

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA BIOCHEMIE



Příprava a charakterizace protilátek proti peptidovým antigenům virulenčních faktorů bakterií

Bakalářská práce

Barbora Bláhová

Školitel: Doc. RNDr. Hodek, CSc.

Praha 2007

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

V Praze dne: 3.9.2007

Podpis: 

Obsah

Seznam použitých zkratk	1
1. Teoretický úvod	2
1.1. Cystická fibróza	2
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.3. Faktory patogenity a virulence	5
1.4. Bičík (Flagella)	6
1.5. Imunizace	7
1.6. Protilátky	8
1.6.1. Protilátky savčí	8
1.6.2. Protilátky ptačí	9
1.6.3. Výhody použití ptačích protilátek	10
2. Cíl práce	11
3. Materiál a metody	12
3.1. Izolace bičků <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frakční centrifugací	12
3.2. Elektroforéza	12
3.3. Příprava a purifikace protilátek IgY	13
3.3.1. Sběr vajec	13
3.3.2. Imunizace slepice	13
3.3.3. Purifikace protilátek	13
3.4. Určení koncentrace proteinů	14
3.5. ELISA	14
3.6. Western blotting	15
3.6.1. SDS-PAGE	16
3.6.2. BLOT	16
4. Výsledky	18
4.1. Příprava preparátu bičků a elektroforéza bičků	18
4.2. Příprava a charakterizace protilátek	19
4.2.1. ELISA	19
4.2.2. Western blotting	22
5. Diskuse	23
6. Souhrn	25
7. Použitá literatura	27

Seznam použitých zkratk

CF ... cystická fibróza

CFTR gen ... cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene

PA ... pseudomonas aeruginosa

OprF ... vnější membránový protein F

LPS ... lipopolysacharid

LD₅₀ ... letální dávka, při které nepřežije 50 % z pokusných zvířat

IgY ... slepičí imunoglobulin

IgG ... savčí imunoglobulin

RPM ... otáčky za minutu

SDS ... PAGE - elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného

ELISA ... enzyme-linked immuno sorbent assay

ÚLM UK 2.LF ... Ústav lékařské mikrobiologie Univerzity Karlovy 2. lékařské fakulty

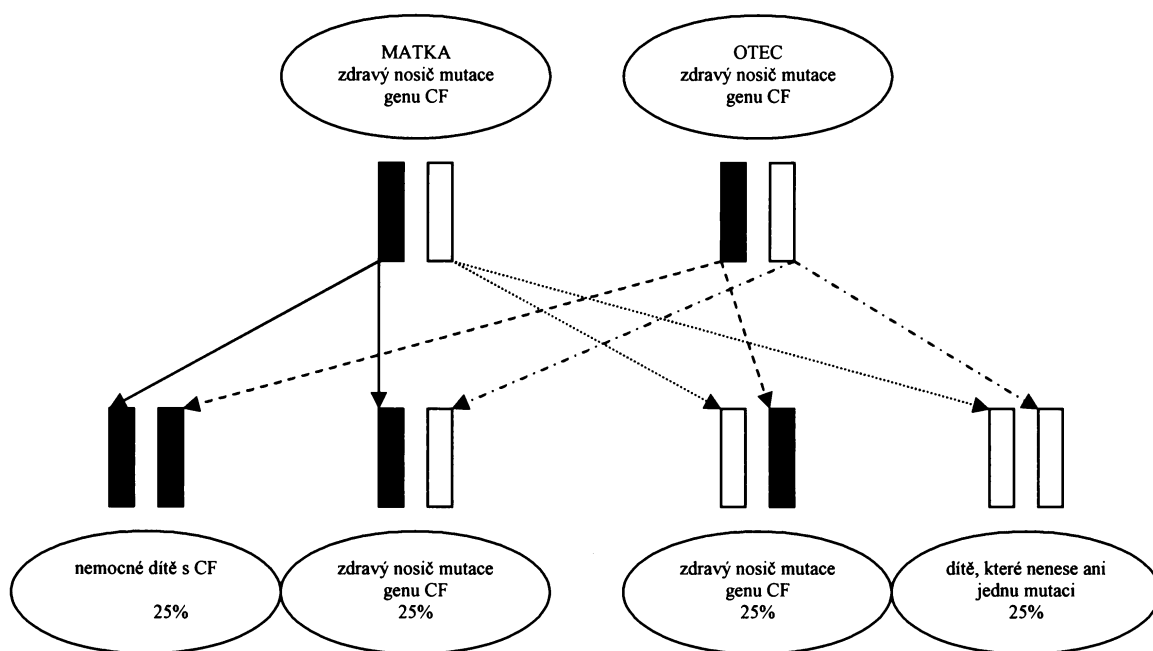
ÚŽFG AVČR ... Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky

PVDF membrána ... polyvinylidendifluoridová membrána

1. Teoretický úvod

1.1. Cystická fibróza

Cystická fibróza (dříve mukoviscidóza) je autozomálně recesivní vrozená choroba. Patologicky postihuje zejména dýchací cesty, plíce a pankreat, ale neméně postihuje i další části gastrointestinálního systému, kůži a pohlavní žlázy. Cystická fibróza (CF) je nejčastější smrtelnou geneticky podmíněnou chorobou u indoevropského obyvatelstva, vyskytuje se zde u jednoho z 2500 – 4000 narozených dětí. Každé 656. manželství může být tvořeno dvěma nosiči a má tedy 25% pravděpodobnost, že se narodí dítě postižené CF (viz.obrázek č. 1) [Jakubec, 2006].



Obrázek č. 1 : Dědičnost mutace CFTR genu z rodičů na děti

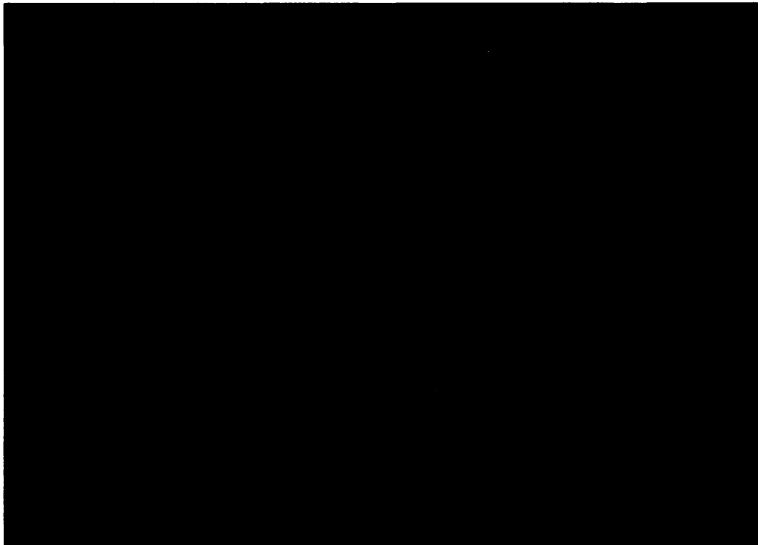
Zdroj: vlastní

Podstatou onemocnění CF je mutace genu pro transmembránový regulátor vodivosti iontů – CFTR gen (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene), jehož genovým produktem je CFTR protein. CFTR protein je chloridový kanál, který reguluje další chloridové a sodíkové kanály. Porucha funkce CFTR proteinu vede

k abnormálnímu transportu chloridových a sodíkových iontů buněčnou membránou, což zapříčiní například poškození obranných plicních mechanismů. Schopností zmutovaného CFTR je také změna sekreční funkce podslizničních žlázových buněk, čímž se mění viskozita hlenu a negativně ovlivňuje funkce mukociliárního čištění dýchacích cest [Vávrová a kol., 2006]. Mutovaný CFTR také usnadňuje vazbu oportunních mikroorganismů, například *Pseudomonas aeruginosa*, na povrch epiteliálních buněk sliznice. Bakterie se snáze obklopují hlenovou vrstvou a tvoří mukoidní formy, což znesnadňuje jejich likvidaci makrofágy. Dýchací cesty a plíce jsou tak ireverzibilně poškozovány rozvíjející se infekcí a perzistujícím zánětem. Právě poškození dýchacích cest a plic je nejvýznamnějším projevem cystické fibrózy a zapříčiňuje až z 90% úmrtnost pacientů s CF [Jakubec, 2006].

1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (obrázek č. 2), patřící do rodu *Pseudomonad*, je typickým představitelem nesporulujících gramnegativních bakterií. Je aerobní, anaerobně může přežívat pouze v přítomnosti nitrátů. *Pseudomonas aeruginosa* (*PA*) se snadno kultivuje na běžných půdách a je schopna růstu v poměrně velkém rozmezí teplot (20 - 42°C). Je odolná vůči běžně používaným desinfekcím a antibiotikům. Kolonie *PA* produkují charakteristické pigmenty (zelenomodrý pyocyanin a žlutozelený pyoverdin) a díky těkavým metabolitům (2-acetylanilin a trimethylamin) specificky zapáchají, podobně jako ovoce či květy jasmínu. *PA* se vyskytují ve třech růstových formách: R ("rough", drsná), S ("smooth", hladká) a M (mukoidní) [Julák, 2006].



Obrázek č. 2 : *Pseudomonas aeruginosa*
Zdroj: [Pseudomonas, 2007]

Pseudomonas aeruginosa je schopna infikovat jakýkoli lidský orgán či místo na povrchu těla. Je původcem obávaných nosokomiálních infekcí u dlouhodobě hospitalizovaných pacientů. Nejčastějším zdrojem nákazy bývají nesterilní terapeutické a diagnostické lékařské pomůcky. Infekce jsou rozšířeny zejména u pacientů s poruchami imunity, u diabetiků, pacientů po podávání imunosupresiv, kortikoidů a širokospektrých antibiotik. U pacientů s tělními popáleninami končí infekce *PA* často i smrtí. Výjimečně je *PA* schopna způsobit sepsi či nekrotizující pneumonii, v takových případech je mortalita pacientů také vysoká.

Avšak mezi nejvíce ohrožené jedince stále patří pacienti postižení cystickou fibrózou. Počáteční kolonizace je způsobena nemukoidními typy *PA*, poměrně dobře reagujícími na léčbu antibiotiky. Při pozdní či nedostatečné léčbě antibiotiky se nemukoidní typy rychle přemění na mukoidní, produkující velké množství exopolysacharidu alginátu. Alginát vytváří kolem mikrokolonií neprostupný biofilm, který je hlavním důvodem rezistence *PA*. Chronická kolonizace pacientů je definována jako přítomnost bakterie v dýchacích cestách po dobu minimálně 6 měsíců, kdy bývá přítomen zánět nebo specifická protilátková odpověď [Vávrová a kol., 2006]. Chronická infekce je u pacientů s CF jednoznačně zodpovědná za zhoršování klinického stavu, funkce plic a celkové prognózy.

1.3. Faktory patogenity a virulence

Pseudomonas aeruginosa je velmi významným patogenem a je známa svým velkým počtem virulenčních faktorů, svou invazivitou a toxicitou.

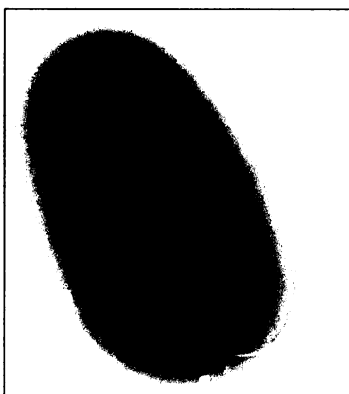
Invazivita je schopnost mikroorganismu vstoupit do hostitele, nasednout na jeho povrch, množit se a pronikat do vnitřního prostředí, dále se množit ve vnitřním prostředí hostitele, šířit se uvnitř a překonávat hostitelovy obranné mechanismy. Adherence (schopnost přilnout) je vyvinuta u všech patogenů, buď pomocí speciálních struktur na povrchu bakterie (pili, flagella) nebo pomocí zvláštních bílkovin (nefibriální adhesiny) [Votava, 2005]. U *PA* jsou jako aderenční faktory považovány bičíky, pili, exoenzym S, vnější membránové proteiny (OprF) a alginátový obal mukoidních mikrokolonií. Průnik do vnitřního prostředí probíhá nejčastěji fagocytickým pohlcením mikroba, který pak odolá intracelulární likvidaci. Povrchové bakteriální proteiny, odpovídající za průnik bakterie od buňky se nazývají invaziny. Typické invaziny pro *PA* jsou elastasa, alkalická proteasa, fosfolipasa, lecitinasa, cytotoxin, siderofory či pyocyanin.

Toxicita je schopnost mikroba poškozovat svého hostitele. Poškození může vznikat dvěma způsoby, buď přímým účinkem infekčního agens nebo reakcí hostitele na toto agens. Nejčastější příčinou poškození je vliv mikrobiálních toxinů. Toxiny se dělí klasicky na exotoxiny (toxické bakteriální proteiny) a endotoxiny, které jsou součástí buněčné stěny a do okolí se uvolní až po zániku bakterie. Mezi exotoxiny *Pseudomonas aeruginosa* patří exoenzym S a exotoxin A, typickým endotoxinem *PA* je lipopolysacharid (LPS).

Znalosti virulenčních faktorů bakterie, zvláště pak aderenčních schopností, je možno využít pro vytipování antigenů pro imunizaci pacientů. Pokud by se totiž podařilo předejít adhezenci bakterií *PA*, nedošlo by k chronické infekci a snad ani k předčasné mortalitě pacientů s CF. V praktické části své bakalářské práce jsem se věnovala přípravě protilátek pro pasivní imunizaci proti jednomu z aderenčních faktorů – bičíku.

1.4. Bičík (Flagella)

Schopnost bakterie *PA* adherovat na epiteliální buňky tkáně je první a velmi důležitý předpoklad k rozvoji bakteriální infekce a následné kolonizace hostitele. Ideálně by tedy bylo možné zablokováním důležitých adhezenčních faktorů kolonizaci a chronické infekci zabránit. Jedním z vytypovaných antigenů, který je spojen s adhezní schopností, je bičík neboli flagella (obrázek č. 3).



Obrázek č. 3 : *Pseudomonas aeruginosa* s bičíkem
Zdroj: [Hanover, 2007]

Bičík bakterie využívá k pohybu a chemotaxi. Je to komplexní struktura a je velmi důležitá k úspěšnému životu bakterie. U bakterií, kterým se bičík nevyvinul, byla prokázána snížená schopnost tvorby biofilmu [Yoon a kol., 2002]. Bakterie bez vyvinutého bičíku mají až o 78 % sníženou schopnost adherence, bakterie postrádající kromě bičíku zároveň i pili dokonce 95 % redukci adherence [Feldman a kol., 1998].

Podle strukturních analýz byly určeny dva typy bičíků [Feldman a kol., 1998] :

Typ a – heterogenní s 45 – 52 kDa

Typ b – homogenní s 53 kDa

Mezi kmeny *PA* je bičík velmi konzervovaná struktura, existují nejspíše jen 2 druhy bičíků, které mají odlišné imunogenní struktury [Holder, 2004]. Právě díky virulenčním a adhezenčním vlastnostem a pro svou značnou konzervovanost mezi kmeny *PA* je bičík vhodným cílem pro vývoj imunizačních vakcín.

Testů na potvrzení virulence bičíku bylo již prováděno mnoho. Jedním takovým byl test na myších s popáleninami - myši byly aktivně imunizovány celým bičíkem a pasivně králičími protilátkami proti bičíku. Oba způsoby imunizace byly shledány jako

dostatečně účinné. Monoklonální specifické protilátky proti oběma typům bičíku zabezpečují ochranu proti letální dávce *PA*. Myši, které byly imunizované monoklonálními protilátkami proti bičíku dostaly po 1 až 2 hodinách desetkrát vyšší dávku bakterií než je LD₅₀. Imunizované myši přežily na rozdíl od kontrolní neimunizované skupiny, kde přežilo pouhých 20 % [Rosok a kol., 1990].

Další pokusy prováděné s bičíky jsou shrnuty v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 : Přehled použití flagelly pro imunizaci

imunogen	efekt imunizace
purifikovaná flagella (A)	vyšší přežití dle specifického flagelárního antigenu; rovnoměrně vyšší přežití při použití divalentní imunizace (myši s popáleninami)
částečně purifikovaná flagella (A)	specifická in vitro inhibice pohybu dle flagelárního antigenu při použití protilátky proti flagelle
velmi purifikovaná flagella (A, P); (myši s popáleninami nebo opárené)	specifická in vitro inhibice pohybu dle flagelárního antigenu při použití protilátky proti flagelle; vyšší přežití dle specifického flagelárního antigenu
monoklonální protilátky proti částečně purifikované flagelle	specifická in vitro inhibice pohybu dle flagelárního antigenu při použití protilátky proti flagelle; vyšší přežití dle specifického flagelárního antigenu (myši s popáleninami)

Poznámka: A – aktivní imunizace, P – pasivní imunizace

Zdroj: [Holder, 2004]- převzato a upraveno

1.5. Imunizace

Imunizace je proces, který vede k navození imunity. Běžně k aktivní imunizaci dochází po prodělání infekce přirozenou cestou. Při transplacentárním přestupu protilátek z matčina těla do plodu jde též o imunizaci přirozenou, ale pasivní. Imunitu lze však navodit i umělou imunizací, jenž umožňuje oslabeným jedincům získat specifickou imunitu proti určitému agens. Pokud imunizaci používáme jako prevenci, imunizujeme aktivně (očkovaním) a imunizovaný jedinec si pak vytváří imunitu sám. Pokud imunizací chceme ochránit osoby bezprostředně ohrožené nebo již postižené nákazou, používáme imunizaci pasivní, kdy je jedinec pasivním příjemcem již hotových protilátek (antisér) [Greenwood a kol., 1999].

Pro použití aktivní imunizace proti patogennímu organismu je třeba splnit určité předpoklady, například nalézt dostatečně specifický antigen pro daný organismus, který je zároveň dostatečně imunogenní (tvoří se proti němu protilátky v dostatečně vysoké

koncentraci). Antigen musí být pro lidský organismus netoxický a riziková aktivně imunizovaná skupina musí mít na tento antigen silnou imunitní odpověď. Pokud nejsou tyto základní podmínky dostatečně splněny, je vhodné použít pasivní imunizaci, která může sloužit i jako podpůrný léčebný prostředek.

V dnešní době jsou pacienti s chronickou infekcí *PA* léčeni celou řadou antibiotik, která jsou schopná infekci udržet delší dobu pod kontrolou, a pacientům se tak prodlouží doba života. Vyléčit chronickou infekci se však ještě nezdařilo. Dlouhodobé podávání antibiotik také velmi zatěžuje pacientův organismus a hrozí, že bakterie *PA* si proti podávaným antibiotikům vytvoří rezistenci. Výhoda použití protilátek namísto antibiotik spočívá v tom, že si bakterie proti protilátkám rezistenci vytvořit nedokáže. Účinná preventivní imunizace pacientů ohrožených touto chronickou infekcí by proto byla nejlepším východiskem.

1.6. Protilátky

1.6.1. Protilátky savčí

U savců je ochrana potomstva zajištěna v časném postnatálním období pasivní imunizací, a to přenosem protilátek do kolostra. Po narození mláďate je další přísun protilátek, které jsou nezbytné pro neutralizaci patogenů v trávicím traktu, zajištěn z mateřského mléka.

Protilátky jsou složeny ze čtyř polypeptidových řetězců, dvou těžkých H ("heavy") a dvou lehkých L ("light"), které jsou spojené hydrofobními silami a disulfidovými můstky do tvaru písmene Y. Těžké řetězce existují v pěti strukturálních a antigenních typech, pojmenovaných písmeny řecké abecedy jako γ , μ , α , δ a ϵ , lehké řetězce v typech κ a λ . Podle typů těžkých řetězců rozdělujeme imunoglobuliny do pěti tříd: IgG, IgM, IgA, IgD a IgE. Jednotlivé vlastnosti jsou uvedeny v tabulce č. 2. Každý imunoglobulin má jen jeden typ lehkých řetězců, buď κ nebo λ . Lehké řetězce jsou složeny ze dvou tzv. domén (V_L a C_L) a těžké z čtyř až pěti domén (V_H , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , eventuelně C_{H4}). Většina domén má konstantní aminokyselinové složení (C), ale složení koncové domény na aminotermálním konci řetězců je variabilní (V). Protilátky proti různým antigenům se liší právě touto V doménou. V_H a V_L spolu sousedí tak, že

jejich variabilní úseky spolu souvisí a tvoří vazebné místo protilátky, které si lze představit jako komplementární obraz antigenní determinanty [Votava, 2005].

Tabulka č. 2 : Vlastnosti jednotlivých tříd imunoglobulinů

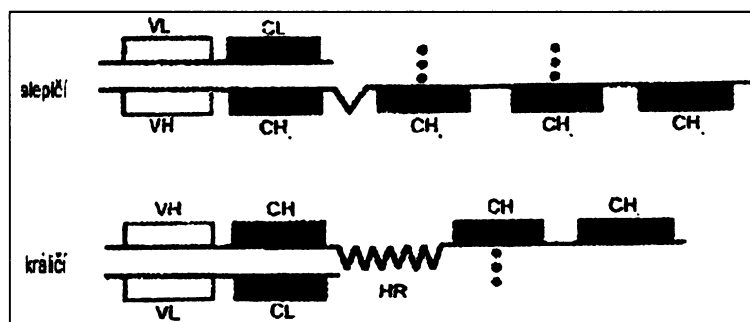
imunoglobulin	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
hlavní význam	opsonizace, neutralizace	likvidace bakteriémie	ochrana sliznic	obrana proti parazitům, alergické stavy	?
hlavní místo účinku	sérum	sérum	sekrety	žírné buňky	lymfocyty
klasická vazba komplementu	++	++++	-	-	-
přestup přes placentu	++	-	-	-	-

Zdroj: [Votava, 2005]

1.6.2. Protilátky ptačí (slepičí)

Ptáci zajišťují ochranu potomstva sekrecí protilátek do vajíčka. Imunoglobuliny odpovídající IgG savců jsou sekretovány do žloutku, IgA a IgM s dalšími proteiny jsou přenášeny do bílku. Koncentrace IgG ve žloutku je asi 1,3 – 1,9 x větší než v krvi slepice [Sunwoo a spol., 1996]. Po vylíhnutí přechází IgG do krve a IgA a IgM plní funkci pasivní imunizace v trávicím traktu kuřete.

Narozdíl od savců byly u ptáků nalezeny jen tři třídy imunoglobulinů – IgG, IgA a IgM. Ptačí IgG má však rozdílnou stavbu oproti savčímu. Ptačí IgG má čtyři konstantní domény, zatímco savčí jen tři a u ptačího IgG chybí pantová oblast. Proto bylo navrženo označení ptačích IgG jako IgY (z angl. yolk - žloutek). Rozdíl mezi ptačími a savčími imunoglobuliny ukazuje obrázek č. 4.



Obrázek č. 4 : Rozdíl mezi slepičím a králičím imunoglobulinem

Zdroj: [Oramune, 2007]

1.6.3. Výhody použití ptačích protilátek

Produkce a izolace protilátek z vajec je etičtější, než u savců. Imunizované slepici se jen odebere vajíčko, zatímco u savců je nutný odběr krve nebo srdeční punkce vedoucí ke smrti zvířete. Další výhodou je až 30x větší výtěžek slepičích imunoglobulinů IgY oproti zisku protilátek z krve králíka [Hatta a spol., 1993]. Koncentrace IgY ve vaječném žloutku je sice menší než v krvi savců, slepice však za rok vyprodukuje až 25 g protilátek, neboť vejce obsahuje 70 – 150 mg IgY a je snášeno slepicí téměř denně. Na stejné množství protilátek by bylo třeba krve až z 30 králíků. Slepice, vzhledem k fylogenetické vzdálenosti, reaguje mnohem silněji na aplikovaný savčí antigen, který u králíka imunitní odpověď třeba vůbec nevyvolá. Slepíčí protilátky nereagují s rheumatoidním faktorem a systémem komplementů savců, čímž lze předejít falešným pozitivním výsledkům, které při použití savčích protilátek vznikají [Ntakarutimana a spol., 1992]. Savčí protilátky mohou po navázání na antigen vyvolat aktivaci komplementu, což může v těle vyvolat zánětlivou reakci [Hořejší a kol., 2002]. Takový zánět by například pacientům s CF mohlo značně přitížit, proto je v našem případě vhodné použít protilátky slepičí, které tyto nežádoucí účinky nevyvolávají. V dnešní době se slepičí protilátky pro své výhody stávají velmi oblíbenou alternativou k protilátkám savčím.

2. Cíl práce

Cílem této práce bylo vytvořit teoretický přehled týkající se problematiky kolonizace pacientů s cystickou fibrózou bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a možností ochrany pacientů proti této bakteriální infekci. V této souvislosti připravit izolovanou frakci bičíků *Pseudomonas aeruginosa* a následně získat protilátky proti těmto antigenům z vajec imunizované slepice, jako prostředek pasivní imunizace. U izolovaných protilátek pak ověřit specifitu metodami ELISA a Western blotting.

3. Materiál a metody

3.1. Izolace bičků *Pseudomonas aeruginosa* frakční centrifugací

Vzorek bakterií *PA* (sbírkový kmen) byl získán z ÚLM UK 2.LF a nakultivován v suspenční kultuře v ÚŽFG AVČR. Bakterie v exponenciální fázi růstu byly sedimentovány s uchovány PBS – ELISA (13 mM NaCl, 1,8 mM Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 0,4 mM NaH₂PO₄ x 2 H₂O, pH = 7,2), přibližné množství bylo 15 ml.

Vzorek byl v kádince na magnetické míchače promíchán s 180 ml PBS - ELISA. Po promíchání byl mixován po dobu 1 minuty s přestávkami po patnácti sekundách v mixeru (zn. ETA) a centrifugován v centrifuze K24 Janetzki 20 minut při 13 000 RPM (rotor 6 x 65 ml). Supernatant byl přelit do kyvetek pro ultracentrifugu Ti 45 Beckman a centrifugován při 45 000 RPM (rotor 6 x 70 ml). Sediment byl rozsuspendován v 400 µl PBS – ELISA a uchován při -20°C (vzorek bičků č. 1).

Zbýlý sediment v kyvetách pro centrifugu K24 Janetzki byl znovu rozsuspendován v PBS - ELISA, poté mixován nepřetržitě 2 minuty a dále zpracován jako vzorek č. 1. Sediment byl rozsuspendován v 400 µl PBS – ELISA a uchován při -20°C (vzorek bičků č. 2)

3.2. Elektroforéza

Metodou SDS – PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného) bylo třeba ověřit, zda se v subbuněčných frakcích *PA* nachází flagelin, protein bičků s předpokládanou Mr = 55 000.

Do aparatury na elektroforézu byl nanesen polymerizační roztok pro 8% gel A a byl převrstven destilovanou vodou. Po půl hodině byla destilovaná voda odlita a nanesen 3% gel B. Do aparatury byl vložen hřeben. Po vytvoření gelu byl hřeben vyjmut, čímž vznikly požadované komůrky pro jednotlivé dráhy. Ze vzorků bičků č. 1 a 2 bylo odebráno 20 µl a smícháno s vzorkovacím pufrem (0,063 M TRIS-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 0,003% bromfenolová modř, 5% merkaptoethanol) v poměru 1:1. Z takto připravených elektroforetických vzorků bylo 20 µl pipetováno do jamek v gelu.

Do další jamky byl nanesen standard molekulových hmotností. Aparatura byla zapojena do zdroje elektrického proudu a ponechána 2 hodiny při napětí 150 V. Po 2 hodinách byla elektroforéza zastavena a gel byl přenesen do roztoku Coomassie Brilliant Blue R 250, kde byl ponechán do té doby, než byly na gelu dobře patrné vybarvené zóny. Poté byl gel odbarven v odbarvovacím roztoku (kyselina octová, ethanol, destilovaná voda) a usušen při laboratorní teplotě mezi filtračními papíry.

3.3. Příprava a purifikace protilátek IgY

3.3.1. Sběr vajec

Slepice byla chována v separátní kleci za řízeného světelného režimu. Vejce byla sbírána každý den a skladována v lednici při 8°C. Před první imunizační dávkou byla odebrána kontrolní vejce pro stanovení bazální hladiny protilátek.

3.3.2. Imunizace slepice

Slepice byla imunizována na zakázku třemi dávkami připraveným bakteriálním antigenem – subbuněčnou frakcí *PA* nabohacenou o bičíky (vzorek č. 1) .

3.3.3. Purifikace protilátek

Frakce protilátek byly připraveny z 2-8 vajec. Žloutky byly pomocí separátorku odděleny a pod tekoucí vodou dokonale očištěny od proteinů bílku. Žloutky byly přeneseny přes nálevku do polyethylenového válce a po odečtení objemu byly zředěny 8 násobným množstvím destilované vody. Směs byla homogenizována na magnetické míchačce. Poté bylo sníženo pH roztoku na 5,0 – 5,2 přidávkem 0,5 M HCl. Homogenát byl přenesen do uzavřené skleněné nálevky a zmražen při -20°C. Po rozmražení byl homogenát přefiltrován přes filtrační papír v nálevce do většího odměrného válce. K získanému filtrátu byl přidán NaCl tak, aby vznikl 8,76% (w/v) roztok. Hodnota pH byla upravena na 4,0 0,5M HCl, roztok byl míchán na magnetické míchačce 30 minut a poté ponechán v klidu precipitovat 2 hodiny [Hodek a spol.,

1996]. Poté byla suspenze centrifugována v centrifuze Janetzki K70D (výkyvný rotor 4 x 750 ml) 25 minut při 3 500 RPM. Sediment byl rozpuštěn v PBS + azid (PBS s obsahem 0,1 % (w/v) azidu sodného). Roztok IgY frakce byl přenesen do skleněné lahvičky a skladován při 8 °C.

3.4. Určení koncentrace proteinů

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

$$\text{konc.} = A_{280} \cdot f$$

$$f \text{ ... empirický faktor} \quad f = 1,094$$

3.5. ELISA

ELISA z angl. enzyme-linked immuno sorbent assay, je imunochemická metoda používaná ke kvantitativnímu stanovení různých antigenů. Metoda je založena na vysoce specifické interakci antigenu a protilátky, přičemž antigen je zakotven na nosiči. Nejprve se tvoří komplex antigen-protilátka, poté se na protilátku váže sekundární protilátka s kovalentně vázaným enzymem (nejčastěji alkalická fosfatasa). Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán do reakční směsi, na barevný produkt. Při tomto provedení je koncentrace produktu úměrná koncentraci protilátky ve vzorku.

Jako antigen byly použity izolované bičíky bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (vzorek č.1). Antigen byl naředěn imobilizačním pufrem (13 mM Na₂CO₃, 25 mM NaHCO₃, pH = 9,6) na koncentraci 4 µg/ml a nanesen po 100 µl do každé jamky mikrotitrační desky. Deska byla inkubována minimálně 12 hodin v lednici při 8 °C.

Po inkubaci byla deska vyklepána a čtyřikrát promyta 250 µl promývacího roztoku (PBS s obsahem 0,1% (w/v) Tween 20). Pak byla deska inkubována s 150 µl blokovacího roztoku (2% (w/v) řídký bílek v PBS-Tween 20) v termostatu při 37°C po

dobu jedné hodiny. Po odstranění obsahu jamek vyklepnutím byla deska opět čtyřikrát promyta 250 μ l PBS-Tween 20.

Protilátky byly naředěny na koncentraci 90, 30, 10 a 3,3 μ g/ml roztokem PBS-ELISA (13 mM NaCl, 1,8 mM Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 0,4 mM NaH₂PO₄ x 2 H₂O, pH = 7,2) a nanoseny po 100 μ l do jamek. Mikrotitrační deska byla inkubována 2 hodiny při 37 °C. Po odstranění obsahu jamek vyklepnutím a dalším důkladným vymytí čtyřikrát PBS-Tween 20 bylo do jamek napipetováno 100 μ l sekundární protilátky (konjugát králičí IgG proti slepičím IgY s navázanou alkalickou fosfátasou) naředěné pufrům PBS-ELISA v poměru 1:1500. Deska byla inkubována 1 hodinu při 37 °C. Poté byla deska vyklepána a opět promyta čtyřikrát PBS-Tween 20. Do jamek bylo následně aplikováno 100 μ l vyvolávacího roztoku (0,2 M NaHCO₃, 0,2 M Na₂CO₃, 1 M MgCl₂, 0,1% (w/v) 4-nitrofenylfosfát). Deska byla inkubována 10 minut a následně byla vyvolávací reakce zastavena 50 μ l 3 M NaOH. Nakonec byla změřena absorbance při 405 nm na čtečce (Tecan Sunrise).

3.6. Western blotting

Western blotting je metoda založená na bázi elektroforézy, elektropřenosu a enzymatické detekci specifické protilátky. První částí je SDS-PAGE, kdy je antigen nanesen do polyakrylamidového gelu a separován v elektrickém poli dle molekulární hmotnosti proteinů antigenu. Gel se poté vyjme z elektroforetické aparatury a přenesse se na PVDF (polyvinylidendifluoridovou) membránu. Na blokovacím zařízení dojde k přeblotování proteinů z gelu do membrány. Poté se membrána nastříhá na jednotlivé proužky a každý se nechá inkubovat v Petriho miskách s testovanými protilátkami. Po promytí se přidávají protilátky proti druhově specifickým protilátkám značené enzymem a po dalším promytí se přidává substrát. Zóny, na které se navázaly specifické protilátky se obarví. Vybarvená membrána je poté vyhodnocována pomocí srovnání se standardy.

3.6.1. SDS-PAGE

Elektroforéza byla provedena stejným způsobem jako ke uvedeno na str. 12. Vzorky byly do jamek nanесeny po 20 μ l v pořadí: standard molekulových hmotností - Sigma Wide Molecular Weight Range (M 4038), vzorkový pufr s destilovanou vodou v poměru 1:1, vzorek bičičků č. 1, opět vzorek bičičků č. 1 a vzorek bičičků č. 2.

3.6.2. BLOT

Byl sestaven "sandwich" pro přenos bílkovin z gelu na membránu v následujícím pořadí (od anodové desky): tři archy papíru Whatmann 3 pro blotting navlhčené v transferovém pufru (25 mM TRIS, 192mM glycin, 20% methanol, destilovaná voda), PVDF (polyvinylidendifluoridová) membrána navlhčená nejprve v methanolu, vodě a nakonec v transferovém pufru, gel z elektroforézy navlhčený v transferovém pufru a opět tři archy papíru pro blotting namočené v transferovém pufru. Poté byly skleněnou tyčinkou vytlačeny bublinky a aparatura byla zapojena na 10 minut při 104 mA (vypočteno na plochu tak, aby bylo 0,8 mA na cm^2) a poté na 45 minut při 260 mA (vypočteno na plochu, tak aby bylo 2 mA na cm^2).

Po uplynutí dané doby byl sandwich opatrně rozebrán, gel byl vložen do Coomassie Brilliant Blue R 250 na 20 minut a poté do odbarvovací lázně (kyselina octová, ethanol, destilovaná voda), z membrány byl odstříhnut proužek se standardem a vložen na 5 sekund do Coomassie Brilliant Blue R 250 a poté do odbarvovací lázně. Zbytek membrány byl vložen do reverzibilní červeně (0,5 % Panceau v 1 % kyselině octové) na 20 sekund, poté se nechal odbarvit ve vodě.

Po odbarvení byla membrána označena tužkou na proužky, podle kterých byla poté dělena a byla min. 12 hodin inkubována v roztoku PBS-TRITON X100 (PBS s obsahem 0,05% TRITON X100) + 5% sušené mléko (Laktino - Promil).

Po inkubaci byl připraven do dvou Petriho misek roztok 10 ml PBS-TRITON X100 + 5% sušené mléko s protilátkami K1 (negativní kontrola), 4 (vzorek s největší koncentrací protilátek podle ELISA testu) v koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$. Membrána byla rozdělena a jednotlivé části vloženy do příslušných roztoků s protilátkami, kde byly za míchání ponechány dvě hodiny. Poté byly části membrány třikrát za sebou vymyty

PBS-TRITON X100 + 5% sušené mléko po dobu 15 minut. Po důkladném promytí byly části membrány společně vloženy do roztoku 40 ml PBS-TRITON X100 + 5% sušené mléko s králičí protilátkou (konjugát králičí IgG proti slepičím IgY s navázanou alkalickou fosfatasou) v poměru 1:4000 a ponechány jednu hodinu inkubovat v Petriho misce. Následně byly membrány promyty dvakrát v PBS-TRITON X100 + 5% sušené mléko a poté třikrát jen v PBS-TRITON X100.

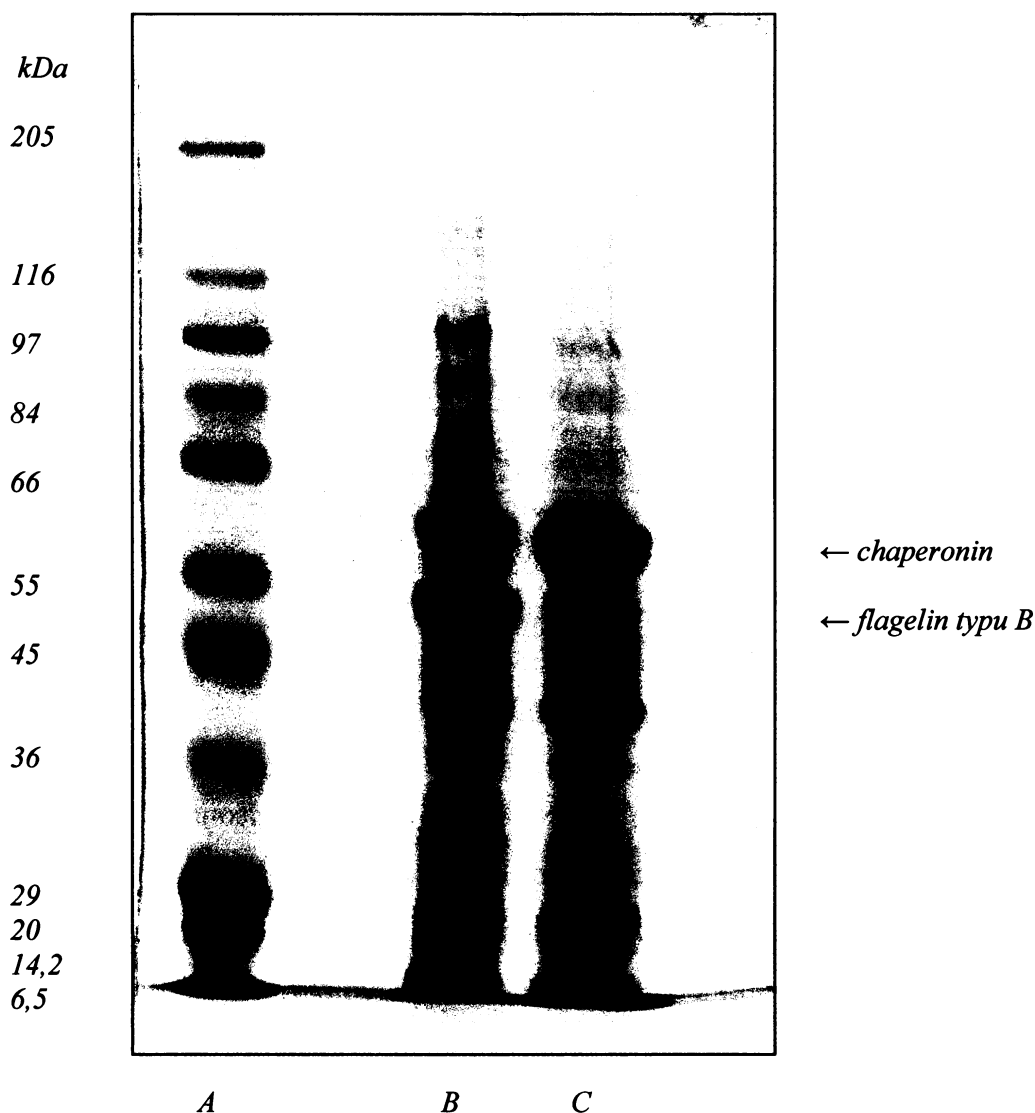
Do dvou Petriho misek byly připraveny 3 ml roztoku obsahujícího substrát pro alkalickou fosfatasu tak, že tableta BCIP/NBT SIGMA FAST™ byla rozpuštěna v 10 ml destilované vody. Membrány se v roztoku nechaly inkubovat do vybarvení, přibližně 6 minut. Poté byly membrány přeneseny do destilované vody a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

4. Výsledky

4.1. Příprava preparátu bičků a elektroforéza bičků

Metodou frakční centrifugace byly připraveny dva preparáty bičků: vzorek č. 1 (jedenkrát mixován, jedenkrát centrifugován v K24) a vzorek č. 2 (sediment z první centrifugace vzorku č. 1 byl znovu rozpuštěn a podruhé mixován i centrifugován). Oba vzorky byly po centrifugaci v centrifuze Ti 45 Beckman rozsuspendovány v 400 μ l PBS – ELISA.

Metodou SDS – PAGE byly srovnány vzorky izolovaných bičků č. 1 a 2 se standardem molekulových hmotností – Sigma Wide Molecular Weight Range (M 4038), který má rozpětí molekulových hmotností od 6 500 do 205 000 daltonů.



Obrázek č. 5 : Elektroforéza bičků: A – standard molekulových hmotností, B – vzorek bičků č. 1, C – vzorek bičků č. 2

4.2. Příprava a charakterizace protilátek

Z vajec získaných před imunizací byla izolována kontrolní frakce protilátek. Poté byla slepice imunizována třemi dávkami antigenu 31.10., 7.11. a 14.11. 2006. Celkem bylo získáno 85 vajec vhodných pro izolaci IgY. Vejce byly rozděleny do frakcí podle tabulky č. 3. Z každé frakce byly izolovány IgY, změřena absorbance při 280 nm a určena koncentrace IgY.

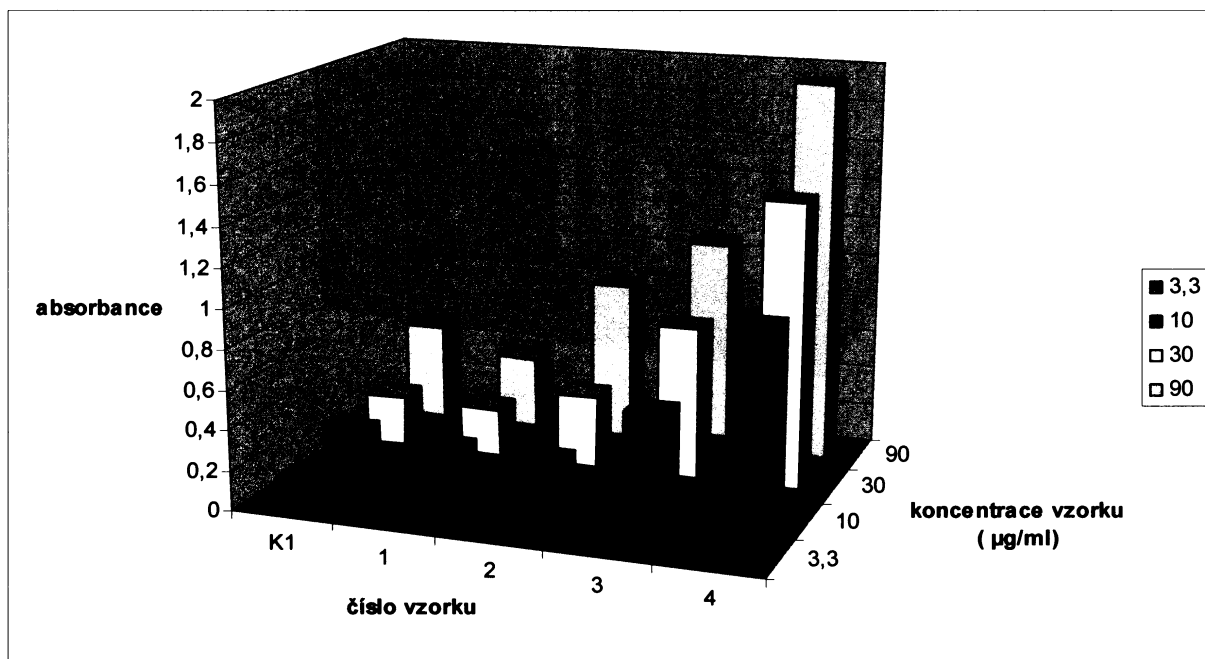
Tabulka č. 3.: Izolované frakce protilátek

frakce	datum sběru vajec	počet vajec	koncentrace IgY (mg/ml)
K1	18.10. - 24.10.2006	7	16,7
1	31.10. - 5.11.2006	6	12,2
2	6.11. - 10.11.2006	4	10,7
3	11.11. - 16.11.2006	3	10,5
4	3.1. - 4.1.2007	2	7,3
5	1.2. - 8.2.2007	5	18,7
6	9.2. - 13.2.2007	5	16,5
7	14.2. - 28.2.2007	8	16,9
8	29.2. - 5.3.2007	7	21,0
9	6.3. - 13.3.2007	7	19,7
10	14.3. - 20.3.2007	7	13,4
11	22.3. - 29.3.2007	7	13,8
12	7.4. - 17.4.2007	7	32,8
13	20.4. - 25.4.2007	5	33,7
14	27.7. - 5.5.2007	5	31,1

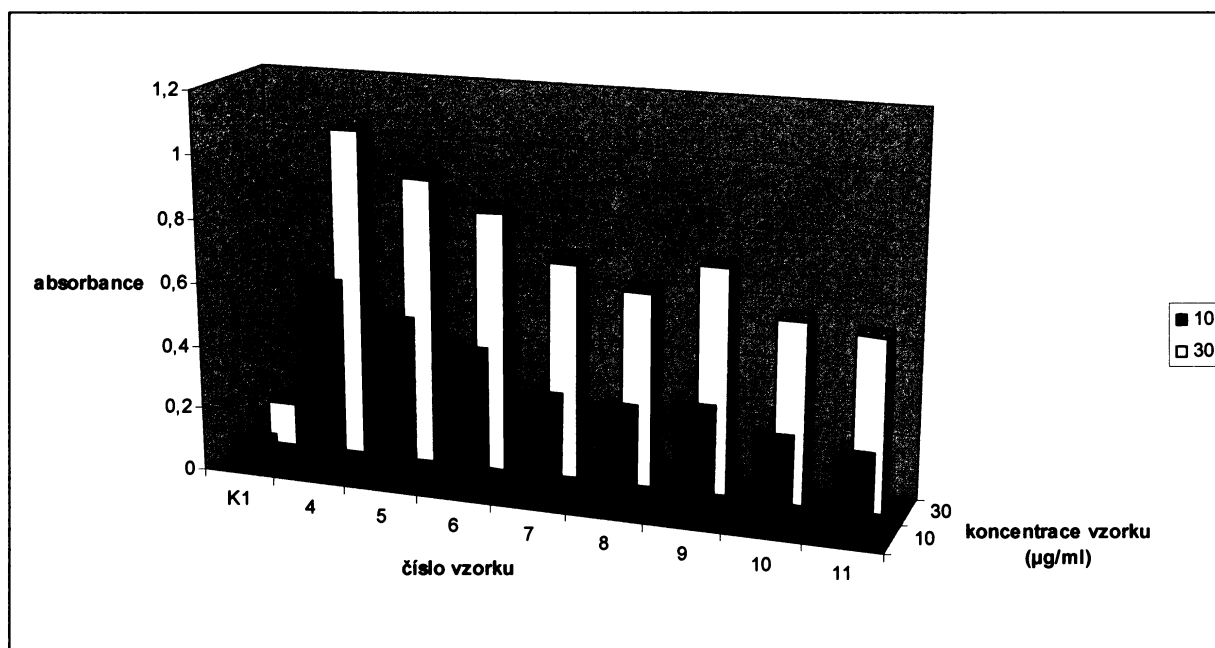
4.2.1. ELISA

Přítomnost specifické protilátky IgY v izolovaných frakcích 1 – 14 byla detekována metodou ELISA. U ELISA č. 1 a ELISA č. 3 bylo použito ředění na koncentraci 90, 30, 10, a 3,3 µg/ml a u ELISA č. 2 ředění na koncentraci 30 a 10 µg/ml. Jako negativní kontrola byla použita K1 – frakce z vajec před imunizací. U ELISY č. 2 a č. 3 byla pro srovnání použita jako pozitivní kontrola frakce č. 4 – frakce s největší koncentrací protilátek podle testu ELISA č. 1. Sledování koncentrací jednotlivých

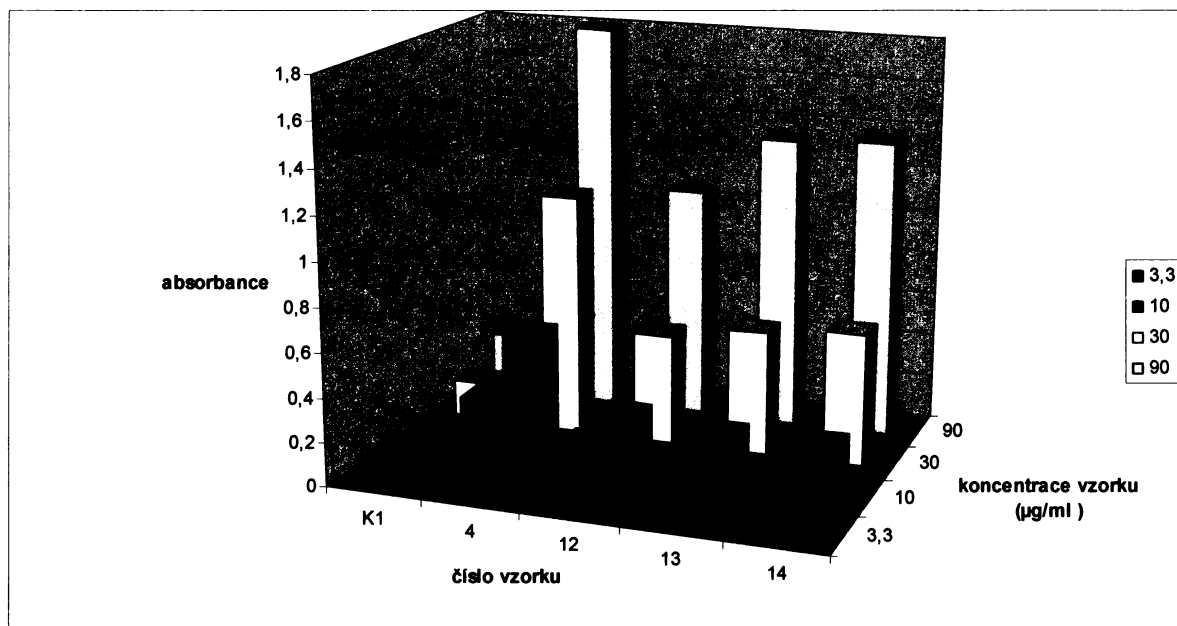
frakcí ukazují grafy na obrázcích č. 6, 7 a 8. Na obrázku č. 9 byla na ukázkou zdokumentována ELISA č. 1.



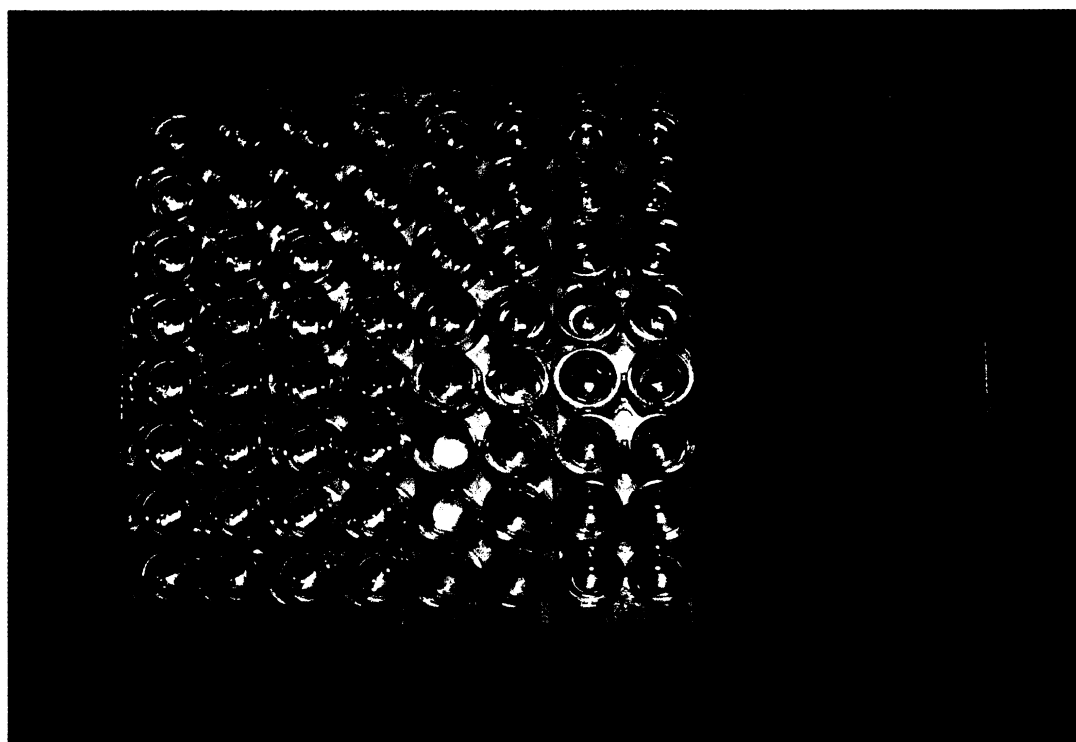
Obrázek č. 6: Sledování koncentrace specifických IgY – ELISA č. 1



Obrázek č. 7: Sledování koncentrace specifických IgY – ELISA č. 2



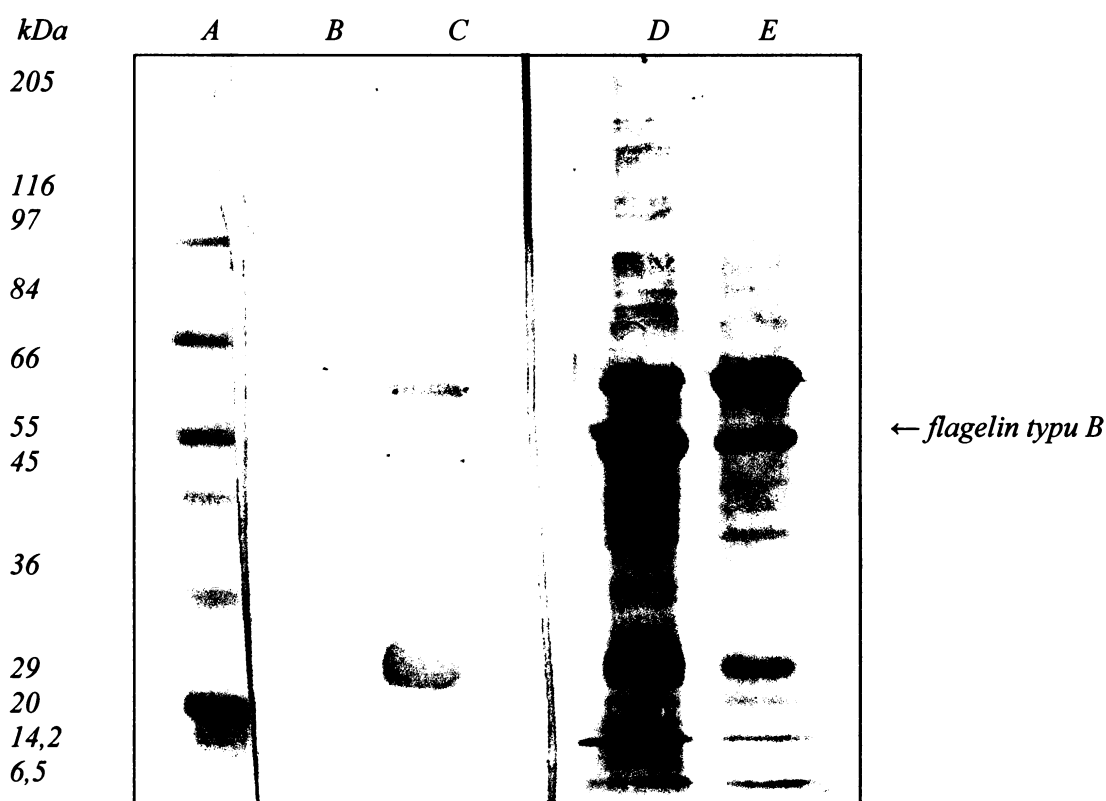
Obrázek č. 8: Sledování koncentrace specifických IgY – ELISA č. 3



Obrázek č. 9: Ukázka výsledku ELISA testu - ELISA č.1
Zdroj: vlastní, foto: Doc. Hodek

4.2.2. Western blotting

Jak je patrné z obrázku č. 10, přenos proteinů z gelu na blotovací membránu se zdařil a zóny nanášených vzorků byly porovnány se standardem molekulových hmotností - Sigma Wide Molecular Weight Range (M 4038), který má rozpětí molekulových hmotností od 6 500 do 205 000 daltonů



Obrázek č. 10: Western blotting bičičků s protilátkami

A : standard molekulových hmotností, *B* : vzorkovací pufr + destilovaná voda 1:1, protilátka - kontrola K1, *C* : bičičky č. 1, protilátka - kontrola K1, *D* : bičičky č. 1, protilátka - vzorek č. 4, *E* : bičičky č. 2, protilátka - vzorek č. 4

Na obrázku č. 10 byla u drah B (vzorkovací pufr + destilovaná voda v poměru 1:1) a C (vzorek bičičků č. 1) použita protilátková frakce K1, tedy negativní kontrola neobsahující protilátky proti bičičkům. U drah D (vzorek bičičků č. 1) a E (vzorek bičičků č. 2) byla použita protilátková frakce č. 4, tedy frakce která podle ELISA testu obsahovala nejvíce protilátek proti bičičkům.

5. Diskuse

Jak bylo zmíněno v teoretickém úvodu, u lidí postižených geneticky podmíněnou nemocí cystickou fibrózou je mortalita nejčastěji způsobena chronickou infekcí v plicích, zapříčiněnou kolonizací bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. Účinný lék, který by této kolonizaci a následné infekci zabránil doposud nebyl nalezen. Nejúčinnějším řešením, jak infekci oddálit je zatím dlouhodobé podávání antibiotik, na které se ale bakterie stává rezistentní. Možným způsobem, jak předejít kolonizaci bakterií by mohla být pasivní imunizace pacientů proti *pseudomonadové* infekci. Výhodou imunizace protilátkami oproti používání antibiotik je nesporně i v tom, že na protilátky si bakterie těžko vytvoří rezistenci. Pro imunizaci pacientů s CF je vhodné použít ptačí protilátky IgY, protože na rozdíl od protilátek savčích nevyvolávají po aplikaci nežádoucí zánětlivou reakci, která by mohla stav pacientů zhoršit.

Při výběru vhodné imunizační vakcíny je dobré vzít v úvahu, že *PA* v plicích pacientů s CF je schopna vyvolat chronický zánět díky svým schopnostem adherence a virulence. Proto by tedy bylo možné aplikací protilátek proti adhezenčním faktorům zabránit bakterii vázat se na epitel plicních buněk pacientů a tím snad zabránit i kolonizaci bakterie. Mezi vytipované adhezenční faktory *PA* patří bičíky, pili, exoenzym S, vnější membránové proteiny (OprF) a alginátový obal mukoidních mikrokolonií. V praktické části své bakalářské práce jsem se proto věnovala přípravě protilátek proti jednomu z těchto vytipovaných adhezenčních faktorů - bičíku.

Po izolaci bičíků z kontrolního kmenu *Pseudomonas aeruginosa* frakční centrifugací byla provedena elektroforéza pro srovnání molekulových hmotností částí izolovaných vzorků se standardem. Předpokládaná molekulová hmotnost proteinů bičíků je okolo 55 000 daltonů, a na obrázku č. 5 je patrné, že takové proteiny izolované vzorky opravdu obsahují. Pro ověření, že zóna okolo $M_r = 55\ 000$ je typický protein bičíků flagelin, byla provedena metoda MALDI TOF (realizoval pan RNDr. M. Šulc). Touto metodou se potvrdilo, že zmiňovaná zóna patří proteinu flagelinu typu B (označení – FliC), který je právě hlavní složkou bičíku bakterie, a že zóna nad flagelinem patří dalšímu bakteriálnímu proteinu – chaperoninu. Vzorek bičíků č. 1

(použit první supernatant) viditelně obsahuje větší množství bičíků než vzorek č. 2 (první sediment rozsuspendován, centrifugován a použit tak druhý supernatant). U vzorku č. 1 byla podle elektroforézy přibližně určena koncentrace 0,5 mg/ml.

Vejce, z kterých byly separovány protilátky byly získány ze slepice imunizované antigenem - subbuněčnou frakcí *PA* nabohacenou o bičíky (vzorek č. 1). Slepice byla imunizována třikrát po sobě a to v datech 31.10., 7.11., 14.11. 2006. Z vajec bylo izolováno celkem 12 frakcí (včetně negativní kontroly) a provedena ELISA. U ELISA č. 1 (obrázek č. 6) je patrný postupný nárůst specifických protilátek s tím, jak byla slepice třikrát po sobě imunizována. U frakce č. 4 z data 3.1. - 4.1.2007 je zaznamenán největší podíl specifických protilátek. Tato frakce byla proto u ostatních ELISA testů použita jako pozitivní kontrola. U ELISA č. 2 (obrázek č. 7) je vidět, že krátce po třetí imunizaci slepice se koncentrace protilátek drží dostatečně vysoko. V průběhu času ovšem dochází k zřetelnému poklesu obsahu specifických protilátek. Proto byly izolovány další frakce protilátek – frakce 12, 13 a 14 a mezi frakcemi 12 a 13 byla slepice znovu imunizována (19.4.2007). Poté byla provedena ELISA č. 3 a na grafu (obrázek č. 3) je patrné, že došlo k opětovnému nárůstu specifických protilátek.

Pro další ověření specifčnosti protilátek byla použita další metoda – Western blotting (obrázek č. 10). U drah B (vzorkovací pufr + destilovaná voda 1:1) a C (bičíky č. 1), kde byla použita negativní kontrola K1, se podle očekávání zóna pro flagelin nevybarvila. U drah D (bičíky č. 1) a E (bičíky č. 2) byla použita protilátková frakce č. 4, tedy frakce která podle ELISA testu obsahovala nejvíce protilátek proti bičíkům. Jak je vidět na obrázku č. 10, vzorek bičíků č. 1 zareagoval s protilátkovou frakcí č. 4 mnohem ostřeji, než vzorek bičíků č. 2, také podle očekávání.

Metodami ELISA a Western blotting byla tedy, po srovnání s molekulovými hmotnostmi standardu a srovnání s negativní kontrolou, prokázána přítomnost a funkčnost specifických protilátek proti bičíkovým antigenům.

Na základě těchto výsledků bude pokračovat práce s izolovanými protilátkami i nadále. Uvažuje se o použití metody afinitní chromatografie pro přímou izolaci specifických protilátek ze směsi izolovaných IgY a provedení *in vitro* testu pro ochranu buněk před infekcí.

6. Souhrn

Podářilo se vytvořit postup pro izolaci buněčných frakcí nabohacenou na bičíky bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, což bylo ověřeno provedením SDS – PAGE ve srovnání se standardem molekulových hmotností. Byla provedena i metoda MALDI TOF, která potvrdila přítomnost proteinu flagelinu typu B, který je součástí bičíků bakterie.

Z vajec imunizované slepice byly úspěšně izolovány protilátky proti bičíkům *PA* a pomocí metod ELISA a Western blotting byla ověřena jejich specifčnost.

7. Použitá literatura

1. Feldman M., Bryan R., Rajan S., Scheffler L., Brunnert S., Tang H., Prince A.: *Infection and Immunity* 66, (1998)
2. Greenwood D., Slack R.C.B., Peutherer J.F.: *Lékařská mikrobiologie – Přehled infekčních onemocnění. patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*, Grada Publishing, Praha (1999)
3. Hatta H., Kim M., Yamamoto T.: *Agric. Biol. Chem.* 54, 2531, (1990)
4. Holder I. A.: *Vaccine* 22, (2004)
5. Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy imunologie*, Triton, Praha (1998)
6. Jakubec P.: *Cystická fibróza*, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc (2006)
7. Julák J.: *Úvod do lékařské bakteriologie*, Univerzita Karlova v Praze, Praha (2006)
8. Ntakarutimana V., Demedts P., van Sande P. Scharpé S.: *J. Immunol. Methods* 153, 133, (1992)
9. Rosok M. J., Stebbins M. R., Connelly K., Lostrom M. E., Siadak A. W.: *Infection and Immunity* 58, (1990)
10. Sunwoo H. H., Nakano T., Dixon W. T., Sim J. S.: *Poultry Sci.* 75, 342, (1996)
11. Vávrová V. : *Cystická fibróza*, Grada Publishing a.s., Praha (2006)
12. Votava M.: *Lékařská mikrobiologie obecná*, Neptun, Brno (2005)
13. Yoon S. S., Hennigan R. F., Hilliard G. M., Ochsner Urs A., Parvatiyar K., Kamani M. C., Allen H. L., DeKievit T. R., Gardner P. R., Schwab U., Rowe J. J., Iglewski B. H., McDermott T. R., Mason R. P., Wozniak D. J., Hancock R. E. W., Parsek M. R., Noah T. L., Boucher R. C., Hassett D. J.: *Developmental Cell* 3, (2002)

14. Hanover: <http://www99.mh-hannover.de/kliniken/kinderheilkunde/kfg/pseudo/Pseudomonas.jpg> – staženo 28.8.2007
15. Pseudomonas: <http://www.pseudomonas.com/images/paeruginosa.jpg> – staženo 28.8.2007
16. Oramune: <http://www.oramune.com/images/review2.jpg>

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

jméno, příjmení a adresa	číslo OP	datum vypůjčení	poznámka
-----------------------------	----------	-----------------	----------