

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



ANDREA ÁČOVÁ

Studium profylaktického účinku glykoklastrů na modelu bakteriální adherence

Study of glycocluster prophylaxis on bacterium adherence model

Bakalářská práce

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

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne:

Podpis

Poděkování

Nejdříve bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za jeho ochotu, trpělivost, neocenitelné rady a odborné vedení při zpracování této bakalářské práce.

Chci také poděkovat paní laborantce Anně Ammerové za snaživý přístup, vstřícnost a nesmírnou technickou pomoc, kolegyním Bc. Kateřině Vyhnalové a Bc. Michaele Augustínové za jejich pomoc během provedení experimentální části této práce a mojí rodině za nekonečnou podporu během celého studia.

Abstrakt

Cystická fibróza (CF), jakožto autosomálně-recesivní dědičné onemocnění způsobené mutací v *CFTR* genu, způsobuje poruchu iontového kanálu, vlivem které pacienti trpí množstvím zdravotních problémů. Nejzávažnější jsou komplikace spojené s respirační soustavou. Hromadění hustého hlenu a pozměněná glykosylace v plicích vedou ke zvýšené adhezenci bakteriálních buněk, především *Pseudomonas aeruginosa* (PA) a *Burkholderia cepacia* komplex, k plicním epitelialním buňkám pacientů s CF.

Předkládaná práce se zaměřením na jeden z virulentních faktorů PA, lektin PA-III, studuje adhezenci kontrolního kmene PA (PAK; ST 1763) pod vlivem anti-PA-III slepičích protilátek IgY a multivalentních glykokonjugátů na bázi fukosy k plicním epitelialním buňkám odebraným od zdravé osoby (NuLi-1) a osoby s CF (CuFi-1).

Před samotným studiem adherence byla ověřena přítomnost PA-III v používané kultuře PAK pomocí metody „Western Blotting“ s následnou imunodetekcí. Pro kvantitativní vyhodnocení adhezenčního testu byly plicní epitelialní i bakteriální buňky nejprve fluorescenčně označeny barvivou PKH. Výsledky spektrofluorimetrického měření po provedení adhezenčního testu byly také porovnány s mikroskopickým pozorováním adherence PAK.

Různé frakce slepičích anti-PA-III protilátek z vaječných žloutků vykazovaly odlišný vliv na míru adherence PAK k plicním buňkám, což je plně v souladu s předchozími výsledky. Předimunizační kontrolní (1K1) a poimunizační specifická frakce (3S1) snižovaly adhezenci PAK, zatímco spojené frakce (3R1-8R1) ji zvyšovaly.

Výsledky adhezenčních testů s multivalentními glykoklastry LTS-18, LTS-38 a LTS-42 na bázi fukosy zaměřenými na lektin PA-III nebyly tak jednoznačné. Přestože byly u buněčných linií NuLi-1 i CuFi-1 pozorovány podobné trendy, ve třech nezávislých experimentech s každou z testovaných látek byly získány výsledky neprokazující jejich významnou inhibici adherence PAK na plicní buňky. Pouze v případě inhibitoru LTS-38 byl při nejvyšší koncentraci (500 μ M) viditelný pokles adherence bakterií na buňky linií NuLi-1 i CuFi-1.

Klíčová slova: cystická fibróza, plicní epitelialní buňky, *Pseudomonas aeruginosa*, lektin PA-III, slepičí protilátky, glykoklastry, fluorescence

Abstract

Cystic fibrosis (CF), as autosomal-recessive inherited disease caused by mutation in *CFTR* gene, induces an ion channel disorder which triggers big amount of CF patients' health problems. The gravest are complications associated with the respiratory system. Accumulation of thick mucus and altered glycosylation in lung lead to increased adherence of bacterial cells, mainly *Pseudomonas aeruginosa* (PA) and *Burkholderia cepacia* complex, to lung epithelial cells of CF patients.

The presented thesis, focusing on one of the virulence factors of PA, the PA-IIL lectin, studies the adherence of the PA control strain (PAK; ST 1763) under the influence of anti-PA-IIL chicken IgY antibodies and multivalent glycoconjugates based on fucose, to lung epithelial cells collected from healthy person (NuLi-1) and CF patient (CuFi-1).

Before the adherence testing, the presence of PA-IIL in PAK culture was checked by "Western Blotting" followed by immunodetection. For quantitative evaluation of the adherence testing, both lung epithelial and bacterial cells were first fluorescently labeled with PKH dyes. The results of spectrofluorimetric measurement after the adherence testing were also compared to microscopic observation of PAK adherence.

Different fractions of chicken anti-PA-IIL antibodies from egg yolks showed different effects on the adherence of PAK to lung cells, which is fully consistent with previous results. The pre-immunization control (1K1) and post-immunization specific fraction (3S1) decreased adherence of PAK, while the pooled fractions (3R1-8R1) increased it.

The results of adherence test with multivalent glycoclusters LTS-18, LTS-38 and LTS-42, which are based on fucose and targeting the PA-IIL lectin were not so unequivocal. Although similar trends observed for both (NuLi-1 and CuFi-1) cell lines, three independent experiments with each of the tested substances showed no significant inhibition of PAK adherence to lung cells. Just in the case of the inhibitor LTS-38, at the highest concentration (500 μ M), a decrease in bacterial adherence to cells of the NuLi-1 and CuFi-1 lines was visible.

Key words: cystic fibrosis, lung epithelial cells, *Pseudomonas aeruginosa*, PA-IIL lectin, chicken antibodies, glycoclusters, fluorescence

[IN CZECH]

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD	10
1.1 CYSTICKÁ FIBRÓZA	10
1.1.1 Charakteristika onemocnění	10
1.1.2 Gen pro CFTR protein	11
1.1.3 Patogenese plic.....	13
1.1.3.1 Odlišná glykosylace mucinů dýchacích cest u osob s cystickou fibrózou.....	15
1.1.4 Příznaky onemocnění	16
1.1.5 Diagnostika	19
1.1.6 Léčba.....	21
1.1.6.1 Symptomatická léčba cystické fibrózy	22
1.1.6.2 Profylaktická léčba.....	22
1.1.6.3 Genová terapie	24
1.2 IMUNITNÍ SYSTÉM.....	25
1.2.1 Vrozený imunitní systém.....	25
1.2.2 Systém získané imunity.....	26
1.2.3 Imunitní systém pacientů s CF	27
1.3 PSEUDOMONAS AERUGINOSA	28
1.3.1 Virulentní faktory Pseudomonas aeruginosa.....	28
1.3.2 Lektiny PA	29
2 CÍL PRÁCE	31
3 MATERIÁL A METODY	32
3.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A MATERIÁL	32
3.1.1 Přístroje.....	32
3.1.2 Materiál	34
3.2 PRÁCE S TKÁŇOVÝMI KULTURAMI	37
3.2.1 Příprava kultivačních nádob	37
3.2.2 Rozmrazení buněčných kultur.....	37
3.2.3 Kultivace buněčných linií.....	39
3.2.4 Subkultivace buněčných linií	39
3.2.5 Stanovení počtu a viability buněk	40
3.2.6 Zamrazení buněčných linií.....	40
3.3 PRÁCE S PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	41
3.3.1 Kultivace PAK	41

3.3.2	<i>Zamrazení PAK</i>	42
3.3.3	<i>Fotometrická kvantifikace bakterií</i>	42
3.3.4	<i>Proměření růstové křivky PAK</i>	42
3.3.5	<i>Elektroforesa</i>	42
3.3.6	<i>„Western Blotting“ s následnou imunodetekcí</i>	45
3.4	FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ BUNĚK	46
3.4.1	<i>Fluorescenční značení plicních epitelálních buněk pomocí sloučeniny PKH67</i>	47
3.4.2	<i>Fluorescenční značení buněk bakterií Pseudomonas aeruginosa</i>	48
3.5	ADHERENČNÍ TEST	50
4	VÝSLEDKY	53
4.1	RŮSTOVÁ KŘIVKA PAK	53
4.2	ELEKTROFORESA A „WESTERN BLOTTING“	53
4.3	BARVENÍ BUNĚK <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	54
4.4	ADHERENČNÍ TESTY	55
4.4.1	<i>Adherenční testy se slepičími protilátkami</i>	56
4.4.2	<i>Adherenční testy s multivalentními inhibitory</i>	57
5	DISKUZE	65
6	SOUHRN	70
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71

Seznam zkratek

A ₂₈₀	absorbance při vlnové délce 280 nm
ABC	„ATP-binding cassette“, ATP vázající
ASL	„airway surface liquid“, povrchová plicní kapalina
APS	„ammonium persulfate“, peroxosíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
BEGM	„Bronchial Epithelial Cell Growth Medium“, růstové médium pro plicní epitelové buňky
CF	cystická fibróza
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“, regulátor transmembránové vodivosti cystické fibrózy
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ENaC	„epithelial sodium channel“, epitelový sodíkový kanál
FBS	„fetal bovine serum“, fetální bovinní sérum
Ig	imunoglobulin
kb	kilobáze, 1000 nukleotidů (bází)
kDa	kilodalton, jednotka molekulové hmotnosti
LB	Luria-Bertani médium
LHC	„Laboratory of Human Carcinogenesis“, laboratoř lidské karcinogenese
M	mol · dm ⁻³ , jednotka koncentrace
MDa	megadalton, jednotka molekulové hmotnosti
Mr	relativní molekulová hmotnost
MB- lektin	„mannan-binding lectin“, lektin vázající manan
ML	„mucus layer“, hlenová vrstva
NC	nitrocelulóza
NK buňky	„natural killer cells“, přirozeně zabíječské buňky
NVD	„nucleotide-binding domaine“, doména vázající nukleotid

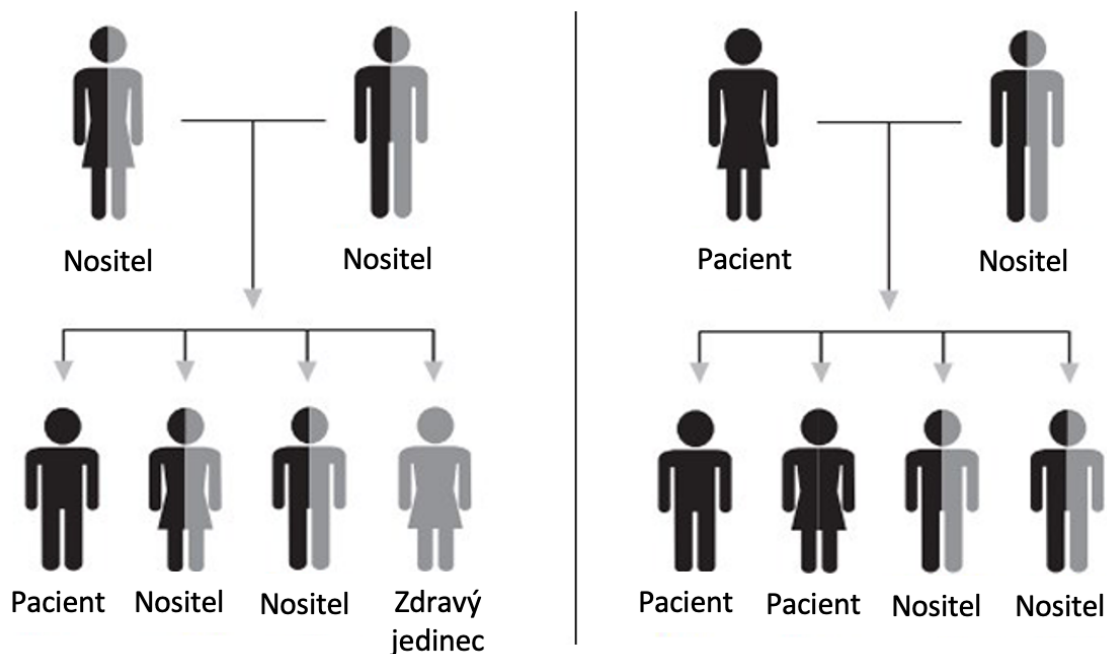
OD ₆₀₀	optická denzita při vlnové délce 600 nm
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-IL	lektin I bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-III	lektin II bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAK	kontrolní kmen <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	„phosphate buffered saline“, roztok soli pufovaný fosfátem
PCL	„periciliary liquid“, meziřasinková kapalina
PS	speciální médium pro <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PVDF	polyvinylidenfluorid
RPM	„revolutions per minute“, počet otáček za minutu
SDS	dodecylsírán sodný
TEMED	tetramethylethylendiamin
TMD	„trans-membrane domain“, transmembránová doména
Tris	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol

1 Úvod

1.1 Cystická fibróza

1.1.1 Charakteristika onemocnění

Cystická fibróza (CF), nazývaná také jako mukoviscidóza, je jednogenové onemocnění autosomálně-recesivního charakteru, které se řídí Mendelovým štěpným poměrem (obr. 1.1, str. 10). Znamená to, že u potomstva, jehož oba rodiče jsou zdraví nositelé mutace, je 25% šance výskytu onemocnění a 25% šance, že se u něj neobjeví žádná mutace genu *CFTR* (z angl. „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) způsobující CF. Existuje ale až 50% šance, že dítě nositelů mutace bude taky jejím nositelem. Jiná situace nastává, pokud je jeden rodič zdravý nositel mutace a druhý je pacient s CF. U takového páru se štěpné poměry mění a je u něj 50% šance narození dítěte, které je nositelem mutace a 50% šance, že dítě bude taky trpět CF¹.



Obr. 1.1: Schéma dědičnosti mutace *CFTR* genu. Obrázek byl převzat a upraven¹.

CF jako chronické dědičné onemocnění způsobené mutacemi genu *CFTR* postihuje celosvětově přibližně 70 000 až 100 000 lidí, přičemž jedno z 2 500 až 4 000 narozených dětí je pacientem s CF. V současné době žije v České republice přes 700 pacientů s nejběžnější formou CF². Nejčastěji postihuje CF jedince indoevropského původu. Z důvodu mnohonásobně se zvyšujícího průměrného věku dožití pacientů s CF se však počet těchto pacientů každým rokem zvyšuje³.

Mutace genu *CFTR* vede k poškozenému nebo dokonce nefunkčnímu proteinu CFTR, který má v organismu mnoho funkcí, a jeho poškození proto vede ke značnému množství zdravotních komplikací, počínajících primárně respiračními těžkostmi způsobenými narušeným transportem chloridových a sodných, ale i hydrogenuhličitanových iontů⁴. Nejzásadnějším důsledkem mutace *CFTR* genu je náchylnost pacientů k infekcím způsobeným bakteriemi jako jsou *Pseudomonas aeruginosa* (PA) nebo *Burkholderia cepacia* komplex, které ve většině případů pro zdravé jedince nepředstavují zdravotní riziko, ale pro tyto pacienty jsou život ohrožující^{5,6}.

1.1.2 Gen pro CFTR protein

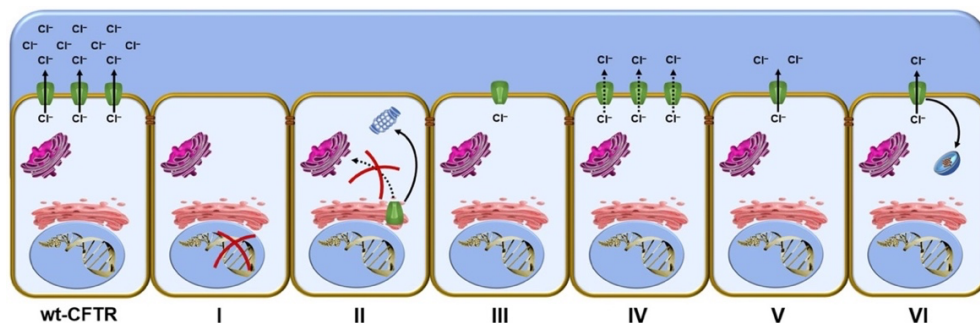
I když byla CF jako onemocnění objevena a pojmenována již v roce 1938 lékařkou Dorothy Hansine Andersen, která měla zásadní vliv na studium a pochopení této nemoci, její příčina, kterou je mutace genu pro CFTR protein, byla objevena až v roce 1989 týmem, na jejímž čele byly genetičky Batsheva Kerem a Johanna Rommens. V roce 1989 byla nalezena i nejčastější mutace *CFTR* genu, F508del^{7,8,9}.

Gen pro CFTR protein se nachází v oblasti 7q31.2 na dlouhém raménku chromosomu 7. Jedná se o úsek delší než 230 kb, ze kterého se exprimuje glykoprotein složený z 1 480 aminokyselin, jehož součástí je 27 exonů. Po expresi a úplné glykosylaci dochází k přenosu tohoto proteinu na apikální membránu epitelálních buněk mnoha orgánů⁹.

Výše zmíněná F508del mutace *CFTR* genu způsobuje, že v pozici 508 v CFTR proteinu chybí fenylalanin, protože v genu dojde k vynechání 3 párů bází⁹. Jedná se o nejčastější mutaci *CFTR* genu a jejím nositelem je přibližně 85 % pacientů indoevropského původu trpících CF. V dnešní době známe více než 2 100 variant tohoto genu, ale ne všechny varianty jsou příčinou vzniku CF. Z tohoto celkového počtu asi 2 100 mutací *CFTR* genu jen přibližně 380 způsobuje CF^{10,11}.

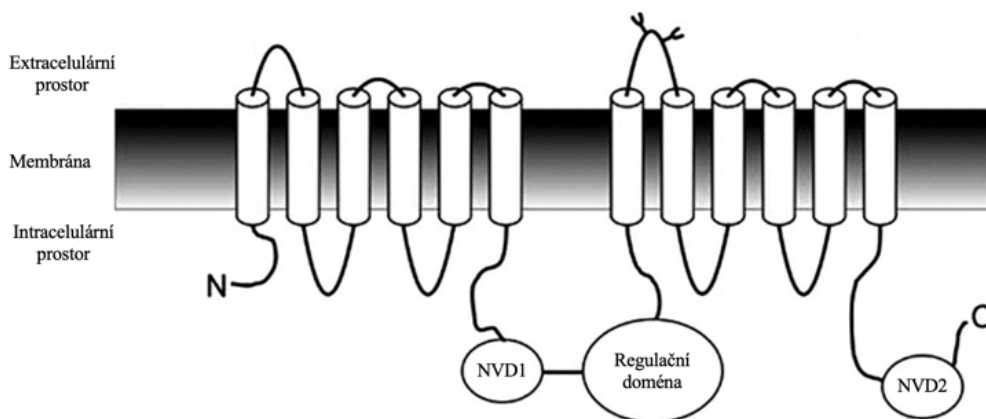
Mutace genu *CFTR* se rozdělují do šesti hlavních tříd (obr. 1.2, str. 12), přičemž nejzávažnější jsou mutace ze tříd I–III; někdy se přidává i třída VII způsobující ztrátu funkce dalších, nechloridových iontových kanálů¹²:

- **Třída I:** v důsledku předčasného STOP kodonu nedochází k translaci celého *CFTR* genu a nedochází tedy k biosyntéze *CFTR* proteinu
- **Třída II:** mutace vede k nesprávnému sbalení (abnormální posttranslační glykosylaci) proteinu a nefunkční protein je následně degradován v endoplasmatickém retikulu
- **Třída III:** *CFTR* protein je sice přítomen na apikální membráně buňky, ale v důsledku slabé vazby ATP není schopen plnit funkci chloridového kanálu
- **Třída IV:** v důsledku mutace nedochází ke snížení množství chloridových kanálů na povrchu buněk, ale dochází ke snížení jejich vodivosti
- **Třída V:** na rozdíl od mutací ze třídy IV dochází substitucí aminokyseliny nebo alternativním sestřihem k redukované syntéze chloridových kanálů a následkem toho ke snížení jejich množství na povrchu buněk, čímž dojde ke snížení intracelulárního transportu chloridových iontů
- **Třída VI:** mutace třídy VI způsobují nižší stabilitu vzniklého proteinu, což často vede k jeho degradaci v lysosomech¹²



Obr. 1.2: Rozdělení mutací *CFTR* genu do tříd I–VI. Obrázek byl převzat a upraven¹².

Protein *CFTR* se řadí mezi transportéry ABC superrodiny (z angl. „ATP-binding cassette“, ATP vázající). Jeho strukturu (obr. 1.3, str. 13) tvoří 2 komplexy spojené R-doménou, přičemž oba jsou složeny z transmembránové domény (TMD) a domény vázající nukleotid (NVD), takže celkově je složen z 5 domén. Obě TMD obsahují 6 transmembránových segmentů a tvoří kanál, kterého otevírání je regulováno fosforylací R-domény proteinkinasou A a vazbou ATP na NVD, což vede k dimerizaci NVD domén¹².



Obr. 1.3: Schéma proteinu CFTR. Protein CFTR je složen ze 2 komplexů spojených R-doménou. Oba komplexy jsou tvořené 2 NVD a 2 TMD sestávajícími ze 6 transmembránových helixů. Obrázek byl převzat a upraven¹³.

Na základě strukturní analýzy genu pro CFTR protein z roku 1989 bylo zjištěno, že tento protein funguje jako chloridový kanál a současně byly předpovězeny jeho další funkce. To vedlo k závěru, že právě mutace genu pro CFTR protein je zodpovědná za CF a došlo k průlomů ve studiu této nemoci a nové naději pro pacienty s CF⁹. V posledních desetiletích byly objevené mnohé funkce CFTR proteinu, což vysvětluje komplexnost daného onemocnění, pokud dojde k poškození nebo nefunkčnosti tohoto proteinu. CFTR protein plní nejenom roli chloridového kanálu, ale souvisí taky s transportem dalších iontů, jako je hydrogenuhličitanový aniont (HCO_3^-) nebo sodný kationt (Na^+). Tento protein se také dává do souvislosti s oxidačním stresem, tedy s glutathionem a thiokyanátovým aniontem, s metabolismem lipidů, mukociliární clearance a imunitním systémem. Jeho funkce jsou více diskutovány v kapitole 1.1.3⁴.

1.1.3 Patogenese plic

Povrchová plicní kapalina (z angl. „airway surface liquid“, ASL), pokrývající buňky plicního epitelu, je složena ze dvou vrstev. Přímo nad plicním epitelem se nachází první vrstva povrchové plicní kapaliny, kterou je meziřasinková kapalina (z angl. „periciliary liquid“, PCL) a nad ní je druhá, hlenová vrstva (z angl. „mucus layer“, ML). Obě vrstvy povrchové plicní kapaliny jsou nezbytné pro správnou funkci plic a pohyb řasinek nacházejících se v plicích. PCL musí mít na rozdíl od ML konstantní složení, konstantní objem, a tedy i konstantní výšku odpovídající délce řasinek (7–10 μm). PCL je tvořena

především vodou a malou část tvoří soli, lipidy, bílkoviny a hlen. PCL je mnohem řidší než ML a řasinky jsou proto schopny se v ní pohybovat. Hlen je kromě vody a malého množství solí, lipidů a proteinů tvořen hlavně vysoce glykosylovanými muciny. ML může podle potřeby zadržovat kapalinu, a tedy hydratovat nebo dehydratovat PCL. Tím udržuje konstantní výšku PCL, čímž udržuje i správnou funkci řasinek. Obecně je však výška ML větší než výška PCL, většinou se pohybuje kolem 10–50 μm ^{14,15,16}.

Následkem poruchy CFTR kanálu je i porucha sodíkového kanálu ENaC závislého na CFTR kanálu. Za fyziologického stavu CFTR kanál reguluje sekreci chloridových iontů a tyto chloridové ionty pak způsobí pohyb sodných iontů, aby byla zachována elektroneutralita prostředí. Pokud však CFTR kanál nefunguje správně, tak chloridové ionty nejsou sekretovány, a tedy dochází k inhibici ENaC kanálu. Sodné ionty nemusí být transportovány pro zachování elektroneutrálního prostředí. Tento narušený transport iontů způsobuje osmotickou změnu prostředí, kvůli které voda opouští ASL a dochází ke snížení objemu a výšky PCL. Postupná dehydratace PCL může vést až k její vyčerpání, čehož důsledkem může být omezení nebo přímo zabránění pohybu řasinek nacházejících se v příliš hustém prostředí hlenu. Právě omezený či znemožněný pohyb řasinek je zodpovědný za akumulaci hlenu v plicích¹⁷.

Hlavním problémem onemocnění dýchacích cest u pacientů s CF jsou nečistoty a patogeny zachycované hlenem, které díky jeho akumulaci v plicích získávají vhodné podmínky pro své množení¹⁸. Patogeny se následně chrání před hypoxií a buňkami imunitního systému tvorbou alginátového biofilmu¹⁹. Buňky imunitního systému, zejména neutrofilů a jejich antimikrobiální látky tak nemají problém jenom s průchodem přes hustý, velice viskózní hlen, ale také s průchodem přes alginátový biofilm²⁰. Výsledkem je zánět, který se u pacientů s CF objevuje opakovaně a s vysokou četností. Vzniklý zánět má u pacientů s CF značnou souvislost s neadekvátním množstvím imunitních buněk, zejména neutrofilů, v jejich dýchací soustavě²¹. Neutrofilní proteasy (např. neutrofilní elastasa), ve velké míře uvolňované neutrofilů při zánětu, pak nadále ovlivňují aktivitu sodíkového kanálu, a tím i dehydrataci ASL výše zmíněným mechanismem. Vedle toho může vysoké množství neutrofilních proteas způsobovat také značné poškození plic (viz. 1.1.6)^{22–24}. Důsledkem zvýšené tvorby mucinů, hlavní složky ASL, a dalšího zahušťování hlenu je dále zhoršená mukociliární clearance, tedy vykašlávání nebo polykání hlenu obsahujícího nečistoty a patogenní mikroorganismy²⁴.

S rostoucím množstvím akumulovaného hlenu sice klesá hladina kyslíku, ale jak již bylo zmíněno, pro pacienty s CF jsou nejnebezpečnější bakterie PA a *Burkholderia cepacia* komplex, které se řadí mezi oportunní patogeny. Pro jejich přežití a množení tedy nepředstavuje problém ani snížené množství či absence kyslíku, protože se anaerobním podmínkám dokážou přizpůsobit, a tudíž mohou, na rozdíl od mnoha jiných patogenů, způsobovat chronickou infekci i v nepřítomnosti kyslíku¹⁹.

Opakované záněty pak mohou vést až k poškození plic nejen již zmíněnými proteasami, ale i reaktivními formami kyslíku vznikajícími v důsledku obrovského množství zánětlivých buněk nebo nerovnováhou oxidantů a antioxidantů^{14,22,23,25}.

Jak již bylo řečeno, porucha CFTR kanálu snižuje kromě sekrece chloridových iontů i sekreci HCO_3^- . Snížená sekrece HCO_3^- vede k nižšímu pH povrchové plicní kapaliny, které má za následek sníženou antimikrobiální ochranu dýchacích cest, zvýšení viskozity ASL a současně i ovlivnění aktivity enzymů (např. sialyltransferas)^{26,27}.

1.1.3.1 Odlišná glykosylace mucinů dýchacích cest u osob s cystickou fibrózou

Složením pestré prostředí dýchacích cest obsahuje jako jednu z hlavních složek hlen, jehož základ tvoří muciny. Muciny jakožto velké glykoproteinové komplexy s molekulovou hmotností pohybující se v MDa mohou být v plicích sekretovány pohárkovými buňkami nebo podslizničními žlázami^{28,29}.

Sekretované i membránově-vázané muciny jsou nepostradatelné pro správnou funkci hlenu. Oba typy mucinů mají podobnou strukturu tvořenou aminokyselinovým řetězcem s opakujícími se úseky s vysokým obsahem serinu a threoninu, na které se většinou prostřednictvím *N*-acetyl-D-galaktosaminového zbytku *O*-glykosidicky vážou glykany, jako např. fukosa, galaktosa nebo *N*-acetylglukosamin. Na konci glykanů bývají pak ještě navázané sialové kyseliny nebo sulfátové skupiny^{30,31}. Mucinové monomery se spojují do dimerů a následně polymerů disulfidovými můstky, které spolu s hydratační kapacitou a nekovalentními interakcemi udávají viskoelastické vlastnosti hlenu³².

Rozdíly ve složení hlenu jedinců trpících CF byly pozorovány již před téměř 60 lety. I přesto, že příčina CF byla objevena až v roce 1989, tak na pokles sodných a chloridových iontů v sekretech, respektive na jejich nárůst v potu pacientů s CF, bylo poukázáno již v roce 1963. Tato změna v koncentraci iontů byla ve stejné práci spojována se zánětem a infekcí, a stejně tak bylo naznačeno spojení mezi nízkou koncentrací daných iontů

v plicních sekretech a jejich vysokou koncentrací v potu pacientů. Tato převratná práce vedla dále k důležitému poznání rozdílů v glykosylaci mucinů u zdravých jedinců a také u jedinců s CF. Jak bylo zmíněno výše, hlen zdravých osob je vůči hlenu nemocných s CF mnohem řidší, navíc je tvořen mnohem menším množstvím DNA, lipidů, proteinů a glykanů, které výrazným způsobem zvyšují viskozitu hlenu^{8,33}.

Rozdílná glykosylace byla pozorována nejen mezi muciny zdravých osob a nemocných s CF, ale také mezi sekretovanými a membránově-vázanými muciny. U obou typů mucinů bylo pozorováno celkové snížení glykosylace^{33,34}. Sekretované muciny, jako jsou MUC5AC a MUC5B, vykazují vyšší sialylaci a nižší sulfataci a fukosylaci v porovnání se zdravými jedinci, i když glykany vykazují nejen vyšší sialylaci, ale také vyšší sulfataci^{35,36}. Rozdílnou glykosylaci sekretovaných mucinů a mucinů vázaných na membránu dýchacích cest pacientů s CF zřejmě způsobují rozdílné regulační mechanismy¹⁵. Rozdíly spočívají především v nižší sialylaci a vyšší fukosylaci glykoproteinů membránově-vázaných mucinů, ale také v nižší fukosylaci glykolipidů a vyšším množství asialových glykolipidů, respektive značně zvýšeném poměru asialoGM1 ku sialoGM1. Nižší sialylace mucinů, která je spojována s nižší aktivitou sialyltransferas propojuje defekt CFTR proteinu s patogenezi plic u těchto pacientů^{5,37}. Pro rozdílnost v glykosylaci mucinů však existuje několik možných hypotéz. Některé se zaměřují na změnu pH trans-Golgiho sítě a následné ovlivnění aktivity glykosyltransferas³⁷, jiné na původ mucinů³⁸ a jiné na souvislost se zánětem^{15,39}.

Převládajícím patogenem u pacientů s CF je PA. Jedním z důvodů tohoto stavu je zřejmě zvýšená afinita PA k mucinům s pozměněnou glykosylací, kterou umožňují různé bakteriální proteiny vázající glykany. Glykokonjugáty se sníženou sialylací a zvýšenou fukosylací se chovají jako adhezenční receptory pro bakteriální patogeny, jako je právě PA. PA se pak naváže na receptory asialoGM1 a postupně se začne proces tvorby biofilmu a následného zánětu^{5,6}.

1.1.4 Příznaky onemocnění

I když je CF genetické, velice závažné a komplexní onemocnění, nedochází u každého pacienta k projevům nemoci ihned po narození. V dnešní době se proto v České republice provádí novorozenecký „screening“, v rámci kterého se testuje i CF, a měl by

tak být zachycen i novorozenecký pacient bez příznaků tohoto onemocnění. Při podezření na CF dochází k okamžité terapii. Včasné zachycení a prevence je u CF velice důležité, protože pacienti s CF, s jejichž léčbou se nezačne dostatečně včas, se často dožívají jen velice nízkého věku. Průměrný věk pacientů s CF se díky moderní medicíně každým rokem zvyšuje a kvalita jejich života je z důvodu výrazného tlumení příznaků mnohem vyšší, než byla v minulosti⁴⁰.

Komplexnost CF dokazují velice různorodé příznaky. CF postihuje především respirační trakt, gastrointestinální trakt a reprodukční soustavu, ale nelze opomenout ani potní žlázy. Všechny tyto patologické projevy jsou následkem nefunkčního nebo poškozeného genu, na základě něhož je exprimován CFTR protein⁴⁰.

Typickými vnějšími projevy CF jsou paličkovité prsty a soudkovitý hrudník. Hromadění hlenu v plicích, zachytávání patogenů, jejich množení a následné opakované akutní i chronické infekce a záněty vedou k množství obtíží spojených s dýchací soustavou. Hustý hlen a ztížený nebo znemožněný pohyb řasinek způsobuje, jak již bylo zmíněno výše, nedostatečné vykašlávání hlenu a pacienti mají proto neustálou potřebu zbavit se tohoto nahromaděného hlenu. To má za následek chronický kašel, který může časem vést až k hemoptýze, tedy k vykašlávání krve. Pacienti s CF neřídka trpí, zřejmě i z důvodu nepohyblivosti řasinek, nosními polypy, což způsobuje ztížené dýchání a dušnost. Pacienti s nosními polypy musí kvůli omezenému dýchání nosem často dýchat ústy a neustále pootevřená ústa pak vedou k většímu vdechování patogenů a dalším infekcím, čímž se koloběh progresu nemoci uzavírá⁴⁰.

U zdravých jedinců se na konci jícnu nachází dolní jícnový svěrač, který se pevně sevře a nedovolí návrat přijaté potravy do ústní dutiny. V důsledku silného kašle však u značného procenta pacientů s CF dochází ke zvýšení nitrobřišního tlaku a následně ke gastroezofageálnímu refluxu. Znamená to, že dolní jícnový svěrač není dostatečně sevřený a v důsledku toho může docházet k navrácení potravy nebo žaludečních šťáv ze žaludku zpátky do jícnu nebo ústní dutiny. Při častém navrácení potravy nebo kyselých žaludečních šťáv do jícnu může dojít až k poškození stěny jícnu. U pacientů s CF se neřídka objevují bolesti břicha související nejen s refluxem. Hustý hlen objevující se nejen v plicích způsobuje nedostatek trávicích enzymů ve střevě. I pokud není narušená syntéza těchto enzymů v pankreatu, enzymy nejsou schopny kvůli hustému hlenu projít z pankreatu do střeva a nedochází proto k dostatečnému natrávení potravy.

Pokud se už enzymy do střeva dostanou, objevuje se problém s jejich nedostatečnou funkcí, což je následkem nesprávné sekrece HCO_3^- iontů. Nestrávená potrava způsobuje nedostatečné vstřebávání živin a hnilobné a kvasné procesy rozkládající nestrávenou potravu nadýmání a zvětšené břicho. Největší problém u pacientů s CF je trávení tuků, protože střevní sliznice není schopná produkovat enzymy rozkládající tuky na rozdíl od enzymů štěpících bílkoviny a sacharidy. Rozklad bílkovin a sacharidů tímto způsobem sice nedokáže plně nahradit správnou funkci trávicího traktu, hlavně pankreatických enzymů, ale díky nim nejsou následky pankreatické insuficience v souvislosti s proteiny a sacharidy tak závažné, jako je tomu v případě tuků.

Nedokonalé trávení bílkovin se projevuje nedostatečným množstvím majoritního krevního proteinu, albuminu, a tedy otoky souvisejícími s nesprávnou regulací objemu vody v krevním řečišti zmíněným albuminem. Nedokonalé trávení sacharidů se projevuje hlavně obtěžujícím nadýmáním.

Problémy s trávením tuků mají však mnohem dalekosáhlejší následky. Lipidy jsou z organismu vylučovány v téměř nezměněné formě a dochází tak k problému s resorpcí vitaminů rozpustných v tucích vedoucích k hypovitaminóze až avitaminóze. Vyloučené lipidy jsou pozorovatelné ve formě mastných kapiček na objemné stolici, jejíž hustý a mastný obsah může před vyloučením dokonce ucpat střevo pacienta. Mekoniový ileus u novorozence je proto první známkou CF. Při vylučování tak obrovského množství lipidů se z organismu současně ztrácí energie, která by měla být použita pro růst a přibývání na váze. Pokud děti s CF nepřijímají potravní doplňky, objevuje se u nich často nízký vzrůst a celkově neprospívají. Hlavně u pacientů, které netrápí pankreatická insuficience se opakovaně objevují pankreatitidy. V některých případech nedochází u pacientů s CF jen k zahuštění hlenu, ale také žluči a tvoří se žlučové kameny, případně dochází i k poruše jater, která může vést až k cirhóze jater. Čím jsou nemocní s CF starší, tím je vyšší pravděpodobnost, že se u nich objeví cukrovka vázaná na CF související s poškozením slinivky břišní, konkrétně β -buněk, které za normálních okolností syntetizují inzulín⁴⁰.

Reprodukční soustava mužských pacientů je cystickou fibrózou zasažena mnohem více než je tomu u žen. U mužů není problém ani se sexuálními schopnostmi, ani s tvorbou a pohyblivostí spermií. U 98 % mužů však dochází k neplodnosti, protože spermie ve většině případů nejsou schopny dostat se do ejakulátu. Většina mužů s CF není

schopna přirozenou cestou oplodnit ženská vajíčka. Ale po umělém odebrání spermií a oplodnění vajíčka nebývá s otěhotněním problém. U žen s CF je neplodnost často způsobena hlavně viskózním hlenem, přes který spermie nejsou schopny proniknout a oplodnit vajíčko. K problémům s neplodností u ženských pacientek dochází mnohem méně než u mužů s CF, ale objevují se u nich cysty na děložním čípku nebo vaječnicích⁴⁰.

Nemocní s CF potem často ztrácí velké množství soli. Pokud se pacient s CF nadměrně potí, například při vysokých vnějších teplotách, ztrácí velké množství soli a může tak upadnout do šoku způsobeného hyponatremií. Důvody ztráty soli a případné hyponatremie byly popsány v předchozí kapitole (1.1.3)⁴⁰.

Výjimkou u pacientů s CF nejsou ani problémy spojené s opornou soustavou, jako jsou osteoporóza a artritida. Ve většině případů souvisí s nedostatkem v tucích rozpustného vitamínu D⁴⁰.

1.1.5 Diagnostika

Pokud se CF objevila v blízké nebo širší rodině, může těhotná pacientka podstoupit prenatalní diagnostiku. CF je ale většinou diagnostikována až po porodu, a to především v rámci novorozeneckého „screeningu“. Po narození dítěte se CF může diagnostikovat také na základě klinických příznaků uvedených v kapitole 1.1.4 nebo tzv. „kiss your baby“ testem, při kterém si matka dítěte při jeho políbení uvědomí extrémní slanost potu miminka. Při podezření na CF se ještě molekulárně-genetickým vyšetřením zjišťuje přítomnost mutace *CFTR* genu pro potvrzení nebo vyvrácení nemoci.

Pokud je těhotná pacientka či její partner nositelem mutace *CFTR* genu, přímo trpí CF nebo se CF vyskytuje v jejich rodině, je vhodné podstoupit **prenatální diagnostiku** spočívající v hledání mutace *CFTR* genu molekulárně-genetickým vyšetřením. Na rozdíl od postnatálního molekulárně-genetického vyšetření se místo DNA z leukocytů analyzují buňky plodu získané biopsií choria od 13. týdne těhotenství nebo amniocentézou z plodové vody od 17. týdne těhotenství. Na CF může poukazovat také zvýšená echogenita v břišní dutině plodu mezi 17.–20. týdnem těhotenství, která je známkou abnormálně vazkého mekonia. Při potvrzení CF nebo při podezření na tuto nemoc mají rodiče ještě několik týdnů na rozhodnutí přerušit těhotenství. Tento zákrok lze provést až do 24. týdne těhotenství⁴¹.

Z důvodu narůstajícího počtu pacientů s CF a nutné včasné diagnostiky se toto onemocnění už i v České republice testuje v rámci tzv. **novorozeneckého „screeningu“**. Po 48–72 hodinách se novorozenci z patičky odebere kapilární krev a otestuje se na 18 nemocí. Otestování CF, která je jednou z těchto 18 onemocnění spočívá ve stanovení koncentrace imunoreaktivního trypsinogenu ze suché kapky krve na filtračním papírku. Imunoreaktivní trypsinogen je produktem pankreatu a jeho zvýšená koncentrace s velkou pravděpodobností znamená prokázání CF. Při pozitivním výsledku tohoto testu dochází k okamžitému zahájení preventivní péče o miminko a k provedení potního testu nebo molekulárně-genetického vyšetření⁴².

Laboratorní vyšetření je založeno na potním testu, již zmíněném molekulárně-genetickém vyšetření nebo na určení transepiteliálního rozdílu potenciálů.

- **Potní test** je krátké a bezbolestní ambulantní vyšetření, které by nemělo být prováděno v prvních dvou dnech po narození dítěte⁴³. Toto vyšetření, které poprvé zavedli Gibson a Cooke v roce 1959 je prováděno postupně ve třech fázích. Nejdříve dochází k stimulaci pocení pilokarpinovou iontoforézou, následně je pot sbírán na filtrační papír, a nakonec analyzován pomocí coulometrické titrace a chloridometru⁴⁴. Alternativní metodou pro sběr potu je systém Macroduct vyvinutý v roce 1983, který nesbírá pot na filtrační papír, ale do kapiláry. Pro úspěšnou analýzu koncentrace chloridů v potu je nutné při použití filtračního papírku sesbírat minimálně 75 miligramů potu a při použití kapiláry minimálně 15 mililitrů potu. Interpretace výsledků se v literatuře mírně liší, ale obecně je koncentrace chloridů v potu menší než 30 mmol/l potu považována za normální koncentraci značící nepravděpodobnost výskytu CF. Naopak, pokud koncentrace chloridů přesáhne 60 mmol/l, je výskyt CF pravděpodobný a potvrzení diagnózy vyžaduje provedení molekulárně-genetického vyšetření. Rozmezí koncentrací 30–60 mmol/l je považováno za hraniční. Při hraniční koncentraci chloridů není možné potvrzení ani vyvrácení CF a je proto nutné buď zopakovat potní test nebo provést molekulárně-genetické vyšetření stejně, jako při vysoké koncentraci chloridů, protože hraniční koncentrace se poměrně často vyskytují u atypických forem CF⁴³.
- **Molekulárně-genetické vyšetření** se neprovádí jenom při potřebě potvrzení nebo vyvrácení daného onemocnění po provedení potního testu s hraniční

či vysokou koncentraci chloridů nebo při objevu klinických příznaků, ale provádí se také u poměrně široké skupiny rodinných příslušníků potenciálního pacienta s CF. Provedení molekulárně-genetického vyšetření je časté i u dospělých pacientů s CF, kteří se svými partnery plánují těhotenství. Na základě výsledků vyšetření je možné podstoupit umělé oplodnění jen s buňkami bez mutace *CFTR* genu, díky čemuž by nemělo dojít k přenosu mutace daného genu na budoucího potomka. Pokud nebylo toto vyšetření provedeno před plánovaným těhotenstvím, je možné ho podstoupit v rámci výše zmíněné prenatální diagnostiky. Pokud se nejedná o prenatální diagnostiku, tak je metodou polymerasové řetězové reakce analyzována DNA leukocytů po jejich izolaci z krve odebrané ze žíly pacienta. Analýzou dané DNA se hledají alely *CFTR* genu. Pokud není nalezena žádná mutovaná alela tohoto genu, stále není možné CF úplně vyloučit, protože může být způsobena nějakou vzácnější mutací genu. Při nalezení jedné mutované alely a objevu klinických příznaků je onemocnění vysoce pravděpodobné. Při nálezů obou mutovaných alel daného genu se vyšetření považuje za pozitivní a pacient trpí CF⁴¹.

- **Transepiteliální rozdíl potenciálů** mezi měřicí a referenční elektrodou se měří po podání amiloridu a isopreterenolu. Měřicí elektroda se většinou nachází na nosní nebo rektální sliznici a referenční elektroda bývá umístěna v podkoží paže. Výsledkem narušeného aktivního transportu chloridových a sodných iontů u pacientů s CF je pokles hodnoty rozdílu potenciálů oproti zdravým jedincům. Tato metoda je známá již několik desítek let, ale stále není šířeji používána.

1.1.6 Léčba

V současné době existuje několik možností pro léčbu CF. Momentálně je jako jediná používána symptomatická léčba nebo léčba pomocí modulátorů proteinu CFTR. Další potenciální variantou do budoucna je profylaktická léčba bránící kolonizaci organismu pacienta bakteriemi PA či *Burkholderia cepacia* komplex, na kterou je zaměřena i tato bakalářská práce, nebo vakcinace. Třetí, do budoucna velice perspektivní variantou, je genová terapie, která by jako jediná měla být schopná odstranit nejen příznaky, ale i příčinu nemoci opravením poškozeného genu pro CFTR protein. Poslední možností je

transplantace plic, ke které dochází až v konečném stadiu onemocnění, kdy již pacientovi nezbývá žádná další varianta pro zlepšení jeho zdravotního stavu a zbývá mu jen několik měsíců života⁴⁵.

1.1.6.1 Symptomatická léčba cystické fibrózy

Symptomatická léčba je velice komplexní, dlouhodobá a soustřeďuje se na několik hlavních problémů CF pacientů. Zaměřuje se nejen na nejproblematičtější dýchací a trávicí obtíže, ale i na problémy způsobené nadměrným pocením, a tedy ztrátou solí.

Hlavním nástrojem pro boj s bakteriemi PA nebo *Burkholderia cepacia* komplex u pacientů s CF je stále antibiotická léčba. Přestože máme proti těmto bakteriím několik účinných antibiotik, je nutné hledat a aplikovat i jiné formy léčby. Hlavním důvodem je rostoucí rezistence na různé typy antibiotik a s tím související opakované záněty u těchto pacientů⁴⁶.

Pokud však pacient s CF aktuálně netrpí bakteriální nebo virovou infekcí, hlavním cílem symptomatické léčby je zbavení se hustého hlenu způsobujícího množení bakterií a zánětlivé procesy. Pacienti s CF pravidelně podstupují fyzioterapii a pro uvolnění hustého hlenu z plic používají také vibrační vestu⁴⁷. Inhalace hypertonického roztoku soli je pro pacienty s CF důležitá hned z dvojího důvodu. Nejenže doplňuje sodné a chloridové ionty, které pacient ztrácí nadměrným vylučováním potu, ale také rozpouští hustý hlen v plicích⁴⁸.

Mezi modulátory CFTR proteinu se řadí tzv. korektory a potenciátory. První skupina, korektory, jsou látky, které přímo interagují s daným proteinem a mají vliv na jeho správné složení a přesun na membránu. Jako první byl použit lumacaftor, který se začal aplikovat v kombinaci s potenciátorem ivacaftorem, přičemž úlohou potenciátorů je ovlivnění průtoku iontů iontovými kanály^{49,50}. Tyto dvě látky úspěšně odstartovaly rozvoj modulátorů CFTR proteinu, díky čemuž byly objeveny další látky a jejich úspěšné dvojkombinace nebo třikombinace, které v léčbě CF představují velký posun vpřed.

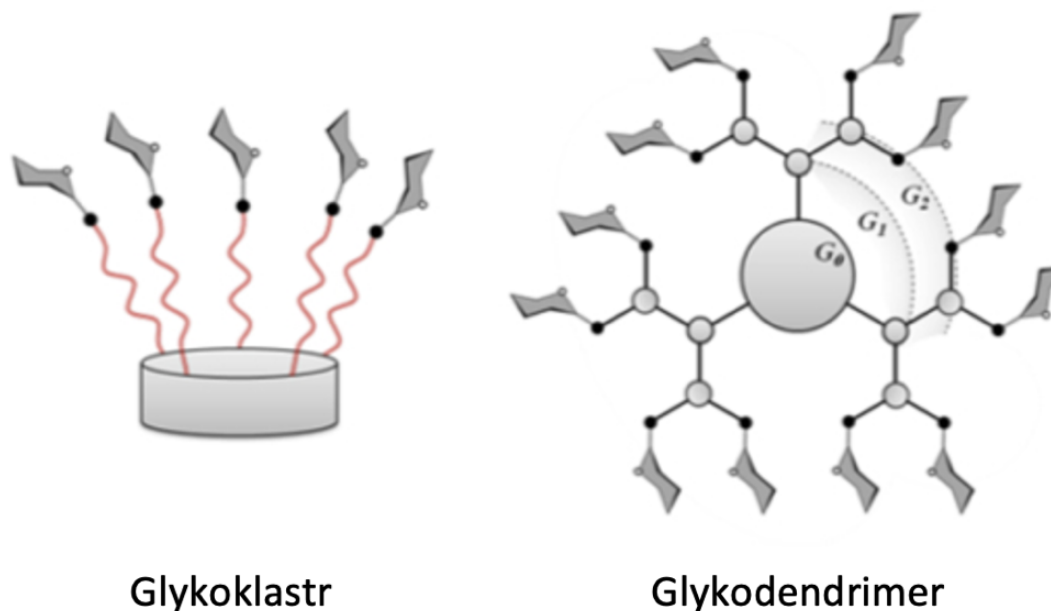
1.1.6.2 Profylaktická léčba

Syntetické glykokonjugáty:

V posledních letech se významně posunul vývoj látek označovaných jako syntetické glykokonjugáty. Do této skupiny látek se řadí různé glykosylované struktury, např.

glykoklastry nebo glykodendrimery. Schematické znázornění jejich struktur je na obr. 1.4 (str. 23). Použití těchto látek v terapii bakteriálních nemocí je do budoucna velice perspektivní, protože jejich syntetický původ umožňuje přípravu různých variant potřebné sloučeniny a jejich získání není závislé na živých organismech (jako je tomu např. u slepičích protilátek) a jejich individuálním imunitním systémem. Předpokládá se, že by v případě léčby CF bylo možno pomocí glykoklastrů zamezit navázání bakterií PA nebo *Burkholderia cepacia* komplex na plicní buňky s pozměněnou glykosylací. V současné době se řada laboratoří zaměřuje na syntézu multivalentních glykoklastrů, což jsou sloučeniny obsahující ve své struktuře několik identických vazných míst. Multivalencí těchto sloučenin lze totiž dosáhnout značné zvýšení afinity sacharidových struktur glykoklastrů k bakteriálním lektinům a také zvýšení selektivity^{51,52}.

Jako centrální molekula glykoklastrů může být použita například rozvětvená aromatická nebo alifatická sloučenina, kalixaren či porfyrin. Tento základní skelet neobsahuje opakující se jednotky a pomocí ramen jsou na něj navázány sacharidové jednotky⁵³. V této práci jsou pro ovlivnění adherence bakteriálních buněk na plicní epitelální buňky použity trivalentní glykoklastry, které mají na ramenech připojené molekuly fukosy.



Obr. 1.4: Schematické znázornění struktury multivalentních glykokonjugátů – glykoklastru a glykodendrimeru. Obrázek byl převzat a upraven⁵⁴.

Slepičí protilátky:

Použití slepičích protilátek neboli vakcinace pro boj s hlavními bakteriálními patogeny CF pacientů je do budoucna jednou z nejperspektivnějších alternativ léčby CF. Aktivní nebo pasivní imunizace by v budoucnu mohla zachránit množství pacientů trpících CF. Je obecně známo, že rezistence na antibiotika se stává pořád větším celosvětovým problémem a pro pacienty s CF je tato rezistence přímo život ohrožující.

Náhrada savčích protilátek slepičími IgY by mohla přinést množství výhod. Jedná se sice o strukturní analog savčích IgG, ale jejich získání je mnohem jednodušší a časově i finančně mnohem méně náročný. Savčí protilátky je nutné získávat odběrem krve zvířete, což je značně invazivní technika, která je pro dané zvíře velice stresující. Slepičí protilátky jsou však uvolňovány do vaječných žloutků v poměrně velkém množství a k jejich získání tedy stačí sesbírat vejce imunizovaných slepic, což je možné dělat velice pravidelně a v poměrně krátkém časovém úseku tak lze získat velká kvanta těchto protilátek^{55,56}. Dalším, velice důležitým faktem je, že slepičí imunoglobuliny neaktivují komplementový systém a nespouští tedy zánětlivou reakci lidského organismu⁵⁷.

V posledních letech se na studium profylaktického účinku slepičích IgY kladl poměrně velký důraz. Úspěch již zaznamenaly nejen laboratorní, ale také klinické zkoušky⁵⁸.

1.1.6.3 Genová terapie

Genová terapie je brzděna množstvím problémů, včetně problémů etických, kvůli kterým je její využití prozatím značně omezené. Jak již bylo zmíněno, CF je genově podmíněné onemocnění, a proto je genová terapie jedinou možností, jak vyléčit příčinu tohoto velice komplexního onemocnění, mutaci v genu pro CFTR protein. Pro opravu mutovaného genu je nutné změnit genetickou informaci zapsanou v genomu buňky nebo vpravit do buňky novou genetickou informaci, ať již ve formě DNA nebo mRNA.

S přepisem genetické informace se pojí značné etické problémy, poněvadž tuto změnu by bylo nutné dělat již v zárodečné buňce. I přesto dnes známe několik způsobů přepisu genetické informace. Aktuálně nejznámější a dobře aplikovatelná je metoda CRISPR-Cas9, za kterou byla v roce 2020 udělena Nobelova cena dvěma vědkyním, Jennifer Anne Doudna a Emmanuelle Marie Charpentier. Jejich spolupráce vedla od objevu nové bakteriální molekuly zvané tracrRNA, který uskutečnila v roce 2011 Emmanuelle Charpentier až k vývoji podobného systému nukleas, které jsou schopny

štěpit na přesně definovaném místě, ve kterém je nutné pozměnit konkrétní gen^{59,60}. Další variantou je použití metody ZNF-HDR (z angl. zinc-finger nuklease homology directed repair“) nebo TALEN (z angl. transcription activator-like effector nuclease)^{61,62}.

DNA je možné do buňky vpravit pomocí virového nebo nevirového vektoru. Jako virový vektor lze použít např. adenoviry nebo adenoasociované viry^{63,64}. Největším problémem při použití virových vektorů je imunitní odpověď organismu na přítomnost viru a možný zánět. Jako nevirový vektor lze použít např. liposomy⁶⁵. Při použití nevirových vektorů není imunitní odpověď tak běžná, ale efektivita transfekce je mnohem nižší. Při vpravení mRNA do buňky nejsou vedlejší účinky tak výrazné a není třeba dopravit mRNA až do jádra, poněvadž translace probíhá v cytoplasmě. Hlavní nevýhodou je ale nutnost opakovaného vpravení mRNA do buňky^{66,67}.

1.2 Imunitní systém

V průběhu evoluce se vyvinuly dva imunitní systémy. Prvním z nich je vrozený neboli neadaptivní imunitní systém. Později se začala vyvíjet získaná neboli adaptivní imunita. Oba systémy jsou sice tvořeny buněčnou i humorální složkou, ale mezi sebou se značně liší. Pro ochranu organismu jsou však oba nesmírně důležité.

1.2.1 Vrozený imunitní systém

Vrozená imunita je nespecifická vůči antigenu a nemá imunologickou paměť. Fyzické bariéry, jako např. epitel kůže nebo hlen se s patogenem setkávají jako první. Až když patogen překoná fyzickou bariéru, začíná čelit bariérám chemickým, jako je nízké pH v některých částech organismu nebo přítomnost lysosymu. Pro boj s patogenem jsou nesmírně důležité také aktivní antimikrobiální mechanismy organismu⁶⁸.

Po překonání všech výše zmíněných bariér začínají s patogenem bojovat aktivní obranné mechanismy tvořené humorální a buněčnou složkou vrozeného imunitního systému. Humorální složku tvoří systém komplementu, lektinů a interferonů, které se řadí mezi cytokiny. Buněčnou složku tvoří hned několik typů buněk. Patří tam přirozené zabíječské (NK, z angl. „natural killer“) buňky a fagocytující makrofágy, monocyty a granulocyty. Monocyty se mohou dále diferencovat na makrofágy nebo dendritické

buňky. Mezi granulocyty se řadí neutrofilů a buňky uvolňující zánětlivé mediátory jako jsou bazofily, eosinofily a žírné buňky⁶⁸.

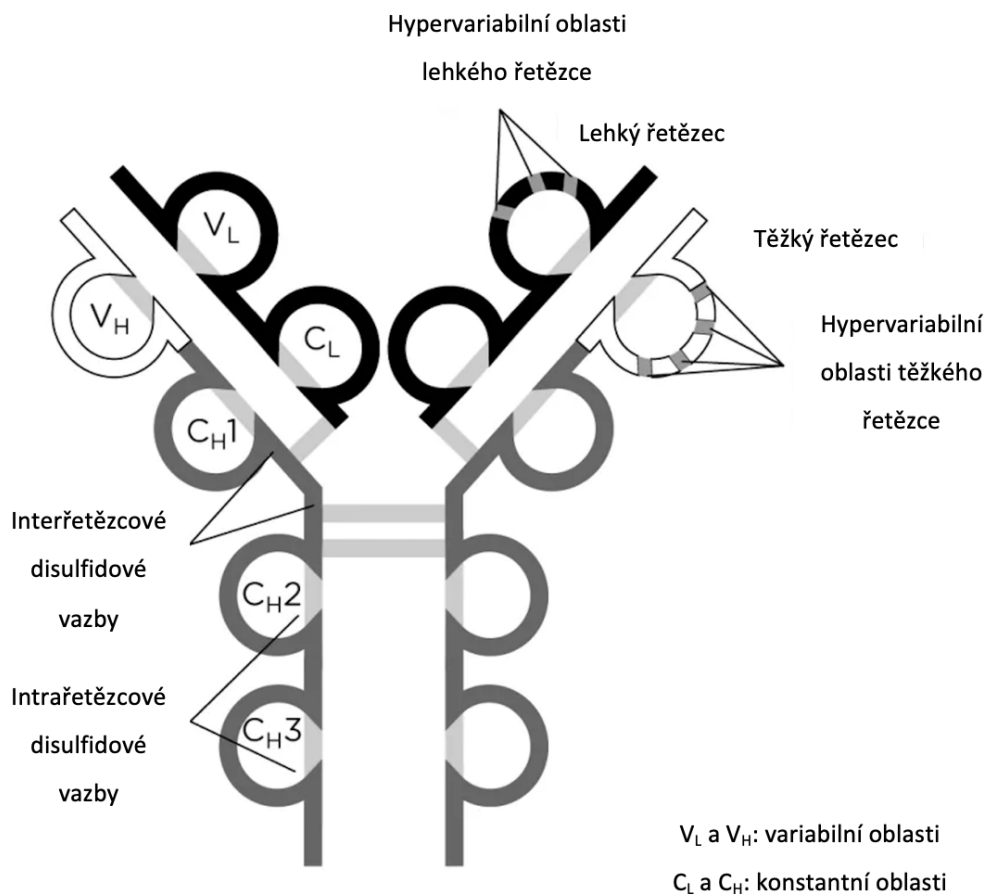
Proteiny plasmy tvoří systém komplementu, k jehož aktivaci může dojít klasickou, alternativní nebo MB-lektinovou (z angl. „mannan-binding-lectin) cestou, která nás v souvislosti s CF zajímá nejvíc. V případě MB-lektinové aktivace dochází k navázání MB-lektinu na sacharidové, konkrétně na manosové zbytky mikrobiálního povrchu. Ať už aktivace probíhá kterýmkoliv z uvedených tří způsobů, výsledkem je kaskáda reakcí vedoucí k opsonizaci, tedy jakémusi označení patogenu protilátkami pro následnou fagocytózu, chemotaxi nebo přímé zabití patogenu osmolýzou⁶⁹.

NK buňky se díky svým neobvyklým vlastnostem někdy řadí do obou imunitních systémů. Ačkoliv jsou většinou zařazeny k buňkám vrozeného imunitního systému, na rozdíl od ostatních buněk neadaptivní imunity disponují imunologickou pamětí. K propojení vrozené a adaptivní imunity dochází také u fagocytujících buněk, které jsou kromě své primární funkce, samotné fagocytózy, schopné tvořit i antimikrobiální látky a cytokiny ovlivňující lymfocyty⁶⁸.

1.2.2 Systém získané imunity

Získaný neboli adaptivní imunitní systém je mnohem pomalejší, ale také výrazně specifičtější než vrozený imunitní systém. Je schopen tvořit paměťové buňky, čehož, jak již bylo zmíněno výše, buňky vrozeného imunitního systému (kromě NK buněk) nejsou schopny. Humorální složku získaného imunitního systému tvoří B lymfocyty a jimi produkované protilátky. Buněčnou složkou jsou T lymfocyty⁶⁸.

Protilátky, nazývané též imunoglobuliny, jsou glykoproteiny specificky rozeznávající a vážící se na epitop antigenu. Protílátky mohou být membránově vázané nebo sekretované. V obou případech se však jedná o homodimerní strukturu (obr. 1.5, str. 27) ve tvaru písmene Y tvořenou čtyřmi řetězci (dvěma lehkými a dvěma těžkými) propojenými disulfidovými můstky. Lehké řetězce mají dvě formy (κ a λ). Protílátky se na základě pěti forem těžkých řetězců (α , γ , δ , ϵ , μ) dělí do tříd, a to IgA, IgG, IgD, IgE a IgM. Každá z těchto tříd má při styku s cizorodou látkou jinou funkci, ale vzájemně spolupracují. Protílátky jsou tvořeny konstantní a variabilní oblastí. Variabilní oblast je tvořena přibližně 110 aminokyselinami od N-konce řetězce a váží se na ní antigeny⁶⁹.



Obr. 1.5: Struktura protilátky. Homodimerní struktura protilátek je tvořena dvěma lehkými a dvěma těžkými řetězci propojenými disulfidovými můstky. Obrázek byl převzat a upraven⁷⁰.

1.2.3 Imunitní systém pacientů s CF

U pacientů s CF není narušen ani jeden z těchto systémů, ale v důsledku mutace *CFTR* genu pozměňující vlastností hlenu a dalších mechanismů souvisejících s CF, jako je například mukociliární clearance, dochází ke změnám způsobujícím nedostatečné odstraňování patogenů. To vede ke zvýšené bakteriální kolonizaci v plicích a následné infekci, se kterou imunitní systém těchto pacientů nedokáže dostatečně bojovat. Hromadění fagocytujících buněk v místě zánětu způsobuje uvolňování DNA rozpádlých buněk, což dále zvyšuje viskozitu hlenu, a ještě více znemožňuje pohyb řasinek. Následně se opět zvýší bakteriální adherence a tvorba biofilmu. Zánětlivé buňky také uvolňují látky (hlavně proteasy a růstové faktory) poškozující okolní tkáň. Tento kruhový děj neustále poškozuje plíce pacientů s CF, a proto tyto pacienti často potřebují transplantaci plic^{71,72}.

1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterie PA je bakterie z rodu *Pseudomonas*. Jedná se o gramnegativní, nesporulující, většinou obligátně aerobní mikroorganismy (jako konečný akceptor elektronů proto využívá kyslík) tyčinkovitého tvaru, které jsou velmi rozšířené hlavně v půdě, na rostlinách a ve vodních zdrojích. Jejich velikost se pohybuje od 1–5 μm do délky a 0,5–1,0 μm do šířky. Je důležité zmínit, že ne všechny kmeny rodu *Pseudomonas* jsou pohyblivé⁷³. Bakterie rodu *Pseudomonas* lze rozdělit do dvou skupin, a to na fluorescentní a nefluorescentní. PA se řadí do první skupiny, přičemž ve vodě produkuje žlutozelený pigment pyoverdin a pyocyanin s modrozelenou barvou⁷⁴.

Problémem u této bakterie je, že se snadno množí na vlhkém místě, a to i ve sterilním prostředí. PA se tedy často vyskytuje i v nemocnicích, snadno se šíří mezi organismy a kolonizuje lidský organismus – jedná se především o kolonizaci sliznic, respiračního a gastrointestinálního traktu. Tento mikroorganismus sice není nebezpečný pro lidi bez zdravotních obtíží, ale rozhodně představuje zdravotní riziko pro lidi s vážným onemocněním, jako je např. CF⁷³.

PA nejlépe roste při teplotě v rozmezí 37–42 °C a tvoří několik typů kolonií. Prvním typem jsou velké a hladké kolonie s plochými okraji. Dalším typem jsou malé, hrubé a vypuklé kolonie s drsnými okraji, a posledním typem jsou mukoidní kolonie podílejší se na tvorbě alginátu. Mukoidní kolonie se získávají ze sekretů pacientů napadených PA, kteří trpí hlavně respiračními problémy. Tato forma je proto typická pro pacienty s CF⁷⁵.

1.3.1 Virulentní faktory *Pseudomonas aeruginosa*

PA obsahuje a produkuje množství virulentních faktorů, mezi které patří bičíky, pili, lipopolysacharidy, alginát, siderofory a další.

Flagella, fimbrie a pili jsou přítomny u většiny bakterií z rodu *Pseudomonas*. PA má jeden polární bičík, ale ne všechny kmeny této bakterie mají stejný typ bičíku. První typ bičíku, často označovaný *a*, bývá glykosylován a druhý typ, který se označuje jako *b*, se na rozdíl od prvního typu obvykle vyznačuje fosforylací tyrosinových zbytků. Pili typu IV slouží především k bakteriální adhezenci, a tím i ke kolonizaci povrchů sliznic^{76,77}.

Lipopolysacharid slouží primárně jako ochrana bakteriální buňky před imunitním systémem hostitele, ale také se část lipopolysacharidu váže na CFTR receptor hostitele,

aby tak zajistil vstup bakterie do eukaryotické buňky a následně až do plic⁷⁷.

Jeden z nejdůležitějších virulentních faktorů je **alginát** související s již několikrát zmíněnou tvorbou biofilmu. Alginát tedy chrání bakterii jak před imunitním systémem hostitele, tak i před antibiotiky⁷⁷.

Siderofory jsou extrémně důležité pro přežití bakterie v podmínkách s malým obsahem iontů železa nebo v podmínkách, kde se železo nachází v nerozpustné formě. Mezi komplexní siderofory patří například barvivo **pyoverdin**, které je potřebné pro sekreci dvou virulentních faktorů, a to exotoxinu A a proteasy PrpL. I když další barvivo produkované PA, **pyocyanin**, nepatří mezi siderofory, řadí se taky mezi virulentní faktory PA, protože zvyšuje uvolňování interleukinu a tím i vnitrobuněčný oxidační stres⁷⁷.

Kromě výše zmíněných virulentních faktorů se nesmí zapomínat ani na extracelulární virulentní faktory. U PA byly zatím identifikovány tři proteasy, konkrétně **elastasa**, **proteasa LasA** a **alkalická proteasa**. Tyto proteasy narušují integritu hostitelských buněk degradací strukturních proteinů extracelulárního matrixu a mají vliv i na imunoglobuliny a sérové proteiny.

Mezi virulentní faktory PA patří i různé exotoxiny a exoenzymy. **Exotoxin A**, nejtoxičtější protein produkovaný PA, je polypeptid tvořený dvěma fragmenty a čtyřmi disulfidovými můstky. Katalyzuje ADP-ribosylaci, což se projeví na inhibici syntézy buněčných proteinů hostitele. **Exoenzym S** a **exoenzym T** jsou extrabuněčné toxiny sekretované až po interakci bakterie s hostitelskou buňkou. Exoenzym S také katalyzuje ADP-ribosylaci, ale projeví se to místo inhibice syntézy proteinů na stimulaci proliferace lymfocytů⁷⁷.

Schopnost PA ničit tkáň má na svědomí také **komplex dvou fosfolipas C**, jedné **esterasy** vázané na vnější membránu a jedné sekretované **lipasy**. Narušení mezibuněčných spojů zase způsobují **rhamnolipidy**.

Mezi další významné virulentní faktory PA patří **lektiny** (viz. kapitola 1.3.2).

1.3.2 Lektiny PA

Lektiny patří mezi nejvýznamnější virulentní faktory PA. Jsou to proteiny schopné specificky rozpoznávat a vázat sacharidy. Jsou také schopné aglutinovat erytrocyty, a kromě vlivu na patogenitu mají i cytotoxický účinek na epitelové buňky plic⁷⁸. Lektiny

tedy mají hned několik klíčových funkcí. Lektin PA-IIL (viz. níže) primárně zprostředkovává adhezenci bakterie na vysokofukosylované glykoproteiny hostitelských buněk, přičemž kvůli rozdílné glykosylaci je hostitelem často pacient s CF. Sekundární funkcí lektinů je inhibice pohybu řasinek a tím i imobilizace hlenu. To následně vede k již zmíněné kolonizaci plic bakteriemi a tvorbě biofilmu. Bylo potvrzeno, že lektiny se nachází v cytoplasmě, periplasmě, na cytoplasmatické membráně i vnější membráně bakteriálních buněk^{79–81}.

U PA byly zatím popsány dva typy lektinů – PA-IL (*Pseudomonas aeruginosa* lektin I) nazývaný též LecA a PA-IIL (*Pseudomonas aeruginosa* lektin II) nazývaný též LecB. Oba lektiny mají stejnou terciární strukturu. Jedná se o proteiny složené ze čtyř podjednotek. Obsahují vazné místo pro sacharid a v něm zachycený vápenatý iont. Jejich primární struktura, velikost a specifita vůči sacharidu je však odlišná⁸². PA-IL je složen ze 121 aminokyselin na podjednotku a jedna podjednotka má přibližně 12,75 kDa. Celý protein pak má velikost 51 kDa. Váže D-galaktosu a její deriváty s různou afinitou. Nejsilněji váže α -D-galaktosu, slaběji β -D-galaktosu a nejslaběji váže D-N-acetylgalaktosamin⁸³. PA-IIL je složen ze 114 aminokyselin na podjednotku a jedna podjednotka má přibližně 11,75 kDa. Celá bílkovina pak má velikost 47 kDa. Váže hlavně L-fukosu a D-manosu, a v menší míře váže i další sacharidy, např. L-galaktosu⁸⁴. PA-IIL má na rozdíl od PA-IL ve své struktuře až dva vápenaté ionty⁸².

Množství obou lektinů se v průběhu růstu bakteriální kultury mění a závisí nejen na složení kultivačního média, ale i na fázi růstu bakterií⁸⁵. Přítomnost solí a kvasinkového extraktu v růstovém médiu podporuje expresi PA-IL, zatímco přítomnost peptonu a hovězího extraktu podporuje expresi PA-IIL. Naopak, exprese obou lektinů je potlačena přítomností antibiotik v růstovém médiu. Pro tuto bakalářskou práci je přítomnost lektinů v bakteriální kultuře důležitá, a proto je kultivace ukončena až ve stacionární fázi, kdy jsou už oba lektiny exprimovány⁸⁶.

2 Cíl práce

Hlavním cílem této bakalářské práce je otestování vlivu trivalentních inhibitorů založených na fukose na adherenci bakteriálního kmene PAK (ST 1763) na imortalizované buňky plicního epitelu získané od zdravého jedince (NuLi-1) a od pacienta s CF (CuFi-1). Pro dosažení tohoto hlavního cíle práce je nutné splnit následující dílčí úkoly:

- Proměřit růstovou křivku PAK a porovnat ji s růstovou křivkou z předchozí diplomové práce zaměřené na tuto problematiku
- Ověřit expresi lektinu PA-III různými kmeny bakterie PA
- Reprodukovat a případně optimalizovat barvení plicních epiteliálních a bakteriálních buněk pomocí sloučenin PKH67 a PKH26
- Reprodukovat výsledky adhezenčních testů se slepičími anti-PA-III protilátkami (1K1, 3S1, spojené frakce 3R1-8R1) uvedené v předchozích pracích
- Otestovat efekt trivalentních inhibitorů na báze fukosy (LTS-18, LTS-38 a LTS-42) na adherenci PAK na plicní epiteliální buňky

3 Materiál a metody

3.1 Použité přístroje a materiál

3.1.1 Přístroje

Analytické váhy DV215CD	Ohaus, Švýcarsko
Aparát pro horizontální přenos Fast Blot B43	Biometra, Německo
Autokláv Varioklav®	H+P Labortechnik GmbH, Německo
Centrifuga 5418 s rotorem FA-45-18-11	Eppendorf, USA
Centrifuga HERMLE Z 383 K s rotorem 220.86	HERMLE LaborTechnik, Německo
Centrifuga Hettich Universal 320 R s rotorem #1324 a adapterem #1483A	Hettich Zentrifugen, Německo
CO ₂ inkubátor MCO-170AICUV	Panasonic Healthcare Co., Japonsko
Elektroforetická aparatura Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, USA
Hlubokomrazící box Thorbi Primus TPU5086DCC	National Lab GmbH, Německo
Inkubátor IB-01E	Jeio Tech, Korea
Inkubátor s funkcí třepání Multitron Pro	Infors HT, Švýcarsko
Inkubátor s funkcí třepání ES-60	MIUlab, Čína
Laminární box BIO 126	Labox, ČR
Laminární box MB 120	Labox, ČR
Magnetická míchačka KMO 2 basic	IKA, Čína
Mikroskop Motic AE31	Motic, Německo
Mikroskop Nikon Eclipse TE2002-U s programem NIS-Elements AR 3.00	Nikon, Japonsko
Mikrovlnný autokláv Microjet	The Rodwell Autoclave Company, UK
Mini centrifuga Spectrafuge™	Labnet, USA
Orbitální třepačka SHO-2D	Witeg, Německo
pH metr HI-2211	Hanna Instruments, UK
Pipetovací nástavec Pipetus	Hirschmann, Německo
Předvážky 440-35A	KERN, Německo

Sonikátor Sonopuls HD 3100	Bandelin, Německo
Spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro s programem i-control	Tecan, Švýcarsko
Spektrofotometr Metash V-5000	Shangai Metash Instruments Co., LTD., Čína
Spektrofotometr Spektromom 195D	Magyar Optical Művek, Maďarsko
Termoblok MINIB-100 Mini Dry Bath	MIUlab, Čína
Vodní lázeň WNE 10	Memmert, Německo
Vortex genius 3	IKA, Čína
Výkyvná třepačka MR-1	Biosan Ltd., Lotyšsko
Zdroj pro elektroforézu	Bio-Rad, USA

3.1.2 Materiál

2-merkaptoethanol	Fluka, Švýcarsko
Akrylamid, bisakrylamid	Sigma, USA
Králičí protilátka (značena alkalickou fosfatasou) proti slepičím IgG	Sigma, USA
BCIP/NBT Color Development Substrate	Promega™, USA
BEGM™ Bronchial Epithelial Cell Growth Medium BulletKit™	Lonza, Švýcarsko
Borax	Lachema, ČR
Bromfenolová modř	Sigma, USA
BSA frakce V	Merck, Německo
Buněčné linie CuFi-1 a NuLi-1	ATCC®, USA
Citrát	Lach:Ner, ČR
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma, USA
Kolagen typu IV z lidské placenty	Sigma, USA
Destičky CellBind® 96 jamek	Corning, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Aplichem, Německo
Dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma, USA
dsGreen for Real-Time PCR (100× koncentrovaný)	Lumiprobe, Německo
D-Tube™ Dialyzer Mini-Maxi (6–8 kDa a 12–14 kDa) dialyzační tuby	Novagen®, USA
EDTA	Lach:Ner, ČR
Ethanol	Lach:Ner, ČR
Fetální bovinní sérum (FBS)	Lonza, Švýcarsko
Glycerol	Lach:Ner, ČR
Glycin	Sigma, USA
HCl	Lach:Ner, ČR
Injekční stříkačka 1–20 ml	B. Braun, Německo
Isopropylalkohol	PENTA, ČR
Jednorázové plastové sterilní pipety 1–25 ml	Corning, USA
Kryozkumavky	Corning, USA
Kultivační lahve 25–125 cm ²	TPP, Švýcarsko; VWR International, ČR

Kvasinkový extrakt	Thermo Scientific™ Oxoid™, UK
Kyselina octová	Lachema, ČR
LHC-9 medium	Gibco™ Invitrogen, UK
Methanol	Lach:Ner, ČR
Mikrozkumavky 0,2–2,0 ml	Eppendorf, USA
MgCl ₂	Lach:Ner, ČR
Multivalentní glykokonjugáty	Mgr. Lenka Malinovská, Ph.D.; Národní centrum pro výzkum biomolekul, PŘF MU, Brno, ČR
NaCl	Lach:Ner, ČR
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	Lach:Ner, ČR
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	Lach:Ner, ČR
NaOH	Lach:Ner, ČR
Nitrocelulosoová membrána (0,2 µm)	Bio-Rad, USA
Parafilm	Bemis, USA
PBS tablety (1 do 500 ml dH ₂ O; pH 7,45)	Gibco™ Invitrogen, UK
Peha-Soft nitrilové rukavice bez pudru	Hartmann, ČR
Peroxodisíran amonný (APS)	Sigma, USA
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Midi Kit for General Cell Membrane labeling	Sigma, USA
PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Midi Kit for general Cell Membrane Labeling	Sigma, USA
Plastové zkumavky 15 ml a 50 ml	TPP, Švýcarsko
Ponceau red	Loba Chemie, Rakousko
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Sigma, USA
PVDF membrána Immobilon®-P ^{SQ} (0,2 µm)	Merck, Německo
Rekombinantní PA-IIL	Mgr. Lenka Malinovská, Ph.D.; Národní centrum pro výzkum biomolekul, PŘF MU, Brno, ČR
Sterilní mikrofiltry 0,22 µm	Merck Millipore, Německo
Sušené odtučněné mléko	Bio-Rad, USA
SYBR™ Green II RNA Gel Stain (10,000x koncentrovaný roztok v DMSO)	Invitrogen™, USA
Špičky	Biohit, UK

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, USA
Tris-base	Sigma, USA
Tris-HCl	Sigma, USA
Triton X-100	Sigma, USA
Trypanová modř 0,4%	Sigma, USA
Trypsin-EDTA Solution 0,25%	Sigma, USA
Trypton	Thermo Scientific™ Oxoid™, UK Fluka, Německo
Whatman filtrační papíry (Grade 3)	Thermo Fisher Nalgene®, USA
Zmrazovací kontejner Nalgene® Cryo 1 °C	Sigma, USA

3.2 Práce s tkáňovými kulturami

Adherence PA, nemukoidního kontrolního kmene PAK (ST 1763) byla studována *ex vivo* pomocí adhezenčních buněčných linií NuLi-1 (ATCC® CRL-4011™) a CuFi-1 (ATCC® CRL-4013™). Jedná se o imortalizované buňky plicního epitelu. Linie NuLi-1 pocházela od zdravého dárce, zatímco CuFi-1 byly izolovány z epitelu plic pacienta s CF nesoucího nejrozšířenější mutaci, F508del, na obou alelách *CFTR* genu.

S oběma buněčnými liniemi se pracovalo v laminárním boxu MB 120 v tkáňové laboratoři za dodržení přísně aseptických podmínek. Jako protokol pro práci s danými tkáňovými kulturami sloužily produktové listy^{87,88}.

3.2.1 Příprava kultivačních nádob

Obě buněčné linie byly pěstovány v lahvích potažených kolagenem typu IV z lidské placenty. Rozpuštěním lyofilizátu v 0,25 % kyselině octové (naředěné deionizovanou vodou) při 4 °C byl ve sterilní skleněné nádobě za občasného promíchání připraven zásobní roztok kolagenu o koncentraci 0,9 mg/ml. Po jeho částečném rozpuštění (asi po 4 hodinách) byl roztok zředěn deionizovanou vodou na výslednou koncentraci kolagenu 60 µg/ml. Takto připravený roztok byl filtrován přes 0,22 µm filtr a následně nanášen do kultivačních lahví tak, aby pokryl celý jejich povrch, tj. 1–2 ml roztoku kolagenu na každých 25 cm² kultivačního povrchu. Takto připravené lahve byly inkubovány v zapnutém laminárním boxu MB 120 alespoň 18 hodin. Následně byl kolagen odstraněn a nádoby byly s pootevřeným víčkem otočeny dnem vzhůru. V zapnutém laminárním boxu se sušily 1–2 dny. Po vysušení byly lahve 2–3x promyty ekvivalentním množstvím roztoku soli pufovaného fosfátem (PBS) a důkladně vysušeny (1–2 dny). Po vysušení bylo víčko zatáhnuto a zajištěno parafilmem. Připravené nádoby byly skladovány v uzavřeném sáčku při 4 °C a těsně před použitím byl povrch opět promyt PBS.

3.2.2 Rozmrazení buněčných kultur

Kryovialky se zamrazenou buněčnou suspenzí a roztokem DMSO (kryoprotektivní medium) byly den před rozmrazením přesunuty z kapalného dusíku do boxu Thorbi Primus TPU5086DCC s teplotou -80 °C v zmrazovacím boxu naplněném isopropanolem.

Na druhý den bylo nejdřív připraveno růstové médium (LHC-9 nebo BEGM), které bylo hned po přípravě temperováno ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Následně, ihned po vyjmutí z hlubokomrazícího boxu, byla buněčná suspenze ve vialkách velmi rychle (10 sekund až 2 minuty – vialky bylo nutné neustále kontrolovat, protože DMSO je při dlouhodobější expozici pro buňky toxický) rozmrazovaná ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Takto rozmrazená buněčná suspenze o objemu 1–2 ml byla přenesena do sterilní plastové mikrozkušavky s objemem 15 ml a postupně k ní byl přidáván vzrůstající objem růstového média (podle tab. 1, str. 38) o stejné teplotě.

Tab. 1: Postupné ředění buněčné suspenze

Objem buněčné suspenze [ml]	Přídavek temperovaného média po minutách [ml]									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0,10	0,12	0,15	0,19	0,26	0,36	0,52	0,86	1,69	4,75
2	0,20	0,24	0,30	0,38	0,52	0,72	1,04	1,72	3,38	9,50

Po přidání posledního objemu byla buněčná suspenze centrifugována při 1000 RPM po dobu 5 minut (centrifuga Hettich Universal 320 R). Po oddělení supernatantu byla peleta resuspendována v 1 ml média. Po resuspendaci byl odebrán alikvot pro stanovení počtu a viability buněk. K tomuto stanovení byla použita trypanová modř a postup popsaný v kapitole 3.2.5. Stanovením počtu a viability buněk bylo potřebné ověřit minimální počet buněk potřebný k nasazení do kultivační lahve potažené kolagenem typu IV s povrchem o velikosti 25 cm². Minimální počet buněk nasazovaný do lahve se u buněčných linií NuLi-1 a CuFi-1 liší. U linie CuFi-1 odpovídá 1–3 · 10³ buněk/cm², tj. 25–75 · 10³ buněk do lahve s povrchem o velikosti 25 cm² a u linie NuLi-1 odpovídá 1,5–2 · 10⁴ buněk/cm², tj. 37,5–50 · 10⁴ buněk do lahve o stejné velikosti. Po ověření minimálního množství buněk byly kultivační lahve o velikosti povrchu 25 cm² potažené kolagenem typu IV naplněny 5 ml temperovaného média. Pro buňky je proces rozmrazování velmi náročný a množství buněk tento proces nepřežije. Z tohoto důvodu bylo do kultivačních lahví nasazované vyšší než minimální množství buněk. V našem případě byl do kultivační lahve přenesen celý zbytek buněčné suspenze a takto připravené buňky byly pak kontrolovány každý den.

3.2.3 Kultivace buněčných linií

Buněčné linie CuFi-1 i NuLi-1 byly kultivovány v CO₂ inkubátoru MCO-170AICUV při 37 °C a 5 % CO₂. Obě linie byly pěstovány v kultivačních nádobách potažených kolagenem typu IV z lidské placenty, které byly připraveny postupem popsáním v kapitole 3.2.1. Přibližně po 4–5 subkultivacích (viz. kapitola 3.2.4) od rozmrazení byly buněčné linie přeneseny z kultivační lahve o velikosti povrchu 25 cm² do lahve o velikosti povrchu 75 cm², později i do 150 cm². Tyto lahve byly naplněny růstovým médiem, kterého objem odpovídal velikosti povrchu lahve, tj. 5 ml na každých 25 cm² kultivačního povrchu. Pro dané buněčné linie byly používány 2 druhy růstového média (LHC-9 nebo BEGM) a růstové médium bylo v lahvích měněno každé 2–3 dny.

3.2.4 Subkultivace buněčných linií

Subkultivace nazývaná také pasáž buněčných linií byla prováděná, když buňky pokrývaly většinu kultivačního povrchu lahve, ale ještě nebyla vytvořena konfluentní vrstva. K uvolnění buněk z kultivačního povrchu byl používán roztok trypsin-EDTA (0,25% trypsin/0,53 mM EDTA) temperovaný na laboratorní teplotu.

Růstové médium inhibuje účinek používaného trypsin-EDTA, a proto k jeho odstranění z kultivační lahve byly buňky nejdříve promyty 2 ml PBS na každých 25 cm² kultivačního povrchu. Následně byl do kultivační lahve nanesen 1 ml temperovaného trypsin-EDTA na každých 25 cm² kultivačního povrchu. Kultivační nádoba s buněčnou linií a daným objemem trypsin-EDTA byla inkubována po dobu 8 minut při 37 °C. Po tomto čase bylo uvolnění buněk z kultivačního povrchu zkontrolováno na mikroskopu Motic AE31 a následně byla aktivita trypsin-EDTA zastavena 1% roztokem fetálního bovinního séra (FBS) v PBS temperovaným na laboratorní teplotu. Použité množství 1% roztoku FBS bylo ekvivalentní použitému množství trypsin-EDTA. Aby bylo dosaženo oddělení zbylých buněk od povrchu, byl povrch lahve několikrát opláchnut buněčnou suspenzí. Pak byla celá buněčná suspenze převedena do centrifugační zkumavky a centrifugována 5–10 minut při 1000 RPM na centrifuze Hettich Universal 320 R. Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována v 1–2 ml růstového média temperovaného na 37 °C ve vodní lázni. Z takto připravené suspenze byl odebrán alikvot na stanovení počtu a viability buněk podle postupu uvedeném v kapitole 3.2.5.

Ze získaného počtu buněk bylo vypočteno, kolik buněčné suspenze je nutné převést do nové kultivační lahve, aby tento počet v případě buněčné linie NuLi-1 odpovídal množství $1,5-2 \cdot 10^4$ viabilních buněk na 1 cm^2 kultivačního povrchu a v případě buněčné linie CuFi-1 množství $1-3 \cdot 10^3$ viabilních buněk na 1 cm^2 kultivačního povrchu. Do nových kultivačních lahví potažených kolagenem typu IV z lidské placenty propláchnutých pomocí PBS byl přidán potřebný objem temperovaného média, který byl uveden v kapitole 3.2.3. Do takto připraveného média byl nanesen vypočtený objem buněčné suspenze.

3.2.5 Stanovení počtu a viability buněk

Do plastové mikrozkušavky o objemu 0,5 ml bylo přeneseno 16 μl používaného růstového média a k tomu byly přidány 4 μl buněčné suspenze získané resuspendováním pelety v 1–2 ml růstového média. Do této zkumavky bylo následně přidáno 20 μl barviva trypanová modř, aby bylo dosaženo 10-násobného zředění buněčné suspenze, a aby bylo pod mikroskopem možné rozeznat mrtvé buňky od živých (mrtvé buňky byly pod mikroskopem vidět modře, zatímco živé byly nenabarvené).

Po opatrném promíchání buněčné suspenze bylo do Bürkerovy komůrky (hemocytometr) přeneseno 10 μl suspenze a buňky byly spočítány pod mikroskopem. Buňky se počítaly uprostřed třech čtverců po uhlopříčce a vždy na dvou hranách daného čtverce. Následně byl počet buněk zprůměrován a vynásoben 10^5 , čímž byl zjištěn výsledný počet buněk v celé buněčné suspenzi (1–2 ml).

3.2.6 Zamrazení buněčných linií

Z buněčné suspenze připravené postupem uvedeným v kapitole 3.2.4 byl odebrán alikvot na stanovení počtu a viability buněk (viz. kapitola 3.2.5). Zbytek buněčné suspenze byl centrifugován 5–10 min při 1000 RPM (Hettich Universal 320 R) a vzniklá peleta byla resuspendována v kryoprotekčním médiu, které bylo připraveno z růstového média LHC-9 nebo BEGM, dimethylsulfoxidu (DMSO) a 100% FBS ve výsledném poměru 6 : 1 : 3. Použitý objem kryoprotekčního média byl vypočítán tak, aby koncentrace buněk odpovídala $1-5 \cdot 10^6$ viabilních buněk na 1 ml. Takto připravena buněčná suspenze byla

přenesena do vychlazených kryozkumavek po 1–1,5 ml. Kryozkumavky byly následně umístěny ve vychlazeném zmrazovacím boxu naplněném isopropanolem do -80 °C na 24–48 hodin, aby došlo k postupnému zmrazování vzorků. Po tomto čase byly kryozkumavky uloženy do kapalného dusíku, aby nedošlo ke ztrátě jejich viability. Takto skladované buněčné linie neztrácí viabilitu i několik let, na rozdíl od skladování při teplotě -80 °C, kdy již po několika málo týdnech dochází ke ztrátě viability obou typů buněčných linií.

3.3 Práce s *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteriální adherence byla studována pomocí sbírkového (kontrolního) kmene bakterií PA označovaného PAK (ST 1763), který byl dlouhodobě uchováván v hlubokomrazícím boxu Thorbi Primus TPU5086DCC při teplotě -80 °C. Veškerá práce s PA probíhala v mikrobiologické laboratoři při dodržování aseptických podmínek, primárně v laminárním boxu BIO 126.

3.3.1 Kultivace PAK

Bakteriální kultura kmene PAK z hlubokomrazícího boxu Thorbi Primus TPU5086DCC s -80 °C byla rozmrazena při laboratorní teplotě. Do sterilní 100 ml Erlenmayerove baňky bylo přes 0,22 µm filtr přefiltrováno 10 ml růstového média. Pro kultivaci PAK bylo používáno LB (Luria-Bertani) nebo „PS“ médium. Složení médií bylo následovné:

- *PS médium*: 1,6% (w/v) pepton, 1% (w/v) enzymatický kaseinový hydrolyzát, 0,5% (v/v) glycerol, 57 mM K₂SO₄, 15 mM MgCl₂; médium bylo připraveno Ing. H. Bartoňovou z UŽFG, AV ČR
- *LB médium*: 1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasinkový extrakt, 171 mM NaCl

Do přefiltrovaného média bylo přidáno 20 µl rozmrazené bakteriální suspenze PAK. Takto připravena Erlenmayerova baňka byla uzavřena alobalem a bakterie byly kultivovány 14 hodin při 37 °C za konstantního třepání (150 RPM, Infors HT Multitron Pro nebo ES-60 MIUlab).

3.3.2 Zamrazení PAK

Bakteriální kultura PAK kultivována postupem uvedeným v kapitole 3.3.1 byla alikvotována po 200 μl . Ke každému alikvotu bylo přidáno 200 μl kryoprotektivního média (40% (w/v) glycerol v PBS) přefiltrovaného přes 0,22 μm filtr. Připravené alikvoty o objemu 400 μl byly rychle zamrazeny v kapalném dusíku a následně skladovány v hlubokomrazícím boxu Thorbi Primus TPU5086DCC s $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.3 Fotometrická kvantifikace bakterií

Bakterie byly kvantifikovány pomocí měření optické denzity (zákalu) vzorku při vlnové délce 600 nm (OD_{600}) na spektrofotometru Metash V-5000. Koncentrace bakterií ve vzorku byla zjištěna přepočtem OD_{600} podle vztahu, na základě kterého $\text{OD}_{600} = 1,000$ odpovídá $6 \cdot 10^8$ bakterií v 1 ml vzorku⁸⁹.

3.3.4 Proměření růstové křivky PAK

Po rozmražení bakteriálního kmene PAK byl sledován růst této kultury v PS médiu při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ za konstantního třepání (150 RPM, Infors HT Multitron Pro) po dobu 17 hodin.

Pravidelně, vždy po uplynutí určitého časového intervalu byl odebrán alikvot bakteriální kultury a na spektrofotometru METASH V-5000 byla proměřena jeho optická denzita při 600 nm. Jako slepý vzorek sloužilo dané růstové médium s nulovou koncentrací bakterií. Výsledná růstová křivka byla znázorněna jako graf závislosti $\log(\text{OD}_{600})$ na čase.

3.3.5 Elektroforesa

Roztok použitý pro přípravu vzorků:

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

Postup přípravy vzorků pro elektroforesu:

Bakteriální kultura byla kultivována (podle postupu z kapitoly 3.3.1) za konstantního třepání (150 RPM, Infors HT Multitron Pro) 14 hodin při 37 °C. Po ukončení kultivace byla centrifugována 5 min (5 000 RPM, HERMLE Z 383 K). Peleta byla 3x centrifugačně promyta 5 ml destilované vody (vždy 5 min, 5 000 RPM, HERMLE Z 383 K). Po posledním promytí byla spektrofotometricky stanovena koncentrace bakterií v kultuře (viz. kapitola 3.3.3). Při přípravě vzorků několika kmenů PA byl z bakteriálních suspenzí odebrán do centrifugačních zkumavek vždy stejný objem suspenze PA o koncentraci $6 \cdot 10^8$ PA/ml, aby bylo dosaženo uniformního množství bakterií ve vzorcích. Nádobky s jednotným množstvím bakterií byly opět centrifugovány (10 min, 5 000 RPM, HERMLE Z 383 K). Peleta byla resuspendována v destilované vodě (1 ml destilované vody na $7,8 \cdot 10^9$ PA). Vzorky byly povařeny 10 min při 100 °C (termoblok MINIB-100 Mini Dry Bath) a následně sonikovány (amplituda 50 %, 2 min, 15s pulsy, sonikátor Bandelin sonopuls, sonda MS 73). Po sonikaci byly vzorky opět povařeny 10 min při 100 °C (termoblok MINIB-100 Mini Dry Bath), centrifugovány 5 min při 10 000 RPM (Eppendorf 5418) a supernatant byl alikvotován po 150 µl. Alikvoty byly uchovány při -20 °C.

Těsně před elektroforesou byl alikvot rozmražen a bylo k němu přidáno 50 µl 4x koncentrovaného *vzorkového pufu*. Takto připravený vzorek byl opět povařen 10 min při 100 °C (termoblok MINIB-100 Mini Dry Bath), pro odstředění kondenzované vody z víčka byl krátce centrifugován (mini centrifuga Spectrafuge™) a následně vortexován (vortex genius 3). Do gelu byl nanášen v objemu 15 µl/jamka.

Jako standard pro elektroforesu a následný „Western Blotting“ byl použit rekombinantní PA-III poskytnutý Mgr. Lenkou Malinovskou, Ph.D. (Národní centrum pro výzkum biomolekul, PŘF MU, Brno). Ke 20 µl roztoku PA-III o koncentraci 1 mg/ml bylo přidáno 55 µl deionizované vody a tento roztok byl následně ředěn 4x koncentrovaným *vzorkovým pufrem*, povařen při 100 °C 10 min (MINIB-100 Mini Dry Bath), centrifugován (Spectrafuge™), vortexován a nanášen do jamek gelu v množství 3 µg/jamka.

Elektroforesa:

Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu jakožto elektromigrační metoda probíhající v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) se používá k rozdělení směsi proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Jednotlivé proteiny putují (separují se) v gelu rychlostí

přímo úměrnou jejich zápornému náboji, který odpovídá molekulové hmotnosti konkrétního proteinu. Záporný náboj proteiny získávají právě díky SDS⁹⁰.

Gely a použité roztoky:

- *15% separační gel:* 5,0 ml pufr A; 5,0 ml polymerační roztok A; 100 μ l roztok APS; 10 μ l TEMED
- *4% zaostřovací gel:* 3,5 ml pufr B; 533 μ l polymerační roztok B; 80 μ l roztok APS; 4 μ l TEMED
- *Pufr A:* 0,375 M Tris/HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,8
- *Polymerační roztok A:* 30% (w/v) akrylamid; 0,8% (w/v) BIS v pufru A
- *Pufr B:* 0,125 M Tris/HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH 6,8
- *Polymerační roztok B:* 30% (w/v) akrylamid; 0,8% (w/v) BIS v pufru B
- *Roztok APS:* 10% (w/v) peroxosíran amonný v destilované vodě
- *Elektrodový pufr:* 0,192 M glycin; 0,025 M Tris/HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3
- *Přenosový pufr:* 0,025 M TRIS/HCl; 0,192 M glycin; 10% (v/v) methanol; pH 8,3
- *Barvicí roztok:* 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 9,2% CH₃COOH; 46% (v/v) ethanol
- *Barvicí roztok Ponceau red:* 0,5% (w/v) Ponceau red; 1% (v/v) CH₃COOH v destilované vodě
- *Odbarvovací roztok:* 10% (v/v) CH₃COOH; 25% (v/v) ethanol; destilovaná voda

Postup:

Skla pro přípravu gelů o síle 1 mm byla důkladně vyčištěna a odmaštěna ethanolem. Po složení elektroforetické aparatury byl připraven roztok pro 15% *separační gel*. Mezi skla bylo nalito přibližně 5 ml tohoto roztoku, který byl převrstven destilovanou vodou. Následná polymerace probíhala přibližně 40 minut. Po skončení polymerace a přípravě 4% zaostřovacího gelu byla destilovaná voda odstraněna a mezi skla byly přidány přibližně 2 ml roztoku pro zaostřovací gel, do kterého byl okamžitě vložen 15-jamkový hřeben o síle 1 mm. Polymerace zaostřovacího gelu probíhala přibližně 30 minut. Po jejím ukončení byla skla s gelem vložena do aparatury s elektrodami a ze zaostřovacího gelu byl opatrně vytažen hřeben. Mezi skla a do vany elektroforetické aparatury byl nalit

elektrodový pufr. Do jamek gelu byl nanesen marker molekulové hmotnosti (Precision Plus Protein Dual Color Standards; Bio-Rad) o objemu 5 μ l/jamka, standard PA-III v množství 3 μ g/jamka a připravený vzorek směsi proteinů PA (popsáno v sekci postup přípravy vzorků pro elektroforesu) o objemu 15 μ l/jamka. Po připojení aparatury ke zdroji napětí probíhala elektroforesa při 150 V 90–120 minut. Po jejím ukončení byl *elektrodový pufr* z vany vylit, skla byla po odstranění z aparatury oddělena od sebe a *zaostřovací gel* byl uříznutý od *separačního gelu*. *Separační gel* byl označen naříznutím, krátce promyt nepoužitým *elektrodovým pufrem*, destilovanou vodou a 3x 5–10 minut *přenosovým pufrem* na orbitální třepačce Witeg SHO-2D (55 RPM). Po promytí byl proveden „Western Blotting“ s následnou imunodetekcí.

3.3.6 „Western Blotting“ s následnou imunodetekcí

Použité roztoky:

- *PBS Triton X-100*: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄·12 H₂O; 1 mM NaH₂PO₄·2 H₂O; 0,3% (v/v) Triton X-100; pH 7,2
- *Blokovací roztok*: 5% (w/v) roztok odtučněného mléka v PBS Triton X-100

Postup:

Po proměření velikosti gelu byly vystřiženy plátky filtračního papíru Whatman 3 a nitrocelulósová (NC) nebo PVDF membrána o stejné velikosti. NC membrána, stejně jako filtrační papírky, byla před elektropřenosem jen smočena v *přenosovém pufre*. PVDF membránu je na rozdíl od NC nutné aktivovat smočením v methanolu po dobu 30 vteřin a následně ji promýt *přenosovým pufrem* 3x 10 min za třepání (55 RPM, Witeg SHO-2D).

Na anodu aparatury pro horizontální přenos (Biometra Fastblot B43) byl umístěn „sandwich“ složený z jednotlivých vrstev namočených v *přenosovém pufre*. Na 3 filtrační papírky byla položena NC/PVDF membrána, na ní byl položen promytý gel a na něj byly opět položeny 3 filtrační papírky. Každá vrstva byla pro odstranění bublin vždy jemně uválená válečkem. Po vytvoření „sandwich“ byla aparatura uzavřena přiklopením katody a zatížena. Na zdroji byl nastaven proud [mA] odpovídající ploše gelu [cm²] vynásobené hodnotou 0,8. Při těchto parametrech probíhal elektropřenos prvních 10 minut. Dalších 45 minut probíhal elektropřenos za konstantního proudu [mA] odpovídajícím ploše gelu

[cm²] vynásobené hodnotou 2,0. Po ukončení elektropřenosu byly gel i membrána promyty destilovanou vodou. Gel byl následně vložen do *barvicího roztoku* přibližně na 1 hod a následně byl odbarvován. Membrána byla obarvena *roztokem Ponceau red* pro vizualizaci proteinových zón. Po jejím následném promytí destilovanou vodou byla membrána ještě 3x promyta roztokem PBS Triton X-100. Po promytí byla za konstantního třepání (55 RPM, Witeg SHO-2D) inkubována 1 hod s *blokovacím roztokem* při laboratorní teplotě nebo přes noc při 4 °C. Následně byla membrána za konstantního třepání (55 RPM, Witeg SHO-2D) inkubována s roztokem primární (specifické nebo kontrolní) protilátky v blokovacím roztoku 2 hod při laboratorní teplotě. Koncentrace protilátky v daném roztoku byla 0,03 mg/ml. Po inkubaci s primární protilátkou byla membrána 3x promyta 10 ml blokovacího roztoku a následně byla za konstantního třepání (55 RPM, Witeg SHO-2D) inkubována 1 hod s roztokem sekundární protilátky v blokovacím roztoku, který byl připraven z 2,5 µl králičí protilátky (značené alkalickou fosfatasou) proti slepičím IgG a z 10 ml blokovacího roztoku. Po této inkubaci byla membrána 3x promyta 10 ml blokovacího roztoku a 3x roztokem PBS Triton X-100. Po promytí byla membrána inkubována s vyvolávacím roztokem připraveným z AP pufru o pH 9 (5,0 ml), BCIP (16,5 µl) a NBT (33,0 µl). Pro zastavení reakce byla membrána přenesena z vyvolávacího roztoku do destilované vody. Po vysušení mezi filtračními papírky byla membrána zdokumentována digitalizací.

3.4 Fluorescenční značení buněk

Pro značení plicních a bakteriálních buněk byla použita fluorescenční barviva PKH. Jedná se o barviva rozpustná v Diluentu C, která se trvale inkorporují do buněčné membrány. Inkorporaci do membrány buněk jim umožňují jejich alifatické řetězce.

Adherenci bakteriálních buněk na plicní epitelální buňky lze pozorovat díky fluorescenci v různých částech spektra. Plicní buňky byly značeny pomocí barviva PKH67, zatímco na označení buněk PAK bylo použito barvivo PKH26. Tato barviva se liší excitačním i emisním maximem. Barvivo PKH67 fluoreskuje v zelené části spektra a výrobce udává excitační maximum při vlnové délce 490 nm a emisní při 502 nm, zatímco PKH26 fluoreskuje v žluto-oranžové části spektra a podle výrobce je jeho excitační maximum 551 nm a emisní maximum 567 nm.

Fluorescenční značení obou typů buněk bylo prováděno na základě produktových listů barviv PKH67 a PKH26 a diplomové práce Mgr. Libuše Noskové^{91–93}.

3.4.1 Fluorescenční značení plicních epitelálních buněk pomocí sloučeniny PKH67

Před fluorescenčním značením buněčných linií byly buňky převedeny do buněčné suspenze subkultivací (viz. kapitola 3.2.4). Po odebrání množství buněk potřebného na barvení byly tyto buňky centrifugovány 5–10 min při 1000 RPM na centrifuze Hettich Universal 320 R a následně byly centrifugačně promyty 5 ml PBS (5–10 min, 1000 RPM, Hettich Universal 320 R). Po promytí byla peleta obsahující přibližně $4,8 \cdot 10^6$ buněk resuspendována ve 250 μ l Diluentu C a k takto připravené buněčné suspenzi byl přidán stejný objem 8 μ M roztoku barviva PKH67 v Diluentu C, který byl připraven těsně před přidáním k buněčné suspenzi. Po pečlivém promíchání pipetou probíhala inkubace 5 minut za tmy (pod alobalem) v CO₂ inkubátoru MCO-170AICUV při 37 °C a 5 % CO₂.

Po inkubaci bylo barvení plicních buněk zastaveno přidáním ekvivalentního objemu 1 % FBS. Po promíchání byla suspenze centrifugována (10 min, 1000 RPM, Hettich Universal 320 R). Po odstranění supernatantu byla peleta opět centrifugačně promyta (5 min, 1000 RPM, Hettich Universal 320 R) nejdříve 5 ml růstového média BEGM nebo LHC-9 a následně ještě 2x po 1 ml. Po závěrečném centrifugačním promytí byla peleta resuspendována v 1–2 ml růstového média a z takto připravené buněčné suspenze byl odebrán alikvot na počítání nabarvených buněk (viz. kapitola 3.2.5).

Fluorescence nabarvených buněk byla proměřena za použití černé destičky s průhledným dnem (Corning 96 CellBind® Black Polystyrol (COS96fb)) na přístroji Tecan Infinite M200 Pro za použití programu i-control. Pro měření relativní fluorescence byla nastavena optimalizovaná excitační vlnová délka 470 nm a emisní vlnová délka 505 nm. Parametr „gain“ byl nastaven na hodnotu 140. Fluorescence v jamkách destičky byla proměřena vícenásobně (vyplněný čtverec 3x3) se záznamem zespoďu. Následně byla fluorescence zkontrolována i na mikroskopu Nikon Eclipse (filtr 31001 FITC C87701) TE2002-U za použití programu NIS-Elements AR 3.00.

3.4.2 Fluorescenční značení buněk bakterií *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteriální kultura PAK byla po 14 hodinách kultivace v PS/LB médiu centrifugována 5 min při 12 000 RPM (Eppendorf 5418). Vzniklé pelety byly resuspendovány v PBS a na přístroji Metash V-5000 byla proměřena optická denzita při 600 nm (OD_{600}), na jejímž základě byla stanovena koncentrace bakterií ve vzorku. Z bakteriální suspenze o koncentraci $6 \cdot 10^8$ PA/ml ($OD_{600} = 1,000$) bylo odebráno množství bakterií potřebné pro barvení a toto množství bylo centrifugováno (5 min, 12 000 RPM, Eppendorf 5418).

Optimalizace barvení:

Nejdříve byly bakteriální buňky PAK barveny způsobem popsaným v diplomové práci⁸⁶ a následně byly testovány různé podmínky barvení:

- Sonikace barviva PKH26⁹²
- Vyšší / nižší teplota centrifugace⁹⁴
- Náhrada Diluentu C 50% DMSO
- Použití 2 různých růstových médií pro kultivaci PAK: PS médium / LB médium
- Změna podmínek kultivace:
 - Kultivace bakteriální kultury PAK při 180 RPM bez přístupu vzduchu
 - Kultivace bakteriální kultury PAK odebrané z roztěru PAK na agarové plotně přibližně po 24 hodinách inkubace při 37 °C
- Záměna PBS za Tris-HCl / Tris-HCl s EDTA / citrát-boraxový pufr o různém pH a složení:
 - *Tris-HCl pufr (pH 7,4)*: 20 mM Tris báze; voda; HCl (na úpravu pH)
 - *Pufr Tris-HCl s EDTA (pH 7,4)*: 10 mM EDTA; Tris-HCl pufr (pH 7,4)
 - *Citrát-boraxový pufr (pH 5; 7; 9)*: 50 mM citrát; 50 mM borax; destilovaná voda; HCl nebo NaOH (na úpravu pH)
- Kultivace bakteriální kultury PAK s růstovým médiem v přítomnosti 1 mM EDTA⁹⁵
- Náhrada sloučeniny PKH26 za SYBR Green II⁹⁶ a Diluentu C za destilovanou vodou (použitý roztok byl připraven naředěním 10 000x koncentrované sloučeniny SYBR Green II destilovanou vodou)

- Náhrada sloučeniny PKH26 za dsGreen⁹⁷
- Použití 10-násobného množství barviva PKH26 aj Diluentu C (v porovnání s předchozí prací⁸⁶) / 10-násobné koncentrace barviva PKH26 v Diluentu C⁹⁸

Barvení PAK pod vlivem různých podmínek bylo vždy porovnáno s obarvením PAK provedeným podle postupu uvedeného v diplomové práci⁸⁶ a zkontrolováno na fluorescenčním mikroskopu.

Postup fluorescenčního značení buněk PAK pomocí sloučeniny PKH26:

Po optimalizaci barvení byly bakteriální buňky PAK fluorescenčně značeny barvivem PKH26 tak, že nejdříve byla vzniklá peleta po odstranění supernatantu resuspendována v Diluentu C (25 μ l Diluentu C na $6 \cdot 10^8$ PA). Po důkladném promíchání přes špičku pipety bylo k této bakteriální suspenzi přidáno ekvivalentní množství (25 μ l na $6 \cdot 10^8$ PA) čerstvě připraveného roztoku barviva PKH26 v Diluentu C, který byl připraven smísením 4 μ l zásobního roztoku PKH26 a 21 μ l Diluentu C. Po přidání roztoku barviva v Diluentu C k bakteriální suspenzi byla vzniklá směs důkladně promíchána špičkou pipety a inkubována 30 minut za tmy (pod alobalem) při 37 °C v inkubátoru IB-01E. Po inkubaci bylo barvení bakteriálních buněk zastaveno přidávkem ekvivalentního množství 1% FBS v PBS. Po promíchání byla směs centrifugována 10 min při 13 000 RPM (Eppendorf 5418) a peleta byla resuspendována v 1 ml PBS. Centrifugační promytí bakteriálních buněk bylo zopakováno ještě 4x (nejdříve 10 min při 13 000 RPM a pak 3x 5 min při 12 000 RPM). Po poslední centrifugaci byly pelety resuspendovány v 1–2 ml PBS. Opět bylo proměřeno OD₆₀₀, čímž byla zkontrolována koncentrace bakterií v suspenzi. Pokud koncentrace neodpovídala (tj. OD₆₀₀ byla větší než 1,000), ke směsi byl přidán potřebný objem PBS tak, aby optická denzita při 600 nm byla rovná jedné.

Výsledná fluorescence byla proměřena na přístroji Tecan Infinite M200 Pro při optimalizované vlnové délce excitace 522 nm a emise 569 nm. Pro vrchní vícenásobné měření v 96-jamkové černé destičce s průhledným dnem (Corning 96 CellBind® Black Polystyrol (COS96fb)) byl nastaven parametr „gain“ 160, pozice Z 17 000 a vyplněný čtverec 3x3. Fluorescence byla zhodnocena také vizuálně na mikroskopu Nikon Eclipse (filtr 31002 Rdil C87702) za použití programu NIS-Elements AR 3.00.

3.5 Adherenční test

Po fluorescenčním označení (viz. kapitola 3.4.1) a spočítání buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1 (viz. kapitola 3.2.5) byly buněčné suspenze naředěny růstovým médiem BEGM nebo LHC-9 temperovaným na 37 °C na koncentraci $5,6 \cdot 10^5$ buněk/ml a z takto naředěné suspenze bylo do jamek 96-jamkové černé destičky s průhledným dnem (Corning 96 CellBind® Black Polystyrol (COS96fb)) aplikováno po 150 µl, aby výsledné množství buněk odpovídalo $8,4 \cdot 10^4$ buněk/jamka. Analogicky byly pro kontrolu barvení do několika jamek přidány i fluorescenčně neoznačené buňky. Buňky byly ponechány k inkubaci za tmy (pod alobalem) v CO₂ inkubátoru MCO-170AICUV při 37 °C a 5 % CO₂ po dobu 42–45 hodin, aby došlo k regeneraci buněk (jejich povrchových struktur) po fluorescenčním značení a jejich adherenci na povrch jamky.

Adherenční test byl prováděn s protilátkami nebo glykoklastrami. Při použití protilátek bylo nutné nejdříve zjistit koncentraci zásobního roztoku protilátky a provést dialýzu následovným postupem. Protilátka byla 5 min centrifugována při 10 000 RPM (Eppendorf 5418). Ze supernatantu bylo odebráno množství naředěné podle potřeby tak, aby proměřená absorbance (280 nm, Spektromom 195D) byla menší než 1,000. Z výsledné hodnoty absorbance a koeficientu 1,094 byla pak vypočítána koncentrace zásobního roztoku protilátky podle vztahu $c \text{ [mg/ml]} = A_{280} \cdot \text{ředění} \cdot 1,094$. Zásobní roztok protilátky byl naředěn na 1–2 ml roztoku o koncentraci 3–4 mg/ml pomocí *dialyzačního pufu* (PBS), který byl připraven z 10 l destilované vody; 78,5 g NaCl; 6,5 g Na₂HPO₄ · 12H₂O a 1,5 g NaH₂PO₄ · 2H₂O. Takto připravený roztok protilátky v dialyzační nádobce byl dialyzován proti 10 litrům PBS za konstantního míchání na magnetické míchačce přes noc při 4 °C. Na druhý den byla opětovně proměřena absorbance dialyzovaného roztoku protilátky a koncentrace byla upravena na 2,5 mg/ml.

Následující den po aplikaci plicních buněk do jamek destičky byla kultura PAK skladována při -80 °C rozmrazena při laboratorní teplotě. Po naočkování 20 µl kultury do 10 ml PS nebo LB média (při zaplnění 10 % Erlenmayerovy baňky) byla takto připravena bakteriální suspenze ponechána ke kultivaci (podle kapitoly 3.3.1) za konstantního třepání. Kultivace probíhala při 37 °C a 150 RPM 14 hodin (Infors HT Multitron Pro).

Po ukončení kultivace byly bakterie kvantifikovány (viz. 3.3.3), fluorescenčně označeny (viz. kapitola 3.4.2) a použity pro přípravu zásobních suspenzí pro experiment.

Byly připraveny 2 typy zásobních suspenzí – suspenze bez multivalentního inhibitoru (neošetřené buňky) a suspenze s multivalentním inhibitorem (ošetřené buňky). Použité objemy jednotlivých suspenzí odpovídaly výslednému objemu (počtu) jamek, do kterých byla daná suspenze aplikována v množství 50 μ l suspenze/jamka. Objemy jednotlivých složek suspenze byly propočítány tak, aby množství PAK odpovídalo $8,4 \cdot 10^6$ PAK/jamka, výsledná koncentrace glykoklastru v suspenzi se pohybovala v rozmezí 0–500 μ M, a tedy použitý objem glykoklastru byl závislý na koncentraci zásobního roztoku glykoklastru, na výsledné koncentraci glykoklastru a výsledném objemu (počtu) jamek, do kterých byla tato suspenze aplikována. Každá suspenze byla do výsledného objemu doplněna PBS.

Připravené zásobní suspenze byly inkubovány 30 minut za tmy (pod alobalem) při laboratorní teplotě. Během inkubace bylo z jamek destičky z prvního dne odsáto růstové médium a buňky adherované na povrch jamek byly 3x promyty PBS (nejdříve 1x 150 μ l a pak 2x 100 μ l). Po 30-minutové inkubaci byly zásobní suspenze PAK aplikovány do jamek destičky v objemu 50 μ l/jamka a jamky se suspenzí byly inkubovány 2 hodiny za tmy (pod alobalem) při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly nenavázané bakterie odstraněny promytím PBS (1x 150 μ l a 2x 100 μ l). Po posledním promytí byly buněčné linie s navázanými bakteriemi převrstveny 100 μ l PBS, aby nedošlo k jejich vysušení. Pro kontrolu barvení byly do několika jamek bez epiteliálních plicních buněk aplikovány fluorescenčně označené bakteriální buňky a do několika jamek bez epiteliálních plicních buněk označené bakteriální buňky ve stejném množství, tj. $8,6 \cdot 10^6$ PAK/jamka a objem v jamce byl doplněn pomocí PBS do 100 μ l.

Ihned po promytí a převrstvení buněk v jamkách byla měřena fluorescence na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro za použití programu i-Control. Vždy byla měřena nejdříve fluorescence bakterií (PKH26), pak fluorescence buněk (PKH67) a z jejich vzájemného poměru byla nakonec získána relativní fluorescence. Pro měření byly použity následující parametry:

- *PKH67*: Ex/Em = 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3 pro 96-jamkovou destičku), „gain“ nastaven na hodnotu 140
- *PKH26*: Ex/Em = 522/569 nm, vrchní čtení destičky (pozice Z = 17 000), vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3 pro 96-jamkovou destičku), „gain“ byl nastaven na hodnotu 160

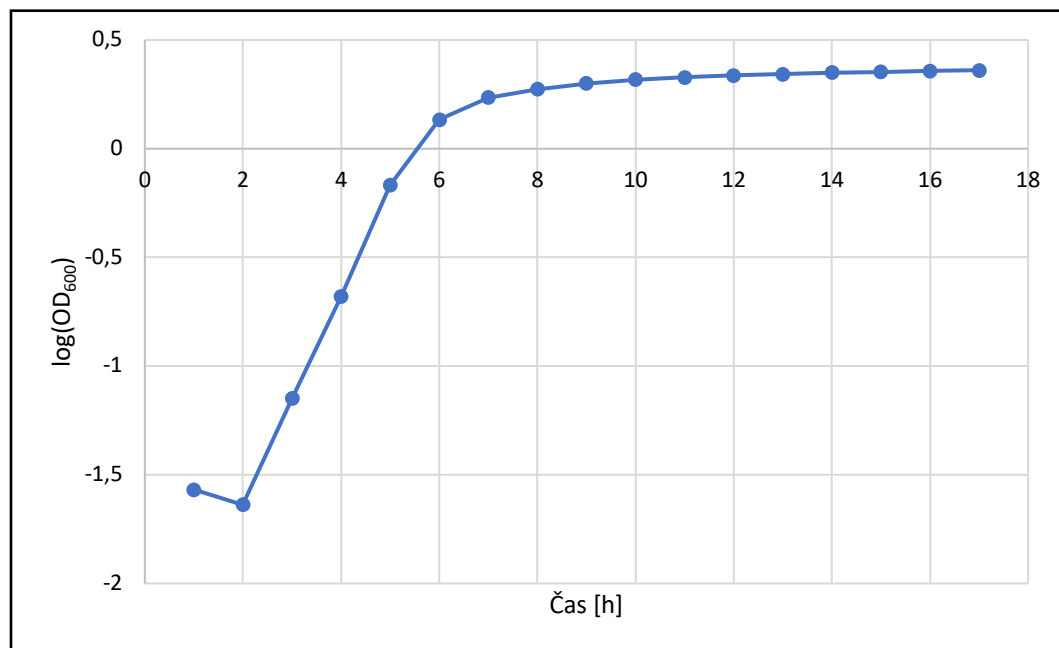
Preparáty plicních buněčných linií s adherovanými PAK byly na závěr zkontrolovány za použití programu NIS-Elements AR 3.00 a mikroskopu Nikon Eclipse. Pro bakteriální a plicní epitelální buňky byly použity odlišné filtry:

- *Bakteriální buňky (PKH26):* 31002 RdiI C87702
- *Plicní epitelální buňky (PKH67):* 31001 FITC C87701q

4 Výsledky

4.1 Růstová křivka PAK

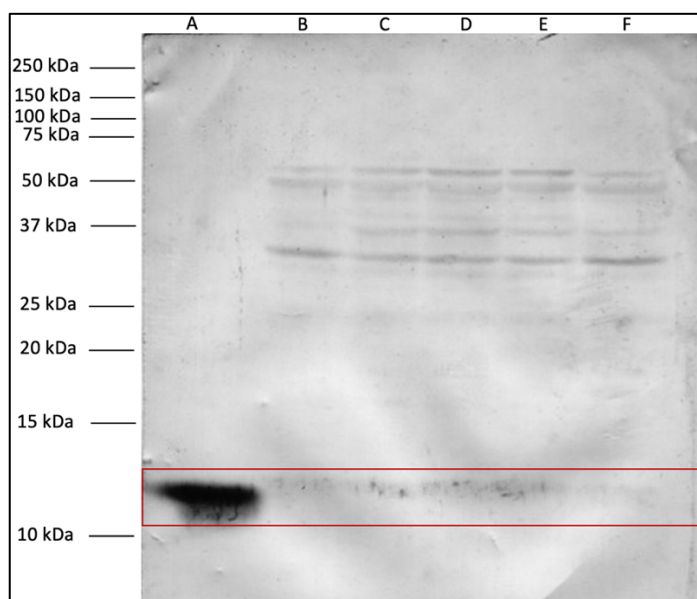
Pro sledování růstu bakteriální kultury PAK kultivované v PS médiu byly každou hodinu během 17 hodin odebrány alikvoty této kultury a proměřeny OD_{600} . Růstová křivka je znázorněná jako závislost $\log(OD_{600})$ na čase (obr. 4.1, str. 53).



Obr. 4.1: Růstová křivka PAK. Byl studován růst bakteriální kultury PAK v PS médiu a výsledná křivka byla znázorněná jako závislost $\log(OD_{600})$ na čase.

4.2 Elektroforesa a „Western Blotting“

Dále bylo důležité zjistit, zda a za jakých podmínek (médiu, bakteriální kmen) bakterie produkují PA-IIL, který je jedním z rozhodujících faktorů pro jejich adhezenci na epiteliální buňky. Proteiny obsažené v bakteriálním lyzátu různých kmenů PA kultivovaných v PS nebo LB médiu 14 hodin byly separovány pomocí SDS-elektroforesy. Po následném přenosu proteinů z gelu na membránu byla provedena imunodetekce exprimovaného lektinu PA-IIL. Vyvolaná membrána je zobrazena na obr. 4.2 (str. 54).



Obr. 4.2: NC membrána po imunodetekci lektinu PA-III. Byla studována exprese PA-III v kultuře různých kmenů PA s využitím primární (slepičí protilátka – frakce získaná po imunizaci (S8) o koncentraci 30 µg/ml) a sekundární protilátky (králičí protilátka (značena alkalickou fosfatasou) proti slepičím IgG ředěna v poměru 1 : 4000). Bakterie byly kultivovány v LB (sloupec A až E) nebo PS (sloupec F) médiu v Erlenmayerově baňce při 37 °C za konstantního třepání (150 RPM, Infors HT Multitron Pro) po dobu 14 hodin. Jako standard sloužil rekombinantní PA-III. Na membráně se vzorky nachází v pořadí: **A** = standard PA-III; **B** = PAK (kultivováno v LB médiu); **C** = PAK (kultivováno v PS médiu); **D** = RH813; **E** = PACF; **F** = PA1022. K detekci byla použita protilátková frakce po imunizaci – S8.

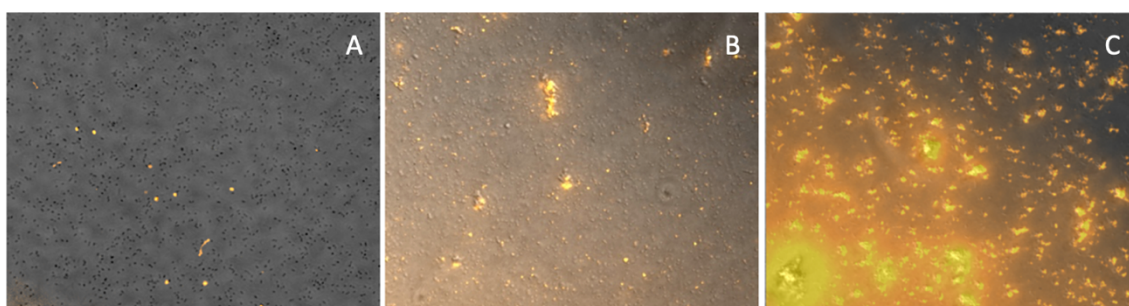
4.3 Barvení buněk *Pseudomonas aeruginosa*

Z důvodu neúspěšnosti barvení buněk PAK způsobem popsáním v diplomové práci Mgr. Michaely Vaškové⁸⁶ bylo přistoupeno k testování různých podmínek barvení. Obarvení PAK bylo vždy zkontrolováno na fluorescenčním mikroskopu. Reprezentativní mikroskopické snímky znázorňující barvení PAK jsou zobrazeny na obr. 4.3 (str. 55).

Na základě měření fluorescence nebo mikroskopického pozorování lze říct, že na barvení PAK neměla vliv sonikace, teplota centrifugace, změna růstového média, kultivace bakteriální kultury PAK odebrané po inkubaci na agarové plotně, náhrada PBS za Tris nebo citrát-boraxový pufr ani barvení pomocí dsGreen.

Na obarvení PAK mělo mírný vliv použití 50% DMSO jako rozpouštědla pro barvivo PKH26, kultivace při 180 RPM bez přístupu vzduchu a použití EDTA (ať už ve formě Tris-EDTA pufru jakožto náhrady za PBS nebo její přítomnost v růstovém médiu při kultivaci PAK za běžných podmínek (viz. kapitola 3.3.1)).

Úspěšně se podařilo buňky PAK nabarvit pomocí 100x koncentrované sloučeniny SYBR Green II, ale barvivo se postupně z bakteriálních buněk uvolňovalo a značilo i plicní buňky použité v adhezenčním testu. Bylo proto pro účely této práce vyhodnoceno jako nevhodné. Největší úspěch byl zaznamenán při použití 10x vyššího množství barviva PKH26 vůči množství uvedenému v diplomové práci⁸⁶. Při použití 10x vyšší koncentrace barviva PKH26 v roztoku a 10x vyššího množství barviva PKH26 a i Diluentu C na stejný počet bakteriálních buněk byl výsledek barvení porovnatelný, a proto bylo pro další postup zvoleno barvení pomocí 10-násobné koncentrace barviva PKH26 v Diluentu C.



Obr. 4.3: Reprezentativní mikroskopický snímek znázorňující fluorescenční značení PAK. Neúspěšné fluorescenční značení PAK při použití Tris pufru (A), zvýšení efektivity značení PAK při použití 50% DMSO (B), úspěšné fluorescenční značení PAK při použití 10x vyšší koncentrace barviva PKH26 (C). Na obrázku je znázorněn překryv nativních snímků a fluorescence PAK (filtr 31002 RdiI C87702). Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U pomocí programu NIS-Elements AR 3.00 a zvětšení 40x. Snímky byly kolorovány v programu ImageJ.

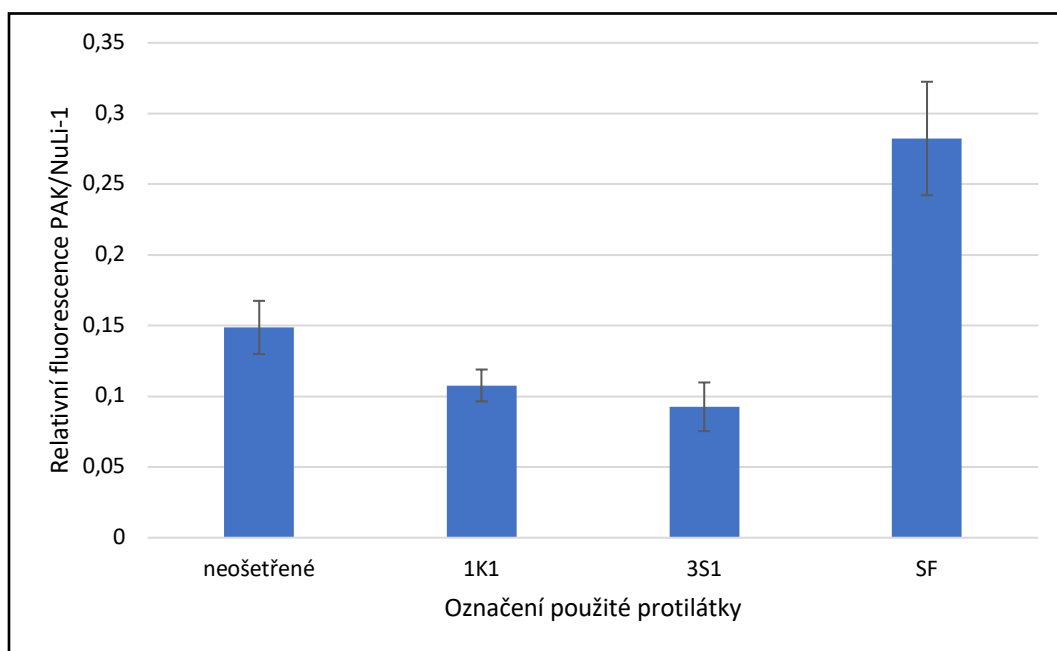
4.4 Adherenční testy

Nejprve byla ověřena míra adherence bakteriálních buněk (PAK) na plicní epitelální buňky (NuLi-1 či CuFi-1) v přítomnosti anti-PA-IIL slepičích protilátek a následně pak byl studován vliv multivalentních inhibitorů založených na fukose. Jako kontrola sloužily neošetřené bakteriální buňky (PAK navázané na plicní epitelální buňky v nepřítomnosti anti-PA-IIL slepičích protilátek nebo multivalentních inhibitorů).

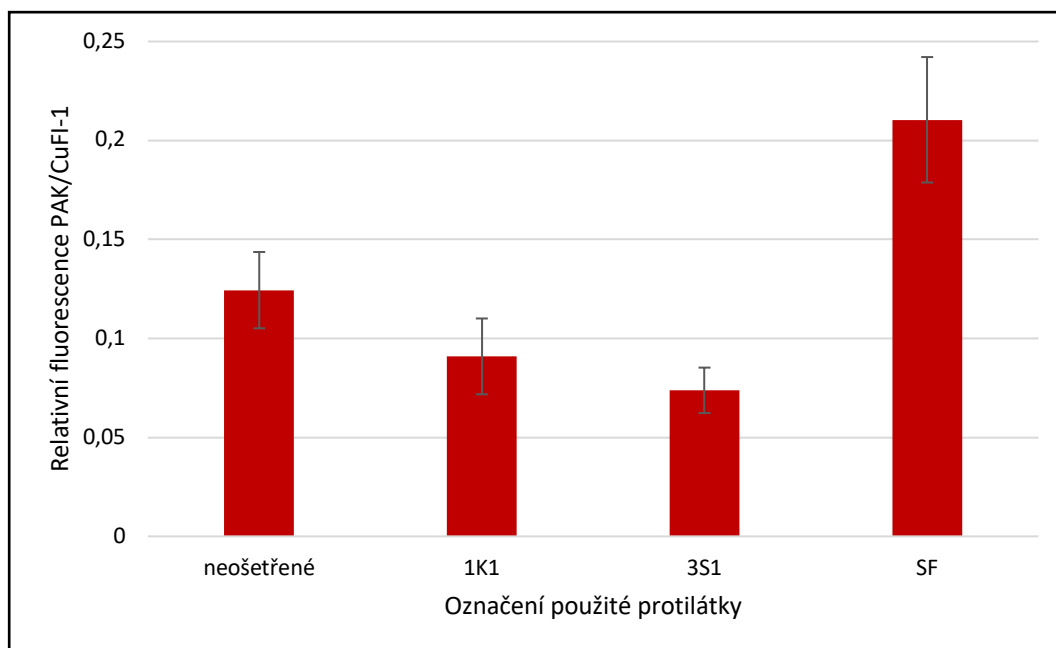
Před provedením adhezenčního testu byly plicní epitelální buňky (NuLi-1 a CuFi-1) fluorescenčně označeny barvivem PKH67 a bakteriální buňky (PAK) sloučeninou PKH26. Po proměření fluorescence byla míra adherence zhodnocena jako relativní fluorescence PAK/NuLi-1 nebo PAK/CuFi-1.

4.4.1 Adherenční testy se slepičími protilátkami

V těchto testech byl zjišťován vliv různých frakcí slepičích protilátek na adherenci bakteriálních buněk (PAK) k plicním epiteliálním buňkám (NuLi-1 a CuFi-1). Cílem bylo porovnání trendů v míře adherence s předchozí diplomovou prací⁸⁶. Výsledky graficky znázorňující adherenci PAK na NuLi-1 jsou uvedeny na obr. 4.4 (str. 56) a adherenci PAK na CuFi-1 na obr. 4.5 (str. 57).



Obr. 4.4: Adherence bakteriálních buněk PAK na plicní epiteliální buňky NuLi-1. Vynesené hodnoty jsou poměry relativní fluorescence PAK (*PKH26*: Ex/Em: 522/569 nm, vrchní čtení destičky ($Z = 17\ 000$), vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3), „gain“ 160) vůči relativní fluorescenci NuLi-1 (*PKH67*: Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3), „gain“ 140). Výsledné relativní fluorescence vynesené do grafu jsou poměry průměrných hodnot fluorescence ze 3 jamek a chybové úsečky jsou jejich směrodatné odchylky. Byly použity slepičí protilátky: frakce 1K1 (kontrolní), 3S1 (specifická) a spojené frakce SF (frakce 3R1-8R1) o výsledné koncentraci 1 mg/ml. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky.

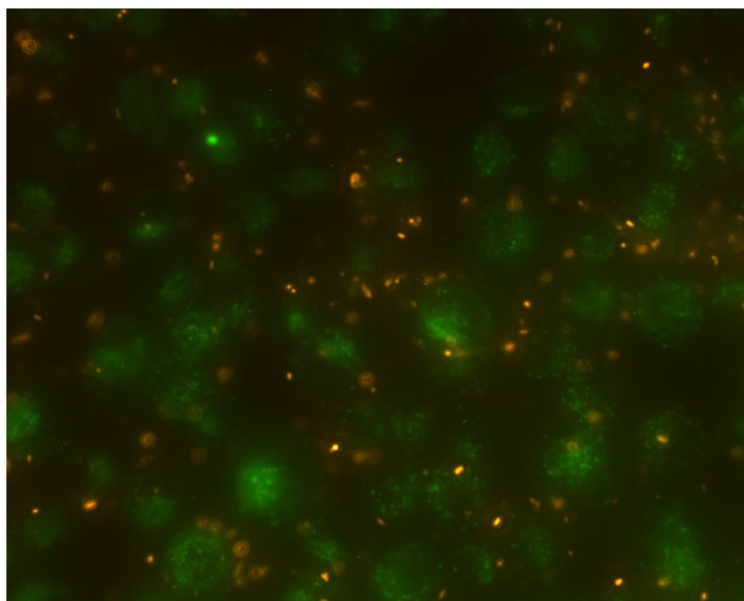


Obr. 4.5: Adherence bakteriálních buněk PAK na plicní epitelální buňky CuFi-1. Vynesené hodnoty jsou poměry relativní fluorescence PAK (*PKH26*: Ex/Em: 522/569 nm, vrchní čtení destičky ($Z = 17\ 000$), vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3), „gain“ 160) vůči relativní fluorescenci CuFi-1 (*PKH67*: Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3), „gain“ 140). Výsledné relativní fluorescence vynesené do grafu jsou poměry průměrných hodnot fluorescence ze 3 jamek a chybové úsečky jsou jejich směrodatné odchylky. Byly použity slepičí protilátky: frakce 1K1 (kontrolní), 3S1 (specifická) a spojené frakce SF (frakce 3R1-8R1) o výsledné koncentraci 1 mg/ml. Jako kontrola sloužily neošetřené buňky.

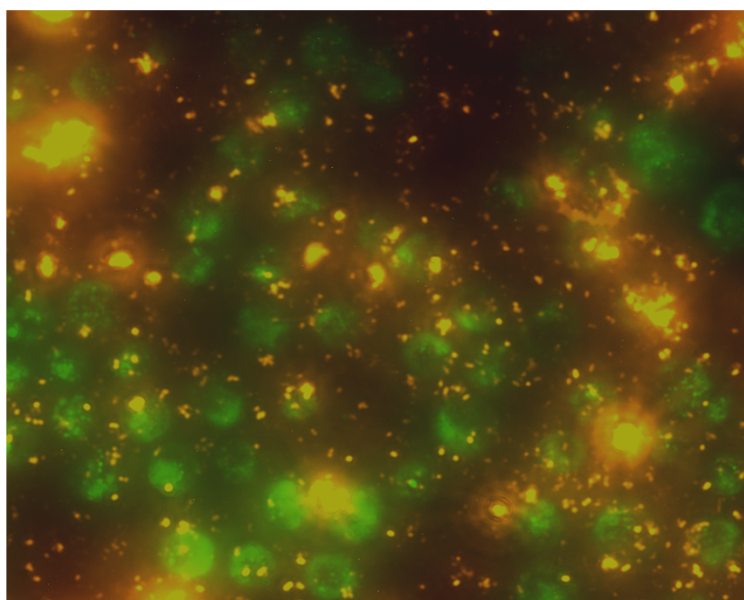
4.4.2 Adherenční testy s multivalentními inhibitory

Na obou liniích plicních buněk byly 3x nezávisle na sobě testovány 3 různé trivalentní inhibitory s navázanými molekulami fukosy na konci ramen jednotlivých molekul. Byly testovány látky s označením LTS-18, LTS-38 a LTS-42, přičemž poslední z nich má ke své základní molekule připojeno antibiotikum ciprofloxacin. Všechny látky byly testovány v rozsahu koncentrací 0–500 μM . Výsledné efekty jednotlivých látek na míru adherence PAK na plicní buňky jsou znázorněny na obr. 4.8, 4.10, 4.12, 4.14, 4.16 a 4.18 (str. 59 až 64) jako průměr poměrů relativních fluorescencí PAK na fluorescenci plicních buněk vztažených na relativní fluorescenci neošetřených buněk považovanou za 100 %.

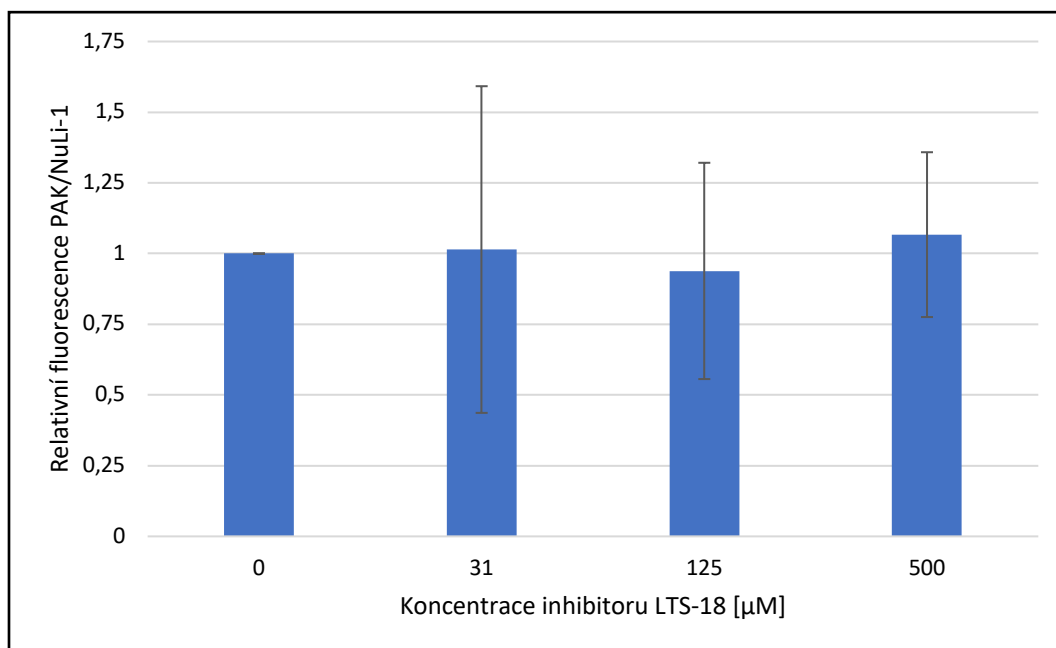
Míra adherence PAK na plicní buňky byla po proměření fluorescence zkontrolována na mikroskopu. Černobílé snímky byly počítačově kolorovány v programu ImageJ. Překryvy reprezentativních snímků PAK a plicních buněk znázorňující míru adherence jsou vyobrazeny na obr. 4.6, 4.7, 4.9, 4.11, 4.13, 4.15, 4.17 a 4.19 (str. 58 až 64).



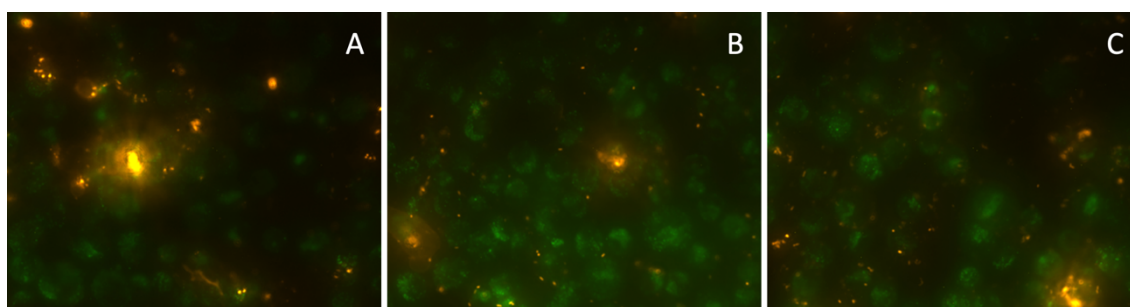
Obr. 4.6: Překryv mikroskopických snímků fluorescence NuLi-1 a PAK bez ošetření multivalentním inhibítozem. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U pomocí programu NIS-Elements AR 3.00 a zvětšení 40x. Pro plicní epiteliální buňky NuLi-1 byl použit filtr 31001 FITC C87701 a pro buňky PAK filtr 31002 RdiI C87702. Snímky byly kolorovány v programu ImageJ.



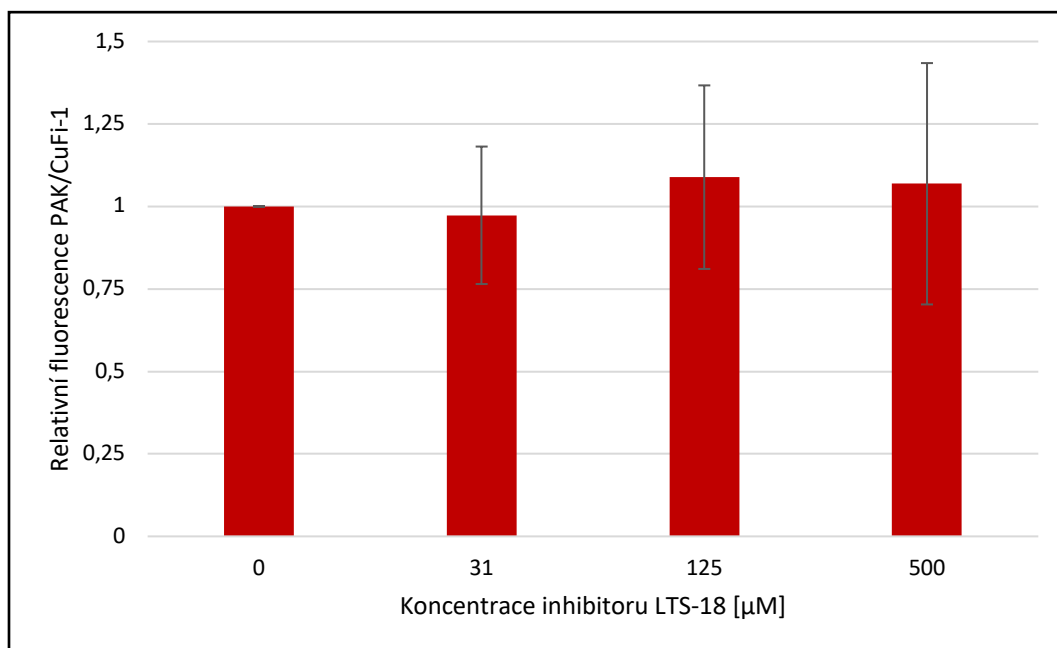
Obr. 4.7: Překryv mikroskopických snímků fluorescence CuFi-1 a PAK bez ošetření multivalentním inhibítozem. Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U pomocí programu NIS-Elements AR 3.00 a zvětšení 40x. Pro plicní epiteliální buňky CuFi-1 byl použit filtr 31001 FITC C87701 a pro buňky PAK filtr 31002 RdiI C87702. Snímky byly kolorovány v programu ImageJ.



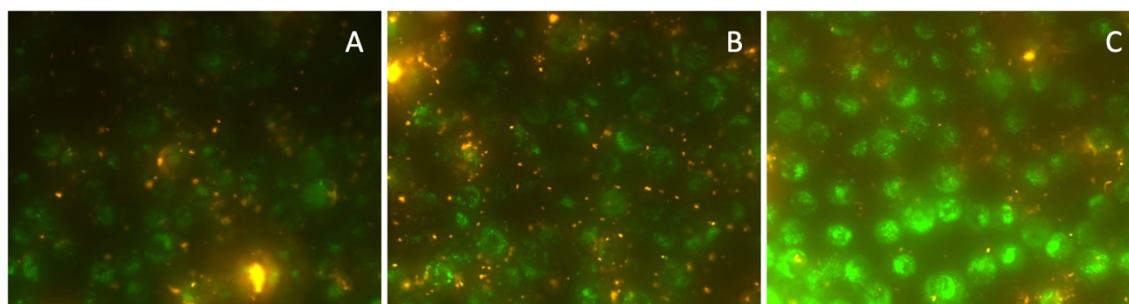
Obr. 4.8: Vliv multivalentního inhibitoru LTS-18 na relativní adhezenci buněk PAK na plicní epitelální buňky NuLi-1. Vynesené hodnoty jsou průměrem poměrů relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, vrchní čtení destičky (Z = 17 000), vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3), „gain“ 160) vůči relativní fluorescenci NuLi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3), „gain“ 140) ze 3 nezávislých měření. Během experimentu byly otestovány 3 různé koncentrace inhibitoru LTS-18 (31 µM, 125 µM a 500 µM) a jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku inhibitoru).



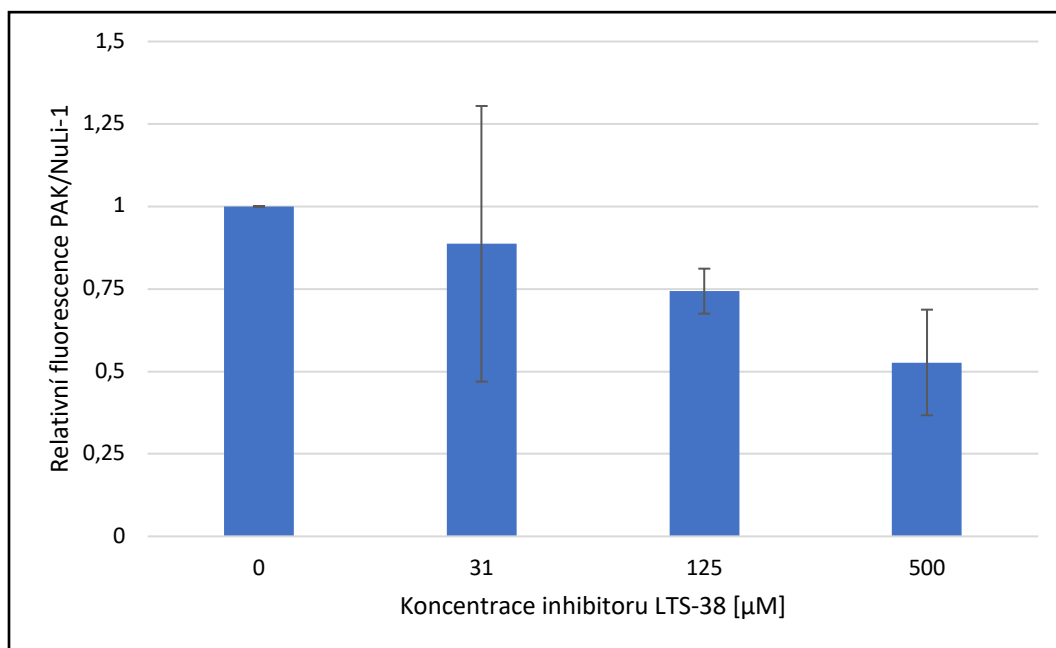
Obr. 4.9: Mikroskopické snímky NuLi-1 a PAK po ošetření multivalentním inhibitorem LTS-18 o koncentraci 31 µM (A), 125 µM (B), 500 µM (C). Překryv snímků fluorescence NuLi-1 (filtr 31001 FITC C87701) a fluorescence PAK (filtr 31002 RdiI C87702) pořízených na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U pomocí programu NIS-Elements AR 3.00 a zvětšení 40x. Snímky byly kolorovány v programu ImageJ.



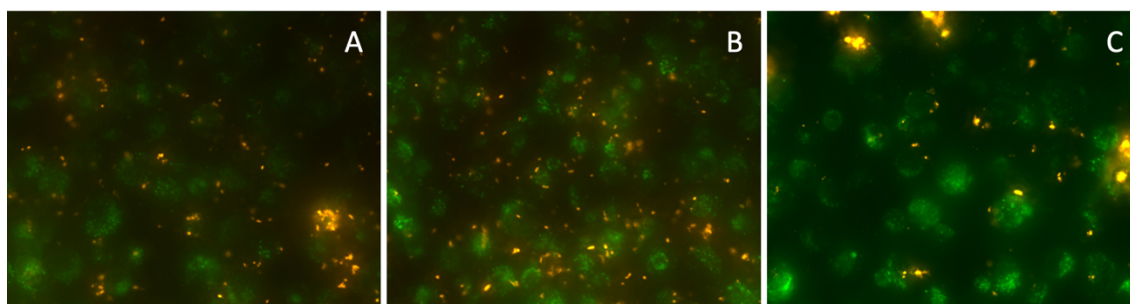
Obr. 4.10: Vliv multivalentního inhibitoru LTS-18 na relativní adhezenci buněk PAK na plicní epiteliální buňky CuFi-1. Vynesené hodnoty jsou průměrem poměrů relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, vrchní čtení destičky (Z = 17 000), vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3), „gain“ 160) vůči relativní fluorescenci CuFi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3), „gain“ 140) ze 3 nezávislých měření. Během experimentu byly otestovány 3 různé koncentrace inhibitoru LTS-18 (31 µM, 125 µM a 500 µM) a jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přídavku inhibitoru).



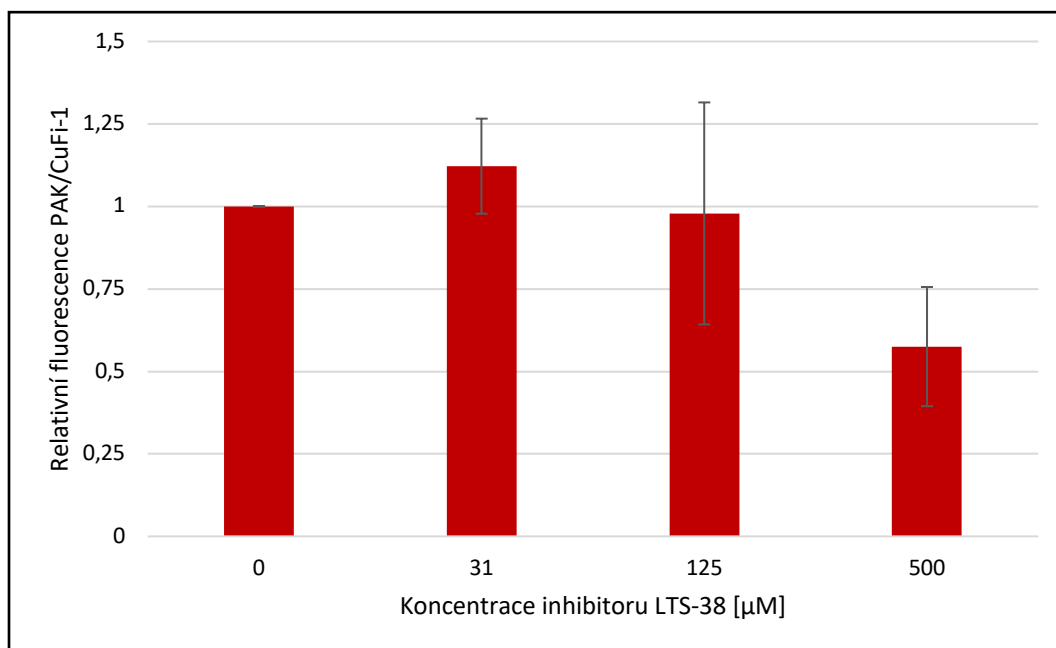
Obr. 4.11: Mikroskopické snímky CuFi-1 a PAK po ošetření multivalentním inhibitorem LTS-18 o koncentraci 31 µM (A), 125 µM (B), 500 µM (C). Překryv snímků fluorescence CuFi-1 (filtr 31001 FITC C87701) a fluorescence PAK (filtr 31002 RdiI C87702) pořízených na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U pomocí programu NIS-Elements AR 3.00 a zvětšení 40x. Snímky byly kolorovány v programu ImageJ.



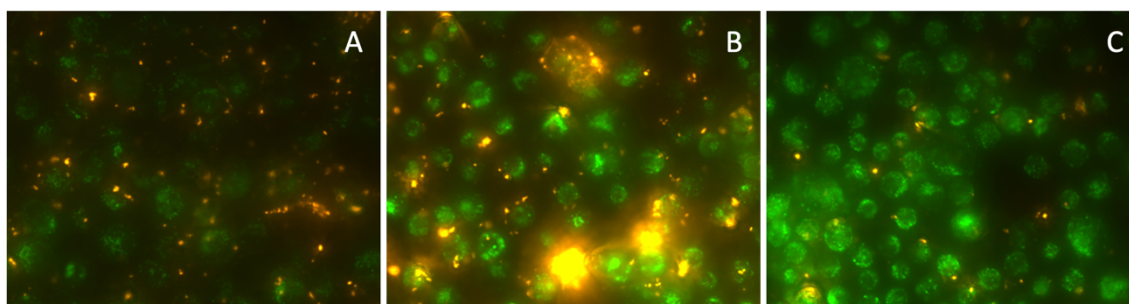
Obr. 4.12: Vliv multivalentního inhibitoru LTS-38 na relativní adhezenci buněk PAK na plicní epiteliální buňky NuLi-1. Vynesené hodnoty jsou průměrem poměrů relativní fluorescence PAK (*PKH26*: Ex/Em: 522/569 nm, vrchní čtení destičky (Z = 17 000), vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3), „gain“ 160) vůči relativní fluorescenci NuLi-1 (*PKH67*: Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3), „gain“ 140) ze 3 nezávislých měření. Během experimentu byly otestovány 3 různé koncentrace inhibitoru LTS-38 (31 µM, 125 µM a 500 µM) a jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku inhibitoru).



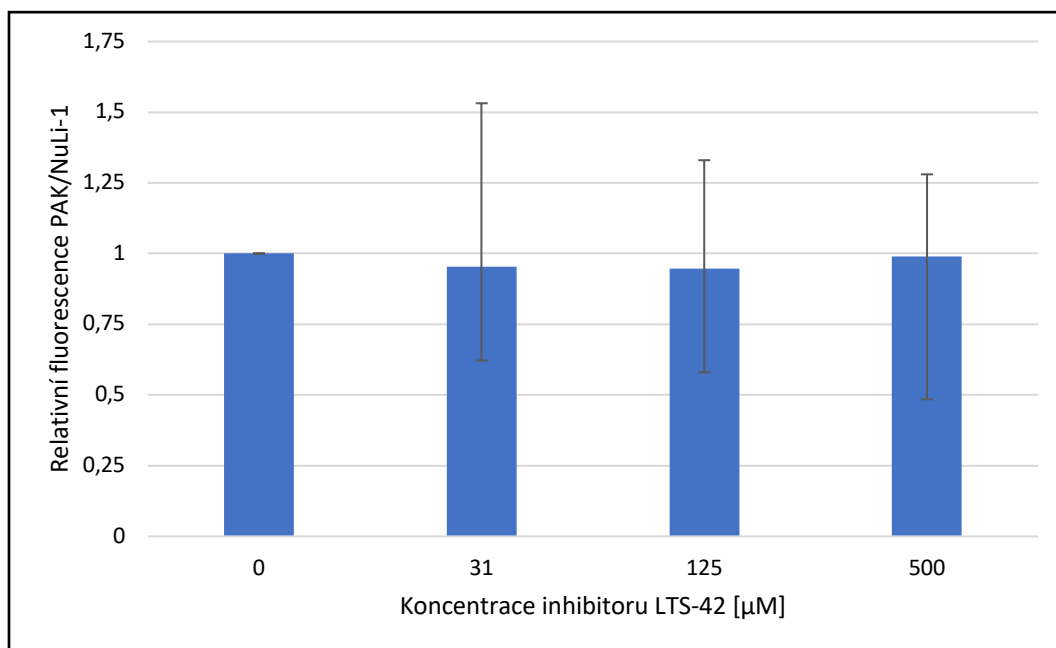
Obr. 4.13: Mikroskopické snímky NuLi-1 a PAK po ošetření multivalentním inhibitorem LTS-38 o koncentraci 31 µM (A), 125 µM (B), 500 µM (C). Překryv snímků fluorescence NuLi-1 (filtr 31001 FITC C87701) a fluorescence PAK (filtr 31002 RdiI C87702) pořízených na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U pomocí programu NIS-Elements AR 3.00 a zvětšení 40x. Snímky byly kolorovány v programu ImageJ.



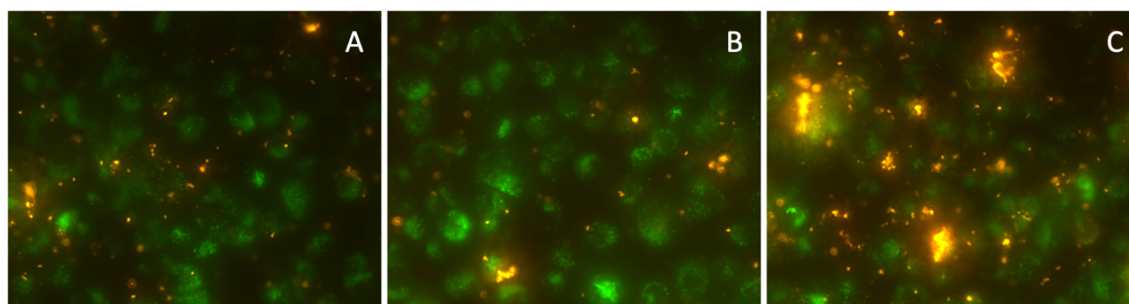
Obr. 4.14: Vliv multivalentního inhibitoru LTS-38 na relativní adhezenci buněk PAK na plicní epitelální buňky CuFi-1. Vynesené hodnoty jsou průměrem poměrů relativní fluorescence PAK (PKH26: Ex/Em: 522/569 nm, vrchní čtení destičky (Z = 17 000), vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3), „gain“ 160) vůči relativní fluorescenci CuFi-1 (PKH67: Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3), „gain“ 140) ze 3 nezávislých měření. Během experimentu byly otestovány 3 různé koncentrace inhibitoru LTS-38 (31 μM, 125 μM a 500 μM) a jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přídavku inhibitoru).



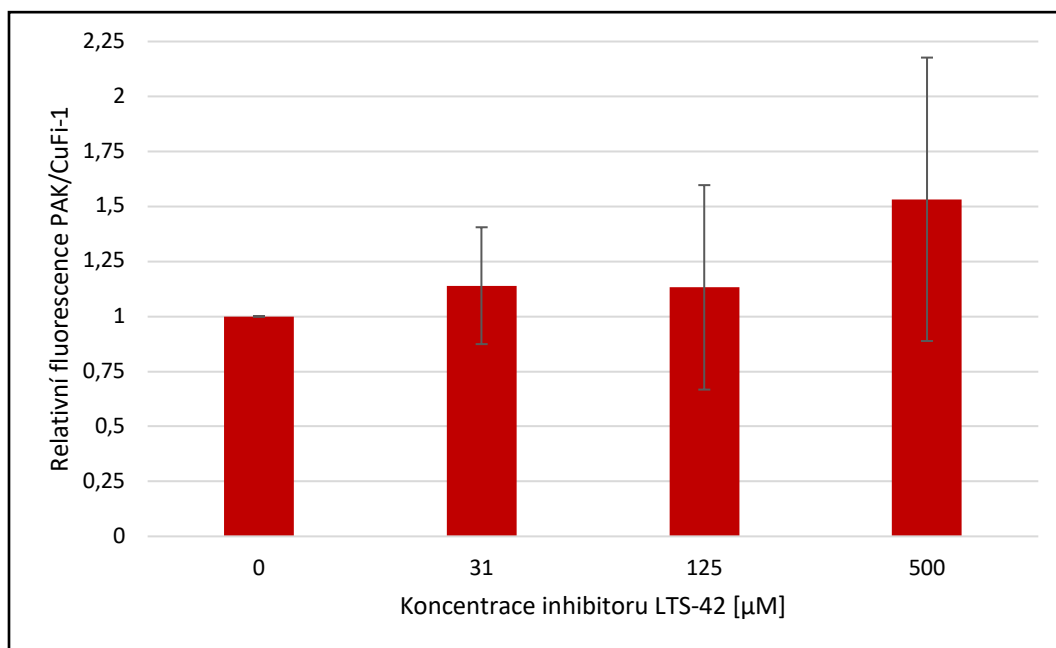
Obr. 4.15: Mikroskopické snímky CuFi-1 a PAK po ošetření multivalentním inhibitorem LTS-38 o koncentraci 31 μM (A), 125 μM (B), 500 μM (C). Překryv snímků fluorescence CuFi-1 (filtr 31001 FITC C87701) a fluorescence PAK (filtr 31002 RdiI C87702) pořízených na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U pomocí programu NIS-Elements AR 3.00 a zvětšení 40x. Snímky byly kolorovány v programu ImageJ.



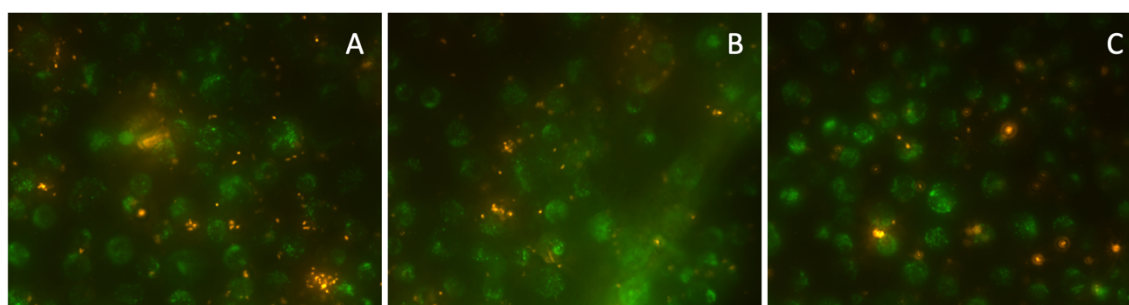
Obr. 4.16: Vliv multivalentního inhibitoru LTS-42 na relativní adhezenci buněk PAK na plicní epiteliální buňky NuLi-1. Vynesené hodnoty jsou průměrem poměrů relativní fluorescence PAK (*PKH26*: Ex/Em: 522/569 nm, vrchní čtení destičky (Z = 17 000), vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3), „gain“ 160) vůči relativní fluorescenci NuLi-1 (*PKH67*: Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3), „gain“ 140) ze 3 nezávislých měření. Během experimentu byly otestovány 3 různé koncentrace inhibitoru LTS-42 (31 µM, 125 µM a 500 µM) a jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku inhibitoru).



Obr. 4.17: Mikroskopické snímky NuLi-1 a PAK po ošetření multivalentním inhibitorem LTS-42 o koncentraci 31 µM (A), 125 µM (B), 500 µM (C). Překryv snímků fluorescence NuLi-1 (filtr 31001 FITC C87701) a fluorescence PAK (filtr 31002 RdiI C87702) pořízených na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U pomocí programu NIS-Elements AR 3.00 a zvětšení 40x. Snímky byly kolorovány v programu ImageJ.



Obr. 4.18: Vliv multivalentního inhibitoru LTS-42 na relativní adhezenci buněk PAK na plicní epitelální buňky CuFi-1. Vynesené hodnoty jsou průměrem poměrů relativní fluorescence PAK (*PKH26*: Ex/Em: 522/569 nm, vrchní čtení destičky (Z = 17 000), vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3), „gain“ 160) vůči relativní fluorescenci CuFi-1 (*PKH67*: Ex/Em: 470/505 nm, spodní čtení destičky, vícenásobné čtení jamky (vyplněný čtverec 3x3), „gain“ 140) ze 3 nezávislých měření. Během experimentu byly otestovány 3 různé koncentrace inhibitoru LTS-42 (31 µM, 125 µM a 500 µM) a jako kontrola sloužily neošetřené buňky (bez přidavku inhibitoru).



Obr. 4.19: Mikroskopické snímky CuFi-1 a PAK po ošetření multivalentním inhibitorem LTS-42 o koncentraci 31 µM (A), 125 µM (B), 500 µM (C). Překryv snímků fluorescence CuFi-1 (filtr 31001 FITC C87701) a fluorescence PAK (filtr 31002 RdiI C87702) pořízených na mikroskopu Nikon Eclipse TE2002-U pomocí programu NIS-Elements AR 3.00 a zvětšení 40x. Snímky byly kolorovány v programu ImageJ.

5 Diskuze

CF jakožto jednogenné onemocnění je způsobené mutací genu pro CFTR protein. Tento protein plní roli chloridového kanálu a jeho porucha nebo nefunkčnost vede k celé řadě zdravotních komplikací. Pro pacienty s tímto velice komplexním onemocněním jsou nejzávažnější infekce respiračního traktu způsobené bakteriemi PA a *Burkholderia cepacia* komplex⁴⁻⁶. Tyto patogeny se u pacientů s CF objevují v mnohem větší míře, než je tomu u zdravých osob. Důvodem je primárně zahuštěný hlen a pozměněná glykosylace v plicích^{8,33}. Jedním z virulentních faktorů PA, který přispívá k její zvýšené adhezenci na buňky plicního epitelu pacientů s CF a tvorbě biofilmu je lektin PA-IIL^{63,81}. Cílem této bakalářské práce bylo studium vlivu vybraných anti-PA-IIL slepičích protilátek a multivalentních inhibitorů na adhezenci PA na plicní epitelální buňky od zdravých jedinců (NuLi-1) a jedinců trpících CF (CuFi-1). K tomu bylo nejdříve nutné otestovat expresi PA-IIL jednotlivými kmeny PA a optimalizovat barvení bakteriálních buněk PA pomocí barviva PKH26.

Prvním úkolem této bakalářské práce bylo proměření růstové křivky PAK a vyhodnocení délky kultivace vhodné pro růst bakterií PA a expresi PA-IIL. Získaná růstová křivka byla srovnatelná s křivkou uvedenou v diplomové práci Mgr. Michaely Vaškové⁸⁶. Lze proto předpokládat, že doba kultivace (14 hodin) stanovená v dané práci je optimální, a proto byla dále využívána.

Následně byla testována exprese PA-IIL různými bakteriálními kmeny PA. Vzorky bakteriálních kultur byly odebírány po 14 hodinách od začátku kultivace, kdy by PA-IIL měl být již v dostatečné míře přítomen v bakteriální kultuře⁹⁹. Literatura¹⁰⁰ popisuje kultivaci PA v různých růstových médiích, přičemž kromě LB média patří mezi nepoužívanější také minimální média označovaná jako „MOPS“ nebo „M9“, se kterými se během provádění experimentů popisovaných v této práci nemanipulovalo. Naopak, speciální médium s označením „PS“ není v literatuře běžně uváděné, a proto ani nebylo možné porovnat výsledky analýzy exprese lektinu PA-IIL různými kmeny PAK, případně v různých růstových médiích získané metodou „Western Blotting“. Zde popisované výsledky „Western Blotting“ s imunodetekcí ukazují, že PA-IIL je různými kmeny exprimován v odlišné míře, avšak kontrolní kmen PA (PAK; ST 1763) jej exprimuje při růstu v LB médiu a PS médiu v podobné míře. Tyto výsledky ale také ukazují, že další

kmene PA (hlavně RH813) exprimují PA-IIL o něco víc než PAK. Aby mohly být výsledky dalších testů porovnány s předchozí prací^{86,101}, byl navzdory výsledkům „Western Blotting“ k dalším testům používán kmen PAK.

V dnešní době je již známo mnoho sloučenin použitelných pro fluorescenční označení buněk bakterií. Mezi nejznámější a nejdříve používané reagenty patří např. jaderná barviva 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) nebo akridinová oranž. Použití obou těchto barviv je popsáno v mnoha pracích a ke značení mnoha druhů bakterií. K barvení PA je použil např. kolektiv autorů práce z roku 2010¹⁰². O 7 let později jsou v jiné práci použita na fluorescenční značení gramnegativní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*¹⁰³. Fluorescenční značení gramnegativních bakterií, jako je *E. coli*, pomocí PKH26 bylo rovněž popsáno již před více než 10 lety¹⁰⁴. PA je také gramnegativní bakterie a lze proto předpokládat, že by barvení mělo fungovat podobně, jako ve zmíněných pracích. Tato hypotéza se však nepotvrdila a podmínky fluorescenčního značení barvivem PKH26 bylo nutné značně optimalizovat. Při prvních pokusech o nabarvení buněk PA pomocí této sloučeniny rozpustné v Diluentu C postupem uvedeným v diplomové práci⁸⁶ byly na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro zaznamenány velmi nízké hodnoty fluorescence, které byly potvrzeny i mikroskopicky (Nikon Eclipse TE2002-U). Barvení bakteriálních buněk bylo proto provedeno za různých podmínek. Většina vyzkoušených podmínek nevedla ke zvýšení naměřených hodnot fluorescence / ke změnám viditelným na fluorescenčním mikroskopu. Ve většině případů bylo množství nabarvených buněk PAK zanedbatelné vůči celkovému počtu přítomných bakterií a fluorescence nebyla dostatečně odlišitelná od pozadí. Některé změny podmínek se ukázaly jako vhodné pro barvení, ale jejich vliv na celkové množství nabarvených buněk nebyl tak výrazný, aby převážil rizika spojená s jejich použitím. Platí to např. pro přítomnost EDTA v pufru nebo růstovém médiu pro PA, která vedla k mírnému nárůstu celkového množství nabarvených PA. V předchozí práci⁹⁵ bylo potvrzeno, že EDTA ovlivňuje množství alginátového biofilmu produkovaného PA, který by mohl být jednou z příčin problematického barvení těchto buněk. Tato kyselina je ale také chelátor iontů, které se mimo jiné nachází ve vazných místech lektinů PA-IL aj PA-IIL. Případné změny vazných míst těchto virulentních faktorů PA by proto mohly zásadním způsobem ovlivňovat výsledky adhezenčních testů. Podobný mírný vliv mělo použití 50% DMSO jakožto rozpouštědla pro barvivo PKH26. Při dlouhodobější expozici (již několik minut) je však

DMSO pro buňky toxický. Pro naše použití jsou zásadní povrchové struktury bakterií, které by mohly být použitím DMSO ovlivněny. Kultivace při 180 RPM (Infors HT Multitron Pro) v uzavřené Erlenmayerově baňce vedla ve finále k vyšším hodnotám fluorescence, avšak při mikroskopickém pozorování bylo zjištěno, že došlo spíše k nabarvení alginátového biofilmu než samotných bakterií. To pravděpodobně souvisí s množstvím kyslíku přítomného v baňce během kultivace. Výzkumné práce ukazují, že PA je obligátně aerobní mikroorganismus, který při nedostatku kyslíku produkuje větší množství biofilmu⁷³. Barvivo PKH26 se pravděpodobně není schopno přes alginátový biofilm dostat do bakteriálních buněk v takové míře, jako když jsou bakterie kultivovány za běžných podmínek a dochází proto k nabarvení samotného biofilmu. Po promytí bakterií bylo barvivo PKH26 také částečně uvolňováno z biofilmu a nebylo možné určit, jaká fluorescence odpovídá nabarveným bakteriím a jaká bakteriálnímu biofilmu. Navíc během fluorescenčního značení PAK a následného adhezního testu nedochází jen k promývání samotné bakteriální suspenze, ale také k promývání bakterií v jednotlivých jamkách a množství barviva uvolněného z biofilmu přítomného v jamkách není stejné, a proto by nebylo možné porovnávat míru adherence mezi jednotlivými jamkami ani mezi experimenty. Jako opakovaně úspěšné se ukázalo barvení s 10x vyšším množstvím barviva PKH26 než je doporučováno výrobcem⁹². To platí jak pro použití 10x vyšší koncentrace PKH26, tak pro použití 10x vyššího množství sloučenin PKH26 aj Diluentu C. Předpokládá se proto, že pro míru barvení je důležité samotné barvivo PKH26, a nikoliv jeho rozpouštědlo (Diluent C), jehož složení není veřejně dostupné. Pro další experimenty byla proto k barvení PA zvolena 10-násobná koncentrace PKH26 a inkubace 30 minut při 37 °C, protože vyšší teplota při inkubaci se opakovaně ukázala jako důležitý faktor ovlivňující míru nabarvení bakterií. Použití 10x vyšší koncentrace PKH26, než je uvedena v práci⁸⁶, odpovídá koncentraci této sloučeniny používané v bakalářské práci⁹⁸. Použití vyšší koncentrace PKH26 je také možné najít v literatuře popisující optimalizaci barvení buněk pomocí této sloučeniny¹⁰⁵. Koncentrace použitá v této bakalářské práci je sice ještě větší než ta, která je popisována v literatuře, ale tenhle fakt by mohlo být možné přisoudit daným typům a velikosti buněk, pro které je barvení optimalizováno.

Jednou z možných příčin rozdílů v barvení bakteriálních buněk je použití novějšího balení barviva PKH26 a Diluentu C. Nelze vyloučit, že postupem času dochází ke zvyšování koncentrace zásobního roztoku barviva. Menší množství barviva

potřebného pro nabarvení stejného množství bakteriálních buněk v předchozích pracích^{86,101} lze proto vysvětlit použitím staršího otevřeného balení barviva PKH26, respektive Diluentu C. Tato hypotéza je v souladu s bakalářskou prací Mgr. Libuše Noskové⁹⁸ zavádějící na katedře barvení bakteriálních buněk PA pomocí PKH26.

Po optimalizaci barvení bakteriálních buněk byla nejdříve adhezenčním testem *ex vivo* studována míra adherence PAK na imortalizované plicní epiteliální buňky (NuLi-1 a CuFi-1) v přítomnosti anti-PA-III slepičích protilátek a následně v přítomnosti multivalentních inhibitorů.

Z důvodu potřeby porovnání jednotlivých výsledků navzájem bylo nutné jejich zpracování ve formě relativní fluorescence. Adherentní plicní buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 byly proto barveny sloučeninou PKH67 rozpustnou v Diluentu C. Je pravděpodobné, že během barvení těchto buněk dochází k poškození jejich povrchových struktur důležitých pro potřeby adhezenčního testu. Z tohoto důvodu jsou plicní buňky ponechány k inkubaci, během které by mělo dojít nejen k jejich adhezenci na povrch jamek destičky, ale také k regeneraci daných struktur na povrchu buněk. Po kultivaci bakteriálních buněk PAK byly tyto buňky značeny pomocí sloučeniny PKH26. Aby bylo možné porovnávat míru adherence bakteriálních buněk na plicní epiteliální buňky, muselo dojít k odstranění nenavázaných bakterií z jednotlivých jamek. K tomu bylo nejdříve nutné ponechat destičku s adherovanými epiteliálními buňkami a bakteriální suspenzí (s nebo bez multivalentního inhibitoru či slepičí protilátky) k inkubaci. Po ukončení inkubace a promytí jamek destičky byla proměřena fluorescence obou typů buněk, která byla také zkontrolována na fluorescenčním mikroskopu, aby bylo možné digitální znázornění situace v jamkách a případné vyloučení technických problémů spojené s měřením fluorescence.

Výsledky adhezenčního testu se slepičími protilátkami ukazují shodu s předchozími pracemi^{86,101}. Je patrné, že frakce protilátky před imunizací (kontrolní frakce 1K1) snižuje adhezenci PAK na plicní epiteliální buňky, frakce po imunizaci (specifická 3S1) adhezenci PAK na NuLi-1 a CuFi-1 snižuje ještě významněji, zatímco frakce jiné slepice („pool“ frakcí 3R1-8R1) výrazně zvyšuje adhezenci PAK na používané buňky plicního epitelu. Je možné, že se daná slepice, od které byla získána protilátka 1K1 s bakterií PA, respektive s lektinem PA-III již setkala a její imunitní systém si proti vůči tomuto virulentnímu faktoru vytvořil protilátky. Její efekt na míru adherence proto není až tak překvapivý.

Výsledky aderenčních testů s multivalentními inhibitory jsou naopak poněkud neočekávané. I přes podobné trendy v grafech pro buněčné linie NuLi-1 a CuFi-1 týkající se jednotlivých inhibitorů není jednoznačné, zda testované multivalentní inhibitory LTS-18, LTS-38 a LTS-42 spíše snižují nebo zvyšují adherenci PAK na použité buněčné linie. Ve třech nezávislých experimentech s každou ze zmíněných látek měly tyto sloučeniny vždy poněkud odlišný efekt. Výsledky v grafech jsou proto uvedeny jako průměr relativních fluorescencí PAK/NuLi-1 či PAK/CuFi-1 ze všech 3 nezávislých experimentů. Důsledkem tohoto zpracování dat jsou velké směrodatné odchylky. Na grafech průměrovaných hodnot se většina multivalentních sloučenin jeví jako nefunkční, respektive adherenci neovlivňující.

Z porovnání grafického a mikroskopického znázornění výsledků s jednotlivými inhibitory je zřejmé, že se značně odlišují. Snímky pořízené na fluorescenčním mikroskopu ukazují ve většině případů snížení adherence bakteriálních buněk na plicní epitelální buňky v různé míře, což z grafů není patrné. Důvodem může být přítomnost shluků barviva PKH26, které mohou interferovat s měřením fluorescence na přístroji Tecan Infinite M200 Pro.

Při dalším zkoumání bude třeba vysvětlit určité obtíže s reprodukovatelností výsledků s jednotlivými trivalentními fukosidovými inhibitory a rozdíly mezi mikroskopickým pozorováním adherence PAK na plicní epitelální buňky a měřením fluorescence. Vhodné bude nejdříve pomocí vhodného testu prozkoumat schopnost sloučenin LTS-18, LTS-38 a LTS-42 aglutinovat bakteriální buňky.

6 Souhrn

- Podařilo se reprodukovat předchozí výsledky ohledně růstu kultury PAK a ověřit optimální délku kultivace (14 hodin).
- Pomocí imunodetekce byla prokázána přítomnost lektinu PA-III v bakteriálních kulturách různých kmenů PA (PAK, RH813, PACF).
- Zkoušením různých podmínek barvení PA bylo optimalizováno fluorescenční značení bakteriálních buněk PAK s využitím 10x zvýšené koncentrace barviva PKH26.
- Adherence PAK na plicní epitelální buňky NuLi-1 a CuFi-1 ovlivněna přítomností slepičích protilátek byla v souladu s předchozími výsledky jiných vědeckých pracovníků.
- Trivalentní glykoklastry na bázi fukosy významně neinhibovaly adhezenci PAK na epitelální buňky plic NuLi-1 a CuFi-1, což není v souladu s mikroskopickým pozorováním.

Seznam použité literatury

1. Cystic Fibrosis Foundation: *CF Genetics: The Basics*. <<https://www.cff.org/intro-cf/cf-genetics-basics>> (cit. 21.11.2021).
2. Klub cystické fibrózy: *Co je cystická fibróza – vše o nemoci*. <<https://klubcf.cz/o-cysticke-fibroze/o-nemoci/co-je-cysticka-fibroza/>> (cit. 27.3.2022).
3. Jakubec, P: Cystická fibróza. *Interní Med.* **8**(5), 235-239 (2006).
4. Hanssens, L. S.; Duchateau, J.; Casimir, G. J.: CFTR Protein: Not Just a Chloride Channel? *Cells.* **10**(11), 2844 (2021).
5. Saiman, L.; Prince, A.: Pseudomonas aeruginosa pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **92**(4), 1875–1880 (1993).
6. Bryan, R., Kube, D., Perez, A., Davis, P.; Prince, A.: Overproduction of the CFTR R domain leads to increased levels of asialoGM1 and increased Pseudomonas aeruginosa binding by epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **19**(2), 269–277 (1998).
7. Andersen, D. H.: Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. *Am. J. Dis. Child.* **56**(2), 344–399 (1938).
8. Kerem, B.; Rommens, J. M.; Buchanan, J. A.; Markiewicz, D.; Cox, T. K.; Chakravarti, A.; Buchwald, M.; Tsui, L. C.: Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic Analysis. *Science.* **245**(4922), 1073–1080 (1989).
9. Riordan, J. R.; Rommens, J. M.; Kerem, B.; Alon, N.; Rozmahel, R.; Grzelczak, Z.; Zielenski, J.; Lok, S.; Plavsic, N.; Chou, J. L.; Drumm, M. L.; Iannuzzi, M. C.; Collins, F. S.; Tsui, L. C.: Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* **245**(4922), 1066–1073 (1989).
10. The Clinical and Functional Translation of CFTR <<https://cftr2.org/>> (cit. 2.4.2022)
11. Quon, B. S.; Rowe, S. M.: New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis. *BMJ.* **352**, i859 (2016).
12. Lopes-Pacheco, M.: CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Front. Pharmacol.* **7**, 275 (2016).
13. Radpour, R.; Gourabi, H.; Dizaj, A. V; Holzgreve, W.; Zhong, X. Y.: Genetic Investigations of CFTR Mutations in Congenital Absence of Vas Deferens, Uterus,

- and Vagina as a Cause of Infertility. *J. Androl.* **29**(5), 506–513 (2008).
14. Zajac, M.; Dreano, E.; Edwards, A.; Planelles, G.; Sermet-Gaudelus, I.: Airway Surface Liquid pH Regulation in Airway Epithelium Current Understandings and Gaps in Knowledge. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(7), 3384 (2021).
 15. Venkatakrisnan, V.; Packer, N. H.; Thaysen-Andersen, M.: Host mucin glycosylation plays a role in bacterial adhesion in lungs of individuals with cystic fibrosis. *Expert Rev. Respir. Med.* **7**(5), 553–576 (2013).
 16. Knowles, M. R.; Boucher, R. C.: Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest.* **109**(5), 571–577 (2002).
 17. Hendrik, H. D.; Raubenheimer, E. J.: The Role of Airway Surface Liquid in the Primary Management of Rhinosinusitis. *J. Interdiscipl. Med. Dent. Sci.* **01**(106), (2013).
 18. Matsui, H.; Grubb, B. R.; Tarran, R.; Randell, S. H.; Gatzky, J. T.; Davis, W.; Boucher, R. C.: Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* **95**(7), 1005–1015 (1998).
 19. Worlitzsch, D.; Tarran, R.; Ulrich, M.; Schwab, U.; Cekici, A.; Meyer, K. C.; Birrer, P.; Bellon, G.; Berger, J.; Weiss, T.; Botzenhart, K.; Yankaskas, J. R.; Randell, S.; Boucher, R. C.; Döring, G.: Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest.* **109**(3), 317–325 (2002).
 20. Flemming, H.-C.; Wingender, J.: The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–633 (2010).
 21. Armstrong, D. S.; Hook, S. M.; Jansen, K. M.; Nixon, G. M.; Carzino, R.; Carlin, J. B.; Robertson, C. F.; Grimwood, K.: Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Pediatr. Pulmonol.* **40**(6), 500–510 (2005).
 22. Margaroli, C.; Garratt, L. W.; Horati, H.; Dittrich, S.; Rosenow, T.; Montgomery, S. T.; Frey, D. L.; Brown, M. R.; Schultz, C.; Guglani, L.; Kicic, A.; Peng, L.; Scholte, B. J.; Mall, M. A.; Janssens, H. M.; Stick, S. M.; Tirouvanziam, R.: Elastase Exocytosis by Airway Neutrophils Is Associated with Early Lung Damage in Children with Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **199**(7), 873–881 (2019).
 23. Tosi, M. F.; Zakem, H.; Berger, M.: Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized pseudomonas as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. *J. Clin. Invest.* **86**(1), 300–308 (1990).

24. Tucker, S. L.; Sarr, D.; Rada, B.: Neutrophil extracellular traps are present in the airways of ENaC-overexpressing mice with cystic fibrosis-like lung disease. *BMC Immunol.* **22**(1), 7 (2021).
25. Spicuzza, L.; Parisi, G. F.; Tardino, L.; Ciancio, N.; Nenna, R.; Midulla, F.; Leonardi, S.: Exhaled markers of antioxidant activity and oxidative stress in stable cystic fibrosis patients with moderate lung disease. *J. Breath Res.* **12**(2), 026010 (2018).
26. Abou Alaiwa, M. H.; Reznikov, L. R.; Gansemer, N. D.; Sheets, K. A.; Horswill, A. R.; Stoltz, D. A.; Zabner, J.; Welsh, M. J.: pH modulates the activity and synergism of the airway surface liquid antimicrobials β -defensin-3 and LL-37. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**(52), 18703–18708 (2014).
27. Tang, X. X.; Ostedgaard, L. S.; Hoegger, M. J.; Moninger, T. O.; Karp, P. H.; McMenimen, J. D.; Choudhury, B.; Varki, A.; Stoltz, D. A.; Welsh, M. J.: Acidic pH increases airway surface liquid viscosity in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* **126**(3), 879–891 (2016).
28. Okuda, K.; Chen, G.; Subramani, D. B.; Wolf, M.; Gilmore, R. C.; Kato, T.; Radicioni, G.; Kesimer, M.; Chua, M.; Dang, H.; Livraghi-Butrico, A.; Ehre, C.; Doerschuk, C. M.; Randell, S. H.; Matsui, H.; Nagase, T.; O’Neal, W. K.; Boucher, R. C.: Localization of Secretory Mucins MUC5AC and MUC5B in Normal/Healthy Human Airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **199**(6), 715–727 (2019).
29. Widdicombe, J. H.; Wine, J. J.: Airway Gland Structure and Function. *Physiol. Rev.* **95**(4), 1241–1319 (2015).
30. Sheehan, J. K.; Kirkham, S.; Howard, M.; Woodman, P.; Kutay, S.; Brazeau, C.; Buckley, J.; Thornton, D. J.: Identification of molecular intermediates in the assembly pathway of the MUC5AC mucin. *J. Biol. Chem.* **279**(15), 15698–15705 (2004).
31. Van den Steen, P.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Opdenakker, G.: Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **33**(3), 151–208 (1998).
32. Morrison, C. B.; Markovetz, M. R.; Ehre, C.: Mucus, mucins, and cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **54**(3), 84–96 (2019).
33. Matthews, L. W.; Spector, S.; Lemm, J.; Potter, J. L.: Studies on pulmonary secretions: I. The over-all chemical composition of pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis, and laryngectomy. *Am. Rev. Respir. Dis.*

- 88**, 199–204 (1963).
34. Virella-Lowell, I.; Herlihy, J.-D.; Liu, B.; Lopez, C.; Cruz, P.; Muller, C.; Baker, H. V.; Flotte, T. R.: Effects of CFTR, interleukin-10, and *Pseudomonas aeruginosa* on gene expression profiles in a CF bronchial epithelial cell line. *Mol. Ther.* **10**(3), 562–573 (2004).
 35. Schulz, B. L.; Sloane, A. J.; Robinson, L. J.; Prasad, S. S.; Lindner, R. A.; Robinson, M.; Bye, P. T.; Nielson, D. W.; Harry, J. L.; Packer, N. H.; Karlsson, N. G.: Glycosylation of sputum mucins is altered in cystic fibrosis patients. *Glycobiology.* **17**(7), 698–712 (2007).
 36. Xia, B.; Royall, J. A.; Damera, G.; Sachdev, G. P.; Cummings, R. D.: Altered O-glycosylation and sulfation of airway mucins associated with cystic fibrosis. *Glycobiology.* **15**(8), 747–775 (2005).
 37. Barasch, J.; Kiss, B.; Prince, A.; Saiman, L.; Gruenert, D.; Al-Awqati, Q.: Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature.* **352**(6330), 70–73 (1991).
 38. Sharma, P.; Dudus, L.; Nielsen, P. A.; Clausen, H.; Yankaskas, J. R.; Hollingsworth, M. A.; Engelhardt, J. F.: MUC5B and MUC7 are differentially expressed in mucous and serous cells of submucosal glands in human bronchial airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **19**(1), 30–37 (1998).
 39. Delmotte, P.; Degroote, S.; Lafitte, J.-J.; Lamblin, G.; Perini, J.-M.; Roussel, P.: Tumor necrosis factor alpha increases the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases responsible for the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewis x epitopes in the human bronchial mucosa. *J. Biol. Chem.* **277**(1), 424–431 (2002).
 40. Vávrová, V.; Bartošová, J.; kolektiv CF centra FN Motol: *Cystická fibróza – příručka pro nemocné a jejich rodiče*. 2nd ed. Praha, Professional Publishing (2009).
 41. Vávrová, V. a kol.: *Cystická fibróza*. Praha, Grada Publishing (2006).
 42. Novorozenecký screening: *Cystická fibróza*. <<https://www.novorozeneckyscreening.cz/cysticka-fibroza>> (cit. 27.5.2022).
 43. Gokdemir, Y.; Karadag, B. T.: Sweat Testing and Recent Advances. *Front. Pediatr.* **9**, 649904 (2021).
 44. Gibson, L. E.; Cooke, R. E.: A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic

- fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* **23**(3), 545–549 (1959).
45. Arjuna, A.; Olson, M. T.; Walia, R.: Current trends in candidate selection, contraindications, and indications for lung transplantation. *J. Thorac. Dis.* **13**(11), 6514–6527 (2021).
46. European Centre for Disease Prevention and Control: *Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2019*. <<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2019>> (cit. 28.6.2022).
47. Cystic Fibrosis Care Center: *Living with CF*. <http://www.cfcareli.com/livingwithcf Acts_vest.php> (cit. 28.6.2022).
48. King, M.; Dasgupta, B.; Tomkiewicz, R. P.; Brown, N. E.: Rheology of cystic fibrosis sputum after in vitro treatment with hypertonic saline alone and in combination with recombinant human deoxyribonuclease I. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**(1), 173–177 (1997).
49. Van Goor, F.; Hadida, S.; Grootenhuys, P. D. J.; Burton, B.; Cao, D.; Neuberger, T.; Turnbull, A.; Singh, A.; Joubran, J.; Hazlewood, A.; Zhou, J.; McCartney, J.; Arumugam, V.; Decker, C.; Yang, J.; Young, C.; Olson, E. R.; Wine, J. J.; Frizzell, R. A.; Ashlock, M.; Negulescu, P.: Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**(44), 18825–18830 (2009).
50. Wainwright, C. E.; Elborn, J. S.; Ramsey, B. W.; Marigowda, G.; Huang, X.; Cipolli, M.; Colombo, C.; Davies, J. C.; De Boeck, K.; Flume, P. A.; Konstan, M. W.; McColley, S. A.; McCoy, K.; McKone, E. F.; Munck, A.; Ratjen, F.; Rowe, S. M.; Waltz, D.; Boyle, M. P.: Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N. Engl. J. Med.* **373**(3), 220–231 (2015).
51. Wittmann, V. & Pieters, R. J. Bridging lectin binding sites by multivalent carbohydrates. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 4492–4503 (2013).
52. Vašková, L.; Nosková, L.; Bláhová, B.; Wimmerová, M.; Dřevínek, P.; Kubíčková, B.; Stiborová, M.; Hodek, P.: Evaluation of anti-PAIII lectin hen yolk antibody as an agent inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence to epithelial cells. *Monatsh. Chem.* **147**, 889–896 (2016).

53. Utratna, M.; Deegan, S.; Joshi, L.: Exploitation of Glycobiology in Anti-Adhesion Approaches against Biothreat Agents. *J. Bioterror. Biodef.* **7**(3), (2016).
54. Zuttion, F.: *Glycocluster inhibition effect on bacterial adhesion of Pseudomonas aeruginosa characterized by atomic force microscopy and spectroscopy: from molecule to cell, Dizertační práce.* (Université de Lyon, 2016).
55. Chalghoumi, R.; Beckers, Y.; Portetelle, D.; Théwis, A.: Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13**(2), 295–308 (2009).
56. Schade, R.; Staak Ch.; Hendriksen, C.; Erhard, M.; Hugl, H.; Koch, G.; Larsson, A.; Pollmann, W.; van Regenmortel, M.; Rijke, E.; Spielmann, H.; Steinbusch, H.; Straughan, D.: The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY: The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 21. *Altern. Lab. Anim.* **24**(6), 925–934 (1996).
57. Larsson, A.; Wejåker, P.-E.; Forsberg, P.-O.; Lindahl, T.: Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *J. Immunol. Methods* **156**(1), 79–83 (1992).
58. Nilsson, E.; Larsson, A.; Olesen, H. V., Wejåker, P.-E.; Kollberg, H.: Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* **43**(9), 892–899 (2008).
59. Doudna, J. A.; Charpentier, E.: Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* **346**(6213), 1258096 (2014).
60. The Nobel Prize: *Press Release: The Nobel Prize in Chemistry 2020.* <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>> (cit. 28.6.2022).
61. Kim, Y.-G.; Cha, J.; Chandrasegaran, S.: Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**(3), 1156–1160 (1996).
62. Boch, J.; Bonas, U.: Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**, 419–436 (2010).
63. Grubb, B. R.; Pickles, R. J.; Ye, H.; Yankaskas, J. R.; Vick, R. N.; Engelhardt, J. F.; Wilson, J. M.; Johnson, L. G.; Boucher, R. C.: Inefficient gene transfer by adenovirus vector to cystic fibrosis airway epithelia of mice and humans. *Nature.* **371**(6500),

- 802–806 (1994).
64. Moss, R. B.; Rodman, D.; Spencer, L. T.; Aitken, M. L.; Zeitlin, P. L.; Waltz, D.; Milla, C.; Brody, A. S.; Clancy, J. P.; Ramsey, B.; Hamblett, N.; Heald, A. E.: Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Chest*. **125**(2), 509–521 (2004).
 65. Zabner, J.; Fasbender, A. J.; Moninger, T.; Poellinger, K. A.; Welsh, M. J.: Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J. Biol. Chem.* **270**(32), 18997–19007 (1995).
 66. Bangel-Ruland, N.; Tomczak, K.; Fernández, E. F.; Leier, G.; Leciejewski, B.; Rudolph, C.; Rosenecker, J.; Weber, W.-M.: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator - mRNA delivery: a novel alternative for cystic fibrosis gene therapy. *J. Gene Med.* **15**(11-12), 414–426 (2013).
 67. Koski, G. K.; Karikó, K.; Xu, S.; Weissman, D.; Cohen, P. A.; Czerniecki, B. J.: Cutting edge: innate immune system discriminates between RNA containing bacterial versus eukaryotic structural features that prime for high-level IL-12 secretion by dendritic cells. *J. Immunol.* **172**(7), 3989–3993 (2004).
 68. Actor, J. K.: *Introductory immunology – basic concepts for interdisciplinary applications*. 2nd ed. London, Elsevier (2019).
 69. Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M.: *Immunobiology – The Immune System in Health and Disease*. 5th ed. New York, Garland Publishing (2001).
 70. Westin, J.: Structure Of Antibody Molecule. <<https://jackwestin.com/resources/mcat-content/immune-system/structure-of-antibody-molecule>> (cit. 30.6.2022).
 71. Döring, G.; Gulbins, E.: Cystic fibrosis and innate immunity: how chloride channel mutations provoke lung disease. *Cell. Microbiol.* **11**(2), 208–216 (2009).
 72. Bals, R.; Weiner, D. J.; Wilson, J. M.: The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Invest.* **103**(3), 303–307 (1999)
 73. Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A.: *Medical Microbiology*. 9th ed. New York, Elsevier (2021).
 74. Riedel S.; Hobden, J. A.; Miller, S.; Morse, S. A.; Mietzner, T. A.; Detrick, B.; Mitchell, T. G.; Sakanari, J. A.; Hotez, P.; Mejia, R.: *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical*

- Microbiology*. 28th ed. McGraw-Hill Education (2019).
75. Todar K.: *Todar's online textbook of bacteriology: Pseudomonas aeruginosa*. <<http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>> (30.6.2022).
 76. Bradley, D. E.: The adsorption of *Pseudomonas aeruginosa* pilus-dependent bacteriophages to a host mutant with nonretractile pili. *Virology*. **58**(1), 149–163 (1974).
 77. Schaechter, M.: *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd ed. Elsevier (2009).
 78. Sharon, N.; Lis, H.: Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*. **177**(4053), 949–959 (1972).
 79. Adam, E. C.; Mitchell, B. S.; Schumacher, D. U.; Grant, G.; Schumacher, U.: *Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. **155**(6), 2102–2104 (1997).
 80. Diggle, S. P.; Stacey, R. E.; Dodd, C.; Cámara, M.; Williams, P.; Winzer, K.: The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol*. **8**(6), 1095–1104 (2006).
 81. Tielker, D.; Hacker, S.; Loris, R.; Strathmann, M.; Wingender, J.; Wilhelm, S.; Rosenau, F.; Jaeger, K.E.: *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* **151**(5), 1313–1323 (2005).
 82. 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**(2), 221–228 (2004).
 83. Avichezer, D.; Katcoff, D. J.; Garber, N. C.; Gilboa-Garber, N.: Analysis of the amino acid sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* galactophilic PA-I lectin. *J. Biol. Chem*. **267**(32), 23023–23027 (1992).
 84. Gilboa-Garber, N.; Katcoff, D. J.; Garber, N. C.: Identification and characterization of *pseudomonas aeruginosa* PA-III lectin gene and protein compared to PA-IL. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. **29**(1), 53–57 (2000).
 85. Kruczek, C.; Qaisar, U.; Colmer-Hamood, J. A.; Hamood, A. N.: Serum influences the expression of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing genes and QS-controlled virulence genes during early and late stages of growth. *MicrobiologyOpen*. **3**(1), 64–79 (2014).

86. Vašková, M.: *Vývoj antibakteriálních protilátek pro pacienty s cystickou fibrosou, Diplomová práce.* (PřF UK, 2019).
87. ATCC. *NuLi-1 (ATCC® CRL-4011™)*. <<https://www.atcc.org/products/crl-4011>> (cit. 29.6.2022).
88. ATCC. *CuFi-1 (ATCC® CRL-4013™)*. <<https://www.atcc.org/products/crl-4013>> (cit. 29.6.2022).
89. Chi, E.; Mehl, T.; Nunn, D.; Lory, S.: Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. *Infect. Immun.* **59**(3), 822–828 (1991).
90. PřF MU: *Metody biochemického výzkumu: SDS-PAGE + western blotting* (2018). <https://is.muni.cz/el/1431/podzim2018/C9320/um/Uloha_4_SDSPAGE_WB_2018.pdf> (cit. 24.7. 2022).
91. Sigma-Aldrich. *PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling.* <<https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/pkh67gl>> (cit. 29.6.2022).
92. Sigma-Aldrich. *PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling.* <<https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/pkh26gl>> (29. 6. 2022).
93. Nosková, L.: *Studium adheze Pseudomonas aeruginosa na buňky plicního epitelu, Diplomová práce.* (PřF UK, 2013).
94. Pužar Dominkuš, P.; Stenovec, M.; Sitar, S.; Lasič, E.; Zorec, R.; Plemenitaš, A.; Žagar, E.; Kreft, M.; Lenassi, M.: PKH26 labeling of extracellular vesicles: Characterization and cellular internalization of contaminating PKH26 nanoparticles. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1860**(6), 1350–1361 (2018).
95. O'May, C. Y.; Sanderson, K.; Roddam, L. F.; Kirov, S. M.; Reid, D. W.: Iron-binding compounds impair *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, especially under anaerobic conditions. *J. Med. Microbiol.* **58**(Pt 6), 765–773 (2009).
96. Thermofisher. *SYBR™ Green II RNA Gel Stain, 10,000X concentrate in DMSO.* <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S7564>> (cit. 12.8.2022).
97. Lumiprobe. *dsGreen for Real-Time PCR, 100x.* <<https://www.lumiprobe.com/p/sybrgreen-realttime-pcr>> (cit. 12.8.2022).
98. Nosková, L.: *Vývoj modelového systému pro studium bakteriální adheze na plicní epitel pacientů s CF, Bakalářská práce* (PřF UK, 2011).

99. 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**(22), 6401–6411 (2000).
100. LaBauve, A. E.; Wargo, M. J.: Growth and Laboratory Maintenance of Pseudomonas aeruginosa. *Curr. Protoc. Microbiol.* **06**(Unit-6E.1), (2012).
101. Augustínová, M.: *Studium profylaktického účinku glykoklastrů na modelu bakteriální adherence, Bakalářská práce* (PřF UK, 2021).
102. Rändler, C.; Matthes, R.; McBain, A. J.; Giese, B.; Fraunholz, M.; Sietmann, R.; Kohlmann, T.; Hübner, N.-O.; Kramer, A.: A three-phase in-vitro system for studying Pseudomonas aeruginosa adhesion and biofilm formation upon hydrogel contact lenses. *BMC Microbiol.* **10**, 282 (2010).
103. Howell, M.; Daniel, J. J.; Brown, P. J. B.: Live Cell Fluorescence Microscopy to Observe Essential Processes During Microbial Cell Growth. *J. Vis. Exp.* **129**, 56497 (2017)
104. Kaizu, A.; Fagutao, F. F.; Kondo, H.; Aoki, T.; Hirono, I.: Functional analysis of C-type lysozyme in penaeid shrimp. *J. Biol. Chem.* **286**(52), 44344–44349 (2011).
105. Tario Jr., J. D.; Humphrey, K.; Bantly, A. D.; Muirhead, K. A.; Moore, J. S.; Wallace, P. K.: Optimized Staining and Proliferation Modeling Methods for Cell Division Monitoring using Cell Tracking Dyes. *J. Vis. Exp.* **70**(e4287), (2012).