

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Kateřina Dostálová

Studium onemocnění cystická fibrosa na myším experimentálním modelu

Study of cystic fibrosis using mouse experimental model

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2019

Prohlášení

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

V Praze dne

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé práce prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení této diplomové práce, za množství cenných rad a připomínek při jejím vypracovávání.

Především bych ráda poděkovala Mgr. Boženě Kubíčkové za pomoc při provedení experimentů s experimentálními zvířaty a cenné rady. Také za její čas, trpělivost, milý přístup, který mi byl oporou po celou dobu práce na diplomové práci. Dále Mgr. Janě Rychnové za uvedení do tématu a práce s experimentálními zvířaty.

A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat kolegyni Bc. Michaele Vaškové za její podporu, cenné rady a spolupráci při laboratorní činnosti.

Abstrakt

Cystická fibrosa je dědičné onemocnění projevující se změnou podmínek v plicích vedoucích ke zvýšené kolonizaci patogenů, především *Pseudomonas aeruginosa* (PA). U pacientů dochází ke snížené sialylaci glykokonjugátů epiteliálních buněk, což vede k odhalení sacharidových struktur, na které se bakterie PA snáze váží, např. pomocí lektinu PA-III. Léčba infekce způsobené bakterií PA antibiotiky je problematická z důvodu vzniku rezistence. Proto jsou hledány nové terapeutické přístupy. Jednou ze studovaných možností je pasivní imunizace slepičími protilátkami proti lektinu PA-III. Tyto protilátky jeví schopnost snižovat adhezi bakterií PA na plicní epiteliální buňky *ex vivo*. Aby mohl být efekt slepičích protilátek dále studován, je nutné vytvořit vhodný experimentální *in vivo* model.

Cílem bylo optimalizovat myší model, který by napodoboval podmínky v plicích jako u pacientů s CF. V první řadě bylo zapotřebí vybrat vhodný bioluminiscenční kmen z těchto tří kmenů PA-lux 1, PA-lux 2 a PA-XEN 41. Bylo nutné vybrat kmen s nejvyšší schopností bioluminiscence, které je využíváno pro sledování bakteriální infekce *in vivo*. Na základě nejvyšší naměřené hodnoty relativní luminiscence byl vybrán kmen PA-lux 1 kultivovaný ve zkumavce s kónickým dnem.

Následně byl proveden experiment na myších, při kterém byl sledován vliv enzymu neuraminidasy a průběh infekce po aplikaci množství bakterií $5,5 \cdot 10^5$ a $2,75 \cdot 10^6$. Při tomto experimentu nedošlo k navození bakteriální infekce, což mohlo být způsobeno několika možnými příčinami, které byly dále zkoumány. Nejprve byla ověřena přítomnost lektinu PA-III, který byl pomocí specifických slepičích protilátek detekován pouze v Erlenmeyerově baňce. Druhým důvodem, proč nedošlo k navození infekce, mohla být snížená životaschopnost bakterií PA-lux, proto byla proměřena růstová křivka pro PA-lux 1 i PA-lux 2. Bakterie PA-lux 2 jeví lepší schopnost adaptace na nové prostředí. Vzhledem k těmto výsledkům a naměřeným hodnotám relativní luminiscence byly pro další experimenty použity bakterie PA-lux 2 kultivované 6 hodin v Erlenmeyerově baňce.

Dále byla provedena optimalizace dávky bakterií pro vznik akutní bakteriální infekce s přežitím 50 % myší. Výsledky z těchto experimentů naznačují, že optimální dávka bakterií se bude pravděpodobně pohybovat v rozmezí mezi $1 \cdot 10^6$ a $2 \cdot 10^6$ bakterií.

Klíčová slova

myší modely, *Pseudomonas aeruginosa*, bakteriální infekce, bioluminiscence

Abstract

Cystic fibrosis is a hereditary disease manifested by a change in lung conditions leading to increased colonization of pathogens, especially *Pseudomonas aeruginosa* (PA). The lung epithelial cells of cystic fibrosis (CF) patients frequently contain glycoconjugates with low sialylation which leads to the reveal of carbohydrate structures to which PA are bind easier, e.g. with PA-IIL lectin. Treatment of PA infection with antibiotics is problematic due to the formation of resistance. Therefore, new therapeutic approaches are studied. One of the studied options is passive immunization with chicken antibodies against PA-IIL lectin. These antibodies show the ability to reduce PA adhesion to lung epithelial cells *ex vivo*. In order to further study the effect of chicken antibodies, it is necessary to create an appropriate experimental *in vivo* model.

The aim of this study was to optimize the mouse model to mimic lung conditions as in CF patients. First of all, it was necessary to select a suitable bioluminescent strain from these three strains PA-lux 1, PA-lux 2 and PA-XEN 41. On the basis of the highest measured luminescence value, the strain PA-lux 1 cultivated in a conical bottom tube was selected.

Subsequently, an experiment was carried out on mice in which the effect of the enzyme neuraminidase and the course of infection after application of the dose of bacteria $5,5 \cdot 10^5$ a $2,75 \cdot 10^6$ was observed. Bacterial infection was not induced during this experiment, this could be caused due to several possible reasons that were further investigated. First, the presence of PA-IIL lectin was verified, which was detected in an Erlenmeyer flask using specific chicken antibodies, and a change in the culture method was considered. Another reason could be the reduced viability of PA-lux bacteria. Therefore, the growth curve for PA-lux 1 and PA-lux 2 was measured. PA-lux 2 bacteria appeared to be better adapted to the new environment. Due to these results and the measured values of relative luminescence, the PA-lux bacteria and the cultivation method were changed for further experiments. For further experiments, PA-lux 2 cultures were cultivated for 6 hours in an Erlenmeyr flask. Further, the dose of bacteria was optimized for the emergence of acute bacterial infection with survival of 50 % of mice. The results from these experiments suggest that the optimal dose of bacteria is likely to be between $1 \cdot 10^6$ and $2 \cdot 10^6$ dose of bacteria.

Key words

mouse models, *Pseudomonas aeruginosa*, bacterial infection, bioluminescence

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Teoretický úvod	10
1.1 Cystická fibrosa	10
1.1.1 Protein CFTR	10
1.1.2 Patofyziologie plicního onemocnění	13
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
1.3 Lektiny PA-IL a PA-IIL	16
1.4 Slepíčí protilátky	18
1.4.1 Pasivní imunizace	20
1.5 Studium CF na myších modelech	21
2 Cíl práce	25
3 Materiál a metody	26
3.1 Použité chemikálie a materiál	26
3.2 Použité přístroje	28
3.3 Pokusná zvířata	29
3.4 Metody	30
3.4.1 Práce s <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
3.4.2 Proměření bioluminiscence bakteriálních kmenů	32
3.4.3 Určení homogenity bakteriálních kultur	32
3.4.4 Proměření růstové křivky	35
3.4.5 Ověření produkce bakteriálního lektinu PA-IIL	36
3.4.6 Práce s experimentálními zvířaty	41
4 Výsledky	45
4.1 Ověření čistoty bakteriálních kmenů	45
4.1.1 Metoda křížového roztěru bakteriálních kmenů	45
4.2 Měření bioluminiscence kmenů PA	45
4.3 Průběh infekce	46
4.4 Produkce bakteriálního lektinu PA-IIL	48
4.5 Růstová křivka PA-lux	49
4.6 Ověření čistoty bakteriálního kmene PA-lux 2	51
4.6.1 Kultivace separovaných kolonií PA-lux 2	51
4.6.2 Mikroskopické pozorování PA-lux 2	52
4.7 Měření bioluminiscence PA-lux 2 v závislosti na době kultivace	52

4.8	Optimalizace dávky bakterií	53
5	Diskuze	56
6	Souhrn.....	62
7	Seznam použité literatury	63

Seznam použitých zkratek

APS	peroxodisíran amonný
ASL	povrchová plicní kapalina („Airway Surface Liquid“)
ATP	adenosintrifosfát
BCIP	5-bromo-4-chlor-3-indolyl fosfát
C	konstantní doména imunoglobulinů
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CF	cystická fibrosa
CFTR	„Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator“
dH ₂ O	deionizovaná voda
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ENaC	epiteliální sodný kanál („Epithelial Na ⁺ Channel“)
H	těžký řetězec imunoglobulinů („Heavy“)
IgG	imunoglobulin třídy G
IgY	imunoglobulin Y (výskyt u ptáků)
KO	„knockout“
L	lehký řetězec imunoglobulinů („Light“)
LB médium	Luria-Bertani médium
M9 médium	minimální médium
MSD	membránová doména („Membrane Spanning Domain“)
NBD	nukleotidová vazebná doména („Nucleotid Binding Domain“)
NBT	„4-Nitro Blue Tetrazolium chlorid“

OD ₆₀₀	optická denzita při vlnové délce 600 nm
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-IL, PA-IIL	bakteriální lektiny
PA-lux 1	bioluminiscenční kmen PA opakovaně subkultivovaný
PA-lux 2	bioluminiscenční kmen PA uchovávaný na šikmém agaru při 5 °C
PBS	fosfátový pufr („Phosphate Buffered Saline“)
PMN	polymorfonukleární neutrofily
PS	médium pro kultivaci bakterií rodu <i>Pseudomonas</i>
R	regulační doména („Regulatory“)
RCF	relativní odstředivá síla („Relative Centrifugal Rorce“)
RPM	otáčky za minutu („Revolutions Per Minute“)
SDS	dodecylsulfát sodný
V	variabilní domény imunoglobulinů („Variable“)
TEMED	tetramethylethylendiamin

1 Teoretický úvod

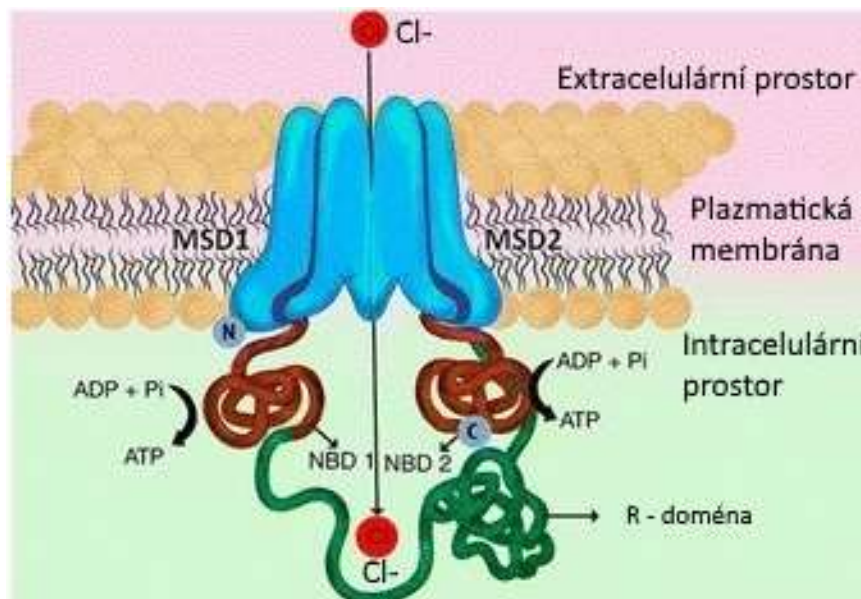
1.1 Cystická fibrosa

CFTR („Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) je membránový protein s funkcí chloridového kanálu kódovaný genem *CFTR*. Mutace genu *CFTR* ovlivňuje funkci chloridového kanálu vedoucí ke vzniku onemocnění cystická fibrosa (CF). Cystická fibrosa je autosomálně recesivní onemocnění, u kterého bylo identifikováno více než 2000 mutací. CF je označována jako „nemoc slaných dětí“, protože v potu novorozeneckých dětí je zvýšená koncentrace soli způsobená nepropustností potních kanálů pro Cl^- , které jsou přítomny spolu s Na^+ v potních sekretech¹. Při dysfunkci *CFTR* dochází v plicích k akumulaci hustého hlenu, který brání potřebné bakteriální mukociliární clearance, což usnadňuje kolonizaci plic bakteriemi. Pacienti s CF jsou náchylní k infekci patogenními mikroorganismy jako jsou *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* (PA) či *Burkholderia cepacia* komplex^{2,3}. Kolonizace *Burkholderia cepacia* komplexem má tak negativní prognózu, že je kontraindikována s transplantací plic⁴. Bakteriální infekce začíná již v raném dětství, kdy jsou plíce pacientů kolonizovány nejprve patogenem *Staphylococcus aureus* a *Haemophilus influenzae*, které poškozují epiteliální buňky plic. Následně je infekce těmito patogeny nahrazena infekcí způsobenou *Pseudomonas aeruginosa*⁵.

1.1.1 Protein CFTR

CFTR je chloridový cAMP regulovaný kanál, který se nachází na apikální straně membrány epiteliálních buněk. Strukturně je to membránově vázaný glykoprotein o 1480 aminokyselinách. Sestává se ze dvou symetrických transmembránových domén MSD 1 a 2 („Membrane spanning domain“) a dvou domén vázajících nukleotidy NBD 1 a NBD 2 („Nucleotid binding domain“), na kterých dochází k vazbě a hydrolýze ATP (viz obr. 1, str. 11). Mezi oběma NBD doménami se nachází regulační doména (R - „Regulatory“), která je tvořena mnoha nabitými aminokyselinami a obsahuje

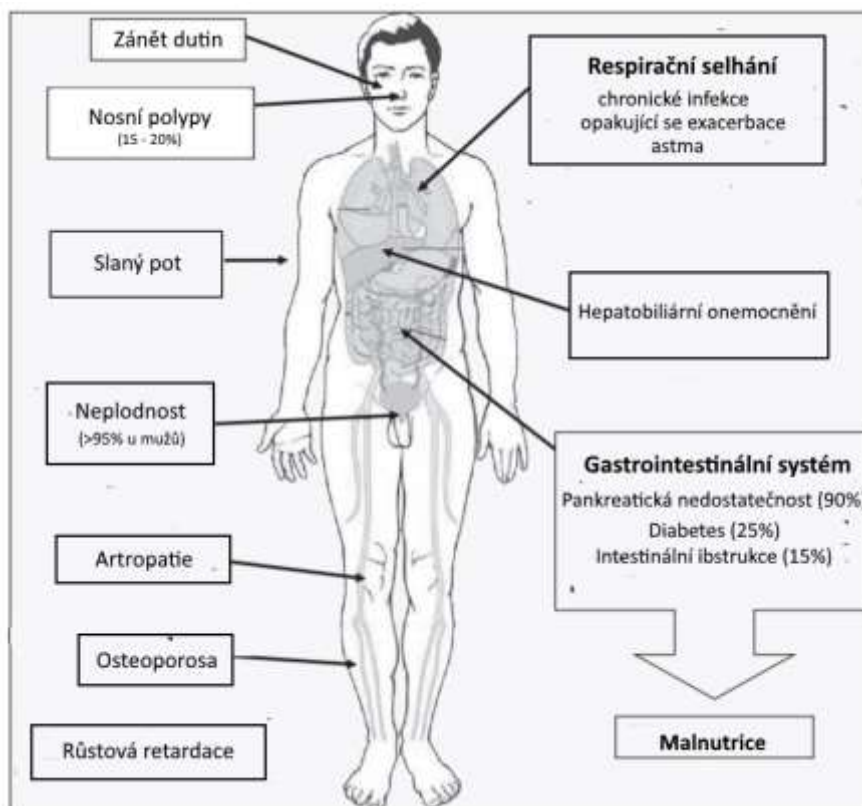
fosforylační místa pro fosforylaci proteinkinásou A, která je aktivována cAMP^{3,6}. Při navázání ATP na doménu NBD 1 se kanál otevře a anionty mohou proudit podle elektrochemického gradientu pomocí póru, který je tvořen transmembránovými doménami. Po úplné fosforylaci regulační domény dochází k vazbě ATP na NBD 2 a ke stabilizaci otevřeného stavu kanálu. Hydrolýzou ATP na ADP a fosfát dojde k jejich uvolnění z obou NBD domén a kanál se uzavře. Pokud dojde k defosforylaci pomocí fosfatas, NBD domény nejsou schopny vázat ATP bez aktivace proteinkinásou A^{7,8}.



Obrázek 1: CFTR iontový kanál. CFTR se skládá ze dvou domén MSD, z nichž je každá spojena s vazebnými doménami nukleotidů (NBD 1 a 2 červeně). NBD 1 s doménou NBD 2 jsou propojeny regulační doménou².

Bylo prokázáno, že tento kanál hraje významnou roli v regulaci Na⁺, K⁺ a Cl⁻ iontů³. V menší míře také funguje jako kanál pro HCO₃⁻ ionty. Jeho primární funkcí je regulace objemu, ale i hustoty kapaliny na povrchu epitelu právě prostřednictvím sekrece Cl⁻ a inhibice absorpce Na⁺. Je exprimován v řadě orgánů, kde ovlivňuje jejich sekreční funkci, jako jsou ledviny, plíce, pankreat a střevo^{6,9}. Všechny tyto orgány jsou ovlivněny poruchou CFTR kanálu a jejich poškození se řadí mezi projevy tohoto onemocnění. V gastrointestinálním traktu má porucha CFTR kanálu za následek sníženou produkci pankreatických enzymů vedoucích k malabsorpci zejména tuků a deficitu nutrientů. Poškozování pankreatu vede u starších pacientů ke vzniku diabetu mellitu. Dalšími příznaky onemocnění jsou nosní polypy, paličkové prsty, postižení jater, pankreatitida, snížená

fertilita u žen a neplodnost u mužů (viz obr. 2)^{1,9,10}. Z hlediska přežití pacientů jsou nejzávažnější a nejkomplicovanější plicní onemocnění.



Obrázek 2: Klinické následky CF. Čísla v závorkách představují přibližné procento takto postižených pacientů. Převzato a upraveno⁹.

1.1.1.1 Glykosylace u CF

Delece fenylalaninu v pozici 508 je nejčastější mutace proteinu CFTR u CF a vyskytuje se ve vysoce konzervované α -helikální doméně NBD 1. Mutace způsobuje špatnou průchodnost iontového kanálu, ale vazba ATP ovlivňována není. Dále dochází k pozměnění glykosylace vznikajícího proteinu a ke snížené expresi funkčního proteinu na buněčném povrchu^{3,11}. Mutace má vliv nejenom na glykosylaci vlastního proteinu, ale navíc jsou glykosylovány i jiné glykoproteiny. Změna glykosylace nastává jak u N-vázaných glykokonjugátů tak u mucinů^{12,13}. Bylo zjištěno, že u glykokonjugátů je snižené množství kyseliny sialové a zvýšená přítomnost fukosylových zbytků vázaných vazbou α -1,3 a α -1,6 se zbytky N - acetylglukosaminu¹⁴. Pozměněná fukosylace a sialylace jsou charakteristickými znaky membránových i sekretovaných glykoproteinů u nemocných s CF. Hlavní patogen pacientů s CF *Pseudomonas aeruginosa* má vazebné proteiny rozpoznávající

fukosu ve vazbě α -1,3 a asialoglykokonjugáty. Proto je předpokládáno, že změna terminální glykosylace epiteliálních glykoproteinů dýchacích cest přispívá k chronické infekci a silné zánětlivé odpovědi v plicích postižených CF⁵.

Změny glykosylace jsou způsobeny mutovaným CFTR proteinem, který pravděpodobně ovlivňuje pH v trans-Golgiho aparátu, a to takovým způsobem, že jeho nefunkčnost nebo nepřítomnost v trans-Golgiho aparátu epiteliálních buněk vede k nadměrnému okyselení s následnými abnormalitami v sialylaci a sulfataci glykoproteinů. Snížené pH v trans-Golgiho aparátu má vliv na přítomné enzymy, které jsou citlivé na pH. Změna pH inhibuje terminální sialyltransferasy a tím dochází ke snížené sialylaci¹⁵. V případě α -L-fukosidas dochází ke zvýšení jejich aktivity a následnému zvýšení fukosylace¹⁴. Snížená sialylace ovlivňuje vazbu bakterií PA. Tyto bakterie se ve zvýšené míře váží na asialo-GM1 (gangliotetraosylceramid) receptor, a to například prostřednictvím svých pilusů. Na sialo-GM1 k vazbě nedochází. To potvrzuje, že pozměněná glykosylace je velice důležitý aspekt při vzniku bakteriálních infekcí^{16,17}.

1.1.2 Patofyziologie plicního onemocnění

U onemocnění CF je nejdůležitější pochopit rozdíly v dýchacích cestách u zdravého jedince a pacienta s CF. U zdravých jedinců jsou horní cesty dýchací kolonizovány přirozenými mikroorganismy, zatímco dolní cesty dýchací jsou relativně sterilní díky vrozené obranyschopnosti plic. Mukociliární clearance je vrozený obranný mechanismus plic, který je založen na funkci řasinek, hlenové vrstvy pokrývající dýchací cesty a vrstvy povrchové tekutiny (ASL) dýchacích cest³. Velmi důležitou součástí plic je právě povrchová tekutina (ASL) skládající se ze dvou vrstev, z vrstvy hlenu a perikulární tekutiny¹⁰. Vrstva hlenu obsahuje vysokomolekulární muciny, které mají značné množství sacharidových postranních řetězců vázajících cizorodé částice pro jejich konečné odstranění z plic. Vlastnosti hlenu jsou ovlivněné množstvím vody, koncentrací iontů a pH¹⁸. Funkcí hlenu je odstraňování patogenů z plic a v případě nutnosti poskytnutí ochranné bariéry před toxickými endogenními a exogenními produkty¹⁹. Hlen tvoří vlastně jakousi „past“ pro vdechované bakterie, viry a cizorodé částice. Dále je mechanické čištění dýchacích cest podporováno kašlem²⁰.

Zásadním rozdílem mezi nemocným CF a zdravým člověkem jsou právě dolní cesty dýchací, které přestávají být sterilní a jsou kolonizovány mikroorganismy. Mění se vlastnosti povrchové tekutiny a hlenové vrstvy dýchacích cest. Změna podmínek v plicích je způsobená nefunkčností proteinu CFTR, kdy dochází k abnormálnímu transportu převážně Cl^- a Na^+ iontů^{3,21}. Abnormální transport Cl^- a Na^+ vede k dehydrataci ASL tekutiny na povrchu plic, zhoustnutí hlenu a poškození mukociliární clearance. Dehydratované sekrety nejsou schopny vylučovat bakterie z plic, a to usnadňuje bakteriální kolonizaci a rozvoj infekce. Hlen vytváří plaky na povrchu plic spolu s patogeny a následným zánětem vedoucím k poklesu funkce plic. Navíc bylo prokázáno, že uvnitř takovýchto plaků je nízká koncentrace kyslíku přispívající ke kolonizaci dýchacích cest patogeny jako je *Pseudomonas aeruginosa*^{3,22}. Při počáteční kolonizaci plic dochází ke stimulaci vrozeného imunitního systému a zvýšené odezvě cytokinů, což vede k chemotaxi neutrofilů na místo infekce. Tvoří se zánět a nadměrná přítomnost neutrofilů způsobuje destrukci plicní tkáně produkcí destruktivních molekul. Tyto mediátory indukují další příliv zánětlivých buněk^{9,23,24}. Mezi tyto mediátory se řadí neutrofilní proteasy, které způsobují proteolysu a chondrolysu plicní tkáně s následnou dilatací dýchacích cest⁹.

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je gramnegativní aerobní až fakultativně anaerobní bakterie všudypřítomná v životním prostředí. Podle tvaru se řadí mezi tyčinkovité bakterie^{3,25}. Nejvhodnější teplota pro jejich růst je při 25 - 37 °C²⁶. Tyto bakterie jsou schopny přežít v různých prostředích jako jsou odpadní vody, půdy nebo nemocnice^{25,27}. Nejčastěji kolonizují výlevky, kohouty, mopy a dýchací přístroje v nemocnici. Tato bakterie infikuje rostliny, zvířata, ale také člověka. PA je podmíněný patogen, který způsobuje vážnou infekci u pacientů s oslabenou imunitou a trpících těžkými popáleninami, ale převážně u pacientů s cystickou fibrosou. Nejčastěji způsobuje pneumonie, infekce močových cest a chirurgických ran^{25,27}.

Produkce virulentních faktorů je strategie pro přežití patogenů, aby se vyhnuly imunitní obraně hostitele, což umožňuje progresi patogeneze zejména v rané fázi kolonizace a akutní infekce. PA má tři základní skupiny virulentních faktorů zahrnující adheziny, toxiny

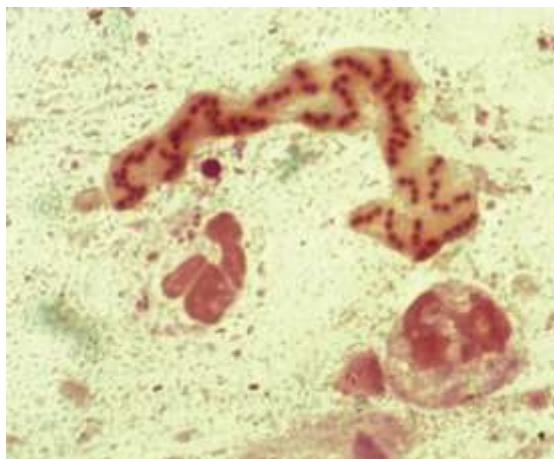
a enzymy. K adhezi na hostitelskou buňku, která je zásadní pro tvorbu infekce, využívá bakterie nejméně čtyř povrchových struktur (komponent)⁴. Mezi ně patří pili, bičíky, lipopolysacharidy a alginát. Pili usnadňují adhezi na epitelální buňky hostitele. Krom toho se účastní také formace biofilmu a mohou napomáhat agregaci bakterií a tím vytvoření bakteriálních kolonií na cílové tkáni, což přispívá k ochraně před imunitním systémem hostitele a antibiotiky. Bičík interaguje s muciny epitelálních buněk a je nezbytný pro motilitu, chemotaxi a invazivitu bakterií. Lipopolysacharidy se váží na cukerné struktury na povrchu epitelálních buněk^{4,25,28-30}. Alginát je mukoidní exopolysacharid skládající se z částečně acetylované kyseliny D-mannurové a kyseliny L-guluronové³¹. Syntéza alginátu chrání bakterie před fagocytózou a účinkem antibiotik tvorbou alginátové kapsule na povrchu bakterií, díky čemuž se usnadní kolonizace a zvýší se jejich odolnost. Alginát je také nejvíce zastoupený polysacharid v biofilmu, který bakterie začínají tvořit po ireverzibilní adhezi na epitelální buňky²⁻⁴.

Dalšími virulentními faktory jsou toxiny, které usnadňují překonání hostitelské imunity³. K jejich sekreci přímo do hostitelské buňky dochází po kontaktu s bakterií²⁹. Mezi toxiny patří jeden z nejdůležitějších virulenčních faktorů PA, kterým je exotoxin A. Exotoxin A brání syntéze proteinů mechanismem blokace prodlužování peptidového řetězce eukaryotních buněk. Dále pravděpodobně přispívá k poškození tkáně při chronické infekci plic⁴. Mezi toxiny se řadí také barevné pigmenty, které bakterie produkují. Prvním z nich je pyocyanin, modrý pigment katalyzující produkci reaktivních forem kyslíku. Je předpokládáno, že také přispívá k odolnosti PA v plicích pacientů s CF^{4,27}. Druhým je žlutozelený pigment vázající ion železa (Fe^{3+}) pyoverdin, který poskytuje bakteriím konkurenční výhodu v prostředí, které je chudé na ionty železa^{4,29}.

Poslední skupinou virulenčních faktorů, které má bakterie *Pseudomonas aeruginosa* jsou enzymy. Produkují dvě elastasy, serinovou proteasu a zinkovou metalloproteasu. Tyto elastasy degradují elastin a poškozují plicní epitel. Mohou také inhibovat chemotaxi neutrofilů a jejich funkci, což vede k dalšímu rozšiřování a degradaci tkáně při infekci. Proteasy navíc degradují faktory komplementu hostitele⁴.

U pacientů s CF bylo prokázáno, že PA prochází změnou metabolismu, aby byly schopné přizpůsobovat se abnormálnímu prostředí v dýchacích cestách s CF. Jak již bylo zmiňováno, při počáteční kolonizaci CF plic je produkován velký počet virulentních faktorů důležitých pro vznik bakteriální infekce. Po vzniku infekce musí bakterie čelit zánětlivým

reakcím způsobeným hostitelskou imunitou včetně oxidačního stresu následovaného léčbou antibiotik^{32,33}. Tyto stresové faktory indukují expresi genů, které umožňují PA se přizpůsobit a vytvářet rezistentní a přetrvávající fenotypy vedoucí ke vzniku chronické infekce^{29,34}. PA se tak stávají méně virulentní, dochází ke ztrátě flagel a pilů, k nadprodukcí alginátu (viz obr. 3), zvýšení rezistence vůči antibiotikům a formaci biofilmu^{2,3,26,29}. Biofilm je velice strukturované a organizované společenství bakterií charakteristické pro chronické infekce PA, které je tvořeno z 50 – 90 % extracelulárními látkami. Mezi tyto látky se řadí polysacharidy, nukleové kyseliny, lipidy a bílkoviny. Biofilm odolává mechanickým silám a snižuje pronikání toxických látek pro bakterie. V tomto prostředí dochází ke zpomalení růstu bakterií, protože mají malé množství kyslíku a živin²⁹. Fenotyp spojený s nadprodukcí alginátu je nazýván jako mukoidní fenotyp a je spojován s horší prognózou infekce. Pokud dojde ke vzniku chronické infekce je úplné odstranění bakterií z organismu téměř nemožné^{2,3}.



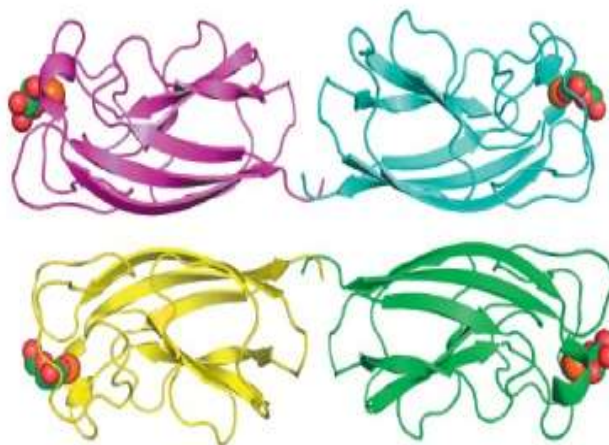
Obrázek 3: *Pseudomonas aeruginosa*. Gramovo barvení bakterie obklopené alginátem u pacientů s cystickou fibrosou. Převzato²⁵.

1.3 Lektiny PA-IL a PA-IIL

Jak již bylo uvedeno *Pseudomonas aeruginosa* produkuje virulentní faktory, mezi které patří také dva lektiny PA-IL a PA-IIL. Tyto lektiny jsou rozpustné proteiny účastníci se vazby patogenů na hostitelské buňky. U obou lektinů byla prokázána významná role při tvorbě biofilmu, již se pravděpodobně účastní díky své schopnosti multivalentně vázat polysacharidy^{13,35–37}. Lektiny jsou lokalizovány jak v buněčné cytoplazmě, tak ve vnější

membráně, díky čemuž jsou využívány bakterií k adhezi na epiteliální buňky hostitele³⁵. Syntéza obou lektinů je indukována při dosažení stacionární fáze růstu bakteriální kultury^{4,38}. Produkce lektinů se zvyšuje při kontaktu patogenu s molekulami, které produkuje hostitel pod vlivem stresových podmínek. Mezi takovéto molekuly patří například noradrenalin, interferon γ , adenosin²⁹. Lektiny se od sebe odlišují svou specifitou k sacharidovým strukturám glykokonjugátů buněk.

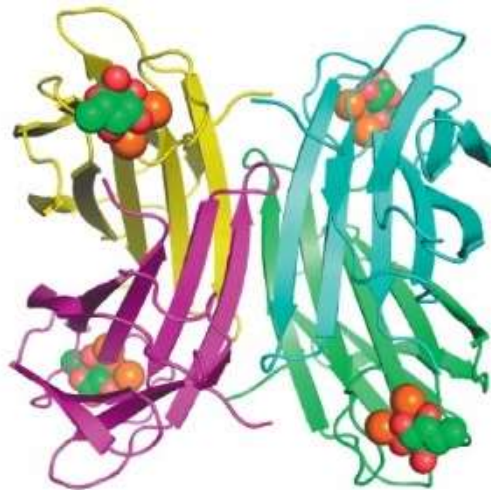
Lektin PA-IL je malý homotetramerní protein (12,8 kDa), u kterého má každý monomer jedno vazebné místo pro ligand. Díky jeho struktuře (viz obr. 4) napomáhá bakterii k vazbě na hostitelskou buňku, ale také k vzájemné interakci bakterií a následné tvorbě biofilmu. Dále má cytotoxický účinek na epiteliální buňky plic, což přispívá k poškozování epitelu během infekce^{13,35,36}. U tohoto lektinu jeden atom vápníku společně se sítí vodíkových vazeb vytváří vazebné místo specifické pro D - galaktosu, která je hlavním ligandem pro tento lektin³⁹. Váže se také k N - acetyl-D-galaktosaminu a dalším derivátům galaktosy^{28,29,40}.



Obrázek 4: Struktura lektinu PA-IL. Jednotlivé monomery jsou zobrazeny jako polypeptidové řetězce označené různými barvami. Ploché šipky označují β - listy (vlákna). Oranžové kuličky jsou vápenaté ionty. Navázaná galaktosa je zobrazena jako uhlíkové (zelené) a kyslíkové (červené) kuličky. Převzato a upraveno⁴¹.

Lektin PA-IIL je také homotetramerní protein (viz obr. 5, str. 18) o velikosti podjednotek 11,7 kDa⁴². Má neobvykle vysokou afinitu k L-fukose, ale váže se také na L-galaktosu, D-arabinosu a D-mannosu. Neobvyklý způsob vazby je zprostředkovaný dvěma ionty vápníku přítomnými na každé podjednotce zodpovídající za vysokou afinitu k L-fukose, která je mnohem vyšší, než je typické pro jiné interakce protein - sacharid.

Lektin je exprimován společně s dalšími faktory virulence a molekulami účastnícími se tvorby biofilmu. Úloha lektinu PA-III_L může být ve vazbě na glykanové struktury na povrchu buněk, ale také se může zapojovat do sekrece a fungování adhesinů. Jeho úloha je pravděpodobně také spojena s agregací bakteriálních buněk a tvorbou mikroklonů. Také je potřebný pro zajištění normální tvorby pilů a sekrece některých bílkovin⁴¹. Tento lektin není přímo cytotoxický jako lektin PA-III_L, ale inhibuje pohyb řasinek a tím poškozuje obranný mechanismus plic⁴³.



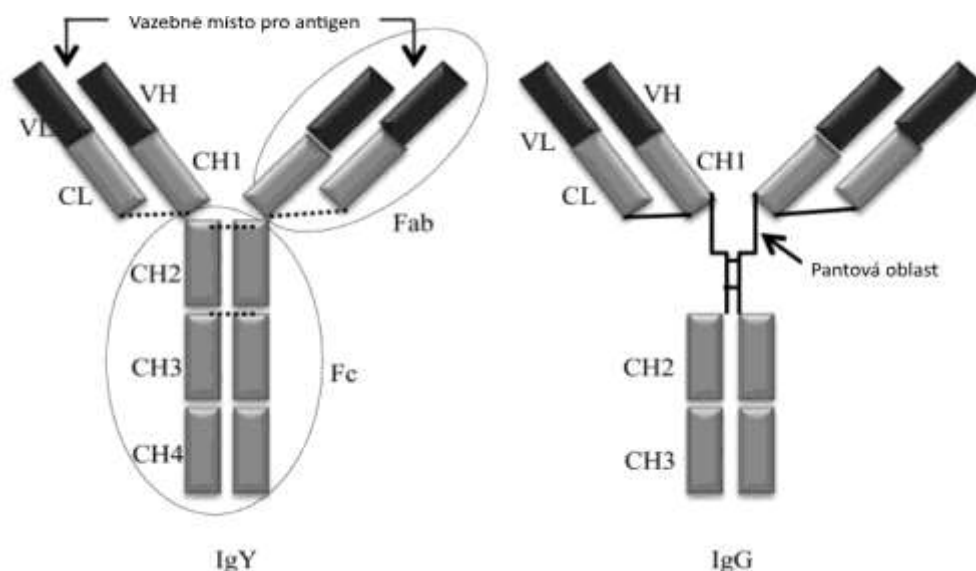
Obrázek 5: Struktura lektinu PA-III_L. Jednotlivé monomery jsou zobrazeny jako polypeptidové řetězce označené různými barvami. Ploché šipky označují β – listy (vlákna). Oranžové kuličky jsou vápenaté ionty. Navázaná fukosa je zobrazena jako uhlíkové (zelené) a kyslíkové (červené) kuličky. Převzato a upraveno⁴¹.

1.4 Slepičí protilátky

Pasivní imunizace IgY nabízí alternativní přístup k léčbě infekcí, při kterém nedochází ke vzniku vedlejších účinků. V posledních letech je snaha nahradit léčbu antibiotiky jinými alternativními přístupy, protože bakterie získávají vůči nim rezistenci a antibiotika přestávají být účinná. Jedním z těchto přístupů může být právě pasivní imunizace slepičími protilátkami⁴⁴.

Slepičí protilátky (IgY) mají dva těžké a dva lehké řetězce propojené disulfidickými vazbami. Těžký řetězec má jednu variabilní a 4 konstantní domény, zatímco

lehký řetězec se skládá z jedné variabilní domény a jedné konstantní domény (viz obr. 6)⁴⁵. IgY jsou velmi podobné savčím protilátkám IgG. IgY mají vyšší molekulovou hmotnost než IgG. Je to z toho důvodu, že IgY mají těžký řetězec o jednu konstantní doménu větší a vyšší míru glykosylace⁴⁶. Těžký řetězec IgY má hmotnost 67-70 kDa, zatímco molekulová hmotnost těžkého řetězce savčího IgG je přibližně 50 kDa. Obě protilátky obsahují N - vázané oligosacharidy, ale IgY obsahují vysoce manosové typy oligosacharidů na rozdíl od IgG⁴⁷. Pantová oblast u IgY chybí, proto je flexibilita ramen nižší než v případě IgG^{45,48}. Snížená flexibilita může způsobit rozdíly mezi IgY a IgG v rozpoznání antigenního epitopu⁴⁸. Imunoglobuliny Y a G se liší v dalších funkčních charakteristikách. První z nich je neschopnost IgY vázat proteiny A nebo G a revmatoidní faktor⁴⁶. Nezpůsobují žádné zánětlivé reakce díky tomu, že neaktivují savčí komplement⁴⁹. Na rozdíl od používaných antibiotik jsou slepičí protilátky šetrné k životnímu prostředí a nevyvolávají žádné nežádoucí vedlejší účinky⁵⁰. Mezi savci a ptáky existuje fylogenetická vzdálenost, která umožňuje produkovat protilátky proti vysoce konzervovaným savčím proteinům, které by jinak nebyly u savců možné⁵¹. Vzhledem k těmto rozdílům jsou slepičí protilátky využívány v řadě aplikací v lékařských oblastech, jako je například xenotransplantace a pasivní imunizace⁵⁰.



Obrázek 6: Struktura slepičí (IgY) a savčí (IgG) protilátky. Obě molekuly mají dva těžké a dva lehké řetězce. Lehký řetězec obsahuje jednu variabilní (V_L) a jednu konstantní (C_L) doménu. Těžký řetězec u IgY se skládá z jedné variabilní (V_H) a čtyř konstantních (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} a C_{H4}) domén. IgG má o jednu konstantní doménu méně. Převezato a upraveno⁵².

Izolace těchto protilátek je neinvazivní a ekonomicky výhodná. Náklady na chov nosnic jsou nižší než u savců, jako jsou například králíci. Měsíčně lze získat přibližně 200 mg savčích IgG z králíka z čehož je 5 % specifických protilátek, u slepic může být získáno přibližně 1500 mg IgY každý měsíc s obsahem specifických protilátek 2-10 %⁵³. V porovnání s produkcí IgG z krve savců mají IgY několik výhod. Nedochozí k žádnému invazivnímu zásahu, je nutný pouze sběr vajec. Izolace je velmi rychlá a jednoduchá. Pro imunizaci slepice je vyžadováno velmi malé množství antigenu pro získání vysokých a dlouhodobých IgY titrů ve vaječném žloutku⁵⁴.

1.4.1 Pasivní imunizace

Pacienti s chronickou infekcí způsobenou PA jsou léčeni vysokými dávkami antibiotik. Problémem této léčby je vznik bakteriální rezistence. Léčba antibiotiky navíc může způsobovat problémy souvisejícími se vznikem dalších bakteriálních infekcí, plísní a houbových infekčních onemocnění (*Aspergillus fumigatus*), ale i alergických a toxických reakcí. Z toho důvodu jsou hledány nové terapeutické prostředky proti PA. Právě pasivní imunizace slepičími protilátkami proti PA má dobrý potenciál být vhodným doplňkem k prevenci před bakteriální infekcí vedle profylaxe antibiotiky^{44,55,56}. IgY se váží na PA a zabraňují tak adhezi na epiteliální buňky *in vivo*⁵⁶, mají navíc pozitivní účinek na inhibici bakteriálních enzymů a neutralizaci toxinů⁵⁷. Nehrozí riziko, že by docházelo ke vzniku rezistence na IgY. Při orálním podání nedochází ke vzniku žádných toxických účinků ani zánětlivých reakcí⁵⁸. Při pasivní imunizaci dochází k rychlému a lokálnímu nástupu účinku, vysoce specifické aktivitě a metoda je použitelná pro široké věkové rozmezí od novorozenců až po dospělé⁵². Profylaxe a léčba kombinací IgY a antibiotik by mohla přinést mnoho výhod. Mohlo by dojít ke snížení nebo zabránění kolonizaci PA a zabránit tak vzniku chronické infekce. Snížení množství infekcí by vedlo k menšímu používání antibiotik, snížení vzniku rezistence a dalších nežádoucích účinků antibiotik⁵⁵. Orální podání slepičích protilátek nabízí možnost pasivní imunizace, u které bylo prokázáno, že IgY by mohly být použity jako možná profylaktická léčba pacientů s CF. Bylo zjištěno, že při terapii pomocí IgY nedochází k vyvinutí chronické infekce⁵⁹.

1.5 Studium CF na myších modelech

Zvířecí modely jsou velmi důležité pro pochopení mechanismů asociovaných s daným onemocněním a při vývoji nových léčebných postupů. Experimenty prováděné na myších modelech byly zásadním průlomem při studiu mechanismů onemocnění CF^{60,61}. Tyto modely jsou využívány a zkoumány od devadesátých let 20. století. Postupem času se vyvíjely i další zvířecí modely, například prasete nebo fretky⁶². Při výběru zvířecích modelů pro onemocnění se hledí na jednotlivé důležité parametry včetně typů buněk v dýchacích cestách ve srovnání s lidmi, distribuci submukózních žláz, o nichž se předpokládá, že hrají důležitou roli při onemocnění dýchacích cest, zachování funkce a struktury CFTR, složení alternativních chloridových kanálů v dýchacích cestách a v neposlední řadě i reprodukčních parametrů druhu, který umožňuje rychle provádět výzkumné studie⁶².

Pro studium onemocnění cystická fibrosa jsou myší modely využívány především proto, že poskytují řadu výhod v porovnání s ostatními zvířecími modely. Mezi tyto výhody patří zejména nízká cena, rychlá reprodukce, nízké náklady na chov a snadná genetická manipulace. Lze využívat jak transgenních myší, tak i „knockout“ myší, přičemž existuje minimálně 14 takovýchto modelů. Během studia je nutné brát v úvahu jejich anatomické, ale také imunologické rozdíly v porovnání s člověkem^{62,63}. Přes všechny jejich výhody, které je řadí mezi nejvyužívanější zvířecí model u onemocnění CF, lze nalézt i několik nevýhod. Jednou z nich je jejich krátká životnost, což brání adekvátně pozorovat vývoj onemocnění. U myších modelů je problémem vyvolat spontánní zánětlivé nebo chronické onemocnění plic, které je typické pro nemocné CF^{61,62}. Důvodem jsou rozdíly mezi myší a člověkem s defektním proteinem CFTR. Podstata spočívá v rozdílné biologii buněk dýchacích cest, neboť u myší jsou přítomné jiné typy sekrečních buněk než u lidí. Dalším rozdílem je distribuce submukózních žláz a přítomnost alternativního chloridového kanálu regulovaného Ca^{2+} , který se u lidí nevyskytuje. Tento kanál dokonce v plicích myší převažuje nad CFTR kanálem, a tak kompenzuje následky dysfunkčního kanálu CFTR^{60,63}.

Prvními modely, které byly studovány, byly myši s mutovaným genem pro CFTR. Mutace genu byly prováděny pomocí homologní rekombinace v myších embryonálních buňkách. Takto bylo možné vytvořit myši se zbytkovou i s úplnou KO funkcí^{61,64}. Mezi modely s úplnou ztrátou funkce patří CFTRtm1Unc a CFTRtm1Cam⁶¹. U modelu

CFTRtm1Unc byla zjištěna nízká míra přežití, a proto nebylo možné sledovat průběh onemocnění. Tyto myši vykazovaly patologické změny v horních cestách dýchacích, ale bez známky zánětu a bakteriální infekce v plicích^{65,66}. U těchto myší ale může docházet ke kompenzaci nefunkčního CFTR kanálu pomocí alternativního Cl⁻ kanálu. Byl však vyvinut model, u kterého alternativní Cl⁻ kanál přítomen nebyl. Tento model je označován B6CFTRtm1Unc. Zde došlo k vyvolání spontánního plicního onemocnění zahrnujícího poruchy mukociliární clearance a tvorbu fibrotické tkáně⁶⁰. U modelů, u kterých dochází k produkci nízké hladiny CFTR mRNA i přes poruchu genu, nelze očekávat, že by tato mutace přesně replikovala stav u specifických klinických mutací, při kterých je produkován dysfunkční CFTR protein. Z toho důvodu byly vytvořeny nové rekombinantní modely CF se specifickým i klinicky relevantními mutacemi v CFTR⁶¹. Takovéto modely byly vytvořeny zavedením nejběžnějších lidských mutací $\Delta F508$, G551D a G480C do myšího lokusu pro gen *CFTR*⁶⁴. Myší modely s mutací v genu pro CFTR ale také selhaly ve vývoji spontánní a chronické infekce⁶⁷. Znakem většiny geneticky modifikovaných modelů jsou závažná střevní onemocnění. Obecně platí, že myši trpící vážnou střevní chorobou mají vysokou mortalitu a snížené přežití po anestezii. Z toho důvodu není možné takovéto modely používat pro studium adheze bakteriálních buněk na plicní epitel a vznik akutní infekce^{65,68}.

Pro studium infekce vyvolané *Pseudomonas aeruginosa* bylo vytvořeno několik modelů, ale žádný plně nenapodobil prostředí v plicích u pacientů s CF, protože je problematické vytvořit spontánní bakteriální infekci a sledovat její průběh. Model akutní pneumonie je vytvořen intratracheální aplikací bakteriální suspenze experimentálnímu zvířeti. U tohoto modelu dochází k akutní plicní infekci s rychlým odstraněním bakterií nebo k akutní sepsi a smrti zvířete^{63,67,69}. Díky tomuto modelu bylo prokázáno, že PA při bakteriální infekci exprimují řadu důležitých virulentních faktorů (lipopolysacharidy, adheziny, exoenzymy) stejných jako u pacientů s CF⁶⁹⁻⁷¹. Takovýto model není využitelný pro studium chronické infekce. Pro vytvoření chronické infekce trvající déle než měsíc musí být bakterie inokulovány s imobilizačním činidlem jako je agar nebo alginát z mořských řas. Uzavření bakterií do kuliček umožňuje zadržení bakterií a jejich ochranu před fyzickou a imunitní eliminací. To napodobuje bakteriální biofilm pozorovaný při bakteriální plicní infekci⁶⁷. Takový model je založen na intratracheální instilaci bakterií v agarových nebo alginátových kuličkách. U myší s takto aplikovanými bakteriemi byla prokázána nedostatečná mukociliární clearance⁶³. U tohoto modelu bylo částečně dosaženo klinických

příznaků jako u člověka, včetně zánětu dýchacích cest a výsledné patologie. Bylo možné studovat virulenci patogenu a zánětlivou odpověď při dlouhodobé infekci^{69,72}.

Klíčem k vytvoření modelu, který by umožňoval přechod akutní infekce způsobené PA k chronické infekci plic, byl model využívající agarové kuličky s klinickým mukoidním kmenem PA. Infikovaná zvířata vykazují velmi omezenou akutní morbiditu a mortalitu a lze u nich pozorovat úbytek váhy související s infekcí a neutrofilním zánětem, produkci anti-PA protilátek, endobronchiální infekci a mikrobiální adaptaci s variantami malých kolonií PA. Tento model by mohl umožnit výzkum hostitelských a mikrobiálních faktorů při přechodu na chronickou infekci. Nedostatek takovýchto modelů reprezentujících lidské plicní onemocnění způsobené infekcí PA u nemocných CF je výzvou pro další výzkum v této oblasti⁶⁷.

Pro imitaci poruchy Cl⁻ kanálu a nadměrné absorpci Na⁺ iontů ENaC kanálem v epitelálních buňkách je využíváno transgenního modelu se zvýšenou expresí sodíkového kanálu. Takový model umožňuje studium patofyziologie způsobené zvýšením absorpce Na⁺ iontů, což způsobuje v dýchacích cestách vyčerpání povrchové tekutiny v plicích a zhoustnutí hlenu jako u CF pacientů. Na tomto modelu byla zkoumána účinnost obnovení normálního toku Na⁺ a následné účinky na clearance a záněty v plicích^{60,73}.

Modely pro onemocnění CF využívající větších zvířat, např. prasat, napodobují především klinické příznaky onemocnění u novorozenech dětí. Například fretka domácí je potenciálně velice atraktivní druh pro model CF ze dvou hlavních důvodů. Plicní anatomie a biologie plicních buněk jsou velice podobné lidským a navíc se rychle rozmnožují. Fretky a lidé mají submukózní žlázy v celém chrupavčitém systému dýchacích cest, zatímco myši je mají pouze v proximální průdušnici^{74,75}. U neonatálních fretok s vyřazeným *CFTR* genem se vyvinulo mnoho patologií obdobných jako u člověka s CF, včetně mekonium ileus, onemocnění slinivky břišní a jater, vážného poškození příjmu potravy a predispozic k infekcím plic během raného období⁷⁶. Dále existují modely prasete s „knockout“ genu *CFTR* a model s mutací $\Delta F508$. Tyto modely jsou upřednostňovány z důvodu dlouhé životnosti prasat, která umožňuje sledovat vývoj onemocnění v čase a účinnost dlouhodobých léčiv⁷⁷.

Protože změny dýchacích cest typické pro pacienty s CF nebyly úspěšně vytvořeny u žádného myšího modelu, vyvíjíme nový *in vivo* model, který by byl vhodný pro mimiku

plicních podmínek u CF. Náš koncept myšího modelu je založen na skutečnosti, že je potvrzena snížená sialylace glykokonjugátů epitelálních buněk plic⁵. Myším je podán enzym neuraminidasa, který odštěpuje kyselinu sialovou, díky čemuž se v plicích experimentálního zvířete vytvoří prostředí podobné jako u nemocných s CF⁷⁸. Díky tomu jsme schopni studovat adhezi bakteriálních buněk PA a následný profylaktický účinek slepičích protilátek proti lektinu PA-III.

2 Cíl práce

Hlavním cílem této práce bylo pokusit se vyvinout myší model reprodukcí podmínky v plicích pacientů s cystickou fibrosou, který by umožňoval sledovat průběh infekce způsobené *Pseudomonas aeruginosa in vivo*:

- vypracovat techniku intratracheální instilace
- nalézt vhodný bioluminiscenční kmen PA
- ověřit produkci lektinu PA-IIL u bakteriálního kmene PA-lux
- proměřit růstovou křivku PA a nalézt úsek exponenciální fáze
- optimalizovat dávku bakterií pro vznik akutní bakteriální infekce u myší s přežitím přibližně 50 % jedinců

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie a materiál

BioRad (USA)

- Blotting-Grade Blocker – sušené odtučněné mléko
- Precision Plus Protein™ Dual Color Standards
- nitroceluloseová membrána 0,2 μm

Carl Roth (Německo)

- SDS ($\geq 99,5 \%$), krystalová violet'

Corning (USA)

- destičky černé CellBind® 96 jamek, sterilní mikrofiltry 0,22 μl

Fluka (Německo)

- 2-merkapt ethanol, Tween® 20, azid sodný

Gibco™ Invitrogen (UK)

- PBS tablety (1 do 500 ml dH₂O; pH 7,45)

Chirana (Slovensko)

- insulinová injekční stříkačka, injekční stříkačka

Lachner (Česká republika)

- aceton (99,9 %), dihydrogenfosforečnan draselný (99,8 %), D-glukosa (92 %), glycin (99,5 %), chlorid amonný (99 %), chlorid hořečnatý (99 %), chlorid sodný (99,5 %), hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (98,3 %), isopropanol (99,7 %), kyselina octová 99%, methanol (99,99 %), síran hořečnatý (99 %), jod (99,5 %),

Merck (Německo)

- lysozym

New England BioLabs (UK)

- neuraminidasa

NZYTech (Portugalsko)

- Tris base (> 99,9 %)

Oxoid (UK)

- agar, kvasnicový extrakt, masový extrakt, pepton, trypton,

Penta (Česká republika)

- fenol (99,5 %), chlorid vápenatý dihydrát (99,5 %), jodid draselný (99,5 %)

Promega Corporation (USA)

- BCIP, NBT

Roche (Švýcarsko)

- Complete ULTRA Tablets (EDTA-free)

Serva (Německo)

- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin)

Sigma – Aldrich (USA)

- protilátka Rabbit-Anti-chicken IgY – Alkaline Phosphatase, antibody produced in rabbit
- akrylamid, bromfenolová modř, Comossie Brilliant Blue R-250, peroxidisíran amonný, safranin, , Whatman filtrační papíry # 3

Terumo (Japonsko)

- intravenosní kanyly Surflo®

Ostatní:

- deionizovaná voda
- Mesocain gel 200 mg/ml (Zentiva)
- zvlhčující oční kapky Visine (McNeil)
- ketamin, xylazin (Bioveta, a. s.)
- isofluran (Baxter, ČR)

3.2 Použité přístroje

analytické váhy	Ohaus (USA)
aparatura pro elektroforesu	BioRad (USA)
aparatura Biometra Fastblot B43	Biometra (Německo)
centrifuga 5415R	Eppendorf (USA)
centrifuga Allegra X-30 R	Beckman (USA)
fotometr Spekol 11	Carl-Zeiss (Německo)
inkubátor Raven 2	LTE Scientific (UK)
inkubátor s funkcí třepání Multitron Pro	Infors MT (Švýcarsko)
inkubátor s funkcí třepání ES-60	Miulab (Čína)
laminární box BIO 126	Labox (ČR)
mikroskop 720 B	Levenhuk (USA)
optický tomograf	Caliper Life Sciences (USA)
s programem Living Image® (verze 4.2.0; PerkinElmer – pro optický tomograf Caliper IVIS® Lumina)	
pH metr HI 2211	Hanna instruments (USA)
předvážky EW 600	Kern (ČR)

rolovací třepačka MX-T6-S	Scilogex (USA)
spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 PRO s programem i-control 1.8	Tecan (Švýcarsko)
sonikátor	Bandelin (Německo)
světlovod	Schott (Německo)
termoblok LS-1	VLM (Německo)
topná deska	P-Lab a. s. (ČR)
třepačka SHO-2D	Witeg (Německo)

3.3 Pokusná zvířata

Anlab (ČR)

- myši – kmen ICR CD1, samci

3.4 Metody

3.4.1 Práce s *Pseudomonas aeruginosa*

Pro experimenty byl použit bioluminiscenční kmen bakterií PA-lux (daroval prof. B. Hancock, University of British Columbia, Canada). Dále byl studován také bioluminiscenční kmen PA-XEN 41 (Caliper Sciences, USA). Tyto kmeny byly vybrány a používány pro jejich schopnost bioluminiscence. Bakterie byly uchovávány v hluboko mrazícím boxu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v kryoprezervačním médiu. Veškerá práce s nimi byla prováděna asepticky v laminárním boxu.

3.4.1.1 Kultivace bakterií

Použité kultivační médium:

- PS médium (speciální pro kultivaci PA): 1,6% (w/v) pepton; 1% (w/v) enzymatický kaseinový hydrolyzát; 0,5% (v/v) glycerol; 57 mM K_2SO_4 ; 15 mM MgCl_2 (připraveno Ing. H. Bartoňovou, UŽFG, AV ČR)
- M9 (minimální) médium: 16,8 mM Na_2HPO_4 ; 22 mM KH_2PO_4 ; 5 mM NaCl; 49 mM NH_4Cl ; (sterilizováno v autoklávu 20 minut při $121\text{ }^{\circ}\text{C}$); 2 mM MgSO_4 ; 0,1 mM CaCl_2 ; 0,2% (w/v) glukosa
- LB (Luria-Bertani) médium: 1% (w/v) trypton; 0,5% (w/v) kvasnicový extrakt; 1% (w/v) NaCl

Pro inokulaci PS média bylo využito připravené bakteriální kryokonzervy, která byla rozmrazena při laboratorní teplotě. Pro jednotlivé inokulace do 5 ml kapalného média bylo použito 10 μl rozmrazené bakteriální suspenze. Ke kultivaci bakterií bylo použito tří druhů kultivačních médií: PS médium, M9 médium a LB médium. Kultivace probíhala v 10 % objemu kultivační nádoby.

Kultivace bakterií probíhala aerobně v 50 ml plastové zkumavce s kónickým dnem při 37 °C za konstantního třepání v inkubátoru s funkcí třepání (ES-60) při rychlosti 120 otáček za minutu. V případě kultivace v Erlenmeyerově baňce byly bakterie inkubovány při 37 °C za konstantního třepání v inkubátoru s funkcí třepání (Infors MT Pro 2000) při rychlosti 150 otáček za minutu.

3.4.1.2 Zamrazení PA-Lux

Pro dlouhodobé uchování bakterií bylo využito metody kryoprezervace, kdy byly bakterie zamrazeny v kryoprezervačním médiu pomocí kapalného dusíku. Takto byla zamrazena bakteriální kultura kmene PA-lux opakovaně subkultivovaného (1) a bakteriální kultura získaná kultivací kmene PA-lux původně uchovávaného na šikmém agaru při 5 °C (2).

Postup:

Bakteriální kultura kultivovaná 14 hodin (viz 3.4.1.1) byla rozdělena do mikrozkušavek po 100 µl a bylo přidáno 100 µl kryoprezervačního média (40% (w/v) glycerol ve sterilním PBS) filtrovaného přes mikrobiální filtr (0,22 µm). Po promísání byly mikrozkušavky ihned zamrazeny v kapalném dusíku a uskladněny v hlubokomrazícím boxu při – 80 °C.

3.4.1.3 Fotometrické měření bakteriální kultury

K určení množství bakterií v roztoku bylo využito měření optické hustoty při vlnové délce 600 nm na fotometru Spekol 11.

Postup:

Z bakteriální kultury získané 14 hodinovou kultivací přes noc (viz 3.4.1.1) byly odebrány 2 ml do mikrozkušavky dle Eppendorfa, které byly centrifugovány 10 minut při 4 °C a otáčkách 12000 RPM. Centrifugace probíhala v centrifuze (Eppendorf 5415 R) s úhlovým rotorem 24 x 1,5 / 2,0 ml. Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována v 1,5 ml PBS.

Tento postup byl zopakován, aby byla bakteriální kultura dostatečně promyta. Pro určení množství bakterií bylo využíváno fotometrického měření optické denzity při vlnové délce 600 nm v kyvetě o optické dráze 1 cm. Jako srovnávací vzorek byl použit roztok PBS. Pro měření optické denzity byl vzorek 20 x naředěn. Množství $6 \cdot 10^8$ bakterií v 1 ml odpovídá $OD_{600} \cong 1$ ⁷⁹.

3.4.2 Proměření bioluminiscence bakteriálních kmenů

Bioluminiscence bakterií byla měřena u tří bakteriálních kmenů PA-lux 1, PA - XEN 41 a PA-lux 2. Bakterie pro měření bioluminiscence byly kultivovány v Erlenmeyerově baňce a v plastové zkumavce s kónickým dnem.

Postup:

Bakteriální kmeny byly kultivovány 14 hodin (viz 3.4.1.1), centrifugovány a dvakrát promyty v PBS (viz 3.4.1.3). Promyté bakteriální kultury byly zředěny na stejnou optickou denzitu při 600 nm, která se rovnala 1. Z takto zředěných promytých kultur byly desítkovou ředící řadou připraveny roztoky pro měření bioluminiscence.

Bioluminiscence byla měřena v černé 96 jamkové destičce. Do jednotlivých jamek bylo aplikováno 100 μ l bakteriální suspenze v triplicátech. Jako srovnávací vzorek byl použit roztok PBS. Měření probíhalo na přístroji Tecan Infinite M200 PRO v módu luminescence, čtení s víčkem, s třepáním 5 s a amplitudou 3 mm.

3.4.3 Určení homogenity bakteriálních kultur

Pro ověření čistoty bakteriálních kultur bylo využíváno metody křížového roztěru bakteriální kultury, měření bioluminiscence a mikroskopického pozorování. Čistota byla určována u tří bakteriálních kmenů PA-XEN 41, PA-lux 1 a PA-lux 2.

3.4.3.1 Metoda křížového roztěru bakteriálních kmenů

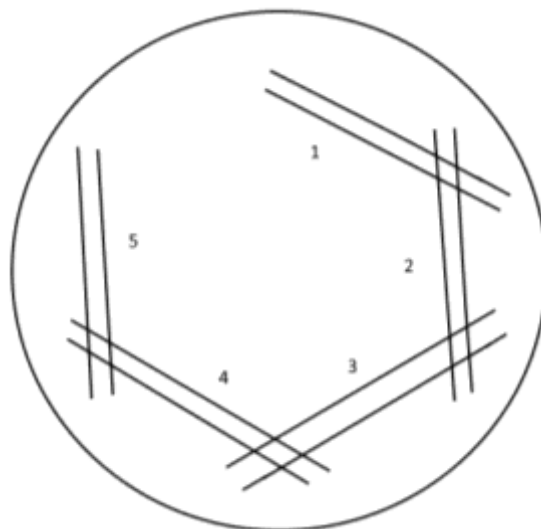
K určení čistoty bylo využito metody křížového roztěru bakterií na agarovou plotnu. Křížovým roztěrem bakterií dojde ke snižování koncentrace bakterií. Po inkubaci jsou pozorovatelné jednotlivé kolonie, díky čemuž lze makroskopicky i mikroskopicky určit, zda-li bylo přítomno v bakteriální suspenzi více druhů bakterií.

Použité roztoky:

- roztok pro nalití plotny - masopeptonový agar: 1% (w/v) masový extrakt; 1% (w/v) pepton; 0,5% (w/v) NaCl; 2% (w/v) agar

Postup:

Na křížový roztěr byly použity bakteriální suspenze ze zamrazené kryokonzervy. Bakteriální kultura po 14 hodinové kultivaci byla centrifugována 15 min při 5000 RCF při 4 °C (centrifuga Allegra X-30 R). Kryokonzervy rozmrazené při laboratorní teplotě byly centrifugovány 1 minutu při 4 °C a 12000 RPM (Eppendorf 5415 R, 24 x 1,5 / 2 ml). Supernatant byl odstraněn a pelety byly resuspendovány pomocí očkovací kličky ve 20 µl média a nanесeny na agarovou plotnu. Očkovací klička byla ponořena v ethanolu a poté byla opálena na lihovém kahanu a ochlazena o vrchní část Petriho misky s agarem. Nejdříve se očkuje část první, poté se klička opálí, ochladí a pokračuje se z již naočkované bakteriální kultury. Tento postup se v jednotlivých směrech opakuje až k části 5 (viz obr. 7). Takto očkované plotny byly inkubovány při 37 °C po dobu 22 hodin.



Obrázek 7: Schéma křížového roztěru na agaru v Petriho misce.

3.4.3.2 Měření bioluminiscence bakteriálních kolonií z plotny

Pro potvrzení čistoty kryoprezervované bakteriální kultury byla měřena relativní luminiscence bakteriálního kmene PA-lux 2 z agarové plotny kultivovaných v kapalném PS médiu.

Postup:

Ze tří jednotlivých bakteriálních kolonií narostlých na agarové plotně bylo zaočkováno 5 ml PS média v triplikátech. Takto zaočkované kultury byly inkubovány za používaných podmínek (viz 3.4.1.1).

Bakteriální kultura (14 hodinová kultivace) byla dvakrát promyta v PBS (viz 3.4.1.3). Všechny bakteriální suspenze byly naředěny na $OD_{600} = 1$. Takto připravené bakteriální suspenze byly aplikovány do černé 96 jamkové destičky po 100 μ l. Jako srovnávací vzorek byl použit roztok PBS. Bioluminiscence bakterií byla měřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro v módu luminiscence, čtení s víčkem, s třepáním 5 s a amplitudou 3 mm.

3.4.3.3 Mikroskopické pozorování PA-lux 2

Bakteriální kultura PA-lux 2 byla mikroskopicky hodnocena po barvení dle Grama.

Použité roztoky:

- krystalová violet: 1,1% (w/v) krystalová violet; 9,6% (v/v) ethanol; 4,5% (v/v) fenol
- Lugolův roztok: 1% (w/v) jodid draselný; 0,3% (w/v) jód
- safranin: 0,23% (w/v) safranin; 8,7 (v/v) ethanol

Postup:

Vzorek bakterií z agarové plotny s velmi malým množstvím vody byl rozetřen na krycím skličku a nechán zaschnout. Poté bylo skličko s nátěrem 3 x fixováno plamenem. Takto byla připravena dvě sklička pro barvení grampozitivních a gramnegativních bakterií.

Pro barvení grampozitivních bakterií byl nátěr zakápnut roztokem krystalové violeti na 20 sekund. Následně byl preparát převrstven Lugolovým roztokem a po 20 sekundách

opláchnut tekoucí vodou a ihned omyt acetonem. Na druhém sklíčku byl postup zopakován pro barvení gramnegativních bakterií, které pokračovalo roztokem safraninu působícím 60 sekund. Safranin byl omyt pod tekoucí vodou a preparát byl osušen.

Připravené preparáty byly převrstveny kapkou imerzního oleje a byly mikroskopovány imerzním objektivem. Zvětšení mikroskopu (Levenhuk 720B) bylo 2000 x.

3.4.4 Proměření růstové křivky

Proměření růstové křivky byla ověřována životaschopnost bakterií, důležitého parametru ovlivňujícího bakteriální infekci v plicích experimentálního zvířete. Vedle nárůstu počtu bakterií v čase byla měřena i jejich bioluminiscence.

Postup:

Kultivace bakterií PA-lux 1 a 2 probíhala v Erlenmeyerově baňce (500 ml) za stálého třepání při rychlosti 150 otáček za minutu v inkubátoru (Multitron Pro Infors MT) při 37 °C. Bylo inokulováno 100 µl ze zamrazené bakteriální kultury do 50 ml PS média.

Z bakteriální kultury byl každou hodinu odebírán vzorek pro změření optické denzity při vlnové délce 600 nm na fotometru Spekol 11. Jako srovnávací vzorek bylo použito PS médium.

Vedle optické denzity při vlnové délce 600 nm byla měřena i relativní luminiscence bakterií PA-lux 2. Pro měření luminiscence byl každý roztok zředěn na stejnou $OD_{600} = 0,15$. Měření probíhalo v černé 96 jamkové destičce, kdy do jamek bylo nanášeno 100 µl bakteriální suspenze v triplicátech. Jako srovnávací vzorek bylo použito PS médium. Měření probíhalo na přístroji Tecan Infinite M200 PRO v módu luminiscence, čtení s víčkem, s třepáním 5 s a amplitudou 3 mm.

3.4.5 Ověření produkce bakteriálního lektinu PA-IIL

U bakteriálního kmene PA-lux 1 byla ověřována produkce lektinu PA-IIL. K tomu bylo využito metod SDS elektroforezy a následné detekce proteinu PA-IIL pomocí protilátek metodou „Western blot“. Pro detekci lektinu PA-IIL byla použita primární slepičí protilátka izolovaná kolegyní Bc. Michaelou Vaškovou.

3.4.5.1 Příprava bakteriálního lyzátu

Pro účely identifikace bakteriálního lektinu PA-IIL u bakteriálního kmenu PA-lux 1 metodou SDS elektroforézy a „Western blotu“ bylo zapotřebí provést lyzi bakteriálních buněk a uvolnit proteiny do roztoku.

Použité roztoky:

- inhibitory proteas (Complete ULTRA) – 1 tableta v 50 ml dH₂O
- lysozym 1 mg/ml v roztoku inhibitoru proteas (Complete ULTRA)

Postup:

Bakterie byly kultivovány ve třech různých kultivačních médiích v LB, M9 a PS médiu v Erlenmeyerových baňkách 14 hodin (viz 3.4.1.1). Po kultivaci byla změřena optická denzita při vlnové délce 600 nm na fotometru Spekol 11. Bylo odebráno 5 ml narostlé bakteriální kultury do centrifugační zkumavky. Následně byla provedena centrifugace při 4 °C, 4696 RCF, 15 minut (centrifuga Allegra X-30 R). Množství bakterií $7,8 \cdot 10^9$ bylo resuspendováno v 1 ml roztoku lysozymu (1 mg/ml) rozpuštěném v roztoku inhibitoru proteas. Vzorek byl sonikován 8 x v 15 sekundových pulsech na ledu. Vzniklý lyzát byl použit jako vzorek pro elektroforezu a „Western blot“.

3.4.5.2 SDS elektroforesa v polyakrylamidovém gelu

SDS elektroforesa je elektroforetická metoda sloužící k rozdělení proteinů dle velikosti v polyakrylamidovém gelu. SDS dodá všem proteinům dle jejich velikosti záporný náboj a proteiny v gelu mohou putovat ke kladně nabitě elektrodě. Rychlost takto nabitých molekul závisí na jejich náboji, velikosti a tvaru. Největší proteiny putují gelem nejpomaleji, nejmenší putují nejrychleji. Díky tomu dochází k jejich rozdělení. Konkrétní molekulovou hmotnost lze určit pomocí srovnání s proteinovým standardem.

Použité roztoky a chemikálie:

- 3 x koncentrovaný redukující vzorkový pufr: 0,22 M Tris-HCl pH 6,8; 35% (v/v) glycerol; 8% (w/v) SDS; 0,004% bromfenolová modř; 15 % (v/v) β - merkaptoethanol
- 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
- 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
- polymerační roztok: 29% (w/v) akrylamid; 1% (w/v) bisakrylamid
- 10% (w/v) SDS
- 10% (w/v) APS
- TEMED
- elektrodový pufr: 50 mM Tris-base; 384 mM glycin; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,5
- barvicí lázeň: 9,2% (v/v) kyselina octová; 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R - 250 (CBB); 46% (v/v) ethanol
- odbarvovací lázeň: 10% (v/v) kyselina octová; 25% (v/v) ethanol
- směs standardů molekulových hmotností - Precision Plus Protein Dual Color Standards

Postup:

Příprava vzorků pro elektroforesu:

Pro elektroforézu byly vzorky smíchány s 3x koncentrovaným vzorkovým pufrem v poměru 2 : 1 a následně 10 minut povařeny v termobloku LS-1. Jako standard byl použit rekombinantní lektin Δ G PA-III (0,1 mg/ml). Po povaření byly vzorky krátce centrifugovány kvůli vzniklému odparu.

Elektroforesa:

Byla sestavena elektroforetická aparatura (BioRad) pro gel velikosti 8,6 x 6,7 cm o síle 1 mm. Před přípravou gelů byla elektroforetická skla odmaštěna ethanolem a vložena do aparatury. Následně byl připraven roztok pro přípravu 15% separačního gelu o daném složení (viz tab. 1). Do roztoku gelu je přidáván roztok APS jako iniciátor, který se působením světla rozkládá na volné radikály zahajující polymerační reakci a TEMED jako stabilizátor těchto volných radikálů.

Připravený roztok pro separační gel byl po 5 ml aplikován mezi elektroforetická skla a převrstven 700 μ l isopropanolu, aby polymerace gelu probíhala za nepřístupu vzduchu a jeho hladina byla rovná. Polymerace gelu probíhala 45 minut. Po polymeraci byl isopropanol odstraněn a byl nalit připravený roztok pro 4% zaostřovací gel podle následujícího složení (viz tab. 1). Do něho byl zasunut „hřeben“ pro vytvoření 10 nebo 15 jamek. Polymerace zaostřovacího gelu probíhala 30 minut.

Tabulka 1: Složení gelů pro elektroforesu.

Typ gelu	Porozita	Složení roztoků
separační	15%	1,4 ml dH ₂ O 1,52 ml 1,5 M Tris – HCl, pH = 8 3 ml 30% akrylamidu 60 μ l 10% SDS 20 μ l 10% APS 2,4 μ l TEMED
zaostřovací	4%	1015 μ l dH ₂ O 417 μ l 0,5 M Tris-HCl, pH = 6,8 217 μ l 30% akrylamid 16,7 μ l 10% SDS 8,3 μ l 10% APS 1,7 μ l TEMED

Po polymeraci byly opatrně vytáhnuty hřebínky a jamky byly promyty destilovanou vodou. Do aparatury s gely byl vnesen elektrodový pufr. Do jamek bylo aplikováno 25 μ l standardu

lektinu ΔG PA-IIL, 5 μl směsi proteinových standardů, 21 μl vzorku do 15jamkového gelu a v případě 10jamkového gelu 30 μl vzorku. Po aplikaci vzorků byla aparatura s gely vložena do elektroforetické vany, která byla doplněna elektrodovým pufrem. Elektroforesa probíhala při konstantním napětí 150 V a maximálním proudu 240 mA po dobu 90 minut.

Po ukončení elektroforesy byl gel opatrně oddělen od skel a zaostřovací gel byl odstraněn od separačního gelu. Separační gel byl následně inkubován v transferovém pufru.

3.4.5.3 Metoda „Western blot“

„Western blot“ je označení pro elektromigrační metodu přenosu proteinů z gelu na membránu (nitrocelulosa nebo polyvinylidenfluorid). Přítomnost proteinu na membráně je detekována pomocí tzv. primární protilátky proti danému proteinu. Tato primární protilátka navázaná na protein je rozpoznávána sekundární protilátkou konjugovanou s enzymem (alkalická fosfatasa nebo křenová peroxidasa), který přeměňuje chromogenní rozpustný substrát na nerozpustný barevný produkt, díky čemuž je možné daný protein na membráně detekovat.

Použité roztoky:

- transferový pufr: 25 mM Tris-base; 192 mM glycin; 20% (v/v) methanol; pH 8,3
- TBS pufr: 20 mM Tris-base; 137 mM NaCl; pH upraveno HCl na 7,6
- TBS – T 0,1%: TBS pufr, 0,1% (v/v) Tween® 20
- vyvolávací pufr: 100 mM TRIS; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 10 mM NaN₃; pH upraveno HCl na 9
- vyvolávací roztok pro alkalickou fosfatasu: 1 ml vyvolávacího pufru; 6,6 μl NBT; 3,3 μl BCIP
- roztok primární protilátky:
 - 1 μg/ml afinitně purifikovaná slepičí protilátka R1A4a; 2% (w/v) odtučněné sušené mléko; 0,1% TBS – T
- roztok sekundární protilátky:
 - 0,01% „rabbit anti – chicken IgY“ – alkalická fosfatasa; 2% (w/v) odtučněné sušené mléko, 0,1% TBS-T

Postup:

Nitrocelulosová membrána byla před přenosem aktivována v transferovém pufru 2 minuty. Pro přenos proteinů byl na anodu vrstven tzv. sendvič skládající se ze tří přenosových papírů Whatman, membrány, gelu a dalších tří papírů Whatman. Vše bylo před skládáním na anodu namočeno v transferovém pufru. Při pokládání membrány bylo třeba zajistit, aby se nevytvořily žádné bubliny mezi gelem a membránou, proto byla membrána pomocí válečku urovnána. Po naskládání celého „sendviče“ byly válečkem odstraněny případné další vzduchové bubliny. Následně byla sestavena aparatura pro horizontální přenos (Biometra Fastblot B43). Elektropřenos probíhal 30 minut při nastavení elektrického proudu 170 mA a napětí 25 V pro dvě membrány.

Po ukončení přenosu byly membrána i gel ponořeny do destilované vody. Membrána byla poté vložena do 50 ml centrifugační zkumavky, ve které probíhaly všechny následující kroky za stálého míchání na rolovací míchačce (Scilogex). Nejprve byla membrána promyta 5 minut v 10 ml TBS pufru. Gel byl barven v barvicí lázni 45 minut. Po obarvení gelu byl gel třikrát promyt v odbarvovací lázni.

Před imunodetekcí pomocí primární a sekundární protilátky byla membrána blokována v 10 ml 5% odtučněného sušeného mléka (BioRad) rozpuštěného v pufru TBS-T. Blokace membrány probíhala jednu hodinu při pokojové teplotě. Po blokaci byla membrána třikrát promyta vždy v 10 ml pufru TBS-T po osmi minutách. Po promytí byl k membráně přidáno 10 ml roztoku primární protilátky. Primární slepičí protilátka po afinitní chromatografii byla použita v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Inkubace s primární protilátkou probíhala přes noc při 4 °C.

Druhý den po inkubaci s primární protilátkou byla membrána opět promyta, a to postupně pětkrát v 10 ml pufru TBS-T po 8 minutách a jednou v 10 ml pufru TBS. Následovala inkubace s konjugátem sekundární protilátky s alkalickou fosfatasou, která probíhala 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po tomto procesu byla membrána opět promyta stejným způsobem jako po inkubaci s primární protilátkou. Vizualizace proteinu byla provedena ve vyvolávacím roztoku pro alkalickou fosfatasu. Vyvolávací reakce byla zastavena přenesením membrány do destilované vody. Membrána byla nakonec osušena a oskenována.

3.4.6 Práce s experimentálními zvířaty

3.4.6.1 Intratracheální instilace

Intratracheální instilace je metoda, pomocí které je možné aplikovat kapalný vzorek přímo do plic experimentálního zvířete. Roztok je díky tomu distribuován po celém vnitřním povrchu plic. Experimentálním zvířatům byla aplikována bakteriální suspenze PA-lux pro navození bakteriální infekce.

Použitá experimentální zvířata:

- myši - samci, kmen ICR CD 1 – rozmezí 31 – 35 g

Použité roztoky:

- bakteriální suspenze PA-lux v PBS (viz 3.4.1.1)

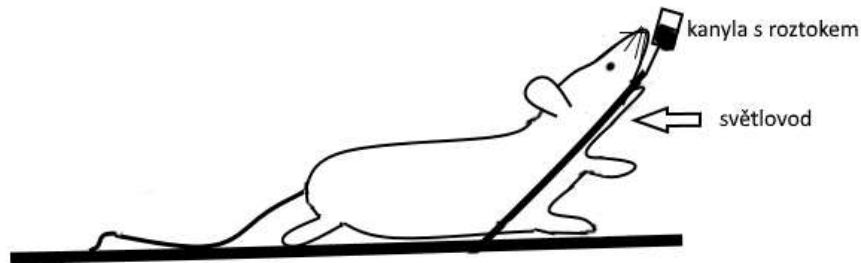
Použitá anestezie:

- směs komerčních anestetik – roztoky ketaminu a xylazinu v poměru 1 : 1
- mesocain – gelová forma lokálního anestetika (Zentiva)

Postup:

Myši bylo subkutánně podáno 50 μ l směsi anestetik ketaminu a xylazinu. Tato dávka byla vhodná pro uspání zvířete na přibližně 30 minut spánku, aby mohl být aplikován kapalný vzorek. Po uspání byla myš připravena na aplikační destičku s hrazdou, na kterou byla zachycena za přední zuby tak, aby přední nohy myši směřovaly dopředu a myš byla v záklonu (viz obr. 8, str. 42). Světlovod (Schott) se zdrojem studeného světla byl nastaven tak, aby byl dobře viditelný vstup do hrtanu. Jazyk byl přidržován na stranu pomocí navázaného provázku, aby byla zpřístupněna trachea. Kanyla byla před aplikací lehce potřena lokálním anestetikem a zasunuta do trachey. Následně do ní byl aplikován kapalný vzorek, který myš samovolně nadechla. Pro úplnou aplikaci a distribuci roztoku v plicích bylo následně aplikováno 200 μ l vzduchu plastovou stříkačkou. Poté byl myši navlhčen jazyk vatovou tyčinkou namočenou ve vodě a do očí byly nakapány oční kapky (Visine),

které zabraňují vysušení očí během anestezie. Do probuzení byla myš ponechána v krabici na topné desce (P-Lab a. s.) nastavené na přibližně 35 °C (stupeň 4).



Obrázek 8: Schéma intratracheální instilace.

Optimalizace dávky bakterií

Pro navození akutní infekce u 50 % jedinců bylo nutné optimalizovat dávku aplikovaných bakterií. Nejprve byly použity bakterie v dávkách $5 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^6$ a $5 \cdot 10^6$. Pro druhý optimalizační experiment bylo použito dávek $2 \cdot 10^6$, $3 \cdot 10^6$ a $4 \cdot 10^6$ bakterií.

Postup:

Bakterie PA-lux 2 byly kultivovány 6 hodin v 10 ml PS média v Erlenmeyerově baňce (100 ml) (viz 3.4.1.1). Promytá bakteriální kultura v PBS byla ředěna na potřebné množství bakterií ve 30 μ l ($5 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^6$ bakterií).

Experimentální zvířata byla rozdělena do tří skupin po osmi jedincích a byla provedena intratracheální instilace (viz 3.4.6.1) bakteriální suspenze PA-lux dle uvedeného schématu (viz tab. 2 a 3, str. 43). Aplikace bakteriální suspenze mezi jednotlivými skupinami byla po 30 minutách. U myši byl po aplikaci bakteriální suspenze sledován jejich zdravotní stav každých 6 hodin a během noci po 12 hodinách. Při druhém experimentu byla aplikace bakterií v jednotlivých skupinách provedena s rozestupem jedné hodiny.

Tabulka 2: Schéma 1. experimentu optimalizace dávky bakterií.

Skupina	Dávka bakterií ve 30 μ l
1	$5 \cdot 10^5$
2	$1 \cdot 10^6$
3	$5 \cdot 10^6$

Tabulka 3: Schéma 2. experimentu optimalizace dávky bakterií.

Skupina	Dávka bakterií ve 30 μ l
1	$2 \cdot 10^6$
2	$3 \cdot 10^6$
3	$4 \cdot 10^6$

3.4.6.2 Studium průběhu bakteriální infekce

V experimentu, kdy byl sledován průběh infekce způsobené bakteriálním kmenem PA-lux 1 v čase, bylo použito 25 samců myši. Myším byl jako premedikace aplikován roztok neuraminidasy, enzymu odštěpujícího kyselinu sialovou z glykokonjugátů epiteliálních buněk plic. Díky tomu jsou odhaleny cukerné struktury. V tomto experimentu byl studován vliv množství bakterií na průběh infekce.

Použité roztoky k aplikacím:

- roztok neuraminidasy 3333 U/ml v PBS
- bakteriální suspenze PA-lux v PBS (viz 3.4.1.1)

Použitá anestezie:

- směs komerčních anestetik – roztoky ketaminu a xylazinu v poměru 1 : 1
- isofluran - 1% a 2% mísený se vzduchem - inhalační podání

Postup:

Byl připraven zásobní roztok enzymu neuraminidasy o koncentraci 3333 U/ml. Promytá 14 hodinová bakteriální kultura (viz 3.4.1.1) byla ředěna na množství bakterií

$5,5 \cdot 10^5$ a $2,75 \cdot 10^6$ ve 30 μl pro myš. Jako premedikace bylo myši podáno 100 U enzymu neuraminidasy ve 30 μl PBS nebo pouze 30 μl roztoku PBS. S odstupem čtyř hodin bylo aplikováno 30 μl připravené bakteriální suspenze. Aplikace obou vzorků probíhala pomocí intratracheální instilace (viz 3.4.6.1). Při prvním podání anestezie bylo zvířeti aplikováno 50 μl směsi anestetik, před aplikací bakteriální suspenze musela být zvířata uspana dávkou 80 μl anestetik.

Celkem 24 experimentálních zvířat bylo rozděleno do čtyř skupin po šesti jedincích (viz tab. 4). Jeden jedinec byl použit jako kontrola, kdy bylo aplikováno pouze PBS.

Tabulka 4: Uspořádání myši do skupin.

Skupina	Počet myši	Aplikované roztoky
1	6	30 μl PBS + $5,5 \cdot 10^5$ bakterií
2	6	100 U NEU + $5,5 \cdot 10^5$ bakterií
3	6	30 μl PBS + $2,75 \cdot 10^6$ bakterií
4	6	100 U NEU + $2,75 \cdot 10^6$ bakterií

NEU – enzym neuraminidasa

3.4.6.3 Měření bioluminiscence *in vivo*

Pro sledování průběhu bakteriální infekce u myši bylo využito optického tomografu (IVIS® Lumina XR, Caliper; IKEM). U všech zvířat byl rozvoj bakteriální infekce monitorován 6, 12, 18 a 24 hodin po aplikaci bakteriální suspenze. Zvířata uspaná inhalačním anestetikem (2% isofluranem) byla vkládána do přístroje po trojicích. Uvnitř přístroje byl konstantní přívod 1% isofluranu.

Měření bioluminiscence probíhalo při expozici 120 s, rozlišení 4 (binning 4) a otevřené cloně (f/1). Analýza snímků byla provedena v programu Living Image® (verze 4.2.0; PerkinElmer). Získané hodnoty byly dále zpracovávány v programu MS Excel 2016.

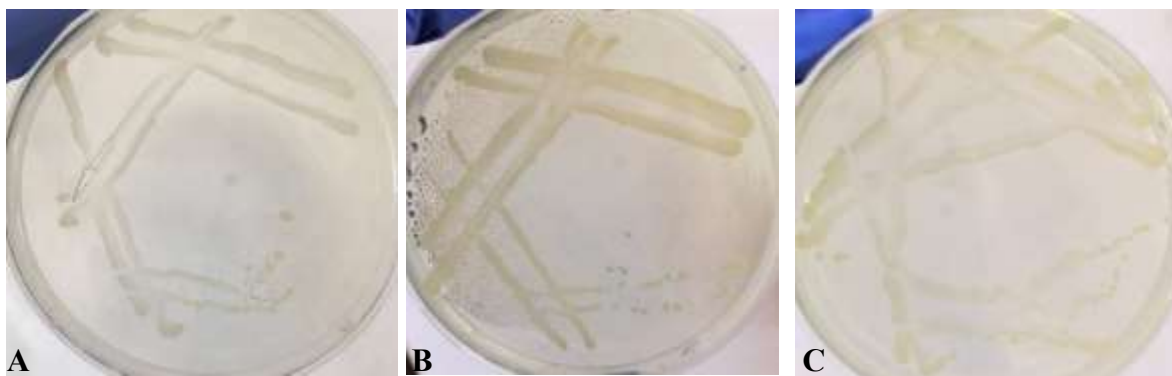
4 Výsledky

4.1 Ověření čistoty bakteriálních kmenů

Pro ověření čistoty kryoprezervovaných bakteriálních suspenzí bylo využito metody křížového roztěru. Při tomto experimentu byly použity vzorky tří bakteriálních kmenů PA-XEN 41, PA-lux 1 a PA-lux 2.

4.1.1 Metoda křížového roztěru bakteriálních kmenů

Pro ověření kontaminace byla provedena metoda křížového roztěru kryoprezervovaných bakteriálních kultur. Vzorky bakteriálních kultur byly rozmrazeny a nanесeny na agarové plotny. Kultivace probíhala 22 hodin při 37 °C. Narostlé bakteriální kolonie jsou zobrazeny na obrázku č. 9.



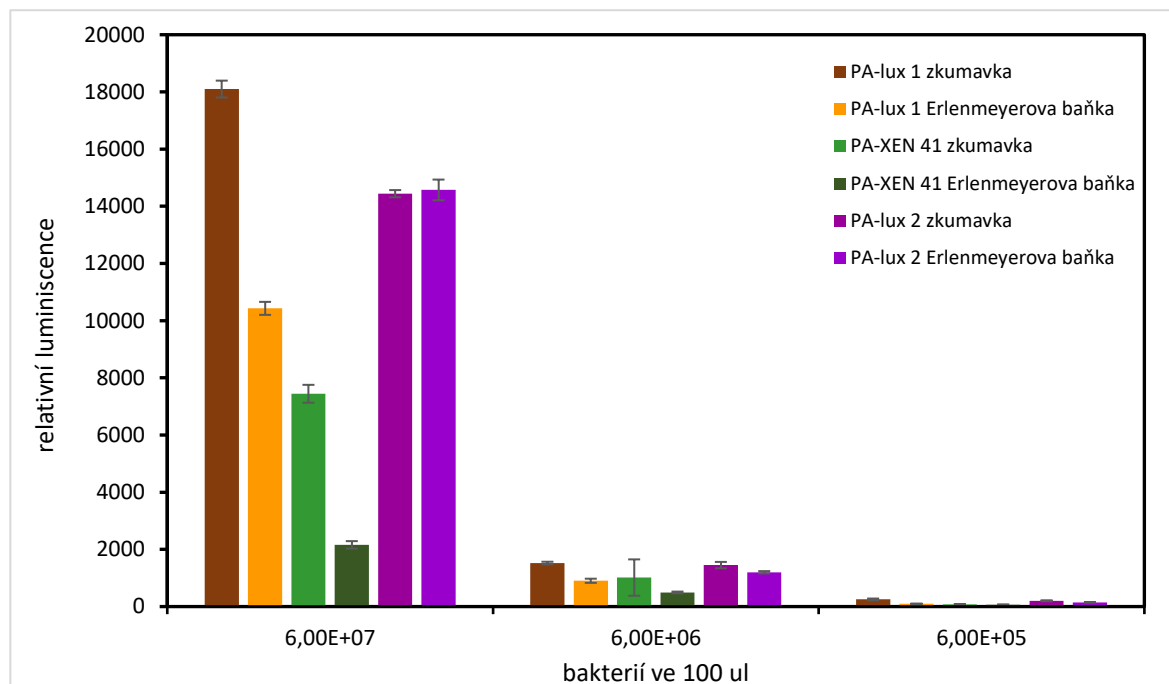
Obrázek 9: Metoda křížového roztěru. (A) Pa-lux 1, (B) PA-lux 2, (C) PA-XEN 41. Inkubace 22 hodin při 37 °C.

4.2 Měření bioluminiscence kmenů PA

Bylo nutné ověřit, zda-li opakovanou kultivací a uskladněním v hlubokomrazícím boxu nedochází ke ztrátě schopnosti bioluminiscence. Bioluminiscence byla sledována u tří

bakteriálních kmenů PA-lux 1, PA-lux 2 a PA-XEN 41. Zároveň bylo zjišťováno, zda kmen PA-XEN 41 má 10 x nižší schopnost bioluminiscence než PA-lux⁸⁰.

Byla porovnávána schopnost bioluminiscence tří vzorků bakterií kultivovaných 14 hodin ve zkumavce s kónickým dnem a v Erlenmeyerově baňce. Bakteriální kultury byly zředěny na množství bakterií $6 \cdot 10^7$ - $6 \cdot 10^5$ ve 100 μ l vzorku. Měření probíhalo na přístroji Tecan Infinite M200 Pro v černé 96 jamkové destičce. Získané hodnoty relativní luminiscence jsou znázorněny na obrázku č. 10.



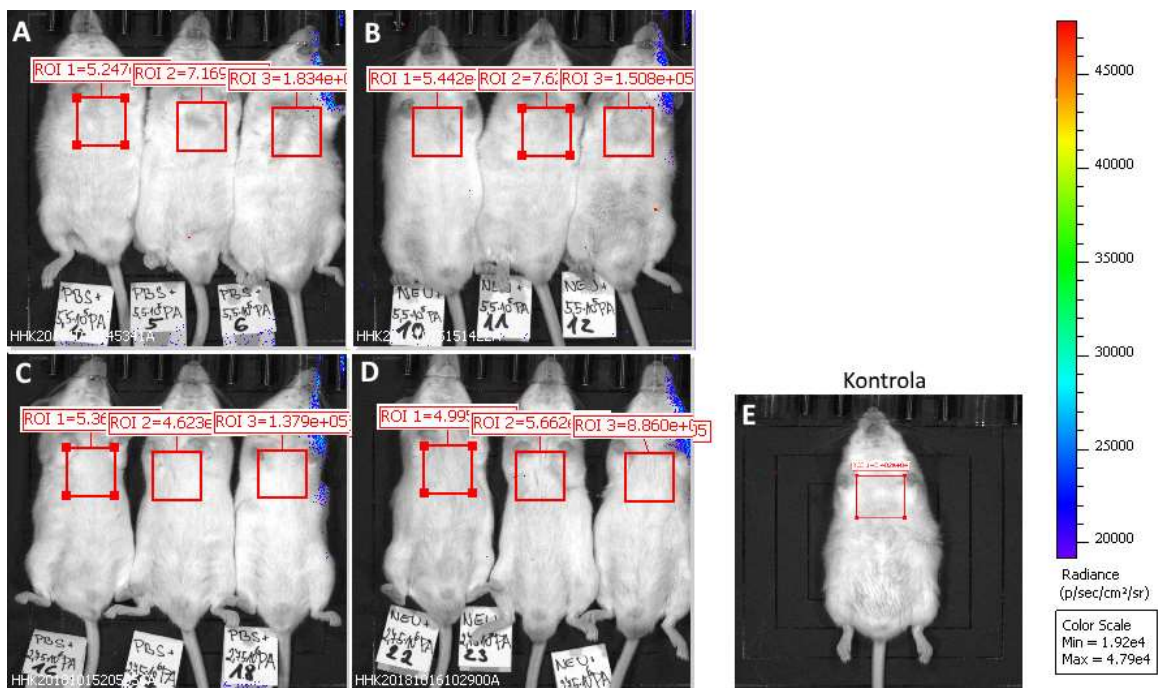
Obrázek 10: Srovnání bioluminiscence bakteriálních kmenů. Ze zásobní bakteriální suspenze o optické densitě při vlnové délce 600 nm rovné 1 byly připraveny suspenze o množství bakterií $6 \cdot 10^7$, $6 \cdot 10^6$ a $6 \cdot 10^5$ ve 100 μ l. Měření probíhalo na Tecan Infinite M200 Pro v 96 jamkové černé destičce o objemu vzorků 100 μ l. Použity hodnoty po odečtení srovnávacího vzorku, které byly průměrem tří hodnot. Jako srovnávací vzorek použit roztok PBS s hodnotou relativní luminiscence 20. Nastavení podmínek měření: mód luminiscence, třepání 5 s, amplituda 3 mm, čtení s víčkem.

4.3 Průběh infekce

Vývoj infekce byl pozorován v čase u myši jak ošetřených enzymem neuraminidasou tak u myši ošetřených pouze PBS. 25 myši bylo rozděleno do čtyř skupin po šesti jedincích a jedna myš byla použita jako kontrola (viz 3.4.6.2). Bakterie PA-lux 1 byly kultivovány 14 hodin v PS médiu ve zkumavce s kónickým dnem. Byly aplikovány dávky bakterií

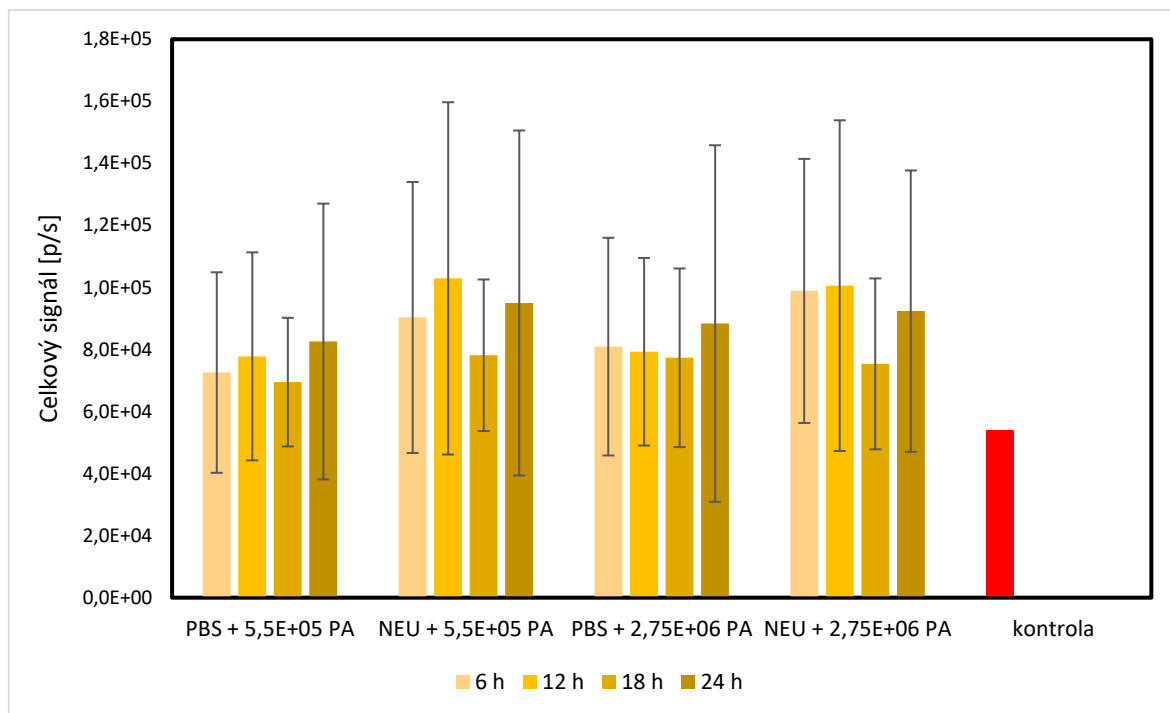
v množství $5,5 \cdot 10^5$ a $2,75 \cdot 10^6$ ve 30 μl . Bioluminescence byla sledována detekcí počtu fotonů ($(\text{p}) \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) pomocí optického tomografu IVIS® Lumina XR (IKEM).

Na obrázku č. 11 jsou znázorněny skeny myší, kde jsou zobrazeny tři reprezentativní myši z každé skupiny 6 hodin po intratracheální instilaci bakterií, v dalších časech měření (12, 18 a 24 hodin) byl stav totožný (neuveďeno). Pro srovnání je zobrazena kontrolní myš, které byl aplikován pouze roztok PBS.



Obrázek 11: Monitorování infekce u experimentálních zvířat. Stav po šesti hodinách od aplikace bakteriální suspenze PA-lux 1. A) PBS + $5,5 \cdot 10^5$ bakterií, B) 100 U neuraminidasy + $5,5 \cdot 10^5$ bakterií, C) PBS + $2,75 \cdot 10^6$ bakterií, D) 100 U neuraminidasy + $2,75 \cdot 10^6$ bakterií, E) kontrola - opakovaně pouze PBS. Použitý přístroj na měření IVIS® Lumina XR, Caliper. Expozice 120 s, rozlišení 4 (binning 4), otevřená clona (f/1). ROI (oblast zájmu) stejné velikosti u všech experimentálních zvířat.

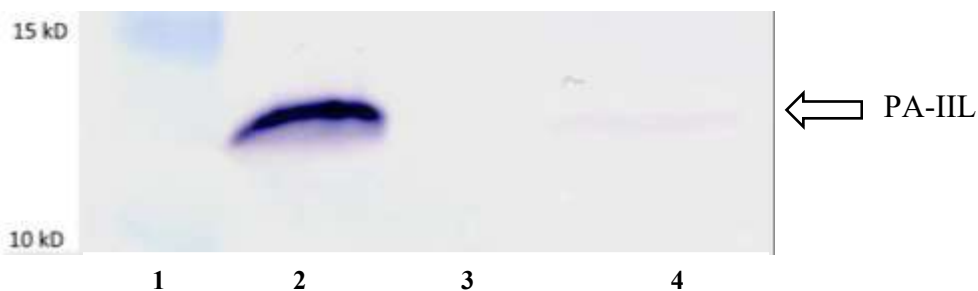
Porovnání hodnot celkového signálu luminiscence (p/s) v čase u myší lze pozorovat na obrázku č. 12.



Obrázek 12: Porovnání celkové luminiscence v čase u jednotlivých skupin myší. Měřeno v šesti hodinových časových intervalech od aplikace bakteriální suspenze. Sloupce znázorňují průměrné hodnoty celkové luminiscence 6 myší v jednotlivých skupinách. Měření probíhalo na optickém tomografu IVIS® Lumina XR (IKEM). Podmínky měření: expozice 120 s, rozlišení 4 (binning 4), otevřená clona (f/1).

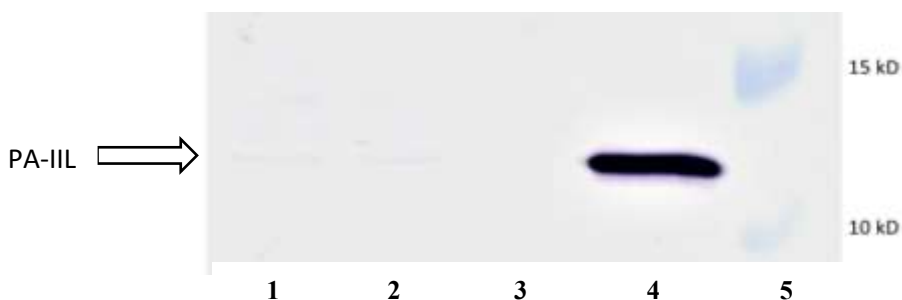
4.4 Produkce bakteriálního lektinu PA-IIL

Byla sledována produkce PA-IIL metodou „Western blot“ při kultivaci trvající 14 hodin v PS médiu v plastové zkumavce s kónickým dnem a v Erlenmeyerově baňce. Lyze bakteriálních buněk byla provedena pomocí roztoku lysozymu (1 mg/ml) a sonikace. Lektin PA-IIL byl detekován primární slepičí protilátkou získanou afinitní chromatografií proti lektinu PA-IIL. Membrána po imunodetekci je znázorněna na obrázku č. 13 (str. 49).



Obrázek 13: Detekce lektinu PA-IIL metodou „Western blot“ u bakterií PA-lux 1. Jako standard použit ΔG PA-IIL. 1) marker molekulových hmotností, 2) standard, 3) lyzát PA-lux 1 získaný kultivací v plastové zkumavce 14 hodin, 4) lyzát PA-lux 1 získaný kultivací v Erlenmayerově baňce 14 hodin. Imunodetekce za použití slepičí primární protilátky proti lektinu PA-IIL získané afinitní chromatografií (1 $\mu\text{g/ml}$).

Zároveň byl sledován vliv různých kultivačních médií LB, M9 a PS média na produkci lektinu PA-IIL. Na obrázku č. 14 je znázorněna membrána po imunodetekci s detekovaným lektinem PA-IIL.

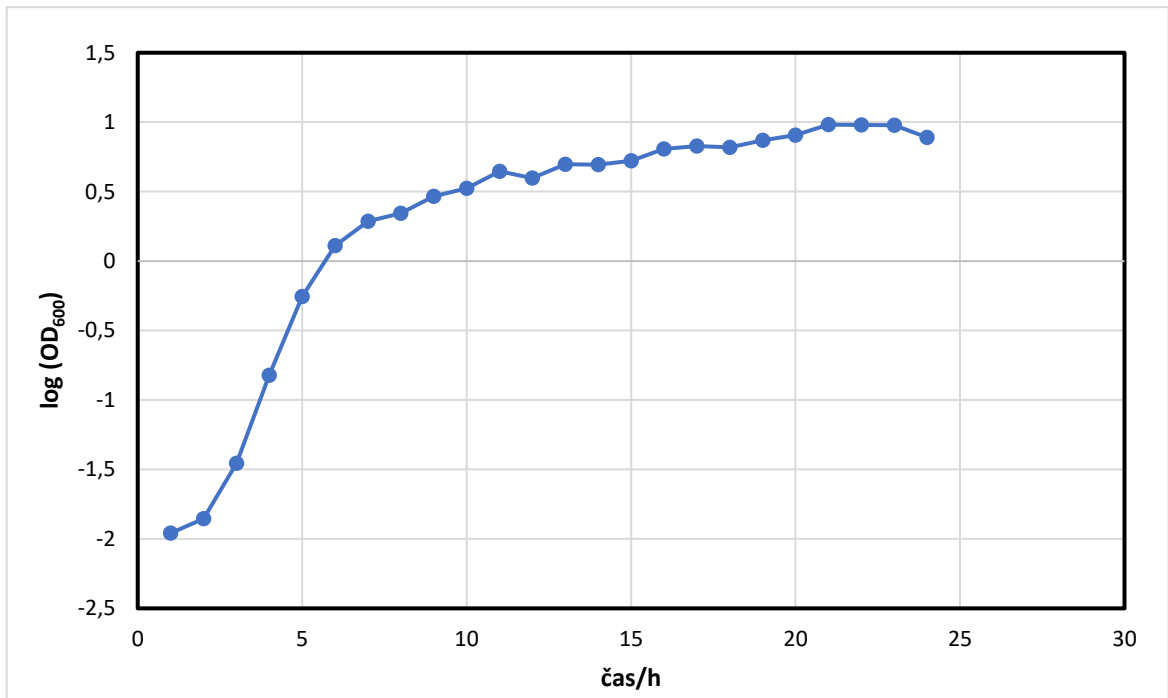


Obrázek 14: Detekce lektinu PA-IIL metodou „Western blot“ u bakterií PA-lux 1. Kultivace probíhala 14 hodin v Erlenmayerově baňce. Jako standard použit ΔG PA-IIL. 1) kultivace v LB médiu, 2) kultivace v PS médiu, 3) kultivace v M9 médiu, 4) standard, 5) marker molekulových hmotností. Imunodetekce za použití slepičí primární protilátky proti lektinu PA-IIL získané afinitní chromatografií (1 $\mu\text{g/ml}$).

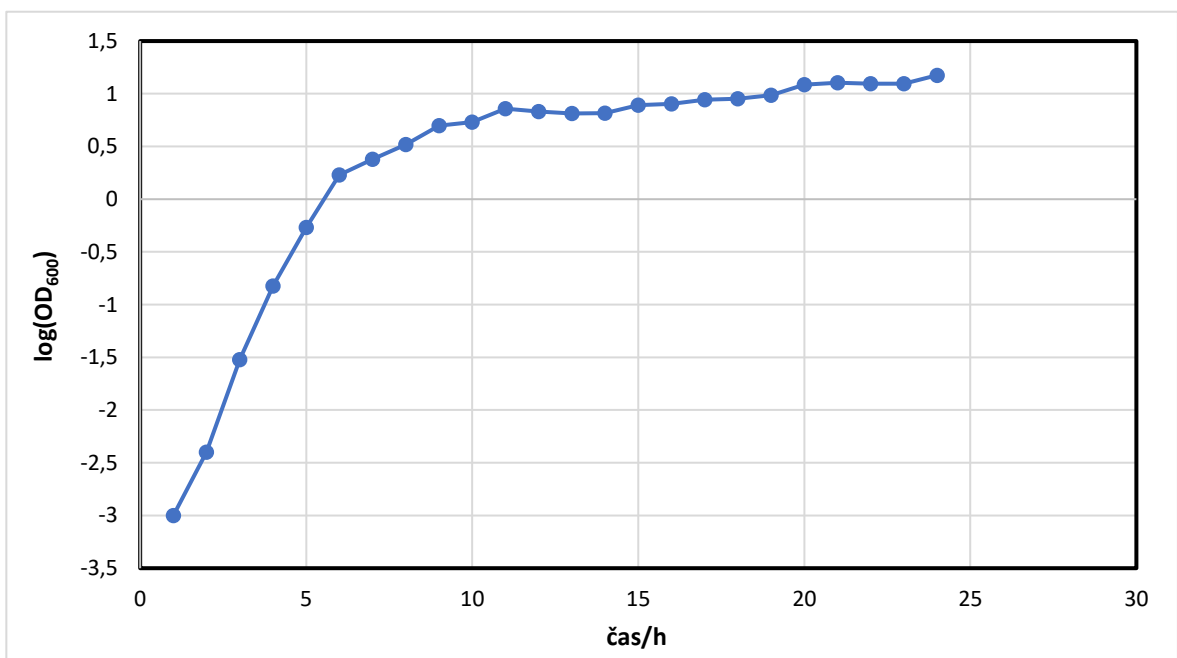
4.5 Růstová křivka PA-lux

Pro práci s experimentálními zvířaty je důležité pracovat s bakteriemi, které jsou dostatečně životaschopné k navození akutní bakteriální infekce v plicích myši. Proto byla proměřena růstová křivka pro bioluminiscenční kmen PA-lux 1 a 2. Bakterie byly kultivovány v PS médiu v Erlenmayerově baňce. Měření optické denzity při vlnové délce

600 nm na fotometru Spekol 11 probíhalo po dobu 24 hodin. Růstové křivky jsou zobrazeny na obrázku č. 15 a č. 16 .



Obrázek 15: Růstová křivka PA-lux 1. Kultivace v PS médiu v Erlenmeyerově baňce. Optická denzita při vlnové délce 600 nm byla měřena na přístroji Spekol 11 každou hodinu po dobu 24 hodin. Jako srovnávací vzorek bylo použito PS médium.



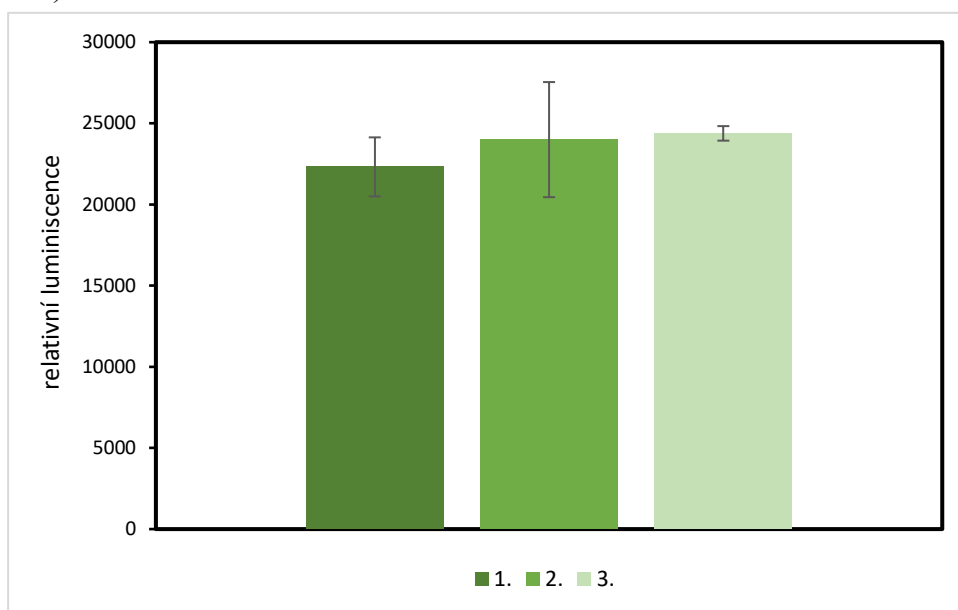
Obrázek 16: Růstová křivka PA-lux 2. Kultivace v PS médiu v Erlenmeyerově baňce. Optická denzita při vlnové délce 600 nm byla měřena na přístroji Spekol 11 každou hodinu po dobu 24 hodin. Jako srovnávací vzorek bylo použito PS médium.

4.6 Ověření čistoty bakteriálního kmene PA-lux 2

Pro ověření čistoty kryoprezervované bakteriální kultury PA-lux 2 bylo využito metod měření bioluminiscence separovaných kolonií z agarové plotny a mikroskopického pozorování.

4.6.1 Kultivace separovaných kolonií PA-lux 2

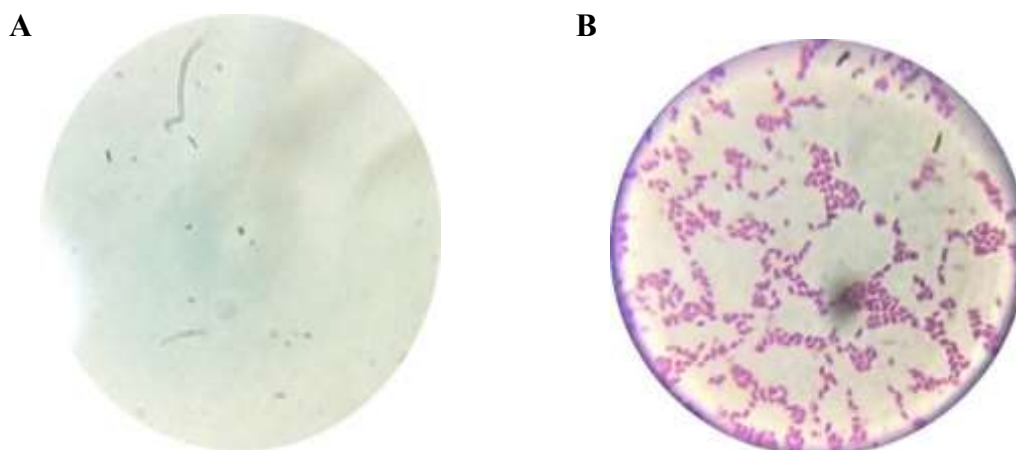
Kultivace bakteriálních kolonií separovaných metodou křížového rozřezu byla provedena u bakteriálního kmene PA-lux 2. Ze tří separovaných kolonií narostlých na agarové plotně bylo inokulováno v triplicátech do PS média. Kultivace probíhala 14 hodin ve zkumavce s kónickým dnem. Bakteriální kultury zředěné na stejnou optickou denzitu při 600 nm byly měřeny v černé 96 jamkové destičce na přístroji Tecan Infinite M200 Pro (viz obr. 17).



Obrázek 17: Relativní luminiscence bakteriálních suspenzí PA-lux 2 inokulovaných z agarové plotny. Měřeno na Tecan Infinite M200 Pro. Čísla 1., 2., 3. označují bakteriální kolonie. Bakteriální suspenze ředěny na $OD_{600} = 1$. Měřeno v černé 96 jamkové destičce o objemu vzorků 100 μ l. Hodnoty jsou průměry ze tří naměřených hodnot. Jako srovnávací vzorek použit roztok PBS. Od naměřených hodnot relativní luminiscence byla odečtena relativní luminiscence srovnávacího vzorku 17. Nastavení přístroje: měřeno v módu luminiscence, čtení s víčkem, třepání 5 s, amplituda 3 mm.

4.6.2 Mikroskopické pozorování PA-lux 2

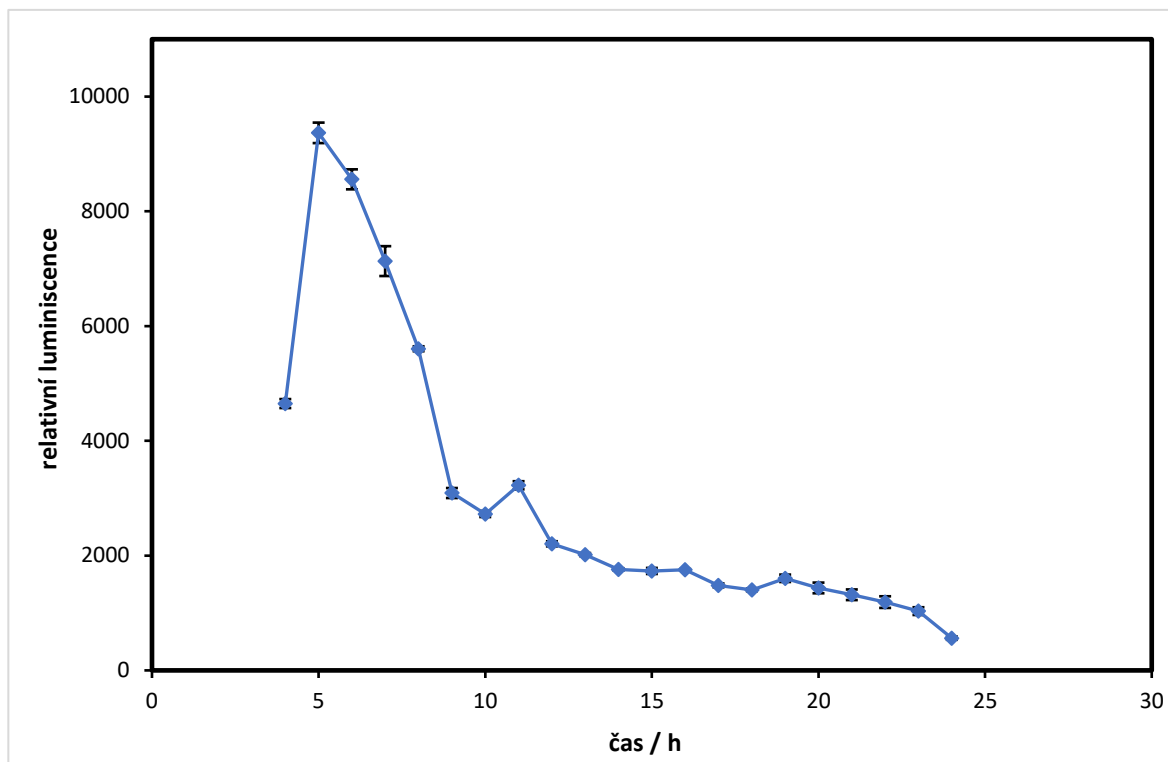
Barvení dle Grama bylo provedeno pro grampozitivní a gramnegativní bakterie u bakteriálního kmene PA-lux 2. Barvení bakterií bylo následováno mikroskopickým pozorováním bakteriálních preparátů při zvětšení 2000 x. Získané mikrofotografie jsou zobrazeny na obrázku č. 18.



Obrázek 18: Mikrofotografie pozorování bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. (A) Grampozitivní barvení dle Grama (B) Gramnegativní barvení dle Grama. Zvětšení mikroskopu 2000x (Levenhuk 720 B).

4.7 Měření bioluminiscence PA-lux 2 v závislosti na době kultivace

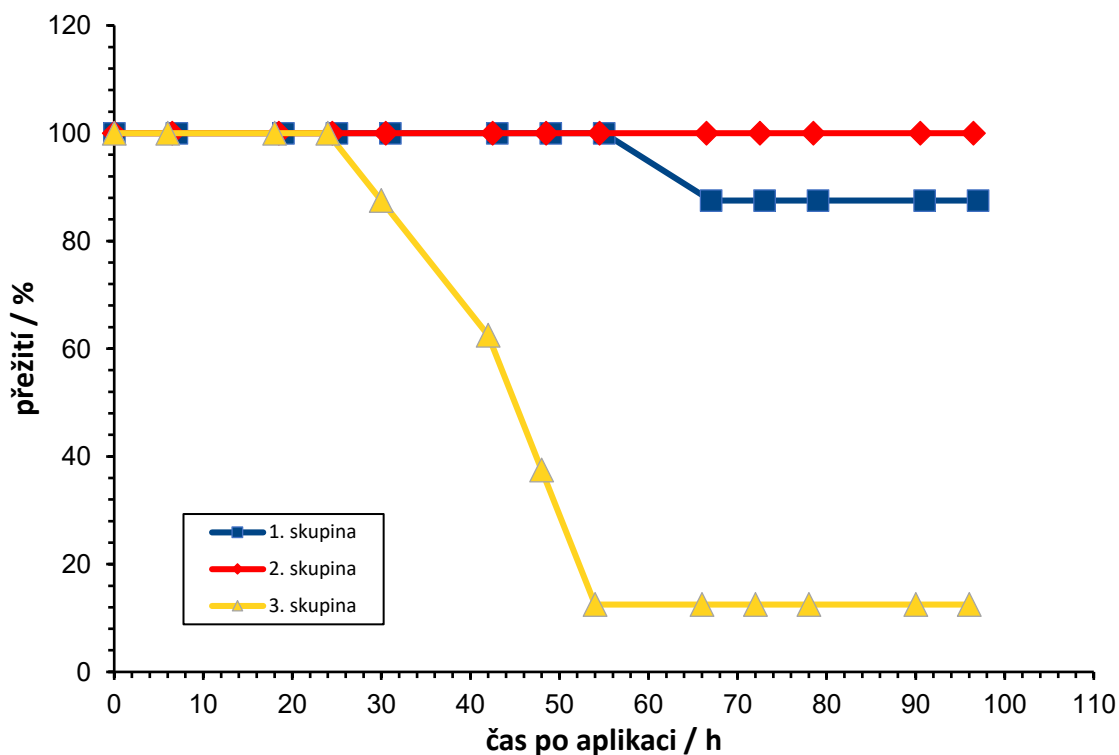
Byla měřena bioluminiscence v závislosti na době kultivace bakterií PA-lux 2. Bakterie byly kultivovány v PS médiu v Erlenmeyerově baňce. Bioluminiscence byla sledována až od 4. hodiny růstové křivky, kdy optická denzita při vlnové délce 600 nm bakteriální suspenze dosáhla hodnoty 0,15, na kterou byly vzorky během kultivace ředěny. Na obrázku č. 19 (str. 53) je znázorněn průběh měření relativní luminiscence.



Obrázek 19: Relativní luminiscence bakterií PA-lux 2 v čase. Bakteriální kmen PA-lux 2 byl kultivovaný v PS médiu v Erlenmeyerově baňce. Měření probíhalo na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro v 96 jamkové destičce o objemu vzorků 100 μ l. Pro měření bioluminiscence byly vzorky ředěny na stejnou $OD_{600} = 0,15$. Jako srovnávací vzorek bylo použito PS médium. Naměřené hodnoty jsou průměry tří hodnot.

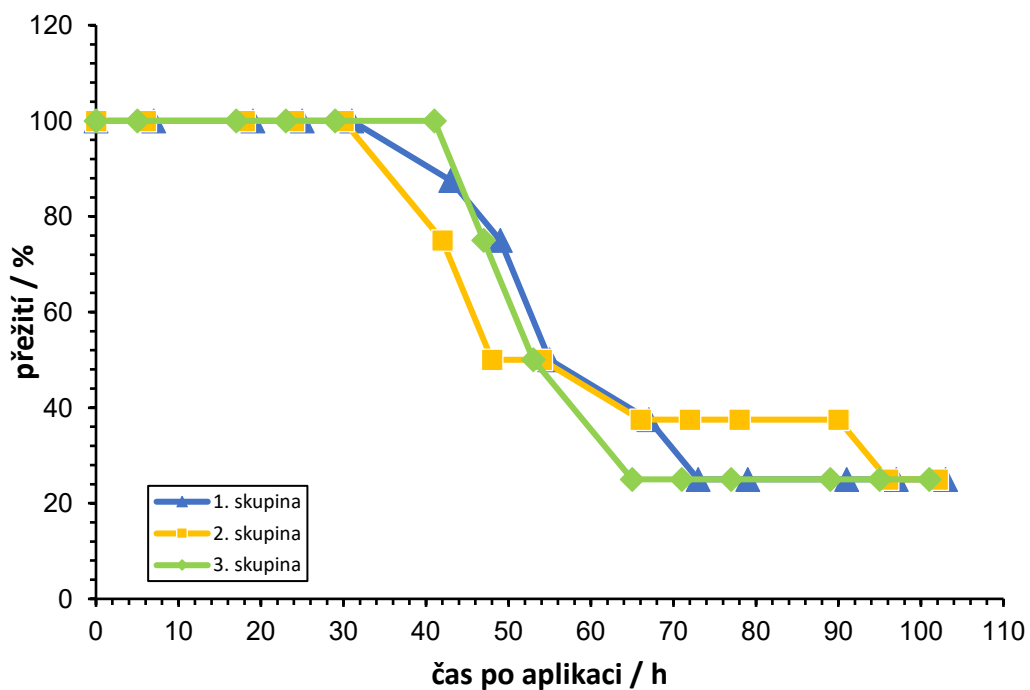
4.8 Optimalizace dávky bakterií

Pro navození akutní bakteriální infekce u myší způsobené *Pseudomonas aeruginosa* bylo nutné optimalizovat dávku bakterií. Je potřebné nalézt takovou dávku bakterií, u které by bylo přežití experimentálních myší přibližně 50 %. Bakterie PA-lux 2 byly kultivovány 6 hodin v PS médiu v Erlenmeyerově baňce a byly aplikovány ve třech dávkách $5 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^6$ a $5 \cdot 10^6$ ve 30 μ l. Na obrázku č. 20 (str. 54) lze pozorovat vliv dávky bakterií na přežití myší v dané skupině.



Obrázek 20: Časová závislost přežití experimentálních zvířat s bakteriální infekcí. Myši byly sledovány po 6 hodinách, v noci po 12 hodinách. Tři skupiny po 8 jedincích. Aplikovaná dávka bakterií PA: $5 \cdot 10^5$ v 1 skupině, $1 \cdot 10^6$ ve 2. skupině a $5 \cdot 10^6$ ve 3. skupině.

Pro nalezení optimální dávky bakterií byly na základě předchozího výsledku sledovány další tři dávky bakterií $2 \cdot 10^6$, $3 \cdot 10^6$ a $4 \cdot 10^6$ ve 30 μl . Bakterie byly kultivovány po dobu 6 hodin v PS médiu a v Erlenmeyerově baňce. Promytá bakteriální suspenze byla myši aplikována pomocí intratracheální instilace. Na obrázku č. 21 (str. 55) je zobrazen graf přežití experimentálních zvířat sledovaných po 6 hodinách, přes noc po 12 hodinách.



Obrázek 21: Časová závislost přežití experimentálních zvířat s bakteriální infekcí. Myši byly sledovány po 6 hodinách, v noci po 12 hodinách. Tři skupiny po 8 jedincích. Aplikované množství bakterií PA: $2 \cdot 10^6$ v 1. skupině, $3 \cdot 10^6$ ve 2. skupině a $4 \cdot 10^6$ ve 3. skupině.

5 Diskuze

Chronická infekce způsobená *Pseudomonas aeruginosa* je nejčastějším projevem onemocnění u pacientů s cystickou fibrosou, který vede až k jejich úmrtí. Tato infekce je obtížně léčena antibiotiky, které přestávají mít účinek vzhledem ke vzniku rezistence PA na používaná antibiotika. Řešením tohoto problému se zabývá celá řada výzkumů, které se snaží nalézt nové terapeutické prostředky zmírňující nebo zabraňující vznik bakteriální infekce způsobené PA^{13,35}.

Jednou z možných alternativ k současné terapii antibiotiky může být pasivní imunizace CF pacientů slepičími protilátkami. Tento výzkum je zaměřený na použití slepičích protilátek proti významnému virulencnímu faktoru bakterie PA, kterým je lektin PA-III. Tento lektin se podílí na adhezi bakterií na epiteliální buňky plic a tvorbě biofilmu^{13,35}. Pokusy *in vitro* naznačují, že slepičí protilátky proti tomuto lektinu brání adhezi PA na epiteliální buňky plic nemocných CF⁸¹. Proto pro další studium efektu slepičích protilátek bylo třeba vytvořit vhodný *in vivo* experimentální model.

Jako experimentální zvířecí model byly vybrány myši (samci) kmene ICR CD1. Ke sledování průběhu bakteriální infekce na myším modelu jsou používány bioluminiscenční kmeny PA. Myším je navíc podáván enzym neuraminidasa, který odštěpuje kyselinu sialovou, díky čemuž dochází k napodobení pozměněné glykosylace pozorované u pacientů s CF. U těchto pacientů je potvrzeno snížené množství kyseliny sialové na povrchových glykokonjugátech plicních epiteliálních buněk^{5,78}.

Nejdříve byla ověřena čistota potencionálně vhodných bakteriálních bioluminiscenčních kmenů PA-XEN 41, PA-lux 1 a PA-lux 2 pomocí metody křížového roztěru. Díky této metodě bylo následně možné charakterizovat jednotlivé kolonie. U jednotlivých kmenů PA byly pozorovatelné kolonie, které měly stejnou morfologii i tvar. Tvar kolonií byl kruhovitý s vroubkovaným či roztřepeným okrajem a perleťovým leskem. Konzistence kolonií působila spíše slizovitě. Do okolí bakterií na agarové plotně byl uvolňován okem pozorovatelný modrozelený pigment. Samotné kolonie byly také zabarveny do zelena. Všechny tyto pozorované znaky jsou charakteristické pro *Pseudomonas aeruginosa*, které nenasvědčují přítomnosti jiného druhu bakterií. Toto ověření čistoty je dostačující pro naše další experimenty na myších.

Pro vytvoření funkčního myšního modelu bylo dále zapotřebí vybrat kmen PA s nejvyšší schopností bioluminiscence. Byla sledována bioluminiscence tří kmenů PA-XEN 41, PA-lux 1 a PA-lux 2. Zároveň byl studován vliv kultivace na schopnost bioluminiscence bakterií v případě kultivace v plastové zkumavce s kónickým dnem a v Erlenmeyerově baňce. Předpokládá se, že v Erlenmeyerově baňce dochází k lepší aeraci, a tedy lepším podmínkám pro kultivaci bakterií. Měření probíhalo na spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 Pro, který je standardně používán pro měření bioluminiscence bakterií. Bylo zjištěno, že množství bakterií $6 \cdot 10^5$ není téměř detekovatelné. Proto je nutné pro měření relativní luminiscence bakteriálních suspenzí používat vyšší množství bakterií.

Naměřené hodnoty ukazují, že u kmene PA-lux 2 jsou hodnoty relativní luminiscence srovnatelné při obou typech kultivace. V případě kmenů PA-XEN 41 a PA-lux 1 byly naměřeny vyšší hodnoty relativní luminiscence při kultivaci v plastové zkumavce. Dále bylo pozorováno, že PA-lux 1 a 2 mají vyšší schopnost bioluminiscence v závislosti na množství bakterií než kmen PA-XEN 41, a to přibližně 7 x při kultivaci v Erlenmeyerově baňce a přibližně 2 x při kultivaci ve zkumavce s kónickým dnem. Tyto výsledky plně nekorelují s předešlými studiemi, kde byla schopnost bioluminiscence přibližně 10 x vyšší^{80,82}. Pravděpodobně dochází ke ztrátě bioluminiscence bakterií opakovanou subkultivací, ale také uskladněním na šikmém agaru při 5 °C, protože kmen PA-lux 1 ani PA-lux 2 nedosáhly hodnot 10 x vyšších než PA-XEN 41. Z důvodu nejvyšší naměřené relativní luminiscence byl pro následující experiment vybrán bakteriální kmen PA-lux 1 kultivovaný ve zkumavce s kónickým dnem.

Následně byl proveden experiment, při kterém byl sledován průběh akutní bakteriální infekce u myši. Jako premedikace bylo experimentálním zvířatům podáno 100 U neuraminidasy nebo PBS u myši neošetřených enzymem. Neuraminidasa je enzym odštěpující kyselinu sialovou z glykokonjugátů, díky čemuž dochází k odhalení sacharidových struktur na povrchu plicních epitelálních buněk. K asialylovaným sacharidovým strukturám mají bakterie vyšší afinitu. Pro vznik bakteriální infekce byly podány dvě dávky bakterií $5,5 \cdot 10^5$ a $2,75 \cdot 10^6$. Tyto dávky byly použity dle publikací, kde bylo zjištěno, že toto množství bakterií způsobuje vznik bakteriální infekce, při které je možné sledovat vliv neuraminidasy na průběh infekce^{82,83}. Průběh infekce u myši byl monitorován měřením bioluminiscence PA-lux 1 v čase pomocí optického tomografu. U myši nebyl pozorovaný vznik infekce detekovatelný pomocí optického tomografu.

U všech myší byl sledován velmi dobrý zdravotní stav bez známek onemocnění. Zdravotní stav myší koreloval s výsledky z optického tomografu, a to i navzdory tomu, že byl aplikován enzym neuraminidasa, který by měl zvýšit schopnost adherence bakterií PA na epiteliální buňky plic myši.

Nedostatečná bioluminiscence a absence infekce mohly být způsobeny řadou faktorů jako je například nedostatečné množství životaschopných bakterií PA i nízká účinnost enzymu neuraminidasy, která může být způsobena nepřítomností lektinu PA-III při kultivaci bakterií v plastové zkumavce s kónickým dnem. Tyto předpoklady bylo nutné experimentálně ověřit.

Nejprve byla ověřována přítomnost bakteriálního lektinu PA-III, který je důležitý jak z hlediska vzniku akutní bakteriální infekce u vyvíjeného myšího modelu, tak pro budoucí studium vlivu anti - PA-III slepičích protilátek. Pro detekci lektinu v bakteriálním lyzátu byla použita primární slepičí protilátka získaná afinitní chromatografií na koloně s imobilizovaným lektinem PA-III.

Byla studována produkce lektinu PA-III u bakterií PA-lux 1, které byly kultivovány 14 hodin v plastové zkumavce s kónickým dnem a v Erlenmeyerově baňce. Dle literárních údajů je potvrzené, že produkce lektinu PA-III se v průběhu stacionární fáze zvyšuje, což nasvědčuje tomu, že by ve 14. hodině kultivace měl být lektin detekovatelný⁸⁴. Avšak při kultivaci ve zkumavce s kónickým dnem se nám nepodařilo lektin PA-III detekovat. Je tedy možné, že bakterie lektin produkují v tak malém množství, které není možné touto metodou ověřit. Pro ověření by bylo zapotřebí použít citlivější metodu, kterou je například chemiluminiscence⁸⁵. Tyto výsledky poukazují na možnou příčinu, proč enzym neuraminidasa neměl žádný vliv na bakteriální adhezi a vznik infekce.

Protože lektin byl detekován pouze v Erlenmeyerově baňce bylo přistoupeno ke změně kultivačních podmínek. Bakterie byly pro další experimenty kultivovány v Erlenmeyerově baňce. Zároveň byl porovnáván vliv kultivačních médií na produkci lektinu PA-III. Bylo použito LB médium, PS médium s optimálním složením pro růst bakteriálního rodu *Pseudomonas* a M9 médium, které stimuluje bakterie ke tvorbě lektinu⁸⁶. Bylo potvrzeno, že bakteriální kmen PA-lux produkuje lektin PA-III v LB a v PS médiu, ale M9 médium nemá u tohoto kmene na produkci lektinu PA-III žádný stimulační vliv. Při kultivaci v Erlenmeyerově baňce oproti kultivaci v plastové zkumavce s kónickým dnem dochází

k vyšší produkci lektinu, který je imunochemicky detekovatelný. Vzhledem k těmto výsledkům by bylo vhodné změnit způsob kultivace.

Druhým důvodem ovlivňujícím virulenci u myši by mohla být snížená životaschopnost bakteriálních buněk. Pro vznik bakteriální infekce je nutné, aby množství bakterií skutečně odpovídalo životaschopným bakteriím, které jsou schopny vyvolat infekci u experimentálního zvířete. Proto byla proměřena růstová křivka bakteriálního kmene PA-lux 1 a PA-lux 2.

Charakter a strmost růstových křivek vykazují podobnost, ale liší se v průběhu klidové fáze, která nebyla u bakterií PA-lux 2 téměř pozorovatelná. To ukazuje na jejich lepší schopnost adaptace na nové prostředí, a tedy rychlejší růst bakterií. Dle průběhu růstové křivky lze předpokládat, že bakterie vstupují do exponenciální fáze přibližně ve 3. hodině a od 7. hodiny růstu postupně přechází do stacionární fáze. Při 14 hodinové kultivaci jsou bakterie pravděpodobně méně vitální a počet živých bakterií klesá, což může vysvětlovat jejich neschopnost navodit bakteriální infekci u myši.

Vzhledem k lepší adaptaci na prostředí u kmene PA-lux 2 a změně způsobu kultivace na Erlenmeyerovu baňku se jeví bakterie PA-lux 2 jako vhodnější pro další experimenty. Tomuto tvrzení tak napovídají naměřené hodnoty relativní luminiscence, které byly u bakterií kultivovaných v Erlenmeyerově baňce vyšší pro PA-lux 2 než pro PA-lux 1, a to přibližně o 30 %.

Pro zajištění optimálních podmínek experimentu na myších byla navíc ověřena čistota bakteriální kultury PA-lux 2 pomocí kultivace separovaných bakteriálních kolonií a následného mikroskopického pozorování a byla proměřena bioluminiscence PA-lux 2 v závislosti na době kultivace.

Čistota bakterií byla dále ověřována měřením relativní luminiscence bakteriálních suspenzí PA-lux 2 kolonií z agarové plotny a následným mikroskopickým pozorováním. Měření probíhalo na přístroji Tecan Infinite M200 Pro. Naměřené hodnoty relativní luminiscence nám nenasvědčují přítomnosti kontaminace jiným bakteriálním kmenem. Toto zjištění bylo potvrzeno mikroskopickým pozorováním, kde nebyl pozorovaný odlišný bakteriální kmen. Takto byla dostatečně ověřena čistota bakteriální suspenze PA-lux 2 pro naši experimentální činnost.

Bioluminiscence v závislosti na době kultivace byla měřena vždy při stejném ředění bakteriální suspenze. Měření bylo provedeno až od 4. hodiny kultivace z toho důvodu, že při prvních třech hodinách měření byly hodnoty optické denzity při vlnové délce 600 nm příliš nízké. Nejvyšší hodnoty bioluminiscence byly naměřeny v 5. a 6. hodině růstu, což potvrzuje životaschopnost bakterií v exponenciální fázi. Při vstupu do stacionární fáze dochází k výraznému poklesu schopnosti bioluminiscence, která pravděpodobně souvisí s odumíráním bakterií v důsledku nedostatku živin a ztráty vhodných podmínek pro růst. Z toho vyplývá závislost bioluminiscence na životaschopnosti bakterií.

Z těchto výsledků je zřejmé, že zásadním parametrem je délka kultivace bakterií a je nutné, aby optická denzita při vlnové délce 600 nm bakteriální suspenze odpovídala množství životaschopných bakterií. Pro experimenty je tedy důležité kultivovat bakterie pět až 6 hodin, aby byly myším aplikovány pouze životaschopné bakterie a mohlo dojít ke vzniku bakteriální infekce. Navíc mají takto kultivované bakterie vysokou schopnost bioluminiscence, která by při vzniku bakteriální infekce měla být detekovatelná pomocí optického tomografu IVIS® Lumina XR *in vivo*. To podporuje také fakt, že bakterie v 5. až 6. hodině růstu produkují bioluminiscenci přibližně 5 x vyšší než ve 14. hodině. Pro vývoj myšího modelu bylo tedy nutné znovu optimalizovat podmínky a dávku bakterií pro vznik akutní bakteriální infekce.

Pro optimalizaci byla vybrána tři různá množství bakterií $5 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^6$ a $5 \cdot 10^6$ ve 30 μ l. Cílem bylo nalézt dávku, která by měla způsobit bakteriální infekci s 50% přežitím myší. Pro tento experiment byly bakterie PA-lux 2 kultivovány v Erlenmeyerově baňce po dobu 6 hodin. Bakterie tedy byly v exponenciální fázi růstu a plně životaschopné. U nejnižší dávky bakterií $5 \cdot 10^5$ došlo ke vzniku infekce u tří jedinců, přičemž došlo k úhynu jednoho z těchto jedinců. Tato dávka nebyla shledána dostatečnou pro navození bakteriální infekce pro vyvíjený myší model. Úhyn jednoho experimentálního zvířete mohl být způsoben variabilitou v odolnosti vůči PA u jednotlivců v rámci skupiny. Při množství bakterií $1 \cdot 10^6$ byl u všech myší pozorován rychlý nástup infekce po šesti hodinách od aplikace bakterií. Po 18 hodinách došlo k výraznému zlepšení stavu u všech jedinců s následným plným uzdravením, tedy přežití bylo 100 %. Při nejvyšší dávce bakterií ($5 \cdot 10^6$) byl pozorován zhoršený stav u všech jedinců, kdy k prvnímu úhynu došlo po 30 hodinách od aplikace. Procento přežití bylo 12,5 % po třech dnech. Na základě výsledků tohoto experimentu lze konstatovat, že pravděpodobným důvodem selhání předchozího

experimentu bylo příliš nízké množství životaschopných bakterií, které nebyly schopny bakteriální infekci navodit. Nebyla však nalezena dávka, která by způsobila akutní infekci s přežitím zvířat přibližně 50 %.

Proto bylo nutné ověřit vliv dalších dávek bakterií PA-lux 2 v rozmezí hodnot $1 \cdot 10^6$ a $5 \cdot 10^6$. U těchto dávek bylo předpokládáno, že způsobí bakteriální infekci přibližně u 50 % experimentálních myši. Bylo zjištěno, že aplikované množství bakterií $2 \cdot 10^6$, $3 \cdot 10^6$ a $4 \cdot 10^6$ má stejný vliv na vznik bakteriální infekce, kdy ve všech skupinách došlo k úhynu 75 % myši. K prvním úhynům začalo docházet po přibližně třech dnech od aplikace bakteriální suspenze, kdy rozvoj infekce byl pozorován 24 hodin po intratracheální instilaci. Získané poznatky z tohoto experimentu nasvědčují, že se bude pravděpodobně optimální množství bakterií pohybovat v rozsahu mezi $1 \cdot 10^6$ a $2 \cdot 10^6$ bakterií.

K vytvoření funkčního myšího modelu pro onemocnění CF bude zapotřebí provést další experimenty. U myši je potřebné ověřit, zda-li se skutečně optimální dávka bakterií pro přežití 50 % zvířat pohybuje v rozsahu množství bakterií $1 \cdot 10^6$ až $2 \cdot 10^6$, jak nasvědčují naše výsledky. Do budoucna by bylo zapotřebí provést experimenty s neuraminidasou pro vytvoření myšího modelu mimikujícího glykosylaci plic jako u nemocných s CF. Dále opětovně provést experiment, při kterém by byl sledován průběh akutní bakteriální infekce s optimalizovaným postupem kultivace bakterií a bakteriální dávkou.

Pokud by byl daný myší model využíván pro studium vlivu slepičích protilátek proti lektinu PA-III, popřípadě jiných molekul inhibujících tento lektin, bylo by nutné charakterizovat produkci lektinu PA-III v plicích myši, protože myším byly aplikovány bakterie PA-lux 2 z exponenciální fáze, kde nebyla ověřena produkce tohoto lektinu.

6 Souhrn

- Podařilo se vypracovat techniku intratracheální instilace umožňující reprodukovatelnou aplikaci vzorků do plic experimentálních zvířat.
- Byl vybrán vhodný bioluminiscenční kmen pro práci s experimentálními zvířaty PA-lux 2.
- Produkce lektinu PA-IIL byla ověřena při kultivaci bakterií PA-lux v Erlenmeyerově baňce.
- Bylo zjištěno, že bakteriální kmen PA-lux ztrácí opakovanou subkultivací schopnost bioluminiscence přibližně o 30 % při kultivaci v Erlenmeyerově baňce.
- Růstová křivka byla proměřena a bylo zjištěno, že exponenciální fáze bakterií PA-lux probíhá přibližně od 3. do 7. hodiny kultivace, kdy nejvyšší bioluminiscence byla naměřena v 5. a 6. hodině kultivace.
- Nebylo možné určit přesnou dávku bakterií pro vznik akutní bakteriální infekce s 50% přežitím experimentálních zvířat, vhodné množství bakterií leží pravděpodobně v intervalu $1 \cdot 10^6$ až $2 \cdot 10^6$ bakterií.

7 Seznam použité literatury

1. Lyczak, J. B.; Cannon, C. L.; Pier, G. B.: Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 194-222 (2002).
2. Silva Filho, L. V. R. F.; Aguiar Ferreira, F.; Caldeira Reis, F. J.; Britto, M. C. A.; Levy, C. E.; Clark, O.; Ribeiro, J. D.: Pseudomonas aeruginosa infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis, and treatment. *J. Bras. Pneumol.* **39**, 495-512 (2013).
3. Bhagirath, A. Y.; Li, Y.; Somayajula, D.; Dadashi, M.; Badr, S.; Duan, K.: Cystic fibrosis lung environment and Pseudomonas aeruginosa infection. *BMC Pulm. Med.* **16**, 174 (2016).
4. Murray, P.; Rosenthal, K.; Pfaller, M.: *Medical Microbiology 7th Edition*. Elsevier Saunders, Philadelphia (2012).
5. Scanlin, T. F.; Glick, M. C.: Terminal glycosylation in cystic fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1455**, 241-253 (1999).
6. Cutting, G. R.: Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 45-56 (2015).
7. Vankeerberghen, A.; Cuppens, H.; Cassiman, J. J.: The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J. Cyst. Fibros.* **1**, 13-29 (2002).
8. Carson, M. R.; Travis, S. M.; Welsh, M. J.: The Two Nucleotide-binding Domains of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Have Distinct Functions in Control Channel Activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 1711-1717 (1995).
9. Horsley, A.; Cunningham, S.; Innes, A. J.: *Cystic fibrosis*. Oxford University Press, New York (2015).
10. Gibson, R. L.; Burns, J. L.; Ramsey, B. W.: Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 918-951 (2003).

11. Du, K.; Lukacs, G. L.: Cooperative Assembly and Misfolding of CFTR Domains In Vivo. *Mol. Biol. Cell.* **20**, 1903-1915 (2009).
12. Alhadeff, J. A.: Glycoproteins and cystic fibrosis: A review. *Clin. Genet.* **14**, 189-201 (2008).
13. Chemani, C.; Imberty, S.; de Bentzmann, M.; Pierre, M.; Wimmerova, M.; Guery, B. P.; Faure, K.: Role of LecA and LecB Lectins in Pseudomonas aeruginosa-Induced Lung Injury and Effect of Carbohydrate Ligands. *Infect. Immun.* **77**, 2065-2075 (2009).
14. Lazatin, J. O.; Glick, M. C.; Scanlin, T. F.: Fucosylation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Glycosylation Dis.* **1**, 263-270 (1994).
15. Barasch, J.; Al-Awqati, Q.: Defective acidification of the biosynthetic pathway in cystic fibrosis. *J. Cell Sci.* **17**, 229-235 (1993).
16. Krivan, H. C.; Ginsburg, V.; Roberts, D. D.: Pseudomonas aeruginosa and Pseudomonas cepacia isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to gangliotetraosylceramide (asialo GM1) and gangliotriaosylceramide (asialo GM2). *Arch. Biochem. Biophys.* **260**, 493-496 (1988).
17. Saiman, L.; Prince, A.: Pseudomonas aeruginosa pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J. Clin. Invest.* **92**, 1875-1880 (1993).
18. Knowles, M. R.; Boucher, R. C.: Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J. Clin. Invest.* **109**, 571-577 (2002).
19. Collawn, J. F.; Matalon, S.: CFTR and lung homeostasis. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **307**, 917-923 (2014).
20. Wine, J. J.: The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Invest.* **103**, 309-312 (1999).
21. Allen, L. J.; Panitch, H. B.; Rubenstein, R. C.: *Cystic fibrosis*. CRC Press, Boca Raton (2010).
22. Huffnagle, G. B.; Dickson, R. P.: The bacterial microbiota in inflammatory lung diseases. *Clin. Immunol.* **159**, 177-182 (2015).

23. Cohen-Cymerknoh, M.; Kerem, E., Ferkol, T.; Elizur, A.: Airway inflammation in cystic fibrosis: molecular mechanisms and clinical implications. *Thorax*. **68**, 1157-1162 (2013).
24. Watt, A. P.: Neutrophil cell death, activation and bacterial infection in cystic fibrosis. *Thorax*. **60**, 659-664 (2005).
25. Wu, W.; Jin, Y.; Bai, F.; Jin, S.: Pseudomonas aeruginosa. *Molecular Medical Microbiology*. 753-767 (2015).
26. Baron, S.: *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch, Galveston (1996).
27. Rolsma, S.; Frank, D. W.; Barbieri, J. T.: Pseudomonas aeruginosa toxins. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*. 133-160 (2015).
28. Worstell, N. C.: Hetero-Multivalency of Pseudomonas aeruginosa Lectin LecA Binding to Model Membranes. *Sci. Rep.* **8**, 8419 (2018).
29. Gellatly, S. L.; Hancock, R. E. W.: Pseudomonas aeruginosa : new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.* **67**, 159-173 (2013).
30. Arora, S. K.; Ritchings, B. W.; Almira, E. C.; Lory, S.; Ramphal, R.: The Pseudomonas aeruginosa flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect. Immun.* **66**, 1000-1007 (1998).
31. Pier, G. B.: Rationale for development of immunotherapies that target mucoid Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis patients. *Behring Inst. Mitt.* 350-360 (1997).
32. Furukawa, S.; Kuchma, S. L.; O'Toole, G. A.: Keeping their options open: acute versus persistent infections. *J. Bacteriol.* **188**, 1211–1217 (2006).
33. Moradali, M. F.; Ghods, S.; Rehm, B. H.: Pseudomonas aeruginosa Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 39 (2017).
34. Poole, K.: Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* **20**, 227-234 (2012).

35. Glick, J.; Garber, N.: The intracellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 3085-3090 (1983).
36. Bajolet-Laudinat, O.; de Bentzmann, S. G.; Tournier, J. M.; Madoulet, C.; Plotkowski, M. C.; Chippaux, C.; Puchelle, E.: Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture. *Infect. Immun.* **62**, 4481-4487 (1994).
37. Loris, R.; Tielker, D.; Jaeger, K.-E.; Wyns, L.: Structural basis of carbohydrate recognition by the lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* **331**, 861-870 (2003).
38. Diggle, S. P.; Winzer, K.; Chhabra, S. R.; Worrall, K. E.; Cámara, M.; Williams, P.: The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol. Microbiol.* **50**, 29-43 (2003).
39. Imberty, A.; Wimmerová, M.; Mitchell, E. P.; Gilboa-Garber, N.: Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect.* **6**, 221-228 (2004).
40. Garber, N.; Guempel, U.; Belz, A.; Gilboa-Garber, N.; Doyle, R. J.: On the specificity of the D-galactose-binding lectin (PA-I) of *Pseudomonas aeruginosa* and its strong binding to hydrophobic derivatives of D-galactose and thiogalactose. *Biochim. Biophys. Acta.* **1116**, 331-333 (1992).
41. Grishin, A. V.; Krivozubov, M. S.; Karyagina, A. S.; Gintsburg, A. L.: *Pseudomonas Aeruginosa* Lectins As Targets for Novel Antibacterials. *Acta Naturae.* **7**, 29-41 (2015).
42. Gilboa-Garber, N.; Katcoff, D. J.; Garber, N. C.: Identification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PA-III lectin gene and protein compared to PA-II. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **29**, 53-57 (2000).
43. Adam, E. C.; Mitchell, B. S.; Schumacher, D. U.; Grant, G.; Schumacher, U.: *Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155**, 2102-2104 (1997).

44. Keller, M. A.; Stiehm, E. R.: Passive Immunity in Prevention and Treatment of Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 602–614 (2000).
45. Warr, G. W.; Magor, K. E.; Higgins, D. A.: IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today.* **16**, 392-398 (1995).
46. Tini, M.; Jewell, U.; Camenisch, G.; Chilov, D.; Gassmann, M.: Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **131**, 569-574 (2002).
47. Suzuki, N.; Lee, C. Y.: Site-specific N-glycosylation of chicken serum IgG. *Glycobiology.* **14**, 1460-2423 (2003).
48. Schade, R.; Calzado, E. G.; Sarmiento, R.; Chacana, P. A.; Porankiewicz-Asplund, J.; Terzolo, H. R.: Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern. Lab. Anim.* **33**, 129-154 (2005).
49. Carlander, D.; Kollberg, H.; Wejåker, P.-E.; Larsson, A.: Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol Res.* **21**, 1-6 (2000).
50. Schwarzkopf, C.; Thiele, B.: Effectivity of Different Methods for the Extraction and Purification of IgY. *Altex.* **13**, 35-39 (1996).
51. Gassmann, M.; Thömmes, P.; Weiser, T.; Hübscher, U.: Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *Faseb J.* **4**, 2528-2532 (1990).
52. Rahman, S.; Nguyen, S. V.; Icatlo, C. F. J.; Umeda, K.; Kodama, Y.: Oral passive IgY-based immunotherapeutics: A novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. *Hum. Vaccin. Immunother.* **9**, 1039-1048 (2013).
53. Schade, R.; Bürger, W.; Schöneberg, T.; Schniering, A.; Schwarzkopf, C.; Hlinak, A.; Kobilke, H.: Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunisation with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies. *Altex.* **11**, 75-84 (1994).

54. Larsson, A.; Carlander, D.; Wilhelmsson, M.: Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. *Food Agric. Immunol.* **10**, 29-36 (1998).
55. Nilsson, E.; Larsson, A.; Olesen, H. V.; Wejåker, P.-E.; Kollberg, H.: Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* **43**, 892-899 (2008).
56. Carlander, D.; Sundstrom, J.; Berglund, A.; Larsson, A.; Wretling, B.; Kollberg, H.: Immunoglobulin Y (IgY) -A new tool for the prophylaxis against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* **19**, 241 (1999).
57. Müller, S.; Schubert, A.; Zajac, J.; Dyck, T.; Oelkrug, C.: IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. *Nutr. J.* **14**, 109 (2015).
58. Larsson, A.; Balow, R. M.; Lindahl, T. L.; Forsberg, P. O.: Chicken Antibodies: Taking Advantage of Evolution-A Review. *Poult. Sci.* **72**, 1807-1812 (1993).
59. Kollberg, H.; Carlander, D.; Olesen, H.; Wejaker, P. E.; Johannesson, M.; Larsson, A.: Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: A phase I feasibility study. *Pediatr. Pulmonol.* **35**, 433-440 (2003).
60. Lavelle, G. M.; White, M. M.; Browne, N.; McElvaney, N. G.; Reeves, E. P.: Animal Models of Cystic Fibrosis Pathology: Phenotypic Parallels and Divergences. *Biomed Res. Int.* **2016**, 1-14 (2016).
61. Scholte, B. J.; Davidson, D. J.; Wilke, M.; de Jonge, H. R.: Animal models of cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **3**, 183-190 (2004).
62. Fisher, J. T.; Zhang, Y.; Engelhardt, J. F.: Comparative Biology of Cystic Fibrosis Animal Models. *Methods Mol. Biol.* **742**, 311-334 (2011).
63. Guilbault, C.; Saeed, Z.; Downey, G. P.; Radzioch, D.: Cystic Fibrosis Mouse Models. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **36**, 1-7 (2007).
64. Kukavica-Ibrulj, I.; Levesque, R. C.: Animal models of chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*: useful tools for cystic fibrosis studies. *Lab. Anim.* **42**, 389-412 (2008).

65. Snouwaert, J. N.; Brigman, K. K.; Latour, A. M.; Malouf, N. N.; Boucher, R. C.; Smithies, O.; Koller, B. H.: An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science* **257**, 1083-1088 (1992).
66. Kent, G.; Iles, R.; Bear, C. E.; Huan, L. J.; Griesenbach, U.; McKerlie, C.; Frndova, H.; Ackerley, C.; Gosselin, D.; Radzioch, D.; O'Brodivich, H.; Tsui, L. C.; Buchwald, M.; Tanswell, A. K.: Lung disease in mice with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* **100**, 3060-3069 (1997).
67. Bayes, H. K.; Ritchie, N.; Irvine, S.; Evans, T. J.: A murine model of early *Pseudomonas aeruginosa* lung disease with transition to chronic infection. *Sci. Rep.* **6**, 35838 (2016).
68. Dickinson, P.; Kimber, W. L.; Kilanowski, F. M.; Webb, S.; Stevenson, B. J.; Porteous, D. J.; Dorin, J. R.: Enhancing the efficiency of introducing precise mutations into the mouse genome by hit and run gene targeting. *Transgenic Res.* **9**, 55-66 (2000).
69. Bragonzi, A.: Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 584-593 (2010).
70. Tang, H. B.; DiMango, E.; Bryan, R.; Gambello, M.; Iglewski, B. H.; Goldberg, J. B.; Prince, A.: Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect. Immun.* **64**, 37-43 (1996).
71. Lee, V. T.; Smith, R. S.; Tummler, B.; Lory, S.: Activities of *Pseudomonas aeruginosa* Effectors Secreted by the Type III Secretion System In Vitro and during Infection. *Infect. Immun.* **73**, 1695-1705 (2005).
72. Van Heeckeren, A. M.; Schluchter, M. D.: Murine models of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Lab. Anim.* **36**, 291-312 (2002).
73. Zhou, Z.; Duerr, J.; Johannesson, B.; Schubert, S. C.; Treis, D.; Harm, M.; Graeber, S. Y.; Dalpke, A.; Schultz, C.; Mall, M. A.: The ENaC-overexpressing mouse as a model of cystic fibrosis lung disease. *J. Cyst. Fibros.* **10**, 172-182 (2011).

74. Choi, H. K.; Finkbeiner, W. E.; Widdicombe, J. H.: A comparative study of mammalian tracheal mucous glands. *J. Anat.* **197**, 361-372 (2000).
75. Sun, X.; Sui, H.; Fisher, J. T.; Yan, Z.; Liu, X.; Cho, H. J.; Joo, N. S.; Zhang, Y.; Zhou, W.; Yi, Y.; Kinyon, J. M.; Lei-Butters, D. C.; Griffin, A. M.; Naumann, P.; Luo, M.; Ascher, J.; Wang, K.; Frana, T.; Wine, J. J.; Meyerholz, D. K.; Engelhardt, J. F.: Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* **120**, 3149–3160 (2010).
76. Egan, M. E.: How useful are cystic fibrosis mouse models? *Drug Discov. Today Dis. Model.* **6**, 35–41 (2009).
77. Rogers, C. S.; Hao, Y.; Rokhlina, T.; Samuel, M.; Stoltz, D. A.; Li, Y.; Petroff, E.; Vermeer, D. W.; Kabel, A. C.; Yan, Z.; Spate, L.; Wax, D.; Murphy, N. C.; Rieke, A.; Whitworth, K.; Linville, M. L.; Korte, S. W.; Engelhardt, J. F.; Welsh, M. J.; Prather, R. S.: Production of CFTR-null and CFTR- Δ F508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. *J. Clin. Invest.* **118**, 1571–1577 (2008).
78. Feng, C.; Zhang, L.; Nguyen, Ch.; Vogel, N. S.; Goldblum, S. E.; Blackwelder, W. C.; Cross, A. S.: Neuraminidase Reprograms Lung Tissue and Potentiates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice. *J. Immunol.* **191**, 4828-4837 (2013).
79. Chi, E.; Mehl, T.; Nunn, D.; Lory, S.: Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. *Infect. Immun.* **59**, 822–8 (1991).
80. Pacholík, L.: *Diplomová práce*. PřF UK, Praha (2012).
81. Vašková, L.; Nosková, L.; Bláhová, B.; Wimmerová, M.; Dřevínek, P.; Kubíčková, B.; Stiborová, M.; Hodek, P.: Evaluation of anti-PAIIL lectin hen yolk antibody as an agent inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence to epithelial cells. *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* **147**, 889–896 (2016).
82. Hadrabová, J.: *Diplomová práce*. PřF UK, Praha (2015).

83. Kubíčková, B.; Hadrabová, J.; Vašková, L.; Mandys, V.; Stiborová, M.; Hodek, P.: Susceptibility of airways to *Pseudomonas aeruginosa* infection: mouse neuraminidase model. *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* **148**, 1993–2002 (2017).
84. Winzer, K.; Falconer, C.; Garber, N. C.; Diggle, S. P.; Camara, M.; Williams, P.: The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J. Bacteriol.* **182**, 6401-6411 (2000).
85. <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemiluminescent-westernblotting.html>. (duben 2019)
86. Scharfman, A.; Kroczyński, H.; Carnoy, C.; Brussel, V. E.; Lamblin, G.; Ramphal, R.; Roussel, P.: Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory mucins and expression of mucin-binding proteins are increased by limiting iron during growth. *Infect. Immun.* **64**, 5417-5420 (1996).

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

Jméno a příjmení Adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka