

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Jan Král

**Možné přístupy ke genové terapii cystické fibrózy**

**Possible approaches to gene therapy of cystic fibrosis**

Bakalářská práce

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

Praha, 2016

## **Prohlášení:**

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

V Praze, dne .....

.....  
Jan Král

## **Poděkování:**

Rád bych poděkoval RNDr. Lucii Bořek-Dohalské, Ph.D. za odborné vedení této bakalářské práce a za rady při jejím zpracování.

Dále bych chtěl poděkovat Bc. Kateřině Peckové za spolupráci během experimentální činnosti.

# Abstrakt

Cystická fibróza je autosomálně recesivní onemocnění způsobené mutací v CFTR genu, která má za následek nefunkčnost či absenci CFTR chloridového kanálu. Jeden ze způsobů, jak indukovat tvorbu CFTR proteinu v postižených buňkách, představuje genová terapie. V rámci genové terapie lze do cílových buněk přenášet buď DNA, nebo mRNA. Tato práce byla zaměřena na optimalizaci metody detekce CFTR proteinu pomocí metody Western blot, díky níž byla studována účinnost přenosu CFTR-mRNA do buněčných linií.

CFTR protein byl detekován v buněčné linii zdravého plicního epitelu (NuLi-1), plicního epitelu postiženého cystickou fibrózou s mutací  $\Delta F508$  (CuFi-1) a v buněčné linii plicního karcinomu (A549). Byla porovnávána účinnost čtyř způsobů buněčné lyze – lyze pomocí ultrazvuku a lyze třemi různými lyzačními pufrů. Jako nejúčinnější pro detekci tohoto proteinu se ukázala lyze RIPA pufrů s inhibitory proteas. Zároveň byly porovnávány tři primární monoklonální protilátky pro detekci CFTR proteinu metodou Western blot. Z těchto protilátek se ukázala jako nejvhodnější protilátka CF3, která je specifická proti extracelulárnímu epitopu CFTR proteinu. Byly detekovány různé glykosylované formy CFTR proteinu. Největší množství CFTR protein bylo zjištěno v buněčné linii NuLi-1. Zároveň byl tento protein detekován v buněčné linii A549, která měla sloužit jako negativní kontrola. Množství CFTR proteinu v linii A549 korespondovalo s linií CuFi-1.

Nakonec byla zkoumána míra exprese CFTR proteinu po transfekci buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1 CFTR-mRNA. Jako transfekční činidlo byl použit kationtový liposom lipofektamin. Bylo zjištěno, že po transfekci CFTR-mRNA došlo k zvýšení množství CFTR proteinu v obou zkoumaných liniích. Množství CFTR proteinu v buněčné linii CuFi-1 se po transfekci dostalo na úroveň množství obsaženého v buněčné linii NuLi-1. Transfekce CFTR-mRNA pomocí lipofektaminu je tedy potenciálně slibná metoda obnovy CFTR proteinu v postižených buňkách. Její reálná využitelnost stojí za další prozkoumání.

## Klíčová slova

Cystická fibróza, Western blot, CFTR protein, genová terapie, přenos mRNA, kationtový liposom

# Abstract

Cystic fibrosis is an autosomal recessive disorder caused by a mutation in the CFTR gene, which leads to inefficiency or absence of CFTR chlorid channel. One way to induce production of CFTR protein in target cells, is to use gene therapy. The principle od gene therapy is to transfer DNA or mRNA molecules inside malfunctioning cells. The aim of this study was to optimise the detection of CFTR protein using the Western blot analysis. Then, using this method the effectiveness of CFTR-mRNA transfection was studied.

To study the CFTR protein, a number of cell lines was used: a healthy human ephitelial cell line (NuLi-1), an ephitelial cell line with  $\Delta F508$  mutation (CuFi-1), and a human lung carcinoma cell line (A549). This study compared four different ways of cell lysis – lysis by sonication and lysis by three distinct lysis buffers. Lysis by RIPA buffer with protease inhibitors was determined for the detection of CFTR protein. Moreover, three different primary monoclonal antibodies were also tested. The CF3 antibody, which is specific to an extracellular epitope of CFTR protein, was found able to detect CFTR protein specifically. A couple of different glycosylated forms of CFTR protein was detected. The highest amount of CFTR protein was determined in the NuLi-1 cell line. CFTR protein was also detected in the A549 cell line, which was supposed not to produce it. The amount of CFTR protein in A549 cell line was comparable to the amount in with CuFi-1 cell line.

Using the optimised detection method, the effectiveness of CFTR-mRNA transfection by a cationic liposome lipofectamine was studied. An overall increase in the amount of CFTR protein was detected. Practically the same level of CFTR protein was found in CuFi-1 cell line after transfection in comparison with NuLi-1 cell line without transfection. In conclusion, CFTR-mRNA transfection by lipofektamin is a promising method of restoring the CFTR protein levels in cells affected by cystic fibrosis. However, more experiments are required to determine it's actual usefulness.

## Key words

Cystic fibrosis, Western blotting, CFTR protein, gene therapy, mRNA transfer, cationic liposome

# Obsah

Seznam použitých zkratek.....	7
1. Úvod.....	8
1.1 Cystická fibróza.....	8
1.2 Struktura CFTR proteinu a jeho funkce .....	8
1.3 CFTR gen a jeho mutace .....	10
1.4 Patogenese CF.....	12
1.4.1 Obecné projevy CF.....	12
1.4.2 Patogenese plic .....	13
1.4.3 Léčba plicních projevů CF .....	15
1.5 Genová terapie CF.....	16
1.5.1 DNA přenos.....	17
1.5.2 mRNA přenos.....	21
2. Cíl práce .....	23
3. Materiál a metody.....	24
3.1 Použité přístroje a materiál.....	24
3.1.1 Přístrojové vybavení.....	24
3.1.2 Použitý materiál.....	24
3.2 Práce s buněčnými kulturami .....	26
3.2.1 Kultivace buněčných linií.....	26
3.2.2 Příprava kultivačních lahví potažených kolagenem IV.....	26
3.2.3 Subkultivace buněčných linií .....	27
3.2.4 Stanovení počtu buněk v suspenzi .....	28
3.2.5 Zamrazení buněčných linií .....	28
3.2.6 Rozmrazení buněčných linií.....	29
3.3 Lyze buněčných linií CuFi-1, NuLi-1 a A549 .....	30
3.3.1 Lyzační protokol 1 .....	30

3.3.2 Lyzační protokol 2 .....	30
3.3.2 Lyzační protokol 3 a 4.....	31
3.4 Transfekce buněčných linií CuFi-1, NuLi-1 a A549 CFTR-mRNA.....	31
3.5 Stanovení koncentrace proteinů .....	33
3.6 SDS-PAGE elektroforéza.....	34
3.7 Metoda Western blot .....	36
4. Výsledky.....	39
4.1 Optimalizace detekce CFTR proteinu .....	39
4.1.1 Detekce CFTR proteinu v závislosti na způsobu lyze.....	39
4.1.2 Srovnání účinnosti protilátek proti C-konci a R doméně.....	46
4.1.3 Studium množství CFTR proteinu v závislosti na pořadí subkultivace .....	47
4.2 Studium exprese CFTR proteinu po transfekci CFTR-mRNA.....	47
5. Diskuze.....	50
6. Závěr.....	53
7. Seznam literatury.....	54

## Seznam použitých zkratek

AAV	adeno-asociovaný virus
ABC	„ATP-binding cassette“
APS	peroxosíran amonný („Ammonium persulfate“)
ASL	povrchová plicní kapalina („Airway surface liquid“)
BCIP	„5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate“
CaCC	„Calcium-activated chlorid channel“
CBB	„Coomassie brilliant blue“
CF	cystická fibróza
CFTR	„Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
DMEM	„Dulbecco´s Modified Eagle Medium“
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ENaC	„Epithelial Na <sup>+</sup> channel“
FBS	fetální hovězí albumin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
kDa	kilodalton
MSD	transmembránová doména („Membrane spanning domain“)
NBD	nukleotid vážící doména („Nucleotide-binding domain“)
NBT	„4-Nitro blue tetrazolium chloride“
PBS	fosfátový pufr („Phosphate buffered saline“)
PCL	meziřasinková kapalina („Periciliary liquid“)
PEI	polyethylenimin
Poly-K	poly-L-lysine
PVDF	polyvinylidene difluorid
RPM	otáčky za minutu
TEMED	tetramethylethylenediamin
UV	ultrafialové záření



# 1. Úvod

## 1.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) je genetická choroba způsobená mutací v CFTR genu (z angl. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), který kóduje stejnojmenný chloridový kanál. Jedná se o smrtelné autosomálně recesivní onemocnění, které postihuje jen homozygotní jedince. Heterozygotní jedinci jsou zcela zdraví a působí pouze jako přenašeči.<sup>1</sup>

Nemoc byla poprvé popsána v roce 1938<sup>2</sup> a v roce 1989 byl sekvenován CFTR gen,<sup>3</sup> díky čemuž byla umožněna genová terapie CF.

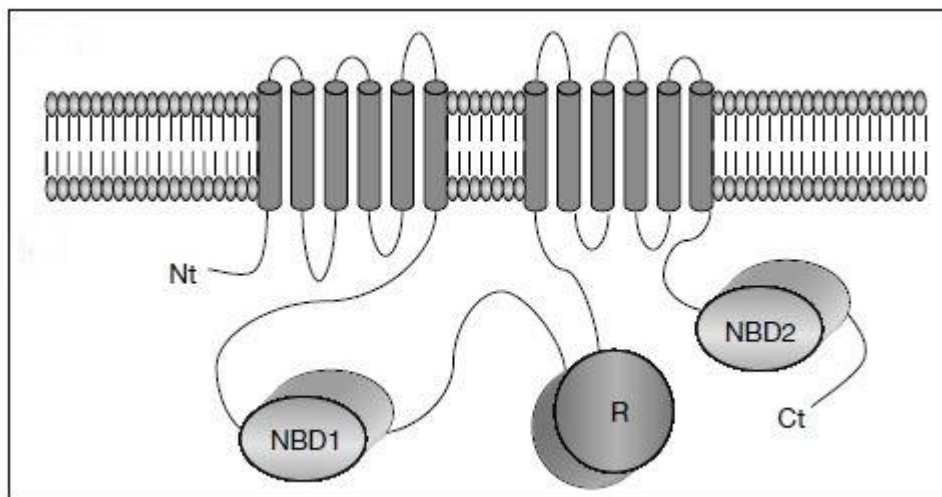
CF postihuje nejvíce indoevropskou populaci. Udává se, že se v České republice s CF narodí jedno dítě z 4023, což činí přibližně 30 nových pacientů ročně.<sup>4</sup> Průměrný věk pacienta s CF se s dokonalejší léčbou stále zvyšuje. V dnešní době je průměrná doba života člověka postiženého CF 36 let.

## 1.2 Struktura CFTR proteinu a jeho funkce

CFTR protein je chloridový kanál nacházející se na apikální straně epitelálních buněk. Sestává z celkem 1480 aminokyselin a řadí se do rodiny ABC (z angl. ATP-binding cassette) iontových kanálů.<sup>5</sup> Pro svou značnou velikost je syntetizován jako konstrukt několika menších polypeptidů, jejichž přesný počet a podoba jsou však zatím nejasné.

V závislosti na glykosylaci CFTR proteinu se rozlišují jeho tři různé molekulární velikosti – 168 kDa pro plně maturovaný, 131 kDa pro částečně glykosylovaný a 127 kDa pro neglykosylovaný protein.<sup>6</sup>

CFTR protein tvoří celkem pět charakteristických domén – dvě transmembránové domény (MSD, z angl. Membrane-spanning domain), dvě domény vázící nukleotidy (NBD, z angl. Nucleotide-binding domain) a jedna regulační R doména<sup>7</sup> (obrázek č. 1, strana 9).

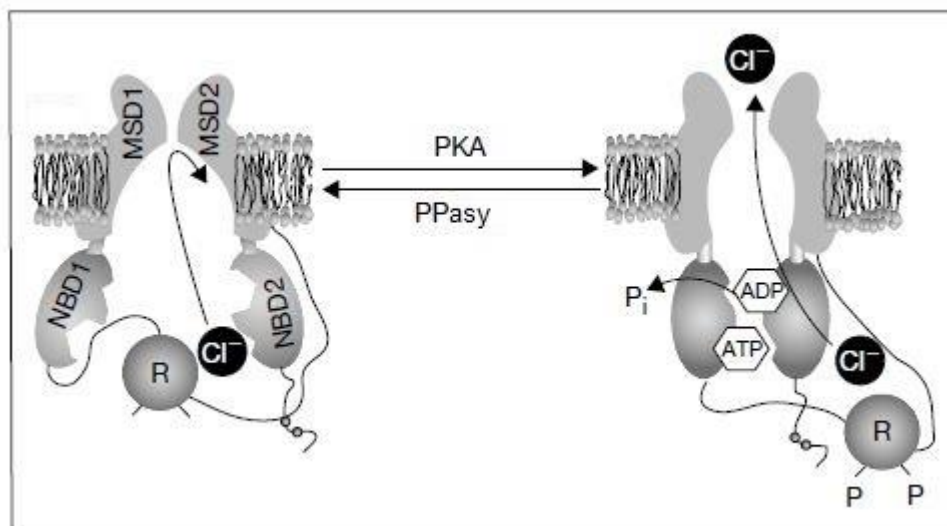


**Obrázek č. 1:** *Struktura CFTR kanálu.* Plasmatickou membránou prochází dvě transmembránové domény. Uvnitř buňky se nacházejí dvě nukleotidy vážící domény (NBD1 a NBD2) a jedna regulační R doména. Převzato z publikace.<sup>8</sup>

Obě MSD domény tvoří šest transmembránových smyček. Tyto domény jsou pevně zakotveny v plasmatické membráně a dohromady formují tunel, kterým jsou přenášeny chloridové, popřípadě hydrogenuhličitanové anionty. Takto vytvořený kanál je zevnitř vystlán aminokyselinami se záporně nabitými skupinami, což jednak napomáhá transportu aniontů, jednak chrání protein před nežádoucími interakcemi.<sup>8</sup>

Stejně jako všichni členové ABC rodiny přenašečů i CFTR protein využívá ke svému otevření hydrolýzu ATP na NBD<sup>7</sup>. Na rozdíl od většiny ABC transportérů má však tyto domény dvě. Dlouho nebylo jasné, proč tomu tak je. První domněnkou bylo, že NBD1 slouží k otevření kanálu, zatímco NBD2 k jeho uzavření. Jak se ukázalo později, obě NBD ve skutečnosti tvoří po hydrolýze ATP dimer, čímž mění konformaci obou transmembránových domén a tím umožňují otevření kanálu<sup>9</sup> (obrázek č. 2, strana 10).

Unikátním prvkem CFTR kanálu je R doména. Tato regulační doména je závislá na cAMP-dependentní proteinkinase A, která ji fosforyluje. R doména takto stimuluje interakci ATP s NBD a tím i celkovou aktivitu kanálu.<sup>10</sup>



**Obrázek č. 2:** *Mechanismus funkce CFTR kanálu.* NBD1 a NBD2 mají každá jedno hydrolytické místo pro ATP. Po fosforylaci R domény se zvyšuje afinita NBD k ATP, ATP se hydrolyzuje a obě domény tvoří dimer, čímž umožňují přenos  $\text{Cl}^-$  aniontů přes plasmatickou membránu. Převzato a upraveno z publikace.<sup>8</sup>

Kromě své funkce chloridového kanálu vykonává CFTR protein ještě důležitou úlohu v regulaci dalších iontových kanálů a přenašečů. Právě tato role je zásadní pro patogenesi CF, třebaže přesné mechanismy regulace dosud nejsou detailně popsány. Mezi ovlivněné kanály patří například další chloridový kanál ORCC<sup>11</sup> (z angl. Outward rectifying chlorid channel) a vápníkem aktivovaný chloridový kanál CaCC (z angl. Calcium-activated chlorid channel). CFTR navíc ovlivňuje aktivitu akvaporinů, které řídí tok vody přes plasmatickou membránu.<sup>12</sup> Spolu s regulací akvaporinů je zásadní ovlivnění absorpce  $\text{Na}^+$  iontů pomocí ENaC (z angl. Epithelial  $\text{Na}^+$  channel) kanálu, která má za následek vážnou patogenesi, zejména v plicích.<sup>13</sup>

### 1.3 CFTR gen a jeho mutace

CFTR gen byl poprvé popsán v roce 1989 a položil tak základ studiu funkce CFTR a genové terapie CF. Tento gen se nachází na dlouhém raménku chromosomu 7, čítá přes 250 kb DNA, z toho 27 kódujících exonů. RNA přepis genu je dlouhý 6,5 kb.<sup>14</sup>

Jak již bylo řečeno výše, CF je onemocněním způsobeným mutací CFTR genu. Celosvětově je v současné době známo přes 2000 mutací CFTR genu.<sup>15</sup> V České republice jich bylo podle studie 2. LF UK z roku 2013 zjištěno celkem 91, přičemž 67 %

zkoumaných pacientů mělo mutaci  $\Delta F508$ .<sup>4</sup> Tato mutace způsobuje vynechání fenylyalaninu v pozici 508 a je nejčastější i celosvětově. Další čtyři časté mutace jsou: G542X, G551D, A455E a W1282X.<sup>16</sup> Zbylé bývají pouze lokální a vzácné.

Veškeré mutace CFTR lze podle jejich efektu na funkci CFTR proteinu rozdělit do pěti tříd:

### *Třída I*

První třída zahrnuje takové CFTR mutace, které vedou k poruše syntézy proteinu. Tyto mutace nejčastěji spočívají v předčasných stop kodonech. Pacient zcela postrádá CFTR kanál. Mezi tyto mutace patří G542X.<sup>17</sup>

Mezi mutace první třídy patří ale i takové, které sice CFTR vytvoří, ale pouze v zanedbatelném množství, jako například u druhé nejčastější mutace na světě A455E.<sup>18</sup>

Mutace spojené s předčasnými stop kodony bývají považovány za jedny z nejvážnějších forem CF.

### *Třída II*

Druhá třída mutací způsobuje chybné zpracování proteinu a tím narušený transport k plasmatické membráně. Po dokončení proteosyntézy je CFTR kanál modifikován v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu. V případě tohoto typu mutací dochází k vadné glykosylaci, a tedy i k chybnému složení.<sup>8</sup> Tento protein je označen a degradován proteasomem.

Do druhé třídy patří celosvětově nejčastější mutace  $\Delta F508$ .<sup>19</sup>

### *Třída III*

Do třetí třídy jsou řazeny všechny CFTR proteiny, které jsou zabudovány do plasmatické membrány, ale mají ovlivněnou regulaci iontového transportu. Dochází k porušení funkce NBD domén, které nejsou schopny hydrolyzovat ATP a tím kanál aktivovat.<sup>20</sup>

Mezi tyto mutace patří například G551D.

## *Třída IV*

Čtvrtá třída zahrnuje mutace v CFTR genu, které vedou k syntéze proteinu, jenž je zabudován do plasmatické membrány, má funkční aktivitu NBD domén, ale není schopen dostatečné vodivosti. Tato porucha postihuje oblast MSD domén, kde chybí záporně nabitá aminokyselina v samotném iontovém kanálu a transportované ionty tak interagují s proteinem.<sup>21</sup>

## *Třída V*

Do poslední třídy mutací spadají CFTR proteiny, které sice fungují bezchybně, ale jejich množství v buňce je sníženo. To je způsobeno nestabilním C-koncem proteinu, díky němuž se CFTR protein degraduje až šestkrát rychleji než obvykle.<sup>22</sup>

## **1.4 Patogenese CF**

### **1.4.1 Obecné projevy CF**

CFTR protein se nachází v epitelálních buňkách celé řady orgánů, mezi něž patří slinivka, střeva, játra, rozmnožovací soustava, kosti a zejména plíce. CF tedy nezasahuje jen jedno specifické místo, nýbrž prakticky celý lidský organismus.

Pacienti s CF mívají neobvykle slaný pot způsobený špatnou reabsorpcí soli kožními buňkami.

Typickým projevem CF je porucha funkce slinivky břišní, která se projevuje hlavně nedostatečnou sekrecí vody a enzymů.<sup>23</sup> To má za následek špatné strávení potravy, a tedy i snížené množství přijímaných živin. Pacienti s CF špatně prospívají a dosahují menšího vzrůstu.<sup>1</sup> Tento projev CF je dobře léčitelný enzymovými doplňky stravy.

V játrech se CF projevuje cirhózou a zvýšenou viskozitou žluči. Jen ale 25 % pacientů zaznamená chronické potíže s játry.<sup>6</sup>

Střeva jsou, podobně jako ostatní orgány, postižena vadným transportem vody a minerálů, což způsobuje jak zácpy, tak i průjmy. Postižení gastrointestinální soustavy je jedním z nejranějších příznaků CF.<sup>24</sup>

Dalším typickým znakem CF je mužská neplodnost, která vyplývá ze strukturních abnormalit reprodukční soustavy produkující azoospermie.<sup>8,25</sup> Zbylé funkce reprodukční

soustavy zasaženy nejsou. Až 95 % mužů je sterilních, existují ale výjimečné případy, kdy jsou pacienti plodní.<sup>26</sup>

Rozmnožovací soustava u žen s CF je zasažena méně než u mužů. CF ovšem způsobuje zpoždění hormonální regulace, a třebaže jsou pacientky schopny počít, těhotenství je pro ně značně rizikové.<sup>8</sup>

Se stále úspěšnější léčbou symptomů CF se prodlužuje průměrný věk pacientů. To s sebou však přináší dříve nepozorované projevy CF, jako jsou například nemoci kostí a kloubů. Mezi ně patří křehkost kostí z důvodu nízkého obsahu minerálů,<sup>27</sup> vaskulitida a artritida.<sup>8</sup>

## 1.4.2 Patogenese plic

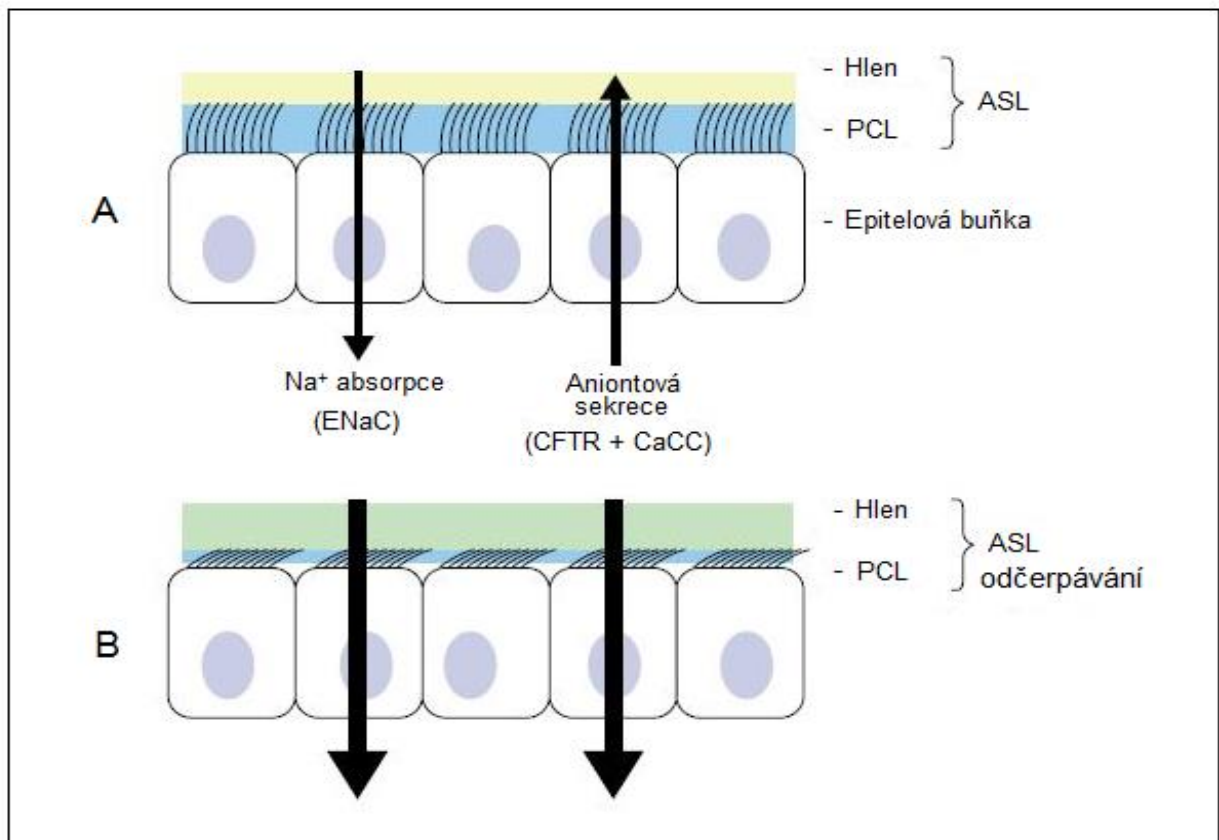
Nejzávažnější symptomy CF se projevují v plicích. Objevují se už od kojeneckého věku a jsou nejčastější příčinou úmrtí. Plíce pacientů s CF bývají v útlém věku zdánlivě zdravé, byly však zdokumentovány případy velice raných úmrtí z důvodu zdušení příliš hustým hlenem, který je typickým znakem CF.<sup>8</sup>

Povrch plicních epiteliálních buněk je pokryt tenkou ochrannou vrstvou. Tato povrchová plicní kapalina (ASL, z angl. Airway surface liquid) se skládá ze dvou složek – viskózního hleny a řídké meziřasinkové kapaliny.<sup>28</sup> Meziřasinková kapalina (PCL, z angl. Periciliary liquid) je spodní vrstva ASL o přesně definovaném složení a výšce. Musí být řidší než povrchový gel, aby umožnila pohyb řasinek řasinkového epitelu. PCL bývá vysoká 7μm, což odpovídá délce natažené řasinky.<sup>29</sup> Hlen slouží hlavně jako mechanická obrana. Zachytává vdechnuté nečistoty a obaluje je, až se s hlenem spojí. Takto polapená částice je následně pohybem řasinkového epitelu společně s celou ASL pužena z dýchací soustavy. Povrchový hlen je zároveň bohatý na muciny, které zajišťují nízkou afinitu k většině částic<sup>30</sup> (obrázek č. 3A, strana 14).

ASL kromě mechanické obrany poskytuje i obranu chemickou, protože obsahuje celou řadu antimikrobiálních látek, jako například lysozomy, lactoferriny a imunoglobuliny.<sup>31</sup>

Jak bylo zmíněno výše, PCL vrstva musí mít vždy konstantní výšku, což reguluje povrchový hlen svou schopností zadržovat kapalinu a měnit objem v závislosti na PCL. Udává se, že povrchový hlen může ztratit až polovinu svého objemu, než se ztráta vody projeví na výšce PCL.<sup>32</sup>

Objem vody v ASL je udáván celkovým množstvím rozpuštěné NaCl. CFTR kanál, který se nachází zejména v submukosálních žlázách, ale i v epiteliálních buňkách,<sup>33</sup> nepřímo slouží jako hlavní regulátor objemu ASL. CFTR svou aktivitou inhibuje sodíkový kanál ENaC. V případě absence či nefunkčnosti CFTR, jak je tomu u CF, dochází k razantnímu navýšení aktivity ENaC<sup>34</sup> a tím hyperabsorpci soli z ASL. Epiteliální buňky tak společně s Na<sup>+</sup> nadměrně odčerpávají i vodu, což nejprve vede ke snížení objemu povrchového hleny a následně k vyčerpání PCL.<sup>35</sup> Zahuštěný hlen přilehne na řasinkový epitel a znemožní mu pohyb. Tímto se celá ASL stává nehybnou (obrázek č. 3B).



**Obrázek č. 3:** Model patogeneze CF v buňkách plicního epitelu. A – Zdravé plicní buňky jsou pokryty tenkou vrstvou povrchové kapaliny (ASL). Objem kapaliny je regulován vyváženým iontovým přenosem. B – Buňky postižené cystickou fibrózou mají zasaženu aniontovou sekreci. Dochází k nadměrné absorpci Na<sup>+</sup> iontů a vody, což vede ke snížení objemu ASL a znemožnění pohybu řasinkového epitelu. Převzato a upraveno z publikace.<sup>8</sup>

Studie ukázaly, že nemožnost správného odstranění vdechnutých částic vede k produkci cytokinů, které společně s neutrofilů vyvolají zánětlivou reakci, aniž by probíhala skutečná bakteriální infekce.<sup>36</sup> Zvýšená aktivita neutrofilů vede k povzbuzení tvorby mucinů a tím ještě většímu zahuštění a zvětšení hlenu. Jakmile výška hlenu dosáhne 100  $\mu\text{m}$ , začne být neprodyšný a dochází v něm k vyčerpání kyslíku.<sup>30</sup> Takto tlustý hlen nejen ucpává dýchací cesty, ale navíc je vhodným prostředím pro bakterie jako *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Tyto bakterie jsou schopny přizpůsobit se anaerobnímu prostředí nehybného povrchového hlenu a nekontrolovatelně se v něm šířit. Dochází tak ke stádiu chronické infekce. Studie navíc ukázaly, že anaerobně přizpůsobené *Pseudomonas* jsou až o dva řády méně citlivé vůči antibiotikům.<sup>37</sup>

### 1.4.3 Léčba plicních projevů CF

Cystickou fibrózu je jako genetické onemocnění nemožné trvale vyléčit bez zásahu do lidského genomu. Veškerý výzkum se tedy soustřeďuje buď na obnovu funkce CFTR kanálu (viz kapitola 1.4), nebo na léčbu symptomů.

V současné době je v symptomatické léčbě velice populární farmakoterapie. Jejím cílem je obnovit objem plicní povrchové kapaliny a umožnit tak odstranění naneseného hlenu.

Prvním přístupem je aplikace hypertonického roztoku soli.<sup>31</sup> Tato terapie využívá osmotický tlak, který z plicního epitelu nasaje vodu a tím zředí ASL. Byla provedena celá řada *in vivo* studií, které zkoumaly možnost klinické aplikace této terapie, všechny ovšem ukázaly, že aplikace hypertonického roztoku NaCl sice funguje, ale je potřeba se jí podrobovat několikrát denně, což pacienty značně omezuje.<sup>38</sup>

Alternativou k hypertonickému roztoku je mannitolový prášek, který *in vitro* vykázal až několikahodinový efekt. Ovšem při aplikaci *in vivo* se jeho účinek projevil pouze po dobu 20 minut.<sup>39</sup>

Dalším způsobem obnovy objemu ASL je regulace iontového transportu. Jejím cílem je hlavně snížení aktivity ENaC kanálu a kompenzace absence funkce CFTR proteinu pomocí jiných chloridových kanálů. Tyto metody využívají molekuly nukleotidtrifosfátů (ATP, UTP) pro inhibici ENaC a zároveň stimulaci CaCC chloridového kanálu.<sup>40</sup> Další alternativou jsou CFTR korektory, které stimulují transport CFTR proteinu do buněčné membrány.<sup>41</sup>



Klinická aplikace těchto postupů přináší určité zlepšení stavu pacientů s CF, jedná se však většinou o komplikované a pro pacienty nepohodlné procedury s krátkodobým účinkem.

Obnova objemu ASL s sebou navíc přináší i určitá rizika. Uvolnění naneseného hlenu v průdušinkách vyúsťuje v jeho pomalý přesun do širších dýchacích cest. Zde může docházet k jeho nahromadění a následovnému ucpání cest.<sup>42</sup> Dalším rizikem je fakt, že proto, aby bylo možné odstranit veškerý nastřádaný hlen, je třeba ho naředit přibližně 1,35 litry vody. Takové množství kapaliny, pokud by bylo uvolněno příliš rychle, by vedlo k zadušení pacienta.<sup>32</sup> Celá terapie tedy musí probíhat zdlouhavě po malých dávkách.

Důležitým prvkem léčby CF je terapie antibiotiky. Pacientům jsou denně podávána množství různých antibiotik, která mají za úkol zabránit bakteriální infekci. Jakmile jsou totiž plíce více než jednou infikovány bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Staphylococcus aureus*, léčba se stává neefektivní a bakterie získávají resistenci.<sup>37</sup>

Alternativní způsob boje proti bakteriální infekci je umělá imunizace plicních buněk. K tomu se užívají cizorodé protilátky, které by neměly způsobit imunitní odpověď.<sup>43</sup>

Jakkoli účinná může být farmakoterapie, jedná se pouze o symptomatickou léčbu, není tedy schopna nápravy příčiny samotné. K tomu je dosud vhodná pouze genová terapie.

## 1.5 Genová terapie CF

Genová terapie CF je metoda, která obnovuje funkci CFTR chloridového kanálu. Jejím základem je vložit do buňky buď CFTR gen (DNA přenos), nebo CFTR-mRNA. CF díky postižení jediného genu představuje ideální cíl pro genovou terapii.

Genová terapie CF bývá nejčastěji zaměřena na plíce, neboť právě plicní onemocnění je hlavní příčinou úmrtnosti na CF. Zároveň se plíce zdají být ze všech postižených orgánů nejsnáze přístupné. Genová terapie cílí především na řasinkový epitel, ale i na submukosální žlázy, v nichž se přirozeně vyskytuje více CFTR proteinu než v epitelálních buňkách.<sup>44</sup>

Terapeutické látky bývají zpravidla podávány v rozprášené inhalační formě. Jedná se o nejnadanější přímou formu podání léku a zároveň i nejméně agresivní.<sup>45</sup> Pro přenos nukleové kyseliny se využívají speciální genové přenašeče. Přenašeče je možné dělit na dva druhy: virové a neviróvé.<sup>45</sup>

Plicní podání má ovšem několik zásadních nevýhod. Jednou z nich je skutečnost, že nevirové přenašeče bývají zpravidla velké makromolekuly neschopné difuze skrze plasmatickou membránu, je pro ně tedy náročnější dostat se do buňky. Navíc všechny přenašeče musí překonávat četné mechanické a biologické překážky.<sup>8</sup> Pro nevirové přenašeče bývá největší překážkou hustý hlen na povrchu buněk. Plicní epitel rovněž neproliferuje, případný účinek léčby tedy bude vždy dočasný, a je proto nutné, aby byla možná opětovná podání léku.

Pro nápravu funkce plic postižených CF se udává, že je zapotřebí indukovat tvorbu CFTR proteinu alespoň v 10 % epiteliálních buněk.<sup>46</sup>

### **1.5.1 DNA přenos**

DNA přenos využívá syntetizované komplementární DNA (cDNA) CFTR genu. Tento gen je vpraven do jádra a napojen na chromozom. Buňka by si následně pomocí takto vložené informace měla být schopna vytvářet funkční CFTR kanál.

#### ***1.5.1.1 Virové přenašeče***

Viry jsou organismy, jejichž celý životní cyklus je založen na schopnosti proniknout do hostitelské buňky a exprimovat v ní nesenou genetickou informaci. Představují tak ideální přenašeče pro transfer CFTR genu. Bývají však často imunogenní, nevhodné k průmyslové výrobě a představují zdravotní riziko.<sup>8</sup>

Mezi virové přenašeče patří adenoviry, adeno-asociované viry, sendai virus a další.

#### ***Adenoviry***

Adenoviry jsou viry s dvouvláknovou DNA. Genom mají v rozsahu od 36 do 40 kb.<sup>47</sup> Adenoviry jsou v přirozené formě spojovány s infekcemi horních cest dýchacích, jater, ledvin a močových cest. Jejich rekombinantní forma je tedy velmi dobře schopna pronikat do plicního epitelu. Do buněk prochází pomocí CAR receptoru (z angl. Coaxie virus and adenoviral receptor), který se u epiteliálních buněk horních cest dýchacích nachází na apikální straně a je tedy přístupný.<sup>48</sup>

Podání rekombinantních adenovirů však vyústilo v zánětlivost a samotný transfekční efekt byl nízký a krátkodobý.<sup>49</sup> Navíc CAR receptor, který adenoviry využívají k průniku do buňky, se v dolních cestách dýchacích nachází na basolaterální straně a je tak těžko

přístupný. Jak se následně ukázalo, adenoviry také nelze použít k opětovné aplikaci, neboť v buňkách dochází ke kumulativní imunitní odpovědi.<sup>50</sup>

Za tuto imunitní odpověď nejspíše může rozpoznání virové části nesené DNA. Ve snaze vyhnout se imunitní reakci byla vyvinuta „vykostěná“ verze adenoviru, který se tak stal pouhou virovou schránkou nesoucí CFTR cDNA.<sup>51</sup> Jak se ale ukázalo, tato verze adenoviru sice nezpůsobovala tak značnou imunitní odpověď, organismus nicméně dokázal rozeznat virovou schránku a spustil zánětlivou reakci.<sup>52</sup>

I když momentálně probíhají snahy o vytvoření takové varianty adenovirového vektoru, který by byl před hostitelským imunitním systémem ukryt, pro svou patogenitu a nízkou účinnost zůstávají adenoviry nevhodnými přenašeči.

### *Adeno-asociované viry*

Adeno-asociované viry (AAV) jsou viry s jednovláknovým DNA genomem. Jedná se o velice malé viry s kapacitou pouhých 4,7 kb.<sup>47</sup> *In vivo* studie ukázaly, že rekombinantní AAV jsou schopny transfekovat celou řadu epiteliálních buněk, včetně plicních.<sup>53</sup> AAV vkládá svůj genom do chromosomu 19, čímž zajišťuje dlouhodobou expresi. Třebaže se AAV ukázaly jako bezpečný vektor, jeho aplikace vykazala pouze mírná zlepšení, přičemž v cytosolu nebyla detekována CFTR mRNA.<sup>54</sup> Rekombinantní AAV tedy nejsou schopny dostatečně indukovat produkci CFTR, jejich opětovné podání je navíc znemožněno vytvořením specifické imunity.

Třebaže adeno-asociované viry jsou díky své schopnosti dlouhodobé transfekce lákavým vektorem genové terapie, ukázaly se, podobně jako adenoviry, jako nevhodné přenašeče pro léčbu CF.

### *Ostatní virové vektory*

Adenoviry a adeno-asociované viry patří mezi nejprozkoumanější virové přenašeče, nejsou však jedinými. Zde je uvedeno několik příkladů dalších virů, jejichž možné využití je zatím pouze v experimentální fázi.

Mezi viry schopné vložení genové informace do buněčného chromozomu patří retroviry, které tak mohou zajistit dlouhodobou genovou expresi. Nejsou ovšem schopny transfekovat nedělitelné buňky, což je činí nevhodnými pro léčbu CF.<sup>55</sup>

Zvláštním příkladem retrovirů jsou lentiviry. Tyto viry jsou schopné transfekovat nedělitelné buňky. Aplikace lentivirů, vykazujících vysokou efektivnost v myších plicích,<sup>56</sup> narazila na stejné úskalí jako většina virových přenašečů – opětovná podání jsou neefektivní z důvodu imunitní odpovědi hostitele.

Dalším možným vektorem je Sendai virus. Jedná se o obalený virus s RNA genomem.<sup>57</sup> Sendai virus je schopný transfekovat terminálně diferencované buňky a jeho rekombinantní forma dosáhla vysoké účinnosti genové exprese CFTR genu. Jedná se o zdaleka nejefektivnější v současné době známý virový vektor. Jeho nevýhodou je však krátkodobý účinek transfekce a silná zánětlivá reakce po jeho podání.<sup>58</sup>

Virové přenašeče, třebaže zdánlivě nejlepší řešení genové terapie CF, se ukázaly jako nepřilíš vhodné, a to hlavně z důvodu terminální diferencovanosti epitelálních buněk a vysoké imunogenese plic.

### ***1.5.1.2 Nevirové přenašeče***

Nevirové vektory představují alternativní formu genového přenosu. Nevyvolávají natolik silnou imunogenní a zánětlivou odpověď jako virové vektory. Jsou rovněž snáze modifikovatelné a vhodnější k průmyslové výrobě.<sup>59</sup> Jejich nevýhodou je ovšem poměrně nízká účinnost.<sup>8</sup>

Mezi neviróvé přenašeče se řadí kationtové liposomy, kationtové polymery a plasmidová DNA.

#### ***DNA***

Nejjednodušším příkladem neviróvého přenašeče je cirkulární plasmidová DNA (pDNA). Samostatná DNA je schopna transfekovat ovčí plíce *in vivo* za tvorby patřičné RNA.<sup>8,60</sup> Praktickému využití DNA jako přenašeče však brání její neschopnost být převedena do aerosolu, aniž by nebyla poškozena.

#### ***Kationtové liposomy***

Kationtové liposomy jsou látky složené z kationtových lipidů smíšených zpravidla s cholesterolem a dioleoylfosfatidylethanolaminem (DOPE). Mají kladně nabitý postranní

řetězec, který je schopen interagovat se záporně nabitou molekulou pDNA a utvářet tak komplexy zvané lipoplexy.<sup>61</sup> Kromě nabitě části disponují hydrofobní lipidovou částí, která celému konstruktovi usnadňuje vstup do buňky podporováním fúze s membránou. Velikost částice bývá v průměru 100 – 500 nm.

Kationtové lipoplexy jsou odolné vůči endonukleasové aktivitě a na rozdíl od virových vektorů nemají omezení velikosti přenášené DNA. Zároveň nejsou imunogenní, poskytují tedy možnost opakovaných podání.<sup>47</sup>

Existuje mnoho různých typů kationtových liposomů (např. DC-Chol/DOPE, EDMPC-Chol), z nichž většina v kombinaci s CFTR genem měla účinek buď příliš slabý, nebo zcela žádný.<sup>75</sup> Naproti tomu liposom GL-67:DOPE vykázal v myších plicích sto až tisícinásobnou míru exprese oproti ostatním kationtovým liposomům, třebaže tato exprese se rovnala expresi samostatné pDNA.<sup>64</sup>

Podání komplexu s GL-67 *in vivo* vyústilo v určitou toxicitu. Mnoho pacientů mělo zvýšenou hladinu prozánětlivých cytokinů a dalších chřipkových příznaků, které trvaly po dva dny. Samotné podání GL-67 ovšem žádnou toxicitu nezpůsobovalo.<sup>65</sup> Tyto příznaky byly později vysvětleny aktivováním Toll-like receptoru 9, který se nachází v endosomu a detekuje bakteriální DNA, vyznačující se sekvencemi nemetylovaných CpG.<sup>66</sup> Tento nedostatek lze ale obejít modifikací nukleových bází.

Hlavním problémem kationtových liposomů je jejich nízká transfekční účinnost. Tomu může napomoci slibná metoda, kdy jsou kationtové lipoplexy spojeny s nanoapatitovými částicemi.<sup>67</sup>

Pokud by se tedy dala spolehlivě zajistit vysoká úroveň exprese přenášeného genomu, staly by se kationtové liposomy vhodnými přenašeči pro CF genovou terapii.

### *Kationtové polymery*

Kationtové polymery představují další skupinu nevirových přenašečů. Podobně jako kationtové liposomy jsou schopné tvorby komplexů s DNA, kdy s nukleovou kyselinou kondenzují za tvorby částic odolných nukleasám.<sup>68</sup> Polymery elektrostaticky interagují s plasmatickou membránou a následně podléhají endocytóze.

Mezi kationtové polymery patří například poly-L-lysine (Poly-K), polyethylenimin (PEI) nebo polyamidoaminové dendrimery.<sup>47</sup> Nejčastěji byl užíván PEI, který je díky svým postranním řetězcům schopen protrhnout endosom a vniknout tak do cytoplasmy.<sup>69</sup>

Podobně však jako s kationtovými liposomy, úroveň transfekce PEI je poměrně nízká (1-5 %). Navíc vysoká molekulová hmotnost PEI způsobuje, že jej buňka není schopna rozložit. Zároveň svou schopností ničit endosomy způsobuje toxicitu jak *in vitro*, tak *in vivo*.<sup>70</sup>

Alternativou PEI je Poly-K. Tento polymer proniká do buňky pomocí tvorby komplexu s ligandem SecR receptoru (z angl. Serpin-enzym complex receptor). Třebaže samotná transfekce Poly-K nevykazovala žádnou imunitní odpověď, opětovné podání bylo znemožněno vytvořením imunity vůči SecR receptoru.<sup>47</sup>

## 1.5.2 mRNA přenos

Zásadní problém DNA genové terapie spočívá v nutnosti přenášeny genom dopravit do jádra buňky, aby mohl být exprimován. K tomu jsou zapotřebí buď virové vektory, které jsou sice adaptovány k průniku do jádra, vyvolávají však imunologické a zánětlivé reakce (viz kapitola 1.4.1), nebo nevirové přenašeče, ty jsou ovšem pro přenos DNA povětšinou neúčinné.

Alternativou DNA přenosu je přenos mRNA, který má hned několik výhod oproti konvenčnímu přenosu DNA. Nedochází k imunologické reakci na virový vektor; mRNA je překládána přímo v cytosolu, nepotřebuje tedy být transportována do jádra, čímž se eliminuje složitá biologická bariéra; pro přenos mRNA není důležité, zda je buňka schopna proliferace; mRNA je podstatně menší molekulou, než je DNA, a jsou možná její opakovaná podání bez rizika mutagenese.<sup>71</sup>

Třebaže mRNA genová terapie na první pohled přináší mnoho pozitiv, jsou s ní spojeny i charakteristické problémy. Jedním z nich je relativní nestabilita molekuly. Pro uměle vytvořenou mRNA je nutné, aby měla 5' čepičku a dostatečnou délku polyadenylového konce. Studie ukázaly, že stabilita mRNA v organismu prudce stoupá při délce 100 adenosinů a více.<sup>72</sup>

Pro přenos mRNA se zpravidla využívají nevirové přenašeče.<sup>73</sup> Mezi kationtovými lipidy je to například lipofektamin, lipofektin nebo DOTAP. Z kationtových polymerů je možné jmenovat rozvětvený PEI 25 kDa nebo lineární PEI 22 kDa.

Z virových vektorů je možné jmenovat Sendai virus, který je schopný pronikat do celé řady savčích buněk a zároveň exprimovat nesený genom přímo v cytosolu.<sup>74</sup>

Druhou obtíží při přenosu syntetické mRNA je její rozpoznání Toll-like receptory. Tyto receptory jsou schopné identifikovat bakteriální nukleovou kyselinu, která se

vyznačuje absencí modifikovaných nukleových bází, čímž aktivuje zánětlivou odpověď.<sup>66</sup> Tomuto problému lze předejít úpravou syntetizované mRNA. Mezi takto modifikované báze mRNA patří například 5-methylcytidin, N6-methyladenosin a N7-methylguanosen, který je součástí 5' čepičky.<sup>75</sup>

Ačkoliv možnost mRNA přenosu je známá už od osmdesátých let dvacátého století,<sup>76</sup> stále se jedná o relativně neprobádané území genové terapie, které ovšem poskytuje mnoho výhod oproti DNA přenosu a stojí za důkladnější prozkoumání.

## 2. Cíl práce

V této práci byla zkoumána technika detekce CFTR proteinu pomocí metody Western blot. Hlavním cílem bylo optimalizovat metodu detekce tohoto proteinu a následně ji aplikovat pro určení míry exprese CFTR proteinu v buněčných liniích po jejich transfekci CFTR-mRNA.

Pro splnění cíle této práce bylo třeba splnit následující úkoly:

- Provést literární rešerši zaměřenou na genovou terapii cystické fibrózy.
- Optimalizovat způsob lyze buněčných linií NuLi-1, CuFi-1 a A549, aby během lyzačního procesu nedocházelo k degradaci CFTR proteinu.
- Porovnat účinnost primárních protilátek proti CFTR proteinu využitých při metodě Western blot.
- Pomocí metody Western blot stanovit míru exprese CFTR proteinu v buněčných liniích po jejich transfekci CFTR-mRNA.



## 3. Materiál a metody

### 3.1 Použité přístroje a materiál

#### 3.1.1 Přístrojové vybavení

centrifuga Hettich Universal 320 R	Hettich Zentrifugen, Německo
centrifuga Eppendorf 5418	Eppendorf, USA
centrifuga Eppendorf 5485 R	Eppendorf, USA
CO <sub>2</sub> inkubátor	ShellLab, ČR
elektroforetická aparatura	Bio-Rad, USA
laminární box BIO 126	Labox, ČR
mikroskop Motic AE31	Motic, Německo
spektrofotometr Tecan Sunrise	Tecan, Švýcarsko
třepačka Yellowline os 2 basic	IKA, Německo
tyčový sonikátor Bandelin UW 3100	Bandelin, Německo
vodní lázeň	Memmert, Německo
zamrazovací box Nalgene™	
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, USA
zařízení pro Western blot	Biometra, Německo

#### 3.1.2 Použitý materiál

0,25% Trypsin + EDTA	Sigma, USA
akrylamid, bisakrylamid	Sigma, USA
anti-CFTR (CF3) myší IgM	ThermoFisher Scientific, USA
anti-CFTR proti C-konci myší IgG	R&D Systems, USA
anti-CFTR proti R doméně myší IgG	R&D Systems, USA
anti-GAPDH králičí IgG	Abcam, USA
anti-mouse IgG – Alkaline Phosphatase králičí	Sigma, USA
anti-rabbit IgG – Alkaline Phosphatase kozi	Sigma, USA
APS	Sigma, USA
Bromfenolová modř	Sigma, USA
BCIP	Sigma, USA

CBB	Sigma, USA
CuFi-1	ATCC®, USA
Complete inhibitor protease	Roche Diagnostics, Švýcarsko
DMEM	PAA Laboratories, Rakousko
DMSO	AppliChem GmbH, Německo
EDTA	Sigma, USA
FBS	Gibco™ Invitrogen , UK
Geneticin	Gibco™ Invitrogen , UK
Gentamycin	Biochrom <sup>AT</sup> , UK
glycin	Sigma, USA
HEPES	Sigma, USA
Cholát sodný	Sigma, USA
Kolagen IV	Sigma, USA
LHC-9	Gibco™ Invitrogen , UK
L-glutamin	Gibco™ Invitrogen , UK
Lipofectamin	ThermoFisher Scientific, USA
Microplate BCA™ Protein Assay Kit	Thermo sciences, USA
NBT	Sigma, USA
NuLi-1	ATCC®, USA
Optimem medium	Gibco™ Invitrogen , UK
PBS tablety	Gibco™ Invitrogen , UK
Polyakrylamid	Sigma, USA
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Sigma, USA
Precision Plus Protein Western C	Sigma, USA
PVDF membrána	Thermo sciences, USA
SDS	Sigma, USA
Sterilní vybavení tkáňové laboratoře	TPP, Švýcarsko
TEMED	Sigma, USA
Tris-HCl	Sigma, USA
Triton X-100	Sigma, USA
Trypanová modř 0,4%	Sigma, USA
Tween 20	Sigma, USA

## 3.2 Práce s buněčnými kulturami

Pro experimenty byly použity tři buněčné linie: CuFi-1, NuLi-1 a A549 (ATCC®). CuFi-1 je immortalizovaná buněčná linie plicního epitelu, získaného od pacienta trpícího CF s mutací  $\Delta F508$ . NuLi-1 je immortalizovaná kultura zdravých plicních buněk a A549 je linie plicního karcinomu. Všechny tyto tři buněčné kultury jsou komerčně dostupné preparáty.

### 3.2.1 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie byly uchovávány v ShellLab CO<sub>2</sub> inkubátoru za teploty 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Tento inkubátor je umístěn v laboratoři vyhrazené pro kultivaci tkáňových kultur. Manipulace s kulturami probíhala přísně sterilně v laminárním boxu BIO 126.

Pro kultivaci buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1 bylo užíváno LHC-9 medium, které bylo vyvinuto speciálně pro plicní epitelální buňky. Toto medium se vyznačuje absencí fetálního séra. Do LHC-9 media bylo přidáváno antibiotikum Geneticin, jehož výsledná koncentrace byla 50 µg/ml. Tyto dvě kultury navíc vyžadují pro správný růst kultivační povrch potažený kolagenem IV (viz kapitola 3.2.2).

Buněčná linie A549 byla pěstována v DMEM mediu. Toto komerčně dostupné medium bylo následně upraveno, aby obsahovalo 10% (v/v) FBS, 2 mM L-glutamin a antibiotikum Gentamycin v koncentraci 50 µg/ml.

Všem třem liniím bylo po 3-4 dnech vyměňováno kultivační medium. Do kultivačních nádob s povrchem 75 cm<sup>2</sup> bylo dáváno 15-16 ml kultivačního media, do nádob s povrchem 25 cm<sup>2</sup> 5-10 ml kultivačního media.

### 3.2.2 Příprava kultivačních lahví potažených kolagenem IV

Pro správný růst buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 je nezbytné, aby měly k dispozici povrch potažený kolagenem IV. Tento kolagen je získáván z lidské placenty. Komerčně dostupný produkt byl rozpuštěn v 0,25% (v/v) kyselině octové, aby jeho výsledná koncentrace byla 1,8 mg/ml. Tím byl získán zásobní roztok, který byl uchováván ve skleněné nádobě, v chladu a bez přístupu světla.

Zásobní roztok kolagenu byl ředěn PBS pufrem (přípraveným rozpuštěním jedné PBS tablety v 500 ml destilované vody), aby vznikl roztok o koncentraci 60 µg/ml. Takto získaný roztok byl sterilizován filtrací přes 0,22µm filtr. Roztok byl následně nanášen do

kultivačních lahví. Do nádob s kultivačním povrchem 25 cm<sup>2</sup> byly přidávány 2 ml roztoku, do nádob s povrchem 75 cm<sup>2</sup> bylo přidáváno 4-5 ml tohoto roztoku.

Kultivační nádoby byly s roztokem kolagenu inkubovány do druhého dne. Poté byl roztok odstraněn a nově vzniklý kolagenový povrch byl dvakrát promyt 4-5 ml PBS pufru. Kultivační lahve byly ponechány vyschnout dnem vzhůru, aby se na kolagenovém povrchu neutvořily krystalky z PBS pufru.

Suché kultivační nádoby byly minimálně 2 hodiny sterilizovány UV zářením. Uzávěry nádob byly obtočeny parafilmem. Kolagenové lahve byly skladovány v chladu. Před dalším použitím byly jednou promyty PBS pufrem.

### **3.2.3 Subkultivace buněčných linií**

Subkultivace je metoda, při níž je odebrána část kultivované linie, která je následně nasazena do nové kultivační lahve. Subkultivace se provádí tehdy, když jsou buňky v kultivačních nádobách narostlé tak, že tvoří jednolitou vrstvu a nemají už prostor k dalšímu dělení. Buňkám je nejprve nutné přerušit adherentní spoje s kultivační nádobou, čehož bylo dosaženo přidavkem 0,25% (v/v) trypsinu s 0,53 mM EDTA. Působení trypsinu je pak zastaveno přidavkem fetálního hovězího séra (FBS).

#### *Subkultivace buněčných linií CuFi-1, NuLi-1*

Subkultivace byla prováděna jednou za 7 dní. Z kultivačních nádob bylo odstraněno staré medium. Buňky v nádobě byly uvolněny přidavkem 2-3 ml 0,25% trypsinu s EDTA po dobu 8-10 minut. Trypsinace byla inhibována ekvivalentním přidavkem 1% FBS v PBS pufru. Poté byla buněčná suspenze 5 minut centrifugována (centrifuga Hettich, 1000 RPM).

Supernatant byl odstraněn a buněčná peleta resuspendována v 1 ml kompletního LHC-9 (viz kapitola 3.2.1) media, temperovaného na 37°C.

Pro další kultivaci bylo do kolagenové kultivační nádoby s povrchem 75 cm<sup>2</sup> dáno přibližně 1,5-2·10<sup>6</sup> buněk v 16 ml LHC-9 media.

#### *Subkultivace buněčných linií A549*

Z důvodu rychlého růstu rakovinné linie byla subkultivace A549 prováděna jednou za 3-4 dny. Z kultivačních nádob bylo nejprve odstraněno medium. Buněčná vrstva byla

následně jednou až dvakrát omyta PBS pufrem, aby bylo odstraněno FBS nacházející se v kompletním DMEM mediu.

K buňkám bylo přidáno 2-3 ml 0,25% (v/v) trypsinu s EDTA a byly ponechány inkubovat přibližně 8 minut. Působení trypsinu bylo zastaveno ekvivalentním přídatkem 10-50% FBS v PBS. Buněčná suspenze byla 5 minut centrifugována (centrifuga Hettich, 1000 RPM).

Po skončení centrifugace byl odstraněn supernatant a buněčná peleta byla resuspendována v 1 ml kompletního temperovaného DMEM media (viz kapitola 3.2.1). Pro další kultivaci bylo do kultivační nádoby s povrchem 75 cm<sup>2</sup> nasazeno 2·10<sup>6</sup> buněk v 16 ml media.

### 3.2.4 Stanovení počtu buněk v suspenzi

Stanovení počtu buněk bylo prováděno v Bürkerově komůrce pomocí 0,4% trypanové modři. Trypanová modř obarvuje mrtvé a poškozené buňky. Pod reverzním mikroskopem tedy lze spočítat množství živých buněk v suspenzi. Buněčná suspenze získaná během subkultivace byla naředěna kultivačním médiem a 20 µl roztoku 0,4% trypanové modři tak, aby v případě buněčné linie CuFi-1 a NuLi-1 vznikl 10x ředěný roztok a linie A549 20x ředěný.

Burkerova komůrka obsahuje síť devíti velkých čtverců. Při této metodě byly počítány buňky v pěti z nich. Výsledný počet buněk n byl upraven podle následujícího vztahu, čímž bylo získáno celkové množství buněk v suspenzi.

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

### 3.2.5 Zamrazení buněčných linií

Pro dlouhodobé uchování buněčných linií je třeba je skladovat při teplotě -80°C, popřípadě v tekutém dusíku.

Příprava na zamrazení probíhala zpočátku identicky jako subkultivace buněčných linií. Buňky byly uvolněny 0,25% trypsinem s EDTA a následně po přídatku FBS roztoku centrifugovány (viz kapitola 3.2.3). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a buněčná suspenze byla promyta PBS pufrem. Suspenze byla opět 5 minut centrifugována

(centrifuga Hettich, 1000 RPM). Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována v zamrazovacím mediu, jehož složení bylo následující: kultivační medium, 10% (v/v) DMSO a 30% (v/v) FBS. DMSO slouží jako kryoprotektant.

Buněčná suspenze byla pipetována po 1 ml do kryozkumavek, které byly dále umístěny do zamrazovacího boxu Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container a umístěny přes noc do hlubokomrazícího boxu. Zamrazovací box ochlazuje buněčnou suspenzi 1°C za minutu. Po zmražení byly buňky uchovávány při teplotě -80°C nebo v tekutém dusíku.

### 3.2.6 Rozmrazení buněčných linií

Buněčné linie jsou dlouhodobě uchovávány v hlubokomrazících boxech při -80°C. Aby byly schopné vydržet takto nízké teploty, přidává se do zamrazovacího media DMSO. Tento kryoprotektant je však pro buňky částečně toxický, je tedy třeba, aby proces rozmrazování probíhal co nejrychleji. Zároveň je nutné u citlivých buněčných linií (jako jsou CuFi-1 a NuLi-1) postupně přidávat medium, aby došlo k vyrovnání osmotických tlaků a nedošlo k lyzi buněk.

#### *Buněčné linie CuFi-1, NuLi-1*

Ještě před vyjmutím kryozkumavek z mrazícího boxu bylo připraveno kompletní LHC-9 medium (viz kapitola 3.2.1). Toto medium bylo temperováno na 37°C. Zamražené buňky byly rychle rozmrazeny ve vodní lázni a v laminárním boxu BIO 126 byly převedeny do zkumavky Falcon. Následně k nim bylo přidáváno vytemperované medium dle tabulky 1.

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

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

Buněčná suspenze byla 5 minut centrifugována (centrifuga Hettich, 1000 RPM). Peleta byla resuspendována v 1 ml LHC-9 media. Byl odebrán alikvot ke stanovení viability (viz kapitola 3.2.4). Zbylé buňky byly nasazeny do 25 cm<sup>2</sup> kultivační lahve s kolagenovým povrchem do 10 ml LHC-9 media.

## *Buněčná linie A549*

Buňky v kryozkumavce byly vyjmuty z hlubokomrazícího boxu a rychle rozmrazeny ve vodní lázni na 37°C. Následně byly převedeny do zkumavky Falcon a postupně k nim bylo přidáváno kompletní DMEM medium (viz kapitola 3.2.1) temperované na 37°C. Buněčná suspenze byla 5 minut centrifugována (centrifuga Hettich, 1000 RPM). Peleta byla resuspendována v 1 ml DMEM media. Z buněčné suspenze byl odebrán alikvot ke stanovení počtu buněk (viz kapitola 3.2.4). Zbylá buněčná suspenze byla převedena do kultivační lahve s povrchem 25 cm<sup>2</sup> do 10 ml DMEM media.

### **3.3 Lyze buněčných linií CuFi-1, NuLi-1 a A549**

Buňky určené k lyzi a následné elektroforéze a Western blotu byly během subkultivace nasazeny na sterilní Petriho misky. Na Petriho misky s průměrem 4 cm bylo nasazeno  $0,5 \cdot 10^6$  buněk do 2 ml kultivačního media. Petriho misky s průměrem 10 cm byly naplněny 10 ml kultivačního media, do něhož bylo přidáno  $10^6$  buněk.

Buňky byly po vytvoření monovrstvy lyzovány různými postupy a typy lyzačních pufků.

#### **3.3.1 Lyzační protokol 1**

Z Petriho misek o průměru 4 cm bylo odsáto kultivační medium. Buňky byly dvakrát omyty 1 ml PBS pufku a následně seškrabány do 100  $\mu$ l PBS. Buněčná suspenze byla sonikována tyčovým sonikátorem Bandelin UW 3100 se sonikační hlavou MS73 na 10% amplitudu.

K buněčnému lyzátu bylo přidáno patřičné množství 4x koncentrovaného vzorkového pufku (viz kapitola 3.6). Vzorby byly vzápětí analyzovány SDS-PAGE elektroforézou a metodou Western blot (viz kapitola 3.6 a 3.7).

#### **3.3.2 Lyzační protokol 2**

Z Petriho misky o průměru 10 cm bylo odstraněno kultivační medium a buňky byly dvakrát omyty 3-5 ml PBS pufku. Následně byly seškrabány stěrku do 1 ml PBS pufku a převedeny do 2 ml mikrozukavky Eppendorf. Buňky byly 5 minut centrifugovány (centrifuga Eppendorf 5485 R, 4500 RPM). Po následném odstranění supernatantu bylo

k buňkám přidáno 250  $\mu$ l lyzačního pufru A (50 mM HEPES, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, pH 7,5). Vzorky byly umístěny na třepačku Yellowline a třepány 10 minut při 1100 RPM.

Buněčný lyzát byl poté 15 minut centrifugován (centrifuga Eppendorf 5418, 13 000 RPM). Supernatant byl přenesen do sterilních mikrozkuvek Eppendorf a skladován při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$  do další analýzy.

### **3.3.2 Lyzační protokol 3 a 4**

Z Petriho misek bylo odsáto kultivační medium. Buňky byly následně dvakrát promyty PBS puforem. Buňky nasazené v miskách o průměru 10 cm byly omyty 3-5 ml PBS pufru, buňky nasazené v miskách o průměru 4 cm byly omyty 1 ml pufru.

Byly připraveny dva různé lyzační pufrы – B (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1% (v/v) Triton X-100, pH 8) a RIPA (150 mM NaCl; 50 mM Tris; 1% (v/v) Triton X-100; 0,5% (v/v) cholát sodný; 0,1% (v/v) SDS, pH 8). V 15 ml příslušného pufru byla vždy těsně před použitím rozpuštěna čtvrtina tablety Complete inhibitor protease. K buňkám kultivovaným v Petriho miskách o průměru 10 cm byl přidán 1 ml lyzačního pufru, do misek s průměrem 4 cm bylo přidáno 100  $\mu$ l pufru. Buňky byly poté do tohoto pufru seškrabány stěrkou.

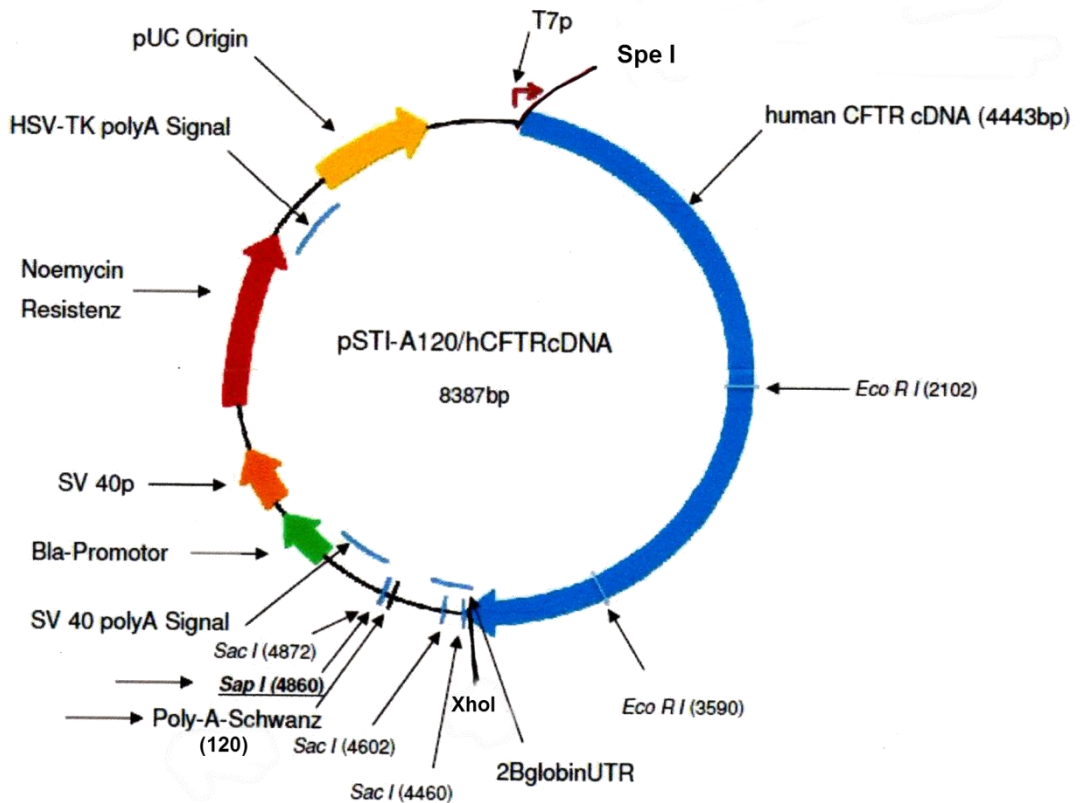
Buněčný lyzát byl držen na ledu a umístěn na třepačku Yellowline a třepán 30 minut při 1100 RPM. Vzorky byly následně centrifugovány 25 minut při 13 000 RPM v centrifuze Eppendorf 5485 R, vychlazené na  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant byl převeden do sterilních mikrozkuvek a zamražen tekutým dusíkem. Vzorky byly skladovány v hlubokomrazícím boxu při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$  do další analýzy.

## **3.4 Transfekce buněčných linií CuFi-1, NuLi-1 a A549 CFTR-mRNA**

Transfekce je proces, při kterém je do cílové eukaryotické buňky vpravena cizorodá nukleová kyselina (DNA, RNA). V této práci byl k transfekci použit kationtový liposom lipofektamin (Lipofectamine MessengerMAX, 300 ng/ $\mu$ l). Kationtový liposom disponuje kladně nabitou částí, kterou na sebe váže záporně nabitou nukleovou kyselinu, a nepolární částí, díky níž proniká skrz plasmatickou membránu a vnáší tak genetickou informaci do buňky.<sup>77</sup> Pomocí lipofektaminu byla přenášena CFTR-mRNA, která byla syntetizována podle DNA vycházející z plasmidu na obrázku č. 4 (strana 32). CFTR-mRNA byla



vytvořena RNDr. Tomášem Koblasem, Ph.D. v Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM). CFTR-mRNA obsahovala 25 % pseudouridinu, 25 % methylcytidinu, enzymaticky připojenou 7-methylguanosylovou čepičku a polyA konec obsahující 200 adeninů.



**Obrázek č. 4:** Plasmid použitý k syntéze CFTR-mRNA.

Buněčná linie byla nasazena v počtu  $0,5 \cdot 10^6$  buněk na tři Petriho misky o průměru 4 cm. Buňky byly kultivovány ve 2 ml kultivačního media do vytvoření souvislé monovrstvy. Následující postup platí vždy pro jednu buněčnou linii.

Ve vodní lázni bylo temperováno Optimem medium na  $37^\circ\text{C}$ . Do tří sterilních mikrozkušavek Eppendorf bez RNas, označených A, B a C, bylo pipetováno 125  $\mu\text{l}$  Optimem media. Do mikrozkušavky A a B bylo pipetováno 3,75  $\mu\text{l}$  lipofektaminu, do mikrozkušavky C 7,5  $\mu\text{l}$  lipofektaminu. Takto připravené roztoky byly inkubovány 10 minut za laboratorní teploty.

Do nové sterilní mikrozkušavky Eppendorf bez RNas bylo pipetováno 250  $\mu\text{l}$  Optimem media, do něhož bylo přidáno 5  $\mu\text{g}$  CFTR-mRNA.

Po 10 minutách inkubace bylo do mikrozkušavky A, která sloužila jako kontrola, pipetováno 125  $\mu$ l Optimem media a do mikrozkušavek B a C 125  $\mu$ l výše uvedeného roztoku CFTR-mRNA v Optimem medium. Tento roztok byl inkubován 5 minut za laboratorní teploty.

Po skončení inkubace bylo z každé mikrozkušavky odebráno 250  $\mu$ l roztoku a pipetováno k buněčným liniím. Buněčným liniím bylo před transfekcí vyměněno medium, které neobsahovalo antibiotikum.

### 3.5 Stanovení koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace proteinů je nezbytné pro rovnoměrnou nanášku proteinů na SDS-PAGE elektroforézu (viz kapitola 3.6). K tomuto stanovení se využívá např. kyseliny bicinchoninové (BCA). Metoda je založena na redukci měďnatých kationtů na měďné pomocí proteinů přítomných ve vzorku. Tato reakce probíhá v alkalickém prostředí. Měďné kationty se váží na BCA za tvorby fialového komplexu, který absorbuje světlo o vlnové délce 562 nm. Ke stanovení koncentrace proteinů byl využit komerční set Microplate BCA Protein Assay Kit.<sup>78</sup>

Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno na průhledné 96 jamkové mikrotitrační destičce s plochým dnem. Nejprve byl pipetován triplet slepého vzorku a paralelní vzorky BSA (hovězí sérový albumin) jako standardy o koncentracích: 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 a 2,0 mg/ml. Poté byly nanášeny triplety vzorků. Každý vzorek byl připraven minimálně ve dvou ředěních (2,5x; 5x a 10x). Slepý vzorek, standardy a vzorky byly nanášeny v množství 9  $\mu$ l. Do jamek byly přidány 4  $\mu$ l compatibility reagent a 260  $\mu$ l working reagent, které bylo vytvořeno smícháním reagent A (2% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 0,95% (w/v)  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,4% (w/v)  $\text{NaOH}$ ; 0,16% (w/v) vínan sodno-draselný; pH 11,25) a reagent B (4% (w/v)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) v poměru 50:1.

Destička byla inkubována při 37°C po dobu 30 minut. Po inkubaci byla destička ponechána několik minut při laboratorní teplotě a pak byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm na spektrofotometru Tecan Sunrise. Ke zpracování hodnot byl použit program KIM 32.

### 3.6 SDS-PAGE elektroforéza

#### *Použité roztoky*

10% (w/v) APS

10% (w/v) SDS

*Pufř A:* 1,5 M Tris-HCl; pH 8,8

*Pufř B:* 1,0 M Tris-HCl, pH 6,8

*Polymerační roztok:* 29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) bisakrylamid

*Elektrodový pufř:* 0,192 M glycin; 0,025 M Tris-HCl; 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3

*Barvicí lázeň:* 9,2% (v/v) kyselina octová; 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) ; 46% (v/v) ethanol

*Odbarvací lázeň:* 10% (v/v) kyselina octová; 25% (v/v) ethanol

*Redukující vzorkový pufř 4x koncentrovaný:* 0,063 M Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) glycerol, 0,003% (w/v) bromfenolová modř, 5% (v/v) 2-merkptoethanol, pH 6,8

#### *Gely*

*8% separační gel:* 2,3 ml destilované vody; 1,3 ml polymeračního roztok; 1,3 ml pufřu A; 50  $\mu$ l 10% SDS; 50  $\mu$ l 10% APS; 3  $\mu$ l TEMED

*4% zaostřovací gel:* 1,5 ml destilované vody; 267  $\mu$ l polymeračního roztok; 250  $\mu$ l pufřu B; 20  $\mu$ l 10% SDS; 20  $\mu$ l 10% APS; 2  $\mu$ l TEMED

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE) v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS) je elektromigrační metoda sloužící k separaci proteinů na základě rozdílné molekulové velikosti. SDS v gelu slouží jako denaturační činidlo, které se vždy stejně váže na hydrofobní části proteinů, čímž jim uděluje jednotný záporný náboj.<sup>79</sup>

Gel užívaný k elektroforéze se skládá ze dvou částí: zaostřovacího gelu a separačního gelu. Během elektroforézy jsou nejlépe děleny takové molekuly, které svou velikostí odpovídají velikosti pórů separačního gelu. Polymeraci gelu iniciuje TEMED a persíran amonný (APS), který zahajuje radikálovou reakci způsobující polymeraci akrylamidu. Samotný akrylamid však vytváří lineární polymery, do polymeračního roztoku se tedy přidává i bisakrylamid, který tyto lineární polymery propojí do trojrozměrné sítě.

Pro separaci CFTR proteinu, jehož velikost je ~170 kDa, bylo využito 8% separačního gelu a 4% zaostřovacího gelu. Nejprve byla elektroforetická skla, sloužící jako forma pro elektroforetické gely, důkladně očištěna a odmaštěna ethanolem. Následně byl smíchán 8% separační gel. Gel byl pipetován mezi 1 mm široká elektroforetická skla do výšky přibližně 2 cm pod horní okraj a převrstven malým množstvím destilované vody. Gel byl ponechán polymerovat 40-50 minut. Destilovaná voda byla slita a prostor mezi skly vysušen filtračním papírem.

Na separační gel byl pipetován 4% zaostřovací gel. Tento gel byl nanášen až po samotný okraj skel a vzápětí do něho byl zanořen 10 jamkový hřeben.

Během polymerace gelu byly připraveny vzorky na elektroforézu. Buněčný lyzát byl naředěn destilovanou vodou a byl k němu přidán 4x koncentrovaný redukující vzorkovým pufr tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 25-50 µg proteinů na 40 µl. Vzorky byly následně 5 minut povařeny, popřípadě zahřáty na 70°C po dobu 6 minut v lázni Mini Dry Bath. Poté byly naneseny do jamky zaostřovacího gelu.

Pro zjištění molekulových velikostí dělených proteinů byly použity markery Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standards a Bio-Rad Precision Plus Protein Western C.

Elektroforéza probíhala 60-80 minut v elektroforetické vaně Bio-Rad při stálém napětí 200 V. Po jejím skončení byl odstraněn zaostřovací gel. Separační gel, který nebyl určen k elektropřenosu proteinů, byl dán na 1 hodinu do barvicí lázně, z níž byl následně přesunut minimálně na tři hodiny do odbarvovací lázně a poté do destilované vody.

### 3.7 Metoda Western blot

#### *Použité roztoky*

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

*TBST-Tween 5x koncentrovaný:* 0,1 M Tris-HCl; 0,75M NaCl, 0,5% Tween 20; pH 7,5

*Blokovací roztok:* 5% (w/v) nízkotučné sušené mléko v TBST-Tween

*Vyvolávací pufr:* 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9

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

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

anti-CFTR (CF3) myši IgM 10µl + 5 ml blokovacího roztoku (ředění podle doporučení výrobce)

anti-CFTR proti R doméně myši IgG (0,2 mg/ml) 50 µl + 10 ml blokovacího roztoku (ředění podle doporučení výrobce)

anti-CFTR proti C-konci myši IgG (0,2 mg/ml) 50 µl + 10 ml blokovacího roztoku (ředění podle doporučení výrobce)

anti-GAPDH králičí IgG 10 µl + 5 ml blokovacího roztoku (ředění podle doporučení výrobce)

anti-mouse IgG – Alkaline Phosphatase 7 µl + 10 ml blokovacího roztoku (ředění podle doporučení výrobce)

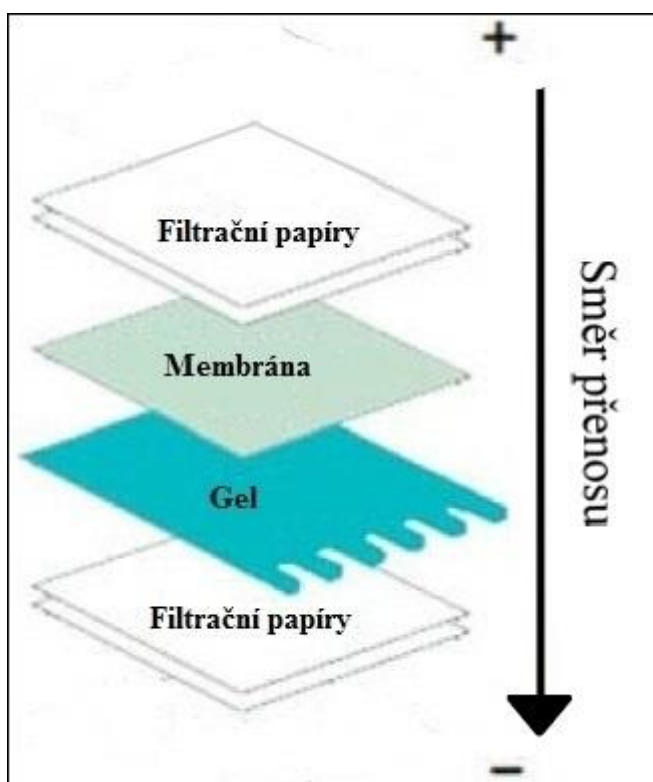
anti-rabbit IgG – Alkaline Phosphatase 0,5 µl + 10 ml blokovacího roztoku (ředění podle doporučení výrobce)

Western blot je přenosová metoda, při níž se proteiny rozdělené pomocí elektroforézy přenáší elektrickým proudem na membránu.<sup>80</sup> Hledaný protein je identifikován specifickou protilátkou, na kterou se váže sekundární protilátka nesoucí enzymatickou sondu. Touto sondou může mít například křenová peroxidasa nebo alkalická fosfatasu, která po reakci s vyvolávacím roztokem vytvoří fialové barvivo indigo. V tomto postupu byly využity sekundární protilátky s alkalickou fosfatasou. Jako kontrola množství analyzovaných proteinů se využívají tzv. house-keeping proteiny, které každá buňka produkuje stejnoměrně. Mezi tyto proteiny se řadí například glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH).

SDS-PAGE elektroforetický gel byl ponechán 30 minut omývat přenosovým pufrům. Poté byla ustřižena PVDF membrána tak, aby byla o 10 % větší než gel. Membrána byla 30 sekund smočena v methanolu, přibližně 1 minutu v destilované vodě a 5 minut v přenosovém pufru.

Na každou použitou membránu bylo ustřiženo 6 silných filtračních papírů Whatman tak, aby každý přibližně o 0,5 cm přesahoval membránu.

Na blotovací zařízení Biometra byly umístěny tři filtrační papíry smočené v přenosovém pufru, dále pak položena PVDF membrána, na ni přiložen gel a nakonec zbylé tři filtrační papíry, rovněž smočené v přenosovém pufru. Ze vzniklého „sendviče“ byly válečkem vytlačeny bubliny společně s přebytečnou kapalinou. Vyteklý přenosový pufr byl osušen buničinou. Schéma skládání „sendviče“ je zobrazeno na obrázku č. 5.



**Obrázek č. 5:** Schéma složení „sendviče“ pro elektropřenos. Obrázek byl převzat a upraven z publikace.<sup>81</sup>

Elektropřenos probíhal ve dvou krocích. První krok trval 10-30 minut a procházející proud byl nastaven tak, aby jeho hodnota odpovídala  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  membrány. V druhém kroku, který trval 45-60 minut, byl elektrický proud nastaven podle vztahu  $3,5 \text{ mA/cm}^2$ .

Po dokončení elektropřenosu byl gel vložen na 1 hodinu do barvicí lázně a poté minimálně na 3 hodiny do odbarvovací lázně.

Membrána byla obarvena roztokem Ponceau červení, čímž bylo zjištěno, zda a v jakém rozsahu došlo k přenosu bílkovin na PVDF membránu. Ponceau červeně byla následně zcela odmyta destilovanou vodou, případně máčením membrány v TBST-Tween pufriu.

Membrána byla inkubována 1 hodinu v blokovacím roztoku. Po blokaci byl k membráně přidán roztok primární protilátky. S primární protilátkou byla membrána inkubována přes noc na orbitální třepačce v chladovém boxu při 4°C.

Druhý den byl od membrány slit roztok primární protilátky, který se uchovával pro opětovné použití. Membrána byla čtyřikrát 5 minut promyta blokovacím roztokem. Následně byl k membráně na 1 hodinu přidán roztok sekundární protilátky, která nesla sondu alkalické fosfatasy.

Sekundární protilátka byla po ukončení inkubace vylita a membrána byla dvakrát 5 minut promyta blokovacím roztokem, dvakrát 5 minut TBST-Tween pufrem a jednou 5 minut destilovanou vodou. Membrána byla dále smočena ve vyvolávacím roztoku pro alkalickou fosfatasy, dokud se na ní neobjevily charakteristické proužky. Membrána byla omyta destilovanou vodou, osušena, naskenována a uschována v alobalovém pouzdře. Množství detekovaného CFTR proteinu bylo vyhodnoceno pomocí programu ImageJ.

## 4. Výsledky

### 4.1 Optimalizace detekce CFTR proteinu

Jedním z cílů této práce byla optimalizace detekce CFTR proteinu pomocí metody Western blot. K tomuto byly využity buněčné linie NuLi-1, CuFi-1 a A549 (ATCC®). NuLi-1 a CuFi-1 jsou imortalizované linie lidského plicního epitelu. NuLi-1 byla získána od zdravého pacienta, CuFi-1 linie pochází od pacienta s CF s mutací  $\Delta F508$  a měla by CFTR protein produkovat ve sníženém množství. A549 je linií plicního karcinomu a podle dostupných publikací by neměla vykazovat žádnou expresi CFTR proteinu.<sup>82</sup> Sloužila tedy jako kontrolní skupina.

Detekce CFTR proteinu byla prováděna pomocí metody Western blot. Buněčný lyzát byl rozdělen pomocí SDS-PAGE elektroforézy a separované proteiny byly následně přeneseny na PVDF membránu. CFTR protein se vyskytuje ve třech různých molekulových velikostech: 168 kDa pro plně maturovaný protein, 131 kDa pro částečně glykosylovaný a 127 kDa pro neglykosylovaný protein.<sup>6</sup> Pro identifikaci CFTR proteinu byly využívány tři monoklonální primární protilátky: protilátka proti extracelulárnímu epitopu transmembránové domény (dále označena jako CF3). Tato protilátka je specifická proti aminokyselinové sekvenci G(103)RIIASYDPDNKEER(117)<sup>83</sup> a byla získána od firmy ThermoFisher scientific. Dále byly využity protilátky proti C-konci a proti R doméně CFTR proteinu (R&D systems), které byly pro zvýšení citlivosti detekce využívány ve směsi<sup>84</sup> (dále označovány jako směs protilátek). CFTR protein byl na PVDF membráně zobrazen pomocí sekundárních protilátek nesoucích sondu alkalické fosfatasy.

#### 4.1.1 Detekce CFTR proteinu v závislosti na způsobu lyze

##### 4.1.1.1 Detekce CFTR proteinu v buňkách lyzovaných podle protokolu 1

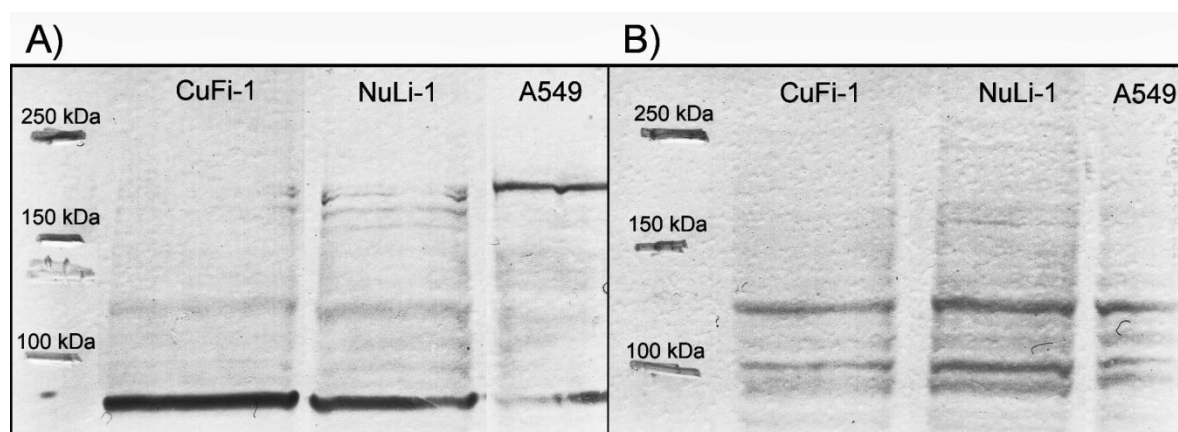
Buněčné kultury CuFi-1, NuLi-1 a A549 byly nejprve lyzovány pomocí tyčového sonikátoru Bandelin UW 3100 (viz kapitola 3.3.1). K buněčnému lyzátu byl přidán redukující vzorkový pufr a celá směs byla ihned nanášena na SDS-PAGE elektroforetický gel. K detekci byla využita protilátka CF3 a směs protilátek proti CFTR proteinu.

Obrázek č. 6 (strana 41) ukazuje výsledek detekce CFTR proteinu v buněčném lyzátu. Vlevo (A) je zobrazena detekce pomocí CF3 protilátky, vpravo (B) je detekce směsí



protilátek. U stanovení CF3 protilátkou byla pozorována výrazná zóna pod úrovní 100 kDa. Tato zóna je nejsilnější v kultuře CuFi-1. Mezi 100 kDa a 150 kDa lze u CuFi-1 a NuLi-1 pozorovat slabou zónu. V oblasti, která odpovídá ~170 kDa, neboli velikosti plně maturovaného CFTR proteinu, není u buněčné linie CuFi-1 žádná zóna a u linie NuLi-1 pouze slabý náznak zóny. Zdaleka nejsilnější zónu lze pozorovat u linie A549.

Pomocí směsi protilátek proti CFTR proteinu byly označeny dvě různé zóny. První svou velikostí odpovídá 100 kDa. Druhá zóna koresponduje s proužkem zobrazeným pomocí CF3 protilátky v oblasti 100-150 kDa. Tato oblast odpovídá ~130 kDa, tedy velikosti neglykosylované či částečně glykosylované formy CFTR proteinu. V oblasti, která by odpovídala ~170 kDa plně maturovaného CFTR proteinu, nebyly detekovány žádné zóny.



**Obrázek č. 6:** Detekce CFTR proteinu v buňkách lyzovaných podle lyzačního protokolu 1. CFTR protein byl stanovován v buněčných liniích CuFi-1, NuLi-1 a A549. Lyzát byl nanášen v množství 25  $\mu$ g proteinů. Buňky byly lyzovány tyčovým sonikátorem Bandelin UW 3100 podle lyzačního protokolu 1. **A)** Detekce CF3 protilátkou. **B)** Detekce směsí protilátek proti CFTR proteinu.

#### 4.1.1.2 Detekce CFTR proteinu v buňkách lyzovaných podle protokolu 2

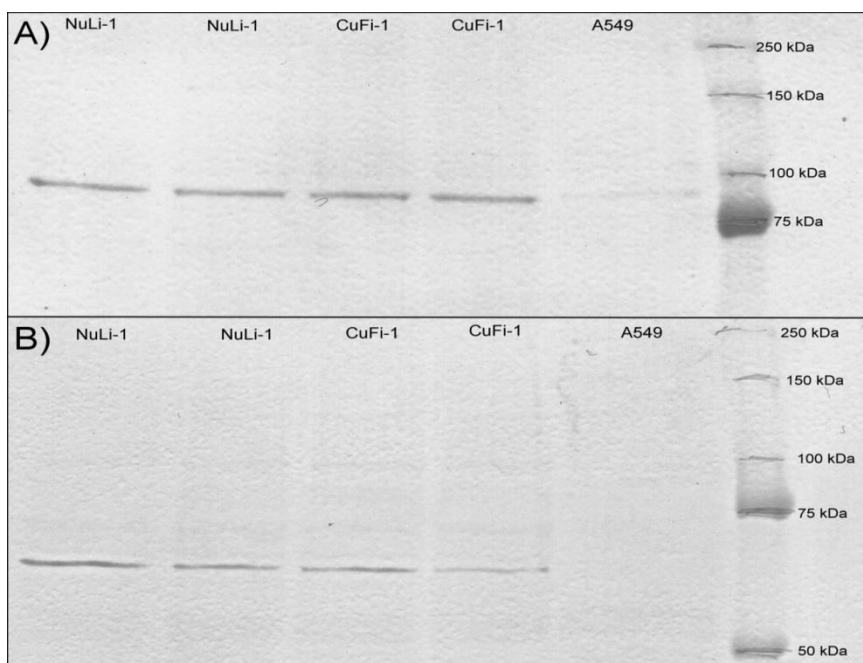
Buněčné kultury CuFi-1, NuLi-1 a A549 byly lyzovány pomocí lyzačního pufru A (viz kapitola 3.3.2) a následně v nich byl zjišťován obsah CFTR proteinu (obrázek č. 7). Linie CuFi-1 a NuLi-1 jsou přítomny ve vzorcích ze dvou různých fází subkultivace (subkultivace číslo 10 a 11).

Na obrázku č. 7A, na němž je ukázána detekce CFTR proteinu pomocí CF3 protilátky, je možné vidět pouze jediný proužek, který se nachází v oblasti ~90 kDa. Tato zóna je v liniích CuFi-1 a NuLi-1 srovnatelná, zatímco v buněčné linii A549 je takřka neznatelná.

Obrázek 7B ukazuje detekci pomocí směsi protilátek proti CFTR proteinu. Podobně jako u detekce CF3 protilátkou i na této membráně lze pozorovat pouze jediný proužek, který se ovšem nachází v oblasti ~65 kDa. Tento proužek je nejsilnější u buněčné linie NuLi-1, slabší u linie CuFi-1 a u linie A549 zcela mizí.

Ani na obrázku 7A, ani na 7B však není možné pozorovat zónu, která by odpovídala některé z molekulových velikostí CFTR proteinu.

Detekce CFTR proteinu v lyzátu získaném podle lyzačního protokolu 2 byla několikrát opakována (data neuvedena). Výsledky těchto stanovení korespondovaly s výsledky na obrázku č. 7.



**Obrázek č. 7:** Detekce CFTR proteinu v buňkách lyzovaných podle lyzačního protokolu 2. Linie CuFi-1 a NuLi-1 ze dvou různých subkultivací. Vzorky nanášeny v množství 25  $\mu$ g proteinů. **A)** Detekce CF3 protilátkou. **B)** Detekce směsí protilátek proti CFTR proteinu.

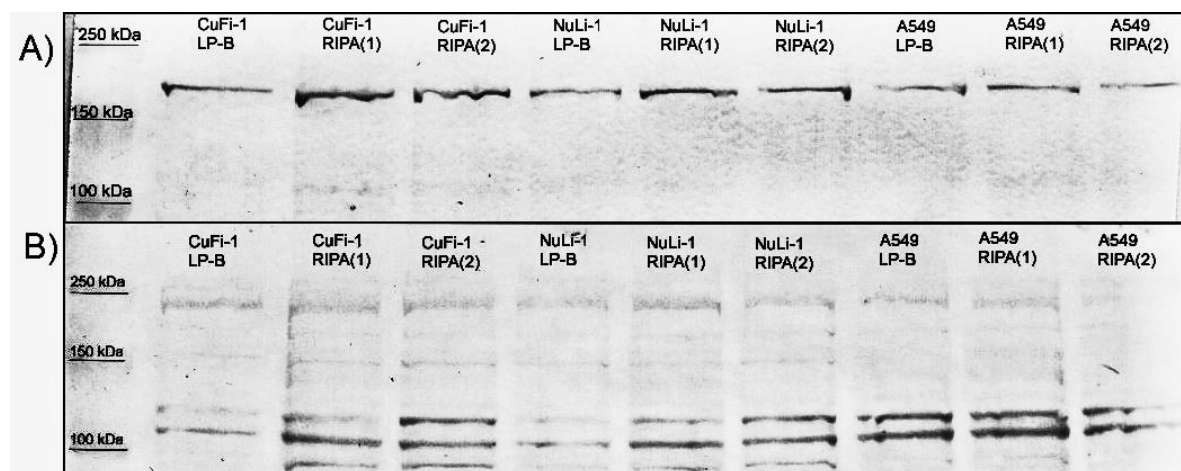
#### 4.1.1.3 Detekce CFTR proteinu v buňkách lyzovaných podle protokolu 3 a 4

Buněčné linie byly lyzovány pomocí lyzačního protokolu 3 a 4 za použití dvou různých pufrů – lyzačního pufru B (dále LP-B) a RIPA pufru. Do lyzačních pufrů byly přidány inhibitory proteas (viz. kapitola 3.3.3). Na obrázku č. 8 jsou zobrazeny membrány ze stanovení, kde byla porovnána lyze LP-B pufrém a lyze RIPA pufrém. Experiment byl prováděn pro dvě různé lyze RIPA pufrém.

Na obrázku č. 8A je ukázán výsledek detekce CFTR proteinu pomocí CF3 protilátky. Napříč všemi buněčnými linie je patrná jediná zóna nacházející se v oblasti odpovídající ~170 kDa. Tato zóna se objevuje i u kontrolní linie A549, třebaže ne s takovou intenzitou. Jak je rovněž patrné, vzorky lyzované pomocí RIPA pufru vykazují silnější proužky než vzorky lyzované pomocí pufru LP-B.

Obrázek č. 8B zobrazuje detekci pomocí směsi protilátek. V oblasti ~170 kDa je patrná pouze velice slabá zóna. Oproti tomu byla detekována celá řada proužků v okolí 100 kDa. V souladu se stanovením CF3 protilátkou lze konstatovat, že proužky detekované v lyzátech pomocí LP-B pufrém vykazují menší intenzitu než v lyzátech RIPA pufrém.

Za povšimnutí stojí, že linie CuFi-1 a NuLi-1 vykazují celkem 3 zóny, zatímco linie A549 pouze 2.



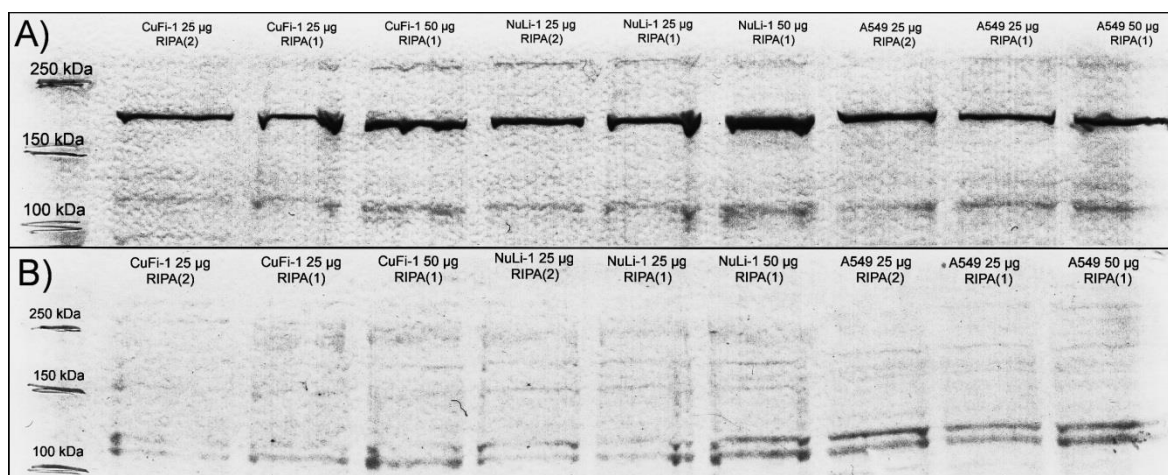
**Obrázek č. 8:** Detekce CFTR proteinu v závislosti na různých lyzačních pufrách. RIPA(1), RIPA(2) – dvě různé lyze RIPA pufrém. LP-B – lyzační pufr B. Buňky byly lyzovány podle lyzačních protokolů 3 a 4. Vzorky byly nanášeny v množství 25 µg proteinů. **A)** Detekce CF3 protilátkou **B)** Detekce směsí protilátek proti CFTR proteinu.

#### 4.1.1.4 Srovnání lyzí RIPA pufrem v různém uspořádání

V rámci optimalizace metody detekce CFTR proteinu byl pro další lyze buněk používán lyzační pufr RIPA. V tomto experimentu bylo zjišťováno, zda jsou výsledky získané lyzí RIPA pufrem reprodukovatelné a jak se mění intenzita a uspořádání zón se zvyšující se koncentrací proteinů. Byly využity identické vzorky jako v kapitole 4.1.1.3. Vzorky byly do jamek elektroforetického gelu nanášeny v množstvích 25  $\mu$ g a 50  $\mu$ g proteinů na jamku.

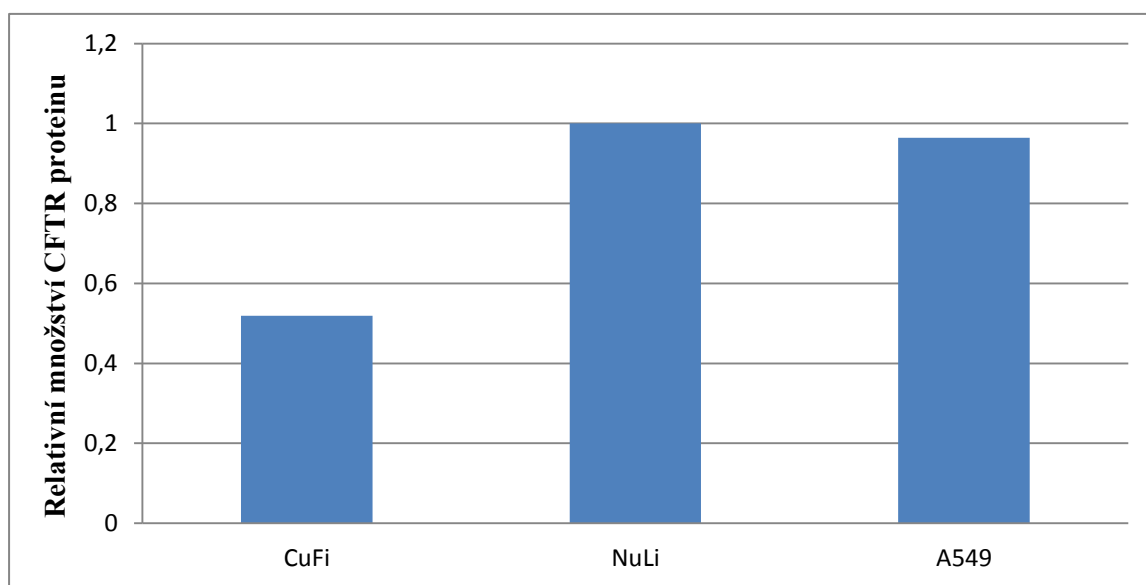
Na obrázku č. 9 je možné vidět stanovení CFTR proteinu pomocí CF3 protilátky. Na membráně jsou patrné dvě výrazné zóny, které se nachází jak v buňkách CuFi-1 a NuLi-1, tak i v kontrolní buněčné linii A549. První zóna se nalézá v pozici ~170 kDa, neboli v oblasti odpovídající plně maturovanému CFTR proteinu. Druhá zóna je v molekulové velikosti ~130 kDa. Z obrázku je patrné, že síla proužků se zvyšuje s koncentrací proteinů. Nejsilnější zóny poskytuje buněčná linie NuLi.

Na obrázku č. 9B je ukázána detekce pomocí směsi protilátek proti CFTR proteinu. Na této membráně lze pozorovat dvě zóny v okolí 100 kDa. Tyto proužky jsou nejvýraznější v buněčných liniích NuLi-1 a A549. V oblasti ~170 kDa lze u všech linií pozorovat velmi slabou zónu.



**Obrázek č. 9:** Srovnání detekce CFTR proteinu ve dvou lyzích RIPA pufrem. Porovnány dvě lyze RIPA lyzačním pufrem – RIPA(1) a RIPA(2). Lyzát RIPA(1) byl nanesen v množstvích 25  $\mu$ g a 50  $\mu$ g proteinů. Buňky byly lyzovány podle lyzačního protokolu 4. **A)** Detekce CF3 protilátkou. **B)** Detekce směsí protilátek proti CFTR proteinu.

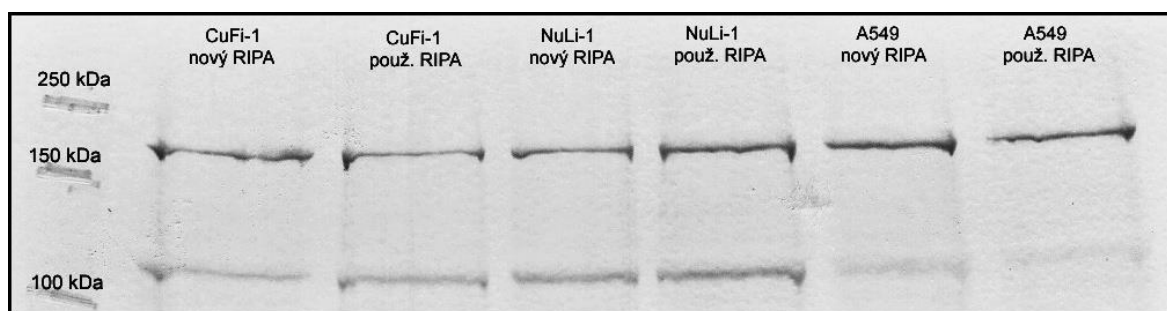
Pro srovnání množství detekovaného proteinu v jednotlivých buněčných liniích bylo využito programu ImageJ. Pomocí tohoto programu byly měřeny plochy proužků v molekulových velikostech ~170 kDa a ~130 kDa, jejichž součet byl následně vztažen vůči ploše korespondujícího proužku GAPDH proteinu, který sloužil jako kontrola naneseného množství proteinů. Relativní množství CFTR proteinu v buněčné linii NuLi bylo vztaženo na jednotku. Pro toto stanovení byly využity vzorky s nanáškou 50 µg z membrány detekované CF3 protilátkou (obrázek č. 10). Z obrázku č. 10 je patrné, že se v linii CuFi-1 nachází poloviční množství CFTR proteinu než v linii NuLi-1. Zároveň linie A549 vykazuje téměř shodné množství CFTR proteinu jako linie NuLi-1.



**Obrázek č. 10:** *Relativní zastoupení CFTR proteinu v buněčných liniích.* Sečtené plochy zón ~170 kDa a ~130 kDa z obrázku č. 9 (strana 43) byly standardizovány vůči množství GAPDH. Relativní množství CFTR proteinu v buněčné linii Nuli-1 bylo vztaženo na jednotku. Stanovení provedeno ze vzorků s nanáškou 50 µg proteinů.

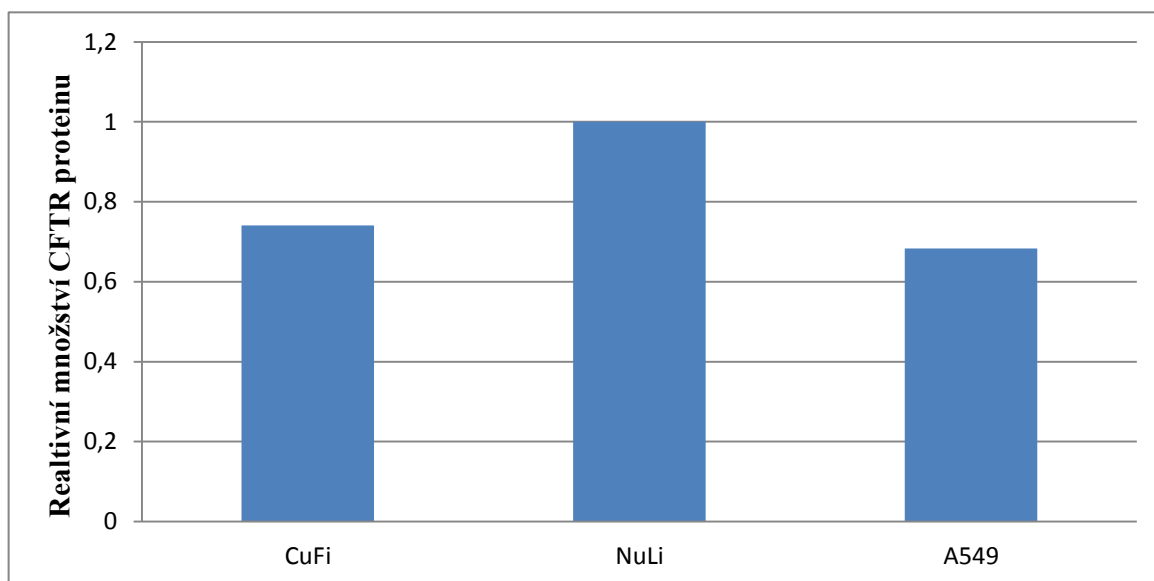
#### 4.1.1.5 Srovnání lyzí RIPA pufrem s čerstvě rozpuštěným inhibitory proteas a zamraženým RIPA pufrem.

Před každou buněčnou lyzí byla v 15 ml alikvotu RIPA pufru rozpuštěna čtvrtina tablety Complete inhibitor proteas (Roche diagnostics). Zbylý pufr byl zamražen a uchováván při  $-20^{\circ}\text{C}$ . V tomto experimentu bylo zjišťováno, zda je rozdíl v množství detekovaného CFTR proteinu v lyzátu získaném RIPA pufrem s čerstvě rozpuštěnými inhibitory proteas a v lyzátu získaném již použitým RIPA pufrem. Výsledek tohoto stanovení je uveden na obrázku č. 11, který zobrazuje detekci CFTR proteinu pomocí CF3 protilátky. Na membráně jsou pro každou linii patrné celkem dvě zóny. První zóna se nachází v oblasti  $\sim 130$  kDa. U buněčné linie A549 je proužek takřka neznatelný, zatímco u linie NuLi-1 je nejsilnější. Druhá zóna se nachází ve výšce  $\sim 170$  kDa a je velmi výrazná pro všechny tři buněčné linie. Zóna poskytnutá linií A549 je silnější, než u linie CuFi-1.



**Obrázek č. 11:** Srovnání množství CFTR proteinu v lyzátech RIPA pufru s nově rozpuštěnými inhibitory proteas a již použitým RIPA pufrem. Nový RIPA – RIPA lyzační pufr s čtvrtě rozpuštěnou směsí inhibitorů proteas. Použ. RIPA – RIPA pufr s inhibitory proteas, který byl již použit a mezi lyzemi uchováván při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Buňky byly lyzovány podle lyzačního protokolu 4. Vzorky byly na elektroforetický gel nanášeny v množství 25  $\mu\text{g}$  proteinů. Detekce CF3 protilátkou.

Pro kvantifikování množství CFTR proteinu bylo využito programu ImageJ. Postup vyhodnocení pomocí toho programu je popsán v kapitole 4.1.1.4. Stanovení bylo provedeno ze vzorků lyzovaných již použitým RIPA pufrem. Z obrázku č. 12 (strana 46) je patrné, že jak buněčná linie CuFi-1, tak buněčná linie A549 mají méně CFTR proteinu než buněčná linie NuLi-1.



**Obrázek č. 12:** Relativní zastoupení CFTR proteinu ve vzorcích lyzovaných již použitým RIPA puforem. Sečtené plochy zón ~170 kDa a ~130 kDa z obrázku č. 11 byly standardizovány vůči množství GAPDH. Relativní množství CFTR proteinu v buněčné linii NuLi-1 bylo vztaženo na jednotku. Stanovení ze vzorků lyzovaných použitým RIPA puforem.

#### 4.1.2 Srovnání účinnosti protilátek proti C-konci a R doméně

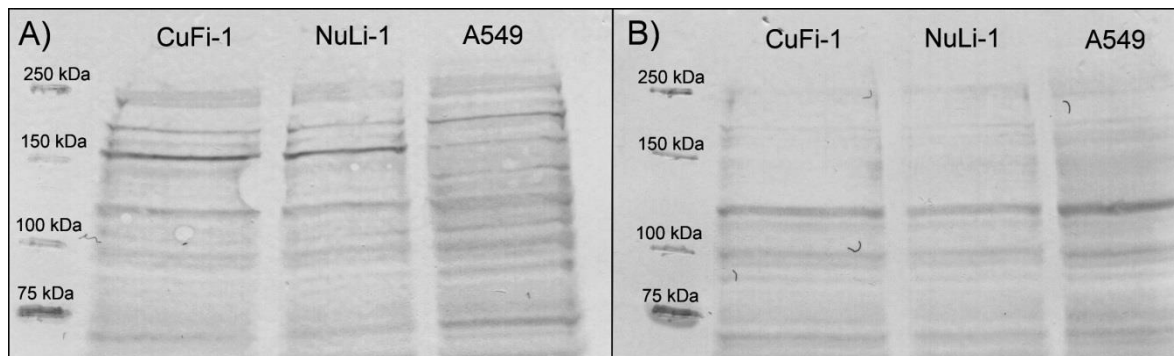
Během výše uvedených experimentů užíváno směsi dvou protilátek proti C-konci a proti R doméně CFTR proteinu<sup>85</sup>. Protilátky byly smíchány pro zvýšení specifity detekce CFTR proteinu. Aby bylo zjištěno, jak jednotlivé protilátky detekují CFTR protein, byly použity odděleně.

Na obrázku č. 13 (strana 47) jsou zobrazeny dvě membrány srovnávající detekci pomocí protilátky proti C-konci (obrázek č. 13A) a R doméně (obrázek č. 13B) CFTR proteinu.

Z obrázku 13A je patrné, že protilátka proti C-konci CFTR proteinu označila velké množství proteinů napříč celou elektroforetickou drahou. Nejvýraznější jsou dva proužky v okolí 150 kDa v buněčných liniích CuFi-1 a NuLi-1. U linie A549 si lze povšimnout výraznější zóny, která se nachází v oblasti ~170 kDa.

Na rozdíl od protilátky proti C-konci nelze u protilátky proti R doméně CFTR proteinu pozorovat žádné zóny v oblasti nad 150 kDa. Oproti tomu je patrná výrazná zóna v oblasti ~130 kDa, která svým umístěním odpovídá stejnému proteinu, který označila protilátka proti C-konci. Proužek označený protilátkou proti R doméně je však výraznější.

Tato protilátka stejně jako protilátka proti C-konci zobrazila celé množství proteinů od 100 kDa níže. Zóny u buněčné linie NuLi-1 jsou překvapivě slabší než u buněčných linií CuFi-1 a A549.



**Obrázek č. 13:** Srovnání účinnosti detekce CFTR proteinu protilátkami proti C-konci a R doméně. Buňky byly lyzovány RIPA puřem podle lyzačního protokolu 4. Vzorby byly na elektroforetický gel nanášeny v množství 25  $\mu$ g proteinů. **A)** Protilátka proti C-konci CFTR proteinu. **B)** Protilátka proti R doméně CFTR proteinu.

#### 4.1.3 Studium množství CFTR proteinu v závislosti na pořadí subkultivace

Během této práce vyvstala otázka, zda se v průběhu subkultivace buněčných linií nemění množství CFTR proteinu přítomného v buňkách. Z tohoto důvodu bylo provedeno několik různých stanovení, jejichž účelem bylo tuto otázku prostudovat. Experimenty byly provedeny s celkem 7 buněčnými lyzáty buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1 (subkultivace číslo 2, 4, 5, 7, 8, 10 a 11) a dvěma buněčnými lyzáty od kultury A549 (subkultivace číslo 3 a 5). K detekci byla využita CF3 protilátka a směs protilátek proti CFTR proteinu. Síla a umístění zón získaných napříč těmito stanoveními se neměnily.

#### 4.2 Studium exprese CFTR proteinu po transfekci CFTR-mRNA

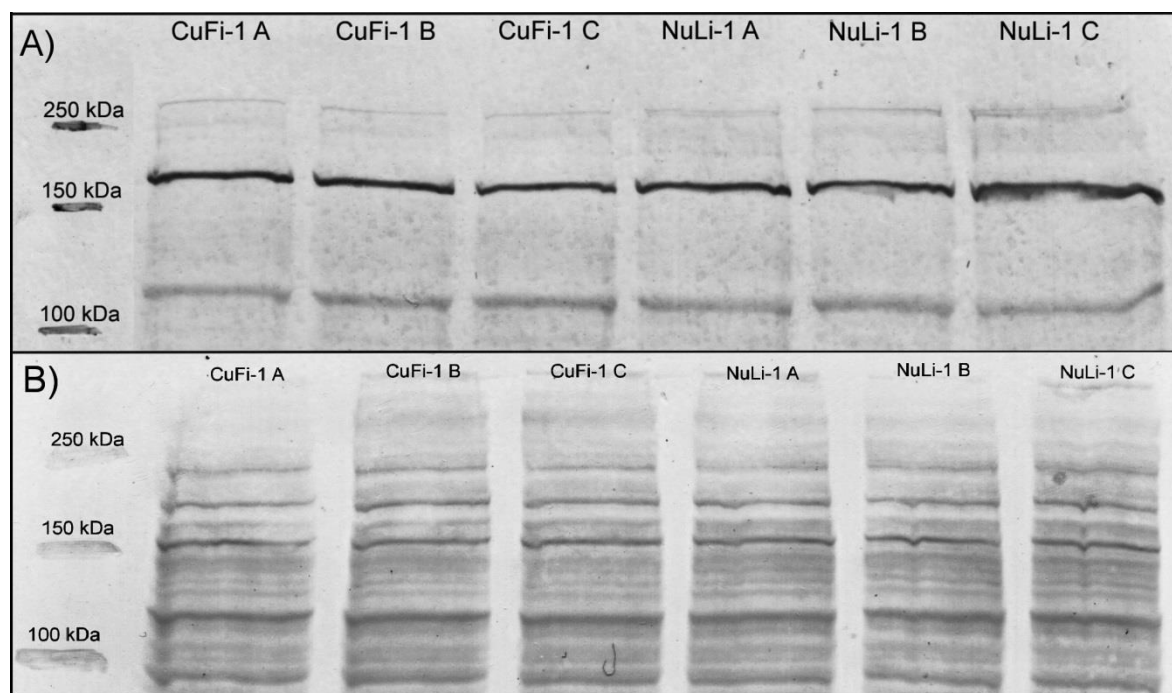
Poté, co byla optimalizována metoda detekce CFTR proteinu, mohla být provedena transfekce buněčných kultur CuFi-1 a NuLi-1 CFTR-mRNA. Jelikož buněčná linie A549 v předchozích experimentech vykazovala přítomnost CFTR proteinu, nemohla sloužit jako



kontrolní skupina, a byla proto vynechána z transfekce. Jako transfekční činidlo byl použit kationtový liposom lipofektamin. Postup transfekce je popsán v kapitole 3.4.

Na obrázku č. 14 je ukázána membrána s detekcí CFTR proteinu ze vzorků transfekovaných CFTR-mRNA. Obrázek č. 14A zobrazuje detekci CFTR proteinu pomocí CF3 protilátky. Na membráně jsou pro každou kulturu patrné dvě výrazné zóny. První a zdaleka nejvýraznější zóna se nachází ve výšce odpovídající ~170 kDa. Druhá zóna je v oblasti ~130 kDa.

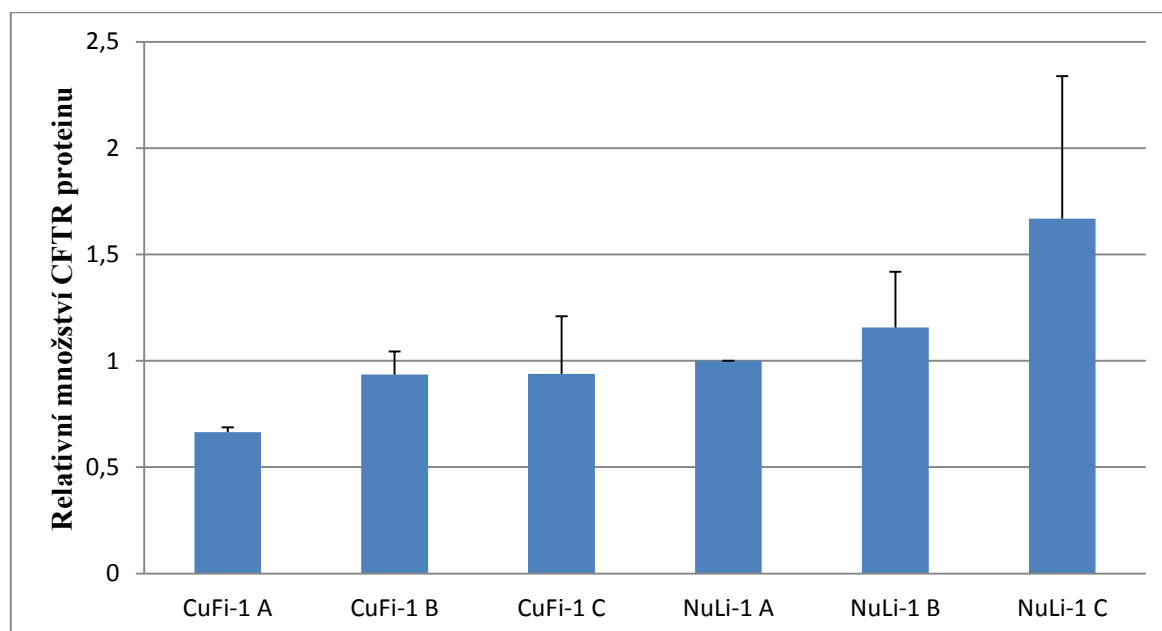
Na obrázku č. 14B je zobrazena detekce pomocí směsi protilátek proti CFTR proteinu. Z obrázku je patrné, že se primární protilátky vázaly vysoce nespecificky, a není proto možné směrodatně určit výsledek stanovení. V oblasti ~130 kDa se u všech vzorků zdá být silnější proužek, který koresponduje se zónou z obrázku č. 14A.



**Obrázek č. 14:** Detekce CFTR proteinu po transfekování buněk CFTR-mRNA. A – kontrolní skupina, přidán pouze lipofektamin (3,75  $\mu$ l). B – přidán lipofektamin (3,75  $\mu$ l) a 2,5  $\mu$ g CFTR-mRNA. C – přidán lipofektamin (7,5  $\mu$ l) a 2,5  $\mu$ g CFTR-mRNA. Buněčné linie byly lyzovány RIPA puřem podle lyzačního protokolu 4. Vzorky byly nanášeny v množství 25  $\mu$ g proteinů na dráhu. **A)** Detekce CF3 protilátkou. **B)** Detekce směsi protilátek proti CFTR proteinu.

Tento experiment byl následně opakován s identickými vzorky (data neuvedena). Výsledek obou stanovení byl vyhodnocen v programu ImageJ, kde byly porovnány plochy

proužků z oblastí ~170 kDa a ~130 kDa. Takto získaná data z obou stanovení byla sečtena, standardizována vůči kontrole množství proteinů GAPDH a vzorek NuLi-1 A byl vztažen na jednotku. K vyhodnocení byly použity pouze výsledky z detekce CF3 protilátkou. Na obrázku č. 15 je uveden graf průměrné relativní exprese CFTR proteinu z obou stanovení.



**Obrázek č. 15:** Relativní zastoupení CFTR proteinu v buněčných liniích po transfekci CFTR-mRNA. Vztaženo vůči NuLi-1 A. A – kontrolní skupina, přidán pouze lipofektamin (3,75  $\mu$ l). B – přidán lipofektamin (3,75  $\mu$ l) a 2,5  $\mu$ g CFTR-mRNA. C – přidán lipofektamin (7,5  $\mu$ l) a 2,5  $\mu$ g CFTR-mRNA. Změřeny plochy zón (~170kDa, ~130 kDa), standardizovány vůči kontrole GAPDH a sečteny. Z obou stanovení byl proveden aritmetický průměr. Vzorek NuLi-1 A byl vztažen na jednotku a hodnoty byly doplněny chybovou úsečkou směrodatné odchylky.

Jak je patrné z obrázku č. 15, v obou buněčných liniích došlo ke zvýšení množství CFTR proteinu. V rámci optimalizace množství transfekčního činidla byly při transfekci užity dva různé objemy lipofektaminu. U buněčné linie CuFi-1 není rozdíl v účinnosti transfekce při použití různých množství transfekčního činidla příliš patrný, zatímco u buněčné linie NuLi-1 lze pozorovat zásadní skok. Tento nárůst je ovšem zatížen nezanedbatelnou směrodatnou odchylkou.

Z vyhodnocení detekce CFTR proteinu po transfekci CFTR-mRNA lze konstatovat, že se hladina CFTR proteinu zvýšila a v případě linie CuFi-1 téměř dosahuje množství proteinu v netransfekované buněčné linii NuLi-1 (NuLi-1 A).

## 5. Diskuze

Cystická fibróza je genetická choroba zapříčiněná mutací v CFTR genu. Tato mutace způsobuje nefunkčnost či absenci CFTR iontového kanálu a spouští tak patologickou kaskádu, která závažně ovlivňuje život pacientů s CF a velmi často ústí v jejich smrt. Existuje celá řada terapeutických metod pro zlepšení stavu pacientu s CF, většina z nich je však pouze symptomatická, a tedy neschopná vyléčit samotný původ problému - nefunkční CFTR protein. K tomuto úkolu je nejvhodnější genová terapie, jejímž cílem je vpravit do buněk postižených CF genetickou informaci, pomocí níž by byl organismus schopen syntetizovat funkční CFTR protein. DNA přenos se však potýká s celou řadou problémů a není v současné době klinicky využitelný. Alternativou DNA přenosu je přenos mRNA přímo do cytoplasmy.

V této práci byla zkoumána detekce CFTR proteinu pomocí metody Western blot. Byly využity buněčné linie CuFi-1 (lidské plicní buňky postižené mutací  $\Delta F508$ ), NuLi-1 (zdravé lidské plicní buňky) a A549 (plicní karcinom). Zároveň byly porovnány tři různé protilátky proti CFTR kanálu: protilátka proti epitopu transmembránové domény (CF3), protilátka proti C-konci CFTR proteinu a protilátka proti R doméně CFTR proteinu. Díky metodě, která byla v rámci práce optimalizována, byla zkoumána míra exprese CFTR proteinu po transfekci buněčných linií CFTR-mRNA pomocí kationtového liposomu lipofektaminu.

CFTR protein se vyskytuje ve třech molekulových velikostech – neglykosylovaný protein má velikost 127 kDa, částečně glykosylovaný 131 kDa a plně maturovaný 168 kDa.<sup>6</sup>

Buněčné linie byly lyzovány různými způsoby – ultrazvukem a třemi různými lyzačními pufrů (viz kapitola 3.3).

Lyze pomocí ultrazvuku (lyzační protokol 1, viz kapitola 3.3.1) se neosvědčila. V lyzátu nebyl spolehlivě detekován CFTR protein v žádné své variantě (obrázek č. 6, strana 40). To mohlo být způsobeno nešetrným způsobem lyze a nepřítomností inhibitorů proteas.

Lyze lyzačním pufrů A (lyzační protokol 2, viz kapitola 3.3.2) se rovněž neprokázala jako vhodná. Pomocí metody Western blot nebyly detekovány žádné zóny odpovídající CFTR proteinu (obrázek č. 7, strana 41). Tato skutečnost mohla být zapříčiněna faktem, že vzorky nebyly při práci drženy v chladu. Lyzační pufr A sice

obsahoval EDTA, který by měl chelátovat železité ionty proteas, ale i přesto byl CFTR protein velmi pravděpodobně rozštěpen.

Během třetího a čtvrtého způsobu lyze (lyzační protokol 3 a 4, viz kapitola 3.3.3) byly vzorky při práci udržovány na ledu a dlouhodobě skladovány při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ . Do lyzačních pufrů byla rovněž přidávána tableta s inhibitory proteas. Byly srovnávány dva lyzační pufrы – lyzační pufr B a RIPA pufr (obrázek č. 8, strana 42). Lyzační pufr RIPA oproti lyzačnímu pufru B obsahoval cholát sodný a SDS. Pomocí obou pufrů byly získány buněčné lyzáty obsahující jak plně maturovaný CFTR protein ( $\sim 170$  kDa), tak částečně glykosylovaný ( $\sim 130$  kDa). Jak se ovšem ukázalo, lýza RIPA pufrem vykazovala podstatně vyšší míru CFTR proteinu, a proto byl tento pufr preferován v dalších experimentech. Třebaže RIPA pufr bývá běžně používaným lyzačním pufrem, v této práci nebyl zpočátku využit kvůli obavám, že by mohl během lyze narušit strukturu CFTR proteinu.

Díky experimentům, které zkoumaly variace množství CFTR proteinu na různých proměnných, bylo možné konstatovat, že zastoupení CFTR proteinu se v buněčných lyzátech nemění ani v závislosti na pořadí subkultivace, ani při použití pufru s čerstvě rozpuštěnými inhibitory proteas vůči již použitému pufru (viz kapitoly 4.1.3 a 4.1.1.5). S vyšší koncentrací proteinů nanesených na elektroforézu se zvyšovala i detekovaná zóna CFTR proteinu (viz kapitola 4.1.1.4).

V této práci byly kultivovány tři buněčné linie – CuFi-1, NuLi-1 a A549. NuLi-1 je immortalizovaná linie zdravého plicního epitelu. CuFi-1 je immortalizovaná linie plicního epitelu postiženého cystickou fibrózou s mutací  $\Delta F508$ . Linie s touto mutací by měla obsahovat snížené množství CFTR proteinu. Tento předpoklad byl potvrzen z různých stanovení (obrázky č. 10, strana 44, a č. 12, strana 46).

Linie A549 měla sloužit jako negativní kontrola, protože by neměla vytvářet žádný CFTR protein.<sup>82</sup> Jak ale bylo zjištěno napříč celou prací, buněčná kultura A549 nejen CFTR produkovala, ale jeho množství bylo srovnatelné s množstvím v linii CuFi-1, a někdy dokonce i vyšší. Fakt, že buňky A549 opravdu produkují nezanedbatelné množství CFTR proteinu, byl doložen španělskou studií z roku 2013.<sup>86</sup>

Dalším cílem této práce bylo porovnat účinnost tří různých CFTR protilátek. Byly využity monoklonální protilátky proti epitopu transmembránové domény (CF3), proti C-konci a proti R doméně. Protilátky proti C-konci a R doméně byly pro zvýšení citlivosti využívány v kombinaci.<sup>85</sup> Zároveň bylo provedeno stanovení porovnávající jejich

jednotlivou účinnost (obrázek č. 13, strana 47). CF3 protilátka se ukázala jako velmi specifická a bylo s ní dosaženo nejlepších výsledků. Protilátky proti C-konci a R doméně CFTR proteinu se ukázaly jako vysoce nespecifické a nevhodné pro detekci metodou Western blot. Tato směs protilátek je naopak vhodná pro detekci CFTR proteinu pomocí nepřímé fluorescence.<sup>87</sup>

Tato práce měla mimo jiné za cíl stanovit, zda se zvyšuje míra exprese CFTR proteinu po transfekci buněk CFTR-mRNA. Pro tento experiment byly využity pouze linie CuFi-1 a NuLi-1. Jako nosič CFTR-mRNA byl využit liposom lipofektamin. Byla zkoumána míra exprese CFTR proteinu v závislosti na množství transfekčního činidla. Jako kontrolní skupina sloužila buněčná linie, k níž bylo přidáno pouze transfekční činidlo. Ke stanovení byla využita syntetická CFTR-mRNA vyrobená v Institutu klinické a experimentální medicíny. Tato CFTR-mRNA obsahovala 25 % pseudouridinu, 25 % methylcytidinu, enzymaticky připojenou 7-methylguanosylovou čepičku a polyA konec obsahující 200 adeninů.

Na základě těchto stanovení bylo možné konstatovat, že po transfekci CFTR-mRNA skutečně dochází k nárůstu množství CFTR proteinu v buňkách (obrázek č. 15, strana 49). Metodou Western blot však nelze pozorovat, zda CFTR protein přítomný v buňkách je funkční a nepoškozený. K tomuto účelu je možné využít například metody měření iontového proudu či změn fluorescence fluorescenčních sond citlivých na Cl<sup>-</sup> ionty, což je ovšem již nad rámec této práce.

Dosavadní výsledky ukazují, že přenos mRNA poskytuje potenciálně slibný způsob genové terapie cystické fibrózy, jehož reálná využitelnost stojí za důkladnější prozkoumání.

## 6. Závěr

V této práci byla vypracována literární rešerše o cystické fibróze a genové terapii cystické fibrózy.

Byla optimalizována metoda detekce CFTR proteinu pomocí metody Western blot. V rámci této optimalizace byly vyzkoušeny čtyři různé postupy lýzy buněčných linií CuFi-1, NuLi-1 a A549. Bylo ukázáno, že nejvhodnějším lyzačním postupem pro získání neporušeného CFTR proteinu je lýza RIPA pufrům s inhibitory proteas. Množství CFTR proteinu se nemění během subkultivace.

Byla porovnána účinnost protilátky proti extracelulárnímu epitopu, proti C-konci a proti R doméně CFTR proteinu. V tomto stanovení bylo zjištěno, že protilátky proti C-konci a R doméně CFTR proteinu jsou pro detekci CFTR proteinu metodou Western blot nevhodné, neboť vykazují značnou nespecifičnost. Použití protilátky proti extracelulární doméně (CF3) vykazovalo velmi dobré výsledky.

Byla provedena transfekce buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1 CFTR-mRNA za použití kationtového liposomu lipofektaminu. Bylo zjištěno, že po transfekci dochází v buněčných liniích CuFi-1 ke zvýšení množství CFTR proteinu na úroveň množství obsaženého v buněčné linii NuLi-1. Metodou Western blot nebylo možné určit, zda se jedná o funkční protein, což bylo nad rámec této práce.

## 7. Seznam literatury

1. Vávrová, V. *Cystická fibróza*. (Grada Publishing a.s., 2006).
2. Andersen D. H. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathologic study. *Am. J. Dis. Child.* **56**, 344–399 (1938).
3. Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B., Drumm, M. L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J. L., Kennedy, D., Hidaka, N. & Al, E. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**, 1059–1065 (1989).
4. Křenková, P., Piskáčková, T., Holubová, A., Balaščáková, M., Krulišová, V., Čamajová, J., Turnovec, M., Libik, M., Norambuena, P., Štambergová, A., Dvořáková, L., Skalická, V., Bartošová, J., Kučerová, T., Fila, L., Zemková, D., Vávrová, V., Koudová, M., Macek, M., Krebsová, A. & Macek Jr., M. Distribution of CFTR mutations in the Czech population: Positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations. *J. Cyst. Fibros.* **12**, 532–537 (2013).
5. Riordan, J. R. Assembly of Functional Cftr Chloride Channels. *Annu. Rev. Physiol.* **67**, 701–718 (2005).
6. O’Riordan, C. R., Lachapelle, A. L., Marshall, J., Higgins, E. A. & Cheng, S. H. Characterization of the oligosaccharide structures associated with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Glycobiology* **10**, 1225–1233 (2000).
7. Sheppard, D. N. & Welsh, M. J. Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiol. Rev.* **79**, S23–S45 (1999).
8. Bush, A. *Cystic Fibrosis in the 21st Century*. (Karger Medical and Scientific Publishers, 2006).
9. Zhang, L., Aleksandrov, L. A., Zhao, Z., Birtley, J. R., Riordan, J. R. & Ford, R. C. Architecture of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein and structural changes associated with phosphorylation and nucleotide binding. *J. Struct. Biol.* **167**, 242–251 (2009).
10. Winter, M. C. & Welsh, M. J. Stimulation of CFTR activity by its phosphorylated R domain. *Nature* **389**, 294–296 (1997).
11. Gabriel, S. E., Clarke, L. L., Boucher, R. C. & Stutts, M. J. CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* **363**, 263–266 (1993).
12. Morales, M. M., Falkenstein, D. & Lopes, A. G. The Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) in the kidney. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **72**, 399–406 (2000).
13. Mason, S. j., Paradiso, A. m. & Boucher, R. c. Regulation of transepithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Br. J. Pharmacol.* **103**, 1649–1656 (1991).
14. Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M. & Tsui, L. C. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**, 1073–1080 (1989).
15. Cystic Fibrosis Mutation Database: Statistics. Available at: <http://genet.sickkids.on.ca/cftr/StatisticsPage.html>. (Accessed: 23rd March 2016)
16. Zielenski, J. Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. *Respiration* **67**, 117–133 (2000).

17. Hamosh, A., Rosenstein, B. J. & Cutting, G. R. CFTR nonsense mutations G542X and W1282X associated with severe reduction of CFTR mRNA in nasal epithelial cells. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 542–544 (1992).
18. Gan, K.-H., Veeze, H. J., van den Ouweland, A., Halley, D., Scheffer, H., van der Hout, A., Overbeek, S. E., de Jongste, J. C., Bakker, W. & Heijerman, H. A Cystic Fibrosis Mutation Associated with Mild Lung Disease. *N. Engl. J. Med.* **333**, 95–99 (1995).
19. Kerem, E., Corey, M., Kerem, B., Rommens, J., Markiewicz, D., Levison, H., Tsui, L.-C. & Durie, P. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis—analysis of the most common mutation ( $\Delta F508$ ). *N. Engl. J. Med.* **323**, 1517–1522 (1990).
20. Logan, J., Hiestand, D., Daram, P., Huang, Z., Muccio, D. D., Hartman, J., Haley, B., Cook, W. J. & Sorscher, E. J. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations that disrupt nucleotide binding. *J. Clin. Invest.* **94**, 228–236 (1994).
21. Sheppard, D. N., Rich, D. P., Ostedgaard, L. S., Gregory, R. J., Smith, A. E. & Welsh, M. J. Mutations in CFTR associated with mild-disease-form CI- channels with altered pore properties. *Nature* **362**, 160–164 (1993).
22. Gentsch, M. & Riordan, J. R. Localization of Sequences within the C-terminal Domain of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Which Impact Maturation and Stability. *J. Biol. Chem.* **276**, 1291–1298 (2001).
23. Kopelman, H., Durie, P., Gaskin, K., Weizman, Z. & Forstner, G. Pancreatic Fluid Secretion and Protein Hyperconcentration in Cystic Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **312**, 329–334 (1985).
24. Kelly, T. & Buxbaum, J. Gastrointestinal Manifestations of Cystic Fibrosis. *Dig. Dis. Sci.* **60**, 1903–1913 (2015).
25. Taussig, L. M., Lobeck, C. C., di Sant Agnese, P. A., Ackerman, D. R. & Kattwinkel, J. Fertility in Males with Cystic Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **287**, 586–589 (1972).
26. Barreto, C., Pinto, L. M., Duarte, A., Lavinha, J. & Ramsay, M. A fertile male with cystic fibrosis: molecular genetic analysis. *J. Med. Genet.* **28**, 420–421 (1991).
27. Aris, R. M., Renner, J. B., Winders, A. D., Buell, H. E., Riggs, D. B., Lester, G. E. & Ontjes, D. A. Increased Rate of Fractures and Severe Kyphosis: Sequelae of Living into Adulthood with Cystic Fibrosis. *Ann. Intern. Med.* **128**, 186–193 (1998).
28. Wanner, A., Salathé, M. & O’Riordan, T. G. Mucociliary clearance in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 1868–1902 (1996).
29. Joris, L., Dab, I. & Quinton, P. M. Elemental composition of human airway surface fluid in healthy and diseased airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**, 1633–1637 (1993).
30. Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K. C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., Botzenhart, K., Yankaskas, J. R., Randell, S., Boucher, R. C. & Döring, G. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest.* **109**, 317–325 (2002).
31. Cuthbert, A. New horizons in the treatment of cystic fibrosis. *Br. J. Pharmacol.* **163**, 173–183 (2011).
32. Boucher, R. C. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur. Respir. J.* **23**, 146–158 (2004).
33. Widdicombe, J. Regulation of the depth and composition of airway surface liquid. *J. Anat.* **201**, 313–318 (2002).



34. Chinet, T. C., Fullton, J. M., Yankaskas, J. R., Boucher, R. C. & Stutts, M. J. Mechanism of sodium hyperabsorption in cultured cystic fibrosis nasal epithelium: a patch-clamp study. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **266**, C1061–C1068 (1994).
35. Matsui, H., Grubb, B. R., Tarran, R., Randell, S. H., Gatzky, J. T., Davis, C. W. & Boucher, R. C. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* **95**, 1005–1015 (1998).
36. Fujii, T., Hayashi, S., Hogg, J. C., Vincent, R. & Van Eeden, S. F. Particulate Matter Induces Cytokine Expression in Human Bronchial Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**, 265–271 (2001).
37. Kievit, T. R. D., Parkins, M. D., Gillis, R. J., Srikumar, R., Ceri, H., Poole, K., Iglewski, B. H. & Storey, D. G. Multidrug Efflux Pumps: Expression Patterns and Contribution to Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1761–1770 (2001).
38. Robinson, M., Regnis, J. A., Bailey, D. L., King, M., Bautovich, G. J. & Bye, P. T. Effect of hypertonic saline, amiloride, and cough on mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, 1503–1509 (1996).
39. Robinson, M., Daviskas, E., Eberl, S., Baker, J., Chan, H. K., Anderson, S. D. & Bye, P. T. The effect of inhaled mannitol on bronchial mucus clearance in cystic fibrosis patients: a pilot study. *Eur. Respir. J.* **14**, 678–685 (1999).
40. Knowles, M., Clarke, L. & Boucher, R. Activation by Extracellular Nucleotides of Chloride Secretion in the Airway Epithelia of Patients with Cystic-Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **325**, 533–538 (1991).
41. Boyle, M. P., Bell, S. C., Konstan, M. W., McColley, S. A., Rowe, S. M., Rietschel, E., Huang, X., Waltz, D., Patel, N. R. & Rodman, D. A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir. Med.* **2**, 527–538 (2014).
42. Castagnaro, A., Chetta, A., Foresi, A., D’Ippolito, R., Malorgio, R. & Olivieri, D. Effect of sputum induction on spirometric measurements and arterial oxygen saturation in asthmatic patients, smokers, and healthy subjects. *Chest* **116**, 941–945 (1999).
43. Carlander, D., Stålberg, J. & Larsson, A. Chicken Antibodies. *Ups. J. Med. Sci.* **104**, 179–189 (1999).
44. Engelhardt, J. F., Zepeda, M., Cohn, J. A., Yankaskas, J. R. & Wilson, J. M. Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *J. Clin. Invest.* **93**, 737–749 (1994).
45. Gill, D. R., Davies, L. A., Pringle, I. A. & Hyde, S. C. The development of gene therapy for diseases of the lung. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **61**, 355–368 (2004).
46. Davies, J. C., Geddes, D. M. & Alton, E. W. F. W. Gene therapy for cystic fibrosis. *J. Gene Med.* **3**, 409–417 (2001).
47. Mueller, C. & Flotte, T. R. Gene Therapy for Cystic Fibrosis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **35**, 164–178 (2008).
48. Pickles, R. J., McCarty, D., Matsui, H., Hart, P. J., Randell, S. H. & Boucher, R. C. Limited Entry of Adenovirus Vectors into Well-Differentiated Airway Epithelium Is Responsible for Inefficient Gene Transfer. *J. Virol.* **72**, 6014–6023 (1998).
49. Grubb, B. R., Pickles, R. J., Ye, H., Yankaskas, J. R., Vick, R. N., Engelhardt, J. F., Wilson, J. M., Johnson, L. G. & Boucher, R. C. Inefficient gene transfer by adenovirus vector to cystic fibrosis airway epithelia of mice and humans. *Nature* **371**, 802–806 (1994).

50. Harvey, B.-G., Leopold, P. L., Hackett, N. R., Grasso, T. M., Williams, P. M., Tucker, A. L., Kaner, R. J., Ferris, B., Gonda, I., Sweeney, T. D., Ramalingam, R., Kovesdi, I., Shak, S. & Crystal, R. G. Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus. *J. Clin. Invest.* **104**, 1245–1255 (1999).
51. Toietta, G., Koehler, D. R., Finegold, M. J., Lee, B., Hu, J. & Beaudet, A. L. Reduced inflammation and improved airway expression using helper-dependent adenoviral vectors with a K18 promoter. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **7**, 649–658 (2003).
52. Palmer, D. J. & Ng, P. Helper-Dependent Adenoviral Vectors for Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* **16**, 1–16 (2005).
53. Flotte, T. R., Afione, S. A., Conrad, C., McGrath, S. A., Solow, R., Oka, H., Zeitlin, P. L., Guggino, W. B. & Carter, B. J. Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10613–10617 (1993).
54. Moss, R. B., Rodman, D., Spencer, L. T., Aitken, M. L., Zeitlin, P. L., Waltz, D., Milla, C., Brody, A. S., Clancy, J. P., Ramsey, B., Hamblett, N. & Heald, A. E. Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis\*: A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest* **125**, 509–521 (2004).
55. Olsen, J. C., Johnson, L. G., Wong-Sun, M. L., Moore, K. L., Swanstrom, R. & Boucher, R. C. Retrovirus-mediated gene transfer to cystic fibrosis airway epithelial cells: effect of selectable marker sequences on long-term expression. *Nucleic Acids Res.* **21**, 663–669 (1993).
56. Mitomo, K., Griesenbach, U., Inoue, M., Somerton, L., Meng, C., Akiba, E., Tabata, T., Ueda, Y., Frankel, G. M., Farley, R., Singh, C., Chan, M., Munkonge, F., Brum, A., Xenariou, S., Escudero-Garcia, S., Hasegawa, M. & Alton, E. W. Toward Gene Therapy for Cystic Fibrosis Using a Lentivirus Pseudotyped With Sendai Virus Envelopes. *Mol. Ther.* **18**, 1173–1182 (2010).
57. Hasan, M. K., Kato, A., Shioda, T., Sakai, Y., Yu, D. & Nagai, Y. Creation of an infectious recombinant Sendai virus expressing the firefly luciferase gene from the 3' proximal first locus. *J. Gen. Virol.* **78**, 2813–2820 (1997).
58. Griesenbach, U., Geddes, D. M. & Alton, E. W. F. W. Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Ther.* **13**, 1061–1067 (2006).
59. Nishikawa, M. & Hashida, M. Nonviral Approaches Satisfying Various Requirements for Effective *in Vivo* Gene Therapy. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 275–283 (2002).
60. Emerson, M., Renwick, L., Tate, S., Rhind, S., Milne, E., Painter (née Alsop), H., Boyd, A. C., McLachlan, G., Griesenbach, U., Cheng, S. H., Gill, D. R., Hyde, S. C., Baker, A., Alton, E. W., Porteous, D. J. & Collie, D. D. S. Transfection Efficiency and Toxicity Following Delivery of Naked Plasmid DNA and Cationic Lipid–DNA Complexes to Ovine Lung Segments. *Mol. Ther.* **8**, 646–653 (2003).
61. Felgner, P. L., Barenholz, Y., Behr, J. P., Cheng, S. H., Cullis, P., Huang, L., Jessee, J. A., Seymour, L., Szoka, F., Thierry, A. R., Wagner, E. & Wu, G. Nomenclature for Synthetic Gene Delivery Systems. *Hum. Gene Ther.* **8**, 511–512 (1997).
62. Caplen, N. J., Alton, E. W. F. W., Middleton, P. G., Dorin, J. R., Stevenson, B. J., Gao, X., Durham, S. R., Jeffery, P. K., Hodson, M. E., Coutelle, C., Huang, L., Porteous, D. J., Williamson, R. & Geddes, D. M. Liposome-mediated CFTR gene

- transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nat. Med.* **1**, 39–46 (1995).
63. Noone, P. G., Hohneker, K. W., Zhou, Z., Johnson, L. G., Foy, C., Gipson, C., Jones, K., Noah, T. L., Leigh, M. W., Schwartzbach, C., Efthimiou, J., Pearlman, R., Boucher, R. C. & Knowles, M. R. Safety and Biological Efficacy of a Lipid–CFTR Complex for Gene Transfer in the Nasal Epithelium of Adult Patients with Cystic Fibrosis\*. *Mol. Ther.* **1**, 105–114 (2000).
  64. Lee, E. R., Marshall, J., Siegel, C. S., Jiang, C., Yew, N. S., Nichols, M. R., Nietupski, J. B., Ziegler, R. J., Lane, M. B., Wang, K. X., Wan, N. C., Scheule, R. K., Harris, D. J., Smith, A. E. & Cheng, S. H. Detailed Analysis of Structures and Formulations of Cationic Lipids for Efficient Gene Transfer to the Lung. *Hum. Gene Ther.* **7**, 1701–1717 (1996).
  65. Chadwick, S. L., Kingston, H. D., Stern, M., Cook, R. M., O’Connor, B. J., Lukasson, M., Balfour, R. P., Rosenberg, M., Cheng, S. H., Smith, A. E., Meeker, D. P., Geddes, D. M. & Alton, E. W. F. W. Safety of a single aerosol administration of escalating doses of the cationic lipid GL-67/DOPE/DMPE-PEG5000 formulation to the lungs of normal volunteers. *Gene Ther.* **4**, 937–942 (1997).
  66. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. & Akira, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740–745 (2000).
  67. Zohra, F. T., Chowdhury, E. H., Nagaoka, M. & Akaike, T. Drastic effect of nanoapatite particles on liposome-mediated mRNA delivery to mammalian cells. *Anal. Biochem.* **345**, 164–166 (2005).
  68. Liu, G., Li, D., Pasumarthy, M. K., Kowalczyk, T. H., Gedeon, C. R., Hyatt, S. L., Payne, J. M., Miller, T. J., Brunovskis, P., Fink, T. L., Muhammad, O., Moen, R. C., Hanson, R. W. & Cooper, M. J. Nanoparticles of Compacted DNA Transfect Postmitotic Cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 32578–32586 (2003).
  69. Boussif, O., Lezoualc’h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. & Behr, J. P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 7297–7301 (1995).
  70. Gebhart, C. L. & Kabanov, A. V. Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J. Controlled Release* **73**, 401–416 (2001).
  71. Bangel-Ruland, N., Tomczak, K., Fernández Fernández, E., Leier, G., Leciejewski, B., Rudolph, C., Rosenecker, J. & Weber, W.-M. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mRNA delivery: a novel alternative for cystic fibrosis gene therapy. *J. Gene Med.* **15**, 414–426 (2013).
  72. Koski, G. K., Karikó, K., Xu, S., Weissman, D., Cohen, P. A. & Czerniecki, B. J. Cutting Edge: Innate Immune System Discriminates between RNA Containing Bacterial versus Eukaryotic Structural Features That Prime for High-Level IL-12 Secretion by Dendritic Cells. *J. Immunol.* **172**, 3989–3993 (2004).
  73. Malone, R. W., Felgner, P. L. & Verma, I. M. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 6077–6081 (1989).
  74. Bitzer, M., Armeanu, S., Lauer, U. M. & Neubert, W. J. Sendai virus vectors as an emerging negative-strand RNA viral vector system. *J. Gene Med.* **5**, 543–553 (2003).
  75. Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H. & Weissman, D. Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors: The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. *Immunity* **23**, 165–175 (2005).

76. Krieg, P. A. & Melton, D. A. Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res.* **12**, 7057–7070 (1984).
77. Zohra, F. T., Chowdhury, E. H., Tada, S., Hoshiba, T. & Akaike, T. Effective delivery with enhanced translational activity synergistically accelerates mRNA-based transfection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 373–378 (2007).
78. Pierce Microplate BCA Protein Assay Kit - Reducing Agent Compatible - Thermo Fisher Scientific. Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23252>. (Accessed: 24th April 2016)
79. Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., Deber, C. M. & Engelman, D. M. Detergent Binding Explains Anomalous SDS-Page Migration of Membrane Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 1760–1765 (2009).
80. Kurien, B. T. & Scofield, R. H. Western blotting. *Methods* **38**, 283–293 (2006).
81. Mahmood, T. & Yang, P.-C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North Am. J. Med. Sci.* **4**, 429–434 (2012).
82. Bossard, F., Robay, A., Toumaniantz, G., Dahimene, S., Becq, F., Merot, J. & Gauthier, C. NHE-RF1 protein rescues  $\Delta$ F508-CFTR function. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **292**, L1085–L1094 (2007).
83. Walker, J., Watson, J., Holmes, C., Edelman, A. & Banting, G. Production and characterisation of monoclonal and polyclonal antibodies to different regions of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR): detection of immunologically related proteins. *J. Cell Sci.* **108**, 2433–2444 (1995).
84. Farinha, C. M., Mendes, F., Roxo-Rosa, M., Penque, D. & Amaral, M. D. A comparison of 14 antibodies for the biochemical detection of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Mol. Cell. Probes* **18**, 235–242 (2004).
85. Carvalho-Oliveira, I., Efthymiadou, A., Malhó, R., Nogueira, P., Tzetis, M., Kanavakis, E., Amaral, M. D. & Penque, D. CFTR Localization in Native Airway Cells and Cell Lines Expressing Wild-type or F508del-CFTR by a Panel of Different Antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* **52**, 193–203 (2004).
86. Giordano, S., Amato, F., Elce, A., Monti, M., Iannone, C., Pucci, P., Seia, M., Angioni, A., Zarrilli, F., Castaldo, G. & Tomaiuolo, R. Molecular and Functional Analysis of the Large 5' Promoter Region of CFTR Gene Revealed Pathogenic Mutations in CF and CFTR-Related Disorders. *J. Mol. Diagn.* **15**, 331–340 (2013).
87. Pecková, K. osobní sdělení

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

<b>Jméno a příjmení Adresa</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum vypůjčení</b>	<b>Poznámka</b>