

UNIVERZITA KARLOVA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

STUDIJNÍ PROGRAM: BIOCHEMIE

STUDIJNÍ OBOR: BIOCHEMIE



Anna Volejníková

Vývoj modelového systému pro studium adheze bakterie *Burkholderia cenocepacia* na plicní epitel pacientů trpících cystickou fibrózou

Development of a model system to study adhesion of *Burkholderia cenocepacia* to epithelial lung cells of patients with cystic fibrosis

**Bakalářská práce**

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

Praha, 2017

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Lucie Bořek Dohalské, Ph.D. a že jsem všechny použité informační zdroje řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne .....

Anna Volejníková

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda vyjádřila své poděkování RNDr. Lucii Bořek Dohalské, Ph.D. za odborné vedení této bakalářské práce, za cenné rady a připomínky jak během experimentální části, tak při závěrečném sepisování práce.

Dále bych ráda poděkovala prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za pomoc během experimentální činnosti. Děkuji Bc. Janu Královi a Michaele Vaškové za příjemnou spolupráci v laboratoři.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým za poskytnutou podporu a zázemí po celou dobu studia.

## ABSTRAKT

Cystická fibróza (CF) je běžné autozomálně recesivní onemocnění, které nejčastěji postihuje plicní respirační epitel. Vlivem poškození plic dochází k chronické kolonizaci dýchacího ústrojí řadou patogenních mikroorganismů, jako je *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Burkholderia cepacia* komplex. Vzhledem k závažnosti infekce těmito bakteriemi a jejich rezistenci na většinu používaných antibiotik jsou hledány vhodné léčebné alternativy, jako je například pasivní imunizace pacientů pomocí specifických slepičích protilátek.

V této práci byla studována adheze oportunního lidského patogenu *Burkholderia cenocepacia* na plicní epitel zdravých jedinců a pacientů trpících CF. Cílem bylo vytvořit a optimalizovat vhodný modelový systém pro toto studium. K tomuto účelu byly použity plicní buněčné linie získané od pacienta s cystickou fibrózou (CuFi-1, mutace  $\Delta F508$ ) a nepoškozené plicní linie (NuLi-1). Bakteriální kmeny *B. cenocepacia* (ST28 a ST32) byly úspěšně fluorescenčně označeny barvivem PKH26 při zachování jejich viability. Dále byla optimalizována metodika fluorescenčního značení buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1 pomocí barviva PKH67. Na vytvořeném modelovém systému byla prokázána až trojnásobně vyšší adheze bakterií k buněčné linii CuFi-1 ve srovnání s linií NuLi-1. Jako potenciální terapeutické agens byla v této práci testována slepičí protilátka proti lektinu BC2L-A, což je jedna z adhezivních struktur uvedené bakterie. Po izolaci této protilátky z vaječného žloutku imunizované slepice byla metodou ELISA ověřena její interakce s rekombinantně připraveným lektinem BC2L-A. Pilotní experimenty naznačují, že připravené protilátky mohou snižovat adhezi *B. cenocepacia* na plicní epitel linie CuFi-1. Jednotlivé aspekty použití slepičích protilátek v boji proti infekci *B. cenocepacia* budou předmětem dalšího zkoumání.

### **Klíčová slova:**

cystická fibróza, buňky plicního epitelu, *Burkholderia cenocepacia*, fluorescenční značení, slepičí protilátky

## **ABSTRACT**

Cystic fibrosis (CF) is a common autosomal recessive disorder that primarily affects epithelial cells in respiratory system. As a consequence of lung damage the patients are chronically colonized by a number of pathogenic microorganisms such as *Pseudomonas aeruginosa* or *Burkholderia cepacia* komplex. Due to the seriousness of these bacterial infection and its primary resistance to commonly used antibiotics the suitable therapeutic alternatives are being sought. The passive immunization with yolk antibodies seems to be a suitable alternative.

This thesis studied the bacterial adhesion of *Burkholderia cepacia*, the opportunistic human pathogen, to lung epithelial cells of healthy individuals and patients with CF, respectively. The aim of this study was to develop a model system suitable for this research. Two types of immortalised cell lines have been used for this purpose. CuFi-1 is the cell line derived from patient with CF caused by  $\Delta F508$  mutation, NuLi-1 is a healthy epithelial cell line. The strains of *B. cenocepacia* (ST28 and ST32) were fluorescently labeled with fluorescent cell linker PKH26. Furthermore, the way of fluorescent labeling of cell lines CuFi-1 and NuLi-1 using PKH67 dye was optimized.

Using this model system, the adhesion of bacteria to cell line CuFi-1 was up to three times higher in comparison to cell line NuLi-1 with respect to bacteria and cell concentration. Further, the yolk antibody against *B. cenocepacia* lectin BC2L-A was tested as a potential therapeutic agents. This antibody was isolated from the egg yolks of immunized hens. Specific interaction between recombinant BC2L-A protein and yolk antibody against this lectin was determined by ELISA test. Pilot experiments indicated that isolated yolk antibodies may decrease adhesion of *B. cenocepacia* to cell line CuFi-1 were performed.

Using yolk antibodies for prevention and treatment of *B. cenocepacia* infection will be subject of following research.

### **Key words:**

cystic fibrosis, epithelial lung cells, *Burkholderia cenocepacia*, fluorescent labelling, yolk antibodies

## OBSAH

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>1</b>
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>2</b>
1.1 Cystická fibróza .....	2
1.1.1 Historie onemocnění .....	2
1.1.2 Výskyt onemocnění a dědičnost CF .....	2
1.1.3 Molekulární podstata onemocnění .....	3
1.1.4 Projevy CF .....	5
1.1.5 Diagnostika pacientů .....	8
1.1.6 Možnosti terapie CF .....	9
1.2 Mikroorganismy spjaté s CF .....	12
1.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	12
1.2.2 <i>Burkholderia cepacia</i> komplex .....	13
1.2.3 Adhezivní struktury <i>Bcc</i> .....	15
1.2.4 Virulenční faktory <i>Bcc</i> .....	15
1.2.5 Problematika terapie antibiotiky u <i>Bcc</i> .....	16
1.2.6 <i>Burkholderia cenocepacia</i> .....	16
1.2.7 Lektiny <i>Burkholderia cenocepacia</i> .....	17
<b>2 CÍL PRÁCE .....</b>	<b>18</b>
<b>3 MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>19</b>
3.1 Použité přístroje a materiál .....	19
3.1.1 Přístrojové vybavení a nástroje .....	19
3.1.2 Použité chemikálie a biologický materiál .....	19
3.2 Práce s buněčnými liniemi plicního epitelu .....	21
3.2.1 Kultivace buněčných linií .....	21
3.2.2 Subkultivace buněčných linií .....	21
3.2.3 Stanovení počtu buněk a jejich viability barvením trypanovou modří .....	22
3.2.4 Potažení kultivačních nádob kolagenem IV .....	22
3.2.5 Rozmražení buněčných linií .....	23
3.3 Práce s bakteriemi <i>Burkholderia cenocepacia</i> .....	24
3.3.1 Kultivace a dlouhodobé uchovávání <i>Burkholderia cenocepacia</i> .....	24
3.4 Fluorescenční značení plicních a bakteriálních buněk .....	24

3.4.1	Fluorescenční značení plicních buněk .....	25
3.4.2	Fluorescenční značení bakteriálních buněk .....	25
3.5	Adhezní test.....	26
3.5.1	Adhezní test s použitím slepičích protilátek .....	26
3.6	Izolace slepičí protilátky IgY z vaječného žloutku .....	27
3.6.1	Stanovení koncentrace protilátek .....	27
3.6.2	Dialýza roztoku protilátky .....	28
3.7	ELISA .....	28
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>30</b>
4.1	Fluorescenční značení bakterie <i>Burkholderia cenocepacia</i> .....	30
4.2	Adhezní testy.....	32
4.3	Izolace a charakterizace slepičí protilátky proti lektinu BC2L-A.....	35
4.4	Ovlivnění adheze <i>B. cenocepacia</i> na buněčnou linii CuFi-1 specifickou protilátkou proti lektinu BC2L-A.....	36
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>SOUHRN .....</b>	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>42</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>Bcc</b>	<i>Burkholderia cepacia</i> complex
<b>bp</b>	pár bází
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)
<b>CF</b>	cystická fibróza
<b>CFTR</b>	gen CF (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
<b>CFU</b>	vyjádření koncentrace bakterií (Colony-forming Unit)
<b>DMSO</b>	dimethylsufoxid
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylendiaminetetraaceticacid)
<b>ELISA</b>	imunochemická metoda (enzyme linked immunosorbent assay)
<b>FBS</b>	fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)
<b>Ig</b>	imunoglobulin
<b>IgY</b>	imunoglobulin třídy Y
<b>IRT</b>	imunoreaktivní trypsin
<b>kb</b>	kilobáze
<b>LPS</b>	lipopolysacharid
<b>MSD</b>	doména prostupující membránou (membrane-spanning domain)
<b>NBD</b>	doména vázající nukleotidy (nucleotide-binding domain)
<b>NSCS</b>	novorozenecký screening cystické fibrózy
<b>OD</b>	optická denzita
<b>PBS</b>	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)

# 1 ÚVOD

## 1.1 Cystická fibróza

### 1.1.1 Historie onemocnění

Již v dochovaných pramenech z období středověku lze najít popsané charakteristické příznaky choroby, dnes označované jako cystická fibróza (CF). Jednalo se o malé děti s neobvykle slaným potem, později byly také zaznamenány případy lidí, u nichž docházelo k patologickým změnám na pankreatu.

V roce 1938 podala první ucelený popis patologicko-anatomických nálezů u 49 dětí americká patoložka Dorothy Andersenová a onemocnění nazvala cystická fibróza pankreatu [1]. V období po 2. světové válce se povědomí o CF šířilo jen zvolna, povětšinou se hovoří o pacientech s plicním onemocněním, trpících průjmami a s abnormální funkcí pankreatu. Později, pro zdůraznění tvorby hustého hlenu v postižených orgánech, se vžilo označení mukoviscidóza, které se místy užívá dodnes.

Pro správnou diagnostiku byl klíčový objev abnormálního zastoupení elektrolytů v potu nemocných CF. Bylo prokázáno, že jejich pot obsahuje velké množství solí, především chloridů. Dále byla vyvrácena přímá spojitost cystické fibrózy a abnormální funkce pankreatu, protože u některých pacientů trpících CF nebyla funkce slinivky ovlivněna [2].

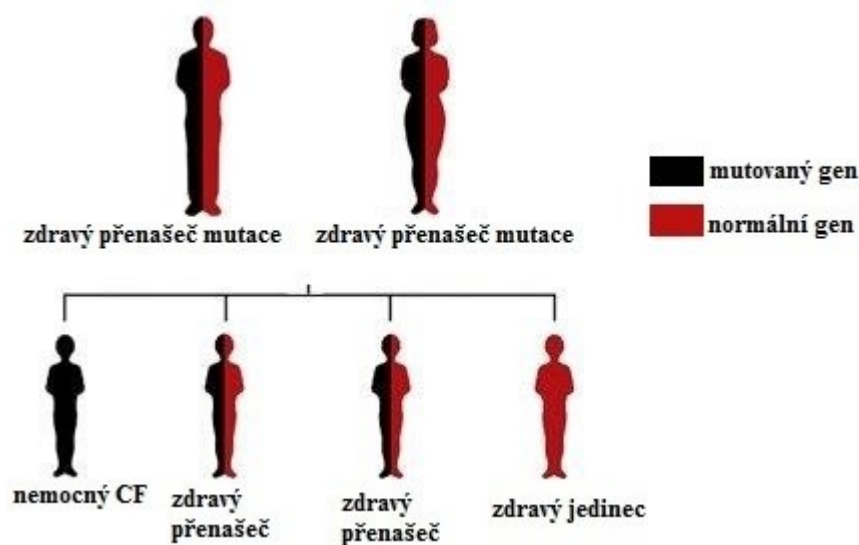
Důležitým mezníkem ve výzkumu molekulární podstaty této nemoci se stal objev impermeability buněčné membrány pro chloridové ionty [3]. Na konci 80. let byl identifikován gen zodpovědný za CF – gen *CFTR* („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) [4]. V současné době je známo kolem 2000 mutací tohoto genu. S rostoucími poznatky a dokonalejší léčbou se zvyšuje průměrný věk dožití. Zatímco v polovině 20. století umírala většina nemocných dětí ještě v kojeneckém věku, dnes se až polovina pacientů dožívá 40 let [5].

### 1.1.2 Výskyt onemocnění a dědičnost CF

V České republice byl stanoven výskyt CF na přibližně 1 případ z 2500 novorozenech dětí. Vzhledem k autozomálně recesivní povaze choroby je však pravděpodobné, že až každý 26.

jedinec je zdravým přenašečem onemocnění. U neevropské populace je výskyt mnohem méně častý, např. v asijské populaci je udávána pravděpodobnost onemocnění asi jen 1:30 000 [5].

CF je monogenní choroba, což znamená, že za vznikem onemocnění stojí mutace v jednom genu, a to v genu *CFTR* (viz dále). Dědičnost CF se řídí Mendelovými zákony dědičnosti (viz Obr. 1).



**Obr. 1: Schéma dědičnosti CF.** U zdravých heterozygotních rodičů (tj. s genovou mutací, ale bez projevů onemocnění) je 25% šance, že se narodí dítě trpící CF (recesivní homozygot); 25% šance, že dítě bude zcela zdravé a 50% možnost, že se narodí heterozygotní přenašeč. Převzato a upraveno z [6].

### 1.1.3 Molekulární podstata onemocnění

Podstatou vzniku CF je, jak již bylo řečeno, mutace v genu *CFTR*, který kóduje stejnojmenný protein. Gen *CFTR* se nachází na dlouhém raménku chromozomu 7 a je složen až z 250 000 bp obsahujících 27 exonů. Výsledný transkript je 6,5 kb dlouhý a kóduje protein obsahující 1480 aminokyselinových zbytků [7, 8]. Nejvýznamnější mutace je označována jako  $\Delta F508$  a byla zjištěna až u 70 % pacientů. Podstatou této mutace je delece 3 bp kódujících fenylalanin v pozici 508 proteinu [9]. Obecně lze podle míry dopadu na funkci CFTR proteinu rozdělit genové mutace do pěti tříd [10]:

- **I. třída – Defekt v syntéze proteinu** – protein je produkován v minimálním množství nebo vůbec
- **II. třída – Chyba v postranlační úpravě proteinu** – protein zaujímá nevhodnou konformaci a ještě před transportem k membráně je degradován v proteozomu. Mezi

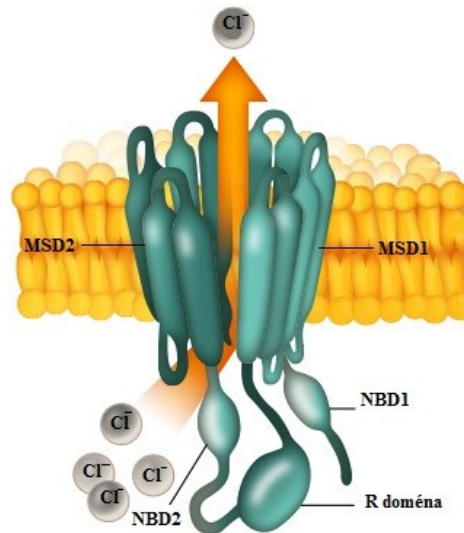
mutace tohoto typu patří nejčastější mutace  $\Delta F508$ .

- **III. třída – Defekt v regulaci proteinové aktivity** – nedochází k fosforylaci a defosforylaci jednotlivých proteinových domén, což vede k nesprávnému otevírání kanálu
- **IV. třída – Nedostatečná vodivost kanálu**
- **V. třída – Produkce nedostatečného množství CFTR proteinu**

Výskyt jednotlivých mutací se výrazně liší v závislosti na národnosti, některé se vyskytují napříč celou evropskou populací, jiné jsou jen lokální a velmi vzácné. Obecně lze říci, že mutace třídy I-III předurčují závažnější průběh onemocnění. Ačkoliv bylo objeveno více než 2000 variant nukleotidové sekvence v genu CFTR, tak zdaleka ne všechny mají patogenní potenciál [5].

Produktem zmiňovaného genu je protein CFTR, který patří do skupiny ABC („ATP-binding cassette“) membránových proteinů. Tyto proteiny aktivně přenášejí různé substráty přes buněčnou membránu za spotřeby ATP. CFTR se nachází na apikální membráně buněk epitelu, kde slouží jako chloridový kanál. Jako membránový přenašeč má tedy CFTR klíčovou roli při transepiteliálním transportu solí, proudění tekutin a regulaci koncentrace iontů. Podílí se na správné sekreci tekutin a elektrolytů ve střevě, plicních epiteliálních buňkách a pankreatu. Naopak v buňkách potních žláz je zodpovědný za reabsorpci solí. Je tedy zřejmé, že onemocnění má dopad na správnou funkci řady orgánů [11]. Vedle transportu chloridových iontů se kanálem v menší míře přenášejí i  $\text{HCO}_3^-$  nebo glutathion. Kromě funkce chloridového kanálu má CFTR protein i regulační funkce. Ovlivňuje aktivitu jiných chloridových kanálů nebo sodíkových epiteliálních kanálů (např. kanál ENaC). Vlivem zvýšené koncentrace chloridů v buňce dochází k abnormální reabsorpci sodíkových iontů do buněk, aby byla zachována iontová rovnováha. V principu je tedy CF způsobena jak defektem v sekreci a resorpci chloridových iontů, tak sekundárně i sodíkových iontů [12].

Protein CFTR je složen z pěti domén. Dvě domény prostupují membránou a jsou označovány jako MSD1 a MSD2 („membrane-spanning domains“), každá je složena z šesti helikálních transmembránových komponent (TM1 až TM12), které dohromady formují kanál. Další domény se nacházejí v cytoplazmě. Jedná se o nukleotid vázající domény NBD1 a NBD2 („nucleotide binding domains“) a regulační doménu R. Na obr. 2 (str. 5) je protein CFTR schematicky znázorněn.



**Obr. 2: Struktura CFTR kanálu.** Kanál je složen ze dvou transmembránových částí (MSD1 a MSD2). V cytoplazmě se nachází dvě nukleotid vázající domény (NBD1 a NBD2) a regulační doména R. Převzato a upraveno z [13].

#### 1.1.4 Projevy CF

Vlivem defektu CFTR kanálu dochází k abnormálnímu transportu chloridových a sodíkových iontů přes epiteliální membrány sliznic. Nedostatečná sekrece chloridových iontů způsobuje nadměrnou reabsorpci sodíkových iontů, které jsou pasivně následovány vodou. V důsledku osmotické nerovnováhy je narušena správná hydratace sekretů dýchacích cest a pankreatu, což vede k tvorbě viskózního hlenu, který se pak usazuje v postižených orgánech.

V potních žlázách naopak nedochází ke správné reabsorpci solí, což vede k produkci výrazně slaného potu. Při zvýšeném pocení může pak dojít snadno k dehydrataci.

Jedním z dalších důsledků mutace genu CFTR je rozdílná glykosylace buněčných glykoproteinů ve srovnání se zdravými buňkami. Především se jedná o pozměněnou glykosylaci mucinů, což jsou glykoproteiny syntetizované epiteliálními buňkami. Muciny mohou být přímo součástí cytoplazmatické membrány nebo jsou přítomny ve formě sekretů v extracelulární matrix. Obvykle jsou tvořeny oligosacharidy vázanými *O*-glykosidickou vazbou na hydroxylové funkční skupiny serinu nebo threoninu. Jako sacharidová složka je obvykle přítomna galaktosa, fukosa, *N*-acetylglukosamin a kyselina sialová. V menší míře jsou v mucinu přítomny i *N*-glykosidicky vázané glykoproteiny.

Membránové i sekretované muciny u pacientů s CF vykazují především rozdílnou fukosylaci a sialyzaci.

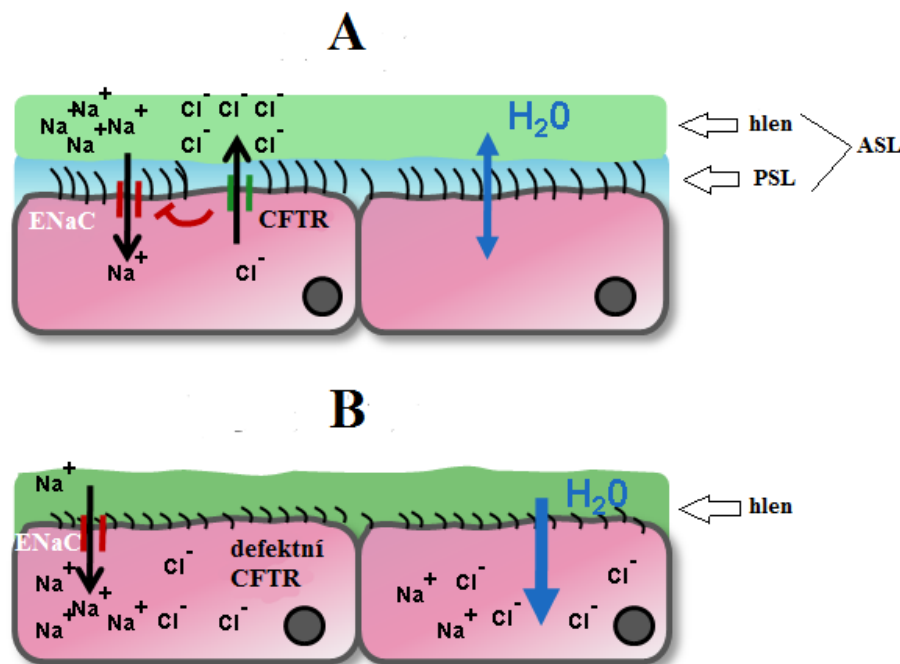
Pozměněné glykoproteiny mucinu slouží bakteriálním patogenům jako receptor pro vazbu prostřednictvím specifických proteinových struktur přítomných na povrchu bakterie. Bakteriím k tomuto účelu obvykle slouží **lektiny**, což jsou proteiny bez enzymové aktivity s vysokou specifitou vůči konkrétním sacharidovým zbytkům [14].

Klinické symptomy jsou velmi individuální, některé příznaky jsou zřetelné již při narození, jiné se mohou projevit kdykoliv v průběhu života. Závažnost projevů choroby je ovlivněna typem mutace v genu *CFTR*, včasnou diagnózou a následnou vhodnou léčbou a ochranou před bakteriálními infekcemi.

#### **1.1.4.1 Postižení respiračního systému**

CF má nejzávažnější dopad na správné fungování plic. Postižením dýchacího ústrojí trpí všichni pacienti s CF, často už od kojeneckého věku.

Plicní epitel je na povrchu kryt řasinkami, které se pohybují v tzv. periciliární tekutině (PCL). Na PCL přiléhá tenká vrstva řídkého hlenu, která slouží k zachycení nečistot a patogenů. Pohybem řasinek pak dochází k odstranění vdechnutých částic z plic zpět do horních cest dýchacích. Tato samočisticí schopnost plic se nazývá mukociliární clearance. Obě vrstvy se dohromady označují jako ASL (airway surface liquide), tedy tekutina na povrchu dýchacích cest. U pacientů s CF je na povrchu epitelu usazena vrstva hustého hlenu, která brání pohybu řasinkového epitelu a znemožňuje tak odstraňování nečistot (viz obr. 3, str. 7). Dochází pak snáze k infekcím a tvorbě zánětů. Na přítomnost cizorodých látek reagují bílé krvinky, ale jejich pohyb je vzhledem k tvorbě hustého hlenu značně omezen a nedochází tak k dostatečnému odstranění patogenů. Z rozpadlých leukocytů se uvolňuje DNA, která přispívá k dalšímu zvýšení hustoty hlenu [15, 16].



**Obr. 3 Schematické znázornění principu patogeneze cystické fibrózy v plicním epitelu. A – U zdravých plicních buněk dochází k vyváženému přenosu chloridových a sodných iontů, čímž je zajištěna optimální tloušťka ASL. B – u buněk s defektním CFTR kanálem dochází vlivem nedostatečné sekrece chloridových iontů k nadměrné reabsorpci sodíku a vody. Projevem této nerovnováhy je zvýšení hustoty hleny a znemožnění pohybu řasinkového epitelu. Převzato a upraveno z [17].**

#### 1.1.4.2 Vliv na ostatní orgány

Vedle postižení dýchacího ústrojí je ovlivněna i funkce orgánů **gastrointestinálního traktu (GIT)**. Postižení respiračního a trávicího ústrojí spolu úzce souvisí a navzájem se ovlivňují. Pacienti s vážnými dýchacími problémy obtížně přijímají potravu a vlivem narušené sekrece pankreatu mají následně problém s jejím trávením [5]. V žaludku nedochází vlivem porušeného transportu bikarbonátu k optimální neutralizaci kyselý žaludeční šťávy. U pacientů také často dochází, vlivem těžkého kašle, k vrácení žaludečních šťáv do jícnu, což způsobí tzv. pálení žáhy. Celý proces trávení potravy je narušen nedostatečnou sekrecí slinivky břišní, jejíž vývody jsou ucpané hlenem. Následkem nedostatečné produkce trávicích enzymů pak nedochází v tenkém střevě ke správnému štěpení složek potravy a dostatečnému využití živin. Nejhůře trávené jsou lipidy, což se u dětí projevuje objemnými, mastnými stolicemi. U novorozenců bývá prvním příznakem CF přítomnost tzv. mekoiového ilea, což je ucpaní střev hustým hlenem. Postiženy bývají i žlučové cesty a

žlučník, kde může docházet k tvorbě žlučových kamenů. Asi u 20 % pacientů nemocných CF dochází k poškození jater, které může vést až k rozvoji jaterní cirhózy [18, 19].

Až 95 % mužů nemocných CF je z důvodu poškození chánovodů **neplodných**. U žen není reprodukční soustava výrazně zasažena, ale vzhledem k postižení funkcí jiných orgánů je pro ně těhotenství značně rizikové. Těhotenství se obvykle nedoporučuje ženám, které trpí kromě CF i diabetem, mají těžkou poruchu dýchacích funkcí a jsou infikovány bakteriemi *Burkholderia cepacia* [20, 21].

**Imunitní systém** pacientů s CF není primárně poškozen, ale z důvodu poškození některých mechanismů nespecifické imunity (např. mukociliární clearance) dochází hůře k odstraňování patogenů.

### 1.1.5 Diagnostika pacientů

Stanovení diagnózy CF se tradičně opírá o přítomnost charakteristických příznaků. Vzhledem k závažnosti choroby byly hledány metody, jak onemocnění diagnostikovat co nejdříve, ještě než se klinicky projeví. CF lze stanovit již v prenatálním stádiu, kdy lze již v 16. – 17. týdnu těhotenství z buněk v plodové vodě provést genetický rozbor. Toto vyšetření je standardně nabízeno všem rodinám, kde se již CF vyskytla nebo jsou rodiče zjištěnými nositeli CF mutace. Standardně se využívají následující metody:

- **Novorozenecký screening** je metoda vyhledávání chorob v jejich časném, preklinickém stádiu. Od roku 2009 se v České republice celoplošně provádí i novorozenecký screening cystické fibrózy (NSCF). Při vyšetření se stanovuje přítomnost imunoreaktivního trypsinu (IRT), což je enzym produkovaný slinivkou břišní. V případě zvýšených hodnot IRT se dále přistupuje ke genetickému vyšetření [22]. S rozšířením NSCF lze podchytit děti s CF již ve věku 2 měsíců, čímž se průměrný věk stanovení diagnózy stále snižuje [18, 23].
- Při **molekulárně genetickém vyšetření** se postupně hledají nejčastější známé mutace genu *CFTR*. Při nálezů dvou mutací je u pacienta potvrzena diagnóza CF. Kromě vyšetření dítěte se rovněž hledají mutace u rodičů, což má význam jednak pro potvrzení diagnózy u dítěte, tak pro případné budoucí těhotenství.
- **Potní test** je tradiční metoda, která se stále standardně používá k potvrzení diagnózy CF. Měří se koncentrace chloridů v potu prostřednictvím tzv. pilokarpinové

iontoforézy. Při podání pilokarpinu se stimuluje pocení a následně se na filtrační papírek sbírá pot, ve kterém se stanovuje koncentrace chloridů. Jako normální hodnoty koncentrace chloridových iontů se uvádí 10-30 mmol/l, u CF dosahují tyto hodnoty často nad 60 mmol/l. Tato metoda se provádí ambulantně, je zcela bezbolestná a výsledek je znám obvykle do dvou hodin. Při hraničních hodnotách je vždy třeba stanovení opakovat a výsledky porovnávat s genetickým vyšetřením [5, 18, 22].

- K měření **transepiteliálního rozdílu potenciálů** se přistupuje výjimečně, v případě nejednoznačných výsledků potního testu a genetických rozborů. Pomocí měrné a referentní elektrody se měří rozdíl potenciálů mezi povrchem nosní sliznice a podkožím [24].

### 1.1.6 Možnosti terapie CF

CF je chronická nemoc, která je stále ještě nevyléčitelná, ale lze léčit některé symptomy. Základem je udržování průchodnosti plic, léčba zánětů, prevence před infekcemi a vzhledem k postižení GIT také vhodná strava.

K udržení průchodnosti dýchacích cest se využívá **inhalační terapie**. Formou inhalace se mohou nemocným podávat léky zředující hlen (mukolytika), jejichž podstatou účinku je štěpení mucinu. U CF je viskozita hlenu způsobena především nesprávnou funkcí CFTR kanálu a dále molekulami DNA z rozpadlých leukocytů, proto je léčba klasickými mukolytiky často neúčinná. Z tohoto důvodu se používají některé inhalační léky speciálně určené pro CF. Jedná se například o přípravky obsahující rekombinantní DNAasu, která degraduje DNA přítomnou v hlenu a dochází pak k snazšímu odkašlávání [25]. K inhalační terapii lze také využít hypertonický (5-7%) roztok chloridu sodného. Na principu úpravy transportu sodíkových iontů funguje lék amilorid, ale vzhledem ke krátké době účinku (několik desítek minut) se užívá jen omezeně [18, 26]. Pacientům mohou být ve formě inhalací rovněž podávány antibiotika nebo protizánětlivé látky, především kortikoidy. Součástí udržení správného fungování plic je dále fyzioterapie a pohybová cvičení.

U pacientů, jejichž plíce jsou už tak poškozeny, že klasická léčba je pro ně dále neúčinná, lze přistoupit k transplantaci plic.

Zásadní je **prevence před infekcemi** dýchacích cest. Mikrobiologická vyšetření pacientů nemocných CF se provádí obvykle každý měsíc. Mezi patogeny typicky napadající pacienty

s CF patří *Pseudomonas aeruginosa*, méně často pak bakterie tzv. *Burkholderia cepacia* komplexu (*Bcc*). Na základě vyšetření jsou pacienti striktně separováni podle typu bakteriální infekce. Z důvodu výrazně horšího průběhu infekce bakteriemi *Bcc* je třeba důsledně separovat právě pacienty infikované tímto patogenem. V případě průkazu bakteriální infekce pak spočívá léčba v podávání vysokých dávek antibiotik, obvykle intravenózní cestou. Léčba je však často komplikována rezistencí zmíněných bakterií na řadu podávaných antibiotik. [18, 27]

Děti nemocné CF jsou očkovány rutinně podle standardního očkovacího schématu, pouze se navíc doporučuje vakcinace proti chřipce. Vakcíny proti *Pseudomonas aeruginosa* ani proti bakteriím *Bcc* nejsou zatím v současné době k dispozici.

Kromě očkování (tj. aktivní imunizace oslabeným patogenem) by mohla pacientům pomoci tzv. pasivní imunizace prostřednictvím dodání specifických protilátek (viz kap. 1.1.6.1).

Vlivem postižení některých orgánů GIT pacienti s CF celkově špatně prospívají, následkem čehož vykazují sníženou obranyschopnost vůči infekcím. Základem celé léčby je tak zajištění plnohodnotné stravy, která je obvykle výrazně energeticky bohatší než výživa zdravého jedince. Chybějící enzymy slinivky břišní jsou doplňovány ve formě tabletek, mluví se o tzv. **pankreatické substituci**.

Průlomem v léčbě CF by mohla být intenzivně studovaná **genová terapie**. Princip léčby spočívá v opravě defektního nebo chybějícího genu *CFTR* vložení odpovídající sekvence DNA prostřednictvím virového nebo syntetického vektoru. Tato léčba má ovšem význam pouze u pacientů, u nichž ještě nedošlo k výraznému poškození orgánů. Je proto důležité, aby pacienti důsledně dodržovali klasické léčebné postupy, čímž se zvyšuje šance, že se do budoucna dočkají genové terapie v co nejlepším zdravotním stavu.

### 1.1.6.1 Pasivní imunizace pacientů specifickými protilátkami

Protilátky (imunoglobuliny, Ig) jsou klíčové proteiny specifické imunitní reakce vyšších organismů na přítomnost cizorodé látky. Protilátky izolované z krevního séra zvířat (obvykle potkana, králíka či koně) jsou hojně využívány jako detekční protilátky v imunochemických stanoveních typu ELISA, Western blotting apod. Kromě diagnostického stanovení lze využít zvířecí protilátky jako profylaktický prostředek pro navození či zvýšení imunity vůči konkrétním antigenům (tzv. pasivní imunizace).

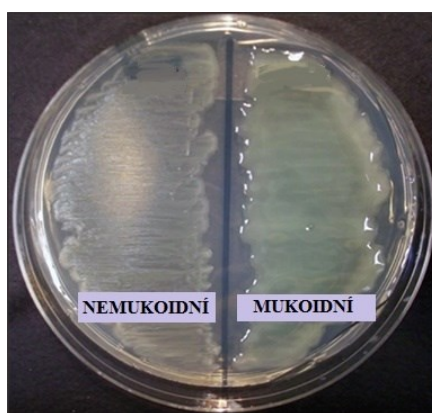
Vhodnou alternativou savčích protilátek by mohly být protilátky izolované z vajec ptáků. Ve vaječném žloutku je nejvíce zastoupen imunoglobulin IgY, který se strukturou i funkcí v organismu velmi podobá savčímu IgG [28, 29]. Výhodou slepičích protilátek je výrazně vyšší koncentrace protilátky ve vejcích ve srovnání se savčími protilátkami v krevním séru. Byla prokázána účinnost slepičích protilátek jako antidota proti hadímu toxinu [30]. V oblasti profylaxe byl prokázán pozitivní efekt slepičích protilátek v boji proti rotavirům, patogenním formám *E. coli*, *Salmonella sp.* nebo *Streptococcus mutans* [31]. Ve vztahu k terapii CF bylo zkoumáno orální podávání slepičích protilátek pacientům infikovaným *P. aeruginosa*. Po podání protilátky byla prokazatelně snížena infekce touto bakterií [32]. Velkou výhodou využití slepičích protilátek proti bakteriálním infekcím je skutečnost, že na rozdíl od terapie antibiotiky, nevzniká proti dodaným protilátkám rezistence.

## 1.2 Mikroorganismy spjaté s CF

Jak již bylo řečeno, poškození respiračního systému u pacientů s CF s sebou nese vyšší riziko infekce bakteriemi, která pak bývá často chronického rázu. Typické jsou infekce různými oportunními (tj. pro zdravého člověka nepatogenními) bakteriálními druhy, převážně *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia* komplex. Mezi další významné patogeny CF se řadí *Staphylococcus aureus* a *Haemophilus influenzae*.

### 1.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* je oportunní lidský patogen, který typicky napadá pacienty nemocné CF či jedince s oslabenou imunitou. Uvádí se, že v dospělosti je až 80 % pacientů s CF infikováno tímto patogenem. *PA* je gramnegativní, tyčinkovitá bakterie, která je schopna adaptace na celou řadu životních podmínek (obr. 4). I přes primárně aerobní metabolismus je schopna přežívat v respiračním ústrojí pacientů za anaerobních podmínek. V dýchacím traktu pacientů vytváří typické mukoidní kolonie, které produkují alginát a tím napomáhají vzniku biofilmu. Kromě respiračního ústrojí mohou být postiženy i močové cesty nebo gastrointestinální trakt [33, 34]. K virulečním faktorům patří, vedle tvorby biofilmu, také produkce extracelulárních toxických enzymů, rezistence na běžně používaná antibiotika a existence různých typů adhezních struktur. Zvýšená adheze *PA* na epitel pacientů s CF je způsobena přítomností bakteriálních lektinů, které specificky rozpoznávají pozměněné glykosylované proteiny na membránách buněk. *PA* vytváří 2 typy lektinů, PA-IL (specifita k D-galaktose) a PA-IIL (specifita k L-fukose a D-mannose) [35].

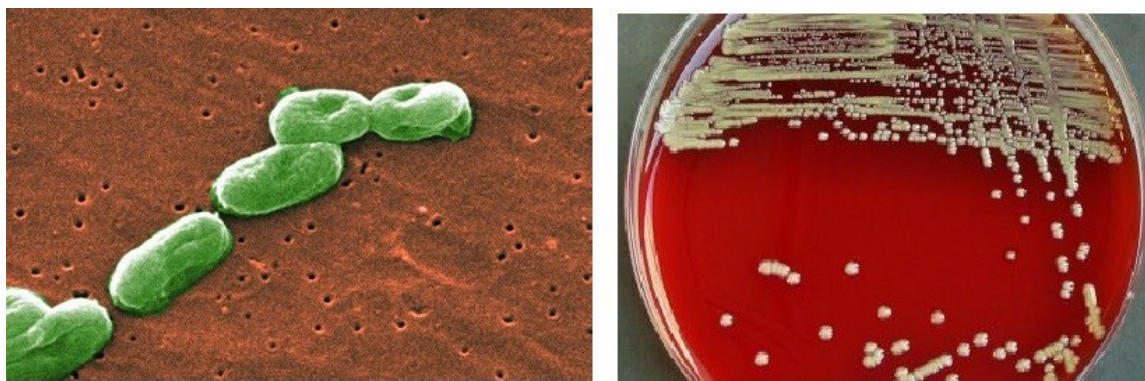


**Obr. 4:** Typy kolonií u *Pseudomonas aeruginosa*. Nemukoidní formy pochází obvykle z přírodních zdrojů, mukoidní forma je typická pro pacienty nemocné CF. Převzato a upraveno z [36].

### 1.2.2 *Burkholderia cepacia* komplex

Bakterii dnes označovanou jako *Burkholderia cepacia* poprvé popsal v roce 1950 anglický biolog W. H. Burkholder. Na hnojících kořenech cibule si všiml bakterie, která se odlišovala od dosud popsaných rostlinných patogenů. Bakterii popsal jako gramnegativní, striktně aerobní tyčinku s jedním až třemi bičíky a pojmenoval ji *Pseudomonas cepacia* (cepa, latinsky cibule) [37]. V polovině 80. let byl popsán [38] prudký nárůst infekce pacientů touto bakterií. Dle odhadů bylo v té době *B. cepacia* infikováno kolem 20 % pacientů a průběh infekce byl horší než v případě *P. aeruginosa*. Hovoří se o tzv. **cepacia syndromu**, kdy pacienti trpí vysokou horečkou, leukocytózou, postupně dochází k těžké pneumonii a infekce nezdědka končí až smrtelně. Roku 1992 byl pro některé druhy *Pseudomonas* (včetně *P. cepacia*) utvořen nový rod *Burkholderia* [39]. Na konci 90. let bylo pomocí molekulárních analýz zjištěno, že bakterie do té doby označovaná jako *B. cepacia* ve skutečnosti zahrnuje více genově odlišných druhů (označeny jako genomovary, viz dále), které se nyní souhrnně označují jako *Burkholderia cepacia* komplex (*Bcc*) [40]. Dnes jsou tyto bakterie (převážně druh *B. cenocepacia*) považovány za hlavní patogeny pacientů trpících CF.

Jak již bylo zmíněno, bakterie z komplexu *Burkholderia cepacia* jsou gramnegativní, nefermentující, pohyblivé tyčinky (obr. 5, str. 14) běžně se vyskytující v přírodě. Jejich přirozeným rezervoárem jsou stojaté vody a především půda, kde se vyskytuje jako symbiont či naopak patogen kořenů rostlin. Při kultivaci produkují zelený, nachový nebo hnědý pigment. Pozoruhodný je jejich unikátní genom, který je až 8 Mb velký a je rozdělen do 2 - 4 replikonů [41]. Díky unikátním metabolickým vlastnostem (např. rozkládají jinak těžko odstranitelné toxické chlorované aromatické uhlovodíky přítomné v pesticidech a herbicidech) byla snaha o jejich využití jako potenciální biodegradační agens v zemědělství. Vzhledem k patogennímu dopadu na lidský organismus se od využití v zemědělství nakonec upustilo [42].



**Obr. 5: *Burkholderia cepacia*:** vlevo obarvený snímek z elektronového mikroskopu, vpravo kolonie na agaru. Převzato z [43, 44].

Rozlišení jednotlivých druhů rodu *Burkholderia* pomocí běžných biologických a biochemických metod je obtížné. Jednotlivé druhy si jsou sice fenotypově podobné, ovšem geneticky se liší. Až použitím molekulárně-genetických metod se podařilo rozlišit jednotlivé druhy a zavést taxonomickou jednotku **genomovar**. Komplex *Bcc* zahrnuje tyto genomovary [5, 45]:

- genomovar I = *Burkholderia cepacia*
- genomovar II = ***Burkholderia multivorans***
- genomovar III = ***Burkholderia cenocepacia***
- genomovar IV = *Burkholderia stabilis*
- genomovar V = *Burkholderia vietnamiensis*
- genomovar VI = *Burkholderia dolosa*
- genomovar VII = *Burkholderia ambifaria*
- genomovar VIII = *Burkholderia anthina*
- genomovar IX = *Burkholderia pyrrocinia*
- genomovar X = *Burkholderia ubonensis*

Všechny popsané genomovary byly u pacientů trpících CF nalezeny, avšak téměř 90 % z nich bylo infikováno výhradně *B. cenocepacia*, případně *B. multivorans* [46].

Vedle zástupců *Bcc* má rod *Burkholderia* mnoho dalších druhů, přičemž stále dochází k objevování nových. Mezi významné patří *B. gladioli* a *B. pseudomallei*, řadí se rovněž mezi významné lidské patogeny [33]. Sekvenováním 16S rRNA se podařily rozlišit až jednotlivé sekvenční typy (ST) v rámci jednotlivých genomovarů [47].

### 1.2.3 Adhezivní struktury *Bcc*

Adhezi na povrch hostitelských buněk umožňují bakteriím struktury zvané obecně adheziny. *Bcc* využívají řadu specifických i nespecifických interakcí s hostitelskou buňkou. Povrchové výběžky, **pili**, vykazují afinitu k mucinu přítomnému v cytoplazmatické membráně epiteliálních buněk. U *B. cenocepacia* byly nalezeny tzv. cable pili, které umožňují velmi silnou adhezi na respirační epitel [48]. Rovněž **lipopolysacharidové struktury** na povrchu bakterie slouží k uchycení na povrch. *Bcc* syntetizují 2 typy flagellinu, který jednak vytváří polární **bičík** a ovlivňuje motilitu bakterie, jednak umožňuje vazbu na epiteliální povrchy [49].

Vysoce specifický typ interakce mezi patogenem a hostitelskou buňkou umožňují **lektiny** přítomné na povrchu bakteriální buňky. Bakteriální lektiny slouží bakteriím k rozpoznání sacharidových struktur na povrchu hostitelské buňky. Lektiny *Bcc* vykazují určité sekvenční podobnosti s lektiny *PA*. U *B. cenocepacia* nacházíme 3 typy lektinů (viz kap. 1.2.7).

### 1.2.4 Virulenční faktory *Bcc*

Významným virulenčním faktorem bakterií *Bcc* je produkce exopolysacharidů (EPS), které umožňují bakteriím vytvářet biofilmovou vrstvu na povrchu epitelu. **Biofilm** bakterie chrání před působením buněk imunitního systému hostitele, znesnadňuje přístup antimikrobiálních látek a poskytuje ochranu před různými fyzikálními vlivy (změny pH, UV záření). Právě vlivem tvorby biofilmu se infekce *Bcc* stává často chronickou.

K dalším virulenčním faktorům patří tvorba řady **toxických extracelulárních enzymů**. *Bcc* produkují proteasy a metalloproteasy (v komplexu se zinkem), jejichž působením dochází u hostitele k poškození tkání. Produkce fosfolipasy C umožňuje štěpit důležité fosfátové skupiny v infikované buňce.

Železo potřebné k růstu získávají *Bcc* prostřednictvím speciálních chelatačních molekul, tzv. **sideroforů**, převážně ornibactinu a pyochelinu [50].

Vliv na infekci bakteriemi *Bcc* má i předchozí infekce jinými patogeny, převážně *P. aeruginosa*. Případy infekce výhradně *Bcc* jsou velmi vzácné, téměř vždy se jedná o kolonizaci více bakteriálními rody [51].

Vzhledem k závažnosti infekce a snadnému šíření *Bcc* je nezbytná správná identifikace patogenu a následná separace pacientů podle bakteriálního nálezu.

### 1.2.5 Problematika terapie antibiotiky u *Bcc*

Léčba infekce pomocí antimikrobiálních látek je v případě nákazy *Bcc* komplikována několika faktory. Průnik antibiotika k cílové tkáni je ztížen přítomností bakteriálního biofilmu na povrchu epitelu. Hlavním problémem je pak přirozená rezistence bakterie na celou řadu antibiotik, které se k léčbě pacientů nemocných CF běžně používají. Tato primární rezistence je způsobena několika vlivy. *Bcc* se odlišují od jiných gramnegativních bakterií strukturou vnější membrány, převážně pak v množství fosfátových skupin a lipopolysacharidů (LPS). Bylo také zjištěno, že *Bcc* mají výrazně menší permeabilitu porinů, ve srovnání s *E. coli* až 10× nižší [52, 53]. K odstranění antimikrobiálních látek či jiných sloučenin slouží *Bcc* dále tzv. efflux pumpy přítomné v cytoplazmatické membráně [54]. Uvedené mechanismy snižují permeabilitu membrány a tím ztěžují průnik antibiotika k cílové buňce.

Další ochranou uvedené bakterie před účinnou léčbou antibiotiky je produkce degradačních enzymů. Jedná se hlavně o  $\beta$ -laktamasu, což činí *Bcc* přirozeně rezistentní na  $\beta$ -laktamová antibiotika (např. peniciliny). *Bcc* je dokonce schopna využít penicillin G jako zdroj uhlíku [55]. Dále jde o enzymy snižující účinek aminoglykosidů či polymyxinů. Při léčbě se nejlépe uplatňuje intravenózní podání kombinace 2-3 antibiotik, obvykle se užívá meropenem spolu s kotrimoxazolem či piperacillin-tazobaktamem. Chronická infekce *Bcc* se kvůli vzniku sekundárních rezistencí neléčí opakovanými podáváním antibiotik, ale k léčbě se přistupuje až při náhlém zhoršení zdravotního stavu. V takovém případě se pak podává kombinace 3 i více antibiotik. [18, 56, 57].

### 1.2.6 *Burkholderia cenocepacia*

Nejrozšířenějším a také nejlépe prozkoumaným druhem *Bcc* je *B. cenocepacia*. Infekce tímto druhem má mnohem vážnější klinické dopady než nákaza jinými bakteriemi z *Bcc*. U *B. cenocepacia* bylo popsáno nejvíce epidemických klonů, které jsou pokládány za výrazně virulentnější než sporadicky se vyskytující kmeny. V České republice je přibližně 30 % pacientů nemocných CF infikováno bakteriemi z *Bcc*, přičemž asi z 90 % se jedná o *B. cenocepacia*. Nejrozšířenější epidemický kmen je označován jako CZ-1 (ST-32) [58]. Infekce *B. cenocepacia* s sebou rovněž nese vyšší riziko vzniku již uvedeného cepacia syndromu. Pacienti s CF infikovaní tímto druhem také vykazují vyšší úmrtnost po

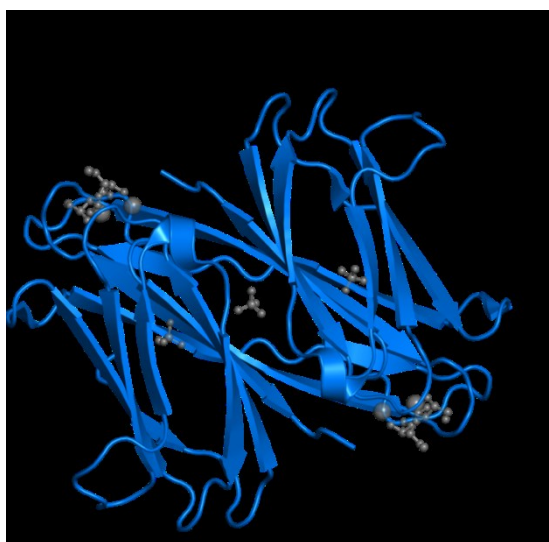
transplantaci plic, než pacienti nakažení jiným druhem *Bcc* nebo *PA*. Vzhledem k řadě posttransplantačních komplikací je často pacientům infikovaným *B. cenocepacia* transplantace nedoporučena [59, 60].

### 1.2.7 Lektiny *Burkholderia cenocepacia*

Všechny dosud identifikované lektiny *B. cenocepacia* vykazují podobnost s lektinem *P. aeruginosa* označovaným jako PA-III. Tento lektin se specifitou k L-fukose je kódován genem *LecB*, jehož strukturní obdoby, tzv. *LecB*-like domény, nacházíme i v genomu *B. cenocepacia* [61].

U *B. cenocepacia* byly popsány 3 strukturně odlišné lektiny označované jako BC2L-A, BC2L-B a BC2L-C. Všechny obsahují doménu podobnou lektinu PA-III a některé navíc obsahují N-terminální doménu, jejíž struktura nebyla nalezena u žádných dosud známých proteinů.

**Lektin BC2L-A** má dimerní strukturu, každý monomer je 13,8 kDa velký a obsahuje jedno vazebné místo se specifitou k mannose. Lektin se váže *O*-glykosidovou vazbou přes 3 hydroxylové skupiny mannosy, vazba je navíc koordinována dvěma ionty vápníku [62]. Struktura lektinu je znázorněna na obrázku 6.



Obr. 6: Lektin BC2L-A. Převzato z [63].

## 2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo vyvinout vhodný modelový systém pro studium adheze bakterie *Burkholderia cenocepacia* na plicní epitel pacientů nemocných cystickou fibrózou, který by umožnil studium ovlivnění této adheze pomocí specifických protilátek.

Pro splnění cíle této práce bylo třeba řešit následující úkoly:

- navrhnout techniku pro vizualizaci bakterie *B. cenocepacia*
- zavést a optimalizovat vhodnou metodiku ke studiu adheze vybraných kmenů *B. cenocepacia* na buněčnou linii odvozenou od pacientů s CF (CuFi-1) a na zdravou buněčnou linii NuLi-1
- z vaječné frakce slepic imunizovaných lektinem BC2L-A izolovat specifickou protilátku proti tomuto lektinu a ověřit, zda tato protilátka specificky rozpoznává rekombinantně připravený lektin BC2L-A
- zjistit, zda je připravená protilátka schopna ovlivnit míru adheze bakterie na plicní epitel buněčné linie CuFi-1

## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Použité přístroje a materiál

#### 3.1.1 Přístrojové vybavení a nástroje

analytické váhy 40 SM	<i>PESA, Švýcarsko</i>
centrifuga Hettich Universal 320 R	<i>Hettich Zentrifugen, Německo</i>
centrifuga Eppendorf 5415 R	<i>Eppendorf, USA</i>
centrifuga Hermle Z 383 K	<i>Hermle Labortechnik, Německo</i>
CO <sub>2</sub> inkubátor	<i>ShellLab, ČR</i>
destička CellBIND, 96 jamek	<i>Corning, USA</i>
dialyzační tuby	
D-Tube™ Dialyzer Mini-Maxi (6-8 kDa)	<i>Lonza Biotec, Švýcarsko</i>
inkubátor s funkcí třepání	<i>New Brunswick Scientific, USA</i>
kultivační lahve, 25 a 75 cm <sup>2</sup>	<i>Corning, USA</i>
laminární box BIO 126	<i>Labox, ČR</i>
laminární box MB 20	<i>Labox, ČR</i>
mikrobiální filtr s velikostí pórů 0,22 μm	<i>Corning, USA</i>
mikroskop Motic AE31	<i>Motic, Německo</i>
mixér Vortex Zx <sup>3</sup>	<i>VELP Scientifica, Itálie</i>
parafilm	<i>Bemis, USA</i>
spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro	<i>Tecan, Švýcarsko</i>
spektrofotometr Helios Alpha	<i>Thermo Scientific,</i>
sterilní mikrofiltr 0,22 μm	<i>Merck Milipore, Německo</i>
vodní lázeň	<i>Memmert, Německo</i>

#### 3.1.2 Použité chemikálie a biologický materiál

bromfenolová modř	<i>Lachema, ČR</i>
-------------------	--------------------

BSA fraction V	<i>Merck, USA</i>
buněčné linie CuFi-1, Nuli-1	<i>ATCC®, USA</i>
Diluent C	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
DMSO	<i>Aplichem, Německo</i>
FBS	<i>Gibco™ Invitrogen, UK</i>
Geneticin	<i>Gibco™ Invitrogen, UK</i>
Kolagen IV	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
kyselina octová	<i>Lachema, ČR</i>
LHC-9 medium	<i>Gibco™ Invitrogen, UK</i>
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labelling	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
PKH67 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labelling	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
trypsin-EDTA 10× koncentrovaný roztok	<i>PAA Laboratories, Rakousko</i>
TWEEN® 20	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>

## **3.2 Práce s buněčnými liniemi plicního epitelu**

V této práci byly při experimentech používány imortalizované buňky plicního epitelu. Linie CuFi-1 pochází z epitelu pacienta trpícího CF s mutací  $\Delta F508$ , linie NuLi-1 je kultura zdravých plicních buněk. Použité linie jsou komerčně dostupné preparáty (ATCC®, USA). U linie CuFi-1 je uvedena doba zdvojení 26 hodin, u linie NuLi-1 je to přibližně 43 hodin. Pro zachování deklarovaných vlastností obou buněčných linií je doporučeno omezit počet subkultivací maximálně na 15 [64, 65].

### **3.2.1 Kultivace buněčných linií**

Manipulace s buněčnými liniemi probíhala výhradně v laminárním boxu BIO 126, umístěném v laboratoři určené pro kultivaci tkáňových kultur. Při práci s těmito liniemi byly používány sterilní jednorázové nástroje (plastové zkumavky Falcon, pipety a kultivační lahve) nebo byl materiál sterilizován v autoklávu při 121 °C.

Buněčné linie byly pěstovány v LHC-9 mediu určeném speciálně pro linie plicního epitelu. Do tohoto media bylo přidáváno antibiotikum Geneticin v koncentraci 50 µg/ml. Medium bylo každé 3 dny měněno. Pro kultivaci buněk byly používány kultivační lahve s povrchem dna 25 nebo 75 cm<sup>2</sup>, které bylo potažené kolagenem typu IV (viz dále kap. 3.2.4). Kultivační lahve s plicními buňkami byly inkubovány v ShellLab CO<sub>2</sub> inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.

### **3.2.2 Subkultivace buněčných linií**

Po určité době kultivace buněk dojde k vytvoření jednolité vrstvy po celém povrchu kultivační nádoby a buňky tak již nemají prostor k dalšímu dělení. Je tedy potřeba část buněčné kultury odebrat a převést do nové kultivační nádoby, aby byly zajištěné optimální podmínky pro další dělení. Tato metoda se nazývá subkultivace, neboli „pasáž“. Pro uvolnění adheovaných buněk z povrchu kultivační nádoby je používán trypsin s EDTA. Pro zastavení jeho účinku je následně přidáváno hovězí fetální sérum (FBS).

Subkultivace byla prováděna vždy po 7 dnech kultivace buněk. Z kultivačních nádob bylo odebráno původní LHC-9 medium a bylo přidáno 2,5 ml 0,25% (v/v) trypsinu s 0,53mM EDTA. Kultivační nádoby byly umístěny do inkubátoru po dobu 8 minut při 37

°C. Poté byla trypsinace zastavena ekvivalentním množstvím 1% (v/v) FBS v PBS pufru. Povrch nádoby byl několikrát opláchnut, aby došlo k uvolnění veškerých buněk. Vzniklá buněčná suspenze byla poté centrifugována (centrifuga Hettich, 5minut/1000 RPM). Po odstředění byl odebrán supernatant a usazené buňky resuspendovány v 1 ml kompletního LHC-9 média. Z této buněčné suspenze bylo odebráno 100  $\mu$ l a převedeno do nové kultivační lahve potažené kolagenem s povrchem 75 cm<sup>2</sup> obsahující 15-16 ml kompletního média LHC-9. Byl také odebrán alikvot na počítání buněk.

### **3.2.3 Stanovení počtu buněk a jejich viability barvením trypanovou modří**

Nabarvením buněčné suspenze trypanovou modří lze rozlišit mrtvé a živé buňky. Živé buňky toto barvivo přes membránu vylučují, proto se při mikroskopickém pozorování jeví jako bezbarvé, naopak mrtvé buňky jsou obarvené modře.

20  $\mu$ l buněčné suspenze bylo smícháno s 80  $\mu$ l média LHC – 9 a v poměru 1:1 obarveno 0,4 % (w/v) roztokem trypanové modří. Tímto postupem vznikl 10 $\times$  ředěný roztok základní buněčné suspenze. Tohoto roztoku bylo na mřížku Bürkerovy komůrky pipetováno 20  $\mu$ l. Byly počítány vždy živé buňky v 5 velkých čtvercích komůrky a následně vypočten průměrný počet buněk v 1 velkém čtverci. Výsledný počet buněk  $n$  v 1 ml základní buněčné suspenze byl stanoven pomocí převodního vztahu:

$$n = \text{průměrný počet buněk ve velkém čtverci} \times \text{ředění základní suspenze} \times 10\,000$$

### **3.2.4 Potažení kultivačních nádob kolagenem IV**

Pro správný růst buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1 je vhodné je kultivovat v nádobách, jejichž dno je potaženo kolagenem. Byl použit komerčně dostupný kolagen IV získávaný z lidské placenty. Lyofilizovaný kolagen byl rozpuštěn v 0,25 % (v/v) kyselině octové, aby vznikl zásobní roztok o koncentraci 1,8 mg/ml. Takto připravený roztok kolagenu byl uchováván v chladu ve skleněné lahvičce.

Zásobní roztok kolagenu byl dále ředěn pufrům PBS na výslednou koncentraci 60  $\mu$ g/ml. Tento roztok byl následně sterilizován filtrací přes mikrofiltr s velikostí pórů 0,22  $\mu$ m. Do kultivačních lahví s povrchem 75 cm<sup>2</sup> bylo pipetováno 4-5 ml připraveného roztoku

kolagenu a bylo zajištěno, aby bylo celé dno roztokem rovnoměrně pokryto. Do lahví s kulturačním povrchem 25 cm<sup>2</sup> byly nanášeny 2 ml tohoto roztoku. Lahve byly poté inkubovány v laminárním boxu po dobu minimálně 12 hodin.

Zbylý kolagen byl odebrán. Lahve byly dvakrát promyty 4 ml PBS a ponechány otočené dnem vzhůru do úplného vyschnutí. Poté byly sterilizovány UV zářením po dobu minimálně 2 hodin a nakonec jejich víčko zajištěno parafilmem. Před dalším použitím byly uchovávány v chladu a každá lahev byla před kultivací buněk ještě jednou promyta pufrem PBS.

### 3.2.5 Rozmražení buněčných linií

Buněčné linie byly uchovávány v hlubokomrazícím boxu při – 80 °C. Vzhledem k přítomnosti toxického DMSO v zamražené buněčné suspenzi je třeba při rozmrazování postupovat opatrně a přesně daným způsobem. Medium se přidává postupně v daných časových intervalech, aby se buňky adaptovaly na změnu pH a osmolality v buněčné suspenzi.

Kryokonzervy s buněčnými liniemi byly vyjmuty z mrazicího boxu a rychle rozmrazeny ve vodní lázni temperované na 37 °C. Tyto buňky byly následně po objemu 1 ml převedeny do sterilní plastové zkumavky, ve které již bylo připraveno 100 µl media LHC-9. Následně bylo v minutových intervalech přidáváno vytemperované medium (37 °C) – schéma postupných přídavek media ukazuje tabulka 1:

**Tab. 1:** Schéma přídavek LHC-9 media k rozmražené buněčné suspenzi

1 ml buněčné suspenze	Čas [min]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Přídavek media [ml]	0,10	0,12	0,15	0,19	0,26	0,36	0,52	0,86	1,69	4,75

Buněčná suspenze byla následně centrifugována (centrifuga Hettich 320 R, 5 minut/1000 RPM). Vzniklá peleta buněk byla resuspendována v 1 ml media a převedena do kulturační lahve s povrchem potaženým kolagenem. Z této buněčné suspenze byl rovněž odebrán alikvot na počítání a stanovení viability buněk (viz kap. 3.2.3).

### 3.3 Práce s bakteriemi *Burkholderia cenocepacia*

V této práci byly použity dva různé epidemické kmeny *Burkholderia cenocepacia* poskytnuté Ústavem lékařské mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol:

- *Burkholderia cenocepacia*, izolát 1232 kmene ST32 (referenční kmen CZ-1)
- *Burkholderia cenocepacia*, izolát J2315 kmene ST28 (referenční kmen LMG 16656)

#### 3.3.1 Kultivace a dlouhodobé uchovávání *Burkholderia cenocepacia*

Bakterie byly kultivovány v kapalném médiu označovaném jako PS medium (plné medium). Složení tohoto media je následující: 1,6% (w/v) pepton, 1% (w/v) enzymatický kaseinový hydrolyzát, 57 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15 mM MgCl<sub>2</sub> a 0,5% (v/v) glycerol.

Ze zamražené bakteriální suspenze bylo vždy odebráno 50 µl, přidáno k 6 ml PS média a ponecháno inkubovat v třepacím inkubátoru (New Brunswick) při teplotě 37 °C za mírného třepání. Kultivace probíhala obvykle po dobu alespoň 15 hodin. Po namnožení bakterií byla při vlnové délce 600 nm změřena optická denzita (OD) na spektrofotometru Helios α. Pomocí převodního vztahu:

$$CFU = A_{600} \times 6 \times 10^8$$

CFU (Colony-forming Units) – koncentrace bakterií [b/ml]

A<sub>600</sub> – absorbance při 600 nm

bylo orientačně stanoveno množství bakterií v 1 ml bakteriální suspenze.

Pro dlouhodobé uchovávání byly z bakteriální suspenze utvořeny 100µl alikvoty obsahující bakteriální suspenzi a kryokonzervační médium (40 % glycerol v pufru PBS) v poměru 1:1. Tato směs byla rychle zmrazena tekutým dusíkem a uchovávána v hlubokomrazícím boxu při – 80 °C.

### 3.4 Fluorescenční značení plicních a bakteriálních buněk

Pro studium adheze *Burkholderia cenocepacia* na plicní epitel bylo třeba studované buňky a bakterie vhodně fluorescenčně označit, aby mohlo být následně kvantitativně stanoveno množství adherovaných bakterií na epitel plicních buněk. Byla použita komerčně dostupná

barviva poskytovaná firmou Sigma-Aldrich®. Plicní buňky byly barvené zelenou fluorescenční sloučeninou PKH67. Pro studium bakteriálních buněk bylo od téže firmy použito barvivo PKH26. Tato sloučenina poskytuje fluorescenci v červené oblasti spektra. Obě popsané fluorescenční sloučeniny se pomocí dlouhých alifatických řetězců vážou do lipidové membrány buněk a zanechávají je plně životaschopné. Měření fluorescence probíhalo na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro. Fluorescence obarvených plicních buněk byla měřena při vlnové délce excitace 470 nm a emise 505 nm. Pro stanovení fluorescence bakteriálních buněk byla hodnota excitačního maxima nastavena na 522 nm, emisního pak na 569 nm.

### **3.4.1 Fluorescenční značení plicních buněk**

Pro fluorescenční značení bylo do 96-jamkové destičky nasazeno  $5 \cdot 10^4$  buněk na jamku ve 200  $\mu$ l LHC-9 media bez antibiotika. Po vytvoření monovrstvy bylo medium odebráno a do každé jamky pipetováno 25  $\mu$ l Diluentu C, který je spolu s barvou PKH67 součástí kitu od firmy Sigma-Aldrich®. Do jamek bylo následně přidáno 25  $\mu$ l 0,8% (v/v) roztoku barvy PKH67 v Diluentu C. S tímto roztokem barviva byly buňky inkubovány za laboratorní teploty a nepřístupu světla po dobu 10 minut. Reakce byla zastavena přidáním 150  $\mu$ l 100% FBS. Buňky byly následně 1 $\times$  promyty 150  $\mu$ l 1% (v/v) FBS a poté 5 $\times$  150  $\mu$ l media LHC-9. Po promytí bylo do každé jamky přidáno 200  $\mu$ l LHC-9 media a destička ponechána v inkubátoru (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) do té doby, než byly k buňkám přidány bakterie.

### **3.4.2 Fluorescenční značení bakteriálních buněk**

Bakterie byly standardním způsobem namnoženy v PS mediu (viz kap. 3.3.1). Bakteriální suspenze byla centrifugována (centrifuga Hermle Z 383K, 18 minut/5000 RPM). Po odstranění supernatantu byly bakterie ještě 2 $\times$  promyty 2 ml pufru PBS (centrifuga Hermle Z 383K/5 minut/5000 RPM). Byla změřena optická denzita a orientačně stanoven počet bakterií v suspenzi (viz kap. 3.3.1). Bakterie byly poté ředěny pufrům PBS na koncentraci 10<sup>9</sup> bakterií/ml. Bakteriální suspenze byla centrifugována (viz výše) a vzniklá peleta resuspendována ve 250  $\mu$ l Diluentu C. Do této bakteriální suspenze bylo přidáno 250  $\mu$ l roztoku barviva PKH26 v Diluentu C o výsledné koncentraci 8  $\mu$ mol/l. Bakteriální roztok byl inkubován 30 minut za laboratorní teploty a nepřístupu světla. Reakce byla zastavena 1 ml

1% roztoku BSA v pufru PBS (w/v) a reakční směs centrifugována (centrifuga Eppendorf 5415 R, 5 minut/13 000 RPM). Po odebrání supernatantu byly bakterie 2× promyty 1 ml pufru PBS za výše uvedených podmínek a poté resuspendovány v 1 ml tohoto pufru. Koncentrace bakterií v této suspenzi byla určena z měření optické denzity při 600 nm, kdy byl jako blank použit pufr PBS.

### **3.5 Adhezní test**

Buňky byly nasazeny do 96-jamkové destičky v množství  $5 \cdot 10^4$  buněk linie CuFi-1 a  $7,5 \cdot 10^4$  buněk NuLi-1 na jamku ve 200  $\mu$ l LHC-9 media bez přidaného antibiotika a ponechány růst do vytvoření konfluentní monovrstvy. Poté byly buňky standardním způsobem obarveny barvivem PKH67 (viz kap. 3.4.1). Bakterie byly po kultivaci promyty od média a rovněž barveny pomocí barviva PKH26 (viz kap. 3.4.2.).

Před přidáním bakterií k buněčným liniím bylo z jamek odebráno medium a jamky 2× promyty 200  $\mu$ l pufru PBS. Poté bylo do každé jamky pipetováno 80  $\mu$ l bakteriální suspenze. Inkubace probíhala po dobu 2 hodin za laboratorní teploty a bez přístupu světla. Přibližně 10 minut před uplynutím této doby bylo provedeno kontrolní měření fluorescence (parametry měření viz kap. 3.4). Následně byla bakteriální suspenze z jamek odsáta a jamky důkladně promyty pufrům PBS (nejdříve 150  $\mu$ l, poté 2× 100  $\mu$ l). Po promytí bylo do každé jamky přidáno 50  $\mu$ l pufru PBS a provedeno finální měření fluorescence na spektrofluorimetru Tecan Infinite za parametrů uvedených v kap. 3.4. Vzhledem k faktu, že použité barevné sloučeniny absorbují při jiných vlnových délkách, byla relativní fluorescence bakterií a buněčných linií měřena zvlášť. Z vzájemného jejich poměru pak byla vypočítána míra adheze daného bakteriálního kmenu na buněčnou linii CuFi-1 nebo NuLi-1. Užitím dvouvýběrového T-testu pro testování rozdílu dvou středních hodnot byla stanovena hladina významnosti.

#### **3.5.1 Adhezní test s použitím slepičích protilátek**

V případě testování vlivu slepičích protilátek (viz dále) na adhezi bakterie k plicnímu epitelu bylo postupováno obdobně, jako v postupu popsaném výše (kap. 3.5). Z obarvené bakteriální suspenze byly připraveny následující frakce:

- bakteriální suspenze o dané koncentraci v pufru PBS
- bakteriální suspenze v pufru PBS obsahující **kontrolní protilátku** o koncentraci 1 mg/ml
- bakteriální suspenze v pufru PBS obsahující **specifickou protilátku** proti lektinu BC2L-A o koncentraci 1 mg/ml

### 3.6 Izolace slepičí protilátky IgY z vaječného žloutku

#### Použité roztoky:

- **uchovávací roztok PBS–ELISA + azid:** 0,134M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; 1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% (w/v) NaN<sub>3</sub>; pH = 7,2

Vaječné žloutky získané od slepice imunizované lektinem BC2L-A z *Burkholderia cenocepacia* byly uchovávány v roztoku PBS s azidem v poměru 1:1. Tato frakce byla před samotnou izolací ředěna destilovanou vodou tak, aby byly žloutky celkově 8× zředěny. pH reakční směsi bylo upraveno na hodnotu 5,00-5,20 přidávkem 0,5M HCl. Směs byla přelita do trychtýře se zátkou a při -20 °C zamrzena.

Po úplném zmrazení byla frakce přendána do žebrovaného trychtýře vyloženého filtračním papírem. V tomto uspořádání byla frakce za laboratorní teploty ponechána postupně rozmrznout. Do vzniklého filtrátu byl za stálého míchání přidáván chlorid sodný v takovém množství, aby vznikl jeho 8,8% (w/v) roztok. Přídávkem 0,5 M kyseliny chlorovodíkové bylo poté upraveno pH na hodnotu 4,00. Filtrát žloutků byl ponechán 2 hodiny za laboratorní teploty a následně centrifugován (centrifuga K70 Janetzki, 20 minut/5000 RPM). Vzniklá peleta byla resuspendována v pufru PBS s azidem - tento uchovávací roztok byl přidáván postupně, až do vzniku zcela čiré suspenze. Roztok protilátky byl poté skladován při 8 °C.

#### 3.6.1 Stanovení koncentrace protilátek

Z roztoku protilátky bylo odebráno požadované množství (100-500 µl) do mikrozkušavky a centrifugováno (centrifuga Micro Centaur/5 minut/13 000 RPM). Koncentrace protilátek ve vzorku byla stanovována spektrofotometricky na přístroji HP 8453 E při vlnové délce 280 nm. Jako slepý vzorek bylo použito 2,5 ml uchovávacího roztoku (popř. dialyzačního pufru), do kterého bylo poté přidáno 50 µl roztoku protilátky.

Koncentrace protilátky byla vypočtena ze vztahu:

$$c = A_{280} \times \text{ředění vzorku} \times 1,094$$

[c] = mg/ml

### 3.6.2 Dialýza roztoku protilátky

Před přidáním protilátek k bakteriální suspenzi a následně k buněčným liniím je třeba odstranit z uchovávacího roztoku azid, který je pro buňky toxický.

Požadované množství roztoku protilátky bylo převedeno do dialyzační kolonky (propustnost molekul v rozmezí 6-8 kDa). Dialýza probíhala proti pufru PBS nejméně 24 hodin. Po 12 hodinách byl pufr PBS vyměněn. Po dialýze byla změřena koncentrace protilátek (viz 3.6.1).

## 3.7 ELISA

Metoda ELISA patří mezi imunochemické metody založené na specifické interakci mezi antigenem a protilátkou. Název je zkratkou anglického označení metody „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“. Pomocí metody ELISA lze kvantitativně určit množství antigenu či protilátky. Existuje mnoho typů uspořádání ELISA v závislosti na tom, v jakém pořadí se na sebe antigeny a protilátky váží.

#### Použité roztoky:

- **PBS-ELISA:** 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; pH = 7,2
- **PBS ELISA-TWEEN:** 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; 0,1% (v/v) TWEEN®; pH = 7,2
- **blokovací roztok:** 2% (w/v) roztok řídkého bílku v PBS ELISA-TWEEN
- **imobilizační roztok:** 13 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; pH = 9,6
- **vyvolávací roztok:** 30 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % (w/v) p-nitrofenylfosfát (pNPP)

Byl připraven roztok lektinu BC2L-A v imobilizačním pufru o koncentraci 4 µg/ml. Do jamek destičky Polysorb bylo pipetováno 100 µl připraveného roztoku lektinu a destička poté inkubována přes noc při 5 °C.

Po navázání antigenu byly jamky 5× promyty 200 µl pufru PBS ELISA-TWEEN. Následně bylo do jamek pipetováno 150 µl 2% (w/v) roztoku řídkého bílku. Blokování probíhalo 1 hodinu v inkubátoru při 37 °C. Jamky byly poté promyty 3× 200 µl pufru PBS ELISA-TWEEN. Do jamek bylo následně pipetováno 100 µl roztoku primární protilátky proti lektinu BC2L-A v koncentraci 3,3; 10; 30 a 90 µg/ml. Stejným způsobem byl do jamek aplikován i roztok kontrolní protilátky. Inkubace s primárními protilátkami probíhala 2 hodiny při 37 °C. Po jejich navázání byly jamky opět 3× promyty 200 µl pufru PBS ELISA-TWEEN. Následně byl do jamek aplikován roztok sekundární protilátky konjugované s alkalickou fosfatase v PBS v poměru 1:1600. Inkubace se sekundární protilátkou probíhala 1 hodinu při 37 °C, poté byla destička promyta stejným způsobem jako po inkubaci s primárními protilátkami.

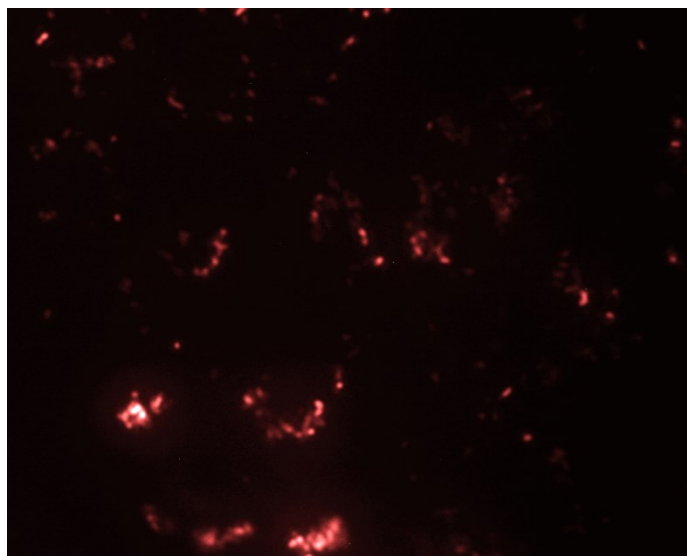
Pro vznik barevného produktu a následné vyhodnocení na spektrofotometru bylo do jamek pipetováno 100 µl vyvolávacího roztoku. Po 10 minutách byla reakce zastavena přidáním 50 µl 3M NaOH. Vyhodnocení probíhalo na spektrofotometru Sunrise Remote při vlnové délce 405 nm.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Fluorescenční značení bakterie *Burkholderia cenocepacia*

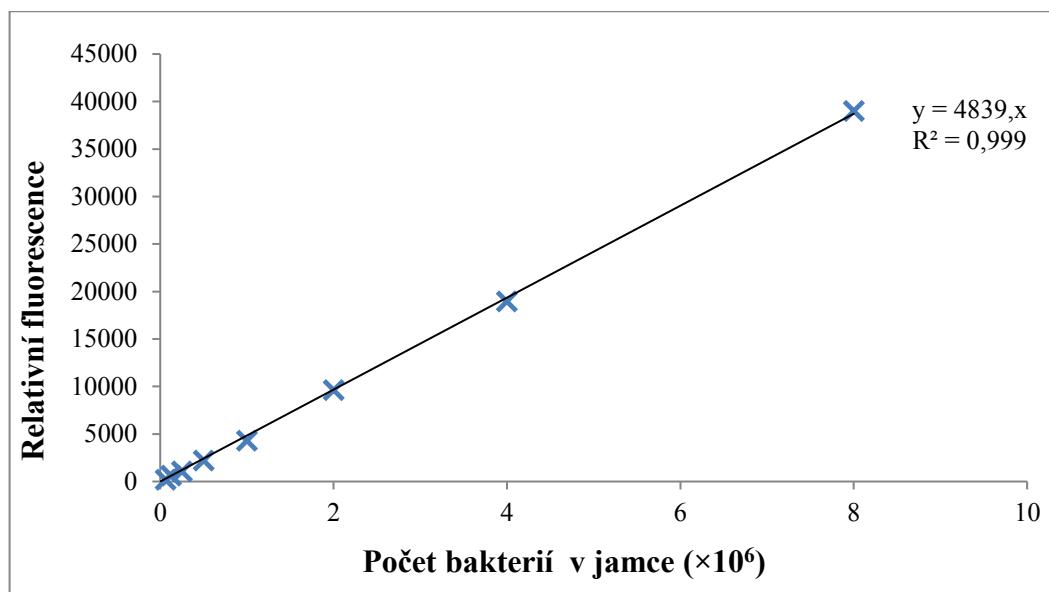
Prvním krokem předkládané práce bylo navrhnout vhodný postup vizualizace bakterie *B. cenocepacia*, který by umožnil sledování adheze této bakterie na plicní epitelální buňky. Byl optimalizován způsob barvení bakteriálních buněk pomocí fluorescenčního barviva PKH26. Pro vlastní postup byl použit návod od firmy Sigma-Aldrich® s menšími úpravami (viz kap. 3.4) vedoucími k optimalizaci metody.

Při optimalizaci barvení *B. cenocepacia* byl nejprve hledán optimální poměr mezi koncentrací bakteriální suspenze a koncentrací přidávané sloučeniny PKH26. Před barvením byly bakterie kultivovány v PS mediu a poté promyty pufrům PBS. Poté byla 8 $\mu$ M roztokem PKH26 barvena bakteriální kultura o koncentraci 10<sup>10</sup> bakt/ml získaná po cca 15 hodinové kultivaci. Bylo zřejmé, že došlo k obarvení pouze horní vrstvy bakteriální pelety. Ani barvení bakteriální kultury o koncentraci 3 $\cdot$ 10<sup>9</sup> bakt/ml nepřineslo uspokojivé výsledky. Jako vyhovující se ukázalo fluorescenční značení bakteriální suspenze o koncentraci 10<sup>9</sup> bakt./ml roztokem PKH26 o výsledné koncentraci 8  $\mu$ mol/l. Při uvedené koncentraci bakterií došlo k rovnoměrnému obarvení veškeré bakteriální kultury. Na obrázku 7 je snímek fluorescenčně značené bakteriální kultury vyhodnocený fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse.

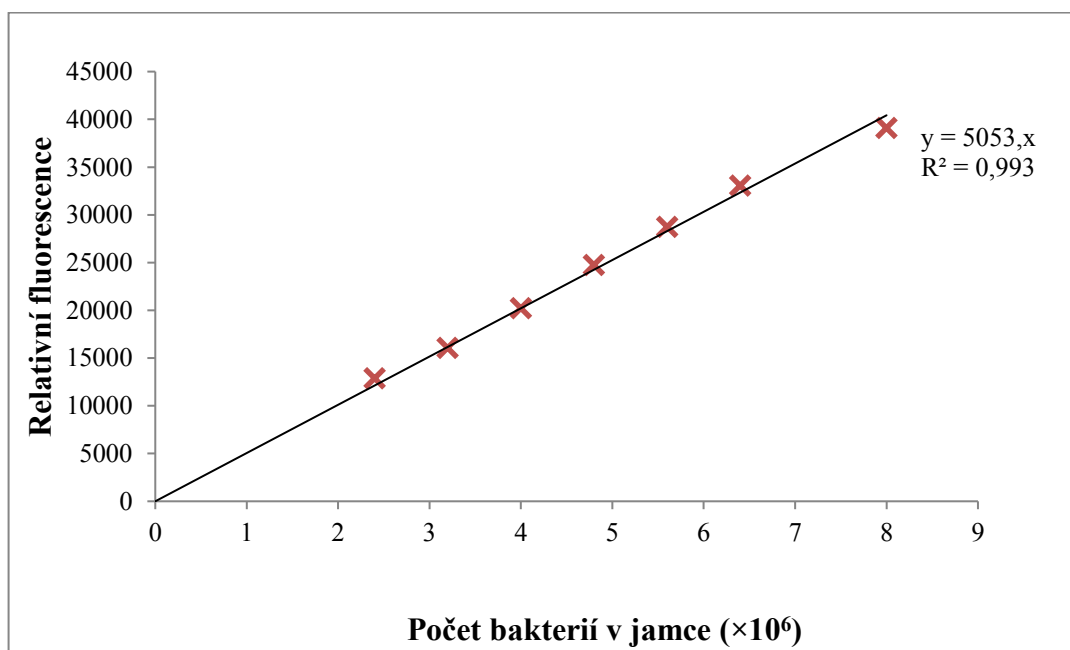


**Obr. 7: Mikroskopický snímek *Burkholderia cenocepacia* značené PKH26. Pozorováno na mikroskopu Nikon Eclipse (40 $\times$ , filtr 31002 RdiI C87702).**

Dále byla sledována závislost relativní fluorescence obarvené bakteriální suspenze na její koncentraci (obr. 8,9). Měření probíhalo na spektrofluorimetru Tecan Infinite.



**Obr. 8:** Závislost relativní fluorescence *Burkholderia cenocepacia*, kmen ST28, na koncentraci bakterií v jamce. Měřeno na spektrofluorimetru Tecan Infinite, excitace/emise – 522/569 nm, destička čtena zespodu, „gain“ 176.



**Obr. 9:** Závislost relativní fluorescence *Burkholderia cenocepacia*, kmen ST32, na koncentraci bakterií v jamce. Měření probíhalo za stejných parametrů jako v případě kmene ST28 (obr. 8).

U obou použitých kmenů *B. cenocepacia* má závislost lineární charakter v uvedeném rozsahu koncentrací bakteriálních buněk. Během adhezních testů byla prokázána lineární závislost fluorescence na počtu bakteriálních buněk až do hodnoty  $8 \cdot 10^7$  bakterií na jamku (viz kap. 4.2).

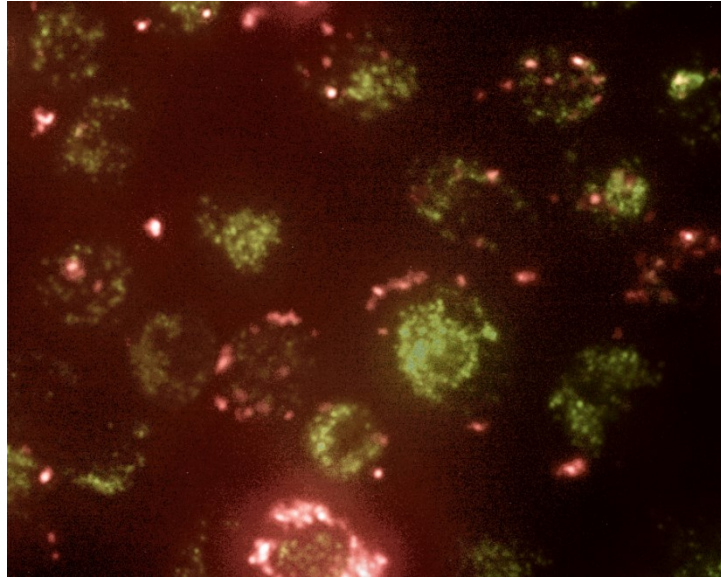
Jako mezní počet bakteriálních buněk, jejichž fluorescence je ještě odlišitelná od slepého vzorku (pufr PBS), se jeví  $10^5$  bakteriálních buněk na jamku.

Z uvedených grafů je dále zřejmé, že oba kmeny *B. cenocepacia* se barví použitým roztokem PKH26 stejně intenzivně.

## 4.2 Adhezní testy

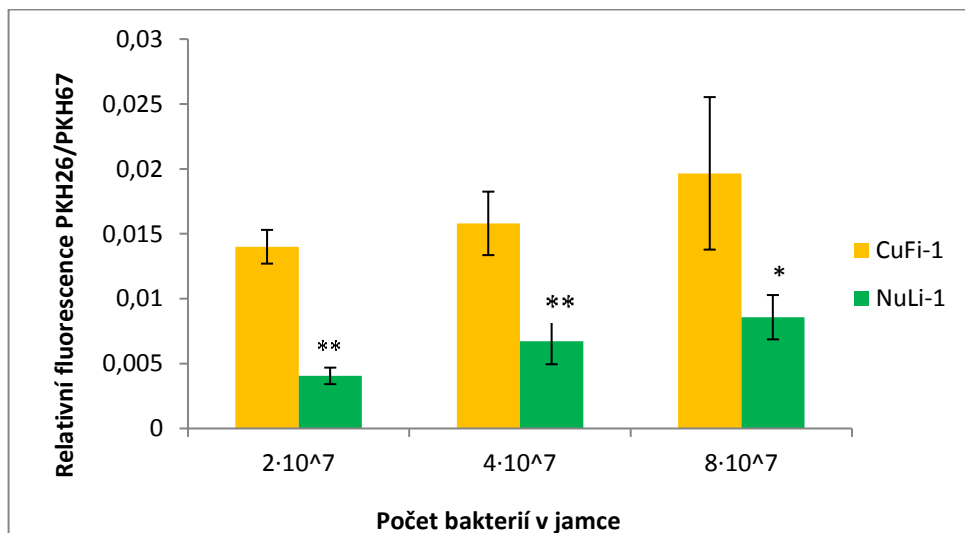
Pro studium adheze bakterie *B. cenocepacia* na buněčné linie plicního epitelu zdravých jedinců a jedinců s CF bylo třeba zavést a optimalizovat vhodnou metodiku. Pro vyhodnocení interakce bakterií *B. cenocepacia* s buňkami plicního epitelu je třeba nějakým způsobem kvantifikovat obě složky. Proto bylo použito fluorescenční značení sloučeninami PKH26 a PKH67, které nepozměňují buněčné membránové struktury a neovlivňují tak adhezi bakterie na povrch epiteliálních buněk. Přesný postup fluorescenčního značení je popsán v kapitole 3.4. Sloučeninou PLH67 byla barvena monovrstva buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1 kultivovaných v 96—jamkové destičce.

Během optimalizace adhezních testů bylo hledáno vhodné množství buněk aplikovaných na destičku a optimální doba kultivace potřebná k vytvoření konfluentní monovrstvy. Byly zkoušeny koncentrace  $5 \cdot 10^4$ ,  $1 \cdot 10^5$  a  $1,5 \cdot 10^5$  buněk na jamku. Po sérii pozorování bylo zvoleno množství  $5 \cdot 10^4$  buněk linie CuFi-1 a  $7,5 \cdot 10^4$  buněk linie NuLi-1 na jamku, které do 24 hodin vytvoří souvislou monovrstvu. Koncentrace buněčné linie NuLi-1 byla při výsevu buněk vyšší vzhledem k delší době zdvojení (46 hodin) ve srovnání s linií CuFi-1 (23 hodin), aby bylo v době experimentu dosaženo přibližně stejného množství buněk u obou buněčných linií. K takto obarveným buněčným liniím byly přidány obarvené bakteriální buňky. Následující mikroskopický snímek (obr. 10, str. 33) zobrazuje adhezi *B. cenocepacia* na buněčnou linii CuFi-1.

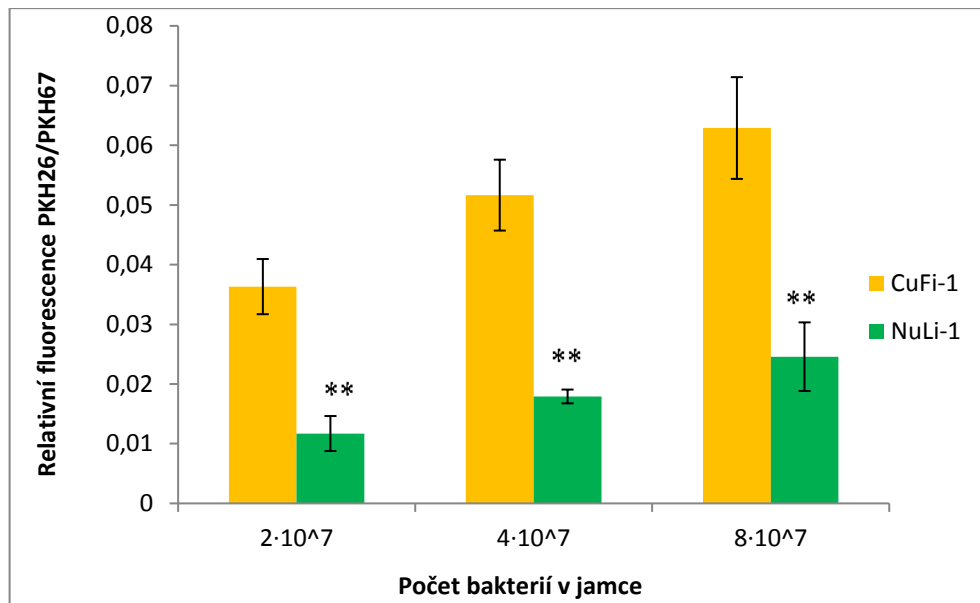


**Obr. 10:** Adheze *B. cenocepacia* na buňky CuFi-1. Pozorováno na mikroskopu Nikon Eclipse (40×). Pro sledování bakterií značených PKH26 (červeně) byl použit filtr 31002 RdiI C87702, pro buňky (PKH67, zeleně) filtr 31001 FITC C87701.

Pro kvantifikaci adherovaných bakterií na povrchu plicních buněk bylo využito měření relativní fluorescence na spektrofluorimetru Tecan Infinite. Na buněčné linie CuFi-1 a NuLi-1 byly aplikovány bakteriální suspenze obou dostupných kmenů *B. cenocepacia* (ST28 a ST32) o různých koncentracích (obr. 11, 12). Pro vyhodnocení míry adheze bakterií na uvedené buněčné linie byl použit vzájemný poměr fluorescencí bakteriálních a plicních epiteliálních buněk.



**Obr. 11:** Adheze kmene ST32 *B. cenocepacia* na plicní epitel buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1. Měřeno na spektrofluorimetru Tecan Infinite, hodnoty exc./em 470/505 nm pro PKH67, „gain“ 134; 522/569 nm pro PKH26, „gain“ 114. Čtení zespu a bez víčka. Hladina významnosti: \* $\alpha < 0,05$ ; \*\* $\alpha < 0,01$ .



**Obr. 12:** Adheze kmene ST28 *B. cenocepacia* na plicní epitel buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1. Měřeno na spektrofluorimetru Tecan Infinite, hodnoty exc./em 470/505 nm pro PKH67, „gain“ 134; 522/569 nm pro PKH26, „gain“ 114. Čtení zesponu a bez víčka. Hladina významnosti: \*\* $\alpha < 0,01$ .

Jak je zřejmé z grafu 11 a 12, u obou bakteriálních kmenů byla prokázána až trojnásobně vyšší adheze k buněčné linii CuFi-1 ve srovnání s linií NuLi-1. Z grafů dále vyplývá, že se stoupající koncentrací bakteriálních buněk se prohlubuje rozdíl v množství adherovaných bakterií na buněčnou linii CuFi-1 oproti linii NuLi-1.

Na základě získaných výsledků lze soudit, že bakteriální kmen ST28 vykazuje vyšší adhezi k plicnímu epitelu než kmen ST32.

Při všech uvedených koncentracích bakteriální suspenze byl zaznamenán rozdíl v adhezi bakterie na linii CuFi-1 oproti NuLi-1. Pro další experimenty byl na základě získaných poznatků vybrán bakteriální kmen ST28. Jako vhodná koncentraci bylo určeno  $2 \cdot 10^7$  a  $4 \cdot 10^7$  bakteriálních buněk na jamku.

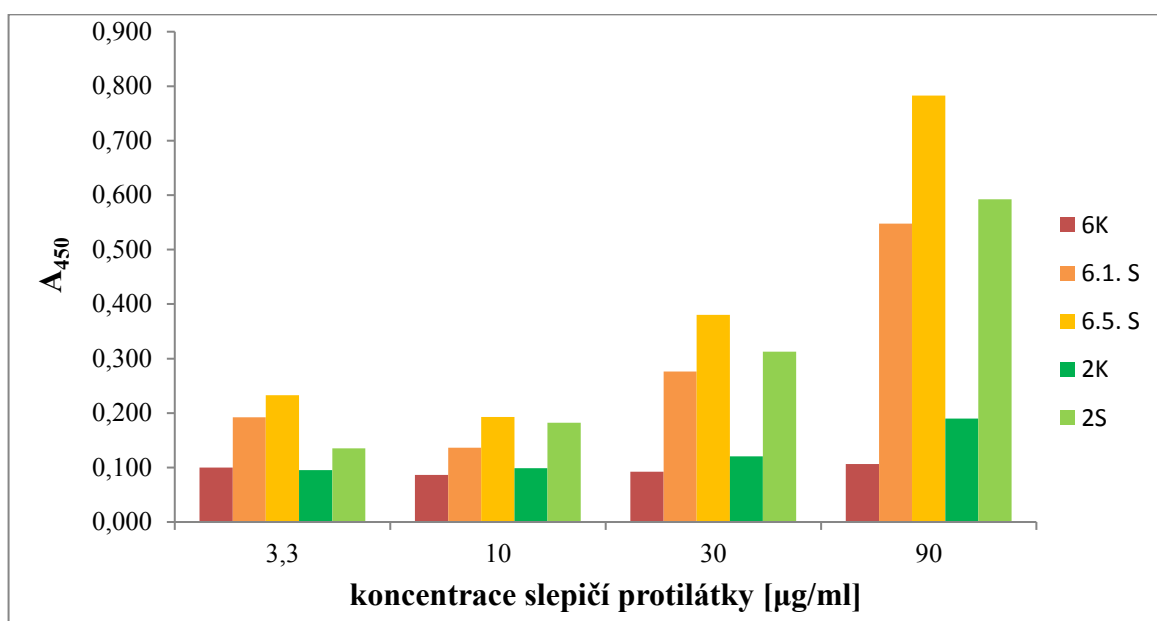
### 4.3 Izolace a charakterizace slepičí protilátky proti lektinu BC2L-A

Po optimalizaci adhezních testů byla izolována a testována protilátka proti lektinu BC2L—A produkovaném *B. cenocepacia* z hlediska možného ovlivnění adheze této bakterie na plicní epitel.

Ze žloutků slepic imunizovaných rekombinantně připraveným lektinem BC2L—A byla izolována směs protilátek IgY. Izolace zahrnovala srážení lipidní frakce roztokem NaCl, vymražení a následné dělení získaného roztoku proteinů „vysolováním“ NaCl za přesně definované hodnoty pH (viz kap. 3.6). Uvedeným způsobem byla získána frakce obsahující specifickou protilátku proti výše uvedenému lektinu (označena číslem 2S). Stejným způsobem byla izolována i kontrolní frakce, tj. směs protilátek před imunizací zvířete (ozn. 2K). Tyto primární protilátky byly v rámci předkládané práce srovnávány s již dříve izolovanými protilátkami (dále označeny číslem 6), u nichž byla prokázána specifická vazba na lektin BC2L—A [66]. Mimo jiné bylo sledováno, zda dlouhodobé uchovávání protilátek v roztoku PBS s azidem neovlivňuje jejich vazbu na uvedený lektin.

Zda připravené primární protilátky specificky váží a rozpoznávají lektin BC2L—A bylo ověřováno metodou ELISA, kde jako sekundární protilátka byla použita protilátka konjugovaná s alkalickou fosfátasou katalyzující chromogenní reakci. Naměřená absorbance pak odpovídá koncentraci primární protilátky vázané na antigen (v tomto případě lektin BC2L—A). Získaná data jsou na obr. 13 na straně 36.

Z výsledků je patrné, že protilátky s rekombinantně připraveným lektinem BC2L-A interagují. Ve všech případech je hodnota signálu u specifické protilátky vyšší než v případě kontrolní protilátky. S rostoucí koncentrací protilátek se tento rozdíl výrazně prohlubuje. Navíc specifická protilátka izolovaná v rámci předkládané práce (frakce 2S) má srovnatelnou účinnost jako již dříve izolované protilátky (frakce 6.1.S a 6.5.S). Zdá se tedy, že dlouhodobé skladování protilátek v roztoku PBS s azidem nevede k ovlivnění interakce mezi protilátkou a lektinem.

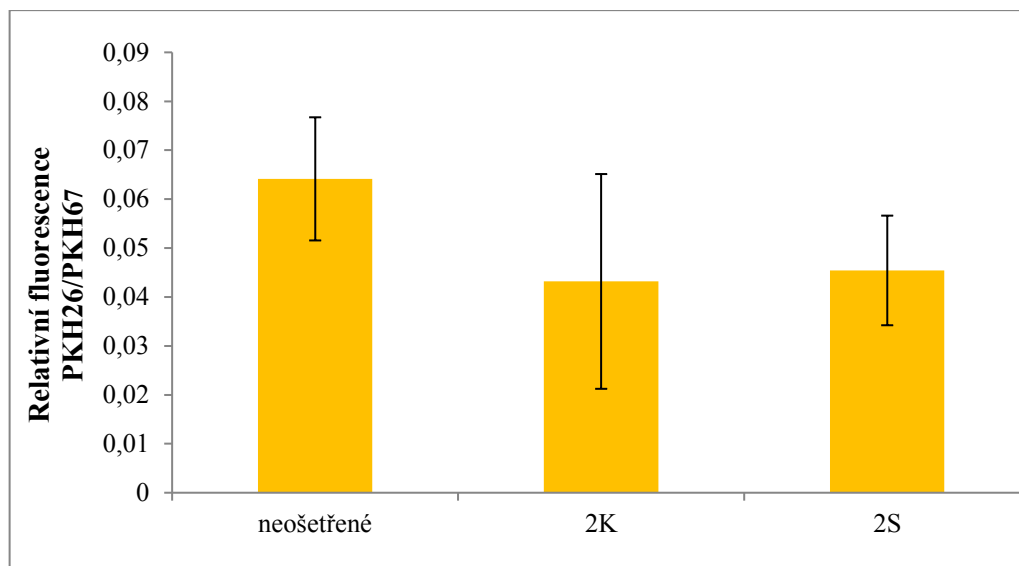


**Obr. 13: Interakce lektinu BC2L-A s protilátkami proti tomuto lektinu.** Uvedená data znázorňují závislost naměřené absorbance na koncentraci primárních protilátek. Protilátky izolované v rámci této práce jsou označeny číslem 2, protilátky označené číslem 6 byly izolovány již dříve [66]. K = kontrolní frakce získaná před imunizací zvířete, S = specifická protilátka. Jako antigen byl použit roztok rekombinantně připraveného lektinu o koncentraci 4µg/ml. Měřeno na spektrofotometru Sunrise remote při vlnové délce 450 nm.

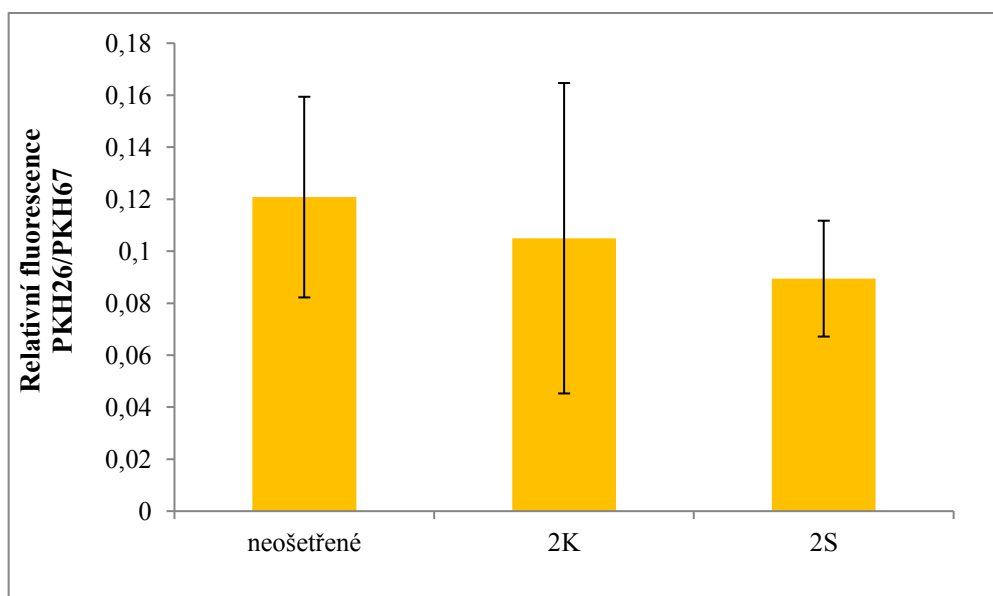
#### 4.4 Ovlivnění adheze *B. cenocepacia* na buněčnou linii CuFi-1 specifickou protilátkou proti lektinu BC2L-A

Byl sledován vliv slepičích protilátek (2S a 2K) na adhezi *B. cenocepacia* na buněčnou linii CuFi-1. Byl použit bakteriální kmen ST28 a připraveny bakteriální suspenze o koncentraci  $2 \cdot 10^7$  a  $4 \cdot 10^7$  bakt./jamku bez přidání protilátky (neošetřené), s kontrolní (2K) a specifickou protilátkou (2S) proti lektinu BC2L-A.

Pilotní experimenty (obr. 14, 15, str. 37) naznačují mírný pokles adheze bakterií na buněčnou linii CuFi-1 jak po přidání specifické, tak kontrolní protilátky. Pokles byl zaznamenán u obou koncentrací bakteriální suspenze. Avšak vzhledem k vysokým směrodatným odchylkám bude tyto experimenty třeba dále zopakovat.



**Obr. 14:** Vliv slepičích protilátek proti lektinu BC2L-A na adhezi bakteriálního kmene ST28 o koncentraci  $2 \cdot 10^7$  bakt./jamku na buněčnou linii CuFi-1. Neošetřené — bez přidání protilátky, 2K — kontrolní protilátka o koncentraci 1 mg/ml, 2 — specifická protilátka o koncentraci 1 mg/ml. Měřeno na spektrofluorimetru Tecan Infinite, hodnoty exc./em pro PKH67 470/505 nm, „gain“ 134; pro PKH26 522/569 nm, „gain“ 114. Čtení zespu, bez víčka.



**Obr. 15:** Vliv slepičích protilátek proti lektinu BC2L-A na adhezi bakteriálního kmene ST28 o koncentraci  $4 \cdot 10^7$  bakt./jamku na buněčnou linii CuFi-1. Neošetřené — bez přidání protilátky, 2K — kontrolní protilátka o koncentraci 1 mg/ml, 2 — specifická protilátka o koncentraci 1 mg/ml. Měřeno na spektrofluorimetru Tecan Infinite, hodnoty exc./em pro PKH67 470/505 nm, „gain“ 134; pro PKH26 522/569 nm, „gain“ 114. Čtení zespu, bez víčka.

## 5 DISKUZE

Cystická fibróza je závažné genetické onemocnění způsobené mutací v genu *CFTR*. Tento gen kóduje stejnojmenný protein, který slouží jako chloridový kanál a zároveň se podílí na regulaci řady dalších systémů. Narušení správné funkce CFTR proteinu (či jeho úplná absence) s sebou nese řadu zdravotních komplikací [3, 4]. Převážně bývá postižena dýchací soustava, což snižuje odolnost organismu vůči bakteriálním infekcím. Pozměněné struktury glykoproteinů na povrchu epitelálních buněk respiračního traktu umožňují snazší adhezi bakterií pomocí různých specifických adhezínů, např. lektinů [21]. Mezi nejčastější patogeny pacientů nemocných CF se řadí *Pseudomonas aeruginosa* a dále bakterie z *Burkholderia cepacia* komplexu. Ve srovnání s *PA* jsou bakterie *Bcc* považovány za výrazně virulentnější. Důvodem těžkého průběhu infekce je rezistence na většinu běžně používaných antibiotik a také riziko vzniku tzv. cepacia syndromu. Mezi nejčastější druhy ze skupiny *Bcc* patří *Burkholderia cenocepacia*. K adhezi slouží této bakterii, vedle řady dalších struktur, také lektiny. U *B. cenocepacia* byly identifikovány tři lektiny, sekvenčně podobné s lektiny *PA*, které jsou označeny jako BC2L–A, –B a –C [61, 62]. Cílem práce bylo zavést a optimalizovat vhodný modelový systém, na kterém by mohla být studována adheze bakterie *B. cenocepacia* na buňky plicního epitelu.

Ke studiu interakce mezi *B. cenocepacia* a plicním epitelem byly využity buněčné linie CuFi-1 odvozené od plicních buněk pacienta s cystickou fibrózou s mutací  $\Delta F508$  a linie NuLi-1 pocházející z buněk zdravého jedince. Pro studium adheze byly použity 2 bakteriální kmeny *B. cenocepacia*. Kmen ST32 (CZ1) je epidemický kmen nejčastěji se vyskytující mezi pacienty v České republice, kmen ST28 patří do epidemické linie ET-12 typické pro pacienty ve Velké Británii.

K vizualizaci bakterií a plicních buněk bylo využito fluorescenční značení pomocí komerčních barviv společnosti Sigma–Aldrich. Takto označené plicní a bakteriální buňky lze také sledovat pod fluorescenčním mikroskopem, což může být užitečné pro pochopení chování systému v podmínkách *in vivo*. V rámci bakalářské a diplomové práce [67, 68] byla vypracována metodika pro studium adheze *PA* na plicní epitel pomocí fluorescenčního značení. Pro vizualizaci bakterií *PA* bylo v tomto případě využito barvení fluorescenční sloučeninou PKH26. Proto bylo testováno, zda je toto barvivo vhodné i k barvení bakterie *B. cenocepacia*. Bakterie *Bcc* vykazují ve srovnání s ostatními gramnegativními bakteriemi (včetně *PA*) odlišnosti ve složení lipopolysacharidů (LPS) ve vnější membráně buňky. V

oligosacharidovém jádru LPS bylo zjištěno výrazně nižší zastoupení 3-deoxy-D-ocetulosonové kyseliny a fosfátových skupin [69]. Vlivem uvedených strukturních modifikací je výrazně snížen náboj na membráně bakteriální buňky. Vzhledem k uvedeným strukturním odlišnostem bylo tedy nutno zjistit, zda a v jaké míře *B. cenocepacia* váže do své membrány barvivo PKH26. V předkládané práci bylo ukázáno, že bakterii *B. cenocepacia* lze barvit uvedenou fluorescenční sloučeninou a také, že se oba bakteriální kmeny barví přibližně stejně intenzivně. Dalším krokem byla následná optimalizace postupu barvení. Dle postupu v produktovém listu výrobce je doporučeno k obarvení buněčné suspenze o koncentraci  $10^7$  buněk/ml použít 4  $\mu\text{M}$  roztok PKH26 v Diluentu C [52]. V rámci diplomové práce [68] byl uvedený postup pro bakterii *PA* modifikován, k obarvení suspenze o koncentraci  $6 \cdot 10^8$  bakt./ml byl používán 20  $\mu\text{M}$  roztok barvy [67].

V případě bakterie *B. cenocepacia* se ukázalo jako optimální barvení bakteriální suspenze o koncentraci  $10^9$  bakt./ml 8  $\mu\text{M}$  roztokem PKH26. Mikroskopické stanovení prokázalo, že bakterie jsou i po obarvení plně životaschopné. Rovněž byla prokázána lineární závislost fluorescence bakterií na jejich množství až do koncentrace  $8 \cdot 10^7$  bakt./jamku.

Dalším krokem bylo optimalizovat způsob kultivace a barvení epiteliálních buněk pro použití v adhezním testu. Stejně jako v již zmíněné diplomové práci [68] zaměřené na problematiku adheze *PA*, bylo přistoupeno k barvení epiteliálních buněk linií CuFi-1 a NuLi-1 zeleným fluorescenčním barvivem PKH67. Jednou z metod je obarvení suspenze buněk, která je poté ponechána kultivovat na destičce do vytvoření konfluentní monovrstvy. Uvedeným způsobem však může při dělení buněk docházet k nerovnoměrné distribuci barviva mezi jednotlivé buňky a naměřená fluorescence pak nemusí korelovat se skutečným počtem buněk. Výsledky by pak mohly být zkresleny, protože získaná data jsou vyhodnocována jako vzájemné poměry fluorescence bakterií obarvených sloučeninou PKH26 a obarvených buněk epitelu sloučeninou PKH67. Z uvedených důvodů bylo přistoupeno ke fluorescenčnímu značení již vytvořené monovrstvy buněk, kde lze předpokládat, že buňky budou nabarveny rovnoměrně.

V průběhu optimalizace adhezních studií byly testovány různé koncentrace bakterií aplikovaných na monovrstvu plicních epiteliálních buněk. Bylo prokázáno, že bakterie obou kmenů se více adherují na buněčnou linii CuFi-1 ve srovnání s linií NuLi-1, přičemž pro míru adheze je důležitý poměr mezi množstvím bakterií a buněk. Prokazatelný rozdíl v adhezi na linii CuFi-1 oproti linii NuLi-1 byl pozorován v rozmezí koncentrací  $2 \cdot 10^7$  až  $8 \cdot 10^7$  bakteriálních buněk na monovrstvu buněk v jamce.

Z provedených experimentů dále vyplývá, že epidemický kmen *B. cenocepacia* ST28, vykazuje výrazně vyšší adhezi k buňkám plicnímu epitelu linie CuFi-1 a NuLi-1, než kmen ST32.

Jako vhodný terapeutický prostředek potlačující chronické bakteriální infekce u pacientů s CF by mohly sloužit slepičí protilátky IgY. V oblasti profylaxe byla prokázána účinnost slepičích protilátek proti rotavirům a *E. coli* působící patogenně na skot či infekci *Salmonella* u myši [71]. U lidí bylo zaznamenáno snížení virulence *Streptococca mutans*, který je považován za jednoho z původců zubního kazu [31]. Jako prevence infekce *PA* u pacientů s CF již bylo testováno ústní podání slepičích imunoglobulinů ve formě kloktadla, které prokázalo snížení chronické infekce tímto patogenem [32]. Studie zabývající se vlivem slepičích protilátek na infekci bakteriemi rodu *Burkholderia* zatím nejsou známy.

V rámci předkládané práce byla provedena samotná izolace protilátky proti lektinu BC2L-A z vaječných žloutků imunizované slepice. Rovněž byla izolována kontrolní protilátka z vajec slepice před imunizací. Metodou ELISA bylo prokázáno, že připravená protilátka rozpoznává a váže rekombinantně připravený lektin BC2L-A se srovnatelnou afinitou jako již dříve izolované protilátky [66], které si zachovaly i po dlouhodobém uchování specifické vlastnosti.

Získaný izolát obsahuje vedle specifické protilátky proti popsanému lektinu i řadu jiných protilátek a proteinových příměsí. Čistota izolátu protilátky by se dala zvýšit afinitní purifikací, která by mohla přispět ke zvýšení její specifity.

Dále byl v rámci této práce proveden pilotní experiment studující ovlivnění adheze *B. cenocepacia* na buněčnou linii CuFi-1 izolovanou slepičí protilátkou. Předběžné výsledky naznačují, že uvedené protilátky snižují adhezi kmene ST28 *B. cenocepacia* na buněčnou linii CuFi-1. Vzhledem k vysokým směrodatným odchylkám však bude třeba tento experiment ještě zopakovat. Součástí další práce bude i optimalizace koncentrace přidávaných protilátek. Uvádí se, že množství exprimovaného lektinu BC2L-A je nižší v porovnání s lektiny BC2L-B a BC2L-C [62]. Dalším krokem tak bude prokázat expresi lektinu BC2L-A u studovaných kmenů *B. cenocepacia* pomocí kombinace SDS elektroforézy a metody Western blot.

Na vytvořeném modelovém systému bude ovlivnění adheze epidemických kmenů *B. cenocepacia* pomocí specifických protilátek dále studováno.

## 6 SOUHRN

- V předkládané práci byla vypracována literární rešerše o cystické fibróze s důrazem na specifické postavení bakterií *Burkholderia cepacia* mezi ostatními patogeny pacientů nemocných CF.
- Bakteriální kmeny *B. cenocepacia* byly úspěšně fluorescenčně označeny barvivem PKH26 při zachování jejich viability.
- Byla optimalizována metodika fluorescenčního značení buněčných linií CuFi-1 a NuLi-1 odvozených od lidských buněk plicního epitelu.
- Na vytvořeném modelovém systému byla pomocí adhezních testů prokázána vyšší adheze bakterií *B. cenocepacia* na buňky postižené cystickou fibrózou ve srovnání se zdravými buňkami.
- Z vaječného žloutku byla izolována slepičí protilátka proti lektinu *B. cenocepacia*, BC2L-A. Metodou ELISA bylo prokázáno, že připravená protilátka specificky interaguje s rekombinantně připraveným lektinem BC2L-A.
- Pilotní experimenty naznačily, že připravené protilátky mohou snižovat adhezi bakterie na buňky plicního epitelu.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. D. H. Andersen: Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathological study. *American Journal of Diseases of Children*. **56**, 344-399 (1938).
2. P. D. di Sant'Agnese, R. C. Darling, G. A. Perera a E. Shea: Abnormal Electrolyte Composition of Sweat in Cystic Fibrosis of the Pancreas. *Pediatrics*. **12**, 549-563 (1953).
3. P. M. Quinton: Cystic fibrosis: a disease in electrolyte transport. The *FASEB Journal*. **4**, 2709-2717 (1990).
4. B. Kerem, J. M. Rommens, J. A. Buchanan, D. Markiewicz, T. K. Cox, A. Chakravarti a M. Buchwald: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. **245**, 1073-1080 (1989).
5. V. Vávrová: Cystická fibróza. (*Grada Publishing a.s.* 2006).
6. <http://www.bordercf.com.au/>; březen 2017
7. C. S. Francis: Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science*. **256**, 774-779 (1992).
8. M. Nissim-Rafinia, L. Linde a B. Kerem: The CFTR Gene: Structure, Mutations and Specific Therapeutic Approaches. *Cystic Fibrosis in the 21st century*. **34**, 1-10 (2005).
9. N. Morral, J. Bertranp, X. Estivill, V. Nunes, T. Casals, J. Giménez, A. Rais, R. Varon-Mateeva, M. Macek a L. Kalaydjieva: The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nature Genetics*. **7**, 169-175 (1994).
10. R. K. Rowntree a A. Harris: The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Annals of Human Genetics*, **67**, 471-485 (2003).
11. D. N. Sheppard a M. J. Welsh: Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiological Reviews*. **79**, 23-45 (1999).
12. E. M. Schwiebert, D. J. Benos, M. E. Egan, M. J. Stutts, a W. B. Guggino: CFTR Is a Conductance Regulator as well as a Chloride Channel. *Physiological Reviews*. **79**, 145-166 (1999).
13. <http://www.cftr.info/>; březen 2017.
14. T. F. Scanlin a M. C. Glick: Terminal glycosylation in cystic fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. **1455**, 241-253 (1999).
15. J. J. Smith, S. M. Travis, E. P. Greenberg, a M. J. Welsh: Cystic Fibrosis Airway Epithelia Fail to Kill Bacteria Because of Abnormal Airway Surface Fluid. *Cell*. **85**, 229-236 (1996).
16. H. Matsui, B. R. Grubb, R. Tarran, S. H. Randell, J. T. Gatzky, C. W. Davis a R. Boucher: Evidence for Periciliary Liquid Layer Depletion, Not Abnormal Ion Composition, in the Pathogenesis of Cystic Fibrosis Airways Disease. *Cell*. **95**, 1005-1015 (1998)
17. <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/pathogens-and-disease/microbial-infection-in-cystic-fibrosis/>; duben 2017
18. C. Colombo, P. Battezzati, A. Crosignani, A. Morabito, D. Costantini, R. Padoan a A. Giunta; Liver disease in cystic fibrosis: A prospective study on incidence, risk factors, and outcome. *Hepatology*. **36**, 1374-1382 (2002).
19. V. Vávrová: Cystická fibróza: příručka pro nemocné a jejich rodiče. *Klub nemocných cystickou fibrózou*. 3. doplněné vydání (2016).
20. E. F. Tizzano, M. M. Silver, D. Chitayat, J. C. Benichou, a M. Buchwald: Differential cellular expression of cystic fibrosis transmembrane regulator in human reproductive

- tissues. Clues for the infertility in patients with cystic fibrosis. *The American Journal of Pathology*. **144**, 906–914 (1994).
21. S. J. Tanser, M. E. Hodson a D. M. Geddes: Case reports of death during pregnancy in patients with cystic fibrosis - three out of four patients were colonized with *Burkholderia cepacia*. *Respiratory Medicine*. **94**, 1004–1006 (2000).
  22. P. M. Farrell, B. J. Rosentein, T. B. White, F. J. Accurso, C. Castellani, G. R. Cutting, P. R. Durie, V. A. LeGrys, J. Massie, R. B. Parad a P. Campbell: Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *The Journal of Pediatrics*. **153**, 4–14 (2008).
  23. <http://www.cystickafibroza.cz/>; duben 2017
  24. D. Schüler, I. Sermet-Gaudelus, M. Wilschanski, M. Ballmann, M. Dechaux, A. Edelman, M. Hug, T. Leal, J. Lebacqz, P. Lebecque, G. Lenoir, F. Stanke, P. Wallemacq, B. Tümmler a M. R. Knowles: Basic protocol for transepithelial nasal potential difference measurements. *Journal of Cystic Fibrosis*. **3**, 151–155 (2004).
  25. K. Paul, E. Rietschel, M. Ballmann, M. Griese, D. Worlitzsch, J. Shute, Ch. Chen, T. Schink, G. Döring, S. van Koningsbruggen, U. Wahn a F. Ratjen: Effect of Treatment with Dornase Alpha on Airway Inflammation in Patients with Cystic Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **169**, 719–725 (2004).
  26. M. R. Knowles, N. R. Church, W. E. Waltner, J. R. Yankaskas, P. Gilligan, M. King, L. J. Edwards, R. W. Helms a R. C. Boucher: A pilot study of aerosolized amiloride for the treatment of lung disease in cystic fibrosis. *The New England Journal of Medicine*. **322**, 1189–1194 (1990).
  27. S. Conway: Segregation is good for patients with cystic fibrosis. *Journal of the Royal Society of Medicine*. **101**, 31–35 (2008).
  28. A. Michael, S. Meenatchisundaram, G. Parameswari, T. Subbraj, R. Selvakumaran a S. Ramalingam: Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) as an Alternative to Mammalian Antibodies. *Indian Journal of Science and Technology*. **3**, 468–474 (2010).
  29. P. Hodek a M. Stiborová: Chicken Antibodies – Superior Alternative for Conventional Immunoglobulins. prezentováno na *Indian National Science Academy B69*. **4**, 461–468 (2003).
  30. B. S. Thalley a S. B. Carroll: Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized hens. *Biotechnology (N.Y.)*. **8**, 934–938 (1990).
  31. S. Hamada, S. Horikoshi, T. Minami, S. Kawabata, J. Hiraoka, T. Fujiwara a T. Ooshima; Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*. **59**, 4161–4167 (1991).
  32. H. Kollberg, D. Carlander, H. Olesen, P. E. Wejåker, M. Johannesson a A. Larsson; Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: A phase I feasibility study. *Pediatric Pulmonology*. **35**, 433–440 (2003).
  33. P. R. Murray, K. S. Rosenthal a M. A. Pfaller; Medical Microbiology, *Elsevier Health Sciences*, 2015.
  34. J. R. Govan a V. Deretic: Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological Reviews*. **60**, 539 (1996).
  35. A. Imberty, M. Wimmerová, E. P. Mitchell a N. Gilboa-Garber: Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes and Infection*. **6**, 221–228 (2004).
  36. [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas\\_aeruginosa](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_aeruginosa); duben 2017

37. W. Burkholder: Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology*. **40**, 115–117 (1950).
38. A. Isles, I. MacLusky, M. Corey, R. Gold, C. Prober, P. Fleming a H. Levison: Pseudomonas cepacia infection in cystic fibrosis: an emerging problem. The *Journal of Pediatrics*. **104**, 206–210 (1984).
39. E. Yabuuchi, Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki a M. Erakawa: Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus Pseudomonas homology group II to the new genus, with the type species Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and Immunology*. **36**, 1251–1275 (1992).
40. P. Vandamme, B. Holmes, M. Valcanneeyt, T. Coenye, B. Hoste, R. Coopman, H. Revets, S. Lauwers, M. Gillis, K. Kersters a J. R. W. Govan: Occurrence of Multiple Genomovars of Burkholderia cepacia in Cystic Fibrosis Patients and Proposal of Burkholderia multivorans sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **47**, 1188–1200 (1997).
41. E. Mahenthiralingam, T. A. Urban, a J. B. Goldberg: The multifarious, multireplicon Burkholderia cepacia complex. *Nature Review Microbiology*. **3**, 144–156 (2005).
42. A. Holmes, J. Govan, a R. Goldstein: Agricultural use of Burkholderia (Pseudomonas) cepacia: a threat to human health?. *Emerging Infectious Diseases*. **4**, 221–227 (1998).
43. <http://burkholderia.com/>; duben 2017
44. <http://microbe-canvas.com/>; duben 2017
45. T. Coenye, P. Vandamme, J. R. W. Govan, a J. J. LiPuma: Taxonomy and Identification of the Burkholderia cepacia Complex. *Journal Clinical Microbiology*. **39**, 3427–3436 (2001).
46. D. P. Speert, D. Henry, P. Vandamme, M. Corey, a E. Mahenthiralingam: Epidemiology of Burkholderia cepacia Complex in Patients with Cystic Fibrosis, Canada. *MyScienceWork*. **8**, (2002).
47. E. Mahenthiralingam, A. Baldwin, a C. G. Dowson: Burkholderia cepacia complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *Journal of Applied Microbiology*. **104**, 1539–1551 (2008).
48. T. A. Urban, J. B. Goldberg, J. F. Forstner a U. S. Sajjan: Cable Pili and the 22-Kilodalton Adhesin Are Required for Burkholderia cenocepacia Binding to and Transmigration across the Squamous Epithelium. *Infection and Immunity*. **73**, 5426–5437 (2005).
49. B. A. Hales, J. A. W. Morgan, C. A. Hart a C. Winstanley: Variation in Flagellin Genes and Proteins of Burkholderia cepacia. *Journal of Bacteriology*. **180**, 1110–1118 (1998).
50. M. B. Visser, S. Majumdar, E. Hani a P. A. Sokol: Importance of the ornibactin and pyochelin siderophore transport systems in Burkholderia cenocepacia lung infections. *Infection and Immunity*. **72**, 2850–2857 (2004).
51. D. McKenney, K. E. Brown a D. G. Allison: Influence of Pseudomonas aeruginosa exoproducts on virulence factor production in Burkholderia cepacia: evidence of interspecies communication. *Journal of Bacteriology*. **177**, 6989–6992 (1995).
52. R. A. Moore a R. E. Hancock: Involvement of outer membrane of Pseudomonas cepacia in aminoglycoside and polymyxin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **30**, 923–926 (1986).
53. R. E. W. Hancock: Resistance Mechanisms in Pseudomonas aeruginosa and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*. **27**, 93–99 (1998).

54. P. Gugliera, M. Pasca, E. de Rossi, S. Buroni, P. Arrigo, G. Manina a G. Riccardi: Efflux pump genes of the resistance-nodulation-division family in *Burkholderia cenocepacia* genome. *BMC Microbiology*. **6**, (2006).
55. W. Beckman a T. G. Lessie: Response of *Pseudomonas cepacia* to beta-Lactam antibiotics: utilization of penicillin G as the carbon source. *Journal of Bacteriology*. **140**, 1126–1128 (1979).
56. T. Coenye a P. Vandamme: *Burkholderia*: Molecular Microbiology and Genomics. *Horizon Scientific Press*. (2007).
57. S. Nzula, P. Vandamme a J. R. W. Govan: Influence of taxonomic status on the in vitro antimicrobial susceptibility of the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **50**, 265–269 (2002).
58. P. Dřevínek, Š. Vosáňlová, O. Cinek, V. Vávrová, J. Bartošová, P. Pohůnek, E. Mahenthiraling: Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic. *Journal of Medical Microbiology*. **54**, 655–659 (2005).
59. R. M. Aris, J. C. Routh, J. J. LiPuma, D. G. Heath a P. H. Gilligan: Lung Transplantation for Cystic Fibrosis Patients with *Burkholderia cepacia* Complex. *American Journal Respiratory and Critical Care of Medicine*. **164**, 2102–2106 (2001).
60. B. D. Alexander, E. W. Petzold, L. B. Reller, S. M. Palmer, R. D. Davis, C. W. Woods, J. J. LiPuma: Survival After Lung Transplantation of Cystic Fibrosis Patients Infected with *Burkholderia cepacia* Complex. *American Journal of Transplantation*. **8**, 1025–1030 (2008).
61. E. Lameignere, T. Ch. Shiao, R. Roy, M. Wimmer, F. Dubreuil, A. Varrot a A. Imberty: Structural basis of the affinity for oligomannosides and analogs displayed by BC2L-A, a *Burkholderia cenocepacia* soluble lectin. *Glycobiology*. **20**, 87–98 (2010).
62. R. Marchetti, L. Malinová, E. Lameignère, L. Adamová, C. de Castro, G. Cioci, Ch. Stanetty, P. Kosma, A. Molinaro, M. Wimmerová, A. Imberty a A. Silipo: *Burkholderia cenocepacia* lectin A binding to heptoses from the bacterial lipopolysaccharide. *Glycobiology*. **22**, 1387–1398 (2012).
63. <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4aoc/protein/1>; duben 2017
64. [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4013.aspx?geo\\_country=cz](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-4013.aspx?geo_country=cz); duben 2017
65. [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-4011.aspx?geo\\_country=cz](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-4011.aspx?geo_country=cz); duben 2017
66. M. Růžička: Slepíčí protilátky jako prostředek pasivní imunizace proti mikrobiálním onemocněním dýchacího traktu. *Diplomová práce*. PřF UK 2010
67. L. Nosková: Vývoj modelového systému pro studium bakteriální adheze na plicní epitel pacientů s CF. *Bakalářská práce*. PřF UK 2011
68. L. Nosková: Studium adheze *Pseudomonas aeruginosa* na buňky plicního epitelu. *Diplomová práce*. PřF UK 2013
69. A. D. Vinion-Dubiel a J. B. Goldberg: Lipopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Endotoxin Research*. **9**, 201–213 (2003).
70. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/pkh26gl>; květen 2017
71. R. C. Peralta, H. Yokoyama, Y. Ikemori, M. Kuroki a Y. Kodama: Passive immunisation against experimental salmonellosis in mice by orally administered hen egg-yolk antibodies specific for 14-kDa fimbriae of *Salmonella Enteritidis*. *Journal of Medical Microbiology*. **41**, 29–35 (1994).

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

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