

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

# **Diplomová práce**

**2023**

**Bc. Pavla Petráňová**

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Molekulárně biologická a strukturní studie  
bakteriálních lysostafinů a jejich mutantních  
forem**

Diplomová práce

**Bc. Pavla Petráňová**

Školitelka: prof. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, Ph.D.

Školitel-specialista: Mgr. Petra Havlíčková

České Budějovice 2023

Petráňová, P., 2023: **Molekulárně biologická a strukturní studie bakteriálních lysostafinů a jejich mutantních forem.** [Molecular biological and structural studies of bacterial lysostaphins and their mutant forms. Master Thesis, in Czech.] – počet stran práce 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

This master thesis is aimed at molecular biological and structural studies of bacterial lysostaphins and their mutant forms. These proteins can be considered as the potential alternative candidates for the development of new drugs for the treatment of bacterial infections. The focus of this thesis is to prepare the recombinant proteins for crystallization and further structural studies.

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 11. dubna 2023

.....

Podpis

**Cíle práce:**

- zvládnout expresi a purifikaci bakteriálních lysostafinů a jejich mutantních forem
- zvládnout základní metody analýzy proteinů
- zvládnout základní a pokročilé krystalizační metody
- charakterizovat studované proteiny a pokusit se nalézt krystalizační podmínky pro přípravu proteinových krystalů
- připravit *in silico* modely studovaných lysostafinů a následně je porovnat

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce prof. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. za cenné rady, věnovaný čas a trpělivost.

Také bych poděkovala své školitelce-specialistce Mgr. Petře Havlíčkové za velkou pomoc, ochotu a trpělivost při práci v laboratoři a sepisování práce.

Poděkování patří také RNDr. Lubomíru Jandovi, Ph.D., a Mgr. Šárce Kobzové, z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i., (VÚVeL), v Brně, za pomoc při přípravě proteinů a poskytnutí vzorků lysostafinu WT a lysostafinu mutant D.

Na závěr bych ráda poděkovala své nejbližší rodině za ohromnou podporu nejen během psaní magisterské práce, ale i během studia.

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled.....	2
2.1	<i>Staphylococcus aureus</i> – charakteristika, onemocnění .....	2
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i> – rezistence na antibiotika.....	2
2.3	<i>Staphylococcus simulans</i> .....	4
2.4	Klasifikace studovaných proteinů .....	5
2.5	Lysostafiny .....	6
2.6	Endolysiny .....	9
3	Materiál a metody .....	10
3.1	Příprava rekombinantních proteinů .....	10
3.1.1	Transformace proteinů .....	10
3.1.2	Příprava buněčných pelet .....	10
3.1.3	Expresce proteinů.....	11
3.1.4	Purifikace .....	11
3.1.5	SDS-PAGE elektroforéza.....	13
3.2	Krystalizace proteinů .....	14
3.2.1	Pre-krystalizační test .....	14
3.2.2	Precipitační činidla .....	15
3.2.3	Screening pomocí krystalizačního robota .....	16
3.2.4	Optimalizace krystalizačních podmínek ručně.....	17
3.3	AlphaFold .....	17
4	Výsledky .....	18
4.1	Expresce proteinů .....	18
4.2	Purifikace proteinů a SDS-PAGE elektroforéza .....	18
4.3	Krystalizace proteinů .....	23
4.4	Predikce struktur proteinů .....	24
5	Diskuze .....	29
6	Závěr .....	35
7	Seznam literatury .....	36
8	Seznam obrázků .....	45
9	Seznam tabulek .....	46
10	Přílohy.....	47
	Příloha 1: Sekvence jednotlivých proteinů.....	47
	Příloha 2: Složení médií – příprava buněčných pelet .....	48

Příloha 3: Složení činidel sady PCT (Hampton Research).....	48
Příloha 4: Srovnání různých konstruktů lysostafinu.....	49
Příloha 5: Srovnání různých konstruktů endolysinu.....	50
Příloha 6: Run protocol – lysostafin. ....	51
Příloha 7: Run protocol – endolysin. ....	55

## Seznam použitých zkratek a symbolů

- A – L-alanin
- AK – aminokyselina/y
- APS – persíran amonný
- BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
- CWD – C-terminální doména vázající buněčnou stěnu
- D-A – D-alanin
- ddH<sub>2</sub>O – deionizovaná voda
- D-Q – D-glutamin
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- *E. coli* – *Escherichia coli*
- EAD - N-terminální doména enzymatické aktivity
- G – L-glycin
- His Tag – histidine tag = histidinová značka
- IPTG – izopropyl-β-D-thiogalaktopyranozid
- K – L-lysin
- kDa – kilo Dalton
- LB médium – lysogeny broth = bujónové médium pro bakterie
- Lst-ABD – lysostafin s albumin-vázající doménou
- MIC – Minimální inhibiční koncentrace
- mut – mutant
- NAcGlu – N-acetylglukosamin
- NAcM – N-acetylmuramová kyselina
- NIH – National Institutes of Health
- OD – optical density = optická hustota
- PEG – polyethylenglykol
- PDB – Protein Data Bank
- pH – potential/power of hydrogen
- pI – izoelektrický bod (isoelectric point)
- RMSD – Root mean square distance
- rpm – revolutions per minutes = otáčky za minutu
- SDS – dodecylsíran sodný



- SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis = elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
- SP – signální peptid
- SOC Medium – Super Optimal broth with Catabolite repression
- *S. aureus* – *Staphylococcus aureus*
- *S. epidermidis* – *Staphylococcus epidermidis*
- *S. simulans* – *Staphylococcus simulans*
- TB – terrific broth = obohacené bujónové médium pro bakterie
- TEMED – NNN'N'-tetramethylethylendiamin
- TEV – Tobacco Etch Virus
- Tris – 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3- diol
- Ubq – Ubikvitin
- WHO - Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
- WT – wild type (divoký typ)

### **Aminokyseliny:**

- Ala (A) – alanin
- Arg (R) – arginin
- Asn (N) – asparagin
- Asp (D) – kyselina asparagová
- Cys (C) – cystein
- Gln (Q) – glutamin
- Glu (E) – kyselina glutamová
- Gly (G) – glycin
- His (H) – histidin
- Ile (I) – izoleucin
- Leu (L) – leucin
- Lys (K) – lysin
- Met (M) – methionin
- Phe (F) – fenylalanin
- Pro (P) – prolin
- Pyl (O) – pyrolysin
- Sec (U) – selenocystein
- Ser (S) – serin
- Thr (T) – threonin
- Trp (W) – tryptofan
- Tyr (Y) – tyrosin
- Val (V) – valin

# 1 Úvod

Produkce antibiotik se každoročně stále zvyšuje, pohybuje se v rozmezí 100-200 tisíc tun ročně (Serwecińska, 2020). Kvůli tomu, že dochází k nadměrnému používání antibiotik, vzniká antibiotická rezistence. Bakterie jsou schopné obnovit svou strukturu tak, aby je uchránila před působením antibiotik (Czekalski et al., 2014; Serwecińska, 2020).

Rezistence vůči antibiotikům je hrozbou pro pacienty a prodlužuje jejich pobyt v nemocnicích (Vacek et al., 2020). Podle organizace WHO jsou antimikrobiální léčiva účinná, jejich systematické zneužívání a nadužívání v humánní i veterinární medicíně ohrožuje celý svět (WHO, 2015).

Celosvětovým problémem jsou hlavně stafylokokové infekce. *Staphylococcus aureus* je významný lidský patogen s rezistencí vůči antibiotikům (Bastos et al., 2010; Tang & Stratton, 2010; Kashani et al., 2018). V dnešní době je snaha hledat nové alternativní možnosti léčby bakteriálních infekcí, např. bakteriociny (Sabala et al., 2014).

Bakteriociny jsou bakteriální antimikrobiální peptidy a proteiny, které obecně vykazují baktericidní aktivitu vůči bakteriím. Produkce bakteriocinů je sebeochranný mechanismus, který pomáhá tzv. koaguláza-negativním stafylokokům (neschopni koagulovat plazmu) přežít v jejich přirozeném prostředí (Newstead et al., 2020). Jedním z nejvýznamnějších zástupců této skupiny látek jsou lysostafiny.

Lysostafiny vykazují vysoký stupeň bakteriolytické aktivity vůči lidským i zvířecím stafylokokům, přičemž nejsou aktivní vůči bakteriím všech ostatních rodů. Vzhledem k této skutečnosti mají lysostafiny potenciál pro biotechnologické využití při léčbě stafylokokových infekcí. Studie *in vitro* a *in vivo* provedené s lysostafiny ukázaly, že mohou být použity samostatně, nebo v kombinaci s jinými antibakteriálními látkami, k prevenci nebo léčbě stafylokokových infekcí (Bastos et al., 2010).

## 2 Literární přehled

### 2.1 *Staphylococcus aureus* – charakteristika, onemocnění

*S. aureus* je častá komenzální bakterie a jeden z nejvýznamnějších bakteriálních patogenů člověka, který má celosvětově vysokou mortalitu v rozmezí 10 až 30% (Wertheim et al., 2005; van Hal et al., 2012).

*S. aureus* může trvale kolonizovat v nose, v kůži, hrdle, podpaží, tříslech nebo ve střevě (Wertheim et al., 2005; Misawa et al., 2015). Pro vytvoření podmínek pro kolonizaci *S. aureus* je zapotřebí dalších komenzálů – jiné stafylokoky, korynebakterie nebo propionibakterie (Costello et al., 2009; Wollenberg et al., 2014; Krismer et al., 2017). Samotný proces kolonizace je neškodný, ale představuje potenciální riziko pro následný vznik a rozvoj infekcí, které jsou často způsobené kolonizujícím kmenem (Clarridge et al., 2013). Infekce se mohou lišit, mohou být ve formě mírných kožních infekcí a infekcí měkkých tkání, až po závažné invazivní infekce kostí a kloubů, bakteriémie, pneumonie a endokarditidy (Kavanagh et al., 2018; Bai & Morris, 2019; Urish & Cassat, 2020; Clark & Hicks, 2023).

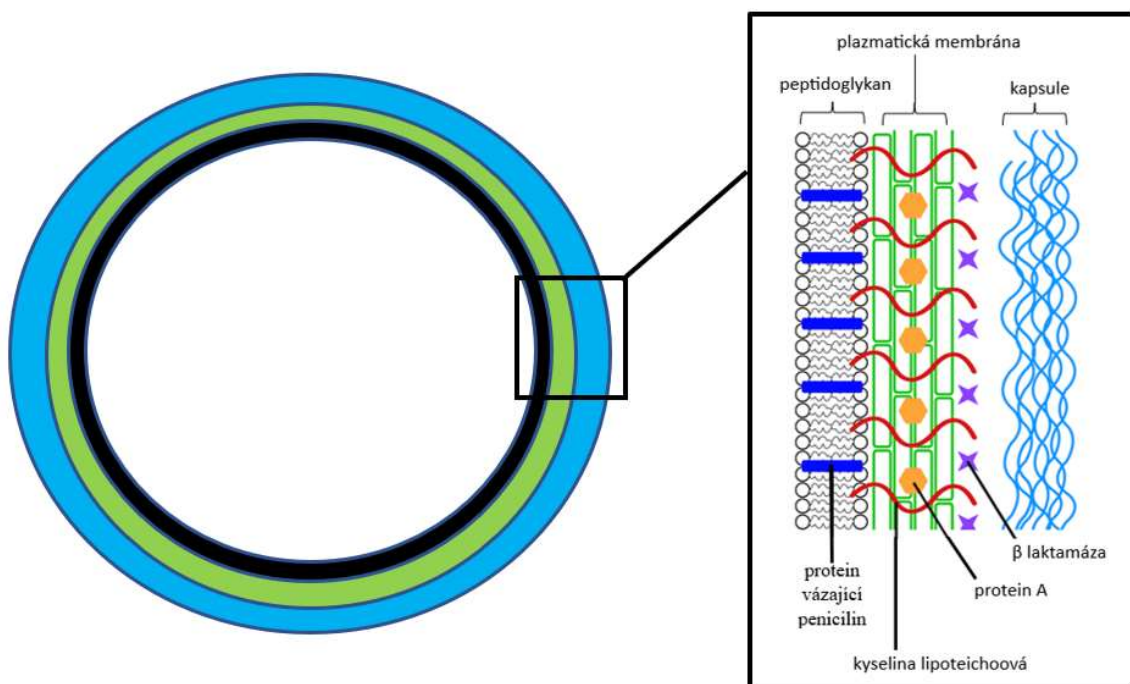
### 2.2 *Staphylococcus aureus* – rezistence na antibiotika

*S. aureus* je schopen se vyhýbat imunitnímu obrannému systému hostitele díky tomu, že funguje jako komenzál i patogen savců. Další jeho vlastností je jeho genomická plasticita. *S. aureus* produkuje širokou škálu faktorů virulence a faktorů imunitního úniku, které brání vzniku lidské imunitní odpovědi (Thammavongsa et al., 2015; Spaan et al., 2017).

*S. aureus* se dokáže bránit proti imunitnímu systému využíváním neutrofilů a makrofágů, specifických enzymů a dalších látek, např. fenol-rozpustné moduliny, superantigeny, inhibitor stafylokokové peroxidázy nebo leukocidiny (Pidwill et al., 2021; Siwczak et al., 2022; Howden et al., 2023).

Pro získání ucelených poznatků je třeba studovat interakce mezi hostitelem a patogenem. Součástí výzkumu je i zkoumání genetické variability *S. aureus* nebo identifikace lidských genetických znaků spojených s rizikem onemocnění *S. aureus*. Výsledky těchto výzkumů budou využívány např. při navrhování strategií prevence a terapeutických přístupů stafylokokových onemocnění (Jansen et al., 2013; Howden et al., 2023).

Buněčná stěna *S. aureus* udržuje buněčnou integritu a je tvořena peptidoglykany (Obrázek 1). Na principu inhibice syntézy buněčné stěny je založen mechanismus účinku některých z vyvinutých antibiotik, jako jsou  $\beta$ -laktamy a vankomycin (Salamaga et al., 2021). Zatím není známo, jak se mění struktura a dynamika peptidoglykanu během infekce. Tato znalost by proto mohla poskytnout podrobnější informace o interakcích *S. aureus* s imunitním systémem hostitele, což je důležité pro vývoj nových léků (Sutton et al., 2021). Lysostafiny prokázaly účinnost vůči *S. aureus* a *S. epidermidis* v biofilmech *in vitro* (Wu et al., 2003), znalost jejich struktury může mít využití ve farmaceutickém průmyslu.



Obrázek 1: Schématické znázornění stavby buněčné stěny *S. aureus* (upraveno dle Kong et al., 2016).

### 2.3 *Staphylococcus simulans*

*Staphylococcus simulans*, koaguláza-negativní stafylokok, je patogenem zvířat jako jsou koně, kozy, krávy, a jiná hospodářská nebo domestikovaná zvířata a je často spojován se záněty mléčné žlázy neboli mastitidou u skotu (Unal & Cinar, 2012).

Infekce způsobené *S. simulans* jsou u lidí vzácné, infekce se týkají měkkých tkání a kostí, *S. simulans* může způsobovat i bakteriální nefritidu (Vallianou et al., 2008; Drobeniuc et al., 2021; Shishido et al., 2022). Specifickou sebeobranou funkcí je vylučování specifických proteinů, lysostafinů, které štěpí buněčnou stěnu jiných stafylokoků.

*S. simulans*, konkrétně biotyp *sfaphylolyticus*, je díky náhradě jednoho nebo více glycinových zbytků v pentaglycinovém můstku serinovými zbytky, chráněn proti lytickým účinkům lysostafinů. Enzym, který se účastní přeměny serinu na glycin, se nazývá serinhydroxymethyltransferáza (Batool et al., 2020).

## 2.4 Klasifikace studovaných proteinů

Lysostafiny patří do skupiny tzv. bakteriocinů, které představují skupinu mikrobiálních proteinů, charakteristických úzkým spektrem účinnosti. Produkce bakteriocinů zvýhodňuje bakterie v jejich životním prostředí (Bastos et al., 2010).

Tabulka I: Klasifikace bakteriocinů, jejich vlastnosti a konkrétní příklady (upraveno dle Bastos et al., 2010).

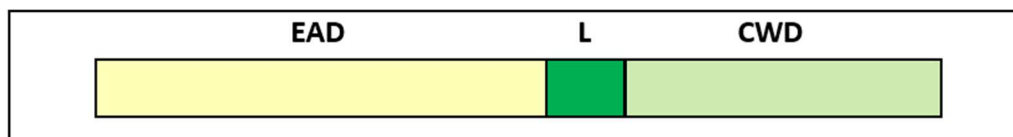
klasifikace	vlastnosti	skupiny/podtřídy	příklady
třída I (lantibiotika)	nízká molekulová hmotnost, tepelně stabilní peptidy (<5 kDa), obsahující modifikované AK	typ A (lineární)	nisin
			pep5
			epidermin
		typ B (globulární)	mersacidin,
		typ C (dvě složky)	lacticin 3147
		typ D (snížená antimikrobiální aktivita)	sapT
třída II	nízká molekulová hmotnost, tepelně stabilní peptidy (<10 kDa), neobsahují žádné modifikované AK	typ IIa (lineární)	pediocin PA-1
		typ IIb (lineární)	lactacin F
		typ IIc (cyklické peptidy)	enterocin AS-48
		typ IId (lineární)	aureocin A53
		typ IIe (lineární)	aureocin A70
třída III	vysoká molekulová hmotnost, tepelně labilní proteiny	typ IIIa (bakteriolyziny)	lysostafin
		typ IIIb (nelytické)	helveticin J

Endolysiny jsou samostatnou skupinou enzymů, které jsou schopny lyzovat mikrobiální buňky, stejně jako bakteriociny, autolyziny a lysozomy (Vollmer et al., 2008; Hojčková et al., 2013). Endolysiny jsou kódované bakteriofágy s dvouvláknovou DNA, které jsou aktivně produkovány ke konci fágového lytického cyklu, aby byla rozložena bakteriální buněčná stěna a uvolnila se další generace fágů (Borysowski et al., 2006; Schmelcher et al., 2012).

## 2.5 Lysostafiny

Lysostafiny jsou antibakteriální Zn-dependentní metaloenzymy o velikosti 27 kDa, které jsou schopny štěpit pentaglycinový můstek mezi třetím a čtvrtým glycinem v peptidoglykanu buněčné stěny u *S. aureus*. Jedinečná struktura buněčné stěny činí lysostafiny vysoce účinnými prostředky v léčbě stafylokokových infekcí rezistentních vůči antibiotikům (Dixon et al., 1968; Climo et al., 1998; Kumar, 2008; Chung et al., 2022).

Lysostafiny byly poprvé izolovány Schindlerem a Schuhardtem v roce 1964 z kultury *S. simulans* (Schindler & Schuhardt, 1964). Tyto enzymy se skládají z N-terminální katalytické domény (EAD) a C-terminální domény vázající buněčnou stěnu (CWD), označována také jako SH3b, jejichž hlavní funkcí je ukotvování proteinu k peptidoglykanu (Sabala et al., 2012). Obě tyto domény jsou spojeny tzv. linkerem.

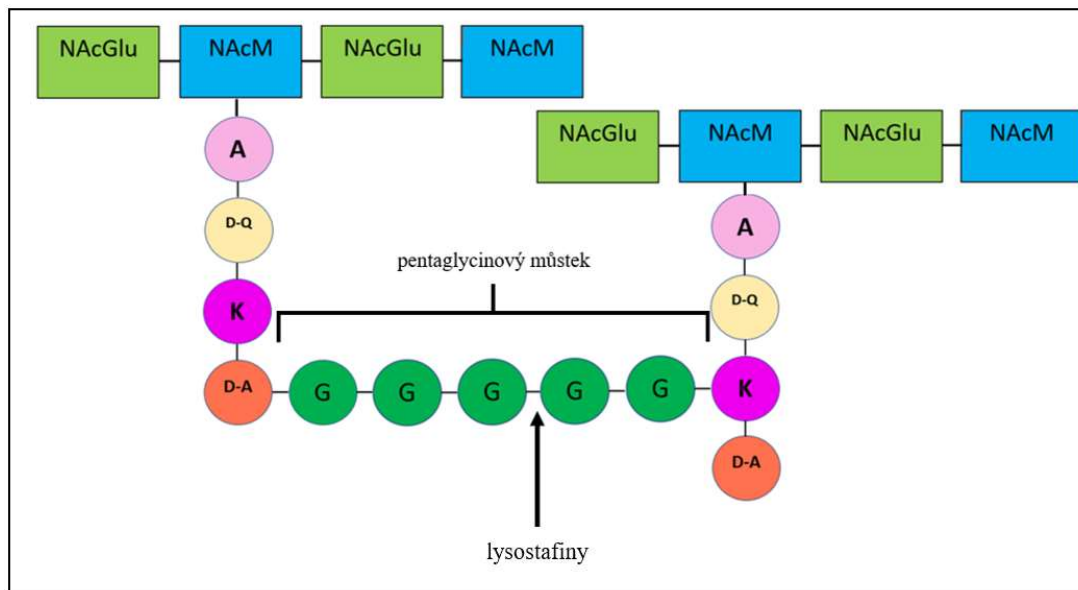


Obrázek 2: Schéma uspořádání domén lysostafinů (upraveno dle Zha et al., 2022).

EAD – N-terminální doména enzymatické aktivity, L – linker, CWD – C-terminální doména vázající buněčnou stěnu.

Cukerná složka buněčné stěny *S. aureus* se skládá ze střídajících se zbytků  $\beta$ -(1,4) vázaného N-acetylglukosaminu (NacGlu) a N-acetylmuraminové kyseliny (NacM). Buněčná stěna je tvořena tetrapeptidovými řetězci, které jsou navzájem spojené pentaglycinovými můstky (Bastos et al., 2010). Konkrétní topologie peptidoglykanu *S. aureus* je zobrazena na Obrázku 3.

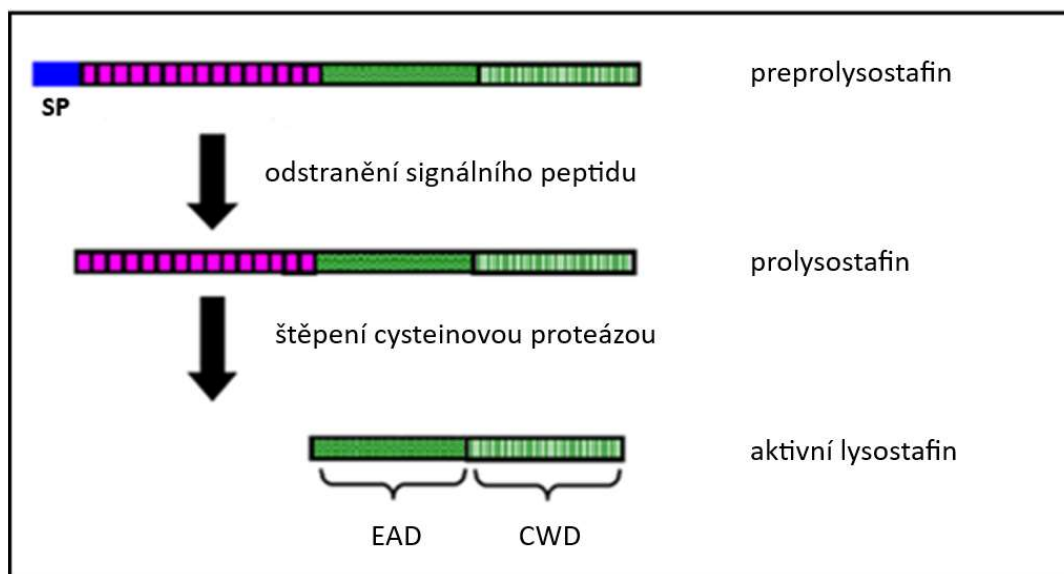




Obrázek 3: Schématické uspořádání peptidoglykanu u *S. aureus* a místo primární hydrolyzy lysostafinů (upraveno dle Bastos et al., 2010).

NAcGlu – N-acetylglukosamin; NAcM – N-acetylmuramová kyselina; A – L-alanin; D-Q – D-glutamin; K – L-lysin; D-A – D-alanin a G – L-glycin. Šipka označuje místo působení lysostafinů.

Lysostafiny jsou syntetizovány nejdříve jako tzv. preprolysostafiny, obsahující signální peptid. Po odštěpení signálního peptidu vznikají prolysostafiny, které se uvolňují do extracelulárního prostředí. Proteolytickým štěpením propeptidů, pomocí cysteinové proteázy, vznikají lysostafiny, které jsou biologicky aktivní a fungují jako glycil-glycin endopeptidázy proti citlivým buňkám stafylokoků (Bastos et al., 2010). Schéma aktivace lysostafinů je zobrazeno na Obrázku 4.



Obrázek 4: Schéma procesu aktivace lysostafinů (upraveno dle Bastos et al., 2010).

SP – signální peptid, EAD – N-terminální doména, CWD – C-terminální doména vázající buněčnou stěnu.

Lysostafiny mají řadu výhodných vlastností, mezi které patří např. závislost aktivity enzymu na iontovém složení prostředí. Nicméně tyto vlastnosti se mohou mezi homology lysostafinů lišit. V práci Sabala et al. pozorovali, že LytM je patrně vysokou koncentrací solí silně inhibován, na rozdíl od původní formy lysostafinu, který vysoké koncentrace solí potřebuje pro svou aktivaci (Sabala et al., 2012).

Konkrétní lysostafiny, použité pro experimenty v této práci, jsou následující: lysostafin wild type (WT), lysostafin mutant 9 a mutant D (zkráceně mut 9/mut D), z organismu *S. simulans*; základní charakteristiky a vzájemné rozdíly jsou shrnuty v Tabulce II. Konkrétní AK sekvence lysostafinů jsou uvedeny v Příloze 1.

Tabulka II: Základní charakteristiky lysostafinu WT, mut 9 a mut D (Expasy, 2022).

	lysostafin WT	lysostafin mut 9	lysostafin mut D
<b>mutace</b>		N39P T178L	S83M T178L K232P
<b>molekulární hmotnost [kDa]</b>	26,89	26,88	26,91
<b>teoretické pI</b>	9,59	9,59	9,54
<b>extinkční koeficient</b>	67840	67840	67840

## 2.6 Endolysiny

Endolysiny jsou hydrolázy produkované fágy, které jsou schopné štěpit peptidoglykan gram pozitivních bakterií (Schmelcher et al., 2012; Briers et al., 2014). Vykazují specifickou baktericidní aktivitu a nezabíjejí prospěšnou mikroflóru člověka (Nelson et al., 2001). Jejich výhodou oproti konvenčním antibiotikům je jejich vysoká specifita a nízké riziko vzniku rezistence. Jsou považovány za nadějnou skupinu antibiotik, která jsou odvozena od enzymů známých pod názvem „enzymbiotika“ (Dams & Briers, 2019). Pomocí molekulárního inženýrství lze vytvořit velké množství účinných typů endolysinů (Kashani et al., 2018; Choi et al., 2022). U endolysinů byla popsána synergická aktivita s různými antibakteriálními látkami a schopnost účinně fungovat v biofilmech a na povrchu sliznic (Letrado et al., 2018; Blasco et al., 2020).

Endolysiny se u gram pozitivních fágů skládají ze dvou domén – EAD, která přispívá ke štěpení různých vazeb v peptidoglykanu, a CWD, která rozpoznává receptor bakteriálních buněčných stěn a specificky se na něj váže (viz Obrázek 5). Obě tyto domény jsou navzájem spojeny krátkým flexibilním linkerem (São-José, 2018).



Obrázek 5: Schéma uspořádání domén endolysinu (upraveno dle Zhou et al., 2020).

EAD – N-terminální doména enzymatické aktivity, L – linker = spojovací smyčka, CWD – C-terminální doména vázající buněčnou stěnu.

V této práci byla použita mutovaná forma endolysinu označovaná jako endolysin mutant T1 (zkráceně mut T1), z bakteriofága  $\Phi$  812. Základní informace o tomto studovaném proteinu jsou uvedeny v Tabulce III. Konkrétní AK sekvence endolysinu mut T1 je uvedena v Příloze 1.

Tabulka III: Základní charakteristika endolysinu mut T1.

	<b>endolysin mut T1</b>
<b>mutace</b>	I44V T72P G124P
<b>molekulární hmotnost [kDa]</b>	31,40
<b>teoretické pI</b>	9,32
<b>extinkční koeficient</b>	76570

## 3 Materiál a metody

V této kapitole jsou popsány použité chemikálie, metody a postupy použité pro přípravu endolysinu mut T1 a lysostafinu mut 9 a následné krystalizační postupy. Mutované proteiny byly navrženy ve firmě Enantis na základě jejich programu, který využívá energetického a evolučního přístupu – databáze FireProt: <https://loschmidt.chemi.muni.cz/fireprotweb/>.

### 3.1 Příprava rekombinantních proteinů

#### 3.1.1 Transformace proteinů

Pro bakteriální transformaci bylo použito 100  $\mu$ l buněk *Escherichia coli* kmen BL21(DE3)<sub>RIPL</sub> a bylo přidáno 5  $\mu$ l plazmidové DNA o finální koncentraci 150 ng/ $\mu$ l. Po následném zvortexování se mikrozkušavka uložila na 30 minut na led. Tepelný šok byl proveden ponořením zkumavky na 60 sekund do vodní lázně za teploty 42°C. Poté byla mikrozkušavka vrácena na led a přidáno 500  $\mu$ l SOC média. Následovala inkubace při 37°C po dobu 1 hodiny při 200 rpm, poté centrifugace při 4°C po dobu 5 minut při 8 000 rpm. Takto získané buňky byly rozpuštěny a nanášeny na agarové plotny, které obsahovaly antibiotika chloramfenikol a kanamycin. Plotny byly vloženy do inkubátoru (37°C) a kultivovány přes noc.

#### 3.1.2 Příprava buněčných pelet

Pro přípravu buněčných pelet bylo využito čerstvě transformovaných buněk s požadovanou plazmidovou DNA. Sterilní kličkou bylo setřeno 10-15 kolonií a zaočkováno 100 ml TB média s obsahem 1% glukózy a kanamycinu (50  $\mu$ g/ml). Na 1 litr TB média bylo přidáno 900 ml média a 100 ml fosfátu draselného, konkrétní složení je v Příloze 2.

Takto připravené médium s bakteriální kulturou bylo ponecháno přes noc (14-16 hodin) při 37°C za stálého třepání (200 rpm). Buňky byly stočeny při 4000 rpm, po dobu 10 minut, při 4°C a rozpuštěny v 10% sterilním glycerolu. Buněčná suspenze byla rozdělena do sterilních mikrozkušavek, které byly následně zamrazeny v tekutém dusíku. Takto připravené buněčné pelety byly uchovány při -80°C. Bakterie *E. coli* BL21(DE3)<sub>RIPL</sub>, obsahující rekombinantní plazmid pUbEx100 s genem pro lysostafin/endolysin, byly připraveny Mgr. Šárkou Kobzovou ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v. v. i., (VÚVeL) v Brně.

### 3.1.3 Exprese proteinů

Kultivační médium s buňkami obsahovalo 400 ml LB média, 400  $\mu$ l buněčných pelet, 20 ml (20%) glukózy a 400  $\mu$ l kanamycinu (50  $\mu$ g/ml). Kultivace probíhala v 5 l Erlenmeyerově baňce v přístroji Incubator Shaker Series Innova® 43/43R. Kultura se nechala narůst v rozmezí od OD = 0,6 do OD = 0,8 při 37°C, 200 rpm. Po dosažení adekvátní hodnoty OD byl přidán 0,4 mM IPTG (160  $\mu$ l IPTG) jako induktor. Následovala kultivace přes noc (15 hodin) při 22°C, 200 rpm.

Centrifugace probíhala na přístroji HERMLE Z383K při 3250 rpm, po dobu 10 minut, při 4°C, následovalo odlití supernatantu. Buněčný pelet byl rozpuštěn v 25 ml desintegračního pufru (100 mM Trisu (pH 7,5); 500 mM NaCl; 10 mM imidazol; 0,1% Triton-x-100 a 0,01%  $\beta$ -merkaptoethanol). Pro sonikaci lysostafinu mut 9 byl použit přístroj Ultrasonic homogenisers SONOPULS od BANDELIN. Použita byla 30% amplituda, pulz 1 sekunda a pauza 3 sekundy, roztok byl sonikován na ledu celkem 3krát po dobu 15 minut.

V případě endolysinu mut T1 byly buňky rozbity pomocí homogenizátoru, Homogenising systems LTD Stansted, Pressure cell homogeniser SPCH-EP (240 V, 50 Hz) kvůli většímu výslednému objemu buněk v desintegračním pufru (75 ml). Experiment probíhal při teplotě 6°C, 3krát po sobě. Roztok s homogenizovanými buňkami byl následně rovnoměrně rozdělen do zkumavek, které se daly stočit při 15 000  $\times g$  po dobu 40 minut, při teplotě 4°C.

Roztoky byly poté přefiltrovány pomocí stříkačky (20 ml) s 0,22  $\mu$ m filtrem.

### 3.1.4 Purifikace

Proteiny byly přečištěny pomocí iontové afinitní chromatografie s imobilizovaným kovem (IMAC). Purifikace probíhala na afinitní koloně HisTrap<sup>TM</sup> od GE Healthcare a HiPrep 26/10 desalting od GE Healthcare.

#### 3.1.4.1 Pufry pro purifikaci

- Ekvilibrační pufr: 100 mM Tris (pH 7,5); 500 mM NaCl; 10 mM imidazol a 0,01%  $\beta$ -merkaptoethanol
- Eluční pufr: 100 mM Tris (pH 7,5); 500 mM NaCl a 300 mM imidazol
- Odsolovací pufr: 100 mM Tris (pH 7,5); 300 mM NaCl a 0,01%  $\beta$ -merkaptoethanol

Před použitím byly všechny pufrы přefiltrovány a odvzdušněny. Purifikace byla provedena na přístroji FLPC, AZURA® BIO PURIFICATION. HisTrap<sup>TM</sup> kolona (5 ml) byla nejprve promyta 25 ml sterilní vody a následně 25 ml ekvilibračního pufru (průtok 5 ml/min). Dále byl nanesen vzorek (průtok 3 ml/min), poté byla kolona promyta ekvilibračním pufrem (A = 100%), dokud absorbance neklesla na základní linii (baseline).

Následně byla kolona promývána 25 ml směsí pufru o finální koncentraci imidazolu cca 40 mM, tzv. soft WASH. Cílový protein byl vymyt elučním pufrem (eluční gradient A = 90,0 % - ekvilibrační pufr, B = 10,0 % - eluční pufr), frakce posbírány. Poté byla kolona promyta ekvilibračním pufrem (A = 100%), sterilní vodou a uchována v 20% ethanolu.

Pro odstranění imidazolu byla použita odsolovací kolona 50 ml HiPrep 26/10 desalting (GE Healthcare). Odsolovací kolona byla nejprve promyta 50 ml (průtok 5 ml/min) ddH<sub>2</sub>O, poté ekvilibrována 100 ml pufru (A = 100%), poté byl nanesen vzorek 25 ml – lysostafin mut 9 a 75 ml – endolysin mut T1 (průtok 3 ml/min a opět byla kolona promývána pufrem (průtok 5 ml/min). Frakce s cílovým proteinem byly posbírány.

Poté byl k roztoku proteinů přidán glycerol (20%) a TEV (Tobacco Etch Virus) proteáza v poměru 1:30. Následovalo štěpení (roller mixer) při pokojové teplotě po dobu 2 hodin, poté v lednici přes noc.

Oddělení cílového proteinu probíhalo na afinitní koloně HisTrap<sup>TM</sup>, která byla nejprve promyta 25 ml vody a následně 25 ml ekvilibračního pufru (A = 100%). Poté byl nanesen vzorek a ihned sbírán (eluční gradient A = 90.0 %, B = 10.0 %), zatímco ubiquitin (ubq) zůstal zachycen na koloně a posléze byl vymyt elučním pufrem.

Následně byla změřena koncentrace proteinů BCA metodou. Pomocí SDS-PAGE elektroforézy byla ověřena čistota proteinů. Lysostafin a endolysin byly následně lyofilizované v lyofilizátoru (Labconco, USA).

Pro následné krystalizační experimenty byly poskytnuty vzorky lysostafinu WT a mut D Mgr. Šárkou Kobzovou (VÚVeL, Brno).

### 3.1.5 SDS-PAGE elektroforéza

K elektroforéze byl použit 12,5% gel, chemikálie použité pro přípravu, stejně jako jejich konkrétní množství, je uvedeno v Tabulce IV. Směs byla smíchána a nalita do aparatury pro přípravu gelů. Poté byl povrch skla zalit 100-200  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O a během 20 minut došlo k polymeraci. Po ztuhnutí separačního gelu byla odsáta vrstva vody. Na separační gel byl nanesen koncentrační gel. Do gelu byl vložen hřebínek a nastala polymerace. Poté, co koncentrační gel zpolymeroval, hřebínek byl vyjmut a gel se skly byl vložen do aparatury a zalit elektrodoým pufr (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3).

Tabulka IV: Příprava polyakrylamidového gelu.

separační gel 12,5 %		koncentrační gel 5 %	
30 % akrylamid	2,1 ml	30 % akrylamid	250 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	1,6 ml	ddH <sub>2</sub> O	800 $\mu$ l
separační pufr	1,25 ml	koncentrační pufr	400 $\mu$ l
10 % SDS	50 $\mu$ l	10 % SDS	16 $\mu$ l
10 % APS	50 $\mu$ l	10 % APS	25 $\mu$ l
TEMED	3 $\mu$ l	TEMED	1 $\mu$ l

#### 3.1.5.1 Příprava a nanášení vzorků

Vzorky byly smíchány s 4  $\times$  koncentrovaným nanášecím pufr (v poměru 3:1). Proteiny byly zdenaturovány při 95 °C po dobu 10 minut. Společně se vzorky byl nanesen proteinový marker Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo SCIENTIFIC).

- Nanášecí pufr: 200 mM Tris (pH 6,8), 400 mM DTT, 8% SDS, 0,4% bromfenolová modř a 35% glycerol.

Pomocí pipety byly naneseny na gel vzorky (finální koncentrace proteinu mut 9 byla 0,2 mg/ml, endolysin 0,5 mg/ml) a standard (10  $\mu$ l). Celá aparatura byla přikryta víkem a připojena ke zdroji napětí. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 160 V.

Vzorky byly nanášeny na gel v následujícím pořadí: sonikát, FT, WASH, E1, E2, Bez ubq a endolysin + ubq + TEV proteáza, konkrétně popsány na Obrázku 9 a 13.

Po skončení elektroforézy byl gel vyňat a obarven. Nejprve byl gel zalit roztokem 1 (10% CH<sub>3</sub>COOH, 50% etanol, ddH<sub>2</sub>O) a ohříván v mikrovlnné troubě po dobu 1 minuty. Poté došlo k výměně roztoku 1 za roztok 2 (7,5% CH<sub>3</sub>COOH, 5% etanol, ddH<sub>2</sub>O) a byl přidán 1 ml barviva Coomassie Brilliant Blue R-250. Vzorek byl opět ohříván 1 minutu, následně byl ponechán po dobu 5 minut při laboratorní teplotě, aby došlo k obarvení. Poté byl roztok slit a gel byl uchován v destilované vodě a následně naskenován pomocí skeneru od EPSONU pro následné vyhodnocení (Obrázek 9 a 13).

## 3.2 Krystalizace proteinů

### 3.2.1 Pre-krystalizační test

Před vlastní krystalizací lysostafinů byl proveden tzv. pre-krystalizační test metodou sedící kapky, aby byla zjištěna vhodná koncentrace proteinu pro krystalizační experimenty. Pre-krystalizační test byl proveden pomocí komerčně dodávané sady PCT Pre-Crystallization Test od firmy Hampton Research (USA). Složení jednotlivých činidel (A1, A2, B1, B2) je uvedeno v Příloze 3.

Test byl proveden v destičce s 24 jamkami. Do rezervoáru bylo napipetováno 20 µl činidla podle seznamu od výrobce. Nad rezervoár s činidlem byl napipetován vzorek lysostafinu WT s příslušným činidlem v poměru 1:1 (v objemu 1 µl proteinu a 1 µl činidla).



### 3.2.2 Precipitační činidla

Všechna precipitační činidla použitá pro krystalizaci na robotovi i ručně byla komerčně dodána v kitech, které obsahovaly 96 precipitačních činidel.

Použité krystalizační sady, tzv. screening kits u lysostafinů, experimenty byly provedeny školitelkou-specialistkou:

- INDEX HR (Hampton Research, USA)
- JB SCREEN BASIC (Jena Bioscience)
- JCSG++ (JCSG, USA; European Genomics Consortium)
- LFS (Ligand-Friendly Screen) (Molecular Dimension, USA)
- Mem Gold 2 (Molecular Dimension, USA)
- MIDAS+ (Molecular Dimension, USA)
- Natrix (Hampton Research, USA)
- PACT PREMIER (Molecular Dimension, USA)
- PEG Ion (Hampton Research, USA)
- PEGRx (Hampton Research, USA)
- SG1 SCREEN (Molecular Dimension, USA)
- Wizard Classic 1 & 2 (Molecular Dimension, USA)

Ručně pipetované kity:

- Morpheus 2 (Molecular Dimension, USA)
- PEGRx (Hampton Research, USA)

Použité krystalizační sady použité u endolysinu mut T1:

- Morpheus 1 & 2 (Molecular Dimension, USA)
- PEG Ion (Hampton Research, USA)
- PEGRx (Hampton Research, USA)

Použité koncentrace u lysostafinů a krystalizační poměry při pipetování pomocí robota i ručně jsou uvedeny v Tabulce V.

Tabulka V: Použité koncentrace lysostafinu WT, mut 9 a mut D.

	koncentrace [mg/ml]	poměry
lysostafin WT	7; 7,5; 10; 15	1:1, 1:2, 2:1, 4:1
lysostafin mut 9	1,9; 6; 9,5; 10	
lysostafin mut D	1,5; 3; 5; 6; 7; 7,5; 10; 15	

Použité koncentrace a krystalizační poměr u endolysinu mut T1 jsou uvedeny v Tabulce VI.

Tabulka VI: Použité koncentrace endolysinu T1.

	koncentrace [mg/ml]	poměr
endolysin mut T1	5; 10; 15; 18; 20; 30	1:1

### 3.2.3 Screening pomocí krystalizačního robota

Na začátku krystalizace lysostafinů byl proveden screening pomocí krystalizačního robota, se zmíněnými kity. Ke screeningu byl použit robot OryxNano 4 od Douglas Instruments (Velká Británie) s použitím 96 jamkové destičky MRC 2-Drop Plate od Swissci při 20°C.

Do horní jamky, nad rezervoár s precipitačním činidlem, byl robotem napipetován vzorek lysostafinu s příslušným precipitačním činidlem v poměru 1:1, tedy 1 µl proteinu a 1 µl precipitačního činidla a ve spodní jamce s poměrem 1:0,5.

Tabulka VII ukazuje schéma první krystalizační jamky. Každá destička byla poté zaizolována lepicí páskou, a ponechána při pokojové teplotě nebo dána do lednice při teplotě 4°C.

Tabulka VII: Schéma krystalizační jamky.

	1	
A	50 µl precipitačního činidla	1:1
		1:0,5

### 3.2.4 Optimalizace krystalizačních podmínek ručně

Krystalizační pokusy se sadou Morpheus 2 s lysostafiny byly pipetovány ručně bez použití robota. Byly použity destičky s 24 jamkami pro 4 různé poměry precipitačních roztoků a roztoků proteinu. Použité poměry byly 1:1, 1:2, 2:1 a 4:1 s koncentrací proteinů 11,5 mg/ml. Podrobné objemy jsou vypsány v Tabulce VIII.

Tabulka VIII: Použité objemy proteinů (LSN – lysostafin) a precipitačního roztoku (PR) ze sady Morpheus 2.

	<b>sloupec 1</b>	<b>rezervoár</b>	<b>sloupec 2</b>
<b>A</b>	1 $\mu$ l LSN + 1 $\mu$ l PR	50 $\mu$ l precipitačního roztoku č.1	1 $\mu$ l LSN + 0,5 $\mu$ l PR
<b>B</b>	0,5 $\mu$ l LSN + 1 $\mu$ l PR		2 $\mu$ l LSN + 0,5 $\mu$ l PR

V případě endolysinu byla použita sada Morpheus 1 & 2, destičky s 24 jamkami pro 4 různé koncentrace proteinu a to 30; 18; 15 a 10 mg/ml. U krystalizačních sad PEG Ion a PEGRx byly použity koncentrace proteinu 30; 20; 15 a 5 mg/ml. Všechny experiment s endolysinem byly v poměru 1:1.

Destičky se sadou Morpheus u všech studovaných proteinů byly překryty lepicí páskou a ponechány při 4°C v lednici. U sady PEG Ion a PEGRx (endolysin) byly ponechány při pokojové teplotě. Po dobu několika týdnů byly destičky pravidelně kontrolovány a byly zaznamenány změny v kapkách.

### 3.3 AlphaFold

Pro predikci struktur studovaných proteinů byl použit program AlphaFold. AlphaFold má svou databázi, ve které se nachází více než 200 milionů predikovaných struktur proteinů, přístupná na: <https://alphafold.ebi.ac.uk/>.

## 4 Výsledky

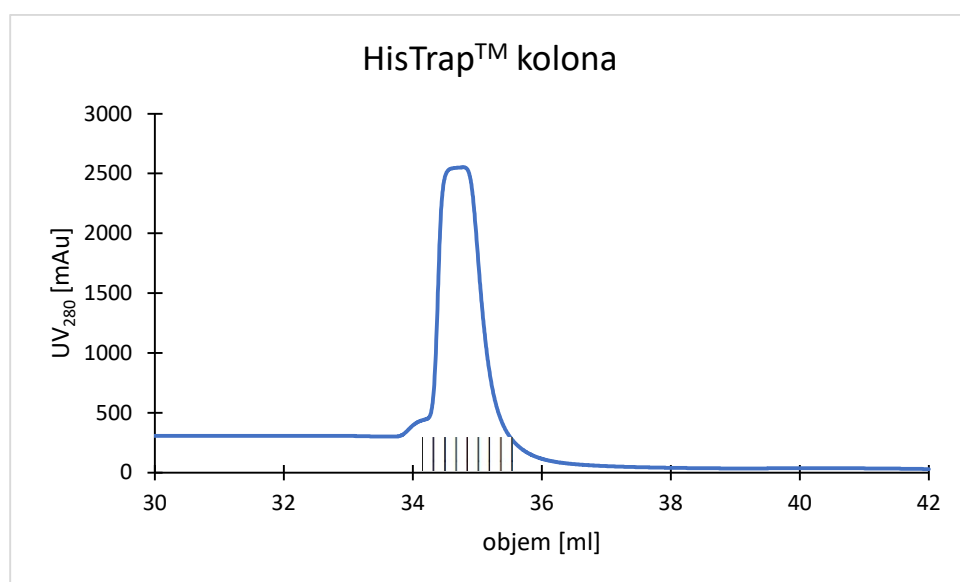
V této části magisterské práce jsou uvedeny výsledky provedených experimentů s proteiny: lysostafin WT, lysostafin mut 9 a mut D a endolysin mut T1. Zaznamenány jsou kroky v průběhu přípravy proteinů pro krystalizační experimenty a predikované struktury studovaných proteinů.

### 4.1 Expres proteinů

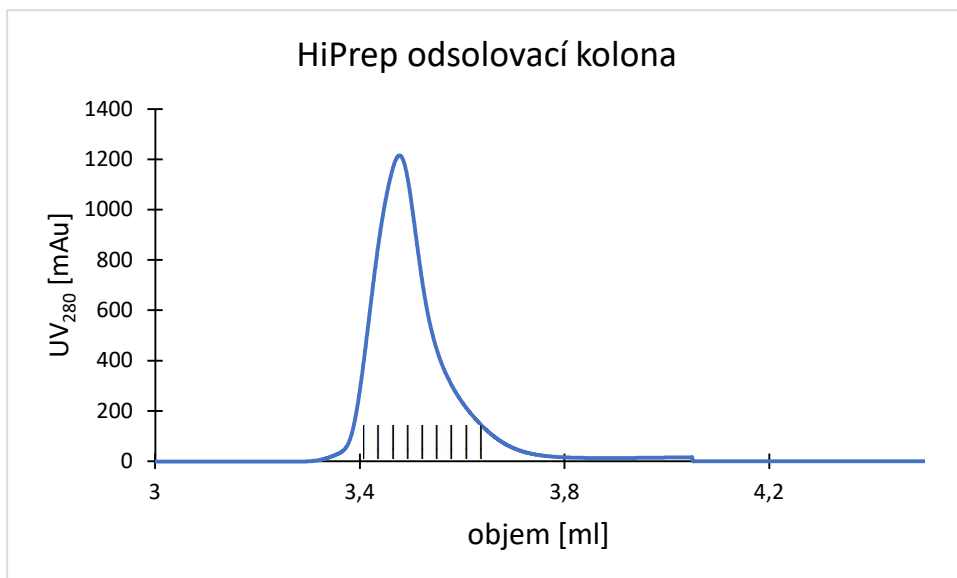
Kultura se nechala narůst v rozmezí od OD = 0,6-0,8, za 4 hodiny a 45 minut. Celková koncentrace lysostafinu mut 9 byla stanovena přibližně na 0,2 mg/ml a endolysinu na 50 mg/ml.

### 4.2 Purifikace proteinů a SDS-PAGE elektroforéza

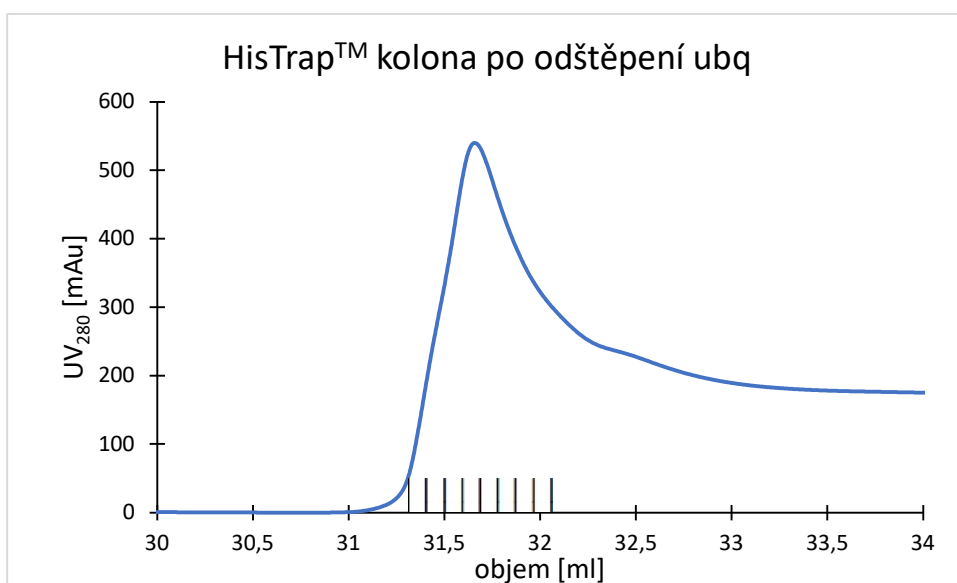
Proteiny byly přečištěny pomocí iontové afinitní chromatografie s imobilizovaným kovem (IMAC). Purifikace byla provedena na přístroji FLPC, AZURA® BIO PURIFICATION. Purifikace probíhala na afinitní koloně HisTrap™ (5 ml) od GE Healthcare, odsolovací koloně (50 ml) HiPrep 26/10 desalting od GE Healthcare. Oddělení cílového proteinu probíhalo na afinitní koloně HisTrap™. K uvolnění proteinu došlo při 10% pufru B.



Obrázek 6: Chromatogram purifikace lysostafinu mut 9 na HisTrap™ koloně. Vyznačeny sbírané frakce (1,5 ml) s proteinem (vzorek 4 na gelu – viz Obrázek 9).

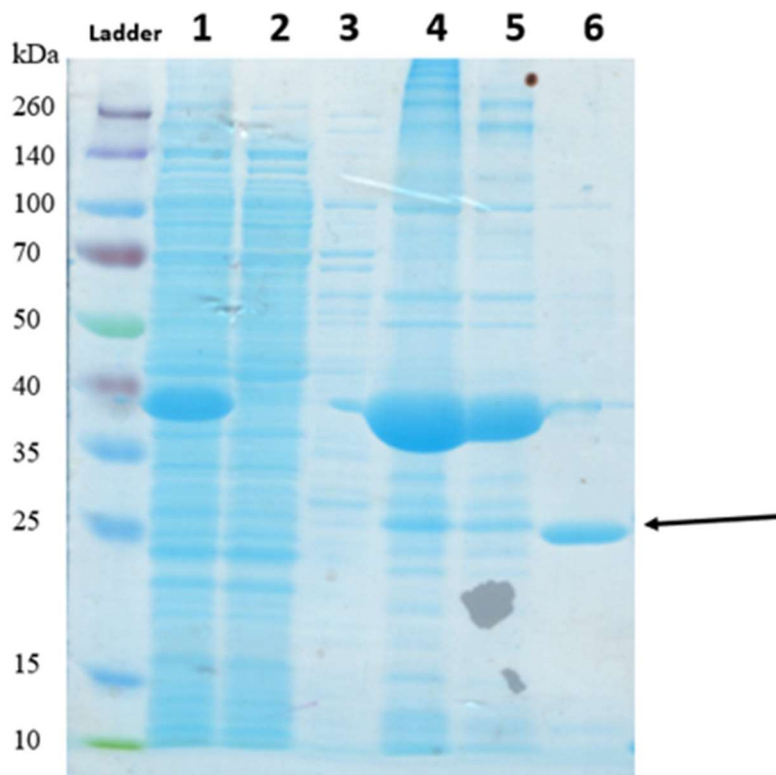


Obrázek 7: Chromatogram purifikace lysostafinu mut 9 na HiPrep odsolovací koloně. Vyznačeny sbírané frakce (1,5 ml) s proteinem (vzorek 5 na gelu – viz Obrázek 9).



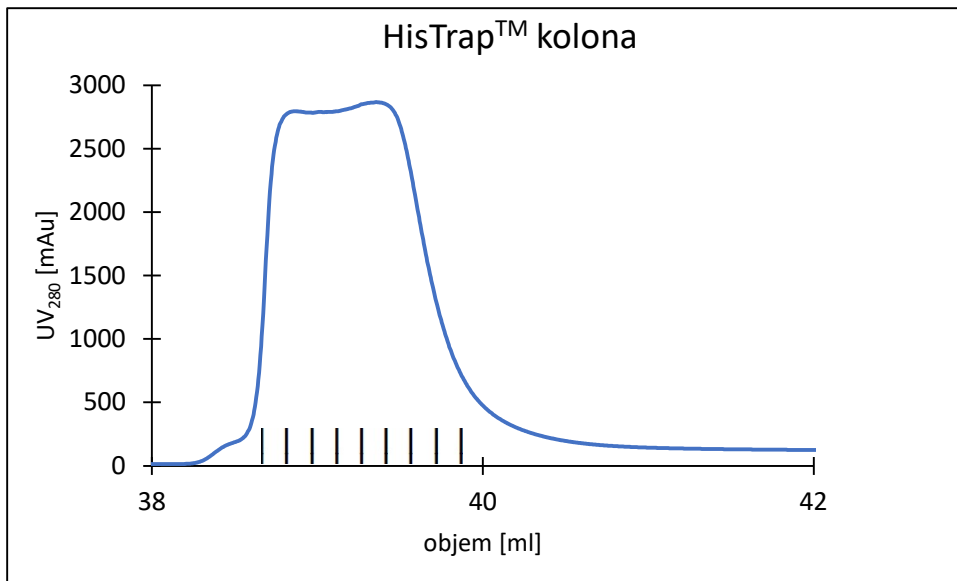
Obrázek 8: Chromatogram při oddělování lysostafinu mut 9 na HisTrap™ koloně. Vyznačeny sbírané frakce (1,5 ml) s proteinem (vzorek 6 na gelu – viz Obrázek 9).

SDS-PAGE elektroforéza po IMAC chromatografii prokázala přítomnost lysostafinu mut 9. Ve srovnání s ladderem byla určena jeho velikost – přibližně na 25 kDa. FT je tzv. flow through, což představuje to, co projde a nezachytí se na koloně. Vzorek E1 představuje protein odmytý imidazolem (1. HisTrap purifikace). Vzorek E2 je protein po odsolení a nakonec vzorek označen bez ubq je protein po odštěpení ubq (čistý protein).

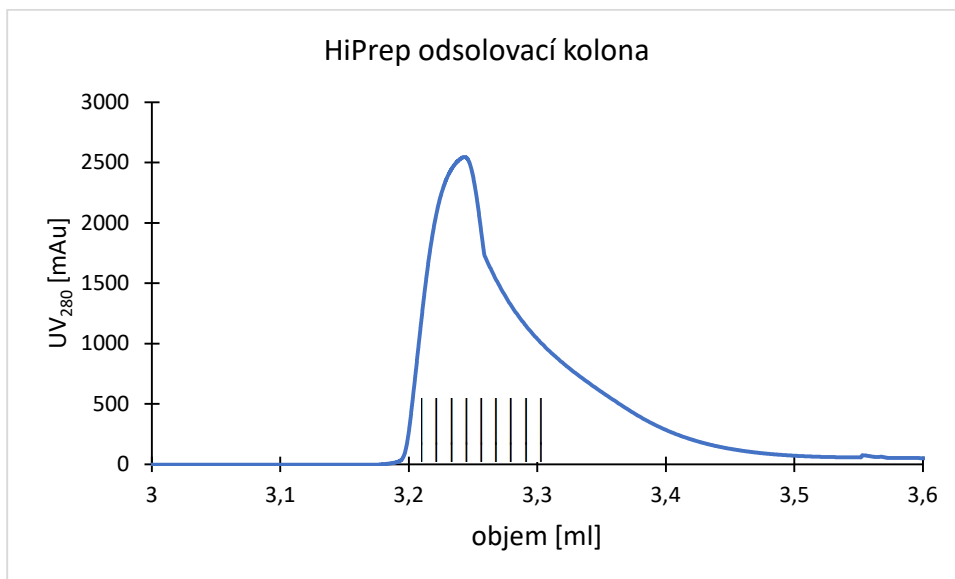


Obrázek 9: Záznam gelu po IMAC chromatografii u lysostafinu mut 9.

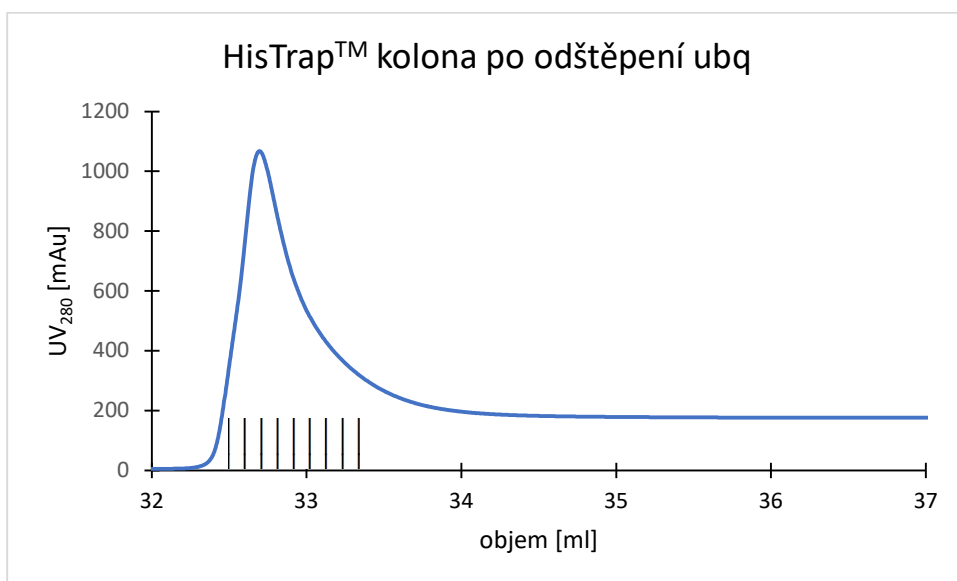
1 – sonikát, 2 – FT, 3 – WASH, 4 – E1, 5 – E2, 6 – lysostafin bez ubq. Šipka označuje lysostafin.



Obrázek 10: Chromatogram purifikace endolysinu mut T1 na HisTrap™ koloně. Vyznačeny sbírané frakce (1,5 ml) s proteinem (vzorek 5 na gelu – viz Obrázek 13).



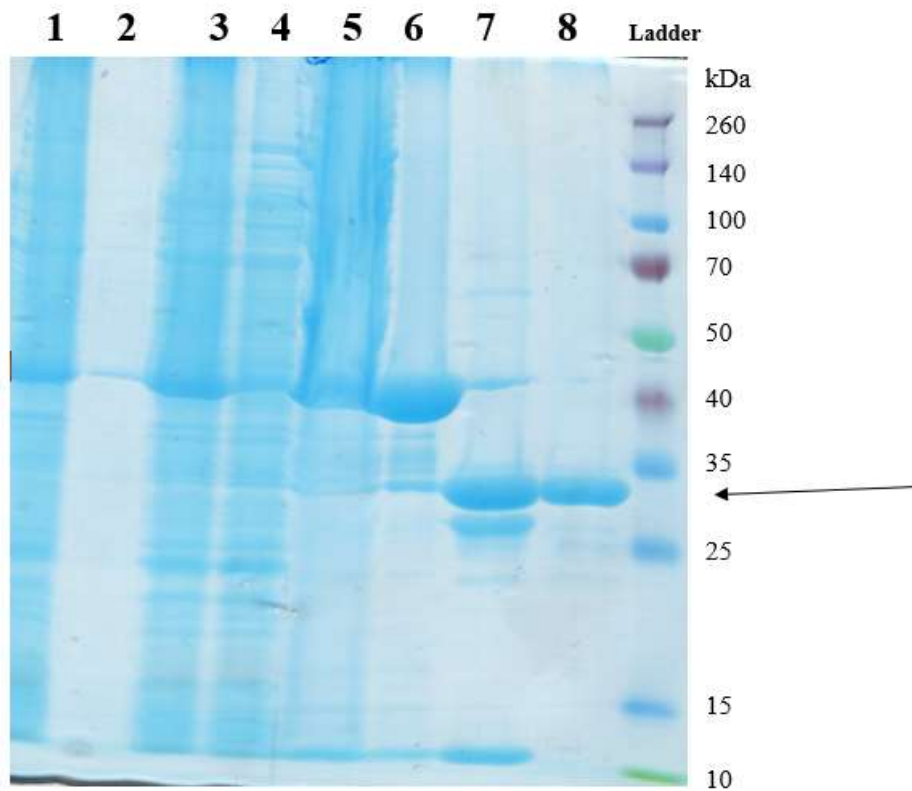
Obrázek 11: Chromatogram purifikace endolysinu mut T1 na HiPrep odsolovací koloně. Vyznačeny sbírané frakce (1,5 ml) s proteinem (vzorek 6 na gelu – viz Obrázek 13).



Obrázek 12: Chromatogram při oddělování endolysinu mut T1 na HisTrap™ koloně. Vyznačeny sbírané frakce (1,5 ml) s proteinem (vzorek 8 na gelu – viz Obrázek 13).

SDS-PAGE elektroforéza po IMAC chromatografii prokázala přítomnost endolysinu mut T1 s molekulární hmotností přibližně 31 kDa. FT je tzv. flow through, vzorek E1 představuje protein odmytý imidazolem (1. HisTrap purifikace). Vzorek E2 je sběr proteinu po odsolení. Vzorek označen endolysin + ubq je protein po štěpení s ubq a nakonec vzorek označen bez ubq znázorňuje protein po oddělení ubq (čistý protein).





Obrázek 13: Záznam gelu po IMAC chromatografii u endolysinu mut T1.

1 – sonikát před filtrací, 2 – WASH, 3 – sonikát po filtraci, 4 – FT, 5 – E1, 6 – E2, 7 – endolysin + ubq, 8 – endolysin bez ubq. Šipka označuje endolysin mut T1.

### 4.3 Krystalizace proteinů

Bylo vyzkoušeno 13 krystalizačních sad v různých poměrech protein a precipitační činidlo a také byly použity různé koncentrace studovaných proteinů, celkem bylo takto vytvořeno 4690 různých krystalizačních podmínek. Nicméně ani v jedné z nich nevyrostl proteinový krystal a nepomohla ani následná optimalizace podmínek.

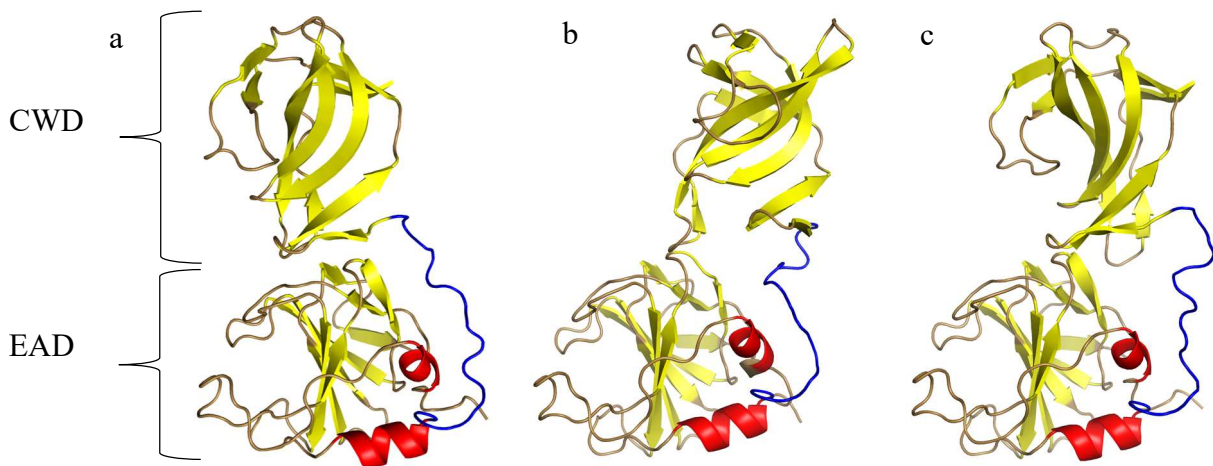
#### 4.4 Predikce struktur proteinů

Pro predikci struktur studovaných proteinů byl použit program AlphaFold (ColabFold v1.5.2: AlphaFold2 using MMseqs2) dostupný na:

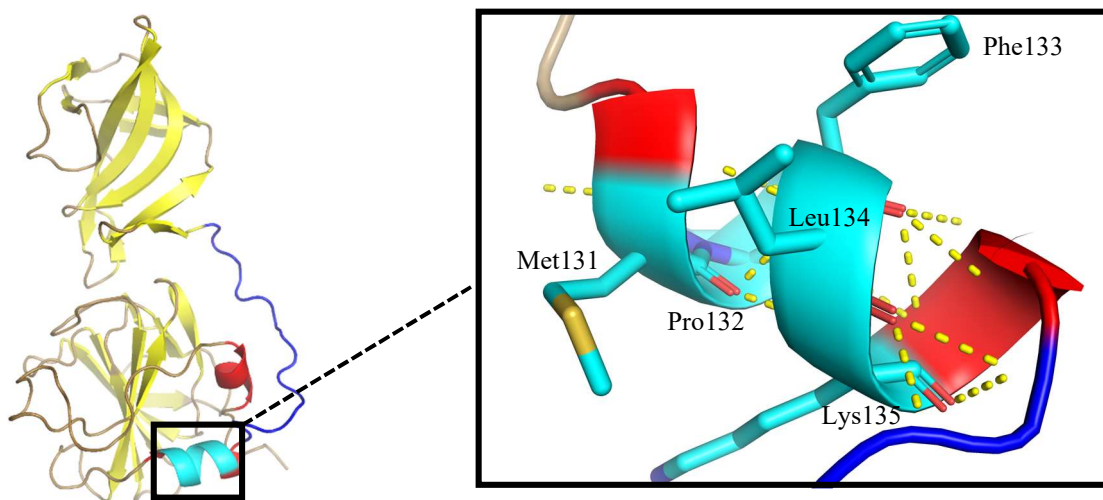
<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>.

Byly použity sekvence jednotlivých proteinů (Příloha 1).

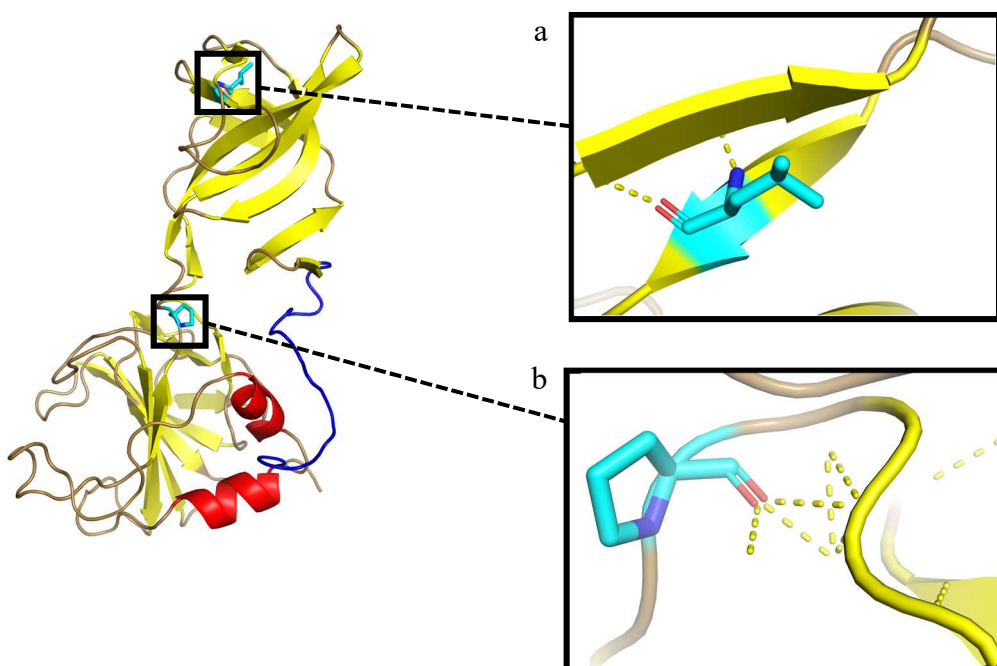
Pomocí programu PyMOL byly zobrazeny napredikované modely a v případě mutantních forem lysostafinů a endolysinu byly zvýrazněny případné mutace mezi jednotlivými proteiny. Všechny modely lysostafinů obsahují 2 krátké  $\alpha$ -helixy, které se nacházejí v EAD, a z 19  $\beta$ -skládaných listů, paralelních i antiparalelních, v obou doménách proteinů.



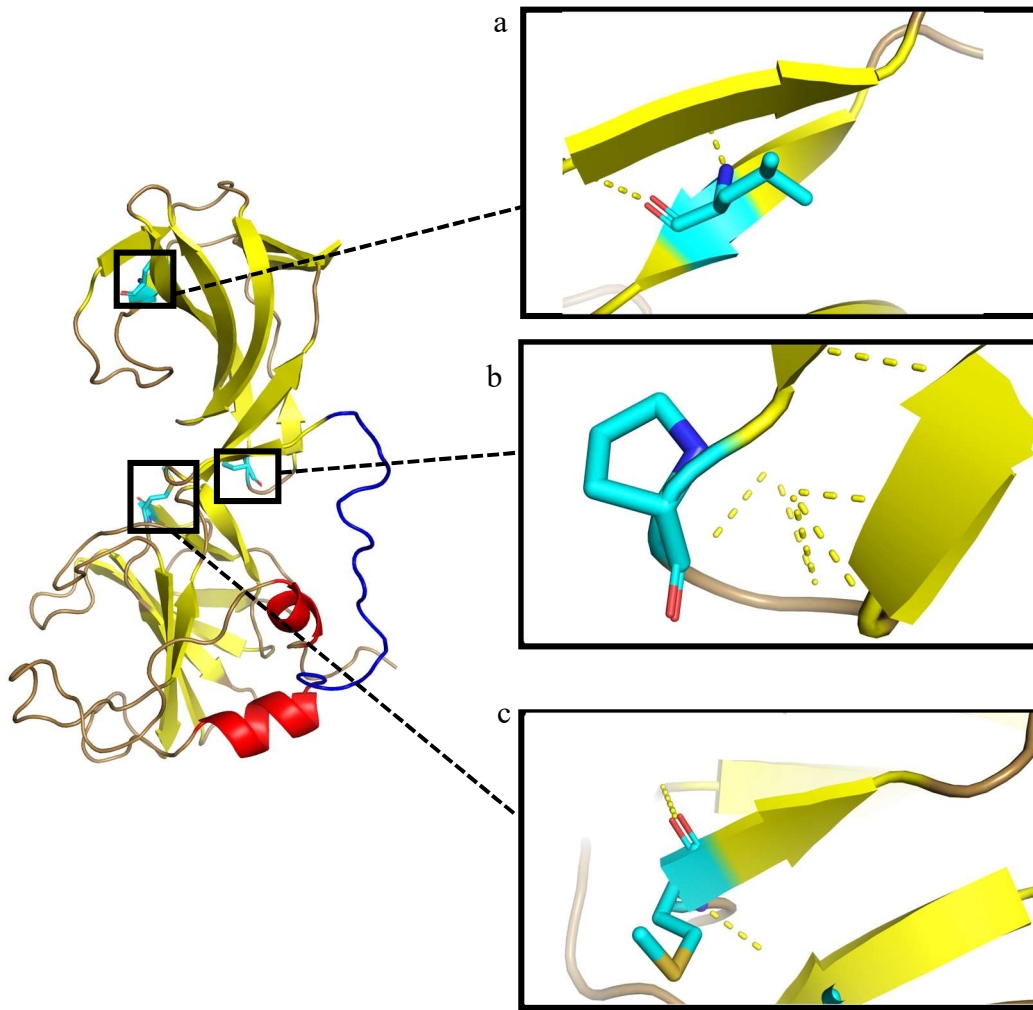
Obrázek 14: Predikce struktur proteinů: a. lysostafin WT; b. lysostafin mut 9; c. lysostafin mut D. EAD (1-137), linker (138-154) (modře), CWD (155-245). Vyznačené  $\alpha$ -helixy (červeně) a  $\beta$ -skládané listy (žlutě).



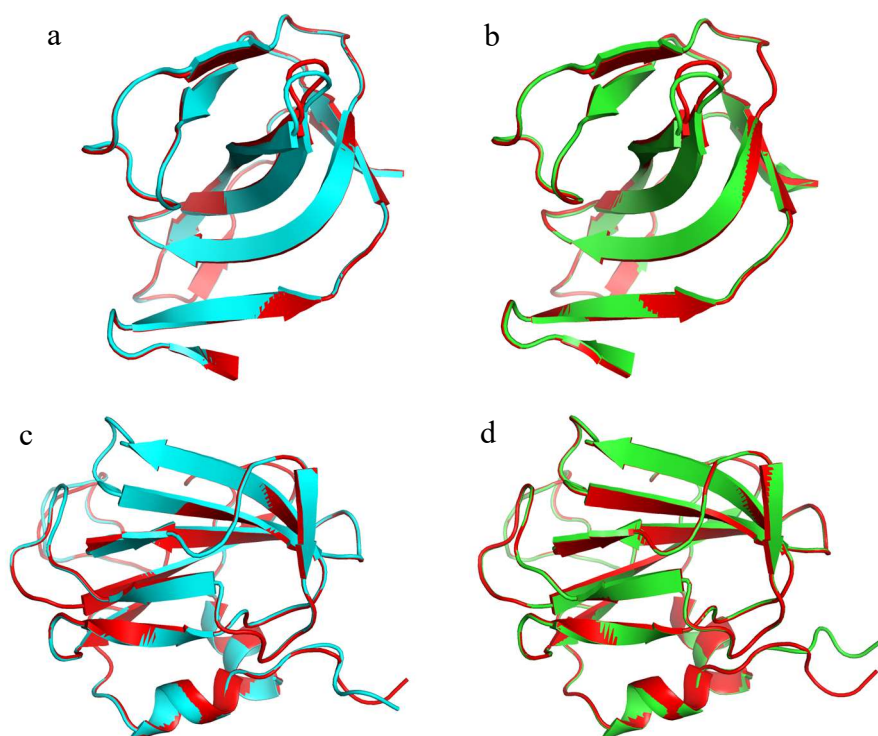
Obrázek 15: Aktivní místo lysostafinů (Met131, Pro132, Phe133, Leu134, Lys135) (dle UniProtKB/Swiss-Prot: P10547).



Obrázek 16: Vyznačené mutace lysostafinu mut 9: a. mutace T178L; b. N39P.



Obrázek 17: Vyznačené mutace lysostafinu mut D: a. mutace T178L; b. K232P; c. S83M.

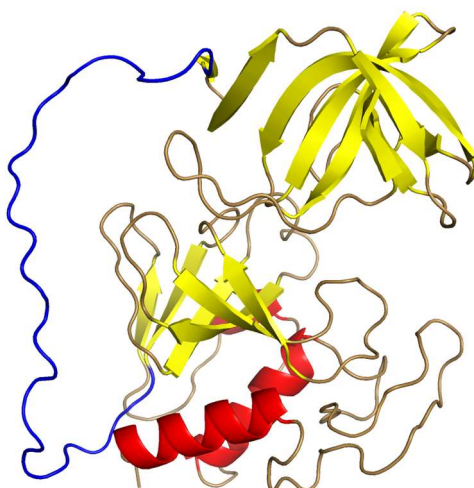


Obrázek 18: Vzájemné srovnání predikcí struktur proteinů – lysostafinu WT s mut 9 a mut D.

a. CWD lysostafinu WT (červeně) a mut 9 (světle modře); b. CWD lysostafinu WT (červeně) a mut D (zeleně); c. EAD lysostafinu WT (červeně) a mut 9 (světle modře); d. EAD lysostafinu WT (červeně) a mut D (zeleně).

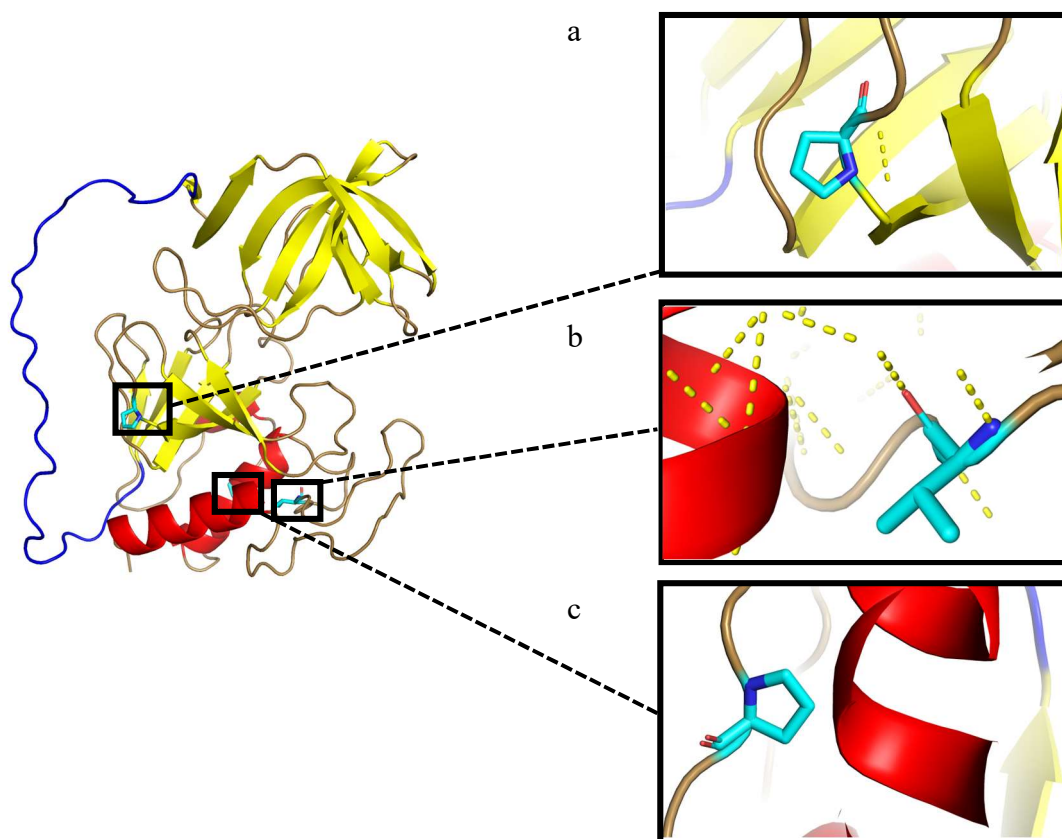
Na obrázku 18, lze pozorovat určité posuny predikcí struktur vůči sobě, které byly vyhodnoceny pomocí hodnoty RMSD (technika, která nám umožňuje porovnat podobnosti 3D struktury proteinů). Lysostafin WT a lysostafin mut 9 jsou vůči sobě posunuty, v EAD je RMSD = 0,08, v CWD je RMSD = 0,118, u mut D je RMSD = 0,057 pro EAD a RMSD = 0,129 pro CWD. Tyto posuny mohou být způsobeny flexibilitou linkeru, který AlphaFold nedokáže přesně predikovat, proto nejsou linkery ve struktuře zobrazeny.

K zobrazení predikce struktury endolysinu mut T1 byl též použit program PyMOL. Model se skládá ze 3  $\alpha$ -helixů a 15  $\beta$ -skládaných listů.



Obrázek 19: Predikce struktury endolysinu mut T1.

EAD (1-160), linker (161-190) (modře) a CWD (191-284). Vyznačené  $\alpha$ -helixy (červeně) a  $\beta$ -skládané listy (žlutě).



Obrázek 20: Vyznačené mutace endolysinu mut T1: a. mutace G124P; b. I44V; c. T72P.



## 5 Diskuze

Lysostafiny při lokálním a systémovém podávání u experimentálních zvířat mají významný terapeutický přínos proti lékově rezistentním infekcím vyvolaným stafylokokem *S. aureus*, jelikož jeho účinná koncentrace je velice nízká (hodnota MIC<sub>90</sub> je v rozmezí 0,001-0,064 µg/ml) (Wu et al., 2003; Jayakumar et al., 2021). Dokáží zlyzovat *S. aureus* v biofilmu, ale také narušovat extracelulární matrix biofilmů *S. aureus in vitro* na různých površích (Wu et al., 2003; Jayakumar et al., 2021).

Jedním z nevýhod použití lysostafinů je krátký poločas lysostafinu v krevním oběhu, a proto se provádí řada výzkumů, které mají snahu poločas zvýšit. Možným řešením jsou konjugace lysostafinu, např. s polymery – PEG, nebo s albumin-vázající doménou (komplex označován jako Lst-ABD) (Johnson, et al., 2018; Grishin et al., 2019). Výsledky těchto výzkumů odhalily lepší aktivitu komplexu, která byla 8-64krát vyšší než MIC samotného lysostafinu (Grishin et al., 2019), nicméně bude potřeba provedení dalších výzkumů a testů na zvířecích modelech. Dle Jayakumar et al., by se měly pro pomalé a trvalé uvolňování lysostafinu vyvinout polymerní zapouzdřené nanokapsle, které by teoreticky mohly přispět k dalšímu prodloužení poločasu lysostafinu v séru a snížení jeho antigenicity (Jayakumar et al., 2021). Zjištění struktury lysostafinů by mohlo být nápomocno při pochopení jeho příznivých vlastností, které by poté mohly být použity k vytvoření variant lysostafinu s lepšími vlastnostmi.

V práci Vacek et al. byl použit lysostafin - LYSSTAPH-S, který se vyznačuje genovou sekvencí optimalizovanou pro heterologní expresi v *E. coli*. Původní AK sekvence jsou dostupné na NIH, pod kódem: WP\_013012297.1. Sekvence byla zkrácena o 209 AK (o tzv. predoménu). V sekvenci v pozici 237 byl izoleucin nahrazen méně hydrofobním methioninem dle práce Farhangnia et al., 2014, přičemž v této práci byl u lysostafinu mut 9 asparagin nahrazen prolinem v pozici 39 a threonin nahrazen leucinem v pozici 178, u lysostafinu mut D byly mutace v pozici 83 ze serinu na methionin, v pozici 232 lysin nahrazen prolinem a také mutace T178L jako u lysostafinu mut 9.

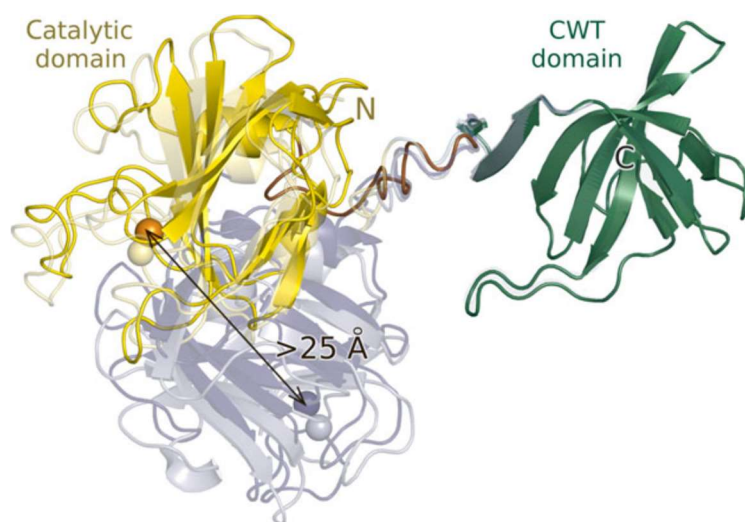
Výsledný konstrukt rekombinantní DNA obsahoval gen pro ubq, 14× histidinovou značku (His Tag), gen pro katalytickou doménu a gen pro doménu vázající buněčnou stěnu. Celý fúzní protein obsahuje 356 AK o celkové molekulové hmotnosti kolem 39 kDa (Vacek et al., 2020). Lysostafin mut 9 se skládá z 245 AK a má přibližně 25 kDa.

Vacek et al., zkoumali novou rekombinantní variantu endolysinu LYSDERM-S optimalizovanou pro heterologní expresi v *E. coli*. Sekvence AK pro endolysin vychází z konstruktů LysF1 (Benešík et al., 2018). Konečný konstrukt obsahoval gen pro ubq, 14× His Tag, doménu CHAP a gen pro vazbu na buněčnou stěnu (doména SH3b). Celý fúzní protein obsahoval 395 AK o celkové molekulové hmotnosti přibližně 43 kDa, přičemž endolysin mut T1 obsahoval 283 AK o velikosti 31 kDa. Postup přípravy a purifikace proteinů v práci Vacek et al., byl principiálně stejný jako v této magisterské práci (Vacek et al., 2020).

Vypurifikované proteiny byly použity pro krystalizační pokusy. Pro nalezení vhodných krystalizačních podmínek byly sekvence studovaných proteinů porovnány se sekvencemi přístupných v PDB databázi. Pomocí programu BLAST byla zjištěna podobnost sekvencí lysostafinů se sekvencí z práce Sabala et al. (2014). Sekvence se v případě mut 9 a mut D shodovaly se sekvencí v 98%, a s lysostafinem WT v 99%. Sabala et al. (2014) vypěstoval krystal katalytické domény lysostafinu smícháním 11,5 mg/ml roztoku proteinu se zásobním pufrem Morpheus 2-46 (Molecular Dimensions, Newmarket, UK) v poměru 1 : 1. Na základě této práce byl pro optimalizaci krystalizačních podmínek použit právě Morpheus 2, který byl pipetován ručně. Poměrů proteinu a precipitačního činidla bylo zvoleno několik - 1:1, 1:2, 2:1 a 4:1, pro všechny varianty lysostafinu v koncentracích 11,5 mg/ml. Destičky byly kontrolovány 1-2 týdně, jediný krystal v práci Sabala et al (2014) vyrostl během jednoho měsíce, nicméně v této magisterské práci ani po uplynutí dvou měsíců nebyly pozorovány krystaly proteinů, patrně kvůli snaze o zkrystalizování celého proteinu s oběma doménami.

V práci Sabala et al. se podařil vypěstovat jeden difraktující krystal s rozlišením 3,5-4 Å na zdroji synchrotronového záření z 10 000 vyzkoušených podmínek. Krystal vyrostl v podmínce, která obsahovala 0,1 M Tris (báze), bicin (pH 8,5), 0,1 M AK (L-Na-glutamát, alanin – racemická směs, glycin, lysin-HCl – racemická směs, serin – racemická směs) a 30% v/v PEG 8000. Struktura lysostafinu je znázorněna na Obrázku 21 (Sabala et al., 2014).



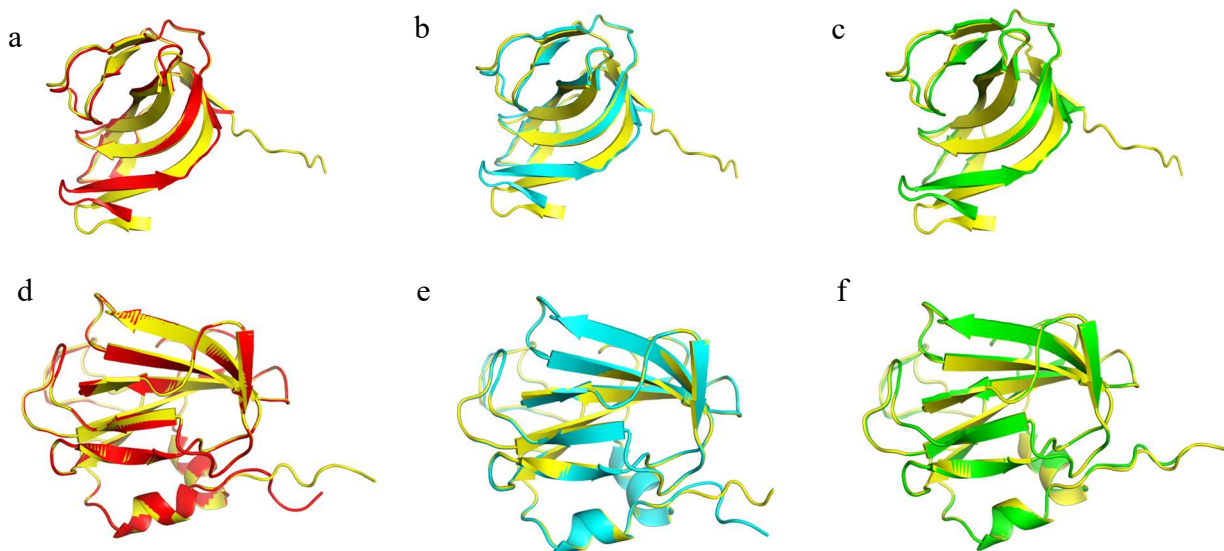


Obrázek 21: Struktura lysostafinu (Sabala et al., 2014.).

Kulička označuje  $Zn^{2+}$  iont. Doména CWT (zeleně), katalytická doména (žlutě) se liší v orientaci téměř o  $100^\circ$ .

Struktury studovaných proteinů byly predikovány pomocí programu AlphaFold a jejich následné zpracování bylo provedeno v programu PyMOL. Predikované struktury proteinů byly porovnány s již vyřešenými strukturami lysostafinů, ID PDB: 4LXC (Sabala et al., 2014) a 5NMY (Tossavainen et al., 2018) z *S. simulans*.

Největší sekvenční podobnost je se strukturou označovanou 4LXC (*S. simulans*), která činí v případě lysostafinu WT v této práci sekvenční shodu 99% a u mutantních forem 98%.



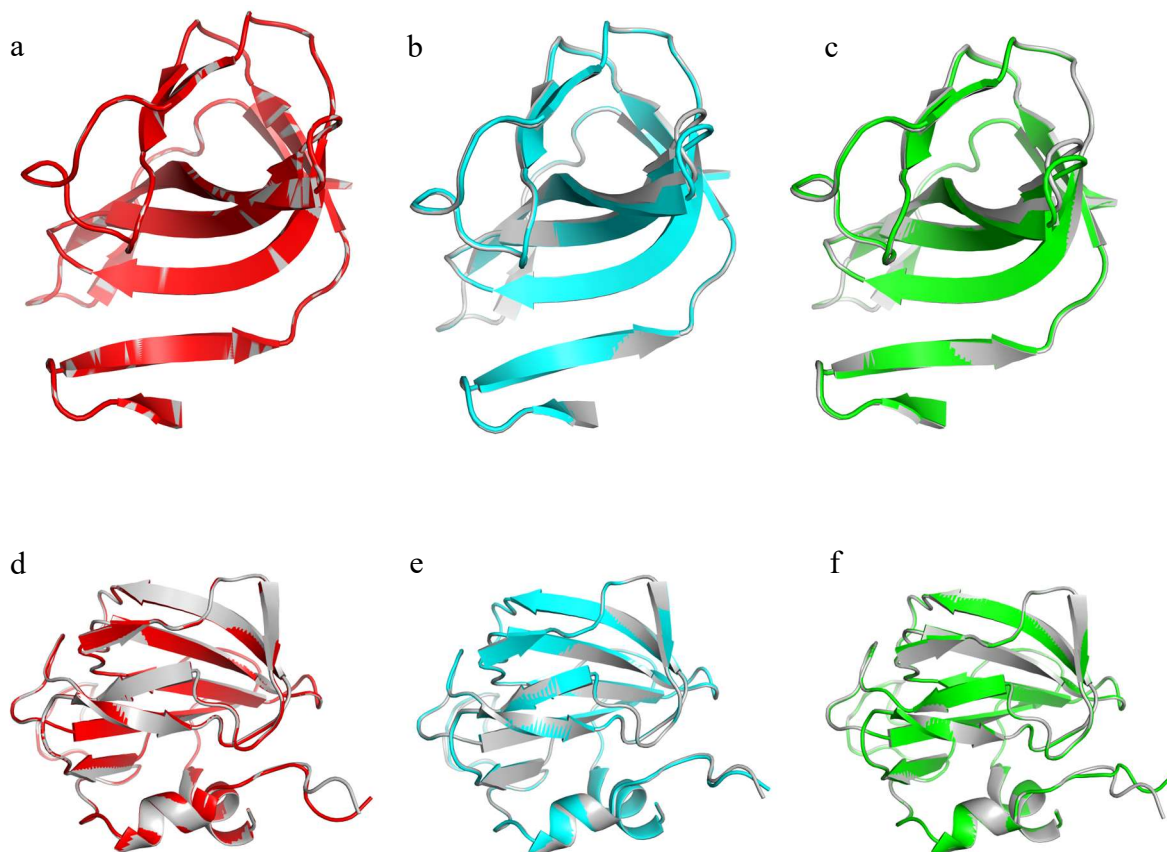
Obrázek 22: Vzájemné srovnání predikcí struktur proteinů se strukturou lysostafinu 4LXC (žlutě).

a. CWD lysostafinu WT (červeně); b. CWD lysostafinu mut 9 (světle modře); c. CWD lysostafinu mut D (zeleně); d. EAD lysostafinu WT (červeně); e. EAD lysostafinu mut 9 (světle modře); f. EAD lysostafinu mut D (zeleně).

Na Obrázku 22 jsou patrné větší posuny, v případě CWD je RMSD = 0,543 pro lysostafin WT, RMSD = 0,507 pro lysostafin mut 9 a RMSD = 0,434 pro lysostafin mut D. V případě EAD, RMSD = 0,051 pro lysostafin WT, RMSD = 0,08 pro lysostafin mut 9 a RMSD = 0,065 pro lysostafin mut D, jsou patrně dány též flexibilitou linkeru.

Dalším z možných vysvětlení posunů může být i přítomná mutace, kde došlo k výměně prolinu. Z několika prací – Vitagliano et al. a Muralidharan et al., je řečeno, že prolin nemůže tvořit vodíkovou vazbu a tvoří často cis-vazby, které nejsou pro AK typické. Vytvořením tohoto typu vazby prolin zaujímají tzv. down puckering (puklinový tvar) (Vitagliano et al., 2001; Muralidharan et al., 2020). Má tendenci rotovat a neudrží tak pevnou interakci mezi ostatními AK, jak je tomu u AK s trans-vazbou. V případech mutací N39P, S83M a T178L, se jedná o výměnu z polární na nepolární AK, výjimku tvoří mutace K232P, kde se jedná o změnu z bazické na nepolární AK.

U druhé struktury lysostafinu 5NMY (*S. simulans*) byla zjištěna též shoda 99% u lysostafinu WT a 98% v případě mutantních forem (mut 9 a mut D) jako v případě struktury 4LXC.

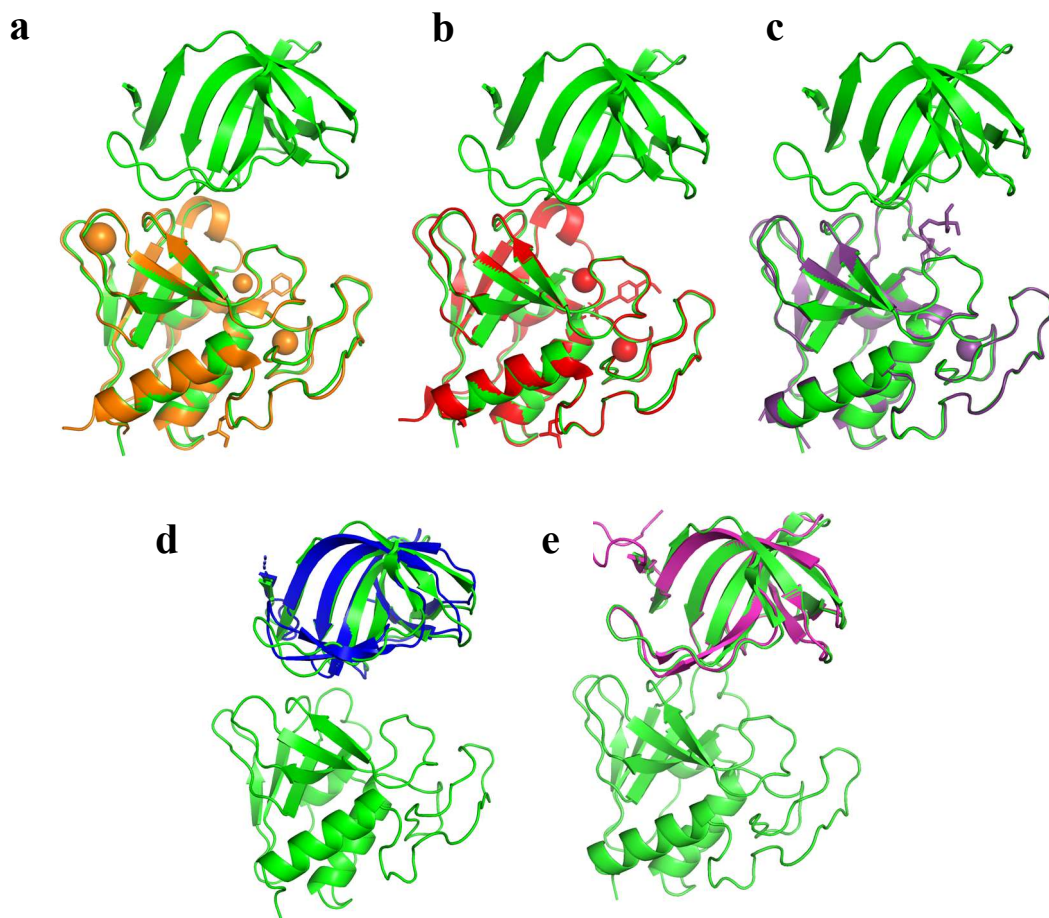


Obrázek 23: Vzájemné srovnání predikcí struktur proteinů se strukturou lysostafinu 5NMY (šedě).

a. CWD lysostafinu WT (červeně); b. CWD lysostafinu mut 9 (světle modře); c. CWD lysostafinu mut D (zeleně); d. EAD lysostafinu WT (červeně); e. EAD lysostafinu mut 9 (světle modře); f. EAD lysostafinu mut D (zeleně).

Na Obrázku 23 jsou též patrné posuny v případě obou přítomných domén, velikost posunu se liší od daného studovaného proteinu, kdy u EAD jsou hodnoty RMSD = 0,051 pro lysostafin WT; 0,066 pro lysostafin mut 9; 0,063 pro lysostafin mut D. V případě CWD u lysostafinu WT je hodnota RMSD rovná 0, ale u mutantních forem jsou hodnoty, oproti EAD vyšší - 0,118 a 0,129 (lysostafin mut 9 a lysostafin mut D), jsou patrně dány též flexibilitou linkeru.

V případě endolysinu byly nalezeny následující shodné struktury: CHAP<sub>K</sub> doména endolysinu – LysK (PDB: 4CSH) a CHAP<sub>K</sub> – LysK (CH<sub>3</sub>HgCl) (PDB: 4CT3) z *Staphylococcus phage K*, oba se shodou 98% (Sanz-Gaitero et al., 2014), CHAP doména – LysGH15 (PDB: 4OLK) se shodou 97%, SH3 – LysGH15 (PDB: 2MK5) z *Staphylococcus phage G15* se shodou 92% (Gu et al., 2014) a CWD – LysF1 (PDB: 5O1Q) z *Staphylococcus Phage 812F1* se shodou 100% (Benešik et al., 2018). Dle značení domén, lze CHAP doménu pojmenovat jako EAD a SH3 se též nazývá CWD doména.



Obrázek 24: Vzájemné porovnání struktur endolysinu mut T1 s proteiny:

a. LysK 4CSH (oranžově); b. LysK 4CT3 (červeně); c. LysGH15 4OLK (světle fialově); d. LysGH15 2MK5 (světle modře); e. LysF1 5O1Q (růžově).

Na Obrázku 24 lze pozorovat posun CWD, vyšší u struktury LysGH15 2MK5 (RMSD = 1,397) než u struktury LysF1 5O1Q (RMSD = 0,656). Ostatní struktury se skládají pouze z EAD: LysK 4CSH (RMSD = 0,392), LysK 4CT3 (RMSD = 0,371) a LysGH15 4OLK (RMSD = 0,406), rozdíly ve strukturách v porovnání s predikcí struktury endolysinu mut T1 jsou menší.

## 6 Závěr

Teoretická část magisterské práce byla zaměřena na studium bakteriálních proteinů a to divokého typu lysostafinu WT, mutantních variant lysostafinu mut 9/mut D, z bakterie *S. simulans* a dále endolysinu z bakteriofága  $\phi$  812. V práci byly popsány základní charakteristiky proteinů, jejich význam a důvod, proč by měly fungovat jako náhrada antibiotik.

V praktické části byl popsán postup přípravy proteinů a jejich následná krystalizace. Proteiny byly nejdříve zaklonovány v laboratoři VÚVeL (Brno) a poté transformovány v laboratoři pomocí protokolu BL21. Proteiny byly následně exprimovány a purifikovány pomocí IMAC chromatografie. Byla provedena analýza čistoty proteinů pomocí SDS-PAGE elektroforézy, která prokázala jejich dostatečnou čistotu k použití ke krystalizačním experimentům.

Jako první byl proveden tzv. pre-krystalizační test pomocí PCT testu. Následné krystalizační experimenty byly prováděny s různými komerčně dodávanými sadami precipitačních činidel.

Krystaly v difrakční kvalitě se nepodařilo připravit a nebylo možné provést difrakční experiment a strukturní analýzu na základě dat z rentgenové krystalografie. Důvodem je s největší pravděpodobností fakt, že struktura studovaných proteinů je tvořena dvěma doménami složenými z  $\alpha$ -helixů a  $\beta$ -skládaných listů spojených dlouhou smyčkou, která způsobuje jejich flexibilitu a nestabilitu. To byl důvod použití programu AlphaFold k predikci struktur studovaných proteinů a jejich následného porovnání pomocí programu PyMOL. Bylo prokázáno, že struktury obsahují  $\alpha$ -helixy a  $\beta$ -skládané listy uspořádané do domén spojených dlouhou smyčkou.

Pro vyřešení struktury pomocí rentgenové difrakce bude nutné připravit a krystalizovat zvlášť jednotlivé domény lysostafinů i endolysinu.

## 7 Seznam literatury

- Bai, A.D., & Morris, A.M. (2019): Management of *Staphylococcus aureus* bacteremia in adults. *CMAJ*, **191** (35), 967-967. <https://doi.org/10.1503/cmaj.190363>.
- Bastos, M. do C. de F., Coutinho, B. G., & Coelho, M. L. V. (2010): Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals (Basel)*, **3** (4), 1139-1161.
- Batool, N., Ko, K.S., Chaurasia, A.K., & Kim, K.K. (2020): Functional Identification of Serine Hydroxymethyltransferase as a Key Gene Involved in Lysostaphin Resistance and Virulence Potential of *Staphylococcus aureus* Strains. *International Journal of Molecular Sciences*, **21** (23), 9135, 1-20. <https://doi.org/10.3390/ijms21239135>.
- Benešik, M., Nováček, J., Janda, L., Dopitová, R., Pernisová, M., Melková, K., Tišáková, L., Doškař, J., Žídek, L., Hejátko, J., & Pantůček, R. (2018): Role of SH3b binding domain in a natural deletion mutant of Kayvirus endolysin LysF1 with a broad range of lytic activity. *Virus Genes*, **54** (1), 130-139. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1507-2>.
- Blasco, L., Ambroa, A., Trastoy, R., Bleriot, I., Moscoso, M., Fernández-Garcia, L., Perez-Nadales, E., Fernández-Cuenca, F., Torre-Cisneros, J., Oteo-Iglesias, J., Oliver, A., Canton, R., Kidd, T., Navarro, F., Miró, E., Pascual, A., Bou, G., Martínez-Martínez, L., & Tomas, M. (2020): In vitro and in vivo efficacy of combinations of colistin and different endolysins against clinical strains of multi-drug resistant pathogens. *Scientific Reports*, **10**, 7163, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64145-7>.
- Borysowski, J., Weber-Dabrowska, B., & Górski, A. (2006): Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, **231** (4), 366-377. <https://doi.org/10.1177/153537020623100402>.
- Briers, Y., Walmagh, M., Van Puyenbroeck, V., Cornelissen, A., Cenens, W., Aertsen, A., Oliveira, H., Azeredo, J., Verween, G., Pirnay, J.P., Miller, S., Volckaert, G., & Lavigne, R. (2014): Engineered endolysin-based "Artilysins" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens. *mBio*, **5** (4): e01379-14, 1-10. <https://doi.org/10.1128/mBio.01379-14>.



- Choi, Y.-J., Kim, S., Bae, S., Kim, Y., Chang, H.-H., & Kim, J. (2022): Antibacterial Effects of Recombinant Endolysins in Disinfecting Medical Equipment: A Pilot Study. *Frontiers in Microbiology*, **12**, 773640, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.773640>.
- Chung, A. S. M. T., Teo, Y. K., Cheng, W. T., & Tan, J. B. L. (2022): Biological Macromolecules, V „Chapter 2 - Structure–activity relationship of biological macromolecules,“, *Academic Press*, 2022, str, 23-51, ISBN 9780323857598. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85759-8.00002-6>.
- Clark, S.B., & Hicks, M.A. (2023): *Staphylococcal Pneumonia*. [Updated 2022 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559152/>.
- Clarridge, J. E. III, Harrington, A. T., Roberts, M. C., Soge, O. O., & Maquelin, K. (2013): Impact of strain typing methods on assessment of relationship between paired nares and wound isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**, 224–231.
- Climo, M.W., Patron, R.L., Goldstein, B.P., & Archer, G.L. (1998): Lysostaphin treatment of experimental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* aortic valve endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42** (6), 1355-1360. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.6.1355>.
- Clustal Omega < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI. EMBL-EBI homepage | EMBL-EBI [online]. Copyright © EMBL [cit. 14.02.2023]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.
- Costello, E.K., Lauber, C.L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J.I., & Knight, R. (2009): Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, **326** (5960), 1694-1697. <https://doi.org/10.1126/science.1177486>.
- Czekalski, N., Gascón Díez, E., & Bürgmann, H. (2014): Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *The ISME Journal*, **8**, 1381–1390. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.8>.
- Dams, D., & Briers, Y. (2019): Enzybiotics: Enzyme-Based Antibacterials as Therapeutics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **1148**, 233-253. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7709-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7709-9_11).

- Dixon, R.E., Goodman, J.S., & Koenig, M.G. (1968): Lysostaphin: an enzymatic approach to staphylococcal disease. 3. Combined lysostaphin-methicillin therapy of established staphylococcal abscesses in mice. *Yale Journal of Biology and Medicine (YJBM)*, **41** (1), 62-68.
- Drobeniuc, A., Traenkner, J., Rebolledo, P.A., Ghazaryan, V., & Roupshael, N. (2021): *Staphylococcus simulans*: A rare uropathogen. *IDCases*, **25**: e01202, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01202>.
- Expasy (2022): Expasy – ProtParam tool [online]. Dostupné z: <https://web.expasy.org/protparam/>.
- Farhangnia, L., Ghaznavi-Rad, E., Mollae, N., & Abtahi, H. (2014): Cloning, Expression, and Purification of Recombinant Lysostaphin From *Staphylococcus simulans*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, **7** (5): e10009, 1-5. <https://doi.org/10.5812/jjm.10009>.
- Grishin, A.V., Shestak, N.V., Lavrova, N.V., Lyashchuk, A.M., Popova, L.I., Strukova, N.V., Generalova, M.S., Ryazanova, A.V., Polyakov, N.B., Galushkina, Z.M., Soboleva, L.A., Boksha, I.S., Karyagina, A.S., & Lunin, V.G. (2019): Fusion of Lysostaphin to an Albumin Binding Domain Prolongs Its Half-Life and Bactericidal Activity in the Systemic Circulation. *Molecules*, **24** (16), 2892, 1-14. <https://doi.org/10.3390/molecules24162892>.
- Gu, J., Feng, Y., Feng, X., Sun, C., Lei, L., Ding, W., Niu, F., Jiao, L., Yang, M., Li, Y., Liu, X., Song, J., Cui, Z., Han, D., Du, C., Yang, Y., Ouyang, S., Liu, Z.J., & Han, W. (2014): Structural and biochemical characterization reveals LysGH15 as an unprecedented "EF-hand-like" calcium-binding phage lysin. *PLoS Pathogens*, **10** (5): e1004109, 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004109>.
- Hojčková, K., Stano, M., & Křučár, L. (2013): phiBIOTICS: catalogue of therapeutic enzybiotics, relevant research studies and practical applications. *BMC Microbiology*, **13**, 53, 1-6. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-53>.
- Howden, B.P., Giulieri, S.G., Wong Fok Lung, T., Baines, S.L., Sharkey, L.K., Lee, J.Y.H., Hachani, A., Monk, I.R., & Stinear, T.P. (2023): *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nature Reviews Microbiology*, **19**, 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00852-y>.



- Jansen, K.U., Girgenti, D.Q., Scully, I.L., & Anderson, A.S. (2013): Vaccine review: ‘*Staphylococcus aureus* vaccines: problems and prospects’. *Vaccine*, **31**, 2723–2730.
- Jayakumar, J., Kumar, V.A., Biswas, L., & Biswas, R. (2021): Therapeutic applications of lysostaphin against *Staphylococcus aureus*, *Journal of Applied Microbiology*, **131** (3), 1072–1082. <https://doi.org/10.1111/jam.14985>.
- Johnson, C.T., Wroe, J.A., Agarwal, R., Martin, K.E., Guldborg, R.E., Donlan, R.M., Westblade, L.F., & García, A.J. (2018): Hydrogel delivery of lysostaphin eliminates orthopedic implant infection by *Staphylococcus aureus* and supports fracture healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, **115** (22), 4960–4969. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801013115>.
- Kashani, H.H., Schmelcher, M., Sabzalipoor, H., Hosseini, E.S., & Moniri, R. (2018): Recombinant endolysins as potential therapeutics against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: Current status of research and novel delivery strategies. *Clinical Microbiology Reviews*, **31**: e00071-17, 1-26. <https://doi.org/10.1128/CMR.00071-17>.
- Kavanagh, N., Ryan, E.J., Widaa, A., Sexton, G., Fennell, J., O'Rourke, S., Cahill, K.C., Kearney, C.J., O'Brien, F.J., & Kerrigan, S.W. (2018): Staphylococcal Osteomyelitis: Disease Progression, Treatment Challenges, and Future Directions. *Clinical Microbiology Reviews*, **31** (2): e00084-17, 1-25. <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-17>.
- Kong, E.F., Johnson, J.K., & Jabra-Rizk, M.A. (2016): Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: An Enemy amidst Us. *PLoS Pathogens*, **12** (10): e1005837, 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005837>.
- Krismer, B., Weidenmaier, C., Zipperer, A., & Peschel, A. (2017): The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, **15**, 675–687.
- Kumar, J.K. (2008): Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **80**, 555–561.

- Letrado, P., Corsini, B., Díez-Martínez, R., Bustamante, N., Yuste, J.E., & García, P. (2018): Bactericidal synergism between antibiotics and phage endolysin Cpl-711 to kill multidrug-resistant pneumococcus. *Future Microbiology*, **13** (11), 1215-1223. <https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0077>.
- Misawa, Y., Kelley, K.A., Wang, X., Wang, L., Park, W.B., Birtel, J., Saslowsky, D., & Lee, J.C. (2015): *Staphylococcus aureus* Colonization of the Mouse Gastrointestinal Tract Is Modulated by Wall Teichoic Acid, Capsule, and Surface Proteins. *PLoS Pathogens*, **11** (7): e1005061, 1-21. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005061>.
- Muralidharan, A., Schmidt, J.R., & Yethiraj, A. (2020): Solvation Induced Ring Puckering Effect in Fluorinated Prolines and Its Inclusion in Classical Force Fields. *The Journal of Physical Chemistry B*, **124** (28), 5899-5906. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c04312>.
- Nelson, D., Loomis, L., & Fischetti, V.A. (2001): Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, **98** (7), 4107-4112. <https://doi.org/10.1073/pnas.061038398>.
- Newstead, L.L., Varjonen, K., Nuttall, T., & Paterson, G.K. (2020): Staphylococcal-Produced Bacteriocins and Antimicrobial Peptides: Their Potential as Alternative Treatments for *Staphylococcus aureus* Infections. *Antibiotics (Basel)*, **9** (2), 40, 1-19. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020040>.
- Pidwill, G.R., Gibson, J.F., Cole, J., Renshaw, S.A., & Foster, S.J. (2021): The Role of Macrophages in *Staphylococcus aureus* Infection. *Frontiers in Immunology*, **11**: 620339, 1-30. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.620339>.
- Sabala, I., Jonsson, I.M., Tarkowski, A., & Bochtler, M. (2012): Anti-staphylococcal activities of lysostaphin and LytM catalytic domain. *BMC Microbiology*, **12** (97), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-97>.
- Sabala, I., Jagielska, E., Bardelang, P.T., Czapinska, H., Dahms, S.O., Sharpe, J.A., James, R., Than, M.E., Thomas, N.R., & Bochtler, M. (2014): Crystal structure of the antimicrobial peptidase lysostaphin from *Staphylococcus simulans*. *The FEBS Journal*, **281** (18): 4112-4122. <https://doi.org/10.1111/febs.12929>.

- Salamaga, B., Kong, L., Pasquina-Lemonche, L., Lafage, L., von Und Zur Muhlen, M., Gibson, J.F., Grybchuk, D., Tooke, A.K., Panchal, V., Culp, E.J., Tatham, E., O'Kane, M.E., Catley, T.E., Renshaw, S.A., Wright, G.D., Plevka, P., Bullough, P.A., Han, A., Hobbs, J.K., & Foster, S.J. (2021): Demonstration of the role of cell wall homeostasis in *Staphylococcus aureus* growth and the action of bactericidal antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, **118** (44): e2106022118, 1-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.2106022118>.
- Sanz-Gaitero, M., Keary, R., Garcia-Doval, C., Coffey, A., & van Raaij, M.J. (2014): Crystal structure of the lytic CHAP<sub>K</sub> domain of the endolysin LysK from *Staphylococcus aureus* bacteriophage K. *Virology Journal*, **11**: 133, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-133>.
- São-José, C. (2018): Engineering of Phage-Derived Lytic Enzymes: Improving Their Potential as Antimicrobials. *Antibiotics (Basel)*, **7** (2): 29, 1-31. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020029>.
- Schindler, C.A., & Schuhardt, V.T. (1964): Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the *Staphylococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, **51** (3), 414-421. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.3.414>.
- Schmelcher, M., Donovan, D.M., & Loessner, M.J. (2012): Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiology*, **7** (10), 1147-1171. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.97>.
- Serwecińska, L. (2020): Antimicrobials and Antibiotic-Resistant Bacteria: A Risk to the Environment and to Public Health. *Water*, **12**: 3313, 1-17. <https://doi.org/10.3390/w12123313>.
- Shishido, M., Kitaoka, H., Watanabe, K., Fujimoto, M., & Kumagai, T. (2022): Acute Focal Bacterial Nephritis Caused by *Staphylococcus simulans*. *Cureus*, **14** (11): e31241, 1-6. <https://doi.org/10.7759/cureus.31241>.
- Siwczak, F., Cseresnyes, Z., Hassan, M.I.A., Aina, K.O., Carlstedt, S., Sigmund, A., Groger, M., Surewaard, B.G.J., Werz, O., Figge, M.T., Tuchscher, L., Löffler, B., & Mosig, A.S. (2022): Human macrophage polarization determines bacterial persistence of *Staphylococcus aureus* in a liver-on-chip-based infection model. *Biomaterials*, **287**: 121632, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121632>.

- Spaan, A. N., van Strijp, J. A. G., & Torres, V. J. (2017): Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nature Reviews Microbiology*, **15**, 435–447.
- Sutton, J.A.F., Carnell, O.T., Lafage, L., Gray, J., Biboy, J., Gibson, J.F., Pollitt, E.J.G., Tazoll, S.C., Turnbull, W., Hajdamowicz, N.H., Salamaga, B., Pidwill, G.R., Condliffe, A.M., Renshaw, S.A., Vollmer, W., & Foster, S.J. (2021): *Staphylococcus aureus* cell wall structure and dynamics during host-pathogen interaction. *PLoS Pathogens*, **17** (3): e1009468, 1-30. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009468>.
- Tang, Y.W., & Stratton, C.W. (2010): *Staphylococcus aureus*: An old pathogen with new weapons. *Clinics in Laboratory Medicine – Journals*, **30** (1), 179-208. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.01.005>.
- Thammavongsa, V., Kim, H. K., Missiakas, D., & Schneewind, O. (2015): Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nature Reviews Microbiology*, **13**, 529–543.
- Tossavainen, H., Raulinaitis, V., Kauppinen, L., Pentikäinen, U., Maaheimo, H., & Permi, P. (2018): Structural and Functional Insights Into Lysostaphin-Substrate Interaction. *Frontiers in Molecular Biosciences*, **5**: 60, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00060>.
- Unal, N., & Cinar, O.D. (2012): Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Panton-Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Tropical Animal Health and Production*, **44** (2), 369-375. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-0032-x>.
- Urish, K.L., & Cassat, J.E. (2020): *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis: Bone, Bugs, and Surgery. *Infection and Immunity - ASM Journals*, **88** (7):e00932-19, 1-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00932-19>.
- Vacek, L., Kobzová, Š., Čmelík, R., Pantůček, R., & Janda, L. (2020): Enzybiotics LYSSTAPH-S and LYSDERM-S as Potential Therapeutic Agents for Chronic MRSA Wound Infections. *Antibiotics*, **9**: 519, 1-16. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080519>.

- Vallianou, N., Evangelopoulos, A., Makri, P., Zacharias, G., Stefanitsi, P., Karachalios, A., & Avgerinos, P.C. (2008): Vertebral osteomyelitis and native valve endocarditis due to *Staphylococcus simulans*: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, **2**: 183, 1-3. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-2-183>.
- van Hal, S.J., Jensen, S.O., Vaska, V.L., Espedido, B.A., Paterson, D.L., & Gosbell, I.B. (2012): Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clinical Microbiology Reviews*, **25** (2), 362-386. <https://doi.org/10.1128/CMR.05022-11>.
- Vitagliano, L., Berisio, R., Mastrangelo, A., Mazzarella, L., & Zagari, A. (2001): Preferred proline puckerings in cis and trans peptide groups: implications for collagen stability. *Protein Science*, **10** (12), 2627-2632. <https://doi.org/10.1110/ps.ps.26601a>.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., & Foster, S. (2008): Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*, **32** (2), 259-286. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x>.
- Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., & Nouwen, J.L. (2005): The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases*, **5** (12), 751-762. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70295-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70295-4).
- WHO (2015): Global action plan on antimicrobial resistance. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*. [https://www.amcra.be/swfiles/files/WHO%20actieplan\\_90.pdf](https://www.amcra.be/swfiles/files/WHO%20actieplan_90.pdf).
- Wollenberg, M.S., Claesen, J., Escapa, I.F., Aldridge, K.L., Fischbach, M.A., & Lemon, K.P. (2014): Propionibacterium-produced coproporphyrin III induces *Staphylococcus aureus* aggregation and biofilm formation. *mBio*, **5** (4):e01286-14, 1-10. <https://doi.org/10.1128/mBio.01286-14>.
- Wu, J.A., Kusuma, C., Mond, J.J., & Kokai-Kun, J.F. (2003): Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **47** (11), 3407-3414. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.11.3407-3414.2003>.
- Zha, J., Li, J., Su, Z., Nuraly, A., Xia, W. (2022): Lysostaphin: Engineering and Potentiation toward Better Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **70** (37), 11441-11457.

Zhou, B., Zhen, X., Zhou, H., Zhao, F., Fan, C., Perčulija, V., Tong, Y., Mi, Z., & Ouyang, S. (2020): Structural and functional insights into a novel two-component endolysin encoded by a single gene in *Enterococcus faecalis* phage. *PLoS Pathogens*, **16** (3), 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008394>.

## 8 Seznam obrázků

Obrázek 1: Schématické znázornění stavby buněčné stěny <i>S. aureus</i> (upraveno dle Kong et al., 2016).....	3
Obrázek 2: Schéma uspořádání domén lysostafinů (upraveno dle Zha et al., 2022). ....	6
Obrázek 3: Schématické uspořádání peptidoglykanu u <i>S. aureus</i> a místo primární hydrolýzy lysostafinů (upraveno dle Bastos et al., 2010).....	7
Obrázek 4: Schéma procesu aktivace lysostafinů (upraveno dle Bastos et al., 2010). ....	8
Obrázek 5: Schéma uspořádání domén endolysinu (upraveno dle Zhou et al., 2020). ....	9
Obrázek 6: Chromatogram purifikace lysostafinu mut 9 na HisTrap™ koloně. Vyznačeny sbírané frakce (1,5 ml) s proteinem (vzorek 4 na gelu – viz Obrázek 9). ....	18
Obrázek 7: Chromatogram purifikace lysostafinu mut 9 na HiPrep odsolovací koloně. Vyznačeny sbírané frakce (1,5 ml) s proteinem (vzorek 5 na gelu – viz Obrázek 9). ....	19
Obrázek 8: Chromatogram při oddělování lysostafinu mut 9 na HisTrap™ koloně. Vyznačeny sbírané frakce (1,5 ml) s proteinem (vzorek 6 na gelu – viz Obrázek 9). ....	19
Obrázek 9: Záznam gelu po IMAC chromatografii u lysostafinu mut 9.....	20
Obrázek 10: Chromatogram purifikace endolysinu mut T1 na HisTrap™ koloně. Vyznačeny sbírané frakce (1,5 ml) s proteinem (vzorek 5 na gelu – viz Obrázek 13). ....	21
Obrázek 11: Chromatogram purifikace endolysinu mut T1 na HiPrep odsolovací koloně. Vyznačeny sbírané frakce (1,5 ml) s proteinem (vzorek 6 na gelu – viz Obrázek 13). ....	21
Obrázek 12: Chromatogram při oddělování endolysinu mut T1 na HisTrap™ koloně. Vyznačeny sbírané frakce (1,5 ml) s proteinem (vzorek 8 na gelu – viz Obrázek 13). ....	22
Obrázek 13: Záznam gelu po IMAC chromatografii u endolysinu mut T1.....	23
Obrázek 14: Predikce struktur proteinů: a. lysostafin WT; b. lysostafin mut 9; c. lysostafin mut D.....	24
Obrázek 15: Aktivní místo lysostafinů (Met131, Pro132, Phe133, Leu134, Lys135) (dle UniProtKB/Swiss-Prot: P10547).....	25
Obrázek 16: Vyznačené mutace lysostafinu mut 9: a. mutace T178L; b. N39P.....	25
Obrázek 17: Vyznačené mutace lysostafinu mut D: a. mutace T178L; b. K232P; c. S83M. ...	26
Obrázek 18: Vzájemné srovnání predikcí struktur proteinů – lysostafinu WT s mut 9 a mut D. ....	27
Obrázek 19: Predikce struktury endolysinu mut T1.....	28
Obrázek 20: Vyznačené mutace endolysinu mut T1: a. mutace G124P; b. I44V; c. T72P. ....	28
Obrázek 21: Struktura lysostafinu (Sabala et al., 2014.).....	31
Obrázek 22: Vzájemné srovnání predikcí struktur proteinů se strukturou lysostafinu 4LXC (žlutě). ....	32
Obrázek 23: Vzájemné srovnání predikcí struktur proteinů se strukturou lysostafinu 5NMY (šedě). ....	33
Obrázek 24: Vzájemné porovnání struktur endolysinu mut T1 s proteiny .....	34

## 9 Seznam tabulek

Tabulka I: Klasifikace bakteriocinů, jejich vlastnosti a konkrétní příklady (upraveno dle Bastos et al., 2010).....	5
Tabulka II: Základní charakteristiky lysostafinu WT, mut 9 a mut D (Expasy, 2022).....	8
Tabulka III: Základní charakteristika endolysinu mut T1.....	9
Tabulka IV: Příprava polyakrylamidového gelu.....	13
Tabulka V: Použité koncentrace lysostafinu WT, mut 9 a mut D.....	16
Tabulka VI: Použité koncentrace endolysinu T1.....	16
Tabulka VII: Schéma krystalizační jamky.....	16
Tabulka VIII: Použité objemy proteinů (LSN – lysostafin) a precipitačního roztoku (PR) ze sady Morpheus 2.....	17



## 10 Přílohy

Příloha 1: Sekvence jednotlivých proteinů. Mutace jsou označeny žlutě.

1. Sekvence endolysinu mut T1 (z bakteriofága  $\phi$  812, mutace: I44V\_ T72P\_ G124P):

MAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSPYRVKKATSYPDSPFGVMEAGAVDADGYYHAQC  
QDLITDYVLWLTDNKVRPWGNAKDQIKQSYGTGFKIHENKPSTVPPKKGWIAVFTSGS  
YEQWGHIGIVYDPPGNTSTFTILEQNWNGYANKKPTKRVDNYYGLTHFIEIPVKAGTT  
VKKETAKKSASTPATRPVTGSWKKNQYGTWYKPENATFVNGNQPIVTRIGSPFLNAP  
VGGNLPAGATIVYDEVCIQAGHIWIGYNAYNGNRVYCPVRTCQGVPPNQIPGVAWG  
VFK

2. Sekvence lysostafinu WT (z bakterie *S. simulans*):

MAHEHSAQWLNNYKKGYGYGPYPLGINGGMHYGVDFFMNIGTPVKAISSGKIVEAG  
WSNYGGGNQIGLIENDGVHRQWYMHLKYNVKGVDYVKAGQIIGWSGSTGYSTAP  
HLHFQRMVNSFSNSTAQDPMPLKLSAGYKAGGSVTPTPNTGWKTNKYGTLYKSES  
ASFTPNTDIITRTTGPFERSMPQSGVLKAGQTIHYDEVMKQDGHVWVG YTGNSGQRIY  
LPVRTWNKSTNTLGVLWGTIK

3. Sekvence lysostafinu mut 9 (z bakterie *S. simulans*, mutace: N39P\_ T178L):

MAHEHSAQWLNNYKKGYGYGPYPLGINGGMHYGVDFFMPIGTPVKAISSGKIVEAG  
WSNYGGGNQIGLIENDGVHRQWYMHLKYNVKGVDYVKAGQIIGWSGSTGYSTAP  
HLHFQRMVNSFSNSTAQDPMPLKLSAGYKAGGSVTPTPNTGWKTNKYGTLYKSES  
ASFTPNTDIILRTTGPFERSMPQSGVLKAGQTIHYDEVMKQDGHVWVG YTGNSGQRIY  
LPVRTWNKSTNTLGVLWGTIK

4. Sekvence lysostafinu mut D (z bakterie *S. simulans*, mutace: S83M\_ T178L\_ K232P):

MAHEHSAQWLNNYKKGYGYGPYPLGINGGMHYGVDFFMNIGTPVKAISSGKIVEAG  
WSNYGGGNQIGLIENDGVHRQWYHMLMKYNVKGVDYVKAGQIIGWSGSTGYSTAP  
HLHFQRMVNSFSNSTAQDPMPLKLSAGYKAGGSVTPTPNTGWKTNKYGTLYKSES  
ASFTPNTDIILRTTGPFERSMPQSGVLKAGQTIHYDEVMKQDGHVWVG YTGNSGQRIY  
LPVRTWNPSTNTLGVLWGTIK

## Příloha 2: Složení médií – příprava buněčných pelet

<b>TB médium</b>	<b>roztok fosfátu draselného</b>
12 g trypton	23,1 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$
24 g kvasinek	125,4 g $\text{K}_2\text{HPO}_4$
4 ml glycerolu	ddH <sub>2</sub> O
ddH <sub>2</sub> O	

## Příloha 3: Složení činidel sady PCT (Hampton Research).

### PCT Formulation

- Reagent A1 – 0,1 M Tris hydrochloride (pH 8,5), 2,0 M Ammonium sulfate
- Reagent B1 – 0,1 M Tris hydrochloride (pH 8,5), 1,0 M Ammonium sulfate
- Reagent A2 – 0,1 M Tris hydrochloride (pH 8,5); 0,2 M Magnesium chloride hexahydrate; 30% w/v Polyethylene glycol 4,000
- Reagent B2 – 0,1 M Tris hydrochloride (pH 8,5); 0,2 M Magnesium chloride hexahydrate; 15% w/v Polyethylene glycol 4,000

## Příloha 4: Srovnání různých konstruktů lysostafinu.

Srovnání lysostafinu WT, mut 9 a mut D s konstruktem ze článku Sabala et al., 2014, struktura 4LXC, a ze článku Tossavainen et al., 2018, struktura 5NMY.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

wt          --MAHEHSAQWLNNYKKGYGYPYPLGINGGMHYGVDFFMNIGTPVKAISSGKIVEAGWS  58
mut9        --MAHEHSAQWLNNYKKGYGYPYPLGINGGMHYGVDFFMNIGTPVKAISSGKIVEAGWS  58
mutD        --MAHEHSAQWLNNYKKGYGYPYPLGINGGMHYGVDFFMNIGTPVKAISSGKIVEAGWS  58
pdb|4LXC|A  MAATHEHSAQWLNNYKKGYGYPYPLGINGGMHYGVDFFMNIGTPVKAISSGKIVEAGWS  60
pdb5NMY     --GSHEHSAQWLNNYKKGYGYPYPLGINGGMHYGVDFFMNIGTPVKAISSGKIVEAGWS  58
           :*****

wt          NYGGGNQIGLIENDGVHRQWYMHLSKYNVKVGDYVKAGQIIIGWSGSTGYSTAPHLHFQRM  118
mut9        NYGGGNQIGLIENDGVHRQWYMHLSKYNVKVGDYVKAGQIIIGWSGSTGYSTAPHLHFQRM  118
mutD        NYGGGNQIGLIENDGVHRQWYMHLMKYNVKVGDYVKAGQIIIGWSGSTGYSTAPHLHFQRM  118
pdb|4LXC|A  NYGGGNQIGLIENDGVHRQWYMHLSKYNVKVGDYVKAGQIIIGWSGSTGYSTAPHLHFQRM  120
pdb5NMY     NYGGGNQIGLIENDGVHRQWYMHLSKYNVKVGDYVKAGQIIIGWSGSTGYSTAPHLHFQRM  118
           *****

wt          VNSFSNSTAQDMPFFLKSAGYGKAGGSVTPPTNTGWKTNKYGTLYKSESASFPTNDIIT  178
mut9        VNSFSNSTAQDMPFFLKSAGYGKAGGSVTPPTNTGWKTNKYGTLYKSESASFPTNDIIL  178
mutD        VNSFSNSTAQDMPFFLKSAGYGKAGGSVTPPTNTGWKTNKYGTLYKSESASFPTNDIIL  178
pdb|4LXC|A  VNSFSNSTAQDMPFFLKSAGYGKAGGTVTPTNTGWKTNKYGTLYKSESASFPTNDIIT  180
pdb5NMY     VNSFSNSTAQDMPFFLKSAGYGKAGGTVTPTNTGWKTNKYGTLYKSESASFPTNDIIT  178
           *****

wt          RTTGPFRRSMPQSGVLKAGQTIHYDEVKQDGHVWVGTYGNSGQRIYLPVRTWNKSTNTLG  238
mut9        RTTGPFRRSMPQSGVLKAGQTIHYDEVKQDGHVWVGTYGNSGQRIYLPVRTWNKSTNTLG  238
mutD        RTTGPFRRSMPQSGVLKAGQTIHYDEVKQDGHVWVGTYGNSGQRIYLPVRTWNKSTNTLG  238
pdb|4LXC|A  RTTGPFRRSMPQSGVLKAGQTIHYDEVKQDGHVWVGTYGNSGQRIYLPVRTWNKSTN---  237
pdb5NMY     RTTGPFRRSMPQSGVLKAGQTIHYDEVKQDGHVWVGTYGNSGQRIYLPVRTWNKSTN---  235
           *****

wt          VLWGTIK      245
mut9        VLWGTIK      245
mutD        VLWGTIK      245
pdb|4LXC|A  -----      237
pdb5NMY     -----      235

```

Srovnání sekvencí provedeno na serveru: Clustal Omega < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI. Mutace jsou označeny žlutě.

## Příloha 5: Srovnání různých konstruktů endolysinu.

Srovnání endolysinu mut T1 s konstruktem ze článku Sanz-Gaitero et al., 2014, struktury 4CSH a 4CT3, ze článku Gu et al., 2014, struktury 4OLK a 2MK5, a ze článku Benešík et al., 2018, struktura 5O1Q.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

ENDOT1      ---MAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSPYRVKKATSYPDPSFGVMEAGAVDADGGYYHAQCQDL  57
4CSH_1      ---MAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSPYRVKKATSYPDPSFGVMEAGAIADADGGYYHAQCQDL  57
4CT3_1      ---MAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSPYRVKKATSYPDPSFGVMEAGAIADADGGYYHAQCQDL  57
4OLK_1      SNAMAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSPYRIKKATSYPDPSFGVMEAGAIADADGGYYHAQCQDL  60
2MK5_1      ----- 0
5O1Q_1      ----- 0

ENDOT1      ITDYVLWLTDNKVRPWGNAKDQIKQSYGTGFKIHENKPSTVPPKGGWIAVFTSGSYEQWGH  117
4CSH_1      ITDYVLWLTDNKVRTWGNADQIKQSYGTGFKIHENKPSTVPPKGGWIAVFTSGSYEQWGH  117
4CT3_1      ITDYVLWLTDNKVRTWGNADQIKQSYGTGFKIHENKPSTVPPKGGWIAVFTSGSYEQWGH  117
4OLK_1      ITDYVLWLTDNKVRTWGNADQIKQSYGTGFKIHENKPSTVPPKGGWIAVFTSGSYEQWGH  120
2MK5_1      ----- 0
5O1Q_1      ----- 0

ENDOT1      IGIVYDFGNTSTFTILEQNWNGYANKKPTKRVDNYYGLTHFIEIPVKAGTTVKKETAKKS  177
4CSH_1      IGIVYDGGNTSTFTILEQNWNGYANKKPTKRVDNYYGLTHFIEIPVKA-----  165
4CT3_1      IGIVYDGGNTSTFTILEQNWNGYANKKPTKRVDNYYGLTHFIEIPVKA-----  165
4OLK_1      IGIVYDGGNTSTFTILEQNWNGYANKKPTKRVDNYYGLTHFIEIPVKA-----  168
2MK5_1      -----SNAKN-----YMDKG-TSSSTVVKDGKTS  24
5O1Q_1      ----- 0

ENDOT1      ASTPATRPVTGSWKKNQYGTWYKPENATFVNGNQPIVTRIGSPFLNAPVGGNLPAGATIV  237
4CSH_1      ----- 165
4CT3_1      ----- 165
4OLK_1      ----- 168
2MK5_1      ASTPATRPVTGSWKKNQYGTWYKPENATFVNGNQPIVTRIGSPFLNAPVGGNLPAGATIV  84
5O1Q_1      -EPATRPVTGSWKKNQYGTWYKPENATFVNGNQPIVTRIGSPFLNAPVGGNLPAGATIV  59

ENDOT1      YDEVCIQAGHIWIGYNAYNGNRVYCPVRTCQGVPPNQIPGVAWGVEFK  284
4CSH_1      ----- 165
4CT3_1      ----- 165
4OLK_1      ----- 168
2MK5_1      YDEVCIQAGHIWIGYNAYNGNRVYCPVRTCQGVPPNHIPGVAWGVEFK  131
5O1Q_1      YDEVCIQAGHIWIGYNAYNGNRVYCPVRTCQGVPPNQIPGVAWGVEFK  106

```

Srovnání sekvencí provedeno na serveru: Clustal Omega < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI. Mutace jsou označeny žlutě.

Příloha 6: Run protocol – lysostafin.

Time Table		
Column	Function	Parameter
0.00	Composition Major Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
0.00	Composition Minor Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
0.00	Flowrate Major Pump	5.00 ml/min Constant Flow
0.00	Flowrate Minor Pump	0.00 ml/min Constant Flow
0.00	Valve Position	Buffer Selection = MilliQ water
0.00	Valve Position	Pump Head A = A1
0.00	Valve Position	Pump Head B = Elution buffer
0.00	Valve Position	Injection valve = Load
0.00	Valve Position	Fraction Collector valve = Waste
0.00	UV Lamp	UV Lamp = ON
0.00	Threshold	Length = 57.98 , Value = 5.00 Bar Data Source = Pressure <b>Over Event = PurityChrom Hold current run</b>
0.00	Threshold	Length = 57.98 , Value = ON / OFF Data Source = Aircensor Pumphead A Over Event = PurityChrom Hold current run <b>Over Event = PurityChrom Acoustic Signal</b>
0.00	Threshold	Length = 57.98 , Value = ON / OFF Data Source = Aircensor Pumphead B Over Event = PurityChrom Hold current run <b>Over Event = PurityChrom Acoustic Signal</b>
0.00	UV Wavelength	Wavelength1 = 280.0 nm
0.00	Fraction Limiter	Limit = 1.50 ml
0.00	Collector	Step to Position 1
5.00	Valve Position	Buffer Selection = Loading buffer
9.00	Threshold	Length = 7.99 , Value = ON / OFF Data Source = Aircensor Sample pump <b>Over Event = PurityChromJump to next Line</b>
9.00	UV Autozero	-
9.00	Start Chromatogram	Channel 1,P,F ( 500 ms SliceWidth )
9.90	Flowrate Major Pump	3.00 ml/min Constant Flow
9.95	Valve Position	Injection valve = Inject
10.00	Flowrate Minor Pump	3.00 ml/min Constant Flow
17.00	Valve Position	Injection valve = Load
17.02	Flowrate Major Pump	5.00 ml/min Constant Flow
17.20	Flowrate Minor Pump	0.00 ml/min Constant Flow
26.00	Composition Major Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
26.00	Fraction Limiter	Limit Variable Value (Frac [ml]) = 1.50 ml
26.01	Composition Major Pump	A = 90.0 % , B = 10.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
33.00	Composition Major Pump	A = 90.0 % , B = 10.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
33.01	Composition Major Pump	A = 0.0 % , B = 100.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
33.02	Valve Position	Fraction Collector valve = Fraction

### Time Table

Column	Function	Parameter
41.00	Composition Major Pump	A = 0.0 % , B = 100.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
41.01	Composition Major Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
42.00	UV Lamp	UV Lamp = OFF
42.00	Valve Position	Fraction Collector valve = Waste
42.00	Stop Chromatogram	All started Channels
42.02	Collector	Home
46.00	Valve Position	Buffer Selection = MilliQ water
51.00	Valve Position	Buffer Selection = 20% EtOH
53.97	Stop all	-

### Time Table

Column	Function	Parameter
0.00	Composition Major Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
0.00	Composition Minor Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
0.00	Flowrate Major Pump	3.00 ml/min Constant Flow
0.00	Flowrate Minor Pump	6.00 ml/min Constant Flow
0.00	Threshold	Length = 9.05 , Value = ON / OFF Data Source = Airsensor Pumphead A Over Event = PurityChrom Hold current run <b>Over Event = PurityChrom Acoustic Signal</b>
0.00	Threshold	Length = 9.05 , Value = ON / OFF Data Source = Airsensor Pumphead B Over Event = PurityChrom Hold current run <b>Over Event = PurityChrom Acoustic Signal</b>
0.00	Threshold	Length = 9.05 , Value = 1.80 Bar Data Source = Pressure Major Pump Over Event = PurityChrom Hold current run <b>Over Event = PurityChrom Acoustic Signal</b>
0.00	Threshold	Length = 9.05 , Value = 1.80 Bar Data Source = Pressure Minor Pump Over Event = PurityChrom Hold current run <b>Over Event = PurityChrom Acoustic Signal</b>
0.00	Valve Position	Buffer Selection = MilliQ water
0.00	Valve Position	Pump HeadA = A1
0.00	Valve Position	Pump HeadB = Elution buffer
0.00	Valve Position	Fraction Collector valve = Waste
0.00	Valve Position	Injection valve = Load
0.00	Collector	Step to Position 1
0.00	Fraction Limiter	Limit Variable Value (Frac[m]) = 1.50 ml
0.00	Start Chromatogram	Channel 1,2,P,F ( 500 ms SliceWidth)
0.05	Composition Major Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
0.05	Flowrate Major Pump	6.00 ml/min Constant Flow
1.00	Valve Position	Buffer Selection = Loading buffer
1.00	Flowrate Major Pump	5.00 ml/min Constant Flow
2.00	UV Range	280
2.00	UV Lamp	UV Lamp = ON
2.95	UV Autzero	-
2.95	Flowrate Major Pump	3.00 ml/min Constant Flow
2.98	Valve Position	Injection valve = Inject
3.00	Flowrate Minor Pump	3.00 ml/min Constant Flow



### Time Table

Column	Function	Parameter
3.00	Threshold	Length = 0.24 , Value = ON / OFF Data Source = Airsensor Sample pump <b>Over Event = PurityChromJump to next Line</b>
3.25	Flowrate Minor Pump	0.00 ml/min Constant Flow
3.25	Valve Position	Injection valve = Load
3.27	Valve Position	Fraction Collector valve = Fraction
3.30	Flowrate Major Pump	5.00 ml/min Constant Flow
3.70	Valve Position	Fraction Collector valve = Waste
4.05	Valve Position	Buffer Selection = MilliQ water
4.05	UV Lamp	UV Lamp = OFF
6.05	Valve Position	Buffer Selection = 20% EtOH
6.10	Flowrate Major Pump	3.00 ml/min Constant Flow
7.55	Stop Chromatogram	All started Channels
7.55	Stop all	-



Příloha 7: Run protocol – endolysin.

Run Protocol		
Time	Event	
11:51:09	<b>Time Control Start (Manual Control)</b>	
11:51:13	Composition Major Pump = 100.0 , 0.0 , 0.0 , 0.0	
11:51:13	Composition Minor Pump = 100.0 , 0.0 , 0.0 , 0.0	
11:51:13	Flowrate Major Pump = 5.00 ml/min Constant Flow	
11:51:13	Flowrate Minor Pump = 0.00 ml/min Constant Flow	
11:51:13	Buffer Selection = MilliQ water (Timetable Function)	
11:51:13	Pump Head A = A1 (Timetable Function)	
11:51:13	Pump Head B = Elution buffer (Timetable Function)	
11:51:13	Injection valve = Load (Timetable Function)	
11:51:13	Fraction Collector valve = Waste (Timetable Function)	
11:51:13	UV Lamp = ON	
11:51:13	Wavelength 1 = 280 nm	
11:51:13	Limiter Value = 1.50 ml	
11:51:13	Collector Position 1	
11:56:12	Buffer Selection = Loading buffer (Timetable Function)	
12:00:12	Autozero	
12:00:12	Start Chromatogram Channel UV,Pressure Channel,Flowrate Channel , 500 ms	
12:01:06	Flowrate Major Pump = 3.00 ml/min Constant Flow	
12:01:11	Injection valve = Inject (Timetable Function)	
12:01:16	Flowrate Minor Pump = 3.00 ml/min Constant Flow	
12:19:36	Injection valve = Load (Timetable Function)	
12:19:38	Flowrate Major Pump = 5.00 ml/min Constant Flow	
12:19:49	Flowrate Minor Pump = 0.00 ml/min Constant Flow	
12:28:37	Composition Major Pump = 100.0 , 0.0 , 0.0 , 0.0	
12:28:37	Limiter Value = 1.50 ml	
12:28:38	Composition Major Pump = 90.0 , 10.0 , 0.0 , 0.0	
12:35:37	Composition Major Pump = 90.0 , 10.0 , 0.0 , 0.0	
12:35:38	Composition Major Pump = 0.0 , 100.0 , 0.0 , 0.0	
12:35:38	Fraction Collector valve = Fraction (Timetable Function)	
12:39:36	<b>Fraction Collector valve = Waste (Manual Control)</b>	
12:41:29	<b>Run Stop (Manual Control)</b>	
Time Table		
Column	Function	Parameter
0.00	Composition Major Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
0.00	Composition Minor Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
0.00	Flowrate Major Pump	5.00 ml/min Constant Flow
0.00	Flowrate Minor Pump	0.00 ml/min Constant Flow
0.00	Valve Position	Buffer Selection = MilliQ water
0.00	Valve Position	Pump Head A = A1
0.00	Valve Position	Pump Head B = Elution buffer

Time Table		
Column	Function	Parameter
0.00	Valve Position	Injection valve = Load
0.00	Valve Position	Fraction Collector valve = Waste
0.00	UV Lamp	UV Lamp = ON
0.00	Threshold	Length = 61.98 , Value = 5.00 Bar Data Source = Pressure <b>Over Event = PurityChrom Hold current run</b>
0.00	Threshold	Length = 61.98 , Value = ON / OFF Data Source = Aircensor Pumphead A Over Event = PurityChrom Hold current run <b>Over Event = PurityChrom Acoustic Signal</b>
0.00	Threshold	Length = 61.98 , Value = ON / OFF Data Source = Aircensor Pumphead B Over Event = PurityChrom Hold current run <b>Over Event = PurityChrom Acoustic Signal</b>
0.00	UV Wavelength	Wavelength1 = 250.0 nm
0.00	Fraction Limiter	Limit = 1.50 ml
0.00	Collector	Step to Position 1
5.00	Valve Position	Buffer Selection = Loading buffer
9.00	Threshold	Length = 11.99 , Value = ON / OFF Data Source = Aircensor Sample pump <b>Over Event = PurityChromJump to next Line</b>
9.00	UV Autozero	-
9.00	Start Chromatogram	Channel 1,P,F ( 500 ms SliceWidth )
9.90	Flowrate Major Pump	3.00 ml/min Constant Flow
9.95	Valve Position	Injection valve = Inject
10.00	Flowrate Minor Pump	3.00 ml/min Constant Flow
21.00	Valve Position	Injection valve = Load
21.02	Flowrate Major Pump	5.00 ml/min Constant Flow
21.20	Flowrate Minor Pump	0.00 ml/min Constant Flow
30.00	Composition Major Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
30.00	Fraction Limiter	Limit Variable Value (Frac [ml]) = 1.50 ml
30.01	Composition Major Pump	A = 90.0 % , B = 10.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
37.00	Composition Major Pump	A = 90.0 % , B = 10.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
37.01	Composition Major Pump	A = 0.0 % , B = 100.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
37.02	Valve Position	Fraction Collector valve = Fraction
45.00	Composition Major Pump	A = 0.0 % , B = 100.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
45.01	Composition Major Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
46.00	UV Lamp	UV Lamp = OFF
46.00	Valve Position	Fraction Collector valve = Waste
46.00	Stop Chromatogram	All started Channels
46.02	Collector	Home
50.00	Valve Position	Buffer Selection = MilliQ water
55.00	Valve Position	Buffer Selection = 20% EtOH
57.97	Stop all	-

Run Protocol		
Time	Event	
15:51:44	<b>Time Control Continue (Manual Control)</b>	
15:51:50	Fraction Collector valve = Fraction (Timetable Function)	
15:52:09	Flowrate Major Pump = 5.00 ml/min Constant Flow	
15:56:24	Fraction Collector valve = Waste (Timetable Function)	
15:59:19	Time Control Hold	
15:59:28	<b>Time Control Continue (Manual Control)</b>	
15:59:57	<b>Run Stop (Manual Control)</b>	
Time Table		
Column	Function	Parameter
0.00	Composition Major Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
0.00	Composition Minor Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
0.00	Flowrate Major Pump	3.00 ml/min Constant Flow
0.00	Flowrate Minor Pump	0.00 ml/min Constant Flow
0.00	Threshold	Length = 9.05 , Value = ON / OFF Data Source = Aircensor Pumphead A Over Event = PurityChrom Hold current run <b>Over Event = PurityChrom Acoustic Signal</b>
0.00	Threshold	Length = 9.05 , Value = ON / OFF Data Source = Aircensor Pumphead B Over Event = PurityChrom Hold current run <b>Over Event = PurityChrom Acoustic Signal</b>
0.00	Threshold	Length = 9.05 , Value = 1.80 Bar Data Source = Pressure Major Pump Over Event = PurityChrom Hold current run <b>Over Event = PurityChrom Acoustic Signal</b>
0.00	Threshold	Length = 9.05 , Value = 1.80 Bar Data Source = Pressure Minor Pump Over Event = PurityChrom Hold current run <b>Over Event = PurityChrom Acoustic Signal</b>
0.00	Valve Position	Buffer Selection = MilliQ water
0.00	Valve Position	Pump Head A = A1
0.00	Valve Position	Pump Head B = Elution buffer
0.00	Valve Position	Fraction Collector valve = Waste
0.00	Valve Position	Injection valve = Load
0.00	Collector	Step to Position 1
0.00	Fraction Limiter	Limit Variable Value (Frac[ml]) = 1.50 ml
0.00	Start Chromatogram	Channel 1,2,P,F ( 500 ms SliceWidth )
1.00	Valve Position	Buffer Selection = Loading buffer
1.00	Flowrate Major Pump	5.00 ml/min Constant Flow
1.02	Composition Major Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %



### Time Table

Column	Function	Parameter
1.02	Flowrate Major Pump	7.00 ml/min Constant Flow
2.00	UV Range	280
2.00	UV Lamp	UV Lamp = ON
2.95	UV Autozero	-
2.95	Flowrate Major Pump	3.00 ml/min Constant Flow
2.98	Valve Position	Injection valve = Inject
3.00	Flowrate Minor Pump	3.00 ml/min Constant Flow
3.00	Threshold	Length = 0.24 , Value = ON / OFF Data Source = Aircensor Sample pump <b>Over Event = PurityChromJump to next Line</b>
3.02	Composition Minor Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
3.02	Flowrate Minor Pump	2.00 ml/min Constant Flow
3.02	Composition Major Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
3.02	Flowrate Major Pump	2.00 ml/min Constant Flow
3.06	Composition Minor Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
3.06	Flowrate Minor Pump	1.50 ml/min Constant Flow
3.06	Composition Major Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
3.06	Flowrate Major Pump	1.50 ml/min Constant Flow
3.25	Flowrate Minor Pump	0.00 ml/min Constant Flow
3.25	Valve Position	Injection valve = Load
3.25	Composition Major Pump	A = 100.0 % , B = 0.0 % , C = 0.0 % , D = 0.0 %
3.25	Flowrate Major Pump	5.00 ml/min Constant Flow
3.27	Valve Position	Fraction Collector valve = Fraction
3.30	Flowrate Major Pump	5.00 ml/min Constant Flow
3.70	Valve Position	Fraction Collector valve = Waste
4.05	Valve Position	Buffer Selection = MilliQ water
4.05	UV Lamp	UV Lamp = OFF
6.05	Valve Position	Buffer Selection = 20% EtOH
6.10	Flowrate Major Pump	3.00 ml/min Constant Flow
7.55	Stop Chromatogram	All started Channels
7.55	Stop all	-