

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Bc. ANDREA ÁČOVÁ

**Studium potenciálních anti-adherenčních sloučenin na buněčném modelu
plic jako prostředku profylaxe bakteriálních infekcí u cystické fibrózy**

**Study of potential anti-adherence compounds in a lung cell model as a
means for the prophylaxis of bacterial infections in cystic fibrosis**

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením pana prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité informační prameny jsem uvedla v seznamu použité literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis

Poděkování

Mé obrovské děkuji patří zejména panu prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc., který vyniká svou ochotou a nesmírně trpělivým přístupem. Bylo mi velkou ctí pracovat pod Vaším odborným vedením plným dobře míněných rad a návrhů, které posouvaly tuto práci dál.

Opomenout nemůžu ani naši paní laborantku, Annu Ammerovou, která vždy dělala maximum pro zabezpečení co možná nejlepších pracovních podmínek a příjemného laboratorního prostředí. Mojí skvělé kolegyni Mgr. Michaele Kurucové děkuji za spolupráci a oporu po celou dobu studia.

A v neposlední řadě děkuji mojí rodině, zejména mým úžasným rodičům a příteli, kteří mi zabezpečili pevné zázemí plné lásky a neutichající podpory i v nejtěžších časech.

Abstrakt

Cystická fibróza (CF) je zákeřné genetické onemocnění s autosomálně-recesivní dědičností. Narušená funkce CFTR proteinu zapříčiněná mutací ve stejnojmenném genu způsobuje celou řadu symptomů, z níž nejzávažnější je ovlivnění respirační soustavy. Hlavním důvodem je výskyt hustého hlenu, který se podílí na kumulaci bakteriálních buněk v plicích pacienta. Mezi životohrožující patogeny patří bakterie *Burkholderia cenocepacia* (BC) a *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Tyto bakterie produkují množství virulentních faktorů, jako jsou např. lektiny BC2L-A či BC2L-C u BC a PA-IIL u PA. Díky nim se bakterie prostřednictvím protein-sacharidových interakcí váží na plicní buňky s pozměněnou glykosylací, která se vyskytuje u nemocného jedince s CF.

V této práci byla předmětem studia právě tato lektinová interakce a inhibiční vliv slepičích protilátek IgY nebo trivalentních fukosylovaných glykoklastrů na adhezenci BC (kmen ST-32, CCM 7291) / PA (kmen PAK, ST 1763) na buňky epitelu plic linie CuFi-1 (od nemocného jedince s CF) / NuLi-1 (od zdravého dárce). Bylo proto studováno možné ovlivnění viability buněk PA (kmene PA-lux) glykoklastry, které neukázalo žádný signifikantní efekt. Pro ověření exprese lektinu BC2L-C bylo nutné připravit protilátky. Slepičí protilátky proti N-terminální doméně lektinu BC2L-C na „Western Blotu“ prokázaly expresi celého lektinu BC2L-C. Naopak lektin BC2L-A nebyl v BC kulturách imunochemicky detekován. Před samotnými adhezenčními testy vyhodnocujícími rozsah vazby bakterií na buňky epitelu plic byla úspěšně optimalizovaná metodika fluorescenčního značení bakteriálních buněk sloučeninou PKH26. Následné adhezenční testy prokázaly výrazné snížení adherence bakteriálních buněk (BC nebo PA) na buňky epitelu plic (CuFi-1 či NuLi-1) způsobené protektivní schopností protilátek proti lektinu BC2L-C či trivalentních fukosylovaných glykoklastrů (A/B/C).

Je tedy zřejmé, že jak specifické slepičí protilátky, tak fukosylované glykokonjugáty mají terapeutický potenciál jako profylaktické přípravky proti bakteriálním infekcím u CF pacientů.

Klíčová slova: cystická fibróza, buňky plicního epitelu, *Burkholderia cenocepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, lektiny, slepičí protilátky, glykoklastry, studium adherence

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is an insidious genetic disease with autosomal-recessive inheritance. The impaired function of the CFTR protein, caused by a mutation in the eponymous gene, results in a wide range of symptoms, the most serious being the effect on the respiratory system. The main impact on the respiratory system is the appearance of thick mucus, which contributes to the accumulation of bacterial cells in the patient's lungs. Life-threatening pathogens include *Burkholderia cenocepacia* (BC) and *Pseudomonas aeruginosa* (PA). These bacteria produce several virulence factors such as BC2L-A or BC2L-C lectins in BC and PA-IIL in PA. The virulence factors allow bacteria to bind via protein-saccharide interactions to lung cells with altered glycosylation, which is seen in the CF patient.

This diploma thesis focuses on the above-mentioned lectin interaction and the inhibitory effect of hen IgY antibodies or trivalent fucosylated glycoclusters on the adherence of BC (strain ST-32, CCM 7291) / PA (strain PAK, ST 1763) to lung epithelial cells of the CuFi-1 (from a CF patient) / NuLi-1 (from a healthy donor). The possible influence of glycoclusters on PA (PA-lux strain) cell viability was studied, but no significant effect was observed. To verify the expression of the BC2L-C lectin, it was necessary to prepare antibodies. The expression of the entire BC2L-C lectin was proved using hen antibodies against the N-terminal domain of BC2L-C lectin on “Western Blot”. On the contrary, BC2L-A lectin in BC cultures using immunochemical methods was not observed. The methodology of fluorescent labeling of bacterial cells with the compound PKH26 was successfully optimized beforehand the adherence assays evaluating the extent of bacterial binding to lung epithelial cells. The adherence assays demonstrated a significant reduction in the adherence of bacterial cells (BC or PA) to lung epithelial cells (CuFi-1 or NuLi-1) caused by the protective ability of antibodies against the BC2L-C lectin or trivalent fucosylated glycoclusters (A/B/C).

The thesis proves that both hen-specific antibodies and fucosylated glycoconjugates have therapeutic potential as prophylactic agents against bacterial infections in CF patients.

Keywords: cystic fibrosis, lung epithelial cells, *Burkholderia cenocepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, lectins, hen antibodies, glycoclusters, study of adherence

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD	10
1.1 CYSTICKÁ FIBRÓZA	10
1.1.1 <i>Patogenese plic</i>	14
1.1.2 <i>Symptomy a diagnostika onemocnění</i>	18
1.1.3 <i>Imunitní systém a léčba cystické fibrózy</i>	22
1.2 BAKTERIÁLNÍ DRUHY <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> A <i>BURKHOLDERIA CENOCEPACIA</i>	31
1.2.1 <i>Bakteriální lektiny</i>	33
2 CÍL PRÁCE	36
3 MATERIÁL A METODY	37
3.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A MATERIÁL	37
3.1.1 <i>Přístroje</i>	37
3.1.2 <i>Materiál</i>	39
3.2 PRÁCE S TKÁŇOVÝMI KULTURAMI	42
3.2.1 <i>Příprava kultivačního povrchu</i>	42
3.2.2 <i>Rozmrazení buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1</i>	43
3.2.3 <i>Kultivace buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1</i>	44
3.2.4 <i>Subkultivace buněk CuFi-1 a NuLi-1</i>	44
3.2.5 <i>Stanovení počtu a viability buněk</i>	45
3.2.6 <i>Zamrazení buněčných linií</i>	46
3.3 PRÁCE S BAKTERIÁLNÍMI BUŇKAMI	47
3.3.1 <i>Kultivace bakteriálních buněk</i>	47
3.3.2 <i>Fotometrická kvantifikace bakterií</i>	47
3.3.3 <i>Zamrazení bakteriálních buněk</i>	48
3.3.4 <i>Růstová křivka Burkholderia cenocepacia</i>	48
3.4 TESTOVÁNÍ VIABILITY BAKTERIÁLNÍCH BUŇEK	48
3.5 PŘÍPRAVA SLEPIČÍCH PROTLÁTEK	50
3.5.1 <i>Izolace protilátek ze žloutků slepičích vajec</i>	51
3.6 OVĚŘENÍ SPECIFITY PROTLÁTEK METODOU ELISA	52
3.7 ELEKTROFORÉZA A „WESTERN BLOT“ NÁSLEDOVANÝ IMUNODETEKČÍ	54
3.7.1 <i>Příprava vzorků</i>	54
3.7.2 <i>Elektroforéza</i>	56
3.7.3 <i>„Western Blot“ následovaný imunodetekcí</i>	57
3.8 FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ BUŇEK	59
3.8.1 <i>Značení eukaryotních buněk barvivem PKH67</i>	60
3.8.2 <i>Značení bakteriálních buněk barvivem PKH26</i>	61

3.9	ADHERENČNÍ TESTY	64
4	VÝSLEDKY.....	69
4.1	TESTOVÁNÍ VIABILITY BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK.....	69
4.2	PŘÍPRAVA SLEPIČÍCH PROTILÁTEK PROTI BC2L-C	73
4.3	STANOVENÍ REAKTIVITY SLEPIČÍCH PROTILÁTEK METODOU ELISA.....	75
4.4	RŮSTOVÁ KŘIVKA <i>BURKHOLDERIA CENOCEPACIA</i>	77
4.5	DETEKCE LEKTINŮ BC2L-C A BC2L-A METODOU „WESTERN BLOT“ S IMUNODETEKČÍ	78
4.6	OPTIMALIZACE ZNAČENÍ BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK FLUORESCENČNÍM BARVIVEM PKH26	80
4.6.1	<i>Kalibrační závislost fluorescence bakteriálních buněk značených barvivem PKH26.....</i>	<i>82</i>
4.7	ADHERENČNÍ TESTY	86
5	DISKUZE.....	96
6	SOUHRN.....	103
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	104

Seznam zkratek

$\times g$	násobek gravitačního zrychlení
A_{280}	absorbance při vlnové délce 280 nm
A_{405}	absorbance při vlnové délce 405 nm
ABC	ATP vázající; „ATP-binding cassette“
APS	peroxodisíran amonný; „ammonium persulfate“
BC	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BC2L-A	lektin A bakterie BC
BC2L-B	lektin B bakterie BC
BC2L-C	lektin C bakterie BC
BC2L-C- ct	C-terminální D-mannosa-specifická doména lektinu BC2L-C
BC2L-C- nt	N-terminální L-fukosa-specifická doména lektinu BC2L-C
BC2L-D	lektin D bakterie BC
Bcc	<i>Burkholderia cepacia</i> komplex; „ <i>Burkholderia cepacia</i> complex“
BCIP	5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát
c	koncentrace; „concentration“
Ca^{2+}	vápenaté ionty
CaCCs	chloridové kanály aktivované vápníkem; „calcium-activated chloride channels“
CF	cystická fibróza
CFRD	cukrovka vázaná na CF; „CF related diabetes“
CFTR	regulátor transmembránové vodivosti cystické fibrózy; „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
C_L	konstantní oblast lehkého řetězce imunoglobulinu
Cl^-	chloridové ionty
diH_2O	deionizovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	imunostanovení na pevné fázi s enzymovou aktivitou; „enzyme linked immunosorbent assay“
ENaC	epiteliální sodný kanál; „epithelial sodium channel“
FBS	fetální hovězí sérum; „fetal bovine serum“
HCO_3^-	hydrogenuhličitanové ionty

HEPES	<i>N</i> '-2-hydroxyethylpiperazin- <i>N</i> '-2-ethansulfonová kyselina
hTERT	reverzní transkriptasa lidské telomerasy; „human telomerase reverse transcriptase“
C _H	konstantní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu
LB	Luria-Bertani médium
mRNA	„messenger“ ribonukleové kyseliny; „messenger ribonucleic acid“
Na ⁺	sodné ionty
NaN ₃	azid sodný
NBT	nitrotetrazoliová sůl
NK buňky	přirozeně zabíječské buňky; „natural killer cells“
NVD	doména vázající nukleotid; „nucleotide-binding domain“
OD ₆₀₀	optická denzita při vlnové délce 600 nm
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-III	lektin II bakterie PA
PA-IL	lektin I bakterie PA
PA-lux	luminiscenční kmen bakterie PA
PAK	kontrolní kmen bakterie PA
PBS	fyzilogický roztok chloridu sodného pufrovaný fosfátem; „phosphate buffered saline“
R	regulační doména
RPM	počet otáček za minutu; „revolutions per minute“
SDS	dodecylsírán sodný
ST-32	referenční kmen bakterie BC
TBS	roztok soli pufrovaný Tris; „Tris buffered saline“
TEMED	tetramethylethylendiamin
TMD	transmembránová doména; „trans-membrane domain“
Tris	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
V	volt (jednotka napětí)
V _H	variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu
V _L	variabilní oblast lehkého řetězce imunoglobulinu

1 Úvod

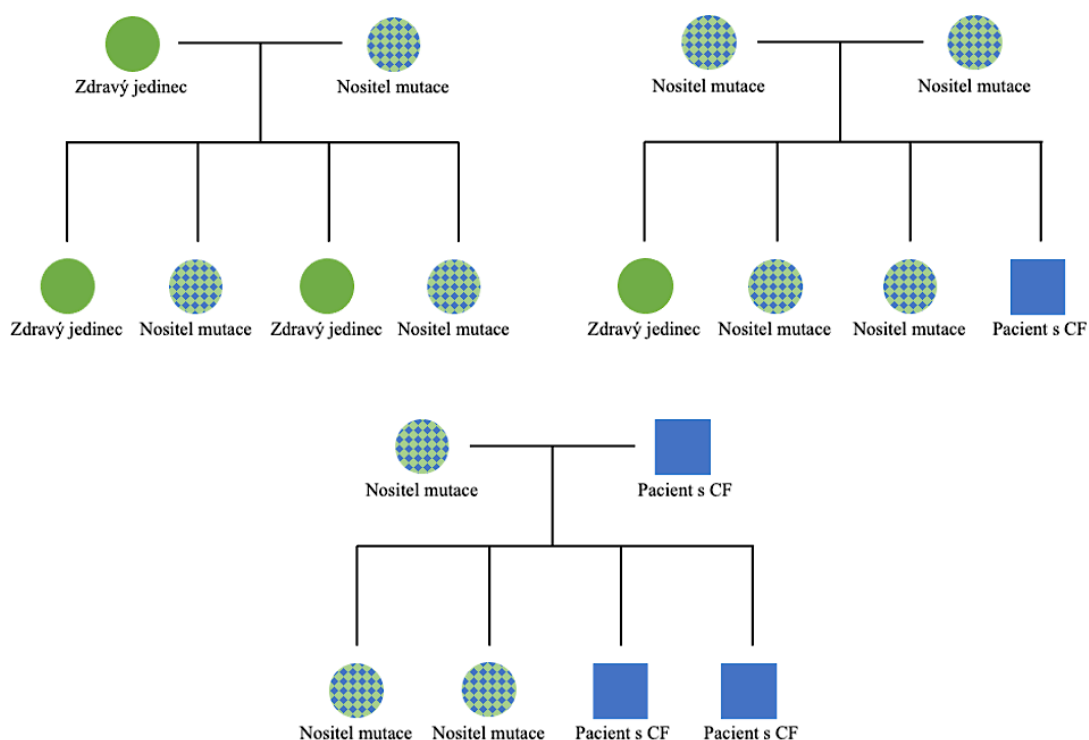
1.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) jakožto autosomálně-recesivní onemocnění byla popsána doktorkou Dorothy Hansine Andersen již v roce 1938¹. O 20 let později představili Gibson a Cooke potní test využitelný pro odhalení tohoto onemocnění, avšak navzdory narůstajícího množství informací ohledně CF byla její příčina, mutace v genu pro CFTR (z angl. „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) protein, odhalena týmem vedeným genetičkami Batsheva Kerem a Johanna Rommens až v roce 1989²⁻⁴.

Od roku 1966 vznikly po celém světě registry CF zaznamenávající velké množství údajů o nemocných s CF, které následně slouží jak pro vědecké, tak i pro lékařské účely⁵. Český registr pacientů s CF (RECYF) k 1.5.2024 eviduje celkem 709 pacientů, z toho 369 žen a 340 mužů, zatímco k 31.12.2021 byl celkový počet pacientů 679, žen 353 a mužů 326. Tento nárůst je v souladu s celosvětovým trendem, podle kterého každoročně roste počet pacientů s CF. Důvodem tohoto nárůstu je pravděpodobně postupné zvyšování kvality léčby CF, v důsledku čehož se zvyšuje medián věku dožití^{6,7}. Data ukazují, že aktuálně má na světě CF diagnostikovanou přibližně 100 000 lidí. Odhaduje se ale, že počet těchto pacientů celosvětově převyšuje 160 000⁸.

Jak již bylo zmíněno, jedná se o onemocnění s autosomálně-recesivní dědičností *CFTR* genu. Aplikací Mendelova štěpného poměru na tuto nemoc může nastat několik situací (viz obr. 1, str. 11):

- *Jeden rodič je zdravý a bez mutace v CFTR genu, druhý rodič je zdravý nositel mutace: potomek bude buď zdravý jedinec bez mutace anebo její zdravý nositel*
- *Oba rodiče jsou nositelé mutace CFTR genu: existuje 25% šance, že potomek bude zdravý, 25% šance výskytu CF a až 50% šance, že dítě bude zdravým nositelem mutace*
- *Jeden rodič je zdravý nositel mutace CFTR genu a druhý rodič je pacient s CF: potomek bude buď zdravý nositel mutace anebo u něj dojde k projevu onemocnění*

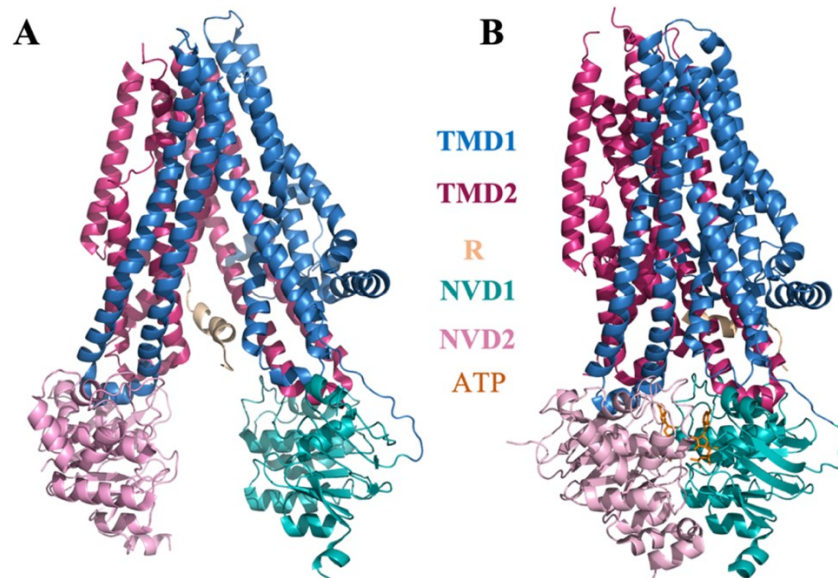


Obr. 1: Autosomálně-recesivní dědičnost *CFTR* genu. Podle Mendelova štěpného poměru mohou u autosomálně-recesivní dědičnosti nastat různé situace. Potomek může být zdravý, nemocný anebo může ve svých genech nosit mutaci pro CFTR protein. Kromě situací na obrázku může nastat i velice vzácný jev, kdy budou oba rodiče pacienti s CF a nemoc se v tomto případě projeví i u potomka.

Gen pro CFTR protein je delší než 230 kb a lze ho nalézt na dlouhém raménku chromosomu 7, v oblasti označované 7q31.2. Exprimuje se z něj glykoprotein CFTR obsahující 1 480 aminokyselin. Ten plní v organismu značné množství úloh. Po úplné glykosylaci exprimovaného proteinu je přenesený na apikální membránu epitelálních buněk různých orgánů. Jak bylo v roce 1989 zjištěno strukturální analýzou *CFTR* genu, jedná se primárně o chloridový kanál, ale nelze opomenout ani jeho další funkce (diskutovány blíže v kapitole 1.1.1, str. 14), neboť vysvětlují jeho značnou komplexnost u CF^{4,9}.

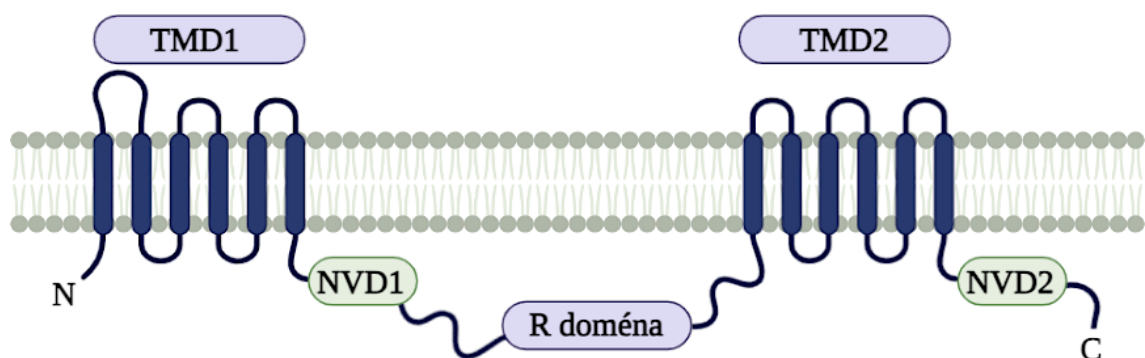
Protein CFTR patří do superrodiny ABC transportérů (z angl. „ATP-binding cassette“, ATP vázající) se skládá z několika domén (viz struktura A (PDB ID: 8FZQ) znázorněná na obr. 2, str. 12). Cytosolická regulační (R) doména spojuje dva komplexy. Oba tyto komplexy sestávají z transmembránové domény (TMD) a domény vázající nukleotid (NVD). Po proteinkinasou A katalyzované fosforylaci R domény a navázání ATP na obě NVD dochází k přiblížení obou komplexů tvořících protein a dimerizaci

NVD1 s NVD2 (fosforylovaný CFTR protein (PDB ID: 6MSM) je znázorněn jako struktura B na obr. 2, str. 12). Tento proces tak reguluje otevírání kanálu vzniklého ze šesti transmembránových segmentů každé TMD¹⁰. Schématické znázornění CFTR proteinu v membráně lze vidět na obr. 3 (str. 12).



Obr. 2: Struktura defosforylovaného a fosforylovaného CFTR proteinu. **A** – defosforylovaný protein CFTR složený ze dvou komplexů spojených R doménou, přičemž oba komplexy sestávají z TMD a NVD (PDB ID: 8FZQ). **B** – protein CFTR měnící konformaci po fosforylaci, čímž je regulováno otevírání iontového kanálu (PDB ID: 6MSM). Obrázky byly vytvořeny pomocí „softwaru“ PyMOL^{10–12}.

Extracelulární prostor

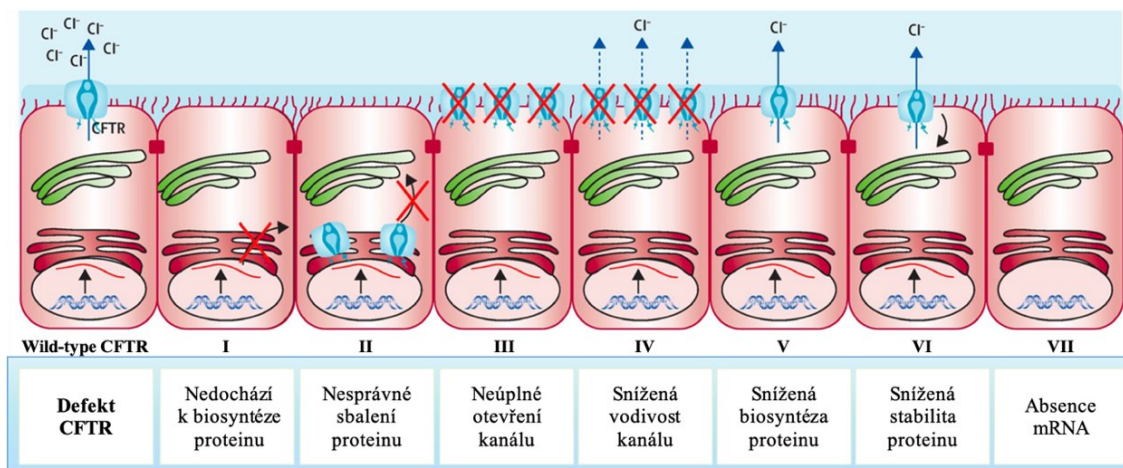


Intracelulární prostor

Obr. 3: Schéma proteinu CFTR v membráně. Oba komplexy CFTR proteinu jsou propojené R doménou a skládají se ze šesti transmembránových segmentů tvořících TMD a z NVD. Obrázek byl inspirován autoři Farinha a Canato a byl vytvořen pomocí „softwaru“ BioRender^{13,14}.

V průběhu téměř 35 let od objevení *CFTR* genu a jeho celosvětově nejčastější mutace, F508del, při které dochází k delecí 3 párů bází kódujících fenylalanin v pozici 508, bylo identifikováno více než 2 500 variant *CFTR* genu. Pravděpodobně více než 1 700 variant z celkového počtu těchto mutací může způsobovat projevy CF. Pacient s CF může mít i několik různých mutací genu pro CFTR protein najednou, avšak více než 70 % nemocných nese alespoň jednu mutaci F508del^{15,16}. Obecně lze rozdělit mutace genu pro CFTR protein do sedmi tříd (obr. 4, str. 14)¹⁷:

- **Třída I:** předčasný STOP kodon nebo posunutý čtecí rámec má za následek nedostatečnou translaci do CFTR proteinu, a tedy nedochází k jeho biosyntéze
- **Třída II:** nesprávně sbalený protein s abnormální posttranslační glykosylací, který důsledkem mutací podléhá degradaci v endoplazmatickém retikulu a na apikální membráně buňky je ho pak nedostatečné množství
- **Třída III:** kvůli slabé vazbě ATP na NVD nedochází ke změně konformace proteinu, jak bylo uvedeno dříve, takže je narušené otevírání kanálu, a ačkoli je množství CFTR proteinu na apikální membráně dostatečné, tak neplní svou hlavní funkci (funkci chloridového kanálu)
- **Třída IV:** podobně jako u předchozí skupiny, i v tomto případě se protein nachází na membráně buňky, ale dochází ke snížení iontové vodivosti otevřeného kanálu
- **Třída V:** následkem této třídy mutací je snížená syntéza proteinu CFTR a jeho redukované množství na povrchu buňky, díky čemuž proudí do extracelulárního prostředí menší množství chloridových iontů (Cl^-)
- **Třída VI:** snížená stabilita tohoto Cl^- kanálu způsobuje jeho degradaci v lyzosomech
- **Třída VII:** tato skupina mutací (např. rozsáhlé mutace v genu nebo značný posun čtecího rámce) způsobuje úplnou absenci „messenger“ ribonukleové kyseliny (mRNA, z angl. „messenger ribonucleic acid“) pro CFTR a na rozdíl od předchozích tříd mutací u ní nelze aplikovat farmakologickou léčbu pomocí modulátorů



Obr. 4: Třídy mutací *CFTR* genu. Jednotlivé mutace *CFTR* genu se rozdělují do sedmi tříd. Obrázek byl převzat a upraven¹⁷.

1.1.1 Patogenese plic

Patologické změny v respirační soustavě byly studovány na prasečím modelu CF. Získaná data ukazují, že abnormální dýchací cesty, povrchová plicní kapalina (ASL, z angl. „airway surface liquid“) o nižším pH a s ní související patofyziologické jevy a procesy by se mohly vyskytovat u pacientů s CF již při narození. Za zmínku stojí především zvýšené množství mucinů, problematické odlučování hlenu ze submukózních žláz nebo také narušená antimikrobiální ochrana, která má za následek také rozpad buněk, při kterém dochází k uvolňování DNA z důvodu nahromadění fagocytujících buněk. Následkem pak mohou být infekce a záněty vedoucí většinou až k poškození plic, k nimž obvykle dochází už v předškolním věku^{18–21}. Buňky plic jsou poškozovány zejména proteasami a růstovými faktory uvolňovanými ve velkém množství zánětlivými buňkami²².

Meziřasinková kapalina (PCL, z angl. „periciliary liquid“), první vrstva ASL, pokrývá přímo plicní epitel a sestává z vody, solí, lipidů, bílkovin a hlenu²³. Objem i složení této vrstvy musí být konstantní, aby byla zachována její optimální síla 6 μm až 8 μm , což se shoduje s délkou řasinek, které se dokážou pohybovat v řídkém prostředí PCL. Hlenová vrstva (ML, z angl. „mucus layer“) nacházející se nad PCL je hustější a silnější, její výška je obvykle v rozmezí 10–30 μm , ale může dosáhnout až 50 μm . Její hlavní složku tvoří kromě vody také vysoce glykosylované sekretované muciny (jsou to především produkty genů *MUC5AC* a *MUC5B*), ale nachází se tam i soli, lipidy,

proteiny, DNA a různé buněčné struktury^{24,25}. Na rozdíl od PCL má však proměnlivý objem a složení. Důvodem pro to je funkce, kterou tato vrstva plní. Dokáže zadržovat různé množství kapaliny, díky čemuž udržuje konstantní výšku PCL. Společně se tyto dvě vrstvy ASL podílejí na zachycování a odstraňování patogenů z plic procesem zvaným mukociliární „clearance“²⁶.

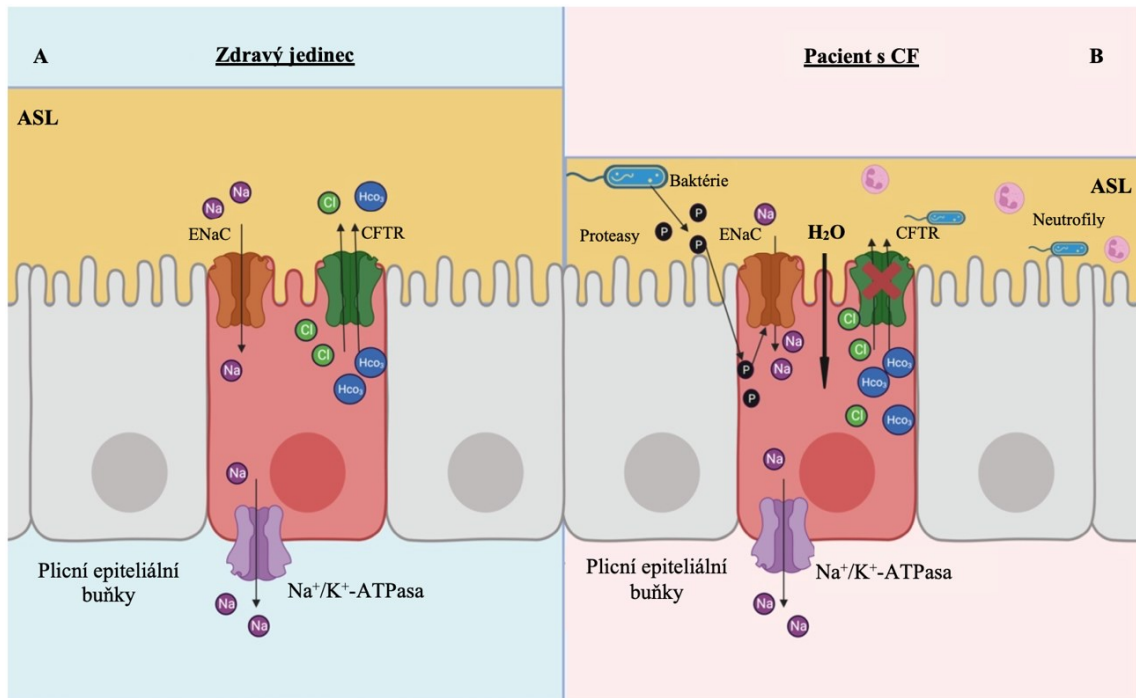
U zdravých osob dochází ke správné funkci mukociliární „clearance“ díky transepiteliální elektroosmotické síle poháněné transportem iontů přes iontové kanály jako je především CFTR, epiteliální sodný kanál (ENaC, z angl. „epithelial sodium channel“) a vápníkem-aktivované chloridové kanály označované jako CaCCs (z angl. „calcium-activated chloride channels“). Všechny vyjmenované kanály se nachází na apikální straně membrány epiteliálních buněk respirační soustavy²⁷. Díky těmto kanálům dochází k transportu Cl^- , hydrogenuhličitanových (HCO_3^-) i sodných (Na^+) iontů. Kanál CFTR transportuje primárně Cl^- , ale je částečně propustný i pro HCO_3^- . Směrem ven z buňky, do ASL, jsou tedy transportovány Cl^- a HCO_3^- . Naopak, přes ENaC proudí z ASL do epiteliálních buněk dýchací soustavy Na^+ a pro zachování elektroosmotické rovnováhy jsou tyto ionty dále transportovány ven z buněk proteinovým kanálem nazývaným Na^+/K^+ -ATPasa²⁸.

Protein ENaC jakožto amilorid-senzitivní, napětím neřízený kanál je složený ze tří podjednotek (α , β a γ)²⁹. Jak již bylo zmíněno, jeho hlavní úlohou je transport Na^+ a tím udržování jejich homeostázy. Nesprávná funkce tohoto proteinu může mít vliv na velké množství fyziologicky relevantních změn. Pro tuto závěrečnou práci je nejdůležitější spojitost ENaC s pneumonií a dalšími poruchami dýchací soustavy³⁰.

U pacientů s CF dochází k narušení mukociliární „clearance“ mechanismem zahrnujícím všechny dříve zmiňované kanály (viz obr. 5, str. 17). Nesprávně nebo v nedostatečné míře fungující CFTR kanál má vliv i na ENaC a CaCCs³¹. Při poruše CFTR proteinu je v buňce zadržováno větší množství Cl^- i HCO_3^- , které nemohou být sekretovány. Z důvodu zachování elektroneutrálního prostředí to vede ke zvýšení aktivity ENaC a tím i k influxu většího počtu Na^+ do buňky²⁸. Následkem tohoto procesu je osmotická změna prostředí uvnitř epiteliální buňky. Aby došlo ke kompenzaci této změny, začne dovnitř buňky procházet voda z PCL. Jelikož musí zůstat zachovaný objem PCL, do této vrstvy pak prochází voda z ML. Konečným důsledkem je vyčerpání vody z ASL a celkové snížení její výšky. Dochází tak k významnému zvýšení viskozity prostředí a v tomto hustém hleně se řasinky nejsou

schopny pohybovat³². Při omezeném či znemožněném pohybu řasinek není pacient schopný vykašlat hustý hlen, který se mu tak hromadí v plicích a vytváří vhodné prostředí pro zadržování nečistot a patogenních mikroorganismů. Oportunní mikroorganismy jsou schopny množit se i v prostředí bez přístupu vzduchu a vyhovuje jim proto i toto husté prostředí hlenu³³. Větší množství bakteriálních buněk vede také k uvolnění proteas aktivujících ENaC³⁴. Hyperfunkce ENaC vede kromě jiného k ovlivnění signálních drah spojených se zánětem. Dochází k aktivaci imunitních buněk, zvýšené expresi zánětlivých cytokinů a následně k zánětu³⁵. Opakované záněty způsobují poškození dýchací soustavy, což u těchto pacientů může vést až k potřebě transplantace plic³⁶.

Buňky respiračního traktu jsou poškozovány také v důsledku oxidativního stresu, který je projevem nadměrné hladiny reaktivních forem kyslíku. U zdravého člověka je udržován správný poměr mezi těmito reaktivními formami kyslíku a antioxidanty jako je glutathion a thiokyanátový aniont. U nemocného jedince s CF však dochází vlivem narušené funkce CFTR kanálu k poklesu koncentrace daných antioxidantů přítomných v ASL, jelikož právě CFTR protein se podílí na jejich transportu. Další problém tkví ve zvyšujícím se množství reaktivních forem kyslíku, které je důsledkem vysokého počtu zánětlivých buněk, jež je tvoří³⁷.



Obr. 5: Mukociliární „clearance“ u zdravých jedinců (A) a nemocných s CF (B). Za fyziologických podmínek dochází prostřednictvím CFTR a CaCCs k přenosu Cl^- a HCO_3^- z buňky do prostředí ASL a transportu Na^+ z ASL do buňky prostřednictvím ENaC. Tyto Na^+ jsou pak dále transportovány přes Na^+/K^+ -ATPasu. U pacientů s CF vede porucha CFTR k zadržování většího množství Cl^- a HCO_3^- uvnitř buňky a kvůli zachování elektroneutraroty prostředí se zvyšuje aktivita ENaC, a tedy influx Na^+ do buňky. K hyperfunkci ENaC vedou také proteasy uvolňované bakteriálními buňkami. Následkem narušené osmolarity uvnitř buňky je odčerpávání vody z ASL, jejíž vrstva se tak neustále ztenčuje a řasinky nejsou schopny se dostatečně pohybovat v hustém prostředí hlenu, což způsobuje oslabení mukociliární „clearance“ a hromadění nečistot a patogenů v plicích. Obrázek byl převzat a upraven²⁸.

Jak již bylo zmíněno, snížená mukociliární „clearance“ související také s nízkým pH ASL vede k hromadění patogenů v plicích nemocných osob a následnému zánětu. Ukazuje se, že na snížené pH ASL má vliv nejen CFTR, ale mimo jiné i transport HCO_3^- . Zvýšením pH bylo dosaženo zlepšení antimikrobiální ochrany a tím přežití menšího množství bakteriálních buněk při porovnání s počtem patogenů přežívajících v ASL při původním nízkém pH³⁸.

Složení mikrobiomu plic je závislé na věku pacienta trpícího CF. U dětí lze pozorovat větší různorodost než u dospělých pacientů. Obecně je však možné říct, že dominantním patogenem u dětí je *Staphylococcus aureus* spolu s *Haemophilus influenzae* a s narůstajícím věkem se do popředí dostává bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Méně často se u nemocných jedinců vyskytuje i *Burkholderia cepacia* komplex (Bcc).

Vzhledem k četnosti výskytu PA a závažnosti onemocnění u pacientů kolonizovaných bakteriemi Bcc se tato diplomová práce zaměřuje právě na uvedené bakteriální druhy³⁹.

Dalším potenciálním vysvětlením nadměrného osídlení respirační soustavy pacientů s CF těmito mikroby je zvýšená adherence k mucinům s glykosylací odlišnou od té nacházející se u zdravých jedinců. Již zmiňované muciny jsou glykoproteinové komplexy o enormní velikosti složené z mnoha monomerů vzájemně spojených pomocí disulfidických vazeb. Obě skupiny mucinů, sekretované muciny (jako MUC5AC nebo MUC5B) i membránově-vázané muciny (zejména MUC1, MUC4 a MUC16), jsou vylučovány pohárkovými buňkami anebo podslizničními žlázami. V obou případech se jedná o dlouhé řetězce aminokyselin, z níž velkou část tvoří seriny a threoniny. Právě v oblastech s častým výskytem těchto dvou aminokyselin jsou *O*-glykosidickou vazbou připojeny glykany obsahující fukosu, galaktosu nebo *N*-acetylglukosamin, a to obvykle vazbou přes *N*-acetyl-*D*-galaktosamin. Tyto glykany bývají dále zakončeny sialylací nebo sulfatací⁴⁰. Za patofyziologických podmínek CF však dochází k poklesu glykosylace mucinů tvořících hlen, jež je oproti hlenu zdravého člověka nejen mnohem viskóznější, ale obsahuje také vyšší množství lipidů a proteinů. Je nutný zmínit, že se odlišuje také glykosylace sekretovaných mucinů a na membránu vázaných mucinů. U sekretovaných mucinů sledujeme vyšší sialylaci a nižší fukosylaci, zatímco u druhého typu mucinů je tento trend opačný, a zřejmě právě tato snížená sialylace a zvýšená fukosylace je důvodem zvýšené adherence mikrobiálních buněk⁴¹. Rozdíly lze pozorovat také u glykolipidů, u kterých dochází ke snížení fukosylace a snížení sialylace⁴².

1.1.2 Symptomy a diagnostika onemocnění

Multifaktoriální onemocnění CF se u pacientů s narušenou funkcí CFTR proteinu může projevit mnoha způsoby v různé míře a fázi života, a je proto klíčové diagnostikovat toto onemocnění a zahájit podpůrnou léčbu včas. Jelikož u novorozenců nemusíme pozorovat žádný z příznaků CF, kvůli své závažnosti je v České republice jednou z dvaceti nemocí testovaných v rámci **novorozeneckého „screeningu“**⁴³⁻⁴⁵. Navenek lze u nemocných s CF pozorovat například paličkovité prsty, soudkovitý hrudník, tenké končetiny a nafouklé břicho, které je důsledkem nedostatečného natrávení potravy⁴⁶⁻⁴⁹. Mezi mnohem vážnější projevy patří postižení dýchací soustavy či reprodukční soustavy

a gastrointestinálního traktu^{49–51}. Mezi základní patofyziologické jevy pacientů s CF se řadí i ovlivnění potních žláz⁵². Nelze opomenout ani problémy s kosterní soustavou – pacienti může postihnout i porucha růstu, osteoporóza a bolesti kloubů (častokrát způsobené artritidou)⁵³. Výjimkou není ani anemie či snížené množství krevních bílkovin, zejména albuminu, projevující se otoky, což je úzce propojeno s narušenou funkcí trávicí soustavy (konkrétně s trávením bílkovin)⁵⁴.

Narušená funkce respirační soustavy se objevuje téměř u všech pacientů s CF. S dýchacím ústrojím souvisí kromě výše uvedených problémů i množství dalších symptomů. Mezi ně patří například chronický kašel způsobený potřebou odstranění hustého hlenu z plic, který může vyústit až v hemoptýzu (vykašlávání krve)⁵⁵. K patologickým změnám dochází i v nosu – tvorba nosních polypů má za následek obtížnější dýchání až dušnost⁵⁶.

Reprodukční soustava je postižená až u 98 % mužů. Problémem u mužských pacientů je průnik spermií do ejakulátu⁵⁷. Ženská populace pacientek s CF trpí častým výskytem cyst na vaječnicích a neplodnost u ní bývá způsobená například výskytem příliš viskózního hlenu. Tuto bariéru mužské spermie obvykle nejsou schopny překonat. Mezi další možné důvody problematického početí se v souvislosti s ženskou populací pacientek s CF v literatuře uvádějí třeba poruchy ovulace, abnormální hladiny hormonů nebo pozměněná sekrece HCO_3^- v děloze^{51,58}.

Trávicí obtíže se také vyskytují u více než 80 % nemocných s CF a jsou úzce provázány s narušením respiračního systému^{59,60}. Chronický kašel postupně ovlivňuje fyziologii různých částí gastrointestinálního traktu. V důsledku vysokého nitrobřišního tlaku dochází nejen k bolestem břicha, ale také k oslabení jícnového svěrače, což vyúsťuje až v gastroezofageální reflux. Nebezpečí pak tkví právě v pravidelně se opakujícím navracení potravy a žaludečních šťáv do jícnu nebo, v horším případě, až do úst. Kyselá povaha těchto šťáv pak narušuje buněčnou stěnu jícnu^{60,61}.

Jak již bylo zmíněno, u mnoha lidí s CF dochází k omezenému trávení potravy, což je způsobeno sníženým množstvím trávicích enzymů, jako jsou lipasy, amylasy nebo trypsin, ve střevech. Tyto enzymy mohou být plně funkční, ale jejich vstup do střeva je blokován ve vývodech slinivky břišní hustým hlenem⁶². Objevují se však i případy, kdy funkce těchto enzymů není dostatečná, což je následkem narušené sekrece iontů HCO_3^- ⁶³.

Nejproblematictější složkou trávení jsou u těchto pacientů tuky, které se častokrát vylučují stolicí v nestrávené podobě. Stolice bývá proto hodně páchnoucí, mastná, objemná, a tudíž může způsobit až ucpání pacientova střeva⁶⁴. Jedním z typických příznaků CF u novorozence je právě mekoniový ileus, tedy ucpání střeva mekoniem (neboli smolkou) tvořeným zejména hlenem, žlučovými barvivy a buňkami odtrženými z gastrointestinálního traktu^{64,65}. Mekoniový ileus je tedy jedním z prvních ukazatelů pro diagnostiku CF. Již jen v případě podezření na CF je nutný okamžitě započít intervenci, a to například suplementací potřebných složek potravy a vitaminů, jelikož při nesprávně fungujícím trávení tuků nedochází ani k žádané resorpci vitaminů rozpustných v tucích (D, E, K, A). Může tak poměrně jednoduše dojít ke značné hypovitaminóze. Projevem hypovitaminózy vitaminu D jsou mimo jiné také již dříve zmiňované problémy s kosterní soustavou. Dalším následkem snížené resorpce tuků je ztráta značného množství energie, jež je zejména u dětí důležitá pro růst a přibírání na váze⁶⁴.

S přibývajícím věkem se u lidí s CF objevují i další problémy spojené s gastrointestinálním traktem. Jsou to například opakující se pankreatitidy, tvorba žlučových kamenů, porucha až cirhóza jater či cukrovka vázaná na CF běžně označovaná zkratkou CFRD (z angl. „CF related diabetes“). Tato CFRD se může objevit při poškození pankreatických β -buněk syntetizujících inzulín. Výskyt CFRD koreluje s věkem pacienta s CF – jen velmi malé procento dětských pacientů trpí tímto typem cukrovky, avšak trápí téměř 50 % jedinců s CF nad 40 let⁶⁶.

Již dříve byl v této práci zmiňován **potní test**, který lze použít pro diagnostiku CF poměrně krátce po narození dítěte. Tento test funguje na základě měření koncentrace chloridů v potu⁵². Toto jednoduché, rychlé a bezbolestní ambulantní vyšetření se provádí u jedinců s podezřením na CF. Pot pacientů s CF je podstatně slanější oproti potu zdravých lidí a matka dítěte tak může slanou chuť pozorovat už při prvním polibku novorozence⁶⁷. Slaný pot spolu s mekoniovým ileem patří mezi první ukazatele CF. Tento projev CF je nebezpečný zejména v situacích, kdy pacient ztrácí hodně potu, a tedy i Na^+ a Cl^- , protože v extrémních případech by mohlo dojít až k hyponatremii s následným šokem⁶⁸. Provedení potního testu má tři fáze. V první fázi se využívá metoda známá jako pilokarpinová iontoforéza, která má za úkol zvýšit produkci potu, jenž je v další fázi zachycován na filtrační papír (původní metoda z roku 1959) nebo do kapiláry systémem „Macroduct“ (novější způsob objeven v roce 1983). Tyto dva

způsoby se liší nejen svým provedením, ale také nejnižším množstvím potu, které je nutné získat – v případě použití filtračního papírku je to 75 mg potu, zatímco u systému „Macroduct“ postačuje 15 µl. Posledním krokem je analýza potu, k čemuž se využívá chloridometr fungující na principu coulometrické titrace. Na základě získaných hodnot koncentrace chloridů pohybujících se pod hodnotou 30 mmol/l potu, lze vyvrátit výskyt CF u daného jedince. Potní test je vyhodnocen jako pozitivní v případě, že získané hodnoty přesáhnou 60 mmol/l. V tomto případě je CF u pacienta velmi pravděpodobná, avšak k potvrzení je nutné provést i další, molekulárně-genetické, vyšetření^{2,52,69}. Vysoké hodnoty chloridů totiž mohou být zřídka způsobené i jinými onemocněními, například atopickou dermatitidou nebo onemocněními endokrinního charakteru⁷⁰. Ve třetím případě, kdy se hodnoty chloridů pohybují v rozmezí 30 mmol/l až 59 mmol/l, nejsou výsledky potního testu konkluzivní. V praxi to znamená, že potní test musí být buď zopakován anebo musí být u pacienta provedeno i vyšetření molekulárně-genetickými metodami, jelikož tyto hraniční hodnoty chloridů mohou, ale nemusí znamenat výskyt CF u testovaného člověka⁵². Hraniční hodnoty chloridů se s vysokou četností objevují u jedinců s atypickou formou tohoto onemocnění, ale mohou značit i jiné nemoci, které jsou spojeny například s nadledvinami^{71,72}.

Již zmíněné **molekulárně-genetické vyšetření** se provádí v následujících případech. Jedná se nejen o výše uvedené okolnosti, ale taky o prenatální diagnostiku. V případech, kdy existuje podezření na CF u embrya z důvodu výskytu této nemoci u jednoho z partnerů nebo v jejich rodině, se amniocentézou odebírá plodová voda (zpravidla mezi 16. a 18. týdnem těhotenství⁷³) anebo biopsií choria buňky plodu (obvykle se provádí mezi 10. a 12. týdnem gravidity⁷³) pro molekulárně-genetickou analýzu⁷⁴. Vzhledem k problémům s početím u lidí s CF je častější varianta provést molekulárně-genetické vyšetření DNA leukocytů izolovaných z periferní krve ještě před plánovaným otěhotněním. Tímto způsobem může být dosaženo selekce buněk bez mutace v genu pro CFTR protein, které mohou být dále použity pro umělé oplození s výrazně nižší pravděpodobností vzniku CF u potomka⁷⁵.

V rámci molekulárně-genetického vyšetření se k nalezení potenciálně mutovaných alel daného genu využívá polymerasová řetězová reakce známá pod zkratkou PCR (z angl. „polymerase chain reaction“). Pokud dojde k objevení obou mutovaných alel *CFTR* genu, toto vyšetření lze s jistotou prohlásit za pozitivní a pacient trpí CF. V dalších případech však výsledky nejsou tak zřejmé. Pokud je objevena jedna mutovaná alela

daného genu a objevují se další příznaky odpovídající CF, tak je u pacienta vysoká pravděpodobnost výskytu této zákeřné nemoci⁷⁶. Avšak za běžných okolností se v rámci molekulárně-genetického vyšetření testují pouze některé mutace genu pro CFTR protein. Jedná se o nejrozšířenější mutace vyskytující se u více než 80 % jedinců postižených CF. Pokud tedy není objevena mutovaná alela, nelze s jistotou rozhodnout, zda daný člověk není pacient trpící CF, jelikož může mít vzácnou mutaci. Za těchto okolností se u nemocných s vysokou pravděpodobností odhalení CF proto přistupuje k dalšímu testování, které spočívá v sekvenování a důkladné analýze všech možných patologií v *CFTR* genu⁷¹.

Další diagnostickou technikou je **měření transmembránového rozdílu potenciálů**, které se ale nepoužívá u dětí do 6 let věku⁷⁷. Principem této metody je měření bioelektrických potenciálů mezi dvěma elektrodami. Jedna elektroda, měřící, se obvykle nachází na nosní sliznici (nebo případně rektální sliznici⁷⁸) a druhá, referenční, bývá lokalizována v podkožní oblasti paže. Před samotným měřením je však nutná aplikace amiloridu a isoproterenolu. Amilorid inhibuje funkci ENaC kanálu pro Na⁺, čímž dojde k depolarizaci membrány, jelikož se sníží absorpce těchto iontů. Následným podáním isoproterenolu dojde u zdravého člověka k opětovnému zvýšení potenciálu, avšak z důvodu porušeného CFTR proteinu, na který isoproterenol mimo jiné cílí, nedojde u nemocného jedince s CF k normální odpovědi, a tudíž se pozitivní výsledek tohoto testu poukazující na přítomnost CF projevuje zápornější naměřenou hodnotou rozdílu potenciálů⁷⁹.

1.1.3 Imunitní systém a léčba cystické fibrózy

1.1.3.1 Imunitní systém

Obranyschopnost lidského organismu je zabezpečována vrozenou imunitou nespecifickou vůči antigenu a získanou neboli adaptivní (specifickou) imunitou. Vrozený i adaptivní imunitní systém mají dvě důležité komponenty – buněčnou a humorální⁸⁰.

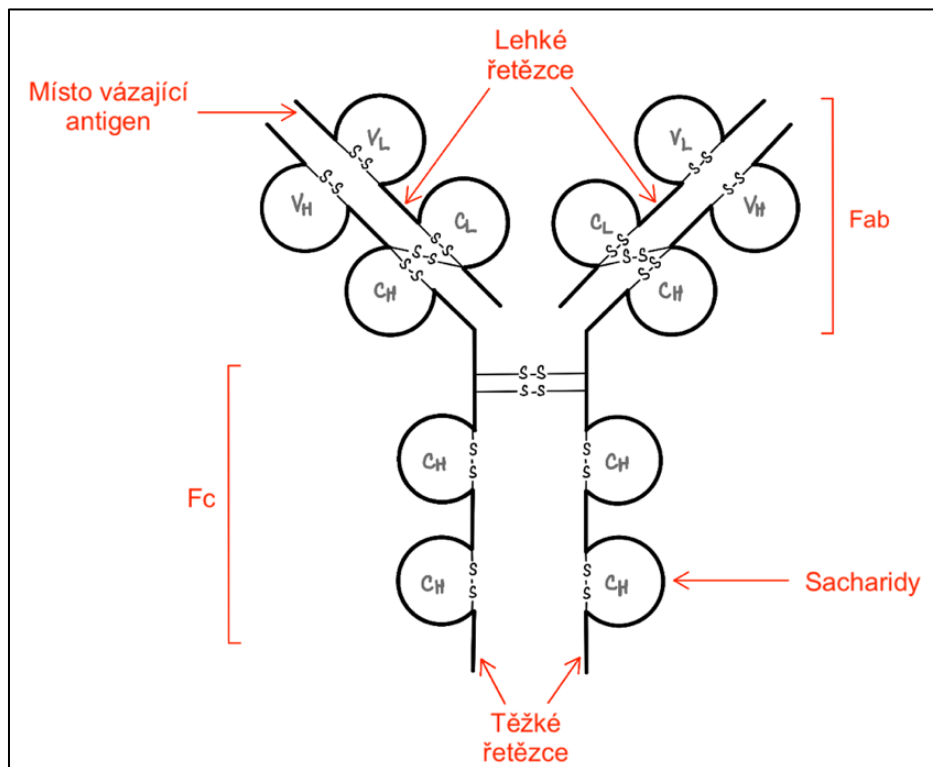
Antimikrobiální obrana je započata vrozenou imunitní odpovědí. Antigen se setkává nejdříve s fyzickými bariérami, jako jsou sliznice, kůže, plicní epitel či mezibuněčné spoje regulující propustnost skrz epitel. Neméně důležitá je i mukociliární „clearance“. Dále se patogen setkává s chemickými bariérami, které jsou tvořeny například sníženým

pH, lysozymem či dalšími antimikrobiálními peptidy a proteiny, jako je třeba β -defensin-3 nebo laktoferrin. Problematická je také funkce proteinu známého pod zkratkou SPLUNC1 (z angl. „short palate lung and nasal epithelial clone 1“). Táto na pH závislá bílkovina je důležitá pro vazbu produktů bakteriálních buněk a inhibici absorpce Na^+ . V podmínkách s nízkou hodnotou pH, které se vyskytují u nemocných s CF však dochází k deaktivaci její funkce, což dále přispívá ke snížení obranyschopnosti pacientova organismu. Neopomenutelné jsou také další imunitní mechanismy, jako je aktivita proteas či antioxidantů, které byly krátce popsány již dříve⁸¹.

V dalším kroku dochází k zapojení aktivních obranných mechanismů – buněčné a humorální složky. V rámci vrozeného imunitního systému se do boje s cizorodými látkami a patogeny zapojuje několik typů buněk. Jedná se o fagocytující makrofágy, dendritické buňky, neutrofil, eozinofil, bazofil, žírné buňky a řadí se sem i přirozené zabíječské buňky známé jako NK buňky (z angl. „natural killer cells“), které mají na rozdíl od předchozích typů buněk schopnost imunologické paměti. Humorální komponentou je systém komplementu, lektinů a interferonů⁸⁰. Komplement je systém několika desítek rozpustných proteinů, které se kaskádovitě aktivují na účinná agens. Tato soustava může být aktivována několika různými způsoby, a to klasickou dráhou (první protein z komplementové kaskády označovaný jako C1 se váže na protilátky interagující s mikrobiálním povrchem), lektinovou dráhou (lektiny vázající mannosu anebo ficoliny rozeznávají polysacharidy na povrchu patogenu) anebo alternativní cestou (spontánní aktivace přes látky přirozeně se vyskytující u patogenních mikroorganismů). Ve všech případech vzniká proteolytický enzym C3 konvertasa a nakonec MAC komplex (z angl. „membrane attack complex“), který způsobí zabití a lyzi buňky daného patogenu⁸².

S vrozeným imunitním systémem je úzce propojena i odpověď získaného imunitního systému, který však na rozdíl od toho vrozeného reaguje mnohem pomaleji. Kromě vysoké antigenní specifity se od vrozené imunity odlišuje také imunologickou pamětí. Buněčnou komponentu tvoří T lymfocyty a humorální složkou jsou B lymfocyty a protilátky produkované plazmatickými buňkami vzniklými diferenciací B lymfocytů⁸³. Protilátky (imunoglobuliny) mohou být sekretované anebo vázané na membránu. Jsou to glykoproteiny, které dokáží specificky rozeznat a následně navázat antigenní epitop⁸⁴. Obecná struktura protilátek (sekretovaných i vázaných na membránu) je znázorněná

na obr. 6 (str. 24). Dva lehké řetězce a dva těžké řetězce jsou disulfidickými můstky udržovány v konformaci připomínající tvar písmene Y. Pomocí proteasy lze protilátku rozštěpit na dvě části – dva Fab fragmenty a jeden Fc fragment⁸⁵. Konstantní oblasti lehkého/těžkého řetězce (C_L/C_H) se svou aminokyselinovou sekvencí neliší mezi protilátkami z různých klonů lymfocytů B, na rozdíl od variabilních oblastí těchto řetězců (V_L/V_H). Tyto V_L/V_H se nacházejí na N-koncích proteinové sekvence, a právě na koncových úsecích V_L či V_H je místo označované jako paratop, na nějž se váže epitop antigenu. Existuje několik typů protilátek, které se odlišují v aminokyselinové sekvenci C_L či C_H . Lehký řetězec se označuje κ nebo λ . Těžký řetězec může být μ , δ , γ , α nebo ϵ a na základě nich rozlišujeme protilátky pěti tříd – IgM, IgD, IgG, IgA a IgE. Prvotním typem protilátek tvořících se při imunitní reakci na antigen je IgM. Nejvýznamnějším je IgG, jehož množství v séru mnohonásobně převyšuje koncentraci všech ostatních imunoglobulinů⁸⁴.

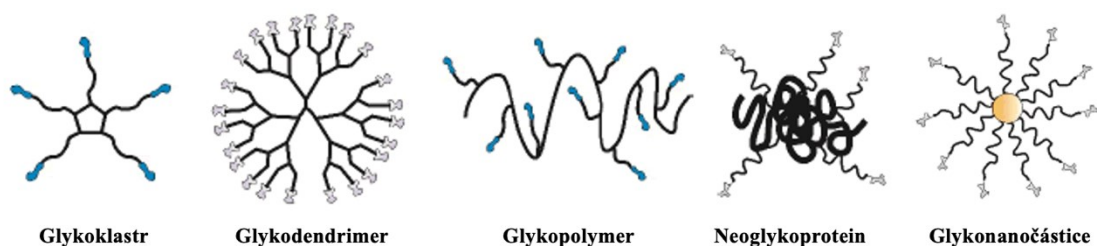


Obr. 6: Struktura protilátky. Dva lehké a dva těžké řetězce jsou spojeny disulfidickými můstky. Štěpením proteasou mohou vzniknout dva Fab fragmenty a jeden Fc fragment. Na konci V_L (variabilní oblasti lehkého řetězce) a V_H (variabilní oblasti těžkého řetězce) se nachází paratop vázající antigen. Konstantní oblast lehkého/těžkého řetězce je značena C_L/C_H . Obrázek byl inspirován autoři Hoffman a spol⁸⁶.

1.1.3.2 Profylaktická léčba cystické fibrózy

Jak bylo uvedeno výše, u nemocných s CF dochází k častým bakteriálním infekcím. K jejich léčbě se využívají antibiotika, kterých opakované užívání je nebezpečné zejména z důvodu narůstajícího rizika vzniku rezistence, která může ohrozit život pacienta s CF. U těchto lidí je také vysoké riziko projevů infekce způsobené aktivní imunizací, které se zvyšuje opakovanou aplikací antigenu⁸⁴. Hledají se proto další terapeutické možnosti. Alternativou či dodatečnou formou léčby symptomů CF, o které pojednává odsek 1.1.3.3 na str. 27, je profylaktická léčba pomocí protilátek nebo glykokonjugátů. Použití savčích protilátek IgG je problematické, jelikož často aktivují systém komplementu, což vede k zánětlivým procesům. Řešením by mohlo být použití slepičích protilátek IgY, které je výhodné z několika důvodů. Získání IgY (ve velkých množstvích) z vajec imunizovaných slepic je rychlý, efektivní a levný způsob. Dále je výhodou možnost opakovaného neinvazivního získávání IgY ze slepičích vajec na rozdíl od savčích protilátek, které se musí izolovat z odebrané krve imunizovaného zvířete. Neopomenutelnou předností slepičích protilátek IgY je jejich bezpečnost. Vzhledem k faktu, že slepičí vejce jsou ve světě běžnou součástí lidské potravy, riziko spojené s imunitní reakcí organismu je velmi nízké, a proto jsou tyto imunoglobuliny považovány za jednu z nejbezpečnějších variant podpůrné léčby CF a mnohých dalších chorob^{87,88}. Podle publikace dokládající desetileté užívání této léčby zaměřené proti bakterii PA nedošlo během celé dekády k žádné nebezpečné reakci lidského organismu⁸⁸. Vedle bezpečnosti byla prokázána také účinnost těchto imunoglobulinů proti bakteriální infekci a ochrana před tvorbou biofilmu. Tyto protilátky mohou inhibovat bakteriální adherenci na lidské buňky plicního epitelu. Lze však připravit a purifikovat i protilátky, které budou fungovat na jiném principu a budou cílit například na toxiny produkované bakteriemi nebo agregaci bakteriálních buněk. Využití slepičích imunoglobulinů je proto do budoucna velice perspektivní^{87,88}.

Další nadějnou variantou pro nahrazení antibiotické léčby či protilátek jsou glykokonjugáty. Mezi glykokonjugáty se řadí několik typů sloučenin, například glykoklastry, glykodendrimery, glykopolymery, neoglykoproteiny, glykonanočástice. Základní rozdíly ve struktuře jednotlivých typů molekul jsou znázorněny na obr. 7 (str. 26)⁸⁹. Obecně se jedná se o syntetické látky složené z centrální molekuly, jako je například rozvětvená alifatická struktura nebo struktura s aromatickým jádrem, porfyrin nebo kalixaren. Na centrální část molekuly se váže jedno nebo více sacharidových ramen a valence molekuly je dána právě počtem těchto glykosylovaných ramen⁹⁰.



Obr. 7: Schématické znázornění struktur jednotlivých typů glykokonjugátů. Obrázek byl převzat a upraven⁸⁹.

Výhodou je, že lze připravit glykokonjugát složený z různých sacharidů (tzv. heteroglykokonjugát) – jedna molekula nemusí obsahovat pouze jeden typ sacharidů, ale může být kombinací několika různých sacharidových jednotek, což umožňuje zvýšení afinity k lektinům vázajícím se na cukerné zbytky. Právě kvůli případnému obsazení vazebných míst lektinů může dojít k inhibici adherence bakteriálních buněk na glykosylované struktury nacházející se například na povrchu buněk plicního epitelu. Nemělo by tedy docházet k narušení životaschopnosti buněk daného patogenu ani ke vzniku rezistence⁹¹. Na základě principu obsazení vazebných míst se dá předpokládat, že valence glykoinhibitoru bude hrát velkou roli v anti-adherenčním účinku dané sloučeniny. Ukazuje se však, že prostorové uspořádání sacharidových jednotek je pro vazbu lektinů ještě důležitější než valence⁹². Heteroglykokonjugáty způsobují také nestabilní agregaci bakteriálních buněk (odlišnou od biofilmu), díky čemuž následně dochází k poklesu jejich dalšího šíření v organismu. Výsledkem je také vyšší antibiotická účinnost (glykany mohou vést k efektivnějšímu vstupu antibiotik do buněk) a naopak, snížení zánětlivé odpovědi organismu projevující se menší degradací epitelálních plicních buněk⁹³.

Výsledky studií demonstrují pozitivní efekt heteroglykokonjugátů na adherenci bakterií na plicní epitel zdravých jedinců i pacientů s CF. Inhalační podávání těchto inhibitorů mělo při současné aplikaci antibiotik významný terapeutický vliv. V kombinaci s antibiotikem ciprofloxacinem došlo také k likvidaci značného počtu bakterií mukoidního kmene⁹⁴.

Literatura dále poukazuje na možný dvojitý účinek některých glykokonjugátů. Prvním účinkem jsou již zmiňované anti-adherenční vlastnosti sloučenin. Pokud se však na tkáň s bakteriálními buňkami v přítomnosti glykokonjugátu, který má ve své struktuře

začleněny zlaté nanočástice krátce aplikuje záření z blízké infračervené oblasti (650 nm až 900 nm), dojde také k výraznému snížení tvorby biofilmu a baktericidnímu účinku téměř bez poškození lidské tkáně⁹¹.

Poměrně nízká cena léčby slepičími protilátkami IgY nebo glykoinhibitory motivuje vědeckou komunitu k jejímu dalšímu zkoumání, a právě proto se i tato práce zaměřuje na danou problematiku. Testovány a diskutovány budou slepičí imunoglobuliny a také glykoklastry na báze fukosy.

1.1.3.3 Symptomatická léčba cystické fibrózy

Symptomatická léčba CF se kromě antibiotické léčby infekcí (různá antibiotika mohou být podávána odlišnou formou – perorálně, intravaskulárně, intramuskulárně, ale i inhalačně) zaměřuje na nejzávažnější obtíže nemocných jedinců, tedy na problémy s dýchací soustavou a gastrointestinálním traktem. Terapeutický základ tvoří fyzioterapie zaměřené na zlepšení funkce mukociliární „clearance“. V rámci ní se pacienti soustředí na správné dýchání spojené s vykašláváním hustého hlenu. Dnes už jsou běžnou praxí také vibrační vesty napomáhající právě dalšímu odstranění hlenu z plic. Nemocní jedinci doplňují fyzioterapii inhalací osmoticky aktivního hypertonického solného roztoku, který má za cíl naředit viskózní hlen pro jeho snadnější vykašlání a tím následně i zlepšit funkci plic. Tento roztok plní i další funkci – doplňuje do organismu ionty, které pacient ve velkém množství ztrácí potem^{95,96}.

Již dříve byla zmíněna potřeba suplementace některých složek potravy, jako jsou mastné kyseliny, vitaminy nebo minerály. U pacientů s CF se mimo jiné vyskytuje i nedostatečné množství kyseliny dokosaheptaenové patřící do skupiny omega-3 mastných kyselin a kyseliny linolové řadí se mezi omega-6 mastné kyseliny. Z kyseliny linolové se následně syntetizuje kyselina arachidonová, která při nesprávném poměru mastných kyselin souvisí se zvýšeným rizikem zánětlivé reakce organismu pacienta. I z tohoto důvodu pacienti dlouhodobě užívají rybí olej, který obsahuje vysoké množství omega-3 mastných kyselin^{97,98}. U nemocných s CF dochází častokrát k nedostatečnému vstřebávání tuků i při suplementaci pankreatem vylučovaných enzymů. Projevem jsou následně nízké hladiny vitaminů rozpustných v tucích (D, E, K, A), které je potřeba pacientům dodávat formou tablet či kapsul. Vzhledem k malabsorpci vitaminů se však stále hledají a testují další, lépe vstřebatelné formy těchto vitaminů (jako jsou třeba

emulze, nanoemulze, nanomicely, liposomy nebo lipidové nanočástice) a probíhají také klinické studie, jejíž pozitivní výsledky mohou vést ke značnému zlepšení kvality života těchto pacientů⁹⁹.

V posledních letech se značně rozšířila terapie modulátory CFTR proteinu. Tyto látky jsou sice účinné a v mnoha ohledech zmírňují obtíže způsobené CF, ale nemají všestranné využití. Jedná se o molekuly, které mohou výrazně zlepšovat funkci CFTR kanálu nebo jeho stabilitu. Jsou však účinné pouze u některých typů mutací v genu pro tento protein, a tudíž je nelze využít u všech pacientů. U nemocných jedinců s mutací, na kterou modulátor cílí, je ale léčba těmito modulátory velice žádaná i navzdory vysoké ceně¹⁰⁰.

Modulátory CFTR proteinu se rozdělují do několika kategorií podle svého účinku. Prvním typem modulátorů jsou potenciátory. První známý potenciátor, perorálně podávaná tableta ivacaftor (také známý jako VX-770), byl schválen v roce 2012. Ivacaftor (s obchodním názvem Kalydeco) cílí na mutace spojené s nesprávnou funkcí otevírání CFTR kanálu, a tedy s narušeným průchodem iontů (III. a IV. třída mutací *CFTR* genu). Nefunguje tedy na nejčastější mutaci F508del patřící do II. třídy mutací, která způsobuje nesprávné seskládání CFTR proteinu projevující se jeho nedostatečným množstvím na apikální membráně buňky. U tohoto malého množství kanálů, které se dostanou na membránu je ještě pozměněna i jejich schopnost otevírání a stabilita proteinů. Výhodou je, že ivacaftor způsobuje také redukci množství přežívajících bakteriálních buněk PA, které se vyskytují u pacientů, čímž snižuje pravděpodobnost infekce a zánětu, a tudíž vede ke zlepšení funkčního stavu plic¹⁰⁰⁻¹⁰².

Časem se ivacaftor začal používat jako kombinovaná terapie s jedním nebo později až se dvěma korektory. Korektory jsou sloučeniny, které se využívají k léčbě symptomů CF spojených s mutací F508del. Zaměřují se tedy na správné složení a následné úpravy CFTR proteinu tak, aby došlo ke zvýšení množství těchto kanálů na apikální buněčné membráně. Ivacaftor působí ve dvojkombinaci s prvním známým korektorem, lumacaftorem (sloučenina s označením VX-809), anebo v trojkombinaci s další generací korektorů, tezacaftorem (VX-661) a elexacaftorem (VX-445). Tyto kombinace (dvojkombinace Orkambi používaná od roku 2015 anebo trojkombinace Trikafta (USA) / Kaftrio (Evropa) od roku 2019/2020) se ukázaly jako velice prospěšné pro obnovení správné funkce plic^{100,103-105}.

Třetí skupinou modulátorů jsou amplifikátory (jako např. nesolicaftor známý pod označením PTI-428), které nemají vliv na funkci CFTR kanálu. Způsobují však zmnožení mRNA pro syntézu dalšího (mutantního) CFTR proteinu, čímž v konečném důsledku dochází ke zlepšení stavu u pacientů s CF. Je to navýšením množství CFTR kanálů na apikální membráně. Studie ukazují, že při aplikaci s dalšími modulátory lze zlepšit funkci CFTR proteinu i dolních dýchacích cest¹⁰⁰.

Čtvrtou kategorií jsou stabilizátory. Tyto modulátory cílí na mutace VI., případně i II. třídy, jelikož jejich úkolem je zvýšit stabilitu (a tudíž i dobu fungování na apikální membráně) CFTR proteinu. Ten je následně lysosomy degradován v menší míře, čímž dojde ke zlepšení transportu iontů kanály a omezení projevů nemoci¹⁰⁶.

Další skupinou jsou sloučeniny označované jako „read-through“ zaměřující se na I. třídu mutací v *CFTR* genu. Tyto malé molekuly umožňují translaci celé mRNA do funkčního CFTR proteinu, ke které běžně nedochází z důvodu ukončení translace přítomností předčasného STOP kodonu¹⁰⁶.

1.1.3.4 Genová terapie cystické fibrózy

Genová terapie je jedinou možností, jak úplně vyléčit CF (její příčinu, a tudíž i všechny příznaky). První způsob provedení genové terapie cílí na somatické buňky a další na opravu genu v zárodečných buňkách. Velkým pozitivem této metody je možnost univerzálního využití pro všechny pacienty. S oběma způsoby se však spojuje množství problémů, a genová terapie proto ještě ani dnes není dostupná pro pacienty s tímto závažným onemocněním¹⁰⁷.

U somatických buněk je to především neschopnost ovlivnit všechny orgány, takže by se mohly například zlepšit respirační problémy, ale trávicí obtíže či ztráta iontů potom by přetrvávala. Otázkou také zůstává, jak zajistit bezpečnost (a vyloučení rizik spojených například s rozvojem karcinogeneze) a současně dlouhotrvající účinek léčby. Aktuálně se testují různé varianty léčebného postupu. Jednou z nich je integrovaná terapie, při které se do jádra buňky vpraví správná genetická informace ve formě DNA, jež se včlení přímo do genomu dané buňky a díky tomu bude účinek této terapie přetrvávat dlouhodobě. Problémem ale je již zmiňované nebezpečí rozvoje rakovinového bujení, pokud by došlo k integraci úseku DNA do nesprávné části buněčného genomu. Existuje také varianta

využití neintegrováné terapie, při které je efekt v podstatě opačný – nedojde k začlenění vpravené genetické informace (DNA) do genomu buňky, a tudíž nehrozí ani riziko vzniku karcinogeneze, nicméně účinek bude trvat mnohem kratší dobu a léčbu bude nutné pacientovi aplikovat v pravidelných intervalech. Možností je rovněž aplikovat pacientovi genetickou informaci přímo ve formě mRNA, kdy není nutné vkládat tuto informaci do buněčného jádra a integrovat jí do genomu. Vzhledem k nestabilitě mRNA by však efekt byl ještě výrazně kratší než v případě neintegrováné terapie^{108–110}.

V průběhu posledních desetiletí byly testovány různé možnosti vpravení genetické informace do buňky – zkoumány byly rekombinantní virové vektory i neviróvé vektory. První pokusy byly založeny na adenoviru, a i když některé studie prokázaly úspěšnou transdukcí, tak problémem bývá výskyt zánětu a nutnost opakované aplikace, což zvyšuje riziko zánětlivého procesu. Další výzkumy se zaměřovaly na rekombinantní adeno-asociované virové vektory, u kterých bylo riziko spojené s imunitní reakcí lidského organismu výrazně nižší a transdukce byla účinná. Vliv na zlepšení funkce dýchacího systému se však téměř neprojevil. V současnosti se za nejperspektivnější virové vektory považují vektory na báze lentivirů, jelikož byly objeveny jejich možné modifikace na bezpečnější formu a jejich úspěšnost byla ověřena na několika zvířecích modelech. Neviróvé vektory mohou být založeny na různých molekulách – lipidech, peptidech nebo polymerech. Studie se zaměřují především na kationtové lipidy. V případě neviróvých vektorů je riziko zánětu nízké, avšak stejně tak je nízká i jejich účinnost¹⁰⁸.

Genová terapie v zárodečných buňkách by měla velkou výhodu, a to možnou opravu mutace v *CFTR* genu buněk všech orgánů. Avšak vzhledem k mnoha otázkám a problémům, včetně etických aspektů, které se s touto možností spojují, se aktuálně výzkumy zaměřují na ovlivnění somatických buněk. Vzhledem k pokrokům v oblasti genových manipulací, ke kterým došlo v posledních letech se však dá předpokládat, že výzkum genové terapie CF by se mohl ještě urychlit. Stojí za tím především vysoce studovaná CRISPR/Cas9 metoda, za kterou v roce 2020 získaly Jennifer Anne Doudna a Emmanuelle Marie Charpentier Nobelovou cenu pouze několik let od jejího objevení, na kterém spolupracoval také úspěšný český vědec, Martin Jínek. Podařilo se jim spolu úspěšně nejen odhalit, ale také aplikovat přirozený bakteriální mechanismus nukleasového štěpení na možný vývoj léčby různých onemocnění^{111,112}.

1.2 Bakteriální druhy *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cenocepacia*

Bakterie PA, jak již bylo zmíněno, je vedle Bcc jedním ze závažných patogenů, které ohrožují pacienty s CF. Jedná se o gramnegativní oportunní pohyblivý mikroorganismus, který byl poprvé popsán v roce 1882. Její elipsovitý tvar má rozměry kolem 1–5 μm (délka) a 0,5–1 μm (šířka). Jako konečný akceptor elektronů dokáže využívat kyslík (v aerobních podmínkách) nebo dusičnany, pokud se nachází v prostředí bez kyslíku. Tento mikroorganismus preferuje stálou teplotu 37 °C, ale přežívá i při jiné teplotě, která se pohybuje v rozmezí 4–42 °C. Schopnost PA přežít v podmínkách s omezenými zdroji, ať již uhlíku nebo energie, umožňuje její přítomnost v různých prostředích. Přežívá v půdě, vodě, na rostlinách, v jiných organismech, ale také ve sterilním prostředí nemocnic¹¹³.

Podobně jako PA, i Bcc je pohybu schopný gramnegativní oportunní mikroorganismus, který se umí velmi rychle přizpůsobovat změnám okolního prostředí, a tudíž přežít ve značně odlišných podmínkách i s omezenými energetickými a nutričními zdroji. Právě to je důvodem, proč se s ní setkáváme i při kontaminacích zdravotnických pomůcek, prostředků a léčiv¹¹⁴. K původnímu objevu Bcc došlo až v roce 1950¹¹⁵. Dnes se k Bcc řadí 24 bakteriálních druhů, ze kterých jsou nejrozšířenější *Burkholderia cenocepacia* (BC) a *Burkholderia multivorans*¹¹⁴. Ukazuje se však, že BC je pro nemocné jedince s CF mnohem větším rizikem než třeba *Burkholderia multivorans* – v případě BC dochází ke chronické infekci až v 94 % případů, zatímco u infekcí způsobených *Burkholderia multivorans* je tato pravděpodobnost 50%. Progrese onemocnění je u BC také výrazně horší^{116,117}.

Bakterie PA a Bcc se často vyskytují společně, vzájemně interagují a u lidí s CF proto patří mezi nejrizikovější faktory zhoršení projevů nemoci. Infekce PA jsou mnohem víc rozšířené než infekce způsobené Bcc. Nebezpečí tkví v opakovaných zánětech a v případě Bcc také ve vzniku tzv. „cepacia syndromu“^{118,119}. „Cepacia syndrom“ je život ohrožující stav, při kterém dochází k pneumonii (zánětu plic) doprovázené nekrózou tkáně, bakteriemií (přítomností bakteriálních buněk v krevním řečišti, jelikož buňky Bcc dokáží procházet epiteliální bariérou) a syndromem akutní dechové tísně. Z bakterií řadících se k Bcc způsobuje „cepacia syndrom“ častokrát právě BC,

na kterou se mimo jiné zaměřuje i tato diplomová práce^{120,121}. Jedním z pozoruhodných zjištění bylo, že u pacienta může dojít k projevům „cepacia syndromu“ až mnoho let po překonání infekce způsobené Bcc¹²². S oběma bakteriemi (PA i BC) se spojuje množství virulentních faktorů, které napomáhají adhezenci bakterií, kolonizaci hostitele a vzniku infekce s následným zánětem.

Buňky PA a BC produkují virulentní faktory přímo spojené s bakteriální buňkou anebo virulentní faktory, které sekretují do svého okolí. Do první skupiny se řadí adhesiny a lipopolysacharidy. Do druhé kategorie spadají exotoxin A, exoenzymy, proteasy, komplex fosfolipas C, siderofory jako je například zelený fluoreskující pigment pyoverdin produkovaný PA, polysacharid alginát, cepacian či DNasa^{123,124}.

Bičíky, fimbrie (pili) a lektiny jsou adhesiny proteinové povahy vyskytující se u PA i u BC. Polární bičík zabezpečuje více úloh. Kromě pohybu umožňuje bakteriální buňce navázat se na povrch hostitelského epitelu a účastní se i na tvorbě biofilmu. Fimbrie mají podobnou roli jako bičík. Slouží k buněčnému pohybu, adhezenci na buňky hostitele i k navození produkce biofilmu. Podílí se také na regulaci jiných virulentních faktorů nebo přenosu genů pro rezistenci na antibiotika mezi bakteriemi^{125–127}. Lektiny jsou důležité virulentní faktory, které budou detailně probrány v samostatné kapitole 1.2.1 na str. 33.

Lipopolysacharidy se nacházejí ve vnější membráně gramnegativních buněk bakterií. Jejich strukturu tvoří lipid A, oligosacharidové jádro a O-antigen. Je zajímavé, že na jedné straně mohou lipopolysacharidy aktivovat imunitní systém hostitele, ale na druhé straně před ním chrání bakteriální buňku. Neopomenutelná je také role lipopolysacharidů v bakteriální adhezenci – PA se může přes lipopolysacharid navázat na CFTR protein, čímž se lipopolysacharidy přímo podílejí na invazi bakterie dovnitř eukaryotní buňky^{125,128}.

Exotoxin A je bílkovina produkovaná PA, jejíž funkcí je inhibice procesu proteosyntézy v buňkách hostitele¹²³. Proteiny označované například exoenzym S či exoenzym T slouží bakterii PA k provedení změn v aktinové cytoskeletální síti hostitelských buněk a tím u svého hostitele indukují buněčnou smrt¹²⁹. I když BC nevytváří tyto exotoxiny/exoenzymy, je také schopná působit cytotoxicky¹²⁸. Proteasy (jako je u PA například elastasa nebo alkalická proteasa a u BC proteasa ZmpA nebo ZmpB) kromě poškozování okolních buněk také inhibují imunitní systém.

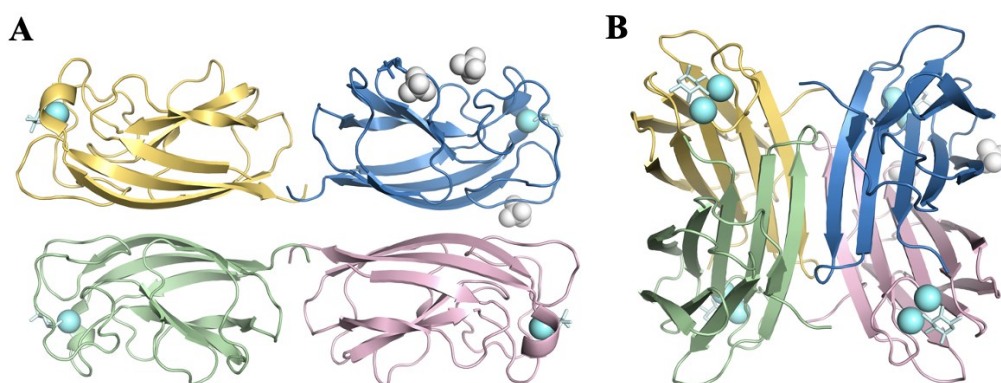
Fosfolipasy jsou využívány bakterií PA/BC pro vstup do hostitelské buňky, jelikož štěpením fosfolipidů se naruší její plazmatická membrána^{128,130}. Pigment pyoverdin chelatuje ionty železa a pyocyanin souvisí se vznikem reaktivních forem kyslíku, které vedou k degradaci biologické tkáně. Viskózní vlastnosti alginátu se spojují s produkcí již zmíněného mukózního biofilmu, jenž zásadním způsobem zhoršuje průběh infekcí u nemocných jedinců trpících CF. Plní však i další funkci, a tou je ochrana buněk PA před fagocytózou¹²³. U BC nebyl sice objeven alginát, ale objevuje se u ní polysacharid cepacian, jehož primární funkcí je ochrana buňky této bakterie před působením vnějších stresových podmínek¹³¹. DNasa napomáhá bakterii získávat živiny z okolního prostředí¹²³.

1.2.1 Bakteriální lektiny

Lektiny jsou proteinové struktury, které se nacházejí prakticky u všech živých organismů. Pro tuto práci jsou důležité lektiny u PA a BC, které fungují jako důležité virulentní faktory. Účastní se protein-sacharidových interakcí, které ovlivňují množství buněčných procesů (kontrola kvality bílkovin, vzájemné interakce mezi bakteriální a hostitelskou buňkou, mezibuněčná komunikace, imunitní odpověď organismu a případný zánět nebo dokonce karcinogeneze). Lektiny jsou také schopny aglutinovat buňky (například erytrocyty) a vykazují patogenní a cytotoxický účinek na eukaryotní buňky^{132,133}.

PA disponuje dvěma lektiny, jejichž struktury jsou znázorněny na obr. 8 (str. 34). První z nich, homotetramerní lektin I bakterie PA označovaný PA-IL nebo také LecA, rozpoznává a váže především α -D-galaktosu, ale s nižší afinitou navazuje i další sacharidy – β -D-galaktosu a D-N-acetylgalaktosamin¹³⁴. Tento protein schopný vazby jednoho vápenatého iontu (Ca^{2+}) obsahuje čtyři podjednotky, z nichž každá je složena ze 121 aminokyselin s přibližnou hmotností 12,75 kDa^{135,136}. Lektin II bakterie PA (PA-III nebo LecB) se váže zejména na L-fukosu a slaběji na D-mannosu a mannan, L-galaktosu a/nebo D-fruktosu. Opět se jedná o protein složený ze čtyř podjednotek. Tento protein schopný vázat dva Ca^{2+} je o něco menší než PA-IL – jedna podjednotka je složena ze 114 aminokyselin o celkové hmotnosti 11,75 kDa^{137,138}. Lektin PA-III se podílí taktéž na tvorbě biofilmu a narušení pohyblivosti plicních řasinek, což má vliv

na patogenitu bakterie PA^{139,140}. Při studiu obou těchto lektinů je třeba si uvědomit, že jejich exprese se mění v průběhu kultivace bakteriálních buněk PA a je závislá na složení růstového média. PA-IL se ve zvýšené míře exprimuje v kultivačním médiu s přítomností soli a kvasinkového extraktu, zatímco pro PA-IIL je výhodné použití média s vysokým obsahem peptonu a hovězího extraktu¹³⁴.

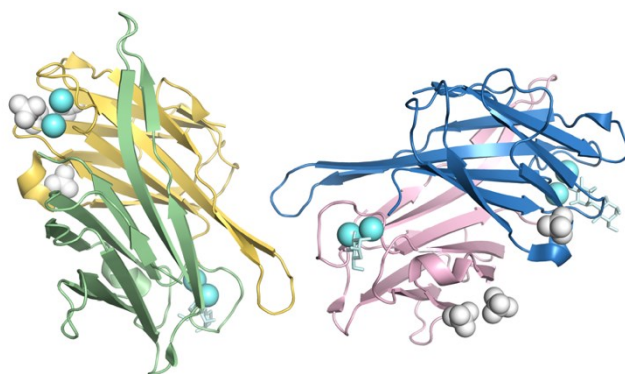


Obr. 8: Struktura homotetramerních bakteriálních lektinů PA-IL a PA-IIL. **A** – lektin PA-IL (PDB ID: 1OKO). **B** – lektin PA-IIL (PDB ID: 1UZV). Jednotlivé proteinové řetězce jsou znázorněny různými barvami. Tyrkysovou barvou jsou vyznačeny Ca²⁺ a navázané sacharidy – β-D-galaktosa u PA-IL a α-L-fukosa u PA-IIL. Slabě sivá barva zvýrazňuje sulfátové ionty. Obrázky byly vytvořeny pomocí „softwaru“ PyMOL^{12,136,141}.

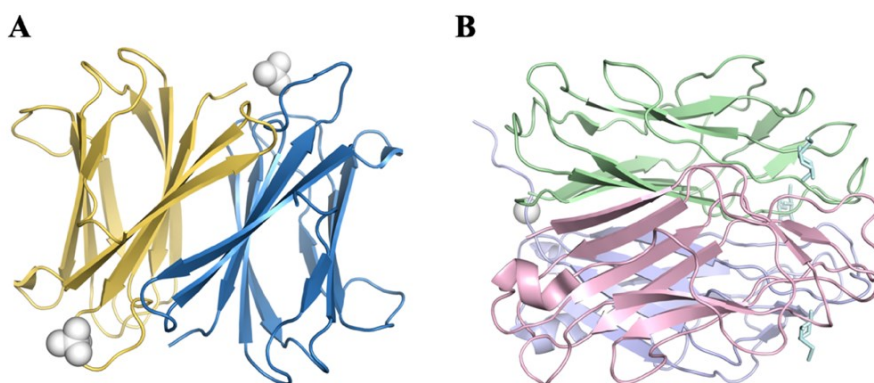
Bakterie BC produkuje čtyři lektiny, které se podobají PA-IIL. Označují se proto BC2L-X nebo případně BclX, kde X je písmeno A, B, C nebo D^{142,143}. Opět podobně jako u PA-IIL, i lektiny BC se podílejí na tvorbě biofilmu¹⁴⁴. První z lektinů BC, BC2L-A, má homodimerní strukturu (podobnou PA-IIL i vazbou dvou Ca²⁺ ve vazebném místě) vázající ve svých dvou vazebných místech D-mannosu a *N*-glykany mannosového typu. Dokáže se však navázat i na heptosy vnější membrány bakteriálních buněk (na jejich lipopolysacharidy). Monomerní forma tohoto proteinu má hmotnost 13,76 kDa a 129aminokyselinová sekvence BC2L-A je ze 32 % identická se sekvencí PA-IIL^{142,145,146}. Struktura BC2L-A je na obr. 9 (str. 35). Všechny další lektiny bakterie BC také váží Ca²⁺. Kromě C-terminální domény, jež je strukturním analogem PA-IIL, obsahují také svojí specifickou, unikátní, N-terminální doménu. Protein BC2L-B je tetramer tvořený 244 a BC2L-D až 289 aminokyselinami. Pro naše výzkumné účely je zásadní lektin označovaný BC2L-C, jehož čtyři podjednotky obsahují 272 aminokyselin¹⁴⁷. Celý hexamerní protein má molekulovou hmotnost asi 145 kDa a monomerní forma lektinu má 28,15 kDa. Dimerní C-terminální D-mannosa-specifická

doména lektinu BC2L-C (BC2L-C-ct) s přibližnou molekulovou hmotností 22 kDa (12,4 kDa / monomer) se shoduje s PA-III ve 48 % aminokyselinové sekvence. Druhá část tohoto proteinu, N-terminální L-fukosa-specifická doména lektinu BC2L-C (BC2L-C-nt) se 41 kDa (monomer má molekulovou hmotnost 19,3 kDa) je homotrimerní¹⁴³. Struktury obou domén lektinu BC2L-C jsou na obr. 10 na str. 35.

Vysoká patogenita lektinových struktur z nich dělá vhodné cíle pro hledání dalších možností antibakteriální terapie. Mezi ně se řadí využití protilátek nebo různých glykostruktur. Za nejatraktivnější cílové molekuly jsou v dnešní době považovány lektiny PA-III a BC2L-C, a právě proto se na ně zaměřuje tato diplomová práce.



Obr. 9: Struktura dimerního bakteriálního lektinu BC2L-A. Jednotlivé řetězce proteinu (PDB ID: 2WR9) jsou znázorněny různými barvami. Tyrkysovou barvou jsou vyznačeny Ca^{2+} a mannosový disacharid. Slabě sivá barva zvýrazňuje sulfátové ionty. Obrázky byly vytvořeny pomocí „softwaru“ PyMOL^{12,145}.



Obr. 10: Struktura jednotlivých domén lektinu BC2L-C. **A** – dimerní struktura BC2L-C-ct (PDB ID: 2XR4). **B** – trimerní struktura BC2L-C-nt (PDB ID: 2WQ4). Jednotlivé proteinové řetězce jsou znázorněny různými barvami. Slabě sivá barva u struktury A zvýrazňuje sulfátové ionty a u struktury B bromidový ion. Obrázky byly vytvořeny pomocí „softwaru“ PyMOL^{12,143,147}.

2 Cíl práce

Hlavním cílem této diplomové práce bylo studium inhibičního vlivu slepičích protilátek a trivalentních fukosylovaných glykoklastrů na adhezenci bakteriálních buněk *Burkholderia cenocepacia* (BC) (kmen ST-32, CCM 7291) a *Pseudomonas aeruginosa* (PA) (kmen PAK, ST 1763) na buněčné linie plicního epitelu CuFi-1 od pacienta trpícího CF nebo NuLi-1 od zdravého dárce. Pro splnění tohoto hlavního cíle bylo potřebné provést následující dílčí úkoly:

- Otestovat životaschopnost buněk PA v přítomnosti glykoklastrů
- Ověřit expresi lektinů BC2L-C a BC2L-A
 - Připravit protilátky proti N-terminální L-fukosa-specifické doméně lektinu BC2L-C (BC2L-C-nt) a C-terminální D-mannosa-specifické doméně lektinu BC2L-C (BC2L-C-ct) a poté ověřit jejich imunoreaktivitu proti daným antigenům
 - Ověřit specifitu anti-BC2L-A protilátek
 - Proměřit růstovou křivku bakteriálních buněk BC kultivovaných v LB (Luria-Bertani) médiu
- Optimalizovat proces fluorescenčního značení bakterií a prověřit závislost fluorescence na počtu bakteriálních buněk
- Ověřit profylaktickou účinnost slepičích protilátek a multivalentních glykoklastrů v adhezenčních testech

3 Materiál a metody

3.1 Použité přístroje a materiál

3.1.1 Přístroje

analytické váhy DV215CD	Ohaus, Švýcarsko
aparát pro horizontální přenos Trans-Blot® Turbo™	Bio-Rad, USA
autokláv Varioklav®	H+P Labortechnik GmbH, Německo
automatický dávkovač s nástavci	Eppendorf, USA
Bürkerova komůrka	Marienfeld Superior, Německo
centrifuga 5418 s úhlovým rotorem FA-45-18-11	Eppendorf, USA
centrifuga HERMLE Z 383 K s výkyvným rotorem 220.86	HERMLE LaborTechnik, Německo
centrifuga Hettich Universal 320 R s výkyvným rotorem #1324 a adapterem #1483A	Hettich Zentrifugen, Německo
CO ₂ inkubátor MCO-170AICUV	Panasonic Healthcare Co., Japonsko
Corning® Cell Counter CLS6749	Corning, USA
elektroforetická aparatura Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, USA
hlubokomrazicí box Thorbi Primus TPU5086DCC	National Lab GmbH, Německo
inkubátor IB-01E	Jeio Tech, Korea
inkubátor s funkcí třepání ES-60	MIUlab, Čína
inkubátor s funkcí třepání Multitron Pro	Infors HT, Švýcarsko
laminární box BIO 126	Labox, ČR
laminární box MB 120	Labox, ČR
magnetická míchačka KMO 2 basic	IKA, Čína
mikroskop Motic AE31	Motic, Německo
mikroskop Nikon Eclipse TE2002-U s programem NIS-Elements AR 3.00	Nikon, Japonsko

mikrovlenný autokláv Microjet	The Rodwell Autoclave Company, UK
mini centrifuga Spectrafuge™	Labnet, USA
orbitální třepačka SHO-2D	Witeg, Německo
orbitální třepačka Yellow Line OS 2 basic	IKA, Čína
pH metr HI-2211	Hanna Instruments, UK
pipetovací nástavec Pipetus	Hirschmann, Německo
předvážky 440-35A	KERN, Německo
sonikátor Sonopuls HD 3100 se sondou MS 73	Bandelin, Německo
spektrorimetr Tecan Infinite M200 Pro s programem i-control	Tecan, Švýcarsko
spektofotometr Metash V-5000	Shangai Metash Instruments Co., LTD., Čína
spektofotometr SPEKTROMOM 195D	Magyar Optical Művek, Maďarsko
termoblok MINIB-100 Mini Dry Bath	MIUlab, Čína
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad, USA
ultrazvuková vana K10	KRAINTEK s.r.o., Slovensko
„vortex“ Genius 3	IKA, Čína
zdroj napětí pro elektroforézu PowerPac™ Basic	Bio-Rad, USA

3.1.2 Materiál

Precision Plus Protein Dual Color Standards	Merck, Německo
2-merkapt ethanol	Fluka, Švýcarsko
akrylamid, bisakrylamid	Merck, Německo
BCIP/NBT „Color Development Substrate“	Promega™, USA
BEGM™ „Bronchial Epithelial Cell Growth Medium BulletKit™“	Lonza, Švýcarsko
bromfenolová modř	Merck, Německo
buněčné linie CuFi-1 a NuLi-1	ATCC®, USA
CaCl ₂ · 2H ₂ O	PENTA, ČR
Coomassie Brilliant Blue R-250	Merck, Německo
D-glukosa · H ₂ O	Lach:Ner, ČR
destičky Corning® CellBind® Flat Bottom Black Polystyrene – 96 jamek	Corning, USA
dimethylsulfoxid	Aplichem, Německo
disodná sůl hexahydrátu 4-nitrofenylfosfátu	Merck, Německo
dodecylsíran sodný	Merck, Německo
ethanol	Lach:Ner, ČR
fetální bovinní sérum	Lonza, Švýcarsko
frakce slepičích protilátek S a K proti BC2L-A (v původní práci značených S1 a K1)	připravené bývalou studentkou (Arina Bolshova) PřF UK, Praha, ČR (katedra biochemie) v roce 2019 ¹⁴⁸
glycerol	Lach:Ner, ČR
glycin	Merck, Německo
glykoklastry	poskytla Mgr. Lenka Malinovská, Ph.D. (výzkumná skupina prof. RNDr. M. Wimmerové, Ph.D., Národní centrum pro výzkum biomolekul, PřF MU, Brno, ČR); Dr. Magdolna Csávás a prof. Dr. Anikó Borbás (University of Debrecen, Department of Pharmaceutical Chemistry, Maďarsko)
HCl	Lach:Ner, ČR
HEPES	Thermo Fisher Scientific, USA

izopropylalkohol	PENTA, ČR
KCl	Lach:Ner, ČR
kolagen typu IV z lidské placenty	Merck, Německo
králíčí protilátka IgG (značena alkalickou fosfatasou) proti slepičím IgY	Merck, Německo
kryozkumavky	Corning, USA
kultivační lahve 25–125 cm ²	TPP, Švýcarsko; Avantor Performance Materials, Inc., USA
kvasinkový extrakt	Thermo Scientific™ Oxoid™, UK
kyselina octová	Lach:Ner, ČR
LB agar	Thermo Scientific™ Oxoid™, UK
LHC-9 medium	Gibco™ Invitrogen, UK
lyofilizát řídkého vaječného bílku	poskytl prof. RNDr. Petr Hodek, CSc. (Katedra biochemie, PřF UK, Praha, ČR)
methanol	Lach:Ner, ČR
MgCl ₂	Lach:Ner, ČR
moduly F16 POLYSORB Unfractionated Immuno Modules (NUN96ft)	Thermo Fischer Scientific, Dánsko
Na ₂ CO ₃	Lach:Ner, ČR
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	Lach:Ner, ČR
NaCl	Lach:Ner, ČR
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	Lach:Ner, ČR
NaHCO ₃	Lach:Ner, ČR
NaN ₃	Merck, Německo
NaOH	Lach:Ner, ČR
parafilm	Bemis, USA
Peha-Soft nitrilové rukavice bez pudru	Hartmann, ČR
peroxodisíran amonný	Merck, Německo
PKH26 „Red Fluorescent Cell Linker Midi Kit for General Cell Membrane Labeling“	Merck, Německo / MedChemExpress, USA
PKH67 „Green Fluorescent Cell Linker Midi Kit for General Cell Membrane Labeling“	Merck, Německo

plastové Petriho misky	Avantor Performance Materials, Inc., USA
plastové zkumavky – 15 ml a 50 ml	TPP, Švýcarsko
rekombinantní lektiny: BC2L-C, BC2L-C-nt, BC2L-C-ct, BC2L-A	poskytla Mgr. Lenka Malinovská, Ph.D.; výzkumná skupina prof. RNDr. M. Wimmerové, Ph.D., Národní centrum pro výzkum biomolekul, PřF MU, Brno, ČR
sušené odtučněné mléko	Bio-Rad, USA
špičky	Biohit, UK
tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Německo
Tris báze	Merck, Německo
trypton	Thermo Scientific™ Oxoid™, UK
Tween 20®	SERVA, Německo
Whatman filtrační papíry (Grade 3)	Thermo Fisher Nalgene®, USA
zmrazovací kontejner Cryo 1 °C	Nalgene® Merck, Německo
injekční stříkačka 1–20 ml	B. Braun, Německo
jednorázové plastové sterilní pipety 1–25 ml	Corning, USA
mikrozkumavky 0,2–2,0 ml	Eppendorf, USA
nitrocelulosová membrána (0,2 µm)	Bio-Rad, USA
trypanová modř 0,4%	Merck, Německo
sterilní mikrofiltry 0,22 µm	Merck Millipore, Německo
0,25% roztok trypsin-EDTA	Merck, Německo
PBS tablety (1 do 500 ml deionizované H ₂ O; pH 7,45)	Gibco™ Invitrogen, UK
D-Tube™ Dialyzer Mini-Maxi (6–8 kDa a 12–14 kDa) dialyzační tuby	Novagen®, USA

3.2 Práce s tkáňovými kulturami

V této diplomové práci byla na buněčných liniích epitelu plic immortalizovaných vnesením genu pro reverzní transkriptasu lidské telomerasy (hTERT, z angl. „human telomerase reverse transcriptase“), studována adherence bakteriálních buněk. Byly použity dvě buněčné linie – NuLi-1 (ATCC® CRL-4011™) pocházející od zdravého dospělého muže a CuFi-1 (ATCC® CRL-4013™) získané od dětské pacientky postižené CF s homozygotní mutací F508del. Základem pro práci s těmito buněčnými liniemi v laminárním boxu MB120, nacházejícím se v laboratoři pro tkáňové kultury, byly produktové listy dodavatele. Celý čas se pracovalo opatrně a sterilně, aby nedošlo k poškození či kontaminaci buněk^{149,150}.

3.2.1 Příprava kultivačního povrchu

Pro kultivaci buněk linií NuLi-1 a CuFi-1 byly použity kultivační lahve potažené kolagenem typu IV získaného z lidské placenty. Příprava tohoto povrchu probíhala v průběhu několika dní v laminárním boxu MB 120, jak je popsáno dále.

K 11,7 mg lyofilizátu kolagenu bylo přidáno 13 ml deionizované vody (diH₂O) a 32,5 µl 0,25% (v/v) kyseliny octové (ředěné diH₂O). Následně byl kolagen v tomto zásobním roztoku o koncentraci 0,9 mg/ml za občasného promíchání rozpuštěn při 4 °C ve sterilní skleněné nádobě přibližně 2–4 hodiny. Po tomto čase byl už kolagen zčásti rozpuštěn a k roztoku bylo přidáno 221 ml diH₂O pro dosažení výsledné koncentrace kolagenu 50 µg/ml. Kolagen byl následně ponechán k úplnému rozpuštění při 4 °C do druhého dne. Druhý den byl získaný roztok přefiltrován přes 0,22µm filtr a nanesen do kultivačních lahví. Pro pokrytí celého povrchu lahve byly použity 2 ml roztoku kolagenu na každých 25 cm² povrchu. Uzavřené lahve byly inkubovány při laboratorní teplotě v zapnutém laminárním boxu s vypnutým UV zářením (minimálně po dobu 18 hodin). Lahve otočené dnem nahoru se po vylití roztoku sušily v zapnutém laminárním boxu s pootevřeným víčkem 1–2 dny. Suché lahve byly 2× promyty fyziologickým roztokem chloridu sodného pufrovaným fosfátem (PBS) připraveným rozpuštěním jedné tablety (Gibco™ Invitrogen, UK) v 500 ml diH₂O, vždy objemem totožným s objemem dříve použitého roztoku kolagenu. Sušení pootevřených lahví

probíhalo opět 1–2 dny v zapnutém laminárním boxu (při vypnutém UV světle) dnem vzhůru a víčka suchých lahví byly po sterilizaci UV zářením (alespoň 2 hodiny) zajištěny parafilmem. Lahve potažené kolagenem se dlouhodobě skladovaly v uzavřeném obalu při 4 °C. Před použitím byly kultivační nádoby opět sterilizovány UV zářením a propláchnuty PBS.

3.2.2 Rozmrazení buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1

Suspenze obou buněčných linií zamrazených v „kryovialkách“ byly přeneseny z kapalného dusíku do zmrazovacího boxu, jenž byl naplněn isopropanolem. Pro postupné zvyšování teploty byly buněčné suspenze v tomto boxu uloženy do hlubokomrazícího boxu (Thorbi Primus TPU5086DCC) o teplotě –80 °C na 24 hodin.

Po 24 hodinách bylo připraveno a ve vodní lázni (37 °C) temperováno růstové médium LHC-9 nebo BEGM, které bylo následně dáno (5 ml na 25 cm² kultivačního povrchu) do nových kultivačních lahví potažených kolagenem typu IV, sterilizovaných UV zářením a promytých PBS pufrům (1 tableta od GibcoTM Invitrogen, UK do 500 ml diH₂O). Takto připravené lahve byly ponechány alespoň 10 minut při 37 °C a 5 % CO₂ (CO₂ inkubátor MCO-170AICUV), aby kultivační médium dosáhlo pH potřebného pro optimální růst používaných buněk.

V této lázni byly krátce rozmrazovány (10–120 s, aby nedošlo k delšímu vystavení buněk toxickému dimethylsulfoxidu (DMSO), který je obsažen v kryoprotektivním médiu) buněčné suspenze, které byly pak přeneseny do sterilních 15ml centrifugačních zkumavek. K buněčné suspenzi bylo podle jejího objemu (1–2 ml) každou minutu přidáno růstové médium o teplotě 37 °C podle rozpisu v tab. 1 na str. 43.

Tab. 1: Rozpis objemů růstového média postupně přidávaného k buněčné suspenzi.

Objem buněčné suspenze	Objem přidávaného růstového média o teplotě 37 °C po 1 minutě [ml]									
	0 min	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min	6 min	7 min	8 min	9 min
1 ml	0,10	0,12	0,15	0,19	0,26	0,36	0,52	0,86	1,69	4,75
2 ml	0,20	0,24	0,30	0,38	0,52	0,72	1,04	1,72	3,38	9,50

Buněčné suspenze s finálním objemem růstového média byly centrifugovány (Hettich Universal 320 R) 5 minut (25 °C, 163× g). Získané pelety byly resuspendovány v 1 ml kultivačního média. Následně byl podle postupu z kapitoly 3.2.5 (str. 45) stanoven počet a viabilita buněk v homogenátu a výsledek určil počet buněk, respektive objem buněčných suspenzí, přenesených do nových kultivačních lahví s růstovým médiem ekvilibrovaným na správné pH. Počet buněk NuLi-1, respektive CuFi-1, nasazovaných do lahve (25 cm²) by podle produktových listů měl odpovídat 37,5–50 · 10⁴, respektive 27–75 · 10³ buněk. Kvůli vysoké náročnosti procesu rozmrazování pro buňky byl však do lahví přenesen celý zbytek buněčných suspenzí. Kontrola buněk probíhala po rozmrazení každý den.

3.2.3 Kultivace buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1

Obě používané linie buněk byly kultivovány v růstovém médiu LHC-9 nebo BEGM na kolagenovém (kolagen typu IV z lidské placenty) povrchu lahví (způsob přípravy tohoto povrchu je popsán v kapitole 3.2.1 na str. 42). Výměna růstového média (5 ml na každých 25 cm² kultivačního povrchu) u obou typů buněk probíhala nejpozději každý třetí den. Po dobu prvních čtyř pasáží (postup pasážování je uveden v oddílu 3.2.4, str. 44) byly buňky pěstovány v malých lahvích (25 cm²) a následně, pro napěstování na experiment, byly kultivovány ve větších lahvích s povrchem 75 cm² nebo 150 cm². Podmínky kultivace v inkubátoru MCO-170AICUV byly vždy stejné (37 °C, 5 % CO₂).

3.2.4 Subkultivace buněk CuFi-1 a NuLi-1

Subkultivace nebo také pasáž je proces, při kterém se pomocí roztoku trypsinu (0,25%) s ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA; 0,53mM) oddělují buňky od povrchu kultivační nádoby a část z nich se přenesse do nové lahve s čerstvým růstovým médiem, čímž dojde k naředění dané buněčné suspenze. Buňky jsou pasážovány opakovaně podle potřeby, průměrně každý sedmý den. Proces pasážování probíhá následovně.

Z kultivační lahve, jejíž povrch byl přibližně z 80 % pokryt buňkami, bylo odstraněno růstové médium a buňky byly promyty pomocí 2 ml (na 25 cm² povrchu) 10mM PBS

(připravené rozpuštěním 1 tablety (Gibco™ Invitrogen, UK) v 500 ml diH₂O) nebo 20mM roztoku soli pufovaného Tris (TBS, z angl. „Tris buffered saline“; s obsahem Tris báze (20 mM), NaCl (140 mM), KCl (2,68 mM), diH₂O a pH 7,4) pro odstranění zbytků růstového média inhibujícího účinek roztoku trypsin-EDTA. Tento roztok trypsin-EDTA o laboratorní teplotě byl pak nanesen do lahve v objemu 1 ml na každých 25 cm² a důkladně rozprostřen po povrchu kultivační nádoby, jež byla následně inkubována 8–10 minut při 37 °C a 5 % CO₂ v inkubátoru MCO-170AICUV. Po uplynutí doby inkubace byly dosud přisedlé buňky uvolněny jemným natáčením lahve a kontrola uvolnění buněk probíhala na mikroskopu Motic AE31. Aktivita roztoku trypsin-EDTA byla inhibována přidáním 1 ml (na 25 cm²) 1% (v/v) roztoku fetálního hovězího séra (FBS) v PBS (nebo v TBS) o laboratorní teplotě. Odstranění zbylých buněk adherovaných na kultivační povrch bylo dosaženo jeho několikanásobným promytím buněčnou suspenzí přítomnou v dané lahvi. Celý objem této suspenze byl přenesen do 15ml centrifugační zkumavky, ve které byl centrifugován při teplotě 25 °C a zrychlení 163× g (Hettich Universal 320 R) 5–10 minut. Získaná peleta byla resuspendována v kultivačním médiu (podle velikosti pelety byly použity 1–2 ml) ohřátém ve vodní lázni na teplotu 37 °C. Toto médium bylo dále použito i pro přípravu alikvotů, v nichž byl stanovován počet a viabilita buněk odebraných z dané buněčné suspenze (viz dále v kapitole 3.2.5 na str. 45). Podle počtu buněk přítomných v suspenzi byl vypočten objem této suspenze později pipetovaný do nové kultivační lahve potažené kolagenem typu IV z lidské placenty. Povrch této nádoby byl promyt 4 ml PBS či TBS (tím byly odstraněny krystalky vzniklé při přípravě kultivačního povrchu postupem uvedeným v oddílu 3.2.1. (str. 42)) a bylo do ní přidáno LHC-9 nebo BEGM médium temperované ve vodní lázni na 37 °C (5 ml na 25 cm²). V případě linie NuLi-1 odpovídal počet životaschopných buněk nasazovaných do nové lahve 3,75–5,0 · 10⁵ na 25 cm² povrchu, v případě CuFi-1 to bylo 2,5–7,5 · 10⁴ viabilních buněk na stejný povrch.

3.2.5 Stanovení počtu a viability buněk

Ke stanovení počtu a viability eukaryotních buněk CuFi-1 a NuLi-1 v buněčné suspenzi byl využit přístroj Corning® Cell Counter CLS6749. Jedná se o rychlou a přesnou metodu, která vyhodnocuje stanovované parametry ze snímků pořízených pomocí tohoto zařízení napojeného na počítač s programem CytoSMART Cell Counter, jenž umožňuje

rozlišit nejen velikost buněk, ale také jejich viabilitu, a to díky obarvení mrtvých buněk trypanovou modří (živé buňky jsou vůči ní odolné, nezbarví se)¹⁵¹.

Před samotným počítáním buněk a vyhodnocením jejich viability je nutné připravit zásobní suspenzi. Ta se získá odebráním alikvoty (4 μ l) buněčné suspenze v procesu subkultivace (viz kapitola 3.2.4, str. 44), k němuž se přidá 16 μ l růstového média a 20 μ l 0,4% (w/v) roztoku trypanové modří. Tato 10 \times naředěná suspenze byla aplikována na Bürkerovu komůrku. S použitím programu CytoSMART Cell Counter bylo pořízeno 8 snímků z různých oblastí mřížky Bürkerovy komůrky, jejichž analýzou byl programem vyhodnocen počet živých i mrtvých buněk.

Tento počet buněk lze ověřit manuálním počítáním za pomoci mikroskopu, kdy se z mřížky Bürkerovy komůrky obsahující 9 velkých čtverců spočítají buňky pouze uvnitř a na dvou hranách tří čtverců po uhlopříčce. Po vynásobení průměru z těchto tří čtverců ředěním vzorku (tzn. 10 \times) a hodnotou $1 \cdot 10^4$ se získá počet buněk na 1 ml původní neředěné buněčné suspenze.

3.2.6 Zamrazení buněčných linií

Alikvot buněčné suspenze odebraný v procesu subkultivace (viz kapitola 3.2.4, str. 44) byl použit pro stanovení počtu a viability buněk provedené způsobem z kapitoly 3.2.5 (str. 45). Peleta získaná centrifugací (5–10 minut, 25 °C, 163 \times g, Hettich Universal 320 R) zbylé suspenze buněk byla resuspendována v kryoprotektivním médiu. Toto médium se skládalo z kultivačního média LHC-9 nebo BEGM, DMSO a FBS v objemovém poměru 6 : 1 : 3. V 1 ml kryoprotektivního média bylo resuspendováno $1 \cdot 10^6$ až $5 \cdot 10^6$ viabilních buněk CuFi-1 nebo NuLi-1. Alikvoty (po 1–2 ml ve vychlazených kryozkumavkách) této buněčné suspenze bylo nutné ochlazovat postupně, a proto byly umístěny do zmrazovacího kontejneru, jenž byl naplněn isopropanolem a následně byl umístěn na 1–2 dny do hlubokomrazicího boxu Thorbi Primus TPU5086DCC s teplotou –80 °C. Pro zachování viability používaných buněk byly NuLi-1 i CuFi-1 po uvedené době přeneseny do kapalného dusíku pro dlouhodobé skladování.

3.3 Práce s bakteriálními buňkami

V průběhu zpracování této diplomové práce byly použity dva bakteriální rody, BC (referenční kmen ST-32 s označením CCM 7291 poskytnutý prof. MUDr. Pavlem Dřevínkem, Ph.D. z 2. lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice Motol v Praze, ČR) a PA (kontrolní kmen PAK, který lze nalézt i pod označením ST 1763). Oba kmeny byly dlouhodobě skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v hlubokomrazícím boxu Thorbi Primus TPU5086DCC. S oběma bakteriálními preparáty se pracovalo při aseptických podmínkách v mikrobiologické laboratoři, většinou v laminárním boxu BIO 126. Jako základ pro práci s těmito bakteriemi sloužily dříve zveřejněné práce^{152,153}.

3.3.1 Kultivace bakteriálních buněk

Bakteriální kultura byla po vyjmutí z mrazícího boxu o teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ rozmrazována při laboratorní teplotě. V mezidobí bylo do vyklávané 100ml Erlenmayerovy baňky přes $0,22\mu\text{m}$ filtr přidáno 10 ml sterilního LB média (použito pro obě bakterie) o následujícím složení:

- *LB médium*: 1% (w/v) trypton; 0,5% (w/v) kvasinkový extrakt; 171mM NaCl

Do takto přefiltrovaného média bylo přidáno 20 μl rozmrazené bakteriální suspenze a Erlenmayerova baňka byla zakryta alobalem. Bakterie PA byly následně kultivovány 14 hodin při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 150 RPM, bakterie BC 24 hodin při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 250 RPM. Pro kultivaci obou bakterií byla použita třepačka Infors HT Multitron Pro nebo ES-60 MIUlab.

3.3.2 Fotometrická kvantifikace bakterií

Množství bakteriálních buněk PA i BC ve vzorku bylo stanoveno na spektrofotometru Metash V-5000. Optická densita (zákal) byla měřena proti slepému vzorku ve viditelné oblasti spektra. Bakterie byly kvantifikovány na základě hodnoty optické density naměřené při 600 nm (OD_{600}). Pro přepočítání OD_{600} na množství buněk PA nebo BC byl použit vztah, podle kterého se v 1 ml měřeného vzorku nachází $6 \cdot 10^8$ buněk těchto bakterií při $\text{OD}_{600} = 1,000$ ^{154,155}.

3.3.3 Zamrazení bakteriálních buněk

Postup zamrazení bakteriálních buněk byl stejný pro oba bakteriální preparáty. Bakterie BC nebo PA byly kultivovány postupem popsaným v kapitole 3.3.1 (str. 47) a následně naředěny LB médiem na $OD_{600} = 1,000$. Z této naředěné suspenze byly v 0,5ml zkumavkách vytvořeny 200 μ l alikvoty, k nimž bylo přidáno stejné množství přefiltrovaného (0,22 μ m filtr) kryoprotektivního média. Toto médium se skládalo ze 40% (w/v) glycerolu v PBS. Připravené alikvoty byly nejdříve zamrazeny v kapalném dusíku a následně byly dlouhodobě uchovávány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Thorbi Primus TPU5086DCC).

3.3.4 Růstová křivka *Burkholderia cenocepacia*

Bakterie BC (kmen ST-32 (CCM 7291)) byly kultivovány 24 hodin v LB médiu při podmínkách uvedených v oddílu 3.3.1 na str. 47. Následně byla proměřena OD_{600} (viz kapitola 3.3.2, str. 47) a bakteriální kultura byla naředěna sterilním LB médiem na hodnotu 1,000. Z této bakteriální suspenze byl dalším ředěním LB médiem vytvořen alikvot kultury BC s $OD_{600} = 0,010$, který byl kultivován po dobu 24 hodin při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 250 RPM na třepačce Infors HT Multitron Pro. Pravidelným měřením OD_{600} na spektrofotometru Metash V-5000 byla změřena růstová křivka – každou hodinu byly z kultivované bakteriální suspenze odebírány další alikvoty a po jejich patřičném naředění použitým LB médiem byla měřena OD_{600} proti LB médiu bez bakteriálních buněk. Hodnoty OD_{600} byly přepočteny na neředěnou bakteriální suspenzi a logaritmy získaných hodnot byly vyneseny do grafu v závislosti na době kultivace.

3.4 Testování viability bakteriálních buněk

Pro studium adhezenčního efektu bylo přínosné zjistit, zda multivalentní glykokonjugáty na báze fukosy nemají vliv na životaschopnost bakterií. Z důvodu provedení této metody byla použita bakterie PA, konkrétně bioluminiscenční kmen s označením PA-lux,

který poskytl pan prof. B. Hancock z University of British Columbia v Kanadě. Pro experiment byly využity 2 fukosylované glykoklastry – monovalentní KGY-4 a trivalentní KGY-12. Koncentrace těchto glykoklastrů se pohybovala mezi 2 μM a 1000 μM .

V rámci experimentu byly jako pozitivní kontrola použity různé koncentrace azidu sodného (NaN_3). Buď dané koncentrace odpovídaly přímo koncentracím glykoklastrů v adhezenčních testech anebo bylo provedeno ředění dvojkovou ředící řadou, při níž se vycházelo z původního 0,1% (w/v) roztoku NaN_3 .

Bakteriální životaschopnost byla zkoumána ve spolupráci s kolegyní Mgr. Michaelou Kurucovou.

Postup:

Rozmrazená bakteriální suspenze PA-lux skladována při $-80\text{ }^\circ\text{C}$ v boxu Thorbi Primus TPU5086DCC byla oživena na plotně LB agaru, na nějž byla přenesena za pomoci sterilní jednorázové kličky. Tato plotna byla připravena nalitím teplého LB agaru do sterilní Petriho misky, která byla po ztuhnutí agaru uložena do lednice se $4\text{ }^\circ\text{C}$ na 24 hodin. Kultivace PA-lux na zavěšeném agaru probíhala 24 hodin při $37\text{ }^\circ\text{C}$ v inkubátoru IB-01E.

Další den byly ve 20 ml přefiltrovaného (přes $0,22\mu\text{m}$ filtr) LB média v 50ml sterilní plastové centrifugační zkumavce kultivovány přibližně 2 kolonie PA-lux odebrané z LB agaru. Tato kultivace probíhala při $37\text{ }^\circ\text{C}$ a 200 RPM v inkubátoru ES-60 MIUlab opět po dobu 24 hodin.

Po 24 hodinách bylo do sterilní plastové zkumavky o maximálním objemu 50 ml přes $0,22\mu\text{m}$ mikrofiltr přidáno 10 ml LB média. Po přidavku roztoku glukosy (výsledná koncentrace 20 mM) byl do tohoto roztoku dodán i 1 ml bakteriální suspenze. Za konstantního třepání (200 RPM) v inkubátoru ES-60 MIUlab při $37\text{ }^\circ\text{C}$ došlo během 2 hodin k namnožení bakterií. Na spektrofotometru Metash V-5000 byla pak za použití 1cm kyvety proměřena OD_{600} získané suspenze PA-lux, která měla hodnotu přibližně 0,3. Do jamek mikrotitrační destičky s 96 jamkami a neprůhledným dnem (Corning® 96 CellBind® Flat Bottom Black Polystyrene) bylo za pomoci opakovacího dávkovače

aplikováno vždy 100 μ l této suspenze. Pro dosažení celkového objemu 200 μ l na jamku bylo do každé jamky v triplicátech aplikováno ještě 100 μ l jednoho ze 3 roztoků:

1. Samotného LB média
2. Roztoků glykoklastru KGY-4 nebo KGY-12 naředěného pomocí LB média na potřebnou koncentraci (rozmezí 2–1000 μ M v případě monovalentního KGY-4 anebo 8–125 μ M při použití trivalentního KGY-12)
3. Roztoků NaN_3 v LB médiu (koncentrační rozmezí 2–1000 μ M anebo ředění 0,1% (w/v) roztoku NaN_3 dvojkovou ředící řadou)

Takto připravená destička byla inkubována při 37 °C ve spektrofotometru Tecan Infinite M200 Pro za využití programu i-control s nastavením 5 kinetických cyklů po 20 minut s měřením luminiscence s následujícími parametry – doba integrace 1500 ms, doba ustálení 10 ms, orbitální třepání 10 s a amplituda 1 mm. Výsledky byly následně zpracovány ve formě sloupcových grafů.

3.5 Příprava slepičích protilátek

Slepičí protilátky byly připraveny ve spolupráci s panem Ing. Pavlem Trefilem. Tyto protilátky byly izolovány ze žloutků vajec snesených slepicemi chovanými v separátních klecích. Nejdříve byla téměř každý den sbírána slepičí vejce snesená před imunizací slepic antigeny a protilátky získané z těchto vajec sloužily při dalších experimentech jako kontrolní frakce označované KX, kde K značí kontrolní frakci a X je číslo slepice, od které tato frakce s bazálními hladinami protilátek pochází. Protilátky získané z pravidelně sbíraných slepičích vajec snesených po imunizaci antigeny byly dále používány jako specifické protilátky proti danému antigenu. Tato specifická frakce byla označena SX, kde S značí specifickou frakci a X je opět číslo slepice, od které daná frakce pochází.

Obě slepice byly intramuskulárně imunizovány třemi dávkami antigenu (rekombinantně připravena BC2L-C-nt nebo BC2L-C-ct poskytnutá Mgr. Lenkou Malinovskou, Ph.D.; výzkumná skupina prof. RNDr. Michaely Wimmerové, Ph.D., Národní centrum pro výzkum biomolekul, PřF MU, Brno, ČR) vždy po 100 μ g. Roztok aplikovaný slepicím obsahoval kromě samotného antigenu také adjuvans s usmrcenými

mykobakteriemi. Imunizace obou slepic proběhly ve dnech 14.6.2023, 22.6.2023 a 30.6.2023. Slepice číslo 1 byla imunizována antigenem BC2L-C-nt a z jejích vajec byly izolovány protilátky K1 a S1, zatímco slepici číslo 2 byl opakovaně aplikován antigen BC2L-C-ct. Z vajec slepice číslo 2 byly pak izolovány protilátky s označením K2 a S2.

3.5.1 Izolace protilátek ze žloutků slepičích vajec

Každá frakce protilátek byla izolována ze 6 žloutků slepičích vajec. Pomocí oddělovače bílků byly vaječné žloutky separovány a zbaveny bílků slabým proudem tekoucí kohoutkové vody. Omyté žloutky byly přeneseny do 250ml polyethylenového válce přes nálevku a byl změřen jejich objem. Následně byl celý obsah přelit do polyethylenové kádinky o objemu 1 l, ve které byl kohoutkovou vodou naředěn 8× tak, že nejdříve byly žloutky na magnetické míchače při laboratorní teplotě homogenizovány v menším objemu vody a až pak byl dolit zbylý objem. Po úplné homogenizaci žloutků v celém objemu vody bylo za stálého míchání upraveno pH na hodnotu 5,0 pomocí 0,5M HCl. Získaný roztok byl následně v kónické nádobě zamrazen při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalšího dne (přibližně 24 hodin na 1 litr homogenátu).

Zmrazený homogenát byl po oddělení od nádoby a opětovném zmrznutí povrchu přenesen do kónické nádoby s dírkami a filtračním papírem. V tomto uspořádání došlo k postupnému rozmrzání a současně filtraci do skleněné kádinky v průběhu cca 18 hodin.

Následně byl změřen objem získaného filtrátu. Pak bylo přistoupeno ke srážení pomocí přídatku NaCl a úpravy pH za stálého míchání na magnetické míchače tak, že nejdříve se k filtrátu přidala navážka NaCl odpovídající finálnímu 8,76% (w/v) roztoku NaCl ve filtrátu a po rozpuštění NaCl byla upravena hodnota pH roztoku na 4,0 pomocí 0,5M HCl. Po 30minutovém míchání roztoku na magnetické míchače při laboratorní teplotě byl roztok ponechán precipitovat (2 hodiny, laboratorní teplota)¹⁵⁶. Po rozmíchání sedimentu byl roztok centrifugován na centrifuze HERMLE Z 383 K (9000× g, 20 minut, 4 °C). Získaná peleta byla na orbitální třepače Yellow Line OS 2 basic (4. stupeň třepání) rozpuštěna v izolačním PBS-NaN₃ pufru. Rozpuštění pelety v izolačním PBS-NaN₃ pufru bylo přibližně po 10 minutách rozpouštění usnadněno úpravou pH na hodnotu 7,2 pomocí 1M NaOH.

- *Složení izolačního PBS-NaN₃ pufru:* 0,1M NaCl; 0,01M Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 0,1% (w/v) NaN₃; diH₂O (1 l); pH 7,2

Po centrifugaci (Eppendorf 5418, 13 4000× g, 25 °C, 5 minut) získaného roztoku byla určena koncentrace protilátky v supernatantu naředěném pomocí PBS-NaN₃ pufru měřením absorbance při 280 nm (A₂₈₀) proti stejnému pufru ve křemenné kyvetě na přístroji SPEKTROMOM 195D. Koncentrace protilátky byla vypočtena z hodnoty absorbance pomocí vztahu:

$$c \text{ [mg/ml]} = A_{280} \cdot \text{ředění} \cdot 1,094,$$

kde 1,094 je experimentálně stanovený faktor.

3.6 Ověření specifity protilátek metodou ELISA

Imunochemická metoda známá pod zkratkou ELISA (imunostanovení na pevné fázi s enzymovou aktivitou; z angl. „enzyme linked immunosorbent assay“) se již od roku 1971 využívá k detekci a kvantifikaci komplexu antigenu a protilátky. Na antigen vázaný na dně jamky mikrotitrační destičky se specificky váže primární protilátka, která následně váže sekundární protilátku konjugovanou s enzymem. Ten slouží jako značkovácí molekula přeměňující chromogenní substrát na produkt. K detekci dochází měřením absorbance vzniklého produktu a její míra odpovídá koncentraci testovaného analytu (protilátky)¹⁵⁷.

Použité roztoky:

- *Imobilizační pufr:* 13mM Na₂CO₃; 25mM NaHCO₃; diH₂O; pH 9,6
- *PBS-ELISA pufr:* 1,8mM Na₂HPO₄ · 12H₂O; 0,96mM NaH₂PO₄ · 2H₂O; 134mM NaCl; diH₂O; pH 7,2
- *PBS-ELISA-Tween pufr:* PBS-ELISA pufr; 0,1% (w/v) Tween 20®; pH 7,2
- *Blokovací roztok:* 2% (w/v) lyofilizát vaječného bílku v PBS-ELISA-Tween
- *Vyvolávací roztok:* 7,5 µl diH₂O; 1,1 ml 0,2M Na₂CO₃; 1,4 ml 0,2M NaHCO₃; 10 µl 1M MgCl₂; 10 mg disodné soli hexahydrátu 4-nitrofenylfosfátu
- *Zastavovací roztok:* 3M NaOH

Postup:

Metodou ELISA byla ověřena specifita nově připravených slepičích protilátek proti jednotlivým doménám proteinu BC2L-C. Touto technikou byla testována také specifita slepičích protilátek proti BC2L-A¹⁴⁸. Protilátky byly uchovány v izolačním PBS pufru s NaN₃ (složení je uvedeno v oddílu 3.5.1, str. 51) při 4 °C.

Do 5 ml imobilizačního pufru bylo přidáno 20 µl roztoku lektinu v PBS-ELISA pufru o koncentraci 1 mg/ml. Výsledný roztok o koncentraci 4 µg/ml byl po 100 µl aplikován automatickým dávkovačem do jamek destičky POLYSORB (NUN96ft). Takto připravená destička zakrytá víčkem byla následně inkubována ve vlhké komůrce při 4 °C přes noc.

Po ukončení inkubace byly jamky důkladně promyty 3× 220 µl PBS-ELISA-Tween pufru. Do každé jamky bylo pak aplikováno 150 µl 2% (w/v) blokovacího roztoku přefiltrovaného přes vatku (před filtrací bylo rozpouštění lyofilizátu vaječného bílku v PBS-ELISA-Tween pufru usnadněno krátkou sonikací v ultrazvukové vaně K10). Blokace jamek uzavřené destičky následně probíhala ve vlhké komůrce 60 minut při 37 °C (inkubátor IB-01E).

Po trojnásobném promytí jamek 220 µl PBS-ELISA-Tween bylo do jamek přidáno po 100 µl roztoku slepičí protilátky proti danému antigenu. Finální koncentrace testované protilátky v PBS-ELISA pufru byla 90 µg/ml, 30 µg/ml, 10 µg/ml a 3,3 µg/ml. Po dvouhodinové inkubaci uzavřené destičky ve vlhké komůrce při 37 °C (inkubátor IB-01E) byly jamky opětovně promyty 3× 220 µl PBS-ELISA-Tween. Následně byl do jamek destičky aplikován roztok sekundární protilátky (konjugát králičí IgG proti slepičím IgY s navázanou alkalickou fosfatase) naředěné PBS-ELISA pufrům – bylo použito 8 µl sekundární protilátky ve 12 ml PBS-ELISA pufru. Po hodinové inkubaci destičky ve vlhké komůrce při 37 °C (inkubátor IB-01E) a trojnásobném promytí jamek 220 µl PBS-ELISA-Tween pufru bylo do jamek přidáno po 100 µl čerstvě připraveného vyvolávacího roztoku. Vyvolání bylo zastaveno přidáním 100 µl 3M roztoku NaOH po 10 minutách. Jako pozitivní kontrola aktivity alkalické fosfatasy sloužil roztok připravený z naředěné sekundární protilátky připravené dříve a vyvolávacího roztoku smíšených v poměru 1 : 1. Následně byla na přístroji Tecan Infinite M200 Pro (program i-control) proměřena absorbance při 405 nm (A₄₀₅).

3.7 Elektroforéza a „Western Blot“ následovaný imunodetekcí

V této diplomové práci byla elektromigrační separační metoda, elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, použita pro rozdělení směsi denaturovaných proteinů z bakteriálních lyzátů. Dodecylsírán sodný (SDS) uděluje jednotlivým proteinům celkový záporný náboj (nekovalentní navázání 1,4 g SDS na 1 g proteinu) umožňující jejich postup v gelu (od záporné katody ke kladné anodě). Rozdělování proteinů v gelu podle molekulové hmotnosti je umožněno jejich různou rychlostí putování, která je úměrná zápornému náboji, jenž SDS uděluje jednotlivým proteinům¹⁵⁸.

„Western Blot“ je imunochemická metoda navazující na elektroforézu. V prvním kroku jsou proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulosovou nebo polyvinylidenfluoridovou membránu působením elektrického proudu. Po zablokování nespecifických interakcí následuje imunochemická detekce bílkovin pomocí primární protilátky připravené proti žádanému antigenu (epitopu vybraného proteinu) a sekundární protilátky zacílené proti primární protilátce. Výsledná detekce probíhá pomocí enzymu navázaného na sekundární protilátku, který reaguje se substrátem, z něhož vzniká barevná sraženina¹⁵⁸. Základní postup pro provedení této metody byl převzat z předcházející diplomové práce¹⁵³.

3.7.1 Příprava vzorků

Roztok pro přípravu vzorků:

- *4× koncentrovaný vzorkový pufr:* 0,25M Tris/HCl; 8% (w/v) SDS; 20% (v/v) 2-merkптоethanol; 0,004% (w/v) bromfenolová modř; 40% (v/v) glycerol; pH 6,8

Postup:

Suspenze bakterií BC po 24hodinové kultivaci (podle postupu uvedeného v oddílu 3.3.1, str. 47) byla centrifugována (25 °C, 9000× g, HERMLE Z 383 K) v 15ml centrifugační zkumavce 5 minut. Po trojnásobném centrifugačním promytí pelety diH₂O (vždy 5 ml a 5 minut, 25 °C, 9000× g, HERMLE Z 383 K) byla měřením OD₆₀₀ (Metash V-5000) proti diH₂O stanovena koncentrace bakteriálních buněk v homogenizované směsi podle kapitoly 3.3.2, str. 47. V případě přípravy několika různých vzorků bylo vždy odebráno do nové centrifugační zkumavky uniformní množství bakteriálních buněk, které byly v dalším kroku centrifugovány při 9000× g a teplotě 25 °C po dobu 10 minut (HERMLE Z 383 K). Získaná peleta ($7,8 \cdot 10^9$ BC) byla resuspendována v 1 ml diH₂O. Po přidání 4× koncentrovaného vzorkového pufru (1 díl vzorkového pufru ke 3 dílům bakteriální suspenze) byla získaná suspenze sonikována na ledu (amplituda 50 %, 2 minuty, 15s pulsy, sonikátor Bandelin sonopuls, sonda MS 73) a po přenesení do 0,5ml mikrozkušavek (po 200 µl) inkubována na stolním termobloku MINIB-100 Mini Dry Bath 10 minut při 95 °C. Takto připravené vzorky byly centrifugovány (stolní mini centrifuga Spectrafuge™) pro odstranění zkondenzované vody z víčka zkumavky a byly uchovány při -20 °C.

Po rozmrazení, těsně před nanesením do jamek polyakrylamidového gelu, byly vzorky opět ohřívány při 95 °C 10 minut a centrifugovány stejně jako před zamrazením, promíchány („vortex“ Genius 3) a opět krátce centrifugovány (stolní mini centrifuga Spectrafuge™), jelikož byly vzorky připraveny z celých bakteriálních lyzátů. Supernatanty vzorků byly nanášeny do jamek gelu v objemu 20 µl.

Lyzáty rekombinantně připravených lektinů sloužících jako standardy pro elektroforézu a „Western Blot“ byly rozpuštěny v diH₂O na výslednou koncentraci roztoku 1 mg/ml. Tento roztok byl následně naředěn diH₂O a 4× koncentrovaným vzorkovým pufrem na koncentraci 0,2 mg/ml (k 20 µl roztoku lektinu o koncentraci 1 mg/ml tedy bylo přidáno 55 µl diH₂O a 25 µl 4× koncentrovaného vzorkového pufru). Vzorek byl inkubován 10 minut při 95 °C (MINIB-100 Mini Dry Bath), centrifugován pro odstranění kondenzátu z víčka (stolní mini centrifuga Spectrafuge™), promíchán („vortex“ Genius 3), opět krátce centrifugován (stolní mini centrifuga Spectrafuge™) a aplikován do jamek gelu v množství 30 µl/jamka v případě standardu BC2L-A nebo 15 µl/jamka v případě standardu BC2L-C.

3.7.2 Elektroforéza

Gely a použité roztoky:

- *Pufř A:* 0,375M Tris/HCl v diH₂O; 0,1% (w/v) SDS v diH₂O; pH 8,8
- *Pufř B:* 0,125M Tris/HCl v diH₂O; 0,1% (w/v) SDS v diH₂O; pH 6,8
- *Polymerační roztok:* 29% (w/v) akrylamid; 1% (w/v) bisakrylamid; diH₂O
- *Roztok APS:* 10% (w/v) peroxidisíran amonný (APS, z angl. „ammonium persulfate“); diH₂O
- *12% separační gel:* 3,0 ml pufřu A; 2,0 ml polymeračního roztoku A; 50 μ l roztoku APS; 5 μ l tetramethylethylendiaminu (TEMED)
- *4% zaostřovací gel:* 1,7 ml pufřu B; 267 μ l polymeračního roztoku B; 40 μ l roztoku APS; 2 μ l TEMED
- *Elektrodový pufř:* 0,192M glycin v diH₂O; 0,025M Tris/HCl v diH₂O; 0,1% (w/v) SDS v diH₂O; pH 8,3
- *Barvicí roztok:* 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 9,2% (v/v) kyselina octová; 46% (v/v) ethanol; diH₂O
- *Odbarvovací roztok:* 10% (v/v) kyselina octová; 25% (v/v) ethanol; diH₂O

Postup:

Po vyčištění a odmaštění skel pomocí ethanolu byl do elektroforetické aparatury (Bio-Rad) sestavené z těchto skel nalit roztok (asi 5 ml) pro přípravu 12% separačního gelu o síle 1 mm, který byl převrstven diH₂O. Roztok byl nechán polymerovat 30 minut a po odstranění vrstvy diH₂O byl na zatuhnutý separační gel nalit roztok pro přípravu 4% zaostřovacího gelu (asi 2 ml), do kterého byl ihned vložen hřeben o síle 1 mm tak, aby v gelu nevznikly bublinky. Po ukončení polymerace gelu (20 minut) byla aparatura se skly, mezi nimiž byl tuhý gel, vložena do elektroforetické vany. Mezi skla i do vany byl nalit elektrodový pufř a ze zaostřovacího gelu byl opatrně vytažen hřeben, čímž se vytvořily jamky pro aplikaci 3 μ l markeru molekulové hmotnosti („Precision Plus Protein Dual Color Standards“; Bio-Rad) a potřebného objemu připravených vzorků standardů a bakteriálních lyzátů (viz kapitola 3.7.1, str. 54). Elektroforéza probíhala v aparatuře připojené ke zdroji napětí PowerPacTM Basic obvykle 60–120 minut

při 150 V. Dále se pracovalo pouze s označeným separačním gelem opláchnutým diH₂O. Jeden gel byl ihned barven barvicím roztokem minimálně 1 hodinu, pak byl promyt diH₂O, vložen do odbarvovacího roztoku a odbarvován na třepačce; druhý gel byl použit pro „Western Blot“ následovaný imunodetekcí.

3.7.3 „Western Blot“ následovaný imunodetekcí

Použité roztoky:

- *Přenosový pufr*: 0,025M Tris/HCl; 0,192M glycin; 20% (v/v) methanol; diH₂O; pH 8,3
- *TBS pufr*: 0,02M Tris/HCl; 0,137M NaCl; diH₂O; pH 7,6
- *TBS-Tween pufr*: TBS pufr; 0,1% (w/v) Tween 20®; pH 7,6
- *Blokovací roztok*: 5% (w/v) sušené odtučněné mléko v TBS-Tween pufru
- *AP pufr*: 0,1M Tris; 0,15M NaCl; 1mM MgCl₂; 10mM NaN₃; diH₂O; pH 9,0
- *Vyvolávací roztok*: 5 ml AP pufru; 33 µl NBT (nitrotetrazoliová sůl); 16,5 µl BCIP (5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát)

Postup:

Během elektroforézy bylo nastříháno 6 filtračních papírků Whatman 3 a nitrocelulosová membrána, vše o velikosti odpovídající velikosti gelu (6 cm × 8 cm). Následně byl opláchnutý gel po elektroforéze celkem 30 minut třepán (55 RPM, třepačka Witeg SHO-2D) v přenosovém pufru – prvních 15 minut byl přenosový pufr vyměněn vždy po 5 minutách a pak se gel třepal dalších 15 minut v dále neměněném přenosovém pufru. Nitrocelulosová membrána byla nejdříve pouze smočena v elektrodovém pufru (složení uvedeno v oddílu 3.7.2 na str. 56), v diH₂O a v přenosovém pufru, ve kterém pak byla třepána (55 RPM, Witeg SHO-2D) 30 minut. Po inkubaci byl na anodě aparatury pro „Western Blot“ sestaven „sendvič“ sestávající ze 3 kusů filtračních papírků namočených do přenosového pufru, označené nitrocelulosové membrány, označeného polyakrylamidového separačního gelu a dalších 3 kusů namočených filtračních papírků. Po položení každé vrstvy byly možné bubliny narušující proces přenosu proteinů z gelu na membránu odstraněny válečkem. Na poslední vrstvu filtračního papíru bylo ještě

přidáno malé množství přenosového pufru, které bylo po celém povrchu papírku rozprostřeno válečkem. Přenosový pufr prosáklý mimo „sendviče“ byl vysušen a aparatura byla uzavřena víkem s katodou. Přenos proteinů z gelu o výše uvedené velikosti na membránu probíhal v přístroji Trans-Blot Turbo 45 minut při 0,1 A a konstantním napětí 5 V.

Po přenosu byl gel promyt diH_2O a barven barvicím roztokem minimálně 1 hodinu (za stálého třepání (55 RPM) na třepače Witeg SHO-2D). Po promytí diH_2O byl odbarvován na třepače (za stejných podmínek jako při barvení) v odbarvovacím roztoku až do vymizení barevného pozadí. Pro urychlení procesu odbarvování byl odbarvovací roztok několikrát vyměněn.

Membrána byla po opláchnutí diH_2O a TBS pufrem následně inkubována s 30 ml blokovacím roztoku na třepače (55 RPM, Witeg SHO-2D) 1 hodinu při laboratorní teplotě nebo přes noc při 4 °C. Membrána byla po promytí TBS-Tween pufrem (30 ml, 5 minut, 55 RPM, Witeg SHO-2D) rozstříhnutá na polovinu. Jedna polovina byla za stálého třepání (55 RPM, Witeg SHO-2D) inkubována s 10 ml roztoku specifické a druhá s 10 ml kontrolní slepičí protilátky v blokovacím roztoku 2 hodiny při laboratorní teplotě nebo přes noc při 4 °C. Roztoky protilátek (specifické nebo kontrolní) byly nejdříve centrifugovány při 25 °C po dobu 5 minut při 13 4000× g (Eppendorf 5418) a získaný supernatant byl použit pro přípravu potřebné koncentrace (10 µg/ml) dané protilátky v blokovacím roztoku. Pro detekci lektinu BC2L-C byly použity připravené protilátky S1 a K1 (viz oddíl 3.5.1, str. 51), pro detekci lektinu BC2L-A byly použity starší protilátky S a K¹⁴⁸.

Po 2hodinové inkubaci se slepičí protilátkou byla membrána 3× promyta TBS-Tween pufrem (vždy 15 ml, 5 minut, 55 RPM, Witeg SHO-2D) a pak byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě (55 RPM, Witeg SHO-2D) s roztokem sekundární protilátky (2,5 µl) v blokovacím roztoku (10 ml). Jako sekundární protilátka sloužila králičí protilátka IgG proti slepičím IgY, která byla konjugovaná s alkalickou fosfatase, díky níž byla na závěr umožněna detekce. Membrána byla pak 3× promyta TBS pufrem (vždy 15 ml, 5 minut, 55 RPM, Witeg SHO-2D).

Vyvolávací roztok byl připraven tak, že nejdříve bylo k 5 ml AP pufru přidáno 33 µl NBT. K tomuto promíchanému roztoku bylo přidáno 16,5 µl BCIP. Po dalším promíchání byl celý objem připraveného vyvolávacího roztoku použit na membránu

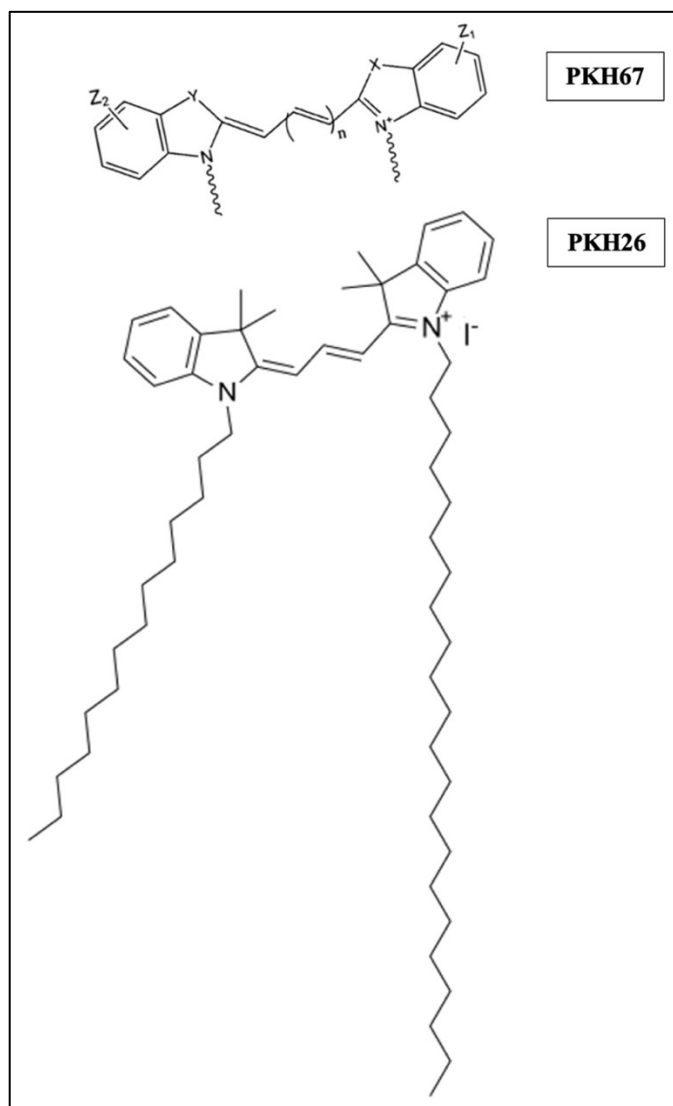
o dané velikosti nejpozději do jedné hodiny od přípravy. Vyvolání probíhalo na třepače (55 RPM, Witeg SHO-2D) za tlumeného světla a maximálně po 10 minutách bylo zastaveno přenesením membrány do dH_2O . Po jejím vysušení byl proveden digitální záznam vyvolané membrány.

3.8 Fluorescenční značení buněk

Oba typy buněk byly značeny pomocí patentovaných fluorescenčních membránových barviv PKH, jejichž struktury jsou uvedeny na obr. 11 (str. 60). Tyto sloučeniny obsahují kromě fluorescenčních skupin také dva dlouhé alifatické řetězce, které slouží k zanoření molekuly do lipidové vrstvy membrány^{159,160}. Jako rozpouštědlo se pro obě barviva používá sloučenina označovaná jako Diluent C (Merck, Německo).

Pro eukaryotní buňky bylo používáno barvivo PKH67. Výrobce (Merck, Německo) této sloučeniny udává maximum fluorescence při vlnových délkách 490 nm (excitace) a 502 nm (emise), čili fluorescence se projevuje v zelené části spektra. Dále prováděné adhezenční testy lze vyhodnocovat z naměřených hodnot fluorescence obou typů buněk (bakteriálních a plicních buněk), jelikož bakteriální buňky byly na rozdíl od plicních buněk značeny barvivem PKH26. Odlišná chemická struktura této molekuly a molekuly PKH67 má za následek rozdílné fluorescenční vlastnosti. Na rozdíl od barviva PKH67, pozorujeme fluorescenci sloučeniny PKH26 v oranžovo-červené části spektra. Maximální fluorescenci lze podle doporučení výrobce (Merck, Německo / MedChemExpress, USA) pozorovat při vlnové délce emise 567 nm (po excitaci při 551 nm).

Pro naše účely bylo nutný zvolit měření při jiných vlnových délkách, než je doporučeno výrobcem. Fluorescence eukaryotních buněk byla měřena při vlnových délkách 470 nm (excitace), 505 nm (emise) a pro měření fluorescence buněk bakterií byly zvoleny vlnové délky 522 nm (excitace) a 569 nm (emise). Při fluorescenčním značení obou typů buněk se postupovalo metodou, jejíž základ tvořily produktové listy daných sloučenin a předchozí vysokoškolské kvalifikační práce^{152,161–163}.



Obr. 11: Struktura patentovaných fluorescenčních sloučenin PKH67 a PKH26. Obě molekuly obsahují fluorescenční skupiny (ve struktuře PKH67 značených Z1 a Z2) emitující zelené (PKH67) nebo oranžovo-červené (PKH26) světlo a dlouhé alifatické řetězce, kterými se tato barviva začleňují do lipidové dvouvrstvy ve vnější membráně buněk. Obrázek byl převzat a upraven^{159,160}.

3.8.1 Značení eukaryotních buněk barvivem PKH67

Před samotným značením buněk plicního epitelu (CuFi-1 či NuLi-1) pomocí fluorescenční sloučeniny PKH67 bylo nutné provést subkultivaci (postupem uvedeným v kapitole 3.2.4 uvedeným na str. 44), kterou byla získána buněčná suspenze pro barvení. Tato suspenze byla centrifugována (Hettich Universal 320 R) 5–10 minut (25 °C, 163× g) a vzniklá peleta byla resuspendována v 5 ml 20mM TBS se složením:

- 20mM TBS: 20mM Tris/HCl; 140mM NaCl; 2,68mM KCl; diH₂O; pH 7,4

Další centrifugací (5–10 minut, 25 °C, 163× g, Hettich Universal 320 R) byla získána peleta s přibližně $4,8 \cdot 10^6$ buněk (množství buněk odpovídá asi jedné kultivační nádobě s obsahem 75 cm²), k jejíž resuspendování bylo využito 250 µl Diluentu C. K důkladně promíchané suspenzi byl přidán čerstvě připravený 8µM roztok barviva (sloučenina PKH67 (2 µl) rozpuštěna ve 248 µl Diluentu C) také v objemu 250 µl. Po opatrném, ale důkladném promíchání buněčné směsi byla centrifugační zkumavka obalena alobalem pro zamezení přístupu světla a inkubována (při 37 °C a 5 % CO₂) v CO₂ inkubátoru MCO-170AICUV 5 minut.

K zastavení fluorescenčního značení buněk bylo po 5minutové inkubaci k buněčné suspenzi přidáno 500 µl 1% (v/v) FBS v TBS a směs byla důkladně promíchána špičkou pipety. Peleta byla po další centrifugaci (Hettich Universal 320 R, 10 minut, 25 °C, 163× g) a odstranění supernatantu 3× centrifugačně promývána pomocí kultivačního média LHC-9 nebo BEGM (nejdříve 5 ml a pak 2× 1 ml, 5–10 minut při teplotě 25 °C a zrychlení 163× g na centrifuze Hettich Universal 320 R). Závěrečným promytím byla získána peleta, z níž byl po resuspendování v 1 ml růstového média odebrán alikvot na stanovení počtu a viability fluorescenčně označených buněk (viz kapitola 3.2.5, str. 45). Následně byla přidáním LHC-9 nebo BEGM připravena suspenze o koncentraci $5,6 \cdot 10^5$ buněk/ml.

3.8.2 Značení bakteriálních buněk barvivem PKH26

Postup fluorescenčního značení bakteriálních buněk, PA (kmen PAK, ST 1763) nebo BC (kmen ST-32, CCM 7291), byl v zásadě stejný. Lišily se pouze podmínky kultivace, které již byly popsány v kapitole 3.3.1 na str. 47. Základní postup barvení byl optimalizován dle bakalářské práce¹⁵².

Optimalizace fluorescenčního značení bakterií sloučeninou PKH26

V předchozí bakalářské práci byl zmíněn možný problém výskytu agregátů interferujících s měřením fluorescence na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro¹⁵². Abychom předešly nesprávným výsledkům při adhezenčních experimentech, byl protokol barvení ve spolupráci s kolegyní Mgr. Michaelou Kurucovou nejdříve optimalizován. Samotná

optimalizace byla provedena s využitím bakterií PA a na bakteriích BC byl ověřen až optimalizovaný způsob značení. K vyhodnocení výsledků v průběhu testování různých podmínek barvení byly použity fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse TE2002-U (filtr 31002 FITC C87702) s programem NIS-Elements AR 3.00 a spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro.

Při optimalizaci sloužily jako kontrola buňky PA obarvené postupem přebraným z předchozí bakalářské práce, při kterém byl jako pufr použit 10mM PBS o pH 7,45 (připraven rozpuštěním jedné PBS tablety (od firmy Gibco™ Invitrogen, UK) v 500 ml diH₂O)¹⁵². Mikroskopické pozorování takto označených buněk ukázalo kromě zmíněných shluků také značně omezenou pohyblivost bakterií. Abychom předešly těmto problémům, byly proto postupně testovány alternativní provedení:

a) Změna 10mM PBS v celém procesu barvení za nový pufr o pH 7,4 a složení:

- *10mM HEPES*: 10mM HEPES (*N*'-2-hydroxyethylpiperazin-*N*'-2-ethansulfonová kyselina); 150mM NaCl; diH₂O
- *10mM TBS*: 10mM Tris/HCl; 140mM NaCl; 2,68mM KCl; diH₂O
- *10mM Tris/HCl*: 10mM Tris/HCl; diH₂O
- *20mM Tris/HCl*: 20mM Tris/HCl; diH₂O

b) Nahrazení původního 10mM PBS za nový pufr (20mM Tris/HCl o hodnotě pH 7,4) a jeho změně za pufr s izotonickým charakterem a případně i s přidavkem roztoku CaCl₂ (0,5mM finální koncentrace Ca²⁺) v posledním kroku promytí obarvených bakterií:

- *20mM TBS*: 20mM Tris/HCl; 140mM NaCl; 2,68mM KCl; diH₂O; pH 7,4
- *20mM TBS + 0,5mM Ca²⁺*: 20mM Tris/HCl; 140mM NaCl; 2,68mM KCl; 0,5mM CaCl₂ · 2H₂O; diH₂O; pH 7,4

Jak již bylo zmíněno, vyhodnocení procesu optimalizace bylo provedeno také měřeními fluorescence buněk PA nabarvených v přítomnosti jednotlivých pufrů a v triplicátech aplikovaných do 96jamkové mikrotitrační destičky s průhledným dnem (Corning® 96 CellBind® Flat Bottom Black Polystyrene). Díky ředění bakteriální suspenze dvojkovou ředící řadou (neředěný vzorek s $8,4 \cdot 10^6$ PA/jamka až 2048× ředěná bakteriální suspenze) mohla být sestrojena kalibrační křivka závislosti fluorescence bakterií na počtu buněk. Přístrojem Tecan Infinite M200 Pro (program i-control) byly vícenásobným horním čtením jamek (vyplněný čtverec 3×3, Z = 17 000) při vlnové délce

excitace 522 nm, emise 569 nm a parametru „gain“ 160 zaznamenány hodnoty bakteriální fluorescence. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost hodnot relativní fluorescence (průměr ze 3 jamek) na počtu buněk PA v jamce doplněná o směrodatnou odchylku.

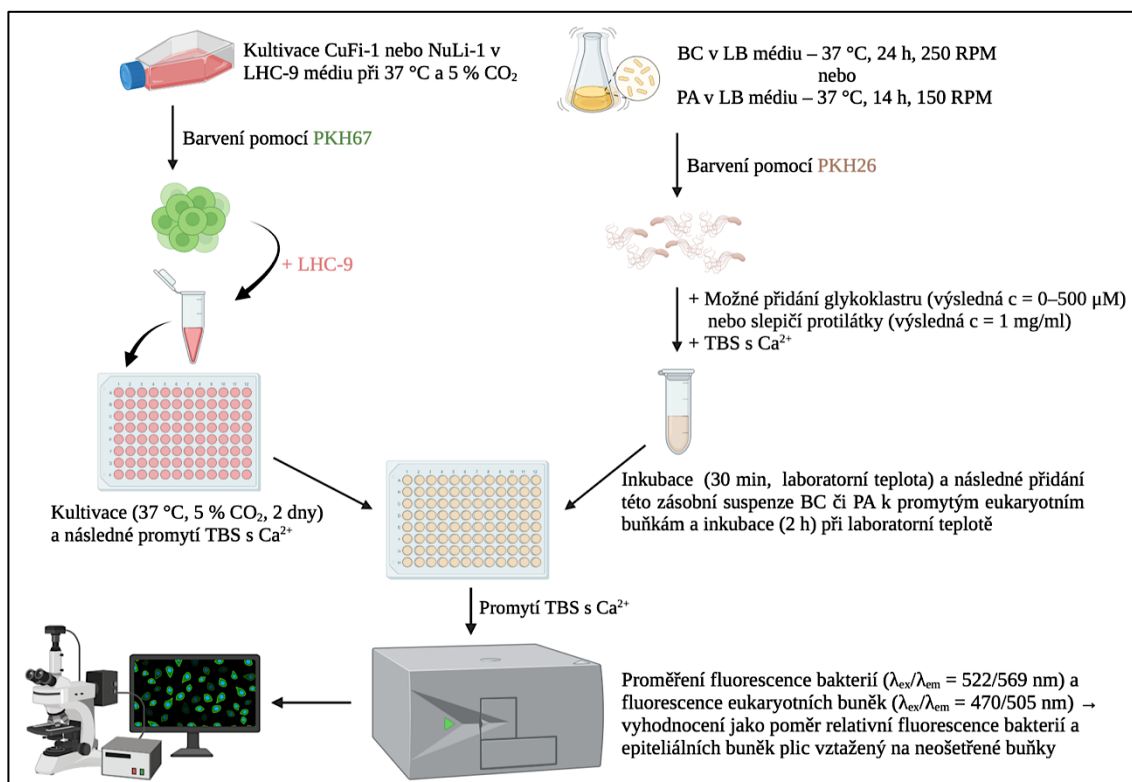
Optimalizovaný postup fluorescenčního značení bakterií sloučeninou PKH26

Po kultivaci bakterií PA nebo BC (viz kapitola 3.3.1, str. 47) bylo 5 minut centrifugováno (25 °C, zrychlení 13 400× g, centrifuga Eppendorf 5418) 8 ml bakteriální suspenze. Resuspendováním pelety ve 20mM Tris/HCl pufru o pH 7,4 (1 ml pufru na 1 ml původní bakteriální kultury) vznikla suspenze, z níž byl po měření OD₆₀₀, a tudíž stanovení počtu bakteriálních buněk (podle postupu z kapitoly 3.3.2, str. 47) a naředění na OD₆₀₀ = 1,000, odebrán objem odpovídající potřebnému množství bakterií pro adhezenční test. Centrifugace (5 minut, 25 °C, 13 400× g, centrifuga Eppendorf 5418) této odebrané kultury už poskytla peletu, jež byla resuspendována v Diluentu C (50 µl Diluentu C na 12 · 10⁸ buněk). Po přidání 50 µl čerstvě připraveného a promíchaného („vortex“ Genius 3) roztoku barviva (8 µl PKH26 rozpuštěných ve 42 µl Diluentu C) k bakteriím resuspendovaným v Diluentu C byla získaná suspenze pečlivě promíchána špičkou pipety a inkubována ve zkumavce obalené alobalem. Tato inkubace probíhala celkem 30 minut v inkubátoru IB-01E o teplotě 37 °C. V průběhu inkubace byla směs slabě promíchána („vortex“ Genius 3) nejdříve 2× po uběhnutí 2,5 minut a následně vždy po 5 minutách až do celkového času inkubace 30 minut. Po ukončení inkubace bylo fluorescenční značení zastaveno přidavkem 2 ml 1% (v/v) FBS v TBS a důkladným promícháním špičkou pipety. Po 10minutové centrifugaci (25 °C, 15 700× g, Eppendorf 5418) byly bakterie ještě 2× promyty 2 ml 20mM Tris/HCl pufru (25 °C, 15 700× g, Eppendorf 5418, nejprve 10 minut a pak 5 minut). Při třetím (posledním) promývacím kroku byly pro resuspendování pelety už použity 2 ml 20mM TBS pufru s přidavkem 0,5mM Ca²⁺ a centrifugace probíhala 5 minut (25 °C) a zrychlení 13 400× g na centrifuze Eppendorf 5418. Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována přibližně v 1–2 ml 20mM TBS pufru s Ca²⁺ (0,5 mM). Následně byl určen počet bakteriálních buněk (kapitola 3.3.2, str. 47) a byla připravena suspenze fluorescenčně označených buněk PA nebo BC o koncentraci 6 · 10⁸ buněk/ml. Měření fluorescence bakteriálních buněk aplikovaných do jamek černé mikrotitrační destičky s průhledným

dnem (Corning® 96 CellBind® Flat Bottom Black Polystyrene) probíhalo na stejném spektrofluorimetru a při stejných parametrech, jako bylo popsáno při optimalizaci tohoto fluorescenčního značení.

3.9 Adherenční testy

Během adherenčních testů (schéma experimentu je vyobrazeno na obr. 12, str. 65) byla studována adherence bakteriálních buněk BC nebo PA označených fluorescenční sloučeninou PKH26 (kapitola 3.8.2, str. 61) na plicní epitelální buňky CuFi-1 nebo NuLi-1 fluorescenčně označené barvivem PKH67 (oddíl 3.8.1, str. 60). Byla testována míra ovlivnění adherence v přítomnosti slepičích protilátek (S1 a K1) či syntetických trivalentních fukosylovaných glykoklastrů (mají tři terminální zbytky fukosy) uvedených v tab. 2 na str. 65, které byly použity už v předchozí bakalářské práci (lišily se však použité bakterie, BC nebo PA)¹⁵². Dané protilátky byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 3.5 (str. 50) a jejich imunoreaktivita byla ověřena metodou ELISA popsanou v části 3.6 (str. 52). Struktury použitých glykokonjugátů (poskytnutých Mgr. Lenkou Malinovskou, Ph.D. (výzkumná skupina prof. RNDr. M. Wimmerové, Ph.D., Národní centrum pro výzkum biomolekul, PřF MU, Brno, ČR), Dr. Magdolna Csávás a prof. Dr. Anikó Borbás (University of Debrecen, Department of Pharmaceutical Chemistry, Maďarsko)) se liší délkou „linkerů“ nebo vazbou antibiotika (sloučenina B má na rozdíl od sloučenin A a C ještě připojené antibiotikum ciprofloxacin). Nelze je však zveřejnit z důvodu ochrany duševního vlastnictví. Bakteriální buňky adherované na buňky linie CuFi-1 či NuLi-1 v nepřítomnosti protilátek/glykoklastrů sloužily v těchto testech jako kontrola. K provedení adherenčních experimentů byl využit postup popsáný v předešlých bakalářských pracích^{152,164}.



Obr. 12: Schéma provedení aderenčního testu. Po kultivaci, fluorescenčním označení eukaryotních buněk CuFi-1 nebo NuLi-1 fluorescenčním barvivem PKH67 a nasazení buněk do jamek mikrotitrační destičky jsou v LB médiu kultivovány bakteriální buňky (BC nebo PA). Bakterie jsou následně fluorescenčně značeny sloučeninou PKH26. Po vytvoření pracovní suspenze sestávající z nabarvených buněk bakterií, TBS pufru s 0,5mM Ca²⁺ a glykoklastru nebo slepičí protilátky (kontrolní suspenze sestává pouze z bakteriálních buněk a daného pufru) je samotný test adherence proveden přidáním této suspenze k promytým eukaryotním buňkám. Po společné inkubaci se odmyjí z jamek nenavázané bakterie a proměří se duální fluorescence. Na závěr probíhá kontrola na fluorescenčním mikroskopu. Obrázek byl vytvořen pomocí „softwaru“ BioRender¹³.

Tab. 2: Glykoklastry použité v aderenčních testech.

Původní označení glykoklastru	Označení glykoklastru v této práci	Relativní molekulová hmotnost	Koncentrační rozmezí v aderenčních testech [μM]	Kombinace glykoklastru s bakterií
LTS-18	A	1574,65	0–500	BC nebo PA
LTS-42	B	1970,03	0–500	BC
LTS-38	C	1600,64	0–250	BC

Po aplikaci CuFi-1 nebo NuLi-1 fluorescenčně značených barvivem PKH67 (triplikát nenabarvených buněk byl použit jako kontrola značení) do jamek černé mikrotitrační destičky s průhledným dnem (Corning® 96 CellBind® Flat Bottom Black Polystyrene) pro účely aderenčního testu (viz kapitola 3.9, str. 64) v množství $8,4 \cdot 10^4$ buněk/jamka

(tzn. 150 μ l suspenze o koncentraci $5,6 \cdot 10^5$ buněk/ml připravené v posledním kroku části 3.8.1 na str. 60) byla tato destička uzavřena a obalena alobalem. Následně byla inkubována v CO₂ inkubátoru MCO-170AICUV při 37 °C a 5 % CO₂ po dobu 42 až 45 hodin (tento čas byl dostatečný pro regeneraci povrchových struktur buněk po trypsinizaci následované fluorescenčním značením a současně pro vytvoření konfluentní vrstvy v jamce).

Bakterie BC nebo PA byly kultivovány (viz kapitola 3.3.1, str. 47) a fluorescenčně barveny sloučeninou PKH26 podle postupu z oddílu 3.8.2 (str. 61). Po kvantifikaci buněk (kapitola 3.3.2 na str. 47) byla bakteriální suspenze naředěna pomocí 20mM TBS s 0,5mM koncentrací Ca²⁺ na OD₆₀₀ = 1,000, při kterém se v 1 ml bakteriální suspenze nachází $6 \cdot 10^8$ buněk BC nebo PA. Tato zásobní suspenze byla pak použita pro přípravu pracovních suspenzí aplikovaných do jamek s připravenou vrstvou eukaryotních buněk. Postup provedení adhezenčního testu se slepičími protilátkami a multivalentními glykokonjugáty se lišil právě v přípravě těchto pracovních suspenzí.

Příprava pracovní suspenze pro adhezenční testy se slepičími protilátkami:

Zásobní roztok protilátky byl naředěn pomocí dialyzačního PBS pufru na 1–2 ml roztoku s koncentrací 3–4 mg/ml, který byl přenesen do dialyzační tuby (D-TubeTM Dialyzer). Celkem bylo připraveno 10 l tohoto dialyzačního pufru o následujícím složení:

- *Dialyzační PBS pufr:* 1,8mM Na₂HPO₄ · 12H₂O; 1mM NaH₂PO₄ · 2H₂O; 134mM NaCl; diH₂O; pH 7,2

Dialýza probíhala přes noc při 4 °C za konstantního míchání na magnetické míchačce proti 10 l dialyzačního pufru. Další den byla opět proměřena A₂₈₀, tentokrát ale proti nepoužitému dialyzačnímu PBS pufru a pomocí něj byla také upravena koncentrace roztoku protilátky na 2,5 mg/ml. Finální koncentrace protilátky v jamce mikrotitrační destičky (v 50 μ l suspenze aplikované do jamky) byla 1,0 mg/ml. Do jedné mikrozkušavky se připravovala suspenze o celkovém objemu 200 μ l (triplikát a rezervní dávka), který sestával z 56 μ l bakteriální suspenze (o koncentraci $6 \cdot 10^8$ buněk/ml), 80 μ l roztoku protilátky (s koncentrací 2,5 mg/ml) a pro doplnění objemu do 200 μ l bylo použito 64 μ l 20mM TBS pufru s přidavkem 0,5mM Ca²⁺. Směs byla pečlivě promíchána a inkubována za tmy při laboratorní teplotě po dobu 30 minut za občasného promíchání.

Příprava pracovní suspenze pro adhezenční testy s multivalentními glykoklastry:

V adhezenčním testu byly používány různé koncentrace glykoklastrů. Pracovní suspenze (pro každou koncentraci glykoklastru) o objemu 200 μl (triplikát a rezervní dávka), z níž bylo následně aplikováno 50 μl /jamku, byla připravena do mikrozkuhavky. Při aplikaci 50 μl pracovní suspenze bakterií bylo do jamky k CuFi-1 nebo NuLi-1 ($8,4 \cdot 10^4$ buněk na jamku) přidáno $8,4 \cdot 10^6$ buněk BC/PA na jamku. Celkový objem v mikrozkuhavce je složen z 56 μl bakteriální suspenze (o $\text{OD}_{600} = 1,000$), potřebného objemu roztoku glykoklastru pro dosažení žádané koncentrace a 20mM TBS pufru s 0,5mM Ca^{2+} , jenž doplní objem do 200 μl . Takto připravená suspenze musí být důkladně promíchána a inkubována 30 minut za tmy při laboratorní teplotě za občasného promíchání.

Další postup adhezenčního testu při použití slepičích protilátek nebo glykoklastrů

V průběhu 30minutové inkubace pracovních suspenzí slepičích protilátek nebo trivalentních glykoklastrů s bakteriemi v mikrozkuhavkách, bylo z jamek mikrotitrační destičky s monovrstvou CuFi-1 či NuLi-1 vytvořenou na dně jamky odstraněno růstové médium. K trojnásobnému promytí těchto buněk od zbytků kultivačního média byl využit 20mM TBS pufr s Ca^{2+} (0,5 mM) – na 1 jamku se spotřebovalo $3 \times 100\text{--}150$ μl tohoto pufru.

Po ukončení inkubace (30 minut) bylo do každé jamky aplikováno již zmíněných 50 μl pracovní suspenze. Do kontrolních jamek s vrstvou eukaryotních buněk byla přidána suspenze bez přídavku slepičích protilátek či glykokonjugátů. Pro další kontrolu byly do jamek bez CuFi-1 či NuLi-1 přidány pouze nenabarvené bakterie s pufrům. Zavřená destička byla inkubována 2 hodiny za tmy při laboratorní teplotě. Po inkubaci a postupném odstranění suspenze z každé jamky ve stejném pořadí, v jakém byla tato suspenze do jamek přidána, byly jamky $3 \times$ promyty 100–150 μl 20mM TBS s 0,5mM Ca^{2+} . Následně byly buňky převrstveny 100 μl tohoto pufru, aby nedošlo k jejich vysušení. Přídavek 100 μl pufru byl aplikován také do tří prázdných jamek, které sloužily jako slepý vzorek.

Na závěr byla měřena fluorescence obou typů buněk – bakteriálních i plicních epiteliálních buněk aplikovaných do černé mikrotitrační destičky s průhledným dnem

(Corning® 96 CellBind® Flat Bottom Black Polystyrene) označené kódem COS96fb. Byl k tomu využit spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro s programem i-control. Nejdříve byla měřena fluorescence bakteriálních buněk (BC nebo PA) s inkorporovaným barvivem PKH26 a následně fluorescence epiteliálních buněk plic (CuFi-1 nebo NuLi-1), které mají do své membrány inkorporovanou sloučeninu PKH67.

- **Fluorescence bakteriálních buněk (PKH26):** Fluorescence byla zaznamenána vícenásobným horním čtením jamek (vyplněný čtverec 3×3, Z = 17 000) při vlnové délce excitace 522 nm, emise 569 nm a parametru „gain“ 160. Počet záblesků byl 50, čas integrace 20 μs a doba prodlevy (tzv. „lag time“) byla 0 μs.
- **Fluorescence eukaryotních buněk plicního epitelu (PKH67):** Každá jamka byla čtena zespodu a opakovaně (vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 470 nm, emise 505 nm a za použití „gain“ 140. Počet záblesků byl nastaven na hodnotu 50, čas integrace byl 20 μs a doba prodlevy (tzv. „lag time“) byla 0 μs.

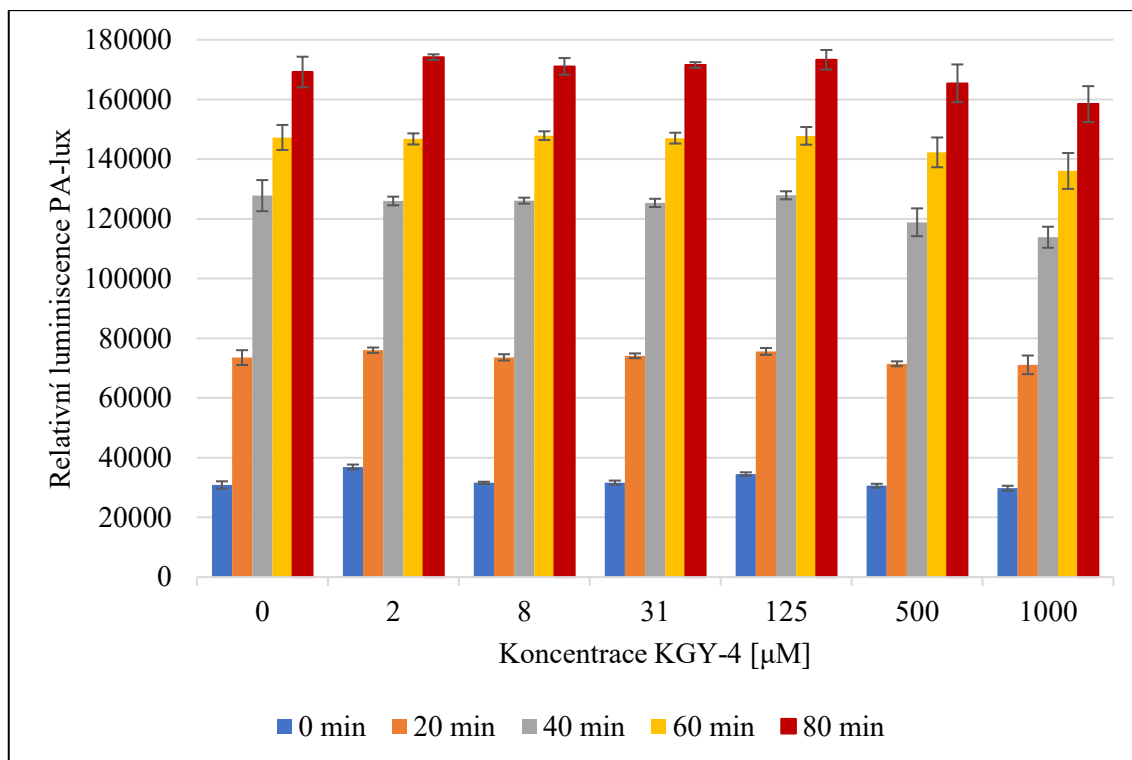
Výsledky byly vyhodnoceny ve formě sloupcového grafu následujícím způsobem. Z poměru relativní fluorescence bakteriálních buněk / eukaryotních buněk byl z triplikátů vypočítán průměr a směrodatná odchylka pro každou testovanou substanci a pro všechny koncentrace. Hodnoty získané tímto způsobem byly vztaženy na analogické hodnoty u neošetřených buněk (bez přídavku slepičích protilátek nebo multivalentních glykoklastrů) a převedeny na procenta vyjadřující adherenci bakterií na plicní buňky, aby bylo možné vzájemné porovnávání testovaných substancí. Ve výsledném sloupcovém grafu byla tedy znázorněná závislost adherence bakterií na plicní buňky (v procentech) na použité protilátce o koncentraci 1 mg/ml anebo na koncentraci testovaného glykokonjugátu. Každý sloupec byl doplněn o směrodatnou odchylku.

K ověření fluorescence buněk byl použit i fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse TE2002-U s programem NIS-Elements AR 3.00. V případě fluorescence v oranžovo-červené části spektra (bakteriální buňky) byl nastaven filtr 31002 FITC C87702 a pro zelenou emisi eukaryotních buněk byl použit filtr 31001 FITC C87701.

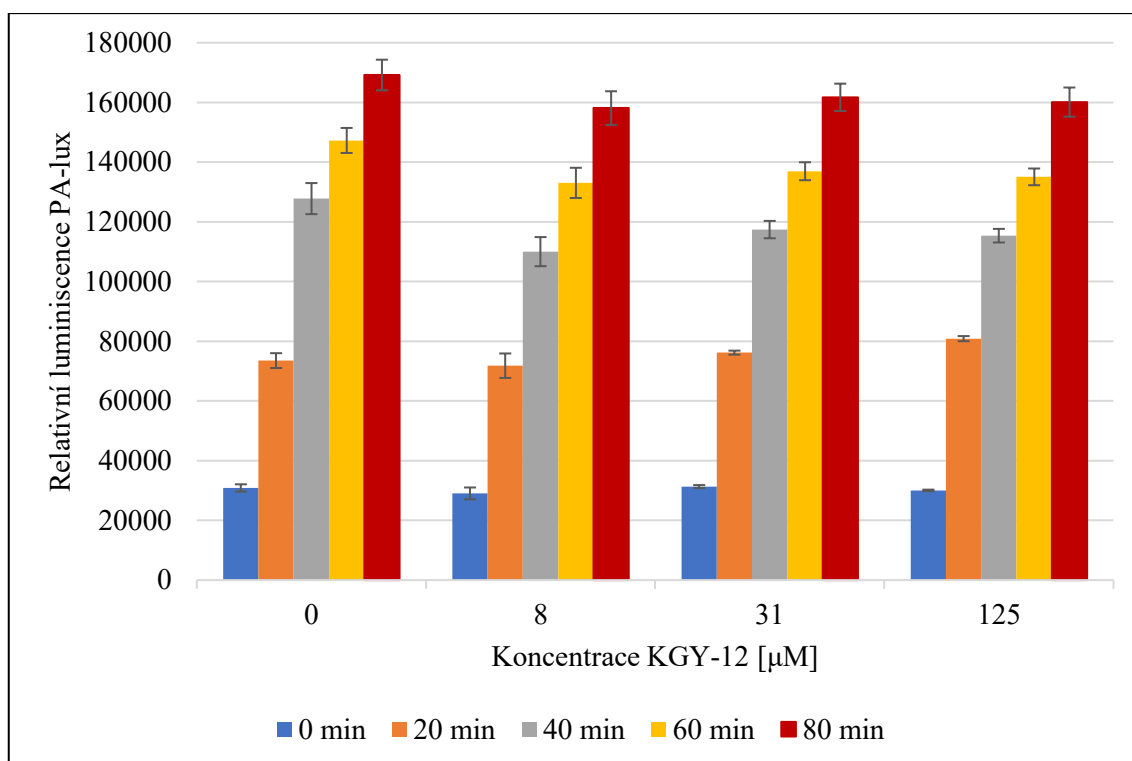
4 Výsledky

4.1 Testování viability bakteriálních buněk

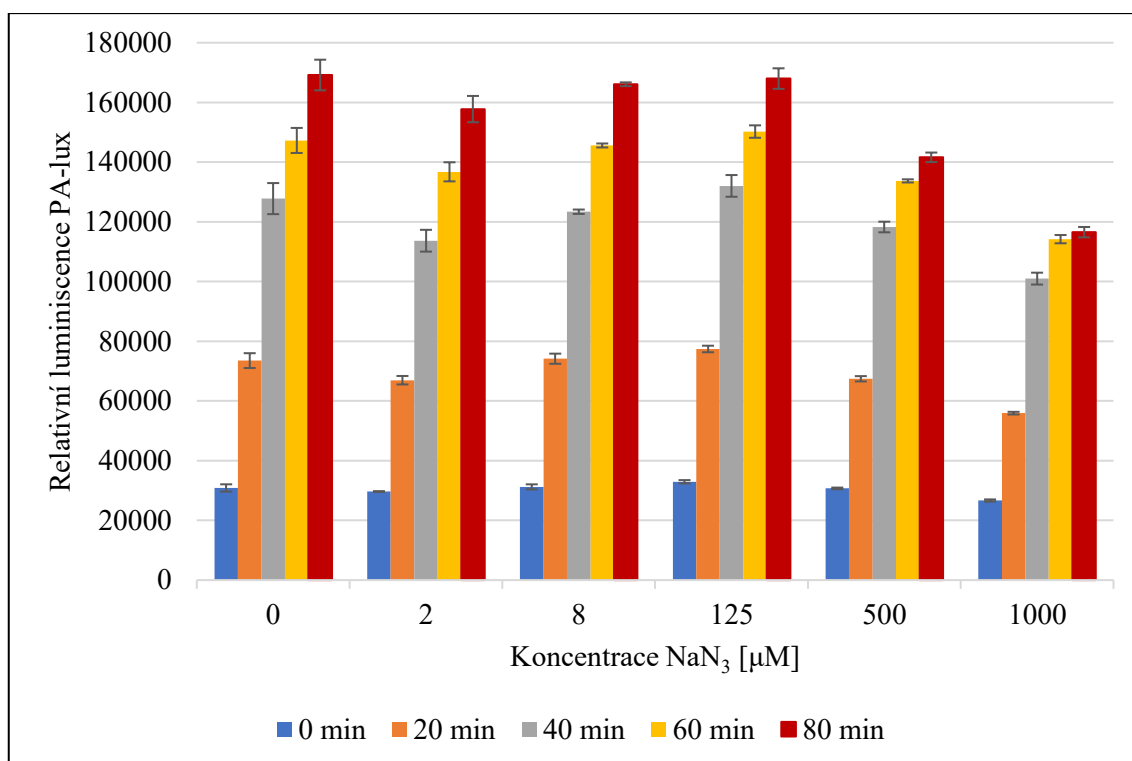
Nejprve byla studována životaschopnost buněk bakterie PA (bioluminiscenčního kmene PA-lux) v přítomnosti glykoklastrů založených na fukose. Pokus byl proveden ve spolupráci s kolegyní Mgr. Michaelou Kurucovou. První testovanou substancí byl monovalentní glykoklastr označovaný KGY-4 a další sloučeninou byl trivalentní glykokonjugát KGY-12. Jako pozitivní kontrola sloužil roztok NaN_3 a jako slepý vzorek bylo použité pouze LB médium s bakteriálními buňkami. Koncentrace použitých glykoklastrů v tomto experimentu byly následující: 0–1000 μM pro KGY-4 a 0–125 μM pro KGY-12. Stejný koncentrační rozmezí 0–1000 μM bylo použito i při adhezenčních testech. Pro porovnání byl testován NaN_3 , sloučenina běžně používaná k antibakteriální ochraně biologických vzorků, v koncentračním rozmezí 0–1000 μM a 0–0,1% (w/v) NaN_3 . Viabilitu PA-lux vyjádřenou jako relativní luminiscenci bakterií v průběhu kultivace zachycují obr. 13 až obr. 16 (str. 70 až 73).



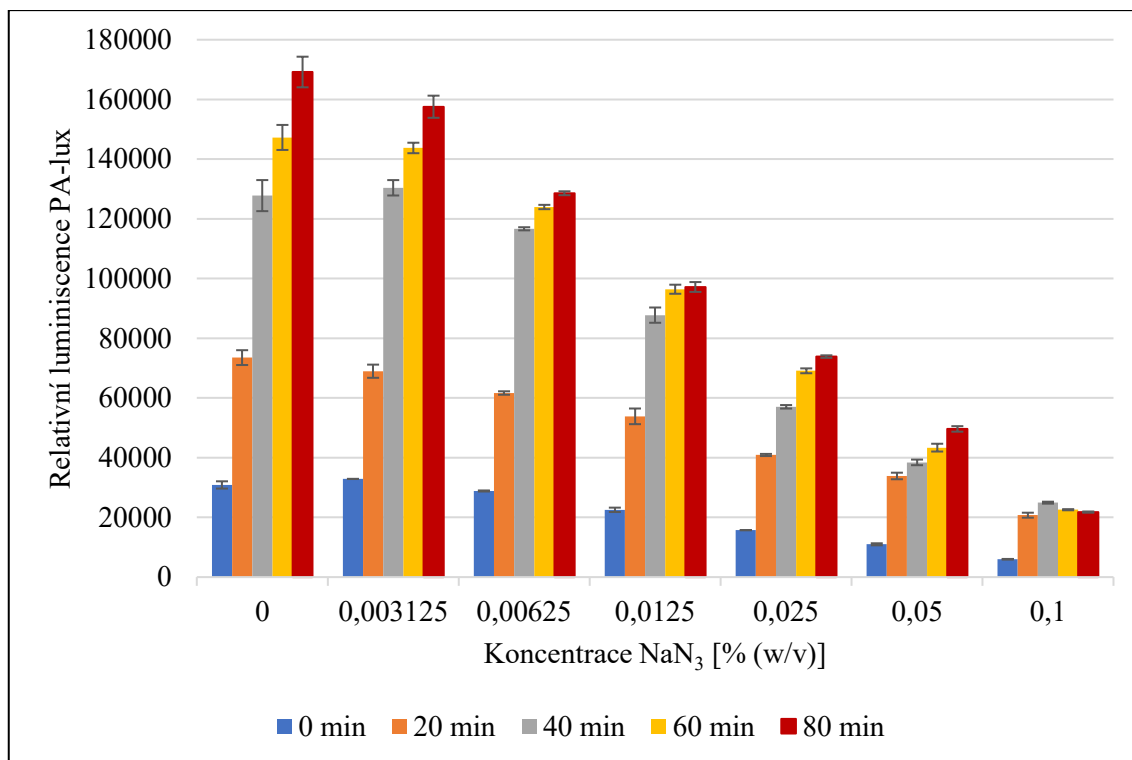
Obr. 13: Kultivace buněk PA-lux v přítomnosti sloučeniny KGY-4. Graf znázorňuje vliv monovalentního glykoklastru KGY-4 založeného na terminálním fukosovém zbytku na růst bakteriálních buněk v LB médiu při 37 °C. Hodnoty relativní luminescence PA-lux byly získány jako průměr hodnot ze tří nezávislých měření \pm SD. Luminescence byla měřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro s programem i-control v pěti kinetických cyklech po 20 minut při následujících parametrech: doba integrace 1500 ms, doba ustálení 10 ms a 10s orbitální třepání s amplitudou 1 mm.



Obr. 14: Kultivace buněk PA-lux v přítomnosti sloučeniny KGY-12. Graf znázorňuje vliv trivalentního glykoklastru KGY-12 založeného na třech terminálních fukosových zbytcích na růst bakteriálních buněk v LB médiu při 37 °C. Hodnoty relativní luminescence PA-lux byly získány jako průměr hodnot ze tří nezávislých měření \pm SD. Luminescence byla měřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro s programem i-control v pěti kinetických cyklech po 20 minut při následujících parametrech: doba integrace 1500 ms, doba ustálení 10 ms a 10s orbitální třepání s amplitudou 1 mm.



Obr. 15: Kultivace buněk PA-lux v přítomnosti NaN₃ v koncentračním rozmezí 0–1000 µM. Graf znázorňuje vliv roztoku NaN₃ na růst bakteriálních buněk v LB médiu při 37 °C. Hodnoty relativní luminiscence PA-lux byly získány jako průměr hodnot ze tří nezávislých měření ± SD. Luminiscence byla měřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro s programem i-control v pěti kinetických cyklech po 20 minut při následujících parametrech: doba integrace 1500 ms, doba ustálení 10 ms a 10s orbitální třepání s amplitudou 1 mm.



Obr. 16: Kultivace buněk PA-lux v přítomnosti 0–0,1% (w/v) NaN₃. Graf znázorňuje vliv roztoku NaN₃ na růst bakteriálních buněk v LB médiu při 37 °C. Hodnoty relativní luminescence PA-lux byly získány jako průměr hodnot ze tří nezávislých měření ± SD. Luminescence byla měřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro s programem i-control v pěti kinetických cyklech po 20 minut při následujících parametrech: doba integrace 1500 ms, doba ustálení 10 ms a 10s orbitální třepání s amplitudou 1 mm.

4.2 Příprava slepičích protilátek proti BC2L-C

Slepičí protilátky IgY byly připraveny ze žloutků vajec slepic, které byly intramuskulárně imunizovány ve třech dávkách (14.6.2023, 22.6.2023 a 30.6.2023) rekombinantně připravenými antigeny, BC2L-C-nt pro slepici číslo 1 a BC2L-C-ct pro slepici číslo 2.

Kontrolní protilátky K1 byly izolovány ze šesti vajec snesených slepicí 1 před první imunizací. Analogicky byly získány i kontrolní protilátky K2 od slepice 2. Protilátky vytvořené proti aplikovaným antigenům (S1 v případě slepice 1 nebo S2 v případě slepice 2) byly v obou případech izolovány také ze šesti žloutků vajec, která však byla snesená po imunizacích. Imunizace oběma antigeny mimo jiné vyvolala i omezení snůšky. Slepice 1 snesla celkem 25 vajec, zatímco slepice 2 pouze 17 vajec.

V připravených frakcích IgY byla proměřena A_{280} a z hodnot absorbance následně vypočítána koncentrace protilátek. Přehled připravených frakcí protilátek je uveden v tab. 3 na str. 74.

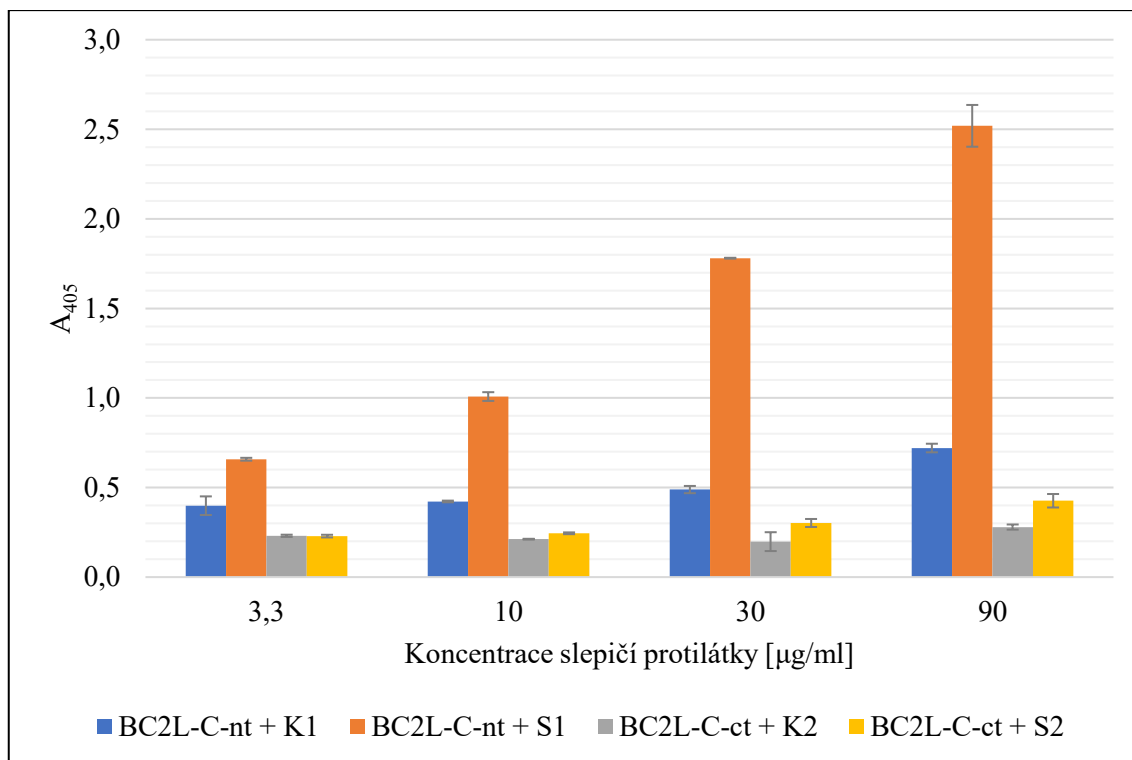
Tab. 3: Připravené frakce protilátek proti BC2L-C-nt a BC2L-C-ct.

Číslo slepice	Použitý antigen	Označení protilátek	Datum sběru vajec	Počet vajec použitých pro izolaci protilátek	Objem získaných frakcí protilátek [ml]	Koncentrace protilátek [mg/ml]
1	BC2L-C-nt	Kontrolní protilátka K1 získaná před imunizací	5.6.2023 až 13.6.2023	6	25	14,9
		Specifická protilátka S1 získaná po imunizaci	28.6.2023 až 5.7.2023	6	16	28,8
2	BC2L-C-ct	Kontrolní protilátka K2 získaná před imunizací	4.6.2023 až 11.6.2023	6	27	20,2
		Specifická protilátka S2 získaná po imunizaci	19.6.2023 až 1.7.2023	6	17	35,0

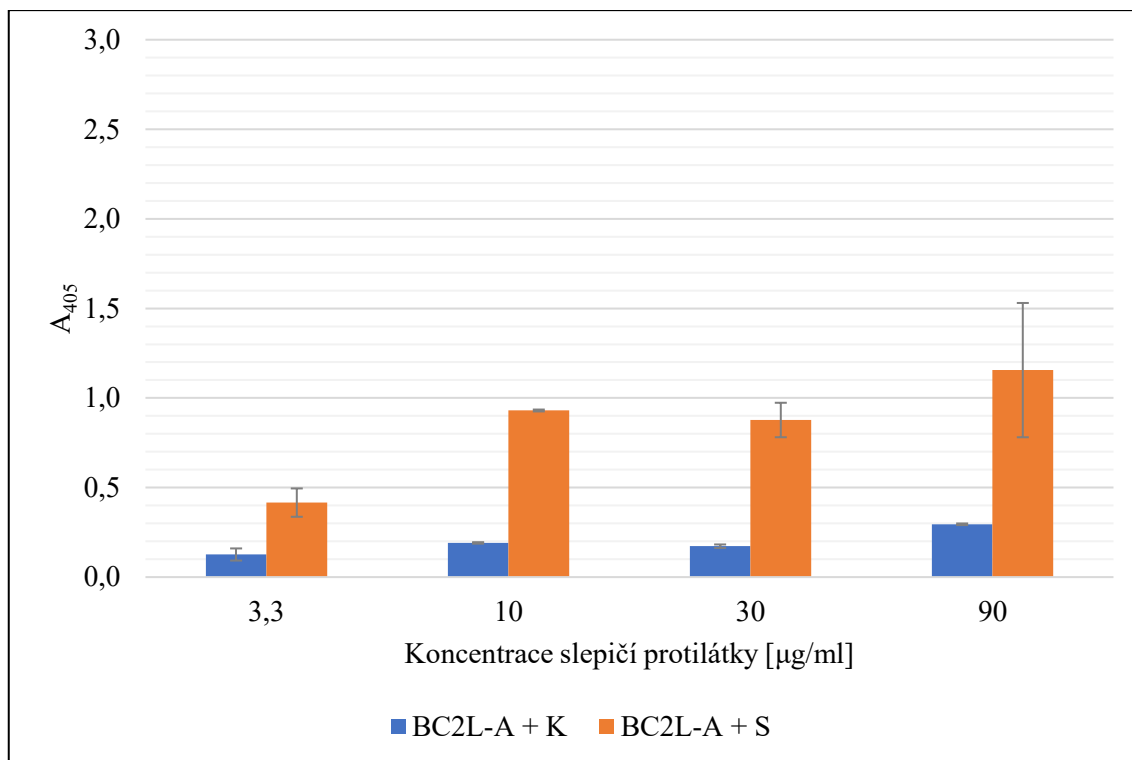
4.3 Stanovení reaktivity slepičích protilátek metodou ELISA

Metodou ELISA byla testována imunoreaktivita nově připravených protilátek proti jednotlivým doménám lektinu BC2L-C, tedy BC2L-C-nt a BC2L-C-ct (viz oddíl 3.5 (str. 50) a 4.2 (str. 73)). Stanovována byla také imunochemická reaktivita slepičích protilátek proti lektinu BC2L-A připravených Arinou Bolshovou¹⁴⁸. V obou případech byla jako sekundární protilátka využita králičí protilátka IgG proti slepičím protilátkám IgY, která byla konjugovaná s alkalickou fosfátasou.

Pro provedení metody ELISA s rekombinantními antigeny BC2L-C-nt, BC2L-C-ct a BC2L-A byly použity destičky POLYSORB (NUN96ft). Specifické rozpoznání imobilizovaného antigenu nově připravenými slepičími protilátkami (K1, S1, K2, S2), anebo protilátkami připravenými Arinou Bolshovou (K, S) bylo prováděno v koncentračním rozmezí 3,3 µg/ml až 90 µg/ml. Výsledky jsou zobrazeny v grafech na obr. 17 a obr. 18 (str. 76–77).



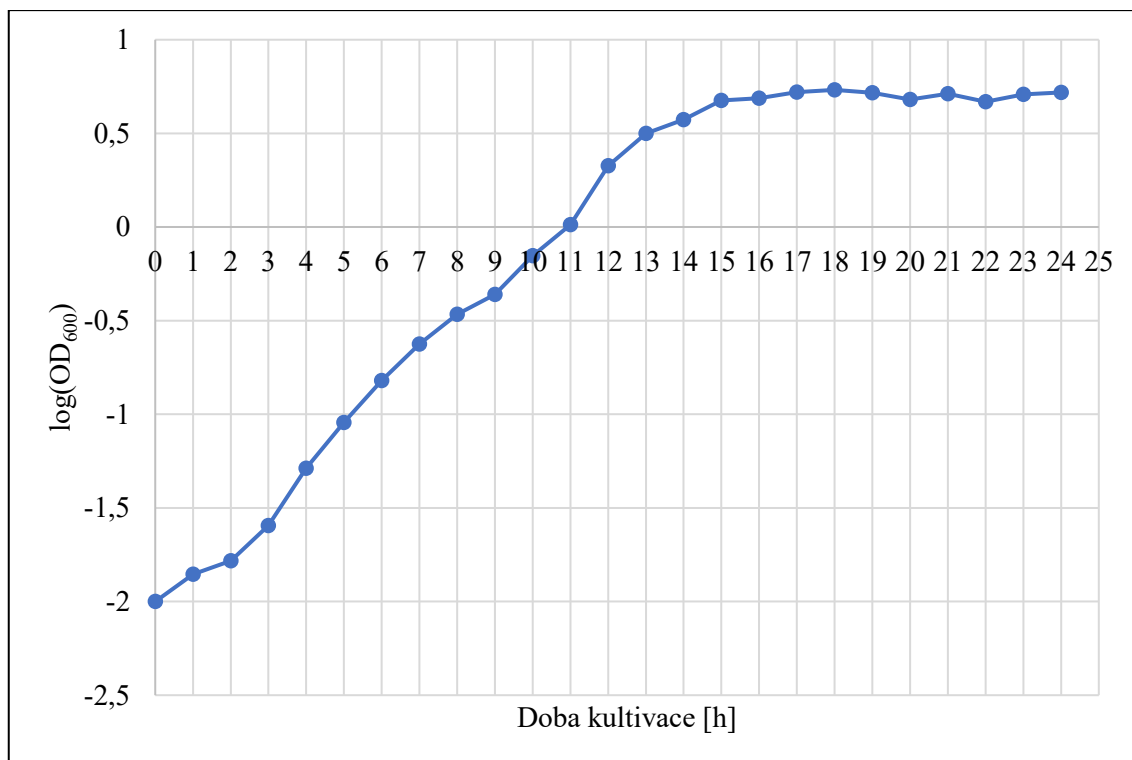
Obr. 17: Imunochemické stanovení reaktivity slepičích protilátek (K1, S1, K2, S2) vůči antigenům BC2L-C-nt a BC2L-C-ct metodou ELISA. V každé jamce bylo imobilizováno 0,4 µg rekombinantního antigenu (BC2L-C-nt nebo BC2L-C-ct). Jako sekundární protilátka sloužila králičí IgG proti slepičím IgY konjugovaná s alkalickou fosfatase. Imunoreaktivita testovaných slepičích protilátek byla vyjádřena jako závislost A_{405} na koncentraci dané protilátky. Chybové úsečky znázorňují variační rozpětí duplikátů. Legenda na obrázku uvádí použitý antigen v kombinaci s testovanou slepičí protilátkou.



Obr. 18: Imunochemické stanovení reaktivity slepičích protilátek (K, S) proti antigenu BC2L-A metodou ELISA. V každé jamce bylo imobilizováno 0,4 μg rekombinantně připraveného proteinu BC2L-A. Jako sekundární protilátka sloužila králičí IgG proti slepičím IgY konjugovaná s alkalickou fosfatase. Imunoreaktivita testovaných slepičích protilátek byla vyjádřena jako závislost A_{405} na koncentraci. Chybové úsečky znázorňují variační rozpětí duplikátů. Legenda na obrázku uvádí použitý antigen v kombinaci s testovanou slepičí protilátkou.

4.4 Růstová křivka *Burkholderia cenocepacia*

Bakteriální suspenze BC (kmen ST-32, CCM 7291) byla kultivována v LB médiu po dobu 24 hodin, během níž byl z buněčné suspenze (o počáteční hodnotě $\text{OD}_{600} = 0,010$) každých 60 minut odebrán alikvot. Vždy byla odečtena hodnota OD_{600} proti LB médiu bez buněk, která byla následně přepočtena na neředěnou suspenzi. Růstová křivka je na obr. 19 (str. 78) znázorněna jako závislost $\log(\text{OD}_{600})$ neředěné bakteriální kultury na době kultivace.



Obr. 19: Růstová křivka BC. Bakterie BC byly kultivovány v LB médiu při 37 °C a 250 RPM na třepačce Infors HT Multitron Pro po dobu 24 hodin. V grafu je vynesena závislost log(OD₆₀₀) na době kultivace bakteriální suspenze.

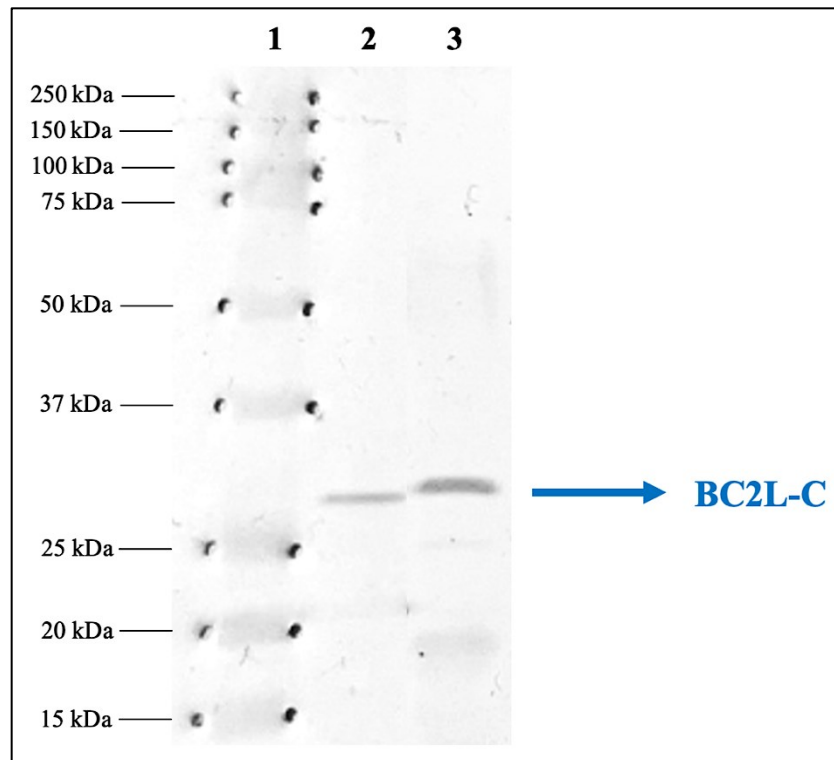
4.5 Detekce lektinů BC2L-C a BC2L-A metodou „Western Blot“ s imunodetekcí

Připravené slepičí protilátky S1 a K1 (viz oddíl 4.2, str. 73), jejichž specifita byla ověřena metodou ELISA (v kapitole 4.3 (str. 75)), byly dále použity pro imunochemickou detekci při studiu exprese lektinu BC2L-C bakteriálními buňkami BC kultivovanými v LB médiu 24 hodin při 37 °C. Po elektroforetické separaci bílkovin (v denaturujících podmínkách) obsažených v bakteriálním lyzátu byla k jejich přenosu na nitroceluloseovou membránu využita technika „Western Blot“.

Stejným postupem byla studována také exprese lektinu BC2L-A. Pro imunodetekci tohoto proteinu byly jako primární protilátky použity specifické primární slepičí protilátky S a K (viz kapitola 4.3 (str. 75)) dlouhodobě uskladněny při 4 °C¹⁴⁸.

V obou případech byla jako sekundární protilátka použita králičí protilátka IgG s navázanou alkalickou fosfatase. Na výsledné membráně (obr. 20 na str. 79)

lze po inkubaci s protilátkou S1 (membrána po inkubaci s kontrolní protilátkou K1 není zobrazena) pozorovat signál v oblasti molekulové hmotnosti odpovídající lektinu BC2L-C (28,15 kDa)¹⁴⁷. Za použitých kultivačních podmínek zřejmě nedochází k expresi lektinu BC2L-A, protože na membráně po inkubaci s protilátkou S byl v oblasti molekulové hmotnosti 13,76 kDa opakovaně patrný pouze standard rekombinantního proteinu BC2L-A¹⁴⁵. Obrázek membrány není proto uveden.



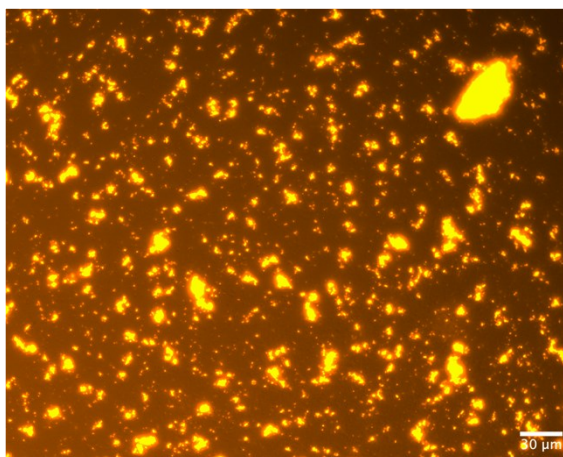
Obr. 20: Imunochemická detekce lektinu BC2L-C. Exprese lektinu BC2L-C v lyzátu bakteriálních buněk BC kultivovaných 24 hodin v LB médiu (37 °C, 250 RPM, Infors HT Multitron Pro) byla studována za využití rekombinantně připraveného standardního proteinu BC2L-C. Po provedení elektroforézy a „Western Blot“ byla k detekci využita primární slepičí protilátka S1 o koncentraci 10 µg/ml a s alkalickou fosfatasou konjugovaná sekundární králičí protilátka IgG proti slepičím IgY naředěna 4001×. Vzorky se na membráně nachází v pořadí: **1** = marker molekulové hmotnosti („Precision Plus Protein Dual Color Standards“); **2** = standard BC2L-C; **3** = lyzát BC po kultivaci (24 hodin) v LB médiu.

4.6 Optimalizace značení bakteriálních buněk fluorescenčním barvivem PKH26

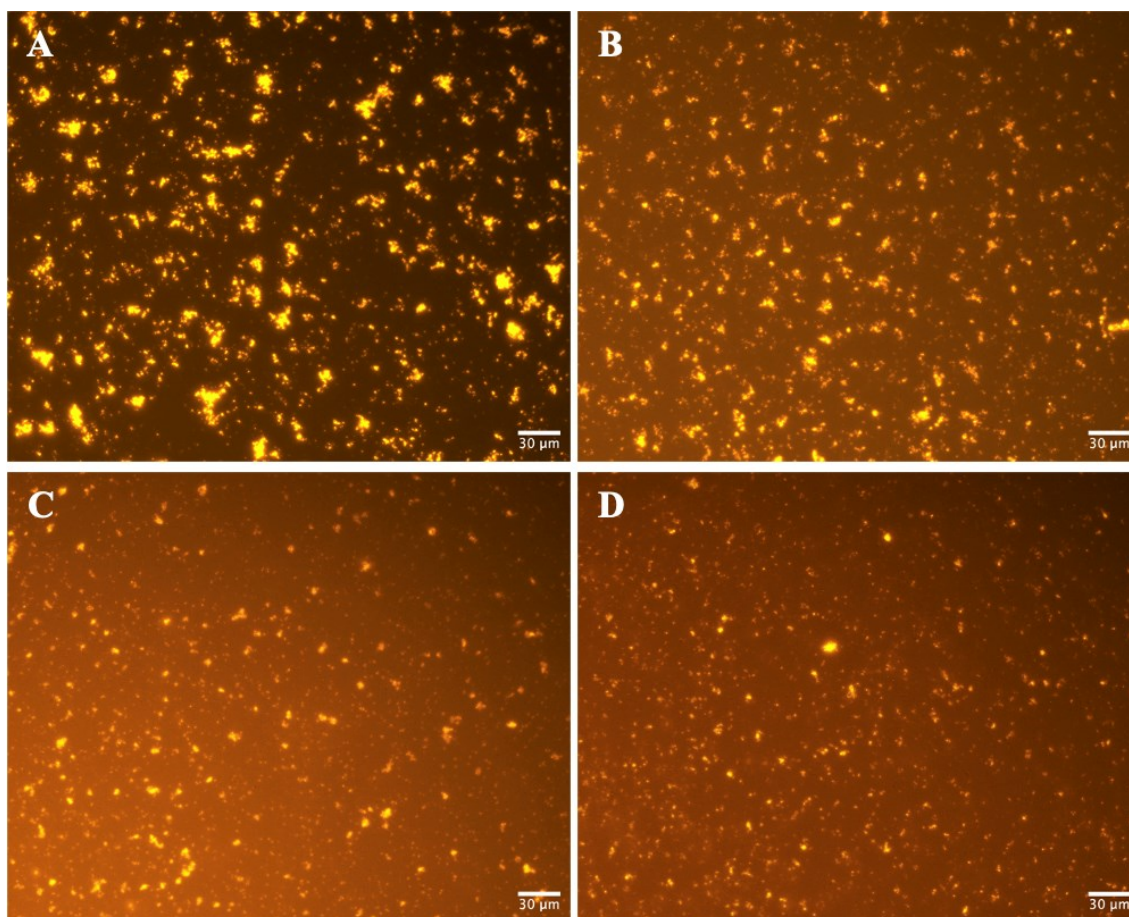
Optimalizace fluorescenčního barvení buněk bakterií sloučeninou PKH26 byla provedena ve spolupráci s M. Kurucovou a navazovala na předchozí práci¹⁵². Tato metodika byla provedena na buňkách PA (kmen PAK, ST 1763) a výsledný postup byl následně aplikován na bakterii BC (kmen ST-32, CCM 7291). Výsledky byly vyhodnocovány primárně z mikroskopických snímků (Nikon Eclipse TE2002-U, filtr 31002 FITC C87702). Využito však bylo také měření fluorescence na spektrofluorimetru (Tecan Infinite M200 Pro).

Vzhledem k tomu, že v procesu barvení roztokem PKH26 v 10mM PBS o hodnotě pH 7,45 buňky PA ztrácejí pohyblivost a objevují se agregáty pozorovatelné jak na nativních, tak na fluorescenčních snímcích, bylo přistoupeno ke změně používaného pufru¹⁵².

Nejdříve byly zkoušeny různé pufrы používané během celého procesu fluorescenčního značení bakteriálních buněk. Na obr. 21 (str. 81) jsou zobrazeny fluorescenčně označené buňky PA s použitím původního 10mM PBS (pH 7,45). Na tomto snímku je pozorovatelné výše zmiňované velké množství agregátů. Na obr. 22 (str. 81) jsou výsledky procesu barvení PA v pufrách: 10mM HEPES (**A**), 10mM TBS (**B**), 10mM Tris/HCl pufr (**C**) a 20mM Tris/HCl pufr (**D**). Všechny tyto pufrы měly pH 7,4. Lze vidět, že postupně docházelo k poklesu tvorby shluků. Pro další pokusy byl použit 20mM Tris/HCl pufr, který nejvíce omezoval tvorbu agregátů, ale také bránil ztrátě pohyblivosti bakterií.

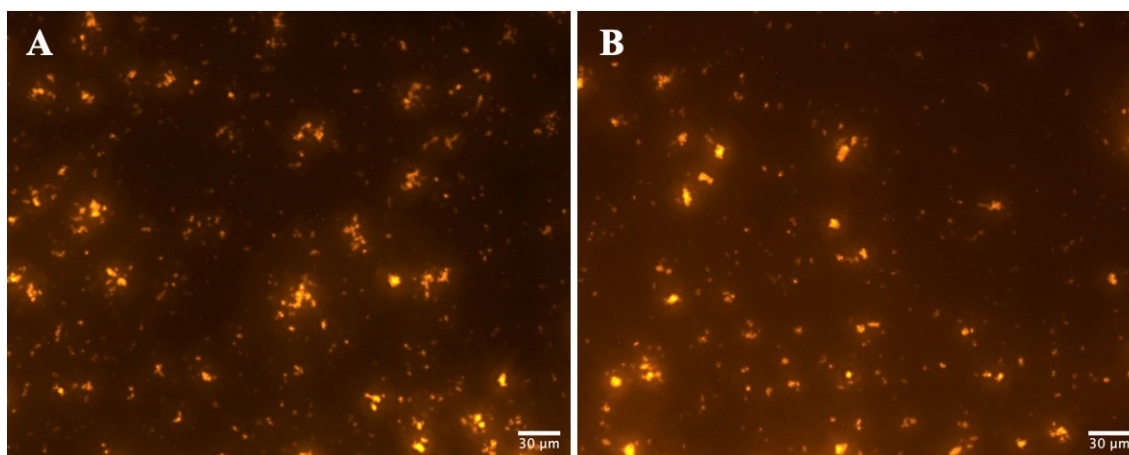


Obr. 21: Reprezentativní snímek buněk PA označených fluorescenčním barvivem PKH26 v přítomnosti 10mM PBS (pH 7,45). Snímek byl pořízen na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U (filtr 31002 FITC C87702) za použití programu NIS-Elements AR 3.00 při zvětšení 20×. K obarvení snímku byl použit program ImageJ¹⁶⁵.



Obr. 22: Reprezentativní snímky buněk PA označených fluorescenčním barvivem PKH26 v přítomnosti různých pufrů (pH 7,4). Byly použité pufrы: 10mM HEPES (A), 10mM TBS (B), 10mM Tris/HCl pufr (C) a 20mM Tris/HCl pufr (D). Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U (filtr 31002 FITC C87702) za použití programu NIS-Elements AR 3.00 při zvětšení 20×. K obarvení snímků byl použit program ImageJ¹⁶⁵.

Pro použití označených PA v adhezenčním testu jsou důležité také Ca^{2+} a pufr s izotonickým charakterem. Byla proto testována změna pufru v posledním promývacím kroku po obarvení bakteriálních buněk, a to z 20mM Tris/HCl pufru na TBS anebo na TBS s obsahem 0,5mM Ca^{2+} . Použitá koncentrace TBS byla v obou případech 10 mM nebo 20 mM. Změna koncentrace pufru během promývání buněk PA měla nepříznivý vliv na tvorbu agregátů, a proto byly další testy provedené pouze s 20mM TBS / 20mM TBS s Ca^{2+} . Na obr. 23 (str. 82) jsou zachyceny výsledky získané po změně 20mM Tris/HCl pufru na 20mM TBS pufr bez Ca^{2+} (A) anebo na 20mM TBS pufr s 0,5mM Ca^{2+} (B). Ukázalo se, že přítomnost Ca^{2+} nezvýšila tvorbu agregátů na rozdíl od přítomnosti solí obsažených v TBS (viz snímek B a C na obr. 22, str. 81).

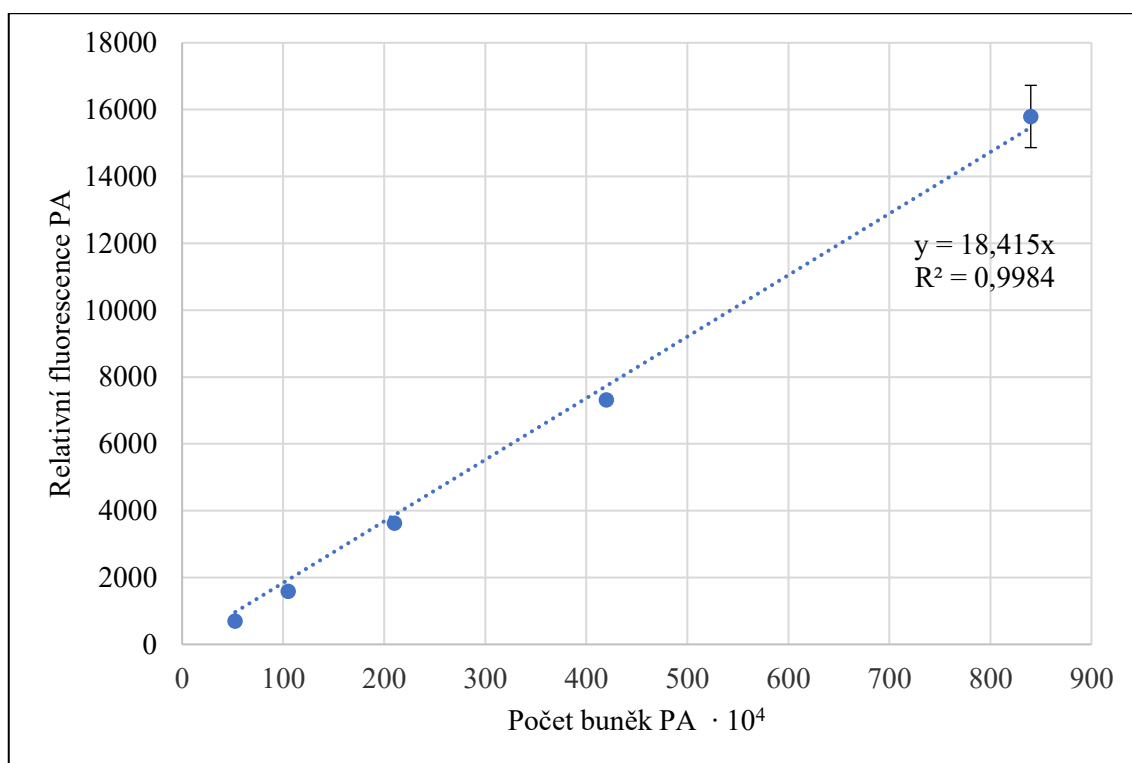


Obr. 23: Reprezentativní snímky buněk PA označených fluorescenčním barvivem PKH26 v přítomnosti 20mM TBS pufru bez/s Ca^{2+} . V posledním promývacím kroku po barvení bakteriálních buněk PA byl 20mM Tris/HCl pufr zaměněn za 20mM TBS (A) anebo za 20mM TBS s přidavkem 0,5mM Ca^{2+} (B). Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U (filtr 31002 FITC C87702) za použití programu NIS-Elements AR 3.00 při zvětšení 20 \times . K obarvení snímků byl použit program ImageJ¹⁶⁵.

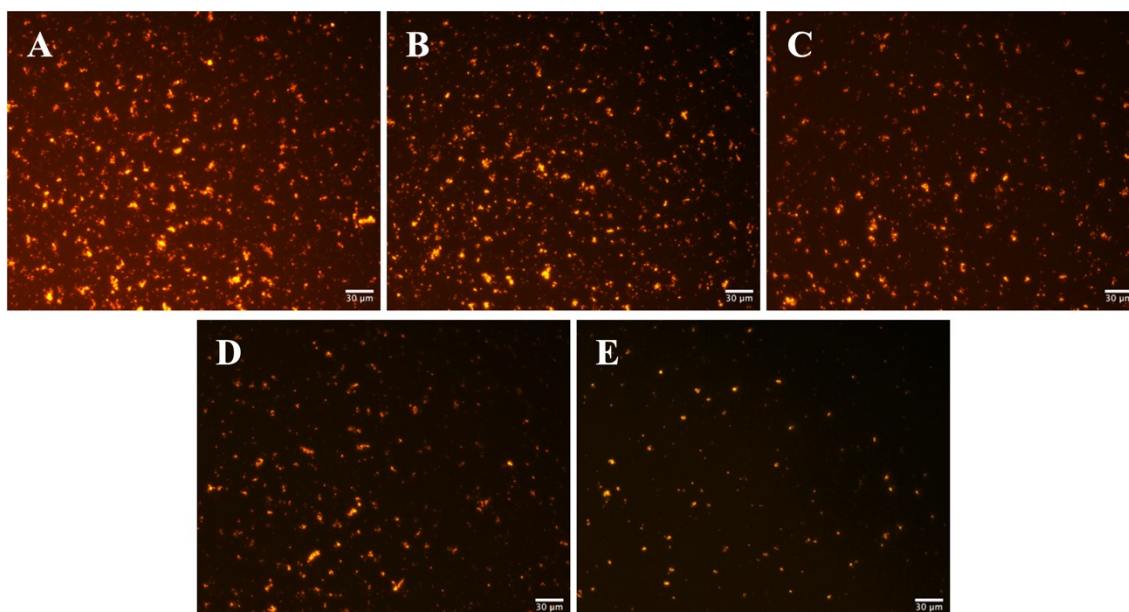
4.6.1 Kalibrační závislost fluorescence bakteriálních buněk značených barvivem PKH26

Vzorky bakteriálních buněk PA a BC fluorescenčně značených barvivem PKH26 byly ředěny dvojkovou ředící řadou a po jejich aplikaci do jamek mikrotitrační destičky byla měřena fluorescence. Na obr. 24 (str. 83) je uvedena kalibrační závislost fluorescence PA při použití 20mM TBS pufru s 0,5mM koncentrací Ca^{2+} . Reprezentativní mikroskopické

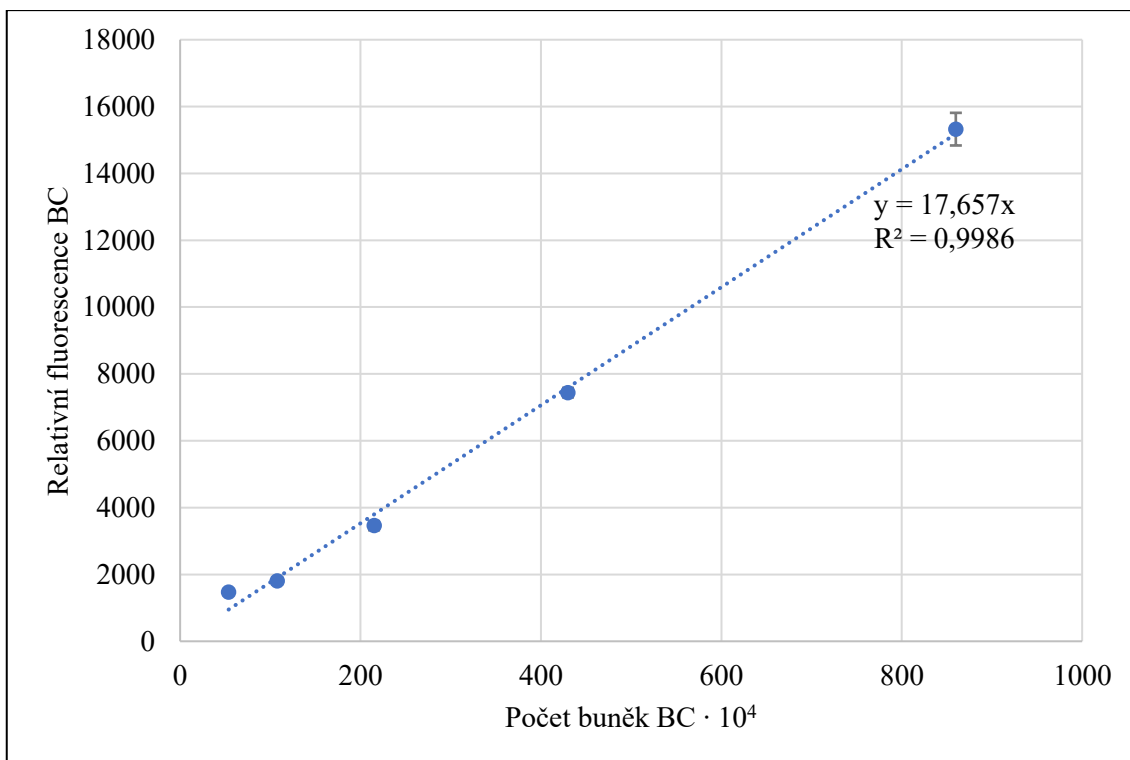
snímky znázorněné na obr. 25 (str. 84) odpovídají jednotlivým bodům kalibrační křivky z obr. 24 (str. 83). Kalibrační křivka fluorescence BC za použití stejného pufru je ukázána na obr. 26 (str. 85) a je podložena reprezentativními mikroskopickými snímky znázorňujícími postupný pokles počtu bakteriálních buněk (viz obr. 27 na str. 86).



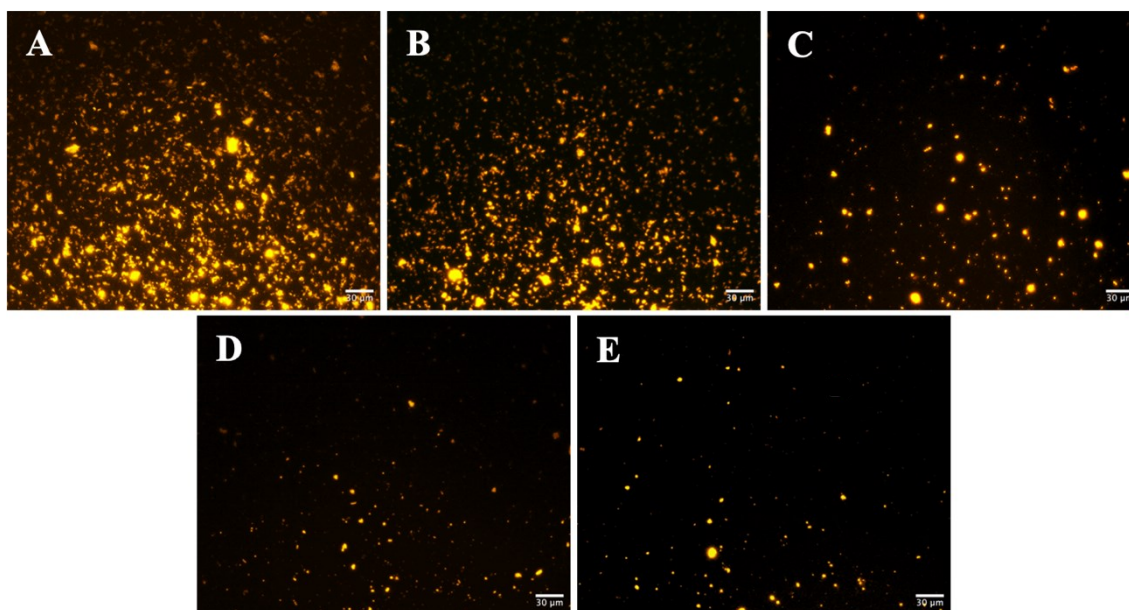
Obr. 24: Kalibrační závislost fluorescence buněk PA značených barvivem PKH26. Bakteriální buňky PA byly fluorescenčně značeny sloučeninou PKH26 za použití 20mM TBS s 0,5mM Ca²⁺. Vzorky ředěny dvojkovou ředící řadou byly v triplikátech aplikovány do jamek (do první jamky bylo nasazeno 8,4 · 10⁶ PA) mikrotitrační destičky Corning® 96 CellBind® Flat Bottom Black Polystyrene (COS96fb) a na přístroji Tecan Infinite M200 Pro (program i-control) byla proměřena fluorescence seshora (Z = 17 000) při následujících parametrech – vlnová délka excitace/emise byla 522 nm / 569 nm, parametr „gain“ měl hodnotu 160. Jamky byly čteny vícenásobně (vyplněný čtverec 3×3). Jednotlivé body odpovídají průměru hodnot z triplikátů (po odečtu fluorescence pozadí, tedy 20mM TBS s Ca²⁺) ± SD.



Obr. 25: Reprezentativní mikroskopické snímky buněk PA značených PKH26 v postupném ředění. V průběhu barvení PA byl 20mM Tris/HCl pufr zaměněn za 20mM TBS s 0,5mM Ca^{2+} . Po patřičném zředění a proměření fluorescence (Tecan Infinite M200 Pro, program i-control) daných vzorků v jamkách mikrotitrační destičky byly tyto snímky zaznamenány na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U (filtr 31002 FITC C87702) za použití programu NIS-Elements AR 3.00 a zvětšení 20 \times . Následně byly kolorovány v programu ImageJ¹⁶⁵. Snímky odpovídají jednotlivým bodům z kalibrační křivky znázorněné na obr. 24 (str. 83). Počet buněk PA aplikovaných do jamek byl následující: $8,4 \cdot 10^6$ (A); $4,2 \cdot 10^6$ (B); $2,1 \cdot 10^6$ (C); $1,05 \cdot 10^6$ (D); $5,25 \cdot 10^5$ (E).



Obr. 26: Kalibrační závislost fluorescence buněk BC značených barvivem PKH26. Bakteriální buňky BC byly fluorescenčně značeny sloučeninou PKH26 za použití 20mM TBS s 0,5mM Ca²⁺. Vzorke ředěny dvojkovou ředící řadou byly v triplikátech aplikovány do jamek (do první jamky bylo nasazeno 8,4 · 10⁶ PA) mikrotitrační destičky Corning® 96 CellBind® Flat Bottom Black Polystyrene (COS96fb) a na přístroji Tecan Infinite M200 Pro (program i-control) byla proměřena fluorescence seshora (Z = 17 000) při následujících parametrech – vlnová délka excitace/emise byla 522 nm / 569 nm, parametr „gain“ měl hodnotu 160. Jamky byly čteny vícenásobně (vyplněný čtverec 3×3). Jednotlivé body odpovídají průměru hodnot z triplikátů (po odečtu fluorescence pozadí, tedy 20mM TBS s Ca²⁺) ± SD.



Obr. 27: Reprezentativní mikroskopické snímky buněk BC značených PKH26 v postupném ředění. V průběhu barvení BC byl 20mM Tris/HCl pufr zaměněn za 20mM TBS s 0,5mM Ca²⁺. Po patřičném zředění a proměření fluorescence (Tecan Infinite M200 Pro, program i-control) daných vzorků v jamkách mikrotitrační destičky byly tyto snímky zaznamenány na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U (filtr 31002 FITC C87702) za použití programu NIS-Elements AR 3.00 a zvětšení 20×. Následně byly kolorovány v programu ImageJ¹⁶⁵. Snímky odpovídají jednotlivým bodům z kalibrační křivky znázorněné na obr. 26 (str. 85). Počet buněk BC aplikovaných do jamek byl následující: $8,4 \cdot 10^6$ (A); $4,2 \cdot 10^6$ (B); $2,1 \cdot 10^6$ (C); $1,05 \cdot 10^6$ (D); $5,25 \cdot 10^5$ (E).

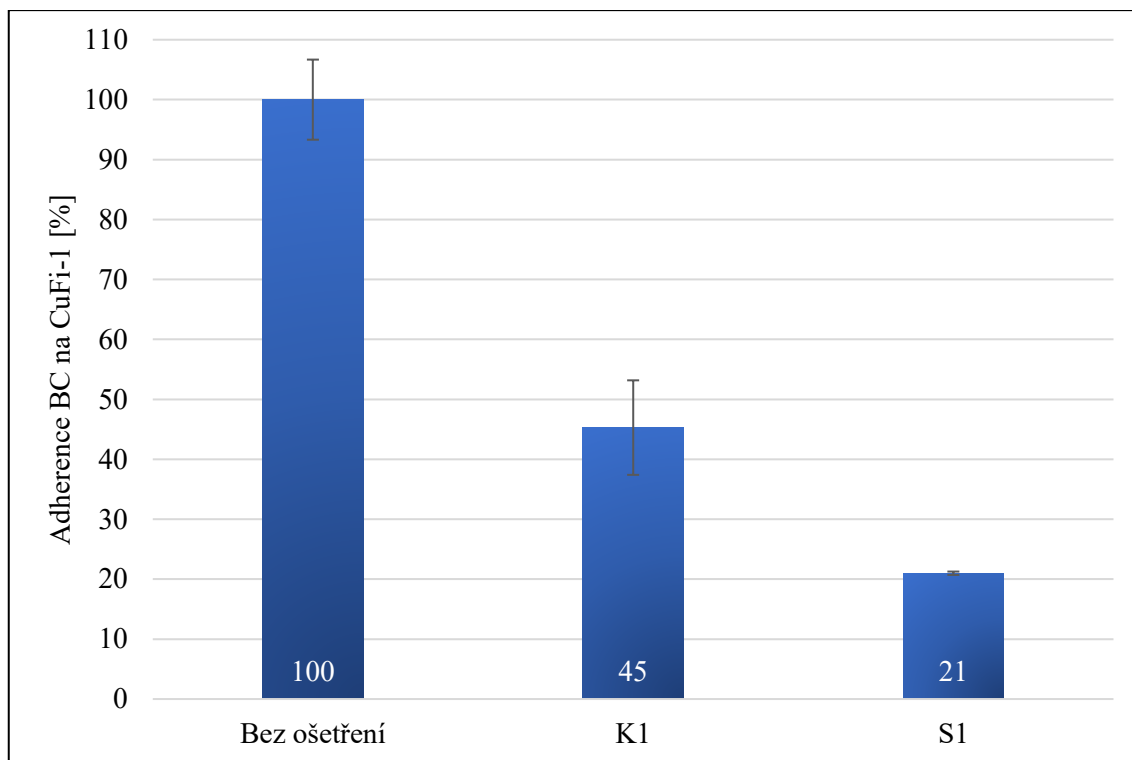
4.7 Adherenční testy

Testy adherence bakteriálních buněk (BC nebo PA) fluorescenčně značených PKH26 na plicní epiteliální buňky (CuFi-1 nebo NuLi-1) značené fluorescenčním barvivem PKH67 byly provedeny v přítomnosti slepičích protilátek proti BC2L-C-nt (K1 či S1) anebo trivalentních glykoklastrů na báze fukosy (A/B/C). Jamky s nulovou koncentrací testovaných substancí byly použity jako kontrola.

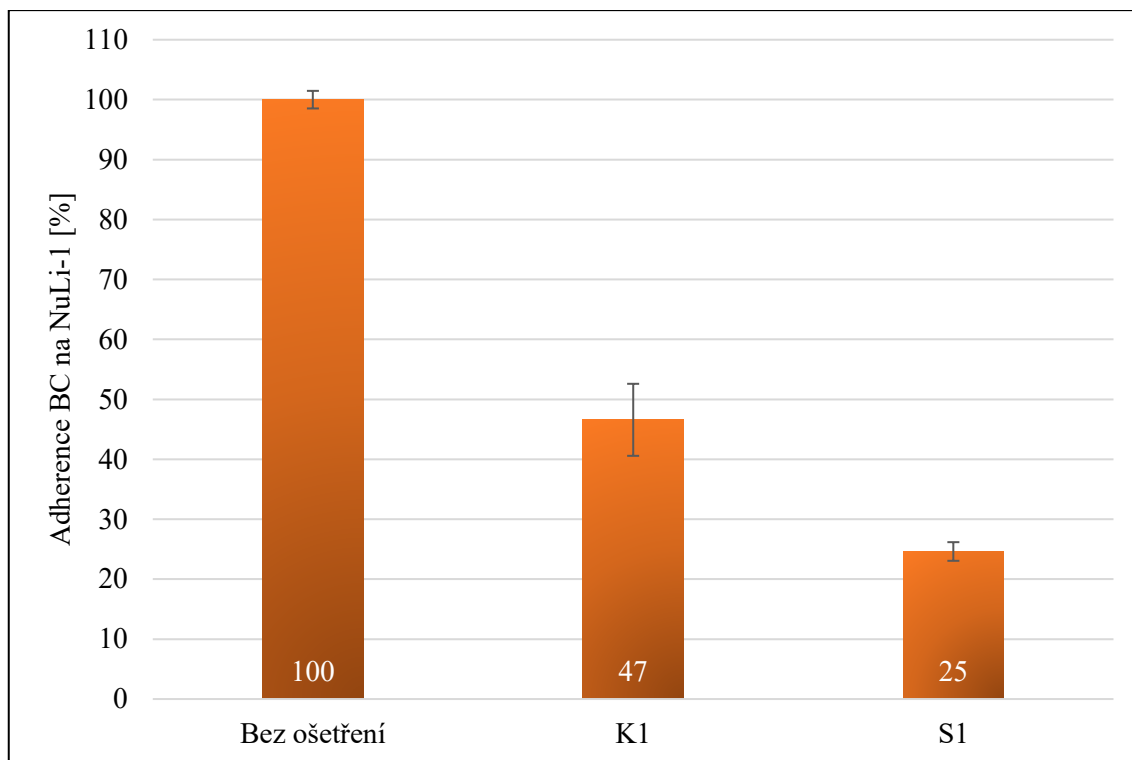
Nejdříve byly provedeny adherenční testy s protilátkami proti BC2L-C-nt (K1 a S1). Experiment byl proveden s bakterií BC a s oběma buněčnými liniemi plicního epitelu. Na základě výsledků (viz obr. 28 na str. 88 a obr. 29 na str. 89) lze konstatovat, že mezi oběma buněčnými liniemi není velký rozdíl v ovlivnění míry adherence. V případě CuFi-1, respektive NuLi-1, snížila protilátka K1 oproti neošetřeným buňkám adherenci bakteriálních buněk na plicní epiteliální buňky o 55 %, respektive o 53 %. Efekt

protilátky S1 byl ještě výraznější. Při porovnání s neošetřenými buňkami byla adherence u linie CuFi-1 pouze 21%, zatímco u NuLi-1 byla 25%.

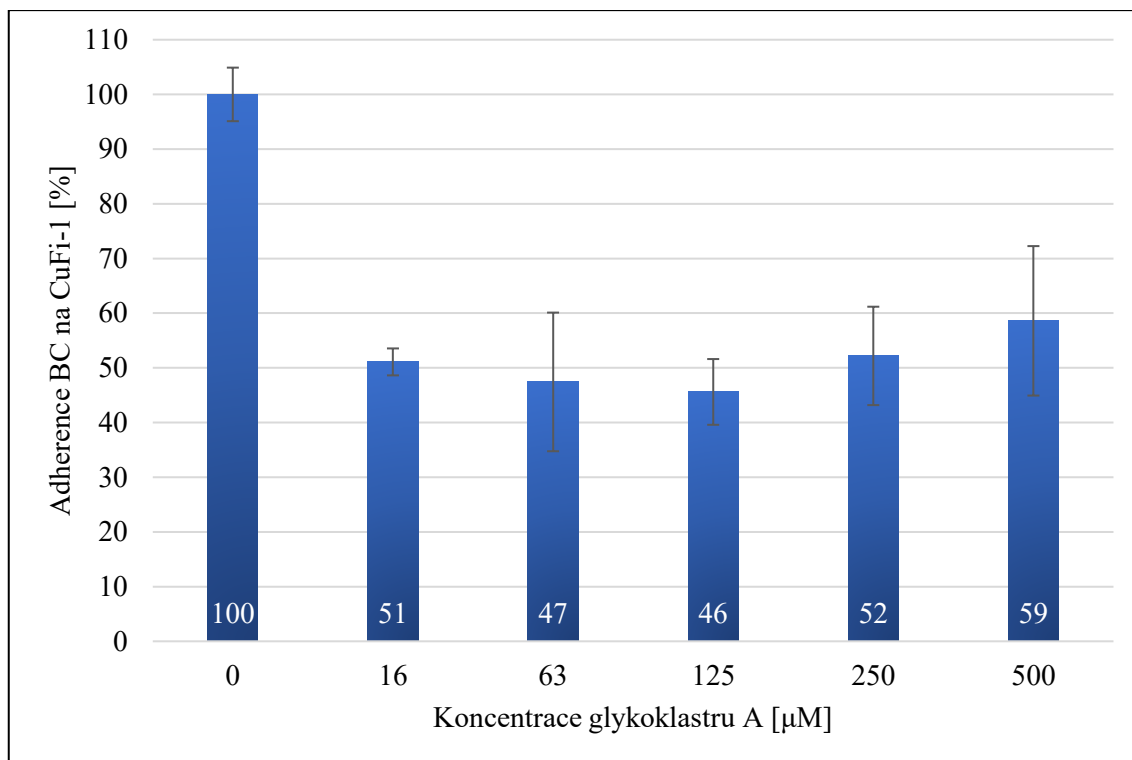
Výsledky aderenčních testů se syntetickými trivalentními glykokonjugáty prokázaly, že glykoklastr B je nejúčinnější v 500 μ M koncentraci (viz obr. 32 a obr. 33 na str. 92–93). Adherenci BC na CuFi-1 se při použití této molekuly podařilo snížit až o 72 % a na NuLi-1 o 63 %. Na obr. 30 (str. 90) lze pozorovat, že glykoklastr A ve své nejúčinnější koncentraci (125 μ M) snížil adherenci BC na CuFi-1 na 46 % oproti neošetřeným buňkám. V případě adherence BC na NuLi-1 se jednalo o snížení na 52 % (viz obr. 31, str. 91). Jak ukazuje obr. 35 na str. 95, vliv glykoklastru A na adherenci PA na CuFi-1 byl výraznější než v případě BC – adherence byla snížena o 60 %. Glykoklastr C působil nejefektivněji v koncentraci 63 μ M, při které snížil adherenci BC na CuFi-1 o 51 % (viz obr. 34 na str. 94).



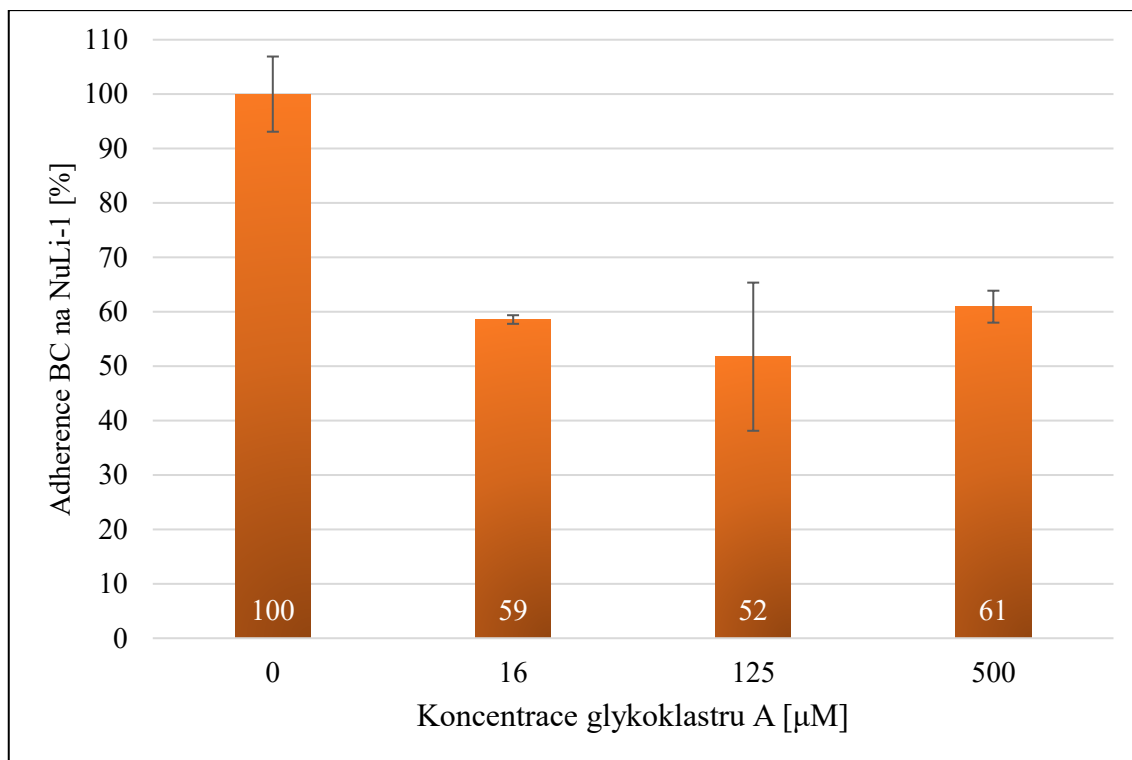
Obr. 28: Vliv protilátek proti BC2L-C-nt na adhezenci buněk BC na CuFi-1. Buňky CuFi-1 a BC byly po kultivaci fluorescenčně označeny. K bakteriím byl přidán roztok anti-BC2L-C-nt protilátky S1 nebo preimunní protilátky K1 o výsledné koncentraci 1 mg/ml. Po společné inkubaci bakterií s CuFi-1 byly odstraněny nnavázané bakteriální buňky a proměřena duální fluorescence (spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro, program i-control). K vyhodnocení výsledků byly využity naměřené hodnoty fluorescence. K měření fluorescence BC (PKH26) bylo využito vrchního vícenásobného čtení jamek ($Z = 17\ 000$, vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 522 nm a emise 569 nm a parametr „gain“ byl nastaven na hodnotu 160. K měření fluorescence CuFi-1 (PKH67) bylo využito spodního vícenásobného čtení jamek (vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 470 nm a emise 505 nm a parametr „gain“ byl 140. Vynesené hodnoty jsou v procentech vyjádřené průměry (\pm SD) relativní fluorescence BC/CuFi-1 triplikátu neošetřených buněk nebo buněk ošetřených protilátkou, které jsou vztažené na obdobnou hodnotu neošetřených buněk. Za kontrolu (100 %) byly považovány jamky s neošetřenými buňkami, jejichž hodnota relativní fluorescence BC/CuFi-1 měla hodnotu 0,4062.



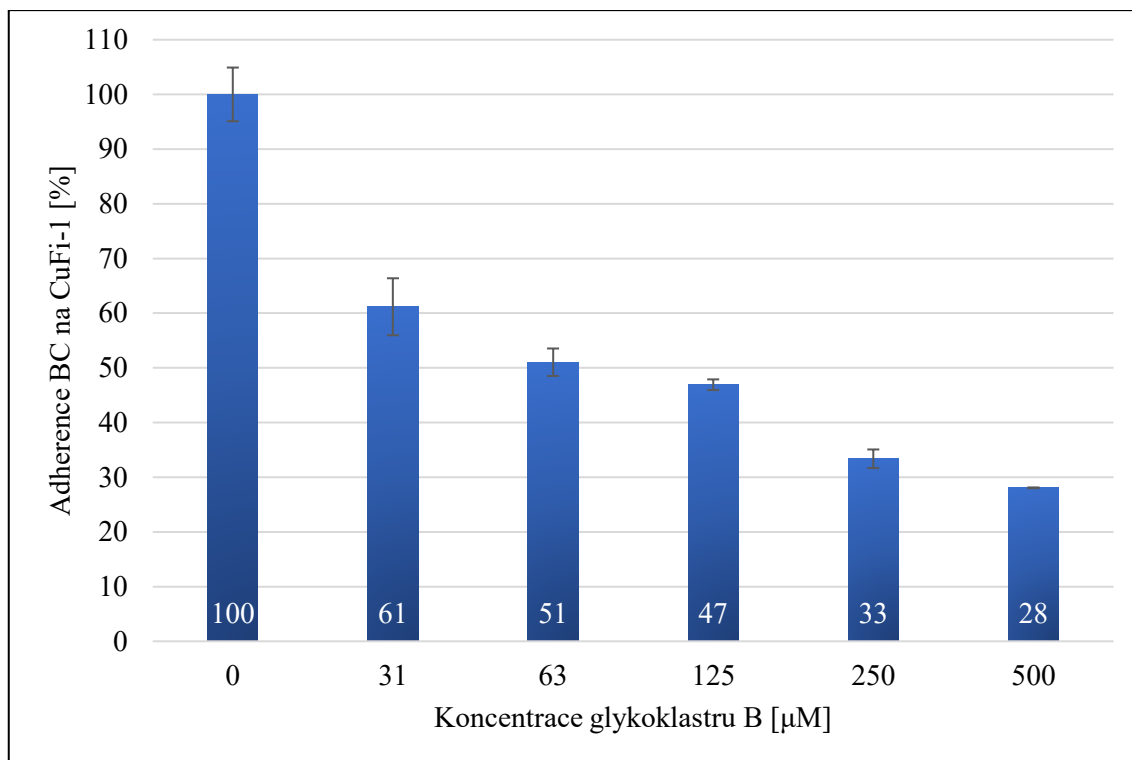
Obr. 29: Vliv protilátek proti BC2L-C-nt na adhezenci buněk BC na NuLi-1. Buňky NuLi-1 a BC byly po kultivaci fluorescenčně označeny. K bakteriím byl přidán roztok anti-BC2L-C-nt protilátky S1 nebo preimunní protilátky K1 o výsledné koncentraci 1 mg/ml. Po společné inkubaci bakterií s NuLi-1 byly odstraněny nenačkané bakteriální buňky a proměřena duální fluorescence (spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro, program i-control). K vyhodnocení výsledků byly využity naměřené hodnoty fluorescence. K měření fluorescence BC (PKH26) bylo využito vrchního vícenásobného čtení jamek ($Z = 17\ 000$, vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 522 nm a emise 569 nm a parametr „gain“ byl nastaven na hodnotu 160. K měření fluorescence NuLi-1 (PKH67) bylo využito spodního vícenásobného čtení jamek (vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 470 nm a emise 505 nm a parametr „gain“ byl 140. Vynesené hodnoty jsou v procentech vyjádřené průměry (\pm SD) relativní fluorescence BC/NuLi-1 triplikátu neošetřených buněk nebo buněk ošetřených protilátkou, které jsou vztaženy na obdobnou hodnotu neošetřených buněk. Za kontrolu (100 %) byly považovány jamky s neošetřenými buňkami, jejichž hodnota relativní fluorescence BC/NuLi-1 měla hodnotu 0,2462. Při vyhodnocování nebyly uvažovány odlehlé výsledky.



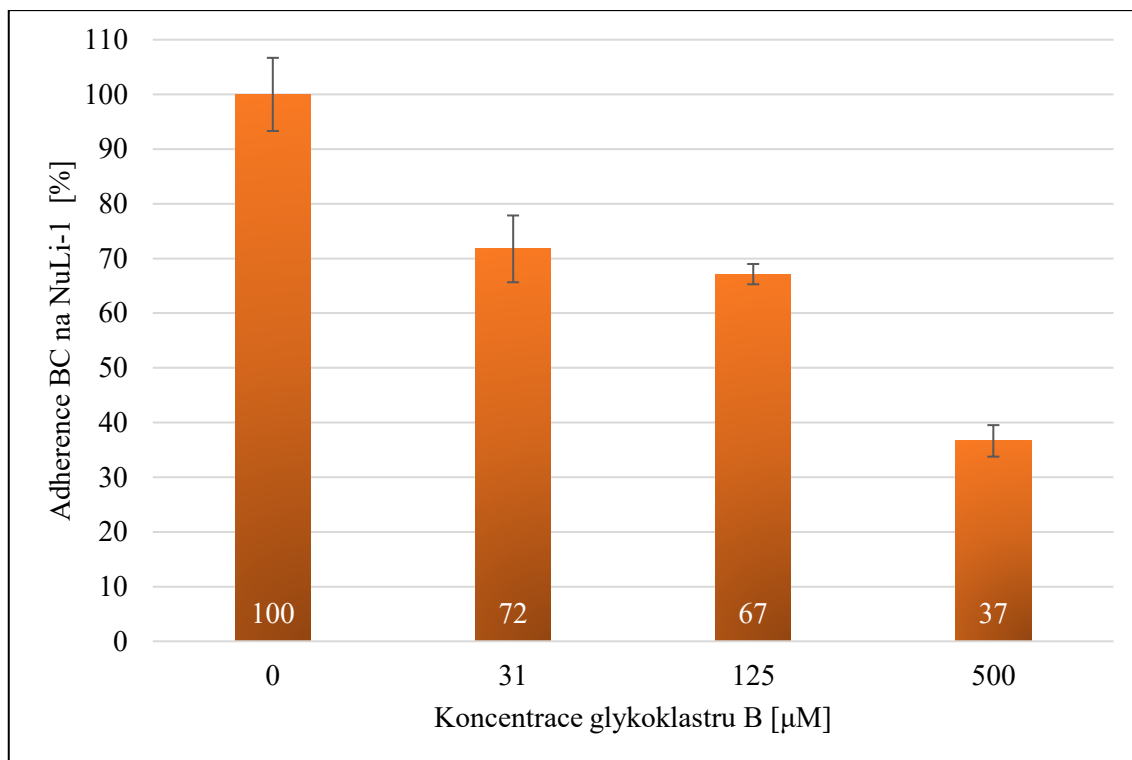
Obr. 30: Vliv glykoklastru A na adherenci buněk BC na CuFi-1. Buňky CuFi-1 a BC byly po kultivaci fluorescenčně označeny. K bakteriím byl přidán roztok glykoklastru A. Po společné inkubaci bakterií s CuFi-1 byly odstraněny nenavázané bakteriální buňky a proměřena duální fluorescence (spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro, program i-control). K vyhodnocení výsledků byly využity naměřené hodnoty fluorescence. K měření fluorescence BC (PKH26) bylo využito vrchního vícenásobného čtení jamek ($Z = 17\ 000$, vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 522 nm a emise 569 nm a parametr „gain“ byl nastaven na hodnotu 160. K měření fluorescence CuFi-1 (PKH67) bylo využito spodního vícenásobného čtení jamek (vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 470 nm a emise 505 nm a parametr „gain“ byl 140. Vynesené hodnoty jsou v procentech vyjádřené průměry (\pm SD) relativní fluorescence BC/CuFi-1 triplikátu pro každou koncentraci glykoklastru A, které jsou vztaženy na obdobnou hodnotu neošetřených buněk. Za kontrolu (100 %) byly považovány jamky s neošetřenými buňkami, jejichž hodnota relativní fluorescence BC/CuFi-1 měla hodnotu 0,1336. Při vyhodnocování nebyly uvažovány odlehle výsledky.



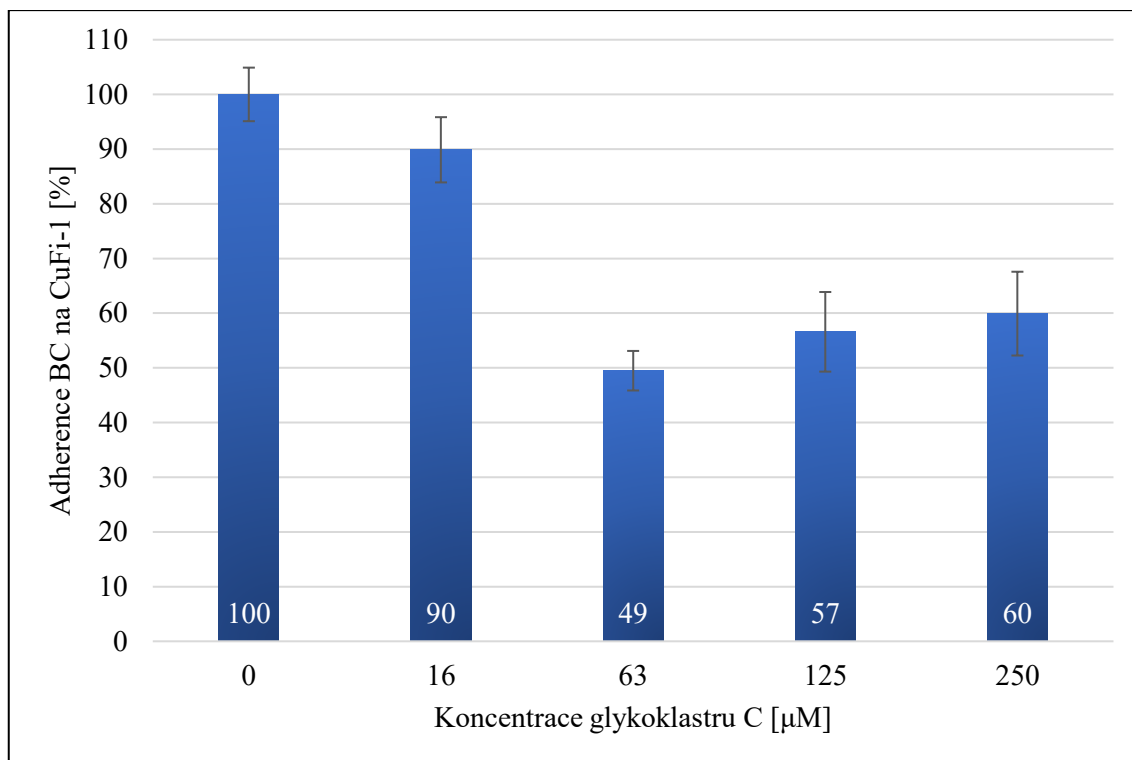
Obr. 31: Vliv glykoklastru A na adhezi buněk BC na NuLi-1. Buňky NuLi-1 a BC byly po kultivaci fluorescenčně označeny. K bakteriím byl přidán roztok glykoklastru A. Po společné inkubaci bakterií s NuLi-1 byly odstraněny nenasazené bakteriální buňky a proměřena duální fluorescence (spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro, program i-control). K vyhodnocení výsledků byly využity naměřené hodnoty fluorescence. K měření fluorescence BC (PKH26) bylo využito vrchního vícenásobného čtení jamek ($Z = 17\ 000$, vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 522 nm a emise 569 nm a parametr „gain“ byl nastaven na hodnotu 160. K měření fluorescence NuLi-1 (PKH67) bylo využito spodního vícenásobného čtení jamek (vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 470 nm a emise 505 nm a parametr „gain“ byl 140. Vynesené hodnoty jsou v procentech vyjádřené průměry (\pm SD) relativní fluorescence BC/NuLi-1 triplikátu pro každou koncentraci glykoklastru A, které jsou vztaženy na obdobnou hodnotu neošetřených buněk. Za kontrolu (100 %) byly považovány jamky s neošetřenými buňkami, jejichž hodnota relativní fluorescence BC/NuLi-1 měla hodnotu 0,1172. Při vyhodnocování nebyly uvažovány odlehlé výsledky.



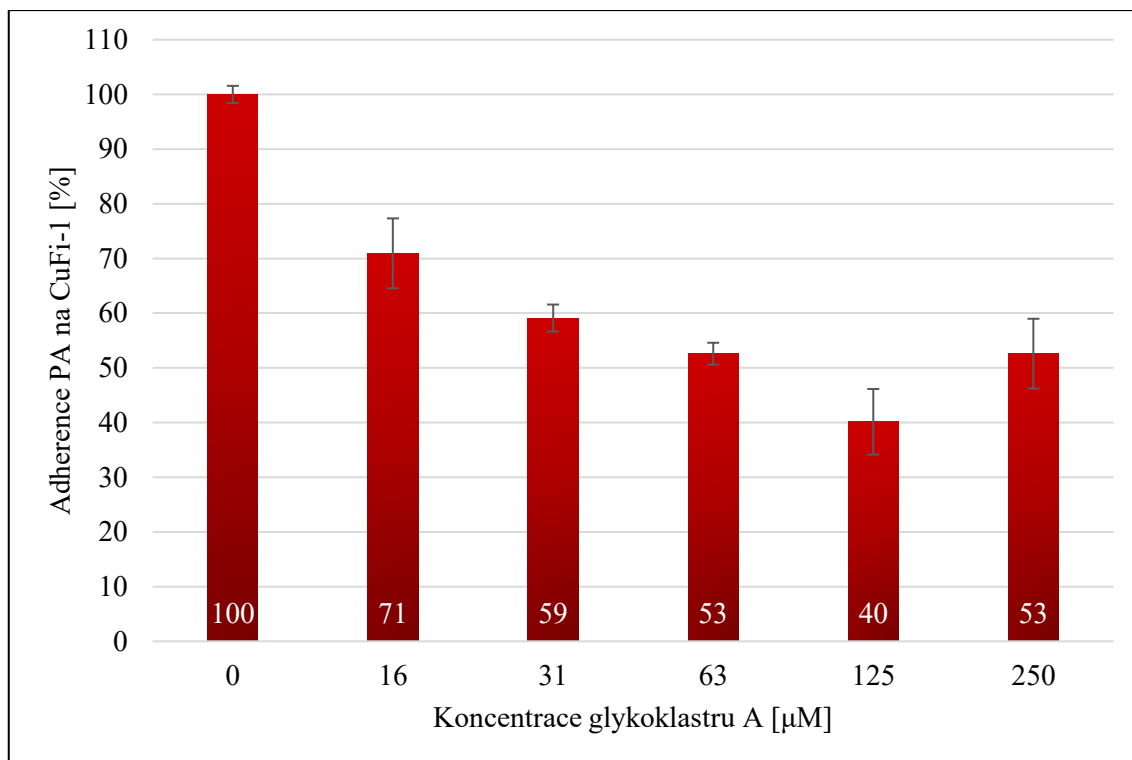
Obr. 32: Vliv glykoklastru B na adherenci buněk BC na CuFi-1. Buňky CuFi-1 a BC byly po kultivaci fluorescenčně označeny. K bakteriím byl přidán roztok glykoklastru B. Po společné inkubaci bakterií s CuFi-1 byly odstraněny nenavázané bakteriální buňky a proměřena duální fluorescence (spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro, program i-control). K vyhodnocení výsledků byly využity naměřené hodnoty fluorescence. K měření fluorescence BC (PKH26) bylo využito vrchního vícenásobného čtení jamek ($Z = 17\ 000$, vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 522 nm a emise 569 nm a parametr „gain“ byl nastaven na hodnotu 160. K měření fluorescence CuFi-1 (PKH67) bylo využito spodního vícenásobného čtení jamek (vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 470 nm a emise 505 nm a parametr „gain“ byl 140. Vynesené hodnoty jsou v procentech vyjádřené průměry (\pm SD) relativní fluorescence BC/CuFi-1 triplikátu pro každou koncentraci glykoklastru B, které jsou vztažené na obdobnou hodnotu neošetřených buněk. Za kontrolu (100 %) byly považovány jamky s neošetřenými buňkami, jejichž hodnota relativní fluorescence BC/CuFi-1 měla hodnotu 0,1366. Při vyhodnocování nebyly uvažovány odlehle výsledky.



Obr. 33: Vliv glykoklastru B na adhezenci buněk BC na NuLi-1. Buňky NuLi-1 a BC byly po kultivaci fluorescenčně označeny. K bakteriím byl přidán roztok glykoklastru B. Po společné inkubaci bakterií s NuLi-1 byly odstraněny nnavázané bakteriální buňky a proměřena duální fluorescence (spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro, program i-control). K vyhodnocení výsledků byly využity naměřené hodnoty fluorescence. K měření fluorescence BC (PKH26) bylo využito vrchního vícenásobného čtení jamek ($Z = 17\ 000$, vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 522 nm a emise 569 nm a parametr „gain“ byl nastaven na hodnotu 160. K měření fluorescence NuLi-1 (PKH67) bylo využito spodního vícenásobného čtení jamek (vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 470 nm a emise 505 nm a parametr „gain“ byl 140. Vynesené hodnoty jsou v procentech vyjádřené průměry (\pm SD) relativní fluorescence BC/NuLi-1 triplikátu pro každou koncentraci glykoklastru B, které jsou vztažené na obdobnou hodnotu neošetřených buněk. Za kontrolu (100 %) byly považovány jamky s neošetřenými buňkami, jejichž hodnota relativní fluorescence BC/NuLi-1 měla hodnotu 0,1201. Při vyhodnocování nebyly uvažovány odlehlé výsledky.



Obr. 34: Vliv glykoklastru C na adhezenci buněk BC na CuFi-1. Buňky CuFi-1 a BC byly po kultivaci fluorescenčně označeny. K bakteriím byl přidán roztok glykoklastru C. Po společné inkubaci bakterií s CuFi-1 byly odstraněny nenavázané bakteriální buňky a proměřena duální fluorescence (spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro, program i-control). K vyhodnocení výsledků byly využity naměřené hodnoty fluorescence. K měření fluorescence BC (PKH26) bylo využito vrchního vícenásobného čtení jamek ($Z = 17\ 000$, vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 522 nm a emise 569 nm a parametr „gain“ byl nastaven na hodnotu 160. K měření fluorescence CuFi-1 (PKH67) bylo využito spodního vícenásobného čtení jamek (vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 470 nm a emise 505 nm a parametr „gain“ byl 140. Vynesené hodnoty jsou v procentech vyjádřené průměry (\pm SD) relativní fluorescence BC/CuFi-1 triplikátu pro každou koncentraci glykoklastru C, které jsou vztaženy na obdobnou hodnotu neošetřených buněk. Za kontrolu (100 %) byly považovány jamky s neošetřenými buňkami, jejichž hodnota relativní fluorescence BC/CuFi-1 měla hodnotu 0,1336. Při vyhodnocování nebyly uvažovány odlehle výsledky.



Obr. 35: Vliv glykoklastru A na adhezenci buněk PA na CuFi-1. Buňky CuFi-1 a PA byly po kultivaci fluorescenčně označeny. K bakteriím byl přidán roztok glykoklastru A. Po společné inkubaci bakterií s CuFi-1 byly odstraněny nenavázané bakteriální buňky a proměřena duální fluorescence (spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro, program i-control). K vyhodnocení výsledků byly využity naměřené hodnoty fluorescence. K měření fluorescence PA (PKH26) bylo využito vrchního vícenásobného čtení jamek ($Z = 17\ 000$, vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 522 nm a emise 569 nm a parametr „gain“ byl nastaven na hodnotu 160. K měření fluorescence CuFi-1 (PKH67) bylo využito spodního vícenásobného čtení jamek (vyplněný čtverec 3×3) při vlnové délce excitace 470 nm a emise 505 nm a parametr „gain“ byl 140. Vynesené hodnoty jsou v procentech vyjádřené průměry (\pm SD) relativní fluorescence PA/CuFi-1 triplikátu pro každou koncentraci glykoklastru A, které jsou vztažené na obdobnou hodnotu neošetřených buněk. Za kontrolu (100 %) byly považovány jamky s neošetřenými buňkami, jejichž hodnota relativní fluorescence PA/CuFi-1 měla hodnotu 0,2298. Při vyhodnocování nebyly uvažovány odlehlé výsledky.

5 Diskuze

Cystická fibróza je genetické onemocnění řídicí se autosomálně-recesivní dědičností. Příčinou této nemoci je mutace v *CFTR* genu, která se projeví v defektu glykosylovaného CFTR proteinu. Tento protein je za fyziologických podmínek dopraven na apikální buněčnou membránu a v různých orgánech se podílí zejména na transportu Cl^{-} ^{3,4,9}. Plíce jsou u nemocných jedinců s CF nejvíce postiženým orgánem. Problém tkví především v narušené distribuci iontů (zejména Cl^{-}) a v abnormálně vysokém počtu plicních mucinů s pozměněnou glykosylací. Muciny tvoří hustý a viskózní hlen a pacienti mají problém s jeho vykašláním, což vede k hromadění bakteriálních buněk, opakovaným infekcím, zánětům a poškození buněk plic¹⁸⁻²⁰.

K patogenním mikroorganismům nebezpečným pro jedince s CF patří například PA či Bcc³⁹. Tyto bakterie kolonizují plíce pacientů ve vyšší míře. Vysvětlení může spočívat mimo jiné právě v pozměněné glykosylaci plicních mucinů⁴¹. Vzhledem k rizikům spojeným s PA a Bcc je snaha nalézt alternativní léčebné postupy. Jednou z variant je využití profylaxe slepičími protilátkami IgY anebo syntetickými sacharidovými konjugáty (například glykoklastry) cílicími na lektiny. Lektiny, jako jsou např. BC2L-C bakterie BC patřící do rodiny Bcc či PA-IIL bakterie PA, jsou proteinové adhesiny fungující jako virulentní faktory těchto bakterií. Zprostředkovávají specifické protein-sacharidové interakce mezi bakteriemi a patologicky glykosylovanými strukturami v plicích pacientů. Právě inhibice lektinových interakcí by se mohla využít v léčbě CF pro zamezení adherence buněk patogenů na epitelální plicní buňky^{87-89,91,132,137,147}.

Zkoumání této interakce a ovlivnění adherence bakterií BC (kmen ST-32, CCM 7291) a PA (kmen PAK, ST 1763) značených fluorescenčním barvivem PKH26 k fluoreskujícím (sloučenina PKH67) plicním epitelálním buněčným liniím CuFi-1 (získaným od jedince s CF) či NuLi-1 (od zdravého dárce) pomocí slepičích protilátek IgY nebo trivalentních glykoklastrů na báze fukosy bylo hlavním cílem předkládané práce. Nejdříve však bylo třeba ověřit, zda glykoklastry neovlivňují viabilitu bakteriálních buněk, jelikož případné ovlivnění by mohlo způsobit falešné výsledky aderenčních testů. Dalším dílčím cílem bylo prokázání exprese bakteriálních lektinů. V neposlední řadě muselo před provedením aderenčních testů ještě dojít k optimalizaci značení bakteriálních buněk sloučeninou PKH26.

Testování potenciálního ovlivnění bakteriální viability fukosylovanými glykoklastry bylo z důvodu experimentálního zjednodušení provedeno s využitím luminiscenčního kmene PA (PA-lux). Jak ukazuje obr. 16 na str. 73, během 80 minut kultivace PA-lux s pozitivní kontrolou, roztokem NaN_3 (0–0,1% (w/v)), došlo s jeho rostoucí koncentrací k postupnému poklesu luminiscence. To indikuje výrazné snížení životaschopnosti buněk PA-lux. Tyto výsledky jsou ve shodě s literárními daty, podle kterých baktericidní účinek NaN_3 závisí na použité koncentraci této sloučeniny a době inkubace s prokaryotními buňkami¹⁶⁶. V rámci testovaného rozmezí koncentrací testovaných substancí (0–1 mM v případě monovalentního KGY-4 (graf zobrazený na obr. 13, str. 70) nebo 0–125 μM u trivalentního glykoklastru KGY-12 (zobrazeno na obr. 14, str. 71)) nedošlo k významné změně naměřených hodnot luminiscence. Lze proto předpokládat, že ani další glykokonjugáty s podobnou strukturou neovlivní bakteriální viabilitu, což je nezbytné z důvodu potřeby zachování experimentálních podmínek v adhezenčním testu. Lze tedy předpokládat, že při použití látek tohoto typu nedojde ke vzniku bakteriální rezistence¹⁶⁷.

Další postup spočíval v prověření exprese bakteriálních lektinů. Předchozí práce již potvrdily expresi PA-III s preferovanou afinitou vůči fukose^{152,153,168}. Pozornost proto byla věnována lektinům bakterie BC s označením BC2L-A a BC2L-C. U nově obdržených bakterií BC kmene ST 32 (CCM 7291) byla nejprve proměřena růstová křivka. Na základě získaných výsledků uvedených na obr. 19 (str. 78) byly stanoveny podmínky inkubace buněk BC v LB (Luria-Bertani) médiu – 24 hodin za konstantního třepání (250 RPM) v inkubátoru se stálou teplotou 37 °C¹⁶⁹.

V bakteriálních lyzátech připravených po 24hodinové kultivaci byla exprese lektinů BC2L-A a BC2L-C zkoumána imunochemicky pomocí připravených protilátek. Po elektroforetické separaci jednotlivých proteinů z lyzátů a jejich přenosu na nitrocelulosovou membránu metodou „Western Blot“ byly k imunochemické detekci lektinu BC2L-A využity anti-BC2L-A protilátky IgY původně značené S1 a K1¹⁴⁸. Nejprve bylo třeba ověřit jejich specifitu vůči danému antigenu (BC2L-A) metodou ELISA. Z obr. 18 (str. 77) lze soudit, že specifická protilátka rozeznává lektin BC2L-A. Prudký nárůst absorbance při použitých koncentracích a podobné hodnoty získané u koncentrací 10–90 $\mu\text{g/ml}$ by mohly být způsobeny rychlým nasycením antigenu protilátkou, svědčící o jejím vysokém obsahu ve vzorku. Pro imunochemickou detekci bylo tedy možno zvolit koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. Na membráně se však nepodařilo lektin BC2L-A detekovat ani při opakovaném provedení metody s využitím protilátek o vyšší

koncentraci (30 $\mu\text{g/ml}$). Při kultivaci buněk BC v kapalném LB médiu se tedy lektin BC2L-A neexprimuje, což odpovídá předchozím výsledkům¹⁴⁸.

Kvůli nedostupnosti anti-BC2L-C protilátek bylo nejdříve třeba tyto protilátky připravit. Vzhledem k dostupnosti rekombinantních proteinů z N-terminální (nt) a C-terminální (ct) domény BC2L-C byly tyto antigeny použity samostatně (viz tab. 3 na str. 74). Následně byla metodou ELISA u izolovaných protilátek ověřována jejich reaktivita na použitý antigen. Z výsledků (obr. 17, str. 76) je patrné, že pouze protilátka izolovaná z vajec slepice 1 (specifická protilátka S1) vykazovala specifickou reakci vůči použitému antigenu (BC2L-C-nt). Nebylo proto nutný protilátky od slepice 1 afinitně purifikovat, jelikož pro zviditelnění lektinu BC2L-C na nitrocelulosové membráně by už měla být dostatečná i koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$. Na druhou stranu imunoreaktivita imunoglobulinů získaných z vajec od slepice 2 vůči antigenu BC2L-C-ct byla velmi nízká. Důvodem tohoto neúspěchu může být vychytání lektinového antigenu na glykosylované tkáni slepice. Tento problém by se v případě potřeby mohl dát vyřešit mutací antigenu tak, aby došlo ke snížení jeho afinity vůči danému sacharidu, v tomto případě mannose, anebo modifikační vazebného místa prostřednictvím diazomethanu. Tyto postupy byly již dříve využity pro lektin PA-III¹⁷⁰. Bylo tedy možné provést jen imunochemickou detekci lektinu BC2L-C v bakteriálních lyzátech (po 24hodinové kultivaci) s využitím protilátek od slepice 1. Na membráně inkubované s preimunní protilátkou nebyl viditelný signál odpovídající BC2L-C na rozdíl od membrány inkubované se specifickou protilátkou (viz obr. 20 na str. 79), kde byl viditelný proužek v dráze s aplikovaným rekombinantním lektinem (standardem) a i v dráze s naneseným lyzátem BC. Tento výsledek potvrzuje, že zvolené kultivační podmínky jsou vhodné pro expresi tohoto lektinu bakteriálními buňkami BC a mohou být proto použity pro kultivaci buněk BC v rámci adhezenčních testů.

Nevěrohodné výsledky adhezenčních testů by vedle narušené bakteriální viability mohla způsobit i nesprávně optimalizovaná metodika provedení. V návaznosti na předcházející závěrečnou práci, která naznačila možné obtíže spojené s fluorescenčním značením bakteriálních buněk PA sloučeninou PKH26, se výzkum zaměřil i na tuto problematiku. Mezi naznačené problémy patří tvorba shluků interferujících s měřením hodnot fluorescence adherovaných bakterií¹⁵². Jak prokázala M. Kurucová, k agregaci buněk PA způsobené glykoklastrem došlo až při delší době kultivace, případně u vyšší koncentrace použitého glykoklastu¹⁶⁸. Bylo proto

přístupeno k dalšímu studiu agregace. Podrobným zkoumáním se podařilo zjistit, že se nejedná o shluky barviva, jak se předpokládalo. Vytvářejí se agregáty bakteriálních buněk, a to i v nepřítomnosti glykoklastru. Tvorba bakteriálních shluků je běžná, přímo souvisí s interakcí mezi bílkovinami a sacharidy a podílí se například na tvorbě biofilmu, jenž je zásadní pro pacienty trpící CF¹⁷¹. Přirozeně se bakterie agregují také při „stresových podmínkách“, jako je třeba nedostatek vody anebo přítomnost antibiotik^{172,173}. V průběhu dalšího zkoumání bylo zjištěno, že vznik shluků PA je způsoben právě „stresovými podmínkami“, konkrétně pufrům použitým během barvení buněk bakterií – 10mM PBS o hodnotě pH 7,45, na což poukazuje obr. 21 (str. 81). Pufr PBS se používá v procesu fluorescenčního značení buněk už od minulého století¹⁷⁴ a již v roce 2007 Hara-Kaonga a Pistole zveřejnili článek, ve kterém fluorescenčně označili prokaryotní i eukaryotní buňky, s nimiž prováděli adhezenční test a používali při tom právě PBS. Analýza byla prováděná za pomoci metody průtokové cytometrie, díky čemuž byli autoři schopni při zpracování výsledků neuvažovat agregáty bakterií. Mimo jiné tím tedy potvrdili vznik těchto agregátů a naznačili potřebu tento problém řešit¹⁷⁵. Byly proto vyzkoušeny různé pufrы o pH 7,4 a získané mikroskopické snímky pořízené na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U (filtr 31002 FITC C87702) dokladující vznik bakteriálních shluků po jejich označení barvivem PKH26 jsou vyobrazeny na obr. 22 (str. 81). Testována byla 10mM koncentrace pufrů HEPES, TBS a Tris/HCl. U posledního zmíněného bylo přístupeno také k testování 20mM koncentrace a tento pufr se opakovaně jevil jako nejvhodnější varianta. Pufru Tris/HCl (20 mM) se využívá také pro práci s lektiny bakterie PA^{176,177}. Bakteriální buňky barveny v přítomnosti tohoto pufru vykazovaly taktéž největší pohyblivost. Zheng a spol. pozoroval, že pohyblivost bakterií je nejen ovlivněna použitým pufrům, ale skutečně má vliv i na bakteriální adhezenční¹⁷⁸. Tudíž optimalizace fluorescenčního značení z výše uvedených důvodů byla nutná pro správné provedení adhezenčních testů.

Při adhezenčních experimentech se bakterie přidávají k plicním epiteliálním buňkám (CuFi-1 nebo NuLi-1), a je proto třeba uvažovat poškození buněk způsobené nevhodnou iontovou silou pufru přidaného se značenými bakteriemi. Zejména eukaryotní buňky jsou totiž citlivé na správnou osmolaritu prostředí, která souvisí s použitým pufrům^{179,180}. V předcházejících pracích byl PBS pufr používán při fluorescenčním značení buněk epitelu plic (sloučeninou PKH67), bakterií (barvivem PKH26) i při samotném studiu adhezenční^{152,164}. Tento isotonický roztok je sice bezpečný pro buňky a má bohaté

aplikační spektrum¹⁸¹, ale není vhodný z důvodu tvorby agregátů a vlivu na pohyblivost bakteriálních buněk. Z těchto důvodů byl zvolen během barvení eukaryotních buněk a při adhezenčním testu 20mM TBS. Ukázalo se, že v případě adhezenčního testu je nejvýhodnější provést změnu Tris/HCl pufru na TBS pufr až po fluorescenčním označení buněk bakterií (konkrétně v posledním promývacím kroku), jelikož soli přítomné v pufru opět navyšovaly tvorbu agregátů. Dalším faktorem, který je nutno vzít v úvahu je potřeba Ca^{2+} pro plnou funkci vazebných míst lektinů^{136,138,142,143}. Lišil se proto TBS pufr použitý při fluorescenčním značení plicních buněk CuFi-1/NuLi-1 a při adhezenčním testu – v případě adhezenčního testu byl TBS pufr ještě obohacen o Ca^{2+} ve výsledné koncentraci 0,5 mM. Přidání těchto iontů do TBS pufru nezpůsobilo tvorbu dalších bakteriálních shluků (viz obr. 23 na str. 82).

Dalším problémem diskutovaným v předcházející práci byl nesoulad mezi výsledky získanými z naměřených hodnot fluorescence s těmi, které byly pozorovány na mikroskopických snímcích¹⁵². Po úspěšné optimalizaci barvení buněk bakterií, která byla nejdříve provedena na buňkách PA a následně BC byla proměřena kalibrační závislost fluorescence buněk obou typů bakterií, která byla porovnána s mikroskopickým pozorováním. Na obr. 24 a obr. 26 (str. 83 a 85) lze pozorovat kalibrační závislost fluorescence daných bakterií. V obou případech byl způsob provedení metody i počet buněk nasazovaný do jamek stejný. Lze konstatovat, že při opakovaném provedení tohoto experimentu se podařilo dosáhnout nejen podobný lineární trend, ale také podobné hodnoty fluorescence včetně maximální fluorescence. Shoda byla mezi jednotlivými pokusy i mezi oběma typy bakteriálních buněk. Všechny body kalibračního výnosu jsou i mikroskopicky doloženy obr. 25 a obr. 27 (str. 84 a 86). Potvrzuje se tím také hypotéza, že agregáty mohou interferovat s měřením fluorescence a poskytovat tak falešné výsledky.

Po optimalizačních pracích byly provedeny finální adhezenční testy nejprve s protilátkou anti-BC2L-C-nt (v systému buněčných linií CuFi-1 i NuLi-1 s bakterií BC). Mezi výsledky zobrazenými na obr. 28 a obr. 29 (str. 88–89) nebyl pozorovatelný signifikantní rozdíl. Preimunní protilátka (1 mg/ml) způsobila snížení adherence BC na plicní epiteliální buňky průměrně (od obou buněčných linií) o 54 %, zatímco specifická protilátka (o stejné koncentraci) až o 77 %. Anti-BC2L-C protilátky tedy vykazují slibný potenciál pro antibakteriální profylaxi u CF. Již v minulosti byla prokázána anti-adhezenční účinnost polyklonální protilátky připravené proti proteinu

BCAL2645 (patřícímu do rodiny OmpA) bakterie BC¹⁸². Novější publikace poukazuje na analogii mezi BC a PA, a ukazuje, že anti-BCAL2645 polyklonální protilátka funguje také jako substance zabraňující adhezenci dalších patogenů – PA a *Burkholderia multivorans*¹⁸³. Vzhledem ke slibným výsledkům adhezenčních experimentů s anti-BC2L-C-nt protilátkami by další výzkum měl vést k přípravě anti-BC2L-C-ct anebo anti-BC2L-C protilátek, jak bylo naznačeno dříve, a to zejména kvůli strukturní analogii BC2L-C-ct s PA-III.

Jako další antiadherenční agens byly testovány multivalentní glykoklastry. Podle literatury váží multivalentní glykoklastry lektiny výrazně efektivněji (s vyšší afinitou) než monovalentní glykoklastry^{167,184}. Byl proto testován vliv tří trivalentních fukosylovaných glykoklastrů na adhezenci bakteriálních buněk na eukaryotní buňky plicního epitelu. Nejúčinnější koncentrace glykoklastru A byla vždy 125 μM. Jak je patrné na obr. 30 (str. 90) a obr. 31 (str. 91), adherence buněk BC na CuFi-1 byla snížena o 54 % a na NuLi-1 o 48 %. Tato látka byla proto také použita v obdobných testech v kombinaci s PA. Získané výsledky (viz obr. 35, str. 95) dokazují až 60% snížení adherence PA na CuFi-1. Tato substance by tedy, podobně jako anti-BC2L-C protilátky, mohla fungovat pro profylaxi proti oběma typům bakterií. Glykoklastr C (viz obr. 34, str. 94) způsobil 51% snížení adherence BC na CuFi-1 při použití 63μM koncentrace. Glykoklastr B však fungoval nejefektivněji až v koncentraci 500 μM, v níž snižoval adhezenci BC na CuFi-1 o 72 % (viz obr. 32 na str. 92) a na NuLi-1 o 63 % (vyobrazeno na obr. 33, str. 93). U této sloučeniny lze pozorovat zajímavý trend, odlišný od ostatních testovaných molekul. Na rozdíl od glykoklastrů A a C došlo u glykoklastru B pouze k poklesu adherence, a ne k následnému nárůstu, jak je to běžné u tohoto typu sloučenin, a to nejen v této práci¹⁸⁵. Zůstává proto otázkou, čím je tento efekt způsoben. Je možné, že koncentrace této sloučeniny ještě nebyla dostatečná pro tzv. „zesíťování“, kterým se vysvětluje efekt následného zvýšení adherence. Zjednodušeně lze tento efekt vysvětlit vzájemným propojováním lektinů (bakterií) přes jednotlivá ramena glykoklastru, což může vést k nedostatečnému odmytí takto propojených bakteriálních buněk a následnému zvýšení naměřené hodnoty fluorescence¹⁸⁶.

Tato studie byla inspirována snahou o nalezení alternativní léčebné metody předcházející vzniku chronických zánětů plic u pacientů s CF. Jak protilátky proti lektinům, tak glykosylované sloučeniny (glykoklastry) se v *ex vivo* experimentech prokázaly jako potenciální anti-adherenční terapeutika. Slibně se jeví také

heteroglykoklastry, což jsou sloučeniny obsahující více typů sacharidových zbytků, jež by mohly současně cílit na lektiny s různou sacharidovou specifitou¹⁸⁷. Léčebné postupy založené na testovaných látkách by mohly vést ke značnému zlepšení kvality života pacientu s tak závažným onemocněním, jako je CF^{183,185}.

6 Souhrn

- Testované glykoklastry signifikantně neovlivňovaly viabilitu buněk bakterie PA kmene PA-lux.
- Byly připraveny protilátky proti dvěma exprimovaným antigenům lektinu BC2L-C. Protilátka anti-BC2L-C-nt efektivně reagovala s antigenem, zatímco anti-BC2L-C-ct nevykazovala vůči svému antigenu žádnou aktivitu.
- Metodou ELISA byla potvrzena také specifita protilátek S a K vůči lektinovému antigenu (BC2L-A).
- Proměřením růstové křivky bakteriální kultury BC v kapalném LB médiu byly nalezeny vhodné podmínky pro její kultivaci – 24 hodin, 37 °C a 250 RPM.
- Pomocí anti-BC2L-C-nt protilátek byla potvrzena exprese lektinu BC2L-C v průběhu kultivace BC v kapalném LB médiu.
- Imunochemická detekce neprokázala expresi lektinu BC2L-A za použitých kultivačních podmínek.
- Metoda fluorescenčního značení buněk bakterií byla úspěšně optimalizována a byla ověřena závislost fluorescence bakteriálních buněk na jejich počtu.
- Slepíčí protilátka anti-BC2L-C-nt v adhezenčních experimentech snížila vazbu BC na eukaryotní buňky epitelu CF plic (linie CuFi-1) až o 79 %.
- Trivalentními glykoklastry na báze fukosy způsobily významný pokles adherence bakteriálních buněk BC nebo PA na eukaryotní buňky epitelu plic. Nejúčinnější glykoklastr B snížil adherenci BC na CuFi-1 až o 72 %.

Seznam použité literatury

1. Andersen, D. H.: Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. *Am J Dis Child*. 56, 344–399 (1938).
2. Gibson, L. E.; Cooke, R. E.: A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*. 23, 545–549 (1959).
3. Kerem, B.; Rommens, J. M.; Buchanan, J. A.; Markiewicz, D.; Cox, T. K.; Chakravarti, A.; Buchwald, M.; Tsui, L. C.: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 245, 1073–1080 (1989).
4. Riordan, J. R.; Rommens, J. M.; Kerem, B.; 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.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 245, 1066–1073 (1989).
5. Jackson, A. D.; Goss, Ch. H.: Epidemiology of CF: How registries can be used to advance our understanding of the CF population. *J Cyst Fibros*. 17, 297–305 (2018).
6. Český registr cystické fibrózy. *Data z registru*. <<https://cfregistr.cz/data/>> (cit. 1.5.2024).
7. Davis, S. D.; Rosenfeld, M.; Chmiel, J.: *Cystic Fibrosis: A Multi-Organ System Approach*. 1st ed. Humana, Cham. (2020).
8. Guo, J.; Garratt, A.; Hill, A.: Worldwide rates of diagnosis and effective treatment for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 21, 456–462 (2022).
9. Rommens, J. M.; Iannuzzi, M. C.; Kerem, B.; Drumm, M. L.; Melmer, G.; Dean, M.; Rozmahel, R.; Cole, J. L.; Kennedy, D.; Hidaka, N.: Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*. 245, 1059–1065 (1989).
10. Levring, J.; Terry, D. S.; Kilic, Z.; Fitzgerald, G.; Blanchard, S. C.; Chen, J.: CFTR function, pathology and pharmacology at single-molecule resolution. *Nature*. 616, 606–614 (2023).
11. Zhang, Z.; Liu, F.; Chen, J.: Molecular structure of the ATP-bound, phosphorylated human CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115, 12757–12762 (2018).
12. Schrödinger LLC. Thy PyMOL Molecular Graphics System, verze 2.5.7. <<https://pymol.org/>> (cit. 9.7.2023).
13. BioRender. <<https://www.biorender.com/>> (cit. 30.4.2024).

14. Farinha, C. M.; Canato, S.: From the endoplasmic reticulum to the plasma membrane: mechanisms of CFTR folding and trafficking. *Cell Mol Life Sci.* 74, 39–55 (2017).
15. Johns Hopkins Cystic Fibrosis Center. *CFTR*. <<https://hopkinscf.org/knowledge/cftr/>> (cit. 7.7.2023).
16. Vertex Pharmaceuticals Incorporated. *CF Below the Surface*. <<https://www.cfsource.com/understanding-the-impact>> (cit. 7.7.2023).
17. De Boeck, K.: Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatr.* 109, 893–899 (2020).
18. Stoltz, D. A.; Meyerholz, D. K.; Welsh, M. J.: Origins of cystic fibrosis lung disease. *N Engl J Med.* 372, 351–362 (2015).
19. Hoegger, M. J.; Fischer, A. J.; McMenimen, J. D.; Ostedgaard, L. S.; Tucker, A. J.; Awadalla, M. A.; Moninger, T. O.; Michalski, A. S.; Hoffman, E. A.; Zabner, J.; Stoltz, D. A.; Welsh, M. J.: Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis. *Science.* 345, 818–822 (2014).
20. Esther Jr, Ch. R.; Muhlebach, M. S.; Ehre, C.; Hill, D. B.; Wolfgang, M. C.; Kesimer, M.; Ramsey, K. A.; Markovetz, M. R.; Garbarine, I. C.; Forest, M. G.; Seim, I.; Zorn, B.; Morrison, C. B.; Delion, M. F.; Thelin, W. R.; Villalon, D.; Sabater, J. R.; Turkovic, L.; Ranganathan, S.; Stick, S. M.; Boucher, R. C.: Mucus accumulation in the lungs precedes structural changes and infection in children with cystic fibrosis. *Sci Transl Med.* 11, eaav3488 (2019).
21. Ho, P.-M.; Nazeer, R. R.; Welch, M.: Therapeutic interventions alter ecological interactions among cystic fibrosis airway microbiota. *Front Microbiol.* 14, 1178131 (2023).
22. Thomassen, J. C.; Trojan, T.; Walz, M.; Vohlen, Ch.; Fink, G.; Rietschel, E.; Alejandro Alcazar, M. A.; van Koningsbruggen-Rietschel, S.: Reduced neutrophil elastase inhibitor elafin and elevated transforming growth factor- β 1 are linked to inflammatory response in sputum of cystic fibrosis patients with *Pseudomonas aeruginosa*. *ERJ Open Res.* 7, 00636–2020 (2021).
23. Zajac, M.; Dreano, E.; Edwards, A.; Planelles, G.; Sermet-Gaudelus, I.: Airway Surface Liquid pH Regulation in Airway Epithelium Current Understandings and Gaps in Knowledge. *Int J Mol Sci.* 22, 3384 (2021).
24. Fröhlich, E.: Non-Cellular Layers of the Respiratory Tract: Protection against Pathogens and Target for Drug Delivery. *Pharmaceutics.* 14, 992 (2022).

25. Verdugo, P.; Tam, P. Y.; Butler, J.: Conformational structure of respiratory mucus studied by laser correlation spectroscopy. *Biorheology*. 20, 223–230 (1983).
26. Button B.; Cai, L.-H.; Ehre, C.; Kesimer, M.; Hill, D. B.; Sheehan, J. K.; Boucher, R. C.; Rubinstein, M.: A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science*. 337, 937–941 (2012).
27. Bartoszewski, R.; Matalon, S.; Collawn, J. F.: Ion channels of the lung and their role in disease pathogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 313, L859–L872 (2017).
28. Chen, Y.; Yu, X.; Yan, Z.; Zhang, S.; Zhang, J.; Guo, W.: Role of epithelial sodium channel-related inflammation in human diseases. *Front Immunol*. 14, 1178410 (2023).
29. Canessa, C. M.; Schild, L.; Buell, G.; Thorens, B.; Gautschi, I.; Horisberger, J. D.; Rossier, B. C.: Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*. 367, 463–467 (1994).
30. Blaconà, G.; Raso, R.; Castellani, S.; Pierandrei, S.; Del Porto, P.; Ferraguti, G.; Ascenzioni, F.; Conese, M.; Lucarelli, M.: Downregulation of epithelial sodium channel (ENaC) activity in cystic fibrosis cells by epigenetic targeting. *Cell Mol Life Sci*. 79, 257 (2022).
31. Zeitlin, P. L.: Cystic fibrosis and estrogens: a perfect storm. *J Clin Invest*. 118, 3841–3844 (2008).
32. Boucher, R. C.: Muco-Obstructive Lung Diseases. *N Engl J Med*. 380, 1941–1953 (2019).
33. Thornton, Ch. S.; Surette, M. G.: Potential Contributions of Anaerobes in Cystic Fibrosis Airways. *J Clin Microbiol*. 59, e01813-19 (2021).
34. Anand, D.; Hummler, E.; Rickman, O. J.: ENaC activation by proteases. *Acta Physiol*. 235, e13811 (2022).
35. Scambler, T.; Jarosz-Griffiths, H. H.; Lara-Reyna, S.; Pathak, S.; Wong, Ch.; Holbrook, J.; Martinon, F.; Savic, S.; Peckham, D.; McDermott, M. F.: ENaC-mediated sodium influx exacerbates NLRP3-dependent inflammation in cystic fibrosis. *eLife*. 8, e49248 (2019).
36. Cohen-Cymerknoh, M.; Kerem, E.; Ferkol, T.; Elizur, A.: Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications. *Thorax*. 68, 1157–1162 (2013).
37. Hanssens, L. S.; Duchateau, J.; Casimir, G. J.: CFTR Protein: Not Just a Chloride

- Channel? *Cells*. 10, 2844 (2021).
38. Simonin, J.; Bille, E.; Crambert, G.; Noel, S.; Dreano, E.; Edwards, A.; Hatton, A.; Pranke, I.; Villeret, B.; Cottart, Ch.-H.; Vrel, J.-P.; Urbach, V.; Baatallah, N.; Hinzpeter, A.; Golec, A.; Touqui, L.; & Nassif, X.; Galiotta, L. J. V.; Planelles, G.; Sallenave, J.-M.; Edelman, A.; Sermet-Gaudelus, I.: Airway surface liquid acidification initiates host defense abnormalities in Cystic Fibrosis. *Sci Rep*. 9, 6516 (2019).
 39. Janahi, I. A.; Rehman, A.: *Progress in Understanding Cystic Fibrosis*. Intech (2017).
 40. Denny, E.; Sahota, J.; Beatson, R.; Thornton, D.; Burchell, J.; Porter, J.: Mucins and their receptors in chronic lung disease. *Clin Transl Immunology*. 9, e01120 (2020).
 41. Venkatakrishnan, V.; Packer, N. H.; Thaysen-Andersen, M.: Host mucin glycosylation plays a role in bacterial adhesion in lungs of individuals with cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med*. 7, 553–576 (2013).
 42. Saiman, L.; Prince, A.: *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J Clin Invest*. 92, 1875–1880 (1993).
 43. Národní screeningové centrum. *Novorozenecký laboratorní screening se dále rozrůstá – jeho součástí je nyní 20 onemocnění*. <<https://nsc.uzis.cz/news-detail/cs/160-novorozenecky-laboratorni-screening-rozsireni-sma-scid/>> (cit. 1.4.2024).
 44. Chalmers, S.: Mayo Clinic. Cystic fibrosis. <<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cystic-fibrosis/symptoms-causes/syc-20353700>> (cit. 31.3.2024).
 45. Coverstone, A. M.; Ferkol, T. W.: Early Diagnosis and Intervention in Cystic Fibrosis: Imagining the Unimaginable. *Front Pediatr*. 8, (2021).
 46. Callemeyn, J.; Van Haecke, P.; Peetermans, W. E.; Blockmans, D.: Clubbing and hypertrophic osteoarthropathy: insights in diagnosis, pathophysiology, and clinical significance. *Acta Clin Belg*. 71, 123–130 (2016).
 47. Maiworm, A. I.; Monteiro, M. B.; Santos-Filho, S. D.; Lopes, A. J.; Azeredo, L.; Missailidis, S.; Marín, P. J.; Bernardo-Filho, M.: Cystic fibrosis and the relevance of the whole-body vibration exercises in oscillating platforms: a short review. *Health*. 3, 656–662 (2011).
 48. Wu, K.; Mendes, P. L.; Sykes, J.; Stephenson, A. L.; Mathur, S.: Limb muscle size

- and contractile function in adults with cystic fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *J Cyst Fibros.* 20, e53–e62 (2021).
49. Tabori, H.; Arnold, Ch.; A.; Mentzel, H.-J.; Renz, D. M.; Reinsch, S.; Lorenz, M.; Michl, R.; Gerber, A.; Lehmann, T.; Mainz, J. G.: Abdo-al symptoms in cystic fibrosis and their relation to genotype, history, clinical and laboratory findings. *PLoS One.* 12, e0174463 (2017).
 50. Mingora, Ch. M.; Flume, P. A.: Pulmonary Complications in Cystic Fibrosis: Past, Present, and Future. *Chest.* 160, 1232–1240 (2021).
 51. Cohen-Cymerknoh, M.; Garber, K. M.; Reiter, J.; Shteinberg, M.; Stolovas, A.; Barghouti, I.; Adler Lazarovits, Ch.; Esh Broder, E.; Hershko Klement, A.: Ovarian reserve in women with cystic fibrosis: is this a cause of sub-fertility? *J Ovarian Res.* 16, 148 (2023).
 52. Cirilli, N.; Southern, K. W.; Barben, J.; Vermeulen, F.; Munck, A.; Wilschanski, M.; Nguyen-Khoa, T.; Aralica, M.; Simmonds, N. J.; De Wachter, E.: Standards of care guidance for sweat testing; phase two of the ECFS quality improvement programme. *J Cyst Fibros.* 21, 434–441 (2022).
 53. Hecker, T. M.; Aris, R. M.: Management of osteoporosis in adults with cystic fibrosis. *Drugs.* 64, 133–147 (2004).
 54. Sismanlar, T.; Aslan, A. T.; Köse, M.; Pekcan, S.; Ezgü, F. S.; Budakoğlu, I. İ.; Yenicesu, İ.: Early severe anemia as the first sign of cystic fibrosis. *Eur J Pediatr.* 175, 1157–1163 (2016).
 55. Stenbit, A. E.; Flume, P. A.: Pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* 17, 442–447 (2011).
 56. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. Nasal Polyps. <<https://www.aaaai.org/tools-for-the-public/conditions-library/allergies/nasal-polyps>> (cit. 31.3.2023).
 57. Grangeia, A.; Barro-Soria, R.; Carvalho, F.; Damas, A. M.; Maurício, A. C.; Kunzelmann, K.; Barros, A.; Sousa, M.: Molecular and functional characterization of CBAVD-causing mutations located in CFTR nucleotide-binding domains. *Cell Physiol Biochem.* 22, 79–92 (2008).
 58. Iyer, A. G.; Yu, B.; Reddy, A.; Khera, M.: Optimizing sexual reproductive health of men and women with cystic fibrosis: A systematic review. *J Cyst Fibros.* (2024).
 59. Calthorpe, R. J.; Goodchild, N.; Gleetus, V.; Premakumar, V.; Hayee, B.; Elliott, Z.; Evans, B.; Rowbotham, N. J.; Carr, S. B.; Barr, H.; Horsley, A.; Peckham, D.;

- Smyth, A. R.: A grumbling concern: an international survey of gastrointestinal symptoms in cystic fibrosis in the modulator era. *NIHR Open Res.* 3, 21 (2023).
60. Robinson, N. B.; DiMango, E.: Prevalence of Gastroesophageal Reflux in Cystic Fibrosis and Implications for Lung Disease. *Ann Am Thorac Soc.* 11, 964–968 (2014).
 61. Bendig, D. W.; Seilheimer, D. K.; Wagner, M. L.; Ferry, G. D.; Barrison, G. M.: Complications of gastroesophageal reflux in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr.* 100, 536–540 (1982).
 62. Berry, A. M.: Pancreatic enzyme replacement therapy during pancreatic insufficiency. *Nutr Clin Pract.* 29, 312–321 (2014).
 63. Kim, Y.; Jun, I.; Shin, D. H.; Yoon, J. G.; Piao, H.; Jung, J.; Park, H. W.; Cheng, M. H.; Bahar, I.; Whitcomb, D. C.; Lee, M. G.; Regulation of CFTR Bicarbonate Channel Activity by WNK1: Implications for Pancreatitis and CFTR-Related Disorders. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 9, 79–103 (2020).
 64. McDonald, C. M.; Reid, E. K.; Pohl, J. F.; Yuzyuk, T. K.; Padula, L. M.; Vavrina, K.; Altman, K.: Cystic fibrosis and fat malabsorption: Pathophysiology of the cystic fibrosis gastrointestinal tract and the impact of highly effective CFTR modulator therapy. *Nutr Clin Pract.* 39 Suppl 1, S57–S77 (2024).
 65. Kornblith, B. A.; Otani, S.: Meconium Ileus with Congenital Stenosis of the Main Pancreatic Duct. *Am J Pathol.* 5, 249-262.5 (1929).
 66. Sommerburg, O.; Schenk, J.P.: Abdominal manifestations in cystic fibrosis. *Radiologe.* 60, 781–790 (2020).
 67. The Royal College of Pathologists of Australasia. The salty kiss: cystic fibrosis screening. <<https://www.rcpa.edu.au/Library/Publications/Pathway/Docs/The-salty-kiss-cystic-fibrosis-screening>> (cit. 1.4.2024).
 68. Ampuero Acuña, C.; Tomarelli Rubio, G.; Montes Franceschini, S.; Donoso Fuentes, A.: Extreme electrolyte depletion associated with septic shock as a form of presentation of cystic fibrosis. *Andes Pediatr.* 93, 110–116 (2022).
 69. Hammond, K. B.; Turcios, N. L.; Gibson, L. E.: Clinical evaluation of the macroduct sweat collection system and conductivity analyzer in the diagnosis of cystic fibrosis. *J Pediatr.* 124, 255–260 (1994).
 70. Feldshtein, M.; Elkrinawi, S.; Yerushalmi, B.; Marcus, B.; Vullo, D.; Romi, H.; Ofir, R.; Landau, D.; Sivan, S.; Supuran, C. T.; Birk, O. S.: Hyperchlorhidrosis Caused by Homozygous Mutation in CA12, Encoding Carbonic Anhydrase XII.

- Am J Hum Genet.* 87, 713–720 (2010).
71. De Boeck, K.; Wilschanski, M.; Castellani, C.; Taylor, C.; Cuppens, H.; Dodge, J.; Sinaasappel, M.: Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax.* 61, 627–635 (2006).
 72. Baker, L. B.: Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temperature.* 6, 211–259 (2019).
 73. Dundar, M.; Uzak, A. S.; Erdogan, M.; Akbarova, Y.: Prediction, prevention and personalisation of medication for the prenatal period: genetic prenatal tests for both rare and common diseases. *EPMA J.* 2, 181–195 (2011).
 74. Jeppesen, L. D.; Lildballe, D. L.; Hatt, L.; Hedegaard, J.; Singh, R.; Toft, Ch. L. F.; Schelde, P.; Pedersen, A. S.; Knudsen, M.; Vogel, I.: Noninvasive prenatal screening for cystic fibrosis using circulating trophoblasts: Detection of the 50 most common disease-causing variants. *Prenat Diagn.* 43, 3–13 (2023).
 75. UC Health. PGD-PGS Preimplantation Genetic Diagnosis Screening. <<https://www.uchealth.com/fertility/patient-services/pgd-pgs-preimplantation-genetic-diagnosis-screening/>> (cit. 1.4.2024).
 76. Richards, C. S.; Bradley, L. A.; Amos, J.; Allitto, B.; Grody, W. W.; Maddalena, A.; McGinnis, M. J.; Prior, T. W.; Popovich, B. W.; Watson, M. S.: Standards and Guidelines for CFTR Mutation Testing. *Genet Med.* 4, 379–391 (2002).
 77. Minso, R.; Schulz, A.; Dopfer, Ch.; Alfeis, N.; van Barneveld, A.; Makartian-Gyulumyan, L.; Hansen, G.; Junge, S.; Müller, C.; Ringshausen, F. C. C.; Sauer-Heilborn, A.; Stanke, F.; Stolpe, C.; Tamm, S.; Welte, T.; Dittrich, A.-M.; Tümmler, B.: Intestinal current measurement and nasal potential difference to make a diagnosis of cases with inconclusive CFTR genetics and sweat test. *BMJ Open Respir Res.* 7, e000736 (2020).
 78. Weiner, S. A.; Caputo, Ch.; Bruscia, E.; Ferreira, E. C.; Price, J. E.; Krause, D. S.; Egan, M. E.: Rectal Potential Difference and the Functional Expression of CFTR in the Gastrointestinal Epithelia in Cystic Fibrosis Mouse Models. *Pediatr Res.* 63, 73–78 (2008).
 79. Sermet-Gaudelus, I.; Nguyen-Khoa, T.; Hatton, A.; Hayes, K.; Pranke, I.: Sweat Chloride Testing and Nasal Potential Difference (NPD) Are Primary Outcome Parameters in Treatment with Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Modulators. *J Pers Med.* 11, 729 (2021).
 80. Jermanová, J.: *Analýza receptorových komplexů přirozených zabiječských buněk*

s využitím nativní elektroforesy, Bakalářská práce (PřF UK, 2008).

81. Bruscia, E. M.; Bonfield, T. L.: Innate and Adaptive Immunity in Cystic Fibrosis. *Clin Chest Med.* 37, 17–29 (2016).
82. Dunkelberger, J. R.; Song, W.-Ch.: Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 20, 34–50 (2010).
83. Marshall, J. S.; Warrington, R.; Watson, W.; Kim, H. L.: An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 14, 49 (2018).
84. Hořejší, V.; Bartůňková, J.: *Základy imunologie.* 3. vyd. Praha, Triton (2005).
85. Stanfield, R. L.; Wilson, I. A.: Antibody Structure. *Microbiol Spectr.* 2, (2014).
86. Hoffman, W.; Lakkis, F. G.; Chalasani, G.: B Cells, Antibodies, and More. *Clin J Am Soc Nephrol.* 11, 137–154 (2016).
87. El-Kafrawy, S. A.; Abbas, A. T.; Oelkrug, Ch.; Taha, M.; Ezzat, S.; Zumla, A.; Azhar, E. I.: IgY antibodies: The promising potential to overcome antibiotic resistance. *Front Immunol.* 14, 1065353 (2023).
88. Nilsson, E.; Kollberg, H.; Johannesson, M.; Wejåker, P.-E.; Carlander, D.; Larsson, A.: More than 10 years' continuous oral treatment with specific immunoglobulin Y for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a case report. *J Med Food.* 10, 375–378 (2007).
89. Utratna, M.; Deegan, S.; Joshi, L.: Exploitation of Glycobiology in Anti-Adhesion Approaches against Biothreat Agents. *J Bioterror Biodef.* 7, (2016).
90. Chabre, Y. M.; Roy, R.: Design and Creativity in Synthesis of Multivalent Neoglycoconjugates. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 63, 165–393 (2010).
91. Zhao, Y.; Guo, Q.; Dai, X.; Wei, X.; Yu, Y.; Chen, X.; Li, Ch.; Cao, Z.; Zhang, X.: A Biomimetic Non-antibiotic Approach to Eradicate Drug-resistant Infections. *Adv Mater.* 31, e1806024 (2019).
92. Moni, L.; Pourceau, G.; Zhang, J.; Meyer, A.; Vidal, S.; Souteyrand, E.; Dondoni, A.; Morvan, F.; Chevlot, Y.; Vasseur, J.-J.; Marra, A.: Design of triazole-tethered glycoclusters exhibiting three different spatial arrangements and comparative study of their affinities towards PA-IL and RCA 120 by using a dna-based glycoarray. *Chembiochem.* 10, 1369–1378 (2009).
93. Wojtczak, K.; Byrne, J. P.: Structural Considerations for Building Synthetic Glycoconjugates as Inhibitors for *Pseudomonas aeruginosa* Lectins. *ChemMedChem.* 17, e202200081 (2022).
94. Bucior, I.; Abbott, J.; Song, Y.; Matthay, M. A.; Engel, J. N.: Sugar administration

- is an effective adjunctive therapy in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 305, L352–L363 (2013).
95. Powner, J.; Nesmith, A.; Kirkpatrick, D. P.; Nichols, J. K.; Bermingham, B.; Solomon, G. M.: Employment of an algorithm of care including chest physiotherapy results in reduced hospitalizations and stability of lung function in bronchiectasis. *BMC Pulm Med*. 19, 82 (2019).
 96. Cystic Fibrosis News Today. Antibiotics for CF. <<https://cysticfibrosisnewstoday.com/antibiotics/>> (cit. 21.4.2024).
 97. Ayats-Vidal, R.; Bosque-García, M.; Cordobilla, B.; Asensio-De la Cruz, O.; García-González, M.; Loureda-Pérez, S.; Fernández-López, E.; Robert-Barriocanal, E.; Valiente-Planas, A.; Domingo, J. C.: Impact of 1-Year Supplementation with High-Rich Docosahexaenoic Acid (DHA) on Clinical Variables and Inflammatory Biomarkers in Pediatric Cystic Fibrosis: A Randomized Double-Blind Controlled Trial. *Nutrients*. 16, 970 (2024).
 98. Ayats-Vidal, R.; Bosque-García, M.; Cordobilla, B.; Asensio-De la Cruz, O.; García-González, M.; Castro-Marrero, J.; López-Rico, I.; Domingo, J. C.: Changes of Erythrocyte Fatty Acids after Supplementation with Highly Concentrated Docosahexaenoic Acid (DHA) in Pediatric Cystic Fibrosis: A Randomized Double-Blind Controlled Trial. *J Clin Med*. 12, 3704 (2023).
 99. Soleimanzadeh, M.; Talebi, S.; Jaafari, M. R.; Sayedi, S. J.; Emadzadeh, M.; Kianifar, H. R.: Evaluation of the efficiency of nanomicellar formulation of fat-soluble vitamins in patients with cystic fibrosis: the study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 25, 60 (2024).
 100. Reihill, J. A.; Douglas, L. E. J.; Martin S. L.: Modulation of Ion Transport to Restore Airway Hydration in Cystic Fibrosis. *Genes*. 12, 453 (2021).
 101. Vertex Pharmaceuticals. FDA Approves KALYDECO™ (ivacaftor), the First Medicine to Treat the Underlying Cause of Cystic Fibrosis. <<https://investors.vrtx.com/news-releases/news-release-details/fda-approves-kalydecotm-ivacaftor-first-medicine-treat>> (cit. 18.4.2024).
 102. Hisert, K. B.; Heltshe, S. L.; Pope, Ch.; 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, Ch. G.; Bruce, J. E.; Stoltz, D. A.; Welsh, M. J.; Hoffman, L. R.; McKone, E. F.; Singh, P. K.: Restoring Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function Reduces Airway

- Bacteria and Inflammation in People with Cystic Fibrosis and Chronic Lung Infections. *Am J Respir Crit Care Med.* 195, 1617–1628 (2017).
103. Vertex Pharmaceuticals. FDA Approves ORKAMBI™ (lumacaftor/ivacaftor) – the First Medicine to Treat the Underlying Cause of Cystic Fibrosis for People Ages 12 and Older with Two Copies of the F508del Mutation. <<https://investors.vrtx.com/news-releases/news-release-details/fda-approves-orkambitm-lumacaftorivacaftor-first-medicine-treat>> (cit. 18.4.2024).
 104. Vertex Pharmaceuticals. FDA Approves TRIKAFTA™ (elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor and ivacaftor) to Treat the Underlying Cause of Cystic Fibrosis in People Ages 12 and Older Who Have at Least One F508del Mutation. <<https://investors.vrtx.com/news-releases/news-release-details/fda-approves-trikafta-elexacaftortezacaftorivacaftor-and>> (cit. 18.4.2024).
 105. Vertex Pharmaceuticals. European Commission Approves KAFTRIO® (ivacaftor/tezacaftor/elexacaftor) in Combination With Ivacaftor to Treat Cystic Fibrosis in People Ages 12 Years and Older. <<https://investors.vrtx.com/news-releases/news-release-details/european-commission-approves-kaftrior>> (cit. 18.4.2024).
 106. Cao, L.; Wu, Y.; Gong, Y.; Zhou, Q.: Small molecule modulators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR): Structure, classification, and mechanisms. *Eur J Med Chem.* 265, 116120 (2024).
 107. Ajilore, P. O.; Yang, H. Y.; Kerasidis, A.; Castro, R.: Curative Measures for Cystic Fibrosis: A Perspective on Current Stem Cell–Based, Gene, and Small Molecule Therapies. *GMR.* 6, (2022).
 108. Mercier, J.; Ruffin, M.; Corvol, H.; Guillot, L.: Gene Therapy: A Possible Alternative to CFTR Modulators? *Front Pharmacol.* 12, 648203 (2021).
 109. Cystic Fibrosis Foundation. Gene Therapy for Cystic Fibrosis. <<https://www.cff.org/research-clinical-trials/gene-therapy-cystic-fibrosis>> (cit. 21.4.2024).
 110. Cystic Fibrosis Foundation. mRNA Therapy for Cystic Fibrosis. <<https://www.cff.org/research-clinical-trials/mrna-therapy-cystic-fibrosis>> (cit. 21.4.2024).
 111. Harrison, P. T.; Hoppe, N.; Martin, U.: Gene editing & stem cells. *J Cyst Fibros.* 17, 10–16 (2018).
 112. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J. A.; Charpentier, E.: A

- Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 337, 816–821 (2012).
113. Diggle, S. P.; Whiteley, M.: Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*. 166, 30–33 (2020).
114. Tavares, M.; Kozak, M.; Balola, A.; Sá-Correia, I.: *Burkholderia cepacia* Complex Bacteria: a Feared Contamination Risk in Water-Based Pharmaceutical Products. *Clin Microbiol Rev*. 33, e00139-19 (2020).
115. Burkholder, W. H.: Sour skin, a bacterial rot of Onion bulbs. *Phytopathology*. 40, 115–118 (1950).
116. Chu, K. K.; Davidson, D. J.; Halsey, T. K.; Chung, J. W.; Speert, D. P.: Differential persistence among genomovars of the *Burkholderia cepacia* complex in a murine model of pulmonary infection. *Infect Immun*. 70, 2715–2720 (2002).
117. Jones, A. M.; Dodd, M. E.; Govan, J. R. W.; Barcus, V.; Doherty, C. J.; Morris, J.; Webb, A. K.: *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia multivorans*: influence on survival in cystic fibrosis. *Thorax*. 59, 948–951 (2004).
118. Perault, A. I.; Chandler, C. E.; Rasko, D. A.; Ernst, R. K.; Wolfgang, M. C.; Cotter, P. A.: Host Adaptation Predisposes *Pseudomonas aeruginosa* to Type VI Secretion System-Mediated Predation by the *Burkholderia cepacia* Complex. *Cell Host Microbe*. 28, 534-547.e3 (2020).
119. Morin, Ch.; Landry, M.; Groleau, M.-Ch.; Déziel, E.: Surface Motility Favors Codependent Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. *mSphere*. 7, e00153-22 (2022).
120. Branstetter, J. W.; Yarbrough, A.; Poole, C.: Management of Cepacia Syndrome With a Combination of Intravenous and Inhaled Antimicrobials in a Non-Cystic Fibrosis Pediatric Patient. *J Pediatr Pharmacol Ther*. 25, 730–734 (2020).
121. Sousa, S. A.; Seixas, A. M. M.; Marques, J. M. M.; Leitão, J. H.: Immunization and Immunotherapy Approaches against *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* Complex Infections. *Vaccines*. 9, 670 (2021).
122. Blackburn, L.; Brownlee, K.; Conway, S.; Denton, M.: ‘Cepacia syndrome’ with *Burkholderia multivorans*, 9 years after initial colonization. *J Cyst Fibros*. 3, 133–134 (2004).
123. Edward, E. A.; El Shehawy, M. R.; Abouelfetouh, A.; Aboulmagd, E.: Prevalence of different virulence factors and their association with antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Egypt. *BMC Microbiol*. 23,

- 161 (2023).
124. Drevinek, P.; Mahenthiralingam, E.: *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin Microbiol Infect.* 16, 821–830 (2010).
 125. Liao, Ch.; Huang, X.; Wang, Q.; Yao, D.; Lu, W.: Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Front Cell Infect Microbiol.* 12, 926758 (2022).
 126. Leitão, J. H.; Sousa, S. A.; Ferreira, A. S.; Ramos Ch. G.; Silva, I. N.; Moreira, L. M.: Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87, 31–40 (2010).
 127. Urban, T. A.; Griffith, A.; Torok, A. M.; Smolkin, M. R.; Burns, J. L.; Goldberg, J. B.: Contribution of *Burkholderia cenocepacia* flagella to infectivity and inflammation. *Infect Immun.* 72, 5126–5134 (2004).
 128. Ganesh, P. S.; Vishnupriya, S.; Vadivelu, J.; Mariappan, V.; Vellasamy, K. M.; Shankar, E. M.: Intracellular survival and innate immune evasion of *Burkholderia cepacia*: Improved understanding of quorum sensing-controlled virulence factors, biofilm, and inhibitors. *Microbiol Immunol.* 64, 87–98 (2020).
 129. Kaminski, A.; Gupta, K. H.; Goldufsky, J. W.; Lee, H. W.; Gupta, V.; Shafikhani, S. H.: *Pseudomonas aeruginosa* ExoS Induces Intrinsic Apoptosis in Target Host Cells in a Manner That is Dependent on its GAP Domain Activity. *Sci Rep.* 8, 14047 (2018).
 130. Jazayeri, J.; Nguyen, K.; Kotsanas, D.; Schneiders, F.; Tan, Ch.-H.; Jazayeri, M.; Armstrong, D.: Comparison of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from Cystic Fibrosis patients. *J Med Microbiol Diagn.* 5, 1–6 (2016).
 131. Ferreira, A. S.; Silva, I. N.; Oliveira, V. H.; Cunha, R.; Moreira, L. M.: Insights into the Role of Extracellular Polysaccharides in *Burkholderia* Adaptation to Different Environments. *Front Cell Infect Microbiol.* 1, (2011).
 132. Cho, S.-H.; Park, J.-Y.; Kim, Ch.-H.: Systemic Lectin-Glycan Interaction of Pathogenic Enteric Bacteria in the Gastrointestinal Tract. *Int J Mol Sci.* 23, 1451 (2022).
 133. Sharon, N.; Lis, H.: Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. *Science.* 177, 949–959 (1972).

134. Gilboa-Garber, N.: *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *Methods Enzymol.* 83, 378–385 (1982).
135. Avichezer, D.; Katcoff, D. J.; Garber, N. C.; Gilboa-Garber, N.: Analysis of the amino acid sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* galactophilic PA-I lectin. *J Biol Chem.* 267, 23023–23027 (1992).
136. Cioci, G.; Mitchell, E. P.; Gautier, C.; Wimmerová, M.; Sudakevitz, D.; Pérez, S.; Gilboa-Garber, N.; Imberty, A.: Structural basis of calcium and galactose recognition by the lectin PA-IL of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 555, 297–301 (2003).
137. Gilboa-Garber, N.; Katcoff, D. J.; Garber, N. C.: Identification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PA-III lectin gene and protein compared to PA-IL. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 29, 53–57 (2000).
138. Mitchell, E.; Houles, C.; Sudakevitz, D.; Wimmerová, M.; Gautier, C.; Perez, S.; Wu, A.; Gilboa-Garber, N.; Imberty, A.: Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. *Nat Struct Biol.* 9, 918–21 (2002).
139. Tielker, D.; Hacker, S.; Loris, R.; Strathmann, M.; Wingender, J.; Wilhelm, S.; Rosenau, F.; Jaeger, K.-E.: *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology.* 151, 1313–1323 (2005).
140. Adam, E. C.; Mitchell, B. S.; Schumacher, D. U.; Grant, G.; Schumacher, U.: *Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am J Respir Crit Care Med.* 155, 2102–2104 (1997).
141. Mitchell, E. P.; Sabin, Ch.; Snajdrová, L.; Pokorná, M.; Perret, S.; Gautier, C.; Hofr, C.; Gilboa-Garber, N.; Koca, J.; Wimmerová, M.; Imberty, A.: High affinity fucose binding of *Pseudomonas aeruginosa* lectin PA-III: 1.0 Å resolution crystal structure of the complex combined with thermodynamics and computational chemistry approaches. *Proteins.* 58, 735–746 (2005).
142. Lameignere, E.; Malinová, L.; Sláviková, M.; Duchaud, E.; Mitchell, E. P.; Varrot, A.; Sedo, O.; Imberty, A.; Wimmerová, M.: Structural basis for mannose recognition by a lectin from opportunistic bacteria *Burkholderia cenocepacia*. *Biochem J.* 411, 307–318 (2008).
143. Šulák, O.; Cioci, G.; Lameignère, E.; Balloy, V.; Round, A.; Gutsche, I.; Malinová, L.; Chignard, M.; Kosma, P.; Aubert, D. F.; Marolda, C. L.; Valvano,

- M. A.; Wimmerová, M.; Imberty, A.; Saper, M. A.: *Burkholderia cenocepacia* BC2L-C Is a Super Lectin with Dual Specificity and Proinflammatory Activity. *PLoS Pathog.* 7, e1002238 (2011).
144. Inhülsen, S.; Aguilar, C.; Schmid, N.; Suppiger, A.; Riedel, K.; Eberl, L.: Identification of functions linking quorum sensing with biofilm formation in *Burkholderia cenocepacia* H111. *Microbiologyopen.* 1, 225–242 (2012).
145. Lameignere, E.; Shiao, T. Ch.; Roy, R.; Wimmerova, M.; Dubreuil, F.; Varrot, A.; Imberty, A.: Structural basis of the affinity for oligomannosides and analogs displayed by BC2L-A, a *Burkholderia cenocepacia* soluble lectin. *Glycobiology.* 20, 87–98 (2010).
146. Marchetti, R.; Malinowska, L.; Lameignère, E.; Adamova, L.; de Castro, C.; Cioci, G.; Stanetty, Ch.; Kosma, P.; Molinaro, A.; Wimmerova, M.; Imberty, A.; Silipo, A.: *Burkholderia cenocepacia* lectin A binding to heptoses from the bacterial lipopolysaccharide. *Glycobiology.* 22, 1387–1398 (2012).
147. Šulák, O.; Cioci, G.; Delia, M.; Lahmann, M.; Varrot, A.; Imberty, A.; Wimmerová, M.: A TNF-like trimeric lectin domain from *Burkholderia cenocepacia* with specificity for fucosylated human histo-blood group antigens. *Structure.* 18, 59–72 (2010).
148. Bolshova, A.: *Protilátky proti bakteriálním lektinům jako prostředek prevence plicních infekcí pacientů s cystickou fibrosou, Bakalářská práce (PřF UK, 2019).*
149. ATCC. NuLi-1 (ATCC® CRL-4011TM). <<https://www.atcc.org/products/crl-4011>> (cit. 25.9.2023).
150. ATCC. CuFi-1 (ATCC® CRL-4013TM). <<https://www.atcc.org/products/crl-4013>> (cit. 25.9.2023).
151. Corning: Corning® Cell Counter. Time-saving Technology using the Power of the Cloud. <<https://www.corning.com/catalog/cls/documents/product-information-sheets/CLS-EQ-129.pdf>> (cit. 20.2.2024).
152. Áčová, A.: *Studium profylaktického účinku glykoklastrů na modelu bakteriální adherence, Bakalářská práce (PřF UK, 2022).*
153. Vašková, M.: *Vývoj antibakteriálních protilátek pro pacienty s cystickou fibrosou, Diplomová práce (PřF UK, 2019).*
154. Chi, E; Mehl, T.; Nunn, D.; Lory, S.: Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. *Infect Immun.* 59, 822–828 (1991).
155. Kalferstová, L.: *Studium patogeneze infekce, kterou způsobují bakterie komplexu*

- Burkholderia cepacia* u nemocných cystickou fibrózou, Dizertační práce (2. lékařská fakulta UK, 2016).
156. Hodek, P.; Trefil, P.; Šimůnek, J.: *Způsob výroby protilátek z vodných frakcí žloutků ptačích vajec*. Česká republika, Patentový spis 281298 (1996).
 157. Song, J. G.; Baral, K. Ch.; Kim, G.-L.; Park, J.-W.; Seo, S.-H.; Kim, D.-H.; Jung, D. H.; Ifekpolugo, N. L.; Han, H.-K.: Quantitative analysis of therapeutic proteins in biological fluids: recent advancement in analytical techniques. *Drug Deliv.* 30, 2183816 (2023).
 158. PřF MU: *Metody biochemického výzkumu: SDS-PAGE + western blotting*. <https://is.muni.cz/el/sci/podzim2018/C9320/um/Uloha_4_SDSPAGE_WB_2018.pdf> (cit. 8.10.2023).
 159. Mousseau, F.; Berret, J.-F.; Oikonomou, E. K.: Design and Applications of a Fluorescent Labeling Technique for Lipid and Surfactant Preformed Vesicles. *ACS Omega.* 4, 10485–10493 (2019).
 160. MedchemExpress. PKH 26. <https://www.medchemexpress.com/pkh-26.html?utm_source=google&utm_medium=CPC&utm_campaign=Europe&utm_term=HY-D1451&utm_content=PKH%2026&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAivGuBhBEiWAWiFmYeBVo128PdtMmmWYWyCatz0tjL3E7_GNIZWcjuOTSazpOchZOO8mxoCCekQAvD_BwE> (cit. 27.2.2024).
 161. Merck. PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling. <<https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/pkh67gl>> (cit. 26.2.2024).
 162. Merck. PKH26 Red Fluorescent Cell Membrane Labeling. <<https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/pkh26gl>> (cit. 26.2.2024).
 163. Nosková, L.: *Studium adheze Pseudomonas aeruginosa na buňky plicního epitelu*, Diplomová práce (PřF UK, 2013).
 164. Augustínová, M.: *Studium profylaktického účinku glykoklastrů na modelu bakteriální adherence*, Bakalářská práce (PřF UK, 2021).
 165. Abramoff, M.; Magalhães, P.; Ram, S.J.: Image Processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* 11, 36–42 (2004).
 166. Cabrol, L.; Quéméneur, M.; Misson, B.: Inhibitory effects of sodium azide on microbial growth in experimental resuspension of marine sediment. *J Microbiol Methods.* 133, 62–65 (2017).

167. Grishin, A. V.; Krivozubov, M. S.; Karyagina, A. S.; Gintsburg, A. L.: *Pseudomonas Aeruginosa* Lectins As Targets for Novel Antibacterials. *Acta Naturae*. 7, 29–41 (2015).
168. Kurucová, M.: *Studium profylaktického účinku glykoklastrů na modelu bakteriální adherence, Diplomová práce* (PřF UK, 2024).
169. Coutinho, C. P.; de Carvalho, C. C. C. R.; Madeira, A.; Pinto-de-Oliveira, A.; Sá-Correia, I.: *Burkholderia cenocepacia* Phenotypic Clonal Variation during a 3.5-Year Colonization in the Lungs of a Cystic Fibrosis Patient. *Infect Immun*. 79, 2950–2960 (2011).
170. Vašková, M.: *Protilátky proti lektinu PA-III jako prostředek prevence bakteriálních infekcí u pacientů s cystickou fibrosou, Bakalářská práce* (PřF UK, 2017).
171. Datta, A.; Stapleton, F.; Willcox, M. D. P.: Bacterial Coaggregation Among the Most Commonly Isolated Bacteria From Contact Lens Cases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 58, 50–58 (2017).
172. Kuczyńska-Wiśnik, D.; Stojowska-Swędrzyńska, K.; Laskowska, E.: Liquid–Liquid Phase Separation and Protective Protein Aggregates in Bacteria. *Molecules*. 28, 6582 (2023).
173. Bollen, C.; Dewachter, L.; Michiels, J.: Protein Aggregation as a Bacterial Strategy to Survive Antibiotic Treatment. *Front Mol Biosci*. 8, 669664 (2021).
174. Raybourne, R. B.; Bunning, V. K.: Bacterium-host cell interactions at the cellular level: fluorescent labeling of bacteria and analysis of short-term bacterium-phagocyte interaction by flow cytometry. *Infect Immun*. 62, 665–672 (1994).
175. Hara-Kaonga, B.; Pistole, T. G.: A dual fluorescence flow cytometric analysis of bacterial adherence to mammalian host cells. *J Microbiol Methods*. 69, 37–43 (2007).
176. Gillon, E.; Varrot, A.; Imbert, A.: LecB, a High Affinity Soluble Fucose-Binding Lectin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Mol Biol*. 2132, 475–482 (2020).
177. Illyés, T. Z.; Malinová, L.; Róth, E.; Tóth, B.; Farkas, B.; Korsák, M.; Wimmerová, M.; Kövér, K. E.; Csávás, M.: Synthesis of Tetravalent Thio- and Selenogalactoside-Presenting Galactoclusters and Their Interactions with Bacterial Lectin PA-IL from *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*. 26, 542 (2021).
178. Zheng, S.; Bawazir, M.; Dhall, A.; Kim, H.-E.; He, L.; Heo, J.; Hwang, G.: Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic

- Conditions on Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion. *Front Bioeng Biotechnol.* 9, 643722 (2021).
179. Hoffmann, E. K.; Pedersen, S. F.: Physiology of Cell Volume Regulation in Vertebrates. *Physiol Rev.* 89, 193–277 (2009).
180. Pharmacy Infoline. Buffered isotonic solutions and their applications. <<https://pharmacyinfoline.com/buffered-isotonic-solutions/>> (cit. 28.4.2024).
181. Visikol. TBS vs PBS in Immunohistochemistry: Navigating the Buffers. <<https://visikol.com/blog/2024/01/04/tbs-vs-pbs-in-immunohistochemistry-navigating-the-buffers/>> (cit. 28.4.2024).
182. Seixas, A. M. M.; Sousa, S. A.; Feliciano, J. R.; Gomes, S. C.; Ferreira, M. R.; Moreira, L. M.; Leitão, J. H.: Polyclonal Antibody Raised against the *Burkholderia cenocepacia* OmpA-like Protein BCAL2645 Impairs the Bacterium Adhesion and Invasion of Human Epithelial Cells In Vitro. *Biomedicines.* 9, 1788 (2021).
183. Seixas, A. M. M.; Gomes, S. C.; Silva, C.; Moreira, L. M.; Leitão, J. H.; Sousa, S. A.: A Polyclonal Antibody against a *Burkholderia cenocepacia* OmpA-like Protein Strongly Impairs *Pseudomonas aeruginosa* and *B. multivorans* Virulence. *Vaccines.* 12, 207 (2024).
184. Galanos, N.; Chen, Y.; Michael, Z. P.; Gillon, E.; Dutasta, J.-P.; Star, A.; Imberty, A.; Martinez, A.; Vidal, S.: Cyclotrimeratrylene-Based Glycoclusters as High Affinity Ligands of Bacterial Lectins from *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia ambifaria*. *ChemistrySelect.* 1, 5863–5868 (2016).
185. Thai Le, S.; Malinovská, L.; Vašková, M.; Mező, E.; Kelemen, V.; Borbás, A.; Hodek, P.; Wimmerová, M.; Csávás, M.: Investigation of the Binding Affinity of a Broad Array of L-Fucosides with Six Fucose-Specific Lectins of Bacterial and Fungal Origin. *Molecules.* 24, 2262 (2019).
186. Lundquist, J. J.; Toone, E. J.: The Cluster Glycoside Effect. *Chem. Rev.* 102, 555–578 (2002).
187. Csávás, M.; Kalmár, L.; Szőke, P.; Farkas, L. B.; Bécsi, B.; Kónya, Z.; Kerékgyártó, J.; Borbás, A.; Erdódi, F.; Kövér, K. E.: A Fucosylated Lactose-Presenting Tetravalent Glycocluster Acting as a Mutual Ligand of *Pseudomonas aeruginosa* Lectins A (PA-IL) and B (PA-IIL)—Synthesis and Interaction Studies. *Int J Mol Sci.* 23, 16194 (2022).