

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY
KATEDRA BIOCHEMIE



Diplomová práce

**PŘÍPRAVA SLEPIČÍCH PROTILÁTEK PROTI
VYBRANÝM ANTIGENNÍM STRUKTURÁM
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Bc. Martina Kosová

Školitel diplomové práce: Doc. RNDr. Petr Hodek, CSc.

PRAHA, 2008

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Místo a datum:

Podpis:

Chtěla bych tímto poděkovat vedoucímu své diplomové práce Doc. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za cenné rady a pomoc při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří mě podporovali a stáli za mnou v době mého studia. Děkuji.

Obsah diplomové práce

Seznam použitých zkratk	3
1. ÚVOD	5
1.1. Pseudomonas	6
1.1.1. Pseudomonas aeruginosa	7
1.1.2. Burkholderia cepacia	9
1.1.3. Patogenita.....	10
1.1.3.1. Způsobená onemocnění a rizikové faktory	12
1.2. Cystická fibróza	13
1.2.1. Bakteriální infekce spojené s cystickou fibrózou	21
1.3. Terapie infekcí Pseudomonas Aeruginosa	24
1.3.1. Léčba antibiotiky	24
1.3.2. Aktivní versus pasivní imunizace	27
1.4. Protilátky a imunitní systém	29
1.4.1. Savčí protilátky	29
1.4.2. Slepíčí protilátky	31
1.5. Virulenní a s virulencí spojené faktory Pseudomonas aeruginosa	35
1.5.1. Vybrané antigeny pro imunizaci.....	36
1.5.2. Bičík.....	37
2. CÍL PRÁCE	42
3. MATERIÁL A METODY	43
3.1. Použitý materiál	43
3.2. Použité přístrojové vybavení a pomůcky	44
3.3. Použité metody	45
3.3.1. Schéma práce	45
3.3.2. Příprava antigenů pro imunizaci	46
3.3.2.1. Isolace bičíků bakterie Pseudomonas aeruginosa	46
3.3.2.2. Konjugace peptidů A a B s KLH	46
3.3.3. Imunizace slepic	47
3.3.4. Isolace protilátek IgY.....	48
3.3.4.1. Měření koncentrace proteinů	49
3.3.5. Afinitní purifikace protilátek	49
3.3.6. Testy specifity protilátek	54
3.3.6.1. ELISA	54
3.3.6.2. Elektroforéza.....	56
3.3.6.3. Western Blot	59

3.3.7.	Isolace potkaních plicních epitelálních buněk typu II	60
3.3.8.	Barvení bakterií a buněk pro pozorování v mikroskopu.....	61
3.3.8.1.	Barvení barvou Giemsa	61
3.3.8.2.	Grammovo barvení	62
3.3.8.3.	Flourescenční značení bakterií.....	62
3.3.9.	Testy adheze bakterií	63
4.	VÝSLEDKY	65
4.1.	Příprava antigenů pro imunizaci.....	65
4.1.1.	Isolace bičků	65
4.2.	Isolace protilátek	67
4.3.	Testy specifity protilátek	68
4.3.1.	ELISA	68
4.3.2.	Western blot.....	71
4.4.	Afinní purifikace protilátek	72
4.4.1.	Ověření specifity purifikovaných protilátek	75
4.4.1.1.	ELISA	75
4.4.1.2.	Western blot.....	78
4.4.1.3.	ELISA IgY proti peptidům za použití bičkové frakce jako antigenu	79
4.5.	Ověření specifity protilátek IgY proti celé PA	80
4.6.	Mikroskopování bakterií <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	81
4.7.	Isolace potkaních plicních epitelálních buněk typu II.....	84
4.8.	Test adheze bakterií	84
5.	DISKUSE	87
6.	SOUHRN.....	93
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	94

Seznam použitých zkratk

A	absorbance
A ₂₈₀	absorbance při 280 nm
AK	aminokyselina
BC	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát/nitroblue tetrazolinum
BIS	N, N'-methylen-bis-akrylamid
CF	cystická fibróza
CFTR	<u>C</u> ystic <u>f</u> ibrosis <u>t</u> ransmembrane <u>c</u> onductance <u>r</u> egulator
CNBr	bromkyan
DEA	diethylamin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	<u>e</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbent <u>a</u> ssay, imunochemická metoda
EtOH	ethanol
Fc	rheumatoidní faktor protilátek
FITC	fluorescein isothiokyanát
GIT	gastrointestinální trakt
Gua	guanidin hydrochlorid
h	hodina
IFN	gama interferon
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
Ig	imunoglobuliny
IgG	savčí imunoglobulin
IgY	slepičí imunoglobulin
IL-8	interleukin 8, chemokin
LD ₅₀	letální dávka, při které nepřežije 50 % z pokusných zvířat
m	hmotnost
M	molarita
MeOH	methanol
min	minuta
Mr	relativní molekulová hmotnost

OprF	vnější membránový protein F
OprI	vnější membránový protein I
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	sodný fosfátový pufr s obsahem NaCl (isotonický roztok)
PMN	polymorfonukleárové
PNPP	<i>para</i> -nitrofenyl fosfát
PVDF	polyvinylidendifluoridová membrána
RPM	otáčky za minutu
s	sekunda
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS–PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TLR	toll-like receptors – eukaryotické receptory, které rozeznávají molekulární části asociované s patogeny
TNF	tumor nekrotizující faktor
TRIS	tris-(hydroxymethyl) aminomethan
TWEEN® 20	polyoxyethylen (20) sorbitan monolaureát
V	objem
v/v	objemová procenta
w/v	hmotnostní procenta
ÚLM UK 2.LF	Ústav lékařské mikrobiologie Univerzity Karlovy 2. lékařské fakulty
ÚŽFG AVČR	Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky

1. Úvod

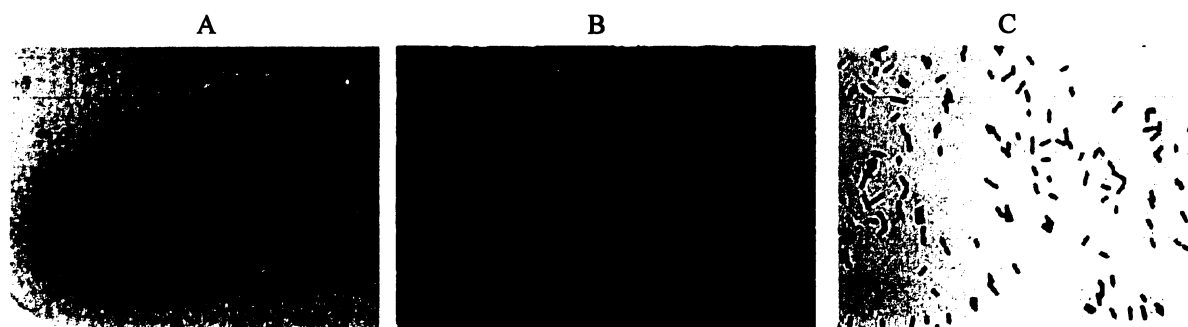
Pseudomonas aeruginosa je gramnegativní bakterie, která může vystupovat jako oportunní lidský patogen. Pro rizikové skupiny potencionálních pacientů je velmi nebezpečná, protože způsobuje vážné infekce. Významnou skupinou takto ohrožených jedinců jsou pacienti trpící cystickou fibrózou, pro které jsou infekce *Pseudomonas aeruginosa* často i smrtelné.

Tato bakterie prokazuje velkou rezistenci na širokou škálu antibiotik, bylo by tedy vhodné navrhnout nějakou účinnou prevenci - očkovací metodu, která by výskyt infekcí zásadně omezila nebo alespoň zlepšila průběh již probíhajících infekcí.

Slepičí protilátky na rozdíl od savčích nevyvolávají zánětlivou reakci, a proto mohou být vhodným nástrojem pro pasivní imunizaci chránící rizikové skupiny před infekcí *Pseudomonas aeruginosa*.

Významným virulenčním i adhezenčním faktorem této bakterie je bičík (majoritní protein FliC) a zejména protein FliD ze špičky bičíku. Proto byly bičík a peptid z proteinu FliD (typ A, B) vybrány pro přípravu protilátek v organismu slepice.

1.1. Pseudomonas



Obrázek 1: Obrázky *Pseudomonad*: A. Elektronmikroskopický snímek, B. Snímek z fluorescenčního mikroskopu, C. Gramovo barvení¹

Je to gramnegativní aerobní tyčinkovitá bakterie (viz obrázek 1). Vyskytuje se v odpadních vodách, v půdě a také vzácněji ve stolici lidí a domácích zvířat. Velmi často se nalézá v nemocničním prostředí: na jednotkách intenzivní péče, novorozeneckých odděleních, na stomatologickém oddělení - kde může kontaminovat různé lékařské náčiní. Z tohoto důvodu způsobuje často nemocniční nákazy - tzv. nosokomiální infekce. Kolonizuje především sliznice respiračního traktu a močových cest u hostitelů se sníženou schopností obrany².

Pseudomonady hrají důležitou roli v aerobní dekompozici, biodegradaci a přírodních cyklech prvků uhlíku a dusíku. Mají schopnost rozkládat stovky organických sloučenin. Mezi nimi například: plasty, pesticidy, herbicidy, insekticidy, petroleové substance, mastné kyseliny, různé alifatické i aromatické uhlovodíky a jiné těžce rozložitelné a odolné organické molekuly znečišťující životní prostředí. Neumí ovšem degradovat teflon, jednouchlíkaté sloučeniny (methan, methanol, formaldehyd), biopolymery – celulózu a lignin a jejich role v anaerobním rozkladu je minimální.

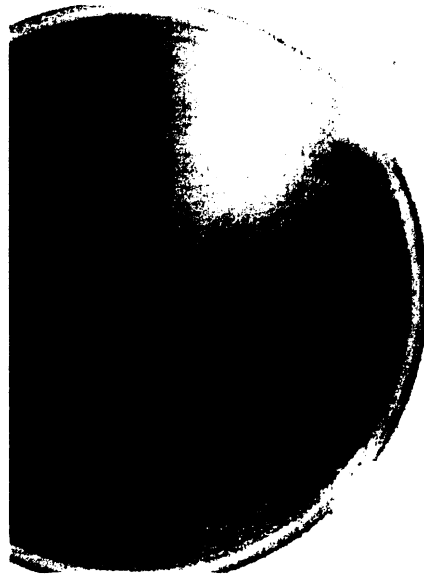
Charakteristickými znaky jsou tyto fyziologické vlastnosti: chemoorganotrofie, aerobní metabolismus, neschopnost fermentace, fotosyntézy a fixace dusíku a možnost růstu na mnoha organických substrátech. Disimilují cukry Entner-Doudoroff cestou. Samozřejmě existují výjimky z této poměrně přesné fyziologické charakterizace. Některé druhy umí fixovat vzdušný dusík (*Pseudomonas stutzeri*). *Pseudomonas aeruginosa* je po fenotypickém „shiftu“, který se odehrává při kolonizaci hostitelské tkáně schopna



Obrázek 2: Kolonie *Pseudomonas aeruginosa* na agaru ¹

Plasmidy, které mohou *PA* obsahovat jim často propůjčují rezistenci k mnoha antibiotikům a jiným antibakteriálním látkám. Tato rezistence je také z části odůvodněna jejich přirozeným sklonem vytvářet si anaerobní biofilm, přes který se antibiotika nedostanou.

PA tvoří rozpustné pigmenty: modrozelený pyocyanin (methyllhydrofenazin) a žlutozelený fluorescein ². *PA* je jediným známým producentem pyocyaninu (viz obrázek 3). Často ještě také produkuje pyoverdin – fluoreskující pigment a někdy i červený pyorubin nebo hnědý pyomelanin. Fluorescenční pigmenty působí jako siderofory při přijímání železa z okolí (jejich produkce je výrazně zvýšena při nedostatku železa). Některé tyto pigmenty působí také jako virulenční faktory ¹.



Obrázek 3: Rozpustný modrý pigment pyocyanin je produkován mnoha kmeny *Pseudomonas aeruginosa* ¹

1.1.2. *Burkholderia cepacia*



Obrázek 4: *Burkholderia cepacia* ⁴

Burkholderia cepacia (BC) gramnegativní pohyblivá tyčinka (na obrázku 4). Prvně byla popsána roku 1949 jako původce hniloby cibulovitých rostlin. Později bylo zjištěno, že je schopna způsobovat nosokomiální infekce a zařadila se tak mezi nebezpečné humánní

oportunní patogeny. Nejčastěji byla nalezena u imunosupresivních pacientů a u pacientů trpících cystickou fibrózou ⁵.

Tato bakterie byla dříve známa pod jménem *Pseudomonas cepacia*, dnes už ale je zařazena do své vlastní skupiny. Má také jako *PA* minimální nutriční požadavky a může růst dokonce i na penicilinu G ¹. *Burkholderia cepacia* je rezistentní vůči mnoha druhům antibiotik.

1.1.3. Patogenita

Bakterie *PA* se mohou uplatňovat jako patogeny dýchacího traktu, vylučovací soustavy, při různých zraněních (výskyt *PA* při zraněních se projevuje modrým hnisem, způsobovaným právě pyocyaninem nebo fluorescencí) a také se nachází v krvi. Protože je bakterie tak nenáročná na nutriční požadavky, je přítomna v nejrůznějších prostředích: často kontaminuje lékařské přístroje, je nalézána v potravě, v lécích, kosmetických přípravcích a preparátech obsahujících rostlinné látky ². Dezinfekční účinek proti *PA* mají chlorované preparáty ².

Díky celé řadě virulencních faktorů produkovaných *PA* je patogenita *PA* multifaktoriální. Na patogenitě se ze strany mikroba uplatňují jednak faktory vázané na bakteriální buňku (extracelulární polysacharid, slizová vrstva, stěnový lipopolysacharid), jednak extracelulární produkty (enzymy, toxiny, pigmenty) ².

Infekce *Pseudomonas Aeruginosa* má 3 fáze:

- 1) adherence na hostitelskou tkáň
- 2) akutní infekce
- 3) chronická infekce

1) adherence na hostitelskou tkáň

PA se pomocí svých pili a bičíku adhezuje na epiteliální buňky (často respiračního traktu). Funkci specifických receptorů pro adhezi mají sacharidy jako galaktosa, manna nebo sialová kyselina exponované v glykolipidech na povrchu membrán epiteliálních buněk. Ke schopnosti bakterie adherovat se na epiteliální buňky přispívají také některé vnější membránové proteiny (OprF).

Kromě toho také mukoidní polysacharid – alginát a exoenzym S pravděpodobně hrají svou roli v bakteriální adhezi. Je-li epiteliální tkáň nějakým způsobem pozměněná (zranění, hlenový sekret, atd.), jsou tyto monosacharidy zřejmě lépe dostupné a nastává tudíž větší riziko, že se bakterie na tkáni uchytlí.

2) akutní infekce

Akutní infekce se většinou projevuje do určitého počtu vyskytujících se bakterií. V této fázi se dá ještě léčit. Na průběh infekce má vliv mnoho faktorů - ať již samotný stav pacienta, tak množství různých virulenčních faktorů, kterými jednotlivé bakterie na hostitelský organismus působí.

Schopnost *PA* napadnout hostitelskou tkáň a vyvolat infekci závisí na množství produkovaných extracelulárních enzymů a toxinů, které narušují fyzikální bariéry a poškozují hostitelskou buňku, a také na rezistenci *PA* k fagocytóze a k hostitelskému imunitnímu obrannému systému^{1, 2}. Výčet a funkce některých těchto faktorů virulence jsou podrobněji uvedeny dále v oddílu 1.5.

Imunitní reakce je kromě počátečních fází přirozené imunity (kdy působí polymorfonukleáry) vázána hlavně na IgM, které zvyšují opsonizaci a napomáhají tudíž fagocytóze. Komplement nepůsobí zpravidla na virulentní kmeny baktericidně².

3) chronická infekce

Chronická infekce *PA* je definována jako trvalá perzistence bakterie po dobu minimálně 6 měsíců nebo jako signifikantní vzestup protilátek. Charakteristickým příznakem perzistující chronické infekce *PA* je produkce mukoidního alginátu a tvorba mikrokolonií, které jsou špatně propustné pro antibiotika⁶. Dochází zde k takzvanému fenotypovému shiftu, bakterie mění způsob výživy - jde o anaerobní respiraci využívající NO_3^- . V tomto stadiu infekce se říká, že bakterie kolonizovala hostitele a léčení této fáze již není příliš možné.

Také u zdravého člověka se výjimečně tato bakterie může objevit a způsobit i menší infekci. Patogenita *PA* je však do značné míry ovlivněna aktuálním stavem infikované osoby. Nebezpečí vzniku infekce je převážně mezi ohroženými skupinami pacientů, které mají jisté predispozice ke vzniku *PA* infekce dle dále zmíněných rizikových faktorů.

1.1.3.1. Způsobená onemocnění a rizikové faktory

PA způsobuje celou řadu onemocnění a zdravotních komplikací ¹:

- endokarditida (*PA* infikuje srdeční chlopně; dostává se sem z krevního řečiště)
- respirační infekce (ohroženi jsou pacienti se špatným stavem dýchacích cest nebo imunity; objevují se tedy u pacientů s chronickým plicním onemocněním, u neutropenických pacientů, pacientů trpících rakovinou podstupujících chemoterapii, u pacientů CF; mukoidní kolonizace u pacientů CF)
- bakteriémie a septikémie (u pacientů se špatnou imunitou – AIDS, neutropenie, vážné popáleniny; většinou se pacienti nakazí v nemocnicích)
- infekce centrální nervové soustavy (meningitidy a mozkové abscesy; příčiny - zranění hlavy, lékařský zákrok anebo infekce v jiné části těla)
- ušní infekce a zánět vnějšího ucha (často způsobuje záněty uší u plavců; nebo při zranění, piercingu)
- oční infekce (jestliže jsou oční obranné mechanismy poškozeny, bakterie produkuje elastasu, alkalickou proteasu a exotoxin A - naruší se rohovka a infekce může vést až ke ztrátě zraku)
- infekce kostí a kloubů (většinou se rozšíří z jiného místa infekce; nebo po nějakém zranění)
- infekce vylučovacího traktu (většinou nosokomiální infekce; může se dostat do krevního řečiště a způsobit septický šok)
- infekce gastrointestinálního traktu (může způsobovat infekce v jakékoliv části; často jedinci s oslabenou imunitou; také možnost vzniku septického šoku)
- kožní infekce (dermatitidy, infekce po zranění, popáleninách; snadná nákaza u pacientů AIDS; může se vyskytovat i u zvláštních forem akné)

Rizikové faktory, které podstatně zvyšují pravděpodobnost stát se hostitelem *PA* jsou: rakovina, popáleniny, kritický stav, pobývání na jednotkách intenzivní péče, AIDS, otevřená zranění, neutropenie, imunodeficience, imunosuprese (po transplantaci), dlouhodobé užívání antibiotik, leukémie, těžké operace, diabetes mellitus ⁷, piercing chrupavky horního ušního boltce ⁸, nošení kontaktních čoček ⁹. Nejvýznamnějším rizikovým faktorem pro vznik *PA* infekce je ale dědičné onemocnění cystická fibróza.

1.2. Cystická fibróza

Infekce *Pseudomonas aeruginosa* jsou často spojovány s cystickou fibrózou.

Cystická fibróza (CF) je autosomálně recesivním dědičným onemocněním. Podstata patogenetických změn u CF je mutace CFTR genu. „Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ - CFTR je chloridový kanál, lokalizovaný v apikální membráně epitelálních buněk a regulovaný cyklickým adenosinmonofosfátem. Tento kanál je u CF neprůchodný pro chloridové ionty, v důsledku čehož se mění složení a fyzikálně chemické vlastnosti hlenu na povrchu sliznic. Hlenový sekret na povrchu epitelu se zahušťuje, což narušuje normální funkci orgánů a je příčinou většiny klinických příznaků CF. Ve vývodech potních žláz nemohou být z primárního sekretu, tvořícího se v kloubíčku potních žláz jako ultrafiltrát plazmy, resorbovány chloridy a tedy ani sodík, a proto je v potu vysoká koncentrace solí⁶. CF se projevuje především opakovanými infekcemi dýchacích cest, neprospíváním, vysokým obsahem solí v potu a u mužů neplodností⁶.

Cystická fibróza je závažné onemocnění, které bylo dříve pro postižené smrtelné hned v prvních letech života. Ovšem dnes už včasná správná diagnostika a moderní léčebné metody změnily prognózu nemoci a i kvalitu života nemocných. V důsledku toho se také značně prodloužil věk, kterého se dnes běžně lidé s cystickou fibrózou dožívají: V uplynulých 65 letech se výrazně změnila prognóza nemoci. Zatímco ještě po skončení 2. světové války umírala většina dětí v kojeneckém věku, přežívá dnes 50 % nemocných do 4. dekády života¹⁰. Nicméně ani toto ještě není vše, co může lékařská věda spolu s dalšími přírodními vědami pro boj s touto nemocí udělat. Jsou zde stále další cesty, které by mohly ještě více zkvalitnit život CF pacientů, prodloužit jejich dobu života anebo úplně odstranit příčinu jejich obtíží.

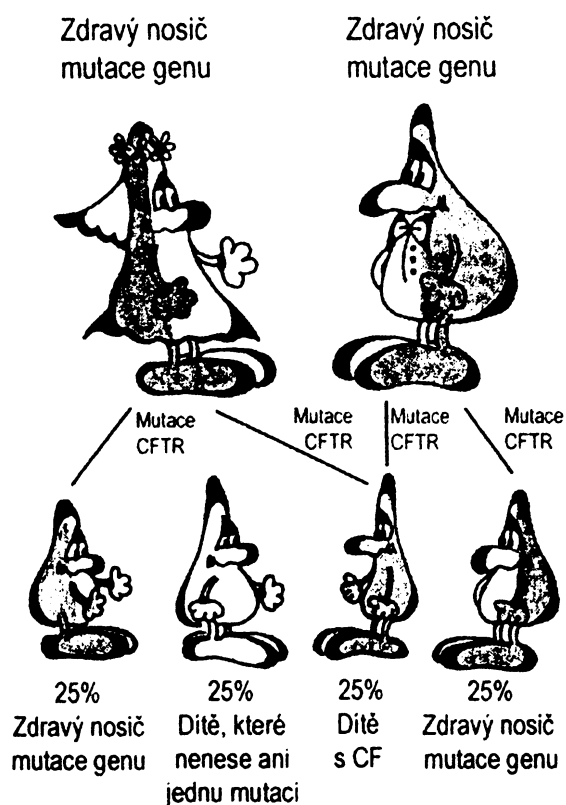
První historické zmínky o CF jsou známy dokonce už ze 17. století, kdy se zpívaly lidové popěvky o tom, že dítě, jehož pot chutná slaně je očarované a proto brzy zemře. Později byla samozřejmě snaha o zracionalnění této zvláštní souvislosti. Soudilo se, že těžce nemocné děti se hodně potí a málo myjí a tímto lze vysvětlit slanost jejich potu.

První popis cystické fibrózy je ale až z roku 1938 od americké patoložky D. Andersonové. Hodně nápomocný začal být také potní test pro včasné a dostatečně přesné diagnostikování této nemoci. Roku 1976 bylo vypracováno první komplexní léčebné schéma, s nímž se i výrazně zlepšily vyhlídky nemocných. Gen pro CFTR byl odhalen

roku 1989, což umožnilo poznání podstaty nemoci a také se započaly úvahy a pokusy související s genovou terapií.

Očekává se, že dnes narození nemocní mají naději dožít se kauzální léčby - ať již genovou terapií, či farmakologickým ovlivněním defektního proteinu.

CF je dědičná porucha, která se vyskytuje poměrně často: Každý 25.-30. z nás může být nosičem této nemoci. Pravděpodobnost je tedy, že každé 625.-900. manželství je manželstvím, v kterém oba potencionální rodiče jsou nosiči nemoci. Statisticky připadá jedno CF dítě na každých 2 500-3 500 narozených dětí, nejvyšší frekvence výskytu CF je v evropské populaci, a to 1:2500. Dnes již také mnohem lépe rozumíme genetice a biochemické podstatě onemocnění. Mutace CFTR genu jsou přenášeny podle Mendelových zákonů autosomálně recesivním způsobem. Pro dva rodiče-nosiče mutace tohoto genu tedy existuje 25% pravděpodobnost, že se jim narodí dítě postižené CF (to zdědí od každého rodiče právě tu alelu, na níž je přítomný zmutovaný CFTR gen), 50% pravděpodobnost, že narozené dítě bude zdravým nosičem mutace tohoto CFTR genu (ať už mutace zděděné po otci či po matce) a konečně 25% pravděpodobnost, že se jim narodí zdravé dítě, které ani nenesé žádnou mutaci CFTR genu (viz obrázek 5) ⁶.



Obrázek 5: Schéma dědičnosti mutace CFTR genu z rodičů na děti ¹¹

Gen kódující CFTR protein se nachází na 7. chromosomu. CFTR protein je tvořen 1480 aminokyselinami, obsahuje doménu několikrát procházející membránou, několik vazných míst pro ATP a oblast transportu iontů přes membránu ¹².

Je známo přibližně 800 možných mutací CFTR genu. Je také pozoruhodné sledovat nejčastější typy vyskytujících se mutací na různých zeměpisných místech, v kterých se odráží historie a migrace evropských národů ¹¹.

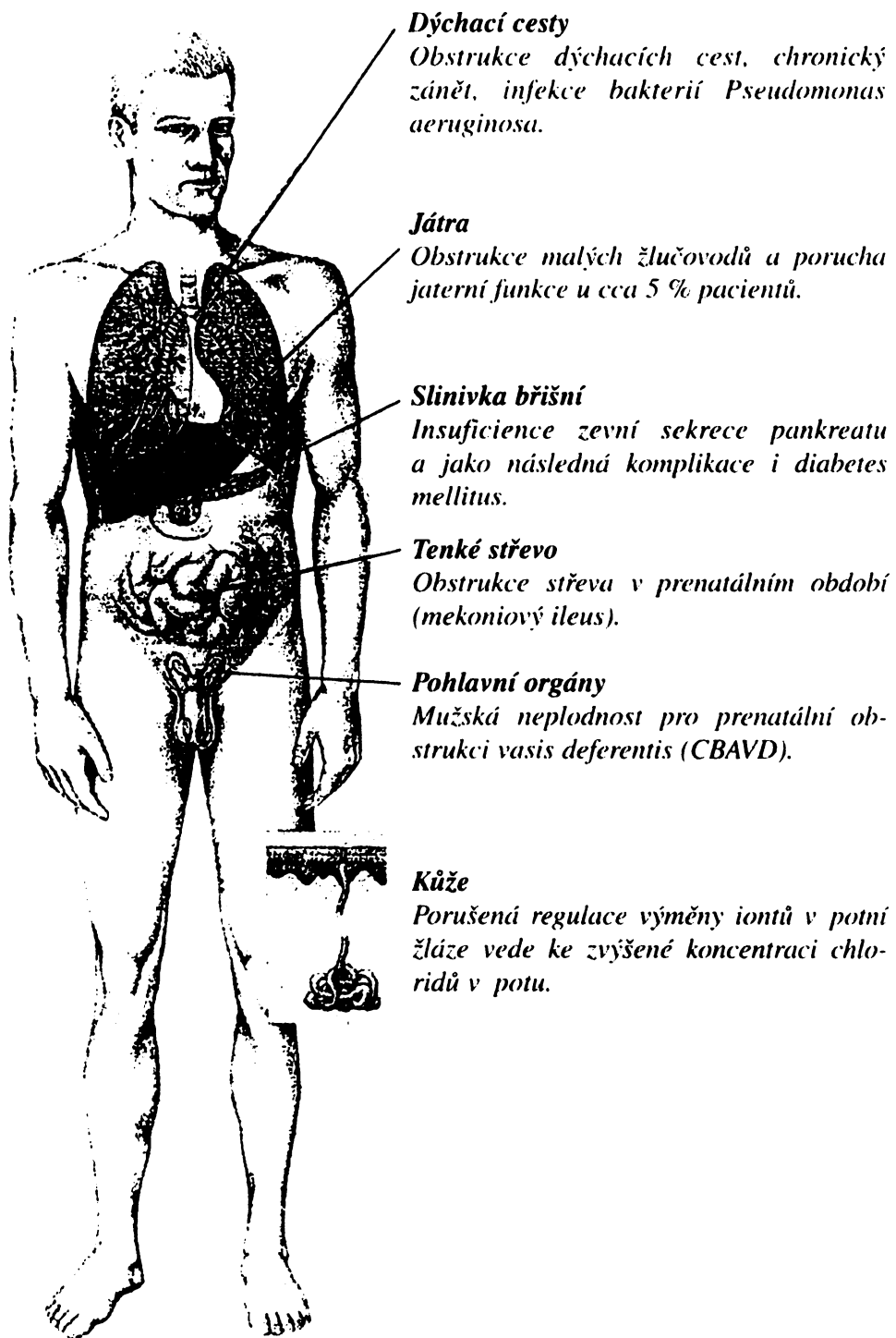
K diagnóze CF se používá několik metod: vyšetření potním testem (normální koncentrace chloridů v potu je 10-30 mmol/l potu, u CF jsou hodnoty většinou nad 60 mmol/l), molekulárně genetické vyšetření a vyšetření transepiteliálního rozdílu potenciálů. Nejdůležitější metodou ale samozřejmě zůstává molekulárně genetické vyšetření, které může potvrdit nebo vyvrátit podezření na CF. Používá se molekulárně genetická a prenatální diagnostika buď přímá (známé a přesně lokalizované mutace) nebo nepřímá (pomocí genových markerů, které se vyskytují v blízkosti mutovaného genu nebo v genu samotném) ⁶. Prenatální diagnóza CF je možná už od 11. týdne gravidity a provádí se z DNA buněk plodové vody nebo z placenty ⁶.

Příznaky upozorňující na diagnózu CF

První upozornění na CF může být ultrazvukové vyšetření v těhotenství nebo anamnestický dotaz při vyšetření novorozenců, zda jejich pot chutná slaně.

Klinické podezření je spojeno především s příznaky vyskytujícími se problémů respiračního ústrojí a gastrointestinálního traktu. V různých věkových obdobích však mohou být příznaky upozorňující na CF různé. Stručný popis hlavních příznaků spojených s CF můžeme vidět na následujícím obrázku 6.

CYSTICKÁ FIBRÓZA V PRAXI



Obrázek 6: Projevy cystické fibrózy⁶

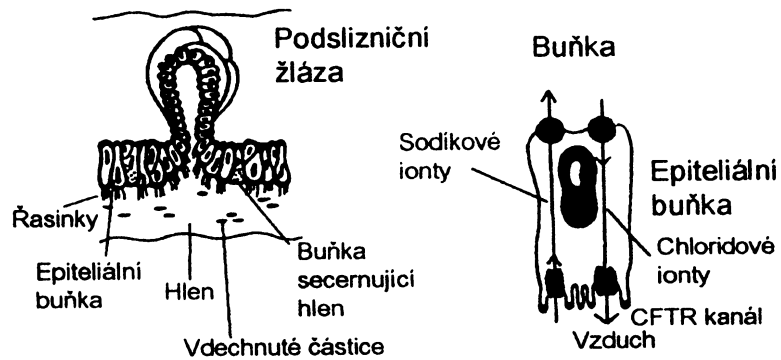
Patofyziologie u CF a způsoby léčení

Respirační ústrojí

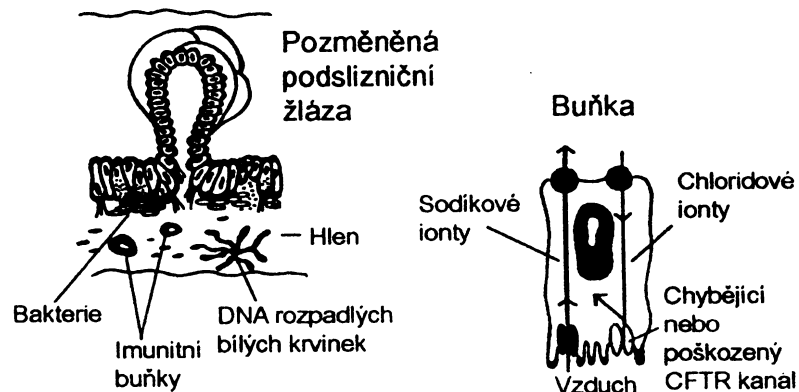
V patofyziologii plicních změn se uplatňuje základní geneticky podmíněný defekt CFTR genu. V důsledku poruch CFTR genu se zahušťuje hlen a mění jeho složení a tak periciliární tekutina na povrchu epitelu dýchacích cest je u CF isotonická a neschopná baktericidie (narozdíl od normálního hypotonického složení). Snadno zde tudíž vzniká infekce. Neutrofilů v reakci na vzniklou infekci produkují proteasy a ty se přímo podílejí na destrukci plicní tkáně, vyvolávají hypersekreci hlenu a poškozují činnost řasinkového epitelu. Při progresivním plicním onemocnění se též uplatňují eosinofily, zánětlivý interleukin IL-8, volné kyslíkové radikály (snížení hladiny ochranného vitamínu E). Degradace neutrofilů způsobuje uvolňování jejich DNA a ta dále přispívá k zvýšené viskoelasticitě sekretu⁶.

Na obrázku 7 je rozdíl mezi normální a poškozenou sliznicí dýchacích cest.

Normální sliznice dýchacích cest



Poškozená sliznice dýchacích cest



Obrázek 7: Normální a poškozená sliznice dýchacích cest s hlenotvornou podslizniční žlázou a buňkami výstelky (epitelu) – řasinkovými a sekretujícími hlen. Vedle je znázorněna buňka s normálně fungujícím chloridovým kanálem. V dolní části obrázku je sliznice dýchacích cest u CF se zbytnělou podslizniční žlázou, porušenou výstelkou, bakteriemi, imunitními buňkami a DNA z rozpadlých bílých krvinek v hlen. V pravé části obrázku je buňka s chybějícím nebo poškozeným CFTR kanálem, který je nepropustný pro chloridy¹¹.

Léčení respiračních onemocnění CF pacientů je časově velmi náročné - probíhá vlastně téměř neustále. Léčebná rehabilitace sestává z respirační fyzioterapie, dechové rehabilitace a pohybových aktivit.

Pacienti denně inhalují léky na zředování hlenu. Významný je nedávný objev, pomocí něhož dochází k velmi dobrému zředění hlenu - je to inhalace rekombinantní lidské DNAsy, která štěpí DNA degradovaných polymorfonukleárů.

Při velkém zhoršení funkce plic se přistupuje i k transplantaci plic, která obvykle výrazně zvýší kvalitu života pacienta. Navzdory tomu se ale pacient po transplantaci nedoživá mnoho let z důvodu agresivní imunosupresivní léčby provázené mnoha vedlejšími účinky (jako je i snadná infekce organismu) ⁶.

Gastrointestinální trakt u CF

Insuficience exokrinní funkce pankreatu je nejběžnějším gastrointestinálním symptomem CF. Pankreas je morfologicky a částečně i funkčně změněn a nemůže proto produkovat trávicí enzymy. Nejvíce je narušeno trávení tuků. Léčba proto spočívá v perorální dodávce pankreatických enzymů.

Dalšími potížemi mohou být: pankreatitida, diabetes mellitus vázaný na CF, gastroezofageální reflux, peptidické vředy, gastritida, mekoniový ileus, distální intestinální syndrom, invaginace, onemocnění appendixu, fibrotizující kolonopatie, prolaps rekta, jaterní onemocnění ⁶.

Dobrá výživa - vhodný a dostatečný příjem energie, je pro pacienty s CF velmi důležitý - ovlivňuje průběh jejich nemoci. Pankreaticky insuficientní nemocní se špatným stavem výživy bývají dříve chronicky kolonizováni *PA* a jejich stav se zhoršuje rychleji než u pacientů s dobrým stavem výživy. Stav výživy tak do určité míry vypovídá o celkovém klinickém stavu pacienta ⁶.

Při zvýšeném pocení (v létě, při fyzické zátěži) je nutný větší přívod solí. Potíže také mohou být s příjmem vitamínů rozpustných v tucích - což jsou A, D, E, K. Tyto vitamíny se proto většinou podávají spolu s pankreatickou substitucí, aby byla zajištěna jejich maximální absorpce.

Ostatní komplikace

- postižení potních žláz (pot obsahuje 5krát více solí, při velkém pocení proto nebezpečí hypoelektrolytémického šoku)
- postižení reprodukčního ústrojí (98 % mužů, nadvarle končí slepě, chybí jeho vývod - pravděpodobně vývodné cesty ucpány hustým hlenem; někdy i ženy, v děložním hrdle vazký hlen)
- osteoporóza (horší vstřebávání vitamínu D z potravy)
- kardiomyopatie
- projevy autoimunity ⁶

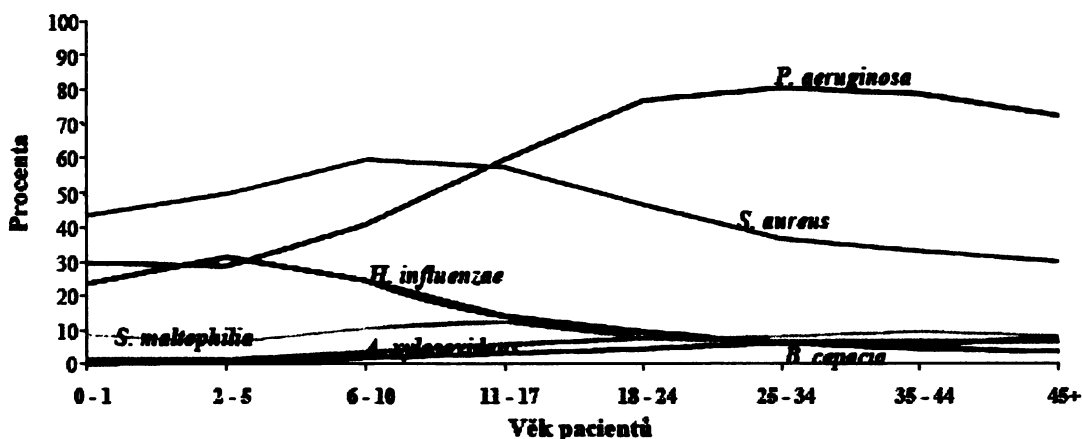
Prognóza léčení CF

Délka a kvalita života jedinců s CF pomalu stoupá - z důvodu nových a stále lepších způsobů léčby. Přestože výzkum a vývoj genové terapie neustále pokračuje, dosud není použitelná ke kauzální léčbě. Proto je teď důležité co nejlépe pečovat o nemocné CF, léčit je zatím dostupnými metodami, aby se dožili genové terapie v co nejlepším stavu. A tyto způsoby léčby se také dále snažit zdokonalovat a vyvíjet nové. Tím mám na mysli hlavně boj s největšími nepříteli pacientů CF, což jsou bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*.

1.2.1. Bakteriální infekce spojené s cystickou fibrózou

Plicní infekce

Hustý hlen u pacientů je živnou půdou pro bakterie a viry. Pacienti trpí opakovanými respiračními infekcemi, jejichž přechod do chronické podoby je nejčastější příčinou úmrtí. Kromě nejzávažnějších infekcí *PA* a *BC* se u pacientů CF ještě mohou vyskytovat infekce způsobené těmito patogeny: Především jsou to *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*. Dále se také mohou objevit *Pneumococci*, *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Legionella*, *Pasteurella multocida*, *Alcaligenes faecalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Aspergillus fumigatus* a další ⁶. Respirační viry mezi něž patří i viry chřipky mohou zvýšit vnímavost pacientů k sekundárním kolonizacím způsobených bakteriemi. Na obrázku 8 je graf ukazující výskyt jednotlivých patogenů u pacientů CF v USA v roce 2002.



Obrázek 8: Graf srovnávající výskyt jednotlivých patogenů v plicích pacientů s cystickou fibrózou (USA, 2002) ¹⁴

Pseudomonas aeruginosa

Významným faktorem pro rozvoj plicního poškození je chronická infekce *Pseudomonas aeruginosa*, která je zodpovědná za velkou část morbidity a mortality CF pacientů. Kolonizace touto bakterií roste s věkem, v dospělém věku bývá kolonizováno až 80 % pacientů ⁶. (Rovněž pankreatická insuficience je asociovaná s dřívější kolonizací *PA*.) Tato infekce se může přenášet i mezi pacienty CF, ale není přenosná na zdravého člověka. Číslo asialylovaných glykolipidů - buněčných povrchových receptorů pro *PA* je totiž větší u homozygotů $\Delta F508$ ¹⁵.

Pseudomonas aeruginosa produkuje mnoho toxinů a faktorů virulence. Některé z nich, jako např. elastasa a alkalická proteasa interferující s faktory nespecifické (fagocytóza) a specifické imunity (NK buňky, imunoglobuliny). Toto lokální poškození imunity přispívá k chronickému rázu infekce *Pseudomonas aeruginosa*. Specifické protilátky, které stoupají v průběhu infekce mají spíše blokující charakter než aby zprostředkovaly opsonizaci a lýzi bakterií. Protilátky tak nejsou schopny infekci eliminovat. Hlavní důvod perzistence pseudomonádové infekce je schopnost bakterie produkovat mikrokolonie obsahující alginát. Alginát interferuje s chemotaxí fagocytózou a účinností antibiotik.

Počáteční infekce je přitom většinou zahájena nemukoidními typy *PA*, ale změna na mukoidní typ koreluje s rozvojem protilátkové odpovědi na antigeny a toxiny *PA*. Protilátková odpověď se postupně zvyšuje v průběhu několika let ¹⁶. Objevují se protilátky patřící ke všem třídám IgG. Vysoké hodnoty IgG₂ a IgG₃ korelují s horším průběhem a to

po spojení s imunokomplexovým chronickým zánětem v plicích, na kterém se podílí velký příliv polymorfonukleárů ⁶.

Takzvaný mukoidní fenotyp *PA* je tedy spojen s horším průběhem infekce a horší prognózou. Má za následek větší rezistenci na antibiotika, ochranu před fagocytózou a komplementem. Proto je velmi důležitá prevence a včasné zachycení iniciální kolonizace *PA* v době, kdy bakterie ještě nebývá přítomna v mukoidní formě. Nutná je časná razantní antibiotická léčba - tak lze chronickou infekci oddálit o několik měsíců až let.

Burkholderia cepacia

Infekce tímto patogenem u CF pacientů nabývají v posledních desetiletích na významu a intenzitě. Zdrojem infekce je pravděpodobně především sekret dýchacích cest nemocných pacientů. Riziko přenosu se zvyšuje s intenzitou kašle u pacientů. Prevalence infekce *BC* roste s věkem. Riziko infekce ze zevního prostředí je malé, ale velké je riziko přenosu infekce navzájem mezi pacienty CF (nebo i z rukou zdravotnického personálu – mezi pacienty CF).

Hlavním úskalím infekce tímto patogenem je velká primární rezistence a snadné získání další rezistence tohoto patogenu na antibiotika. Eradikace této infekce u CF pacientů není prakticky možná.

Jsou známé různé kmeny *BC*, které se liší epidemiologickým a klinickým průběhem infekce. Infekce tímto patogenem může probíhat zcela asymptomaticky (buď samostatně nebo v kombinaci s infekcí *PA*) nebo jako progresivní zhoršování plicního onemocnění (s teplotou, úbytkem na váze a nutností opakovaných hospitalizací). Třetí forma této infekce může probíhat jako rapidní zhoršování stavu, vedoucí rychle k smrti pacienta (dokonce i u onemocnění, které dosud probíhalo mírně). Bezprostřední příčinou smrti pak obvykle bývá abscedující pneumonie a sepse („cepacia syndrom“) ⁶.

1.3. Terapie infekcí *Pseudomonas Aeruginosa*

(zaměřeno především na pacienty cystické fibrózy)

Infekce vyvolaná různými patogeny se léčí antibiotiky, ale bakterie *PA* a *BC* jsou na antibiotika značně rezistentní. Jestliže není infekce chronická, je ještě možná její léčba, ale jakmile se dostane do své chronické fáze - antibiotika již jen snižují aktuální počet bakterií v plicích, ale infekci zcela neodstraní. Antibiotika se většinou podávají delší dobu nebo opakovaně, ve větším množství a také v různých kombinacích - což je samozřejmě obrovská zátěž pro celý organismus pacienta CF. Dále budou uvedeny možnosti léčby či prevence infekcí *PA* (především ve spojení s pacienty CF).

1.3.1. Léčba antibiotiky

Na léčbu *PA* infekcí se používá: polymyxin B, kolistin, gentamicin, ofloxacin a ciprofloxacin²; flourochinoly, gentamicin, imipenem⁷.

Největší centrum v ČR, které sdružuje pacienty s CF a které se této nemoci už několik let věnuje je při Fakultní nemocnici Motol v Praze - II. dětská klinika. Zde popisují léčbu takto: U nemocných infikovaných *PA* se doporučuje pravidelná 3-4krát ročně opakovaná čtrnáctidenní kúra, která spočívá v intravenózním podávání kombinací antibiotik. Aminoglykosidy se podávají s betalaktamy (piperacilin, ceftazidim, imipenem, aztreonam) nebo s cotrimoxazolem či chinolony. Hladiny aminoglykosidů jsou monitorovány. Pravidelné provádění této terapie se osvědčilo v dánském CF centru a je přejímáno mnoha dalšími pracovišti. Výběr antibiotika se řídí citlivostí mikroba. V posledních letech se osvědčil i ciprofloxacin podávaný perorálně - podává se v dávce 30 mg/kg/den, a to i malým dětem. Inhalovaná antibiotika jsou u nemocných chronicky infikovaných *PA* podávána dlouhodobě, někdy i trvale. Nejčastěji se k tomuto způsobu léčby užívá Colimycin, případně aminoglykosidy nebo betalaktamy. V současné době se v USA zkouší tobramycin bez konzervačního prostředku ve vysokých dávkách (600 mg/3krát denně). Léčení infekcí vyvolaných multirezistentními bakteriemi je jedním z největších problémů posledních let. Je to také *BC*, která bývá velmi rezistentní na aminoglykosidy a je citlivá pouze na 2-4 betalaktamy. Nicméně se v léčbě doporučuje podávat kombinaci vysokých dávek aminoglykosidů s betalaktamy, protože in vivo může

existovat synergismus. Za velmi důležitou je pokládána prevence infekce, poněvadž je dobře přenositelná mezi pacienty navzájem¹³.

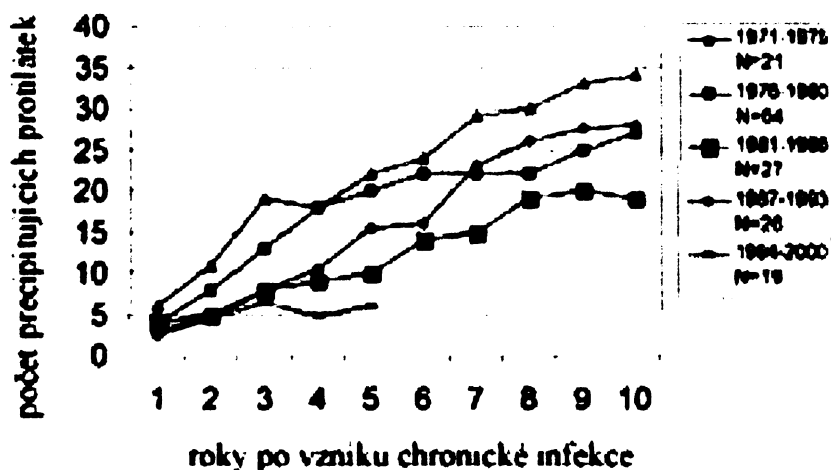
V dánském centru pro CF, v Kodani začali v roce 1971 s výzkumem CF - sledovali pravidelně hodnoty specifických protilátek proti *PA* v séru pacientů CF, kteří byli již ve stadiu chronické infekce¹⁶. Zjistili, že tato protilátková odpověď úzce koreluje s průběhem nemoci a že s její pomocí mohou diagnostikovat závažnost a pokročilost infekce. Rozlišovali tak mezi občasnými, přerušovanými infekcemi a chronickou kolonizací, která je charakterizována zvýšenou protilátkovou odpovědí. Míra protilátkové odpovědi je závislá na pokročilosti zánětu a poškození tkáně. Rychle rostoucí množství protilátek a tvorba imunokomplexů a precipitátů je spojena se špatnou prognózou¹⁶. S postupně se zlepšující léčbou *PA* infekcí se zvyšuje i šance udržet infekci *PA* alespoň nějaký čas pod kontrolou.

Dle použité léčby v jednotlivých časových obdobích se postupně zvyšoval čas přežití pacientů po objevení se chronické infekce a také se prodlužoval průměrný věk počátku chronické infekce.

Zlepšující se léčba infekcí *PA* je presentována v tomto časovém vývoji (grafické znázornění je na obrázku 9):

- 1971-1975; intravenózní antibiotická terapie byla předepisována pouze u akutních plicních problémů, průměrně to bylo jedenkrát ročně
- 1976-1980; všichni pacienti s chronickou *PA* infekcí byli léčeni každé 3-4 měsíce po dobu 2 týdnů podáváním antibiotik intravenózní cestou
- 1981-1986; byla zavedena důsledná izolace infikovaných a neinfikovaných pacientů, zlepšení všeobecných hygienických podmínek v nemocnici bránícím vzájemnému přenosu infekcí mezi pacienty, zavedení vysoce kalorické diety
- 1987-1993; pro prevenci či odložení počátku chronické infekce byla indikována agresivní chemoterapie orálním podáváním ciprofloxacinu s kombinací s inhalací colistinu po 3 týdny kdykoliv byla *PA* izolována ze sputa neinfikovaného pacienta, inhalace colistinu byla předepsána všem chronicky infikovaným pacientům mezi pravidelnou intravenózní léčbou, některým pacientům byl podáván ještě orálně ciprofloxacin, později byla počáteční agresivní terapie prodloužena až na 3 měsíce
- 1994-2000; denní inhalace rekombinantní lidské DNAsy

Dříve se každoročně u infikovaných pacientů CF objevilo 5 nových precipitujících protilátek proti *PA* v krvi, dnes už se toto číslo snížilo na 2,4 (v posledních 10 letech) - což indikuje lepší prognózu a delší přežívání pacientů s chronickou *PA* infekcí. V grafu na obrázku 9 je znázorněn počet specifických protilátek (proti *PA*) v závislosti na čase od počátku chronické infekce *PA*. Také počátek chronické infekce se zvýšil z 11 let (později už 9,3 let) na 13,8 let¹⁶.



Obrázek 9: Průměrný počet precipitujících protilátek po vzniku chronické infekce¹⁶

Přes všechny tyto snahy se ještě nepodařilo vyléčit chronickou infekci *PA*. Podáváním antibiotik se infekce pouze zmírní a prodlouží život pacientům. Ale tyto vysoké dávky antibiotik a jejich dlouhodobé užívání jsou velkou zátěží pro lidský organismus a je zde také nebezpečí, že si bakterie postupně na účinné léky navyknou a stanou se vůči nim rezistentní.

Řešením by bylo těmto *PA* infekcím úplně zabránit. O to se můžeme snažit prostřednictvím imunizace rizikových skupin pacientů ohrožených touto vážnou infekcí.

1.3.2. Aktivní versus pasivní imunizace

Pseudomonas aeruginosa je nejčastější patogen způsobující příležitostné nosokomiální infekce. Dále jsou to ještě například *Staphylococcus aureus* a *Enterobacterie*. Tyto příležitostné patogeny představují v dnešní době čím dál větší problém. Je to důsledkem zvyšující se rezistence bakterií na běžně užívaná antibiotika. Častý výskyt oportunních infekcí je také zapříčiněn tím, že přibývá více jedinců, kteří mají omezenou funkci imunity způsobenou chronickým či akutním onemocněním nebo zraněním¹⁷.

Nabízí se zde proto jiný způsob jak se vypořádat s těmito bakteriálními infekcemi. K tomuto účelu by mohla posloužit aktivní či pasivní imunizace ohrožených jedinců – tedy potenciálních pacientů, u kterých existuje zvýšená pravděpodobnost nákazy těmito příležitostnými patogeny.

Na otázku, zda je vhodnější aktivní či pasivní imunizace nelze odpovědět jednoznačně a musíme proto uvažovat případ od případu.

Jaké by měly být obecné předpoklady pro použití aktivní imunizace?

- musí být možné přesně určit v dostatečném časovém odstupu před možností vzniku infekce rizikové skupiny, aby mohla proběhnout včasná preventivní opatření (očkování)
- nalezení dostatečně imunogenního (protilátky proti němu se tvoří ve vysoké koncentraci a mají velkou afinitu) antigenu specifického pro daný organismus, který je zároveň pro lidský organismus netoxický
- riziková skupina lidí, která má být aktivně imunizovaná je schopná dostatečně velké imunitní odpovědi na podávaný antigen (či celou bakterii)

Jestliže nejsou výše zmíněné podmínky splněny, tak je na místě použít spíše pasivní imunizaci, která může sloužit i jako podpůrný léčebný prostředek.

Pasivní imunizaci je vhodné použít u nosokomiálních infekcí, kdy nelze dostatečně předem určit, kdo bude patřit do ohrožené skupiny a tudíž použití aktivní imunizace by zde nebylo vždy včasné. Aktivní imunizace také více zatěžuje organismus – což je pro pacienty, kteří již trpí nějakým zdravotním problémem další komplikací. U pacientů CF by se po aktivní imunizaci mohla vytvořit zánětlivá odpověď – která je u nich velmi nežádoucí, protože výrazně zhoršuje jejich zdravotní stav. Výhodou použití protilátek

k léčbě těchto nosokomiálních infekcí místo antibiotik je, že bakterie si na protilátky nedokáže vytvořit rezistenci.

Kritéria výběru antigenu

Dále je třeba rozhodnout, použije-li se pro aktivní imunizaci nebo na produkci protilátek pro pasivní imunizaci celá bakterie či pouze její vybraná část – nejčastěji faktory odpovědné za virulenci či adhezi bakterie. Nebo je také možnost vybrat z těchto antigenních struktur přímo peptidový antigen, kdy vznikají monoklonální (či polyklonální) protilátky proti vybranému epitopu, který je schopen navodit dostatečnou produkci protilátek. Vhodné je vybrat dostatečně účinný peptidový antigen.

Při výběru peptidového antigenu je třeba brát v úvahu následující obecná kritéria:

- peptid by neměl být součástí výrazné sekundární struktury (α - helix, β - struktura), naopak vhodná jsou místa s absencí sekundární struktury
- peptid, který je co nejvíce obnažen a exponován na povrchu (aby byl snadno dostupný protilátkám)
- dostatečná antigenicita (aby byla navozena dostatečná tvorba protilátek)
- musí být jedinečný (podobná peptidová struktura samozřejmě nesmí být přítomna v těle hostitele, struktura by měla být druhově specifická)
- často je vhodný peptidový antigen nedaleko C konce proteinové sekvence

Vodítkem při výběru peptidu může být také jeho schopnost kompetitivně inhibovat adhezi celé bakterie. Významnost jednotlivých aminokyselin v peptidu pak lze zjistit postupnými záměnami jednotlivých aminokyselin v peptidu a vzájemným porovnáním jejich inhibičních schopností.

Pokud je diskutována aktivní a pasivní imunizace, byly by vhodné popsat podrobněji strukturu protilátek a jejich základní funkci v imunitním systému.

1.4. Protilátky a imunitní systém

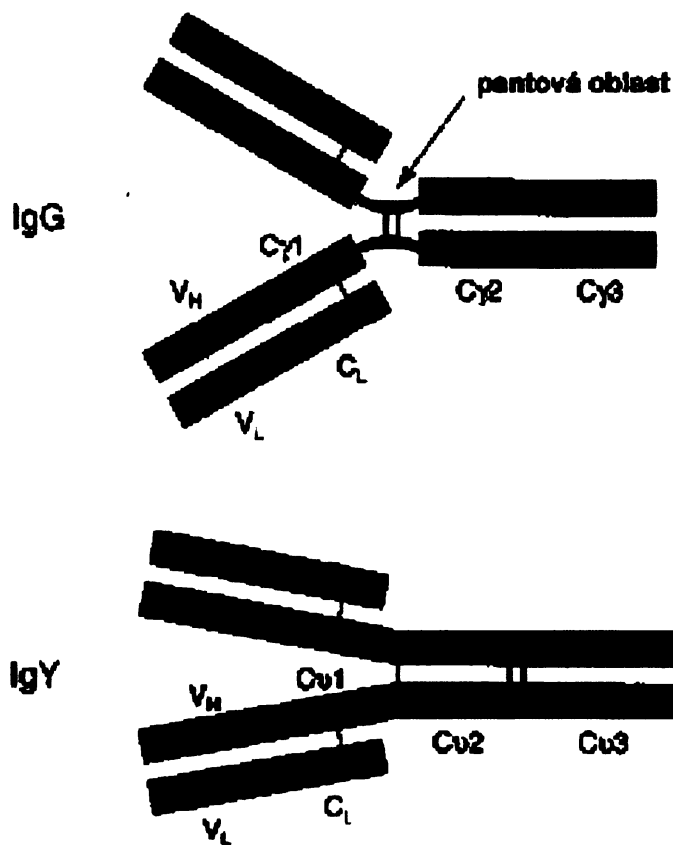
Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům organismu. Jeho funkcí je udržování integrity organismu tím, že rozpoznává škodlivé od neškodného a chrání tak organismus proti škodlivinám zevního i vnitřního původu¹⁸. Tato funkce se projevuje takto:

- obranyschopnost – imunitní systém rozpozná vnější škodliviny a chrání organismus proti patogenním mikroorganismům a jejich toxickým produktům
- autotolerance – imunitní systém rozpoznává vlastní tkáň organismu a udržuje toleranci vůči nim
- imunitní dohled – imunitní systém rozpozná vnitřní škodliviny, tj. průběžně odstraňuje staré, poškozené a některé změněné (zmutované) buňky¹⁸

1.4.1. Savčí protilátky

Struktura protilátek

Protilátky jsou tvořeny dvěma těžkými (H) řetězci kovalentně spojenými disulfidickými můstky. Ke každému těžkému řetězci je disulfidickým můstkem připojen ještě jeden lehký (L) řetězec. Těžké se skládají ze čtyř a lehké řetězce ze dvou imunoglobulinových domén. Domény na N-konci těžkého i lehkého řetězce jsou variabilní a označují se V_H a V_L , ostatní domény jsou konstantní (viz obrázek 10). Variabilní domény H a L řetězců vytvářejí společně vazebné místo pro antigen. Těžké řetězce jsou v Fc části (opsonizující imunoglobuliny se touto oblastí váží na Fc-receptory fagocytů) glykosylovány¹⁸.



Obrázek 10: Struktura savčí protilátky IgG a slepičí protilátky IgY¹⁹

V_H , V_L – variabilní domény těžkého a lehkého řetězce; C_L – konstantní doména lehkého řetězce, $C\gamma_{1, 2, 3}$ – konstantní domény těžkého řetězce IgG, $C\gamma_{1, 2, 3, 4}$ – konstantní domény těžkého řetězce IgY

Třídy imunoglobulinů

- IgM – pentamer; prvním typem protilátek tvořící se po setkání s antigenem; neváže se na Fc-receptory fagocytů, účinně aktivuje komplement
- IgG (IgG1 – IgG4) – nejhojnějším imunoglobulinem, dobře se váže na Fc-receptory fagocytů; IgG1 a IgG3 aktivují dobře komplement
- IgA – slizniční a sérová forma; sekretovaný na povrch sliznic; neaktivuje komplement; funguje jako opsonin
- IgE – uplatňuje se v obranných reakcích proti mnohobuněčným parazitům na sliznicích; alergické reakce
- IgD – na povrchu B buněk¹⁸

Mechanismy působení protilátek

- neutralizace – protilátky mohou blokovat (neutralizovat) aktivitu toxinů, virů a jiných mikroorganismů tím, že se váží na kritické epitopy mající toxickou nebo adhezenční funkci
- opsonizace – vazbou protilátky na mikroorganismy a antigenní částice se podstatně zlepšuje nebo vůbec umožňuje jejich pohlcení fagocyty a aktivují se destrukční mechanismy fagocytů
- aktivace komplementu – protilátky navázané na antigen mohou aktivovat komplement; to přispívá k opsonizaci, chemotaxi fagocytů a rozvoji zánětlivé reakce ¹⁸

Bylo by vhodnější, aby protilátky používané pro účely pasivní imunizace nedávaly podnět k rozvoji zánětlivé reakce. Těmto podmínkám vyhovují ptačí imunoglobuliny izolované z vaječných žloutků a označované IgY, které se poslední dobou těší stále větší oblibě. Mají totiž oproti savčím protilátkám některé výhody.

1.4.2. Slepičí protilátky

Struktura ptačího IgG je odlišná od savčího. Ptačí IgG obsahuje 4 konstantní domény, zatímco savčí IgG pouze 3. Proto byly ptačí IgG přejmenovány na IgY (egg yolk). Struktura IgY v porovnání s IgG je ukázána na obrázku 10. IgY (~ 180kDa) je typická protilátka vyskytující se u ptáků, plazů a obojživelníků, zatímco protilátky IgG se vyskytují pouze u savců. Srovnáním aminokyselinové sekvence IgY s IgG se ukazuje, že C γ 2 a C γ 3 domény IgG jsou podobné spíše doménám C γ 3 a C γ 4 IgY. Předpokládá se, že z chybějícího ekvivalentu C γ 2 domény u IgG se mohla stát pantová oblast (kterou postrádají IgY protilátky) ¹⁹.

Předtím, než slepice snese vejce, sekretuje do vaječného žloutku krevní imunoglobuliny typu IgY a imunoglobuliny IgA a IgM do bílku. Koncentrace protilátek ve žloutku je dokonce 1,3 – 1,9 krát vyšší než v krvi slepice. Po vylíhnutí kuřete přejdou IgY ze žloutku do jeho krve, zatímco IgA a IgM z bílku zajišťují pasivní imunizaci trávicího traktu ²⁰.

IgY na rozdíl od IgG nereagují se savčími Fc-receptory a neaktivují savčí komplement. Z důvodu snížené flexibility protilátek IgY komplexy antigen-IgY precipitují méně než imunokomplexy se savčími protilátkami ²¹. Tyto všechny vlastnosti IgY jsou potenciaálně výhodné pro pacienty CF, které právě nejvíce obtěžuje zánětlivá reakce a tvorba imunokomplexů zhoršující funkci plic.

Výhodou použití IgY je i menší stres experimentálního zvířete. Slepici se totiž jen odebere snesené vajíčko, kdežto u savců se protilátky získávají odběry krve či dokonce srdeční punkcí vedoucí ke smrti zvířete.

Výtěžnost slepičích IgY oproti získávání protilátek např. z králičí krve je až 30 krát vyšší. Přestože je koncentrace IgY ve vaječném žloutku menší než v krvi savců, je slepice schopna vyprodukovat až 25 g protilátek za rok, neboť vejce obsahující 70-150 mg IgY jsou slepicí snášena téměř denně. Stejně množství protilátek bychom dostali za rok z krve 30 králíků. Specifické protilátky proti určitému antigenu použitému pro imunizaci představují 0,1 -10 % celkové produkce IgY (závisí na použitém antigenu) ^{22, 23}.

V obecné rovině jsou vejce důležitým zdrojem živin, obsahují proteiny, lipidy, vitaminy, minerály a růstové faktory potřebné pro rozvíjející se embryo. Ale vejce obsahují i komponenty, které mají další funkce kromě vyživovací. Zajímavé biologické aktivity s nimi asociované jsou: antimikrobiální aktivita, antiadhesivní vlastnosti, imunomodulace, protirakovinná aktivita, aktivita snižující vysoký krevní tlak, antioxidační vlastnosti a inhibice proteas ²⁴.

Antimikrobiální aktivita je spojována především s IgY a pak také s lysozymem. IgY protilátky byly již produkovány proti mnohým bakteriím a virům a prokázaly svou schopnost vázat se na jejich části a zabránit infekci ²⁴. Působily například proti bakteriím *E. coli*, *Salmonella*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus mutans*. Potlačení infekce *H. pylori* u lidí bylo dosaženo podáváním jogurtu s IgY proti enzymu *H. pylori*. Ve studiích in vitro prokázaly protilátky IgY proti *PA* redukcii adheze *PA* na lidské epiteliální buňky, ale neinhibovaly růst bakterií. V další studii s lidmi orálně podávané IgY proti *Pseudomonas aeruginosa* zabraňovaly *PA* kolonizacím plic u CF pacientů ²⁵.

Účinnost pasivní imunizace podáváním IgY

Podmínkou začlenění do studie byla jedna pozitivní kultura *PA* ze sputa a žádné známky chronické infekce *PA*. Této studii se zúčastnili vybraní pacienti CF. Kontrolní skupina byla vybrána retrospektivně.

Protože vejce jsou normální složkou lidské potravy, není zde prakticky žádné riziko nežádoucích vedlejších efektů při orálním podávání IgY. Lidé si nevytváří protilátky proti orálně podávaným slepičím IgY. Experiment začal intramuskulární imunizací slepic dvěma kmeny *PA*. Po iniciální imunizaci slepice obdržely ještě další 3 upomínací dávky v dvoutýdenních intervalech a pak každé 2-3 měsíce. Z nasbíraných vajec byly poté získávány specifické IgY.

Pacientům byla předepsána denní dávka 50 mg IgY, což je asi množství obsažené v polovině jednoho vejce. Efekty imunizace za celé časové období jsou shrnuty v následující tabulce 1:

Tabulka 1: Vliv pasivní imunizace IgY proti *PA* infekcím u pacientů CF²⁵

	imunizovaná skupina	kontrolní skupina
počet pacientů	10	21
průměrný věk	11,5	10,6
počet nasbíraných kultur	315	560
pozitivní <i>PA</i> kultury	14	105
procento pozitivních kultur	4,4%	18,7%
pacienti bez pozitivní kultury	4 (40%)	3 (14%)
chronicky kolonizovaní pacienti	0	5

Efekt pasivní imunizace orálním podáváním IgY – stručné shrnutí

- prodloužení intervalu mezi první a následující infekcí *PA*
- odkládá počátek chronické infekce *PA*; u nikoho z imunizované skupiny se nerozvinula chronická infekce *PA*
- redukuje stupeň kolonizace a tedy snižuje množství potřebných antibiotik²⁵

Pro vyvození závažnějších závěrů z této studie by bylo potřeba více účastníků. Nicméně tento způsob imunizace má slibný potenciál. Bylo by také možné použít pro vytvoření specifických protilátek namísto celé bakterie pouze nějaký její antigen. Jako antigeny vhodné k imunizaci jsou většinou vybírány některé virulenční či adhezní faktory dané bakterie. Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* má takovýchto struktur více.

1.5. Virulenční a s virulencí spojené faktory

Pseudomonas aeruginosa

Poznání virulenčních faktorů je důležité pro odhalení jejich úlohy při infekcích lidského organismu. Pro výběr vhodného antigenu pro pasivní či aktivní imunizaci je vhodné zvolit virulenční či adhezenční faktor a tak pomocí protilátek zabránit adhezi bakterie nebo eliminovat její škodlivé působení (např. prostřednictvím toxinů).

Nejdůležitější faktory přispívající k virulenci bakterie ^{1, 2, 26}:

- adherenční faktory
 - pili
 - flagella
 - exoenzym S
 - vnější membránové proteiny (OprF)
 - biofilm, extracelulární vrstva tvořena alginátem
- invaziny
 - elastasa – štěpí kolagen, kasein, elastin, IgA, IgG, inaktivuje komplement, rozkládá fibronectin, narušuje respirační epitel a řasinky, inaktivuje IFN a TNF
 - alkalická proteasa – rozkládá fibrin, inaktivuje IFN a TNF
 - fosfolipasa, lecitinasa (hemolysiny) – narušují tkáň a napomáhají lepšímu množení bakterií
 - cytotoxin (leukocidin)
 - siderofory
 - pyocyanin – inhibitor mitochondriálních enzymů, narušuje tkáň, snižuje pohyb řasinek
- toxiny
 - exoenzym S - bakteriální toxin, ADP – ribosylující
 - exotoxin A – má transferázovou aktivitu, katalyzuje přenos adenosinfosfát ribózy z NAD na elongační faktor 2 a tím inhibuje proteosyntézu v buňce
 - lipopolysacharid (LPS) – bakteriální toxin

1.5.1. Vybrané antigeny pro imunizaci

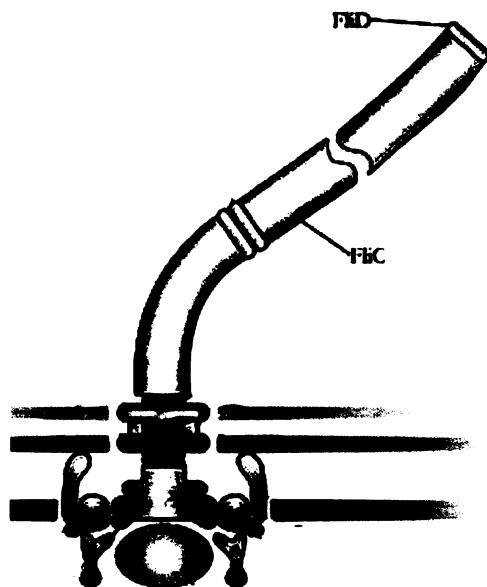
Pro imunizaci byly již vybírány různé struktury *PA*. V tabulce 2 je uveden stručný přehled antigenů, které již byly využity k experimentům využívajícím aktivní či pasivní imunizaci.

*Tabulka 2: Virulenční a další faktory využívané jako antigeny pro aktivní či pasivní imunizaci*²⁶

antigen	funkce, důvod
pili (fimbrie)	odpovědné z 90% za adhezi
flagella (bičík)	pohyb, adheze
LPS	bakteriální toxin, část buněčné stěny
vnější membránový protein F	porin, adheze
vnější membránový protein I	porin
elastasa	proteasa
fosfolipasa C	hemolysin
exotoxin A	bakteriální toxin, ADP – ribosylující
exoenzym S	bakteriální toxin, ADP – ribosylující
alginát	mukoidní exopolysacharid tvořící anaerobní biofilm
ribosom	evoluční vzdálenost
DNA	evoluční vzdálenost
lektiny (LecA a LecB)	adheze, cytotoxicita

Pro naši studii jsme si jako antigen vybrali bičík, protože je významným virulenčním a adhezenčním faktorem bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

1.5.2. Bičik



Obrázek 11: Struktura bičíku a lokalizace proteinů FliC a FliD²⁷

Bičik slouží bakterii k pohybu a chemotaxi (viz obrázek 11, 12). Mutanti bez bičíku prokázali značně redukovanou schopnost tvorby bakteriálního biofilmu za aerobních či anaerobních podmínek²⁸. Bičik je odpovědný i za adheenci bakterie a je také významným virulencním faktorem bakterie.

Bičik je velmi komplexní strukturou (přes 50 genů je zapojeno v syntéze a funkci bičíku), což indikuje, že se jedná o důležitou strukturu nezbytnou pro úspěšný život bakterie. Protilátky proti bičíku mají v pokusech značný protektivní účinek. Mutanti mají až 78 % sníženou schopnost adherence, mutanti postrádající kromě bičíku zároveň i pili dokonce 95 % redukci adherence²⁹.

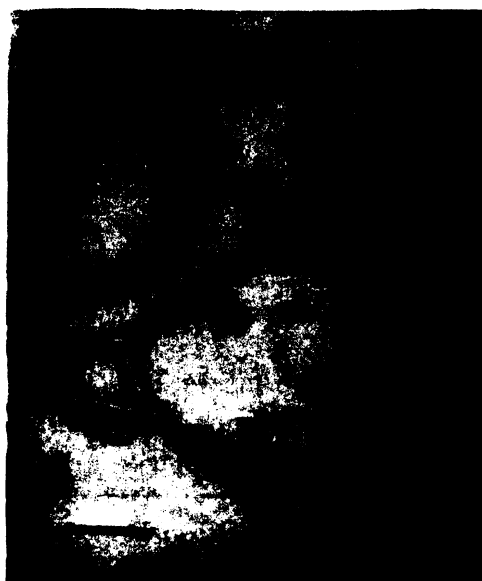
Role bičíku v procesu bakteriální infekce se dělí do 3 fází²⁹, které korelují s dříve popsányi 3 fázemi *PA* infekce:

- pohyb a chemotaxe pomocí bičíku na místo určení (většinou po vdechnutí do plic)
- adherence na glykolipidy epiteliálních buněk - bičik je adhesinem; po navázání spouští imunitní signalizační kaskádu chemokinů IL-8, které přilákají polymorfonukleáry a makrofágy – čímž dochází k zánětlivé odpovědi; *PA* je potom fagocytována za účasti bičíku jako ligandu
- chronická infekce při níž jsou většinou selektivním tlakem preferovány mutantní bakterie bez bičíku přeživší fagocytózu (bakterie už dále bičik nepotřebuje)

Protein FliC

Bičik je značně konzervovaná struktura mezi kmeny *PA* – existují jen 2 druhy bičíků které mají odlišné imunogenní struktury ²⁶. Bičik je tvořen především proteinem FliC (produkt genu *flic*). Dle strukturních analýz byly určeny dva typy tohoto proteinu (flagellinu) ²⁹:

- typ A, heterogenní s molekulovou hmotností 45-52 kDa (za heterogenitu a různou velikost jsou mimo jiné odpovědné glykosylace flagellinu)
- typ B, homogenní s molekulovou hmotností 53 kDa



Obrázek 12: Snímek z elektronového mikroskopu - izolované bičíky ³⁰

Glykosylace bičíku se zdá být důležitým dějem, protože mutanti bez glykosylace jsou méně virulentní - pravděpodobně nějakým způsobem zvyšuje zánětlivou odpověď vyvolanou bičíkem ³¹. Sacharidové komponenty ovšem tvoří epitopy bičíku ³².

Díky virulenčním a adhezenčním vlastnostem a také pro svou značnou konzervovanost mezi kmeny *PA* je bičik vhodným adeptem pro vývoj imunizačních vakcín.

Účinnost imunizace

Byly prováděny různé testy na potvrzení virulence bičíku. Jeden z testů prokázal, že letální dávka mutantů bez bičíku musí být asi 10^4 vyšší než u normálních bakterií *PA*.

Testy byly prováděny na myších s popáleninami. Myši byly imunizováni aktivně celým bičíkem nebo pasivně králičími protilátkami proti bičíku. Oba typy imunizace se projeví jako dostatečně účinné. Monoklonální specifické protilátky proti oběma typům flagelly (A, B) zabezpečují ochranu proti letální dávce *PA*. Myši imunizované monoklonálními protilátkami proti bičíku dostaly po 1 až 2 hodinách desetkrát vyšší LD₅₀. Imunizované myši přežily na rozdíl od kontrolní neimunizované skupiny, kde jich přežilo pouhých 20 %³³.

Další pokusy prováděné s bičíky jsou shrnuty v tabulce 5.

Tabulka 3: Užití flagelly pro imunizaci²⁶

imunogen	efekt imunizace
purifikovaná flagella (A)	↑ přežití dle specifického flagelárního antigenu; rovnoměrně ↑ přežití při použití divalentní imunizace (myši s popáleninami) ³⁴
částečně purifikovaná flagella (A)	specifická in vitro inhibice pohybu dle flagelárního antigenu při použití protilátky proti flagelle ³⁵
purifikovaná flagella (A, P); (myši s popáleninami nebo opařené)	specifická in vitro inhibice pohybu dle flagelárního antigenu při použití protilátky proti flagelle; ↑ přežití dle specifického flagelárního antigenu ³⁶
monoklonální protilátky proti částečně purifikované flagelle	specifická in vitro inhibice pohybu dle flagelárního antigenu při použití protilátky proti flagelle; ↑ přežití dle specifického flagelárního antigenu (myši s popáleninami) ³⁷

(A – aktivní imunizace, P – pasivní imunizace)

Na bičíku lze však určit specifičtější místo odpovědné za jeho adhezní schopnosti.

Protein FliD

Pro navázání bičičku na mucin je nezbytný protein ze špičky bičičku, produkt *fliD* genu. Je to dobře exponovaná struktura a proto je pravděpodobné, že se na ní nachází nějaké epitopy. Gen *fliD* se vyskytuje spolu s *fliC* (gen kódující hlavní protein bičičku – flagelin) ve dvou odlišných typech A, B. Protilátky proti A, B typům proteinu FliD reagovaly se všemi kmeny *PA*, z čehož vyplývá, že tyto 2 druhy proteinu jsou mezi *PA* velmi konzervované³⁸.

V databázích není k dispozici struktura proteinu FliD. Jako nejbližší protein byl nalezen flagelární protein ze *Salmonelly typhimurum* (~ 20% identita, ~ 50% podobnost).

Aminokyselinové sekvence obou typů proteinu FliD jsou uvedeny následně (viz obrázek 13, 14). Jejich AK složení je ze 43 % identické a z 51 % podobné³⁸. Pro imunizaci byly vybrány C – terminální peptidy z obou typů proteinu FliD (A, B) – zvýrazněny v AK sekvencích. C – terminální peptidy jsou potencionálně imunogenní z důvodu absence sekundární struktury a expozice.

MANSTTINGYNSGLDIKNIVSTLVAAEKAPKEAQLKRLESDDAKFTGIGQLKSAISDLQILKELNKP
ELFQKRSASTSDEKFATATATKDALPGIYKLEVTQLASVSKVATASFADGYKTTSGGTLTIKQGADD
AGVTVNVAAGATLAEVRDSLNAQLKDKGITANIVNPNPGDGSRLVFTGKDSGAGKDVVQGSGL
ENFNIGSVGADGKLTLSQLDGTSSSSSGYITQAKNAKFSIDGLTLESPTNTVDKINGVTFELKTVT
DTNKPITISVEQDRGGVKDNIKKFVAAYNKLVGVTSELTGVTKVGDDKAPVVGALVGDSSVRNLLT
TMRNEMVQPGQGT DVRMLADMGITKKDGTLEIDDKDKLVKDKFESVSALFTGDTGLMKRLDD
KLTPYTQTGGVLQQRDLGLQDTIKSVDTQREALNRRVEQLQDRLLKQFTAMDQLIGQLNQTSGRM
AQ ██████████

Obrázek 13: Aminokyselinová sekvence proteinu FliD (typ A)³ a vybraný epitop

MAGISIGVGSTDYTDLVNKMVNLEGAAKTNQLATLEKTTTTTRLTALGQFKSAISAFQTALTALNSNA
VFMARTAKSSNEDILKASATQSAVAGTYQIQVNSLATSSKIALQAIADPANAKFNSTLNISVGDTKL
PAITVDSSNNTLAGMRDAINQAGKEAGVSATIITDNSGSRLVLSSTKTGDGKDIKVEVSDDGSGGN
TSLSQLAFDPATAPKLSDGAAAGYVTKAANGEITVDGLKRSIASNSVSDVIDGVSFVKAIVTEAGK
PITLTVSRDDAGVKDNVKKFVEAYNTLTKFINEQTVVTKVGEDKNPVTGALLGDASVRALVNTMRS
ELIASNENGSVRNLAALGITTTKDGTLIDEKKLDKAISADFEQVASYFTGDTGLAKRLGDKMKPYT
DAQGILDQRTTTLQKTLNVDQKADLAKRLAALQEKLTTQFNLLSAMQDEMTRKQKSITDNL ██████████
██████████

Obrázek 14: Aminokyselinová sekvence proteinu FliD (typ B)³ a vybraný epitop

Flagelární aktivace epiteliální signalizace

Zdá se, že bičík hraje dokonce dominantní imunostimulační roli při plicní infekci *PA* – především v jejím počátečním stadiu. Plicní epiteliální buňky mají na své apikální straně přítomen receptor TLR 5, který specificky váže bakteriální flagelin. Flagella se také váže na glykolipid asialoGM1, který je přítomen v lipidovém raftu spolu s TLR 2. Obě tyto vazby mají pak za následek zahájení zánětlivých signálních kaskád vedoucích například k produkci cytokinů NF- κ B a IL-8 a zvýšenou expresi mucinu³⁹.

2. Cíl práce

Cílem této práce bylo připravit specifické slepičí protilátky proti vybraným antigenním strukturám bakterie *Pseudomonas aeruginosa*:

- bičíku – hlavním proteinem je FliC
- peptidům z bičíkového proteinu FliD – typu A / B

Dále prokázat zda tyto specifické protilátky rozpoznávají použité antigeny a zda jsou účinné při inhibici adheze bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

3. Materiál a metody

3.1. Použitý materiál

Fluka, Německo

azid sodný, p-nitofenylfosfát, Tween® 20, Giemsa, Coomassie Brilliant Blue R-250

Lachema, Brno, ČR

všechny ostatní chemikálie

Nunc, InterMed, Dánsko

mikrotitrační destičky Polysorb a Maxisorb (ELISA)

Nutricia Mléčná výživa a.s., Opočno, ČR

nízkotučné sušené mléko

Pierce, USA

SulfoLink® Coupling Gel, Imject® Maleimide Activated mcKLH

Sigma, USA

králičí protilátka IgG proti slepičí IgY konjugovaná a alkalickou fosfátasou, králičí protilátka IgG proti slepičí IgY konjugovaná s FITC, DEA, DMSO, CNBr aktivovaná Sepharosa 4B, BCIP/NBT, WRM – standard molekulových hmotností pro SDS-PAGE

Vidia, Vestec, ČR

syntetizovány peptidy A / B

3.2. Použité přístrojové vybavení a pomůcky

Spektrofotometr HP 8453 E – Hewlett Packard

Spektrofotometr Sunrice remote (čtečka mikrotitračních destiček) – TEKAN, Austria

Analytické váhy 40 SM – PESA

Předvážky EW 600 – KERN

pH metr model 370 – ATI Orion

Mixér ETA 0010 – ETA, ČR

Centrifuga MS –SANYO, UK

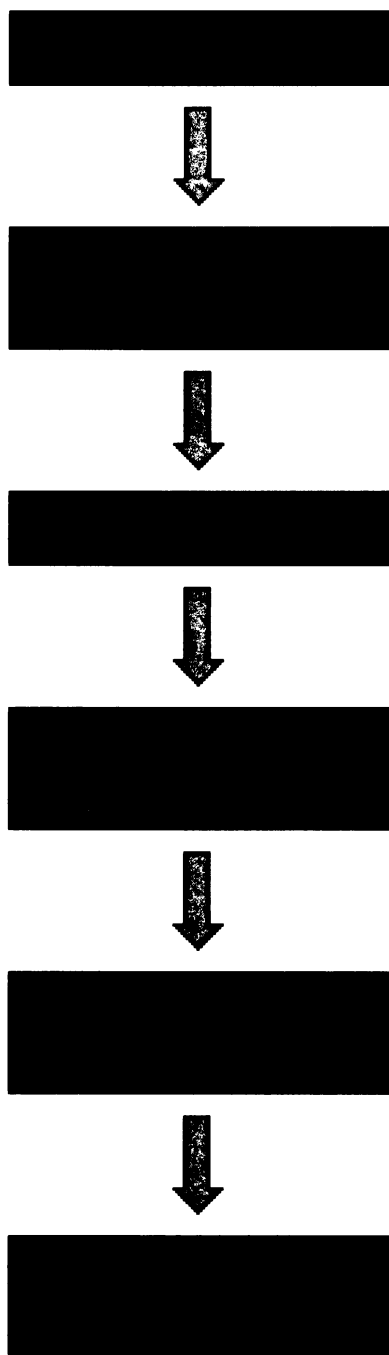
Centrifuga K 70D – JANETZKY, Germany

Ultracentrifuga BECKMAN COULTER™- Optima™ LE-80K Ultracentrifuge, USA

Mikroskop Nikon ECLIPSE TE2002-U, program NIS-Elements AR 2.30

3.3. Použité metody

3.3.1. Schéma práce



3.3.2. Příprava antigenů pro imunizaci

3.3.2.1. Isolace bičků bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

Použité roztoky

- PBS: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄·12H₂O; 1 mM NaH₂PO₄·2H₂O; pH 7,2

Vzorek bakterií *PA* (sbírkový kmen) byl získán z ÚLM UK 2.LF a kultivován v suspenzní kultuře v ÚŽFG AVČR. Bakterie byly v exponenciální fázi růstu sedimentovány a uchovány v PBS (~ 15 ml).

Vzorek byl v kádince na magnetické míchačce homogenizován po přidání pufru PBS do výsledného objemu 200 ml. Po promíchání byl vzorek mixován po dobu celkem 1 min (4 x 15 s) v mixeru (zn. ETA) a centrifugován v centrifuze K24 Janetzki (rotor 6 x 65 ml) 20 min při 13 000 RPM.

Supernatant byl přelit do kyvet pro ultracentrifugu Ti 45 Beckman (rotor 6 x 70 ml) a centrifugován při 45 000 RPM po dobu 3 h. Supernatant byl opatrně odsát a sediment rozsuspendován v ~ 500 µl PBS a dále uchován při -20° C. Tento postup byl lehkou modifikací postupu převzatého z literatury ⁴⁰.

3.3.2.2. Konjugace peptidů A a B s KLH

Vybrané peptidy A a B z proteinu FliD určené k imunizaci byly syntetizovány.

Synteticky připravené peptidy

- peptid A: **CALSSLPGLVKKS**
- peptid B: **CASLPYGSGKKT**

Protože peptid sám o sobě má příliš malou molekulovou hmotnost, aby vyvolal produkci protilátek, je třeba z něho připravit imunogen - tedy zvýšit molekulovou hmotnost navázáním peptidu na vhodnou molekulu (nosič), aby vzniklý konjugát již mohl být použit k imunizaci a navodil patřičnou imunitní odpověď v produkčním organismu.

Imunogen můžeme připravit tak, že peptid (obsahující cystein) propojíme pomocí bifunkčního činidla přes SH skupinu cysteinu na nosičový protein – např. vysokomolekulární hemocyanin KLH⁴¹. Proto byl v případě obou synteticky připravených peptidů k jejich N – konci přidán cystein. Výhodou takto připravených imunogenů je lepší expozice peptidových antigenů, která amplifikuje signál pro tvorbu protilátek.

Použité látky a roztoky

- Imject® Maleimide Activated mcKLH (Pierce)
- konjugační pufr: 0,1 M NaH₂PO₄·2H₂O; 0,15 M NaCl; pH 7,2

Aktivovaný mcKLH nabízí dostupné maleimidové skupiny které mohou reagovat s –SH skupinami peptidů (tvorba thioetherové vazby).

Aktivovaný mcKLH se rekonstituoval přidáním vody za tvorby 10 mg/ml roztoku. Navážené peptidy A, B (1,5 mg) se rozpustily v 200 µl konjugačního pufru, smíchaly se stejným objemem roztoku aktivovaného mcKLH a nechaly se spolu reagovat 2 h za laboratorní teploty.

3.3.3. Imunizace slepic

Pro imunizaci byly použity slepice označené dále:

- A5 – antigenem celá PA – sbírkový kmen
- A9 – antigenem bičíková frakce
- 21 – antigenem peptid A
- 22 – antigenem peptid B

Slepice (Leghorn) byly chovány v separátní kleci za řízeného světelného režimu. Vejce byla sbírána každý den a skladována v lednici při 8°C. Před první imunizační dávkou byla odebrána kontrolní vejce pro stanovení bazální hladiny protilátek – dále používány jako kontrolní frakce protilátek IgY. Slepice byly imunizovány intramuskulárně 3 dávkami antigenu – vždy po 100 µg v týdenních intervalech. Po poklesu hladiny protilátek byla slepici aplikována další upomínací dávka (100 µg).

Protilátky proti celé *PA* byly připraveny již dříve⁴². Slepice (A9) byla imunizována připraveným bakteriálním antigenem – subbuněčnou frakcí *PA* nabohacenou o bičíky. Další slepice (21 a 22) byly imunizovány synteticky připravenými peptidovými antigeny navázanými na vysokomolekulární hemocyanin KLH.

3.3.4. Isolace protilátek IgY

Použité roztoky

- PBS s azidem: PBS; 0,1% (w/v) azidu sodného (NaN_3)

Frakce protilátek byly připraveny z 2-9 vajec. Žloutky byly pomocí separátoru odděleny a pod tekoucí vodou dokonale očištěny od proteinů bílku. Pak byly přeneseny přes nálevku do polyethylenového odměrného válce a po odečtení objemu byly zředěny 8 násobným množstvím destilované vody. Směs byla homogenizována na magnetické míchačce. Poté bylo sníženo pH roztoku na 5,0 – 5,2 přidáním 0,5 M HCl, homogenát byl přenesen do uzavřené skleněné nálevky a zmražen při -20°C .

Po rozmrazení byl homogenát přefiltrován přes filtrační papír v nálevce do většího odměrného válce. K získanému filtrátu byl přidán NaCl tak, aby vznikl 8,76% (w/v) roztok. Hodnota pH byla upravena na 4,0 přidáním 0,5 M HCl. Roztok byl míchán na magnetické míchačce 30 minut a poté ponechán v klidu precipitovat 2 hodiny⁴³. Nakonec byla suspenze centrifugována v centrifuze Janetzki K70D (výkyvný rotor 4 x 750 ml) 25 minut při 3 500 RPM. Sediment (IgY frakce) byl rozpuštěn v PBS s azidem a skladován při 8°C .

3.3.4.1. Měření koncentrace proteinů

Z roztoku protilátek bylo odebráno 300 μ l do mikrozkušavky a tento vzorek byl centrifugován po dobu 5 minut při cca 13 000 RPM v mikrocentrifuze Micro Centaur Sanyo. Ze supernatantu bylo odebráno 50 μ l a přeneseno do 2,45 ml PBS s azidem v křemenné kyvetě. Byla změřena absorbance při 280 nm, slepým vzorkem byl pufr PBS s azidem. Koncentrace proteinu ve vzorku byla vypočtena podle vzorce:

$$K = A_{280} \cdot n \cdot f$$

Kde:

K...koncentrace v [mg/ml]

A_{280} ... absorbance při 280 nm

n...ředění vzorku

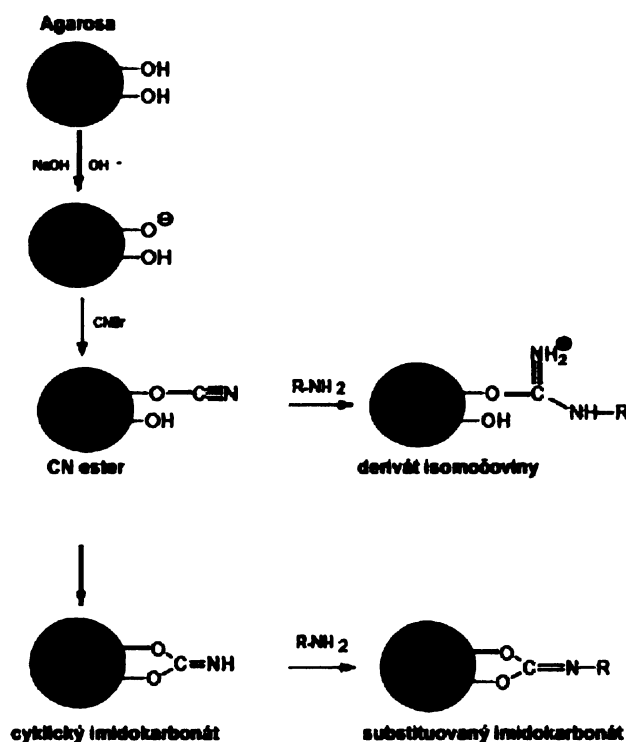
f...empirický faktor = 1,094

3.3.5. Afininí purifikace protilátek

IgY proti bičíkové frakci

Tato metoda je založena na specifické interakci mezi izolovanou protilátkou a antigenem, který je kovalentně navázán na povrchu nějakého nosiče. Je to jedna z neúčinnějších metod selektivní separace biopolymerů.

Pro vazbu afinantu na nosič se často používá CNBr aktivovaná Sepharosa. CNBr reaguje s –OH skupinami na agarose za tvorby esterů kyanátu nebo imidokarbonátů. Ty pak reagují s primárními aminy. Preferovanou výslednou skupinou je substituovaný imidokarbonát, který nenese žádný náboj⁴⁴. Reakční schéma je znázorněno na obrázku 15.



Obrázek 15: CNBr aktivovaná Sepharosa – schéma reakce ⁴⁴

Příprava kolony – imobilizace antigenu

Použité roztoky a látky

- CNBr aktivovaná Sepharosa 4B (Sigma)
- 0,001 M HCl
- vazný pufr: 0,1 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl; pH 8,4
- blokovací roztok: 0,2 M glycin; pH 8
- promývací pufr: 0,1 M octová kyselina 0,5 M NaCl; pH 4
- PBS s azidem: PBS; 0,1% (w/v) azidu sodného (NaN₃)
- kolona

370 μ l izolované bičkové frakce bylo povařeno 15 min v SDS (1:1 s 10% SDS) a smícháno s vazným pufrém do výsledného objemu 1,5 ml.

K naváženému množství - 0,5 g CNBr aktivované Sepharosy 4B na fritě bylo postupně přidáváno po dávkách 0,001 M HCl (celkové množství 100 ml) – na nabobtnání

a promytí vytvořeného gelu. Na kolonu bylo nanášeno 1,5 ml gelu a dále promýváno destilovanou vodou (10 x objemu sloupce na koloně).

Kolona byla ještě promyta vazným pufrem (5ml/na 1g suchého gelu) a hned poté byl na kolonu aplikován roztok antigenu ve vazném pufru. Kolona se takto nechala inkubovat přes noc při 5°C na „end – over – end“ mixeru.

Druhý den byla kolona vymyta opět vazným pufrem (4ml) a pak blokována 0,2 M glycinem (1,5 ml) 2 h při laboratorní teplotě na „end – over – end“ mixeru.

Poté byla kolona střídavě promývána 3 x vždy po 4 ml: bazickým vazným pufrem, destilovanou vodou a kyselým promývacím pufrem. Nakonec byla kolona ještě promyta PBS s azidem (6ml) a 1ml PBS s azidem byl na koloně ponechán pro uskladnění.

Afinitní chromatografie

Použité roztoky

- neutralizační pufr: 2 M K/PO₄; pH 6,6
- PBS + 1 M NaCl; pH 7,2
- 0,05 M DEA; pH 11,5
- 4 M guanidin hydrochlorid; pH 7
- na neutralizaci kolony: 0,2 M K/PO₄; pH 7,2

Na kolonu bylo aplikováno 2 ml (tj. 59,5 mg proteinu) spojených frakcí protilátek IgY proti bičkové frakci. Kolona pak byla inkubována přes noc při 5°C na „end – over – end“ mixeru.

Další den byla kolona promyta následovně:

- nejprve se nechal vytéct obsah kolony a kolona byla vymyta ještě 1ml PBS s azidem
- promývání PBS – vždy po 1,5 ml a měřena absorbance u jednotlivých frakcí – promýváno dokud neklesla A₂₈₀ na ~ 0,03 (v 0,5 cm kyvetě)
- promývání PBS + NaCl k dalšímu poklesu A₂₈₀ (tento krok později vynechán – docházelo už k eluci specifických protilátek)
- eluce DEA – frakce po 1,4 ml (sbírány do eppendorfek, které obsahovaly 100 µl KH₂PO₄ na neutralizaci); v každé 1,5 ml frakci změřeno absorbní spektrum (220 – 400 nm) proti blanku (1,4 ml DEA + 100 µl KH₂PO₄)

- promývání guanidin hydrochloridem (4 x 1,5 ml)
- kolona promyta dále 3 ml roztoku 0,2 M K₂PO₄ o pH 7,2 na neutralizaci kolony
- nakonec kolona ještě promyta asi 6 ml PBS s azidem, 1ml PBS s azidem byl na koloně ponechán pro uskladnění

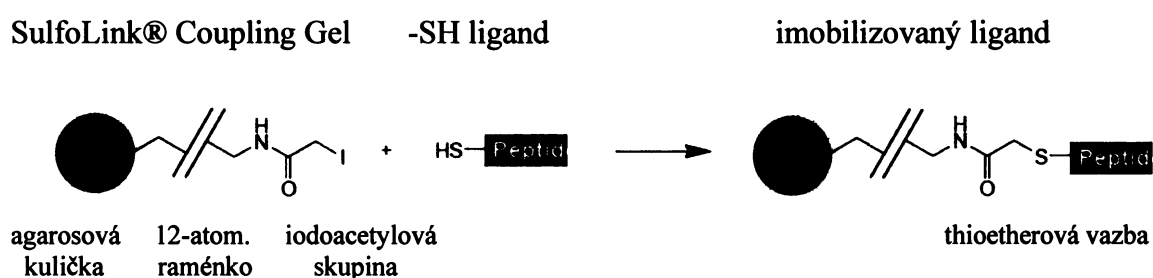
Frakce po eluci DEA s nejvyšším obsahem proteinu byly dialyzovány proti 7 l PBS s azidem při 5°C přes noc. (Nejprve dialyzovány i frakce po eluci guanidin hydrochloridem.)

Pro kontrolu průběhu afinitní chromatografie byla provedena ELISA – všech frakcí, které byly postupně jímány v jednotlivých krocích afinitní chromatografie.

IgY proti peptidu A / B

Afinitní chromatografie za použití imobilizovaného antigenu slouží k purifikaci specifických protilátek.

SulfoLink® Coupling Gel umožňuje kovalentní imobilizaci peptidů, proteinů a jiných ligandů obsahujících SH skupinu na agarosu pro provedení afinitní chromatografie. Iodoacetylové skupiny na tomto gelu reagují specificky s volnými SH skupinami (viz obrázek 16). Raménko tvořeno 12 atomy minimalizuje stérické zábrany a zajišťuje účinnou interakci s navázanou molekulou. Gel je ideální pro navázání peptidů a následnou purifikaci protilátek. Může imobilizovat asi 1 mg peptidu obsahující skupinu SH / na 1 ml připraveného gelu ⁴⁵.



Obrázek 16: Struktura a reakční schéma pro SulfoLink® Coupling Gel ⁴⁵

Příprava kolony

Použité látky a roztoky

- SulfoLink® Coupling Gel – Pierce
- vazný pufr: 0,05 M Tris; 0,005 M EDTA – Na; pH 8,5
- blokovací roztok: 0,05 M L – cystein . HCl ve vazném pufru
- promývací roztok: 1 M NaCl
- PBS s azidem: PBS; 0,1% (w/v) azidu sodného (NaN₃)

SulfoLink® Coupling Gel se nechal ekvilibrovat na laboratorní teplotu. Pro vytvoření 2 ml sloupce na koloně je zapotřebí použít 2násobného množství výchozí suspenze gelu. Do každé kolony tedy bylo nanášeno 4 ml suspenze a následně byla kolona promyta 8 ml vazného pufru.

4 mg peptidu A a B bylo rozpuštěno ve 2 ml vazného pufru a vzniklé roztoky byly aplikovány na kolony (označené A, B). Zde se nechaly 15 min míchat na „end – over – end“ mixeru za laboratorní teploty a poté byly ještě ponechány 30 min ve svislé poloze bez míchání.

Roztoky se poté z kolon nechaly vytéct a na kolony byl aplikován blokovací roztok cysteinu (2 ml) a opět 15 min probíhalo míchání a 30 min stály kolony pouze ve svislé poloze.

Kolona se nakonec promývá promývacím roztokem (6 x 2 ml) – a poté ještě skladovacím pufrem – který se v malém množství zanechá na koloně.

Afinitní chromatografie

Použité látky a roztoky

- PBS
- PBS s azidem: PBS; 0,1% (w/v) azidu sodného (NaN₃)
- eluční pufr: 0,1 M glycin . HCl; pH 3
- neutralizační pufr: 1 M TRIS . HCl; pH 8,5

Gely z kolon byly přelity do uzavíratelných nádobek a bylo k nim bylo přidáno 5 ml roztoku protilátek proti odpovídajícím peptidům A / B. Nádobky byly dány na „end – over – end“ mixer a míchány přes noc při 5°C.

Gely byly postupně přeneseny zpět na kolony a promývány:

- nejprve se nechal vytéct aplikovaný roztok + ještě bylo přidáno 1 ml PBS na vymytí
- kolony byly promývány PBS vždy po 1,5 ml a v tomto množství byla měřena A_{280} - dokud neklesla na $\sim 0,03$ (v 0,5 cm kyvetě).
- eluce poté probíhala roztokem glycinu – frakce po 1,5 ml byly jímány do eppendorfek (obsahujících 75 μ l neutralizačního pufru); absorpční spektrum bylo poté měřeno v rozmezí 220 – 400 nm proti blanku (titrovanému roztoku glycinu a Tris)
- poté byla kolona promyta ještě 6 x 2 ml PBS a nakonec 2 x 2 ml PBS s azidem (+ 1ml roztoku ponecháno pro uskladnění kolon)

Frakce s nejvyšším obsahem proteinů (dle A při 280 nm) byly dialyzovány přes noc při 5°C proti 7 l pufru PBS s azidem. Ve vzorcích byla poté změřena koncentrace proteinů a provedena ELISA – pro zhodnocení průběhu afinitní chromatografie.

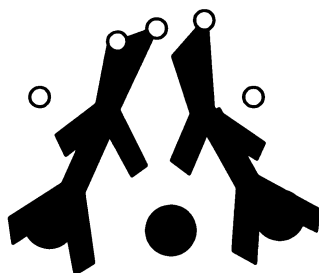
3.3.6. Testy specifity protilátek

3.3.6.1. ELISA

ELISA je imunochemická metoda, jejíž označení pochází z anglického názvu „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“. ELISA byla používána pro ověření aktivity specifických protilátek IgY – v izolovaných frakcích a ve vzorcích po afinitní purifikaci protilátek. Princip této metody je založen na interakci specifické protilátky s antigenem následované interakcí této primární protilátky se sekundární protilátkou s navázaným enzymem, který přeměňuje dodaný bezbarvý substrát na barevný produkt.

Metoda ELISA má více modifikací. Pro účely této práce byl používán následující postup: Antigen byl adsorbován do jamek mikrotitrační destičky, poté proběhla interakce

se specifickou (primární) protilátkou a na tento komplex se navázala sekundární protilátka – s enzymem alkalickou fosfatázou (viz obrázek 17). Detekce tohoto ternárního komplexu se pak děje pomocí přeměny substrátu enzymu (PNNP) na barevnou formu měřitelnou při 405 nm.



Obrázek 17: Komplex antigenu s primární a sekundární protilátkou

Použité látky a roztoky

- PBS pufr: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄·12H₂O; 1 mM NaH₂PO₄·2H₂O; pH 7,2
- PBS Tween pufr: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄·12H₂O; 1 mM NaH₂PO₄·2H₂O; 0,1% v/v Tween® 20; pH 7,2
- vazný (imobilizační pufr): 13 mM Na₂CO₃; 25 mM NaHCO₃; pH 9,6
- blokovací pufr: 2% w/v řídký bílek v PBS Tween pufru (viz výše)
- roztok sekundární protilátky: PBS; 1:2000 sekundární protilátky – králičí IgG proti slepičí IgY s navázanou alkalickou fosfatázou (Sigma)
- vyvolávací roztok: 30 mM NaHCO₃; 20 mM Na₂CO₃; 1mM MgCl₂; 0,01% w/v PNNP
- stopovací roztok: 3 M NaOH
- ethanol, methanol

Pro proteinové (a větší) antigeny je používána destička Polysorp, pro peptidové antigeny destička Maxisorp.

Jako antigen byla používána izolovaná bičiková frakce v koncentraci 4 µg/ml nebo roztok peptidu A či B (rozpuštěného v PBS) o koncentraci 4 µg/ml - roztoky byly připraveny v imobilizačním pufru. Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo aplikováno 100 µl roztoku antigenu a poté inkubováno přes noc při 4°C.

Při použití formaldehydem usmrcených bakteriálních buněk jako antigenu byl tento postup modifikován (tzv. metoda CELISA): Suspenze bakteriálních buněk byla naředěna imobilizačním pufrům na koncentraci $4 \cdot 10^7$ buněk/ml. Takto zředěný roztok antigenu byl po 100 μ l aplikován do každé jamky mikrotitrační destičky. Poté byla mikrotitrační destička centrifugována (centrifuga Janetzky – K 70 D) 15 minut při 2 000 RPM. Do každé jamky bylo přidáno navíc 150 μ l EtOH – necháno 10 minut při laboratorní teplotě a odstraněno vyklepnutím. Nakonec bylo do každé jamky přidáno 150 μ l MeOH – necháno 15 minut při laboratorní teplotě a opět odstraněno vyklepnutím. Vysušená destička byla uschována přes noc při 4°C.

Následující den byla každá jamka promyta 5 x 150 μ l pufru PBS Tween, destička se pak vysušila poklepem na filtrační papír. Poté byla každá jamka blokována 150 μ l blokovacího pufru a inkubována 1 h při 37°C.

Po inkubaci byla destička promyta 5x pufrům PBS Tween - 200 μ l/jamka. Do jamek bylo přidáno 100 μ l podle předem vypočítaného množství primární specifické kontrolní protilátky (ředěné v pufru PBS) a destička byla inkubována 2 h při 37°C. Použité ředění protilátek bylo 90–30–10–3,3 μ g/ml pro izolované frakce protilátek a pro protilátky po afinitní chromatografii byly použity nižší koncentrace 10–3,3–1,1–0,37–0,12–0,033 μ g/ml.

Po odstranění protilátek a promytí jamek 5 x 150 μ l PBS Tween byla do všech jamek aplikována sekundární protilátka (1:2000) a destička byla inkubována 1 h při 37°C.

Po opětovném vymytí jamek 5 x 150 μ l PBS Tween bylo do každé jamky dáno 100 μ l vyvolávacího roztoku, ponecháno 10 min stát při laboratorní teplotě a pak byla probíhající reakce zastavena přidáním 100 μ l 3 M NaOH. Nakonec byla změřena na ELISA-čtečce absorbance při 405 nm a porovnávala se intenzita absorbance u jednotlivých použitých protilátek.

3.3.6.2. Elektroforéza

Elektroforéza je metoda, která využívá schopnosti nabitých částic v elektrickém poli pohybovat se různou rychlostí. Rychlost pohybu částic je závislá na velikosti náboje a

velikosti molekuly, takže různě velké a různě nabitě molekuly se pohybují odlišnou rychlostí. Můžeme proto elektroforézu využívat k separaci makromolekulárních látek.

SDS-PAGE:

Elektroforéza v polyakryamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS) je elektroforetický způsob separace na základě velikosti molekul separovaných látek, jehož použití je vymezeno speciálně pro bílkoviny. SDS je detergent, který nese poměrně vysoký záporný náboj, a proto při vazbě na bílkovinu vyrovnává nábojové rozdíly bílkovin a ty se pohybují v gelu jen podle velikosti. Takto stanovené hodnoty relativní molekulové hmotnosti se obecně užívají pro účely charakterizace bílkovinného preparátu.

Roztoky pro elektroforézu SDS-PAGE

- pufr A: 0,375 M TRIS; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,8
- polymerační roztok A: 30% (w/v) akrylamid; 0,8% (w/v) BIS v pufru A
- pufr B: 0,125 M TRIS; 0,1% (w/v) SDS; pH 6,8
- polymerační roztok B: 30% (w/v) akrylamid; 0,8 % (w/v) BIS v pufru B
- vzorkový redukující pufr: 0,063 M TRIS; 2% (w/v) SDS; 5% (v/v) 2-merkptoethanol; 10% (v/v) glycerol; 0,003% (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8
- elektrodový pufr: 0,129 M glycin; 0,025 M TRIS; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3
- redukující vzorkový pufr: 0,063 M TRIS; 2% (w/v) SDS; 10% (v/v) glycerol; 5% (v/v) 2-merkptoethanol; 0,003 % (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8
- barvicí lázeň: 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 46% (v/v) ethanol; 9,2% (v/v) kyselina octová
- odbarvovací lázeň: směs kyseliny octové, ethanolu, destilované vody – v poměru 10:25:65

Tabulka 4: Příprava gelů na SDS-PAGE

hustota gelu	separační gel 8% - A	zaostřovací gel 3% - B
polymerační roztok A (B) / ml	2	0,3
pufr A (B) / ml	5,5	2,7
TEMED / μ l	7,5	3
persíran amonný (100 mg/ml) / μ l	75	60

Skla pro elektroforézu byla odmaštěna ethanolem, pak byla sestavena elektroforetická aparatura. Roztok pro tvorbu separačního gelu byl připraven podle předpisu v tabulce 4. Poté byl nalit mezi skla do výšky cca 3 cm od horního okraje skel a převrstven destilovanou vodou. Asi po 30 min, kdy gel zpolymeroval byla vylita destilovaná voda a prostor nad gelem byl opatrně vysušen filtračním papírem.

Na separační gel byl nalit roztok pro tvorbu gelu zaostřovacího (připravený dle rozpisu v tabulce 4) a mezi skla byl vsunut hřeben pro vytvoření jamek na aplikaci vzorků. Po zpolymerování gelu (~ 20 min) se hřeben vyndal a aparatura se umístila do elektroforetické vany. Do horního a spodního elektrodového prostoru byl nalit elektrodový pufr.

Příprava vzorků: Jednotlivé vzorky (obsahující protein v množství: 2 µg/jamku pro Western blot, 10 µg/jamku pro elektroforézu) byly naředěny redukcujícím vzorkovým pufrem v poměru 1:1 a 5 minut inkubovány za teploty 100°C. Do jamek v gelu bylo poté aplikováno (opatrně podvrstvením) asi 20 µl připravených roztoků vzorků. Jako standard byl používán Sigma Wide range. Složení standardu viz tabulka 5.

Po nanesení všech vzorků byla elektroforéza zapojena ke zdroji a nastavena na 130 V. Elektroforéza byla zastavena v momentě, kdy čelo bromfenolové modře doputovalo k spodnímu okraji skel. Skleněné desky s gelem byly vyjmuty z elektroforetické vany a gel byl opatrně přenesen na 1 h do barvicí lázně. Poté se gel nechal přes noc v odbarvovací lázni. Odbarvený gel se pak naskenoval nebo dal sušit do celofánových folií. Nebo byl gel místo barvení použit dále pro Western Blot.

Tabulka 5: Složení používaného standardu Sigma – Wide molecular range

Mr	proteiny WMR standard
205 000	myosin
116 000	β - galaktosidasa
97 000	fosforylasa
84 000	fruktosa-6-fosfát kináza
66 000	albumin
55 000	glutamát dehydrogenasa
45 000	ovalbumin
36 000	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
29 000	karbonát anhydrasa
24 000	trypsinogen
20 000	trypsin inhibitor
14 200	α-laktalbumin
6 500	aprotinin

3.3.6.3. *Western Blot*

Western „blot“ je metoda přenosu proteinů z elektroforetického gelu na nitrocelulózovou nebo PVDF membránu schopnou adsorbovat proteiny. Membrána se po inkubaci v blokovacím roztoku (blokování volných vazebných míst) inkubuje v roztoku primární protilátky. Detekce navázané protilátky se provede pomocí sekundární protilátky s konjugovaným enzymem a následně vyvolá specifickým substrátem.

Tato imunochemická metoda může sloužit jak k prokázání přítomnosti antigenu na membráně tak k průkazu specifických protilátek proti tomuto antigenu.

Použité roztoky a látky

- přenosový pufr: 0,025 M TRIS; 0,192 M glycin; 10% methanol; pH 8,3
- blokující pufr: PBS; 0,3% (v/v) Triton X-100; 5% (w/v) nízkotučné sušené mléko; pH 7,2
- PBS Triton X-100 pufr: PBS; 0,3% (v/v) Triton X-100; pH 7,2
- reverzibilní barvicí červeň: 0,5% Panceau v 1% kyselině octové
- sušené mléko (Laktino - Promil)
- tableta BCIP/NBT SIGMA FAST™
- PVDF (polyvinylidendifluoridová) membrána
- papíry Whatmann 3

Nejprve byly pomocí SDS – PAGE rozděleny proteiny jednotlivých vzorků. Tyto proteiny byly potom přeneseny z gelu na PVDF membránu následujícím způsobem:

Byl sestaven “sandwich“ v následujícím pořadí (od anodové desky): tři vrstvy papíru Whatmann 3 (navlhčené v přenosovém pufru), PVDF membrána (navlhčená nejprve v methanolu, vodě a nakonec v přenosovém pufru), gel z elektroforézy (inkubovaný 20 min v přenosovém pufru) a opět tři vrstvy papíru Whatmann (namočené v přenosovém pufru). Poté byly skleněnou tyčinkou vytlačeny bublinky a aparatura byla zapojena na 10 minut - při 0,8 mA/cm² a poté na 45 minut při - 2 mA/cm² (vypočítáno dle změřeného rozměru gelu).

Po uplynutí dané doby se sandwich opatrně rozebral. Gel byl vložen do barvicí lázně s Coomassie Brilliant Blue R 250 na 1 h a poté do odbarvovací lázně (kyselina octová, ethanol, destilovaná voda) – pro zjištění účinnosti přenosu proteinů. Z membrány

byl odstříhnut proužek se standardem a vložen na 5 sekund do barvicí lázně (Coomassie Brilliant Blue R 250) a poté do odbarvovací lázně. Zbytek membrány byl vložen do reverzibilní červeně na 20 sekund (můžeme si obyčejnou tužkou lehce označit zabarvené zóny jednotlivých proteinů), poté se nechal odbarvit ve vodě.

Po odbarvení byla membrána případně dle potřeby rozdělena na proužky – pro inkubaci v různých roztocích primárních protilátek a inkubována přes noc za míchání v blokovacím roztoku.

Další den byly v Petriho miskách připraveny roztoky jednotlivých primárních protilátek (kontrolních i specifických) v blokovacím roztoku (10 ml; koncentrace protilátek byla 30 µg/ml, u afinitně purifikovaných i 1 µg/ml). Jednotlivé části membrány byly vloženy do příslušných roztoků s protilátkami, kde byly za míchání inkubovány 2 h při laboratorní teplotě. Poté byly části membrány 3 x 5 min promývány blokovacím roztokem.

Po důkladném promytí byly části membrány vloženy do Petriho misek s 5 ml blokovacího roztoku se sekundární protilátkou (konjugát králičí IgG proti slepičím IgY s navázanou alkalickou fosfatasou) v poměru 1:4000 a ponechány 1 h inkubovat na míchačce. Následně byly membrány promyty 2 x 5 min v blokovacím roztoku a poté 3 x 5 min jen v PBS Triton X-100.

Do Petriho misek byly připraveny 3 ml roztoku obsahujícího substrát pro alkalickou fosfatasu tak, že tableta BCIP/NBT SIGMA FASTTM byla rozpuštěna v 10 ml destilované vody. Membrány se v roztoku nechaly inkubovat do vybarvení ~ 6 min. Poté byly membrány přeneseny do destilované vody a nakonec ponechány uschnout mezi filtračními papíry při laboratorní teplotě.

3.3.7. Isolace potkaních plicních epitelálních buněk typu II

Plicní potkaní epitelální buňky

Buňky II. typu neboli velké alveolární buňky jsou roztroušeny mezi buňkami typu I. a spojení s nimi pomocí dezmosomů i zonulae occludentes. Buňky II. typu jsou zhruba kubické a uspořádané do skupin 2-3 buněk podél povrchu alveolů v místech, kde se stěny plicních sklípků úhlovitě sbíhají. Tyto buňky, jež jsou uloženy na bazální membráně, jsou

součástí epitelu a mají stejný původ jako výstelkové buňky I. typu. Obsahují mitochondrie, drsné endoplasmatické retikulum, dobře vyvinutý Golgiho komplex a na svém volném apikálním povrchu jsou opatřeny mikrovlky. Sekretují plicní surfaktant (fosfolipidy, glykosaminoglykany, proteiny), který snižuje povrchové napětí⁴⁶.

Isolace

Isolace byla provedena v IKEMu Mgr. Tomášem Koblasem podle protokolu⁴⁷ s lehkými modifikacemi: Potkani byly vykrveni a poté jim byly opatrně odebrány plíce. Plíce byly promyty fyziologickým roztokem. Pro rozvolnění plicní tkáně byla použita elastasa. Alveolární epiteliální buňky typu II byly pak získány po 20 min centrifugaci při 1000 RPM na Ficollovém gradientu (hustotně odpovídal v protokolu používanému Percollovému gradientu)⁴⁷.

3.3.8. Barvení bakterií a buněk pro pozorování v mikroskopu

Pro barvení a pozorování bakterií a buněk v mikroskopu bylo používáno následujících technik:

3.3.8.1. Barvení barvou Giemsa

- Vzorek byl nanesen na sklíčko a nechán zaschnout.
- Vzorek byl fixován methanolem – 30 s.
- Poté se vzorek nechal barvit 5% (w/v) čerstvým roztokem barvy Giemsa v destilované vodě 20 – 30 min, následně byl opláchnut destilovanou vodou.
- Sklíčko se vysušilo a pozorovalo pod mikroskopem. Giemsa barví modro – fialově.

3.3.8.2. Grammovo barvení

- Vzorek byl nanesen na sklíčko a fixován nad plamenem nebo 4% formaldehydem v PBS.
- Na sklo byla nanesena krystalová violet – nechána působit 1 min.
- K tomu byl přidán Lugolův roztok – na 30 s.
- Sklíčko bylo myto směsí ethanolu–acetonu (1:1).
- Na sklo byl nanesen safranin a ponechán působit – 1 min.
- Barvivo bylo opatrně odmyto destilovanou vodou (~ 5s).
- Sklo se vysušilo a pozorovalo pod mikroskopem. Safranin barví G- bakterie, ale i buňky (jádro tmavší než cytoplazma) do růžova.

3.3.8.3. Flourescenční značení bakterií

Tato metoda může sloužit pro fluorescenční označení bakterií, ale také pro ověření specifity primárních protilátek. Jestliže specifické primární protilátky rozeznávají na bakterii antigeny, sekundární protilátky se pak na ně navážou a bakterie zůstane flourescenčně označena.

Použité látky a roztoky

- PBS
- 4% formaldehyd v PBS
- blokovací roztok: 0,5% w/v řídký bílek v PBS Tween pufru
- králičí protilátka IgG proti slepičí IgY konjugovaná s FITC

Vzorek bakterií *PA* (sbírkový kmen) byl kultivován v suspenzní kultuře v ÚŽFG AVČR. Na sklíčka pro mikroskopování byly zhotoveny roztěry sedimentu bakteriální suspenze. Po zaschnutí byly fixovány 4% roztokem formaldehydu v PBS. Fixační roztok byl po 10 min opatrně odmyt destilovanou vodou. Poté byly preparáty blokovány 5 min roztokem 0,5% řídkého bílku v PBS Tween.

Po slití blokovacího roztoku byly na jednotlivé preparáty aplikovány roztoky primárních protilátek v blokovacím roztoku: celkové množství aplikovaných protilátek

bylo 100 µg pro protilátky proti celé *PA* (+ kontrolní protilátky) a pro afinitně purifikované protilátky proti bičíkové frakci (+ kontrolní protilátky) a 50 µg pro afinitně purifikované protilátky proti peptidům A a B. Preparáty byly inkubovány s primárními protilátkami 1 h ve vlhké komůrce za laboratorní teploty.

Pak byla sklička opláchnuta 3x blokovacím roztokem a 2x roztokem PBS. Sekundární protilátka - králičí protilátka IgG proti slepičí IgY konjugovaná s FITC byla aplikována v ředění 1:300 (v 1ml blokovacího roztoku) a inkubována s preparáty 1 h za temna ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě.

Po inkubaci byla sklička opláchnuta 2x blokovacím roztokem a 3x roztokem PBS. Sklička se nechala uschnout a poté byla pozorována ve fluorescencečním mikroskopu.

3.3.9. Testy adheze bakterií

Metoda pro testování ovlivnění adheze *PA* na plicní epitelální buňky při užití připravených protilátek byla zvolena na základě postupů uváděných v literatuře^{48, 49, 50, 51, 52}.

Použité látky a roztoky

- sterilní PBS
- 4% formaldehyd v PBS
- izolované buňky v mediu bez antibiotik
- bakteriální suspenze *PA*
- předialyzované roztoky specifických protilátek (sterilní – přefiltrované přes bakteriální filtr)

Připravené roztoky specifických protilátek obsahovaly azid sodný a proto byly přes noc dialyzovány proti 7 l PBS, aby byl eliminován případný vliv samotného azidu na *PA*. Do jamek destičky pro pěstování bakterií bylo dáno vždy – 200 µl media (bez antibiotik) s buňkami (10^6 buněk/ml). Destička byla umístěna do inkubátoru a nechala se inkubovat 4 h při 37°C a 5% CO₂.

Přibližná koncentrace bakterií byla určena pomocí A_{600} . Při $A_{600} = 1$ by měla být koncentrace bakterií asi 6×10^8 bakterií/ml⁴⁸. V eppendorfkách bylo pak inkubováno

dohromady vždy 200 μ l bakteriální suspenze (odpovídající přibližně 2×10^7 bakteriím) s celkovým množstvím 0,5 mg jednotlivých protilátek. Tato inkubace za občasného lehkého promíchání probíhala při 37°C celkem 15 min. Jako protilátky byly použity: specifické proti celé *PA*, kontrolní proti bičíkové frakci, afinitně purifikované proti bičíkové frakci, afinitně purifikované proti peptidům A / B (vybrány IgY vždy s nejvyšším obsahem specifických protilátek).

Po inkubaci byly tyto inkubační směsi přidávány po řadě jednotlivě k buňkám v jamkách destičky. Experiment byl prováděn dvojité (1/2 jamek pokryta před experimentem polylysinem) a následující jamky s buňkami měly vždy toto obsazení: pouze buňky, kontrolní protilátka s bakteriálním médiem, bakterie *PA*; protilátky proti celé *PA* + *PA*, kontrolní protilátky proti bičíkové frakci + *PA*, afinitně purifikované protilátky proti bičíkové frakci + *PA*, afinitně purifikované protilátky proti peptidům A / B + *PA*. Poměr počtu bakterií na buňku byl tedy vždy přibližně 50-100 bakterií/ na 1 buňku. Tedy v jamce celkově 10^7 bakterií/ 2×10^5 buněk (z důvodu pravděpodobné kontaminace i neepiteliálními buňkami zvoleno raději toto množství buněk). Destička byla takto inkubována 1 h v inkubátoru (37°C, 5% CO₂).

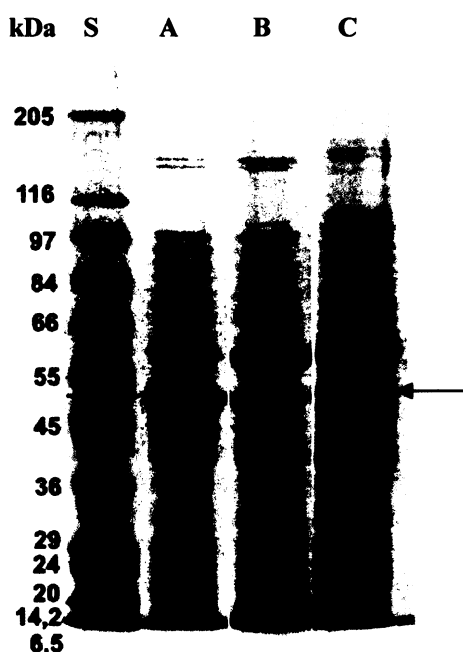
Jamky byly vymyty 3 x teplým sterilním PBS, fixovány 10 min 4% formaldehydem v PBS, lehce vymyty vodou, obarveny (Grammovo barvením) a pozorovány v mikroskopu.

4. Výsledky

4.1. Příprava antigenů pro imunizaci

4.1.1. Isolace bičků

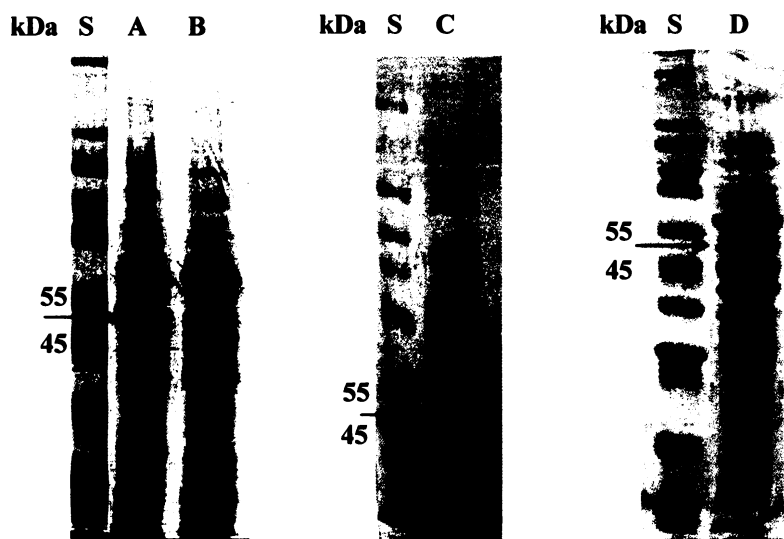
Bičky bakterií byly zisolovány a se vzorkem bičkové frakce z každé izolace byla provedena SDS-PAGE. Na obrázku 18 je vidět SDS-PAGE jednotlivých frakcí bičků z dříve provedených isolací ⁴². Molekulová hmotnost proteinu (označeném na obrázku šipkou) ve vzorcích byla odhadována asi na 50 kDa dle porovnání se standardem molekulových hmotností. Pomocí metody MALDI-TOF bylo ověřováno, zda předpokládané proteiny z tohoto elektroforetického gelu skutečně jsou flagelární proteiny *PA*. Bylo zjištěno, že protein z oblasti mezi 45-55 kDa (označený šipkou) vyskytující se ve všech vzorcích opravdu je flagellin B – majoritní protein bičku *Fli C* – což je homogenní protein o velikosti 53 kDa ^{29,40}.



Obrázek 18: SDS-PAGE vzorků izolovaných bičkových frakcí: šipky označují polohu proteinu *FliC* typu B (53 kDa)

S – standard molekulových hmotností; *A*, *B*, *C* – vzorky jednotlivých isolací bičků

Na dalších gelech (obrázek 19) jsou znázorněny elektroforézy vzorků subcelulárních frakcí *PA* získaných během následujících izolací bičíků. Opět se zde vyskytuje protein v oblasti 45–55 kDa (označen šipkami) – tedy předpokládaný hlavní protein bičíku *FliC* typu B (53 kDa).



*Obrázek 19: SDS-PAGE vzorků izolovaných bičíkových frakcí: šipky označují polohu proteinu *FliC* typu B (53 kDa)*

S – standard molekulových hmotností; A, C, D – vzorky jednotlivých izolací bičíků; B – vzorek izolace bičíků – sediment po vzorku A

4.2. Isolace protilátek

Protilátky proti bičkové frakci

Z vajec získaných před imunizací byla izolována kontrolní frakce protilátek. Poté byla slepice imunizována třemi dávkami antigenu 31.10., 7.11. a 14.11. 2006. Upomínací dávka byla aplikována 19. 4. 2007. Celkem bylo získáno 100 vajec vhodných pro izolaci protilátek IgY. Vejce byla rozdělena do frakcí podle tabulky 6. Z každé frakce byly izolovány IgY a určena koncentrace proteinu ve vzorcích.

Tabulka 6: Isolované frakce protilátek

frakce	datum sběru vajec	počet vajec	koncentrace proteinu (mg/ml)
K	18.10. - 24.10.2006	7	16,7
1	31.10. - 5.11.2006	6	12,2
2	6.11. - 10.11.2006	4	10,7
3	11.11. - 16.11.2006	3	10,5
4	3.1. - 4.1.2007	2	7,3
5	1.2. - 8.2.2007	5	18,7
6	9.2. - 13.2.2007	5	16,5
7	14.2. - 28.2.2007	8	16,9
8	29.2. - 5.3.2007	7	21,0
9	6.3. - 13.3.2007	7	19,7
10	14.3. - 20.3.2007	7	13,4
11	22.3. - 29.3.2007	7	13,8
12	30.3. - 6.4. 2007	7	19,2
13	7.4. - 17.4.2007	7	32,8
14	20.4. - 25.4.2007	5	33,7
15	27.4. - 5.5.2007	5	31,1
16	6.5. - 15.5. 2007	8	38,5

Protilátky proti peptidům A / B z proteinu FliD

Z vajec získaných před imunizací byla izolována kontrolní frakce protilátek. Poté byla slepice imunizována třemi dávkami antigenu 2. 3., 9. 3. a 16. 3. 2007 (pro obě slepice 21, 22). Vejce byly rozděleny do frakcí podle tabulky 7. Z každé frakce byly izolovány IgY a určena koncentrace proteinu. Upomínací dávka byla aplikována 7. 8. 2007.

Tabulka 7: Isolované frakce protilátek

frakce	datum sběru vajec (2007)	počet vajec	koncentrace proteinu (mg/ml)
KA	před imunizací	x	21,5
A1	po imunizaci	x	34,8
A2	8. 5. – 17. 5.	4	29,9
A3	19. 5. – 30. 5.	6	35,8
A4	28.7. – 21.8.	7	31,7
KB	před imunizací	x	26,4
B1	po imunizaci	x	24,6
B2	13.3. – 21.4.	9	35,0
B3	23. 4. – 13. 5.	9	39,1
B4	17. 5. – 26. 5.	6	36,7
B5	28.7. – 22. 8.	8	9,5

Pozn.: chybějí některá data

4.3. Testy specifity protilátek

4.3.1. ELISA

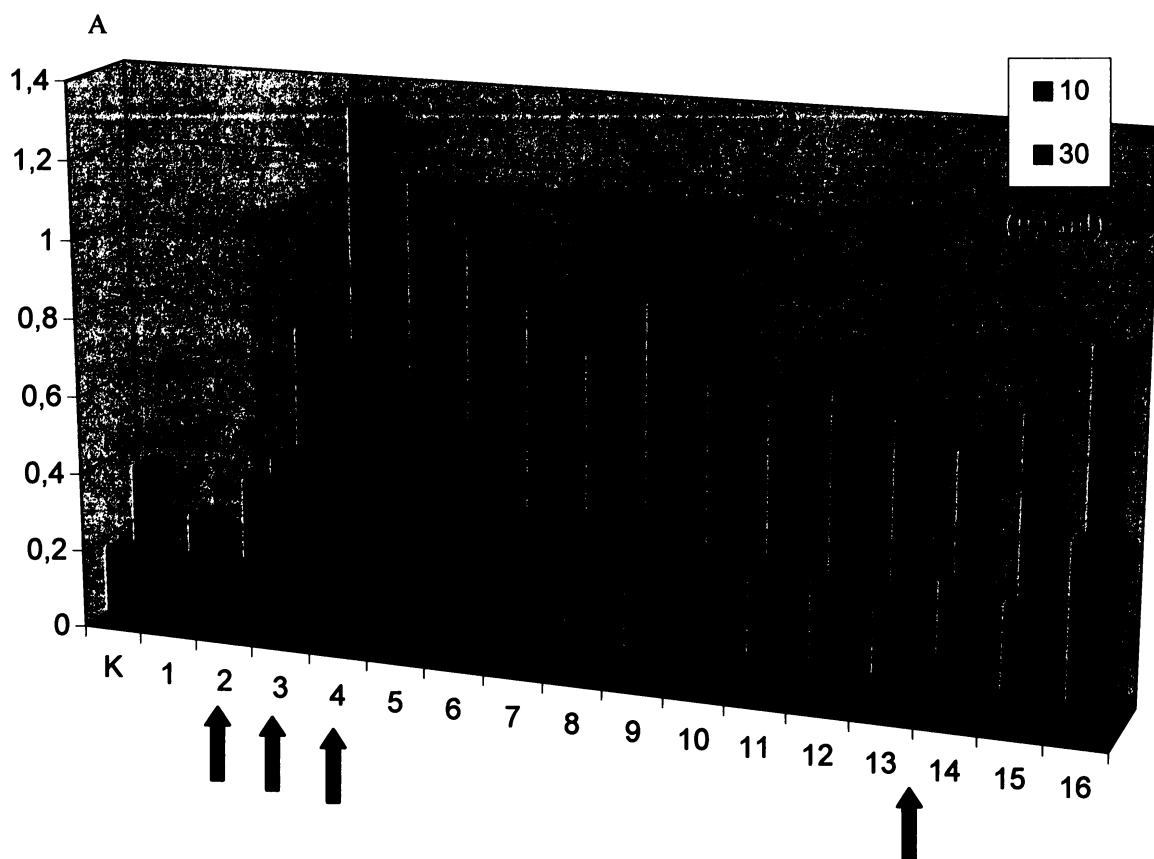
Protilátky proti bičkové frakci

Frakce izolovaných protilátek byly podrobeny testu ELISA s jehož pomocí byl porovnán obsah specifických protilátek v jednotlivých frakcích.

Slepici byla odebírána vejce ještě před imunizací – aby sloužila jako kontrolní frakce protilátek IgY. Po 3. imunizační dávce (imunizace provedeny v průběhu frakcí 1 - 3) byla u slepice A9 navozena imunitní odpověď (frakce 4). Tato imunitní odpověď

postupem času klesá (slepice bohužel také v rozmezí 4.1. – 1.2. 2007 přestala dočasně snášet vajíčka), pořád je ale obsah specifických protilátek výrazný ve srovnání s kontrolou jak je vidět z obrázku 20.

Po upomínací dávce (po frakci 13) imunitní odpověď opět vzrůstá.

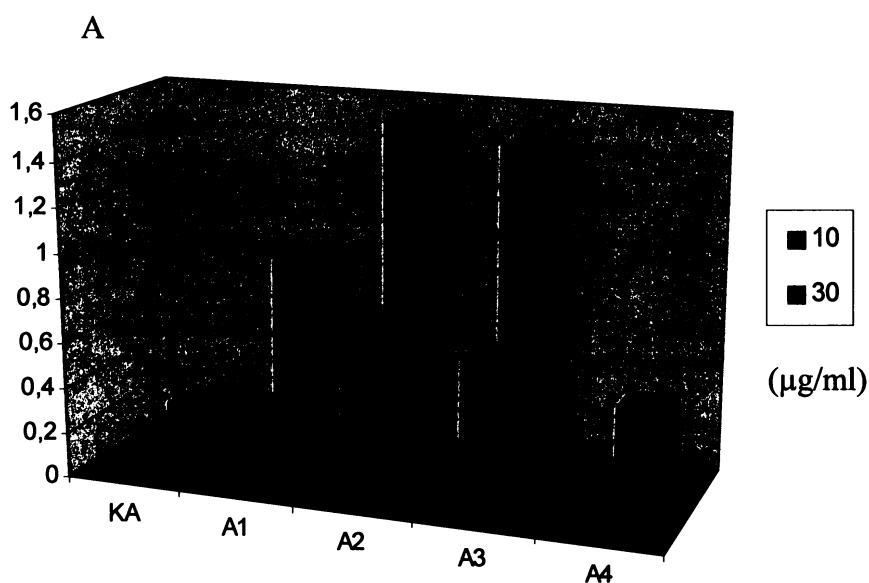


Obrázek 20: ELISA obsahu specifických IgY proti bičíkové frakci: šipky značí časové rozmezí kdy probíhaly imunizace; pro porovnání obsahu specifických protilátek ve frakcích izolovaných IgY byly použity koncentrace 10 a 30 µg/ml; K – kontrolní frakce IgY, 1-16 frakce IgY v časové souslednosti

Protilátky proti peptidům A / B

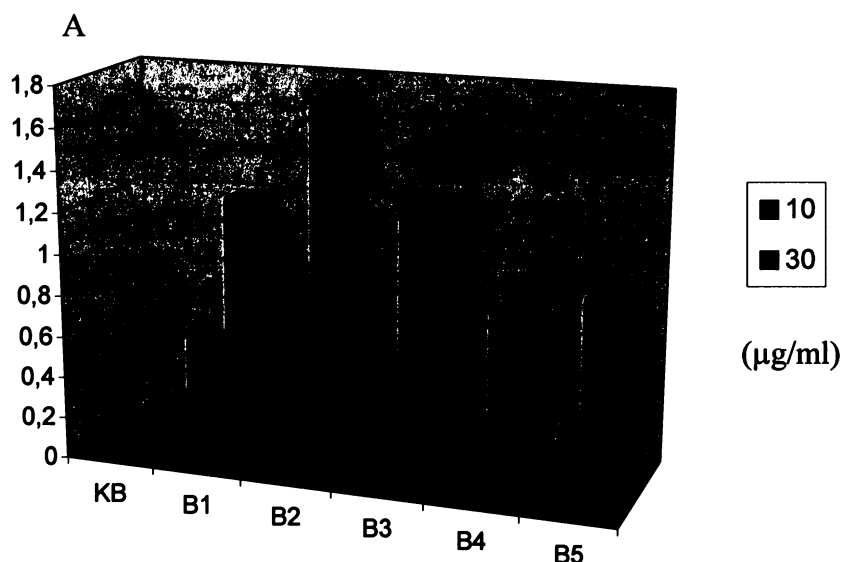
Pomocí testu ELISA byl porovnán obsah specifických protilátek IgY v jednotlivých frakcích izolovaných protilátek.

Slepícím (21 a 22) byla odebírána vejce ještě před imunizací – aby sloužila jako kontrolní frakce protilátek IgY. Slepice po imunizaci peptidovými antigeny vytvořily dostatečnou imunitní odpověď, kterou jsme sledovali v čase (viz obrázky 21, 22).



Obrázek 21: ELISA obsahu specifických IgY proti peptidu A: pro porovnání obsahu specifických protilátek ve frakcích izolovaných IgY byly použity koncentrace 10 a 30 µg/ml;

KA – kontrolní frakce IgY, A1-A4 – frakce IgY v časové souslednosti



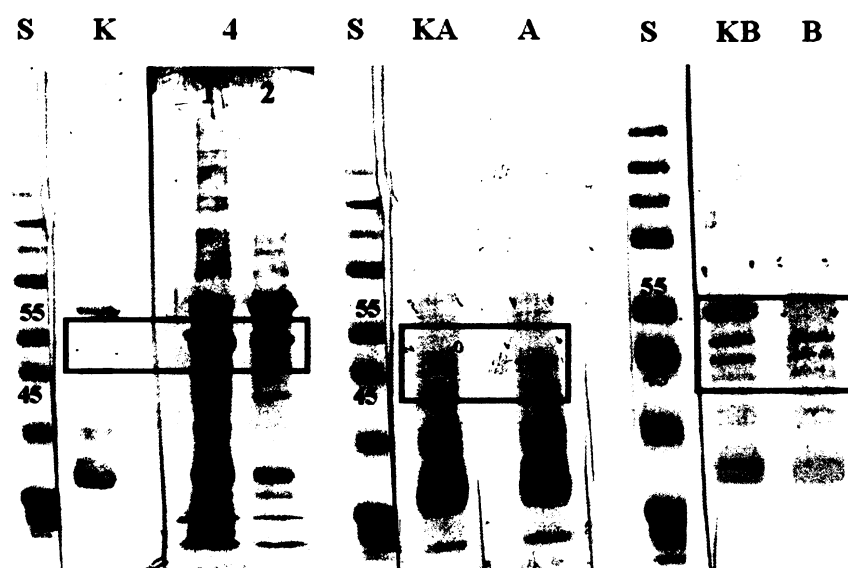
Obrázek 22: ELISA obsahu specifických IgY proti peptidu B: pro porovnání obsahu specifických protilátek ve frakcích izolovaných IgY byly použity koncentrace 10 a 30 µg/ml;

KB – kontrolní frakce IgY, B1-B5 – frakce IgY v časové souslednosti

4.3.2. Western blot

Technikou Western blot byla sledována schopnost protilátek rozeznat bičíkové proteiny: zda protilátky proti bičíkové frakci rozeznají proteiny bičíku na membráně (především majoritní bičíkový protein FliC) a zda také protilátky proti peptidům A / B rozeznají svůj peptid v proteinu FliD z něhož byly peptidy A, B odvozeny.

Isolovaná bičíková frakce byla z gelu po SDS-PAGE přenesena na PVDF membránu. Části membrány byly pak jednotlivě inkubovány s příslušnými roztoky primárních protilátek. Výsledky Western blotu jsou na obrázku 23.



Obrázek 23: Western blot protilátek proti bičíkové frakci a proti peptidům: primární protilátky byly použity v koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$; v rámečcích jsou označeny polohy výskytu bičíkových proteinů

S – standard molekulových hmotností; K, KA, KB – kontrolní IgY; 4 – IgY proti bičíkové frakci; A, B - IgY proti peptidu A / B; 1, 2 – jsou vzorky A a B po izolaci bičíkové frakce (viz obrázek 19) , u ostatních byl použit vzorek 1

4.4. Afinitní purifikace protilátek

Afinitní chromatografie protilátek proti bičíkové frakci

Purifikace specifických protilátek proti bičíkové frakci byla prováděna afinitní chromatografií za použití imobilizovaného antigenu – izolované bičíkové frakce – na CNBr aktivované Sepharose 4B. Na tomto afinitním nosiči byly purifikovány protilátky získané spojením frakcí 10-16. Naneseno bylo vždy 2 ml roztoku protilátek spojených frakcí v pufru PBS s azidem o koncentraci 29,8 mg/ml.

Kolona byla pak promývána postupně jednotlivými pufrů – jak je uvedeno v sekci Metody (oddíle 3.3.4.). Frakce obsahující specifické protilátky proti bičíkové frakci byla eluována pufrům s vysokým pH. Při promývání byly získány tyto frakce protilátek:

- protilátky které se nenavázaly na afinitní nosič

- protilátky nespecificky adsorbované na nosič (vymyty PBS)
- protilátky vymyté PBS + NaCl – už obsahovaly i specifické protilátky
- protilátky eluované pufrům o vysoké pH (0,05 M DEA pH 11,5)
- protilátky eluované pufrům o vysoké iontové síle s denaturačním účinkem (4 M Gua pH 7)

Charakteristiky jednotlivých frakcí protilátek jímaných v průběhu afinitní chromatografie jsou uvedeny v tabulce 8. Pro demonstraci průběhu afinitní chromatografie jsou uvedeny údaje pouze z dvou provedení (další měly obdobný průběh).

Tabulka 8: Průběh afinitní purifikace IgY - 1.) a 2.) provedení

1.)

frakce protilátky	koncentrace proteinu (mg/ml)	množství proteinu (mg)	výtěžek (%)
spojené frakce	29,8	59,5	(100)
nenavázané IgY	9,3	28,7	48,3
PBS	0,7	5,1	8,5
PBS + NaCl	0,06	0,3	0,5
Gua ^{a)}	0,2	0,5	0,9

2.)

frakce protilátky	koncentrace proteinu (mg/ml)	množství proteinu (mg)	výtěžek (%)
spojené frakce	29,8	59,5	(100)
nenavázané IgY	10,6	41,4	69,5
PBS	0,9	6,4	10,8
PBS + NaCl	0,04	0,3	0,4

Pozn.: ^{a)} pouze dialyzované frakce

Afinitní chromatografie protilátek proti peptidům A / B

Purifikace specifických protilátek proti peptidům A / B byla prováděna afinitní chromatografií za použití imobilizovaných antigenů – peptidů A / B – na nosiči Sulfolink. Na tomto afinitním nosiči byly purifikovány jednotlivé frakce izolovaných protilátek. Naneseno bylo vždy 5 ml roztoku protilátek jednotlivých frakcí v pufru PBS s azidem.

Kolona byla pak promývána postupně jednotlivými pufrý – jak je uvedeno v sekci Metody (oddíl 3.3.4.). Frakce obsahující specifické protilátky proti peptidu A / B byla eluována pufrým s nízkým pH. Při promývání byly získány tyto frakce protilátek:

- protilátky které se nenavázaly na afinitní nosič
- protilátky nespecificky adsorbované na nosič (vymyty PBS)
- protilátky eluované pufrým o nízkém pH (0,1 M glycin pH 3)

Charakteristiky jednotlivých frakcí protilátek jímaných v průběhu afinitní chromatografie jsou uvedeny v tabulce 9. (3 provedení).

Tabulka 9: Průběh afinitní purifikace IgY - 1.), 2.) a 3.) provedení

1.)

frakce protilátky	koncentrace proteinu (mg/ml)		množství proteinu (mg)		výťažek (%)	
	A	B	A	B	A	B
IgY proti peptidu						
původní frakce	37,1	38,4	185,4	191,8	(100)	(100)
nenavázané IgY	24,8	21,6	128,7	112,1	69,5	58,4
PBS	2,6	1,4	25,1	14,6	13,6	7,6

2.)

frakce protilátky	koncentrace proteinu (mg/ml)		množství proteinu (mg)		výťažek (%)	
	A	B	A	B	A	B
IgY proti peptidu						
původní frakce	34,8	39,1	173,8	195,5	(100)	(100)
nenavázané IgY	26,3	25,5	144,7	163,0	83,3	83,4
PBS	1,6	3	17,5	30,3	10,1	15,5

3.)

frakce protilátky	koncentrace proteinu (mg/ml)		množství proteinu (mg)		výťažek (%)	
	A	B	A	B	A	B
IgY proti peptidu						
původní frakce	31,7	39,1	158,6	195,5	(100)	(100)
nenavázané IgY	22,1	28,6	141,4	163,0	89,2	83,4
PBS	1,8	3,0	21,0	36,1	13,3	18,5

Pozn.: ^{a)} pouze dialyzované frakce

4.4.1. Ověření specifity purifikovaných protilátek

4.4.1.1. ELISA

Přítomnost specifických protilátek v jednotlivých frakcích z afinitní chromatografie byla ověřována metodou ELISA. Výsledky ELISA testu jsou shrnuty v tabulkách 10, 11, 12. Uvedené hodnoty A_{405} odpovídající obsahu specifických protilátek jsou uvedeny již po odečtu hodnot kontroly.

Afinitně purifikované protilátky proti bičkové frakci

Tabulka 10: ELISA obsahu specifických IgY v jednotlivých frakcích z afinitní chromatografie - 1.) a 2.) provedení

1.)	frakce IgY					
koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	původní IgY	nenavázané IgY	PBS	PBS+NaCl	■	Gua
0,033	-	-	-	-	■	-
0,12	-	-	-	-	■	-
0,37	-	-	-	-	■	-
1,1	-	-	-	-	■	0,021
3,3	0,110	-	-	-	■	0,022
10	0,326	-	-	0,582	■	0,027
30	0,700	0,163	0,553	0,689	-	0,030
90	1,166	-	0,852	0,767	-	0,000
150	-	0,376	0,889	-	-	0,165
750	-	0,488	0,808	-	-	-
3000	-	0,771	-	-	-	-

A_{405}

2.) koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	frakce IgY					
	původní IgY	nenavázané IgY	PBS	PBS+NaCl	█	DEA1
0,033	-	-	-	-	█	0,026
0,12	-	-	-	-	█	0,009
0,37	-	-	-	-	█	0,008
1,1	-	-	-	-	█	0,076
3,3	0,154	-	-	-	█	0,344
10	0,374	-	-	1,080	█	0,799
30	0,790	0,109	0,350	1,671	-	-
90	1,188	-	0,678	-	-	-
150	-	0,447	0,797	-	-	-
750	-	1,030	0,870	-	-	-
3000	-	0,752	-	-	-	-

A₄₀₅

Pozn.: pro porovnání obsahu specifických protilátek v jednotlivých frakcích byly použity jen vybrané koncentrace (viz tabulka); DEA1 – frakce po eluci DEA z 1.) provedení; DEA2) – frakce po eluci DEA z 2.) provedení

Afinitně purifikované protilátky proti peptidu A

Tabulka 11: ELISA obsahu specifických IgY v jednotlivých frakcích z afinitní chromatografie - 1.), 2.) a 3.) provedení

1.)

koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	frakce IgY proti peptidu A			
	původní IgY	nenavázané IgY	PBS	█
0,033	-	-	-	█
0,12	-	-	-	█
0,37	-	-	-	█
1,1	-	-	-	█
3,3	0,060	-	-	█
10	0,217	-	-	█
30	0,446	0,123	-	-
90	0,833	-	0,171	-
150	-	0,350	-	-
750	-	0,829	-	-

A₄₀₅

2.) + 3.)

koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	frakce IgY proti peptidu A				A ₄₀₅
	původní IgY	█	původní IgY	█	
0,37	-	█	-	█	
1,1	-	█	-	█	
3,3	0,039	█	0,000	█	
10	0,078	█	0,019	█	
30	0,249	-	0,025	-	
90	0,480	-	0,000	-	

Pozn.: pro porovnání obsahu specifických protilátek v jednotlivých frakcích byly použity jen vybrané koncentrace (viz tabulka); glycín 2, 3 – frakce po eluci glycinem v 2.) a 3.) provedení

Afinitně purifikované protilátky proti peptidu B

Tabulka 12: ELISA obsahu specifických IgY v jednotlivých frakcích z afinitní chromatografie - 1.), 2.) a 3.) provedení

1.)

koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	frakce IgY proti peptidu B				A ₄₀₅
	původní IgY	nenavázané IgY	PBS	█	
0,033	-	-	-	█	
0,12	-	-	-	█	
0,37	-	-	-	█	
1,1	-	-	-	█	
3,3	0,089	-	-	█	
10	0,399	-	-	█	
30	0,762	0,041	-	-	
90	1,257	-	0,028	-	
150	-	0,077	-	-	
750	-	0,000	-	-	

2.) + 3.)

koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	frakce IgY proti peptidu B			
	původní IgY			
0,37	-			A ₄₀₅
1,1	-			
3,3	0,039			
10	0,064			
30	0,157	-	-	
90	0,374	-	-	

Pozn.: pro porovnání obsahu specifických protilátek v jednotlivých frakcích byly použity jen vybrané koncentrace (viz tabulka); glycin 2, 3 – frakce po eluci glycinem v 2.) a 3.) provedení

4.4.1.2. Western blot

Po afinitní purifikaci protilátek byl opět proveden Western blot – pro vyhodnocení specifity protilátek purifikovaných afinitní chromatografií. Výsledky Western blotu, kde jsou vedle sebe vždy porovnávány kontrolní, izolovaná a purifikovaná frakce protilátek proti bíčkové frakci i proti oběma peptidům jsou na obrázku 24.

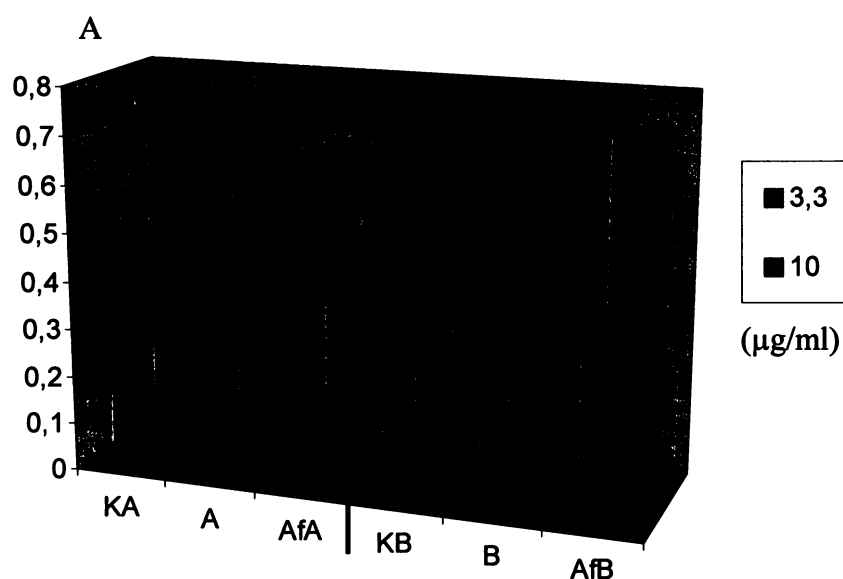


Obrázek 24: Western blot afinitně purifikovaných protilátek proti bičíkové frakci a proti peptidům; primární protilátky byly použity v koncentraci 30 µg/ml; afinitně purifikované 15 µg/ml (IgY proti bičíkové frakci) a 1 µg/ml (IgY proti peptidům); v rámečcích jsou označeny polohy výskytu bičíkových proteinů

S – standard molekulových hmotností; K, KA, KB – kontrolní frakce IgY; 5, A, B – frakce izolovaných IgY; Af, AfA, AfB – afinitně purifikované frakce IgY

4.4.1.3. ELISA IgY proti peptidům za použití bičíkové frakce jako antigenu

Pro ověření zda afinitně purifikované protilátky proti peptidu A / B rozpoznávají antigen v izolované bičíkové frakci byla dále provedena ELISA – za použití bičíkové frakce jako antigenu. Bičíková frakce byla nejprve denaturována povařením v redukujícím pufu pro SDS-PAGE (obsahujícím SDS a merkaptoethanol) a poté aplikována do jamek mikrotitrační destičky v koncentraci 4 µg/ml jako antigen. Pro srovnání byly použity protilátky proti oběma peptidům A / B (izolované i afinitně purifikované) – viz obrázek 25.

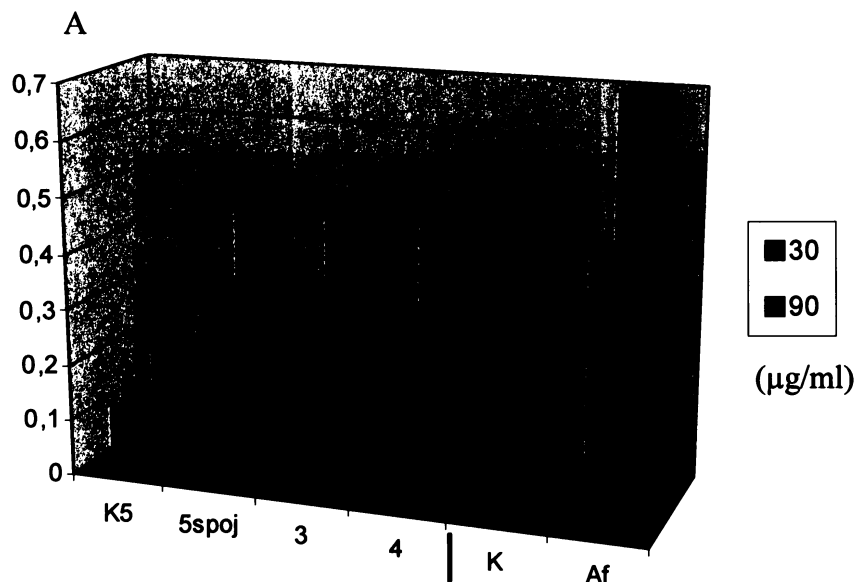


Obrázek 25: ELISA obsahu specifických IgY proti bičíkové frakci v protilátkách proti peptidům: pro porovnání obsahu specifických protilátek v jednotlivých frakcích IgY byly použity koncentrace 3,3 a 10 µg/ml;

KA, KB - kontrolní frakce IgY; A, B – frakce izolovaných IgY; AfA, AfB - afinitně purifikované frakce IgY proti peptidům A / B

4.5. Ověření specifity protilátek IgY proti celé PA

Byla ověřena reaktivita protilátek IgY připravených proti celé bakterii *Pseudomonas aeruginosa*⁴² (viz obrázek 26) metodou ELISA. Pro srovnání byl testován i vzorek afinitně purifikovaných protilátek proti bičíkové frakci. Jako antigen byly použity formaldehydem usmrcené bakterie PA, které byly imobilizovány na mikrotitrační destičku.



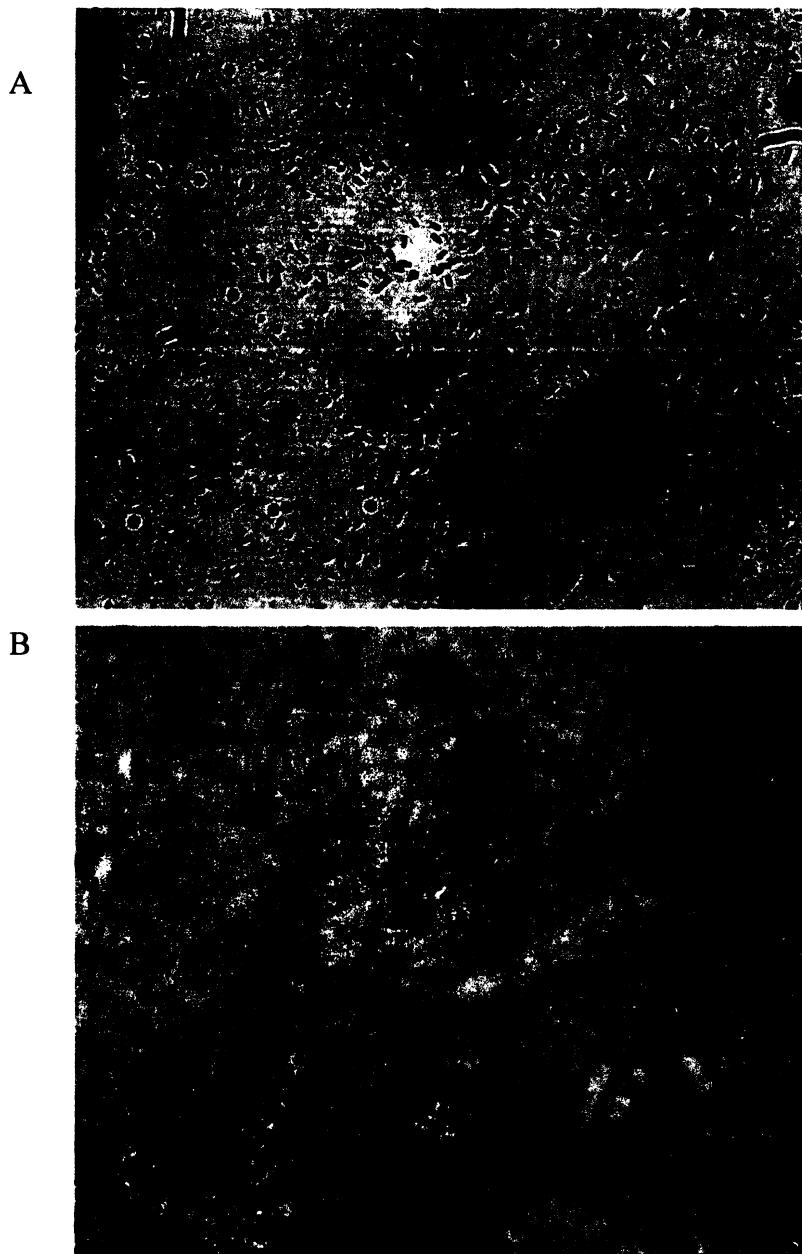
Obrázek 26: ELISA obsahu specifických IgY proti celé PA: pro porovnání obsahu specifických protilátek v jednotlivých frakcích IgY byly použity koncentrace 30 a 90 µg/ml; K5 – kontrolní frakce IgY proti celé PA; 5spoj, 3, 4 – jednotlivé frakce IgY proti celé PA; K – kontrolní frakce IgY proti bičíkové frakci; Af – afinitně purifikovaná IgY proti bičíkové frakci

4.6. Mikroskopování bakterií *Pseudomonas aeruginosa*

Na mikroskopické sklíčko byly naneseny vzorky bakterií *PA*. Preparáty byly fixovány a následně obarveny Grammovo barvením, barvou Giemsa a flourescenčním značením. Preparáty byly dále pozorovány pod mikroskopem (viz obrázky 27, 28).

Ověření specifity protilátek proti *PA* flourescenčním značením

Na obrázku 28 jsou flourescenčně značené bakterie *PA* pomocí sekundární králičí protilátky proti IgY značené flourescenční značkou FITC. V pokusu byly jako primární protilátky použity kontrolní protilátky, protilátky proti celé *PA*, afinitně purifikované protilátky proti bičíkové frakci a afinitně purifikované protilátky proti peptidům A a B. Pro srovnání je ukázán mikroskopický snímek bakterií při použití kontrolní IgY a specifické IgY proti celé *PA*.

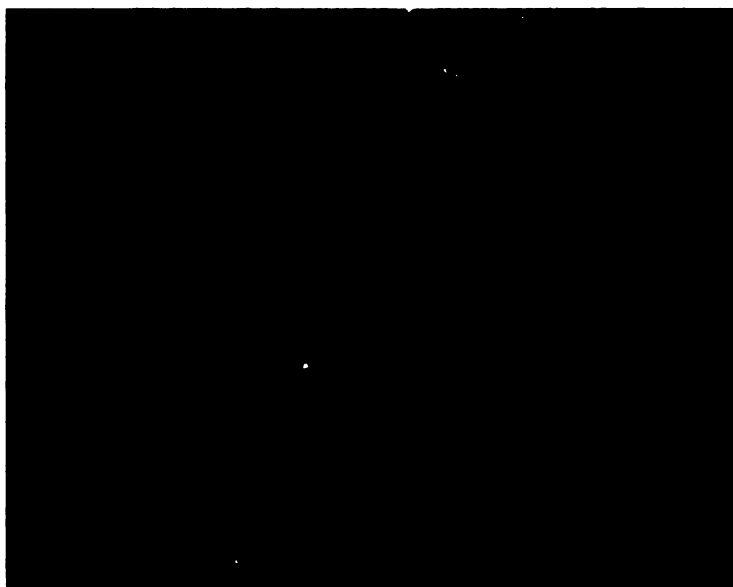


Obrázek 27: Typický záznam mikroskopického snímku obarvených bakterií PA (pozorováno při zvětšení 1500x): A - Grammovo barvení, B - barvení barvou Giemsa

A



B



Obrázek 28: Fluorescenčně značené bakterie (pozorováno při zvětšení 1500x): flourescenční značení pomocí sekundární králičí protilátky proti slepičím protilátkám s navázanou flourescenční značkou FITC, jako primární protilátka jsou zde použity: A - kontrolní IgY, B - IgY proti celé PA

4.7. Isolace potkaních plicních epitelálních buněk typu II

Plicní epitelální buňky typu II byly izolovány ze 4 potkanů. Bylo získáno 11 ml media s izolovanými plicními buňkami v koncentraci asi 10^6 buněk/1 ml media. Ze sedimentu buněk byly zhotoveny mikroskopické preparáty obarvené technikou dle Gramma a pozorovány v mikroskopu. V preparátech se objevovaly i jiné typy buněk, pravděpodobně se izolací nezískaly jen čisté plicní epitelální buňky typu II. Na obrázku 29 jsou nejčastěji pozorované buňky.



Obrázek 29: Isolované plicní potkaní buňky – Grammovo barvení (pozorováno při 1500x zvětšení)

4.8. Test adheze bakterií

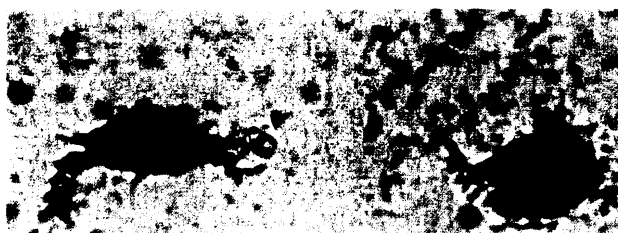
S izolovanými potkaními plicními buňkami byly provedeny testy na ověření schopnosti připravených specifických protilátek inhibovat adhezi bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Isolované potkaní plicní buňky byly před pokusem pěstovány v mediu bez antibiotik. K jednotlivým buňkám v jamkách byly postupně přidávány inkubační směsi bakterií *PA* s různými protilátkami (viz sekce 3.3.9.). Po provedení pokusu byly vzorky (v jamkách destičky) obarveny Grammovo barvením a pozorovány v mikroskopu při 600x zvětšení (viz následující obrázky 30, 31, 32, 33). Na otázku, zda připravené protilátky omezují adhezi bakterie *PA* však nebylo možno odpovědět jednoznačně – z důvodu nedostatku vhodných obrázků z experimentu ke srovnávání.



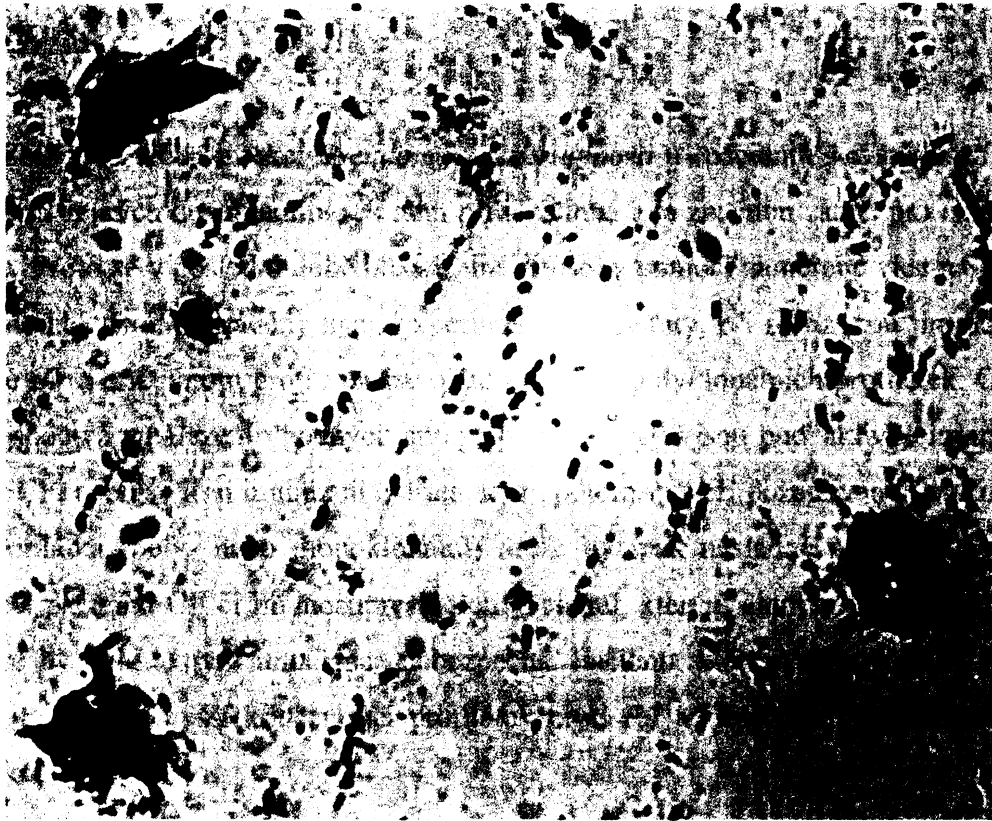
Obrázek 30: Isolované buňky bez bakterií (pozorováno při zvětšení 600x)



Obrázek 31: Isolované buňky s bakteriemi PA (pozorováno při zvětšení 600x)



Obrázek 32: Isolované buňky s bakteriemi PA a protilátkami proti bičíkové frakci (pozorováno při zvětšení 600x)



Obrázek 33: Isolované buňky s bakteriemi PA v jamce pokryté polylysinem

5. Diskuse

Současná léčba infekcí *Pseudomonas aeruginosa* u pacientů s cystickou fibrózou podáváním velkých dávek antibiotik není příliš účinná a je značnou zátěží pro organismus pacienta. Proto se v poslední době hledají jiné způsoby pomoci zaměřené více na prevenci těchto infekcí. Jsou prováděny např. experimenty se zvířaty, při nichž jsou jim podávány oslabené *PA* a ona potom proti nim navozují produkci polyklonálních protilátek. Cílenější metoda spočívá v nalezení vhodných antigenů *PA*, kterými jsou buď aktivně imunizováni pacienti CF, nebo se jimi imunizují zvířata, která potom vytváří požadovanou protilátku²⁶. Tato protilátka (poly- nebo monoklonální) může být pak následně použita pro pasivní imunizaci pacientů CF či imunosupresivních pacientů, kterým akutně hrozí infekce *PA* a pro které by byla aktivní imunizace nebezpečná. Pacienti, kteří jsou infikováni *PA* totiž prokazují znatelně vyšší koncentraci protilátek proti *PA* až když se infekce dostane do chronického stavu^{6, 16}.

Bakterie má více druhů antigenů - většinou spojených přímo s nějakým virulenčním faktorem bakterie. Příkladem tohoto typu antigenu může být např. lipopolysacharid nebo toxin A. Další antigeny jsou asociovány s adhezní schopností bakterie - za to jsou odpovědné povrchové struktury: především flagella, pili a OprF²⁶.

Schopnost bakterie dobře se adherovat na epitelální buňky plicní tkáně je první a zásadní předpoklad k rozvoji bakteriální infekce následované kolonizací s výslednými patologickými změnami hostitelské tkáně. Na základě těchto znalostí lze *PA* infekcím předejít tím, že zabráníme adhezi bakterií - blokováním jejich důležitých adhezních faktorů. V ideálním případě tedy použitím protilátek vytvořených na antigen odpovědný za vazebnou schopnost *PA* lze znemožnit adhezi bakterie na epitelální buňky hostitelské tkáně.

Nejdůležitějším krokem je tedy vybrání vhodného antigenu, z kterého se může připravit účinný imunogen použitelný k aktivní imunizaci. Komplikace v tomto případě spočívá v tom, že v souboru potenciálních hostitelů *PA* se většinou nevyskytují zdraví jedinci schopni dobré imunitní odpovědi. Ohrožené skupiny tvoří imunosupresivní pacienti trpící nějakým defektem imunity nebo na medikaci léky potlačující imunitu (například po transplantacích) anebo jinak oslabení jedinci (HIV pozitivní, s rakovinou, leukémií, těžkými popáleninami)⁷ - u kterých se vzhledem k jejich špatné funkci imunity či aktuálnímu zdravotnímu stavu zdá vhodnější přiklonit k použití pasivní imunizace. Druhou

skupinou jsou pacienti CF, pro něž by sice bylo možno v některých případech použít aktivní imunizaci (především v mladším věku a ty jedince, kteří se ještě nesetkali s PA), ale vzhledem k jejich celkovému zdravotnímu oslabení by toto očkování mohlo zhoršit jejich aktuální stav. Je tedy i zde na místě využít spíše pasivní imunizaci. Pasivní imunizace je také používána k přímé léčbě a v tomto případě PA je to jistě vhodná alternativa k podávání antibiotik, jejichž účinnost je často omezená.

Proti použití aktivní imunizace hovoří i fakt, že vlastní protilátky po vazbě na antigen aktivují komplement a tím způsobují tvorbu imunokomplexů, které jsou důvodem vzniku zánětlivé reakce způsobující další komplikace – jako je zahušťování hlenu u CF pacientů. Stejný problém nastává i s pasivní imunizací protilátkami savčího původu, protože aplikované protilátky mají velmi podobnou strukturu lidským protilátkám a tudíž po interakci s antigenem navodí opět zánětlivou reakci. Východisko z této situace by mohlo spočívat v aplikaci slepičích protilátek.

Slepičí protilátky mají srovnatelné vlastnosti se savčími a v některých ohledech se mohou jevit dokonce jako výhodnější. Slepice má podobný imunoglobulin lidskému IgG označovaný IgY, který ovšem neaktivuje komplement jako lidské IgG a tak nevzniká zánětlivá reakce. Slepičí protilátky jsou tedy ideálním nástrojem pro pasivní imunizaci. I přesto, že jejich izolace z vaječných žloutků je náročnější, z celkového pohledu je jejich příprava ekonomická a způsob získávání je neinvazivní, čímž odpadá etické hledisko využívání zvířat.

Lze předpokládat, že by se následně takovéto ptačí protilátky mohly přidávat do inhalačních směsí. Sloužily by pak buď jako podpůrná léčba pasivní imunizací u již infikovaných pacientů nebo především jako způsob profylaxe všech rizikových skupin ohrožených touto bakterií.

Na základě literárního přehledu byly vybírány antigeny pro přípravu slepičích protilátek. Významným virulencním a adhezním faktorem bakterie je bičík. Hraje důležitou roli v iniciaci zánětlivé odpovědi organismu³⁹. Za jeho adhezní schopnosti je odpovědný především protein FliD ze špičky bičíku³⁸. Proto byly jako antigeny pro imunizaci slepic určeny bičík (majoritní protein FliC) a C – koncové peptidy z proteinu FliD (typu A, B) ze špičky bičíku.

Prvním krokem naší práce byla příprava antigenů pro imunizaci slepic. Z bakterie *Pseudomonas aeruginosa* se podařilo izolovat bičíkovou frakci. Molekulová hmotnost

předpokládaného bičíkového proteinu ve vzorcích byla odhadnuta dle porovnání se standardem molekulových hmotností asi na 50 kDa. Dále pak bylo pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF ověřováno, zda proteiny na elektroforetickém gelu z obrázku 18 (str. 65) obsahují flagelární proteiny *PA*. Bylo zjištěno, že předpokládaný protein z oblasti mezi 45-55 kDa vyskytující se ve všech vzorcích je majoritní protein bičíku Fli C (typu B) o velikosti 53 kDa^{29,40}.

Slepice byly imunizovány připravenými antigeny: bičíkovou frakcí a peptidy A / B navázanými na vysokomolekulární proteinový nosič KLH. Od těchto slepic byla pak dále v průběhu času sbírána vejce a z jejich žloutků byly pak izolovány protilátky IgY. Přítomnost specifických protilátek proti antigenům, kterými byly jednotlivé slepice imunizovány byla pak zjišťována pomocí testu ELISA. U všech slepic se po třech imunizačních dávkách aplikovaných v rozmezí 3 týdnů objevila dostatečná imunitní odpověď. Přítomnost specifických protilátek byla poté dále monitorována. Imunitní odpověď má samozřejmě postupem času klesající tendenci. Proto byly slepicím po pár měsících znovu aplikovány antigeny – tzv. upomínací dávka, což opět zvýšilo hladiny jejich specifických protilátek (vyjma protilátek proti peptidu A – ale poslední izolovaná frakce IgY obsahovala pravděpodobně i zkažená vejce).

Dále bylo nutno zjistit, zda tyto protilátky rozpoznávají antigen také přímo pomocí techniky Western blot. Jako antigen zde byla použita izolovaná bičíková frakce. Na membránách po Western blotu (obrázek 23, str. 72) lze vidět, že protilátky proti bičíkové frakci tento antigen opravdu rozeznávají. V oblasti výskytu flagelárních proteinů je zřetelný proužek na membráně inkubované se specifickými protilátkami oproti membráně inkubované pouze s kontrolní protilátkou. Protilátky proti peptidům A / B s proteiny bičíkové frakce na membráně nereagovaly. Usuzujeme, že reagovat by případně měly pouze protilátky proti peptidu B – jelikož v bičíkové frakci je přítomný protein FliC typu B, měl by se v bičíkové frakci vyskytovat též protein FliD typu B³⁸.

Dalším krokem byla afinitní purifikace izolovaných protilátek. Specifické protilátky – proti bičíkům i proti peptidům se podařilo nakoncentrovat afinitní chromatografií na imobilizovaných antigenech (prokázáno metodou ELISA). Afinitní chromatografie protilátek proti bičíkové frakci byla prováděna na CNBr aktivované Sepharose 4B, na níž byl předtím imobilizován antigen (izolovaná bičíková frakce). Specifické protilátky se eluovaly bazickým pufrům DEA a částečně i pufrům PBS s 1 M NaCl (tento krok byl později vynechán, aby se zvýšila eluce specifických protilátek bazickým pufrům DEA).

Frakce po eluci Gua neobsahovala žádné zvýšené množství specifických protilátek. Protilátky proti bičíkové frakci se tedy tímto způsobem podařilo nakoncentrovat až ~ 8x oproti původnímu vzorku (odhadnuto dle ELISA testu). Afinitní chromatografie protilátek proti peptidům A / B byla prováděna na nosiči SulfoLink s imobilizovanými peptidy A / B. Specifické protilátky se eluovaly kyselým glycinovým pufrům. Specifické protilátky proti peptidu A se podařilo nakoncentrovat ~ 50x oproti původnímu vzorku. Specifické protilátky proti peptidu B se podařilo nakoncentrovat ~ 80x oproti původnímu vzorku.

S afinitně purifikovanými protilátkami byl proveden opět Western blot. Touto technikou bylo ověřeno rozpoznání antigenu specifickými protilátkami proti bičíkové frakci ve vzorcích před i po afinitní chromatografii (obrázek 24, str. 79). Oproti tomu ani afinitně purifikované protilátky proti peptidům A / B s proteiny bičíkové frakce na membráně nereagovaly. Protein FliD se pravděpodobně vyskytuje v izolované bičíkové frakci ve velmi malém množství oproti proteinu FliC (jakožto majoritnímu proteinu bičíku). Z tohoto důvodu nemusí být protein FliD rozeznatelný pro protilátky na membráně. Proto byla provedena ELISA protilátek proti peptidům za použití bičíkové frakce jako antigenu (obrázek 25, str. 80). Touto metodou bylo zjištěno, že afinitně purifikované protilátky IgY proti peptidu z proteinu FliD (B) rozeznávají antigen v izolované bičíkové frakci (lepšího výsledku bylo dosaženo s antigenem povařeným s SDS a merkaptoethanolem).

Dále byly s těmito specifickými protilátkami IgY prováděny další testy⁴² - jako už dříve při použití specifických protilátek proti celé PA: bylo sledováno zda zabraňují růstu či motilitě bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Inhibice růstu či motility při těchto pokusech nebyly ani tentokrát pozorovány, ačkoliv v literatuře je zmíněna schopnost protilátek ovlivňovat negativně bakteriální motilitu^{37, 40}. Připravené protilátky by však především měly sloužit k zabránění adheze bakterie, což je možné i přes to, že nijak neovlivňují její růst či motilitu.

Pro ověření funkčnosti dříve vyrobených protilátek proti celé PA⁴² byla provedena ELISA těchto protilátek (za použití formaldehydem usmrcených bakterií jako antigenu). Protilátky prokázaly schopnost rozpoznat antigenní struktury PA. Při tomto experimentu byl také použit vzorek afinitně purifikovaných protilátek proti bičíkové frakci. Tyto protilátky rozpoznávají majoritně bičíkový protein FliC na usmrcených bakteriích.

Pro další experimenty bylo potřeba vyzkoušet, jakým způsobem se dají označit bakterie PA, aby byly dobře pozorovatelné v mikroskopu. Bakterie byly barveny

klasickým Grammovo barvením nebo barvou Giemsa. V obou případech byly bakterie po obarvení viditelné, lepšího výsledku bylo však dosaženo Grammovo barvením.

Další možností vizualizace bakterií je fluorescenční značení pomocí sekundární králičí protilátky IgG proti IgY konjugované s fluorescenční značkou FITC. Pomocí tohoto značení lze i ověřit, zda vytvořené specifické protilátky IgY proti celé *PA* či jejím antigenním strukturám rozeznávají bakterii *PA*. Při tomto pokusu však docházelo i k nespecifickému označování bakterií *PA* sekundární protilátkou bez přítomnosti protilátky primární či v přítomnosti pouze primární protilátky kontrolní. Podle očekávání nejlépe vizualizované bakterie byly při použití primární protilátky proti celé *PA* (na obrázku 28, str. 83) . Bylo tomu tak pravděpodobně z toho důvodu, že tyto protilátky jsou polyspecifické a rozeznávají na bakterii *PA* více struktur. Oproti tomu protilátky proti bičíkové frakci či protilátky pouze proti peptidům A / B jsou specifické vůči flagelární struktuře bakterie, která je ovšem nepozorovatelná ve fluorescenčním mikroskopu.

Nakonec byl proveden pokus, který měl určit, zda připravené protilátky brání adhezi *PA* na potkaní plicní epiteliální buňky typu II. Isolované potkaní plicní buňky neobsahovaly jen jeden typ buněk, pravděpodobně nedošlo k úplnému oddělení epiteliálních buněk typu II a ostatních plicních buněk. Pro přesnější charakterizaci složení izolovaných plicních buněk by bylo potřeba zkusit je označit např. nějakou specifickou protilátkou. Dělat nějaké závěry z tohoto experimentu je bohužel obtížné. V jamkách totiž po promývání a barvení nezůstalo příliš buněk, aby se výsledky daly spolehlivě vyhodnotit. Pro buňky to byla pravděpodobně krátká doba, aby se dokonale adherovaly na jamku a udržely se tam i během promývání. Při adhezním experimentu bylo zjištěno, že použití polylysinu pro lepší adhezi buněk na dno jamky není vhodné, protože se na povrch pokrytý polylysinem adherují i bakterie (viz obrázek 33, str. 86). Bakterie *PA* se za daných podmínek pokusu skutečně adherují na izolované plicní buňky – jak je vidět na obrázku 31, str. 85.

Závěrem lze tedy konstatovat, že se podařilo připravit slepičí protilátky proti vybraným antigenním strukturám bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, které prokázaly specifickou reaktivitu proti použitým antigenům. Zatím se ovšem nepodařilo prokázat, zda tyto protilátky jsou schopny inhibovat adhezi bakterie *Pseudomonas aeruginosa* na potkaní plicní epiteliální buňky typu II. Tyto pokusy však budou muset být ještě zopakovány, aby se vyloučily případné metodické nedostatky. Poslední dobou se slepičím protilátkám proti

hlavnímu bičíkovému proteinu FliC jako slibnému profylaktickému prostředku už věnují i samostatné studie⁵³.

6. Souhrn

- Byly připraveny specifické slepičí protilátky proti bičíkové frakci (majoritnímu proteinu bičíku FliC, typu B) a proti peptidům A / B z proteinu FliD (typu A, B) ze špičky bičíku.
- Protilátky se podařilo dále nakoncentrovat afinitní chromatografií na imobilizovaných antigenech: protilátky proti bičíkové frakci ~ 8x, protilátky proti peptidu A ~ 50x a protilátky proti peptidu B ~ 80x oproti původní frakci protilátek (odhadováno dle testu ELISA).
- Metodou ELISA byl prokázán obsah specifických protilátek proti použitým antigenům ve vzorcích před i po afinitní chromatografii.
- Technikou Western blot bylo prokázáno rozpoznání proteinu FliC (typu B) protilátkami proti bičíkové frakci před i po afinitní chromatografii. Protilátky proti peptidům A i B s proteiny bičíkové frakce na membráně nereagovaly, ale metodou ELISA bylo prokázáno rozpoznání antigenu protilátkami proti peptidu B v bičíkové frakci.
- Dosud se neprokázal inhibiční vliv připravených protilátek na adhezi bakterie *Pseudomonas aeruginosa* na potkaní plicní epiteliální buňky typu II.

7. Seznam použité literatury

- 1) <http://textbookofbacteriology.net>
- 2) Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J. a kol.: Lékařská mikrobiologie (bakteriologie, virologie, parazitologie), Marvil, Praha 2 (1996)
- 3) www.pseudomonas.com
- 4) http://burkholderia.com/b_cenocepacia.jsp
- 5) <http://www.lmg.cz>
- 6) Vávrová V. a kol.: Cystická fibróza v praxi, Kreace s. r. o., Praha 5 (1999)
- 7) Cachia P. J., Hodges R. S.: Biopolymers 71, 141-168, (2003)
- 8) Keene W. a kol.: J. Am. Med. Assoc. 291, 981-985, (2004)
- 9) Baumann U., Mansouri E., von Specht B.-U.: Vaccine 22, 840-847, (2004)
- 10) Vávrová V. a kol.: Cystická fibróza, Grada, Praha (2006)
- 11) Vávrová V. a kol. Centra CF Motol: Cystická fibróza (příručka pro nemocné, jejich rodiče a přátele), Professional Publishing, Praha (2000)
- 12) Mareš J., Kočárek E. a Sedláček Z.: Praktikum z molekulární genetiky, 2. LF UK, Praha (2001)
- 13) Vávrová V., Zemková D., Macek M. jr., Pohunek P.: Forum Medicinae 3, 49 - 55, (2000)
- 14) <http://cepacia.wz.cz>
- 15) Taccetti G., Campana S., Marianelli L.: J. Pediatr. 129, 619, (1996)
- 16) Johansen H. K., Norregaard L., Gotzsche P., Pressler T., Koch C., Hoiby N.: Pediatr. Pulmonol. 37, 427-432, (2004)
- 17) Walker R. I., Blanchard T., Braun J. M., Cebra J. J., Cross A. S., Fattom A., Giannasca P. J., Holder I. A.: Vaccine 22, 801-804, (2004)
- 18) Hořejší V., Bartůňková J. a kol.: Základy imunologie, Triton, Praha (1998)
- 19) Warr G., Magor K., Higgins D.: Immunol. Today 16, 392-398, (1995)
- 20) Sunwoo H. H., Nakano T., Dixon W. T., Sim J. S.: Poult. Sci. 75, 342, (1996)
- 21) Ntakarutimana V., Demedts P., van Sande P. Scharpé S.: J. Immunol. Methods 153, 133, (1992)
- 22) Hatta H., Kim M. Yamamoto T.: Agricult. Biol. Chem. 54, 2531, (1990)
- 23) Hodek P., Koblas T., Rýdlová H., Kubičková B., Šulc M., Hudeček J., Stiborová M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 69, 659-673, (2003)

- 24) Kovacs-Nolan J., Phillips M., Mine Y.: *J. Agricult. Food. Chem.* 53, 8421-8431, (2005)
- 25) Kollberg H., Carlander D., Olesen H., Wejaker P., Johannesson M., Larsson A.: *Pediatr. Pulmonol.* 35, 433-440, (2003)
- 26) Holder I. A.: *Vaccine* 22, 831-839, (2004)
- 27) <http://www.aip.org/pt/jan00/berg.htm>
- 28) Yoon S. S., Hennigan R. F., Hilliard G. M., Ochsner Urs A., Parvatiyar K., Kamani M. C., Allen H. L., DeKievit T. R., Gardner P. R., Schwab U., Rowe J. J., Iglewski B. H., McDermott T. R., Mason R. P., Wozniak D. J., Hancock R. E. W., Parsek M. R., Noah T. L., Boucher R. C., Hassett D. J.: *Dev. Cell* 3, 593-603, (2002)
- 29) Feldman M., Bryan R., Rajan S., Scheffler L., Brunnert S., Tang H., Prince A.: *Infect. Immun.* 66, 43-51, (1998)
- 30) Ansorg R. A., Knoche M. E., Spies A. F., Kraus C. J.: *J. Clin. Microbiol.* 20, 84-88, (1984)
- 31) Arora S. K., Neely A. N., Blair B., Lory S., Ramphal R.: *Infect. Immun.* 73, 4395-4398, (2005)
- 32) Brimer C. D., Montie T. C.: *J. Bacteriol.* 180, 3209-3217, (1998)
- 33) Rosok M. J., Stebbins M. R., Connelly K., Lostrom M. E., Siadak A. W.: *Infect. Immun.* 58, 3819-3828, (1990)
- 34) Holder I. A., Wheeler R., Montie T. C.: *Infect. Immun.* 35, 276-280 (1982)
- 35) Holder I. A., Naglich J. G.: *J. Trauma* 26, 118-22 (1986)
- 36) Montie T. C., Drake D., Sellin H., Slater O., Edmonds S.: V :Doring G, Holder IA, Botzenhart K.: *Basic research and clinical aspects of Pseudomonas aeruginosa.* Karger: 233-48, Basilej (1987)
- 37) Ochi H., Ohtsuka H., Yokota S., Uezumi I., Terashima M., Irie K., Noguchi H.: *Infect. Immun.* 59, 550-554 (1991)
- 38) Arora S. K., Dasgupta N., Lory S., Ramphal R.: *Infect. Immun.* 68, 1474-1479, (2000)
- 39) Prince A.: *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 34, 548-551 (2006)
- 40) Montie T. C., Craven R. C., Holder I. A.: *Infect. Immun.* 35, 281-288 (1982)
- 41) Hodek P.: osobní sdělení
- 42) Sobotková Z.: *Studium vaječných protilátek jako prostředku pasivní imunizace: Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie, (2006)*

- 43) Hodek P., Trefil P., Šimůnek J.: CZ Patent 281298, (1996)
- 44) Sigma: Cyanogen bromide activated matrices (C9142) (Product information)
- 45) Pierce: SulfoLink® Coupling Gel (20401) (Instructions)
- 46) Junqueira L. C., Carneiro J., Kelley R. O.: Základy histologie, H&H, Jinočany 1997
- 47) Ritchie K., Kandalaf L., Campbell L., Sakagami M.: Pharmaceutical Cell Biology Group, Cardiff University (2003)
- 48) Chi E., Mehl T., Nunn D., Lory S.: Infect. Immun. 59, 822-828 (1991)
- 49) Svanborg Edén C., Hansson H. A.: Infect. Immun. 21, 229-237 (1978)
- 50) Yokoyama H., Umeda K., Peralta R. C., Hashi T., Icalto Jr F. C., Kuroki M., Ikemori Y., Kodama Y.: Vaccine 16, 388-393 (1998)
- 51) Carterson A. J., Honer zu Bentrup K., Ott C. M., Clarke M. S., Pierson D. L., Vandenburg C. R., Buchanan K. L., Nickerson C. A., Schurr M. J.: Infect. Immun. 73, 1129-1140 (2005)
- 52) Ewanowich C. A., Sherburne R. K., Man S. F. P., Pepler M. S.: Infect. Immun. 57, 1240-1247 (1989)
- 53) Nilsson E., Amini A., Wretling B., Larsson A.: J. Chromatogr. B 856, 75-80 (2007)

