

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

**Metody dekontaminace rekombinantních  
proteinů od bakteriálního lipopolysacharidu**

Bakalářská práce

Lucie Hrubcová

Školitel: RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.

České Budějovice 2020

Hrubcová L., 2020: Metody dekontaminace rekombinantních proteinů od bakteriálního lipopolysacharidu. [Methods of decontamination of recombinant proteins from bacterial lipopolysaccharide. Bc. Thesis, in Czech.] – 49 p., Faculty of Science. University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

In this work, three decontamination methods based on two-phase micellar system and affinity chromatography were used to decontaminate recombinant proteins from bacterial lipopolysaccharide and to determine which method is the most effective. The efficiency of this method was measured using various recombinant proteins at several protein concentrations. Three different assays, two chromogenic and one fluorogenic, were used to measure the concentration of endotoxins in samples. The most accurate method for measuring the concentration of endotoxins was determined.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Lucie Hrubcová

**Poděkování:**

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Jindřichu Chmelařovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, trpělivost a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, příteli a kamarádům za morální podporu při psaní této práce.

# Obsah

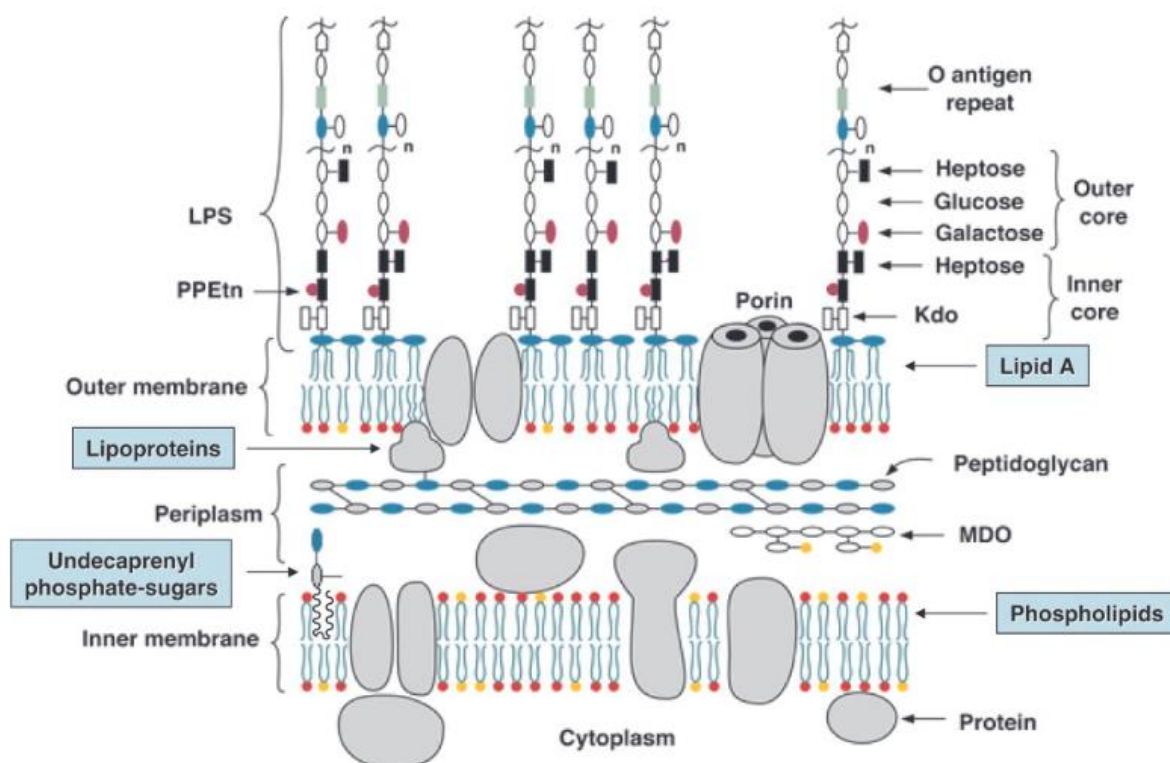
<b>1.</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
1.1.	Struktura a syntéza lipopolysacharidů.....	2
1.1.1.	Minimální struktura lipopolysacharidů .....	4
1.1.2.	Struktura a syntéza lipidu A.....	4
1.1.3.	Struktura a syntéza O-antigenu .....	4
1.1.4.	Struktura a syntéza jádrových oligosacharidů .....	5
1.2	Role lipopolysacharidů v zánětu .....	5
1.2.1	TLR receptory .....	6
1.2.2	Aktivace TLR4.....	6
1.3	Citlivost obratlovců na LPS.....	7
1.4	Potřeba odstranění LPS .....	7
1.4.1	Metody odstranění LPS .....	8
1.5	Metody detekce LPS .....	10
<b>2.</b>	<b>Cíle práce.....</b>	<b>12</b>
<b>3.</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>13</b>
3.1.	Pomůcky a chemikálie.....	13
3.2.	Metody.....	13
3.2.1.	Příprava vzorků.....	14
3.2.2.	Fázová separace Tritonem X-114 .....	15
3.2.3.	ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript).....	15
3.2.4.	Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific).....	16
3.2.5.	PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza) .....	17
3.2.6.	Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (ThermoFisher Scientific)....	18
3.2.7.	ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript) .....	19
3.2.8.	Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific).....	20
<b>4.</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>21</b>
4.1.	Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (ThermoFisher Scientific)....	21
4.1.1.	Triton X-114 .....	22
4.1.2.	Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific).....	23
4.1.3.	ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript).....	24
4.2.	ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript) .....	25
4.2.1.	Triton X-114 .....	26
4.2.2.	Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific).....	27
4.2.3.	ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript).....	28

4.3.	PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza) .....	29
4.3.1.	Triton X-114 .....	30
4.3.2.	Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific) .....	30
4.3.3.	ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript) .....	31
4.4.	Měření proteinu - Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) .....	33
4.4.1.	Triton X-114 .....	35
4.4.2.	Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific) .....	36
4.4.3.	ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript) .....	36
<b>5.</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>40</b>
<b>6.</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>44</b>
<b>7.</b>	<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>45</b>
<b>8.</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>46</b>

# 1. Úvod

Gramnegativní bakterie mají asymetrickou lipidovou dvojvrstvu, vnější membránu, která obepíná buněčnou stěnu. Vnitřní vrstva vnější membrány je složena z různých glycerofosfolipidů na její vnitřní i vnější straně (Meredith *et al.*, 2006) (Doerrler, 2006). Vnější vrstva vnější membrány je asymetrická lipidová dvojvrstva, jejíž vnitřní plochu tvoří fosfolipidy, zatímco vnější plocha je tvořena lipopolysacharidy (Meredith *et al.*, 2006).

Bakteriální lipopolysacharid (LPS) je komplexní glykolipid na bázi glukosaminu, specifický pro gramnegativní bakterie (Doerrler, 2006). Pro mnoho gramnegativních bakterií je LPS esenciální, existují ale výjimky jako *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* a *Acinetobacter baumannii*, tyto bakterie mohou růst bez LPS (Morè *et al.*, 2019). LPS se obvykle skládá z hydrofobní části známé jako lipid A (endotoxin), která je kovalentně spojená s hydrofilní částí, oligosacharidem a specifickým polysacharidem (O-antigen) (Obr. 1) (Raetz a Whitfield, 2002) (Lopes *et al.*, 2010).

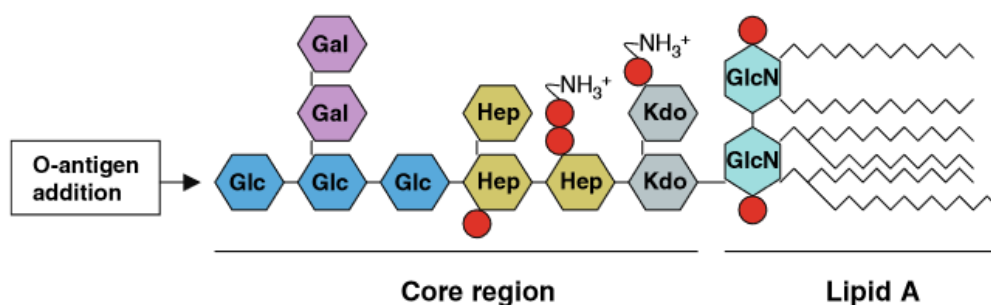


Obr. 1: Model vnitřní a vnější membrány *Escherichia coli* K-12. Spodní, vnitřní membrána tvořená fosfolipidy je od horní, vnější membrány oddělena periplazmou. LPS se nacházejí na vnější straně vnější membrány, polysacharidy tvořící jádro a O-antigen z jejího povrchu vyčnívají. Převzato z Raetz a Whitfield, 2002.

Každá buňka *E. coli* obsahuje přibližně 2 miliony molekul LPS (Magalhães a Pessoa, 2010). Molekuly LPS pokrývají skoro tři čtvrtiny celkové plochy povrchu vnějších buněk, což odpovídá přibližně 30 % z celkové hmotnosti vnější membrány. LPS je hlavním antigenem spojeným s vnější membránou, a proto se podílí na širokém spektru patologických a fyziologických aktivit spojených s imunitní odpovědí člověka. Vrstva LPS je nezbytná jak pro formu, tak pro funkci vnější membrány gramnegativních bakterií. LPS je tedy klíčovým hráčem v patogenezi, ale i kritickým determinantem přežití gramnegativních bakterií (Raetz a Whitfield, 2002).

### 1.1. Struktura a syntéza lipopolysacharidů

Molekula LPS může být rozdělena do tří částí: lipid A, polysacharidy tvořící jádro a O-antigen (Obr. 2). Lipid A je hydrofobní složka LPS, která se nachází ve vnější vrstvě vnější membrány gramnegativních bakterií. Polysacharidy tvořící jádro a O-antigeny vyčnívají z povrchu bakterie. Podrobná struktura LPS se u jednotlivých bakterií může lišit, což ovlivňuje virulenci bakterie (Wang a Quinn, 2010).



Obr. 2 Struktura LPS u *E. coli*. Fosfáty jsou znázorněny červenými kolečky, ethanolamin lomenými čarami s aminovými skupinami a cukry jsou znázorněny pomocí hexagonů. Monofosfát na lipidu A se váže na monofosfát lipidu A sousedního LPS. Převzato z Doerrler, 2006.

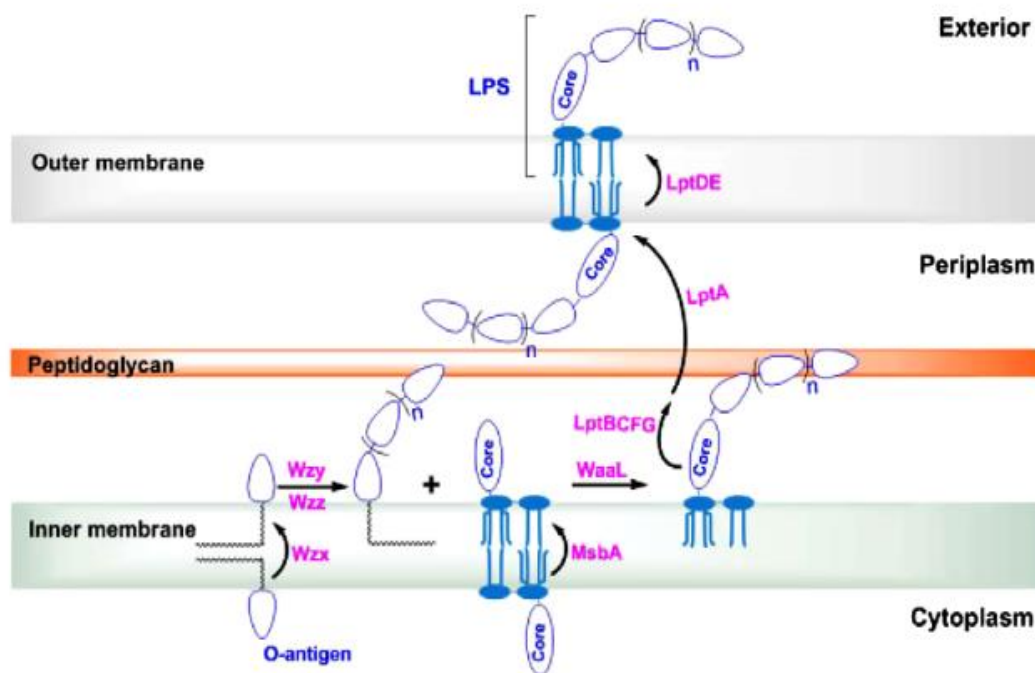
LPS je uchyceno na svém místě ve vnější membráně pomocí dvou mechanismů. První zahrnuje vazbu dvojmocného kationtu na jiné molekuly LPS, pravděpodobně interakcí prostřednictvím monofosfátu terminální jednotky lipidu A. Druhým mechanismem vazby LPS je hydrofobní a iontová interakce s jinými molekulami v membráně (Leive, 1974).

Přestože je LPS distribuováno na povrchu buňky, jeho syntéza je zahájena v cytoplazmě. Proces syntézy LPS v cytoplazmě a jeho export na povrch bakterie byl nejvíce prostudován u *E. coli*. Biosyntéza LPS v *E. coli* je zahájena z molekuly UDP-N-acetylglukosaminu (UDP-GlcNAc), což je uridin difosfát N-acetylglukosamin. Několik enzymů postupně přeměňuje UDP-GlcNAc na Kdo<sub>2</sub>-lipid A, zatímco se na lipidu A postupně



sestavují jádrové oligosacharidy za pomoci glykosyltransferáz a nukleotidových cukrů jako donorů (Wang a Quinn, 2010).

Jakmile jsou cytoplazmatické kroky biosyntézy kompletní, nově syntetizovaný lipid A s jádrovými oligosacharidy a O-antigen jsou transportovány přes vnitřní membránu (Doerrler, 2006). K transportu lipidu A s jádrovými oligosacharidy přes vnitřní membránu je zapotřebí přítomnosti MsbA proteinu, lipidové flipázy na vnitřní membráně. MsbA má mezi svými dvěma podjednotkami štěrbinu orientovanou směrem k cytoplazmě. Tato štěrbinu je dostatečně velká, aby mohla pojmout lipid A. Vazba ATP a hydrolýza způsobí konformační změnu, která má za následek extrakci lipidů na periplazmatický povrch vnitřní membrány. Pokud dojde ke ztrátě funkce MsbA, lipopolysacharidy a fosfolipidy se akumulují na vnitřní membráně bakterie (Doerrler a Raetz, 2002) (Wang a Quinn, 2010). Transport O-antigenu přes vnitřní membránu je zprostředkován proteiny Wzx (Obr. 3) (Wang a Quinn, 2010).



Obr. 3 Export LPS a jeho prekurzorů u *E. coli*. Protein MsbA přenese oligosacharidové jádro s lipidem A z vnitřní strany na vnější stranu vnitřní membrány. O-antigen je přenesen zvláště pomocí Wzx transportéru. Poté je polymerizován proteiny Wzy a Wzz a transportován na oligosacharidové jádro s lipidem A pomocí proteinu WaaL. Proteiny LptA, LptB, LptC, LptF a LptG přesunou LPS z periplazmy na vnitřní plochu vnější membrány a proteiny LptD a LptE přesunou LPS na vnější stranu vnější membrány. Převzato z Wang a Quinn, 2010.

Po transportu lipidu A a O-antigenu přes vnitřní membránu následuje navázání O-antigenu na lipid A s jádrovými oligosacharidy pomocí proteinu WaaL, čímž vznikne kompletní molekula LPS. Přenos LPS přes periplazmu a peptidoglykan na vnější stranu vnější membrány je umožněn sedmi esenciálními proteiny, LptA až LptG, které utvářejí přes

periplazmu můstek (Morè *et al.*, 2019) (Wang a Quinn, 2010). Pro transport LPS na vnější membránu je zapotřebí proteinů LptD a LptE (Wang a Quinn, 2010).

### 1.1.1. Minimální struktura lipopolysacharidů

Minimální struktura lipopolysacharidu (Re-LPS) potřebná pro růst *E. coli* nebo jiné gramnegativní bakterie se skládá z lipidu A a dvou Kdo (kyselina 3-deoxy-D-manno-okt-2-ulózonová) (Raetz a Whitfield, 2002). Kdo je hlavní složkou LPS, proto je jediným konzervovaným útvarem nacházejícím se v téměř všech strukturách LPS (Meredith *et al.*, 2006). U kmenů divokého typu mohou být přítomny ještě další cukry a O-antigen. Ty mohou bakterii pomáhat odolávat antibiotikům, komplementovému systému a dalším vlivům vnitřního prostředí hostitele (Raetz a Whitfield, 2002). Kmeny, které mají jen minimální strukturu LPS (Re-LPS), jsou hypersenzitivní na hydrofobní antibiotika, zatímco kmeny s kompletním LPS mají evoluční výhodu. Minimální struktura LPS, při které dochází k růstu *E. coli*, je mezi jednotlivými bakteriálními druhy zakonzervovaná a je plně aktivní jako endotoxin (Raetz *et al.*, 1991).

### 1.1.2. Struktura a syntéza lipidu A

Lipid A, fosfolipid na bázi glukosaminu, tvoří vnější vrstvu vnější membrány většiny gramnegativních bakterií (Raetz a Whitfield, 2002). Lipid A je spojený se specifickým polysacharidem (O-antigen) pomocí oligosacharidového jádra (Meredith *et al.*, 2006). Je zodpovědný za většinu biologické aktivity lipopolysacharidů, například toxicitu (Lopes *et al.*, 2010) a jeho struktura je konzervativnější než jádrové oligosacharidy nebo O-antigeny (Wang a Quinn, 2010).

Prvním krokem v syntéze LPS, ke které dochází na vnitřní straně vnitřní membrány bakterií, je syntéza Kdo<sub>2</sub>-lipid A (Doerrler a Raetz, 2002). Počátečním stavebním blokem této syntézy je UDP-GlcNAc. Dráha je zprostředkována devíti enzymy (LpxA, LpxB, LpxC, LpxD, LpxH, LpxK, LpxL, LpxM a KdtA) a probíhá v cytoplazmě a na vnitřním povrchu vnitřní membrány. (Wang a Quinn, 2010).

### 1.1.3. Struktura a syntéza O-antigenu

O-antigeny v LPS vykazují značnou rozmanitost (Wang a Quinn, 2010), která dává vzniku O-stereotypní specifitě napříč bakteriemi. Strukturální rozmanitost O-antigenů je způsobena složením cukru, jejich vazbami a substitucí monomerů cukru nebo necukernými zbytky (Whitfield, 1995). O-antigeny mohou být homopolymery nebo heteropolymery a spojení

jednotek v O-antigenu může být lineární i rozvětvené. Jednotky O-antigenu se mohou navzájem lišit jak typem monomeru, tak i polohou a stereochemií O-glykosidických vazeb (Wang a Quinn, 2010).

O-antigen je podobně jako jádrový oligosacharid syntetizován na cytoplazmatickém povrchu vnitřní membrány, za použití nukleotidových cukrů jako donorů. Jednotlivé monomery nejsou přenášeny přímo na rostoucí molekulu LPS, ale jsou spojovány pomocí enzymů glykosyltransferázy na undekapenylfosfátu, nosiči vázaném na membránu (Wang a Quinn, 2010). Po dokončení syntézy je O-antigen přemístěn do periplazmy, polymerizován pomocí W<sub>zy</sub> a W<sub>zz</sub> a kovalentně se váže na již vytvořené jádro lipidu A na periplazmatické ploše plazmatické membrány (Whitfield, 1995) (Wang a Quinn, 2010).

#### 1.1.4. Struktura a syntéza jádrových oligosacharidů

Jádrové oligosacharidy se postupně vytvářejí na lipidu A na vnitřní membráně gramnegativních bakterií. Tento proces zahrnuje řadu membránových glykosyltransferáz za použití nukleotidových cukrů jako donorů. Biosyntéza jádrových oligosacharidů je rychlá a účinná, z čehož vyplývá, že glykosyltransferázy fungují jako koordinovaný komplex. Jádrové oligosacharidy lze rozdělit do dvou strukturně odlišných oblastí. Vnitřní jádro, které se připojuje k lipidu A a vnější jádro, které se připojuje k repetitivnímu O-antigenu (Wang a Quinn, 2010). Vnější jádro je oproti vnitřnímu jádru méně konzervované, může se lišit jak ve složení sacharidů, tak v glykosidických vazbách. Vnitřní jádro obsahuje u většiny gramnegativních bakterií alespoň jednu molekulu Kdo (Meredith *et al.*, 2006).

Oligosacharidy s vnitřním jádrem typicky obsahují zbytky Kdo a L-glycero-D-mannoheptozy (Hep). Zbytek Kdo je nejkonzervovanější složkou v jádrové oblasti LPS. Oligosacharidy s vnějším jádrem vykazují větší strukturní diverzitu než oligosacharidy s vnitřním jádrem. Struktury jádrových oligosacharidů se u různých kmenů gramnegativních bakterií liší, ale páteří všech je lineární oligosacharid se šesti jednotkami, které mohou být připojeny k jiným jednotkám za vzniku větví. Běžné cukry tvořící jádrový oligosacharid jsou Kdo, Hep, D-glukóza a D-galaktóza (Wang a Quinn, 2010).

## 1.2 Role lipopolysacharidů v zánětu

Lipid A působí jako silný aktivátor vrozené imunitní odpovědi u savců prostřednictvím Toll-like receptorů (TLR). Během růstu bakterie nebo při její smrti během infekce dochází k uvolňování lipidu A, což způsobuje nadměrnou aktivaci TLR (Doerrler, 2006). To má za následek stimulaci monocytů, makrofágů a neutrofilů k produkci zánětlivých faktorů, jako

TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) a interleukiny (IL-6, IL-10, IL-17, IL-1 $\beta$ , atd). Dochází ke zvýšení tělesné teploty, chemotaxi leukocytů, aktivaci komplementu a koagulačního systému. Dále dochází ke snížení krevního tlaku a v případě, že nedojde k léčbě, ke gramnegativnímu septickému šoku (Liu *et al.*, 2019). Díky své zakonzervované stavbě je většina typů molekul lipidu A detekována vrozeným imunitním systémem již na pikomolární úrovni receptorem na makrofázích a endoteliálních buňkách. Tento receptor se označuje jako TLR4 (Doerrler, 2006).

### 1.2.1 TLR receptory

Imunitní systém je možné rozdělit na specifickou imunitu a nespecifickou vrozenou imunitu. K rozpoznání patogenů v hostiteli u vrozené imunity slouží molekulární receptory, které se souhrnně nazývají Pattern recognition receptory (PRR). Tyto receptory se nacházejí v séru, na povrchu buněk, v cytoplazmě a v endozomech. PRR lze obecně rozdělit do tří kategorií, a to receptory NLR (NOD like receptory), RLR (RIG like receptory) a TLR (Toll-like receptory) (Vidya *et al.*, 2018). Aktivace PRR vede k opsonizaci patogenů, cytoskeletální reorganizaci vedoucí k fagocytóze, sekreci imunitních mediátorů (prozánětlivé cytokiny) a k aktivaci adaptivního imunitního systému (Lacagnina, Watkins a Grace, 2017).

TLR jsou transmembránové proteiny exprimované na dendritických buňkách, makrofázích, NK buňkách, T a B lymfocytech a dalších neimunitních buňkách, jako jsou epiteliální, endoteliální buňky a fibroblasty (Vidya *et al.*, 2018). TLR rozpoznává ligandy, tzv. PAMP (pathogen-associated molecular patterns) na infekčních mikroorganismech a endogenní molekuly. TLR rozezná ligand, to způsobí dimerizaci receptoru a indukci imunitních mediátorů, prozánětlivých cytokinů a chemokinů (Lacagnina, Watkins a Grace, 2017).

### 1.2.2 Aktivace TLR4

Toll-like receptor 4 je převážně exprimován na povrchu krvetvorných buněk, monocytů, dendritických buněk a makrofágů (Cochet a Peri, 2017). LPS je ligandem pro TLR4 (Lacagnina, Watkins a Grace, 2017). TLR4 detekuje volný LPS uvolněný z buněčné stěny gramnegativních bakterií ve formě jednotlivých molekul nebo agregátů (Cochet a Peri, 2017).

Protein vázající LPS (LBP) dopraví LPS na CD14 (cluster of differentiation), chaperonový protein dodávající LPS do komplexu TLR4. Aby mohlo být LPS rozpoznáno, je zapotřebí koreceptorového myeloidního diferenciačního faktoru 2 (MD-2) poskytujícího hydrofobní jádro, které může vázat hexaacylovaný řetězec lipidu A z LPS (Lacagnina,

Watkins a Grace, 2017). Přenos LPS na MD-2 iniciuje primární odpověď přes MyD88 (gen myeloidní diferenciacní primární odpovědi 88) (Cochet a Peri, 2017). Jeho aktivace vede k aktivaci NF- $\kappa$ B a IFN regulující faktor 5 (IRF5), ústící v transkripci cytokinů, chemokinů a dalších imunitních mediátorů (Lacagnina, Watkins a Grace, 2017). Vznik hexamerového komplexu (TLR4/MD-2/LPS)<sub>2</sub> je prvním krokem ve spuštění zánětlivého procesu (Cochet a Peri, 2017).

### 1.3 Citlivost obratlovců na LPS

Zánět je častý patologický rys vyskytující se u časné infekce nebo poranění. Je součástí imunitní odpovědi organismu (Liu *et al.*, 2019). Poté, co je organismus vystaven patogenu (LPS), dochází k uvolňování prozánětlivých cytokinů aktivovanými imunitními buňkami. Vystavení LPS v organismu přechodně zvýší IL-6 a TNF- $\alpha$  a je možné pozorovat další příznaky nemoci, jako jsou zvýšení tělesné teploty, únava (Draper *et al.*, 2018).

V normálním případě se u zdravého člověka pohybuje plazmatická hodnota endotoxinu kolem 3 pg/ml. Malé množství endotoxinu, uvolněné do krve, je okamžitě zneškodněno fagocytózou neutrofilů, monocytů a retikuloendoteliálními buňkami. Nezpůsobí tudíž žádné významné poškození orgánů (Liu *et al.*, 2019). Pyrogenní reakce a endotoxinový šok nastávají u savců při aplikaci intravenózní injekce LPS o koncentraci přibližně 1,00 ng/ml (Schumann *et al.*, 1990).

Množství endotoxinu, vyvolávající imunitní reakci, není mezi organismy stejné. Například množství endotoxinu potřebného k vyvolání plazmatické koncentrace IL-6 ~1000 pg/ml není u lidí a myši stejné. U lidí je potřeba 2 ng/kg tělesné váhy, kdežto u myši je potřeba 500 ng/kg tělesné váhy (Copeland *et al.*, 2005).

### 1.4 Potřeba odstranění LPS

V biotechnologickém průmyslu se gramnegativní bakterie, především *E. coli*, široce používají k syntéze produktů rekombinantní DNA, rekombinantních peptidů a proteinů. Takovéto produkty jsou vždy kontaminované endotoxiny, které mohou u lidí a zvířat vyvolat nežádoucí účinky. Proto musí být věnována takto vyrobeným proteinům zvláštní pozornost a musí být snížen obsah endotoxinu na minimum (Magalhães a Pessoa, 2010).

Endotoxiny jsou velice stabilní molekuly, jejich biologicky aktivní část přežije i extrémní teploty a pH. Aby bylo v laboratorních podmínkách možné zničit endotoxiny, musí být dosaženo teplot 180 - 250 °C a kyseliny nebo zásady o koncentraci alespoň 0,1 M. Je tedy poměrně obtížné odstranit endotoxiny z citlivých látek, například z proteinů (Petsch, 2000).

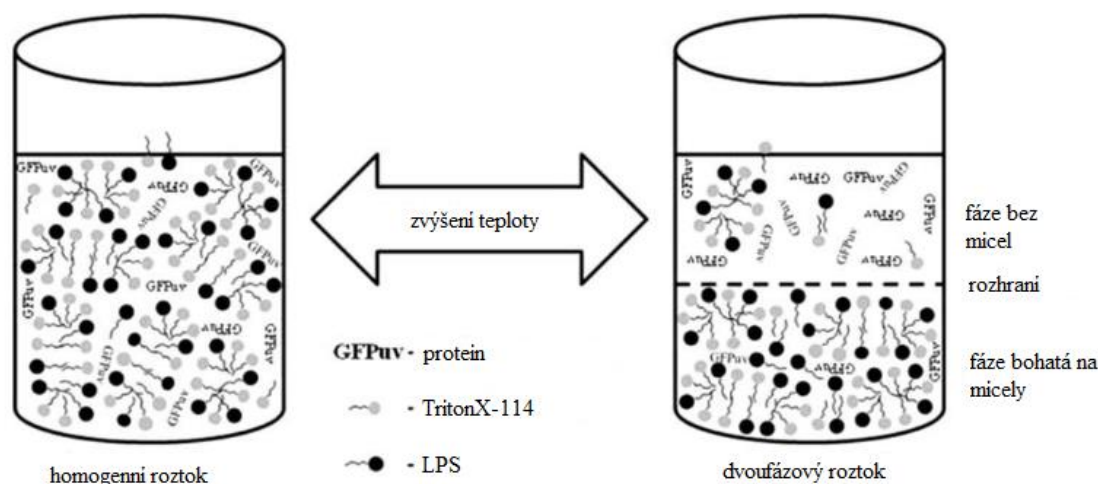
Množství endotoxinů se udává v endotoxinových jednotkách (EU), které popisují biologickou aktivitu endotoxinu. Maximální hladina endotoxinu pro intravenózní podání farmaceutických výrobků je stanovena na 5 EU na kilogram váhy těla za hodinu. Splnění této hodnoty je v biologickém výzkumu a farmaceutickém průmyslu poměrně komplikované (Magalhães a Pessoa, 2010). Obecně platí, že 1 EU odpovídá 100 pg endotoxinu (Petsch, 2000).

### 1.4.1 Metody odstranění LPS

Metody odstranění LPS z farmaceutických výrobků, například vakcín, musí splňovat řadu kritérií. Důležité je, aby nedocházelo k nadměrné ztrátě produktu, dále musí být metoda natolik účinná, aby byla schopna odstranit velké množství endotoxinu. Metoda také nesmí do produktu zanést potenciálně toxické látky a použité chemikálie nesmí nepříznivě ovlivňovat antigen (Mapleson a Sizer, 2007).

Ultrafiltrace nebo chromatografie na základě velikosti vyžaduje, aby byly mezi proteinem a endotoxinem velké rozdíly ve velikosti a nejsou účinné, pokud je endotoxin silně vázaný na protein (Lopes *et al.*, 2010). Ultrafiltrace se nejlépe hodí pro odstraňování endotoxinu z vody, roztoků solí a léčiv obsahující jen malé molekuly bez afinity k endotoxinům (Schneier *et al.*, 2020).

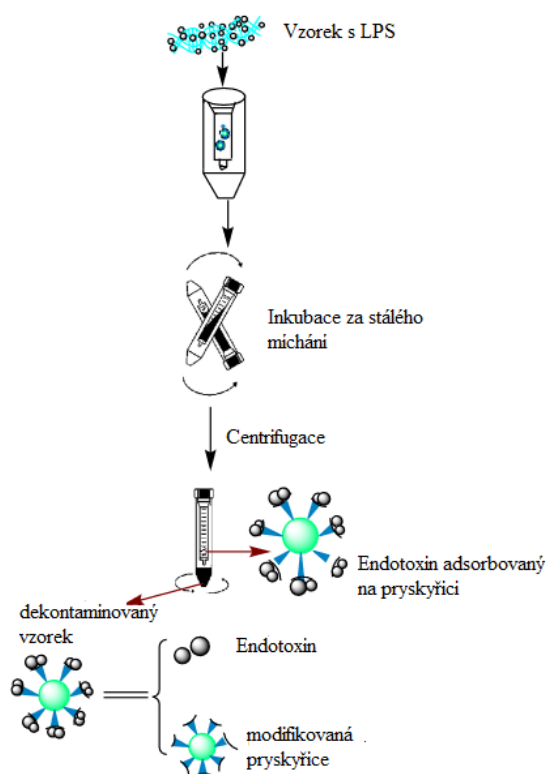
Další možnou metodou pro odstranění LPS je extrakce. Tato metoda se využívá k oddělení LPS od terapeutik na základě jejich relativních rozpustností ve dvou nemísitelných kapalinách. Hydrofilní molekuly dekontaminovaných terapeutik zůstávají ve vodné fázi, zatímco endotoxin v organické fázi (Schneier *et al.*, 2020). Mezi tyto metody patří i dvoufázová extrakce na bázi detergentu, např. Triton X-114 (Obr. 4). Triton X-114 je povrchově aktivní látka, která způsobuje, že endotoxin vytváří micely, které se následně při teplotě 22 °C shlukují ve fázi bohaté na povrchově aktivní látky. Po tomto shlukování může být fáze s LPS separována pomocí centrifugace od proteinu. Triton X-114 je však již při nízkých koncentracích pro buňky toxický, je ho proto nutné z roztoku proteinu odstranit (Teodorowicz *et al.*, 2017).



Obr. 4: Schematická ilustrace metody dvoufázové extrakce na bázi detergentu TX-114. Převzato z Lopes *et al.*, 2010.

Účinnou metodou odstranění LPS z pozitivně nabitého proteinu je i ionexová chromatografie, protože endotoxiny jsou negativně nabité. Ionexová chromatografie umožňuje vazbu polutantu, zatímco produkt volně projde adsorbující látkou (Anspach, 2001). Pokud jsou však mezi proteiny a endotoxiny nebo mezi proteiny a pryskyřicí pozorovány silné iontové interakce, může dojít ke ztrátám proteinu nebo nedostatečné dekontaminaci. Tato metoda není vhodná pro dekontaminaci negativně nabitých molekul (Schneier *et al.*, 2020).

Afinitní chromatografie se také využívá pro odstranění LPS, za využití vysoce specifických interakcí mezi endotoxiny a ligandem navázaným na stacionární fázi. Tento ligand by měl vykazovat silnou interakci s endotoxiny a nízkou interakci s dekontaminovanou látkou (Obr. 5). Ligandy obvykle interagují s nejvíce konzervativní částí molekuly endotoxinu, lipidem A, prostřednictvím hydrofobních a elektrostatických interakcí (Schneier *et al.*, 2020). Mezi běžně využívané ligandy patří například histamin, histidin, polymyxin B a imobilizovaný  $\epsilon$ -poly-L-lysin. Podmínkou pro afinitní i iontově výměnnou metodu je koncentrace endotoxinu v roztoku maximálně 1500 EU/ml, v opačném případě by nemuselo být dosaženo akceptovatelné hranice koncentrace endotoxinu, 5 EU/ml (Lopes *et al.*, 2010).



Obr. 5: Schematická ilustrace odstranění endotoxinu na principu afinitní chromatografie. Převzato ze Zhang *et al.*, 2014.

V mé práci jsem vyzkoušela tři metody odstranění LPS, založené na Tritonu X-114, poly-L-lysinu a polymyxinu B.

## 1.5 Metody detekce LPS

Mezi způsoby detekce LPS ve vzorcích se řadí test pyrogenicity na králících (RPT- rabbit pyrogen test), test na amébovým lyzátem z *Limulus polyphemus* (LAL- *Limulus amoebocyte lysate*), rekombinantní faktor C (rFC) a test kravské krve (bWBA- bovine whole blood assay) (Schneier *et al.*, 2020).

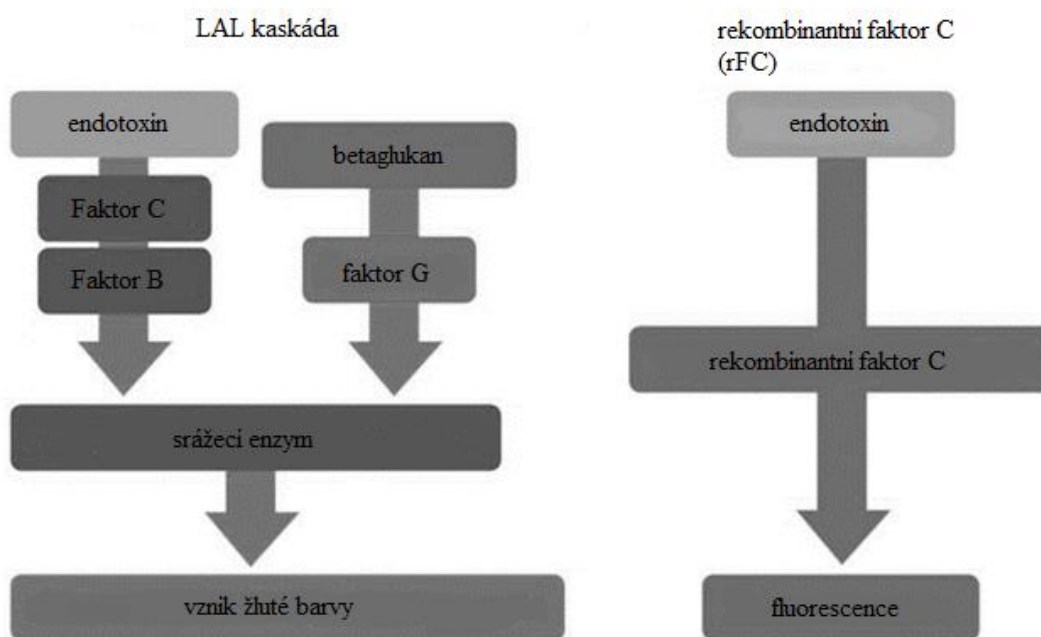
Test pyrogenicity na králících je nejstarší a nejjednodušší detekční metoda. Vzorek je injekčně vpraven do králíka a následně je měřena rektální teplota králíka za účelem sledování rozvoje horečky (Park *et al.*, 2005). Tato metoda je založena na podobnosti horečnatých stavů u lidí a králíků pod vlivem endotoxinů. Limitní koncentrace LPS detekovatelná pomocí této metody je 0,5 EU/ml (Schneier *et al.*, 2020).

Principem testu na amébovým lyzátem je koagulační enzymatická reakce s lyzátem z amébovým ostrorepa vyvolaná endotoxinem (Iwanaga, 2007). Faktor C, první článek koagulační kaskády, je serinová proteáza aktivující se vazbou endotoxinů. Následně dochází k aktivaci srážecího enzymu, ten poté působí na koagulogen, který se přemění na koagulin



(Abate *et al.*, 2017). Endotoxinem aktivovaný enzym koagulóza štěpí chromogenní substrát, dochází k uvolnění p-nitroanilinu (pNA) ze syntetického substrátu, čímž vzniká žlutá barva, která je následně měřena spektrofotometricky. Změna absorbance je úměrná koncentraci endotoxinu, jedná se o kvantitativní kinetický test (Schneier *et al.*, 2020). Koagulační kaskáda může být aktivována také aktivací faktoru G glukany (Obr. 5), avšak aktivace faktoru C pomocí LPS je mnohonásobně citlivější (Abate *et al.*, 2017).

Test rekombinantního faktoru C je endotoxinově specifický, protože jsou z roztoku odstraněny všechny další krevní složky ostrorepa. Aktivovaný faktor C reaguje přímo s fluoroforem (Obr.6) (Piehler *et al.*, 2020). rFC štěpí fluoresciový substrát, aminomethylkumarin, to vede k tvorbě fluorogenní sloučeniny a fluorescence se měří pomocí excitace/emise při 380/440 nm v nepřítomnosti a přítomnosti endotoxinů. Tato metoda vylučuje falešně pozitivní výsledky kvůli aktivaci faktoru G glukany (Schneier *et al.*, 2020).



Obr. 6: Srovnání reakčních kaskád testu na amébocytárním lyzátu (LAL) a testu rekombinantního faktoru C (rFC). Převzato z Piehler *et al.*, 2020.

Pro test kravské krve je potřeba odebrat krev z velmi mladých telat a zavést ji do roztoku s testovaným vzorkem. V reakci na LPS produkují bílé krvinky v hovězí krvi hormon prostoglandin E2 (PGE2) v zánětlivé odpovědi podobné jako u lidí. Produkce PGE2 je přímo úměrná koncentraci endotoxinů ve vzorku. Test je schopný detekovat endotoxiny do koncentrace 0,25 EU/ml (Schneier *et al.*, 2020).

## 2. Cíle práce

Cíle této práce jsou:

- 1) Zpracovat rešerši na téma lipopolysacharidy a metody jejich dekontaminace.
- 2) Vyhodnotit účinnost jednotlivých metod dekontaminace lipopolysacharidu.
- 3) Zjistit, jaký z použitých testů pro měření koncentrace endotoxinu je nejpřesnější a uživatelsky nejprívětivější.
- 4) Zjistit, jak nejúčinnější metoda funguje u jednotlivých koncentrací proteinu a jak je účinná při čištění klíčecích rekombinantních proteinů.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Pomůcky a chemikálie

V tabulce 1 je uveden seznam použitých chemikálií a komerčních kitů v této práci.

Tabulka 1: Seznam použitých chemikálií.

Název	Firma + kat. číslo
10x PBS	Gibco, #70011-036
Endotoxin free water	Biosciences, #170711
Bovine Serum Albumin	Sigma Aldrich, #SLBJ2938V
LPS from <i>E.coli</i> 055:B5	Sigma Aldrich, #025M4040V
Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific, #23227
Triton X-114	Sigma Aldrich, #057K0150
Bio-Beads SM-2 Adsorbent	BioRad, #152-8920
ToxinEraser Endotoxin Removal Kit	GenScript, #L00338
Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Spin Columns	ThermoFisher Scientific, #88274
Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit	ThermoFisher Scientific, #88282
ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit	GenScript, #L00350
PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay	Lonza, #50-658U

#### 3.2. Metody

V tabulce 2 jsou navzájem porovnány metody dekontaminace vzorků od LPS, Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific) a ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript), dle údajů udávaných výrobcem.

Tabulka 2: Porovnání dvou použitých komerčních metod dekontaminace LPS dle údajů udávaných výrobcem.

metoda	výrobce	vazebná kapacita [EU/ml pryskyřice]	ligand	konečná koncentrace [EU/ml]	počet použití
Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin	ThermoFisher Scientific	2 000 000	$\epsilon$ -poly-L-lysine	<5	min. 5
ToxinEraser Endotoxin Removal Kit	GenScript	2 000 000	polymixin B	<0,1	5

V tabulce 3 jsou navzájem porovnány metody detekce LPS, Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (ThermoFisher Scientific), ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript) a PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza), dle údajů udávaných výrobcem.

Tabulka 3: Porovnání tří použitých metod detekce LPS dle údajů udávaných výrobcem.

metoda	výrobce	princip	délka testu [min]	limitní koncentrace LPS [EU/ml]
Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit	ThermoFisher Scientific	chromogenní test	26	0,1
ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit	GenScript	chromogenní test	16	0,01
PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay	Lonza	fluorogenní test	70	0,01

### 3.2.1. Příprava vzorků

Připravila jsem si 8 mg/ml roztok proteinu Bovine Serum Albumin (BSA, hovězí albumin) v 1x PBS. Nejprve jsem si připravila 1x PBS naředěním z 10x koncentrovaného zásobního PBS (Gibco). Následně jsem navázila 0,160 g BSA a rozpustila ho ve 20 ml 1x PBS. Tím jsem

získala roztok o koncentraci 8 mg/ml BSA v 1x PBS. Roztok jsem krátce zvortexovala. Do endotoxin free mikrozkušavky jsem odebrala 2 ml roztoku, jako kontrolní vzorek bez LPS. Poté jsem připravila roztok 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml LPS. Spočítala jsem si, že roztok musí obsahovat 0,6 ng/ml LPS, aby měl 5 EU/ml. Zásobní koncentrace LPS byla 5 mg/ml, přidala jsem tedy 1,2 µl LPS do 10 ml 1x PBS a následně jsem přidala 8 µl tohoto roztoku do 8 ml roztoku BSA v 1x PBS. Připravila jsem také roztok 8 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS tak, že jsem do 8 ml roztoku BSA v PBS přidala 80 µl z roztoku LPS v PBS. Dále jsem si připravila roztoky 4 mg/ml BSA v PBS, 2 mg/ml BSA v PBS a 1 mg/ml BSA v PBS. Smíchala jsem 80 mg BSA s 20 ml 1x PBS, čímž vznikl roztok se 4 mg/ml BSA v PBS. Z tohoto roztoku jsem připravila roztoky o 2 mg/ml a 1 mg/ml BSA v PBS dvojkovou ředící řadou. Do všech tří roztoků jsem přidala 80 µl z předem připraveného roztoku LPS v PBS, tím všechny tři roztoky obsahovaly LPS 50 EU/ml. Roztok Sialostatinu L1 a IRS-5 jsem dostala od svého školitele a koncentrace LPS v nich byla neznámá.

### 3.2.2. Fázová separace Tritonem X-114

Pro přečištění proteinu od LPS Tritonem X-114 jsem použila předem připravené roztoky 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml LPS a 8 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml a postupovala jsem dle protokolu od Liu *et al* (Liu *et al.*, 1997). Nejprve jsem přečistila vzorek o koncentraci LPS 5 EU/ml. Odebrala jsem ze zásobní zkumavky 3 ml vzorku, přidala jsem k němu 30 µl Tritonu X-114 tak, aby byla celková koncentrace Tritonu X-114 v roztoku 1 %. Vzorek jsem dala inkubovat na 30 minut při 8 °C za stálého míchání. Poté jsem vzorek vložila do vodní lázně o 37 °C na 10 minut. Následně jsem vzorek rozdělila do dvou endotoxin free mikrozkušavek (2x 1,5 ml) a centrifugovala při 25 °C na 20 000 *rcf* 10 minut. V mikrozkušavkách se vytvořily dvě fáze, horní vodní fáze s přečištěným proteinem a spodní fáze s LPS. Horní fázi jsem opatrně odpipetovala do zkumavky a spodní fázi jsem vyhodila. Do endotoxin free mikrozkušavky jsem navázila přibližně 0,05g Bio-Beads (Aida a Pabst, 1990) a přidala 500 µl horní vodní fáze. Zbylou vodní fázi jsem podrobila druhému pročištění. Tritonu X-114 jsem vždy přidala 1 % celkového objemu vzorku. Získanou vodní fázi jsem podrobila třetímu přečištění a stejným postupem jsem přečistila i vzorek 8 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS. Celkem byl každý vzorek přečištěn třikrát.

### 3.2.3. ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript)

Touto metodou jsem přečistila vzorky 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml a 50 EU/ml LPS, 1 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS, 2 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS, 4 mg/ml BSA

v PBS s 50 EU/ml LPS, Sialostatin L1 a IRS-5. Postupovala jsem dle návodu z kitu ToxinEraser Endotoxin Removal Kit od výrobce GenScript.

Použila jsem kolonu o objemu 1,5 ml obsahující modifikovaný polymyxin B. Upravila jsem pH vzorku pomocí 0,1 M NaOH a 0,1 M HCl na cca 7,5, protože pH 7-8 je optimální a LPS se nejlépe váže na polymyxin B. Z kolony jsem nechala odtéct její obsah a poté do ní přidala 5 ml regeneračního pufru, který jsem z kolony nechala vykatat rychlostí 10 kapek za minutu (cca 0,25 ml/min). To jsem zopakovala ještě dvakrát. Důležité bylo pufrem kompletně omýt i stěny kolony. Následně jsem do kolony přidala 4 ml ekvilibračního pufru a nechala vykatat rychlostí 20 kapek za minutu (cca 0,5 ml/min). Opět jsem omyla stěny kolony a celý postup jsem opakovala dvakrát. Poté jsem do kolony přidala pročištěný vzorek, nastavila rychlost průtoku na 10 kapek za minutu a prvních proteklých 1,5 ml jsem vyhodila. Dále jsem pročištěný vzorek začala sbírat do zkumavky, dokud se celý nedostal do pryskyřice. Do kolony jsem přidala 1,5 ml ekvilibračního pufru a sbírala vzorek, dokud se ekvilibrační pufr celý nedostal do pryskyřice. Následně jsem celý proces zopakovala ještě jednou, každý vzorek byl tedy pročištěný dvakrát.

#### 3.2.4. Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific)

Pomocí Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific) jsem dekontaminovala vzorky 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml LPS, 8 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml a Sialostatin L1. Postupovala jsem dle návodu z kitu Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin od výrobce ThermoFisher Scientific.

Upravila jsem pH vzorků pomocí 0,1 M HCl a 0,1 M NaOH na pH cca 7,5. Uvolnila jsem víčko kolony a otevřela spodní otvor v koloně. Kolonu jsem vložila do endotoxin free centrifugační zkumavky (15 ml) a centrifugovala jsem kolonu 1 minutu na 500 rcf (relative centrifugation force), aby z kolony její obsah vytekl. Filtrát jsem vyhodila. Sundala jsem z kolony víčko a nasadila zátku na spodní otvor. Do kolony jsem napipetovala 3 ml 0,2 M NaOH, nasadila jsem víčko a kolonu několikrát převrátila, dokud se pryskyřice v roztoku nerozpustila. Kolonu jsem nechala přes noc v pokojové teplotě inkubovat. Následně jsem uvolnila víčko a sundala spodní zátku. Vložila jsem kolonu do endotoxin free centrifugační zkumavky a centrifugovala 1 minutu na 500 rcf, aby se z kolony odstranil roztok, který jsem následně vyhodila. Sundala jsem víčko a nasadila spodní zátku. Přidala jsem do kolony 3 ml 2M NaCl, nasadila jsem víčko a kolonu několikrát převrátila, dokud se pryskyřice v roztoku

nerozpustila. Víčko jsem uvolnila a sundala spodní zátku, kolonu jsem vložila do endotoxin free centrifugační zkumavky a centrifugovala 1 minutu na 500 rcf, filtrát jsem opět vyhodila. Sundala jsem víčko a nandala spodní zátku. Do kolony jsem napipetovala 3 ml LAL vody, kolonu jsem několikrát převrátila, dokud se pryskyřice v roztoku nerozpustila. Uvolnila jsem horní víčko a sundala spodní zátku, kolonu jsem vložila do endotoxin free centrifugační zkumavky a centrifugovala 1 minutu na 500 rcf. Sundala jsem víčko a nandala spodní zátku, do kolony jsem napipetovala 3 ml PBS/TBS (u vzorků 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml a 8 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml jsem použila 1x PBS, u vzorku Sialostatin L1 jsem použila TBS). Kolonu jsem zamíchala, dokud se pryskyřice nerozpustila. Uvolnila jsem víčko a sundala spodní zátku, kolonu jsem vložila do endotoxin free centrifugační zkumavky a centrifugovala 1 minutu na 500 rcf, filtrát jsem vyhodila. Toto propláchnutí kolony PBS/TBS jsem opakovala ještě dvakrát. Poté jsem sundala víčko a nandala spodní zátku. Do kolony jsem přidala 3 ml pročištěvaného vzorku, nandala jsem víčko a kolonu promíchala, dokud se pryskyřice v roztoku nerozpustila. Kolonu jsem inkubovala za stálého míchání při 8 °C 1,75 hodiny. Následně jsem odstranila zátku a uvolnila víčko, kolonu jsem vložila do endotoxin free centrifugační zkumavky a centrifugovala 1 minutu na 500 rcf, shromáždila jsem vzorek. Každý vzorek byl pročištěn jednou.

### 3.2.5. PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza)

Pomocí PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza) jsem detekovala obsah LPS ve vzorcích 8 mg/ml BSA v PBS bez LPS, s 5 EU/ml LPS, s 50 EU/ml LPS a Sialostatin L1. Tyto vzorky byly dekontaminované pomocí TX-114, Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific) a ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript). Dále jsem tímto testem měřila vzorky 1 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS, 2 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS, 4 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS a IRS-5. Tyto vzorky byly dekontaminovány pomocí ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript). Vzorky jsem měřila v duplikacích. Postupovala jsem dle návodu z kitu PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay od výrobce Lonza.

Nejprve jsem si připravila standardní roztoky o koncentracích LPS 5 EU/ml, 0,5 EU/ml, 0,05 EU/ml a 0,005 EU/ml. Lyofilizovaný endotoxin z *E. coli* 055:B5 jsem rozředila v 5,2 ml LAL vody, čímž jsem získala roztok o 20 EU/ml LPS. Roztok jsem vortexovala 5 minut. Roztok o koncentraci LPS 5 EU/ml jsem připravila smícháním 0,25 ml zásobního

roztoku s 20 EU/ml LPS s 0,75 ml LAL vody. Roztok jsem 1 minutu vortexovala. Roztoky o koncentraci 0,5 EU/ml, 0,05 EU/ml a 0,005 EU/ml LPS jsem připravila desítkovou ředící řadou. Vzorky jsem vždy 1 minutu vortexovala. Na destičku s 96 jamkami jsem napipetovala 100 µl každého standardního roztoku, vzorku a kontrolního vzorku, všechny v duplikacích. Destičku jsem inkubovala při 37 °C 10 minut. Během inkubace jsem si připravila pracovní roztok smícháním fluorogenního substrátu, pufru a roztoku s rFC enzymem v poměrech 5:4:1. Do každé jamky jsem napipetovala 100 µl pracovního roztoku a destičku jsem hodinu inkubovala při 37 °C. Následně jsem změřila fluorescenci pomocí excitace/emise při 380/440 nm.

### 3.2.6. Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (ThermoFisher Scientific)

Pomocí Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (ThermoFisher Scientific) jsem testovala vzorky Sialostatin L1, 8 mg/ml BSA v PBS bez LPS, 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml LPS, 8 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS. Tyto vzorky byly dekontaminované pomocí TX-114, Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific) a ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript). Postupovala jsem dle návodu z kitu Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit od výrobce ThermoFisher Scientific.

Nejprve jsem si připravila zásobní a kalibrační roztoky. Do ampule, obsahující lyofilizovaný endotoxin *E. coli*, jsem napipetovala 1 ml LAL vody, roztok jsem vortexovala 15 minut. Tím jsem získala zásobní roztok o koncentraci endotoxinu 28 EU/ml. Připravila jsem si kalibrační roztok o 1 EU/ml tak, že jsem smíchala 50 µl zásobního roztoku s 1,35 ml LAL vody, roztok jsem vortexovala 1 minutu. Roztok 0,5 EU/ml LPS jsem získala smícháním 250 µl roztoku 1 EU/ml a 250 µl LAL vody. Roztok 0,25 EU/ml LPS jsem získala smícháním 250 µl roztoku 1 EU/ml a 750 µl LAL vody. Roztok 0,1 EU/ml LPS jsem získala smícháním 100 µl roztoku 1 EU/ml s 900 µl LAL vody. Dále jsem přidala 1,4 ml LAL vody do lahvičky s lyofilizovaným lyzátem améboctů ostrorepa *Limulus polyphemus*. Roztok jsem jemně promíchala, získala jsem LAL roztok. Za další jsem si připravila chromogenní substrát tak, že jsem přidala 6,5 ml LAL vody do lahvičky obsahující ~7 mg lyofilizovaného substrátu. Získala jsem finální koncentraci roztoku ~2 mM.

Destičku s 96 jamkami jsem zahřála na 37 °C. Do jamek jsem napipetovala 50 µl standardních roztoků a vzorků. V čase T=0 jsem přidala do každé jamky 50 µl LAL roztoku a jemným poklepáním s destičkou jsem roztoky promíchala. Destičku jsem inkubovala při 37



°C 10 minut. V čase T=10 jsem do každé jamky přidala 100 µl chromogenního substrátu, předehřátého na 37 °C. Roztoky jsem opět poklepáním s destičkou promíchala a destičku jsem inkubovala při 37 °C 6 minut. V čase T=16 jsem do každé jamky přidala 100 µl 25% kyseliny octové, čímž se zastavila reakce. Absorbanci jsem měřila při 405 nm.

### 3.2.7. ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript)

Pomocí ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript) jsem testovala vzorky Sialostatin L1, 8 mg/ml BSA v PBS bez LPS, 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml LPS, 8 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS. Tyto vzorky byly dekontaminované pomocí TX-114, Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific) a ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript). Postupovala jsem dle návodu z kitu ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit od výrobce GenScript.

Nejprve jsem si připravila LAL roztok tak, že jsem přidala 1,7 ml LAL vody do lahvičky s lyofilizovaným lyzátem amebocytů. Lahvičku jsem 30 sekund jemně míchala. Poté jsem přidala 1,7 ml LAL vody do lahvičky s chromogenním substrátem, finální koncentrace roztoku byla ~2 mM. Do lahvičky s barevným stabilizátorem č. 1 (stop roztok) jsem napipetovala 10 ml pufru S. Do lahvičky s barevným stabilizátorem č. 2 a č. 3 jsem do každé přidala 10 ml LAL vody. Následně jsem si připravila endotoxinový standardní roztok o koncentraci endotoxinu 7,5 EU/ml. Do lahvičky s lyofilizovaným endotoxinem jsem napipetovala 2 ml LAL vody a lahvičku jsem 15 minut vortexovala. Připravila jsem si kalibrační roztok o 1 EU/ml tak, že jsem smíchala 133 µl roztoku o 7,5 EU/ml s 867 µl LAL vody. Připravila jsem si kalibrační roztok o 0,5 EU/ml tak, že jsem smíchala 700 µl roztoku o 1 EU/ml se 700 µl LAL vody. Připravila jsem si kalibrační roztok o 0,25 EU/ml tak, že jsem smíchala 350 µl roztoku o 0,5 EU/ml s 350 µl LAL vody. Nakonec jsem si připravila kalibrační roztok o 0,1 EU/ml tak, že jsem smíchala 280 µl roztoku o 0,25 EU/ml s 350 µl LAL vody. Do endotoxin free skleněných ampulek jsem napipetovala 100 µl kalibračních roztoků nebo vzorků, které předtím byly 30 sekund vortexované. Do každé ampulky jsem přidala 100 µl LAL roztoku, ampulky jsem zavíčkovala a promíchala. Následně jsem ampulky inkubovala při 37 °C 10 minut. Poté jsem přidala 100 µl chromogenního substrátu do každé ampulky. Ampulky jsem zavíčkovala, promíchala a inkubovala při 37 °C 6 minut. Dále jsem do ampulek přidala 500 µl barevného stabilizátoru č. 1 a krouživým pohybem promíchala. Následně jsem přidala do každé ampule 500 µl barevného stabilizátoru č. 2 a promíchala. Nakonec jsem do každé

ampulky přidala 500  $\mu$  barevného stabilizátoru č. 3 a krouživým pohybem jsem je zamíchala, aby nevznikly bubliny. Každý roztok jsem přepipetovala na destičku s 96 jamkami a absorbanci jsem měřila při 545 nm.

### 3.2.8. Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific)

Pierce BCA Protein Assay Kit je test založený na kyselině bichinoninové (BCA), sloužící pro kolorimetrickou detekci a kvantifikaci proteinu ve vzorku. Dochází k redukci  $\text{Cu}^{2+}$  na  $\text{Cu}^+$  proteinem v alkalickém médiu a ke kolorimetrické detekci  $\text{Cu}^+$  činidlem obsahujícím BCA. Vzniká fialová barva způsobená chelací dvou molekul BCA s jedním měďným iontem (Smith *et al.*, 1985).

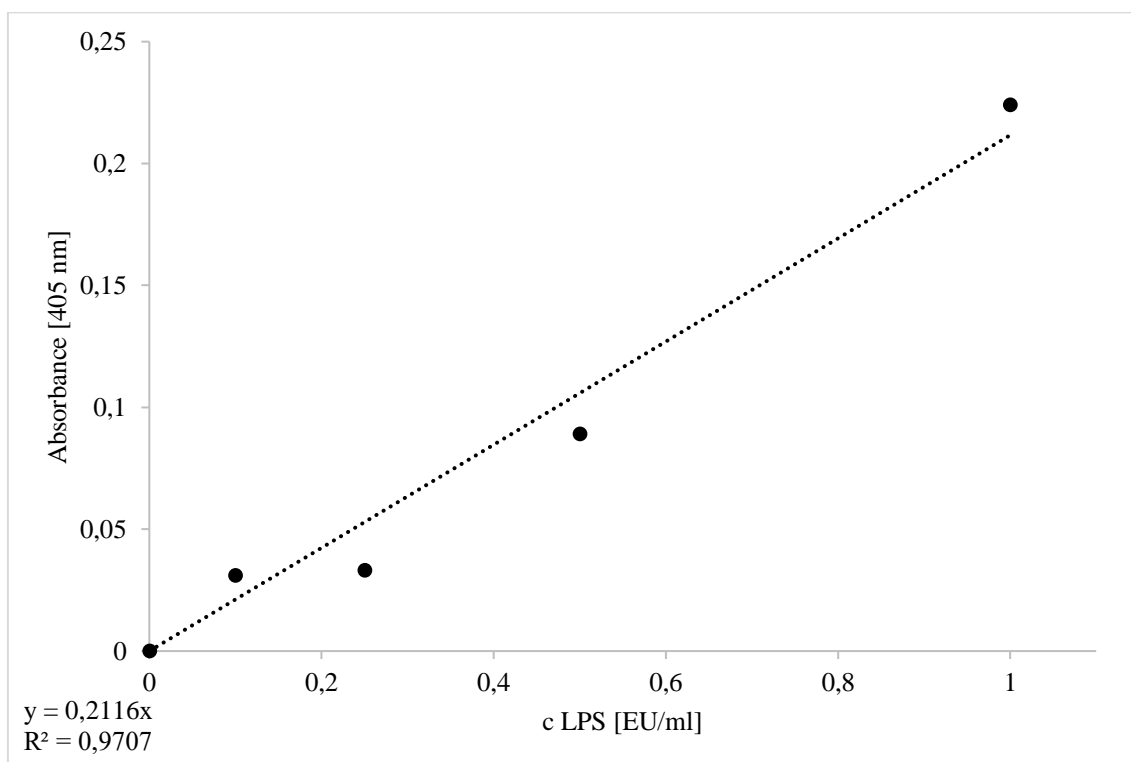
Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) jsem použila pro měření koncentrace proteinu u všech vzorků. Postupovala jsem dle návodu z kitu Pierce BCA Protein Assay Kit od výrobce ThermoFisher Scientific. Nejprve jsem si připravila zásobní a kalibrační roztoky. Zásobní ampule obsahovala roztok 2 mg/ml BSA. Odebrala jsem 300  $\mu$ l ze zásobního roztoku, čímž jsem získala kalibrační roztok o koncentraci proteinu 2000  $\mu$ g/ml (roztok A). Dále jsem smíchala 125  $\mu$ l 1x PBS s 375  $\mu$ l zásobního roztoku, získala jsem kalibrační roztok o 1500  $\mu$ g/ml (roztok B). Smíchala jsem 325  $\mu$ l 1x PBS a 325  $\mu$ l zásobního roztoku, získala jsem kalibrační roztok o 1000  $\mu$ g/ml (roztok C). Smíchala jsem 175  $\mu$ l 1x PBS a 175  $\mu$ l roztoku B a získala jsem kalibrační roztok o 750  $\mu$ g/ml (roztok D). Smíchala jsem 325  $\mu$ l 1x PBS a 325  $\mu$ l roztoku C a získala jsem kalibrační roztok o 500  $\mu$ g/ml (roztok E). Smíchala jsem 325  $\mu$ l 1x PBS s 325  $\mu$ l roztoku E a získala jsem kalibrační roztok o 250  $\mu$ g/ml (roztok F). Smíchala jsem 325  $\mu$ l 1x PBS a 325  $\mu$ l roztoku F a získala jsem kalibrační roztok o 125  $\mu$ g/ml (roztok G). Smíchala jsem 400  $\mu$ l 1x PBS s 100  $\mu$ l roztoku G a získala jsem kalibrační roztok o 25  $\mu$ g/ml (roztok H). Odebrala jsem 400  $\mu$ l 1x PBS (roztok I, kontrolní vzorek). Dále jsem si připravila BCA činidlo smícháním 50 dílů reagentu A s 1 dílem reagentu B. Činidlo jsem zvortexovala. Připravila jsem si destičku s 96 jamkami a do každé jamky jsme napipetovala 25  $\mu$ l každého kalibračního roztoku a vzorku. Do jamek jsem přidala 200  $\mu$ l BCA činidla a destičku jsem jemným poklepáním promíchala. Následně jsem destičku inkubovala při 37 °C 30 minut. Destičku jsem nechala zchladnout na pokojovou teplotu a změřila jsem absorbanci při 562 nm.

## 4. Výsledky

Ke změření koncentrace LPS ve vzorcích, a tedy zjištění účinnosti použité metody pro dekontaminaci vzorků jsem použila tři různé LAL testy od třech výrobců. Následně jsem u vzorků měřila koncentraci proteinu před dekontaminací a po dekontaminaci pomocí Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific).

### 4.1. Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (ThermoFisher Scientific)

Kalibrační křivka závislosti absorbance při 405 nm na koncentraci LPS ve vzorcích je zobrazena na obrázku 7.



Obr. 7: Kalibrační křivka Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit, závislost absorbance při 405 nm na koncentraci LPS ve vzorku.

Z rovnice grafu jsem si vypočítala rovnici pro výpočet koncentrace LPS ve vzorcích (1),

$$x = \frac{y}{0,2116} \quad (1)$$

kde  $x$  je výsledná koncentrace LPS [EU/ml] a  $y$  je hodnota absorbance po odečtení kontrolního vzorku.

Data získaná pomocí Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (ThermoFisher Scientific) jsem zpracovala do tabulek, viz tabulka 4, tabulka 5 a tabulka 6.

Z naměřených absorbancí jsem odečetla kontrolní vzorek a pomocí rovnice 1 jsem vypočítala konečnou koncentraci LPS ve vzorcích.

#### 4.1.1. Triton X-114

Naměřené hodnoty absorbance a vypočítané koncentrace LPS ve vzorcích 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml a 50 EU/ml LPS jsou zanesené v tabulce 4.

Tabulka 4: Absorbance vzorků 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml a 50 EU/ml LPS při 405 nm a výsledná koncentrace LPS ve vzorcích přečištěných Tritonem X-114.

<b>vzorek</b>	<b>A [405 nm]</b>	<b>odečtený kontrolní vzorek</b>	<b>c LPS [EU/ml]</b>
bez LPS	0,431	0,347	1,640
5 EU/ml LPS	2,062	1,978	9,348
50 EU/ml LPS	3,592	3,508	16,578
5 EU/ml LPS, 1. cyklus TX-114	0,184	0,100	0,473
5 EU/ml LPS, 2. cyklus TX-114	0,261	0,177	0,836
5 EU/ml LPS, 3. cyklus TX-114	0,383	0,299	1,413
50 EU/ml LPS, 1. cyklus TX-114	0,269	0,185	0,874
50 EU/ml LPS, 2. cyklus TX-114	0,320	0,236	1,115
50 EU/ml LPS, 3. cyklus TX-114	0,174	0,090	0,425
LAL voda	0,084	0,000	0,000

V tabulce 4 lze vidět, že předpokládaná koncentrace LPS u vzorků 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml a 50 EU/ml LPS se liší od skutečné naměřené hodnoty. To je způsobeno rozsahem kalibrační křivky, která končí koncentrací LPS 1 EU/ml a není dále lineární, dochází tedy ke zkreslení výpočtu. U vzorku 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml LPS došlo k největší dekontaminaci hned při prvním cyklu a se zvyšujícím se cyklem se koncentrace LPS naopak

zvyšovala. U vzorku 8 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS došlo po prvním cyklu přečištění také ke zdánlivému zvýšení koncentrace LPS.

#### 4.1.2. Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific)

V tabulce 5 jsou zaneseny hodnoty naměřené absorbance a vypočítané koncentrace LPS ve vzorcích 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml a 50 EU/ml LPS a Sialostatin L1.

Tabulka 5: Absorbance vzorků při 405 nm a výsledná koncentrace LPS ve vzorcích 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml a 50 EU/ml LPS a Sialostatin L1, přečištěných Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin.

<b>vzorek</b>	<b>A [405 nm]</b>	<b>odečtený kontrolní vzorek</b>	<b>c LPS [EU/ml]</b>
Sialostatin L1	3,362	3,278	15,491
bez LPS	0,431	0,347	1,640
5 EU/ml LPS	2,062	1,978	9,348
50 EU/ml LPS	3,592	3,508	16,578
Sialostatin L1 dekontaminovaný	3,142	3,058	14,452
5 EU/ml LPS, dekontaminovaný	0,378	0,294	1,389
50 EU/ml LPS, dekontaminovaný	0,454	0,370	1,749
LAL voda	0,084	0,000	0,000

Sialostatin L1 se nepodařilo dekontaminovat téměř vůbec. Vzorky 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml a 50 EU/ml LPS byly přečištěny, avšak nepodařilo se dosáhnout tak nízkých hodnot, jako u jiných metod.

#### 4.1.3. ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript)

Naměřené hodnoty absorbance a vypočítané koncentrace LPS ve vzorcích Sialostatin L1, 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml a 50 EU/ml LPS jsou v tabulce 6.

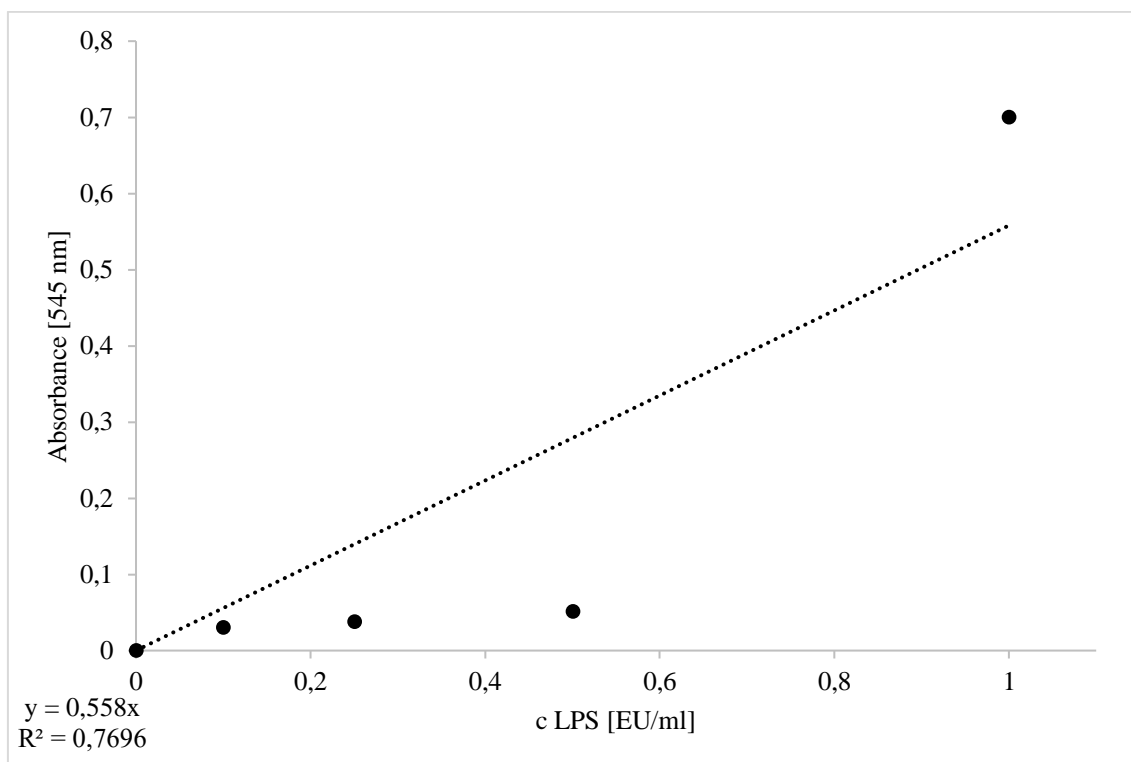
Tabulka 6: Absorbance vzorků při 405 nm a výsledná koncentrace LPS ve vzorcích Sialostatin L1, 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml a 50 EU/ml LPS, přečištěných ToxinEraser Endotoxin Removal Kit

<b>vzorek</b>	<b>A [405 nm]</b>	<b>odečtený kontrolní vzorek</b>	<b>c LPS [EU/ml]</b>
Sialostatin L1	3,362	3,278	15,491
bez LPS	0,431	0,347	1,640
5 EU/ml LPS	2,062	1,978	9,348
50 EU/ml LPS	3,592	3,508	16,578
5 EU/ml LPS, 1x dekontaminovaný	0,123	0,039	0,184
5 EU/ml LPS, 2x dekontaminovaný	0,108	0,024	0,113
50 EU/ml LPS, 1x dekontaminovaný	0,109	0,025	0,118
50 EU/ml LPS, 2x dekontaminovaný	0,101	0,017	0,080
Sialostatin L1, 1x dekontaminovaný	0,311	0,227	1,073
Sialostatin L1, 2x dekontaminovaný	0,199	0,115	0,543
LAL voda	0,084	0,000	0,000

Z tabulky 6 je patrné, že všechny tři vzorky se podařilo dekontaminovat a po opakování dekontaminace koncentrace LPS ve vzorcích ještě klesla, zejména u Sialostatínu L1.

## 4.2. ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript)

Kalibrační křivka (Obr. 8) udává závislost absorbance při 545 nm na koncentraci LPS ve vzorcích.



Obr. 8: Kalibrační křivka ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit, závislost absorbance při 545 nm na koncentraci LPS ve vzorku.

Koeficient determinace ( $R^2$ ) mi v tomto testu vyšel velice nízký, bylo tedy jasné, že výsledky nebudou příliš reálné. Proto uvádím jen naměřenou absorbanci u vzorků (Tabulka 7, Tabulka 8 a Tabulka 9), vypočítané koncentrace LPS by byly zkreslené.

#### 4.2.1. Triton X-114

Tabulka 7: Absorbance vzorků Sialostatin L1, 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml a 50 EU/ml LPS při 545 nm. Vzorky přečištěné Tritonem X-114.

<b>vzorek</b>	<b>A [545 nm]</b>
Sialostatin L1	0,704
bez LPS	0,203
5 EU/ml LPS	0,950
50 EU/ml LPS	1,478
5 EU/ml LPS, 1. cyklus TX-114	0,084
5 EU/ml LPS, 2. cyklus TX-114	0,139
5 EU/ml LPS, 3. cyklus TX-114	0,220
50 EU/ml LPS, 1. cyklus TX-114	0,178
50 EU/ml LPS, 2. cyklus TX-114	0,172
50 EU/ml LPS, 3. cyklus TX-114	0,115
Sialostatin L1, 1. cyklus TX-114	0,127
Sialostatin L1, 2. cyklus TX-114	0,074
Sialostatin L1, 3. cyklus TX-114	0,089
LAL voda	0,054

Z tabulky 7 je patrné, že hodnoty absorbance po prvním cyklu čištění klesly, při dalších cyklech dekontaminace došlo ke kolísání hodnot.



#### 4.2.2. Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific)

Tabulka 8: Absorbance vzorků Sialostatin L1, 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml a 50 EU/ml LPS při 545 nm. Vzorky přečištěné pomocí Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific).

<b>vzorek</b>	<b>A [545 nm]</b>
Sialostatin L1	0,704
bez LPS	0,203
5 EU/ml LPS	0,950
50 EU/ml LPS	1,478
Sialostatin L1 dekontaminovaný	1,399
5 EU/ml LPS, dekontaminovaný	0,344
50 EU/ml LPS, dekontaminovaný	0,370
LAL voda	0,054

Hodnoty absorbance z tabulky 8 ukazují, že v případě vzorků 8 mg/ml BSA v PBS došlo k poklesu absorbance po dekontaminaci, tedy i ke snížení koncentrace LPS. U vzorku Sialostatin L1 došlo po dekontaminaci ke zvýšení absorbance, tedy k údajnému zvýšení LPS ve vzorku.

### 4.2.3. ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript)

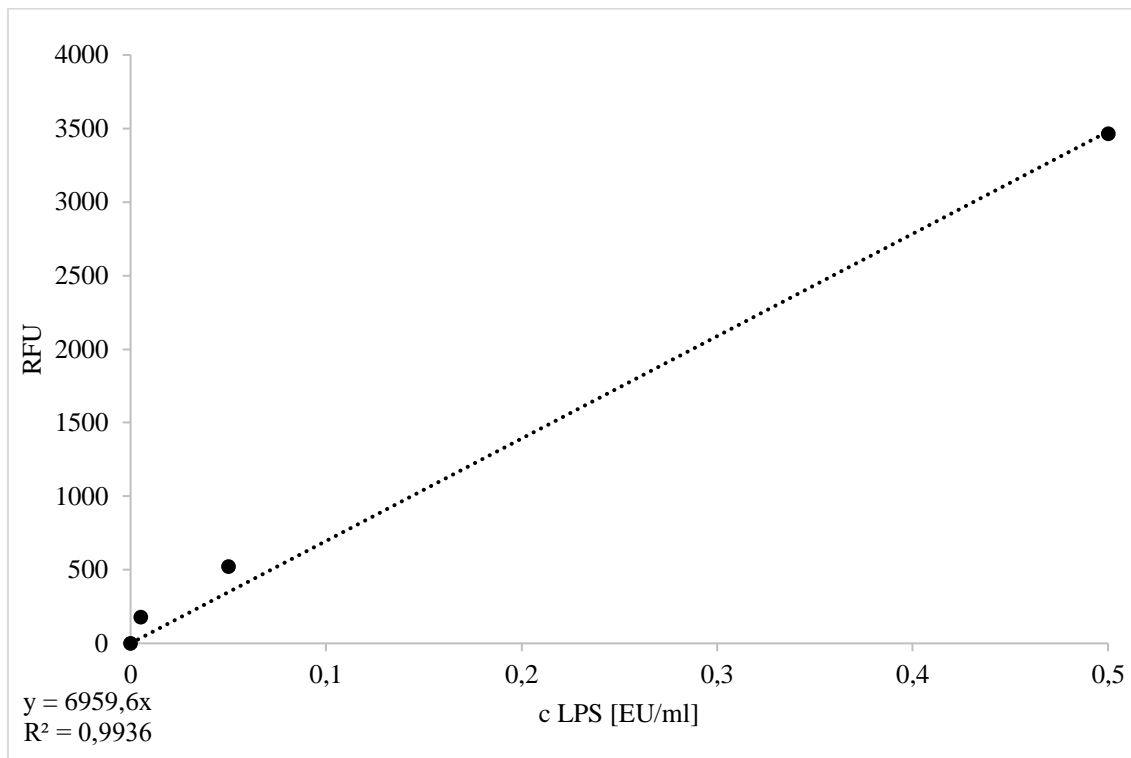
Tabulka 9: Absorbance vzorků Sialostatin L1 a 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml LPS při 545 nm. Vzorky přečištěné pomocí ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript).

<b>vzorek</b>	<b>A [545 nm]</b>
Sialostatin L1	0,704
bez LPS	0,203
5 EU/ml LPS	0,950
5 EU/ml LPS, 1x dekontaminovaný	0,076
5 EU/ml LPS, 2x dekontaminovaný	0,079
Sialostatin L1, 1x dekontaminovaný	0,214
Sialostatin L1, 2x dekontaminovaný	0,083
LAL voda	0,054

Z tabulky 9 lze vyčíst, že naměřené hodnoty absorbance se významně liší od hodnot naměřených pomocí obou předchozích LAL testů. Snižující se trend absorbance, a tedy i koncentrace LPS v dekontaminovaných vzorcích, je však zachován.

### 4.3. PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza)

Kalibrační křivka (Obr. 9) udává závislost fluorescence na koncentraci LPS ve vzorcích.



Obr. 9: Kalibrační křivka PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza), závislost fluorescence na koncentraci LPS ve vzorku.

Z rovnice grafu jsem si vypočítala rovnici pro výpočet koncentrace LPS ve vzorcích (2),

$$x = \frac{y}{6959,6} \quad (2)$$

kde x je výsledná koncentrace LPS [EU/ml] a y je hodnota fluorescence po odečtení kontrolního vzorku.

### 4.3.1. Triton X-114

Naměřené hodnoty fluorescence a vypočítané koncentrace LPS ve vzorcích přečištěných TX-114 jsou zaneseny v tabulce 10.

Tabulka 10: Fluorescence vzorků a výsledná koncentrace proteinu ve vzorcích s 8 mg/ml BSA v PBS přečištěných pomocí Tritonu X-114.

<b>vzorek</b>	<b>RFU</b>	<b>c LPS [EU/ml]</b>
bez LPS	589,500	0,085
5 EU/ml 1. cyklus	470,000	0,068
5 EU/ml 2. cyklus	457,500	0,066
5 EU/ml 3. cyklus	457,000	0,066
50 EU/ml 1. cyklus	391,000	0,056
50 EU/ml 2. cyklus	413,500	0,059
50 EU/ml 3. cyklus	370,500	0,053

Z tabulky 10 vyplývá, že u vzorků 8 mg/ml BSA v PBS s původní koncentrací LPS 5 EU/ml i 50 EU/ml došlo již po prvním cyklu dekontaminace k výraznému přečištění.

### 4.3.2. Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific)

V tabulce 11 jsou uvedeny naměřené hodnoty fluorescence a vypočítané koncentrace LPS ve vzorcích přečištěných Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific).

Tabulka 11: Fluorescence vzorků a výsledná koncentrace proteinu ve vzorcích s 8 mg/ml BSA v PBS a Sialostatin L1 dekontaminovaných pomocí Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific).

<b>vzorek</b>	<b>RFU</b>	<b>c LPS [EU/ml]</b>
bez LPS	589,500	0,085
Sialostatin L1	62920,000	90,407
5 EU, 1x dekontaminované	475,500	0,068
50 EU, 1x dekontaminované	804,500	0,116
Sialostatin L1, 1x dekontaminované	17150,500	2,464

Z tabulky 11 vyplývá, že se všechny vzorky podařilo pročistit. Vzorek Sialostatin L1 má po dekontaminaci vyšší koncentraci endotoxinu, než vzorky 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml a 50 EU/ml LPS.

#### 4.3.3. ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript)

Hodnoty naměřené fluorescence a vypočítané koncentrace LPS u vzorků přečištěných pomocí ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript) jsou zaneseny do tabulek 12 a 13.

Tabulka 12: Fluorescence vzorků a výsledná koncentrace proteinu ve vzorcích s 8 mg/ml BSA v PBS a Sialostatin L1 dekontaminovaných pomocí ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript).

<b>vzorek</b>	<b>RFU</b>	<b>c LPS [EU/ml]</b>
bez LPS	589,500	0,085
Sialostatin L1	62920,000	90,407
5 EU 1x dekontaminované	223,000	0,032
5 EU 2x dekontaminované	205,000	0,029
50 EU 1x dekontaminované	242,500	0,035
Sialostatin L1 1x dekontaminované	291,500	0,042
Sialostatin L1 2x dekontaminované	175,000	0,025

Z tabulky 12 je patrné, že došlo k dekontaminaci vzorků 8 mg/ml BSA v PBS s počáteční koncentrací LPS 5 EU/ml i 50 EU/ml i k dekontaminaci vzorku Sialostatin L1.

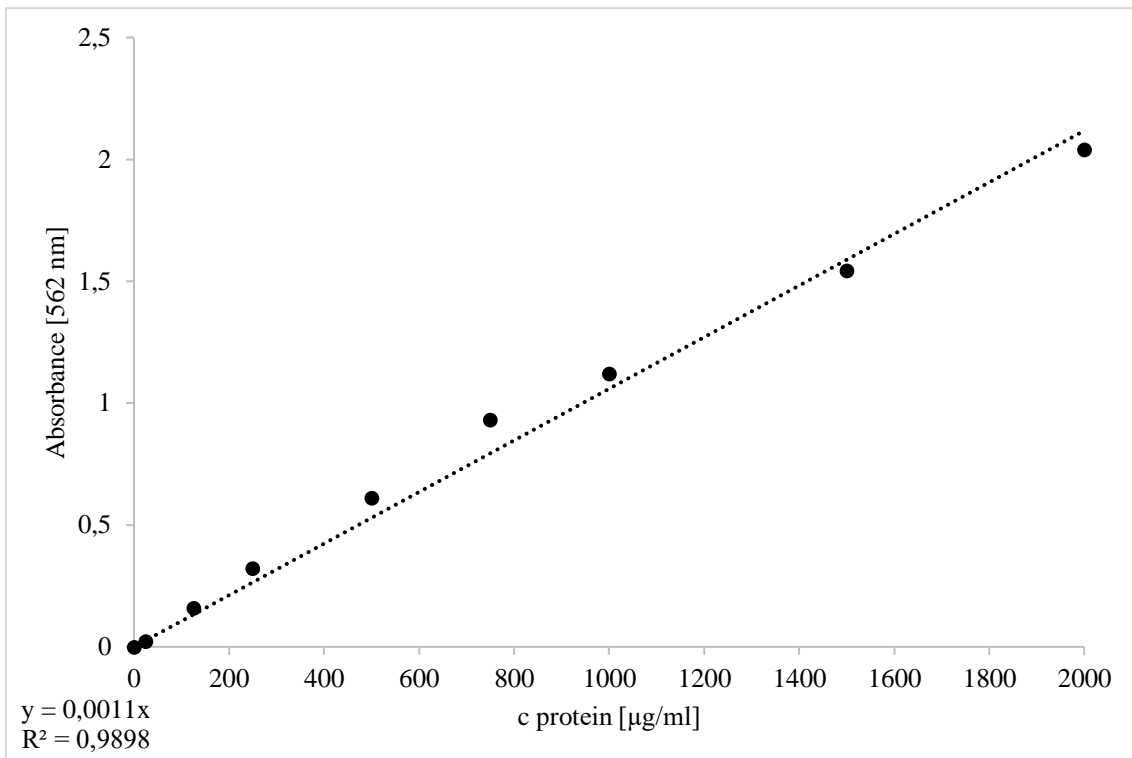
Tabulka 13: Fluorescence vzorků a výsledná koncentrace proteinu ve vzorcích s 4 mg/ml BSA v PBS, 2 mg/ml BSA v PBS, 1 mg/ml BSA v PBS a IRS-5.

<b>vzorek</b>	<b>RFU</b>	<b>c LPS [EU/ml]</b>
IRS-5	11424,000	16,415
1 mg/ml 1x dekontaminované	196,000	0,028
1 mg/ml 2x dekontaminované	171,000	0,025
2 mg/ml 1x dekontaminované	241,500	0,035
2 mg/ml 2x dekontaminované	138,000	0,020
4mg/ml 1x dekontaminované	270,000	0,039
4mg/ml 2x dekontaminované	152,000	0,022
IRS-5 1x dekontaminované	1479,000	0,213
IRS-5 2x dekontaminované	190,000	0,027

Hodnoty z tabulky 13 ukazují, že se podařilo dekontaminovat vzorky 1 mg/ml BSA v PBS, 2 mg/ml BSA v PBS i 4 mg/ml BSA v PBS, které před dekontaminací obsahovaly 50 EU/ml LPS. Vzorek IRS-5 se také podařilo dekontaminovat. U všech vzorků došlo při druhé dekontaminaci k dalšímu snížení koncentrace LPS.

#### 4.4. Měření proteinu - Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific)

Pomocí Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific) jsem měřila koncentraci proteinu ve vzorcích před dekontaminací a po dekontaminaci. Neznámé i standardní vzorky jsem měřila v duplikacích a jako kontrolní vzorek jsem použila 1x PBS. Veškeré měřené vzorky byly 4x zředěny 1x PBS. Na obrázku 10 je vynesena graf závislosti absorbance při 562 nm na koncentraci proteinu ve vzorcích.



Obr. 10: Kalibrační křivka závislosti absorbance při 562 nm na koncentraci proteinu ve vzorcích.

Z rovnice grafu jsem si odvodila rovnici pro výpočet koncentrace proteinu (3) ve vzorcích,

$$x = \frac{y}{0,0011} \quad (3)$$

kde x je výsledná koncentrace proteinu [µg/ml] a y je hodnota absorbance po odečtení kontrolního vzorku.



#### 4.4.1. Triton X-114

Naměřené hodnoty absorbance a vypočítané koncentrace proteinu ve vzorcích pročištěných TX-114 jsou zaneseny v tabulce 14.

Tabulka 14: Absorbance vzorků při 562 nm a výsledná koncentrace proteinu ve vzorcích s 8 mg/ml BSA v PBS.

<b>vzorek</b>	<b>A [562 nm]</b>	<b>odečtený kontrolní vzorek</b>	<b>c protein [μg/ml] 4x zředěné</b>	<b>c protein [μg/ml]</b>
bez LPS	1,975	1,875	1704,545	6818,182
5 EU/ml LPS	1,593	1,493	1357,273	5429,091
50 EU/ml LPS	2,180	2,080	1890,909	7563,636
5 EU/ml 1. cyklus	2,029	1,929	1753,636	7014,545
5 EU/ml 2. cyklus	2,029	1,929	1753,636	7014,545
5 EU/ml 3. cyklus	2,138	2,038	1852,727	7410,909
50 EU/ml 1. cyklus	1,997	1,897	1724,545	6898,182
50 EU/ml 2. cyklus	1,991	1,891	1719,091	6876,364
50 EU/ml 3. cyklus	2,368	2,268	2061,818	8247,273
kontrolní vzorek	0,100	-	-	-

Z tabulky 14 je patrné, že ačkoli by původní nepřečištěné vzorky měly obsahovat 8 mg/ml BSA v PBS, koncentrace proteinu je nižší. Se zvyšujícím se počtem cyklů dekontaminace TX-114 docházelo také ke zdánlivému zvyšování koncentrace proteinu ve vzorcích.

#### 4.4.2. Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific)

V tabulce 15 jsou zaneseny hodnoty absorbance při 562 nm a vypočítané koncentrace proteinu ve vzorcích pročištěných pomocí Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific).

Tabulka 15: Absorbance vzorků při 562 nm a výsledná koncentrace proteinu ve vzorcích s 8 mg/ml BSA v PBS a Sialostatin L1.

vzorek	A [562 nm]	odečtený kontrolní vzorek	c protein [μg/ml] 4x zředěné	c protein [μg/ml]
bez LPS	1,975	1,876	1705,000	6820,000
5 EU/ml LPS	1,593	1,493	1357,273	5429,091
50 EU/ml LPS	2,180	2,011	1827,727	7310,909
Sialostatin L1	0,168	0,168	152,273	609,091
5 EU/ml LPS po dekontaminaci	2,167	2,068	1879,545	7518,182
50 EU/ml LPS po dekontaminaci	2,219	2,119	1926,364	7705,455
Sialostatin L1 po dekontaminaci	0,170	0,070	63,636	254,545
kontrolní vzorek	0,100	-	-	-

Z tabulky 15 lze vyčíst, že u všech vzorků došlo opět ke zdánlivému zvýšení koncentrace proteinu.

#### 4.4.3. ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript)

Naměřené hodnoty absorbance při 562 nm a vypočítané koncentrace proteinu ve vzorcích dekontaminovaných pomocí ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript) jsou zaneseny v tabulce 16 a v tabulce 17.

Tabulka 16: Absorbance vzorků při 562 nm a výsledná koncentrace proteinu ve vzorcích s 8 mg/ml BSA v PBS a Sialostatin L1.

vzorek	A [562 nm]	odečtený kontrolní vzorek	c protein [μg/ml] 4x zředěné	c protein [μg/ml]
bez LPS	1,975	1,876	1705,000	6820,000
5 EU/ml LPS	1,593	1,493	1357,273	5429,091
50 EU/ml LPS	2,180	2,081	1891,364	7565,455
Sialostatin L1	0,168	0,068	61,818	247,273
5 EU/ml LPS 1x dekontaminované	1,412	1,313	1193,182	4772,727
5 EU/ml LPS 2x dekontaminované	1,001	0,902	819,545	3278,182
50 EU/ml LPS 1x dekontaminované	1,559	1,459	1326,364	5305,455
Sialostatin L1, 1x dekontaminované	0,153	0,054	48,636	194,545
Sialostatin L1, 2x dekontaminované	0,141	0,041	37,273	149,091
kontrolní vzorek	0,100	-	-	-

Z tabulky 16 lze vyčíst, že v případě vzorku s 5 EU/ml dojde po první dekontaminaci k poklesu koncentrace proteinu o 12 % a po druhé dekontaminaci klesne koncentrace proteinu o dalších 28 %, celkový výtěžek proteinu po dvou dekontaminacích byl 60 %. U vzorku s 50 EU/ml došlo k poklesu koncentrace proteinu po první dekontaminaci o 30 %. V případě vzorku Sialostatin L1 došlo po první dekontaminaci k poklesu koncentrace proteinu ve vzorku o 21 % a po druhé dekontaminaci o dalších 19 %, celkový výtěžek proteinu po dvou dekontaminacích byl 60 %.

Tabulka 17: Absorbance vzorků při 562 nm a výsledná koncentrace proteinu ve vzorcích IRS-5, 1 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS, 2 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS a 4 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS.

vzorek	A [562 nm]	odečtený kontrolní vzorek	c protein [μg/ml] 4x zředěné	c protein [μg/ml]
IRS-5	-	-	-	1140,000
1 mg/ml BSA v PBS	0,404	0,304	276,364	1105,455
2 mg/ml BSA v PBS	0,654	0,554	503,636	2014,545
4 mg/ml BSA v PBS	1,192	1,093	993,182	3972,727
1 mg/ml BSA v PBS, 1x dekontaminované	0,330	0,231	209,545	838,182
1 mg/ml BSA v PBS, 2x dekontaminované	0,268	0,169	153,182	612,727
2 mg/ml BSA v PBS, 1x dekontaminované	0,523	0,423	384,545	1538,182
2 mg/ml BSA v PBS, 2x dekontaminované	0,498	0,398	361,818	1447,273
4 mg/ml BSA v PBS, 1x dekontaminované	0,934	0,834	758,182	3032,727
4 mg/ml BSA v PBS, 2x dekontaminované	0,701	0,601	546,364	2185,455
IRS-5, 1x dekontaminované	0,319	0,220	199,545	798,182
IRS-5, 2x dekontaminované	0,230	0,131	118,636	474,545
kontrolní vzorek	0,100	-	-	-

Hodnoty zanesené v tabulce 17 ukazují, že u vzorku IRS-5 došlo po první dekontaminaci k poklesu koncentrace proteinu ve vzorku o 30 % a po druhé dekontaminaci o dalších 28 %, celkový výtěžek proteinu po dvou dekontaminacích byl 42 %. V případě vzorku 1 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS došlo po první dekontaminaci k poklesu koncentrace proteinu ve vzorku o 24 % a po druhé dekontaminaci o dalších 28 %, celkový výtěžek proteinu po dvou dekontaminacích byl 55 %. U vzorku 2 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS se koncentrace proteinu po první dekontaminaci snížila o 24 % a po druhé dekontaminaci o další 4 %, celkový výtěžek proteinu po 2 dekontaminacích byl 72 %. U vzorku 4 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS došlo ke snížení koncentrace proteinu po první dekontaminaci o 24 % a po

druhé dekontaminaci o dalších 21 %. Celkový výtěžek proteinu byl 55 %. U vzorku IRS-5 před dekontaminací jsem neměřila koncentraci proteinu, jelikož byla koncentrace proteinu ve vzorku již dříve změřena.

5.

## 5. Diskuze

Bakteriální lipopolysacharid je hlavní složkou vnější membrány gramnegativních bakterií a zároveň endotoxin, který působí jako silný aktivátor vrozené imunitní odpovědi. Rekombinantní proteiny produkované gramnegativními bakteriemi jsou kontaminované lipopolysacharidy a kvůli jejich toxicitě hrají metody odstranění lipopolysacharidů z rekombinantních proteinů důležitou roli. Existuje několik metod odstranění lipopolysacharidů, viz 1.4.1 Metody odstranění LPS. Cílem mé práce bylo porovnat účinnost tří vybraných metod dekontaminace rekombinantního proteinu od bakteriálního lipopolysacharidu a následně porovnat přesnost výsledků tří vybraných LAL testů pro měření koncentrace lipopolysacharidů ve vzorku.

Prvním krokem bylo vybrat tři metody dekontaminace rekombinantního proteinu od bakteriálního lipopolysacharidu, které jsou proveditelné v podmínkách naší laboratoře. První použitou metodou byl Triton X-114. Výhodou Tritonu X-114 je jeho nízká cena a možnost přečištění velkého množství vzorku, jelikož se Tritonu X-114 přidává jen tolik, aby jeho celková koncentrace ve vzorku byla 1 %. Jeho další výhodou jsou jen malé ztráty proteinu, menší jak 5 % (Aida a Pabst, 1990). To v mé práci nebylo možné potvrdit, jelikož došlo k ovlivnění naměřené absorbance zbytkovým Tritonem X-114 ve vzorcích. Teplota inkubace i koncentrace Tritonu X-114 ve vzorku mají kritický vliv na jeho dekontaminaci (Teodorowicz *et al.*, 2017). Teodorowicz použil teplotu inkubace 37 °C a 2% koncentraci Tritonu X-114 ve vzorku s výslednou 99,9% dekontaminací po prvním a jediném cyklu. Teodorowicz dále uvádí, že více cyklů dekontaminace nevedlo k vyšší extrakci LPS (Teodorowicz *et al.*, 2017). V mé práci jsem Triton X-114 také inkubovala při 37 °C, ale jeho koncentrace byla pouze 1 % celkové koncentrace ve vzorku. Výsledná dekontaminace vzorku 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml LPS po třech cyklech dekontaminace byla dle PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza) 98,68 %. U vzorku 8 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS byla dle PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza) 99,89 %. Domnívám se, že je účinnější použít vyšší koncentraci Tritonu X-114 a dekontaminovat pouze jednou, protože při každé manipulaci se vzorkem hrozí jeho kontaminace, jako tomu bylo u mých vzorků, kde k největší dekontaminaci došlo hned v prvním cyklu přečištění a v dalších cyklech už koncentrace LPS kolísala směrem k vyšším hodnotám. Velkou nevýhodou této metody je, že malé množství detergentu zůstává ve vzorku, a i malé množství Tritonu X-114 je toxické pro živé buňky (Aida a Pabst, 1990). Použití Bio-Beads SM-2 (BioRad) pro odstranění Tritonu X-114 by mělo vést ke snížení jeho koncentrace ve vzorku až na 0,005 %.

Toto množství již není pro buňky toxické (Teodorowicz *et al.*, 2017). Nicméně při použití Bio-Beads může dojít ke ztrátám proteinu, který je těmito kuličkami adsorbován (Aida a Pabst, 1990). Další velkou nevýhodou této metody shledávám v ovlivňování absorbance Tritonem X-114, pokud nedojde k jeho dostatečnému odstranění ze vzorku. Se zvyšující se koncentrací Tritonu X-114 ve vzorku dochází i ke zvyšování absorbance při 556 nm (Bahram, Khezri a Khezri, 2013). To se v mé práci potvrdilo, neboť podle mých výsledků koncentrace proteinu ve vzorcích, měřených při 562 nm, dochází s vyšším počtem cyklů dekontaminace k nesmyslnému nárůstu koncentrace proteinu ve vzorcích. Pravděpodobně došlo k ovlivnění absorbance Tritonem X-114, tudíž se mi nepodařilo vzorky pomocí Bio-Beads dostatečně očistit od Tritonu X-114.

Druhá použitá metoda, Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific), má výhodu ve své jednoduchosti, komerční kit obsahuje vše potřebné. Avšak použití pryskyřice s aktivními ligandy je mnohem dražší než například TX-114. V mé práci se podařilo dekontaminovat vzorky 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml o 98,64 % dle PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza) a 50 EU/ml LPS o 99,77 % dle PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza). Avšak klíštěcí Sialostatin L1 se podařilo dle PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza) dekontaminovat o 97,27 %. Hietala uvádí, že samotné použití Pierce High-Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific) nesnížilo koncentraci endotoxinu ve vzorku. K výrazné dekontaminaci došlo až po prvotním použití ionexové chromatografie (Hietala *et al.*, 2019). Zhang navrhuje použití afinitní chromatografie společně s dekontaminací pomocí TX-114, protože kombinace dvou metod odlišného principu dekontaminace endotoxinu vede k lepším výsledkům. Dále uvádí, že použití jedné metody, byť opakovaně, nemůže vést k dostatečnému odstranění LPS (Zhang *et al.*, 2015). V mé práci se podařilo vzorky úspěšně dekontaminovat, avšak kombinace více metod odlišného principu by mohla vést k ještě větší dekontaminaci, zejména u klíštěcího Sialostatinu L1. V mé práci došlo při této metodě ke zdánlivému nárůstu koncentrace proteinů ve vzorku po dekontaminaci, příčinu tohoto nárůstu se mi však nepodařilo objasnit. Domnívám se, že došlo k chybnému změření absorbance.

Třetí použitou metodou byl ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript). Tato metoda má výhodu opět ve své jednoduchosti použití. Pomocí jedné kolony lze vyčistit až pět vzorků, všechny potřebné roztoky jsou poskytnuty výrobcem a není zapotřebí žádného speciálního laboratorního vybavení. Nevýhodou shledávám, stejně jako u Pierce High-

Capacity Endotoxin Removal Resin (ThermoFisher Scientific), vysokou cenu. Za použití této metody se v mé práci podařilo dekontaminovat vzorek 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml LPS o 99,42 % dle PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza). Vzorek 8 mg/ml BSA v PBS s 50 EU/ml LPS se dle PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza) podařilo dekontaminovat o 99,93 % a vzorek Sialostatin L1 se dle PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza) podařilo dekontaminovat o 99,97 %. Při použití kolony využívající polymyxin B jako ligand může docházet k vyšším ztrátám proteinu. Na aminokyselinových skupinách na polymyxinu B existují kladné náboje, které mohou přitahovat záporně nabitě cílové molekuly (Schneier *et al.*, 2020). V mé práci byla ztráta proteinu po dvou dekontaminacích pomocí ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript) u vzorku 8 mg/ml BSA v PBS s 5 EU/ml LPS i Sialostatinu L1 40 %, potvrdily se tedy vyšší ztráty produktu při použití polymyxinu B. Dalším potenciálním nebezpečím polymyxinu B je jeho neurotoxicita a nefrotoxicita, což může být problém pro další experimenty, pokud by se polymyxin B uvolnil z kolony (Schneier *et al.*, 2020).

Z hlediska použitelnosti a spolehlivosti dekontaminace sledávám ToxinEraser Endotoxin Removal Kit (GenScript) jako nejlepší metodu pro dekontaminaci rekombinantních proteinů od LPS, za cenu větší ztráty produktu. Jelikož vazba proteinů na polymyxin B je ovlivněna pH (Schneier *et al.*, 2020), optimalizací pH roztoku by bylo možné tuto ztrátu zmírnit. Přitom je však třeba dbát i na pI proteinu, které nesmí odpovídat pH roztoku, jinak by došlo k jeho precipitaci. Abych ověřila spolehlivost této metody i při jiných koncentracích proteinů a jiných proteinech, použila jsem tuto metodu k dekontaminaci vzorků o koncentraci BSA v PBS 1 mg/ml, 2 mg/ml a 4 mg/ml, všechny vzorky obsahovaly 50 EU/ml LPS, a také k dekontaminaci IRS-5. V případě IRS-5 byl celkový výtěžek proteinu po dvou dekontaminacích pouhých 42 %, u vzorků s 1 mg/ml a 4 mg/ml BSA v PBS byl výtěžek proteinu 55 % a u vzorku 2 mg/ml BSA v PBS byl výtěžek proteinu 72 %. Vzorky 1 mg/ml, 2 mg/ml a 4 mg/ml BSA v PBS se dle PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza) podařilo dekontaminovat o 99,96 %, vzorek IRS-5 se podařilo dekontaminovat o 99,84 %.

K měření koncentrace LPS ve vzorcích jsem použila tři různé LAL testy s cílem zjistit, s jakým se nejlépe pracuje a jaký je z hlediska výsledků nejspolehlivější. Prvním LAL testem byl PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza), jehož velkou předností oproti LAL testům na principu amébocytárního lyzátu je šetrnost k přírodě.



Populace ostrorepů v mořích v důsledku lovu, ztrátě stanoviště a znečištění klesají a komerční využití ostrorepů pro LAL testy ještě zvyšuje ohrožení jejich populace (Abate *et al.*, 2017). Testy rekombinantního faktoru C jsou navíc endotoxinově specifické a aktivovaný faktor C reaguje přímo s fluoroforem (Piehler *et al.*, 2020). Je vyloučen vznik falešně pozitivních výsledků kvůli aktivaci faktoru G betaglukany, jako je tomu u testu na amébocytárním lyzátu (Schneier *et al.*, 2020). Dalším použitým testem byl Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (ThermoFisher Scientific). Nevýhodou LAL testu používajícího amébocytární lyzát je možnost aktivace koagulační kaskády betaglukany, způsobující zkreslení výsledků. Nečistoty ve vzorcích a teplota či například pH mohou také ovlivnit koagulační kaskádu. (Piehler *et al.*, 2020). Výhodou Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (ThermoFisher Scientific) je jeho jednoduchost a rychlost použití. Oproti PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza), kde se vzorky musejí hodinu inkubovat, lze u tohoto testu výsledky odečítat již po 16 minutách. Třetí použitý LAL test, ToxinSensor Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript), je také test používající amébocytární lyzát, stejně jako u předchozího testu tedy hrozí falešně pozitivní výsledky způsobené aktivací faktoru G betaglukany (Schneier *et al.*, 2020). Tento test byl oproti testu předchozímu složitější, místo na 96 jamkové destičce se roztoky míchaly ve skleněných mikrozkuvkách, manipulace byla tedy mnohem složitější a pro spektrofotometrické měření jsem všechny roztoky musela přepipetovat na 96 jamkovou destičku. Koeficient determinace ( $R^2$ ) mi u kalibrační křivky tohoto testu vyšel jen 0,7696, proto jsem z naměřené absorbance nevypočítávala koncentraci LPS, neboť by byla zkreslená.

Z hlediska přesnosti výsledků shledávám PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay (Lonza) jako nejlepší metodu pro měření koncentrace LPS ve vzorcích. Ačkoli je tento test časově náročnější, jeho nespornou výhodou je vyloučení vzniku falešně pozitivních výsledků aktivací faktoru G betaglukany.

## 6. Závěr

V této práci se podařilo určit nejúčinnější metodu pro dekontaminace rekombinantních proteinů od bakteriálního lipopolysacharidu ze tří testovaných metod, proveditelnou v podmínkách naší laboratoře. Touto metodou je ToxinEraser Endotoxin Removal Kit od firmy GenScript. Potvrdila se účinnost této metody při dekontaminaci proteinů o různé koncentraci i při dekontaminaci různých proteinů (BSA, Sialostatin L1 a IRS-5), bohužel za cenu ztráty přečišťovaného proteinu. Podařilo se také určit nejlepší metodu pro měření koncentrace LPS ve vzorcích ze tří testovaných metod, kterou je PyroGene Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay od firmy Lonza.

## 7. Seznam zkratek

**ATP** – adenosintrifosfát

**BCA** – kyselina bicinchoninová

**BSA** – hovězí sérový albumin

**bWBA** – bovine whole blood assay

**CD** – cluster of differentiation

**EU** – endotoxinová jednotka

**Hep** – L-glycero-D-manno-heptóza

**IFN** – interferon

**IL** – interleukin

**IRF** – interferon regulující faktor

**Kdo** – kyselina 3-deoxy-D-manno-okt-2-ulózonová

**LAL** – amébocytární lyzát z *Limulus polyphemus*

**LAL voda** – voda bez endotoxinu, používaná při měření LPS

**LBP** – protein vázající LPS

**LPS** – lipopolysacharid

**MD** – myeloidní diferenciací faktor

**MyD88** – gen myeloidní diferenciací primární odpovědi 88

**NF** – nukleární faktor

**NLR** – NOD like receptory

**PAMP** – pathogen-associated molecular patterns

**PBS** – Phosphate Buffered Saline

**PGE2** – prostoglandin E2

**PRR** – Pattern recognition receptory

**rcf** – relative centrifugation force

**rFC** – rekombinantní faktor C

**RLR** – RIG like receptory

**RPT** – rabbit pyrogen test

**TBS** – Tris-buffered saline

**TLR** – Toll-like receptory

**TNF** – tumor necrosis factor

**TX-114** – Triton X-114

## 8. Literatura

Abate, W. *et al.* (2017). Evaluation of recombinant factor C assay for the detection of divergent lipopolysaccharide structural species and comparison with *Limulus* amoebocyte lysate-based assays and a human monocyte activity assay, *Journal of Medical Microbiology*. Microbiology Society, 66, pp. 888–897. doi:10.1099/jmm.0.000510.

Aida, Y. and Pabst, M. J. (1990). Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114, *Journal of Immunological Methods*, 132, pp. 191-195.

Anspach, F. B. (2001). Endotoxin removal by affinity sorbents, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49, pp. 665-681. doi:10.1016/s0165-022x(01)00228-7.

Bahram, M., Khezri, Somayeh and Khezri, Sakineh (2013). Cloud point extraction, pre-concentration and spectrophotometric determination of nickel in water samples using dimethylglyoxime, *Current Chemistry Letters*. Growing Science, 2, pp. 49–56. doi:10.5267/j.ccl.2012.11.001.

Cochet, F. and Peri, F. (2017). The role of carbohydrates in the lipopolysaccharide (LPS)/toll-like receptor 4 (TLR4) Signalling, *International Journal of Molecular Sciences*, 18, doi:10.3390/ijms18112318.

Copeland, S. *et al.* (2005). Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12, pp. 60–67. doi:10.1128/CDLI.12.1.60-67.2005.

Doerrler, W. T. (2006). Lipid trafficking to the outer membrane of Gram-negative bacteria, *Molecular Microbiology*, 60, pp. 542–552. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05130.x.

Doerrler, W. T. and Raetz, C. R. H. (2002). ATPase activity of the MsbA lipid flippase of *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry*, 277, pp. 36697–36705. doi:10.1074/jbc.M205857200.

Draper, A. *et al.* (2018). Effort but not reward sensitivity is altered by acute sickness induced by experimental endotoxemia in humans, *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group, 43, pp. 1107–1118. doi:10.1038/npp.2017.231.

Hietala, V. *et al.* (2019). The removal of endo- and enterotoxins from bacteriophage preparations, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media SA, 10, doi:10.3389/fmicb.2019.01674.

Iwanaga, S. (2007). Biochemical principle of Limulus test for detecting bacterial endotoxins, *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 83, pp. 110-119. doi:10.2183/pjab.83.110.

Lacagnina, M. J., Watkins, L. R. and Grace, P. M. (2017). Toll-like receptors and their role in persistent pain, *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc., pp. 145–158. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.10.006.

Leive, L. (1974). The barrier function of the gram-negative envelope, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 235, pp. 109-129. doi:10.1111/j.1749-6632.1974.tb43261.x.

Liu, D. *et al.* (2019). Recent advances in endotoxin tolerance, *Journal of Cellular Biochemistry*. Wiley-Liss Inc., 120, pp. 1-15. doi:10.1002/jcb.27547.

Liu, S. *et al.* (1997). Removal of endotoxin from recombinant protein preparations, *Clinical Biochemistry*, 30, pp. 455-463. doi:10.1016/s0009-9120(97)00049-0.

Lopes, A. M. *et al.* (2010). LPS removal from an E. coli fermentation broth using aqueous two-phase micellar system, *Biotechnology Progress*, 26, pp. 1644–1653. doi:10.1002/btpr.463.

Magalhaes, P. O. and Pessoa, A. (2010). Lipopolysaccharide, LPS removal, depyrogenation, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. doi:10.1002/9780470054581.eib388.

Mapleson, B. K. and Sizer, P. (2007). Method of removing endotoxin from vaccines, U.S. Patent No. 7,226,775 B2.

Meredith, T. C. *et al.* (2006). Redefining the requisite lipopolysaccharide structure in *Escherichia coli.*, *ACS chemical biology*, 1, pp. 33–42. doi:10.1021/cb0500015.

Morè, N. *et al.* (2019). Peptidoglycan remodeling enables *Escherichia coli* to survive severe outer membrane assembly defect, *Molecular Biology and Physiology*, 10. doi:10.1128/mbio.02729-18.

Park, C. Y. *et al.* (2005). Comparison of the rabbit pyrogen test and Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide, *Biologicals*, 33, pp. 145–151. doi:10.1016/j.biologicals.2005.04.002.

Petsch, D. (2000). Endotoxin removal from protein solutions, *Journal of Biotechnology*, 76, pp. 97-119. doi:10.1016/s0168-1656(99)00185-6.

Piehler, M. *et al.* (2020). Comparison of LAL and rFC assays - participation in a proficiency test program between 2014 and 2019, *Microorganisms*, 8. doi:10.3390/microorganisms8030418.

Raetz, C. R. H. *et al.* (1991). Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction, *The FASEB Journal*, 5, 2652–2660. doi:10.1096/fasebj.5.12.1916089.

Raetz, C. R. H. and Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins, *Annual Review of Biochemistry*, 71, pp. 635–700. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414.

Schneier, M. *et al.* (2020). Current technologies to endotoxin detection and removal for biopharmaceutical purification, *Biotechnology and Bioengineering*. doi:10.1002/bit.27362.

Schumann, R. R. *et al.* (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein, 249, pp. 1429-1431. doi:10.1126/science.2402637.

Smith, P. K. *et al.* (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry*, 150, pp. 76-85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.

Teodorowicz, M. *et al.* (2017). Optimized triton X-114 assisted lipopolysaccharide (LPS) removal method reveals the immunomodulatory effect of food proteins, *PLOS ONE*. Public Library of Science, 12. doi:10.1371/journal.pone.0173778.

Vidya, M. K. *et al.* (2018). Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals, *International Reviews of Immunology*, 37, pp. 20–36. doi:10.1080/08830185.2017.1380200.

Wang, X. and Quinn, P. J. (2010). Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification, *Progress in Lipid Research*, 49, pp. 97–107. doi:10.1016/j.plipres.2009.06.002.

Whitfield, C. (1995). Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens, *Trends in Microbiology*, 3, pp. 178-185. doi:10.1016/s0966-842x(00)88917-9.

Zhang, H. *et al.* (2014). Effect of Tris-acetate buffer on endotoxin removal from human-like collagen used biomaterials, *Materials Science and Engineering*, 42, pp. 124–129. doi:10.1016/j.msec.2014.05.015.

Zhang, J. *et al.* (2015). A two-step protocol to remove endotoxins from human-like collagen, *Separation Science and Technology*, 50, pp. 993–1001. doi:10.1080/01496395.2014.978467.