

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Patrik Pomazal

**Vývoj protilátek k prevenci bakteriální infekce u pacientů s
cystickou fibrózou**

**Development of antibacterial antibodies for patients with cystic
fibrosis**

Bakalářská práce

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

Praha, 2017

Prohlášení:

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

V Praze dne 19. 5. 2017

.....

podpis

Poděkování:

Chtěl bych především poděkovat panu Prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za svěřeni této práce do mé péče, za jeho ochotu a všechny znalosti, které mi předal. Dále bych chtěl poděkovat paní Anně Ammerové za její neutuchající pomoc a podporu při práci v laboratoři. Mé poděkování patří i kolegyni Michaele Vaškové za naši společnou spolupráci.

Abstrakt

Cystická fibróza je autozomálně recesivní genetické onemocnění, které patří mezi nejrozšířenější dědičné choroby. Tato zatím nevyléčitelná nemoc je způsobena mutacemi na CFTR genu. Mutace způsobují dysfunkci nebo celkovou absenci chloridového kanálku v plasmatické membráně epitelálních buněk, čímž dochází k poruše transportu iontů a zahušťování hlenu v dýchacím systému. Zahuštěný hlen vytváří ideální podmínky pro bakteriální infekce a růst bakterií v plicním traktu. Tyto infekce, zejména bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa*, bývají nejčastější příčinou smrti u pacientů s CF. Nejrozšířenějším přístupem k léčbě CF je odstranění zmíněných bakterií z plicního systému pomocí antibiotik, což je komplikováno čím dál častějším vznikem rezistencí, proto se stále hledají nové možnosti terapie CF. Potencionálně by mohla být účinná dlouhodobá profylaktická léčba inhalováním žloutkových imunoglobulinů IgY specifických proti adhezivním strukturám *P. aeruginosa*.

Byly izolovány protilátky ze žloutků imunizovaných slepic proti bakteriálním lektinům PA-IL a proti kombinaci lektinů Δ GPA-IIL/PA-IL. Specifita izolovaných protilátek byla stanovena metodou ELISA nepřímého typu. Na ELISA testech byl pozorován výrazný nárůst reaktivity specifických protilátek v porovnání s kontrolními (izolované z vajec snesených před imunizací). ELISA testy ukázaly, že zvíře imunizované proti kombinaci lektinů Δ GPA-IIL/PA-IL produkovalo protilátky proti oběma lektinům, avšak produkce IgY anti-PA-IL byla výrazně vyšší.

Pro purifikaci specifických protilátek byla využita afinitní chromatografie na nosiči s imobilizovanými lektiny. Byly připraveny dvě chromatografické kolony, jedna pro protilátky anti-PA-IL a druhá pro anti- Δ GPA-IIL. Výtěžky z kolony pro PA-IL (0,74%) byly přibližně 1,5x vyšší než u kolony pro Δ GPA-IIL (0,49), což lze vysvětlit nízkou specifitou protilátek anti- Δ GPA-IIL. Pomocí kolony s navázaným lektinem Δ GPA-IIL se podařilo rozdělit IgY anti- Δ GPA-IIL od IgY anti-PA-IL z kombinované frakce protilátek anti- Δ GPA-IIL/PA-IL pro budoucí adhezní testy.

Klíčová slova: Žloutkové protilátky, profylaxe, purifikace, ELISA

Abstract

Cystic fibrosis is an autosomal recessive genetic disease that is one of the most prevalent hereditary diseases. This yet incurable disease is caused by mutations in the CFTR gene. Mutations cause dysfunction or total absence of the chloride channel in the plasma membrane of the epithelial cells, resulting in a malfunction of ion transport and mucus thickening in the respiratory system. Congealed mucus creates ideal conditions for bacterial infections and bacterial growth in the lung. These infections, especially by *Pseudomonas aeruginosa*, are the most common cause of death in CF patients. The most widespread approach to CF is the removal of bacteria from the pulmonary system by antibiotics, which is complicated by increasing bacterial resistance, so new CF therapy options are still being sought. Potentially, long-term prophylactic treatment could be effective by inhaling yolk immunoglobulins specific to *P. aeruginosa's* adhesion structures, lectins PA-IL and PA-IIL.

Immunized hen egg yolk antibodies against PA-IL bacterial lectins and the lectins Δ GPA-IIL / PA-IL were isolated. The specificity of the isolated antibodies was determined by the indirect type ELISA. In the ELISA tests, a marked increase in the reactivity of the specific antibodies was observed compared to control (isolated from eggs laid before immunization). ELISA assays have shown that the animal immunized against the lectins Δ GPA-IIL / PA-IL produced antibodies against both lectins, but IgY anti-PA-IL production was significantly higher.

For the purification of specific antibodies, affinity chromatography on a carrier with immobilized lectins was used. Two chromatographic columns were prepared, one for anti-PA-IL antibodies and the other for anti- Δ GPA-IIL. PA-IL column yields (0.74%) were approximately 1.5 times higher than those for Δ GPA-IIL (0.49), which can be explained by the low specificity of anti- Δ GPA-IIL component. With the use of chromatographic column with bound lectin Δ GPA-IIL, we managed to separate IgY anti- Δ GPA-IIL and IgY anti-PA-IL from the mixed fraction of IgY anti- Δ GPA-IIL/PA-IL for future adhesion tests.

Key words: yolk antibodies, prophylaxis, purification, ELISA

Obsah

Obsah	5
Seznam zkratek	7
1 Úvod.....	8
1.1 Cystická fibróza	8
1.2 Struktura CFTR a jeho funkce	8
1.3 Mutace CFTR genu	10
1.4 Příznaky a projevy CF	12
1.4.1 Plicní epitel	13
1.5 Imunita	15
1.5.1 Vrozená imunita.....	15
1.5.2 Získaná (adaptivní) imunita	16
1.5.3 Slepíčí protilátky IgY.....	18
1.6 Pseudomonas aeruginosa (PA)	20
1.6.1 Adherence Pseudomonas aeruginosa	21
1.7 Léčba CF	22
1.7.1. Alternativí přístupy k léčbě.....	23
1.7.2. Slepíčí protilátky IgY jako prostředek v léčbě CF	24
2. Cíl práce.....	25
3. Materiál a metody	26
3.1 Použité materiály a chemikálie	26
3.2 Použité přístroje.....	27
3.3 Izolace slepičích protilátek.....	28
3.4. Určení koncentrace bílkovin	29
3.5. ELISA.....	29
3.5.1 ELISA - postup.....	30

3.6 Afinitní purifikace protilátek anti PA-III	31
3.6.1 Příprava chromatografického sorbentu	32
3.6.2 Afinitní chromatografie.....	33
4. Výsledky.....	35
4.1 Izolace protilátek.....	35
4.2 Specifita izolovaných protilátek.....	36
4.2.1 Křížová reaktivita IgY.....	38
4.3 Příprava afinitně purifikovaných protilátek	40
4.3.1 Afinitní chromatografie frakcí 2S5 a 2S6	40
4.3.2 Afinitní chromatografie frakcí 2S6 a 4S6	42
5. Diskuze	45
6. Souhrn	48
7. Použitá literatura:	49

Seznam zkratek

AMK - Amino kyseliny

ATP - Adenosin trifosfát

ASL - Plicní povrchová kapalina

cAMP - Cyklický adenosin monofosfát

CF - Cystická fibróza

CFTR - “Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator”, transmembránový protein ovlivňovaný cystickou fibrosou

IgG - Imunoglobulin G

IgA - Imunoglobulin A

IgE - Imunoglobulin E

IgM - Imunoglobulin M

IgD - Imunoglobulin D

IgY - Imunoglobulin Y

LPS - Lipopolysacharidy

MSD - Transmembránové domény

NBD - Nukleotid-vázající domény

PA - *Pseudomonas aeruginosa*

PKA - Protein kinasa A

RF - Revmatoidní faktor

1 Úvod

1.1 Cystická fibróza

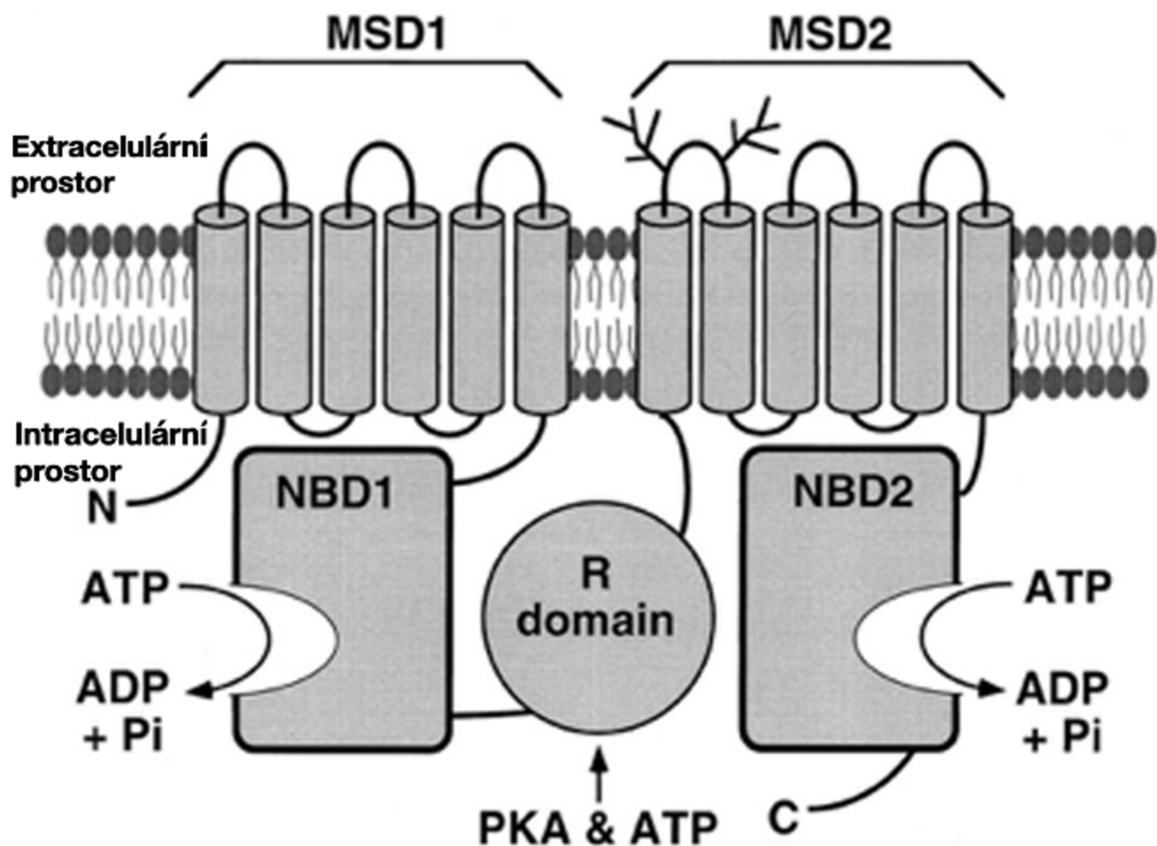
Cystická fibróza (CF) je autozomálně recesivní geneticky podmíněná nemoc, která je stále považována za nevléčitelnou, ale přesto léčitelnou. Dodnes je to jedno z nejčastějších dědičných onemocnění, které postihuje hlavně bělošskou část populace [1]. V České republice je CF považována za vzácné onemocnění s výskytem 1:6330 (1 postižený jedinec ku 6330 zdravým), v současné době se 50% pacientů (na světě) dožije více než 37 let. Cystická fibróza postihuje jedno z 2500-4000 narozených dětí, což statisticky odpovídá tomu, že se v České republice každoročně narodí 32 - 46 dětí s touto nemocí a každý 26. jedinec je nositelem mutace genu CFTR (angl. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), který je zodpovědný za expresi stejnojmenného proteinu [2,3]. Dnes je známo 1900 mutací CFTR genu zodpovědných za onemocnění CF.

1.2 Struktura CFTR a jeho funkce

CFTR gen se nachází na dlouhém raménku chromozomu 7, je asi 190 000 bazí dlouhý, avšak jen část z těchto bazí je zodpovědná za expresi CFTR proteinu, který patří do skupiny ABC transportérů (z angl. ATP-binding cassette). Protein má dvě nukleotid-vázající a dvě membránové domény, charakteristické pro ABC transportéry a tzv. R-doménu s četnými místy pro fosforylaci (viz obr. 1, str. 9), zodpovědnou za aktivitu iontového kanálu.

CFTR protein zastává funkci chloridového transportéru přes plasmatickou membránu a účastní se tak sekrece Cl⁻ ve střevním epitelu, dýchacích cestách a v pankreatu. Též ovlivňuje aktivitu jiných membránových přenašečů, například absence normálního CFTR způsobuje hyperaktivitu transportérů přenášejících sodné soli do buňky [1,4.]. Při absorpci kationtu sodíku s sebou do buňky vnáší molekulu vody z extracelulárního prostoru a způsobuje zahuštění hlenu v plicních cestách. Zahuštěného hlenu se pacienti hůře zbavují a snáze se v něm zachytávají patogenní mikroorganismy

(např. *Pseudomonas aeruginosa*), které ze sacharidů tvoří biofilmy, které brání penetraci antimikrobiálních agens, tento jev vede k chronickým zánětům či jiným onemocněním nejen plicního systému [5].



Obrázek 1 - Hypotetická struktura CFTR proteinu

Protein má dvě membránové (MSD1,2) a dvě nukleotid-vázající domény (NBD1,2) společně s regulační doménou (R), kde probíhá ATP-dependetní fosforylace, která ovlivňuje aktivitu chloridového kanálu [8,9].

Po identifikaci sekvence aminokyselin (AMK) CFTR genu byla navrhnutá jeho struktura, založená na porovnávání CFTR s různými zástupci z ABC rodiny transportérů, jako například periplasmatické permeázy (systémy pro transport maltosy a histidinu) a p-glykoprotein (Pgp) v prokaryotech [6,7]. Tyto transportéry a CFTR jsou složeny ze dvou motivů, z nichž každý obsahuje transmembránovou doménu MSD, která se často, ale ne vždy skládá ze 6 transmembránových segmentů, a nukleotidy-vázající doménu NBD, která podle predikce obsahuje sekvenci pro vazbu ATP,

viz Obrázek 1 [8,9]. Tyto domény jsou spojeny unikátní R (regulační) doménou, která obsahuje četná místa pro fosforylaci a nabitě aminokyseliny.

CFTR Cl⁻ kanály mají několik rozlišujících charakteristik: 1) Vykazují malou jedno-kanálovou konduktanci. 2) Převažuje selektivita pro anionty ($\text{Br}^- \geq \text{Cl}^- > \text{I}^-$). 3) Průtok iontů není závislý na čase a napětí. 4) Jejich aktivita je regulována cAMP-dependentní fosforylací a intracelulárními nukleotidy. Tyto vlastnosti jsou dány funkcemi MSD, NBD a R doménami. MSD přispívají k formování Cl⁻-selektivního póru, NBD hydrolyzují ATP a tím je regulováno otvírání kanálu. Fosforylace na R doménách zodpovídá za regulaci aktivity celého kanálu [10-12]. Otvírání a zavírání CFTR Cl⁻ kanálu je úzce spojeno s rovnováhou aktivit kinas a fosfatas v buňce, stejně jako s hladinou ATP. Aktivace cAMP dependentní protein kinasy A (PKA) má za následek fosforylaci mnoha serinových zbytků na R doméně. Jakmile je R doména fosforylovaná, otvírání kanálu je regulováno hydrolýzou ATP na NBD. Následně protein fosfatázy defosforylují R doménu a tím se kanál vrátí do původního stavu [12 - 14].

1.3 Mutace CFTR genu

Dřívější studie naznačují, že distribuce mutací na předpokládaných funkčních doménách CFTR není náhodná. Při bližším ohledání se toto tvrzení potvrdilo, mutace se soustřeďují do určitých regionů CFTR genu. Například v regionu exonu 11 bylo zaznamenáno 11 různých změn v pěti kodonech AMK sekvence, naproti tomu jsou exony, na kterých nebyly detekovány žádné změny (např. exony 6b, 16, 17a a 24).

In vitro fyziologické studie ukázaly, že mutace v CFTR genu narušují funkci exprimovaného proteinu v různých směrech. Ve většině mutací jde o delece celých úseků sekvence aminokyselin nebo jednotlivých AMK (tzv. "missense" mutace), které negativně ovlivňují celý proces vzniku CFTR a jeho funkce. Doposud známe mutace se rozdělují do pěti tříd. Pět hlavních mechanismů, jak mutace ovlivňují funkci CFTR proteinu, je popsáno na Obrázku 2, str. 12 [15,17].

Třída I:

Mutace první třídy (např. G542X nebo A455E) způsobují předčasnou terminaci transkripce, což má za následek nestabilní, zkrácenou nebo vůbec neprobíhající expresi CFTR proteinu.

Tyto mutace způsobují u pacientů s CF celkovou absenci CFTR kanálu [15,16].

Třída II:

Z této třídy je u pacientů s CF nejčastější mutace F508del, to značí delecii fenylalaninu na pozici 508. Přibližně u 70% pacientů s CF byla přítomna právě mutace II. třídy [17] na CFTR doméně NBD1 a NBD2 (viz Obrázek 1 str. 9). Tyto mutace vyvolávají změnu v "procesingu" CFTR, který není správně složen a tím dochází k předčasné degradaci [1,16].

Třída III:

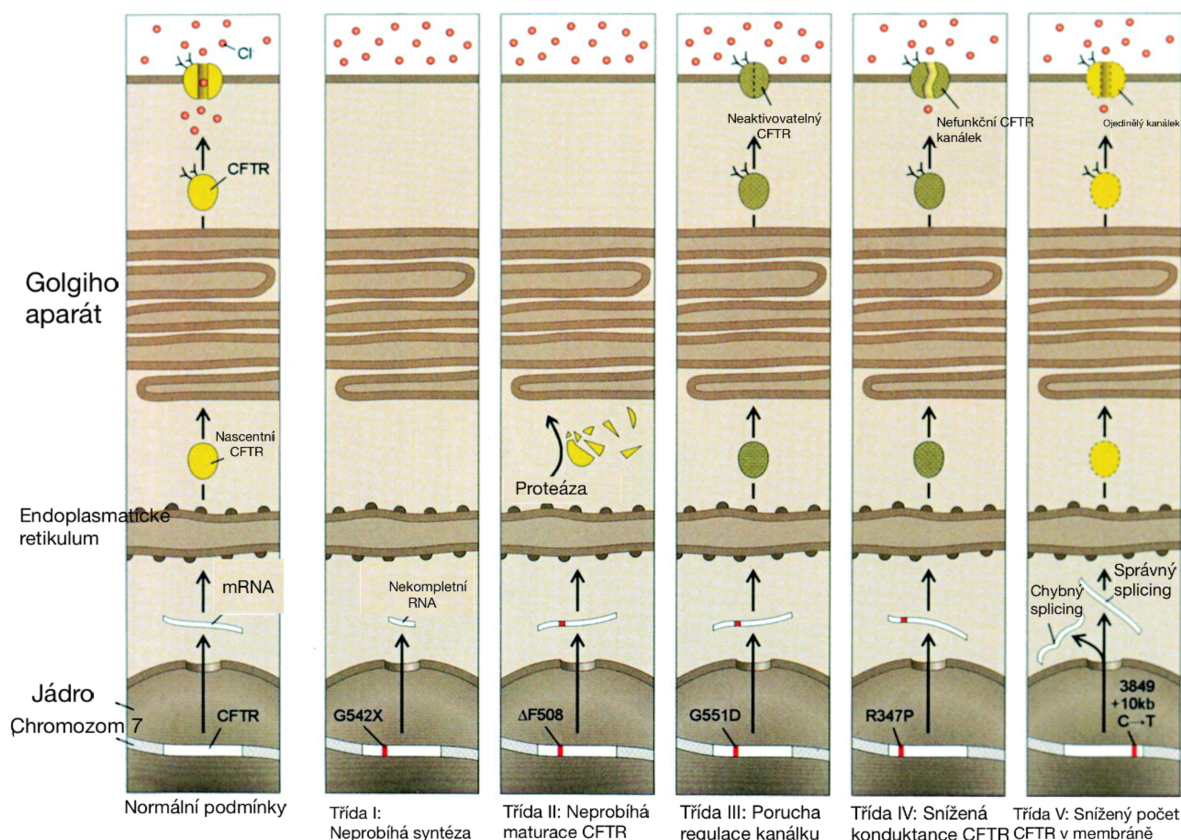
Mutace této třídy můžeme charakterizovat jako bodové substituční mutace. Produkovaný protein není schopný reagovat na cyklický adenosin monofosfát, což vede k defektu regulace CFTR proteinu [1,18]. Typickou mutací III. třídy je třetí nejčastější mutace u pacientů s CF, G551D [16].

Třída IV:

V tomto případě se exprimovaný CFTR dostane do apikální membrány, ale mutace zapříčiňují změnu ve vlastnostech kanálu [18]. Ovlivněná je vodivost kanálu, kvůli snížené chloridové permeabilitě a snížené pravděpodobnosti otevření kanálu [16].

Třída V:

Tento typ mutací je vzácný, objevuje se u přibližně 1% pacientů s CF. Vzniklý CFTR vykazuje normální funkci, avšak změnou transkripční regulace se výrazně sníží celkové množství exprimovaného CFTR [19].



Obrázek 2 - Přehled pěti hlavních mechanismů poruchy CFTR

Schéma porovnání normálního průběhu vzniku CFTR proteinu oproti různým mutacím v genu CFTR [1].

1.4 Příznaky a projevy CF

Cystická fibróza se projevuje na téměř všech orgánových systémech v lidském těle kromě centrální nervové soustavy. První příznaky onemocnění se dají poznat v raném věku dítěte (i několik měsíců po porodu). Hlavními oblastmi, které CF postihuje jsou: dýchací systém, trávicí systém a plodnost jedinců (až 98% mužů s CF je neplodných). Téměř 85% pacientů má sníženou sekreci enzymů z pankreatu do střev, což je důsledkem dysfunkce chloridového kanálku v epitheliálních buňkách a následné blokáce pankreatických kanálků. Tito pacienti neprospívají a mohou být až podvyživení [2,4].

Ztráta funkce CFTR negativně ovlivňuje submukózní žlázy v dýchacích cestách, což vede k jejich kolonizaci mikroorganismy už v raném věku. K takovým

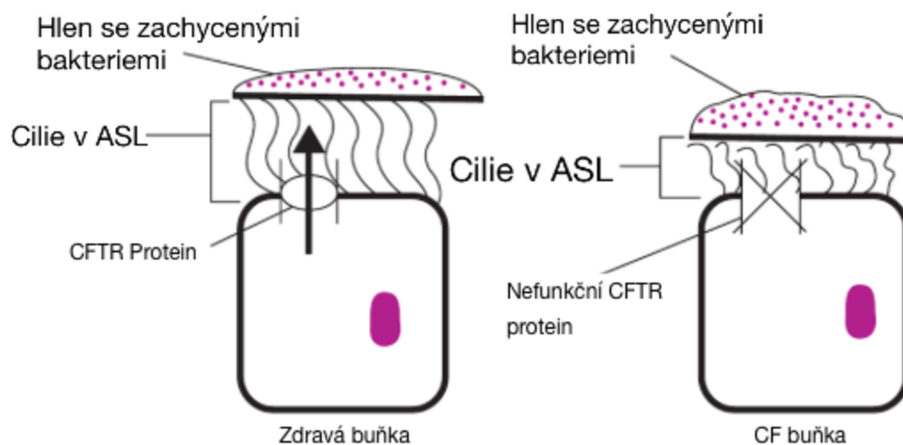
mikroorganismům patří *Staphylococcus aureus* a *Haemophilus influenzae*, které značně poškozují epiteliální povrch, což následně způsobuje zvýšenou náchylnost k infekcím *Pseudomonas aeruginosa*. Chronické infekce *P. aeruginosa* jsou hlavní příčinou poklesu funkce dýchacích cest a celkové mortality u pacientů s CF [20].

1.4.1 Plicní epitel

Na povrchu dýchacích cest se nachází epiteliální buňky s řasinkami zvané cilie, které se rytmicky pohybují v plicní povrchové kapaline (ASL z angl. airway surface liquid) a vytlačují tak hlen z plic. Ze vzduchu vdechujeme různé částice i bakterie, které dopadají právě na hlen [4]. Zdraví jedinci se bakterií v hlenu snadno zbaví právě díky tomuto “čistícímu mechanismu”.

Při ztrátě funkce CFTR je velice pravděpodobné, že se změní makromolekulární kompozice sekretovaných látek ze submukálních žláz a tím i složení, objem a viskozita ASL. Porovnáme-li viskozitu u zdravého jedince a jedince s CF, zjistíme, že u nemocného je viskozita až dvojnásobná [1]. Snížený objem a zvýšená viskozita ASL zpomaluje proces odstranění hlenu a bakterií z dýchacího systému, protože řasinky na povrchu epitelu nemohou správně fungovat [4]. *In vivo* studie ukazují, že typicky se bakterie odstraní přibližně do 6 hodin. Během těchto šesti hodin defenziny, lactoferrin a lysozomy potlačují bakteriální růst, tímto se organismus úspěšně zbaví patogeních bakterií. Je-li funkce řasinek narušena, proces čištění dýchacích cest může trvat až 24 hodin. V této situaci byl detekován masivní růst bakterií, které následně vyvolávají záněty [21, 22].

Zajímavé je, že i při zhoršeném odstraňování hlenu z dýchacích cest pohárkové buňky v epitelu stále produkují muciny. Zvýšená koncentrace mucinů v hlenu přispívá k zrychlení transportu Na^+ iontů do extracelulárního prostoru, což vyžaduje nárůst produkce ATP a tím se musí zvýšit i aktivita mitochondrií společně se spotřebou O_2 . Vzniklé gradienty O_2 vytváří vhodné prostředí pro růst bakterií [21].



Obrázek 3 - Znázornění funkce cilií ve zdravé a CF postižené buňce

Při ztrátě funkce CFTR se řasinky nemohou v povrchové plicní kapalině (ASL) volně pohybovat a tím se zpomaluje odstranění hlenu společně s bakteriemi [4].

Množící se patogenní bakterie vyvolávají imunitní odpověď, která vede k tvorbě zánětů. Zánětlivá reakce probíhá nejdříve lokálně aktivací komplementu a koagulačního systému (viz níže kapitola 1.5.1 Vrozená imunita). Tyto záněty se dají vysvětlit jako reakce na imunostimulační molekuly asociované s patogeny (PAMPs z angl. pathogen-associated molecular patterns) jako například lipopolysacharidy (LPS), bíčičky a bakteriální DNA [23].

Když nastane bakteriální infekce například kmeny *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Staphylococcus aureus*, jsou tyto bakterie schopné se do jisté míry přizpůsobit plicnímu prostředí a přechází z planktonické formy do biofilmu. Na povrchu biofilmu jsou mutantní bakterie tvořící exopolysacharidy rezistentní vůči fagocytóze [20,24]. Díky tomu imunitní systém nedokáže odstranit bakterie z organismu. Mezi další důležité na CFTR závislé mechanismy ovlivňující epiteliální buňky patří například glykosylace glykokonjugátů, jejíž míra má dopad na interakce bakterie-hostitel (adheze bakterií na epitel) a kompozici hlenu [23].

1.5 Imunita

Po vniknutí bakterie do organismu jako první ochrana slouží tzv. vrozená imunita a následně tzv. získaná imunita, asociovaná s aktivací T a B lymfocytů a příslušných protilátek. Vrozená imunita tvoří prvotní bariéru proti infekci a kolonizaci patogeními mikroorganismy a navíc selektuje, na které antigeny bude získaná imunita reagovat a jakým mechanismem [25]. Dysfunkce CFTR vede ke zvýšení koncentrace solí, které inaktivují antimikrobiální substance (např. defenziny) a výrazně snižují sekreci protilátek [26].

1.5.1 Vrozená imunita

Vrozená (nespecifická) imunita využívá tři mechanismů k rozeznání bakteriální buněk. První mechanismus je schopný rozeznat díky receptorům (PRRs z angl. pattern recognition receptors) produkty metabolismu unikátní pro mikroorganismy, tzn. látky, které nejsou lidskému tělu přirozené. Mezi tyto látky patří PAMP, tedy LPS a peptidoglykan u gram-pozitivních bakterií a další.

Druhou strategií je rozeznávání tělu přirozených markerů. Tyto markery (majoritní histokompatibilní komplexy MHC, z angl. major histocompatibility complex) jsou spojovány s inhibicí imunitní reakce proti vlastním buňkám. NK buňky (z angl. natural killers) rozeznávají absenci MHC jako signál cizí buňky, které budou následně lyzovány buňkami imunitního systému.

Třetí mechanismus rozeznává markery indukované imunitním systémem nebo tvořené samotnými buňkami. Imunitní systém vyvolává v takto označených buňkách nebo virech indukovanou apoptózu [27].

Jakmile imunitní systém rozezná markery asociované s patogenním agens, aktivuje se efektor, tzv. komplement. Komplement je tvořený neaktivními proteiny v krevním séru. Po rozeznání bakteriálních buněk se aktivují proteázy, které štěpí zmíněné sérové proteiny a aktivují je. Tyto aktivované proteiny uvolňují cytokiny a iniciují enzymatickou kaskádu,

která vede k aktivaci komplementu. Komplement může být také aktivován během imunitní reakce získané (adaptivní) imunity navázáním protilátky na antigen, což je klíčové spojení efektorových mechanismů vrozené a získané imunity [28].

Komplement plní funkci zabránění infekce a odstranění bakterií z organismu několika způsoby. Usnadňuje fagocytózu bakteriálních buněk, mikrobů a molekul jejich opsonizací. Opsonizace je proces při kterém jsou dané mikrobiální cíle chemicky modifikovány a tím se sníží jejich negativní náboj na membráně, což umožňuje silnější interakci s fagocyty a usnadnění fagocytózy. Společně s opsonizací proteinový komplex komplementu snižuje pravděpodobnost vzniku infekce tím, že přitahuje makrofágy a neutofily (chemotaxi), což jsou hlavní buňky zodpovědné za vznik zánětů.

Dále komplement může tvořit tzv. terminální komplementární komplex (TCC z angl. terminal complement complex), který je formován na povrchu patogenních bakteriálních buněk. TCC formují transmembránové kanálky na buněčné membráně bakterií a tím narušují její strukturu. Následně dochází k lysi bakteriálních buněk [29].

1.5.2 Získaná (adaptivní) imunita

Získaná imunita neboli adaptivní či humorální je zprostředkována několika druhy buněk, např. B- a T-lymfocyty, fagocyty, dendritickými buňkami a další. B- a T-lymfocyty jsou zodpovědné za rozeznávání specifických chemických struktur, tzv. antigenů, k identifikaci patogenů. Při infekci se B-lymfocyty začnou množit a transformovat na plasmatické buňky produkující protein, který je vystaven na membráně, tzv. protilátku nebo imunoglobulin (Ig). Každá protilátka se specificky váže na antigen unikátní pro konkrétní mikroorganismus a spustí proliferaci, diferenciaci buněk a celkovou imunitní odpověď [28].

Imunoglobuliny se řadí do tříd podle struktury a funkce:

IgG - Tato třída imunoglobulinů je schopná aktivovat komplement a prochází přes placentu a tak zajišťuje ochranu novorozence.

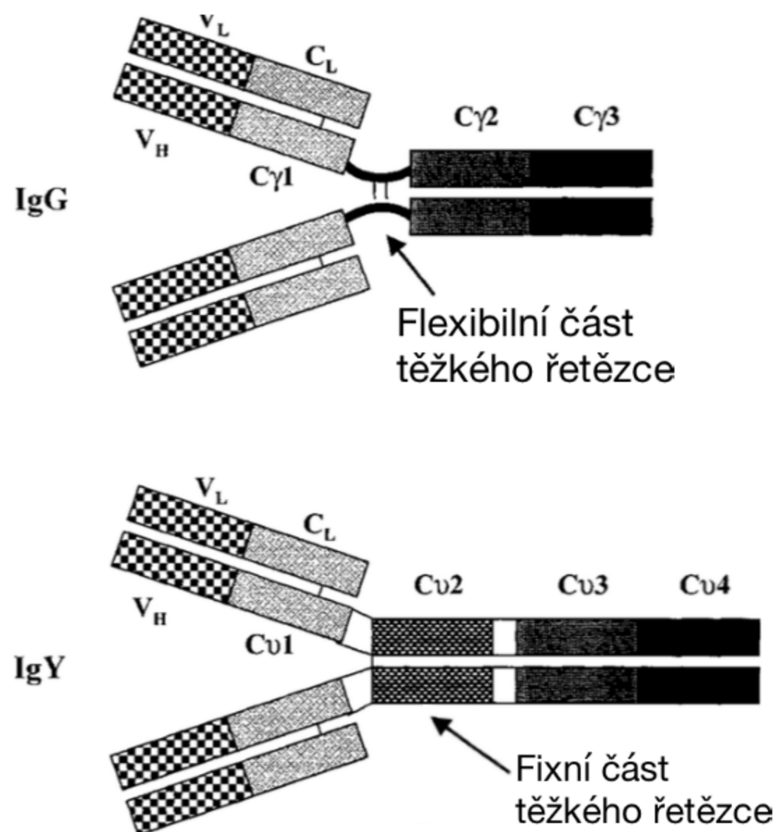
IgA - Většinou se vyskytují v sekretech mukózních membrán jako např. mateřské mléko, slzy a sliny. IgA nejsou degradovány proteolytickými enzymy a tak mohou přežít i v prostředí gastrointestinálního traktu.

IgE - Často spojované protilátky s alergickými reakcemi jako astma a senná rýma

IgD - Funkce těchto imunoglobulinů není zcela jasná, ale protože se vykytují v organismech od ryb až po člověka (kromě ptáků) lze předpokládat, že plní důležitou imunologickou funkci.

IgY - Imunoglobuliny třídy Y se vyskytují u ptáků a plazů, konkrétně ve žloutku jejich vajec. Jejich funkce je podobná té IgG a IgE. IgY jsou též schopné se navázat na patogeny a snížit jejich invazivitu [28 - 30].

Funkce protilátek úzce souvisí s jejich strukturou a vlastnostmi, mezi které např. patří specifita vazby, vazebná všestranost a biologická aktivita. Všechny protilátky lze schematizovat tvarem písmene Y. Skládají se ze dvou lehkých (18,6 kDa) a dvou těžkých řetězců (65 kDa) spojených disulfidickými vazbami a nekovalentními interakcemi. Řetězce se dají rozdělit ještě na další části a to Fab fragmenty vázající antigen a Fc fragmenty, které antigen neváží. Na každém řetězci jsou i pro různé druhy protilátek identické segmenty aminokyselin, nazývané konstantní část a segmenty s velkou variabilitou v sekvenci aminokyselin, označované jako variabilní část. Právě díky vysoké variabilitě protilátky mohou rozeznávat miliony antigenů [31]. Struktura protilátky je znázorněna na Obrázku 4 (str. 18).



Obrázek 4 - Srovnání struktury IgG a IgY

V_{L,H}- Variabilní části lehkého a těžkého řetězce, C_v- konstantní části protilátky na těžkém řetězci, C_L- konstantní část na lehkém řetězci [32].

Antigen se váže na V_L a V_H [32]

1.5.3 Slepíčí protilátky IgY

U ptáků se vyskytující tři třídy imunoglobulinů IgA, IgM a IgG. IgY byly považovány za součást IgG kvůli podobné funkci v sekundární imunitní odpovědi, což se ukázalo jako nesprávné, protože se liší svojí strukturou. IgY narozdíl od IgG zprostředkovává anafylaktické reakce. IgY se skládá ze dvou lehkých a ze dvou těžkých řetězců, ale oproti IgG má na těžkém řetězci navíc jednu konstantní část (C_{v2}). IgG u savců prochází přes placentu a matka tak dočasně poskytuje imunitu svým potomkům. IgY u ptáků funguje principiálně stejně, transportuje se ze séra do vajíček [33]. Do žloutku v

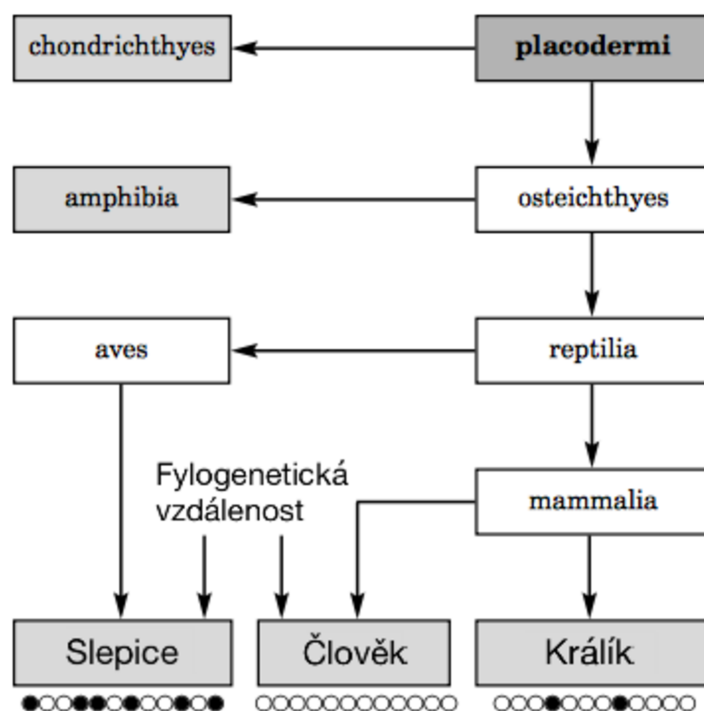
nepatrném množství prochází i IgA a IgM, které se vyskytují ve větším množství v bílku [34].

Při přípravě protilátek v savčím organismu jejich izolace probíhá z krevního séra, což často vede k usmrcení zvířete. IgY se většinou izolují ze slepičích vajec, bez ovlivnění zvířete. Navíc chov slepic je ekonomičtější než například u králíků. Další výhodou izolace protilátek z vajec je fakt, že produkce protilátek slepicí přibližně koresponduje s produkcí u středně velkých savců (ovce, kozy). Jedna slepice za rok přibližně vyprodukuje 17-35g IgY, v tomto množství lze očekávat 1-10% imunoglobulinů specifických k danému antigenu [33].

V lidském organismu se nachází tzv. revmatoidní faktory (RF). Tyto proteiny jsou autoprotilátky cílené proti Fc části všech tříd imunoglobulinů. RF značně snižují aktivitu imunoglobulinů, nicméně ELISA testy ukázaly, že na slepičí IgY se RF neváží [32,35]. Tento fakt je velkou výhodou i při využití IgY v profylaktické léčbě.

Z fylogenetické vzdálenosti (význam spojení fylogenetická vzdálenost je popsán na Obrázku 5, str. 21) IgY od ostatních imunoglobulinů plynou další výhody pro využití slepičích protilátek. Imunizace slepic pro savce specifickým proteinem vykazuje větší specifitu a celkovou produkci protilátek proti danému antigenu než imunizace králíků [36]. Tvorba imunologického komplexu po navázání antigenu na protilátku je jeden z hlavních faktorů ovlivňující výsledky *in vitro* imunologických testů. Komplex totiž blokuje některá vazná místa antigenu.

Díky fylogenetickým rozdílům IgY aktivují tvorbu komplexu jen u ptáků, nikoliv u savců [37].



Obrázek 5 - Fylogenetický strom a vzdálenost

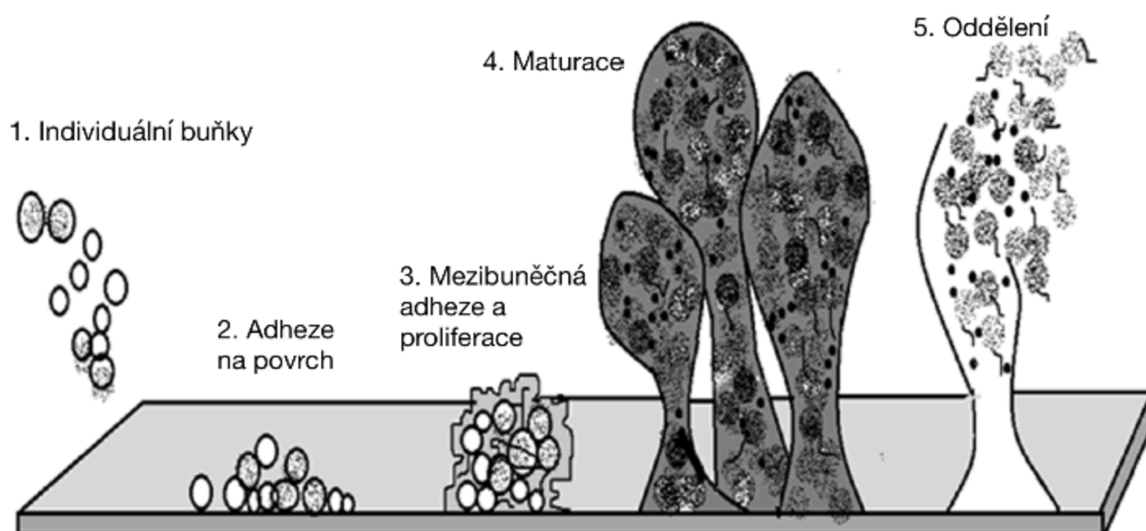
Diagram objasňuje význam pojmu fylogenetická vzdálenost. Řetězec bílých teček znázorňuje hypotetický protein a černé tečky reprezentují záměny amino kyselin oproti člověku. Kvůli fylogenetické vzdálenosti savců a ptáků jsou záměny AMK u slepic častější než-li u králíka v porovnání s člověkem. Tím pádem imunitní systém slepic má větší pravděpodobnost rozeznání lidského proteinu jako cizorodé agens [33].

1.6 *Pseudomonas aeruginosa* (PA)

Gram-negativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* jsou oportunistickými patogeními mikroorganismy běžně se vyskytující v přírodním i umělém prostředí. Jde o všudypřítomný organismus, který může být izolován z různých organismů včetně rostlin, zvířat a člověka. Minimální nutriční nároky PA společně se vzrůstajícím počtem kmenů rezistentních vůči antibiotikům jim umožňují přežít např. i v nemocničním prostředí. [38, 39].

V lidském těle se bakterie vyskytují buď v planktonické podobě (volně plovoucí buňky), nebo jsou přisedlé neboli ve formě biofilmu. Biofilmy chrání bakterie a činí je extrémně rezistentní vůči chemikáliím z okolí, včetně antibiotik a desinfekčních činidel,

což výrazně ztěžuje léčbu infekce. Kvůli hydrofilnímu charakteru biofilmu je převládající složkou voda a heterogenně lokalizované bakterie tvoří 10-20% objemu biofilmu [41]. Na Obrázku 6 je znázorněna tvorba biofilmu.



Obrázek 6 - Stádia tvorby biofilmu

Jednotlivé bakteriální buňky nejprve nasedají na povrch, v tomto zachyceném stavu začnou produkovat exopolysacharid a začnou se množit. Po oddělení se jednotlivé bakterie znovu přichytávají na povrch a celý proces se opakuje [40,41]

1.6.1 Adherence *Pseudomonas aeruginosa*

Biofilm tvořen PA začne růst po navázání PA na epitelální buňky. Proces adheze je reversibilní v několika prvních hodinách po navázání PA, později se adheze stane ireversibilní kvůli glykokalyxu a fimbriím [38,41]. PA na svém povrchu nesou pili (fimbrie) typu 4, společně s jedním bičíkem a lektiny, což jsou ty nejdůležitější struktury (faktory) při adhezi, formování biofilmů a pohyblivosti PA. Pili jsou dlouhé tyčovité proteinové útvary na povrchu bakterií, skládající se z hlavního proteinu pilinu a několika doplňkových. Na “špičce” fimbrie jsou lokalizovány adheziny [42].

Adheze PA je zprostředkována glykokonjugáty na povrchu hostitelských buňek, které slouží jako specifické cíle pro bakteriální adheziny včetně lektinů. Ve vnější

membráně PA byly identifikovány dva rozpustné lektiny, LecA (PA-IL) tvořený 121 AMK a LecB (PA-III) tvořený 114 AMK, specificky vázající galaktosu a L-fukosu. Lektiny, vedle funkce adhezínů, působí také jako virulenční faktory. Například galaktofilní PA-IL vykazuje cytotoxický efekt na epiteliální buňky dýchacích cest, kde výrazně zpomaluje jejich růst a indukuje defekt permeability, což způsobí zvýšenou absorpci exotoxinu A. Tento exotoxin je produkován bakteriemi PA, který inhibuje elongační faktor 2 a tak zastavuje elongaci polypeptidů při proteosyntéze [43].

PA-III se skládá ze čtyř podjednotek (11.73 kDa). Lektin vykazuje vysokou afinitu pro L-fukosu a její deriváty a také pro D-manosu, ale s nižší afinitou. U pacientů s CF je zvýšena terminální fukosylace glykoproteinů na epiteliálních buňkách v dýchacích cestách, stejně jako vyšší procento sialyzovaných a sulfatovaných postranních oligosacharidových řetězců, které reprezentují preferovaná vazná místa PA. Všechny tyto faktory významně přispívají k chronickým infekcím *Pseudomonas aeruginosa* [44].

1.7 Léčba CF

Studie u novorozenců s CF ukázaly podstatné snížení funkce plic v prvních dvou letech života i při absenci infekce PA nebo *S. aureus*. Mezi hlavní přístupy k léčení pacientů s CF patří antimikrobiální terapie antibiotiky společně s mechanickým uvolňováním hlenu a dalších sekretů z dýchacích cest fyzioterapií. Azitromycin, makrolidové antibiotikum je relativně efektivní proti mikrobům v dýchacích cestách pacientů a dokáže tak zpomalit pokles funkce plic. Využití azitromycinu je omezené z důvodu jeho akumulace v makrofázích, což vede k zvýšení náchylnosti pacientů k infekcím jinými mikroorganismy [23].

Navíc léčba PA infekce antibiotiky je značně ztížena schopností PA vytvořit resistence a biofilmy [39]. Pacientům jsou vedle antibiotik předepisovány i protizánětlivé léky a bronchodilatátory pro usnadnění čištění dýchacích cest od hlenu.

Pokud je plicní infekce v pokročilém stádiu a výše zmíněné způsoby léčby již nefungují dostatečně efektivně, doporučuje se pacientům kyslíková terapie. Kyslík je podáván maskou nebo zavedenými trubičkami do trachey a usnadňuje dýchání pacienta. Mnoho jedinců s CF je donuceno kvůli selhávání plic podstoupit jejich transplantaci [45].

1.7.1. Alternativí přístupy k léčbě

Jelikož pro CF nebyly vyvinuty dostatečně účinné léčebné metody a jedná se o monogenetické onemocnění, stává se CF vhodným kandidátem pro genovou terapii. Principiálně jde o nahrazení dysfunkčního CFTR genu pacienta funkčním v mukózních a plicních epitelálních buňkách. Ovšem tento přístup není zdaleka ideální, kvůli intra- i extracelulárním bariérám, jako jsou například mukus a glykokalyx. Navíc k těmto fyzikálním bariérám efektivitu transfekce DNA snižují specifické i nespecifické imunitní reakce [46].

Ve snaze oddálit letální poškození plic pacientů se dnes používají imunizační (vaccinační) metody proti různým druhům bakterií. Vakcinací pacientů v raném věku proti bakteriím *P. aeruginosa* lze snížit frekvenci chronických infekcí a tím zpomalit ztrátu funkce plic. Jak ukázala studie v letech 1989-2001, při vakcinaci pacientů od raného věku po dobu deseti let se celkový zdravotní status pacientů zlepšil oproti pacientům, kterým vakcína nebyla podávána (kontrolní skupina pacientů byla sladěna s testovanou na základě pohlaví, věku a kde to bylo možné tak i podle typu mutace CFTR) [47].

Dalším možným přístupem je profylaktická léčba antibiotiky ve formě inhalovaného aerosolu. Tento přístup umožňuje zavedení antibiotik přímo k poškozené tkáni. Zaměřením léčby inhalací antibiotik byla eradikace bakterií z plicního traktu u pacientů již infikovaných bakteriemi, avšak studie prokázaly, že při dlouhodobém podávání antibiotik ve formě aerosolu pacientům od raného věku lze oddálit a dokonce i zabránit bakteriální infekci. Testy prováděné v letech 1986-1996 sledovaly 28 pacientů, kteří podstoupili dlouhodobý profylaktický program s inhalovaným gentamicinem ve snaze zabránit infekci *P. aeruginosou*. Žádný z pacientů ze skupiny, která program dokončila nebyl infikován PA. Bohužel v této skupině bylo pouze 12 pacientů z původních 28 z důvodů přerušení profylaktické léčby kvůli vedlejším účinkům antibiotik, nedostatku opakovaně se vyskytujících rizikových situací nebo nedodržování předpisů programu [48].

1.7.2. Slepičí protilátky IgY jako prostředek v léčbě CF

Jak bylo výše řečeno, lektiny PA a bakterií obecně hrajou velmi důležitou roli při adhezi a iniciaci infekce u pacientů s CF. K neutralizaci funkce lektinů, včetně PA-IL a PA-III, je možno využít protilátky, které zablokují vazná místa na lektinu a následně znemožní navázání na glykosacharidy na plasmatické membráně epitelálních buněk. Tak lze omezit adhezi bakterií a zabránit infekci a tvorbě biofilmů. Výhodou použití IgY oproti antibiotikům je fakt, že nespouštějí imunitní reakci v lidském organismu a nemají vedlejší efekty.

2. Cíl práce

Tato práce byla zaměřena na vývoj terapeutických protilátek proti lektinům PA-IL a PA-III bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Tyto protilátky mohou být v budoucnu hypoteticky použity jako prostředek pro zabránění infekce pacientů s cystickou fibrózou bakteriemi *P. aeruginosa*. Hlavním cílem byla příprava frakce žloutkových imunoglobulinů anti-PA-IL a frakce s kombinací IgY anti- Δ GPA-III/PA-IL, jejich charakterizace a purifikace. Pro splnění hlavních cílů bylo třeba splnit několik dílčích úkolů:

- Samotná izolace žloutkových imunoglobulinů
- Rozdělení izolovaných frakcí podle data sběru vajec, ze kterých byly IgY izolovány a zjistit koncentraci bílkovin v každé frakci
- Ověření specifity izolovaných protilátek metodou ELISA
- Zjištění křížové reaktivity jednotlivých izolovaných frakcí
- Příprava kolon pro afinitní chromatografii a jejich aplikace
- Charakterizace afinitně purifikovaných protilátek

3. Materiál a metody

3.1 Použité materiály a chemikálie

CNBr aktivovaná Sepharosa 4B	Sigma, USA
Lyofilizát vaječného bílku (k dispozici v laboratoři)	
Lyofilizát antigenu PA-IL (poskytnuto Wimmerovou M., Muni, Brno)	
Lyofilizát antigenu PA-III (poskytnuto Wimmerovou M., Muni, Brno)	
Lyofilizát antigenu PA- Δ GIIL (poskytnuto Wimmerovou M., Muni, Brno)	
Protilátka proti slepičím IgG značená fosfatázovou aktivitou	Sigma, USA
Ethanolamin	Sigma, USA
Diethylamin	Sigma, USA
Guanidin hydrochlorid	Sigma, USA
HCl	Lachner, ČR
NaCl	Lachner, ČR
NaN ₃	Sigma, USA
NaOH	Lachner, ČR
MgCl ₂	Lachner, ČR
H ₂ PO ₄	Lachner, ČR
NaHPO ₄	Lachner, ČR
Na ₂ PO ₄	Lachner, ČR
Na ₂ HCO ₃	Lachner, ČR
NaHCO ₃	Lachner, ČR
P-nitrofenol	Sigma, USA
Microarray destičky Nunc-Immuno Polysorp	Sigma, USA
KOH	Lachner, ČR
Kyselina octová	Sigma, USA
Octan sodný	Sigma, USA
Tween 20	Sigma, USA

3.2 Použité přístroje

pH/ORP Meter HI 2211	Hanna Instruments, Itálie
Míchačka KMO 2	IKA -Werker, Německo
Analytické váhy Discovery	OHAUS, USA
Spektrofotometr IB1	Hewlett Packard, USA
Spektromom I95 D	MOM, Maďarsko
Stolní centrifuga 5418	Eppendorf, USA
Automatický CO ₂ inkubátor	ShellLab, ČR
Centrifuga K 70D	LABsystem s.r.o., ČR
Obracecí mixér	Chemos Cz, ČR
Čtečka SunRise	Hewlett Packard, USA
Pipety	Eppendorf, USA
Mrazicí box	Nalgene, USA

3.3 Izolace slepičích protilátek

Použité roztoky:

0,5 M HCl

PBS/NaN₃: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; 0,1 % (w/v) azid sodný (NaN₃); pH 7,2

Veškeré izolované frakce jsou pojmenovány podle data snesení daných vajec a čísla příslušné slepice, buď 5 podle Iva 5 (imunizovaná PA-IL) a Iva 6 (imunizovaná ΔGPA-IIL i PA-IL). Například frakce od slepice Iva 5 z 5.5.2016 - 15.5. 2016 izolovaná jako první, týden po 3. imunizaci, je označena jako 1S5, kde číslo 1 označuje časové rozmezí, S jako slepice a 5 označuje číslo slepice. Lektin ΔGPA-IIL se od PA-IIL liší pouze v C-koncové aminokyselině (ΔGPA-IIL je o jednu aminokyselinu zkrácen).

Z vajíček imunizovaných byly odděleny žloutky od bílků do odměrného válce za pomoci oddělovače bílků. V odměrném válci byl zjištěn objem oddělených žloutků. V průměru 10 žloutků odpovídá přibližně 170 ml. Žloutky určené pro pozdější izolaci byly naředěny 1:1 (objem) s PBS izolačním pufrem (obsahující 0,1% NaN₃) v plastové láhvy a ponechány při 5° C v lednici.

V případě okamžité izolace se žloutky ředily 1:7 vodovodní H₂O v plastové odměrné kádince. Následně bylo upraveno pH roztoku žloutků pomocí 0,5M HCl na pH=5. Takto upravený roztok byl převeden do skleněné nálevky (objem nálevky je přibližně 1,5 l) s uzavřeným hrdlem (silikonová zátka) a ponechán v mrazícím boxu při -22°C přes noc.

Z nálevky byly zmražené žloutky vyjmuty a přeneseny do titrační nálevky s vloženým filtračním papírem a smotkem vaty ve špičce v průběhu roztávání při laboratorní teplotě (22,5 °C) přes noc byl filtrát jímán do odměrného válce.

Po změření objemu byl filtrát převeden do skleněné kádinky s míchadlem. Pro precipitaci bílkovin bylo přidáno NaCl tak, aby vznikl 8,8% roztok NaCl. Po kompletním rozpuštění soli bylo upraveno pH roztoku na pH=4 pomocí 0,5M HCl. Roztok byl míchán 30 minut na míchače a následně ponechán v klidu 2 hod. při laboratorní teplotě 22,8 °C.

Precipitát bílkovin byl oddělen centrifugací 25 minut při 3000 RPM (v centrifuze). Po odstranění supernatantu byly pelety v plastových kyvetách resuspendovány v izolačním pufru (PBS obsahující 0,1% NaN_3) a po rozpuštění převedeny do plastových zkumavek (Falcon).

Přehled izolovaných frakcí je v Tabulce č.1 str. , kde K5 a K6 značí protilátky izolované z vajec před imunizací (K5 - kontrola PAI-L, K6 - kontrola Δ GPA-IIL).

3.4. Určení koncentrace bílkovin

Dříve byla experimentálně stanovena standardní křivka s faktorem $f = 1,094$ [50]. Koncentrace proteinů byly vypočítány z absorbancí roztoků jednotlivých frakcí při 280 nm. Měření bylo provedeno na spektrofotometru (Spektromom I95 D, Maďarsko) a jako slepý vzorek bylo použito PBS. Z příslušné frakce bylo převedeno 50 μl do křemené kyvety a přidáno 2,5 ml PBS, aby vznikl 51x naředěný roztok protilátek. Výpočet koncentrace byl proveden následovně:

$$k = A \cdot l \cdot r \cdot f$$

k..... koncentrace

A..... absorbance

l.....optická dráha

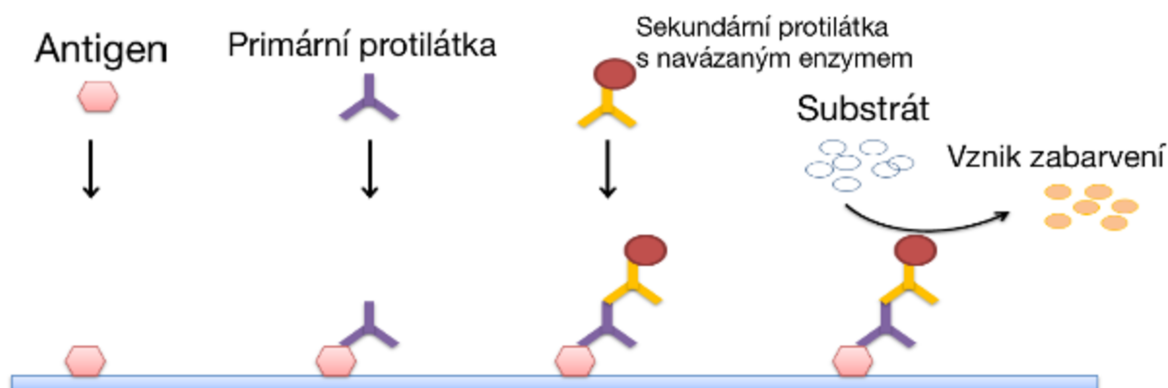
r..... ředění

f..... experimentálně zjištěný faktor ze standardní křivky ($f = 1,094$)

3.5. ELISA

Imunoreaktivita protilátek proti lektinům PA-IIL, PA-IIL a Δ GPA-IIL byla určena pomocí metody ELISA (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay). Byl zvolen nepřímý typ konfigurace ELISA (viz Obrázek 7, str. 30). Metoda je založená na specifické reakci antigenu (vázaný na nosiči) a protilátky. Po navázání primární protilátky na antigen vzniká komplex antigen-protilátka, na který se následně váže sekundární protilátka značená

enzymem. Enzym pak katalyzuje přeměnu chromogenního substrátu na barevný produkt, jehož koncentrace odpovídá koncentraci primárních protilátek v reakční směsi [50].



Obrázek 7 - Schéma nepřímého uspořádání ELISA

Nejprve je na destičku navázán antigen, na který se váže primární protilátka, tedy protilátka jejíž reaktivita s daným antigenem nás zajímá. Sekundární protilátka s enzymem se váže na primární a za přítomnosti vhodného substrátu vzniká zbarvení [51].

3.5.1 ELISA - postup

Použité roztoky:

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

PBS + Tween: 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; 0,1% (v/v) Tween® 20; pH 7,2

imobilizační pufr: 13 mM Na₂CO₃; 25 mM NaHCO₃; pH 9,6

blokovací roztok: PBS + Tween; 2% w/v řídký bílek

vyvolávací roztok pro alkalickou fosfatasa: 30 mM NaHCO₃; 20 mM Na₂CO₃; 1 mM MgCl₂, 0,01% *p*-nitrofenylfosfát

zastavovací roztok pro alkalickou fosfatasa: 3 M NaOH

Lyofilizát antigenu (PA-IL, PA-IIL nebo ΔGPA-IIL) byl ropuštěn v PBS a ředěn v imobilizačním uhličitanovém pufru (pH 9,6), tak aby vzniknul roztok antigenu o koncentraci 4 mg/ml. 100 μl roztoku antigenu bylo aplikováno opakovacím dávkovačem

na každou jamku 96-jamkové destičky Polysorp (Sigma, USA) a destička byla vložena do CO₂ inkubátoru (ShellLab, ČR) na 1 hod. při 37 °C. Nezachycený antigen byl odstraněn promíváním PBS + Tween, bylo aplikováno třikrát 200 µl PBS Tween na každou jamku destičky. Po každém promytí byl roztok odstraněn švihem a destička sušena filtračním papírem. Po odstranění roztoku švihem a promytí destičky (stejný postup jako při prvním promývání) následovala aplikace 150 µl blokačního roztoku na každou jamku, aby se v dalším kroku sekundární protilátky nevázaly na místa na destičce, kde není antigen. Destička s blokačním roztokem byla inkubována 1 hod. při 37 °C.

Roztoky primárních protilátek o koncentracích 90, 30, 10 a 3 µg/ml byly připraveny trojkovou ředící řadou z předem připraveného zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/ml a na destičku nanášeny vždy v duplikátech. Vždy bylo aplikováno 100 µl specifických protilátek na jamku. Dále se destička nechala inkubovat 2 hod. při 37 °C pro navázání protilátek na antigen.

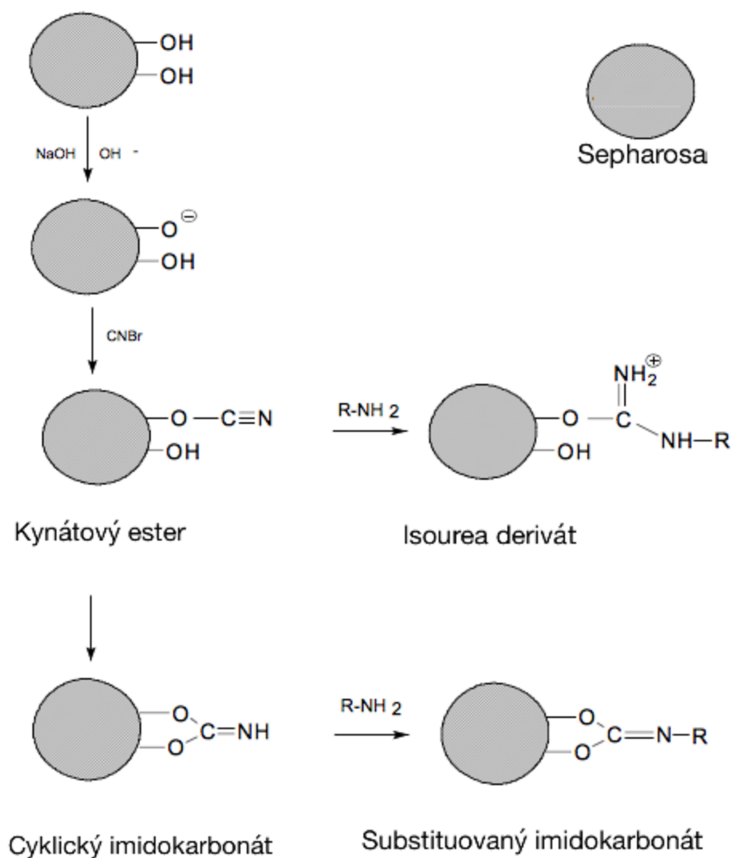
Po promytí PBS + Tween byla sekundární protilátka značená fosfatasou zředěna v poměru 1:2000 do PBS a aplikována po 100 µl na každou jamku. Destička se sekundárními protilátkami byla inkubována 1 hod. při 37 °C. Pro vyvolání destičky byl připraven vyvolávací roztok z 0,7 ml 0,2 M NaHCO₃, 0,5 ml 0,2 M Na₂CO₃, 5 µl MgCl₂, 5 mg *p*-nitrofenylfosfátu doplněním do 5 ml destilovanou vodou (v případě vyšší potřeby bylo připraveno dvojnásobné množství). Do každé jamky bylo aplikováno maximální rychlostí 100 µl vyvolávacího roztoku. Po 10 minutách byla reakce zastavena přidávkem 50 µl 3M NaOH.

Vzniklé zabarvení v jamkách bylo vyhodnocováno na čtečce SunRise (Hewlett Packard) při 405 nm.

3.6 Afinitní purifikace protilátek anti PA-IIL

Afinitní chromatografie je metoda umožňující purifikaci biomolekul na základě jejich specifických interakcí s ligandem, který je navázán na matrix chromatografické kolony.

Pro navázání ligandu byla použita CNBr aktivovaná Sepharosa. CNBr aktivuje Sepharosu reakcí s jejími -OH skupinami za vzniku kyanátových esterových skupin nebo imidokarbonátů (viz Obrázek 8, str 31), které váží proteiny, peptidy a aminokyseliny přes jejich primární aminoskupinu [52].



Obrázek 8 - Schéma aktivace sepharosy bromkyanem

Bromkyan reakcí s -OH skupinami aktivuje sepharosu za vzniku imidokarbonátů a derivátů močoviny [52].

3.6.1 Příprava chromatografického sorbentu

Použité roztoky:

CNBr aktivovaná Sepharosa 4B

1mM HCl

vazný pufr: 0,1 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl; pH 8,4

acetátový pufr: 0,1 M kyselina octová/octan sodný; 0,5 M NaCl; pH 4

PBS/NaN₃: 0,134 M NaCl; 1,8 mM NaH₂PO₄; 0,1 % (w/v) azid sodný (NaN₃); pH 7,2

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

1 M ethanolamin; pH 8,0

0,05 M diethylamin; pH 11,5

Byl navážen 1 g lyofilizovaného prášku CNBr aktivované Sepharosy 4B (Sigma Aldrich), který poskytne 3,5 ml nabobtnaného gelu. Před navázáním ligandu bylo nutno odstranit stabilizující aditiva, čehož bylo docíleno suspendací naváženého lyofilizátu v 15 ml 1 mM HCl (pH 3). Supernatant byl opatrně odebrán a proces ještě dvakrát opakován. Medium bylo následně převedeno do plastové kolonky a promýváno asi 200 ml 1mM HCl. HCl bylo z kolony odmyto 10 ml vazného pufru.

Následovalo navázání ligandu, tedy lektinu ΔGPA-IIL nebo PA-IL na gel (matrix kolony). Byly připravovány dvě kolony, jedna pro lektin ΔGPA-IIL a druhá pro PA-IL, vždy po 1,75 ml gelu. Navážky 1mg lektinu ΔGPA-IIL a 1mg PA-IL byly rozpuštěny v 2,5 ml vazného pufru a roztoky nanoseny na patřičnou kolonu s gelem. Kolony byly uzavřeny a ponechány na převraccím mixeru přes noc při 5 °C. Následující den byl nenavázaný lektin odstraněn z kolon promytím pětinasobkem objemu média vazným pufrům.

Dále bylo nutné zablokovat zbylé aktivní skupiny, na které se antigen nenavázal. Proto byl gel z obou kolon převedena do 1 M ethanolaminu a ponechána 2 hod. při laboratorní teplotě (20,5 °C).

Následovalo promývání kolon třemi cykly s pufrů o různých pH. Každý cyklus se skládal z promytí 12 ml acetátového pufru (pH 4), 5 ml PBS (pH 7,2) a 12 ml diethylaminem (pH 11,5). Nakonec byly kolony propláchnuty uchovávacím roztokem PBS/NaN₃ a uskladněny při 4 °C.

3.6.2 Afinitní chromatografie

Použité roztoky:

promývací roztok I (PBS): 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; pH 7,2

promývací roztok II (PBS + 1 M NaCl): 1 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; pH 7,2

promývací roztok III: 0,05 M diethylamin; pH 11,5

promývací roztok IV: 4 M guanidin/HCl; pH 7,2

neutralizační pufr: 1 M KH₂PO₄; pH 6,75 (upraveno 2 M KOH)

dialyzační roztok (PBS/NaN₃): 0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; 0,1 % (w/v) azid sodný (NaN₃); pH 7,2

Nejprve byl připraven roztok protilátek odebráním 5,25 ml z izolovaných frakcí 2S6 nebo 4S6, popřípadě 4,9 ml pro frakci 2S5 a převedením do plastové zkumavky. Do zkumavky byla pro frakce 2S6 a 4S6 přidána L-fukosa (2% w/v) a pro frakci 2S5 galaktosa (2% w/v) kvůli blokaci vazných míst na lektinu. Roztokem protilátek se sacharidem byl vypláchnut obsah kolonky do plastové zkumavky. Takto připravený roztok protilátek s gelem byl míchán na obraběči přes noc při 5°C.

Následující den byl obsah plastové zkumavky převeden zpět do chromatografické kolonky. Byl jímán eluát (tzv. nezachycená frakce, dále označováno jako NF) a uschován při 5°C. Kolonka byla poté promývána roztokem I (pH 7,2) a byly sbírány frakce po 2 ml. U každé frakce byla měřena absorbance při 280 nm. Jakmile klesla absorbance pod hodnotu 0,03 začlo promívání roztokem II (pH 7,2) za současného odebírání frakcí a měření jejich absorbance při 280 nm. Když klesla absorbance pod hodnotu 0,03 byla zahájena eluce zachycené protilátky roztokem III o výsledném pH 11,5 do mikrozkuvek s připraveným neutralizačním pufrem (potřebné množství neutralizačního pufru k dosažení výsledného pH 7,2 bylo předem stanoveno titrací). Po poklesu absorbance na minimální hodnotu byla kolonka regenerována roztokem IV, což odstranilo zbývající zachycený protein a měřena absorbance frakcí při 280 nm. Následovalo promytí 5 ml roztoku I a 30 ml roztoku PBS/NaN₃ pro uschování kolonky. U frakcí eluovaných roztokem III bylo měřeno absorpční spektrum v rozmezí 200 — 700 nm. Frakce s největším obsahem proteinů byly spojeny a dialyzovány proti 10 l roztoku PBS/NaN₃ přes noc při 5°C. Reaktivita afinitně purifikovaných frakcí byla vyhodnocena pomocí metody ELISA.

4. Výsledky

4.1 Izolace protilátek

Koncentrace izolovaných protilátek byly stanoveny spektrofotometricky. Koncentrace frakcí byla vždy měřena v supernatantu po centrifugaci, aby se zabránilo interferenci případných nerozpustných částí. V tabulce 1 jsou uvedené charakteristiky izolovaných frakcí.

Tabulka 1 - Izolace protilátek proti lektinům PA-IL a Δ GPA-IIL

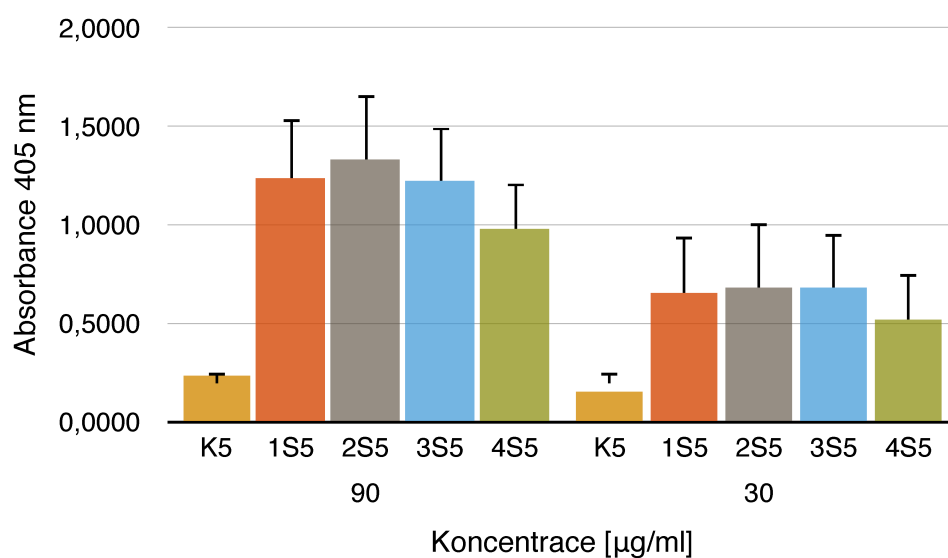
Označení frakce	Časový interval sběru	Počet vajec	Koncentrace frakce [mg/ml]	Objem frakce [ml]	Výtěžek bílkovin [mg]
K5	11.3.2016 – 22.3.2016	10	36,04	23,1	832,5
1S5	5.5.2016 – 16.5.2016	7	33,36	20,2	673,9
2S5	18.5.2016 – 31.5.2016	12	27,06	22,9	619,7
3S5	8.5.2016 – 4.6.2016	10	32,08	29,5	946,36
4S5	22.6.2016 – 3.7.2016	10	36,6	16,5	603,9
K6	12.3.2016 – 22.3.2016	10	41,56	25,0	1039,0
1S6	13.5.2016 – 16.5.2016	5	30,30	16,3	493,9
2S6	18.5.2016 – 29.5.2016	11	26,81	41,5	1112,6
3S6	27.4.2016 – 31.5.2016	4	3,24	9,1	29,5
4S6	2.6.2016 – 1.7.2016	10	33,75	23	776,25

Protilátky proti PA-IL jsou označeny číslem 5 a protilátky proti kombinaci Δ GPA-IIL a PA-IL číslem 6. K5 a K6 jsou kontrolní frakce odebrané před imunizací slepic.

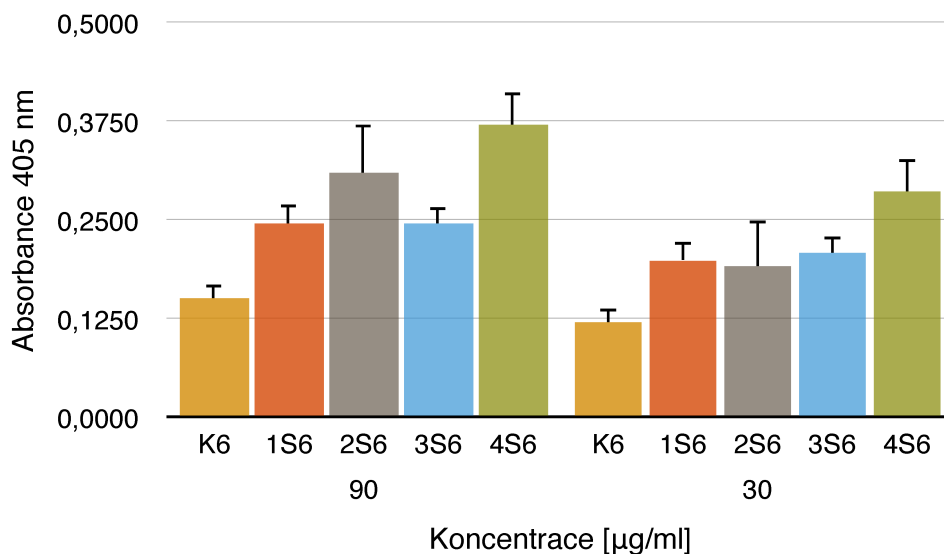
4.2 Specifita izolovaných protilátek

Metodou ELISA bylo na 96-jamkových destičkách zjišťováno, zda imunizované slepice tvořili specifické protilátky proti lektinům jimiž byli imunizováni (obrázky 9 - 11) a křížová reaktivita protilátek (obrázky 12 - 14).

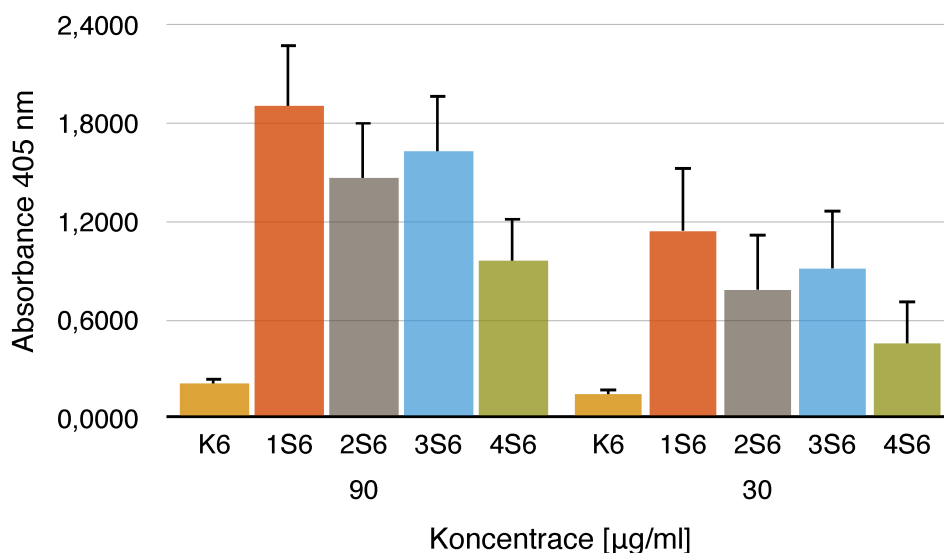
Vyhodnocení výsledků ELISA bylo provedeno na čtečce Sunrise (Hewlett Packard) v programu XRead Plus (verze 4.30), kde byla měřena absorbance v jamkách při 405 nm.



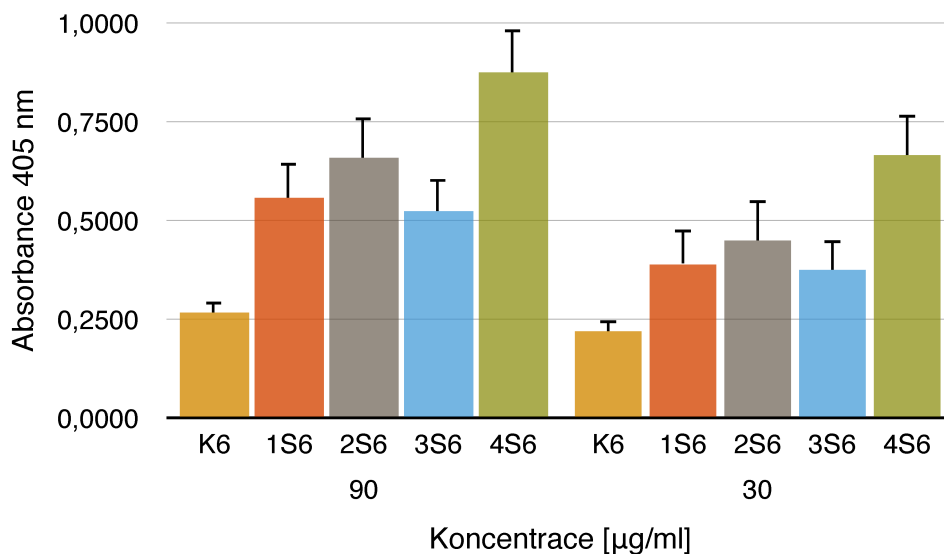
Obrázek 9 - Reaktivita anti-PA-IL protilátek na ELISA. Absorbance byla měřena při 405 nm, protilátky byly nanášeny v koncentracích 90 µg/ml a 30 µg/ml na destičku s ukotveným lektinem PA-IL. K5 značí preimunizační frakci (kontrolu), označení 1-4S5 značí frakce protilátek anti-PA-IL a jejich pořadí izolace.



Obrázek 10 - Reaktivita kombinovaných anti- Δ GPA-IIL/PA-IL protilátek na ELISA. Absorbance byla měřena při 405 nm, protilátky byly nanášeny v koncentracích 90 μ g/ml a 30 μ g/ml na destičku s ukotveným lektinem Δ GPA-IIL. K6 značí preimunizační frakci (kontrolu), označení 1-4S6 značí kombinované frakce protilátek anti- Δ GPA-IIL/PA-IL a jejich pořadí izolace.



Obrázek 11 - Reaktivita kombinovaných anti- Δ GPA-IIL/PA-IL protilátek na ELISA. Absorbance byla měřena při 405 nm, protilátky byly nanášeny v koncentracích 90 μ g/ml a 30 μ g/ml na destičku s ukotveným lektinem PA-IL. K6 značí preimunizační frakci (kontrolu), označení 1-4S6 značí značí kombinované frakce protilátek anti- Δ GPA-IIL a anti-PA-ILa jejich pořadí izolace.

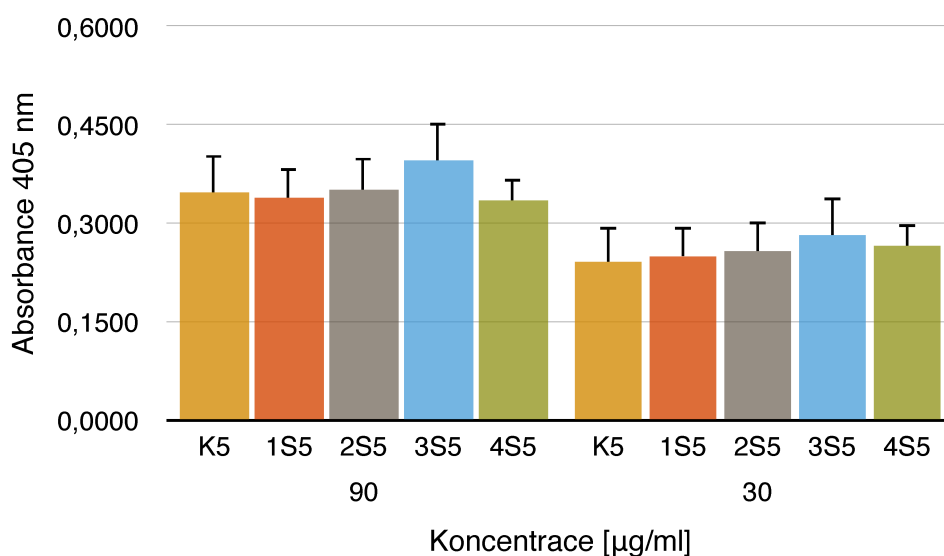


Obrázek 12 - Reaktivita kombinovaných anti- Δ GPA-IIL/PA-IL protilátek na ELISA. Absorbance byla měřena při 405 nm, protilátky byly nanášeny v koncentracích 90 µg/ml a 30 µg/ml na destičku s ukotveným lektinem PA-IIL. K6 značí preimunizační frakci (kontrolu), označení 1-4S6 značí kombinované frakce protilátek anti- Δ GPA-IIL a anti-PA-IL a pořadí jejich izolace.

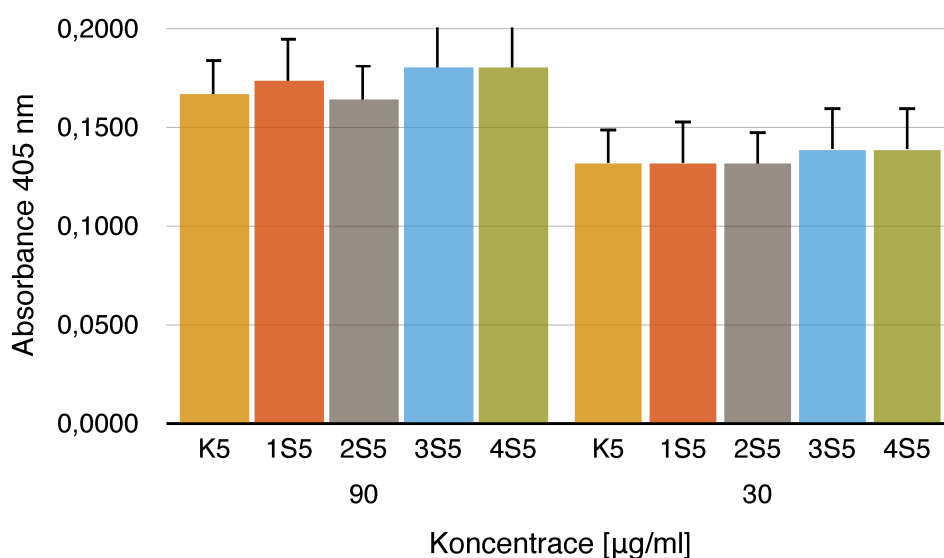
Byl pozorován nárůst reaktivity protilátek anti-PA-IL podle očekávání, u frakce obsahující IgY anti- Δ GPA-IIL/PA-IL byla reaktivita vyšší na lektinu PA-IL oproti Δ GPA-IIL i PA-IIL

4.2.1 Křížová reaktivita IgY

Metodou ELISA byla na 96-jamkových destičkách zkoumána křížová reaktivita frakcí IgY anti-PA-IL na lektinech Δ GPA-IIL i PA-IIL (obrázky 13 a 14).



Obrázek 13 - Křížová reaktivita protilátek anti-PA-IL na ELISA. Absorbance byla měřena při 405 nm, protilátky byly nanášeny v koncentracích 90 µg/ml a 30 µg/ml na destičku s ukotveným lektinem PA-IIL. K5 značí preimunizační frakci (kontrolu), označení 1-4S5 značí frakce protilátek anti-PA-IL a pořadí jejich izolace.



Obrázek 14 - Křížová reaktivita protilátek anti-PA-IL na ELISA. Absorbance byla měřena při 405 nm, protilátky byly nanášeny v koncentracích 90 µg/ml a 30 µg/ml na destičku s ukotveným lektinem ΔGPA-IIL. K5 značí preimunizační frakci (kontrolu), označení 1-4S5 značí frakce protilátek anti-PA-IL a pořadí jejich izolace.

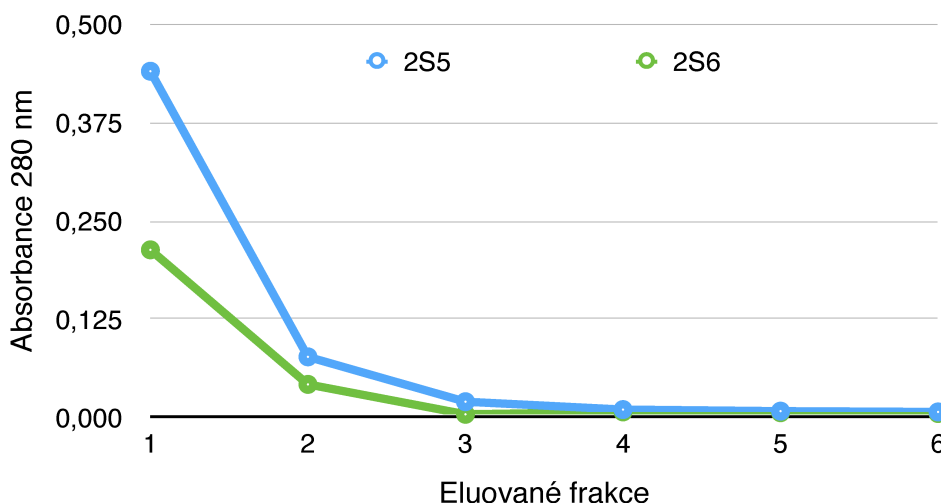
Nebyla pozorována žádná křížová reaktivita protilátek anti-PA-IL.

4.3 Příprava afinitně purifikovaných protilátek

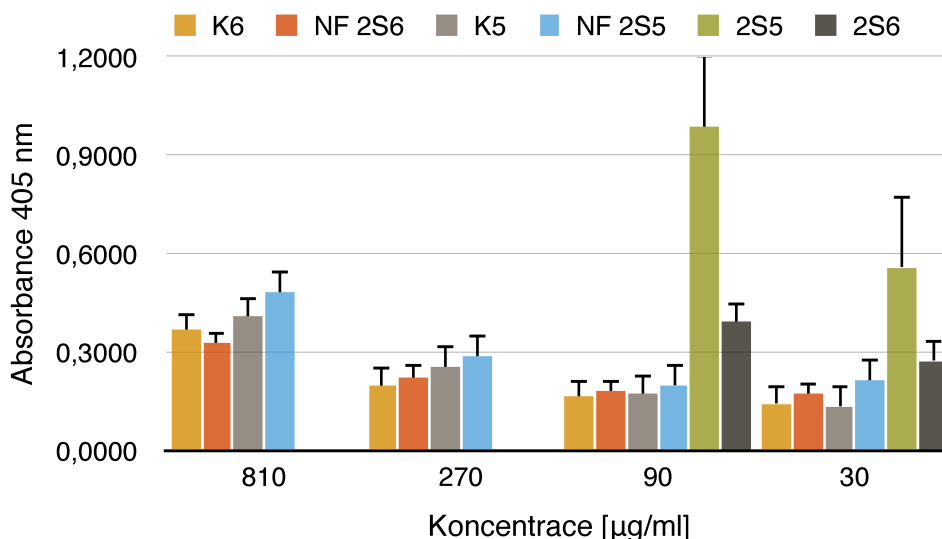
S cílem oddělit specifické IgY proti lektinům PA-IL a Δ GPA-IIL od ostatních protilátek byla prováděna afinitní chromatografie. Na jedné kolonce byl imobilizován lektin PA-IL a na druhé Δ GPA-IIL. Podle reaktivity na ELISA byly pro afinitní chromatografii vybrány frakce 2S5, 2S6 a 4S6. Specifita afinitně purifikovaných protilátek byla stanovena pomocí metody ELISA, viz obrázky 17 a 20.

4.3.1 Afinitní chromatografie frakcí 2S5 a 2S6

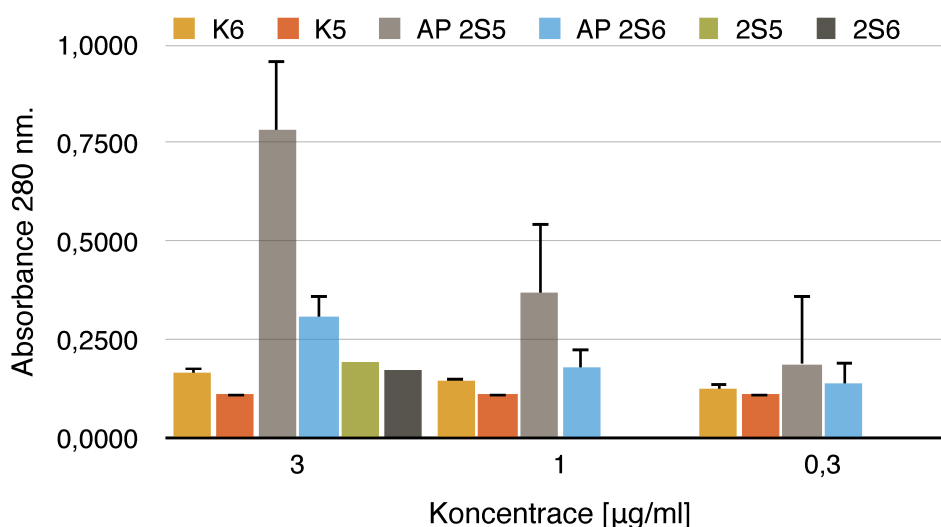
Frakce 2S5 byla purifikována na koloně s lektinem PA-IL a frakce 2S6 na koloně s lektinem Δ GPA-IIL. Na kolonu pro Δ GPA-IIL bylo nanášeno 5,25 ml frakce 2S6 a na kolonu pro PA-IL 4,9 ml frakce 2S5 (množství zvoleno tak, aby se shodovala množství nanesených bílkovin). Eluované frakce s největším obsahem specifických protilátek, tedy frakce 1 a 2 (platí pro 2S5 i 2S6), viz obrázek 15, byly spojeny a určeny pro dialýzu. Po dialýze spojených frakcí 1 a 2 z obou kolon byla měřena koncentrace specifických protilátek a vypočítán výtěžek. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2, str. 42.



Obrázek 15 - Eluce specifických protilátek anti-PA-IL a anti- Δ GPA-IIL/PA-IL. Eluce frakce 2S5 (modrá) z kolony s navázaným lektinem PA-IL a frakce 2S6 (zelená) z kolony s navázaným lektinem Δ GPA-IIL byla provedena roztokem 0,05 M diethylaminu, pH 11,5. Absorbance frakcí byla měřena při 280 nm.



Obrázek 16 - Porovnání reaktivity nezachycených frakcí protilátek anti-PA-IL (NF 2S5) a Δ GPA-IIL/PA-IL (NF 2S6) na ELISA. Absorbance byla měřena při 405 nm, byly nanášeny nezachycené frakce NF 2S5, NF 2S6, kontroly K5 a K6 v koncentracích 810 μ g/ml, 270 μ g/ml, 90 μ g/ml a 30 μ g/ml. Dále byly nanášeny nepurifikované frakce 2S5 a 2S6 v koncentracích 90 μ g/ml a 30 μ g/ml. Frakce K5, 2S5 a NF 2S5 byly naneseny na jamky s lektinem PA-IL a frakce K6, 2S6 a NF 2S6 na jamky s lektinem Δ GPA-IIL.



Obrázek 17 - Porovnání reaktivity afinitně purifikovaných protilátek anti-PA-IL (AP 2S5) a anti- Δ GPA-IIL/PA-IL (AP 2S6) na ELISA. Absorbance byla měřena při 405 nm, byly nanášeny purifikované frakce AP 2S5, AP 2S6, kontroly K5 a K6 v koncentracích 3 μ g/ml, 1 μ g/ml a 0,3 μ g/ml. Dále byly nanášeny nepurifikované frakce 2S5 a 2S6 v koncentracích 3 μ g/ml. Frakce K5, 2S5 a AP 2S5 byly naneseny na jamky s lektinem PA-IL a frakce K6, 2S6 a AP 2S6 na jamky s lektinem Δ GPA-IIL.

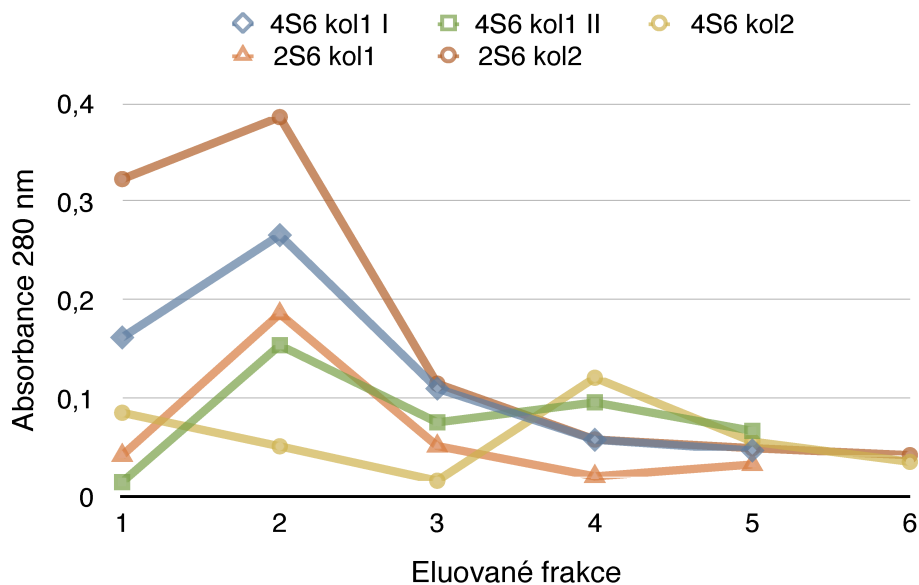
Tabulka 2 - Afinitní chromatografie frakcí 2S6 a 2S5

Název frakce	Objem [ml]	Koncentrace [mg/ml]	Nanášené protilátky [mg]	Afinitně purifikované protilátky [mg]	Výtěžek [%]
AP 2S5	3	0,326	131,5	0,978	0,74
AP 2S6	3	0,159	131,5	0,477	0,36

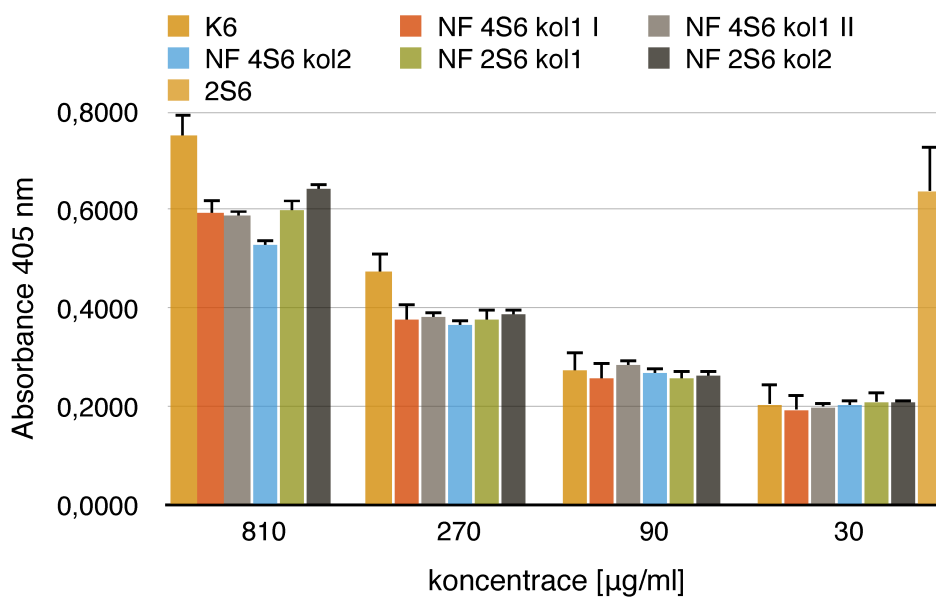
AP 2S5 značí afinitně purifikované protilátky z frakce 2S5 a AP 2S6 značí afinitně purifikované protilátky z frakce 2S6.

4.3.2 Afinitní chromatografie frakcí 2S6 a 4S6

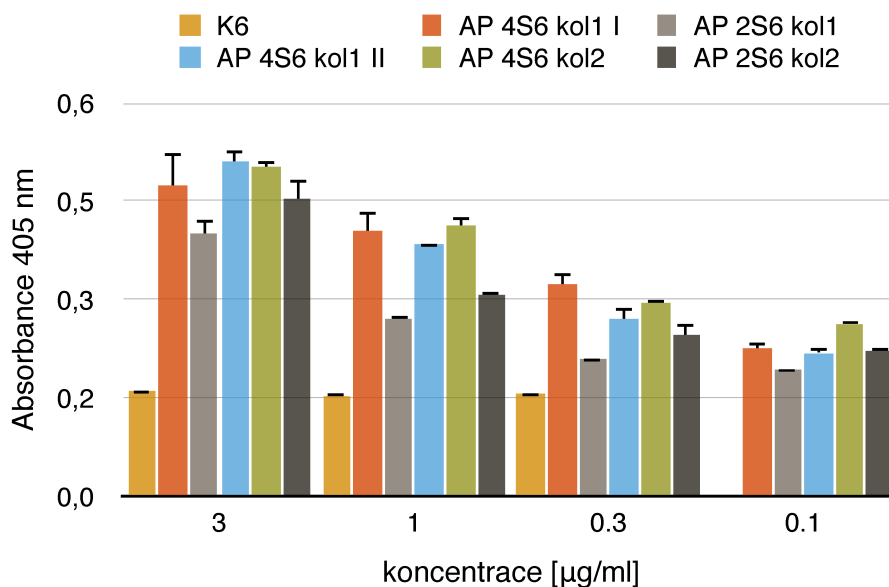
Při těchto afinitních chromatografiích byla porovnávána účinnost kolony pro Δ GPA-IIL (dále označovaná jako kol1), která byla připravená v rámci této práce a kolony s navázaným lektinem PA-IIL (dále označovaná jako kol2), která byla k dispozici v laboratoři. Na kol1 bylo při 1. afinitní chromatografii nanášeno 5,25 ml frakce 4S6 I (aliquota I frakce 4S6), 5,25 ml frakce 4S6 II (aliquota II frakce 4S6) při 2. afinitní chromatografii a 5,25 ml frakce 2S6 při 3. afinitní chromatografii. Na kol2 bylo nanášeno 13 ml frakce 4S6 při 1. afinitní chromatografii a 14 ml frakce 2S6 při 2. afinitní chromatografii. Pro dialyzaci byly zvoleny a spojeny frakce s nejvyšším obsahem bílkovin, pro 4S6 kol1 I frakce 1,2 a 3, pro 4S6 kol1 II frakce 2 a 3, pro 4S6 kol2 frakce 1,2,4 a 5, pro 2S6 kol1 frakce 2,3 a 4, pro 2S6 kol2 frakce 1,2,3,4 a 5. Po dialýze spojených frakcí byla měřena koncentrace specifických protilátek a vypočítán výtěžek. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3, str. 44.



Obrázek 18 - Eluce afinitně purifikovaných protilátek anti- Δ GPA-IIL/PA-IIL. Eluce frakcí z kolony s navázaným lektinem Δ GPA-IIL byla provedena roztokem 0,05 M diethylaminu, pH 11,5. Absorbance frakcí byla měřena při 280 nm.



Obrázek 19 - Porovnání reaktivity nezachycených frakcí protilátek anti- Δ GPA-IIL/PA-IIL na ELISA. Absorbance byla měřena při 405 nm, byly nanášeny nezachycené frakce NF 2S6 kol1, NF 2S6 kol2, NF 4S6 kol1 I, NF 4S6 kol1 II, NF 4S6 kol2 a kontrola K6 v koncentracích 810 μ g/ml, 270 μ g/ml, 90 μ g/ml a 30 μ g/ml. Dále byla nanášena nepurifikovaná frakce 2S6 v koncentraci 30 μ g/ml. Frakce byly naneseny na destičku s ukotveným lektinem Δ GPA-IIL.



Obrázek 20 - Porovnání reaktivity afinitně purifikovaných protilátek anti- Δ GPA-IIL/PA-IIL na ELISA. Absorbance byla měřena při 405 nm, byly nanášeny purifikované frakce AP 2S6 kol1, AP 2S6 kol2, AP 4S6 kol1 I, AP 4S6 kol1 II, AP 4S6 kol2 a kontrola K6 v koncentracích 3 μ g/ml, 1 μ g/ml a 0,3 μ g/ml. Na destičce byl ukotven lektin Δ GPA-IIL.

Tabulka 3 - Koncentrace afinitně purifikovaných frakcí a výtěžky

Název Frakce	Objem [ml]	Koncentrace [mg/ml]	Nanášené protilátky [mg]	Afinitně purifikované protilátky [mg]	Výtěžek [%]
AP 4S6 kol1 I	6,54	0,141	178,5	0,922	0,52
AP 4S6 kol1 II	3,98	0,178	178,5	0,708	0,40
AP 4S6 kol2	12,10	0,115	442,0	1,392	0,32
AP 2S6 kol1	6,70	0,153	141,8	1,025	0,72
AP 2S6 kol2	11,00	0,219	378,0	2,409	0,64

AP 4S6 kol1 I značí afinitně purifikovanou frakci alikvoty I 4S6 (anti- Δ GPA-IIL/PA-IIL) z kolony 1, AP 4S6 kol1 II značí afinitně purifikovanou frakci alikvoty II 4S6 (anti- Δ GPA-IIL/PA-IIL) z kolony 1, AP 4S6 kol2 je afinitně purifikovanou frakci 4S6 (anti- Δ GPA-IIL/PA-IIL) z kolony 2, AP 2S6 kol1 značí značí afinitně purifikovanou frakci 2S6 (anti- Δ GPA-IIL/PA-IIL) a AP 2S6 kol2 je afinitně purifikovaná frakce 2S6 (anti- Δ GPA-IIL/PA-IIL) z kolony 2.

5. Diskuze

Cystická fibróza je genetické onemocnění způsobené mutacemi v CFTR genu, které jsou příčinou ztráty funkce či celkové absence CFTR kanálku v plasmatické membráně epitelálních buněk. Ztráta funkce nebo absence CFTR kanálku iniciuje celou řadu zdravotních problémů u pacientů s CF. Nejzávažnější je postižení dýchacího ústrojí, které postupně ztrácí funkci, kvůli chronickým bakteriálním infekcím. Nejčastěji pacienty s CF infikují všudypřítomné bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, které snadno adherují na plicní epitel pokrytý vrstvou hlenu a způsobují záněty. Tato práce byla zaměřena na vývoj terapeutických protilátek proti bakteriálním virulentním faktorům *Pseudomonas aeruginosa* PA-IL a PA-IIL, které bakterie využívají pro adhezi. Tyto protilátky by mohly v sloužit při dlouhodobé profylaktické léčbě CF, kde mají potenciál snižovat adhezi *P. aeruginosa* na plicní epitel a tak zabránit infekci.

Pro vývoj protilátek byl zvolen přístup izolace imunoglobulinu Y z vaječných žloutků. Žloutkové imunoglobuliny jsou vhodnější pro profylaktickou léčbu ve srovnání s antibiotiky, jelikož na antibiotika mohou vznikat rezistence a IgY nespouštějí signální kaskádu aktivující komplement v lidském organismu [33].

Dvě slepice byly imunizovány proti rekombinantně připraveným lektinům. První proti PA-IL, druhá proti kombinaci rekombinantně připravených lektinů Δ GPA-IIL/PA-IL. Pro imunizaci byl zvolen Δ GPA-IIL namísto PA-IIL, kvůli minimální produkci specifických IgY po imunizaci zvířete lektinem PA-IIL [53]. Lektiny byly podávány zvířatům v kompletním Freudově adjuvans.

Metoda využitá pro izolaci IgY ze slepičích žloutků je ekonomická a časově nenáročná. Izolace zahrnovala ředění oddělených žloutků od bílku do celkového zředění 8x vodovodní vodou s PBS, zamražení a samovolné rozání souběžně s filtrací přes filtrační papír, precipitaci bílkovin pomocí NaCl, centrifugaci a resuspendaci v PBS/NaN₃.

Slepice do žloutků transportují vedle IgY i mnoho dalších imunoglobulinů a proto bylo potřeba ověřit úspěšnost imunizace a specifitu izolovaných frakcí protilátek. Pro tyto účely byla použita metoda ELISA v nepřímém uspořádání na 96-jamkových destičkách. Jelikož hodnoty absorbance totožných frakcí se test od testu liší, můžeme říci, že metoda

ELISA není 100% reprodukcibilní. Mezi možné příčiny této skutečnosti patří: inkonzistentní doby inkubace, inkonzistentní promývání destičky, chyby při pipetování, použití reagensů při různých teplotách. Z těchto důvodů nelze porovnávat hodnoty absorbance ze dvou různých destiček. Nicméně můžeme porovnávat poměry, jak dané protilátky reagovaly. Prováděné testy prokázaly, že zvířata po imunizaci opravdu produkovala protilátky specifické proti příslušným lektinům, byl pozorován nárůst reaktivity oproti kontrolním protilátkám izolovaným před imunizací (viz kapitola 4.2 Specifita izolovaných protilátek, str. 37).

Z porovnání výsledků z obrázků 9-14 vyplývá několik důležitých závěrů. IgY izolované z vajec slepic, které byli imunizovány proti lektinu PA-IL se chovají podle očekávání, tzn.: vykazují výrazný nárůst absorbance při 405 nm oproti kontrolním protilátkám na lektinu PA-IL (obrázek 9) a hodnoty absorbance při 405 nm na lektinech PA-IIL i Δ GPA-IIL jsou srovnatelné nebo identické s kontrolou (obrázky 13 a 14), tedy IgY anti-PA-IL nevykazují křížovou reaktivitu. Z těchto faktů vyplývá, že imunizace proti lektinu PA-IL proběhla podle očekávání a slepice tvořila specifické IgY anti-PA-IL. Výsledky z obrázků 10 a 11 potvrzují, že zvíře imunizované oběma lektiny (Δ GPA-IIL a PA-IL) produkovalo specifické protilátky proti zmíněným lektinům. Byla pozorována větší reaktivita frakcí IgY anti- Δ GPA-IIL/PA-IL (1S6-426) na lektinu PA-IL oproti reaktivitě těchto frakcí na lektinu Δ GPA-IIL. Důvod tohoto jevu je zatím neznámý, možným vysvětlením je teorie, že imunizace zvířete lektinem Δ GPA-IIL z neznámých důvodů podporuje tvorbu jak IgY anti-PA-IL, tak IgY anti- Δ GPA-IIL. Porovnáním výsledků z obrázků 10 a 12 je patrné, že reaktivita frakcí IgY anti- Δ GPA-IIL/PA-IL na lektinu PA-IIL je vyšší než na lektinu Δ GPA-IIL. Tento jev je pravděpodobně důsledkem odstranění C-koncové aminokyseliny na lektinu Δ GPA-IIL.

Pro získání jen specifické frakce protilátek proti příslušným lektinům bylo využito metody afinitní chromatografie na gelovém nosiči s imobilizovaným lektinem. Purifikace frakce 2S5 na koloně s imobilizovaným PA-IL poskytla nižší než obvyklé výtěžky (0,74 % oproti obvyklému 1,0-1,5 % výtěžku [33]). Aplikace příliš nízkého množství lektinu při přípravě kolony je možným vysvětlením těchto pozorování, tedy kolona neměla dostatečnou kapacitu. První purifikace frakce 2S6 bez přidané L-fukosy do elučního roztoku též skončila s nižším výtěžkem (0,36 %, viz tabulka 3, str. 44) než bylo očekáváno.

Výsledky na obrázcích 16 a 17 prokazují, že afinitní purifikace neproběhla se 100% účinností (reaktivita nezachycených frakcí na ELISA je vyšší než u kontrolních protilátek), dále dokazují, že ve frakci AP 2S6 se nachází nejen specifické protilátky (viz, srovnání reaktivity afinitně purifikované frakce a původní frakce na obrázku 17, str. 41). Druhá purifikace frace 2S6, již s přidanou L-fukosou do elučního roztoku byla úspěšnější než první, výtěžek byl přibližně dvojnásobný (0,72 %) a z výsledků na obrázcích 19 a 20 plyne, že afinitní purifikace proběhla s vyšší účinností než předchozí (reaktivita nezachycených frakcí je menší než reaktivita kontrolních protilátek). Nižší výtěžky z první afinitní purifikace jsou vysvětleny faktem, že část specifických protilátek protekla kolonou do nezachycené frakce. Dále bylo prokázáno, že ve frakci z druhé afinitní purifikace je větší procento specifických protilátek (porovnání obrázků 20 a 17). Je tedy patrné, že přítomnost L-fukosy v elučním roztoku úspěšně zabraňuje interakcím lektin-protilátka přes glykosylovanou Fc část protilátky a tedy byly zachyceny jen protilátky specificky vázající lektin Δ GPA-III. Afinitní chromatografie frakce 4S6 též probíhala obdobně s nižšími výtěžky. Při purifikaci frakce 4S6 byly porovnány účinnosti kolon 1 a 2. Z tabulky 3 je patrné, že kolony 1 i 2 purifikovaly se srovnatelnou účinností. Různé výtěžky ve frakcích AP 4S6 kol1 I a AP 4S6kol1 II vznikly chybou při postupu afinitní chromatografie, namísto použití 0,05 M diethylaminu (pH 11,5) byl omylem aplikován roztok guanidinu (roztok IV, pH 6,75) a až následně roztok diethylaminu a tak část protilátek protekla kolonou.

Můžeme říci, že oddělení IgY anti-PAIL od IgY anti- Δ GPA-III proběhlo úspěšně u frakcí AP 2S6 kol1 a AP 2S6 kol2. Takto oddělené frakce specifických protilátek mohou být využity k porovnání vlivu jednotlivých specifických protilátek i protilátek v kombinaci na adheenci *P. aeruginosa* na plicní buňky na adhezních testech. Porovnání je možné, protože purifikované specifické IgY pochází z jednoho vzířete.

6. Souhrn

- Podařilo se izolovat frakce žloutkových imunoglobulinu IgY anti-PA-IL a kombinovanou frakci IgY Δ GPA-IIL/Pa-IL z vajec imunizovaných slepic příslušnými lektiny.
- Spektrofotometricky byly určeny koncentrace frakcí, které byly seřazeny podle data sběru vajec.
- Metodou ELISA bylo ověřeno, že slepice po imunizaci začli produkovat specifické protilátky proti příslušným antigenům. Reaktivita IgY na ELISA u specifických protilátek výrazně narostla oproti reaktivitě kontrolních protilátek.
- Metodou ELISA byla stanovena specifita pro každou frakci na každém bakteriálním lektinu, protilátky anti PA-IL vykazovaly vysokou specifitu na lektinu PA-IL a žádnou nebo minimální na lektinu Δ GPA-IIL a PA-IIL, frakce protilátek anti- Δ GPA-IIL/Pa-IL vykazovaly vyšší specifitu pro lektin PA-IL než pro Δ GPA-IIL.
- Pro afinitní purifikaci specifických protilátek byly připraveny dvě chromatografické kolony, jedna s imobilizovaným lektinem PA-IL a druhá s Δ GPA-IIL.
- Byly provedeny afinitní purifikace frakcí 2S5, 2S6 a 4S6. Při purifikaci frakcí 2S5 a 2S6 větší výtěžek poskytla kolona s lektinem PA-IL (0,74 %) oproti koloně s imobilizovaným Δ GPA-IIL (0,32 %). Při purifikaci frakcí 2S6 a 4S6 na koloně s lektinem Δ GPA-IIL byl výtěžek vyšší pro frakci 2S6 (0,72 %) oproti 4S6 (0,46 %). Přidáním L-fukosy do elučního roztoku byly navýšeny výtěžky specifických protilátek.
- Metodou ELISA bylo prokázáno, že afinitní purifikace frakcí 2S6 (při druhé afinitní purifikaci) a 4S6 byly více načištěné oproti afinitně purifikovaným frakcím z první afinitní chromatografie
- Protilátky anti- Δ GPA-IIL byly odděleny z frakce obsahující IgY anti-anti- Δ GPA-IIL/Pa-IL

7. Použitá literatura:

- [1] Gibson, Ronald L., Jane L. Burns, and Bonnie W. Ramsey. "Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis." *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 168 (2003): 918-951.
- [2] <http://www.cystickafibroza.cz> (25. únor 2016)
- [3] <http://www.cfklub.cz/data/import/File/Zluta-Knizka-Prirucka-pro-Nemocne-a-Jejich-Rodice.pdf> (25. únor 2016)
- [4] Ann Harris, Anne H. Thomson. "Cystic Fibrosis". *Oxford University Press* (2008): 1-19.
- [5] Row, S. M., S. Miller, and E. J. Sorscher. "Mechanisms of disease; cystic fibrosis." *N. Engl. J. Med.* 352 (2005): 1992-2001.
- [6] Riordan, John R., Johanna M. Rommens, and Alon Bat-Sheva. "Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA." *Science* 245 (1989): 1066–73.
- [7] Higgins, Christopher F. "ABC transporters: from microorganisms to man." *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8 (1992): 67-113.
- [8] Ames, Giovanna Ferro-Luzzi, Carol S. Mimura, and Venkatakrisna Shyamala. "Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *Escherichia coli* to human: traffic ATPases." *FEMS Microbial. Lett.* 6 (1990): 429-446.
- [9] Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., & Gileadi, U. "Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport." *Nature* 346 (1990): 362.
- [10] Anderson, Matthew P., and Richard J. Gregory. "Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity." *Science* 253 (1991): 202.
- [11] Cheung, Min, and Myles H. Akabas. "Identification of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel-lining residues in and flanking the M6 membrane-spanning segment." *Biophys. J.* 70 (1996): 2688-2695.

- [12] Anderson, M. P., Berger, H. A., Rich, D. P., Gregory, R. J., Smith, A. E., & Welsh, M. J. "Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel." *Cell* 67 (1991): 775-784.
- [13] Baukowitz, T., Hwang, T. C., Nairn, A. C., & Gadsby, D. C. "Coupling of CFTR Cl⁻ channel gating to an ATP hydrolysis cycle." *Neuron* 12 (1994): 473-482.
- [14] Carson, Mark R., Sue M. Travis, and Michael J. Welsh. "The two nucleotide-binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity." *J. Biol. Chem.* 270 (1995): 1711-1717.
- [15] Welsh, Michael J., and Alan E. Smith. "Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis." *Cell* 73 (1993): 1251-1254.
- [16] Hamosh, Ada, Beryl J. Rosenstein, and Garry R. Cutting. "CFTR nonsense mutations G542X and W1282X associated with severe reduction of CFTR mRNA in nasal epithelial cells." *Hum. Mol. Genet.* 1 (1992): 542-544.
- [17] Tsui, Lap-Chee. "The spectrum of cystic fibrosis mutations." *Trends. Genet.* 8 (1992): 392-398.
- [18] Wilschanski, M., Zielenski, J., Markiewicz, D., Tsui, L. C., Corey, M., Levison, H., & Durie, P. R. "Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations." *J. Pediatr.* 127 (1995): 705-710.
- [19] Kerem, Eitan. "Pharmacological induction of CFTR function in patients with cystic fibrosis: mutation-specific therapy." *Pediatrics. Pulmonol.* 40 (2005): 183-196.
- [20] Lyczak, Jeffrey B., Carolyn L. Cannon, and Gerald B. Pier. "Lung infections associated with cystic fibrosis." *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (2002): 194-222.
- [21] Boucher, Richard C. "An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease." *Curr. Opin. Pulm. Med.* (2002): 1359-1371.
- [22] Cole, Alexander M., Puneet Dewan, and Tomas Ganz. "Innate antimicrobial activity of nasal secretions." *Infect. Immun.* 67 (1999): 3267-3275.
- [23] Cohen, Taylor Sitarik, and Alice Prince. "Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome." *Nat. Med.* 18 (2012): 509-519.
- [24] Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J., & Greenberg, E. P. "Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms." *Nature* 407 (2000): 762-764.

- [25] Fearon, Douglas T., and Richard M. Locksley. "The instructive role of innate immunity in the acquired immune response." *Science* 272 (1996): 50.
- [26] Zabner, J., Smith, J. J., Karp, P. H., Widdicombe, J. H., & Welsh, M. J.. "Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro." *Mol. Cell.* 2 (1998): 397-403.
- [27] Medzhitov, Ruslan, and Charles A. Janeway. "Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system." *Science* 296 (2002): 298-300.
- [28] Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., & Roitt, I. M. *Roitt's essential immunology*. John Wiley & Sons, 2016.
- [29] <http://www.immune.org.nz/category/tags/specific-immunity> (20.3.2017)
- [30] <http://www.antibodies-online.com/resources/#General> (20.3.2017)
- [31] <http://www.wiley.com/legacy/products/subject/life/elgert/CH04.pdf> (20.3.2017)
- [32] Davalos-Pantoja, L., Ortega-Vinuesa, J. L., Bastos-Gonzalez, D., & Hidalgo-Alvarez, R. "A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles." *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 11 (2000): 657-673.
- [33] 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 (2005): 129-154.
- [34] Morrison, S. L., Mohammed, M. S., Wims, L. A., Trinh, R., & Etches, R. "Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk." *Mol. Immunol.* 38 (2002): 619-625.
- [35] Larsson, Anders, A. Karlsson-Parra, and J. Sjöquist. "Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors." *Clin. Chem.* 37 (1991): 411-414.
- [36] Gerl, M., Steinert, C., Quint, M., Schade, R., & Günzler, V. "Immunisation of Chickens with the Aminoterminal Propeptide of Bovine Procollagen Type III (Specificity of egg yolk antibodies and comparison with immunoassays using rabbit and mouse antibodies." *ALTEX* 13 (1995): 51-56.
- [37] Carlander, David, and Anders Larsson. "Avian antibodies can eliminate interference due to complement activation in ELISA." *Ups. J. Med. Sci.* 106 (2001): 189-195.

- [38] Gellatly, Shaan L., and Robert EW Hancock. "Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses." *Pathog. Dis.* 67 (2013): 159-173.
- [39] Lister, Philip D., Daniel J. Wolter, and Nancy D. Hanson. "Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms." *Clin. Microbiol. Rev.* 22 (2009): 582-610.
- [40] <https://www.rroij.com/articles-images/microbiology-biotechnology-biofilm-life-cycle-4-3-1-g001.png> (1.4.2017)
- [41] Høiby, N., Johansen, H. K., Moser, C., Song, Z., Ciofu, O., & Kharazmi, A. "Pseudomonas aeruginosa and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth." *Microbes. Infect.* 3 (2001): 23-35.
- [42] Hori, Katsutoshi, and Shinya Matsumoto. "Bacterial adhesion: from mechanism to control." *Biochem. Eng. J.* 48 (2010): 424-434.
- [43] Chemani, C., Imberty, A., de Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerová, M., Guery, B. P., & Faure, K. "Role of LecA and LecB lectins in Pseudomonas aeruginosa-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands." *Infect. Immun.* 77 (2009): 2065-2075.
- [44] Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S. & Jaeger, K. E. "Pseudomonas aeruginosa lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation." *Microbiology* 151 (2005): 1313-1323.
- [45] <https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/cf/treatment> (4.4.2017)
- [46] Griesenbach, U., D. M. Geddes, and E. W. F. W. Alton. "Gene therapy for cystic fibrosis: an example for lung gene therapy." *Gene. Ther.* 11 (2004): 43-50.
- [47] Lang, A. B., Rådeberg, A., Schöni, M. H., Que, J. U., Furer, E., & Schaad, U. B. "Vaccination of cystic fibrosis patients against Pseudomonas aeruginosa reduces the proportion of patients infected and delays time to infection." *J. Pediatric. Infect. Dis. Soc.* 23 (2004): 504-510.
- [48] Heinzl, B., Eber, E., Oberwaldner, B., Haas, G., & Zach, M. S. "Effects of inhaled gentamicin prophylaxis on acquisition of Pseudomonas aeruginosa in children with cystic fibrosis: a pilot study." *Pediatr. Pulmonol.* 33 (2002): 32-37.
- [49] <http://www.sinobiological.com/indirect-elisa.html> (20.4.2017)

[50] Hodek, P., Trefil, P., Simunek, J., Hudecek, J., & Stiborova, M. "Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations." *Int. J. Electrochem. Sci.* 8 (2013): 113-124.

[51] <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/indirect-elisa>

[52] Sigma: Cyanogen bromide activated matrices (C9142), Product information

[53] Hodek, P. slovní sdělení

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

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka