

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Diplomová práce

Praha 2009

Barbora Fliedrová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Diplomová práce

Optimalizace kultivačních podmínek *Pseudallescherie boydii* a analýza jejích sekretovaných proteinů

Optimalization of *Pseudallescheria boydii* cultivation and analysis of secreted proteins

Vypracovala:

Barbora Fliedrová

Obor:

Klinická a toxikologická analýza

Školitel diplomové práce:

Mgr. Jan Sklenář, PhD.

Vedoucí diplomové práce:

Prof. RNDr. Karel Bezouška, DSc.

Vypracováno v Laboratoři charakterizace molekulové struktury MBÚ AV ČR

Praha 2009

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Mgr. Jana Sklenáře, PhD. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 30. dubna 2009

.....
Barbora Fliedrová

Barbora Fliedrová

Poděkování

Na této stránce bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za možnost pracovat na této diplomové práci. Dále děkuji svému školiteli Mgr. Janu Sklenáři, PhD. za vedení diplomové práce, ochotu a pomoc. Poděkování také patří Doc. Ing. Vladimíru Havlíčkovi CSc. za možnost vypracovávat diplomovou práci v Laboratoři charakterizace molekulové struktury MBÚ AV ČR, Mgr. Danielu Kavanovi za pomoc při práci v laboratoři a při grafické úpravě této diplomové práce a mé díky také patří celému kolektivu laboratoře charakterizace molekulové struktury za poskytnutí dobrého pracovního zázemí a ochotu kdykoli poradit a pomoci.

Celá práce byla umožněna díky financování z grantu č. 310/08/P58 Grantové agentury České Republiky.

1 Obsah

1	OBSAH	5
2	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
3	ÚVOD	8
4	TEORETICKÁ ČÁST	9
4.1	EUMYCOTA – HOUBY VLASTNÍ (<i>FUNGI</i>).....	9
4.1.1	<i>Nepohlavní rozmnožování</i>	10
4.1.2	<i>Pohlavní rozmnožování</i>	10
4.1.3	<i>Ascomycota – vřeckovýtrusé houby</i>	10
4.2	<i>PSEUDALLESCHERIA BOYDII</i>	13
4.2.1	<i>Infekce způsobené P. boydii</i>	14
4.2.2	<i>Diagnostika</i>	15
4.3	HOUBAMI SEKRETOVANÉ PROTEINY	16
5	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	17
6	PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE A MÉDIA	18
6.1	PŘÍSTROJE	18
6.2	CHEMIKÁLIE.....	19
6.2.1	<i>Chemikálie</i>	19
6.2.1	<i>Roztoky a pufry</i>	20
6.3	MÉDIA.....	21
7	SEZNAM KMENŮ	22
8	METODY	23
8.1	OPTIMALIZACE KULTIVAČNÍCH PODMÍNEK PRO <i>PSEUDALLESCHERII BOYDII</i>	23
8.1.1	<i>Příprava spor</i>	23
8.1.2	<i>Kultivace P. boydii</i>	23
8.2	OPTIMÁLNÍ METODA NA PŘÍPRAVU VZORKŮ PRO SDS ELEKTROFORESU	24
8.2.1	<i>Srážení proteinů síranem amonným</i>	24
8.2.2	<i>Srážení proteinů acetonem</i>	24
8.2.3	<i>Dialýza s následnou lyofilizací</i>	25
8.2.4	<i>Ultrafiltrace</i>	25

8.2.5	<i>Iontově výměnná chromatografie</i>	25
8.2.6	<i>Chromatografie s hydrofobní interakcí</i>	26
8.2.7	<i>Chromatografie s reverzní fází</i>	27
8.2.8	<i>Ultracentrifugace</i>	27
8.3	ELEKTROFORETICKÉ METODY	28
8.3.1	<i>Proteinová elektroforesa na polyakrylovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)</i>	28
8.4	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	29
8.4.1	<i>Příprava vzorků pro hmotnostní spektrometrii</i>	30
9	VÝSLEDKY	32
9.1	KULTIVACE <i>PSEUDALLESCHERIE BOYDII</i> A PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO SDS-PAGE	32
9.1.1	<i>Sporulace</i>	32
9.1.2	<i>Výběr tekutého produkčního média</i>	32
9.1.3	<i>Příprava vzorků pro SDS-PAGE</i>	33
9.1.4	<i>Porovnání všech kultivovaných kmenů na základě jejich proteinů sekretovaných do média, sporulace a makroskopického popisu</i>	36
9.2	IDENTIFIKACE PROTEINŮ POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	41
9.2.1	<i>Identifikované proteiny</i>	42
10	DISKUZE	44
10.1	KULTIVACE <i>P. BOYDII</i> A PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO SDS-PAGE	44
10.2	POROVNÁNÍ KMENŮ	47
10.3	PROTEINY IDENTIFIKOVANÉ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ.....	48
11	ZÁVĚR	49
12	PŘÍLOHA	50
13	SEZNAM LITERATURY	51

2 Seznam použitých zkratk

AcN	acetonitril
APS	persíran amonný
CBB	Coomasie Brilliant Blue
CD	Czapkovo médium
CS	Corn steep médium
DTT	dithiothreitol
ER	endoplazmatické retikulum
EtMF	ethylmorfolin
EtOH	ethanol
HAc	kyselina octová
HIC	chromatografie s hydrofobní interakcí
IAA	jodacetamid
IEC	iontoměničová chromatografie
MeOH	methanol
OA	Oatmeal agar
PDA	Potato-dextrose agar
RPC	chromatografie s reverzní fází
SB	Sabouraudovo médium
SBA	Sabouraudův agar
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforesa v prostředí SDS
SPITC	4-sulfofenyl isothiokyanát
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenethylendiamin
TFA	kyselina trifluoroctová
Tris	tris-hydroxymethyl-aminomethan

3 Úvod

Houby patří mezi nejrozšířenější eukaryotické heterotrofní organismy na světě. Vyskytují se v půdě, vzduchu, sladkých vodách i v mořích. Jako heterotrofní organismy získávají živiny přímo z živých (parazitismus) nebo odumřelých (saprofytismus) buněk rostlin, živočichů nebo jiných druhů hub. Některé tvoří symbiózu s autotrofními rostlinami, ať již cévnatými (mykorhiza) nebo bezcévnými (lichenismus). Jejich význam pro člověka je obrovský v kladném i záporném smyslu. Jsou to producenti nejrůznějších látek (antibiotik, růstových regulátorů či stimulátorů, feromonů). Svými kvasnými schopnostmi jsou nepostradatelné v potravinářství. Na straně druhé způsobují řadu rostlinných i živočišných infekcí a v neposlední řadě existují druhy, které produkují mykotoxiny (toxické cyklické peptidy, fenoly, terpenoidy, polysacharidy, glykoproteiny) většinou jako produkty sekundárního metabolismu. Je popsáno kolem 70000 – 75000 druhů hub, asi 300 z nich jsou známy jako příčiny lidských infekcí.¹

Houbové patogeny se rozdělují na primární např. *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* a oportunní např. *Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium marneffei*, *Trichosporon beigeli*, *Fusarium* spp.² Primární jsou schopny rozvinout infekci u zdravých jedinců, zatímco oportunní patogen potřebuje k rozvinutí infekce oslabeného hostitele (např. rakovina, transplantace orgánů, operace, AIDS). Primární houbové patogeny se dostávají do těla hostitele přes dýchací ústrojí. Oportunní houby způsobují mykózy například přes dýchací trakt, zažívací ústrojí, intravaskulární systém nebo sliznice.

Pro zdravého jedince nepředstavují oportunní houbové infekce riziko ve smyslu ohrožení života, avšak v posledních letech jsou rostoucím problémem kvůli nadměrnému používání antibakteriálních a imunosupresivních látek. Jedinci s pozměněnou mikroflórou nebo s poškozenými obrannými mechanismy jsou náchylnější k rozvinutí oportunní houbové infekce, jako je například kandidóza nebo aspergilóza, než zdraví lidé.²

Tato diplomová práce se zabývá *Pseudallescherii boydii*, která patří mezi oportunní patogeny.

4 Teoretická část

4.1 Eumycota – houby vlastní (*Fungi*)

Dělí se na *Chytridiomycota*, *Microsporidiomycota*, *Zygomycota* (spájkivé houby), *Ascomycota* (vřeckovýtrusé houby), *Glomeromycota*, *Bazidiomycota* (stopkovýtrusé houby).³ U oddělení *Chytridiomycota* a *Microsporidiomycota* tvoří vegetativní stélku jediná buňka. U zbylých oddělení je vegetativní stélka tvořena vláknitými hyfami (myceliem).

Výjimečně může být tvořena jednotlivými, nepravidelně laločnatými buňkami nebo kulovitými buňkami se schopností tvorby pseudomycelia vzniklého pučením. U některých se mohou objevit přehrádkované hyfy (hyfa je rozdělena na vícejaderné, dvoujaderné či jednojaderné úseky).

U většiny zástupců je přítomna buněčná stěna, která je tvořena různými polysacharidy, bílkovinami a tuky. Chemické složení buněčných stěn není zcela jednotné. Hlavní polysacharidovou složku tvoří chitin a chitosan nebo chitin a $\beta(1-3,6)$ -glukan nebo chitin a β -mannan. U některých skupin je chitin nahrazen glykosaminoglykanem. V nepatrném množství u některých skupin byla v buněčné stěně zjištěna celulóza.

Většina hub tvoří pohlavní a nepohlavní stádia. Stádium houby sloužící k pohlavnímu rozmnožování je označováno jako teleomorfa (perfektní forma). Naproti tomu při nepohlavním způsobu rozmnožování předchází tvorbě spor pouze mitotické dělení. Stádium houby, jež je nositelem nepohlavního způsobu rozmnožování je tzv. anamorfa (imperfektní forma, vedlejší rozmnožovací forma, konidiové stádium). Obě stádia jsou od sebe časově a ekologicky oddělená. V systému hub lze rozlišit i skupinu mikromycet, u kterých pohlavní způsob rozmnožování nebyl pozorován. Takovou skupinu hub označujeme jako tzv. houby nedokonalé (*Fungi imperfekti*) s nepohlavním způsobem rozmnožování pomocí konidií.

4.1.1 Nepohlavní rozmnožování

Nepohlavní rozmnožování u hub je velmi významné a u řady druhů představuje dominantní způsob rozmnožování. Cyklus nepohlavního rozmnožování může proběhnout několikrát během vegetační sezóny a jeho výsledkem je vznik velkého množství jedinců, což je důležité zvláště u parazitických druhů.

Nepohlavní rozmnožování může probíhat jak na haploidním, tak i na dikaryotickém myceliu. Kromě fragmentace hyf nebo stélky dochází ke tvorbě nepohlavních spor. Z morfologického hlediska mohou mít spory rozličný tvar, velikost, barvu, mohou být jedno či vícebuněčné a mohou vznikat jednotlivě, v menším či větším počtu. Spory vznikají buď endogenně ve sporangíích tzv. sporangiospory nebo endogenně či exogenně na specializovaných hyfách, označovaných jako konidiofory, pak se nazývají konidie (konidiospory). Konidiofory se nacházejí izolovaně na různých místech na myceliu nebo se mohou seskupovat v určité útvary, které mohou morfologicky připomínat plodnice hub.

4.1.2 Pohlavní rozmnožování

Pohlavní rozmnožování je spojeno se změnou ploidie. Nejprve dochází k plazmogamii (splývají protoplasty buněk) za vzniku dvoujaderné fáze vývoje (dikaryofáze), ta může být různě dlouhá. Pak dochází ke splývání jader – karyogamii. Následuje meioza a vznik meiospor.

4.1.3 *Ascomycota* – vřeckovýtrusé houby

Je rozdělena na tři pododdělení: *Taphrinomycotina*, *Saccharomycotina*, *Pezizomycotina*. Rozsáhlá skupinu hub, která je vybavena dostatečným spektrem enzymů, aby mohla rozkládat i složité organické polymery biologického původu (např. keratin – keratofilní houby, mezi nimiž je řada fakultativních patogenů i člověka; dřevo – lignikolní houby). Osídlují nejrozmanitější biotopy, kde se vyživují saprofyticky na opadu rostlin, na výkalech (koprofilní houby) a na mrtvých živočiších. Je znám druh, který je schopný využívat také letecký benzín (*Amorphotheca resinae*), objevil se v nádržích US letectva v Indonézii. Z řady specializovaných forem zmiňme kvasinky, které mohou osídlivat například kapalná prostředí s dostatkem živin (mízotok rostlin, vnitřní prostředí teplokrevných živočichů, kde parazitují). Velké množství druhů žije paraziticky na rostlinách, houbách i živočiších (původce zápalu plic u lidí s oslabenou imunitou – *Pneumocystis carini*). Vstupují do mutualistických symbióz:

lichenizované houby, mykorhizní houby, endofyti (zde mohou mít význam jako ochrana pletiv proti UV záření, proti spásání býložravci nebo zlepšují vodní režim rostlin). Endofyt v oslabených rostlinách nebo jejich částech začíná působit jako parazit a přispívá k odumření rostliny. Někteří zástupci jsou součástí sladkovodních i mořských ekosystémů, kde rozkládají rostlinný odpad, dřevo nebo parazitují na živočiších a vodních rostlinách.

U saprofytických druhů je stélka tvořena bohatě větveným mycéliem, které se rozrůstá v substrátu.

Nepohlavní rozmnožování se uskutečňuje nejčastěji pomocí nejrůznějších typů konidií, dělením a fragmentací stélky. Při pohlavním rozmnožování dochází ke vzniku dikaryotických hyf (hyfy, jejichž buňky obsahují dvě jádra), tvořících plodnice (askomata). Základními typy plodnic jsou kleistothecium, perithecium a apothecium. Terminální buňky dikaryotických hyf se stávají meiosporangii tj. přeměňují se na vřecko. Vřecka jsou charakterizována dle struktury jejich stěny. Rozlišujeme protunikátní vřecka (mají tenkou jednovrstevnou stěnu bez otevíracího aparátu, spory jsou uvolňovány rozpadem nebo zeslizováním stěny, nedochází k aktivnímu vymršťování spor, nýbrž k jejich pasivnímu rozptýlení v prostoru plodnice a jejím okolí), unitunikátní vřecka (mají dvouvrstvou stěnu, členěnou na exoaskus a endoaskus, spory jsou z vřecka uvolňovány aktivně pórem či štěrbinou na vrcholku vřecka) a bitunikátní vřecka (dvouvrstvé, při dozrání spor praskne tuhý exoaskus, pružný endoaskus vyhřeze a prodlouží se o délku vřecka, potom dojde k uvolnění spor askoapikálním aparátem). V mladém vřecku dochází ke karyogamii. Následující meiózou a mitózou vzniká obvykle osm haploidních jader, které po obklopení plazmou a buněčnou stěnou představují endogenně vzniklé haploidní askospory.¹

4.1.3.1 *Sordariomycetes*

Řadí se do pododdělení *Pezizomycotina*. Třída, ve které jsou řády charakterizovány peritheciálním, někdy kleistotheciálním askomatem. Mohou být nazývány pyrenomycety. Mají vejčitá nebo válcovitá vřecka, která se tvoří na askogenních hyfách v hymeniu nebo jsou rozptýlena v askomatu. Mají jedno nebo několikabuněčné askospory různého tvaru. Charakteristické jsou pro ně rozmanité a často složité anamorfy a příbuzné konidiální druhy, které se nerozmnožují sexuálně. V této skupině se vyskytují endofyti, paraziti rostlin, mykoparaziti, vektory virů (některé houby mohou být infikovány a přenášet extragenomické faktory, jako jsou

viry, např. *Cryptonectria parasitica* přenáší dsRNA), producenti toxinů a patogeni člověka (člověk může být infikován mnoha saprofytickými houbami tehdy, dojde-li ke snížení jeho imunity z různých příčin). Z pyrenomycetů jsou pro člověka patogenní druhy z řádů *Ophiostomatales* a *Microascales*).

4.2 *Pseudallescheria boydii*

Taxonomické zařazení

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>, 25.3 2009)

Doména:	<i>Eucaryota</i>
Říše:	<i>Fungi</i>
Oddělení:	<i>Ascomycota</i>
Třída:	<i>Sordariomycetes</i>
Řád:	<i>Microascales</i>
Čeleď:	<i>Microascaceae</i>
Rod:	<i>Pseudallescheria</i>
Druh:	<i>Pseudallescheria boydii</i>

Pseudallescheria boydii (anamorfa *Scedosporium apiospermum*) je celosvětově rozšířená saprofytická houba, byla identifikována při celé řadě lidských infekcí které mohou ovlivnit prakticky všechny orgány v těle.⁴

Je známá svým dobrým růstem v prostředí, kde může využít svoji schopnost rozkládat alkany a přežít v podmínkách s nedostatkem kyslíku.^{5,6} Hlavní ekologickou nikou jsou zemědělsky vytížené oblasti nebo průmyslové plochy, které svým znečištěním dovolují houbám vyvinout si vyšší virulenci bez nebezpečí ohrožení vlastní existence. Bohužel však nejsme ani s těmito znalostmi schopni popsat niku *P. boydii* dostatečně přesně, abychom mohli odhadnout riziko nákazy.^{7,8} To je navíc ztíženo i vysokým stupněm genetické různorodosti a s tím související objevující se počet nových poddruhů *P. boydii*. Jeden z nejtypičtějších rysů tohoto druhu je jeho schopnost vyvinout sexuální struktury na obvyklých kultivačních mediích. Přítomnost kulovitých askomat (kleistothecium) a větvenovitých nebo elipsoidních askospór dovolí snadnou identifikaci tohoto druhu a jeho diferenciaci od jiných druhů scedosporia (*S. prolificans*), jejichž pohlavní stádia zůstávají neznámá.^{9,10} Na základě jaderné DNA-DNA reasociace některé studie prokázaly existenci významné genetické rozmanitosti *P. boydii*, byly objeveny tři intraspecifické (specifické uvnitř druhu) ekologické a klinické skupiny¹¹ a byla objevena existence pěti různě dlouhých rRNA malých podjednotek ribozómů.¹² Pokusy s náhodně amplifikovanou polymorfní DNA prokázaly existenci četných odlišných genotypů, mnozí autoři navíc poukazují na významné rozdíly v růstu a sporulaci.⁹ Při klinických studiích se rovněž ukazuje velmi rozdílná citlivost pacientů vůči různým izolátům.^{13,14}

Na čtyřech různých DNA sekvencích byly analyzovány a studovány fylogenetické vztahy a druhové hranice uvnitř komplexu druhů *P. boydii*. Až donedávna převládal názor, že geny *Pseudallescherie* zahrnují následujících sedm druhů: *P. africana*, *P. fusioidea*, *P. angusta*, *P. boydii*, *P. desertorum*, *P. ellipsoidea*, *P. fimeti*. Všechny tyto druhy jsou morfologicky velmi podobné, jejich rozlišování je založeno na velikosti kleistothencia a askospór. Nedávno Rainer¹² použitím různých molekulárních technik popsal, že *P. fusioidea*, *P. ellipsoidea* a *P. angusta* jsou pravděpodobně synonyma *P. boydii* ovšem ve studii F. Gilgada a kol.⁹ jsou zahrnuty typické kmeny těchto tří druhů a výsledky potvrdily, že všechny z nich jsou geneticky a morfologicky odlišné od *P. boydii*. Zkoumali také velký počet fylogenetických druhů, ale pouze dva z nich mohou být zřetelně rozlišeny morfologicky.

Všechny tyto objevy dávají podnět k tomu, že *P. boydii* je pravděpodobně komplex druhů. V posledních letech aplikace konceptu fylogenetických druhů v rozdílných biologických druzích patologických hub odhalila fylogenetické vztahy, které odrážely druhovou rozdílnost a existenci skrytých druhů. Tyto domnělé skryté druhy *P. boydii* mohou vykazovat různé patologické chování a různou antifungální citlivost. Pro správné léčení agresivních infekcí způsobených těmito houbami je klíčové stanovení hranic druhů a jejich charakterizace.

4.2.1 Infekce způsobené *P. boydii*

Tyto infekce jsou známé již dlouhou dobu, ale v posledních letech byl zaznamenán vyšší počet agresivních infekcí u lidí s potlačenou imunitou, kde byla následkem infekce smrt.⁹ Infekce způsobené *P. boydii* jsou známy jako pseudallescheriasy a klasifikovány jako přízpusobivé systémové mykózy.^{15, 16} Infekce probíhá obvykle cestou inhalace výtrusů, po inhalaci výtrusů roste houba uvnitř tkáně, působí odumírání a absces. Byl zaznamenán případ mozkové infekce po tonutí v kontaminované vodě.¹⁷ Kapénková infekce vede k zápalu plic. Ve schopnosti kolonizovat průduškový strom a tvořit houbové koule v plicní a paranasální dutině se *P. boydii* podobá *Aspergillu*. *P. boydii* je jeden z původců bílého vláknitého mycetomu a také způsobuje infekce v dalších orgánech (mozek, oko, klouby, močová trubice atd.) nejčastěji jsou infikováni lidé se sníženou imunitou v důsledku transplantace orgánů, onemocnění AIDS nebo pacienti po chemoterapii. Navzdory řídkému výskytu ve vzduchu je u vnímavých pacientů četnost výskytu *P. boydii* v plicích velmi vysoká. S 8,6 % je to druhá nejběžnější vláknitá houba v plicích pacientů s cystickou fibrózou.¹⁸

U infekcí způsobených *P. boydii* je alarmující úmrtnost, která dosahuje až 70 %.¹⁵ *P. boydii* je na rozdíl od *Aspergillu* odolná proti nejčastěji předepisovanému léku amphotericinu B. Nejefektivnější lék se zdá být voriconazol, často předepisovaný v empirických směsích s ostatními antimykotickými léky.

Výzkumné týmy zabývající se tímto patogenem odráží jeho výskyt. Nejvíce je studován v Brazílii, Španělsku, Francii a USA. Nedávné objevení případu pseudallescheriasy v Rakousku a na Slovensku by měla přitahovat naši pozornost.¹⁹

4.2.2 Diagnostika

Pro správnou diagnózu, kultivaci a mikroskopii jsou nutné klinické vzorky (biopsie). Hyfy se podobají *Aspergillu* což vede k možným záměnám, stejně jako u agresivní aspergilózy mohou být přítomny intravaskulární hyfy, v infikovaných tkáních se mohou objevit i přehrádkované hyfy. Klasické diagnostiky se spoléhají na zřetelnou morfologii sexuálních orgánů (kleistothecium), které bohužel nejsou přítomny v klinických vzorcích, ale až po několikátýdenní kultivaci *P. boydii*, ale ne v *S. apiosmermum*. Další faktor který přispívá k diagnostickým chybám je pomalý růst *P. boydii* v ko-kulturách s *Aspergillus sp.* Jako první se může jevit *A. fumigatus* a následně potom *P. boydii*. Takto může být *P. boydii* přehlédnuta. Poslední problém metod klasické mikrobiologie je pomalá rychlost kultivací a obtížné rozlišení kolonizace od symbióz.

4.3 Houbami sekretované proteiny

Vysoká kapacita sekrečního mechanismu hub je široce využívána pro produkci homolytických a heterolytických proteinů. Sekretované proteiny začínají svoji cestu do extracelulárního média v endoplazmatickém retikulu (ER). V ER jsou proteiny skládány za vzniku jejich prostorové struktury, která dále bývá modifikována glykosylací, tvorbou disulfidických můstků, fosforylací či navázáním podjednotek. Postupně proteiny opouštějí ER sbalené v transportních váčcích a směřují do Golgiho aparátu, kde mohou být dále modifikovány. Dále jsou shromážděny do váčků a směřovány přes cytoplazmatickou membránu a buněčnou stěnu, což je proces označovaný jako sekrece. V některých případech proteiny nejsou sekretovány do extracelulární tekutiny, ale míří do intracelulárních organel, například vakuol, kde se stanou trvalými proteiny nebo podstoupí proteolýzu.²⁰

Mezi sekretovanými proteiny nacházíme především trávicí enzymy sloužící k degradaci složitých látek na jednodušší, které jsou buňky schopny přijmout a metabolizovat, dále pak různé ochranné proteiny (antibiotika, inhibitory proteáz) a proteiny sloužící buňkám ke komunikaci s prostředím.

5 Cíle diplomové práce

Cílem celého projektu je charakterizace sekretovaných proteinů patogenní houby *Pseudallescheria boydii* pomocí metod proteomiky a hmotnostní spektrometrie. Mykózy představují značné nebezpečí pro pacienty procházející imunodeficiencí. Druh *Pseudallescheria* je původcem mykóz u těchto pacientů a předpokládá se, že díky nedokonalé diagnostice je četnost výskytu tohoto pathogenu podceněna. Současné diagnostické metody (RTG, ELISA, kultivace) neposkytují výsledky dostatečně rychle, přesně, případně představují pro pacienta značnou zátěž. Nalezení nových biomarkerů by proto velice usnadnilo léčbu těchto onemocnění. Potenciální skupinu biomarkerů představují fungální sekretované proteiny či peptidy z nich odvozené, které by se díky své stabilitě mohly šířit z místa infekce do tělních tekutin nebo být rychleji detekovatelné v biopsiích. Doposud existuje jen několik málo souhrných proteomických studií na toto téma u několika fungálních pathogenů. Práce popisující proteom *Pseudallescheria boydii* dosud nebyla publikována.

Cílem této diplomové práce je kultivace *Pseudallescherie boydii*, příprava vzorků pro SDS-PAGE a identifikace extracelulárně sekretovaných proteinů *Pseudallescherie boydii* pomocí hmotnostní spektrometrie.

6 Přístroje, chemikálie a média

6.1 Přístroje

Automatické pipety (1-10, 2-20, 20-200, 200-1000)	Gilson, USA
Bürkerova počítací komůrka	P-LAB, ČR
Centrifuga J2-21	Beckman, USA
Centrifuga Universal 320 R	Hettich-Zentrifugen, Německo
Dialyzační střevo	Sigma, USA
Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF	Bruker Daltonics, USA
Chladnička	Zanussi, Itálie
Koncentrátor Amicon Ultra 30 kDa	Millipore, USA
Magnetická míchačka	Laboratorní přístroje Praha, ČR
Mikrocentrifuga 16M	National Labnet, USA
Mikroskop DN 45	Lambda Praha, ČR
MilliQ	Millipore, USA
Mrazicí box (-20 °C)	Zanussi, Itálie
pH metr f 200	Beckman, USA
Předvážky HF1200G	AND, USA
Souprava pro vertikální elektroforesu	Sigma, USA
Speedvac RC 1010	Jouan, Francie
Steriflip (filtrační systém)	Millipore, USA
Termostat	Eppendorf, Německo
Třepačka na Erlenmayerovy baňky - termostatovaná	PIS SPOFA n.p., Československo
Ultracentrifuga	Beckman, USA
Ultracentrifuga Optima Le-80K	Beckman, USA
Ultrazvuková lázeň (sonikátor)	Elma, USA
Ultrazvuková sonda Ultrasonic	
Homogenizer 4710 Series	Cole-Parmer Instrument Co., USA
Váhy ALJ 120-4	KERN, Německo
Vákuový manifold	Axygen, USA
Vortexový mixér	Dílny ČSAV, ČR
Zdroj pro SDS-PAGE	Amersham Pharmacia Biotech, EPS 3501

6.2 Chemikálie

6.2.1 Chemikálie

Aceton	Lachner, ČR
AcN	Merck, Německo
Agar	Oxoid, USA
Akrylamid	Sigma, USA
APS	Sigma, USA
Bromfenolová modř	Sigma, USA
Coomasie Brilliant Blue R-250	Sigma, USA
Corn steep	Sigma, USA
DTT	Fluka, Německo
Dusičnan sodný	Lachema, ČR
Ethanol	Lachner, ČR
EtMF	Sigma, USA
Fenyl Sepharosa	GE Healthcare, UK
Glukosa	Lachema, ČR
Glycerol	Sigma, USA
Glycin	Penta, ČR
H ₂ ¹⁸ O 97%	Sigma, USA
Heptahydrát síranu hořečnatého	Lachner, ČR
Heptahydrát síranu zinečnatého	Sigma, USA
Heptahydrát síranu železnatého	Lachner, ČR
Hydrogenfosforečnan didraselný	Lachner, ČR
Hydroxid draselný	Lachner, ČR
Chlorid draselný	Lachema, ČR
Chlorid sodný	Lachema ČR
IAA	Fluka, Německo
Kvasničný extrakt	Fluka, Německo
Kyselina fosforečná 85%	Fluka, Německo
Kyselina octová	Lachema, ČR
Kyselina trifluorooctová	Fluka, Německo
LiChroprep RP-18 (5-20 μm)	Merck, Německo
Marker pro SDS-PAGE kat. č. S8445	Sigma, USA
Methanol	Lachner, ČR
N-acetylglukosamin	Sigma, USA
N,N'-metylen-bis-akrylamid	Sigma, USA
Oatmeal agar	Sigma, USA
Pentahydrát síranu měďnatého	Lachner, ČR
Pepton	Fluka, Německo
Poros 20 R3	Applied Biosystems, USA
Potato-dextrose agar	Sigma, USA
Sacharosa	Lachner, ČR

SDS	Serva, USA
Síran amonný	Sigma, USA
SP Sepharosa	GE Healthcare, UK
SPITC	
TCEP	Sigma, USA
TEMED	Serva, USA
Tris	Sigma, USA
Tris-Cl	Fluka, Německo
Trypsin	Promega, USA
Tween-20	Loba Feinchemie, Německo

Všechny použité chemikálie byly nejvyšší komerčně dostupné čistoty, nejméně však p.a.

6.2.1 Roztoky a pufry

5% gel pro SDS elektroforesu (zaostřovací)	destilovaná voda (1,4 ml), 30% akrylamidový mix (29 g akrylamidu + 1 g N,N'-methylen-bis-akrylamidu) (0,33 ml) 1 M Tris (pH 6,8) (0,25 ml), 10% SDS (0,02 ml), TEMED (0,004 ml), 10% APS (0,02 ml)
12% gel pro SDS elektroforesu (rozlišovací)	destilovaná voda (1,6ml), 30% akrylamidový mix (29 g akrylamidu+ 1 g N,N'-methylen-bis-akrylamidu) (2,0 ml), 1,5 M Tris (pH 8,8) (1,3 ml), 10% SDS (0,05 ml), TEMED (0,002 ml), 10% APS (0,05 ml)
15% gel pro SDS elektroforesu (rozlišovací)	destilovaná voda (1,1ml), 30% akrylamidový mix (29 g akrylamidu + 1 g N,N'-methylen-bis-akrylamidu) (2,5 ml), 1,5 M Tris (pH 8,8) (1,3 ml), 10% SDS (0,05 ml), TEMED (0,002 ml), 10% APS (0,05 ml)
Barvicí roztok pro SDS elektroforesu	45% MeOH, 10% HAc, 0,25% CBB R-250

Odbarvovací roztok pro SDS elektroforesu	35% EtOH, 10% HAc
Vzorkový pufr pro SDS elektroforesu	50 mM Tris-Cl pH (6,8), 100 mM DTT, 2% SDS, 0,01% bromfenolová modř, 10% glycerol
Pufr A (Phenyl Sepharosa)	20 mM fosfátový pufr pH (5,0) s 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄
Pufr B (Phenyl Sepharosa)	20 mM fosfátový pufr pH (5,0)
Pufr A (SP Sepharosa)	20 mM fosfátový pufr pH (3,0)
Pufr B (SP Sepharosa)	20 mM fosfátový pufr pH (3,0) s 1 M NaCl

6.3 Média

Tekutá média

CD 3% sacharosa
0,02% NaNO₃
0,05% KCl
0,001% FeSO₄×7H₂O
0,1% K₂HPO₄
0,001% ZnSO₄×7H₂O
0,0005% CuSO₄×5H₂O
0,05% MgSO₄×7H₂O
pH (6,5)

SB 4% glukosa
1% pepton
pH (5,6)

CS 3% sacharosa
2% corn steep
pH (4,7)

Pevné půdy

SBA 4% glukosa
1% pepton
2% agar
pH (5,6)

OA 7,25% oatmeal agar

PDA 3,9% potato-dextrose agar

7 Seznam kmenů

Kód	Sbírka a identifikační číslo	Druh	Původ
K2	CCF 3082	<i>Pseudallescheria boydii</i>	nosní dutina psa, Česká Republika
K3	CBS 116779 = IHEM 21163	<i>Pseudallescheria boydii</i>	lidská dutina, Čína
K4	CBS 116895 = FMR 6694	<i>Pseudallescheria boydii</i>	lidský mozkový absces, Španělsko, 1999
K5	CBS 116894 = IHEM 21166	<i>Pseudallescheria boydii</i>	půda, Thailand
K6	CBS 116897 = FMR 4167	<i>Pseudallescheria boydii</i>	zánět stř. ucha, Španělsko, 1992
K7	CBS 695.70 = IHEM 21162	<i>Pseudallescheria boydii</i>	nosní dutina vepře, Ukrajina, 1970
K8	CBS 108.54 = IHEM 21165	<i>Pseudallescheria boydii</i>	půda, Zaire, 1953
K9	CBS 116899 = IHEM 14268	<i>Pseudallescheria boydii</i>	hlen pacienta s cystickou fibrózou, Francie, 1998
K10	CBS 116898 = IHEM 14263	<i>Pseudallescheria boydii</i>	hlen pacienta s cystickou fibrózou, Francie, 1998
K11	CBS 116892 = IHEM 21159	<i>Pseudallescheria boydii</i>	hlen pacienta s cystickou fibrózou, Francie, 1998
K12	CBS 116403 = IHEM 21167	<i>Pseudallescheria boydii</i>	mozková tkáň člověka po utonutí, Německo, 1995
K22	CBS 101.22 = IHEM 15933	<i>Pseudallescheria boydii</i>	lidský mycetom, U.S.A., 1921
K24	ATCC 28206	<i>Scedosporium apiospermum</i>	plicní hlen, Kanada
K13	CBS 467.74 = IHEM 5739	<i>Scedosporium prolificans</i>	půda, Belgie, 1971
K14	CBS 114.90 = IHEM 21171	<i>Scedosporium prolificans</i>	lidská kost, U.S.A., 1981
K15	CBS 116904 = FMR 6649	<i>Scedosporium prolificans</i>	lidská krev, Španělsko, 1998
K16	CBS 116900 = FMR 3569	<i>Scedosporium prolificans</i>	lidská krev, Španělsko, 1990
K17	CBS 116901 = FMR 6721	<i>Scedosporium prolificans</i>	půda, Španělsko, 1992
K18	CBS 116906 = IHEM 14076	<i>Scedosporium prolificans</i>	hlen pacienta s cystickou fibrózou, Francie, 1998
K19	CBS 116905 = FMR 7252	<i>Scedosporium prolificans</i>	čelní dutina, Španělsko, 1996
K21	CBS 116902 = FMR 6654	<i>Scedosporium prolificans</i>	lidská krev, Španělsko, 1998

Tab. 1: Seznam používaných kmenů

8 Metody

8.1 Optimalizace kultivačních podmínek pro *Pseudallescherii boydii*

8.1.1 Příprava spor

Pro optimální sporulaci kmenů byly vyzkoušeny tři typy sporulačních agarů. SAB agar, PDA agar a OA agar. Ze šikmých konzervačních agarů byly zaočkovány tři Petriho misky od každého agaru, kmeny K2, K10 a K18. Po měsíčním růstu při teplotě 27 °C byly spory sklizeny tzv. mokrou cestou: Na misku bylo pipetováno 10 ml sterilního fyziologického roztoku obsahujícího 0,01% Tween-20. Po převedení spor s myceliem do roztoku bylo mycelium sterilně odfiltrováno. Spory byly uchovávány sterilně ve fyziologickém roztoku obsahující 0,01% Tween-20 při teplotě 4 °C.²¹

Celkové množství spor bylo zjištěno pod mikroskopem při zvětšení 60 × pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Počítací komůrka je speciálně upravené podložní sklo, které má na horní ploše uprostřed přesně stanovenou hloubku a vybroušený rastr s počítací sítí o přesně definovaných rozměrech.²² Síť je tvořena šestnácti čtverci. Do vybroušené sítě bylo pipetováno 10 µl zředěné suspenze spor tak, aby na každý čtverec připadlo přibližně deset spor. Byly spočítány spory uvnitř každého čtverce, i ty co se dotýkaly obvodů jednotlivých čtverců. Výsledné množství spor v 1 ml suspenze je pak součin mezi průměrným počtem spor na jeden čtverec, ředěním suspenze a přepočítávacím koeficientem pro tuto komůrku, který činí $2,5 \times 10^5$. Komůrka obsahuje dvě sítě o šestnácti čtvercích. Výsledné množství spor je pak průměr mezi výsledky získanými z obou sítí.

Spory byly spočítány pro každou misku zvlášť. Z výsledků byl vypočítán průměr na jednu misku.

8.1.2 Kultivace *P. boydii*

Do 500 ml Erlenmayerovy baňky bylo připraveno 200 ml média tak, jak je popsáno v literatuře.²³ Po sterilizaci bylo médium očkováno 10^7 spor vybraných kmenů. Kultivováno bylo 7 dní při teplotě 27 °C a třepání 200 otáček za minutu. Byl sledován nárůst biomasy jednotlivých kmenů v různých médiích.

8.2 Optimální metoda na přípravu vzorků pro SDS elektroforesu

Po sedmidenní kultivaci při teplotě 27 °C bylo odfiltrováno mycelium a odstraněny spory centrifugací při 7500 g. Sporové proteiny by mohly velmi zkreslovat výsledek a tudíž je odstranění spor důležitým krokem. Některé kmeny tvoří glukany, které mrazem vyprecipitují. Proto byl filtrát zamrazen na -20 °C. Vyprecipitované glukany byly odstraněny centrifugací při 7500 g. Následně byly vyzkoušeny různé metody přípravy vzorků.

8.2.1 Srážení proteinů síranem amonným

Principem této metody je vysolování proteinů z roztoku. Hydrofilní aminokyseliny interagují s molekulami vody a vytvářejí s ní vodíkové můstky (čím více hydrofilních skupin, tím více je protein rozpustný). Přidání soli do roztoku odebírá proteinu vodní plášť a tím je interakce protein-protein silnější než interakce protein-roztok. Molekuly proteinu koagulují díky hydrofobním interakcím. Při vysoké iontové síle se protein kompletně vysráží.

Ke 100 ml filtrátu byl za stálého míchání a teplotě 4 °C přidáván síran amonný do 90% saturace. Vysrážený precipitát byl odstředěn při 20 000 g, rozpuštěn v 10 ml destilované vody a zakoncertován na 800 µl v koncentrátoru Amicon Ultra pro proteiny s minimální Mr 10 kDa při 3500 g a teplotě 10 °C.

8.2.2 Srážení proteinů acetonem

Aceton je nepolární rozpouštědlo, které je mísitelné s vodou. Převedením proteinů do prostředí s nadbytkem acetonu (80 %) dojde k jejich obklopení nepolárním prostředím a tím ke zrušení stabilizujících hydrofilních interakcí s prostředím, naopak se projeví interakce prostředí s hydrofobním jádrem proteinů, následkem čehož je vysrážení proteinů z roztoku.

K 20 ml filtrátu bylo přidáno 80 ml acetonu a ponecháno přes noc při -20 °C. Poté byl precipitát odstředěn při 20 000 g rozpuštěn v 2 ml destilované vody

a zakoncortován na 800 μ l v koncentrátoru Amicon Ultra pro proteiny s minimální Mr 10 kDa při 3500 g a teplotě 10 °C.

8.2.3 Dialýza s následnou lyofilizací

Dialýza je separační proces, kterým je možno odstraňovat analyticky disperzní složky z koloidního systému. Koloidní disperze je oddělena polopropustnou membránou od prostoru, který na počátku obsahuje čisté disperzní prostředí. Analyticky disperzní podíly přecházejí do roztoku o nižší koncentraci do ustanovení koncentrační rovnováhy mezi oběma disperzními prostředími.

Lyofilizace je metoda, při níž dochází k vysušení vzorku za vakua a teploty -80 °C. Voda se změní v led, který se za výše uvedených podmínek přímo mění na vodní páru (sublimuje).

100 ml filtrátu bylo dialyzováno v dialyzačním střeově proti 10 litrům destilované vody za stálého míchání tři dny. Pak byl filtrát lyofilizován. Vzniklý prášek byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody a zakoncortován na 800 μ l v koncentrátoru Amicon Ultra pro proteiny s minimální Mr 10 kDa při 3500 g a teplotě 10 °C.

8.2.4 Ultrafiltrace

Tato metoda se používá k oddělování koloidně disperzního podílu od disperzního prostředí i od nízkomolekulárních látek, současně přítomných ve formě pravého roztoku filtrací polopropustnými membránami o dané velikosti pórů. Filtrace pod pouhým hydrostatickým tlakem filtrovaného systému probíhá velmi pomalu, používá se buď vakuové filtrace (sání pod filtrem), nebo působení vnějšího tlaku na filtrovaný roztok (tlaková filtrace).

50 ml filtrátu bylo zakoncortováno na 200 μ l v koncentrátoru Amicon Ultra pro proteiny s minimální Mr 10 kDa při 3500 g a teplotě 10 °C.

8.2.5 Iontově výměnná chromatografie

(IEC, angl. Ion-Exchange Chromatography)

Tato chromatografie umožňuje dělit biologické nízkomolekulární i vysokomolekulární ionty. Stacionární fázi tvoří ionex (anex nebo katex), na nějž se na

začátku pokusu naváží ionty opačného náboje obsažené ve vzorku (dělené látky). Poté se změni složení mobilní fáze (hodnota pH nebo koncentrace soli) tak, aby se složky dělené směsi postupně ze stacionární fáze uvolňovaly.²⁴ V této práci byl použit nosič SP Sepharosa.

K 50 ml filtrátu byl přidán 1 ml kyseliny fosforečné o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. pH filtrátu bylo upraveno na hodnotu 3 hydroxidem draselným. Filtrát byl dávkován na kolonu ($1 \times 2 \text{ cm}$; 3 ml) ekvilibrovanou pufrém A. Po nadávkování filtrátu byla kolona promyta pufrém A. Eluce byla provedena 6 ml pufru B.

8.2.6 Chromatografie s hydrofobní interakcí

(HIC, angl. Hydrophobic Interaction Chromatography)

Moderní chromatografická kolonová technika vyvinutá zejména pro dělení bílkovin. Jako stacionární fáze slouží speciální nosiče nesoucí hydrofobní skupiny, na něž se bílkoviny váží, aniž by byly (na rozdíl od chromatografie s obrácenými fázemi) denaturovány. Při vysoké iontové síle mobilní fáze na začátku chromatografie se bílkoviny váží na stacionární fázi; postupným snižováním iontové síly (sestupný solný gradient) dochází k oslabování hydrofobních interakcí bílkovin s nosičem a k jejich postupné eluci z kolony.²⁴ V této práci byl použit hydrofobní nosič Fenyl Sepharosa.

Nejprve byla vyzkoušena v klasickém uspořádání.

K 50 ml filtrátu bylo přidáno 1 ml kyseliny fosforečné o koncentraci $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a síran amonný do výsledné koncentrace $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. pH filtrátu bylo upraveno na hodnotu 5 hydroxidem draselným. Filtrát byl dávkován na kolonu ($1 \times 2 \text{ cm}$; 3 ml) ekvilibrovanou pufrém A. Po nadávkování filtrátu byla kolona promyta pufrém A. Eluce byla provedena 6 ml pufru B.

Pomocí této chromatografie byly odstraněny kontaminace a nečistoty (pravděpodobně záporně nabitě, hydrofobní látky, na SDS-elektroforéze tvořící smír), který některé kmeny tvořily. Tudíž byla použita v netradičním uspořádání.

Vzorek připravený IEC byl hydroxidem draselným upraven na pH 5 a zasolen síranem amonným do výsledné koncentrace $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Takto připravený vzorek byl dávkován na kolonu ($1 \times 3 \text{ cm}$; 4 ml) ekvilibrovanou pufrém A. Kolona nebyla promyta pufrém A. Po nadávkování vzorku byla provedena eluce 3 ml pufru B. Některé proteiny, které byly vázány IEC, se nevázaly na HIC, proto byla spojena eluční frakce s frakcí nevážající se.

Smyslem bylo zadržení nečistot jakožto hydrofobních látek na stacionární fázi Fenyl Sepharose.

8.2.7 Chromatografie s reverzní fází

(RPC, angl. Reversed Phase Chromatography)

Rozdělovací chromatografie, kdy proti běžnému provedení je stacionární fáze nepolární a mobilní fází je polární kapalina. Dnes používané stacionární nepolární fáze (uhlovodíkové řetězce C₄ - C₁₈) jsou chemicky vázané na nosič (grafitové nebo uhlíkem potažené silikagely, kopolymery styrenu a divinylbenzenu). Ve většině aplikací této metody slouží jako mobilní fáze směs vody a organického rozpouštědla (acetonitrilu, isopropanolu, methanolu). Vzhledem k nepolárnímu charakteru stacionární fáze k ní mají větší afinitu látky s vyšším obsahem hydrofobních oblastí, tedy méně polární. Na počátku pokusu jsou obvykle dělené látky rozpuštěny ve vodě a svými hydrofobními skupinami se zachytí na kolonu; poté jsou postupně z kolony eluovány rostoucím gradientem koncentrace organického rozpouštědla.²⁴

Chromatografie s tímto uspořádáním byla také vyzkoušena pro odstranění kontaminací. V této práci byl použit nosič LiChroprep RP-18 (5-20 μm).

Na kolonu (1×2 cm; 3 ml) ekvilibrovanou destilovanou vodou bylo nanášeno 50 ml filtrátu. Po nadávkování filtrátu byla kolona promyta destilovanou vodou. Eluce byla provedena 6 ml 80% metanolu.

Vzorky po všech chromatografiích byly zakoncertovány na 200 μl v koncentrátoru Amicon Ultra pro proteiny s minimální Mr 10 kDa při 3500 g a teplotě 10 °C.

8.2.8 Ultracentrifugace

Ultracentrifuga je odstředivka s vysokými otáčkami. Základem zařízení je rotor ze speciální slitiny, do něhož se vkládá kyveta s analyzovaným vzorkem. Rotor je umístěn v evakuované termostátované skříni. Slouží k separačním účelům, kdy dochází k oddělení jednotlivých disperzních frakcí, které pak mohou být analyzovány.

Ultracentrifugace byla vyzkoušena pro odstranění kontaminací ze vzorků po ultrafiltraci. 1 ml vzorku byl ultracentrifugován 12 hodin při teplotě 4 °C a 200 000 g. Byly vytvořeny tři frakce. Spodní frakci tvořily nečistoty, prostřední frakci nečistoty v roztoku a vrchní frakci tvořil roztok prostý nečistot. Frakce byly odebrány, smíchány se vzorkovým pufrem a puštěny na SDS-PAGE.

8.3 Elektroforetické metody

8.3.1 Proteinová elektroforesa na polyakrylovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Elektroforesa v prostředí SDS je separační metoda která dělí bílkoviny dle jejich molekulové hmotnosti. Bílkoviny k separaci jsou modifikovány tvorbou komplexů s SDS, vzniklé komplexy mají prakticky stejný povrchový záporný náboj a v zónově elektroforetickém uspořádání se dělí podle molekulových hmotností. Podle velikosti očekávaných proteinů se zvolí správná koncentrace gelu a gel se připraví tak, jak je popsáno v literatuře.²⁵

Gel na startu elektroforézy je 5% s nižším pH a slouží k „zaostření“ vzorků, dolní gel je pak rozlišovací o určené koncentraci.

Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrům pro SDS-PAGE v poměru 1:1. Před nanesením na gel se vzorky 5 minut povařily ve vodní lázni a centrifugovaly se 10 minut při 12 000 g. Poté byly vzorky naneseny na zaostřovací gel. Počáteční nastavení napětí bylo 80 V a proud na jeden gel byl 20 mA. Po zaputování vzorků do rozlišovacího gelu bylo napětí zvýšeno na 125 V.

Detekce pomocí Coomassie BBR250:

Gel SDS-PAGE se nejprve ponoří na 45 min. do roztoku barvy CBB-R250 (kap. roztoky) a poté se odbarvuje ve fixačním roztoku (kap. roztoky) dokud nedojde k odbarvení pozadí a zviditelnění proteinových proužků.

8.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická analytická metoda, která určuje hmotnosti atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení v plynné fázi na ionty. Každý hmotnostní spektrometr má tři základní části: zdroj iontů (např. MALDI nebo ESI), hmotnostní analyzátor (dělí ionty na základně poměru hmotnosti k náboji, m/z) a detektor. S výjimkou ESI, kde zdroj pracuje za atmosférického tlaku, jsou všechny části spektrometru umístěny ve vysokém vakuu.²⁶

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za pomoci matrice s analyzátozem měřícím dobu letu (MALDI-TOF MS)

(angl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry)

Tato metoda se využívá k detekci a identifikaci proteinů, studiu prostorové struktury proteinů, sekvenci peptidů i DNA, k určování posttranslačních modifikací nebo k analýze složitějších směsí peptidů.²⁷ MALDI ionizátor využívá ke vzniku molekulových iontů přítomnost matrice, obecně slabé organické kyseliny, která silně absorbuje laserové záření. Pro analýzu peptidů jsou nevhodnější tři matrice – CCA (α -kyano-4-hydroxy-*trans*-skořicová kyselina), DHB (2,5-dihydroxybenzoová kyselina), SA (sinapová kyselina, 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-*trans*-skořicová kyselina). Směs vzorku a matrice v nadbytku se nechá společně vykristalizovat na terčíku. Po ozáření laserem přechází matrice do plynné fáze a strhává s sebou jednotlivé molekuly vzorku, následně jim předává protony a tím vznikají kationty. V této práci byla použita CCA matrice.

Rozpad molekuly může být sledován buď ve zdroji metodou ISD/ISF (angl. in-source decay/fragmentation) nebo během letu v analyzátoru TOF metodou PSD (angl. post-source decay). Metoda ISD/ISF vyžaduje předchozí oddělení analyzovaného peptidu ze směsi, u PSD je toto řešeno pomocí tzv. iontové brány. Při průletu mezi destičkami iontové brány jsou všechny ionty vychylovány vloženým napětím; ve chvíli, kdy bránou proletí ionty zvoleného prekurzorového peptidu, je napětí vypnuto a vybrané ionty proletí úzkou bránou přímo na detektor.²⁸

TOF analyzátor měří dobu letu iontu od okamžiku vstupu urychlených iontů do oblasti bez elektrického pole až po dopad na detektor. Doba letu iontů je závislá na jejich hmotnosti, lehčí ionty se pohybují rychleji.

Hmotnostní spektrum, které získáme, graficky zobrazuje závislost intenzity signálu detektoru, která je přímo úměrná množství částic na něj dopadajících, na poměru hmotnosti a náboje m/z .

Hmotnostní spektra byla měřena na přístroji Ultraflex III společnosti Bruker Daltonics (USA) s dusíkovým laserem. Vyhodnocena byla v programu Bruker Daltonics flexAnalysis Software 3.0. Spektra byla interpretována *de novo* (*lat. de novum*) Mgr. Janem Sklenářem, PhD.

8.4.1 Příprava vzorků pro hmotnostní spektrometrii

Práce se vzorky pro MALDI-TOF hmotnostní analýzu musí být prováděna tak, aby nedocházelo ke kontaminaci vzorků keratinem z pokožky rukou, vlasů nebo rachových částic. Používají se chemikálie vysoké čistoty (voda, acetonitril – fa. Merck).

Proteinové proužky byly z gelu vyříznuty a nakrájeny na asi milimetrové kostky. Ty byly poté odbarvovány.

Pro snazší interpretaci spekter byl celý protokol přípravy vzorků prováděn ve vodě, která obsahovala 50 % ^{18}O .

Odbarvování gelu barveného Coomassie BBR250

K nakrájenému gelu se přidá 100 μl 50 mM ethylmorfolinu pH 8,1 v 50% acetonitrilu (v/v) a sonikuje se v ultrazvukové lázni 5 min. Supernatant se odsaje, postup se opakuje až do úplného odbarvení.

K odbarvenému gelu se přidá 100 μl vody (50% ^{18}O) a sonikuje se v ultrazvukové lázni 5 min supernatant se odsaje. Poté se přidá 100 μl acetonitrilu a gel je sušen po dobu 10 min v rotačním vakuovém koncentrátoru Speed Vac.

Redukce a alkylace peptidů

Pro redukci disulfidových vazeb uvnitř a mezi proteiny bylo použito redukční činidlo TCEP a pro alkylaci reaktivních cysteinů bylo použito alkylační činidlo IAA.

K vysušenému gelu se přidá 50 μl 30 mM TCEP v 50 mM ethylmorfolinu pH 8,1 a ponechá se inkubovat 20 min při 80 °C (Thermomixer Comfort, Eppendorf). Poté se odsaje supernatant, přidá se 50 μl acetonitrilu, sonikuje se v ultrazvukové lázni 5 min, supernatant se odsaje. Pak se přidá 50 mM ethylmorfolin pH 8,1 s IAA ve finální koncentraci $5,6\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ a inkubuje se 40 min ve tmě.

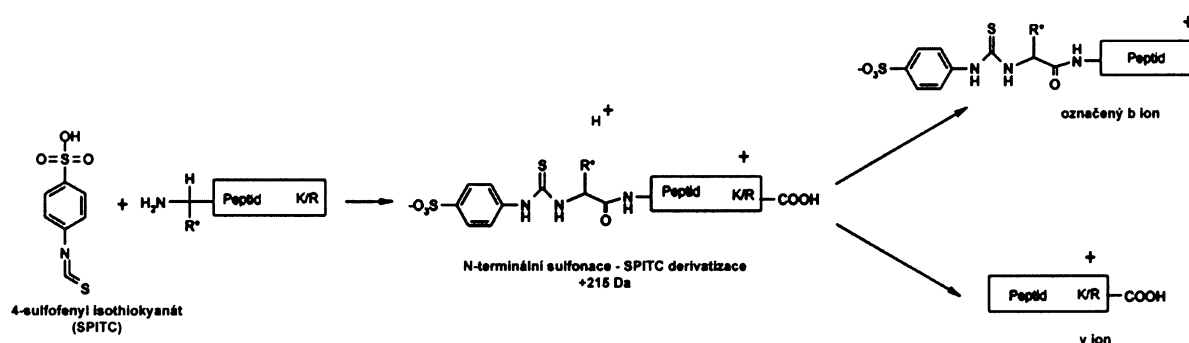
Po inkubaci se odsaje supernatant a vzorek se opakovaně promývá vodou (50% ^{18}O) (přidání 50 μl vody; sonikace; odsátí supernatantu; přidání 50 μl acetonitrilu; sonikace; odsátí supernatantu – tento postup se opakuje dvakrát). Poté je vzorek sušen po dobu 5 min v rotačním vakuovém koncentrátoru Speed Vac.

Štěpení proteinů trypsinem

K vysušenému vzorku se přidá 30 μl štěpicího pufru (50 mM ethylmorfolin pH 8,1 10% acetonitril) s proteasou trypsinem tak, aby finální koncentrace trypsinu byla 2,5 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ a ponechá se inkubovat minimálně 20 hod při 37 °C (Thermomixer Comfort, Eppendorf). Trypsin štěpí peptidovou vazbu mezi karboxylovou skupinou lysinu nebo argininu a libovolnou další aminokyselinou s výjimkou prolinu.

SPITC derivatizace

Po štěpení trypsinem se ke vzorku přidá 8,5 μl SPITC činidla (10 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ ve 20 mM NaHCO_3) a nechá se inkubovat 30 min při 56 °C. Pak je reakce zastavena 10 μl 5% TFA.²⁹



Obr. 1: Schéma N-terminální derivatizace peptidů pomocí SPITC (4-sulfofenyl isothiokyanát).

(převzato z http://www.shimadzu-biotech.net/literature/application_note/202_1.pdf)

Nanášení vzorku na terčík

Po derivatizaci musí být vzorek odsolen. Na polymerní nosič s reverzní fází ekvilibrovaný v 0,2% TFA se nanese vzorek. Poté se propláchne 0,2% TFA a vylučuje se 2,5 μl roztoku matrice (5 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ CCA v 60% acetonitrilu (v/v) a 0,1% TFA (v/v)) přímo na terč a nechají se společně vykrystalizovat.³⁰

9 Výsledky

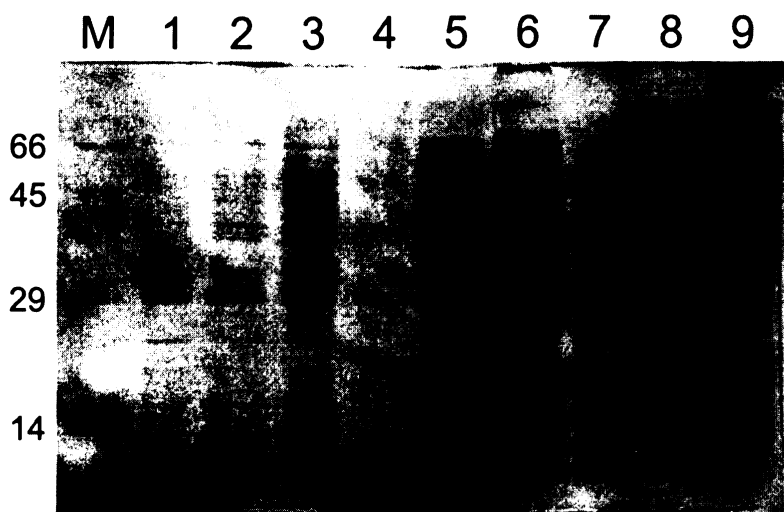
9.1 Kultivace *Pseudallescherie boydii* a příprava vzorků pro SDS-PAGE

9.1.1 Sporulace

Nejlépe sporulace byla pozorována u ovesného agaru, tudíž byl vybrán pro produkci spor od všech kmenů. Tekutá média byla očkovaná 10^7 spor.

	K2	K10	K18
OA	$1,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$
PDA	$9,0 \times 10^5$	$3,3 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$
SBA	$5,9 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$	$8,0 \times 10^6$

Tab. 2: Výtěžek spor na jednu Petriho misku o průměru 9 cm.



Obr. 1: Ukázka sporových proteinů. (SDS-PAGE, 12% gel)

Spory byly sonikovány 3×10 sekund sonikační sondou, povařeny ve vzorkovém pufru, centrifugovány 2 minuty při 12 000 g. Na gel bylo nanášeno 10 μ l vzorku.

Dráha č.1 K2 1×10^7 spor z SBA, č.2 K2 1×10^7 spor z PDA,
 č.3 K2 1×10^7 spor z OA, č.4 K10 1×10^7 spor z SBA,
 č.5 K10 6×10^7 spor z PDA, č.6 K10 6×10^7 spor z OA,
 č.7 K18 6×10^7 spor z SBA, č.8 K18 6×10^7 spor z PDA,
 č.9 K18 6×10^8 spor z OA.

9.1.2 Výběr tekutého produkčního média

Jak již bylo popsáno výše, je *Pseudallescherie boydii* v rámci svého druh velmi rozmanitá. Proto hlavní produkční médium bylo voleno tak, aby na něm vyrostly

všechny kmeny, a zároveň, aby jejich proteinový profil byl co nejvíce rozdílný a umožňoval tak vydělit kmeny sobě podobné. Byly vyzkoušeny dva typy bohatého média na živiny – CS a SB a jedno médium chudé na živiny – minerální – CD.

Největší nárůst biomasy byl zaznamenán na SB médiu. Kmen K18 jako zástupce *Scedosporii* téměř nenarostl na CD médiu.

Několik kmenů bylo kultivováno na CS médiu a na CD médiu s 5% kvasničným extraktem pro zjištění, do jaké míry se liší sekrece proteinů v závislosti na druhu média. Všechny kmeny se podařilo nakultivovat na SB médiu a jejich proteinový profil na SDS-PAGE vykazoval největších rozdílů mezi jednotlivými kmeny, což byl hlavní důvod pro výběr toho média.

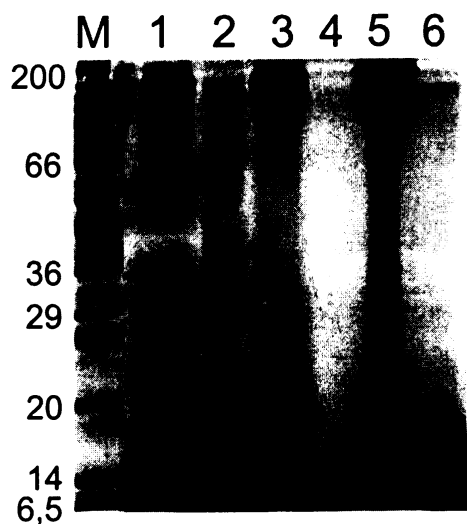
9.1.3 Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Hlavní myšlenkou bylo připravit vzorek tak, aby na SDS-PAGE byla vidět co největší škála do média sekretovaných proteinů a zároveň snaha připravit co nejlepší vzorek ve smyslu viditelnosti těchto proteinů. Zde byl velký rozdíl mezi *Pseudallescherii* a *Scedosporiem*. Tyto optimalizační kroky byly vyzkoušeny na kmeni K2.

Testovány byly tyto postupy: precipitace síranem amonným, dialýza s následnou lyofilizací a ultrafiltrací média. Proteinový profil získaný pomocí použitých metod byl podobný.

V čistotě vzorků byla lepší lyofilizace a ultrafiltrace. Bylo pracováno s 21 kmeny proto svou roli hrála i jednoduchost metody. Jako metoda pro přípravu vzorků byla vybrána ultrafiltrace.

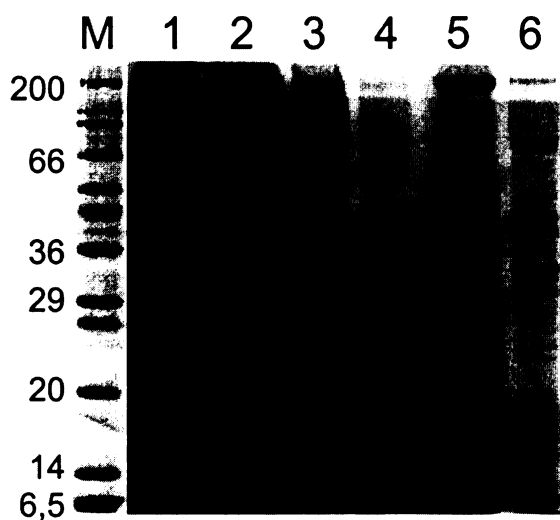
Po kultivaci všech kmenů bylo zjištěno, že *Scedosporia* produkuje do média látky které na SDS-PAGE tvoří souvislý pruh přes celou elektroforetickou dráhu a zabraňují tak identifikaci vlastních proteinů. Další testování se proto zabývalo odstraněním tohoto pozadí. Dle chování látky při elektroforese a na reverzní fázi jsme předpokládali, že látky jsou hydrofobního charakteru, záporně nabitě. Byla vyzkoušena iontoměničová chromatografie, chromatografie s hydrofobní interakcí, chromatografie s reverzní fází, acetonová precipitace a ultracentrifugace na kmeni K16.



Obr.2: Metody na odstranění kontaminant. (SDS-PAGE, 15% gel)

Na dráhu bylo nanášeno 10 μ l vzorku.

- Dráha č.1 K16 purifikace IEC,
č.2 K16 purifikace HIC,
č.3 K16 precipitace acetonem,
č.4 K16 po ultrafiltraci a následné ultracentrifugaci (vrchní frakce),
č.5 K16 po ultrafiltraci a následné ultracentrifugaci (prostřední frakce),
č.6 K16 purifikace RPC.

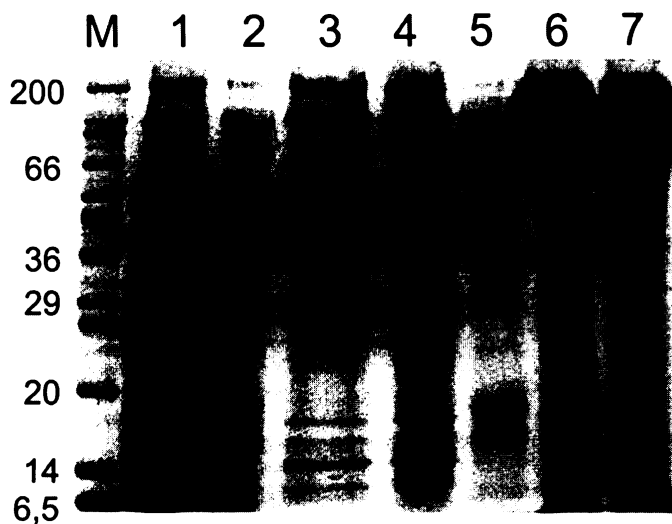


Obr. 3: Kontaminace znesnadňující SDS-PAGE a způsoby metody pro její odstranění. (SDS-PAGE, 15% gel)

Na dráhu bylo nanášeno 10 μ l vzorku.

- Dráha č.1 K16 spodní frakce po ultracentrifugaci,
č.2 K16 po ultrafiltraci,
č.3 K16 purifikace IEC,
č.4 K16 purifikace HIC,
č.5 K18 purifikace IEC,
č.6 K18 purifikace HIC.

Jak je vidět z obr. 2 a 3 je nejlepší metodou pro odstranění kontaminací IEC a HIC. Protože u HIC dochází k větším ztrátám proteinů, ale naopak ke zlepšení čistoty vzorků byly tyto metody spojeny a použity tak, jak je uvedeno v kapitole metody.

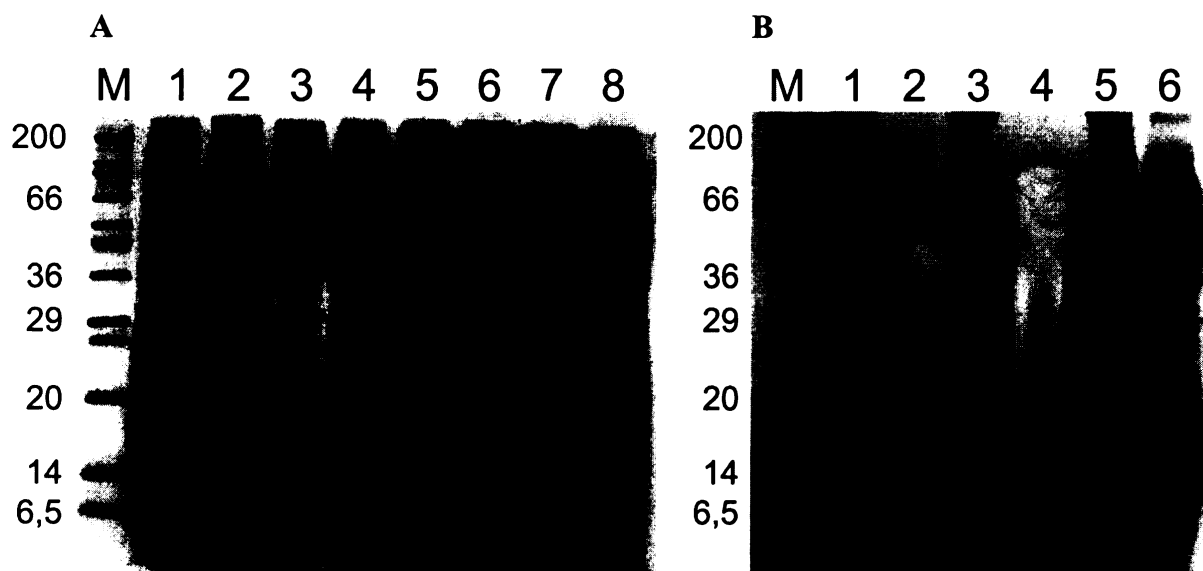


Obr. 4: Optimalizace spojení metod IEC a HIC (kmen K18, SDS-PAGE, 15% gel)
Na dráhu nanášeáno 10 μ l vzorku.

Dráha č.1 purifikace IEC,
č.2 purifikace HIC,
č.3 K18 eluovaný na IEC následně odsolený a dávkovaný na HIC pouze
v pufru A,
č.4 spojení IEC a HIC viz. kapitola metody,
č.5 u frakce která se nevázála na IEC byla zvýšena iontová síla síranem
amonným do koncentrace 0,5 mol \cdot dm⁻³ a purifikována HIC, eluce byla
provedena 6 ml pufru B,
č.6 frakce která se nevázála na IEC byla purifikována HIC, eluce byla
provedena 12 ml pufru B,
č.7 frakce která se nevázála na IEC dávkována na HIC pouze v pufru A.

9.1.4 Porovnání všech kultivovaných kmenů na základě jejich proteinů sekretovaných do média, sporulace a makroskopického popisu

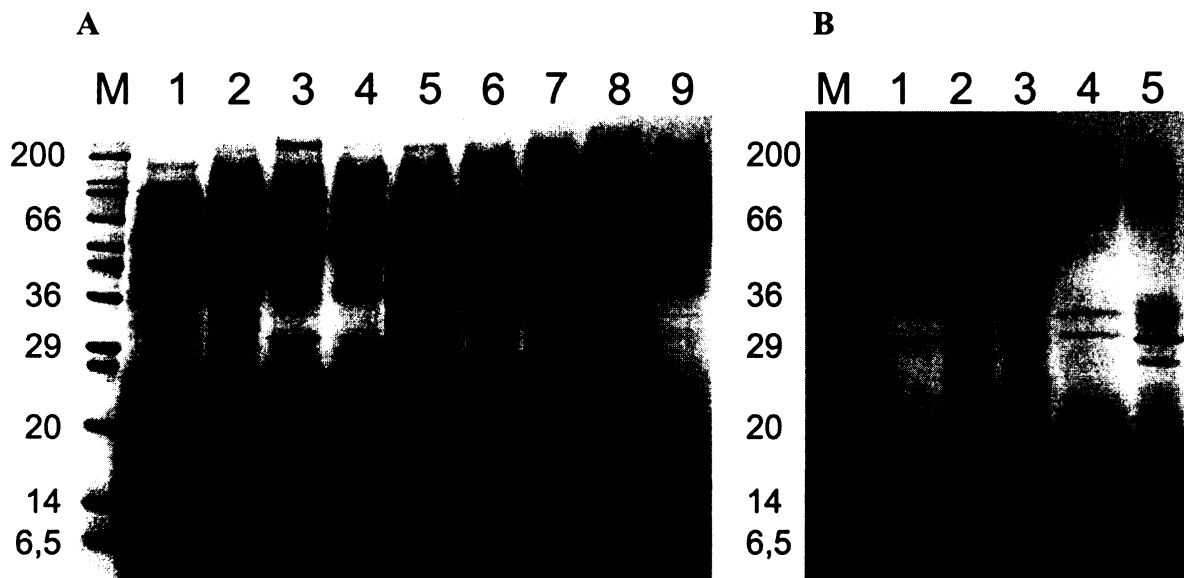
Kultivace na SB médiu (porovnání kmenů dle proteinů sekretovaných do média)



Obr. 5: Kultivace na SB médiu (porovnání kmenů dle sekretovaných proteinů, SDS-PAGE, 15% gel, na dráhu nanášeno 10 μ l vzorku).

A) Dráha	<u>č.1</u> K2,	B) Dráha	<u>č.1</u> K6,
	<u>č.2</u> K3,		<u>č.2</u> K12,
	<u>č.3</u> K7,		<u>č.3</u> K8,
	<u>č.4</u> K10,		<u>č.4</u> K21,
	<u>č.5</u> K22,		<u>č.5</u> K9,
	<u>č.6</u> K4,		<u>č.6</u> K24
	<u>č.7</u> K5,		
	<u>č.8</u> K11		

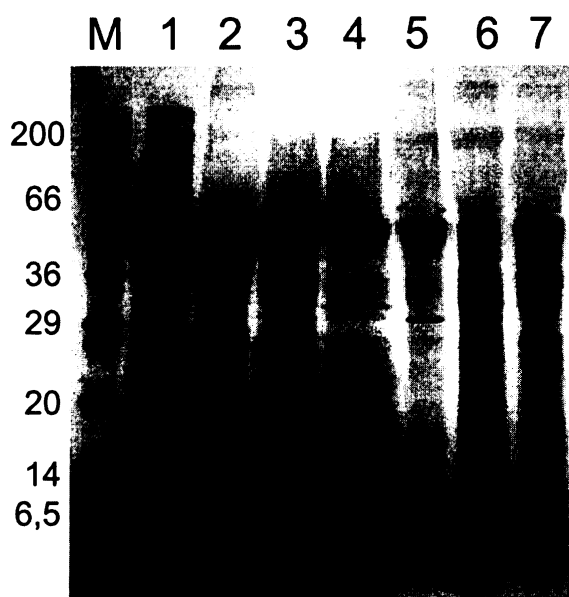
Obr. 5 ukazuje rozdílnost proteinového profilu mezi *Pseudallescheriemi* a *Scedosporiem*. Vzorky byly připraveny ultrafiltrací. Z obrázku je patrná největší podobnost mezi kmeny K4, K5, K9, K10, K11 a K24. K24 je *S. apiospermum*, netvoří kontaminanty a jeho proteinový profil se liší od ostatních *Scedosporií*. Jeho podobnost k *P. boydii* může být vysvětlena faktem, že se jedná o anamorfu *P. boydii*. V dráze B4 je pak ukázka *S. prolificans*, kde jsou vidět kontaminanty, které překrývají vlastní proteiny.



Obr. 6: Kultivace na SB médiu (porovnání kmenů dle sekretovaných proteinů, SDS-PAGE, 15% gel, na dráhu nanášeno 10 μ l vzorku).

A) Dráha	<u>č.1</u> K4, <u>č.2</u> K6, <u>č.3</u> K9, <u>č.4</u> K2, <u>č.5</u> K10, <u>č.6</u> 22, <u>č.7</u> K24, <u>č.8</u> K11, <u>č.9</u> K7	B) Dráha	<u>č.1</u> K3, <u>č.2</u> K5, <u>č.3</u> K8, <u>č.4</u> K12, <u>č.5</u> K21
----------	--	----------	---

Jak je patrné z obr. 6 je elektroforetické pozadí u *Pseudallescherii* poměrně výrazné. Proto byla vyzkoušena metoda přípravy vzorků, která se osvědčila u *Scedosporii* (spojení metod IEC a HIC). K výraznému zviditelnění proteinů nedošlo, došlo však k nabohacení určitých proteinů, což bylo výhodné pro jejich identifikaci.

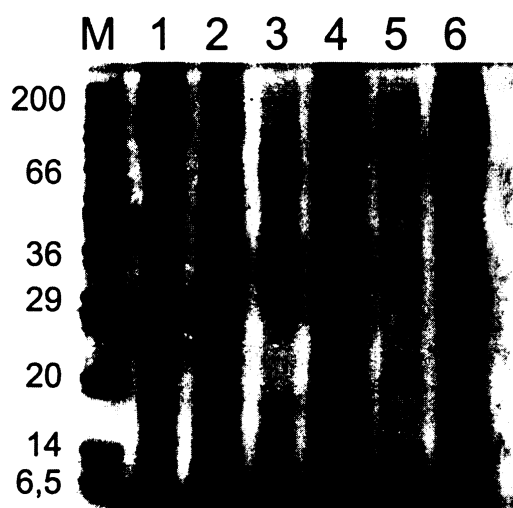


Obr. 7: Kultivace na SB médiu (porovnání kmenů dle sekretovaných proteinů, SDS-PAGE, 15% gel, na dráhu nanášeno 10 μ l vzorku).

Dráha č.1 K13, č.2 K14,
č.3 K15, č.4 K16,
č.5 K17, č.6 K18,
č.7 K19

Obr. 7 ukazuje proteinové profily *S. prolificans*, u kterých je vidět vzájemná podobnost než u *Pseudallescherii*. Jediným více lišícím se *S. prolificans* je pak kmen K21 viz obr. 6. Vzorky byly připraveny chromatografií (spojení metod IEC a HIC).

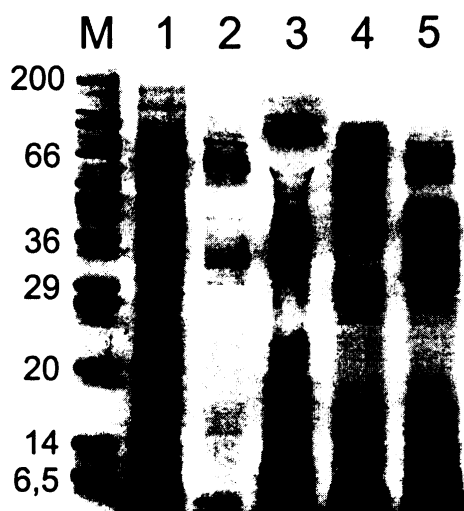
Kultivace na CS médiu (porovnání kmenů dle proteinů sekretovaných do média)



Obr. 8: Kultivace na CS médiu (porovnání kmenů dle sekretovaných proteinů, SDS-PAGE, 15% gel, na dráhu nanášeno 10 μ l vzorku).

Dráha č.1 K5, č.2 K8,
č.3 K12, č.4 K22,
č.5 K13, č.6 K18

Kultivace na CD médiu s 5% kvasničným extraktem (porovnání kmenů dle proteinů sekretovaných do média)



Obr. 9: Kultivace na CD médiu (porovnání kmenů dle sekretovaných proteinů, SDS-PAGE, 15% gel, na dráhu nanášeno 10 µl vzorku).

Dráha č.1 K5,
č.3 K22,
č.5 K18

č.2 K8,
č.4 K13,

Obr. 8 a 9 ukazuje závislost sekrece proteinů na typu média. Na CS médiu byl obecně proteinový profil chudší, co se týče množství různých proteinů, ale kvantitativně byly určité proteiny sekretovány výrazněji než na CD médiu s 5% kvasničným extraktem.

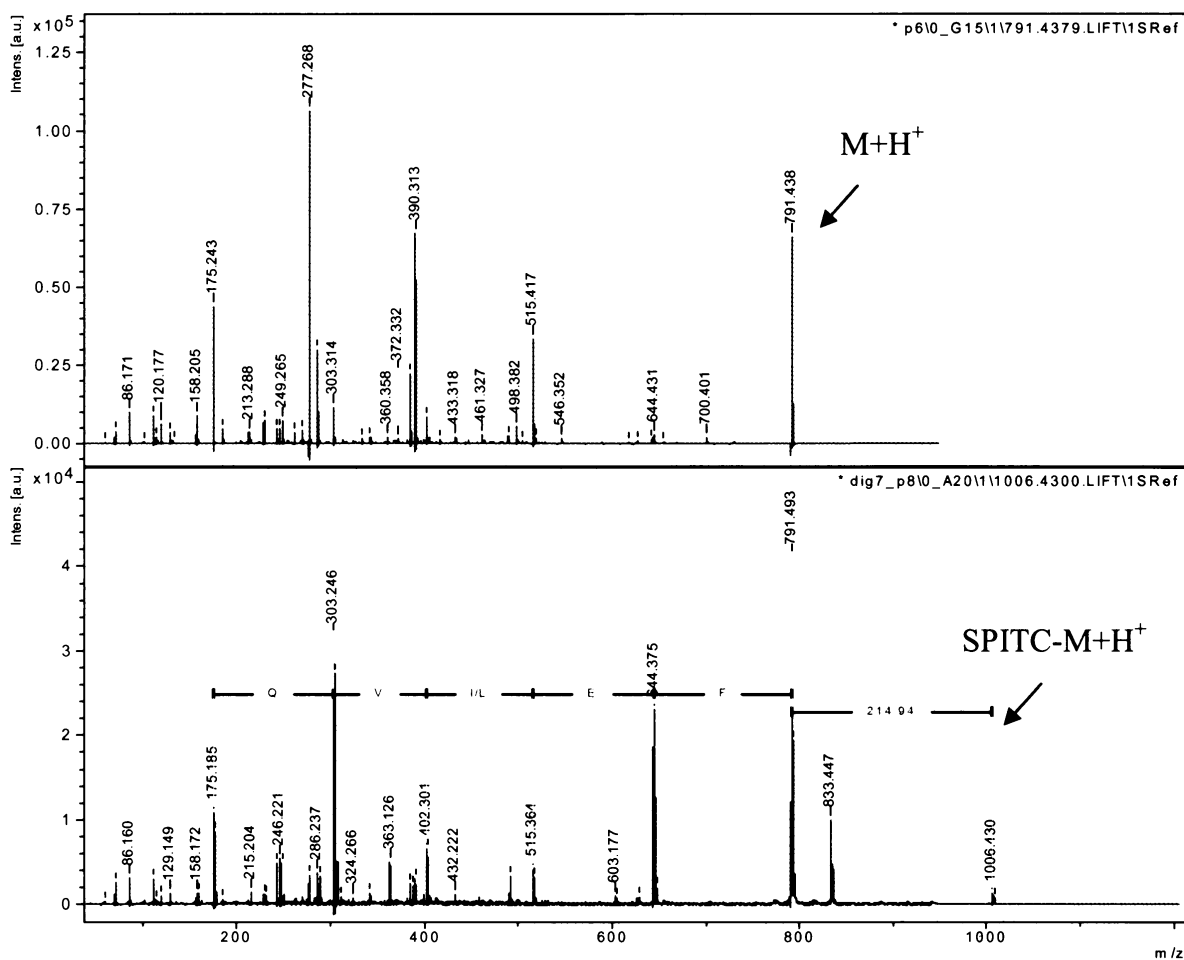
Porovnání kmenů dle sporulace, makroskopického popisu, produkce glukanu a kontaminací na SB médiu

Kmen	Produkce spor (počet spor na 1 misku o průměru 13 cm)	Množství a barva mycelia (tekutá kultivace na SB)	Produkce glukanu	Produkce kontaminant tvořících na SDS-PAGE souvislý pruh
<i>Pseudallescherie</i>				
K4	$4,7 \times 10^9$	Vysoké, světlá	+	-
K5	$2,5 \times 10^8$	Vysoké, světlá	+	-
K10	$9,0 \times 10^8$	Vysoké, světlá	+	-
K11	$2,1 \times 10^8$	Vysoké, světlá	+	-
K9	$8,6 \times 10^7$	Vysoké, světlá	+	-
K7	$1,4 \times 10^7$	Vysoké, světlá	+	-
K12	0	Vysoké, světlá	+	-
K2	$5,5 \times 10^7$	Vysoké, světlá	+	-
K3	$1,7 \times 10^7$	Střední, světlá	-	-
K6	$5,2 \times 10^7$	Vysoké, světlá	+	-
K8	$3,5 \times 10^7$	Vysoké, světlá	+	-
K22	$3,7 \times 10^8$	Vysoké, světlá	-	-
<i>Scedosporia</i>				
K13	$1,5 \times 10^9$	Střední, tmavá	-	+
K14	$7,2 \times 10^8$	Střední, tmavá	-	+
K15	$5,5 \times 10^9$	Střední, tmavá	-	+
K16	$1,0 \times 10^9$	Střední, tmavá	-	+
K17	$1,8 \times 10^{11}$	Střední, tmavá	-	+
K18	$3,6 \times 10^9$	Střední, tmavá	-	+
K19	$4,5 \times 10^9$	Střední, tmavá	-	+
K21	$2,9 \times 10^8$	Střední, tmavá	+	+
K24	$3,8 \times 10^7$	Vysoké, světlá	+	-

Tab. 3: Porovnání kmenů
Vysvětlivky: produkuje (+)
neprodukuje (-)

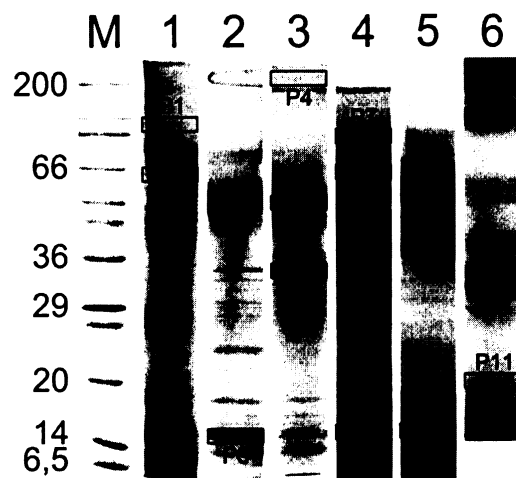
9.2 Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie

Protože jde o organismus s nesequenovaným genomem a poměrně málo prozkoumaným proteomem nebylo možné efektivně použít k identifikaci proteinů běžné MS algoritmy (MASCOT),³¹ které přiřazují naměřená spektra na teoretická spektra generovaná ze známých sekvencí a počítají pravděpodobnost přiřazení. Interpretaci naměřených tandemových spekter viz obr. 10 byly *de novo* určeny sekvence několika peptidů z vybraných elektroforetických zón, pro které byly hledány sekvenční homologie pomocí programu BLAST2³² a MS BLAST,³³ což je program WU-BLAST – implementace BLAST algoritmu Washingtonské univerzity³⁴ – upravený pro hmotnostně-spektrometrické výsledky.



Obr. 10: Ukázka hmotnostního spektra, porovnání téhož nederivatizovaného a derivatizovaného peptidu. Horní spektrum je nederivatizovaného peptidu, dolní spektrum je naopak derivatizovaného peptidu, kde je vidět výraznější y-série. Sekvence FELVGR (m/z 791,44) byla určena z proteinového proužku P5.

9.2.1 Identifikované proteiny



Obr. 11: Kompilace SDS-PAGE, označené proteinové proužky byly vyříznuty a identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

Dráha č.1-5 15% gel, dráha č.6 12% gel

Vyříznuté proužky:

P1 a P2 – kmen K2, kultivováno na CD s 1% N-acetylglukosaminem,

P3 – kmen K14, kultivováno na SB,

P4, P5 a P6 – kmen K18, kultivováno na SB,

P7, P8, P9 – kmen K4, kultivováno na SB,

P10 – kmen K5, kultivováno na SB,

P11 – kmen K2, kultivováno na CD

Kmen	Označení v obr. 11	M+H ⁺	Sekvence	Nalezený homolog	Nalezený homolog
K2	P1	998,48 2123,02	LFDDLLPR FSNPGLVPPALTFHNDALR	hexosaminidasa	hexosaminidasa
	P2	1642,7	XSPSFDDHWSQPR	katalasa	katalasa
K14	P3	1688,56	ASVGYDQGFDDGSR	chitin aktivátor	chitin aktivátor
	P4	2517,2 999,47	LNGHPEQSGPEHGGPEHGGXXELR XNQQWNR	konzervovaná oblast fungální glukosidasy fungální glukosidasa	glukosidasa
K18	P5	1188,5	SLPLSFPGR		
		1612,6 791,44	YLSFQVDQELR FELVQR		monokarboxylát permeasa
K18	P6	906,46	LTTWETR		
		2086,8 1082,6	SFGMASVGTFLDNNQR WPQTPVQAR	monokarboxylát permeasa	monokarboxylát permeasa
K4	P7	1320,65 1612,7	YGAAVPSLDNASR YLSFQVDGAEELR	proteasa/karboxypeptidasa proteasa/karboxypeptidasa	karboxypeptidasa
		2011,9 1486,7	XGPDQDSNPX QFETSLTDFWGR		lysofosfolipasa fosfolipasa
K4	P8	1403,7 1307,5	NALVQNGFNVAT YDDQYVPNSER		lysofosfolipasa
		1599,9 2503,24	QVDKWTFFHX RLTEQWNALYQYLDGVR	na serin bohatý extracelulární protein	na serin bohatý extracelulární protein
K5	P9	2123,12 1515,64	FSNPGLVPXXLTGLNGNDAL VSVGYYDQGFDDASR	hypotetický houbový protein, elicitin	elicitin
		1515,64 1964,84	VSVGYYDQGFDDASR SMLVVSCSDGPNGLAS	hypotetický houbový protein, elicitin hypotetický houbový protein, elicitin	elicitin
K2	P10	1416,64 1161,5	VSVGYYDQGFDDASR LALCLSNR		
		1811,88 2136,85	HVGDLNIEITDAQGNSK TIVVHAGVDDDLGKGGNEESLK	superoxid dismutasa Cu/Zn-superoxid dismutasa	superoxid dismutasa
K2	P11	1324,95	TIVVHAGTDDLK		

Tab. 4: Identifikované proteiny
Identifikované peptidy z jednotlivých proužků a případný k nim nalezený homologii protein

10 Diskuze

Typické houbové sekretované proteiny jsou enzymy využívané pro extracelulární trávení hub: proteasy, endo/exoglykosidasy, redox enzymy, elektron/proton transportní a další. Mnoho průmyslově důležitých proteinů bývá izolováno právě z hub, postupy izolace těchto proteinů jsou většinou založeny na sledování aktivity těchto enzymů po jejich indukci.

Proteomický přístup může vést k identifikaci nových proteinů a může tak využívat biologickou rozmanitost specifických druhů. Ačkoli existuje mnoho proteinů izolovaných z filtrátů houbových kultur, pouze několik studií se zabývá celkovým vylučovaným proteomem. Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo nalezeno okolo padesáti unikátních sekvencí peptidů z *A. flavus*³⁵ a v práci Schwienbachera a kol. byla nalezena většina zastoupených proteinů použitím 1D elektroforetické separace z *A. fumigatus*.³⁶ Mezi sekretovanými proteiny bylo také objeveno velké množství alergenů. Proteiny sekretované patogenními houbami jsou aktivní enzymy hrající roli v propagaci mykózy a patologiei.

Známé vylučované proteiny *P. boydii* jsou 33 kDa serinová proteasa a 28 kDa metaloproteasa.^{37,38} Charakterizace a detailní znalost xenoproteinů *P. boydii* v infikovaných jedincích by mohla mít velký význam pro diagnostiku a léčbu houbových infekcí.

10.1 Kultivace *P. boydii* a příprava vzorků pro SDS-PAGE

Jednou z prvních myšlenek bylo porovnání extracelulárně sekretovaných proteinů jednak na stejném médiu mezi různými kmeny a jednak na médiích bohatých a chudých na živiny – jaké proteiny jsou sekretovány při stresových podmínkách (nedostatek živin) a jaké při podmínkách které jsou k růstu houby optimální, a vydělit tak sobě podobné kmeny.

Pro zajištění reprodukovatelnosti kultivací a efektivity práce byly od každého kmene připraveny spory, které byly uchovávány ve sterilním fyziologickém roztoku obsahující šetrný detergent pro jejich vyšší smáčivost (0,01% Tween-20) při teplotě 4 °C.²¹

Byla vybrána CS a SB média jakožto bohatá a CD médium jakožto chudé na živiny. Ukázalo se však, že *Pseudallescherie* vykazovaly nereprodukovatelný růst na CD médiu a *Scedosporia* na něm nejsou schopna růstu vůbec. Po několika neúspěšných pokusech, kdy byly měněny různé podmínky: množství spor kterými bylo očkováno, původ spor (zda byly připraveny na OA, PDA nebo SBA agaru), očkování pomocí inokula (houba se nechá čtyři dny růst na bohatém médiu a tím se pak očkuje chudé médium) bylo rozhodnuto porovnávat sekretom mezi kmeny na SB médiu, protože na tomto médiu všechny kmeny vykazovaly reprodukovatelný růst. Pro částečné zodpovězení otázky ohledně závislosti extracelulárně sekretovaných proteinů na druhu média byly vybrané kmeny kultivovány na CS médiu a CD médiu s 5% kvasničným extraktem.

Z vyzkoušených metod přípravy vzorků pro SDS-PAGE byla vybrána ultrafiltrace média, jako metoda s nejlepším poměrem efektivnosti vůči požadovanému výsledku.

Po kultivaci všech kmenů bylo zjištěno že *Scedosporia* produkuje do média látky, které na SDS-PAGE tvoří souvislý pruh přes celou elektroforetickou dráhu a zabraňují viditelnosti vlastních proteinů. Další testování se proto zabývalo odstraněním tohoto pozadí. Dle chování látky při elektroforese a na reverzní fázi jsme předpokládali, že látky jsou hydrofobního charakteru a nesou zřejmě záporný náboj v Tris-glycinovém pufru pH 8,8. Odstranění těchto kontaminantů se stalo klíčovou záležitostí pro identifikaci proteinů sekretovaných *Scedosporii* a zároveň to potvrzovalo rozdílnost mezi *Pseudallescherii* a *Scedosporiem*. Byla vyzkoušena iontoměničová chromatografie, chromatografie s hydrofobní interakcí, chromatografie s reverzní fází, acetonová precipitace a ultracentrifugace na kmeni K16 (obr. 2). Ionexová chromatografie byla volena tak, aby propustila, co pokud možno nejvíce nežádoucích látek. Proto bylo voleno pH 3 při kterém jsou proteiny kladně nabitě a váží se tak na záporně nabitý katex. Eluce byla provedena zvýšením iontové síly. Naopak chromatografie s hydrofobní interakcí byla volena tak aby se nežádoucí látky zadržely na stacionární fázi. Vzorek byl nanášen při pH 5 a vysoké iontové síle, došlo k zadržení nežádoucích látek, ale i některých proteinů které byly následně eluovány pufrům o nízké iontové síle o objemu stacionární fáze. Při tomto objemu nedocházelo k eluci nežádoucích látek. Touto metodou se podařilo kontaminanty odstranit (obr. 4).

Jelikož u kmenů (*Pseudallescherie*), které netvoří kontaminanty zabraňující viditelnosti proteinů na SDS-PAGE, bylo pozadí na elektroforetické dráze poměrně

výrazné, byla výše popsaná metoda vyzkoušena pro jeho vylepšení. Jak ukazují obr. 5 a 6, k výraznému zviditelnění proteinů nedošlo, pouze určité proteiny byly nabohaceny. V obr. 5B je pro názornější ukázkou v dráze č.4 vzorek filtrátu *Scedosporia* připravený ultrafiltrací. Tento pokus dokládá rozdílnost vlastností kontaminant sekretovaných *Pseudallescherii* a *Scedosporiem*. Tímto se nabízí otázka: Co konkrétněji ony kontaminanty jsou a případně jakou mohou hrát roli ve smyslu patogenity hub?

Látkami, které tvoří souvislý pruh přes celou elektroforetickou dráhu, by mohly být melaniny – pigmenty v přírodě se nachází běžně v mnoha organismech, v nichž plní mnoho různých, především ochranných funkcí. Jsou to tmavě hnědé až černé polymery, hydrofobního charakteru, záporně nabitě, vznikající oxidativní polymerací fenolických nebo indolových sloučenin.³⁹ Pravděpodobně největší pozornost budí v souvislosti s tím, že některé studie prokázaly spojitost schopnosti produkce melaninů patogenními mikroorganismy s jejich virulencí.⁴⁰ Melaniny mohou fungovat jako ochranné látky proti oxidativním látkám hubící patogenní mikroorganismy a snižují vnímavost buněk obsahující tyto pigmenty vůči antifungálním látkám.^{41, 42} Fugální melaniny jsou také imunoaktivními látkami.^{43, 44} Extracelulárně sekretovaný melanin byl prokázán u druhu *Fonsecaea pedrosoi* což je původce chromoblastomykózy. Patogen proniká sporami nebo myceliem pod kůži v oblasti poranění a začne produkovat hnědo-žluté buňky obsahující ve své stěně melaniny.^{45, 46}

Dalším rozdílem byla tvorba glukanu, který z média při -20 °C vyprecipitoval. U filtrátů kmenů, které tvořily kontaminanty (*Scedosporia*), nedocházelo při -20 °C k vyprecipitování glukanu. Výjimkou byl kmen K24 (*Scedosporium apiospermum*), který netvořil kontaminanty a při -20 °C docházelo k vyprecipitování glukanu. Jeho podobnost s *Pseudallescheriemi* potvrzuje skutečnost, že se jedná o anamorfu *P. boydii*. K vydělení kmenů sobě podobných dále přispěla jejich sporulace, proteinový profil na SDS-PAGE a celkový makroskopický popis kmenů.

10.2 Porovnání kmenů

Všechny kmeny byly navzájem porovnávány na SB médiu a byly rozděleny do skupin na základě podobnosti těchto faktorů: tvorba glukanu, tvorba kontaminant, sporulace, proteinový profil na SDS-PAGE a celkový makroskopický vzhled.

Ve skupině *Pseudallescherii* jsou si nejvíce podobné kmeny K4, K5, K9, K10 a K11. Těmto kmenům se podobá i kmen K24 (*S. apiospermum*) což je anamorfa *P. boydii*. U ostatních kmenů *Pseudallescherii*: K2, K3, K6, K7, K8, K12 a K22 nenacházíme výraznějších podobností vzhledem k profilu extracelulárně sekretovaných proteinů na SDS-PAGE. Z makroskopického hlediska byl pozorován u všech *Pseudallescherii* veliký nárůst světlé biomasy, podobně jako i u kmene K24.

U *Scedosporii* byla pozorována větší podobnost, výjimku tvoří kmeny K21 a K24, ostatní vykazovaly téměř identické vlastnosti. Jejich sporulace je o řád až dva vyšší než u *Pseudallescherii*, z makroskopického hlediska byl pozorován růst tmavé biomasy a jejich profil extracelulárně sekretovaných proteinů na SDS-PAGE byl téměř identický.

Posledním pokusem v porovnávání extracelulárně sekretovaných proteinů bylo porovnat závislost sekrece proteinů na typu média, kde byly pozorovány rozdíly. Jak je patrné z obr. 8 a 9 na CS médiu byl obecně proteinový profil na SDS-PAGE chudší co se týče množství různých proteinů, ale v kvantitativně byly určité proteiny sekretovány výrazněji než na CD médiu s 5% kvasničným extraktem. Toto může být vysvětleno tím, že CS médium je více komplexnější, a tudíž vytváří vhodnější podmínky pro optimální růst a houba tak nemusí vyvinout vyšší sekreční aktivitu co do různorodosti možných extracelulárně sekretovaných trávicích enzymů.

10.3 Proteiny identifikované hmotnostní spektrometrií

Mezi identifikovanými proteiny byly předpokládány proteiny ze skupiny trávicích enzymů sloužící k degradaci složitých látek na jednodušší, které jsou buňky schopny přijmout a metabolizovat, ochranné proteiny a proteiny sloužící buňkám ke komunikaci s prostředím.

Identifikované trávicí enzymy byly ze třídy hydrolas, což jsou enzymy katalyzující hydrolytické štěpení vazeb vzniklých kondensací molekul za odštěpení vody: karboxypeptidasa – katalyzuje odštěpování aminokyseliny z C-konce peptidového řetězce, glukosidasa – odštěpuje glukosu ze sacharidového řetězce, hexosaminidasa – je to exoglykosidasa, u hub je součástí důležitého chitinolytického systému v buněčné stěně rostoucích hyf, podílí se na zpracování chitinu, lysofosfolipasa – což je esterasa která štěpí esterové vazby.

Jako ochranný protein byla identifikována superoxid dismutasa – enzym, který katalyzuje disproportionaci superoxidu (O_2^-) na kyslík a peroxid (O_2^{2-}), je to tedy důležitý antioxidační ochranný enzym v podstatě všech buněk vystavených působení kyslíku. Druhým ochranným proteinem byla identifikována katalasa – enzym ze třídy oxidoreduktas katalyzující disproportionaci toxického peroxidu vodíku: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$. Je přítomna ve všech živočišných orgánech (zejm. v erythrocytech a v peroxisomech jaterních buněk), v rostlinných tkáních a aerobních mikroorganismech. Dalším identifikovaným proteinem byla monokarboxylát permeasa, což je membránový protein, který usnadňuje procházení monokarboxylátu přes membránu. Otázkou tedy zůstává proč byl nalezený jako extracelulárně sekretovaný protein. Největším přínosem této práce se zdá být identifikace elicitinu.

Elicitiny jsou rodina proteinů, které jsou známy produkcí u rodu *Phytophthora*, což je mikroskopický organismus patřící do říše *Protista*. Tyto mikroorganismy žijí parazitickým způsobem života, parazitují převážně na vyšších suchozemských rostlinách. Elicitiny jsou tzv. elicitory, což jsou signální molekuly, díky kterým jsou rostliny schopny rozeznat patogen a reagovat na něj.⁴⁷ Elicitin byl identifikován z kmene K5 a K4 ale z SDS-PAGE je patrné že ho produkují téměř všechny *Pseudallescherie*, jedná se o nejintenzivnější proteinový proužek v oblasti okolo 14-15 kDa.

11 Závěr

Závěrem bych výsledky své práce shrnula do několika bodů:

- Všechny kmeny *Pseudallescherie* a *Scedosporia* se kterými jsem pracovala se podařilo nakultivovat na SB médiu a na základě několika faktorů vydělit sobě podobné kmeny. Jak bylo popsáno výše je rod *Pseudallecherie* velmi geneticky rozmanitý a tudíž pro správnou léčbu infekcí způsobených těmito patogeny je klíčové stanovení hranic druhů.
- Při přípravě vzorků pro SDS-PAGE byly zjištěny značné rozdíly mezi *Pseudallescherií* a *Scedosporií* v sekreci kontaminant znesnadňujících viditelnost proteinů na elektroforetických drahách. *Scedosporia* sekretují látky, které se svými vlastnostmi podobají melaninu. Jelikož v poslední době melanin budí pozornost ve spojitosti s virulencí patogenních mikroorganismů, je toto zajímavým výsledkem.
- Podařilo se identifikovat několik proteinů. Většina z nich byly běžné trávicí enzymy, případně ochranné enzymy. Nejzajímavějším nálezem však byl protein ze skupiny elicitinů, který se vyskytoval téměř ve všech kmenech *Pseudallescherií*. Jak již bylo zmíněno, tato skupina proteinů funguje jako tzv. elicitory a tedy je z námi identifikovaných proteinů nejvýznamnějším kandidátem na marker infekce.

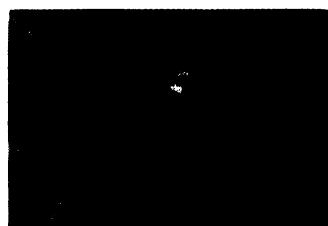
12 Příloha



K02



K03



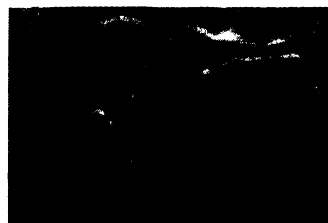
K04



K05



K06



K07



K08



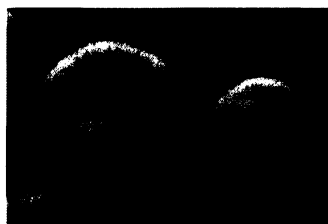
K09



K10



K11



K12



K13



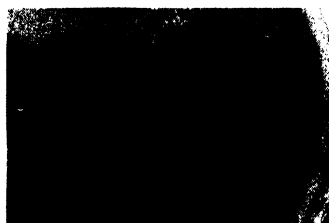
K14



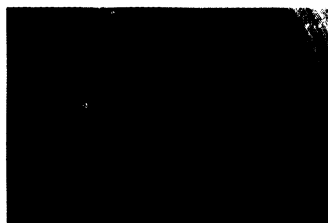
K15



K16



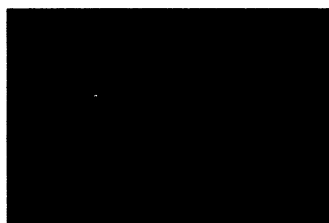
K17



K18



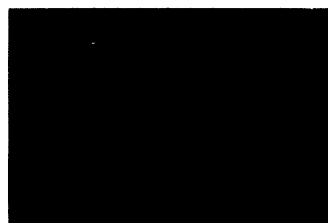
K19



K21



K22



K24

Fotografie jednotlivých kmenů

Seznam literatury

1. Kalina, T.; Váňa, J.: *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii* Karolinum, Praha: 2005.
2. medical microbiology, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mmed>
3. <http://www.sci.muni.cz/botany/mycology/mykosyst.htm>
4. de Hoog, G. S.; Guarro, J.; Gene', J.; Figueras, M. J.: *Atlas of clinical fungi* Centraalbureau voor Schimmelcultures: Utrecht, 2000.
5. April, T. M.; Abbott, S. P.; Foght, J. M.; Currah, R. S.: Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microascaceae). *Can. J. Microbiol.* **44**, 270-8 (1998).
6. de Hoog, G. S.; Marvin-Sikkema, F. D.; Lahpoor, G. A.; Gottschall, J. C.; Prins, R. A.; Gueho, E.: Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses.* **37**, 71-8 (1994).
7. Guarro, J.; Kantarcioglu, A. S.; Horre, R.; Rodriguez-Tudela, J. L.; Cuenca Estrella, M.; Berenguer, J.; de Hoog, G. S.: *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med. Mycol.* **44**, 295-327 (2006).
8. Kaltseis, J.; Rainer, J.: Abundance of *Pseudallescheria boydii*, an opportunistic pathogen, in urban habitats. *Mycoses.* **49**, 359 (2006).
9. Gilgado, F.; Cano, J.; Gene, J.; Guarro, J.: Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4930-42 (2005).
10. Tomsikova, A.: Causative agents of nosocomial mycoses. *Folia Microbiol. (Praha)* **47**, 105-12 (2002).
11. Gueho, E.; de Hoog, G. S.: Taxonomy of the medical species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium*. *J. Mycol. Med.* **1**, 3-9 (1991).
12. Rainer, J.; de Hoog, G. S.; Wedde, M.; Graser, Y.; Gilges, S.: Molecular variability of *Pseudallescheria boydii*, a neurotropic opportunist. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3267-73 (2000).
13. Capilla, J.; Serena, C.; Pastor, F. J.; Ortoneda, M.; Guarro, J.: Efficacy of voriconazole in treatment of systemic scedosporiosis in neutropenic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3976-8 (2003).
14. Carrillo, A. J.; Guarro, J.: In vitro activities of four novel triazoles against *Scedosporium spp.* *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2151-3 (2001).

15. O'Bryan, T. A.: Pseudallescheriasis in the 21st century. *Expert review of anti-infective therapy* **3**, 765-773 (2005).
16. www.doctorfungus.org
17. Buzina, W.; Feierl, G.; Haas, D.; Reinthaler, F. F.; Holl, A.; Kleinert, R.; Reichenpfader, B.; Roll, P.; Marth, E.: Lethal brain abscess due to the fungus *Scedosporium apiospermum* (teleomorph *Pseudallescheria boydii*) after a near-drowning incident: case report and review of the literature. *Med. Mycol.* **44**, 473-7 (2006).
18. Cimon, B.; Carrere, J.; Vinatier, J. F.; Chazalotte, J. P.; Chabasse, D.; Bouchara, J. P.: Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**, 53-6 (2000).
19. Firdova, M.; Tkacova, E.; Jesenska, Z.; Minova, M.: Mycotic keratitis with uveitis cause by *Scedosporium apiospermum*. *Cesk. Slov. Oftalmol.* **53**, 248-51 (1997).
20. Conesa, A.; Punt, P. J.; van Luijk, N.; van den Hondel, C. A.: The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal. Genet. Biol.* **33**, 155-71 (2001).
21. Borman, A. M.; Szekely, A.; Campbell, C. K.; Johnson, E. M.: Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia* **161**, 361-8 (2006).
22. http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=P017
23. Samson, R.; Hoekstra, E.; Frisvad, J.: *Introduction to food- and airborne fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures: Utrecht, 2004.
24. Štulík, K.; Ševčík, J.; Pacáková, V.; Jelínek, I.; Coufal, P.; Bosáková, Z.: *Analytické separační metody*. Karolinum, Praha: 2004.
25. Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T.: *Molecular Cloning/A Laboratory Manual* Nolan Ch. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: New York 1989.
26. Pešlová, K.: Hmotnostní spektrometrie a chemické modifikace jako nástroj ke studiu protein-proteinové interakce. Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie, (2006)
27. Mazanec, K.; Chmelik, J.: Využití MALDI-TOF MS při analýze směsí polymerů. *Chem. List.* **99**, 175-178 (2005).
28. Šedo, O., Havel, J.: Analýza peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. *Chem. List.* **97**, 109-113 (2005).

29. Wang, D.; Kalb, S. R.; Cotter, R. J.: Improved procedures for N-terminal sulfonation of peptides for matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay peptide sequencing. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **18**, 96-102 (2004).
30. Zhang, X.; Rogowska-Wrzesinska, A.; Roepstorff, P.: On-target sample preparation of 4-sulfophenyl isothiocyanate-derivatized peptides using AnchorChip Targets. *J. Mass. Spectrom.* **43**, 346-59 (2008).
31. http://www.matrixscience.com/search_form_select.html
32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
33. <http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/msblast.html>
34. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/blast2/index.html>
35. Medina, M. L.; Haynes, P. A.; Breci, L.; Francisco, W. A.: Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Proteomics* **5**, 3153-61 (2005).
36. Schwienbacher, M.; Weig, M.; Thies, S.; Regula, J. T.; Heesemann, J.; Ebel, F.: Analysis of the major proteins secreted by the human opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* under in vitro conditions. *Med. Mycol.* **43**, 623-30 (2005).
37. Larcher, G.; Cimon, B.; Symoens, F.; Tronchin, G.; Chabasse, D.; Bouchara, J. P.: A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum*. *Biochem. J.* **315** 119-26 (1996).
38. da Silva, B. A.; dos Santos, A. L.; Barreto-Bergter, E.; Pinto, M. R.: Extracellular peptidase in the fungal pathogen *Pseudallescheria boydii*. *Curr. Microbiol.* **53**, 18-22 (2006).
39. Nosanchuk, J. D.; Casadevall, A.: The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell. Microbiol.* **5**, 203-23 (2003).
40. Gomez, B. L.; Nosanchuk, J. D.: Melanin and fungi. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **16**, 91-6 (2003).
41. Stevenson, F. J.; Goh., K. M.: Infrared spectra of humic and fulvicacids and their methylated derivatives: evidence for non-specificity of analytical methods for oxygen containing functional groups. *Soil. Sci.* **113**, 334-335 (1972).
42. Van Duin, D.; Casadevall, A.; Nosanchuk, J. D.: Melanisation of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibility to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3394-3400 (2002).
43. Nosanchuk, J. D.; Rosas, A. L.; Casadevall, A.: The antibody response to fungal melanin in mice. *J. Immunol.* **160**, 6026-6031 (1998).
44. Rosas, A. L.; Nosanchuk, J. D.; Gomez, B. L.; Edens, W. A.; Henson, J. M.;

- Casadevall, A.: Isolation and serological analyses of fungal melanins. *J. Immunol. Methods* **244**, 69-80 (2000).
45. da Silva, J. P.; Alviano, D. S.; Alviano, C. S.; de Souza, W.; Travassos, L. R.; Diniz, J. A.; Rozental, S.: Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **33**, 63-9 (2002).
46. McGinnis, M. R.; Hilger, A. E.: Infections caused by black fungi. *Arch. Dermatol.* **123**, 1300-2 (1987).
47. Ponchet, M.; Panabieres, F.; Milat, M. L.; Mikes, V.; Montillet, J. L.; Suty, L.; Triantaphylides, C.; Tirilly, Y.; Blein, J. P.: Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 1020-47 (1999).