

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



MICHAELA AUGUSTÍNOVÁ

Studium profylaktického účinku glykoklastrů na modelu bakteriální adherence

Study on glycocluster prophylaxis by using a bacterium adherence model

Bakalářská práce

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

Praha, 2021

Prohlášení:

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

V Praze

Podpis

Poděkování:

V první řadě bych ráda poděkovala prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za možnost zúčastnit se na tomhle výzkumu, za cenné rady a odborné vedení při zpracování mé bakalářské práce.

Za pomoc a spolupráci během experimentální činnosti děkuji svým kolegyním Kateřině Vyhnalové a Veronice Supové. Také děkuji paní laborantce Anně Ammerové za její velkou ochotu a technickou podporu.

Abstrakt:

Cystická fibróza (CF) je autozomálně recesivní dědičné onemocnění, které vzniká mutací *CFTR* genu kódujícího CFTR protein sloužící v těle jako iontový kanál. Pro pacienty s CF je typická zvýšená adherence bakterií k plicnímu epitelu způsobená vznikem velmi hustého hlenu pokrývajícího povrch dýchacích cest a pozměněnou glykosylací v plicích. Tyto podmínky zvyšují citlivost pacientů s CF k bakteriálním infekcím plic působeným zejména *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Významnou roli v patogenitě PA hrají její virulentní faktory jako jsou například lektiny PA-IL a PA-IIL, které umožňují adhezi PA na hostitelské buňky vazbou na jejich povrchové receptory obsahující D-galaktosu (PA-IL) nebo L-fukosu (PA-IIL). V této práci bylo hlavním cílem ověřit schopnost daných anti-PA-IIL slepičích protilátek a multivalentních inhibitorů PA-IIL (konkrétně tzv. glykoklastrů na bázi fukosy) zabránit adherenci PA na plicní epiteliální buňky a tím u pacientů s CF zamezit PA infekcím.

Profylaktický účinek obou antiadhezivních agens (protilátky anti-PA-IIL, fukosylované glykoklastry) byl studován *ex vivo* na modelovém systému immortalizovaných plicních epiteliálních buněčných linií CuFi-1 izolovaných od nemocného s CF a NuLi-1 izolovaných od zdravé osoby. Pro adhezní test byl jako bakteriální model použit kontrolní kmen bakterií PA (ST 1763). Plicní epiteliální buňky i bakteriální buňky byly pro spektrofluorimetrické vyhodnocení fluorescenčně značeny PKH barvivou.

Pro experimenty byly vybrány různé frakce IgY protilátek proti PA-IIL lektinu. U linií CuFi-1 IgY izolované frakce před a po imunizaci slepice nevykazovali žádný efekt. Naopak u jiné specifické anti-PA-IIL protilátky byl protektivní efekt vůči adhezi PA na epiteliální buňky potvrzen.

Další studované antiadhezivní látky byly syntetické glykoklastry cílené na lektin PA-IIL. Schopnost ovlivnit adhezi PA k plicním epiteliálním buňkám vykazoval u linií CuFi-1 jak tetravalentní glykoklastr, tak ve vyšších koncentracích i divalentní glykoklastr. Multivalentní inhibitory na bázi fukosy tak představují potenciální prostředek prevence infekcí způsobených PA.

Klíčová slova: cystická fibrosa, plicní epiteliální buňky, *Pseudomonas aeruginosa*, lektin PA-IIL, slepičí protilátky IgY, glykoklastry

Abstract:

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by the mutations of the *CFTR* gene encoding CFTR protein which serves like a field ion channel in the body. For the patients suffering from CF is a typical increased adherence of bacteria to lung epithelium caused by the accumulation of thickened mucus on the surface of air passages and varied glycosylation in lungs. These conditions increase sensitivity of patients who suffer from CF to bacterial infections of lungs caused by *Pseudomonas aeruginosa* (PA). A considerable role in the pathogenicity of PA plays its virulent factors such as for example PA-IL and PA-IIL lectins, which enable an adherence of PA on the host cells joining on its surface receptors containing D-galactose (PA-IL) or L-fucose (PA-IIL). In this thesis the main aim was to verify an ability of given anti-PA-IIL chicken antibodies and multivalent PA-IIL inhibitors (specifically of the so-called fucose-based glycoclaters) to prevent PA adherence on lung epithelial cells and to stop from a formation of the PA infections at the patients.

A prophylactic impact both antiadhesive agents (anti-PA-IIL antibodies, fucose-based glycoclaters) was studied *ex vivo* on the model system of immortalized lung epithelial cell lines CuFi-1 isolated from the ill patients with CF and NuLi-1 isolated from the healthy individuals. For the adhesive test was as a bacterial model used a control base of bacteria PA (ST 1763). Lung epithelial cells and bacterial cells were fluorescently labeled with PKH dyes.

For the experimental realizations were chosen various fractions IgY antibodies targeting at PA-IIL lectin. At the lines of CuFi-1 IgY isolated fractions before and after immunization of chicken did not show any effect. By contrast, at another specific anti-PA-IIL antibody was confirmed protective effect against PA adhesion on epithelial cells.

Other studied antiadhesive substances were synthetic glycoclaters also targeting at lectin PA-IIL. The ability to influence the adherence PA to lung epithelial cells showed at the lines of CuFi-1 as tetravalent glycoclaster as well as divalent glycoclaster in higher concentration too. Fucose-based multivalent PA-IIL inhibitors present potential facility of prevention of the infections caused by PA.

Key words: cystic fibrosis, lung epithelial cells, *Pseudomonas aeruginosa*, lectin PA-IIL, chicken antibodies IgY, glycoclaters.

Obsah:

Seznam zkratk:	1
1. Úvod:	2
1.1 Cystická fibróza	2
1.2 <i>CFTR</i> gen	2
1.3 <i>CFTR</i> protein	4
1.4 Dědičnost	5
1.5 Projevy onemocnění CF a jejich patofyziologická podstata	6
1.6 Diagnostika onemocnění	8
1.7 Léčba	9
1.8 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.8.1 Virulentní faktory <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
1.8.1.1 Bakteriální lektiny	13
1.8.2 Rezistence na antibiotika	15
1.9 Inhibitory lektinů PA-IL a PA-III	16
1.9.1 Slepíčí protilátky	16
1.9.2 Multivalentní inhibitory na bázi sacharidů	18
1.9.2.1 Glykoklastry	20
2. Cíl práce:	23
3. Materiál a metody:	24
3.1 Použitý materiál, chemikálie a přístroje	24
3.1.1 Přístroje	24
3.1.2 Materiál a chemikálie	25
3.2 Metody práce s tkáňovými kulturami	26
3.2.1 Příprava kultivačních láhví s kolagenem	26
3.2.2 Rozmrazení buněčných linií	27
3.2.3 Kultivace buněčných linií	28

3.2.4 Subkultivace buněčných linií	28
3.2.5 Určení počtu a viability buněk	29
3.2.6 Zamrazení buněčných linií	30
3.3 Metody práce s <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
3.3.1 Rozmrazení a kultivace PAK	31
3.3.2 Stanovení množství PAK v suspenzi	31
3.3.3 Zamrazení PAK.....	31
3.4 Fluorescenční značení	31
3.4.1 Fluorescenční značení buněčných linií pomocí barviva PKH67.....	32
3.4.2 Fluorescenční značení bakterií pomocí barviva PKH26	33
3.5 Adhezní test.....	34
4. Výsledky:	37
4.1 Adhezní testy.....	37
4.1.1 Adhezní testy se slepičími protilátkami	37
4.1.2 Adhezní testy s multivalentními glykoklastry.....	39
4.2 Mikroskopická pozorování.....	44
5. Diskuse:	46
6. Souhrn:	50
7. Seznam použité literatury:.....	51

Seznam zkratek:

ABC	„ATP-binding cassette“, doména vázající ATP
ASL	„airway surface liquid“, povrchová kapalina dýchacích cest
ATP	adenosintrifosfát
bp	„base pair“, pár bází
CF	cystická fibróza
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“, transmembránový regulátor vodivosti vyskytující se u pacientů s CF
DMSO	dimethylsulfoxid
ENaC	„epithelial sodium channel“, epitelový sodíkový kanál
Fab	„fragment antigen binding“
FBS	fetální telecí sérum
Fc	„fragment crystallizable“
Ig	imunoglobulin
IRT	imunoreaktivní trypsin
kb	kilobáze
MDR	„multidrug-resistant“, odolný vůči více lékům
MSD	„membrane spanning domains“
NBD	„nucleotide binding domains“, nukleotid-vázající doména
ORCC	„outwardly rectified chloride channel“
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-IL, PA-IIL	lektiny <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	„phosphate buffered saline“
PSL	„periciliary liquid“, mezirasinková kapalina
R	„regulatory domain“, regulační doména
RPM	počet otáček za minutu

1. Úvod:

1.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF), dříve také mukoviscidóza, je autozomálně recesivní genetické onemocnění, které postihuje mnoho orgánů v těle, mezi ty hlavní patří dýchací cesty, plíce a pankreas. Je nejčastější letální chorobou indoevropského obyvatelstva, která je geneticky podmíněná¹. Vyskytuje se u jednoho z 2500-4500 narozených dětí². V České republice je známých přibližně 500 nemocných, avšak z důvodu nesprávného diagnostikování nemocných může být uvedené číslo vyšší³.

Toto závažné dědičné onemocnění je vyvolané poruchou genu *CFTR* (z angl. „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) objeveném v roce 19893, který kóduje protein se stejným názvem. Vzniká tak *CFTR* protein se změněnou strukturou, a tedy i omezenou funkcí. Odhadované množství nosičů mutované genové alely činí 3-4 % celé populace¹. Přestože se díky terapeutickým postupům moderní medicíny průměrné dožití pacientů s CF prodloužilo a kvalita jejich života značně zvýšila, tato nemoc bohužel nadále zůstává nevléčitelnou³.

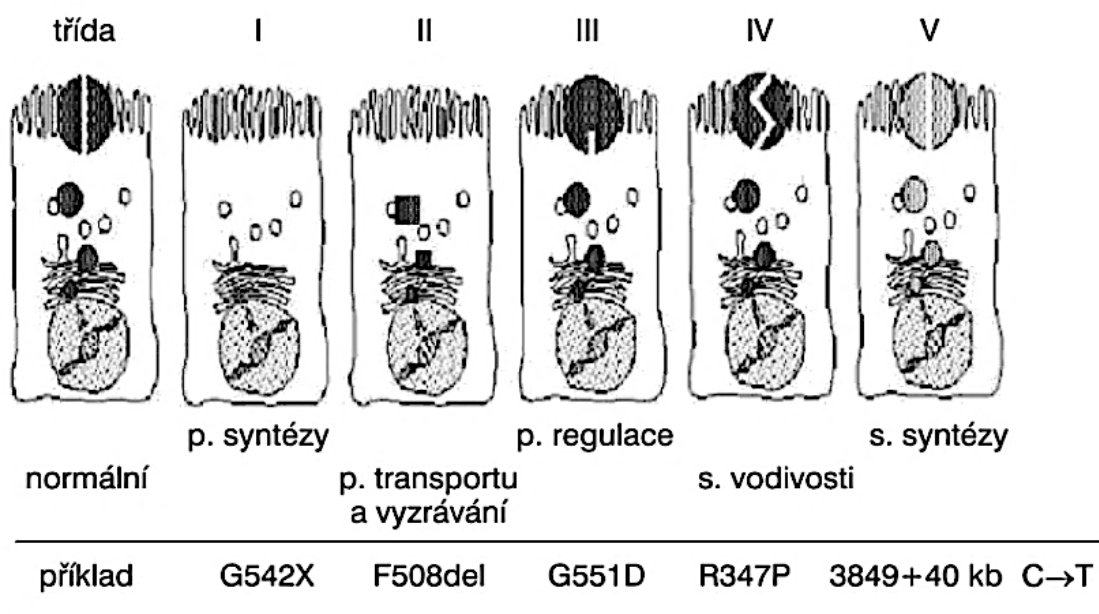
1.2 *CFTR* gen

CFTR gen, který je zodpovědný za CF, je umístěn na dlouhém raménku lidského chromozomu 7 v oblasti q31-q32. Tento gen byl nedávno identifikován a ukázalo se, že má velikost přibližně 250 kb a obsahuje 27 kódujících exonů⁴.

Doposud je známo přes 1500 jeho mutací³. Prakticky se jedná pouze o germinální mutace, tj. zárodečného původu, které se tedy vyskytují ve všech buňkách jedince. Somatické mutace, které se například vyskytují u nádorů, nebyly v *CFTR* genu zatím popsány. Mutace v *CFTR* genu jsou přenášeny z generace na generaci, což je řadí mezi mutace tzv. ancestrální povahy⁵. Velmi často se projevují v regulační doméně (z angl. „regulatory domain“, R) nebo v nukleotid-vázajících doménách (z angl. „nucleotide binding domains“, NBD), které jsou

z hlediska funkce a struktury proteinu důležité⁶. Na základě funkčního dopadu různých mutací *CFTR* genu na CFTR protein řadíme tyto mutace do 5 základních tříd (obrázek č. 1):

1. třída I – mutace narušující syntézu proteinu CFTR, který pak chybí na apikální membráně
2. třída II – mutace narušující maturaci (tj. správná posttranslační glykosylace a výsledná terciární konformace) CFTR proteinu a jeho transport na apikální membránu
3. třída III – mutace narušující aktivaci nebo regulační funkce CFTR proteinu sloužícího jako chloridový kanál
4. třída IV – mutace snižující vodivost chloridového kanálu CFTR proteinu
5. třída V – mutace redukující syntézu, zhoršující intracelulární transport a snižující množství funkčního CFTR proteinu na membráně.



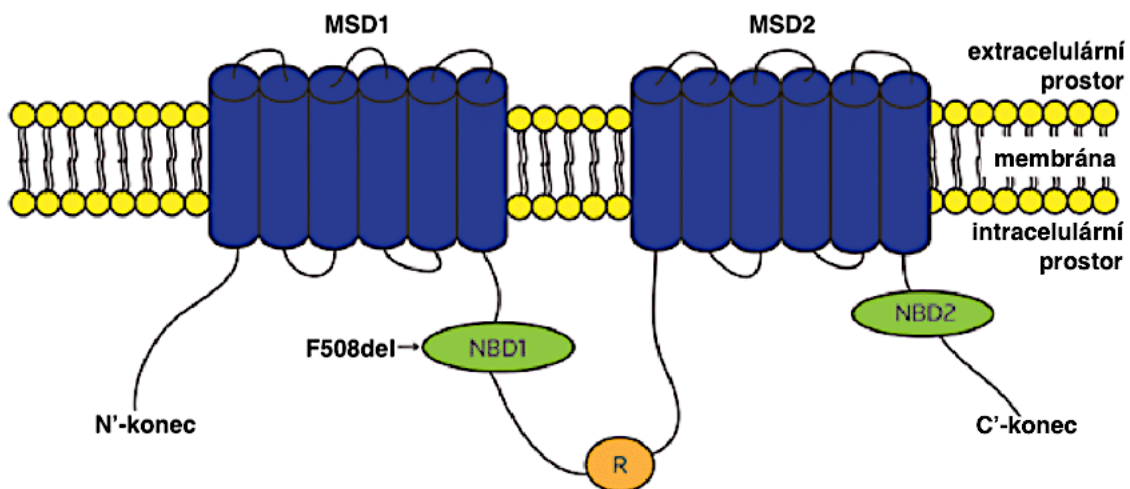
Obrázek č. 1 – Patogenetické třídy mutací *CFTR* genu. Zkratka: p – porucha funkce, s – snížení funkce CFTR proteinu. Ke každé povaze dysfunkce CFTR proteinu je uvedený jeden příklad mutace. Obrázek byl převzat a upraven⁵.

Nejčastější mutací genu u pacientů s CF je delece 3 bp (z angl. „base pair“, pár bází) vedoucí ke ztrátě fenylalaninu (F) na pozici 508 v proteinu CFTR – označení Δ F508. Jak můžeme vidět na obrázku č. 1 (str. 3) tento typ mutace patří do třídy II, kde vzniká

nesprávně složený CFTR protein, který následně není transportován na apikální membránu buňky⁵.

1.3 CFTR protein

Na základě primární struktury CFTR protein řadíme do ABC nadrodiny (z angl. „ATP-binding cassette“, vázající ATP) transportních proteinů. Tato nadrodina je specifická tím, že její členové využívají energii z hydrolyzy ATP na aktivní transport molekul přes membránu buňky. CFTR protein má funkci iontového kanálu⁷. Zároveň je schopný regulovat funkci resorpčního epitelového sodíkového kanálu ENaC (z angl. „epithelial sodium channel“) a také chloridového kanálu ORCC (z angl. „outwardly rectified chloride channel“). Tento protein se skládá z transmembránových domén MSD1 a MSD2 (přičemž každá z nich obsahuje 6 α -helixů), dále z nukleotid-vázajících domén NBD1 a NBD2 plus regulační domény R, které se nacházejí v intracelulárním prostoru buňky⁵ (obrázek č. 2). Domény MSD1 a MSD2 vlastní chloridový kanál ukotvují v apikální membráně buňky. Průtok iontů tímto chloridovým kanálem regulují svými konformačními změnami právě domény NBD1 a NBD2 (obsahující vazebná místa pro ATP)⁸. Prostřednictvím fosforylace regulační domény R proteinkinasou a následnou hydrolyzou ATP na povrchu NBD1 a NBD2 je protein CFTR aktivován cAMP⁵.



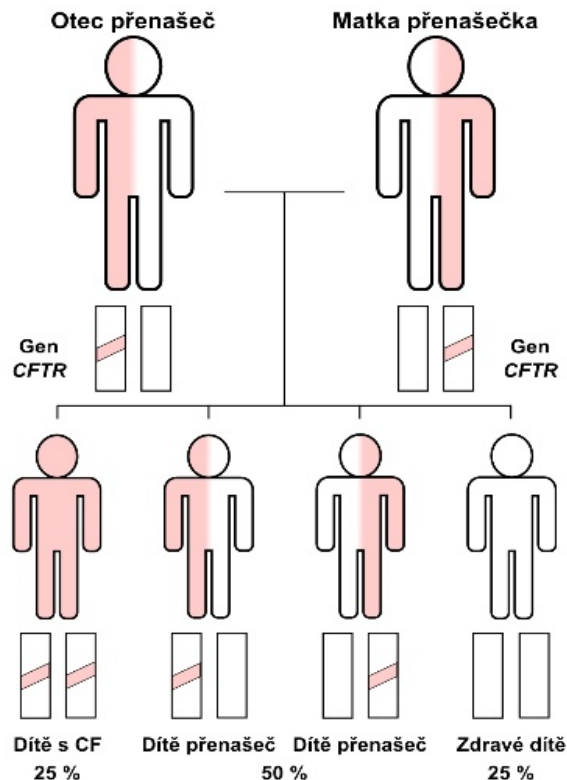
Obrázek č. 2 – Struktura CFTR proteinu, který je složený ze dvou transmembránových domén (MSD1, MSD2). Tyto domény jsou spojené regulační doménou (R), plus každá z nich obsahuje nukleotid-vázající doménu (NBD1, NBD2). Taktéž je znázorněno, že k nejčastější mutaci u pacientů s CF ($\Delta F508$) dochází v doměně NBD1. Obrázek byl převzat a upraven⁹.

CFTR protein se vyskytuje na již zmíněné apikální membráně epitelálních buněk, kde zabezpečuje transport elektrolytů (sekrece Cl^- a HCO_3^- u buněk střeva, pankreatu, plic nebo zpětná absorpce solí u buněk potních žláz) a transepiteliální tekutiny⁸. V důsledku porušení CFTR proteinu, fungujícího jako chloridový kanál, dochází k abnormálnímu transportu chloridových a sodíkových iontů přes membrány epitelálních buněk, čímž se naruší hydratace mukoidních sekretů dýchacích cest a pankreatu, což následně směřuje k řadě dalších poruch v těle pacienta s CF⁵.

1.4 Dědičnost

CF je autozomálně recesivní onemocnění, které se projeví pouze tehdy, když jsou přítomny dva mutované rodičovské *CFTR* geny. Člověk, který má jen jeden mutovaný *CFTR* gen se pokládá za zdravého přenašeče, a to proto, že jeho nemutovaná alela svou aktivitou vyváží funkci mutované alely⁵.

Když si znázorníme situaci, kdy jsou oba rodiče přenašeči mutace (tedy každý má jeden mutovaný *CFTR* gen), tak je 25 % pravděpodobnost, že se narodí dítě s CF (oba geny jsou mutované), 50 % pravděpodobnost, že dítě bude zdravý přenašeč (pouze jeden mutovaný gen) nebo 25 % možnost, že se narodí dítě, které bude úplně zdravé (nebude mít ani jeden mutovaný gen)¹⁰ (obrázek č. 3, str. 6).



Obrázek č. 3 – Dědičnost mutace *CFTR* genu z rodičů na děti. Pokud jsou oba rodiče zdravý přenašeči s jedním mutovaným genem *CFTR*, tak je 25 % pravděpodobnost narození dítěte s CF, 50 % pravděpodobnost, že dítě bude přenašeč, tedy zdravý s jedním mutovaným genem *CFTR*, který pak může předat svým potomkům. Poslední možností je 25 % pravděpodobnost narození úplně zdravého dítěte nemajícího žádný mutovaný *CFTR* gen. Obrázek byl převzat a upraven¹⁰.

1.5 Projevy onemocnění CF a jejich patofyziologická podstata

CF má velmi variabilní průběh – příznaky CF a jejich závažnost se u jednotlivých pacientů značně liší. Prakticky u většiny nemocných se vyskytují problémy s dýchacím ústrojím, které u každého mohou vyjít najevo různě v průběhu života. Projevy poruchy trávení se objevují u 80-85 % nemocných. Až u 99 % pacientů nalézáme zvýšený obsah solí v potu a až 98 % dospělých mužů trpí neplodností (může se ale vyskytovat i u žen).

Mezi obecné příznaky spojené s dýchacím ústrojím patří hlavně dráždivý kašel nebo vykašlávání hustého hlenu, zrychlené či ztížené dýchání, dušnost, u dětí častý soudkovitý hrudník nebo paličkovité prsty. Další onemocnění, která postihují dýchací cesty jsou

bronchitidy (opakované záněty průdušek), pneumonie (opakované záněty plic), záněty vedlejších nosních dutin nebo nosní polypy.

V důsledku porušení zevní funkce slinivky břišní, která produkuje trávicí enzymy (trypsin, lipázy, amylázy), je u pacientů s CF v různém stupni narušen proces štěpení potravy. Hlavním důvodem je hustý hlen, který uzavře vývody pankreatu, a tak se enzymy nemohou dostat do střeva, kde štěpí jednotlivé složky potravy. Tím pádem jsou tyto složky jen částečně vstřebávány, přičemž ty zbývající podléhají hnilobným a kvasným reakcím, což může v některých případech vést ke vzniku nafouklého břicha kontrastujícího s hubenými končetinami. Nejčastěji jsou u pacientů s CF tráveny tuky, což vede k vylučování objemné a páchnoucí stolice obsahující tukové kapénky. Dále z nedostatečného množství bílkovin (albuminu) v krvi mohou vznikat otoky. Kromě složek potravy se špatně vstřebávají i vitaminy, především ty, které jsou rozpustné v tucích (A, D, E, K). Častým projevem CF u novorozenců je vznik tzv. mekoniového ilea, také způsobeného hustým hlenem ve střevech.

Velmi běžným projevem CF je tvorba nápadně slaného potu. Při vysokých ztrátách solí dokonce může dojít k metabolickému šoku¹⁰.

Všechny výše uvedené klinické projevy CF jsou důsledkem již zmíněné mutace *CFTR* genu, která vede k porušení CFTR proteinu sloužícímu jako iontový kanál. Zdravý jedinec má tento CFTR kanál volně propustný, čímž zajišťuje správnou koncentraci iontů chloridu a sodíku v lumen exokrinních žláz a dýchacích cestách⁸. Díky vzniklému osmotickému gradientu může procházet přes plazmatickou membránu do lumen voda, která pak zabezpečuje dostatečnou hydrataci mukoidních sekretů a sliznic¹¹. Můžeme tedy tvrdit, že hlavní patologická podstata CF tkví v inaktivitě chloridových a v hyperaktivitě sodíkových kanálů⁸, což je spojeno s následnou dehydratací sliznice nebo mukoidních sekretů¹¹. Mnohé klinické projevy jsou právě způsobené touto změnou ve složení a ve vlastnostech hlenu na povrchu sliznic, který narušuje normální funkci orgánů¹².

Dýchací cesty jsou vystlané řasinkovým epitelem pokrytým tzv. ASL (z angl. „airway surface liquid“, povrchová kapalina dýchacích cest), jejíž součástí je tzv. PCL (z angl. „periciliary liquid“, meziřasinková kapalina) o nízké viskozitě, ve které řasinky kmitají. Nad touto kapalinou se nachází vrstva hlenu (muciny v něm zabezpečují vazkost) zachycující vdechnuté nežádoucí látky, které jsou pohybem řasinek transportovány a odstraňovány – mluvíme o tzv. samočisticí schopnosti plic. Důsledkem poruchy CFTR proteinu dojde v plících

nemocného ke snižování množství solí a vody v hlenu a vyčerpání PCL, což vede k tvorbě velmi hustého hlenu (vznik tzv. hlenových plátů), který kromě toho, že brání pohybu řasinek a narušuje samočisticí schopnost plic, tak vytváří ideální prostředí pro růst bakterií^{10,13}. Zároveň zvýšená koncentrace solí v PCL kapalině inaktivuje antimikrobiální peptidy (např. β -defensin)¹². Dochází pak k navození závažných procesů – k infekci, zánětu a následné obstrukci dýchacích cest¹⁰.

Zvýšená adherence bakterií k plicnímu epitelu pacientů s CF je způsobená poruchou sialyzace a fukosylace glykokonjugátů v plazmatické membráně epiteliálních buněk. Také u glykoproteinů nacházejících se v hustém hlenu dochází ke změně jejich glykosylace. Pravděpodobně je to způsobeno abnormálním pH buněčných organel, především hyperacidifikace Golgiho aparátu^{5,14}.

Mezi hlavní systémy obrany organismu proti infekci patří buněčná imunita zprostředkovaná bílými krvinkami, které jednak zabraňují škodlivému působení bakterií tím, že je pohlcují a jednak uvolňují různé látky, které bakterie ničí. Po skončení této tzv. obranné práce se bílé krvinky rozpadnou a uvolní svou DNA. Tímto významně zvyšují vazkost už tak hustého hlenu a přispívají ke snížené samočisticí schopnosti plic. Navíc látky, které jsou vylučované bílými krvinkami ničí tkáň dýchacích cest, čím se podílejí na vzniku výdutí na průduškách – tzv. bronchiektázií¹⁰. Přesto, že získaná imunitní odpověď u pacientů s CF je nedostatečně účinná, imunitní systém jako celek není narušen⁵.

1.6 Diagnostika onemocnění

Kritérii pro diagnózu CF jsou především pozorovatelné klinické příznaky, rodinná anamnéza nebo pozitivní novorozenecký „screening“. Další důležitou součástí diagnostiky CF jsou laboratorní vyšetření, z nichž jsou v současné době používány tři metody – potní test, molekulárně genetické vyšetření, transepiteliální rozdíl potenciálů.

„Screeningové“ vyšetření je velmi vhodné pro časnou diagnostiku CF. Je založené na vyšetření tzv. imunoreaktivního trypsinu (IRT) ze suché kapky krve novorozence. Když je hodnota IRT zvýšená, indikuje se genetické vyšetření.

Ještě před novorozeneckým „screeningem“ může na CF ukazovat nález ultrazvukového vyšetření v 17.-20. týdnu gravidity, kdy je zvýšená echogenita v břišní krajině plodu jako známka mekoniového ilea¹.

Za pomoci potního testu zjišťujeme koncentraci chloridů v potu po stimulaci pocení polikarpinovou iontoforézou. Na rozdíl od klasického sběru potu do filtračních papírků se dnes používá sběr do kapiláry za pomoci systému Macroduct. Normální hodnoty koncentrace chloridů v potu jsou pod 30 mmol/l, hraniční hodnoty jsou v rozmezí 30-59 mmol/l. Výsledek testu je pokládán za pozitivní, pokud je hodnota koncentrace chloridů ≥ 60 mmol/l. Pacienti s atypickou formou CF, nositelé jedné mutace *CFTR* genu, zdravé osoby nebo jedinci trpící jinými onemocněními, jako insuficience nadledvin, mentální anorexie, celiakie, hypotyreóza a další, mají ve výsledku potního testu právě hraniční hodnoty koncentrace chloridu v potu¹⁵.

Molekulárně genetické vyšetření se provádí u pacientů s pozorovatelnými klinickými projevy CF, s hraničními nebo patologickými hodnotami chloridů v potu, u pokrevních příbuzných jedinců s alespoň jednou mutací *CFTR* genu, v případě plánovaného těhotenství i u jejich partnerů, dále u dárců gamet nebo u lidí s podezřením na „CFTR-related disease“ jako jsou například obstruktivní azoospermie, diseminované bronchiektázie a idiopatická rekurentní/chronická pankreatitida. Tato metoda je založena na vyšetření DNA izolované z leukocytů v odebrané krvi. Pozitivní výsledek dostaneme při nálezů mutace obou alel *CFTR* genu¹⁶.

Posledním laboratorním vyšetřením je měření bioelektrických potenciálů nosní sliznice (*in vivo*) či rektální sliznice (*ex vivo*) po aplikaci isoproterenolu nebo amiloridu sloužícímu k posouzení funkce CFTR proteinu. Nicméně v České republice ještě není tato metoda běžně dostupná¹⁷.

1.7 Léčba

Při léčení CF je potřebné si uvědomit, že toto onemocnění je komplexní a multisystémové, při kterém je vyžadovaná řádná znalost problematiky. Naneštěstí CF patří mezi nevléčitelné nemoci, jejichž léčba je pouze symptomatická – řešící jenom projevy, ne příčinu. Vkládají se však velké naděje do genové terapie, která by mohla vyřešit mutaci *CFTR*

genu, a tak zbavit pacienty jejich příznaků, pokud by byla aplikovaná v prenatálním nebo nejranějším stadiu rozvoje CF^{3,5}.

Léčba CF se zaměřuje na prodloužení a zabezpečení co nejvyšší kvality života pacienta. S tím souvisí zabránění endobronchiální infekci a udržení správné funkce plic po co nejdelší dobu, též zajištění správné výživy, která obsahuje vysokokalorickou stravu obohacenou o chybějící pankreatické enzymy. Je potřebné, aby pacienti z důvodu prevence před bakteriální infekcí dodržovali důsledný hygienicko-epidemiologický režim a tzv. centrovou péči.

Velká část terapie je orientovaná na hlavní klinické projevy CF, zejména na plicní onemocnění. Ke zlepšení průchodnosti dýchacích cest se využívá respirační fyzioterapie a inhalačně podávané mukoaktivní léky. Na ředění hlenu jsou rovněž vhodné látky obsahující enzym DNasu, který štěpí DNA rozpadlých bílých krvinek, a díky kterému je nemocný schopen sekret dýchacích cest lépe vykašlat. U pacientů s chronickou bakteriální infekcí (např. způsobenou *Pseudomonas aeruginosa*) je aplikovaná chronická supresní antibiotická a protizánětlivá léčba, která je také ve většině případů podávána inhalačně (když nedochází ke zlepšení, lze podat intravenózně). Antibiotická léčba je častokrát kombinovaná, dlouhodobá a užívaná ve vysokých dávkách. Úspěchem této antimikrobiální kúry je časná diagnostika infekce^{2,3}. Správný druh antibiotik je volen na základě přítomnosti daného mikroba v dýchacích cestách, proto je nezbytné pravidelné mikrobiologické vyšetření sputa. Je-li přítomná bakterie dobře citlivá na antibiotika (jako například „zlatý stafylokok“), mohou být podávána perorálně¹⁰.

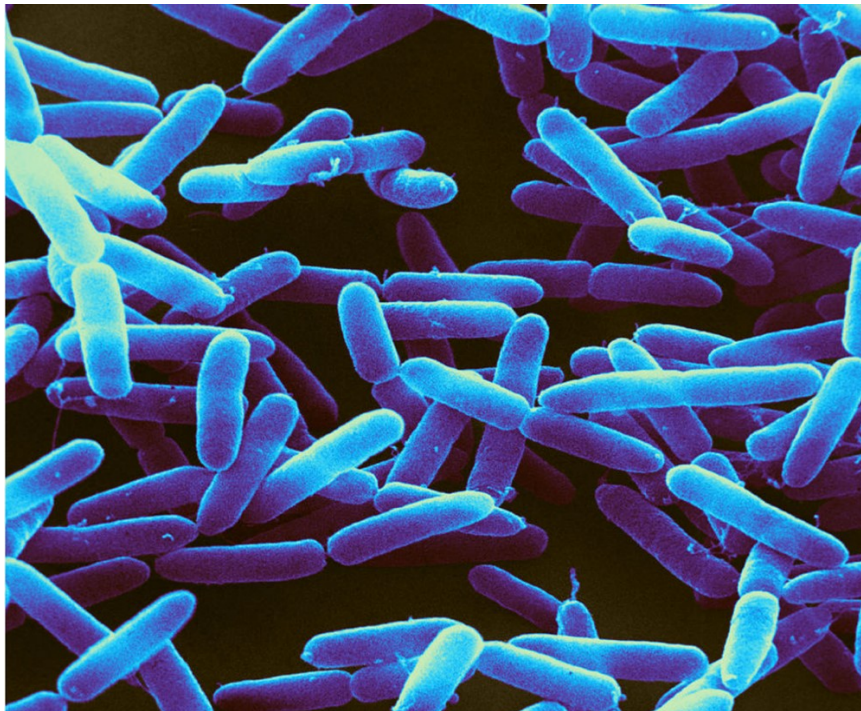
Další snaha výzkumných týmu je vytvořit funkční antipseudomonádovou vakcínu zabraňující u pacientů s CF kolonizaci *Pseudomonas aeruginosa*. Vytvářejí se vakcíny buď monovalentní, cílené na jednotlivé antigeny *Pseudomonas aeruginosa*, nebo polyvalentní proti více antigenům najednou. Velmi slibně se jeví monovalentní vakcína proti bičíkovým antigenům bakterie, nebo konjugativní vakcíny⁵.

Ve stavu, kdy plíce nejsou schopné plně okysličovat krev, se doporučuje dlouhodobá kyslíková terapie. Nedostatečné okysličení krve totiž může vést k zúžení cév v plicích, a tím k nadměrnému namáhání srdce, které pak pumpuje krev do užších cév než je obvyklé.

Pokud se stav nemocného zhorší natolik, že intenzivní výše popsaná léčba selhává a naděje na přežití déle než 1-1,5 roku mizí, jako řešení se volí transplantace plic¹⁰.

1.8 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (PA) je gramnegativní, pohyblivá, aerobní tyčinka, která je z rodu *Pseudomonas* klinicky nejvýznamnější. PA je typickým představitelem oportunních patogenů. Kromě rostlin a zvířat se vyskytuje i u lidí. Neohrožuje zdravé jedince, avšak u nemocných s CF a imunokompromitovaných pacientů způsobuje závažné infekce¹⁸. Tvar této bakterie je znázorněn na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4 – *Pseudomonas aeruginosa*. Snímek byl zachycen pomoci skenovacího elektronového mikroskopu. Obrázek byl převzat a upraven¹⁹.

I když PA nejlépe roste v rozmezí teplot 25-37 °C, je schopná růstu až při 42 °C, což ji pomáhá odlišit se od mnoha jiných druhů z rodu *Pseudomonas*. PA je ubikviterní mikroorganismus způsobilý přežít za různých podmínek okolního prostředí¹⁸. V přírodě se vyskytuje zejména v odpadních vodách a v menší míře v půdě. Ve velkých počtech bývá objevena v běžných potravinách jako je zelenina či ovoce. Stejně jako jiné bakteriální druhy, které se vyskytují v životním prostředí, PA kolonizuje širokou škálu povrchů – například nedostatečně dezinfikované respirační pomůcky či stomatologické náčiní, katetry, nechlórované bazény, hlavice sprch, vodovodní kohoutky a odpady nebo vířivky. V souhrnu můžeme tvrdit, že pro pacienty s CF je velkým rizikem právě vlhké prostředí, kde mohou být

infikováni. Tato tzv. všudypřítomnost PA byla připsaná jejímu všestrannému energetickému metabolismu a nízkým růstovým nárokům. Navíc přibližně 8 % z velkého genomu PA kóduje tzv. regulační geny, které umožňují bakterii přizpůsobit se různým složitým růstovým prostředím^{5,18,20}.

Nedávné epidemiologické studie prokazují, že PA je běžný nozokomiální kontaminant, což je typické zejména pro kmeny se zvýšenou rezistencí na antibiotika. Odhaduje se, že způsobuje 10-20 % tzv. nemocničních infekcí. Bakterie napadá jakoukoli tkáň ohroženou imunodeficiencí. PA je příčinou vzniku infekce dýchacích cest, močových cest, škály (dermis), měkkých tkání, kostí a kloubů, krve a gastrointestinálního traktu, obzvláště u pacientů s CF, závažnými popáleninami, transplantacemi orgánů, tuberkulózou, akutní leukémií nebo AIDS. U pacientů hospitalizovaných z důvodu CF, rakoviny nebo popálenin zapříčiňuje až 50 % úmrtnost^{21,22}. PA může kolonizovat i zdravé jedince, u kterých se však onemocnění málokdy projeví.

Při kultivaci se PA vyznačuje svými kovově lesklými koloniemi, které jsou mnohdy zčásti autolyzovány. Nejčastější jsou S (hladká) a R (drsná) disociační fáze, pro nemocné s CF jsou typické mukoidní kolonie.

1.8.1 Virulentní faktory *Pseudomonas aeruginosa*

Nejen změna prostředí v dýchacím traktu hostitele je důsledkem častého výskytu PA u pacientů s CF, ale významnou roli také hrají určité vlastnosti bakterie – její virulentní faktory. PA obsahuje celou řadu těchto faktorů zúčastňujících se na patogenitě. Rozdělujeme je na ty, které jsou vázané na buňku bakterie (extracelulární polysacharid, lipopolysacharid, poriny, fimbrie, bičíky, lektiny) a ty, které jsou extracelulárními produkty bakteriální buňky (pigmenty, enzymy, toxiny)²³.

PA má schopnost konvertovat se v mukoidní formu, a to díky tvorbě mukoidního exopolysacharidu nazývaného alginát, který je lineárním kopolymerem kyseliny β -D-mannurové a kyseliny α -L-gulonové. Alginát formuje kolem buňky bakterie ochranný obal, který má tendenci se spájet s alginátovými obaly sousedících buněk a tím vytvářet matici biofilmu (vyšší forma bakteriálního společenství). Tento exopolysacharid umožňuje bakteriím lépe se ukotvit k buňkám respiračního epitelu a vytvářet účinnou bariéru proti opsonizaci a

fagocytóze. Bakterie, které jsou součástí biofilmu vykazují též větší rezistenci k antibiotikům. Produkce alginátu je řízená přes tzv. „quorum sensing“ systém⁵.

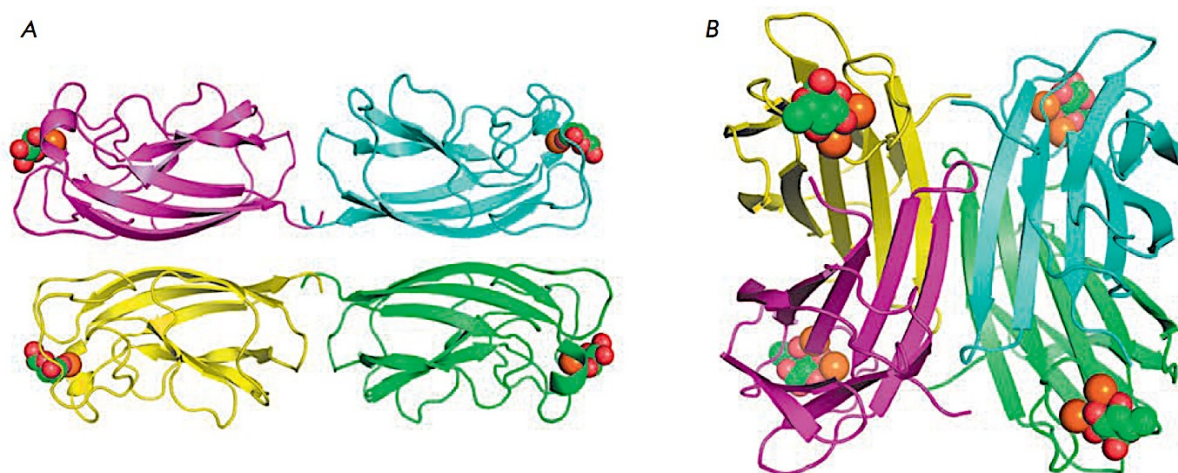
Složkou vnější membrány bakteriální buňky jsou lipopolysacharidy (LPS) a proteinové molekuly nazývané poriny, které mnohým látkám (dokonce i některým antibiotikům) zabraňují difúzi přes membránu do buňky. Součástí LPS je lipid A, který indukuje endotoxické vlastnosti LPS. LPS PA je méně toxický než u jiných gramnegativních tyčinek, což usnadňuje vznik chronických infekcí z důvodu vyvolání nízké zánětlivé odpovědi. Na virulenci bakterie se účastní polysacharidová část LPS, a to tak, že zprostředkovává adhezi na CFTR protein epiteliálních buněk. Další činitele adherence PA jsou pili typu IV zabezpečující vazbu na hostitelské buňky a polární bičíky, které kromě toho, že se váží na mucin epiteliálních buněk, se také zúčastňují na pohybu bakterie a tvorbě biofilmu^{18,22}.

Většina kmenů PA produkuje jeden nebo více pigmentů, z kterých nejznámější jsou pyocyanin (modrozelený), pyoverdin (žlutozelený a fluorescenční) a pyorubin (červenohnědý). Předchozí výzkumy naznačují, že pyocyanin nejenom přispívá k perzistenci PA v plicích pacientů s CF, ale také inhibuje některé mitochondriální enzymy, nebo narušuje pohyb řasinek, čím zhoršuje samočisticí schopnost dýchacích cest. Dalšími produkty PA uplatňujícími se v patogenitě jsou extracelulární enzymy, především proteolytické enzymy (štěpící kasein, fibrin, elastin a kolagen) nebo hemolytické enzymy (například hemolyzin s aktivitou C fosfolipasy nebo termostabilní glykolipid)^{18,23}. Ačkoli patogenezé PA byla připisána endotoxinu (LPS), nedávné důkazy naznačují, že exotoxin A (protein, extracelulární produkt bakteriální buňky) je ve skutečnosti nejtoxičtější složkou. Tento toxin inhibuje syntézu proteinů a může způsobit až buněčnou smrt²².

1.8.1.1 Bakteriální lektiny

Další významné virulentní faktory PA jsou lektiny – proteiny, které se v hojné míře vyskytují na vnější membráně bakteriální buňky, kde rozeznávají hostitelské glykokonjugáty a vážou se na jejich sacharidové struktury. Umožňují tak adhezi PA na hostitelské buňky. V plicích epiteliálních buňkách se na povrchové receptory obsahující D-galaktosu specificky váže lektin PA-IL (*Pseudomonas aeruginosa* I lectin) a na receptory obsahující L-fukosu lektin PA-IIL (*Pseudomonas aeruginosa* II lectin). Bylo zjištěno, že díky interakci s glykokonjugáty se tyto lektiny rovněž podílejí na tvorbě biofilmu²⁴.

Lektin PA-IIL (IecB) na rozdíl od PA-IL (IecA) postrádá ve své primární struktuře cystein, methionin a histidin. Kvarterní strukturu mají naopak totožnou. Vytvářejí komplex složený ze čtyř monomerních jednotek (obrázek č. 5). Zvláštností obou lektinů je vazba sacharidových ligandů prostřednictvím přímé interakce s ionty kovů. Interakce lektin-sacharidový ligand také zahrnuje vodíkové vazby mezi postranními řetězci aminokyselin a hydroxylovými skupinami monosacharidů. V PA-IL vytváří vazebné místo se selektivní specifitou pro galaktosu jeden vápenatý iont spolu s výše zmíněnou unikátní sítí vodíkových vazeb. Naproti tomu v PA-IIL se nachází místo se širokou specifitou pro vazbu různých monosacharidů (zejména pro fukosu nebo manosu) tvořené až dvěma ionty vápníku, které jsou schopné vázat s velmi vysokou afinitou. Každá monomerní jednotka těchto dvou lektinů má jedno vazebné místo, čili váže právě jednu molekulu příslušného ligandu²⁵.



Obrázek č. 5 – Kvarterní struktura lektinů PA-IL s galaktosou (A) a PA-IIL s fukosou (B). Znázorněné dva tetramerní komplexy, které mají jednotlivé monomery různě zbarvené. Vápenaté ionty tvořící vazebná místa lektinů jsou zobrazeny oranžovou barvou pomocí kuličkového modelu. Na vazebných místech můžeme pozorovat i navázané sacharidové ligandy (galaktosa pro PA-IL a fukosa pro PA-IIL), jejichž atomy kyslíku jsou červenou a atomy uhlíku zelenou barvou. Obrázek byl převzat a upraven²⁶.

V případě kontaktu PA s poškozenými či zanícenými tkáněmi, jako například u ran z popálení nebo u plic pacientů s CF, se PA může proměnit ve velmi agresivní patogen. Ve všech těchto případech je pozměněna glykosylace povrchů daných hostitelských buněk. U plicního epitelu pacientů s CF je zvýšená terminální fukosylace a snížená sialylace. Rovněž hlen pokrývající epitel dýchacích cest těchto nemocných, který se skládá především z mucinů (glykoproteiny obsahující 70-80 % sacharidů), vykazuje vyšší hladiny sialylovaných

a sulfatovaných oligosacharidů. Pravděpodobně všechny tyto aspekty významně přispívají k vazbě PA-III a tím usnadňují kolonizaci PA na hostitelském povrchu^{14,25}. Mnohé studie naznačují, že oba lektiny kromě toho, že specificky rozeznávají sacharidové struktury a účastní se na vazbě patogenu, se mohou chovat jako determinanty virulence. Bylo prokázáno, že PA-IL má na epitelální buňky dýchacích cest cytotoxický účinek tím, že snižuje jejich růst, a tak přispívá k poškozování těchto buněk²⁷. Na druhé straně PA-III blokuje pohyb řasinek, které zajišťují samočisticí schopnost plic²⁵.

Pro prevenci a léčbu infekcí způsobených PA se v poslední době navrhuje inhibice vazby lektinů PA-IL a PA-III, a to zejména kvůli vysoké stabilitě této vazby a nízkému riziku vzniku bakteriální rezistence. Vazbu lektinů na hostitelské buňky blokuje inhibitory, které obsahují specifické sacharidy. Patří mezi ně například deriváty monosacharidů, vícevazebné glykoklastry a dendrimery, přírodní glykoproteiny a polysacharidy, glykomimetické peptidy. Studie ukázaly, že účinně inhibují tvorbu biofilmu PA. Jejich speciální vlastností je tzv. vícevazebnost (z angl. „multivalence“), která výrazně zvyšuje afinitu a specifitu interakce mezi inhibitorem a lektinem^{24,26}. Další možnou variantou inhibitoru lektinů PA-IL a PA-III jsou specifické anti-lektinové protilátky, např. IgY připravené ze žloutků vajec imunizovaných slepic. Rovněž jako výše uvedené struktury se velmi účinně podílí na zabraňování navázání bakterie PA k epitelu plic²⁸.

1.8.2 Rezistence na antibiotika

Nozokomiální infekce způsobené PA se často těžko léčí jak kvůli vnitřní rezistenci PA vůči antibiotikům, tak pro její schopnost vyvinout další mechanismy rezistence na mnoho skupin antimikrobiálních látek (včetně aminoglykosidů, chinolonů a β -laktamů). PA představuje fenomén rezistence na antibiotika, který využívá téměř všechny známé enzymatické a mutační mechanismy bakteriální rezistence²⁹.

Vnitřní odolnost tohoto patogenu je dána nízkou permeabilitou vnější membrány, kterou PA jako každá gramnegativní bakterie obsahuje, expresí efluxních pump vylučujících antibiotika z buňky a produkcí enzymů inaktivujících antibiotika. Získaná odolnost PA může být dosažena mutačními změnami nebo získáním rezistentních genů horizontálním genovým přenosem. Mutační změny mohou způsobit sníženou absorpci antibiotika do bakteriální buňky

(zejména kvůli mutaci porinových proteinů vyskytujících se ve vnější membráně PA, které běžně zprostředkovávají difuzi hydrofilních antibiotik), modifikace cílových látek, nadměrnou expresí efluxních pump a enzymů inaktivujících antibiotika. Takto získaná rezistence výrazně přispívá k rozvoji kmenů odolných proti mnoha terapeutickým látkám (tzv. MDR kmeny – z angl. „multidrug-resistant“), které způsobují těžkosti při eradikaci PA a tím způsobují větší počet perzistentních infekcí. Adaptivní odolnost PA se týká tvorby biofilmu v plicích infikovaných pacientů, kde biofilm slouží jako difuzní bariéra pro omezení přístupu antibiotik k bakteriálním buňkám, a generování perzistentních buněk. Mukoidní kmeny, které jsou schopny tvořit biofilm a přežít útok antibiotik jsou zodpovědné za dlouhodobé a opakované infekce u pacientů s CF.

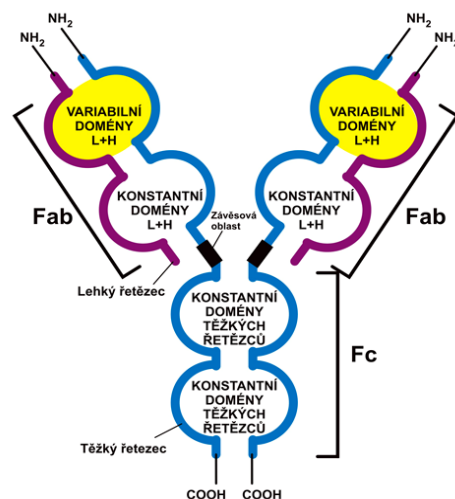
Prakticky u všech pacientů s CF se časem vyvine MDR kmen. Z tohoto důvodu se konvenční antibiotiky proti infekcím PA stávají stále méně efektivní. V dnešní době je jen několik částečně účinných druhů antibiotik, včetně fluorochinolonů, imipenemu a gentamicinu²⁴. V rámci současné léčby infekce způsobené PA se doporučuje použití různých kombinací antibiotik nebo vyvinutí dalších účinnějších antibiotik, co se však jeví jako velmi omezené a časově náročné. Vývoj nových terapeutických přístupů k léčbě PA je proto velmi žádoucí a v posledních letech získává stále více pozornosti. Tyto nové strategie působí zejména na virulentní faktory bakteriální buňky s cílem prevence infekce a to tak, že virulentní faktory inaktivují či inhibují. Zahrnují například inhibici systému „quorum sensing“ nebo bakteriálních lektinů. Jednou z výhod těchto strategií je velké množství potenciálních cílů zásahu. Dalšími terapeutickými přístupy mohou být použití chelatačních látek, nanočástic, fágové terapie, vakcinační strategie a mnohé jiné^{24,30}.

1.9 Inhibitory lektinů PA-IL a PA-IIL

1.9.1 Slepíčí protilátky

V širším slova smyslu jsou protilátky, jinak také imunoglobuliny (Ig), specifické bílkoviny produkované v těle jako odezva na cizí látky, nazývané antigeny. Rozeznáváme pět odlišných tříd imunoglobulinů (IgM, IgA, IgG, IgD, IgE) produkovaných plazmatickými buňkami, které v rámci diferenciací vznikají z aktivovaných B lymfocytů, tzn. z B lymfocytů,

které se setkaly s příslušným antigenem. Protilátky jsou významnou složkou specifické (získané) imunitní odpovědi humorálního typu. Jejich úlohou je identifikovat a označit dané cizorodé látky, a tak zajistit jejich likvidaci (destrukci) pomocí fagocytózy, kterou zabezpečují speciální buňky – makrofágy³¹. Struktura imunoglobulinů je tvořena dvěma totožnými těžkými a dvěma totožnými lehkými polypeptidovými řetězci navzájem propojenými disulfidickými můstky. Například u savců lehké řetězce sestávají ze dvou domén – variabilní a konstantní. Naopak těžké řetězce obsahují jednu variabilní a tři konstantní domény. Tvar molekuly protilátek připomíná písmeno Y. Tyto makromolekuly lze proteolyticky rozštěpit na dva stejné fragmenty Fab (z angl. „fragment antigen binding“) způsobilé vázat antigen a jeden fragment Fc (z angl. „fragment crystallizable“), který zabezpečuje vazbu na Fc receptory daného fagocytu. Popsaná struktura protilátky IgG, která reprezentuje až 75 % ze všech protilátek v krvi, je zobrazena na obrázku č. 6. Navázáním protilátky na antigen přes N-konce zmíněných variabilních domén dochází k tzv. neutralizaci cizích látek, což vede např. k zabránění vstupu patogenu do buněk a poškozování buněk hostitele. Vazbou na antigen může také dojít k ději nazývaném opsonizace, kde dochází k označení patogenu a následujícímu zničení efektorovými buňkami, především fagocyty. Tím, že je protilátka navázána přes její Fab fragment na antigen patogenu a přes Fc fragment na fagocyt, stává se mezi patogenem a fagocytem jakýmsi spojovacím mostem^{31,32}.



Obrázek č. 6 – Struktura homodimeru imunoglobulinu IgG. Protilátka se skládá z dvou těžkých (H) a dvou lehkých (L) polypeptidových řetězců navzájem propojených disulfidickými můstky. Rozeznáváme u ní dva různé typy domén – variabilní a konstantní. Molekulu imunoglobulinu je možno pomocí proteas rozštěpit na dva stejné fragmenty Fab, které se vážou na antigen a jeden fragment Fc zabezpečující vazbu na fagocyt. Obrázek byl převzat a upraven³³.

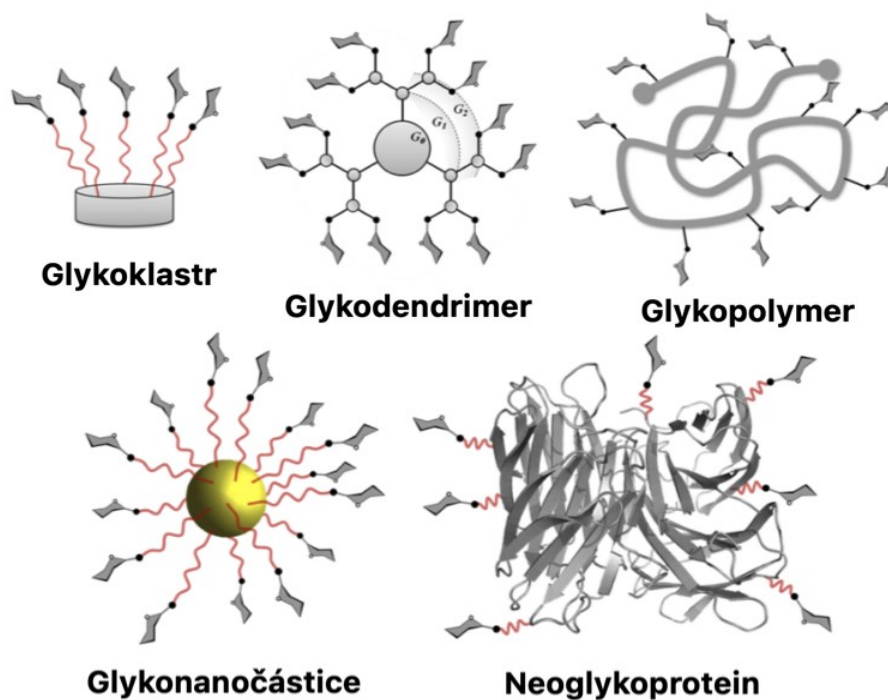
Vhodnou alternativou běžných protilátek získaných z krve experimentálních zvířat jsou slepičí protilátky izolované z vaječných žloutků. Ptáci si koncentrují imunoglobuliny ve svých vajíčkách kvůli ochraně potomků – zajištění jejich pasivní imunizace. Ve vaječném žloutku se nachází imunoglobuliny označované IgY (z angl. „yolk Ig“), které ačkoli mají stejnou funkci jako savčí IgG, strukturálně jsou odlišné. Molekulová hmotnost IgY je vyšší a oproti IgG mají téměř zdvojnásobený obsah cukerných složek. Slepičí protilátky se zdají být výhodným prostředkem pro profylaxi bakteriálních infekcí vzniklých v plicích pacientů s CF, a to hned z více důvodů. Na rozdíl od savčích IgG, protilátky IgY po vytvoření komplexu s antigenem neindukují zánětlivou reakci. Další předností je možnost opakovaně připravit značné množství protilátek, protože jedna slepice je schopna snést přibližně 20 vajec měsíčně, přičemž každé vejce obsahuje až 100 mg IgY. Z etického hlediska je velkou výhodou to, že sběr vajec je na rozdíl od získávání krve savců zcela neinvazivní. Z důvodu velké evoluční vzdálenosti ptáků a savců, slepičí protilátky lépe reagují na savčí antigeny. Na savčích proteinech totiž rozeznávají a váží větší počet epitopů než obdobné savčí protilátky. Studie prokázaly, že protilátky IgY proti lektinům PA se skutečně podílejí na snížení adhezi bakterie PA na epiteliální buňky pacientů s CF tím, že inhibují vazebnou afinitu lektinů^{28,34,35}.

1.9.2 Multivalentní inhibitory na bázi sacharidů

Dalším poměrně novým terapeutickým přístupem je vytvoření molekul se specifickými sacharidy, které by měly vyšší afinitu k lektinům PA, než mají sacharidové struktury glykokonjugátů (glykoproteiny nebo glykolipidy) přirozeně se nacházejících na povrchu epiteliálních buněk. Výzkum se zaměřuje spíše na syntetické než přírodní anti-adhezivní látky. Syntetické glykokonjugáty by obecně měly dosáhnout lepší topologii a vazebné vlastnosti, než přírodní monovalentní glykanové ligandy jejichž interakce se zdají být příliš slabé³⁶. Vzhledem k tomu, že jednotlivé vazby mezi lektiny a sacharidy nejsou obvykle dostatečně silné, je pro dosažení biologicky relevantních vazebných afinit a selektivit nutná tzv. multivalence lektinů i jejich ligandů. Multivalence je umožněna tím, že molekula nebo molekulární komplex obsahuje ve své struktuře několik identických vazebných míst. Účinnost inhibitorů na bázi sacharidů je tedy založena na „chelátovém efektu“ čili na intramolekulární vazbě multivalentního ligandu na několik vazebných míst lektinu^{37,38}.

Návrh takového multivalentního ligandu vychází z dvou přístupů. Prvním a zároveň nejpoužívanějším je tvorba multiglykosylované struktury ligandu, která by nejlépe vyhovovala lektinové topologii (z angl. „lectin-based design“ čili tvar vytvořený na základě multimerní lektinové struktury). Druhým přístupem je návrh založený na ligandu (z angl. „ligand-based design“), kdy se vytvoří zjednodušená a optimalizovaná struktura mimikující oligosacharidy přírodních glykokonjugátů. Avšak tento postup je z důvodu obtížnosti získat přehled o přirozené valenci, topologii a hustotě oligosacharidů nesmírně komplikovaný³⁹.

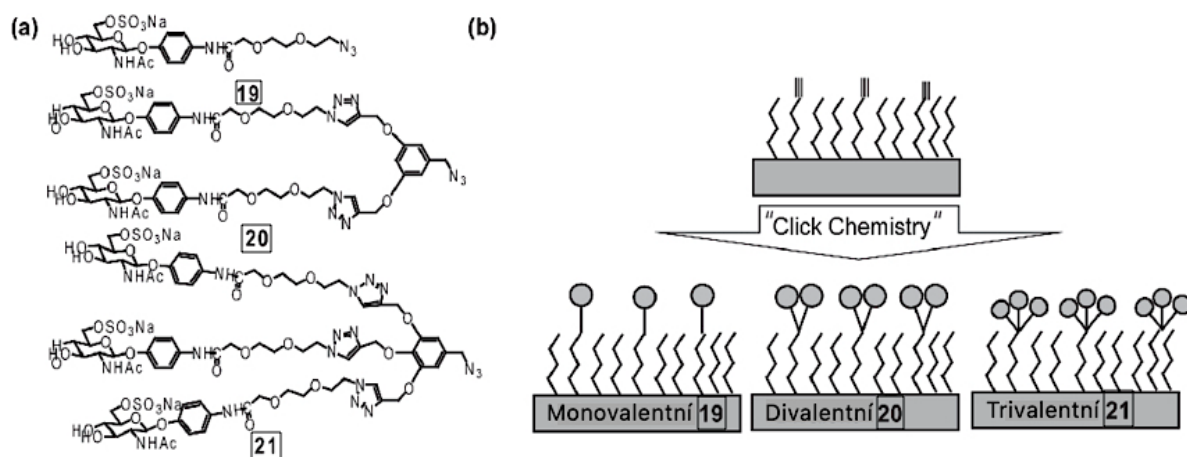
Za účelem vytvoření inhibičních systémů bylo syntetizováno velké množství glykokonjugátů vyznačujících se různými tvary, fyzikálními vlastnostmi a valencí (obrázek č. 7, str. 20), která je ve většině případů vyšší než u cílových molekul. Zvyšování valence často zvýší afinitu k lektinům až do bodu, kdy další zvyšování již nemá žádný nebo jen velmi malý účinek na asociační (vazebnou) konstantu K_a dané interakce. Valence struktury také může ovlivnit tvorbu makromolekulárních produktů. Ukázalo se, že její zvýšení mohlo vést nejen k intramolekulárním interakcím ligandu a receptoru, ale k intermolekulárnímu zesílení a tvorbě agregátů (např. zesíťování molekul lektinu multivalentními inhibitory). V závislosti na aplikaci a cíli byly pro přípravu vícevazebných glykokonjugátů použity různorodé multivalentní struktury. Obecně jsou tvořeny centrální jednotkou – jádrem, na kterém jsou navázány „větve“ zakončené sacharidovými epitopy (koncové jednotky). Povaha jádra ve skutečnosti určuje počet větví, jejich vzájemnou vzdálenost a prostorové uspořádání. Struktura jádra také hraje důležitou roli v aktivitě a mechanismu účinku celého ligandu. Další dva zásadní faktory pro získání účinné inhibiční makromolekuly jsou délka a rigidita větví. Strukturu jádra mohou tvořit například polymerní molekuly, sacharidy a bílkoviny. Zajímavostí je to, že různé skelety těchto inhibitorů se stejnou valencí mohou vykazovat různé úrovně aktivity vůči stejnému lektinu^{40,41,42}.



Obrázek č. 7 – Schematické zobrazení struktur různých typů multivalentních glykokonjugátů. Obrázek byl převzat a upraven³⁹.

1.9.2.1 Glykoklastry

Glykoklastry, taky nazývané klastrové glykosidy, jsou malé molekuly obsahující synteticky řízený počet vazebných epitopů připojených rameny („větve“) k multivalentnímu jádru. Tímto způsobem se propojí výhody homogenních malých molekulárních inhibitorů se zvýšením valencí³⁶. Finální struktury glykoklastrů jsou obvykle dimery, trimery, tetramery atd. Na obrázku č. 8 (str. 21) je znázorněn příklad chemické struktury monovalentního (monomer), divalentního (dimer) a trivalentního (trimer) glykoklastru. Tyto malé syntetické molekuly mohou poskytovat často různorodé funkce a být víceméně flexibilní⁴². V porovnání s odpovídajícími monovalentními sacharidy mají glykoklastry výrazně zvýšenou aviditu. Jejich strukturu jádra tvoří např. rozvětvené aromatické nebo alifatické konstrukce, cyklické peptidy, kalixareny, porfyriny či cyklodextriny⁴³.



Obrázek č. 8 – Chemická struktura monovalentního (19), divalentního (20) a trivalentního (21) glykoklastru (a). Schematická ilustrace těchto tří typů glykoklastrů ukotvených na povrchu (b). Obrázek byl převzat a upraven⁴⁴.

Doposud byly syntetizovány různé druhy glykoklastrů. Ukázalo se, že jsou velmi účinné v souvislosti s aplikací tzv. klastrového glykosidového efektu (z angl. „cluster glycoside effect“). Koncept tohoto efektu spočívá ve zvýšení afinity komplexu lektin-sacharid díky multivalenci lektinů a / nebo sacharidů. Zvýšením počtu nezávislých vazeb zapojených do interakce umožňuje až exponenciálně zvýšit sílu celkové slabé vazby komplexu lektin-sacharid. Tím se globální interakce stává silnější než u monovalentní struktury.

Ve skutečnosti je vzhledem k malé velikosti struktury glykoklastrů usnadněna interakce jejich sacharidových koncových skupin (sacharidových zbytků) s vazebnými místy různých lektinů spíše než interakce s různými vazebnými místy stejného lektinu. To může souviset se situací, kdy je spojovací rameno („větve“) příliš krátké, což následně vede k tvorbě agregátů⁴².

Použití glykoklastrů vykazujících vysokou afinitu k lektinům se ukazuje jako slibná strategie boje proti patogenům, která nevyvolává fenomén rezistence. Několik studií naznačuje, že u PA-IL mohou galaktoklastry současně dosáhnout na dvě vazebná místa nacházející se na malé straně tetramerní struktury lektinu, což vede ke klastrovému glykosidovému efektu. Takové současné vazby je u PA-III z důvodu jiné prostorové distribuci vazebných míst obtížnější dosáhnout. Studie též ukázaly, že řada dimerních struktur obsahujících fukosu může vázat PA-III účinněji (vykazují efektivní klastrový glykosidový efekt) než trimerní struktury, protože jsou schopny vázat s vysokou afinitou a nižší disociační konstantou. Přesný způsob

rozpoznávání multivalentních glykoklastrů jejich bakteriálními lektinovými partnery ještě stále není plně pochopen, a proto návrh vhodných ligandů zůstává prozatím empirický^{45,46}.

Tato práce je zaměřena na studium multivalentních inhibitorů na bázi sacharidů (konkrétně glykoklastrů) a jejich využití v inhibici adheze PA na plicní epitelální buňky. Zároveň jsou tyto mechanismy porovnávány s dalším typem inhibitorů – anti-PA-IIL slepičími protilátkami.

2. Cíl práce:

Cílem práce je prokázat schopnost vybraných multivalentních inhibitorů na bázi fukosy (tzv. glykoklastrů) inhibovat adherenci *Pseudomonas aeruginosa* (sbírkový kmen ST 1763) na epiteliální buňky plic (linie CuFi-1 a NuLi-1).

Pro uskutečnění tohoto cíle bylo potřebné splnit následující dílčí úkoly:

- ověřit správnost fungování systému adhezního testu pomocí slepičích IgY s inhibičními vlastnostmi
- reprodukovat výsledky z předchozí práce použitím tetravalentního glykoklastru (CSM-539)
- vlastní studium profylaktického účinku glykoklastrů s nižší valencí.

3. Materiál a metody:

3.1 Použitý materiál, chemikálie a přístroje

3.1.1 Přístroje

analytické váhy DV215CD	Ohaus, Švýcarsko
autokláv Varioklav [®]	H+P Labortechnik GmbH, Německo
centrifuga Eppendorf 5415 R, 5418	Eppendorf, USA
centrifuga Hettich Universal 320 R	Hettich Zentrifugen, Německo
CO ₂ inkubátor MCO-170AIC	Panasonic Healthcare Co., Japonsko
inkubátor s funkcí třepání ES-60	MIUlab, Čína
laminární box BIO 126	Labox, ČR
laminární box MB 120	Labox, ČR
mikroskop Motic AE31	Motic, Německo
mikroskop Nikon ECLIPSE TE2002-U s programem NIS-Elements AR 2.30	Nikon, Japonsko
mikrovlnný autokláv Microjet	The Rodwell Autoclave Company, UK
pipetovací nástavec Pipetus	Hirschmann, Německo
předvážky 440-35A	KERN, Německo
spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 Pro s programem i-control	Tecan, Švýcarsko
spektrofotometr Spekol 11	Carl-Zeiss, Německo
vodní lázeň	Memmert, Německo

3.1.2 Materiál a chemikálie

0,25% Trypsin-EDTA Solution	Gibco™ Invitrogen, UK
15, 50 ml plastové zkumavky	TPP, Švýcarsko
BEGM medium	Lonza Biotec s.r.o., Švýcarsko
BSA fraction V	Merck, Německo
buněčné linie CuFi-1 a NuLi-1	ATCC®, USA
Collagen type IV from human placenta	Sigma, USA
destičky CellBind® 96 jamek	Corning®, USA
dimethylsulfoxid (DMSO)	Aplichem, Německo
fetální bovinní sérum (FBS)	Lonza, Švýcarsko
jednorázové plastové sterilní pipety 1-25 ml	Corning, USA
kryozkumavky	Corning, USA
kultivační lahve 12,5-25 cm ²	TPP, Švýcarsko; VWR International, ČR
kyselina octová	Lachema, ČR
LHC-9 medium	Gibco™ Invitrogen, UK
mikrozkumavky 0,2-2,0 ml	Eppendorf, USA
parafilm	Bemis, USA
PBS tablety (1 do 500 ml dH ₂ O; pH 7,45)	Gibco™ Invitrogen, UK
Peha-Soft nitrilové rukavice bez pudru	Hartmann, ČR
penicilin G, sodná sůl	DUCHEFA BIOCHEMIE B. V., Holandsko
PKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling	Sigma, USA

PKH 67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit for General Cell Membrane Labeling	Sigma, USA
sterilní mikrofiltry 0,22 µm	Merck Millipore, Německo
streptomycin sulfát	SERVA GmbH, Německo
špičky	Biohit, UK
trypanová modř 0,4%	Sigma, USA
zmrazovací kontejner Nalgene® Cryo 1 °C	Thermo Fisher Nalgene®, USA

3.2 Metody práce s tkáňovými kulturami

V této experimentální části byly celkově využity dvě buněčné linie – CuFi-1 a NuLi-1, které představují adherentní, immortalizované epiteliální buňky plic. Linie CuFi-1 jsou izolované od pacienta s cystickou fibrózou (s mutací $\Delta F508$ v CFTR genu, homozygotní forma) a naopak linie NuLi-1 jsou odebrány od normálního (zdravého) jedince.

Z důvodu zabránění riziku kontaminace byla veškerá práce s buněčnými kulturami uskutečňována ve sterilním prostředí speciální tkáňové laboratoři (konkrétně v laminárním boxu MB 120). Pro dodržení zásad aseptické práce byly rovněž všechny příslušné pracovní pomůcky sterilní jednorázové nebo námi vysterilizované v autoklávu (program při teplotě 121 °C, za čas 20 min). Při práci s buněčnými liniemi bylo jednáno podle originálního produktového listu ATCC^{47,48}.

3.2.1 Příprava kultivačních láhví s kolagenem

Povrch kultivačních láhví byl potažen kolagenem typu IV z lidské placenty. Nejdříve byl připraven zásobní roztok o koncentraci 0,9 mg/ml – komerční preparát kolagenu byl v laminárním boxu MB 120 rozpuštěn v 0,25% v/v kyselině octové při teplotě 4 °C přibližně 4 h za občasného zamíchání (pozn. kolagen se váže na plast, proto jeho rozpuštění musí probíhat ve sterilní skleněné nádobce). Následně byl tento zásobní roztok zředěn 15x deionizovanou vodou na výslednou koncentraci 60 µg/ml a přefiltrován přes 0,22 µm filtr. Dále byl roztok

aplikován do kultivačních láhví v takovém objemu, aby byl pokryt celý kultivační povrch – pro 25 cm² láhev 2 ml, pro 75 cm² láhev 4-5 ml a pro 150 cm² láhev 8-9 ml. Takto připravené láhve byly ponechány přes noc (minimálně 18 h) inkubovat v laminárním boxu při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl roztok kolagenu odebrán. Lahve byly 2-3x promyty 4 ml PBS a následně nechány vyschnout v zapnutém laminárním boxu dnem vzhůru s pootevřenými víčky. Po přibližně 2 h sterilizaci UV zářením byly kultivační láhve zajištěny parafilmem a dále skladovány při teplotě 4 °C. Před každým použitím byl povrch láhví vždy pečlivě promyt PBS.

3.2.2 Rozmrazení buněčných linií

Dlouhodobě se tyto linie uskladňují v kapalném dusíku nebo v hlubokomrazícím boxu, kde teplota dosahuje -80 °C. Celý proces rozmrazení musí proběhnout ve velmi malém časovém intervalu, a to z důvodu částečné toxicity dimethylsulfoxidu (DMSO), který se zde využívá jako kryoprotektant.

Postup:

Nejdříve bylo připraveno médium (LHC-9 nebo BEGM) s kombinací antibiotik penicilin-streptomycin (100x koncentrovaný roztok – penicilin G sodná sůl o koncentraci 6 mg/ml a streptomycin sulfát o koncentraci 10 mg/ml). Následně bylo toto médium vytemperováno ve vodní lázni na 37 °C. Z hlubokomrazícího boxu byly buňky vyjmuty a rychle v intervalu 50-60 s rozmrazeny ve stejné vodní lázni. Dále byly přeneseny do plastové sterilní 15ml zkumavky. Podle tabulky č. 1 bylo k buněčné suspenzi (o objemu 1 nebo 2 ml) postupně po minutách přidáváno vytemperované médium.

Tabulka č. 1 – Postup naředování suspenze.

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

Po přidání poslední dávky média byla suspenze centrifugována v centrifuze Hettich Universal 320R po dobu 5 minut (1000 RPM). Vzniklá peleta byla resuspendována v 1 ml média. Z této suspenze byl následně odebrán alikvot na určení počtu a viability buněk za použití trypanové modři (kapitola 3.2.5). Zbytek buněčné suspenze byl přenesen do kultivační láhve s povrchem 25 cm² (speciální láhev potažená kolagenem typu IV, viz. v kapitole 3.2.1), která byla předem naplněna vytemperovaným médiem (opět LHC-9 nebo BEGM s antibiotiky penicilin-streptomycin) o objemu 5 ml. Na rozdíl od běžné subkultivace se zde nasazuje inokulum o vyšší hustotě buněk.

Pozn. – buňky po rozmrazení rostou velmi pomalu, nutno je kontrolovat každý den.

3.2.3 Kultivace buněčných linií

Buněčné kultury byly kultivovány v inkubátoru MCO-170AIC při teplotě 37 °C a 5% CO₂, který je uložen ve speciální laboratoři vyhrazené pro práci s tkáňovými kulturami. Vhodný povrch pro růst buněk vytváří kolagen typu IV z lidské placenty, kterým se potahují kultivační láhve (kapitola 3.2.1). Při kultivaci byla k médiu LHC-9 nebo BEGM přidávána kombinace antibiotik penicilin-streptomycin. Médium v kultivačních lahvích bylo měněno každé 2-3 dny v objemu závislém na velikosti láhve (pro 25 cm² láhev 5 ml média, pro 75 cm² láhev 15 ml média a pro 150 cm² láhev 25 ml média).

3.2.4 Subkultivace buněčných linií

Subkultivace („pasáž“) buněk se provádí s cílem zmenšení hustoty buněk v kultivační nádobě. Část prvotní buněčné kultury je převedena do nové kultivační nádoby obsahující čerstvé médium. Subkultivace u adherentních linií zabezpečuje jejich nárůst pouze do uniformní monovrstvy. Buňky přisedlé na povrchu láhví jsou uvolněné pomocí trypsinu s EDTA. Pro zastavení působení trypsinu se používá FBS (fetální bovinní sérum).

Samotná „pasáž“ byla prováděna přibližně každých 7 dní – to však závisí na rychlosti růstu buněk, jejich schopnosti vytvořit zmíněnou monovrstvu a počtu nasazených buněk na počátku. U každé linie byl vedený záznam o počtu „pasáží“ od rozmrazení, přičemž maximální doporučený počet subkultivací je 15 (kvůli zachování vlastností buněk).

Postup:

Původní médium bylo z kultivačních láhví vylito a k přisedlým buňkám byl pipetován 0,25% trypsin s EDTA (0,53 mM) v objemu závislém na velikosti láhve (pro 25 cm² láhev 1,5 ml, pro 75 cm² láhev 3 ml a pro 150 cm² láhev 6 ml). Kultivační nádoby byly následně po dobu 8 min ponechány v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C. Mezitím byla k médiu LHC-9 / BEGM přidána kombinace antibiotik penicilin-streptomycin a všechny zkumavky a kultivační láhve byly označeny (buněčná linie, číslo pasáže, datum, jméno). Po uplynutí 8 minut byly láhve z inkubátoru vyndány a pod mikroskopem ověřeno, zda se buňky uvolnily z povrchu láhví. Působení trypsinu bylo inhibováno přidávkem ekvivalentního množství 1% (v/v) FBS (přidaný objem na základě velikosti kultivační láhve jako při přidávku roztoku trypsinu). Aby se uvolnil i zbytek buněk, byl kultivační povrch pomocí pipety pečlivě opláchnut (min. 3x) roztokem s buněčnou suspenzí, který byl pak převeden do centrifugačních zkumavek a centrifugován 5 min v centrifuze Hettich Universal 320R (1000 RPM). Supernatant byl odstraněn tak, aby se nenarušila peleta, která byla pak resuspendována v 1 ml připraveného média (LHC-9 / BEGM s antibiotiky penicilin-streptomycin). Pro stanovení počtu a viability buněk byl z této suspenze odebrán alikvot. Nové kultivační láhve s kolagenem typu IV byly promyty 4 ml PBS a naplněny připraveným vytemperovaným médiem s antibiotiky. Následně do nich bylo nasazeno vypočítané množství buněk – u linie CuFi-1: 1-3 x 10³ viabilních buněk/cm², u linie NuLi-1: 1,5-2,0 x 10⁴ viabilních buněk/cm².

3.2.5 Určení počtu a viability buněk

Pro stanovení počtu a viability buněk byl využíván mikroskop Motic AE31 a Bürkerova komůrka (též nazývána hemocytometr). Pro odlišení živých buněk od mrtvých slouží barvivo trypanová modř, které vstupuje do neživých buněk, hromadí se v nich, a tak způsobuje jejich modré zbarvení, přičemž živé buňky zůstávají nezabarvené.

Postup:

Alikvot odebrány z 1ml buněčné suspenze vzniklé po „pasáži“ byl zředěn médiem a smíchán s 0,4% w/v trypanovou modří v poměru 1:1 (4 µl buněčné suspenze zředěné 16 µl média + 20 µl trypanové modři). Z této směsi bylo pipetováno 10 µl na mřížku Bürkerovy komůrky, která pak byla vložena pod mikroskop. Mřížka je složena z 9 velkých čtverců

(tvořené 4x4 malými čtverci), z kterých byly vybrány vždy 3 pro počítání (v každém spočítány jen 2 strany po obvodu a střed velkého čtverce). Do statistického vyhodnocení jsou zahrnuty jenom živé buňky (modře neobarvené).

Počet buněk na mililitr suspenze (x) je daný vztahem:

$$x = \frac{\text{celkový spočítaný počet buněk}}{\text{počet čtverců, v kterých se počítalo}} \times \text{ředění vzorku} \times 10^4 .$$

3.2.6 Zamrazení buněčných linií

Buňky byly převedeny do suspenze jako při běžné subkultivaci (kapitola 3.2.4). Pro stanovení počtu a viability buněk byl ze zásobní suspenze odňat alikvot (postup dle kapitoly 3.2.5). Následně byl připraven potřebný objem tzv. kryoprotekčního média – 60 % (v/v) LHC-9 nebo BEGM médium, 10 % (v/v) DMSO a 30 % (v/v) FBS. Buněčná suspenze byla dále centrifugovaná v centrifuze Hettich Universal 320R po dobu 5-10 minut (1000 RPM). Vytvořená peleta byla resuspendována v připraveném kryoprotekčním médiu o doporučené koncentraci $1-5 \times 10^6$ viabilních buněk/ml. Po 1-1,5 ml této suspenze bylo alikvotováno do předem vychlazených a popsanych kryozkumavek, které pak byly přemístěny do zmrazovacího kontejneru Nalgene® Cryo 1 °C (naplněný isopropanolem) zajišťujícího postupné ochlazování vzorků rychlosti přibližně 1 °C/min. Kryozkumavky s kontejnerem byly po dobu 24 h umístěné do hlubokomrazícího boxu. Druhý den byly zkumavky z kontejneru vyjmuty a přeloženy do kapalného dusíku (v případě dlouhodobého uchování) nebo byly ponechány v boxu při teplotě -80 °C (v případě krátkodobého uchování). Při skladování buněčných linií po delší dobu než 2 týdny při teplotě -80 °C však může dojít ke snižování viability buněk.

3.3 Metody práce s *Pseudomonas aeruginosa*

Veškerá práce s PA probíhala v mikrobiologické laboratoři, konkrétně v laminárním boxu BIO 126 za dodržení všech podmínek aseptické práce. Pro testování bakteriální adheze byl využit sbírkový (kontrolní) kmen bakterií PA označený PAK (ST 1763). Bakterie byly běžně skladovány v hlubokomrazícím boxu (-80 °C).

3.3.1 Rozmrazení a kultivace PAK

Vzorek bakteriální suspenze byl vyjmut z hlubokomrazícího boxu (-80 °C) a rozmrazen při laboratorní teplotě. Za pomoci injekční stříkačky bylo do 100ml sterilní Erlenmeyerove baňky převedeno 10 ml média pro PA („PS“ médium – 1,6% (w/v) pepton; 1% (w/v) enzymatický kaseinový hydrolyzát; 0,5 % (v/v) glycerol; 57 mM K₂SO₄; 15 mM MgCl₂; připraveno Ing. H. Bartoňovou, UŽFG, AV ČR). Do tohoto média pak bylo pipetováno 20 µl rozmrazené bakteriální suspenze.

Kultivace probíhala v inkubátoru s funkcí třepání ES-60 (konstantní třepání při 150 RPM) po dobu 14 h, při teplotě 37 °C.

3.3.2 Stanovení množství PAK v suspenzi

Pro určení koncentrace bakterií v suspenzi bylo využito měření optické hustoty (absorbance při 600 nm, OD₆₀₀) na spektrofotometru Spekol 11. Vztah, na základě kterého byla vypočítána koncentrace bakteriálních buněk v suspenzi je: $OD_{600} = 1 \leftrightarrow c = 6 \cdot 10^8$ bakterií/ml.

3.3.3 Zamrazení PAK

Po 14 h kultivaci (kapitola 3.3.1) ze vzniklých namnožených bakterií v PS médiu bylo alikvotováno po 100 µl do mikrozkuvek. Dále bylo do nich pipetováno ekvivalentní množství (100 µl) kryoprotekčního média – 40% (w/v) glycerol v PBS, které bylo sterilizováno přes 0,22 µm filtr. Mikrozkuvky s jednotlivými alikvoty byly rychle zamrazeny v kapalném dusíku a poté uskladněny v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80 °C.

3.4 Fluorescenční značení

Fluorescenční značení epiteliálních buněk plic (linie CuFi-1 a NuLi-1) a bakterií PA bylo uskutečňováno pomocí fluorescenčních barviv PKH67 a PKH26, které mají odlišné excitační a emisní maxima. Využitím svých dlouhých alifatických řetězců jsou tato barviva schopna vázat se do membrány buňky aniž by modifikovaly jejich povrchové struktury,

čímž by se mohla ovlivnit adheze. Součástí balení byl i roztok Diluentu C, ve kterém se barviva rozpouštějí.

Epiteliální buňky plic byly značeny barvivem PKH67 (zeleně fluoreskující sloučenina), kterého excitační maximum je při 490 nm a emisní maximum při 520 nm. Bakteriální buňky byly značeny barvivem PKH26 (žluto-oranžově fluoreskující sloučenina), jehož excitační maximum je při 551 nm a emisní maximum při 567 nm.

Postup fluorescenčního značení byl prováděn na základě produktových listů^{49,50} a diplomové práce Mgr. Michaely Vaškové⁵¹.

3.4.1 Fluorescenční značení buněčných linií pomocí barviva PKH67

Po převedení buněk do suspenze subkulturací (kapitola 3.2.4) bylo odebráno potřebné množství buněk pro značení barvou PKH67, které byly vzápětí od zbytků média centrifugačně promyty 5 ml PBS po dobu 5 min (1000 RPM, centrifuga Hettich Universal 320R). Supernatant byl opatrně oddělen a vzniklá peleta byla resuspendována v 250 μ l Diluentu C (objem stanovený pro 1 kultivační nádobu o velikosti 75 cm²). Dále byl připraven roztok barviva PKH67 v Diluentu C o koncentraci 8 μ M (2 μ l PKH67 s 248 μ l Diluentu C), který byl v ekvivalentním množství přidán k připravené suspenzi buněk (ředění 1:1). Směs byla šetrně ale důkladně promíchána pipetou a ponechána inkubovat 5 min v CO₂ inkubátoru bez přístupu světla (zkumavka obalena alobalem). Reakce byla zastavena přidáním ekvivalentního množství 1% FBS (tzn. k 250 μ l roztoku barviva PKH67 v Diluentu C přidáno 250 μ l FBS). Reakční směs byla opět důkladně promíchána a pak 10 min centrifugována v centrifuze Hettich Universal 320R (1000 RPM). Nato byly buňky ještě 3x centrifugačně promyty 3 ml média LHC-9 nebo BEGM (5 min, 1000 RPM, centrifuga Hettich Universal 320R). Na závěr byla vzniklá peleta resuspendována v 1-2 ml média. Pro určení počtu a viability buněk byl z této základní buněčné suspenze odebrán alikvot (kapitola 3.2.5).

Měření relativní fluorescence:

Pro toto měření byl využíván spektrofluorimetr Tecan Infinite M200. Na začátku byly nastaveny parametry pro měření – vlnová délka excitace 470 nm a emise 505 nm, spodní čtení destičky, několikanásobné čtení jamky (u 96-jamkové destičky - vyplněný čtverec 3x3), automatické zasílení („optimal gain“).

Nakonec byla fluorescence buněk kontrolována na mikroskopu Nikon Eclipse (filtr 31001 FITC C87701).

3.4.2 Fluorescenční značení bakterií pomocí barviva PKH26

Po 14 h kultivace (kapitola 3.3.1) byla narostlá bakteriální kultura PAK v PS médiu rozdělena do 2ml mikrozkušavek, které byly centrifugovány 5 min v centrifuze Eppendorf 5415R (12000 RPM). Vzniklé pelety byly resuspendovány v 1 ml PBS a spojeny do jedné zkumavky. Dále bylo změřené OD_{600} a koncentrace bakterií v suspenzi byla stanovena dle kapitoly 3.3.2. Pro fluorescenční značení bylo odebráno potřebné množství suspenze bakterií (odebraný objem závisí od počtu měření, čili nasazených jamek při adhezním testě). Ta pak byla po dobu 5 min centrifugována v Eppendorf 5415R (12000 RPM). Vytvořená peleta byla po opatrném odstranění supernatantu resuspendována v Diluentu C (125 μ l na $3 \cdot 10^9$ bakterií). Nato byl připraven 20 μ M roztok barviva PKH26 v Diluentu C (2 μ l PKH26 v 123 μ l Diluentu C), který byl pak v ekvivalentním množství (125 μ l) přidán k bakteriální suspenzi. Pipetováním byla reakční směs pečlivě promíchána a pak ponechána inkubovat za tmy (zkumavka obalená alobalem) při laboratorní teplotě po dobu 30 min. Reakce byla zastavena přidávkem ekvivalentního množství 1% (w/v) BSA (bovinní sérový albumin). Po důkladném promíchání byla směs centrifugována 10 min při 13000 RPM (Eppendorf 5415R). Peleta byla pak ještě 3x centrifugačně promyta 1 ml PBS nejdřív 10 min (13000 RPM), potom 7,5 min a nakonec 5 min (12000 RPM) v centrifuze Eppendorf 5415R. Konečná peleta byla resuspendována v 1-2 ml pufru PBS. Na závěr byla opět dle kapitoly 3.3.2 stanovena koncentrace (už nabarvených) bakterií v suspenzi.

Měření relativní fluorescence:

Pro toto měření byl též využíván spektrofluorimetr Tecan Infinite M200. Na začátku byly zadány parametry pro měření – vlnová délka excitace 522 nm a emise 569 nm, spodní čtení destičky, několikanásobné čtení jamky (u 96-jamkové destičky je vyplněný čtverec 3x3), zesílení nastaveno manuálně na hodnotu 160.

Fluorescence buněk byla také kontrolována na mikroskopu Nikon Eclipse přes filtr 31002 RdiI C87702.

3.5 Adhezní test

Byl studován vliv vybraných látek (multivalentní inhibitory na bázi sacharidů nebo anti-PA-III slepičí protilátky) na adhezi *Pseudomonas aeruginosa* na plicní epitelální buňky. K tomu byla využita metodika tzv. adhezního testu, která byla převzata z předešlých diplomových prací^{51,52}.

Pro adhezní testy byl využit modelový systém epitelálních buněk plic CuFi-1 a NuLi-1 (kapitola 3.2), které byly kvůli jejich kvantifikaci fluorescenčně značeny pomocí barviva PKH67. Jako bakteriální model byl využit sbírkový kmen *Pseudomonas aeruginosa* označován PAK, který byl fluorescenčně značen barvivem PKH26. Jamky s neošetřenými buňkami (bez multivalentního inhibitoru nebo protilátky) sloužili jako kontrola. Jednotlivé situace v jamkách pak byly vyhodnoceny jako poměr relativní fluorescence PAK vztažený na relativní fluorescenci CuFi-1 nebo NuLi-1.

První vybrané agens, na kterém byly studovány inhibiční vlastnosti, byly anti-PA-III slepičí protilátky (tabulka č. 2).

Tabulka č. 2 – Seznam použitých protilátek.

Označení vzorku protilátky	Původní značení protilátky	Popis vzorku protilátek
A	K1	frakce před imunizací
B	3R1-8R1 (spojené frakce)	frakce po imunizaci
C	NF7	frakce nezachycené na afinitní koloně

Protilátky byly poskytnuty Mgr. Michaelou Vaškovou a Mgr. Patrikem Pomazalem (katedra biochemie PŘF UK, Praha).

Dalším zkoumaným antiadhezivním agens byly tři multivalentní inhibitory na bázi fukosy – KGY-4, ERJ-440 a CSM-539 (tabulka č. 3).

Tabulka č. 3 – Seznam použitých multivalentních inhibitorů.

Označení inhibitoru	Relativní molekulová hmotnost	Valence (odpovídá množství terminálních zbytků fukosy)
KGY-4	356,43	monovalentní
ERJ-440	898,95	divalentní
CSM-539	2074,16	tetravalentní

Inhibitory byly poskytnuty Mgr. Lenkou Malinovskou, Ph.D. (Národní centrum pro výzkum biomolekul, PřF MU, Brno a výzkumná skupina prof. RNDr. M. Wimmerové, Ph.D, CEITEC, Brno). Avšak z důvodu ochrany duševního vlastnictví není možné jejich struktury zveřejnit.

Postup:

Po fluorescenčním značení barvivem PKH67 (kapitola 3.4.1) byl ze zásobní suspenze epiteliálních buněk (CuFi-1 nebo NuLi-1) odebrán alikvot pro stanovení počtu buněk v roztoku dle kapitoly 3.2.5. Do 96-jamkové destičky Corning CellBind® bylo aplikováno vytemperované (na 37 °C) médium (LHC-9 nebo BEGM), v takovém množství, aby celkový objem v jedné jamce byl 150 µl. K médiu bylo následně přidáno spočítané množství nabarvených buněk – pro 96-jamkovou destičku výsledný počet by měl odpovídat $8,4 \cdot 10^4$ buněk/jamka. S cílem vytvořit v jednotlivých jamkách konfluentní vrstvu buněk byla destička inkubována v CO₂ inkubátoru (5% CO₂) přibližně 24-48 h při teplotě 37 °C, čímž byl také poskytnut dostatečný čas pro regeneraci buněk po jejich barvení.

Bakterie PAK značené barvivem PKH26 (kapitola 3.4.2) byly kvantifikovány (kapitola 3.3.2) a na jamku bylo na rozdíl od epiteliálních buněk aplikováno stonásobné množství – $8,4 \cdot 10^6$ bakterií/jamka.

Pro adhezní test byly připraveny zásobní suspenze bakterií:

1. pro jamky s neovlivněnými buňkami (bez multivalentního inhibitoru / protilátky):
8,4·10⁶ bakterií PAK/jamka + doplnění PBS do celkového objemu v jamce 50 µl
2. pro jamky s ošetřenými buňkami:
 - a) přídavek multivalentního inhibitoru: 8,4·10⁶ bakterií PAK/jamka + roztok inhibitoru o konečné koncentraci 2-1000 µM + doplnění PBS do celkového objemu v jamce 50 µl
 - b) přídavek protilátek: 8,4·10⁶ bakterií PAK/jamka + roztok protilátky o konečné koncentraci 1 mg/ml + doplnění PBS do celkového objemu v jamce 50 µl.

Mikrozkumavky s takto připravenými zásobními suspenzemi byly inkubovány za tmy při laboratorní teplotě po dobu 30 min.

Jakmile se v jednotlivých jamkách vytvořila konfluentní monovrstva buněk (CuFi-1, NuLi-1), byla destička vyjmuta z inkubátoru a médium z jamek opatrně odstraněno. Dále byla každá jamka promyta 200 µl PBS. Z připravených zásobních vzorků bakterií bylo do jamek přidáváno po 50 µl odpovídající bakteriální suspenze. Destička byla obalena do alobalu a ponechána 2 h inkubovat (při laboratorní teplotě). Následně byly bakterie, které se nenavázaly, z jamek odstraněny trojnásobným promytím PBS (prvně 100 µl a pak dvakrát 60 µl PBS). Aby nedošlo k vyschnutí, byly jamky s buňkami nakonec převrstveny 40 µl PBS.

Na závěr byla destička vložena do spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro a změřena relativní fluorescence (program i-Control). Pro správné měření byly nastaveny parametry dle kapitoly 3.4.1 (pro barvu PKH67) a kapitoly 3.4.2 (pro barvu PKH26).

Rovněž byly jednotlivé jamky s různými experimentálními situacemi pozorovány na mikroskopu Nikon Eclipse (program NIS-Elements AR 2.30).

4. Výsledky:

4.1 Adhezní testy

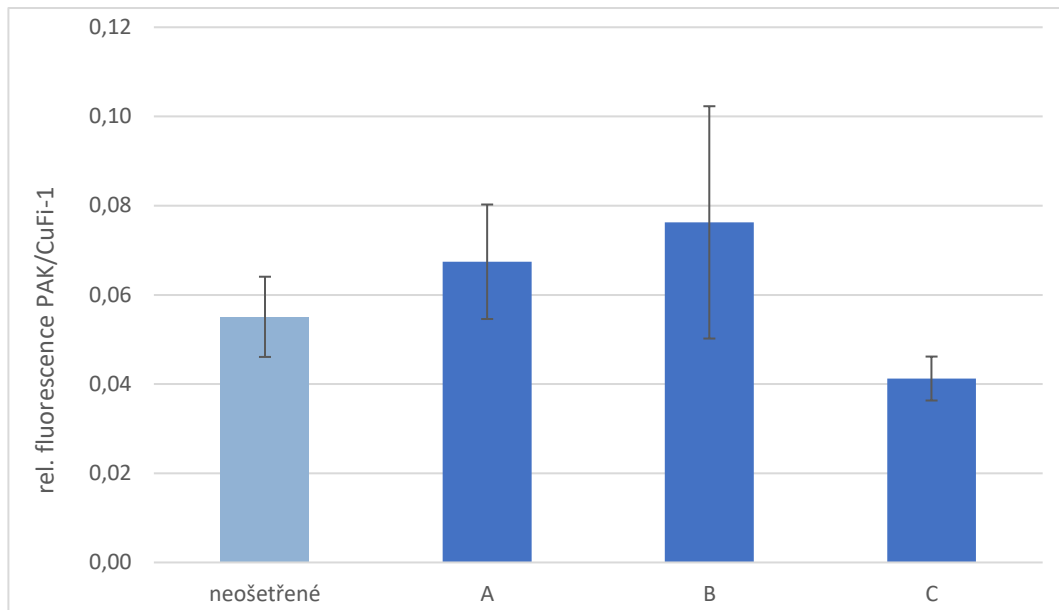
V první řadě jako antiadhezivní látky byly zkoumány anti-PA-IIL slepičí protilátky. Dále byl studován profylaktický účinek multivalentních inhibitorů, konkrétně glykoklastrů, na modelu bakteriální adherence PAK na plicní epitelální buňky CuFi-1 a NuLi-1. Pro porovnání (jako kontrola) byly použity pouze bakteriální buňky bez glykoklastrů či protilátek.

Oba typy buněk, jak plicní epitelální, tak bakterie PAK, byly kvůli vizualizaci a kvantifikaci značeny fluorescenčním barvivem PKH67 (pro buňky CuFi-1 a NuLi-1) a PKH26 (pro bakterie PAK). K vyhodnocení míry adherence bakterií byl pak využit poměr relativních fluorescencí, tedy relativní fluorescence PAK vztažená na relativní fluorescenci CuFi-1 nebo NuLi-1.

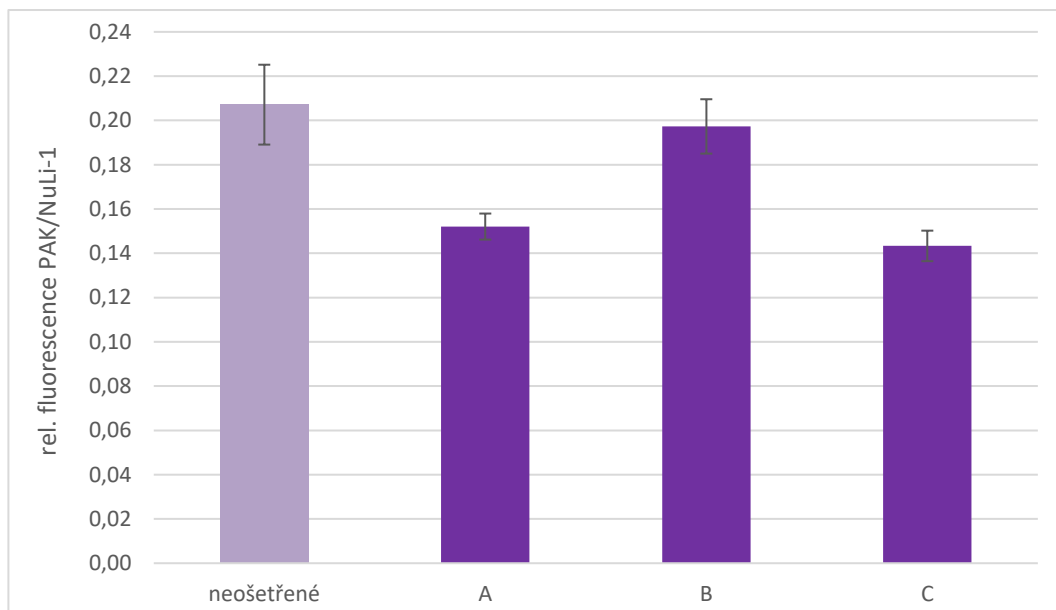
4.1.1 Adhezní testy se slepičími protilátkami

Vedle efektu glykoklastrů byl studován i vliv specifických žloutkových imunoglobulinů na adhezi bakterií PAK na plicní epitelální buňky CuFi-1 či NuLi-1. K tomu byly vybrány dva vzorky anti-PAIIL protilátek – vzorek B obsahující SF čili spojené frakce (3R1-8R1) po imunizaci a vzorek C obsahující nezachycené frakce (NF7) z afinitní purifikace spojených frakcí. Vzorek A byl připraven z vajíček před imunizací, a proto sloužil jako kontrolní (K1).

Výsledky pokusů s buněčnou linií CuFi-1 jsou zobrazeny na obrázku č. 9 (str. 38) a pro linii NuLi-1 na obrázku č. 10 (str. 39).



Obrázek č. 9 – Vliv anti-PA-III slepičích protilátek na adhezenci PAK na epiteliální buňky CuFi-1. Bakterie PAK jsou fluorescenčně značeny barvivem PKH26 (Ex/Em: 522/569 nm, „gain“ 160). Plicní epiteliální buňky CuFi-1 jsou fluorescenčně značeny barvivem PKH67 (Ex/Em: 470/505 nm, „gain“ 158). Jako antiadhezivní látky byly použity IgY frakce: A – před imunizací (K1), B – po imunizací (SF), C – nezachycené frakce po afinitní purifikaci (NF7), v jamce vždy koncentrace 1 mg/ml. Jamky s CuFi-1 bez přidání protilátky (tzv. neošetřené buňky) sloužily jako kontrola. Vynesené hodnoty jsou průměr naměřených hodnot (ze tří jamek) relativní fluorescence PAK vztážený na průměr naměřených hodnot (ze tří jamek) relativní fluorescence CuFi-1 \pm SD. Od hodnot relativní fluorescence PAK a CuFi-1 byla odečtena hodnota relativní fluorescence pozadí.



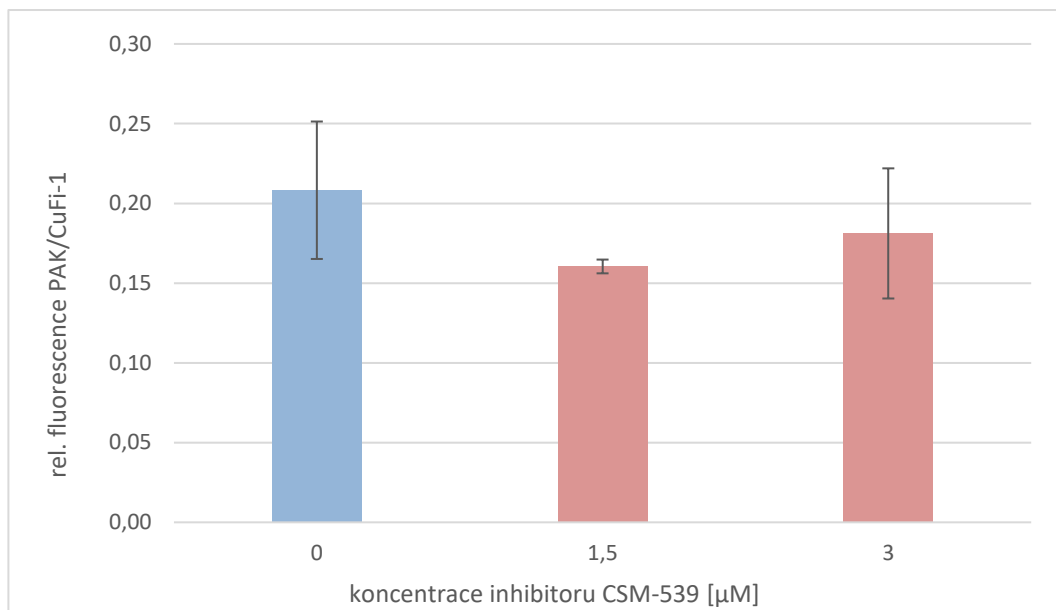
Obrázek č. 10 – Vliv anti-PA-III slepičích protilátek na adhezenci PAK na epiteliální buňky NuLi-1.

Bakterie PAK jsou fluorescenčně značeny barvivem PKH26 (Ex/Em: 522/569 nm, gain 160). Plicní epiteliální buňky NuLi-1 jsou fluorescenčně značeny barvivem PKH67 (Ex/Em: 470/505 nm, gain 158). Jako antiadhezivní látky byly použity IgY frakce: A – před imunizací (K1), B – po imunizací (SF), C – nezachycené frakce po afinitní purifikaci (NF7), v jamce vždy koncentrace 1 mg/ml. Jamky s NuLi-1 bez přidání protilátky (tzv. neošetřené buňky) sloužily jako kontrola. Vynesené hodnoty jsou průměr naměřených hodnot (ze tří jamek) relativní fluorescence PAK vztažený na průměr naměřených hodnot (ze tří jamek) relativní fluorescence NuLi-1 \pm SD. Od hodnot relativní fluorescence PAK a NuLi-1 byla odečtena hodnota relativní fluorescence pozadí.

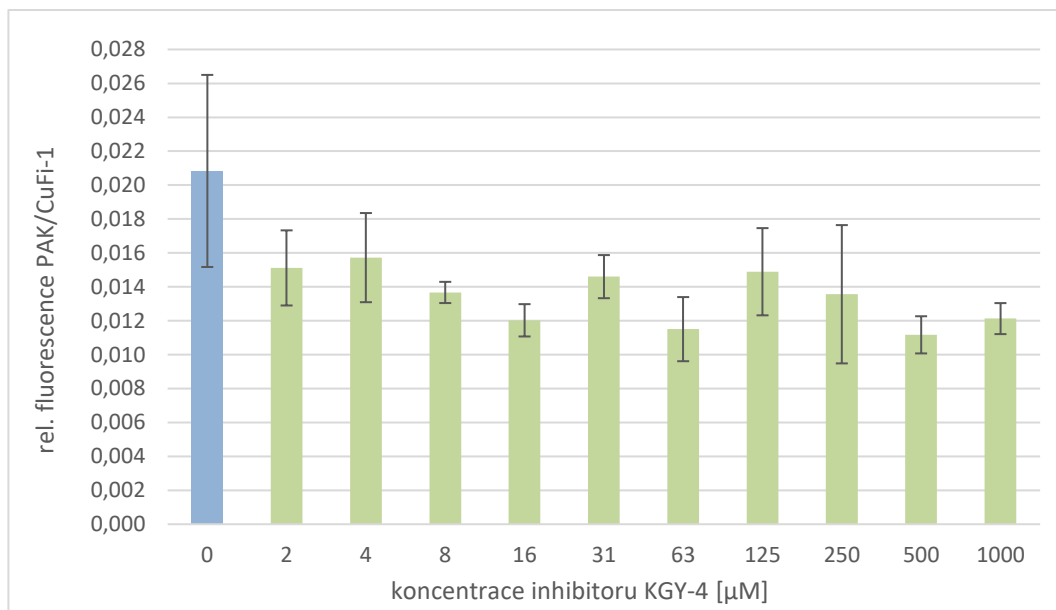
4.1.2 Adhezní testy s multivalentními glykoklastry

S cílem reprodukovat výsledky z předchozí diplomové práce⁵¹ byl jako první použit tetravalentní inhibitor CSM-539 v koncentraci 1,5 a 3 mM (obrázek č. 11, str. 40).

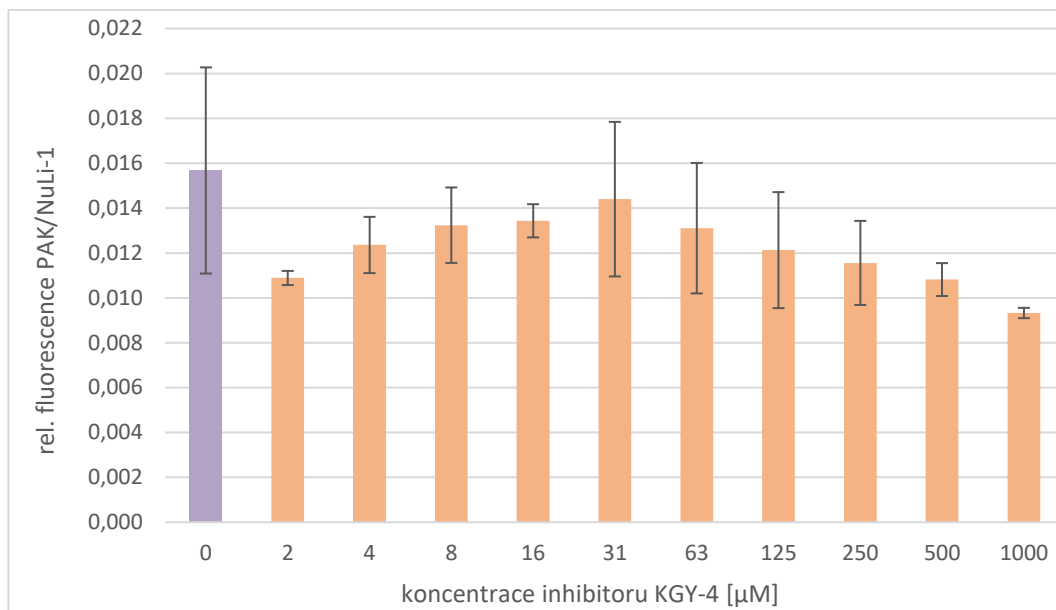
Následně byly v adhezních pokusech testovány glykoklastry s nižší valenci – monovalentní KGY-4 a divalentní ERJ-440 v koncentračním rozmezí 2-1000 μ M (obrázek č. 12 na str. 41, obrázek č. 13 na str. 42, obrázek č. 14 na str. 43 a obrázek č. 15 na str. 44).



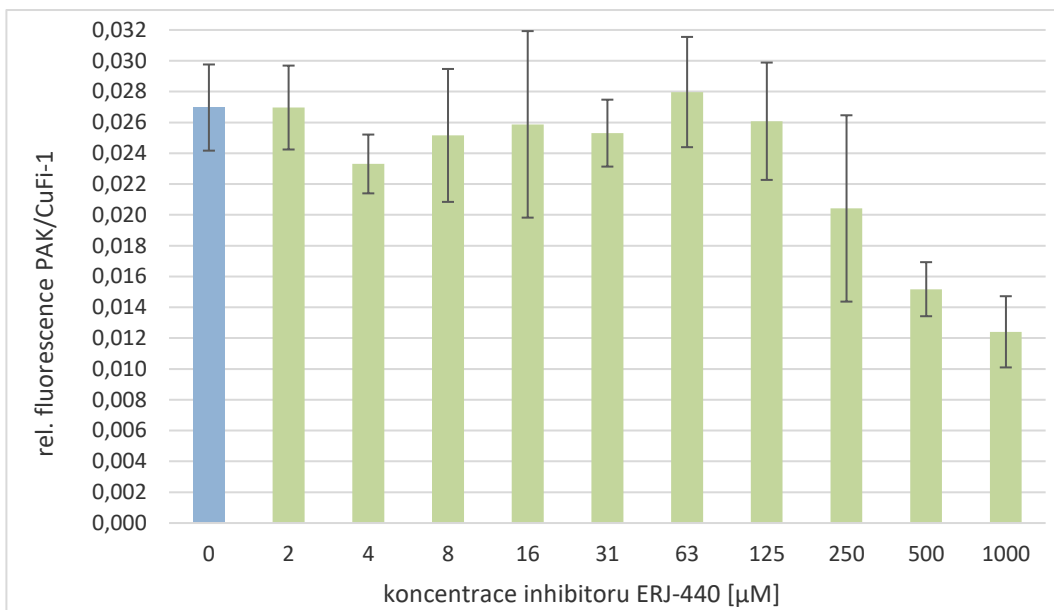
Obrázek č. 11 – Vliv CSM-539 na adhezenci PAK na epitelální buňky CuFi-1. Bakterie PAK jsou fluorescenčně značeny barvivem PKH26 (Ex/Em: 522/569 nm, gain 160). Plicní epitelální buňky CuFi-1 jsou fluorescenčně značeny barvivem PKH67 (Ex/Em: 470/505 nm, gain 146). Jako antiadhezivní multivalentní inhibitor na bázi fukosy byl použit tetravalentní glykoklastr CSM-539 v koncentraci 1,5 a 3 mM. CuFi-1 bez přidání inhibitoru sloužily jako kontrola (modrý sloupec). Vynesené hodnoty jsou průměr naměřených hodnot (ze tří jamek) relativní fluorescence PAK vztažený na průměr naměřených hodnot (ze tří jamek) relativní fluorescence CuFi-1 \pm SD. Od hodnot relativní fluorescence PAK a CuFi-1 byla odečtena hodnota relativní fluorescence pozadí.



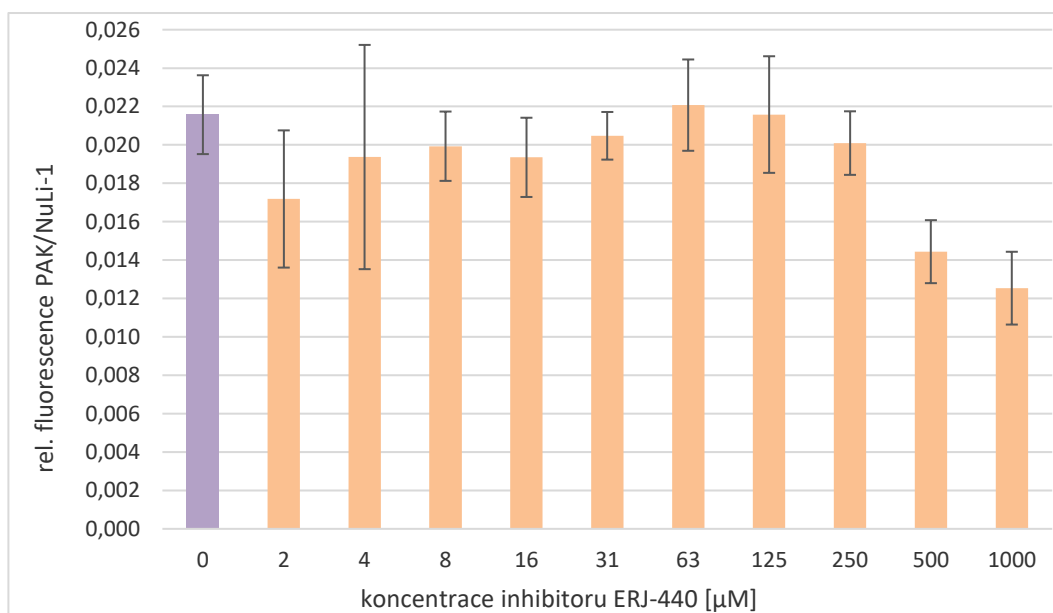
Obrázek č. 12 – Vliv KGY-4 na adherenci PAK na epitelální buňky CuFi-1. Bakterie PAK jsou fluorescenčně značeny barvivem PKH26 (Ex/Em: 522/569 nm, gain 160). Plicní epitelální buňky CuFi-1 jsou fluorescenčně značeny barvivem PKH67 (Ex/Em: 470/505 nm, gain 148). Jako antiadhezivní inhibitor na bázi fukosy byl použit monovalentní glykoklastr KGY-4 v koncentračním rozmezí 2-1000 µM. CuFi-1 bez přidání inhibitoru (tzv. neošetřené buňky) sloužily jako kontrola. Vynesené hodnoty jsou průměr naměřených hodnot (ze tří jamek) relativní fluorescence PAK vztažený na průměr naměřených hodnot (ze tří jamek) relativní fluorescence CuFi-1 ± SD. Od hodnot relativní fluorescence PAK a CuFi-1 byla odečtena hodnota relativní fluorescence pozadí.



Obrázek č. 13 – Vliv KGY-4 na adherenci PAK na epitelální buňky NuLi-1. Bakterie PAK jsou fluorescenčně značeny barvivem PKH26 (Ex/Em: 522/569 nm, gain 160). Plicní epitelální buňky NuLi-1 jsou fluorescenčně značeny barvivem PKH67 (Ex/Em: 470/505 nm, gain 148). Jako antiadhezivní inhibitor na bázi fukosy byl použit monovalentní glykoklastr KGY-4 v koncentračním rozmezí 2-1000 μM . NuLi-1 bez přidání inhibitoru (tzv. neošetřené buňky) sloužily jako kontrola. Vynesené hodnoty jsou průměr naměřených hodnot (ze tří jamek) relativní fluorescence PAK vztažený na průměr naměřených hodnot (ze tří jamek) relativní fluorescence NuLi-1 \pm SD. Od hodnot relativní fluorescence PAK a NuLi-1 byla odečtena hodnota relativní fluorescence pozadí.



Obrázek č. 14 – Vliv ERJ-440 na adherenci PAK na epitelální buňky CuFi-1. Bakterie PAK jsou fluorescenčně značeny barvivem PKH26 (Ex/Em: 522/569 nm, gain 160). Plicní epitelální buňky CuFi-1 jsou fluorescenčně značeny barvivem PKH67 (Ex/Em: 470/505 nm, gain 143). Jako antiadhezivní multivalentní inhibitor na bázi fukosy byl použit divalentní glykoklastr ERJ-440 v koncentračním rozmezí 2-1000 µM. CuFi-1 bez přidání inhibitoru (tzv. neošetřené buňky) sloužily jako kontrola. Vynesené hodnoty jsou průměr naměřených hodnot (ze tří jamek) relativní fluorescence PAK vztažený na průměr naměřených hodnot (ze tří jamek) relativní fluorescence CuFi-1 ± SD. Od hodnot relativní fluorescence PAK a CuFi-1 byla odečtena hodnota relativní fluorescence pozadí.

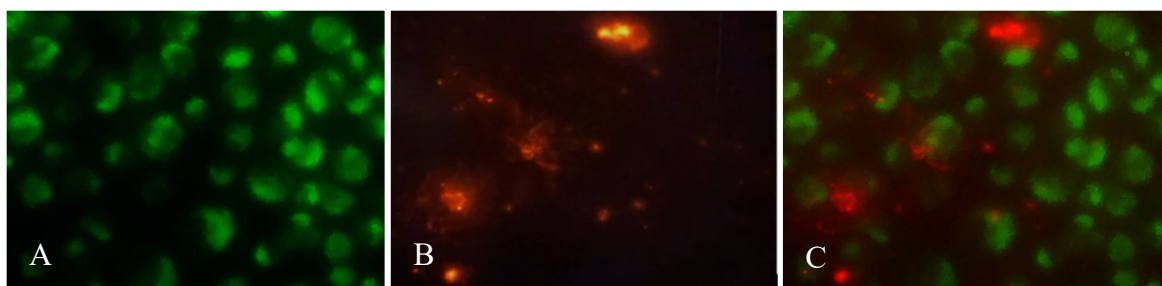


Obrázek č. 15 – Vliv ERJ-440 na adhezenci PAK na epiteliální buňky NuLi-1. Bakterie PAK jsou fluorescenčně značeny barvivem PKH26 (Ex/Em: 522/569 nm, gain 160). Plicní epiteliální buňky NuLi-1 jsou fluorescenčně značeny barvivem PKH67 (Ex/Em: 470/505 nm, gain 143). Jako antiadhezivní multivalentní inhibitor na bázi fukosy byl použit divalentní glykoklastr ERJ-440 v koncentračním rozmezí 2-1000 µM. NuLi-1 bez přidání inhibitoru (tzv. neošetřené buňky) sloužily jako kontrola. Vynesené hodnoty jsou průměr naměřených hodnot (ze tří jamek) relativní fluorescence PAK vztažený na průměr naměřených hodnot (ze tří jamek) relativní fluorescence NuLi-1 ± SD. Od hodnot relativní fluorescence PAK a NuLi-1 byla odečtena hodnota relativní fluorescence pozadí.

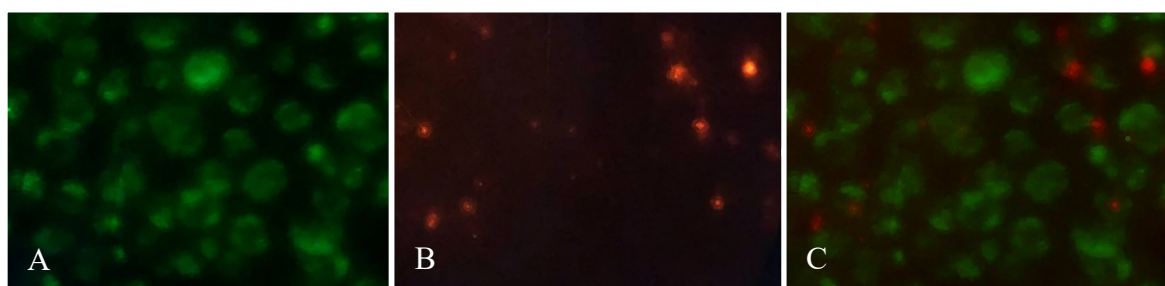
4.2 Mikroskopická pozorování

Pro doplnění byly jednotlivé jamky mikrotitrační destičky s různými experimentálními situacemi pozorovány na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse (program NIS-Elements AR 2.30). Některé situace byly také zdokumentovány.

Na obrázku č. 16 je znázorněná situace v jamce s buňkami CuFi-1 bez přidavku inhibitoru a na obrázku č. 17 s přidavkem tetravalentního inhibitoru CSM-539, kde lze pozorovat pokles množství navázaných bakterií PAK.



Obrázek č. 16 – Mikroskopické snímky buněk CuFi-1 a PAK, bez přídavku inhibitoru. Pozorování bylo provedeno na mikroskopu Nikon Eclipse (program NIS-Elements AR 2.30) při zvětšení 40x. **A** – linie CuFi-1 (nabarvená PKH67), použitý filtr 31001 FITC C87701; **B** – bakteriální buňky PAK (nabarvené PKH26), použitý filtr 31002 RdiI C87702; **C** – překryv snímků A a B. Upraveno v programu ImageJ.



Obrázek č. 17 – Mikroskopické snímky buněk CuFi-1 a PAK, s přídavkem inhibitoru CSM-539. Pozorování bylo provedeno na mikroskopu Nikon Eclipse (program NIS-Elements AR 2.30) při zvětšení 40x. **A** – linie CuFi-1 (nabarvená PKH67), použitý filtr 31001 FITC C87701; **B** – bakteriální buňky PAK (nabarvené PKH26), použitý filtr 31002 RdiI C87702; **C** – překryv snímků A a B. Upraveno v programu ImageJ.

5. Diskuse:

Autozomálně recesivní dědičný onemocnění cystická fibróza (CF) vzniká mutací *CFTR* genu, který kóduje CFTR protein sloužící v těle jako chloridový kanál. Většina vzniklých klinických projevů u pacientů s CF se může vysvětlit právě poruchou propustnosti tohoto iontového kanálu³. Důsledkem poruchy CFTR proteinu je vznik velmi hustého hlenu pokrývajícího povrch dýchacích cest, který kromě jiného přispívá k tvorbě příznivého prostředí pro růst bakterií. U pacientů s CF se vyskytuje zvýšená adherence bakterií k plicnímu epitelu způsobená poruchou glykosylace glykokonjugátů nacházejících se v plazmatické membráně epiteliálních buněk⁵. Nejčastější bakterií způsobující infekce u nemocných je *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Důvodem jejího častého výskytu je nejen změna prostředí v dýchacím traktu hostitele, ale významnou roli také hrají její virulentní faktory jako je například lektin PA-IIL. Tento lektin umožňuje adhezi PA na hostitelské buňky, kde se váže na povrchové receptory obsahující L-fukosu a zároveň se podílí na tvorbě biofilmu²⁴. Právě k zamezení adherence bakterií byly v této práci testované různé antiadhezivní agens jako například multivalentní inhibitory na bázi fukosy cílené na lektin PA-IIL. K tomu, aby byla ověřena správnost fungování celého systému byly použity i jiné antiadhezivní látky, konkrétně anti-PA-IIL slepičí protilátky.

Pro účel testování daných agens byl využit experimentální systém založený na imortalizovaných plicních epiteliálních buněčných liniích CuFi-1 izolovaných od pacienta s CF a NuLi-1 izolovaných od zdravého jedince. Tento systém byl převzat z předcházejících prací^{51,52} a následně optimalizován. Obě imortalizované linie jsou stabilní a nenáročné na dlouhodobější kultivace. Proto byly použity jako relevantní model pro studium adheze bakterií PA na plicní buňky pacienta s CF a plicní buňky zdravé osoby. Pro sledování bakteriální adheze byl s cílem navázat na předešlou diplomovou práci⁵¹ využit stejný sbírkový (kontrolní) kmen bakterií PA označený PAK (ST 1763). Adhezí test spočívá v sledování míry adherence PAK na uvedené buněčné linie v nepřítomnosti nebo v přítomnosti vybraných antiadhezivních agens. Z důvodu vizualizace a stanovení počtu byly buněčné linie a PAK fluorescenčně značeny barvivou PKH (PKH67 pro buňky, PKH26 pro bakterie). Takto nabarvené buňky a bakterie byly aplikovány do speciálních 96-jamkových mikrotitračních destiček s upraveným povrchem pro adherentní linie značky Corning CellBind[®]. Z důvodu dostupnosti jen malého množství multivalentních inhibitorů byly zvoleny

96-jamkové mikrotitrační destičky, kterých jamky na rozdíl od 24-jamkových destiček mají menší objem. Zároveň 96-jamkové destičky poskytují větší počet možných experimentálních uspořádání (v jedné destičce se může testovat široká škála koncentrací daného inhibitoru). Specifickou vlastností epiteliálních buněk je to, že přirozeně adherují na povrch jamky a na dně vytvářejí monovrstvu, čím se napodobuje situace v plicích a zároveň se zamezí odmytí buněk během jednotlivých kroků adhezního testu. Při vyhodnocování naměřených dat byl využit poměr relativní fluorescence PAK/CuFi-1 nebo PAK/NuLi-1, který vyjadřuje počet bakterií na jednu buňku. Zhodnocení situací v jednotlivých jamkách bylo vždy provedeno i mikroskopickým pozorováním, čímž byla také ověřena účinnost fluorescenčního značení.

Imunoterapie specifickými protilátkami IgY připravenými z vaječných žloutků imunizovaných slepic se jeví jako slibná alternativa antibiotik pro prevenci např. respiračních infekcí u pacientů s CF. U lidí a zvířat byly IgY využívány v boji proti různým bakteriálním nebo virovým infekcím. Mnohé klinické studie potvrzují profylaktický účinek orálně podávaných IgY protilátek proti PA. Jejich aplikace je zřejmě bezpečná, protože během dlouhodobého užívání IgY nebyly zaznamenány žádné negativní vedlejší účinky^{53,54}.

Jako první antiadhezivní agens byly tedy vybrány různé frakce IgY protilátek proti lektinu PA-IIL poskytnuté katedrou biochemie, PřF UK (Praha). První vzorek značený K1 byla frakce získaná z vajíček před imunizací slepice. Další vzorek byla spojená frakce (3R1-8R1) izolovaná z vaječného žloutků po imunizaci slepice antigenem PA-IIL Δ G/fuc (modifikovaný rekombinantní antigen s mutací snižující afinitu pro fukosu, který obecně vykazuje s protilátkou vyšší reaktivitu než jiné typy modifikovaných rekombinantních antigenů⁵⁵). V diplomové práci⁵¹ byla metodou ELISA ověřena schopnost těchto dvou izolovaných frakcí rozeznat antigen PA-IIL – obě frakce vykazovaly s antigenem jen nízkou reaktivitu. V našem případě frakce po imunizaci (3R1-8R1) u linií CuFi-1 nevykazovala žádný efekt. Ve zmíněné diplomové práci⁵¹ nebyl výsledek adhezního testu zcela jednoznačný – jedna frakce izolovaná po imunizaci nevykazovala žádný efekt, avšak druhá frakce stejného typu od jiné slepice protektivní efekt vykazovala. Tak, jak se předpokládalo, frakce izolované před imunizací slepice v případě linií CuFi-1 zde neměly žádný efekt. Překvapivě, v předcházející práci⁵¹ bylo chování těchto frakcí opačné – nespecifické frakce, jako jsou frakce získané před imunizací, nebo nezachycená frakce (NF7) z afinitní purifikace, které by specifické anti-PA-IIL protilátky neměly obsahovat, častokrát protektivní efekt vykazovaly. Nezachycená frakce NF7 znatelně snižovala adhezenci PAK jak u linií CuFi-1, tak u NuLi-1. Vysvětlení tohoto efektu zřejmě

spočívá v tom, že lektin imobilizovaný na afinitní koloně neměl dostupné vazebné místo pro sacharidy, a tak protilátky proti tomuto vazebnému místu se nemohly zachytit a kolonou prošly do nezachycené frakce⁵⁶. Tak v nezachycené frakci NF7 zůstaly specifické protilátky, které inhibují lektin. Když byl porovnán protektivní efekt protilátek IgY u linií CuFi-1 a NuLi-1 nebyly výsledky zcela jednoznačné. U linie CuFi-1 by měl být inhibiční efekt IgY výraznější, a to z důvodu větší adherence bakterií PA na tyto buňky (předpoklad pozměněné sialyzace). Avšak v předkládané práci i předchozích pracích^{51,55} byla adherence PA u obou linií srovnatelná.

Dalším vybraným antiadhezivním agens jsou syntetické multivalentní inhibitory PA-III na bázi fukosy – konkrétně tzv. glykoklastry, kterých strukturu tvoří multivalentní jádro a z něho vycházející spojovací ramena („větve“) zakončené sacharidovými skupinami, fukosami. Glykoklastry vykazují vysokou afinitu k lektinům, a proto se jejich využití jeví jako velmi slibná strategie boje proti patogenům, která na rozdíl od antibiotik nevyvolává fenomén rezistence. Jejich významnou vlastností, díky které vykazují značný inhibiční potenciál, je multivalence^{37,45}. Cílem výzkumu zabývajícího se těmito syntetickými inhibitory je snaha najít co nejlepší glykoklastr, který by byl využit ve vývoji nových antibakteriálních léků. Výhodou synteticky připravených inhibitorů oproti slepičím protilátkám IgY je jejich definovaná struktura, která umožňuje dobrou reprodukovatelnost jejich účinku.

Nejprve byl použit již dříve testovaný tetravalentní inhibitor CSM-539 s cílem reprodukovat výsledky z předchozí diplomové práce⁵¹, na kterou předkládaná bakalářská práce navazuje. U tohoto glykoklastru byl opět potvrzen trend zvyšujícího se inhibičního efektu se snižující se koncentrací. Takový typ chování, pozorovaný i u jiných multivalentních inhibitorů, je připisován síťování bakterií prostřednictvím těchto látek. Při vyšších koncentracích multivalentního inhibitoru dochází tak k tvorbě agregátů PAK, které adherují na epitelální buňky a tím zvyšují hodnotu fluorescenčního signálu^{51,57}. Další dva vybrané inhibitory byly monovalentní glykoklastr KGY-4 a divalentní glykoklastr ERJ-440. Jejich inhibiční efekt byl studován v širším koncentračním rozsahu i proto, že bylo k dispozici větší množství těchto látek. Monovalentní inhibitor pravděpodobně z důvodu nízké valence nevykazoval žádný význačný protektivní efekt jak u linie CuFi-1, tak u NuLi-1. Naopak u divalentního inhibitoru bylo ve vyšších koncentracích (500 a 1000 μ M) pozorováno významné snížení bakteriální adheze u obou linií buněk. Publikované studie naznačují, že dimerní inhibitor na bázi fukosy váže PA-III účinněji (vykazují efektivní klastrový

glykosidový efekt) než trimerní struktury. Pozorovaný efekt souvisí s tím, že dimery jsou schopny vázat se s vysokou afinitou a nižší disociační konstantou⁴⁶. Zároveň se jinde prokazuje, že pro dosažení vysoké afinity jsou často rozhodující topologie a povaha linkerů („větvi“), spíše než samotná valence⁴⁵. To, že nebyl významný protektivní efekt u obou typů glykoklastrů jednoznačně dokázán, mohlo být způsobené tím, že bakterie PA lektin PA-III neexprimovaly v dostatečné míře. Jak ukazují výsledky v předešlé práci⁵¹, PA-III v použitém modelovém systému adhezního testu hraje jako adhesin PAK významnou roli. V jeho nepřítomnosti se koncové fukosy glykoklastrů nemají na co navázat a následně neinhibují adhezi PA na buněčný povrch. Z časových důvodů však nebylo možné ověřit přítomnost PA-III v kultuře kontrolního kmenu PAK a tím potvrdit či vyvrátit uvedenou domněnku. Závěrem je možno shrnout, že divalentní inhibitory, zejména ve vyšších koncentracích, nebo více valentní inhibitory, jako CSM-539, se zdají být slibnými kandidátními sloučeninami pro další inhibiční studie.

6. Souhrn:

- Pomocí specifických slepičích anti-PA-III protilátek byla ověřena funkce modelového systému pro studium adherence PA na epiteliální buněčné linie – protilátky inhibovaly vazbu PA.
- V případě tetravalentního glykoklastru CSM-539 byl potvrzen inhibiční efekt, který se se snižující se koncentrací inhibitoru zvyšoval.
- Monovalentní glykoklastr nevykazoval u buněčných linií CuFi-1 nebo NuLi-1 žádný výrazný protektivní efekt.
- Naopak divalentní glykoklastr ve vyšších koncentracích (500 a 1000 μM) prokazoval u obou buněčných linií významné snížení adheze PA.

7. Seznam použité literatury:

- ¹ Jakubec, P. Cystická fibróza. *Interni Med.* **5**, 253–239 (2006).
- ² Fila, L. Cystická fibróza dospělých. *Vnitr. Lek.* **63**, 834–842 (2018).
- ³ Vávrová, V.; Bartošová, J.; Fila, L. Možnosti léčby cystické fibrózy – 1. část. *Klin. Farmakol. Farm.* **21**, 22–26 (2007).
- ⁴ Zielenski, J.; Rozmahel, R.; Bozon, D.; Kerem, B.; Grzelczak, Z.; Riordan, J. R.; Rommens, J.; Tsui, L.-C. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* **10**, 214–228 (1991).
- ⁵ Vávrová, V. *Cystická fibróza*. Praha, Grada Publishing a.s., 2006.
- ⁶ Rowntree, R. K.; Harris, A. The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Ann. Hum. Genet.* **67**, 471–485 (2003).
- ⁷ Gadsby, D. C.; Vergani, P.; Csanády, L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* **440**, 477–483 (2006).
- ⁸ Welsh, M. J.; Ramsey, B. W.; Accurso, F.; Cutting, G. R.; Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8th ed. New York, McGraw-Hill Inc., 2001.
- ⁹ Zhang, W.; Zhang, X.; Zhang, Y. H.; Stokes, D. C.; Naren, A. P. Lumacaftor/ivacaftor combination for CF patients homozygous for Phe508del-CFTR. *Drugs Today (Barc.)* **52**, 229–237 (2016).
- ¹⁰ Vávrová, V.; Bartošová, J. a kolektiv CF centra FN Motol. *Cystická fibróza – příručka pro nemocné a jejich rodiče*. 2nd ed. Praha, Professional Publishing, 2009.
- ¹¹ Simpson, J.L. Hledání významu screeningu cystické fibrózy. *Gynekol. Prom.* **1**, 26–31 (2005).
- ¹² Vávrová, V.; Zemková, D.; Macek, M. jr.; Pohunek, P. Cystická fibróza u dětí – ale nejen u nich. *Forum Med.* **3**, 49–55 (2000).

- ¹³ Boucher, R. C. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur. Respir. J.* **23**, 146–158 (2004).
- ¹⁴ Rhim, A. D.; Kothari, V. A.; Park, P. J.; Mulberg, A. E.; Glick, M. C.; Scanlin, T. F. Terminal glycosylation of cystic fibrosis airway epithelial cells. *Glycoconj. J.* **17**, 385–391 (2000).
- ¹⁵ Farrell, P. M.; White, T. B.; Ren, C. L.; Hempstead, S. E.; Accurso, F.; Derichs, N.; Howenstine, M.; McColley, S. A.; Rock, M.; Rosenfeld, M.; Sermet-Gaudelus, I.; Southern, K. W.; Marshall, B. C.; Sosnay, P. R. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J. Pediatr.* **181**, 4–15 (2017).
- ¹⁶ Farrell, P. M.; White, T. B.; Derichs, N.; Castellani, C.; Rosenstein, B. J. Cystic Fibrosis Diagnostic Challenges over 4 Decades: Historical Perspectives and Lessons Learned. *J. Pediatr.* **181**, 16–26 (2017).
- ¹⁷ De Boeck, K.; Derichs, N.; Fajac, I.; de Jonge, H. R.; Bronsveld, I.; Sermet, I.; Vermeulen, F.; Sheppard, D. N.; Cuppens, H.; Hug, M.; Melotti, P.; Middleton, P. G.; Wilschanski, M. New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe. *J. Cyst. Fibros.* **10**, 53–66 (2011).
- ¹⁸ Wu, W.; Jin, Y.; Bai, F.; Jin, S. In *Molecular Medical Microbiology (2nd ed.)*. Tang, Y.-W.; Sussman, M.; Liu, D.; Poxton, I.; Schwartzman, J. (Eds.) **2**, 753–767. Boston, Academic Press, 2015.
- ¹⁹ *Pseudomonas Aeruginosa*, Sem. <<https://fineartamerica.com/featured/3-pseudomonas-aeruginosa-sem-david-m-phillips.html>> [cit. 20. 8. 2020]
- ²⁰ Neves, P. R.; McCulloch, J. A.; Mamizuka, E. M.; Lincopan, N. In *Encyclopedia of Food Microbiology (2nd ed.)*. Batt, C. A.; Tortorello, M. L. (Eds.) **3**, 253–260. Oxford, Academic Press, 2014.
- ²¹ Wu, M.; Li, X. In *Molecular Medical Microbiology (2nd ed.)*. Tang, Y.-W.; Sussman, M.; Liu, D.; Poxton, I.; Schwartzman, J. (Eds.) **3**, 1547–1564. Boston, Academic Press, 2015.

- ²² Bodey, G. P.; Bolivar, R.; Fainstein, V.; Jadeja, L. Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* **5**, 279–313 (1983).
- ²³ Bednář, M.; Fraňková, V.; Schindler, J.; Souček, A.; Vávra, J. *Lékařská mikrobiologie – bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha, Marvil, 1996.
- ²⁴ Pang, Z.; Raudonis, R.; Glick, B. R.; Lin, T.-J.; Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* **37**, 177–192 (2019).
- ²⁵ Imberty, A.; Wimmerová, M.; Mitchell, E. P.; Gilboa-Garber, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect.* **6**, 221–228 (2004).
- ²⁶ Grishin, A. V.; Krivozubov, M. S.; Karyagina, A. S.; Gintsburg, A. L. *Pseudomonas aeruginosa* lectins as targets for novel antibacterials. *Acta Naturae* **7**, 29–41 (2015).
- ²⁷ Chemani, C.; Imberty, A.; Bentzmann, S. de; Pierre, M.; Wimmerová, M.; Guery, B. P.; Faure, K. Role of LecA and LecB Lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Lung Injury and Effect of Carbohydrate Ligands. *Infect. Immun.* **77**, 2065–2075 (2009).
- ²⁸ Vašková, L.; Nosková, L.; Bláhová, B.; Wimmerová, M.; Dřevínek, P.; Kubíčková, B.; Stiborová, M.; Hodek, P. Evaluation of anti-PAIIL lectin hen yolk antibody as an agent inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence to epithelial cells. *Monatsh. Chem.* **147**, 889–896 (2016).
- ²⁹ Strateva, T.; Yordanov, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J. Med. Microbiol.* **58**, 1133–1148 (2009).
- ³⁰ Clatworthy, A. E.; Pierson, E.; Hung, D. T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 541–548 (2007).
- ³¹ Hořejší, V.; Bartůňková, J. *Základy imunologie*. 3rd ed. Praha, Triton, 2005.
- ³² Sompayrac, L. M. *How the Immune System Works*. 6th ed. New York, John Wiley & Sons, 2019.

³³ IMUNOGLOBULIN.

<<https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:IMUNOGLOBULIN.png>> [cit. 26. 2. 2021]

³⁴ 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).

³⁵ Carlander, D.; Stålberg, J.; Larsson, A. Chicken Antibodies. *Ups. J. Med. Sci.* **104**, 179–189 (1999).

³⁶ Utratna, M.; Deegan, S.; Joshi, L. Exploitation of Glycobiology in Anti-Adhesion Approaches against Biothreat Agents. *J. Bioterror. Biodef.* **7** (2016).

³⁷ Wittmann, V.; Pieters, R. J. Bridging lectin binding sites by multivalent carbohydrates. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 4492–4503 (2013).

³⁸ Malinovská, L.; Le, S. T.; Herczeg, M.; Vašková, M.; Houser, J.; Fujdiarová, E.; Komárek, J.; Hodek, P.; Borbás, A.; Wimmerová, M.; Csávás, M. Synthesis of β -D-galactopyranoside-Presenting Glycoclusters, Investigation of Their Interactions with *Pseudomonas aeruginosa* Lectin A (PA-IL) and Evaluation of Their Anti-Adhesion Potential. *Biomolecules* **9**, 686 (2019).

³⁹ Cecioni, S.; Imberty, A.; Vidal, S. Glycomimetics versus Multivalent Glycoconjugates for the Design of High Affinity Lectin Ligands. *Chem. Rev.* **115**, 525–561 (2015).

⁴⁰ Lahmann, M. Architectures of Multivalent Glycomimetics for Probing Carbohydrate – Lectin Interactions. *Top. Curr. Chem.* **288**, 17–65 (2009).

⁴¹ Pertici, F.; Pieters, R. J. Potent divalent inhibitors with rigid glucose click spacers for *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecA. *Chem. Commun. (Camb.)* **48**, 4008–4010 (2012).

⁴² Reynolds, M.; Pérez, S. Thermodynamics and chemical characterization of protein–carbohydrate interactions: The multivalency issue. *C. R. Chim.* **14**, 74–95 (2011).

⁴³ Chabre, Y. M.; Roy, R. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Horton, D. (Ed.) **63**, 165–393. Academic Press, 2010.

- ⁴⁴ Miura, Y.; Fukuda, T. In *Amyloidosis: Mechanisms and Prospects for Therapy*. Sarantseva, S. (Ed.) 92. Rijeka, InTech, 2011.
- ⁴⁵ Ligeour, C.; Dupin, L.; Angeli, A.; Vergoten, G.; Vidal, S.; Meyer, A.; Souteyrand, E.; Vasseur, J.-J.; Chevolut, Y.; Morvan, F. Importance of topology for glycocluster binding to *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia ambifaria* bacterial lectins. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 11244–11254 (2015).
- ⁴⁶ Marotte, K.; Préville, C.; Sabin, Ch.; Moumé-Pymbock, M.; Imbert, A.; Roy, R. Synthesis and binding properties of divalent and trivalent clusters of the Lewis a disaccharide moiety to *Pseudomonas aeruginosa* lectin PA-IIL. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 2953–2961 (2007).
- ⁴⁷ ATCC. CuFi-1 (ATCC[®] CRL4013[™]). <<https://www.atcc.org/products/crl-4013>> [cit. 20. 4. 2021]
- ⁴⁸ ATCC. NuLi1 (ATCC[®] CRL4011[™]). <<https://www.atcc.org/products/crl-4011>> [cit. 20. 4. 2021]
- ⁴⁹ Sigma-Aldrich. PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labeling. <<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/271/475/mini26bul.pdf>> [cit. 21. 4. 2021]
- ⁵⁰ Sigma-Aldrich. PKH67 Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labeling. <<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/984/984/pkh67glbul.pdf>> [cit. 21. 4. 2021]
- ⁵¹ Vašková, M. Vývoj antibakteriálních protilátek pro pacienty s cystickou fibrosou. Diplomová práce. (PřF UK, 2019).
- ⁵² Nosková, L. Studium adheze *Pseudomonas aeruginosa* na buňky plicního epitelu. Diplomová práce. (PřF UK, 2013).

- ⁵³ Nilsson, E.; Larsson, A.; Olesen, H. V.; Wejåker, P.-E.; Kollberg, H. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* **43**, 892–899 (2008).
- ⁵⁴ Nilsson, E.; Kollberg, H.; Johannesson, M.; Wejåker, P.-E.; Carlander, D.; Larsson, A. More Than 10 Years' Continuous Oral Treatment with Specific Immunoglobulin Y for the Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: A Case Report. *J. Med. Food* **10**, 375–378 (2007).
- ⁵⁵ Vašková, M. Protilátky proti lektinu PA-IIL jako prostředek prevence bakteriálních infekcí u pacientů s cystickou fibrosou. Bakalářská práce. (PřF UK, 2017).
- ⁵⁶ Dle ústního sdělení pana prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. (PřF UK, Praha) dne 19.6.2021.
- ⁵⁷ Kašáková, M.; Malinovská, L.; Klejch, T.; Hlaváčková, M.; Dvořáková, H.; Fudiarová, E.; Rottnerová, Z.; Maťátková, O.; Lhoták, P.; Wimmerová, M.; Moravcová, J. Selectivity of original C-hexopyranosyl calix[4]arene conjugates towards lectins of different origin. *Carbohydr. Res.* **469**, 60–72 (2018).