

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav molekulární a translační medicíny



**BUNĚČNÉ MODELY VYUŽITELNÉ KE STUDIU
PATOFYZIOLOGIE CYSTICKÉ FIBRÓZY**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor: **Mgr. Martin Ondra**

Studijní program: **Pediatric**

Forma studia: **Prezenční**

Vedoucí práce: **doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.**

Olomouc 2024

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato předložená disertační práce byla vypracována samostatně a vychází z mého výzkumu provedeného na Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období od září 2017 do prosince 2023. Práce byla realizována pod odborným dohledem mého školitele doc. MUDr. Mariána Hajdúcha, Ph.D. Spoluautoři souhlasí se zařazením publikovaných výsledků.

Výsledky z prvoautorských publikací (Příloha 1 a 2) byly použity jakou součástí experimentální části a spoluautorský článek (Příloha 3) byl použit k sepsání teoretické části této disertační práce.

V Olomouci, 10. 01. 2024

Mgr. Martin Ondra

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych rád poděkoval svému školiteli a řediteli Ústavu molekulární a translační medicíny (ÚMTM) doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení a trpělivost. Dále děkuji prof. Danutě Radzioch, Ph.D. za pomoc, ochotu a rady, které mi věnovala a za možnost uskutečnit svou zahraniční stáž v její laboratoři. Poděkování také patří všem spoluautorům publikací. Rád bych také poděkoval kolegům z ÚMTM, kteří se v průběhu let stali mými přáteli. Jmenovitě velké poděkování patří Mgr. Jarmile Stankové, Bc. Renatě Burianové, Mgr. Lukáši Lenartovi, Mgr. Kateřině Ječmeňové, Mgr. Agátě Kubíčkové, Mgr. Dušanu Holubovi, Ph.D. a prof. Juan B. De Sanctis, Ph.D. Závěrem, mé poděkování patří také celé rodině, která mě během studia podporovala a v neposlední řadě mé milující manželce Karolíně, která stála vždy při mně a byla mi nesmírnou oporou.

Výzkum prezentovaný v této práci byl finančně podpořen: Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (EATRIS-CZ - LM2018133), Evropským fondem pro regionální rozvoj - Projekt ENOCH (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868), Technologickou agenturou České republiky (TE02000058), Národním ústavem pro výzkum rakoviny - program EXCELES (LX22NPO5102) a interní grantovou agenturou Univerzity Palackého IGA_LF_2018 - 2023.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Mgr. Martin Ondra
Název práce: BUNĚČNÉ MODEL Y VYUŽITELNÉ KE STUDI U
PATO FYZIOLOGIE CYSTICKÉ FIBRÓZY
Typ práce: Disertační
Pracoviště: Laboratoř experimentální medicíny
Ústav molekulární a translační medicíny
Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce: doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.
Klíčová slova: CFTR, CRISPR/Cas9, cystická fibróza, HTS, HiBiT,
manózo vý receptor, luminiscence, FND
Rok obhajoby: 2024
Počet stran: 179
Jazyk: Český

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

Author's name and surname: Mgr. Martin Ondra
Title: CELL MODELS TO STUDY PATHOPHYSIOLOGY OF
CYSTIC FIBROSIS
Type of thesis: Dissertation
Department: Laboratory of Experimental Medicine
Institute of Molecular and Translational Medicine
Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University
Olomouc
Supervisor: doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.
Keywords: CFTR, CRISPR/Cas9, cystic fibrosis, HTS, HiBiT,
mannose receptor, luminescence, FND
The year of defence: 2024
Number of pages: 179
Language: Czech

ABSTRAKT

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) je membránový protein, který funguje jako iontový kanál. Mutace, které narušují jeho biosyntézu, transport nebo funkci, způsobují cystickou fibrózu (CF). V teoretické části je sepsán úvod do problematiky CF se specifickým zaměřením na dostupné systémy pro detekci funkce CFTR, či přímo CFTR proteinu a pro monitorování aktivity profesionálních fagocytů, které sehrávají významnou roli v zánětlivé reakci doprovázející toto onemocnění.

První sekce experimentální části této disertační práce popisuje vývoj a validaci nového *in vitro* systému pro detekci CFTR proteinu. V tomto modelu je do 4. extracelulární smyčky endogenně exprimovaného CFTR (WT-CFTR) vložena HiBiT peptidová značka pomocí CRISPR/Cas9 editace genomu, která umožňuje detekci CFTR v plazmatické membráně živých buněk. Souhrnně, byla vytvořena a validována nová reportérová buněčná linie využitelná jako stavební blok pro vývoj unikátních buněčných CF modelů pomocí CRISPR zprostředkovaného vkládání mutací CFTR způsobujících CF. Navíc tento optimalizovaný design CRISPR/Cas9 zprostředkovaného vložení HiBiT značky může být dále použit pro značení mutovaného CFTR v mnoha dalších buněčných liniích.

V druhé části je popsán vývoj a validace nové metody vhodné k monitoringu fagocytární aktivity makrofágů zprostředkované manózovým receptorem CD206 (MR), jehož exprese bývá často snížena u CF pacientů. Princip této inovativní metody je založen na detekci internalizace fluorescenčních nanodiamantů (FND) se speciální povrchovou architekturou nesoucích polyvalentní manózu. *In vitro* experimenty prokázaly signifikantní zvýšení internalizace manozylovaných FND při srovnání s nemanozylovanými FND, přičemž u obou částic nebyla pozorována žádná významná toxicita. Specifické zapojení MR bylo potvrzeno blokadou MR mananem a anti-MR protilátkou.

Závěrem je důležité zdůraznit využitelnost nově vyvinutých inovativních metod a modelových systémů pro lepší porozumění procesů při průběhu CF, nebo i k objevení nových modulátorů CFTR, případně látek potlačujících zánět.

ABSTRACT

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is a membrane protein that functions as an ion channel. Mutations that disrupt its biosynthesis, trafficking, or function cause cystic fibrosis (CF). The theoretical part provides an introduction to CF with a specific focus on available systems for detection of CFTR function or CFTR protein, and for monitoring the activity of professional phagocytes, which play a significant role in the inflammation accompanying this disease.

The first section of the experimental part of this thesis describes the development and validation of a new *in vitro* system for CFTR protein detection. In this model, a HiBiT tag is inserted into the 4th extracellular loop of endogenously expressed CFTR (WT-CFTR) using CRISPR/Cas9 genome editing to enable the detection of CFTR in the plasma membrane of live cells. In summary, a novel reporter cell line has been established and validated with the potential to be used as a building block for the development of unique CF cell models using CRISPR-mediated insertion of CFTR-causing mutations. In addition, this optimized CRISPR/Cas9 mediated HiBiT tag insertion design can be further used to label mutant CFTR in diverse cell lines.

The second part describes the development and validation of a new method suitable for monitoring macrophage phagocytic activity mediated by the mannose receptor (MR) CD206, whose expression is often reduced in CF patients. The principle of this innovative method is based on the detection of internalization of fluorescent nanodiamonds (FNDs) with a special surface architecture displaying polyvalent mannose. *In vitro* experiments showed a significant increase in the internalization of mannosylated FNDs when compared to non-mannosylated FNDs, while at the same time no significant toxicity was observed for both particles. The specific involvement of MR was confirmed by blocking MR with mannan and anti-MR antibody.

In conclusion, it is important to emphasize the utility of newly developed innovative methods and model systems for a better understanding of processes during CF progression, or even for the discovery of new CFTR modulators or substances suppressing inflammation.

OBSAH

1. ÚVOD.....	10
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1. Cystická fibróza.....	11
2.1.1. Role zánětu a imunitního systému při CF	12
2.1.2. CFTR.....	14
2.1.3. Mutace CFTR	15
2.1.4. <i>In vitro</i> metody pro identifikaci CFTR modulátorů	16
2.1.4.1. Metody detekce funkce CFTR.....	18
2.1.4.2. Metody detekce CFTR proteinu	27
2.2. Bioluminiscenční detekce.....	31
2.2.1. NanoLuc luciferáza	32
2.2.2. NanoLuc Binary Technology	34
2.3. Fluorescenční nanodiamanty - nanočástice využitelné pro monitorování fagocytární aktivity.....	36
2.3.1. Biokompatibilizace a funkcionalizace FND.....	38
2.3.2. Aplikace FND pro biologické zobrazování.....	39
3. SPECIFICKÉ CÍLE PRÁCE.....	40
4. MATERIÁL A METODY	41
4.1. Cíl 1: Příprava linie exprimující WT-CFTR značený HiBiT značkou.....	41
4.1.1. Reagencie	41
4.1.2. Buněčné linie a kultivace.....	41
4.1.3. Příprava gRNA, RNP komplexů a elektroporace buněk.....	41
4.1.4. Analýza účinnosti Cas9/gRNA editace genomu	42
4.1.5. HDR zprostředkované vložení HiBiT značky.....	42
4.1.6. Limitní ředění	42
4.1.7. Primární a sekundární screening	43
4.1.8. Kvantifikace celkové hladiny CFTR-HiBiT (lytický test)	43
4.1.9. Kvantifikace membránového CFTR-HiBiT (extracelulární test).....	43
4.1.10. Genotypizace, sekvenování a detekce CRISPR/Cas9 nespecifické aktivity	44
4.1.11. Western blotting a HiBiT blotting.....	44
4.1.12. Elektrofyzologie – Ussing chamber	45

4.1.13.	Imunofluorescenční značení	46
4.1.14.	Aplikace siRNA a viabilita buněk (MTS)	46
4.1.15.	Inhibice CFTR transportu z GA do ER	47
4.1.16.	HiBiT značení Δ F508-CFTR.....	47
4.1.17.	Detekce účinku trojkombinace CFTR modulátorů.....	47
4.1.18.	Statistická analýza a grafické zpracování	48
4.2.	Cíl 2: Vývoj systému pro monitorování fagocytární aktivity.....	48
4.2.1.	Buněčné linie a kultivace.....	48
4.2.2.	Příprava a charakterizace fluorescenčních nanodiamantů.....	48
4.2.3.	Viabilita buněk a duální zobrazování FND internalizace.....	48
4.2.4.	Internalizace FND-p a FND-p-Man v živých buňkách	49
4.2.5.	Inhibice MR-zprostředkované internalizace FND-p-Man.....	50
4.2.6.	Statistická analýza a grafické zpracování	50
5.	VÝSLEDKY.....	51
5.1.	Cíl 1: Příprava linie exprimující WT-CFTR značený HiBiT značkou.....	51
5.1.1.	Návrh a princip detekčních systémů.....	51
5.1.2.	Návrh crRNA a ověření účinnosti Cas9/gRNA editace	53
5.1.3.	HDR zprostředkované vložení HiBiT značky do ECL4	56
5.1.4.	Příprava monoklonálních buněčných linií.....	58
5.1.5.	Ověření správné glykosylace, lokalizace a funkce WT-CFTR-HiBiT.....	61
5.1.6.	Detekce snížení exprese CFTR	64
5.1.7.	Monitorování endocytického transportu CFTR.....	65
5.1.8.	Značení Δ F508-CFTR HiBiT značkou.....	67
5.1.9.	Detekce efektu CFTR modulátorů.....	69
5.2.	Cíl 2: Vývoj systému pro monitorování fagocytární aktivity.....	71
5.2.1.	Příprava a charakterizace FND-p/FND-p-Man	71
5.2.2.	Viabilita buněk a duální zobrazování internalizace FND.....	73
5.2.3.	Internalizace FND v reálném čase.....	76
5.2.4.	Inhibice internalizace FND-p-Man zprostředkované MR.....	78
6.	DISKUZE	80
6.1.	Cíl 1: Příprava linie exprimující WT-CFTR značený HiBiT značkou.....	80
6.2.	Cíl 2: Vývoj systému pro monitorování fagocytární aktivity.....	85

7.	ZÁVĚR.....	88
8.	SEZNAM ZKRATEK	89
9.	BIBLIOGRAFIE	93
9.1.	Publikace v časopisech s IF	93
9.2.	Další publikační činnost	94
9.3.	Patenty a užité vzory	94
9.4.	Orální prezentace na konferencích	94
9.5.	Poster prezentace na konferencích	95
9.6.	Další publikované abstrakty	96
9.7.	Ocenění.....	97
10.	REFERENCE.....	99
11.	SUPLEMENT.....	124
12.	PŘÍLOHY	129

1. ÚVOD

Cystická fibróza (CF) je nejčastější autozomálně recesivní onemocnění postihující pacienty již od raného věku. Toto multisystémové onemocnění je charakterizované aberantním transportem chloridových, bikarbonátových a sodíkových iontů, nejčastěji doprovázené narušením transportu tekutiny v epitelu dýchacích cest. Vznik CF je zapříčiněn mutacemi v genu cystic fibrosis conductance regulator (*CFTR*). Doposud bylo identifikováno více než 2000 mutací *CFTR*. Ačkoliv je CF stále nevléčitelnou chorobou, objev chemických modulátorů *CFTR* na počátku 21. století vedl ke zvýšení očekávané délky života (>50 let) u více jak 85 % pacientů. Tento úspěch je do značné míry důsledkem nejen obrovského rozšíření znalostí a podrobného studia funkce *CFTR* pomocí různých modelových systémů a testů, ale také studia mechanismu zánětu, který vede k poškození orgánových funkcí u většiny pacientů. Stále však zbývají pacienti s mutacemi *CFTR*, kteří na dosud dostupnou léčbu neodpovídají, tudíž je vývoj efektivních modelových systémů pro urychlení identifikace nových modulátorů stále nutný.

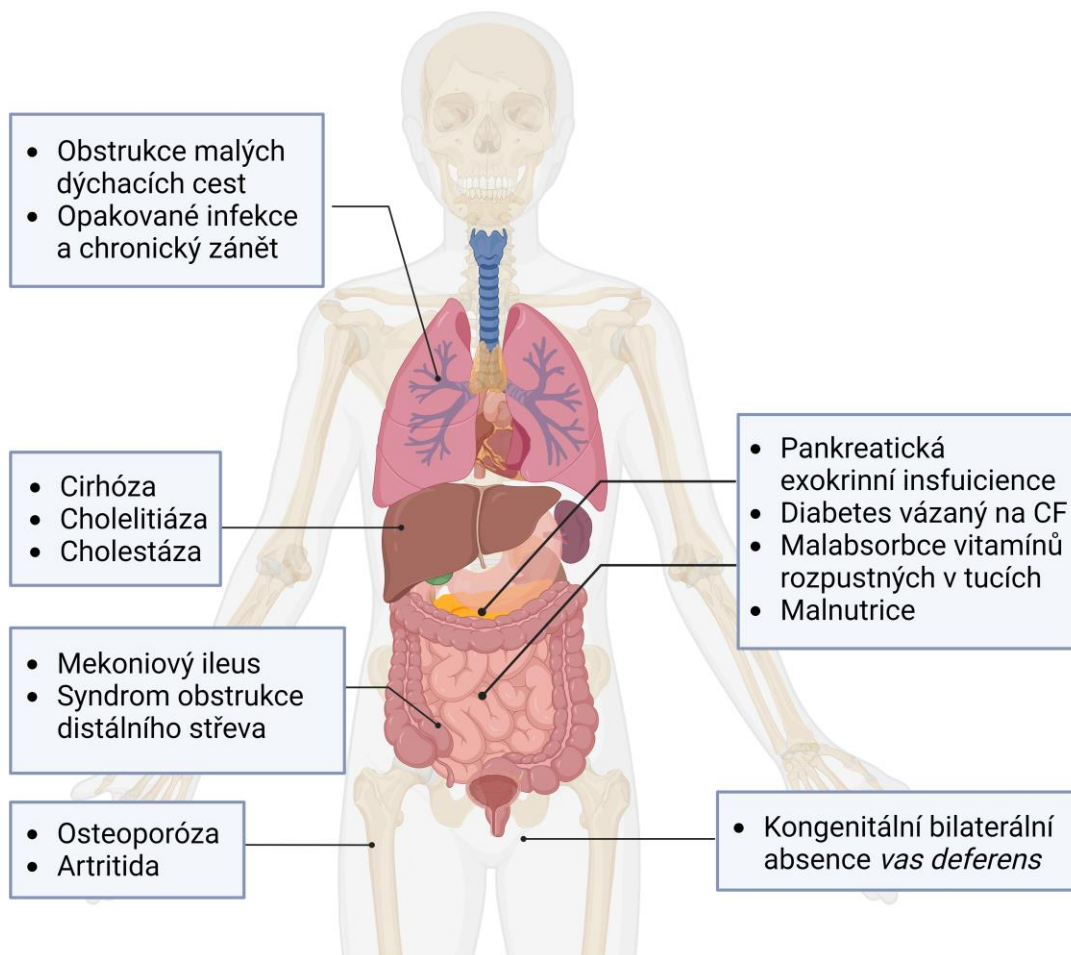
V teoretické části jsou shrnuty základní poznatky o CF, *CFTR* proteinu a mutacích se specifickým zaměřením na *in vitro* systémy dostupné k identifikaci *CFTR* modulátorů. Bioluminiscence a její využití společně s fluorescenčními nanodiamanty (FND) jsou pak dalšími kapitolami teoretické části. Právě bioluminiscence a FND byly využity pro vývoj nových modelových systémů aplikovatelných pro výzkum CF.

Praktická část této disertační práce je rozdělena do dvou částí. V první části se tato práce zabývá přípravou nového vysokokapacitního testovacího systému pro identifikaci potenciálních modulátorů *CFTR*, který by mohl v budoucnu sloužit jako stavební blok pro vytváření nových *in vitro* CF modelových systémů, pro mutace *CFTR*, u kterých dostupná léčba nezabírá. Druhá část poté popisuje vývoj nového *in vitro* systému vhodného pro kvantifikaci manózovým receptorem CD206 (MR) zprostředkované fagocytární činnosti makrofágů, jejichž funkce je u pacientů s CF alterována.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) je autozomálně recesivní onemocnění způsobené mutacemi v genu *CFTR* (z anglického cystic fibrosis conductance regulator), které vedou k aberantnímu transportu chloridových, bikarbonátových a sodíkových iontů (Kerem *et al.*, 1989; Mall *et al.*, 1996; Poulsen *et al.*, 1994; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989; Stutts *et al.*, 1995; Tabcharani *et al.*, 1991). Jelikož je CFTR protein exprimován na apikální membráně epitelových buněk většiny orgánů, je CF multiorgánovým onemocněním ovlivňující funkci potních žláz, slinivky břišní, jater, gastrointestinálního traktu, reprodukčního a dýchacího systému (Molina & Hunt, 2017) (**Obr. 1**). Navzdory systémové povaze CF jsou recidivující plicní infekce hlavní příčinou morbidity a mortality (Turcios, 2020). Defektní transport iontů a tekutin v epitelu dýchacích cest mění extracelulární pH a vede k dehydrataci povrchu dýchacích cest, což se projevuje zhoršením mukociliárního transportu hustého, lepkavého hlenu (Boucher, 2007; Coakley *et al.*, 2003; Poulsen *et al.*, 1994). Tyto změny podporují rozvoj opakujících se infekcí dýchacích cest a následně se podílejí na vzniku intenzivní zánětlivé reakce nejen v místě vzniku infekce (Cantin *et al.*, 2015; Pezzulo *et al.*, 2012). Začarovaný kruh infekce a akutního i chronického zánětu vede k trvalému strukturálnímu poškození dýchacích cest a rozvoji bronchiectázií, které spolu s obstrukcí malých dýchacích cest přispívají k respiračnímu selhání u pacientů s CF (pwCF, z anglického people with CF) (Cantin *et al.*, 2015; Turcios, 2020).



Obrázek 1. Orgánové soustavy postižené u pacientů s cystickou fibrózou, včetně nejčastějších patofyziologických projevů.

2.1.1. Role zánětu a imunitního systému při CF

Jedním z nejčastějších patofyziologických projevů CF jsou chronické plicní infekce a s nimi spojený zánět způsobený oportunními mikroby, jako jsou *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* a *Staphylococcus aureus*. Tento proces je důsledkem kaskády začínající nedostatečnou sekrecí chloridů zprostředkovanou CFTR, která vede k nadměrné viskozitě hlenu, selhání mukociliárního transportu a tvorbě biofilmu, což vyvrcholí nedostatečnou imunitní odpovědí v plicích. Právě opakující se infekce dýchacích cest nakonec vedou u většiny PwCF ke zhoršení plicních funkcí a smrti (Turcios, 2020). Ačkoliv dostupnost vysoce účinné léčby modulátory CFTR pro osoby s alespoň jednou kopií nejčastější mutace $\Delta F508$ -CFTR obnovuje funkci CFTR na úroveň, která se blíží úrovni

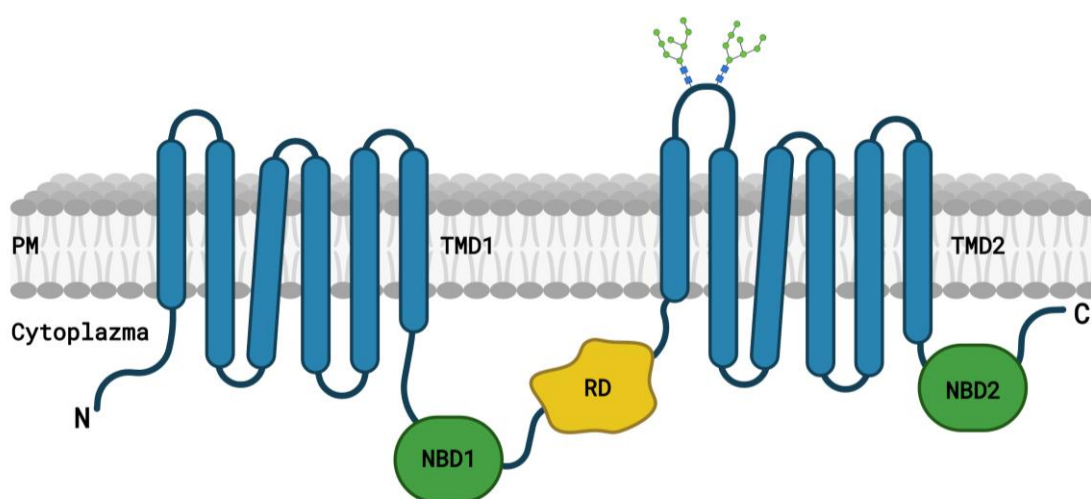
u lidí bez mutace CFTR, bakteriální kolonizace bohužel přetrvává u většiny PwCF a může být příčinou další progresse plicního onemocnění (Hisert *et al.*, 2017).

Na imunitní odpovědi se podílejí klíčovým způsobem profesionální fagocyty, kterými jsou neutrofilové, monocytové, makrofágy a dendritické buňky (Uribe-Querol & Rosales, 2020). Právě makrofágy slouží jako strážci imunitního systému, a proto je zkoumání jejich reakce na modulatory CFTR zásadní pro širší pochopení imunitní odpovědi u CF (Bruscia & Bonfield, 2016). U CF byla dobře popsána dysfunkce makrofágů v plicích, která může přispívat k přetrvávání bakteriálních infekcí. Kromě toho, že je CFTR exprimováno epiteliálními buňkami, je CFTR exprimováno právě i makrofágy (Yoshimura *et al.*, 1991). Stále se diskutuje o tom, zda dysfunkce makrofágů u CF souvisí přímo s expresí mutovaného CFTR v makrofázích, nebo je nepřímým důsledkem chronického zánětu a mukostázy. A proto pochopení vlivu jednotlivých mutací CFTR na funkci makrofágů vyžaduje odlišení sekundárních účinků mutovaného CFTR na různé buněčné procesy od primárního defektu, tedy dysfunkce/absence CFTR (Turton *et al.*, 2021).

Jak již bylo zmíněno, léčba PwCF modulatory CFTR by měla předcházet vzniku zánětu korekcí CFTR a následnou obnovou fyziologického prostředí plic, avšak infekce a zánět stále přetrvávají v některých případech u PwCF i po léčbě modulatory (Hisert *et al.*, 2017). Základem komplexního programu plicní léčby u CF je zmírnění obstrukce pomocí mukolytiků a zprůchodnění dýchacích cest, kontrola infekce pomocí antibiotik a snížení zánětu pomocí protizánětlivých léků. Řešení zánětlivé reakce je opodstatněné, protože je hlavním procesem vedoucím k poškození plic. Z tohoto důvodu zůstávají protizánětlivé léky důležitou součástí léčby CF. První studie protizánětlivých léků se zaměřily na systémové a inhalační kortikosteroidy, a další nesteroidní protizánětlivé léky (Mitri *et al.*, 2020). I když mnohé z nich byly převedeny z laboratorního testování do klinických studií, jen velmi málo je doporučeno pro klinické použití (Chmiel *et al.*, 2013). Lepší pochopení molekulárních mechanismů, které se podílejí na infekci a zánětu dýchacích cest u CF, vedlo k vývoji nových terapeutických přístupů, které jsou v současné době hodnoceny v klinických studiích (Mitri *et al.*, 2020).

2.1.2. CFTR

CFTR je jedinečným členem proteinové rodiny ABC (z anglického ATP binding cassette) transportérů, který na rozdíl od většiny ostatních členů funguje jako aniontový kanál se specifickou regulací (Vasiliou *et al.*, 2009). Gen *CFTR*, s délkou ~190 kb, kódující tento protein se nachází na dlouhém raménku chromozomu 7 (7q31.2). Jeho 27 exonů se překládá do proteinu CFTR o 1480 aminokyselinách (Riordan *et al.*, 1989; Tsui & Dorfman, 2013). CFTR se skládá ze dvou transmembránových domén (TMD), dvou domén vázajících nukleotidy (NBD) a regulační domény (RD) (**Obr. 2**).



Obrázek 2. Struktura CFTR proteinu. Upraveno podle Ondra *et al.*, 2023.

V cytosolu jsou lokalizovány vysoce organizované NBD spolu s neorganizovanou RD obsahující rozpoznávací sekvence pro fosforylaci proteinkinázy A (PKA) a proteinkinázy C (PKC) (Jia *et al.*, 1997; Riordan *et al.*, 1989; Sheppard & Welsh, 1999). Právě přítomnost RD umožňuje jedinečnou cAMP dependentní regulaci CFTR (Dean *et al.*, 2001; Lopes-Pacheco, 2020; Sheppard & Welsh, 1999). TMD procházejí skrze plazmatickou membránu (PM), každá šesti šroubovicovými segmenty, a po aktivaci tvoří pór kanálu (F. Liu *et al.*, 2017; Riordan *et al.*, 1989; Sheppard & Welsh, 1999). Protože je NBD1 v neaktivním stavu stericky blokována doménou RD, musí být jak regulační vložený segment NBD1, tak RD fosforylovány PKA, aby byla umožněna dimerizace obou NBD. Následné otevření kanálu CFTR je vyvoláno dimerizací NBD po navázání dvou molekul ATP. Cyklus

otevření/zavření CFTR závislý na ATP je ukončen hydrolyzou ATP, která vrací kanál do uzavřeného stavu (Della Sala *et al.*, 2021; F. Liu *et al.*, 2017; Sheppard & Welsh, 1999; Vergani *et al.*, 2005). U většiny ABC transportérů je substrát aktivně přenášen přes PM za hydrolyzy ATP, nicméně u CFTR je selektivní proudění iontů skrze kanál tvořený TMD zprostředkováno elektrochemickým gradientem. V epitelu potních kanálků řídí CFTR reabsorpci Cl^- , zatímco v epitelu střev, slinivky břišní a dýchacích cest CFTR řídí sekreci Cl^- a HCO_3^- . Navíc byla prokázána schopnost CFTR vést více iontů zároveň. Tento charakteristický rys CFTR je klíčovým faktorem určujícím vodivé vlastnosti kanálu, protože odpudivé interakce mezi jednotlivými anionty uvnitř póru zajišťují rychlý průnik aniontů (Gong & Linsdell, 2004).

2.1.3. Mutace CFTR

S více než 2000 identifikovanými variantami mutantních alel CFTR ([The Clinical and Functional Translation of CFTR; databáze CFTR2](#)) je nejčastější mutací delece tří nukleotidů vedoucí ke ztrátě fenylalaninu na pozici 508 proteinu CFTR (ΔF508). Přibližně 90 % PwCF nese alespoň jednu kopii ΔF508 , přičemž 50 % z nich jsou homozygoti ΔF508 (Guo *et al.*, 2022). Běžně jsou mutace CFTR rozdělovány do šesti tříd (**Obr. 3**) na základě jejich vlivu na biosyntézu CFTR a buněčný fenotyp (Boyle & De Boeck, 2013; Zielenski, 2000). Zatímco první dvě třídy (I, II) jsou charakterizovány absencí CFTR v PM, další čtyři třídy (III-VI) zahrnují mutace CFTR ovlivňující funkci kanálu a/nebo množství proteinu CFTR spíše než jeho transport do PM. Bylo však popsáno, že některé mutace vedou k pleiotropnímu defektu CFTR. Například v případě mutace ΔF508 , patřící do II. třídy, se většina chybně složených proteinů nedostane do PM, protože podléhá degradaci spojené s endoplazmatickým retikulem (ERAD). Nicméně některé z chybně složených proteinů ΔF508 -CFTR mohou uniknout ERAD, a dostat se tak do PM, kde však vykazují sníženou aktivitu a stabilitu, což jsou charakteristické znaky mutací třídy III a VI (Veit *et al.*, 2016). Příklady zástupců jednotlivých tříd mutací a jejich charakteristické znaky jsou popsány na **Obr. 3**.

Fyziologický fenotyp	I	II	III	IV	V	VI
-	Absence funkčního CFTR	Absence funkčního CFTR v PM	Narušení regulace CFTR	Snižení vodivosti CFTR	Pokles hladiny CFTR	Snižení stability CFTR
-	Nonsense, posunové a sestřihové mutace	Missense mutace a delece	Missense mutace a substituce	Missense mutace a substituce	Missense a setřihové mutace	Missense mutace a substituce
-	G542X W1282X R553X	ΔF508 N1303K ΔI507	G551D S549R V520F	R117H R334W S1235R	3849+10kb C→T 2789+5 G→A 3120+1G→A	4326delTC G1412X 4279insA

Obrázek 3. Třídy mutací a jejich vliv na funkci CFTR. Upraveno podle (Boyle & De Boeck, 2013; Zielenski, 2000).

2.1.4. *In vitro* metody pro identifikaci CFTR modulátorů

Jak již bylo uvedeno výše, CF může vzniknout v důsledku mnoha typů mutací. Kromě konvenční podpůrné léčby, která se zaměřuje na zmírnění příznaků CF, bylo vynaloženo velké úsilí při identifikaci malých molekul, tzv. modulátorů, které cílí na základní defekty CFTR a snaží se je odstranit. Nejvýznamnějšími kategoriemi CFTR modulátorů jsou korektory a potenciátory. Zatímco korektory zprostředkovávají správné složení mutovaného CFTR a umožňují tak jeho glykosylaci a lokalizaci v membráně, potenciátory zvyšují vodivost kanálu i pravděpodobnost otevřeného stavu CFTR, který se již nachází v PM (Lopes-Pacheco, 2016; Rowe & Verkman, 2013). Identifikaci a validaci účinnosti modulátorů předchází vytvoření relevantních *in vitro* modelů. Účinné látky identifikované *in vitro* jsou následně testovány *ex vivo* a *in vivo*, za účelem posouzení dalších parametrů potenciálního léčiva, jako například absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování (Verkman, 2004). Jelikož je příprava *in vitro* modelu s endogenní expresí značeného CFTR náplní prvního cíle praktické části této disertační práce, bude následující text dedikován

převážně problematice *in vitro* modelů a technik používaných k detekci funkce a lokalizace CFTR.

V posledních dvou desetiletích byla vytvořena spousta *in vitro* modelů vhodných pro identifikaci modulátorů CFTR pomocí vysokokapacitního testování látek (HTS). Tyto testy jsou založeny buď na přímém nebo nepřímém měření iontového toku zprostředkovaného CFTR (Ramalho *et al.*, 2022), jedná se tedy o funkční testy, nebo na sledování lokalizace samotného CFTR proteinu prostřednictvím jeho značení (Carlile *et al.*, 2007). Vytvoření halid-senzitivního žlutého proteinu (Galietta *et al.*, 2001; Jayaraman *et al.*, 2000) vedlo k významnému pokroku v oblasti vývoje funkčních HTS testů (Galietta *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2017). Stejně tak jako značení extracelulárních smyček CFTR (Carlile *et al.*, 2007; Howard *et al.*, 1995), které otevřelo novou kapitolu HTS identifikace modulátorů, zaměřujících se na defekty v syntéze, zpracování a následné membránové lokalizaci CFTR (mutace I. a II. třídy).

Navzdory nespornému přínosu těchto metod při identifikaci CFTR modulátorů jsou výše uvedené systémy převážně založeny na exogenní expresi mutovaného CFTR nebo specifické sondy. Tato nadměrná exprese nepředstavuje přirozený stav buňky a může vést k narušení vyvážené stechiometrie proteinových komplexů a k nefyziologickým artefaktům (Moriya, 2015; Prelich, 2012). Co více, jelikož je exogenní mutovaný CFTR exprimován z cDNA, nezachycují tyto modely základní aspekty zpracování CFTR, a tudíž jsou nevhodné pro identifikaci modulátorů cílících například na sestřihové mutace, intronické jednonukleotidové polymorfizmy a předčasné terminační kodony (Clancy *et al.*, 2019).

V následujících podkapitolách budou detailně popsány vybrané metody využívané k *in vitro* identifikaci CFTR modulátorů.

2.1.4.1. Metody detekce funkce CFTR

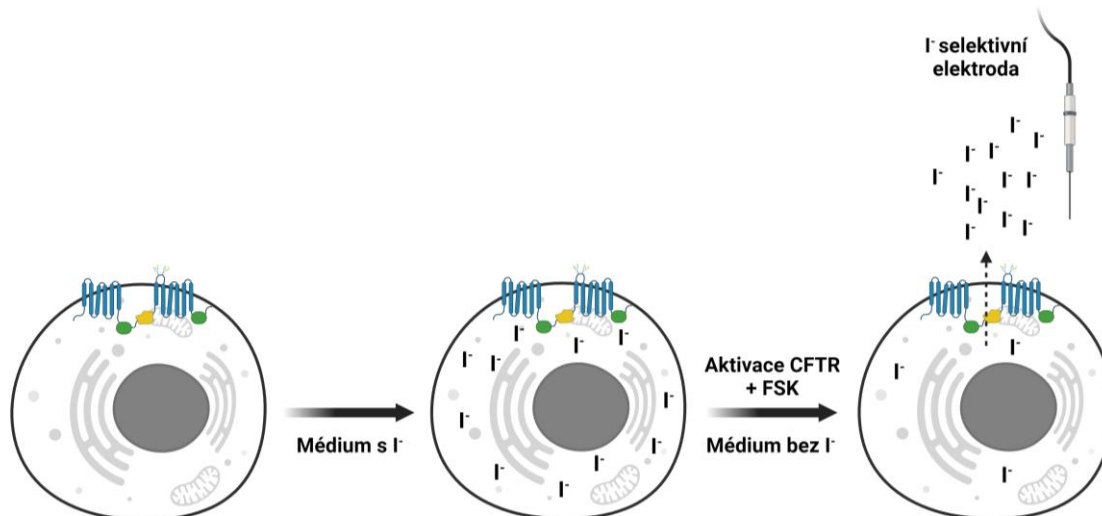
Eflux chloridových iontů skrze CFTR nezávisí jen na celkovém množství CFTR exprimovaného na apikální membráně, ale také na samotné funkci každého z těchto kanálů. V závislosti na typu mutace CFTR dochází k oslabení jedné nebo více determinant funkce, což je hlavní příčinou snížení sekrece aniontů. K hodnocení funkce CFTR, jako aniontového kanálu, lze použít několik *in vitro* metod založených buď na přímé detekci toku aniontů nebo na měření iontového proudu či membránového potenciálu epitelu apikálně exprimujícího CFTR, tzv. elektrofyziologické metody.

- **Měření toku aniontů**

Funkci CFTR lze stanovit na základě detekce množství iontů inkorporovaných nebo uvolňovaných ze stimulovaných buněk.

Měření efluxu jodidových iontů

Díky tomu, že CFTR je propustný nejen pro chloridové a hydrogenuhličitanové anionty, ale také pro další halogenidy (jodid, bromid, fluorid), které se však přirozeně nevyskytují v intracelulárním ani extracelulárním prostoru, je možné pomocí přidání halogenidů a jejich následného efluxu specificky měřit funkci CFTR. Studium funkce CFTR pomocí měření efluxu radioaktivního (^{125}I) nebo neznačeného jodidu (I^-) představuje vhodný předstupeň před detailní funkční analýzou pomocí elektrofyziologických metod (Anderson *et al.*, 1991). Vystavení buněk ^{125}I nebo neznačenému I^- , který je buňkami absorbován, a následná aktivace CFTR, umožňuje pomocí měření efluxu jodidu kvantifikovat funkci CFTR. Kvantifikace v případě ^{125}I probíhá měřením gamma záření a u neznačeného I^- za pomocí jodidově selektivní elektrody (**Obr. 4**) (Long & Walsh, 1997; Norez *et al.*, 2004).



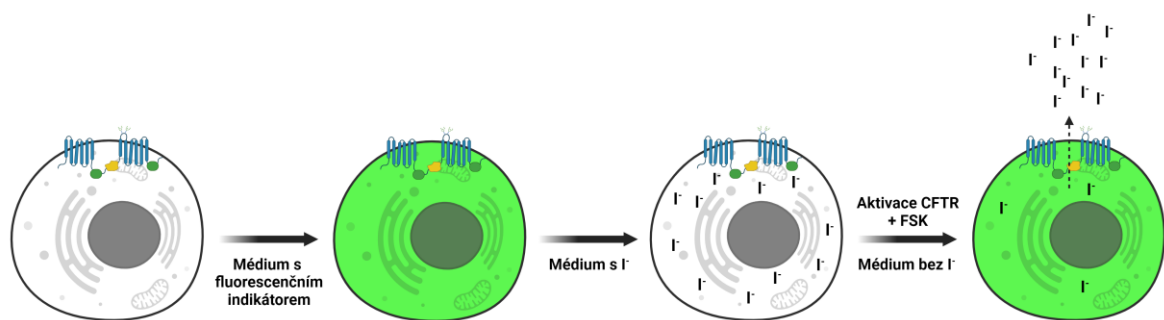
Obrázek 4. Princip měření efluxu jodidových iontů.

Senzitivita a téměř nulové pozadí u ^{125}I a možnost aplikace obou systémů u různorodých buněčných typů bez nutnosti polarizace buněk patří k největším výhodám. Nestabilita a nutná kalibrace I⁻ selektivních elektrod před každým měřením a radioaktivita u ^{125}I jsou naopak nevýhodami těchto systémů.

Halid-senzitivní fluorescenční indikátory

Fluorescenční indikátory pro měření funkce CFTR v živých buňkách by měly být netoxické, chemicky stabilní, rovnoměrně distribuovány v buněčné cytoplazmě, citlivé a specifické. Principiálně jsou halid-senzitivní fluorescenční indikátory založeny na zhášení fluorescence heterocyklických organických sloučenin s kvartérním dusíkem (např. deriváty chinolonů) v přítomnosti halidů (Mansoura *et al.*, 1999). První biologická aplikace chloridového indikátoru, SPQ (6-methoxy-N-(3-sulfopropyl)quiolinium) byla popsána již v roce 1987 (Illsley & Verkman, 1987). Alternativou k chloridovým indikátorům jsou indikátory citlivé na I⁻, protože eflux I⁻ je v buňkách zprostředkován téměř výlučně CFTR, a navíc zhášení fluorescence je u I⁻ výraznější než u Cl⁻, což vede k lepšímu poměru signál/pozadí (Jayaraman *et al.*, 1999). Podobně jako u metody měření efluxu jodidových iontů, musí být v tomto případě buňky vystaveny I⁻. Nejprve však musí být vystaveny i samotnému fluorescenčnímu indikátoru. Fluorescenční indikátory se mohou do buněk dostat pomalou pasivní difúzí, hypotonickým šokem nebo přímou mikroinjekcí. Nejprve jsou tedy buňky vystaveny indikátoru jako např. LMQ (4-aminopyrido[2,1-h]-pteridin-11-ium-6-

olate) za účelem intracelulární akumulace indikátoru v cytoplazmě. Přidání pufru s fyziologickou hladinou I^- způsobuje jeho akumulaci v buňkách, následovanou zhášením fluorescenčního signálu. Dalším krokem je výměna pufru obsahujícího I^- za izotonický pufr s nitrátem, který je také transportován do buněk, ale nezpůsobuje zhášení fluorescence. V této fázi jsou buňky připraveny na test funkce CFTR, kdy po přidání CFTR aktivátoru (např. forskolinu) dochází k efluxu I^- a opětovnému obnovení fluorescence, tedy pouze v případě, že je CFTR funkční (**Obr. 5**) (Jayaraman *et al.*, 1999; Verkman & Galietta, 2005).



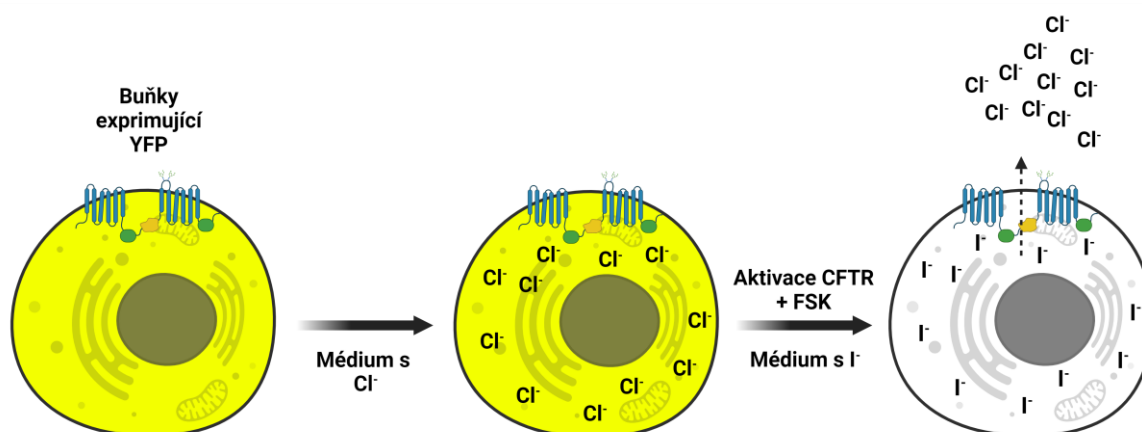
Obrázek 5. Princip halid-senzitivní fluorescenční indikátorů LMQ založeného na I^- zhášení.

Hlavními výhodami fluorescenčních indikátorů jsou citlivost, technická jednoduchost, možnost testovat funkci CFTR v různorodých typech buněk a využitelnost pro HTS. Navíc, jsou fluorescenční testy rychlé, kvantitativní a technicky jednoduché a lze je provádět pomocí fluorescenční mikroskopie, automatických fluorescenčních analyzátorů nebo průtokové cytometrie. Naopak, u některých fluorescenčních indikátorů se setkáváme mnohdy s několika technickými problémy, kterými jsou nedokonalá retence v buňkách, photobleaching (fotovybělování) a omezený dynamický rozsah (Verkman & Jayaraman, 2002).

Halid-senzitivní žlutý fluorescenční protein

Další z možností jak elegantně monitorovat funkci CFTR je využití halid-senzitivního žlutého proteinu (YFP) (Galietta *et al.*, 2001; Jayaraman *et al.*, 2000). V případě, kdy je možné buňky transfekovat, je tento systém upřednostňován před halid-senzitivními indikátory, protože zde není nutná preinkubace s indikátory a následné promývání buněk, nedochází k úniku indikátoru z cytoplazmy do extracelulárního prostoru a navíc YFP

poskytuje silnější signál. Mutant YFP (YFP-H148Q) byl vytvořen postupnou genetickou modifikací původního zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) izolovaného z medúzy *Aequorea victoria* (Wachter *et al.*, 1998). Právě vytvoření tohoto proteinu a následné zjištění jeho citlivosti na halogenidy vedlo k významnému pokroku v oblasti vývoje funkčních HTS testů pro identifikaci CFTR modulátorů (Galiotta *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2002, 2002; Smith *et al.*, 2017). Základním principem tohoto přístupu je výměna Cl^- iontů za I^- ionty v intracelulárním prostoru buněk, kdy je fluorescence YFP-H148Q podstatně citlivější na I^- než na Cl^- zhášení. Tedy v případě, kdy jsou buňky exprimující zároveň funkční CFTR a YFP-H148Q nejprve vystaveny médiu obsahujícímu fyziologickou koncentraci Cl^- , posléze dojde k výměně média s obsahem Cl^- za médium bohaté na I^- a sekvenčně pak k přidání aktivátoru CFTR (forskolin), dochází díky aktivaci CFTR k postupnému toku Cl^- z buněk, I^- do buněk a výsledkem je měřitelné zhášení fluorescence (**Obr. 6**).



Obrázek 6. Princip testů založených na halid-senzitivním žlutém fluorescenčním proteinu (YFP-H148Q senzitivní na I^-).

Dochází-li k obnově funkce mutovaného CFTR vlivem modulátorů, pozorujeme v systémech založených na halid-senzitivním YFP zmíněné zhášení fluorescence. Tyto systémy jsou tedy vhodné pro identifikaci modulátorů funkce mutovaného CFTR (Galiotta *et al.*, 2001). Celkově je tento způsob fluorescenčního měření technicky jednodušší například ve srovnání s elektrofyziologickými metodami, avšak neposkytuje informace o jednotlivých CFTR kanálech. Další nevýhodou tohoto systému je nefyziologická exprese celkového množství proteinů v buňce, díky expresi YFP z expresních vektorů, která neodráží přirozený

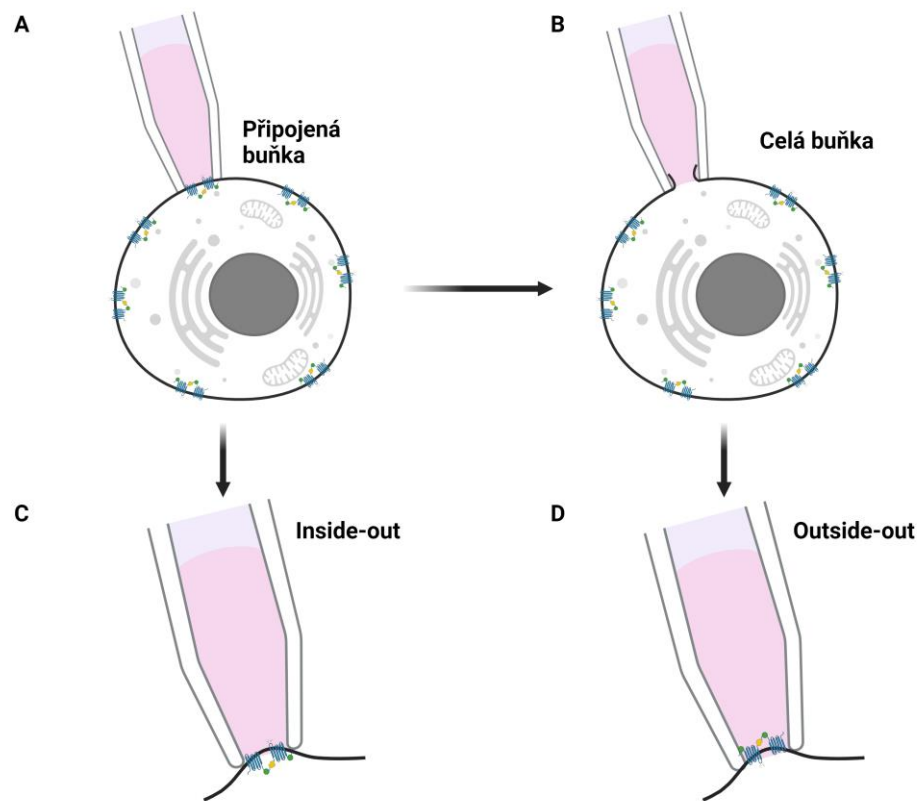
stav a může vést k výše zmíněnému narušení vyvážené stechiometrie proteinových komplexů a nefyziologickým artefaktům (Moriya, 2015; Prelich, 2012).

- ***Elektrofyzilogické metody***

Elektrofyzilogické metody využitelné pro hodnocení aktivity CFTR lze rozdělit do dvou skupin, a to na základě měření iontového proudu (Patch-clamp, Ussing chamber) nebo membránového potenciálu pomocí specifických sond.

Patch-clamp

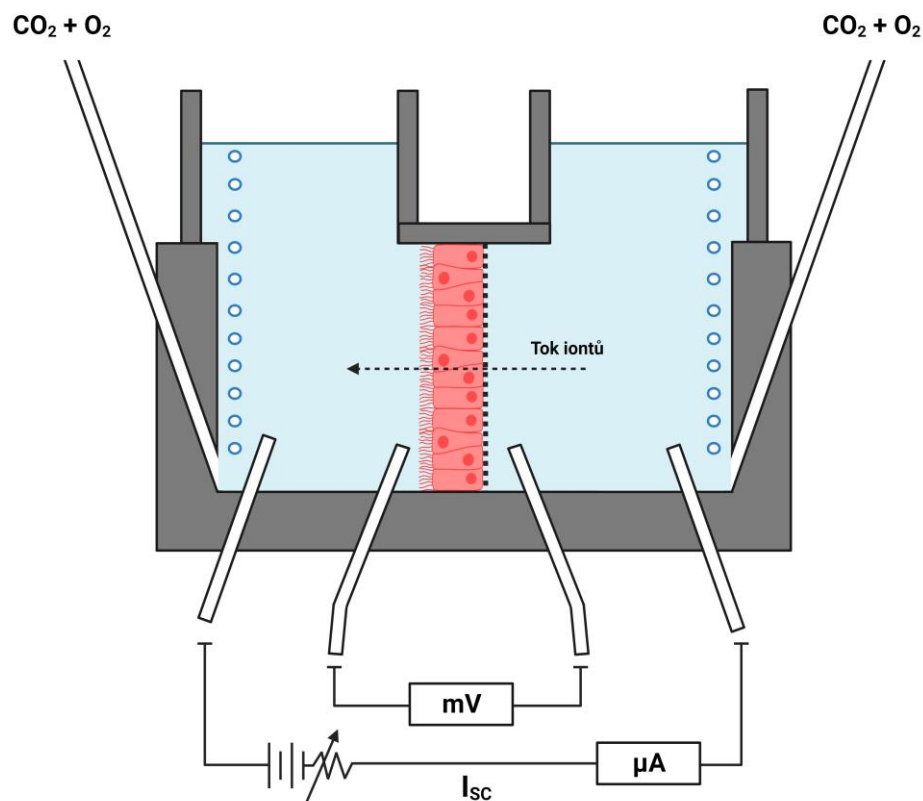
Převážná část prvotních znalostí a poznatků o funkci CFTR pochází právě ze studií využívajících Patch-clamp (PC) (Hamill *et al.*, 1981). Pomocí PC lze v reálném čase nejen měřit celkovou funkci CFTR na povrchu celých buněk, ale lze také monitorovat otevírání a zavírání CFTR až na úrovni jednotlivých iontových kanálů. Navíc k měření mohou být použity celé intaktní živé buňky, nebo jen membránové fragmenty obsahující CFTR. PC patří mezi metody pro studium transportu iontů s nejvyšším rozlišením. Existuje několik různých přístupů jak provádět PC, mezi něž patří monitoring celé buňky, membránových části živých buněk a fragmentů membrán s různým směrem měření toku iontů skrze iontový kanál (**Obr. 7**) (Sheppard *et al.*, 2004). Technika PC byla úspěšně použita na téměř všech typech disociovaných buněk s přístupným povrchem. Základní princip spočívá ve vytvoření těsněného spojení mezi dutou skleněnou mikropipetou naplněnou roztokem elektrolytu spojenou s mikroelektrodami a danou oblastí buněčné membrány (Cai *et al.*, 2011). V závislosti na typu měření, umožňuje vytvoření uzavřeného spoje měřit elektrickou aktivitu celé buňky, včetně změn napětí, iontového proudu nebo u měření jednotlivého CFTR kanálu otevírání, zavírání, vodivost a další parametry. Ačkoliv PC představuje nejcitlivější metodu k charakterizaci otevírání, iontové propustnosti, protein-protein a lékových interakcí, stále se jedná o techniku, kterou je obtížné automatizovat pro účely HTS (Moran & Zegarra-Moran, 2008).



Obrázek 7. Technika Patch-clamp. Schéma možných konfigurací připojení mikropipety: **A)** připojená buňka, **B)** celá buňka, **C)** inside-out, **D)** outside-out během patch-clamp, přičemž ve výzkumu CF se nejčastěji používá konfigurace inside-out. Vytvořeno podle (Nowotny & Marra, 2013).

Ussing chamber

Původně byl tento systém navržen ke studiu transportu iontů skrze žabí kůži, avšak svou univerzálností způsobil převrat ve znalostech způsobu, jakým elektrolyty prostupují epitelem (Ussing & Zerahn, 1951). Ussing chamber je považována za "zlatý standard" pro měření funkce CFTR s cílem studovat epiteliální transport iontů. Tato metoda spočívá v měření elektrických parametrů mezi dvěma komůrkami oddělenými monovrstvou polarizovaných buněk rostoucích na porézním plastovém nosiči (filtru), jak je znázorněno na **Obr. 8** (H. Li *et al.*, 2004). Sestava pro měření se skládá ze dvou vyhřívaných, plynem probublávaných a roztokem naplněných komor, čtyř elektrod a systému pro sběr dat.



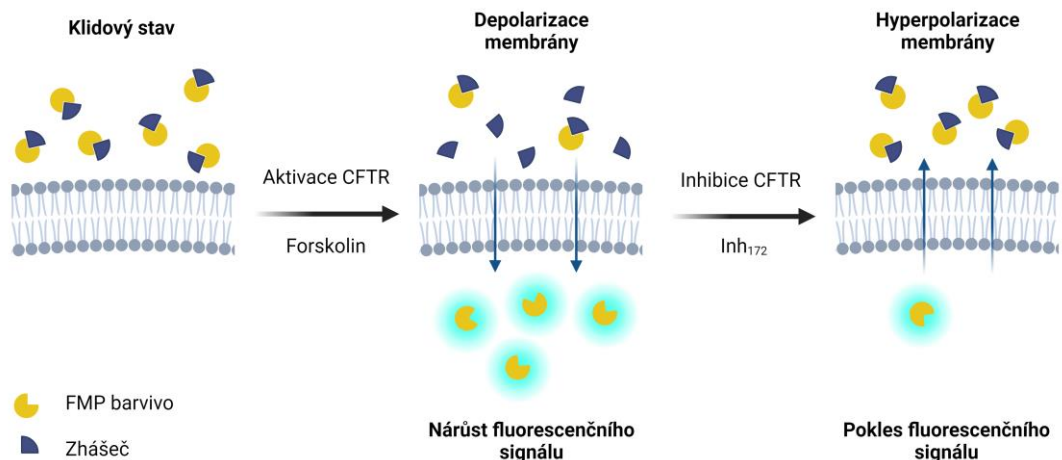
Obrázek 8. Ussing chamber. Vytvořeno podle Rasgado-Flores *et al.*, 2013.

Při měření funkce iontových kanálů se běžně zaznamenává v reálném čase napětí (mV), transepiteliální odpor (Ω/cm^2) a zkratový proud (μA), neboli I_{sc} (z anglického short-circuit current). Nejčastěji využívaným parametrem pro měření funkce CFTR u monovrstvy polarizovaných buněk je I_{sc} , tj. proud procházející přes epitel, kdy je transepiteliální napětí rovno 0 mV. K měření I_{sc} je používán zpětnovazebný zesilovač, který převádí proud skrze epitel a tím udržuje transepiteliální napětí na 0 mV. V tomto případě výsledný I_{sc} , způsobený tokem iontů skrze aktivovaný CFTR, odpovídá přiváděnému proudu z amplifikátoru. Se stoupající konfluencí buněk a vytvářením diferenciované monovrstvy bez jakýchkoliv trhlin, stoupá odpor, jehož hodnota je důležitým parametrem prokazujícím snížení paracelulárního toku iontů přes mezibuněčné spoje reprezentující připravenost buněčné vrstvy pro měření I_{sc} . Tato hodnota je specifická pro každý typ buněk (Moran & Zegarra-Moran, 2008). Standardní protokol pro měření funkce CFTR v Ussing chamber se skládá nejprve z inhibice sodíkového kanálu (ENaC) aplikací amiloridu na apikální straně buněčné monovrstvy, protože ENaC se svou funkcí také podílí na I_{sc} . Následuje aktivace transportu chloridových

iontů zprostředkovaného CFTR pomocí forskolinu a poté inhibice CFTR pomocí specifického inhibitoru funkce CFTR (CFTR_{Inh-172}). Z křivky měření je pak patrné, kdy přesně dochází k aktivaci CFTR, což odpovídá nárůstu hodnoty I_{SC} a naopak poklesu I_{SC} v případě inhibice funkce CFTR (H. Li *et al.*, 2004). Na rozdíl od ostatních funkčních testů vyžaduje Ussing chamber použití epiteliálních buněk, které dokáží vytvořit neporušenou polarizovanou monovrstvu s těsnými mezibuněčnými spoji. Nevýhodou je také nutnost polarizace velkého množství buněk, nutnost specializovaného přístrojového vybavení a vyškoleného personálu, a z těchto důvodů není tento přístup využitelný pro HTS. Nicméně hlavní výhodou této techniky spočívá v možnosti využití různých typů epiteliálních buněk, včetně těch primárních s endogenní expresí CFTR. Tato metoda umožňuje kvantifikaci funkce CFTR bez potřeby nadměrné exprese a umožňuje pracovat se vzorky přímo získanými od pacientů (Moran & Zegarra-Moran, 2008).

Test membránového potenciálu

Jednou z novějších metod, aplikovatelnou pro měření funkce CFTR, je detekce změny membránového potenciálu (MP) (Maitra *et al.*, 2013). Právě díky tomu, že aktivace CFTR vede ke změně MP, lze tento jev využít k nepřímé detekci funkce CFTR pomocí vhodných sond (Coclet-Ninin *et al.*, 2002). Pro měření změny MP byly obvykle používány buď oxonolové nebo styrylové sondy (Wolff *et al.*, 2003). V případě CFTR, se komerční FLIPR Membrane Potential (FMP) Assay Kit od Molecular Devices obsahující lipofilní, aniontové, bis-oxonolové barvivo, prokázal jako jeden z dalších sofistikovaných způsobů jak měřit funkci CFTR (Maitra *et al.*, 2013). Při tomto testu vede agonisty zprostředkovaná aktivace CFTR (např. forskolin) k depolarizaci membrány, v návaznosti na to ke vstupu fluorescenčního FMP barviva do buněk a jeho vazbě k lipidům a proteinům, což má za následek zvýšení fluorescenčního signálu (**Obr. 9**). Naopak blokáce funkce CFTR (např. CFTR_{Inh-172}) vede k hyperpolarizaci membrány, která způsobuje vyloučení FMP barviva z buněk a je indikována poklesem fluorescence. Důležitou součástí FMP Assay Kit je lipofilní zhášec, který se nedostává do buněk při depolarizaci, a tudíž snižuje pozadí reakce v extracelulárním prostoru. Přesné složení FMP assay kitu není dostupné, protože je součástí patentu.



Obrázek 9. Princip FMP testu založeného na detekci změn membránového potenciálu pomocí fluorescenčních sond. Vytvořeno podle Maitra *et al.*, 2013.

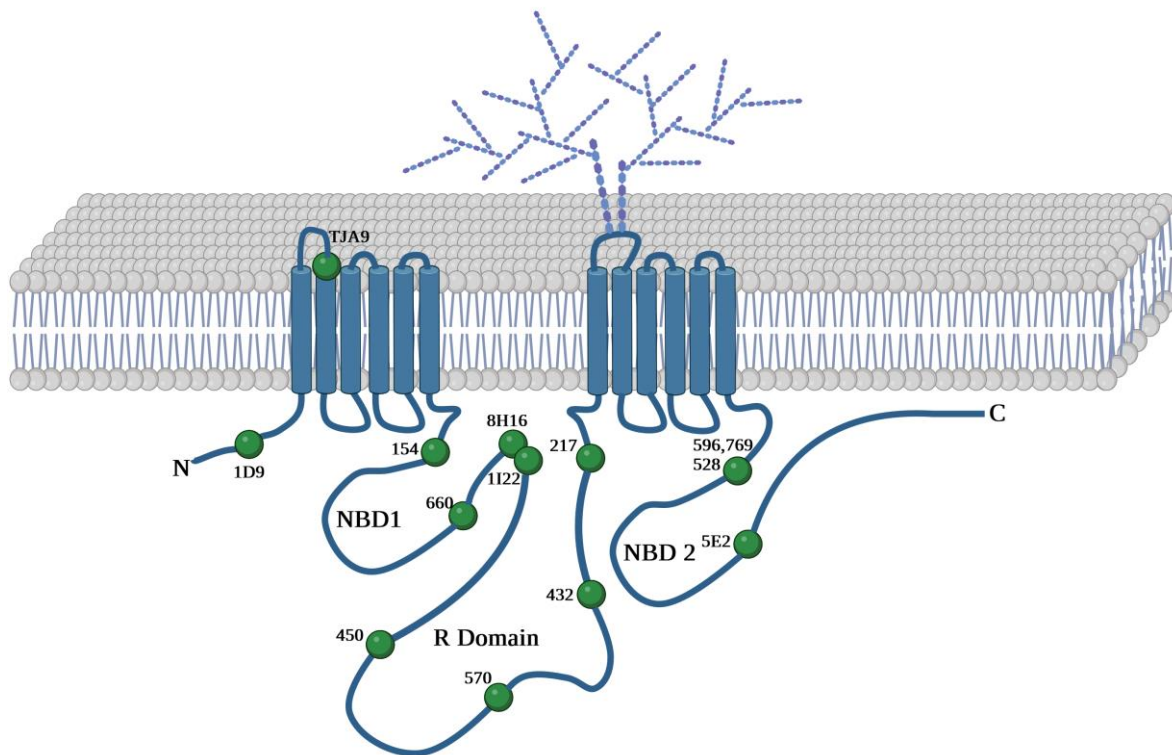
Velkou výhodou tohoto přístupu je možnost provádět vysoce senzitivní kinetické měření v HTS formátu bez nutnosti promývacích kroků (Maitra *et al.*, 2013). Na druhou stranu, hlavní nevýhodou spojenou s touto metodou je riziko falešně pozitivních výsledků. Při hledání nových modulátorů CFTR může totiž docházet k aktivaci nejen CFTR, ale také dalších iontových kanálů, což se projeví nescifickým ovlivněním celkového membránového potenciálu (Alberts *et al.*, 2002).

2.1.4.2. Metody detekce CFTR proteinu

Správná lokalizace a transport proteinů v buňce jsou řízeny komplexní sítí chaperonů a dalších komponent sekrečních drah. Narušení těchto fundamentálních procesů je základem mnoha lidských onemocnění včetně CF. Ačkoli funkční testy jsou nesmírně užitečné, nedokáží přímo identifikovat chemické látky ovlivňující právě transport CFTR proteinu v cytoplasmě nebo jeho lokalizaci v PM. V následující podkapitole budou popsány příklady nejčastěji používaných metod pro detekci a lokalizaci CFTR proteinu. Většina z těchto metod je založena na použití fluorescenční mikroskopie, nebo přístrojů detekujících luminiscenci.

- ***Imunofluorescenční detekce pomocí protilátek***

Imunofluorescenční mikroskopie se běžně používá k hodnocení subcelulární lokalizace a kvantifikaci relativního množství CFTR. Vizualizace heterologně exprimovaného CFTR pomocí protilátek je obvykle bezproblémová a jednoduchá, zatímco v některých případech detekce endogenního CFTR může být náročná a vyžaduje vysoce specifické protilátky a optimalizaci. V průběhu let bylo vyvinuto nespočetné množství CFTR protilátek lišících se detekcí různých CFTR epitopů, původem, typem, senzitivitou na fosforylaci epitopu a dalšími vlastnostmi (Mendes *et al.*, 2004; van Meegen *et al.*, 2013). Program distribuce protilátek Nadace pro cystickou fibrózu ([CFTR Antibodies Distribution Program; Cystic Fibrosis Foundation](#)) se snaží zjednodušit přístup k protilátkám specifickým pro detekci CFTR, a tím zvýšit reprodukovatelnost výsledků mezi jednotlivými laboratořemi. Dostupné protilátky s vyznačenými epitopy jsou znázorněny na **Obr. 10**. Imunofluorescenční detekce může být ovlivněna mnoha experimentálními parametry (Sato *et al.*, 2021), a proto by studie exprese CFTR proteinu neměly vycházet pouze z údajů o imunolokalizaci, ale být v nejlepším případě kombinací detekce proteinu i jeho funkce.

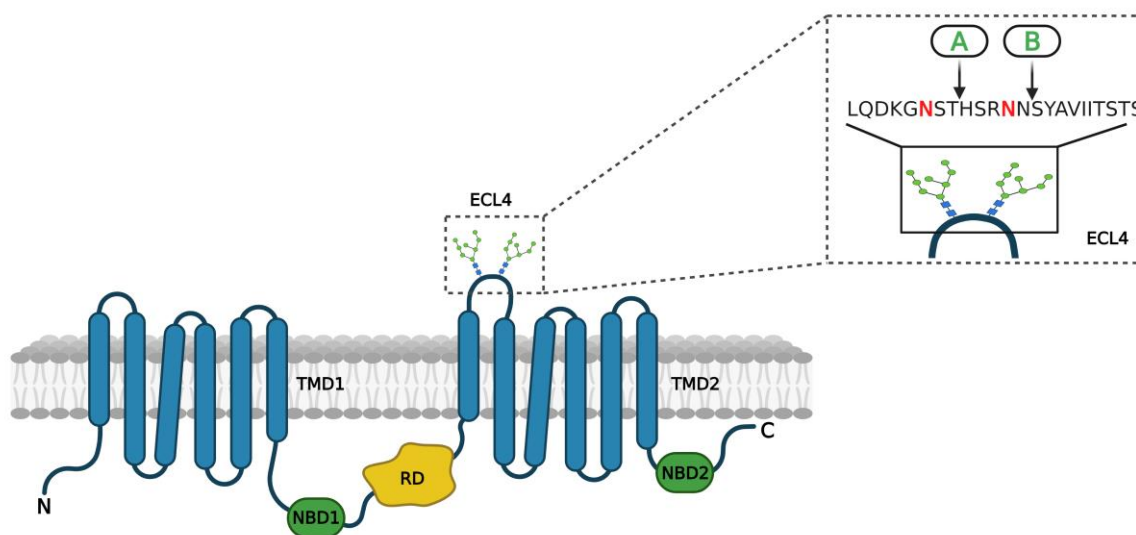


Obrázek 10. Protilátky pro detekci CFTR dostupné u CF nadace. Převzato ze © 2023 CFTR Antibody Distribution Program (<https://cftrantibodies.web.unc.edu/available-antibodies>).

- **Značení pomocí specifických epitopů nebo fluorescenčních značek**

Značení proteinů specifickými epitopy jakými jsou HA nebo FLAG pomocí technik genového inženýrství bylo úspěšně použito u řady cytoplazmatických a membránových proteinů k určení jejich buněčné lokalizace (Y. T. Chen *et al.*, 1993), buněčného transportu (Molloy *et al.*, 1994), nebo k identifikaci protein-protein interakcí (Lemas *et al.*, 1994). Nejčastěji jsou tyto epitopy připojovány k proteinu na N- nebo C- konec. Jelikož jsou u CFTR oba tyto konce intracelulární a pouze malá část proteinu extracelulární, je velmi složité vyvinout anti-CFTR protilátky umožňující specifický membránový monitoring CFTR v reálném čase u živých nepermeabilizovaných buněk. Jedním z řešení tohoto problému je vkládání různých epitopů přímo do struktury extracelulárních smyček CFTR a následná detekce těchto epitopů pomocí specifických protilátek. Fúzní gen (protein + epitop) se naklonuje do vhodného expresního vektoru a transfekuje do hostitelské buňky. Fúzní protein lze poté detektovat a/nebo dokonce purifikovat pomocí monoklonální protilátky specifické

pro epitopovou značku (Brizzard & Chubet, 2001). Prvním takovýmto úspěšným značením, které umožnilo detekci ektopicky exprimovaného CFTR proteinu na povrchu živých buněk bylo vložení FLAG epitopu (detekovatelného anti-FLAG M2 protilátkou) do ECL4 (Obr. 11). Howard *et al.*, 1995 otestovali nejen různé pozice FLAG, ale i dalšího epitopu HA, a navíc zjistili, že při vkládání epitopů do ECL4 je velmi důležité nenarušit glykosylační sekvence CFTR. Narušení těchto konsenzuálních glykosylačních sekvencí totiž snižuje stabilitu CFTR (X. Chang *et al.*, 2008).



Obrázek 11. Schématický obrázek testovaných pozic pro vložení epitopů do CFTR ECL4. Zelená písmena (A, B) představují dvě různé pozice vložení epitopů. Červená písmena (N) znázorňují glykosylační místa. Upraveno podle Howard *et al.*, 1995.

Podobný postup byl pak dále využit například ve studii od Carlile *et al.*, 2007 k vytvoření rekombinantního CFTR pomocí vložení sekvence tří HA epitopů spojených pomocí specifického linkeru opět do ECL4. Takto připravený rekombinantní protein byl pak dále ektopicky exprimován v buněčné linii odvozené od ledvin mláďat křečků a následná optimalizace imunofluorescenčního značení vedla k vytvoření HTS systému, který byl použit pro identifikaci modulátorů ovlivňujících transport mutovaného CFTR do plazmatické membrány (Carlile *et al.*, 2007).

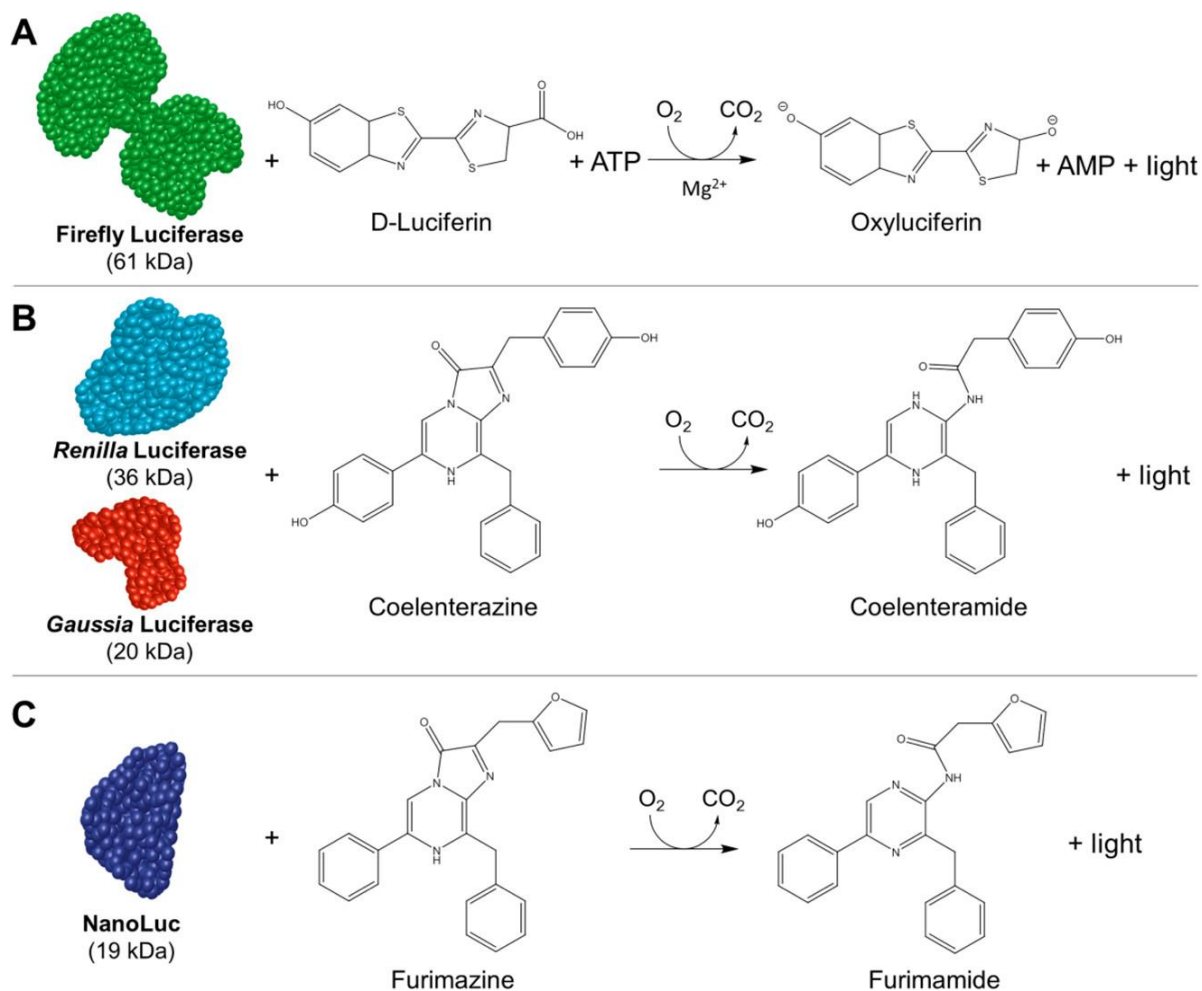
Další možnost značení CFTR spočívá v připojení fluorescenční značky ke struktuře CFTR proteinu, jakou je např. zelený fluorescenční protein (GFP). Tento rekombinantní protein (CFTR-GFP) je pak snadno vizualizován jak ve fixovaných, tak v živých buňkách.

Moyer *et al.*, 1998 jako první vytvořili expresní vektor, ve kterém bylo GFP přidáno k N-konci WT-CFTR. Při takovémto připojení GFP nebyla detekována změna funkce ani lokalizace WT-CFTR. Na základě těchto poznatků byl rekombinantní CFTR-GFP využit v mnoha studiích napomáhaje například objasnění interakčních partnerů CFTR, transportu CFTR a identifikaci CFTR modulátorů (Benharouga *et al.*, 2003; Haggie *et al.*, 2002; Moyer *et al.*, 1998; Watson *et al.*, 2016). Hlavní nevýhodou studia fúzních GFP proteinů je, že jsou obvykle ektopicky exprimovány a ve srovnání s endogenní expresí může jejich nefyziologická exprese v zásadě ovlivnit celkovou funkci proteinu.

Jak již bylo uvedeno, většina CFTR je lokalizovaná v cytoplazmě nebo prochází skrze PM, tudíž není snadné detekovat CFTR na povrchu buněk. Avšak díky přítomnosti glykosylací v ECL4 je možné využít dalšího způsobu detekce membránové lokalizace CFTR, kterým je biotinylace. Toto značení je založeno na oxidaci glykanů pomocí periodiátu sodného k vytvoření reaktivních aldehydových skupin nutných pro připojení biotinu (biotinové činidlo biotin-LC-hydrazid) a následné detekci pomocí avidinu konjugovaného s fluoroforem (Prince *et al.*, 1993). Nejedná se tedy ani o metodu založenou na detekci epitopů CFTR pomocí protilátek nebo na detekci fluorescenčních značek připojených ke struktuře CFTR proteinu. Nevýhodou této metody je, že všechny další membránové proteiny, které jsou glykosylovány, podléhají také značení biotinem, a tudíž je tato metoda přímo ve fixovaných buňkách spíše komparativní než kvantitativní. Tato metoda je tedy vhodnější pro imunoprecipitaci membránového CFTR značeného biotinem s pomocí avidinových kuliček a následnou detekci pomocí specifických protilátek při western blottingu (Peter *et al.*, 2002; Varga *et al.*, 2004).

2.2. Bioluminiscenční detekce

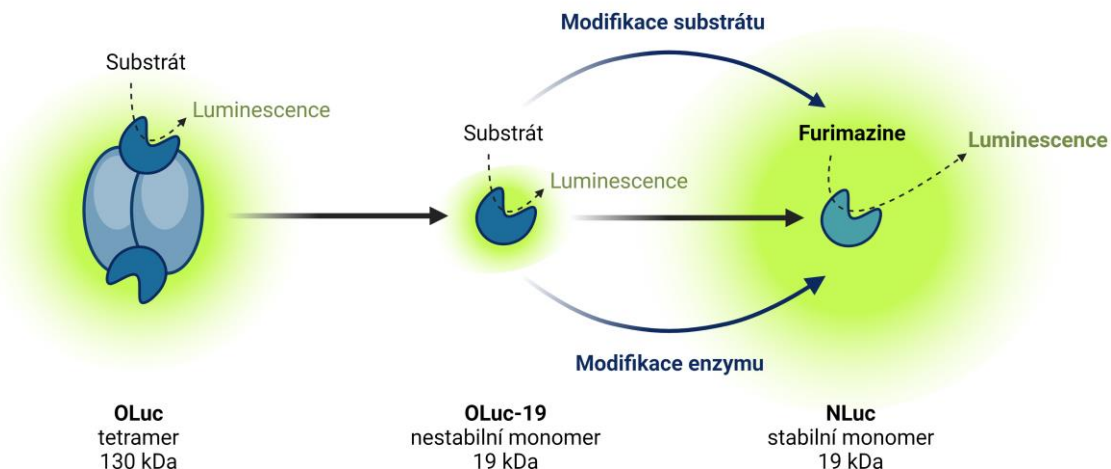
Bioluminescence, neboli schopnost organismů nebo laboratorních biochemických systémů vytvářet světlo, je jedním z nejúžasnějších přírodních jevů. Před necelým stoletím byla popsána první luciferáza (McElroy, 1947; McElroy & Ballentine, 1944) a od tohoto objevu došlo v oblasti bioluminiscenční detekce k významnému pokroku. Detekční metody založené na bioluminiscenci jsou mimořádně užitečné díky své vysoké citlivosti, širokému dynamickému rozsahu a provozní jednoduchosti. Luciferázy představují heterogenní skupinu enzymů katalyzující oxidaci substrátu za vzniku excitovaného meziproduktu, který při rozpadu uvolňuje světlo (Shimomura, 2012). V průběhu let byly objeveny a ve výzkumu aplikovány různé typy luciferáz izolované například z *Photinus pyralis* (FLuc, 61 kDa) (de Wet *et al.*, 1987), *Renilla reniformis* (RLuc, 36 kDa) (Matthews *et al.*, 1977), *Gaussia princeps* (GLuc, 20kDa) (Verhaegen & Christopoulos, 2002), nebo jedna z novějších geneticky vytvořených luciferáz, NanoLuc (NLuc, 19 kDa) (Hall *et al.*, 2012). Tyto luciferázy byly použity pro objasnění molekulárních procesů spojených s genovou expresí, dále pak k měření viability buněk, apoptózy a různých procesů spojených s buněčným metabolismem (Badr & Tannous, 2011). Každá z těchto luciferáz má jiné vlastnosti, které ji činí atraktivní pro určité aplikace, ale ne optimální pro jiné. Jednotlivé typy luciferázy se od sebe navzájem mohou lišit jak samotnou velikostí enzymu, typem substrátu, tak intenzitou produkovaného signálu, původem nebo samotným procesem vzniku signálu (**Obr. 12**) (M. Kaskova *et al.*, 2016). Dále pak byly pro sledování nejen protein-protein interakcí v živých buňkách vytvořeny bifunkční reportérové systémy, které jsou založené na rozdělení samotného enzymu luciferázy (Azad *et al.*, 2014; Dixon *et al.*, 2016). NanoLuc Binary technologie, která bude detailněji popsána v kapitole 2.2.2, je jedním z takovýchto specifických systémů, ve kterém je plně využito výše popsaných vlastností luciferáz.



Obrázek 12. Bioluminiscence je založena na chemické reakci, která probíhá mezi enzymem luciferázou a příslušným substrátem. Převzato z England *et al.*, 2016.

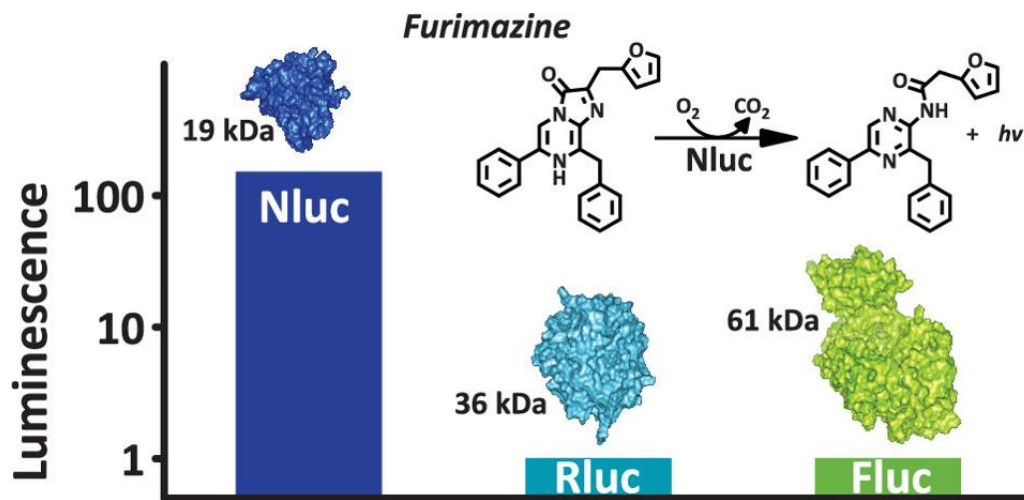
2.2.1. NanoLuc luciferáza

NanoLuc (NLuc) byla vyvinuta z luciferázy pocházející z hlubokomořské krevety *Oplophorus gracilirostris* (OLuc; 106 kDa), jejíž heteromerní struktura je původně tvořena ze dvou 35kDa podjednotek a dvou 19kDa podjednotek (Shimomura *et al.*, 1978). Ačkoli se OLuc skládá ze dvou heterodimerických oblastí, její bioluminiscenční vlastnosti jsou určeny pouze 19kDa podjednotkou, nazvanou OLuc-19, která je ovšem samostatně velmi nestabilní. Genetickými modifikacemi OLuc-19 byla vytvořena vysoce stabilní monomerní NLuc, jež je zároveň stále nezávislá na ATP. V kombinaci s novým substrátem, furimazinem, který vznikl modifikací původního substrátu coelenterazinu (Hall *et al.*, 2012), generuje NLuc vysoce intenzivní dlouho trvající luminiscenci (**Obr. 13**).



Obrázek 13. Vývoj NanoLuc a specifického substrátu furimazinu. Vytvořeno podle Hall *et al.*, 2012.

V poslední době se NLuc stává jednou z nejvyužívanějších, komerčně dostupných luciferáz. Jednou z největších výhod NLuc je produkce specifického luminiscenčního signálu se ~150krát vyšší intenzitou při srovnání s FLuc nebo RLuc luciferázami (**Obr. 14**), čímž se stává z NLuc nepostradatelná součást reportérových systémů pro detekci proteinů s nízkou expresí.

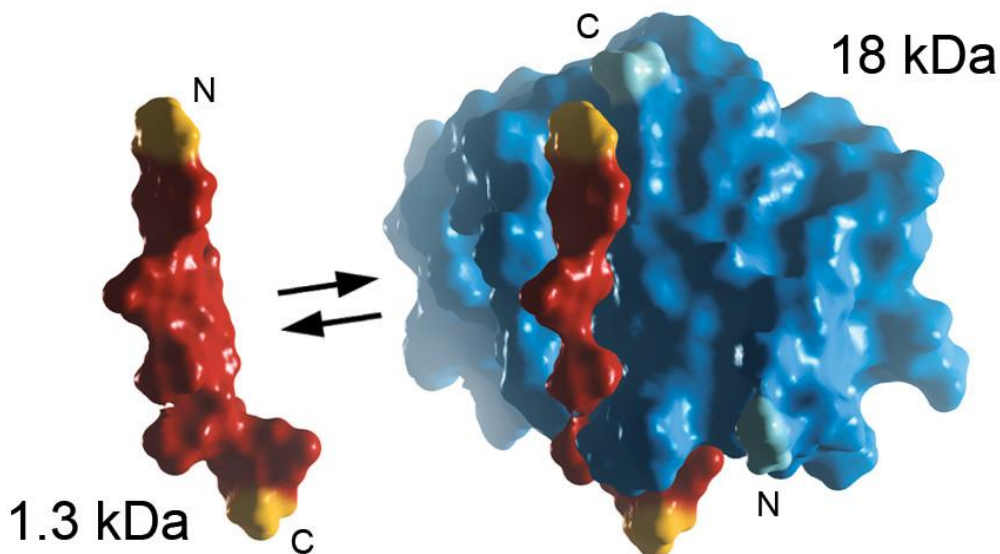


Obrázek 14. Porovnání intenzity luminiscenčního signálu NLuc, RLuc a FLuc. Převzato z Hall *et al.*, 2012.

Dalšími výhodami jsou zvýšená stabilita, malá velikost, žádné známky posttranslačních modifikací ani nespecifické subcelulární lokalizace v savčích buňkách, vysoká fyzikální stabilita až do 55 °C a mnohé další (Hall *et al.*, 2012). Navíc fúze s proteiny umožňuje zkoumání exprese, lokalizace nebo degradace přímo v živých buňkách (Grohmann *et al.*, 2022; White *et al.*, 2020).

2.2.2. NanoLuc Binary Technology

NanoLuc Binary Technology (NanoBiT) (Dixon *et al.*, 2016) je bioluminiscenční binární reportérový systém založený na rozdělení NLuc na dvě podjednotky, a to 18 kDa velkou podjednotku zvanou Large BiT (LgBiT) a malou 11 aminokyselinovou komplementární podjednotku (**Obr. 15**). Při tomto rozdělení ani jedna ze samotných podjednotek neprodukuje luminiscenční signál. Avšak prostorové přiblížení a následná nekovalentní interakce těchto fragmentů způsobuje obnovu funkce luciferázy, která v přítomnosti substrátu produkuje intenzivní luminiscenční signál (Dixon *et al.*, 2016). NanoBiT je užitečným nástrojem jak při studiu protein-protein interakcí, tak buněčné signalizace, který lze použít pro diagnostické i terapeutické účely.



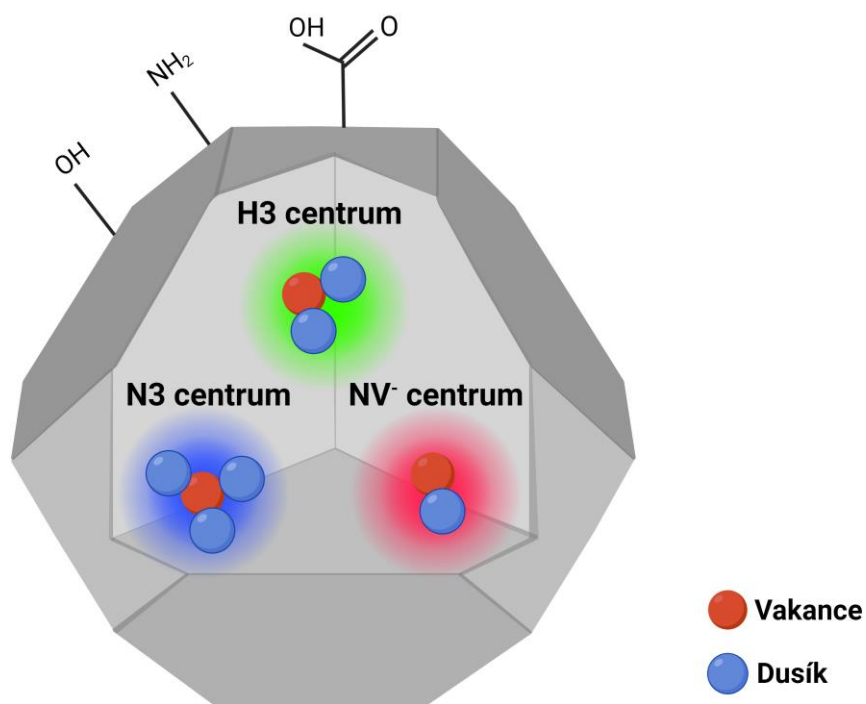
Obrázek 15. Grafické znázornění komplementačního reportéru NanoBiT. Převzato z Dixon *et al.*, 2016.

Modifikací aminokyselinové sekvence původní malé podjednotky vzniklé rozdělením NLuc, bylo vyvinuto několik variant malých komplementárních podjednotek s různou afinitou k LgBiT. Jedna z nich, peptid o 11 aminokyselinách (1,3 kDa) označován jako HiBiT, produkuje po vysokoafinitní komplementaci ($K_D = 700 \text{ pM}$) s LgBiT jasnou a kvantitativní luminiscenci v přítomnosti substrátu. Díky svým malým rozměrům a vlastnostem je HiBiT ideální značkou pro sledování endogenně exprimovaných proteinů v případě, kdy je jeho sekvence vložena do cílového genu například pomocí CRISPR/Cas9 editace genomu. HiBiT lze použít ke kvantitativní, extrémně citlivé analýze exprese a lokalizaci značených proteinů, přičemž jeho detekce je mnohem rychlejší než konvenční imunoanalýzy, jakou je např. imunofluorescenční detekce pomocí protilátek. Proteiny označené HiBiT lze snadno kvantifikovat a lokalizovat pouhým přidáním LgBiT a substrátu. NanoBiT je neuvěřitelně všestranným systémem a lze jej využít pro širokou škálu aplikací (Hwang *et al.*, 2020; Ondra *et al.*, 2023; Schwinn *et al.*, 2018). Stejně jako všechny podobné technologie má však i NanoBiT svá omezení, která mohou způsobit, že v některých oblastech najde jen omezené využití. Jednou z takovýchto limitací je neideální emisní spektrum pro *in vivo* aplikace. Dalším potenciálním omezením je požadavek na specifický substrát furimazin, který není genericky dostupný. Tudíž náklady pro aplikaci jsou vyšší než u tradičních luciferázových systémů, což může omezit využití tohoto systému v některých laboratořích (England *et al.*, 2016).

2.3. Fluorescenční nanodiamanty - nanočástice využitelné pro monitorování fagocytární aktivity

V posledním desetiletí se fluorescenčním nanodiamantům (FND) dostalo značné míry pozornosti díky jejich jedinečným optickým vlastnostem využitelných v biomedicínských aplikacích jak pro *in vitro* (Chipaux *et al.*, 2018), tak *in vivo* zobrazování (van der Laan *et al.*, 2018). Navíc jsou FND vysoce biokompatibilní, vykazují nízkou toxicitu, vysoký kvantový výtěžek, výjimečnou chemickou stabilitu a fotostabilitu (Shenderova *et al.*, 2019).

Nejčastěji jsou FND připravovány z nanodiamantů (ND) vzniklých pomocí vysokotlaké vysokoteplotní syntézy (HPHT; z angl. high-pressure high-temperature). Tímto způsobem vznikají různé velikostní frakce ND s průměrnou velikostí částic od 10 nm až po mikrometrové velikosti (Boudou *et al.*, 2009). Ve HPHT ND se přirozeně vyskytují různé strukturní defekty. Fluorescence ND je způsobena právě existencí takovýchto defektů, avšak přirozeně obsahují ND tyto defekty pouze v minimálním množství (Dobrinets *et al.*, 2013). Díky ozáření ND vysokoenergetickými částicemi (elektrony, protony nebo ionty helia) a následnému žíhání (Havlik *et al.*, 2013), vznikají tyto defekty ve struktuře ND v daleko větší míře, což vede ke vzniku FND (Boudou *et al.*, 2009; Y. R. Chang *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2005; Zaitsev, 2001). Intenzita fluorescence FND také závisí na velikosti částic. S narůstající velikostí FND stoupá také intenzita fluorescence díky většímu počtu defektů, které se prostorově vejdu do struktury FND (Wilson *et al.*, 2019). Většina opticky aktivních defektů FND vzniká v důsledku přítomnosti nečistot (atomy H, He, Ne, Xe, Li, B, N, O, Ni, Co, Zn a další), které jsou vázány k vnitřním strukturním defektům ND. Tato situace nastává, když na jednom z míst v mřížce ND chybí atom uhlíku, jedná se o tzv. vakanci (krystalovou poruchu). Defekty na bázi dusíku, tzv. nitrogen-vacancy (NV) centra (**Obr. 16**), tvoří nejširší škálu fotoluminiscenčních center a produkují emisi v celém viditelném spektru až do blízké infračervené (NIR) oblasti (Balasubramanian *et al.*, 2009; Zaitsev, 2001).



Obrázek 16. NV fluorescenční centra (NV⁻, N3 a H3) s funkčními skupinami připojenými k povrchu FND (hydroxyl -OH, amin -NH₂ a karboxyl -COOH). Vytvořeno podle Torelli *et al.*, 2019.

Negativně nabitá NV centra (NV⁻) se těší největšímu zájmu díky svému NIR emisnímu spektru, které je vhodné pro zobrazování v biologických systémech, a také díky magnetooptickým vlastnostem. Dalšími centry jsou pak H3 centra, kdy se dva atomy dusíku nacházejí ve vakanci struktury FND, a N3 centra, v nichž tři atomy dusíku obklopují FND vakanci. H3 centra jsou zodpovědné za zelenou fluorescenci, na rozdíl od N3 center, která emitují modrou fluorescenci (Shenderova *et al.*, 2019). Všechna tato fluorescenční centra mají absolutní fotostabilitu a díky ochraně robustní diamantové mřížky nejsou vybělována nebo zhasena na základě trvání nebo intenzity excitačního záření (Gruber *et al.*, 1997; Reineck *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2005).

2.3.1. Biokompatibilizace a funkcionalizace FND

ND nevykazují žádnou přirozenou toxicitu (Zhu *et al.*, 2012), avšak mohou projevit toxicitu závislou na přítomnosti připojených molekul k jejich povrchu (Xing *et al.*, 2011), což zdůrazňuje potřebu otestovat všechny nové ND s modifikovaným povrchem jak z hlediska jejich toxicity, tak i biokompatibility. Přestože jsou obecně diamanty známé svou inertností, lze na jejich povrchu provádět překvapivě mnoho chemických reakcí. V důsledku je tedy reaktivita ND stanovena jejich povrchovými modifikacemi (Schrand, Huang, *et al.*, 2007; Zaitsev, 2001).

Při přípravě FND může docházet k přichycení různých typů nečistot k jejich povrchu, které mohou dále nejen ovlivňovat biokompatibilitu, ale také kvantový výtěžek a fototoxicitu (T. Zhang *et al.*, 2021). Proto je velmi důležité čištění povrchu FND, které se obvykle provádí oxidací jak v kapalině (varem v kyselinách), tak na vzduchu při teplotách nad 500 °C (Turcheniuk & Mochalin, 2017). Další modifikací potřebnou pro využití FND v biologických systémech je připojení funkčních skupin k jejich povrchu. Tyto funkční skupiny jako jsou například aminy, hydroxyly, karboxyly (**Obr. 16**) pak lze dále použít k navázání různých molekul na povrch FND (Y. Liu, Gu, *et al.*, 2004; Nagl *et al.*, 2015). Navázání specifických molekul k povrchu FND je prováděno z několika důvodů. Zaprvé, ačkoli jsou oxidované FND stabilní ve vodě, v biologických kapalinách obsahujících soli, jako jsou pufrы, buněčná kultivační média či krev, okamžitě agregují. Takovéto agregaci lze předejít právě zmíněnými modifikacemi povrchu FND (Hemelaar *et al.*, 2017; Rehor *et al.*, 2014; Wilson *et al.*, 2019). Potažení povrchu FND biokompatibilními polymery (např. polyethylenglykol (PEG), metakrylátové deriváty, polyglycerol) zvyšuje koloidní stabilitu FND a navíc umožňuje další konjugaci specifických ligandů na tyto polymery (Neburkova *et al.*, 2017). Za druhé, specifická modifikace povrchu FND může sloužit k nasměrování FND na určité místo nejen v samotné buňce nýbrž v celém organismu. Nejčastěji připojovanými molekulami jsou protilátky (Suarez-Kelly *et al.*, 2021), molekuly DNA (Petraikova *et al.*, 2016), streptavidin (B. M. Chang *et al.*, 2013), nebo specifické ligandy receptorů (Weng *et al.*, 2009).

2.3.2. Aplikace FND pro biologické zobrazování

Fluorescenční mikroskopie je klíčovým prvkem moderního výzkumu. Právě FND lze použít jako citlivé a specifické fluorescenční sondy pro biologické zobrazování pomocí fluorescenční mikroskopie. Jejich univerzálnost pro krátkodobé i dlouhodobé značení různých typů buněk (kmenové buňky, neurony a nádorové buňky) nebo monitorování buněčných procesů je nedoceníitelná (Claveau *et al.*, 2018; Hsiao *et al.*, 2016).

Bez ohledu na použití pro *in vitro* nebo *in vivo* aplikace je interakce povrchu FND s buňkami důležitým faktorem při návrhu biologického využití. U většiny případů, pokud se nejedná o značení např. receptorů na povrchu buněk (Sotoma *et al.*, 2016), je nezbytné, aby FND byly buňkami internalizovány. V tomto případě musí překonat fyzickou bariéru, buněčnou membránu (T. Chou *et al.*, 2011). Vzhledem k velké rozmanitosti buněk a jejich různým funkcím není překvapivé, že existují velké rozdíly ve způsobu a rychlosti internalizace FND buňkami. Po vstupu do buňky mohou být částice udržovány v endozomech nebo také uvolňovány do cytoplazmy. Nejběžnějším způsobem nespecifické internalizace FND je klathrin-dependentní endocytóza (Faklaris *et al.*, 2009; Perevedentseva *et al.*, 2013; Vaijayanthimala *et al.*, 2009). Tento typ internalizace byl využit například pro dlouhodobé značení, sledování proliferace a diferenciaci myších kmenových buněk jak *in vitro*, tak i po jejich transplantaci do plic (Wu *et al.*, 2013).

Připojení specifických molekul k FND, neboli funkcionalizace, slouží k zacílení na určité buněčné receptory nebo kompartmenty, nebo dokonce k řízení distribuce FND v živých organizmech (Fu *et al.*, 2007; Chauhan *et al.*, 2020; Krueger, 2008). Funkcionalizace může tedy být využita například ke specifickému značení buněk (Hsieh *et al.*, 2019), monitorování buněčných procesů (K. Liu *et al.*, 2009), nebo zkoumání distribuce a efektu protinádorových léčiv (Y. Li *et al.*, 2023). Oproti používání obvyklých fluorescenčních sond má značení pomocí FND mnoho výhod, jak již bylo dříve zdůrazněno. Kromě toho polyvalentní povrch FND zvyšuje účinnost vazby cílených ligandů a je využitelný například pro cílení na nadměrně exprimované receptory na nádorových buňkách (Ruoslahti *et al.*, 2010; Slegerova *et al.*, 2015).

3. SPECIFICKÉ CÍLE PRÁCE

Výsledky předkládané disertační práce jsou rozděleny do dvou částí, každá z nich postupně popisuje přípravu *in vitro* modelu/systému pro studium patofyziologie CF:

1. Příprava buněčného modelu pro monitorování endogenně exprimovaného CFTR s využitím HiBiT značky. Výsledky tohoto cíle jsou součástí publikace „CRISPR/Cas9 bioluminescence-based assay for monitoring CFTR trafficking to the plasma membrane“ (Ondra *et al.*, 2023) a jsou součástí této práce jako příloha 1.
2. Vytvoření systému pro monitorování fagocytární aktivity makrofágů. Výsledky tohoto cíle jsou součástí publikace „Visualization of Sentinel Lymph Nodes with Mannosylated Fluorescent Nanodiamonds“ (Kvakova *et al.*, 2022) a jsou součástí této práce jako příloha 2.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Cíl 1: Příprava linie exprimující WT-CFTR značený HiBiT značkou

4.1.1. Reagencie

Všechny reagencie Alt-R CRISPR-Cas9 (S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3, electroporation enhancer, tracrRNA ATTO550 a crRNA) a ssODN (HDR templáty) byly zakoupeny od Integrated DNA Technologies (IDT). PCR primery byly objednány od společnosti GeneriBiotech. Nano-Glo[®] HiBiT Lytic Detection System a Nano-Glo[®] HiBiT Extracellular Detection System byly zakoupeny od společnosti Promega. Protilátky: myší protilátky proti lidskému CFTR (569, TJA9; CF Foundation), oslí sekundární protilátky proti myšímu IgG (H+L) (Alexa Fluor 647; Invitrogen). siRNA: CFTR Human siRNA Oligo Duplex (Locus ID 1080; Origene), RAB5 (RAB5A) Human siRNA Oligo Duplex (Locus ID 5868) a RAB11 Human siRNA Oligo Duplex (Locus ID 8766). Všechny chemikálie, pokud není jinak specifikováno, byly zakoupeny u společnosti Merck.

4.1.2. Buněčné linie a kultivace

Lidské bronchiální epiteliální buňky (16HBE14o-) byly darovány Dr. D. Gruenertem (University of California, San Francisco). Tato buněčná linie byla vytvořena imortalizací pomocí plazmidu SV40 (pSVori-) (Cozens *et al.*, 1994). Buňky byly kultivovány v kompletním Eagle's Minimum Essential Medium (Enzo) s přidavkem 10% fetálního hovězího séra (FBS), 100 U/100 µg na ml penicilinu/streptomycinu (Gibco[™]) při 5 % CO₂ a 37 °C.

4.1.3. Příprava gRNA, RNP komplexů a elektroporace buněk

Všechny crRNA byly navrženy pomocí softwaru CHOPCHOP (Labun *et al.*, 2019) a lze je nalézt v **Tab. S1**. crRNA (200µM) a tracrRNA (200µM) byly smíchány v poměru 1:1 a inkubovány při 95 °C po dobu 5 min pro přípravu gRNA. Komplexy RNP pro jednu transfekci ($2,4 \times 10^5$ buněk) byly vytvořeny smícháním 3 µg proteinu Alt-R S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3, 0,5 µl 100µM gRNA a inkubací po dobu 15 min při pokojové teplotě. Buňky byly resuspendovány v R pufru v počtu $2,4 \times 10^7$ buněk/ml. Ke vnesení RNP do buněk 16HBE14o- byla použita sada The Neon[™] Transfection System 10 µl Kit (Invitrogen).

Komplexy RNP s ssODN (2 μ M) nebo bez ssODN byly elektroporovány do buněk za následujících podmínek: 1200 V, 20 ms, 4 pulzy. Po elektroporaci byly buňky přeneseny do média bez antibiotik. Po 48 hodinách byla účinnost elektroporace ověřena detekcí signálu ATTO550 pomocí přístroje Incucyte Live-cell analysis (Sartorius).

4.1.4. Analýza účinnosti Cas9/gRNA editace genomu

Genomická DNA (gDNA) z buněk 16HBE14o- elektroportovaných pouze RNP komplexy (bez přítomnosti ssODN) byla extrahována pomocí soupravy Monarch Genomic DNA Purification Kit (New England Biolabs, NEB) podle pokynů výrobce. PCR byla provedena s následujícími primery, forward: 5'-GCTCCTGCAGTTTCTAAAGAATATAG-3' a reverse: 5'-GAGAGGTATGACTGACCCATAAG-3'. S použitím Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) byla amplifikována oblast o délce 849 bp, která obklopuje cílová místa gRNA ve 4. extracelulární smyčce WT-CFTR. PCR amplikony byly přečištěny pomocí sady Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (NEB). Přečištěné amplikony byly sekvenovány pomocí Sangerova sekvenování s výše uvedeným forward primerem. Pro analýzu účinnosti crRNA byly jako vstupní data do webového nástroje TIDE (Tracking of Indels by Decomposition) (Brinkman *et al.*, 2014) použity výsledky ze Sangerova sekvenování z kontrolních (neupravených) a upravených buněk.

4.1.5. HDR zprostředkované vložení HiBiT značky

RNP společně s korespondujícími ssODN (**Tab. S1**) byly elektroporovány do buněk. Po 7 dnech od elektroporace byly vysazeny populace editovaných buněk ve třech různých koncentracích: 2×10^4 , 4×10^4 a 6×10^4 buněk/jamku do bílé neprůhledné 96jamkové destičky CulturPlate-96 (PerkinElmer). Následující den byl proveden lytický a extracelulární test, dle postupu uvedeného níže. Kinetické měření luminiscenčního signálu pro lytický a extracelulární test bylo provedeno po dobu tří hodin.

4.1.6. Limitní ředění

Buněčné populace editované pomocí Cas9/gRNA spolu s ssODN byly použity pro limitní ředění k přípravě monoklonálních buněčných linií. Buňky byly naředěny v kondicionovaném médiu na 1 buňku/100 μ l, přeneseny do jednotlivých jamek 96jamkové destičky a inkubovány po dobu 3 týdnů. Po \sim 7 dnech byly destičky prohlédnuty z hlediska

růstu buněk a identifikace jamek, které obsahovaly pouze jednu kolonii. Jamky s více než jednou kolonií byly z dalších experimentů vyloučeny. Po ~21 dnech (dosažení ≥ 80 % konfluence) byla 1/4 buněk z každé jamky obsahující monoklonální buněčnou linií použita pro primární screening a zbylé 3/4 buněk byly přeneseny do 24jamkových destiček a dále paralelně kultivovány.

4.1.7. Primární a sekundární screening

Jak bylo uvedeno výše, při primárním screeningu byla 1/4 buněk z každé jamky obsahující monoklonální buněčnou linii přenesena do bílé neprůhledné 96jamkové destičky CulturPlate-96 (PerkinElmer) a byl proveden lytický test, dle postupu uvedeného níže. Klony pozitivní pro luminiscenční signál byly po týdnu znovu testovány za využití buněk z 24jamkových destiček, přičemž pro sekundární screening byly nasazeny v koncentraci 1×10^4 buňky/jamku ve třech technických opakováních. Následující den po vysazení buněk byl proveden lytický a extracelulární test. Pozitivní klony v obou testech byly dále expandovány a následně kryoprezervovány.

4.1.8. Kvantifikace celkové hladiny CFTR-HiBiT (lytický test)

K měření celkové exprese WT-CFTR-HiBiT proteinu byl použit Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System (Promega) dle protokolu výrobce s níže specifikovanými modifikacemi. Ve stručnosti, buňky byly vysety do 96jamkových nebo 384jamkových destiček CulturePlate (PerkinElmer) a kultivovány po dobu 24 hodin. Před přidáním reakční směsi, obsahující lytický pufr s LgBiT, substrát a čerstvé médium bez FBS, bylo od buněk odstraněno původní médium. Po přidání reakční směsi byl luminiscenční signál měřen pomocí přístroje EnVision (Perkin Elmer).

4.1.9. Kvantifikace membránového CFTR-HiBiT (extracelulární test)

Buňky byly vysazeny a inkubovány stejným způsobem, jako je uvedeno výše u lytického testu. Pro stanovení membránové lokalizace WT-CFTR-HiBiT byl použit Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System (Promega) dle protokolu výrobce s níže specifikovanými modifikacemi. Před přidáním reakční směsi obsahující pufr s LgBiT, substrát a čerstvé médium bez FBS, bylo od buněk odstraněno původní médium. Po přidání reakční směsi byl luminiscenční signál měřen pomocí přístroje EnVision (Perkin Elmer).

4.1.10. Genotypizace, sekvenování a detekce CRISPR/Cas9 nespecifické aktivity

gDNA byla extrahována z HiBiT pozitivních klonů identifikovaných v sekundárním screeningu pomocí Monarch® Genomic DNA Purification Kit (NEB) dle pokynů výrobce. PCR byla provedena dle postupu uvedeného v části "Analýza účinnosti editace genomu Cas9/gRNA". PCR amplikony byly velikostně separovány pomocí elektroforézy v 2% agarózovém gelu. Dále pak byly PCR amplikony z identifikovaných homozygotů přečištěny pomocí sady Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (NEB) a sekvenovány pomocí Sangerova sekvenování s forward primerem: 5'- GCTCCTGCAGTTTCTAAAGAATATAG -3'. Pro detekci CRISPR/Cas9 nespecifické aktivity byla extrahována gDNA z klonu B38 a A22. Cílové sekvence byly amplifikovány pomocí PCR, jak je uvedeno výše, s primery uvedenými v **Tab. S2**. Sangerovo sekvenování bylo provedeno pouze s forward primery.

4.1.11. Western blotting a HiBiT blotting

Proteinové lyzáty byly připraveny z 5×10^6 buněk v pufru RIPA (150 μ M NaCl, 1% NP-40, 0,5% deoxycholát sodný, 0,1% SDS, 50 μ M Tris-HCl pH 8,0 a 1 μ M EDTA) doplněného o cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Lyzáty byly inkubovány 30 min na ledu, v průběhu inkubace několikrát vortexovány a následně centrifugovány při 14 000 g po dobu 30 min při 4 °C. Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) a 30 μ g/jamku celkového proteinového lyzátu bylo separováno ve 7,5% (w/v) SDS-PAGE gelu. Rozdělené proteiny byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu pomocí systému Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). **Western blotting:** Membrány byly blokovány v 5% roztoku sušeného mléka v TBS pufru (Merck) s 0,1% Tween-20 (TBST) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě, poté následovala inkubace s příslušnými primárními protilátkami přes noc při 4 °C. Následující den byly membrány promyty v TBST a inkubovány 1 hodinu s peroxidázou konjugovanou sekundární protilátkou (1:10 000, Sigma-Aldrich). K detekci C a B bandu CFTR proteinu byla použita monoklonální protilátka proti lidskému CFTR 596 (ředění 1:1 000, CF Foundation) a jako kontrola byla použita protilátka proti β -aktinu (ředění 1:1 000, Sigma-Aldrich). Detekce signálu byla provedena pomocí zobrazovacího systému ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories, Inc.) **HiBiT blotting:** Nano-Glo HiBiT Blotting System (Promega)

byl použit pro vizualizaci proteinů značených HiBiT značkou přenesených na nitrocelulóзовou membránu podle protokolu výrobce.

4.1.12. Elektrofyziologie – Ussing chamber

Buňky klonu B38 a 16HBE14o- byly vysety v koncentraci 3×10^5 buněk/cm² na 6,5mm TranswellPermeable® Supports filtry (Corning Inc.) a kultiovány po dobu 7 dní v růstovém médiu (100 µl apikální, 600 µl bazolaterální), přičemž médium se měnilo každé 2 až 3 dny. Buňky byly kultiovány v Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Wisent Inc) doplněném 10 % FBS (Wisent Inc), 1 % neesenciálních aminokyselin (Sigma-Aldrich), 2 mM L-Glutaminu (Wisent Inc), 1 mM pyruvátu sodného (Wisent Inc), 100 IU penicilinu a 100 mg/ml streptomycinu (Wisent Inc). Před elektrofyziologickou analýzou byly buňky promyty PBS (Wisent Inc) a inkubovány v médiu OptiMEM Reduced Serum Medium (ThermoFisher Scientific) doplněném 10 mg/ml BSA (Sigma-Aldrich), (100 µl apikálně, 500 µl bazolaterálně) po dobu 72 hodin s výměnou média každých 24 hodin. I_{SC} byl měřen pomocí Ussing chamber (Physiologic Instruments). Polarizované buňky na filtru byly umístěny mezi dvě komory obsahující 5 ml bazolaterálního nebo apikálního roztoku, oba o pH = 7,40. Apikální roztok se skládal ze 1,2mM NaCl, 115mM glukonátu sodného, 25mM NaHCO₃, 1,2mM MgCl₂, 4mM CaCl₂, 2,4mM KH₂PO₄, 1,24mM K₂HPO₄ a 10mM D-dextrozy. Bazolaterální roztok se skládal ze 115mM NaCl, 25mM NaHCO₃, 1,2mM MgCl₂, 1,2mM CaCl₂, 2,4mM KH₂PO₄, 1,24mM K₂HPO₄ a 10mM D-dextrozy. Roztoky v obou komorách byly udržovány při teplotě 37 °C a probublávány směsí 95% O₂ a 5% CO₂. V nich byly monovrstvy buněk apikálně vystaveny působení 10µM amiloridu (blokátor ENaC), 10µM forskolinu (agonista cAMP), 50µM genisteinu (potenciátor CFTR), 10µM CFTRInh-172 (blokátor CFTR) a 10µM ATP (purinergní agonista pro aktivaci Ca²⁺ aktivovaných Cl⁻ kanálů) v tomto pořadí (Gianotti *et al.*, 2018). K posouzení nepropustnosti vytvořené monovrstvy buněk byly souběžně při záznamu I_{SC} aplikovány periodické pulzy 1 mV a výsledné výchylky v pulzu I_{SC} byly použity k výpočtu TEER. Do analýzy byly zahrnuty pouze monovrstvy s TEER $\geq 200 \Omega \times \text{cm}^2$.

4.1.13. Imunofluorescenční značení

Buňky byly vysazeny do 96jamkové destičky PhenoPlate (PerkinElmer) v počtu 4×10^4 buněk/jamku a inkubovány po dobu 24 hodin. Po inkubaci byly buňky třikrát promyty PBS a inkubovány po dobu 3 minut s 2 $\mu\text{g/ml}$ WGA Alexa Fluor 555 (Invitrogen) v Hanksově vyváženém solném roztoku (Invitrogen), následovala 20minutová fixace 4% paraformaldehydem při pokojové teplotě. Navíc byla část buněk inkubována 15 min s 0,25% Triton X-100 v PBS za účelem permeabilizace buněčných membrán. Následně byly provedeny tři promytí PBS a poté 90 minut blokování. Pro blokování a ředění primárních a sekundárních protilátek byl použit roztok 1% BSA v PBS. Po zablokování byla přidána primární myší monoklonální protilátka proti lidskému CFTR TJA9 (ředění 1:250, CF Foundation) a buňky byly inkubovány přes noc při 4 °C. Následující den byly všechny jamky třikrát promyty PBS a inkubovány se sekundární protilátkou Alexa Fluor 647 (ředění 1:1 000, Sigma-Aldrich) po dobu 60 min při RT. Před barvením jader byly buňky třikrát promyty. Nakonec byl k buňkám na 10 minut přidán 10 μM Hoechst 33342 v PBS. Mikroskopické snímky byly pořízeny pomocí přístroje Cell Voyager CV8000 (Yokogawa). BrightField, Alexa Fluor 647 (ex 640 nm; em 676/29 nm), WGA (ex 561 nm; em 600/37 nm) a Hoechst 33342 (ex 405 nm, em 445/45 nm) byly zachyceny pomocí 20 \times objektivu. Všechny snímky byly následně zpracovány a analyzovány pomocí softwaru Columbus verze 2.7.1 (Perkin-Elmer) a softwaru ImageJ.

4.1.14. Aplikace siRNA a viabilita buněk (MTS)

Transientní siRNA transfekce byla provedena pomocí transfekčního činidla jetPRIME (Polyplus) podle protokolu výrobce. Pro ošetření siRNA byly buňky B38 nasazeny do 96jamkové destičky (PerkinElmer) v počtu 2×10^4 buněk/jamku jeden den před transfekcí. Pro snížení exprese CFTR byly použity tři různé varianty siRNA Human Oligo Duplexes (Origene) v koncentracích 10 nM a 50 nM. Pro snížení exprese RAB5 (RAB5A) a RAB11 pomocí Human siRNA Oligo Duplex (Origene) byly také použity koncentrace 10 nM a 50 nM. Jako kontrola byla použita transfekce univerzální negativní kontrolní siRNA, scrambled siRNA (Origene). Buňky byly po transfekci inkubovány po dobu 48 nebo 72 hodin a následně byla detekována hladina CFTR pomocí lytického a extracelulárního testu. K vyloučení cytotoxicity siRNA, byl proveden MTS test pomocí CellTiter 96 AQueous

One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) podle protokolu výrobce. Relativní životaschopnost buněk (%) byla vypočtena jako $(A_{\text{vzorku}} - A_{\text{pozadí}}) / (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{pozadí}}) \times 100 \%$. Absorbance z odpovídajících podmínek bez buněk byla použita jako pozadí.

4.1.15. Inhibice CFTR transportu z GA do ER

Buňky B38 byly vysazeny stejným způsobem jako při ošetření siRNA (viz kapitola 4.1.14). Následně byly buňky vystaveny po dobu 6 h brefeldinu A (Sigma-Aldrich) v koncentraci od 1,56 do 25 μM . Po inkubaci byl proveden lytický, extracelulární a MTS test.

4.1.16. HiBiT značení $\Delta\text{F508-CFTR}$

Pro přípravu monoklonální populace exprimující HiBiT značený $\Delta\text{F508-CFTR}$ byly použity stejné metody, které jsou popsány výše (4.1.3. Příprava gRNA, RNP komplexů a elektroporace buněk; 4.1.6. Limitní ředění; 4.1.7. Primární a sekundární screening; 4.1.8. Kvantifikaci celkové hladiny CFTR-HiBiT (lytický test); 4.1.9. Kvantifikaci membránového CFTR-HiBiT (extracelulární test)). Ve zkratce, CF linie bronchiálních epitelových buněk CFBE41o- $\Delta\text{F508-CFTR} / \Delta\text{F508-CFTR}$ (CFBE) s ektopickou expresí $\Delta\text{F508-CFTR}$ byla použita jako výchozí biologický materiál. Tato linie byla poskytnuta jako dar od prof. J. Hanrahana a byla kultivována za stejných podmínek jako buněčná linie 16HBE14o- (viz kapitola 4.1.2). RNP3 komplexy společně s ssODN s 8AA linkery (stejně jako pro přípravu klonu B38) byly použity pro přípravu populace modifikovaných buněk, která byla dále použita k přípravě monoklonálních linií exprimujících $\Delta\text{F508-CFTR-HiBiT}$ pomocí limitního ředění, primárního a sekundárního screeningu.

4.1.17. Detekce účinku trojkombinace CFTR modulátorů

K potvrzení schopnosti lytického a extracelulárního testu identifikovat účinky modulátorů CFTR byly CFBE buňky exprimující $\Delta\text{F508-CFTR-HiBiT}$ vysazeny v koncentraci 1×10^4 buněk/jamku do 96jamkových destiček CulturePlate (PerkinElmer) a kultivovány po dobu 24 hodin. Následující den bylo odebráno médium a přidáno nové s různými kombinacemi těchto látek: 1,25 μM LAU-7b (Fenretinid; Laurent Pharmaceuticals), 12,5 μM síran zinečnatý (Sigma-Aldrich), trojkombinace CFTR modulátorů (ETI; MedChemExpress): 3 μM Elexacaftor (VX-445), 3 μM Tezacaftor (VX-

661) a 10nM Ivacaftor (VX-770). Po přidání těchto látek byly buňky dále inkubovány po dobu 24 nebo 72 hodin s následnou detekcí hladin CFTR pomocí lytického a extracelulárního testu.

4.1.18. Statistická analýza a grafické zpracování

Pro statistickou analýzu byla použita jednocestná ANOVA - Tukey test, ns = nesignifikantní, * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, za použití softwaru GraphPad Prism 8.0. Ve všech testech byla p-hodnota rovná nebo menší než 0,05 považována za statisticky signifikantní. Obrázky použité v této disertační práci byly upraveny nebo vytvořeny pomocí grafického editoru BioRender.com

4.2. Cíl 2: Vývoj systému pro monitorování fagocytární aktivity

4.2.1. Buněčné linie a kultivace

Myší monocyto-makrofágové buňky J774A.1 (ATCC® TIB-67), epiteliální buňky lidského bronchioloalveolárního karcinomu plic A549 (ATCC® CCL-185), epiteliální buňky lidského karcinomu tlustého střeva HCT116 (ATCC® CCL-247) a imortalizované lidské embryonální buňky ledvin HEK293 (ATCC® CRL-3216) byly zakoupeny u American Type Culture Collection (ATCC). J774A.1 a HEK293T buňky byly kultivovány v kompletním Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Lonza), A549 v Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium (Lonza) a HCT116 v McCoy's 5A Medium (Lonza) s obsahem 10% FBS a 100 U/100 μg na ml penicilinu/streptomycinu (obojí Gibco) v inkubátoru s 5 % CO_2 při 37 °C.

4.2.2. Příprava a charakterizace fluorescenčních nanodiamantů

Příprava a charakterizace fluorescenčních diamantů (FND) byla provedena Ing. Klaudíí Kvakovou, Ph.D. Z tohoto důvodu, není tento metodický postup součástí této disertační práce, ale je detailně popsán v publikaci (Kvakova *et al.*, 2022).

4.2.3. Viabilita buněk a duální zobrazování FND internalizace

Pro stanovení případné cytotoxicity FND byl proveden MTS test pomocí CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) podle protokolu výrobce

s malou změnou. Stručně řečeno, buňky J774A.1 byly vysazeny do průhledných 96jamkových destiček (TPP) v počtu 1×10^4 buněk/jamku a kultivovány po dobu 24 h. Médium bylo kompletně vyměněno za čerstvé médium s FND-p a FND-p-Man (0 – 200 $\mu\text{g/ml}$) nebo bez nich. Buňky byly inkubovány s FND po dobu 24 h před přidáním roztoku MTS (1,5h inkubace s MTS při 37 °C). Po centrifugaci (1000 rcf, 5 min) a přenesení supernatantu na novou destičku, byla pomocí přístroje EnVision (Perkin Elmer) změřena absorbance při 500 nm. Relativní životaschopnost buněk (%) byla vypočtena jako $(A_{\text{vzorku}} - A_{\text{pozadí}}) / (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{pozadí}}) \times 100 \%$. Absorbance z odpovídajících bezbuněčných podmínek byla použita jako kontrolní pozadí.

Pro duální zobrazování internalizace/fagocytózy FND-p/FND-p-Man byl použit stejný protokol jako pro nasazení a ošetření buněk pro MTS test, s tím rozdílem, že buňky byly vysazeny do 96jamkové destičky ViewPlate-96 (PerkinElmer). Mikroskopické snímky byly pořízeny pomocí Cell Voyager CV7000 (Yokogawa). Světlé pole (BrightField), zelený signál (green channel; ex 488 nm; em 540 ± 20 nm) a červený signál (red channel; ex 561 nm; em 620 ± 35 nm) byly zachyceny pomocí 20 \times PH Long W.D. objektivu. Všechny snímky byly následně zpracovány pomocí softwaru Columbus verze 2.7.1 (Perkin-Elmer) a softwaru ImageJ. Mikroskopické snímky byly vytvořeny jako maximální 3D projekce všech pořízených rovin (tzv. z-stacks).

4.2.4. Internalizace FND-p a FND-p-Man v živých buňkách

Pro sledování internalizace FND v živých buňkách bylo vysazeno 1×10^4 buněk J774A.1/jamku do ViewPlate-96 (PerkinElmer) a kultivováno po dobu 24 h při 37 °C a 5 % CO₂. Před konfokální mikroskopií bylo médium zcela vyměněno za čerstvé médium s nebo bez FND-p a FND-p-Man (10 $\mu\text{g/ml}$). Zobrazování živých buněk bylo prováděno pomocí Cell Voyager CV7000 (Yokogawa) při 37 °C v 5 % CO₂ po dobu 12 h. Světlé pole (BrightField), červený kanál (red channel; ex 561 nm; em 620 ± 35 nm) a digitální fázový kontrast (DPC) byly snímány pomocí 20 \times PH Long W.D. objektivu nebo 60 \times objektivu s vodní imerzí. Všechny snímky byly následně zpracovány a analyzovány pomocí softwaru Columbus verze 2.7.1 (Perkin-Elmer) a softwaru ImageJ. Kvantifikace internalizace FND-p/FND-p-Man byla vypočtena jako průměrný počet skvrn (spotů) na buňku v červeném

kanálu. Mikroskopické snímky byly vytvořeny jako maximální 3D projekce všech pořízených rovin (tzv. z-stacks).

4.2.5. Inhibice MR-zprostředkované internalizace FND-p-Man

Buňky byly vysazeny, jak je popsáno v kapitole 4.2.4. Inhibice internalizace FND-p-Man prostřednictvím MR byla provedena pomocí neutralizující protilátky anti-Hu CD206 klon 15.2 (protilátka proti MR; Exbio) a mananu (Sigma-Aldrich). Po 24 hodinách od vysazení buněk bylo médium před mikroskopickým měřením vyměněno za čerstvé médium bez nebo s 1 mg/ml mananu nebo 30 µg/ml mAb 15.2. Po 20 minutách inkubace byly přidány FND-p-Man (10 µg/ml) v kompletním médiu. Detekce inhibice MR v živých buňkách byla provedena pomocí Cell Voyager CV7000 (Yokogawa) při 37 °C v 5 % CO₂ po dobu 12 h. DPC a červený kanál (red channel; ex 561 nm; em 620 ± 35 nm) byly zachyceny pomocí 20× PH Long W.D. objektivu. Všechny snímky byly následně zpracovány a analyzovány pomocí softwaru Columbus verze 2.7.1 (Perkin-Elmer) a softwaru Image J. Inhibice internalizace FND-p-Man byla vypočtena kvantifikací obrazu jako průměrný počet skvrn na buňku v červeném kanálu. Mikroskopické snímky byly vytvořeny jako maximální 3D projekce všech pořízených rovin (tzv. z-stacks).

4.2.6. Statistická analýza a grafické zpracování

Kvantifikace internalizace FND-p a FND-p-Man a výpočet inhibice jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka (n = 3). Vždy jsou uvedena data získaná z maximálních 3D projekcí z-stacků konfokální mikroskopie. Všechna biologická opakování byla provedena ve 3 technických opakováních. Pro analýzu získaných výsledků byla použita jednocestná ANOVA - Dunnett test, nebo dvoucestná ANOVA - Tukey test za pomoci softwaru GraphPad Prism 8.0. Obrázky použité v této disertační práci byly upraveny nebo vytvořeny pomocí grafického editoru BioRender.com

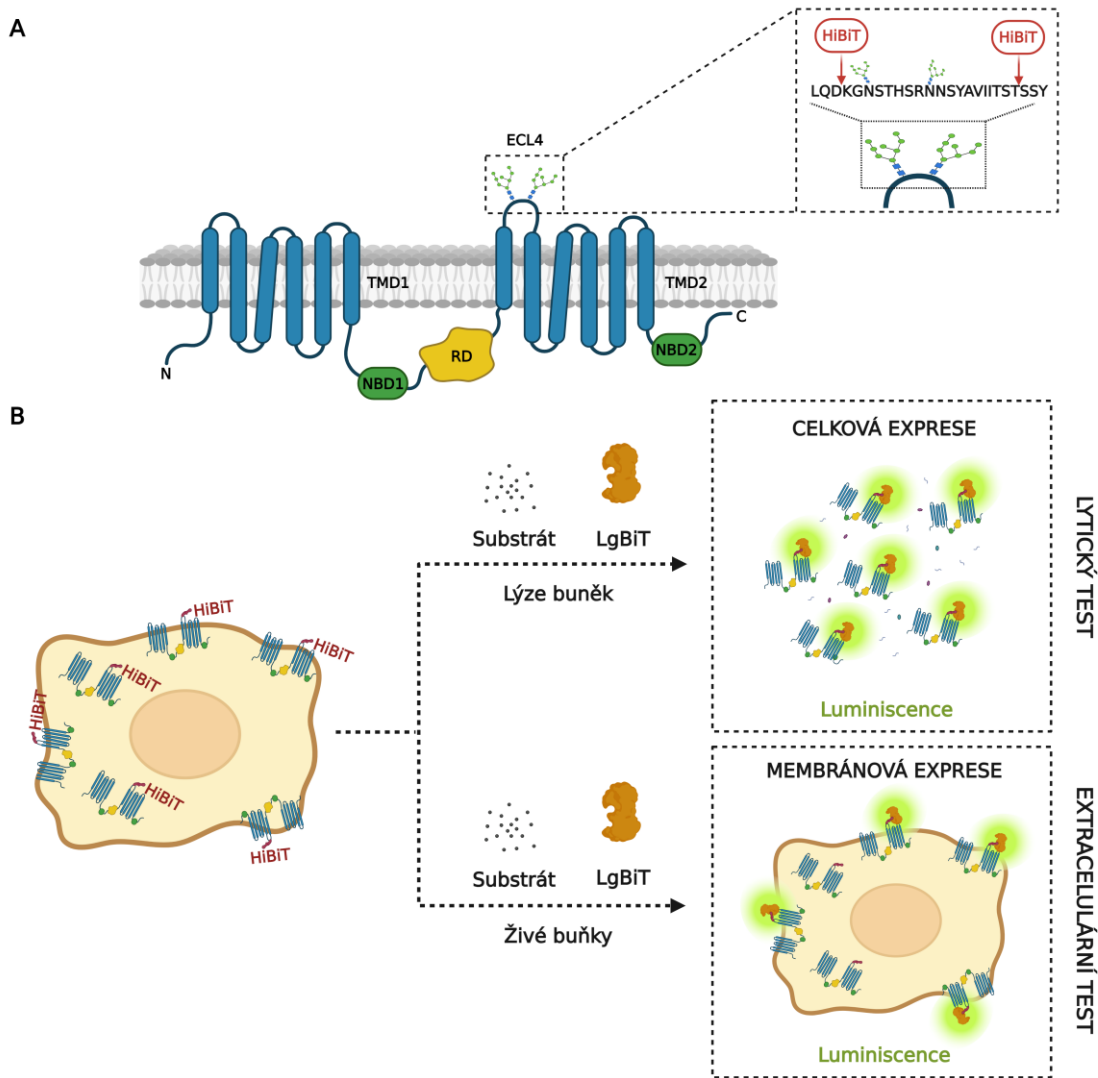
5. VÝSLEDKY

5.1. Cíl 1: Příprava linie exprimující WT-CFTR značený HiBiT značkou

Cílem bylo připravit a validovat bioluminiscenční metodu pro kvantifikaci a detekci membránové lokalizace endogenně exprimovaného CFTR divokého typu (WT-CFTR) pomocí kombinace CRISPR/Cas9 editace genomu (Cong *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2012) a komplementárního reportérového systému HiBiT/LgBiT (Schwinn *et al.*, 2018).

5.1.1. Návrh a princip detekčních systémů

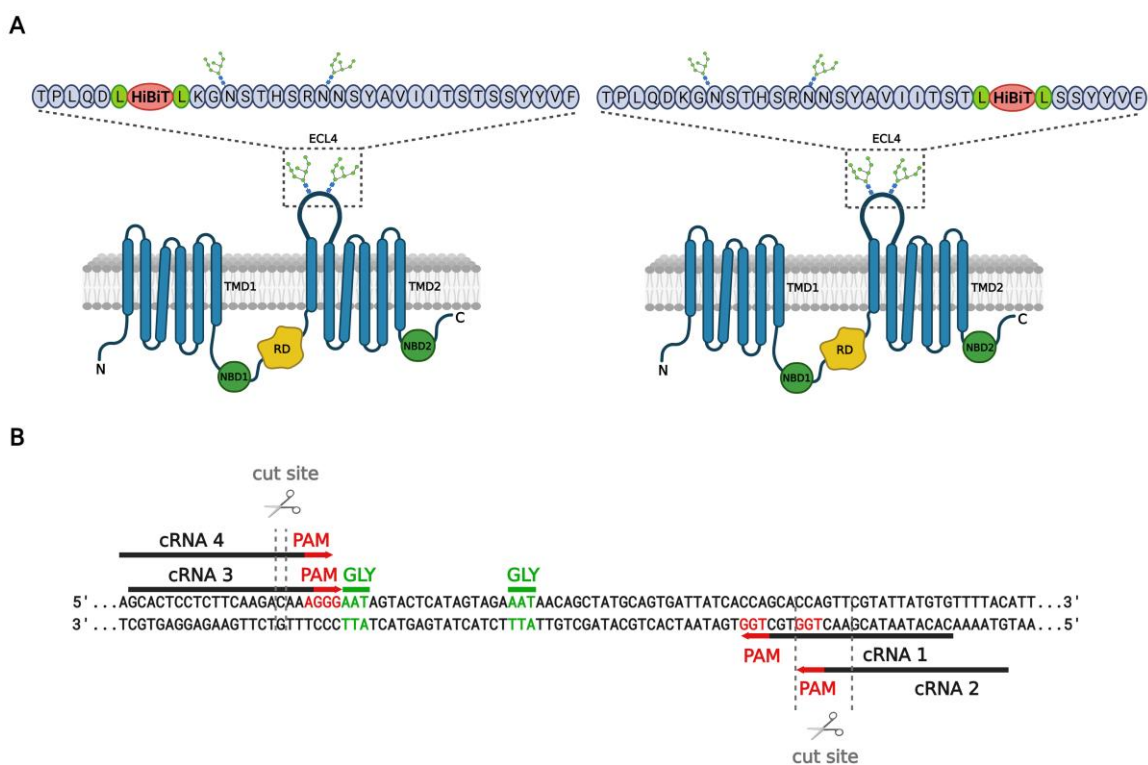
NanoBiT technologie (Dixon *et al.*, 2016) v kombinaci s CRISPR/Cas9 editací genomu byla využita k vytvoření nové bioluminiscenční metody pro celkovou kvantifikaci a detekci WT-CFTR v PM živých buněk. NanoBiT je unikátním fragmentovým komplementárním reportérem složeným ze dvou částí, HiBiT (1,3 kDa) a Large Bit (LgBiT; 18 kDa), odvozených z luciferázy NanoLuc. Pro CRISPR/Cas9 zprostředkované vložení HiBiT peptidické značky byly vybrány dvě potenciální pozice ve ECL4 WT-CFTR (**Obr. 17A**), které měly umožnit bioluminiscenční kvantifikaci jak celkové endogenní hladiny WT-CFTR (lytický test), tak detekci pouze WT-CFTR v PM živých buněk (extracelulární test). Při lytickém testu (**Obr. 17B**) byly buňky exprimující WT-CFTR-HiBiT lyzovány v pufru obsahujícím detergent v přítomnosti LgBiT a substrátu furimazinu. Následně byla detekována luminiscence. Naproti tomu při detekci WT-CFTR-HiBiT v PM živých buněk v extracelulárním testu (**Obr. 17B**), nebyl součástí reakčního pufru žádný detergent, tudíž byly detekovány pouze proteiny značené HiBiT nacházející se na povrchu buněk. Luminiscenční signál v obou testech byl úměrný množství CFTR značeného HiBiT v buněčném lyzátu nebo v PM buněk. Celkové reakční objemy byly optimalizovány pro 96jamkové a 384jamkové destičky pro optimální funkčnost testu v poměru 1:1; médium (bez FBS):Nano-Glo® činidlo pro lytický/extracelulární test s poměrem objemů 12,5 µl:12,5 µl pro 384jamkové a 50 µl:50 µl pro 96jamkové destičky.



Obrázek 17. Vývoj a princip detekčních systémů pro kvantifikaci celkového množství a membránovou detekci WT-CFTR. A) Dvě potenciální pozice HiBiT značky ve WT-CFTR. Schematická struktura CFTR domén: dvě transmembránové domény (TMD1 a 2), dvě domény vázající nukleotidy (NBD1 a 2) a regulační doména (RD). Detail 4. extracelulární smyčky (ECL4) zobrazující vložení značky HiBiT pomocí CRISPR/Cas9 do dvou různých míst, před nebo za glykosylačními místy v ECL4 WT-CFTR. B) Princip detekčních metod. Kvantifikace celkové exprese WT-CFTR-HiBiT (lytický test) a detekce WT-CFTR-HiBiT v PM živých buněk (extracelulární test).

5.1.2. Návrh crRNA a ověření účinnosti Cas9/gRNA editace

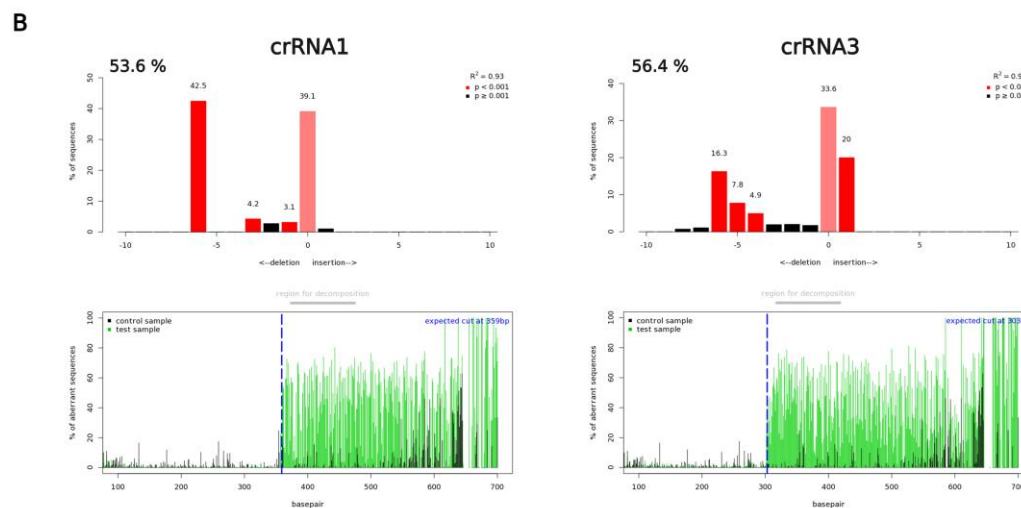
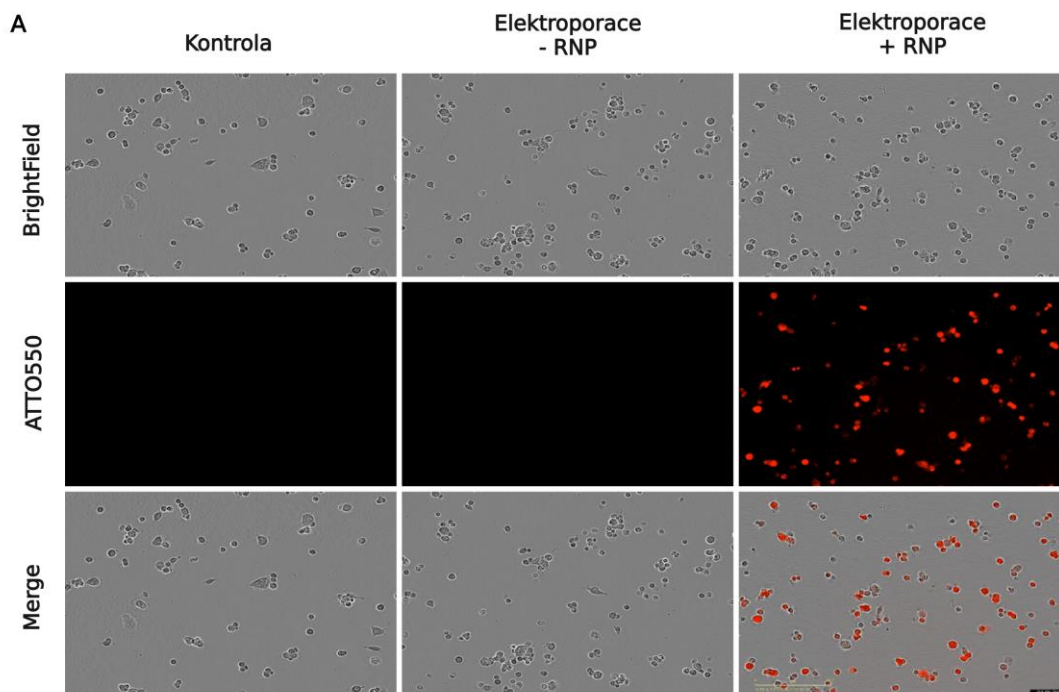
Dvě potenciální místa pro vložení HiBiT značky do struktury WT-CFTR byla vybrána na základě omezené dostupnosti sekvencí PAM (z anglického protospacer adjacent motif) v ECL4 (**Obr. 18A**). Tyto sekvence jsou nezbytné pro funkci Cas9. Byly navrženy čtyři různé CRISPR RNA (crRNA; **Obr. 18B**), které se nacházely přímo před sekvencemi PAM a cílily na oblast v *CFTR* kódující ECL4; lokus chr7: 117 603 509-117 603 625. crRNA1 a crRNA2 cílily na oblast za glykosylačními místy (GLY) v ECL4, zatímco crRNA3 a crRNA4 rozpoznávaly oblasti před GLY. Spolu s trans-aktivační CRISPR RNA (tracrRNA) specifickou pro Cas9, vytvořily tyto crRNA naváděcí RNA (gRNA).



Obrázek 18. Pozice HiBiT značky v ECL4 WT-CFTR a schematické znázornění sekvencí crRNA. A) Dvě možné varianty pozice HiBiT značky v ECL4. B) crRNA sekvence s vyznačenou PAM sekvencí červeně, glykosylačními místy (GLY) zeleně a místy štěpení DNA (cut site).

Účinnost transfekce buněk ribonukleoproteinovými (RNP) komplexy (Cas9:gRNA) za pomoci elektroporace byla ověřena fluorescenční mikroskopií 48 hodin po transfekci (**Obr. 19A**). Buňky 16HBE14o- (HBE) transfekované RNP komplexy vykazovaly pozitivní fluorescenční signál díky fluoroforu ATTO 550 (ex 561 nm; em 620 ± 35 nm) navázanému na tracrRNA, potvrzující úspěšnost elektroporace. Autofluorescence byla zanedbatelná jak v elektroporovaných buňkách bez RNP, tak v neelektroporovaných buňkách.

Pro přesnou analýzu editační účinnosti Cas9 endonukleázy, a tudíž pro výběr nejúčinnější crRNA, byly cílové oblasti v genomické DNA editovaných buněk analyzovány pomocí Sangerova sekvenování (72 hodin po transfekci) pro přítomnost oprav dvouvláknových DNA zlomů nehomologním spojováním konců (NHEJ). Pomocí online softwaru Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) (Brinkman *et al.*, 2014) byly crRNA1 a crRNA3 identifikovány jako nejlepší kandidáti pro další experimenty s 53,6% a 56,4% účinností editace cílových oblastí (**Obr. 19B**). Tyto crRNA byly dále použity pro vložení HiBiT značky pomocí mechanismu homologí řízené opravy (HDR). U obou crRNA byly inzerece/delece způsobené NHEJ nalezeny v blízkosti předpokládaného místa editace Cas9, tedy poblíž PAM sekvence.



Obrázek 19. Validace elektroporace a ověření účinnosti Cas9/gRNA editace.

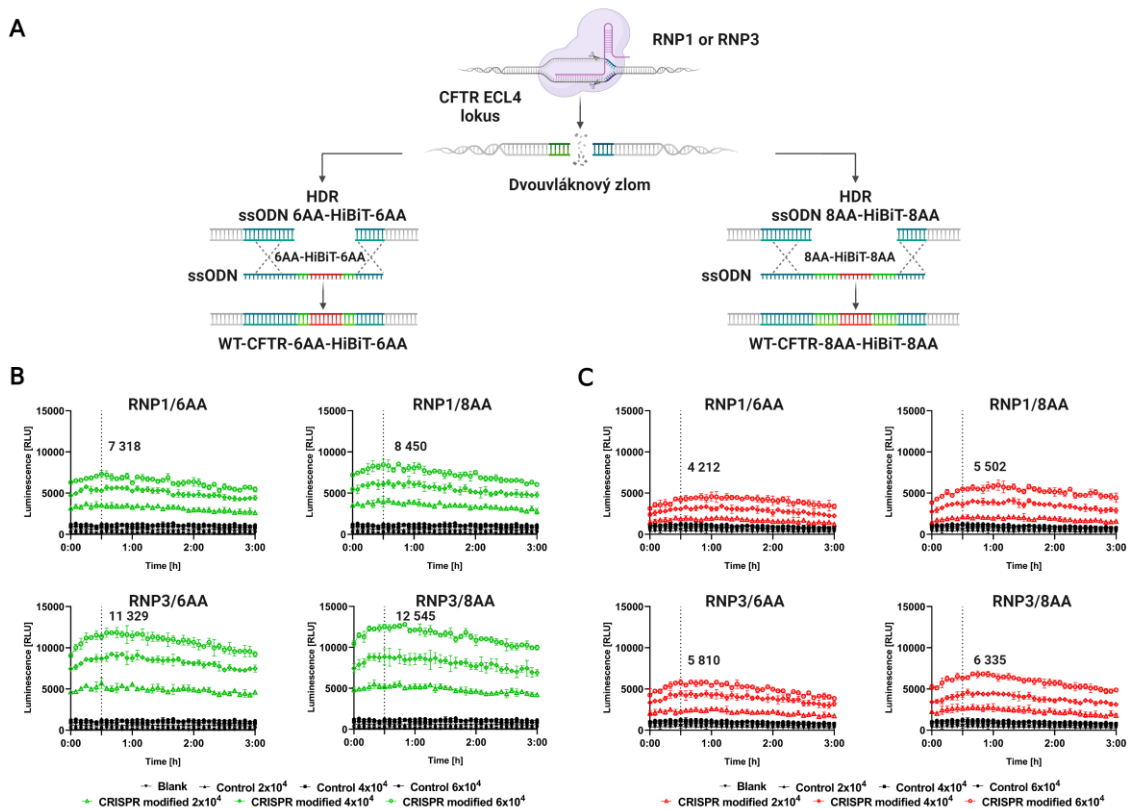
A) Účinnost transfekce buněk RNP komplexu (Cas9:crRNA:tracrRNA) byla ověřena fluorescenční mikroskopií 48 hodin po transfekci. Fluorescenční signál RNP komplexů (ATTO550) po jejich elektroporaci do buněk, BrightField - mikroskopie ve světlém poli, Merge – spojení ATTO550 a BrightField, Kontrola – neelektroporované HBE buňky, Elektroporace – RNP - HBE buňky elektroporované bez RNP, Elektroporace + RNP - HBE buňky elektroporované s RNP. **B)** Účinnost Cas9 genového editace v populaci editovaných

buněk analyzovaných pomocí online softwaru Tracking of Indels by Decomposition (TIDE; 72 hodin po transfekci).

5.1.3. HDR zprostředkované vložení HiBiT značky do ECL4

Pro vložení HiBiT značky do ECL4 byla provedena genová editaci HBE buněk pomocí dvou dříve ověřených RNP komplexů (RNP1 a RNP3) v přítomnosti syntetických donorových jednořetězcových oligodeoxynukleotidových (ssODN) fragmentů (**Obr. 20A**). Byl použit buď RNP1 komplex obsahující crRNA1, nebo komplex RNP3 s crRNA3, cílí do oblasti před nebo za GLY místy v ECL4. Dále byly testovány ssODN s 6 nebo 8 aminokyselinovými linkery (6AA nebo 8AA) na obou stranách sekvence HiBiT, specificky navržené pro jednotlivé RNP komplexy (**Obr. 20**). ssODN byly navrženy s asymetrickou délkou homologních ramen pro zvýšení účinnosti HDR (Richardson *et al.*, 2016) a se synonymními mutacemi v sekvenci PAM, pro zabránění opětovnému štěpení modifikovaného lokusu (**Tab. S1**).

Pro posouzení vlivu délky aminokyselinových linkerů na detekci HiBiT a stabilitu luminiscenčního signálu byl proveden lytický (**Obr. 20B**) a extracelulární (**Obr. 20C**) test 7 a 14 dní po modifikaci buněčné linie HBE (**Obr. 20B-C; Obr. S1**). Luminiscenční signál byl zaznamenáván po dobu 3 hodin z důvodů posouzení kinetických vlastností obou testů. Lytický i extracelulární test byl proveden s třemi různými množstvími buněk, aby se určil optimální počet buněk. V obou případech buněčné populace modifikované pomocí RNP1 nebo RNP3 za přítomnosti ssODN s 8AA linkery poskytovaly zvýšený signál ve srovnání s RNP a ssODN s 6AA linkery při lytickém (RNP1/8AA $8,5 \times 10^3$ RLU, RNP3/8AA $12,5 \times 10^3$ RLU; **Obr. 20B**) i extracelulárním testu (RNP1/8AA $5,5 \times 10^3$ RLU, RNP3/8AA $6,3 \times 10^3$ RLU; **Obr. 20C**). Nemodifikované buňky HBE (kontrola) měly nízké pozadí autoluminiscence $\sim 1 \times 10^3$ RLU jak při lytickém testu, tak i při extracelulárním testu $\sim 1,3 \times 10^3$ RLU, při nejvyšší testované koncentraci buněk. Na základě výše získaných výsledků byly vybrány pro další experimenty pouze ssODN s 8AA linkery.



Obrázek 20. Srovnání ssODN s 6AA a 8AA linkery pro vložení HiBiT značky.

A) Schéma HDR zprostředkovaného vložení HiBiT značky s 6AA nebo 8AA linkery.

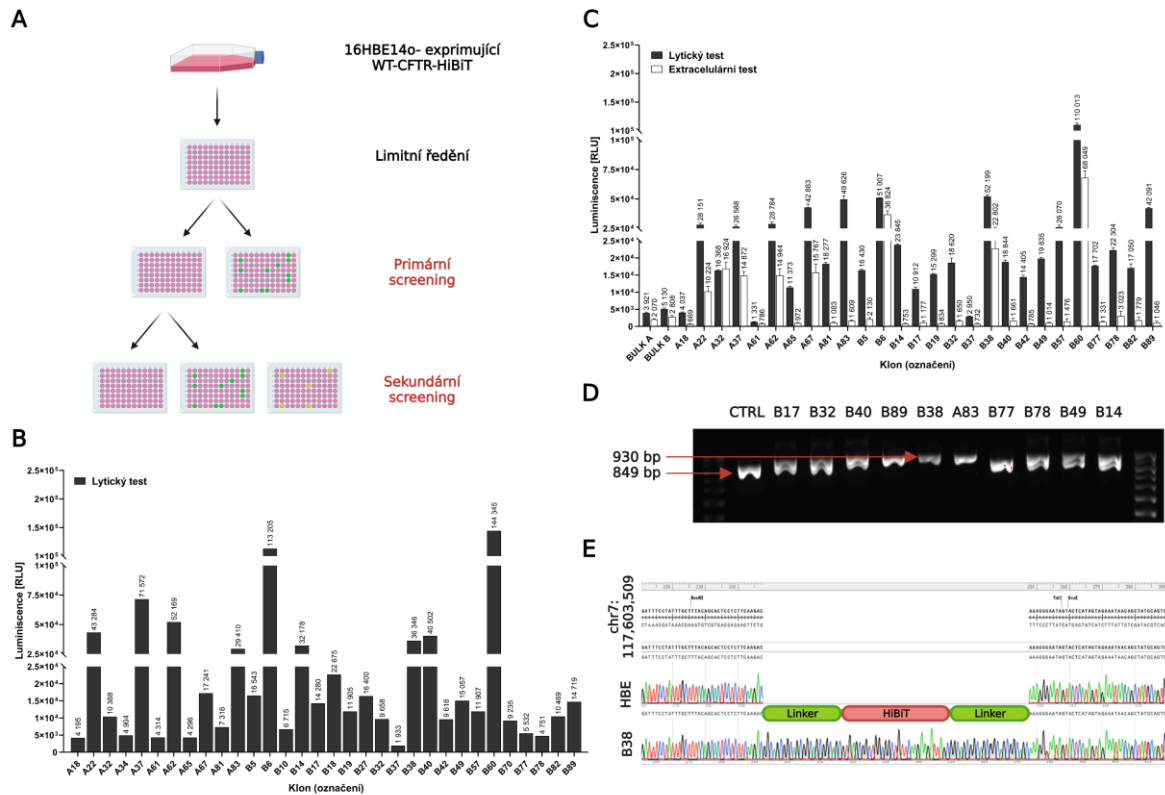
B) Lytický test a **C)** Extracelulární test 7 dní po transfekci buněk. Byly testovány tři různé koncentrace buněk (2×10^3 , 4×10^3 a 6×10^3). Zvýrazněná čísla v grafech představují signál pro nejvyšší koncentraci buněk po 30 minutách (průměr \pm SD, $n=3$, technická opakování). Blank - pozadí lytického/extracelulárního testu bez přítomnosti buněk, Control = nemodifikované buňky HBE, CRISPR modified – buňky modifikované RNP komplexy a ssODN s různou délkou aminokyselinových linkerů.

5.1.4. Příprava monoklonálních buněčných linií

K přípravě monoklonálních buněčných linií z buněk editovaných RNP1/8AA, nebo RNP3/8AA ssODN bylo použito limitní ředění (**Obr. 21A**). Ze 182 testovaných klonů v primárním screeningu (91 A-klonů, připraveny pomocí RNP1/8AA; 91 B-klonů, připraveny pomocí RNP3/8AA) bylo identifikováno 32 HiBiT pozitivních klonů (10 A-klonů a 22 B-klonů) s různou úrovní luminiscence (**Obr. 21B**). V sekundárním screeningu bylo znovu otestováno 27 z celkových 32 identifikovaných HiBiT pozitivních klonů (**Obr. 21C**), k potvrzení HiBiT positivity z primárního screeningu a identifikaci takových klonů, které navíc exprimují WT-CFTR-HiBiT i v PM. Zbylých 5 klonů bylo kvůli bakteriální kontaminaci vyřazeno. Všechny identifikované pozitivní klony z primárního screeningu byly pozitivní i v sekundárním screeningu, avšak současně mělo i v extracelulárním testu pouze osm klonů (A22, A32, A37, A62, A67, B6, B38, B60) signifikantně vyšší signály než nemodifikované HBE buňky (**Obr. 21C**).

Dále pak byla k identifikaci homozygotních klonů, nesoucích HiBiT značku, použita genotypizace pomocí PCR a separace PCR produktů gelovou elektroforézou (**Obr. 21D**). Heterozygoti byli zastoupeni dvěma bandy (849 bp a 930 bp) odpovídajícími needitované a editované alele (+81 bp) *WT-CFTR*. Naopak u homozygotních klonů byl detekován pouze jeden band (930 bp). Celkem bylo identifikováno 9 homozygotů z 27 testovaných klonů (A22, A65, A67, A83, B38, B42, B57, B60, B89). Cílová oblast pro vložení HiBiT značky u homozygotních klonů, které rovněž generovaly luminiscenci při extracelulární testu (8 klonů), byla osekvenována pro ověření správné pozice HiBiT značky. Takto byly identifikovány 3 klony (A22, A67 a B38) se správným vložением HiBiT sekvence s 8AA linkery; příklad je znázorněn na **Obr. 21E** (klon B38).

Vzhledem k tomu, že klon A67 během další kultivace ztratil své fenotypové vlastnosti, byly pomocí Sangerova sekvenování analyzovány potenciální CRISPR/Cas9 nespecifické efekty pouze u klonů A22 a B38 (**Tab. S2**). Ani u jednoho z těchto dvou klonů nebyly zjištěny žádné odchylky při srovnání s nemodifikovanými HBE buňkami (**Obr. 22A-B**).

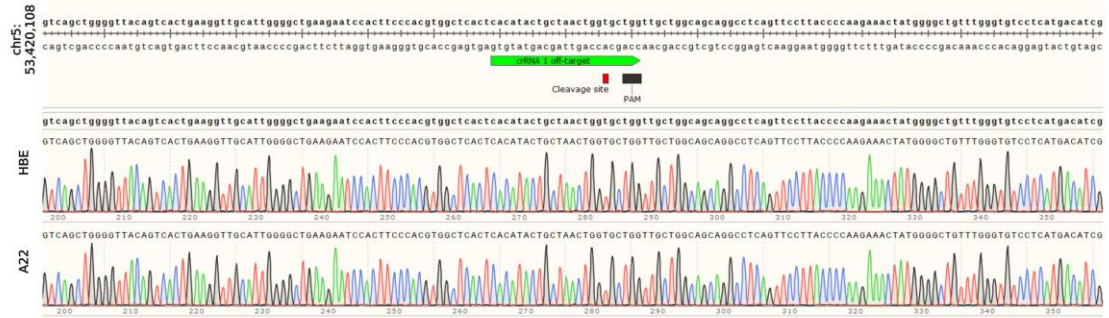


Obrázek 21. Vývoj monoklonálních buněčných linií exprimujících WT-CFTR-HiBiT a ověření správné pozice vložení HiBiT značky. **A)** Pracovní postup použitý pro identifikaci WT-CFTR-HiBiT pozitivních klonů. Buněčné populace modifikované pomocí RNP1/8AA, nebo RNP3/8AA ssODN byly použity pro limitní ředění k získání monoklonálních buněčných linií, které byly dále otestovány v primárním a sekundárním screeningu. **B)** Primární screening. Lytický test byl použit k detekci HiBiT pozitivních klonů. **C)** Sekundární screening. Pozitivní klony z primárního screeningu byly znovu otestovány pomocí lytického a nově i extracelulárního testu pro detekci jak celkové, tak membránové exprese WT-CFTR-HiBiT (průměr ± SD, n=3, technická opakování). **D)** PCR genotypizace. Reprezentativní obrázek separace PCR produktů při gelové elektroforéze. Heterozygoti jsou zastoupeni dvěma bandy (849 bp a 930 bp) a homozygoti pouze jedním (930 bp). CTRL = nemodifikované HBE buňky (849 bp). **E)** Sangerovo sekvenování. Chromatogram klonu B38 ve srovnání s parentálními nemodifikovanými HBE buňkami a referenční genomickou sekvencí *CFTR*.

A



B



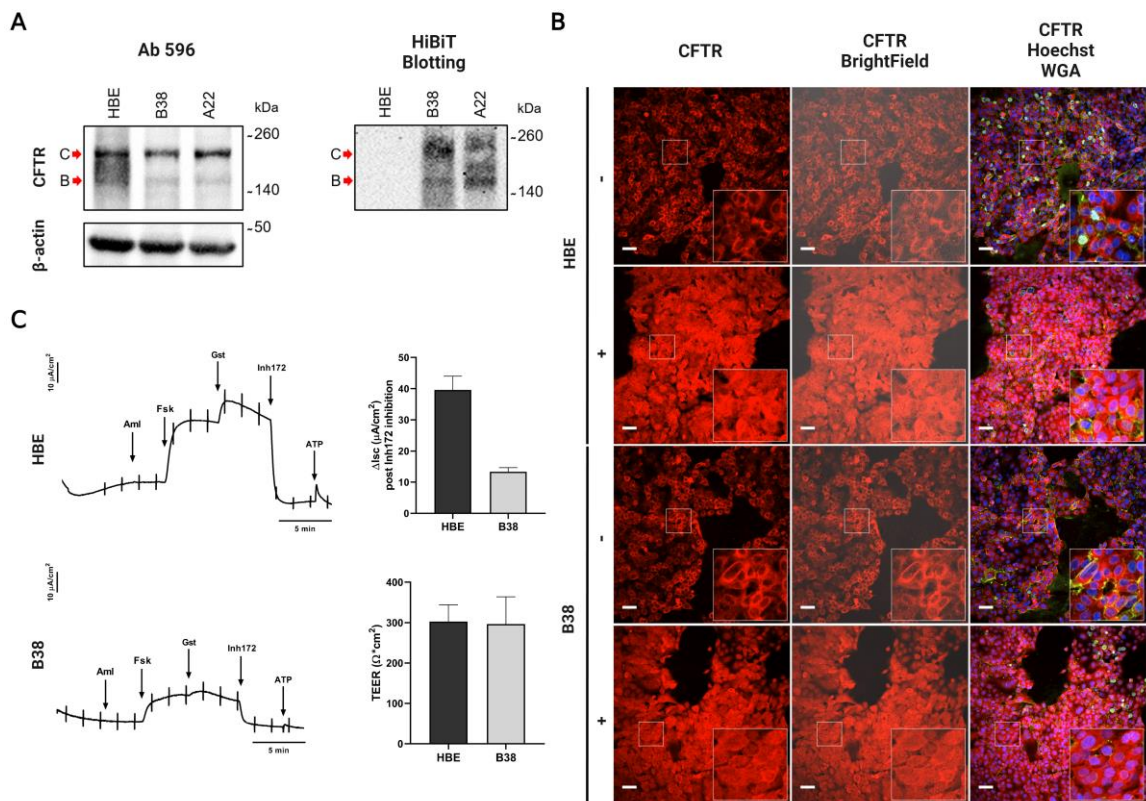
Obrázek 22. Reprezentativní chromatogramy CRISPR/Cas9 nespecifických štěpných míst. A) Klon B38 a B) klon A22 byly analyzovány na přítomnost potenciálních CRISPR/Cas9 nespecifických efektů, jak je blíže popsáno v **Tabulce S2**, pomocí Sangerova sekvenování. Pro nespecifické místo v pozici chr5:166,841,613 byl u HBE a klonu B38 zjištěn identický signál v pozadí chromatogramů. Návrh primerů bez generování nespecifických PCR produktů se ukázal jako náročný vzhledem k umístění tohoto nespecifického místa v nekódující oblasti. Cleavage site = dvouřetězcový zlom DNA způsobený Cas9 endonukleázou.

5.1.5. Ověření správné glykosylace, lokalizace a funkce WT-CFTR-HiBiT

Vliv vložení HiBiT značky na expresi a glykosylaci WT-CFTR, byl evaluován pomocí Western blottingu (WB) a HiBiT blottingu (HB). Stejně jako u parentální nemodifikované linie HBE, byl u obou klonů (A22, B38) při WB detekován jak CFTR band C (~ 170 kDa, kompletně glykosylovaný CFTR) tak i band B (~ 150 kDa, částečně glykosylovaný CFTR přítomný v ER) (**Obr. 23A**). Nicméně, u obou klonů byla zjištěna nižší celková exprese CFTR. Zatímco HB analýza odhalila další band v blízkosti bandu B u klonu A22, klon B38 nevykazoval žádné další aberantní bandy při HB ani WB analýze (**Obr. 23A**), což potvrzuje specifické vložení a expresi HiBiT značky výhradně ve WT-CFTR, stejně jako nezměněnou glykosylaci WT-CFTR-HiBiT.

Dále byla správná lokalizace WT-CFTR-HiBiT potvrzena pomocí imunofluorescenční detekce (IF) s využitím konfokální mikroskopie. Lokalizace WT-CFTR-HiBiT u klonu B38 byla porovnána s WT-CFTR v parentálních HBE buňkách pomocí IF s permeabilizací buněk nebo bez ní (**Obr. 23B**). Monoklonální protilátka použitá pro IF se vážala na epitop v 1. extracelulární smyčce (ECL1) CFTR, což umožnilo nejen detekci celkového CFTR po permeabilizaci buněk, ale také detekci pouze membránového CFTR, v případě, kdy buňky nebyly permeabilizovány. U buněk bez permeabilizace bylo pozorováno neměnné membránové barvení při srovnání WT-CFTR-HiBiT a WT-CFTR. U buněk po permeabilizaci byla v obou případech pozorována obdobná vyšší úroveň imunofluorescenčního signálu odpovídající součtu obarveného CFTR v PM a cytoplazmě (**Obr. 23B**).

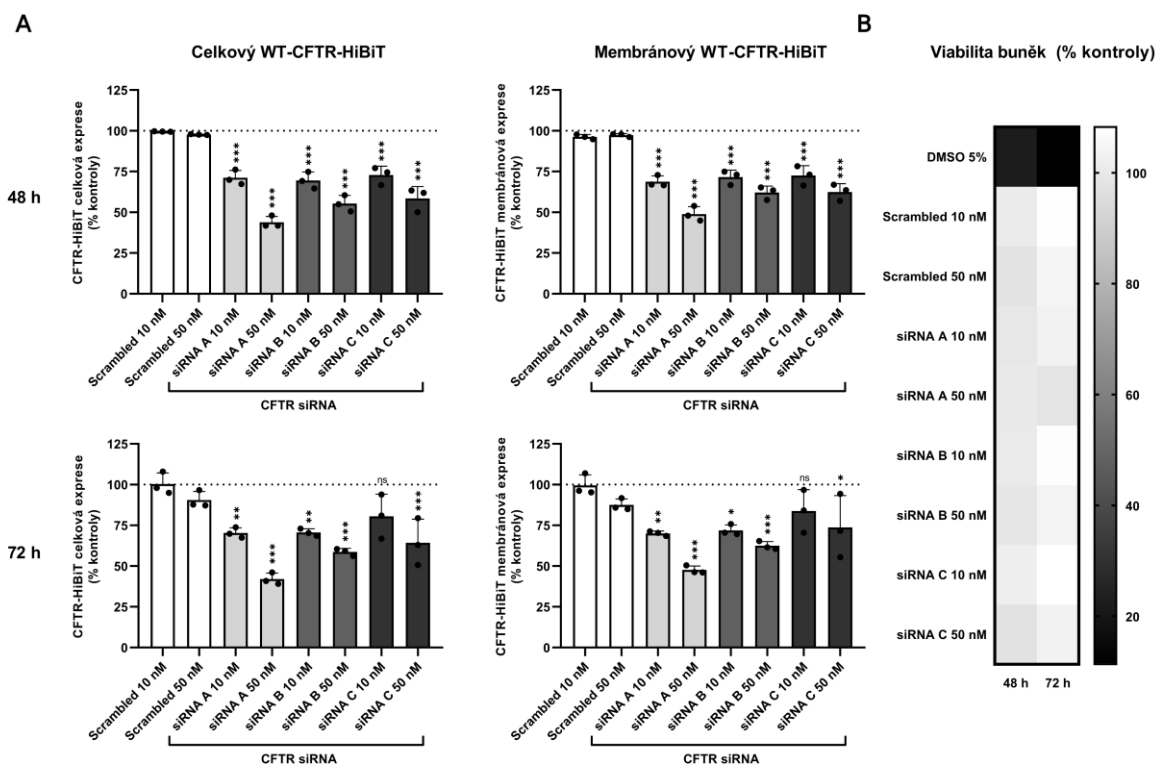
Pro ověření správné funkce WT-CFTR-HiBiT jako Cl⁻ iontového kanálu bylo provedeno elektrofyziologické měření v Ussing chamber. Nejprve byl přidán amilorid, aby se zajistilo, že absorpce sodíku nepřispívá k měření iontového proudu (I_{SC}). Postupné přidání forskolinu a genisteinu způsobilo maximální aktivaci CFTR v apikální membráně buněčné monovrstvy, čímž došlo ke zvýšení I_{SC}. Inhibitor CFTR_{Inh-172} (Inh172) snížil I_{SC} na výchozí hodnotu a odhalil tak celkový podíl CFTR na naměřeném I_{SC} (ΔI_{SC}). Toto snížení bylo použito ke kvantifikaci aktivity CFTR (**Obr. 23C**). Ačkoli ΔI_{SC} zaznamenaný u klonu B38 byl nižší než u HBE, B38 klon stále vykazoval adekvátní odpověď na aktivátor CFTR (forskolin) a na inhibitor (Inh172); reprezentativní křivky měření jsou znázorněny na **Obr. 23C**. Měřením transepiteliálního elektrického odporu (TEER; **Obr. 23C**) se dále potvrdilo, že žádné z monovrstev neobsahovaly ve své struktuře trhliny, byly tedy pro volný pohyb iontů nepropustné. Do analýzy byly zahrnuty pouze monovrstvy s TEER $\geq 200 \Omega \times \text{cm}^2$. Celkově vzato, tyto výsledky prokázaly, že vložení HiBiT značky před GLY do ECL4 nenarušilo glykosylaci, lokalizaci ani funkci WT-CFTR u klonu B38.



Obrázek 23. Validace klonů. **A)** Western a HiBiT blotting. WB imunoblot s protilátkou 596 proti NBD2 doméně CFTR. Band C označuje plně glykosylovanou formu WT-CFTR ~ 170 kDa a band B částečně glykosylovanou formu ~ 150 kDa. **B)** Imunocytochemie. Detekce CFTR pomocí konfokální mikroskopie v buňkách HBE a B38 (objektiv 20 \times). Buňky inkubovány s protilátkou TJA9 anti-CFTR proti ECL1 CFTR a následně se sekundární protilátkou konjugovanou s Alexa 647 (CFTR, červená). Jádra obarvena Hoechst 33342 (modře) a PM aglutininem z pšeničných klíčků (WGA; zeleně). Zvětšení 3 \times pro vložené čtverce (faktor zvětšení). Měřítko 50 μm . **C)** Měření iontového proudu – Ussing chamber. Iontový proud byl zaznamenán po expozici amiloridu (Aml; 100 μM), forskolinu (Fsk; 10 μM), genisteinu (Gst; 50 μM), adenosintrifosfátu (ATP; 10 μM) a inhibitoru CFTR^{Inh-172} (Inh172; 10 μM). Maximální iontový proud (ΔI_{SC}) byl vypočten z rozdílu po aktivaci CFTR (Fsk, Gst) a inhibici (Inh172). Do analýzy byly zahrnuty pouze monovrstvy buněk s TEER $\geq 200 \Omega \times \text{cm}^2$. V grafech je znázorněna průměrná hodnota ΔI_{SC} se SD. Všechny experimenty byly provedeny ve třech nezávislých biologických opakováních (n=3).

5.1.6. Detekce snížení exprese CFTR

Pro potvrzení schopnosti lytického a extracelulárního testu kvantifikovat změny v celkovém a membránovém množství WT-CFTR, byly použity tři unikátní malé interferující RNA (siRNA) ke snížení hladiny CFTR. Po 48 a 72 hodinovém ovlivnění klonu B38 těmito siRNA bylo detekováno signifikantní snížení CFTR pomocí lytického i extracelulárního testu. Maximální snížení exprese CFTR bylo pozorováno u buněk transfekovaných siRNA A po 72 hodinách. Konkrétně u buněk transfekovaných 50nM siRNA A bylo zjištěno 58% snížení v lytickém ($p < 0,001$; **Obr. 24A**) a 52% snížení v extracelulárním testu ($p < 0,001$; **Obr. 24A**) při srovnání s neošetřenými buňkami. Mezi neošetřenými buňkami a buňkami transfekovanými kontrolní siRNA (Scrambled) nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl. K vyloučení možných cytotoxických účinků siRNA, které by mohly falešně ovlivnit úroveň luminiscence, byl proveden test viability buněk (MTS). Pro MTS test byl klon B38 ošetřen siRNA stejným způsobem souběžně s lytickým a extracelulárním testem. MTS neodhalilo žádný významný vliv siRNA na životaschopnost buněk (**Obr. 24B**). Souhrnně lze říci, že výsledky umlčování exprese CFTR pomocí siRNA, potvrdily schopnost lytického i extracelulárního testu kvantifikovat celkové množství WT-CFTR-HiBiT po lýzi buněk a lokalizaci WT-CFTR-HiBiT na povrchu živých buněk.

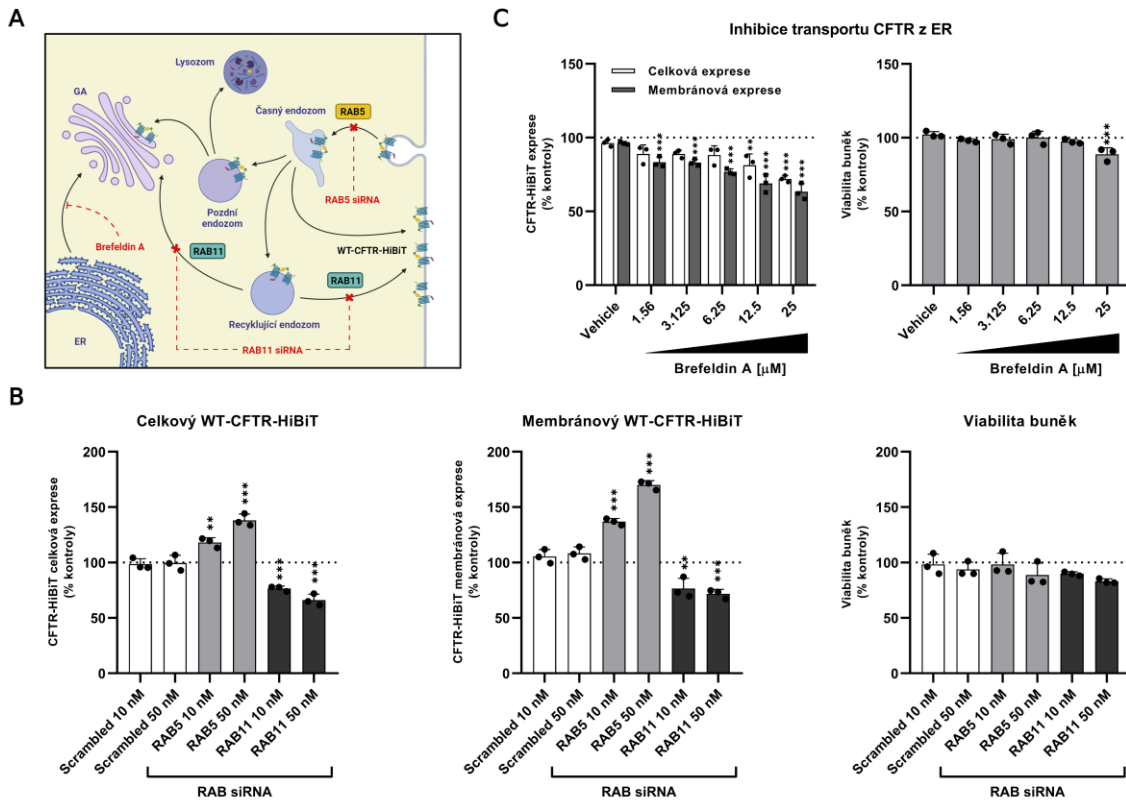


Obrázek 24. Detekce snížení CFTR exprese u klonu B38 pomocí siRNA. A) Lytický a extracelulární test po 48 a 72 hodinách působení siRNA. Luminiscenční signál měřen po 30 minutách v obou testech (průměr ± SD). **B)** Viabilita buněk. Účinek siRNA na životaschopnost buněk byl měřen pomocí MTS testu (průměr ± SD). Všechny experimenty byly provedeny ve třech nezávislých biologických opakováních (n = 9; technická opakování). p-hodnoty byly vypočteny pomocí jednocestné ANOVA-Tukey test, ns = nesignifikantní, *p ≤ 0,05, **p < 0,005, ***p < 0,001.

5.1.7. Monitorování endocytického transportu CFTR

Pro ověření využitelnosti luminiscenčních testů ke sledování transportu CFTR do a z PM, byly buňky B38 ošetřeny RAB5 a RAB11 siRNA, způsobující ovlivnění přirozeného endocytického cyklu CFTR (**Obr. 25A**). Po ošetření buněk RAB5 siRNA, bylo pozorováno výrazné zvýšení luminiscenčního signálu, odpovídající zvýšení celkového i membránového CFTR. Naproti tomu, ošetření RAB11 siRNA vedlo k poklesu signálu (**Obr. 25B**). Aplikace obou siRNA neměla žádný významný vliv na životaschopnost buněk. Dále byl evaluován vliv brefeldinu A, sloučeniny ovlivňující intracelulární transport proteinů

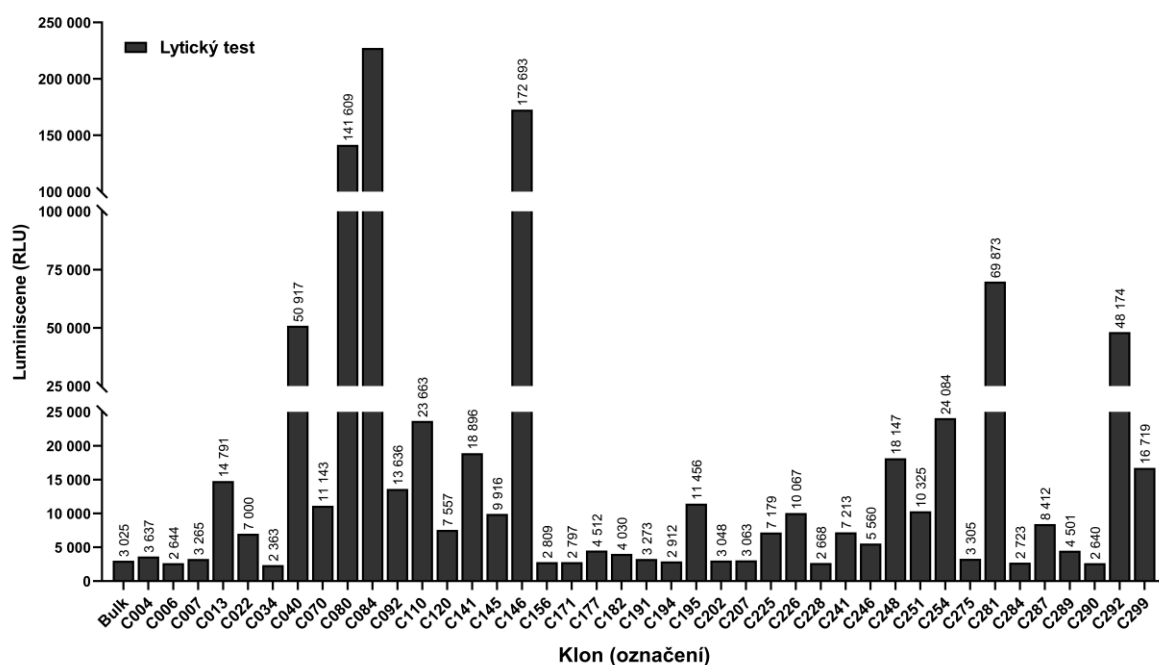
z endoplazmatického retikula (ER) do Golgiho aparátu (GA) (**Obr. 25A**). V tomto případě bylo pozorováno snížení hladiny CFTR v závislosti na dávce brefeldinu A, přičemž pouze u koncentrace 25 μM byl zaznamenán mírný cytotoxický účinek (**Obr. 25C**). Tyto výsledky v podstatě pevně potvrzují potenciál lytického a extracelulárního testu nejen při sledování celkové hladiny CFTR proteinu, ale také jejich užitečnost při sledování transportu a membránové lokalizace CFTR.



Obrázek 25. Modulace transportu CFTR. **A)** Schéma účinku RAB5, RAB11 siRNA a brefeldinu A na transport CFTR. **B)** RAB5 a RAB11 siRNA. Lytický a extracelulární test byl proveden po 48 hodinách od přidání siRNA k buňkám. **C)** Inhibice transportu proteinů z ER do GA. Lytický a extracelulární test byl proveden po 6 h od přidání brefeldinu A k buňkám. Vliv siRNA a brefeldinu A na životaschopnost buněk byl měřen pomocí MTS testu (průměr \pm SD). Luminiscenční signál byl měřen po 30 minutách (průměr \pm SD). Všechny experimenty byly provedeny ve třech nezávislých biologických opakováních ($n = 9$; technická opakování). p -hodnoty byly vypočteny pomocí jednocestné ANOVA-Tukey test, ns = nesignifikantní, * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$.

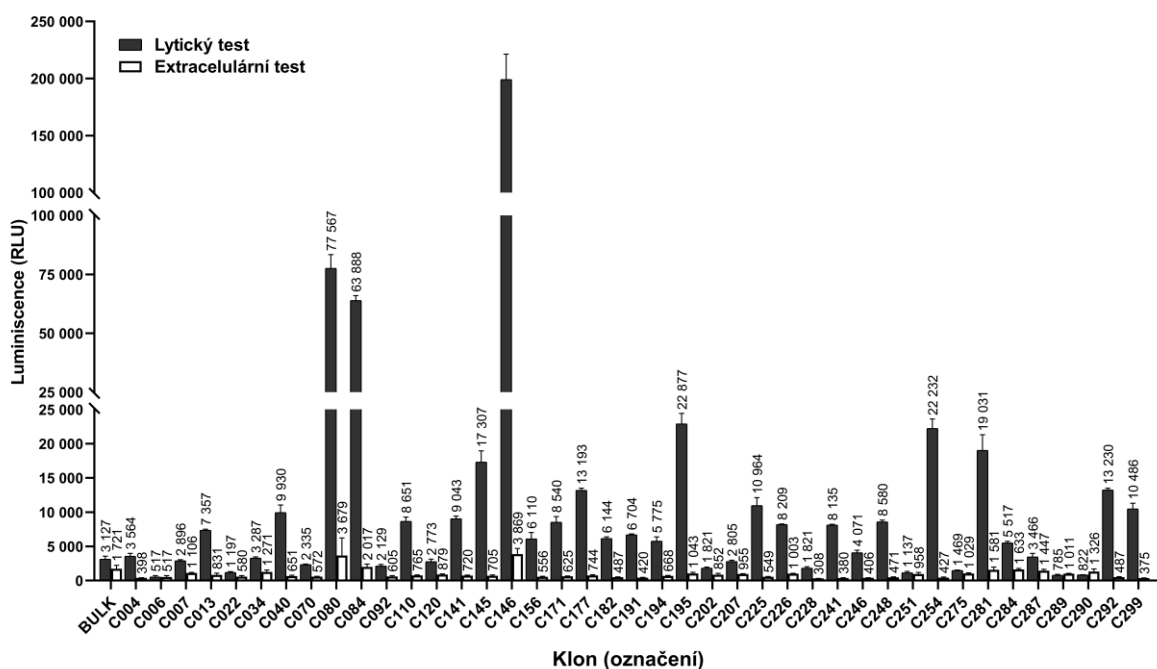
5.1.8. Značení Δ F508-CFTR HiBiT značkou

Pro vložení HiBiT značky do Δ F508-CFTR, exprimovaného buněčnou linií CFBE, byl použit optimalizovaný crRNA a ssODN design, uplatněný pro vytvoření klonu B38. Buňky modifikované RNP3/8AA ssODN byly použity pro limitní ředění k získání monoklonálních buněčných linií. Celkově bylo otestováno 319 klonů v primárním screeningu pro identifikaci HiBiT pozitivních klonů. Pomocí lytického testu bylo identifikováno 41 HiBiT pozitivních klonů (**Obr. 26**).

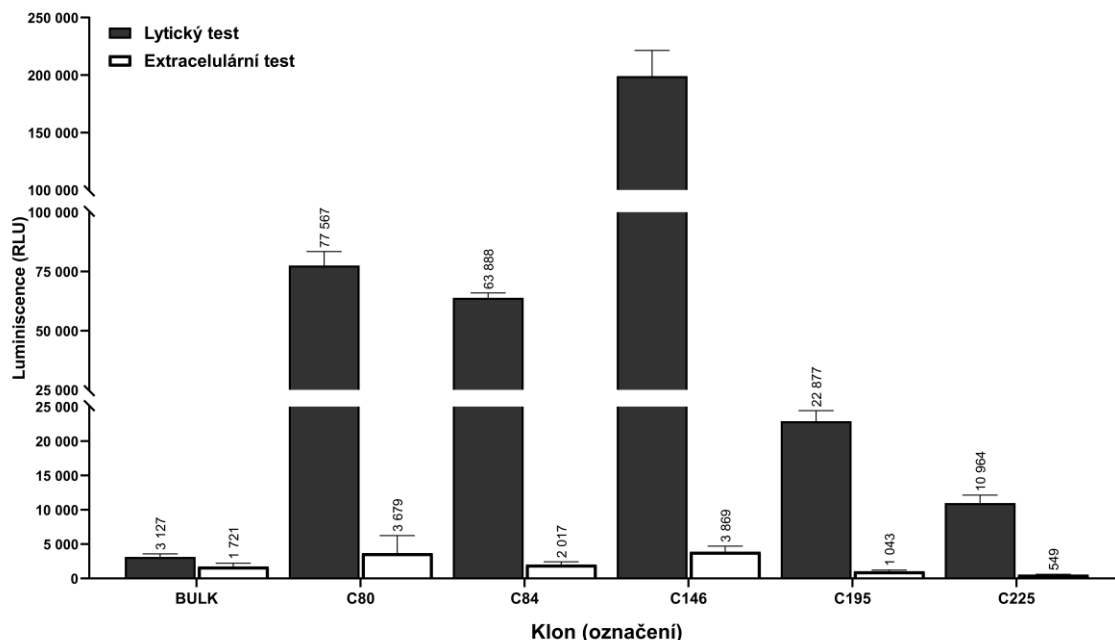


Obrázek 26. Primární screening pro identifikaci Δ F508-CFTR-HiBiT pozitivních klonů. CFBE buněčná linie modifikovaná pomocí RNP3/8AA ssODN byla použita pro limitní ředění k získání monoklonálních buněčných linií, které byly dále otestovány v primárním screeningu. Lytický test byl použit k detekci HiBiT pozitivních klonů.

V sekundárním screeningu byly znovu otestovány všechny identifikované klony k potvrzení HiBiT positivity z primárního screeningu a identifikaci takových klonů, které zároveň neexprimují $\Delta 508$ -CFTR-HiBiT v PM, nebo jej exprimují v minimálním množství. Většina identifikovaných pozitivních klonů z primárního screeningu byly pozitivní i v sekundárním screeningu (**Obr. 27**). Klony s RLU v rozmezí 1000 – 2000 v lytickém testu byly považovány za falešně pozitivní klony (C06, C022, C202, C228, C251, C275, C289, C290). Při extracelulárním testu žádný z klonů nevykazoval takový signál, který by odpovídal lokalizaci většího množství $\Delta F508$ -CFTR-HiBiT v PM. Pro další experimenty bylo vybráno 5 reprezentativních klonů (C080, C084, C146, C195, C225) s různou hladinou lytického signálu a minimálním signálem detekovaným v extracelulárním testu (**Obr. 28**).



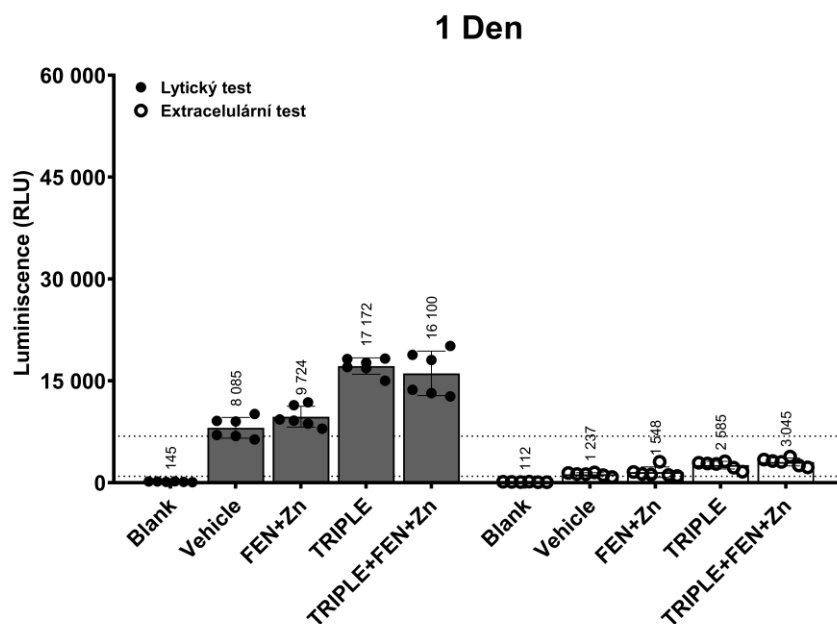
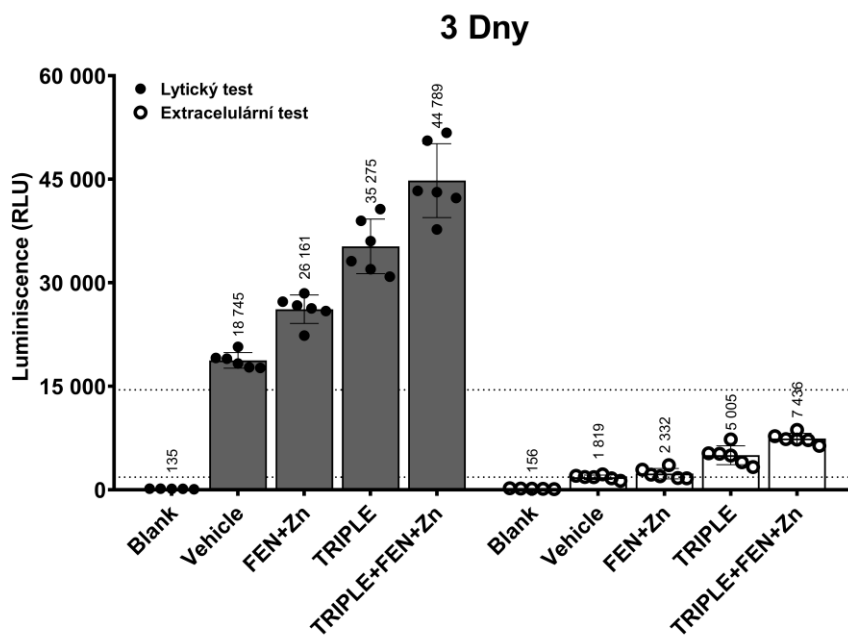
Obrázek 27. Sekundární screening $\Delta F508$ -CFTR-HiBiT pozitivních klonů. HiBiT pozitivní klony z primárního screeningu byly znovu otestovány, pomocí lytického a extracelulárního testu, pro detekci jak celkové, tak membránové exprese $\Delta F508$ -CFTR-HiBiT (průměr \pm SD, n=3, technická opakování).



Obrázek 28. Klony vybrané k testování CFTR modulátorů. Na základě různé úrovně signálu detekovaného v lytickém testu a v extracelulárním testu bylo vybráno 5 klonů pro detekci efektu CFTR modulátorů.

5.1.9. Detekce efektu CFTR modulátorů

K potvrzení schopnosti lytického a extracelulárního testu detekovat účinky modulátorů CFTR, bylo ošetřeno 5 vybraných klonů exprimujících $\Delta F508$ -CFTR-HiBiT trojkombinací CFTR modulátorů elexacaftor, tezacaftor, ivacaftor (ETI). Navíc byl otestován vliv syntetického derivátu vitamínu A (fenretinid, FEN) v kombinaci s ETI. Při aplikaci ETI byl efekt pozorován pouze u klonu C195 a C225. Jako příklad je uveden klon C195. V případě 1denní aplikace ETI došlo ke 100% navýšení signálu v lytickém testu a 146% navýšení v extracelulárním testu (**Obr. 29A**). Samotné přidání FEN nezpůsobilo signifikantní zvýšení signálu ani v jednom testu. U kombinace ETI a FEN také nebyl zaznamenán aditivní účinek FEN. Ovšem po 3denní aplikaci byl zaznamenán nejen účinek ETI při lytickém i extracelulárním testu, ale také aditivní účinek FEN při přidání k ETI (**Obr. 29B**).

A**B**

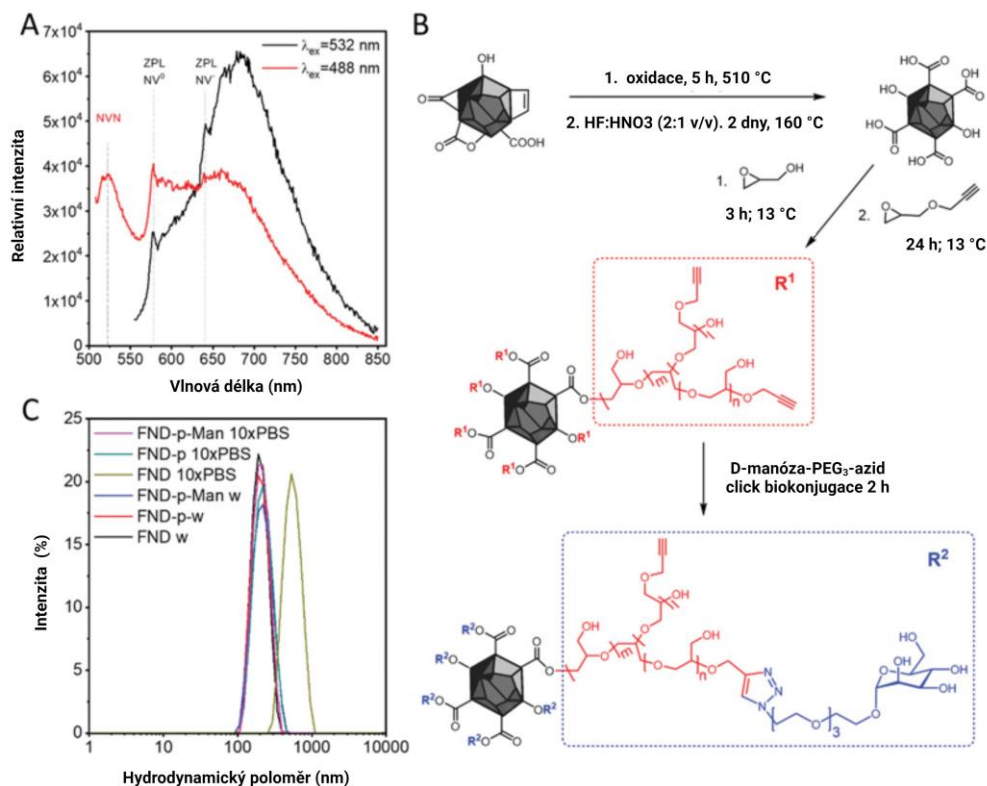
Obrázek 29. Detekce efektu ETI u klonu C225. Lytický a extracelulární test byl proveden po **A**) 1 dnu nebo **B**) 3 dnech od ošetření buněk klonu C195 exprimujícího Δ F508-CFTR-HiBiT. Luminiscenční signál byl měřen po 30 minutách (průměr \pm SD). Všechny experimenty byly provedeny ve dvou nezávislých biologických opakováních (n = 6; technická opakování).

5.2. Cíl 2: Vývoj systému pro monitorování fagocytární aktivity

Druhým cílem této disertační práce bylo vytvoření *in vitro* systému pro snadné monitorování fagocytární aktivity makrofágů za pomoci FND se speciální povrchovou úpravou. Tato speciální úprava umožnila připojení manózy na povrch FND (FND-p-Man). V důsledku toho by měly být takto modifikované FND specificky internalizovány pomocí manózového receptoru CD206 (MR) a následně vizualizovány/kvantifikovány pomocí konfokální mikroskopie.

5.2.1. Příprava a charakterizace FND-p/FND-p-Man

V prvním kroku přípravy FND-p/FND-p-Man, byly komerčně zakoupené polydispersní nanodiamanty (ND) podrobeny několika kolům diferenciální centrifugace pro separaci různých velikostních frakcí ND, 121 až 225 nm. Dále byla z takto připravených frakcí použita pouze frakce obsahující ND o velikosti ~ 200 nm. ND této frakce byly ozářeny vysokoenergetickými elektrony k vytvoření defektů ve struktuře ND a následně také oxidovány. Tyto defekty v struktuře ND, NV- centra (infračervená emise) a H3 centra (zelená emise), jsou zdrojem stabilní fluorescence, a proto bylo možné takto připravené FND fluorescenčně detekovat (**Obr. 30A**). Následně byla provedena koloidní stabilizace FND pomocí polymerace s glycidolem za vzniku polyglycerolové vrstvy (PG) na povrchu FND. PG vrstva FND byla dále modifikována glycidyl propargyl etherem pro zavedení trojných vazeb potřebných pro připojení manózy (FND-p). Pomocí mědi katalyzované azidoalkynové cykloadice byla připojena k FND-p α -D-manóza nesoucí hydrofilní flexibilní linker zakončený azidem za vzniku FND-p-Man (**Obr. 30B**). Pro otestování a srovnání koloidní stability nově vytvořených FND-p/FND-p-Man s FND byla použita metoda dynamického rozptylu světla (DLS), která byla využita ke sledování velikosti FND/FND-p/FND-p-Man ve vodě a také v extrémních podmínkách $10\times$ koncentrovaného pufru PBS (vysoká iontová síla). U FND-p ani FND-p-Man nebyla pozorována agregace, zatímco FND bez koloidní stabilizace vykazovaly rychlou agregaci při testovaných podmínkách (**Obr. 30C**).

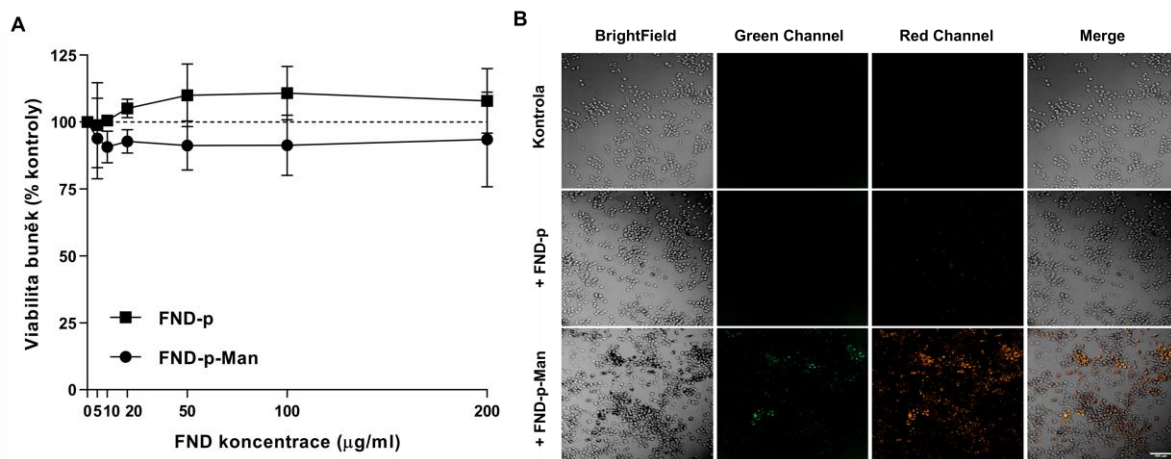


Obrázek 30. Příprava a charakterizace FND-p/FND-p-Man. **A)** Fotoluminiscenční spektra FND ukazující přítomnost NV⁻ i H3 center ve FND. **B)** Příprava FND, FND-p a FND-p-Man. Povrch 200nm FND byl oxidován a následně koloidně stabilizován polyglycerolovou vrstvou zakončenou alkynem, což umožnilo následnou click biokonjugaci CuAAC s manózou obsahující azid (FND-p-Man). **C)** Srovnání koloidních stabilit. Vzorky byly měřeny pomocí DLS ve vodě (w) a extrémním iontovém prostředí 10× koncentrovaného pufru PBS (10× PBS).

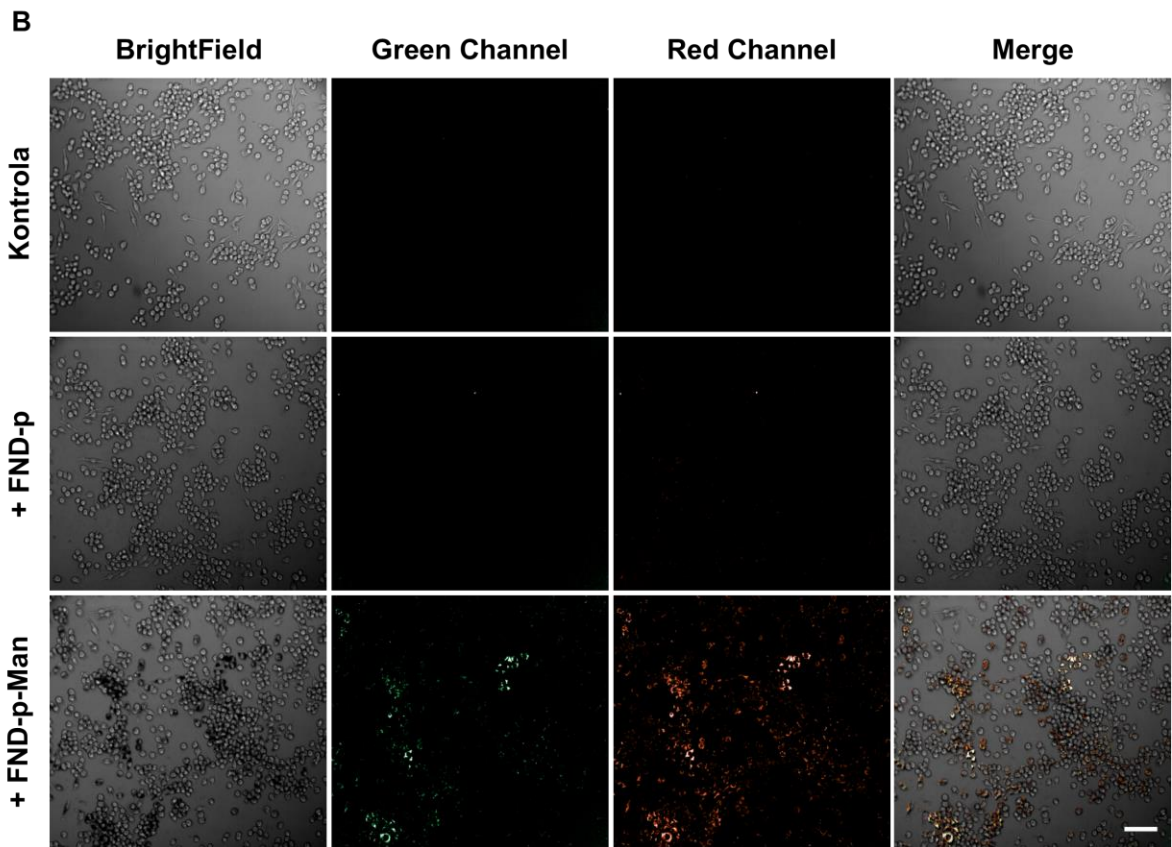
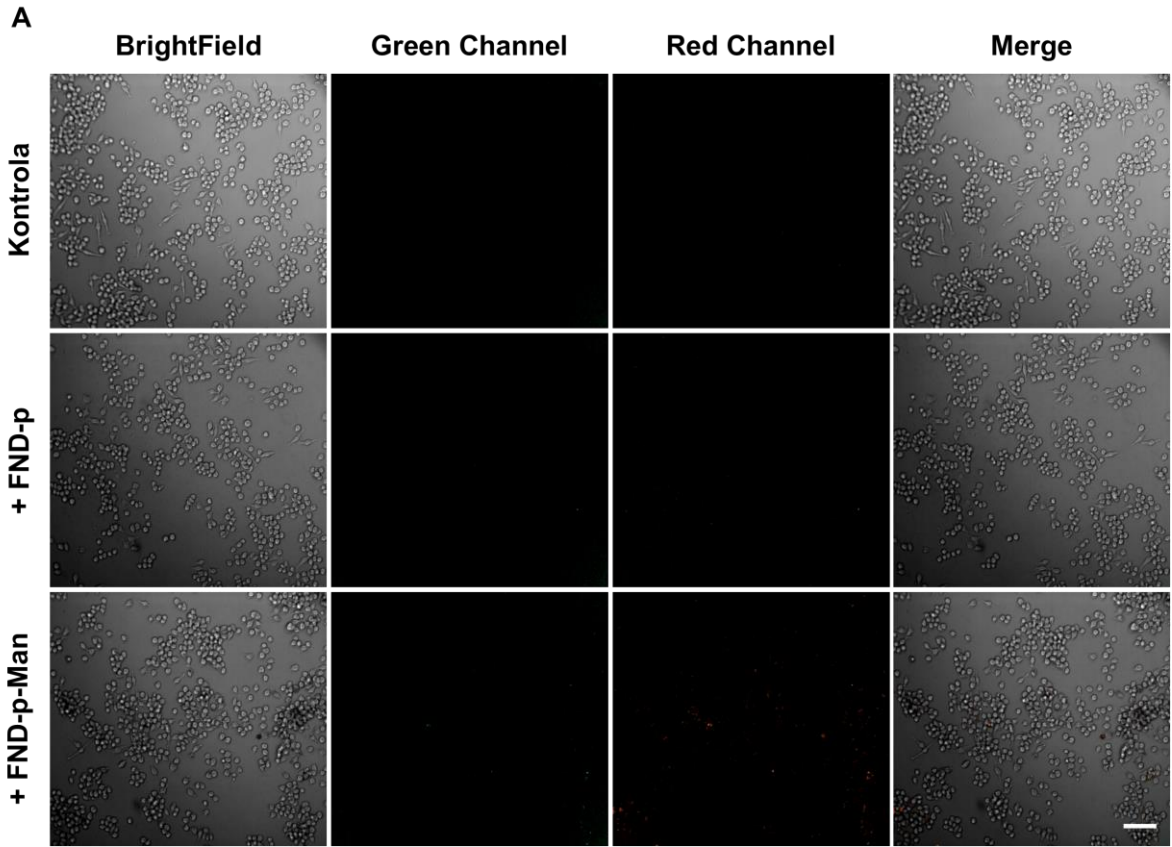
5.2.2. Viabilita buněk a duální zobrazování internalizace FND

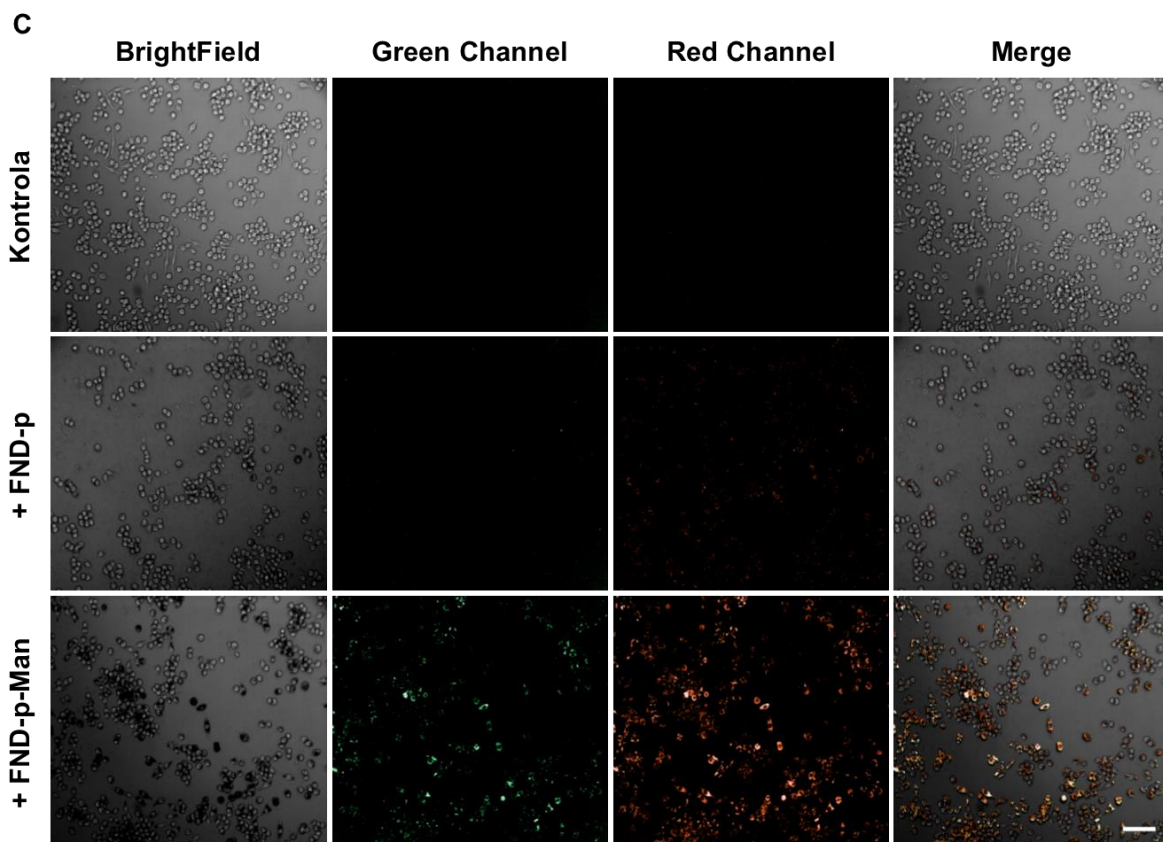
K vyloučení potenciální cytotoxicity FND-p/FND-p-Man byly buňky J774A.1 exprimující MR vystaveny různým koncentracím FND. Vyhodnocení výsledků MTS neodhalilo žádný významný vliv na životaschopnost buněk při koncentracích 5 - 200 $\mu\text{g/ml}$ FND-p/FND-p-Man po 24 hodinách inkubace, čímž byla potvrzena biokompatibilita připravených FND (**Obr. 31A**; **Tab. S3**).

Díky přítomnosti dvou typů bodových defektů ve struktuře FND, kterými jsou NV-centra (infračervená emise) a H3 centra (zelená emise), bylo možné pozorovat internalizaci FND při excitaci pomocí konfokální fluorescenční mikroskopie. Dále tedy byl otestován vliv manozylace na internalizaci FND právě na základě detekce fluorescenčního signálu v buňkách. Po 24 hodinách bylo skutečně pozorováno znatelné zvýšení internalizace FND-p-Man ve srovnání s FND-p (podrobná analýza internalizace FND je popsána v podkapitole 5.2.3 Internalizace FND v reálném čase). U námi připravených FND byla potvrzena dvoubarevná emise po internalizaci a akumulaci (10 $\mu\text{g/ml}$) při postupné excitaci dvěma různými lasery, poskytující tedy zelený (ex 488/em 540 \pm 20 nm) a červený (ex 561/em 620 \pm 35 nm) signál (**Obr. 31B**). Následně byla při testování zvyšující se koncentrace FND-p/FND-p-Man 5 - 20 $\mu\text{g/ml}$ (**Obr. 32A-C**) detekována rostoucí intenzita signálu v buňkách závislá na koncentracích FND.



Obrázek 31. Viabilita J774A.1 buněk a internalizace/dvoubarevná emise FND. **A)** Vliv FND na životaschopnost buněk byl ověřen pomocí MTS testu po 24hodinové expozici buněk různým koncentracím FND-p a FND-p-Man (0 - 200 µg/ml; průměr ± SD); p-hodnoty byly vypočteny pomocí jednocestné ANOVA - Dunnett test. **B)** Obrázky konfokální mikroskopie buněk J774A.1 ošetřených FND-p a FND-p-Man (oba 10 µg/ml) po 24 hodinách s duální emisí signálu, n = 3. BrightField - světelné pole; Green channel - zelený kanál ex 488/em 540 ± 20 nm, Red Channel - červený kanál, ex 561/em 620 ± 35 nm; Merge - sloučení všech kanálů. Měřítka: 100 µm.



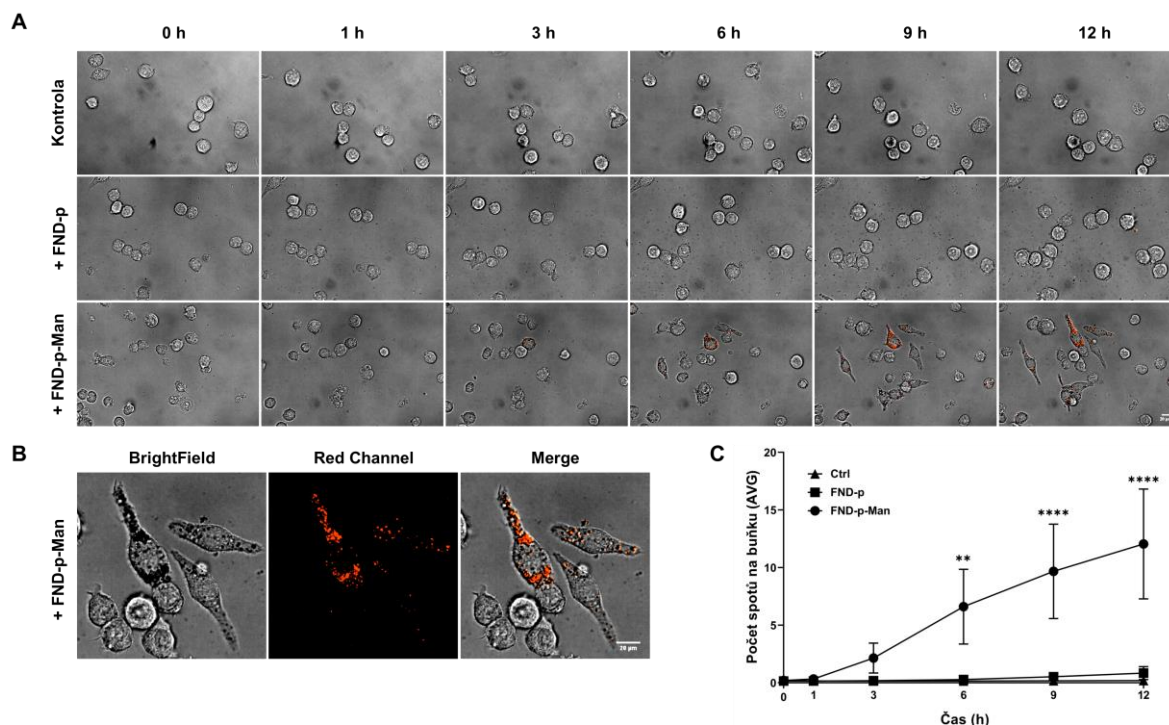


Obrázek 32. Výsledky konfokální mikroskopie buněk J774A.1 ošetřených třemi různými koncentracemi FND-p a FND-p-Man. A) 5 µg/ml B) 10 µg/ml a C) 20 µg/ml FND po 24 hodinách inkubace, n = 3. BrightField - světelné pole; Green channel - zelený kanál ex 488/em 540 ± 20 nm, Red Channel - červený kanál, ex 561/em 620 ± 35 nm; Merge - sloučení všech kanálů. Měřítko: 100 µm.

5.2.3. Internalizace FND v reálném čase

V následujících experimentech bylo sledováno pouze jedno (červené) ze dvou emisních spekter dostupných pro vizualizaci FND, potvrzených v předchozí kapitole. Pro kvantifikaci vlivu manozylace na internalizaci FND byly buňky J774A.1 ošetřeny FND-p nebo FND-p-Man (v obou případech koncentrace 10 µg/ml) a monitorovány po dobu 12 hodin. Signál (spot) detekovaný konfokální mikroskopií v červeném kanálu (em 620 ± 35 nm) představoval akumulaci FND-p nebo FND-p-Man v buňkách J774A.1 (**Obr. 33A-B**). Již po 3 hodinách inkubace byly detekovány spoty pro FND-p-Man, ale téměř žádné pro FND-p. Výsledky konfokální mikroskopie v živých buňkách prokázaly akumulaci

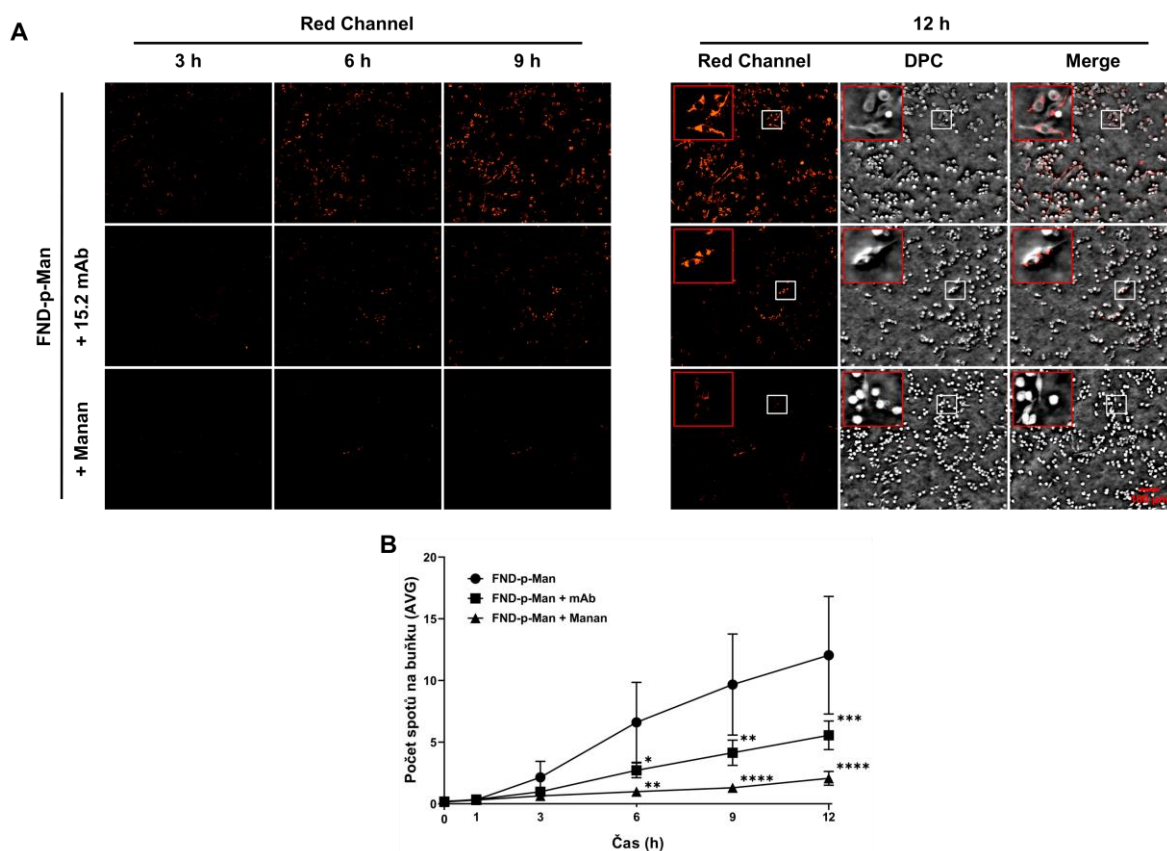
a významně lepší internalizaci po 6 h ($p = 0,002$), 9 h ($p < 0,0001$) a 12 h ($p < 0,0001$) pro FND-p-Man ve srovnání s FND-p. FND-p byly také internalizovány, ale výrazně pomaleji a počet detekovaných spotů byl velmi nízký, blížíci se pozadí experimentu. Průměrný počet spotů na buňku po 12 hodinách byl $12,05 \pm 4,77$ pro FND-p-Man, $0,84 \pm 0,57$ pro FND-p a $0,19 \pm 0,22$ pro kontrolní buňky (Obr. 33C; Tab. S4). Navíc nebyla pozorována žádná akumulace či agregace FND-p nebo FND-p-Man na PM buněk.



Obrázek 33. Internalizace FND-p a FND-p-Man v J774A.1 buňkách. **A)** Zobrazení internalizace FND-p a FND-p-Man v živých buňkách (obojí 10 $\mu\text{g/ml}$). **B)** Lokalizace FND-p-Man v J774A.1 buňkách po 12 h. **C)** Statistická analýza počtu spotů na buňku (průměr \pm SD) po internalizaci FND v průběhu času; $n = 3$. Bright Field - světelné pole; Red Channel - červený kanál, ex 561/em 620 \pm 35 nm; Merge - sloučení všech kanálů. p -hodnoty byly vypočteny pomocí dvoucestné ANOVA-Tukey test, $*p \leq 0,05$, $**p < 0,005$, $***p < 0,001$.

5.2.4. Inhibice internalizace FND-p-Man zprostředkované MR

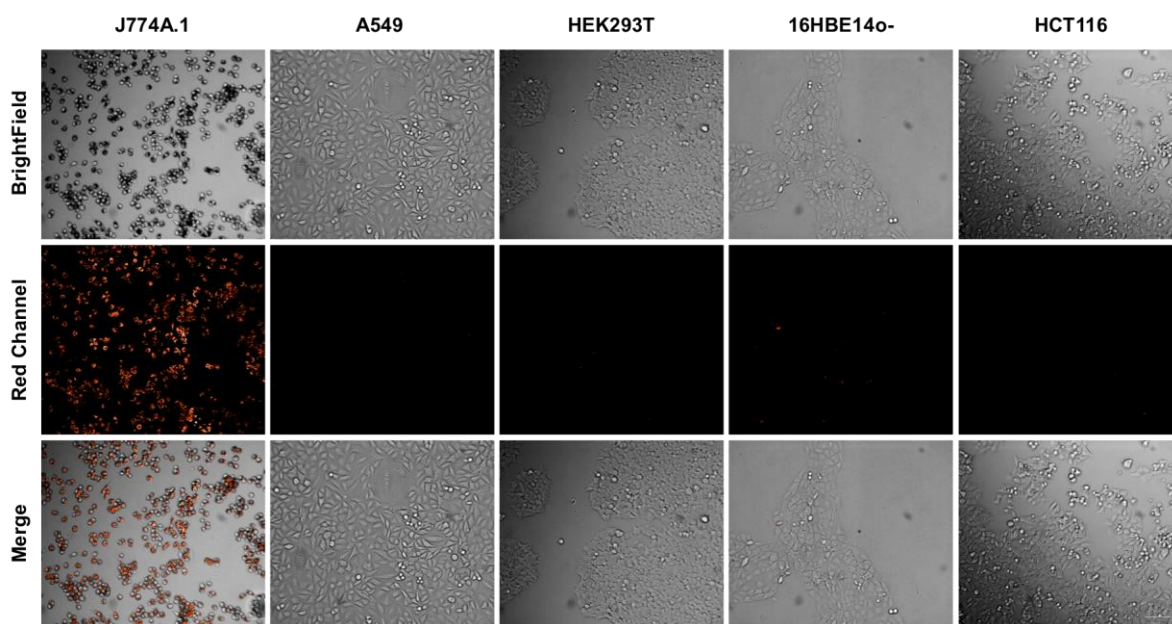
Pro potvrzení specifického účinku manózy na povrchu FND, byl navržen inhibiční test, který měl prokázat specificitu internalizace FND-p-Man pomocí MR. V tomto experimentu byl k buňkám přidán manan v koncentraci 1 mg/ml a anti-MR blokační protilátka 15.2 mAb v koncentraci 30 μ g/ml. Přítomnost jak mananu ($p = 0,0011$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$), tak blokační protilátky 15.2 mAb ($p = 0,0266$, $p = 0,0013$, $p = 0,0002$) vedla k významnému poklesu počtu spotů na buňku po 6-9-12 h od přidání FND-p-Man (**Obr. 34A-B; Tab. S5**). Celkově tedy analog manózy, manan, snížil průměrný počet spotů o ~ 83 % (detekováno $2,07 \pm 0,56$ spotů na buňku) a neutralizační protilátka 15.2 mAb o ~ 54 % (detekováno $5,56 \pm 1,16$ spotů na buňku) po 12 h ošetření FND-p-Man ve srovnání s buňkami ošetřenými pouze FND-p-Man (detekováno $12,05 \pm 4,77$ spotů na buňku). Tímto bylo potvrzeno, že internalizace FND-p-Man je zprostředkována právě MR.



Obrázek 34. Inhibice MR zprostředkované internalizace FND-p-Man. **A)** Snímky z konfokální mikroskopie při inhibici MR mananem (1 mg/ml) nebo 15.2 mAb (30 μ g/ml). Detailní zobrazení výřezů s faktorem zvětšení 4 \times po 12 h. **B)** Statistická analýza inhibice

FND-p-Man (průměr ± SD); n = 3. DPC - digitální fázový kontrast; Red Channel - červený kanál, ex 561/em 620 ± 35 nm; Merge - sloučení všech kanálů. p-hodnoty byly vypočteny pomocí dvoucestné ANOVA-Tukey test, *p ≤ 0,05, **p < 0,005, ***p < 0,001, ****p < 0,0001. Měřítko: 100 μm.

Kromě toho byly za účelem potvrzení MR dependentní internalizace FND-p-Man otestovány další 4 různé epiteliální buněčné linie (16HBE14o-, A549, HCT116, HEK293T) bez exprese MR. V těchto buněčných liniích byla detekována minimální nebo žádná internalizaci FND-p-Man (**Obr. 35**). Toto zjištění finálně potvrdilo specifické zapojení MR do internalizace FND-p-Man.



Obrázek 35. Průkaz specifické internalizace FND-p-Man pouze buňkami exprimujícími MR. Konfokální mikroskopické snímky buněk J774A.1 a epiteliálních buněk (A549, HEK293T, 16HBE14o- a HCT116) bez exprese MR ošetřených FND-p-Man po 24hodinové inkubaci (10 μg/ml), n = 3. BrightField - světelné pole; Red Channel - červený kanál, ex 561/em 620 ± 35 nm; Merge - sloučení všech kanálů. Měřítko: 100 μm.

6. DISKUZE

6.1. Cíl 1: Příprava linie exprimující WT-CFTR značený HiBiT značkou

V průběhu let byly vyvinuty různé HTS metody pro sledování exprese a lokalizace CFTR, které byly následně využity k objevení modulátorů CFTR. Ektopická exprese CFTR značeného intracelulárními, nebo extracelulárními epitopy, jako jsou FLAG, HA (Howard *et al.*, 1995) nebo fluorescenčními značkami (Moyer *et al.*, 1998), byla pomocí fluorescenční mikroskopie využita ke studiu transportu CFTR, jeho subcelulární lokalizace a degradace (Carlile *et al.*, 2007; Meacham *et al.*, 2001). Ačkoli jsou tyto přístupy sofistikované, právě ektopická exprese rekombinantních proteinů může způsobit nerovnováhu ve zpracování, lokalizaci a protein-protein interakcích, což může vést ke vniku nefyziologických artefaktů (Moriya, 2015; Prelich, 2012). Z tohoto důvodu je důležitý vývoj a validace nových relevantních HTS metod a buněčných modelů s endogenní expresí CFTR vhodných pro identifikaci CFTR modulátorů. Tudíž, hlavním cílem bylo vyvinout a validovat detekční systém, s expresí CFTR z jeho přirozeného genomového lokusu, který by mohl být dále použit pro vývoj modelových CF systémů.

Od doby, kdy byl objeven editační potenciál CRISPR/Cas9 využitelný k programovatelné úpravě genomu (Cong *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2012), se rapidně rozšiřuje množství modelových systémů pro široké spektrum onemocnění (Dow, 2015; Kampmann, 2020). Modely připravené pomocí CRISPR pomáhají objasnit mechanismy onemocnění a identifikovat potenciální terapeutické cíle. Ke specifickému zacílení Cas9 endonukleázy pro štěpení DNA sekvencí je zapotřebí gRNA. crRNA, část gRNA, která je komplementární k cílové sekvenci DNA, řídí zacílení celého RNP komplexu k následnému vytvoření dvouřetězcové zlomu DNA (DSB) (Cong *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2012; Konstantakos *et al.*, 2022; Mali *et al.*, 2013). V případě nepřítomnosti homologního DNA templátu je DSB opraven pomocí NHEJ, čímž vznikají malé inserce nebo delece (indelů) ve štěpených oblastech. Kvantifikací takovýchto indelů lze stanovit efektivitu jednotlivých crRNA. Tohoto mechanismu bylo využito pro otestování čtyř navržených crRNA cílicích do odlišných oblastí ECL4 ve WT-CFTR (**Obr. 18**). Prostřednictvím elektroporací zprostředkované transfekce RNP komplexů do buněk 16HBE14o- a následnou analýzou

NHEJ oprav v cílových oblastech, byly crRNA1 a crRNA3 identifikovány jako nejlepší kandidáti pro další kroky vedoucí k vložení HiBiT značky do ECL4 (**Obr. 19B**).

DSB vytvořené CRISPR/Cas9 mohou být opraveny nejen pomocí NHEJ, ale také HDR mechanismem jež vyžaduje přítomnost homologního templátu pro průběh reparace (Kim & Kim, 2014). Právě tento přirozený reparační mechanismus buněk lze využít ke specifické záměně párů bází nebo dokonce ke vložení, či delecí DNA segmentů pomocí syntetických homologních templátů nesoucích ve své struktuře požadovanou změnu (Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). Na základě těchto poznatků, bylo pro vytvoření nového HTS systému pro monitoring CFTR využito HDR zprostředkovaného vložení DNA sekvence kódující značku HiBiT do ECL4 WT-CFTR. HiBiT značka je součástí NanoBiT technologie (Dixon *et al.*, 2016), kdy po vzájemné nekovalentní vazbě dvou fragmentů, HiBiT a LgBiT, dochází k obnově funkce NLuc luciferázy, ze které byly tyto dva fragmenty odvozeny. Detekce luminiscence produkované vzniklou luciferázou, pak dále umožňuje kvantifikaci a lokalizaci endogenních proteinů značených HiBiT značkou (Schwinn *et al.*, 2018). Pro správnou funkčnost tohoto systému je rozhodujícím faktorem prostorová dostupnost HiBiT pro vazbu s LgBiT. Pro optimalizaci vazby LgBiT na HiBiT byly přidány 6AA nebo 8AA linkery kolem sekvence HiBiT v donorovém ssODN templátu, aby HiBiT vyčníval z rigidní struktury ECL4 (**Obr. 20A**). V heterogenních populacích editovaných buněk, poskytovaly 8AA linkery vyšší luminiscenční signál ve srovnání s buňkami editovanými RNP v přítomnosti ssODN s 6AA linkery (**Obr. 20B-C**), tudíž další experimenty byly prováděny vždy pouze s ssODN s 8AA linkery.

Konzistentní genetické pozadí monoklonálních buněčných linií je jedním ze základních předpokladů pro přípravu relevantních modelů onemocnění, zejména v případě CF (Pedemonte *et al.*, 2010). Fenotypově-genotypové studie u PwCF ukázaly, že stejné mutace způsobující CF mohou mít odlišný výsledek onemocnění na základě genetické výbavy (Cutting, 2010, 2015; Zielenski, 2000). Tudíž pro vývoj reprodukovatelných buněčných systémů pro HTS je klíčový relevantní výchozí materiál. Pro přípravu takovýchto linií bylo provedeno limitní ředění s cílem získat monoklonální buněčné linie exprimující WT-CFTR-HiBiT. Konkrétně, ve dvou kolech screeningu (**Obr. 21B-C**) bylo identifikováno 27 klonů pozitivních na HiBiT značku. Kromě toho, bylo pomocí PCR genotypizace identifikováno ~ 5 % homozygotů, ze všech testovaných klonů (9 ze 182), s vloženou HiBiT

značkou (**Obr. 21D**), což je v souladu s dříve uvedenými údaji o účinnosti HDR v přítomnosti syntetických homologních ssODN (Ruan *et al.*, 2019).

Dvě kandidátní monoklonální buněčné linie (B38 a A22) byly dále detailněji charakterizovány pro potvrzení správné glykosylace, lokalizace a funkce CFTR. CFTR má dvě N-vázané glykosylace v pozici 894 a 900 (Gregory *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 1990; Riordan *et al.*, 1989). Narušení DNA glykosylačních sekvencí snižuje stabilitu CFTR v PM (X. Chang *et al.*, 2008). S ohledem na tuto skutečnost, byl dále hodnocen vliv vložení HiBiT značky do dvou různých míst v ECL4, a to buď před (klon B38), nebo za GLY místa (klon A22). Při WB byly detekovány dva bandy, jak CFTR band C (~ 170 kDa, kompletně glykosylovaný CFTR) tak i band B (~ 150 kDa, částečně glykosylovaný CFTR přítomný v ER) (**Obr. 23A**). Nejvýraznější byl u obou klonů stejně jako u parentální linie band C, což potvrzuje, že po vložení HiBiT nedošlo k aberantnímu procesu glykosylace CFTR. Naopak při HB, byl na rozdíl od klonu B38, detekován další aditivní band u klonu A22. Pro konečnou fázi validace byl tedy vybrán pouze klon B38. Kromě toho, byla pomocí fluorescenční mikroskopie potvrzena lokalizace WT-CFTR-HiBiT v PM (**Obr. 23B**). Zde je významná zejména totožná distribuce IF signálu v parentálních buňkách HBE a klonu B38. Poslední krok funkční validace byl proveden měřením zkratového proudu. HBE jsou immortalizované buňky odvozené z buněk epitelu dýchacích cest, které se při konfluenci polarizují a vytvářejí těsné spoje, což se projevuje nejen při aktivaci CFTR Cl^- proudem, ale i měřitelným transepiteliálním elektrickým odporem (Cozens *et al.*, 1994). Ačkoliv klon B38 vykazoval nižší ΔI_{SC} ve srovnání s parentálními HBE buňkami, přesto byla funkce CFTR přiměřeně stimulována forskolinem a inhibována $\text{CFTR}_{\text{Inh-172}}$ (**Obr. 23C**). Snižovaný ΔI_{SC} klonu B38 byl pravděpodobně způsoben nižší expresí celkového CFTR (**Obr. 23A**), která byla pravděpodobně zapříčiněna klonální selekcí. U HBE a klonu B38 byl pozorován podobný TEER (**Obr. 23C**), což svědčí o normální bariérové funkci po polarizaci buněk. Tato pozorování jsou v souladu s předchozími publikacemi (Cozens *et al.*, 1994; Gianotti *et al.*, 2018; Illek *et al.*, 2008). Závěrem lze říci, že vložení HiBiT před GLY místa v ECL4 nenarušilo glykosylaci, lokalizaci ani funkci WT-CFTR.

Pro ověření jednoduchého formátu „přidej a měř“ lytického i extracelulárního testu byly buňky ošetřeny CFTR siRNA, které specificky snižují množství CFTR mRNA dostupné pro translaci, čímž snižují hladinu celkového a membránového CFTR. Takto vyvolané změny hladiny celkového a membránového WT-CFTR-HiBiT byly následně kvantifikovány pomocí lytického a extracelulárního testu. Souhrnně lze říci, že po ošetření B38 buněk různými variantami siRNA bylo detekováno ve všech případech snížení jak celkového WT-CFTR-HiBiT až o 58 %, tak i plazmatického až o 52 % (**Obr. 24A**). Kromě toho, nebyla detekována žádná cytotoxicita CFTR siRNA, která by mohla falešně ovlivnit měření exprese a lokalizace CFTR (**Obr. 24B**). Tato pozorování potvrzují užitečnost těchto testů pro přímou detekci hladin CFTR a jeho PM lokalizace.

Hladina membránového CFTR je výsledkem celkové exprese CFTR, degradace, membránového transportu a jeho endocytické recyklace. Jedním z podstatných faktorů endocytické recyklace CFTR jsou malé RAB GTPázy, které fungují jako molekulární přepínače regulující efektorové proteiny zprostředkovávající intracelulární transport (Farinha & Canato, 2017). Pro prokázání využitelnosti HiBiT značky pro monitorování CFTR v buněčné linii B38, bylo provedeno specifické snížení exprese RAB5 a RAB11 proteinů pomocí siRNA. Jelikož RAB5 podporuje internalizaci CFTR z PM do časných endozomů a RAB11 reguluje transport CFTR z recyklačních endozomů do PM a GA (Ameen *et al.*, 2007), vedlo snížení exprese RAB5 ke zvýšení membránové hladiny CFTR, zatímco snížení exprese RAB11 vedlo ke snížení membránové hladiny CFTR (**Obr. 25B**). Využitelnost tohoto systému pro sledování membránového transportu CFTR byla navíc potvrzena narušením transportu CFTR z ER do GA pomocí brefeldinu A (**Obr. 25C**), jak popsal Donaldson *et al.*, 1992.

Značení a monitoring proteinů pomocí HiBiT značky je ideální metodou pro HTS (C. Zhang *et al.*, 2023). Důležitým krokem pro každý test, který má být dále využíván pro HTS, je jeho miniaturizace. V tomto případě, lytický i extracelulární test byl snadno převeden z 96jamkových destiček do 384jamkového formátu, přičemž oba testy během měření vykazovaly jen malé rozdíly mezi jednotlivými opakováními (**Obr. S2**).

Objevení a zavedení modulátorů CFTR do klinické praxe, jako je například nejnovější trojkombinace léčiv ETI (prodávána pod názvem TRIKAFTA[®] nebo KAFTRIO[®]), významně zlepšilo život ~85 % pacientů s CF. ETI zlepšuje produkci a funkci CFTR proteinu u pacientů s alespoň jednou mutací $\Delta F508$ (King *et al.*, 2022). Navzdory tomu, ale stále zůstávají pacienti s dalšími vzácnými mutacemi CFTR, pro které nebyla doposud léčba objevena. Pomocí našeho optimalizovaného postupu CRISPR/Cas9 zprostředkované inzerce HiBiT do CFTR byla vyvinuta $\Delta F508$ -CFTR-HiBiT linie, na které byla prokázána schopnost reportérových CFTR-HiBiT systémů spolehlivě detekovat působení CFTR modulátorů jako je trojkombinace ETI. Jako přímý důkaz detekční schopnosti obou testů byl pozorován nárůst celkového množství CFTR, tak i zvýšená membránová lokalizace CFTR (**Obr. 29**), po ošetření buněk ETI, což koresponduje s výsledky uvedenými například v práci od Keating *et al.*, 2018, které byly identifikovány prostřednictvím western blottingu. Navíc lytický i extracelulární test potvrdil aditivní efekt FEN po přidání k ETI při 3denním ošetření buněk, kdy bylo detekováno zvýšení jak celkového množství CFTR, tak i membránové lokalizace $\Delta F508$ -CFTR-HiBiT (**Obr. 29B**), stejně jak bylo popsáno v práci od Centorame *et al.*, 2022. Tímto způsobem byla finálně potvrzena funkčnost a využitelnost našeho designu pro HiBiT značení různých mutovaných variant CFTR.

V závěru lze konstatovat, že kombinace CRISPR/Cas9 editace se značkou HiBiT (Schwinn *et al.*, 2018) byla úspěšně využita k vytvoření nového reportérového HTS systému založeného na bioluminiscenční detekci. Tento modelový systém může být přímo využíván ke zkoumání látek ovlivňující WT-CFTR nebo jako stavební blok pro vznik CF modelů při vložení CF-způsobujících mutací pomocí další CRISPR editace. Navíc tento optimalizovaný design vkládání HiBiT značky může být aplikován pro značení různých variant mutovaných CFTR proteinů v jiných buněčných liniích (Ondra *et al.*, 2023).

6.2. Cíl 2: Vývoj systému pro monitorování fagocytární aktivity

Fagocyty jsou naprogramovány k rozpoznávání, pohlcování a ničení imunitních komplexů, cizorodých částic, bakterií a apoptotických buněk, což z nich činí nepostradatelnou složku imunitního systému. Mezi profesionální fagocyty se řadí neutrofil, monocyt, makrofág a dendritická buňka (Uribe-Querol & Rosales, 2020). Fagocytární kapacita makrofágů je jedním z klíčových parametrů při zastavení opakujících se infekcí, avšak jejich fagocytární funkce bývá snížena právě u pwCF (Bruscia & Bonfield, 2016). Navzdory úspěšné korekci mutovaného CFTR pomocí modifikátorů, jsou pwCF sužování opakujícími se chronickými infekcemi, právě na základě snížené fagocytární schopnosti CF makrofágů (Hisert *et al.*, 2017).

Existuje několik způsobů monitorování fagocytární aktivity jako např. pomocí fluorescenčních prób nebo různých typů částic, kdy je většinou finální měření prováděno pomocí průtokové cytometrie. Současné metodiky kvantifikace fagocytární funkce *in vitro* měří buď fagocytární aktivitu jednotlivých buněk (průměrný počet fagocytovaných kuliček nebo částic/buňku), nebo populační výsledek (% buněk, které obsahují fagocytovaný materiál) (Elbim & Lizard, 2009; Fuhrmann *et al.*, 2008; Miksa *et al.*, 2009). Tyto metody jsou většinou multikrokové s nutností odmytí dané próby. K nejobtížnějším pak patří měření fagocytární aktivity živých (nefixovaných) makrofágů, které jsou při aktivaci silně adhezivní a vytvářejí shluky. Ty nejenže ztěžují studium jednotlivých buněk při průtokové cytometrii, ale také často vedou k ucpávání samotného přístroje. Z tohoto důvodu, by bylo velmi přínosné vytvoření nového jednokrokového systému se specifickou kvantifikací fagocytózy makrofágů. Jedním z endocytických receptorů jehož snížená exprese byla identifikována u CF makrofágů je manózoový receptor CD206 (MR) (Slimmen *et al.*, 2023; Wright *et al.*, 2009). Hlavním záměrem tedy bylo vyvinout novou specifickou metodu pro studium MR dependentní fagocytární aktivity založenou na mikroskopické detekci internalizace FND.

Velikost částic je kritickým parametrem pro použití FND v biologických aplikacích ze dvou hlavních důvodů: (1) Intenzita fluorescence FND silně závisí na velikosti částic, protože čím větší je velikost FND tím více NV⁻ nebo H3 center se v nich nachází, a tím snadněji lze FND vizualizovat pomocí standardních fluorescenčních mikroskopů, (2) velikost FND kriticky ovlivňuje interakci s biologickými systémy (Chipaux *et al.*, 2018;

Rondin *et al.*, 2010). Při zohlednění obou těchto klíčových parametrů byly pomocí diferenciální centrifugace připraveny 200nm FND, které při srovnání s menšími FND poskytují vyšší fluorescenční signál částic a tudíž zlepšení detekční schopnosti (Torelli *et al.*, 2019). Typickým limitujícím faktorem použití FND v biomedicínských aplikacích je jejich nízká koloidní stabilita v biologických tekutinách obsahujících soli, jako jsou pufrы, buněčná média a krev, kde okamžitě agregují (Rehor *et al.*, 2014; Wilson *et al.*, 2019). Navíc diamantový povrch váže nespecificky proteiny, které mohou následně blokovat interakce s molekulami navázanými na povrch FND a s jejich cíli (Aramesh *et al.*, 2015). Z důvodů výše zmíněných, byla dalším krokem stabilizace FND pomocí oxidace a PG vrstvy (**Obr. 30B**). Doposud žádná studie neprokázala koloidní stabilizaci FND s průměrem větším než 140 nm odpovídajícím způsobem.

MR rozpoznává polysacharidy s koncovými manózami, které jsou přítomny na mnoha patogenních mikroorganismech (P. R. Taylor *et al.*, 2005). Molekuly a nanočástice obsahující manózu na svém povrchu mohou být tedy preferenčně fagocytovány přes MR (Basu *et al.*, 2015). Na základě tohoto principu, byla na polymerní rozhraní FND-p připojena manóza (FND-p-Man) (**Obr. 30B**). Právě FND-p-Man byly dále testovány jako potenciální nástroj pro monitorování fagocytární aktivity zprostředkované MR. Důležitým parametrem každé diagnostické metody je její vlastní netoxické působení na testované buňky. Pro potvrzení absence cytotoxicity u nově připravených FND (FND-p a FND-p-Man) bylo využito MTS testu. Jako buněčný model pro zkoumání cytotoxicity a internalizace byly použity myší makrofágové nádorové buňky J774A.1, které díky variabilní povrchové expresi funkčního MR věrně napodobují expresi MR mezi různými typy makrofágů (Fiani *et al.*, 1998). U nově připravených FND nebyla zaznamenána žádná toxicita (**Obr. 31A**), což je v souladu s již dříve publikovanými výsledky pro menší FND (Schrand, Dai, *et al.*, 2007; Schrand, Huang, *et al.*, 2007).

Konfokální fluorescenční mikroskopie je jedním z přístupů používaných pro *in vitro* i *ex vivo* zobrazování interakcí nanočástic s buňkami a jejich buněčné internalizace (Ramos-Gomes *et al.*, 2020; Shang *et al.*, 2014; Thurn *et al.*, 2007). Stejně jako bylo prokázáno u jiných částic (P. Chen *et al.*, 2020; Patil & Deshpande, 2020), manozylace FND způsobila signifikantně výraznější internalizaci FND-p-Man při srovnání s nemanozylovanými FND-p (**Obr. 33**). Domény rozpoznávající sacharidy MR (CRD, z anglického carbohydrate

recognition domains) jsou zodpovědné za vazbu monosacharidů, jako jsou manóza, fukóza a N-acetylglukosamin. Na CRD se vážou nejen monosacharidy, ale také oligosacharidy a polysacharidy, které nesou výše zmíněné koncové zbytky (M. E. Taylor *et al.*, 1992; M. E. Taylor & Drickamer, 1993). Tyto cukry se vážou na MR účinněji než monosacharidy a mohou být ve skutečnosti použity jako kompetitivní inhibitory pro MR (M. E. Taylor *et al.*, 1992). Dalším způsobem, jak inhibovat funkci MR, je použití neutralizačních protilátek (Barrett-Bergshoeff *et al.*, 1997; Verbij *et al.*, 2017). Na základě výše uvedeného, byla specifická internalizace FND-p-Man pomocí MR potvrzena jak přidáním blokujících anti-MR protilátky, tak i mananu (**Obr. 34**). Tato zjištění korespondují s publikovanými výsledky pro inhibici aktivity MR (Barrett-Bergshoeff *et al.*, 1997; Y. Liu, Liu, *et al.*, 2004; Sallusto *et al.*, 1995).

Profesionální fagocyty, zmíněné dříve v diskuzi, nejsou jedinými, kteří dokáží internalizovat nanočástice. Obecně se na nespecifické endocytóze také podílejí epiteliální buňky, přestože nejsou profesionálními fagocyty (Kuhn *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2011). Avšak v testovaných epiteliálních buněčných liniích byla pozorována minimální nebo žádná internalizace FND-p-Man (**Obr. 35**), což dále potvrzuje specifickou účast MR na internalizaci FND-p-Man.

S ohledem na uvedené skutečnosti, by FND-p-Man mohly být do budoucna použity jako diagnostický nástroj pro rozklíčování procesů snížené fagocytární aktivity CF makrofágů a identifikaci látek obnovující správnou fagocytární aktivitu. Paralelně, byly FND-p-Man využity pro další studii, ve které byla prokázána jejich užitečnost jako potenciálního *in vivo* vizualizačního nástroje pro detekci sentinelových lymfatických uzlin (Kvakova *et al.*, 2022).

7. ZÁVĚR

V rámci této disertační práce byl vyvinut *in vitro* buněčný model vhodný pro stanovení celkového nebo membránového WT-CFTR. Tento ověřený model lze dále použít jako platformu pro přípravu nových CF modelů, například pro vzácné CFTR mutace, které se obtížně studují v primárních buňkách. Kromě toho lze optimalizovaný postup značení CFTR pomocí HiBiT značky využít i u dalších buněčných linií exprimujících specifické mutace v genu CFTR. Dále pak byla popsána příprava a bylo představeno potenciální využití FND-p-Man pro detekci fagocytární aktivity makrofágů zprostředkované MR. Kromě toho, připravené FND-p-Man mohou být dále v budoucnu využity jako systém pro vizualizaci sentinelových uzlin u pacientů s karcinomem prsu či melanomem, založený právě na detekci jejich internalizaci makrofágy lokalizovanými v těchto uzlinách a následné vizualizaci celé uzliny.

8. SEZNAM ZKRATEK

ABC	z angl. ATP binding casset
ATP	adenosintrifosfát
B38	monoklonální linie exprimující WT-CFTR-HiBiT
BF	světelné pole (z angl. BrightField)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CF	cystická fibróza
CFBE	lidské CF bronchiální epitelové buňky (CFBE41o-)
CFTR	z angl. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CFTR-GFP	CFTR značené GFP
CFTR _{inh-172}	blokátor CFTR funkce
CRD	domény rozpoznávající sacharidy (z angl. carbohydrate recognition domain)
crRNA	CRISPR RNA
DLS	metoda dynamického rozptylu světla (z angl. dynamic light scattering)
DMSO	dimethylsulfoxid
DSB	dvouvláknový zlom (z angl. double-strand break)
ECL1	první extracelulární smyčka
ECL4	čtvrtá extracelulární smyčka
ENaC	sodíkový kanál (z angl. epithelial sodium channe)
ER	endoplazmatické retikulum
ERAD	degradace spojená s ER (z angl. endoplasmic reticulum associated degradation)
ETI	elexacaftor, tezacaftor, ivacaftor
FBS	fetální bovinní sérum
FEN	fenretinid; Lau-7b
FLIPR	z angl. fluorometric imaging plate reader

Fluc	luciferáza izolovaná z <i>Photinus pyralis</i>
FMP	z angl. FLIPR Membrane Potential
FND	fluorescenční nanodiamanty
FND-p	FND s PG vrstvou
FND-p-Man	FND s PG vrstvou a manózou na povrchu
GA	Golgiho aparát
gDNA	genomická DNA
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)
GLuc	luciferáza izolovaná z <i>Gaussia princeps</i>
GLY	glykosylační místa
gRNA	naváděcí RNA (z angl. guide RNA)
HB	HiBiT blotting
HBE	lidské bronchiální epiteliální buňky (16HBE14o-)
HDR	homologií řízená oprava (z angl. homology directed repair)
HiBiT	malá komplementární podjednotka s vysokou afinitou k LgBiT
HPHT	vysokotlaká vysokoteplotní syntéza (z angl. high-pressure high-temperature)
HTS	vysokokapacitní testování látek (z angl. high throughput screening)
IDT	firma Integrated DNA Technologies
IF	imunofluorescence
I _{sc}	zkratový proud (z angl. short-circuit current)
LgBiT	velká pojednotka NanoBiT systému (z angl. Large Bit)
LMQ	4-aminopyrido[2,1-h]-pteridin-11-ium-6-olate
Luc	luciferáza izolovaná z <i>Oplophorus gracilirostris</i>
MP	membránový potenciál
MR	manózový receptor CD206
NanoBiT	z angl. NanoLuc Binary Technology
NBD	doména vázající nukleotidy (z angl. nucleotide binding domain)
ND	nanodiamanty

NEB	firma New England Biolabs
NHEJ	oprava nehomologním spojováním konců (z angl. non-homologous end joining)
NIR	infračervená oblast (z angl. near infrared)
NLuc	NanoLuc luciferáza
NV	defekty na bázi dusíku (z angl. nitrogen-vacancy)
NV ⁻	negativně nabité NV centra
PAM	motiv sousedící s protospacerem (z angl. protospacer adjacent motif)
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PC	Patch-clamp
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PEG	polyethylenglycol
PG	polyglycerol
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PM	plazmatická membrána
PwCF	pacienti s CF (z angl. people with CF)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (z angl. quantitative polymerase chain reaction)
RD	regulační doména
RLuc	luciferáza izolovaná z <i>Renilla reniformis</i>
RNP	ribonukleoprotein
siRNA	krátké interferující RNA (z angl. short interfering RNA)
SPQ	6-methoxy-N-(3-sulfopropyl)quiolinium
ssODN	syntetické jednořetězové oligodeoxynukleotidy (z angl. single-stranded oligodeoxynucleotides)
TEER	trans-epiteliální elektrický odpor (z angl. transepithelial electrical resistance)
TIDE	online softwaru pro analýzu indelů (z angl. Tracking of Indels by Decomposition)

TMD	transmembránová doména
tracRNA	trans-aktivační CRISPR RNA
ÚMTM	Ústav molekulární a translační medicíny
WB	western blotting
WT-CFTR	CFTR divokého typu (z angl. wild type CFTR)
YFP	žlutý fluorescenční protein (z angl. yellow fluorescent protein)
Δ F508	delece fenylalaninu v pozici 508
Δ I _{sc}	změna zkratového proudu
6AA	6 aminokyselinový linker
8AA	8 aminokyselinový linker

9. BIBLIOGRAFIE

9.1. Publikace v časopisech s IF

M. ONDRA, L. LENART, A. CENTORAME, D. DUMUT, A. HE, S. ZAIDI, J. HANRAHAN, J. DE SANCTIS, D. RADZIOCH, M. HAJDUCH. CRISPR/Cas9 bioluminescence-based assay for monitoring CFTR trafficking to the plasma membrane. *Life Science Alliance*. **2023**, 7(1), e202302045, ISSN: 2575-1077. DOI: 10.26508/lsa.202302045. **IF: 4.4. PRVOATORSKÁ PUBLIKACE.**

K. KVAKOVA, M. ONDRA, J. SCHIMER, M. PETRIK, Z. NOVY, H. RAABOVA, M. HAJDÚCH, P. CIGLER. Visualization of Sentinel Lymph Nodes with Mannosylated Fluorescent Nanodiamonds. *Advanced Functional Materials*. **2022**, 32(23), 2109960, ISSN: 1616-301X. DOI: 10.1002/adfm.202109960. **IF: 19.0. SDÍLENÁ PRVOATORSKÁ PUBLIKACE.**

A. CENTORAME, D. DUMUT, M. YOUSSEF, M. ONDRA, I. KIANICKA, J. SHAH, R. PAUN, T. OZDIAN, J. HANRAHAN, E. GUSEV, B. PETROF, M. HAJDUCH, R. PISLARIU, J. DE SANCTIS, D. RADZIOCH. Treatment With LAU-7b Complements CFTR Modulator Therapy by Improving Lung Physiology and Normalizing Lipid Imbalance Associated With CF Lung Disease. *Frontiers in Pharmacology*. **2022**, 13, 876842, ISSN: 1664-3224. DOI: 10.3389/fphar.2022.876842. **IF: 5.6.**

A. KUBÍČKOVÁ, Z. MACECKOVA, P. VOJTA, M. ONDRA, J. VOLEJNIKOVA, P. KORALKOVA, A. JUNGOVA, O. JAHODA, R. MOJZIKOVA, I. HADACOVA, J. CERMAK, M. HORVATHOVA, D. POSPISILOVA, M. HAJDUCH. Missense mutation in RPS7 causes Diamond-Blackfan anemia via alteration of erythrocyte metabolism, protein translation and induction of ribosomal stress. *Blood Cells, Molecules & Diseases*. **2022**, 97, 102690, ISSN: 1079-9796. DOI: 10.1016/j.bcmed.2022.102690. **IF: 2.3.**

9.2. Další publikační činnost

M. ONDRA. Kapitola: Transformation of bacteria v knize J. DRÁBEK, P. DŽUBÁK, M. HAJDÚCH, A. LIGASOVÁ, K. KOBERNA, M. MISTRÍK, J. SROVNAL *et al.* Laboratory techniques in cellular and molecular medicine, 1.vyd., Olomouc, Palacky University, 2021, 7, 51-56, ISBN: 978-80-244-6049-9.

9.3. Patenty a užité vzory

POVRCHOVĚ MODIFIKOVANÉ ČÁSTICE (patent)

Patent: CZ 309422; Uděleno: 28. 12. 2022; Vlastnictví: Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Univerzita Palackého v Olomouci; Vynálezci: M. HAJDÚCH, H. JAWOREK, **M. ONDRA**, A. KUBÍČKOVÁ

POVRCHOVĚ MODIFIKOVANÉ ČÁSTICE (užitný vzor)

Užitný vzor: CZ 34808; Uděleno: 10. 2. 2021; Vlastnictví: Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Univerzita Palackého v Olomouci; Vynálezci: M. HAJDÚCH, H. JAWOREK, **M. ONDRA**, A. KUBÍČKOVÁ

9.4. Orální prezentace na konferencích

M. ONDRA, L. LENART, J. DE SANCTIS, D. RADZIOCH, M. HAJDUCH. Cystic fibrosis drug discovery: Unleashing the power of high-throughput screening with the HiBiT tag. *IMTM Reactor*, 2. - 4. říjen **2023**, Velké Karlovice, Česká republika.

M. ONDRA, L. LENART, A. CENTORAME, C. DUMUT, J. DE SANCTIS, D. RADZIOCH, M. HAJDUCH. CRISPR-based cellular models with endogenous expression of HiBiT-tagged wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator enables high-throughput biology studies and screening for new transporter modulators. North American Cystic Fibrosis Conference. 3 - 5. listopad **2022**. Philadelphia, USA.

M. ONDRA, A. CENTORAME, J. DE SANCTIS, D. C. DUMUT, J. HANRAHAN, A. HE, L. LENART, J. LIAO, D. RADZIOCH, M. HAJDUCH. Novel high-throughput screening tool for monitoring CFTR levels and localisation in cytoplasm membrane with luminescent

peptide tag. *European Cystic Fibrosis Conference*, 8. - 11. červen **2022**, Rotterdam, Nizozemsko.

M. ONDRA, K. KVAKOVA, Z. NOVY, M. PETRIK, H. RAABOVA, J. SCHIMER, P. CIGLER, M. HAJDUCH. Diamonds Are Forever: Development and application of ultra-bright 200-nm fluorescent nanodiamonds for the sentinel lymph nodes visualisation. *IMTM Reactor*, 6. - 8. září **2021**, Bystřice nad Pernštejnem, Česká republika.

M. ONDRA, A. CENTORAME, D. DUMUT, J. SHAH, D. RADZIOCH D, M. HAJDUCH. Development of a novel high throughput screening tool for CFTR modifiers discovery. *IMTM Reactor*, 7. - 9. září **2020**, Bystřice nad Pernštejnem, Czech Republic.

M. ONDRA, A. KUBICKOVA, M. HAJDUCH. The role of ribosomal proteins and ribosomal stress in DNA damage. *EATRIS TMex*, 11. - 15. listopad **2019**, Barcelona, Španělsko.

M. ONDRA, A. KUBICKOVA, M. HAJDUCH. CRISPR/Cas9-mediated tagging of endogenous proteins with HiBiT. *IMTM Reactor*, 16. - 18. září **2019**, Bystřice nad Pernštejnem, Česká republika.

M. ONDRA. Implementation of a novel HiBiT Protein Tagging System for monitoring proteins expression. *IMTM Reactor*, 18. – 21. září **2018**, Pastviny, Česká republika.

9.5. Poster prezentace na konferencích

M. ONDRA, K. KVAKOVA, P. MENOVA, P. CIGLER, M. HAJDUCH. Towards identification and validation of novel DC-SIGN ligands. *Czech Annual Cancer Meeting*, 20. - 22. listopad **2023**, Olomouc, Česká republika.

M. ONDRA, L. LENART, A. CENTORAME, D. DUMUT, J. DE SANCTIS, D. RADZIOCH, M. HAJDUCH. Developing innovative high-throughput screening assays based on HiBiT-tagged CFTR for identification of CFTR modulators. *North American Cystic Fibrosis Conference*, 2. - 4. listopad **2023**, Phoenix, USA.

M. ONDRA, A. CENTORAME, D. DUMUT, J. LIAO, J. HANRAHAN, J. DE SANCTIS, D. RADZIOCH, M. HAJDUCH. Towards a new high throughput screening tool for the cystic fibrosis drug discovery. *OLAPERMED*, 25. – 27. listopad **2021**, Olomouc, Česká republika.

M. ONDRA, A. CENTORAME, D. DUMUT, J. LIAO, J. HANRAHAN, J. DE SANCTIS, D. RADZIOCH, M. HAJDUCH. Design and validation of luminescent HTS tool for discovery and optimization of novel combination of CFTR correctors and modifiers. *North American Cystic Fibrosis Conference*, 2. - 5. listopad **2021**, online conference.

M. ONDRA, A. CENTORAME, D. DUMUT, J. SHAH, J. DE SANCTIS, D. RADZIOCH, M. HAJDUCH. A novel high-throughput screening tool for discovery of modifiers correcting mutated CFTR protein expression in membrane. *North American Cystic Fibrosis Conference*. 2 - 5. listopad **2020**, online conference.

M. ONDRA, A. KUBICKOVA, M. HAJDUCH. CRISPR/Cas9-mediated tagging of proteins involved in ribosomal biogenesis. *XV. Diagnostic, Predictive And Experimental Oncology Days*, 25. - 27. listopad **2019**, Olomouc, Česká republika.

M. ONDRA, A. KUBICKOVA, M. HAJDUCH. Implementation of a novel HiBiT Protein Tagging System for monitoring endogenous protein expression. *CRISPR 2019*, 17 – 19. červen **2019**, Quebec, Kanada.

9.6. Další publikované abstrakty

Z. MACECKOVA, E. MOKSHYNA, A. KUBICKOVA, **M. ONDRA**, D. POSPISILOVA, P. VOJTA, M. HAJDUCH. Bystin regulates c-myc on protein level. *XV. Diagnostic, Predictive And Experimental Oncology Days*, 25. - 27. listopad **2019**, Olomouc, Česká republika.

A. KUBICKOVA, **M. ONDRA**, P. VOJTA, J. VOLEJNIKOVA, Z. MACECKOVA, P. KORALKOVA, A. JUNGOVA, Z. SAXOVA, R. MOJZIKOVA, I. HADACOVA, J. CERMAK, M. HORVATHOVA, D. POSPISILOVA, M. HAJDUCH. Biological role of novel SNV of RPS7 in Diamond Blackfan anemia-model of ribosomal alterations in cancer.

XV. *Diagnostic, Predictive And Experimental Oncology Days*, 25. - 27. listopad **2019**, Olomouc, Česká republika.

K. KVAKOVA, J. SCHIMER, **M. ONDRA**, M. POPPER, M. PETRIK, Z. NOVY, H. RAABOVA, M. HAJDÚCH, P. CIGLER. Fluorescent Nanodiamonds Modified with Biocompatible Polymers. XV. *Diagnostic, Predictive And Experimental Oncology Days*, 25. - 27. listopad **2019**, Olomouc, Česká republika.

A. KUBICKOVA, P. VOJTA, **M. ONDRA**, N. KUDLOVA, Z. MACECKOVA, J. VOLEJNIKOVA, P. KORALKOVA, A. JUNGOVA, Z. SAXOVA, R. MOJZIKOVA, I. HADACOVA, J. CERMAK, M. HORVATHOVA, D. POSPISILOVA, M. HAJDUCH. SNV in RPS7 causes Diamond Blackfan anemia. *IMTM Reactor*, 16. - 18. září **2019**, Bystřice nad Pernštejnem, Česká republika.

Z. MACECKOVA, A. KUBICKOVA, **M. ONDRA**, P. VOJTA, M. HAJDUCH. Bysl drives Diamond Blackfan pathology through c-myc regulation. *IMTM Reactor*, 16. - 18. září **2019**, Bystřice nad Pernštejnem, Česká republika.

9.7. Ocenění

CENA DĚKANA ZA PUBLIKACI V PRVNÍM DECILU

K. KVAKOVA, **M. ONDRA**, J. SCHIMER, M. PETRIK, Z. NOVY, H. RAABOVA, M. HAJDÚCH, P. CIGLER. Visualization of Sentinel Lymph Nodes with Mannosylated Fluorescent Nanodiamonds. *Advanced Functional Materials*. 2022, 32(23), 2109960, ISSN: 1616-301X.

CENA DĚKANA ZA PUBLIKACI V PRVNÍM KVARTILU

A. CENTORAME, D. DUMUT, M. YOUSSEF, **M. ONDRA**, I. KIANICKA, J. SHAH, R. PAUN, T. OZDIAN, J. HANRAHAN, E. GUSEV, B. PETROF, M. HAJDUCH, R. PISLARIU, J. DE SANCTIS, D. RADZIOCH. Treatment With LAU-7b Complements CFTR Modulator Therapy by Improving Lung Physiology and Normalizing Lipid Imbalance Associated With CF Lung Disease. *Frontiers in Pharmacology*. 2022, 13, 876842, ISSN: 1664-3224.

CENA DĚKANA ZA PATENT

POVRCHOVĚ MODIFIKOVANÉ ČÁSTICE (patent)

Patent: CZ 309422; Uděleno: 28. 12. 2022; Vlastnictví: Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Univerzita Palackého v Olomouci; Vynálezci: M. HAJDÚCH, H. JAWOREK, **M. ONDRA**, A. KUBÍČKOVÁ

10. REFERENCE

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Ion Channels and the Electrical Properties of Membranes. In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26910/>
- Anderson, M. P., Gregory, R. J., Thompson, S., Souza, D. W., Paul, S., Mulligan, R. C., Smith, A. E., & Welsh, M. J. (1991). Demonstration That CFTR Is a Chloride Channel by Alteration of Its Anion Selectivity. *Science*, 253(5016), 202-205. <https://doi.org/10.1126/science.1712984>
- Aramesh, M., Shimoni, O., Ostrikov, K., Praver, S., & Cervenka, J. (2015). Surface charge effects in protein adsorption on nanodiamonds. *Nanoscale*, 7(13), 5726-5736. <https://doi.org/10.1039/c5nr00250h>
- Azad, T., Tashakor, A., & Hosseinkhani, S. (2014). Split-luciferase complementary assay: Applications, recent developments, and future perspectives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(23), 5541-5560. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7980-8>
- Badr, C. E., & Tannous, B. A. (2011). BIOLUMINESCENCE IMAGING: PROGRESS AND APPLICATIONS. *Trends in biotechnology*, 29(12), 624-633. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.010>
- Balasubramanian, G., Neumann, P., Twitchen, D., Markham, M., Kolesov, R., Mizuochi, N., Isoya, J., Achard, J., Beck, J., Tissler, J., Jacques, V., Hemmer, P. R., Jelezko, F., & Wrachtrup, J. (2009). Ultralong spin coherence time in isotopically engineered diamond. *Nature Materials*, 8(5), 383-387. <https://doi.org/10.1038/nmat2420>
- Barrett-Bergshoeff, M., Noorman, F., Bos, R., & Rijken, D. C. (1997). Monoclonal antibodies against the human mannose receptor that inhibit the binding of tissue-type plasminogen activator. *Thrombosis and Haemostasis*, 77(4), 718-724. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1656040>
- Basu, A., Kunduru, K. R., Abteew, E., & Domb, A. J. (2015). Polysaccharide-Based Conjugates for Biomedical Applications. *Bioconjugate Chemistry*, 26(8), 1396-1412. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00242>

- Benharouga, M., Sharma, M., So, J., Haardt, M., Drzymala, L., Popov, M., Schwapach, B., Grinstein, S., Du, K., & Lukacs, G. L. (2003). The Role of the C Terminus and Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor in the Functional Expression of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Nonpolarized Cells and Epithelia*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), 22079-22089. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301030200>
- Boudou, J.-P., Curmi, P. A., Jelezko, F., Wrachtrup, J., Aubert, P., Sennour, M., Balasubramanian, G., Reuter, R., Thorel, A., & Gaffet, E. (2009). High yield fabrication of fluorescent nanodiamonds. *Nanotechnology*, 20(23), 235602. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/23/235602>
- Boucher, R. C. (2007). Airway Surface Dehydration in Cystic Fibrosis: Pathogenesis and Therapy. *Annual Review of Medicine*, 58(1), 157-170. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.58.071905.105316>
- Boyle, M. P., & De Boeck, K. (2013). A new era in the treatment of cystic fibrosis: Correction of the underlying CFTR defect. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 1(2), 158-163. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(12\)70057-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(12)70057-7)
- Brinkman, E. K., Chen, T., Amendola, M., & van Steensel, B. (2014). Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Research*, 42(22), e168. <https://doi.org/10.1093/nar/gku936>
- Brizzard, B., & Chubet, R. (2001). Epitope tagging of recombinant proteins. *Current Protocols in Neuroscience*, (1), 5-8. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0508s00>
- Bruscia, E. M., & Bonfield, T. L. (2016). Cystic Fibrosis Lung Immunity: The Role of the Macrophage. *Journal of Innate Immunity*, 8(6), 550-563. <https://doi.org/10.1159/000446825>
- Cai, Z., Sohma, Y., Bompadre, S. G., Sheppard, D. N., & Hwang, T.-C. (2011). Application of high-resolution single-channel recording to functional studies of cystic fibrosis mutants. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 741, 419-441. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-117-8_27
- Cantin, A. M., Hartl, D., Konstan, M. W., & Chmiel, J. F. (2015). Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *Journal of Cystic Fibrosis*, 14(4), 419-430. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.03.003>

- Carlile, G. W., Robert, R., Zhang, D., Teske, K. A., Luo, Y., Hanrahan, J. W., & Thomas, D. Y. (2007). Correctors of Protein Trafficking Defects Identified by a Novel High-Throughput Screening Assay. *ChemBioChem*, 8(9), 1012-1020. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700027>
- Centorame, A., Dumut, D. C., Youssef, M., Ondra, M., Kianicka, I., Shah, J., Paun, R. A., Ozdian, T., Hanrahan, J. W., Gusev, E., Petrof, B., Hajduch, M., Pislariu, R., De Sanctis, J. B., & Radzioch, D. (2022). Treatment With LAU-7b Complements CFTR Modulator Therapy by Improving Lung Physiology and Normalizing Lipid Imbalance Associated With CF Lung Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 876842. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.876842>
- Clancy, J. P., Cotton, C. U., Donaldson, S. H., Solomon, G. M., VanDevanter, D. R., Boyle, M. P., Gentsch, M., Nick, J. A., Illek, B., Wallenburg, J. C., Sorscher, E. J., Amaral, M. D., Beekman, J. M., Naren, A. P., Bridges, R. J., Thomas, P. J., Cutting, G., Rowe, S., Durmowicz, A. G., Tuggle, K. L. (2019). CFTR modulator therotyping: Current status, gaps and future directions. *Journal of Cystic Fibrosis*, 18(1), 22-34. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.05.004>
- Claveau, S., Bertrand, J. R., & Treussart, F. (2018). Fluorescent Nanodiamond Applications for Cellular Process Sensing and Cell Tracking. *Micromachines*, 9(5), 247. <https://doi.org/10.3390/mi9050247>
- Coakley, R. D., Grubb, B. R., Paradiso, A. M., Gatzky, J. T., Johnson, L. G., Kreda, S. M., O'Neal, W. K., & Boucher, R. C. (2003). Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 16083-16088. <https://doi.org/10.1073/pnas.2634339100>
- Coclet-Ninin, J., Rochat, T., Poitry, S., & Chanson, M. (2002). Discrimination Between Cystic Fibrosis and Cftr-Corrected Epithelial Cells by a Membrane Potential-Sensitive Probe. *Experimental Lung Research*, 28(3), 181-199. <https://doi.org/10.1080/019021402753570491>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 819-823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>

- Cozens, A. L., Yezzi, M. J., Kunzelmann, K., Ohrui, T., Chin, L., Eng, K., Finkbeiner, W. E., Widdicombe, J. H., & Gruenert, D. C. (1994). CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *10*(1), 38-47. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.10.1.7507342>
- Cutting, G. R. (2010). Modifier genes in Mendelian disorders: The example of cystic fibrosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1214*(1), 57-69. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05879.x>
- Cutting, G. R. (2015). Cystic fibrosis genetics: From molecular understanding to clinical application. *Nature Reviews Genetics*, *16*(1), 45–56. <https://doi.org/10.1038/nrg3849>
- Dean, M., Rzhetsky, A., & Allikmets, R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, *11*(7), 1156-1166. <https://doi.org/10.1101/gr.184901>
- Della Sala, A., Prono, G., Hirsch, E., & Ghigo, A. (2021). Role of Protein Kinase A-Mediated Phosphorylation in CFTR Channel Activity Regulation. *Frontiers in Physiology*, *12*, 690247. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.690247>
- de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., & Subramani, S. (1987). Firefly Luciferase Gene: Structure and Expression in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology*, *7*(2), 725-737. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.2.725-737.1987>
- Dixon, A. S., Schwinn, M. K., Hall, M. P., Zimmerman, K., Otto, P., Lubben, T. H., Butler, B. L., Binkowski, B. F., Machleidt, T., Kirkland, T. A., Wood, M. G., Eggers, C. T., Encell, L. P., & Wood, K. V. (2016). NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. *ACS Chemical Biology*, *11*(2), 400-408. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00753>
- Dobrinets, I. A., Vins, V. G., & Zaitsev, A. M. (2013). Structural Features of HPHT-Treated Diamonds. In I. A. Dobrinets, Victor. G. Vins, & A. M. Zaitsev (Ed.), *HPHT-Treated Diamonds: Diamonds Forever* (s. 87-98). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37490-6_5

- Donaldson, J. G., Finazzi, D., & Klausner, R. D. (1992). Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature*, *360*(6402), 350-352. <https://doi.org/10.1038/360350a0>
- Dow, L. E. (2015). Modeling Disease In Vivo With CRISPR/Cas9. *Trends in Molecular Medicine*, *21*(10), 609-621. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.07.006>
- Elbim, C., & Lizard, G. (2009). Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *75*(6), 475-481. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20726>
- England, C. G., Ehlerding, E. B., & Cai, W. (2016). NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence. *Bioconjugate Chemistry*, *27*(5), 1175-1187. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00112>
- Faklaris, O., Joshi, V., Irinopoulou, T., Tauc, P., Sennour, M., Girard, H., Gesset, C., Arnault, J. C., Thorel, A., Boudou, J. P., Curmi, P. A., & Treussart, F. (2009). Photoluminescent diamond nanoparticles for cell labeling: Study of the uptake mechanism in mammalian cells. *ACS Nano*, *3*(12), 3955-3962. <https://doi.org/10.1021/nn901014j>
- Farinha, C. M., & Canato, S. (2017). From the endoplasmic reticulum to the plasma membrane: Mechanisms of CFTR folding and trafficking. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*(1), 39-55. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2387-7>
- Fiani, M. L., Beitz, J., Turvy, D., Blum, J. S., & Stahl, P. D. (1998). Regulation of mannose receptor synthesis and turnover in mouse J774 macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, *64*(1), 85-91. <https://doi.org/10.1002/jlb.64.1.85>
- Fu, C. C., Lee, H. Y., Chen, K., Lim, T. S., Wu, H. Y., Lin, P. K., Wei, P. K., Tsao, P. H., Chang, H. C., & Fann, W. (2007). Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(3), 727-732. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605409104>
- Fuhrmann, S., Streitz, M., & Kern, F. (2008). How flow cytometry is changing the study of TB immunology and clinical diagnosis. *Cytometry Part A*, *73A*(11), 1100-1106. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20614>

- Galiotta, L. J. V., Haggie, P. M., & Verkman, A. S. (2001). Green fluorescent protein-based halide indicators with improved chloride and iodide affinities. *FEBS Letters*, *499*(3), 220-224. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02561-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02561-3)
- Galiotta, L. V. J., Jayaraman, S., & Verkman, A. S. (2001). Cell-based assay for high-throughput quantitative screening of CFTR chloride transport agonists. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *281*(5), C1734-C1742. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.5.C1734>
- Gianotti, A., Delpiano, L., & Caci, E. (2018). In vitro Methods for the Development and Analysis of Human Primary Airway Epithelia. *Frontiers in Pharmacology*, *9*, 1176. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01176>
- Gong, X., & Linsdell, P. (2004). Maximization of the rate of chloride conduction in the CFTR channel pore by ion-ion interactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *426*(1), 78-82. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.03.033>
- Gregory, R. J., Cheng, S. H., Rich, D. P., Marshall, J., Paul, S., Hehir, K., Ostedgaard, L., Klinger, K. W., Welsh, M. J., & Smith, A. E. (1990). Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature*, *347*(6291), 382-386. <https://doi.org/10.1038/347382a0>
- Grohmann, C., Magtoto, C. M., Walker, J. R., Chua, N. K., Gabrielyan, A., Hall, M., Cobbold, S. A., Mieruszynski, S., Brzozowski, M., Simpson, D. S., Dong, H., Dorizzi, B., Jacobsen, A. V., Morrish, E., Silke, N., Murphy, J. M., Heath, J. K., Testa, A., Maniaci, C., Feltham, R. (2022). Development of NanoLuc-targeting protein degraders and a universal reporter system to benchmark tag-targeted degradation platforms. *Nature Communications*, *13*(1), 2073. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29670-1>
- Gruber, A., Dräbenstedt, A., Tietz, C., Fleury, L., Wrachtrup, J., & Borczykowski, C. von. (1997). Scanning Confocal Optical Microscopy and Magnetic Resonance on Single Defect Centers. *Science*, *276*(5321), 2012-2014. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2012>
- Guo, J., Garratt, A., & Hill, A. (2022). Worldwide rates of diagnosis and effective treatment for cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, *21*(3), 456-462. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2022.01.009>

Haggie, P. M., Stanton, B. A., & Verkman, A. S. (2002). Diffusional Mobility of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Mutant, Δ F508-CFTR, in the Endoplasmic Reticulum Measured by Photobleaching of GFP-CFTR Chimeras *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 16419-16425. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112361200>

Hall, M. P., Unch, J., Binkowski, B. F., Valley, M. P., Butler, B. L., Wood, M. G., Otto, P., Zimmerman, K., Vidugiris, G., Machleidt, T., Robers, M. B., Benink, H. A., Eggers, C. T., Slater, M. R., Meisenheimer, P. L., Klaubert, D. H., Fan, F., Encell, L. P., & Wood, K. V. (2012). Engineered Luciferase Reporter from a Deep Sea Shrimp Utilizing a Novel Imidazopyrazinone Substrate. *ACS Chemical Biology*, 7(11), 1848–1857. <https://doi.org/10.1021/cb3002478>

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*, 391(2), 85-100. <https://doi.org/10.1007/BF00656997>

Havlik, J., Petrakova, V., Rehor, I., Petrak, V., Gulka, M., Stursa, J., Kucka, J., Ralis, J., Rendler, T., Lee, S. Y., Reuter, R., Wrachtrup, J., Ledvina, M., Nesladek, M., & Cigler, P. (2013). Boosting nanodiamond fluorescence: Towards development of brighter probes. *Nanoscale*, 5(8), 3208-3211. <https://doi.org/10.1039/c2nr32778c>

Hemelaar, S. R., Nagl, A., Bigot, F., Rodríguez-García, M. M., de Vries, M. P., Chipaux, M., & Schirhagl, R. (2017). The interaction of fluorescent nanodiamond probes with cellular media. *Mikrochimica Acta*, 184(4), 1001-1009. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2086-6>

Hisert, K. B., Heltshe, S. L., Pope, C., Jorth, P., Wu, X., Edwards, R. M., Radey, M., Accurso, F. J., Wolter, D. J., Cooke, G., Adam, R. J., Carter, S., Grogan, B., Launspach, J. L., Donnelly, S. C., Gallagher, C. G., Bruce, J. E., Stoltz, D. A., Welsh, M. J., Singh, P. K. (2017). Restoring Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function Reduces Airway Bacteria and Inflammation in People with Cystic Fibrosis and Chronic Lung Infections. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 195(12), 1617-1628. <https://doi.org/10.1164/rccm.201609-1954OC>

Howard, M., DuVall, M. D., Devor, D. C., Dong, J. Y., Henze, K., & Frizzell, R. A. (1995). Epitope tagging permits cell surface detection of functional CFTR. *The American Journal of Physiology*, 269(6), C1565-C1576. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.269.6.C1565>

- Hsiao, W. W. W., Hui, Y. Y., Tsai, P. C., & Chang, H. C. (2016). Fluorescent Nanodiamond: A Versatile Tool for Long-Term Cell Tracking, Super-Resolution Imaging, and Nanoscale Temperature Sensing. *Accounts of Chemical Research*, 49(3), 400-407. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00484>
- Hsieh, F. J., Chen, Y. W., Hui, Y. Y., Lin, C. H., & Chang, H. C. (2019). Quantification and Imaging of Antigens on Cell Surface with Lipid-Encapsulated Fluorescent Nanodiamonds. *Micromachines*, 10(5), 304. <https://doi.org/10.3390/mi10050304>
- Hwang, B. (Brian), Engel, L., Goueli, S. A., & Zegzouti, H. (2020). A homogeneous bioluminescent immunoassay to probe cellular signaling pathway regulation. *Communications Biology*, 3(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0723-9>
- Chang, B. M., Lin, H. H., Su, L. J., Lin, W. D., Lin, R. J., Tzeng, Y. K., Lee, R. T., Lee, Y. C., Yu, A. L., & Chang, H. C. (2013). Highly Fluorescent Nanodiamonds Protein-Functionalized for Cell Labeling and Targeting. *Advanced Functional Materials*, 23(46), 5737-5745. <https://doi.org/10.1002/adfm.201301075>
- Chang, X., Mengos, A., Hou, Y., Cui, L., Jensen, T. J., Aleksandrov, A., Riordan, J. R., & Gentsch, M. (2008). Role of N-linked oligosaccharides in the biosynthetic processing of the cystic fibrosis membrane conductance regulator. *Journal of Cell Science*, 121(17), 2814-2823. <https://doi.org/10.1242/jcs.028951>
- Chang, Y. R., Lee, H. Y., Chen, K., Chang, C. C., Tsai, D. S., Fu, C. C., Lim, T. S., Tzeng, Y. K., Fang, C. Y., Han, C. C., Chang, H. C., & Fann, W. (2008). Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds. *Nature Nanotechnology*, 3(5), 284-288. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.99>
- Chauhan, S., Jain, N., & Nagaich, U. (2020). Nanodiamonds with powerful ability for drug delivery and biomedical applications: Recent updates on in vivo study and patents. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.09.003>
- Chen, P., Zhang, X., Venosa, A., Lee, I. H., Myers, D., Holloway, J. A., Prud'homme, R. K., Gao, D., Szekely, Z., Laskin, J. D., Laskin, D. L., & Sinko, P. J. (2020). A Novel Bivalent Mannosylated Targeting Ligand Displayed on Nanoparticles Selectively Targets Anti-

Inflammatory M2 Macrophages. *Pharmaceutics*, 12(3), 243.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030243>

Chen, Y. T., Holcomb, C., & Moore, H. P. (1993). Expression and localization of two low molecular weight GTP-binding proteins, Rab8 and Rab10, by epitope tag. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(14), 6508-6512.
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6508>

Cheng, S. H., Gregory, R. J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D. W., White, G. A., O’Riordan, C. R., & Smith, A. E. (1990). Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*, 63(4), 827-834. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90148-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90148-8)

Chipaux, M., van der Laan, K. J., Hemelaar, S. R., Hasani, M., Zheng, T., & Schirhagl, R. (2018). Nanodiamonds and Their Applications in Cells. *Small*, 14(24), 1704263.
<https://doi.org/10.1002/sml.201704263>

Chmiel, J. F., Konstan, M. W., & Elborn, J. S. (2013). Antibiotic and Anti-Inflammatory Therapies for Cystic Fibrosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(10), a009779.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009779>

Illek, B., Maurisse, R., Wahler, L., Kunzelmann, K., Fischer, H., & Gruenert, D. C. (2008). Cl transport in complemented CF bronchial epithelial cells correlates with CFTR mRNA expression levels. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 22(1–4), 057-068.
<https://doi.org/10.1159/000149783>

Illsley, N. P., & Verkman, A. S. (1987). Membrane chloride transport measured using a chloride-sensitive fluorescent probe. *Biochemistry*, 26(5), 1215-1219.
<https://doi.org/10.1021/bi00379a002>

Jayaraman, S., Haggie, P., Wachter, R. M., Remington, S. J., & Verkman, A. S. (2000). Mechanism and Cellular Applications of a Green Fluorescent Protein-based Halide Sensor*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(9), 6047-6050. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6047>

Jayaraman, S., Teitler, L., Skalski, B., & Verkman, A. S. (1999). Long-wavelength iodide-sensitive fluorescent indicators for measurement of functional CFTR expression in cells. *The*

American Journal of Physiology, 277(5), C1008-1018.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.277.5.C1008>

Jia, Y., Mathews, C. J., & Hanrahan, J. W. (1997). Phosphorylation by Protein Kinase C Is Required For Acute Activation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator by Protein Kinase A*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(8), 4978-4984.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.8.4978>

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

Kampmann, M. (2020). CRISPR-based functional genomics for neurological disease. *Nature Reviews Neurology*, 16(9), 465-480. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0373-z>

Keating, D., Marigowda, G., Burr, L., Daines, C., Mall, M. A., McKone, E. F., Ramsey, B. W., Rowe, S. M., Sass, L. A., Tullis, E., McKee, C. M., Moskowitz, S. M., Robertson, S., Savage, J., Simard, C., Van Goor, F., Waltz, D., Xuan, F., Young, T., & Taylor-Cousar, J. L. (2018). VX-445–Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *New England Journal of Medicine*, 379(17), 1612-1620.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1807120>

Kerem, B. S., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M., & Tsui, L.-C. (1989). Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis. *Science*, 245(4922), 1073-1080. <https://doi.org/10.1126/science.2570460>

Kim, H., & Kim, J. S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 15(5), 321-334. <https://doi.org/10.1038/nrg3686>

King, J. A., Nichols, A. L., Bentley, S., Carr, S. B., & Davies, J. C. (2022). An Update on CFTR Modulators as New Therapies for Cystic Fibrosis. *Paediatric Drugs*, 24(4), 321-333.
<https://doi.org/10.1007/s40272-022-00509-y>

Konstantakos, V., Nentidis, A., Krithara, A., & Paliouras, G. (2022). CRISPR–Cas9 gRNA efficiency prediction: An overview of predictive tools and the role of deep learning. *Nucleic Acids Research*, 50(7), 3616-3637. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac192>

- Krueger, A. (2008). New Carbon Materials: Biological Applications of Functionalized Nanodiamond Materials. *Chemistry – A European Journal*, 14(5), 1382-1390. <https://doi.org/10.1002/chem.200700987>
- Kuhn, D. A., Vanhecke, D., Michen, B., Blank, F., Gehr, P., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2014). Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 5, 1625-1636. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.174>
- Kvakova, K., Ondra, M., Schimer, J., Petrik, M., Novy, Z., Raabova, H., Hajduch, M., & Cigler, P. (2022). Visualization of Sentinel Lymph Nodes with Mannosylated Fluorescent Nanodiamonds. *Advanced Functional Materials*, 32(23), 2109960. <https://doi.org/10.1002/adfm.202109960>
- Labun, K., Montague, T. G., Krause, M., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H., & Valen, E. (2019). CHOPCHOP v3: Expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W171-W174. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz365>
- Lemas, M. V., Yu, H. Y., Takeyasu, K., Kone, B., & Fambrough, D. M. (1994). Assembly of Na,K-ATPase alpha-subunit isoforms with Na,K-ATPase beta-subunit isoforms and H,K-ATPase beta-subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 269(28), 18651-18655. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32359-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32359-1)
- Li, H., Sheppard, D. N., & Hug, M. J. (2004). Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *Journal of Cystic Fibrosis*, 3, 123-126. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2004.05.026>
- Li, Y., Zhu, X., Zhang, H., Lu, Y., Zeng, T., Liu, H., Li, T., Wang, J., & Tang, L. (2023). Nanodiamond in cancer theranostics. *Nano TransMed*, 2(1), e9130019. <https://doi.org/10.26599/NTM.2023.9130019>
- Liu, F., Zhang, Z., Csanády, L., Gadsby, D. C., & Chen, J. (2017). Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel. *Cell*, 169(1), 85-95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.024>
- Liu, K. K., Wang, C. C., Cheng, C. L., & Chao, J. I. (2009). Endocytic carboxylated nanodiamond for the labeling and tracking of cell division and differentiation in cancer and

- stem cells. *Biomaterials*, 30(26), 4249-4259. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.056>
- Liu, Y., Gu, Z., Margrave, J. L., & Khabashesku, V. N. (2004). Functionalization of Nanoscale Diamond Powder: Fluoro-, Alkyl-, Amino-, and Amino Acid-Nanodiamond Derivatives. *Chemistry of Materials*, 16(20), 3924-3930. <https://doi.org/10.1021/cm048875q>
- Liu, Y., Liu, H., Kim, B. O., Gattone, V. H., Li, J., Nath, A., Blum, J., & He, J. J. (2004). CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: Requirement for the human mannose receptor. *Journal of Virology*, 78(8), 4120-4133. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.8.4120-4133.2004>
- Long, K. J., & Walsh, K. B. (1997). Iodide efflux measurements with an iodide-selective electrode: A non-radioactive procedure for monitoring cellular chloride transport. *Methods in Cell Science*, 19(3), 207-212. <https://doi.org/10.1023/A:1009766219974>
- Lopes-Pacheco, M. (2016). CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 275. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00275>
- Lopes-Pacheco, M. (2020). CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1662. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.01662>
- Ma, T., Vetrivel, L., Yang, H., Pedemonte, N., Zegarra-Moran, O., Galiotta, L. J. V., & Verkman, A. S. (2002). High-affinity Activators of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Chloride Conductance Identified by High-throughput Screening*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37235-37241. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205932200>
- Maitra, R., Sivashanmugam, P., & Warner, K. (2013). A Rapid Membrane Potential Assay to Monitor CFTR Function and Inhibition. *Journal of Biomolecular Screening*, 18(9), 1132-1137. <https://doi.org/10.1177/1087057113488420>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 823-826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>

- Mall, M., Hipper, A., Greger, R., & Kunzelmann, K. (1996). Wild type but not $\Delta F508$ CFTR inhibits Na⁺ conductance when coexpressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Letters*, *381*(1–2), 47-52. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00079-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00079-8)
- Mansoura, M. K., Biwersi, J., Ashlock, M. A., & Verkman, A. S. (1999). Fluorescent chloride indicators to assess the efficacy of CFTR cDNA delivery. *Human Gene Therapy*, *10*(6), 861-875. <https://doi.org/10.1089/10430349950018274>
- Matthews, J. C., Hori, K., & Cormier, M. J. (1977). Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase. *Biochemistry*, *16*(1), 85-91. <https://doi.org/10.1021/bi00620a014>
- McElroy, W. D. (1947). The Energy Source for Bioluminescence in an Isolated System. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *33*(11), 342-345. <https://doi.org/10.1073/pnas.33.11.342>
- McElroy, W. D., & Ballentine, R. (1944). The Mechanics of Bioluminescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *30*(12), 377-382. <https://doi.org/10.1073/pnas.30.12.377>
- Meacham, G. C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J. M., & Cyr, D. M. (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nature Cell Biology*, *3*(1), 100-105. <https://doi.org/10.1038/35050509>
- Mendes, F., Farinha, C. M., Roxo-Rosa, M., Fanen, P., Edelman, A., Dormer, R., McPherson, M., Davidson, H., Puchelle, E., De Jonge, H., Heda, G. D., Gentsch, M., Lukacs, G., Penque, D., & Amaral, M. D. (2004). Antibodies for CFTR studies. *Journal of Cystic Fibrosis*, *3*, 69-72. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2004.05.016>
- Miksa, M., Komura, H., Wu, R., Shah, K. G., & Wang, P. (2009). A novel method to determine the engulfment of apoptotic cells by macrophages using pHrodo succinimidyl ester. *Journal of Immunological Methods*, *342*(1), 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.11.019>
- Mitri, C., Xu, Z., Bardin, P., Corvol, H., Touqui, L., & Tabary, O. (2020). Novel Anti-Inflammatory Approaches for Cystic Fibrosis Lung Disease: Identification of Molecular Targets and Design of Innovative Therapies. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 1096. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.01096>

- M. Kaskova, Z., S. Tsarkova, A., & V. Yampolsky, I. (2016). 1001 lights: Luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chemical Society Reviews*, 45(21), 6048-6077. <https://doi.org/10.1039/C6CS00296J>
- Molina, S. A., & Hunt, W. R. (2017). Chapter 12 - Cystic Fibrosis: An Overview of the Past, Present, and the Future. In V. K. Sidhaye & M. Koval (Ed.), *Lung Epithelial Biology in the Pathogenesis of Pulmonary Disease* (219–249). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803809-3.00012-9>
- Molloy, S. S., Thomas, L., VanSlyke, J. K., Stenberg, P. E., & Thomas, G. (1994). Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: Localization to the TGN and recycling from the cell surface. *The EMBO Journal*, 13(1), 18-33. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06231.x>
- Moran, O., & Zegarra-Moran, O. (2008). On the measurement of the functional properties of the CFTR. *Journal of Cystic Fibrosis*, 7(6), 483-494. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2008.05.003>
- Moriya, H. (2015). Quantitative nature of overexpression experiments. *Molecular Biology of the Cell*, 26(22), 3893-4181. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-07-0512>
- Moyer, B. D., Loffing, J., Schwiebert, E. M., Loffing-Cueni, D., Halpin, P. A., Karlson, K. H., Ismailov, I. I., Guggino, W. B., Langford, G. M., & Stanton, B. A. (1998). Membrane Trafficking of the Cystic Fibrosis Gene Product, Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, Tagged with Green Fluorescent Protein in Madin-Darby Canine Kidney Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(34), 21759-21768. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21759>
- Nagl, A., Hemelaar, S. R., & Schirhagl, R. (2015). Improving surface and defect center chemistry of fluorescent nanodiamonds for imaging purposes-A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(25), 7521-7536. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8849-1>
- Neburkova, J., Vavra, J., & Cigler, P. (2017). Coating nanodiamonds with biocompatible shells for applications in biology and medicine. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 21(1), 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2016.05.008>

- Norez, C., Heda, G. D., Jensen, T., Kogan, I., Hughes, L. K., Auzanneau, C., Dérand, R., Bulteau-Pignoux, L., Li, C., Ramjeesingh, M., Li, H., Sheppard, D. N., Bear, C. E., Riordan, J. R., & Becq, F. (2004). Determination of CFTR chloride channel activity and pharmacology using radiotracer flux methods. *Journal of Cystic Fibrosis*, 3, 119-121. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2004.05.025>
- Nowotny, T., & Marra, V. (2013). Patch Clamp Technique. In D. Jaeger & R. Jung (Ed.), *Encyclopedia of Computational Neuroscience* (1–4). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7320-6_133-3
- Ondra, M., Lenart, L., Centorame, A., Dumut, D. C., He, A., Zaidi, S. S. Z., Hanrahan, J. W., Sanctis, J. B. D., Radzioch, D., & Hajduch, M. (2023). CRISPR/Cas9 bioluminescence-based assay for monitoring CFTR trafficking to the plasma membrane. *Life Science Alliance*, 7(1), e202302045. <https://doi.org/10.26508/lsa.202302045>
- Patil, T. S., & Deshpande, A. S. (2020). Mannosylated nanocarriers mediated site-specific drug delivery for the treatment of cancer and other infectious diseases: A state of the art review. *Journal of Controlled Release*, 320, 239-252. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.046>
- Pedemonte, N., Tomati, V., Sondo, E., & Galietta, L. J. V. (2010). Influence of cell background on pharmacological rescue of mutant CFTR. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 298(4), C866-C874. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00404.2009>
- Perevedentseva, E., Hong, S.F., Huang, K.J., Chiang, I.T., Lee, C.Y., Tseng, Y.T., & Cheng, C.-L. (2013). Nanodiamond internalization in cells and the cell uptake mechanism. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(8), 1834. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1834-8>
- Peter, K., Varga, K., Bebok, Z., McNicholas-Bevensee, C. M., Schwiebert, L., Sorscher, E. J., Schwiebert, E. M., & Collawn, J. F. (2002). Ablation of Internalization Signals in the Carboxyl-terminal Tail of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Enhances Cell Surface Expression *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49952-49957. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209275200>
- Petrakova, V., Benson, V., Buncek, M., Fiserova, A., Ledvina, M., Stursa, J., Cigler, P., & Nesladek, M. (2016). Imaging of transfection and intracellular release of intact, non-labeled

DNA using fluorescent nanodiamonds. *Nanoscale*, 8(23), 12002-12012. <https://doi.org/10.1039/C6NR00610H>

Pezzulo, A. A., Tang, X. X., Hoegger, M. J., Abou Alaiwa, M. H., Ramachandran, S., Moninger, T. O., Karp, P. H., Wohlford-Lenane, C. L., Haagsman, H. P., van Eijk, M., Bánfi, B., Horswill, A. R., Stoltz, D. A., McCray, P. B., Welsh, M. J., & Zabner, J. (2012). Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature*, 487(7405), 109-113. <https://doi.org/10.1038/nature11130>

Poulsen, J. H., Fischer, H., Illek, B., & Machen, T. E. (1994). Bicarbonate conductance and pH regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5340-5344. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5340>

Prelich, G. (2012). Gene Overexpression: Uses, Mechanisms, and Interpretation. *Genetics*, 190(3), 841-854 <https://doi.org/10.1534/genetics.111.136911>

Prince, L. S., Tousson, A., & Marchase, R. B. (1993). Cell surface labeling of CFTR in T84 cells. *The American Journal of Physiology*, 264(2), C491-498. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.264.2.C491>

Ramalho, A. S., Boon, M., Proesmans, M., Vermeulen, F., Carlon, M. S., & Boeck, K. D. (2022). Assays of CFTR Function In Vitro, Ex Vivo and In Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1437. <https://doi.org/10.3390/ijms23031437>

Ramos-Gomes, F., Ferreira, N., Kraupner, A., Alves, F., & Markus, M. A. (2020). Ex vivo Live Cell Imaging of Nanoparticle-Cell Interactions in the Mouse Lung. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 588922. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.588922>

Rasgado-Flores, H., Krishna Mandava, V., Siman, H., Van Driessche, W., Pilewski, J. M., Randell, S. H., & Bridges, R. J. (2013). Effect of apical hyperosmotic sodium challenge and amiloride on sodium transport in human bronchial epithelial cells from cystic fibrosis donors. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 305(11), C1114-C1122. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00166.2013>

Rehor, I., Slegerova, J., Kucka, J., Proks, V., Petrakova, V., Adam, M. P., Treussart, F., Turner, S., Bals, S., Sacha, P., Ledvina, M., Wen, A. M., Steinmetz, N. F., & Cigler, P.

- (2014). Fluorescent nanodiamonds embedded in biocompatible translucent shells. *Small*, *10*(6), 1106-1115. <https://doi.org/10.1002/sml.201302336>
- Reineck, P., Francis, A., Orth, A., Lau, D. W. M., Nixon-Luke, R. D. V., Rastogi, I. D., Razali, W. A. W., Cordina, N. M., Parker, L. M., Sreenivasan, V. K. A., Brown, L. J., & Gibson, B. C. (2016). Brightness and Photostability of Emerging Red and Near-IR Fluorescent Nanomaterials for Bioimaging. *Advanced Optical Materials*, *4*(10), 1549-1557. <https://doi.org/10.1002/adom.201600212>
- Richardson, C. D., Ray, G. J., DeWitt, M. A., Curie, G. L., & Corn, J. E. (2016). Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nature Biotechnology*, *34*(3), 339-344. <https://doi.org/10.1038/nbt.3481>
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B.-S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L., Drumm, M. L., Iannuzzi, M. C., Collins, F. S., & Tsui, L. C. (1989). Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science*, *245*(4922), 1066-1073. <https://doi.org/10.1126/science.2475911>
- Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B.-S., Drumm, M. L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J. L., Kennedy, D., Hidaka, N., Zsiga, M., Buchwald, M., Tsui, L. C., Riordan, J. R., & Collins, F. S. (1989). Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. *Science*, *245*(4922), 1059-1065. <https://doi.org/10.1126/science.2772657>
- Rondin, L., Dantelle, G., Slablab, A., Grosshans, F., Treussart, F., Bergonzo, P., Perruchas, S., Gacoin, T., Chaigneau, M., Chang, H. C., Jacques, V., & Roch, J. F. (2010). Surface-induced charge state conversion of nitrogen-vacancy defects in nanodiamonds. *Physical Review B*, *82*(11), 115449. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.82.115449>
- Rowe, S. M., & Verkman, A. S. (2013). Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Correctors and Potentiators. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *3*(7), a009761. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009761>

- Ruan, J., Hirai, H., Yang, D., Ma, L., Hou, X., Jiang, H., Wei, H., Rajagopalan, C., Mou, H., Wang, G., Zhang, J., Li, K., Chen, Y. E., Sun, F., & Xu, J. (2019). Efficient Gene Editing at Major CFTR Mutation Loci. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *16*, 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.006>
- Ruoslahti, E., Bhatia, S. N., & Sailor, M. J. (2010). Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *Journal of Cell Biology*, *188*(6), 759-768. <https://doi.org/10.1083/jcb.200910104>
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., & Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: Downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of Experimental Medicine*, *182*(2), 389-400. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.389>
- Santos, T. dos, Varela, J., Lynch, I., Salvati, A., & Dawson, K. A. (2011). Effects of Transport Inhibitors on the Cellular Uptake of Carboxylated Polystyrene Nanoparticles in Different Cell Lines. *PLOS ONE*, *6*(9), e24438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024438>
- Sato, Y., Mustafina, K. R., Luo, Y., Martini, C., Thomas, D. Y., Wiseman, P. W., & Hanrahan, J. W. (2021). Nonspecific binding of common anti-CFTR antibodies in ciliated cells of human airway epithelium. *Scientific Reports*, *11*(1), 23256. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02420-x>
- Shang, L., Nienhaus, K., Jiang, X., Yang, L., Landfester, K., Mailänder, V., Simmet, T., & Nienhaus, G. U. (2014). Nanoparticle interactions with live cells: Quantitative fluorescence microscopy of nanoparticle size effects. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *5*, 2388-2397. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.248>
- Shenderova, O. A., Shames, A. I., Nunn, N. A., Torelli, M. D., Vlasov, I., & Zaitsev, A. (2019). Review Article: Synthesis, properties, and applications of fluorescent diamond particles. *Journal of Vacuum Science & Technology B*, *37*(3), 030802. <https://doi.org/10.1116/1.5089898>
- Sheppard, D. N., Gray, M. A., Gong, X., Sohma, Y., Kogan, I., Benos, D. J., Scott-Ward, T. S., Chen, J.-H., Li, H., Cai, Z., Gupta, J., Li, C., Ramjeesingh, M., Berdiev, B. K., Ismailov,

- I. I., Bear, C. E., Hwang, T.-C., Linsdell, P., & Hug, M. J. (2004). The patch-clamp and planar lipid bilayer techniques: Powerful and versatile tools to investigate the CFTR Cl⁻ channel. *Journal of Cystic Fibrosis*, *3*, 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2004.05.046>
- Sheppard, D. N., & Welsh, M. J. (1999). Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiological Reviews*, *79*(1), S23-S45. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.S23>
- Shimomura, O. (2012). *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*. World Scientific.
- Shimomura, O., Masugi, T., Johnson, F. H., & Haneda, Y. (1978). Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorus gracilorostris*. *Biochemistry*, *17*(6), 994-998. <https://doi.org/10.1021/bi00599a008>
- Schrand, A. M., Dai, L., Schlager, J. J., Hussain, S. M., & Osawa, E. (2007). Differential biocompatibility of carbon nanotubes and nanodiamonds. *Diamond and Related Materials*, *16*(12), 2118-2123. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2007.07.020>
- Schrand, A. M., Huang, H., Carlson, C., Schlager, J. J., Omacr Sawa, E., Hussain, S. M., & Dai, L. (2007). Are diamond nanoparticles cytotoxic? *The Journal of Physical Chemistry. B*, *111*(1), 2-7. <https://doi.org/10.1021/jp066387v>
- Schwinn, M. K., Machleidt, T., Zimmerman, K., Eggers, C. T., Dixon, A. S., Hurst, R., Hall, M. P., Encell, L. P., Binkowski, B. F., & Wood, K. V. (2018). CRISPR-Mediated Tagging of Endogenous Proteins with a Luminescent Peptide. *ACS Chemical Biology*, *13*(2), 467-474. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00549>
- Slegerova, J., Hajek, M., Rehor, I., Sedlak, F., Stursa, J., Hruby, M., & Cigler, P. (2015). Designing the nanobiointerface of fluorescent nanodiamonds: Highly selective targeting of glioma cancer cells. *Nanoscale*, *7*(2), 415-420. <https://doi.org/10.1039/C4NR02776K>
- Slimmen, L. J. M., Giacalone, V. D., Schofield, C., Horati, H., Manaï, B. H. A. N., Estevão, S. C., Garratt, L. W., Peng, L., Tirouvanziam, R., Janssens, H. M., & Unger, W. W. J. (2023). Airway macrophages display decreased expression of receptors mediating and regulating scavenging in early cystic fibrosis lung disease. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1202009. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1202009>

- Smith, E., Giuliano, K. A., Shumate, J., Baillargeon, P., McEwan, B., Cullen, M. D., Miller, J. P., Drew, L., Scampavia, L., & Spicer, T. P. (2017). A Homogeneous Cell-Based Halide-Sensitive Yellow Fluorescence Protein Assay to Identify Modulators of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Ion Channel. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 15(8), 395-406. <https://doi.org/10.1089/adt.2017.810>
- Sotoma, S., Iimura, J., Igarashi, R., Hirosawa, K. M., Ohnishi, H., Mizukami, S., Kikuchi, K., Fujiwara, T. K., Shirakawa, M., & Tochio, H. (2016). Selective Labeling of Proteins on Living Cell Membranes Using Fluorescent Nanodiamond Probes. *Nanomaterials*, 6(4), 56. <https://doi.org/10.3390/nano6040056>
- Stutts, M. J., Canessa, C. M., Olsen, J. C., Hamrick, M., Cohn, J. A., Rossier, B. C., & Boucher, R. C. (1995). CFTR as a cAMP-Dependent Regulator of Sodium Channels. *Science*, 269(5225), 847-850. <https://doi.org/10.1126/science.7543698>
- Suarez-Kelly, L. P., Sun, S. H., Ren, C., Rampersaud, I. V., Albertson, D., Duggan, M. C., Noel, T. C., Courtney, N., Buteyn, N. J., Moritz, C., Yu, L., Yildiz, V. O., Butchar, J. P., Tridandapani, S., Rampersaud, A. A., & Carson, W. E. I. (2021). Antibody Conjugation of Fluorescent Nanodiamonds for Targeted Innate Immune Cell Activation. *ACS Applied Nano Materials*, 4(3), 3122-3139. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c00256>
- Tabcharani, J. A., Chang, X.-B., Riordan, J. R., & Hanrahan, J. W. (1991). Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature*, 352(6336), 628-631. <https://doi.org/10.1038/352628a0>
- Taylor, M. E., Bezouska, K., & Drickamer, K. (1992). Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(3), 1719-1726. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)46005-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)46005-X)
- Taylor, M. E., & Drickamer, K. (1993). Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(1), 399-404. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54164-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54164-8)

- Taylor, P. R., Gordon, S., & Martinez-Pomares, L. (2005). The mannose receptor: Linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends in Immunology*, 26(2), 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.12.001>
- Thurn, K. T., Brown, E., Wu, A., Vogt, S., Lai, B., Maser, J., Paunesku, T., & Woloschak, G. E. (2007). Nanoparticles for applications in cellular imaging. *Nanoscale Research Letters*, 2(9), 430-441. <https://doi.org/10.1007/s11671-007-9081-5>
- T. Chou, L. Y., Ming, K., & W. Chan, W. C. (2011). Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 40(1), 233-245. <https://doi.org/10.1039/C0CS00003E>
- Torelli, M. D., Nunn, N. A., & Shenderova, O. A. (2019). A Perspective on Fluorescent Nanodiamond Bioimaging Special Issue Topic: Nanocarbon Chemistry. *Small*, 15(48), e1902151. <https://doi.org/10.1002/sml.201902151>
- Tsui, L. C., & Dorfman, R. (2013). The Cystic Fibrosis Gene: A Molecular Genetic Perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(2), a009472. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009472>
- Turcios, N. L. (2020). Cystic Fibrosis Lung Disease: An Overview. *Respiratory Care*, 65(2), 233-251. <https://doi.org/10.4187/respcare.06697>
- Turcheniuk, K., & Mochalin, V. N. (2017). Biomedical applications of nanodiamond (Review). *Nanotechnology*, 28(25), 252001. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa6ae4>
- Turton, K. B., Ingram, R. J., & Valvano, M. A. (2021). Macrophage dysfunction in cystic fibrosis: Nature or nurture? *Journal of Leukocyte Biology*, 109(3), 573-582. <https://doi.org/10.1002/JLB.4RU0620-245R>
- Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2020). Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Frontiers in Immunology*, 11, 1066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>
- Ussing, H. H., & Zerahn, K. (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiologica Scandinavica*, 23(2-3), 110-127. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1951.tb00800.x>

- Vaijayanthimala, V., Tzeng, Y. K., Chang, H. C., & Li, C. L. (2009). The biocompatibility of fluorescent nanodiamonds and their mechanism of cellular uptake. *Nanotechnology*, 20(42), 425103. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/42/425103>
- van der Laan, K., Hasani, M., Zheng, T., & Schirhagl, R. (2018). Nanodiamonds for In Vivo Applications. *Small*, 14(19), 1703838. <https://doi.org/10.1002/sml.201703838>
- van Meegen, M. A., Terheggen, S. W. J., Koymans, K. J., Vijftigschild, L. A. W., Dekkers, J. F., van der Ent, C. K., & Beekman, J. M. (2013). CFTR-mutation specific applications of CFTR-directed monoclonal antibodies. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12(5), 487-496. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2012.12.005>
- Varga, K., Jurkuvenaite, A., Wakefield, J., Hong, J. S., Guimbellot, J. S., Venglarik, C. J., Niraj, A., Mazur, M., Sorscher, E. J., Collawn, J. F., & Bebök, Z. (2004). Efficient Intracellular Processing of the Endogenous Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Epithelial Cell Lines *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 22578-22584. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401522200>
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., & Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics*, 3(3), 281. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-3-3-281>
- Veit, G., Avramescu, R. G., Chiang, A. N., Houck, S. A., Cai, Z., Peters, K. W., Hong, J. S., Pollard, H. B., Guggino, W. B., Balch, W. E., Skach, W. R., Cutting, G. R., Frizzell, R. A., Sheppard, D. N., Cyr, D. M., Sorscher, E. J., Brodsky, J. L., & Lukacs, G. L. (2016). From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: Expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Molecular Biology of the Cell*, 27(3), 421-598. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-04-0935>
- Verbij, F. C., Sorvillo, N., Kaijen, P. H. P., Hrdinova, J., Peyron, I., Fijnheer, R., Ten Brinke, A., Meijer, A. B., van Alphen, F. P. J., van den Berg, T. K., Graversen, J. J. H., Moestrup, S. K., & Voorberg, J. (2017). The class I scavenger receptor CD163 promotes internalization of ADAMTS13 by macrophages. *Blood Advances*, 1(5), 293-305. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016001321>

- Vergani, P., Lockless, S. W., Nairn, A. C., & Gadsby, D. C. (2005). CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature*, *433*(7028), 876-880. <https://doi.org/10.1038/nature03313>
- Verhaegen, M., & Christopoulos, T. K. (2002). Recombinant Gaussia Luciferase. Overexpression, Purification, and Analytical Application of a Bioluminescent Reporter for DNA Hybridization. *Analytical Chemistry*, *74*(17), 4378-4385. <https://doi.org/10.1021/ac025742k>
- Verkman, A. S. (2004). Drug discovery in academia. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *286*(3), C465-C474. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00397.2003>
- Verkman, A. S., & Galletta, L. J. V. (2005). *In Vitro/Ex Vivo Fluorescence Assays of CFTR Chloride Channel Function*. *69*(3): 343–344. <https://doi.org/10.1159/000088486>
- Verkman, A. S., & Jayaraman, S. (2002). Fluorescent Indicator Methods to Assay Functional CFTR Expression in Cells. In W. R. Skach (Ed.), *Cystic Fibrosis Methods and Protocols* (187–196). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-187-6:187>
- Wachter, R. M., Elsliger, M. A., Kallio, K., Hanson, G. T., & Remington, S. J. (1998). Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure*, *6*(10), 1267-1277. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00127-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00127-0)
- Watson, M. J., Lee, S. L., Marklew, A. J., Gilmore, R. C., Gentzsch, M., Sassano, M. F., Gray, M. A., & Tarran, R. (2016). The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Uses its C-Terminus to Regulate the A2B Adenosine Receptor. *Scientific Reports*, *6*(1), 27390. <https://doi.org/10.1038/srep27390>
- Weng, M. F., Chiang, S. Y., Wang, N. S., & Niu, H. (2009). Fluorescent nanodiamonds for specifically targeted bioimaging: Application to the interaction of transferrin with transferrin receptor. *Diamond and Related Materials*, *18*(2), 587-591. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2008.07.012>
- White, C. W., Caspar, B., Vanyai, H. K., Pflieger, K. D. G., & Hill, S. J. (2020). CRISPR-Mediated Protein Tagging with Nanoluciferase to Investigate Native Chemokine Receptor Function and Conformational Changes. *Cell Chemical Biology*, *27*(5), 499-510. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.01.010>

- Wilson, E. R., Parker, L. M., Orth, A., Nunn, N., Torelli, M., Shenderova, O., Gibson, B. C., & Reineck, P. (2019). The effect of particle size on nanodiamond fluorescence and colloidal properties in biological media. *Nanotechnology*, 30(38), 385704. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab283d>
- Wolff, C., Fuks, B., & Chatelain, P. (2003). Comparative Study of Membrane Potential-Sensitive Fluorescent Probes and their Use in Ion Channel Screening Assays. *Journal of Biomolecular Screening*, 8(5), 533-543. <https://doi.org/10.1177/1087057103257806>
- Wright, A. K. A., Rao, S., Range, S., Eder, C., Hofer, T. P. J., Frankenberger, M., Kobzik, L., Brightling, C., Grigg, J., & Ziegler-Heitbrock, L. (2009). Pivotal Advance: Expansion of small sputum macrophages in CF: failure to express MARCO and mannose receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(3), 479-489. <https://doi.org/10.1189/jlb.1108699>
- Wu, T. J., Tzeng, Y. K., Chang, W. W., Cheng, C. A., Kuo, Y., Chien, C. H., Chang, H. C., & Yu, J. (2013). Tracking the engraftment and regenerative capabilities of transplanted lung stem cells using fluorescent nanodiamonds. *Nature Nanotechnology*, 8(9), 682-689. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.147>
- Xing, Y., Xiong, W., Zhu, L., Ōsawa, E., Hussin, S., & Dai, L. (2011). DNA Damage in Embryonic Stem Cells Caused by Nanodiamonds. *ACS Nano*, 5(3), 2376-2384. <https://doi.org/10.1021/nn200279k>
- Yoshimura, K., Nakamura, H., Trapnell, B. C., Chu, C. S., Dalemans, W., Pavirani, A., Lecocq, J. P., & Crystal, R. G. (1991). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin. *Nucleic Acids Research*, 19(19), 5417-5423. <https://doi.org/10.1093/nar/19.19.5417>
- Yu, S. J., Kang, M. W., Chang, H. C., Chen, K. M., & Yu, Y. C. (2005). Bright fluorescent nanodiamonds: No photobleaching and low cytotoxicity. *Journal of the American Chemical Society*, 127(50), 17604–17605. <https://doi.org/10.1021/ja0567081>
- Zaitsev, A. M. (2001). *Optical Properties of Diamond*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-04548-0>
- Zhang, C., Zhang, G., Zhang, Y., Lin, X., Zhao, X., Cui, Q., Rong, L., & Du, R. (2023). Development of an HiBiT-tagged reporter H3N2 influenza A virus and its utility as an

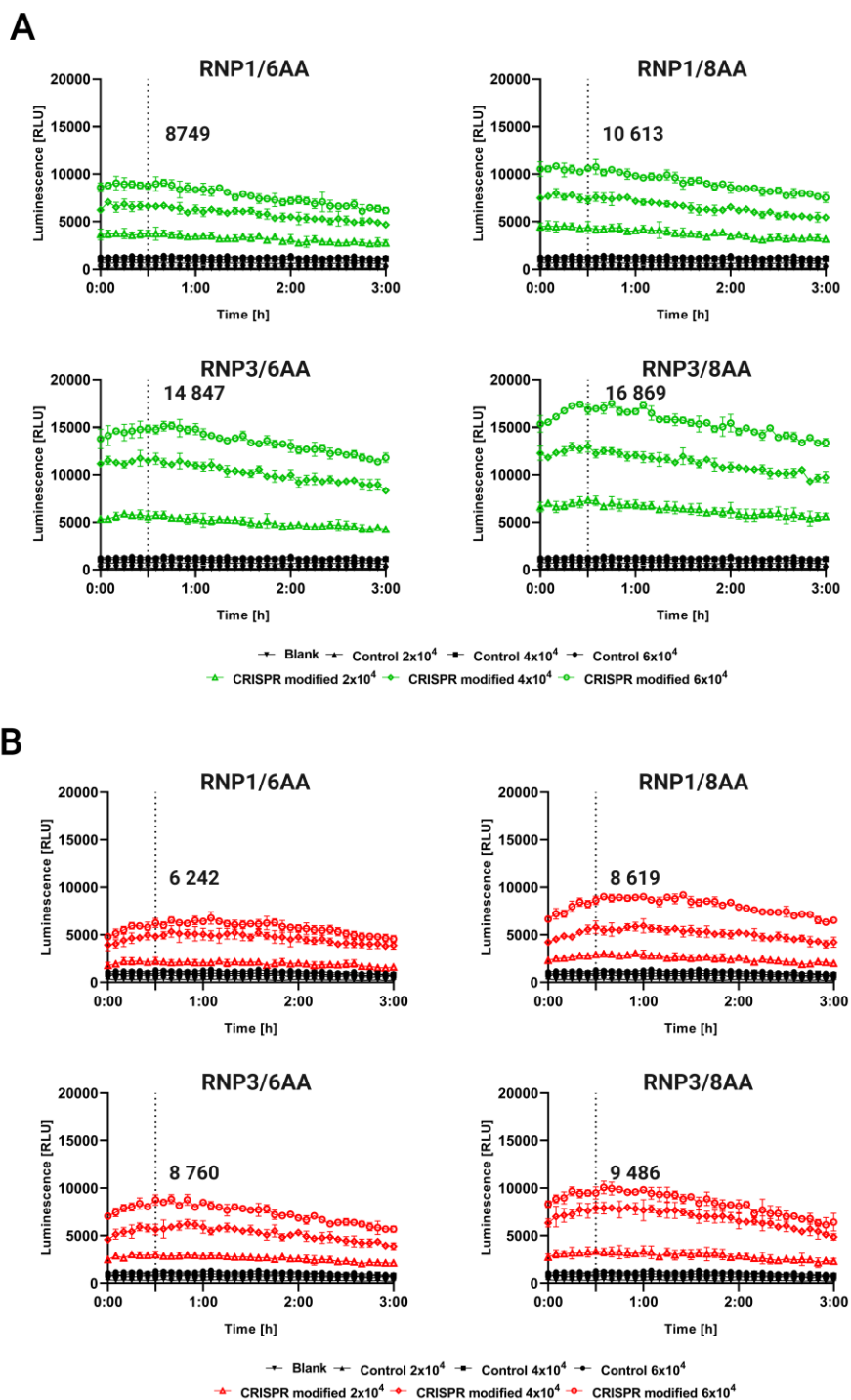
antiviral screening platform. *Journal of Medical Virology*, 95(1), e28345. <https://doi.org/10.1002/jmv.28345>

Zhang, T., Ma, L., Wang, L., Xu, F., Wei, Q., Wang, W., Lin, Y., & Chu, Z. (2021). Scalable Fabrication of Clean Nanodiamonds via Salt-Assisted Air Oxidation: Implications for Sensing and Imaging. *ACS Applied Nano Materials*, 4(9), 9223-9230. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c01751>

Zhu, Y., Li, J., Li, W., Zhang, Y., Yang, X., Chen, N., Sun, Y., Zhao, Y., Fan, C., & Huang, Q. (2012). The biocompatibility of nanodiamonds and their application in drug delivery systems. *Theranostics*, 2(3), 302-312. <https://doi.org/10.7150/thno.3627>

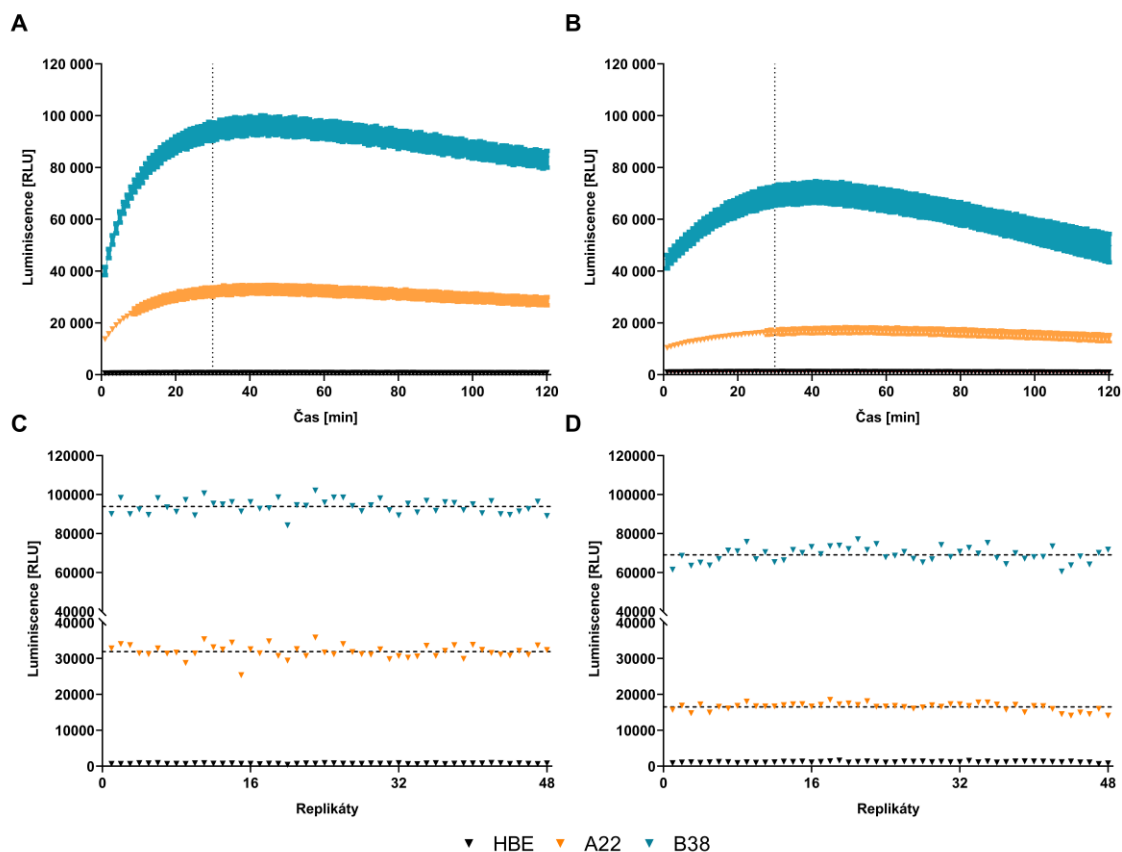
Zielenski, J. (2000). Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases*, 67(2), 117-133. <https://doi.org/10.1159/000029497>

11. SUPPLEMENT



Obrázek S1. Srovnání ssODN s 6AA a 8AA linkery pro vložení HiBiT značky po 14 dnech od elektroporace. A) Lytický test a B) Extracelulární test 14 dní po transfekci buněk. Byly testovány tři různé koncentrace buněk (2×10^3 , 4×10^3 a 6×10^3). Zvýrazněná

čísla v grafech představují signál pro nejvyšší koncentraci buněk po 30 minutách (průměr \pm SD, n=3, technická opakování). Blank - pozadí lytického/extracelulárního testu bez přítomnosti buněk, Control = nemodifikované buňky HBE, CRISPR modified – buňky modifikované RNP komplexy a ssODN s různou délkou aminokyselinových linkerů.



Obrázek S2. Kinetika signálu a homogenita replikátů v 384jamkových destičkách.

A) Kinetika luminiscenčního signálu celkové hladiny WT-CFTR-HiBiT v lytickém testu.
B) Kinetika luminiscenčního signálu WT-CFTR-HiBiT v PM, extracelulární test. Chybové úsečky v **A)** a **B)** představují směrodatnou odchylku pro n = 48. **C)** a **D)** Distribuce technických replikátů v 30minutovém časovém bodě, označeném tečkovanou čarou v **A)** a **B)**, v tomto pořadí. Všechny experimenty byly provedeny ve třech biologických opakováních.

Tabulka S1. Sekvence crRNA a ssODN. Červená tučná **PÍSMENA** označují HiBiT (33 bp), zelená tučná **PÍSMENA** označují AA linkery (18 nebo 24 bp), modrá malá **písmena** označují synonymní mutace v donorových ssODN a podtržení označuje umístění PAM sekvence.

Název	Oligo sekvence
crRNA1	CACATAATACGAAC <u>TGGTGG</u>
crRNA2	GTAAACACATAATACGAAC <u>TGG</u>
crRNA3	GCACTCCTCTTCAAGACAAAGGG
crRNA4	AGCACTCCTCTTCAAGACAAAGG
ssODN_crRNA1_6AA_HiBiT_6AA antisense	5'-GCTTTACAGCACTCCTCTTCAAGACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAACAGCTATGCAGTGATTATCAC <u>AG</u> CACCGG CAGCGGCAGCGGCAGCGTAGCGGCTGGCGCTGTTCAAGAAGATTAGCGGCAGCGGCAGCG GCGCAGTTCGTATTATGTGTTTTACATTTACGTGGGAG-3'
ssODN_crRNA1_8AA_HiBiT_8AA antisense	5'-GCTTTACAGCACTCCTCTTCAAGACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAACAGCTATGCAGTGATTATCAC <u>AG</u> CACCGG CAGCGGCAGCGGCAGCGGCAGCGTAGCGGCTGGCGCTGTTCAAGAAGATTAGCGGCAGCG GCGCGGCAGCGGCAGCAGTTCGTATTATGTGTTTTACATTTACGTGGGAG-3'
ssODN_crRNA3_6AA_HiBiT_6AA antisense	5'-ATGTAAACACATAATACGAAC <u>TGGTGGTGGTATAATCACTGCATAGCTGTTATTCTACTATGAGTACTATT</u> <u>CCCTT</u> <u>TGCTGCCGCTGCCGCTGCCGCTAATCTCTTGAACAGCCGCCAGCCGCTCAGCGTGCCCGCTGCC</u> GTCTTGAAGAGGAGTGCTGTAAAGCAAATAGGAAAT-3'
ssODN_crRNA3_8AA_HiBiT_8AA antisense	5'-ATGTAAACACATAATACGAAC <u>TGGTGGTGGTATAATCACTGCATAGCTGTTATTCTACTATGAGTACTATT</u> <u>CCCTT</u> <u>TGCTGCCGCTGCCGCTGCCGCTGCCGCTAATCTCTTGAACAGCCGCCAGCCGCTCAGCGTGCCCGCTGCC</u> <u>GCTGCCGCTGCC</u> GTCTTGAAGAGGAGTGCTGTAAAGCAAATAGGAAAT-3'

Tabulka S2. Pozice CRISPR/Cas9 nesespecifických cílů pro crRNA1 (klon A22) a crRNA3 (klon B38). Neshody v nesespecifických sekvencích crRNA jsou znázorněny jako tučná červená malá **písmena**. Potenciální nesespecifická místa pro editaci genů CRISPR/Cas9 byla amplifikována pomocí forward (F) a reverse (R) primerů. F primer byl použit pro Sangerovo sekvenování.

Klon	Off-target	Počet neshod	Sekvence nesespecifických cílů	Forward primer	Reverse primer
B38	chr17:15,146,779	3	CCTT T GT C aTGAAGAG G g G TG C	GAGCTCTTACCTTCCCCAC	AAGCTACAGTGCTGGGCAAT
	chr18:1,662,571	3	G C c C TCTCTT A AG G CAAAGGG	AGGCGGCAGATAAAGACAGT	AGCATGCCTAGAAAGTGGTGT
	chr5:3,196,548	3	CCTTTTGTCTT G AG A GA c T G C	GCCAGCTCAAGACTGATGGT	GGGTGTGAATTCCCATGCC
	chr5:166,841,613	3	CCATT T G T TTGAAG A IG I GT G C	GCCTGTGTAAACCCCTCAC	CACTATGCATTATGGCCACA
A22	chr5:53,420,108	3	CACATA c T G C T AACTGGTGT G T G	GCCTCCCTGATCTACGCTTT	TCTGTGGTCACCTCCAGGAT

Tabulka S3. Viabilita buněk. Relativní životaschopnost (% kontroly) buněk J774A.1 ošetřených FND-p/FND-p-Man byla měřena pomocí MTS testu. Všechna biologická opakování byla provedena ve 3 technických opakováních. Statistická analýza byla provedena pomocí jednocestné ANOVA- Dunnett test, přičemž ns = nesignifikantní; * = $p \leq 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

µg/ml	FND-p (% of kontroly)				FND-p-Man (% of kontroly)			
	%	SD	N	p-hodnota	%	SD	N	p-hodnota
0	100.00	0.00	3	ns	100.00	0.00	3	ns
5	98.89	15.91	3	ns	93.87	15.08	3	ns
10	100.53	1.76	3	ns	90.67	5.88	3	ns
20	105.06	3.52	3	ns	92.78	4.37	3	ns
50	109.97	11.77	3	ns	91.22	9.13	3	ns
100	110.82	9.96	3	ns	91.33	11.26	3	ns
200	107.92	12.04	3	ns	93.48	17.71	3	ns

Tabulka S4. Kvantifikace fagocytózy FND. Kinetika FND-p/FND-p-Man internalizace byla stanovena pomocí konfokální mikroskopie (průměr spotů/buňku). Experiment byl proveden ve 3 biologických opakováních. Každý biologický replikát byl proveden v technickém triplicátu (pro analýzu bylo použito nejméně 1500 buněk/technický replikát). Statistická analýza byla provedena pomocí dvoucestné ANOVA - Tukey test, přičemž ns = nesignifikantní; * = $p \leq 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

Čas (h)	Ctrl			FND-p				FND-p-Man			
	Počet	SD	N	Počet	SD	N	p-hodnota	Počet	SD	N	p-hodnota
0:00:00	0.2162	0.2971	3	0.1546	0.1588	3	ns	0.2001	0.1853	3	ns
1:00:00	0.1637	0.2059	3	0.1522	0.1513	3	ns	0.3276	0.0876	3	ns
3:00:00	0.1547	0.1853	3	0.1813	0.1690	3	ns	2.1425	1.3017	3	ns
6:00:00	0.1546	0.1967	3	0.2779	0.2414	3	ns	6.6022	3.2442	3	***
9:00:00	0.1683	0.1993	3	0.5242	0.3774	3	ns	9.6675	4.0991	3	****
12:00:00	0.1927	0.2163	3	0.8357	0.5675	3	ns	12.0500	4.7702	3	****

Tabulka S5. Kvantifikace inhibice fagocytózy FND-p-Man. Kinetika inhibice FND-p-Man internalizace mananem (1 mg/ml) a 15.2 mAb (30 µg/ml) byla stanovena pomocí konfokální mikroskopie (průměr spotů/buňku). Experiment byl proveden ve 3 biologických opakováních. Každý biologický replikát byl proveden v technickém triplikátu (pro analýzu bylo použito nejméně 1500 buněk/technický replikát). Statistická analýza byla provedena pomocí dvoucestné ANOVA - Tukey test, přičemž ns = nesignifikantní; * = $p \leq 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

Čas (h)	FND-p-Man			FND-p-Man + 15.2 mAb				FND-p-Man + manan			
	Počet	SD	N	Počet	SD	N	p-hodnota	Počet	SD	N	p-hodnota
0:00:00	0.2001	0.1853	3	0.1848	0.1451	3	ns	0.1543	0.1464	3	ns
1:00:00	0.3276	0.0876	3	0.3502	0.2059	3	ns	0.3119	0.0148	3	ns
3:00:00	2.1425	1.3017	3	0.9744	0.3382	3	ns	0.6425	0.2369	3	ns
6:00:00	6.6022	3.2442	3	2.7113	0.6029	3	*	0.9876	0.3427	3	**
9:00:00	9.6675	4.0991	3	4.1386	1.0244	3	**	1.3021	0.3335	3	****
12:00:00	12.0500	4.7702	3	5.5569	1.1582	3	***	2.0715	0.5632	3	****

12. PŘÍLOHY

Příloha 1

M. ONDRA, L. LENART, A. CENTORAME, D. DUMUT, A. HE, S. ZAIDI, J. HANRAHAN, J. DE SANCTIS, D. RADZIOCH, M. HAJDUCH. CRISPR/Cas9 bioluminescence-based assay for monitoring CFTR trafficking to the plasma membrane. *Life Science Alliance*. **2023**, 7(1), e202302045, ISSN: 2575-1077. DOI: 10.26508/lsa.202302045. **IF: 4.4. PRVOATORSKÁ PUBLIKACE.**

Příloha 2

K. KVAKOVA, M. ONDRA, J. SCHIMER, M. PETRIK, Z. NOVY, H. RAABOVA, M. HAJDÚCH, P. CIGLER. Visualization of Sentinel Lymph Nodes with Mannosylated Fluorescent Nanodiamonds. *Advanced Functional Materials*. **2022**, 32(23), 2109960, ISSN: 1616-301X. DOI: 10.1002/adfm.202109960. **IF: 19.0. SDÍLENÁ PRVOATORSKÁ PUBLIKACE.**

Příloha 3

A. CENTORAME, D. DUMUT, M. YOUSSEF, M. ONDRA, I. KIANICKA, J. SHAH, R. PAUN, T. OZDIAN, J. HANRAHAN, E. GUSEV, B. PETROF, M. HAJDUCH, R. PISLARIU, J. DE SANCTIS, D. RADZIOCH. Treatment With LAU-7b Complements CFTR Modulator Therapy by Improving Lung Physiology and Normalizing Lipid Imbalance Associated With CF Lung Disease. *Frontiers in Pharmacology*. **2022**, 13, 876842, ISSN: 1664-3224. DOI: 10.3389/fphar.2022.876842. **IF: 5.6.**






PŘÍLOHA 1

M. ONDRA, L. LENART, A. CENTORAME, D. DUMUT, A. HE, S. ZAIDI, J. HANRAHAN, J. DE SANCTIS, D. RADZIOCH, M. HAJDUCH. CRISPR/Cas9 bioluminescence-based assay for monitoring CFTR trafficking to the plasma membrane. *Life Science Alliance*. **2023**, 7(1), e202302045, ISSN: 2575-1077. DOI: 10.26508/lsa.202302045. **IF: 4.4.**

Methods



CRISPR/Cas9 bioluminescence-based assay for monitoring CFTR trafficking to the plasma membrane

Martin Ondra^{1,4} , Lukas Lenart¹, Amanda Centorame^{2,3}, Daciana C Dumut^{2,3}, Alexander He⁵, Syeda Sadaf Zehra Zaidi⁵, John W Hanrahan^{3,5} , Juan Bautista De Sanctis¹ , Danuta Radzioch^{1,2,3} , Marian Hajduch^{1,4,6} 

CFTR is a membrane protein that functions as an ion channel. Mutations that disrupt its biosynthesis, trafficking or function cause cystic fibrosis (CF). Here, we present a novel in vitro model system prepared using CRISPR/Cas9 genome editing with endogenously expressed WT-CFTR tagged with a HiBiT peptide. To enable the detection of CFTR in the plasma membrane of live cells, we inserted the HiBiT tag in the fourth extracellular loop of WT-CFTR. The 11-amino acid HiBiT tag binds with high affinity to a large inactive subunit (LgBiT), generating a reporter luciferase with bright luminescence. Nine homozygous clones with the HiBiT knock-in were identified from the 182 screened clones; two were genetically and functionally validated. In summary, this work describes the preparation and validation of a novel reporter cell line with the potential to be used as an ultimate building block for developing unique cellular CF models by CRISPR-mediated insertion of CF-causing mutations.

DOI [10.26508/lsa.202302045](https://doi.org/10.26508/lsa.202302045) | Received 17 March 2023 | Revised 20 October 2023 | Accepted 20 October 2023 | Published online 2 November 2023

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is a lethal, autosomal recessive disorder caused by mutations in the *CFTR* gene that results in aberrant transport of chloride, bicarbonate, and sodium ions (Kerem et al, 1989; Riordan et al, 1989; Rommens et al, 1989; Tabcharani et al, 1991; Poulsen et al, 1994; Stutts et al, 1995; Mall et al, 1996). CF affects the function of sweat glands, pancreas, liver, gastrointestinal tract, and reproductive and respiratory systems (Molina & Hunt, 2017). Despite the systemic nature of CF, recurrent lung infections are the major cause of morbidity and mortality (Turcios, 2020). Defective ions and fluid transport in the airway epithelia alter extracellular pH and lead to dehydration of the airway surface, translating into the impaired mucociliary clearance of thick, sticky mucus (Poulsen et al, 1994; Coakley et al, 2003; Boucher, 2007). These changes promote airway infections eliciting intense yet unresolved inflammation

(Pezzulo et al, 2012; Cantin et al, 2015). The vicious cycle of infection and inflammation leads to permanent structural airway damage and the development of bronchiectasis that, together with small airway obstruction, contributes to respiratory failure (Cantin et al, 2015; Turcios, 2020).

The *CFTR* gene spans ~190 kb on the long arm of chromosome 7 (7q31.2). Its 27 exons are translated into a 1,480-amino acid CFTR protein (Riordan et al, 1989; Tsui & Dorfman, 2013). CFTR, a member of the ATP-binding cassette protein superfamily, consists of two transmembrane domains, two nucleotide-binding domains (NBD), and a regulatory domain (RD). CFTR differs from the rest of the human ATP-binding cassette proteins in its structure and function, as it comprises a unique RD and operates as a cAMP-dependent ATP-gated ion channel (Sheppard & Welsh, 1999; Dean et al, 2001; Lopes-Pacheco, 2020). The transmembrane domains span through the plasma membrane (PM), each by six helical segments, and form the channel pore (Riordan et al, 1989; Sheppard & Welsh, 1999; Liu et al, 2017). The highly organized NBDs are localized in the cytosol with the unorganized RD containing recognition sequences for PKA and PKC phosphorylation (Rommens et al, 1989; Jia et al, 1997; Sheppard & Welsh, 1999). CFTR channel opening is induced by the dimerization of NBDs upon binding of two molecules of ATP. As the NBD1 is sterically blocked by the RD domain in the inactive state, both the regulatory insertion segment of NBD1, and the RD, need to be phosphorylated by PKA to enable the NBD dimerization. The ATP-dependent gating cycle is completed by the hydrolysis of ATPs returning the channel to its closed state (Sheppard & Welsh, 1999; Vergani et al, 2005; Sorum et al, 2017; Zhang et al, 2017; Della Sala et al, 2021).

With over 2,000 identified *CFTR* mutation variants (The clinical and Functional TRanslation of CFTR, 2023), the most common mutation is the deletion of three nucleotides leading to the loss of phenylalanine at position 508 of the CFTR protein ($\Delta F508$). ~90% of people with CF (PwCF) carry at least one copy of $\Delta F508$, with 50% being $\Delta F508$ homozygotes (Guo et al, 2022). Conventionally, *CFTR* mutations are classified into six classes based on their effect on

¹Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic ²Faculty of Medicine and Health Sciences, McGill University, Montreal, Canada ³RI-MUHC, Montreal, Canada ⁴Czech Advanced Technology and Research Institute, Palacky University, Olomouc, Czech Republic ⁵Physiology, McGill University, Montreal, Canada ⁶Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic

Correspondence: danuta.radzioch@mcgill.ca; marian.hajduch@upol.cz

CFTR biosynthesis and cellular phenotype (Zielenski, 2000; Boyle & De Boeck, 2013). Whereas the first two classes (I, II) are characterized by the absence of CFTR in the PM, the other four classes (III–VI) comprise *CFTR* mutations affecting channel function and/or the amount of CFTR protein rather than its trafficking. However, it has been described that some mutations result in a pleiotropic defect of the CFTR. For example, in the case of class II mutation $\Delta F508$, most of the misfolded proteins do not reach the PM as they undergo endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD). Nonetheless, some of the misfolded $\Delta F508$ -CFTR can escape ERAD, thus reaching the PM, where they exhibit decreased activity and stability, both characteristic traits of class III and VI mutations (Veit et al, 2016).

As mentioned above, numerous mutations give rise to CF. Apart from conventional supportive therapy, focusing on alleviating CF symptoms, there has been a serious effort regarding the development of small molecules called modulators that can target and rectify the underlying CFTR defects. The most prominent categories of CFTR modulators are correctors and potentiators. Whereas correctors mediate the proper folding of mutated CFTR, thus enabling its glycosylation and membrane localization, potentiators increase the channel conductance and the open-state probability of CFTR already located in the PM (Rowe & Verkman, 2013; Lopes-Pacheco, 2016). Over the last two decades, a wide variety of HTS assays have been established to identify CFTR modulators. These assays can either address the channel function by directly or indirectly measuring CFTR ion flux (Ramalho et al, 2022) or assess CFTR localization via its epitope tagging (Carlile et al, 2007). The generation of a halide-sensitive YFP probe (Jayaraman et al, 2000; Galiotta et al, 2001a) resulted in significant advancement in the field of functional HTS assays (Galiotta et al, 2001b; Ma et al, 2002; Smith et al, 2017). Equally, the tagging of WT and $\Delta F508$ CFTR extracellular loops with HA and FLAG tags (Howard et al, 1995; Carlile et al, 2007), without disrupting the protein folding and trafficking, opened a new chapter in the HTS identification of modulators that target defects in CFTR synthesis, processing, and subsequent membrane localization (class I and II mutations). Despite their unquestionable contribution to the development of CFTR modulators, the above-mentioned assays rely on the exogenous overexpression of mutated CFTR. This overexpression does not reflect the natural state of the cell and may lead to the disruption of the balanced stoichiometry of protein complexes and nonphysiological artifacts (Prelich, 2012; Moriya, 2015). As the exogenous mutated CFTR is expressed from cDNA, it does not capture the fundamental aspects of CFTR processing. Therefore, these models are inadequate for the identification of modulators targeting splicing mutations, intronic SNPs, and premature termination codons (Clancy et al, 2019).

Utilizing CRISPR/Cas9-mediated genome editing (Jinek et al, 2012; Cong et al, 2013) and the structural complementation reporter system HiBiT/LgBiT (Schwinn et al, 2018), we developed a bioluminescence-based assay for quantifying and localizing endogenously expressed WT-CFTR. The HiBiT/LgBiT is a bioluminescent binary reporter system derived from previously engineered NanoLuc luciferase (Hall et al, 2012). It takes advantage of the NanoLuc binary technology (NanoBiT; Dixon et al, 2016) exploiting the assembly of split NanoLuc from its 18-kD subunit called Large BiT (LgBiT) and a small complementary subunit. Several variants of small complementary subunits have been developed with various

affinities to LgBiT. One of them, an 11-amino acid peptide (1.3 kD), termed HiBiT (Schwinn et al, 2018), produces bright and quantitative luminescence upon high-affinity complementation with LgBiT in the presence of a substrate. Its small size makes HiBiT an ideal tag for monitoring endogenously expressed proteins when inserted by genome editing. The HiBiT-tagged proteins can easily be quantified and localized by “Add and Read” assays.

This study describes simple cell-based “Add and Read” assays for detecting endogenous levels of WT-CFTR and its membrane localization. CFTR expression, glycosylation, localization, and function are preserved after HiBiT knock-in into the fourth extracellular loop (ECL4) of WT-CFTR. siRNA-mediated knockdown of CFTR demonstrates the utility of our assays. Our validated cell-based model provides a platform for preparing new CF HTS models using the direct introduction of specific mutations by genome editing. Furthermore, our optimized pipeline for CRISPR/Cas9-mediated HiBiT knock-in enables the insertion of HiBiT into CFTR protein variants in other cell lines, allowing the creation of novel models for *CFTR* mutations with currently no available therapies.

Results

Assay design and principle

To develop novel bioluminescence-based assays for total quantification and live-cell detection of WT-CFTR in the PM, we used NanoBiT (Dixon et al, 2016) in combination with CRISPR/Cas9 gene editing. The NanoBiT is a unique fragment complementation reporter composed of two counterparts, HiBiT (1.3 kD) and Large BiT (LgBiT; 18 kD), derived from NanoLuc luciferase. We investigated two potential positions for CRISPR/Cas9-mediated knock-in of HiBiT in the ECL4 of WT-CFTR (Fig 1A) for bioluminescence-based quantification of both total endogenous levels (lytic assay) and live-cell detection of WT-CFTR in the PM (extracellular assay). In the lytic assay (Fig 1B), cells expressing WT-CFTR-HiBiT seeded in multi-well plates were lysed in a detergent-containing buffer in the presence of LgBiT and the substrate furimazine, followed by detection of luminescence. In contrast, no detergent was added in the reaction buffer when measuring live-cell plasma membrane localization in the extracellular assay (Fig 1B), so that only HiBiT-tagged proteins on the cell surface were detected. The luminescent signal in both assays was proportional to the amount of HiBiT-tagged CFTR in the cell lysate or in the PM of cells. Volumes were optimized for 96-well and 384-well plates for optimal assay performance, following a 1:1 ratio of medium (without FBS): Nano-Glo reagent for the lytic/extracellular assay, with volume ratios of 12.5:12.5 μ l for 384-well and 50:50 μ l for 96-well plates.

Design and validation of Cas9/gRNA cleavage efficiency

Two potential insertion sites for the HiBiT tag were selected based on the limited availability of the protospacer adjacent motif (PAM) sequences in ECL4 (Fig 2A). These sequences are required for the Cas9 function. We designed four different CRISPR RNAs (crRNAs; Fig 2B), located directly upstream to the PAM sequences, targeting a

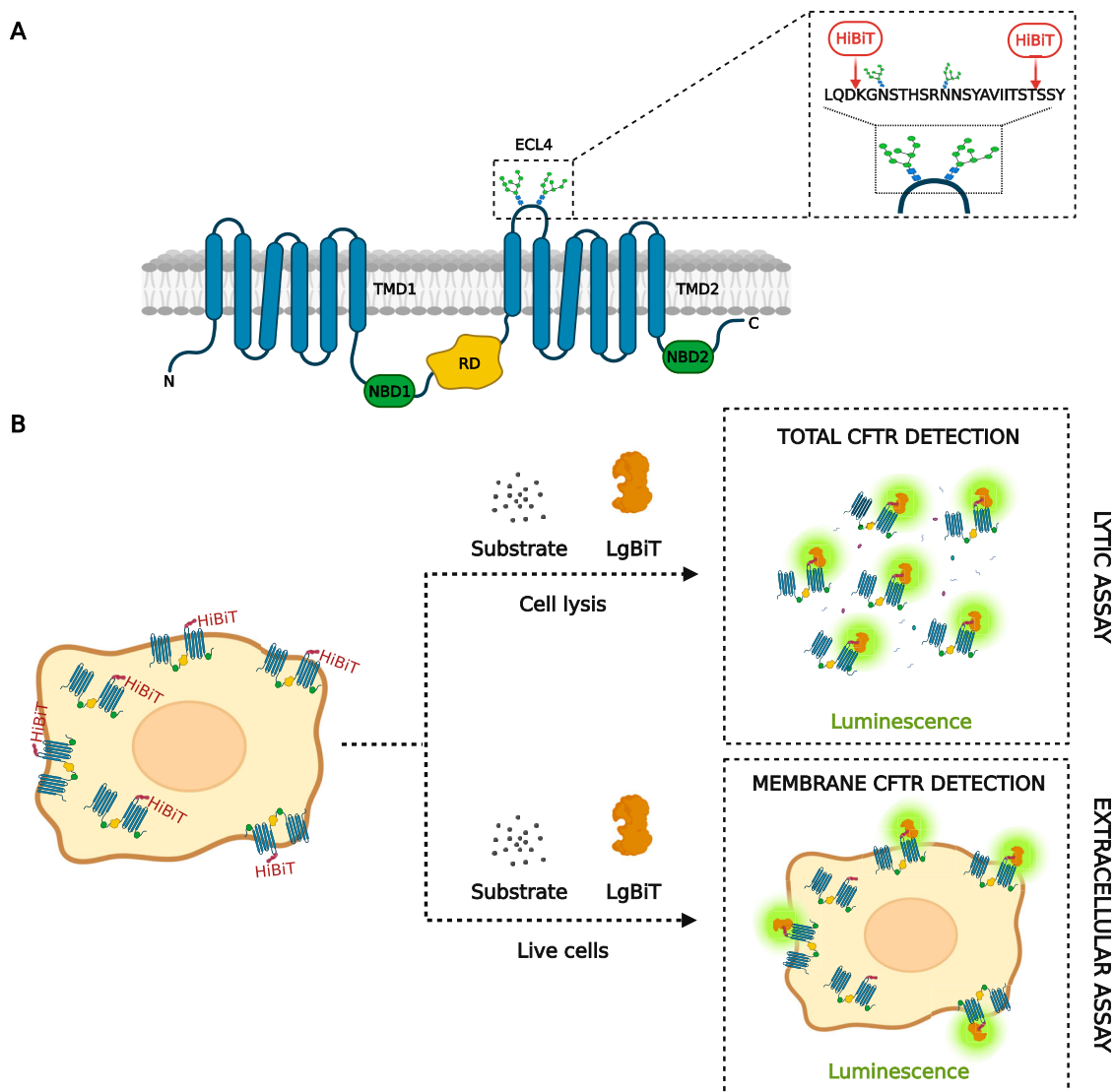


Figure 1. Development and principle of HTS assays for WT-CFTR quantification and membrane detection.

(A) Potential HiBiT tag positions in WT-CFTR. Schematic structure of CFTR domains: two transmembrane-spanning domains (TMD1 and 2), two nucleotide-binding domains (NBD1 and 2), and a regulatory domain (RD). Detail of the fourth extracellular loop (ECL4) depicting the CRISPR/Cas9 insertion of HiBiT tag at different positions, before or after glycosylation sites in the ECL4 of WT-CFTR. **(B)** Principle of Nano-Glo HiBiT detection systems. Quantification of total WT-CFTR-HiBiT expression (lytic assay) and live-cell detection in the membrane (extracellular assay).

region in *CFTR* locus chr7: 117,603,509–117,603,625 coding for ECL4. crRNA1 and crRNA2 targeted loci after the glycosylation (GLY) sites in ECL4, whereas crRNA3 and crRNA4 recognized regions before GLY sites. Together with a Cas9-specific trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA), these crRNAs form guide RNA (gRNA). The transfection efficiency of electroporation with ribonucleoprotein (RNP) complexes (Cas9:gRNA) was verified by fluorescence microscopy 48 h after transfection (Fig S1A). 16HBE14o- cells (HBE) transfected with RNPs were positive for fluorescent signal because of the fluorophore ATTO 550 (ex 561 nm; em 620 ± 35 nm) attached to tracrRNA. Autofluorescence was negligible in mock electroporated cells (i.e., electroporated without RNP) or in non-electroporated cells. To precisely analyze gene-cleavage efficiency (double-stranded breaks) and repairs by nonhomologous end joining (NHEJ) in the pool of

edited cells, the targeted region in the genomic DNA was analyzed by Sanger sequencing 72 h posttransfection. Using Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) online web tool software (Brinkman et al, 2014), we identified crRNA1 and crRNA3 as the best candidates, with 53.6% and 56.4% total gene-cutting efficiencies (Fig S1B). They were used in subsequent experiments for template-dependent HiBiT insertion using the homology-directed repair (HDR) mechanism of cells. For both crRNAs, the indels caused by NHEJ were found in proximity to the predicted Cas9 cut site of the PAM sequence.

HDR-mediated knock-in of HiBiT tag into ECL4

To insert HiBiT into ECL4, we performed gene editing of the HBE cells using two previously validated RNP complexes in the presence of

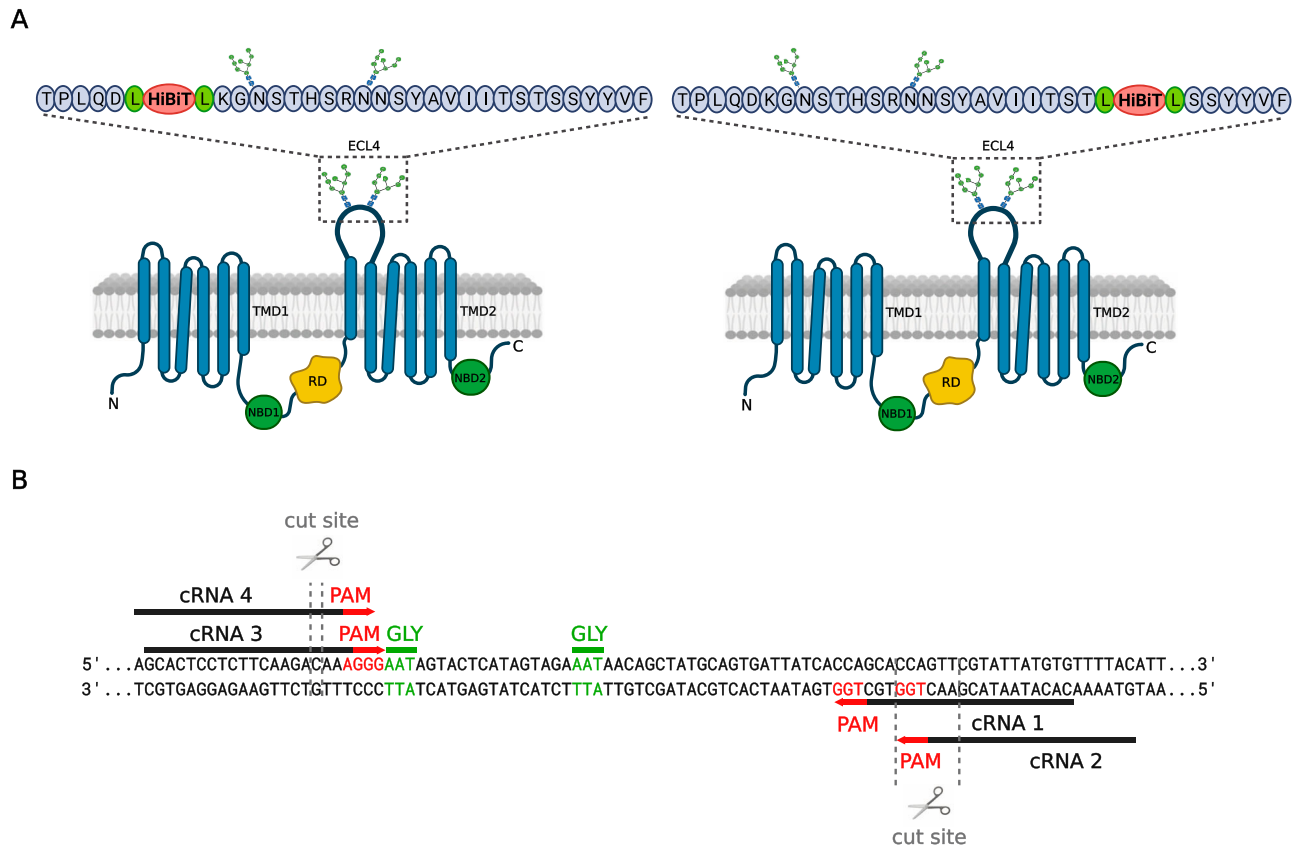


Figure 2. HiBiT tag positions in ECL4 of WT-CFTR and schematic representation of crRNAs sequences.

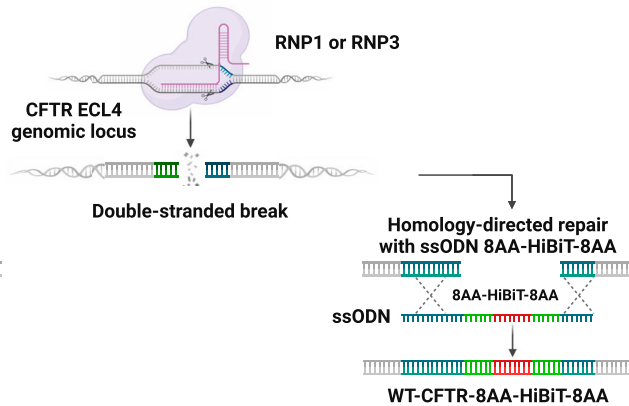
(A) Two variants of HiBiT tag knock-in positions in ECL4. **(B)** crRNA target sequences with protospacer adjacent motif (PAM) sequence in red, glycosylation sites (GLY) in green, and cleavage site of each crRNA.

synthetic single-stranded oligodeoxynucleotide (ssODN) donors (Fig 3A). Either RNP1 complex containing crRNA1 or RNP3 complex, with crRNA3, targeting loci before or after the GLY sites in ECL4, was used. We tested ssODNs, with 6 or 8 amino acid linkers (6 or 8AA) on either side of the HiBiT sequence, specific for each RNP complex (Fig 3). ssODNs were designed with asymmetric lengths of homology arms to increase HDR efficiency and silent mutations in the PAM sequence to prevent recutting of the modified locus (Table S1). To assess the effect of the AA linker's length on HiBiT detection and the stability of the luminescent signal, lytic (Fig 3B) and extracellular (Fig 3C) assays were performed 7 and 14 d after cell electroporation (Figs 3B and C and S2A and B). The luminescent signal was recorded for 3 h to show the kinetic properties of both assays. The lytic and extracellular assays were performed with various amounts of seeded cells to determine an optimal cell number for the assays. Pools of cells edited with RNPs and ssODN with 8AA linkers provided enhanced signal compared with RNPs with 6AA linkers, when used for both lytic (RNP1/8AA 8.5×10^3 RLU, RNP3/8AA 12.5×10^3 RLU; Fig 3B) and extracellular assays (RNP1/8AA 5.5×10^3 RLU, RNP3/8AA 6.3×10^3 RLU; Fig 3C). Unmodified HBE cells (control) had a very low background auto-luminescence $\sim 1 \times 10^3$ RLU (relative light unit) in the lytic assay and $\sim 1.3 \times 10^3$ RLU in the extracellular assay (highest concentration of cells seeded). Consequently, we proceeded with RNPs and ssODNs containing 8AA linkers for further experiments.

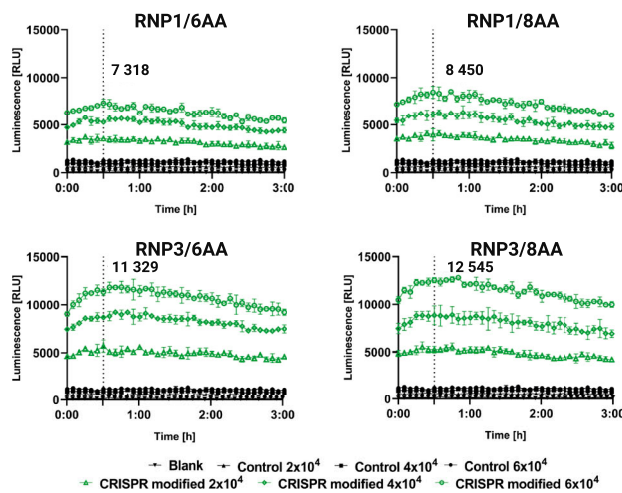
Preparation of monoclonal cell lines expressing WT-CFTR-HiBiT

Limiting dilution cloning was used (Fig 4A) to prepare a monoclonal cell line from pools of cells edited either with RNP1/8AA or RNP3/8AA ssODN. Out of 182 tested clones in the primary screening (91 clones, A-clones RNP1/8AA; 91 clones, B-clones RNP3/8AA), we identified 32 positive clones (10 A-clones and 22 B-clones) with varying levels of luminescence (Fig 4B). In the secondary screening, we retested 27 out of the 32 clones (Fig 4C) to confirm the hits from the primary screening and to identify those expressing WT-CFTR-HiBiT in the PM. All clones found in the primary screening using lytic assay were positive in the secondary screening. At the same time, in the extracellular assay, only eight clones (A22, A32, A37, A62, A67, B6, B38, B60) had notably superior signals to that of non-modified HBE cells (Fig 4C). Moreover, we used PCR genotyping (Fig 4D) to distinguish heterozygous from homozygous clones. Heterozygotes were represented by two bands (849 and 930 bp) corresponding to unedited and edited alleles (+81 bp) of WT-CFTR. In contrast, only one band (930 bp) was detected for homozygous clones. Overall, we identified nine homozygotes (A22, A65, A67, A83, B38, B42, B57, B60, B89). The clones that also generated luminescence in the extracellular assay were sequenced for validation of the correct HiBiT knock-in position. We identified three clones (A22, A67, and B38) with a correct knock-in of the HiBiT sequence containing 8AA

A



B



C

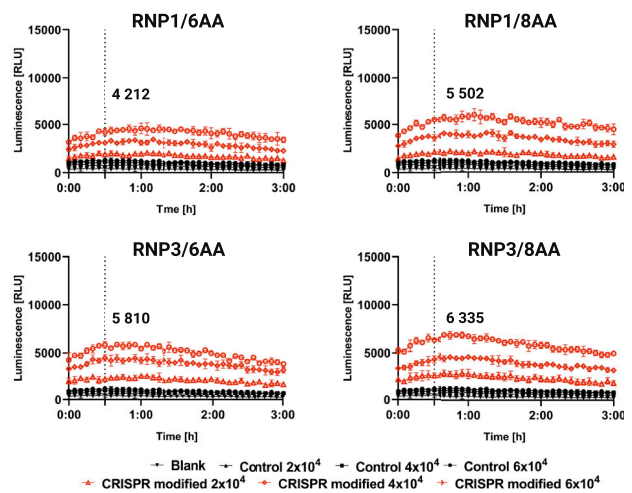


Figure 3. Comparison of single-stranded oligodeoxynucleotide with 6 and 8AA linkers for HiBiT knock-in.

(A) Schematic of homology-directed repair-mediated knock-in of HiBiT with either 6 or 8AA linkers. (B) Lytic assay and (C) Extracellular assay 7 d posttransfection. Three different concentrations of cells (2×10^3 , 4×10^3 , and 6×10^3) were seeded. Highlighted numbers in graphs represent the signal for the highest concentration of cells after 30 min (mean \pm SD, $n = 3$, technical replicates). Control = unmodified HBE cells.

linkers; an example is illustrated in Fig 4E (clone B38). As the clone A67 lost its phenotypic properties further cultivation, only clones A22 and B38 were analyzed for potential CRISPR/Cas9 gene editing off-target effects (Table S2) using Sanger sequencing. There were no variations detected in either of the two clones compared with non-modified HBE cells (Fig S3A and B).

Validation of WT-CFTR-HiBiT glycosylation, localization, and function

To exclude possible alteration of protein processing and glycosylation status of WT-CFTR-HiBiT caused by HiBiT knock-in, Western blotting (WB) and HiBiT blotting (HB) analysis were done. When compared with HBE parental cells, A22 and B38 clones demonstrated similar patterns for CFTR band C (~170 kD, complex-glycosylated CFTR) and band B (~150 kD, core-glycosylated CFTR present in the ER) in WB analysis (Fig 5A). However, a lower expression of CFTR in A22 and B38 clones was detected. Whereas the HB analysis revealed an additional band in the vicinity of band B in clone A22, clone B38 did not exhibit any additional bands in HB or WB analysis (Fig 5A), confirming the

insertion and specific expression of HiBiT exclusively in WT-CFTR, and unaltered glycosylation of the WT-CFTR-HiBiT. Next, the localization of WT-CFTR-HiBiT was assessed by immunofluorescence (IF) detection using confocal microscopy. The expression and localization of WT-CFTR-HiBiT in the B38 clone were compared with WT-CFTR in parental HBE cells by immunostaining with or without permeabilization of cells (Fig 5B). The monoclonal antibody used in IF binds to the first extracellular loop (ECL1) of CFTR, enabling detection of CFTR in the PM and throughout the cytoplasm with cell permeabilization. As a result, we observed invariable membrane staining of WT-CFTR in HBE compared with WT-CFTR-HiBiT in B38 cells, respectively. A notably higher level of immunofluorescence signal was observed for conditions with permeabilization corresponding to the sum of stained CFTR in the PM and the cytoplasm. To validate the correct anion channel activity of WT-CFTR-HiBiT protein, Ussing chamber measurements were performed. First, amiloride was added to ensure that sodium absorption did not contribute to the measured short-circuit current (I_{sc}). Sequential administration of forskolin and genistein caused maximal activation of CFTR channels in the apical membrane of the cell monolayer, thus elevating I_{sc} . The CFTR

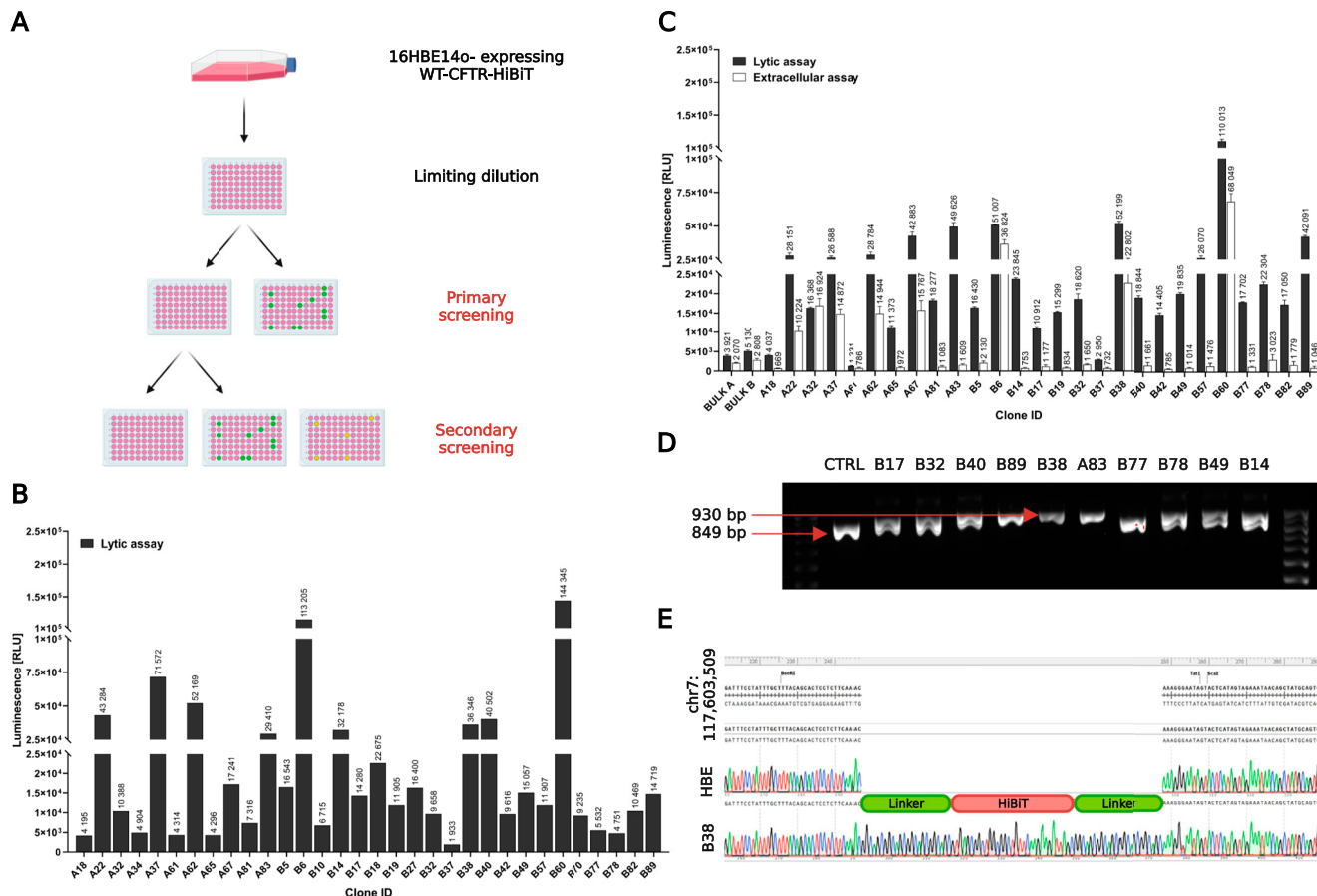


Figure 4. Generation of monoclonal cell lines expressing WT-CFTR-HiBiT and validation of HiBiT tag knock-in position.

(A) WT-CFTR-HiBiT-positive clones identification workflow. The pools of cells edited either with RNP1/8AA or RNP3/8AA single-stranded oligodeoxynucleotide (template for HiBiT tag knock-in) were used for limiting dilution cloning to obtain monoclonal cell lines that were subjected to primary and secondary screenings. (B) Primary screening. Lytic assay to detect positive clones for HiBiT. (C) Secondary screening. Positive clones from primary screening were retested using the lytic and extracellular assays to detect total and membrane WT-CFTR-HiBiT expression (mean \pm SD, n = 3, technical replicates). (D) PCR genotyping. The representative electrophoresis separation pattern of PCR products. Heterozygotes are represented by two bands (849 and 930 bp) and homozygotes by only one band (930 bp). CTRL = non-modified HBE cells (849 bp). (E) Sanger sequencing. Chromatogram of the B38 clone compared with parental HBE cells and reference CFTR genomic sequence.

inhibitor CFTR_{Inh}-172 (Inh172), decreased I_{SC} to its baseline revealing the total contribution of CFTR channel to the measured I_{SC} (ΔI_{SC}). This decrease was used to quantify CFTR activity (Fig 5C). Although ΔI_{SC} recorded for clone B38 was lower than for HBE, B38 still exhibited an adequate response to forskolin and to inhibitor Inh172; representative short-circuit current traces are illustrated in Fig 5C. We further confirmed that all measured monolayers were “non-leaky” by measuring transepithelial electrical resistance (TEER; Fig 5C). Only monolayers with a TEER \geq 200 $\Omega \times$ cm² were included in the analysis. These results demonstrated that the knock-in of HiBiT into the ECL4 did not impair the glycosylation, localization or function of WT-CFTR.

Down-regulation of CFTR expression is detectable by lytic and extracellular assay

To evaluate the ability of our assays to quantify total and membrane CFTR, we treated clone B38 with three unique siRNAs, effectively reducing CFTR levels after 48 and 72 h of treatment according to both lytic and extracellular assays. We observed a maximal reduction of

CFTR expression in cells transfected with siRNA A, after 72 h. Namely, in cells treated with 50 nM siRNA A, a 58% decrease in lytic ($P < 0.001$; Fig 6A) and a 52% decrease in the extracellular assays ($P < 0.001$; Fig 6A) were detected when compared with non-treated cells. No significant difference was observed between non-treated cells and those transfected with scrambled siRNA. To exclude potential cytotoxicity effects of siRNA, that might falsely affect the level of luminescence, a cell viability (MTS) assay was performed. Clone B38 was treated with siRNA in parallel to the lytic and extracellular assays, in the same manner. MTS assay revealed no significant effect of siRNA treatment on cell viability (Fig 6B). In summary, siRNA-mediated silencing results reflect the capacity of our assays to detect and quantify changes in total WT-CFTR-HiBiT after lysis, and in expression of WT-CFTR-HiBiT on the surface of live cells.

Monitoring of CFTR trafficking to the plasma membrane

To further validate the applicability of our assays in monitoring CFTR trafficking to the plasma membrane, we subjected B38

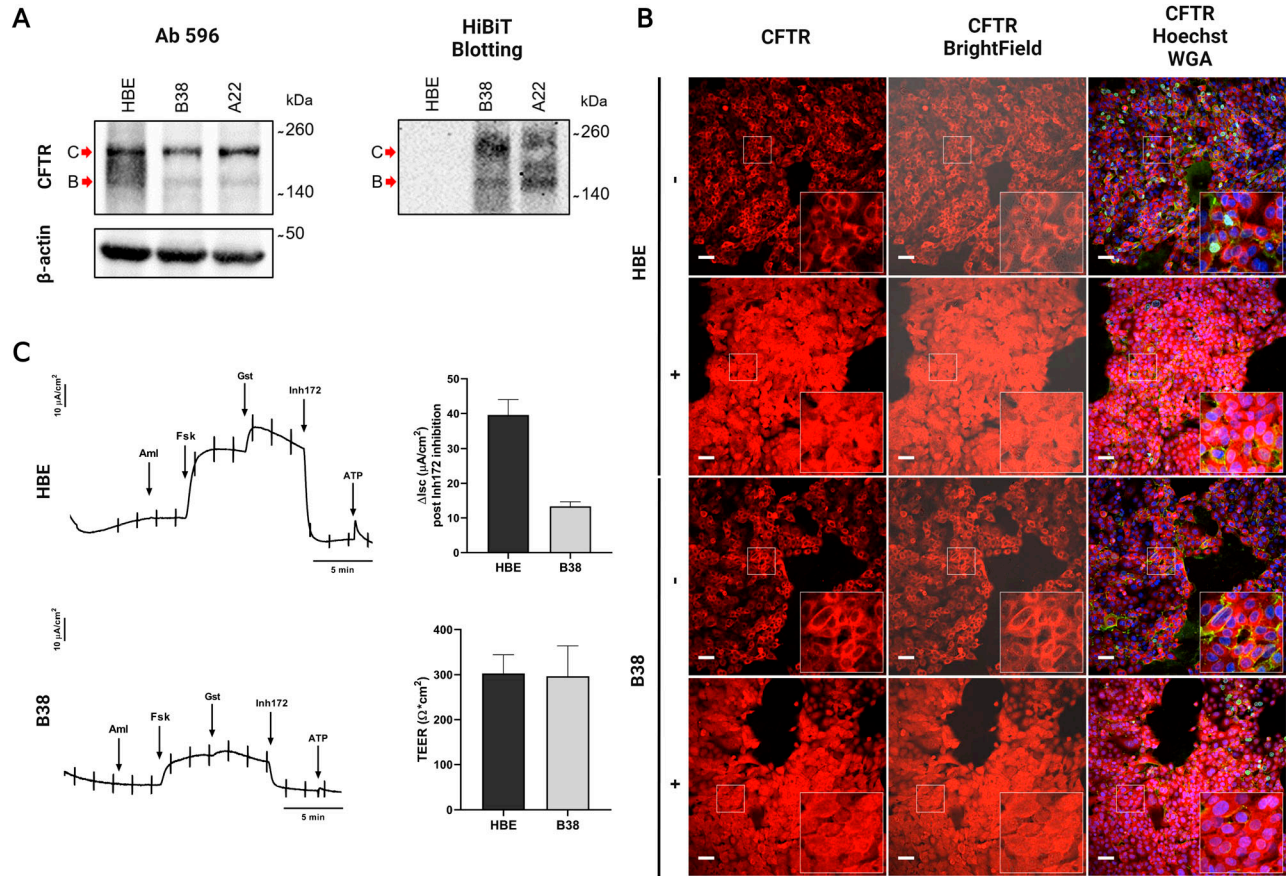


Figure 5. Validation of clones.

(A) Western and HiBiT blotting. WB immunoblot probed with antibody 596 against the NBD2 domain of CFTR. C-band indicates the fully-glycosylated form of WT-CFTR ~170 kDa, and the B-band, the ER core-glycosylated form ~150 kDa. (B) Immunocytochemistry. Detection of CFTR by confocal microscopy in HBE and B38 cells (20x objective). Cells incubated with TJA9 anti-CFTR antibody against ECL1 of CFTR and thereafter with a secondary antibody conjugated to Alexa 647 (red). Nuclei stained with Hoechst 33342 (blue) and PM with wheat germ agglutinin (WGA; green). Zoomed-in insets at 3x magnification (zoomed-in factor). Scale bar: 50 μm. (C) Short-circuit current—Ussing chambers. Short-circuit current was recorded after exposure to amiloride (Aml; 10 μM), forskolin (Fsk; 10 μM), genistein (Gst; 50 μM), ATP (10 μM), and current inhibitor CFTR_{Inh-172} (Inh172; 10 μM). Maximal short circuit current (ΔI_{SC}) was calculated post-forskolin, genistein activation, and current inhibition (Inh172). Only monolayers with transepithelial electrical resistance ≥ 200 Ω × cm² were included in the analysis. Graphs show mean I_{SC} with SD. All experiments were done in three independent biological replicates (n = 3). Source data are available for this figure.

cells to RAB5 and RAB11 siRNA treatments to affect the endocytic trafficking of CFTR (Fig 7A). After RAB5 siRNA treatment, we observed a substantial increase in the luminescent signal within cells. In contrast, treatment with RAB11 siRNA led to a signal decrease (Fig 7B). Notably, there was no significant impact of siRNA treatment on cell viability. In addition, besides the specific down-regulation of expression of aforementioned RABs, we investigated the impact of Brefeldin A, a compound affecting the intracellular transport of proteins from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi apparatus (GA; Fig 7A). Our observations revealed a dose-dependent reduction in CFTR levels after a 6-h Brefeldin A treatment, with no notable toxicity up to 12.5 μM (Fig 7C). In essence, the results presented here firmly affirm the potential of our assays not only in monitoring the overall CFTR protein levels but also in evaluating its trafficking and membrane localization.

Discussion

Various HTS assays have been developed for monitoring CFTR protein expression and trafficking and have been leveraged to discover new CFTR modifiers. The overexpression of CFTR tagged either with intracellular or extracellular epitopes such as FLAG-tag, HA-tag (Howard et al, 1995) or fluorescent tags (Moyer et al, 1998) was employed to study CFTR trafficking, its subcellular localization, and degradation, using fluorescent microscopy (Meacham et al, 2001; Carlile et al, 2007). Although sophisticated, these approaches exploit the overexpression of recombinant proteins which can produce an imbalance in protein processing, localization, and levels, leading to nonphysiological artifacts (Prelich, 2012; Moriya, 2015). In the present study, we described the development and validation of novel assays for detecting total and plasma membrane WT-CFTR protein. Our goal was to develop a system with

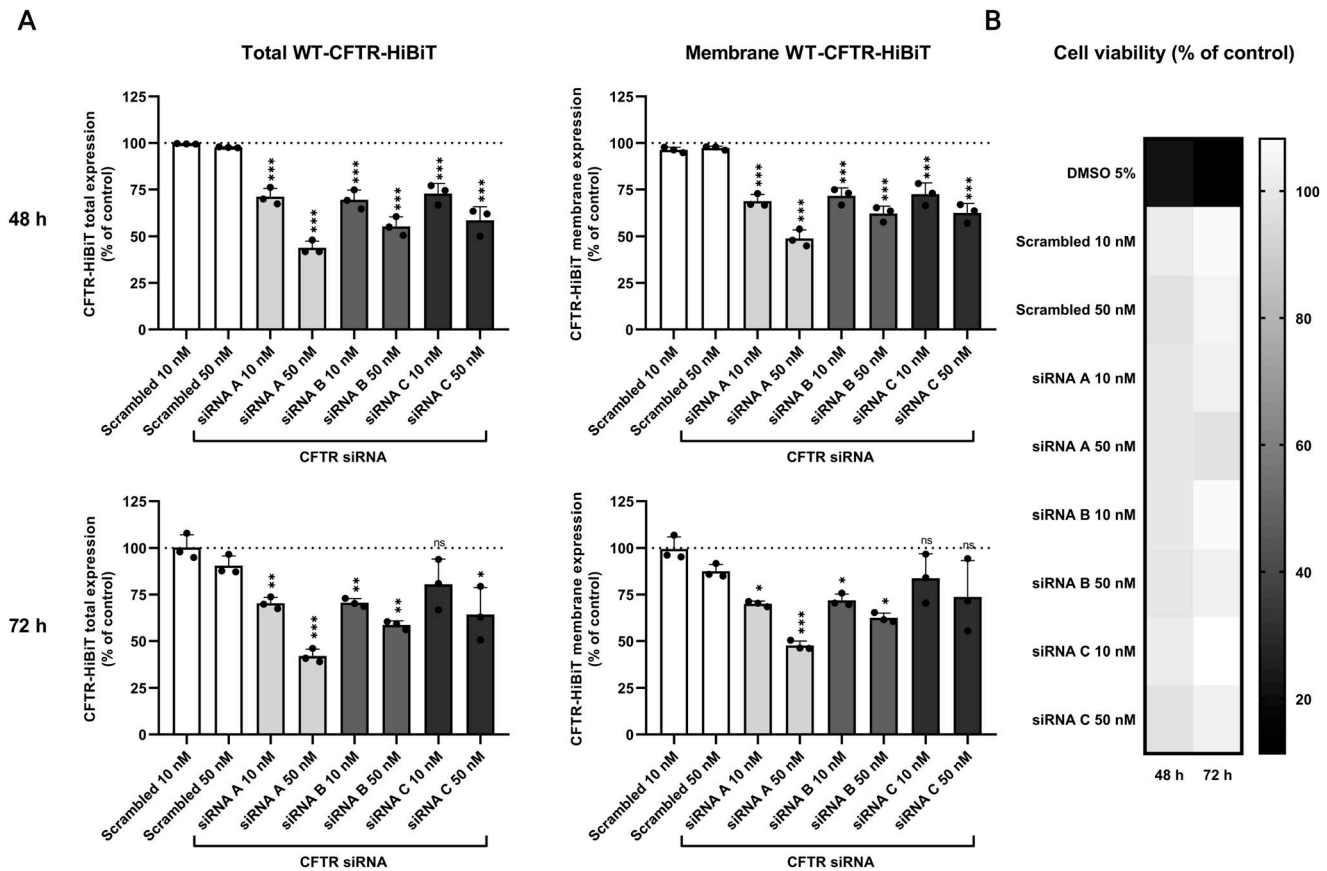


Figure 6. Down-regulation of CFTR expression in the B38 clone using siRNA. (A) Lytic and extracellular assays after 48 and 72 h of siRNA treatment. The luminescent signal was measured after 30 min in both assays (mean ± SD). (B) Cell viability. The effect of siRNA on cell viability was measured by MTS assay (mean). All experiments were done in three independent biological replicates (n = 9; technical replicates). P-values were calculated using one-way ANOVA-Tukey's test, ns = nonsignificant, *P ≤ 0.05, **P < 0.005, ***P < 0.001.

endogenous expression of WT-CFTR from its natural genome locus that could be applicable for further development of CF model systems. We used CRISPR/Cas9-targeted gene editing with the HiBiT tag (Schwinn et al, 2018) to establish new bioluminescence-based reporter assays (Fig 1B).

Since the recognition of CRISPR/Cas9's potential to allow programmable genome editing (Jinek et al, 2012; Cong et al, 2013), disease-specific model system engineering has been expanding (Dow, 2015; Kampmann, 2020). CRISPR-derived models help elucidate disease mechanisms and identify potential therapeutic targets. To target specific DNA sequences for Cas9 endonuclease cleavage, a gRNA is required. crRNA, a part of gRNA that is complementary to the desired DNA sequence, directs the entire RNP complex to generate site-specific double-strand DNA breaks (DSB; Jinek et al, 2012; Cong et al, 2013; Mali et al, 2013; Konstantakos et al, 2022). Therefore, we designed and tested four crRNAs targeting ECL4 in WT-CFTR (Fig 2B) to find the most efficient one. Through electroporation-mediated delivery of RNP complexes into the 16HBE14o- cells and subsequent analysis of gene-editing events by TIDE online web tool software (Fig S1B), we identified crRNA1 and crRNA3 as the best candidates for further genome editing.

DSB created by the CRISPR/Cas9 complex can be repaired through NHEJ or HDR mechanisms (Kim & Kim, 2014). In the absence of a

homologous DNA template, DSB is repaired by NHEJ creating small insertions or deletions at targeted loci. On the other hand, in the presence of a homologous template, DSB can be correctly repaired by HDR. The natural HDR mechanism of cells can be applied to introduce any desired base-pair changes or insertions using synthetic homologous repair templates (Cong et al, 2013; Mali et al, 2013). In our study, HDR-mediated knock-in of the HiBiT tag was performed. Based on the principle of NanoBiT technology (Dixon et al, 2016), HiBiT and LgBiT form an active luciferase enzyme, allowing for the quantification of endogenous, low-abundance proteins by luminescence detection (Schwinn et al, 2018). The spatial accessibility of HiBiT for LgBiT binding is a crucial factor. To optimize the LgBiT to HiBiT binding, we added 6 or 8AA linkers around the HiBiT sequence in the donor ssODN template to protrude HiBiT from the ECL4 rigid structure (Fig 3A). In the pools of edited cells, 8AA linkers provided an enhanced luminescent signal compared with cells edited by RNPs in the presence of ssODNs with 6AA linkers (Fig 3B and C).

A consistent genetic background of isogenic (mono-clonal) cell lines is one of the essential factors for preparing relevant disease models, especially for CF (Pedemonte et al, 2010). Phenotype-genotype studies in PwCF showed that the same CF-causing mutations could have a distinct disease outcome based on the genetic makeup of each person (Zielinski, 2000; Cutting, 2010, 2015). Thus, to develop reproducible cell-

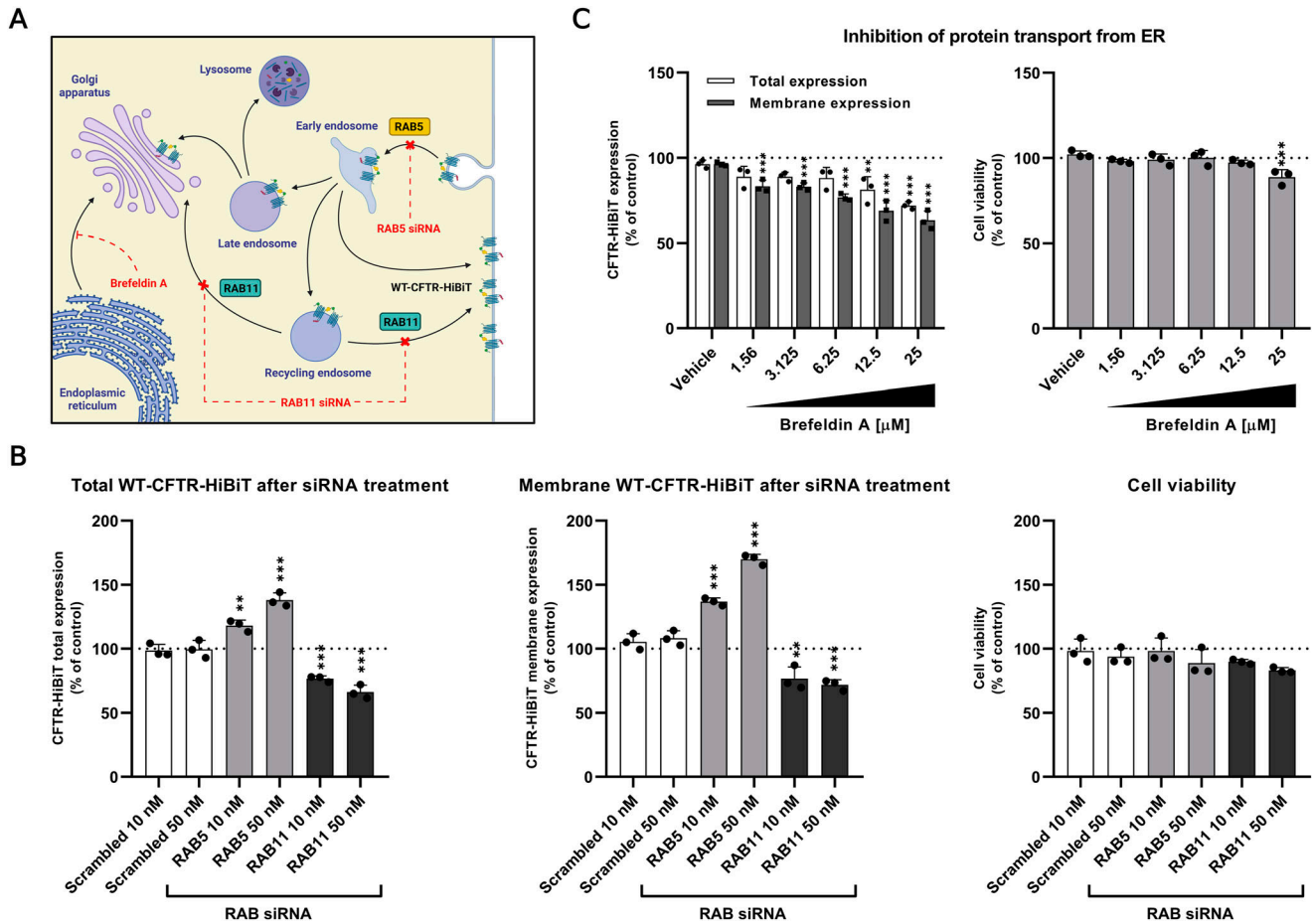


Figure 7. Modulation of CFTR trafficking.

(A) Diagram of RAB5, RAB11 siRNA, and Brefeldin A effect on CFTR trafficking. **(B)** RAB5 and RAB11 siRNA treatments. Lytic and extracellular assays were performed after 48 h of siRNA treatments. **(C)** Brefeldin A inhibition of protein transport from ER to GA. Lytic and extracellular assays were performed after 6 h treatment. The effect of siRNA and Brefeldin A treatments on viability was measured by MTS assay (mean \pm SD). The luminescent signal was measured after 30 min (mean \pm SD). All experiments were done in three independent biological replicates ($n = 9$; technical replicates). P -values were calculated using one-way ANOVA-Tukey's test, ns = nonsignificant, $*P \leq 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.001$.

based systems for drug discovery screening, a relevant starting material for the introduction of disease-causing mutations is crucial. To address this, we have carried out limiting dilution cloning to obtain HiBiT-positive monoclonal cell lines. Namely, in two rounds of clone screening (Fig 4A–C), we identified 27 clones positive for HiBiT knock-in. In addition to that, ~5% of all clones tested (9 of 182) were identified as homozygotes for HiBiT knock-in using PCR genotyping (Fig 4D), which is in accordance with previously reported data for HDR efficiency in the presence of synthetic homologous repair templates (Ruan et al, 2019).

Once monoclonality has been assessed, we further characterized two candidate isogenic cell lines (B38 and A22). CFTR has two N-linked glycosylations at positions 894 and 900 (Riordan et al, 1989; Cheng et al, 1990; Gregory et al, 1990). As previously reported, disruption of these glycosylation consensus sequences reduces WT-CFTR stability (Chang et al, 2008). With this in mind, the effect of HiBiT tag insertion into two distinct sites in ECL4, either before (B38 clone) or after GLY sites (A22 clone), was evaluated. As confirmed by our results, we detected two WT-CFTR-HiBiT bands corresponding to core glycosylated (band B) and fully glycosylated (band C) CFTR in

conventional WB (Fig 5A). In WB, the C band was the most prominent in both clones, confirming the non-aberrant CFTR glycosylation process after the HiBiT knock-in. On the contrary, in HB, an additional band was detected for clone A22. Thus the B38 clone was selected for final validation. In addition, we also confirmed the accurate localization and trafficking of WT-CFTR-HiBiT in the PM by fluorescence microscopy (Fig 5B). Importantly, we did not find significant differences in immuno-staining patterns between parental HBE cells and the B38 clone. The last step of functional validation was carried out by short-circuit current measurements. HBE are immortalized airway-derived epithelial cells, which when confluent, become polarized and form tight junctions, thus manifesting strong transepithelial electrical resistance and maintaining cAMP- and Ca^{2+} -dependent Cl^- currents (Cozens et al, 1994). The clone B38 showed a lower ΔI_{SC} compared with the HBE parental cells but still was adequately stimulated by forskolin and inhibited by CFTR_{inh}-172. The reduced ΔI_{SC} of the B38 clone was presumably caused by lower expression of total CFTR (Fig 5A), most probably generated by clonal selection. We observed a similar TEER (Fig 5C)

for HBE and clone B38 indicating normal barrier function. These observations are consistent with previous reports (Cozens et al, 1994; Illek et al, 2008; Gianotti et al, 2018). To conclude, the HiBiT insertion before GLY sites in ECL4 did not disrupt WT-CFTR glycosylation, localization or function.

To validate the simple “Add and Read” format of the lytic and extracellular assays, the total and the plasma membrane WT-CFTR-HiBiT were quantified after knockdown by siRNAs. CFTR siRNA specifically decreases the amount of CFTR mRNA available for translation (Elbashir et al, 2001), thus reducing the level of total and membrane CFTR. In summary, treatment of the B38 clone with three variants of siRNAs significantly decreased both total WT-CFTR-HiBiT up to 58% and plasma membrane CFTR up to 52% (Fig 6A). In addition, we did not detect any cytotoxicity of the siRNA (Fig 6B). Our observations support the utility of our assays for the direct detection of changes in WT-CFTR levels and PM localization.

The level of membrane CFTR results from balanced CFTR expression, degradation, membrane delivery, and its endocytic recycling. One of the essential factors in the endocytic recycling of CFTR are the small RAB GTPases that function as molecular switches regulating the effector proteins that mediate intracellular trafficking (Farinha & Canato, 2017). To assess the correct trafficking and subsequent membrane localization of WT-CFTR-HiBiT in the B38 cell line, we specifically down-regulated the expression of RAB5 and RAB11 by RNA interference. Because RAB5 promotes the internalization of CFTR from PM into early endosomes and RAB11 regulates the trafficking of CFTR from the recycling endosomes to PM and GA (Ameen et al, 2007), the down-regulation of the RAB5 led to increased membrane CFTR levels, whereas the down-regulation of the RAB11 resulted in decreased membrane CFTR (Fig 7B). Moreover, the suitability of our novel system for monitoring of CFTR membrane trafficking was corroborated by disrupting CFTR trafficking from ER to GA by Brefeldin A as described by Donaldson et al (1992).

As previously reported (Zhang et al, 2023), HiBiT tagging technology is ideal for high-throughput applications. The lytic and extracellular assays were readily transferred from a 96-well plate to the 384-well plate reader format, showing little variation between replicates (Fig S4A–D).

Altogether, we have developed cell-based bioluminescence assays that are convenient and scalable for high-throughput determination of the total or live-cell membrane localized WT-CFTR. Our validated model can potentially be used as a platform for the preparation of new high-content and/or high-throughput screening CF models for specific CFTR mutations, including rare mutations that are difficult to study in primary cells. Moreover, our CRISPR-based pipeline for CFTR HiBiT tagging can be used in other cell lines expressing specific mutations in the CFTR gene.

Materials and Methods

Reagents

Alt-R CRISPR-Cas9 reagents (S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3, Electroporation enhancer, tracrRNA ATTO550, and crRNAs) and ssODN

(HDR Donor Oligos) were purchased from Integrated DNA Technologies. PCR primers were obtained from GeneriBiotech. Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System and Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection System were purchased from Promega. Antibodies: mouse anti-human CFTR antibodies (569, TJA9; CF Foundation), donkey anti-mouse IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody (Alexa Fluor 647; Invitrogen). siRNA: CFTR Human siRNA Oligo Duplex (Locus ID 1080; Origene), RAB5 (RAB5A) Human siRNA Oligo Duplex (Locus ID 5868), and RAB11 Human siRNA Oligo Duplex (Locus ID 8766).

Cell culture

Human bronchial epithelial cells (16HBE14o-) were kindly provided by Dr. Dieter Gruenert (UCSF). 16HBE14o- cell line was originally derived from the surface epithelium of bronchi from a 1-yr-old male heart-lung transplant patient and immortalized by calcium phosphate transfection with the pSVori- plasmid (Cozens et al, 1994). Cells were cultured in complete Eagle’s minimal essential medium (Enzo) with 10% FBS, 100 U/100 µg per ml penicillin/streptomycin (Gibco) under 5% CO₂ at 37°C.

CRISPR gRNA preparation, RNP complex formation, and electroporation

All crRNAs were designed using CHOPCHOP software (Labun et al, 2019). crRNA sequences can be found in Table S1. crRNA (200 µM) and tracrRNA (200 µM) were mixed in a 1:1 ratio and incubated at 95°C for 5 min to prepare gRNA. RNP complexes for one transfection (2.4×10^5 cells) were formed by mixing 3 µg of Alt-R S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3 protein and 0.5 µl of 100 µM gRNA for 15 min at RT. Cells were resuspended in R buffer to 2.4×10^7 cells/ml. To deliver RNP into 16HBE14o- cells, The Neon Transfection System 10 µl Kit (Invitrogen) was used. Cas9 RNP complexes with or without ssODN donor template (2 µM) were electroporated into cells using the following conditions: 1,200 V, 20 ms, 4 pulses. After electroporation, the cells were transferred back to a medium without antibiotics. After 48 h, electroporation was validated by detecting ATTO550 signal of RNP with the Incucyte Live-cell analysis instrument (Sartorius).

Analysis of Cas9/gRNA genome editing (cutting) efficiency in the pool of edited cells

Genomic DNA from 16HBE14o- cells electroporated with RNP complexes without ssODN template was extracted using Monarch Genomic DNA Purification Kit (New England Biolabs, NEB) according to the manufacturer’s instructions. PCR was carried out with the following primers, forward: 5’-GCTCCTGCAGTTTCTAAGAATATAG-3’ and reverse: 5’-GAGAGGTATGACTGACCCATAAG-3’ using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) to amplify a region of a 849-bp flanking target site of gRNAs in the fourth extracellular loop of WT-CFTR. PCR amplicons were purified with Monarch PCR and DNA Cleanup Kit (NEB). Purified amplicons were sequenced using Sanger sequencing with forward primer. To analyze the cutting efficiency of crRNAs, Sanger sequencing files from control (unedited) and edited cells were used as input into the TIDE web tool (Brinkman et al, 2014).

ssODN templates for HiBiT knock-in position

Two variants of ssODN templates with 6 or 8AA linkers on either side of HiBiT (Table S1) specific for each crRNA were electroporated into cells along with Cas9/gRNA. After 7 d, pools of edited cells were seeded at three different concentrations: 2×10^4 , 4×10^4 , and 6×10^4 cells/well into CulturPlate-96, white opaque 96-well plate (PerkinElmer). The following day, lytic and extracellular assays were carried out, as mentioned below. The time-dependent decay of the luminescent signal for the lytic and extracellular assays was measured continuously for 3 h.

Limiting dilution cloning

The pools of cells edited with Cas9/gRNA with ssODN (template for HiBiT tag knock-in) were used for limiting dilution cloning to obtain a monoclonal cell line. Cells were diluted in a conditioned medium to 1 cell/100 μ l, transferred in individual wells of a 96-well plate, and grown for 3 wk. After ~7 d, plates were scanned for cell growth and to identify wells that contained only a single colony. Wells with more than a single colony were excluded from further experiments. After ~21 d (reaching $\geq 80\%$ confluence), 3/4 of each well with a monoclonal cell line were transferred to 24-well plates, and 1/4 was used for primary screening.

Primary and secondary screening for HiBiT-positive monoclonal cell lines identification

As mentioned above, in primary screening 1/4 of each well from the 96-well plate with the monoclonal cell line was transferred into CulturPlate-96, white opaque 96-well plate (PerkinElmer), and the lytic assay was carried out as mentioned below. Positive clones for the luminescent signal were retested after a week, using cells from 24-well plates, seeding 1×10^4 cells/well in triplicate for secondary screening, with the lytic and extracellular assays. Positive clones from both assays were expanded and cryopreserved.

Luminescent assay to quantify the total level of HiBiT-tagged WT-CFTR protein (lytic assay)

To measure the expression of WT-CFTR-HiBiT protein in cells, Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System (Promega) was used according to the manufacturer's protocol with a small alteration. Briefly, cells were seeded in 96-well plates or 384-well CulturePlate (PerkinElmer) and cultured for 24 h. The medium was removed before adding a mixed reagent containing lytic buffer with LgBiT, substrate, and fresh medium without FBS. The luminescent signal was measured by EnVision plate reader (Perkin Elmer).

Luminescent assay to detect HiBiT-tagged WT-CFTR protein expressed on the cell surface (extracellular assay)

To measure membrane localization of WT-CFTR-HiBiT protein in cells, Nano-Glo HiBiT Extracellular Detection System (Promega) was used according to the manufacturer's protocol with a small alteration. Cells were seeded and incubated the same way as mentioned above in the lytic assay protocol. The medium was removed before adding a

mixed reagent containing an assay buffer with LgBiT, substrate, and fresh medium without FBS. We optimized the total assay volume for both lytic and extracellular assays to 100 μ l for 96-well plates and 25 μ l for 384-well plates. The luminescent signal was measured by EnVision plate reader (Perkin Elmer).

Heterozygotes and homozygotes genotyping, sequencing, and CRISPR/Cas9 off-target activity detection

Genomic DNA (gDNA) was extracted from HiBiT-positive clones from secondary screening using Monarch Genomic DNA Purification Kit (NEB) according to the manufacturer's instructions. PCR was carried out as mentioned in the section "Analysis of Cas9/gRNA genome editing (cutting) efficiency in the pool of edited cells." PCR amplicons were size-separated by 2% agarose gel electrophoresis. PCR amplicons from identified homozygotes were purified with Monarch PCR and DNA Cleanup Kit (NEB) and Sanger sequenced using forward primer: 5'-GCTCCTGCAGTTTCTAAAGAATATAG-3'. For detection of CRISPR/Cas9 off-target activity, gDNA was extracted and target sequences were amplified by PCR, as mentioned above, with primers listed in Table S2. Sanger sequencing was carried out only with forward primers.

Western blotting and HiBiT blotting

For both assays, total protein lysates from 5×10^6 cells were prepared using ice-cold RIPA buffer (150 μ M NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 μ M Tris-HCl pH 8.0 and 1 μ M EDTA) supplemented with cComplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). The lysates were incubated on ice for 30 min, vortexed, and centrifuged at 14,000g for 30 min at 4°C. Protein concentration was determined by Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), and 30 μ g/well of total protein lysate were size-separated on 7.5% (wt/vol) SDS-PAGE gel. The resolved proteins were transferred to nitrocellulose membranes using the semi-dry blot method with the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). **Western blotting:** the membranes were blocked with 5% nonfat dried milk in TBS buffer with 0.1% Tween-20 (TBST) for 1 h at RT, followed by incubation with the respective primary antibodies overnight at 4°C. The following day, membranes were washed in TBST and incubated for 1 h with peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000; Sigma-Aldrich). A monoclonal anti-human CFTR antibody 596 (1:1,000; CF Foundation) was used to detect C and B bands of CFTR protein, and an anti- β -actin antibody (1:1,000; Sigma-Aldrich) was used as a loading control. Standard electrochemiluminescence-based detection was performed using ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) **HiBiT blotting:** Nano-Glo HiBiT Blotting System (Promega) was used for visualization of HiBiT-tagged proteins transferred on nitrocellulose membranes according to the manufacturer's protocol.

Short-circuit current—Ussing chamber

Clone B38 and HBE cells were seeded at a 3×10^5 cells/cm² density onto 6.5 mm TranswellPermeable Supports (Corning Inc), and grown for 7 d in growth medium (100 μ l Apical, 600 μ l Basolateral), with medium changes every 2–3 d. Cells were grown in DMEM

(Wisent Inc) supplemented with 10% FBS (Wisent Inc), 1% non-essential amino acids (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamine (Wisent Inc), 1 mM sodium pyruvate (Wisent Inc), 100 IU penicillin and 100 mg/ml streptomycin (Wisent Inc). Before electrophysiology analysis, cells were washed with PBS (Wisent Inc) and incubated in Opti-MEM Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10 mg/ml BSA (Sigma-Aldrich), (100 μ l Apical, 500 μ l Basolateral) for 72 h, with medium changes every 24 h. The short-circuit current (I_{SC}) was measured using an Ussing chamber (Physiologic Instruments). Trans-wells were mounted between two hemi-chambers containing 5 ml of basolateral or apical solutions, both at pH = 7.40. The apical solution consisted of 1.2 mM NaCl, 115 mM sodium gluconate, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM MgCl₂, 4 mM CaCl₂, 2.4 mM KH₂PO₄, 1.24 mM K₂HPO₄, and 10 mM D-dextrose. The basolateral solution consisted of 115 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂, 2.4 mM KH₂PO₄, 1.24 mM K₂HPO₄, and 10 mM D-dextrose. Solutions in both hemi-chambers were maintained at 37°C and bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂. Therein, monolayers were apically exposed to 10 μ M amiloride (Sodium Channel blocker 1), 10 μ M forskolin (cAMP agonist), 50 μ M genistein (CFTR potentiator), 10 μ M CFTR_{inh-172} (CFTR blocker), and 10 μ M ATP (purinergic agonist to activate Ca²⁺-activated Cl⁻ channels) in this sequence (Gianotti et al, 2018). To assess barrier function, periodic 1 mV pulses were applied while recording the I_{SC} , and the resulting deflections in I_{SC} pulse were used to calculate TEER. Monolayers with TEER \geq 200 $\Omega \times \text{cm}^2$ were included in the analysis.

Immunocytochemistry

Cells were seeded into a PhenoPlate 96-well plate (PerkinElmer) at 4×10^4 cells/well and incubated for 24 h at 37°C in a 5% CO₂. The cells were washed three times in PBS and incubated for 3 min with 2 μ g/ml of WGA Alexa Fluor 555 (Invitrogen) in Hanks' Balanced Salt solution followed by 20 min fixation with 4% PFA at RT. In addition, cells were incubated for 15 min with 0.25% Triton X-100 in PBS for the condition with permeabilization. Subsequently, three washes with PBS were performed, followed by 90 min of blocking. A solution of 1% BSA in PBS was used for blocking and diluting primary and secondary antibodies. After blocking, primary anti-human CFTR monoclonal antibody TJA9 (1:250; CF Foundation) was added, and cells were incubated overnight at 4°C. The next day, all the wells were washed three times with PBS and incubated with anti-mouse Alexa Fluor 647 secondary antibody (1:1,000) for 60 min at RT and washed three more times. Finally, Hoechst 33342 in PBS (10 μ M) was added for 10 min to the cells. Images were acquired using a Cell Voyager CV8000 high-throughput cellular imaging and discovery system (Yokogawa). Brightfield, Alexa Fluor 647 (ex 640; em 676/29 nm), WGA (ex 561; em 600/37 nm), and Hoechst 33342 (ex 405, em 445/45 nm) were captured by a 20x objective. All images were post-processed and analyzed using Columbus software version 2.7.1 (Perkin-Elmer) and ImageJ software.

siRNA treatment and cell viability assay

siRNA transient transfection was performed using jetPRIME transfection reagent (Polyplus) following the manufacturer's protocol. For siRNA treatment, B38 cells were seeded in a 96-well plate

(PerkinElmer) at 2×10^4 cells/well 1 d before transfection. CFTR Human siRNA Oligo Duplexes (Origene) variants in 10 and 50 nM concentrations were used for CFTR knockdown. Rab5 (RAB5A) and RAB11 Human siRNA Oligo Duplex (Origene) were used in 10 and 50 nM concentration for RAB5/11 knockdown. Transfection with a Universal Scrambled Negative Control siRNA (Origene) was used as a control. Cells were transfected for 48 or 72 h, followed by lytic and extracellular assay detection of CFTR levels. To exclude siRNA cell cytotoxicity an MTS assay was performed with a CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) according to the manufacturer's protocol. The relative cell viability (%) was calculated as $(A_{\text{sample}} - A_{\text{background}})/(A_{\text{control}} - A_{\text{background}}) \times 100\%$. The absorbance from the corresponding cell-free conditions was used as background.

Brefeldin A treatment

B38 cells were seeded in the same manner as for siRNA treatment. Cells were treated for 6 h with Brefeldin A (Sigma-Aldrich) in concentration ranging from 1.56 to 25 μ M followed by lytic, extracellular, and MTS assays.

Statistical analysis

Statistical significance was calculated using one-way ANOVA—Tukey's test, ns = nonsignificant, * $P \leq 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$, using GraphPad Prism 8.0 software. In all tests, a P -value equal to or less than 0.05 was considered to be significant.

Data Availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Supplementary Information

Supplementary Information is available at <https://doi.org/10.26508/lsa.202302045>.

Acknowledgements

We are grateful to the late Dieter Gruenert for providing the 16HBE14o- cell line, Martina Gentsch (UNC-Chapel Hill, NC) and the CFFT Antibody Distribution Program for antibodies. This research was supported by The Quebec Ministry of Economy and Innovation (MEI; 625 MDEIE-PSVT3 to D Radzioch and JW Hanrahan), Ministry of School and Education of the Czech Republic (ENOCH CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868 and EATRIS-CZ LM2018133 to M Hajduch, D Radzioch, JB De Sanctis, and M Ondra); CIHR Grant FRN115117 #2433990; RI-MUHC Account 4925 to D Radzioch. All figures were created with BioRender.com.

Author Contributions

M Ondra: data curation, formal analysis, investigation, methodology, and writing—original draft, review, and editing.

L Lenart: investigation, methodology, and writing—original draft, review, and editing.

A Centorame: investigation and writing—original draft, review, and editing.

DC Dumut: investigation and writing—original draft, review, and editing.

A He: investigation.

SSZ Zaidi: investigation.

JW Hanrahan: investigation.

JB De Sanctis: methodology and writing—original draft, review, and editing.

D Radzioch: conceptualization, supervision, investigation, and writing—original draft, review, and editing.

M Hajduch: conceptualization, data curation, supervision, funding acquisition, investigation, methodology, and writing original draft, review, and editing.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ameen N, Silvis M, Bradbury NA (2007) Endocytic trafficking of CFTR in health and disease. *J Cyst Fibros* 6: 1–14. doi:[10.1016/j.jcf.2006.09.002](https://doi.org/10.1016/j.jcf.2006.09.002)
- Boucher RC (2007) Airway surface dehydration in cystic fibrosis: Pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med* 58: 157–170. doi:[10.1146/annurev.med.58.071905.105316](https://doi.org/10.1146/annurev.med.58.071905.105316)
- Boyle MP, De Boeck K (2013) A new era in the treatment of cystic fibrosis: Correction of the underlying CFTR defect. *Lancet Respir Med* 1: 158–163. doi:[10.1016/S2213-2600\(12\)70057-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(12)70057-7)
- Brinkman EK, Chen T, Amendola M, van Steensel B (2014) Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res* 42: e168. doi:[10.1093/nar/gku936](https://doi.org/10.1093/nar/gku936)
- Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF (2015) Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros* 14: 419–430. doi:[10.1016/j.jcf.2015.03.003](https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.03.003)
- Carlile GW, Robert R, Zhang D, Teske KA, Luo Y, Hanrahan JW, Thomas DY (2007) Correctors of protein trafficking defects identified by a novel high-throughput screening assay. *ChemBioChem* 8: 1012–1020. doi:[10.1002/cbic.200700027](https://doi.org/10.1002/cbic.200700027)
- Chang X, Mengos A, Hou Y, Cui L, Jensen TJ, Aleksandrov A, Riordan JR, Gentsch M (2008) Role of N-linked oligosaccharides in the biosynthetic processing of the cystic fibrosis membrane conductance regulator. *J Cell Sci* 121: 2814–2823. doi:[10.1242/jcs.028951](https://doi.org/10.1242/jcs.028951)
- Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O’Riordan CR, Smith AE (1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63: 827–834. doi:[10.1016/0092-8674\(90\)90148-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90148-8)
- Clancy JP, Cotton CU, Donaldson SH, Solomon GM, VanDevanter DR, Boyle MP, Gentsch M, Nick JA, Illek B, Wallenburg JC, et al (2019) CFTR modulator therotyping: Current status, gaps and future directions. *J Cyst Fibros* 18: 22–34. doi:[10.1016/j.jcf.2018.05.004](https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.05.004)
- Coakley RD, Grubb BR, Paradiso AM, Gatzky JT, Johnson LG, Kreda SM, O’Neal WK, Boucher RC (2003) Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 16083–16088. doi:[10.1073/pnas.2634339100](https://doi.org/10.1073/pnas.2634339100)
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, et al (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339: 819–823. doi:[10.1126/science.1231143](https://doi.org/10.1126/science.1231143)
- Cozens AL, Yezzi MJ, Kunzelmann K, Ohru T, Chin L, Eng K, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, Gruenert DC (1994) CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10: 38–47. doi:[10.1165/ajrcmb.10.1.7507342](https://doi.org/10.1165/ajrcmb.10.1.7507342)
- Cutting GR (2010) Modifier genes in mendelian disorders: The example of cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* 1214: 57–69. doi:[10.1111/j.1749-6632.2010.05879.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05879.x)
- Cutting GR (2015) Cystic fibrosis genetics: From molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* 16: 45–56. doi:[10.1038/nrg3849](https://doi.org/10.1038/nrg3849)
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11: 1156–1166. doi:[10.1101/gr.184901](https://doi.org/10.1101/gr.184901)
- Della Sala A, Prono G, Hirsch E, Ghigo A (2021) Role of protein kinase A-mediated phosphorylation in CFTR channel activity regulation. *Front Physiol* 12: 690247. doi:[10.3389/fphys.2021.690247](https://doi.org/10.3389/fphys.2021.690247)
- Dixon AS, Schwinn MK, Hall MP, Zimmerman K, Otto P, Lubben TH, Butler BL, Binkowski BF, Machleidt T, Kirkland TA, et al (2016) NanoLuc complementation reporter optimized for accurate measurement of protein interactions in cells. *ACS Chem Biol* 11: 400–408. doi:[10.1021/acscchembio.5b00753](https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00753)
- Donaldson JG, Finazzi D, Klausner RD (1992) Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* 360: 350–352. doi:[10.1038/360350a0](https://doi.org/10.1038/360350a0)
- Dow LE (2015) Modeling disease in vivo with CRISPR/Cas9. *Trends Mol Med* 21: 609–621. doi:[10.1016/j.molmed.2015.07.006](https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.07.006)
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494–498. doi:[10.1038/35078107](https://doi.org/10.1038/35078107)
- Farinha CM, Canato S (2017) From the endoplasmic reticulum to the plasma membrane: Mechanisms of CFTR folding and trafficking. *Cell Mol Life Sci* 74: 39–55. doi:[10.1007/s00018-016-2387-7](https://doi.org/10.1007/s00018-016-2387-7)
- Galiotta LJV, Haggie PM, Verkman AS (2001a) Green fluorescent protein-based halide indicators with improved chloride and iodide affinities. *FEBS Lett* 499: 220–224. doi:[10.1016/S0014-5793\(01\)02561-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02561-3)
- Galiotta LV, Jayaraman S, Verkman AS (2001b) Cell-based assay for high-throughput quantitative screening of CFTR chloride transport agonists. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1734–C1742. doi:[10.1152/ajpcell.2001.281.5.C1734](https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.5.C1734)
- Gianotti A, Delpiano L, Caci E (2018) In vitro methods for the development and analysis of human primary airway epithelia. *Front Pharmacol* 9: 1176. doi:[10.3389/fphar.2018.01176](https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01176)
- Gregory RJ, Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Paul S, Hehir K, Ostedgaard L, Klinger KW, Welsh MJ, Smith AE (1990) Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 347: 382–386. doi:[10.1038/347382a0](https://doi.org/10.1038/347382a0)
- Guo J, Garratt A, Hill A (2022) Worldwide rates of diagnosis and effective treatment for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 21: 456–462. doi:[10.1016/j.jcf.2022.01.009](https://doi.org/10.1016/j.jcf.2022.01.009)
- Hall MP, Unch J, Binkowski BF, Valley MP, Butler BL, Wood MG, Otto P, Zimmerman K, Vidugiris G, Machleidt T, et al (2012) Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol* 7: 1848–1857. doi:[10.1021/cb3002478](https://doi.org/10.1021/cb3002478)
- Howard M, DuVall MD, Devor DC, Dong JY, Henze K, Frizzell RA (1995) Epitope tagging permits cell surface detection of functional CFTR. *Am J Physiol* 269: C1565–C1576. doi:[10.1152/ajpcell.1995.269.6.C1565](https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.269.6.C1565)
- Illek B, Maurisse R, Wahler L, Kunzelmann K, Fischer H, Gruenert DC (2008) Cl transport in complemented CF bronchial epithelial cells correlates

- with CFTR mRNA expression levels. *Cell Physiol Biochem* 22: 57–68. doi:[10.1159/000149783](https://doi.org/10.1159/000149783)
- Jayaraman S, Haggie P, Wachter RM, Remington SJ, Verkman AS (2000) Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor. *J Biol Chem* 275: 6047–6050. doi:[10.1074/jbc.275.9.6047](https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6047)
- Jia Y, Mathews CJ, Hanrahan JW (1997) Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J Biol Chem* 272: 4978–4984. doi:[10.1074/jbc.272.8.4978](https://doi.org/10.1074/jbc.272.8.4978)
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816–821. doi:[10.1126/science.1225829](https://doi.org/10.1126/science.1225829)
- Kampmann M (2020) CRISPR-based functional genomics for neurological disease. *Nat Rev Neurol* 16: 465–480. doi:[10.1038/s41582-020-0373-z](https://doi.org/10.1038/s41582-020-0373-z)
- Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science* 245: 1073–1080. doi:[10.1126/science.2570460](https://doi.org/10.1126/science.2570460)
- Kim H, Kim JS (2014) A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet* 15: 321–334. doi:[10.1038/nrg3686](https://doi.org/10.1038/nrg3686)
- Konstantakos V, Nentidis A, Krithara A, Paliouras G (2022) CRISPR–Cas9 gRNA efficiency prediction: An overview of predictive tools and the role of deep learning. *Nucleic Acids Res* 50: 3616–3637. doi:[10.1093/nar/gkac192](https://doi.org/10.1093/nar/gkac192)
- Labun K, Montague TG, Krause M, Torres Cleuren YN, Tjeldnes H, Valen E (2019) CHOPCHOP v3: Expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Res* 47: W171–W174. doi:[10.1093/nar/gkz365](https://doi.org/10.1093/nar/gkz365)
- Liu F, Zhang Z, Csanády L, Gadsby DC, Chen J (2017) Molecular structure of the human CFTR ion channel. *Cell* 169: 85–95.e8. doi:[10.1016/j.cell.2017.02.024](https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.024)
- Lopes-Pacheco M (2016) CFTR modulators: Shedding light on precision medicine for cystic fibrosis. *Front Pharmacol* 7: 275. doi:[10.3389/fphar.2016.00275](https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00275)
- Lopes-Pacheco M (2020) CFTR modulators: The changing face of cystic fibrosis in the era of precision medicine. *Front Pharmacol* 10: 1662. doi:[10.3389/fphar.2019.01662](https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01662)
- Ma T, Vetrivel L, Yang H, Pedemonte N, Zegarra-Moran O, Galiotta LJV, Verkman AS (2002) High-affinity activators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride conductance identified by high-throughput screening. *J Biol Chem* 277: 37235–37241. doi:[10.1074/jbc.M205932200](https://doi.org/10.1074/jbc.M205932200)
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339: 823–826. doi:[10.1126/science.1232033](https://doi.org/10.1126/science.1232033)
- Mall M, Hipper A, Greger R, Kunzelmann K (1996) Wild type but not deltaF508 CFTR inhibits Na⁺ conductance when coexpressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 381: 47–52. doi:[10.1016/0014-5793\(96\)00079-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00079-8)
- Meacham GC, Patterson C, Zhang W, Younger JM, Cyr DM (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* 3: 100–105. doi:[10.1038/35050509](https://doi.org/10.1038/35050509)
- Molina SA, Hunt WR (2017) Chapter 12 - cystic fibrosis: An overview of the past, present, and the future. In *Lung Epithelial Biology in the Pathogenesis of Pulmonary Disease*, Sidhaye VK, Koval M (eds), pp 219–249. Cambridge, MA: Academic Press.
- Moriya H (2015) Quantitative nature of overexpression experiments. *Mol Biol Cell* 26: 3932–3939. doi:[10.1091/mbc.E15-07-0512](https://doi.org/10.1091/mbc.E15-07-0512)
- Moyer BD, Loffing J, Schwiebert EM, Loffing-Cueni D, Halpin PA, Karlson KH, Ismailov II, Guggino WB, Langford GM, Stanton BA (1998) Membrane trafficking of the cystic fibrosis gene product, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, tagged with green fluorescent protein in madin-darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 273: 21759–21768. doi:[10.1074/jbc.273.34.21759](https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21759)
- Pedemonte N, Tomati V, Sondo E, Galiotta LJV (2010) Influence of cell background on pharmacological rescue of mutant CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C866–C874. doi:[10.1152/ajpcell.00404.2009](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00404.2009)
- Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Abou Alaiwa MH, Ramachandran S, Moninger TO, Karp PH, Wohlford-Lenane CL, Haagsman HP, van Eijk M, et al (2012) Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* 487: 109–113. doi:[10.1038/nature11130](https://doi.org/10.1038/nature11130)
- Poulsen JH, Fischer H, Illek B, Machen TE (1994) Bicarbonate conductance and pH regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5340–5344. doi:[10.1073/pnas.91.12.5340](https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5340)
- Prelich G (2012) Gene overexpression: Uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics* 190: 841–854. doi:[10.1534/genetics.111.136911](https://doi.org/10.1534/genetics.111.136911)
- Ramalho AS, Boon M, Proesmans M, Vermeulen F, Carlon MS, Boeck KD (2022) Assays of CFTR function in vitro, ex vivo and in vivo. *Int J Mol Sci* 23: 1437. doi:[10.3390/ijms23031437](https://doi.org/10.3390/ijms23031437)
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066–1073. doi:[10.1126/science.2475911](https://doi.org/10.1126/science.2475911)
- Rommens JM, Lannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, et al (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059–1065. doi:[10.1126/science.2772657](https://doi.org/10.1126/science.2772657)
- Rowe SM, Verkman AS (2013) Cystic fibrosis transmembrane regulator correctors and potentiators. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3: a009761. doi:[10.1101/cshperspect.a009761](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009761)
- Ruan J, Hirai H, Yang D, Ma L, Hou X, Jiang H, Wei H, Rajagopalan C, Mou H, Wang G, et al (2019) Efficient gene editing at major CFTR mutation loci. *Mol Ther Nucleic Acids* 16: 73–81. doi:[10.1016/j.omtn.2019.02.006](https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.02.006)
- Schwinn MK, Machleidt T, Zimmerman K, Eggers CT, Dixon AS, Hurst R, Hall MP, Encell LP, Binkowski BF, Wood KV (2018) CRISPR-mediated tagging of endogenous proteins with a luminescent peptide. *ACS Chem Biol* 13: 467–474. doi:[10.1021/acscchembio.7b00549](https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00549)
- Sheppard DN, Welsh MJ (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 79: S23–S45. doi:[10.1152/physrev.1999.79.1.S23](https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.S23)
- Smith E, Giuliano KA, Shumate J, Baillargeon P, McEwan B, Cullen MD, Miller JP, Drew L, Scampavia L, Spicer TP (2017) A homogeneous cell-based halide-sensitive yellow fluorescence protein assay to identify modulators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ion channel. *Assay Drug Dev Technol* 15: 395–406. doi:[10.1089/adt.2017.810](https://doi.org/10.1089/adt.2017.810)
- Sorum B, Töröcsik B, Csanády L (2017) Asymmetry of movements in CFTR's two ATP sites during pore opening serves their distinct functions. *Elife* 6: e29013. doi:[10.7554/eLife.29013](https://doi.org/10.7554/eLife.29013)
- Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC (1995) CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269: 847–850. doi:[10.1126/science.7543698](https://doi.org/10.1126/science.7543698)
- Tabcharani JA, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW (1991) Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* 352: 628–631. doi:[10.1038/352628a0](https://doi.org/10.1038/352628a0)

- The clinical and Functional TRanslation of CFTR (2023) CFTR2 database. Available at: <https://cfr2.org>.
- Tsui LC, Dorfman R (2013) The cystic fibrosis gene: A molecular genetic perspective. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3: a009472. doi:[10.1101/cshperspect.a009472](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009472)
- Turcios NL (2020) Cystic fibrosis lung disease: An overview. *Respir Care* 65: 233–251. doi:[10.4187/respcare.06697](https://doi.org/10.4187/respcare.06697)
- Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, Houck SA, Cai Z, Peters KW, Hong JS, Pollard HB, Guggino WB, Balch WE, et al (2016) From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: Expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell* 27: 424–433. doi:[10.1091/mbc.E14-04-0935](https://doi.org/10.1091/mbc.E14-04-0935)
- Vergani P, Lockless SW, Nairn AC, Gadsby DC (2005) CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature* 433: 876–880. doi:[10.1038/nature03313](https://doi.org/10.1038/nature03313)
- Zhang Z, Liu F, Chen J (2017) Conformational changes of CFTR upon phosphorylation and ATP binding. *Cell* 170: 483–491.e8. doi:[10.1016/j.cell.2017.06.041](https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.041)
- Zhang C, Zhang G, Zhang Y, Lin X, Zhao X, Cui Q, Rong L, Du R (2023) Development of an HiBiT-tagged reporter H3N2 influenza A virus and its utility as an antiviral screening platform. *J Med Virol* 95: e28345. doi:[10.1002/jmv.28345](https://doi.org/10.1002/jmv.28345)
- Zielenski J (2000) Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 67: 117–133. doi:[10.1159/000029497](https://doi.org/10.1159/000029497)



License: This article is available under a Creative Commons License (Attribution 4.0 International, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

PŘÍLOHA 2

K. KVAKOVA, **M. ONDRA**, J. SCHIMER, M. PETRIK, Z. NOVY, H. RAABOVA, M. HAJDÚCH, P. CIGLER. Visualization of Sentinel Lymph Nodes with Mannosylated Fluorescent Nanodiamonds. *Advanced Functional Materials*. **2022**, 32(23), 2109960, ISSN: 1616-301X. DOI: 10.1002/adfm.202109960. **IF: 19.0.**

Visualization of Sentinel Lymph Nodes with Mannosylated Fluorescent Nanodiamonds

Kludia Kvakova, Martin Ondra, Jiri Schimer, Milos Petrik, Zbynek Novy, Helena Raabova, Marian Hajduch,* and Petr Cigler*

The present study focuses on the development of a sensitive and specific approach for the visualization of sentinel lymph nodes draining the tumor using ultrabright 200-nm fluorescent nanodiamonds (FNDs) equipped with a designed targeting surface architecture. The FNDs with a narrow size distribution are isolated by differential centrifugation, colloidally stabilized with alkyne-functionalized poly(glycerol) and modified with a polyvalent array of mannose (FND-p-Man). In vitro experiments demonstrate an outstanding increase of the particle internalization by the mannose receptor CD206 (MR) and no significant toxicity. MR involvement is confirmed by blocking ligand binding with mannan and a 15.2 mAb (specific anti-MR) in J774A.1 mouse macrophage cell line. In vivo mouse experiments confirm increased retention of FND-p-Man in sentinel lymph nodes of both healthy and B16 melanoma bearing animals. These results suggest that FND-p-Man has potential as a tracer for lymph node visualization in locoregional perioperative cancer diagnostics and as a tool for endoscopic/robotic fluorescence-guided surgery.

resection. Incomplete resection results in frequent local and/or distant cancer recurrence and it is usually due to positive surgical margins and/or tumor metastases into local lymphatics. Complete resection is required for good therapeutic outcomes in most cancers, which includes free resection margins proved microscopically and nodal dissection. Unfortunately, the macroscopic assessment of tissues currently used during surgery is technically not sensitive enough to identify miliary tumor residues, micrometastases, and/or tumor cells invading beyond the surgical margins or metastasizing into regional lymph nodes. Therefore, it is essential to develop new diagnostics for improved clinical practice in this field. The current standard for surgical care of melanoma and breast cancers is sentinel lymph node (SLN) biopsy.^[1] The SLN is the first lymph

1. Introduction

Despite recent advances in therapeutic approaches, surgery remains the primary tool for the treatment of solid tumors and, in many cases, the only hope for a cure. However, in numerous cases, surgical removal is not as complete as would be required. This situation is termed an incomplete surgical


node receiving lymphatic drainage from a tumor. Currently, the SLN for a given tumor is determined by injecting a compound with a tracer around the tumor. The mixture is drained through the lymphatic vessels to the sentinel node and thereby provides a contrast for identification.^[2] The techniques used, which have been approved by the FDA,^[3] are 1) intraoperative visual blue dye detection; 2) preoperative planar lymphoscintigraphy that may be combined with intraoperative gamma probe/Geiger meter-detection; 3) detection systems using magnetic nanoparticles (recently developed); and 4) intraoperative fluorescence-guided surgery.

SLN biopsy is most commonly performed with a dual-modality technique based on a combination of radioactive tracer and blue dye. Radioactive tracers (mostly colloids radiolabeled with Technetium-99m) are used to track lymph drainage of the breast.^[4] A small amount of the radioactive tracer is injected into the affected tissue around the breast tumor before surgery. The tracer is drained into SLNs by the lymphatic system. The nodes containing the radioactive tracer are localized during surgery by using a hand-held probe dedicated for gamma radiation detection and are removed for examination. Since the tracer is radioactive, the injection is usually carried out in a nuclear medicine department, which is not available in every hospital. Due to the higher costs of radiotracers compared to other lymphatic mapping agents, their applications are generally limited.^[2] The radioactive tracer is usually used in combination with a blue dye, which allows the surgeon to

K. Kvakova, J. Schimer, H. Raabova, P. Cigler
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry
Czech Academy of Sciences
Flemingovo nam. 2, Prague 6 166 10, Czechia
E-mail: cigler@uochb.cas.cz

K. Kvakova
Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics
First Faculty of Medicine
Charles University
Katerinska 1660/32, Prague 2 121 08, Czechia

M. Ondra, M. Petrik, Z. Novy, M. Hajduch
Institute of Molecular and Translational Medicine
Faculty of Medicine and Dentistry
and Czech Advanced Technology and Research Institute
Palacky University Olomouc
Hnevotinska 1333/5, Olomouc 779 00, Czechia
E-mail: marian.hajduch@upol.cz

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/adfm.202109960>.

DOI: 10.1002/adfm.202109960

identify the nodes visually. Current blue dye tracers also exhibit low sensitivity, and systemic allergic reactions to blue dyes have been observed.^[5] Furthermore, highly sensitive gamma probe detection requires the exposure of patients and health care professionals to radiation, and it has only limited spatial resolution and visual inspection potential.^[6]

Fluorescence imaging is a noninvasive technique that can allow visualization of biological processes in a living organism. It is characterized by high sensitivity, low background and a high signal-to-noise ratio. Nevertheless, the penetration of photons into living tissue and the return of photons emitted by the fluorophore in the visible range are limited to a few hundred microns due to scattering and absorption by tissue components. Innovative near-infrared (NIR) range fluorescence is expected to enhance the detection of SLNs during surgery, enabling the use of minimally invasive devices such as laparoscopes, endoscopes and surgical robots (required imaging depths up to ≈ 4 cm). However, the spectral properties of currently approved dyes^[7] have considerably limited the progress of endoscopic and robotic surgeries. The most promising agents are high-performance NIR fluorescence imaging probes.^[3] Among the NIR-emitting systems, several inorganic nanoparticles have been investigated for SLN visualization, including quantum dots,^[8] metal nanoparticles,^[9] silica nanoparticles,^[10] and NIR-emitting fluorescent nanodiamonds (FNDs).^[11]

FNDs have significant advantages over other NIR nanoprobes due to their unlimited photostability,^[12] almost quantitative quantum yield,^[13] inherent biocompatibility,^[14] and hemocompatibility.^[15] FNDs do not show liver toxicity, systemic inflammation, or deleterious effects on the offspring.^[16] The NIR fluorescence of FNDs originates from nitrogen-vacancy (NV) centers, point defects in the diamond lattice created by irradiation with high-energy particles and annealing.^[17] NV centers show favorable properties for fluorescence imaging^[18–20] such as much longer radiative lifetime (>15 ns) compared to other endogenous and exogenous fluorophores commonly used in biological imaging (with lifetimes typically 1–4 ns).^[21] A unique electronic structure of NV centers enables quantum-based optical sensing in biological systems.^[22] Other color centers in diamonds can also be formed from nitrogen impurities, such as the H3 center (also called the NVN center) that provides bright green emission.^[23] Thus, FNDs can be used as sensitive and specific fluorescent probes for bioimaging. Recent advances in imaging research show that FNDs are suitable for long-term tracking of various cell types, such as stem cells, neurons, and cancer cells, which can be further used for monitoring disease stages.^[24] For precise targeting of FNDs to specific cell types,^[25–32] coatings with biocompatible polymers have been developed.^[33–35] Shape-based modulation of cellular uptake and excretion of FNDs has recently been described.^[36,37] Overall, FNDs are highly promising inorganic nanoparticles for in vivo bioimaging^[11,38,39] due to their low toxicity, high tissue biocompatibility, photostability, and flexible surface chemistry.

Lymph nodes are small, round or bean-shaped clusters of cells containing different subsets of white blood cells, predominantly lymphocytes and macrophages (M Φ s) that have specific functions and express various receptors on their surfaces. Mannose receptor (MR; CD206), a member of the C-type lectin superfamily, is a receptor that is abundantly expressed

in lymphatic M Φ s.^[40] CD206 is involved in several distinct processes, such as antigen processing and presentation, cell migration, intracellular signaling, and phagocytosis.^[40,41] MR recognizes a wide range of endogenous and exogenous ligands, namely, glycoprotein hormones with sulfated carbohydrate chains,^[42,43] pathogenic microorganisms with polysaccharides decorating surfaces and cell walls,^[40] monosaccharides or oligosaccharides with terminal mannose, *N*-acetylglucosamine or fucose residues.^[44,45] Since mannose is one of the activators of MR-mediated internalization, MR has been previously targeted for SLN mapping with various mannose-coated molecular agents.^[46,47] Several different studies have led to results showing improved uptake of nanoparticles by M Φ s after mannosylation compared with nonmannosylated nanoparticles.^[48,49]

Here, we report the sensitive visualization of mouse lymph nodes using ultrabright 200-nm FNDs equipped with a designed targeting surface architecture. We provide protocols for the isolation of 200-nm nanodiamonds exhibiting a narrow size range, their electron irradiation and colloidal stabilization. We developed a modification of the polymer periphery leading to a polyvalent display of mannose on the particle interface. We demonstrated that this approach has a beneficial effect on the retention of FNDs in mouse SLNs. The retention of FNDs is ligand specific and is caused by selective targeting of the CD206 receptor. Our visualization conditions and the high brightness of the 200-nm FNDs demonstrate the feasibility of our approach for intraoperative locoregional cancer diagnostics, which is a key approach for image-guided surgery.

2. Results and Discussion

2.1. NDs (200 nm) with a Narrow Size Distribution Were Used as Bioimaging Probes

For advanced in vivo imaging applications, ≈ 100 -nm FNDs prepared by high-pressure high temperature (HPHT) process have been most frequently employed^[11,18,21,50–52] (as previously reviewed^[53–56]). However, the relatively low brightness and the corresponding low signal/noise ratio of 100-nm FNDs still represent an important factor limiting broad application for in vivo imaging. To suppress the undesirable optical background, sophisticated approaches based on magnetic modulation of fluorescence intensity^[57–60] and time gating^[18] have been elaborated. However, these methods require specialized instrumentation, which is not commonly available. The low brightness of FNDs for in vivo bioimaging is thus sometimes overcome by attachment of molecular fluorescent probes to NDs.^[61]

In this study, we report biocompatible, highly colloidal stable ≈ 200 -nm HPHT FNDs that provide ultrabright two-color emission in both the near-infrared (NIR) and visible spectral regions. Upon excitation with green (532 nm) and orange (590 nm) light, the FNDs emit in the 560–800 nm region; excitation with blue light (488 nm) results in green (500–550 nm) emission, which can be utilized in parallel for independent FND spectral detection (**Figure 1A**). The excitation-dependent presence of two spectral colors is caused by presence of two types of point lattice defects in FNDs: NV⁻ centers (NIR emission) and H3 centers (green emission).^[23] The high brightness

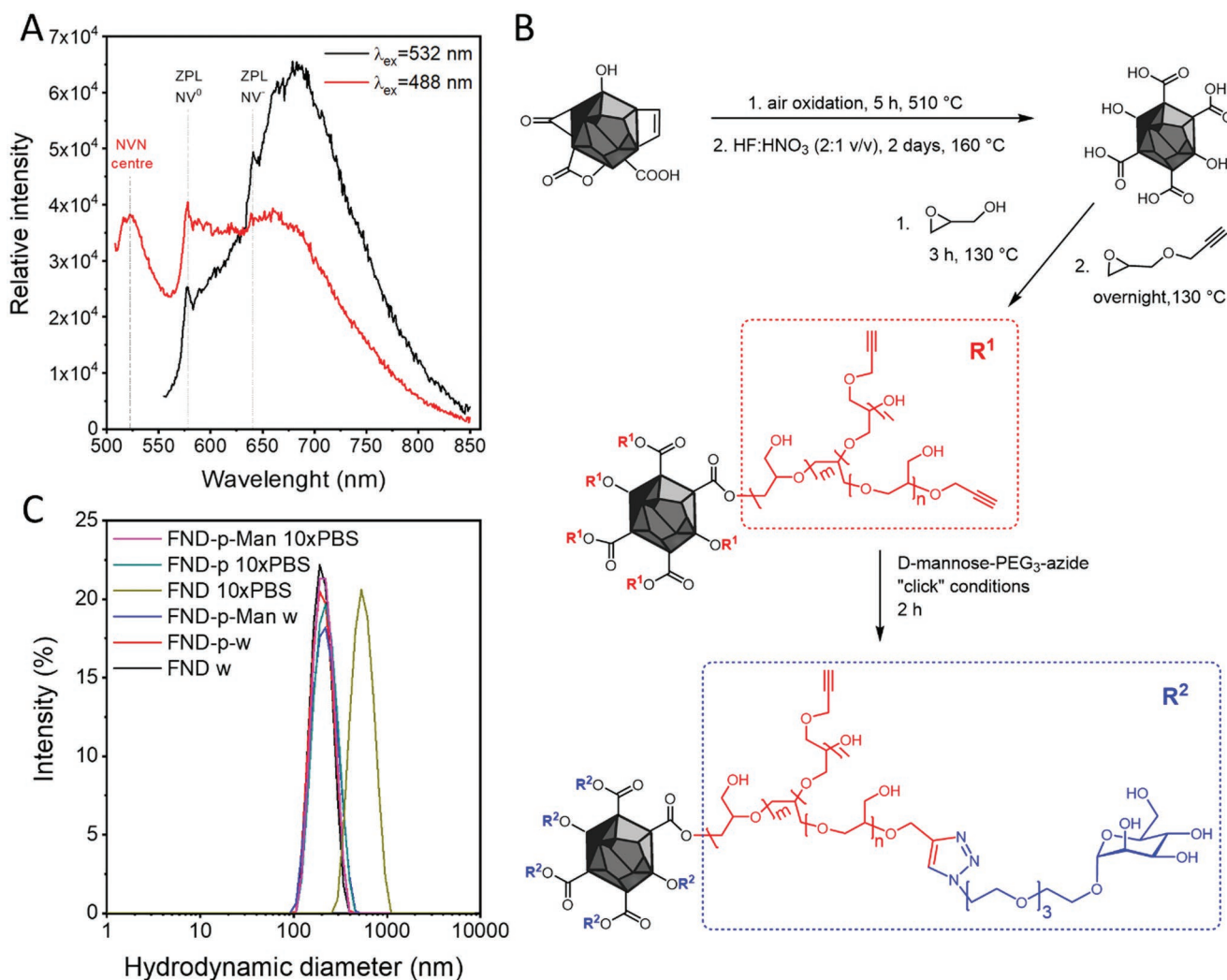


Figure 1. A) Photoluminescence spectra of FNDs showing the presence of both NV and H3 (NVN) centers in FNDs ($\lambda_{\text{ex}} = 532$ and 488 nm, respectively). B) Preparation of FNDs, FND-p, and FND-p-Man. C) Comparison of colloidal stabilities of the largest isolated FND fraction vi, before (FND) and after polymer coating (FND-p) and after attachment of mannose (FND-p-Man). The samples were measured by DLS in water (w) and in an extreme ionic environment of 10 \times concentrated PBS buffer (10 \times PBS).

of our newly developed FNDs is caused mainly by their larger volume, which accommodates a higher number of NV centers and decreases the influence of the particle surface.^[62,63] A comparison of ≈ 100 - and ≈ 200 -nm FNDs shows that both particles fall in the range representing the best compromise between efficient and fast lymphatic drainage and satisfactory retention in the sentinel lymph node (i.e., 100–200 nm).^[64] Nevertheless, the increase of FND diameter from 100 to 225 nm (used in this work) results in an increase in volume by a factor of 11.4 (for a spherical model). This effect is proportionally reflected in the \approx order of magnitude increase in particle brightness and the bioimaging performance.

Since the size of the nanoparticles is a crucial parameter influencing interactions with biological environments, we first prepared NDs with narrow size distributions. After differential centrifugation of a colloidal solution containing a commercial polydisperse ND sample (Scheme S1, Supporting Information), we obtained six fractions (i–vi). The fractions showed gradually

increasing mean ND sizes ranging from 121 to 225 nm (for transmission electron microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS) data, see Figures S1 and S2, Supporting Information, respectively). Although this approach was relatively laborious, we succeeded in removing the fraction with smaller NDs and realized gram-scale preparation of monodisperse 225 nm NDs (fraction vi) in a high yield ($\approx 27\%$). The loss of the starting material was mainly caused by removing the smaller nanoparticles. Irradiation of these NDs using electrons and subsequent annealing and oxidation^[65] provided ultrabright two-colored FNDs (Figure 1A).

2.2. Polymer Coating and Colloidal Stabilization of ≈ 200 -nm FNDs

A typical limitation of FNDs in biomedical applications is their poor colloidal stability in buffers and biological fluids.

Although oxidized FNDs are stable in water, in biological liquids containing salts such as buffers, cell media, and blood, they immediately aggregate.^[63,66,67] The diamond surface also binds proteins that can subsequently block the interactions of moieties attached to FNDs with their targets.^[67–69] For applications in targeted bioimaging, polymer coatings are frequently used to improve FND stability.^[70] Here, we utilized a densely packed branched poly(glycerol) (PG) interface that enabled further postpolymerization modification.^[71] In addition to the strong steric colloidal stabilization effect of PG on nanoparticles, this biocompatible polymer provides antifouling properties, long plasma half-lives and prolonged circulation in blood.^[70] We grew PG shells from oxidized, negatively charged FNDs with carboxylate surfaces using ring-opening polymerization of glycidol at 130 °C. Then, we decorated the PG shell with alkyne groups upon copolymerization with glycidyl propargyl ether,^[72,73] providing an FND-p sample suitable for bioorthogonal modifications using copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (Figure 1B). FND-p contained 4% polymers, as determined by thermogravimetry, and showed a characteristic signature in the FTIR spectrum (Figure S3, Supporting Information). Upon coating, the hydrodynamic diameter of the particles, measured by DLS in water, increased slightly and as expected from 205 ± 1 nm up to 215 ± 3 nm. We note that other polymerization approaches originally developed for smaller FND particles did not work well for ≈200-nm FNDs. For example, a methacrylated silica interlayer suitable for radical polymerization^[25–27] did not provide sufficient colloidal stabilization of the ≈200-nm particles during polymerization (data not shown). Correspondingly, to the best of our knowledge, no study has shown colloidal stabilization of FNDs with diameters larger than 140 nm.

To test the colloidal endurance of nanoparticles for bio-applications, we used an extreme ionic environment containing 10× concentrated PBS buffer (1.37 M solution of NaCl in 100 × 10⁻³ M phosphate buffer). The alkyne-modified PG shell robustly stabilized the FND-p. While no aggregation was observed after transfer of FND-p from water to 10x PBS, “naked” FNDs showed rapid aggregation in the buffer followed by precipitation (Figure 1C).

2.3. Surface Engineering for Targeting MR on Macrophages

MR (CD206) participates in the recognition of branched sugars with terminal mannoses that are present on many pathogenic

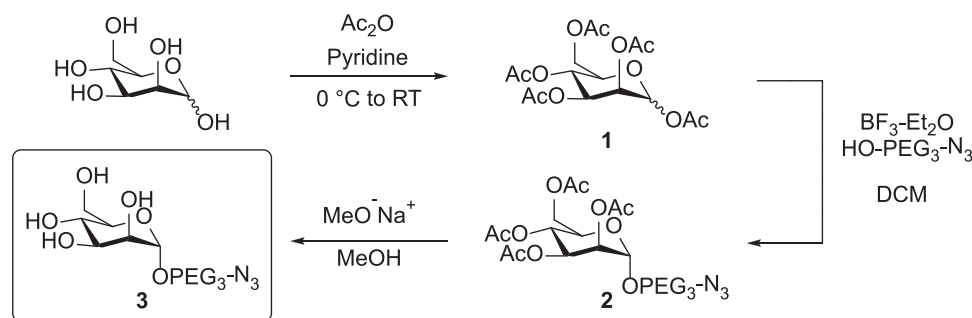
microorganisms.^[74] Molecules and nanoparticles displaying mannose can thus be actively retained in the SLN by residual tissue MΦs and by other cells expressing CD206.^[75,76]

We designed a polymer interface enabling polyvalent display of mannose on FNDs. Because our FND-p particles contained alkyne moieties, α-D-mannose bearing a hydrophilic, flexible linker terminated with azide was synthesized (α-D-mannose-PEG₃-azide; **Scheme 1**). Using copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, we decorated FND-p with α-D-mannose-PEG₃-azide, obtaining FND-p-Man particles (Figure 1B). The presence of mannose on the surface was manifested by increased intensity of the ν(C-O) signal of alcohol (Figure S3B, Supporting Information). FND-p-Man showed excellent colloidal stability in 10× PBS, similar to unmodified FND-p (Figure 1C and Table S1B, Supporting Information). In accordance with recent work,^[77] the zeta potential of FND-p was -19 ± 4 mV. The attachment of mannose caused steric shielding of the PG layer, which increased the zeta potential to a value close to zero and slightly increased the particle sizes in fetal bovine serum (Table S1A, Supporting Information).

2.4. Cell Viability (MTS Assay) and Dual Imaging of FND-p/FND-p-Man Internalization

To confirm the lack of FND cytotoxicity, as previously reported for smaller particles,^[78,79] and to further investigate whether coating and mannosylation affect the biocompatibility of FNDs, the cytotoxicities of FND-p and FND-p-Man were determined by the cell viability (MTS) assay. The J774A.1 mouse macrophage tumor cells were used as a cellular model to investigate the cytotoxicity and internalization. The J774A.1 cell line was chosen as the model due to its variable surface expression of functional MR among cells, closely mimicking MR expression among various types of MΦs in lymph nodes.^[80,81] We treated J774A.1 cells with increasing concentrations of FND-p/FND-p-Man. Evaluation of MTS results revealed no significant effect on cell viability at concentrations 5–200 μg mL⁻¹ FND-p/FND-p-Man after 24 h of incubation, confirming the cytocompatibility of our FNDs (Figure 2A and Table S2, Supporting Information).

Further, we performed confocal fluorescence microscopy imaging to examine FND uptake and evaluate the effect of mannosylation on FND-p-Man internalization. Low concentrations of FND, as previously reported,^[16] were tested to avoid an abundance of noninternalized FNDs in the medium during live imaging. We also assumed that the larger sizes of



Scheme 1. Reaction scheme showing the synthesis of α-D-mannose PEG₃-azide

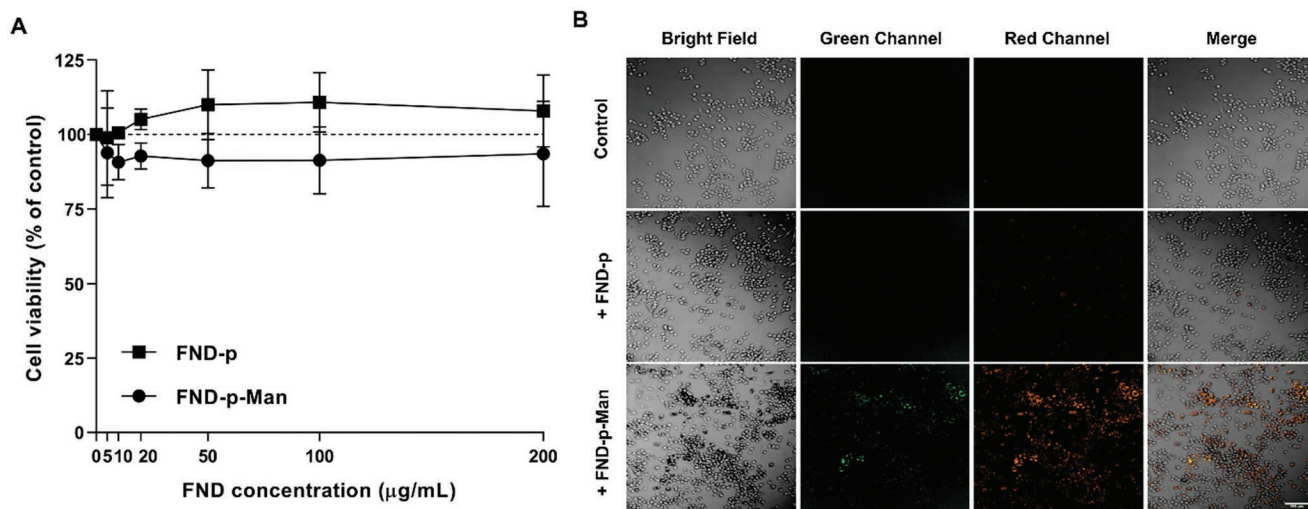


Figure 2. Viability of J774A.1 cells and internalization/two color emission of FNDs. A) The effect of FND on cytotoxicity was measured by MTS assay after 24 h exposure of cells to different concentrations of FND-p and FND-p-Man (0–200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (mean \pm SD). *p*-values were calculated using one-way ANOVA—Dunnett's test. B) Confocal microscopy images of J774A.1 cells treated with FND-p and FND-p-Man (both 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for 24 h (green channel: ex 488/em 540 \pm 20 nm, red channel: ex 561/em 620 \pm 35 nm); *n* = 3. Scale bar: 100 μm .

FND-p/FND-p-Man improve uptake and visualization in J774A.1 cells. Indeed, after 24 h of treatment, a noticeable increase in the internalization of FND-p-Man was observed compared with

that of FND-p (detailed analysis of FND internalization is in the *in vitro* live imaging section) (Figure 3C). We were able to visualize the two-color emission of FND-p-Man after internalization

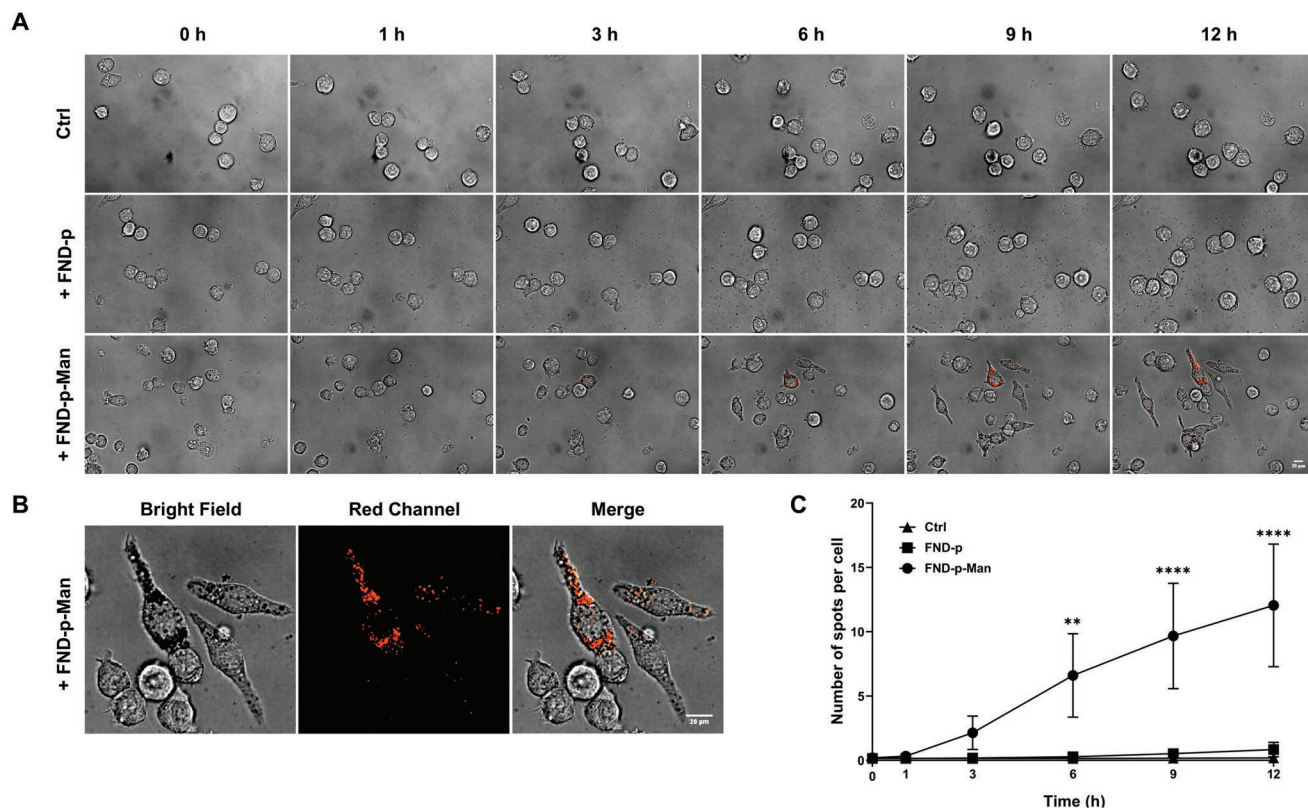


Figure 3. Internalization of FND-p and FND-p-Man in J774A.1. A) Live-cell imaging (bright field and red channel merged) of FND-p and FND-p-Man internalization (both 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). B) Localization of FND-p-Man in J774A.1 cells after 12 h. C) Statistical analyses of spot numbers per cell (mean \pm SD) after nanoparticle uptake over time; *n* = 3. *p*-values were calculated using two-way ANOVA—Tukey's test, * *p* \leq 0.05, ***p* < 0.005, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001. Scale bars: (A) and (B) 20 μm .

and accumulation ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) upon excitation with two different lasers providing green (ex 488/em $540 \pm 20 \text{ nm}$) and red (ex 561/em $620 \pm 35 \text{ nm}$) emission (Figure 2B). Different concentrations of FND-p/FND-p-Man were studied with confocal microscopy (see Figure S4, Supporting Information).

2.5. In Vitro Live Imaging of FND-p/FND-p-Man Internalization

Live imaging by confocal fluorescence microscopy with nanometer resolution is one of the approaches used for both in vitro and ex vivo imaging^[82–84] of nanoparticle–cell interactions and their cellular internalization over time. The focus was on only one (red) of the two emission spectra available for visualization of FNDs, as confirmed in the previous section. We treated J774A.1 cells with FND-p and FND-p-Man (both at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) to determine the effects of the mannose polymer interface on FND internalization. Signals detected by confocal microscopy in the red channel (em $620 \pm 35 \text{ nm}$) represented FND-p or FND-p-Man accumulation in J774A.1 cells (Figure 3A,B). We detected spots for FND-p-Man after 3 h incubation but almost none for FND-p. Live-cell confocal imaging of FND uptake showed accumulation and significantly better uptake after 6 h ($p = 0.002$), 9 h ($p < 0.0001$) and 12 h ($p < 0.0001$) for FND-p-Man compared with FND-p. FND-p was also internalized, but the uptake was slower and the number of spots was very low, close to signal background. The average numbers of spots per cell after 12 h were 12.05 ± 4.77 for FND-p-Man, 0.84 ± 0.57 for FND-p and 0.19 ± 0.22 for control cells (Figure 3C and Table S3, Supporting Information). As expected, the quantitative uptake of mannose receptors expressing J774A.1 cells demonstrated a strong increase in internalization of FND-p-Man compared with nonmannosylated FND-p. We did not observe any accumulation of FND-p or FND-p-Man on the cell membrane prior to internalization (Video S1, Supporting Information), which is in agreement with previously published results with smaller, $\approx 100 \text{ nm}$, FNDs.^[83]

2.6. Inhibition of FND-p-Man Internalization Mediated by MR

CD206 and its carbohydrate recognition domains (CRDs) are responsible for the binding of monosaccharides such as mannose, fucose, and GlcNAc. Not only monosaccharides but also branched sugars (oligosaccharides, polysaccharides) that bear the terminal residues mentioned above bind to CRDs.^[44,45] Branched sugars bind to MR more effectively than monosaccharides and can in fact be used as competitive inhibitors for MR.^[44] Another way to inhibit MR function is by using neutralizing antibodies.^[85,86] To further confirm the specific effects and advantages of the mannose polymer interface on FND uptake, we designed an inhibition assay to prove internalization of FND-p-Man by MR. In the current investigation, mannan at 1 mg mL^{-1} and 15.2 mAb at $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ were used according to previously published protocols for MR inhibition.^[85,87,88] We detected a significant decrease in the number of spots per cell after 6–9–12 h of live-cell imaging, either after 20 min of mannan pretreatment ($p = 0.0011$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$) or with 15.2 mAb neutralizing antibody ($p = 0.0266$, $p = 0.0013$,

$p = 0.0002$) (Figure 4A,B and Table S4, Supporting Information). Overall, the mannose analog mannan decreased the average number of spots by $\approx 83\%$ (2.07 ± 0.56 spots per cell) and neutralizing 15.2 mAbs by $\approx 54\%$ (5.56 ± 1.16 spots per cell) after 12 h of treatment with FND-p-Man compared with cells treated with only FND-p-Man (12.05 ± 4.77 spots per cell). Therefore, this suggests that internalization was mannose receptor mediated. The same detection algorithm was used in the Columbus software for the detection of spots, as mentioned above. In addition, we tested 4 different epithelial cell lines (16HBE14o-, A549, HCT116, HEK293T) lacking MR expression to further prove MR involvement in FND-p-Man internalization. In general, multiple pathways simultaneously contribute to non-specific endocytosis in epithelial cell despite they are not professional phagocytes.^[89,90] However, we observed minimal or no internalization of FND-p-Man in these cell lines (Figure S5, Supporting Information). This further confirms specific involvement of MR in FND-p-Man internalization.

2.7. In Vivo Imaging of FNDs

The accurate perioperative identification followed by microscopic examination of regional lymph nodes (LNs) has important therapeutic and prognostic value in patients with newly diagnosed cancer. Conventional intraoperative SLN localization is usually based on the combination of dedicated radiotracers and blue dye techniques. However, this technique has several drawbacks. Thus, new methods for SLN visualization, such as indocyanine green fluorescence, liposomes, dendrimers, quantum dots, superparamagnetic iron oxide nanoparticles and contrast-enhanced ultrasound microbubbles, have been developed.^[91–93] Promising agents for SLN visualization include NIR fluorescent imaging tracers.^[94–96] Despite these achievements, new standards of care for SLN identification are still missing.

Fluorescent properties combined with inherently good biocompatibility makes FNDs good candidates for future SLN imaging. Indeed, there are already several published reports on FNDs biocompatibility and biodistribution indicating low or absent inflammatory responses in vivo.^[11,97]

To evaluate the applicability of FNDs as NIR fluorescence imaging tracers for SLN imaging, we utilized an established in vivo mouse model. First, we investigated whether FNDs were drained by the lymph from the animal footpad and accumulated in the regional lymph nodes. The mouse hind footpad is a convenient and standard injection site for immunological studies.^[98,99] The path of draining lymph from the footpad is well characterized and provides three lymph node locations for analyses of immunological response (i.e., popliteal, subiliac and inguinal). We injected two groups of healthy Balb/c mice with either FND-p or FND-p-Man. Fluorescence imaging of FNDs in mice showed clear accumulation of both FND-p-Man and FND-p in popliteal lymph nodes after s.c. injection into the hind paw. The fluorescence signal intensities in experimental popliteal lymph nodes ($5.4 \times 10^7 \pm 9.4 \times 10^6 \text{ P s}^{-1} \text{ mm}^{-2}$ for FND-p-Man and $5.1 \times 10^7 \pm 1.7 \times 10^6 \text{ P s}^{-1} \text{ mm}^{-2}$ for FND-p) were significantly ($p < 0.0005$) higher than those in control popliteal lymph nodes for both FNDs ($1.3 \times 10^7 \pm 1.9 \times 10^6$ and $1.5 \times 10^7 \pm 2.4 \times 10^6 \text{ P s}^{-1} \text{ mm}^{-2}$, respectively) (Figure 5).

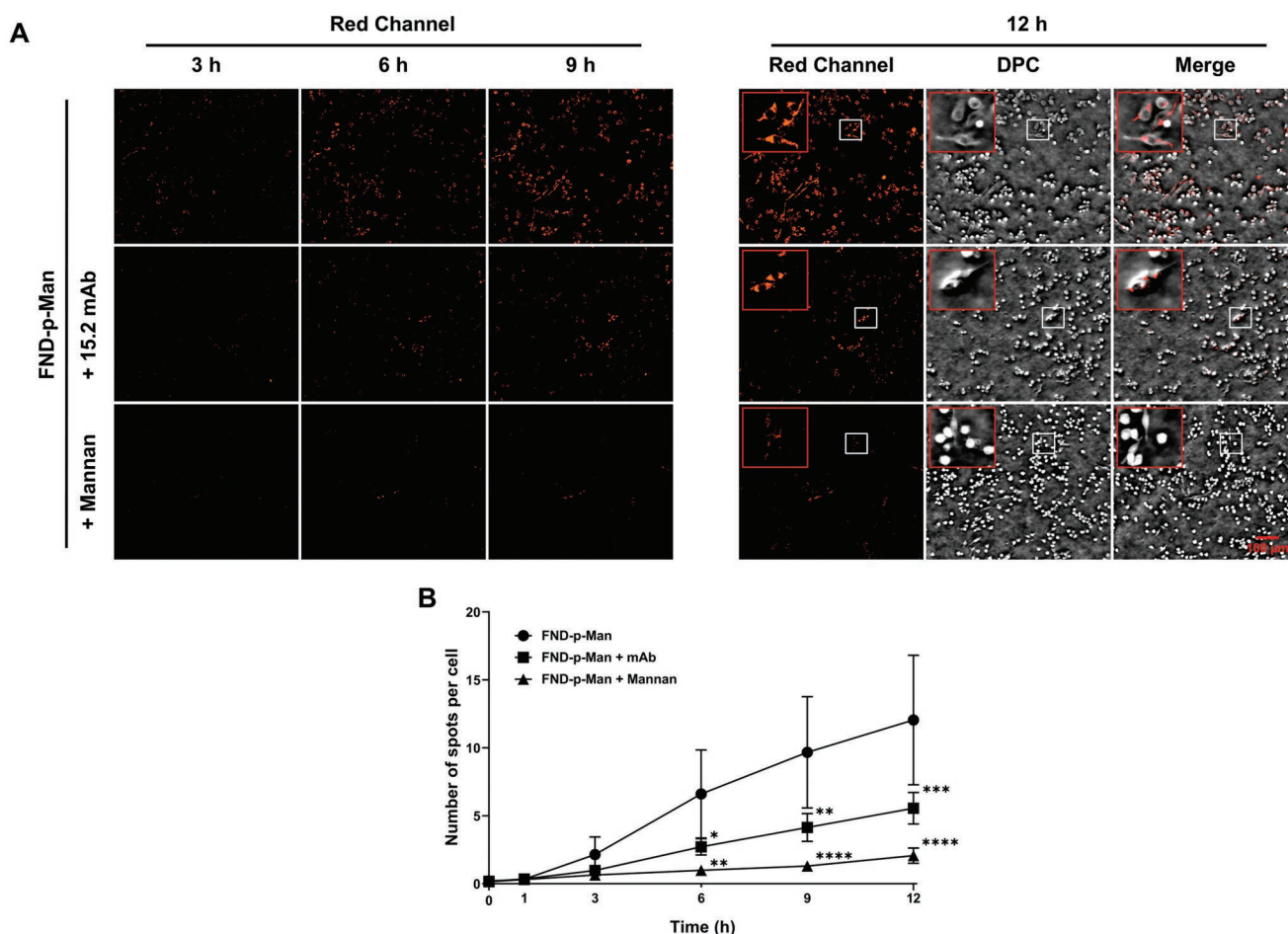


Figure 4. Inhibition of FND-p-Man internalization. A) Confocal microscopy images of MR inhibition by mannan (1 mg mL^{-1}) and 15.2 mAb ($30 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). Zoomed-in insets at 4 \times magnification (zoomed-in factor) after 12 h. B) Statistical analyses of FND-p-Man inhibition (mean \pm SD); $n = 3$. p -values were calculated using two-way ANOVA—Tukey's test, * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. DPC—digital phase contrast. Scale bar: 100 μm .

The target-to-nontarget lymph node ratios were 4.1 for FND-p-Man versus 3.4 for FND-p, indicating superior contrast with FND-p-Man.

Second, we used a murine footpad melanoma (B16-F10 cell line) model, which is a common model for studying lymphangiogenesis associated with murine cancer metastasis.^[100–102] Harrell et al.^[101] reported that B16 tumors induced lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow through tumor-draining lymph nodes, suggesting that these alterations could actively promote lymphatic metastasis of melanoma cells to draining lymph nodes and subsequently to the lungs. To demonstrate the utility of the tested FNDs for SLN imaging in an established tumor mouse model, we evaluated both FND-p and FND-p-Man in C57BL/6 mice with the B16-F10 melanoma. In tumor-bearing animals, results similar to those for healthy mice were obtained, although both types of FNDs displayed lower contrasts compared to those for healthy animals. Necropsy at 24 h after FND injection revealed that the experimental popliteal lymph nodes ($2.6 \times 10^7 \pm 3.4 \times 10^6 \text{ P s}^{-1} \text{ mm}^{-2}$ for FND-p-Man and $1.8 \times 10^7 \pm 5.6 \times 10^6 \text{ P s}^{-1} \text{ mm}^{-2}$ for FND-p) exhibited more intense fluorescence (FND-p-Man $p < 0.005$) than the control

nodes ($1.5 \times 10^7 \pm 3.5 \times 10^6$ and $1.3 \times 10^7 \pm 2.6 \times 10^6 \text{ P s}^{-1} \text{ mm}^{-2}$, respectively) (Figure 6). The target-to-nontarget lymph node ratios in the tumor model were 1.7 for FND-p-Man versus 1.4 for FND-p. Importantly, neither whole body fluorescence imaging nor inspection of organs *post mortem* did not reveal distribution of FNDs outside the site of administration and regional lymph nodes.

2.8. Histological Analyses of Sentinel Lymph Nodes

The histological analysis of LNs is necessary to precisely localize the capture sites for both exogenous and endogenous lymph antigens. LNs, kidney-shaped small encapsulated bodies, can be morphologically subdivided into three main compartments, the cortex, the paracortex and the medulla, and each compartment contains specific types of immune cells with various functions.^[103,104] Efficient uptake of lymph-borne antigens is mediated by different subsets of LN macrophages. Subcapsular sinus macrophages are at the frontline of immune protection and control lymph flowing by afferent lymph vessels to the LNs and trap and present antigens to B cells.^[105–107]

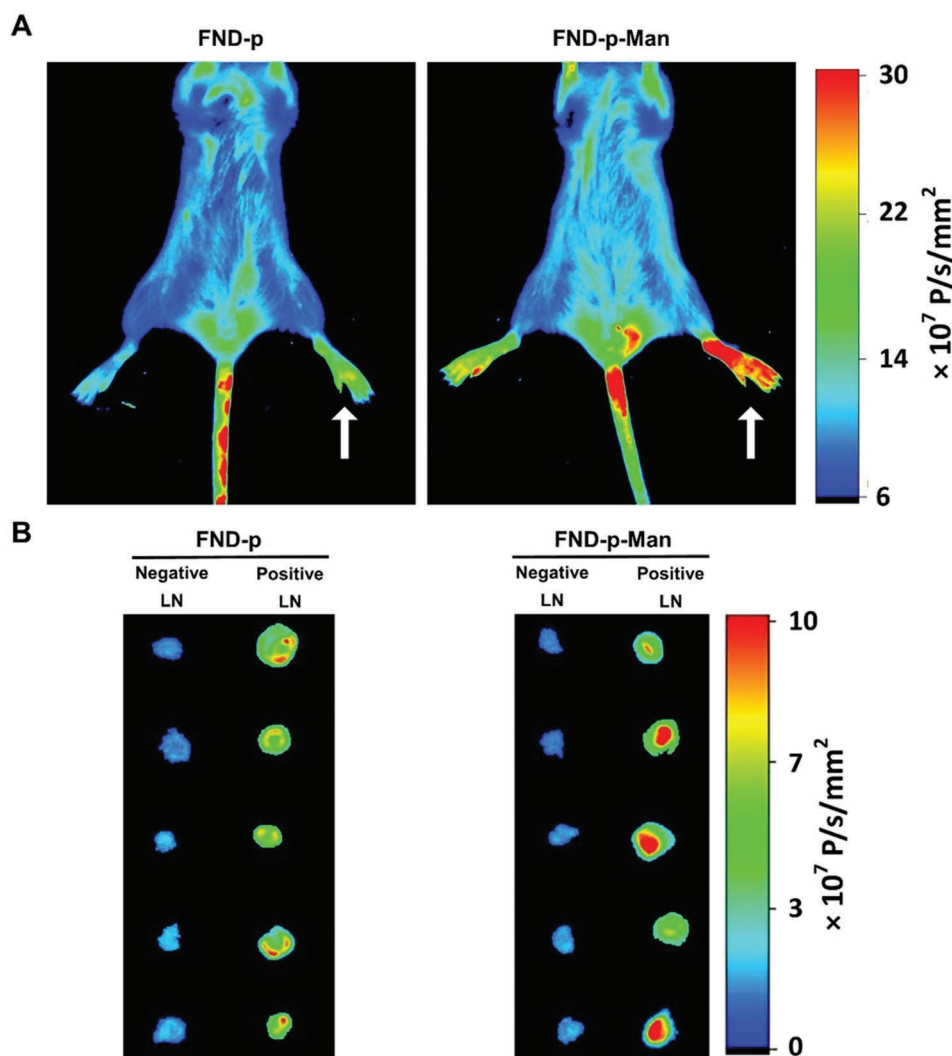


Figure 5. A) Fluorescence images of mice injected into the hind right paw (white arrow indicates a site of injection) with FND-p or FND-p-Man 24 h p.i. B) Excised popliteal LNs from five animals injected with either FND-p or FND-p-Man ($n = 5$).

To further confirm and localize the site of FND retention, we excised negative LNs (control LNs) and popliteal LNs from four tumor-bearing animals injected either with FND-p or FND-p-Man. After counterstaining with neutral red, the presence of FNDs was manifested by dark spots in light microscopy. We observed dark coloration primarily in the subcapsular sinus of LNs of animals injected with either FND-p or FND-p-Man, whereas we did not observe any dark spots in negative control LNs (Figure 7). Correspondingly with *in vitro* uptake data (Figure 3), we found a higher number and larger dark spots in animals injected with FND-p-Man than in those injected with FND-p. We confirmed superior retention of FND-p-Man in the LN subcapsular sinus, where phagocytic subcapsular sinus macrophages are localized. This observation also supports the results obtained from the *in vivo* imaging experiments, where LNs from animals treated with FND-p-Man showed higher contrast than LNs from animals treated with FND-p. Notably, the accumulation of FND-p/FND-p-Man in SLNs was not associated with a local inflammatory response.

3. Conclusions

In summary, we demonstrated locoregional optical visualization of SLNs in mice using biocompatible, photostable and colloiddally stable FND-p-Man nanoparticles. FND-p-Man was efficiently internalized and retained in SLNs and was easily traceable. *In vitro* experiments showed no cytotoxicity and confirmed the effect of polyvalent mannoseylation of FNDs on uptake and retention in MΦs. Overall, we detected significant differences between FND-p and FND-p-Man uptakes due to mannoseylation. In contrast to those of FND-p-Man, internalization of FND-p was significantly lower, suggesting that the mannose receptor is crucial for internalization. The involvement of the mannose receptor was further confirmed by blocking the cellular uptake of FND-p-Man with a selective receptor neutralizing mAb antibody and ligand competition.

In vivo experiments confirmed the advantage of mannose for increased retention in the LNs of healthy and tumor-bearing

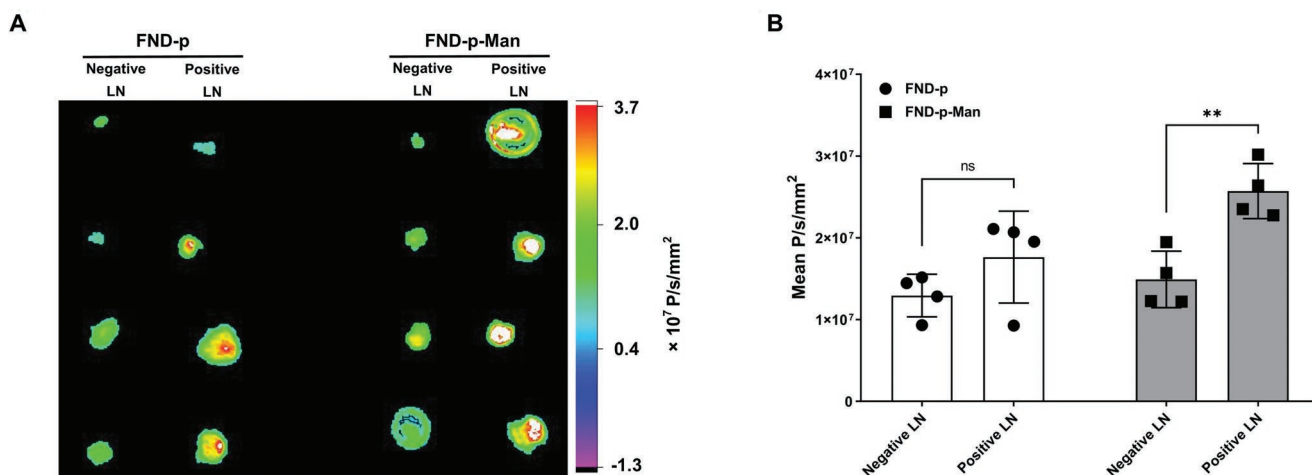


Figure 6. A) Fluorescence images of popliteal LNs excised 24 h p.i. from four B16-F10 tumor-bearing animals. Negative LNs versus positive LNs (injected either with FND-p or FND-p-Man). B) Statistical analysis of fluorescence intensity representing the accumulation of FND-p or FND-p-Man in excised popliteal lymph nodes (mean \pm SD, $n = 4$). p -values were calculated using unpaired two-tailed Student's t -test; ns—not significant, $**p < 0.005$.

animals 24 h after the injection of FNDs. We successfully demonstrated that FNDs could be used for selective fluorescence-guided visualization of lymph nodes. We used imaging conditions similar to those that can be achieved in clinical surgery as the field of view was opened. Such a setting leads to much lower background noise, which is normally generated by tissue/skin autofluorescence and light scattering. Notably, our nanoparticle preparations did not require any special storage conditions and showed a long shelf life (>1 year). Based on recent progress in FND preparation,^[108,109] FND-p-Man can be considered a low-cost nanomaterial for future development.

A general concern for fluorescence imaging using nanoparticles centers around retention of the nanoparticles in the body and their slow excretion rate. In our case, this issue is largely eliminated because of the accumulation of FND-p-Man in the LN, which would be surgically removed with tumor and surrounding tissues shortly after administration. In addition, FND-p-Man can likely be used in individuals with allergy or immunosensitivity to the most commonly used nanomaterials due to PEG coatings. Based on the results obtained, we believe that FND-p-Man is a promising tracer of SLNs during

endoscopic/robotic fluorescence-guided surgeries and may find broader biomedical applications in near future.

4. Experimental Section

FND-p/FND-p-Man Preparation: Chemicals: Sodium hydroxide, nitric acid (65%), and copper(II) sulfate pentahydrate were purchased from Penta (Czechia); hydrofluoric acid, glycidol, amino-guanidine hydrochloride, ethyl acetate, hexane, sodium sulfate, and boron trifluoride etherate purchased from Sigma Aldrich (Czechia); HO-PEG₃-N₃ was purchased from Broadpharm; glycidyl propargyl ether was purchased from TCI Chemicals; L-sodium ascorbate was purchased from Alfa Aesar; HEPES was purchased from GENChem; D-mannose was purchased from Acros Organics; Ac₂O was purchased from Lachner; BTTP was purchased from Click chemistry tools. All the chemicals were p.a. quality and were used as received without further purification except of glycidol and glycidol propargyl ether which were always freshly redistilled before use (for conditions see below). Water used for all operations with NDs was purified using a Milli-Q system.

Instruments: Equipment used and sources include a furnace (Nabertherm P 330), Zetasizer Nano ZS (Malvern), Multimode Microplate Reader Spark (Tecan), Transmission Electron Microscope JEM-1011 (JEOL), Infrared Spectrometer Nicolet 6700 (Thermo Scientific),

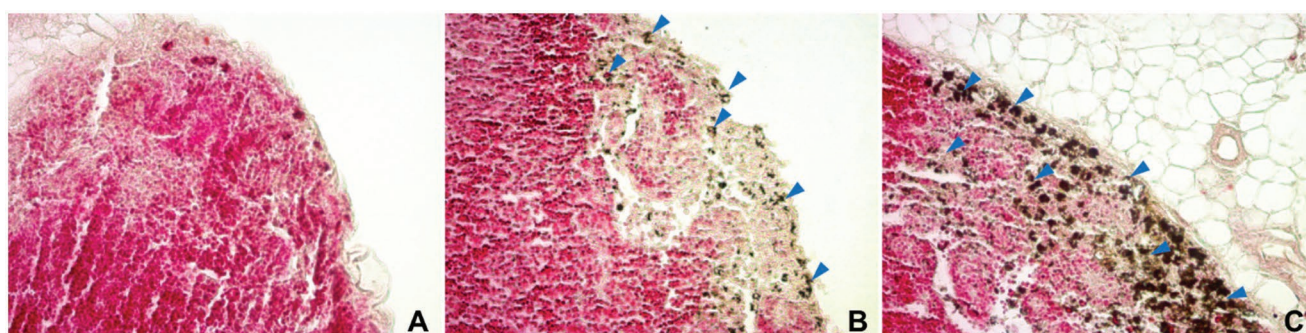


Figure 7. Representative images of experimental popliteal lymph nodes excised 24 h p.i. from tumor-bearing animals. A) Negative control, B) animal injected with FND-p, and C) animal injected with FND-p-Man. Light microscopy images, 20 \times magnification objective. Lymph nodes were counterstained with neutral red; blue arrows represent accumulation of FND-p or FND-p-Man in the subcapsular sinus; $n = 4$. There was no evidence of inflammatory response due to nanoparticle accumulation in SLNs.

Thermobalance TG750 (Stanton-Redcroft), High-resolution Mass-spectrometer with LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific), NMR (Bruker Avance I 500 MHz equipped with Cryoprobe), Sigma Centrifuge 3–30 KS (13150 swinging rotor; 12158-H fixed angle rotor), Ultrasonic Processor Cup Horn and Sonication Probe (Cole-Parmer).

α -D-mannose-PEG₃-azide (compound 3) was prepared according to a published procedure.^[10] First, α/β -D-mannose pentaacetate (compound 1) was synthesized: 2.5 g of D-mannose (2.78 mmol, 1.0 eq, Acros organics) was suspended in 20 mL of dry pyridine and cooled to 0 °C. Ten milliliters of Ac₂O (208 mmol, 7.5 eq) was added dropwise over 5 min. The reaction was left to warm to RT, at which point it was left for an additional 3 h. The remaining unreacted acetic anhydride and pyridine were removed by rotary evaporation, and the residue was dissolved in EtOAc (100 mL) and washed three times with water (3 × 100 mL). The organic layer containing the product was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated to yield the final product (α/β ratio was 1:2) in almost quantitative yield (5.1 g, 94%). The product was used in the next synthetic step without any further purification. The NMR and MS spectra were identical to published spectra.^[10]

The next step involved the synthesis of α -D-mannose tetraacetate-PEG₃-azide (compound 2): 371 mg of compound 1 (0.95 mmol, 1.0 eq) was dissolved in 20 mL of dry DCM. Then, 250 mg of HO-PEG₃-N₃ (1.14 mmol, 1.2 eq, Broadpharm) was added in one portion, and the whole mixture was cooled to 0 °C. A total of 620 μ L of BF₃·Et₂O (5.7 mmol, 5.0 eq) was slowly added in dropwise fashion over 10 min. The reaction mixture was left to warm to RT and was left to react for two days. After 44 h, the whole reaction mixture was evaporated with a small amount of added SiO₂, and flash chromatography was performed using the following conditions: 0 → 50% EtOAc in hexane in 0.5 CV, 50 → 75% of EtOAc in 8 CV, 80 g of SiO₂. The product eluted as the pure compound (TLC R_f = 0.5 in 66% EtOAc in hexane, stained by either phosphomolybdic acid solution or permanganate solution). One hundred mg of the title compound was obtained (yield 18%). Note: a cleaner way to produce the product with a higher yield involved selective cleavage of the acetate in position 1 followed by conversion to the trichloroimidate, which was isolated and quantitatively reacted to form 2. However, only a relatively small quantity of the compound was needed, and the synthetic route was significantly faster. ¹H NMR (400 MHz, methanol-*d*₄, δ) 5.31–5.21 (m, 3H), 4.90 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 4.25 (dd, *J* = 12.7, 5.4 Hz, 1H), 4.14–4.10 (m, 2H), 3.90–3.80 (m, 1H), 3.73–3.64 (m, 13H), 3.42–3.36 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.96 (s, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, methanol-*d*₄, δ) 171.00, 170.20, 170.13, 170.11, 97.56, 70.30 (2 signals), 70.28, 70.18, 69.79, 69.73, 69.38, 69.36, 68.37, 67.02, 65.93, 62.22, 50.40, 19.32, 19.29, 19.28, 19.22; HRMS (ESI) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₂₂H₃₅O₁₃N₃Na⁺, 572.20621; found, 572.20551 (–1.23 ppm).

The final step was the synthesis of α -D-mannose-PEG₃-azide (compound 3): 40 mg of 2 was dissolved in 2 mL of dry MeOH. Fifty microliters of a freshly prepared 1 M solution of sodium methanolate was added in one portion (metallic sodium dissolved in methanol, filtered and used immediately). The reaction was checked using TLC after 1 h, and no starting material was observed. Then, 100 mg of Amberlite CG-120-II strongly acidic catex in the H⁺-cycle was added to quench the reaction. The reaction was stirred for 5 min, and then the whole mixture was filtered and evaporated. The purified product obtained after evaporation was identified using NMR spectra. Note: there are several procedures describing quenching of methanolate cleavage; however, this one required no work-up and gave the title compound directly. Twenty-four milligrams of 3 were isolated upon evaporation and drying (yield: 85 %). ¹H NMR (400 MHz, methanol-*d*₄, δ) 4.79 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 3.84 (ddd, *J* = 6.3, 3.8, 0.8 Hz, 1H), 3.81 (m, 2H), 3.69–3.64 (m, 14H), 3.61–3.53 (m, 2H), 3.38 (t, *J* = 6 Hz, 2H), 3.34 (s, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, methanol-*d*₄, δ) 100.32, 73.19, 71.13, 70.69, 70.25, 70.22, 70.19, 70.12, 69.97, 69.73, 67.17, 66.35, 61.52, 50.34; HRMS (ESI) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₁₄H₂₇N₃O₉Na⁺, 404.16395; found 404.16336 (–1.45 ppm). The final compounds were all at least of 99% purity.

ND Pretreatment: NDs were supplied by Microdiamant Switzerland (MSY 0-0.25, containing ≈100–200 ppm of natural nitrogen impurities).

The NDs (2.05 g) were first oxidized by air oxygen in a tube furnace (Nabertherm P 330) at 510 °C for 5 h and then wet oxidized in a HF:HNO₃ 2:1 v/v stirred mixture (250 rpm) at 160 °C for 2 days in a PTFE container. The acids were removed using centrifugation (4000 g, 15 min), and the NDs were subsequently washed with a mixture of HF:HNO₃:H₂O (1:1:1 v/v/v), 50 °C, 1 h (1×), water (1×), 1 M NaOH, water (1×), 1 M HCl, water (2×) (4000 g, 10 min), water (2×) (20 000 g, 20 min) and then lyophilized, providing 1.15 g of pure oxidized ND (yield 56%).

Size Fractionation of NDs: Purified NDs isolated after oxidation were separated according to size using differential centrifugation (Scheme S1, Supporting Information). A colloidal solution of NDs (≈10 mg mL^{–1}, 1.15 g) was loaded into four centrifuge tubes and centrifuged in a fixed angle rotor (2500 rcf, 20 min). The supernatant was centrifuged again under the same conditions. The supernatant obtained after the second centrifugation was lyophilized, providing fraction i. The pellets from the first and second centrifugations were redispersed in water using cup horn sonication. The resulting colloids were combined, diluted to the same total volume used at the beginning (≈110 mL), loaded into 4 centrifuge tubes and 5× centrifuged (500 rcf, 30 min). In each of these 5 centrifugations, the supernatant was collected and centrifuged further under the same conditions. The supernatant obtained after the series of 5 centrifugations was lyophilized, providing fraction ii. All pellets obtained during the centrifugation series were redispersed in water by sonication, combined, diluted, loaded into 4 centrifuge tubes and centrifuged again (5×) (500 rcf, 30 min). The resulting supernatant provided fraction iii. This “5×” centrifugation series was repeated twice under the same conditions, providing fractions iv and v by lyophilization of the resulting supernatants. Redispersed and combined pellets from the last centrifugation series were collected, redispersed by sonication, lyophilized and designated fraction vi. All resulting fractions were lyophilized and analyzed as described below. The yield of fraction vi was 310 mg (27%). The overall preparation was repeated twice, providing similar yields and particle sizes.

Preparation of FNDs: Irradiation and Oxidation: A total of 330 mg of ND fraction vi (205 nm) isolated during differential centrifugation was irradiated at elevated temperature^[11] (870 °C) in an external target for 80 h with a 15.7 MeV electron beam (2.5 × 10¹⁹ particles cm^{–2}) extracted from the MT-25 microtron.^[65] After irradiation, the NDs (315 mg) were annealed at 900 °C for 1 h under argon atmosphere and subsequently oxidized in air for 5 h at 510 °C. The resulting FNDs were wet oxidized using a 2:1 mixture of HF:HNO₃ and stirred at 250 rpm, washed and lyophilized as described above (“ND pretreatment”), providing 212 mg of FNDs (yield 64%).

Polymer Coating of FNDs and Mannosylation: Glycidol was distilled under reduced pressure (≈1 mbar, 50 °C) and was always freshly distilled for each polymerization. Ten milligrams of FND powder was dispersed in 714 μ L of glycidol using a cup horn sonication processor (Cole Parmer) in pulse mode with 2 s on, 2 s off, and an amplitude of 100% (10 min). The dispersion was checked by DLS (206 nm), and the polymer shells were grown on the FNDs in a pressure tube immersed in an oil bath and stirred by a magnetic stir bar (130 °C, 200 rpm, 3 h). After 3 h, 494 μ L of freshly distilled glycidyl propargyl ether (≈1 mbar, 60 °C) was added to the reaction mixture, and the reaction was continued overnight under the same conditions (molar ratio of glycidol:glycidyl propargyl ether was 7:3). The obtained polymer-coated FND-p particles bearing terminal propargyl groups were washed with MeOH (2×) (15 mL; 30 000 rcf; 15 min) and with water (2×) (15 mL; 30 000 rcf; 15 min). Between the washing steps, each sample was sonicated twice for 10 s, with an amplitude of 100% for the cup horn sonication processor. Purified FND-p was stored as an aqueous colloidal solution (8 mg, 4 mg mL^{–1}) at RT.

FND-p was modified with α -D-mannose-PEG₃-azide (compound 3) using a copper-catalyzed azide-alkyne click reaction.^[112] Stock solutions for click chemistry were prepared in water, except for BTTP, which was dissolved in DMSO. Before addition to the reaction mixture, solutions of CuSO₄·5H₂O and BTTP were premixed (1:2 v/v, respectively). Reagents were combined in the following order and amounts: FND-p (500 μ L, 10 mg mL^{–1}), D-mannose-PEG₃-azide (20 μ L, 50 × 10^{–3} M), premixed solution of CuSO₄·5H₂O (40 μ L, 50 × 10^{–3} M) and BTTP (40 μ L,

100×10^{-3} M), aminoguanidine ($40 \mu\text{L}$, 100×10^{-3} M), and HEPES buffer pH 7 ($115 \mu\text{L}$, 250×10^{-3} M). L-Sodium ascorbate ($40 \mu\text{L}$, 100×10^{-3} M) was added as the last reagent to initiate the reaction. The reaction was allowed to proceed for 1.5 h at RT without stirring, and NDs were then washed five times with distilled water and centrifuged after each wash at $30\,000$ rcf for 15 min. The procedure described above resulted in a solution of FND-p-Man ($500 \mu\text{L}$, $\approx 10 \text{ mg mL}^{-1}$), which was subsequently stored at RT.

Dynamic Light Scattering: The hydrodynamic particle diameters and zeta potentials were measured using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). Unless stated otherwise, the samples were measured at RT with a concentration of 0.05 mg mL^{-1} and a total volume of 1 mL. DLS was measured in a disposable transparent cuvette. Colloidal stabilities of the samples were investigated in water, $1\times$ PBS, $10\times$ PBS, and FBS. For measurements in FBS, a quartz cuvette ZEN2112 tempered at 37°C was used. Five microliters of ND colloidal solution (0.5 mg mL^{-1}) was added to $95 \mu\text{L}$ of FBS (viscosity of FBS was $0.861 \text{ cP}^{[13]}$). The zeta potentials were measured in the dip cell for zeta potential.

Transmission Electron Microscopy: TEM samples were prepared as described previously.^[14] Briefly, carbon-coated copper grids (Pysler) were placed into a UV-ozone chamber (UV/Ozone Pro Cleaner Plus, Bioforce Nanosciences) for 15 min and then covered with a droplet of poly(ethyleneimine) aqueous solution (MW 2.5 kDa, 0.1 mg mL^{-1}). After 2 min, the solution was dried using absorbent paper. The grid was then covered with a sample solution droplet (0.1 mg mL^{-1}), and after 2 min, the excess liquid was removed using absorbent paper. Micrographs were taken with a microscope (JEOL JEM 1011) at an 80 kV acceleration voltage.

Particle size distributions were analyzed using ImageJ software and a previously described procedure.^[15] In all cases, at the first third order, polynomial fitting was applied to remove uneven illumination, and then a Gaussian blur (2 pixels) filter was used to remove background noise. The threshold was set to create a binary image. Connections of NDs caused by thresholding were divided manually with 2-pixel width lines according to the original images. The number of connected particles was small, so this procedure produced a negligible effect on the data. In total, 250–300 particles per sample were analyzed. Total areas of the particles obtained from image analyses were recalculated to produce equivalent circular diameters defined as

$$d_{eq} = \sqrt{\frac{4S}{\pi}} \quad (1)$$

The equivalent diameter is the diameter of a circular particle with the same area as the area of the nanodiamond and can be used to calculate the particle volume (PV):

$$PV = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{d_{eq}}{2} \right)^3 \quad (2)$$

PV was used for the creation of volume-weighted histograms, which were then fitted using the log-normal function.

Thermogravimetry: Thermogravimetric analysis was carried out using thermobalances (Stanton-Redcroft TG750). Samples (1.7–2.3 mg) were placed on platinum pans and heated to 900°C at a rate of $20^\circ\text{C min}^{-1}$ under an air purge (20 mL min^{-1}).

Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR): Spectra were recorded on a spectrometer (Nicolet 6700, Thermo Scientific) using a standard MIR source, KBr beam splitter, and DTGS detector, which was purged with nitrogen. The KBr pellet (diameter 4 mm) contained 0.90 mg of a sample and ≈ 150 mg of KBr. The spectrometer was operated in transmission mode: 128 scans, 2 cm^{-1} spectral resolution, Happ-Genzel apodization function. Recorded spectra were normalized based on the ester peak at 1725 cm^{-1} .

Fluorescence spectra were measured in water using a microplate reader (Tecan Infinite M1000). Excitation wavelengths were 488 and 532 nm for H3 (NVN) centers and NV centers, respectively. The FNDs concentration was 0.5 mg mL^{-1} .

In Vitro Experiments: Cell Culture: Mouse macrophage tumor J774A.1 cells (ATCC TIB-67) were purchased from the American Type

Culture Collection (ATCC). Cells were cultured in complete Dulbecco's modified Eagle's medium (Lonza) with 10% fetal bovine serum and $100 \text{ U}/100 \mu\text{g mL}^{-1}$ penicillin/streptomycin (Gibco) and maintained in a humidified incubator with 5% CO_2 at 37°C .

Cell Viability Assay and Dual Imaging of FND-p/FND-p-Man Internalization: To explore FND cell cytotoxicity, an MTS assay was performed with a CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) according to the manufacturer's protocol with a small alteration. Briefly, J774A.1 cells were seeded in 96-well plates (TPP) at 1×10^4 cells per well and cultured for 24 h. The medium was completely exchanged for fresh medium with or without FND-p and FND-p-Man (0 – $200 \mu\text{g mL}^{-1}$). The cells were incubated with FND for 24 h before adding MTS solution (1.5 h incubation with MTS at 37°C). The absorbance was measured at 500 nm after centrifugation (1000 rcf, 5 min) and transfer of supernatant to a new plate using a microplate reader. The relative cell viability (%) was calculated as $(A_{\text{sample}} - A_{\text{sample background}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{control background}}) \times 100\%$. The absorbance from the corresponding cell-free conditions was used as the sample/control background.

For evaluation and dual imaging of FND-p/FND-p-Man internalization/phagocytosis, the same protocol mentioned above was used for seeding and treatment of cells in a ViewPlate-96 (PerkinElmer). Cells were imaged using a Cell Voyager CV7000 high-throughput cellular imaging and discovery system (Yokogawa). Bright field, green channel (ex 488 nm; em 540 ± 20 nm) and red channel (ex 561 nm; em 620 ± 35 nm) spectra were captured by a $20\times$ PH Long W.D. objective. All images were postprocessed using Columbus software version 2.7.1 (Perkin-Elmer) and ImageJ software. Maximum 3D projections of z-stacks are presented.

Live Cell Imaging of FND-p and FND-p-Man Internalization: For live-cell monitoring of FND internalization, 1×10^4 J774A.1 cells/well were seeded in a ViewPlate-96 (PerkinElmer) and cultured for 24 h at 37°C under 5% CO_2 . The medium was completely replaced for fresh medium with or without FND-p and FND-p-Man ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) before confocal microscopy. Live-cell imaging was performed using a Cell Voyager CV7000 high-throughput cellular imaging and discovery system (Yokogawa) at 37°C in 5% CO_2 for 12 h. Bright-field, red channel (ex 561 nm; em 620 ± 35 nm) and digital phase contrast (DPC) were captured by a $20\times$ PH Long W.D. objective or $60\times$ water immersion objective. Image quantification for FND-p/FND-p-Man internalization was calculated as the average number of spots per cell in the red channel. All images were postprocessed and analyzed using Columbus software version 2.7.1 (Perkin-Elmer) and ImageJ software. Maximum 3D projections of z-stacks are presented.

Inhibition of FND-p-Man Internalization Mediated Via MR: The cells were seeded as described above. Inhibition of FND-p-Man internalization by MR was performed by receptor function neutralizing anti-Hu CD206 antibody clone 15.2 (anti-macrophage mannose receptor antibody; Exbio) and mannan (Sigma-Aldrich). At 24 h after seeding the cells, the medium was exchanged for fresh medium with or without 1 mg mL^{-1} mannan or $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ 15.2 mAb before live imaging. After 20 min incubation, FND-p-Man ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) in complete media was added. Live-cell imaging of MR inhibition was performed using a Cell Voyager CV7000 high-throughput cellular imaging and discovery system (Yokogawa) at 37°C in 5% CO_2 for 12 h. Digital phase contrast (DPC) and red channel (ex 561 nm; em 620 ± 35 nm) were captured by a $20\times$ PH Long W.D. objective. Inhibition of FND-p-Man internalization was calculated by image quantification as the average number of spots per cell in the red channel. All images were postprocessed and analyzed by Columbus software version 2.7.1 (Perkin-Elmer) and ImageJ software. Maximum 3D projections of z-stacks are presented.

In Vivo Imaging: Animal experiments, including fluorescence imaging, were conducted in compliance with the applicable animal protection laws under protocol approval No. MSMT-41830/2018-7 and the institutional Animal Welfare Committee of the Faculty of Medicine and Dentistry of Palacky University in Olomouc. The studies were performed using female 8-week-old Balb/c or C57BL/6 mice (Envigo, Horst, The Netherlands). Small animal imaging was carried out under

2% isoflurane anesthesia (FORANE, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) to minimize animal suffering and prevent animal motion. C57BL/6 mice were used for introduction of an appropriate tumor model for lymph node metastasis imaging studies as previously described in detail.^[102] B16-F10 melanoma cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Mice were injected with 0.5×10^6 B16-F10 murine melanoma cells into the right hind footpad. Two weeks after the implantation of B16-F10 cells, mice were injected with FNDs and treated as follows. $\approx 20 \mu\text{L}$ ($\approx 10 \text{ mg mL}^{-1}$) of either FND-p-Man or FND-p was intra/peritumorally injected into the rear right paw of mice ($n = 5$). Whole-body fluorescence imaging was performed 24 h p.i. followed by immediate euthanasia of isoflurane-anesthetized mice by cervical dislocation and popliteal lymph node collection and imaging. Fluorescence imaging of living animals as well as excised lymph node analyses were performed using the in vivo MS FX PRO system that is suitable for small animal imaging (Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, CT, USA) 24 h p.i. Identical illumination settings (acquisition time 60 s, filters 630 nm for excitation and 700 nm for emission, f-stop 2.8, field of view 100 mm and binning 2×2) were used to acquire all images, and fluorescence emission was normalized to photons $\text{s}^{-1} \text{mm}^{-2}$ ($\text{P s}^{-1} \text{mm}^{-2}$). Images were acquired and analyzed using Bruker MI SE software (Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, CT, USA). In vivo imaging with non-tumor bearing animals were performed identically, but omitting tumor implantation step.

Histological Analysis: Popliteal lymph nodes excised 24 h p.i. from 4 tumor-bearing animals injected either with FND-p or FND-p-Man were fixed overnight with 4% formaldehyde solution at 4 °C. The next day, fixed nodes were imbedded into paraffin blocks using a tissue processor Tissue-Tek TEK (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, The Netherlands). Prepared samples were cut into 4–5 μm thin sections by a microtome (Pfm Medical, Poynton, UK) and deparaffinized. Deparaffinization of samples was performed by incubation in xylene (3×5 min) followed by rinsing in ethanol for 5 min and then in water. The sections were then stained with 0.5% neutral red solution (pH = 4.0). Stained lymph node sections were analyzed by a light microscope (Carl Zeiss Microscopy) with a $20 \times$ magnification objective.

Statistical Analysis: In vitro imaging quantification data of FND-p and FND-p-Man internalization and calculation of inhibition are reported as the mean \pm standard deviation ($n = 3$). Data acquired from maximum 3D projections of z-stacks are presented. All biological replicates were done in 3 technical replicates. The obtained results were analyzed either by one-way ANOVA—Dunnett's test or by two-way ANOVA—Tukey's test using GraphPad Prism 8.0 software. In vivo imaging quantification data are reported as the mean \pm standard deviation ($n = 5$ or 4). The obtained results were analyzed using an unpaired two-tailed Student's *t*-test using GraphPad Prism 8.0 software. In all tests, a *p*-value equal to or less than 0.05 was considered to be significant.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. Martin Hruby, Dr. Danuta Radzioch, Dr. Juan Bautista De Sanctis for stimulating discussions, Ondrej Paces for construction of irradiation containers, Dr. David Chvatil for irradiation of nanodiamonds, Dr. Lucie Bednarova for measurement of IR spectra, and Dr. Marta Khoylou for preparation of lymph node sections for histological analyses. This work was supported by Czech Science Foundation project no. 18-17071S. The work of P.C., J.S., and H.R. was supported by the European Regional Development Fund; OP RDE; Project "Carbon allotropes with rationalized nanointerfaces and nanolinks for environmental and

biomedical applications" (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_026/0008382). The work of M.O. was supported by IGA LF 2020_007. The work of M.H., M.O., Z.N., M.P. was funded by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (EATRIS-CZ LM2018133) and by the European Regional Development Fund—Project ENOCH (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000 868).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Author Contributions

K.K. and M.O. contributed equally to this work. K.K., J.S., and H.R. prepared and characterized the ND samples. M.O. performed in vitro studies, M.P. and Z.N. in vivo studies. P.C. and M.H. supervised the project. All the authors were involved in the experimental design, analyses, interpretation of data, and contributed to the manuscript preparation. Supporting Information is available in the online version of the paper. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.C. and M.H.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Keywords

cancer imaging, fluorescent nanodiamonds, lymph nodes, macrophages, mannose

Received: October 1, 2021

Revised: February 13, 2022

Published online: March 2, 2022

- [1] J. J. Albertini, G. H. Lyman, C. Cox, T. Yeatman, L. Balducci, N. Ku, S. Shivers, C. Berman, K. Wells, D. Rapaport, A. Shons, J. Horton, H. Greenberg, S. Nicosia, R. Clark, A. Cantor, D. S. Reintgen, *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* **1996**, 276, 1818.
- [2] G. Niu, X. Chen, *Theranostics* **2015**, 5, 686.
- [3] D. Yue, M. Wang, F. Deng, W. Yin, H. Zhao, X. Zhao, Z. Xu, *Chin. Chem. Lett.* **2018**, 29, 648.
- [4] S. K. Somasundaram, D. W. Chicken, M. R. S. Keshtgar, *Br. Med. Bull.* **2007**, 84, 117.
- [5] L. L. Montgomery, A. C. Thorne, K. J. Van Zee, J. Fey, A. S. Heerdt, M. Gemignani, E. Port, J. Petrek, H. S. Cody, P. I. Borgen, *Anesth. Analg.* **2002**, 95, 385.
- [6] C. Chi, Y. Du, J. Ye, D. Kou, J. Qiu, J. Wang, J. Tian, X. Chen, *Theranostics* **2014**, 4, 1072.
- [7] S. Hameed, H. Chen, M. Irfan, S. Z. Bajwa, W. S. Khan, S. M. Baig, Z. Dai, *Bioconjugate Chem.* **2019**, 30, 13.
- [8] Y. Yang, L. Lin, L. Jing, X. Yue, Z. Dai, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, 9, 23450.
- [9] J. Qian, L. Jiang, F. Cai, D. Wang, S. He, *Biomaterials* **2011**, 32, 1601.
- [10] F. Chen, K. Ma, M. Benezra, L. Zhang, S. M. Cheal, E. Phillips, B. Yoo, M. Pauliah, M. Overholtzer, P. Zanzonico, S. Sequeira, M. Gonen, T. Quinn, U. Wiesner, M. S. Bradbury, *Chem. Mater.* **2017**, 29, 8766.

- [11] V. Vijayanthimala, P.-Y. Cheng, S.-H. Yeh, K.-K. Liu, C.-H. Hsiao, J.-I. Chao, H.-C. Chang, *Biomaterials* **2012**, *33*, 7794.
- [12] P. Reineck, A. Francis, A. Orth, D. W. M. Lau, R. D. V. Nixon-Luke, I. D. Rastogi, W. A. W. Razali, N. M. Cordina, L. M. Parker, V. K. A. Sreenivasan, L. J. Brown, B. C. Gibson, *Adv. Opt. Mater.* **2016**, *4*, 1549.
- [13] S.-J. Yu, M.-W. Kang, H.-C. Chang, K.-M. Chen, Y.-C. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17604.
- [14] F. C. Barone, C. Marcinkiewicz, J. Li, M. Sternberg, P. I. Lelkes, D. A. Dikin, P. J. Bergold, J. A. Gerstenhaber, G. Feuerstein, *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 5449.
- [15] H.-C. Li, F.-J. Hsieh, C.-P. Chen, M.-Y. Chang, P. C. H. Hsieh, C.-C. Chen, S.-U. Hung, C.-C. Wu, H.-C. Chang, *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 3044.
- [16] Y. Zhu, J. Li, W. Li, Y. Zhang, X. Yang, N. Chen, Y. Sun, Y. Zhao, C. Fan, Q. Huang, *Theranostics* **2012**, *2*, 302.
- [17] J. Stursa, J. Havlik, V. Petrakova, M. Gulka, J. Ralis, V. Zach, Z. Pulec, V. Stepan, S. A. Zargaleh, M. Ledvina, M. Nesladek, F. Treussart, P. Cigler, *Carbon* **2016**, *96*, 812.
- [18] L.-J. Su, M.-S. Wu, Y. Y. Hui, B.-M. Chang, L. Pan, P.-C. Hsu, Y.-T. Chen, H.-N. Ho, Y.-H. Huang, T.-Y. Ling, H.-H. Hsu, H.-C. Chang, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 45607.
- [19] M. Gulka, H. Salehi, B. Varga, E. Middendorp, O. Pall, H. Raabova, T. Cloitre, F. J. G. Cuisinier, P. Cigler, M. Nesladek, C. Gergely, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 9791.
- [20] S. Claveau, M. Kindermann, A. Papine, Z. V. Díaz-Riascos, X. Délen, P. Georges, R. López-Alemay, Ö. M. Tirado, J.-R. Bertrand, I. Abasolo, P. Cigler, F. Treussart, *Nanoscale* **2021**, *13*, 9280.
- [21] T.-J. Wu, Y.-K. Tzeng, W.-W. Chang, C.-A. Cheng, Y. Kuo, C.-H. Chien, H.-C. Chang, J. Yu, *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 682.
- [22] T. Zhang, G. Pramanik, K. Zhang, M. Gulka, L. Wang, J. Jing, F. Xu, Z. Li, Q. Wei, P. Cigler, Z. Chu, *ACS Sens.* **2021**, *6*, 2077.
- [23] L. D. Cas, S. Zeldin, N. Nunn, M. Torelli, A. I. Shames, A. M. Zaitsev, O. Shenderova, *Adv. Funct. Mater.* **2019**, *29*, 1808362.
- [24] S. Claveau, J.-R. Bertrand, F. Treussart, *Micromachines* **2018**, *9*, 247.
- [25] J. Slegerova, M. Hajek, I. Rehor, F. Sedlak, J. Stursa, M. Hruby, P. Cigler, *Nanoscale* **2015**, *7*, 415.
- [26] J. Neburkova, M. Hajek, I. Rehor, J. Schimer, F. Sedlak, J. Stursa, M. Hruby, P. Cigler, In *Integrin Targeting Systems for Tumor Diagnosis and Therapy* (Ed.: E. Patsenker), Springer, New York, NY, **2018**, pp. 169–189.
- [27] J. Neburkova, F. Sedlak, J. Zackova Suchanova, L. Kostka, P. Sacha, V. Subr, T. Etrych, P. Simon, J. Barinkova, R. Krystufek, H. Spanielova, J. Forstova, J. Konvalinka, P. Cigler, *Mol. Pharmaceutics* **2018**, *15*, 2932.
- [28] F.-J. Hsieh, Y.-W. Chen, Y. Y. Hui, C.-H. Lin, H.-C. Chang, *Micromachines* **2019**, *10*, 304.
- [29] M. D. Pham, C. P. Epperla, C.-L. Hsieh, W. Chang, H.-C. Chang, *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 6527.
- [30] S. R. Hemelaar, P. de Boer, M. Chipaux, W. Zuidema, T. Hamoh, F. P. Martinez, A. Nagl, J. P. Hoogenboom, B. N. G. Giepmans, R. Schirhagl, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 720.
- [31] B.-M. Chang, H.-H. Lin, L.-J. Su, W.-D. Lin, R.-J. Lin, Y.-K. Tzeng, R. T. Lee, Y. C. Lee, A. L. Yu, H.-C. Chang, *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 5737.
- [32] I. Rehor, K. L. Lee, K. Chen, M. Hajek, J. Havlik, J. Lokajova, M. Masat, J. Slegerova, S. Shukla, H. Heidari, S. Bals, N. F. Steinmetz, P. Cigler, *Adv. Healthcare Mater.* **2015**, *4*, 460.
- [33] I. Rehor, H. Mackova, S. K. Filippov, J. Kucka, V. Proks, J. Slegerova, S. Turner, G. Van Tendeloo, M. Ledvina, M. Hruby, P. Cigler, *ChemPlusChem* **2014**, *79*, 21.
- [34] L. Zhao, T. Takimoto, M. Ito, N. Kitagawa, T. Kimura, N. Komatsu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 1388.
- [35] V. Petrakova, I. Rehor, J. Stursa, M. Ledvina, M. Nesladek, P. Cigler, *Nanoscale* **2015**, *7*, 12307.
- [36] Z. Chu, S. Zhang, B. Zhang, C. Zhang, C.-Y. Fang, I. Rehor, P. Cigler, H.-C. Chang, G. Lin, R. Liu, Q. Li, *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4495.
- [37] B. Zhang, X. Feng, H. Yin, Z. Ge, Y. Wang, Z. Chu, H. Raabova, J. Vavra, P. Cigler, R. Liu, Y. Wang, Q. Li, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 46462.
- [38] H.-S. Jung, K. C. Neuman, *Nanomaterials* **2021**, *11*, 153.
- [39] K. van der Laan, M. Hasani, T. Zheng, R. Schirhagl, *Small* **2018**, *14*, 1703838.
- [40] P. D. Stahl, R. A. Ezekowitz, *Curr. Opin. Immunol.* **1998**, *10*, 50.
- [41] L. East, C. M. Isacke, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1572*, 364.
- [42] D. J. Fiete, M. C. Beranek, J. U. Baenziger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 2089.
- [43] C. Leteux, W. Chai, R. W. Loveless, C. T. Yuen, L. Uhlin-Hansen, Y. Combarnous, M. Jankovic, S. C. Maric, Z. Misulovin, M. C. Nussenzweig, T. Feizi, *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 1117.
- [44] M. E. Taylor, K. Drickamer, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 399.
- [45] M. E. Taylor, K. Bezouska, K. Drickamer, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1719.
- [46] J. Gao, P. Chen, Y. Singh, X. Zhang, Z. Szekeley, S. Stein, P. J. Sinko, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1332.
- [47] M. Muthiah, H. Vu-Quang, Y.-K. Kim, J. H. Rhee, S. H. Kang, S. Y. Jun, Y.-J. Choi, Y. Y. Jeong, C.-S. Cho, I.-K. Park, *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 1586.
- [48] M. Shveta, P. C. K., K. Veena, C. Veena, K. D. Amit, *Curr. Nanosci.* **2010**, *6*, 413.
- [49] S. Kawakami, A. Sato, M. Nishikawa, F. Yamashita, M. Hashida, *Gene Ther.* **2000**, *7*, 292.
- [50] N. Mohan, C.-S. Chen, H.-H. Hsieh, Y.-C. Wu, H.-C. Chang, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3692.
- [51] R. Igarashi, Y. Yoshinari, H. Yokota, T. Sugi, F. Sugihara, K. Ikeda, H. Sumiya, S. Tsuji, I. Mori, H. Tochio, Y. Harada, M. Shirakawa, *Nano Lett.* **2012**, *12*, 5726.
- [52] Y. Y. Hui, W. W.-W. Hsiao, S. Haziza, M. Simonneau, F. Treussart, H.-C. Chang, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2017**, *21*, 35.
- [53] I. Řehoř, J. Šlegerová, J. Havlík, H. Raabová, J. Hývl, E. Muchová, P. Cíglér, In *Carbon Nanomaterials for Biomedical Applications* (Eds.: M. Zhang, R. R. Naik, L. Dai), Springer International Publishing, Cham, **2016**, pp. 319–361.
- [54] K. van der Laan, M. Hasani, T. Zheng, R. Schirhagl, *Small* **2018**, *14*, 1703838.
- [55] D. Terada, T. Genjo, T. F. Segawa, R. Igarashi, M. Shirakawa, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2020**, *1864*, 129354.
- [56] D. Ho, C.-H. K. Wang, E. K.-H. Chow, *Sci. Adv.* **2015**, *1*, e1500439.
- [57] R. Chapman, T. Plakhoitnik, *Opt. Lett.* **2013**, *38*, 1847.
- [58] Y. Y. Hui, L.-J. Su, O. Y. Chen, Y.-T. Chen, T.-M. Liu, H.-C. Chang, *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5574.
- [59] A. Hegyi, E. Yablonovitch, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 1173.
- [60] S. K. Sarkar, A. Bumb, X. Wu, K. A. Sochacki, P. Kellman, M. W. Brechbiel, K. C. Neuman, *Biomed. Opt. Express* **2014**, *5*, 1190.
- [61] F. Yoshino, T. Amano, Y. Zou, J. Xu, F. Kimura, Y. Furusho, T. Chano, T. Murakami, L. Zhao, N. Komatsu, *Small* **2019**, *15*, 1901930.
- [62] P. Reineck, L. F. Trindade, J. Havlik, J. Stursa, A. Heffernan, A. Elbourne, A. Orth, M. Capelli, P. Cigler, D. A. Simpson, B. C. Gibson, *Part. Part. Syst. Charact.* **2019**, *36*, 1900009.
- [63] E. R. Wilson, L. M. Parker, A. Orth, N. Nunn, M. Torelli, O. Shenderova, B. C. Gibson, P. Reineck, *Nanotechnology* **2019**, *30*, 385704.
- [64] G. Mariani, L. Moresco, G. Viale, G. Villa, M. Bagnasco, G. Canavese, J. Buscombe, H. W. Strauss, G. Paganelli, *J. Nucl. Med.* **2001**, *42*, 1198.
- [65] T. Rendler, J. Neburkova, O. Zemek, J. Kotek, A. Zappe, Z. Chu, P. Cigler, J. Wrachtrup, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14701.
- [66] I. Rehor, J. Slegerova, J. Kucka, V. Proks, V. Petrakova, M.-P. Adam, F. Treussart, S. Turner, S. Bals, P. Sacha, M. Ledvina, A. M. Wen, N. F. Steinmetz, P. Cigler, *Small* **2014**, *10*, 1106.

- [67] S. R. Hemelaar, A. Nagl, F. Bigot, M. M. Rodríguez-García, M. P. de Vries, M. Chipaux, R. Schirhagl, *Microchim. Acta* **2017**, 184, 1001.
- [68] M. Aramesh, O. Shimoni, K. Ostrikov, S. Praver, J. Cervenka, *Nanoscale* **2015**, 7, 5726.
- [69] L. Balek, M. Buchtova, M. Kunova Bosakova, M. Varecha, S. Foldynova-Trantirkova, I. Gudernova, I. Vesela, J. Havlik, J. Neburkova, S. Turner, M. A. Krzyscik, M. Zakrzewska, L. Klimaschewski, P. Claus, L. Trantirek, P. Cigler, P. Krejci, *Biomaterials* **2018**, 176, 106.
- [70] J. Neburkova, J. Vavra, P. Cigler, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2017**, 21, 43.
- [71] L. Zhao, Y.-H. Xu, T. Akasaka, S. Abe, N. Komatsu, F. Watari, X. Chen, *Biomaterials* **2014**, 35, 5393.
- [72] F.-J. Hsieh, S. Sotoma, H.-H. Lin, C.-Y. Cheng, T.-Y. Yu, C.-L. Hsieh, C.-H. Lin, H.-C. Chang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, 11, 19774.
- [73] J. Barton, M. Gulka, J. Tarabek, Y. Mindarava, Z. Wang, J. Schimer, H. Raabova, J. Bednar, M. B. Plenio, F. Jelezko, M. Nesladek, P. Cigler, *ACS Nano* **2020**, 14, 12938.
- [74] P. R. Taylor, S. Gordon, L. Martinez-Pomares, *Trends Immunol.* **2005**, 26, 104.
- [75] M. Rabyk, A. Galisova, M. Jiratova, V. Patsula, L. Srbova, L. Loukotova, J. Parnica, D. Jirak, P. Stepanek, M. Hruby, *J. Mater. Chem. B* **2018**, 6, 2584.
- [76] M. Jiráťová, A. Gálisová, M. Rabyk, E. Sticová, M. Hrubý, D. Jiráť, *Molecules* **2021**, 26, 146.
- [77] L. Zhao, Y. Nakae, H. Qin, T. Ito, T. Kimura, H. Kojima, L. Chan, N. Komatsu, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, 10, 707.
- [78] A. M. Schrand, H. Huang, C. Carlson, J. J. Schlager, E. Omacr Sawa, S. M. Hussain, L. Dai, *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 2.
- [79] A. M. Schrand, L. Dai, J. J. Schlager, S. M. Hussain, E. Osawa, *Diamond. Relat. Mater.* **2007**, 16, 2118.
- [80] A. Bellomo, R. Gentek, M. Bajénoff, M. Baratin, *Cell. Immunol.* **2018**, 330, 168.
- [81] M. L. Fiani, J. Beitz, D. Turvy, J. S. Blum, P. D. Stahl, *J. Leukocyte Biol.* **1998**, 64, 85.
- [82] F. Ramos-Gomes, N. Ferreira, A. Kraupner, F. Alves, M. A. Markus, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, 8, 588922.
- [83] L. Shang, K. Nienhaus, X. Jiang, L. Yang, K. Landfester, V. Mailänder, T. Simmet, G. U. Nienhaus, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2014**, 5, 2388.
- [84] K. T. Thurn, E. Brown, A. Wu, S. Vogt, B. Lai, J. Maser, T. Paunesku, G. E. Woloschak, *Nanoscale Res. Lett.* **2007**, 2, 430.
- [85] F. C. Verbij, N. Sorvillo, P. H. P. Kaijen, J. Hrdinova, I. Peyron, R. Fijnheer, A. Ten Brinke, A. B. Meijer, F. P. J. van Alphen, T. K. van den Berg, J. J. H. Graversen, S. K. Moestrup, J. Voorberg, *Blood Adv.* **2017**, 1, 293.
- [86] M. Barrett-Bergshoeff, F. Noorman, R. Bos, D. C. Rijken, *Thromb. Haemostasis* **1997**, 77, 718.
- [87] F. Sallusto, M. Cella, C. Danieli, A. Lanzavecchia, *J. Exp. Med.* **1995**, 182, 389.
- [88] Y. Liu, H. Liu, B. O. Kim, V. H. Gattone, J. Li, A. Nath, J. Blum, J. J. He, *J. Virol.* **2004**, 78, 4120.
- [89] D. A. Kuhn, D. Vanhecke, B. Michen, F. Blank, P. Gehr, A. Petri-Fink, B. Rothen-Rutishauser, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2014**, 5, 1625.
- [90] T. dos Santos, J. Varela, I. Lynch, A. Salvati, K. A. Dawson, *PLoS One* **2011**, 6, e24438.
- [91] R. Jain, P. Dandekar, V. Patravale, *J. Controlled Release* **2009**, 138, 90.
- [92] M. Ahmed, A. D. Purushotham, M. Douek, *Lancet Oncol.* **2014**, 15, e351.
- [93] M. Ferrucci, G. Franceschini, M. Douek, *Transl. Cancer Res.* **2018**, 7, 5405.
- [94] F. P. R. Verbeek, S. L. Troyan, J. S. D. Mieog, G.-J. Liefers, L. A. Moffitt, M. Rosenberg, J. Hirshfield-Bartek, S. Gioux, C. J. H. van de Velde, A. L. Vahrmeijer, J. V. Frangioni, *Breast Cancer Res. Treat.* **2014**, 143, 333.
- [95] H.-C. Zeng, J.-L. Hu, J.-W. Bai, G.-J. Zhang, *Mol. Imaging Biol.* **2019**, 21, 219.
- [96] J. Cao, B. Zhu, K. Zheng, S. He, L. Meng, J. Song, H. Yang, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, 7, 487.
- [97] Y. Yuan, X. Wang, G. Jia, J.-H. Liu, T. Wang, Y. Gu, S.-T. Yang, S. Zhen, H. Wang, Y. Liu, *Diamond Relat. Mater.* **2010**, 19, 291.
- [98] K. M. Long, M. Heise, *Methods Mol. Biol.* **2013**, 1031, 97.
- [99] Y. Yamaji, S. Akita, H. Akita, N. Miura, M. Gomi, I. Manabe, Y. Kubota, N. Mitsukawa, *Sci. Rep.* **2018**, 8, 5921.
- [100] S. D. Nathanson, P. Anaya, K. C. Karvelis, L. Eck, S. Havstad, *Ann. Surg. Oncol.* **1997**, 4, 104.
- [101] M. I. Harrell, B. M. Iritani, A. Ruddell, *Am. J. Pathol.* **2007**, 170, 774.
- [102] E. L. Servais, C. Colovos, A. J. Bograd, J. White, M. Sadelain, P. S. Adusumilli, *J. Mol. Med.* **2011**, 89, 753.
- [103] J.-P. Girard, C. Moussion, R. Förster, *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, 12, 762.
- [104] N. L. Trevaskis, L. M. Kaminskas, C. J. H. Porter, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2015**, 14, 781.
- [105] E. E. Gray, J. G. Cyster, *J. Innate Immun.* **2012**, 4, 424.
- [106] D. A. P. Louie, S. Liao, *Front. Immunol.* **2019**, 10.
- [107] I. Moran, A. K. Grootveld, A. Nguyen, T. G. Phan, *Trends Immunol.* **2019**, 40, 35.
- [108] J. Havlik, V. Petrakova, J. Kucka, H. Raabova, D. Panek, V. Stepan, Z. Z. Cilova, P. Reineck, J. Stursa, J. Kucera, M. Hruby, P. Cigler, *Nat. Commun.* **2018**, 9, 4467.
- [109] M. D. Torelli, N. A. Nunn, O. A. Shenderova, *Small* **2019**, 15, 1902151.
- [110] T. Tomašić, D. Hajšek, U. Švajger, J. Luzar, N. Obermajer, I. Petit-Haertlein, F. Fieschi, M. Anderluh, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 75, 308.
- [111] M. Capelli, A. H. Heffernan, T. Ohshima, H. Abe, J. Jeske, A. Hope, A. D. Greentree, P. Reineck, B. C. Gibson, *Carbon* **2019**, 143, 714.
- [112] S. I. Presolski, V. P. Hong, M. G. Finn, *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **2011**, 3, 153.
- [113] O. Cakmak, C. Elbuku, E. Ermek, A. Mostafazadeh, I. Baris, B. Erdem Alaca, I. H. Kavakli, H. Urey, *Methods* **2013**, 63, 225.
- [114] I. Rehor, P. Cigler, *Diamond Relat. Mater.* **2014**, 46, 21.
- [115] J. Havlik, H. Raabova, M. Gulka, V. Petrakova, M. Krecmarova, V. Masek, P. Lousa, J. Stursa, H.-G. Boyen, M. Nesladek, P. Cigler, *Adv. Funct. Mater.* **2016**, 26, 4134.

PŘÍLOHA 3

A. CENTORAME, D. DUMUT, M. YOUSSEF, **M. ONDRA**, I. KIANICKA, J. SHAH, R. PAUN, T. OZDIAN, J. HANRAHAN, E. GUSEV, B. PETROF, M. HAJDUCH, R. PISLARIU, J. DE SANCTIS, D. RADZIOCH. Treatment With LAU-7b Complements CFTR Modulator Therapy by Improving Lung Physiology and Normalizing Lipid Imbalance Associated With CF Lung Disease. *Frontiers in Pharmacology*. **2022**, 13, 876842, ISSN: 1664-3224. DOI: 10.3389/fphar.2022.876842. **IF: 5.6.**



Treatment With LAU-7b Complements CFTR Modulator Therapy by Improving Lung Physiology and Normalizing Lipid Imbalance Associated With CF Lung Disease

OPEN ACCESS

Edited by:

Darko Modun,
University of Split, Croatia

Reviewed by:

Olivier Tabary,
Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale (INSERM), France
Fernando Augusto Lima Marson,
Sao Francisco University, Brazil
Miquéias Lopes-Pacheco,
University of Lisbon, Portugal

*Correspondence:

Danuta Radzioch
danuta.radzioch@mcgill.ca

[†]Principal Investigator

Specialty section:

This article was submitted to
Inflammation Pharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 15 February 2022

Accepted: 08 April 2022

Published: 20 May 2022

Citation:

Centorame A, Dumut DC, Youssef M,
Ondra M, Kianicka I, Shah J, Paun RA,
Ozdian T, Hanrahan JW, Gusev E,
Petrof B, Hajdich M, Pislariu R,
De Sanctis JB and Radzioch D (2022)
Treatment With LAU-7b Complements
CFTR Modulator Therapy by Improving
Lung Physiology and Normalizing Lipid
Imbalance Associated With CF
Lung Disease.
Front. Pharmacol. 13:876842.
doi: 10.3389/fphar.2022.876842

Amanda Centorame^{1,2}, Daciana Catalina Dumut^{1,2}, Mina Youssef², Martin Ondra^{3,4},
Irenej Kianicka⁵, Juhi Shah², Radu Alexandru Paun^{2,6}, Tomas Ozdian³, John W. Hanrahan⁷,
Ekaterina Gusev⁸, Basil Petrof⁸, Marian Hajdich^{3,4}, Radu Pislariu⁵,
Juan Bautista De Sanctis^{3,4} and Danuta Radzioch^{1,2,3,5*†}

¹Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, QC, Canada, ²Infectious Diseases and Immunity in Global Health, Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, QC, Canada, ³Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czechia, ⁴Czech Advanced Technology and Research Institute, Palacky University, Olomouc, Czechia, ⁵Laurent Pharmaceuticals, Montreal, QC, Canada, ⁶Department of Biomedical Engineering, McGill University, Montreal, QC, Canada, ⁷Department of Physiology, McGill University, Montreal, QC, Canada, ⁸Meakins-Christie Laboratories, The Centre for Respiratory Research at McGill University and the Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, QC, Canada

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive genetic disease in Caucasians, affecting more than 100,000 individuals worldwide. It is caused by pathogenic variants in the gene encoding *CFTR*, an anion channel at the plasma membrane of epithelial and other cells. Many CF pathogenic variants disrupt the biosynthesis and trafficking of CFTR or reduce its ion channel function. The most frequent mutation, loss of a phenylalanine at position 508 (F508del), leads to misfolding, retention in the endoplasmic reticulum, and premature degradation of the protein. The therapeutics available for treating CF lung disease include antibiotics, mucolytics, bronchodilators, physiotherapy, and most recently CFTR modulators. To date, no cure for this life shortening disease has been found. Treatment with the Triple combination drug therapy, TRIKAFTA[®], is composed of three drugs: Elexacaftor (VX-445), Tezacaftor (VX-661) and Ivacaftor (VX-770). This therapy, benefits persons with CF, improving their weight, lung function, energy levels (as defined by reduced fatigue), and overall quality of life. We examined the effect of combining LAU-7b oral treatment and Triple therapy combination on lung function in a F508del^{tm1EUR} mouse model that displays lung abnormalities relevant to human CF. We assessed lung function, lung histopathology, protein oxidation, lipid oxidation, and fatty acid and lipid profiles in F508del^{tm1EUR} mice.

Keywords: cystic fibrosis, LAU-7b, TRIKAFTA, ceramides, fenretinide (4-HPR), sphingolipids, triple therapy, lung physiology

INTRODUCTION

Cystic Fibrosis (CF, OMIM #219700) is an autosomal recessive disorder that commonly affects Caucasians. It is caused by genetic mutations in a gene on human chromosome 7 which codes for an epithelial membrane protein that acts as a cAMP-activated ATP-gated chloride and bicarbonate channel and water transport regulator, known as the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) (Rommens et al., 1989). Mutations affecting CFTR gene expression result in difficulties with the processing, folding, or trafficking of the protein to the membrane which adversely affect its function. Among the 2000 different genetic variants causing the disease, the most common is F508del, a deletion of the codon for phenylalanine at position 508. This mutation leads to abnormal folding of the CFTR protein and ultimately, degradation of F508del-CFTR occurs mostly at the proteasome, after ER retention, which prevents its trafficking to the Golgi (Naehrig et al., 2017). Missing CFTR chloride channels at the plasma membrane result in liquid depletion and acidification of the airway surfaces impacting mucus clearance (Ratjen et al., 2015; Veit et al., 2016).

Phenotypically, CF manifestations are extremely variable and can be observed in multiple organs such as the pancreas, the gastrointestinal tract, the reproductive system, and most prominently the lungs (Ratjen et al., 2015; Veit et al., 2016). Moreover, Weber and others demonstrated a link between defective CFTR protein and its implications in the activation of the NF- κ B pathway, associated with the drastic increase of IL-8 (Weber et al., 2001; Rottner et al., 2009).

In addition to cytokines, the impaired inflammatory response in CF reflects an imbalance between the initiation and the resolution of the inflammatory response, with the overexpression of pro-inflammatory cytokines and mediators, while anti-inflammatory and pro-resolving mediators are suppressed. During this imbalance in homeostasis, pro-inflammatory lipid mediators, including 2-series prostaglandins and 4-series leukotrienes, are formed when 20-carbon, omega-6 unsaturated fatty acid, arachidonic acid (AA), is metabolized (Ricciotti and FitzGerald, 2011; Lands, 2015). On the other hand, docosahexaenoic acid (DHA), a 22-carbon unsaturated omega-3 fatty acid, is metabolized to yield anti-inflammatory resolvins and protectins (Serhan et al., 2008), which can orchestrate the timely resolution of inflammation (Kohli and Levy, 2009). Therefore, the elevated AA levels in persons with Cystic Fibrosis (PwCF) directly contribute to an increased production of pro-inflammatory mediators, meanwhile, a decrease in DHA and EPA play important roles in reducing the production of anti-inflammatory mediators (Lachance et al., 2013; Garić et al., 2020b).

It has been well documented that sphingolipid metabolism is dysregulated in CF (Guilbault et al., 2007; Guilbault et al., 2008; Guilbault et al., 2009; Garić et al., 2020b). Ceramides are produced through various pathways and the relative composition of specific species of ceramides depends on the expression of specific combination of ceramide synthases in the organs. In the lungs of healthy mice, very long-chain ceramides (VLCCs, C24:0 CER and C26:0 CER) were shown

to represent more than 70% of the total ceramide pool, whereas long-chain ceramides (LCCs, C14:0 and C16:0) constitute less than 20% of the total ceramide pool (Petrache et al., 2013). The relative ratios between VLCCs and LCCs are dramatically affected in CF disease.

In 2006, Fenretinide (FEN), a synthetic retinoid, was reported to effectively inhibit IL-8 release from CFTR-deficient lung epithelial cells (Vilela et al., 2006). Subsequently, FEN has been studied in the context of inflammation in CF disease and its effects have been attributed to its overall ability to trigger the resolution phase of inflammation, as demonstrated by the modulation of macrophage-secreted inflammatory cytokines, to the correction of omega-3/omega-6 fatty acid imbalances impacting phosphorylation of ERK1/2, to the correction of the ceramide deficiency in PwCF, and to the resolution of lung mucus plugging under infection with *P. aeruginosa* (Lachance et al., 2013; Garić et al., 2020a; Veltman et al., 2021). Furthermore, Garić et al. found a partial synergistic relationship between FEN and Zinc (Zn^{2+}), whose deficiency has been reported in PwCF and is associated with severity of CF lung disease (Yadav et al., 2014; Garić et al., 2017).

In 2015, a novel oral formulation of Fenretinide, LAU-7b, was used in a Phase 1, double-blinded, randomized, (3:1, active: placebo), placebo-controlled clinical study, involving 15 adult PwCF (clinicaltrials.gov, NCT02141958). The results from this trial indicated that LAU-7b was safe and well tolerated, while also normalizing lipid imbalances and reducing oxidative stress, as measured in pre-selected plasma biomarkers. Non-clinical experiments with FEN have shown to normalize the aberrant ratio between VLCCs and LCCs as well as AA/DHA ratio *in vitro* F508del-CFTR expressing cell lines and *in vivo* (LAU-7b formulation) in mouse models of CF (Lachance et al., 2013; Garić et al., 2020a; Veltman et al., 2021). It is hypothesized that the cumulated benefits of FEN, both during and after the exacerbation episodes, will translate into clinical benefits such as preservation of pulmonary function, reduced incidence and severity of exacerbation episodes, and ultimately a better quality of life for CF patients. This hypothesis is being tested in a Phase II clinical trial with LAU-7b in adult patients with CF (clinicaltrials.gov, NCT03265288).

Several drugs that increase CFTR channel activity, known as potentiators and correctors, have been developed to improve the folding and/or trafficking of the mutated CFTR protein to the plasma membrane. In July 2012, Kalydeco[®] (Ivacaftor), the first treatment to specifically target G551D mutations causing CF (4–6% of patients), was approved by the Food and Drug Administration (FDA) in the United States (US). In 2015, it was followed by Orkambi[®] (Lumacaftor/Ivacaftor), a combination of CFTR modulators targeting two copies of the F508del mutation (F508del/F508del). In 2018, a more effective combination, Symdeko[®] (Tezacaftor/Ivacaftor) addressing a larger number of CF patients (30%) was released. In October 2019, the Triple-combination therapy TRIKAFTA[®] was approved in the US for PwCF over the age of 12 with at least one copy of F508del-CFTR and recently has been expanded to include an additional 171 CFTR mutations (Table 3: List of CFTR mutations responsive to VX-445+VX-661+VX-770 (Trikafta[®]) and

approved by the FDA) (Lopes-Pacheco et al., 2021). TRIKAFTA[®] is composed of three drugs: Elexacaftor (VX-445), Tezacaftor (VX-661) and Ivacaftor (VX-770) which when used *in vitro* are referred to as a Triple therapy. Elexacaftor and Tezacaftor are CFTR correctors, which work to increase the amount F508del-CFTR protein that reaches the plasma membrane by aiding its processing and trafficking, while Ivacaftor is a CFTR potentiator that works at the cell surface to increase chloride channel activity (Hoy, 2019).

In this study, we examine whether the combination of LAU-7b with TRIKAFTA[®], could have the potential of translating into a clinical benefit to PwCF.

MATERIALS AND METHODS

F508del^{tm1EUR} Mice

The *Cftr*^{tm1EUR} mouse model (C57BL/6J), heterozygous for the F508del *CFTR* mutation, was obtained from the Erasmus Medical Center (Rotterdam, Netherlands) (Wilke et al., 2011; Fontés et al., 2015). Mice were fed with standard diet and water *ad libitum*. Mice of 8–20 months were randomly assigned to five groups: 1) Non-treated, 2) Vehicle-treated, 3) LAU-7b-treated, 4) Triple drug-treated, and 5) combined Triple drug therapy and LAU-7b therapy. The treated mice received daily doses of Vehicle, LAU-7b (25 mg/kg) representing 10 mg/kg fenretinide content, Triple drugs (32 mg/kg Ivacaftor, 21 mg/kg Tezacaftor, 42 mg/kg Elexacaftor) or a combination of LAU-7b with Triple drug therapy by daily gavage *per os* (p.o) over the course of 14 days. The daily doses of Ivacaftor, Tezacaftor and Elexacaftor used in the mouse study were derived by allometric scaling from the daily dose of each individual modulator contained in TRIKAFTA[®] that was approved for treatment in adult CF patients. Based on the preclinical data available in the NDA/BLA Multi-disciplinary Review and Evaluation (NDA 212273) for TRIKAFTA[®], the bioavailability of the three CFTR modulators are similar in rodents and humans. Furthermore, all the derived doses used in the mouse study were below the NOAEL (no observed adverse event level) determined in the rodent toxicity studies with a duration of 28 days up to 3 months.

All animals were harvested 24 h after the last treatment. All experimental procedures were in accordance with Facility Animal Care Committee of the McGill University Health Center, Montreal, QC, Canada.

Lung Resistance Analysis

Airway resistance was measured using a Buxco plethysmograph system (Buxco Research System, Wilmington, NC, United States), ventilators, and nebulizers (Harvard Apparatus, Holliston, MA, United States). Mice were anesthetized using a cocktail of ketamine, acepromazine and xylazine and were connected to a ventilator through tracheotomy as previously described (Kanagaratham et al., 2014). Standard invasive lung resistance measurement was done just prior to mouse harvest. A nebulizer was used to administer a saline dose followed by ascending doses (50 mg/ml to 100 mg/ml) of methacholine (MCh, Acetyl β-methyl choline, Cat: A2251, Sigma Aldrich,

Saint Louis, MO, United States). The maximal resistance at each dose of MCh was determined for each mouse.

Lung Histology Analysis

The left lung lobe of mice in each treatment group was inflated in 10% PBS-buffered formalin and kept in the solution for 48 h. The lung section was then processed, paraffinized, sectioned at 4 μm thickness, then deparaffinized, hydrated, and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Infiltrating cells were quantified in four airways/mice lung at ×20 magnification, that of which were averaged and then normalized with the perimeter squares of the airway basement membrane as previously described (Kanagaratham et al., 2014).

CFBE41o- Epithelial Cells Overexpressing wt-CFTR or F508del-CFTR

The human bronchial epithelial cell line CFBE41o-homozygous for the F508del mutation was shown to retain several characteristics of human CF bronchial epithelial cells (Ehrhardt et al., 2006). Parental CFBE41o- (F508del/F508del) cells are referred to as CFBE41o-(P) and have negligible expression of CFTR. CFBE41o-(P) cells overexpressing F508del/F508del are referred to as CFBE41o-(F508del). CFBE41o-(P) cells overexpressing wt-CFTR are referred to as CFBE41o-(WT). The CFBE41o-(P) cells originally generated by Prof. Dr. D. C. Gruenert (Bruscia et al., 2002), with a stable expression of wtCFTR, CFBE41o-(WT), and the CFBE41o-(F508del) (Bebok et al., 2005) were generously provided from Dr. John W. Hanrahan (McGill University at Montreal, Quebec, Canada). Cells were grown in Eagle's Minimum Essential Medium (Wisent Bioproducts) supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent Bioproducts), 5% penicillin-streptomycin (Wisent Bioproducts) in a 5% CO₂ - 95% air incubator at 37°C.

Treatment of CFBE41o-(P), CFBE41o-(WT) and (F508del) Cell Lines for Lipid and Protein Analysis

For lipid analysis, cell lines were seeded in 100 mm plates with 1,000,000 cells in 12 ml of media and grown overnight to 80% confluence and treated the next day. They were treated with fresh drugs every 24 h, for a total time of 72 h with 1.25 μM LAU-7b (Laurent Pharmaceuticals) and 12.5 μM zinc-sulphate (Sigma-Aldrich), as well as Triple therapy composed of 3 μM Elexacaftor (VX-445), 3 μM Tezacaftor (VX-661) and 10 nM Ivacaftor (VX-770). After completion of treatment, the cell monolayer was washed twice with warmed D-PBS (Wisent Bioproducts), gently scraped with a cell scraper (Sarstedt), and pipetted into a 1.5 ml screw cap tube filled with 1 ml of 1 mM butylated hydroxyanisole (BHA) in a chloroform/methanol solution (2:1 vol/vol) for mass spectrometry lipid analysis. For protein analysis, CFBE41o-(F508del) cell line was seeded in 60 mm plates with 500,000 cells in 6 ml of media and grown overnight to 80% confluence and treated the next day. The cells were also treated for 72 h, with the same drug concentrations as indicated above for the various treatment combinations.

Fatty Acid Analysis

Lipid analysis was done using CFBE41o-(P), CFBE41o-(WT) and CFBE41o-(F508del) cells, 25 mg of macerated lung and liver mouse tissue as well as 50 μ l of plasma from each mouse, preserved in BHA and stored at -80°C . Classical purification of lipids was done as previously described by Folch et al. (Folch et al., 1957) and phospholipids were identified by thin layer chromatography extraction.

In parallel, from the chloroform fraction of the extracted lipids, the fatty acids were methylated under standard conditions and the esters were identified by gas chromatography. An Agilent Technologies 6890 N gas chromatograph (Germany) was used, equipped with a flame ionization detector and capillary column (30 m, 0.53 mm) (Agilent Technologies 6890 N, Germany), silica was used as stationary phase. The chromatographic conditions: detector temperature 280°C ; injector temperature 250°C ; initial column temperature 120°C for 1 min, and programmed to escalate at a rate of 10°C per minute up to 200°C and then at 4°C per minute up to the final temperature of 220°C . Nitrogen and hydrogen were used as carrier and auxiliary gas, respectively, with a flow rate of 1.3 ml/min. To perform the determination, 1 μ l of the derived sample was injected, alternatively with a sample volume/internal standard ratio of 80/20. Fatty acids were identified by comparing the retention times and relative retention times of the standards with those of the samples purchased from Sigma Aldrich. The results obtained in mg/100 g of the sample were calculated according to AOCS methodology (AOCS 2017). Output signals were monitored using Agilent Chem Station for GC systems, data analysis and A/D converter 35900E. The data were estimated by automated integration of the area under the resolved chromatographic profile.

Ceramide Analysis

Tubes were mixed vigorously and centrifuged at 4°C for 5 min at 3,000 rpm. The organic phase was recovered and evaporated using a Speedvac. The extracted lipids were separated as previously described (Guilbault et al., 2008; Guilbault et al., 2009; Garić et al., 2017; Garić et al., 2020b). Total ceramides were measured by ELISA after TLC purification, whereas quantification of the specific ceramides' species among purified ceramide pool were quantified using mass spectrometry. LC-MS/MS was carried out using a TripleTOF 5600+ mass spectrometer (AB sciex) coupled to a Dionex UltiMate 3000 LC-system. The separation column was Kinetex 2.1×50 mm C18, guarded with a SecurityGuard 4×2.0 mm C18 guard pre-column (Phenomenex). The mobile phases were MilliQ water with 50 mM ammonium acetate and 0.1% formic acid (A) and isopropanol/acetonitrile (4:3) with 50 mM ammonium acetate and 0.1% formic acid (B), The flow rate was 300 μ l/min and the gradient was set up to 15 min run time with first 1.5 min running 15% B, then increasing to 85% B in 4.5 min, further increase to 100% B in 12 min and decrease to 15% B in 15 min. The injection volume was 10 μ l using μ l pick-up option and 15% B as loading buffer using 20 μ l sample loop. The sampler solvent was pure isopropanol to prevent sample carry over between runs. The MS was run in positive mode using AB Sciex DuoSpray ion source. The ion source was set up to ion source gas flow 1 to 45, gas flow 2 to 40,

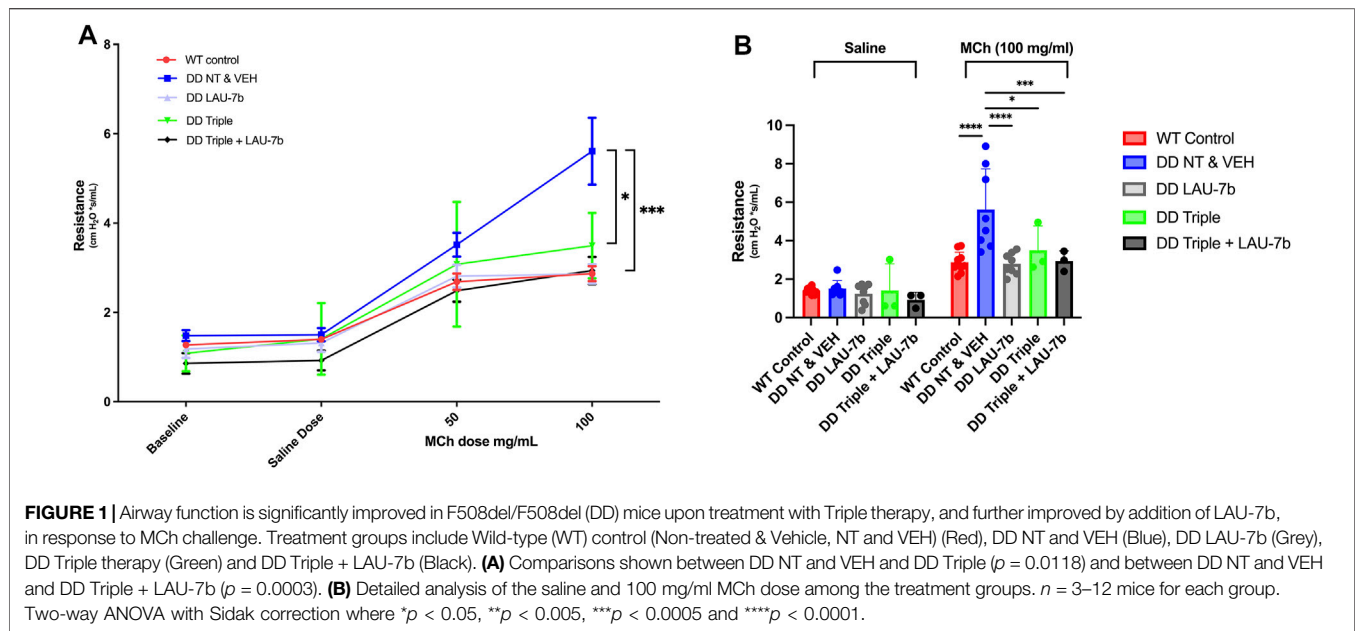
curtain gas to 30, temperature to 200 and ion source voltage to 4,500 V. The instrument was run in product ion mode with eleven separate experiments, one per each monitored analyte. Lipid standards were purchased from Sigma Aldrich and Avanti Polar Lipids.

Analysis of Lipid and Protein Oxidation

Lipid peroxidation was measured fluorometrically using 2-thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs species) as the end product of lipid peroxidation (Niehaus and Samuelsson, 1968; Ohkawa et al., 1979). Briefly, the samples of cells or macerated lung tissue were mixed with 8.1% sodium dodecyl sulfate, 20% acetic acid, and 0.8% 2-thiobarbituric acid. After vortexing, the samples were incubated for 1 h at 95°C after which butanol-pyridine was added at a 15:1 (v/v) ratio. The mixture was shaken for 10 min and then centrifuged. The butanol-pyridine layer was measured fluorometrically at 552 nm after excitation at 515 nm (OptiPlate Perkin-Elmer United States). The results are expressed in nmoles of malondialdehyde (MD) (TBARs species) per mg of protein in the samples reflecting all thiobarbituric acid reactive substances (Lykkesfeldt, 2007). Oxidative damage of proteins was assessed using 3-nitrotyrosine as a surrogate marker. 3-nitrotyrosine (3-NT) was determined by ELISA as previously described using well-characterized antibodies (Ye et al., 1996; Montes de Oca et al., 2008). The antibodies (mouse IgG monoclonal, polyclonal against 3-nitrotyrosine and polyclonal goat anti-rabbit IgG-peroxidase) were obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). The quantification of 3-NT was performed using a standard curve with known concentrations of 3-NT from chemically modified bovine serum albumin. The sensitivity of the assay was 50 pg/ml.

Western Blot Analysis of CFBE41o-(F508del)

CFBE41o-(F508del) cells were lysed in homemade RIPA buffer (50 mM Tris at pH = 7.4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.2 mM Na_3VO_4 , 0.1% SDS, 2 mM EDTA, 1% Triton-X, 0.5% Na-deoxycholate) with freshly dissolved protease inhibitor tablet (Sigma # 4693132001). The protein concentration was determined using BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific #23227) and proteins were denatured using 4x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, #1610747) with 10% (v/v) 2-mercaptoethanol (1x final) and RIPA. 20 μ g of total protein was loaded on a gel and proteins were separated on a precast 4–15% polyacrylamide gradient gel (Bio-Rad, #4561085) by SDS-PAGE. Proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using semi-dry transfer and the fast semi-dry transfer buffer (1X, final) containing 48 mM Tris, 15 mM HEPES with freshly added sodium bisulfate (1 mM final), EDTA (1.0 mM final) and 4 N, N-dimethylformamide (1.3 mM final) as previously described (Garić et al., 2013). Membranes were incubated with primary antibodies: against the R domain of CFTR (23C5, provided by Dr. John Hanrahan lab) and against β -Actin (Santa Cruz, #sc-1616). Membranes were then incubated



with secondary antibodies: goat anti-mouse (IgG-HRP, sc-2005). Lastly, membranes were developed using chemiluminescent kit (Bio-Rad, #170-5060).

Statistical Analyses

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9 (GraphPad, San Diego, CA, United States). For lung function, a two-way ANOVA with Sidak. For infiltrating cells in the airways of the mice, a two-way ANOVA with Bonferroni correction was performed. As for the analysis of the oxidation markers, fatty acids, VLCCs and LCCs, a Brown-Forsythe and Welch one-way ANOVA with Dunnett T3 correction was used. For the analysis of the VLCC/LCC ratio, a Kruskal–Wallis one-way ANOVA with Dunn's correction was performed. Lastly, for Western Blot quantification, a two-way ANOVA with Sidak correction was done.

RESULTS

Combinatory Treatment of Triple Therapy and LAU-7b Normalizes Lung Function in Homozygous F508del/F508del Mice Comparably to WT Controls

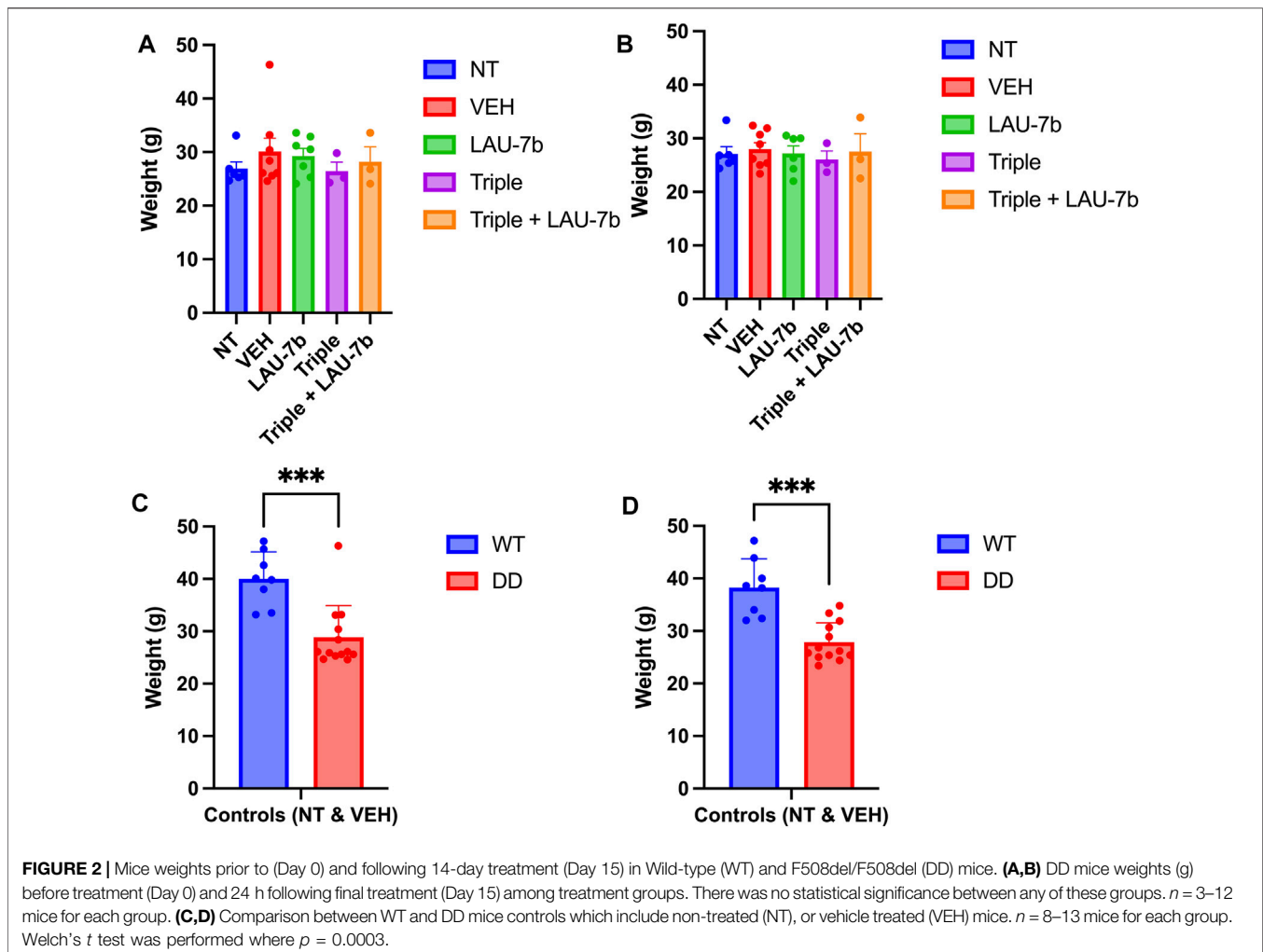
Lung function of F508del/F508del (DD) mice and WT mice treated with LAU-7b, Triple therapy, the combination of the two, or vehicle, was assessed using a classical lung resistance evaluation following aerosolised challenge of the lung with increasing concentrations of methacholine. Lung resistance of 14–20-month-old DD mice compared to their age-matched WT controls (red) is shown in **Figure 1A**. While treatment with Triple therapy (green) decreases the airway resistance in DD mice, treatment with LAU-7b (grey) shows lower airway

hyperresponsiveness than all other treatment groups, comparable to WT control mice. Triple therapy alone, LAU-7b alone and their combination (black) shows protective effects at the level of lung function. Lung function was improved to a higher extent by combinatory treatment with Triple and LAU-7b than Triple therapy alone, as demonstrated by a lower airway resistance in this group of mice compared to Triple alone. In **Figure 1B**, resistance values recorded for the saline and 100 mg/ml MCh doses are shown to better illustrate statistical significance observed between the treatment groups. While DD NT and VEH mice compared to Triple have a p -value of less than 0.05, when compared to Triple + LAU-7b combination, the p -value is less than 0.0005. The complete results of statistical analysis are provided in **Supplementary Table 1**.

As shown in **Figures 2A,B**, the comparative analysis of weights for DD mice across all five groups does not show any statistical significance prior to the experiment (Day 0) and 24-h after final gavage (Day 15), respectively. In fact, the DD mice did not display any statistical differences in weights between treatment groups over the entire course of the oral gavage (**Supplementary Figure 1**). When comparing controls (non-treated, NT and vehicle treated, VEH) WT and DD mice (**Figures 2C,D**), as expected there was a statistically significant difference between the weights of WT and DD mice, but there was no statistically significant weight difference among the experimental groups within the same genotype.

LAU-7b and Triple Therapy Combination Reduces Airway Hyperplasia and Immune Cell Infiltration of the Airway in the Lungs of DD Mice

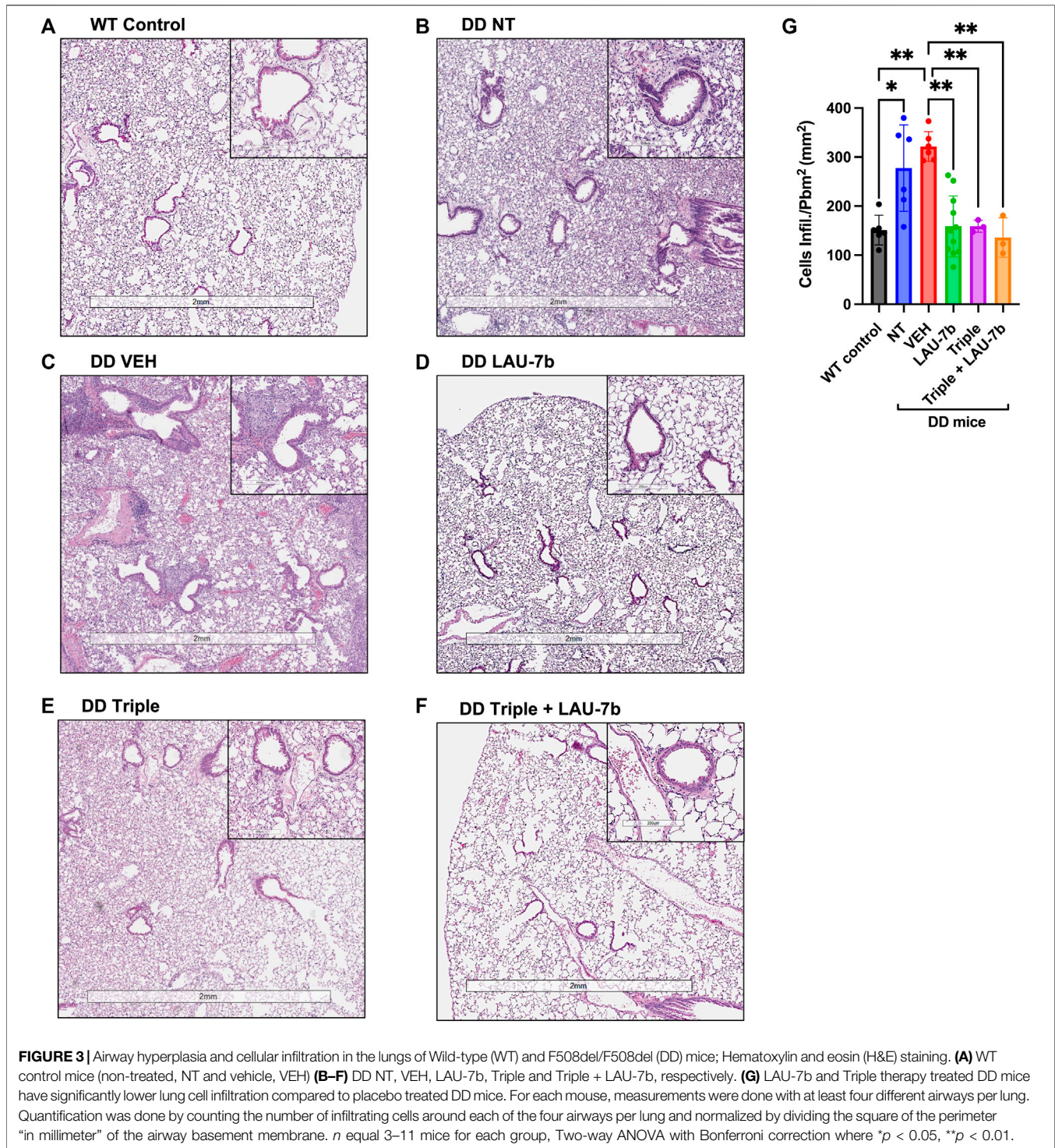
After observing an improvement in airway hyperresponsiveness following combinatory treatment, we assessed lung



histopathology using H&E staining (**Figure 3A**). DD mice were split into five treatment groups: non-treated, vehicle treated, LAU-7b, Triple therapy and LAU-7b combined with Triple therapy (**Figures 3B-F**). DD non-treated and vehicle treated mice with deteriorating lung function show significantly higher airway hyperplasia (**Figures 3B,C**). Triple therapy, as well as LAU-7b treatments alone, reduced elevated airway hyperplasia in DD mice (**Figures 3D,E**). The combination of the two treatments, given daily in a 14-day therapeutic cycle, resulted in further improvement and homogenous looking lungs which show no regions of hyperplasia in any of the multiple lung sections analyzed (**Figure 3F**). However, although a significant improvement in airway resistance following Triple therapy treatment was found, some lung sections still contain pathologically unchanged lung tissue (**Figure 3E**). DD mice develop thickening of the airway due to airway hyperplasia at 8-months old, without further worsening in mice 14-20 months old. As for the WT NT males, there is minimal hyperplasia seen in the airways upon comparison between 9-month-old and 14-month-old WT mice (**Supplementary Figure 2**). We also investigated the impacts of sex and age using our DD and WT NT mice (**Supplementary Figure 2**). WT and DD mice between

the ages of 8-9 months and 14-20 months, both male and female, were analyzed by H&E staining of the lungs (**Supplementary Figure 2**). There was no difference in hyperplasia observed when comparing males and females within each experimental group. Furthermore, based on the histological assessment of **Figures 3A-F**, the treatments have beneficial effects on cellular infiltration in the lung parenchyma in DD mice treated with LAU-7b (**Figure 3D**), Triple (**Figure 3E**) and Triple + LAU-7b (**Figure 3F**) compared to DD NT and VEH treated mice (**Figures 3B,C**). In fact, DD mice treated with Triple and LAU-7b had lungs that look very similar to WT control mice, with the exception of hyperplasia that was still observed in some airways examined.

In addition, we evaluated airway thickening caused by cell infiltration through quantification of these cells from H&E-stained lungs (**Figure 3G**). A significant increase is observed between the WT control group (NT and VEH, mean value 151.08, $n = 6$, SD 30.31) and both the DD non-treated (mean value 277.5, $n = 6$, SD 87.98) and vehicle (mean value 321.6, $n = 6$, SD 30.37) treated groups. A significant decrease can be seen between vehicle treated mice compared to LAU-7b treated DD mice (mean value 158.7, $n = 11$, SD 62.18). A greater



improvement was observed between vehicle treated mice (mean value 321.6, *n* = 6, SD 30.37) and Triple therapy (mean value 158.9, *n* = 3, SD 12.21), as well as with their combination (mean value 136, *n* = 3, SD 40.06). The results indicate a potential benefit with combinatory treatment of LAU-7b and Triple therapy, reducing cellular infiltration in the airways of DD mice.

Correction of Oxidation Markers, Fatty Acids and VLCCs/LCCs in the Lungs, Liver, and Plasma of DD mice Treated with Triple Therapy and LAU-7b

Non-treated and vehicle treated DD mice show increased baseline levels of Malondialdehyde (MD), marker of lipid oxidation, and 3-

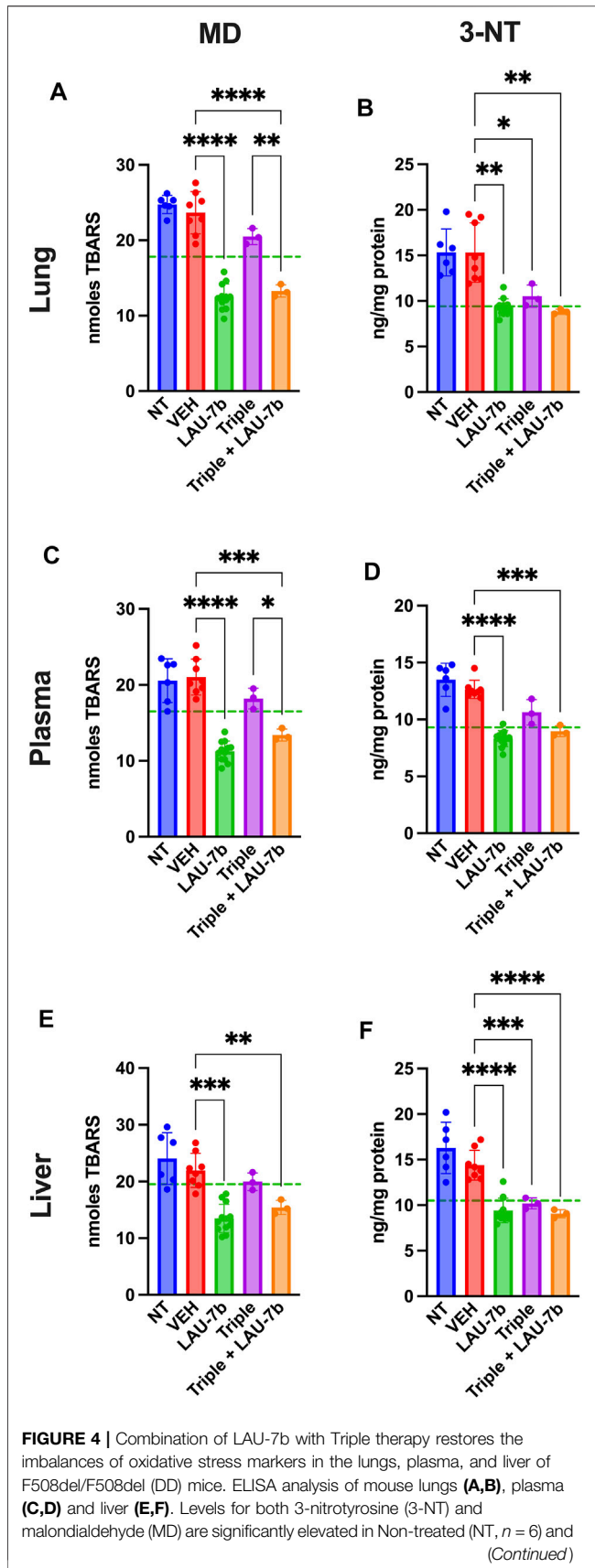


FIGURE 4 | vehicle treated (VEH, n = 8) DD mice as compared to mean levels seen in WT mice (dotted green line). LAU-7b treatment (n = 12) significantly decreases levels of MD and 3-NT in all organs and plasma. Triple therapy (n = 3) treatment on its own has minimal effect. However, combinatory treatment with LAU-7b and Triple therapy (n = 3) restores the decrease in 3-NT and MD seen in the LAU-7b treated mice, when compared to VEH treated DD mice. Brown-Forsythe and Welch One-Way ANOVA with Dunnett T3 correction, where *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

nitrotyrosine (3-NT), marker of protein oxidation, compared to WT control mice (dotted green line) in lungs, liver, and plasma (Figure 4). Triple therapy, and LAU-7b treatment significantly decrease levels of MD and 3-NT, in lungs, liver, and plasma when compared to vehicle treated DD mice. Across all samples shown in Figures 4A–F, combinatory treatment of Triple with LAU-7b significantly decrease both MD and 3-NT to comparable levels with WT mice (dotted green line) or improves these levels below WT, accentuating the benefit of the combinatorial treatment in slowing CF disease progression.

In Figure 5 levels of omega-3 (AA) and omega-6 (EPA and DHA) fatty acids were investigated in DD mice lungs, liver, and plasma. EPA and DHA levels are significantly increased with LAU-7b treatment p.o. when compared to placebo treated DD mice. Combinatory treatment of LAU-7b with Triple therapy also significantly increases EPA and DHA comparably, if not higher, than what is seen in WT controls. On the other hand, AA levels are significantly decreased by LAU-7b treatment, and this decrease is further enhanced with Triple and LAU-7b combination. Overall, combination treatment drastically improves the imbalance observed in AA/DHA and AA/EPA ratios in different organs and plasma of DD mice.

Next, long-chain ceramides (LCCs), C14:0 and C16:0, which are typically elevated in DD mice as compared to WT controls (dotted green line), show improvements upon treatment with Triple therapy, or LAU-7b, both of which bring these levels below those of vehicle treated DD mice (Figure 6). Interestingly, the combination of Triple therapy with LAU-7b further decreases LCC levels below the threshold seen in WT mice across all samples. As for the very long-chain ceramides (VLCCs), Figure 7 shows a baseline increase in C24:0 and a decrease in C24:0, C24:1 and C26:0 levels in both DD non-treated mice and vehicle treated mice. These levels are normalized to the levels seen in WT mice (dotted green line) upon treatment with LAU-7b, and Triple therapy. Again, combinatory treatment significantly increases in C24:0 and C24:1 compared to WT mice while also improving C26:0 levels. Combination treatment also significantly decreases levels of C22:0, below WT levels.

Lastly, the ratios of VLCCs/LCCs for the lungs, plasma and liver of DD mice were studied (Figure 8). Treatment with LAU-7b (green) drastically improves the ratio of VLCCs/LCCs in lungs, plasma and liver of DD mice. While Triple therapy treatment may not show a statistically significant improvement, it does show a trend of correction of the ratio (purple). Moreover, the combination of LAU-7b and Triple (orange) can restore and bring the VLCC/LCC ratio above the levels seen in WT mice (dotted green line). Such correction is like that of LAU-7b's effect on its own.

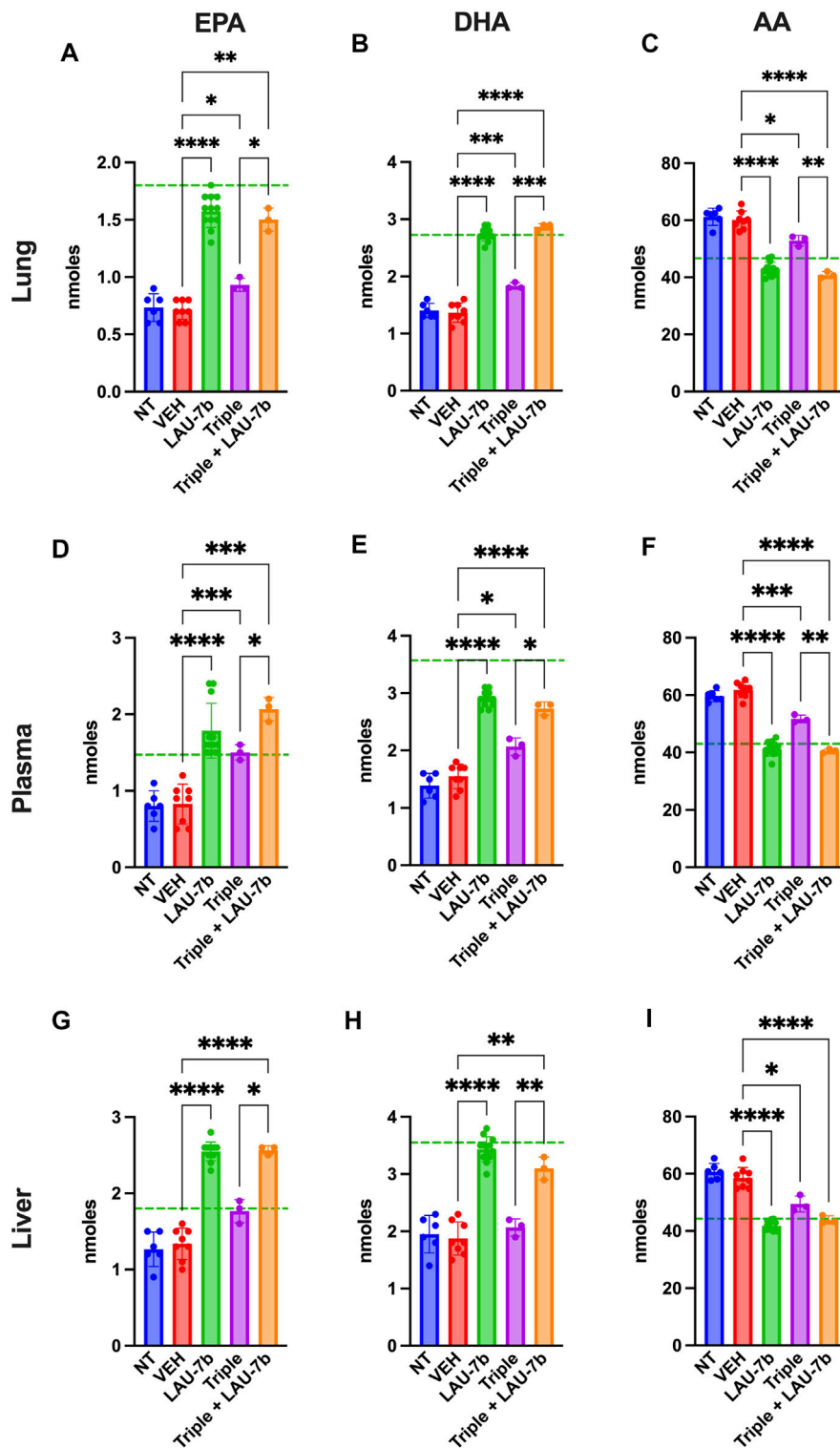


FIGURE 5 | Correction of fatty acids in the lungs, plasma and liver of F508del/F508del (DD) mice is enhanced upon combination of Triple therapy and LAU-7b. Gas chromatography analysis of mouse lungs (A–C), plasma (D–F) and liver (G–I) fatty acids. LAU-7b significantly increases omega-3 fatty acids, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in all three samples comparably to mean levels seen in WT mice (dotted green line). While Triple therapy alone only shows limited level of correction in lungs and plasma, the combination of the two significantly increases EPA and DHA in all samples when compared to vehicle (VEH) treated DD mice. Meanwhile, omega-6 fatty acid, arachidonic acid (AA) levels are significantly decreased in both LAU-7b and Triple therapy treated DD mice seen in all samples. Further improvement is seen upon combination of the two treatments ($n = 6, 8, 12, 3, 3$, respectively for DD-NT, DD-VEH, DD-LAU-7b, DD-Triple, DD-Triple + LAU-7b). Brown-Forsythe and Welch One-Way ANOVA with Dunnett T3 correction, where $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$.

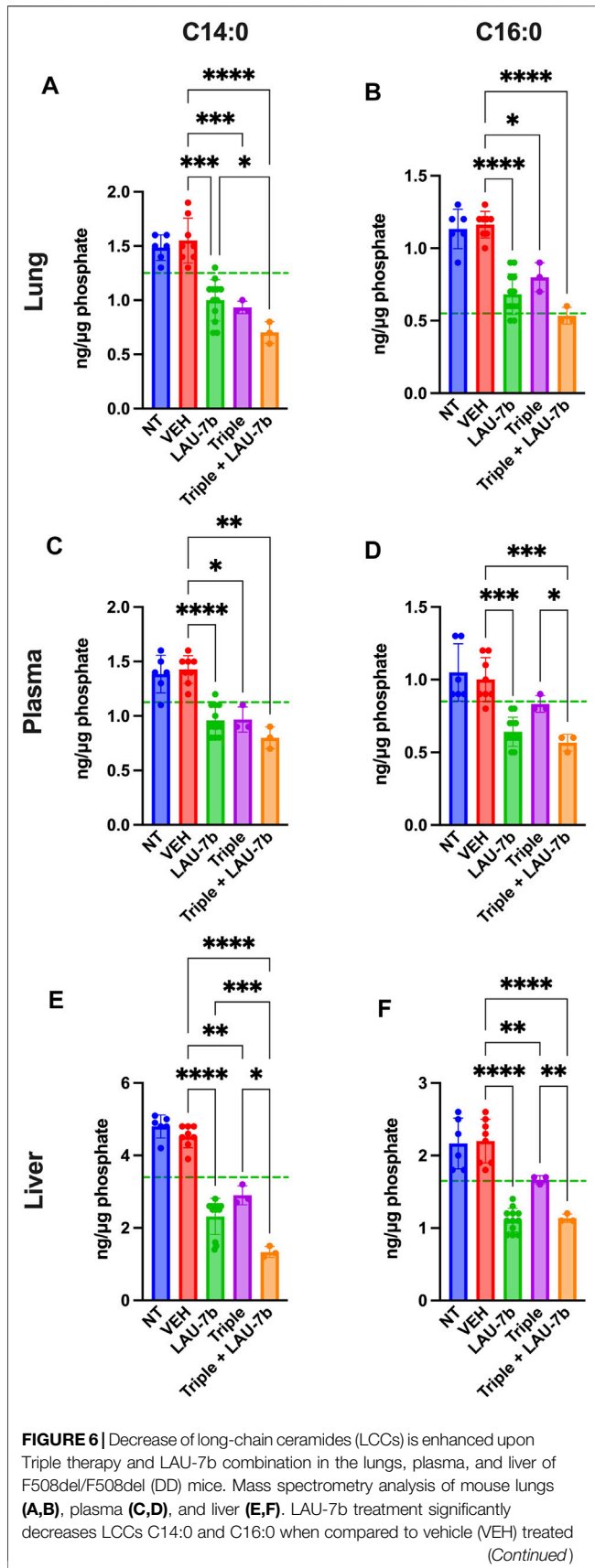


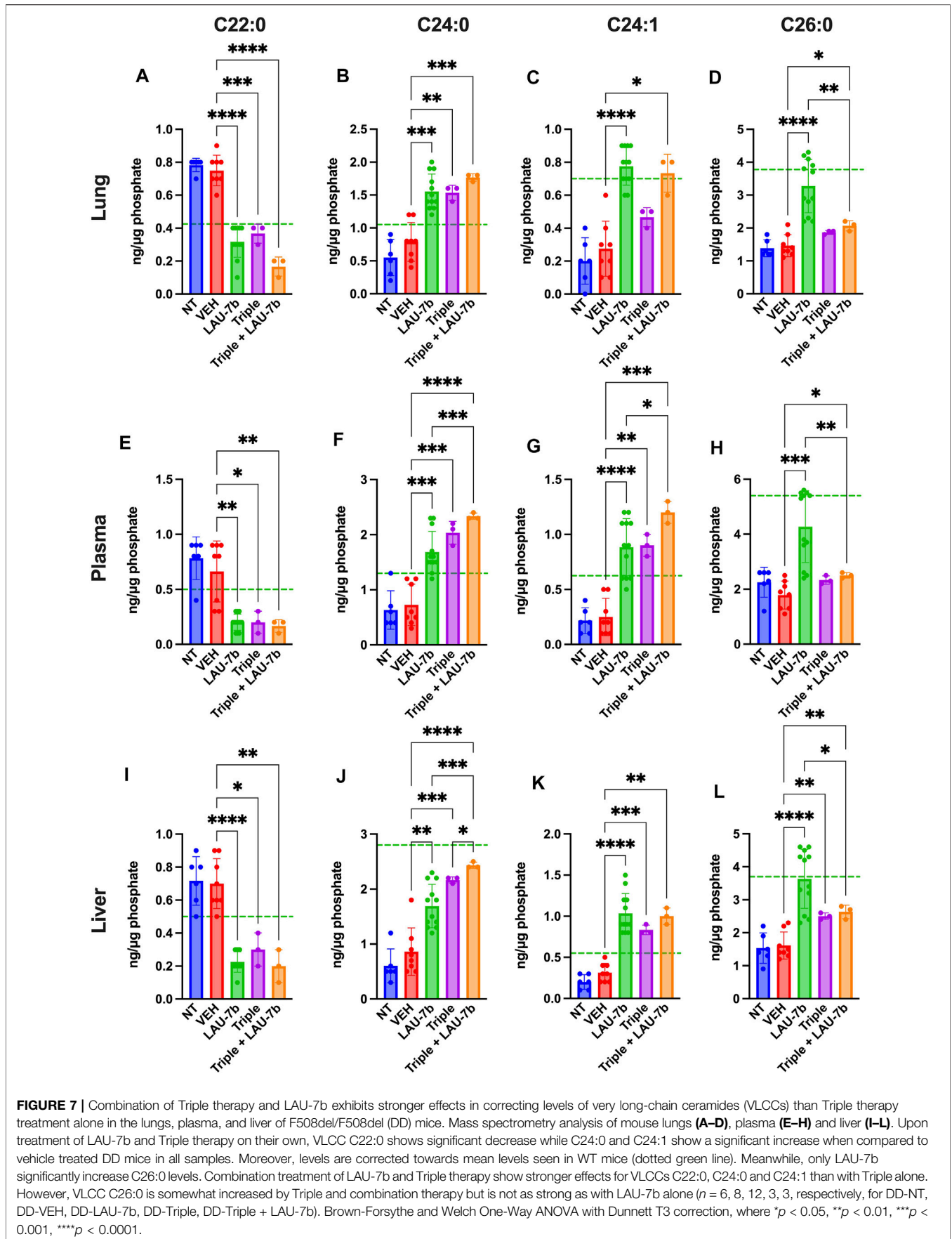
FIGURE 6 | DD mice in all three samples below mean levels seen in WT mice (dotted green line). Similar decrease is also seen upon treatment with Triple therapy. The combination of the two treatments yields a stronger decrease in LCCs than with Triple alone in all samples ($n = 6, 8, 12, 3, 3$, respectively for DD-NT, DD-VEH, DD-LAU-7b, DD-Triple, DD-Triple + LAU-7b). Brown-Forsythe and Welch One-Way ANOVA with Dunnett T3 correction, where $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$.

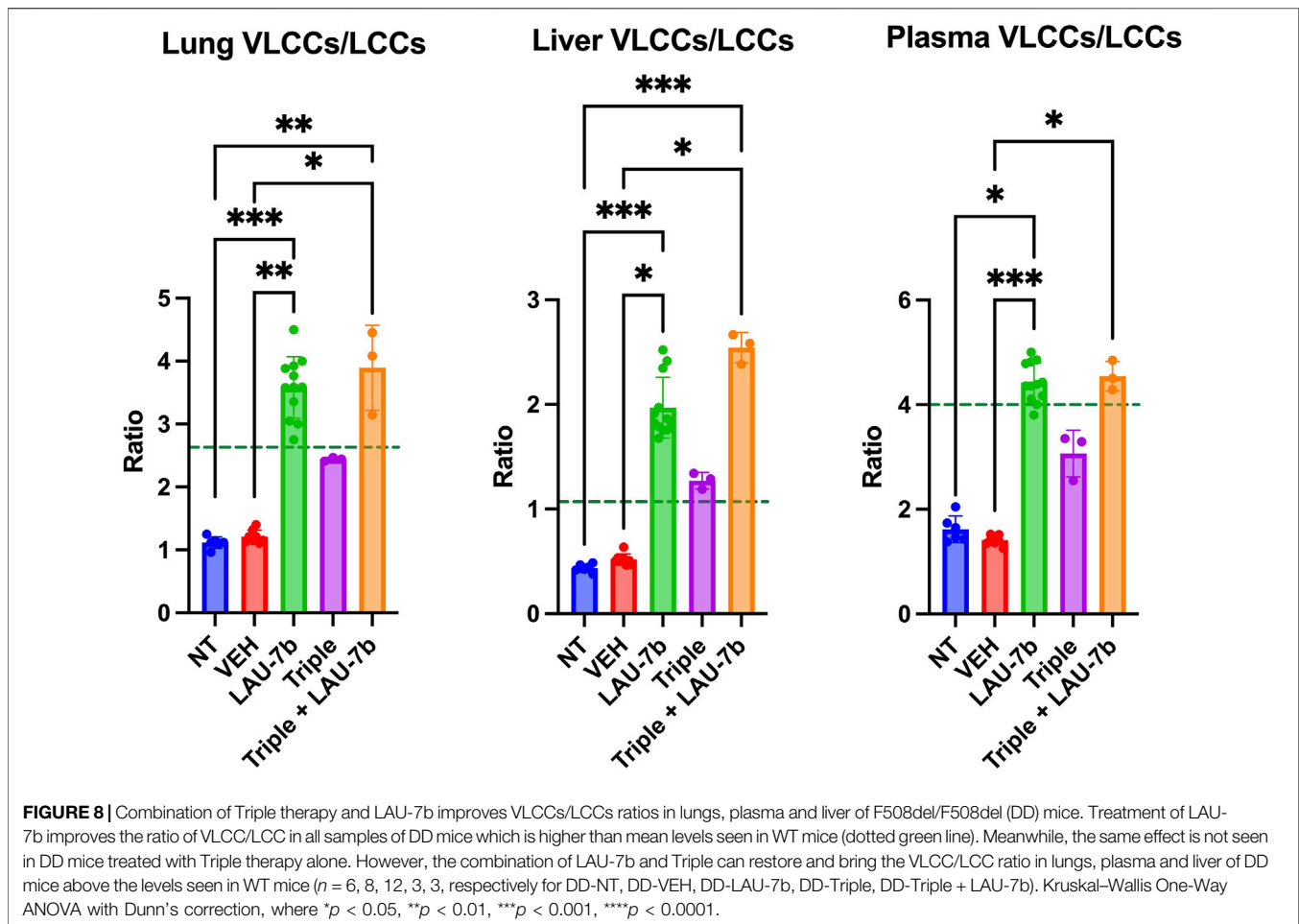
Triple Therapy, Fenretinide and Physiological Concentration of Zinc Combination Shows Improvement in VLCC/LCC Ratio in CFBE Cell Lines

To assess causality of the combination treatment we also studied VLCC/LCC ratio improvements *in vitro*, in CFBE41o-(P), CFBE41o-(WT) and CFBE41o-(F508del) cell lines. Levels of LCCs (C14:0, C16:0), as well as VLCCs (C22:0, C24:0, C24:1, C26:0) were measured, and their ratios were obtained (Supplementary Figure 3). Similar trends are observed for CFBE41o-(P) and CFBE41o-(F508del) cell lines when it comes to their VLCC/LCC ratios. At baseline, CFBE41o-(P) and CFBE41o-(F508del) display an 8% and 19% decrease in the VLCC/LCC ratio, when compared to CFBE41o-(WT) cells (dotted line). Fenretinide and physiological levels of zinc improve VLCC/LCC ratio by approximately 2-fold when compared to vehicle, in both cell lines. Triple therapy treatment does not show improvements in VLCC/LCC ratio. However, Triple therapy in combination with fenretinide and physiological concentration of zinc restores the VLCC/LCC ratio to a similar fold increase as seen with fenretinide and zinc treatment alone, with both treatments elevating the ratio above the baseline seen in CFBE41o-(WT).

Improvement in Total Levels a Glycosylation Status of CFTR Upon Combinatorial Treatment with FEN, Triple Therapy and Zn²⁺ in CFBE41o-(F508del)

Given that CFBE41o-(P) does not have any detectable CFTR protein, the total levels of CFTR protein were assessed in CFBE41o-(F508del) cells treated with Triple therapy, fenretinide or the combination of both treatments, by Western blotting (Figure 9A). The B band for CFTR is ~131 kDa, which represents the core glycosylated CFTR processed in the endoplasmic reticulum (Cheng et al., 1990; O’Riordan et al., 2000; Mall et al., 2004). The C band for CFTR, which is ~160 kDa, represents the fully glycosylated mature CFTR and would indicate processing of the protein in the Golgi apparatus (Cheng et al., 1990; O’Riordan et al., 2000). As expected, the CFBE41o-(F508del) cell line does not express the fully glycosylated and mature CFTR. Only the B band can be observed on the immunoblot. Figure 9B illustrates the quantification data normalized to actin expression levels and shows the differences that were statistically significant. Following 3-day treatment with FEN, the B band was enhanced by 1.5-fold (50%), and upon combination of FEN with Zn²⁺, the B band is further enhanced to 1.85-fold. This indicates an increased amount of core glycosylated CFTR protein in the cells, while the fully glycosylated mature form represented by the



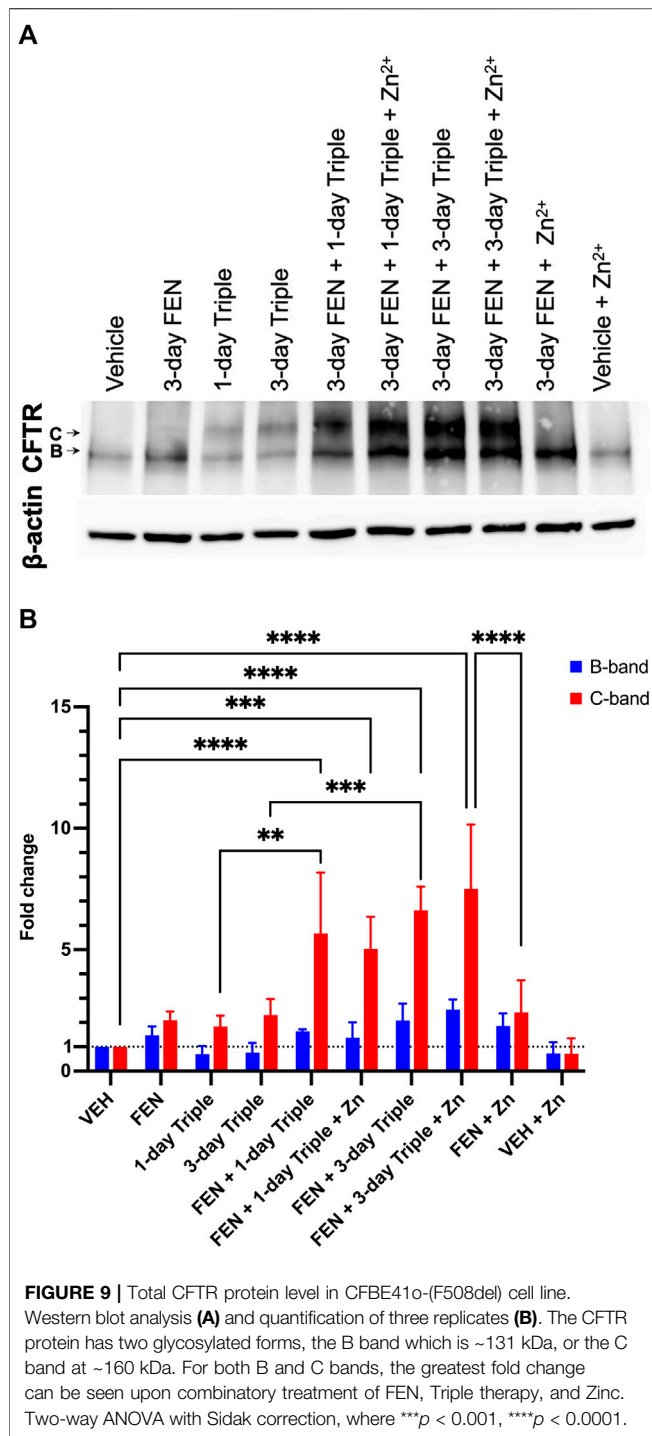


C band remains almost undetectable. While treatment of 1-day or 3-day Triple therapy does not enhance the B band for CFTR, a substantial improvement can be seen upon 3-day treatment with FEN and Triple therapy by 2.1-fold, and upon addition of Zn^{2+} , is further ameliorated to 2.6-fold increase. As for the C band, enhancement is seen for 3-day FEN treatment, Triple therapy treatment for 1 and 3-days, as well as the addition of Zn^{2+} . Of all the treatments, combinatorial treatment with 3-day FEN and 3-day Triple therapy in the presence of physiological concentration of Zn^{2+} , yields the highest intensity for the C band, with a 7.5-fold increase, compared to vehicle. These results demonstrate that treatment with combination of both FEN and Triple augments the total CFTR protein levels further than with Triple therapy alone. These effects can be attributed to increased protein synthesis, stabilization, and/or decreased degradation, ultimately enhancing the efficacy of the modulators. The mechanism of additive effect of this combinatory treatment should be further investigated.

DISCUSSION

CF impacts more than 100,000 individuals worldwide (Shteinberg et al., 2021). To date, there is no cure for CF and available treatments target its symptoms. However, CFTR modulator and

potentiator therapies which target the genetic defect of the disease, have brought much hope to the CF community. Recently, two randomized, double-blind, phase 3 clinical trials involving TRIKAFTA[®], for CF patients 12 years and older, heterozygous or homozygous for the F508del mutation (NCT03525444 and NCT03525548) (Heijerman et al., 2019; Middleton et al., 2019; Zah et al., 2021) were successfully completed and led to the approval of TRIKAFTA[®] treatment in 2019. More recently, TRIKAFTA[®] was approved in younger patients, 6–11 years of age, heterozygous or homozygous for the F508del mutation, following a confirmatory Phase 3 trial in this CF population (NCT03691779) (Zemanick et al., 2021). Across all three studies, improvement in percentage of predicted FEV₁ (ppFEV₁) indicated better lung function, lower sweat chloride concentrations and a higher Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised respiratory domain (CFQ-R RD) score indicating less respiratory symptoms and a better overall quality of life (Zaher et al., 2021). Furthermore, an observational study in PwCF homozygous for the F508del mutation ranging from 20.8 to 48.3 years old (median age = 31.1 years) taking TRIKAFTA[®] over the course of 48 weeks was done (Carnovale et al., 2022). Although inflammation was not evaluated, an improvement in FEV₁, body mass index and sweat chloride was observed. On the other hand, a decrease in exacerbation and a need for intravenous



antibiotics was reported. However, it is important to note that due to COVID-19, CF clinics have seen less bacterial exacerbations since patients were isolating and wearing masks. This is relevant given it is a retrospective study (i.e., without adequate control group comparisons) (Carnovale et al., 2022).

While the disease results in the occurrence of many symptoms, lung deterioration caused by repeated bacterial, viral infections, and exacerbations are the main cause of mortality and morbidity

(Ratjen et al., 2015). To treat these infections, a combination of anti-bacterial, antifungal, and antiviral medications is needed, but cause complications after repeated and extended periods of use (Hahn et al., 2018). Therefore, novel treatment options that can mitigate the genetic defects of the CFTR protein while also addressing the inflammatory storm seen in PwCF, still need to be explored. Interestingly, a study by Gentzsch et al. found that the rescue of mutant CFTR was improved upon CFTR modulator therapies *in vitro* undergoing airway epithelial inflammation (Gentzsch et al., 2021). This could prove to be very intriguing and would be interesting to see in an *in vivo* model.

An interesting strategy, which has gained much ground across various fields in the last decade, is the repurposing and combination of drugs, in the hope of achieving additive and even synergistic effects in treating diseases. In CF disease, small molecule combination has been the strategy employed by the pharmaceutical industries and academic laboratories, which yielded the most successful results (Lopes-Pacheco, 2019; Villella et al., 2019; Pinto et al., 2021).

It was therefore important to investigate whether the inflammation-controlling (pro-resolution) treatment, LAU-7b, would be complementary to the recently approved TRIKAFTA[®] therapy and not interfere with the efficacy of the combination in mice with CF lung disease. With the eventual aim of improving the quality of life for PwCF and to address a broader range of the pathology observed in CF lung disease, we have assessed the efficacy of the combination of pro-resolution LAU-7b, with modulator and corrector therapies.

This study examined the impacts that combinatory treatment of LAU-7b (oral fenretinide) and a Triple therapy similar to TRIKAFTA[®] have *in vivo* on DD mice, and also *in vitro*, using a CFBE overexpressing F508del cell line. While each treatment on its own has demonstrated ameliorative effects in the studies conducted thus far, their combination is studied here for the first time. TRIKAFTA[®]'s mechanism of action remains to be fully elucidated. However, it is thought that correctors, Elexacaftor and Tezacaftor, directly interact with the mutant CFTR protein, facilitating its movement and trafficking to the Golgi, while the potentiator Ivacaftor, increases channel activity at the membrane level (Zaher et al., 2021). LAU-7b's mechanism of action was previously discussed; functioning as a membrane lipid modulator and exerting inflammation-controlling (pro-resolution) in multiple *in vitro* and *in vivo* systems (Garić et al., 2017; Garić et al., 2020b). Given our understanding of the two treatments and the benefits they each have, we began by studying their combination *in vivo* in our older, 14 to 20-month-old DD and WT mice. Before studying the effect of various infections on the efficacy of TRIKAFTA[®], it was important to first study mice that develop CF lung disease even under pathogen-free conditions. This occurs when CF mice reach an age corresponding to that of PwCF at which those with a class 1 and 2 mutations in the CFTR gene have a decline in the force expiratory volume in 1 s (FEV₁).

After diagnosis of CF lung disease, a standard measure of disease progression and airway obstruction is FEV₁ tested by spirometry (Szczesniak et al., 2017). Declining pulmonary function among PwCF is age-dependent, however, the most

dramatic drop in FEV₁ occurs between puberty and the age of 30, although it is dependent on the CFTR gene mutation. The decline in lung function over time in CF patients results from chronic airway inflammation and mucus dehydration, which are triggered by infection-induced increases in pro-inflammatory lipid mediators, which are regulated by AA release (Miele et al., 1997; Elizu et al., 2008). In mice, an invasive measure of airway resistance is a gold standard assay performed to monitor pulmonary function. In **Figure 1A**, our WT control group showed an expected slight increase upon MCh addition. However, a significant impairment in airway function is seen for the DD NT and VEH treated mice, most notably at the 100 mg/ml MCh dose, upon comparison to WT control (**Figure 1B**). Moreover, a significant improvement is seen upon treatment with LAU-7b, which shows airway resistance levels comparable to healthy WT controls. While Triple therapy treatment improves airway function, its effects are less marked than those seen in LAU-7b treated animals. The mice treated with the combination of Triple therapy and LAU-7b, displayed a significant improvement in lung function. The normalization of lung function upon combinatory treatment denotes a lower airway hyperresponsiveness, like that of WT control mice. This indicates that mice treated with LAU-7b, or LAU-7b + Triple therapy, have significantly better pulmonary function than mice treated with only Triple therapy.

In PwCF, the abnormal mucosal defences facilitate recurrent chronic infection, most often with *P. aeruginosa* and sometimes with *Aspergillus fumigatus*, which negatively impacts the inflammatory milieu leading to lung damage and eventually lung failure, the main cause of morbidity and mortality in PwCF (Leclair and Hogan, 2010; Ratjen et al., 2015; Cottrill et al., 2020). It is well documented that MUC5AC overexpression plays a key role in airway plugging, and both MUC5AC and MUC5B are not only upregulated in chronically infected PwCF but are further augmented during lung exacerbations that happen in a large percentage of PwCF 3–4 times a year (Rowe et al., 2005; Fahy and Dickey, 2010; Garić et al., 2020a). To improve mucus clearance, mucoactive agents, consisting of mucolytics and hyperosmolar agents, can be used (Hurt and Bilton, 2014). Bronchodilators work to improve airway opening by relaxing the smooth muscles in the bronchial wall facilitating mucus clearance (Smith and Edwards, 2017; Smith et al., 2020). Despite various treatments, delayed resolution of inflammation that frequently occurs in PwCF following exacerbation, often results in permanent lung damage. To assess lung deterioration in our F508del mice that were kept in a specific pathogen free condition (SPF), histological analysis of lung sections stained with H&E was done (**Figure 3**). Histology revealed overall ameliorated pathological parameters in mice treated with LAU-7b and LAU-7b in combination with Triple therapy as compared to vehicle treated controls, further supporting the results obtained for the physiological assessment. Hyperplasia of airways with significantly thickened airway lining is a pathological feature of cystic fibrosis and other respiratory diseases (Gorrieri et al., 2016). In **Figure 3**, a major difference can be seen between the airways of the WT control mouse and the DD-NT or DD-VEH mouse. Both DD-NT and DD-VEH mice

have elevated levels of hyperplasia compared to WT control. These results corroborate the findings of a lower airway resistance in WT mice, and higher resistance in DD NT and VEH treated mice, highlighting the drastic difference in overall pulmonary health for these two groups. While treatment with LAU-7b or Triple therapy reduce airway cell hyperplasia, the combination of LAU-7b and Triple therapy yields superior results compared to Triple therapy alone, with uniform looking lungs, comparable to those of WT controls. The histology images are further supported by **Figure 3G**, displaying the lowest number of infiltrating cells for the combinatory treatment group.

In response to allergic reactions or infections, goblet cells present in the airways start production of mucus, and an increase in the reproduction rate of these cells leads to mucus hypersecretion, leading to abnormal mucus accumulation and airway plugging. This results in decreased antimicrobial functions and impaired mucociliary clearance, which can further worsen the CF condition (Puchelle et al., 2002). Histological assessment of lung sections demonstrates that treatment with LAU-7b and Triple therapy dramatically diminish the thickening of the airway lining. As the inflammatory response in the lungs of PwCF is self-perpetuating and can be worsened by abnormal immune activity, it is important that any developing CF treatment considers the likely possibility of goblet cell hyperplasia and its consequences. Mucin expression that is inducible upon allergic response to *Aspergillus* antigens and infections with *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and other bacterial and fungal induced lung pathology was not evaluated in the current study, but is one of the important aspects of our ongoing studies.

Since oxidative markers, fatty acids, and overall lipid profiles, are known to be dysregulated in both CF mice and PwCF from birth, prior to their development of CF lung disease (Strandvik et al., 2001; Strandvik, 2010; Youssef et al., 2020), further analysis was done using a portion of the liver, lung and plasma of WT and DD mice under the various treatments to obtain the lipidomic profile of those mice, first, oxidative stress markers were analyzed. Being a universal biological response, oxidative stress plays a major role in a variety of inflammatory disease conditions. In CF, neutrophils are continuously recruited to the airways and liberate their toxic products such as oxidants, in an uncontrolled fashion (Hector et al., 2014). While antioxidants shield the lung from free oxidative damage in healthy patients, the amount and duration of neutrophilic inflammation overwhelms these defence systems in CF subjects, leading to increased protein and lipid oxidation in the lungs. To improve the defense system in PwCF, it is important to introduce a treatment which reduces levels of lipid and protein oxidation as marked by MD and 3-NT, respectively. In **Figure 4**, LAU-7b treatment in DD mice significantly reduced levels of MD and 3-NT in the lungs, plasma, and liver, to a greater extent than Triple therapy treatment. However, upon combination with Triple therapy, improvements are comparable to that of LAU-7b alone, lowering the levels of those oxidative markers below the WT threshold. Thus, the combination of Triple therapy with LAU-7b, is significantly better than Triple therapy alone, given LAU-7b's antioxidant properties counteracting the

overwhelming recruitment of neutrophils seen in lung inflammation.

Moreover, fatty acids abnormalities, in AA, DHA, and EPA, are consistently reported in CF (Sinaasappel et al., 2002). These abnormalities create an imbalance in the DHA/AA ratio in favour of AA, contributing to the increase in pulmonary inflammation and mucus dehydration, resulting in deterioration of PwCF's condition. However, the causal connection between the expression of CFTR protein and this phenomenon has rarely been examined. Some evidence that suggests a role for CFTR in fatty acid metabolism as it was shown in cell culture models, where CFTR dysfunction results in defective fatty acid composition (Andersson et al., 2008). Furthermore, similar polyunsaturated fatty acid changes in CF affected organs such as the lung, pancreas and ileum have been reported in CFTR knock-out mice, further suggesting a causal link between CFTR and fatty acid metabolism (Freedman et al., 1999). Further studies also report that modulation of saturated fatty acids correlates with the modulation of LCCs and VLCCs (Garić et al., 2020a). In **Figure 5**, EPA and DHA levels are shown in the lungs, plasma and liver of DD mice. Upon treatment with LAU-7b, a significant increase in those omega-3 fatty acids was observed. While treatment with Triple therapy alone did show some improvement, it is only after its combination with LAU-7b that we see an increase in EPA and DHA comparable and even exceeding levels of EPA and DHA seen in WT mice. Combinatory treatment with Triple therapy and LAU-7b shows normalization of AA levels, which is not seen with Triple therapy treatment alone. **Figures 6 and 7** show LCCs and VLCCs levels in lung, liver and plasma, respectively. In 2020, Liessi et al. performed an untargeted lipidomic analysis on CFBE41o-cells upon various treatment groups, which included the Triple combination therapy (VX-661/VX-445/VX-770) (Liessi et al., 2020). Our results, as seen in **Figures 6 and 7** corroborate their findings (**Figure 4**), of a downregulation in C14:0 and C16:0 and a concomitant upregulation in VLCCs (Liessi et al., 2020). Recently, an interesting study was published by Westholter and others reporting ceramide levels obtained from plasma analysis of 25 PwCF (age 35.56 ± 12.75 ; 20 out of 25 with intermittent or chronic *Pseudomonas* infection) treated for 4 weeks with TRIKAFTA® (Westhölter et al., 2022). A very modest improvement (decrease) in C16:0 ceramide levels (0.218 ± 0.09 before treatment and 0.178 ± 0.06 ($p = 0.0051$) after 4 weeks of treatment) with TRIKAFTA® was reached. Furthermore, a very modest improvement in the levels of C24:0 (1.354 ± 0.47 before and 1.674 ± 0.65 after 4 weeks of treatment ($p = 0.0048$)) was also achieved. However, only 3 PwCF out of 25 reached levels for C24:0 of 2.5 after treatment, with none of the patients reaching a level of 4, which is typical for healthy individuals (Garić et al., 2017). No improvement in C22:0 or C24:1 ceramide was reported following the treatment with TRIKAFTA® and no analysis of C26:0 ceramides was done. The ratio between C16Cer/C24Cer has improved from 0.171 ± 0.06 before treatment to 0.112 ± 0.03 after 4 weeks of TRIKAFTA® treatment (p -value = <0.001) (Westhölter et al., 2022).

In **Figure 8** the VLCC/LCC ratio, which is known to be altered in CF disease, is emphasized. While Triple therapy can partially improve this ratio by increasing VLCC levels and decreasing LCC levels, the greatest correction occurs upon combinatory treatment with LAU-7b, surpassing the WT threshold in lungs, liver, and

plasma of WT mice. Overall, Triple therapy alone seems to be beneficial in terms of correcting the pool of fatty acids, and ceramides, however, the combination of Triple and LAU-7b is demonstrated to be superior in further ameliorating these levels to similarity with what is seen in WT mice. This cooperative effect might be particularly important for PwCF since most of them are chronically infected with bacteria such as *P. aeruginosa*, and/or fungi.

Results obtained *in vitro* corroborate the *in vivo* findings, once again demonstrating that the combination of Triple with LAU-7b is more efficacious in improving the VLCC/LCC ratio of the CFBE41o-(F508del) cell line, than Triple therapy alone. Interestingly, our data demonstrated that fenretinide treatment increases total CFTR protein levels (**Figure 9**), in the same cell line, thereby providing more protein that can be subsequently processed to the cell membrane with the help of modulators and the potentiator, enabling functional recovery of CFTR channel.

Ultimately, there is a benefit for PwCF from TRIKAFTA®. Moving forward, it is imperative to study whether the effect of TRIKAFTA® is long-lasting and whether the lung inflammation resulting from recurrent lung infections does not diminish its efficacy over time, as previously seen with Kayldeco®, a similarly effective CFTR modulator (Heltshe et al., 2018). The combination of Triple therapy and LAU-7b might resolve this important facet. Taken together, the results obtained in this study strongly suggest for a potential clinical benefit from using TRIKAFTA® in combination with LAU-7b, with the aim of slowing the lung degradation and further improving overall quality of life in PwCF.

While the study presented above can have a lasting impact for PwCF, there are limitations. The cost of the Triple treatment was a limiting factor in our decision for the number of mice to include in each treatment group. Therefore, we chose to include 3 mice in each Triple and Triple + LAU-7b groups, given it is the minimum number of mice required to achieve statistical significance. Furthermore, kinetics of inflammatory mediators and mucin induction, which is usually following exposure to lung pathogens or their filtrates, could not be evaluated in this study since animals were maintained in a specific pathogen-free (SPF) condition. The airway thickening quantification in **Figure 3G** is based on a semi-quantitative assessment of four airways per mouse lung at $\times 20$ magnification and establishment of a fully quantitative approach would be desirable in the future.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Animal Care Committee at the Research Institute of the McGill University Health Centre.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AC: manuscript writing, *in vivo* sample processing, maintenance of delF508 colony, animal experimentation, analysis and quantification of histopathology, Western blot, *in vitro* sample processing. DD: maintenance of delF508 colony, animal experimentation, collection of blood plasma and purification of samples, lung function analysis of F508del mice, manuscript corrections and editing. MY: animal experimentation, analysis of lung function and quantification of histopathology. MO: *in vitro* sample processing and tissue culture, Western blot analysis. JS: *in vitro* sample processing, Western blot analysis. RAP: aided in animal experimentation and editing of manuscript. TO: lipid extraction and ceramide analysis. JDS: lipidomic analysis, protein and lipid oxidation analysis, normalization, data analyses, manuscript editing. EG: genotyping of the mice and help with maintenance of delF508 colony, manuscript editing. JWH: manuscript corrections and editing. BP: manuscript corrections and editing. IK: study design, consulting for animal experimentation. RP: study design, consulting for animal experimentation, manuscript editing. MH: analysis of lipid oxidation, discussion on the conceptual data analysis and exploration of molecular mechanism of action of the drug, manuscript editing. DR: study concept and design, data analysis, manuscript corrections and editing.

FUNDING

This research has been supported by The Quebec Ministry of Economy and Innovation (MEI; MDEIE-PSVT3 to DR and

REFERENCES

- Andersson, C., Al-Turkmani, M. R., Savaille, J. E., Alturkmani, R., Katrangi, W., Cluette-Brown, J. E., et al. (2008). Cell Culture Models Demonstrate that CFTR Dysfunction Leads to Defective Fatty Acid Composition and Metabolism. *J. Lipid Res.* 49 (8), 1692–1700. doi:10.1194/jlr.M700388-JLR200
- Bebok, Z., Collawn, J. F., Wakefield, J., Parker, W., Li, Y., Varga, K., et al. (2005). Failure of cAMP Agonists to Activate Rescued deltaF508 CFTR in CFBE41o-Airway Epithelial Monolayers. *J. Physiol.* 569 (2), 601–615. doi:10.1113/jphysiol.2005.096669
- Bruscia, E., Sangiuolo, F., Sinibaldi, P., Goncz, K. K., Novelli, G., and Gruenert, D. C. (2002). Isolation of CF Cell Lines Corrected at DeltaF508-CFTR Locus by SFHR-Mediated Targeting. *Gene Ther.* 9 (11), 683–685. doi:10.1038/sj.gt.3301741
- Carnovale, V., Iacotucci, P., Terlizzi, V., Colangelo, C., Ferrillo, L., Pepe, A., et al. (2022). Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for the F508del Mutation and Advanced Lung Disease: A 48-Week Observational Study. *J. Clin. Med.* 11 (4), 1021. doi:10.3390/jcm11041021
- Cheng, S. H., Gregory, R. J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D. W., White, G. A., et al. (1990). Defective Intracellular Transport and Processing of CFTR Is the Molecular Basis of Most Cystic Fibrosis. *Cell* 63 (4), 827–834. doi:10.1016/0092-8674(90)90148-8
- Cottrill, K. A., Farinha, C. M., and McCarty, N. A. (2020). The Bidirectional Relationship between CFTR and Lipids. *Commun. Biol.* 3 (1), 179. doi:10.1038/s42003-020-0909-1
- Ehrhardt, C., Collnot, E. M., Baldes, C., Becker, U., Laue, M., Kim, K. J., et al. (2006). Towards an *In Vitro* Model of Cystic Fibrosis Small Airway Epithelium: Characterisation of the Human Bronchial Epithelial Cell Line CFBE41o-. *Cell Tissue Res* 323 (3), 405–415. doi:10.1007/s00441-005-0062-7

JWH) Cystic Fibrosis Canada Grant #494470 to BP; Ministry of School and Education of the Czech Republic (ENOCH CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868 and EATRIS-CZ LM2018133 to MH, DR, JDS); CIHR Grant FRN115117 #2433990; RI-MUHC Account 4925 to DR.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the late Dr. Bob Scholte for generously providing us with the *Cftr*^{tm1EUR} mouse model (C57BL/6J), heterozygous for the F508del *Cftr* mutation, was obtained from the Erasmus Medical Center (Rotterdam, Netherlands). We want to acknowledge Laurent Pharmaceuticals Inc. for having generously provided the clinical capsules used for treatment of *Cftr*^{tm1EUR} F508del mice and their littermate controls.

DEDICATION

This manuscript is dedicated to the memory of our dear friend and colleague Dr. Bob Scholte.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.876842/full#supplementary-material>

- Elizur, A., Cannon, C. L., and Ferkol, T. W. (2008). Airway Inflammation in Cystic Fibrosis. *Chest* 133 (2), 489–495. doi:10.1378/chest.07-1631
- Fahy, J. V., and Dickey, B. F. (2010). Airway Mucus Function and Dysfunction. *N. Engl. J. Med.* 363 (23), 2233–2247. doi:10.1056/NEJMra0910061
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957). A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* 226 (1), 497–509. doi:10.1016/s0021-9258(18)64849-5
- Fontès, G., Ghislain, J., Benterki, I., Zarrouki, B., Trudel, D., Berthiaume, Y., et al. (2015). The ΔF508 Mutation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Is Associated with Progressive Insulin Resistance and Decreased Functional β-Cell Mass in Mice. *Diabetes* 64 (12), 4112–4122. doi:10.2337/db14-0810
- Freedman, S. D., Katz, M. H., Parker, E. M., Laposata, M., Urman, M. Y., and Alvarez, J. G. (1999). A Membrane Lipid Imbalance Plays a Role in the Phenotypic Expression of Cystic Fibrosis in *Cftr*(-/-) Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96 (24), 13995–14000. doi:10.1073/pnas.96.24.13995
- Garić, D., De Sanctis, J. B., Wojewodka, G., Houle, D., Cupri, S., Abu-Arish, A., et al. (2017). Fenretinide Differentially Modulates the Levels of Long- and Very Long-Chain Ceramides by Downregulating *Cers5* Enzyme: Evidence from Bench to Bedside. *J. Mol. Med. (Berl)* 95 (10), 1053–1064. doi:10.1007/s00109-017-1564-y
- Garić, D., Dumut, D. C., Shah, J., De Sanctis, J. B., and Radziach, D. (2020b). The Role of Essential Fatty Acids in Cystic Fibrosis and Normalizing Effect of Fenretinide. *Cell Mol Life Sci* 77 (21), 4255–4267. doi:10.1007/s00018-020-03530-x
- Garić, D., Humbert, L., Fils-Aimé, N., Korah, J., Zarfabian, Y., Lebrun, J. J., et al. (2013). Development of Buffers for Fast Semidry Transfer of Proteins. *Anal. Biochem.* 441 (2), 182–184. doi:10.1016/j.ab.2013.07.009
- Garić, D., De Sanctis, J. B., Dumut, D. C., Shah, J., Peña, M. J., Youssef, M., et al. (2020a). Fenretinide Favorably Affects Mucins (MUC5AC/MUC5B) and Fatty

- Acid Imbalance in a Manner Mimicking CFTR-Induced Correction. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cel. Biol. Lipids* 1865 (2), 158538. doi:10.1016/j.bbali.2019.158538
- Gentzsch, M., Cholon, D. M., Quinney, N. L., Martino, M. E. B., Minges, J. T., Boyles, S. E., et al. (2021). Airway Epithelial Inflammation *In Vitro* Augments the Rescue of Mutant CFTR by Current CFTR Modulator Therapies. *Front. Pharmacol.* 12, 628722. doi:10.3389/fphar.2021.628722
- Gorrieri, G., Scudieri, P., Caci, E., Schiavon, M., Tomati, V., Sirci, F., et al. (2016). Goblet Cell Hyperplasia Requires High Bicarbonate Transport to Support Mucin Release. *Sci. Rep.* 6 (1), 36016. doi:10.1038/srep36016
- Guilbault, C., De Sanctis, J. B., Wojewodka, G., Saeed, Z., Lachance, C., Skinner, T. A., et al. (2008). Fenretinide Corrects Newly Found Ceramide Deficiency in Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Cel Mol Biol* 38 (1), 47–56. doi:10.1165/rcmb.2007-0036OC
- Guilbault, C., Saeed, Z., Downey, G. P., and Radzioch, D. (2007). Cystic Fibrosis Mouse Models. *Am. J. Respir. Cel Mol Biol* 36 (1), 1–7. doi:10.1165/rcmb.2006-0184TR
- Guilbault, C., Wojewodka, G., Saeed, Z., Hajdych, M., Matouk, E., De Sanctis, J. B., et al. (2009). Cystic Fibrosis Fatty Acid Imbalance Is Linked to Ceramide Deficiency and Corrected by Fenretinide. *Am. J. Respir. Cel Mol Biol* 41 (1), 100–106. doi:10.1165/rcmb.2008-0279OC
- Hahn, A., Burrell, A., Fanous, H., Chaney, H., Sami, I., Perez, G. F., et al. (2018). Antibiotic Multidrug Resistance in the Cystic Fibrosis Airway Microbiome Is Associated with Decreased Diversity. *Heliyon* 4 (9), e00795. doi:10.1016/j.heliyon.2018.e00795
- Hector, A., Griesse, M., and Hartl, D. (2014). Oxidative Stress in Cystic Fibrosis Lung Disease: an Early Event, but worth Targeting? *Eur. Respir. J.* 44 (1), 17–19. doi:10.1183/09031936.00038114
- Heijerman, H. G. M., McKone, E. F., Downey, D. G., Van Braeckel, E., Rowe, S. M., Tullis, E., et al. (2019). Efficacy and safety of the elxacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet* 394 (10212), 1940–1948. doi:10.1016/S0140-6736(19)32597-8
- Heltshe, S. L., Rowe, S. M., Skalland, M., Baines, A., and Jain, M. (2018). Ivacaftor-treated Patients with Cystic Fibrosis Derive Long-Term Benefit Despite No Short-Term Clinical Improvement. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 197 (11), 1483–1486. doi:10.1164/rccm.201710-2046LE
- Hoy, S. M. (2019). Elxacaftor/Ivacaftor/Tezacaftor: First Approval. *Drugs* 79 (18), 2001–2007. doi:10.1007/s40265-019-01233-7
- Hurt, K., and Bilton, D. (2014). Inhaled Interventions in Cystic Fibrosis: Mucoactive and Antibiotic Therapies. *Respiration* 88 (6), 441–448. doi:10.1159/000369533
- Kanagaratham, C., Kalivodová, A., Najdekr, L., Friedecký, D., Adam, T., Hajdych, M., et al. (2014). Fenretinide Prevents Inflammation and Airway Hyperresponsiveness in a Mouse Model of Allergic Asthma. *Am. J. Respir. Cel Mol Biol* 51 (6), 783–792. doi:10.1165/rcmb.2014-0121OC
- Kohli, P., and Levy, B. D. (2009). Resolvins and Protectins: Mediating Solutions to Inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 158 (4), 960–971. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00290.x
- Lachance, C., Wojewodka, G., Skinner, T. A., Guilbault, C., De Sanctis, J. B., and Radzioch, D. (2013). Fenretinide Corrects the Imbalance between omega-6 to omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Inhibits Macrophage Inflammatory Mediators via the ERK Pathway. *PLoS One* 8 (9), e74875. doi:10.1371/journal.pone.0074875
- Lands, B. (20152015). Omega-3 PUFAs Lower the Propensity for Arachidonic Acid Cascade Overreactions. *Biomed. Res. Int.* 2015, 285135. doi:10.1155/2015/285135
- Leclair, L. W., and Hogan, D. A. (2010). Mixed Bacterial-Fungal Infections in the CF Respiratory Tract. *Med. Mycol.* 48 Suppl 1 (Suppl. 1), S125–S132. doi:10.3109/13693786.2010.521522
- Liessi, N., Pesce, E., Braccia, C., Bertozzi, S. M., Giraudo, A., Bandiera, T., et al. (2020). Distinctive Lipid Signatures of Bronchial Epithelial Cells Associated with Cystic Fibrosis Drugs, Including Trikafta. *JCI insight* 5 (16), e138722. doi:10.1172/jci.insight.138722
- Lopes-Pacheco, M. (2019). CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Front. Pharmacol.* 10, 1662. doi:10.3389/fphar.2019.01662
- Lopes-Pacheco, M., Pedemonte, N., and Veit, G. (2021). Discovery of CFTR Modulators for the Treatment of Cystic Fibrosis. *Expert Opin. Drug Discov.* 16 (8), 897–913. doi:10.1080/17460441.2021.1912732
- Lykkesfeldt, J. (2007). Malondialdehyde as Biomarker of Oxidative Damage to Lipids Caused by Smoking. *Clin. Chim. Acta* 380 (1–2), 50–58. doi:10.1016/j.cca.2007.01.028
- Mall, M., Kreda, S. M., Mengos, A., Jensen, T. J., Hirtz, S., Seydewitz, H. H., et al. (2004). The ΔF508 Mutation Results in Loss of CFTR Function and Mature Protein in Native Human colon. *Gastroenterology* 126, 32–41. doi:10.1053/j.gastro.2003.10.049
- Middleton, P. G., Mall, M. A., Dřevínek, P., Lands, L. C., McKone, E. F., Polineni, D., et al. (2019). Elxacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N. Engl. J. Med.* 381 (19), 1809–1819. doi:10.1056/NEJMoa1908639
- Miele, L., Cordella-Miele, E., Xing, M., Frizzell, R., and Mukherjee, A. B. (1997). Cystic Fibrosis Gene Mutation (deltaF508) Is Associated with an Intrinsic Abnormality in Ca²⁺-Induced Arachidonic Acid Release by Epithelial Cells. *DNA Cel Biol* 16 (6), 749–759. doi:10.1089/dna.1997.16.749
- Montes de Oca, M., Loeb, E., Torres, S. H., De Sanctis, J., Hernández, N., and Tálamo, C. (2008). Peripheral Muscle Alterations in Non-COPD Smokers. *Chest* 133 (1), 13–18. doi:10.1378/chest.07-1592
- Naehrig, S., Chao, C. M., and Naehrlich, L. (2017). Cystic Fibrosis. *Dtsch Arztebl Int.* 114 (33–34), 564–574. doi:10.3238/arztebl.2017.0564
- Niehaus, W. G., Jr., and Samuelsson, B. (1968). Formation of Malonaldehyde from Phospholipid Arachidonate during Microsomal Lipid Peroxidation. *Eur. J. Biochem.* 6 (1), 126–130. doi:10.1111/j.1432-1033.1968.tb00428.x
- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1979). Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.* 95 (2), 351–358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3
- O’Riordan, C. R., Lachapelle, A. L., Marshall, J., Higgins, E. A., and Cheng, S. H. (2000). Characterization of the Oligosaccharide Structures Associated with the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Glycobiology* 10 (11), 1225–1233. doi:10.1093/glycob/10.11.1225
- Petrache, I., Kamocki, K., Poirier, C., Pewzner-Jung, Y., Laviad, E. L., Schweitzer, K. S., et al. (2013). Ceramide Synthases Expression and Role of Ceramide Synthase-2 in the Lung: Insight from Human Lung Cells and Mouse Models. *PLoS One* 8 (5), e62968. doi:10.1371/journal.pone.0062968
- Pinto, M. C., Quaresma, M. C., Silva, I. A. L., Railean, V., Ramalho, S. S., and Amaral, M. D. (2021). Synergy in Cystic Fibrosis Therapies: Targeting SLC26A9. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (23), 13064. doi:10.3390/ijms222313064
- Puchelle, E., Bajolet, O., and Abély, M. (2002). Airway Mucus in Cystic Fibrosis. *Paediatr. Respir. Rev.* 3 (2), 115–119. doi:10.1016/s1526-0550(02)00005-7
- Ratjen, F., Bell, S. C., Rowe, S. M., Goss, C. H., Quittner, A. L., and Bush, A. (2015). Cystic Fibrosis. *Nat. Rev. Dis. Primers* 1, 15010. doi:10.1038/nrdp.2015.10
- Ricciotti, E., and FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 31 (5), 986–1000. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207449
- Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B., Drumm, M. L., Melmer, G., Dean, M., et al. (1989). Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Chromosome Walking and Jumping. *Science* 245 (4922), 1059–1065. doi:10.1126/science.2772657
- Rottner, M., Freyssonnet, J. M., and Martínez, M. C. (2009). Mechanisms of the Noxious Inflammatory Cycle in Cystic Fibrosis. *Respir. Res.* 10 (1), 23. doi:10.1186/1465-9921-10-23
- Rowe, S. M., Miller, S., and Sorscher, E. J. (2005). Cystic Fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 352 (19), 1992–2001. doi:10.1056/NEJMra043184
- Serhan, C. N., Yacoubian, S., and Yang, R. (2008). Anti-inflammatory and Proresolving Lipid Mediators. *Annu. Rev. Pathol.* 3, 279–312. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151409
- Shteinberg, M., Haq, I. J., Polineni, D., and Davies, J. C. (2021). Cystic Fibrosis. *The Lancet* 397 (10290), 2195–2211. doi:10.1016/s0140-6736(20)32542-3
- Sinaasappel, M., Stern, M., Littlewood, J., Wolfe, S., Steinkamp, G., Heijerman, H. G., et al. (2002). Nutrition in Patients with Cystic Fibrosis: a European Consensus. *J. Cyst Fibros* 1 (2), 51–75. doi:10.1016/s1569-1993(02)00032-2
- Smith, S., and Edwards, C. T. (2017). Long-acting Inhaled Bronchodilators for Cystic Fibrosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 12 (12), Cd012102. doi:10.1002/14651858.CD012102.pub2

- Smith, S., Rowbotham, N., and Edwards, C. (2020). "Short-acting Inhaled Bronchodilators for Cystic Fibrosis," in *Cochrane Database of Systematic Reviews*. New York, NY: John Wiley & Sons Ltd.
- Strandvik, B., Gronowitz, E., Enlund, F., Martinsson, T., and Wahlström, J. (2001). Essential Fatty Acid Deficiency in Relation to Genotype in Patients with Cystic Fibrosis. *J. Pediatr.* 139 (5), 650–655. doi:10.1067/mpd.2001.118890
- Strandvik, B. (2010). Fatty Acid Metabolism in Cystic Fibrosis. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 83 (3), 121–129. doi:10.1016/j.plefa.2010.07.002
- Szczesniak, R., Heltshe, S. L., Stanojevic, S., and Mayer-Hamblett, N. (2017). Use of FEV1 in Cystic Fibrosis Epidemiologic Studies and Clinical Trials: A Statistical Perspective for the Clinical Researcher. *J. Cyst Fibros* 16 (3), 318–326. doi:10.1016/j.jcf.2017.01.002
- Veit, G., Avramescu, R. G., Chiang, A. N., Houck, S. A., Cai, Z., Peters, K. W., et al. (2016). From CFTR Biology toward Combinatorial Pharmacotherapy: Expanded Classification of Cystic Fibrosis Mutations. *Mol. Biol. Cell* 27 (3), 424–433. doi:10.1091/mbc.E14-04-0935
- Veltman, M., De Sanctis, J. B., Stolarczyk, M., Klymiuk, N., Bähr, A., Brouwer, R. W., et al. (2021). CFTR Correctors and Antioxidants Partially Normalize Lipid Imbalance but Not Abnormal Basal Inflammatory Cytokine Profile in CF Bronchial Epithelial Cells. *Front. Physiol.* 12 (24), 619442. doi:10.3389/fphys.2021.619442
- Vilela, R. M., Lands, L. C., Meehan, B., and Kubow, S. (2006). Inhibition of IL-8 Release from CFTR-Deficient Lung Epithelial Cells Following Pre-treatment with Fenretinide. *Int. Immunopharmacol* 6 (11), 1651–1664. doi:10.1016/j.intimp.2006.06.012
- Villella, V. R., Tosco, A., Esposito, S., Bona, G., Raia, V., and Maiuri, L. (2019). Mutation-specific Therapies and Drug Repositioning in Cystic Fibrosis. *Minerva Pediatr.* 71 (3), 287–296. doi:10.23736/S0026-4946.19.05506-3
- Weber, A. J., Soong, G., Bryan, R., Saba, S., and Prince, A. (2001). Activation of NF-kappaB in Airway Epithelial Cells Is Dependent on CFTR Trafficking and Cl-Channel Function. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol* 281 (1), L71–L78. doi:10.1152/ajplung.2001.281.1.L71
- Westhölter, D., Schumacher, F., Wülfinghoff, N., Sutharsan, S., Strassburg, S., Kleuser, B., et al. (2022). CFTR Modulator Therapy Alters Plasma Sphingolipid Profiles in People with Cystic Fibrosis. *J. Cystic Fibrosis* 18 (3), 37–46. doi:10.1016/j.jcf.2022.02.005
- Wilke, M., Buijs-Offerman, R. M., Aarbiou, J., Colledge, W. H., Sheppard, D. N., Touqui, L., et al. (2011). Mouse Models of Cystic Fibrosis: Phenotypic Analysis and Research Applications. *J. Cyst Fibros* 10 Suppl 2 (Suppl. 2), S152–S171. doi:10.1016/S1569-1993(11)60020-9
- Yadav, K., Singh, M., Angurana, S. K., Attri, S. V., Sharma, G., Tajeja, M., et al. (2014). Evaluation of Micronutrient Profile of North Indian Children with Cystic Fibrosis: a Case-Control Study. *Pediatr. Res.* 75 (6), 762–766. doi:10.1038/pr.2014.30
- Ye, Y. Z., Strong, M., Huang, Z. Q., and Beckman, J. S. (1996). Antibodies that Recognize Nitrotyrosine. *Methods Enzymol.* 269, 201–209. doi:10.1016/s0076-6879(96)69022-3
- Youssef, M., De Sanctis, J. B., Shah, J., Dumut, D. C., Hajdich, M., Petrof, B. J., et al. (2020). Age-Dependent Progression in Lung Pathophysiology Can Be Prevented by Restoring Fatty Acid and Ceramide Imbalance in Cystic Fibrosis. *Lung* 198 (3), 459–469. doi:10.1007/s00408-020-00353-2
- Zaher, A., ElSaygh, J., ElSori, D., ElSaygh, H., and Sanni, A. (2021). A Review of Trikafta: Triple Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Modulator Therapy. *Cureus* 13 (7), e16144. doi:10.7759/cureus.16144
- Zemanick, E. T., Taylor-Cousar, J. L., Davies, J., Gibson, R. L., Mall, M. A., McKone, E. F., et al. (2021). A Phase 3 Open-Label Study of Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor in Children 6 through 11 Years of Age with Cystic Fibrosis and at Least One F508del Allele. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 203 (12), 1522–1532. doi:10.1164/rccm.202102-0509OC

Disclosures: Drs Radu Pislariu and Irenej Kianicka are employees of Laurent Pharmaceuticals, and they were consulted about the study design and helped with finding adequate concentrations of each of the Triple treatment components but did not participate in data acquisition or data analysis. Laurent Pharmaceuticals provided the clinical capsules of LAU-7b for the animal studies. The capsules were first approved in 2015 and in 2020 were approved by the FDA and Health Canada for the treatment of PwCF (Clinical Trial Phase 1b, Clinical Trial Phase 2; both successfully completed prior to submission of this manuscript).

Conflict of Interest: The corresponding author, DR, Principal Investigator at the Research Institute of the McGill University Health Centre and Professor at McGill University, is a minority shareholder of Laurent Pharmaceuticals Inc. RP and IK from Laurent Pharmaceuticals had significant intellectual contribution to the conceptual design of the studies, however the funding for the studies was reviewed independently and primarily sponsored by the funding from the Quebec Ministry of Economy and Innovation and funding from peer reviewed grants to DR, BP, JDS and MH. The oral formulation of fenretinide (LAU-7b) used in the *in vivo* studies was generously provided free of charge by Laurent Pharmaceuticals.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Centorame, Dumut, Youssef, Ondra, Kianicka, Shah, Paun, Ozdian, Hanrahan, Gusev, Petrof, Hajdich, Pislariu, De Sanctis and Radzioch. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.