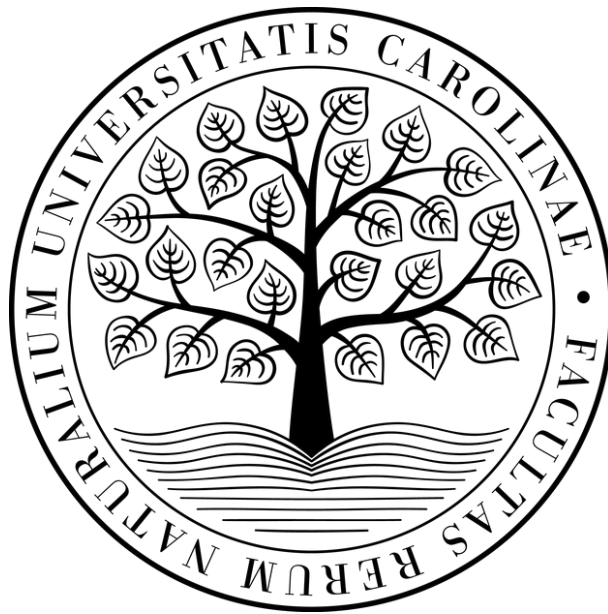


Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Marek Zákopčaník

Studium interakce lektin-protilátka pomocí povrchové plasmonové rezonance

Study of lectin-antibody interaction by using surface plasmon resonance

Bakalářská práce

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

Praha, 2018

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Místo a datum:

Podpis:

# Poděkování

Chtěl bych poděkovat prof. RNDr. Petru Hodkovi za odborné vedení této práce a za poskytnutí prostředí k její realizaci. Mé poděkování patří i Mgr. Josefu Houserovi, Ph.D. z Centrální laboratoře Interakce a krystalizace biomolekul (Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity) za věnovaný čas, prostředky a předané znalosti v oblasti metody SPR. Dále bych rád poděkoval kolegyni Bc. Michaele Vaškové za pomoc a podporu během experimentální části této práce.

# Abstrakt

Cystická fibróza je autozomálně recesivní onemocnění, které postihuje zejména europoidní rasu. Je způsobeno mutacemi v CFTR genu, které vedou k poruchám funkce stejnojmenného iontového kanálu. Nejvíce je zasaženo dýchací ústrojí, jelikož změnou podmínek plic ztrácí přirozenou obrannou funkci a stávají se tak náchylné k bakteriálním infekcím, které jsou nejčastější příčinou úmrtí pacientů s CF. Mezi tyto bakterie se řadí mimo jiné *Burkholderia cepacia*, která u pacientů s CF způsobuje velmi rychlou degradaci plicní tkáně. Boj s touto bakteriální infekcí komplikuje řada rezistencí vůči antibiotikům a tvorba biofilmu.

Potenciálním prostředkem prevence bakteriálních infekcí plic pacientů s CF jsou slepičí protilátky proti bakteriálním lektinům. S využitím afinitní chromatografie na koloně s imobilizovaným lektinem BC2L-A byla získána frakce specifických protilátek. Imunoreaktivita směsné protilátky, afinitně purifikované protilátky a nezachycené frakce byla porovnána metodou ELISA. Z porovnání imunoreaktivity vychází, že došlo k zakoncentrování specifických protilátek více než 10×.

Dále byla studována interakce lektin-protilátka pomocí metody SPR. V prvním uspořádání byla měřena síla vazby aktivního lektinu na glykosylace protilátek obsažených v nezachycené frakci. Disociační konstanta této interakce byla stanovena na  $K_D = (4,97 \pm 0,57) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Ve druhém uspořádání byla měřena afinita specifické protilátky (afinitně purifikované) k lektinu. Schopnost lektinu vázat glykosylace byla inaktivována chelatací  $\text{Ca}^{2+}$  iontů činidlem EDTA. Naměřená afinita byla vyšší s výslednou  $K_D = (6,1 \pm 1,4) \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Ve třetím uspořádání bylo vazné místo lektinu blokováno přidáním D-manosy do roztoku. Výsledné disociační konstanty  $K_D = (2,29 \pm 0,69) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , respektive  $K_D = (2,38 \pm 0,51) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , ukazují, že inaktivace D-manosou není dostatečná.

Klíčová slova: žloutkové imunoglobuliny, afinitní purifikace, *Burkholderia cepacia*, povrchová plasmonová rezonance

# Abstract

Cystic fibrosis is an autosomal recessive disease affecting mostly Caucasian race. The disease is caused by mutations in CFTR gene. The most affected organ system is respiratory tract, because the changes lead to insufficient natural defence function of lungs, causing the lungs being susceptible to bacterial infections, which are the most common cause of death of CF patients. Among these bacteria is also *Burkholderia cepacia*, which causes rapid degradation of pulmonary tissue. Eradication of this bacterial infection is complicated by a number of antibiotic resistances and biofilm formation.

Chicken antibodies against bacterial lectins are potential means of preventing bacterial lung infection of patients with CF. Using the affinity chromatography with BC2L-A immobilized column a specific antibody fraction was obtained. The immunoreactivity of the mixed antibodies, affinity purified antibodies and unbounded fraction was compared by ELISA. The comparison of immunoreactivity has emerged that the concentration of the specific antibodies has grown more than 10 times.

Interaction of lectin-antibody was studied with SPR method. In the first arrangement, the binding strength of the active lectin to glycosylation of the unbounded fraction antibodies was measured. The dissociation constant of this interaction was determined at  $K_D = (4,97 \pm 0,57) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . In the second arrangement, the affinity of specific antibody (affinity purified) to lectin was measured. The ability of lectin to bind glycosylation was inactivated by chelation of  $\text{Ca}^{2+}$  ions with EDTA. The measured affinity was higher with the resulting  $K_D = (6,1 \pm 1,4) \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . In the third arrangement, the binding site of the lectin was blocked by adding D-mannose to the solution. The resulting dissociation constants  $K_D = (2,29 \pm 0,69) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , respectively  $K_D = (2,38 \pm 0,51) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  indicate that D-mannose inactivation is not sufficient.

Key words: yolk immunoglobulins, affinity purification, *Burkholderia cepacia*, surface plasmon resonance

(In Czech)

# Obsah

Seznam zkratk.....	7
1 Úvod.....	8
1.1 Cystická fibróza .....	8
1.2 CFTR gen .....	8
1.2.1 Mutace CFTR genu .....	9
1.2.2 Dědičnost.....	10
1.3 Projevy cystické fibrózy .....	11
1.3.1 Patogeneze respiračního ústrojí.....	12
1.4 <i>Burkholderia cepacia</i> .....	14
1.4.1 Lektiny <i>Burkholderia cepacia</i> .....	14
1.5 Imunitní systém.....	15
1.5.1 Vrozená imunita.....	16
1.5.2 Získaná imunita.....	16
1.6 Léčba cystické fibrózy .....	18
1.6.1 Využití slepičích protilátek.....	19
2 Cíl práce.....	21
3 Materiál a metody.....	22
3.1 Použité přístroje a chemikálie .....	22
3.1.1 Přístroje.....	22
3.1.2 Materiál .....	22
3.2 Určení koncentrace bílkovin.....	23
3.3 Afinitní purifikace protilátek anti BC2L-A .....	23
3.3.1 Příprava chromatografické kolony.....	25
3.3.2 Afinitní purifikace .....	26

3.4	ELISA.....	27
3.5	Stanovení afinity protilátek metodou SPR.....	28
3.5.1	Imobilizace protilátek.....	30
3.5.2	Studium interakce lektin-protilátka.....	31
3.5.3	Vyhodnocení.....	34
4	Výsledky .....	36
4.1	Afinitní purifikace protilátek anti BC2L-A .....	36
4.2	Studium afinity protilátek metodou SPR.....	38
5	Diskuze.....	41
6	Závěr .....	44
7	Seznam použité literatury .....	45
8	Příloha.....	48

# Seznam zkratek

ASL	„airway surface liquid“ (povrchová plicní kapalina)
BC2L-A	lektin <i>Burkholderia cepacia</i>
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CF	cystická fibróza
CFTR	„cystick fibrosis transmembrane conductance regulator“
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Ig	imunoglobulin
kbp	tisíc párů bazí (kilo base pairs)
kDa	kilodalton
MSD	„membrane spanning domain“ (transmembránová doména)
NBD	„nucleotide binding domain“ (nukleotid-vázající doména)
PBS	„phosphate buffered saline“ (fosfátem pufrovaný izotonický roztok)
PCL	„periciliary liquid“ (meziřasinková kapalina)



# 1 Úvod

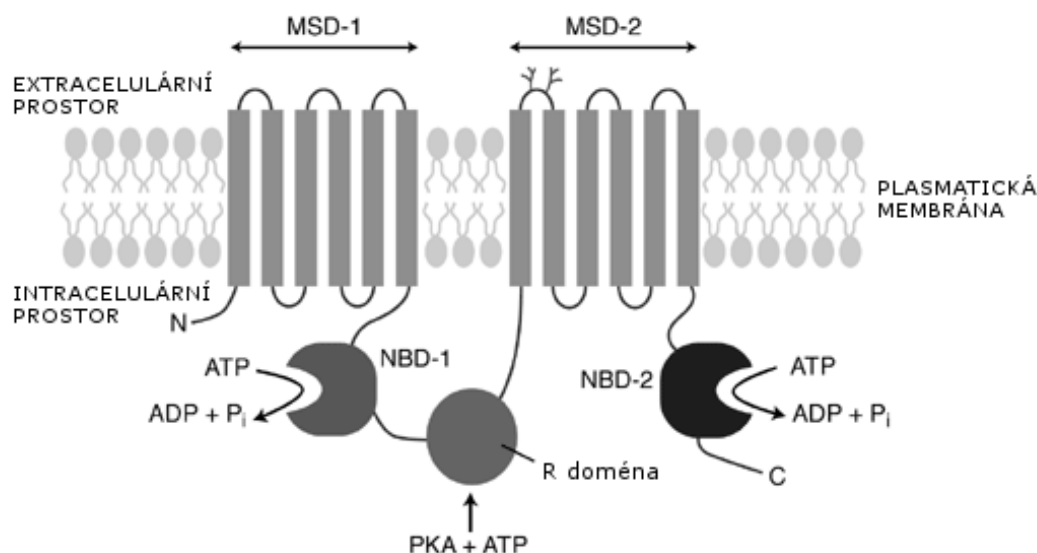
## 1.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) je nejčastějším letálním autozomálně recesivním onemocněním postihujícím zejména europoidní rasu [1]. Toto onemocnění postihuje 1 z 2000 – 3000 novorozenců, v ČR je to přibližně 1 z 6330 narozených – CF je tedy u nás považována za onemocnění vzácné [2,3]. V současné době není možné tuto chorobu vyléčit, pouze mírnit její dopady na život pacientů. Díky tomu ale medián délky života pacientů s CF od jejího popsání v roce 1938 americkou patoložkou a pediatričkou Dorothy Andersen výrazně vzrostl a nyní se pohybuje okolo 40 let [4].

Onemocnění je způsobeno mutacemi v genu pro CFTR protein (z anglického „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“), kterých je v současné době známo přes 2000 různých typů, z nichž ale u méně než 200 byla prokázána spojitost s CF a pouze 22 těchto mutací se vyskytuje u alespoň 0,1 % známých alel [1,5].

## 1.2 CFTR gen

Gen pro CFTR protein se nachází na dlouhém raménku chromosomu 7 (konkrétní lokus: 7q31.2), jeho délka je asi 190 kbp a čítá celkem 32 exonů. CFTR protein je exprimován do apikální membrány epitelálních buněk. Řadí se do ABC (ATP-binding cassette) superrodiny. Tento kanál (Obrázek 1, strana 9) tvoří dvě části, z nichž každá obsahuje zpravidla (ale ne vždy) 6 transmembránových helixů (MSD) a jednu nukleotid-vázající doménu (NBD). Tyto dvě části jsou na intracelulární straně propojeny přes regulační doménu (R). Membránové ukotvení pomocí MSD zároveň tvaruje kanál specificky pro Cl<sup>-</sup> ionty, NBD hydrolyzuje ATP a fosforylace R domény ovlivňuje celkovou aktivitu. Řízení kanálu probíhá na dvou úrovních – jednak přes regulační doménu, jejíž fosforylaci zajišťuje cAMP dependentní protein kinasa (PKA), kdy dochází k fosforylaci serinových zbytků a dále přes nukleotid vázající domény, které pak regulují samotné otevírání či zavírání kanálu [6–8].



Obrázek 1 – Schéma struktury CFTR proteinu. Vyobrazeny jsou dvě části spojené regulační doménou (R), z nichž každá obsahuje doménu, která váže nukleotid (NBD), a kotvící transmembránové helixy (MSD). Převzato a upraveno [9].

Hlavní úlohou CFTR proteinu, jakožto chloridového kanálu, je sekrece  $\text{Cl}^-$  iontů a tím udržování rovnováhy elektrolytů. Souběžně tím ovlivňuje transport  $\text{HCO}_3^-$  iontů do buňky, čímž přispívá k regulaci pH buňky. Činnost CFTR proteinu je také úzce spjata se sodným kanálem epitelálních buněk (ENaC), jelikož oba přispívají k vyrovnané sekreci perikulární tekutiny (PCL – periciliary liquid), která hraje významnou roli v obraně organismu před bakteriemi [2,4].

### 1.2.1 Mutace CFTR genu

V současné době bylo klasifikováno 6 tříd mutací CFTR proteinu podle různých mechanismů poruchy funkce či syntézy:

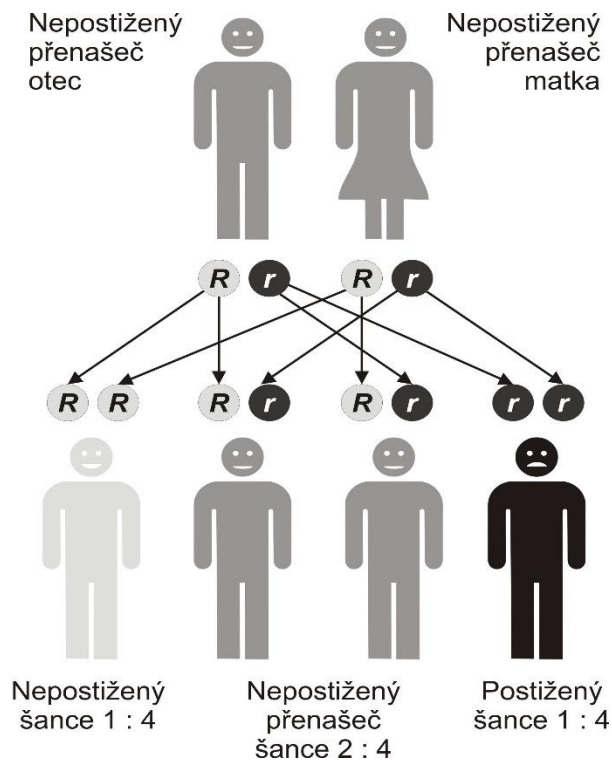
- I. třída První třída zahrnuje mutace způsobující nesmyslné kódování (nonsense mutations), jako např. Gly542X, Trp1282X, dále také mutace vedoucí k posunu čtecího rámce, či chybný sestřih mRNA. Všechny tyto mutace mají za následek poruchu na úrovni biosyntézy CFTR proteinu. Vznikající meziprodukty jsou degradovány a pacientům s touto třídou mutace CFTR kanál zcela chybí [1,10]

- II. třída Do této třídy se řadí mutace, jejichž následkem dochází k chybnému zpracování CFTR. Spadá sem nejrozšířenější mutace  $\Delta F508$  – delece tří bází kódujících fenylalanin v pozici 508 (NBD1). Mutace mění sekundární a terciální strukturu, což vede k chybnému složení proteinu a jeho degradaci [1,2,4,10]
- III. třída Mutace třetí třídy dávají vznik CFTR proteinu, který nereaguje na cAMP signalizaci. Následkem substituce aminokyselin nedochází k přenosu konformační změny, čímž je poškozena regulace kanálu. Nejčastější mutací této třídy je Gly551Asp substituce [1,4,10].
- IV. třída V případě těchto mutací je protein správně exprimován do membrány, ale záměnou aminokyselin (např. Arg117His, Arg347Pro) v doméně kotvící CFTR v membráně má kanál sníženou propustnost pro chloridové ionty a nižší pravděpodobnost otevření. Celková vodivost CFTR kanálu se tak snižuje [1,10].
- V. třída Mutace této třídy vedou k chybnému sestřihu přepsané RNA. Není tak nijak poškozena funkce proteinu, ale množství CFTR kanálu v membráně není dostatečné [1,4]
- VI. třída Nedávno objevená třída mutací způsobuje sníženou stabilitu exprimovaného CFTR proteinu. Mutantní proteiny postrádají zhruba 70 – 100 aminokyselinových zbytků na C-konci, které nejsou nezbytně nutné pro jeho funkci či lokalizaci v membráně, ale výrazně snižují jejich životnost [1,4,10]

### 1.2.2 Dědičnost

Jelikož se jedná o autozomálně recesivní onemocnění, objevuje se pouze, pokud jsou oba geny získané od rodičů postiženy mutací. V případě přítomnosti pouze jednoho mutovaného genu je jedinec zdravým nosičem. V otázce dědičnosti pak fungují základní mendelovské principy. V případě, že jsou oba rodiče nositeli, je u narozeného dítěte 25% pravděpodobnost, že bude trpět CF, 50% pravděpodobnost, že bude zdravým

nosičem a 25% pravděpodobnost, že nezíská ani jeden z mutovaných genů a bude tak zcela zdravé (Obrázek 2).



Obrázek 2 – Schéma dědičnosti autozomálně recesivního onemocnění. Pokud jsou oba rodiče nositeli onemocnění, pravděpodobnost narození zcela zdravého jedince je 25 %, stejně tak pro nemocné dítě a pravděpodobnost, že dítě bude přenašečem, je 50 %. Převzato [11].

### 1.3 Projevy cystické fibrózy

Poškozená či chybějící funkce CFTR kanálu vede k porušení rovnováhy hospodaření s ionty a produkce slizničního sekretu. Jelikož se tento chloridový kanál vyskytuje obecně v epitelu tkání, zasahuje cystická fibróza celou řadu orgánů a orgánových soustav. Nejvýrazněji nemoc ovlivňuje dýchací soustavu, zažívací ústrojí a pankreas, reprodukci a vylučování solí potem [1,4].

V důsledku porušení iontové rovnováhy není pankreas schopen produkovat v dostatečné míře lipolytické enzymy, což vede k podvýživě a deficienci vitaminů rozpustných v tucích (A, D, E, K). Pacientům je tak nutné dodávat náhražky těchto enzymů v přijímané stravě. Hustý hlen rovněž blokuje pankreatické kanálky. Velmi závažnou komplikací je také zvýšená pravděpodobnost rozvinutí cukrovky (CFRD – cystic fibrosis related diabetes) [12,13].

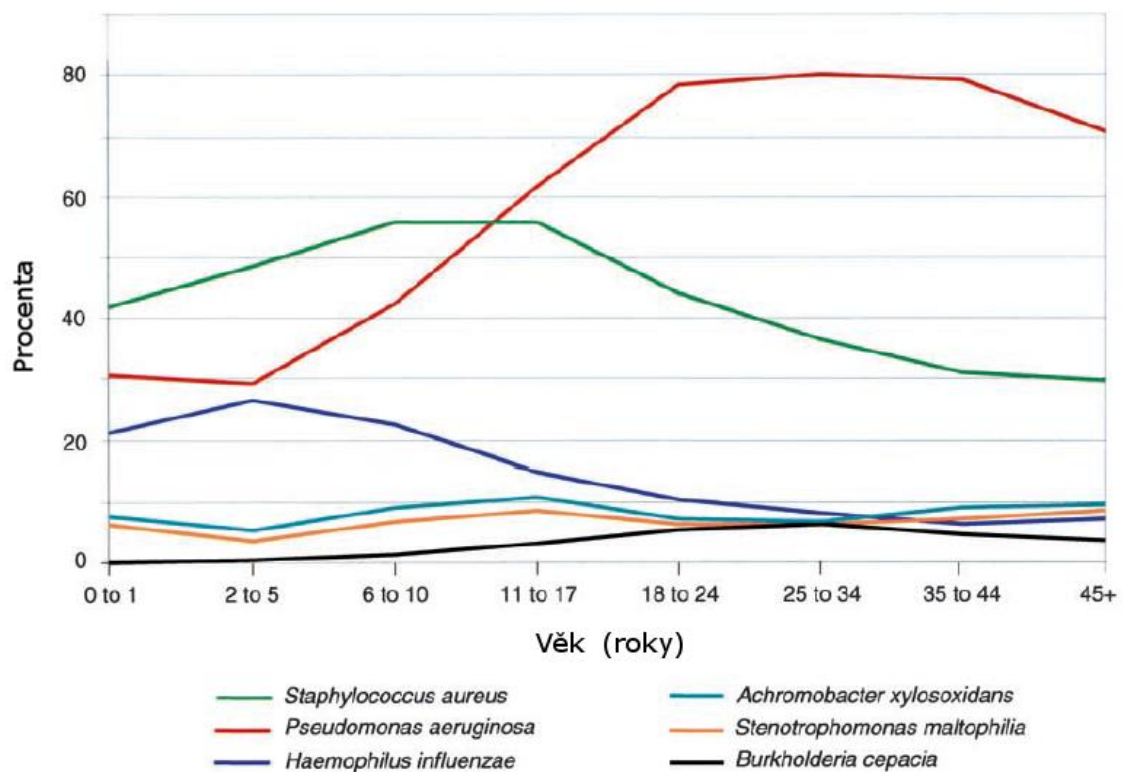
Drtivá většina mužů postižených cystickou fibrózou (zhruba 98 %) je neplodná. Důsledkem přítomnosti hustého hlenu totiž dochází již ve fetálním období vývoje k zneprůchodnění chámovodu. U žen se neplodnost objevuje přibližně v polovině případů. K problémům dochází ze strany nedostatečné výživy zárodku či z důvodu anatomické komplikace, kterými jsou například ovariální cysty, snížené množství folikulů či obtížně průchodná děloha [12,14,15].

### 1.3.1 Patogeneze respiračního ústrojí

Nejzávažnějším důsledkem cystické fibrózy je zasažení plic. Prostředí respiračního ústrojí je za normálních podmínek udržováno sterilní, ovšem v případě onemocnění cystickou fibrózou není schopen organismus tento stav ubránit. Na povrchu plicního epitelu se nachází plicní povrchová kapalina (ASL – airway surface liquid), jejíž součástí je meziřasinková kapalina (PCL), ve které se pohybují řasinky plicního epitelu. Nad nimi umístěná vrstva mucinového hlenu zachytává vdechované bakterie a díky obsahu baktericidních látek zpomaluje růst bakterií (a to na 3 až 6 hodin [5]). Mezi tyto látky patří zejména lysozym, laktoferrin a fosfolipáza A2. Pravidelným pohybem řasinek je tento plicní hlen posouván směrem k ústní dutině, kde dochází k jeho vykašlávání [16–18]. Cystická fibróza s sebou přináší sníženou exkreci  $\text{Cl}^-$  iontů a zároveň zvýšenou sorpci  $\text{Na}^+$  iontů, čímž se snižuje množství solí a následně tedy i vody v hlenu. Produkce mucinů ovšem zůstává zachována ve stejné míře, což vede ve zvýšené viskozitě a poklesu hladiny ASL. Kvůli takto zvýšené viskozitě nejsou schopné řasinky plicního epitelu posouvat hlen dostatečně efektivně směrem z plic a bakterie mají dostatek času překonat potlačující efekty přítomných enzymů, čímž dochází k rozvoji chronické infekce [5,17,19].

Další pozorovanou změnou byla zvýšená sulfatace mucinů v hlenu a dále snížená sialyzace glykoproteinů na povrchu apikální membrány epitelálních buněk. Přesný mechanismus této změny nebyl dosud objasněn, ale odhaduje se, že souvisí s mírně kyselějším pH, které panuje v CF buňkách v důsledku porušené rovnováhy  $\text{Cl}^-$  a  $\text{HCO}_3^-$  iontů. Změna pH může ovlivňovat aktivitu enzymů v Golgiho aparátu, kde dochází k posttranslačním úpravám, jako je právě glykosylace či sulfatace. Takto pozměněné glykokonjugáty pravděpodobně napomáhají adherenci patogenů na plicní epitel a jsou tak významným faktorem podporujícím růst kolonií bakterií [5,20,21].

Chronické bakteriální infekce jsou pak nejvíce omezujícím důsledkem cystické fibrózy a také hlavní příčinou úmrtí pacientů s CF. Zdrojem infekcí je poměrně úzká skupina bakterií, u které navíc byla pozorována korelace výskytu na věku nakaženého (Obrázek 3). V raném stádiu se jedná zejména o *Staphylococcus aureus* a *Haemophilus influenzae*, které pak s postupem nemoci v zastoupení klesají a jako výrazně dominantní se objevuje *Pseudomonas aeruginosa*, jejíž infekcí je v 25 letech věku postiženo kolem 80 % pacientů s CF. V tomto věku je pozorován i nejčastější výskyt bakterie *Burkholderia cepacia*, která se vyskytuje zhruba v 8 % případů [5,8,22].



Obrázek 3 – Převládající zastoupení bakterií v respiračním ústrojí pacientů s CF vzhledem k jejich věku. Data pochází z U.S. Cystic Fibrosis Patient Registry, 2001. Převzato a upraveno [5].

V případě infekce *Pseudomonas aeruginosa* byl pozorován výrazný rozdíl mezi bakteriemi způsobujícími akutní infekci a bakteriemi izolovanými z plic pacientů s CF [5]. U těchto kolonií byly zjištěny změny na fenotypové i genotypové úrovni – bakterie se tak přizpůsobují anaerobnímu prostředí s nedostatkem živin, které v plicním hlenu panuje. Postupně dochází k formování biofilmu a rozvoji rezistence vůči řadě

antibiotik. Standardní antibiotická léčba je tak jen málo účinná a kvůli nižšímu pH dochází ke ztrátě aktivity tělem produkovaných baktericidních enzymů [5,19,22].

## 1.4 *Burkholderia cepacia*

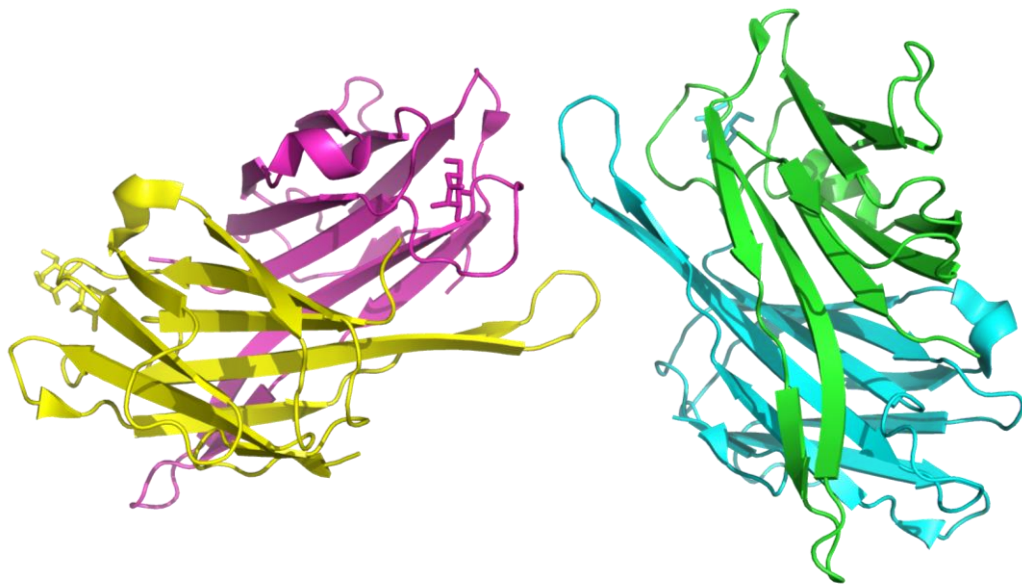
Tato skupina bakterií (někdy též označována jako *Burkholderia cepacia* komplex), původně chybně zařazená do rodu *Pseudomonas*, sdružuje větší množství silně příbuzných druhů, které se podařilo rozlišit až s využitím geneticko-molekulárních metod. Pro označení těchto fenotypově shodných, ale genotypově odlišných bakterií se používá rozdělení na takzvané genomovary. Jedná se o gram-negativní nefermentující bakterie běžně se vyskytující v půdě, vodním prostředí a na rostlinách. Prvně je popsal W. Burkholder roku 1950 jako fytopatogen způsobující hnilobu cibule a první případy *B. cepacia* jako lidského patogenu se objevily počátkem 70. let [23–25].

*B. cepacia* je považována za nejzávažnější patogen postihující pacienty s CF. Mezi její hlavní virulentní faktory patří sekrece hemolysinu, lipasy, různých proteas a ze struktur pak siderofory, pili a lektiny. Přenáší se zejména přímým kontaktem mezi pacienty s CF. Při napadení organismu způsobuje vysoké horečky, bakterémii a velmi rychle dochází k nekrotické pneumonii a smrti [5]. Výraznou komplikací při léčbě této infekce je vysoká rezistence těchto bakterií vůči řadě antibiotik. Odolnost vůči nescifickým antibiotikům a dezinfekčním látkám je do značné míry zapříčiněna nízkou permeabilitou vnější membrány (přibližně 10× nižší než u *E. coli* [23]) a aktivitou membránových pump. Rezistence vůči  $\beta$ -laktamovým a aminoglykosidovým antibiotikům je pak způsobena přítomností enzymů modifikujících tyto látky. *B. cepacia* je dokonce schopná využívat penicilin G jako metabolický substrát. Při tvorbě biofilmu dochází k dalšímu zvýšení rezistence a díky schopnosti adaptace postupně přestávají účinkovat jakákoli další antibiotika. [23,26–28].

### 1.4.1 Lektiny *Burkholderia cepacia*

Lektiny jsou proteinové struktury exprimované bakteriemi na vnější membránu schopné s vysokou afinitou vázat specifické glykosylace na povrchu buněk. Hrají tak důležitou roli v adherenci bakterií na plicní epitel a následné formování biofilmu.

Na vnější straně buněčné stěny bakterie *Burkholderia cepacia* lze rozlišit lektiny tří typů označované jako BC2L-A, BC2L-B a BC2L-C. Tyto lektiny formují dimery (BC2L-A) a tetramery (BC2L-B a BC2L-C), které jsou schopny v součinnosti se dvěma  $\text{Ca}^{2+}$  ionty specificky vázat sacharidy. Lektin BC2L-A (Obrázek 4), na který se tato práce zaměřuje, je uzpůsoben ke specifickému vázání D-manosy a nejlépe se váže na oligomanosové N-glykany, které se nacházejí na vnější straně membrány plicních epitelálních buněk. Zároveň je tento lektin schopen vázat se i na lipopolysacharidy na své vnější membráně (přes L-glycero-D-mano-heptosy), čímž napomáhá síťování a formování biofilmu [29,30].



Obrázek 4 – Kvartérní struktura lektinu BC2L-A (PDB ID 2WR9 [29]). Stuhový model s barevně rozlišenými podjednotkami. Vytvořeno v programu PyMOL [31].

## 1.5 Imunitní systém

Kromě mechanické obrany proti bakteriálním infekcím (kterou je hlen a řasinkový epitel) bojuje lidský organismus proti patogenům pomocí imunitní odpovědi. Tento systém se vyvinul za účelem kontroly či přímo zničení potenciálně škodlivých faktorů, které do organismu vstoupí. Imunitní systém se v základu dělí na imunitu vrozenou a získanou.



### 1.5.1 Vrozená imunita

Vrozená imunita (někdy též nazývána nespecifická) tvoří první obrannou linii imunitního systému. Díky nespecifické povaze je reakce na přítomnost patogenu okamžitá. Jedná se o dědičně předávaný soubor mechanismů reagující na základě rozpoznávání obecných strukturních motivů patogenů na úrovni molekul označovaných jako PAMPs (z anglického pathogen-associated molecular patterns). Na straně organismu jsou pak odpovídající receptory nazývány souhrnně PRRs (pattern recognition receptors). Tímto mechanismem rozpoznávání jsou vybaveny neutrofil, makrofágy a dendritické buňky, které jsou schopné fagocytózy nebo pak dále regulují odpověď imunitního systému na rozpoznáný patogen. Takovou odpovědí může být například indukce tvorby inflamazómu, což je komplex NOD-like receptorů (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors) a proteolytických enzymů, který spouští zánětlivou kaskádu. Kvůli hustému hlenu v plicích pacientů s CF však organismus není schopen pomocí tohoto mechanismu buněčné kolonie účinně zlikvidovat a v důsledku opakované stimulace přítomnými PAMPs produkuje nadměrné množství proteas, které ve výsledku poškozují samotný plicní epitel hostitele [18,32].

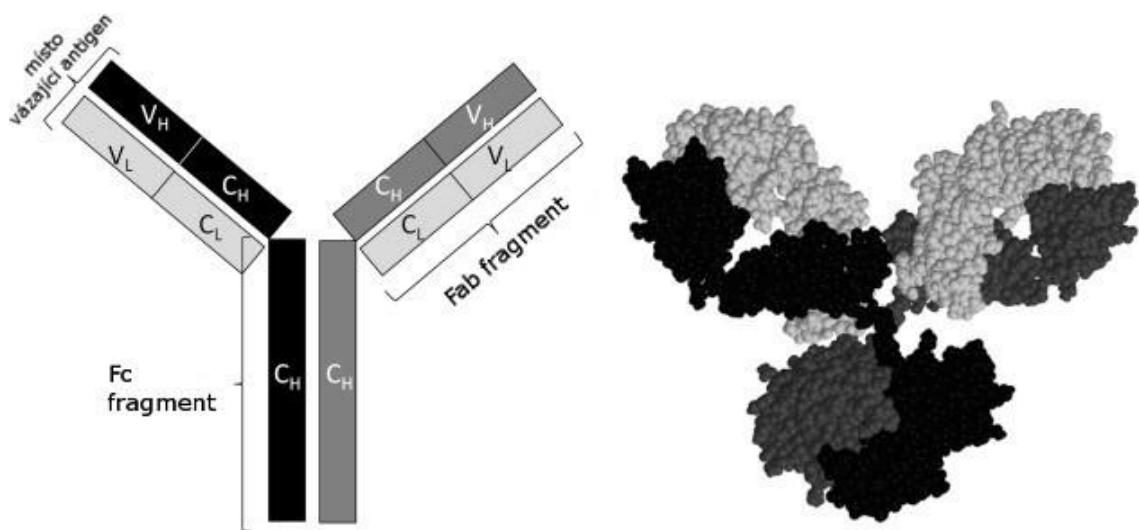
### 1.5.2 Získaná imunita

Adaptivní (nebo také specifická) imunita se v organismu buduje až v průběhu života, kdy je na základě kontaktu jedince s patogenem vytvořena konkrétní rozpoznávací jednotka, která slouží k rychlé reakci imunitního systému v případě opakovaného napadení organismu patogenem (imunitní paměť) [33].

Základním stavebním kamenem imunity jsou leukocyty, které specificky rozpoznávají cizí antigeny. Dělí se na dvě hlavní vývojové větve – T-lymfocyty a B-lymfocyty. T-lymfocyty se oddělují z kostní dřeně a dozrávají v brzlíku. Při rozpoznání antigenu jsou schopny přímého zásahu (jako je například cytotoxický účinek na virem napadené buňky), ale jsou schopny operovat jen na základě rozpoznání krátkých peptidových sekvencí. Slouží též k regulaci imunitní odpovědi pomocí sekrece cytokinů [33,34]. B-lymfocyty dozrávají přímo v kostní dřeni. Ohromného množství variant je docíleno na genetické úrovni díky četným rekombinacím, alternativním sestřihům, ale

i náhodnými insercemi. B-lymfocyty se v případě kontaktu s antigenem přeměňují na takzvané plasmatické buňky, které produkují protilátky o jasně dané specificitě, označované jako imunoglobuliny (Ig). Tím napomáhají jak k identifikaci antigenu pro další složky imunitního systému tak k opsonizaci [34,35].

Imunoglobuliny jsou proteinové molekuly se symetrickou strukturou připodobňovanou k písmenu „Y“. Skládají se ze dvou lehkých (18,6 kDa) a dvou těžkých (65 kDa) řetězců, jenž jsou spojeny disulfidickou vazbou a řadou nekovalentních interakcí. Ramena molekuly imunoglobulinu jsou spojena takzvanou pantovou oblastí. Těžké řetězce obsahují jednu variabilní a tři nebo čtyři konstantní domény, lehké řetězce obsahují po jedné variabilní a jedné konstantní doméně. Molekulu protilátky lze rozdělit také na dva fragmenty – Fab fragment (z anglického „fragment antigen binding“) zodpovědný za rozpoznávání antigenní struktury a Fc fragment („fragment crystallizable“), který slouží k vazbě fagocytu po označení patogenu (Obrázek 5) [33,35].



Obrázek 5 – Struktura protilátky. Na obrázku vlevo je schématické znázornění protilátky a jejích podjednotek.  $C_H$  – konstantní oblast těžkého řetězce;  $C_L$  – konstantní oblast lehkého řetězce;  $V_H$  – variabilní oblast těžkého řetězce;  $V_L$  – variabilní oblast lehkého řetězce. Napravo je zobrazena 3D struktura protilátky. Barevné rozlišení podjednotek je u obou obrázků shodné. Převzato a upraveno [35].

Imunoglobuliny savců se dělí do pěti tříd na základě rozdílných vlastností a funkcí:

- IgG Nejběžnější třída protilátek představující většinu Ig přítomných v séru schopná přímé neutralizace toxinů a virů. Jako jediná isoforma je schopná procházet placentou. Vyskytuje se ve formě monomeru.
- IgA Vyskytuje se zejména v prostředí sliznic, které tak chrání před antigeny díky zabránění jejich vazby na povrch sliznice nebo jejich přímým zneškodněním. Funguje jako monomer či jako dimer.
- IgE Uplatňuje se při rozpoznávání parazitických patogenů a dále je také součástí alergických reakcí. I přes nízké koncentrace v krevním séru je schopen vyvolat silnou imunitní odpověď.
- IgD Jedná se o imunoglobuliny s ne zcela objasněnou funkcí. Nachází se hlavně na povrchu B-lymfocytů a mají nejspíš vliv na jejich řízení.
- IgM Tato třída protilátek je exprimována na povrch B-lymfocytů v průběhu jejich dozrávání a v sekretované formě je součástí primární imunitní odpovědi (schopné spouštět komplement). Důležitou vlastností je rozpoznávání polysacharidových struktur. Díky struktuře pentameru jsou schopné velmi účinně vázat antigeny a tvořit precipitát [33,35].

## 1.6 Léčba cystické fibrózy

V současné době není znám způsob, jak pacienty s cystickou fibrózou vyléčit, daří se pouze zmírňovat projevy onemocnění a tím prodlužovat a zkvalitňovat život nemocných.

Nejzávažnější komplikací, která je přímým důsledkem CF, jsou bakteriální infekce respiračního ústrojí. Terapeutické snahy v této oblasti zahrnují dechová cvičení, léky pro rozpouštění hlenu umožňující jeho snadnější vykašlávání a vysoké dávky antibiotik, která jsou podávána orálně, inhalačně a v některých případech i intravenózně (často kombinace více druhů). Poslední zmíněný druh terapie je často velmi náročný pro lidský organismus, a jelikož imunitní systém není schopen se ani

s touto pomocí úplně zbavit bakteriální infekce, dochází pak ke vzniku multirezistentních kolonií [1,4,26].

Postupně se do klinické praxe dostávají léky zaměřující se přímo na defekty CFTR kanálu. Cílí na nápravu regulace, nedostatečné propustnosti, chybný „processing“, či potlačení předčasné terminace transkripce CFTR proteinu. Dalším přístupem je takzvaná genová terapie, která by v ideálním případě mohla poskytovat univerzální léčbu. V nynějším stádiu ovšem její vývoj komplikuje příliš rozmanité spektrum mutací a komplikace spojené s transportem opravného genu do cílových buněk [2,7].

V rámci prevence bakteriálních infekcí je možné pacienty s CF vůči bakteriím imunizovat (konkrétně proti *P. aeruginosa*). V organismu pak dochází ke vzniku protilátek proti povrchovým strukturám bakterie, ale tyto protilátky vykazují pouze nízkou afinitu a nedostatečnou schopnost opsonizace. Z důvodu existence širokého spektra kmenů, které pacienty s CF napadají, je velmi obtížně získat vakcínu s dostatečně širokým a zároveň stále silně specifickým imunizačním účinkem. Navíc pokud dojde k rozvoji chronické infekce, *P. aeruginosa* mění strukturu povrchových lipopolysacharidů, čímž snižuje svojí antigenicitu. Imunizace se tak zatím ukazuje být účinná pouze v malém množství konkrétních případů, a to zejména jako způsob oddálení vzniku bakteriální infekce [5].

V případě pokročilého stádia nemoci dochází k četným bronchitidám, které vedou až k selhání dýchacího ústrojí. V tomto případě dochází až na transplantaci plic, u které v posledních letech vzrostla úspěšnost dožití na 60–70 % 5 let po transplantaci. Řada klinických zařízení ovšem neprovádí transplantace plic u pacientů nakažených *B. cepacia* či *M. abscesses* kvůli nízké míře úspěšnosti a krátké době dožití po transplantaci [4].

### 1.6.1 Využití slepičích protilátek

U ptáků jsou rozlišovány tři třídy imunoglobulinů – IgA, IgM a IgY. Poslední zmíněná třída je analogem k savčím IgG, ale liší se strukturou a vyšší molekulovou hmotností. Ptačí IgY obsahuje oproti IgG ještě jednu konstantní doménu, která je vysoce glykosylovaná. Jedna z těchto glykosylací je velmi bohatá na manosu. Slepice předává IgY protilátky embryu transportem do žloutku vajec, které se zde tak nacházejí

v poměrně vysoké koncentraci (okolo 100 mg na vejce, z toho  $2 \pm 10$  % specifických). Nabízí se tak možnost produkovat polyklonální protilátky proti bakteriím a jejich povrchovým strukturám (lektiny) imunizací slepic příslušným antigenem. Ta probíhá s použitím adjuvans, nejčastěji v kombinaci s inaktivovanou formou *Mycobacterium tuberculosis*. Díky sekreci do vejce je odběr těchto protilátek neinvazivní, nedochází k usmrcení zvířete a slepice je možné využívat i nadále (roční výnos se může pohybovat až okolo 40 g, naproti tomu roční výnos u králíka je asi 1,4 g). Vlivem fylogenetické vzdálenosti mezi ptáky a savci dochází při imunizaci slepic antigenem typickým pro savce k větší produkci specifitějších protilátek než v případě imunizace savců. Další výhodou je, že slepičí protilátky nemají struktury specifické vůči revmatoidnímu faktoru (autoprotilátka proti Fc fragmentu vlastních IgG), který snižuje aktivitu imunoglobulinů a způsobuje interferenci při imunologických stanoveních. V neposlední řadě nehrozí zhoršování zánětů plicního epitelu, jelikož nespouští savčí komplement. Dále se ptačí protilátky neváží na A/G protein (protilátky vázající proteiny produkované bakteriemi) a oproti savčím protilátkám jsou schopné rozeznávat i jiné epitopy. Pro purifikaci protilátek z vaječného žloutku se využívá iontově-výměnné nebo afinitní chromatografie [36–39].

Při imunizaci slepice na bakteriální lektiny je tak možné získat terapeuticky vhodné protilátky cílené na tyto struktury. Vazba protilátka-lektin by tak mohla zabraňovat adhezenci bakterie na glykosidy přítomné na vnější straně membrány epitelálních buněk respiračního ústrojí.

## 2 Cíl práce

Tato práce je zaměřena na výzkum využití terapeutického účinku slepičích protilátek proti lektinům BC2L-A bakterie *Burkholderia cepacia*. Tyto protilátky by mohly snižovat adhezi tohoto patogenu na plicní epitel pacientů s cystickou fibrózou. Hlavním cílem bylo studium interakce lektin-protilátka. Pro splnění tohoto cíle bylo zapotřebí těchto dílčích kroků:

- stanovení koncentrace protilátek
- příprava kolony pro afinitní chromatografii
- afinitní purifikace frakce směsných protilátek
- ověření specifity získaných protilátek
- proměření síly vazby protilátek k bakteriálnímu lektinu

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Použité přístroje a chemikálie

#### 3.1.1 Přístroje

analytické váhy DV215CD	Ohaus (Švýcarsko)
centrifuga 5418	Eppendorf (USA)
čtecí zařízení ELISA Sunrise Remote	Tecan (Švýcarsko)
magnetická míchačka KMO 2	IKA-Werke (Německo)
pH/ORP Meter HI 2211	Hanna Instruments (Itálie)
pipety	Eppendorf (USA)
předvážky 440-35A	KERN (Německo)
spektrofotometr HP 8453 UV-Visible	Agilent/Hewlett Packard (USA)
špičky	Eppendorf (USA)

#### 3.1.2 Materiál

Anti-chicken IgY (IgG)-alkaline phosphatase (A9171)	Sigma-Aldrich (USA)
CNBr aktivovaná Sepharosa 4B	Sigma-Aldrich (USA)
diethylamin	Sigma-Aldrich (USA)
guanidin hydrochlorid	Sigma-Aldrich (USA)
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Lachner (ČR)
HCl	Lachner (ČR)
Immuno Clear Standard Modules (F16, PolySorp)	Thermo Fisher Scientific (USA)
kyselina octová	Sigma-Aldrich (USA)
lyofilizovaný BC2L-A	Wimmerová M., MUNI, Brno
lyofilizovaný vaječný bílek	lab. 221
MgCl <sub>2</sub>	Lachner (ČR)
mikrozkumavky	Eppendorf (USA)
Na <sub>2</sub> HCO <sub>3</sub>	Lachner (ČR)
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Lachner (ČR)

NaCl	Lachner (ČR)
NaHCO <sub>3</sub>	Lachner (ČR)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Lachner (ČR)
NaN <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich (USA)
NaOH	Lachner (ČR)
octan sodný	Sigma-Aldrich (USA)
p-nitrofenolfosfát	Sigma-Aldrich (USA)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (USA)

## 3.2 Určení koncentrace bílkovin

Koncentrace roztoků protilátek byla určena na základě absorbance při 280 nm. Během předešlé optimalizace metody práce s protilátkami byla stanovena standardní křivka s faktorem  $f = 1,094$  [40]. Měření bylo provedeno na spektrofotometru HP 8453 UV-Visible a pro nulování základní linie byl použit PBS/NaN<sub>3</sub>. Pro stanovení bylo do křemenné kyvety odebráno 50  $\mu$ l roztoku protilátek a rozpuštěno v 2,5 ml PBS/NaN<sub>3</sub>, čímž vznikl 51 $\times$  naředěný roztok. K výpočtu koncentrace byl použit vzorec:

$$k = A \times l \times r \times f ,$$

k – koncentrace

A – absorbance

l – optická dráha kyvety

r – ředění roztoku

f – experimentálně stanovený faktor ( $f = 1,094$ )

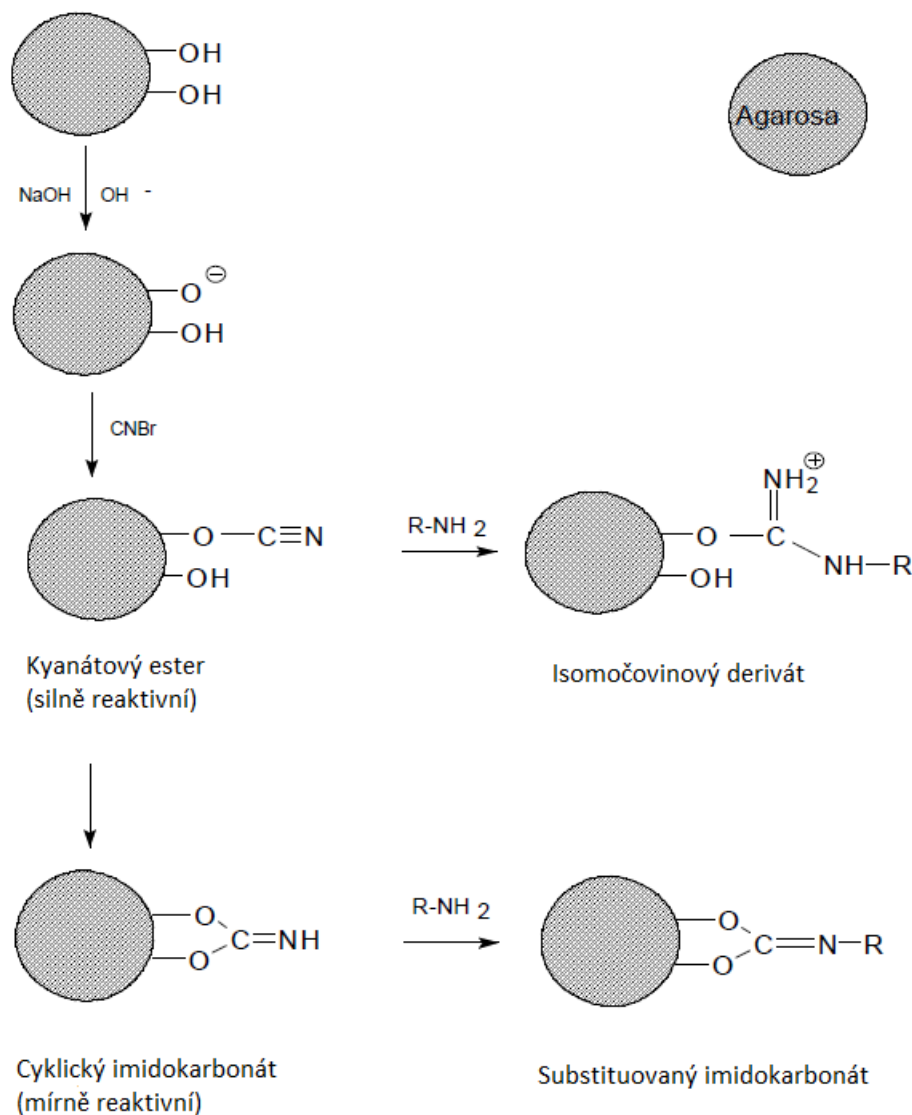
## 3.3 Afinitní purifikace protilátek anti BC2L-A

Afinitní purifikace je zvláštním případem chromatografie, kdy je využíváno specifických interakcí s ligandem imobilizovaným na pevné fázi chromatografické kolony.

Jako pevná fáze byl použit lektin BC2L-A vázaný na CNBr aktivovanou Sepharosu 4B, jejíž primární struktura obsahuje zbytky D-galaktosy a 3-anhydrogalaktosy. CNBr reaguje s hydroxy skupinami Sepharosy za vzniku kyanátových esterových skupin či



imidokarbonátů (Obrázek 6). Takto aktivované skupiny váží primární amin skupiny proteinů, peptidů a aminokyselin. Tímto postupem lze navázat protilátky či lektiny. Zatímco substituovaný imidokarbonát je stabilní a má celkový náboj nulový, při zformování isomočovinnového derivátu není vazba tak pevná a v malé míře může docházet k vyvazování ligandu. Kvůli náboji amin skupiny se také tento derivát může chovat jako slabá aniontově výměnná matrice [41].



Obrázek 6 – Schéma aktivace hydroxylových skupin na agarose působením CNBr. Při aktivaci reaguje CNBr v zásaditém prostředí s  $-\text{OH}$  skupinami agarosy za vzniku kyanátového esteru či imidokarbonátu. Tyto funkční skupiny pak reagují s primárními amin skupinami za vzniku kovalentní vazby ve formě isomočovinnového derivátu, respektive substituovaného imidokarbonátu. Převzato a upraveno [41].

### 3.3.1 Příprava chromatografické kolony

Použité látky a roztoky:

CNBr Sepharosa 4B (Sigma Aldrich)

1mM HCl; pH 3

*vazný pufr*: 0,1M NaHCO<sub>3</sub>; 0,5M NaCl; pH 8,4

*acetátový pufr*: 0,1M CH<sub>3</sub>COOH; 0,1M CH<sub>3</sub>COONa; 0,5M NaCl; pH 4

*PBS/NaN<sub>3</sub>*: 0,134M NaCl; 1,8mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,1% (w/v) NaN<sub>3</sub>; pH 7,2

*PBS*: 0,134M NaCl; 1,8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2

*blokovací roztok*: 0,2M glycin; pH 8,0

*eluční roztok*: 0,05M diethylamin; pH 11,5

Bylo naváženo 500 mg lyofilizované CNBr Sepharosy 4B, která byla suspendována v 15 ml 1mM HCl z důvodu odstranění stabilizujících přísad. Po ustálení byl supernatant opatrně odebrán. Tento proces byl proveden celkem třikrát. Sepharosa byla následně převedena do plastové kolonky a postupně promývána 200 ml 1mM HCl. Roztok HCl byl z kolony odmyt 10 ml vazného pufru.

Dalším krokem byla imobilizace lektinu BC2-L na gel. Byl rozpuštěn 1 mg lektinu ve 2 ml vazného pufru a tento roztok byl nanesen na kolonu s gelem. Kolona byla uzavřena a ponechána na převraccím mixéru 15 hodin při 4 °C. Poté byl nenavázaný lektin z kolony odmyt pětinásobkem objemu gelu vazným pufrem.

Aby se eliminoval vliv zbylých volných aktivních skupin, na které se lektin nenavázal, byla kolona převedena do 4 ml blokovacího roztoku a ponechána 2 h při laboratorní teplotě (21 °C).

Následně byla kolona promyta 5 ml destilované vody a poté třemi cykly pufrů o různých pH. Každý cyklus zahrnoval 12 ml acetátového pufru (pH 4), 5 ml PBS (pH 7,2) a 12 ml diethylaminu (pH 11,5). Na závěr byla kolona promyta roztokem PBS/NaN<sub>3</sub> a uchována při 4 °C.

### 3.3.2 Afinitní purifikace

Použité roztoky:

*promývací roztok I (PBS):* 0,134M NaCl; 1,8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2

*promývací roztok II (PBS + 1M NaCl):* 1M NaCl; 1,8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2

*eluční roztok:* 0,05M diethylamin; 2% (w/v) D-manosa; pH 11,5

*regenerační roztok:* 4M guanidin/HCl; pH 7,2

*neutralizační roztok:* 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 6,75 (úprava 2M KOH)

*dialyzační roztok (PBS/NaN<sub>3</sub>):* 0,134M NaCl; 1,8mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,1% (w/v) NaN<sub>3</sub>; pH 7,2

Kvůli blokaci vazných míst lektinu byla do roztoku protilátek (252 mg, celkový objem 5,6 ml) přidána D-manosa do výsledné koncentrace 2 % (w/v). Ze stejného důvodu byla D-manosa přidána i do elučního roztoku. Takto upraveným roztokem protilátek byl vypláchnut gel z kolony do zkumavky a míchán 15 hodin na obraceči při 4 °C.

Následně byl obsah zkumavky převeden zpátky do chromatografické kolonky a byl jímán eluát, který představoval proteiny, které se na kolonu nenavázaly. Tato nezachycené frakce (NF) byla uschována při 4 °C. Kolonka byla následně promývána roztokem I (pH 7,2) a byly jímány frakce po 2 ml. U frakcí byla měřena absorbance při 280 nm na spektrofotometru HP 8453 UV-Visible v křemenné kyvetě o optické dráze 1 cm. Když klesla absorbance pod hodnotu 0,03, bylo zahájeno odmyváání slabě zachycených IgY promývacím roztokem II (pH 7,2) s odběrem frakcí po 2 ml a měřením jejich absorbance při 280 nm. Jakmile opět klesla absorbance pod hodnotu 0,03, byla zahájena eluce elučním roztokem (pH 11,5) s odběrem frakcí po 0,5 ml do mikrozkuvek s připraveným neutralizačním roztokem (objem neutralizačního roztoku byl předem stanoven titrací, aby bylo dosaženo výsledného pH 7,2). Z důvodu malého objemu těchto frakcí byla jejich absorbance měřena v křemenné kyvetě o optické dráze 2 mm. Po poklesu absorbance na minimální hodnotu bylo použito 10 ml regeneračního roztoku, aby byl odstraněn zbývající protein, což bylo ověřeno měřením absorbance eluovaného roztoku při 280 nm. Kolona byla následně promyta 5 ml roztoku I a 30 ml PBS/NaN<sub>3</sub>. U frakcí eluovaných elučním roztokem bylo měřeno

absorpční spektrum 200 – 700 nm. Frakce s největším obsahem proteinu byly spojeny a dialyzovány proti 2× 5l roztoku PBS/NaN<sub>3</sub> (pokaždé min. 8 h) při 5 °C.

### 3.4 ELISA

Imunoreaktivita protilátek byla hodnocena pomocí metody ELISA (z anglického enzyme-linked immunosorbent assay). Byla použita varianta metody, kdy je na nosiči vázán antigen, na který se váže protilátka. Primární protilátka se specificky váže za vzniku komplexu antigen-protilátka, na který se následně váže sekundární protilátka značená enzymem. Tento enzym (nejčastěji alkalická fosfatasa či křenová peroxidasa) katalyzuje přeměnu chromogenního substrátu za vzniku barevného produktu, jehož koncentraci je možné spektrofotometricky kvantifikovat. Absorbance vzniklého barevného produktu je pak úměrná koncentraci primárních protilátek.

Použité roztoky:

*PBS*: 0,134M NaCl; 1,8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2

*PBS + Tween*: 0,134M NaCl; 1,8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,1% (v/v) Tween 20; pH 7,2

*imobilizační pufr*: 13mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 25mM NaHCO<sub>3</sub>; pH 9,6

*blokovací roztok*: PBS + Tween; 2% (w/v) „řídký bílek“

*sekundární protilátka*: anti-chicken Ig-Y z králíka konjugovaná s alkalickou fosfatou (A9171)

*vyvolávací roztok pro alkalickou fosfatasu*: 30mM NaHCO<sub>3</sub>; 20mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 1mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1% *p*-nitrofenylfosfát

*zastavovací roztok pro alkalickou fosfatasu*: 3M NaOH

Lyofilizovaný lektin BC2L-A byl rozpuštěn v PBS pufru a dále ředěn imobilizačním pufrům na koncentraci antigenu 4 µg · ml<sup>-1</sup>. Ihned po naředění byl roztok lektinu dávkován po 100 µl do jamek destičky Polysorp. Inkubace probíhala 15 hodin při 4°C. Po inkubaci byl nezachycený antigen odmyt 3× 200 µl PBS Tween.

Neobsazená vazná místa destičky byla blokována 150 µl 2% „řidkého bílku“ rozpuštěného v PBS Tween při 37°C po dobu 1 h. Následně byly jamky promyty 3× 200 µl PBS Tween.

V dalším kroku byly do jamek nanесeny roztoky primárních protilátek a to v koncentracích 810; 270; 90 a 30  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  pro nezachycenou frakci, 90; 30; 10 a 3,3  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  pro směsnou protilátku a 3; 1; 0,3 a 0,1  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  pro afinitně purifikovanou protilátku. Od každé koncentrace bylo aplikováno 100  $\mu\text{l}$  roztoku v duplikátech. Inkubace probíhala 2 h při 37 °C. Jamky byly 3× promyty 200  $\mu\text{l}$  PBS Tween.

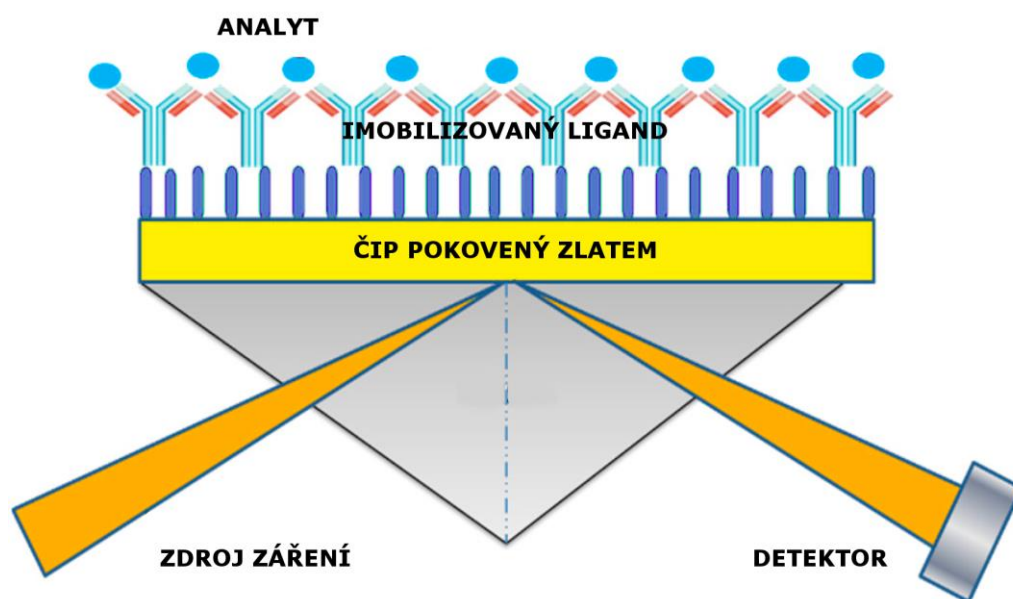
Do jamek bylo nanесeno 100  $\mu\text{l}$  sekundární protilátky (anti-chicken Ig-Y z králíka), která byla naředěna v PBS v poměru 1:1600. Inkubace probíhala 1 h při 37 °C. Jamky byly opět promyty 3× 200  $\mu\text{l}$  PBS Tween.

Do každé jamky bylo aplikováno 100  $\mu\text{l}$  vyvolávacího roztoku, reakce byla ponechána probíhat 10 minut, načež byla zastavena přidáním 100  $\mu\text{l}$  3M NaOH.

Absorbance vzniklého zabarvení byla měřena na přístroji Tecan Sunrise Remote při vlnové délce 405 nm.

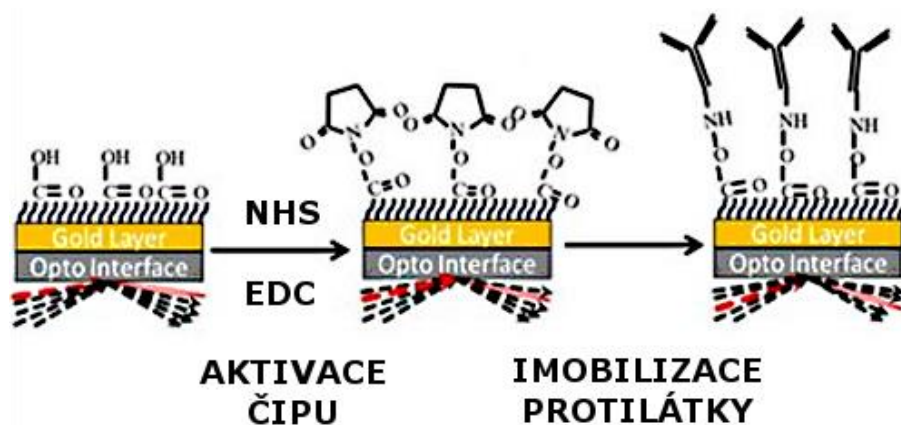
### 3.5 Stanovení afinity protilátek metodou SPR

SPR (z anglického surface plasmon resonance) neboli povrchová plasmonová rezonance je metoda umožňující stanovení síly vazby mezi ligandem a analytem. Využívá fyzikálního jevu vzniku plasmonů a s tím spojené rezonance, ke kterým dochází při interakci světla s tenkou vrstvou kovu. Při dopadu světla na optické rozhraní se část záření láme a část odráží. Postupným zvětšováním úhlu dopadu lze dojít až k takzvanému kritickému úhlu, kdy dochází k totálnímu odrazu a přes optické rozhraní už neprochází žádné světlo. Pokud nastane totální vnitřní odraz na rozhraní kov-dielektrikum (např. vodní prostředí), dojde k excitaci elektronů v kovu a vznikají tzv. plasmony. V závislosti na úhlu dopadu a frekvenci použitého světla může docházet k rezonanci a záření je tak téměř kompletně absorbováno, jelikož na rozhraní kov-voda vzniká evanescentní vlna. Tato rezonance se projeví výrazným poklesem odrazu (SPR dip). Úhel, při kterém dochází k rezonanci, je závislý na indexu lomu prostředí na rozhraní, který se mění s imobilizovaným ligandem, složením nosného média, přítomností analytu a jeho případnou vazbou na ligand (Obrázek 7, strana 29) [42,43].



Obrázek 7 – Schéma principu měření metodou SPR. Vazba analytu na imobilizovaný ligand mění index lomu v blízkosti čipu. Změnu indexu lomu lze detekovat a kvantifikovat. Převzato a upraveno [42].

Použitý čip se může lišit podle zamýšleného použití, ale nejčastěji se jedná o sklo potažené inertním kovem (zlato). V této metodě byl použit čip CM5 (GE Healthcare), na kterém se nachází monovrstva karboxymethylovaného dextranu. Pro vazbu aminoskupin na čip je nutné nejprve karboxymethylové skupiny dextranu aktivovat působením 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDC) a N-hydroxysukcinimidu (NHS). Vznikají tak vysoce reaktivní estery sukcinimidu, které tvoří s aminoskupinami proteinů kovalentní vazbu (Obrázek 8, strana 30) [44].



Obrázek 8 – Schéma aktivace povrchu čipu. Karboxymetylovaný dextran je aktivován působením N-hydroxysukcinimidu (NHS) a 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDC) za vzniku vysoce reaktivního sukcinimidového esteru. Takto aktivovaný čip je schopen kovalentně vázat proteiny (protilátky) přes jejich aminoskupiny. Převzato a upraveno [45].

Použité roztoky:

*operační pufr*: 10mM HEPES; 150mM NaCl; 0,05% (v/v) Tween 20; pH 7,4

*operační pufr – EDTA*: 10mM HEPES; 150mM NaCl; 3mM EDTA; 0,05% (v/v) Tween 20; pH 7,4

*aktivační roztok*: 0,4M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC); 0,1M N-hydroxysukcinimid (NHS)

*vazný pufr*: acetát sodný; pH 4,5

*blokační roztok*: 1M ethanolamin-HCl, pH 8,5

*vyvazovací roztok*: 50mM diethylamin (DEA); pH 11,5

Měření bylo prováděno na přístroji BIACORE T200 (GE Healthcare) s použitím čipu CM5, který na svém povrchu nesl karboxymetylovaný dextran.

### 3.5.1 Imobilizace protilátek

Nejprve byl čip promýván operačním pufrem při průtoku  $10 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$  až do ustálení základní linie. Pro aktivaci karboxylových skupin na povrchu čipu byl použit na všechny kanály aktivační roztok po dobu 7 minut při zachování průtoku. Další postup se pro jednotlivé kanály lišil, průtok roztoků zůstal  $10 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ .

### **kanál 1**

- imobilizace streptavidinu ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), který sloužil jako raménko (spacer), po dobu 7 minut
- vazba směsi  $\alpha$ -/ $\beta$ -D-galaktosy asociované s biotinem ( $0,25\text{mM}$ ), 7 minut
- blokace ethanolaminem, 6 minut

Na kanál 1 nebyly vázány žádné protilátky, protože sloužil jako referenční základní linie (nulová odezva). D-galaktosa byla zvolena jako sacharid, který není vázán lektinem BC2L-A.

### **kanál 2**

- imobilizace nezachycené frakce protilátek ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) ve třech stupních a to 2 + 5 + 2 minut
- blokace ethanolaminem; 6 minut

### **kanál 3**

- imobilizace afinitně purifikované frakce protilátek ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), jako vazný pufr byl použit acetát o pH 5; ve třech stupních: 2 + 5 + 2 minut
- blokace ethanolaminem; 6 minut

### **kanál 4**

- imobilizace afinitně purifikované frakce protilátek ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), jako vazný pufr byl použit acetát o pH 5; pouze 2 minuty
- blokace ethanolaminem; 6 minut

## **3.5.2 Studium interakce lektin-protilátka**

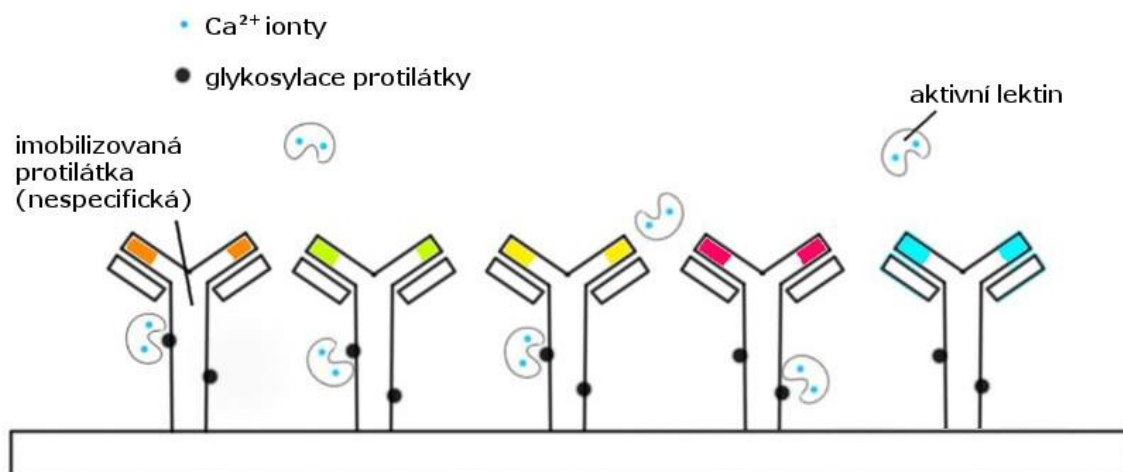
### **1. uspořádání**

Toto uspořádání experimentu sloužilo k charakterizaci vazby aktivního lektinu BC2L-A (v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů) a glykosylací protilátek nezachycené frakce (situace znázorněna na Obrázku 9, strana 32) a dále ověření inertnosti referenčního kanálu.

Dvojkovou ředící řadou byly připraveny roztoky lektinu o koncentraci  $1000 - 7,8 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Měření bylo zahájeno s průtokem nastaveným na  $10 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$  promýváním  $3 \times 5$  minut operačním pufrům (poté 8 minut pro ustálení) a následně byly



nanášeny roztoky lektinu v postupně se zvyšující koncentraci ( $7,8 - 1000 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) po dobu 5 minut s opakováním nejnižší koncentrace na závěr. Po každém kroku nanesení byl zbývající zachycený lektin odmyt 100mM roztokem EDTA (2 minuty). Série byla zopakována s průtokem  $30 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ , ostatní parametry zůstaly zachovány.

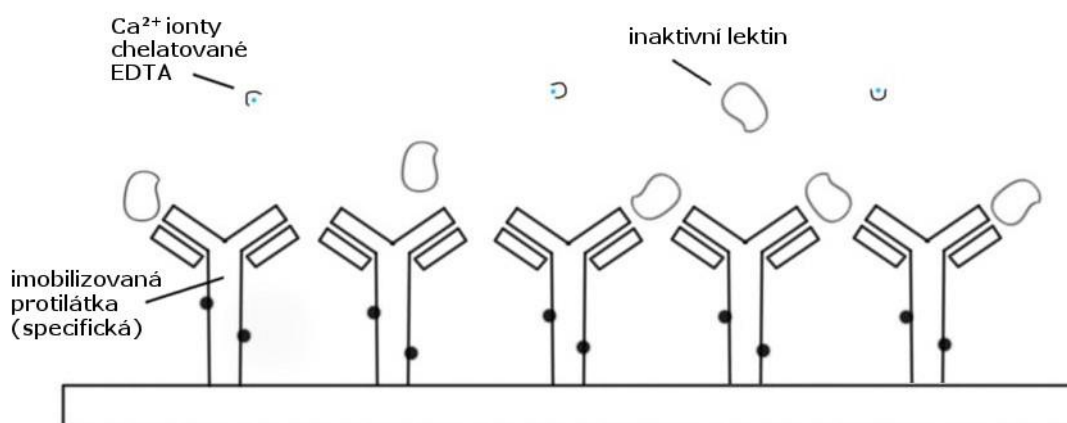


Obrázek 9 – Schéma prvního uspořádání experimentu. Aktivní lektin BC2L-A se váže na glykosylace imobilizované protilátky. Odlišným zbarvením protilátek je znázorněna specifita vůči řadě různých antigenů.

## 2. uspořádání

Druhým uspořádáním byla provedena charakterizace síly vazby afinitně purifikované protilátky a inaktivovaného lektinu. Inaktivace byla provedena odebráním  $\text{Ca}^{2+}$  iontů chelatačním činidlem EDTA (o koncentraci  $3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), což vede ke ztrátě schopnosti lektinu vázat sacharidové struktury (Obrázek 10, strana 33). Měřená interakce by tak teoreticky měla odpovídat pouze specifické vazbě protilátka-lektin.

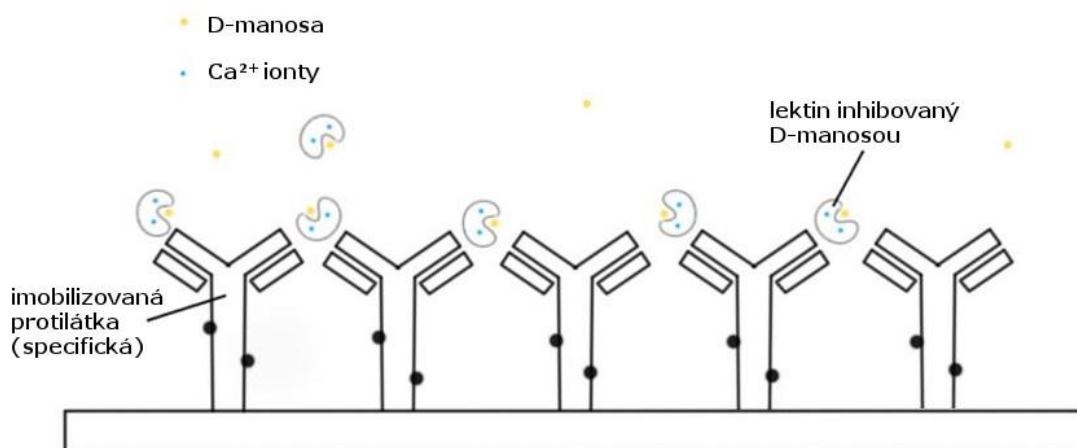
Dvojkovou ředící řadou byly připraveny roztoky lektinu o koncentraci  $1000 - 0,49 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Při průtoku  $30 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$  byly nejprve všechny kanály promyty  $10 \times 3$  minuty operačním pufrem (poté 10 minut na ustálení). Dále pak byly měřeny roztoky lektinu ve zvyšující se koncentraci ( $0,49 - 1000 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) s opakováním nejnižší koncentrace na závěr. Kontaktní čas (doba nanášení) byl 3 minuty. K odmytí byl použit roztok 50mM DEA po dobu 30 sekund. Série byla ještě  $2 \times$  zopakována (měření tedy probíhalo v triplikátech).



Obrázek 10 – Schéma druhého uspořádání. Lektin, z nějž byly působením EDTA vyvázané  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, ztrácí schopnost vázat sacharidy. Teoreticky by tak měla být měřena pouze specifická vazba protilátka-lektin.

### 3. uspořádání

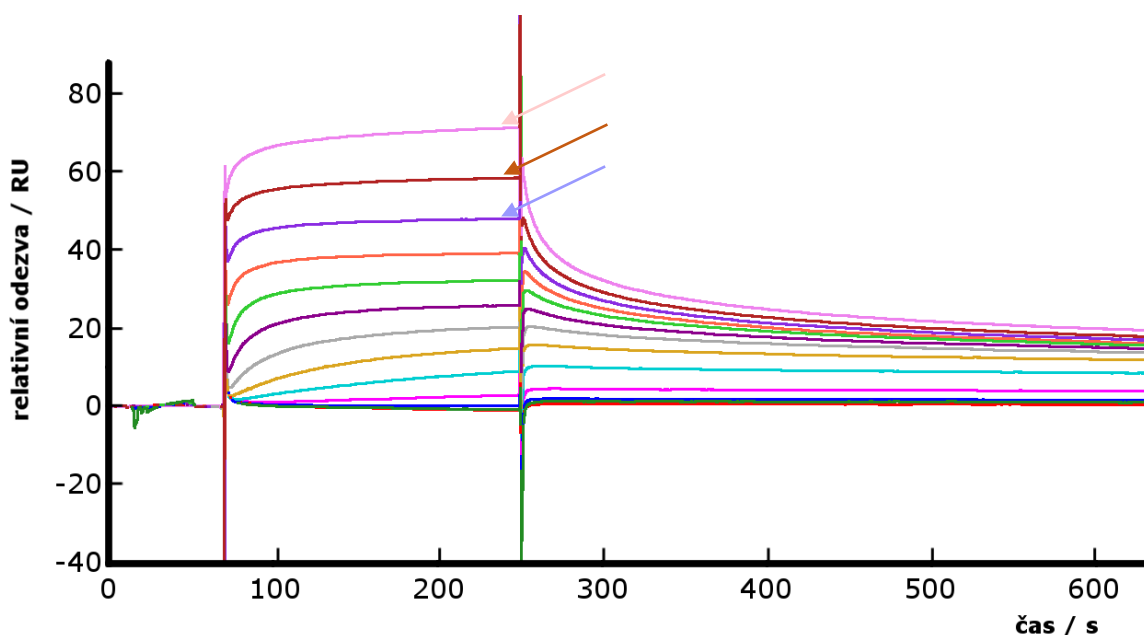
V této metodě byl lektin inaktivován přidáním D-manosy do roztoku (výsledná koncentrace  $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Při obsazení vazného místa manosou by se lektin neměl vázat na glykosylace protilátky (Obrázek 11). Zbytek postupu se shodoval s 2. uspořádáním.



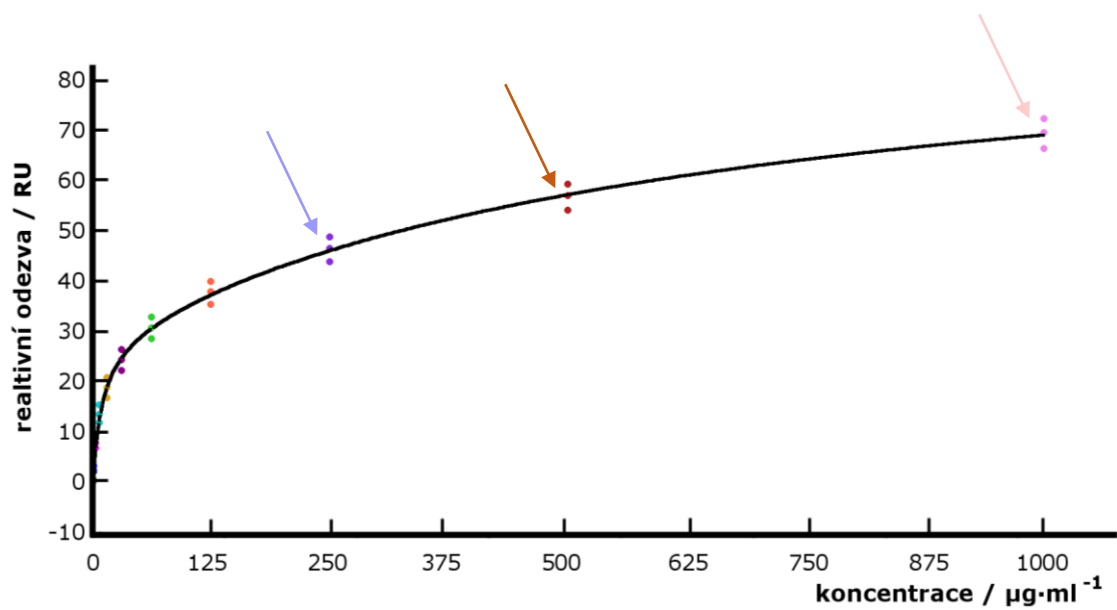
Obrázek 11 – Schéma třetího uspořádání experimentu. Vazné místo lektinu BC2L-A je blokováno D-manosou. Lektin by tak teoreticky neměl interagovat s glykosylacemi na imunoglobulinu a měřená vazba by měla být specifickou interakcí protilátka-lektin.

### 3.5.3 Vyhodnocení

Sensorgramické křivky poskytují informaci o časovém průběhu asociace a disociace, případně informaci o ustáleném stavu, kdy je celková změna počtu vazeb protilátka-antigen nulová. Pro účely tohoto měření bylo použito stanovení disociační konstanty pomocí ustáleného stavu. Díky použití ředící řady byly získány odezvy při ustáleném stavu pro různé koncentrace (Obrázek 12). Relativní hodnoty odezvy (po odečtení hodnot z referenčního kanálu) byly vyneseny proti koncentraci lektinu (Obrázek 13, strana 35). Z křivky proložené touto závislostí byla vypočtena hodnota  $K_D$ . Vyhodnocení bylo provedeno v programu „Biacore T200 Evaluation Software“ pracovníkem Centrální laboratoře Interakce a krystalizace biomolekul na Masarykově univerzitě v Brně, z důvodu rozsáhlejších zkušeností s touto metodou a lepších znalostí parametrů proložení křivek.



Obrázek 12 – Příklad získaného sensorgramu. Je znázorněn průběh relativní odezvy v závislosti na čase pro různé koncentrace lektinu BC2L-A (různě barevné křivky). Po určité době nanášení dochází k ustálení rovnovážného stavu, kdy odezva už dále neroste (pro 3 nejvyšší koncentrace vyznačeno šipkami).

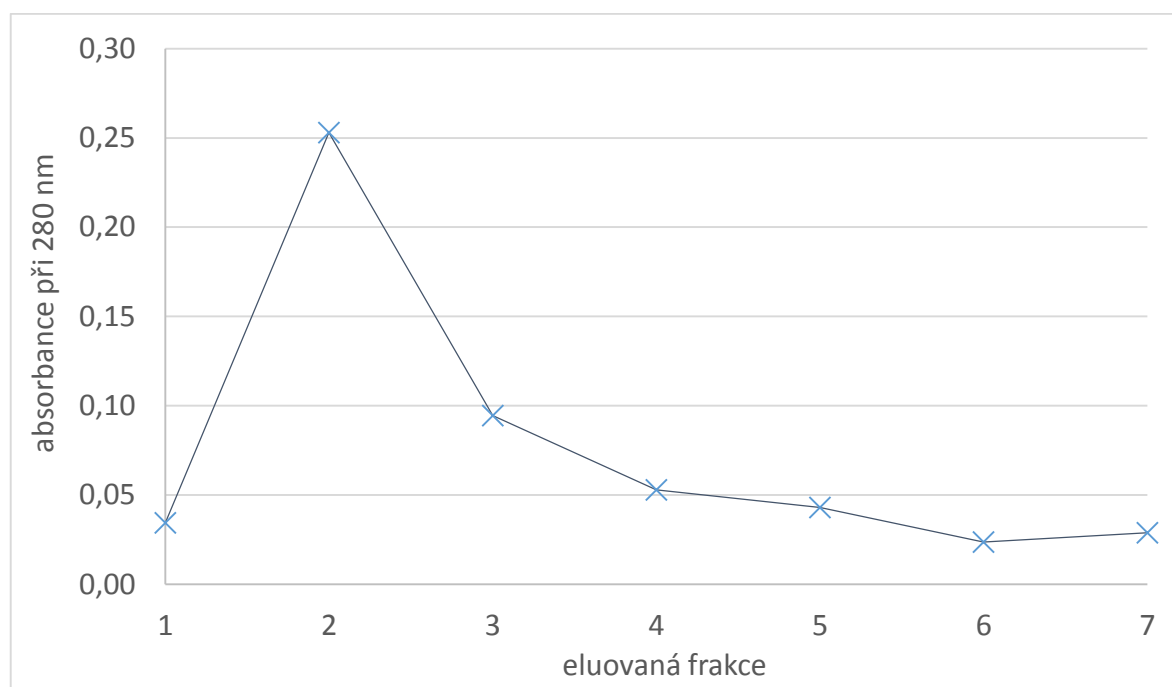


Obrázek 13 – Vynesení závislosti relativní odezvy na koncentraci lektinu. Z křivky, proložené touto závislostí, byla vypočtena hodnota disociační konstanty pro příslušnou interakci. Šipkou jsou vyznačeny odpovídající body z Obrázku 9.

## 4 Výsledky

### 4.1 Afinitní purifikace protilátek anti BC2L-A

Byla provedena afinitní purifikace s cílem izolování frakce protilátek specifických proti lektinu BC2L-A. Na kolonu bylo nanášeno 5,6 ml směsné protilátky o koncentraci  $45 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Měřením absorbance při 280 nm u eluovaných frakcí byly vybrány frakce s největším obsahem proteinů (Obrázek 14) s předpokladem, že obsahují specifické protilátky. Jednalo se o frakce 2, 3 a 4, které byly následně spojeny a dialyzovány. Z aplikovaného množství směsné protilátky a množství finálního preparátu protilátek (po dialýze) byl spočten výtěžek afinitní purifikace (Tabulka 1).



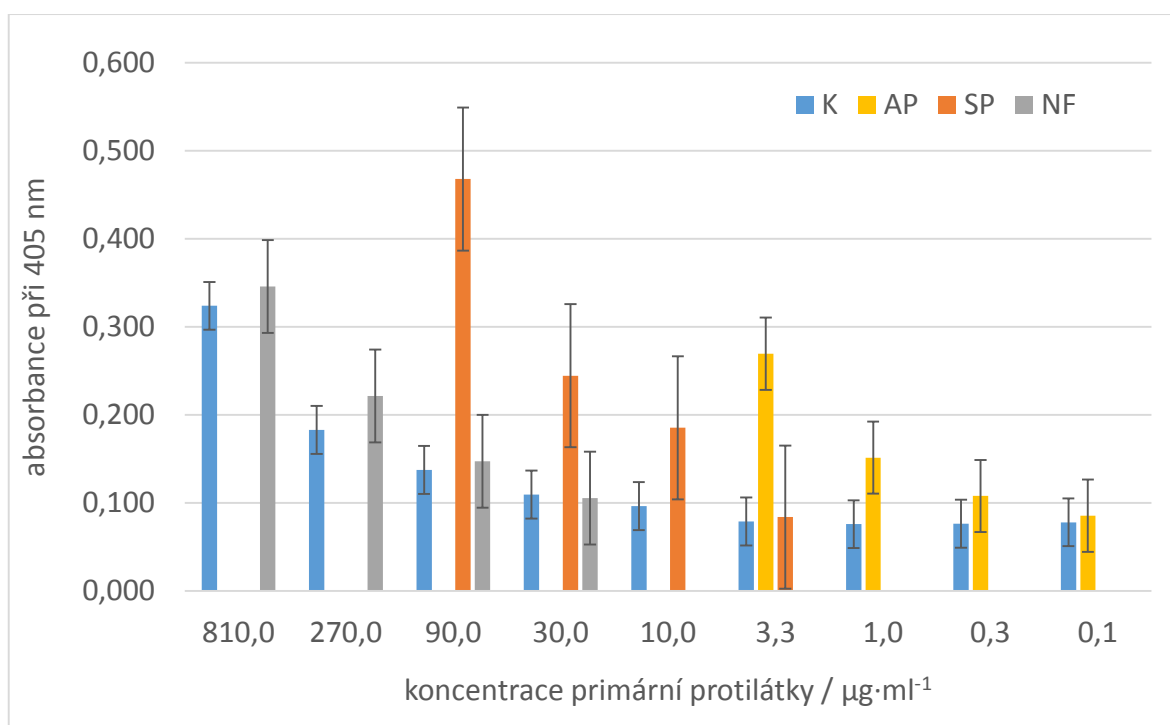
Obrázek 14 - Eluce specifických protilátek anti BC2L-A. Eluce byla prováděna roztokem 0,05M diethylaminu o pH 11,5. Absorbance eluátu byla měřena při 280 nm. Frakce byly sbírány po 0,5 ml.

Tabulka 1 Výtěžek afinitní purifikace specifických protilátek anti BC2L-A

nanášená protilátka	afinitně purifikovaná protilátka			výtěžek / %
	množství / mg	objem / ml	konc. / $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	
252	1,5	0,38	0,58	0,23

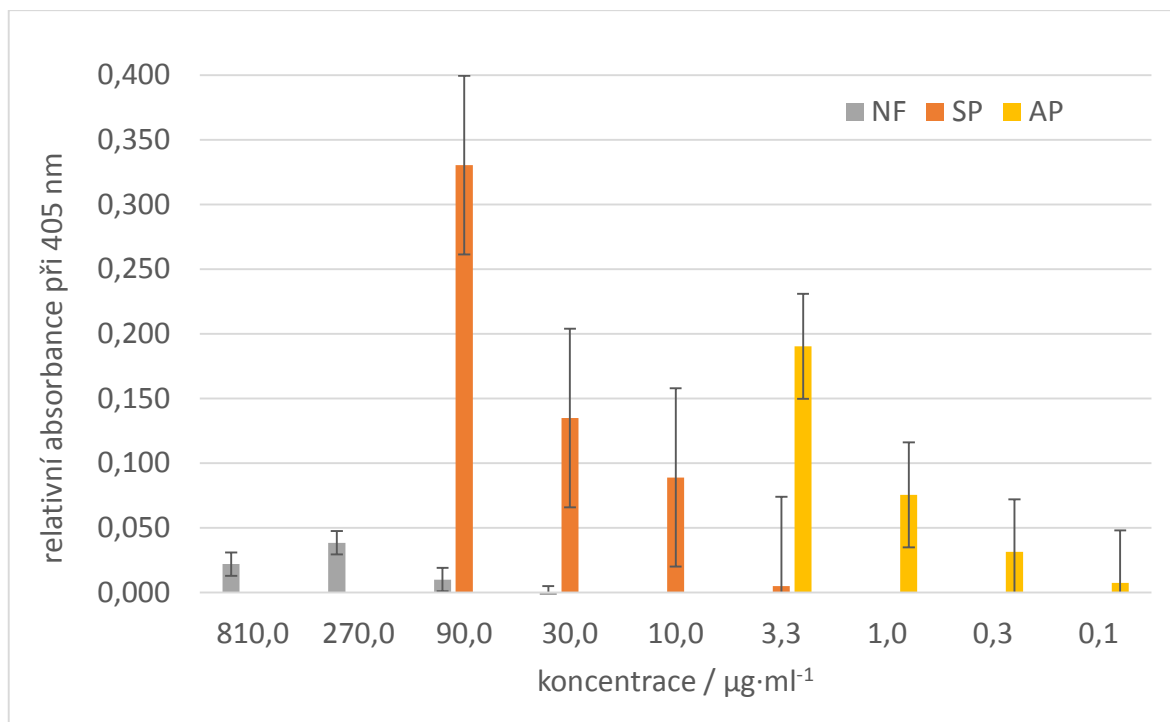
Imunoreaktivita afinitně purifikovaných protilátek byla stanovena specifickým rozeznáním antigenu BC2L-A pomocí metody ELISA (Obrázek 15). Každá jamka destičky obsahovala 0,4  $\mu\text{g}$  antigenu. Proti slepičím protilátkám byla použita sekundární protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatase a byl přidán chromogenní substrát. Odezva byla kvantifikována pomocí absorbance při 405 nm.

Účinnost purifikace byla vyjádřena z porovnání reaktivity směsné protilátky (SP) a získané afinitně purifikované (AP) frakce. Jako kontrola (K) byly použity protilátky získané z vajec téže slepice před samotnou imunizací. Z důvodu ověření, že afinitní purifikací bylo získáno maximum specifické protilátky, byla měřena imunoreaktivita i u nezachycené frakce (NF), kterou tvořily proteiny, které se na koloně nevázaly.



Obrázek 15 – Imunoreaktivita protilátek anti BC2L-A stanovena metodou ELISA. Afinitně purifikovaná protilátka (AP) byla nanášena v koncentracích 3,3 – 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; směsné protilátky (SP) v koncentracích 90 – 3,3  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; nezachycená frakce (NF) v koncentracích 810 – 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a kontrola (K) v celé škále koncentrací, tj. 810 – 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Jako antigen bylo na každou jamku aplikováno 0,4  $\mu\text{g}$  lektinu BC2L-A.

Pro posouzení zakoncentrování specifické protilátky afinitní purifikací byla porovnána imunoreaktivita afinitně purifikované frakce a směsné protilátky. Při tomto porovnání se vycházelo z absorbancí těchto frakcí, od kterých byla odečtena hodnota kontroly (Obrázek 16, strana 38).



Obrázek 16 – Imunoreaktivita protilátek anti BC2L-A metodou ELISA po odečtení kontroly.

Z porovnání imunoreaktivity frakcí při obdobných koncentracích (30 proti  $3,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a 10 proti  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) vychází, že došlo k zakoncentrování specifických protilátek více než  $10\times$ .

$$\eta = \frac{A_{3,3}(AP)}{A_{30}(SP)} \times \frac{30}{3,3} = 12,82$$

## 4.2 Studium afinity protilátek metodou SPR

Pro stanovení disociační konstanty protilátek proti BC2L-A byla použita metoda SPR. S použitím dvojkové ředící řady roztoků lektinu BC2L-A byl proměřen rovnovážný stav vazby antigenu a imobilizované protilátky. Získanou závislostí odezvy čipu na koncentraci lektinu byla proložena křivka, ze které byla vypočtena disociační konstanta ( $K_D$ ).

## 1. uspořádání

Toto uspořádání sloužilo k proměření síly vazby aktivního lektinu na sacharidové jednotky přítomné na protilátkách obsažených ve směsné frakci, viz Obrázek 17.

Nebyla pozorována měřitelná vazba aktivního lektinu na referenční kanál, na kterém byla imobilizována  $\alpha$ -/ $\beta$ -D-galaktosa.

Pro interakci lektinu s glykosylacemi protilátek nezachycené frakce byla vypočtena disociační konstanta:

$$K_D = (4,97 \pm 0,57) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}.$$

## 2. uspořádání

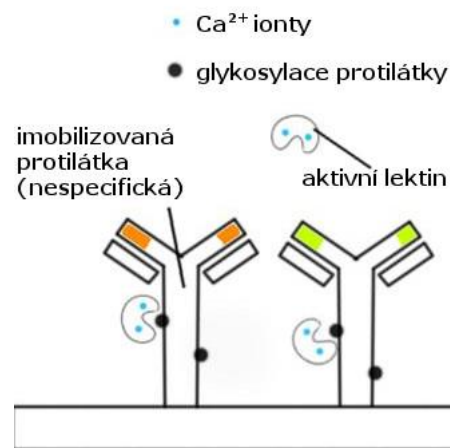
Byla měřena síla interakce afinitně purifikované specifické protilátky s lektinem BC2L-A, který byl inaktivován 3mM EDTA (Obrázek 18). Zjištěná  $K_D$  by tak měla charakterizovat specifickou interakci protilátky ke struktuře lektinu.

Pro interakci lektinu BC2L-A a afinitně purifikované protilátky imobilizované na kanále 3 byla disociační konstanta stanovena na

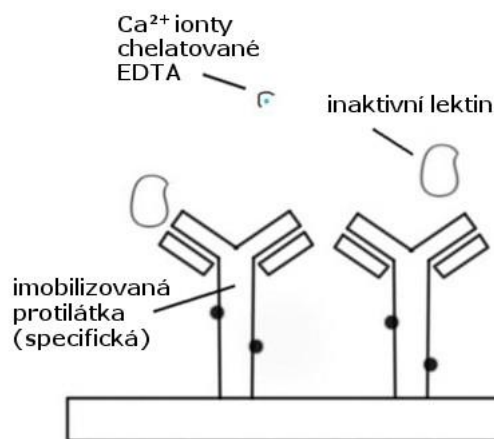
$$K_D = (6,1 \pm 1,4) \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}.$$

Pro stejnou situaci byla pro kanál 4 s menším podílem imobilizované AP naměřena disociační konstanta

$$K_D = (4,5 \pm 1,5) \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$



Obrázek 17 – Schéma 1. uspořádání.



Obrázek 18 – Schéma 2. uspořádání.



### 3. uspořádání

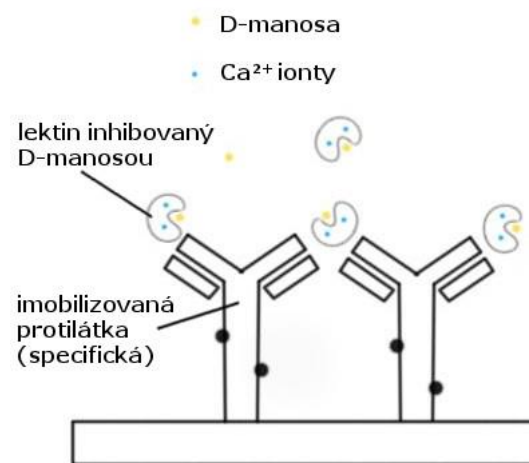
V této variantě byl lektin BC2L-A inaktivován přidáním D-manosy do roztoku (výsledná koncentrace  $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), viz Obrázek 19.

Pro kanál 3 byla naměřena disociační konstanta

$$K_D = (2,29 \pm 0,69) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$

Pro kanál 4 byla naměřena disociační konstanta

$$K_D = (2,38 \pm 0,51) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$$



Obrázek 19 – Schéma 3. uspořádání.

## 5 Diskuze

Cystická fibróza je autozomálně recesivní onemocnění s řadou negativních projevů od život omezujících po život ohrožujících. Nemoc je způsobena mutací CFTR genu, která vede k poruše funkce či celkové absenci CFTR kanálu, jenž se přirozeně vyskytuje na cytoplasmatické membráně epitelálních buněk. Nejzávažnější komplikací CF je zásah respiračního ústrojí, které kvůli chronickým bakteriálním infekcím ztrácí funkci a může dojít až k jeho selhání. Oportunistická bakterie *Burkholderia cepacia* způsobuje u pacientů s CF velmi rychlou progresi poškození plic a z důvodu řady rezistencí není možné tento průběh mírnit. Tato práce byla zaměřena na zkoumání protilátek proti lektinu BC2L-A, který (vedle dalších adhezínů) slouží k adherenci bakterie na plicní epitel a je tak významným virulentním faktorem. Tyto protilátky mají potenciál snižovat adherenci bakterií na epitelální buňky CF pacientů a bránit tak rozvoji infekce.

Byla provedena afinitní purifikace vzorku směsných protilátek izolovaných z vajec po imunizaci slepice lektinem BC2L-A. Afinitní purifikace byla prováděna v přítomnosti D-manosu, která by měla zabraňovat interakcím lektinu s glykosylovanými částmi protilátek. Výtěžek této purifikace byl nižší, než je očekávaný obsah specifických protilátek ve slepičím žloutku (okolo 2 % [36]). Možným vysvětlením je nedostatečně stabilní navázání některých molekul specifické protilátky na lektin imobilizovaný na koloně. Tyto protilátky tak mohly být eluovány z kolony působením promývacích roztoků, a tedy dříve než byl zahájen sběr frakcí.

Pro porovnání imunoreaktivity afinitně purifikované protilátky byla použita metoda ELISA v nepřímém uspořádání. Afinitně purifikovaná protilátka vykazovala v poměru ke koncentraci vyšší reaktivitu než směsná protilátka. Z porovnání reaktivit kontroly a nezachycené frakce (Obrázek 15, strana 37) lze také soudit, že afinitní purifikace neproběhla se 100% účinností, jelikož reaktivita nezachycené frakce na ELISA je o něco vyšší než reaktivita kontroly. Fakt, že i kontrolní frakce protilátek vykazuje imunoreaktivitu při testování metodou ELISA, ukazuje na možné nespecifické interakce – lektin může vázat D-manosu, která se nachází v sacharidových strukturách na povrchu slepičích IgY. Reaktivitu je možné sledovat v rozsahu koncentrací

810 – 10  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , při nižších koncentracích už se úroveň odezvy pohybuje na hranici rozlišovacích schopností metody. Možným krokem k odstínění tohoto vlivu by bylo provádění metody ELISA za přítomnosti D-manosy.

Charakterizace interakcí lektinu BC2L-A s nespecifickými a specifickými slepičími protilátkami IgY byla provedena metodou povrchové plasmonové rezonance (SPR) ve spolupráci s Centrální laboratoří Interakce a krystalizace biomolekul na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity.

Pro referenční kanál byla jako imobilizovaný ligand zvolena směs  $\alpha$ -/ $\beta$ -D-galaktosy. Na tomto kanále nebyla naměřena změna odezvy odpovídající vazbě a z měření tedy vyplývá, že lektin BC2L-A tento disacharid neváže. Směs  $\alpha$ -/ $\beta$ -D-galaktosy se ukázala být vhodným referenčním ligandem pro měření síly vazby lektinu BC2L-A.

Při interakci lektinu s protilátkami nezachycené frakce byla pozorována poměrně silná vazba, které odpovídá i nízká hodnota vypočtené disociační konstanty. Vzhledem k nespecifitě protilátek nezachycené frakce je možné pozorovanou a měřenou interakci považovat za vazbu lektinu BC2L-A a glykosylací nespecifických protilátek. Ze zjištěných faktů vyplývá, že lektin BC2L-A váže D-manosu s vysokou specifitou a vysokou afinitou, což potvrzuje důležitou roli tohoto virulentního faktoru při adherenci bakterie *Burkholderia cepacia* na povrch epiteliálních buněk.

Ve druhém uspořádání experimentu byl lektin inaktivován odebráním  $\text{Ca}^{2+}$  iontů chelatačním činidlem EDTA. Ze získaných dat vyplývá, že lektin inaktivní díky EDTA je specifickou protilátkou vázán silněji než jaká je síla interakce lektin-glykosylace. Při prokládání závislosti relativní odezvy na koncentraci se jako vhodnější ukázal být model multivalentní interakce. To je možné vysvětlit tím, že lektin BC2L-A se při ztrátě  $\text{Ca}^{2+}$  iontů rozpadá z dimerického uspořádání na monomery. Jedna protilátka tak může specificky vázat více monomerů. Při vyhodnocení nebyl zjištěn prakticky žádný rozdíl mezi kanálem 3 a kanálem 4, kde bylo imobilizováno přibližně třetinové množství protilátky oproti kanálu 3. Nebyla tedy pozorována koncentrační závislost.

Síla vazby specifické protilátky k lektinu byla měřena také v uspořádání, kdy bylo vazné místo lektinu BC2L-A inhibováno D-manosou. Výsledná hodnota disociační konstanty vazby specifické protilátky a lektinu inaktivovaného manosou je srovnatelná

s interakcí lektin-glykosylace u nespecifických protilátek (nezachycená frakce). Z vynesení relativní odezvy proti koncentraci lektinu (viz Příloha, Obrázky 20 a 21, strana 48) je patrné, že proložená křivka nekopíruje příliš vhodně průběh závislosti. V oblasti nízkých koncentrací prakticky nelze hovořit o jasně definované závislosti – stanovení je limitováno rozlišovací schopností metody. Z prudkého nárůstu odezvy mezi koncentracemi 7,8 a 15,6  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  a dále pozvolného průběhu lze usuzovat, že byly pozorovány dva typy interakcí. První interakcí mohla být specifická vazba protilátka-inaktivní lektin, která má po krátké „lag-fázi“ velmi rychlou saturaci, a druhou interakcí mohla být vazba volného lektinu v roztoku na glykosylace protilátky. Manosa, která je součástí složitější sacharidové struktury je totiž vhodnějším substrátem pro lektin BC2L-A než volná D-manosa [30]. Se vzrůstající koncentrací lektinu v roztoku tak glykosylace protilátek IgY kompetují s D-manosou v roztoku v obsazení vazného místa lektinu. Mezi těmito dvěma substráty se ustavuje rovnováha a vazba lektin-glykosylace se tak může projevit jako druhá závislost. Celkově nižší hodnota disociační konstanty při blokaci vazného místa lektinu D-manosou oproti inaktivaci EDTA může být vysvětlena faktem, že slepice byly imunizovány volným lektinem. Lektin s D-manosou ve vazném místě může mít odlišnou strukturu od volného lektinu, čímž dojde ke změně některých epitopů a lektin pak nemusí být specifickými protilátkami tak dobře rozpoznáván.

Celkově jsou hodnoty disociačních konstant přibližné, jelikož imobilizace protilátek nemusela proběhnout v ideální monovrstvě s požadovanou orientací a na stanovení tak mělo vliv sterické bránění interakcí. Zároveň je třeba brát v úvahu, že protilátky produkované slepicemi do žloutku jsou polyklonální a stanovená  $K_D$  je tak jakýmsi průměrem různých interakcí protilátka-lektin.

## 6 Závěr

- Spektrofotometricky byly stanoveny koncentrace frakcí protilátek.
- Na připravené afinitní chromatografické koloně s imobilizovaným lektinem BC2L-A byla provedena izolace specifických protilátek s výtěžkem 0,23 % a zakonzentrováním více než 10×.
- Byla stanovena disociační konstanta interakce lektinu BC2L-A s glykosylacemi protilátek nezachycené frakce na  $K_D = (4,97 \pm 0,57) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .
- Pro stanovení disociační konstanty specifické vazby protilátka-lektin byl lektin inaktivován chelatací  $\text{Ca}^{2+}$  iontů činidlem EDTA. Výsledná disociační konstanta činí  $K_D = (6,1 \pm 1,4) \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , respektive  $K_D = (4,5 \pm 1,5) \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  při menším množství imobilizované afinitně purifikované specifické protilátky.
- Při inaktivaci vazného místa lektinu D-manosou nebylo možné získanou závislost relativní odezvy na koncentraci proložit vhodnou křivkou a výsledné  $K_D = (2,29 \pm 0,69) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , respektive  $K_D = (2,38 \pm 0,51) \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  při menším množství imobilizované afinitně purifikované protilátky, nepředstavují reprezentativní hodnoty.

## 7 Seznam použité literatury

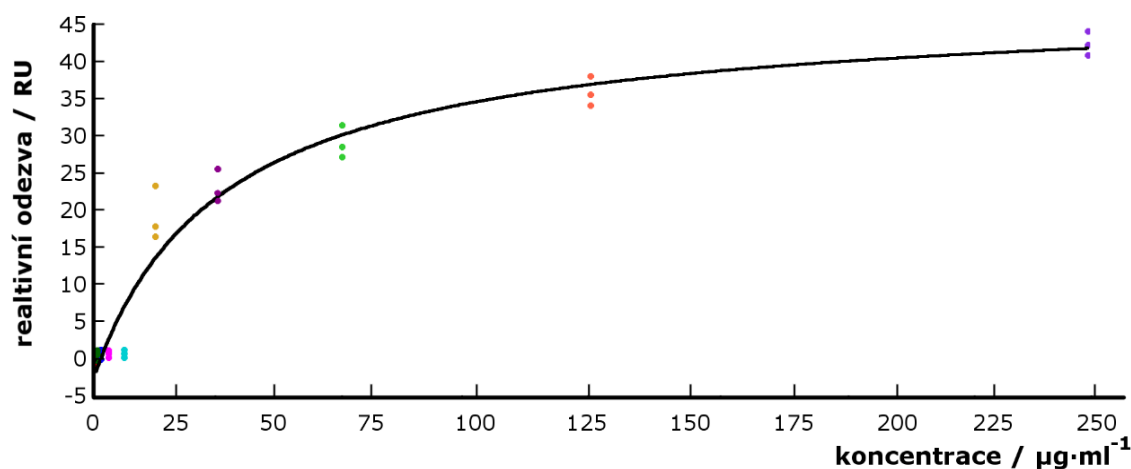
1. Antoniou, S., Elston, C. (2016) Cystic fibrosis. *Medicine (Abingdon)* **44**, 321–25.
2. Kumar, S., Tana, A., Shankar, A. (2014) Cystic fibrosis — What are the prospects for a cure? *Eur J Intern Med* **25**, 803–7.
3. Cystická fibróza - úvod - Cystická fibróza - portál o CF URL: <http://www.cystickafibroza.cz/> [navštíveno 20. března 2018].
4. Elborn, J.S. (2016) Cystic fibrosis. *The Lancet* **388**, 2519–31.
5. Gibson, R.L., Burns, J.L., Ramsey, B.W. (2003) Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **168**, 918–51.
6. Homo sapiens cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), RefSeqGene on chromosome 7 (2018) URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG\\_016465.4](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_016465.4) [navštíveno 20. března 2018].
7. Rowe, S.M., Miller, S., Sorscher, E.J. (2005) Cystic fibrosis. *N Engl J Med* **352**, 1992–2001.
8. Koch, C., Hiby, N. (1993) Pathogenesis of cystic fibrosis. *The Lancet* **341**, 1065–69.
9. Davidson, D.J., Dorin, J.R. (2001) The CF mouse: an important tool for studying cystic fibrosis. *Expert Rev Mol Med* **3**, 1–27.
10. Rowntree R.K., Harris A. (2003) The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Annals of Human Genetics* **67**, 471–85.
11. Štuka, Č. (2011) Soubor:Cystic2cz.jpg URL: <https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:Cystic2cz.jpg>. [navštíveno 24. dubna 2018]
12. Kerem, E. (2006) Atypical CF and CF related diseases. *Paediatr Respir Rev* **7**, 144–46.
13. Mackie A.D.R., Thornton S.J., Edenborough F.P. (2003) Cystic fibrosis-related diabetes. *Diabet Med* **20**, 425–36.
14. Ahmad, A., Ahmed, A., Patrizio, P. (2013) Cystic fibrosis and fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* **25**, 167–72.
15. Claustres, M. (2005) Molecular pathology of the CFTR locus in male infertility. *Reprod Biomed Online* **10**, 14–41.
16. Rubin, B.K. (2002) Physiology of airway mucus clearance. *Respir Care* **47**, 761–68.
17. Fahy, J.V., Dickey, B.F. (2010) Airway Mucus Function and Dysfunction. *N Engl J Med* **363**, 2233–47.
18. Bals, R., Weiner, D.J., Wilson, J.M. (1999) The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* **103**, 303–7.
19. Stoltz, D.A., Meyerholz, D.K., Welsh, M.J. (2015) Origins of cystic fibrosis lung disease. *N Engl J Med* **372**, 351–62.
20. Imundo, L., Barasch, J., Prince, A., Al-Awqati, Q. (1995) Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3019–23.

21. Lo-Guidice, J.M., Wieruszkeski, J.M., Lemoine, J., Verbert, A., Roussel, P., Lamblin, G. (1994) Sialylation and sulfation of the carbohydrate chains in respiratory mucins from a patient with cystic fibrosis. *J Biol Chem* **269**, 18794–813.
22. Langan, K.M., Kotsimbos, T., Peleg, A.Y. (2015) Managing *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Infect Dis* **28**, 547–56.
23. Govan, J.R.W., Deretic, V. (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**, 539–74.
24. Govan, J.R.W., Hughes, J.E., Vandamme, P. (1996) *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol* **45**, 395–407.
25. Mahenthiralingam, E., Baldwin, A., Dowson, C.G. (2008) *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *J Appl Microbiol* **104**, 1539–51.
26. Scoffone, V.C., Chiarelli, L.R., Trespidi, G., Mentasti, M., Riccardi, G., Buroni, S. (2017) *Burkholderia cenocepacia* Infections in Cystic Fibrosis Patients: Drug Resistance and Therapeutic Approaches. *Front Microbiol* **8**, 10.3389/fmicb.2017.01592.
27. Rhodes, K.A., Schweizer, H.P. (2016) Antibiotic Resistance in *Burkholderia* Species. *Drug Resist Updat* **28**, 82–90.
28. Bernier, S.P., Silo-Suh, L., Woods, D.E., Ohman, D.E., Sokol, P.A. (2003) Comparative Analysis of Plant and Animal Models for Characterization of *Burkholderia cepacia* Virulence. *Infect Immun* **71**, 5306–13.
29. Lameignere, E., Shiao, T.C., Roy, R., Wimmerova, M., Dubreuil, F., Varrot, A., Imberty, A. (2010) Structural basis of the affinity for oligomannosides and analogs displayed by BC2L-A, a *Burkholderia cenocepacia* soluble lectin. *Glycobiology* **20**, 87–98.
30. Csávás, M., Malinovská, L., Perret, F., Gyurkó, M., Illyés, Z.T., Wimmerová, M., Borbás, A. (2017) Tri- and tetravalent mannoclusters cross-link and aggregate BC2L-A lectin from *Burkholderia cenocepacia*. *Carbohydr Res* **437**, 1–8.
31. DeLano, W. L. *The PyMOL Molecular Graphic System* (De-Lano Scientific, San Carlos, CA, USA).
32. Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2011) Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int Rev Immunol* **30**, 16–34.
34. Fontenot, A.P., Simonian, P.L. (2016) Adaptive Immunity v knize *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine (Sixth Edition)*, Broaddus, V.C., Mason, R.J., Ernst, J.D., King, T.E., Lazarus, S.C., Murray, J.F., Nadel, J.A., Slutsky, A.S., Gotway, M.B. (W.B. Saunders, Philadelphia), 206–24.
35. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) The Adaptive Immune System v knize *Molecular Biology of the Cell (4th edition)* (Garland Science, New York), 3457–3600.
36. Merlo, L.M.F., Mandik-Nayak, L. (2013) Adaptive Immunity: B Cells and Antibodies v knize *Cancer Immunotherapy (Second Edition)*, Prendergast, G.C., Jaffee, E.M. (Academic Press, San Diego), 25–40.

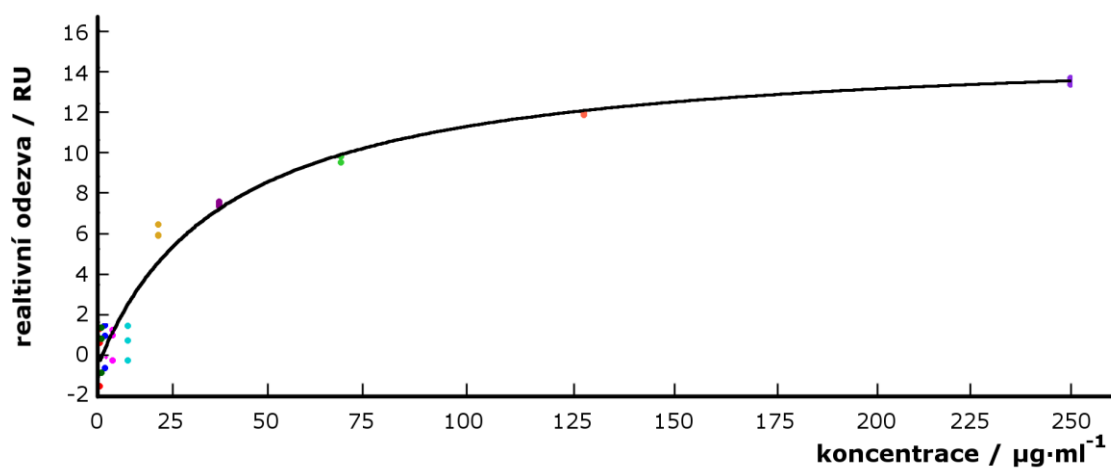
36. Michael, A., Meenatchisundaram, S., Parameswari, G., Subbraj, T., Selvakumaran, R., Ramalingam, S. (2010) Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) as an Alternative to Mammalian Antibodies. *Indian J Sci Technol* **3**, 468–74.
37. Carlander, D., Ståhlberg, J., Larsson, A. (1999) Chicken Antibodies. *Ups J Med Sci* **104**, 179–89.
38. Larsson, A., Karlsson-Parra, A., Sjöquist, J. (1991) Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clin Chem* **37**, 411–14.
39. Suzuki, N., Lee, Y.C. (2004) Site-specific N-glycosylation of chicken serum IgG. *Glycobiology* **14**, 275–92.
40. Hodek, P., Trefil, P., Simunek, J., Hudecek, J., Stiborova, M. (2013) Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. *Int J Electrochem Sci* **8**, 113–24.
41. Cyanogen bromide-activated-Sepharose® 4B C9142 URL: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/c9142pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c9142pis.pdf) [navštíveno 5. května 2018].
42. Nguyen, H.H., Park, J., Kang, S., Kim, M. (2015) Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications. *Sensors (Basel)* **15**, 10481–510.
44. van der Merwe, P.A. (2001) Surface plasmon resonance v knize *Protein-ligand Interactions: Hydrodynamics and Calorimetry: a Practical Approach*, Practical approach series. (Oxford University Press), 137–69.
44. Johnsson, B., Löfås, S., Lindquist, G. (1991) Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem* **198**, 268–77.
45. Mamer, S., Chen, S., Weddell, J., Palasz, A., Wittenkeller, A., Kumar, M., Imoukhuede, P.I. (2017) Discovery of High-Affinity PDGF-VEGFR Interactions: Redefining RTK Dynamics. *Sci Rep* **7**, 10.1038/s41598-017-16610-z.



## 8 Příloha



Obrázek 20 – Vynesení závislosti relativní odezvy na koncentraci BC2L-A + D-Man pro 3. kanál. Z grafu je patrné, že v nízkých koncentracích (přibližně do  $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) není patrná žádná závislost odezvy na koncentraci. Poté dochází ke skokovému zvýšení odezvy a dále ve vyšších koncentracích má proložená křivka mírný průběh.



Obrázek 21 – Vynesení závislosti relativní odezvy na koncentraci BC2L-A + D-Man pro 4. kanál. Vynesení i proložená křivka se velmi podobají datům naměřeným na 3. kanále. Pro nízké koncentrace závislost nelze stanovit, vysoké koncentrace spějí k saturaci.

