

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Medicinální chemie



ARINA BOLSHOVA

**Protilátky proti bakteriálním lektinům jako prostředek prevence
plicních infekcí pacientů s cystickou fibrosou**

**Antibody against bacterial lectins as a tool preventing
lung infections of cystic fibrosis patients**

Bakalářská práce

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

Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborní vedení této bakalářské práce, za cenné rady, připomínky během vypracování experimentální části a závěrečném sepsování práce. Dále bych chtěla poděkovat Bc. Kateřině Dostálové a Bc. Michaele Vaškové za pomoc a ochotu při experimentální činnosti.

Chtěla bych poděkovat své rodině za poskytnutou podporu po celou dobu studia.

ABSTRAKT

Cystická fibrosa (CF) je genetické onemocnění s autosomálně recesivním typem dědičnosti. Příčinou onemocnění je mutace proteinu CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“), který plní funkci kanálu pro chloridové a hydrogenuhličitanové ionty. Tento defekt vede k tvorbě vazkého hlenu v plicích, což způsobuje vznik respiračních obtíží, například, chronických infekcí. Jako profylaktický prostředek pro pacienty je možné využít pasivní imunizaci podáním slepičích protilátek produkovaných proti určitému patogenu. Imunoglobuliny třídy Y přítomné ve vaječných žloutkách dokáží snižovat adhezi bakterií na sliznici dýchacích cest a bránit tak rozvoji infekce. Tato strategie je dobrou alternativou klasické antibiotické léčbě, protože je cílena na konkrétní patogen a neovlivňuje běžnou bakteriální mikroflóru. Byla provedena izolace a následně afinitní purifikace specifických protilátek produkovaných po imunizaci pokusné slepice lektinem bakterie *Burkholderia cenocepacia* (BC2L-A). Při porovnání obsahu specifických protilátek rozpoznávajících lektin s původní frakcí vzorek byl přibližně 9x zakonzentrován a získané množství afinitně purifikovaných imunoglobulinů odpovídá cca 0,2 % z celkového množství protilátek. Následně byla zkoumána reaktivita imunoglobulinů vůči rekombinantnímu lektinu a jejich schopnost rozeznávat lektin produkovaný přímo bakteriálními buňkami. Byla proto ověřena produkce lektinu mikroorganismy kultivovanými v kapalném médiu a na pevné půdě (agarová plotna). Z výsledků vyplývá, že patogen neprodukuje lektin během kultivace v kapalném médiu, ale je schopen jej exprimovat při kultivaci na agarových plotnách. Afinitně purifikovanou frakci protilátek lze dále použít k provedení adhezního testu pro studování vlivu slepičích imunoglobulinů na schopnost adherence bakterie na plicní epitelální buňky.

KLÍČOVÁ SLOVA

vaječné imunoglobuliny, virulenční faktory, ELISA

ABSTRACT

Cystic fibrosis is an autosomal recessive disease that is caused by mutation of the CFTR protein („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“). The CFTR protein is an ion channel for chloride and bicarbonate ions transmission. This defect leads to the formation of dense mucus in lungs that causing breathing problems and chronic bacterial infections. Passive immunization by administering chicken antibodies produced against pathogen can be used as a prophylaxis for patients with cystic fibrosis. Immunoglobulins Y reduce adhesion of bacteria to lung epithelial cells and prevent infection. This strategy is a good alternative to classical antibiotic therapy because it targets the pathogen and doesn't affect normal bacterial microflora. At first the chicken antibodies produced after immunization of the experimental hen by *Burkholderia cenocepacia* lectin (BC2L-A) were isolated and further purified on an affinity column with covalently bound lectin. The affinity purified fraction was 9 times concentrated compared to original fraction as far as the content of the specific anti-lectin antibody is concerned. The amount of affinity purified antibodies is approx. 0.2% of the total isolated immunoglobulins. Their immunoreactivity has been verified using recombinant lectin and the lectin produced by bacterial cells. The lectin production by microorganisms cultivated in liquid medium and on solid soil (agar plate) was examined. The results show that the pathogen doesn't produce lectin during cultivation in liquid medium, but when cultivate on agar plates. Fraction of affinity purified antibody can be used to perform an adhesion assay to study the effect of immunoglobulins on the ability of bacterial cells to adhere to lung epithelial cells.

KEY WORDS

yolk immunoglobulins, virulence factors, ELISA

OBSAH

1	TEORETICKÝ ÚVOD	3
1.1	<i>Burkholderia cepacia</i> komplex.....	3
1.1.1	Virulenční faktory.....	4
1.1.2	Antibiotická rezistence	5
1.1.3	Bakteriální lektiny	6
1.2	Cystická fibrosa	7
1.2.1	Protein CFTR.....	7
1.2.2	Projevy onemocnění	9
1.2.3	Terapie	10
1.3	Imunitní systém nemocných	10
1.3.1	Nespecifické mechanismy imunity.....	11
1.3.2	Adaptivní imunitní mechanismy	11
1.3.2.1	Protilátky.....	11
1.4	Slepičí protilátky.....	13
1.4.1	Výhody použití IgY	14
2	CÍL PRÁCE.....	15
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	16
3.1	Použité chemikálie a přístroje.....	16
3.1.1	Použité chemikálie.....	16
3.1.2	Použité přístroje.....	17
3.1.3	Ostatní pomůcky.....	18
3.2	Použité metody	18
3.2.1	Izolace protilátek	18
3.2.2	Fotometrické stanovení koncentrace	19

3.2.3	Afinitní purifikace	19
3.2.4	ELISA.....	20
3.2.5	Kultivace bakterií <i>Burkholderia cenocepacia</i>	22
3.2.6	Příprava lyzátů.....	23
3.2.7	Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA	23
3.2.8	SDS-PAGE.....	24
3.2.9	Western blot.....	26
4	VÝSLEDKY	28
4.1	Imunoreaktivita izolovaných protilátek proti rekombinantnímu BC2L-A.....	28
4.2	Čistota izolovaných imunoglobulinů	30
4.3	Měření růstu bakterií.....	31
4.4	Imunodetekce lektinu produkovaného epidemickými kmeny	32
4.5	Imunoreaktivita afinitně purifikovaných imunoglobulinů proti rekombinantnímu BC2L-A	33
4.6	Ověření produkce lektinu epidemickými kmeny bakterie	34
5	DISKUZE.....	37
6	SOUHRN	41

SEZNAM ZKRÁTEK A SYMBOLŮ

A ₂₈₀	absorbance měřená při vlnové délce 280 nm
AHL	N-acylhomoserinový lakton
ASL	„airway surface liquid“, povrchová plicní kapalina
ATP	adenosintrifosfát
BC	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCA	„bicinchoninic acid assay“, stanovení koncentrace proteinů pomocí kyseliny bicinchoninové
Bcc	<i>Burkholderia cepacia</i> komplex
CF	cystická fibrosa
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“, transmembránový regulátor transportu iontů
ELISA	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay“, imunochemické stanovení využívající vázaného enzymu
ENaC	„epithelial sodium channel“, epiteliální kanál transportující sodné ionty
Ig	imunoglobulin
LPS	lipopolysacharid
NBD	„nucleotide binding domain“, doména vážící nukleotid
OD ₆₀₀	optická denzita měřena při vlnové délce 600 nm
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	„phosphate buffered saline“, fyziologický roztok pufovaný fosfátem
PCL	„periciliary liquid layer“, pericilulární kapalina
QS	„quorum sensing“ systém
R	„regulatory domain“, regulační doména

SDS-PAGE “sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”,
elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v prostředí
dodecylsíranu sodného

TM „transmembrane domain“, transmembránová doména

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 *Burkholderia cepacia* komplex

Příslušníci rodu *Burkholderia* patří ke gramnegativním aerobním bakteriím. Běžně se vyskytují v přírodě, odpadních vodách a půdě [1]. Byly nalezeny i ve zředěných desinfekčních roztocích, kosmetických přípravcích [2] a nepasterizovaném kravském mléce [3]. Mezi zástupce daného rodu patří bakterie komplexu *Burkholderia cepacia* (Bcc), které byly poprvé objeveny jako původce hniloby cibule americkým botanikem W. Burkholderem v roce 1950, a odsud vlastně pochází druhový název mikroorganismů – latinsky „*Allium cepa*“ se překládá jako kuchyňská cibule [4].

Burkholderia cepacia (BC) může kolonizovat organismus člověka, zejména povrchy dýchacích a močových cest. Ohrožuje pacienty s poškozenou imunitou, zvláště nebezpečí představuje pro lidi trpící cystickou fibrosou (CF) [5] a chronickou granulomatosou [6]. Vzácně dochází k rozvíjení nákazy u zdravých jedinců [7]. Infekce může probíhat s různými klinickými projevy, například jako akutní, při které dochází k poklesu plicních funkcí, což vyvolává život ohrožující stav – označuje se jako cepacia syndrom, nebo jako chronická infekce, která vede k pomalému zhoršení funkcí plic [8].

Studium izolátů bakterií odhalilo, že BC ve skutečnosti představuje skupinu úzce příbuzných mikroorganismů, ze kterých každý reprezentuje samostatný bakteriální druh. Dané druhy byli pojmenováni jako genomovary, skupina genomovarů byla pak označena *Burkholderia cepacia* komplex. Genomovary je možné rozlišit pomocí molekulárně genetických metod, například, DNA-DNA hybridizací, nikoliv běžnými mikrobiologickými technikami. Jako původce infekce u pacientů byly nejčastěji nalezeny genomovar II a genomovar III, někdy též označovaný *Burkholderia cenocepacia*. Na průběh nákazy v organismu mají vliv vlastnosti konkrétního kmene, předchozí nebo současná chronická infekce *Pseudomonas aeruginosa* (PA) a klinický stav pacienta [9 – 11].

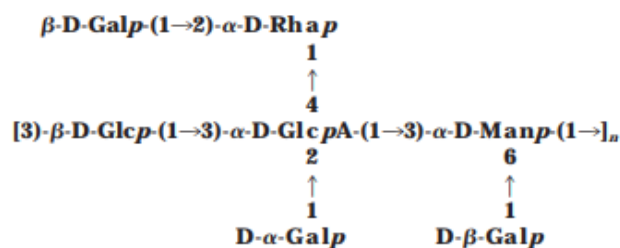
Bakterie je rezistentní na široké spektrum antibiotik a může se šířit mezi pacienty, což zvětšuje vážnost infekce. Přenos je uskutečněn jak cestou přímou – kapénková nákaza, tak i nepřímou – kontaminace, například, kontejnerů na pití, inhalátorů [12, 13].

1.1.1 Virulenční faktory

Mezi faktory virulence bakterií komplexu *Burkholderia cepacia* patří, například, peptidasy, hemolysiny, siderofory. Zinkové metallopeptidasy vykazují proteolytickou aktivitu proti proteinům extracelulárního prostoru (kolagen typu IV, fibronektin) a členům imunitního systému (složky komplementu, cytokiny). Hemolysiny mají schopnost indukovat apoptosu a degranulaci fagocytů. Siderofory a serinové peptidasy se podílejí na metabolismu iontů železa. Tvorba sideroforů bakteriální buňkou umožňuje její soutěž o ionty železa s proteiny hostitele (transferin, laktoferin). Serinovými peptidasami bakterie štěpí ferritin přítomný v organismu hostitele a využívá zásoby iontů železa pro vlastní metabolismus. Vzhledem k tomu, že je koncentrace ferritinu v plicích poškozených CF vyšší než v případě zdravého jedince, je tímto způsobem dále usnadněn rozvoj infekce [14 – 16].

Bakterie Bcc prostřednictvím tzv. „quorum sensing“ systému (QS) může regulovat expresi některých virulenčních faktorů v závislosti na množství přítomných mikroorganismů. Pomocí signálních molekul, jako například N-acylhomoserinových laktonů (AHL), bakterie vnímá počtu jedinců svého druhu v okolním prostředí a při dosažení určitého množství dojde k aktivaci dosud nevyužitých genů. Se vzrůstající dobou trvání infekce se patogen stává agresivnější a odolnější vůči léčbě. QS systém je tvořen proteiny homologickými LuxR a LuxI, které byli nalezeny u *Vibrio fischeri* [17].

Pomocí QS systému bakterie rovněž kontroluje přechod do stadia, kdy tvoří biofilm, který vzniká splýváním cepacianových obalů sousedních buněk. Exopolysacharid cepacian je složen z rozvětvených acetylovaných jednotek glukosy, rhamnosy, mannosy, galaktosy a kyseliny glukuronové [18]. Struktura cepacianu je znázorněna na obrázku 1 (strana 5).



Obrázek 1: Struktura cepacianu. Exopolysacharid produkovaný bakteriemi *Burkholderia cepacia* komplexu se skládá z rozvětvených acetylovaných jednotek glukosy, rhamnosy, mannosy, galaktosy a kyseliny glukuronové. Převzato z [18].

Mikrobiální společenství v této formě účinněji interaguje s epiteliálními buňkami dýchacích cest, zvyšuje možnost přežití nepříznivých podmínek a ochrání mikroorganismy před imunitním systémem hostitele. V plicích pacientů s CF byla prokázána existence smíšených biofilmů bakterií Bcc a PA [19, 20].

1.1.2 Antibiotická rezistence

Zkoumané bakterie jsou přirozeně rezistentní k polymyxinovým antibiotikům v důsledku nepropustnosti vnější membrány. Přítomnost 4-amino-4-deoxyarabinosových zbytků ve struktuře lipopolysacharidu (LPS) způsobuje snížení negativního náboje povrchu buněk, čímž inhibuje navázání a možný zásah kationtových antibiotik, například, gentamicinu a tobramycinu, patřících mezi aminoglykosidy. *B. cenocepacia* může projevovat odolnost vůči β -laktamům, hlavně produkcí β -laktamas, které štěpí β -laktamový kruh, čímž dochází k deaktivaci molekuly jako antibakteriální látky. Systém efluxní pumpy uděluje rezistenci k tetracyklinu, chloramfenikolu, ciprofloxacinu [21 – 23]. Efektivita antibiotické léčby *in vivo* je též snížena v důsledku intracelulárního přežívání mikroorganismů v makrofázích, epiteliálních buňkách a tvorbou biofilmu [24].

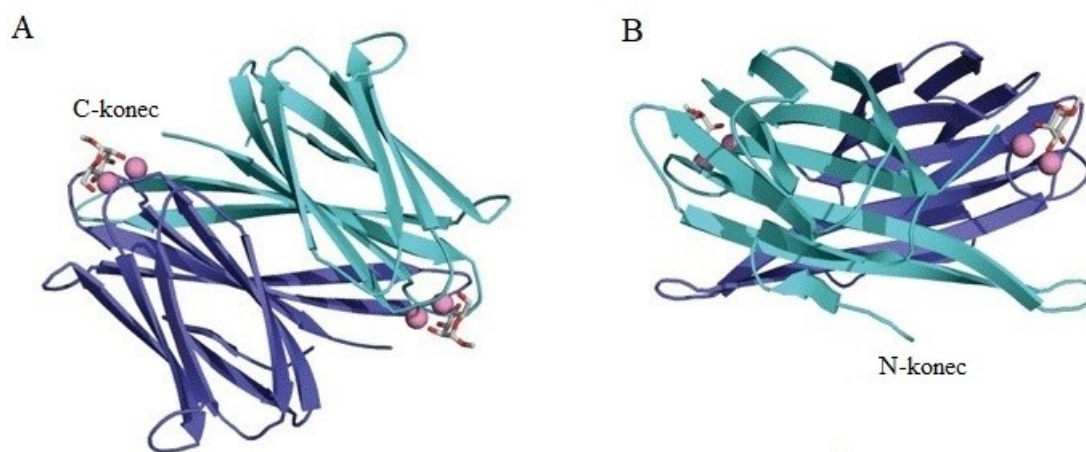
V současné době se jako poslední možnost při léčbě využívá antibiotikum ceftazidim ve spojení s avibactamem. Aplikace cefalosporinu spolu s avibactamem, inhibujícím bakteriální β -laktamasu, umožňuje zachovat aktivitu léku. Provádějí se též klinická testování účinnosti kombinací nestandardních dostupných antibiotik [25].

1.1.3 Bakteriální lektiny

Mezi faktory virulence *Burkholderia cenocepacia* se řadí čtyři lektiny – BC2L-A, BC2L-B, BC2L-C, BC2L-D [26]. Lektiny se nachází na povrchu bakteriální buňky a hrají důležitou roli v systému buněčného rozpoznání, podílejí se na ukotvení patogenu na buňkách organismu hostitele, tvorbě kolonií. Studium bakteriálních lektinů je významné z pohledu vývoje nových léků. Účinek je založen na interakci mezi specifickým sacharidem ve struktuře antibiotika a lektinem bakterie, čímž by bylo možné blokovat vazebné místo lektinu a bránit tak navázání mikroorganismu [27].

Všechny lektiny Bcc obsahují alespoň jednu doménu se silnou sekvenční podobností s lektinem B bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, který selektivně váže L-fukosu. Ve dvou lektinech je přítomna N-terminální doména bez jakýchkoli podobností se známými proteiny [28].

Nejmenší z lektinů, dimerní BC2L-A, projevuje specifitu k D-mannose. Krystalové struktury získané v přítomnosti α -methylmannosidu (obrázek 2) ukazují, že silná afinita lektinu k danému sacharidu souvisí s interakcí mezi třemi hydroxylovými skupinami mannosy a dvěma vápenatými ionty na vazebném místě lektinu [29].



Obrázek 2: Krystalová struktura komplexu BC2L-A s α -methyl-D-mannosidem. Ortografické zobrazení BC2L-A v komplexu s α -methyl-D-mannosidem (tyčky) a Ca^{2+} (kuličky), C-terminální doména (A) a N-terminální doména (B). Převzato a upraveno z [29].

1.2 Cystická fibrosa

Cystická fibrosa je nejčastější život ohrožující geneticky zděděné onemocnění evropské populace. Jedná se o multisystémovou chorobu, která postihuje respirační systém, slinivku břišní, hepatobiliární trakt, střevo, potní žlázy a reprodukční ústrojí u mužů. V České republice je test na CF součástí novorozeneckého screeningu [30].

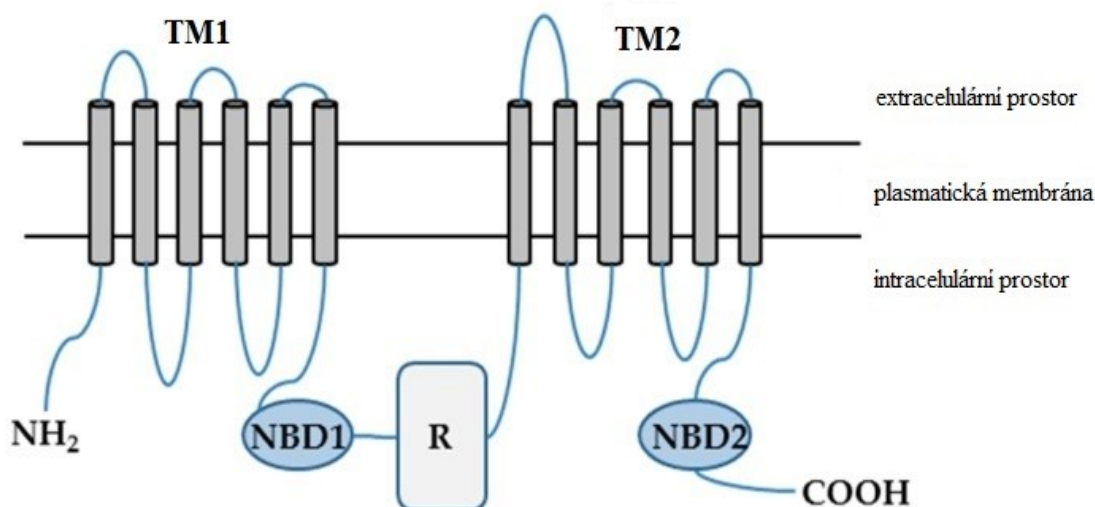
Příčinou onemocnění je mutace proteinu CFTR (z angl. „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“), který plní funkci kanálu pro chloridové a hydrogenuhličitanové ionty. Bílkovina se nachází na aplikální membráně buněk submukozních žláz dýchacích cest, na povrchu sekretorických buněk potních žláz, v malých vývodech pankreasu a hepatobiliárního traktu. V plicích defektní CFTR vede k tvorbě vazkého hlenu, který způsobuje vznik respiračních obtíží, například, obstrukce nebo chronické infekce. Nejčastějšími bakteriálními infekcemi jsou nákazy *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a bakteriemi komplexu *Burkholderia cepacia*. Přítomnost patogenů v poškozeném orgánu stimuluje další tvorbu hlenu, čímž zhoršuje neprůchodnost cest a vede k progresivní ztrátě plicních funkcí, což je primární příčinou úmrtí pacientů s CF [30, 31].

1.2.1 Protein CFTR

Gen kódující CFTR se nachází na dlouhém raménku 7. chromozomu. Mutace genu mají různé následky na funkci proteinu a vedou k různým fenotypům onemocnění. Nejčastější mutací je delece kodonu pro fenylalanin na 508. pozici (F508del neboli Δ F508) [32].

CFTR je protein patřící ke skupině transportních proteinů vázajících adenosintrifosfát (ATP), jinak řečeno ABC transportér (z angl. „ATP binding cassette“). Jsou to transmembránové bílkoviny aktivně přenášející látky dovnitř nebo ven přes membránu buňky za spotřeby ATP. CFTR se skládá ze dvou transmembránových domén, TM1 a TM2 (z angl. „transmembrane domain“), které vytvářejí vlastní kanál a podílejí se na ukotvení transportéru v membráně. Dalšími součástmi jsou v cytoplazmě lokalizované domény vázající aktivované nukleotidy,

NBD1 a NBD2 (z angl. „nucleotide binding domain“), a regulační doména, R (z angl. „regulatory domain“) [33]. Struktura CFTR proteinu je znázorněna na obrázku 3.



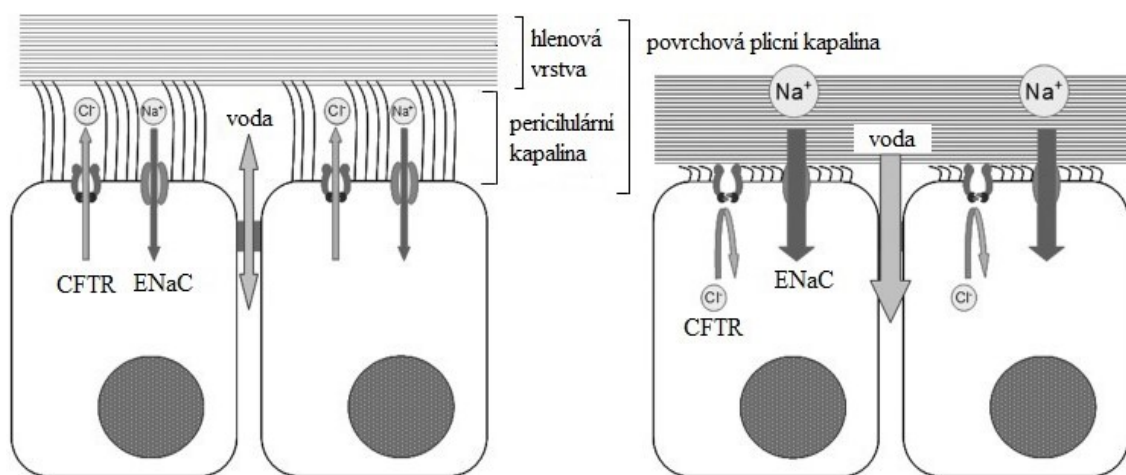
Obrázek 3: Struktura CFTR proteinu. Transportér se skládá ze dvou transmembránových domén (TM1 a TM2), každá z domén je spojena s další doménou, která je schopna vázat aktivované nukleotidy (NBD1 a NBD2), a regulační doménou (R). Převzato a upraveno z [34].

NBD1 a NBD2 regulují otevírání a zavírání kanálu posunem regulační domény. Transportér se aktivuje cyklickým adenosinmonofosfátem prostřednictvím fosforylace R domény proteinkinasou a hydrolýzou ATP na povrchu domén vázajících aktivované nukleotidy [33].

Kombinace dysfunkce chloridového kanálu a hyperaktivity kanálu transportujícího sodné ionty je hlavním patogenetickým principem cystické fibrosy. Funkční CFTR blokuje otevírání ENaC (z angl. „epithelial sodium channel“), ale mutovaná bílkovina toho není schopna. Následkem je větší vstup sodných iontů do buněk což vede k dehydrataci v sekretech žláz a poruše faktorů vrozené imunity [30].

Lumen dýchacích cest je vystlán řasinkovým epitelem. Jeho správná funkce je nezbytná pro prevenci infekcí respiračního systému. Ochranná schopnost přímo souvisí s množstvím produkované povrchové plicní kapaliny, ASL (z angl. „airway surface liquid“). ASL se skládá ze dvou vrstev: z pericilulární kapaliny, PCL (z angl. „periciliary liquid layer“), a vrstvy hlenu. Výška PCL odpovídá výšce pohybujících se v ní řasinek. Současnou ztrátou chloridů

a přebytkem sodných iontů dojde právě k menší produkci PCL, čímž je bráněna účinná řasinková aktivita (obrázek 4). Bakterie vstupující do dýchacích cest již nejsou odstraněny, ale pronikají hluboko mezi řasinky, přiléhají na epiteliální buňky a vytvářejí zánět. Výška a objem produkované PCL též souvisí s účinností dalšího ochranného mechanismu – vykašlávání. Ve zdravých plicích pericilulární kapalina usnadňuje pohyb hlenové vrstvy směrem k horním cestám dýchacím, čímž dochází k odstranění cizorodého mikroorganismu. Zahuštěná PCL pacientů s cystickou fibrosou toho není schopna [35].



Obrázek 4: Rozdíl povrchu epitelu dýchacích cest zdravých jedinců a pacientů s cystickou fibrosou. Povrchová plicní kapalina (ASL) je složena ze dvou vrstev: z pericilulární kapaliny (PCL) a hlenové vrstvy. Rozdílné složení ASL u zdravých jedinců (znázorněno na levé části obrázku) a u pacientů s CF (znázorněno na pravé části obrázku) je způsobeno kombinací dysfunkce chloridového kanálu (CFTR) a hyperfunkce kanálu transportujícího sodné ionty (ENaC) u trpících cystickou fibrosou. Tento defekt vede k dehydrataci PCL, kde je aktivní řasinkový epitel, což vede ke zhoršení očišťovací schopnosti plic. Převzato a upraveno z [36].

1.2.2 Projevy onemocnění

Cystická fibrosa postihuje hlavně dýchací ústrojí člověka, trávicí systém, hepatobiliární trakt. Mezi komplikace respirační soustavy se řadí bronchiectázie, chronické infekce, pneumonie, hemoptýza a pneumotorax. Pro trávicí soustavu jsou charakteristické progresivní jaterní dysfunkce, střevní obstrukce, steatorea.

Onemocnění vede k nedostatečnému vstřebávání živin a vitaminů, nízké produkci pankreatických enzymů. Častou doprovodní chorobou je diabetes mellitus [37].

K typickým projevům choroby v prvních měsících života patří mekoniový ileus a špatné nabírání hmotnosti. Matky se často všimnou slané chuti potu a tvorby solných krystalů na kůži potícího se dítěte, což je projevem poškození hospodaření organismu se sodnými ionty. S věkem dochází k porušení růstu a vývoje. Častým vizuálním projevem CF jsou paličkovité prsty [38].

1.2.3 Terapie

Terapie onemocnění musí být intenzivní a komplexní. Pacienti by měli dodržovat dietu s vysokým obsahem kalorií, dostávat potřebné vitamíny a minerály. Léčení respiračních projevů spočívá hlavně v prevenci infekcí očkováním, boji s kolonizujícím patogenem, péči o průchodnost dýchacích cest. Podání léků se obvykle provádí inhalačně nebo perorálně. Krajním řešením u pacientů se selháním plic je jejich transplantace [39, 40].

Pankreatická nedostatečnost je normalizována substituční léčbou, dodáním pankreatických enzymů. Otokům, vznikajícím při nedostatečném vstřebávání proteinů ze stravy, je možno předcházet dodáním bílkovin infuzí přímo do žíly. Porucha funkce jater se léčí podáváním kyseliny ursodeoxycholové, která snižuje viskozitu žluči a tím brání zhoršování funkce jater [31].

1.3 Imunitní systém nemocných

Jedním z klinických projevů CF jsou opakované, chronické bakteriální infekce, které v první řadě postihují dýchací soustavu. Onemocnění primárně nezpůsobuje poškození imunity. Organismus adekvátně reaguje na přítomnost patogenů, ale kvůli celkové patogenezí choroby je znemožněno odstranění bakterií [30].

Imunitní mechanismy je možné rozdělit do dvou kategorií – nespecifické (vrozené) a adaptivní (získané). Adaptivní imunitní systém je charakterizován specificitou a pamětí [41].

1.3.1 Nespecifické mechanismy imunity

Nespecifická neboli vrozená imunita je založena na molekulách a buňkách, které jsou v organismu předem připraveny a jsou účinné proti mnoha různým patogenům. Její odpověď určuje, na které antigeny bude reagovat adaptivní imunitní systém. Účinkující složky je možné rozdělit na buněčné a humorální. Buněčné nespecifické systémy jsou reprezentovány fagocyty a NK buňkami (z angl. „natural killers“). Humorální část je představena komplementovým systémem, interferony, lektiny a jinými sérovými proteiny [41, 42].

Pacienti s cystickou fibrosou nejsou schopny efektivně bojovat s kolonizujícím mikroorganismem. V důsledku abnormální sekrece ASL dochází k poruše očišťovacího mechanismu plic. Chronická infekce dýchacího ústrojí se projevuje trvalým přibýváním neutrofilů a makrofágů v místě zánětu, sekrecí antimikrobiálních látek a destrukcí sliznice [30, 43].

1.3.2 Adaptivní imunitní mechanismy

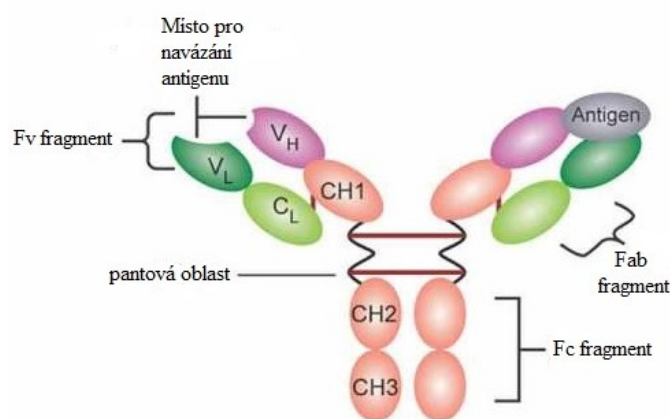
Patří sem protilátky, zodpovědné za humorální mechanismy, a antigenně specifické receptory T-lymfocytů, patřící mezi buněčně zprostředkované mechanismy. K rozvoji specifické imunitní odpovědi dochází v průběhu několika dní až týdnů [41].

1.3.2.1 Protilátky

Protilátky představují rozpustné antigenně specifické receptory, které slouží k označení cizorodých struktur či neutralizaci jejich funkcí. Jedná se o proteiny, imunoglobuliny (Ig), které jsou během imunitní odpovědi produkovány diferenciovanými plasmatickými buňkami vzniklými z aktivovaných B-lymfocytů. V krvi savců bylo nalezeno pět tříd imunoglobulinů – IgA, IgD, IgE, IgG a IgM [44].

Molekula Ig je složena ze dvou těžkých řetězců kovalentně propojených disulfidickými můstky (H), ke každému, je můstkem připojen řetězec lehký (L). Domény na N-koncích řetězců jsou variabilní (V), liší se mezi molekulami produkoványými různými klony B-lymfocytů a vytvářejí místo, na které se váže antigen,

tzv. Fab fragment (z angl. „antigen binding fragment“). Dolní část molekuly je tzv. Fc fragment (z angl. „fragment crystallizable“), umožňující vazbu na Fc receptory fagocytů. Za vhodných podmínek lze působením enzymů rozštěpit molekulu imunoglobulinu na tyto dva fragmenty. Dalším kontrolovaným štěpením je možné z Fab fragmentu získat Fv fragment, který se skládá z nekovalentně asociovaných variabilních domén obou řetězců. Oblast mezi doménami CH1 a CH2 v těžkém řetězci se nazývá pantová neboli „hinge“ oblast a je zodpovědná za flexibilitu protilátky [41, 42]. Struktura savčího IgG je znázorněna na obrázku 5.

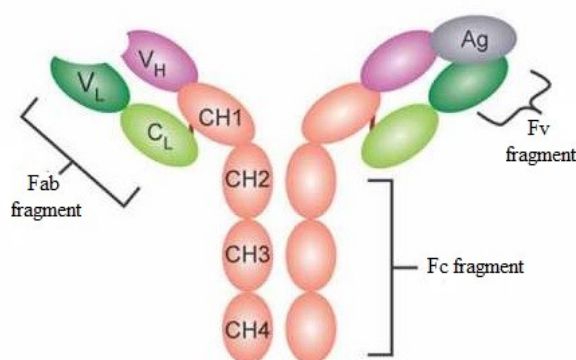


Obrázek 5: Struktura IgG. Molekula je složena ze dvou těžkých řetězců (H), které jsou kovalentně propojené pomocí disulfidických můstků. Ke každému řetězci je připojen řetězec lehký (L). Jako V_L a V_H se označují variabilní domény příslušných řetězců, C_L a C_H jsou domény konstantní. Místo pro navázání antigenu je tzv. Fab fragment (z angl. „antigen binding fragment“), který lze enzymově rozštěpit na Fv fragment. Dolní část molekuly se označuje jako Fc fragment (z angl. „fragment crystallizable“), umožňující vazbu na Fc receptory fagocytů. Oblast mezi doménami CH1 a CH2 v těžkém řetězci se nazývá pantová neboli „hinge“ oblast. Převzato a upraveno z [44].

Imunitní systém pacienta trpícího CF je při infekci schopen produkovat velké množství antigenně specifických protilátek, problémem je však jejich sekrece na epitelech. Pasivní imunizaci podáním slepičích imunoglobulinů produkovaných proti určitému patogenu je možné využít jako profylaktický prostředek u nemocného jedince.

1.4 Slepí protilátky

Ptáci produkují tři typy imunoglobulinů – IgA, IgM a IgY. IgY, které tvoří 75 % všech protilátek, jsou vylučovány do vaječného žloutku a poskytují potomkům účinnou obranu během zrání vlastního imunitního systému. Imunoglobulin třídy Y se liší od savčího IgG hlavně větší molekulovou hmotností, jsou více hydrofobní a mají nižší izoelektrický bod. Navíc, slepičí protilátky nemají ve struktuře pantovou oblast, což se projevuje nižší flexibilitou ve srovnání se savčími imunoglobuliny [45]. Struktura IgY je znázorněna na obrázku 6.



Obrázek 6: Struktura IgY. Protilátka se skládá ze dvou těžkých řetězců (H), ke každému je disulfidickým můstkem připojen řetězec lehký (L). V_L a V_H jsou variabilní domény příslušných řetězců, C_L a C_H jsou domény konstantní. Místo pro navázání antigenu je tzv. Fab fragment (z angl. „antigen binding fragment“), který lze enzymově rozštěpit na Fv fragment. Dolní část molekuly označuje se jako Fc fragment (z angl. „fragment crystallizable“) a umožňuje vazbu na Fc receptory fagocytů. Převzato a upraveno z [44].

Produkce imunoglobulinů začíná imunizací pokusného zvířete, která se provádí opakovanými nitrosvalovými injekcemi specifických antigenů. Dodaná dávka významně ovlivňuje velikost vyvolané odpovědi. Při opakovaném vystavení slepice stejnému antigenu se projeví tzv. paměťový efekt adaptivního imunitního systému – dojde ke větší produkci specifických protilátek za kratší dobu [45, 46].

Vědecké studie odhalily účinnost slepičích IgY produkovaných proti konkrétnímu patogenu při terapii bakteriálních infekcí u pacientů s cystickou fibrosou. Bylo zjištěno, že vyplachování úst a kloktání roztokem specifických protilátek

proti *Pseudomonas aeruginosa* brání jejich adhezi na slizniční povrch dýchacích cest. Dalšími strategiemi terapeuticky využít protilátky je, například, inhibice aktivity bakteriálních enzymů nebo neutralizace vylučovaných toxinů [47].

1.4.1 Výhody použití IgY

Protilátky jsou přirozeně produkovány v organismu zvířete a nejsou syntetickými léčivy. Vejce jsou standardní součástí potravy člověka, takže by neměli při léčbě vyvolávat nežádoucí účinky. Terapie pomocí žloutkových imunoglobulinů může být použita u pacientů i s případnou alergií, protože purifikované IgY neobsahují vaječný albumin nejčastěji způsobující tyto reakce [48].

Slepičí protilátky mají oproti savcům, například, králíci, řadu výhod. Z organismu imunizované slepice je možné získat značné množství imunoglobulinů z téměř každodenní produkce vajec. Bylo stanoveno, že jeden vaječný žloutek obsahuje přibližně 100 mg IgY. Způsob získání je navíc procesem neinvazivním. Fylogenetická vzdálenost ptáků a savců umožňuje slepičím protilátkám rozpoznat větší počet epitopů na savčích proteinech. Žloutkové imunoglobuliny neaktivují systém komplementu a nereagují s lidskými Fc receptory, což nenavozuje rozvoj zánětu [45, 46].

Slepičí protilátky produkované právě proti lektinům bakterie *Burkholderia cenocepacia* je možné využít jako prostředek prevence plicních infekcí u pacientů trpících cystickou fibrosou. Pasivní imunizace by měla snižovat adhezi patogenních mikroorganismů na slizniční povrch dýchacích cest a tím blokovat rozvíjení infekce. Dána metoda je dobrou alternativou k antibiotické terapii, protože je cílena na konkrétní patogen a neovlivňuje běžnou bakteriální mikroflóru organismu.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je zjištění podmínek produkce lektinu epidemickými kmeny bakterie *Burkholderia cenocepacia* pomocí specifických slepičích protilátek.

Pro splnění dané cíle je třeba vyřešit následující dílčí úkoly:

- izolace specificky produkovaných slepičích imunoglobulinů a ověření jejich imunoreaktivity proti rekombinantnímu lektinu BC2L-A;
- měření růstových křivek epidemických kmenů *B. cenocepacia* pro zkoumání růstu bakterií v čase;
- kultivace bakteriálních kultur na pevných půdách (agarové plotny).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a přístroje

3.1.1 Použité chemikálie

- **Bio-Rad, USA:**

peroxodisíran amonný; suché mléko, odtučněné;

- **Carl Roth GmbH, Německo:**

dodecylsíran sodný;

- **Fluka, Německo:**

Tween20;

- **Lachema, Česká republika:**

D (+) – mannosu; hydrogenuhličitan sodný; uhličitan sodný;

- **Lach-Ner, Česká republika:**

chlorid hořečnatý; chlorid sodný; dihydrogenfosforečnan draselný; dihydrogenfosforečnan sodný; hydrogenfosforečnan disodný; glycin; guanidin hydrochlorid; izopropylalkohol; kyselina chlorovodíková; kyselina octová; methanol;

- **NZYTech, Portugalsko:**

tris(hydroxymethyl)aminomethan;

- **Promega, USA:**

5-bromo-4-chlor-3-indoyl-fosfát; nitro blue tetrazolium chlorid;

- **Sigma-Aldrich, USA:**

4-nitorfenylfosfát disodný; azid sodný; diethylamin; králičí protilátka s navázanou alkalicou fosfátou proti slepičí protilátce; N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin; inhibitory proteas (cOmpleteTM ULTRA).

3.1.2 Použité přístroje

analytické váhy 40SM-200A	PESA, Švýcarsko
aparatura pro provedení elektroforézy	Bio-Rad, USA
aparatura pro provedení metody Western blot	Biometra GmbH, Německo
centrifuga K70-D	Janetzky, Německo
centrifuga Z383K	Hermle LaborTechnik GmbH, Německo
čtecí zařízení Tecan Sunrise Remote	Tecan, Švýcarsko
magnetická míchačka MS-H-S	DLAB, Čína
magnetická míchačka RH basic 2	IKA, Čína
minicentrifuga C1301T	Labnet, USA
pH-metr HI-2211	Hanna Instruments, UK
předvážky EW600-2M	KERN, Německo
sonikátor Sonopuls mini20	Bandelin, Německo
spektrofotometr Cary 60 UV-Vis	Agilent Technologies, USA
spektrofotometr Spekol 11	Carl Zeiss Jena, Německo
suchá lázeň MiniB-100	Hangzhou Miu Instruments, Čína
třepačka Multitron Pro	Infors HT, Švýcarsko
váhy EMS	KERN, Německo
vortex Genius 3	IKA, Čína

3.1.3 Ostatní pomůcky

dialyzační membrána	Spectrum Medical Industries, USA
mikrotitrační destičky PolySorp	Nunc, Roskilde, Dánsko
nitroceluloseová membrána	Bio-Rad, USA
parafilm	Bemis, USA

3.2 Použité metody

3.2.1 Izolace protilátek

Slepičí protilátky IgY proti lektinu BC2L-A bakterie *Burkholderia cenocepacia* byly izolovány ze žloutků vajec.

Použité roztoky:

1. izolační PBS pufr (z angl. „Phosphate buffered saline“) (0,1 M NaCl; 25 mM Na₂HPO₄; 15,4 mM NaN₃; pH = 7,2).

Postup:

Vaječné žloutky byly separovány od bílků, promyty a naředěny vodovodní vodou v poměru objemů 1:7. Směs byla homogenizována na magnetické míchače a pH roztoku upraveno na hodnotu 5,1 pomocí 0,5 M kyseliny chlorovodíkové. Připravená směs byla zamražena při teplotě -20 °C ve velké skleněné nálevce utěsněné gumovou zátkou. Při rozmrazování byl uvolňující se roztok filtrován přes filtrační papír.

Precipitace proteinů byla provedena přidáním chloridu sodného v koncentraci 8,76 % (w/v) za stálého míchání a úpravou pH na hodnotu 4,0. Roztok byl ponechán na dvě hodiny bez míchání při laboratorní teplotě. Precipitát byl oddělen od supernatantu centrifugací po dobu 20 minut při 5500 RPM a teplotě 4 °C a následně rozpuštěn v izolačním PBS pufru.

3.2.2 Fotometrické stanovení koncentrace

Koncentrace izolovaných imunoglobulinů byla určena na základě absorbance roztoku při vlnové délce 280 nm.

Postup:

Vzorek protilátky naředěný 101-krát v PBS pufru byl přenesen do křemenné kyvety a následně byla změřena absorbance roztoku při vlnové délce 280 nm na spektrofotometru Cary 60 UV-Vis. Jako srovnávací vzorek byl použit PBS.

Koncentrace imunoglobulinů byla vypočtena podle vzorce:

$$c = A_{280} \cdot \text{ředění} \cdot 1,094^*,$$

*experimentálně stanovený parametr.

3.2.3 Afinitní purifikace

Afinitní purifikace je metoda umožňující oddělit biologicky aktivní látky ze směsi. Technika je založena na reverzibilní interakci mezi ligandem (afinantem), který je kovalentně navázán na pevnou fázi chromatografické kolony, a komplementární látkou v přiváděném roztoku. Během propláchnutí kolony dojde k zachycení biologicky aktivních látek na afinant, látky bez afinity projdou nezadrženy. Následujícím použitím elučního činidla, způsobujícím prudkou změnu pH nebo iontové síly, dochází k uvolnění zachycených látek.

Jako pevný nosič byla použita Sepharosa 4B aktivovaná CNBr, jako afinant – bakteriální lektin BC2L-A.

Použité roztoky:

1. regenerační roztok (4 M guanidin/HCl; pH = 7,2);
2. promývací roztok II (1 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; pH = 7,2);
3. eluční roztok (0,05 M diethylamin; 2 % (w/v) D-mannosa; pH = 11,5);
4. neutralizační roztok (1 M KH₂PO₄; pH = 6,75);

5. dialyzační roztok (0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; 15,4 mM NaN₃; pH = 7,2).

Postup:

K roztoku protilátek byla přidána D-mannosa v koncentraci 2 % (w/v). Chromatografická kolonka s navázaným na pevnou fázi lektinem BC2L-A byla promyta regeneračním roztokem a izolačním PBS pufrem. Následně byl gel z kolony roztokem protilátek přiveden do zkumavky a míchán na obraběči přes noc při teplotě 4 °C.

Gel spolu s roztokem protilátek byl přiveden zpět na kolonu a byl jímán eluát, představující proteiny, které neměli afinitu k ligandu. Chromatografická kolona byla promyta promývacím roztokem I (izolační PBS pufr) a byly jímány frakce objemem 2 ml, u kterých se měřila absorbance při vlnové délce 280 nm na spektrofotometru Cary 60 UV-Vis. Při poklesu absorbance pod hodnotu 0,03, kolonka byla promyta roztokem II s analogickým sebráním frakcí a měřením absorbance. K eluci zachycených specifických imunoglobulinů došlo aplikací na kolonu elučního činidla. Eluát byl jímán do mikrozkuvek s neutralizačním roztokem.

Nakonec kolona byla promyta izolačním PBS pufrem, regeneračním roztokem a znovu PBS pufrem. Sebrané frakce, které měli přibližně stejný obsah bílkovin, byly spojeny a dialyzovány přes noc při teplotě 4 °C. Absorbance afinitně purifikovaných specifických protilátek byla změřena při vlnové délce 280 nm.

3.2.4 ELISA

ELISA (z angl. „Enzyme-linked Immunosorbent Assay”) je imunochemická metoda, která ke kvantitativnímu stanovení komplexu antigen-protilátka využívá enzym jako indikační molekulu.

Technika je založena na specifické interakci mezi antigenem a protilátkou. Antigen, navázaný na dno jamky mikrotitrační destičky, je specificky rozeznán primární protilátkou, která je následně rozpoznána sekundární protilátkou, na kterou je kovalentně navázán enzym. Enzym katalyzuje přeměnu

chromogenního substrátu na barevný produkt. Koncentrace sekundární, resp. primární protilátky je přímo úměrná absorbanci produktu.

Metoda byla využita pro ověření reaktivity izolovaných specifických slepičích imunoglobulinů. Jako antigen byl použit rekombinantně připravený lektin BC2L-A bakterie *Burkholderia cenocepacia*.

Použité roztoky:

1. vzorkový pufr (13 mM Na₂CO₃; 25 mM NaHCO₃; pH = 9,6);
2. PBS-ELISA + Tween (0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1mM NaH₂PO₄; 0,1 % (v/v) Tween20; pH = 7,2);
3. blokovací roztok (2 % roztok „řidkého bílku“ (w/v) v PBS-ELISA + Tween);
4. PBS-ELISA (0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; pH = 7,2);
5. vyvolávací roztok pro alkalickou fosfatasu (30 mM NaHCO₃; 20 mM Na₂CO₃; 1 mM MgCl₂; 0,1 % (w/v) p-nitrofenolfosfát).

Postup:

Do jamek mikrotitrační destičky PolySorp bylo naneseno po 100 µl roztoku antigenu ve vzorkovém pufru o koncentraci 4 µg/ml. Inkubace probíhala přes noc při teplotě 4 °C. Následně byly jamky promyty třikrát 250 µl promývacího roztoku PBS-ELISA + Tween.

Jamky byly blokovány nanesením 150 µl 2 % (w/v) roztoku „řidkého bílku“ v PBS-ELISA + Tween. Blokace probíhala ve vlhké komoře po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C. Následně jamky byly promyty třikrát 250 µl promývacího roztoku PBS-ELISA + Tween.

Primární protilátka naředěná PBS-ELISA byla aplikována na mikrotitrační destičku v koncentracích 90; 30; 10; 3,3 µg/ml. Afinitně purifikovaná protilátka byla použita v koncentracích 3; 1; 0,3; 0,1 µg/ml. Inkubace probíhala ve vlhké komoře

po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C. Následně byly jamky promyty třikrát 250 µl promývacího roztoku PBS-ELISA + Tween.

Do každé jamky bylo naneseo 100 µl roztoku sekundární protilátky ředěné 2000-krát PBS-ELISA. Inkubace probíhala za stejných podmínek 1 hodinu při teplotě 37 °C. Následně jamky byly promyty třikrát 250 µl promývacího roztoku PBS-ELISA + Tween. Nakonec bylo do jamek aplikováno po 100 µl vyvolávacího roztoku a po 10 minutách reakce byla zastavena aplikací 100 µl 3M roztoku hydroxidu sodného. Absorbance vzniklého barevného produktu byla změřena při vlnové délce 405 nm pomocí přístroje Tecan Sunrise Remote.

3.2.5 Kultivace bakterií *Burkholderia cenocepacia*

Při kultivaci bakterií v uzavřeném kultivačním systému lze rozpoznat několik fází jejich růstu: „lag“ fáze, exponenciální, stacionární a fáze odumírání. Během klidové („lag“) fáze se mikroorganismy adaptují na růst v novém prostředí, probíhá syntéza potřebných biomolekul. Dál následuje fáze exponenciální, která končí vyčerpáním živin v médiu. V této fázi začíná intenzivní proces dělení bakterií a jejich exponenciální nárůst. Ve stacionární fázi se rychlost množení postupně zpomaluje a dochází až ke stavu, ve kterém se počet buněk téměř nemění. V médiu se akumulují toxické produkty metabolismu, což spolu s vyčerpáním živin, vede k odumírání mikroorganismů.

Byli kultivovány dva epidemické kmeny bakterie:

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

Použité roztoky:

1. PS médium (1,6 % (w/v) pepton; 1 % (w/v) enzymatický kaseinový hydrolyzát; 57 mM K₂SO₄; 15 mM MgCl₂; 0,5 % (v/v) glycerol);
2. LB médium (1 % (w/v) pepton; 0,5 % (w/v) kvasnicový extrakt; 1 % (w/v) NaCl).

Postup:

Pro kultivaci bakterií v kapalném médiu bylo použito 200 μ l zamražené bakteriální suspenze a 100 ml média. Každou hodinu inkubace byl z narůstající kultury odebrán vzorek pro stanovení optické denzity při vlnové délce 600 nm pomocí přístroje Spekol 11. Inkubace probíhala po dobu 20 hodin při teplotě 37 °C za mírného třepání (150 RPM) na třepače Multitron Pro.

Kultivace na agarové plotně byla provedena křížovým roztěrem bakteriální kultury pomocí ožehnuté očkovací klíčky. Inkubace probíhala po dobu 3 dní při teplotě 37 °C. Celá práce byla realizována za aseptických podmínek.

3.2.6 Příprava lyzátů

Použité roztoky:

1. roztok inhibitorů proteas (1 tableta/50 ml pufru);
2. lyzáční pufr (0,1 % (w/v) lysozym; roztok inhibitorů proteas).

Postup:

Bakteriální peleta oddělená od supernatantu centrifugací po dobu 20 minut při 5500 RPM a teplotě 4 °C byla rozpuštěna v lyzáčním pufru a sonikována na ledu po dobu 2 minut pulsy o délce 15 sekund.

3.2.7 Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA

Metoda BCA (z angl. „Bicinchoninic acid assay“) využívá měření absorbance barevného produktu vzniklého reakcí sodné soli kyseliny bicinchoninové a měďných iontů ke stanovení koncentrace bílkovin. Měďné ionty vznikají v roztoku reakcí mezi peptidovou vazbou a měďnatými ionty.

Postup:

Byla připravena řada kalibračních roztoků v koncentracích 2000; 1500; 1000; 750; 500; 250; 125 μ g/ml BSA (z angl. „Bovine serum albumin“, hovězí sérový albumin). Do jamek mikrotitrační destičky PolySorp bylo nanášeno

po 9 μl lyzátů bakteriální kultury a 260 μl reagentu (směs roztoků A a B 50:1, Thermo Scientific). Inkubace probíhala po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Absorbance vzniklého barevného produktu byla změřena při vlnové délce 562 nm na přístroji Tecan Sunrise Remote.

3.2.8 SDS-PAGE

SDS-PAGE (z angl. “Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”) patří mezi elektromigrační techniky využívající porézních gelů k dělení molekul na základě jejich velikosti a elektroforetické pohyblivosti. Dodecylsírán sodný, použitý při provedení metody, uděluje analyzovaným látkám uniformní záporný náboj a umožňuje separaci na základě rozdílu v molekulových hmotnostech.

Použité roztoky:

1. vzorkový pufr (2 % (w/v) SDS; 0,063 M Tris-HCl; 10 % (v/v) glycerol; 5 % (v/v) 2-merkptoethanol; 0,003 % (w/v) bromfenolová modř; pH = 6,8);
3. pufr A (0,1 % (w/v) SDS; 0,375 M Tris-HCl, pH = 8,8);
4. polymerační roztok A (pufr A obsahující o 30 % (w/v) akrylamid a 0,8 % (w/v) BIS);
5. pufr B (0,1 % (w/v) SDS; 0,125 M Tris-HCl, pH = 6,8);
6. polymerační roztok B (pufr B obsahující o 30 % (w/v) akrylamid a 0,8 % (w/v) BIS);
7. elektrodoový pufr (50 mM Tris-base; 384 mM glycin; 0,1 % (w/v) SDS; pH = 8,5);
8. barvicí roztok (25 % (v/v) CH₃OH; 10 % (v/v) CH₃COOH; 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue);
9. odbarvovací roztok (45 % (v/v) CH₃OH; 10 % (v/v) CH₃COOH).

Postup:

Roztok pro separační polyakrylamidový gel byl aplikován mezi skla a následně převrstven isopropylalkoholem, aby polymerace probíhala za anaerobních

podmínek. Polymerace probíhala po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Po skončení polymerace byla vrstva isopropylalkoholu odstraněna a prostor mezi skly byl opatrně vysoušen filtračním papírem. Následně byl aplikován roztok pro gel zaostřovací a do něho byl zasunut „hřebínek“ pro vytvoření jamek. Polymerace probíhala po dobu 45 minut při laboratorní teplotě a po skončení byl hřebínek opatrně vyjmut. Jamky byly promyty destilovanou vodou a prostor mezi skly vysoušen filtračním papírem. Skla byla vložena do aparatury mezi elektrody a prostor mezi nimi byl naplněn elektrodoým pufrem.

Tabulka 1: Složení polymeračních směsí.

typ gelu	porozita	složení
zaostřovací	4 %	2,5 ml pufr A
		2,5 ml polymerační roztok A
		50 µl 10 % APS
		5 µl TEMED
separační	15 %	1,7 ml pufr B
		267 µl polymerační roztok B
		40 µl 10 % APS
		2 µl TEMED

Vzorky o objemu 24 µl byly smíchány se vzorkovým pufrem v poměru objemů 2:1, povařeny po dobu 5 minut při teplotě 100 °C a aplikovány do jamek. Zároveň do jamek byli aplikovány BC2L-A a standard molekulové hmotnosti v rozsahu molekulových hmotností 10 – 250 kDa (Bio-Rad, USA).

Aparatura byla ponořena do elektroforetické vany a naplněna elektrodoým pufrem. Byli nastaveny potřebné parametry: konstantní hodnota napětí 150 V, hodnota proudu by se měla dosáhnout 60 mA/gel. Elektroforéza při použití 15 % polyakrylamidového gelu probíhala až po dobu, kdy „čelo“ nebo zóna bromfenolové modři dosáhla 5 mm od konce gelu.

Nakonec byla skla opatrně oddělena od sebe a odstraněn zaostřovací gel. Separační gel byl opláchnut destilovanou vodou a přenesen buď do transferového pufru, nebo do barvicí lázně. Barvení probíhalo po dobu 45 minut a následně gel byl přenesen do odbarvovacího roztoku.

3.2.9 Western blot

Působením elektrického proudu je možné bílkoviny z gelu převést na povrch membrány, na které je pak provedena jejich detekce specifickými protilátkami.

Pro provedení metody byla použita nitroceluloseová membrána. Primární specificky produkovaná protilátka byla aplikována v koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$, afinitně purifikované imunoglobuliny – 1 $\mu\text{g/ml}$.

Použité roztoky:

1. transferový pufr (25 mM Tris-base; 192 mM glycin; 20 % CH_3OH ; pH = 8,3);
2. TBS pufr (2 mM Tris-base; 13,7 mM NaCl; pH = 7,6);
3. TBS-Tween pufr (2 mM Tris-base; 13,7 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween20; pH = 7,6);
4. blokovací roztok (5 % (w/v) roztok odtučněného suchého mléka v TBS-Tween);
5. vyvolávací roztok (100 mM Tris-base; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl_2 ; 15 mM NaN_3 ; 0,66 % (v/v) nitro blue tetrazolium chlorid; 0,33 % (v/v) 5-bromo-4-chlor-3-indoyl-fosfát; pH = 9).

Postup:

Po provedení elektroforézy gel byl na 15 minut přenesen do 100 ml transferového pufru. Rovněž pufrem byli namočeny filtrační papíry a membrána. Na anodu byli položeny v příslušném pořadí: tři filtrační papíry, membrána, gel a znovu tři filtrační papíry. Aparatura byla zaklopena katodou a byli nastaveny potřebné parametry: hodnota proudu – 170 mA/2 gely, napětí – 25 V.

Přenos proteinů probíhal po dobu 40 minut. Následně gel a membrána byli promyty destilovanou vodou a gel přenesen do barvicí lázně.

Membrána byla při laboratorní teplotě za stálého míchání 1x promyta TBS pufrem a blokována použitím 10 ml 5 % (w/v) roztoku odtučněného mléka v TBS-Tween pufru. Inkubace probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě za stálého míchání. Následně byla membrána třikrát po dobu 5 minut promyta 10 ml TBS-Tween pufru.

Primární protilátka byla nanášena v 10 ml roztoku 2 % odtučněného mléka v TBS-Tween pufru. Inkubace probíhala po dobu 2 hodin za stálého míchání při laboratorní teplotě. Membrána byla promyta 5x 10 ml TBS-Tween po dobu 8 minut a následně 1x 10 ml TBS pufru. Sekundární protilátka ředěná 10000x-krát byla aplikována v 10 ml roztoku 2 % odtučněného mléka v TBS-Tween. Inkubace probíhala 1 hodinu za stálého míchání při laboratorní teplotě.

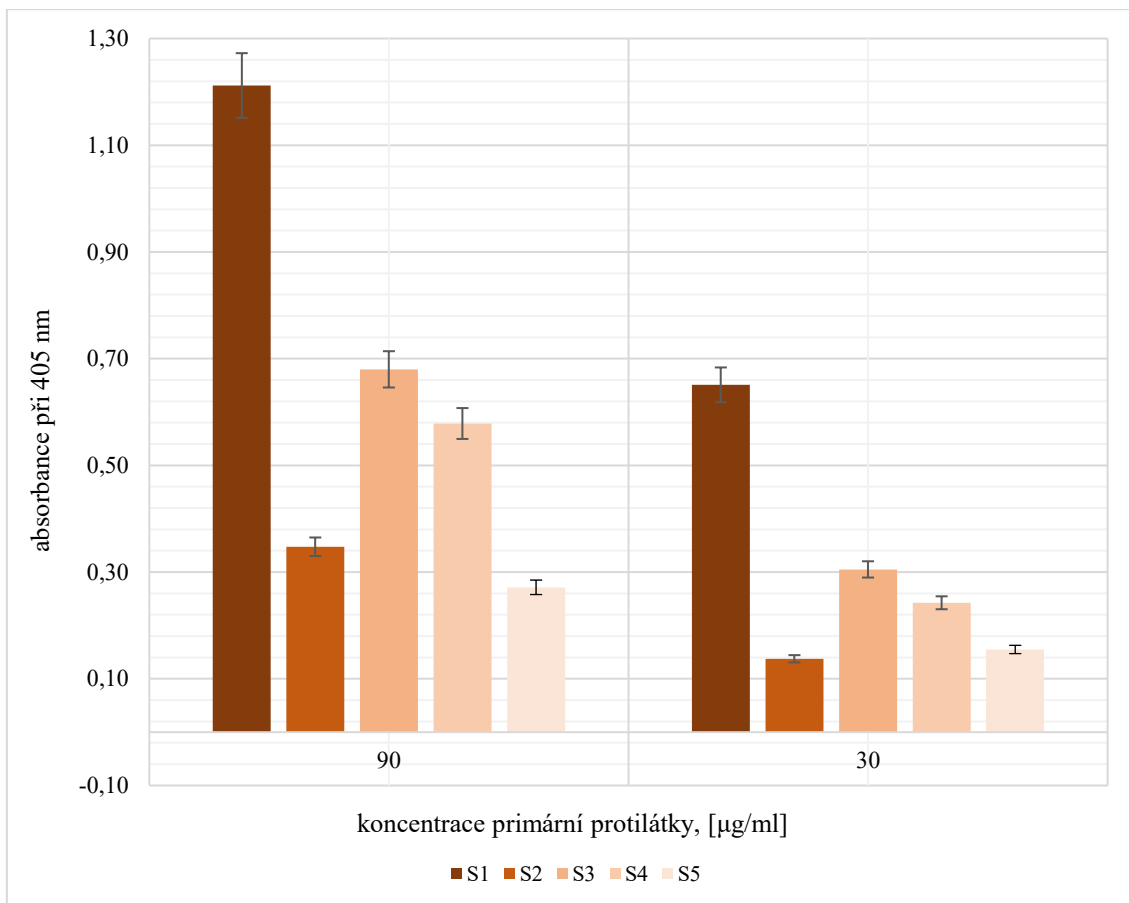
Membrána byla promyta pětkrát 10 ml TBS-Tween po dobu 8 minut a následně 1x 10 ml TBS pufru. Nakonec byl nanášen 1 ml vyvolávacího roztoku pro alkalickou fosfatázu. Vyvolání probíhalo po dobu 1 minuty a pro zastavení reakce membrána byla přenesena do destilované vody.

4 VÝSLEDKY

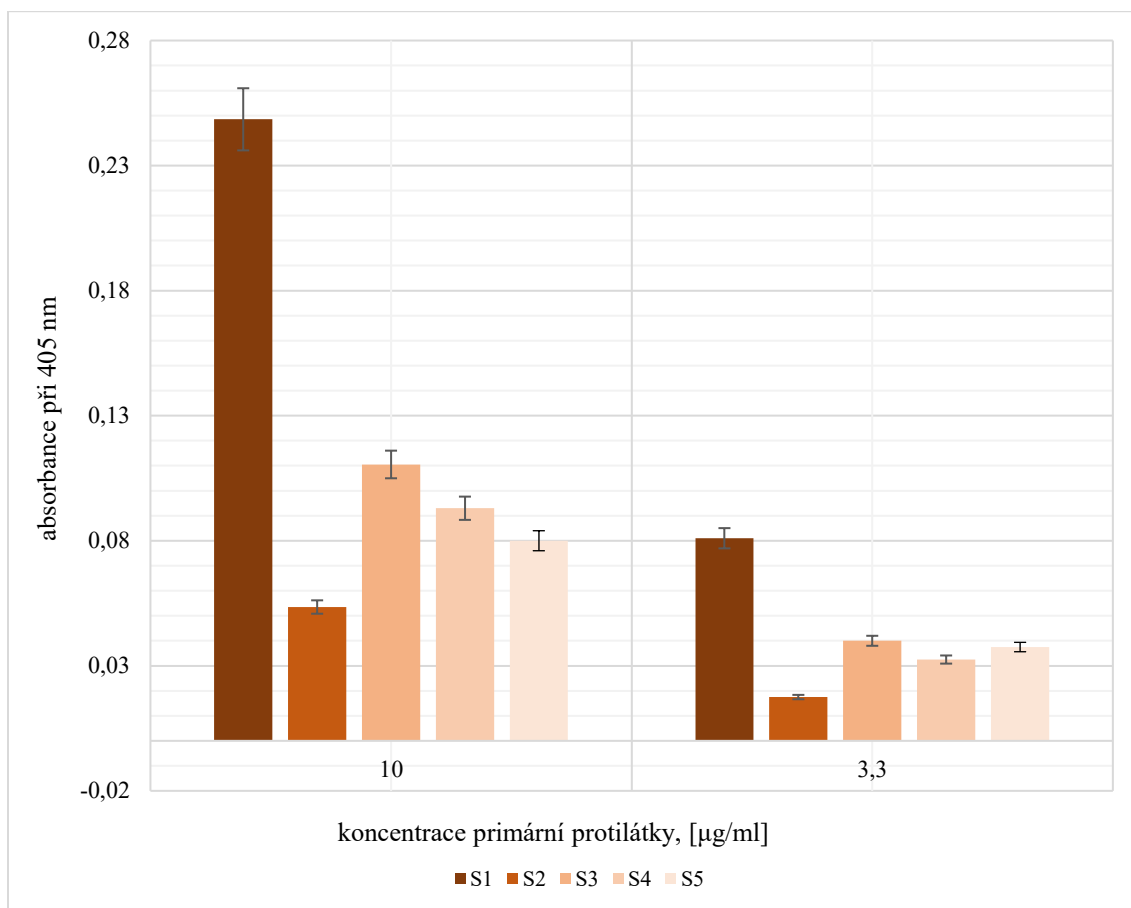
4.1 Imunoreaktivita izolovaných protilátek proti rekombinantnímu BC2L-A

Použitím metody ELISA byla ověřena reaktivita slepičích imunoglobulinů proti lektinu BC2L-A bakterie *Burkholderia cenocepacia*.

Bylo zkoumáno pět frakcí specifických protilátek izolovaných z vajec imunizovaného zvířete a kontrolní frakce připravená z vajec před imunizací. Frakce imunoglobulinů S1 až S4 byli izolovány z vajec produkovaných po první imunizaci pokusné slepice. Jak plyne z níže uvedených grafů (obrázky 7 a 8, strany 29, 30), imunizační schéma provedené s dávkou 3x 100 µg lektinu/zvíře nebylo zcela efektivní. Podáním antigenu byla vyvolána prudká imunitní odpověď, která postupně klesla.



Obrázek 7: Imunoreaktivita specifických slepičích protilátek proti rekombinantnímu BC2L-A určená metodou ELISA. Jako antigen byl použit lektin BC2L-A. Primární protilátka byla testována v koncentracích 90 a 30 µg/ml. Vyhodnocení bylo provedeno při vlnové délce 405 nm. Od hodnot absorbance jednotlivých frakcí imunoglobulinů byla odečtena hodnota absorbance odpovídající kontrolní frakce.



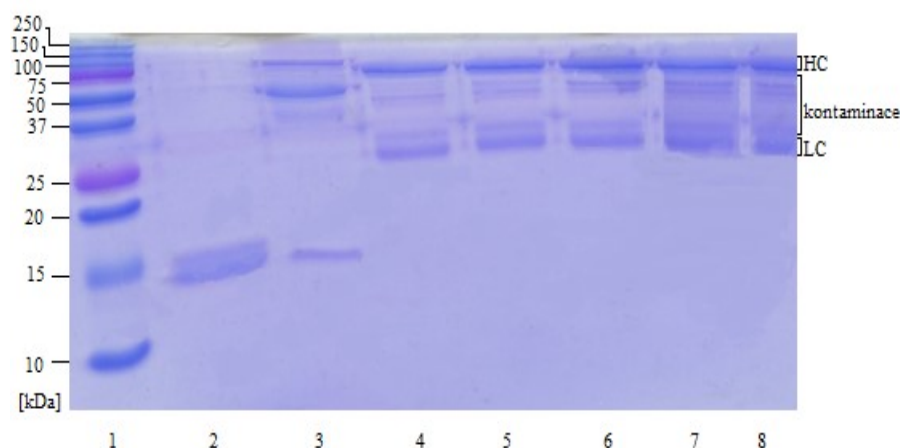
Obrázek 8: Imunoreaktivita specifických slepičích protilátek proti rekombinantnímu BC2L-A určená metodou ELISA. Jako antigen byl použit lektin BC2L-A. Primární protilátka byla testována v koncentracích 10 a 3,3 µg/ml. Vyhodnocení bylo provedeno při vlnové délce 405 nm. Od hodnot absorbance jednotlivých frakcí imunoglobulinů byla odečtena hodnota absorbance odpovídající kontrolní frakce.

Vzhledem k tomu, že první provedené imunizační schéma nevyvolalo u zvířete déle trvající imunitní odpověď vedoucí k produkci potřebného množství specifických protilátek, bylo třeba aplikovat podporující dávku antigenu, tzv. „booster“. Imunoreaktivita izolovaných žloutkových imunoglobulinů byla ověřena pomocí metody ELISA. Výsledky jsou prezentovány v grafech na obrázcích 7 a 8 (sloupec S5).

4.2 Čistota izolovaných imunoglobulinů

Čistota frakcí slepičích protilátek byla ověřena metodou SDS-PAGE. Bylo zkoumáno čtyři frakce specifických imunoglobulinů (S1-S4), kontrolní frakce protilátek a „řidký bílek“. Pro porovnání molekulových hmotností separovaných látek byl

použit standard molekulových hmotností v rozsahu molekulových hmotností 10 – 250 kDa (Bio-Rad, USA). Výsledek provedení metody SDS-PAGE je znázorněn na obrázku 9. Na draze odpovídající „řidkému bílku“ (3) zóna s nejvyšší mobilitou patří lysozymu (14 kDa), pak s nižší mobilitou – ovalbuminu (45 kDa), s nejnižší – ovotrasferinu (76 kDa). Na gelu byli nalezeny těžké řetězce imunoglobulinů (HC), lehké řetězce (LC) a přítomné kontaminace frakcí.

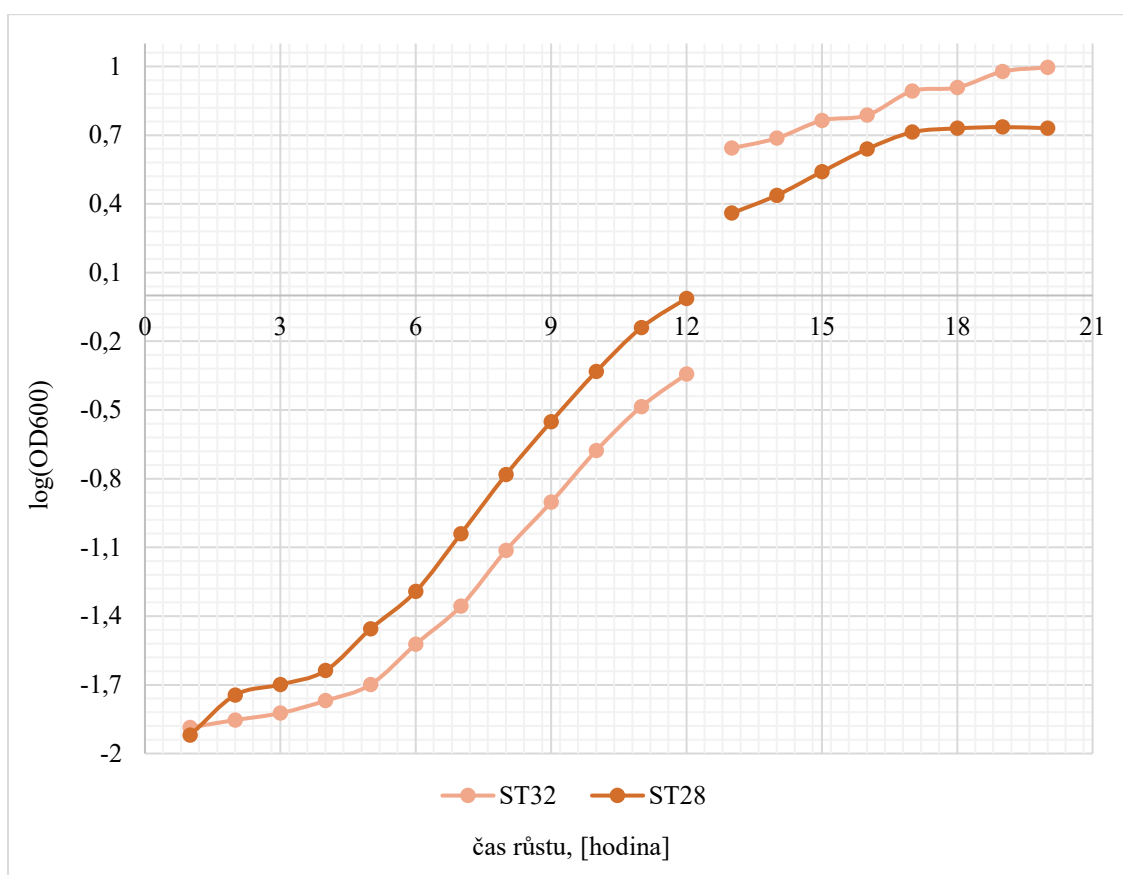


Obrázek 9: SDS-elektroforéza frakcí izolovaných slepičích protilátek. Vzorky byly naneseny na separační gel v následujícím pořadí: standard molekulové hmotnosti (1), rekombinantní lektin BC2L-A (2), „řidký bílek“ (3), kontrolní frakce imunoglobulinů (4), frakce protilátek S1 (5), S2 (6), S3 (7), S4 (8). Standard molekulové hmotnosti byl aplikován v objemu 5 μ l. Antigen, „řidký bílek“ a jednotlivé frakce imunoglobulinů byly testovány v koncentraci 10 μ g proteinů/jamka.

4.3 Měření růstu bakterií

V případě dvou epidemických kmenů bakterie *Burkholderia cenocepacia* – ST32 a ST28, byla proměřena růstová křivka. V každé hodině růstu kultury byl odebírán vzorek pro stanovení optické denzity při vlnové délce 600 nm. Na základě získaných hodnot byl sestrojen graf závislosti hustoty bakteriální kultury na čase (obrázek 10, strana 32).

Růstová křivka byla měřena po dobu 20 hodin. První bakteriální kultura byla kultivována v PS médiu při teplotě 37 °C za mírného třepání a byl sledován nárůst její optické denzity do 12. hodiny. Později za analogických podmínek byla zaočkována další kultura, první vzorek které byl proměřen ve 13. hodině kultivace.

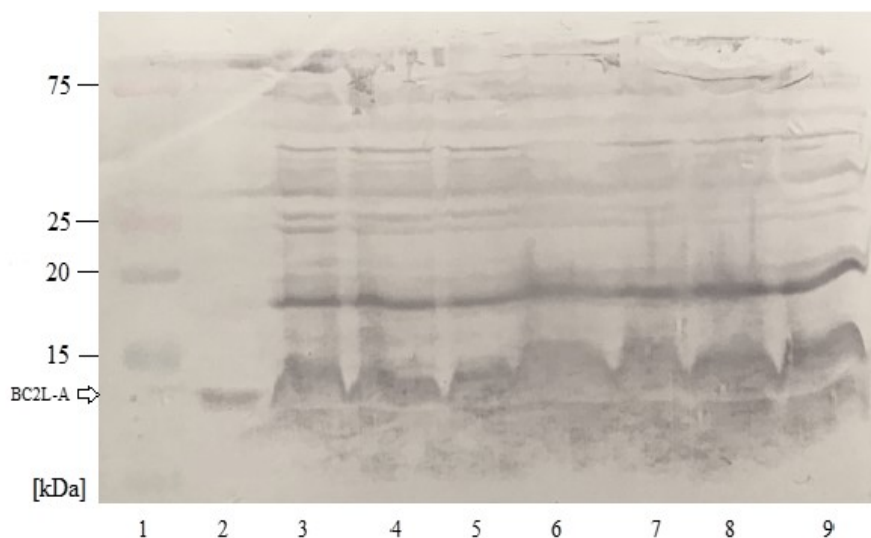


Obrázek 10: Růstová křivka epidemických kmenů bakterie *Burkholderia cenocepacia*. Na grafu je znázorněna závislost logaritmu optické denzity na době růstu kultury pro kmeny ST32 a ST28 kultivované v kapalném PS médiu. Sledování nárůstu hustoty bakterií probíhalo po dobu 20 hodin, měření bylo provedeno při vlnové délce 600 nm. Po dobu prvních 12 hodin byla sledována optická denzita první kultivované kultury (dolní část křivky), následně byla zaočkována další kultura, první měření které proběhlo ve 13. hodině kultivace (horní část křivky).

4.4 Imunodetekce lektinu produkovaného epidemickými kmeny

Schopnost vyrobených protilátek specificky rozeznávat lektin produkovaný kmeny *Burkholderia cenocepacia* byla ověřena pomocí metody Western blot. Byli zkoumány výluhy bakteriálních kultur připravené ze vzorků odebraných v různých časech kultivace. Kmen ST28 byl analyzován v časovém intervalu mezi 10. a 19. hodinou kultivace, kmen ST32 – mezi 12. a 19. hodinou. Celý test probíhal na nitrocelulosové membráně.

Na membráně došlo k vyvolání řady proteinových zón. Na obrázku 11 je znázorněna reprezentativní membrána použitá pro epidemický kmen ST28.

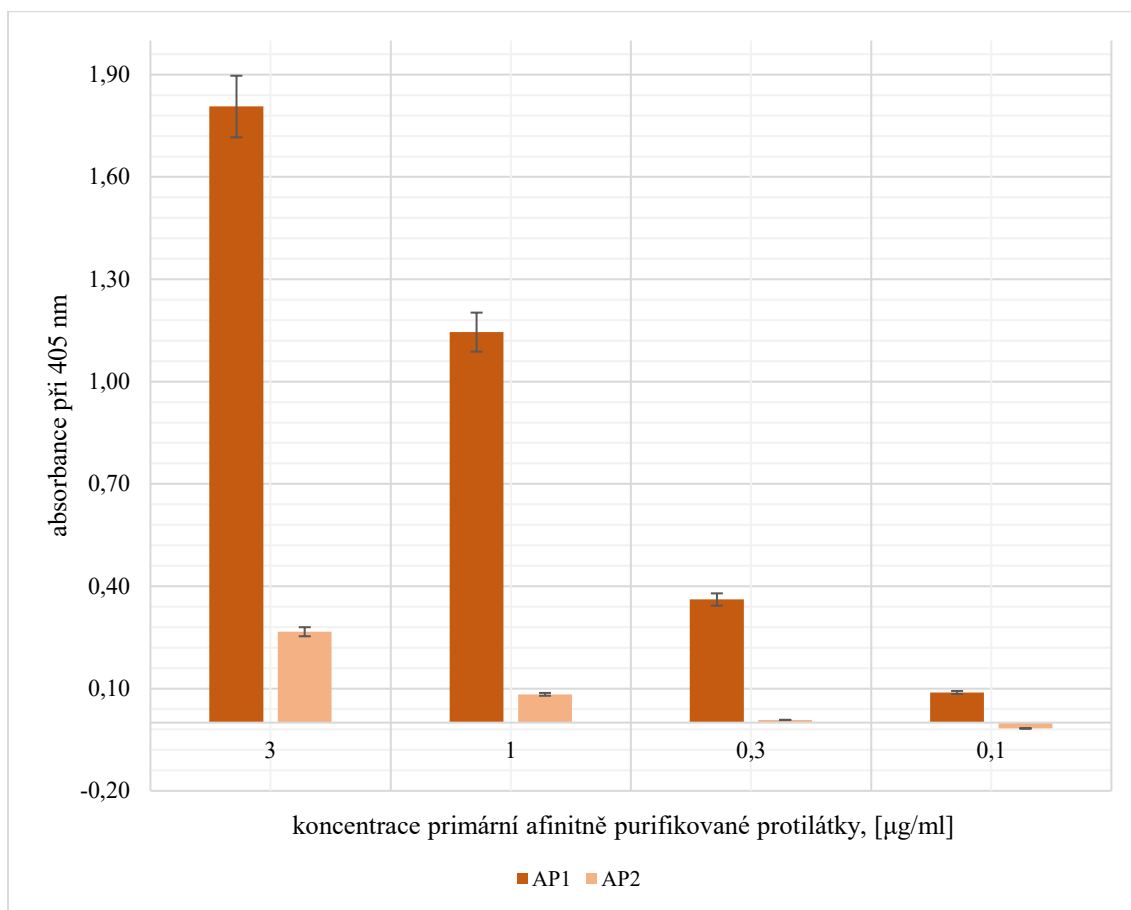


Obrázek 11: Schopnost izolovaných protilátek specificky rozpoznat lektin BC2L-A produkovaný epidemickým kmenem ST28 *Burkholderia cenocepacia* kultivovaným v kapalném PS médiu. Test probíhal na nitrocelulosové membráně. Vzorky byly nanášeny na separační gel v následujícím pořadí: standard molekulové hmotnosti (1), bakteriální lektin BC2L-A (2), vzorek odebraný v 10. hodině (3), v 11. (4), ve 12. (5), ve 13. (6), v 15. (7), v 17. (8), v 19. hodině kultivace (9).

4.5 Imunoreaktivita afinitně purifikovaných imunoglobulinů proti rekombinantnímu BC2L-A

Byla provedena afinitní purifikace frakce s nejvyšším obsahem specificky produkovaných slepičích protilátek (frakce S1). Metodou ELISA byli zkoumány dvě frakce afinitně purifikovaných IgY: frakce s vyšším obsahem proteinů – AP1, frakce s nižším obsahem – AP2. Na obrázku 12 (strana 34) je znázorněn výsledek provedení metody ELISA.

Frakce afinitně purifikovaných protilátek AP2 poskytuje mnohem nižší imunoreaktivitu než frakce AP1, což může být způsobeno denaturací proteinů elučním činidlem v průběhu afinitní purifikace.



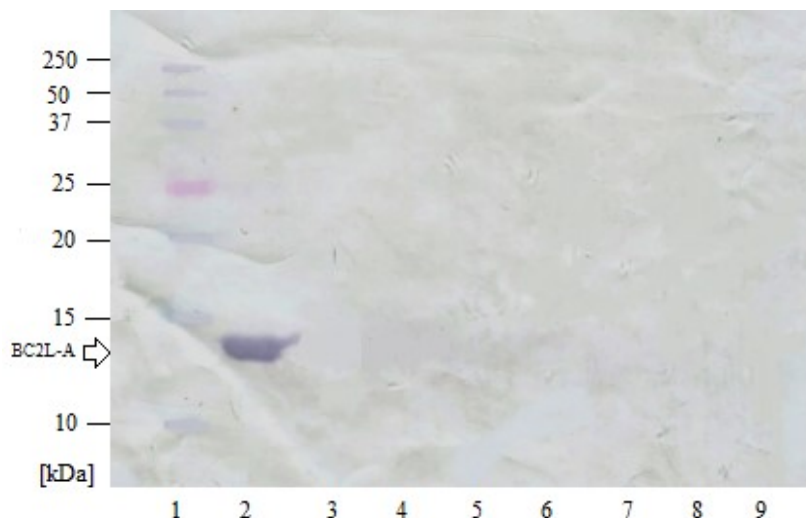
Obrázek 12: Imunoreaktivita afinitně purifikovaných specifických slepičích protilátek proti rekombinantnímu BC2L-A určená metodou ELISA. Jako antigen byl použit lektin BC2L-A. Primární afinitně purifikovaná protilátka byla testována v koncentracích 3; 1; 0,3; 0,1 µg/ml. Vyhodnocení bylo provedeno při vlnové délce 405 nm. Od hodnot absorbance jednotlivých frakcí imunoglobulinů byla odečtena hodnota absorbance odpovídající kontrolní frakce.

4.6 Ověření produkce lektinu epidemickými kmeny bakterie

Použitím metody Western blot byla ověřena produkce lektinu kmeny bakterie *Burkholderia cenocepacia* při kultivaci nejprve v kapalném médiu. Byli zkoumány výluhy připravené ze vzorků odebraných v různých časech kultivace. Kmen ST28 byl analyzován v časovém intervalu mezi 10. a 19. hodinou kultivace, kmen ST32 – mezi 12. a 19. hodinou. Celý test probíhal na nitrocelosové membráně, jako primární protilátka byla použita frakce afinitně purifikovaných imunoglobulinů.

Přítomnost lektinu ve vzorcích nebyla prokázána. Na membráně byli znázorněny pouze standard molekulové hmotnosti a lektin BC2L-A použitý jako marker antigenu.

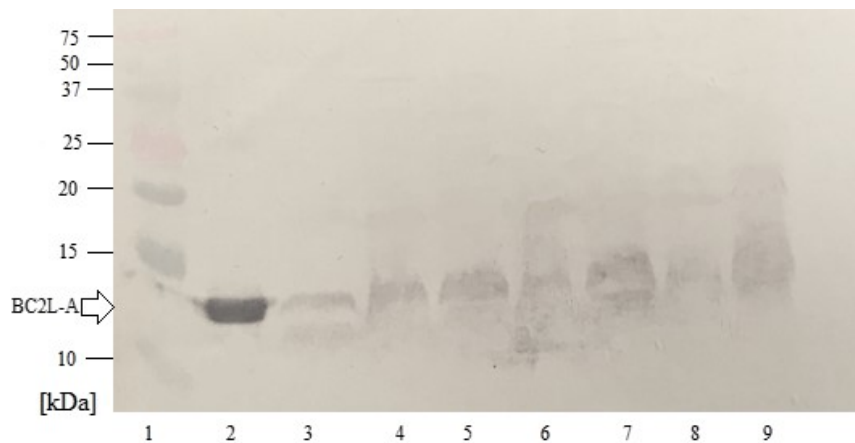
Na obrázku 13 je znázorněna reprezentativní membrána použitá pro epidemický kmen ST28.



Obrázek 13: Ověření produkci lektinu kmenem ST28 bakterie *Burkholderia cenocepacia* kultivovaným v kapalném PS médiu. Testování probíhalo na nitrocelulosové membráně. Vzorky byly nanášeny na separační gel v následujícím pořadí: standard molekulové hmotnosti (1), bakteriální lektin BC2L-A (2), vzorek odebraný v 10. hodině (3), v 11. (4), ve 12. (5), ve 13. (6), v 15. (7), v 17. (8), v 19. hodině kultivace (9). Reprezentativní obrázek je přeexponován pro lepší viditelnost zón.

Později byla použitím metody Western blot ověřena produkce lektinu epidemickými kmeny bakterie *Burkholderia cenocepacia* při kultivaci na agarových plotnách. Byli zkoumány výluhy bakteriálních kultur připravené přímo se vzorkovým pufrem nebo s použitím lyzáčního pufru. Jako primární protilátka byla použita frakce afinitně purifikovaných imunoglobulinů.

K vyvolání lektinu na nitrocelulosové membráně došlo u všech zkoumaných vzorků (obrázek 14, strana 36).



Obrázek 14: Ověření produkci lektinu epidemickými kmeny ST32 a ST28 bakterie *Burkholderia cenocepacia* kultivovanými na agarových plotnách. Celý test pobíhal na nitrocelulosové membráně s použitím afinitně purifikovaných protilátek. Při kultivaci kmenů byla použita PS a LB média. Vzorke byly naneseny na separační gel v následujícím pořadí: standard molekulové hmotnosti (1), rekombinantní lektin BC2L-A (2), vzorek kmenu ST32 kultivovaného na PS médiu připravený s použitím lyzáčního pufru (3), ST32 (PS médium) připravený s použitím vzorkového pufru (4), ST28 (PS médium, lyzáční pufr) (5), ST28 (PS médium, vzorkový pufr) (6), ST32 (LB médium, vzorkový pufr) (7), ST28 (LB médium, vzorkový pufr) (8), ST32 (LB médium, lyzáční pufr) (9).

5 DISKUZE

Cystická fibrosa je genetické onemocnění s autosomálně recesivním typem dědičnosti. Choroba je způsobena mutací proteinu CFTR, plnicího funkci kanálu pro chloridové a hydrogenuhličitanové ionty. Daný defekt vede k tvorbě vazkého hlenu v plicích, což způsobuje vznik respiračních komplikací, například, chronických infekcí. Nejčastějšími bakteriálními nákazami jsou infekce *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a bakteriemi komplexu *Burkholderia cepacia*, zvláště jedním z genomovarů komplexu – *B. cenocepacia* [30, 31].

Onemocnění primárně nezpůsobuje poškození imunitního systému, ale kvůli celkové patogenezi choroby je podstatně omezeno odstranění mikroorganismů z plic. Jako profylaktický prostředek pro pacienty s CF je možné využít pasivní imunizaci podáním slepičích protilátek produkovaných proti určitému patogenu. Imunoglobuliny třídy Y, přítomné ve vaječných žloutkách, dokáží snižovat adhezi bakterií na sliznici dýchacích cest a bránit tak rozvoji infekce [47]. Tato strategie je dobrou alternativou klasické antibiotické léčbě, protože je cílena na konkrétní patogen a neovlivňuje běžnou bakteriální mikroflóru.

Jedním z následků mutace CFTR genu je snížená sialyzace glykoproteinů na povrchích buněk plicního epitelu. Pozměněné glykokonjugáty proto umožňují snazší adhezi patogenních mikroorganismů prostřednictvím specifických adhezínů, například, lektinů [49]. Lektin BC2L-A, který vykazuje afinitu pro vazbu k D-mannose je důležitým faktorem virulence bakterie *Burkholderia cenocepacia* [29]. Slepíčí imunoglobuliny produkované proti tomuto lektinu by měly inhibovat jeho vaznou aktivitu a tím chránit pacienty s CF před rozvojem infekce působené tímto patogenem.

Produkce protilátek začíná imunizací pokusné slepice, která se provádí opakovanými nitrosvalovými injekcemi specifických antigenů. V rámci této práce byla provedena izolace imunoglobulinů z vajec a ověřována jejich reaktivita s lektinem BC2L-A, který byl rekombinantně připraven nebo s přirozeně se vyskytujícím lektinem v bakteriích.

Schopnost vyrobených protilátek specificky rozeznávat antigen byla ověřena nejprve imunochemickou metodou ELISA. Bylo zjištěno, že první provedené imunizační schéma nebylo dostatečně efektivní, protože u pokusného zvířete byla vyvolána prudká, ale postupně klesající imunitní odpověď. Po aplikaci podporující dávky byla znovu izolována frakce žloutkových imunoglobulinů. Při opakovaném vystavení slepice antigenu, by adaptivní imunitní systém měl produkovat větší množství specifických protilátek na základě paměťového efektu. Aplikace další dávky antigenu ale nebyla účinná. Imunoreaktivita frakce S5 byla dokonce menší, než frakce izolované z posledních vajec sebraných po první imunizaci slepice (frakce S4).

Imunizační schéma provedené s dávkou 3x 100 µg lektinu/zvíře navzdory vědeckým údajům nebylo zcela efektivní a pravděpodobně vyvolalo u slepice tolerance k použitému antigenu [46]. Druhým možným vysvětlením je kontaminace frakce po „booster“. Proto byla prověřována čistota izolovaných imunoglobulinů metodou SDS-PAGE. Bylo prokázáno, že všechny frakce obsahují jisté kontaminace, ale ne v takovém množství, aby tím bylo možno vysvětlit relativní snížení obsahu specifických protilátek ve frakcích po aplikaci podpůrné dávky antigenu. Přítomnost kontaminant ve vyrobených frakcích imunoglobulinů je v souladu s daty publikovanými v odborných člancích [50].

V průběhu experimentální činnosti byla zkoumána schopnost izolovaných protilátek specificky rozeznávat lektin produkováný přímo bakteriálními buňkami. Byla provedena kultivace dvou epidemických kmenů bakterie *Burkholderia cenocepacia* – ST32 a ST28. Kmen ST32 se v odborné literatuře označuje jako tzv. „český kmen“ a nejčastěji se vyskytuje mezi pacienty s cystickou fibrosou v České republice. Kmen ST28 se nejvíc šíří mezi pacienty ve Velké Británii [51]. Během kultivace byl z narůstající kultury každou hodinu odebrán vzorek pro stanovení optické denzity. Následně z obdržných hodnot byl sestrojen graf – růstová křivka, která poskytuje informaci o tom, jak rychle bakterie rostou.

Během kultivace byli zároveň odebírány vzorky s cílem určit časový interval, ve kterém jsou buňky schopny produkovat lektin. Přítomnost lektinu byla detekována pomocí vyrobených protilátek metodou Western blot. Pro přenos bílkovin ze separačního gelu byla použita nitrocelulosová membrána. Její hlavní výhoda vůči běžně používané PVDF membráně spočívá v nižší nespecificitě zachycení proteinů. Na membráně přesto došlo k vyvolání řady proteinových zón a ze získaného výsledku nebylo tedy možno zjistit, zda bakterie za daných kultivačních podmínek (kapalné médium a mírné třepání) produkují lektin.

S cílem zvýšit specificitu rozeznávání antigenu imunoglobuliny byla provedena afinitní purifikace frakce s nejvyšším obsahem specificky produkováných protilátek (frakce S1). Schopnost afinitně purifikovaných imunoglobulinů rozpoznávat lektin BC2L-A byla nejprve ověřena metodou ELISA s použitím rekombinantního antigenu. Bylo prokázáno, že došlo k podstatnému navýšení množství specifických protilátek. Při porovnání s původní frakcí došlo k obohacení frakci až 9x a množství afinitně purifikovaných imunoglobulinů odpovídá přibližně 0,2 % z celkového množství izolovaných protilátek. Pomocí afinitní purifikace se podařilo získat 2058 µg specifických imunoglobulinů. Další navýšení jejich množství by bylo možno docílit opakovaným provedením afinitní purifikace frakce nezachycených během první chromatografie proteinů. Rovněž z výsledku imunochemické metody ELISA bylo odhaleno, že frakce purifikovaných protilátek s menším obsahem proteinů (AP1) projevuje mnohem nižší imunoreaktivitu ve srovnání s frakcí s vyšším obsahem bílkovin (AP2). Vysvětlení daného jevu může spočívat v případné denaturaci bílkovin působením elučního činidla při afinitní chromatografii. Následně byla zkoumána schopnost afinitně purifikovaných protilátek rozeznávat lektin produkováný kultivovanými bakteriálními buňkami. Pomocí metody Western blot nebyla produkce lektinu prokázána, přestože afinitně purifikované imunoglobuliny mají vysokou specificitu.

Jednou z důležitých funkcí lektinu je ukotvení bakterií na površích přístupných pro kolonizaci. Za podmínek kultivace v kapalném médiu však mikroorganismy nejsou nuceny aktivovat geny kontrolující produkci

zkoumaných bílkovin. Byla proto ověřována produkce lektinu epidemickými kmeny *B. cenocepacia* při kultivaci na pevných půdách. Jako živná média byla použita PS a LB média. Přítomnost lektinu ve vzorcích byla ověřována použitím metody Western blot. Bylo prokázáno, že za daných podmínek kultivace bakterie produkují lektin na obou pevných mediích. Vzorky bakteriálních kultur byli zpracovány dvěma způsoby. Jednak před sonikací byl k peletě buněk přidán vzorkový pufr a provedena centrifugace, jednak ke vzorku byl přidán ihned lyzáční pufr a provedena sonikace. Z výsledků vyplývá, že způsob zpracování kultury nemá vliv na další detekci lektinu.

6 SOUHRN

- Byla provedena izolace specificky produkovaných slepičích imunoglobulinů proti BC2L-A a imunochemickou metodou ELISA byla ověřena jejich imunoreaktivita vůči rekombinantnímu lektinu. Imunizační schéma provedené s dávkou 3x 100 µg lektinu/zvíře nebylo zcela účinné.
- Afinitní purifikací došlo k obohacení původní frakci a podařilo se získat 2058 µg specifických protilátek, což odpovídá 0,2 % z celkového množství izolovaných imunoglobulinů.
- Bylo prokázáno, že při kultivaci epidemických kmenů bakterie *Burkholderia cenocepacia* na agarových plotnách dochází k produkci lektinu. Během kultivace v kapalném médiu přítomnost lektinu nebyla prokázána.
- Způsob zpracování vzorků bakteriální kultury nemá vliv na další detekci lektinu. Byli získány stejné výsledky jak při sonikaci buněk se vzorkovým pufrem, tak s použitím lyzáčního pufre.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Bednář, M.; Fraňková, V.; Schindler, J.; Souček, A.; Vávra, J.: *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha, Marvil 1996.
2. Jimenez, L.: Molecular diagnosis of microbial contamination in cosmetic and pharmaceutical products: a review. *J. AOAC Int.* **84**, 671 – 675 (2001).
3. Moore, J. E.; McIlhatton, B.; Shaw, A.; Murphy, P. G.; Elborn, J. S.: Occurrence of *Burkholderia cepacia* in foods and waters: clinical implications for patients with cystic fibrosis. *J. Food Prot.* **64**, 1076 – 1078 (2001).
4. Burkholder, W. H.: Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* **40**, 115 – 117 (1950).
5. Isles, A.; Maclusky, I.; Corey, M.; Gold, R.; Prober, C.; Fleming, P.; Levison, H.: *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J. Pediatr.* **104**, 206 – 210 (1984).
6. O'Neil, K. M.; Herman, J. H.; Modlin, J. F.; Moxon, E. R.; Winkelstein, J. A.: *Pseudomonas cepacia*: an emerging pathogen in chronic granulomatous disease. *J. Pediatr.* **108**, 940 – 942 (1986).
7. Hobson, R.; Gould, I.; Govan, J. R.: *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* as a cause of brain abscesses secondary to chronic suppurative otitis media. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**, 908 – 911 (1995).
8. Govan, J. R.; Deretic, V.: Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* **60**, 539 – 574 (1996).
9. Vandamme, P.; Holmes, B.; Vancanneyt, M.; Coenye, T.; Hoste, B.; Coopman, R.; Revets, H.; Lauwers, S.; Gillis, M.; Kersters, K.; Govan, J. R.: Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 1188 – 1200 (1997).
10. Coenye, T.; Vandamme, P.; Govan, J. R.; LiPuma, J. J.: Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3427 – 3436 (2001).

11. Mahenthiralingam, E.; Vandamme, P.; Campbell, M. E.; Henry, D. A.; Gravelle, A. M.; Wong, L. T.; Davidson, A. G.; Wilcox, P. G.; Nakielna, B.; Speert, D. P.: Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 1469 – 1475 (2001).
12. Govan, J. R.; Brown, P. H.; Maddison, J.; Doherty, C. J.; Nelson, J. W.; Dodd, M.; Greening, A. P.; Webb, A. K.: Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet* **342**, 15 – 19 (1993).
13. Ensor, E.; Humphreys, H.; Peckham, D.; Webster, C.; Knox, A. J.: Is *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* disseminated from cystic fibrosis patients during physiotherapy? *J. Hosp. Infect.* **32**, 9 – 15 (1996).
14. Leitão, J. H.; Sousa, S. A.; Ferreira, A. S.; Ramos, C. G.; Silva, I. N.; Moreira, L. M.: Pathogenicity, virulence factors, and strategies to fight against *Burkholderia cepacia* complex pathogens and related species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 31 – 40 (2010).
15. Kooi, C.; Subsin, B.; Chen, R.; Pohorelic, B.; Sokol, P. A.: *Burkholderia cenocepacia* ZmpB is a broad-specificity zinc metalloprotease involved in virulence. *Infect. Immun.* **74**, 4083 – 4093 (2006).
16. Whitby, P. W.; Vanwagoner, T. M.; Springer, J. M.; Morton, D. J.; Seale, T. W.; Stull, T. L.: *Burkholderia cenocepacia* utilizes ferritin as an iron source. *J. Med. Microbiol.* **55**, 661 – 668 (2006).
17. Venturi, V.; Friscina, A.; Bertani, I.; Devescovi, G.; Aguilar, C.: Quorum sensing in the *Burkholderia cepacia* complex. *Res. Microbiol.* **155**, 238 – 244 (2004).
18. Cescutti, P.; Bosco, M.; Picotti, F.; Impallomeni, G.; Leitão, J. H.; Richau, J. A.; Sá-Correia, I.: Structural study of the exopolysaccharide produced by a clinical isolate of *Burkholderia cepacia*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 1088 – 1094 (2000).
19. Riedel, K.; Hentzer, M.; Geisenberger, O.; Huber, B.; Steidle, A.; Wu, H.; Høiby, N.; Givskov, M.; Molin, S.; Eberl, L.: N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* **147**, 3249 – 3262 (2001).

20. Ferreira, A. S.; Leitão, J. H.; Silva, I. N.; Pinheiro, P. F.; Sousa, S. A.; Ramos, C. G.; Moreira, L. M.: Distribution of cepacian biosynthesis genes among environmental and clinical *Burkholderia* strains and role of cepacian exopolysaccharide in resistance to stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 441 – 450 (2010).
21. Votava, M.: *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno, Neptun 2003.
22. Loutet, S. A.; Valvano, M. A.: Extreme antimicrobial peptide and polymyxin B resistance in the genus *Burkholderia*. *Front. Microbiol.* **2** (2011).
23. Podnecky, N. L.; Rhodes, K. A.; Schweizer, H. P.: Efflux pump-mediated drug resistance in *Burkholderia*. *Front. Microbiol.* **6** (2015).
24. Saldías, M. S.; Valvano, M. A.: Interactions of *Burkholderia cenocepacia* and other *Burkholderia cepacia* complex bacteria with epithelial and phagocytic cells. *Microbiology* **155**, 2809 – 2817 (2009).
25. El Chakhtoura, N. G.; Saade, E.; Wilson, B. M.; Perez, F.; Papp-Wallace, K. M.; Bonomo, R. A.: A 17-year nationwide study of *Burkholderia cepacia* complex bloodstream infections among patients in the United States Veterans Health Administration. *Clin. Infect. Dis.* **65**, 1253 – 1259 (2017).
26. Šulák, O.; Cioci, G.; Lameignère, E.; Balloy, V.; Round, A.; Gutsche, I.; Malinovská, L.; Chignard, M.; Kosma, P.; Aubert, D. F.; Marolda, C. L.; Valvano, M. A.; Wimmerová, M.; Imberty, A.: *Burkholderia cenocepacia* BC2L-C is a super lectin with dual specificity and proinflammatory activity. *PLoS Pathog.* **7** (2011).
27. Esko, J. D.; Sharon, N.: *Essential of Glycobiology*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbour 2009.
28. Marchetti, R.; Malinovská, L.; Lameignère, E.; Adamova, L.; de Castro, C.; Cioci, G.; Stanetty, C.; Kosma, P.; Molinaro, A.; Wimmerová, M.; Imberty, A.; Silipo, A.: *Burkholderia cenocepacia* lectin A binding to heptoses from the bacterial lipopolysaccharide. *Glycobiology* **22**, 1387 – 1398 (2012).
29. Lameignère, E.; Malinovská, L.; Sláviková, M.; Duchaud, E.; Mitchell, E. P.; Varrot, A.; Sedo, O.; Imberty, A.; Wimmerová, M.: Structural basis for mannose recognition by a lectin from opportunistic bacteria *Burkholderia cenocepacia*. *Biochem. J.* **411**, 307 – 318 (2008).
30. Vávrová, V.: *Cystická fibrosa*. Praha, Grada Publishing 2006.

31. Vávrová, V.; Bartošová J.: *Cystická fibrosa: příručka pro nemocné a jejich rodiče*. 2. dopl. vyd. Praha, Professional Publishing 2009.
32. Riordan, J. R.; Rommens, J. M.; Kerem, B.; Alon, N.; Rozmahel, R.; Grzelczak, Z.; Zielenski, J.; Lok, S.; Plavsic, N.; Chou, J. L.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066 – 1073 (1989).
33. Devidas, S.; Guggino, W. B.: CFTR: domains, structure, and function. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 443 – 451 (1997).
34. Zhang, W.; Zhang, Z.; Zhang, Y.; Naren, A. P.: CFTR-NHERF2-LPA₂ complex in the Airway and Gut Epithelia. *Int. J. Mol. Sci.* **18** (2017).
35. Davis, P. B.: *Pathophysiology of the lung disease in cystic fibrosis*. New York, Marcel Dekker 1993.
36. Hull, J.: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction and its treatment. *J. R. Soc. Med.* **105** (2012.)
37. Rafeeq, M. M.; Murad, H. A. S.: Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *J. Transl. Med.* **15** (2017).
38. Gomella, T. L.; Cunningham, M. D.; Eyal, F. G.; Zenk, K. E.: *Neonatology: Management, procedures, on-call problems, diseases, and drugs*. 5th ed. New York, Lange Medical Books 2004.
39. Yen, E. H.; Leonard, A. R.: *Nutrition in cystic fibrosis: a guide for clinicians*. New York, Springer International Publishing 2015.
40. Filbrun, A. G.; Lahiri, T.; Ren, C. L.: *Handbook of cystic fibrosis*. New York, Springer International Publishing 2016.
41. Hořejší, V.; Bartůňková, J.: *Základy imunologie*. 3 vyd. Praha, Triton 2005.
42. Chapel, H.; Haeney, M.; Misbah, S.; Snowden, N.: *Základy klinické imunologie*. 6. vyd. Praha, Triton 2018.
43. Bals, R.; Weiner, D. J.; Wilson, J. M.: The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Invest.* **103**, 303 – 307 (1999).
44. Abbas, A. T.; El-Kafrawy, S. A.; Sohrab, S. S.; Azhar, E. I. A.: IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Hum. Vaccin. Immunother.* **15**, 264 – 275 (2019).

45. Dávalos-Pantoja, L.; Ortega-Vinuesa, J. L.; Bastos-González, D.; Hidalgo-Alvarez, R.: A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **11**, 657 – 673 (2000).
46. Gassmann, M.; Thömmes, P.; Weiser, T.; Hübscher, U.: Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* **4**, 2528 – 2532 (1990).
47. Kollberg, H.; Carlander, D.; Olesen, H.; Wejåker, P. E.; Johannesson, M.; Larsson, A.: Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. *Pediatr. Pulmonol.* **35**, 433 – 440 (2003).
48. Müller, S.; Schubert, A.; Zajac, J.; Dyck, T.; Oelkrug, C.: IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. *Nutr. J.* **14** (2015).
49. Scanlin, T. F.; Glick, M. C.: Terminal glycosylation in cystic fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1455**, 241 – 253 (1999).
50. Hodek, P.; Trefil, P.; Simunek, J.; Hudecek, J.; Stiborova, M.: Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. *Int. J. Electrochem. Sci.* **8**, 113 – 124 (2013).
51. Salloum, T.; Nassour, E.; Araj, G. F.; Abboud, E.; Tokajian, S.: Insights into the genome diversity and virulence of two clinical isolates of *Burkholderia cenocepacia*. *J. Med. Microbiol.* **67**, 1157 – 1167 (2018).