

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2022

Veronika Batková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Afinitní pre-purifikace sideroforů jako specifických
markerů mikrobiální infekce pro MALDI-TOF MS
diagnostiku**

Diplomová práce

Veronika Batková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

Vedoucí práce: prof. MUDr. Milan Raška, PhD

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Veronika Batková

Název práce: Afinitní pre-purifikace sideroforů jako specifických markerů mikrobiální infekce pro MALDI TOF MS diagnostiku

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky

Vedoucí práce: prof. Mgr. MUDr. Milan Raška PhD.

Rok obhajoby práce: 2022

Klíčová slova: siderofory, infekce, Tear lipocalin

Počet stran: 61

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

SOUHRN

V současné době stále neexistuje rychlá, cenově dostupná a jednoduchá metoda, pomocí které by bylo možné stanovit původce mikrobiální infekce u člověka. Ve zdravotnické praxi se momentálně provádí kultivace mikroorganismů, která ale často zabere i několik dnů, a právě čas je u imunokompromitovaných pacientů klíčovým faktorem. Čím dříve se stanoví původce mikrobiální infekce u daného jedince, tím dříve je možné zahájit léčbu s antibiotiky cílenými na daného patogena. Právě siderofory by v budoucnu mohly sloužit jako markery mikrobiálních infekcí. Jedná se o malé molekuly produkované mikroorganismy, jejichž hlavním úkolem je navázat na sebe železo z napadeného organismu a dopravit ho zpět ke svému původci. Existuje velké množství druhů sideroforů, na základě kterých by bylo možné určit konkrétního původce infekce.

Cílem této práce bylo vytvoření a optimalizace protokolu pro pre-purifikaci sideroforů na základě jejich afinity k proteinu Tear lipocalin, pro který jsou siderofory přirozeným ligandem. V rámci této práce byl vyprodukován rekombinantní Tear lipocalin, který byl následně izolován a charakterizován pomocí řady metod. Dále byl optimalizován protokol pro navázání Tear lipocalinu na kolonu s Ni-NTA agarosou, pro potřeby purifikace sideroforů.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Veronika Batková

Title: Affinity pre-purification of siderophores as specific markers of microbial infection for MALDI TOF MS diagnostics

Type of thesis: masters

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: prof. Mgr. MUDr. Milan Raška PhD.

The year of presentation: 2022

Keywords: siderophores, infection, Tear lipocalin

Number of pages: 61

Number of appendices: 0

Language. czech

SUMMARY

Currently, there is still no quick, affordable and simple method to determine the causative agent of a microbial infection in humans. Cultivation of microorganisms is currently carried out in medical practice, but it often takes several days, and time is a key factor in immunocompromised patients. The sooner the causative agent of a microbial infection is determined in a given individual, the sooner it is possible to start treatment with antibiotics targeting the given pathogen. Siderophores could serve as markers of microbial infections in the future. These are small molecules produced by microorganisms, whose main task is to bind iron from the host organism and transport it back to its source. There is a large number of species of siderophores, on the basis of which it would be possible to determine a specific agent of infection.

The aim of this work was to create and optimize a protocol for the pre-purification of siderophores based on their affinity to the Tear lipocalin protein, for which siderophores are a natural ligand. As part of this work, recombinant Tear lipocalin was produced, isolated and characterized using a number of methods. Furthermore, the protocol for binding Tear lipocalin to a column with Ni-NTA agarose was optimized for siderophore purification.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně za pomoci vedoucího práce prof. MUDr. Milana Rašky PhD. a uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne.....

Podpis.....

Poděkování: Chtěla bych poděkovat všem, kteří obětovali svůj čas a pomáhali mi v laboratoři s tímto nelehkým úkolem a svému vedoucímu prof. MUDr. Milanu Raškovi PhD.

1. ÚVOD.....	1
2. CÍLE PRÁCE	3
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	4
3.1. Význam železa v biologických systémech	4
3.2 Charakteristika sideroforů	5
3.3 Využití sideroforů.....	8
3.4 Vybrané infekce.....	10
3.4.1. Aspergilóza.....	10
3.4.2 Kandidóza.....	11
3.4.3 Kryptokokóza	13
3.5 Charakteristika a význam slzného lipocalinu (Tear lipocalin, TL).....	14
3.6 CAS assay.....	16
4. MATERIÁL A METODY.....	17
4.1 Použité chemikálie, soupravy a roztoky	17
4.2 Seznam použitých přístrojů a zařízení	20
4.3 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	21
4.3.1 Produkce rekombinantního proteinu Tear lipocalinu (TL).....	21
4.3.2 Izolace rekombinantního Tear lipocalinu za nativních podmínek.....	23
4.3.3 Charakterizace Tear lipocalinu pomocí barvení Coomassie brilliant blue.....	24
4.3.4 Charakterizace Tear lipocalinu pomocí imunochemické detekce prostřednictvím western blotu.....	25
4.3.5 Stanovení koncentrace izolovaného proteinu	26
4.3.6 Optimalizace navázání Tear lipocalinu přes 6x His Tag na kolonku s Ni-NTA agarozou..	27
4.3.7 Příprava a optimalizace CAS assay	28
5. VÝSLEDKY.....	32
5.1 Restrikční štěpení izolovaného plazmidu TL-pET-28b(+).	32
5.2.1 Separace produktů restrikčního štěpení prostřednictvím elektroforézy v agar. gelu	32
5.3 Izolace rekombinantního Tear lipocalinu za nativních podmínek a jeho charakterizace pomocí barvení Coomassie brilliant blue.	33
5.4 Izolace rekombinantního Tear lipocalinu za nativních podmínek a jeho imunochemická detekce prostřednictvím western blotu.....	35
5.5 Stanovení koncentrace izolovaného proteinu	36
5.6 Optimalizace navázání Tear lipocalinu přes 6x His Tag na kolonku s Ni-NTA agarozou.....	37
5.7 Optimalizace CAS assay	39
6. DISKUZE	44
7. ZÁVĚR.....	47
8. LITERATURA	48

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura sideroforů	6
Obrázek 2: Struktura lipocalinu	14
Obrázek 3: Schéma vektoru pET-28b(+)	21
Obrázek 4: Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (New England BioLabs)	23
Obrázek 5: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher).....	24
Obrázek 6: Výsledek restričního štěpení.	33
Obrázek 7: Výsledek elektroforetická separace vzorků z procesu izolace rekombinantního proteinu TL obarvený Coomassie brilliant blue.....	34
Obrázek 8: Výsledek elektroforetická separace vzorků z procesu izolace rekombinantního proteinu TL obarvený Coomassie brilliant blue.....	35
Obrázek 9: Imunochemická detekce izolovaného proteinu TL.	36
Obrázek 10: Výsledek elektroforetické separace BSA kalibrační řady a izolovaného TL o různém množství.	37
Obrázek 11: Imunochemická detekce proteinu TL ve frakcích z optimalizace protokolu pro navázání TL na kolonku s Ni-NTA agarozou.....	39
Obrázek 12: Testování interakce všech použitých roztoků a CAS assaye.	40
Obrázek 13: Frakce získané při optimalizaci protokolu pro pre-purifikaci sideroforů.	41
Obrázek 14: Frakce získané při optimalizaci protokolu pro pre-purifikaci sideroforů, u kterých byla očekávaná přítomnost sideroforů.....	43
Obrázek 15: Frakce získané při optimalizaci protokolu pro pre-purifikaci sideroforů, u kterých byla očekávaná přítomnost sideroforů.....	43

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení reakční směsi pro restriční štěpení.....	22
Tabulka 2: Roztoky pro přípravu dělicího gelu.....	25
Tabulka 3: Roztoky pro přípravu zaostřovacího gelu.....	25
Tabulka 4: Optimalizace navázání Tear lipocalinu přes 6x His Tag na kolonku s Ni-NTA agarozou.	27
Tabulka 5: Velikost fragmentů vzniklých při restričním štěpení vybranými enzymy.....	32
Tabulka 6: Optimalizace navázání Tear lipocalinu přes 6x His Tag na kolonku s Ni-NTA agarozou.	38
Tabulka 7: Seznam vzorků získaných při optimalizaci CAS assaye, u kterých byla očekávána přítomnost sideroforů (pozitivní reakce).	42

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Kalibrační křivka BSA.....	26
------------------------------------	----

1. ÚVOD

U onkologických, imunokompromitovaných pacientů nebo pacientů léčících se se systémovými onemocněními se často objevují komplikace související s vážností orgánového postižení. Tyto komplikace vznikají v důsledku dlouhodobého orgánového poškození či z nežádoucích účinků dlouhodobé imunosupresivní léčby, často jsou to velmi závažné, život ohrožující stavy se špatnou prognózou např. sepse, plicní anebo renální postižení. Důsledkem dlouhodobé imunosupresivní terapie často vznikají těžké septické stavy vyvolané oportunními mikroorganismy, které se v posledních letech stávají dokonce nejčastější příčinou úmrtí u nemocných pacientů. Klinické příznaky sepse jsou navíc velmi heterogenní a průběh u jednotlivých pacientů je ovlivněn řadou faktorů, jako je pohlaví, věk, medikace atd. (Svobodová, 2012).

Mezi významné příčiny úmrtí na jednotkách intenzivní péče patří také syndrom multiorgánového selhání (Multiple organ dysfunction syndrome, MODS). K rozvoji MODS obvykle dochází při těžkých infekcích, u šokových stavů, polytraumat, masivní hemoragie nebo při kombinaci těchto stavů. Kritickým bodem při zvládnutí MODS je mimo jiné kontrola infekcí a podání adekvátní antibiotické léčby v co nejkratší době (Chvojka and Matějovič, 2010). U všech pacientů s podezřením na infekci odebrává lékař k identifikaci původce onemocnění vzorky krve nebo jiné tělní tekutiny, jako je moč nebo mozkomíšní mok k laboratornímu testování. Pro definitivní identifikaci patogenu a testování antimikrobiální citlivosti je však obvykle zapotřebí několik dní. Bylo dokázáno, že podání vhodné antibiotické léčby během prvních čtyř hodin od nástupu sepse snižuje celkový čas hospitalizace o dva dny, snižuje absolutní úmrtnost o 24 % a nakonec vede k lepším zdravotním výsledkům u pacientů. Každá hodina zpoždění léčby souvisela se snížením šance na přežití o 7,6 % (Chun *et al.*, 2015).

Hlavní metodou prvotního zjišťování přítomnosti infekčního agens v krevním řečišti jsou primární kultury. Krevní vzorky se kultivují ve vhodných médiích. Kultivace se ale často provádí přes noc a může trvat až 48-72 h.

Molekulární diagnostické testy pro identifikaci patogenů sepse zahrnují fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH), metody, které využívají PCR amplifikaci s detekcí v reálném čase nebo „end point“ detekci a metody hmotnostní spektrometrie (MS). Molekulární diagnostické metody mohou zkrátit dobu nutnou k získání výsledku, zejména pokud lze test provést přímo z plné krve, bez nutnosti kultivace krve. To je však technicky náročné kvůli nízké koncentraci patogenu či jeho fragmentů v krvi. Technologie fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) může teoreticky zajistit rychlou identifikaci. Testy FISH jsou však náročné na provedení a u každého vzorku musí být provedeno několik testů, což prodlužuje celkovou dobu do získání výsledku (Reimer, Wilson, *et Weinstein*, 1997; Mühl *et al.*, 2010; Chun *et al.*, 2015).

Jednou z perspektivních metod detekce patogenů je MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI-TOF MS). Při identifikaci patogenu využívá extrakci

proteinů patogenu v kyselině, které jsou poté analyzovány MS za účelem vytvoření „hromadného fingerprintu“. Identifikace patogenu (na úrovni druhu nebo poddruhu) je založena na porovnávání hmotnostních spekter MS určených ze vzorku s hmotnostními spektry obsaženými v referenční knihovně. Proteomický fingerprint pomocí MALDI-TOF MS významně urychluje identifikaci patogenu, a to o 23–35 hodin ve srovnání s tradičními metodami založenými na kultivaci. Stále jsou však přítomny komplikace související s identifikací určitých patogenů bez rozlišitelného jedinečného fingerprintu (Chun *et al.*, 2015; (Hrabák, Chudáčková, *et* Walková, 2013). Jako potenciální biomarkery infekčních chorob v případě, kdy se nedaří provést fingerprint mohou být využity mikrobiální siderofory, resp. jejich hmotnostní spektrometrická analýza (Pluháček *et al.*, 2016). Siderofory jsou nízkomolekulární sloučeniny produkované téměř všemi mikroorganismy a jejich hlavní úlohou je vychytávání železa z prostředí (Luckey *et al.*, 1972).

V budoucnu by siderofory izolované ze séra nebo z jiných tělesných tekutin mohly být využity jako markery mikrobiální infekce pro rychlou detekci původce infekce u postiženého pacienta. Identifikace mikroorganismů zodpovědných za infekci by tak proběhla rychleji než u metod využívaných v současnosti.

2. CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše vztahující se k tématu diplomové práce.
2. Zpracování teoretické části.
3. Zvládnutí používaných metod.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuze.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Význam železa v biologických systémech

Většina organismů vyžaduje železo jako základní prvek. Ionty železa jsou esenciální součástí mnoha enzymů v buňce a jsou proto zcela nezbytné pro celou řadu metabolických drah včetně syntézy DNA nebo produkce energie. Více než 100 enzymů působících v primárním a sekundárním metabolismu obsahuje kofaktory jejichž součástí je železo. Kromě toho několik transkripčních a posttranskripčních regulátorů interaguje se železem za účelem detekce jeho intracelulární hladiny nebo aktuálního stavu oxidačního stresu. To umožňuje účinně regulovat expresi širokého spektra genů zapojených hlavně do získávání železa (Miethke and Marahiel, 2007).

V zemské kůře není železitý iont pro mikroorganismy snadno dostupný, i když je čtvrtým nejhojnějším prvkem. Je to proto, že železo při fyziologickém pH a aerobních podmínkách oxiduje na nerozpustné polymery oxyhydroxidu (Paul *et* Dubey, 2014). Pro mnoho mikroorganismů, mezi nimi i pro mnohé významné lidské a zvířecí patogeny, je dostupnost volného železa v hostitelském organismu omezena. Např. v lidském séru udržuje transportní protein železa transferin koncentraci železitého iontu v rozmezí 10^{-24} M. Při těchto koncentracích je železo pro patogeny nedostupné (Patel *et al.*, 2018). Evoluce zvýhodnila mikroby, u kterých se vyvinuly nástroje pro vysoce selektivní příjem železa přímými nebo nepřímými mechanismy.

Přímé mechanismy zahrnují absorpci železa z různých zdrojů, jako je laktoferin, transferin, feritin, hem nebo hemoproteiny. Nevýhodou přímého vychytávání je požadavek specifického receptoru pro každý zdroj (nosič) železa. Strategie získávání železa nepřímo, např. prostřednictvím specializovaných proteinů jsou velmi rozmanité. Jedna z nich, která se uplatňuje u gramnegativních bakterií, využívá specializované proteiny vylučované mikrobem do okolí zvané hemofory. Systémy hemoforů jsou však omezeny na zdroje hemového železa, což je činí minimálně užitečnými v podmínkách nízké dostupnosti hemu. Naproti tomu nepřímá strategie je schopná využít všechny dostupné zdroje železa nezávisle na jejich povaze, což z ní činí nejrozšířenější a nejúspěšnější mechanismus získávání železa v mikrobiálním světě. Analogicky k systému hemoforů je založen na kyvadlovém mechanismu, který však jako chelátory železa využívá sloučeniny zvané siderofory. Dráhy získávání železa závislé na sideroforech lze nalézt mezi prokaryotickými a eukaryotickými mikroby, a dokonce i u vyšších rostlin (Miethke *et* Marahiel, 2007).

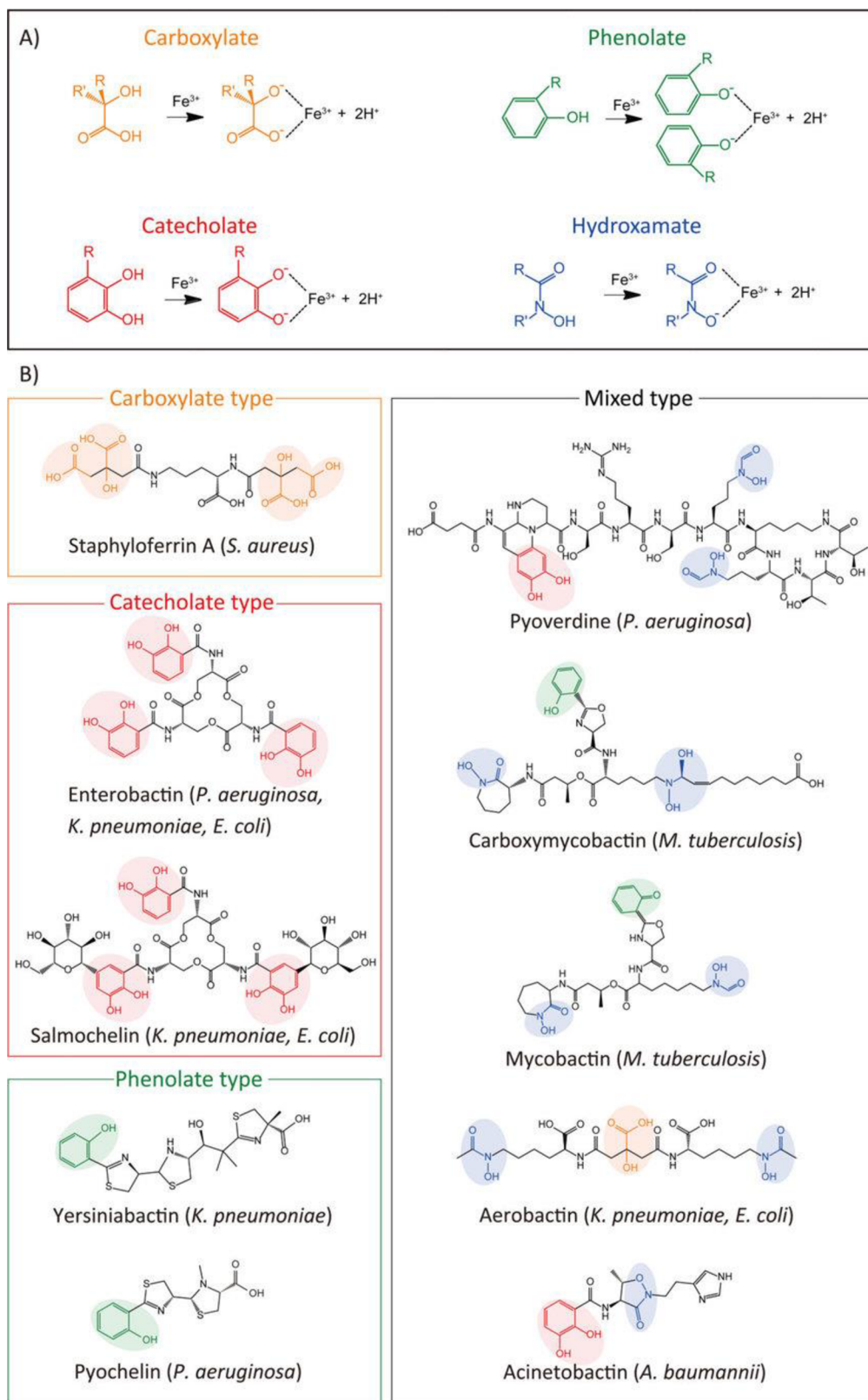
3.2 Charakteristika sideroforů

Siderofory jsou definovány jako nízkomolekulární mikrobiální sloučeniny o molekulové hmotnosti 200–2000 Da s vysokou afinitou k železu. Siderofory obsahují postranní řetězce a funkční skupiny, které mohou poskytnout vysoce afinitní sadu ligandů pro koordinaci železitých iontů, mohou je tak chelatovat z prostředí hostitele a tvořit komplex, který je pak transportován do mikrobiální buňky (Crosa *et* Walsh, 2002; Patel *et al.*, 2018).

Ačkoli je jejich hlavní funkcí získávání železa z nerozpustných hydroxidů nebo ze železa adsorbovaného na pevné povrchy, mohou také extrahovat železo z různých jiných rozpustných a nerozpustných sloučenin železa, jako je citrát železitý, fosforečnan železitý, feritin nebo železo vázané na cukry, rostlinné flavonové pigmenty a glykosidy nebo dokonce z umělých chelátorů, jako je EDTA a nitrilotriacetát (Winkelmann, 2002). Mnohé také tvoří relativně stabilní komplexy s mědí, hliníkem, molybdenem a některými transuranovými prvky (Hider, 2007).

Kromě své schopnosti solubilizovat železo a fungovat jako externí nosiče železa vykazují siderofory strukturní a konformační specifika, aby byly schopny interagovat s membránovými receptory nebo transportéry (Winkelman, 2002). Jakmile jsou Fe^{3+} imobilizovány a zachyceny molekulou sideroforu, jsou přístupné pro buněčnou absorpci (Miethke *et* Marahiel, 2007). Transport přes vnější membránu u gramnegativních bakterií probíhá za pomoci specifických receptorů pro siderofory a vitamin B12. Translokaci těchto substrátů přes vnější membránu zajišťují mimo jiné i proteiny TonB, ExbB, ExbD zakotvené v cytoplazmatické membráně. Receptory sideroforů dále vykazují vyšší substrátovou specifitu než proteiny systémů ABC zprostředkujících další přenos sideroforů do cytoplazmy. Přes cytoplazmatickou membránu se železo translokuje buď ve formě železitého iontu nebo v komplexu se sideroforem nebo hemem. Receptory vnější membrány a také proteiny komplexu Ton nejsou přítomny u grampozitivních bakterií, mykobakterií a u mykoplazmat. U těchto mikrobů jsou proteiny vázající substrát ve formě lipoproteinů vázaných na cytoplazmatickou membránu (Köster, 2001).

Obecně jsou siderofory klasifikovány na základě koordinačních skupin, které chelatují Fe^{3+} . Nejběžnějšími koordinačními skupinami jsou katecholáty, hydroxamáty a karboxyláty (viz obr. č. 1). Některé siderofory jsou klasifikovány jako „smíšené ligandy“, které mají koordinační skupiny, které spadají do chemicky odlišných tříd (Sah *et* Singh, 2015).



Obrázek 1: Struktura sideroforů (Legenda: A. Čtyři skupiny udělují sideroforům schopnost vázat železo: karboxylát (oranžový), fenolát (zelený), catecholát (červený) a hydroxamát (modrý), B. Struktury sideroforů vybraných nozokomiálních patogenů, siderofory smíšeného typu obsahují více než jeden typ skupiny vázající železo (Wilson *et al.*, 2016)).

Hydroxamátový typ sideroforů zahrnuje nejběžnější skupinu sideroforů vyskytujících se v přírodě. Tyto siderofory jsou produkovány hlavně bakteriemi a houbami (Saha *et al.*, 2016). Hydroxamátové siderofory se dělí do čtyř podskupin – rodotorulová kyselina, fusarininy, koprogeny a ferrichromy (Ali *et Vidhale*, 2016). Většina hydroxamátových skupin sestává z C(=O)N(OH)R, kde R je buď aminokyselina, nebo její derivát. Dvě molekuly kyslíku pocházející z každé skupiny hydroxamátu tvoří bidentátní ligand se železem. Každý siderofor je tedy schopen tvořit hexadentátový oktaedrický komplex s Fe³⁺. Hydroxamáty vážou železité ionty při vazebných konstantách v rozmezí 10²² až 10³² M⁻¹. Tato silná vazba chrání komplexy před hydrolyzou a enzymatickou degradací (Saha *et al.*, 2016). Mezi mikroorganismy, které produkují hydroxamátové siderofory patří *Pseudomonas*, *Neisseria gonorrhoeae* a *Neisseria meningitidis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Neurospora crassa* (Sajeed *et Vidhale*, 2013; Renshaw *et al.*, 2002).

Katecholátový typ sideroforů je většinou produkován bakteriemi. Každá katecholátová skupina dodává dva atomy kyslíku pro vazbu se železem. Některé bakterie mohou produkovat buď samotný katecholátový siderofor nebo smíšené siderofory, kde je jedním z členů katecholát. Například bakterie *Erwinia carotovora* mohou produkovat pouze katecholátový siderofor, zatímco někteří členové rodu *Pseudomonas* produkují smíšený siderofor sestávající ze dvou katecholátů a hydroxamátů (Saha *et al.*, 2016). Další katecholátové siderofory jsou produkovány např. *Agrobacterium tumefaciens* (agrobactin) nebo *Paracoccus denitrificans* (parobactin) (Sajeed *et Vidhale*, 2013).

Karboxylátový typ sideroforů je produkován většinou bakteriemi rodu *Rhizobium* a *Staphylococcus* a houbami řádu *Mucorales*. Tento typ sideroforu se váže na železo prostřednictvím karboxylových a hydroxylových skupin. Rhizobaktin, produkováný kmenem *Rhizobium meliloti* DM4, je nejlépe charakterizovaným karboxylátovým sideroforem, který má aminopolykarboxylovou kyselinu sestávající z ethylen diamin dikarboxylových a hydroxykarboxylových skupin, které působí jako skupiny chelatující železo. Staphyloferrin A, vysoce hydrofilní siderofor karboxylátového typu, byl izolován ze *Staphylococcus hyicus* DSM 20459 za podmínek se sníženým obsahem železa v prostředí (Saha *et al.*, 2016).

Syntéza sideroforů je do značné míry nezávislá na primárním metabolismu. Biosyntetické dráhy sideroforů jsou úzce spojeny s aerobním metabolismem zahrnujícím molekulární kyslík aktivovaný mono-, di- a N-oxygenázami a s použitím kyselin pocházejících z konečné oxidace citrátového cyklu, jako je citrát, sukcinát a acetát (Winkelman, 2002). Produkce sideroforů je regulována na transkripční úrovni pomocí proteinu Fur (ferric uptake regulator), který působí jako klasický represor vyžadující Fe²⁺ jako aktivátor. Když je koncentrace železa vysoká, vytváří Fur komplex s Fe²⁺ a naváže se do oblasti promotoru, kde zabraňuje transkripci genů zodpovědných za tvorbu sideroforů. Za podmínek nedostatku železa jsou Fe²⁺ odstraněny z Fur komplexu a dochází k expresi zmiňovaných genů (Sah *et Singh*, 2015). Fur protein dále přímo

nebo nepřímo řídí expresi enzymů, které chrání před poškozením ROS. K aktivaci exprese Fur proteinu může dojít třemi odlišnými mechanismy (1) aktivace nepřímo prostřednictvím malých RNA, (2) aktivace vazbou Fur proteinu na cis regulační prvky, které stimulují zpětné vychytávání holoenzymu RNA polymerázy a (3) fungováním Fur proteinu jako antirepresor prostřednictvím odstranění nebo blokování navázání represoru transkripce na DNA (Troxell *et* Hassan, 2013).

Fur protein je rovněž důležitým faktorem při expresi některých proteinů, které se účastní Citrátového cyklu. Narušení Citrátového cyklu u Fur mutantů může hrát důležitou roli při regulaci virulence, např. u *Vibrio cholerae* nebo *Staphylococcus epidermis* dochází k modifikaci jejich virulence (Troxell *et* Hassan 2013).

Biosyntéza sideroforů je katalyzovaná syntetázy neribosomálních peptidů (NRPS). V závislosti na chemické povaze sideroforů dochází k jejich biosyntéze různými mechanismy. Obecně lze biosyntetické dráhy rozlišit jako závislé nebo nezávislé na NRPS (Miethke *et* Marahiel, 2007). NRPS jsou multimodulární enzymy, které produkují peptidové produkty konkrétní sekvence bez RNA templátu (Crosa *et* Walsh, 2002) a aktivují a sestavují širokou škálu aminokyselin, karboxy a hydroxykyselin, což vede k vysoké strukturální variabilitě peptidových produktů. U většiny bakterií jsou geny kódující NRPS a enzymy pro syntézu arylkyselin přímo regulovány prostřednictvím Fur represoru.

Biosyntéza sideroforů nezávislá na NRPS se uplatňuje u hydroxamátových a karboxylátových sideroforů. Syntéza sideroforů patřících do těchto dvou hlavních tříd je zprostředkována enzymy jako jsou monooxygenázy, dekarboxylázy, aminotransferázy, acetyltransferázy, aminokyselinové ligázy a aldolázy. Siderofory syntetizované cestou nezávislou na NRPS se nacházejí jako faktory virulence u několika patogenů, např. aerobaktin v enterálních bakteriích, alcaligin u *B. pertussis* a *B. bronchiseptica*, stafylobaktin u *Staphylococcus aureus* a petrobactin (dříve antrachelin) u *Bacillus anthracis* (Miethke *et* Marahiel, 2007).

3.3 Využití sideroforů

Schopnost bakterií získat rezistenci vůči antimikrobiálním látkám představuje hlavní hrozbu při léčbě bakteriálních infekcí. Jednou z možných metod, jak obejít odolnost vůči lékům zprostředkovanou snížením permeability je strategie „trojského koně“ (Saha *et al.*, 2016). Tato strategie využívá siderofory jako mediátory k usnadnění buněčného příjmu antibiotik. Interakce antibiotika se siderofory vede k tvorbě konjugátů siderofor - antibiotikum známých jako sideromyciny. Sideroforová část tohoto konjugátu je schopna zachytávat železo a je rozpoznávána buněčnými absorpčními systémy železo-siderofor, zatímco druhá část konjugátu nese antibiotickou aktivitu, která využívá sideroforu jako trojského koně a zprostředkovává transport léčiva zprostředkovaného transportem železa (Nagoba *et* Vedpathak, 2011). Jakmile je aktivní část komplexu v buňce, je odštěpena od antibiotika. Například sulfonamidy byly připojeny

k ferricrocinu a ferrioxaminu B a bylo prokázáno, že výsledné konjugáty inhibují růst *Staphylococcus aureus* (Hider 2007).

Vzhledem k vysokému terapeutickému potenciálu komplexů siderofor – lék, roste zájem i o související terapie. Podobné strategie založené na mechanismu chelatace železa mohou být navíc použity v klinických a farmaceutických aplikacích oxidů železa. Např. se jedná o různé formy nosičů léčiv na bázi magnetických nanočástic (NP) – jako jsou ultrakrátké para-magnetické oxidy železa a super-para-magnetické NP. Speciálně značené magnetické částice poskytují pohodlný nástroj pro neinvazivní studium biologických procesů, jako je zobrazování nádorů a terapie pomocí magnetické rezonance. Předklinické hodnocení bezpečnosti ale ukázalo, že nosiče NP na bázi železa by měly být používány s opatrností u pacientů s poruchami spojenými s nadbytkem železa v organismu. Po jejich aplikaci bylo zjištěno, že se zvyšuje hladina železa v séru (Górska, Sloderbach, et Marszałł, 2014).

Tento fakt by komplikoval léčbu u pacientů, kteří vyžadují transfuze plné krve např. při léčbě thalasemie, srpkovité anemie a některých dalších anemií. Jelikož neexistuje žádný specifický fyziologický mechanismus pro vylučování železa u člověka, vede transfuzní léčba ke stálému hromadění železa v organismu, které způsobuje nemoci jako hemochromatóza, hemosideróza nebo otrava železem, které vyžadují odstranění železa z těla, zejména z jater (Chua *et al.*, 2003). Hemochromatóza je porucha, při které dochází k postupnému zvyšování obsahu železa v těle a způsobuje ukládání železa v játrech, srdci nebo slinivce břišní. Je to nejběžnější forma onemocnění z nadbytku železa v organismu, které se vyskytuje jako primární hemochromatóza nebo jako metabolická porucha. Způsobuje, že tělo vstřebává a ukládá příliš mnoho železa z gastrointestinálního traktu. Hemosideróza je sekundární hemochromatóza způsobená nadměrnými transfuzemi krve. Sekundární hemochromatóza se vyskytuje v důsledku závažné chronické hemolýzy, četných častých transfuzí, nadměrného množství parenterálních doplňků železa a nadměrného příjmu železa ve stravě (Nagoba *et Vedpathak*, 2011). Při těchto onemocněních z nadbytku železa v organismu nebo při akutní intoxikaci železem lze použít siderofory jako chelatační činidla, která jsou schopna vázat železo za vzniku komplexů, které vedou k tvorbě ferrioxaminu. Ferrioxamin je rozpustný ve vodě a snadno se vylučuje ledvinami. Váže se na železo v krvi a zvyšuje jeho vylučování močí a stolicí (Sajeed *et Vidhale*, 2013; Nagoba *et Vedpathak*, 2011). Ferrioxaminové siderofory byly také zkoumány jako léčba neurologických poruch, jako je Parkinsonova choroba, chronické obstrukční plicní nemoci, hojení ran, malárie a rakovina (Rivera, Beamish, *et Wenciewicz*, 2018).

Už Tsafack *et al.* (1996) zjistili, že některé siderofory mají antimalarickou aktivitu proti *Plasmodium falciparum*, například siderofor produkovaný *Klebsiella pneumoniae* (Gysin *et al.*, 1991) a siderofor desferrioxamin B produkovaný *Streptomyces pilosus*, který vstupuje do parazita a způsobuje intracelulární vyčerpání železa (Nagoba *et Vedpathak*, 2011).

3.4 Vybrané infekce

Tato diplomová práce je zaměřena na mykotické siderofory a jejich možné využití v rámci diagnostiky. Odhaduje se, že každý rok zemře na plísňová onemocnění více než 1,6 milionu lidí a přibližně miliarda lidí trpí kožními plísňovými infekcemi (Cole *et al.*, 2017). Mezi nejčastější život ohrožující mykotické infekce patří kryptokokóza, kandidóza, aspergilóza, blastomykóza, histoplazmóza, kokcidiomykóza a pneumocystóza (Del Poeta, 2016). Úmrtí související s plísňovými infekcemi u pacientů s AIDS se odhadují na více než 700 000 případů ročně (47 % všech úmrtí souvisejících s HIV–“human immunodeficiency virus“) (Denning, 2016). Z více než 100 000 známých druhů plísní způsobuje pouze 300 chorob u lidí. Nejběžnějšími chorobami jsou kandidózy, aspergilózy, kryptokokózy a pneumocystové pneumonie–způsobují více než 90 % hlášených úmrtí na plísňové choroby (Schmiedel *et Zimmerli*, 2016).

Každý rok infikují *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* a *Pneumocystis* odhadem dva miliony jedinců po celém světě. Většina z nich je imunokompromitovaná nebo kriticky nemocná. *Candida* je nejčastějším plísňovým patogenem kriticky nemocných a příjemců transplantovaných orgánů. Invazivní aspergilóza zůstává dominantním invazivním mykotickým onemocněním u hematologických pacientů a příjemců transplantovaných orgánů a stále častěji se vyskytuje u jedinců s chronickou obstrukční plicní nemocí. Pneumonie způsobena *Pneumocystis jirovecii* a kryptokokóza se vyskytují se hlavně u příjemců transplantovaných orgánů nebo pacientů s oslabenou imunitou. Dříve typické infekce u pacientů s HIV jsou nyní na ústupu díky efektivní antiretrovirové terapii, zejména v rozvinutém světě. V rozvojovém světě zůstává kryptokokóza běžnou a vysoce smrtelnou komplikací u HIV pozitivních jedinců (Schmiedel *et Zimmerli*, 2016).

3.4.1. Aspergilóza

Aspergilóza je nejčastějším plísňovým onemocněním u lidí. Představuje více než 85 % invazivních mykotických infekcí. Houby rodu *Aspergillus* se nachází v půdě, rozpadající se vegetaci, jídle, vzduchu a ve vodních zdrojích. Všudypřítomné spory se dostávají do dýchacích cest vdechováním (Schmiedel *et Zimmerli*, 2016). Zástupci rodu *Aspergillus* jsou zodpovědní za vznik invazivní aspergilózy (IA) - život ohrožující infekce, která postihuje imunokompromitované jedince, včetně jedinců s neutropenií, chronickou granulomatózní chorobou, syndromem získané imunodeficiency, jedince podstupující transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT) nebo transplantaci orgánů. Původcem IA je nejčastěji *Aspergillus fumigatus*, i když jiné druhy jako *A. flavus*, *A. nidulans* a *A. terreus* mohou rovněž způsobit invazivní infekce (Carroll *et al.*, 2016).

Celosvětově existuje 200 000 odhadovaných ročních případů invazivní aspergilózy. V současnosti se přibližně 50 % všech případů IA vyskytuje u pacientů s hematologickou

malignitou, většinou s akutní myeloidní leukémií, akutní lymfoblastickou leukémií, a u příjemců HSCT. Nejvýznamnějším rizikovým faktorem pro IA je prodloužená těžká neutropenie (> 10 dní; < 500 buněk/mm³) v důsledku chemoterapie. Pacienti na jednotce intenzivní péče (JIP) představují druhou největší rizikovou populaci IA. Těžká alkoholická cirhóza jater je dalším nedávno hlášeným rizikovým faktorem u pacientů na JIP. IA byla také spojována se souběžnými virovými respiračními infekcemi způsobenými chřipkou H1N1, adenovirem a cytomegalovirem (Schmiedel *et* Zimmerli, 2016). Míra úmrtnosti se pohybuje u vysoce rizikových populací od 40 % do 90 % a závisí na faktorech, jako je imunita hostitele, ložisko infekce a použitý léčebný režim (Lin, Schranz, *et* Teutsch, 2001).

Stejně jako u pacientů s invazivní kandidózou nevykazuje žádná z rizikových skupin specifické klinické příznaky. U neutropenických pacientů je horečka nereagující na širokospektrální antibiotika časným znamením, které by mělo vést k dalšímu vyšetření. Vzácně jsou hlášeny kašel nebo bolest na hrudi s hemoptýzou nebo bez ní. Na druhé straně je kriticky nemocný pacient na JIP s IA většinou mechanicky ventilován a může se projevovat zhoršováním plicních funkcí a horečkou nereagující na léčbu (Schmiedel *et* Zimmerli, 2016).

Přes vhodnou antifungální terapii je výsledek pro mnoho pacientů často fatální. Hlavní výzvou pro zvládnutí IA je včasná diagnóza. Antifungální léčba se často podává až po dlouhodobém onemocnění nereagujícím na antibiotickou terapii a potvrzení IA se v mnoha případech provádí až při pitvě (Carroll *et al.*, 2016). Roční míra úmrtnosti by mohla být snížena, pokud budou k dispozici včasné a spolehlivé diagnostické nástroje. Vzhledem k problémům spojeným se všemi současnými přístupy a nutnosti včasné léčby invazivních mykotických infekcí jsou ke zlepšení klinických výsledků nutné nové diagnostické metody. Jednou z potenciálních metod je detekce mikrobiálních sideroforů, jakožto specifických markerů infekce. Carroll *et al.* (2016) popsali N, N', N"-triacetylfusarinin C (TAFC) jako možný časný diagnostický marker invazivní aspergilózy. V jejich klinické studii byl TAFC detekován v séru od pacientů s rizikem invazivní aspergilózy. Luptáková *et al.* (2017) ve své studii prokázali, že siderofory rodu *Aspergillus* jsou účinně vylučovány močí během mikrobiální infekce a definovali tyto siderofory jako neinvazivní biomarkery aspergilózy. Porovnali kvantitativní výsledky distribuce TAFC s distribucí dalšího sideroforu produkovaného *Aspergillus* - ferricrocinu (FC) v krysím séru a plicních tkáních a prokázali, že tyto biomarkery vykazují vysokou sensitivitu průkazu infekce.

3.4.2 Kandidóza

Rod *Candida* je jednou z nejčastějších příčin invazivních mykotických onemocnění v rozvinutém světě. Přirozeně se u člověka tyto kvasinky nacházejí v ústní dutině, gastrointestinálním traktu, v ženském pohlavním ústrojí nebo na kůži. Odhaduje se, že rod *Candida* kolonizuje 24–70 % zdravých lidí starších jednoho roku (Schmiedel *et* Zimmerli, 2016).

Z přibližně 200 druhů rodu *Candida* je pouze 12 hlavním původcem onemocnění (López-Martínez, 2010). Kandidózu nejčastěji způsobují kvasinky *Candida albicans* a v daleko menší míře *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis* a *C. guilliermondi* (Farah, Ashman, et Challacombe, 2000). Kandidóza se častěji vyskytuje u imunodeficientních jedinců v souvislosti s léčbou antibiotiky, steroidy, cytostatiky a imunosupresivy, v souvislosti s transplantací orgánů a kostní dřeně, diabetem, leukémií, AIDS a dalšími stavy (López-Martínez 2010).

Klinické projevy invazivní kandidové infekce jsou nespecifické a různorodé a liší se podle orgánové lokalizace infekce. Závažným problémem jsou infekce systémové (orgánové, invazivní) s postižením parenchymatózních orgánů (Haber *et al.*, 2008).

Invazivní kandidóza, která může vést až ke kandidémii (přítomnost patogena v krvi) často pochází z pacientovy vlastní mikrobioty: kandida může prostoupit do krevního řečiště nebo přilehlé tkáně po porušení kožní nebo slizniční bariéry. Průměrná 30-ti denní úmrtnost u kandidémie je 43 %. To je podstatně vyšší hodnota než u jakékoli jiné infekce krevního oběhu (Schmiedel *et Zimmerli*, 2016).

Laboratorní diagnostické techniky pro stanovení kandidózy mohou často poskytovat falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky, pokud není použita vhodná metoda. V mnoha případech, kdy jsou na kůži nebo v analyzovaných sekretech pozorovány nebo izolovány stopy kvasinek *Candida*, laboratoře hlásí pozitivní výsledek, aniž by vzaly v úvahu, že tyto kvasinky jsou normálním prvkem mikrobiomu kůže a sliznic (López-Martínez 2010). Molekulární testy, jako je stanovení (1-3) - β -D-glukanu, složky buněčné stěny různých lékařsky významných hub, mohou detekovat kandidémii a intraabdominální kandidózu. Nízká citlivost (65–75%) a specifita (80–85%) však omezují užitečnost testu. Komerční test s multiplexní polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) v plné krvi, který detekuje pět klinicky nejdůležitějších druhů *Candidy*, dále *Aspergillus fumigatus*, stejně jako několik bakterií, měl u pacientů s kandidózou senzitivitu 94 % (Schmiedel *et Zimmerli*, 2016).

Kandidózy můžeme podle místa infekce rozdělit na několik skupin. Orofaryngeální kolonizace kvasinkami se vyskytuje přibližně u 20 % zdravých osob. Nejčastější manifestací je orální kandidóza (moučnivka). Kožní kandidóza *C. albicans* může přechodně kolonizovat kůži, ale není stálou součástí kožní mikroflóry. Asymptomatická vaginální kolonizace se objevuje u 20–25 % zdravých žen a až 30 % těhotných žen (Kuklová, 2015).

Léčba této mykózy je další důležitou výzvou. Navzdory novým a účinnějším antimykotikům terapie často selhávají kvůli neznalosti dávek a terapeutických režimů nebo kvůli zvyšující se rezistenci vůči antimykotikům. Pokud je to možné, před zahájením antimykotické léčby by proto měly být provedeny studie citlivosti na antimykotika (López-Martínez 2010).

3.4.3 Kryptokokóza

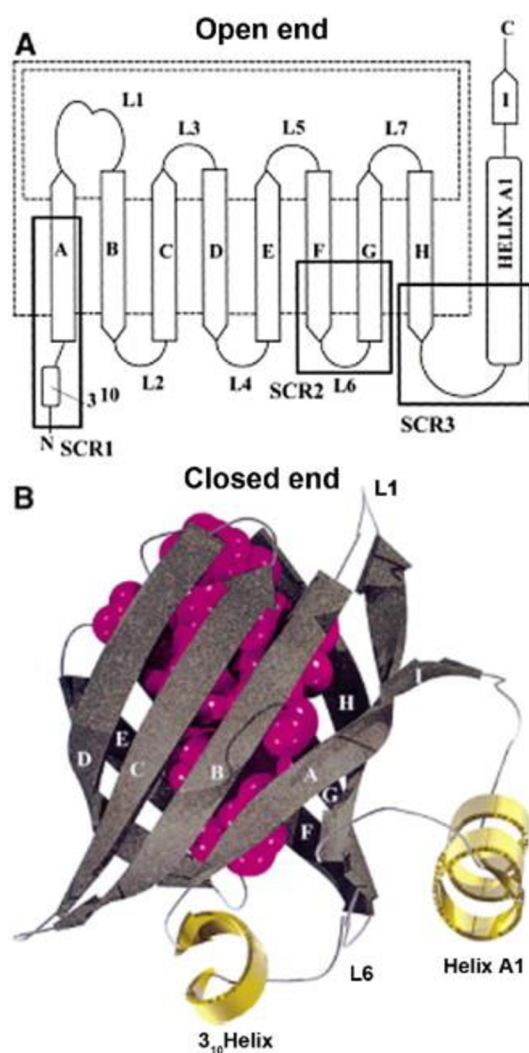
Kryptokokóza je infekční onemocnění s celosvětovou distribucí a širokou škálou klinických projevů způsobené patogenními opouzdřenými kvasinkami rodu *Cryptococcus*. V současné době existují 2 druhy, které běžně způsobují onemocnění u lidí: *Cryptococcus neoformans* a *Cryptococcus gattii* (Maziarz *et* Perfect, 2016). S více než milionem případů a přibližně 650 000 úmrtí ročně je kryptokokóza nejčastějším smrtelným mykotickým onemocněním na světě (Schmiedel *et* Zimmerli, 2016). Meningoencefalitida je hlavním klinickým projevem způsobeným tímto patogenem a primární příčinou vysoké mortality. Až do vypuknutí pandemie HIV bývala kryptokokóza vzácnou infekcí (Negroni, 2012). Globálně zůstává HIV hlavním rizikovým faktorem pro kryptokokovou infekci, ačkoli rozšířené používání antiretrovirové terapie vedlo k trvalému poklesu této infekce ve spojitosti s HIV (Schmiedel *et* Zimmerli, 2016). Obecně způsobuje kryptokokóza onemocnění u pacientů s různými typy imunosuprese, jako je transplantace orgánů, užívání kortikosteroidů, malignita, diabetes a cirhóza. Ale infekce se může objevit také u pacientů bez jakékoli identifikované imunosuprese (Zavala *et* Baddley, 2020).

Příznaky kryptokokózy jsou nespecifické. Klinický obraz se pohybuje od minimálních po závažné příznaky s bolestmi hlavy, malátností, horečkou, zrakovými poruchami, nevolností a zvracením (Schmiedel *et* Zimmerli, 2016). Přestože je *Cryptococcus* známý především svou schopností způsobit meningoencefalitidu, může infikovat téměř jakýkoli orgán lidského těla, přičemž plicní infekce je druhým nejčastějším projevem onemocnění. Příznaky plicního onemocnění jsou nespecifické a mohou zahrnovat horečku, zimnici, kašel, malátnost, noční pocení, dušnost, ztrátu hmotnosti a hemoptýzu (Zavala *et* Baddley, 2020). Intrakraniální tlak se obvykle zvyšuje a při pokročilém onemocnění se mohou objevit záchvaty. Kožní léze, které se vyskytují převážně u pacientů se sníženou imunitou, se mohou projevovat jako pustuly, papuly, vředy, celulitida, povrchové granulomy nebo abscesy (Schmiedel *et* Zimmerli, 2016).

Diagnostika je založena na pozorování zapouzdřených kvasinek přímým mikroskopickým vyšetřením, izolací *C. neoformans* nebo *C. gattii* v kultuře nebo detekcí kryptokokového antigenu (CrAg) v mozkomíšním moku. CrAg test má citlivost a specifitu vyšší než 90 % jak v mozkomíšním moku, tak v séru. Diagnóza plicního onemocnění je založena na pozitivní kultuře sputa ve spojení s kompatibilními zobrazovacími nálezy (Schmiedel *et* Zimmerli, 2016; Negroni 2012). Molekulární metody, přestože jsou dostupné a široce používané pro výzkumné účely, se v současné době v běžné klinické praxi nepoužívají (Maziarz *et* Perfect, 2016).

3.5 Charakteristika a význam slzného lipocalinu (Tear lipocalin, TL)

Potenciál slzného lipocalinu (TL; také známý jako Lcn1) se ukrývá v jeho schopnosti vázat širokou škálu ligandů. Tato vlastnost je klíčová pro jeho antimikrobiální aktivitu, ale také pro udržování stálého prostředí v lidském oku. Slzný lipocalin je totiž sekreční protein přítomný ve velkém množství v tekutinách, které pokrývají epiteliální povrchy, jako jsou slzy a respirační sekrece. Patří do skupiny lipocalinů, které fungují jako extracelulární vazebné proteiny pro siderofory (Fluckinger *et al.*, 2004; Dartt, 2011). TL sestává ze 176 aminokyselin včetně typické eukaryotické signální sekvence o 18 aminokyselinách. Když byl však izolován z lidských slz a analyzován pomocí 2D SDS-PAGE, byla prokázána přítomnost několika izoformem. Rozsáhlá analýza aminokyselinové sekvence odhalila, že tyto izoformy se liší v N-terminální části. Izoforma plné délky má hmotnost 17,446 kDa, nejvíce zkrácená forma má hmotnost 16,870 kDa (Redl, 2000).



Obrázek 2: Struktura lipocalinu. A. Pohled na rozbalený protein. B. Schéma prostorového uspořádání lipocalinu. Vazebné místo ligandu je znázorněno fialově. β -řetězce jsou znázorněny šedou šipkou; α -šroubovice jako zlaté spirály; smyčky jako stříbrné linie (Dartt, 2011).

Součástí struktury lipocalinů je dutina nebo kalich, které váží velké množství lipofilních proteinů, viz obr. č. 2 (Fluckinger *et al.*, 2004; Dartt, 2011).

Protože byl tento protein objeven v slzách, mělo se za to, že je specifický pro slzy, a proto byl pojmenován jako „prealbumin specifický pro slzy“ nebo „slzný prealbumin“. V roce 1992, kdy byl slzný prealbumin klonován a identifikován jako lipocalin, byl přejmenován na slzný lipocalin. O rok později byl TL nalezen také ve slinné žláze známé jako von Ebnerova žláza a následně byl identifikován i v nosní sliznici, sliznici mléčné žlázy, potních žlázách, prostatě, varlatech, v tracheobronchiální sliznici, ale i v kůži a kortikotrofech hypofýzy. TL tedy již nelze považovat za protein specifický pouze pro slzy (Dartt, 2011). TL nicméně stále zůstává hlavní proteinovou složkou slz. Nedávné výzkumy ukázaly, že TL je hlavní protein vázající lipidy v slzách. Lidský slzný film se skládá z komplexní směsi mucinu, proteinových a lipidových složek uspořádaných ve vrstvách. Má důležité funkce při lubrikaci očních víček, vytváření hladké a rovnoměrné vrstvy na povrchu rohovky a poskytování antimikrobiálního systému pro povrch oka. Zatímco většina proteinů je vylučována slznými žlázami, většina lipidů, které tvoří vnější vrstvu slz, pochází z Meibomových žlaz. Tyto lipidy jsou ve vodě nerozpustné a bylo navrženo, že pro povrchové šíření na rozhraní voda-lipid je nezbytná monovrstva molekul s hydrofobními i hydrofilními vlastnostmi. Bylo skutečně prokázáno, že povrchové napětí slz je způsobeno komplexem TL se slznými lipidy. TL je tedy nejdůležitější pro integritu slzného filmu. Existují však další funkce TL, které mohou mít fyziologický význam v slzné tekutině (Redl, 2000).

Je známo, že TL váže řadu různých ligandů od lipidů a retinoidů po makrocyclické antibiotikum rifampin až po mikrobiální siderofory. Neobvyklý rozvětvený tvar centrální dutiny ligandu, je vhodný pro umístění ligandů s různou velikostí a tvarem, i když tvorba komplexu nemusí být příliš stabilní (Breustedt, Schönfeld, *et Skerra*, 2006). TL se váže na široké spektrum sideroforů, včetně všech hlavních tříd fungálních sideroforů. Testy inhibice růstu navíc ukázaly, že tato vazba sideroforu vede k silné redukci růstu bakterií a hub za podmínek se sníženou koncentrací železa. Podmínkou této antimikrobiální aktivity TL je koncentrace a afinita, které musí být dostatečně vysoké, aby dokázaly konkurovat mikrobiálním systémům absorpce sideroforů, TL je proto neustále produkován několika žlázami a jeho koncentrace se zároveň zvyšuje během zánětu nebo infekce (Fluckinger *et al.*, 2004).

3.6 CAS assay

Pro detekci rozdílných druhů sideroforů byla již vyvinuta řada testů. I když jsou tyto testy užitečné pro identifikaci různých sideroforů, v praxi by bylo nutné provést řadu z nich pro detekci všech možných sideroforů a určit tak např. správnou diagnózu. Schwyn a Neilands (1987) vyvinuli univerzální sideroforový test s použitím chromazurolu S (CAS) a hexadecyltrimethylamoniumbromidu (HDTMA) jako indikátorů. CAS/HDTMA se těsně spojí s trojmocným železem za vzniku modré barvy. Když silný chelátor železa, jako je siderofor, odstraní železo z komplexu barviva, barva se změní z modré na oranžovou/žlutou (Lynne, Haarmann, *et Louden*, 2011).

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- 2-merkptoethanol (Cat. no. 21985023, Gibco)
- Agaróza (Cat. no. 0491B70, Amresco)
- Akrylamid (Cat. no. A9099, Sigma-Aldrich)
- Bromfenolová modř (Cat. no. 115-39-9, Sigma-Aldrich)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye (Cat. no. 20279, Thermo Fisher)
- Deionizovaná destilovaná voda, ddH₂O
- Dihydrogenfosforečnan draselný, KH₂PO₄ (Cat. no. 7778-77-0, Sigma-Aldrich)
- Ethanol (Cat. no. 1.00983, Sigma-Aldrich)
- Ethylendiamintetracetát, EDTA (Cat. no. AM9260G, Thermo Fisher)
- Gel Loading Dye, Purple (6X) (Cat. no. B7025S, New England BioLabs)
- GelRed (Cat. no. SCT123, Millipore)
- Glycerol (Cat. no. 17904, Thermo Fisher)
- Glycin (Cat. no. 036435.A1, Thermo Scientific)
- HCl (Cat. no. 7647-01-0, Sigma-Aldrich)
- Hexadecyltrimetylammonium bromid, HDTMA (Cat. no. 57-09-0, Sigma-Aldrich)
- Hydrogenfosforečnan sodný, Na₂HPO₄ (Cat. no. 7558-79-4, Sigma-Aldrich)
- Chlorid železitý hexahydrát, FeCl₃.6H₂O (Cat. no. 10025-77-1, Sigma-Aldrich)
- Chromazurol S (Cat. no. 1667-99-8, Sigma-Aldrich)
- Izopropyl β-D-1-thiogalaktopyranozid, IPTG (Cat. no. 15529019, Invitrogen)
- Kanamycin (Cat. no. 15160054, Thermo Fisher)
- KCl (Cat. no. P3911, Sigma-Aldrich)
- Methanol (Cat. no. 1424109, Sigma-Aldrich)
- NaCl (Cat. no. 7647-14-5, Sigma-Aldrich)
- NaOH (Cat. no. 1310-73-2, Sigma-Aldrich)
- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Cat. no. 26619, Thermo Fisher)
- Dulbecco PBS pufr (Cat. no. D8537-500ML, Sigma-Aldrich)
- Peroxodisíran amonný (Cat. no. 7727-54-0, Sigma-Aldrich)
- Piperazine-N,N'-bis(2-ethansulfonová kyselina), Pipes (Cat. no. 172615000, Thermo Fisher)
- Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (Cat. no. N0550S, New England BioLabs)
- S-dodecylsíran sodný, SDS (Cat. no. 151-21-3, Sigma-Aldrich)
- Sušené mléko (Cat. no. NC9121673, Fisher Scientific)
- Tetramethylethylendiamin, TEMED (Cat. no. 110-18-9, Sigma-Aldrich)

- Tris (Cat. no. AM9855G, Invitrogen)
- Tween 20 (Cat. no. 9005-67-8, Sigma-Aldrich)

Biologický materiál

- *E. coli* BL21 (Cat. no. GE27-1542-01, Sigma-Aldrich)
- *E. coli* DH5 α (Cat. no. 18265017, Thermo Fisher)
- Plazmid pET-28b(+) (Cat. no. 69865, Sigma-Aldrich)

Spotřební materiál

- PVDF membrána (Cat. no. ISEQ00010, Immobilon)
- Ni-NTA agaróza (Cat. no. 30230, Qiagen)
- Ni-NTA Spin Columns (Cat. no. 31014, Qiagen)

Enzymy a siderofory

- Restriční enzym EcoRV (Cat. no. R0195S, New England Biolabs)
- Restriční enzym Pvu II (Cat. no. 81295-34-3, Sigma-Aldrich)
- Restriční enzym Xba I (Cat. no. 10674257001, Sigma-Aldrich)
- Siderofory (Biophore Research Products):
 - Des-Triacetylfusarinine C (Des-TAFC)
 - Rhodotorulová kyselina (iron-free) (RHODO iron-free)
 - Triacetylfusarinine C (TAFC)
 - Rhodotorulová kyselina (RHODO)

Protilátky

- Primární protilátka: Penta-His Tag Monoclonal Antibody (Cat. no. P-21315, Invitrogen)
- Sekundární protilátka: Goat anti-Mouse IgG1 Secondary Antibody, HRP (Cat. no. PA1-7442, Invitrogen)

Použité soupravy

- QIAprep Spin Miniprep Kit (Cat. no. 27104, Qiagen)
- SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Cat. no. 34580, Thermo Scientific)
- QIAexpress Type IV Kit (Cat. no. 32149, Qiagen)

Použité roztoky a jejich příprava

- Roztoky pro SDS-PAGE:
 - 10x PBS (17,8 g of Na_2HPO_4 , 2,4 g of KH_2PO_4 , 80 g of NaCl, 2 g of KCl, ddH₂O ad 1 l)
 - 1x PBS (100 ml 10x PBS, 900 ml ddH₂O)
 - 1x PBS s 0,05% Tween 20 (100 ml 10x PBS, 900 ml ddH₂O, 0,5 ml Tween 20)
 - 2x SDS (2 ml 4X stacking gel buffer- 60,5 g of Tris v 850 ml ddH₂O, upravit pH na 6,8, ddH₂O ad 1 l; 1,6 ml glycerol, 3,2 ml of 10% SDS, 0,8 ml of 2-merkapt ethanol, 0,4 ml 1% bromofenolová modř)
 - 5x SDS (45,3 g Tris, 216 g glycin, 15 g SDS, ddH₂O ad 3 l)
 - Blokovací roztok (5% roztok mléka v 1x PBS s 0,05 % Tween 20: 2,5 g sušeného mléka; 50 ml 1x PBS; 25 μl Tween 20)
 - Elektrofodový pufr (1x SDS, 200 ml 5x SDS, 800 ml ddH₂O)
 - TBS (6,05 g Tris, 8,76 g NaCl, ad 1 l ddH₂O, pH 7,5)
 - Towbinův pufr (9 g Tris, 43,2 g glycin, 600 ml methanol, ddH₂O ad 3 l)
- Roztoky pro vazbu Tear lipocalinu na kolonu:
 - Binding buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8)
 - Eluční pufr (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 200 mM imidazol, pH 8)
 - Promývací pufr (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM NaCl, pH 8)
 - SBP („siderophore binding protein“) pufr (50 mM K_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 20 mM β -merkapt ethanol, pH 8)
- Roztoky pro produkci a izolaci rekombinantního proteinu:
 - Eluční pufr (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 30 mM imidazol, 10 mM Ca^{2+} , 10 mM DTT, pH 8; přidat před použitím (na 10 ml pufru): PMSF 20 μl , leupeptin 4 μl , aprotinin 5,25 μl).
 - LB médium (10 g kaseinového hydrolyzátu, 5 g kvasničného autolyzátu, 5 g peptonu a 10 g NaCl v 1 000 ml ddH₂O)
 - Lyzační pufr (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8; přidat čerstvě před použitím: EDTA (100 mM) - 10 μl /10 ml pufru, Triton X-100 - 10 μl /10 ml pufru, lysozym - 5 mg/10 ml pufru, PMSF (250 mM) - 20 μl /10 ml pufru, leupeptin (1 mg/ml) - 4 μl /10 ml pufru, aprotinin (1 mg/ml) - 5,25 μl /10 ml pufru)
 - Promývací pufr (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8; přidat před použitím (na 10 ml pufru): PMSF 20 μl , leupeptin 4 μl , aprotinin 5,25 μl)

- Roztoky pro barvení Coomassie brilliant blue:
 - Fixační roztok (750 ml isopropanol, 300 ml kyselina octová, ddH₂O ad 3 l)
 - Odbarvovací roztok (150 ml methanol, 210 ml kyselina octová, ddH₂O ad 3 l)

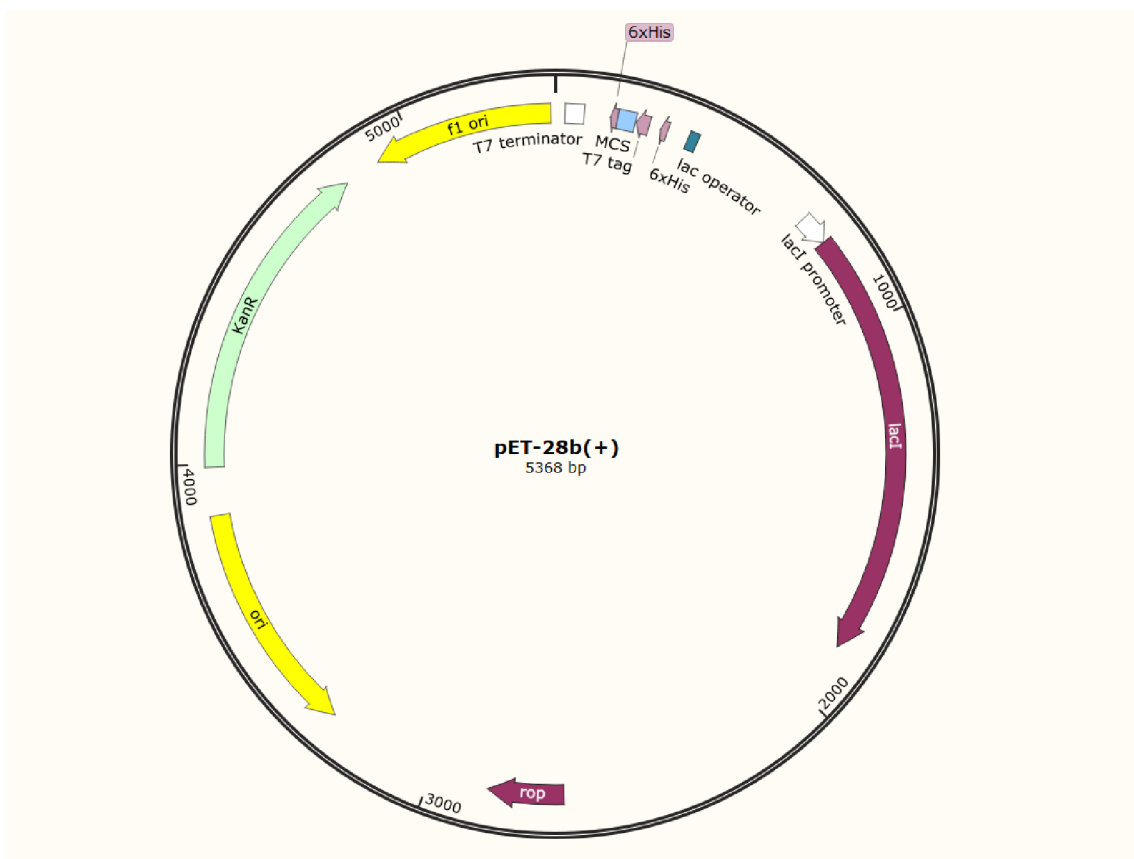
4.2 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (Sigma-Aldrich)
- Analytické váhy AE 24 Q (Mettler)
- Autokláv Systec DX-90 (Thermo Fisher)
- CAPP Rondo Blood Mixer Roller CRR-08X (CAPP)
- Dokumentační systém G-Box včetně softwaru GeneSnap (Syngene)
- Drtič ledu Pro IC70 (Waring Commercial)
- Elektroforetická komora (Bio-Rad)
- Elektronické váhy Kern 440-33N (Kern)
- Flowbox SafeFAST Top (FASTER S.r.l.)
- Glass Econo-Column® Columns (Bio-Rad)
- Inkubátor (Cat. no. RPN2511, Amersham LIFE SCIENCE)
- Lednice (Liebherr)
- Magnetické míchadlo (IKA-Werke GmbH & Co. KG)
- Mikrovlnná trouba (Sharp)
- Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad)
- Multifunkční chlazená centrifuga MPW 150R (Unimed)
- Orbitální třepačka MS 3 basic (IKA-Werke GmbH & Co. KG)
- pH metr (Jenway)
- Programovatelný rotátor Multi RS-60 (Biosan)
- Semi-dry blotting system TE77X (Hoefer)
- Sonikátor (Hielscher)
- Spektrofotometr Microprocessor Visible Spectrophotometer LI-721 (ESICO INTERNATIONAL)
- Termo blok hliníkový SBH130D (Stuart)
- Třepačka (Sigma-Aldrich)
- Výrobník ledu (Brema Icemakers)
- Zdroj stejnosměrného elektrického proudu (Bio-Rad)

4.3 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.3.1 Produkce rekombinantního proteinu Tear lipocalinu (TL)

Produkce TL byla umožněna díky předem připravených transformovaných bakterií *E. coli*, kmen DH5- α , které v sobě již nesly plazmid se sekvencí TL (TL-pET28b(+), viz obr. č. 3.



Obrázek 3: Schéma vektoru pET-28b(+) ([https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pet and duet vectors \(novagen\)&plasmid=pET-28b\(+\)&format=png](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pet%20and%20duet%20vectors%20(novagen)&plasmid=pET-28b(+)&format=png))

4.3.1.1 Transformace bakterií a kultivace

1. Byla provedena kultivace předem připravených bakterií *E. coli*, kmen DH5 α , které v sobě již nesly plazmid se sekvencí TL. Kultivace byla provedena přes noc v LB+K při 37 °C přes noc v inkubátoru s třepačkou při otáčkách 150 rpm.
2. Z pozitivní kolonie byl druhý den izolován plazmid pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).
3. Za účelem potvrzení přítomnosti sekvence v plazmidu bylo provedeno restriční štěpení.
4. Izolovaný plazmid byl pomocí heat shocku přenesen do bakterií *E. coli* kmene BL21 (expresní kmen) a kultivován přes noc při 37 °C na plotnách s LB médiem a kanamycinem (koncentrace kanamycinu 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

5. Vybraná kolonie byla kultivována ve 100ml v LB+K při 37 °C přes noc v inkubátoru s třepačkou při otáčkách 150 rpm. Druhý den byla pomocí spektrofotometru stanovena optická hustota (OD) kultury, která nabyla hodnot 1,4. Na základě těchto hodnot bylo 35 ml kultury doplněno do objemu 500 ml LB+K (konc. kanamycinu 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Výsledná hodnota OD po naředění kultury byla 0,1.
6. Následovala inkubace při 37 °C, 1 h, v inkubátoru s třepačkou při otáčkách 150 rpm.
7. Poté byla znovu změřena OD, následovaly opět inkubace za stejných podmínek (viz krok 6), ale měření OD se opalovalo každých 20 min.
8. Po dosažení hodnoty OD cca 0,5 bylo ke kultuře přidáno 5 ml IPTG a následovala čtyřhodinová inkubace při 37 °C v inkubátoru s třepačkou při otáčkách 150 rpm.
9. Kultura byly poté centrifugována 10 min při 10 000 otáčkách, supernatant byl odstraněn a pelet byl uložen do -18 °C před dalším zpracováním.

4.3.1.2 Restrikční štěpení izolovaného plazmidu TL-pET-28b(+)

Restrikční štěpení bylo provedeno za účelem potvrzení přítomnosti sekvence TL v plazmidu pET28b(+). Byly použity čtyři varianty štěpení pomocí restrikčních enzymů:

1. EcoR V
2. Pvu II
3. EcoR V + Xba I
4. Pvu II + Xba I

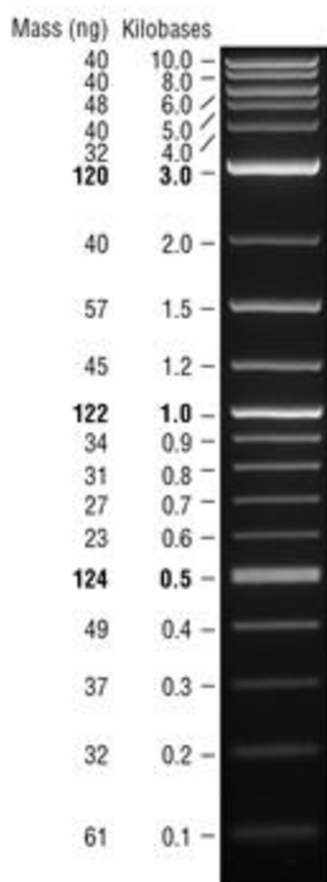
Reakční směsi byly pipetovány podle tabulky č. 1. Restrikční štěpení probíhalo přes noc v inkubátoru při 37 °C.

Tabulka 1: Složení reakční směsi pro restrikční štěpení.

Použité enzymy	dd H ₂ O [μl]	Reakční pufr [μl]	DNA [μl]	Restrikční enzym 1 [μl]	Restrikční enzym 2 [μl]
EcoR V	11,1	1,5	2	0,4	-
Pvu II	11,1	1,5	2	0,4	-
EcoR V + Xba I	11,1	1,5	2	0,2	0,2
Pvu II + Xba I	11,1	1,5	2	0,2	0,2

4.3.1.3 Separace produktů restrikčního štěpení prostřednictvím elektroforézy v agarozovém gelu.

Byla provedena elektroforéza v 1% agarozovém gelu. Do jamek byla pipetována směs vzorku a nanášecího pufru v poměru 1:5 o celkovém objemu 15 μ l. Po ukončení elektroforetické separace byl gel obarven pomocí barviva GelRed a následně byl pořízen záznam gelu prostřednictvím dokumentačního zařízení Syngene. Molekulové hmotnosti separovaných produktů byly určeny na základě markeru molekulové hmotnosti Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (New England BioLabs), viz obr. č. 4.



Obrázek 4: Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (New England BioLabs) <https://international.neb.com/products/n0550-quick-load-purple-1-kb-plus-dna-ladder#Product%20Information>.

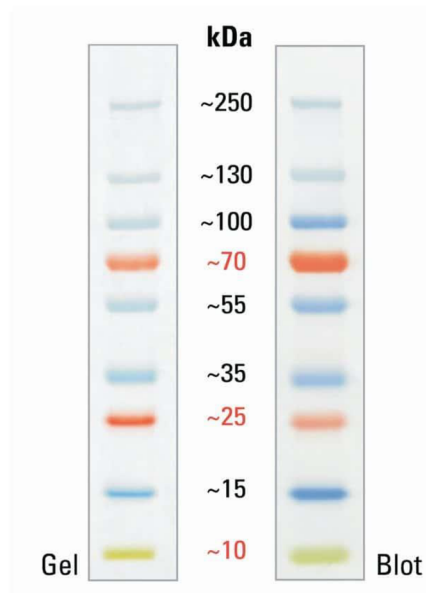
4.3.2 Izolace rekombinantního Tear lipocalinu za nativních podmínek.

Izolace proteinu byla provedena podle návodu kitu QIAexpressionist (Qiagen). K izolaci byl použit 1 g bakteriální pelety z připravené bakteriální kultury. Frakce získané při izolaci proteinu byly dále testovány na přítomnost proteinu pomocí SDS-PAGE a western blotu a jejich koncentrace byla stanovena pomocí barvení Coomassie Brilliant Blue a relativní kvantifikací vůči 1x BSA ředící řadě.

1. Bakteriální peleta byla lyzována lyzačním pufrem (10 ml pufru/1 g pelety) a sonikací (15 s sonikace + 45 s chlazení naledu, celý postup zopakovat 15 x).
2. Vzniklý roztok byl centrifugován 10 min při 10 000 rpm.
3. K supernatantu bylo přidáno 1 ml Ni-NTA agarozy (cca 1 ml na 10 ml lyzátu).
4. Následovala inkubace při 100 rpm 30 min, laboratorní teplota.
5. Po inkubaci byl roztok nanesen na kolonu (Glass Econo-Column® Columns (Bio-Rad)).
6. Kolona byla promyta 20 ml promývacího pufru, frakce byly odebírány po 10 ml.
7. Kolona byla promyta 20 ml elučního pufru, frakce byly odebírány po 5 ml.
8. Protein zakoncentrovaný v kolonce Amicon ultra 10 byl promyt 20 ml 1x PBS.
9. Z kolony bylo získáno 400 µl roztoku PBS s izolovaným rekombinantním proteinem.

4.3.3 Charakterizace Tear lipocalinu pomocí barvení Coomasie brilliant blue

1. Rekombinantní TL a frakce získané v průběhu izolace TL byly naneseny na 12% polyakrylamidový gel (příprava gelu je zaznamenána v tabulce č. 2 a 3).
2. Následně byla provedena SDS-PAGE. Elektroforetická separace probíhala za denaturujících podmínek po dobu 20 min při 80 V a 40 min při 140 V.
3. Po elektroforetické separaci byl jeden gel obarven Coomasie brilliant a po dostatečném odbarvení odbarovacím roztokem byl pořízen záznam gelu.
4. Molekulová hmotnost produktů elektroforetické separace byla stanovena na základě markeru PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher) (viz obr. č. 5).



Obrázek 5: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher) (<https://www.fishersci.se/shop/products/pageruler-plus-prestained-protein-ladder-10-250-kda/p-4529974>).

Tabulka 2: Roztoky pro přípravu dělicího gelu.

12% Roztok dělicího gelu	
30% A/B (akrylamid-bisakrylamid)	5 ml
4x Tris pufr pH 8,8	3, 75 ml
dd H ₂ O	6,25 ml
- po přidání níže uvedených polymeračních činidel nutno rychle nalít gel mezi připravená skla a poté převrstvit n-butanolem	
10% vodný roztok persíran amonný (APS)	75 µl
TEMED	15 µl

Tabulka 3: Roztoky pro přípravu zaostřovacího gelu.

4% Roztok zaostřovacího gelu	
30% A/B (akrylamid-bisakrylamid)	1,3 ml
4x Tris pufr pH 6,8	2,5 ml
dd H ₂ O	6,2 ml
- po přidání níže uvedených polymeračních činidel nutno rychle nalít gel mezi připravená skla	
10% vodný roztok persíran amonný (APS)	50 µl
TEMED	10 µl

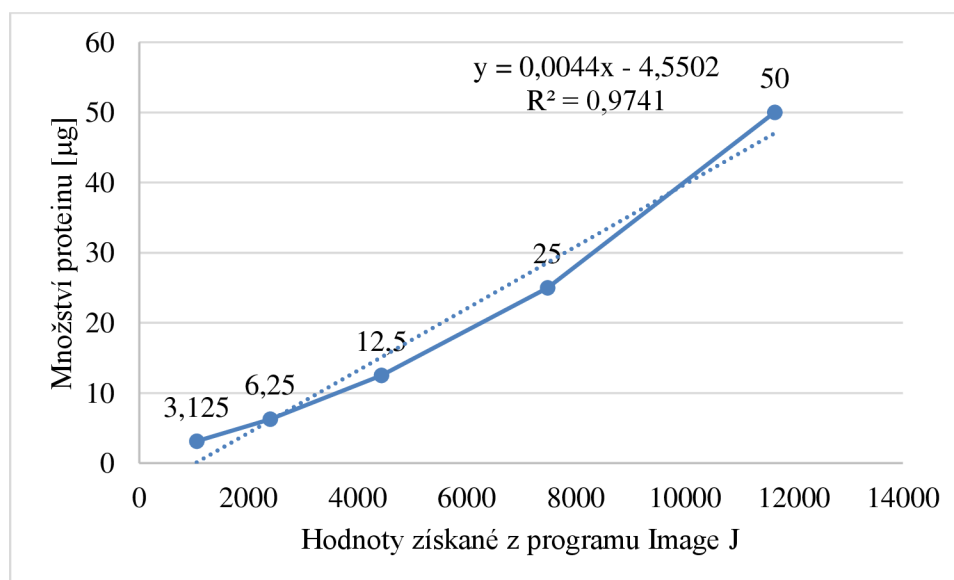
4.3.4 Charakterizace Tear lipocalinu pomocí imunochemické detekce prostřednictvím western blotu

1. Rekombinantní TL a frakce získané v průběhu izolace TL byly naneseny na 12% polyakrylamidový gel (příprava gelu je zaznamenána v tabulce č. 2 a 3).
2. Následně byla provedena SDS-PAGE. Elektroforetická separace probíhala za denaturujících podmínek po dobu 20 min při 80 V a 40 min při 140 V.
3. Po elektroforetické separaci byl gel inkubován 10 min na třepačce při otáčkách 100 rpm v Towbinově pufru spolu s filtračními papíry pro western blot.
4. PVDF membrána byla aktivována v methanolu a inkubována 15 min v Towbinově pufru na třepačce při otáčkách 100 rpm.
5. Blotting byl prováděn 1 h při 60 mA a maximálním napětí 20 V.
6. Po blotování byla membrána blokována přes noc v 5% roztoku mléka v 1x PBS + 0,05% Tween 20 blokovacím roztoku na třepačce při otáčkách 100 rpm, 2 h při laboratorní teplotě.

7. Po zablokování membrány byla přidána primární protilátka (Penta-His Tag Monoclonal Antibody; ředěna v poměru 1:2 000), inkubace proběhla přes noc na třepačce při otáčkách 100 rpm při 4 °C.
8. Po inkubaci s primární protilátkou byla membrána 4 x 15 min promývána roztokem 1x PBS s 0,05% Tween 20.
9. Následovala 1h inkubace se sekundární protilátkou (Goat anti-Mouse IgG1 Secondary Antibody, HRP, ředěna v poměru 1:10 000) v blokovacím roztoku 1 h, při 100 rpm a laboratorní teplotě.
10. Poté byla membrána 4 x 15 min promývána v roztoku 1xPBS + 0,05% Tween 20 a 2 x 10 minut se membrána promývá v roztoku 1x PBS.
11. Záznam membrány byl pořízen po přidání SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate pomocí dokumentačního zařízení Syngene.

4.3.5 Stanovení koncentrace izolovaného proteinu

Koncentrace izolovaného proteinu byla stanovena relativní kvantifikací vůči ředící řadě BSA (viz graf č. 1) pomocí programu Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Gel, ve kterém byly separovány proteiny a kalibrační řada BSA pomocí SDS-PAGE byl obarven barvivem Coomassie Brilliant Blue a následně vizualizován pomocí skeneru.



Graf 1: Kalibrační křivka BSA.

4.3.6 Optimalizace navázání Tear lipocalinu přes 6x His Tag na kolonku s Ni-NTA agarozou

V rámci optimalizace byly upravovány podmínky centrifugace a složení některých pufrů. Proces navázání Tear lipocalinu zahrnoval následující kroky:

1. promytí kolonky
2. navázání Tear lipocalinu na Ni-NTA agarozu přes 6x His tag
3. promytí kolonky
4. eluce proteinu

Jednotlivé kroky byly v rámci experimentů optimalizovány, jak je zaznamenáno v tabulce č. 4.

Tabulka 4: Optimalizace navázání Tear lipocalinu přes 6x His Tag na kolonku s Ni-NTA agarozou.

Číslo experimentu	Promývání	Navázání proteinu	Promytí	Eluce
1.	600 μ l SBP pufr	100 μ g proteinu ve 100 μ l SBP pufru	600 μ l SBP pufr	100 μ l 10M imidazol
	2 min, 6000 rpm	2 min, 6000 rpm	2 min, 6000 rpm (2 x)	2 min/6000 rpm (2 x)
	–	–	viz obr. č. 10, vzorek č. 7, 8, 9	
2.	600 μ l SBP pufr	100 μ g proteinu ve 100 μ l SBP pufru	600 μ l SBP pufr	100 μ l 10M imidazol
	2 min, 1600 rpm	30 min inkubace na ledu	2 min/1600 rpm (2 x)	2 min/1600 rpm (2 x)
3.	600 μ l SBP pufr	5 μ g proteinu v 600 μ l SBP pufru	600 μ l promývací pufr	300 μ l eluční pufr
	2 min/2900 rpm	2 min/2900 rpm	2 min/2900 rpm (2 x)	2 min/2900 rpm (2 x)
4.	600 μ l SBP pufr	5 μ g proteinu v 600 μ l SBP pufru	600 μ l SBP pufr	300 μ l eluční pufr
	2 min/2900 rpm	2 min/1600 rpm	2 min/2900 rpm (2 x)	2 min/2900 rpm (2 x)

Číslo experimentu	Promývání	Navázání proteinu	Promytí	Eluce
5.	600 µl SBP pufr	5 µg proteinu v 600 µl SBP pufru	600 µl promývací pufr	300 µl eluční pufr
	2 min, 2900 rpm (2 x)	5 min, 1600 rpm	2 min, 2900 rpm	2 min, 2900 rpm (2 x)
6.	600 µl SBP pufr	10 µg proteinu v 600 µl SBP pufru	600 µl promývací pufr	300 µl eluční pufr
	2 min, 2900 rpm (2 x)	5 min, 1600 rpm	2 min, 2900 rpm	2 min, 2900 rpm (2 x)

4.3.7 Příprava a optimalizace CAS assay

Podrobný postup byl převzat od Schwyn *et* Neilands (1987).

Modré barvivo:

1. Roztok 1: Rozpustit 0,06 g CAS v 50 ml ddH₂O.
2. Roztok 2: Rozpustit 0,0027 g FeCl₃·6H₂O v 10 ml 10 mM HCl.
3. Roztok 3: Rozpustit 0,073 g HDTMA ve 40 ml ddH₂O.
4. Smíchat roztok 1 s 9 ml roztoku 2. Poté smíchat s roztokem 3. Roztok by nyní měl mít modrou barvu.
5. Výsledný roztok autoklávovat.

Agarozový roztok:

1. Minimal Media 9 (MM9) roztok: Rozpustit 15 g KH₂PO₄, 25 g NaCl a 50 g NH₄Cl v 500 ml ddH₂O.
2. 20% zásobní roztok glukózy: 20 g glukózy se rozpustil ve 100 ml ddH₂O.
3. Zásobní roztok NaOH: Rozpustit 25 g NaOH ve 150 ml ddH₂O; pH by mělo být ~12.
4. Roztok kyseliny casamino: 3 g kyseliny casamino se rozpustil 27 ml ddH₂O, sterilizovat filtrací.

CAS agar:

1. Přidat 100 ml roztoku MM9 k 750 ml ddH₂O.
2. Rozpustit 32,24 g piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonové kyseliny) PIPES.
3. PIPES se nerozpustí pod pH 5. Upravit pH na 6 a pomalu za míchání přidávat PIPES.

4. Při rozpouštění PIPES pH klesne. Za míchání pomalu upravit pH na 6,8. Nepřekračovat hodnotu 6,8, protože to změní barvu roztoku na zelenou.
5. Přidat 15 g agarozy.
6. Autoklávovat a ochladit na 50 °C.
7. Přidat 30 ml sterilního roztoku kyseliny casamino a 10 ml sterilního 20% roztoku glukózy do směsi MM9/PIPES.
8. Pomalu přidat 100 ml roztoku Blue Dye podél skleněné stěny za dostatečného míchání, aby se důkladně promíchal.
9. Asepticky nalít hotový CAS agar do Petriho misek o průměru 10 cm.

Funkčnost CAS assaye byla zpočátku testována pouze roztoky sideroforů v ddH₂O, rovněž byla testována reaktivita všech použitých pufrů s CAS assayí. Ověření interakce sideroforů s imobilizovaným TL bylo provedeno u všech frakcí získaných v průběhu celého postupu navázání TL na kolonu s Ni-NTA agarozou a následně očekávané interakce sideroforů s TL. Celý postup zahrnoval navázání TAFC na Tear lipocalin imobilizovaný na koloně s Ni-NTA agarosou. Následovala eluce TAFC po přidání RHODO, který má větší afinitu k TL než první siderofor. Z každé frakce bylo odebráno 50 µl, které byly napipetovány do otvoru v gelu a inkubovaly se tak přes noc při laboratorní teplotě nebo 2-4 h při 37 °C.

Interakce sideroforů a TL imobilizovaného na kolonce s Ni-NTA agarozou

Experiment A1)

1. 2 x promytí kolony 600 µl SBP pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
2. Navázání proteinu (10 µg TL v 300 µl PBS pufru), centrifugace 5 min, 1600 rpm
3. 2 x promytí kolony 600 µl promývacího pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
4. Navázání sideroforu TAFC (10 µg v 300 µl PBS pufru), centrifugace 2 min, 2900 rpm
5. 2 x promytí kolony 600 µl promývacího pufru pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
6. Navázání sideroforu RHODO (10 µg v 300 µl PBS pufru), centrifugace 2 min, 2900 rpm
7. 2 x promytí kolony 600 µl promývacího pufru pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
8. 2 x eluce 100 µl elučního pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm

Experiment B1)

1. 2 x promytí kolony 600 µl PBS pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
2. Navázání proteinu (10 µg TL v 300 µl binding pufru), centrifugace 5 min, 1600 rpm
3. 3 x promytí kolony 600 µl PBS pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
4. Navázání sideroforu Des-TAFC (10 µg v 300 µl PBS pufru), centrifugace 2 min, 2900 rpm

5. 3 x promytí kolony 600 µl PBS pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
6. Navázání sideroforu RHODO iron-free (10 µg v 300 µl PBS pufru), centrifugace 2 min, 2900 rpm
7. 3 x promytí kolony 600 µl PBS pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
8. 2 x eluce 100 µl elučního pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
9. 300 µl EDTA, centrifugace 2 min, 2900 rpm

Experiment C1)

1. 2 x promytí kolony 600 µl ddH₂O, centrifugace 2 min, 2900 rpm
2. Navázání proteinu (10 µg TL v 300 µl binding pufru), centrifugace 5 min, 1600 rpm
3. 3 x promytí kolony 600 µl ddH₂O, centrifugace 2 min, 2900 rpm
4. Navázání sideroforu Des-TAFC (10 µg v 300 µl ddH₂O), centrifugace 2 min, 2900 rpm
5. 3 x promytí kolony 600 µl ddH₂O, centrifugace 2 min, 2900 rpm
6. Navázání sideroforu RHODO iron-free (10 µg v 300 µl ddH₂O), centrifugace 2 min, 2900 rpm
7. 3 x promytí kolony 600 µl ddH₂O, centrifugace 2 min, 2900 rpm
8. 2 x eluce 100 µl elučního pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
9. 300 µl EDTA, centrifugace 2 min, 2900 rpm

Experiment D1)

1. 2 x promytí kolony 600 µl ddH₂O, centrifugace 2 min, 2900 rpm
2. Navázání proteinu (10 µg TL v 300 µl binding pufru), centrifugace 5 min, 1600 rpm
3. Promytí kolony 600 µl promývacího pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
4. 2 x promytí kolony 600 µl ddH₂O, centrifugace 2 min, 2900 rpm
5. Navázání sideroforu Des-TAFC (10 µg v 300 µl ddH₂O), centrifugace 2 min, 2900 rpm
6. Promytí kolony 600 µl promývacího pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
7. 2 x promytí kolony 600 µl ddH₂O, centrifugace 2 min, 2900 rpm
8. Navázání sideroforu RHODO iron-free (10 µg v 300 µl ddH₂O), centrifugace 2 min, 2900 rpm
9. Promytí kolony 600 µl promývacího pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
10. 2 x promytí kolony 600 µl ddH₂O, centrifugace 2 min, 2900 rpm
11. 2 x eluce 100 µl elučního pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
12. 300 µl EDTA, centrifugace 2 min, 2900 rpm

Experiment E1)

1. 2 x promytí kolony 600 µl PBS pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
2. Navázání proteinu (10 µg TL v 300 µl binding pufru), centrifugace 5 min, 1600 rpm
3. Promytí kolony 600 µl promývacího pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm

4. 2 x promytí kolony 600 µl PBS pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
5. Navázání sideroforu Des-TAFC (10 µg v 300 µl PBS pufru), centrifugace 2 min, 2900 rpm
6. Promytí kolony 600 µl promývacího pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
7. 2 x promytí kolony 600 µl PBS pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
8. Navázání sideroforu RHODO iron-free (10 µg v 300 µl PBS pufru), centrifugace 2 min, 2900 rpm
9. Promytí kolony 600 µl promývacího pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
10. 2 x promytí kolony 600 µl PBS pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
11. 2 x eluce 100 µl elučního pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
12. 300 µl EDTA, centrifugace 2 min, 2900 rpm

Interakce sideroforů a nikelnatých iontů na koloně bez navázaného TL

Experiment A2)

1. Navázání sideroforu Des-TAFC (10 µg v 300 µl PBS pufru), centrifugace 2 min, 2900 rpm
2. 3 x promytí kolony 600 µl PBS pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
3. Navázání sideroforu RHODO iron-free (10 µg v 300 µl PBS pufru), centrifugace 2 min, 2900 rpm
4. 3 x promytí kolony 600 µl PBS pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
5. 2 x eluce 100 µl elučního pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
6. 300 µl EDTA, centrifugace 2 min, 2900 rpm

Experiment B2)

1. Navázání sideroforu Des-TAFC (10 µg v 300 µl ddH₂O), centrifugace 2 min, 2900 rpm
2. 3 x promytí kolony 600 µl PBS pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
3. Navázání sideroforu RHODO iron-free (10 µg v 300 µl ddH₂O), centrifugace 2 min, 2900 rpm
4. 3 x promytí kolony 600 µl PBS pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
5. 2 x eluce 100 µl elučního pufru, centrifugace 2 min, 2900 rpm
6. 300 µl EDTA, centrifugace 2 min, 2900 rpm

5. VÝSLEDKY

5.1 Restrikční štěpení izolovaného plazmidu TL-pET-28b(+).

Za účelem potvrzení přítomnosti sekvence TL v plazmidu byly použity čtyři varianty štěpení pomocí restrikčních enzymů:

1. EcoR V
2. Pvu II
3. EcoR V + Xba I
4. Pvu II + Xba I

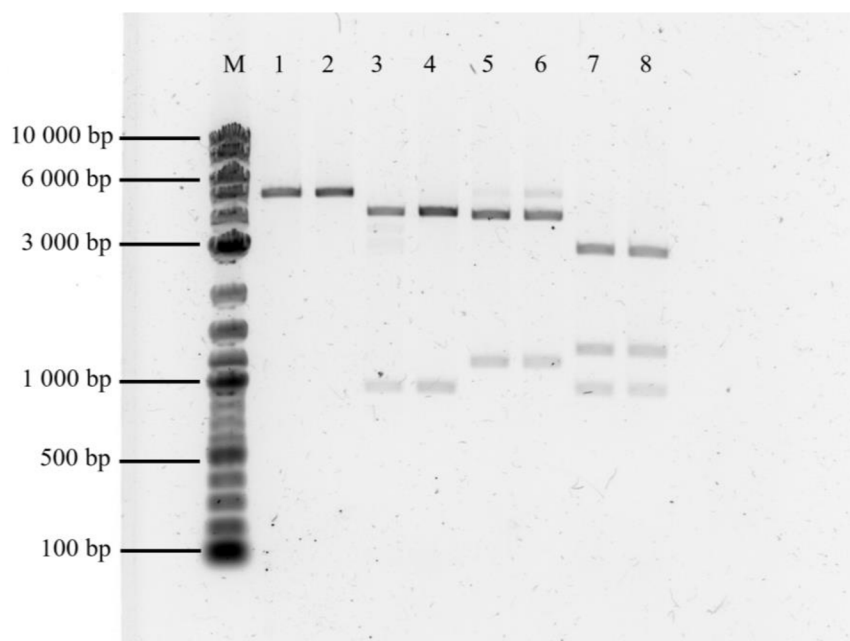
Na základě teoretických výpočtů byly stanoveny délky vzniklých produktů (viz tabulka č. 5), které byly poté porovnány s produkty, které byly separovány v 1% agarozovém gelu. Velikost produktů separovaných v gelu byla stanovena na základě porovnání se standardem molekulové hmotnosti Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (New England BioLabs). Velikost separovaných produktů odpovídala teoreticky stanoveným velikostem. Bylo potvrzeno, že v plazmidu byla přítomna sekvence TL.

Tabulka 5: Velikost fragmentů vzniklých při restrikčním štěpení vybranými enzymy.

Enzym 1	Enzym 2	Velikost fragmentů [bp]		
EcoR V	-	5 839		
Pvu II	-	4 747	999	93
EcoR V	Xba I	4 601	1 238	-
Pvu II	Xba I	3 959	999	93

5.2.1 Separace produktů restrikčního štěpení prostřednictvím elektroforézy v agarozovém gelu.

Výsledek separace produktů restrikčního štěpení je vizualizován na obr. č. 6. Molekulové hmotnosti separovaných produktů byly určeny na základě markeru molekulové hmotnosti Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (New England BioLabs), viz obr. č. 4.



Obrázek 6: Výsledek restrikčního štěpení. Legenda: M – marker molekulové hmotnosti Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (New England BioLabs), 1,2 – plazmid štěpený EcoR V; 3,4 – plazmid štěpený Pvu II; 5,6 – plazmid štěpený EcoR V a Xba I; 7,8 – plazmid štěpený Pvu II a Xba I.

5.3 Izolace rekombinantního Tear lipocalinu za nativních podmínek a jeho charakterizace pomocí barvení Coomassie brilliant blue.

Po elektroforetické separaci byl gel se vzorky z procesu izolace rekombinantního proteinu obarven Coomassie brilliant blue (viz obr. č. 7 a 8).

Ve vzorku č. 1, který byl získán z bakteriálního lyzátu ještě před izolací TL je přítomno velké množství bakteriálních proteinů o velikosti v rozmezí 10–180 kDa.

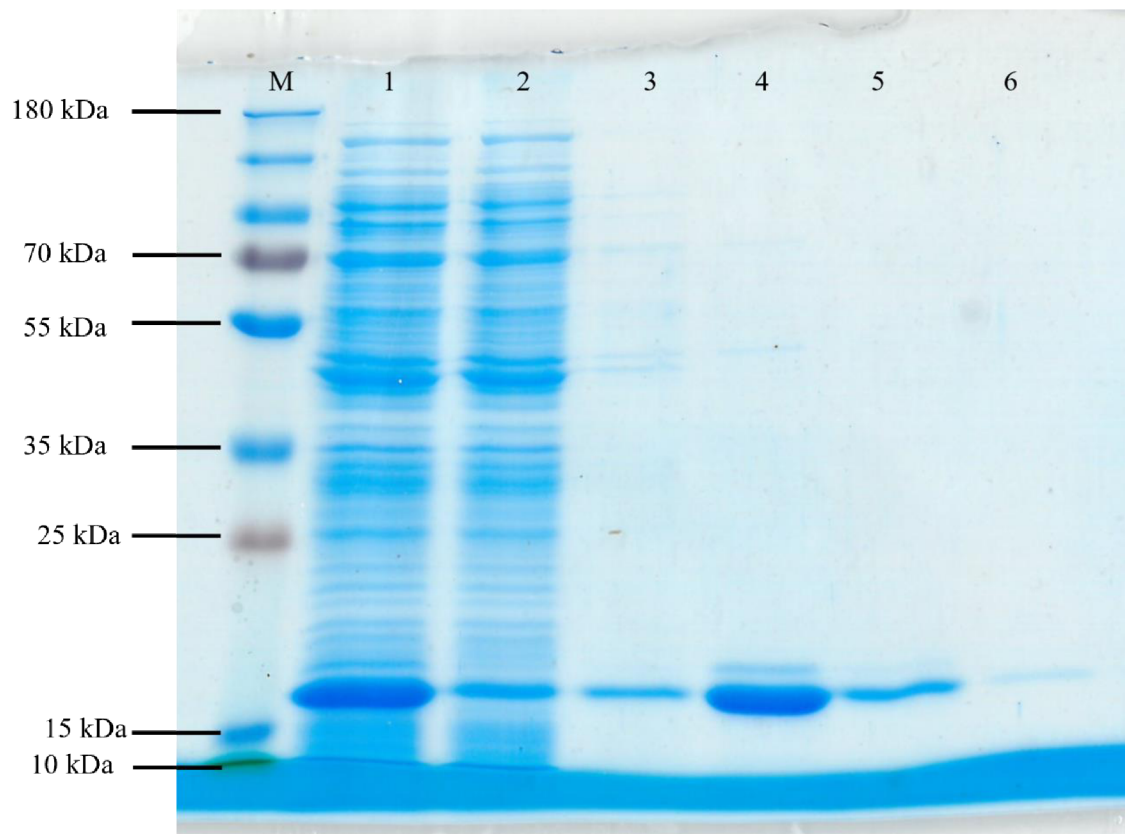
Ve vzorku označeném č. 2, který je tvořen frakcí flow-through buněčného lyzátu, která jako první protekla izolační kolonou je rovněž přítomna široká škála proteinů o velikostech 10–180 kDa.

Zbytky bakteriálních proteinů o různých velikostech jsou slabě viditelné i ve frakci z prvního promytí kolony. Ve frakcích č. 3–6 je přítomný jeden protein o velikosti cca 18 kDa. Předpokládaná molekulová hmotnost rekombinantního proteinu TL je 18 kDa, což odpovídá izolovanému proteinu.

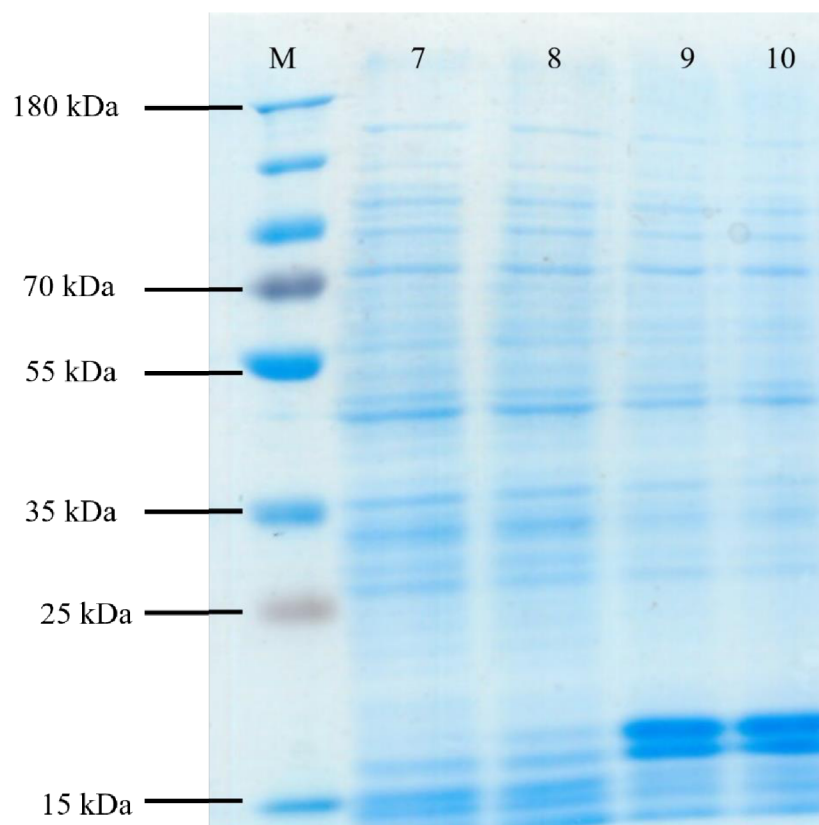
Ve vzorcích č. 7 a 8 není přítomný žádný band, který by svou molekulovou hmotností odpovídal TL. Vzorek byl odebrán z bakteriální kultury ještě před její indukcí IPTG, z toho důvodu v něm

přítomnost proteinu o velikosti cca 18 kDa nebyla očekávána.

Vzorky č. 9 a 10 byly odebrány z bakteriální kultury po indukci IPTG, je v nich přítomen protein o velikosti 18 kDa. Po indukci IPTG tedy začala produkce rekombinantního proteinu, který svou molekulovou hmotností odpovídá TL.



Obrázek 7: Výsledek elektroforetická separace vzorků z procesu izolace rekombinantního proteinu TL obarvený Coomassie brilliant blue. Legenda: M – marker molekulové hmotnosti PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher), 1 – vzorek buněčného lyzátu před izolací proteinu; 2 – flow-through buněčného lyzátu po průchodu izolační kolonou; 3 – frakce prvního promytí kolony, 4 – frakce druhého promytí kolony; 5 – frakce první eluce; 6 – frakce druhé eluce.

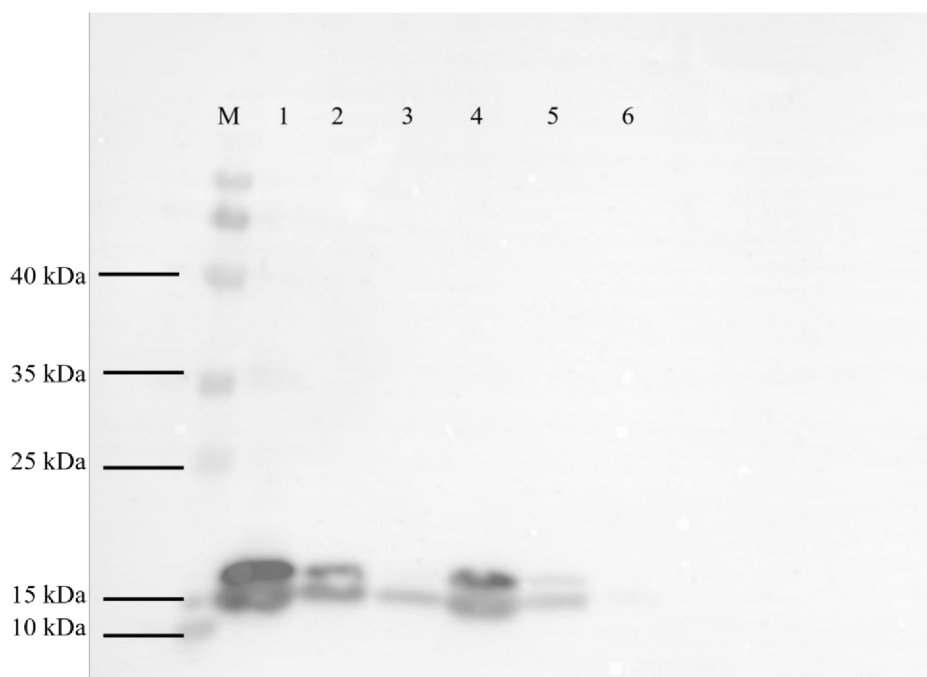


Obrázek 8: Výsledek elektroforetická separace vzorků z procesu izolace rekombinantního proteinu TL obarvený Coomassie brilliant blue. Legenda: M – marker molekulové hmotnosti PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher), 7, 8 – vzorek bakteriální kultury před indukcí IPTG, 9, 10 – vzorek bakteriální kultury po indukcí IPTG.

5.4 Izolace rekombinantního Tear lipocalinu za nativních podmínek a jeho imunochemická detekce prostřednictvím western blotu.

Izolace proteinu byla provedena pomocí kitu QIAexpress Type IV Kit (Qiagen). K izolaci byl použit 1 g bakteriální pelety z připravené bakteriální kultury. Frakce získané při izolaci proteinu byly dále testovány na přítomnost proteinu pomocí SDS-PAGE a wetern blotu a jejich koncentrace byla stanovena pomocí barvení Coomassie Brilliant Blue a relativní kvantifikací vůči BSA ředící řadě.

Imunochemická detekce Tear lipocalinu ve frakcích získaných při jeho izolaci je vizualizována na obr. č. 9. Ve všech vzorcích je přítomen protein o velikosti cca 18 kDa. Předpokládání molekulová hmotnost rekombinantního proteinu TL je 18 kDa, což odpovídá izolovanému proteinu.

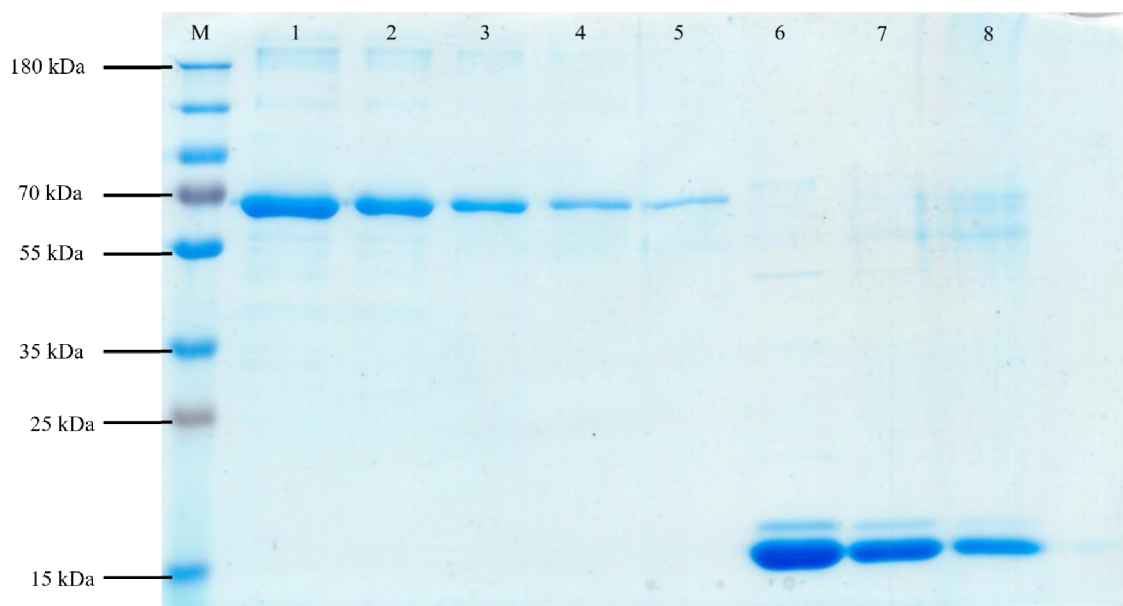


Obrázek 9: Imunochemická detekce izolovaného proteinu TL. Legenda: M – marker molekulové hmotnosti, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher), 1 – vzorek buněčného lyzátu před izolací proteinu; 2 – flow-through buněčného lyzátu po průchodu izolační kolonou; 3 – frakce prvního promytí kolony, 4 – frakce druhého promytí kolony; 5 – frakce první eluce; 6 – frakce druhé eluce.

5.5 Stanovení koncentrace izolovaného proteinu

Koncentrace izolovaného proteinu byla stanovena relativní kvantifikací vůči ředící řadě BSA pomocí programu Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Gel, ve kterém byly separovány proteiny a kalibrační řada BSA pomocí SDS-PAGE byly obarveny barvivem Coomassie Brilliant Blue a následně vizualizovány pomocí skeneru.

Na základě kalibrační řady BSA byla stanovena koncentrace izolovaného proteinu na 200 mg/ml. V celkovém objemu 400 μ l se nám podařilo vyizolovat 80 mg rekombinantního proteinu (viz obr. č. 10).



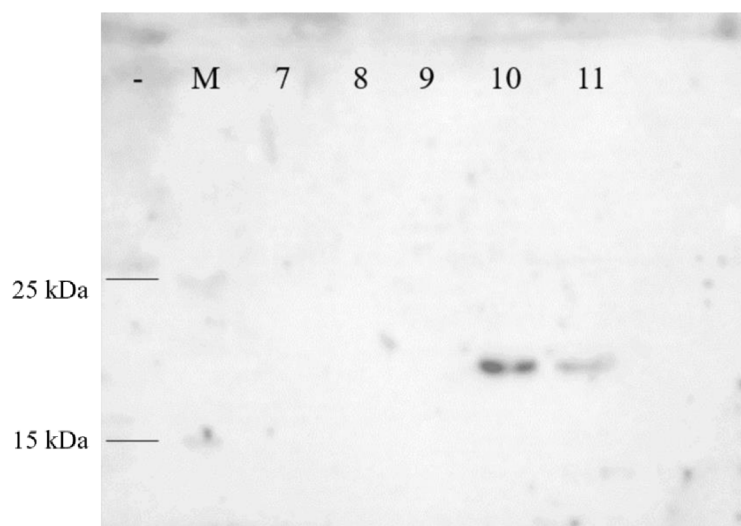
Obrázek 10: Výsledek elektroforetické separace BSA kalibrační řady a izolovaného TL o různém množství. Legenda: M – marker molekulové hmotnosti PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher), 1 – 5 kalibrační řada BSA (50 µg, 25 µg, 12,5 µg, 6,25 µg a 3, 125 µg BSA), 6 – 8 roztok izolovaného proteinu o rozdílných objemech (6–0,5 µl, 7–0,25 µl, 8– 0,1 µl).

5.6 Optimalizace navázání Tear lipocalinu přes 6x His Tag na kolonku s Ni-NTA agarozou

V rámci optimalizace byly upravovány podmínky centrifugace a složení některých pufrů. Navázání proteinu TL na kolonu s Ni-NTA agarozou přes 6x His Tag bylo po úpravě podmínek dosaženo u kroků č. 5 a 6 (viz tabulka č. 6). Přítomnost proteinu byla potvrzena imunochemickou detekcí pomocí SDS-PAGE a western blotu (viz obr. č. 11). Bylo dosaženo nastavení takových podmínek, při kterých se TL naváže na kolonu a při změně podmínek je potom možné jej vyeluovat.

Tabulka 6: Optimalizace navázání Tear lipocalinu přes 6x His Tag na kolonku s Ni-NTA agarozou.

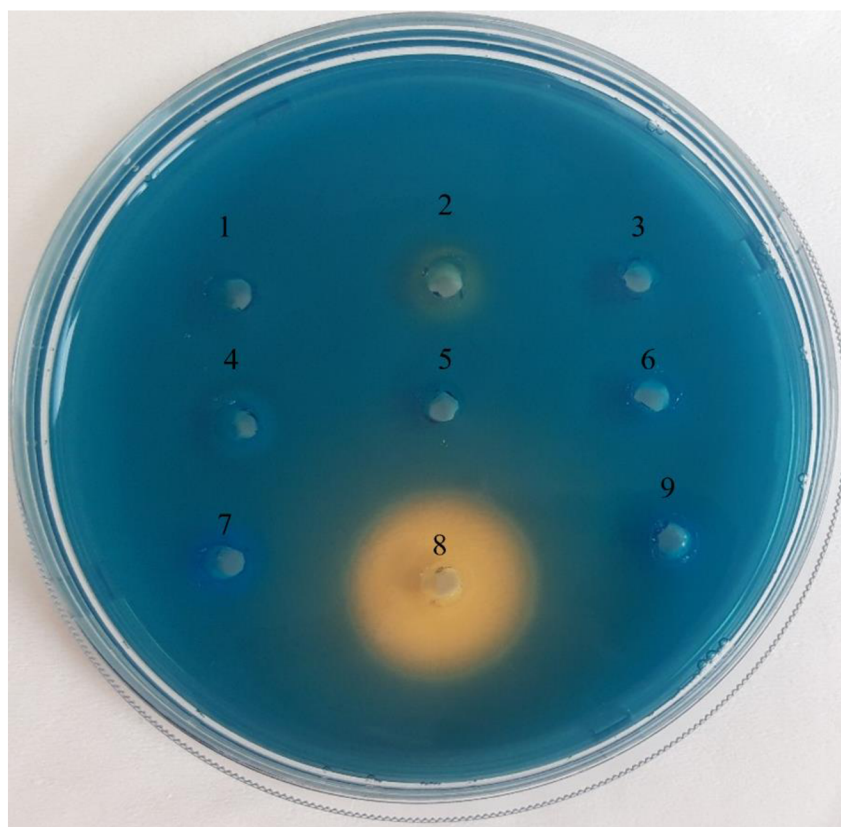
	Promývání	Navázání proteinu	Promytí	Eluce	Přítomnost proteinu v eluci
1.	600 µl SBP pufr 2 min, 6000 rpm	100 µg proteinu ve 100 µl SBP pufru 2 min, 6000 rpm	600 µl SBP pufr 2 min, 6000 rpm (2 x)	100 µl 10M imidazol 2 min/6000 rpm (2 x)	negativní
2.	600 µl SBP pufr 2 min, 1600 rpm	100 µg proteinu ve 100 µl SBP pufru 30 min inkubace na ledu	600 µl SBP pufr 2 min/1600 rpm (2 x)	100 µl 10M imidazol 2 min/1600 rpm (2 x)	negativní
3.	600 µl SBP pufr 2 min/2900 rpm	5 µg proteinu v 600 µl SBP pufru 2 min/2900 rpm	600 µl promývací pufr 2 min/2900 rpm (2 x)	300 µl eluční pufr 2 min/2900 rpm (2 x)	negativní
4.	600 µl SBP pufr 2 min/2900 rpm	5 µg proteinu v 600 µl SBP pufru 2 min/1600 rpm	600 µl SBP pufr 2 min/2900 rpm (2 x)	300 µl eluční pufr 2 min/2900 rpm (2 x)	negativní
5.	600 µl SBP pufr 2 min, 2900 rpm (2 x)	5 µg proteinu v 600 µl SBP pufru 5 min, 1600 rpm	600 µl promývací pufr 2 min, 2900 rpm viz obr. č. 10, vzorky 7–9	300 µl eluční pufr 2 min, 2900 rpm (2 x) viz obr. č. 10, vzorky 10, 11	pozitivní
6.	600 µl SBP pufr 2 min, 2900 rpm (2 x)	10 µg proteinu v 600 µl SBP pufru 5 min, 1600 rpm	600 µl promývací pufr 2 min, 2900 rpm	300 µl eluční pufr 2 min, 2900 rpm (2 x)	pozitivní



Obrázek 11: Imunochemická detekce proteinu TL ve frakcích z optimalizace protokolu pro navázání TL na kolonku s Ni-NTA agarozou. Legenda: M – marker molekulové hmotnosti PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher), 7, 8, 9 – frakce po promytí kolony promývacím pufrem, 10,11 – eluce navázaného proteinu elučním pufrem.

5.7 Optimalizace CAS assay

Při testování roztoků použitých při optimalizaci protokolu pro pre-purifikaci sideroforů (viz obr. č. 12) bylo zjištěno, že SBP pufr poskytuje falešnou pozitivitu. EDTA jakožto silné chelatační činidlo rovněž poskytovala silnou falešnou pozitivitu. Při testování roztoků sideroforů v ddH₂O bylo zjištěno, siderofory, které na sobě již měly navázané železo poskytovaly falešnou negativitu (viz obr. č. 13), veškeré další testy v rámci CAS assaye proto byly prováděny se siderofory bez navázaného železa: des-triacetylfusarinine C (Des-TAFC) a rhodotorulová kyselina (iron-free) (RHODO iron-free).



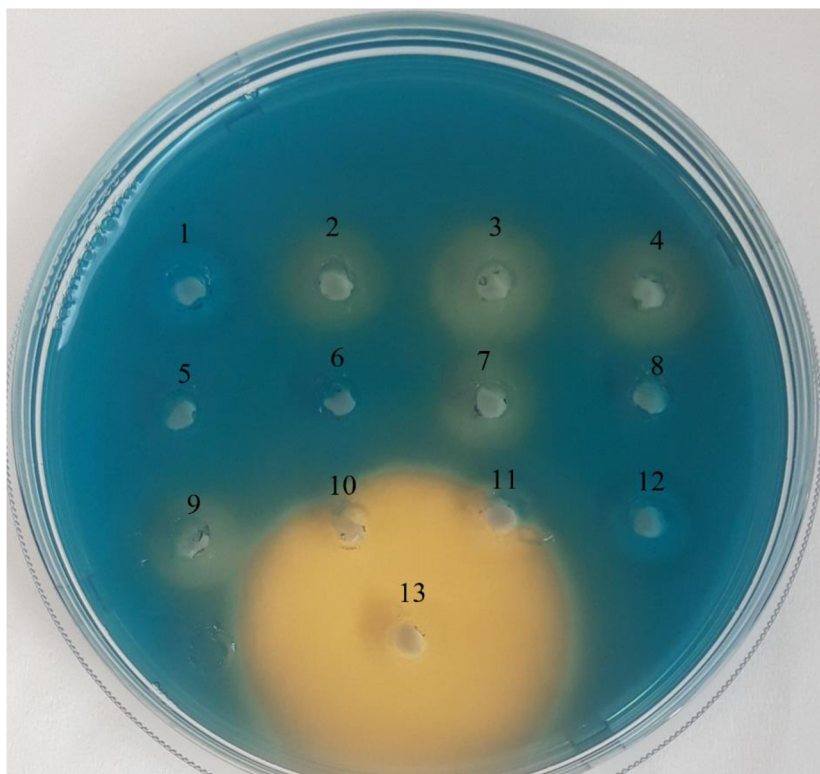
Obrázek 12: Testování interakce všech použitých roztoků a CAS assaye. Legenda: 1 – ddH₂O, 2 – SBP pufr, 3 –promývací pufr, 4 – eluční pufr, 5 – TAFC v ddH₂O (2 µg sideroforu), 6 – RHODO v ddH₂O (2 µg sideroforu), 7 – TAFC v ddH₂O (6 µg sideroforu), 8 – EDTA, 9 – RHODO v ddH₂O (6 µg sideroforu).

Interakce sideroforů a TL imobilizovaného na kolonce s Ni-NTA agarozou

Byly testovány jednotlivé frakce získané při optimalizaci protokolu pro navázání proteinu na kolonu s Ni-NTA a pre-purifikaci sideroforů.

Experiment A1)

Jelikož byly použity siderofory s již navázaným železem, tak byl výsledek detekce sideroforů pomocí CAS assaye negativní u všech frakcí. Pouze výše zmíněné roztoky poskytly falešnou pozitivitu (viz obr. č. 11). EDTA navíc jakožto silné chelatační činidlo odstranila železo velmi rychle a ve větším množství než ostatní roztoky tak, že znemožnila hodnocení vzorků č. 10 a 11.



Obrázek 13: Frakce získané při optimalizaci protokolu pro pre-purifikaci sideroforů. Legenda: 1 – eluce (z důvodu předchozího použití kolony); 2,3 – SBP pufr, 4 – TL v SBP pufru; 5,6 – promytí, 7 – DES-TAFC (10 μg v SBP pufru); 8 – promytí; 9 – RHODO iron-free (10 μg v SBP pufru); 10 – promytí; 11,12 – eluce; 13 – EDTA.

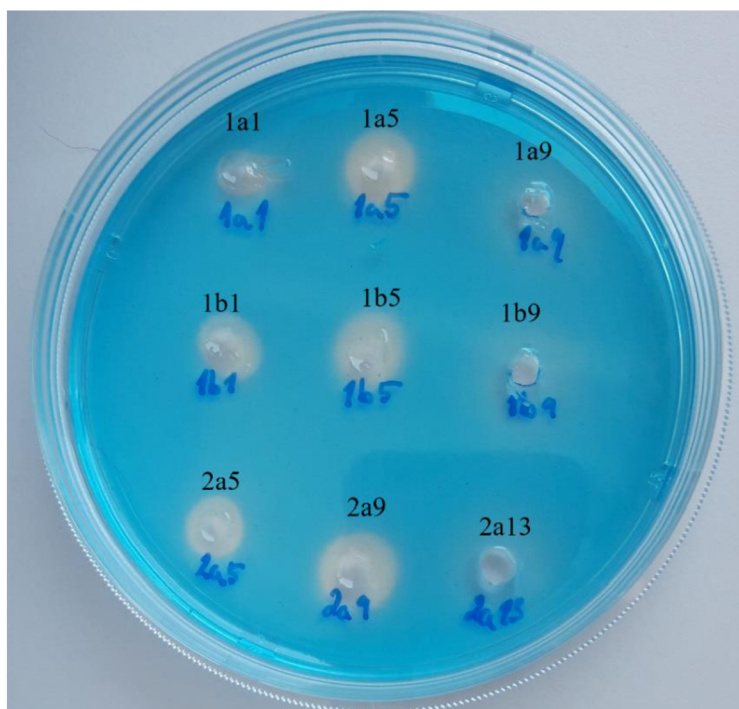
Experimenty B1), C1), D1), E1), A2), B2)

U těchto variant optimalizovaného protokolu byly použity siderofory bez navázaného železa. Zvlášť byly otestovány vzorky, u kterých se očekávala přítomnost sideroforů (viz obr. č. 14 a 15). Jednalo se o frakce, v rámci kterých byly siderofory buď aplikovány na kolonu, nebo z kolony již eluovány. Seznam vzorků, u kterých byla očekávaná pozitivní reakce je uveden v tabulce č. 7. U všech ostatních vzorků byla reakce s CAS assayí negativní. Pozitivní reakce na přítomnost sideroforů ve frakcích, ve kterých byly siderofory teprve vázány na TL byla způsobena aplikací nadměrného množství sideroforu do kolony. Nedošlo k navázání celého množství sideroforu na TL v koloně a nadbytek protekl kolonou ven (např. vzorky 1a1 a 1a5 u experimentu A2 v tabulce č. 7).

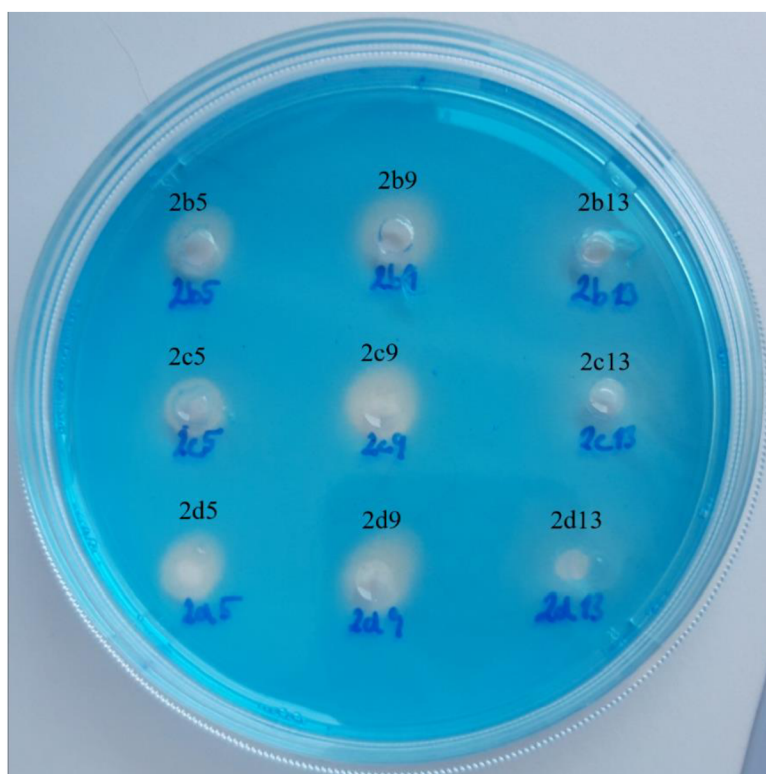
Tabulka 7: Seznam vzorků získaných při optimalizaci CAS assaye, u kterých byla očekávána přítomnost sideroforů (pozitivní reakce).

Označení vzorku/Experiment		Reakce
1a1/A2	Navázání sideroforu Des-TAFC (10 µg v 300 µl PBS pufu)	+
1a5/A2	Navázání sideroforu RHODO iron-free (10 µg v 300 µl PBS pufu)	+++
1a9/A2	Eluce TL s navázanými siderofory, 100 µl elučního pufu	+
1b1/B2	Navázání sideroforu Des-TAFC (10 µg v 300 µl ddH ₂ O)	++
1b5/B2	Navázání sideroforu RHODO iron-free (10 µg v 300 µl ddH ₂ O)	+++
1b9/B2	Eluce TL s navázanými siderofory, 100 µl elučního pufu	+
2a5/B1	Navázání sideroforu Des-TAFC (10 µg v 300 µl PBS pufu)	++
2a9/B1	Navázání sideroforu RHODO iron-free (10 µg v 300 µl PBS pufu)	+++
2a13/B1	Eluce TL s navázanými siderofory, 100 µl elučního pufu	+
2b5/C1	Navázání sideroforu Des-TAFC (10 µg v 300 µl ddH ₂ O)	++
2b9/C1	Navázání sideroforu RHODO iron-free (10 µg v 300 µl ddH ₂ O)	+++
2b13/C1	Eluce TL s navázanými siderofory, 100 µl elučního pufu	+
2c5/D1	Navázání sideroforu Des-TAFC (10 µg v 300 µl ddH ₂ O)	++
2c9/D1	Navázání sideroforu RHODO iron-free (10 µg v 300 µl ddH ₂ O)	+++
2c13/D1	Eluce TL s navázanými siderofory, 100 µl elučního pufu	+
2d5/E1	Navázání sideroforu Des-TAFC (10 µg v 300 µl PBS pufu)	++
2d9/E1	Navázání sideroforu RHODO iron-free (10 µg v 300 µl PBS pufu)	+++
2d13/E1	Eluce TL s navázanými siderofory, 100 µl elučního pufu	+

Legenda: + slabá pozitivní reakce, ++ pozitivní reakce, +++ velmi silná pozitivní reakce



Obrázek 14: Frakce získané při optimalizaci protokolu pro pre-purifikaci sideroforů, u kterých byla očekávána přítomnost sideroforů. Legenda: 1a1, 1a5, 1a9, 1b1, 1b5, 1b9, 2a5, 2a9, 2a13 – viz tabulka č. 4.



Obrázek 15: Frakce získané při optimalizaci protokolu pro pre-purifikaci sideroforů, u kterých byla očekávána přítomnost sideroforů. Legenda: 2b5, 2b9, 2b13, 2c5, 2c9, 2c13, 2d5, 2d9, 2d13 – viz tabulka č. 4.

6. DISKUZE

Cílem práce bylo vyvinout a optimalizovat protokol pro afinitní pre-purifikaci sideroforů, které by poté mohly být identifikovány pomocí MALDI-TOF MS s cílem laboratorně prokázat či vyvrátit přítomnost mikroorganismů, které jednotlivé siderofory produkují. Pro afinitní pre-purifikaci sideroforů bylo využito jejich přirozeného ligandu, Tear lipocalinu neboli „slzného lipocalinu“, který se běžně vyskytuje v lidských sliznicích a žlázách. Zmíněný protein má díky vysoké afinitě vůči sideroforům antimikrobiální efekt.

Rekombinantní protein byl úspěšně produkován a izolován. Jeho charakterizace a identifikace byla provedena prostřednictvím separace SDS-PAGE a následného barvení celkového proteinu pomocí Coomassie brilliant blue nebo po přenosu na PVDF membránu chemiluminiscenční detekcí prostřednictvím HIS tag-specifické HRP-značené protilátky.

Izolace rekombinantního proteinu byla provedena v Ni-NTA agarose v Glass Econo-Column® Columns (Bio-Rad), v průběhu izolace byly sbírány všechny frakce, které byly poté testovány na přítomnost rekombinantního TL. Rekombinantní protein se eluoval již ve frakci druhého promytí pufrům obsahujícím 20 mM imidazol. Eluce při této koncentraci imidazolu byla pozorována i jinými autory při purifikaci jiných proteinů, což nasvědčuje potřebě optimalizovat izolační protokol pro TL s použitím jemnější řady koncentrací imidazolu v promývacím kroku. V rámci této práce optimalizace izolačního protokolu provedena nebyla vzhledem k omezené kapacitě produkovat TL ve větších kultivačních reakcích, a protože to nebylo předmětem práce. Hlavním cílem byla v tomto případě izolace proteinu, který byl sebrán pro další experimenty z druhé promývací frakce. Breustedt *et al.* (2006) doporučuje, aby byly rekombinantní lipokaliny podrobeny gelové permeační chromatografii, aby se odstranily kontaminanty s nízkou molekulovou hmotností pocházející z bakteriální hostitelské buňky.

Na základě porovnání izolovaného proteinu s markerem molekulové hmotnosti byla stanovena jeho hmotnost na 18 kDa, přičemž 1 kDa z této hmotnosti odpovídá 6x His Tagu, který je k proteinu přiklonován pro snadnější purifikaci – pomocí afinitní NiNTA agarosové kolony. Koncentrace izolovaného proteinu byla stanovena na hodnotu 200 mg/ml. Z celkového objemu 35 ml kultury bylo tedy vyzolováno 80 mg Tear lipocalinu.

Optimalizace navázání Tear lipocalinu na kolonku s Ni-NTA agarozou byla provedena na základě protokolu od Rivera *et al.* (2018) s drobnými úpravami. Optimalizace protokolu pro navázání TL na kolonu s Ni-NTA agarozovou centrifugační kolonku (přes 6x His Tag) byla úspěšná. Klíčovou podmínkou při vazbě proteinu na kolonku byla změna počtu otáček při centrifugaci. Optimální hodnota 1 600 RPMI umožnila zachytit na koloně 100 % naneseného TL, což bylo potvrzeno kvalitativně průkazem imunochemickou detekcí pomocí Anti-HIS protilátky

na Western blot.

Tear lipocalin navázaný na koloně sloužil k zachycení sideroforu jakožto jeho přirozený ligand. Afinita různých sideroforů k Tear lipocalinu se liší, podle Fluckinger *et al.* (2004) má nejvyšší afinitu k sideroforu Rhodotorulová kyselina. Z toho důvodu byla v rámci této práce použita jako siderofor, kterým by bylo možné vytěsnit ostatní siderofory z vazby na TL. Rivera *et al.* (2018) rovněž uvádí, že eluci sideroforu navázaného na protein je možné provést jiným sideroforem, který má k použitému proteinu vyšší afinitu a první siderofor tak z vazby vytěsní. Druhou možností uvolnění sideroforů z kolony je odstripování sideroforu i s navázaným lipocalinem pomocí EDTA. V tomto případě by ovšem nebylo možné provést detekci sideroforů pomocí CAS assaye, protože EDTA jakožto chelatační činidlo poskytuje falešnou pozitivitu. V této práci ovšem nebyl zajištěn dostatečný průkaz detekce sideroforů, které byly použity v experimentu. Rovněž nebyla provedena kalibrace CAS analýzy u použitých sideroforů z hlediska citlivosti a detekčního limitu.

Přesto, že Rivera *et al.* (2018) použili kolonu s Ni-NTA agarosou, v rámci stejné studie také prokázal, že např. desferrioxamin (DFO) tvoří koordinační komplexy s Ni-NTA agarosou. Aby se vyhnuli nespecifické chelataci, použili formy sideroforů již vázané na železo. V rámci této práce bylo použito jak sideroforu se železem, tak bez železa. Vzhledem k limitaci detekce sideroforů s železem pomocí CAS nebylo možné použít tuto rychlou detekci pro optimalizaci podmínek afinitní pufrifikace a jediným nástrojem je průkaz pomocí hmotnostní spektrometrie, který v současnosti probíhá. Aby bylo možné se vyhnout kovalentní vazbě sideroforu na Ni-NTA agarosu je možné v dalších experimentech použít jinou kolonu pro zachycení TL jako například coiled-coil vazbu, kde protein je modifikován coiled coil funkčním peptidem a agarosa je funkcionalizována interagujícím peptidem nebo je možné navázat TL protein na HS-funcionalizovanou agarosu nebo magnetické kuličky pomocí sulfo-SMCC chemis a dalších, či použít jiný protein, jak to uvádí Chu *et al.* (2014) nebo (Bailey *et al.*, 2018). Všech případech jde o mezikrok, který zvýší spektrum zachytitelných sideroforů jež musí být testována. Popsaná koordinační vazba DFO nemusí být v principu překážkou, neboť cílem není prepurifikace DFO, ale bakteriálních sideroforů které nemusí nutně s NiNTA agarsou reagovat.

Další otázkou dalšího výzkumu v rámci vazby sideroforů na TL je skutečnost, že dosud není známo, do jakého místa na molekule TL se siderofory váží a v jakém množství. Breustedt *et al.* (2005), kteří se věnovali studiu molekuly TL zjistili přítomnost rozvětvené dutiny s kapacitou pro vazbu více ligandů. Ale vzhledem k tomu, že spektrum ligandů, které váže TL je značně obsáhlé, zatím nebylo zjištěno, jakým způsobem a v jakém množství se jednotlivé siderofory na TL vážou.

Po úspěšné vazbě proteinu na kolonu byla testována specifická interakce sideroforů s TL a jejich eluce pro další zpracování pomocí hmotnostní spektrometrie. Cílem bylo navázat siderofor TAFC na kolonu s již navázaným TL a následně eluovat TAFC sideroforem RHODO, který má k lipocalinu vyšší afinitu (Fluckinger *et al.*, 2004). Přítomnost sideroforů v jednotlivých frakcích byla ověřena CAS assayí. Nicméně bylo zjištěno, že siderofory, které na sobě již měly navázané železo s CAS assayí pozitivní reakci neposkytují, protože nedochází k chelataci železa z média. Pro další experimenty byly tedy použity siderofory, které na sobě železo navázané neměly. Dále bylo prokázáno, že některé organické sloučeniny a nízkoafinitní chelátory železa v komplexních médiích mohou interferovat s assayí a poskytovat falešně pozitivní výsledek, jak popisuje Shin *et al.* (2001).

7. ZÁVĚR

V rámci své diplomové práce jsem vypracovala literární rešerši, která se zabývala zejména tématikou bakteriálních onemocnění a sideroforů. V experimentální části jsem se zabývala přípravou rekombinantního proteinu, jeho izolací a charakterizací pomocí SDS-PAGE a barvením Coomassie brilliant blue a imunochemickou detekcí pomocí Anti-HIS protilátky na Western blotu.

Cílem mé práce bylo vyvinout a optimalizovat protokol pro afinitní pre-purifikaci sideroforů, který by zahrmoval navázání rekombinantního TL přes 6x His Tag na kolonu s Ni-NTA agarozou a následně purifikaci roztoku sideroforu na základě jejich afinity k TL. Takto purifikovaný roztok sideroforů by poté mohl být použit k jejich identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie. V rámci optimalizace jsem použila CAS assay pro stanovení přítomnosti sideroforů v jednotlivých frakcích odebraných v rámci postupu.

V budoucnu by bylo vhodné provést optimalizaci protokolu pro izolaci rekombinantního Tear lipocalinu a upravit zejména koncentrace imidazolu, aby nedocházelo k předčasné eluci proteinu již v rámci promývání kolony.

Úspěšnost eluce sideroforů z kolony s navázaným TL na základě jejich rozdílné afinity ke zmíněnému proteinu, a tedy vytěsnění sideroforu TAFC z vazby na protein sideroforem RHODO se nedala ověřit, protože pomocí CAS assay je možné pouze prokázat přítomnost sideroforu, nelze tak určit o který siderofor se jedná. CAS assay rovněž nebyla optimalizovaná a nebyl stanoven detekční limit pro použité siderofory.

Použití kolony s Ni-NTA agarozou je pro protokol vazby Tear lipocalinu na kolonu nevhodné, protože může docházet k nesespecifickým interakcím sideroforů a nikelnatých iontů z Ni-NTA agarozy. Vhodnější by bylo použít pro purifikaci sideroforů protein kovalentně navázaný na nosiči bez přítomnosti jakýchkoliv kovových iontů. Další možností, jak se vyhnout nesespecifickým interakcím sideroforů je použití sideroforů s již navázaným železem. Za těchto podmínek ovšem siderofory nelze detekovat pomocí CAS assay.

8. LITERATURA

- Ali, S.S., Vidhale, N.N. (2016): Bacterial Siderophore and their Application : A review Review Article Bacterial Siderophore and their Application : A review.
- Bailey, D.C., Bohac, T.J., Shapiro, J.A., Giblin, D.E., Wencewicz, T.A., Gulick, A.M. (2018): Crystal Structure of the Siderophore Binding Protein BauB Bound to an Unusual 2:1 Complex between Acinetobactin and Ferric Iron. *Biochemistry* 57: 6653–6661.
- Breustedt, D.A., Korndörfer, I.P., Redl, B., Skerra, A. (2005): The 1.8-Å crystal structure of human tear lipocalin reveals an extended branched cavity with capacity for multiple ligands. *Journal of Biological Chemistry* 280: 484–493.
- Breustedt, D.A., Schönfeld, D.L., Skerra, A. (2006): Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1764: 161–173.
- Carroll, C.S., Amankwa, L.N., Pinto, L.J., Fuller, J.D., Moore, M.M. (2016): Detection of a serum siderophore by LC-MS/MS as a potential biomarker of invasive aspergillosis. *PLoS ONE* 11: 1–16.
- Chu, B.C.H., Otten, R., Krewulak, K.D., Mulder, F.A.A., Vogel, H.J. (2014): The solution structure, binding properties, and dynamics of the bacterial siderophore-binding protein FepB. *Journal of Biological Chemistry* 289: 29219–29234. © 2014 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- Chua, A.C.G., Ingram, H.A., Raymond, K.N., Baker, E. (2003): Multidentate pyridinones inhibit the metabolism of nontransferrin-bound iron by hepatocytes and hepatoma cells. *European Journal of Biochemistry* 270: 1689–1698.
- Chun, K., Syndergaard, C., Damas, C., Trubey, R., Mukindaraj, A., Qian, S., Jin, X., Breslow, S., Niemz, A. (2015): Sepsis Pathogen Identification. *Journal of Laboratory Automation* 20: 539–561.
- Chvojka, J., Matějovič, M. (2010): Multiple organ dysfunction syndrome: Update 2010. *Cor et Vasa* 52: 116–120. *Cor et Vasa*.
- Cole, D.C., Govender, N.P., Chakrabarti, A., Sacarlal, J., Denning, D.W. (2017): Improvement of fungal disease identification and management: combined health systems and public health approaches. *The Lancet Infectious Diseases* 17: e412–e419. Elsevier Ltd.

- Crosa, J.H., Walsh, C.T. (2002): Genetics and Assembly Line Enzymology of Siderophore Biosynthesis in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 223–249.
- Dartt, D.A. (2011): Tear lipocalin: Structure and function. *Ocular Surface* 9: 126–138. Elsevier Inc.
- Denning, D.W. (2016): Minimizing fungal disease deaths will allow the UNAIDS target of reducing annual AIDS deaths below 500 000 by 2020 to be realized. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371.
- Farah, C.S., Ashman, R.B., Challacombe, S.J. (2000): Oral candidosis: *Clinics in Dermatology* 18: 553–562.
- Fluckinger, M., Haas, H., Merschak, P., Glasgow, B.J., Redl, B. (2004): Human tear lipocalin exhibits antimicrobial activity by scavenging microbial siderophores. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 3367–3372.
- Górska, A., Sloderbach, A., Marszał, M.P. (2014): Siderophore-drug complexes: Potential medicinal applications of the ‘Trojan horse’ strategy. *Trends in Pharmacological Sciences* 35: 442–449.
- Hider, R.C. (2007): Siderophore mediated absorption of iron. *Siderophores from Microorganisms and Plants*: 25–87.
- Hrabák, J., Chudáčková, E., Walková, R. (2013): Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDITOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: From research to routine diagnosis. *Clinical Microbiology Reviews* 26: 103–114.
- Jan, H., Nad'a, M., Evženie, K., Markéta, H., Jan, K., Ivan, H., Praha, U.K. (2008): Epidemiologie invazivní kandidózy a kandidémie – stále aktuální problém. *Anesteziologie a intenzivní medicína* 19: 110–119. *Anesteziologie a intenzivní medicína*.
- Köster, W. (2001): ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Research in Microbiology* 152: 291–301.
- Kuklová, I. (2015): Kandidózy kůže a sliznic: 47–55.
- Lin, S., Schranz, J., Teutsch, S.M. (2001): Aspergillosis Case-Fatality Rate : Systematic Review of the Literature 60612.
- López-Martínez, R. (2010): Candidosis, a new challenge. *Clinics in Dermatology* 28: 178–184. Elsevier Inc.

- Luckey, M., Pollack, J.R., Wayne, R., Ames, B.N., Neilands, J.B. (1972): Iron uptake in *Salmonella typhimurium*: utilization of exogenous siderochromes as iron carriers. *Journal of Bacteriology* 111: 731–738.
- Luptáková, D., Pluháček, T., Petřík, M., Novák, J., Palyzová, A., Sokolová, L., Škriba, A., Šedivá, B., Lemr, K., Havlíček, V. (2017): Non-invasive and invasive diagnoses of aspergillosis in a rat model by mass spectrometry. *Scientific Reports* 7: 1–10.
- Lynne, A.M., Haarmann, D., Loudon, B.C. (2011): Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of Microbiology & Biology Education* 12: 51–53.
- Maziarz, E.K., Perfect, J.R. (2016): Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America* 30: 179–206.
- Miethke, M., Marahiel, M.A. (2007): Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71: 413–451.
- Mühl, H., Kochem, A.J., Disqué, C., Sakka, S.G. (2010): Activity and DNA contamination of commercial polymerase chain reaction reagents for the universal 16S rDNA real-time polymerase chain reaction detection of bacterial pathogens in blood. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 66: 41–49. Elsevier Inc.
- Nagoba, B., Vedpathak, D. (2011): Medical applications of siderophores. *European Journal of General Medicine* 8: 229–235.
- Negróni, R. (2012): Cryptococcosis. *Clinics in Dermatology* 30: 599–609.
- Patel, K., Butala, S., Khan, T., Suvarna, V., Sherje, A., Dravyakar, B. (2018): Mycobacterial siderophore: A review on chemistry and biology of siderophore and its potential as a target for tuberculosis. *European Journal of Medicinal Chemistry* 157: 783–790. Elsevier Masson SAS.
- Paul, A., Dubey, R. (2018): Characterization of Protein involve in Nitrogen Fixation and Estimation of CO Factor. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research* 5: 976–2612.
- Pluháček, T., Lemr, K., Ghosh, D., Milde, D., Novák, J., Havlíček, V. (2016): Characterization of microbial siderophores by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 35: 35–47.
- Del Poeta, M. (2016): Special Issue: Novel antifungal drug discovery. *Journal of Fungi* 2: 1–5.
- Redl, B. (2000): Human tear lipocalin. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and*

Molecular Enzymology 1482: 241–248.

Reimer, L.G., Wilson, M.L., Weinstein, M.P. (1997): Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clinical Microbiology Reviews* 10: 444–465.

Renshaw, J.C., Robson, G.D., Trinci, A.P.J., Wiebe, M.G., Livens, F.R., Collison, D., Taylor, R.J. (2002): Fungal siderophores: Structures, functions and applications. *Mycological Research* 106: 1123–1142.

Rivera, G.S.M., Beamish, C.R., Wencewicz, T.A. (2018): Immobilized FhuD2 Siderophore-Binding Protein Enables Purification of Salmycin Sideromycins from *Streptomyces violaceus* DSM 8286. *ACS Infectious Diseases* 4: 845–859.

Sah, S., Singh, R. (2015): Siderophore: Structural And Functional Characterisation - A Comprehensive Review. *Agriculture* 61: 97–114.

Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B.K., Bhattacharjee, S., Tribedi, P. (2016): Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 3984–3999.

Schmiedel, Y., Zimmerli, S. (2016): Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and *Pneumocystis pneumonia*. *Swiss medical weekly* 146: w14281.

Schwyn, B., Neilands, J.B. (1987): Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160: 47–56.

Shin, S.H., Lim, Y., Lee, S.E., Yang, N.W., Rhee, J.H. (2001): CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *Journal of Microbiological Methods* 44: 89–95.

Svobodová, R. (2012): Systémová onemocnění požív a jejich komplikace. *Interni Medicina pro Praxi* 14: 443–446.

Troxell, B., Hassan, H.M. (2013): Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4: 1–13.

Tsafack, A., Libman, J., Shanzer, A., Cabantchik, Z.I. (1996): Chemical determinants of antimalarial activity of reversed siderophores. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 2160–2166.

Wilson, B.R., Bogdan, A.R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., Tsuji, Y. (2016): Siderophores in Iron

Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. *Trends in Molecular Medicine* 22: 1077–1090.

Winkelmann, G. (2002): Microbial siderophore-mediated transport. *Biochemical Society Transactions* 30: 691–696.

Zavala, S., Baddley, J.W. (2020): Cryptococcosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 41: 069–079.