

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



KATEŘINA VYHNALOVÁ

Interakce bakteriálních lektinů s epitelem lidských plic

Interaction of bacterial lectins with human lung epithelium

Bakalářská práce

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

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení, profesionální přístup a trpělivost při vypracování předkládané práce.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Michaele Vaškové, Mgr. Janu Královi a Mgr. Marku Korsákovi za spolupráci a pomoc v laboratoři. Velké poděkování patří Lence Malinovské, Ph.D. a Ing. Radimu Osičkovi za možnost provedení experimentální části bakalářské práce, ale hlavně za cenné rady a všechen investovaný čas. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat laborantce Anně Ammerové za velkou vstřícnost a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Recesivní autozomální onemocnění cystická fibróza (CF) je způsobena mutací v genu CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“), který kóduje stejnojmenný chloridový kanál. Tato mutace vede k nesprávnému transportu iontů, což má za následek tvorbu nadměrně viskózního hlenu na povrchu dýchacích cest, a následně ke zvýšené náchylnosti k bakteriálním onemocněním. Právě infekce dýchacího systému jsou nejčastější příčinou úmrtí pacientů s CF. Jedním z nejnebezpečnějších patogenů pro tyto pacienty je *Pseudomonas aeruginosa* (PA), bakterie, která ke své patogenitě využívá řadu faktorů virulence, jako jsou pili nebo adheziny. Lektin PA-IIL, ze skupiny adhezinů PA, se vyznačuje vysokou afinitou k L-fukose, takže přispívá k adhezenci PA na málo sialylovaný epitel pacientů s CF.

V této práci byly zkoumány interakce mezi PA-IIL a plicním epitelem. Byly využity buněčné linie CuFi-1 (pacient s CF) a NuLi-1 (zdravý jedinec), které byly zkoumány *ex vivo*. Část těchto linií byla vystavena působení neuraminidasy. Lektin PA-IIL byl izolován z buněčné linie *E. coli pET25_PAIII* a následně fluorescenčně značen DyLight 488. Aktivita zmíněného lektinu byla ověřena pomocí aglutinace červených krvinek. Postup značení nezměnil vazebnou afinitu lektin-sacharid. Interakce mezi lektinem a buněčnými liniemi byly vyhodnoceny pomocí fluorescenční průtokové cytometrie FACS.

Bylo zjištěno, že lektin PA-IIL se s vysokou afinitou váže na buněčné linie ošetřené neuraminidasou. Tyto výsledky potvrzují, že lektin PA-IIL přispívá k adhezi *Pseudomonas aeruginosa* na plicní epitel s nižší sialylací.

Klíčová slova: cystická fibróza, *Pseudomonas aeruginosa*, PA-IIL, buněčné linie

Abstract

Recessive autosomal disease cystic fibrosis (CF) is caused by a mutation in the CFTR gene ("regulator of cystic fibrosis transmembrane conductance"), which encodes the same named chloride channel. This mutation leads to incorrect ion transport, which causes the formation of an excessively viscous mucus on the surface of the airways and subsequently to the susceptibility to bacterial diseases. This disease mainly affects the respiratory system, where infections are associated with various causes of death in patients with CF. The most common pathogen causing infections is *Pseudomonas aeruginosa* (PA), which uses many virulence factors, such as pili or adhesins. Lectin PA-IIL, from the group of PA adhesins, is characterized by a high affinity for L-fucose, so it contributes to the adhesion of PA to the low sialylated epithelium of CF patients.

In this work the interactions between PA-IIL and lung epithelium were investigated. The cell lines CuFi-1 (CF patient) and NuLi-1 (healthy individual), which were examined *ex vivo*, were used. A part of these cell lines were exposed to neuraminidase. The PA-IIL lectin was isolated from the *E. coli* cell line *pET25_PAIII*L and subsequently fluorescently labeled with DyLight 488. The activity of mentioned lectin was verified by red blood cell agglutination. The labeling procedure did not alter the binding affinity of the lectin-saccharide. A spectrofluorimeter (Tecan Infinite M200 Pro) and a FACS fluorescence flow cytometer (BD LSR II) were used to investigate the interaction between lectin and cell lines.

Lectin PA-IIL has been shown to bind more likely to a neuraminidase-treated cell lines. These results confirm that the lectin PA-IIL contributes to the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to the lung epithelium with reduced sialylation.

Key words: cystic fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa*, PA-IIL, cell lines

Obsah

Seznam zkratk	1
1 Teoretický úvod.....	3
1.1 Cystická fibróza.....	3
1.1.1 Dědičnost	3
1.1.1.1 Mutace <i>CFTR</i> genu	4
1.1.2 <i>CFTR</i> protein	7
1.1.3 Projevy cystické fibrózy.....	9
1.1.4 Změny glykosylace v dýchacích cestách	10
1.2 Původce bakteriálních onemocnění u CF	12
1.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
1.2.2 Faktory virulence <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.2.3 Lektiny <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
1.2.3.1 Lektin PA-IIL	17
2 Cíl práce	20
3 Materiál a metody	21
3.1 Použité přístroje a materiál.....	21
3.1.1 Přístroje	21
3.1.2 Materiál a chemikálie.....	23
3.2 Tkáňové kultury.....	25
3.2.1 Rozmražení buněčných kultur	25
3.2.2 Kultivace buněčných linií	26
3.2.3 Příprava kultivačního povrchu	26
3.2.4 Subkultivace buněčných linií	27
3.2.5 Stanovení počtu a viability buněk.....	27
3.2.6 Zamrazení buněčných kultur.....	28
3.3 Příprava lektinu PA-IIL	29
3.3.1 Exprese rekombinantního proteinu PA-IIL.....	29
3.3.2 Purifikace rekombinantního proteinu PA-IIL	30
3.3.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	31
3.3.3.1 Barvení Coomassie Brilliant Blue R-250.....	33
3.3.3.2 Barvení stříbrem.....	33
3.3.4 Značení lektinu PA-IIL barvivem DyLight 488	34
3.3.4.1 Stanovení koncentrace značeného PA-IIL	35

3.3.4.2	Stanovení stupně značení PA-IIL.....	36
3.3.5	Hemaglutinační test.....	37
3.4	Průtoková cytometrie FACS.....	38
4	Výsledky.....	40
4.1	Příprava rekombinantního proteinu PA-IIL	40
4.2	Účinnost značení lektinu PA-IIL.....	42
4.3	Stanovení aktivity lektinu PA-IIL.....	42
4.4	Vazba lektinu PA-IIL na buňky epitelu.....	43
5	Diskuze.....	46
6	Souhrn.....	51
	Seznam použité literatury	52

Seznam zkratek

ABC	„ATP-binding cassette“
ANO1	„anoctamin-1“
APS	„ammonium persulfate“, persíran amonný
ASL	„airway surface liquid“, povrchová plicní kapalina
asialo-GM1	gangliotetraosylceramid
bp	„base pair“, pár báží
BSA	„buried surface area“
cAMP	cyklický adenosintrifosfát
CF	cystická fibróza
KF	„correction factor“, korekční faktor
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	„ethylenediaminetetraacetic acid“, ethylendiamintetraoctová kyselina
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“, typ průtokové cytometrie
FITC	„fluorescein isothiocyanate“, fluorescein isothiokyanát
FPLC	„fast protein liquid chromatography“, rychlá proteinová chromatografie
ENaC	„epithelial sodium channel“, epiteliální sodíkový kanál
FBS	fetální bovinní sérum
GM1	monosialotetrahexosylgangliosid
TERT	„telomerase reverse transcriptase“, telomerasová reverzní transkriptasa
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktosid
kb	kilobáze
kDa	kilodalton
LB	Lauria-Bertani medium
LPS	lipopolysacharid
NEU	neuraminidasa
NBD	„nucleotide-binding domain“, nukleotid-vázající doména
OD	optická denzita
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-IL	lektin I bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-IIL	lektin II bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	„phosphate buffered saline“

PTC	„premature termination codon“, předčasný terminační kodon
RBC	„red blood cells“, erytrocyty
ROMK	„renal outer medullary potassium channel“
RPM	„revolutions per minute“, otáčky za minutu
SDS	dodecylsíran sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
T3SS	„type three secretion system“, sekreční systém typu III
TEMED	tetramethylethyldiamin
TMD	„transmembrane domain“, transmembránová doména

1 Teoretický úvod

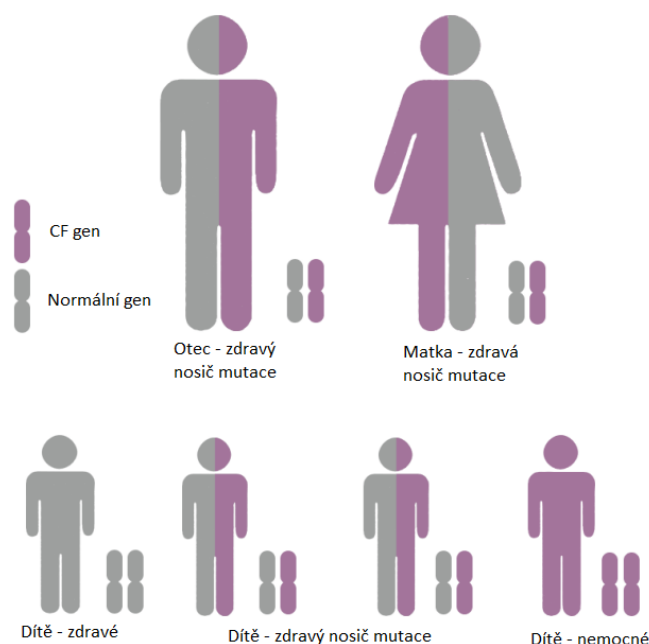
1.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) neboli mukoviscidióza patří mezi nejběžnější autozomálně recesivní onemocnění¹. Dříve byla známá jako „cystická fibróza pankreatu“. Název byl odvozen podle patologického nálezu váčků (cyst) na povrchu slinivky břišní. Postupem času se slovo „pankreas“ z názvu vynechalo, neboť bylo zjištěno, že změny dýchacího ústrojí jsou mnohem významnější než nálezy na slinivce břišní¹. CF je způsobena mutací genu pro transmembránový regulátor vodivosti (CFTR, „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“). Ačkoliv je CF monogenním onemocněním, její fenotypová variabilita je široká. Mutace *CFTR* genu vedou k sekreci abnormálně viskózního hlenu v dýchacích cestách a ve slinivce, který přispívá k tvorbě zánětu, poškození tkání a destrukci obou orgánových systémů². Ovlivněny jsou i další orgány obsahující epitel jako jsou potní žlázy, žlučové cesty jater, mužský reprodukční trakt a střevo³.

CF postihuje přibližně jednoho z 2 500 novorozenců⁴. Celkově se s CF potýká více než 85 000 jedinců na celém světě⁵. Každý rok se v ČR narodí 32-46 dětí s CF¹. Prozatím neexistuje žádná účinná léčba CF, ale včasná diagnostika a symptomatická léčba umožňuje pacientům s CF dožítí až 44 let⁶. Ve většině případů je CF diagnostikována před dospíváním, ale někteří pacienti zůstávají až do dospělosti asymptomaticí⁷.

1.1.1 Dědičnost

CF je dědičně přenášené onemocnění způsobené defektem autozomálních chromozomů. Jelikož CF patří mezi autozomálně recesivní onemocnění, je pro projev CF zapotřebí dvou defektních alel genu – nemoc se projeví pouze v případě, že jedinec zdědí dva defektní *CFTR* geny (homozygot). U jedinců s jedním defektním genem (heterozygoti) se sice CF neprojeví, ale mohou tento defekt přenášet na další generace – jsou tedy přenašeči CF¹. Pravděpodobnost zdědění CF je zobrazeno na obrázku 1 na následující straně.



Obrázek 1 – Riziko pro pár sestávající se ze dvou nosičů CF genu. Pokud jsou oba rodiče nosiči jednoho *CF* genu, je 25% pravděpodobnost narození dítěte s CF, 50% pravděpodobnost, že narozené dítě bude nosičem defektního genu *CFTR* a může ho předat dalším potomkům a 25% pravděpodobnost, že narozené dítě nezdědí ani jeden defektní gen a nestane se ani přenašečem. Převzato a upraveno⁸.

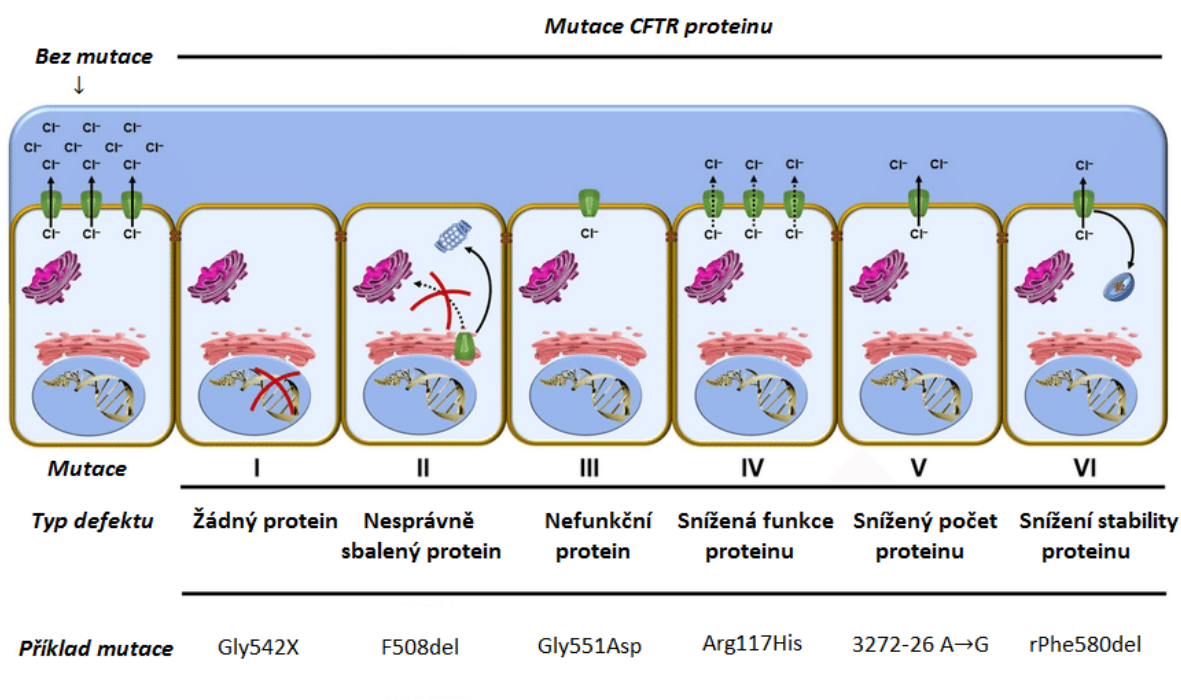
Odhaduje se, že v ČR je nosičem mutace genu *CFTR* každý 26. jedinec. Pravděpodobnost, že se dva nosiči setkají je tedy poměrně vysoká – přibližně každé 676. partnerství. U takových párů je 25% riziko onemocnění dítěte CF (získání dvou defektních alel), 50% možnost, že bude dítě zdravé, ale bude nosičem mutace (získání jedné defektní alely) a 25% možnost, že dítě nebude nosičem a bude zdravé (nezíská ani jednu defektní alelu). Dítě se tedy narodí nemocné jen tehdy, jsou-li oba rodiče nositelé mutace genu *CFTR*¹.

1.1.1.1 Mutace *CFTR* genu

CF je zapříčiněná genovými mutacemi genu *CFTR*, který kóduje stejnojmenný protein. *CFTR* gen má cytogenetické umístění 7q31.2. To znamená, že gen pro *CFTR* protein najdeme na dlouhém raménku chromozomu 7 v poloze 31.2. Velikost *CFTR* genu se pohybuje okolo 250 kb a je složen z 27 exonů⁹. Tento gen kóduje mRNA s o velikosti 6,5 kb, která je předlohou pro *CFTR* protein⁷. U pacientů s CF způsobují mutace genu *CFTR* narušenou syntézu *CFTR* proteinu, který pak nemůže vykonávat svoji funkci¹⁰.

Existuje více než 2 000 mutací genu *CFTR*, které mohou způsobit CF¹¹, ale z tohoto velkého počtu se jich běžně vyskytuje pouze 20¹. Nejčastější mutací CF je mutace F508del.

S touto mutací se ve světě setkáme celkem u 85 % pacientů s CF¹². Mutace F508del způsobuje delecí tří bází kódující aminokyselinu fenylalanin na pozici 508². Delece fenylalaninu v CFTR proteinu vede k jeho nesprávnému sbalení a CFTR protein pak nemůže správně fungovat¹⁰. Přibližně polovina pacientů postižených CF je homozygotní pro mutaci F508del. Homozygoti F508del představují klasickou formu onemocnění se zvýšením elektrolytů v potu, pankreatické nedostatečnosti a obstrukční patologií plic⁷. V České republice tato mutace postihuje 67 % pacientů s CF. Mimo této mutace se v ČR můžeme setkat s dalšími 91 mutacemi genu *CFTR*¹³.



Obrázek 2 – Třídy mutací. Podle mRNA s informací o CFTR proteinu se translačí vytvoří aminokyselinový řetězec, který se následně složí do specifického 3D tvaru, který je důležitý pro jeho funkci. Jakmile je protein CFTR vyroben, je dopraven do plazmatické membrány buňky. Pokud CFTR gen obsahuje mutaci, projeví se to ve výsledné struktuře a funkci CFTR proteinu. Na základě těchto projevů lze mutace CFTR genu rozdělit 6 tříd¹⁰. Převzato a upraveno¹⁴.

Mutace třídy IA: Syntéza proteinu nenastane (žádná mRNA)

První třída mutací brání syntéze mRNA obsahující informaci o CFTR proteinu a tím i syntéze CFTR proteinu. Obvykle se RNA polymerasa naváže na oblast DNA zvanou promotor, která je umístěná těsně před částí DNA, která kóduje CFTR protein a začne syntetizovat mRNA obsahující informaci o CFTR proteinu. Při mutaci třídy IA promotor pro *CFTR* gen obsahuje mutaci a znemožní RNA polymerase se vázat na DNA

a syntetizovat mRNA. Jelikož není k dispozici mRNA s informací o CFTR, nemůže buňka CFTR protein syntetizovat.

Do této třídy mutací patří Dele2,3(21 kb) a 1717-1G→A¹⁵.

Mutace třídy IB: Vadná syntéza proteinu (žádný protein)

Oproti mutaci třídy IA je v této třídě mutací produkována mRNA s informací o CFTR proteinu. Ta je ale poškozená a CFTR protein nemůže být syntetizován. Tato třída mutací zahrnuje mutace čtecího rámce, sestřihové nebo nesmyslné mutace, které zavádějí předčasné terminační kodony (PTC, „premature termination codon“)¹¹. Do mRNA jsou transkripční přeneseny PTC, které po transportu mRNA na ribosom signalizují, aby ribosom čtení mRNA zastavil a ukončila se tak produkce CFTR proteinu. Kvůli mutaci třídy IB se tedy při translaci PTC objeví příliš brzy¹¹. To má za následek produkci zkrácené verze CFTR proteinu, který je pak nefunkční a je buňkou degradován¹⁵. Tím se výrazně sníží exprese CFTR proteinu¹¹.

Mezi mutace třídy IB patří mutace Gly542X a Trp1282X¹⁵.

Mutace třídy II: Nesprávné sbalení CFTR proteinu

CFTR protein po syntéze se nesprávně složí do 3D tvaru a buňka jej degraduje dříve, než se stihne dopravit do plazmatické membrány. Tato třída mutací vede k absenci CFTR proteinu v membráně.

Zahrnuje mutace Asn1303Lys, Ala561Glu a mutaci F508del, což je nejběžnější mutace CFTR genu¹⁵.

Mutace třídy III: Nefunkční CFTR protein v membráně

Oproti mutacím třídy II CFTR protein dosáhne plazmatické membrány, ale zaujme nefunkční strukturu. Výsledkem této třídy mutace je nefunkční CFTR protein nacházející se v plazmatické membráně.

Mutace třídy II jsou mutace Gly551Asp, Ser549Arg a Gly1349Asp¹⁵.

Mutace třídy IV: Snížená vodivost chloridového kanálu

Čtvrtá třída mutací genu *CFTR* vede k syntéze CFTR proteinu, který je sice dopraven do membrány (stejně jako u mutací třídy III), ale nemá dostatečnou vodivost. Je schopen transportovat jen malé množství iontů Cl⁻ a HCO³⁻. Kvůli této třídě mutací je omezen transport iontů.

V třídě mutací IV se setkáme s mutacemi Arg117His, Arg334Trp a Ala455Glu¹⁵.

Mutace třídy V: Snížení počtu CFTR proteinů

Pátá třída mutací nemění strukturu CFTR proteinu, takže je dopraven do plazmatické membrány a je plně funkční. Dochází ale k jeho snížené produkci. Tato mutace je často způsobena procesem zvaným alternativní sestřih, při kterém se někdy vyrábějí správné verze proteinu, ale častěji se vytvářejí verze nesprávné. Tyto vadné verze proteinu nedosáhnou plazmatické membrány, což vede ke snížení počtu CFTR proteinu na plazmatické membráně.

Mutace třídy V obsahuje mutace A455E a G576A¹⁵.

Mutace třídy VI: Snížení stability CFTR proteinu

Poslední třída mutací je zapříčiněná destabilizací již nasyntetizovaného CFTR proteinu v plazmatické membráně. Způsobuje tak jeho zvýšenou degradaci a následně jeho absenci v plazmatické membráně¹¹.

Do šesté třídy mutací patří mutace c.120del123 a Phe580del¹⁵.

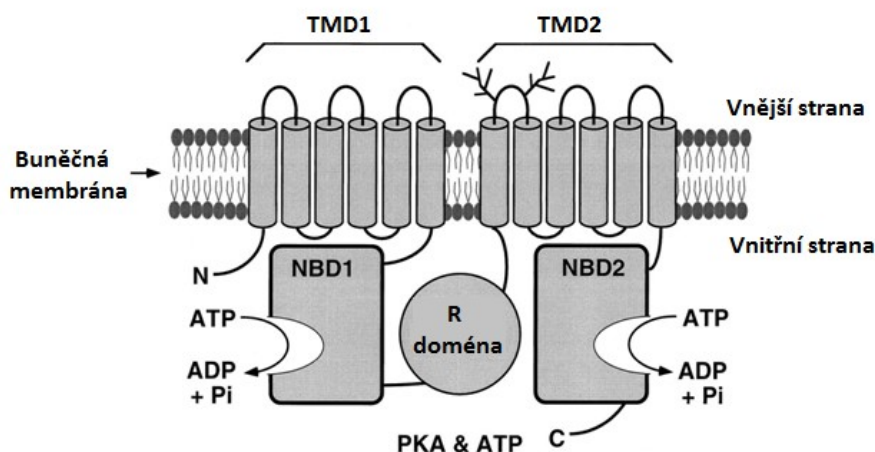
Mutace v *CFTR* genu, které vedou k absenci CFTR na buněčném povrchu nebo ke ztrátě jeho funkce (mutace třídy I-III), jsou obecně závažné mutace spojené s fenotypem jak plicního onemocnění, tak pankreatické nedostatečnosti. Mutace se zbytkovou funkcí CFTR jsou často spojeny se zachovanou funkcí pankreatu². Mutace jedné třídy může vést k defektům více tříd. Například mutace F508del třídy II má za následek defekty třídy III a V¹⁶. Všechny zmíněné mutace mohou snížit počet kanálů a/nebo jejich funkci. Obojí vede ke snížení sekrece chloridu a následné snížení hydratace povrchu dýchacích cest².

1.1.2 CFTR protein

CFTR protein se skládá se z 1 480 aminokyselin¹⁷. CFTR protein hraje zásadní roli při regulaci transepiteliálního transportu iontů a vody⁵. Tento protein je exprimován především v epiteliálních buňkách různých tkání a orgánů, jako jsou plíce, slinivka břišní, játra, střeva a potní žlázy. Nižší hladiny transkriptů CFTR najdeme v ledvinách, děloze, vaječníku, štítné žláze, ve slinných žlázách a močovém měchýři¹⁸.

CFTR patří do rodiny ABC („ATP-binding cassette“, ATP-vázající) transportérů. Většina ABC transportérů je specifická pro jeden nebo několik souvisejících substrátů, ale rodina jako celek má obrovské množství substrátů, včetně anorganických iontů, cukrů,

aminokyselin, lipidů, komplexních polysacharidů, peptidů a dokonce proteinů. Z této velké rodiny transportérů nemá žádný z nich funkci iontového kanálu, kromě CFTR proteinu¹⁹. CFTR protein je součástí podrodiny ABCC („ATP-binding cassette sub-family C“) a najdeme ho pod označením ABCC7⁹. Zatímco ostatní ABC transportéry využívají chemickou energii hydrolýzy ATP k transportu substrátů proti koncentračním gradientům, CFTR protein vede ionty po svém elektrochemickém gradientu. Jako jediný z této skupiny transportérů obsahuje doménu navíc, která mu funkci iontového kanálu propůjčuje⁴. Typický transportér ABC se skládá z celkem ze čtyř domén. Obsahuje dvě hydrofilní transmembránové domény (TMD, "transmembrane domain"), které tvoří vazebné místo substrátu a jeho translokační cestu přes membránu. S nimi propojené dvě cytoplazmatické domény (NBD, „nucleotide-binding domain“), které poskytují energii pro transport substrátu prostřednictvím hydrolýzy ATP¹⁹. Motivy TMD a NBD jsou spojeny pátou R doménou, kterou je nutno fosforylovat, aby se kanál mohl otevřít. Jakmile je R doména fosforylována, vazba ATP otevře kanál CFTR a hydrolýza jej uzavře⁴. Strukturu CFTR proteinu znázorňuje níže uvedený obrázek 3.



Obrázek 3 – Struktura CFTR proteinu. Každá transmembránová doména (TMD1, TMD2) se sestává ze svazku α -helixů, které prostupují dvojvrstvu plazmatické membrány: obvykle v šestkrát, ale až desetkrát¹⁹. Nukleotidové vazebné domény (NBD1, NBD2) obsahují sekvence pro interakce s ATP²⁰. V CFTR jsou motivy TMD2 a NBD1 spojeny jedinečnou R doménou, která obsahuje místa pro fosforylaci⁵. Převzato a upraveno²⁰.

Aktivita CFTR kanálu je závislá na koncentraci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP)²⁰. Pro otevření CFTR kanálu je nutné fosforylovat obě NBD domény, aby vytvořily dimer. Dimerizace NBD domén je doprovázena konformační změnou TMD domén, čímž se iontový kanál otevře²¹. Proteinové fosfatasy defosforylují R doménu a vrátí kanál zpět do klidového stavu²⁰. Zatímco jiní členové podskupiny ABCC využívají energii z hydrolýzy ATP k exportu velkých hydrofobních aniontů, CFTR kanál využívá hydrolýzu ATP pouze

k jeho uzavření. CFTR kanál se otevře po pouhém navázání ATP a k transportu iontů využívá pasivní difúzi²¹.

CFTR protein slouží především jako iontový kanál, který přenáší ionty přes apikální membránu buněk epitelu². Mimo to, je schopný regulovat aktivitu dalších iontových kanálů. Pokud CFTR protein nefunguje správně, naruší se rovnováha chloridů a tekutin na povrchu epitelu, což způsobí zhoustnutí hlenu, který epitel pokrývá. To vede k plicním infekcím, špatnému trávení a problémům v reprodukčním traktu¹⁰. CFTR kanály přednostně transportují anionty. Poměr propustnosti pro sodné ionty ku iontům chloridovým je v rozmezí od 0,1 až 0,03, což svědčí o výrazně vyšší selektivitě pro Cl^- než pro Na^+ . CFTR protein se od ostatních iontových kanálů odlišuje svou nízkou jednokanálovou vodivostí (6-10 pS) a necharakteristickou selektivitou pro transportované ionty. CFTR kanál propouští anionty v pořadí $\text{Br}^- \geq \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$. Toto pořadí aniontové propustnosti odlišuje CFTR kanály od ostatních epitelových kanálů, které mají vyšší permeabilitu pro I^- než pro Cl^- ²⁰. CFTR kanál vedle Cl^- transportuje i ionty hydrogenuhličitanové. Jelikož je CFTR asi pětikrát vodivější pro Cl^- než pro HCO_3^- , transportuje CFTR kanál především Cl^- . Zvýšením sekrece Cl^- a HCO_3^- zvyšuje hydrataci a pH tekutiny na povrchu plicního epitelu (ASL, „airway surface liquid“)²².

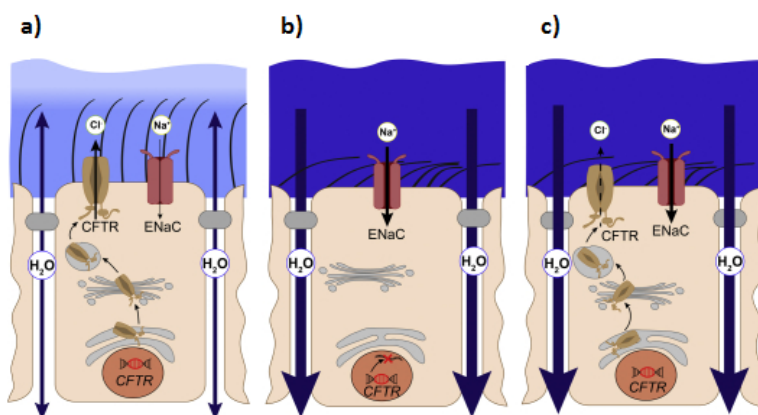
CFTR kromě funkce iontového kanálu zastává funkci regulační. CFTR ovlivňuje mnoho mechanismů ve fyziologii epitelu, jako je udržování hydratace povrchu epitelu a regulace lumenálního pH²³. K udržení optimálně hydratovaného ASL reguluje CFTR také další chloridové kanály a transportéry. Mezi ně patří ANO1 („anoctamin-1“), vápníkem aktivované chloridové kanály (CaCC, „calcium-dependent chloride channel“), transportéry z rodiny SLC („solute carrier family“) a epiteliální Na^+ kanál (ENaC, „epithelial sodium channel“)²². Ve zdravých buňkách CFTR inhibuje aktivitu epitelového ENaC²³. Nedostatečná funkce CFTR je spojena se zvýšenou aktivitou ENaC, která vede ke zvýšené absorpci sodíku a tekutin, což přispívá k dehydrataci povrchu dýchacích cest a zhoršené mukociliární clearance.²⁴ Kromě iontových transportérů přítomných na apikální membráně reguluje draselné kanály (ROMK, „renal outer medullary potassium channel“) nacházející se na bazální membráně buňky⁷.

1.1.3 Projevy cystické fibrózy

CF ovlivňuje funkci tkání epitelu, ve kterých je CFTR vysoce exprimován. Toto onemocnění se primárně projevuje v plicích, slinivce břišní, zažívacím traktu, chánovodu

a potních žlázách². Orgánem největšího defektu CF jsou plíce. Poškození plic je zapříčiněné obstrukcí průdušek zvýšeně viskózním hlenem podporujícím růst mikroorganismů, což vyvolává opakované infekce⁷.

U zdravého člověka umožňuje adekvátní homeostáza povrchu dýchacích cest efektivní transport hlenu vytlačovaného z pohárkových buněk povrchu dýchacích cest a submukózních žláz. Vhodná hladina hydrogenuhličitanu a regulace pH umožňují tvorbu normálního hlenu, který optimalizuje mukociliární clearance a obranu dýchacích cest. K úbytku povrchové kapaliny dýchacích cest dochází v důsledku nepřítomnosti sekrece tekutiny zprostředkované CFTR doprovázené absorpcí tonické tekutiny přes sodíkový kanál ENaC. Vysušení kapaliny závislé na CFTR snižuje hladinu ASL, což vede k tvorbě viskózního a lepkavého hlenu, který blokuje lumilární kompartmenty a kanály¹¹. Tento efekt má za následek dehydrataci povrchu dýchacích cest a zhoršenou mukociliární clearance (obrázek 4). Toto připravuje půdu pro progresivní mukoobstrukční onemocnění plic charakterizované obstrukcí hlenu dýchacích cest, přetrvávající bakteriální infekcí a zánětem, které jsou hlavní příčinou morbidity a mortality u pacientů s CF²⁴.



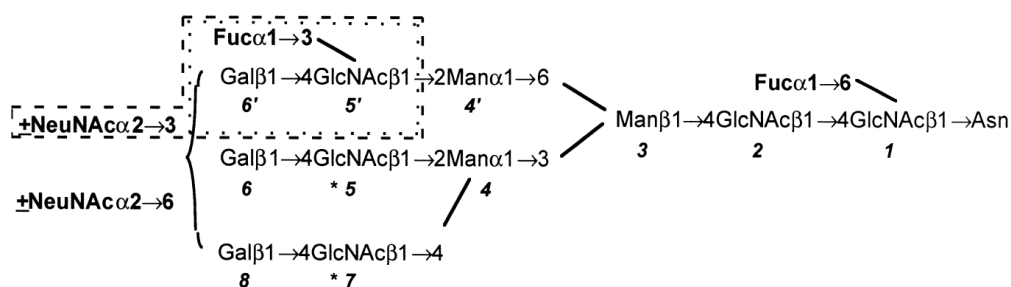
Obrázek 4 – Plicní epitel. a) zdravý epitel dýchacích cest: koordinovaná regulace CFTR a ENaC umožňuje správnou hydrataci povrchu dýchacích cest a efektivní mukociliární clearance, b) epitel jedince s CF: absence CFTR proteinu, c) epitel jedince s CF: nefunkční CFTR protein. U CF pacientů (případy b) a c)) je běžným důsledkem absence/dysfunkce CFTR nevyvážená absorpce sodíku a tekutin zprostředkované ENaC, dehydratace povrchu dýchacích cest a zhoršená mukociliární clearance, která vede k ucpávání hlenu v dýchacích cestách a následně ke vzniku chronických infekcí. Převzato a upraveno²⁴.

1.1.4 Změny glykosylace v dýchacích cestách

Mutovaný CFTR narušuje nejen iontovou rovnováhu, ale ovlivňuje i další buněčné pochody. Nesprávná funkce CFTR vede ke změně pohybu iontů, ale také ovlivňuje *N*-glykosylace proteinu CFTR a dalších povrchových glykoproteinů buňky. Tyto změny glykosylace mohou být způsobené okyslením intracelulárních vezikul, způsobeným vadnou funkcí CFTR. Přesněji se jedná se o sníženou sialyzaci a zvýšenou fukosylaci. Bylo

prokázáno, že pacienti s CF mají o 25 % méně kyseliny sialové a až dvakrát více fukosy na glykoproteinech na povrchu buněk. Tyto strukturální změny na povrchu CF glykokonjugátů jsou pak zodpovědné za rozdílné vazebné vlastnosti patogenů²⁵.

Převaha fukosylovaných zbytků a nedostatečná sialyzace může být důležitým faktorem přispívajícím ke zvýšené adhezenci bakterií, jako je PA, v dýchacích cestách CF. PA je v podstatě saprofytická bakterie, která se může změnit v agresivní patogen při kontaktu s poškozenými a zanícenými tkáněmi, jako jsou popáleniny nebo plíce pacientů s CF. V obou případech jsou přítomny změny glykosylace. Zvýšená fukosylace a snížená sialyzace s vyššími hladinami Lewis^x a Lewis^a epitopů koreluje se specifickou vazbou PA. PA se váže specificky na asialované glykokonjugáty, jako je receptor asialo-GM1 (gangliotetraosylceramid). CF buňky mají zvýšené množství tohoto receptoru ve srovnání s buňkami bez CF, které obsahují hlavně GM1 (monosialotetrahexosylgangliosid). PA se tedy efektivněji váže na CF epitel, který je na asialo-GM1 bohatý. Je známo, že PA disponuje proteiny PA-IL a PAIIL, které napomáhají k adhezenci PA na CF epitel. Galaktosu vázající PA-IL se váže na Gal/GalNAc na asialo-GM1 a PA-IIL, lektin vázající fukosu, se váže na místa se zvýšenou terminální fukosylací. Je zřejmé, že existují multifaktoriální interakce mezi PA a hostitelskými glykokonjugáty plicního epitelu. Proto tento patogen může hrát důležitou roli v patogenezi plicních onemocnění²⁵.



Obrázek 5 – Navrhovaná struktura glykopeptidů na povrchu membrány buněk CF. Nejvýznamnější terminální glykosylace uvedeny tučně. * představuje další místa pro navázání fukosylových zbytků vazbou $\alpha 1-3$. Tečkované čáry obklopující glykosylové zbytky jsou potenciální vazebná místa pro bakterie. Místa, která mohou být sialylovaná jsou znázorněny čárkovanými čarami. Převzato a upraveno²⁵.

Epitel dýchacích cest je pokryt hlenem sestávajícím se hlavně z mucinů, glykoproteinů obsahujících 70-80 % sacharidů. Muciny u pacientů s CF vykazují vyšší hladiny sulfátovaných Lewis^x a Lewis^a oligosacharidů, ke kterým má PA mimořádně vysokou afinitu²⁶. PA se naváže jak na muciny, tak na glykokonjugáty na povrchu buněk CF pacientů, jelikož nesou fukosu jako terminální reziduum²⁷.

1.2 Původce bakteriálních onemocnění u CF

Mezi nejčastěji detekované patogeny dýchacích cest patří druhy *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a *Aspergillus fumigatus*, z nichž PA je spojována s největší mortalitou. Houby včetně druhu *Aspergillus* jsou také stále častěji rozpoznávány jako patogeny při CF a jsou spojovány se zvýšenou mírou exacerbací plic. Virová infekce je také častou příčinou exacerbací u lidí s cystickou fibrózou – ačkoli tito pacienti nejsou náchylnější k virové infekci, dopad je větší. S rostoucím věkem se stále častěji vyskytují infekce jinými bakteriemi – včetně *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomas maltophilia* a *Burkholderia cepacia* komplex, která je spojována s největší mortalitou².

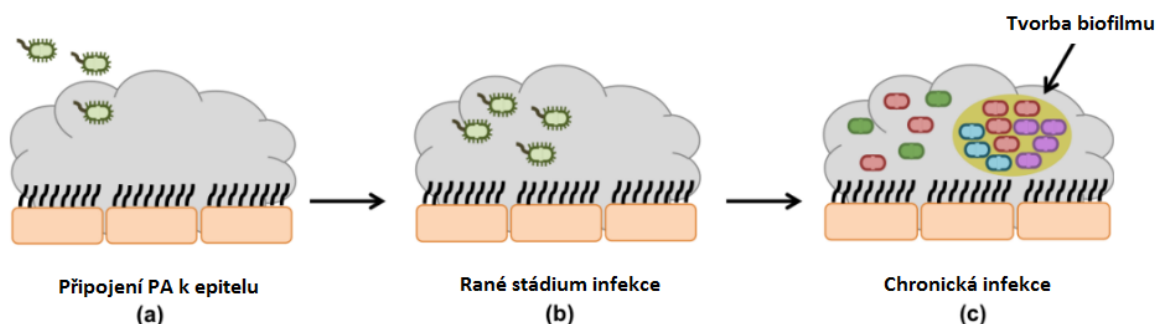
1.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

PA je běžně se vyskytující gramnegativní bakterie skupiny *Pseudomonadaceae*²⁸. Nalezneme ji ve vodním prostředí i půdě²⁹. Pro zdravé jedince je neškodná, ale pro pacienty s CF nebo imunitními poruchami je vážně ohrožující. Tato bakterie se vyskytuje ve vodě a ve vlhkém prostředí. Do dýchacího ústrojí se bakterie dostanou ve formě aerosolu. PA se následně může usadit v plicích a vyvolat záněty. Důvodem snadné infekčnosti PA pacientů s CF může být porušená samočisticí funkce plic a/nebo snížení schopnosti bílých krvinek eliminovat bakterie, což je způsobeno zvýšeným obsahem solí v tekutině na povrchu dýchacích cest¹.

Ačkoli je u zdravých jedinců zřídka patogenní, u pacientů s CF je PA nejvíce frekventovaný původce infekcí. V dospělosti je více než 60 % pacientů s CF chronicky infikováno PA. Chronická infekce je spojena s fenotypovou a genotypovou adaptací bakterie. V raných stádiích infekce se PA vyskytuje v planktonické formě, ale s postupující infekcí se bakteriální kolonie transformují do mukoidní formy. Přeměna PA v mukoidní formu je spojena se snížením motility, tvorbou biofilmu a zvýšenou rezistencí na antibiotika. To má za důsledek snížení plicních funkcí, vyšší frekvence plicních exacerbací a zvýšení úmrtnosti. Mukoidní forma vzniká relativně pozdě během infekce (obrázek 6). Vznik mukoidní formy je způsoben nadprodukcí exopolysacharidu alginátu. Přejít PA v mukoidní formu je podle všeho reakcí na imunitní odpověď hostitele, konkrétně na reaktivní formy kyslíku produkované leukocyty. Alginátová nadprodukce končí tvorbou biofilmu je považována za ochranu před kyslíkovými radikály, opsonizací a fagocytózou²⁹.

Biofilmy jsou mikrokolonie přisedlých bakterií uzavřených ve vlastní matici tvořené exopolysacharidy²⁹, konkrétně alginátem, který je tvořen mannuronovou a guluronovou

kyselinou²⁶. Vrstva exopolysacharidů tvoří bariéru, která způsobí sníženou dostupnost živin v biofilmu. To má za následek pokles růstu a snížení metabolické aktivity v persistujících buňkách. Vzhledem k nerovnoměrnosti dostupnosti živin a kyslíku je růst buněk v různých oblastech nestejný. Bakteriální buňky rostoucí na povrchu biofilmu jsou metabolicky aktivnější, zatímco vnitřní buňky rostou pomaleji. Většina β -laktamových antibiotik je účinná pouze proti rostoucím buňkám, zatímco jiná antibiotika jako jsou polymyxiny, zabíjejí buňky se špatným růstovým stavem. Proto různá antibiotika působí na různé oblasti biofilmů²⁸.



Obrázek 6 – Časový průběh vývoje infekce PA u pacientů s CF. a) PA se v planktonické formě kolonizuje hleny na povrchu epitelu, **b)** rané stádium infekce: PA se začíná přizpůsobovat k epitelu (přechod z planktonického na biofilmový režim růstu), **c)** fáze chronické infekce: fenotypová a genová rozmanitost, tvorba biofilmů. Převzato a upraveno³⁰.

Je důležité, aby se infekce PA odhalila brzy a byla ihned léčena. V rané fázi bývají bakterie citlivé na antibiotika a ještě nevytváří tzv. mukoidní formu. Když se infekce PA léčí opakovaně, může vzniknout rezistence na antibiotika a infekce se pak stává chronickou¹.

1.2.2 Faktory virulence *Pseudomonas aeruginosa*

PA má širokou škálu faktorů virulence, které jí umožňují přizpůsobit se a přetrvávat v dýchacích cestách pacientů s CF. Patří mezi ně povrchové struktury, jako jsou lipopolysacharidy (LPS), bičíky a pili²⁹. LPS jsou u gramnegativních bakterií hlavní složkou vnější membrány. Jsou tvořeny oligosacharidem, lipidem A a O antigenem, což je dlouhý polysacharidový řetězec zasahující do extracelulárního prostředí. O antigen je rozpoznán hostitelem a následně vyvolá jeho imunitní odpověď. LPS svojí stavbou přispívá ke snížení permeability membrány a tím i rezistenci k antibiotikům³¹. Flagella a pili typu IV umožňují bakterii pohyb, připojení k hostitelskému epitelu a tvorbu biofilmu. Vazba PA na epiteliální buňky vzrůstá s rostoucím množstvím asialo-GM1, způsobeným defektem CFTR proteinu²⁹.

PA sekretuje řadu látek, které mají na epitel hostitele škodlivé účinky. Jsou jimi: elastasa, alkalická proteasa, proteasa LasA, exotoxin A, fosfolipasa C, exoenzym S, kyanovodík a pyocyanin³². Elastasa je schopna štěpit imunoglobuliny hostitele. Exotoxin A je silné ADP-ribosylační činidlo, které inhibuje syntézu proteinů v eukaryotických buňkách, což způsobuje buněčnou smrt. Fenazinový derivát pyocyanin (zodpovědný za modrou a zelenou barvu pigmentace kultur PA) je silná redoxně aktivní sloučenina schopná generovat reaktivní formy kyslíku, čímž vystavuje hostitelské buňky oxidačnímu stresu. Pyocyanin společně s kyanovodíkem snižují frekvenci ciliárního rytmu, což může dále narušit vrozenou obranu dýchacích cest. PA je vysoce odolná vůči většině antibiotikům, a to díky expresi β -laktamasy, která β -laktamová antibiotika hydrolyzuje²⁹.

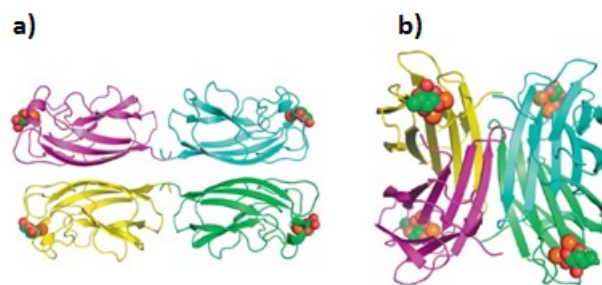
V PA nalezneme i složitější sekreční systémy typu III (T3SS), při jejichž využití jsou toxické efektorové proteiny injikovány přímo do hostitelských buněk. U PA byly popsány čtyři efektorové proteiny T3SS: ExoS, ExoT, ExoU a ExoY. Přičemž ExoU má největší toxickou aktivitu²⁹. PA disponuje efluxními systémy, které regulují vnitřní prostředí bakterie a jsou schopny odčerpávat škodlivé látky (antibiotika, metabolity) ven z buňky²⁸.

1.2.3 Lektiny *Pseudomonas aeruginosa*

Lektiny jsou rozpustné proteiny³³ se schopností specificky vázat sacharidy, ale nemají žádnou katalytickou aktivitu. Lektiny obecně slouží v procesech rozpoznávání buněk, imunitní odpovědi, vazbě endotoxinů a buněčné adhezi. Lektiny PA hrají roli při rozpoznávání hostitele a tvorbě biofilmu během kolonizace na hostitelském epitelu, což vede k poškození hostitelské tkáně. PA produkuje dva lektiny, které souvisí s její virulencí: PA-IL a PA-IIL³⁴. Tyto lektiny byly izolovány z PA v 70. letech jako proteiny schopné aglutinovat lidské a zvířecí erytrocyty³³. Oba lektiny jsou malé proteiny. Lektin PA-IL (51 kDa) je složen ze čtyř podjednotek a každá obsahuje 121 aminokyselin a lektin PA-IIL (47 kDa) se sestává ze čtyř podjednotek a každá podjednotka ze 114 aminokyselin²⁶.

Struktura lektinů PA

Ačkoli mají tyto lektiny odlišnou aminokyselinovou sekvenci, jejich kvartérní struktury (obrázek 7) jsou si velmi podobné. Oba lektiny tvoří homotetramerické komplexy, kde každý monomer má své vlastní vazebné místo pro sacharid. Jediný tetramer tedy může vázat čtyři molekuly odpovídajícího sacharidu³³.



Obrázek 7 – Struktura lektinů PA-IL a PA-IIL. a) PA-IL, b) PA-IIL. Ploché šipky označují β -řetězce. Ionty vápníku jsou zobrazeny jako oranžové koule a lektinově vázaná galaktosa/fruktosa jsou zelené (uhlíkové) a červené (kyslíkové) koule. Převzato a upraveno³³.

Vlastnosti lektinů PA

Lektiny se syntetizují v PA společně s dalšími faktory virulence sekundárního metabolismu řízeného „quorum-sensing control“. Po jejich purifikaci z lyzátu PA se chovají klasicky jako na vápníku závislé tetramerické rostlinné lektiny – vykazují hemaglutinační aktivitu a odolnost vůči zahřívání, extrémnímu pH a proteolýze. Lektiny jsou kódované geny *LecA* a *LecB*. Tyto geny jsou od sebe vzdálené asi 867,5 kb na chromozomu PA. Oběma zralým proteinům chybí počáteční Met a vyznačují se kyselým charakterem²⁶. Tyto lektiny si nejsou evolučně příbuzné, ačkoliv se oba skládají do supersekundární struktury „jelly-roll“. Ještě zajímavější je, že oba lektiny využívají ionty vápníku pro navázání sacharidů. Lektin PA-IL váže sacharid pomocí vápníku za vytvoření jedinečné sítě vodíkových vazeb, které vytváří vazebné místo se specifickou selektivitou pro galaktosu. Naproti tomu PA-IIL zapojuje dva ionty vápníku za vzniku vazebného místa, které je charakteristické svojí vysokou afinitou a širokou specifitou pro vazbu odlišných sacharidů²⁷.

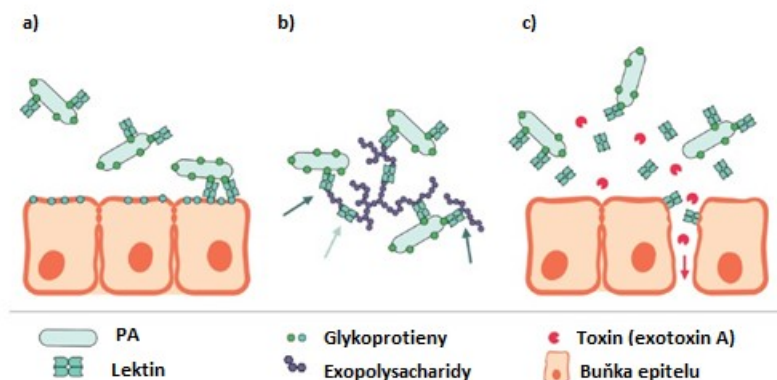
Aktivita (schopnost vázat sacharidy) obou proteinů jsou závislé jak na přítomnosti Ca^{2+} , tak Mg^{2+} iontů, přičemž PA-IIL má vyšší požadavky na Zn^{2+} kationty²⁶. Navázání sacharidů u rostlinných lektinů závisí na přítomnosti Mn^{2+} a Ca^{2+} , které hrají ústřední roli v udržení struktury vazebného místa a neúčastní se přímé vazby sacharidů. Přímá interakce vápník-sacharid byla zpozorována pouze u dvou rodin živočišných lektinů: pentraxiny a C-lektiny. Pentraxiny váží pouze sulfátované či fosforylované sacharidy, kdežto lektiny C váží neutrální monosacharidy (D-manosu, L-fruktosu, D-galaktosu). Navzdory odlišné sekvence, nízké strukturální podobnosti a způsobu vázání sacharidů PA-IL vykazuje nápadnou podobnost s lektiny typu C. Ale u PA-IL může oproti lektinům typu C dojít k silné interakci s O6 skupinou galaktosy, proto má PA-IL asi 10x vyšší afinitu ke galaktose než skupina lektinů typu C. Podobné sekvence PA-IIL byly identifikovány u bakterií *Ralstonia solanacearum* a *Photorhabdus luminescens*, které jsou patogeny rostlin a hmyzu²⁶.

Jak již bylo uvedeno, oba lektiny váží zejména monosacharidy, a to prostřednictvím přímé interakce s ionty kovů. PA-IL a PA-IIL zapojují jeden a dva ionty vápníku. Dosud byly popsány celkem tři krystalové struktury PA-IL: nativní lektin obsahující jeden iont Ca^{2+} na monomer, lektin bez Ca^{2+} a lektin s navázanou galaktosou a iontem vápníku. Ve všech třech případech je kvartérní struktura tetramerní²⁶. U PA-IIL se našlo krystalografických struktur více: lektin nativní, lektin bez vápníku a komplexy s třemi monosacharidy (L-fukosa, D-manosa, D-fruktopyranosa). Jeho struktura je stejně jako u PA-IL tetramerní, ačkoli je oproti PA-IL více kompaktní²⁶.

PA-IL vykazuje střední afinitu k D-galaktose. Mezi monosacharidy je jeho specifická striktně pro galaktosu, s výjimkou *N*-acetyl-D-galaktosaminu, který může PA-IL vázat, ale s podstatně menší afinitou než samotnou galaktosu. PA-IIL se vyznačuje neobvykle vysokou afinitou k L-fukose²⁶.

Funkce lektinů PA

Přesné biologické role obou PA lektinů nebyly dosud objasněny. PA-IL a PA-IIL splňují náležitosti definující lektiny: váží specifické glykany a vykazují multivalenci. Pro uplatnění své role, je pro lektiny důležitá jejich lokalizace. Většina lektinů je uložena intracelulárně, i když malé, ale významné frakce jsou přítomny v cytoplazmatické membráně, na vnější membráně a v periplazmatickém prostoru. Tato distribuce se však může lišit, protože bylo prokázáno, že je PA-IIL hojně přítomný na bakteriální vnější membráně. Vlastnosti i lokalizace těchto proteinů jim umožňuje hrát důležitou roli ve vztahu bakterií k jejich prostředí (obrázek 7). Ukázalo se, že silně aglutinují lidské erytrocyty, což naznačuje, že povrchové struktury mohou být zapojeny do bakteriální adheze k hostitelským buňkám. Bakteriální biofilm je složen z alginátu sestávajícího z téměř pravidelných opakování L-guluronátu a β -D-mannuronátu s určitým stupněm acetylace posledně uvedeném sacharidu. Díky schopnosti síťovat polysacharidy se lektiny skutečně mohou zapojit do tvorby biofilmu²⁶.

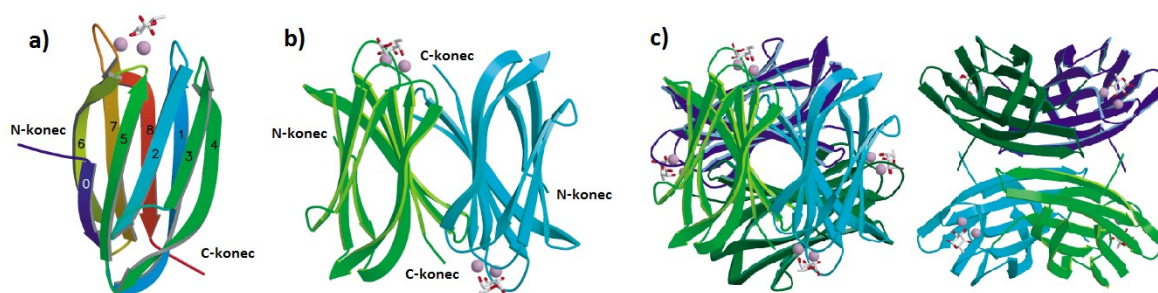


Obrázek 7 – Funkce lektinů PA. a) adheze k hostitelským buňkám epitel, b) připojení bakteriálních buněk k polysacharidům matrice biofilmu a zesíťování těchto polysacharidů, c) zvýšení propustnosti epitelu pro další faktory virulence. Světle šedé šipka označuje zesíťované polysacharidy připojené k bakteriím, červená šipka označuje vstup toxinů narušeným epitelem. Převzato a upraveno³³.

Kromě schopnosti adherence na povrch buněk a tvorby biofilmu, bylo prokázáno, že lektiny PA působí přímo *in vitro* a *in vivo* jako cytotoxické sloučeniny. U epiteliálních buněk dýchacích cest se ukázalo, že PA-IL je cytotoxický v primárních kulturách, kdežto PA-IIL blokuje jejich řasinky, které poskytují mechanickou obranu dýchacích cest hostitele²⁶.

1.2.3.1 Lektin PA-IIL

Jak již bylo uvedeno, lektin PA-IIL je stejně jako PA-IL tetramer čtyř nezávislých podjednotek, z nichž každá obsahuje dva ionty Ca^{2+} a každá váže jednu molekulu ligandu – sacharidu. Každá podjednotka je složena z 8 β -hřebenů, přičemž β -hřebeny 1-5 tvoří motiv řeckého klíče. N-koncová část proteinu (β -hřeben 0) se vkládá mezi β -hřebeny 5 a 6. Dimerizace dvou podjednotek je výsledkem spojení „head-to-tail“ dvou monomerů a zahrnuje hydrofobní interakce mezi β -hřebeny 6, 7 a 8. Velikost plochy interakce podjednotka-podjednotka (BSA, „buried surface area“) je přibližně $1\,500\text{ Å}^2$ na monomer. Nejvíce zapojenou částí monomeru do vazby jsou C-terminální karboxylové skupiny, které se váží do vazného místa pro ligand na druhém monomeru. K tetramerizaci dochází hlavně díky antiparalelní asociaci β -hřebene 6 obou dimerů. BSA tohoto spojení je cca 500 Å^2 na monomer²⁷.



Obrázek 8 – Struktura komplexu PA-III-fukosa. a) monomer PA-III s číslováním β -hřebenů podle motivu řeckého klíče (1-5), **b)** dimer s řetězem A v modré barvě a řetězem B v zelené barvě, **c)** dva pohledy na tetramer tvořený PA-III. Převzato a upraveno²⁷.

Kapsa vázající vápník se skládá ze dvou smyček (β -hřeben 7,8) a z C-konce sousedního monomeru. Místo vázající vápník obsahuje šest karboxylových skupin, z nichž pět se účastní vazby kationtu vápníku. Oba ionty vápníku váží sedm ligandů, které jsou asymetricky uspořádány: vápník v místě 1 přijímá pět karboxylátů a dva kyslíkové atomy, zatímco vápník v místě 2 interaguje s pěti karboxylovými zbytky, dvěma karbonyly a dvěma atomy ligandu. Průměrná vzdálenost mezi dvěma ionty vápníku je relativně malá, 3,75 Å²⁷. Umístění navázaných iontů vápníku pak udává specifitu lektinu. PA-III má širší specifitu a vyšší afinitu ke svým ligandům než PA-II. Důvodem vyšší afinity je to, že v místě vázajícím ligand jsou dva imobilizované ionty vápníku. Koordináční interakce s těmito ionty určují vazbu mezi sacharidy a PA-III. Optimální uspořádání hydroxylových skupin sacharidu pro koordinaci dvou iontů vápníku pomocí PA-III odpovídá dvěma hydroxylovým skupinám v ekvatoriální poloze a jedné hydroxylové skupině v axiální poloze. PA-III interaguje s oligosacharidy, které mají koncové neredukující zbytky odpovídajících monosacharidů, zejména L-fukosy³³.

K vazbě L-fukosy využívá PA-III oba ionty vápníku, což je při klasifikaci interakcí protein-sacharid dosud nevídaný vazebný model. Koordinace iontů vápníku se účastní celkem tři hydroxyly fukosy: O2 na iont vápníku 1, O4 na ion vápníku 2 a O3 na oba ionty vápníku. Z těchto hydroxylů se navíc na vazbě podílejí vodíky, které vytváří vodíkové vazby s kyselými skupinami v místě kde se vápník váže. Methylová skupina fukosy v poloze 6 navíc vytváří hydrofobní interakce s metylovými skupinami proteinu. Nebyl pozorován žádný kontakt mez fukosovým anomerním kyslíkem O1 a proteinem²⁷. Pro navázání sacharidu na dva ionty vápníku je nutné konkrétní stereo-chemické uspořádání tří sacharidových hydroxylových skupin. L-fukosa se vyznačuje ekvatoriálním uspořádáním O2, O3 a axiálním O4. PA-III váže i jiné monosacharidy s touto konfigurací, kdy je jedna axiální a dvě ekvatoriální hydroxylové skupiny jako např. u L-galaktosy, D-manosy

a D-arabiny, i když s odlišnou afinitou. Ve srovnání s jinými lektiny, které obsahují vápník, PA-IIL vykazuje unikátní mechanismus vazby monosacharidu²⁷.

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo studium interakcí lektinu PA-IIL s povrchovými strukturami epitelu lidských plic, linie CuFi-1 a NuLi-1.

Pro splnění tohoto cíle bylo třeba splnit následující úkoly:

- Připravit rekombinantní protein PA-IIL v expresním systému BL21(DE3)/pET25.
- Ověřit přípravu proteinu PA-IIL pomocí SDS-PAGE elektroforézy.
- Provést značení lektinu PA-IIL fluorescenčním barvivem DyLight 488.
- Ověřit účinnost fluorescenčního značení PA-IIL.
- Ověřit aktivitu lektinu PA-IIL pomocí hemaglutinačního testu.
- Stanovit afinitu PA-IIL k buněčným liniím CuFi-1 a NuLi-1 metodou průtokové cytometrie.

3 Materiál a metody

3.1 Použité přístroje a materiál

3.1.1 Přístroje

analytické váhy DV215CD	Ohaus, Německo
aparatura na elektroforézu Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad, USA
autokláv Varioklav®	H+P Labortechnik GmbH, Německo
centrifuga 6-16K	Sigma Centrifuges, UK
centrifuga Centrifuge 5430	Eppendorf, USA
centrifuga Eppendorf MiniSpin	VERKON, Německo
centrifuga Hettich Universal 320 R	VERKON, Německo
centrifuga Ohaus Frontier 5714	VERKON, Německo
CO ₂ inkubátor MCO-170AIC	Panasonic Healthcare Co., Japonsko
denzitometr CO8000 Cell Density Meter	WPA, UK
FPLC ÄCTA Purifier s programem UNICORN 5.11	GE Healthcare, USA
inkubovaná třepačka Ecotron	Biotrade Instruments, ČR
laminární box BIO 126	Labox, ČR
laminární box Holten Laminair	Thermo Electron Industries, USA
magnetická míchačka IKAMAG RH Basic 2	VERKON, Německo
mikroskop FluoView™ 500 Spectral CLSM	OLYMPUS, Japonsko
mikroskop Levenhuk D2L NG	Levenhuk, USA
mikroskop Motic AE31	Motic, Německo
mikrovlnný autokláv Microjet	The Rodwell Autoclave Company, UK
míchačka Mini Vortex Mixer	VWR®, USA
pH metr HI-2211	Hanna Instruments, UK
pipetovací nástavec Pipetus	Hirschmann, Německo
průtokový cytometr FACS LSR II s programem FlowJo	BD Biosciences, USA
předvážky Kern 440-35A	VERKON, Německo
spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro s programem i-control	Tecan, Švýcarsko
spektrofotometr NanoDrop 1 000	Thermo Fisher Scientific, USA
sonikátor Soniprep 150	Sanyo, Japonsko

termocykler AccuBlock™
vodní lázeň WNB 7

Labnet International, USA
VERKON, Německo

3.1.2 Materiál a chemikálie

2-merkapt ethanol	Sigma, USA
aceton	Sigma, USA
lidská krev skupiny 0	Fakultní nemocnice Brno, ČR
persíran amonný (APS)	Sigma, USA
ampicilin, sodná sůl	iBioTech [®] , USA
buněčné linie CuFi-a NuLi-1	ATCC [®] , USA
buněčná linie <i>E. coli</i> BL21(DE3)	Novagen, USA
bromfenolová modř	Sigma, USA
chlorid draselný (KCl)	Lach:Ner, ČR
chlorid hořečnatý (MgCl ₂)	Lach:Ner, ČR
chlorid sodný (NaCl)	Lach:Ner, ČR
chlorid vápenatý (CaCl ₂)	Lach:Ner, ČR
Collagen type IV from human placenta	Sigma, USA
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma, USA
destičky CellBind [®] 96 jamek	Corning [®] , USA
dimethylformamid (DMF)	Sigma, USA
dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem, Německo
dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma, USA
dusičnan stříbrný (AgNO ₃)	Lach:Ner, ČR
dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	Sigma, USA
DyLight 488, NHS ester	Thermo Scientific, USA
fetální bovinní sérum (FBS)	Lonza, Švýcarsko
formaldehyd (HCHO)	Sigma, USA
glycin	Sigma, USA
HEPES	Sigma, USA
HOECHST 33258	Thermo Scientific, USA
hydroxid sodný (NaOH)	Sigma, USA
isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG)	Sigma, USA
isopropylalkohol	PENTA, ČR
kolona mannose-agarose Tricorn [™]	GE healthcare, USA
kolonka Zeba [™] Spin, 7K MWCO	Thermo Fisher Scientific, USA
kolonka VivaSpin 500, 3000 MWCO	Sartorius, Německo

kvasnicový extrakt	Thermo Fisher Scientific, USA
kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma, USA
kyselina chlorovodíková (HCl)	Sigma, USA
kyselina octová	Lach:Ner, ČR
kyselina trichloroctová (TCA)	Sigma, USA
kyselina trihydrogenboritá (H ₃ BO ₃)	Lach:Ner, ČR
LHC-9 medium	Gibco™ Invitrogen, UK
manosa	Thermo Fisher Scientific, USA
methanol	Lach:Ner, ČR
neuraminidasa	BioLabs, USA
papain	Sigma, USA
PBS tablety	Gibco™ Invitrogen, UK
penicilin G, sodná sůl	DUCHEFA BIOCHEMIE B.V. Holandsko
polyakrylamid	Sigma, USA
Protein Marker III (6,5-200)	AppliChem, Německo
Snakeskin Dialysis Tube	Thermo Fisher, USA
streptomycin sulfát	SERVA GmbH, Německo
tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, USA
thiosíran sodný (Na ₂ S ₂ O ₃)	Lach:Ner, ČR
Tris-base	Sigma, USA
Tris-HCl	Sigma, USA
trypanová modř 0,4%	Sigma, USA
Trypsin-EDTA Solution	Sigma, USA
trypton	Sigma, USA
uhličitan sodný (Na ₂ CO ₃)	Lach:Ner, ČR
vektor pET25_PA-IIL	Novagen, USA
zmrazovací kontejner Nalgene® Cryo 1 °C	Thermo Fisher Nalgene®, USA

3.2 Tkáňové kultury

Pro zkoumání *ex vivo* byly použity komerčně dostupné buněčné linie: CuFi-1 a NuLi-1 firmy ATCC®. Obě použité linie plicního epitelu byly immortalizované, přičemž buněčná linie CuFi-1 byla získána od CF pacienta s mutací F508del a NuLi-1 od zdravého dárce. Obě buněčné linie byly kultivovány v kultivačních lahvích s povrchem potaženým kolagenem IV při 37 °C a 5% CO₂. Práce se zmíněnými liniemi probíhala sterilně v místnosti pro tkáňové kultury. Veškerý použitý materiál a chemikálie byly sterilizovány v autoklávu (20 min, 121 °C) nebo filtrací přes 0,22 µm filtr.

3.2.1 Rozmražení buněčných kultur

Zmíněné buněčné linie byly zmrazeny a dlouhodobě skladovány v kapalném dusíku. Pro krátkodobé uchování byl použit hlubokomrazicí box (-80 °C), při delším skladování při -80 °C ztrácí buňky životaschopnost. Buněčné linie byly konzervovány kryoprotektivním činidlem dimethylsulfoxidem (DMSO). Tato látka je pro buňky toxická, a proto je nutné, aby rozmražení buněčných linií probíhalo rychle.

Postup:

Byly připraveny 25 cm² kultivační lahve potažené kolagenem IV (kapitola 3.2.3.) obsahující příslušný objem kultivačního media LHC-9 (5 ml (25cm²) nebo 15 ml (75cm²)), které bylo ve vodní lázni temperováno na teplotu 37 °C. Mikrozkušavka s konzervovanými buněčnými liniemi byla rozmrazena ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Jakmile byla buněčná suspenze rozmrazena, byla mikrozkušavka vyjmuta z vodní lázně a zevnějšku dekontaminována 70% ethanolem. Všechny operace od tohoto okamžiku byly prováděny v přísně aseptických podmínkách v laminární boxu BIO 126. Obsah mikrozkušavky byl přenesen do centrifugační zkumavky a následně bylo k buněčné suspenzi postupně přidáváno medium (tabulka 1). Tímto postupem se buňky lépe adaptují na změny podmínek. Po posledním přidávku media byla buněčná suspenze centrifugována (5 min, 1000 RPM, Hettich Universal 320R).

Tabulka 1 – Objem přídavek media k buněčné suspenzi.

Čas (min)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Přídavek media (ml)	0,00	0,12	0,15	0,19	0,26	0,36	0,52	0,86	1,69	4,75

Uvedená tabulka je pro 1 ml buněčné suspenze.

Získaná peleta byl resuspendována v 1 ml čerstvého media. Celá buněčná suspenze byla přenesena do kultivační lahve. Kultura byla inkubována v inkubátoru MCO-170AIC při 37 °C s 5% CO₂.

3.2.2 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie byly kultivovány v inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂. Práce s buněčnými kulturami probíhala v laminárním boxu. Ke kultivaci buněčných linií bylo použito medium LHC-9 určené pro epiteliální buňky. K eliminaci bakteriální kontaminace byla k mediu přidána směs antibiotik penicilin-streptomycin (100x koncentrovaný roztok: 5 mg/ml penicilin G, sodná sůl a 10 mg/ml streptomycin – roztok v PBS) na výslednou koncentraci 50 µg/ml penicilinu G, sodné soli a 100 µg/ml streptomycinu. Buňky byly pěstovány v kultivačních lahvích potaženým kolagenem IV (kapitola 3.2.3.). Pro kultivaci buněčných linií byly použity kultivační lahve s plochou kultivačního povrchu 25cm² a 75cm² s přídatkem media o objemu: 5 ml (25cm²) nebo 15 ml (75cm²). Medium bylo vyměňováno každé 2-3 dny.

3.2.3 Příprava kultivačního povrchu

Buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 vyžadují pro svou kultivaci specifický povrch potažený kolagenem IV. Byl využit komerčně dostupný lyofilizovaný kolagen IV izolovaný z lidské placenty. Kolagen IV byl rozpuštěn v 0,25% (v/v) kyselině octové na koncentraci 0,9 mg/ml. Rozpuštění probíhalo při 4 °C po dobu 4 hodin za občasného promíchání. Roztok byl následně naředěn na koncentraci 60 µg/ml a přefiltrován přes filtr s póry o velikosti 0,22 µm. Takto připravený roztok kolagenu byl pipetován do kultivačních nádob s povrchem 25cm², resp. 75cm², byly nanášeny 2 ml, resp. 4 ml roztoku kolagenu. Kultivační nádoby s roztokem kolagenu byly inkubovány v laminárním boxu po dobu 12 hodin při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl roztok kolagenu odebrán a kultivační nádoby byly ponechány vyschnout v laminárním boxu po dobu 2 dnů při laboratorní teplotě. Poté byly kultivační nádoby 3x promyty pufrům PBS a ponechány vyschnout po dobu 2 dní. Po této době byly vyschlé kultivační lahve uzavřeny šroubovacím víčkem a hrdla byla překryta parafilmem. Takto připravené lahve byly uskladněny při 4 °C. Před použitím byly kultivační lahve vždy promyty PBS.

3.2.4 Subkultivace buněčných linií

Obě zmíněné linie jsou adherentní, proto je nutno pro subkultivaci buňky „odlepit“ od kultivačního povrchu. Pro uvolnění buněk z povrchu kultivační lahve byl použit trypsin-EDTA, jehož působení bylo zastaveno přidavkem FBS. Subkultivace byla provedena vždy po dosažení 70% konfluence kultivačního povrchu (cca 5-7 dní). Bylo provedeno maximálně 15 subkultivací, aby se u buněčných linií eliminovalo riziko dediferenciace a vzniku mutací.

Postup:

Nejprve bylo z kultivačních lahví odebráno medium a přidán 0,25%(w/v) trypsin/0,53 mM EDTA: 1,25 ml (25 cm²) nebo 2,5 ml (75 cm²). Pro urychlení „odlepení“ buněk od kultivačního povrchu byly kultivační lahve uloženy do inkubátoru na 37 °C. Po 8 minutách inkubace byla provedena kontrola uvolnění buněk pomocí mikroskopu. Trypsinizace byla zastavena přidavkem ekvivalentního objemu 1% FBS v PBS: 1,25 ml (25 cm²) nebo 2,5 ml (75 cm²). Buněčná suspenze byla přenesena do centrifugační zkumavky a centrifugována (5 min, 1000 RPM, Hettich Universal 320R). Byl odstraněn supernatant a peleta byla resuspendována v 1 ml čerstvého media vytemperovaného na 37 °C. Do kultivačních nádob potaženým kolagenem IV s mediem bylo inokulováno 1-3 x 10⁴ buněk/cm² (CuFi-1) a 1-2 x 10⁴ buněk/cm² (NuLi-1). Kultivační lahve obsahující uvedené množství buněk byly uloženy do inkubátoru 37 °C s 5% CO₂.

3.2.5 Stanovení počtu a viability buněk

Ke stanovení počtu buněk byl použit hemocytometr – Bürkerova komůrka. Na skličku Bürkerovy komůrky je vybroušen síťovitý obrazec sestávající se z 9 velkých čtverců, v kterém se nachází dalších 16 menších čtverců. Pro stanovení viability bylo před počítáním do vzorku buněčné suspenze přidáno barvivo – trypanová modř, které je z intracelulárního prostoru buňky aktivně transportováno ven. Trypanová modř tak obarví pouze mrtvé buňky, u nichž je narušena integrita buněčné membrány, zatímco živé buňky zůstanou bezbarvé. Tato metoda byla využita při subkultivaci a nasazení na experiment.

Postup:

Po subkultivaci byla peleta resuspendována v 1 ml media. Z této buněčné suspenze byly odebrány 4 µl a naředěny mediem na výsledný objem 20 µl. K naředěné buněčné suspenzi

byl přidán ekvivalentní objem 0,4% (w/v) trypanové modře. Na Bürkerovu komůrku bylo naneseno 10 µl roztoku buněčné suspenze s barvivem. V mřížce se vybíralo 3-5 velkých čtverců pro statistické vyhodnocení. Pro stanovení koncentrace buněk v 1 ml suspenze byl proveden výpočet pomocí vzorce

$$X = \frac{a \cdot 10\,000}{n} \cdot \text{ředění} \quad (3.1)$$

kde X je koncentrace buněk v suspenzi, a je stanovený počet buněk a n počet opakování (spočítaných čtverců).

3.2.6 Zamrazení buněčných kultur

Buněčné linie v kontinuální kultuře mohou utrpět nežádoucí genetický drift nebo mikrobiální kontaminaci. Proto je důležité, aby byly zmrazeny a uchovány pro dlouhodobé skladování. Nejlepší metodou pro kryokonzervaci buněk je jejich skladování v kapalném dusíku za přítomnosti kryoprotektivního činidla, jako je DMSO nebo glycerol. Kryoprotektivní látky snižují bod tuhnutí media, což výrazně snižuje riziko tvorby ledových krystalů, které mohou buňky poškodit a způsobit jejich smrt. Zmrazení buněčných linií bylo prováděno v logaritmické fázi růstu s viabilitou minimálně 90%.

Postup:

Po běžné subkultivaci byl odebrán alikvot buněčné suspenze pro stanovení počtu a viability buněk (kapitola 3.2.5.). Dále bylo připraveno kryoprotektivní medium: LHC-9 obsahující 10% (v/v) DMSO a 30% (v/v) FBS. Příslušný objem buněk obsahující $1-5 \times 10^6$ viabilních buněk byl centrifugován (5 min, 1 000 RPM, Hettich Universal 320R). Získaná peleta byla resuspendována v 1 ml kryoprotektivního media. Takto připravená buněčná suspenze byla převedena do kryozkumavek, které byly následně umístěny do předem vychlazeného mrazícího kontejneru naplněným isopropanolem. Zmrazovací kontejner byl uložen do hlubokomrazícího boxu (-80 °C) po dobu 1 dne. Následně byly kryozkumavky vyjmuty ze zmrazovacího kontejneru a uskladněny při -80 °C pro krátkodobé uchování nebo uloženy do kapalného dusíku pro dlouhodobé uchování.

3.3 Příprava lektinu PA-IIL

3.3.1 Exprese rekombinantního proteinu PA-IIL

Rekombinantní exprese proteinů slouží k přípravě bílkovin o definované sekvenci aminokyselin, zpravidla v rozpustné, nativní formě. Exprese proteinu PA-IIL probíhala v bakterii *Escherichia coli* BL21(DE3) s předem vloženým vektorem pET25_PA-IIL a rezistencí na ampicilin. Jelikož PA-IIL potřebuje ke své aktivitě přítomnost vápenatých iontů, byl pro práci s PA-IIL zvolen Tris pufr obsahující Ca^{2+} .

Použité roztoky:

Lauria-Bertani broth: 0,5% (w/v) NaCl, 1% (w/v) trypton, 0,5 % (w/v) kvasnicový extrakt; pH 7,4 (pH upraveno pomocí 0,5 M NaOH)

100 mM ampicilin

200 mM isopropyl- β -D-thiogalaktosid

Tris pufr: 20 mM Tris-base, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 ; pH 7,5 (pH upraveno pomocí 0,5 M HCl)

Postup:

Pro kultivaci bakteriálních buněk s plazmidem pro lektin PA-IIL bylo použito 2% Lauria-Bertani broth (LB medium). Pro selekci buněk nesoucích plazmid pET25 byl k 50 ml sterilního LB media byl přidán 100 mM ampicilin na výslednou koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ (dále označeno jako LB medium/ampicilin). Kultura byla inkubována přes noc při 4 °C. Druhý den byla kultura zaočkována do 250 ml LB media/ampicilin a kultivována na třepačce (37 °C, 190 RPM) do dosažení optické denzity (OD) hodnoty 0,3–0,7. Z této buněčné suspenze byl odebrán 1 ml pro analýzu pomocí SDS-PAGE. Následně byla indukována exprese požadovaného proteinu přidáním 200 mM isopropyl- β -D-thiogalaktosidu (IPTG) na výslednou koncentraci 0,5 mM. Samotná exprese probíhala 3 hodiny při 190 RPM a 30 °C.

Po této době byl pro kontrolu exprese pomocí SDS-PAGE odebrán 1 ml buněčné suspenze, který byl upraven na stejnou optickou hustotu jako vzorek před indukcí. Buněčná suspenze byla centrifugována (10 min, 7 000 RPM, 6-16K). Peleta byla rozpuštěna ve 30 ml Tris pufru a rozetřena homogenizátorem. Buňky byly dezintegrovány sonikací pomocí přístroje Soniprep 150. Bylo použito 15 cyklů za současného chlazení ledem. Každý cyklus se sestával z 20 s impulzu s amplitudou 10 μm a 2 min chlazení. Následně byl lyzát buněk

centrifugován (50 min, 17 000 RPM, 6-16K). Získaný supernatant byl zfiltrován přes 0,45 µm filtr a následně purifikován.

3.3.2 Purifikace rekombinantního proteinu PA-IIL

Pro purifikaci PA-IIL byla použita metoda FPLC („fast protein liquid chromatography“). FPLC je forma kapalinové chromatografie, která se používá k přečištění směsi proteinů, které mají různou afinitu pro mobilní a stacionární fázi. Jako stacionární fáze byla použita kolona mannose-agarose Tricorn™, která má na svém povrchu navázané molekuly manosu. Při nanesení buněčného lyzátu se PA-IIL naváže na stacionární fázi, protože má vysokou afinitu pro manosu a ostatní nezachycené proteiny jsou kolonou eluovány. Pro uvolnění PA-IIL ze stacionární fáze byl použit eluční pufr obsahující manosu. Přečištění PA-IIL probíhalo na přístroji FPLC ÄCTA Purifier s programem UNICORN 5.11, s využitím manoso-agarosové kolony Tricorn™.

Použité roztoky:

ekvilibrační pufr: 20 mM Tris-base, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂; pH 7,5

eluční pufr: 20 mM Tris-base, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0,1 M manosa; pH 7,5

dialyzační pufr: 20 mM Tris-base, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂; pH 7,5

0,1% (w/v) SDS

Pozn. pH pufrů bylo upraveno pomocí 0,5 M HCl

Nejprve byl přístroj společně s kolonou promyty *ekvilibračním pufrem*. Následně byl na kolonu nanášen filtrovaný lyzát buněk v *ekvilibračním pufru*. Došlo k zachycení PA-IIL na kolonu, ostatní proteiny přítomné v lyzátu buněk se na kolonu nezachytily. Po vymytí nezachycených proteinů byl PA-IIL eluován *elučním pufrem*. Ze zachycených i nezachycených frakcí byly odebrány vzorky pro analýzu SDS-PAGE. Následně byla kolona promyta 0,1% (w/v) SDS pro eluci ostatních zachycených proteinů. Z jímané frakce byl taktéž odebrán vzorek pro analýzu SDS-PAGE. Po purifikaci byly odstraněny nízkomolekulární látky dialýzou. Získané frakce se dialyzovaly v dialyzační trubici Snakeskin Dialysis Tube proti 5 l dialyzačního pufru po dobu 1 dne. Poté byly frakce po dobu 2 dnů dialyzovány proti destilované vodě. Po dialýze byly odebrány vzorky pro ověření čistoty PA-IIL pomocí SDS-PAGE elektroforézy a byl stanoven výtěžek PA-IIL pomocí přístroje NanoDrop 1 000.

Pozn. Dialyzační pufr i destilovaná voda byly vyměňovány každých 8 hodin.

3.3.3 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) patří mezi elektromigrační metody, využívající schopnosti nabitých částic putovat v elektrickém poli. Tato metoda separuje proteiny na základě jejich molekulové hmotnosti. SDS má funkci detergentu, který se váže na proteiny a uděluje jim jednotný záporný náboj přímo úměrný jejich velikosti. Polyakrylamidový gel se skládá ze dvou vrstev: koncentrační gel a separační gel. Koncentrační gel zakoncentrovává proteiny do úzkého pruhu a separační gel rozděluje proteiny podle jejich molekulové hmotnosti. Dělení proteinových směsí lze ovlivnit hustotou separačního gelu. Zesíťování polyakrylamidového gelu probíhá díky radikálové reakci akrylamidu a bisakrylamidu. Reakce je iniciována volnými radikály persíranu amonného (APS) a stabilizována přísádkem tetramethylethyldiaminu (TEMED)³⁵.

Jelikož je monomer PA-IIL relativně malý (11,9 kDa)³⁶, byl pro analýzu zvolen hustší, 13% separační gel (složení uvedeno níže). SDS-PAGE byla využita pro kontrolu exprese proteinu PA-IIL a také pro kontrolu čistoty proteinu po purifikaci.

Použité roztoky:

10% (w/v) SDS

10% (w/v) APS

polymerační roztok: 30% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) bisakrylamid

separační pufr: 20 mM Tris-base, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂; pH 8,8

koncentrační pufr: 20 mM Tris-base, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂; pH 6,8

vzorkový pufr: 0,05 M Tris-base, 2 mM EDTA, 10 % (v/v) glycerol, 2 % (w/v) SDS, 6% (v/v) merkaptoethanol, 0,2 % (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8

elektrodový pufr: 25 mM Tris-HCl, 250 mM glycín, 0,1% (w/v) SDS; pH 8,5

fixační roztok: 10% (v/v) isopropanol, 10% (v/v) kyselina octová

Pozn. pH pufrů bylo upraveno pomocí 0,5 M HCl

Postup:

Nejprve byly připraveny vzorky pro SDS-PAGE. Purifikované vzorky buněčného lyzátu byly centrifugovány (1 min, 1 700 RPM, Eppendorf MiniSpin). Peleta byla zbavena supernatantu a pro denaturaci proteinu bylo aplikováno: 20 µl 4M močoviny a 20 µl 6% (w/v) merkaptoethanolu. Následně bylo přidáno 20 µl 2x koncentrovaného vzorkového

pufri. Připravené vzorky byly denaturovány po dobu 10 minut při 95 °C. Tím se tetramerní PA-III rozpadl na monomery. Finální vzorek PA-III (pro kontrolu čistoty) byl smísen s 2x koncentrovaným vzorkovým pufrem v poměru 1:1. Z této směsi bylo nanášeno po 15 µl do dvou jamek gelu.

Následně byla připravena elektroforetická aparatura Mini-PROTEAN 3 a polyakrylamidové gely (tabulka 2). Elektroforetická skla byla pečlivě odmaštěna 70% a uložena do elektroforetické aparatury. Byl připraven roztok pro 13% *separační gel*, který byl v objemu 5 ml nanášen mezi elektroforetická skla a převrstven 500 µl isopropanolu. Polymerace probíhala 30 min. Po polymeraci byl odstraněn isopropanol a povrch gelu byl 2x omyt destilovanou vodou. Roztok pro *koncentrační gel* byl nalit až po okraj elektroforetického skla a byl do něj umístěn desetijamkový hřeben, polymerace probíhala 1 hod při laboratorní teplotě. Po ukončení polymerace byl opatrně vyjmut hřeben a jamky byly 2x promyty destilovanou vodou. Skla s připraveným gelem (rozměr: 8 cm x 7,3 cm, x 0,75 mm) byla uložena do elektroforetické vany. Poté byl nalit *elektrodový pufř* do prostoru mezi skly (125 ml) a do elektrodové vany (200 ml). Do každé jamky gelu bylo aplikováno 15 µl vzorku s výjimkou standardu (Protein Marker III, (6,5-100)), kterého bylo nanášeno pouze 5 µl. Samotná elektroforéza probíhala při napětí 120 V po dobu 1 hod při laboratorní teplotě.

Tabulka 2 – Složení gelů pro SDS-PAGE

Chemikálie	13% separační gel	Koncentrační gel
Destilovaná voda	2,7 ml	2,7 ml
<i>Polymerační roztok</i>	4,7 ml	0,67 ml
<i>Separační pufř</i>	2,5 ml	-
<i>Koncentrační pufř</i>	-	0,5 ml
10% SDS	0,1 ml	40 µl
10% APS	80 µl	80 µl
TEMED	7 µl	5 µl

Po ukončení elektroforézy byly proteiny v gelu zafixovány pomocí *fixačního roztoku* po dobu 15 minut. Následně byl gel obarven roztokem Coomassie Brilliant Blue nebo stříbřením.

3.3.3.1 Barvení Coomassie Brilliant Blue R-250

Barvivo Coomassie Brilliant Blue je barvivo běžně používané pro vizualizaci proteinů v polyakrylamidovém gelu. Na proteiny se váže prostřednictvím iontových interakcí a vytváří s nimi komplexy. Barvení Coomassie Brilliant Blue probíhá do rovnováhy, tzn. míra obarvení odpovídá množství proteinu.

Použité roztoky:

barvicí roztok: 0,025% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová

odbarvovací roztok: 40% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová

Postup:

Gel byl zalit *barvicím roztokem* a barven přes noc. Následující den bylo pomocí *odbarvovacího roztoku* odbarveno pozadí gelu, a to po dobu 2 hodin. Následně byl gel opláchnut destilovanou vodou a vizuálně vyhodnocen.

3.3.3.2 Barvení stříbrem

Barvení stříbrem je nejcitlivější metodou pro detekci proteinu v polyakrylamidovém gelu. Stříbrné ionty barvicího činidla elektrostaticky interagují s negativně nabitými skupinami proteinů a sulfátovou skupinou SDS. Přídavkem senzibilizujícího činidla thiosíranu sodného ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) se odstraní volné Ag^+ , které se nezachytilo na proteinech. Ve vyvíjecím kroku dochází k redukci Ag^+ na Ag^0 doprovázené vznikem hnědočerné barvy. Tato reakce probíhá na světle a je nutné ji včas zastavit přidavkem kyseliny octové, která změní pH z bazického na kyselé.

Použité roztoky:

Roztok č.1: 60 ml 50% (v/v) aceton, 1,5 ml TCA, 25 μl HCHO

Roztok č.2: 60 ml 50% aceton

Roztok č.3: 100 ml 10% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 60 ml destilovaná voda

Roztok č.4: 0,8 ml 20% (w/v) AgNO_3 , 0,6 ml 37% (v/v) HCHO, 60 ml destilovaná voda

Roztok č.5: 60 ml 2% (w/v) Na_2CO_3 , 25 μl 37% (v/v) HCHO, 25 μl 10% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Postup:

Gel byl inkubován s připravenými roztoky (tabulka 3). Mezi každou aplikací roztoku byl gel 3x promyt destilovanou vodou. Obarvený gel byl uchován v destilované vodě, aby se zabránilo jeho vysušení.

Tabulka 3 – Rozvrh aplikace roztoků pro barvení gelu stříbrem.

Pořadí	Roztok	Doba působení
1.	<i>Roztok č.1</i>	5 min
2.	Destilovaná voda	3 x 5 min
3.	<i>Roztok č.2</i>	5 min
4.	<i>Roztok č.3</i>	1 min
5.	Destilovaná voda	3 x 5 min
6.	<i>Roztok č.4</i>	8 min
7.	Destilovaná voda	2 x 5 min
8.	<i>Roztok č.5</i>	15 s
9.	1% kyselina octová	30 s
10.	Destilovaná voda	10 s

3.3.4 Značení lektinu PA-IIL barvivem DyLight 488

Na fluorescenční značení lektinu PA-IIL bylo použito fluorescenční amino-reaktivní barvivo DyLight 488 NHS-ester. Váže se pomocí esteru *N*-hydroxysukcinimidu na aminoskupiny proteinů (N-terminální aminoskupina a postranní řetězec lysinu) za vzniku kovalentní amidové vazby. Toto barvivo je velmi dobře rozpustitelné v bezvodém dimethylformamidu (DMF). Excitační maximum DyLight 488 je 493 nm a emisní maximum 518 nm³⁷. Obvykle se proteiny pro značení DyLight 488 rozpouští v borátovém pufru. Jelikož je PA-IIL Ca²⁺ dependentní, byl nejprve rozpuštěn v Tris pufru obsahující Ca²⁺ a do borátového pufru byl převeden před samotným značením.

chemikálie:

Tris pufr: 20 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂; pH 7,5 (pH upraveno pomocí 0,5 M HCl)

borátový pufr: 50 mM H₃BO₃; pH 8,5 (pH upraveno pomocí 0,5 M NaOH)

dimethylformamid

Postup:

Pro značení bylo použito 1,1 mg lektinu PA-IIL. Nejprve byl PA-IIL rozpuštěn v Tris pufru a inkubován přes noc při 4 °C. Následující den byl lektin přefiltrován přes centrifugační filtr 0,22 µm (2 min, 13 000 RPM, Centrifuge 5430). Poté byl lektin přečištěn a převeden do borátového pufru pomocí centrifugační odsolovací kolonky Zeba™ Spin 7K, MWCO (3 x 2 min, 10 000 RPM, Centrifuge 5430)³⁸. Následně byl roztok PA-IIL centrifugačně zakoncentrován pomocí VivaSpin 500 (5 x 2 min, 13 000 RPM, Centrifuge 5430)³⁹. Dále bylo připraveno fluorescenční barvivo DyLight 488 rozpuštěním ve 100 µl 99,8% (v/v) DMF na koncentraci 10 mg/ml. Takto rozpuštěné barvivo bylo inkubováno 15 min za tmy při laboratorní teplotě. Byl proveden výpočet přídavku zásobního roztoku DyLight 488 k 1,1 mg PA-IIL podle vzorce

$$\frac{m(\text{protein})}{M_r(\text{protein})} \cdot 10 \cdot M_r(\text{fluorofor}) = m(\text{fluorofor}) \quad (3.2)$$

kde $m(\text{protein})$ je hmotnost PA-IIL, $M_r(\text{protein})$ relativní molekulová hmotnost PA-IIL, $M_r(\text{fluorofor})$ relativní molekulová hmotnost DyLight 488 a $m(\text{fluorofor})$ hmotnost DyLight 488³⁷.

Bylo smícháno 117 µl PA-IIL (9,4 mg/ml) s 93 µl zásobního roztoku DyLight 488 (10 mg/ml) a 300 µl borátového pufru. Značení PA-IIL probíhalo 1 hodinu za tmy při laboratorní teplotě³⁷. Následně byla směs přečištěna a převedena do Tris pufru kolonkou Thermo Zeba™ Spin 7K, MWCO (3 x 2 min, 10 000 RPM, Centrifuge 5430)³⁸. Poté byla směs centrifugačně zakoncentrována pomocí VivaSpin500, 3 000 MWCO (5 x 3min, 10 000 RPM, Centrifuge 5430)³⁹. Následně se přečištěný roztok PA-IIL přefiltroval přes centrifugační filtr 0,22 µm (1 min, 13 000 RPM, Centrifuge 5430). Pro zjištění úspěšnosti značení lektinu byl proveden výpočet účinnosti značení a pro kontrolu intenzity fluorescence byl značený PA-IIL pozorován pod konfokálním laserovým mikroskopem FluoView™ 500 Spectral CLSM.

3.3.4.1 Stanovení koncentrace značeného PA-IIL

Pro stanovení koncentrace proteinu PA-IIL ve vzorku byla použita hodnota absorbance při 280 nm (A_{280}). Jelikož fluorescenční barvivo také absorbuje při 280 nm, je potřeba

k úpravě hodnoty A_{280} zavést korekční faktor (KF). KF je roven A_{280} barviva děleného absorbancí při maximální vlnové délce barviva. Je tedy nutné zjistit hodnotu absorbance barviva při vlnové délce maxima (A_{max}), pro DyLight 488 byla A_{max} měřena při 493 nm. Dále je zapotřebí znát extinkční molární koeficient neznačeného PA-IIL. Potřebné hodnoty veličin pro výpočet jsou uvedeny v tabulce 4. Pro kontrolu výpočtu byla koncentrace značeného PA-IIL ověřena pomocí spektrofotometru NanoDrop 1 000.

Pozn. Pro výpočet značeného PA-IIL byla použita hodnota korekčního faktoru uvedená výrobcem³⁷ a teoretická hodnota molárního extinkčního koeficientu PA-IIL⁴⁰.

Pro stanovení koncentrace značeného lektinu PA-IIL byl použit vzorec

$$\text{koncentrace PA-IIL} = \frac{A_{280} - (A_{max} \cdot KF)}{\epsilon(PA-IIL)} \quad (3.3)$$

kde A_{280} absorbance při 280 nm, KF korekční faktor, A_{max} absorbance při excitační délce DyLight 488 a $\epsilon(PA-IIL)$ molární extinkční koeficient PA-IIL.

Tabulka 4 – Hodnoty veličin pro výpočet koncentrace značeného proteinu.

Veličina	Označení veličiny	Hodnota veličiny
Korekční koeficient	KF	0,147
Molární extinkční koeficient	$\epsilon(PA-IIL)$	$6\,990\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

3.3.4.2 Stanovení stupně značení PA-IIL

Stupeň značení proteinu se obecně vyjadřuje jako molární poměr fluorofor/protein (F/P). Tento údaj je důležitý pro predikaci množství fluorescenčního barviva připadající na molekulu proteinu. Poměr představuje průměrný počet molekul barviva navázaných na každou molekulou proteinu. Pro stanovení stupně značení PA-IIL byla změřena hodnota A_{max} DyLight 488. Hodnota molárního extinkčního koeficientu DyLight 488 je $70 \cdot 10^3\text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ³⁷. Pro stanovení stupně značení lektinu PA-IIL byl použit vzorec

$$F/P = \frac{A_{max}}{\epsilon(DyLight\ 488) \cdot c(PA-IIL)} \quad (3.4)$$

kde F/P je molární poměr DyLight 488 a PA-IIL, A_{max} absorbance při excitační vlnové délce DyLight 488, $\epsilon(DyLight\ 488)$ molární extinkční koeficient DyLight 488 a $c(protein)$ koncentrace PA-IIL.

3.3.5 Hemaglutinační test

Pro zjištění aktivity lektinu PA-IIL byl použit hemaglutinační test. Hemaglutinace je jednoduchá metoda pro zjištění přítomnosti proteinů schopných aglutinovat červené krvinky. Při navázání aglutinačního činidla (lektinu) na povrchový antigen erytrocytů (aglutinin) dojde k zesíťování buněk, což se projeví jako hemaglutinace⁴¹. Krev je složena cca z 50 % plazmy a 50 % sedimentu. Sediment obsahuje 600-krát více erytrocytů (RBC, „red blood cell“) než leukocytů, proto byly uvažovány pouze RBC⁴². Před vlastním testem je nutné krev zbavit plazmy a ošetřit ji papainem⁴³. Papain odhalí vazebná místa na povrchu RBC a tím se výrazně zkrátí doba inkubace. Jelikož má PA-IIL vysokou afinitu k fukose, jsou pro hemaglutinační test vhodné všechny krevní skupiny⁴⁴. Byla použita komerčně dostupná krev skupiny 0.

Použité roztoky:

krev skupiny 0

papain

Tris pufr: 20 mM Tris-base, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂; pH 7,5

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄; pH 7,4

zásobní roztoky lektinů: neznačený PA-IIL (9,4 mg/ml), značený PA-IIL (2,8 mg/ml)

Postup:

Nejprve byla krev 4x centrifugačně promyta (5 min, 4 000 RPM, Centrifuge 5430). Po odebrání supernatantu (plazmy), byl k sedimentu (RBC) pipetován PBS na cca 50% suspenzi RBC. Poté byl přidán 10%(w/v) papain na výslednou koncentraci 0,1%. Suspenze byla inkubována 30 minut při 37 °C za občasného promíchání. Po inkubaci byla suspenze RBC 3x centrifugačně promyta PBS (5 min, 3 000 RPM, Centrifuge 5430). Jelikož je lektin Ca²⁺ dependentní, bylo nutné suspenzi RBC promýt od PBS (fosfáty v PBS mohou vyvézat Ca²⁺ z vazebného místa lektinu a tím snížit jeho aktivitu). Suspenze RBC byla 3x centrifugačně promyta Tris pufr (3 min, 4 000 RPM, Centrifuge 5430). Po odebrání supernatantu byl k sedimentu přidán Tris pufr na cca 20% suspenzi RBC.

Oba roztoky lektinů (neznačený PA-IIL, značený PA-IIL) byly naředěny Tris pufr (na pracovní koncentraci 1,4 mg/ml). Naředěné roztoky lektinů byly v smíchány s 20% suspenzí RBC v poměru 1:1. Tudiž výsledná koncentrace PA-IIL činila 0,7 mg/ml. Směs

byla inkubována po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl pomocí mikroskopu pozorován vznik agregátů erytrocytů (hemaglutinace). Jako negativní kontrola sloužila krev naředěná Tris pufrům na cca 10% suspenzi RBC.

3.4 Průtoková cytometrie FACS

Průtoková cytometrie je biologická metoda, která umožňuje identifikovat a kvantifikovat různé znaky v buňce. FACS („fluorescence-activated cell sorting“) je varianta průtokové cytometrie, při které buňky proudí tekutinou skrz speciální celu, tak aby v daný okamžik protékala celou právě jedna buňka z analyzované suspenze. Pomocí laserového paprsku je zaznamenávána jejich velikost, vnitřní struktura a relativní intenzita fluorescence. Výstupem z měření na FACS je mnohorozměrný graf, v kterém je zanesena intenzita každého ze sledovaných znaků. Statistickou analýzou se poté roztřídí jednotlivé buňky do skupin podle intenzity jednotlivých znaků. Na základě těchto skupin lze určit jednotlivé znaky populace a jejich zastoupení ve vzorku. Pro analýzu pomocí FACS musí být buňky v suspenzi – převedeny do nosné kapaliny. U adherentních buněčných linií je nutné nejprve buňky uvolnit od kultivačního povrchu.

Tato metoda byla použita pro stanovení afinity PA-IIL značeného DyLight 488 k buněčným liniím CuFi-1 a NuLi-1 ošetřeným i neošetřeným neuraminidasou (NEU). NEU je enzym, který odštěpí kyselinu sialovou. Aplikací NEU by se měla snížit míra sialylace obou linií. Jako nosná kapalina byl zvolen HNKCM pufr s vápennými ionty pro regeneraci vazebných míst lektinu. Uvolnění buněk od kultivačního povrchu bylo provedeno za použití EDTA. Pro stanovení viability buněk na přístroji FACS bylo použito barvivo HOECHST 33258, které se ireverzibilně váže na dsDNA. Excitační maximum HOECHST 33258 je 352 nm a emisní maximum 461 nm⁴⁵. Měření probíhalo na průtokovém cytometru FACS BD LSR II s programem FlowJo, s využitím laseru a detektoru pro FITC.

Použité chemikálie:

0,5 M kyselina ethylendiamintetraoctová

neuraminidasa (50 000 U/ml, vodný roztok)

HNKCM pufr: 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂; pH 7,4 (pH upraveno 0,5 NaOH)

HOECHST 33258 (10 mg/ml, vodný roztok)

Postup:

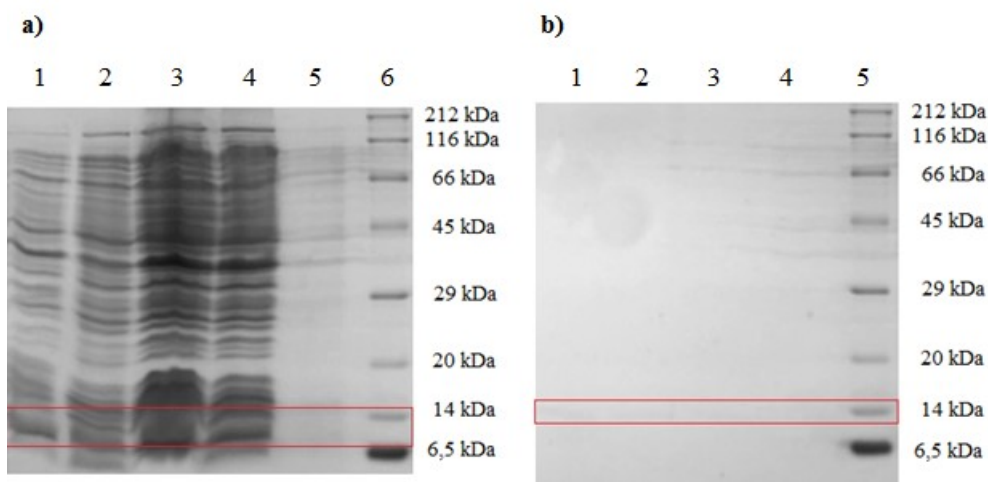
Byla provedena subkultivace (kapitola 3.2.4.), ale namísto 0,25% (w/v) trypsin/0,53 mM EDTA byla použita pouze 0,5 M EDTA. Získaná peleta byla resuspendována v HNKCM pufru a byl stanoven počet a viabilita buněk (kapitola 3.2.5.). Část obou buněčných linií byla ošetřena NEU (50 U na 10^6 buněk ve 100 μ l). Inkubace buněčných linií s NEU probíhala po dobu 1 hod při 37 °C. V mezičase inkubace buněk s NEU, byla připravena dvojková ředící řada lektinu PA-IIL, a to od 16 μ g/ml po 0,25 μ g/ml v HNKCM pufru. Následně byly do 96-jamkové destičky nasazeny buňky jak neošetřené, tak ošetřené NEU, vždy 10^5 buněk/jamka. K buňkám bylo přidáno 50 μ l lektinu každé připravené koncentrace, s výjimkou negativní kontroly, kde byl místo lektinu přidán HNKCM pufr. Inkubace probíhala 30 min při 4 °C. Buněčné suspenze byly 3x centrifugačně promyty (5 min, 1 000 RPM, Ohaus Frontier 5714). Po posledním promytí byly pelety v jamkách destičky resuspendovány ve 100 μ l HNKCM pufru. Následně bylo k buněčné suspenzi přidáno barvivo HOECHST 33258 do výsledné koncentrace 5 μ g/ml a byla stanovena viabilita buněk. Dále byla měřena fluorescence navázaného lektinu PA-IIL značeného DyLight 488. Fluorescence PA-IIL byla detekována pomocí přístroje FACS BD LSR II s programem FlowJo, s využitím laseru a detektoru pro FITC.

4 Výsledky

4.1 Příprava rekombinantního proteinu PA-IIL

Pro produkci lektinu PA-IIL v rekombinantní formě byl použit expresní systém BL21(DE3)/pET25_PA-IIL. Buněčný lyzát byl purifikován na přístroji FPLC ÄCTA Purifier, s využitím manoso-agarosové kolony Tricorn™. Ověření exprese a purifikace PA-IIL bylo provedeno pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Byly analyzovány vzorky před a po indukci IPTG, zachycené frakce, nezachycené frakce a frakce po promytí kolony SDS.

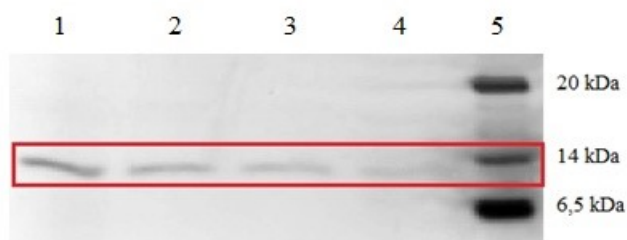
Nejprve byl polyakrylamidový gel obarven barvivem Coomassie Brilliant Blue. U vzorku po indukci na obrázku 9 lze vidět zónu pod úrovní 14 kDa. Naproti tomu u vzorku před indukcí ani u nezachycených frakcí X1, X2 tato zóna pozorována nebyla. Frakce odebraná po promytí kolony SDS nevykazovala přítomnost žádných výrazných zón pod úrovní 14 kDa.



Obrázek 9 – SDS-PAGE elektroforéza vzorků z přípravy PA-IIL po vizualizaci Coomassie Brilliant Blue R-250. Byl použit 13% polyakrylamidový gel obsahující deset jamek. Do každé jamky gelu bylo naneseno 15 µl vzorku s výjimkou standardu (Protein Marker III (6,5-200 kDa)), kterého bylo naneseno pouze 5 µl. **a)** 1: vzorek po indukci, 2: vzorek před indukcí, 3: nezachycená frakce (X1), 4: nezachycená frakce (X2), 5: frakce po promytí SDS (A7), 6: hmotnostní standard Protein Marker III (6,5-200 kDa). **b)** 1-4: specificky eluované frakce (A1, A2, A3, A4), 5: hmotnostní standard Protein Marker III (6,5-200 kDa).

Pozn. červený rámeček označuje PA-IIL.

U specificky eluovaných frakcí byly pozorovány pod úrovní 14 kDa velmi slabé zóny (obrázek 9 b)). Po obarvení gelu stříbrem byly v této úrovni znatelně vidět zóny u každé z frakcí (obrázek 10).



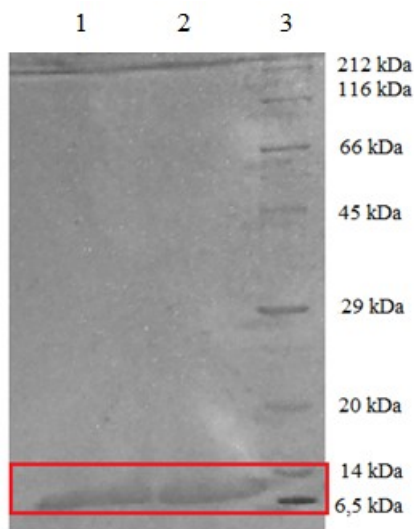
Obrázek 10 – SDS-PAGE elektroforéza vzorků z přípravy PA-IIL s vizualizací stříbřením.

Byl použit 13% polyakrylamidový gel obsahující deset jamek. Do každé jamky gelu bylo nanášeno 15 μ l vzorku s výjimkou standardu (Protein Marker III (6,5-200 kDa)), kterého bylo nanášeno pouze 5 μ l.

1-4: specificky eluované frakce (A1, A2, A3, A4), 5: hmotnostní standard Protein Marker III (6,5-200 kDa).

Pozn. červený rámeček označuje PA IIL.

Pro dialýzu byly vybrány frakce s nejvyšším obsahem PA-IIL (A1, A2, A3). Dialyzované frakce byly spojeny a byla ověřena čistota připraveného PA-IIL pomocí další SDS-PAGE elektroforézy. Výsledky dokumentující čistotu připraveného rekombinantního proteinu PA-IIL jsou na obrázku 11 na následující straně. Ve zkoumaných vzorcích byly pozorovány zóny pouze pod úrovní 14 kDa.



Obrázek 11 – SDS-PAGE elektroforéza finálních vzorků PA-IIL. Byl použit 13% polyakrylamidový gel obsahující deset jamek. Do každé jamky gelu bylo nanášeno 15 μ l vzorku s výjimkou standardu (Protein Marker III (6,5-200 kDa)), kterého bylo nanášeno pouze 5 μ l. 1, 2: specificky eluované frakce spojené frakce obsahující nejvíce PA-IIL (A1, A2, A3) po dialýze. 3: hmotnostní standard Protein Marker III, 6,5-200 kDa.

Gel byl obarven Coomassie Brilliant Blue R-250.

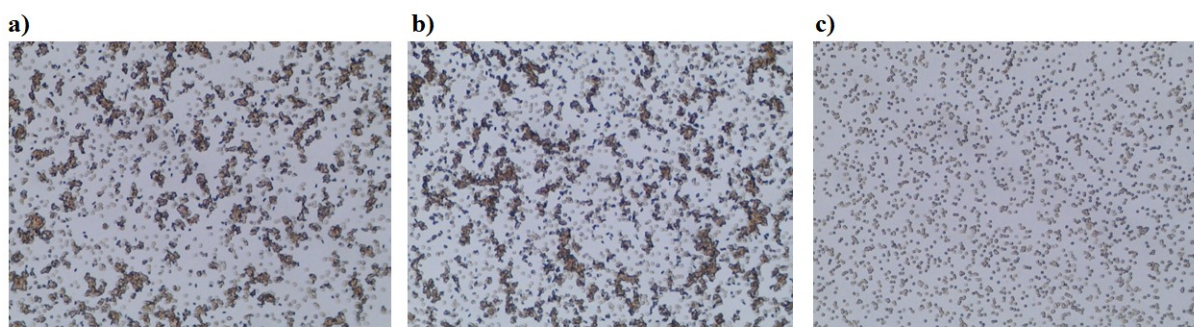
Pozn. červený rámeček označuje PA-IIL.

4.2 Účinnost značení lektinu PA-III

Byla stanovena koncentrace PA-III značeného DyLight 488 pomocí výpočtu (vzorec 3.3, strana 36) 3,63 mg/ml. Pro kontrolu byl roztok značeného lektinu analyzován na spektrofotometru NanoDrop 1 000, který naměřil koncentraci značeného PA-III 2,81 mg/ml. Pro výpočet stupně značení s využitím hodnoty koncentrace změřenou přístrojem NanoDrop 1 000 se zjistilo, že molární poměr flouorofor/lektin je 1,00 (vzorec 3.4, strana 36). Tzn. na 1 monomer PA-III připadá 1 molekula DyLight 488.

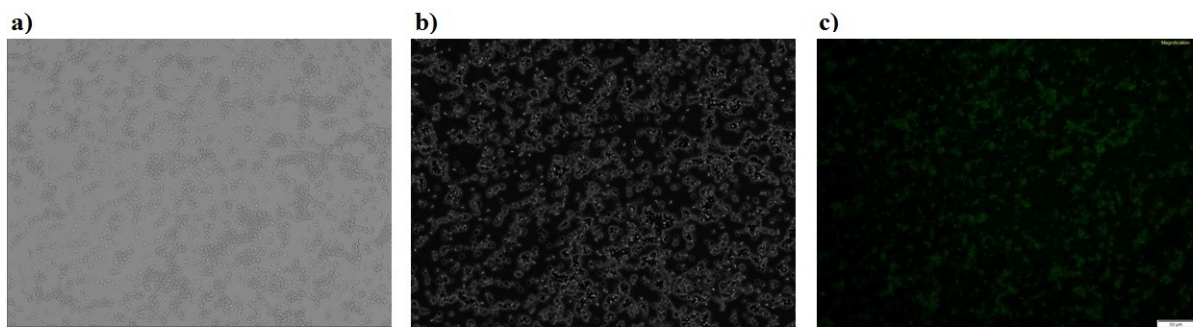
4.3 Stanovení aktivity lektinu PA-III

Pro stanovení aktivity byl použit hemaglutinační test. Byl testován jak neznačený lektin PA-III, tak lektin PA-III značený fluorescenčním barvivem DyLight 488. Vznik agregátů RBC byl pozorován u směsi obou lektinů. U negativní kontroly nebyl pozorován vznik hemaglutinace (obrázek 12).



Obrázek 12 – Hemaglutinační aktivita lektinů PA-III. Byl použit **a)** neznačený PA-III, **b)** PA-III značený fluorescenčním barvivem DyLight 488, **c)** negativní kontrola. Reakční směsi byly tvořeny 10% suspenzí RBC a obsahovaly pokaždé jeden z lektinů o koncentraci 0,7 mg/ml. Jako negativní kontrola sloužila suspenze RBC naředěná Tris pufrem na 10%. Hemaglutinace byla sledována pomocí mikroskopu Levenhuk D2L NG při zvětšení 16x.

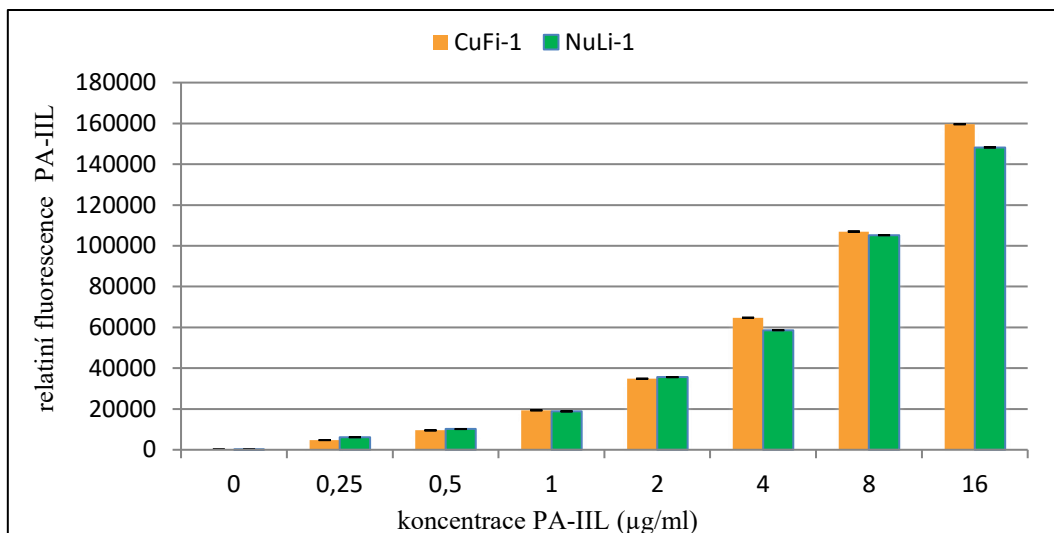
Konfokálním laserovým mikroskopem byla detekována fluorescence značeného lektinu fluorescenčním barvivem DyLight 488 při vazbě na RBC (obrázek 13 na následující straně).



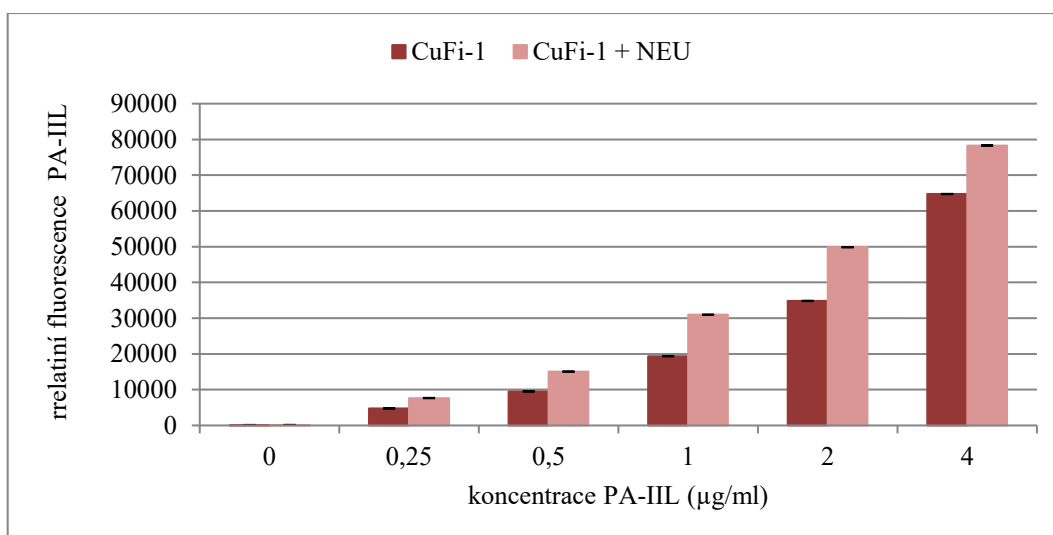
Obrázek 13 – Detekce fluorescence barviva DyLight 488 vázaného na PA-IIL. a) kontrola přítomnosti buněk pod viditelným světlem, b) kontrola přítomnosti buněk pod viditelným světlem s nastavením fázového kontrastu, c) snímání fluorescenčního záření DyLight 488 při expozici 500 ms. Fluorescence DyLight 488 byla detekována mikroskopem FluoView™ 500 Spectral CLSM při zvětšení 16x. Reakční směs byla tvořena 10% suspenzí RBC a obsahovala značený lektin PA-IIL o koncentraci 0,7 mg/ml.

4.4 Vazba lektinu PA-IIL na buňky epitelu

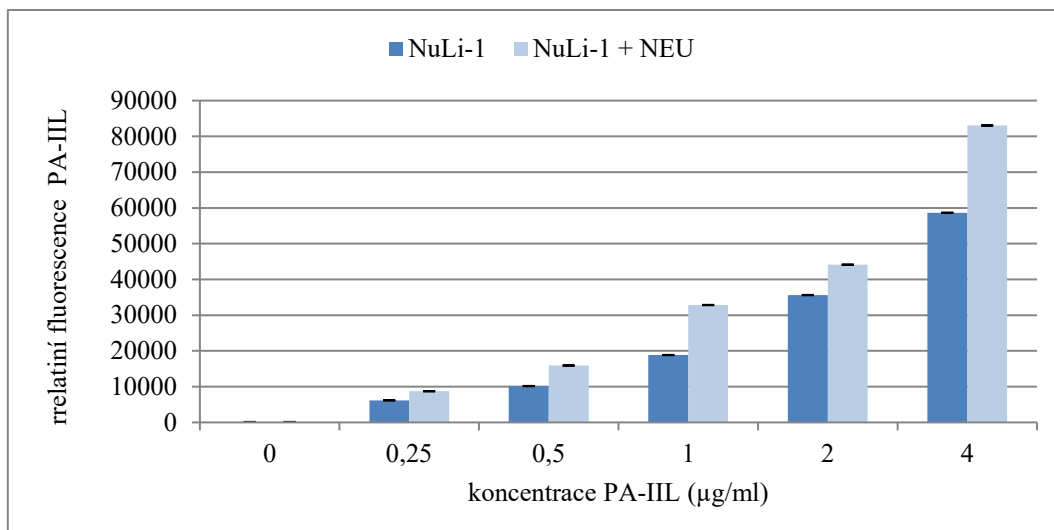
Afinita lektinu PA-IIL značeného DyLight 488 k buněčným liniím CuFi-1 a NuLi-1 byla studována na průtokovém cytometru FACS BD LSR II s programem FlowJo, s využitím laseru a detektoru pro FITC. Část obou zkoumaných linií byla ošetřena NEU. Lektin byl inkubován s buněčnými liniemi CuFi-1 a NuLi-1 a následně byla detekována jeho vazba na obě buněčné linie pomocí FACS (obrázek 14). Se zvyšující se koncentrací lektinu PA-IIL se zvyšuje jeho vazba na obě buněčné linie. Tento trend je lineární do koncentrace 4 $\mu\text{g/ml}$ PA-IIL. PA-IIL se vázal přibližně stejnou mírou na obě buněčné linie. Lektin PA-IIL vykazuje vyšší afinitu k buněčným liniím ošetřeným NEU (obrázek 15 a 16).



Obrázek 14 – Vazba PA-IIL na buněčné linie CuFi-1 a NuLi-1. Výsledky jsou znázorněny jako závislost relativní fluorescence PA-IIL (DyLight 488: Ex./Em:488/493) na jeho koncentraci při inkubaci s buňkami. Fluorescence PA-IIL značeného DyLight 488 byla detekována pomocí přístroje FACS BD LSR II s programem FlowJo, s využitím laseru a detektoru pro FITC. Byla provedena celkem 3 měření.



Obrázek 15 – Porovnání vazby PA-IIL na neovlivněnou buněčnou linii CuFi-1 a po působení neuraminidasy. Výsledky jsou znázorněny jako závislost relativní fluorescence PA-IIL (DyLight 488: Ex./Em:488/493) na jeho koncentraci. Fluorescence PA-IIL značeného DyLight 488 byla detekována pomocí přístroje FACS BD LSR II s programem FlowJo, s využitím laseru a detektoru pro FITC. K buněčným liniím bylo aplikováno 50 U NEU na 10^6 buněk ve 100 µl. Inkubace buněčných linií s NEU probíhala 1 hod při 37 °C. Byla provedena celkem 3 měření.



Obrázek 16 – Porovnání vazby PA-IIL na neovlivněnou buněčnou linii NuLi-1 a po působení neuraminidasoy. Výsledky jsou znázorněny jako závislost relativní fluorescence PA-IIL (DyLight 488: Ex./Em:488/493) na jeho koncentraci. Fluorescence PA-IIL značeného DyLight 488 byla detekována pomocí přístroje FACS BD LSR II s programem FlowJo, s využitím laseru a detektoru pro FITC. K buněčným liniím bylo aplikováno 50 U NEU na 10^6 buněk ve 100 µl. Inkubace buněčných linií s NEU probíhala 1 hod při 37 °C. Byla provedena celkem 3 měření.

5 Diskuze

Cystická fibróza je genetické onemocnění způsobené mutacemi *CFTR* genu, který kóduje stejnojmenný chloridový kanál. Mutace v *CFTR* genu vedou ke ztrátě funkčnosti či absenci CFTR proteinu. Důsledkem těchto mutací je narušení transportu iontů a vody doprovázené vznikem nadměrně hustého hlenu na povrchu plicního epitelu a jeho snížená sialylace. Tato skutečnost vede u pacientů s CF ke vzniku bakteriálních infekcí, následně i k úmrtí. Nejčastější patogenem způsobujícím tyto infekce je *Pseudomonas aeruginosa*, která pro adheenci na plicní epitel využívá řadu faktorů virulence. Mezi ně patří lektin PA-IIL, který má vysokou afinitu k L-fukose, a proto se váže na CF epitel s vyšší terminální fukosylací. Mimo to PA-IIL napomáhá při tvorbě biofilmů. Cílem této práce bylo porovnání afinity lektinu PA-IIL k buněčným liniím CuFi-1 a NuLi-1. Obě tyto komerčně dostupné linie plicního epitelu firmy ATCC® jsou imortalizované pomocí telomerasové reverzní transkriptázy (TERT „telomerase reverse transcriptase“). Buněčná linie CuFi-1 byla získána od CF pacienta s homozygotní mutací F508del způsobující cystickou fibrózu a linie NuLi-1 pochází z buněk zdravého jedince^{57,58}.

V předložené práci byl zkoumán lektin PA-IIL, jenž je důležitý pro adhezi a tvorbu biofilmu u *Pseudomonas aeruginosa*⁴⁰. PA-IIL se navíc účastní biogeneze pili typu IV a ovlivňuje aktivitu proteasy IV⁴⁶. Ačkoliv je patogenita PA multifaktoriální, ukázalo se, že k ní přispívá hlavně PA-IIL. Bylo prokázáno, že PA s nedostatkem PA-IIL vykazuje sníženou schopnost tvorby biofilmu a sníženou adheenci na plicní epitel⁴⁷. Několik studií dokonce naznačuje, že blokování nebo inhibice lektinu PA-IIL může být užitečná pro prevenci a léčbu infekce způsobenými PA⁴⁶.

K produkci PA-IIL byla použita *Escherichia coli*, kmen BL21(DE3) s vloženým vektorem pET25_PA-IIL a rezistencí pro ampicilin. Kmen BL21 je jeden z nejpoužívanějších expresních systémů pro přípravu rekombinantních proteinů. Tento kmen je deficitní v „lon“ a „ompT“ proteasách. Obě tyto proteasy mohou degradovat proteiny během purifikace, tudíž jejich nepřítomnost zvyšuje výtěžek exprimovaných proteinů. Kmen BL21(DE3) je lysogen bakteriofága λDE3, který obsahuje fragment DNA s genem pro T7 RNA polymerasu. Přídavkem induktoru IPTG k rostoucí kultuře lysogenu je iniciována transkripce T7 RNA polymerasy, která následně transkribuje cílovou DNA ve vektoru pET25_PA-IIL, a tím iniciuje translaci lektinu PA-IIL⁴⁸. Významná část syntetizovaného lektinu PA-IIL se nachází v cytoplasmě a v menším množství na vnější membráně PA⁴⁹. Kromě přímé biosyntézy lektinu PA-IIL pomocí expresního systému je

možná jeho izolace z kultury PA. Pro tuto přípravu PA-IIL je za potřeby výrazně větší množství kultury PA, jelikož se v PA dosahuje poměrně malé množství lektinu PA-IIL⁵⁰. Na rozdíl od mnoha jiných faktorů virulence PA existuje jen málo informací o expresi lektinu PA-IIL na molekulární úrovni. Expres genu *PA-IIL* závisí na komunikačním systému buňka-buňka tzv. „quorum-sensing control“ a následná biosyntéza PA-IIL je ovlivněna buněčnou hustotou, stářím a fází růstu kultury. PA-IIL je nejvíce produkován během stacionární fáze růstu kultury³². Jelikož výskyt PA-IIL v PA závisí na mnoha faktorech, byl pro přípravu PA-IIL zvolena metoda rekombinantních proteinů za využití expresního systému BL21(DE3)/pET25_PA-IIL.

Ověření úspěšnosti produkce PA-IIL bylo provedeno pomocí SDS-PAGE. Porovnáním vzorků před a po indukci byla potvrzená úspěšnost indukce, ačkoli s nižší účinností. U nezachycených frakcí nebyly pozorovány zóny pod úrovní 14 kDa – tzn. většina PA-IIL se zachytila na kolonu. U zachycených frakcí A1, A2, A3 a A4 byl v menším množství detekován PA-IIL. Z finální frakce byly odebrány vzorky pro ověření čistoty PA-IIL pomocí SDS-PAGE a byl stanoven výtěžek PA-IIL. Podle výsledků SDS-PAGE pro ověření čistoty byla pozorována pouze jedna zóna pod úrovní 14 kDa, tzn. vzorek PA-IIL byl homogenní. Stanovení výtěžku PA-IIL bylo provedeno za pomoci přístroje NanoDrop 1 000. Po spojení všech frakcí obsahující lektin PA-IIL (frakce: A1, A2, A3) se podařilo izolovat 8 mg PA-IIL (3,2 mg/litr kultury). Výtěžek z použitého množství expresních buněk se běžně pohybuje okolo 60 mg⁵¹. Nízký výtěžek byl nejspíše způsoben stářím expresních buněk. Vzhledem k tomu, že PA-IIL je velmi stabilní protein, který toleruje neobvykle vysoké koncentrace soli (do 1,2 M NaCl) a detergentů (do 1% v/v Tween a Triton X-100), snáší i extrémní pH (pH 4,5-11,5) a vysokou teplotu do 80 °C⁵¹, nebyl nízký výtěžek způsoben degradací, ale sníženou produkcí expresním systémem.

Produkovaný PA-IIL bylo za potřeby ještě purifikovat. Purifikace nativních proteinů je často problematický a časově náročný proces. Narozdíl od konvenčních víceetapových protokolů pro purifikaci rekombinantních proteinů afinitní chromatografie potřebuje pouze vysoce specifický vazebný krok pro purifikaci cílového proteinu. Pro tuto výhodu byla zvolena pro purifikaci PA-IIL afinitní chromatografie. Lektin PA-IIL vykazuje pozoruhodně vysokou afinitu k L-fukose a také váže D-manosu, i když s nižší afinitou. Pro purifikaci byla využita afinita k D-manose za použití manoso-agarosové kolony⁵¹.

Aby bylo možné vazbu PA-IIL na buněčné linie detekovat, byl purifikovaný PA-IIL následně značen. Různá fluorescenční barviva mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti, a proto je důležitý výběr vhodné fluorescenční sondy pro daný protein. Jedním z nejvíce

používaných barviv je fluorescein isothiokyanát (FITC, „fluorescein isothiocyanate“), který patří do skupiny fluorescenčních barviv emitujících světlo v zelené oblasti spektra. Do stejné skupiny barviv patří i DyLight 488, jehož excitační a emisní vlnová délka je velmi podobná FITC: pro FITC 495/521 nm; pro DyLight 488 493/518 nm⁵². Ačkoli se může zdát, že jsou si barviva velice podobná, DyLight 488 oproti FITC disponuje několika výhodami. DyLight 488 fluoreskuje v širokém rozmezí pH (pH 4-9), kdežto FITC preferuje úzké rozmezí pH (nejvíce účinné značení je při pH 8-9)⁵³. Pro značení proteinů pomocí DyLight 488 je za potřeby pouze 10x nadbytku, kdežto FITC je k roztoku proteinu nutno přidat 15-20x nadbytek^{37,53}. Stupeň značení DyLight 488 je vyšší než u FITC, což zvyšuje účinnost značení proteinu⁵². Navíc proteiny značené DyLight 488 vykazují vyšší životnost fluorescence a fotostabilitu než FITC^{37,53}. DyLight 488 má oproti FITC vyšší intenzitu fluorescence tzn. DyLight 488 je „jasnější“ než FITC⁵². Proto byla dána přednost barvivu DyLight 488 před FITC. Pro značení proteinů fluorescenčními barvivami je důležité zvolit vhodné prostředí. Při značení DyLight 488 by protein neměl být rozpuštěn pufru obsahující primární aminy, jako je Tris pufr. Tyto pufrby by s DyLight 488 interferovaly reakcí aminoskupiny pufru s NHS-esterovou skupinou barviva, tím by se výrazně snížilo množství barviva dostupné pro značení proteinu³⁷. Proto byl pro značení PA-IIL použit borátový pufr.

Ihned po značení lektinu PA-IIL fluorescenčním barvivem DyLight 488 byla pomocí přístroje NanoDrop 1 000 stanovena koncentrace PA-IIL značeného DyLight 488 3,63 mg/ml. Pro kontrolu byl finální roztok značeného lektinu analyzován na spektrofotometru NanoDrop 1 000, který naměřil koncentraci 2,81 mg/ml. Tyto rozdílné hodnoty vypovídají zřejmě o ztrátě lektinu při promývání od nenavázaného fluoroforu DyLight 488. Pro výpočet stupně značení s využitím hodnoty koncentrace změřenou přístrojem NanoDrop 1 000 se zjistilo, že molární poměr fluorofor/lektin je 1,00. Tzn. na 1 monomer PA-IIL připadá 1 molekula DyLight 488, což lze považovat za velmi úspěšné značení, jelikož se molární poměr fluorofor/protein pohybuje běžně od 0,10 do 1,00⁵⁴. Značení PA-IIL proběhlo úspěšně, jelikož se z 1,1 mg PA-IIL podařilo naznačit 0,98 mg se stupněm značení 1,00.

Navázané fluorofory mohou narušit aktivitu značeného proteinu. Z tohoto důvodu je nutné provést kontrolu aktivity značeného proteinu⁵⁵. V této práci byl pro ověření zachování vazebných vlastností lektinu po jeho značení použit hemaglutinační test – jednoduchá metoda vhodná pro zjištění přítomnosti proteinů schopných aglutinovat červené krvinky⁵⁶. Samotná hemaglutinace probíhala pomocí 20% suspenze RBC krevní skupiny 0, která v antigenních determinantech obsahuje L-fukosu. Oba použité lektiny (neznačený PA-IIL,

značený PA-IIL) byly naředěny na stejnou koncentraci a jako negativní kontrola byla použita 10% suspenze RBC. Po přidání 20% suspenze RBC ke každému z lektinů a následné inkubaci směsi byl u směsi obsahující lektin pozorován vznik agregátů RBC. Lektin PA-IIL si tedy zachoval své vazebné schopnosti i po značení fluorescenčním barvivem DyLight 488. Takto připravený PA-IIL bylo možné použít pro sledování vazby na buněčné linie plicního epitelu.

Jako modelový systém pro studium vazby PA-IIL na plicní epitel byly zvoleny buněčné linie CuFi-1 (CRL-4013) a NuLi-1 (CRL-4011). CuFi-1 i NuLi-1 jsou vhodnými modely pro studium fyziologie iontů, vrozenou imunitu a terapeutické intervence pro cystickou fibrózu^{57,58}. Byly zvoleny tyto immortalizované linie, jelikož u buněk získaných izolací z buněčných kultur plicní tkáně nebo pomocí bronchoskopické metody „nasal brushing“ byl pozorován podstatně pomalejší růst buněčných linií, snížená viabilita a horší adherence na kultivační povrch⁵⁹. Immortalizované linie CuFi-1 a NuLi-1 sice po rozmrazení vykazovaly taktéž nižší viabilitu, ale po následujících dvou subkultivacích se viabilita zvýšila téměř na 100 %. Pro zmíněné experimenty byly použity buněčné linie po provedení minimálně třech subkultivací s konfluencí 70 % kultivačního povrchu.

Pro sledování interakce lektinu PA-IIL s buněčnými liniemi CuFi-1 a NuLi-1 byla použita metoda fluorescenční průtokové cytometrie. Tato metoda je stále více využívána při pozorování a analýze interakcí fluorescenčně značených ligandů s buněčnými receptory. FACS byla úspěšně aplikována na zkoumání kinetiky asociace a disociace lektinů, haptenu či protilátek na receptory na povrchu membrán buněk⁶⁰. Kromě zkoumání vazby ligandu na buněčné linie, lze zjistit i životaschopnost buněk při experimentu. FACS vyniká mezi ostatními metodami svoji vysokou citlivostí a rychlostí⁶¹. Další výhodou FACS je skutečnost, že tato metoda nevyžaduje obarvení analyzovaných buněčných linií. Při předešlých experimentech se ukázalo, že se linie CuFi-1 a NuLi-1 neobarví stejnou mírou – CuFi-1 vázaly více barviva než NuLi-1. Jelikož pro metodu FACS není potřeba buněčné linie barvit, nedochází k odchylkám při určování počtu použitých a nabarvených buněk. Určitou nevýhodou použití FACS je to, že adherentní buňky musí být odděleny od kultivačního povrchu. Při běžné subkultivaci se pro uvolnění buněk používá trypsin. Trypsinizace však může poškodit některé receptory na buněčném povrchu, což by mohlo ovlivnit přesnost výsledků FACS⁶². Proto byla pro uvolnění buněk použita EDTA namísto trypsinu⁶³.

Při porovnání rozsahu vazby PA-IIL na linie CuFi-1 a NuLi-1 byla očekávána vyšší vazba PA-IIL k buněčné linii CuFi-1, jelikož by tato linie měla mít sníženou sialylaci a vyšší

terminální fukosylaci – CF glykopeptidy obsahují o 25 % méně kyseliny sialové a dvakrát více fukosy²⁵. Podle výsledků z průtokového cytometru FACS se ale PA-IIL vázal přibližně stejnou mírou na obě buněčné linie. Zdá se, že buněčné linie CuFi-1 a NuLi-1 mají podobné množství terminální fukosy. Ačkoliv plicní epitel pacienta s CF má zvýšenou fukosylaci prostřednictvím vazby na *N*-acetylglukosamin (Fuc α 1-3/4GlcNAc), množství fukosy vázané α 1-2 na galaktosu je u CF epitelu menší než u epitelu zdravého jedince⁶⁴. Je možné, že se PA-IIL v případě buněčné linie NuLi-1 vázal právě na Fuc α 1-2Gal, čímž by se daly vysvětlit srovnatelné hodnoty vazby PA-IIL na obě buněčné linie. Tuto domněnku by bylo dobré ověřit dalšími experimenty.

Lektin PA-IIL se výrazně více vázal na buněčné linie ošetřené neuraminidasou, a to v průměru o 50 %. Nárůst vazby PA-IIL na obě buněčné linie ošetřené NEU by mohl být způsoben zvýšením počtu vazebných míst pro PA-IIL. Neuraminidasa totiž katalyzuje hydrolytické odštěpení kyseliny sialové vázaných α 2-3, α 2-6 a α 2-8 z glykoproteinů a oligosacharidů – tím se odkryjí sacharidové struktury (vazebná místo pro PA-IIL) na povrchu buněk obou buněčných linií a zvýší se tak vazba PA-IIL na obě linie^{65,66}. Jak již bylo řečeno, PA se váže specificky pomocí lektinů na asialované glykokonjugáty, jako je asialo-GM1. CF buňky mají přirozeně zvýšené množství tohoto gangliosidu ve srovnání s buňkami bez CF, které obsahují převážně GM1²⁵. Transformace GM1 na asialo-GM1 pomocí NEU by tedy mohla simulovat stav CF buněk plicního epitelu⁶⁷. Odstranění terminální kyseliny sialové u buněčné linie NuLi-1 se tedy zdá být vhodným modelem pro studium adheze PA na epiteliální buňky jedince s CF.

6 Souhrn

- Byl připraven rekombinantní protein PA-IIL v expresním systému BL21(DE3)/pET25_PA-IIL.
- Pomocí SDS-PAGE elektroforézy byla ověřena indukce a exprese lektinu PA-IIL.
- Lektin PA-IIL byl značen fluorescenčním barvivem DyLight 488.
- Byla ověřena aktivita lektinu jak neznačeného, tak značeného DyLight 488 pomocí hemaglutinačního testu.
- Lektin PA-IIL má přibližně stejnou afinitu k buněčným liniím CuFi-1 a NuLi-1.
- Lektin PA-IIL vykazoval vyšší afinitu k buněčným liniím ošetřeným neuraminidasou.
- Na buněčné linie se lektin váže specificky do koncentrace 4 µg/ml.

Seznam použité literatury

1. Vávrová, V.; Bartošová, J.: *Cystická fibróza: příručka pro nemocné a jejich rodiče*. 2nd ed. Praha, Professional Publishing, 2009.
2. Ratjen, F; Bell, S. C.; Rowe, S. M.; Goss, C. H.; Quittner, A. L.; Bush, A.: Cystic fibrosis. *Nat Rev Dis Primers*. **1**, 15010 (2015).
3. Cutting, G. R.: Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet*. **16**, 45-56 (2015).
4. Liu, F.; Zhang, Z.; Csanády, L.; Gadsby, D. C.; Chen, J.: Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel. *Cell*. **169**, 85-95 (2017).
5. Hwang, T. C.; Yeh, J. T.; Zhang, J.; Yu, Y. C.; Yeh, H. I.; Destefano, S.: Structural mechanisms of CFTR function and dysfunction. *J Gen Physiol*. **150**, 539-570 (2018).
7. Scanlin, T. F.; Glick, M. C.: Terminal glycosylation and disease: influence on cancer and cystic fibrosis. *Glycoconj J*. **17**, 617-626 (2000).
8. Popovich, M.: Portable HFCWO Therapy for Cystic Fibrosis. AffloVest. <https://www.afflovest.com/cystic-fibrosis/> [cit. 4.11. 2020].
9. Rommens, J. M; Iannuzzi, M. C.; Kerem, B.: Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*. **245**, 1059-1065 (1989).
10. Bethesda, C. F.: Types of CFTR Mutations. /What-is-CF/Genetics/Types-of-CFTR-Mutations/ [cit. 28.5.2020].
11. Veit, G.; Avramescu, R. C.; Chiang, A. N.: From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell*. **27**, 424-433 (2016).
13. Křenková, P.; Piskáčková, T.; Holubová, A.: Distribution of CFTR mutations in the Czech population: Positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations. *J Cyst Fibros*. **12**, 532-537 (2013).
14. Miquéias, L-P.: CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol*. **7**, 275 (2016).
15. Murphy, B.: Types of CFTR mutations. Cystic Fibrosis News Today <https://cysticfibrosisnewstoday.com/types-of-cftr-mutations/> [cit. 11.12. 2020].
16. Burgener, E. B.; Moss, R. B.: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators: precision medicine in cystic fibrosis. *Curr Opin Pediatr*. **30**, 372-377 (2018).
17. Chang, Y.-H.; Stone, T. A.; Chin, S.; Glibowicka, M.; Bear, C. E.; Deber, C. M.: Structural effects of extracellular loop mutations in CFTR helical hairpins. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. **1860**, 1092-1098 (2018).

19. Harris, E.: The Chlamydomonas Sourcebook. 1st ed. New York, Print Book & E-book, 1989.
20. Sheppard, D. N.; Welsh, M. J.: Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiological Reviews*. **79**, 23-45 (1999).
21. Hwang, T.-C.; Kirk, K. L.: The CFTR Ion Channel: Gating, Regulation, and Anion Permeation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. **3**, (2013).
22. Kunzelmann, K.; Schreiber, R.; Boucherot, A.: Mechanisms of the inhibition of epithelial Na⁺ channels by CFTR and purinergic stimulation. *Kidney International*. **60**, 455-461 (2001).
23. Saint-Criq, V.; Gray, M.: A. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci*. **74**, 93-115 (2017).
24. Gentzsch, M.; Mall, M.: A. Ion Channel Modulators in Cystic Fibrosis. *Chest*. **154**, 383-393 (2018).
25. Scanlin, T. F.; Glick, M. C.: Terminal glycosylation in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. **1455**, 241-253 (1999).
26. Imberty, A., Wimmerová, M., Mitchell, E. P.; Gilboa-Garber, N.: Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insight into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect*. **6**, 221-228 (2004).
27. Mitchell, E.; Houles, C.; Sudakevitz D.: Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. *Nat Struct Biol*. **9**, 918-921 (2002).
28. Azam, M. W.; Khan, A. U.: Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov Today*. **24**, 350-359 (2019).
29. Lund-Palau, H.; Turnbull, A. R.; Bush, A.: *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Rev Respir Med*. **10**, 685-697 (2016).
30. Sousa, A. M.; Pereira, M. O.: *Pseudomonas aeruginosa* Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs—A Review. *Pathogens*. **3**, 680-703 (2014).
31. Huszczyński, S. M.; Lam, J. S.; Khursigara, C. M.: The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathogens*. **9**, (2019).
32. Winzer, K.; Falconer, C.; Garber, N. C.; Diggle, S. P.; Camara, M.; Williams, P.: The *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-IL and PA-IIL Are Controlled by Quorum Sensing and by RpoS. *J Bacteriol*. **182**, 6401-6411 (2000).
33. 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).

34. Kříž, Z.; Adam, J.; Mrázková, J.: Engineering the *Pseudomonas aeruginosa* II lectin: designing mutants with changed affinity and specificity. *J Comput Aided Mol Des.* **28**, 951-960 (2014).
35. Metody biochemického výzkumu: SDS-PAGE, Western blotting (Přf MUNI, 2018) https://is.muni.cz/el/1431/podzim2018/C9320/um/Uloha_4_SDSPAGE_WB_2018.pdf [cit. 16.11. 2020].
36. *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1 (lecB) https://www.pseudomonas.com/feature/show?locus_tag=PA3361. [cit. 16.11. 2020].
37. DyLight Amine-Reactive Dye. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011595_DyLight_AmineReactive_Dye_UG.pdf. [cit. 23.12.2020].
38. Zeba Spin Desalting Columns. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011529_Zeba_Spin_DesaltCol_UG.pdf. [cit. 23.12. 2020].
39. Vivaspin500 2ml. <https://sartorius.com/shop/medias/-usermanual-en-Manual-Vivaspin500-2-SLU6093-s.pdf>. [cit. 23.12. 2020].
40. Sommer, R.; Wagner, S.; Varrot, A; Nycholat, C. M.: The virulence factor LecB varies in clinical isolates: consequences for ligand binding and drug discovery. *Chem Sci.* **7**, 4990-5001 (2016).
41. Sano, K.; Ogawa, H.: Hemagglutination assay. *Methods Mol Biol.* **1200**, 47-52 (2014).
42. Different types of blood cells and their role in human body <https://web.mit.edu/scicom/www/blood.html>. [cit. 26.12. 2020].
43. Hyono, A.; Gabouriaud, F.; Mazda, T.; Takata, Y; Ohshima, H.; Duval, J. F. L.: Impacts of papain and neuraminidase enzyme treatment on electrohydrodynamics and IgG-mediated agglutination of type A red blood cells. *Langmuir.* **25**, 10873-10885 (2009).
44. Adamová, L.; Malinovská, L.; Wimmerová, M.: New sensitive detection method for lectin hemagglutination using microscopy. *Microsc Res Tech.* **77**, 841-849 (2014).
45. Hoechst 33258, Pentahydrate. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/H3569>. [cit. 23.12. 2020].
46. Chemani, C.; Imbert, A.; de Bentzmann, S.: Role of LecA and LecB Lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Lung Injury and Effect of Carbohydrate Ligands. *Infect Immun.* **77**, 2067-2075 (2009).
47. Thuenauer, R.; Landi, A.; Trefzer, A.: The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB causes integrin internalization and inhibits Epithelial Wound Healing. *mBio.* **9** (2020).
48. pET System Manual. <https://research.fredhuts.org/content/dam/stripe/hahn/methods/biochem/pet.pdf>. [cit. 5.3. 2020].

49. Bartels, K.-M.; Funken, H.; Knapp, A.: Glycosylation Is Required for Outer Membrane Localization of the Lectin LecB in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **193**, 1107-1113 (2011).
50. Vašková, M.: *Vývoj antibakteriálních protilátek pro pacienty s cystickou fibrosou*. (Přf UK, 2019).
51. Tielker, D.; Rosenau, F.; Bartels, K.-M.; Rosenbaum, T.; Jaeger, K.-E.: Lectin-based affinity tag for one-step protein purification. *BioTechniques* **41**, 327-332 (2006).
52. Mahmoudi, A. R.; Shaban, E.; Ghods, R.: Comparison of Photostability and Photobleaching Properties of FITC and Dylight488 Conjugated Herceptin. *Int. J. Green Nanotechnol.* **3**, 264–270 (2011).
53. Fluorescein (FITC). <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/fluorescein.html>. [cit. 8.3. 2021].
54. Protein Concentration and DOL - Definition and Relevance. <https://nanotempertech.com/nanopedia/protein-concentration-and-dol/>. [cit. 8.3. 2021].
55. Toseland, C. P.: Fluorescent labeling and modification of proteins. *J Chem Biol.* **6**, 85-95 (2013).
56. Korsák, M.: *Studium interakcí lektinů s povrchovými glykany lidských buněk*. (Přf MUNI, 2017).
57. CuFi-1 ATCC® CRL-4013™. https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4013.aspx?geo_country=cz#generalinformation. [cit. 5.3. 2021].
58. NuLi-1 ATCC® CRL-4011™. https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-4011.aspx?geo_country=cz#characteristics. [cit. 5.3. 2021].
59. Nosková, L.: *Vývoj modelového systému pro studium bakteriální adheze na plicní epitel pacientů s CF*. (Přf UK, 2013).
60. Sklar, L. A.; Finney, D. A.: Analysis of ligand-receptor interactions with the fluorescence activated cell sorter. *Cytometry.* **3**, 161-165 (1982).
61. Bohn, B.: Flow cytometry: a novel approach for the quantitative analysis of receptor-ligand interactions on surfaces of living cells. *Mol Cell Endocrinol.* **20**, 1-15 (1980).
62. Zhang, B.; Shan, H.; Li, D.: Different methods of detaching adherent cells significantly affect the detection of TRAIL receptors. *Tumori.* **98**, 800-803 (2012).
63. Kaur, M.; Esau, L.: Two-step protocol for preparing adherent cells for high-throughput flow cytometry. *BioTechniques.* **59**, 119-126 (2015).
64. Rhim, A. D.; Stoykova, L.; Glick, M. C.; Scanlin, T. F.: Terminal glycosylation in cystic fibrosis (CF): a review emphasizing the airway epithelial cell. *Glycoconj J.* **18**, 649-659 (2001).

65. α 2-3,6,8 neuraminidase. <https://international.neb.com/products/p0720-a2-3-6-8-neuraminidase#Product%20Information>. [cit. 15.5. 2021].
66. Lillehoj, E. P.; Guang, W.; Hyun, S. W.; Liu, A.: Neuraminidase 1–mediated desialylation of the mucin 1 ectodomain releases a decoy receptor that protects against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J Biol Chem*. **294**, 662-678 (2019).
67. Davies, J.; Dewar, A.; Bush, A., Pitt, T; Gruenert D.: Reduction in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to native cystic fibrosis epithelium with anti-asialoGM1 antibody and neuraminidase inhibition. *European Respiratory Journal*. **13**, 565-570 (1999).