
Trypsin-EDTA (10× koncentrovaný roztok)	PAA Laboratories GmbH, Rakousko
Zkumavky Eppendorf	Eppendorf, Německo

4.3 Práce s buněčnými liniemi

Pro studium CF, stejně jako mnoha jiných nemocí, jsou využívány tkáňové a buněčné linie. Jsou vhodné ke studiu aktivity iontových kanálů stejně jako ke sledování terapeutického účinku mnoha léčiv. Pro tuto práci byly zvoleny adherentní plicní buněčné linie NuLi-1 zdravého jedince a CuFi-1 pacienta trpícího CF s mutací F508del.

Buněčné linie NuLi-1 (ATCC® CRL-4011) a CuFi-1 (ATCC® CRL-4013) jsou imortalizované linie buněk získané z plicního epitelu, které jsou komerčně dostupné. Buněčná linie NuLi-1 je získávána od zdravých jedinců, doba zdvojení je přibližně 43 hodin. CuFi-1 je buněčná linie od pacientů, kteří trpí CF s mutací F508del, a jejich doba zdvojení je přibližně 26 hodin. U této buněčné linie sice dochází k expresi CFTR proteinu, ale následně nedochází k jeho zabudování do membrány, a proto je transport chloridových iontů přes plazmatickou membránu omezen [89, 90].

Obě buněčné linie vyžadují pro svůj růst specifický povrch potažený kolagenem (viz 4.3.6). V této práci byl použit kolagen typu IV získaný z lidské placenty. Pro kultivaci buněčných linií bylo použito médium LHC-9 (z angl. „Laboratory of Human Carcinogenesis“), které neobsahuje fetální bovinnní sérum (FBS) a je speciálně vyvinuto pro kultivaci plicních epiteliálních buněk [91]. Mimo růstové faktory obsahuje také fenolovou červeň pro indikaci změny pH [92]. Do média bylo přidáváno antibiotikum Geneticin (G418), jehož výsledná koncentrace v médiu byla 50 μg/ml [93].

Použité buněčné linie byly inkubovány při 37°C a 5% CO_2. S buněčnými liniemi bylo pracováno ve speciální místnosti určené pouze pro tkáňové kultury, aby nedošlo ke kontaminaci. Práce byla vždy prováděna v laminárním boxu BIO 126. Pro práci byl využíván pouze jednorázový sterilní materiál nebo materiál, který byl sterilizován v autoklávu při 121°C.

4.3.1 Rozmražení buněčných linií

Buněčné linie jsou dlouhodobě uchovávány zamražené v tekutém dusíku nebo při -80°C. Díky tomu jsou linie zachovány a mají zajištěnou genetickou stabilitu. Kryozkumavky obsahují DMSO, které slouží jako kryoprotektant. Tato látka je ale pro buněčné linie částečně toxická, a proto se při jejich rozmražování musí postupovat velmi rychle. Při rozmražení jsou buněčné linie nasazovány ve větší hustotě než při běžné subkultivaci, aby se lépe adaptovaly a byly zajištěny lepší podmínky pro jejich zmnožení.

Před samotným rozmražením bylo nejprve připraveno médium LHC-9 s geneticinem (výsledná koncentrace v médiu byla 50 μg/ml). Toto médium bylo temperováno ve vodní lázni na 37°C.

Buněčné linie byly rozmraženy ve vodní lázni (37°C) a následně byl 1 ml buněčné suspenze převeden do zkumavky Falcon. Do této zkumavky byl poté přidáván vzrůstající objem temperovaného média LHC-9 dle tabulky č. 4.1. Buňky se tak lépe adaptují na změnu osmolality a pH.

Tabulka č. 4.1: *Objem přidávaného média LHC-9 k 1 ml buněčné suspenze.*

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

Buněčná suspenze byla centrifugována (5 min, 1000 RPM, centrifuga Hettich Universal 320R) a výsledná peleta byla resuspendována v 1 ml temperovaného média LHC-9. Suspenze byla převedena do vhodné kultivační nádoby (25 cm^2, povrch potažený kolagenem) s médiem a tato nádoba byla uložena do inkubátoru. Z buněčné suspenze byl odebrán malý alikvot pro stanovení viability buněk a jejich počtu pomocí barviva Trypanová modř (TB, z angl. „Trypan blue“) (viz kapitola 4.3.4).

4.3.2 Subkultivace buněčných linií

Subkultivace obou buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 je shodná a byla provedena vždy po 6 – 7 dnech, každé 2 – 3 dny bylo vyměněno kultivační médium.

Před samotnou kultivací bylo připraveno kultivační médium LHC-9 s geneticinem (výsledná koncentrace v médiu byla 50 μg/ml) a následně temperováno ve vodní lázni na 37°C. Veškeré dále uvedené objemy platí pro kultivační lahev s povrchem 75 cm^2.

Po odebrání původního kultivačního média bylo k buňkám přidáno 4 – 5 ml 0,25% trypsinu s EDTA (0,53mM). Po 10 minutách v inkubátoru byla reakce zastavena přidáním stejného množství (tedy 4 – 5 ml) 1% FBS. Pomocí pipety bylo nutno několikrát důkladně opláchnout kultivační povrch pro uvolnění co největšího počtu buněk. Suspenze byla převedena do sterilní zkumavky Falcon a centrifugována (5 min, 1000 RPM, centrifuga Hettich Universal 320R). Získaná peleta byla resuspendována v 1 ml připraveného média LHC-9 a z této suspenze bylo odebráno 200 – 300 μl do nové kultivační lahve potažené kolagenem (viz kapitola 4.3.5).

Do kultivační lahve bylo dáváno 15 – 16 ml kultivačního média LHC-9. Pro kultivaci buněčné linie NuLi-1 bylo dáváno vždy o 50 μl více buněčné suspenze.

4.3.3 Zamražení buněčných linií

Po subkultivaci dané buněčné linie (viz kapitola 4.3.2) byla získaná peleta promyta a znovu centrifugována za výše uvedených podmínek. Výsledná peleta byla resuspendována v zamražovacím médiu obsahujícím LHC-9 médium, 30% FBS (v/v) a 10% DMSO (v/v). Buněčná suspenze byla rozdělena po 1ml alikvotech do označených kryozkumavek a ty byly následně uloženy do zamražovacího boxu Nalgene™ Cryo 1°C freezing Container, který byl uložen přes noc do -80°C. Díky tomuto boxu je zajištěno ochlazovaní kryozkumavek přibližně o 1 °C za minutu až na výsledných -80°C.

4.3.4 Stanovení viability a počtu buněk

Pro určení počtu a viability buněk byly buňky nejprve obarveny barvivem TB. Živé buňky zůstávají po obarvení světlé, protože dochází k aktivnímu přenosu barviva přes membránu, zatímco mrtvé buňky jsou obarveny na modro.

Z buněčné suspenze získané po subkultivaci buněk bylo odebráno 20 µl do zkumavky eppendorf a smícháno 1:1 s 0,4% barvivem TB (w/v). Tato obarvená suspenze byla pipetována na mřížku Bürkerovy komůrky (tzv. hemocytometr), která byla následně umístěna na mikroskop Motic. Vždy byly počítány buňky v pěti velkých čtvercích, v každém malém čtverci byla vždy započítána pouze horní a pravá strana, aby nedošlo ke znásobení počtu buněk. Mrtvé buňky (obarvené modře) nebyly zahrnuty do výsledného počtu. Výsledný počet buněk *n* na mililitr byl stanoven podle následujícího vzorce:

n = počet buněk ve velkém čtverci x 10 000 x ředění

Pokud byl počet buněk v jednom velkém čtverci vyšší než 100, byla obarvená suspenze naředěna kultivačním médiem, aby se předešlo násobnému počítání buněk.

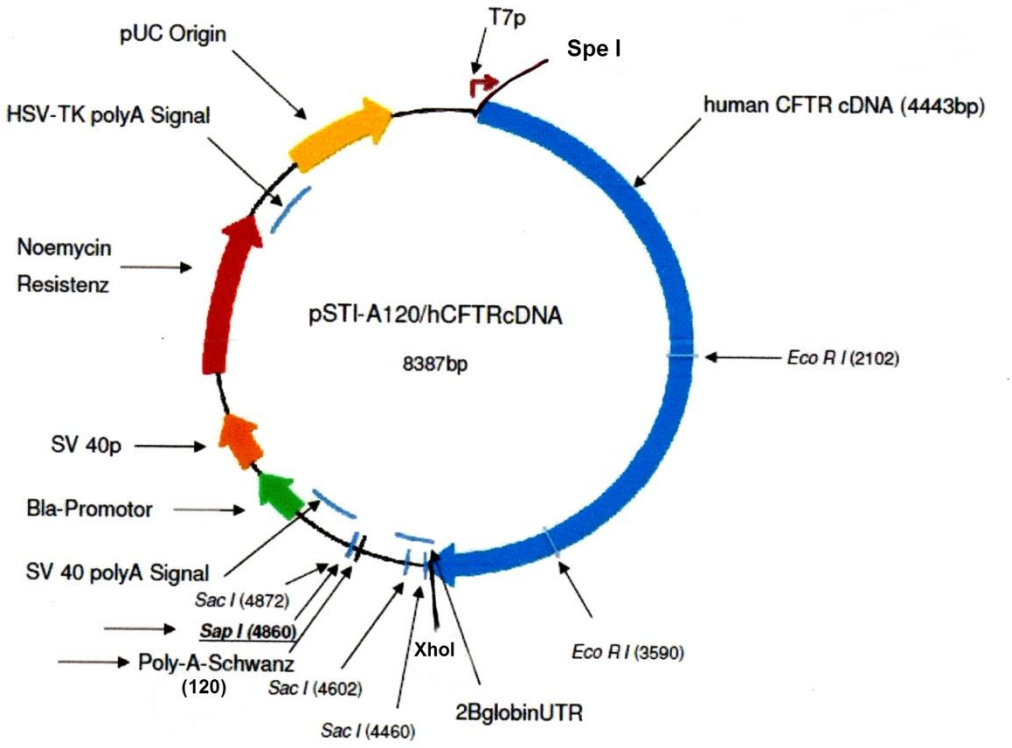
4.3.5 Příprava kultivačních lahví potažených kolagenem

Adherentní linie NuLi-1 a CuFi-1 vyžadují pro svůj růst speciální povrch potažený kolagenem. Byl použit kolagen typu IV z lidské placenty, který byl nejprve naředěn 0,25% kyselinou octovou na koncentraci 1,8 mg/ml. Tento roztok byl uchováván ve skleněné lahvičce v chladu.

Pro potah lahví byl zásobní roztok kolagenu dále ředěn pufrem PBS, případně destilovanou vodou, na koncentraci 60 µg/ml a přefiltrován přes sterilní mikrofiltr (0,22µm). Do lahví s povrchem 25 cm^2 a 75 cm^2 byly pipetovány 2 ml, resp. 5 ml připraveného roztoku kolagenu. Následně byly lahve ponechány minimálně 18 hodin v laminárním boxu a zbylý roztok kolagenu byl odebrán. Lahve byly 3× promyty PBS a byly ponechány v laminárním boxu vyschnout dnem vzhůru, aby nedocházelo k vytvoření krystalků PBS na kultivačním povrchu. Nakonec byly sterilizovány minimálně 3 hodiny (lépe přes noc) UV zářením v laminárním boxu a uzávěry byly překryty parafilmem. Takto připravené kultivační lahve byly uloženy v chladu až do následného použití.

4.4 Syntéza mRNA

Syntéza mRNA kódující CFTR protein byla provedena v Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) RNDr. Tomášem Koblasem, Ph.D., který zároveň poskytl veškeré chemikálie, reagencie a přístroje pro tuto práci. CFTR-mRNA byla syntetizována podle plazmidu DNA, který je znázorněn na obrázku č. 4.1.



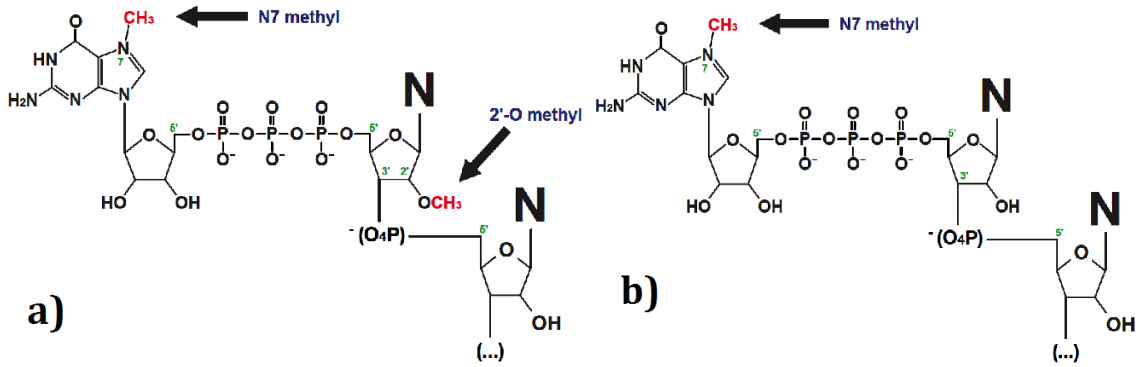
Obrázek č. 4.1: *Plazmid DNA kódující CFTR protein použitý pro in vitro syntézu mRNA.*

In vitro syntéza mRNA byla provedena dle komerčního návodu T7 mScript™ Standard mRNA Production System (CELLSCRIPT™) [94]. Tento kit obsahuje veškeré enzymy a reagencie pro syntézu 5‘-koncové čepičky a 3‘-polyadenylovaného konce mRNA. Takto získaná mRNA má vysokou stabilitu, zvyšuje účinnost translace ve většině eukaryotických buněk a je možno ji použít k transfekci, mikroinjekčním experimentům i u *in vitro* translačních systémů. Pro úspěšnou práci je důležité pracovat ve sterilním prostředí bez RNas a používat pouze roztoky, pipety a zkumavky předem zbavené RNas [94].

Byly syntetizovány 2 typy mRNA s různě připojenou čepičkou na 5‘ konci. „Anti-Reverse Cap Analog“ (ARCA) je čepička syntetická, na 5‘ konec je rovnou vázán N7-methylguanosin. Pozice 2‘-OH druhého nukleotidu směrem od 5‘ konce je methylována prostřednictvím 2‘-O-methyltransferasy. U druhého typu mRNA dochází pomocí enzymové syntézy nejprve k navázání guanosinu a teprve poté k jeho methylaci na pozici N7. K methylaci druhého nukleotidu na pozici 2‘-OH v tomto případě nedochází.

Methylace na 2‘-OH pozici druhého nukleotidu má tu výhodu, že následující nukleotid může být navázán pouze jedním způsobem, a to na pozici 3‘-OH. To je klíčové pro vazbu dalších nukleotidů. Pokud na této pozici nukleotid methylován není, může se stát, že se na tuto pozici naváže následující nukleotid a dojde k ukončení syntézy mRNA. Obě struktury mRNA jsou znázorněny na obrázku č. 4.2 na straně 49 [94, 95].

Proces syntézy mRNA je rozdělen do několika kroků. Nejprve je podle templátu jednořetězcové DNA (ssDNA) transkribována *in vitro* RNA. DNA templát je poté odstraněn pomocí DNasy I a získanou IVT (z angl. „*in vitro* transcribed“) mRNA je třeba purifikovat a to za použití ethanolu a octanu amonného, díky čemuž jsou odstraněny veškeré proteiny a dochází k selektivní precipitaci RNA. Následně dochází k připojení čepičky, a to enzymově (přidání GTP) (dále enzymová mRNA) nebo synteticky za použití ARCA analogu (dále ARCA mRNA). Pro vytvoření polyadenylového konce je nutno ke směsi v dalším kroku přidat poly(A)-polymerasu, díky které dochází k přidání přibližně 200 – 300 nukleotidů na 3‘-konec syntetizované mRNA. Výsledná mRNA je purifikována elucí na kolonce, defosforylována na 5‘-konci pomocí antarktické fosfatasy a znovu eluována. Pro dlouhodobé uchování je mRNA zamražena v -80 °C [94].



Obrázek č. 4.2: *Struktury na 5'-konci transkriptu při in vitro syntéze mRNA*. *a)* Struktura ARCA mRNA – na druhém nukleotidu směrem od 5'-konce methylována 2'-OH pozice transkriptu (syntetická metoda). *b)* Struktura enzymové mRNA – pozice 2'-OH na druhém nukleotidu směrem od 5'-konce transkriptu methylována není (enzymová metoda). Převzato a upraveno podle [94].

4.5 Transfekce buněčných linií CFTR-mRNA

Při transfekci dochází k přenosu cizorodé NK (DNA nebo RNA) do cílových eukaryotických buněk. Jako transfekční činidlo byl použit kationtový liposom Lipofectamine MessengerMAX (300 ng/µl). Díky své kladně nabité části na sebe snadno váže záporně nabitou molekulu NK, a zároveň obsahuje nepolární část, díky které dobře proniká skrze plazmatickou membránu do buněk [74].

Před samotnou transfekcí buněk *in vitro* syntetizovanou mRNA byly dané buněčné linie nasazeny do černé 96-jamkové destičky s průhledným dnem (Corning CellBind®) v koncentraci 10^5 buněk/jamku tak, aby byl povrch jamky pokryt ze 70 – 90% buňkami. Objem kultivačního média v jamce byl 200 µl. Byla použita dvě různá množství „Lipofectamine™ MessengerMAX™" (L-M-MAX) činidla (0,15 a 0,3 µl) a dvě různě syntetizované mRNA (ARCA, enzymová). Transfekce mRNA do buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 byla provedena dle Lipofectamine™ MessengerMAX™ Reagent manuálu [96].

V závislosti na počtu jamek bylo odpovídající množství L-M-MAX činidla smícháno s Opti-MEM™ médiem, tj. na 1 jamku bylo 5 µl Opti-MEM™ média smícháno s 0,15 µl, resp. 0,3 µl L-M-MAX činidla. Tyto roztoky byly dobře promíchány a inkubovány 10 minut při pokojové teplotě. Během této inkubace byla mRNA

naředěna Opti-MEM™ médiem tak, aby její koncentrace byla 0,2 μg/jamku. Poté byla přidána k již připravenému L-M-MAX médiu v poměru 1:1. Tento komplex byl inkubován 5 minut při pokojové teplotě. V jednotlivých jamkách bylo původní kultivační médium vyměněno za nové a do každé jamky bylo přidáno 10 μl daného komplexu, se kterým byly buněčné linie inkubovány 24 hodin při 37°C.

4.6 Ověření účinnosti transfekce

4.6.1 Vizualizace CFTR proteinu transfekovaných buněk

Pro vizualizaci CFTR proteinu po transfekci buněk syntetizovanou mRNA byla zvolena metoda nepřímé imunofluorescence. Při této metodě se využívá primární protilátka, která specificky interaguje s CFTR proteinem, a následně sekundární protilátka, která se váže na primární protilátku a je fluorescenčně značená.

Pro detekci CFTR proteinu byly použity tři různé primární protilátky. Protilátka CF3 je myší monoklonální protilátka, která se váže na třetí extracelulární smyčku proteinu CFTR (103. – 117. AMK) [97]. Dále byla použita kombinace dvou myších monoklonálních protilátek, proti C konci (1477. – 1480. AMK) a R doméně (729. – 736. AMK) CFTR proteinu. Tyto dvě protilátky byly smíchány v poměru 1:1, aby byla zajištěna lepší detekce CFTR proteinu [98].

Jako sekundární protilátka byla použita myší anti-IgG s fluorescenční značkou Alexa Fluor® 555, která má excitační vlnovou délku 555 nm a emisní 580nm [99].

Modré barvivo Hoechst, které se specificky váže na DNA, a barví tedy buněčné jádro, bylo použito jako kontrola počtu buněk [100].

4.6.1.1 Metoda nepřímé imunofluorescence

Před samotným experimentem bylo nutno metodu optimalizovat výběrem vhodné koncentrace primární protilátky, složením blokovacího roztoku a roztoku, kterým byla ředěna primární protilátka (viz kapitola 5.1.1.1).

Použité roztoky:

- Blokovací roztok obsahoval 0,01M glycin, 5% (v/v) Donkey serum, 0,05% (v/v) Triton X-100 a 0,01M PBS (pH = 7,2 – 7,4).

- Roztok pro ředění primární protilátky (dále AD, z angl. „antibody diluent“) obsahoval 1% (w/v) BSA, 0,1% (w/v) „cold fish skin gelatin“, 0,5% (v/v) Triton X-100, 0,05% (w/v) azid sodný a 0,01M PBS (NaCl, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NAH_2PO_4 \cdot 2H_2O$). pH tohoto roztoku bylo upraveno na 7,2 – 7,4 a následně byl přefiltrován. V případě detekce CFTR proteinu pomocí protilátky CF3 byly oba roztoky připraveny bez přidání Tritonu X-100.

- DABCO-Mowiol obsahoval 2,4 g mowiolu, 6 g glycerolu a 6 ml vody. Směs byla míchána po dobu 3 hodin, následně k ní bylo přidáno 12 ml 0,2M Tris-Cl a pH bylo upraveno na 8,5. Roztok byl míchán ještě 10 minut při 50°C a následně centrifugován (5000 g, 15 min). Bylo přidáno činidlo DABCO tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 2,5%. Zkumavky s 500µl aliquoty byly uchovávány v -20°C.

Den po transfekci buněk *in vitro* syntetizovanou mRNA (viz kapitola 3.5) bylo odebráno kultivační médium a jamky byly 3× promyty 200 µl PBS obsahujícím 1% FBS (v/v). Následně byly buňky fixovány na dno jamky 100 µl 4% formaldehydu v PBS (w/v). Tento roztok byl připraven vždy čerstvý těsně před experimentem. Po 20 minutové inkubaci s tímto roztokem při pokojové teplotě byly jamky opět promyty 3× 200 µl PBS.

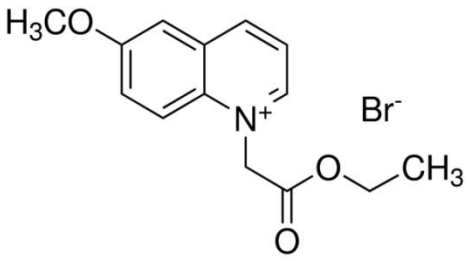
Poté bylo do každé jamky přidáno 100 µl blokovacího roztoku společně s 1 µl barviva Hoechst. Následně byla destička zatemněna alobalem a inkubována 30 minut při pokojové teplotě.

Blokovací roztok byl odebrán a do každé jamky bylo přidáno 100 µl primární protilátky. Primární protilátka CF3 byla ředěna 1:600 v AD, směs protilátek proti C konci a R doméně CFTR proteinu smíchaných v poměru 1:1 byla ředěna v poměru 1:400 v AD. Primární protilátka byla s buněčnými liniemi inkubována přes noc při 4°C za mírného třepání na třepačce Mini Rocker MR-1.

Následující den byl odebrán roztok primární protilátky a jamky byly 3× promyty 200 µl PBS. Do každé jamky bylo přidáno 100 µl sekundární protilátky, která byla ředěna 1:500 v blokovacím roztoku obsahujícím Triton X-100. Destička byla překryta alobalem a inkubována 30 minut při 37°C. Následně byly jamky 3× promyty 200 µl PBS a do každé jamky bylo přidáno 20 µl roztoku Dabco-Mowiol v glycerolu. Buňky s detekovaným CFTR proteinem byly následně pozorovány mikroskopem Nikon ECLIPSE TE2002-U v programu NIS-Elements AR 2.30.

4.6.2 Studium transportu iontů prostřednictvím CFTR kanálu

Funkčnost CFTR proteinu po transfekci buněk *in vitro* syntetizovanou mRNA byla sledována prostřednictvím transportu chloridových iontů skrze tento kanál. Pro studium transportu bylo vybráno fluorescenční barvivo *N*-(ethoxykarbonylmethyl)-6-methoxychinolin (MQAE), které je specificky zhášeno halogenovými ionty [101]. Jeho struktura je znázorněna na obrázku č. 4.4. Barvivo MQAE patří mezi fluorescenční barviva na bázi chinolinu. Toto barvivo má excitační vlnovou délku 350 nm, emisní pak 460 nm, jedná se tedy o modře fluoreskující sloučeninu [102]. V rámci bakalářské práce [103] byly obě vlnové délky optimalizovány: excitační vlnová délka byla 362 nm, resp. emisní vlnová délka 452 nm, destička byla čtena zespodu s víčkem.



Obrázek č. 4.4: *Struktura barviva MQAE* [104].

Transport chloridových/jodidových iontů byl měřen vždy stejným způsobem uvedeným v kapitole 4.6.2.2. Fluorescence byla měřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro za využití programu i-control 1.8.

4.6.2.1 Stanovení vlivu NaCl, resp. KI na fluorescenci MQAE

Byly připraveny 3 různé koncentrace roztoku NaCl, resp. KI, a to 0,4mM, 4mM a 40mM. V tomto pořadí byly postupně pipetovány do jamek 96jamkové destičky obsahující 10mM MQAE v roztoku SR^- (složení viz 4.6.2.2). Fluorescence barviva byla měřena na spektrofluorimetru Tecan v různých časových intervalech.

4.6.2.2 Studium transportu iontů v buněčných liniích obarvených MQAE

Použité pufry:

- Pufr SR^+ obsahoval jodidové ionty („Iodide containing standard ringer“) – NaI (140 mM), KI (5 mM), $CaI_2 \cdot H_2O$ (1,5 mM), MgI_2 (1 mM), HEPES (5 mM), D-glukosa (5 mM).
- V pufru SR^- byly jodidové ionty nahrazeny dusičnanovými ionty („Iodide free standard ringer“) – $NaNO_3$ (140 mM), KNO_3 (5 mM), $Ca(NO_3)_2$ (1,5 mM), $Mg(NO_3)_2$ (1 mM), HEPES (5 mM), D-glukosa (5 mM). Pufry byly připraveny v destilované vodě, výsledné pH mělo hodnotu 7,4.

Buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 byly nasazeny v koncentraci 10^5 buněk/jamku do 200 µl kultivačního média. Po vytvoření konfluentní vrstvy byly buněčné linie inkubovány s 10mM barvivem MQAE v LHC-9 médiu přes noc při 37°C. Kultivační médium bylo odebráno spolu s barvivem, které neproniklo do buněk. Následně byly buněčné linie promyty 3× 100 µl pufru SR^+, se kterým byly následně také po dobu 2 hodin inkubovány při 37°C. Poté bylo přidáno 100 µl pufru SR^- a ihned byla měřena změna fluorescence na spektrofluorimetru Tecan. Uvedená metoda byla upravena a optimalizována na základě již dříve popsané metody a mnou vypracované bakalářské práce na toto téma [103, 105].

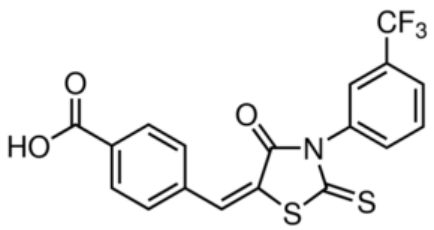
4.6.2.3 Stanovení viability buněk během studia transportu jodidových iontů v buňkách obarvených MQAE

Buněčné linie byly nasazeny a obarveny 10mM MQAE stejným způsobem, který je uveden v kapitole 4.6.2.2. Pro tento experiment byly využity následující skupiny: (a) první skupina byla obarvena 10mM MQAE, (b) druhá skupina byla po obarvení 10mM MQAE navíc promyta 100 µl pufru SR^+, s nímž byla 10 minut inkubována, (c) ve třetí skupině byl po promytí pufrem SR^+ tento pufr nahrazen 100 µl SR^-., s nímž byly buněčné linie inkubovány 15 minut, což odpovídá době měření ve spektrofluorimetru při klasickém provedení experimentu, a následně byla stanovena viabilita buněk. Každá testovaná skupina obsahovala 3 jamky a byla u ní stanovena viabilita buněk podle kapitoly 4.3.4.

4.6.2.4 Využití CFTR(inh)-172 pro stanovení transportu iontů prostřednictvím CFTR kanálu

CFTR(inh)-172 je jedním z nejúčinnějších inhibitorů CFTR kanálu – stabilizuje uzavřený stav tohoto kanálu svým navázáním na NBD [106, 107]. Jeho struktura je znázorněna na obrázku č. 4.5.

Před samotným experimentem byl inhibitor rozpuštěn v DMSO tak, aby výsledná koncentrace zásobního roztoku byla 24mM. Aby nedošlo k narušení viability buněk, byl tento roztok následně zředěn pufrem SR^- (složení viz 4.6.2.2). Výsledná koncentrace DMSO v jamkách byla 4 % (v/v).



Obrázek č. 4.5: *Struktura inhibitoru CFTR(inh)-172* [107].

Do 96-jamkové destičky byly pipetovány roztoky o složení: 100 µl pufru SR^- obsahujícího 10mM MQAE v SR^- pufru a 25µM, 50µM nebo 100µM CFTR(inh)-172. Veškeré roztoky byly připraveny tak, aby obsahovaly stejné množství DMSO (a to 4 % (v/v)). Každá skupina obsahovala 8 jamek. Následně byla měřena fluorescence na spektrofluorimetru Tecan v různých časových intervalech.

4.6.2.5 Ověření funkčnosti CFTR kanálu po transfekci buněčných linií in vitro syntetizovanou mRNA

Bylo testováno celkem 7 skupin, každá z nich obsahovala 4 jamky. Skupiny (1) a (2) byly u buněčné linie CuFi-1 po vytvoření konfluentní vrstvy buněk transfekovány mRNA (viz kapitola 4.5) o koncentraci 0,2 µg/jamku. U buněčné linie NuLi-1 bylo do obou skupin přidáno 0,3 µl transfekčního činidla Lipofectamine. Následující den byly všechny skupiny obarveny 10mM MQAE. Skupiny (1), (3) a (5), resp. (2), (4), a (6), byly třikrát promyty a inkubovány se 100 µl pufru SR^+, resp. SR^+ obsahujícím 50µM CFTR(inh)-172 po dobu 2 hodin při 37°C. Skupiny (1) – (4) byly po inkubaci jednou promyty 100 µl pufru SR^-. Po promytí byl ke skupinám (1) a (3), resp. (2) a (4), přidán pufr SR^-, resp. SR^- s 50µM CFTR(inh)-172. Poslední skupina (7) sloužila jako kontrolní, byla obarvena 10mM MQAE. Následně byla měřena fluorescence MQAE na spektrofluorimetru v různých časových intervalech.

4.6.2.6 Zpracování výsledků

Pro zpracování naměřených výsledků byla vždy autofluorescence buněk (pozadí) odečtena od naměřené hodnoty fluorescence. Dále byla data prezentována jako fluorescence daná rozdílem fluorescence F_t naměřené v čase t a počáteční fluorescence F_0 naměřené v čase 0 minut. Tato data byla v rámci každé skupiny zprůměrována a byla určena směrodatná odchylka této hodnoty.

4.6.3 Studium adheze bakterií *Pseudomonas aeruginosa* u plicních buněčných linií

Ke studiu adheze bakterií *Pseudomonas aeruginosa* na buňky plicního epitelu byl použit kmen ST 966 izolovaný z pacientů trpících CF, který byl poskytnut fakultní nemocnicí v Motole v Praze.

Pro barvení plicních i bakteriálních buněk byly použity kity poskytované firmou Sigma-Aldrich. Byly použity fluorescenční sloučeniny PKH67 (excitace 470 nm, emise 505 nm) a PKH26 (excitace 522 nm, emise 569 nm), které obsahují dlouhé alifatické řetězce, kterými se snadno váží na lipidové části membrány buněk. Dle výrobce by fluorescence PKH67 měla přetrvávat 10 – 12 dní, u PKH26 až několik týdnů [108]. Excitace a emise u PKH26 byly upraveny tak, aby nedocházelo k překryvu fluorescence s barvivem PKH67.

4.6.3.1 Fluorescenční značení monovrstvy plicních buněk

Buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 byly nasazeny do 96-jamkové destičky v koncentraci 10^5 buněk/jamku. Po vytvoření konfluentní monovrstvy buněk bylo z jamek odebráno původní médium a přidáno do každé jamky 25 µl Diluentu C. Následně bylo do jamek přidáno stejné množství Diluentu C obsahujícího barvivo PKH67 v poměru 1:124 (25 µl Diluentu C + 0,2 µl PKH67). Buňky byly s tímto barvivem inkubovány 10 minut, barvení bylo zastaveno přidáním 50 µl 100% FBS/jamku. Jamky byly poté promyty 1× 1% FBS a 5× 150 µl LHC-9 média. Následně bylo do každé jamky přidáno 200 µl média LHC-9 a destička byla uložena do inkubátoru (37°C, 5% CO_2).

4.6.3.2 Fluorescenční značení bakterií Pseudomonas aeruginosa

Den před samotným experimentem byl rozmražen bakteriální kmen PA966. Bylo smícháno 100 µl bakteriální suspenze PA966 s 5 ml plného bakteriálního média. Toto médium obsahovalo 1,6% (w/v) pepton, 1% (w/v) enzymatický kaseinový hydrolyzát, 0,5% (v/v) glycerol, 57mM K_2SO_4 a 15mM $MgCl_2$. Bakteriální suspenze byla míchána na třepačce při středních otáčkách a 37°C přes noc.

Druhý den byla získaná bakteriální suspenze centrifugována (12000 RPM, 5 min, Centrifuga Eppendorf 5415R) a dvakrát promyta pomocí PBS pufru (12000 RPM, 5 min, Centrifuga Eppendorf 5415R). Peleta byla resuspendována v 250 µl Diluentu C, ke kterému bylo následně přidáno stejné množství Diluentu C obsahující barvivo PKH26 (20µM roztok). Tento roztok byl inkubován 30 min za laboratorní teploty bez přístupu světla. Barvení bylo zastaveno přidáním 1 ml 1% BSA v PBS (w/v) a tato bakteriální suspenze byla centrifugována (13000 RPM, 10 min, Centrifuga Eppendorf 5415R). Peleta byla následně 2× promyta pomocí pufru PBS (12000 RPM, 5 min, Centrifuga Eppendorf 5415R).

Koncentrace bakterií v obarvené suspenzi byla stanovena z měření optické denzity při 600 nm (spektrofotometr Helios alpha). Jako blank byl použit roztok PBS. Pro výpočet byl použit vzorec:

$$CFU = A_{600} \cdot 6 \cdot 10^8 \cdot \text{ředění},$$

kde CFU je koncentrace bakterií v 1 ml (z angl. „Colony-forming-unit“).

4.6.3.3 Bakteriální adhezní test po transfekci buněčných linií ARCA mRNA

Před samotným experimentem bylo nutno metodu optimalizovat výběrem vhodné koncentrace přidávaných fluorescenčně značených bakterií (viz kapitola 5.1.3.1).

Po 24hodinové transfekci buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 (viz kapitola 4.5) byly buňky o koncentraci 10^5 buněk/jamku obarveny pomocí barviva PKH67 (viz kapitola 4.6.3.1) a ponechány při 37°C. Bakteriální suspenze byla fluorescenčně značena pomocí barviva PKH26 (viz kapitola 4.6.3.2). Buňky byly 2× promyty 150 µl pufru PBS a do každé jamky bylo poté přidáno 10^8 fluorescenčně značených bakterií (80 µl/jamku). Bakterie byly s buňkami inkubovány po dobu 2 hodin za laboratorní teploty bez přístupu světla.

Po inkubaci bylo provedeno kontrolní měření fluorescence. Vlnové délky excitace/emise pro sloučeninu PKH26 byly 522/569 nm (gain 133), pro sloučeninu PKH67 470/505 nm (gain 135). Destička byla čtena zespodu bez víčka. Po změření

byly jamky promyty 3× 150 µl PBS, převrstveny 50 µl PBS a změřeny při totožném nastavení spektrofluorimetru Tecan. Na závěr byly buňky s bakteriemi hodnoceny vizuálně na mikroskopu Nikon ECLIPSE TE2002-U v programu NIS-Elements AR 2.30.

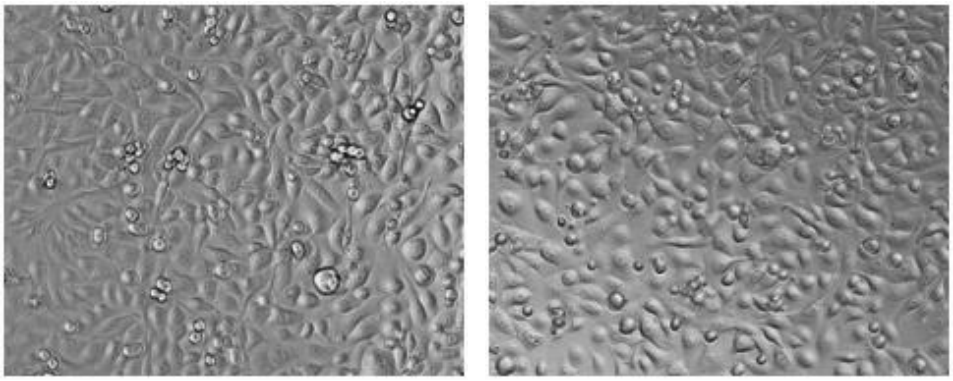
5. Výsledky

Pro experimentální práci byly využity komerčně dodávané (ATCC®) buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1, což jsou imortalizované buněčné linie z plicního epitelu. Linie NuLi-1 byla získána od zdravých jedinců, její doba zdvojení je přibližně 43 hodin. Linie CuFi-1 byla získána od pacientů trpících CF, u kterých se vyskytuje nejčastější mutace F508del. Její doba zdvojení je kratší, a to přibližně 26 hodin. U této buněčné linie sice dochází k expresi CFTR proteinu, ale ten je špatně sbalen, a proto degradován. Následně není zabudován do plazmatické membrány, čímž je narušen transport chloridových iontů přes membránu [51, 52].

Počet subkultivací obou linií by měl být omezen na patnáct, protože při následném použití již může docházet ke změnám vlastností dané buněčné linie, jako je např. změna počtu nebo aktivity iontových kanálů [59].

Po rozmražení zmíněných buněčných linií byla jejich viabilita přibližně 70%, při následujících subkultivacích se však viabilita zvyšovala. Pro experimenty byly použity asi 14 dní staré kultury, jejichž viabilita dosahovala zhruba 95 %.

Dané linie jsou adherentní, a proto s nimi bylo pracováno v 96-jamkových destičkách Corning Cellbind, jejichž povrch je speciálně upraven tak, aby během experimentu nedocházelo k odmytí buněk. Konfluentní vrstva linií NuLi-1 a CuFi-1 je znázorněna na obrázku č. 5.1 na straně 60. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U v programu NIS-Elements AR 2.30 za použití filtru VIS pro viditelné záření, kamery Mutech a rozlišení LWD 10×/0,4.



Obrázek č. 5.1: *Mikroskopické snímky konfluentní vrstvy buněčných linií.* Vlevo je buněčná linie NuLi-1, vpravo CuFi-1. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U v programu NIS-Elements AR 2.30 – kamera Mutech, rozlišení LWD 10×/0,4.

5.1 Studium transfekce buněčných linií CFTR-mRNA

Pro tuto diplomovou práci byla využita CFTR-mRNA, která byla syntetizována RNDr. Tomášem Koblasem, Ph. D. (IKEM). Byly syntetizovány dva různé typy mRNA.

První typ mRNA obsahoval na 5‘ konci tzv. syntetickou čepičku „anti-reverse cap analog“ (ARCA) – 3‘-O-Me-m7G(5‘)ppp(5‘)G. Pozice 2‘-OH druhého nukleotidu směrem od 5‘ konce je methylována 2‘-O-methyltransferasou.

Druhý typ mRNA má na 4‘ konci čepičku, která je připojena enzymově. Při enzymové syntéze dochází nejprve k navázání guanosinu a poté k jeho methylaci na pozici N7. Pozice 2‘-OH methylována není.

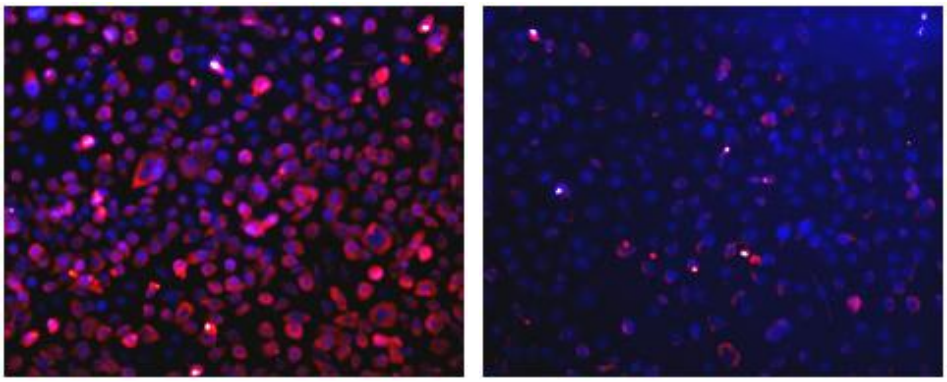
Oba typy mRNA byly připraveny tak, aby kromě standardních nukleotidů obsahovaly také 25 % pseudouridinu a 25 % 5-methylcytidinu. Výsledná koncentrace ARCA mRNA byla 340 ng/µl, enzymové mRNA měla koncentraci 300 ng/µl.

Transfekce buněčných linií *in vitro* syntetizovanou mRNA byla nejprve optimalizována. Byla zvolena dvě rozdílná množství transfekčního činidla (Lipofectamine™ MessengerMAX™) a to 0,15 µl, respektive 0,3 µl/jamku. Při použití 0,3 µl transfekčního činidla/jamku bylo dosaženo po 24h transfekci vyšší exprese CFTR proteinu (data neuvedena). Proto bylo v dalších experimentech používáno toto množství transfekčního činidla.

U metody nepřímé imunifluorescence byly v případě obou typů mRNA použity dvě různé koncentrace, a to 0,1 a 0,2 μg/jamku (viz kapitola 5.1.1.2). V ostatních experimentech byla použita pouze koncentrace 0,2 μg/jamku (viz dále).

5.1.1 Detekce CFTR proteinu metodou nepřímé imunofluorescence

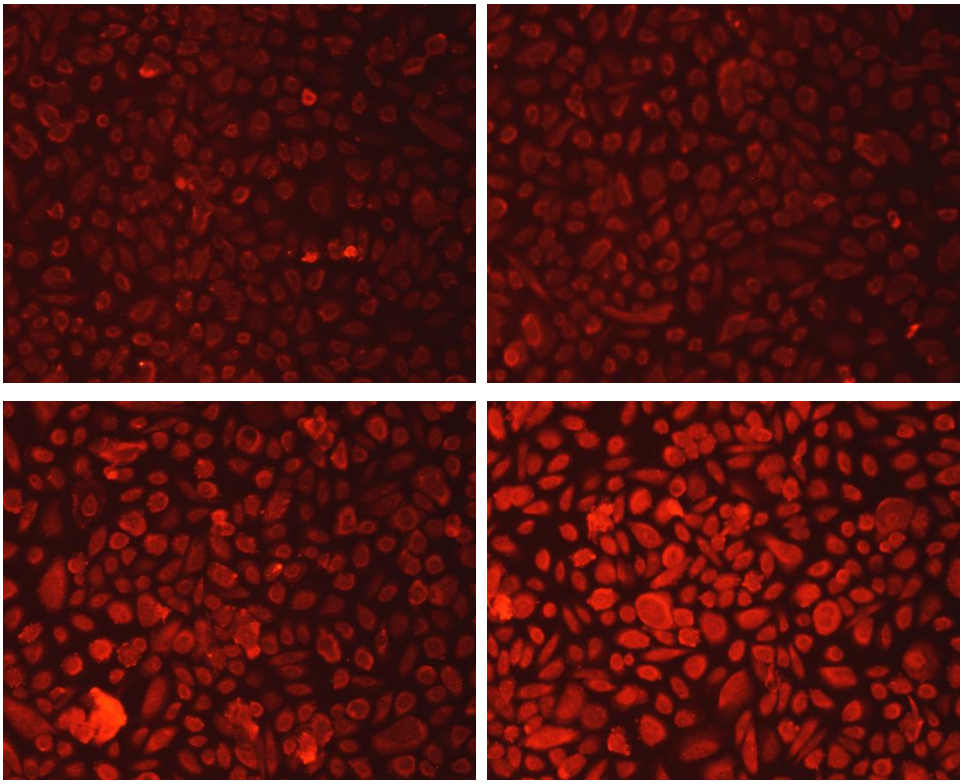
Na obrázku č. 5.2 jsou zobrazeny buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1, kde byl CFTR protein označen jednou z použitých primárních protilátek proti tomuto proteinu (CF3) a poté fluorescenčně značenou sekundární protilátkou Alexa Fluor® 555 (na obrázku červená barva). Modrým barvivem Hoechst byla značena buněčná jádra. Je zřejmé, že u buněčné linie CuFi-1 je v membráně přítomno velmi malé množství CFTR proteinu, a proto dochází k minimální vazbě primární, resp. sekundární protilátky. Naopak u buněčné linie NuLi-1 dochází k normální expresi CFTR proteinu, a tudíž je více patrná fluorescence sekundární protilátky ve srovnání s buněčnou linií CuFi-1.



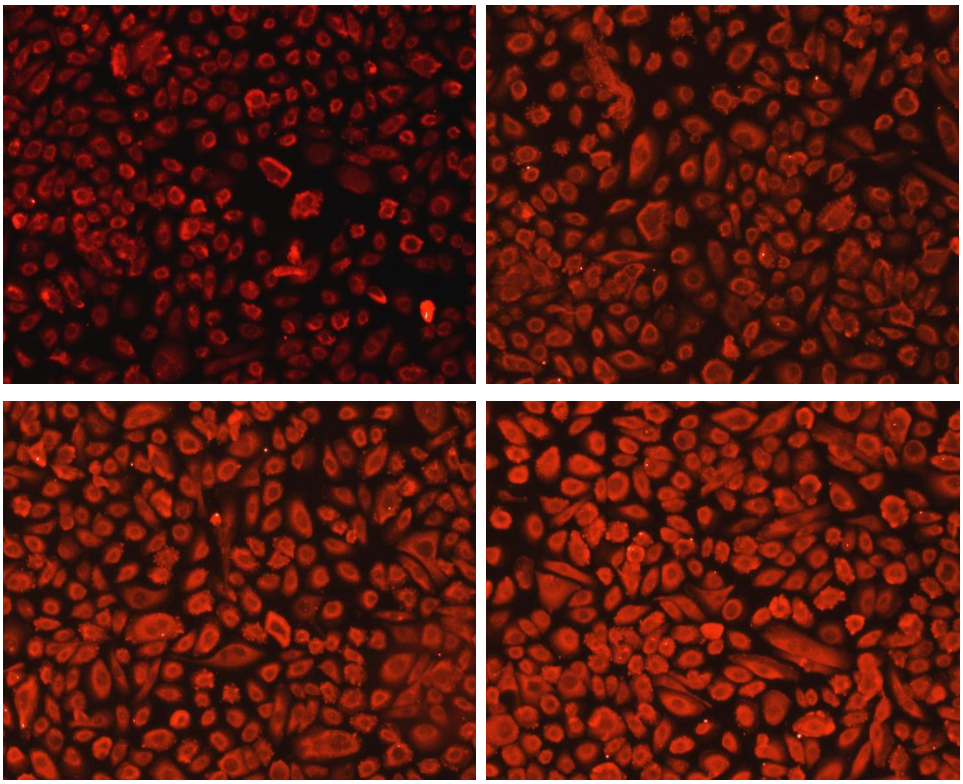
Obrázek č. 5.2: *Fluorescenčně značené buněčné linie.* Vlevo je buněčná linie NuLi-1, vpravo CuFi-1. Červená barva označuje CFTR protein – značený primární protilátkou proti tomuto proteinu (CF3) a poté fluorescenčně značenou sekundární protilátkou Alexa Fluor® 555. Modrá barva Hoechst označuje buněčné jádro. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U v programu NIS-Elements AR 2.30 – filtr 31002 RdiI C87702 a 31000 DAPI C80600, kamera Mutech, rozlišení LWD 10×/0,4.

5.1.1.1 Optimalizace metody nepřímé imunofluorescence

Nejprve byla stanovena optimální koncentrace primární protilátky, při které je již spolehlivě detekován CFTR protein a zároveň je její koncentrace co nejnižší, aby byla zajištěna její specifita. V této řadě experimentů byla použita pouze buněčná linie NuLi-1. Byly studovány 3 různé protilátky proti tomuto proteinu – CF3, která se váže na extracelulární smyčku CFTR proteinu, a směs protilátek proti C konci a R doméně CFTR proteinu. Protilátka CF3 byla ředěna v poměru 1:200, 1:400, 1:600 a 1:800, směs protilátek proti C konci a R doméně CFTR proteinu smíchaných v poměru 1:1 byla dále ředěna v poměru 1:50, 1:100, 1:200 a 1:400. Jednotlivé snímky jsou znázorněny na obrázku č. 5.3a/b na straně 62, resp. 63. V případě protilátky CF3 bylo zvoleno ředění 1:600, pro směs protilátek ředění 1:400.

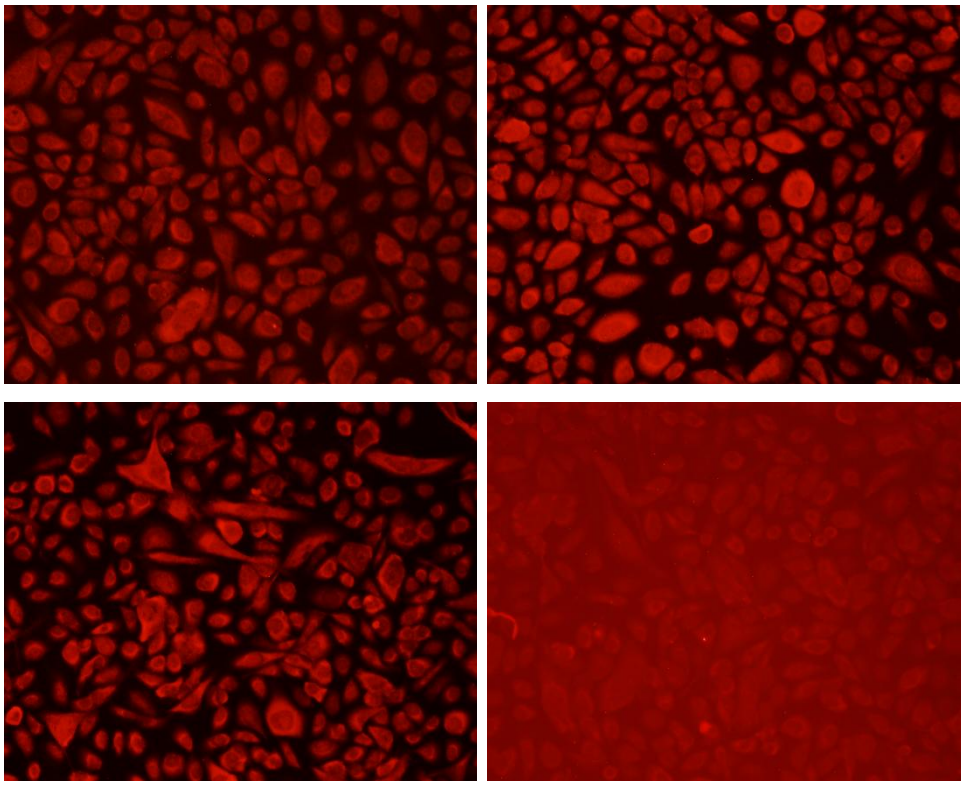


Obrázek č. 5.3a: *Detekce CFTR proteinu u buněčné linie NuLi-1 pomocí protilátky CF3.* Různé koncentrace uvedené primární protilátky – zleva nahoře poměr 1:800, 1:600, 1:400, 1:200. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U v programu NIS-Elements AR 2.30 – filtr 31002 RdiI C87702, kamera Mutech, rozlišení LWD 10×/0,4.

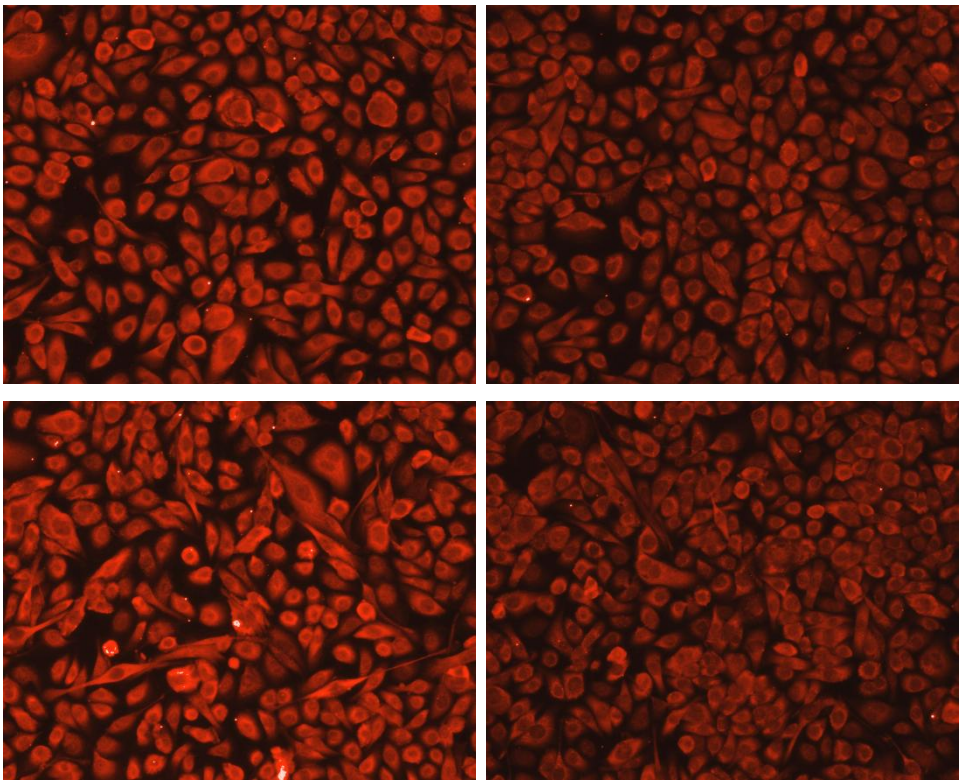


Obrázek č. 5.3b: *Detekce CFTR proteinu u buněčné linie NuLi-1 pomocí směsi protilátek proti C konci a R doméně CFTR proteinu.* Různé koncentrace směsi uvedených primárních protilátek – zleva nahoře poměr 1:400, 1:200, 1:100, 1:50. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U v programu NIS-Elements AR 2.30 – filtr 31002 RdiI C87702, kamera Mutech, rozlišení LWD 10×/0,4.

Dále byl sledován vliv složení blokovacího roztoku na kvalitu detekce CFTR proteinu, a to jak u buněčné linie NuLi-1 tak u linie CuFi-1. Opět byly použity tři různé protilátky. V blokovacím roztoku bylo přítomno buď tzv. Donkey serem (DS) nebo sušené mléko. Obě tyto látky byly ve výsledném roztoku obsaženy v poměru 1:9 (0,1 g mléka, resp. 100 µl DS na 1 ml roztoku). Výsledky tohoto stanovení jsou zobrazeny na obrázcích č. 5.4a/b na straně 64 a 65. Při použití sušeného mléka nebyly výsledné snímky zobrazující CFTR protein tak kvalitní, a proto bylo vybráno DS.



Obrázek č. 5.4a: *Použití rozdílných blokovacích roztoků při použití primární protilátky CF3.* Snímky vlevo – v roztoku obsaženo tzv. Donkey serum, snímky vpravo – v roztoku obsaženo sušené mléko. Na horních snímcích je buněčná linie NuLi-1, na dolních CuFi-1. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U v programu NIS-Elements AR 2.30 – filtr 31002 RdiI C87702, kamera Mutech, rozlišení LWD 10×/0,4.

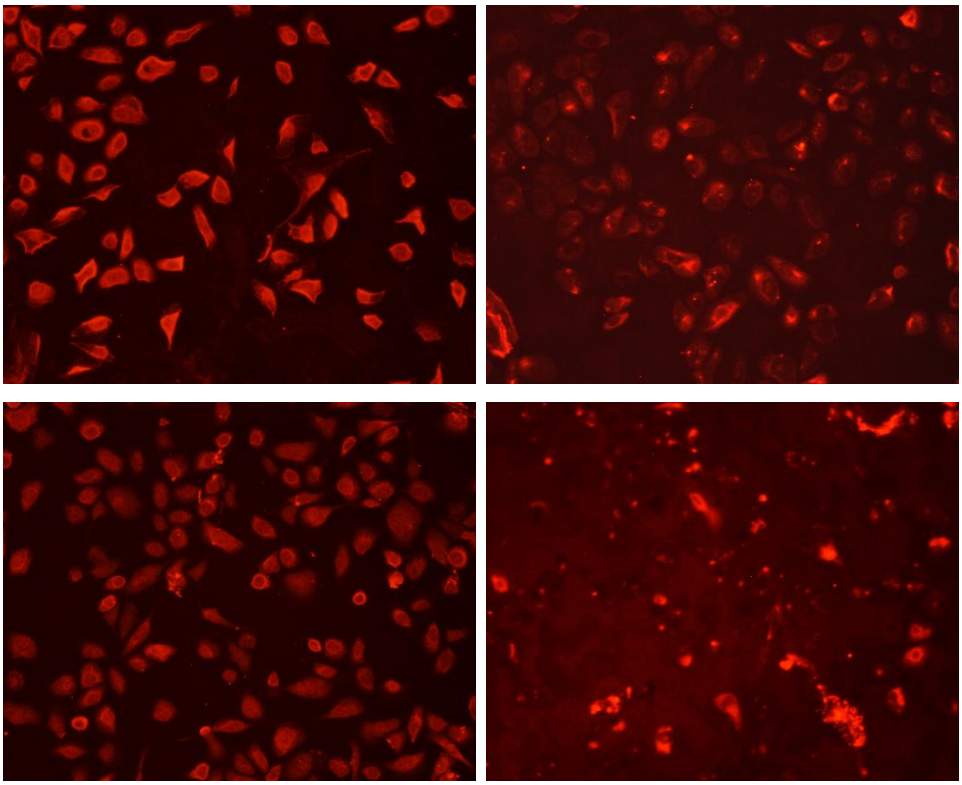


Obrázek č. 5.4b: *Použití rozdílných blokovacích roztoků při použití směsi primárních protilátek proti C konci a R doméně CFTR proteinu.* Snímky vlevo – v roztoku obsaženo tzv. Donkey serum, snímky vpravo – v roztoku obsaženo sušené mléko. Na horních snímcích je buněčná linie NuLi-1, na dolních CuFi-1. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U v programu NIS-Elements AR 2.30 – filtr 31002 RdiI C87702, kamera Mutech, rozlišení LWD 10×/0,4.

Poslední optimalizovanou složkou byla přítomnost detergentu Triton X-100 v blokovacím roztoku a roztoku, kterým byla ředěna primární protilátka, tzv. „antibody diluent“ (AD). Tento detergent permeabilizuje membrány buněk, a proto má vliv na průnik primární protilátky dovnitř buňky. V tomto případě byla použita pouze primární protilátka CF3, neboť se váže na extracelulární epitop CFTR proteinu, a tím by měla při vyloučení Tritonu X-100 z roztoků detekovat pouze protein, který je zanořen v membráně. Pro snížení nespecifity sekundární protilátky byla tato protilátka vždy ředěna blokovacím roztokem s Tritonem X-100.

Z obrázku č. 5.5 na straně 66 je zřejmé, že při použití výše zmíněných roztoků bez přítomnosti Tritonu X-100 dochází k detekci CFTR proteinu, který je zanořen

v membráně. Dále je patrné, že buněčná linie NuLi-1 obsahuje v membráně větší množství tohoto proteinu než linie CuFi-1. Při použití roztoků s detergentem Triton X-100 detekuje protilátka CF3 nejspíše i protein nacházející se uvnitř buňky.



Obrázek č. 5.5: *Detekce CFTR proteinu pomocí primární protilátky CF3 ředěné roztokem v nebo bez přítomnosti detergentu Triton X-100.* Vlevo byly použity roztoky obsahující Triton X-100, vpravo Triton X-100 obsažen nebyl. Na horních snímcích je buněčná linie NuLi-1, na dolních CuFi-1. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U v programu NIS-Elements AR 2.30 – filtr 31002 RdiI C87702, kamera Mutech, rozlišení LWD 10×/0,4.

5.1.1.2 Ověření účinnosti transfekce buněčných linií pomocí CFTR-mRNA metodou nepřímé imunofluorescence

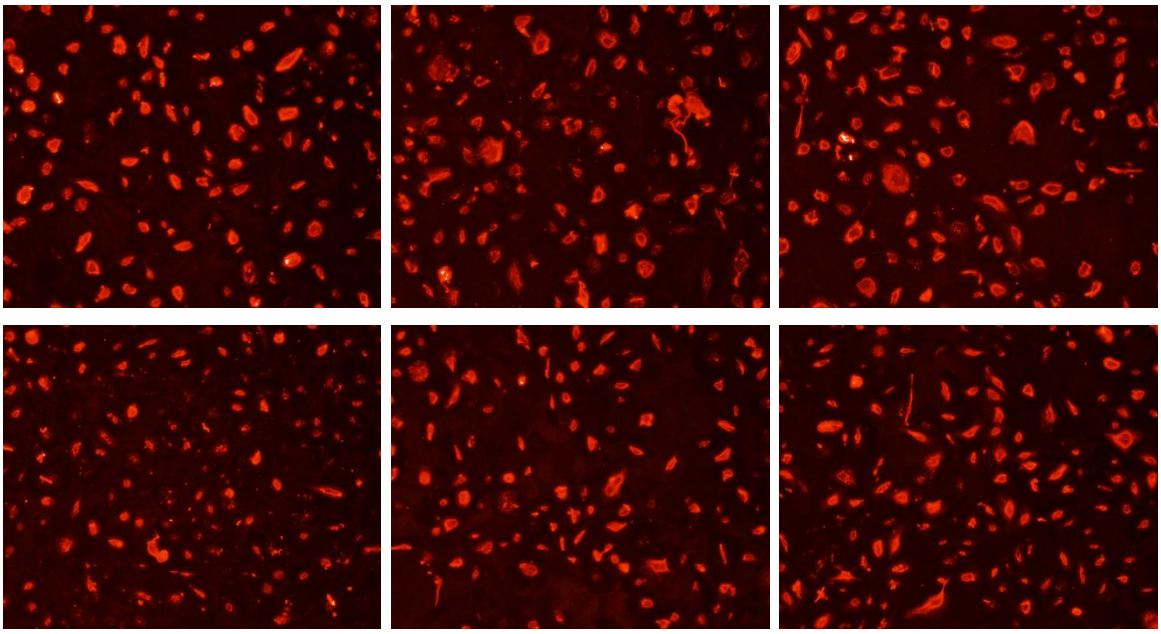
Buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 byly transfekovány oběma typy syntetizované mRNA (ARCA i enzymová) ve dvou různých koncentracích – 0,1, resp. 0,2 μg mRNA/jamku. Po 24 hodinách byl CFTR protein vizualizován metodou nepřímé imunofluorescence.

Podle výsledků uvedených v předešlé kapitole byla primární protilátka CF3 ředěna 1:600 a roztok, kterým byla ředěna, neobsahoval Triton X-100. Jak již bylo řečeno, byl tímto typem vizualizace detekován pouze CFTR protein internalizovaný v membráně. Směs primárních protilátek proti C konci a R doméně CFTR proteinu smíchána v poměru 1:1 byla ředěna 1:400 a roztok pro její ředění obsahoval Triton X-100. V tomto případě bylo detekováno celkové množství CFTR proteinu přítomné v buňkách.

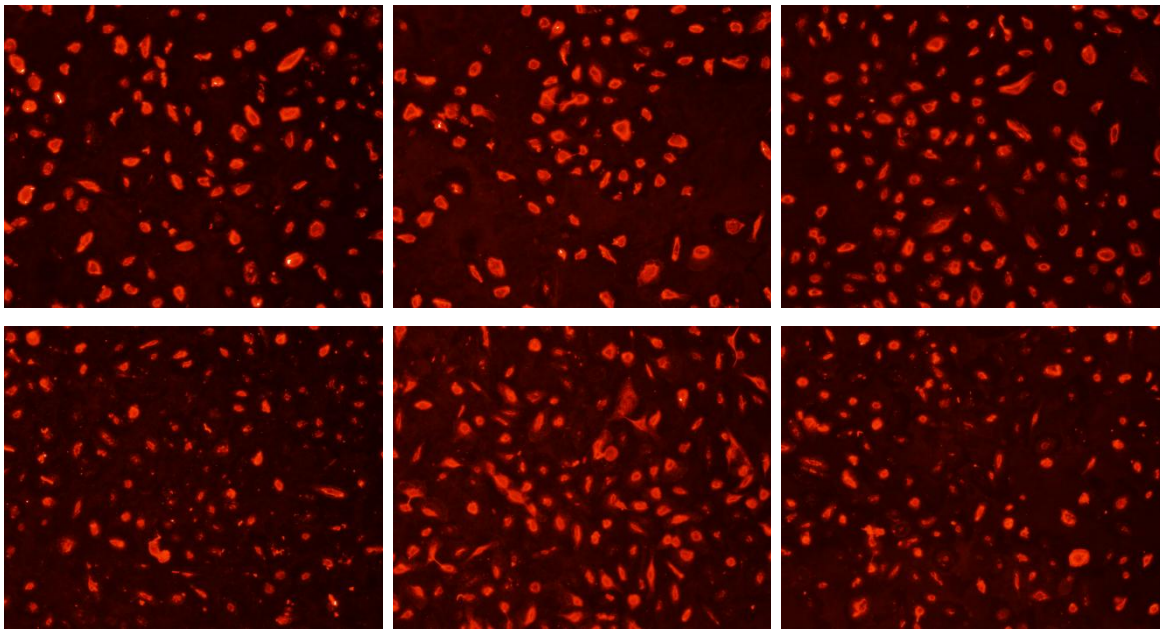
Opět bylo potvrzeno, že buněčná linie NuLi-1 obsahuje v membráně více CFTR proteinu ve srovnání s linií CuFi-1 (obrázky č.5.6a/b). Při použití primární protilátky CF3 však po 24h transfekci linie CuFi-1 jak ARCA mRNA (obrázek č. 5.6a, strana 68) tak enzymovou mRNA (obrázek č. 5.6b, strana 69) došlo ke zvýšení exprese tohoto proteinu a jeho internalizaci do membrány, které bylo srovnatelné nebo i vyšší než u linie NuLi-1. Transfekce 0,1 μg enzymové mRNA byla nejúčinnější. Transfekce buněčné linie NuLi-1 oběma typy mRNA nevedlo ke znatelnému zvýšení CFTR proteinu v membráně buněk ve srovnání s kontrolou, která transfekována nebyla.

Při použití směsi primárních protilátek proti C konci a R doméně CFTR proteinu detekující celkové množství CFTR proteinu v buňce je jasně patrný koncentračně závislý nárůst exprese tohoto proteinu jak při použití ARCA mRNA (obrázek č. 5.6c, strana 70), tak při použití enzymové mRNA (obrázek č. 5.6d, strana 71) u buněčné linie NuLi-1 i CuFi-1.

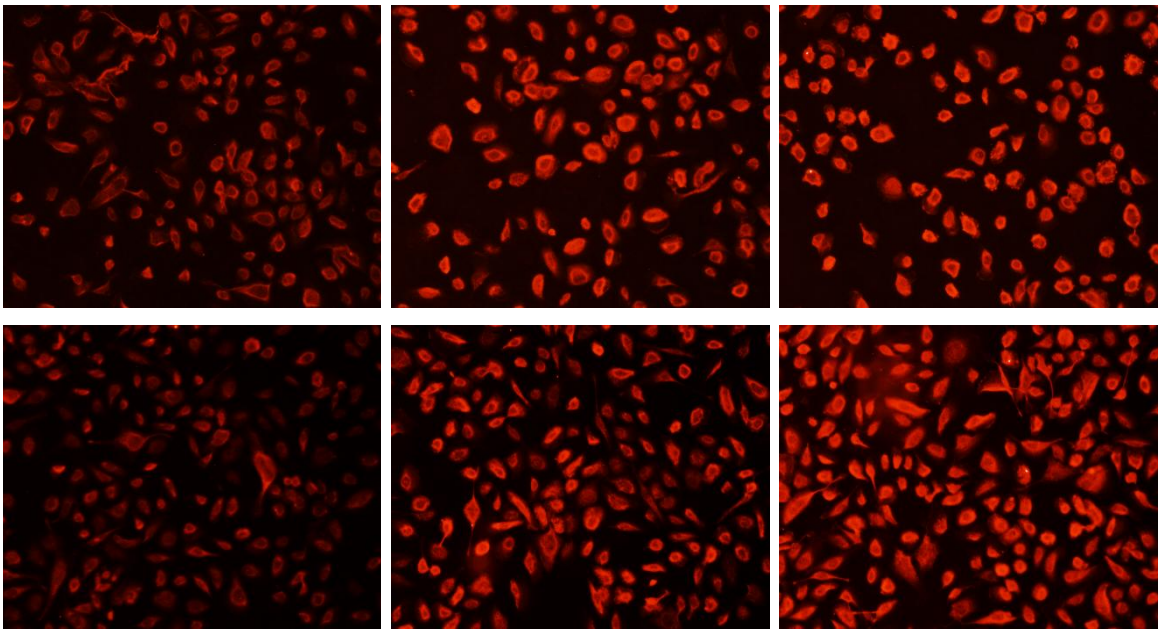
Bylo tedy prokázáno zvýšení exprese CFTR proteinu při použití zmíněných mRNA.



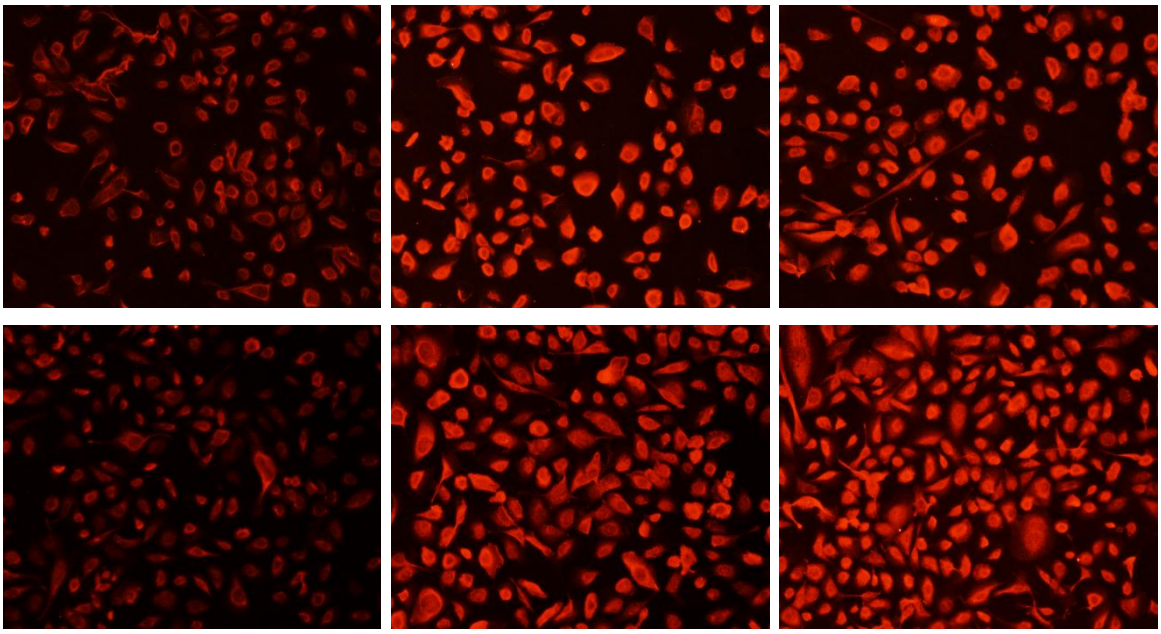
Obrázek č. 5.6a: *Transfekce buněčné linie NuLi-1 (horní řada) a CuFi-1 (dolní řada) ARCA mRNA.* Vlevo je kontrola (bez transfekce mRNA), uprostřed transfekce 0,1 µg mRNA/jamku, vpravo transfekce 0,2 µg mRNA/jamku. Vizualizace CFTR proteinu provedena metodou nepřímé imunofluorescence za použití primární protilátky CF3. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U v programu NIS-Elements AR 2.30 – filtr 31002 RdiI C87702, kamera Mutech, rozlišení LWD 10×/0,4.



Obrázek č. 5.6b: *Transfekce buněčné linie NuLi-1 (horní řada) a CuFi-1 (dolní řada) enzymovou mRNA.* Vlevo je kontrola (bez transfekce mRNA), uprostřed transfekce 0,1 µg mRNA/jamku, vpravo transfekce 0,2 µg mRNA/jamku. Vizualizace CFTR proteinu provedena metodou nepřímé imunofluorescence za použití primární protilátky CF3. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U v programu NIS-Elements AR 2.30 – filtr 31002 RdiI C87702, kamera Mutech, rozlišení LWD 10×/0,4.



Obrázek č. 5.6c: *Transfekce buněčné linie NuLi-1 (horní řada) a CuFi-1 (dolní řada) ARCA mRNA.* Vlevo je kontrola (bez transfekce mRNA), uprostřed transfekce 0,1 µg mRNA/jamku, vpravo transfekce 0,2 µg mRNA/jamku. Vizualizace CFTR proteinu provedena metodou nepřímé imunofluorescence za použití směsi primárních protilátek proti C konci a R doméně CFTR proteinu. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U v programu NIS-Elements AR 2.30 – filtr 31002 RdiI C87702, kamera Mutech, rozlišení LWD 10×/0,4.



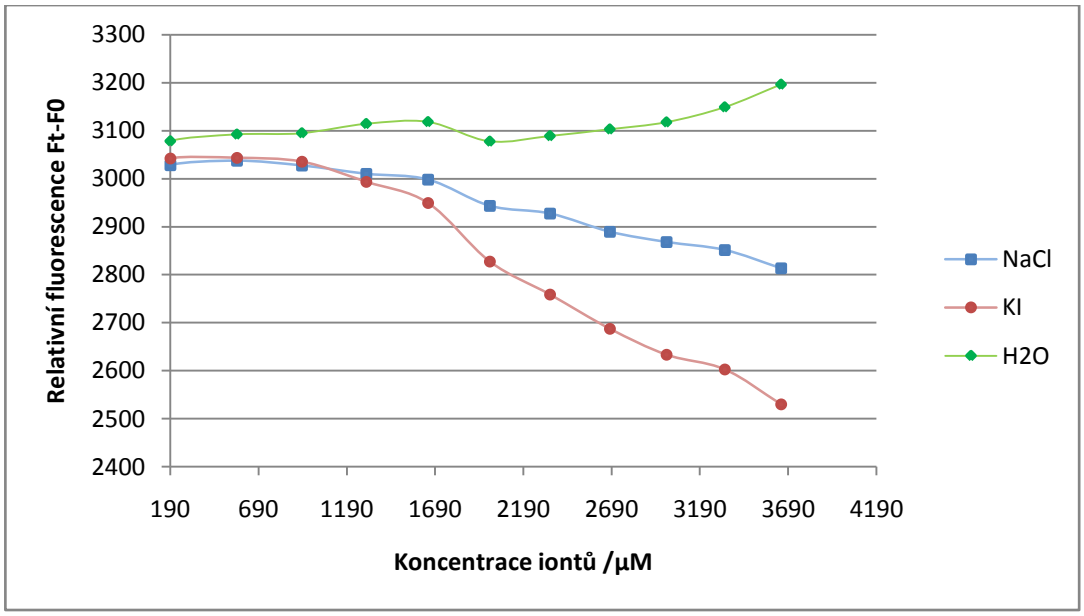
Obrázek č. 5.6d: *Transfekce buněčné linie NuLi-1 (horní řada) a CuFi-1 (dolní řada) enzymovou mRNA.* Vlevo je kontrola (bez transfekce mRNA), uprostřed transfekce 0,1 μg mRNA/jamku, vpravo transfekce 0,2 μg mRNA/jamku. Vizualizace CFTR proteinu provedena metodou nepřímé imunofluorescence za použití směsi primárních protilátek proti C konci a R doméně CFTR proteinu. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U v programu NIS-Elements AR 2.30 – filtr 31002 RdiI C87702, kamera Mutech, rozlišení LWD 10×/0,4.

5.1.2 Studium transportu iontů prostřednictvím CFTR proteinu transfekovaných buněk

Funkčnost CFTR proteinu, neboli transport iontů skrze tento kanál, byla pozorována pomocí fluorescenčního barviva MQAE, které je senzitivní vůči halogenovým iontům. Metoda byla optimalizována v rámci mé bakalářské práce [103]. Fluorescence barviva byla měřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro za využití programu i-control 1.8 vždy v různých časových intervalech. U veškerých experimentů byla viabilita buněk vždy více než 70%.

5.1.2.1 Vliv NaCl, resp. KI na fluorescenci MQAE

Již v rámci bakalářské práce bylo zjištěno, že reprodukovatelnost uvedené metody je problematická. Proto byla sledována citlivost této metody. Z literární rešerše bylo zjištěno, že fluorescence barviva MQAE je zhášena nejen chloridy, ale také jodidy [103]. Byla tedy studována citlivost barviva MQAE vůči uvedeným halogenům v porovnání s kontrolní skupinou, kde byla přidávána pouze destilovaná voda místo halogenidů. Z uvedených výsledků (graf na obrázku č. 5.7) je zřejmé, že jodidové ionty více zhášejí fluorescenci MQAE než ionty chloridové. V dalších experimentech proto bylo pracováno s jodidovými ionty, pomocí nichž je také možno studovat aktivitu CFTR kanálu. Buněčné linie však musí být alespoň 1 hodinu inkubovány v přítomnosti pufru obsahujícím jodidové ionty, aby došlo k intracelulární záměně za ionty chloridové.

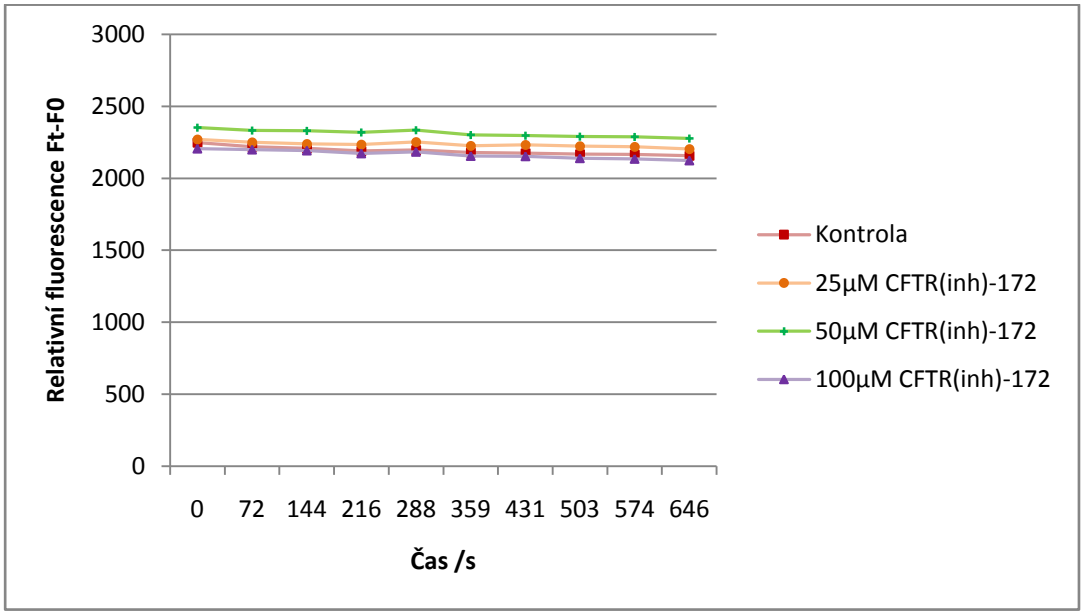


Obrázek č. 4.7: *Vliv halogenidů na fluorescenci 10mM MQAE. Kontrolní vzorky obsahovaly destilovanou vodu.* Měřeno na spektrofluorimetru Tecan, 362/452 nm, gain 80, dolní čtení destičky bez víčka. Směrodatná odchylka nebyla více než 6 %.

5.1.2.2 Stanovení změny fluorescence MQAE vlivem CFTR(inh)-172

CFTR(inh)-172 je jedním z neúčinnějších inhibitorů CFTR kanálu. Pomocí tohoto inhibitoru je ověřováno, zda měřený transport iontů skrze tento kanál probíhá.

Nejprve bylo pozorováno, zda samotný inhibitor neovlivňuje fluorescenci barviva MQAE. Byly použity 3 různé koncentrace tohoto inhibitoru, a to 25µM, 50µM a 100µM. Fluorescence MQAE byla měřena na spektrofluorimetru Tecan v různých časových intervalech. Výsledný graf je znázorněn na obrázku č. 5.8. Bylo zjištěno, že CFTR(inh)-172 nijak neovlivňuje fluorescenci barviva MQAE.



Obrázek č. 5.8: *Vliv CFTR(inh)-172 na fluorescenci 10mM MQAE.* Byly použity 3 koncentrace tohoto inhibitoru - 25µM, 50µM a 100µM. Měřeno na spektrofluorimetru Tecan, 362/452 nm, gain 80, dolní čtení destičky bez víčka. Směrodatná odchylka nebyla více než 7 %.

5.1.2.3 Ověření funkčnosti CFTR kanálu po transfekci buněčných linií in vitro syntetizovanou mRNA

Pro 24h transfekci buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 byla využita syntetizovaná ARCA mRNA v množství 0,2µg/jamku. Jamky byly po 24 hodinách obarveny 10mM MQAE a následně byl sledován transport jodidů skrze CFTR protein.

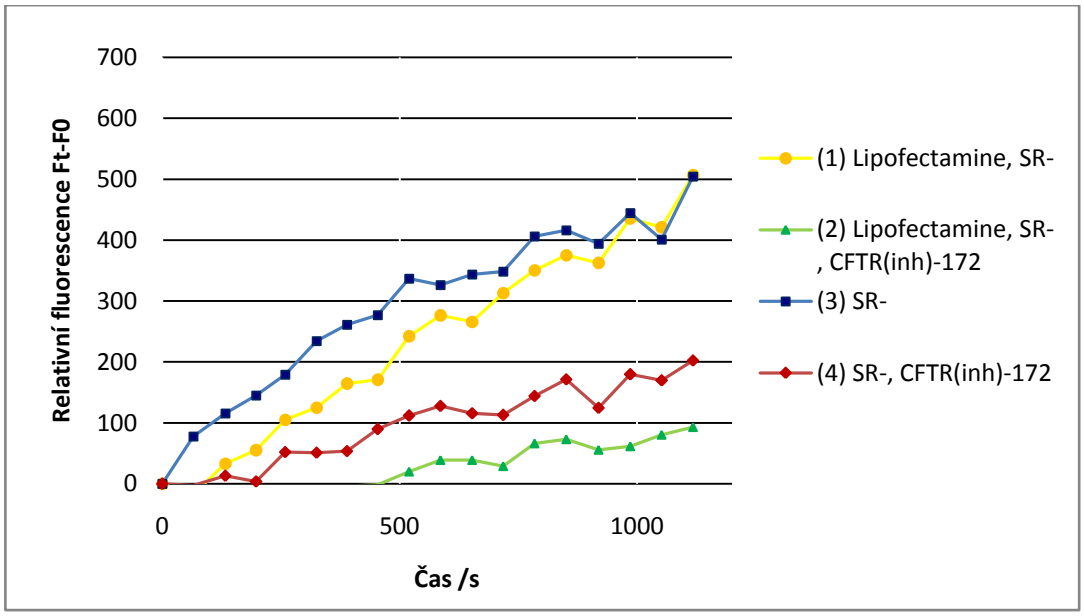
U buněčné linie CuFi-1 skupina (1) byla transfekována mRNA a promyta pufrem SR^-, skupina (2) navíc obsahovala 50µM CFTR(inh)-172. Tyto skupiny byly srovnávány s kontrolními skupinami (3) a (4), které nebyly transfekovány mRNA.

Skupina (3) obsahovala pufr SR^-, skupina (4) navíc 50μM CFTR(inh)-172. U buněčné linie NuLi-1 bylo místo mRNA přidáváno 0,3 μl transfekčního činidla Lipofectamine.

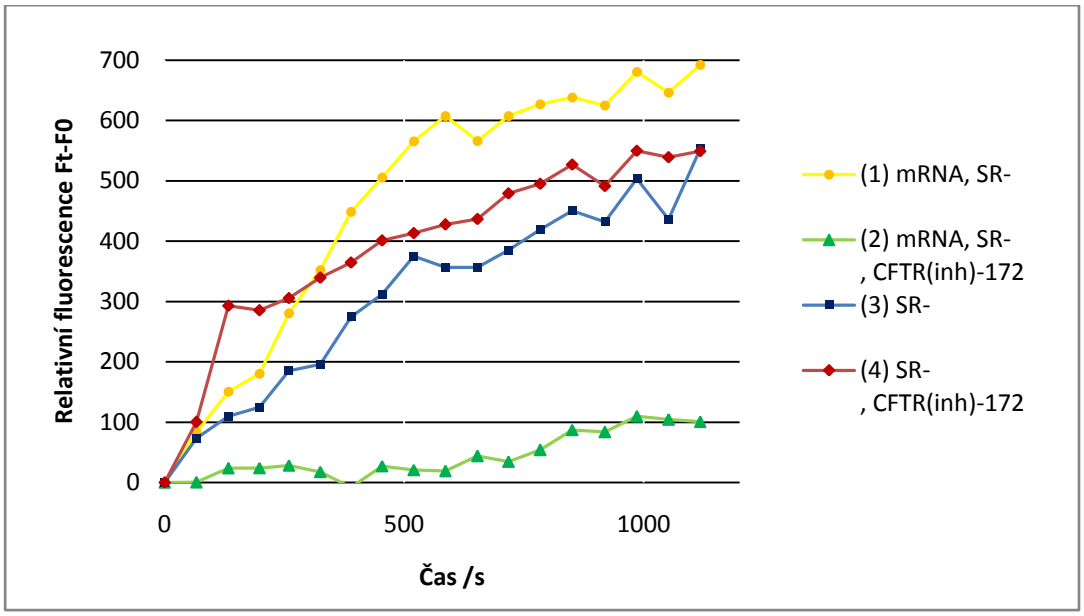
Výsledky byly zpracovány tak, že od fluorescence daných skupin v daném čase byla odečtena vždy hodnota fluorescence v čase 0, tedy fluorescence skupiny (5) obsahující pufr SR^+, resp. (6) obsahující pufr SR^+ a 50μM CFTR(inh)-172. Fluorescence MQAE byla měřena na spektrofluorimetru Tecan v různých časových intervalech. Výsledky jsou znázorněny na grafu na obrázku č. 5.9a/b na straně 75 a 76.

Transport jodidových iontů u buněčné linie NuLi-1 vzrůstal s časem a byl inhibován CFTR(inh)-172. Transfekční činidlo Lipofectamine signifikantně neovlivnilo transport těchto iontů skrze CFTR kanál (obrázek č. 5.9a, strana 75).

U buněčné linie CuFi-1 nedochází k inhibici CFTR kanálu inhibitorem CFTR(inh)-172. Avšak po 24h transfekci ARCA mRNA dochází ke zvýšení transportu jodidových iontů a navíc je tento transport inhibován zmíněným inhibitorem. Je tedy zřejmé, že došlo k napravení funkce CFTR proteinu transfekcí buněčné linie CuFi-1 ARCA mRNA (obrázek č. 5.9b, strana 76).



Obrázek č. 5.9a: *Vliv CFTR(inh)-172 na transport jodidů skrze CFTR kanál u buněčné linie NuLi-1 obarvené 10mM MQAE.* Skupina (1) obsahovala transfekční činidlo Lipofectamine a byla promyta pufrem SR^-, skupina (2) obsahovala navíc 50µM CFTR(inh)-172. Skupina (3) byla promyta pufrem SR^-, skupina (4) obsahovala oproti skupině (3) 50µM CFTR(inh)-172. Měřeno na spektrofluorimetru Tecan, 362/452 nm, gain 80, dolní čtení destičky bez víčka. Směrodatná odchylka nebyla více než 25 %.



Obrázek č. 5.9b: *Vliv transfekce ARCA mRNA na transport jodidů skrze CFTR kanál obarvené 10mM MQAE za využití CFTR(inh)-172.* Skupina (1) byla transfekována ARCA mRNA a promyta pufrem SR^-, skupina (2) byla transfekována ARCA mRNA a navíc obsahovala 50µM CFTR(inh)-172. Tyto skupiny byly srovnávány s kontrolními skupinami (3) a (4), které nebyly transfekovány mRNA. Skupina (3) byla promyta pufrem SR^-, skupina (4) obsahovala oproti skupině (3) 50µM CFTR(inh)-172. Měřeno na spektrofluorimetru Tecan, 362/452 nm, gain 80, dolní čtení destičky bez víčka. Směrodatná odchylka nebyla více než 25 %.

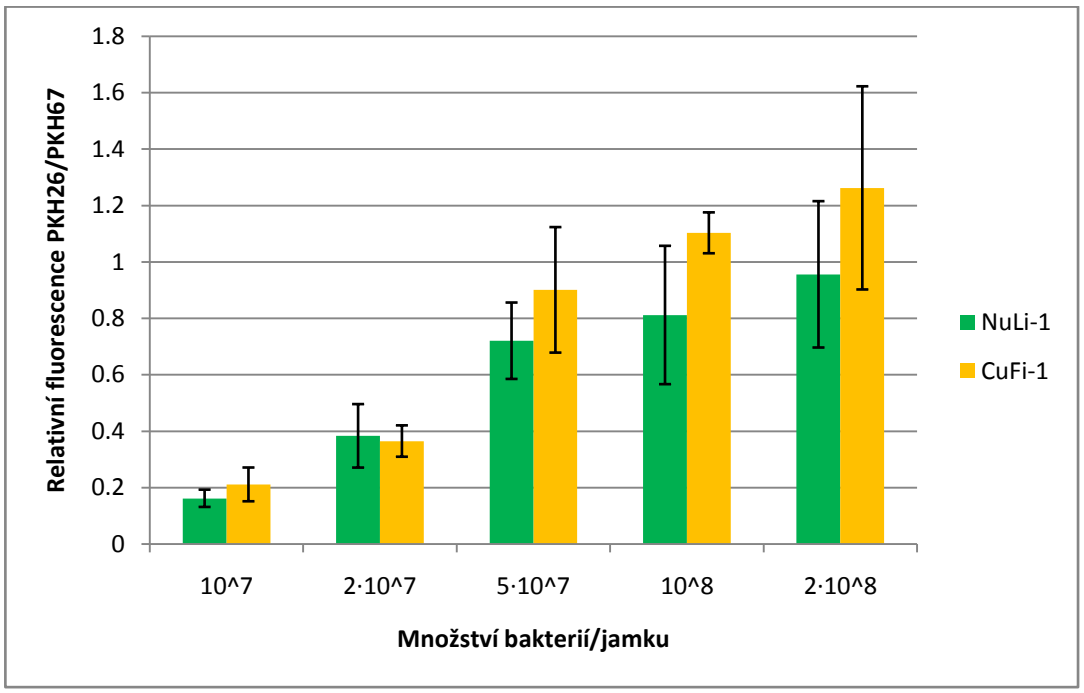
5.1.3 Ověření účinnosti transfekce prostřednictvím změny adheze bakterií *Pseudomonas Aeruginosa*

Bylo studováno, zda zvýšení exprese CFTR proteinu po transfekci buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 syntetickou ARCA mRNA ovlivní bakteriální adhezi *P. aeruginosa* (kmen č. 966). Pro vizualizaci a kvantifikaci bakterií bylo použito fluorescenční barvivo PKH26, u plicních buněk fluorescenční barvivo PKH67. Byla porovnávána adheze bakterií na buněčnou linii NuLi-1 a CuFi-1. Optimalizace této metody byla provedena Mgr. Libuší Noskovou v rámci její bakalářské, resp. diplomové práce [109, 110]. Výsledné grafy byly zpracovány jako vzájemné poměry fluorescencí PKH26/PKH67. Fluorescence byla měřena na spektrofluorimetru Tecan.

5.1.3.1 Výběr vhodné koncentrace fluorescenčně značených bakterií

Bylo použito 5 koncentrací fluorescenčně značených bakterií přidávaných k fluorescenčně značeným buňkám, a to 10^7, $2{\cdot}10^7$, $5{\cdot}10^7$, 10^8, $2{\cdot}10^8$ bakterií/jamku. Výsledný graf je znázorněn na obrázku č. 5.10.

Z výsledků je zřejmé, že se zvyšujícím se množstvím bakterií vzrůstá jejich adheze na použité buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1, přičemž v případě buněčné linie CuFi-1 je tato adheze vyšší. Pro další experimenty byla vybrána koncentrace 10^8 bakterií/10^5 buněk/jamku.

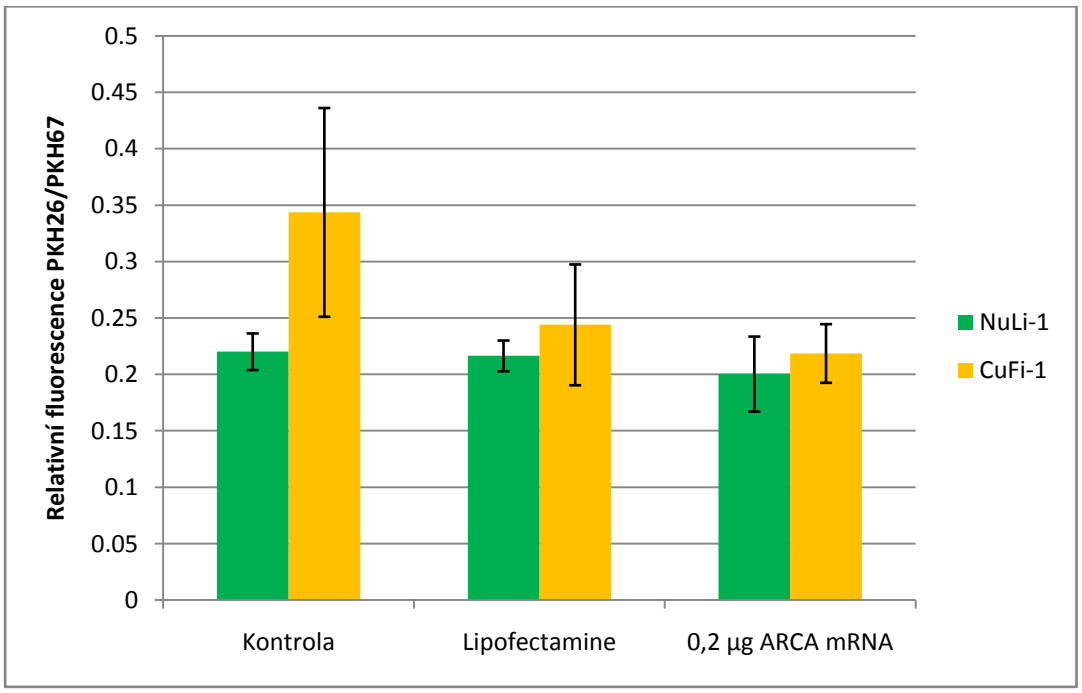


Obrázek č. 5.10: *Výběr vhodné koncentrace fluorescenčně značených bakterií.* Měřeno na spektrofluorimetru Tecan, 470/505 nm pro PKH67 (gain 135), 522/569 nm pro PKH26 (gain 133), dolní čtení destičky bez víčka. Směrodatná odchylka byla maximálně 36 %.

5.1.3.2 Bakteriální adhezní test po transfekci buněčných linií ARCA mRNA

Po 24h transfekci buněčných linií syntetickou ARCA mRNA byla sledována adheze bakterií *P. aeruginosa* na tyto linie. U obou linií byly testovány tři skupiny buněk. První skupina byla kontrolní, ke druhé skupině bylo přidáno pouze transfekční činidlo Lipofectamine, třetí skupina byla transfekována ARCA mRNA (0,2 μg/jamku). Výsledný graf je znázorněn na obrázku č. 5.11.

U buněčné linie CuFi-1 došlo po transfekci ARCA mRNA k poklesu relativní fluorescence PKH26/PKH67, tedy ke snížení adheze bakterií téměř na úroveň buněčné linie NuLi-1. Ke snížení bakteriální adheze došlo také po přidání transfekčního činidla Lipofectamine, které způsobuje penetraci buněk. Adheze bakterií na buněčnou linii NuLi-1 se nemění ani v jednom případě.



Obrázek č. 5.11: *Bakteriální adhezní test po transfekci buněčných linií ARCA mRNA.* Měřeno na spektrofluorimetru Tecan, 470/505 nm pro PKH67 (gain 151), 522/569 nm pro PKH26 (gain 142), dolní čtení destičky bez víčka. Směrodatná odchylka nebyla více než 9 %.

6. Diskuze

Cystická fibróza je geneticky podmíněné onemocnění, které je způsobeno mutací v genu *CFTR* kódujícím stejnojmenný protein. Dochází tak k produkci defektního proteinu nebo k jeho úplné absenci na membráně [6]. Pacienti s CF vážně trpí mnoha sekundárními projevy spojenými s CF, jejich stav může končit až smrtí [1, 2]. Nejvhodnější metodou pro napravení primární příčiny onemocnění, tedy defektní syntézy CFTR proteinu, se zdá být genová terapie. Cílem této metody je vpravit do buněk genetickou informaci, z níž je následně prostřednictvím buněčného aparátu syntetizován funkční protein [57 – 59].

V rámci této diplomové práce byla využita jako genový materiál syntetizovaná mRNA. Výhodou terapie pomocí mRNA je oproti DNA snížení rizika inzerční mutageneze. Avšak tato metoda se potýká i s několika problémy. Největším z nich je nestabilita mRNA uvnitř buňky, neboť dochází k endogenní degradaci. Mimo to je transfekce požadovaného genu pouze přechodná, a proto musí být mRNA podávána opakovaně, čímž se může objevit cytotoxická odpověď imunitního systému na podanou mRNA [57, 69, 71, 72, 74]. Těmto problémům však lze zabránit použitím upravené CFTR-mRNA, která obsahuje dostatečně dlouhý poly(A) 3' konec (minimálně 120 adeninů) a čepičku na 5' konci (m7G(5')ppp(5')G). Takto upravená mRNA je translatována mnohem více než mRNA, která modifikována není, a zároveň je méně imunogenní [70, 73, 75, 95, 111].

Proto byla mRNA používaná v rámci této práce upravena, a to dvěma způsoby, enzymově a synteticky použitím ARCA analogu. Oba typy mRNA obsahují 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-m7G(5')ppp(5')G (tzv. ARCA). Výhodou tohoto analogu je, že díky methylaci na pozici 3'-OH může být následující nukleotid během *in vitro* transkripce navázán pouze na 5' konec a translace *in vivo* je tak účinnější [73, 95]. Všechny uvedené úpravy, jak již bylo řečeno, by měly vést k vyšší stabilitě a účinnější translatovatelnosti mRNA.

Aby byla transfekce účinná, je kromě úpravy mRNA důležité vybrat také vhodný genový nosič. Pro transfekci mRNA jsou vhodné nevirové genové nosiče, jako jsou např. kationtové liposomy nebo kationtové polymery, které jsou z pohledu imunity méně invazivní [63, 67]. Např. za použití CFTR-DNA a liposomálního komplexu pGM160/GL67A byla provedena klinická studie, při které byla potvrzena stabilizace funkce plic po jednom roce podávání [112]. V této diplomové práci byl zvolen kationtový liposom Lipofectamine™ MessengerMAX™.

Účinnost transfekce CFTR-mRNA byla ověřena několika metodami.

V první metodě byla využita pro vizualizaci CFTR proteinu po transfekci buněčných linií syntetizovanou mRNA metoda nepřímé imunofluorescence, při které se na protein nejprve naváže primární protilátka, na kterou se následně váže fluorescenčně značená sekundární protilátka, díky které je CFTR protein mikroskopicky vizualizován. Jako primární protilátka byla použita protilátka CF3, která se váže na extracelulární smyčku CFTR proteinu, a také směs protilátek proti C konci a R doméně CFTR proteinu. Při optimalizaci metody byla stanovena vhodná koncentrace primární protilátky a složení blokovacího roztoku a roztoku pro ředění primární protilátky (tzv. „antibody diluent“, AD). Pro experimenty byla vybrána taková koncentrace primární protilátky, která dobře detekuje protein CFTR a zároveň je co nejnižší, aby byla zajištěna její specifita. Blokování bylo provedeno prostřednictvím tzv. Donkey sera (DS) a sušeného mléka. Vzhledem k zakalení a intenzitě fluorescence výsledných roztoků bylo zvoleno pro další experimenty DS. Poslední optimalizovanou složkou byl detergent Triton X-100, který byl, resp. nebyl přítomen v blokovacím roztoku a roztoku AD. Tato látka permeabilizuje membrány buněk, a proto na ní závisí, zda se primární protilátka dostane dovnitř buněk. Při použití protilátky CF3, která se váže na extracelulární část proteinu, nebyl použit Triton X-100, a tím nedošlo k průniku protilátky dovnitř buněk, a proto je detekován pouze protein, který je zanořen v membráně. Naopak při použití směsi protilátek proti C konci a R doméně CFTR proteinu byl v roztoku přítomen Triton X-100, a tím bylo detekováno celkové množství tohoto proteinu. Pro snížení nespecifity byla sekundární protilátka vždy ředěna v blokovacím roztoku obsahujícím Triton X-100.

Bylo potvrzeno, že buněčná linie NuLi-1 obsahuje v membráně více proteinu CFTR než buněčná linie CuFi-1. Všechny použité primární protilátky velmi dobře detekují CFTR protein. Při použití protilátky CF3 po 24hodinové transfekci linie CuFi-1 oběma typy syntetizované mRNA došlo ke zvýšení exprese CFTR proteinu a jeho zabudování do membrány. Množství proteinu bylo srovnatelné s množstvím detekovaným u buněčné linie NuLi-1, u které nebyla pozorována výrazná změna množství CFTR proteinu na membráně ve srovnání s kontrolní netransfekovanou linií. Transfekce 0,1 μg enzymovou mRNA byla nejúčinnější. Avšak při detekci celkového množství CFTR proteinu v buňce, tedy při použití směsi protilátek, došlo k výraznému koncentračně závislému nárůstu exprese tohoto proteinu jak u buněčné linie NuLi-1, tak i CuFi-1, a to jak při použití ARCA mRNA, tak při použití enzymové mRNA.

Funkčnost CFTR proteinu po transfekci buněčných linií, neboli transport iontů skrze tento kanál, byla pozorována za použití fluorescenčního barviva MQAE, které je specificky zhášeno halogenovými ionty. Výhodou použití fluorescenčního indikátoru oproti fyzikálním metodám (např. Ussing chamber, Voltage clamp, ...) je neinvazivnost v buňce, jednoduchá manipulace a možnost měření velmi rychlých transportů iontů přes membránu [113]. Princip metody spočívá ve sledování úbytku iontů uvnitř buněk, tedy zvyšování fluorescence předem obarvených buněk barvivem MQAE. Po obarvení jsou buněčné linie inkubovány s pufrem, který obsahuje vysoké množství sledovaného iontu, jenž se tak ve velké míře dostává dovnitř buněk. Po jeho odebrání je nahrazen pufrem, který naopak obsahuje nulové množství sledovaného iontu, což má za následek vyplavování iontů ven z buněk, čímž se s časem zvyšuje fluorescence, až do vyrovnání vnitřní a vnější koncentrace iontů [105, 106, 114].

Bylo stanoveno, že barvivo MQAE je lépe zhášeno jodidovými než chloridovými ionty, a proto bylo v dalších experimentech pracováno s jodidovými ionty. Avšak aby došlo uvnitř buněk k výměně chloridových iontů za jodidové, bylo potřeba buněčné linie inkubovat s pufrem obsahujícím jodidy minimálně 1 hodinu.

Pro ověření, že jsou ionty transportovány skrze CFTR kanál, byl použit inhibitor CFTR(inh)-172, který stabilizuje uzavřený stav CFTR proteinu tím, že se váže na NBD. Samotný inhibitor neovlivňoval fluorescenci MQAE. Vzhledem k tomu,

že u buněčné linie CuFi-1 je v membráně přítomno velmi malé množství CFTR proteinu, což bylo potvrzeno i dalšími experimenty, nedochází k inhibici transportu iontů inhibitorem CFTR(inh)-172. Naopak u buněčné linie NuLi-1 je tento transport uvedeným inhibitorem výrazně snížen.

Avšak po 24h transfekci buněčné linie CuFi-1 ARCA mRNA došlo ke zvýšenému transportu sledovaných iontů oproti kontrolním liniím a tento transport byl inhibován zmíněným specifickým inhibitorem CFTR kanálu. Je proto možné konstatovat, že po transfekci buněčné linie CuFi-1 ARCA mRNA došlo ke zvýšení syntézy funkčního proteinu CFTR, a tedy i jeho množství na membráně buněk, což způsobuje snadnější a rychlejší vyplavování sledovaných iontů z buněk, a tedy i zvýšení fluorescence MQAE, což je ve shodě s dříve publikovanými výsledky [105, 106, 114].

Poslední metodou stanovení účinnosti transfekce bylo sledování adheze bakterií *Pseudomonas aeruginosa* na buňky plicního epitelu, tedy linie CuFi-1 a NuLi-1. Infekce touto bakterií jsou nejčastější příčinou chronických infekcí a úmrtí u pacientů trpících CF. Jak již bylo řečeno, u pacientů s CF majících narušený transport chloridových iontů dochází ke snazší kolonizaci plic touto bakterií kvůli změně vnitřního prostředí – dochází k tvorbě hustého hlenu a ke změně glykosylace povrchových struktur buněk plicního epitelu [26 – 28].

Pro kvantifikaci byly buňky značeny fluorescenčními barvivy PKH67 (buňky plicního epitelu) a PKH26 (bakteriální buňky). Tato barviva by neměla ovlivňovat povrchové struktury buněk, a tedy ani bakteriální adhezi. V případě buněčné linie CuFi-1, jejíž buněčné povrchy jsou abnormálně glykosylovány, je adheze bakterií vyšší. Bylo zjištěno, že pro míru adheze je důležitý poměr mezi množstvím bakterií a buněk. Největší rozdíl v adhezi bakterií mezi sledovanými liniemi byl při použití 10^8 bakterií/10^5 buněk/jamku, a proto byla tato koncentrace vybrána pro další experimenty.

U buněčné linie NuLi-1, která má CFTR protein nepoškozen a plně funkční, dochází k nižší bakteriální adhezi než u buněčné linie CuFi-1, která nemá tento protein plně funkční a navíc má pozměněný buněčný povrch umožňující lepší

interakci s bakteriemi. Po transfekci buněčných linií ARCA mRNA je zřejmé, že u buněčné linie CuFi-1 dochází ke snížení adheze bakterií až na úroveň adheze na buněčnou linii NuLi-1.

I vlivem samotného transfekčního činidla Lipofectaminu, které způsobuje penetraci buněk pro snazší průnik mRNA, došlo ke snížení adheze bakterií na buněčnou linii CuFi-1. Samotný nosič má pravděpodobně také vliv na okolní prostředí buněk.

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 nejspíše 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.

7. Shrnutí

Pro transfekci buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1 byla použita stabilní mRNA kódující CFTR protein, která byla syntetizována dvěma způsoby, synteticky za použití ARCA analogu a enzymově.

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

Funkčnost CFTR proteinu byla potvrzena sledováním transportu jodidových iontů skrze tento kanál pomocí fluorescenčního barviva MQAE a specifického inhibitoru CFTR(inh)-172). Po 24h transfekci buněčné linie CuFi-1 došlo k obnově funkce CFTR kanálu.

Účinnost transfekce byla ověřena také prostřednictvím adheze bakterií *Pseudomonas aeruginosa* na obě buněčné linie. Po transfekci buněčných linií ARCA mRNA je zřejmé, že u buněčné linie CuFi-1 došlo ke snížení adheze bakterií až na úroveň adheze na buněčnou linii NuLi-1.

8. Literatura

1. V. Vávrová a kolektiv; *Cystická fibróza*; Grada Publishing, a. s., 2006
2. P. Jakubec; *Cystická fibróza*; Interní medicína 2006; 5; 235–239
3. *http://www.cystickafibroza.cz/*; 30. 12. 2015
4. N. A. Campbell, J. B. Reece; *Biologie*; Computer Press, a. s., 2006
5. *http://www.discern-genetics.org/discern_quality_criteria.php?q=5*; 30. 12. 2015
6. A. Bush, E. W. F. W. Alton, J. C. Davies, U. Griesenbach, A. Jaffe; *Cystic fibrosis in the 21st Century*; Karger, 2006
7. P. A. di Sant'Agnese, R. C. Darling, G. A. Perera, E. Shea; *Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas*; Pediatrics 1953; 12; 549–563
8. S. Farber; *Pancreatic function and disease in early life: V. Pathologic changes associated with pancreatic insufficiency in early life*; Archives of Pathology&Laboratory Medicine1944; 37; 238–250
9. P. M. Quinton; *Chloride impermeability in cystic fibrosis*; Nature 1983; 301; 421–422
10. B. Kerem, J. M. Rommens, J. A. Buchanan, D. Markiewicz, T. K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald, L. C. Tsui; *Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis;*Science1989; 245; 1073–1080
11. J. R. Riordan, J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou; *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA*; Science1989; 245; 1066–1073
12. J. M. Rommens, M. C. Iannuzzi, B. Kerem, M. L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J. L. Cole, D. Kennedy, N. Hidaka; *Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping;* Science1989;245:1059–1065
13. V. Vávrová, J. bartošová a kolektiv CF centra FN Motol; *Cystická fibróza: příručka pro nemocné a jejich rodiče*; Professional publishing; 2009
14. M. Wilschanski, J. Zielenski, D. Markiewicz, L. C. Tsui, M. Corey, H. Levison, P. R. Durie; *Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations*; Journal of Pediatrics1995; 127; 705–710
15. *http://www.cfmedicine.com/htmldocs/cftext/basicproblem.htm*; 1. 1. 2016
16. M. Y. Ng, W. Flight, E. Smith; *Pulmonary complications of cystic fibrosis*; Clinical Biology 2014; 69; 153–162
17. M. T. Clunes, R. C. Boucher; *Cystic fibrosis: the mechanisms of pathogenesis of an inherited lung disorder*; Drug Discovery Today: Disease Mechanisms 2007; 4; 63–72
18. A. S. Verkman, Y. Song, J. R. Thiagarajah; *Role of airway surface liquid and submucosal glands in cystic fibrosis lung disease*; American Journal of Physiology – Cell Physiology 2003; 284; 2–15

19. T. C. Chinet, J. M. Fullton, J. R. Yankaskas, R. C. Boucher, M. J. Stutts; *Mechanism of sodium hyperabsorption in cultured cystic fibrosis nasal epithelium: a patch-clamp study*; American Journal of Physiology 1994; 266; 1061–1068

20. J. J. Wine; *The genesis of cystic fibrosis lung disease*; Journal of Clinical Investigation 1999; 103; 309–312

21. M. A. van Meegen, S. W. J. Terheggen-Lagro, K. J. Koymans, C. K. van der Ent, J. M. Beekman; *Apical CFTR expression in human nasal epithelium correlates with lung disease in CF*; Plos One 2013; 8; 1–8

22. B. Dhooghe, et al; *Lung inflammation in cystic fibrosis: Pathogenesis and novel therapies*; Clinical Biochemistry 2014; 47; 539–546

23. N. Rieber, A. Hector, M. Carevic, D. Hartl; *Current concepts of immune dysregulation in cystic fibrosis*; International Journal od Biochemistry&Cell Biology 2014; 52; 108–112

24. D. Hartl, A. Gaggar, E. Bruscia, A. Hector, V. Marcos, A. Jung, C. Greene, G. McElvaney, M. Mall, G. Döring; *Innate immunity in cystic fibrosis lung disease*; Journal of Cystic Fibrosis 2012; 11; 363–382

25. *http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/cysticka-fibroza-300862*; 11. 2. 2016

26. V. Venkatakrishnan, N. H. Packer, M. Thaysen-Andersen; *Host mucin glycosylation plays a role in bacterial adhesion in lungs of individuals with cystic fibrosis;* Expert Review of respiratory medicine 2013; 7; 553–576

27. L. E. Tatterson, J. F. Poschet, A. Firoved, J. Skidmore, V. Deretic; *CFTR and Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis*; Frontiers in Bioscience 2001; 6; 890–897

28. H. A. Yuehuei, J. R. Friedman; Handbook of bacterial adhesion: Principles, methods and application; Springer 2000

29. *https://en.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa;* 27. 6. 2016

30. *http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html*; 27. 6. 2016

31. M. Schobert, D. Jahn; *Anaerobic physiology of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis lung*; International Journal of Medical Microbiology 2010; 300; 549–556

32. M. Claustress; *Molecular pathology of the CFTR locus in male infertility*; Reproductive BioMedicine Online 2005; 10; 14–41

33. L. Tamburino, A. Guglielmino, E. Venti, S. Chamayou; *Molecular analysis of mutations and polymorphisms in the CFTR gene in male infertility*; Reproductive BioMedicine Online 2008; 17; 27–35

34. R. C. Stern, T. F. Boat, C. F. Doerschuk; *Obstructive azoospermia as a diagnostic criterion for the cystic fibrosis syndrome*; Lancet1982; 1; 1401–1404

35. J. Zielenski; *Genotype and phenotype in cystic fibrosis*; Respiration 2000; 67; 117–133

36. *http://massgenomics.org/2011/02/a-promising-new-drug-for-cystic-fibrosis.html* ; 8. 2. 2016

37. B. D. Moyer, J. Denton, K. H. Karlson, D. Reynolds, S. Wang, J. E. Mickle, M. Milewski, G. R. Cutting, W. B. Guggino, M. Li, B. A. Stanton; *A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal*; Journal of Clinical Investigation 1999; 104; 1353–1361

38. A. G. Valdivieso, T. A. Santa-Coloma; *CFTR activity and mitochondrial function*; Redox Biology 2013; 1; 190–202

39. M. Dorwart, P. Thibodeau, P. Thomas; *Cystic fibrosis: recent structural insights;* Journal of Cystic Fibrosis 2004; 3; 91–94

40. S. Newstead, P. W. Fowler, P. Bilton, E. P. Carpenter, P. J. Sadler, D. J. Campopiano, M. S. P. Sansom, S. Iwata; *Insights into how nucleotide-binding domains power ABC transport*; Atructure 2009; 17; 1213–1222

41. O. Moran; *On the structural organization of the intracellular domains of CFTR*; International Journal of Biochemistry&Cell Biology 2014; 52; 7–14

42. B. Lubamba, B. Dhooghe, S. Noel, T. Leal; *Cystic fibrosis – insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy*; Clinical Biochemistry 2012; 45; 1132–1144

43. T. Okiyoneda, G. L. Likacs; *Cell surface dynamics of CFTR: the ins and outs*; Biochimica et Biophysica Acta 2007; 1773; 476–479

44. L. Zhang, L. A. Aleksandrov, Z. Zhao, J. R. Birtley, J. R. Riordan, R. C. Ford; *Architecture of the CFTR protein and structural changes associated with phosphorylation and nucleotide binding*; Journal of Structural Biology 2009; 167; 242–251

45. I. Kogan, M. Ramjeesingh, CH. E. Bear; *ATPase assay of purified, reconstituted CFTR protein*; Journal of Cystic Fibrosis 2004; 3; 133–134

46. T. Hegedüs, A. Aleksandrov, A. Mengos, L. Cui, T. J. Jensen, J. R. Riordan; *Role of individual R domain phosphorylation sites in CFTR regulation by protein kinase A*; Biochimica et Biophysica Acta 2009; 1788; 1341–1349

47. E. M. Schwiebert, D. J. Benos, M. E. Egan, M. J. Stutts, W. B. Guggino; *CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel*; Physiological reviews 1999; 79; 145–166

48. M. M. Morales, D. Falkenstein, A. Gil Lopes; *The cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) in the kidney*; Annals of the Brazilian Academy of Sciences 2000; 72; 399–406

49. K. De Boeck, A. Zolin, H. Cuppens, H. V. Olesen, L. Viviani; *The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis*; Journal of Cystic Fibrosis 2014; 13(14); 403–409

50. P. Fanen, A. Wohlhuter-Haddad, A. Hinzpeter; *Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies*; International Journal of Biochemistry&Cell Biology; 2014; 52; 94–102

51. A. Hamosh, B. J. Rosenstein, G. R. Cutting; *CFTR nonsense mutations G542X and W1282X associated with severe reduction of CFTR mRNA in nasal epithelial cells*; Human Molecular Genetics 1992; 1, 542–544

52. J. Logan, D. Hiestand, P. Daram, Z. Huang, D. D. Muccio, J. Hartman, B. Haley, W. J. Cook, E. J. Sorscher; *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations that disrupt nucleotide binding*; Journal of Clinical Investigation 1994; 94; 228–236

53. D. N. Sheppard, D. P. Rich, L. S. Ostedgaard, R. J. Gregory, A. E. Smith, M. J. Welsh; *Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl-channels with altered pore properties*; Nature 1993; 362; 160–164

54. M. Mall, S. M. Kreda, A. Mengos, T. J. Jensen, S. Hirtz, H. H. Seydewitz, J. Yankaskas, K. Kunzelmann, J. R. Riordan, R. C. Boucher; *The ΔF508 mutations results in loss of CFTR function and mature protein in native human colon*; Gestroenterology 2004; 126; 32–41

55. *http://www.wikiskripta.eu/index.php/Cystická_fibróza*; 30. 12. 2015

56. M. Conese, F. Ascenzioni, A. Ch. Boyd, Ch. Coutelle, I. De Fino, S. De Smedt, J. Rejman, J. Rosenecker, D. Schindelhauer, B. J. Scholte; *Gene and cell therapy for cystic fibrosis: from bench to bedside*; Journal of Cystic Fibrosis 2011; 10; 114–128

57. Ch. Mueller, T. R. Flotte; *Gene therapy for cystic fibrosis*; Clinical Reviews in Allergy & Immunology 2008; 35; 164–178

58. A. G. Ziady, P. B. Davis; *Current prospects for gene therapy of cystic fibrosis*; Current Opinion in Pharmacology 2006; 6; 515–521

59. J. C. Davies; *Gene and cell therapy for cystic fibrosis*; Paediatric Respiratory Reviews 2006; 7; 63–65

60. D. R. Gill, L. A. Davies, I. A. Pringle, S. C. Hyde; *The development of gene therapy for diseases of the lung;*Cellular and Molecular Life Sciences 2004; 61;355–368

61. U. Griesenbach, E. W. F. W. Alton; *Gene transfer to the lung: Lessons learned from more than 2 decades of CF gene therapy*; Advanced Drug Delivery Reviews 2009; 61; 128–139

62. T. J. Moraes, G. P. Downey; *Cystic fibrosis: potential options for gene-directed therapies*; Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies 2004; 1; 345–349

63. D. Klink, D. Schindelhauer; A. Laner; T. Tucker; Z. Bebok; E. M. Schwiebert; A. Ch. Boyd; B. J. Scholte; *Gene delivery systems – gene therapy vectors for cystic fibrosis*; Journal of Cystic Fibrosis 2004; 3; 203–212

64. R. J. Pickles, D. McCarty, H. Matsui, P. J. Hart, S. H. Randell, R. C. Boucher; *Limited entry of adenovirus vectors into well-differentiated airway epithelium is responsible for inefficient gene transfer*; Journal of Virology 1998; 72; 6014–6023

65. U. Griesenbach, M. Inoue, M. Hasegawa, E. W. F. W. Alton; *Viral vectors for cystic fibrosis gene therapy: What does the future hold?*; Virus Adaptation and Treatment 2010; 2; 159–171

66. K. Mitomo, U. Griesenbach, M. Inoue, L. Somerton, C. Meng, E. Akiba, T. Tabata, Y. Ueda, G. M. Frankel, R. Farley, C. Singh, M. Chan, F. Munkonge, A. Brum, S. Xenariou, S. Escudero-Garcia, M. Hasegawa, E. W. Alton; *Toward gene therapy*

for cystic fibrosis using a lentivirus pseudotyped with Sendai virus envelopes; Molecular Therapy 2010; 18;1173–1182

67. T. Montier, P. Delépine, C. Pichon, C. Férec, D. J. Porteous, P. Midoux; *Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: progress and challenges*; Trends in Biotechnology 2004; 22; 586–592

68. S. Ferrari, D. M. Geddes, E. W. F. W. Alton; *Barriers to and new approaches for gene therapy and gene delivery in cystic fibrosis*; Advanced Drug Delivery Reviews 2002; 58; 1373–1393

69. N. Bangel-Ruland, K. Tomczak, E. F. Fernández, G. Leier, B. Leciejewski, C. Rudolph, J. Rosenecker, W.-M. Weber; *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mRNA delivery: a novel alternative for cystic fibrosis gene therapy*; Journal of Gene Medicine 2013; 15; 414–426

70. Y. Furuichi, A. Lafiandra, A. J. Shatkin; *5'-terminal structure and mRNA stability*; Nature 1977; 266; 235–239

71. H. Hemmi, O. Takeuchi, T. Kawai, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, S. Akira; *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*; Nature 2000; 408; 740–745

72. G. K. Koski, K. Karikó, S. Xu, D. Weissman, P. A. Cohen, 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*; Journal of immunology 2004; 172; 3989–3993

73. K. Karikó, M. Buckstein, H. Ni, D. Weissman; *Supression of RNA recognition by Toll-like receptors: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA*; Immunity 2005; 23; 165–175

74. F. T. Zohra, E. H. Chowdhury, S. Tada, T. Hoshiba, T. Akaike; *Effective delivery with enhanced translational activity synergically accelerates mRNA-based transfection*; Biochemical and Biophysical Research Communications 2007; 358; 373–378

75. B. R. Anderson, H. Muramatsu, B. K. Jha, R. H. Silverman, D. Weissman, K. Karikó; *Nucleoside modifications in RNA limit activation of 2'-5'-oligoadenylate synthetase and increase resistance to cleavage by RNase L*; Nucleic Acids Research 2011; 39; 9329–9338

76. R. W. Malone, P. L. Felgner, I. M. Verma; *Cationic liposome-mediated RNA transfection*; Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 1989; 86; 6077–6081

77. M. Bitzer, S. Armeanu, U. M. Lauer, W. J. Neubert; *Sendai virus vectors as an emerging negative-strand RNA viral vector system*; Journal of Gene Medicine 2003; 5; 543–553

78. K. K. Goncz, N. L. Prokopishyn, B. L. Chow, B. R. Davis, D. C. Gruenert; *Application of SFHR to gene therapy of monogenic disorders*; 2002; 9; 691–694

79. J. H.Chan, S. Lim, W. S. Wong; *Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application*; Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology2006; 33; 533–540
80. *https://en.wikipedia.org/wiki/Trans-splicing;* 18. 3. 2016
81. M. A. Garcia-Blanco*; Messenger RNA reprogramming by spliceosome-mediated RNA trans-splicing*; Journal of Clinical Investigation; 2003; 112; 474–480
82. X. Liu, M. Luo, L. N. Zhang,Z. Yan.,R. Zak., W. Ding, S. G. Mansfield, L. G. Mitchell, J. F. Engelhardt; *Spliceosome-mediated RNA trans-splicing with recombinant adeno-associated virus partially restores cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function to polarized human cystic fibrosis airway epithelial cells*; Human Gene Therapy 2005; 16; 1116–1123
83. M. Puttaraju, S. F. Jamison, S. G. Mansfield, M. A. Garcia-Blanco, L. G. Mitchell; *Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy*; Nature Biotechnology; 1999; 17; 246–252
84. D. J. Weiss*; Stem cells and cell therapies for cystic fibrosis and other lung diseases;* Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 2008; 21; 588–594
85. M. Conese, J. Rejman; *Stem cells and cystic fibrosis*; Journal of Cystic Fibrosis 2006; 5; 141–143
86. P. D. Hsu, E. S. Lander, F. Zhang; *Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering*; Cell 2014; 157; 1262–1278
87. J. Bellec, M. Bacchetta, D. Losa, I. Anegon, M. Chanson, T. H. Nguyen; *CFTR inactivation by lentiviral vector-mediated RNA interference and CRISP-Cas9 genome editing in human airway epithelial cells*; Current Gene Therapy 2015; 15; 447–459
88. *http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/crispr-cas9-genome-editing.html?gclid=CIK8m6fw3s0CfdZsGwodmwoBEg*; 6. 7. 2016
89. *http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4011.aspx?geo_country=cz#generalinformation*; 17. 6. 2016
90. *http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4013.aspx?geo_country=cz#generalinformation*; 17. 6. 2016
91. *http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/F-067155LHCrelaunchflyer_FLR.pdf*; 17. 6. 2016
92. *https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/12680013?CID=searchproduct%2C*; 17. 6. 2016
93. *http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/cell-culture/transfection/selection/g418.html*; 17. 6. 2016
94. *http://www.cellscript.com/products/007pl0114CS.pdf*, 27. 12. 2015
95. J. Jemielity, T. Fowler, J. Zuberek, J. Stepinski, M. Lewdorowitz, A. Niedzwiecka, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz, R. E. Rhoads; *Novel „anti-reverse" cap analogs with superior translational properties*; RNA 2003; 9; 1108–1122
96. *https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Lipofectamine_MessengerMAX_man.pdf*, 18. 11. 2015

97. *https://www.thermofisher.com/order/genome-database/antibody/CFTR-Antibody-clone-CF3-Monoclonal/MA1-935*, 18. 11. 2015
98. *https://www.rndsystems.com/resources/articles/technical-notes-cftr-monoclonal-antibodies*; 17. 6. 2016
99. *https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/alexa-fluor-555.html?icid=fr-af555-main*, 18. 11. 2015
100. *https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/62249*; 5. 7. 2016
101. *http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/E3101*; 17. 6. 2016
102. *http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp00440.pdf*; 17. 6. 2016
103. K. Pecková; *Vývoj modelového systému pro studium transportu chloridových iontů u buněk plicního epitelu pacientů trpících cystickou fibrózou*; Bakalářská práce; PřF UK 2014
104. *http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/46123?lang=en&region=CZ*; 17. 6. 2016
105. M. R. West, C. R. Molloy; *A microplate assay measuring chloride ion channel activity*; Analytical Biochemistry 1996; 241; 51–58
106. O. Moran, O. Zegarra-Moran; *On the measurement of the functional properties of the CFTR*; Journal of Cystic Fibrosis 2008; 7; 483–494
107. *http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c2992?lang=en&region=CZ*; 17. 6. 2016
108. *http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biowire/cell-tracking.html*; 17. 6. 2016
109. L. Nosková; *Vývoj modelového systému pro studium bakteriální adheze na plicní epitel pacientů s CF*; Bakalářská práce; PřF UK 2011
110. L. Nosková; *Studium adheze Pseudomonas aeruginosa na buňky plicního epitelu*; Diplomová práce; PřF UK 2013
111. K. Karikó, H. Muramatsu, F. A. Welsh, J. Ludwig, H. Kato, S. Akira, D. Weissman; *Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability;*Molecular Therapy2008; 16; 1833–1840
112. E. Alton, D. Armstrong, K. Bayfield;*A Randomized, double blind, placebo-controlled trial of repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis;Pediatric Pulmonology*2015; 50; 262-262
113. C. Norez, G. D. Heda, T. Jensen, I. Kogan, L. K. Hughes, C. Auzanneau, R. Dérand, L. Bulteau-Pignoux, C. Li, M. Ramjeesingh, H. Li, D. N.; *Determination of CFTR chloride channel activity and pharmacology using radiotracer flux methods*; Journal of Cystic Fibrosis 2004; 3; 119–121

114. D. A. F. D. Mahlangu, J. A. Dix; *Halide fluxes in epithelial cells measured with an automated cell plate reader*; Analytical Biochemistry 2004; 325; 28 – 34

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

Jméno a příjmení, Adresa	**Číslo občanského průkazu**	**Datum vypůjčení**	**Poznámka**