



Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Plzni
Ústav mikrobiologie



**Proteolytické enzymy vegetativních
forem a spor bakterie *Paenibacillus***

larvae

(Dizertační práce)

Jaroslav Hrabák

Plzeň, 2007



Název: *Proteolytické enzymy vegetativních forem a spor bakterie
Paenibacillus larvae
(Proteolytic Enzymes of Vegetative Forms and Spores of the
Bacterium Paenibacillus larvae)*

Autor: *Ing. Jaroslav Hrabák*

Pracoviště: *Ústav mikrobiologie
Lékařská fakulta v Plzni
Univerzita Karlova v Praze*

Adresa fakulty: *Husova 3, 305 06 Plzeň*

Adresa pracoviště: *Dr. E. Beneše 13, 305 99 Plzeň*

Školitel: *RNDr. Karel Martinek, Ph.D.*

Studijní program: *Všeobecné lékařství*

Obor: *Lékařská mikrobiologie*

Rok vydání: *2007*

Místo vydání: *Plzeň*

Počet číslovaných stran: *94*

Počet obrázků: *33*

Počet tabulek: *5*

Počet příloh: *0*

Počet citovaných pramenů: *75*



Obsah

Obsah.....	2
Prohlášení.....	6
Předmluva.....	7
Souhrn.....	8
Summary.....	10
1. Úvod.....	12
1.1. Taxonomické zařazení bakterie <i>Paenibacillus larvae</i>	12
1.2. Patogeneze moru včelího plodu.....	14
1.3. Fyziologie bakterie <i>P. larvae</i> s ohledem na sporulaci.....	14
1.4. Proteázy bakterie <i>P. larvae</i>	15
1.4.1. Proteázy sekretované kulturou <i>P. larvae</i> do MYPGP média.....	17
1.5. Vliv extraktu z příškrvarů na antibakteriální aktivitu peptidů podílejících se na imunitní odpovědi včelích larev.....	18
1.6. Kultivace bakterie <i>P. larvae</i>	19
2. Cíle práce.....	22
3. Materiál a metody.....	23
3.1. Kultivace <i>P. larvae</i>	23
3.1.1. Izoláty bakterie <i>P. larvae</i>	23
3.1.2. Kultivační média a příprava kultur.....	23
3.1.3. Příprava spor.....	24
3.1.4. Stanovení koncentrace bakterií ve vzorku.....	24
3.2. SDS – PAGE (elektroforéza na polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného) a detekce proteinů na gelu.....	25
3.2.1. Přístrojové vybavení.....	25
3.2.2. Chemikálie.....	25
3.2.3. Zásobní roztoky.....	26
3.2.4. Příprava X% separačního gelu.....	28
3.2.5. Příprava 5% zaostřovacího gelu.....	29
3.2.6. Příprava vzorku a vlastní elektroforéza.....	29
3.2.7. Barvení proteinů pomocí Coomassie modři.....	29
3.2.8. Detekce proteinů stříbrem.....	30
3.2.9. Přibližné stanovení molekulové hmotnosti proteinu.....	30
3.2.10. Archivace gelů.....	30
3.3. Zymografie.....	30
3.3.1. Přístrojové vybavení.....	30
3.3.2. Chemikálie.....	31
3.3.3. Zásobní roztoky.....	32
3.3.4. Příprava gelů a vzorku.....	32
3.3.5. Renaturace proteinů.....	32
3.3.6. Inkubace gelu.....	32
3.3.7. Detekce proteolytické aktivity.....	33
3.3.8. Přibližné stanovení molekulové hmotnosti.....	33
3.4. Lytická aktivita vzorků.....	33
3.4.1. Přístrojové vybavení.....	33
3.4.2. Provedení.....	33
3.5. Elektronová mikroskopie.....	34
3.5.1. Přístrojové vybavení.....	34
3.5.2. Provedení.....	34



3.6. Stabilita sekretovaných proteáz.....	34
3.6.1. Teplotní stabilita.....	34
3.6.2. Stabilita v čase.....	34
3.7. Gelová filtrace na SEPHADEXu G-50, G-100, G-200.....	35
3.7.1. Přístrojové vybavení.....	35
3.7.2. Chemikálie.....	35
3.7.3. Příprava kolony.....	35
3.7.4. Provedení.....	35
3.8. Iontově výměnná chromatografie na DEAE-celulóze.....	36
3.8.1. Přístrojové vybavení.....	36
3.8.2. Chemikálie.....	36
3.8.3. Zásobní roztoky.....	36
3.8.4. Příprava nosiče.....	37
3.8.5. Test vhodného pH.....	37
3.8.6. Provedení chromatografie.....	37
3.8.7. Konzervace kolony.....	38
3.9. Afinitní chromatografie.....	38
3.9.1. Přístrojové vybavení.....	38
3.9.2. Chemikálie.....	38
3.9.3. Zásobní roztoky.....	38
3.9.4. Příprava kolony.....	39
3.9.5. Provedení.....	39
3.10. Stanovení proteolytické aktivity pomocí kapkové metody.....	40
3.10.1. Přístrojové vybavení.....	40
3.10.2. Chemikálie.....	40
3.10.3. Příprava gelu.....	40
3.10.4. Nanesení vzorků na gel, inkubace a vyhodnocení.....	41
3.11. Měření koncentrace proteinů podle M.M. Bradford.....	41
3.11.1. Přístrojové vybavení.....	41
3.11.2. Chemikálie.....	41
3.11.3. Zásobní roztoky.....	42
3.11.3. Provedení.....	42
3.12. Štěpení BSA / kaseinu.....	42
3.12.1. Přístrojové vybavení.....	42
3.12.2. Chemikálie.....	43
3.12.3. Provedení.....	43
3.13. Sporulace <i>P. larvae</i>	43
3.13.1. Stanovení počtu termorezistentních spor.....	43
3.13.2. Statistická analýza.....	43
3.14. Vyšetření základních biochemických vlastností proteáz spor.....	44
3.14.1. Test optimálních inkubačních podmínek při zymografii.....	44
3.14.2. Inhibice.....	44
3.14.3. Testování vlivu kovových iontů na metaloproteázy.....	45
3.15. Elektroeluce proteinů z povrchu spor.....	45
3.15.1. Přístrojové vybavení.....	46
3.15.2. Chemikálie.....	46
3.15.3. Zásobní roztoky.....	46
3.15.4. Provedení.....	47
3.16. Extrakce proteinového pláště spory chemickou cestou.....	47
3.16.1. Přístrojové vybavení.....	47



3.16.2. Chemikálie.....	47
3.16.3. Zásobní roztoky.....	47
3.16.4. Provedení.....	48
3.17. Infekční pokus <i>in vitro</i> podle E. Genersch a kol. (2006)	48
3.17.1. Přístrojové vybavení.....	48
3.17.2. Chemikálie a suroviny.....	48
3.17.3. Krmná směs.....	48
3.17.4. Provedení.....	49
3.18. Infekční pokus v pokusném včelstvu I.....	49
3.18.1. Přístrojové vybavení.....	49
3.18.2. Suroviny.....	50
3.18.3. Provedení.....	50
3.19. Infekční pokus v pokusném včelstvu II.....	50
3.19.1. Přístrojové vybavení.....	50
3.19.2. Chemikálie a suroviny.....	50
3.19.3. Provedení.....	51
4. Výsledky.....	52
4.1. Kultivace v MYPGP bujónu.....	53
4.1.1. Sekretované proteiny v MYPGP médiu.....	54
4.1.2. Sekretované proteázy v MYPGP médiu.....	56
4.1.3. Lytická aktivita vzorků kultury <i>P. larvae</i>	56
4.1.4. Elektron-mikroskopické vyšetření vzorků.....	57
4.2. Srovnání proteolytické aktivity sekretovaných produktů u různých kmenů <i>P. larvae</i>	58
4.3. Stabilita sekretovaných proteáz.....	58
4.4. Purifikační postupy pro izolaci sekretovaných proteáz <i>P. larvae</i>	61
4.4.1. Afinitní chromatografie.....	61
4.4.2. Purifikace na DEAE celulóze s předchozí inkubací nanášeného vzorku při pokojové teplotě.....	62
4.5. Štěpení BSA/kaseinu.....	65
4.6. Sporulace na MYPGP a HCBB agaru.....	65
4.7. Extrakce proteáz z povrchových struktur spory.....	68
4.7.1. Extrakce Tritonem X-100.....	68
4.7.2. Extrakce proteáz extrakčním pufrem podle C.S. Hayese a P. Setlowa (1997).....	69
4.7.3. Elektroeluce povrchových proteinů.....	69
4.8. Germinace spor zbavených pláště.....	70
4.9. Srovnání proteolytické aktivity proteáz izolovaných z povrchových struktur spor u různých kmenů <i>P. larvae</i>	70
4.10. Biochemické vlastnosti proteáz vázaných ve vnějších strukturách spory.....	72
4.11. Infekční pokusy.....	72
4.11.1. Infekční pokus <i>in vitro</i> podle E. Genersch a kol. (2006).....	72
4.11.2. Infekční pokus v pokusném včelstvu I.....	72
4.11.3. Infekční pokus v pokusném včelstvu II.....	72
5. Diskuze.....	73
5.1. Kultivace v MYPGP bujónu.....	73
5.2. Srovnání proteolytické aktivity sekretovaných produktů u různých kmenů <i>P. larvae</i>	74
5.3. Stabilita sekretovaných proteáz.....	75



5.4. Purifikační postupy pro izolaci sekretovaných proteáz <i>P. larvae</i>	75
5.4.1. Afinitní chromatografie.....	76
5.4.2. Purifikace na DEA celulóze s předchozí inkubací nanášeného vzorku při pokojové teplotě.....	76
5.5. Štěpení BSA/kaseinu.....	77
5.6. Sporulace na MYPGP a HCBB agaru.....	77
5.7. Extrakce proteáz z povrchových struktur spory.....	79
5.8. Germinace spor zbavených pláště.....	80
5.9. Srovnání proteolytické aktivity proteáz izolovaných z povrchových struktur spor u různých kmenů <i>P. larvae</i>	80
5.10. Biochemické vlastnosti proteáz vázaných ve vnější struktuře spory.....	81
5.11. Infekční pokusy.....	81
6. Dosažené výsledky.....	83
Použité zkratky.....	84
Literatura.....	86



Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracoval samostatně a za použití citovaných pramenů. Veškeré publikované fotografie a nákresy jsem pořídil sám, pokud není uvedeno jinak. Převzaté fotografie a nákresy byly použity s výslovným souhlasem autora.

Tímto uděluji souhlas k půjčování této dizertační práce, avšak jakákoliv její reprodukce (včetně mechanického, elektronického, fotografického či jiného záznamu) je možná pouze po předchozím písemném souhlasu autora.

V Plzni dne 1.9.2006

Jaroslav Hrabák



Předmluva

Předkládaná dizertační práce se zabývá vlastnostmi velmi zajímavého mikroba – bakterie *Paenibacillus larvae* se zvláštním důrazem na proteolytické enzymy. Tato bakterie je z ekonomického hlediska významným veterinárním patogenem – způsobuje nemoc označovanou jako mor včelího plodu, na nějž dosud existuje pouze jediná účinná terapie – spálení veškerého kontaminovaného materiálu včetně samotných včel. Patogeneze tohoto onemocnění a důležité faktory patogenity však zůstávají záhadou. V poslední době lze v literatuře zaznamenat nárůst článků týkajících se molekulární epidemiologie *P. larvae*, ale ani jejich výsledky zatím nekonvergují k poznání patogenetických vlastností tohoto mikroba. Přístup ke zjištění faktorů patogenity může být dvojitý – hledání jejich genů přímo v genomu mikroorganismu nebo studium již vytvořených metabolitů. První přístup by byl za použití moderních technologií snazší. Druhý je mnohem náročnější a zřejmě také nákladnější. I přesto jsem si pro řešení vybral přístup druhý, jednak z důvodů toho, že naše laboratoř nedisponuje příslušnými technologiemi pro práci s DNA na takové úrovni, ale také i proto, že je tento přístup klasickou a hezkou biochemií.

Na tomto místě bych chtěl poděkovat všem, kteří se na výsledcích této práce jakkoliv podíleli. Jedná se především o mého šolitele RNDr. Karla Martínka, Ph.D., o RNDr. Olgu Hruškovou-Heidingsfeldovou, CSc. z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, které děkuji za cenné rady a spolupráci na některých pokusech, o RNDr. Oldřicha Benadu, CSc. z Mikrobiologického ústavu AV ČR, bez něhož by nebyla možná práce na elektron-mikroskopickém průkazu temperovaného bakteriofága v lyzujících kulturách *P. larvae*. Nesmím rovněž zapomenout poděkovat Ing. Daliboru Titěrovi, CSc. a paní Marcelé Haklové z Výzkumného ústavu včelařského, s.r.o., kde se při dlouhých diskuzích o moru včelího plodu zrodila celá řada podnětných nápadů. Dále můj dík patří studentce všeobecného lékařství Evě Chudáčkové, která se podílela na mnoha experimentech týkajících se spor *P. larvae*. Vděčný jsem i všem dalším pracovníkům Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Plzni za poskytnutí přátelského prostředí na pracovišti. V neposlední řadě patří můj dík rodině a přátelům za pomoc ne sice odbornou, ale neméně důležitou.

Jaroslav Hrabák



Souhrn

Bakterie *Paenibacillus larvae* je díky extrémní odolnosti spor nejnebezpečnějším bakteriálním patogenem včel. Pro své vlastnosti a vzhledem k omezené patogenitě pouze pro včely může být použita jako modelový organizmus ke studiu gram-pozitivních sporulujících aerobních tyčinek. V této práci jsme se zaměřili na doplnění informací o sekretovaných proteázách a na studium proteáz vázaných ve struktuře spory. Ke kultivaci *P. larvae* bylo použito MYPGP médium. V tomto médiu byla zjištěna lýza kultury po 40ti hodinách od naočkování, doprovázená poklesem pH pod hodnotu 6,4. Jako příčina lýzy byla prokázána indukce temperovaného bakteriofága BLA. Ke sporulaci *P. larvae* byl navržen nový agar s označením HCBB. Při srovnání schopností sporulace 31 sbírkových kmenů na MYPGP agaru a na agaru HCBB byl HCBB agar vyhodnocen jako vhodné sporulační médium s mediánem sporulace $4,2 \times 10^6$ spor/cm² v aerobní atmosféře a $5,65 \times 10^6$ spor/cm² v aerobní atmosféře s 10 % CO₂. Pro purifikaci sekretovaných proteáz byla použita jednodenní kultura *P. larvae*, inkubovaná 24 hodin při pokojové teplotě. Po aplikaci takto připraveného vzorku na kolonu s DEAE-celulózou došlo k optimální purifikaci 87/74 kDa a 42/40 kDa proteáz. Následně byla provedena analýza štěpení bovinního sérového albuminu a kaseinu purifikovanými proteázami, avšak ani jeden z těchto substrátů nebyl štěpen. Sekretované proteázy se ukázaly být stabilní po dobu minimálně 14 dní při 4 °C, 3 dny při pokojové teplotě a pouze 24 hodin při 35 °C. Aktivita zůstala zachována i při zahřátí na 60 °C po dobu 10 minut. Se zvyšováním teploty docházelo k poklesu aktivity proteáz. Při srovnání profilů sekretovaných proteáz u sbírkových kmenů se všechny různé varianty nacházely u vzorků signifikantně patogenních, tj. nebyl prokázán vliv konkrétní proteázy ve virulenci *P. larvae*. Pro extrakci proteáz vázaných ve vnějších strukturách spory se podařilo sestavit speciální elektroforetické zařízení, umožňující extrakci proteinů až z 10^8 spor. Extrahované proteázy se nejspíše nalézají ve vnějším proteinovém plášti spory. Jedná se pravděpodobně o metaloproteázy inhibované 1,10-phenantrolinem s pH optimem ležícím v oblasti neutrálního pH. Srovnáním profilu proteáz vázaných v proteinovém plášti spory u sbírkových kmenů byly zjištěny 3 různé kombinace detekovaných proteáz. Vzhledem k tomu, že se všechny varianty vyskytovaly u izolátů izolovaných z klinického materiálu, tj. u signifikantně patogenních kmenů, není žádná z kombinací sama o sobě nutným faktorem patogenity. Infekčním pokusem *in vitro* a *in vivo* byla testována virulence spor zbavených proteinového pláště. Bylo prokázáno, že spory zbavené proteinového pláště jsou stejně virulentní jako spory



nativní. Proto je pravděpodobné, že proteázy vázané v proteinovém plášti spory nemají ve virulenci *P. larvae* významnou úlohu.



Summary

Due to the high resistance of the spores, the bacterium *Paenibacillus larvae* is the most dangerous bacterial pathogen of the honey bee (*Apis mellifera*). Thanks to its biological properties and restricted pathogenicity, this bacterium can be used as a model organism to study gram positive sporulating aerobic rods. This work is focused on completing information about secreted proteases of this bacterium and in a study of proteases bound in a spore structure. MYPGP medium was used for the cultivation of *P. larvae*. In this medium, lysis of the culture was shown after 40 hours of cultivation. The pH of the medium decreased below 6.4 by lysis. The induction of temperate bacteriophage BLA was detected as a causative agent of this lysis. A new sporulation medium called HCBB agar was proposed for the sporulation of *P. larvae*. In comparison with HCBB agar with MYPGP agar by 31 strains of *P. larvae* stored in our collection, HCBB agar was evaluated as an appropriate sporulation medium with a median of sporulation 4.2×10^6 spores per cm^2 in aerobic conditions and 5.65×10^6 spores per cm^2 in aerobic conditions with 10 % CO_2 . For purification of the secreted proteases, a one-day culture incubated at room temperature was used. Optimal purification of 87/74 kDa and 42/40 kDa proteases was observed after application of this sample on a DEAE-cellulose column. In the next step, analysis of the activity of purified proteases against bovine serum albumine was done. The secreted proteases have been stable for 14 days at 4 °C, for 3 days at room temperature and only 24 hrs at 35 °C. Proteolytic activity remained stable after heating at 60 °C for 10 minutes. With the increasing temperature, the proteolytic activity decreased. In comparing proteolytic patterns by the different 31 strains, all variants were presented in significantly pathogenic strains, so that there is no protease responsible for the virulence of *P. larvae*. For the extraction of proteases from the external structures of the spores, special electrophoretical equipment was constructed. This apparatus performs the easy extraction of proteases from 10^8 spores. The extracted proteases are probably located in the spore coat. These proteases were identified as metalloproteases inhibited by 1,10-phenantroline with an optimum of pH in the neutral value. Three combinations of the detected proteases were observed in the 31 strains of *P. larvae*. All these variants were shown in isolates collected from clinical material, so that no one protease is an essential virulence factor. The virulence of the decoated spores was tested *in vitro* and *in vivo*. These experiments proved the same virulence of the decoated and native spores. According to this result, we can hypothesize



that the proteases bound in the spore coat do not have an essential function in the virulence of *P. larvae*.