

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Testování multivalentních inhibitorů lektinu BclDLec

**Karolína Jílková
Jihomoravský kraj**

Brno 2020

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

Testování multivalentních inhibitorů lektinu BclDLec

Testing of multivalent inhibitors of lectin BclDLec

Autor: Karolína Jílková

Škola: Gymnázium Brno, Křenová, příspěvková organizace,
Křenová 304/36, 602 00 Brno

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultant: Mgr. Lenka Malinovská, Ph.D.

Brno 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 1. 2. 2020

Karolína Jílková

Poděkování

Ráda bych poděkovala prof. RNDr. Michaele Wimmerové, Ph.D. za možnost uskutečnit tento výzkum v rámci její výzkumné skupiny Glykobiemie a Mgr. Lence Malinovské, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady. Také bych chtěla poděkovat rodině za podporu a rady při sepisování této práce.

Anotace

V této práci jsem se zkoumala různé možnosti inhibice aglutinace lektinu BclDLec, který pochází z bakterie *Burkholderia cenocepacia*. Bylo provedeno otestování inhibičních účinků D-mannosy, D-galaktosy a multivalentního inhibitoru s terminální D-mannosou s interním technickým označením XIb. Největší inhibiční schopnosti se projevíly u multivalentního inhibitoru s terminální D-mannosou s označením XIb, který obsahuje jádro a deset ramének nesoucích molekuly D-mannosy.

Klíčová slova

Lektin BclDLec, *Burkholderia cenocepacia*, multivalentní inhibitory, cystická fibróza

Annotation

In this work I examined various options of inhibiting the agglutinations of lectin BclDLec which is located in bacteria *Burkholderia cenocepacia*. The inhibitory effects of D-mannose, D-galactose and multivalent inhibitor with terminal D-mannose with internal technical designation XIb were tested. The best inhibitory effects have occurred during the inhibition by the multivalent inhibitor with terminal D-mannose with designation XIb which consists of a core and ten linkers terminated by D-mannose.

Keywords

Lectin BclDLec, *Burkholderia cenocepacia*, multivalent inhibitors, cystic fibrosis

Obsah

Úvod.....	7
1. Teoretická část.....	8
1.1. Lektiny	8
1.2. Cystická fibróza	9
1.3. Burkholderia cepacia komplex	12
2. Praktická část.....	14
2.1. Použité vybavení a chemikálie.....	14
2.2. Metodika	15
2.2.1. Testování aglutinačních schopností lektinu BclDLec	15
2.2.2. Inhibice aglutinace pomocí sacharidů	16
2.2.3. Inhibice aglutinace pomocí multivalentního inhibitoru s terminální D-mannosou (Xlb)	17
2.3. Výsledky.....	18
2.3.1. Testování aglutinačních schopností lektinu BclDLec	18
2.3.2. Inhibice aglutinace pomocí sacharidů	20
2.3.3. Inhibice aglutinace pomocí multivalentního inhibitoru s terminální D-mannosou (Xlb)	22
2.3.4. Změny proteinu v čase	24
3. Závěr	25
4. Použitá literatura	26
5. Seznam použitých zkratk.....	29
6. Seznam obrázků.....	30
7. Seznam tabulek	30

Úvod

Ve své práci se zabývám testováním inhibičních vlastností monosacharidů D-mannosa, D-galaktosa a multivalentního inhibitoru obsahujícího D-mannosu na aglutinaci lektinem BclDLec, který je součástí bakterie *Burkholderia cenocepacia*.

Lektiny jsou proteiny se schopností specificky se vázat na sacharidy. Této schopnosti využívají nejen živočišné a rostlinné buňky, ale i viry a bakterie. Bakterie se pomocí lektinů umístěných na fimbriích mohou specificky navázat na povrch tkání jejich hostitele, lektin je tedy nápomocen při rozvoji bakteriálních infekcí.

Při onemocnění cystickou fibrózou je narušena funkce chloridového kanálu, což způsobuje dehydrataci hlenu a zvýšení jeho viskozity, přičemž se zhoršuje možnost vykašlávání. Hustý hlen tvoří vhodné prostředí pro některé bakterie, které způsobují chronické infekce plic u pacientů s cystickou fibrózou a jsou také častou příčinou úmrtí. Jedním z patogenů způsobujících tyto infekce je *Burkholderia cenocepacia*. *Burkholderia cenocepacia* produkuje lektin BclDLec. Předpokládá se, že se lektin uplatňuje při rozvoji infekce. Možnou budoucí terapií zabráňující rozvinutí pneumonie může být inhalace inhibitorů lektinů.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Lektiny

Lektiny jsou proteiny, které mají schopnost navázat se na sacharidy. Tyto proteiny mají většinou dvě nebo více vazebných míst. Díky tomu se mohou navázat na sacharidy nacházející se na povrchu různých buněk najednou, což vede k aglutinaci buněk.[1]

Lektiny můžeme najít u živočichů, rostlin, virů i bakterií a můžeme je rozdělit na základě jejich specifity vůči monosacharidům, konkrétně vůči D-mannose, D-galaktose, D-glukose, N-acetylgalaktosaminu, N-acetyl-D-glukosaminu, kyselině sialové nebo L-fukose. [1,2]

Prvním objeveným lektinem byl rostlinný lektin konkanavalin A, který byl izolován Jamesem B. Sumnerem z *Canavalia ensiformis*. Tento lektin funguje jako mitogen, tudíž stimuluje mitózu. Mezi mitogenní lektiny patří také fytohemaglutinin A, který je lokalizován v semenech červených fazolí. Obecně můžeme rostlinné lektiny najít v obilovinách, bramborách, oříšcích, banánech, rýži nebo v houbách, ale některé rostlinné lektiny jsou zastoupeny i v listech, oddencích, hlízách a stoncích. [3,4]

Živočišné lektiny se nacházejí mimo jiné rozpuštěné v krevní plazmě, kde mají především imunitní funkci, neboť se podílí na obranných procesech v případě napadení patogenem. Živočišné lektiny se rozdělují do dvou základních skupin – na galektiny, obsahující lektinovou doménu S-typu, a C-lektiny. Galektiny se podílí především na buněčných adhezích, ale i na regulaci buněčného cyklu a indukci proliferace. Galektiny se vyskytují na povrchu buněk, v jejich cytoplazmě nebo v buněčném jádře a jsou specifické vůči galaktosovým derivátům.

C-lektiny mají schopnost vázat sacharidové struktury za pomoci vápníku. Selektiny, které patří mezi C-lektiny, mají adhezivní schopnosti a fungují jako receptory fagocytů. [5,6,7,8,9,10,11]

Bakteriální lektiny se podílí na interakcích mezi patogenem a hostitelem. Ne všechny bakteriální lektiny mají aglutinační schopnosti, avšak i nadále se řadí do skupiny lektinů díky své sacharidové specifitě a neimunitnímu původu. Bakteriální lektiny se často vyskytují na fimbríích nebo bičících. Díky lektinům se mohou bakterie lépe přichytit ke tkáním svého hostitele, kde je přítomen sacharid, vůči kterému je daný lektin specifický. [12,13]

Mezi významné virové lektiny patří hemaglutinin, který se podílí na navázání viru chřipky na hostitele. [15]

1.2. Cystická fibróza

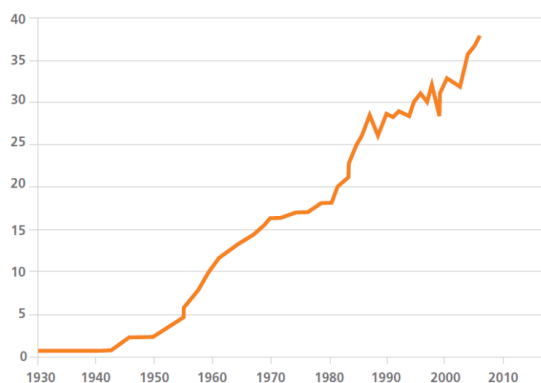
Cystická fibróza (CF) je někdy nazývána jako mukoviscidóza. Jedná se o multisystémové onemocnění, které je geneticky podmíněné. V klasické formě se projevuje chronickým progredujícím onemocněním dýchacích cest a plic, insuficiencí zevní sekrece pankreatu, vysokou koncentrací elektrolytů v potu a poruchou reprodukce u mužů. U tohoto onemocnění je zasaženo mnoho orgánů a systémů, avšak nikdy nebývá zasažen mozek a díky tomu u tohoto onemocnění nenastává zpoždění psychického vývoje. [16, 17]

Cystická fibróza byla poprvé popsána v roce 1938 americkou patoložkou Dorothy Andersonovou, která shrnula patologicko-anatomické nálezy 49 dětí. Dvacet z nich zemřelo na onemocnění nazvané cystická fibróza pankreatu. V této době umírali pacienti s tímto onemocněním v prvním roce života. [18]

Více poznatků o cystické fibróze se začíná v literatuře objevovat po druhé světové válce. Od roku 1960 se u nás začala využívat spolehlivá diagnostika tzv. potním testem, rozvíjí se výzkum a nabízejí se nové možnosti léčby. [18]

V dnešní době se průměrná naděje dožití pacientů s cystickou fibrózou v USA nyní pohybuje kolem 37 let. Navíc se nyní odhaduje, že polovina pacientů s cystickou fibrózou v USA přežije 41 let, v čemž je vidět obrovský pokrok oproti roku 2000, kdy to bylo přibližně 32 let (viz obrázek 1). [19,20]

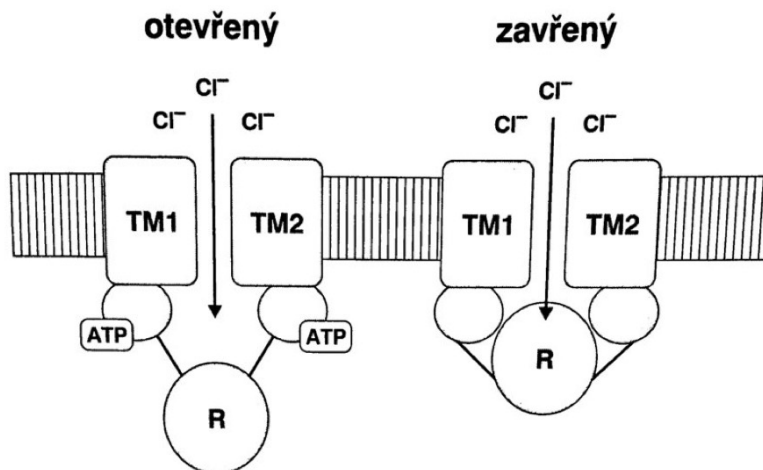
Vývoj předpokládaného průměrného dožití pacientů s cystickou fibrózou



Obrázek 1: Naděje dožití pacientů s cystickou fibrózou

Cystická fibróza patří do skupiny autozomálně recesivních dědičných onemocnění (viz obrázek 3), které je způsobeno geny na nepohlavních chromozomech. Konkrétně je CF způsobena genem CFTR umístěným na 7. chromosomu. Toto onemocnění se vyskytuje převážně u evropské populace. [16,18,21]

Mutace genu CFTR způsobuje porušení funkce proteinu CFTR, který vykonává funkci chloridového kanálu. Protein CFTR patří mezi tzv. ABC transportéry, které jsou zodpovědné za přenos malých částic, např. Cl^- (viz obrázek 2). [18]



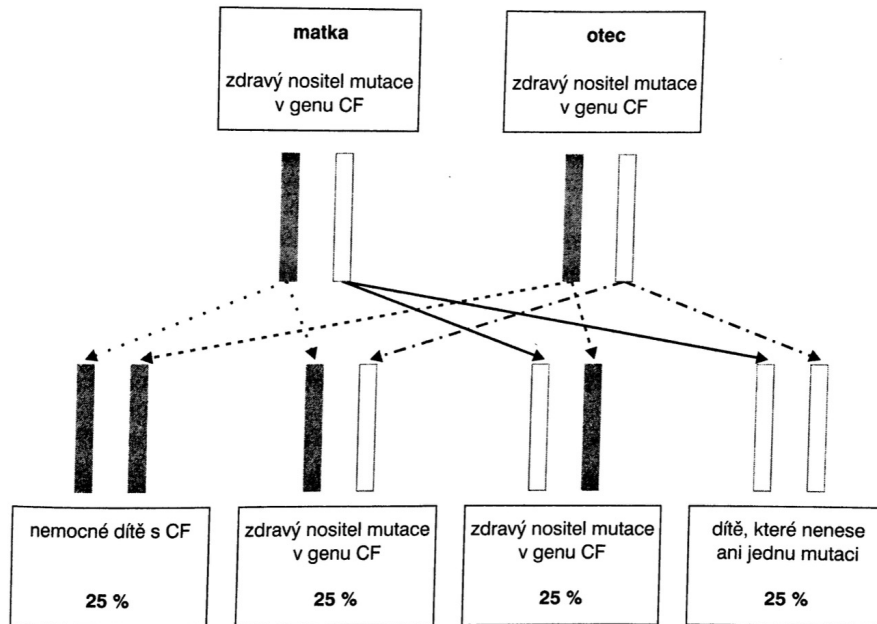
Obrázek 2: Mechanický model regulace toku iontů kanálem proteinu CFTR

V současné době může být toto onemocnění diagnostikováno již během novorozeneckého screeningu, v prvních dnech po narození dítěte, společně s dalšími závažnými chorobami. Odběr krve pro diagnostiku tohoto onemocnění se provádí z paty u novorozenců mezi 72. a 96. hodinou života. [22]

V případě klinického podezření podloženého typickými příznaky (chronický sino-pulmonální syndrom, typický obraz RTG, paličkové prsty, azoospermie, rodinná dispozice a trávicí problémy) je proveden test na koncentraci chloridů v potu. Pomocí pilokarpinové iontoforézy dochází ke stimulaci pocení a u sebraného potu se stanovuje kvantitativní množství chloridů. Jako normální koncentrace je považována hodnota 10-30 mmol/l a u pacientů s vyššími hodnotami je nutné opakování testů pro vyloučení laboratorní chyby. [16,18,23]

Při pozitivní rodinné anamnéze je možné podstoupit molekulárně-genetické vyšetření, které je možné jednak z leukocytů při odběru krve nebo v rámci prenatální diagnostiky, kdy se využívá buněk plodové vody nebo choriových buněk. Toto vyšetření se provádí od 11. týdne těhotenství, kdy se pod ultrazvukovou kontrolou odebírá vzorek plodové vody. [16,18]

U rodičů, kteří patří do rizikové skupiny, tj. jsou zdraví nositelé mutace genu v CFTR (viz obrázek 3), je jedinou prevencí podstoupení asistované reprodukce s preimplantační diagnostikou, při níž jsou vybrána geneticky zdravá embrya. [16,24]



Obrázek 3: Dědičnost cystické fibrózy

Typické příznaky cystické fibrózy se projevují převážně dýchacími a trávicími obtížemi. Mezi dýchací problémy spojené s cystickou fibrózou patří například chronický kašel, časté plicní infekce, infekce dýchacích cest a dušnost. Jako příklad trávicích obtíží můžeme uvést mastnou hustou stolicí, mekoniový ileus (neprůchodnost střev u novorozenců), hubnutí a podvýživu i přes velkou chuť k jídlu a chronický průjem. K dalším symptomům cystické fibrózy patří slaná pot, paličkovité prsty, snížená hladina sodíku a chloru, metabolická alkalóza a snížená plodnost. [25,26]

Léčba cystické fibrózy musí být komplexní a intenzivní. Důležitou roli zde má prevence (např. očkování proti chřipce). U respiračních projevů se jedná o boj s infekcí, kde je důležitá cílená antibiotická terapie. K zajištění průchodnosti dýchacích cest – k ředění sekretu – se používá inhalace mukolytik. Při protizánětlivé léčbě se podávají hlavně NSA (=Nesteroidní antiflogistika). Při nízké saturaci pacienti inhalují kyslík. V současné době je respirační fyzioterapie a pohybová terapie součástí každodenní komplexní terapie. Krajním řešením léčby cystické fibrózy je transplantace plic. [18]

1.3. *Burkholderia cepacia* komplex

Burkholderia cepacia komplex je skupina geneticky odlišných bakterií s podobným fenotypem, které byly poprvé popsány roku 1949 Walterem (viz obrázek 4). Burkholderem. V roce 2013 byla přidána dokomplexu *Burkholderia cepacia* prozatím poslední bakterie (*Burkholderia pseudomultivorans*). [27,28,29]

Tabulka 1: Bakterie komplexu *Burkholderia cepacia*

Species name	Former genomovar designation	Year identified and/or named	Reference(s)
<i>B. cepacia</i>	I	1950, 1997	69, 74
<i>B. multivorans</i>	II	1997	74
<i>B. cenocepacia</i>	III	1997, 2003	73, 74
<i>B. stabilis</i>	IV	1997, 2000	74, 75
<i>B. vietnamiensis</i>	V	1995, 1997	74, 80
<i>B. dolosa</i>	VI	2001, 2004	79
<i>B. ambifaria</i>	VII	2001	70
<i>B. anthina</i>	VIII	2002	71
<i>B. pyrrocinia</i>	IX	2002	71
<i>B. ubonensis</i>	...	2000, 2008	76, 77
<i>B. latens</i>	...	2008	76
<i>B. diffusa</i>	...	2008	76
<i>B. arboris</i>	...	2008	76
<i>B. seminalis</i>	...	2008	76
<i>B. metallica</i>	...	2008	76
<i>B. contaminans</i>	...	2009	72
<i>B. lata</i>	...	2009	72
<i>B. pseudomultivorans</i>	...	2013	78

Burkholderia cepacia parazituje na česnekovitých rostlinách a v současnosti se o ní hovoří v souvislosti s nozokomiálními nákazami, čili infekcemi získanými při pobytu pacientů v nemocnici. Rovněž je *Burkholderia cepacia* rezistentní vůči mnohým desinfekčním prostředkům a antibiotikům. [30,31]

Burkholderia cenocepacia je v přírodě běžně zastoupený druh gramnegativní bakterie, která je stejně jako *Burkholderia cepacia* rezistentní vůči mnoha antibiotikům. S touto bakterií se můžeme setkat v přírodních zdrojích jako je voda, půda a také v plodinách, například v cibuli nebo banánech. [32]

Rod bakterií *Burkholderia* je obzvláště nebezpečný po pacienty s oslabenou imunitou, zejména u jedinců s cystickou fibrózou, neboť tyto bakterie jsou vysoce rezistentní vůči antibiotikům. [33,27]

Cepacia syndrom je velmi závažný stav pacientů s cystickou fibrózou, který je charakterizován zánětem dýchacích cest s vysokými horečkami, kdy dochází k poruchám funkce plic, v některých případech s fatálními následky. [33]

Tyto bakterie rovněž produkují lektiny, které umožňují přichycení se na tkáň jejich hostitele a mohou se tak podílet na vzniku infekce. Jedním z těchto bakteriálních lektinů je lektin BclDLec pocházející z bakterie *Burkholderia cenocepacia*.

2. PRAKTICKÁ ČÁST

2.1. Použité vybavení a chemikálie

- kvasnice (Uniferm)
- pufr o složení 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7,5
- lektin BclDLec
- D-mannosa
- D-galaktosa
- multivalentní inhibitor s terminální D-mannosou
- přenosný mikroskop s kamerou (Levenhuk)
- program ToupLite
- pipety se špičkami
- vortex
- centrifuga
- mikrokumavky (Eppendorf)
- analytické váhy

2.2. Metodika

2.2.1. Testování aglutinačních schopností lektinu BclDLec

Aglutinace je proces, při kterém se shlukují částice (v tomto případě kvasinky). Lektin BclDLec je specifický vůči D-mannose, která se nachází na povrchu kvasinek. Díky tomu může lektin BclDLec aglutinovat kvasinky, což můžeme pozorovat pod mikroskopem a v některých případech i pouhým okem.

Pro zjištění aglutinačních schopností lektinu BclDLec jsem pozorovala velikost a množství shluků kvasinek v přítomnosti lektinu BclDLec o různých koncentracích.

Po navážení malého množství kvasnic do mikrozkušavky na analytických vahách bylo na základě výpočtu pomocí hmotnostního zlomku určeno množství pufru, jež je třeba pro vytvoření 10% roztoku kvasnic. K úplnému rozmíchání kvasnic bylo nezbytné užití vortexu.

Následně jsem vytvořila mikroskopický preparát z malého množství vytvořeného roztoku kvasnic smíchaného s pufrem v poměru 1:1, který sloužil jako negativní kontrola.

Dalším krokem byla tvorba vzorků. První z nich se vytvořil smícháním malého množství výše zmíněného roztoku kvasnic s lektinem BclDLec o koncentraci 10 mg/ml v poměru 1:1. Tomuto vzorku byl ponechán čas pro aglutinaci v délce 5 minut.

Z části tohoto vytvořeného vzorku jsem vytvořila preparát pro pozorování pod mikroskopem. Při následném pozorování byly s pomocí programu ToupLite pořízeny detailní snímky centrální části vzorku.

Poté následovalo vytvoření dalších koncentrací lektinu BclDLec pomocí dvojkové ředící řady a obdobným způsobem byly otestovány aglutinační schopnosti lektinu BclDLec o koncentracích 5 mg/ml; 2,5 mg/ml; 1,25 mg/ml; 0,625 mg/ml; 0,3125 mg/ml; 0,15625 mg/ml; 0,078125 mg/ml.

2.2.2. Inhibice aglutinace pomocí sacharidů

V druhé části výzkumu jsem zkoumala, jak dobře lze inhibovat lektin BclDLec sacharidy D-mannosou a D-galaktosou. D-galaktosa je izomer D-mannosy, avšak lektin BclDLec není vůči D-galaktose specifický, tudíž by ho neměl inhibovat na rozdíl od D-mannosy.

Nejdříve byl vytvořen roztok smícháním lektinu o koncentraci 5 mg/ml a D-mannosy o koncentraci 200 mM v poměru 1:1. Při smíchání se tyto dvě látky navzájem zředí a vznikne roztok, v němž má lektin koncentraci 2,5 mg/ml a D-mannosa 100 mM. Poté jsem nechala vzorek 1 minutu stát, aby bylo možné zablokování vazebných míst lektinu D-mannosou.

Následně byl přidán 10% roztok kvasinek o stejném objemu jako má lektin společně s roztokem D-mannosy. Poté byl ponechán vzorku čas v délce 5 minut na případnou aglutinaci.

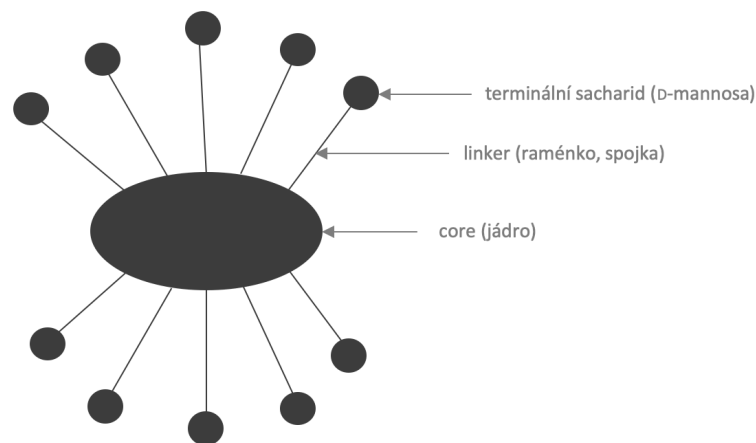
Z části výše uvedeného vzorku jsem vytvořila mikroskopický preparát. Při následném pozorování byly s pomocí programu ToupLite pořízeny detailní snímky centrální části vzorku a byly porovnány s pozitivní kontrolou, tj. vzorkem obsahujícím 10% roztok kvasnic a lektin o koncentraci 2,5 mg/ml.

Obdobný postup byl použit pro otestování D-mannosy o koncentracích 50 mM, 25 mM a 12,5 mM.

Pro ověření inhibičních schopností D-galaktosy byla namísto D-mannosy přidávána D-galaktosa a byly zjištěny její inhibiční schopnosti v koncentracích 100 mM, 50 mM, 25 mM a 12,5 mM.

2.2.3. Inhibice aglutinace pomocí multivalentního inhibitoru s terminální D-mannosou (XIb)

V další části výzkumu jsem zkoumala, do jaké míry bude možná inhibice lektinu BclDLec pomocí multivalentního inhibitoru s terminální D-mannosou, jehož interní technické označení je XIb. Tento inhibitor se skládá z jádra, ze kterého ční 10 ramének, jež jsou zakončeny terminálními sacharidy, v tomto případě D-mannosou (viz obrázek 4). Inhibiční potenciál inhibitoru může být ovlivněn délkou a množstvím ramének, stejně jako charakterem jádra.



Obrázek 4: Zjednodušené schéma inhibitoru XIb

Prvním experimentem byla inhibice pomocí XIb o koncentraci 12,5 mM. Nejdříve jsem smíchala lektin o koncentraci 5 mg/ml s inhibitorem XIb o koncentraci 25 mM v poměru 1:1 a ponechala 1 minutu odstát, aby bylo možné zablokování vazebných míst lektinu inhibitorem XIb. Poté jsem přidala 10% roztok kvasnic o stejném objemu jako měla směs lektinu s inhibitorem. Následně jsem nechala vzorku čas po dobu 5 minut na případnou aglutinaci.

Z části tohoto vytvořeného vzorku jsem vytvořila mikroskopický preparát. Při následném pozorování byly programem ToupLite pořízeny detailní snímky centrální části vzorku a byly porovnány s pozitivní kontrolou.

Obdobným postupem byly otestovány vzorky obsahující inhibitor XIb o koncentracích 6,25 mM, 3,125 mM, 1,5625 mM a 0,78125 mM.

2.3. Výsledky

2.3.1. Testování aglutinačních schopností lektinu BclDLec

Vzorek lektinu o koncentraci 10 mg/ml vytvořil v přítomnosti kvasinek poměrně velké shluky, které byly viditelné na sklíčku pouhým okem. Tím, že výše uvedená koncentrace byla poměrně velká, se vytvořilo velké množství shluků.

Lektin o koncentraci 5 mg/ml vytvořil větší shluky než lektin o koncentraci 10 mg/ml. Z důvodu snížení koncentrace na polovinu se utvořily větší a lépe viditelné agregáty. Velikost agregátů záleží na poměru mezi kvasinkami a lektinem.

Lektin o koncentraci 2,5 mg/ml vytvářel menší, avšak stále dobře pozorovatelné agregáty viditelné i pouhým okem, které vytvářejí dlouhé sítě.

Lektin o koncentraci 1,25 mg/ml vytvářel podstatně menší shluky, které nebyly však někdy zcela zřetelné ani pod mikroskopem a pouhým okem jsou téměř nepozorovatelné.

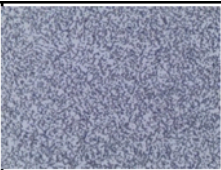
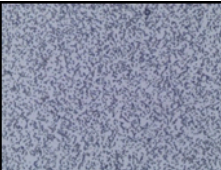
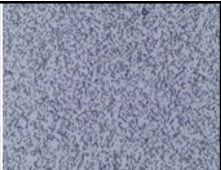
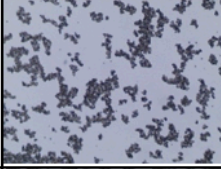

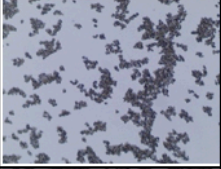
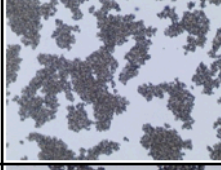
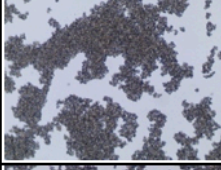
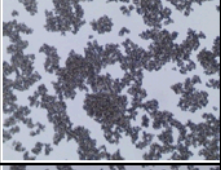
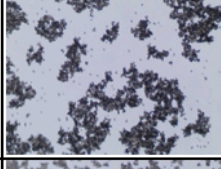
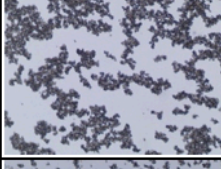
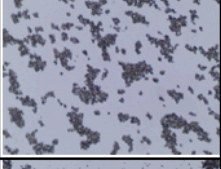
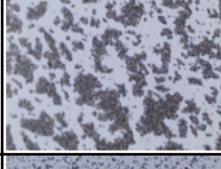
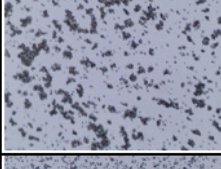
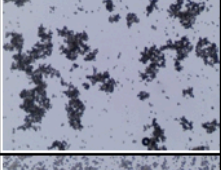
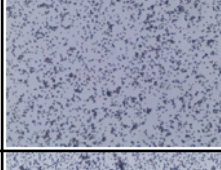
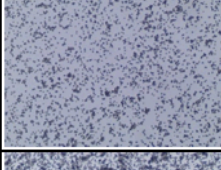
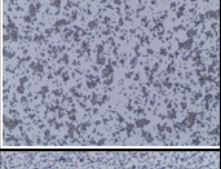
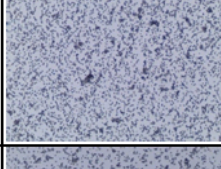
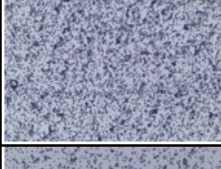
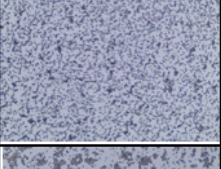
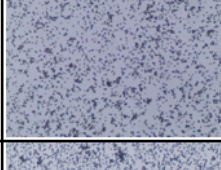
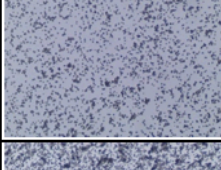
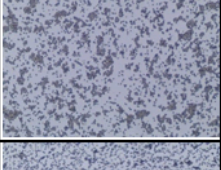
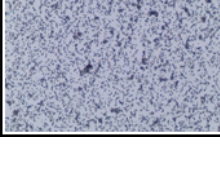
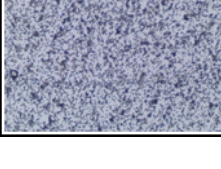
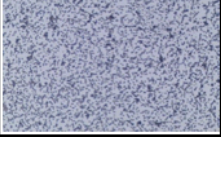
Lektin o koncentraci 0,625 mg/ml nevytvářel téměř žádné shluky a rozdíl od negativní kontroly byl téměř nepatrný.

Lektin o koncentraci 0,3126 mg/ml vytvářel velmi malé shluky a aglutinační schopnosti jsou málo zřetelné.

Lektin o koncentraci 0,15625 mg/ml vytvářel velmi malé shluky až žádné a byl velmi malý rozdíl mezi aglutinační schopností lektinu o této koncentraci a negativní kontrolou.

Lektin o koncentraci 0,078125 nevytvářel žádné agregáty a nebylo možné odlišit tento vzorek od negativní kontroly.

Tabulka 2: Přehled aglutinačních schopností lektinu BclDLec

Negativní kontrola			
Koncentrace lektinu BclDLec 10 mg/ml			
Koncentrace lektinu BclDLec 5 mg/ml			
Koncentrace lektinu BclDLec 2,5 mg/ml			
Koncentrace lektinu BclDLec 1,25 mg/ml			
Koncentrace lektinu BclDLec 0,625 mg/ml			
Koncentrace lektinu BclDLec 0,3125 mg/ml			
Koncentrace lektinu BclDLec 0,625 mg/ml			
Koncentrace lektinu BclDLec 0,3125 mg/ml			

Na základě zhodnocení aglutinačních schopností lektinu (viz Tabulka 1) o rozdílných koncentracích jsem se rozhodla provádět následující experimenty s lektinem o koncentraci 2,5 mg/ml, protože jeho aglutinační schopnosti jsou dobře zřetelné a v porovnání s lektinem o koncentraci 5 mg/ml nemá tak vysokou koncentraci, tudíž je možné ho vytvořit více zředěním lektinu o koncentraci 10 mg/ml.

2.3.2. Inhibice aglutinace pomocí sacharidů

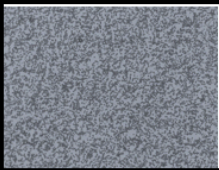
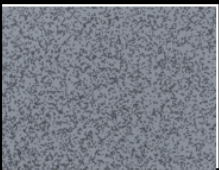
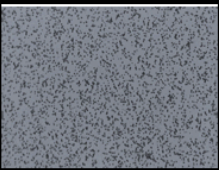
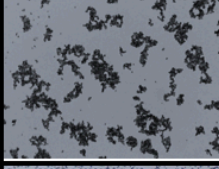
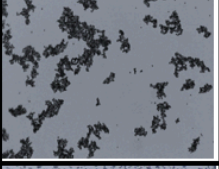
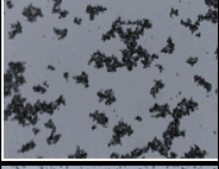
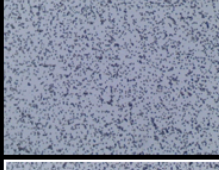
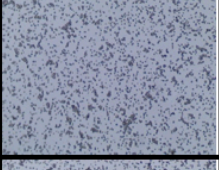
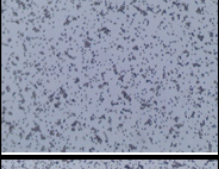
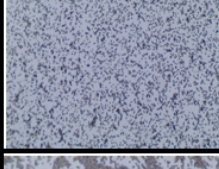
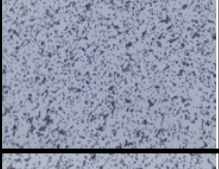
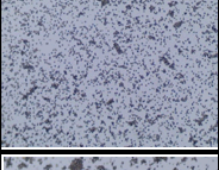
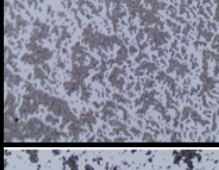
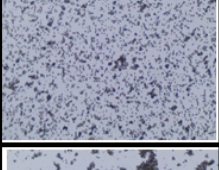
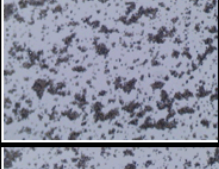
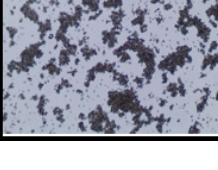
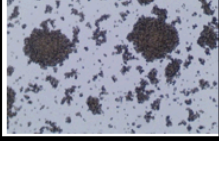
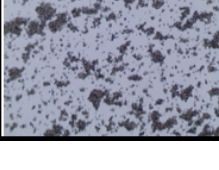
Při porovnání inhibičních účinků s negativní kontrolou (viz Tabulka 2) je vidět značný vliv D-mannosu, avšak i při vysoké koncentraci (100 mM) není schopna 100% inhibice.

D-mannosa o koncentraci 50 mM neinhibuje lektin BclDLec stejně efektivně jako při koncentraci 100 mM, přesto byl výsledek srovnatelný, přičemž měl stále znatelný efekt.

Při inhibici D-mannosou o koncentraci 25 mM vzniká nerovnoměrná agregace, tudíž v některých místech nebyl zřetelný rozdíl mezi inhibičními účinky D-mannosu o koncentracích 50 a 25 mM.

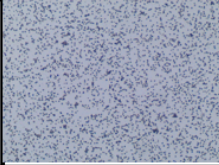
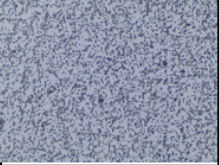
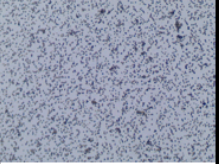
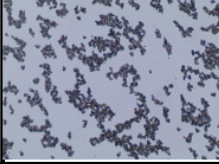
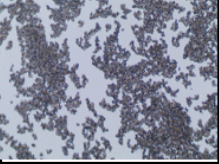
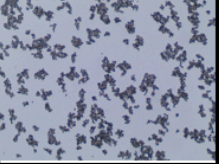
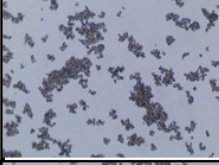
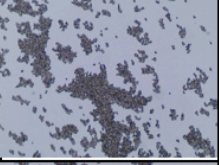
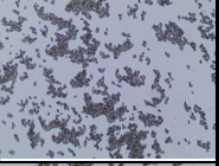
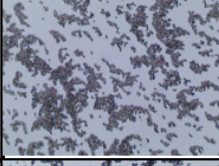
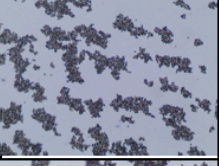
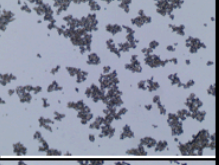
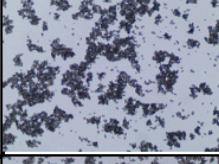
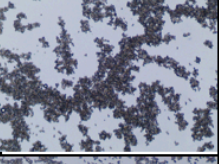
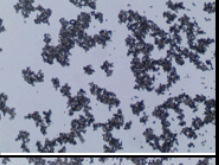
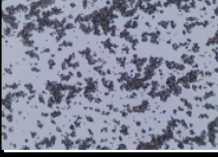
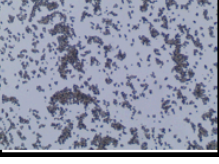
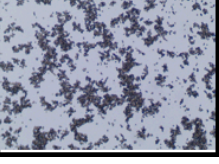
Mezi D-mannosou o koncentracích 25 a 12,5 mM docházelo ke zlomu inhibičních vlastností. Při koncentraci 12,5 mM vznikaly velké shluky kvasinek, které byly větší než shluky kvasinek vytvořené samotným lektinem.

Tabulka 3: Srovnání inhibičních účinků D-mannosu na lektin BclDLec

Negativní kontrola			
Pozitivní kontrola			
D-mannosa o koncentraci 100 mM			
D-mannosa o koncentraci 50 mM			
D-mannosa o koncentraci 25 mM			
D-mannosa o koncentraci 12,5 mM			

Na základě provedených experimentů lze považovat D-mannosu za slabý inhibitor. Pro znatelný inhibiční efekt je proto třeba vyšších koncentrací.

Tabulka 4: Srovnání inhibičních účinků D-galaktosy

Negativní kontrola			
Pozitivní kontrola			
D-galaktosa o koncentraci 100 mM			
D-galaktosa o koncentraci 50 mM			
D-galaktosa o koncentraci 25 mM			
D-galaktosa o koncentraci 12,5 mM			

D-galaktosa je izomer D-mannosy, vůči kterému není lektin BclDLec specifický, a proto byla D-galaktosa vhodná pro otestování, zda lektin BclDLec není poškozován přítomností sacharidů, což by mohlo být příčinou kruhových shluků vytvořených D-mannosou o koncentraci 12,5 mM.

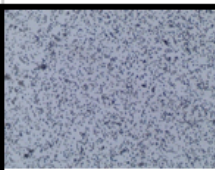
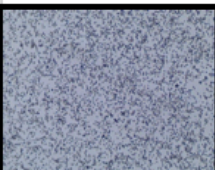
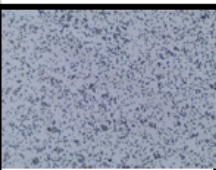
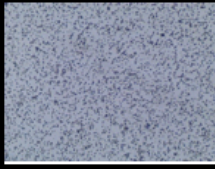
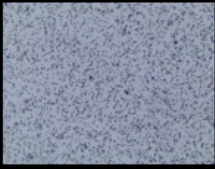
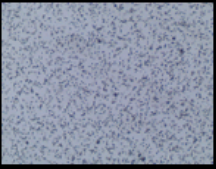
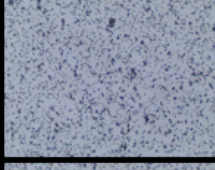
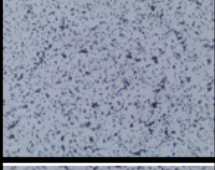
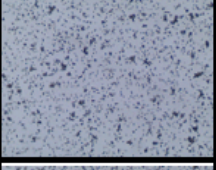
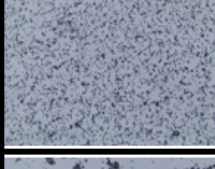
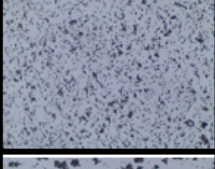
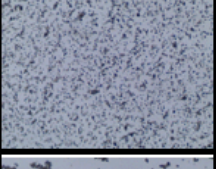
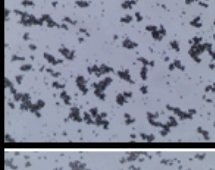
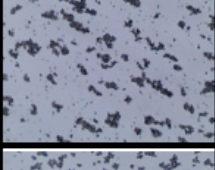
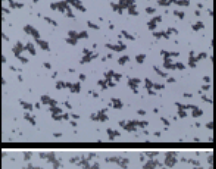



Experimentem byla potvrzena teorie, že D-galaktosa neinhibovala lektin BclDLec ani ve vysokých koncentracích (viz tabulka 3), jak bylo předpokládáno, neboť není lektin BclDLec specifický vůči D-galaktose.

Jelikož se kruhové agregáty nevyskytovaly v žádném dalším případě než při inhibici D-mannosou o koncentraci 12,5 mM, dá se předpokládat, že je to vlastnost daná právě D-mannosou.

2.3.3. Inhibice aglutinace pomocí multivalentního inhibitoru s terminální D-mannosou (XIb)

Multivalentní inhibitor s terminální D-mannosou je v nejvyšších otestovaných koncentracích schopen totální inhibice srovnatelné s negativní kontrolou (viz tabulka 4).

Tabulka 5: Srovnání inhibičních účinků inhibitoru s terminální D-mannosou na aglutinaci lektinem BclDLec

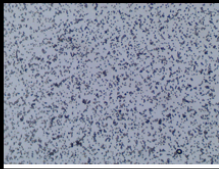
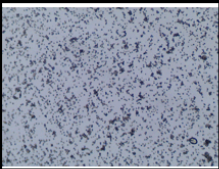
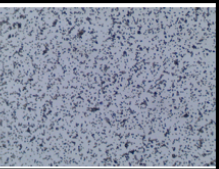
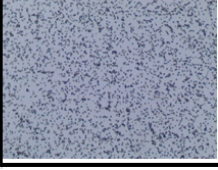
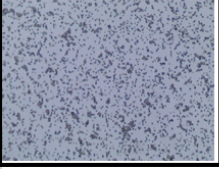
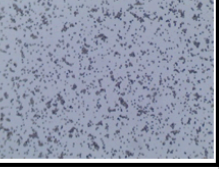
Negativní kontrola			
XIb o koncentraci 12,5 mM			
XIb o koncentraci 6,25 mM			
XIb o koncentraci 3,125 mM			
XIb o koncentraci 1,5625 mM			
XIb o koncentraci 0,78125 mM			

Inhibitor XIb o koncentraci 12,5 mM byl schopen absolutní inhibice, tudíž byl výsledek neodlišitelný od negativní kontroly. Dokonce bylo na výsledku možné vidět menší shluky než při negativní kontrole.

Při inhibici XIb o koncentraci 6,25 mM byl opět pozorovatelný velmi dobrý inhibiční efekt. Na obrázku byly patrné malé shluky nepozorovatelné pouhým okem, které jsou stále neodlišitelné od negativní kontroly a rozdíl oproti inhibici pomocí XIb o koncentraci 12,5 mM byl velmi malý.

Při inhibici pomocí XIb o koncentraci 3,15 mM byla patrná mírná aglutinace, která byla srovnatelná s inhibicí pomocí D-mannosy o koncentraci 100 mM (viz tabulka 5). Koncentrace 3,125 mM inhibitoru XIb je poslední koncentrací, při které byla patrná výrazná inhibice.

Tabulka 6: Srovnání inhibičních účinků D-mannosy o koncentraci 100 mM a XIb o koncentraci 3,125 mM

XIb o koncentraci 3,125 mM			
D-mannosa o koncentraci 100 mM			

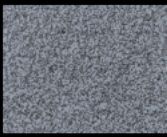
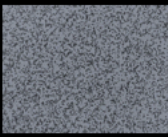
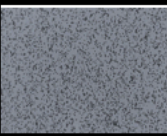
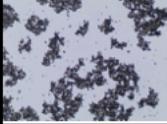
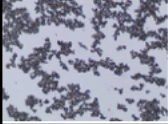
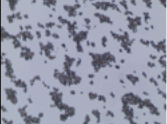
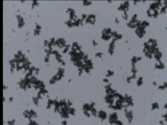
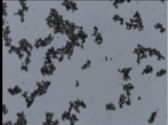

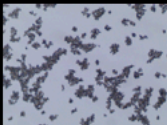

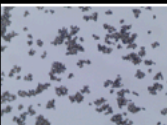
U inhibitoru XIb nastává zlom inhibičních vlastností mezi koncentracemi 3,125 mM a 1,5625 mM, neboť při koncentraci inhibitoru XIb 1,5625 mM jsou viditelné větší agregáty viditelné pouhým okem. Agregáty však ještě nejsou srovnatelné s pozitivní kontrolou.

Při koncentraci 0,78125 mM byly již vytvořeny velké shluky, které jsou neodlišitelné od negativní kontroly.

2.3.4. Změny proteinu v čase

Jelikož jsem pracovala se stejným lektinem po delší dobu, bylo nutné otestovat jeho změny v závislosti na čase.

Tabulka 7: Změna vlastností lektinu BclDLec v závislosti na čase

Negativní kontrola			
Lektin 2,5 mg/ml 4.10.2019			
Lektin 2,5 mg/ml 10.10.2019			
Lektin 2,5 mg/ml 30.1.2020			

Na základě výsledků experimentu (viz tabulka 6) lze konstatovat, že se schopnosti lektinu aglutinovat v závislosti na čase výrazně nezměnily.

3. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo otestovat možnosti inhibice lektinu BclDLec, který je součástí bakterie *Burkholderia cenocepacia*. Bakterie *Burkholderia cenocepacia* se podílí na vzniku oportunních infekcí, které postihují pacienty s cystickou fibrózou a často jsou u těchto pacientů příčinou smrti.

V této práci jsou popsány inhibiční experimenty pomocí tří rozdílných inhibitorů – D-mannosy, D-galaktosy a multivalentního inhibitoru s terminální D-mannosou s interním technickým označením XIb.

D-galaktosa neměla **žádné inhibiční schopnosti**, jak bylo předpokládáno.

D-mannosa měla poměrně **slabé inhibiční účinky**, neboť nebyla schopna absolutní inhibice ani při vysoké koncentraci (100 mM).

Multivalentní inhibitor s terminální D-mannosou (XIb) lze považovat za poměrně **silný inhibitor**. Při koncentraci 3,125 mM má podobné schopnosti jako D-mannosa o koncentraci 100 mM. Tudíž je asi $32 \times$ účinnější a tato vysoká účinnost není způsobena pouze tím, že v jedné molekule XIb je na každém z 10 ramének navázána D-mannosa. Navíc je tento inhibitor na rozdíl od D-mannosy nemetabolizovatelný.

Do budoucna by bylo vhodné otestovat vyšší koncentraci D-mannosy a zjistit, při jaké koncentraci je D-mannosa schopna 100% inhibice.

Rovněž by bylo vhodné otestovat další multivalentní inhibitory s terminální D-mannosou a s rozdílným počtem nebo různou délkou ramének. Přitom rovněž určit jejich inhibiční vliv na lektin BclDLec. U těchto inhibitorů by bylo vhodné stanovit, při jaké nejnižší koncentraci mají výrazné aglutinační schopnosti a najít inhibitor, který by byl účinný i ve velmi malé koncentraci. Tento inhibitor by následně mohl být využit k terapii u pacientů s cystickou fibrózou.

4. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] LIS, H.; SHARON, N. (1998) Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical reviews*, 98.2: 637-674
- [2] SHARON N. (2007) Lectins: Carbohydrates-specific Reagents and Biological recognition Molecules, *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(2): 2753-2764
- [3] SUMNER J.B., HOWELL S.F. (1936) Identification of hemagglutinin of jack bean with concanavalin A. *J. BACTERIOL.* 32: 227–237
- [4] GONZALEZ DE MEJIA, E. – PRISECARU, V. I. (2005) Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2005, vol. 45, no. 6,
- [5] VARKI A., Cummings R., Esko J., Freeze H., Hart G., Marth J. (1999). *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN:0- 87969-559-5
- [6] SHARON N., LIS H. (2001). *Lectins*. Encyclopedia of Life Science. Kluwer Academic Publisher. ISBN:1-4020-1172-5 ;
- [7] LIS H., SHARON N. (1998) Lectins: Carbohydrate-Specific Protein That Mediate Cellular Recognition. *Chemical Review*. 98,
- [8] KREJSEK, J. – KOPECKÝ, O. (2004) *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nukleus HK, 941 s., ISBN 80-86225-50-X
- [9] CAMBI, A. – KOOPMAN, M. – FIGDOR, C. G. (2005) How C–type lectins detect pathogens. *Cellular Mikrobiology*, 2005, vol. 7, no. 4, 481-488.
- [10] MCGREAL E. P., MARTINEZ-POMAREZ L., GORDON S. (2004). Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate imine system. *Molecular Immunology* 41, 1109-1121
- [11] KERRIGAN A. M., BROWN G. D. (2009). C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 214, 562-575
- [12] SHARON N. (1987). Bacterials lectins, cell-cell recognition and infectious dinase. *FEBS Letters* 217 (2), 145-157
- [13] TIELKER, D. – HACKER, S. – LORIS, R. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Mckrobiology*, vol. 151, no. 5, p. 1313-1323
- [14] IMBERTY A., MITCHELL E. P., WIMMEROVÁ M. (2005). Structural basic of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Current Opinion in Structural biology* 15, 525-534.
- [15] CERCHIARA J., HOLSBERY B. (2007). Hemagglutinin(Ha) – Cell Binding Protein in Avian Influenza. Kenyon College Science Division

- [16] Cystická fibróza. Wikiskripta [online]. (cit. 2020) Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Cystická_fibróza
- [17] VÁVROVÁ, Věra. Cystická fibróza v praxi. Praha: Professional Publishing, c2003. ISBN 80-86419-32-0.
- [18] VÁVROVÁ, Věra. *Cystická fibróza*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-0531-1.
- [19] Life Expectancy When You're Living With Cystic Fibrosis - Cystic Fibrosis News Today. Cystic Fibrosis News Today - Home - Cystic Fibrosis News Today [online]. Copyright © 2013 (cit. 2020). Dostupné z: <https://cysticfibrosisnewstoday.com/2017/05/24/living-cf-life-expectancy/>
- [20] Klub cystické fibrózy z.s.. Úvod - Klub cystické fibrózy z.s. [online]. Copyright © (cit. 2020) Dostupné z: <https://klubcf.cz/co-je-cysticka-fibroza/co-je-cysticka-fibroza.html>
- [21] Autosomálně recesivní dědičnost – WikiSkripta. [online]. (cit. 2020) Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Autosomálně_recesivní_dědičnost
- [22] Novorozenecký screening CF - Klub cystické fibrózy z.s.. Úvod - Klub cystické fibrózy z.s. [online]. Copyright © (cit. 2020) Dostupné z: <https://klubcf.cz/novorozenecky-screening-cf/novorozenecky-screening-cysticke-fibrozy-v-ceske-republice.html>
- [23] Péče o dítě v případě prokázání cystické fibrózy - Novorozenecký screening. Novorozenecký screening [online]. Copyright © 2013 (cit. 2020). Dostupné z: <https://www.novorozeneckyscreening.cz/pece-o-dite-cf>
- [24] Cystická fibróza – Gennet [online]. Copyright © 2020 Gennet, Všechna práva vyhrazena (cit. 2020). Dostupné z: <https://www.gennet.cz/cysticka-fibroza>
- [25] Česko-slovenská pediatrie: časopis České a Slovenské pediatrické společnosti. Praha: Práce, 1955-. ISSN 0069-2328.
- [26] Cystická fibróza | Lab Tests Online. Úvodní stránka | Lab Tests Online [online]. Copyright ©2001 (cit. 2020). Dostupné z: <https://www.labtestsonline.cz/cysticka-fibroza.html>
- [27] ROSE H., BALDWIN A., DOWSON C.G., MAHENTHIRALINGAM E. (2009). Biocide susceptibility of the Burkholderia cepacia complex. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 63, 502-510
- [28] AUCOIN D.P., CRUMP R.B., THORKILDSON P., NUTI D.E., LIPUMA J.J., KOZEL T.R. (2009). Identification of Burkholderia cepacia complex bacteria with a lipopolysaccharide-specific monoclonal antibody. Journal of Medical Microbiology, 59, 41-47
- [29] JONES A.M., DODD M.E., GOVAN J.R.W., BARCUS V., ROBERTY C.J., MORRIS J., WEBB A.K. (2004). Burkholderia cenocepacia and Burkholderia multivorans: influence of survival cystic fibrosis. Thorax 59, 948-951

[30] Nozokomiální nákazy. Wikiskripta [online]. (2020) Dostupné z:
https://www.wikiskripta.eu/w/Nozokomiální%C3%AD_nákazy

[31] Burkholderia. Wikiskripta [online]. (2020) Dostupné z: Wikiskripta [online]. (2020)
Dostupné z:

[32] *Burkholderia cenocepacia*. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco
(CA): Wikimedia Foundation, 2001- . (2020) Dostupné z:
https://en.wikipedia.org/wiki/Burkholderia_cenocepacia

[33] SPEERT D.P., HENRY D., VANDAMME P., COREY M., MAHENTHIRALINGAM
E. (2002). Epidemiology of Burkholderia cepacia Complex in Patients with cystic fibrosis,
Emerging Infectious diseases 8(2)

5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CF	cystická fibróza
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
lektin BlcDLec	lektin z bakterie <i>Burkholderia cenocepacia</i>
mM	jednotka molární koncentrace; milimolární (mmol/dm ³)
NSA	nesteroidní antiflogistika
RTG	rentgen

6. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Naděje dožití pacientů s cystickou fibrózou, převzato z New Health Guide. Cystic fibrosis Life Expectancy. (2020) Aktualizováno 29. 5. 2015. Dostupné na: <http://www.newhealthguide.org/Cystic-Fibrosis-Life-Expectancy.html>.

Obrázek 2: Mechanický model regulace toku iontů kanálem proteinu CFTR, převzato z: VÁVROVÁ, Věra. Cystická fibróza. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-0531-1. Str. 31

Obrázek 3: Dědičnost cystické fibrózy, převzato z VÁVROVÁ, Věra. Cystická fibróza. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-0531-1. Str. 21

Obrázek 4: Zjednodušené schéma inhibitoru XIb, vlastní obrázek

7. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Bakterie komplexu Burkholderia cepacia, převzato z Burkholderia cepacia Complex | Download Table. ResearchGate | Find and share research [online]. Copyright © 2008 (2020). Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Burkholderia-cepacia-Complex_tbl2_263933002

Tabulka 2: Přehled aglutinačních schopností lektinu BclDLec

Tabulka 3: Srovnání inhibičních účinků D-mannosy na lektin BclDLec

Tabulka 4: Srovnání inhibičních účinků D-galaktosy

Tabulka 5: Srovnání inhibičních účinků inhibitoru s terminální D-mannosou na aglutinaci lektinem BclDLec

Tabulka 6: Srovnání inhibičních účinků D-mannosy o koncentraci 100 mM a XIb o koncentraci 3,125 mM

Tabulka 7: Změna vlastností lektinu BclDLec v závislosti na čase