

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



Veronika Supová

**Izolace bakteriálního flagelinu jako imunogenu pro přípravu
protilátek pro pacienty s cystickou fibrosou**

**Isolation of bacterial flagellin as an immunogen for the
preparation of antibodies for cystic fibrosis patients**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2022

Poděkování

Ráda bych poděkovala především vedoucímu mé bakalářské práce prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení této bakalářské práce, za ochotný přístup a cenné rady.

Dále bych chtěla poděkovat panu Doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D. za zpracování mých výsledků pomocí hmotnostní spektrometrie. A také děkuji paní laborantce Anně Ammerové za pomoc při práci a orientaci v laboratoři.

Prohlášení

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

V Praze dne

.....

Abstrakt

Cystická fibróza (CF) je autozomálně recesivní onemocnění způsobeno mutacemi v *CFTR* genu. Důsledkem této mutace je špatná funkce chloridového kanálku tvořeného CFTR proteinem. Díky této abnormalitě se sníží či ztratí funkce transportu chloridových iontů a tím dojde k utvoření hlenu nazývaného mukus. Mukus se nejčastěji utváří v plicích a je ideálním prostředím pro patogenní bakterie, jako například *Pseudomonas aeruginosa* (PA).

Pseudomonas aeruginosa je aerobní, gramnegativní, podmíněný patogen, vyskytující se u pacientů se sníženou imunitou či právě u pacientů s CF, kteří jsou často hospitalizováni v nemocnici. Obsahuje jeden polární bičík, jehož vlákno je mimo jiné složeno z proteinu flagelinu. Právě bičík je jedním z nejdůležitějších virulentních faktorů bakterie PA. Tato práce je zaměřena na izolaci flagelinu z bičíku bakterie PA, který poslouží jako antigen pro přípravu profylaktických protilátek pro pacienty s CF.

Flagelin byl izolován pomocí čtyř metod založených na různých kombinacích centrifugačních a precipitačních kroků. Tyto publikované metody bylo třeba optimalizovat tak, aby se podařilo izolovat flagelin.

Finální preparáty a meziprodukty byly analyzovány SDS-elektroforézou na polyakrylamidovém gelu a přítomnost flagelinu byla ověřována hmotnostní spektrometrií. Z výsledku vyplývá, že pouze dvěma metodami byl flagelin FliC typu b úspěšně izolován.

Klíčová slova

Cystická fibrosa, *Pseudomonas aeruginosa*, bičík, flagelin

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by *CFTR* gene mutation. The consequence of this mutation is an improper function of the chloride channel consisting of CFTR protein. Due to this abnormality, the transport of chloride ions is either reduced or inhibited completely, which leads to a mucus secretion. Mucus is mostly created in the lungs and it is the ideal environment for pathogenic bacteria like *Pseudomonas aeruginosa* (PA).

Pseudomonas aeruginosa is an aerobic, gram-negative conditioned pathogen occurring in patients with weakened immunity such as patients with CF, who are often hospitalized. PA has one polar flagellum which contains filament composed of a protein called flagellin. The flagellum is one of the most important virulence factors of PA bacteria. This thesis focused on the isolation of flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* flagella. The isolated flagellin will serve as an antigen for the preparation of prophylactic antibodies for CF patients.

The isolation of flagellin was carried out by four methods using combinations of precipitation and centrifugation. The published methods were optimized to achieve the isolation of flagellin.

Final samples and intermediates were analyzed by SDS-electrophoresis on polyacrylamide gel and the presence of flagellin was verified by mass spectrometry. The results show that flagellin FliC type b has been successfully obtained only by two methods.

Key words

Cystic fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa*, flagellum, flagellin [IN CZECH]

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod	10
1.1 Cystická fibrosa	10
1.2 CFTR gen	11
1.3 CFTR protein	11
1.3.1 Struktura CFTR proteinu	12
1.3.2 Mutace CFTR proteinu	13
1.4 Diagnóza CF	14
1.5 Onemocnění asociovaná s CF a jejich léčba – symptomatická léčba	15
1.5.1 Plíce	15
1.5.2 Pankreas	16
1.5.3 Játra a žlučové cesty	16
1.6 Genová terapie – kauzální léčba	17
1.7 Imunitní systém	18
1.7.1 Protilátky	19
1.7.2 Imunizace	20
1.8 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
1.8.1 Virulentní faktory PA	22
1.8.2 Bičík PA	24
2 Cíl práce	28
3 Materiál a metody	29
3.1 Použité chemikálie	29
3.2 Použité přístroje a materiál	29
3.3 Kultivace bakterie PA	31
3.3.1 Kultivace bakterií v tekutém PS médiu	31
3.3.2 Kultivace PA na agarové plotně	31
3.3.3 Výběr vhodné kultivace bakterie PA	32
3.4 Uvolnění bičíků	32
3.5 Určení množství bakteriálních buněk	33
3.6 Postupy izolace bičíku	34
3.6.1 Metoda I	34
3.6.2 Metoda II	36
3.6.3 Metoda III	38
3.6.4 Metoda IV	39
3.7 Analytické metody	40
3.7.1 SDS-elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	40
3.7.2 Hmotnostní spektrometrie	42
4 Výsledky	44
4.1 Optimalizace kultivace PA v kapalném médiu	44
4.2 Výběr vhodné kultivace bakterie PA	44
4.3 Optimalizace kultivace na tuhém agaru	45

4.4	<i>Uvolnění bičíků – homogenizace</i>	48
4.5	<i>Metoda I</i>	48
4.6	<i>Metoda II</i>	49
4.7	<i>Metoda III</i>	50
4.8	<i>Metoda IV</i>	51
4.9	<i>Hmotnostní spektrometrie</i>	52
5	Diskuse	55
6	Souhrn	58
7	Seznam použité literatury:	59

Seznam použitých zkratk

ABC	„ATP binding cassette“
ASL	„Airway Surface Liquid“
ATP	Adenosintrifosfát
cDNA	komplementární DNA
CF	cystická fibrosa
CFTR	„Transmembrane conductance Regulator“
FliC	Flagelin C
IgG	Imunoglobulin
IRT	Imunoreaktivní trypsinogen
Kb	Kilobáze
MALDI	„Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization“
MS	„Mass spectrometry“
MSD	„Mebrane Spanning Domain“
NBD	„Nucleotid Binding Domain“
OD ₆₀₀	optická denzita při vlnové délce 600 nm
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PKA	cAMP-depedentní proteinkinasy
PMF	„Peptide mass fingerprinting“
QSC	„Quorum-sensing Circuit“
R doména	Regulační doména
TLR	„Toll-like receptor“
TM	Transmembránové helixy
TOF	„Time of Flight“

T3SS

flagelární sekreční systém typu III

UDCA

kyselina ursodeoxycholová

1 Úvod

1.1 Cystická fibrosa

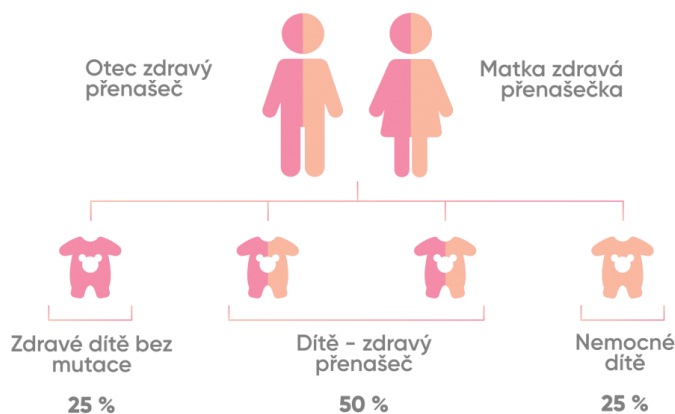
Cystická fibrosa (CF) je autozomálně recesivní onemocnění způsobeno mutacemi v CFTR genu (z angl. „cystic fibrosis transmembrane regulator“). Důsledkem této mutace je tvorba mukusu, zapříčiněna sníženou funkcí či úplnou ztrátou funkce transportu elektrolytů, a tím vytvoření vhodného prostředí pro tvorbu patogenních bakterií. Těmito bakteriemi jsou například bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (PA) či *Burkholderia cepacia*, které kolonizují zejména v orgánech se zvýšenou tvorbou mukusu (např. v plicích) a způsobují smrtelné infekce.

Cystická fibrosa má dlouhou historii a zmínky o ní pochází již ze středověku. Roku 1595 byly její symptomy popsány profesorem Pieter Pauwem, i přestože lze pouze spekulovat, zda šlo o CF¹. Název cystická fibrosa byl poprvé použit v roce 1938 americkou patoložkou Dorothy Andersonovou. V tomto roce byly popsány příznaky CF, mezi které patřilo především respirační onemocnění a pankreatická insuficience.

Název cystická fibrosa je složen ze slov: „cysts“, znamenající váčky vyplněny tekutinou a „fibrosis“ zjizvená tkáň. Samotný název popisuje změny dějící se v pankreatu, u něhož byla CF poprvé popsána. Pankreas vyrábí a poskytuje enzymy, které napomáhají trávení potravy. U cystické fibrosy je funkce pankreatu poškozena a postupně je tkáň nahrazována zjizvenou tkání a cystama². Avšak CF nepostihuje pouze pankreat, nýbrž celou řadu dalších orgánů a tím výrazně zkracuje dobu a kvalitu života. Mezi orgány postižené tímto onemocněním bývají nejvíce zasaženy plíce, na jejichž povrchu se utváří již zmíněný mukózní hlen. Dále mohou být zasažena játra či již zmíněný pankreas.

Genetická podstata CF se řídí Mendelovými zákony dědičnosti (viz obrázek č. 1 na straně č. 11). Nemoc se projeví pouze pokud jsou obě alely příslušného genu zmutovány, tedy jediná zmutovaná alela dané onemocnění nezpůsobí. Zmutované alely dědí po obou rodičích, jednu od matky a druhou od otce. Pokud jsou oba rodiče pouze nositeli je zde 25% pravděpodobnost výskytu CF u dítěte, ti se označují jako recesivní homozygoti (aa). 50% pravděpodobnost narození přenašeče (Aa) a 25% pro narození zdravého jedince (AA). V případě, že recesivní homozygot (aa – tedy člověk s CF) má potomky se

zdravým jedincem, pak je zde 50% pravděpodobnost pro narození přenašeče a jedince s CF.



Obrázek č. 1 – Genetická podstata CF podle Mendelových zákonů dědičnosti. Jsou-li oba rodiče přenašeči, pak je 25% šance narození zdravého dítěte bez mutací, 50% šance narození zdravého dítěte avšak přenašeče a 25% šance narození nemocného dítěte u kterého se CF zcela projeví. Převzato³.

1.2 CFTR gen

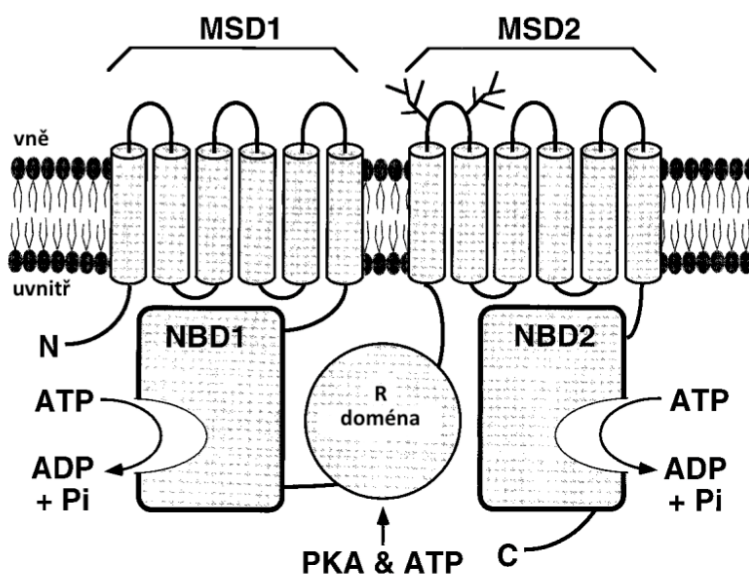
„Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ nebo česky regulátor transmembránové vodivosti iontů je kódován genem, který se nachází na dlouhém raménku chromozomu 7 v rámci chromozomálního úseku 7q31.3¹. Gen obsahuje 27 exonů a jeho velikost zabírá oblast dlouhou přibližně 250 kb. Doposud však nejsou známy faktory regulující transkripci *CFTR* genu. Je ovšem znám jeho genový produkt kódovaný tímto genem, CFTR protein.

1.3 CFTR protein

CFTR protein je chloridový kanál nacházející se v apikální membráně epitelu, kde zprostředkovává přenos Cl^- iontů a regulaci jejich hladiny⁴. CFTR má však také funkci jiných iontových kanálů, jako je například sodný, či draselný a v neposlední řadě transportuje bikarbonát. Jeho přítomnost v orgánech jako je např. pankreas a střeva má klíčovou roli při sekreci elektrolytů a tekutin, a u potních žláz a dýchacího epitelu se účastní absorpce tekutin a elektrolytů. Právě mutace *CFTR* genu způsobuje cystickou fibrosu.

1.3.1 Struktura CFTR proteinu

Z počátku byl CFTR protein popsán jako ABC protein, což je skupina proteinů vážící ATP („ATP Binding Cassette“). Jedná se o transmembránové proteiny, jejichž úlohou je přenos látek dovnitř i vně buňky za spotřeby ATP. Nicméně v případě proteinu CFTR se nejedná o transport látek, nýbrž přesněji o přenos chloridových iontů. Z toho důvodu je tedy považován za chloridový iontový kanál⁵, přičemž zachovává obecnou strukturu ABCC podrodiny podrobně popsanou na obrázku č. 2. Tato struktura obsahuje 4 domény. Dvě membránové domény MSD1 a MSD2 a dvě nukleotid vázající domény, NBD1 a NBD2⁶. Domény NBD1 a NBD2 jsou schopny zavírání a otevírání chloridového kanálu díky změně své konformace. Dochází k tomu posunem regulační domény R¹. CFTR se pozná právě podle přítomnosti této regulační domény, nacházející se mezi NBD1 a MSD2. Každá z MSD domén se skládá z 6 transmembránových helixů (TM1-TM6 a TM7-TM12). Za každou membránovou doménou následuje již zmíněná nukleotid vázající doména (NBD1 a NBD2)⁶.



Obrázek č. 2 – Popsaná struktura CFTR skládající se z MSD1 a MSD2 (z angl. „membrane spanning domain“) procházející skrze membránu, regulační domény R, NBD1 a NBD2 (nukleotid vázající domény) a cAMP–depedentní protein kinasa. Obrázek převzat a upraven⁴.

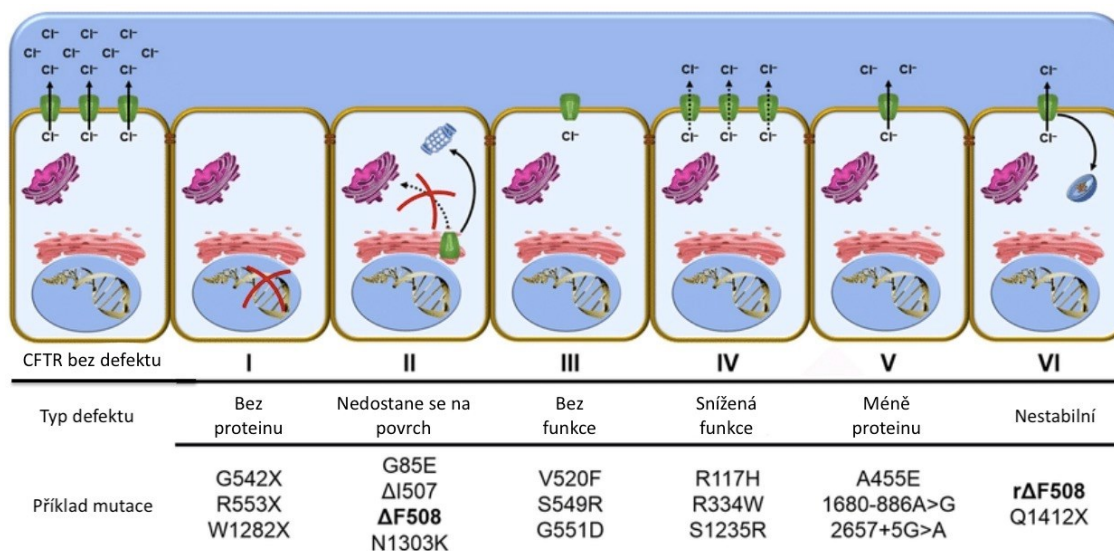
Otevírání a uzavírání CFTR Cl⁻ kanálu je přísně regulováno rovnováhou kinasové a fosfatasové aktivity v rámci buňky a koncentrací ATP v buňce⁴. Aktivace cAMP–depedentní proteinkinasy (PKA) způsobuje fosforylaci několika serinových zbytků v rámci R domény. Jakmile je R doména fosforylována, průchod kanálu je regulován

cyklem ATP hydrolyz na NBD. Nakonec protein fosfatasa defosforyluje R doménu a tím se kanál vrátí do svého klidového stavu.

1.3.2 Mutace CFTR proteinu

Podstatou cystické fibrosy je mutace *CFTR* genu, který kóduje stejnojmenný CFTR protein^{7, 8, 9, 10, 11}. U CFTR proteinu jsou všechny domény kódovány jedním genem. Jedná se o jediný polypeptidový produkt genu, který je defektní při CF. U pacientů s CF bylo objeveno více jak 1 000 mutací genu *CFTR*, kdy mutace *CFTR* genu mohou vést k různým změnám na CFTR proteinu. Podle těchto změn byly mutace rozděleny do 6ti skupin (zobrazeno na obrázku č. 3 na straně č. 14):

- Třída 1A – mRNA není syntetizována.
- Třída 1B – mRNA je syntetizována, avšak porušena a není schopna vytvořit protein.
- Třída 2 – Vytvořený protein se nedostane na povrch buňky. Příčinou mutace je nesprávné složení proteinu, který nakonec bývá buňkou zničen (do této třídy patří nejrozšířenější mutace Phe508del).
- Třída 3 – CFTR protein se dostane na povrch buňky, kde díky mutaci dojde k nesprávnému otevírání kanálu.
- Třída 4 – Protein na povrchu buňky nezíská správnou konformaci, díky čemuž umožní projít skrz jen velmi malému množství chloridových aniontů.
- Třída 5 – Mutace způsobena alternativním „splicingem“ mRNA ovlivňuje množství CFTR proteinu, které se dostane na povrch buňky.
- Třída 6 – Vytvoření funkčního CFTR proteinu, jehož mutace navozuje rychlou degradaci proteinu.



Obrázek č. 3 – Obrázek popisuje 6 skupin mutací CFTR proteinu. Na prvním obrázku zleva je znázorněna buňka s plně funkčním CFTR. Dále jsou zobrazeny buňky s mutací I., II., III., IV., V. a VI. třídy. Pod jednotlivými defekty jsou vypsány nejčastější mutace způsobené právě tímto defektem. Převzato a upraveno¹².

Nejčastější mutace v ČR bývá mutace F508del, delece tří bází vedoucí ke ztrátě fenylyalaninu na pozici č. 508^{8,13}. V případě této mutace je vytvořen CFTR protein, který je nesprávně složen a není schopen přemístit se na povrch buňky, kde vytváří Cl⁻ kanál. Obdobně se projevují mutace N1303K a I507del, které jsou společně s mutací F508del ve světě nejrozšířenější.

1.4 Diagnóza CF

Včasnou diagnózou a následnou léčbou je možno některým negativní následkům CF předejít nebo je alespoň oddálit.

Jednou z možností včasného podchycení nemoci je screening novorozenců z krve^{14,15}. Jedná se o včasnou a přesnou metodu, jak diagnostikovat CF ihned po narození. Novorozenci je odebrána kapička krve z paty, ze které se dále dělají dva testy. Prvním testem se vyhodnocuje hladina imunoreaktivního trypsinogenu (IRT), jehož zvýšené množství může poukázat na možné riziko CF. Problémem tohoto testu je jeho nespecifičnost. Zvýšená koncentrace IRT v krvi může být totiž indikátorem i dalších onemocnění. Proto se zároveň provádí ještě druhý test, z téže kapičky krve. Ve druhém testu se zjišťuje přímo genetická mutace molekulárně-genetickým vyšetřením. V případě, že je nalezena zvýšená koncentrace IRT v krvi a zároveň je nalezena alespoň jedna mutace genu, dochází k další fázi testování, potnímu testu. Z potu se zjišťuje koncentrace

chloridových aniontů a jejich zvýšená hladina potvrzuje CF. Díky vysokému obsahu chloridů v potu se dětem s CF také přezdívá „slané děti“. Tento stav je způsoben chybným transportem Cl^- skrze CFTR protein.

1.5 Onemocnění asociovaná s CF a jejich léčba – symptomatická léčba

Cystická fibrosa sama o sobě léčitelná není, jelikož se jedná o recesivně dědičné onemocnění. Dají se pouze léčit jednotlivé symptomy nemocí spojených s CF nebo jim předcházet.

1.5.1 Plíce

Nejvíce zasaženým orgánem bývají právě plíce, na které se díky abnormalitám způsobeným CF vážou bakterie, např. *P. aeruginosa*, *B. cepacia*. Kvůli špatné funkci chloridových kanálků se v plicích utváří ASL (z angl. „Airway Surface Liquid“)¹⁶.

ASL je tenká vrstva tekutiny pokrývající apikální povrch epitelu dýchacích cest. Hraje významnou roli při udržování stabilního vnitřního prostředí. Důležitým faktorem pro zachování ciliární funkce, mukociliárního clearance a antimikrobiálních vlastností dýchacích cest je právě objem a složení ASL. Pacienti s CF mají tyto vlastnosti narušeny, dochází u nich k dehydrataci dýchacích cest a snížení pH ASL. Snížení objemu ASL je důsledkem defektního aniontového transportu CFTR. Prostor s nízkým pH je vytvářeno bikarbonátovým transportem zprostředkovaným abnormálním CFTR. Nízké pH má také negativní účinky, protože zhoršuje antimikrobiální funkci ASL, mění vlastnosti hlenu a zhoršuje jeho odstranění. Tyto abnormality způsobují zahuštění hlenu a vytváří tak vhodné prostředí pro chronické bakteriální infekce.

Léčba a předcházení bakteriálními infekcím spočívá zejména v odstranění hlenu. Jednou z možností je tzv. inhalační léčba, kdy pacient vdechuje mukolytika, která hlen naředí¹. Díky jejich plynné podobě jsou látky dopraveny až na sliznici dýchacích cest, kde účinkují. Pokud plíce pacienta kolonizují již zmíněné bakterie, vdechují se současně s mukolytiky také antibiotika. Další z možností léčby je rehabilitace, do které spadá mnoho pohybových terapií a dýchacích cvičení, kdy je snaha zbavit se hlenu mechanickými procesy. Mezi takové terapie se řadí např. autogenní drenáž či výuka

správného dýchání. Ve vážnějších případech je již nutné nasadit oxygenoterapii, kdy je vdechován vzduch obohacený kyslíkem. Poslední možností zachování funkce plic je jejich transplantace.

1.5.2 Pankreas

U některých pacientů může docházet k pankreatické insuficienci neboli snížení sekrece pankreatických enzymů. V důsledku defektu CFTR proteinu a tím pádem nesprávnému přenosu iontů (Cl^- a HCO_3^-) dochází ke zvýšení sekrece více kyselé tekutiny. Okyselení zapříčiní precipitaci proteinů, které nahromaděním mohou způsobit obstrukci proximálního kanálku¹⁷. Problémy se slinivkou břišní často vedou k malnutrici. Důvodem je nedostatečné vstřebávání živin, čemuž lze předejít vyváženou stravou. Hlavní léčbou pro pacienty s těmito příznaky bývá podávání pankreatických enzymů, například lipasy ve speciálně upravených tobolkách s resistencí vůči kyselému pH v žaludku¹⁸. Užitím tobolek s jídlem je zajištěno dopravení enzymů bez ztráty aktivity až do tenkého střeva.

1.5.3 Játra a žlučové cesty

Exprese *CFTR* genu se děje pouze v epiteliální části žlučových cest a žlučníku, nenachází se na hepatocytech a tedy neovlivňuje játra přímo. Proces tvorby žluče zůstává neporušen. Problém nastává, kdy je zapotřebí sekrece a absorpce elektrolytů v cholangiocytech (výstelka žlučovodů). Za normálních okolností (u zdravých lidí) dochází k alkalizaci a zředění žluče zvýšením koncentrace cAMP, otevřením chloridových kanálků a tím k přenosu Cl^- do lumenu žlučovodů a HCO_3^- do žlučovodů. U pacientů s CF defektem této sekrece dochází k zahuštění žluči, která se stává viskóznější a nadměrně kyselá. Díky tomu se žlučovody ucpávají a žluč se vrací zpět do jater čímž se poškozují hepatocyty¹.

Mezi tyto komplikace patří například navýšení tvorby jaterních enzymů a jejich sekrece do krve, na čemž jsou založena jaterní biochemická vyšetření^{1, 19}. Bohužel tyto testy nejsou nijak specifické, navýšení jaterních enzymů není přímým indikátorem onemocnění jater a zároveň hladiny enzymů v normě nemusí znamenat zdravá játra.

Poškození hepatocytů může vést až k cirhóze jater^{1, 19, 20}. Cirhóza se většinou vyskytuje u pacientů s více mutacemi CFTR proteinu. Objevují se dva druhy cirhózy: fokální a multilobulární.

Na onemocnění jater způsobené cystickou fibrosou není vzhledem k rozsahu komplikací léčba. Lze opět léčit pouze příznaky. Do této léčby spadá úprava jídelníčku pro zvýšení příjmu potřebných vitamínů; léky obsahující kyselinu ursodeoxycholovou (UDCA), která napomáhá odstranit toxické žlučové kyseliny, či léky na snížení krevního tlaku. Dalšími možnostmi bývá endoskopická operace, při níž se napraví poškozené cévy a transplantace jater u poškození většího rozsahu²⁰.

1.6 Genová terapie – kauzální léčba

Genová terapie je nejnovější způsob léčby CF výměnou zmutovaného genu za nepoškozený zdravý *CFTR* gen. Princip spočívá ve vložení zdravého *CFTR* genu do postižené buňky, kde dále probíhá exprese celé *CFTR* komplementární DNA (cDNA) a obnovuje se funkce aniontového kanálu²¹. Nedostatkem této léčby je její specifčnost. „Zdravé“ *CFTR* iontové kanály mohou být exprimovány pouze v buňce, do které byl zdravý gen vložen. Tedy pokud byl vložen do buněk plic, nebude fungovat na buňky např. pankreatu. Překážkou této terapie je záporný náboj DNA, díky němuž není možné přenést DNA přes plasmatickou membránu. V návaznosti na to, byly vyvinuty způsoby přenosu DNA pomocí vektorového přenosu, tzv. virové a neviróvé vektory.

Nevirové přenašeče se skládají ze dvou částí: molekula nosiče, která se váže na DNA a z nukleové kyseliny, což je terapeutická cDNA²². Molekula nosiče s nukleovou kyselinou na sebe váží negativně nabitý plasmid DNA na základě interakce nábojů a buď zapouzdřují nebo kondenzují DNA za vzniku lipoplexů a polyplexů. Ty se váží na buněčnou membránu, kde dojde k jejich endocytóze do endosomů, které následně prasknou a lipoplexy a polyplexy se dostanou do hostitelské buňky.

Virové přenašeče jsou schopny upravený gen přenést do buněk a následně v buňce exprimovat danou genetickou informaci^{22, 23}. Takto mohou být použity například adenoviry a retroviry. Nevýhodou virových přenašečů je jejich schopnost spustit imunitní odpověď. Po první dávce si tělo vytvoří specifickou imunitní odpověď na daný virový přenašeč a tím je další aplikace znemožněna.

Další léčbou na genetické úrovni je terapie pomocí *CFTR* modulátorů^{24, 25}. Léčba pomocí *CFTR* modulátorů je založena na opravě defektu *CFTR* proteinu, avšak pouze u pacientů se specifickými mutacemi. Terapie *CFTR* pomocí modulátorů se liší, jelikož se také liší defekty proteinu vyrobeny genem *CFTR*. Rozdělují se na 4 skupiny: korektory,

potenciátory, stabilizátory a amplifikátory. Korektory jsou malé molekuly, které stabilizují špatně složený protein v cytosolu a tím zamezují degradaci. Potenciátory jsou malé molekuly vázající se na NBD doménu CFTR kanálu, kde usnadňují otevírání CFTR kanálu. Stabilizátory stabilizují protein na plasmatické membráně, podporují dozrání CFTR proteinu a amplifikátory zvýší produkci výroby CFTR proteinu. Příkladem již využívaných modulátorů je například lék Kaftrio™. Jedná se o trojkombinaci korektorů, které se zaměřují na protein F508del-CFTR a pomáhají mu vytvářet správný tvar a tím správně přenášet chlorid na povrch buňky.

V neposlední řadě existuje CRISPR/Cas9 metoda²⁶. CRISPR (z angl. „Clustered regularly interspaced short palindromic repeats“) asociovaný s nukleasou 9 (CRISPR/Cas9) je metodou genetického inženýrství, která umožňuje rozštěpit gen na požadovaném místě, přičemž lze část genu odstranit a zároveň přidat část genu nového. Jedná se o techniku genetického editování založenou na prokaryotickém „imunitním systému“. CRISPR/Cas9 může být využit v léčbě mnoha onemocnění (např. CF, rakovina, alergie, kardiovaskulární onemocnění).

1.7 Imunitní systém

Imunitní systém je založen na sledu reakcí, zajišťující obranu organismu proti cizím strukturám, mikroorganismům či patogenům. Rozlišujeme imunitní systém vrozený (nespecifický) a adaptivní (specifický).

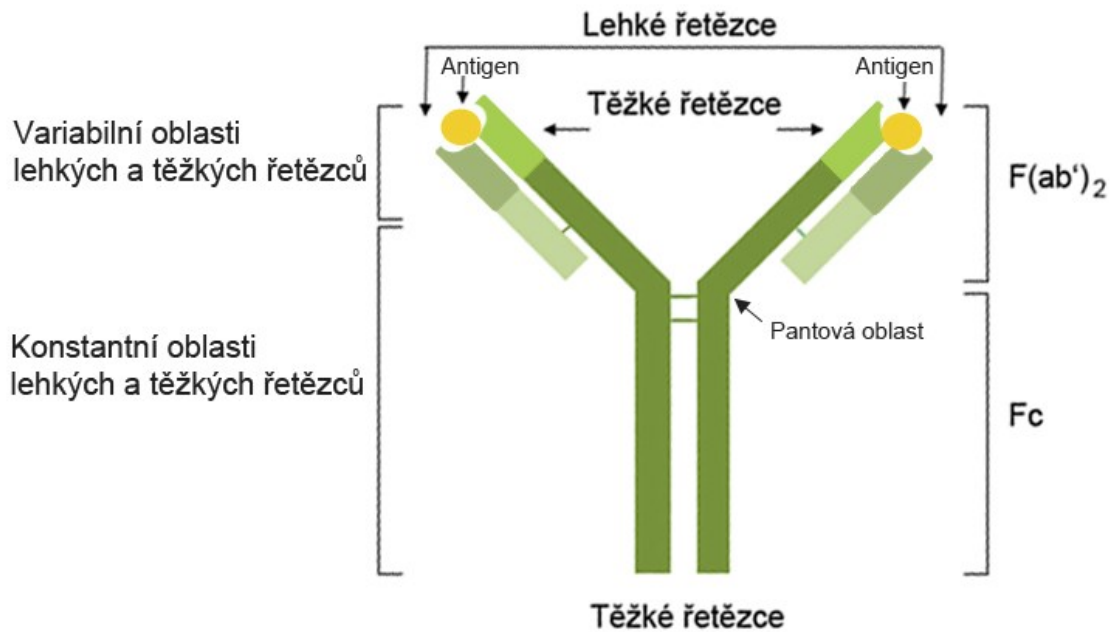
Vrozená imunita zajišťuje první reakci na patogen, kdy se účastní přirozené obranné mechanismy. Mezi tyto přirozené obranné mechanismy patří např. fyzikální bariéra – kůže, sliznice; enzymy; tělesná teplota; cytokiny (peptidy a glykoproteiny zprostředkovávající zánětlivou odpověď); fagocytující buňky – neutrofile, monocyty a makrofágy²⁷. Součástí vrozené imunity jsou též „Toll-like“ receptory (TLR), což je skupina bílkovinných receptorů, která je schopna rozpoznat specifické bakteriální antigeny – např. flagelin, který utváří bakteriální bičík. Po rozpoznání bakteriálního antigenu TLR vyvolají imunitní odpověď, jež má za následek stimulaci adaptivní imunity, kdy vyšle signály pro zahájení proliferace T a B-lymfocytů²⁸.

Adaptivní imunita se aktivuje až po setkání s antigenem, poté vyvolá pomalou imunitní odpověď (na rozdíl od vrozené, která reaguje ihned). Adaptivní imunitu získá organismus postupem času a uplatňuje se u ní imunologická paměť, díky níž po

opakovaném setkání organismu s antigenem nastává již rychlejší imunitní odpověď²⁹. Složkou adaptivní imunitní odpovědi jsou T a B-lymfocyty, kdy T-lymfocyty představují složku buněčné imunity a B-lymfocyty patří do složky humorální.

1.7.1 Protilátky

Protilátka neboli imunoglobulin (IgG) je skupina glykoproteinů, jejichž úkolem je specificky vázat antigeny v organismu^{28, 29, 30}. IgG jsou syntetizovány B-lymfocyty, které dozrávají v sekundárních lymfatických orgánech. Po navázání antigenu na receptory B-lymfocytů je spuštěna produkce specifických protilátek. Imunoglobuliny mohou být sekretované nebo vázané v membráně. Skládají se ze dvou těžkých řetězců, které jsou spojeny cystinovými můstky a zároveň ke každému těžkému řetězci je napojen přes cystinový můstek lehký řetězec (viz obrázek č. 4 na straně č. 20). IgG se dělí na fragmenty Fab a Fc, jež vzniknou rozštěpením za pomoci enzymu papainu. Dále lze rozdělit IgG na domény. Řetězce se skládají z jedné variabilní domény a jedné či více konstantních domén. Variabilní domény se nacházejí na N-koncové části těžkého i lehkého řetězce, kde utváří vazebné místo pro antigen. Konstantní doména se váže na receptor nacházející se na povrchu buněk například makrofágů. Podle této vazby na receptor určité buňky imunitního systému se protilátky rozdělují na skupiny – IgG, IgA, IgD, IgE a IgM, kdy IgG zastává až 75 % ze všech skupin protilátek v krvi. Všechny tyto skupiny jsou produkovány B-lymfocyty.



Obrázek č. 4 – Imunoglobulin se skládá ze 2 řetězců (těžký a lehký). Těžké řetězce jsou navzájem propojené cystinovými můstky a zároveň jsou také cystinovými můstky připojené k lehkým řetězcům. IgG se skládají ze dvou druhů domén neboli oblastí – variabilní a konstantní. Variabilní oblast je vždy pouze jedna a obsahuje místo, na které se váže antigen. Konstantních domén u těžkého řetězce může být více (3-4) avšak u lehkého řetězce je pouze jedna. Převzato³⁰.

1.7.2 Imunizace

Imunizace je proces, při němž je organismus vystaven látce, která má za úkol posílit, či aktivovat imunitu daného jedince. Dělí se na aktivní a pasivní imunizaci.

Aktivní imunizace

Aktivní imunizace je druh imunizace, při které se do těla jedince vpravují látky (imunogeny) za cílem vyvolání specifické imunitní odpovědi proti cílovému antigenu²⁷. Těmito látkami bývají upravené mikroorganismy (zbavené patogenity), na které je imunizace cílená. Tyto očkovací látky neboli vakcíny se dělí do skupin dle složení a způsobu přípravy na:

- Inaktivované vakcíny – obsahují usmrcené mikroorganismy (inaktivované) u kterých nesmí být poškozeny povrchové antigeny.
- Živé atenuované vakcíny – obsahují živé organismy, které jsou zbaveny patogenity.
- Rekombinantní vakcíny – připraveny pomocí DNA rekombinantních technologií
aj.

Pasivní imunizace

U pasivní imunizace se do těla vpravují přímo protilátky. Imunitní systém se neaktivuje, a tedy tato imunizace je pouze dočasná²⁷. K tomu se využívají globuliny, které se dále dělí dle jejich účinku na monospecifické (proti určitým infekčním chorobám) a polyspecifické (léčba protilátkových imunodeficiencí).

Používané globuliny lze získat dvěma způsoby, získáním z plazmy zdravých dárců tzv. homologní, či z hyperimunizovaných zvířat tzv. heterologní globuliny.

U pacientů s CF imunitní systém sám o sobě poškozený není, k narušení dochází až v rámci sekundárního vlivu průběhu onemocnění. Např. výskytem bakterií, kterou může být *Pseudomonas aeruginosa*.

1.8 *Pseudomonas aeruginosa*

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (rodina Pseudomonadaceae) (PA) zobrazena na obrázku č. 5 (strana č. 22) je tyčinkovitá aerobní, pohyblivá, gramnegativní bakterie, která je schopna přežít skoro v každém prostředí³¹. Jedná se o nozokomiální patogen neboli patogen vyskytující se převážně v nemocničním prostředí. PA se objevuje u pacientů, kteří mají zhoršený imunitní systém, jsou hospitalizováni s popáleninami či s chronickým plicním onemocněním s CF. Jedná se tedy o tzv. oportunní patogen. Její nebezpečnost spočívá v dobré adaptivitě na antibiotika a jiné léky, kdy PA exprimuje například beta-laktamasy, vytváří nepropustné proteiny vnější membrány, aj.



Obrázek č. 5 – *Pseudomonas aeruginosa*. Převzato.³²

1.8.1 Virulentní faktory PA

PA může na hostitelskou buňku působit mnoha virulentními faktory (popsány na obrázku č. 6, strana č. 24). U patogeneze PA je důležitá skutečnost, že nepůsobí pouze jeden virulentní faktor, ale virulentní faktory se navzájem doplňují a kooperují spolu, což vede například k vytvoření biofilmu, kolonií či tkáňové nekróze³³.

Virulentní faktory se dají klasifikovat mnoha způsoby např. dle mechanismu jejich působení; nebo na základě toho, zda jsou sekretované či asociované s buňkou.

Sekretované virulentní faktory (extracelulární)

Jedná se o látky produkované bakterií *P. aeruginosa*, které způsobují hostitelskému organismu záněty a poškozují tkáň³³. Sekreci těchto látek dělíme do 3 typů: Sekrece typu I, kdy se vylučují například alkalické proteasy. Sekrece typu II, která je bakterií nejvíce využívaná a je dvoukroková, kdy exoproteiny jsou nejdříve syntetizovány jako prekurzory a po složení do konečné konformace jsou přemístěny přes vnější membránu. Řadí se sem např. exotoxin A, elastasy, fosfolipasa C a proteasa IV. Jejich výhodou je, že toxicky působí na dálku, nepotřebují tedy být v přímém kontaktu s hostitelskou buňkou. Třetí skupinou rozdělení dle sekrece je typu III, která využívá složitou sekreci a translokaci proteinů k tomu, aby přímo do cytoplasmy hostitelské buňky vložily exoproteiny (exoenzym S, T a Y a exotoxin U)³³.

Existuje skupina extracelulárních virulentních faktorů PA, která nespadá do žádné ze 3 skupin – např. pyocyanin, siderfory, kyanovodík.

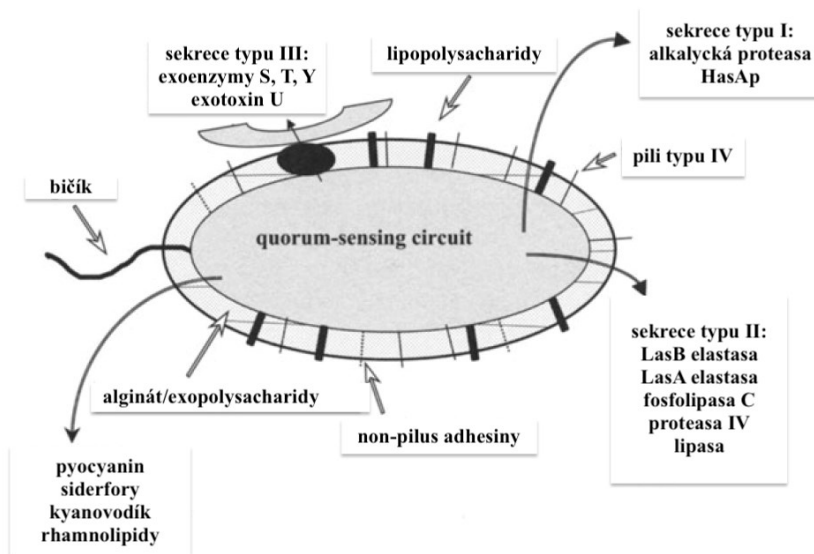
Virulentní faktory asociované s buňkou

Mezi virulentní faktory asociované s buňkou patří faktory poskytující adhezenci k povrchům, jak k epiteliálním, tak také například k mucinu, což je hlavní komponenta mukusu, hlenu pokrývající epitel dýchacích cest^{33, 34}. Za normálních okolností PA infikuje zdravého jedince jen velmi zřídka. Riziko pak bývá zvýšené u hospitalizovaných pacientů, kteří vlivem nemoci, ale také stresu, ztrácí obranné mechanismy zabraňující přilnutí PA na povrch horních cest dýchacích. Uchycení přímo na epitelu je způsobeno přítomností pili typu IV, fimbriemi pokrývajícími povrch bakterie. Umějí se zatahovat, mají schopnost růstu a umožňují určitý druh trhaného pohybu tzv. „twitching“.

Dalšími virulentními faktory jsou specifické molekuly nazývané lektiny³³. Nacházejí se na povrchu bakteriální buňky a mají schopnost vázat sacharidové části glykosfingolipidů, jako je manosa a galaktosa a tím zachytit bakteriální buňku na povrchu hostitelské buňky³³.

„Quorum-sensing circuit“ (QSC) je pokládán za velmi důležitý virulentní faktor, jehož úkolem je regulace produkce ostatních virulentních faktorů³³. QSC také produkuje malé difuzní molekuly, díky nimž dokáží bakterie navzájem komunikovat a vytvořit populaci.

Dalším virulentním a zároveň i adhezenčním faktorem je bičík (flagellum), který též bakterii slouží k pohybu.



Obrázek č. 6 – Popis virulentních faktorů u PA. Extracelulární virulentní faktory: sekrece typu I, II a III; alginát/exopolysacharidy; pyocyanin; siderfory; kyanovodík a rhamnolipidy. Virulentní faktory přímo asociované s hostitelskou buňkou: bičik, lipopolysacharidy, pili typu IV a non-pilus adhesiny. „Quorum-sensing circuit“ je virulentní faktor, díky němuž spolu bakterie PA komunikují a regulují některé virulentní faktory. Převzato a upraveno³³.

1.8.2 Bičik PA

Bičik patří mezi nejdůležitější virulentní faktory PA asociované s hostitelskou buňkou^{34, 35}. V dřívějších studiích bylo na myším modelu dokázáno, že bakterie PA obsahující bičik je více virulentní než ty, které bičik neobsahují. Tato studie prokazuje, že pohyblivost díky bičíku je nezbytná pro šíření infekce. Na modelu novorozenech myši akutní plicní infekce PA byly bičiky nezbytné pro plnou virulenci (přestože to se u dospělců s plicní infekcí nepotvrdilo). Pokud jde o ochranu zprostředkovanou bičíky, imunizace bičíky poskytuje ochranu proti infekci a klesá šíření na hlavní orgány v „burned-mouse“ modelu. U potkana podávání lidských monoklonálních protilátek proti bičikům poskytuje protekci proti infekci PA a snižuje poškození plic.

Struktura bičíku

PA obsahuje jediný polární bičik (viz obrázek č. 7 na straně č. 26)³⁶. Jak již bylo zmíněno je virulentním faktorem bakterie a slouží jí též k pohybu. Bičik PA je tvořen helikálním filamentem a stejně jako u dalších gramnegativních bakterií se skládá ze tří hlavních částí: membránového komplexu, háčky a flagelárního filamentu. Úkolem membránového komplexu je ukotvovat bičik na povrchu buňky. Membránový komplex

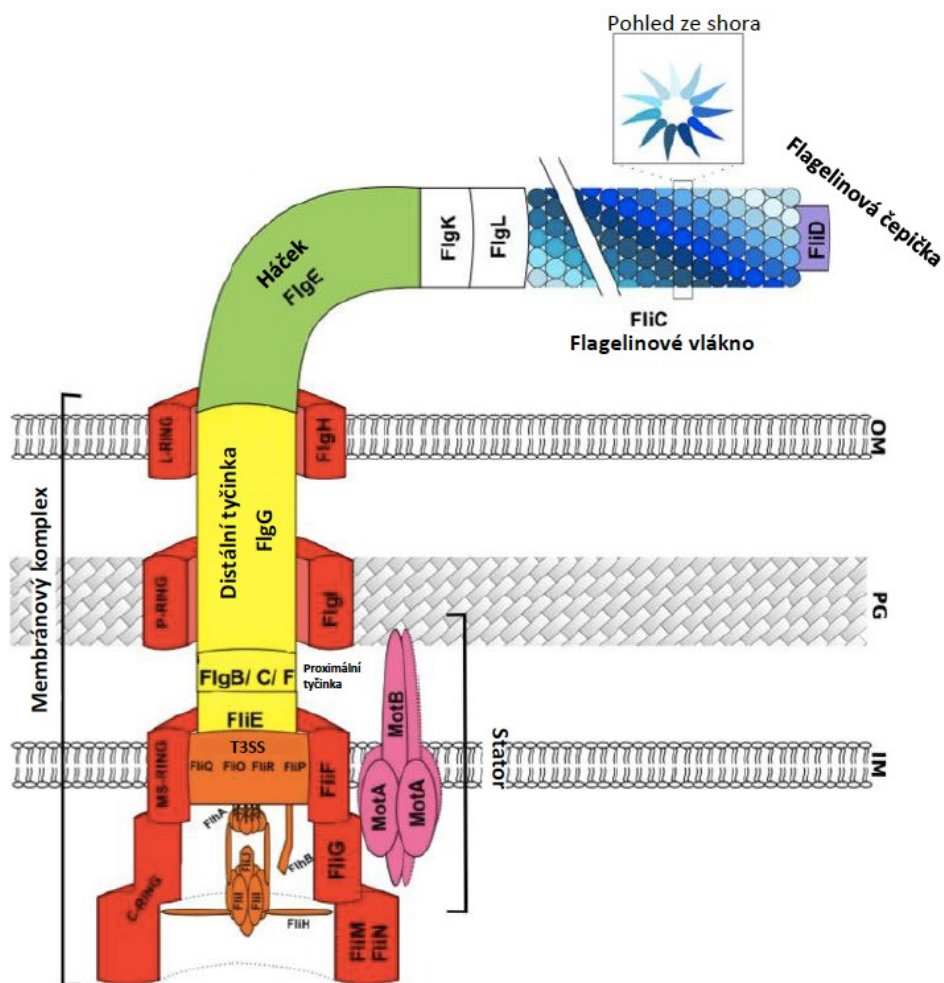
se skládá z bazálního těla, které se dále rozkládá na 4 kruhové destičky, flagelárního sekrečního systému typu III, statoru a duté tyčinky, skrze kterou jsou exportovány flagelinové monomery, které utváří filament. Bazální tělo se skládá z C, MS, P a L kruhových destiček. Ty se nachází v různých vrstvách buňky. MS-kroužek (z angl. „membrane-supra-membrane ring“) je sestaven z FliF proteinových podjednotek a je připojen ke vnitřní membráně. P-kroužek se skládá z FlgI proteinu a je připojen k vrstvě peptidoglykanu. L-kroužek obsahuje FlgH podjednotky a kotví tuto makromolekulární strukturu do vnější membrány. Tyto tři struktury (MS, P, L kruhové destičky) jsou propojeny tyčinkou.

C-kroužek se nachází v cytoplasmě a skládá se ze 3 proteinů: FliG, FliM a FliN. FliM interaguje s chemo-senzorovým systémem a tím mění rotaci bičíku. Protein FliN poskytuje vazebné místo pro navázání chaperonu/substrátového komplexu před jejich sekrecí. N-terminální doména FliG je důležitá pro interakci s MS-kroužkem a s dalšími 2 doménami jsou zapojeny do změny rotace bičíku. C-kroužek je považován za rotor flagelárního motoru a je spojený se statorovým komplexem složeným z proteinů MotA a MotB. Stator je zodpovědný za produkování iontově hnací síly³⁶.

Na bazální tělo je napojen flagelární sekreční systém typu III (T3SS). Tento sekreční systém slouží bakteriím k transportu proteinu flagelinu k výstavbě flagelinového vlákna, tedy bičíku^{36,37}.

Tyčinka je dutá struktura napojena na bazální tělo a na T3SS^{36,37}. Háček je složen z kruhově složených protofilamentů utvořených z FlgE proteinu. Díky jeho struktuře je háček ohebný a pružný.

Flagelinové vlákno je napojeno na háček a dále bazální tělo skrze proteiny FlgK a FlgL, které zde plní funkci spojovacích proteinů^{36,38}. Flagelinové vlákno může dosahovat různých velikostí, udává se cca 10 μm dlouhé a může být složené až z cca 20 000 podjednotek FliC monomerů.



Obrázek č. 7 – Struktura bakteriálního bičíku sestávající se ze 3 hlavních částí: membránového komplexu, háčku a flagelinového vlákna. Membránový komplex obsahuje basální tělo (skládající se z kruhových destiček – C, MS, P a L), stator, proximální a distální tyčinku. Celý komplex je ukotven ve třech vrstvách bakteriální buňky: ve vnitřní membráně (IM), peptidoglykanové vrstvě (PG) a vnější membráně (OM). Na distální tyčinku je napojen háček, který dále přes spojovací proteiny (FlgK a FlgL) přechází ve flagelinové vlákno (FliC) zakončené čepičkou (FliD). Převzato a upraveno³⁶.

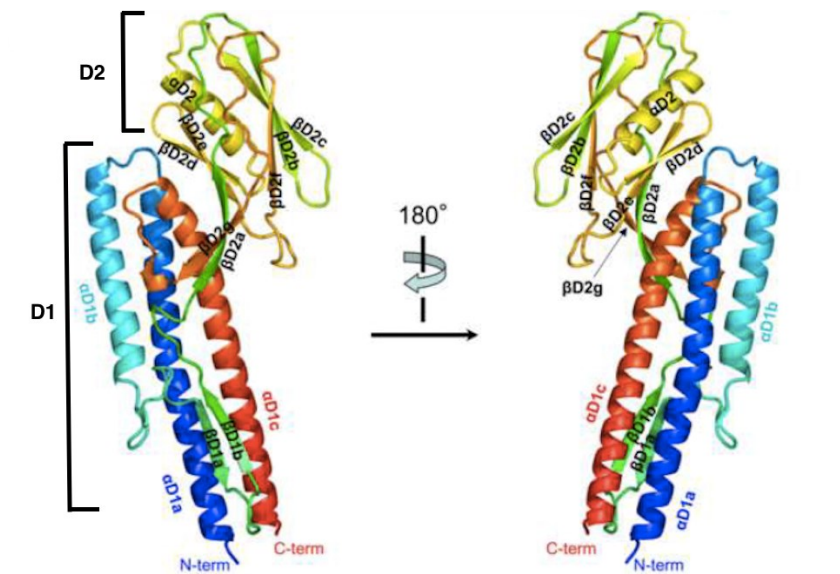
Flagellum se váže na sacharidové skupiny Lewis x derivátů nacházejících se v periferii lidského mucinu^{31, 33}. FliD, proteinová čepička, na konci bičíku přichycuje PA bakterie k mucinu v horních cestách dýchacích. Jak bičík, tak pili PA jsou schopny vázat se na glykosfingolipidy (ganglio-*N*-tetrosylceramidy) nacházející se na apikální vrstvě povrchových buněk epitelu dýchacích cest. Na basolaterálním povrchu se bičík a pili váží na heparansulfát proteoglykany a N-glykany. Signál vyvolaný v buňce díky interakci glykosfingolipid-bičík spustí transkripci a mobilizaci „Toll-like“ receptoru. Nezralé či poškozené epiteliální buňky mají vyšší expresi glykosfingolipidů a heparansulfát proteoglykanů, což zřejmě vysvětluje predispozici PA pro tyto buňky.

Flagelin

Polymerizací jediného proteinu, flagelinu (FliC), je složeno flagelární filamentum. Flagelin kóduje gen *FliC*, pro PA přesněji označen jako *paFliC*³⁹. *paFliC* protein je esenciální virulentní faktor pro kolonizaci PA. Aktivuje vrozenou imunitní odpověď přes jeho poznávací „Toll-like“ receptor 5 (TLR5) a adaptivní imunitu hostitele. Z toho důvodu je *paFliC* navržen pro vakcinaci jako prevence proti PA infekcím u CF pacientů.

W.S. Song a S. Yoon³⁹ určili krystalovou strukturu *paFliC*, která obsahuje zabudovanou D1 doménu a variabilní D2 doménu, jak je vidět na obrázku č. 8. D1 doména je složena do struktury tyčinkovitého tvaru a poskytuje hlavní místo pro vazbu TLR5. Struktura D2 domény je ze dvou β -listů a jednoho α -helixu, který nebyl nalezen v jiných flagelinech.

Na základě exprese proteinu flagelinu můžeme bakterii PA rozdělit do dvou skupin – typ a a typ b^{40, 41, 42}. Rozdělení těchto dvou typů flagelinu je na základě jejich molekulové hmotnosti, kdy flagelin typu a má molekulovou hmotnost 45-52 kDa a flagelin typu b 53 kDa. Flagelin typu a je na rozdíl od typu b glykosylován.



Obrázek č. 8 – Struktura proteinu flagelinu zobrazena ze dvou úhlů ve stuhové „ribbon“ prezentaci. Struktura se skládá ze dvou domén D1 a D2. Kdy D1 doména dále obsahuje diskontinuální N a C-terminální segmenty. N-terminální část obsahuje dva α -helixy (α -D1a a α -D1b) a dvě β -struktury (β D1a and β D1b). C-terminální konec obsahuje pouze α -helix (α -D1c). Doména D2 obsahuje dva β -listy (β D2g-a-e-d a β D2f-b-c) a jeden α -helix (α -D2). Převzato a upraveno³⁹.

2 Cíl práce

Cílem práce byla izolace bičíků bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, které by dále mohly být využity k přípravě protilátek.

Ke splnění tohoto cíle bylo třeba realizovat následující dílčí úkoly:

- 1) Porovnat popsané postupy přípravy bakteriálního flagelinu
- 2) Zjistit vliv podmínek kultivace na produkci flagelinu
- 3) Vybranou technikou purifikovat větší množství flagelinu

3 Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

Agar	Oxoid, UK
Kvasinkový extrakt	Bio Basic Canada Inc, Kanada
MgCl ₂	Lach-Ner, ČR
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	Lach-Ner, ČR
(NH ₄) ₂ SO ₄	Penta, ČR
NaCl	Lach-Ner, ČR
NaN ₃	Merck, Německo
TEMED	Sigma, USA
Trypton	Bio Basic Canada Inc, Kanada
Tween [®] 20	Serva, Německo
4x Laemmli Sample Buffer Precision	Bio-rad, USA
Plus Protein [™] Dual Color Standards	Bio-rad, USA

3.2 Použité přístroje a materiál

Analytické váhy	Adam [®] , UK
Autokláv	Panasonic, USA
Centrifuga HERMLE Z383 K	Hermle Labortechnik GmbH, Německo
dialyzační střevo	Serva, Německo
dialyzační tuby D-tube [™] Dialyzer Midi (6-8 kDa), Mega (3,5 kDa)	Merck Millipore, Německo
Inkubátor s funkcí třepání ES-60	MIUlab, Čína
Inkubátor Mini Dry Bath	Benchmark Scientific, USA
Laminární box	Labox, ČR
Magnetická míchačka	VELP Scientifica, Itálie
Mikrozkumavka 0,5-1,5 ml	Eppendorf, USA
Minicentrifuga	Labnet International, USA
Nechlazený inkubátor (IB-01E)	Jeio Tech, Korea
Orbitální třepačka	Witeg Labortechnik GmbH, Německo
pH metr pHenomenal [®] , pH 1100L	VWR [®] Avantor [®] , USA

Pipeta	Biohit, Finsko
Plastové zkumavky 15 ml, 50 ml	TPP, Švýcarsko
Prosvětlovací pult Kaiser Slimlite plano	Kaiser, Německo
Předvážky	Kern, Německo
Rotor 70 Ti	Beckman Coulter, USA
Ruční mixér	Rohnson, ČR
Spektrofotometr Spekol 11	Carl-Zeiss, Německo
Špičky	Capp, Dánsko
Třepačka – Vortex	IKA [®] , Německo
Ultracentrifuga Optima™ LE-80K	Beckman Coulter, USA
Ultracentrifuga OPTIMA™ XPN-90	Beckman Coulter, USA
Ultracentrifugační kyvety	Beckman Coulter, USA

3.3 Kultivace bakterie PA

Použité kultivační médium:

- PS médium: 1,6% (w/v) pepton; 1% (w/v) enzymatický kaseinový hydrolyzát; 0,5% (v/v) glycerol; 57 mM K₂SO₄; 15 mM MgCl₂ (sterilizováno v autoklávu).
- LB agar (na 1 litr): trypton 10 g; kvasinkový extrakt 5 g; NaCl 10 g; agar 15 g; doplnit H₂O do 1 l

3.3.1 Kultivace bakterií v tekutém PS médiu

Ke kultivaci byl k dispozici kontrolní kmen bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, označen PAK (ST 1763) zamražen v hlubokomrazícím boxu (−80 °C).

Zkumavka se 100 µl suspenze *Pseudomonas aeruginosa* byla vyjmuta z hlubokomrazícího boxu a v laminárním boxu za aseptických podmínek a laboratorní teploty byla rozmrazena. Ke kultivaci PA bylo použito PS médium uchované v lednici při 4 °C. Do 50ml plastové zkumavky bylo pro kultivaci dávkováno injekční stříkačkou 5 ml PS média a do něj bylo inokulováno 10 µl rozmrazené bakteriální suspenze. PA byly kultivovány 14 hodin při 37 °C za konstantního třepání (150 RPM) v inkubátoru ES-60.

Optimalizace kultivace PA v tekutém PS médiu

Zpočátku bylo optimalizováno množství PA inokula do 5 ml LB média v 50ml plastové zkumavce. Bylo použito 10 µl, 20 µl nebo 30 µl rozmrazené bakteriální suspenze PAK. Kultivace probíhala v inkubátoru při 37 °C za konstantního třepání (150 RPM) s pootevřeným víčkem plastové zkumavky.

3.3.2 Kultivace PA na agarové plotně

Byly použity skleněné Petriho misky o průměru 19 cm, ke kterým byla přilepena párátko umožňující vstup vzduchu k agaru a následně byly sterilizovány v autoklávu. LB agar byl připraven v autoklávu a asepticky v laminárním boxu přelit do Petriho misek. Po vychladnutí a zatuhnutí agaru byly Petriho misky ponechány 24 h v lednici při 4 °C.

Po kultivaci bakterií v tekutém PS médiu bylo 400 µl suspenze PA přeneseno na agarovou plotnu a po celé ploše rozetřeno hokejkou. Bakterie byly kultivovány po dobu 24 h v inkubátoru (37 °C).

Optimalizace kultivace PA na agarové plotně:

Cílem této optimalizace bylo získat co největší množství bakteriální hmoty po 24h kultivaci v inkubátoru (37 °C).

Čtyři Petriho misky o průměru 19 cm byly z poloviny naplněny LB agarem (podle předchozího popisu v odstavci 3.3.2). Na dvě z nich bylo aplikováno 400 µl bakteriální suspenze PAK přímo na agar. Po vsáknutí bakteriální suspenze byly bakterie kultivovány v inkubátoru při 37 °C po dobu 24 h.

Na zbylé dvě Petriho misky po nalití a zatuhnutí agaru byl položen kruh z celofánu (ten byl předem sterilizován UV světlem v laminárním boxu) o stejném průměru. Na celofán bylo rovněž nanášeno 400 µl bakteriální suspenze PAK a plotny byly kultivovány za stejných podmínek.

3.3.3 Výběr vhodné kultivace bakterie PA

Při této optimalizaci bylo cílem zjistit, zda bakterie *Pseudomonas aeruginosa* obsahuje více flagelinu při kultivaci v tekutém PS médiu, či při kultivaci na tuhém LB agaru v Petriho misce.

Nejprve byla bakterie PA kultivována v tekutém PS médiu viz odstavec 3.3.1 výše. Poté bylo z bakteriální suspenze po kultivaci odebráno 10 µl na tuhý agar a dalších 10 µl bylo opět použito pro kultivaci v tekutém médiu. Tento krok zajistil přidání stejného množství bakteriální suspenze k obou kultivacím. Dále byly bakterie kultivovány opět podle již popsaných metod 3.3.1 a 3.3.2. Výsledky byly porovnány podle hmotnosti biomasy a absorbance bakteriální suspenze při 600 nm, z čehož byla určena kultivace vhodnější pro tento experiment.

3.4 Uvolnění bičíků

K uvolnění bičíků byla využita homogenizace bakterií pomocí mixéru. Byly použity dva typy mixérů: ruční mixér Rohson, dále označený jako mixér č. 1 a IKA® Ultra Turrax® Tube Drive dispergátor dále pouze mixér č. 2. Rozdíl mezi těmito mixéry spočíval v mechanismu mixování, kdy mixér č. 2 zároveň míchá, drtí, disperguje a homogenizuje bakteriální suspenzi v uzavíratelné tubě až při 8 000 ot./min, kdežto mixér č. 1 obsahuje pouze jednu tyčovou část zakončenou vrtulkou. Mixéry jsou zobrazeny na obrázku č. 9 a č. 10 (strana č. 33).

Pomocí mixéru č. 1 byly bakterie homogenizovány 15ti stlačeními v 50ml plastové zkumavce. U mixéru č. 2 byla tuba s vrtulkou naplněna bakteriální suspenzí a takto byla mixována po dobu 35 s nastavena na úroveň mixování č. 9.



Obrázek č. 9 – Mixér č. 1. Ruční mixér od firmy Rohnson.



Obrázek č. 10 – Mixér č. 2. IKA® Ultra Turrax® Tube Drive dispergátor s jednorázovou nádobou.

3.5 Určení množství bakteriálních buněk

Jedná se o metodu fotometrického určení pomocí optické denzity, kdy bylo stanovováno množství bakteriálních buněk v suspenzi. Měří se tedy absorbance při 600 nm. Koncentrace $6 \cdot 10^8$ bakterií/ml odpovídá $OD_{600} = 1$ ⁴³.

3.6 Postupy izolace bičíku

3.6.1 Metoda I

Použité roztoky:

- Solný roztok: 67 mM NaCl; 10^{-4} M EDTA; 0,002% (w/w) Tween 20
- 1 M HCl
- 1 M NaOH
- 10 l destilované H₂O s 0,1% azidem sodným

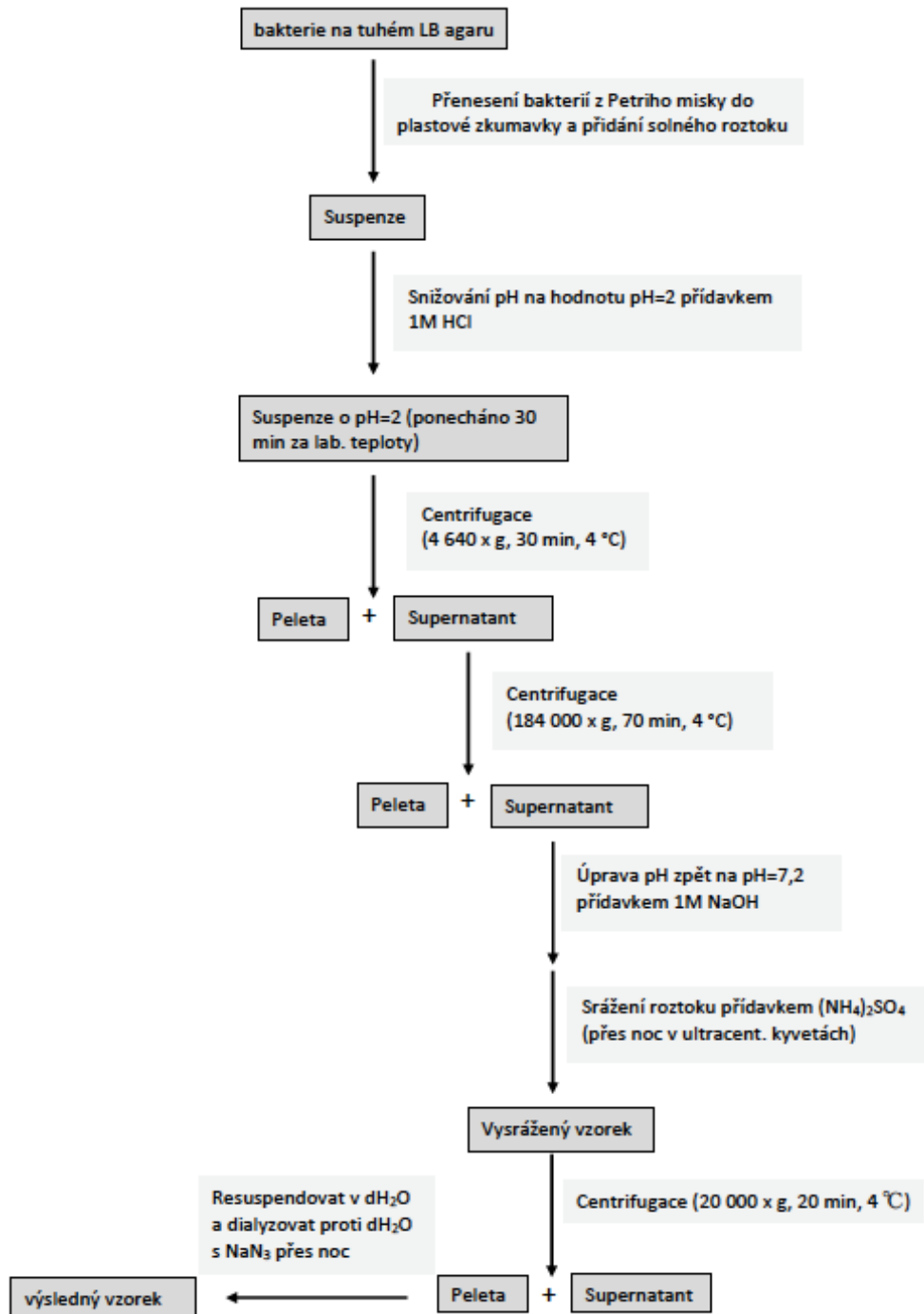
Tato metoda byla přejata^{44,45,46} a následně byla upravena. Je založena na depolymerizaci flagelinu bičíků při snížení pH ze 7 na 2 pomocí 1 M HCl. Při následné centrifugaci se vytvoří sediment z buněk a samotný flagelin zůstává v supernatantu. Tento flagelin je zpět polymerizován při zvýšení pH opět na 7.

Postup:

Zamražená bakteriální suspenze PAK byla nejprve rozmrazena za laboratorní teploty a následně jak již bylo popsáno v odstavci 3.3.1 byla přes noc kultivována. Po kultivaci byla bakteriální suspenze dále nanášena na agarovou plotnu a opět kultivována (viz odstavec 3.3.2). Po kultivaci byly bakterie soustředěny do 50ml plastových zkumavek, zváženy a resuspendovány v 20 ml solného roztoku. Následně bylo proměřeno OD₆₀₀. Bakteriální suspenze v solném roztoku byla přelita do vysoké úzké kádinky. Za stálého míchání na magnetické míchačce bylo měřeno pH roztoku a upravováno přídatkem 1 M HCl na pH 2. Takto byla suspenze ponechána dalších 30 min za stálého míchání při laboratorní teplotě. Po 30 minutách byla bakteriální suspenze přelita z kádinky do 50ml plastové zkumavky a centrifugována na centrifuze Hermle Z 383K (výkyvný rotor HERMLE 220.86) při 4 640 x g po dobu 30 min a při 4 °C. Supernatant se dále centrifuguje v ultracentrifuze OPTIMA™ XPN-90 (typ rotoru 70 Ti) po dobu 70 min při 184 000 x g a 4 °C, kdy se v peletě usadí částice, které se při pH 2 nerozpustily. Poté je upraveno pH supernatantu na 7,2 pomocí 1 M NaOH, opět v úzké vysoké kádince za konstantního míchání na magnetické míchačce. Roztok byl ihned po upravení pH přelit do 50ml plastové zkumavky a byl přidán síran amonný do 2/3 saturace. Vzniklý roztok byl ponechán přes noc v lednici při 4 °C. Druhý den byl vysrážený materiál centrifugačně oddělen na ultracentrifuze OPTIMA™ XPN-90 (rotor 70 Ti) po dobu 20 min při

20 000 x g a 4 °C. Sediment byl resuspendován ve 400 µl destilované H₂O a suspenze byla přenesena do dialyzační tuby D-tube™ Dialyzer Midi (6-8 kDa). Dialyzační tuba byla na noc vložena do 10 l destilované vody s 0,1% azidem za konstantního míchání na magnetické míchače při 4 °C. Druhý den byl roztok převeden z dialyzační tuby do 0,5 ml mikrozkušky a uchován při -20 °C.

Schéma provedení:



3.6.2 Metoda II

Použité roztoky:

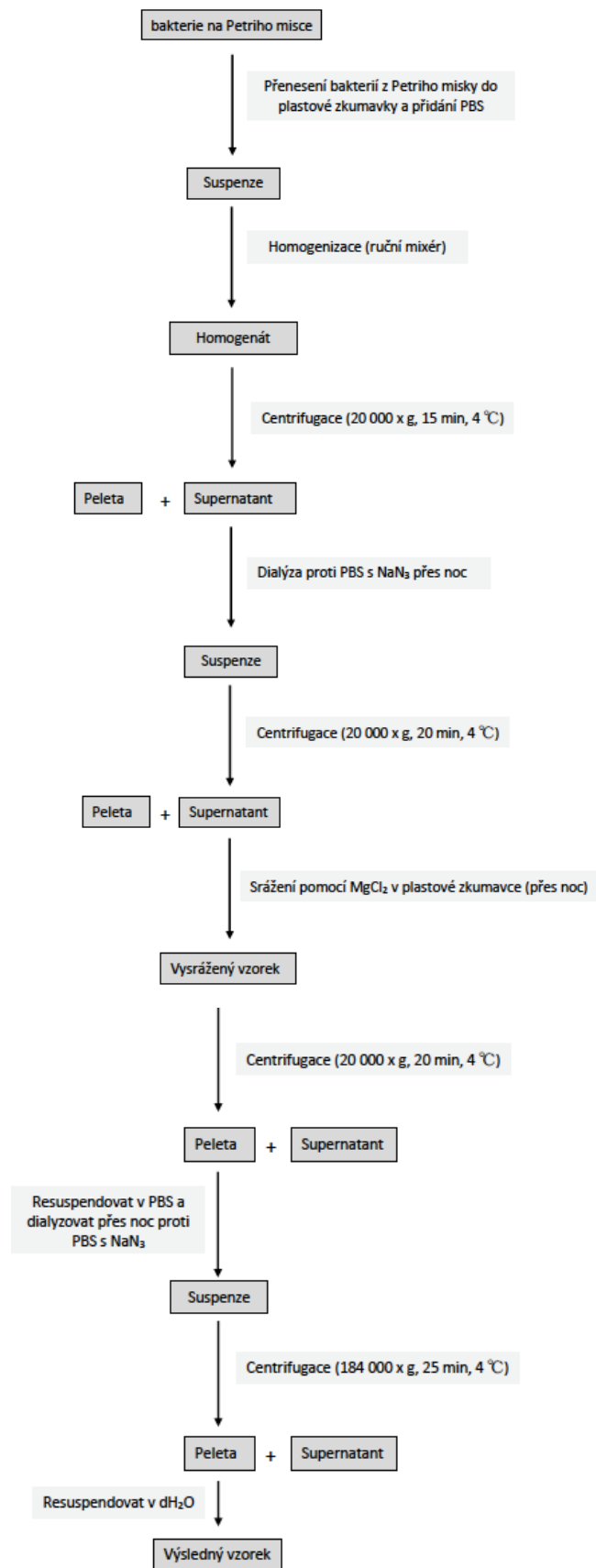
- PBS (pH 7,2): 0,01 M Na₂HPO₄·12H₂O; 0,1 M NaCl; 0,1% NaN₃

Metoda je založena na agregaci bakterií pomocí chloridu hořečnatého, kdy je nejdříve bakteriální suspenze homogenizována a následnou centrifugací a dialýzou zbavena bakteriálních buněk a nečistot⁴⁷.

Postup:

Po sejmutí bakterií z agaru do 50ml plastové zkumavky bylo přidáno 20 ml PBS s 0,1% NaN₃. Bakterie byly v PBS resuspendovány a homogenizovány mixérem č.1 (odstavec 3.4). Homogenát byl přelit do 26,3ml ultracentrifugačních kyvet a centrifugován na ultracentrifuze OPTIMA™ XPN-90 15 min při 20 000 x g a 4 °C (rotor 70 Ti). Poté byl supernatant dialyzován v dialyzačním střevě přes noc proti 10 l PBS a za stálého míchání na magnetické míchačce při 4 °C. Druhý den byl roztok přelit z dialyzačního střeva do 26,3ml ultracentrifugační kyvety a centrifugován opět na ultracentrifuze při 20 000 x g, 4 °C a po dobu 20 min. Supernatant byl po centrifugaci přelit do 50ml plastové zkumavky, ve které byl ponechán přes noc ve 100 mM MgCl₂ při 4 °C. Další den byl vzorek přelit do 26,3 ml ultracentrifugační kyvety a centrifugován na ultracentrifuze při 20 000 x g, 4 °C po dobu 20 min. Peleta byla resuspendována v 5 ml PBS a dialyzována přes noc proti 10 l PBS v D-tube™ Dialyzer Mega (3,5 kDa). Druhý den byl supernatant opět srážen ve 100 mM MgCl₂ přes noc, dále opět dialyzován za stejných podmínek jako předchozí dialýza a centrifugován na ultracentrifuze při 184 000 x g, 4 °C po dobu 25 min. Výsledná peleta byla resuspendována v 500 µl destilované H₂O a uchována v 0,5 ml mikrozkuhavce při -20 °C.

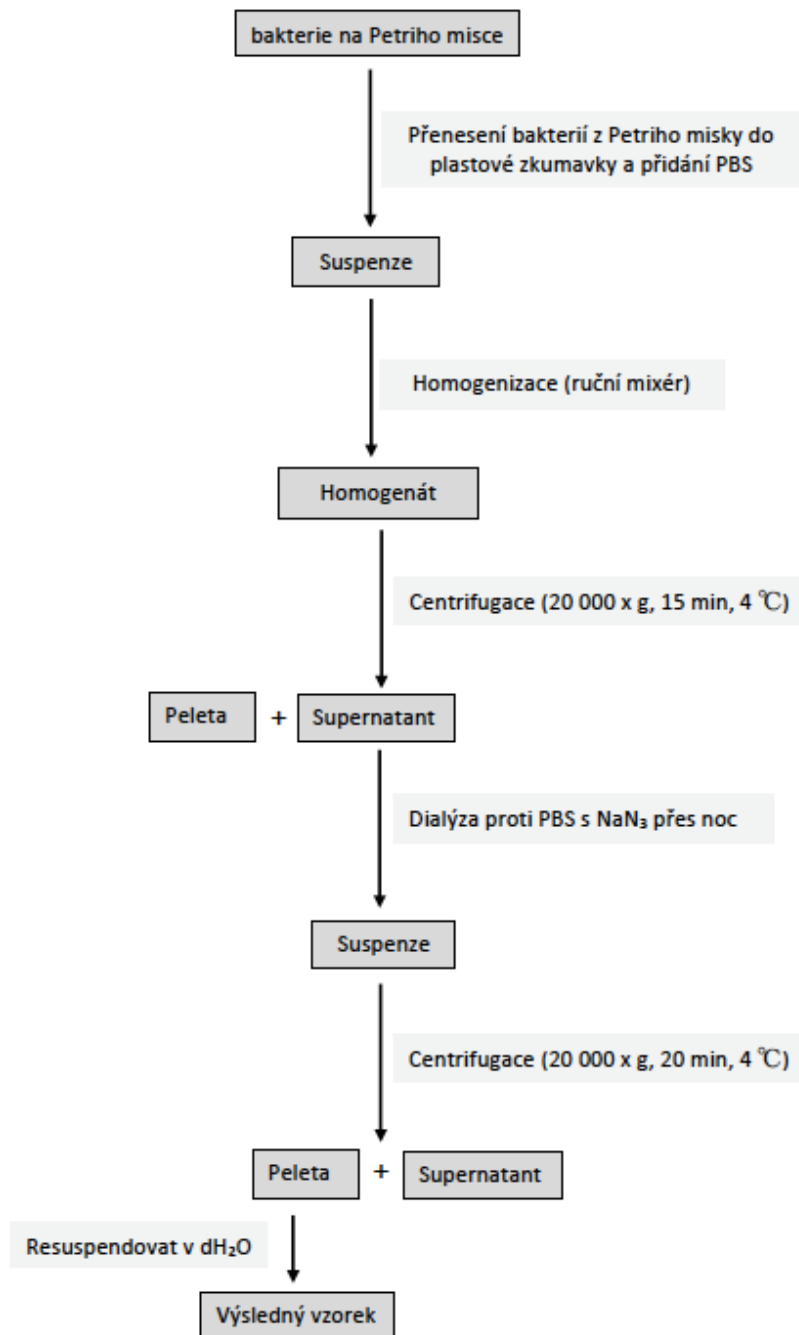
Schéma provedení:



3.6.3 Metoda III

U metody III se postupovalo obdobně jako u metody II (viz 3.6.2), s tím rozdílem, že metoda III je podstatně kratší a bakteriální suspenze se nesráží chloridem hořečnatým. Postup je znázorněn níže.

Schéma provedení:



3.6.4 Metoda IV

Použité roztoky:

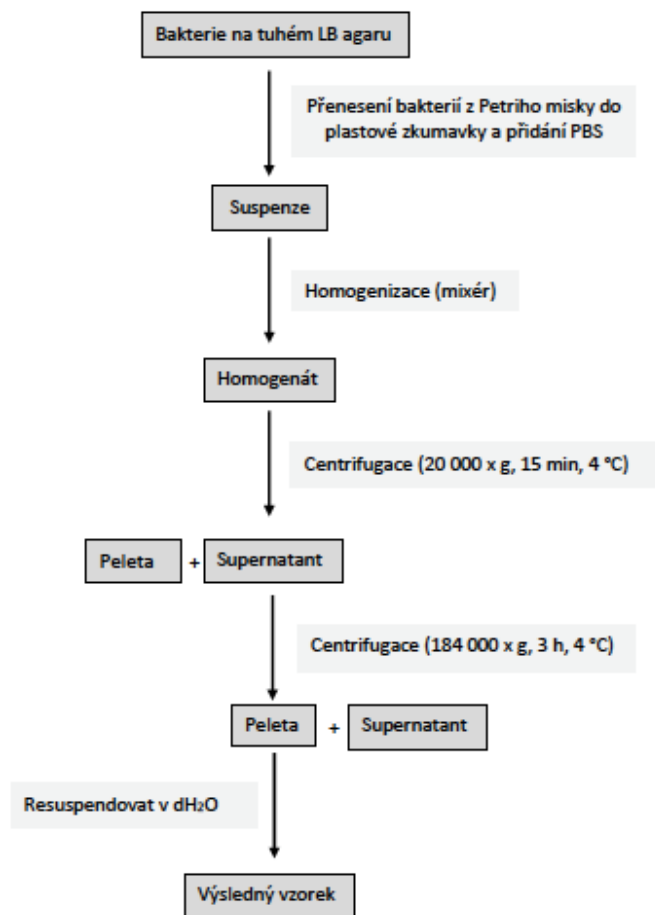
- PBS (pH 7,2): 0,01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,1 M NaCl; 0,1% NaN_3

Tato metoda je založena na izolaci flagelinu diferenční centrifugací. Metoda byla přejata^{34, 48} a upravena.

Postup:

Bakterie byly z agaru přeneseny do 50ml plastové zkumavky, zváženy a homogenizovány mixérem č.1 ve 20 ml PBS. Homogenát byl přelit do 26,3ml ultracentrifugační kyvety a byl poprvé centrifugován při 20 000 x g, 4 °C po dobu 20 min na ultracentrifuze OPTIMA™ XPN-90 (rotor 70 Ti). Supernatant byl dále centrifugován na téže ultracentrifuze se stejným rotorem při 184 000 x g, 4 °C po dobu 3 h. Výsledná peleta byla uschována při -20 °C.

Schéma provedení:



3.7 Analytické metody

3.7.1 SDS-elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Jedná se o elektromigrační separační metodu, jejíž cílem je separovat molekuly na základě jejich rozdílné molekulární hmotnosti a velikosti náboje. Metoda využívá elektrické pole, které je vytvořeno vložení konstantního stejnosměrného napětí mezi dvě elektrody. Nosičem je zde polyakrylamidový gel, který se skládá ze dvou na sebe navrstvených gelů o různé pórovitosti. Spodní gel se nazývá separační a svrchní zaostřovací⁴⁹.

Sestavení aparatury:

Pro sestavení aparatury je potřeba 2 sklíček o velikosti 10x8 cm (síla 1 mm) odmaštěných ethanolem a připevněných ve svorkách a stojanu, ve kterém jsou při nalévání uchyceny. Dále je potřeba hřeben, který vytváří jamky v gelu pro aplikaci vzorků. Sklíčka s gelem se upevní do elektroforetické vany (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell; Bio-rad), která je naplněna elektroforetickým pufrům. Celá aparatura je zapojena do zdroje (PowerPac™ Basic Power Supply; Bio-rad).

Příprava gelu:

Tabulka č. 1 – Roztoky a jejich objemy pro přípravu polyakrylamidového gelu⁵⁰.

	separační gel – 8%	zaostřovací gel – 4%
H ₂ O	4,60 ml	5,86 ml
30% akrylamid v H ₂ O	2,70 ml	1,34 ml
1,5M Tris-HCl (pH 8,8)	2,50 ml	–
0,5M Tris-HCl (pH 6,8)	–	2,60 ml
10% SDS v H ₂ O	100 μl	100 μl
10% APS v H ₂ O	100 μl	100 μl
TEMED	6,00 μl	10,0 μl

SDS – dodecylsírán sodný; APS – persulfát amonný

Nejprve byl připraven separační gel (viz tabulka č. 1). Do 15ml plastové zkumavky byly odměřeny všechny roztoky. TEMED byl přidán jako poslední. Obsah ve zkumavce se promíchá na třepače Vortex a je přenesen mezi sklíčka cca 1 cm pod okraj. Polymerační roztok byl převrstven vodou a ponechán za laboratorní teploty po dobu 20 min. Mezi tím byl připraven roztok pro zaostřovací gel (viz tabulka č. 1), opět TEMED přidán poslední. Před aplikací polymeračního roztoku pro zaostřovací gel byla vysušena

voda převrstvující separační gel. Po promíchání na Vortexu byl nanesen na již polymerovaný separační gel a vložen hřeben. Polymerace probíhala 20 minut při laboratorní teplotě.

Příprava vzorků:

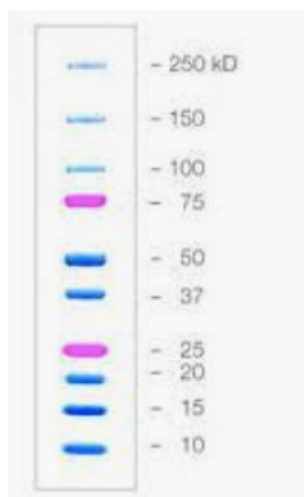
Vzorkový pufr: 900 µl 4x Laemmli Sample Buffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% glycerol; 1% LDS; 0,005% bromfenolová modř), 100 µl 2-mercaptoethanol

Do 0,5ml mikrozku mávek byly připraveny vzorky: 30 µl izolovaného vzorku naředěný 10 µl vzorkový pufr. Takto připravené mikrozku mávky byly inkubovány po dobu 5 minut při 100 °C v inkubátoru MINI Dry Bath a odstředěny na stolní centrifuze cca 1 min při 6 000 RPM.

Průběh elektroforézy:

Do jamek v zaostřovacím gelu ponořených v elektrodo vém pufru byly aplikovány jednotlivé vzorky po 25 µl, 2 µl standardu (Precision Plus Protein™ Dual Color – viz obrázek č. 11 na straně č. 42) a do volných jamek 25 µl naředěného vzorkového pufru.

Elektroforéza probíhala při 200 V do té doby, než čelo vyznačené bromfenolovou modří doputovalo ke spodnímu okraji skel (cca 80 min). Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut ze skel a ponořen do barvicí lázně (0,3% Coomassie Brilliant Blue R-250, 40% methanol, 40% kyselina octová, H₂O), kde byl ponechán přes noc na orbitální třepačce při 50 RPM. Poté byl přendán do odbarvovací lázně (25% ethanol, 10% kyselina octová, H₂O), kde byl ponechán opět na orbitální třepačce při 50 RPM po dobu 10 h. Odbarvený gel byl zdokumentován fotoaparátem na prosvětlovacím zařízení (Kaiser Slimlite plano).



Obrázek č. 11 – Standard Precision Plus Protein™ Dual Color od firmy Bio-rad.

3.7.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytickou metodou, která se využívá ke stanovení hmotnosti molekul na základě měření poměru hmotnosti a náboje (m/z). Samotný stroj se skládá ze tří částí – iontový zdroj, analyzátor a detektor.

V iontovém zdroji jsou nenabitě molekuly převedeny na nabitě ionty, aby se pohybovaly v elektrickém a magnetickém poli. Pro ionizaci biomolekul se využívá např. metoda MALDI.

MALDI (z angl. „Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization“), je důležitým nástrojem pro ionizaci a následnou charakterizaci biomolekul pomocí MS tzv. měkkou technikou s nízkou mírou fragmentace. Směs vzorku a matrice je nanášena na terč, kde se po nanesení vytvoří krystal. Matrice absorbuje energii laseru a uvolňuje se do vakua v plynném stavu. Při uvolňování s sebou strhává vzorek (analyt), na který je následně přenesen proton.

V analyzátoru pak dochází k rozdělení iontů podle jejich hmotnosti a náboje. Nejjednodušším analyzátozem často používaným ve spojení s MALDI, je TOF (z angl. „Time of Flight“). TOF je průletovým analyzátozem, ve kterém se měří m/z z doby letu, za kterou jednotlivé ionty doputují od iontového zdroje k detektoru.

Detektor zaznamenává signál po dopadu iontu. Výsledkem je hmotnostní spektrum.

Identifikace proteinů se provádí např. pomocí PMF (z angl. „Peptide Mass Fingerprinting“), což je mapování peptidů. Podle mapy se z databáze určí o jaký peptid se jedná^{51,52,53,54}.

Pro tuto práci vzorky na hmotnostním spektrometru zpracoval pan doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D. na Přírodovědecké fakultě Karlovy Univerzity.

Vzorky byly nejprve zpracovány metodou SDS-elektroforézy, kdy zóny obsahující protein v oblasti 50 kDa byly vyříznuty a připraveny k analýze na hmotnostním spektrometru. Analyzovány byly výsledné vzorky Metody I, III a IV.

K analýze vzorků pro tuto práci byla využita metoda MALDI-TOF a identifikace proteinů byla provedena pomocí PMF.

4 Výsledky

Pro experimentální práci byl použit kontrolní kmen bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (PAK ST 1763). Bakterie byly před pokusy uschovány v PS médiu v hlubokomrazícím boxu (−80 °C).

Nejprve byla optimalizována metodika kultivace bakteriální suspenze.

4.1 Optimalizace kultivace PA v kapalném médiu

Bylo třeba ověřit, jaké množství bakteriální suspenze PAK je potřeba inokulovat do PS média pro zajištění maximálního nárustu bakteriálních buněk dle bakteriální růstové křivky. Z předchozích experimentů bylo známo, že doba kultivace bakterie *P. aeruginosa* v tekutém PS médiu za konstantního třepání je 14 h. Výsledek je zobrazen v tabulce č. 2. Jelikož hodnoty absorbancí se lišily velmi málo, pro další experimenty byl vybrán nejmenší objem přídatku bakteriální suspenze, 10 µl.

Tabulka č. 2 – Měření absorbance bakteriální suspenze PA při 600 nm

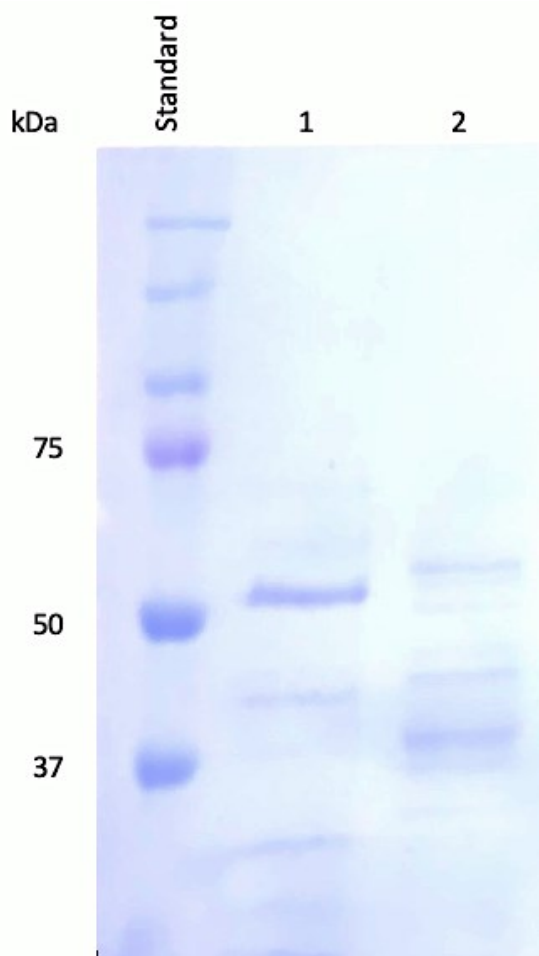
	Absorbance při 600 nm
Přidaný objem PAK	8x ředěno
10 µl	0,809
20 µl	0,756
30 µl	0,791

4.2 Výběr vhodné kultivace bakterie PA

Kultivace bakterie PA byla prováděna dvěma způsoby. První způsob kultivace PA byl na agarové plotně v inkubátoru při 37 °C po dobu 24 h (viz odstavec 3.3.2). Druhý způsob je kultivace PA v tekutém PS médiu v inkubátoru při 37 °C za konstantního třepání (150 RPM) po dobu 14 h (viz odstavec 3.3.1).

Po převedení bakterií z agarové plotny do 50ml plastových zkumavek byla bakteriální biomasa resuspendována v PBS médiu a byla měřena absorbance při 600 nm. Absorbance při 600 nm u PA bakterie kultivované v tekutém PS médiu byla měřena ihned po inkubaci. Hodnoty absorbance se shodovaly při takovém ředění, kdy byla bakteriální suspenze po kultivaci na agarové plotně 5x koncentrovanější.

Výsledek je zobrazen metodou SDS-elektroforézy na polyakrylamidovém gelu, kdy k izolaci flagelinu byla využita Metoda IV. Gel je zobrazen na obrázku č. 12, kdy řada č. 1 obsahuje ostrou zónu odpovídající molekulární hmotnosti flagelinu – vzorek byl kultivován na tuhém LB agaru. Řada č. 2 neobsahuje výraznou zónu, avšak taktéž by zde mohl být obsažen protein odpovídající flagelinu – u tohoto vzorku byla bakterie PA kultivována v tekutém PS médiu.



Obrázek č. 12 – Výsledek SDS-elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (8% separační). Na polyakrylamidovém gelu jsou dva způsoby kultivace bakterií: dráha 1 – kultivace bakterie PA na tuhém LB agaru; dráha 2 – kultivace bakterie PA v tekutém PS médiu. Vzorky byly zpracovány Metodou IV.

4.3 Optimalizace kultivace na tuhém agaru

Byly použity 4 Petriho misky o průměru 19 cm. Na Petriho misku označenou A a C byla bakteriální suspenze PA pipetována přímo na povrch LB agaru. U Petriho misky označené B a D byl na zatuhlý LB agar položen celofán o stejném průměru, na který byla

nanešena daná bakteriální suspenze PA. Po 24h kultivaci byly bakterie z Petriho misek asepticky převedeny do 50ml plastových zkumavek a zváženy (viz tabulka č. 3).

Tabulka č. 3 – Hmotnosti biomasy bakterie PA po přenesení z agarové plotny

vzorek	hmotnost biomasy
A	0,74 g
B	0,67 g
C	0,40 g
D	0,67 g

Vzorky A a C – bakterie PA byly kultivovány na tuhém LB agaru. Vzorky B a D – kultivace bakterií PA na celofánu.

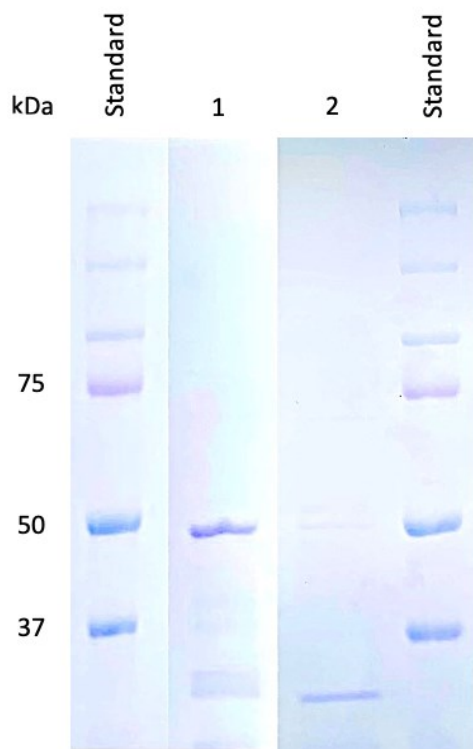
Dále po navážení sklizených bakterií byla biomasa resuspendována v 10 ml roztoku (A, B – solný roztok; C, D – PBS).

Preparáty z optimalizace kultivace na tuhém agaru byly vyhodnoceny pomocí SDS-elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Gely jsou znázorněny na obrázku č. 13 a č. 14 (strana 47). Oba obrázky obsahují jednu dráhu, kdy byla kultivace prováděna na celofánu a dráhu, kde je znázorněn výsledek kultivace pouze na LB agaru (bez celofánu).

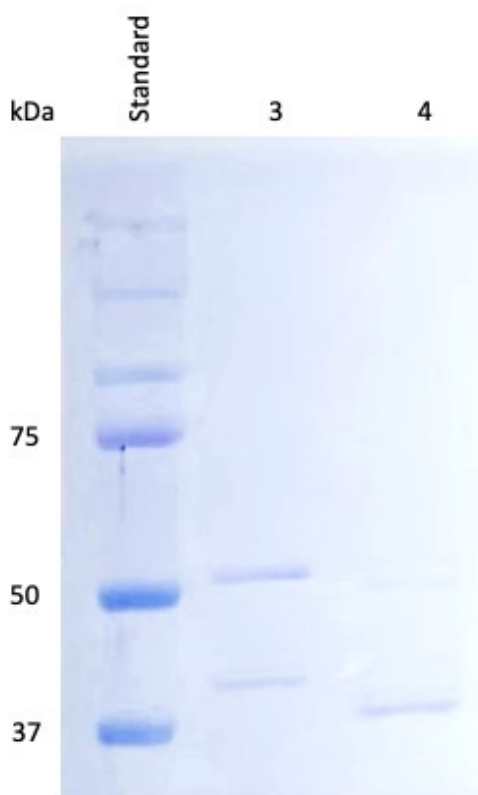
Na obrázku č. 13 dráha 1 zobrazuje výsledek po kultivaci na samotném LB agaru, výše taktéž označen jako vzorek A. Dráha 2 odpovídá výše popsanému vzorku B, který byl kultivován na celofánu. Zde je patrnější zóna v oblasti okolo 50 kDa u vzorku, u kterého byla bakterie PA kultivována pouze na LB agaru.

Na obrázku č. 14 dráha 3 odpovídá výše popsanému vzorku D kultivovanému na celofánu a dráha 4 vzorku C kultivovanému pouze na agaru. Zde je patrnější zóna (v oblasti okolo 50 kDa) u vzorku kultivovaném na celofánu.

Tyto dva obrázky se od sebe liší pouze postupem, kterým byly vzorky izolovány před elektroforézou. Jedná se o metodu I a III.



Obrázek č. 13 – SDS-elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (8% separační) izolovaných vzorků po optimalizaci kultivace bakterie PA na agaru. Dráha 1 odpovídá výše popsanému vzorku A, tedy kultivaci na samotném LB agaru. Dráha 2 odpovídá vzorku B, který byl kultivován na celofánu. Vzorky byly izolovány Metodou I.

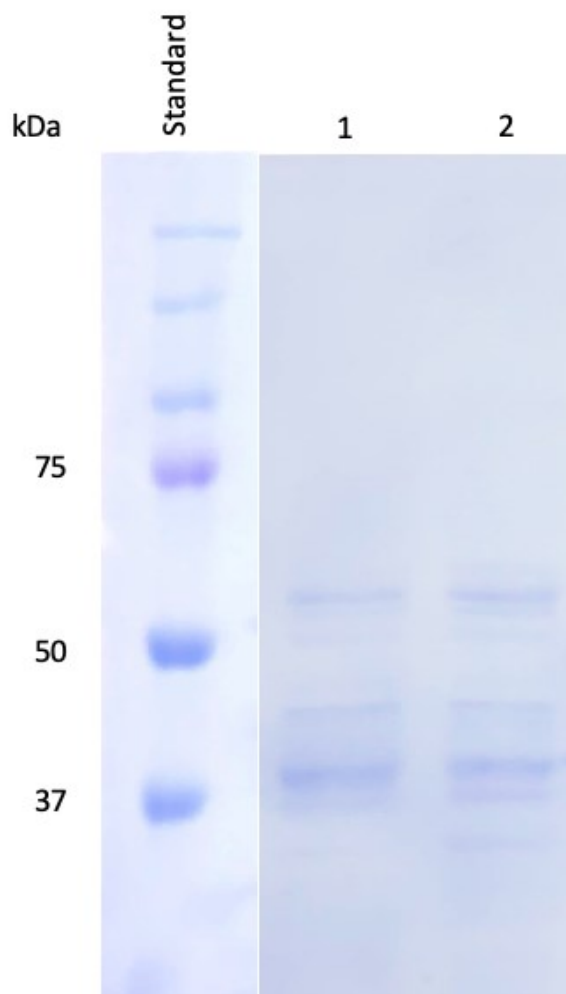


Obrázek č. 14 – SDS-elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (8% separační) izolovaných vzorků po optimalizaci kultivace bakterie PA na agaru. Dráha 3 odpovídá vzorku D, kultivanému na celofánu. Dráha 4 odpovídá vzorku C, který byl kultivován na samotném LB agaru. Vzorky byly izolovány Metodou III.

4.4 Uvolnění bičíků – homogenizace

Na homogenizaci byly použity 2 druhy mixérů: tyčový mixér Rohson (mixér č. 1) a IKA® Ultra Turrax® Tube Drive dispergátor (mixér č. 2).

Flagelin byl izolován metodou IV (viz odstavec 3.6.4) a výsledek byl porovnán na obrázku č. 15. Zde je vidět, že se příslušné zóny od sebe zásadně neliší, tedy na druhu mixéru při izolaci nezáleží.

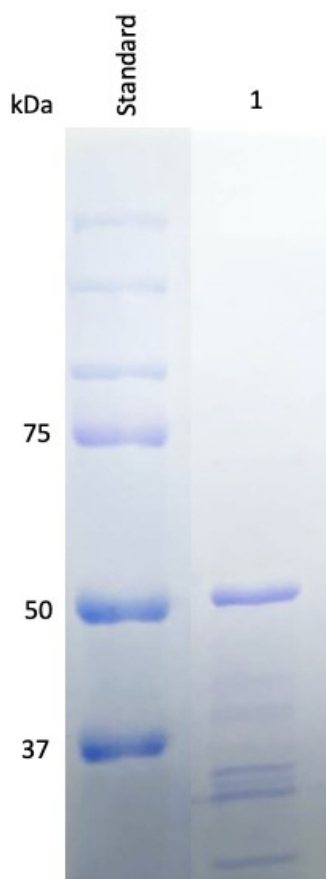


Obrázek č. 15 – Výsledek SDS-elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (8% separační). Na polyakrylamidovém gelu jsou zobrazeny dva způsoby homogenizace bakteriální suspenze: dráha 1 – použitý mixér č. 2 a dráha 2 mixér č. 1. Vzorky byly zpracovány Metodou IV.

4.5 Metoda I

Tato metoda izolace bakteriálního flagelinu z bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je založena na depolymeraci flagelinu snížením pH a zpětné polymeraci opětovným zvýšením pH.

Výsledek (viz obrázek č. 16) je patrný na polyakrylamidovém gelu po SDS-elektroforéze finálních preparátů. Dráha č. 1 obsahuje vzorek, u něhož bakterie PA byla kultivována na samotném LB agaru a je zde ostře zobrazená zóna odpovídající molekulové hmotnosti flagelinu.

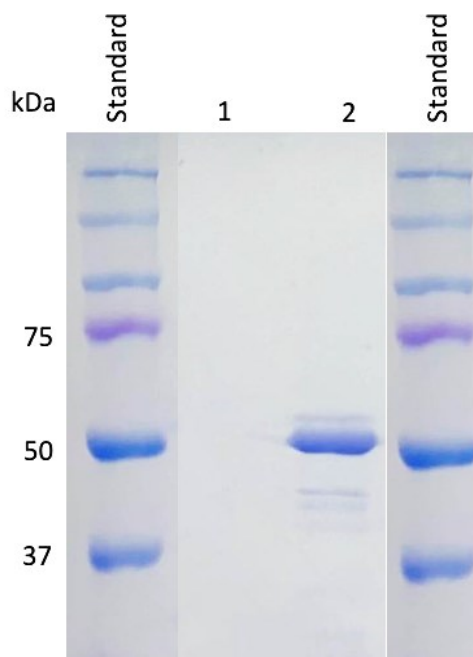


Obrázek č. 16 – Výsledek SDS-elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (8% separační). Na polyakrylamidovém gelu je ve dráze 1 zobrazen výsledek izolace flagelinu pomocí Metody I.

4.6 Metoda II

Cílem Metody II je izolace flagelinu srážením chloridem hořečnatým. Výsledný preparát byl analyzován metodou SDS-elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (viz obrázek č. 17 na straně č. 50).

Na obrázku jsou opět znázorněny dvě dráhy, kdy dráha 1 zobrazuje separaci výsledného vzorku a dráha 2 obsahuje vzorek, z průběhu metody II. Jedná se o peletu (resuspendovanou ve vodě) získanou po druhé centrifugaci (viz schéma provedení v odstavci 3.6.2). Tento vzorek obsahuje protein s molekulovou hmotností odpovídající flagelinu, což také bylo dále potvrzeno hmotnostním spektrometrem.



Obrázek č. 17 – Výsledek SDS-elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (8% separační). Na polyakrylamidovém gelu jsou zobrazeny dva výsledky izolace flagelinu pomocí Metody II. Dráha 1 výsledek metody II. Dráha 2 je peleta uschována v průběhu Metody II po druhé centrifugaci.

Metodou II protein s molekulovou hmotností odpovídající flagelinu nebyl ve finálním preparátu získán. Proto byla dále testována její zkrácená varianta, označená jako Metoda III.

4.7 Metoda III

Tato metoda byla odvozena z metody II, při níž byl protein s molekulovou hmotností odpovídající flagelinu izolován ve dřívějším kroku, než bylo popsáno. Není zde třeba precipitace pomocí chloridu hořečnatého. Provádí se pouze centrifugace, dialýza a následně opět centrifugace (viz schéma provedení v odstavci 3.6.3).

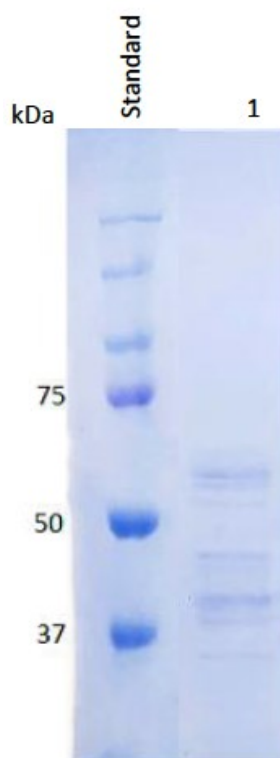
Výsledek je zobrazen na polyakrylamidovém gelu SDS-elektroforézy na obrázku č. 18 na straně č. 51. Kdy je ve dráze 1 viditelná zóna (v oblasti okolo 50 kDa) odpovídající molekulové hmotnosti flagelinu.



Obrázek č. 18 – Výsledek SDS-elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (8% separační). Na polyakrylamidovém gelu je zobrazen výsledek izolace flagelinu pomocí Metody III. Zóna v oblasti okolo 50 kDa odpovídá molekulové hmotnosti flagelinu.

4.8 Metoda IV

Poslední metodou je Metoda IV založena na diferenční centrifugaci. Výsledný preparát byl opět analyzován SDS-elektroforézou na polyakrylamidovém gelu. Na obrázku č. 19 (strana č. 52) ve dráze č. 1 lze pozorovat zóny proteinů různých molekulových hmotností, ale v oblasti okolo 50 kDa nejsou patrné.



Obrázek č. 19 – Výsledek SDS-elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (8% separační). Na polyakrylamidovém gelu je zobrazen výsledek izolace flagelinu pomocí metody IV.

4.9 Hmotnostní spektrometrie

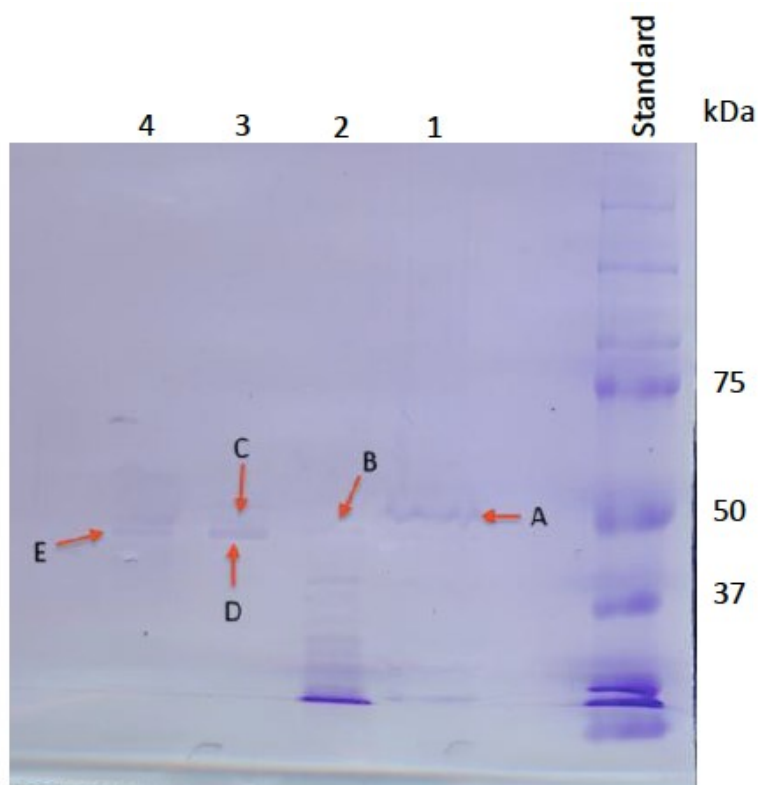
Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo prokázáno, že ve vzorcích izolovaných Metodou I a Metodou III se nachází flagelin, FliC typu b. Ve vzorku izolovaném Metodou IV v oblasti okolo 50 kDa byla nalezena pouze bakteriální aminopeptidasa.

Na obrázku č. 20 (strana č. 53) je zobrazen polyakrylamidový gel SDS-elektroforézy s výsledky izolací Metod I, III a IV. Šipkou jsou zvýrazněny zóny v okolí 50 kDa, které byly vyříznuty a použity k analýze na MS. Vzorek A – zóna z Metody IV; vzorek B – zóna z Metody I; vzorky C, D a E – zóna z metody III.

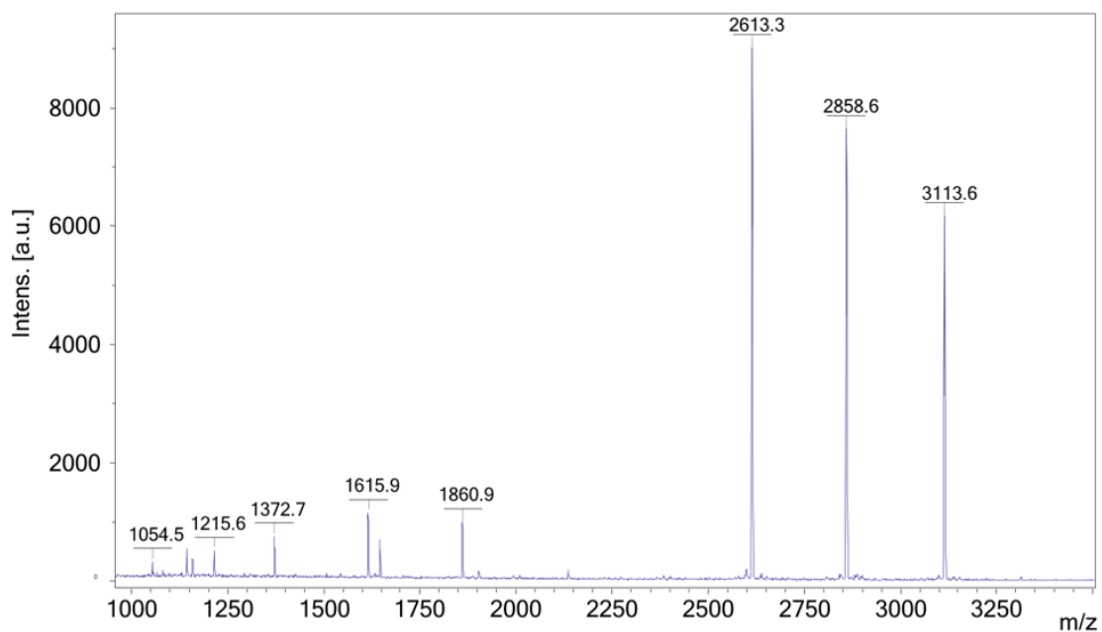
Graf č. 1 (strana č. 54) zobrazuje vybrané MS spektrum vzorku izolovaného Metodou III. Na polyakrylamidovém gelu (obrázek č. 20, strana č. 53) popsaném níže se jedná o zónu D. Pomocí PMF mapování MALDI-TOF byl prokázán flagelin FliC typu b, kdy skóre bylo signifikantní. Signály ve spektru odpovídají m/z tryptických peptidů flagelinu.

Identifikace proteinů byla provedena softwarovým vyhledávačem Mascot, který využívá data hmotnostní spektrometrie k identifikaci proteinů z databází peptidových sekvencí⁵⁵. Pokrytí sekvence bylo 38 %.

Celý výsledek hmotnostní spektrometrie je přiložen v příloze.



Obrázek č. 20 – Výsledek SDS-elektroforézy na polyakrylamidovém gelu (8% separační) s vyznačenými zónami, které byly použity k analýze na hmotnostním spektrometru. Dráha 1 obsahuje finální preparát izolovaný Metodou IV, z něhož byla analyzována zóna A. Dráha 2 obsahuje finální preparát izolovaný Metodou I – analýza zóny B. Dráha 3 – izolovaný preparát Metodou III, zde byly analyzovány dvě zóny (C, D). Dráha 4 také obsahuje izolovaný preparát Metodou III, analyzovaná byla zóna E. Zóny vybrané k analýze obsahují protein s molekulovou hmotností odpovídající flagelinu (v oblasti okolo 50 kDa). Práci provedl pan doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.



Graf č. 1 – Výsledné MS spektrum analyzované z finálního preparátu izolovaného Metodou III – výše na polyakrylamidovém gelu popsáno jako zóna D. Analýza byla provedena PMF mapováním MALDI-TOF. Osa x – hodnota m/z iontů. Osa y – intenzita iontů. Práci provedl pan doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.

5 Diskuse

Jak již bylo popsáno výše, cystická fibrosa je onemocnění dědičného původu postihující celý organismus, díky mutaci CFTR kanálku. Tato mutace omezí výměnu elektrolytů, která vede k utváření hustého hlenu, mukusu, obzvláště v plicích. Tento mukus se stává ideálním prostředím pro patogenní bakterie, kterou je například bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Jedná se o patogenní, gram negativní bakterii, především nozokomiálního původu. PA obsahuje širokou škálu virulentních faktorů, mezi které rovněž patří bičík (flagellum)^{1, 33}. Právě na tento virulentní faktor, složený z flagelinu C (FliC), je tato práce zaměřena.

Cílem práce bylo izolovat flagelin z bičíků bakterie PA v co nejčistší podobě. Byly vybrány čtyři publikované metody (Metoda I, II, III a IV), které se používají k izolaci flagelinu ať už přímo z bakterie PA, či z jiných gram negativních bakterií^{34, 44, 45, 46, 47, 48}. Tyto metody byly reprodukovány a dále upravovány podle výsledků a dostupného laboratorního vybavení. K experimentům byl použit kontrolní kmen bakterie PA (PAK ST 1763).

Nejprve byla optimalizována kultivace bakterie PA, kdy bylo testováno, zda větší přídavek rozmražené bakteriální suspenze PAK k PS médiu (při kultivaci v inkubátoru) zvýší koncentraci bakterií po kultivaci. Avšak tato domněnka nebyla prokázána, protože množství bakterií byla velmi podobná bez ohledu na objem inokula. Tedy dále bylo pro kultivaci používáno nejnižší množství bakteriální suspenze PAK a to 10 µl.

Další optimalizace kultivace spočívala v porovnání kultivace v tekutém PS médiu a na LB agarové plotně. Zjišťovalo se množství bakterie, které narostlo při kultivaci a zároveň i množství bičíků. Podle vyhodnocení množství bakterií byla vyšší produkce pozorována v případě bakterií kultivovaných na tuhém LB agaru. Z toho vyplynulo, že bude výhodnější používat kultivaci právě na LB agaru, i přesto, že rozdíl nebyl viditelně dokázán SDS-elektroforézou.

Kultivace bakterie PA na agarové plotně byla taktéž optimalizována. A to tak, že byl navržen nový postup pro usnadnění přenosu bakterií z agaru do plastové zkumavky. Jelikož škrabkou se zdála práce neefektivní, byl na LB agar položen celofán, který měl seškrabávání ulehčit. Zvážení biomasy po seškrábání a následném měření absorbance resuspendované bakteriální hmoty dokazuje, že kultivace za využití celofánu nevedla ke

zvýšení výtěžku. Rozdíl není patrný ani na polyakrylamidovém gelu po SDS-elektroforéze.

Poslední optimalizací byl způsob homogenizace bakteriální suspenze, při které dochází k odlomení bičků od bakteriálních buněk. U metod II, III a IV byly využity dva mixéry: ruční mixér Rohson (mixér č. 1) a IKA® Ultra Turrax® Tube Drive dispergátor (mixér č. 2). Tyto dva mixéry se lišily jak celkovou konstrukcí, tak rychlostí otáčení nožů (viz obrázek č. 9 a č. 10 na straně č. 33). Výsledek na elektroforéze (viz obrázek č. 15 na straně 48) neprokazuje větší účinnost ani jednoho z nich.

První metodou využitou pro izolaci a purifikaci flagelinu byla metoda za snižování pH, Metoda I. Díky nízkému pH by měly být bičičky depolymerovány a tak uvolněny do rozpustné formy. V dalším kroku bylo pH opět zvýšeno, což umožnilo zpětnou polymeraci bakteriálního flagelinu. Nakonec byl flagelin ještě srážen síranem amonným. Reprodukované publikace^{44, 45, 46} popisují izolaci flagelinu z více druhů gram-negativních bakterií (především *Salmonella typhimurium*). Ve všech třech publikacích je ve výsledcích uváděna vysoká čistota purifikovaného proteinu, což bývá zobrazováno na polyakrylamidovém gelu z SDS-elektroforézy jako jeden proužek značícím daný protein FliC. V případě *Pseudomonas aeruginosa* se tento proužek na polyakrylamidovém gelu zobrazí v rozmezí 45-53 kDa.

V předkládané práci se flagelin FliC typu b podařilo Metodou I izolovat, což bylo také ověřeno hmotnostní spektrometrií. Izolovaný flagelin není tak čistý, jak je uváděno v případě izolace bičičku *Salmonella*, obsahuje příměsy jiných proteinů, což je patrné na polyakrylamidovém gelu (obrázek č. 16 na straně č. 49). Hlavními rozdíly mezi naším postupem a postupem publikovaným v práci Khani a Bagheri⁴⁶ byly především podmínky při centrifugaci, kdy po snížení pH byla bakteriální suspenze centrifugována při nižších otáčkách, aby se usadily pouze bakteriální buňky. Dále byla bakteriální suspenze srážena síranem amonným celou noc na rozdíl od publikace⁴⁶, kde je uváděno pouze 45 min.

Metoda II využívající chlorid hořečnatý ke srážení bakteriálních bičků nebyla úspěšná. Prováděna byla dle publikace od autorů Bucior, Pielage a Engel⁴⁷, kteří nemají ve své práci přímo zobrazeny výsledky z SDS-elektroforézy. Aplikace tohoto postupu v našich podmínkách však nevedla k požadovanému výsledku. Protein o molekulové hmotnosti odpovídající FliC se během druhé centrifugace (viz schéma provedení v odstavci 3.6.2) dostal do pelety. Nebyl tedy obsažen v supernatantu, z něhož měl být

srážen pomocí chloridu hořečnatého, což byl zásadní purifikační krok této metody. Na základě těchto výsledků jsme navrhli modifikaci postupu a jako Metodu III použili v dalších experimentech.

Metodou III byl úspěšně izolován flagelin FliC typu b. Postup této metody byl nejjednodušší a spočíval pouze v centrifugaci homogenizované směsi, přičemž byly buňky bakterií odděleny od bičíků, následovala dialýza proti PBS a druhá centrifugace, která v sedimentu poskytla finální preparát flagelinu. Při této metodě byl izolovaný vzorek nejčistší a také podle výsledků na SDS-elektroforéze se zdá nejkoncentrovanější. Přítomnost FliC typu b v izolovaném vzorku byla prokázána hmotnostní spektrometrií.

Poslední izolační postup, Metoda IV, byl založen na diferenční centrifugaci. I přesto, že ve výsledku jsou na polyakrylamidovém gelu vidět zóny a dalo by se tedy předpokládat, že se flagelin podařilo izolovat, hmotnostní spektrometrií nebyl flagelin ve vzorku prokázán. Jednalo se pouze o bakteriální aminopeptidasu. Není známo, co bylo příčinou negativního výsledku. Bylo postupováno podle publikací^{34,48}, pouze s rozdílem v otáčkách při centrifugaci. Montie, Craven a Holder⁴⁸ ve výsledcích na polyakrylamidovém gelu metodou SDS-elektroforézy uvádí izolovaný flagelin z bakterie PA o molekulové hmotnosti 53 kDa, který je na gelu vidět jako jednotná ostrá zóna. Kdežto vzorek izolovaný Metodou IV v této práci na polyakrylamidovém gelu obsahuje více zón a není zde vidět jediná ostrá zóna. Ani v průběhu izolace, kdy byly odebírány vzorky z pelet a supernatantů, nebyl na gelech flagelin patrný.

6 Souhrn

- Při kultivaci bakterií PA v PS médiu neměl na výsledek kultivace vliv objem přídavku rozmražené bakteriální suspenze PAK.
- Při kultivaci bakterie PA na LB agarové plotně neměl celofán vliv na výtěžek bakteriální biomasy.
- Bylo prokázáno, že kultivace bakterií PA na LB agarové plotně produkuje větší množství biomasy, než kultivace v tekutém PS médiu.
- Při porovnání mixéru Rohnson a IKA[®] Ultra Turrax[®] Tube Drive dispergátor z hlediska jejich účinnosti při odlamování bičíku nebyly pozorovány významnější rozdíly.
- K izolaci bakteriálního flagelinu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (PA) byly použity 4 metody: Metoda I, II, III a IV.
- Pouze Metodou I a III se podařilo připravit finální preparát obsahující flagelin FliC.

7 Seznam použité literatury:

- ¹ Vávrová, V.: *Cystická fibróza*. Praha, Grada Publishing a.s., 2006.
- ² Thomson, A.; Harris, A.; *Cystic Fibrosis*. Oxford: OUP Oxford, 2008.
- ³ Pronatal®: *Test genetické kompatibility* [on-line]. Dostupné z URL: <<https://pronatal.cz/cs/test-geneticke-kompatibility>> [cit 20. 11. 2020].
- ⁴ Welsh, M. J.; Sheppard D. N.: Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* **79**:1, 23-45, (1999).
- ⁵ Moran, O.: The gating of the CFTR channel. *Cell. Mol. Life. Sci.* **74**:1, 85–92 (2016).
- ⁶ Gadsby, D. C.; Nairn, A. C.: Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol. Rev.* **79**:1, 77-107 (1999).
- ⁷ Strub, M. D.; McCray Jr., P. B.; Transcriptomic and Proteostasis Networks of CFTR and the Development of Small Molecule Modulators for the Treatment of Cystic Fibrosis Lung Disease. *Genes.* **11**:5, 546 (2020).
- ⁸ Cystic fibrosis foundation: *Know Your CFTR Mutations*. [on-line] Dostupné z URL: <<https://www.cff.org/Care/Clinician-Resources/Network-News/August-2017/Know-Your-CFTR-Mutations.pdf>> [cit 18. 11. 2020].
- ⁹ BioNews Services, LLC: *Types of CFTR mutations*. [on-line] Dostupné z URL: <<https://cysticfibrosisnewstoday.com/types-of-cftr-mutations/?cn-reloaded=1&cn-reloaded=1>> [cit 18. 11. 2020].
- ¹⁰ Bouhamdan M.; Youming, X.; Sun, F.: Structure-Function Relationships of CFTR in Health and Disease: The Pancreas Story. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, (2018).
- ¹¹ CF-help: *The role of genetics*. [on-line] Dostupné z URL: <<https://cf-help.org/genetics>> [cit 2. 4. 2021].
- ¹² Lopes-Pacheco, M.: CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Front. Pharmacol.* **7**:275 (2016).
- ¹³ MUDr. Jakubec, P.: Cystická Fibróza. *Klinika plicních nemocí a tuberkulózy FN a LF UP, Olomouc*, **5**:235-239, (2006).
- ¹⁴ Klub cystické fribózy: *Stanovení diagnózy* [on-line] Dostupné z URL: <<https://klubcf.cz/o-cysticke-fibroze/o-nemoci/stanoveni-diagnozy/>> [cit 9. 10. 2021].
- ¹⁵ European Cystic Fibrosis Society: *The Early Cystic Fibrosis Years*. [on-line] © 2018. Dostupné z URL: <https://www.ecfs.eu/sites/default/files/publications-free-access-articles/01_ECFS%202018_Yearbook_MAI.pdf> [cit 5. 10. 2021].

-
- ¹⁶ Williams H. D.; Behrends, V; Bundy, J. G.; Ryall, B.; Zlosnik, J. E. A.: Hypertonic saline therapy in cystic fibrosis: do population shifts caused by the osmotic sensitivity of infecting bacteria explain the effectiveness of this treatment?. *Front. Microbio.* **1**:120 (2010).
- ¹⁷ Wilschanski, M.; Novak I.: The cystic fibrosis of exocrine pancreas. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.* **3**:5 (2013).
- ¹⁸ Tajovská, E.: Cystická fibróza a současné možnosti léčby pohledem farmaceuta [on-line]. *Nemocniční lékárna, FN Motol, Praha*, **9**:6, 234-239 (2013).
- ¹⁹ Kamal, N.; Surana, P.; Koh, Ch.: Liver disease in patients with cystic fibrosis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **34**:3, 146-151 (2018).
- ²⁰ Center for Liver Disease and Transplantation: *Cystic Fibrosis and the Liver* [on-line] Dostupné z URL: <<https://columbiasurgery.org/conditions-and-treatments/cystic-fibrosis-liver>> [cit. 23. 4. 2021].
- ²¹ Cystic fibrosis foundation: *Gene Therapy for Cystic Fibrosis*. [on-line]. Dostupné z URL: <<https://www.cff.org/Research/Research-Into-the-Disease/Restore-CFTR-Function/Gene-Therapy-for-Cystic-Fibrosis/>> [cit. 19. 4. 2021].
- ²² Griesenbach, U.; Alton, E. W. F. W.: Moving Forward: cystic fibrosis gene therapy. *Hum. Mol. Gen.* **22**:1, 52-58 (2013).
- ²³ Warnock, J. N.; Daigre, C.; Al-Rubeai, M.: Introduction to viral vectors. *Methods Mol. Biol.* **737**, 1-25 (2011).
- ²⁴ Klub cystické fibrózy: *CFTR modulátorová terapie*. [on-line] Dostupné z URL: <<https://klubcf.cz/o-cysticke-fibroze/lecba/nove-leky/cftr-modulatorova-terapie/>> [cit 9. 10. 2021].
- ²⁵ Lee, JA.; Cho, A.; Huang, E.N.; Xu, Y.; Quach, H.; Hu, J.; Wong, A. P.: Gene therapy for cystic fibrosis: new tools for precision medicine. *J. Transl. Med.* **19**:452 (2021).
- ²⁶ Sharma G.; Sharma A. R.; Bhattacharya, M.; Lee SS.; Chakraborty C.: CRISPR-Cas9: A Preclinical and Clinical Perspective for the Treatment of Human Diseases. *Mol. Ther.* **29**:2, 571-586 (2021).
- ²⁷ Šterzl, I.: *Základy imunologie pro zubní lékařství*. Praha 1, Ovocný trh 3, Nakladatelství Karolinum, 2007.
- ²⁸ Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň: *B lymfocyty* [on-line]. Dostupné z URL: <<https://uia.fnplzen.cz/sites/users/uia/21.3.2018.pdf>> [cit 1.12. 2021].
- ²⁹ Sompayrac, L.: *How The Immune System Works*. [on-line] Dostupné z URL: <[http://213.230.96.51:8090/files/ebooks/Biologiya/Sompayrac%20L.%20How%20the%20immune%20system%20works%20\(5ed.,%20Wiley,%202016\)\(ISBN%209781118997772\)\(C\)\(O\)\(160s\)%20B%20.pdf](http://213.230.96.51:8090/files/ebooks/Biologiya/Sompayrac%20L.%20How%20the%20immune%20system%20works%20(5ed.,%20Wiley,%202016)(ISBN%209781118997772)(C)(O)(160s)%20B%20.pdf)> [cit 2.12. 2021].

-
- ³⁰ Lab Guide Průvodce laboratoří: *Protílátky*. [on-line] Dostupné z URL: <<https://labguide.cz/protilatky/>> [cit 1. 12. 2021]
- ³¹ Curran, C. S.; Bolig, T.; Torabi-Parizi, P.: Mechanisms and Targeted Therapies for *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **197**:6, 708-727 (2018).
- ³² Centers for Disease: *Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa*. *Public Health Image Library (PHIL)*. [on-line] Obrázek dostupný z URL:<<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=16876>> [cit 21. 11. 2020].
- ³³ van Delden C.: *Virulence Factors in Pseudomonas Aeruginosa*. Springer [on-line]. Dostupné z URL: <https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4419-9084-6_1#citeas> [cit 21. 11. 2020].
- ³⁴ Campodónico, V. L.; Llosa, N. J.; Grout, M.; Döring, G.; Maira-Litrán, T.; Pier, G. B.: Evaluation of Flagella and Flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as Vaccines. *Infect. Immun.* **78**:2, 746-755 (2010).
- ³⁵ Montie, T.C.; Doyle-Huntzinger, D.; Craven, R. C.; Holder, I.: Loss of Virulence Associated with Absence of Flagellum in an Isogenic Mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the Burned-Mouse Model. *Infect. Immun.* **38**:3, 1296-8 (1982).
- ³⁶ Bouteiller, M.; Dupont, C.; Bourigault, Y.; Latour, X.; Barbey, C.; Konto-Ghiorgi, Y.; Merieau, A. *Pseudomonas* Flagella: Generalities and Specificities. *Int. J. Mol. Sci.* **22**:7, 3337 (2021).
- ³⁷ Fulano, M. A.; Shen, D.; Zhang, E.H.; Shen, X.; Chou, S.H.; Minamino, T.; Puopolo, G.; Qian, G.: Functional divergence of flagellar type III secretion system: A case study in a non-flagellated, predatory bacterium. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **18**, 3368-3376 (2020).
- ³⁸ Apel, D.; Surette, M. G.: Bringing order to a complex molecular machine: The assembly of the bacterial flagella. *BBA.* **1778**:9, 1851-1858 (2008).
- ³⁹ Song, W. S.; Yoon, S.: Crystal structure of FliC flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* and its implication in TLR5 binding and formation of the flagellar filament. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **444**:2, 109-115 (2014).
- ⁴⁰ Montie, T.C.; Anderson, T. R.: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Pseudomonas aeruginosa* H (Flagellar) antigen. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7**, 256-260 (1988).
- ⁴¹ Arora, S. K.; Bangera, M.; Lory, S.; Ramphal, R.: A genomic island in *Pseudomonas aeruginosa* carries the determinants of flagellin glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:16, 9342-9347 (2001).

-
- ⁴² Brimer, C. D.; Montie, T. C.: Cloning and comparison of *fliC* genes and identification of glycosylation in the flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* a-type strains. *J. Bacteriol.* **180**:12, 3209-3217 (1998).
- ⁴³ Vašková, M.: *Protilátky proti lektinu PA-III jako prostředek prevence bakteriálních infekcí u pacientů s cystickou fibrosou*. Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta. (2017).
- ⁴⁴ Hesse, W. R.; Luo, L.; Zhang, G.; Mulero, R.; Cho, J.; Kim, M. J.: Mineralization of flagella for nanotube formation. *Mat. Sci. Eng.* **29**:7, 2282-2286 (2009).
- ⁴⁵ Ibrahim, G. F.; Fleet, G. H.; Lyons, M. J.; Walker R. A.: Method for the isolation of highly purified *Salmonella* flagellins. *J. Clinl. Microbiol.* **22**:6, 1040-1044 (1985).
- ⁴⁶ Khani, M. H.; Bagheri, M.: Introducing a cost-effective method for purification of bioactive flagellin from several flagellated gram-negative bacteria. *Protein. Expr. Purif.* **155**, 48-53 (2018).
- ⁴⁷ Bucior, I.; Pielage, J. F.; Engel, J. N.: *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. *PLoS. Pathog.* **8**:4 (2012).
- ⁴⁸ Montie, T. C.; Craven, R. C.; Holder, I. A.: Flagellar preparations from *Pseudomonas aeruginosa*: Isolation and characterization. *Infect. Immun.* **35**:1, 281-288 (1982).
- ⁴⁹ Berkelman, T.; Sun, Ch.: *Mini-PROTEAN® TGX™ Gel: A versatile and robust laemmli-like precast gel for SDS-PAGE*. [on-line] Dostupné z URL: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5911A.pdf> [cit 16.12. 2021].
- ⁵⁰ 2021 Merck KGaA: *Introduction to SDS-PAGE – separation of proteins based on size*. [on-line] Dostupné z URL: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/protocol/protein-biology/gel-electrophoresis/sds-page?gclid=Cj0KCQjw8rT8BRCbARIsALWiOvT_7MkDSWeeHmd3R2xKCNUZISXiGT3du3RaHl78IKbrvju_G_-B4rEaAh0oEALw_wcB> [cit 28.12. 2021].
- ⁵¹ Musil, D.: *Analýza posttranslačních modifikací proteinů hmotnostní spektrometrií*. Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta. (2019).
- ⁵² Dle ústního sdělení v rámci přednášky Metody studia biomolekul panem doc. RNDr. Miroslavem Šulcem, Ph.D. (Přírodovědecká fakulta, Karlova Univerzita) dne 5. února 2021
- ⁵³ Broad Institute: *What is mass spektrometry?* [on-line] Dostupné z URL: <<https://www.broadinstitute.org/technology-areas/what-mass-spectrometry>> [cit 28.12. 2021].
- ⁵⁴ Lékařská fakulta UP: *Hmotnostní spektrometrie*. [on-line] Dostupné z URL: <http://old.lf.upol.cz/fileadmin/user_upload/LF-kliniky/hippokrat/Pracoviste/UMTM/02_Hmotnostni_spektrometrie.pdf> [cit 28.12. 2021].

⁵⁵ Matrix Science: *Mascot search overview*. [on-line] Dostupné z URL:
<http://www.matrixscience.com/search_intro.html> [cit 8.1. 2022].

Příloha:

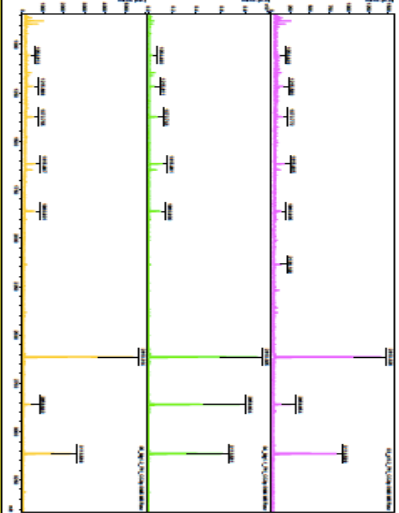
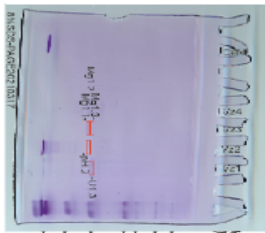
Výsledek hmotnostní spektrometrie vzorků z Metody I, III a IV. Zpracoval pan doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.

Paeruginosa flagellin/sequences confirmation and posttranslational/purification processing

Name: **Comp** TelNum: **Email**
 PA: **PRUK** 221601285 hook: **Total CZK**
 Address: **PH** **ICO** **Total CZK**

Date: **MS** **pathway** **sample name**
 18.03.2021 Ulex: **dataMS20210318_PH_CoM**

02_U1.3_PH_CCoAp 945.512 402-408
 03_pH.2_PH_CCoAp pH.2/PT PH flagel 89PAGE20210317 notCER-P4AA - CCA ol pos 1316.623 74-80
 04_Mg1.1_PH_CCoAp Mg1.1/PT PH flagel 89PAGE20210317 notCER-P4AA - CCA ol pos 1349.813 48-80
 05_Mg1.2_PH_CCoAp Mg1.2/PT PH flagel 89PAGE20210317 notCER-P4AA - CCA ol pos 1358.609
 06_Mg1.3_PH_CCoAp Mg1.3/PT PH flagel 89PAGE20210317 notCER-P4AA - CCA ol pos 1366.623 411-422
 11_U1.3_LIFT_PH_CCoAp 1653.793 409-422
 12_Mg1.1_LIFT_PH_CCoAp 1760.958
 2246.09 203-225
 2374.126 203-226
 2498.180 423-446
 3967.857 124-158
 4009.851 394-401
 4025.91 394-401Mox



02_U1.3_PH_CCoAp	03_pH.2_PH_CCoAp	04_Mg1.1_PH_CCoAp	05_Mg1.2_PH_CCoAp	06_Mg1.3_PH_CCoAp
832.425	1054.449	877.023	1054.613	945.465
945.512	1144.506	1054.49	126-135	402-408
1316.623	1159.462	1144.557	225-235	1144.610
1349.813	1215.611	1159.556	43-53	1159.691
1358.609	1312.772	1215.611	115-125	1215.688
1366.623	1372.743	1372.743	54-66	1372.755
1653.793	1615.835	1615.861	2-16, N-term	1615.887
1760.958	1646.704	1646.774	17-31	1646.824
1807.899	1880.905	1880.9	429-444	1880.901
2246.09	2613.326	2599.211	16st of CH3	2246.054
2374.126	2688.604	2613.306	67-91	203-226
2498.180	3113.581	2858.640	462-488, C-term	2374.174
3967.857	3113.581	3113.561	395-413	2498.180
3772.882	3113.581	3113.561	395-413	423-446
4009.851	394-401	394-401	394-401	394-401
4025.91	394-401Mox	394-401	394-401	394-401

U1.3 sequence coverage

1 HNRDRIEYK LKALAEVFA AALAAERED QTEVETIK PIREICSEIK

51 SVTETGIDRFL CLQGNTEIK LQLEIDAKI NQNRKALIK GYQKSTVTR
 100 QTLQAEHIV SVQEFETIV YRGGGSLA TYVQVTTIK EDQFTLLSGT
 151 EADQVIAIV PVLSSGRIH TSSGSEED FAREPESLTA LIDQSTQNR
 201 QSRDADAKI AAVPTTIRH YTRDQKILAI VTRDQTEPQ IYVATVTRH
 251 GYVQVETEL QALIVVTR KRETTIVVA ETRGSRIVV VQAKLQVQ
 301 FRRGRIHQH SSGAKLQVA VLAQALIVV VTRVWQAE EKVQVQETIK
 351 VQVLAEEER KIKATIKTRH IGRTRVTRT YDQGGVQEL GQRRSALIK
 401 KLVAVYIA GQQRREIHD FRSQVAFIV SGIIVAGLIT GAKLITKEDQ
 451 KQKQVQVQR AIDQCRHQH DQALINQVA LEIHEQAKF VTRKSLSTK
 501 VTRDRIADK QSRASQELKH QSRASQELKH GQKATIKTRH GQKTRIK

Mg1.1 sequence coverage

1 KATVYVTKA SIVYQVAKA SQRDQVTKA KETIQVTRIK ATRDQAKQGT
 51 SRRLLQVIGL LRVYVQAD QIQLAQVAK AKQQRVLIQ RRRLLQLQSA
 101 HNRDRIEYK LKALAEVFA AALAAERED QTEVETIK PIREICSEIK
 151 SVTETGIDRFL CLQGNTEIK LQLEIDAKI NQNRKALIK GYQKSTVTR
 201 QTLQAEHIV SVQEFETIV YRGGGSLA TYVQVTTIK EDQFTLLSGT
 251 GYVQVETEL QALIVVTR KRETTIVVA ETRGSRIVV VQAKLQVQ
 301 FRRGRIHQH SSGAKLQVA VLAQALIVV VTRVWQAE EKVQVQETIK
 351 VQVLAEEER KIKATIKTRH IGRTRVTRT YDQGGVQEL GQRRSALIK
 401 KLVAVYIA GQQRREIHD FRSQVAFIV SGIIVAGLIT GAKLITKEDQ
 451 KQKQVQVQR AIDQCRHQH DQALINQVA LEIHEQAKF VTRKSLSTK
 501 VTRDRIADK QSRASQELKH QSRASQELKH GQKATIKTRH GQKTRIK

MASCOT search RESULTS

Protein	MALDI-TOF data	Protein Name [Organism]	Protein Number	MW (kDa)	pI	Mowse score	Significant hit	Sequence coverage (%)	matched/total peptides	Error of base	Comment No match to
U1.3/PT	U1.3_PH_CCoAp	Aminopeptidase OS=Pseudomonas aeruginosa	LIP_P9EAB	57.85	3.02	138	32%	32%	12/18	30ppm	1358.650, 1760.958, 1807.899, 2913.570, 3677.857
pH.2/PT	pH.2_PH_CCoAp	B-type flagellin OS=Pseudomonas aeruginosa	FLCB_P9EAE	48213	05.1V	156	38%	11/13	30ppm	877.023, 2599.211	
Mg1.1/PT	g1.1_PH_CCoAp	B-type flagellin OS=Pseudomonas aeruginosa									
Mg1.2/PT	g1.2_PH_CCoAp	B-type flagellin OS=Pseudomonas aeruginosa									
Mg1.3/PT	g1.3_PH_CCoAp	Aminopeptidase OS=Pseudomonas aeruginosa									

RESULT 5 protein bands P.aeruginosa were analysed from 8kPAGE CBB R-250 stained

in all analyzed protein bands were detected peptides and proteins were identified using PMF Mascot search with MS/MS confirmation of selected m/z signals (Bolt)
 U1.3 confirmed Aminopeptidase OS=Pseudomonas aeruginosa with sequence coverage 47-483
 pH.2 confirmed B-type flagellin OS=Pseudomonas aeruginosa with sequence coverage 2-461
 Mg1.1 confirmed B-type flagellin OS=Pseudomonas aeruginosa with sequence coverage 2-488
 Mg1.2 confirmed B-type flagellin OS=Pseudomonas aeruginosa with sequence coverage 2-481
 Mg1.3 Aminopeptidase OS=Pseudomonas aeruginosa probably modification on C-term (higher MW on SDS-PAGE)
 in analyzed protein bands no modification of Cys (TCEP reduction and IAA modification) was employed, but 6 Cys are presented in aminopeptidase sequence (no detection of the peptides including Cys)