

**Univerzita Hradec Králové**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biologie**

Proteomická charakterizace vybraných kmenů bakterií  
produkcujících Shiga toxiny

Bakalářská práce

Autor: Pavla Kolářová  
Studijní program: B1501 - Biologie  
Studijní obor: BSP Systematická biologie a ekologie

Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.  
Odborný konzultant: Ing. Mgr. Miloslava Ďuráčová



## Zadání bakalářské práce

**Autor:** Pavla Kolářová

Studium: S18BI072BP

Studijní program: B1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

**Název bakalářské práce:** **Proteomická charakterizace vybraných kmenů bakterií produkujících Shiga toxiny**

Název bakalářské práce AJ: Proteomic characterization of bacterial strains containing Shiga toxins

### **Cíl, metody, literatura, předpoklady:**

Bakalářská práce je zaměřena na charakterizaci (růstové křivky, optimalizace růstového média a agaru a jiných kultivačních podmínek apod.) vybraných kmenů bakterií, které jsou producenty Shiga toxinů. Jde o vybrané zástupce bakterií *Shigella dysenteriae* a *Escherichia coli* STEC.

S ohledem na produkci Shiga toxinu bude vybrána optimální metoda kultivace, doba kultivace, vhodná média a postupy pro získání těchto toxinů v nativní formě pro následné analýzy pomocí gelové elektroforézy a hmotnostní spektrometrie.

Klíčová slova: Shiga toxin, kultivace, proteinové toxiny, hmotnostní spektrometrie, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* STEC

1. Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr.* 2014;2(4):10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013
2. Jonas Bergan, Anne Berit Dyve Lingelem, Roger Simm, Tore Skotland, Kirsten Sandvig, Shiga toxins, *Toxicon*, Volume 60, Issue 6, 2012, Pages 1085-1107, ISSN 0041-0101, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.07.016>

Garantující pracoviště: Katedra biologie,  
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 23.1.2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Hradci Králové dne

Jméno a příjmení

## **Poděkování**

Děkuji vedoucí práce RNDr. Aleně Myslivcové Fučíkové, Ph.D. za vstřícnost, čas a dohled nad mou prací, dále Ing. Mgr. Miloslavě Ďuráčové za mnoho cenných rad a trpělivost, Mgr. Věře Vozandychové za praktické rady a Katedře molekulární patologie a biologie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany za poskytnutí materiálu a přístrojového vybavení. Děkuji svým rodičům za podporu během celého studia a Rostovi za oporu.



## Anotace

KOLÁŘOVÁ, P. Proteomická charakterizace vybraných kmenů bakterií produkujících Shiga toxiny. Hradec Králové, 2021. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D. 49 s.

Bakalářská práce je zaměřena na charakterizaci (růstové křivky, optimalizace růstového média a agaru a jiných kultivačních podmínek apod.) vybraných kmenů bakterií, které jsou producenty Shiga toxinů. Jde o vybrané zástupce bakterií *Shigella dysenteriae* a *Escherichia coli* STEC. S ohledem na produkci Shiga toxinu bude vybrána optimální metoda kultivace, doba kultivace, vhodná média a postupy pro získání těchto toxinů v nativní formě pro následné analýzy pomocí gelové elektroforézy a hmotnostní spektrometrie.

Klíčová slova: Shiga toxin, kultivace, proteinové toxiny, hmotnostní spektrometrie, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* STEC

## **Annotation**

KOLÁŘOVÁ, P. *Proteomic characterization of bacterial strains containing Shiga toxins*. Hradec Králové, 2021. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis supervisor RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D. 49 s.

The bachelor thesis is focused on the characterization (growth curves, optimization of growth medium and agar and other culture conditions etc.) of selected strains of bacteria (representatives of *Shigella dysenteriae* and *Escherichia coli* STEC), which are Shiga toxin producers. With regards to production of Shiga toxin the optimal method of cultivation, culture time, convenient media and procedures for obtaining these toxins in native form for subsequent analysis using gel electrophoresis and mass spectrometry will be selected.

Key words: Shiga toxin, cultivation, protein toxins, mass spectrometry, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* STEC

# Obsah

Úvod .....	9
1. Teoretická část.....	10
1.1.Vysoce riziková biologická agens a toxiny .....	10
1.2.Bakteriální kmeny <i>Shigella dysenteriae</i> a <i>Escherichia coli</i> .....	12
1.2.1.Základní charakteristika vybraných kmenů.....	12
1.2.2.Místo výskytu genů pro toxiny .....	12
1.3.Patogenita vybraných kmenů.....	13
1.3.1.Základní složky patogenity .....	13
1.3.2.Klinický obraz onemocnění vyvolaném <i>E. coli</i> .....	13
1.3.3.Klinický obraz onemocnění způsobeného bakterií <i>Shigella dysenteriae</i> .....	16
1.4.Toxiny .....	16
1.4.1.Exotoxiny .....	16
1.4.2.Shiga toxin.....	16
1.5.Metody analýzy toxinů a jejich původců.....	18
1.5.1.Kultivace.....	18
1.5.2.Metody imunodetekce.....	20
1.5.3.Detekce pomocí PCR.....	21
1.5.4.Hmotnostní spektrometrie – identifikace a cílená proteomická analýza.....	22
1.5.5.Příprava proteinového vzorku.....	23
2. Praktická část.....	25
2.1.Laboratorní materiál.....	25
2.1.1.Bakteriální kmeny.....	25
2.1.2.Agary a tekutá média.....	25
2.1.3.Chemické látky .....	25
2.1.4.Kapalinová chromatografie a kolony .....	26
2.1.5.Kity .....	27
2.1.6.Laboratorní materiál .....	27
2.1.7.Přístroje a programové vybavení .....	27
2.2.Kultivace .....	28

2.3. Izolace proteinového obsahu a jeho kvantifikace.....	28
2.3.1. Sonikace .....	28
2.3.2. Bakteriální lýza s využitím CelLytic™ Express.....	29
2.3.3. Bakteriální lýza s využitím deoxycholátu sodného .....	29
2.3.4. Kvantifikace proteinového vzorku.....	30
2.4. Gelová elektroforéza (1D SDS-PAGE).....	30
2.5. Příprava vzorků pro MS.....	31
2.5.1. Enzymatické štěpení lyzátů připravených s 5% DOCHNa.....	31
2.5.2. Enzymatické štěpení vzorků připravených s CelLytic™ Express ....	31
2.5.3. Kapalinová chromatografie s UV kontrolou a následná analýza pomocí hmotnostní spektrometrie .....	32
3. Výsledky a diskuse .....	34
3.1. Měření proteinového obsahu ve vzorku.....	34
3.2. Gelová elektroforéza .....	35
3.3. Identifikace proteinů s využitím LC-MS/MS.....	38
Závěr.....	41
Seznam použitých zkratk.....	42
Seznam zdrojů.....	44

## Úvod

Bakterie jsou nezbytnou součástí života na Zemi, jelikož svou přítomností ovlivňují vývoj dalších živých organismů i vývoj prostředí. Některé zástupce nalézáme v lidském těle, jako součást střevní mikroflóry, jiné na hlízách rostlin pro fixaci dusíku apod. Ne vždy je přítomnost bakterií žádoucí, protože mohou způsobovat řadu různě závažných onemocnění. Tuto vlastnost mají mimo jiné díky schopnosti produkovat specifické bakteriální toxiny, jejichž toxicita souvisí s koncentrací a citlivostí atakovaného jedince. Pokud není provedena včasná diagnostika a zahájena léčba, může v závažných případech dojít k úmrtí. Je důležité si uvědomit, že produkce toxinů není samozřejmostí. Bakteriální toxiny jsou často sekundárními produkty metabolismu a bakterie je tudíž netvoří vždy. Ačkoliv je na bakteriální toxiny nahlíženo především negativně, existují oblasti, kde se jejich funkce mohou využít, například v onkoterapii.

Jedním z diskutovaných problémů v souvislosti s bakteriálními toxiny je jejich možné zneužití při výrobě biologických zbraní. Ze stejného důvodu je použití některých bakteriálních zástupců ošetřeno zákonem č. 281/2002 Sb. V případě Shiga toxinu je sice riziko zneužití malé, ale stále se jedná o nezanedbatelnou hrozbu. Riziková bakteriální agens jsou rozdělena podle míry nebezpečnosti a od toho se odvíjí zabezpečení laboratoře, které konkretizuje vyhláška č. 474/2002 Sb.

Cílem této bakalářské práce je poukázat na problematiku a dosavadní poznatky o detekčních metodách, bakteriálních toxinech, konkrétně Shiga toxinu a v rámci praktické části, s využitím hmotnostně spektrometrické analýzy ve spojení s kapalinovou chromatografií a též s elektroforetickými metodami, detekovat Shiga toxin pro charakterizaci vybraných bakteriálních kmenů *Shigella dysenteriae* a *Escherichia coli*.

# 1. Teoretická část

Zástupci z kmene *Bacteria* jsou běžnou součástí lidského života a jedná se o nejrozšířenější skupinu živých organismů na Zemi. Nalezneme je v ovzduší, půdě, vodě a v neposlední řadě také v živých organismech. Ačkoliv někteří jedinci vystupují jako vnější, popř. vnitřní symbionti, a nepůsobí tak jinému organismu obtíže, existují rody, jež mohou v krajních případech zapříčinit smrt hostitele (Bergey 2005). S tím souvisí jejich schopnost tvorby nejrůznějších toxinů, ať už se jedná o neurotoxiny, cytotoxiny nebo enterotoxiny, zmiňované dále.

Bakterie produkující toxiny označujeme, společně s dalšími biologickými faktory způsobujícími onemocnění hostitele (viroidy, viry etc.), jako patogeny. Tyto toxiny produkují nejčastěji z důvodu vlastního poškození a jejich působením může dojít k poškození případně usmrcení jiného organismu (hostitele apod.). Patogeny jsou charakteristické určitou hodnotou virulence, která je kvantitativním vyjádřením patogenity. Jednotlivé kmeny se v rámci druhu mohou lišit právě mírou virulence.

## 1.1. Vysoce riziková biologická agens a toxiny

*Shigella dysenteriae* a enterotoxigenní *Escherichia coli*, jsou, stejně jako řada dalších patogenů, potenciální biologickou hrozbou a mohly by být zneužity formou biologické zbraně, například kontaminací pitné vody. Z toho důvodu je jejich použití ošetřeno zákonem č. 281/2002 Sb. *O některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona*, kde je specifikována potřebná způsobilost k nakládání s rizikovými agens, pravidla jejich evidence, přeprava, zabezpečení a v neposlední řadě pokuty spojené s porušením těchto pravidel. Povolení, potřebná k nakládání s vysoce rizikovými agens, vydává Státní úřad pro jadernou bezpečnost (SÚJB). Žadatel o povolení musí uvést své osobní údaje, účel, množství a název rizikového agens případně toxinu, místo výkonu činnosti a zároveň doložit technickou dokumentaci budovy (laboratoře), v níž bude povolovaná činnost vykonávána. Podmínkou pro vydání povolení je dále trestní bezúhonnost, odborná způsobilost a pobyt nebo sídlo na území České republiky (Zákon č. 281/2002 Sb.).

Vybavenost laboratoře a práce v ní je určena úrovní biologické bezpečnosti tzv. *biosafety level*. Tato úroveň je stanovena vzhledem k patogenitě organismů, s nimiž se v laboratoři pracuje, nese označení BSL a nabývá hodnot 1-4 (nejvyšší úroveň zabezpečení BSL-4). *Shigella dysenteriae* i enterotoxigenní *Escherichia coli* jsou řazeny do skupiny 2 a smí se s nimi pracovat v laboratořích BSL-2 (vyhláška č. 474/2002 Sb.). Rozdělení laboratoří BSL-1 až BSL-4 nesouvisí se zařazením rizikových agens do skupin

1-4. Skupinou 2 se rozumí taková biologická agens, která mohou zapříčinit onemocnění člověka, ale bezprostředně jej neohrožují na životě a obvykle je dostupná léčba případně účinná profylaxe (SÚJB). Laboratoř BSL-2 musí být označena symbolem biologického nebezpečí, je zde nutné použití ochranných osobních pomůcek a práce s rizikovými biologickými agens probíhá převážně v boxu s laminárním prouděním (MBB). Před vstupem do laboratoře je nutná dezinfekce rukou, stejně jako před odchodem z laboratoře. Stejně jako v ostatních typech laboratoří, i zde je zapovězeno jíst a pít. Všechny používané látky, mikroorganismy a vzorky je třeba důkladně popsat názvem, datem, jménem laboratorního pracovníka a uchovávat vhodným způsobem. Kontaminované pomůcky jsou zlikvidovány podle platných předpisů. Požadavky na vybavení laboratoří, zajištění ochranných pomůcek a hygienické požadavky jsou uvedeny v podmínkách ochrany zdraví při práci (Nařízení vlády č. 361/2007 Sb.).

Ačkoliv vojenské použití biologických zbraní je velice nepravděpodobné, *bioterrorismus* je reálnou hrozbou. Zneužití biologicky rizikových agens teroristickými, extremistickými a náboženskými skupinami je již zdokumentováno. Jedním z nejvýraznějších incidentů je bezpochyby útok *sarinem* v tokijském metru v roce 1995 sektou Óm šinrikjó (Sakurada 2020). Příklady zástupců zneužitelných v bioterrorismu jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tab. 1: Někteří zástupci zneužitelní v bioterrorismu podle CDC. Kategorie A zobrazuje nejpatogeničtější a nejlépe šířitelná agens. Kategorie B obsahuje méně nebezpečná agens a kategorie C méně běžná agens. (Zdroj: Beneš 2009)

A	B	C
virus Eboly	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (multirezistentní)
virus Marburg	<i>Salmonella enterica</i>	viry klíšťových hemoragických horeček
virus varioly	<i>Coxiella burnetii</i>	hantaviry
<i>Clostridium botulinum</i> (toxin)	<i>Brucella</i> sp.	virus Napah
<i>Bacillus anthracis</i> (inhalační forma)	<i>Staphylococcus aureus</i> (enterotoxin)	
<i>Francisella tularensis</i> (inhalační forma)	<i>Clostridium perfringens</i> (toxin)	
<i>Yersinia pestis</i>	<i>Burkholderia mallei</i>	

## **1.2. Bakteriální kmeny *Shigella dysenteriae* a *Escherichia coli***

### **1.2.1. Základní charakteristika vybraných kmenů**

*Escherichia coli* náleží do kmenu *Proteobacteria*, třídy *Gammaproteobacteria*, řádu *Enterobacteriales*, čeledi *Enterobacteriaceae* a rodu *Escherichia*. V případě *E. coli* se jedná o gramnegativní tyčinkovitou bakterii. *E. coli* je fakultativní, pohyblivý anaerob (Mayer et al. 2012). Pohyblivostí docílila přítomností bičíků, popř. fimbrií, které ovšem slouží především k lepšímu uchycení na hostitelskou buňku. Patří mezi běžné obyvatelé lidského tlustého střeva a za normálních okolností nezpůsobuje vážnější problémy. Ačkoliv se jedná o velmi dobře studovanou bakterii, stále existují značné mezery v pochopení některých procesů virulence. Často je virulence spojována s přítomností specifických genových shluků, tzv. ostrovů patogenity (Groisman et al. 1996). Potíže způsobuje patogenní forma *E. coli*, která zahrnuje více než 160 miliónů případů úplavice ročně.

*Shigella dysenteriae* je, stejně jako již zmíněná *E. coli*, řazena do kmenu *Proteobacteria*, třídy *Gammaproteobacteria*, řádu *Enterobacteriales*, čeledi *Enterobacteriaceae*, jedná se o rod *Shigella*. Tato gramnegativní bakterie je fakultativně anaerobní, nesporulující a na rozdíl od *E. coli* nepohyblivá. Za určitých podmínek je *S. dysenteriae* schopna napadnout erytrocyty a různé epiteliální buňky a replikovat se v nich (Ryan 2018).

Co se těchto dvou zástupců týče, potenciální problém představuje tvorba již zmíněných toxinů, konkrétně Shiga toxinu, který napadá střevní buňky ve formě enterotoxinu nebo nervový systém ve formě neurotoxinu (Carroll et al. 2016). To může vést až k propuknutí těžkých forem shigelózy, které mohou ve vážných případech skončit smrtí.

### **1.2.2. Místo výskytu genů pro toxiny**

Bakteriální toxiny jsou jedním z důležitých virulenčních faktorů, syntetizují se a jsou řízeny pomocí specifických genů. Tyto geny jsou často lokalizované na plasmidech. K předání nebo přijetí genetické informace od jiného jedince může dojít prostřednictvím horizontálního přenosu. HGT (horizontal gene transfer) je velmi významný proces, s jehož pomocí mohou bakterie získat výhodné geny a dosáhnout například antibiotické rezistence (Varga 2016). Například geny Stx1 a Stx2 pro tvorbu toxinu jsou do STEC introdukovány pomocí bakteriofágu, jenž setrvává v temperovaném stavu do doby, kdy dojde k vystavení nadměrné stresové zátěži bakterie (Marejková 2015). Takovou zátěž představuje mimo jiné právě antibiotická expozice.



### 1.3. Patogenita vybraných kmenů

Patogeny jsou mikroby schopné vyvolávat různá onemocnění jejich hostitele. Virulence je velmi individuální a napříč světem mikrobů velice variabilní. Z toho důvodu existují kmeny s rozdílnou virulencí, ačkoliv se jedná o jeden patogenní druh (Bednář 1996). Virulence u gramnegativních bakteriálních buněk je mimo jiné určena uvolňovaným endotoxinem nebo přítomností kapsuly (Horáček 2000). Na základě míry virulence rozlišujeme kmeny *avirulentní* a *málo virulentní*, neschopné nebo omezeně schopné vyvolat onemocnění u hostitele, *středně virulentní*, schopné vyvolávat onemocnění a dále se šířit a *vysoce virulentní*, jež sice nejsou schopny tak masivního šíření, jako virulentní kmeny, ale mohou zapříčinit smrt většiny svých hostitelů. Málo virulentní kmeny slouží jako hlavní podklad pro přípravu očkovacích látek, s tím souvisí i *atenuace*, umělé snižování virulence (Votava 2005).

Infekce způsobená přítomností *S. dysenteriae* se do organismu dostává převážně ústy a je zapříčiněna nedostatečnou hygienou nebo kontaminovanou potravou. Po průchodu *S. dysenteriae* trávicí soustavou dochází k jejímu množení v tenkém střevě a následně poškozuje epiteliální buňky v tlustém střevě. Zmíněné chování je projevem činnosti 140 Md plasmidu, na němž jsou lokalizovány geny pro kódování strukturálních membránových proteinů, které celý proces řídí. Infekce vyvolaná přítomností enterotoxigenní *E. coli* se dokonce šíří ze zažívacího traktu nebo z močového měchýře do krevního oběhu.

#### 1.3.1. Základní složky patogenity

Do jaké míry je patogen způsobilý k poškození hostitele, určují tři základní složky patogenity. Schopnost vlastního šíření mezi hostiteli neboli *kontagiozita*, schopnost vstupu do hostitele a následného množení a šíření uvnitř těla označovaná jako *invazivita* a aktivní nebo pasivní schopnost poškození hostitele tzv. *toxická* (Votava 2005). *Shigella dysenteriae*, narozdíl od enterotoxigenní *E. coli*, proniká do epiteliálních buněk střevní sliznice. Musíme zvážit skutečnost, že projevy onemocnění často souvisí s vlastní, někdy velmi intenzivní, reakcí organismu hostitele na přítomnost patogenu.

#### 1.3.2. Klinický obraz onemocnění vyvolaném *E. coli*

*E. coli* způsobuje četné infekce močových cest, novorozeneckou meningitidu a častá střevní onemocnění. V souvislosti se střevními chorobami rozlišujeme 5 základních podtypů *E. coli* podle produkujícího toxinu (některé zdroje uvádějí i další) – ETEC, EPEC, EIEC, EHEC známý i jako STEC a EAEC (Mueller 2020). Konkrétní kmen určujeme prostřednictvím sérotypizace a klíčovou roli hraje přítomnost faktorů virulence (Beneš 2009). Při sérotypizaci patogenní *E. coli* se nejčastěji používá lipopolysacharidový neboli O-antigen a H antigen

(bičkový) (Bryan 2015). Základní charakteristiku a odlišnosti skupin popisuje tabulka č. 2.

Tab. 2: Základní skupiny *E. coli* způsobující střevní onemocnění (Zdroj: Mueller 2020)

Skupina	Název	Sérotyp	Charakteristika	Zdroj infekce
<b>ETEC</b>	enterotoxigenní <i>E. coli</i>	Neuvádí se konkrétní sérotyp spojený s produkcí toxinů.	původci tzv. cestovatelských průjmů; subtropické a tropické oblasti s nedostatečnou hygienou	požití kontaminované vody
<b>EPEC</b>	enteropatogenní <i>E. coli</i>	15 O sérotypů; nejrozšířenější: O111, O55, O26	původci vodnatých průjmů; především kojenci a malé děti; vznik epidemických ohnisek	nejčastěji požití kontaminované vody nebo potravy
<b>EAEC</b>	enteroagregativní <i>E. coli</i>	Neuvádí se konkrétní sérotyp spojený s produkcí toxinů.	původci tzv. cestovatelských průjmů; rozvojové oblasti; akutní i chronické případy vodnatého průjmu	požití kontaminované vody
<b>EHEC/STEC</b>	enterohemoragická/shigatoxigenní <i>E. coli</i>	Sérotypy O157: H7, O104: H4 a další (produkce Shiga toxinu)	původci hemoragické kolitidy (všechny věkové skupiny), hemolyticko-uremického syndromu (děti do 5. roku a dospělí starší 60 let)	požití kontaminované zeleniny, nedostatečně tepelně upraveného hovězího masa nebo nezpracovaných mléčných výrobků

Skupina	Název	Sérotyp	Charakteristika	Zdroj infekce
<b>EIEC</b>	enteroinvazivní <i>E. coli</i>	14 O sérotypů; nejrozšířenější: O124, O28	původci onemocnění s projevy stejnými jako u bakteriální dysenterie způsobené <i>Shigellou</i>	požití kontaminova- né zeleniny nebo nedostatečně tepelně upraveného masa

Terapie je v případě *E. coli* odlišná u bakteriálních infekčních průjmů a extraintestinálních infekcí. V případě druhé varianty se podávají antibiotika nejčastěji ze skupiny aminoglykosidů, například gentamicin, netilmicin a amikacin v kombinaci s  $\beta$ -laktamovými antibiotiky. Vzhledem k nedostatečnému vstřebávání v trávicím traktu se aplikují parenterálně (Beneš 2009).

### Hemolyticko-uremický syndrom

Hemolyticko-uremický syndrom (HUS) je onemocnění související s trombotickými mikroangiopatiemi (TMA). TMA se projevují trombocytopenií, hemolýzou a tvorbou trombů v malých cévách, v jejichž důsledku dochází k poškození a selhávání orgánů. Mezi nejčastěji se vyskytující TMA patří STEC-HUS, způsobený shigatoxigenní *E. coli*, trombotická trombocytopenická purpura (TTP), aHUS (atypický HUS) a sekundární HUS (Jokiranta 2017).

STEC-HUS nastupuje obvykle po několik dní trvající gastroenteritidě způsobené STEC, nejčastěji sérotypem O157: H7 nebo O104: H4. Jeho spouštěčem je činnost A a B podjednotek Shiga toxinu. Nejčastěji jsou poškozeny ledviny nebo tračník, ale infekce může zasáhnout i oči, mozek a další orgány. (Beneš 2009) Tkáňový tropismus Shiga toxinu na základě silné exprese Gb3 na glomerulárním endotelu je hlavním důvodem, proč infekce zasahuje zejména ledviny (Jokiranta 2017).

Včasná symptomatická terapie je nadmíru důležitá, jelikož stav téměř poloviny pacientů vyžaduje hemodialýzu nebo peritoneální dialýzu. Jedná se o velmi závažné onemocnění, postihující převážně děti do 5 let a osoby starší 60 let. Trvalé následky ve formě renální insuficience, proteinurie nebo hypertenze se vyskytují u téměř 25 % pacientů (Beneš 2009). Mortalita se pohybuje pod 5 %. Specifická léčba zaměřená na STEC-HUS v současné době neexistuje, léčí se převážně symptomy onemocnění (Walsh 2019). Podávání antibiotik je kontraindikováno z důvodu další lýzy bakteriálních buněk.

### **1.3.3. Klinický obraz onemocnění způsobeného bakterií *Shigella dysenteriae***

Klinické příznaky způsobené infekcí *S. dysenteriae* nastupují po relativně krátké dvoudenní inkubační době. Shigelóza je provázena teplotami, případně horečkou, častou vodnatou stolicí s krví a hlenem a bolestivým vylučováním. Jedná se o výhradně lidské onemocnění (Horáček 2000). Následná terapie zahrnuje dietu s podporou dezinficiencí (nifuroxazid, kloroxin). Z převážně epidemiologického důvodu se podávají antibiotika, z nichž můžeme zmínit kotrimoxazol a trimethoprim (Beneš 2009).

## **1.4. Toxiny**

Toxické bakteriální proteiny, zkráceně toxiny jsou látky převážně bílkovinné povahy. Proteinové toxiny můžeme rozdělit do dvou skupin – *exotoxiny* a *endotoxiny*. První zmiňovaná skupina produkuje toxiny do okolí buňky a je spojována s grampozitivními (G+) i gramnegativními (G-) bakteriemi. S endotoxiny jsou spojovány gramnegativní bakterie, které toxiny do okolí buňky uvolňují převážně po narušení buněčné membrány (Votava 2005).

### **1.4.1. Exotoxiny**

Účinek těchto toxinů není omezen pouze na místo infekce, ale může difundovat na větší vzdálenost. Exotoxiny porušují buněčné membrány hostitelských buněk, prostřednictvím receptorů se mohou vázat na specifické buňky organismu (enterocyty, leukocyty, neurony etc.) a poškozovat nebo inhibovat jejich činnost (buněčný cyklus, syntézu proteinů etc.). Oproti endotoxinům jsou exotoxiny více toxické, ale zároveň termolabilnější (při vysokých teplotách dochází k jejich denaturaci). Geny pro syntézu exotoxinů se nacházejí převážně na temperovaných bakteriofázích a plasmidech a jejich tvorba tak není pro bakterie prioritní, ale jedná se o užitečný nástroj k přežití (Hrdina et al 2004).

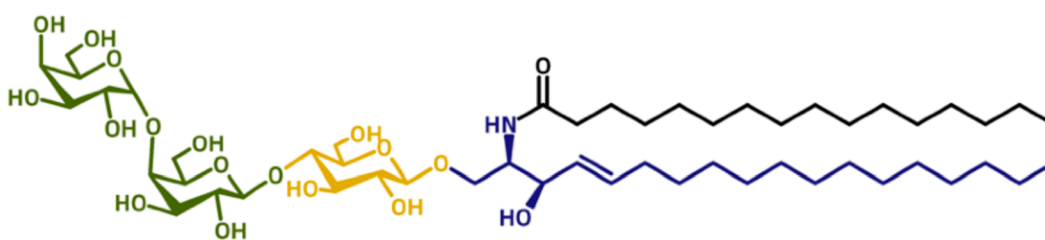
Proteinové toxiny rozdělujeme na povrchově aktivní, které interagují s buněčnou membránou, cytolytické (poškozují buněčnou membránu) a enterogenně (intracelulárně) působící (Popoff et al 2004). Mezi enterogenní exotoxiny se řadí Shiga toxin produkovaný *S. dysenteriae* a některými kmeny *E. coli*.

### **1.4.2. Shiga toxin**

Název Shiga toxin je odvozen od původce bakteriální dysenterie (*Shigella dysenteriae*), kterou v roce 1898 poprvé popsal Kiyoshi Shiga (Bergan 2012). V roce 1977 dr. Jeffrey D. Konowalchuk společně se svým týmem uvedl vědeckou studii, ve které byl poprvé popsán tzv. Vero toxin (dnes známý jako Shiga toxin). Tento toxin produkovaný některými kmeny *E. coli* byl toxický

pro Vero buňky (extrahované epitelové ledvinné buňky *Chlorocebus aethiops*) (Takede 1997). Kultivační filtráty, v nichž se Vero toxin prokázal, byly odlišné od termolabilních a termostabilních enterotoxinů, běžně produkovaných zástupci *E. coli*. Od termolabilního enterotoxinu se nelišil pouze cytotoxicitou, ale i účinkem na Vero buňky (Konowalchuk 1977).

Shiga toxin produkovaný bakterií *Shigella dysenteriae* sérotypem 1 vykazuje stejnou biologickou aktivitu jako Shiga-like toxiny produkované kmeny *E. coli* (O'Brien 1987). Molekula toxinu obsahuje podjednotku A (32 kDa) a pět podjednotek B (7,7 kDa) (Marejková 2015). Podjednotka A způsobuje poškození eukaryotického ribozomu a tím zastavuje syntézu proteinů v hostitelské buňce. Homopentamer B se váže na buněčný receptor Gb3 (globotriaosylceramid) na endotelových buňkách (Melton-Celsa 2014). Po vstupu podjednotky A do cytosolu dochází v místě citlivém na trypsin k jejímu štěpení furinem na fragment A1 (27 kDa) a A2 (4 kDa). A1 fragment působí jako specifická N-glykosidasa a štěpí adeninový zbytek z 3' konce 28S podjednotky rRNA. Tato depurinace blokuje elongační faktor 1, na němž je závislá vazba aminoacyl tRNA a způsobí tak inhibici syntézy proteinů a apoptózu buňky (Mukhopadhyay et al 2020). Kmeny produkující výhradně Shiga toxin Stx2 jsou spojovány s HUS, zatímco kmeny produkující oba typy (Stx1 i Stx2) Shiga toxinu se vyskytují u méně závažných gastroenteritid. (Russo 2016) Stx1 a Stx2 se liší především sekvencemi obsažených aminokyselin. Zároveň je Stx2 přibližně 400x toxičtější než Stx1 a může způsobit neuronální dysfunkce. (Melton-Celsa 2014)



Obr. 1: Struktura receptoru Gb3 (globotriaosylceramid). Galaktosy jsou znázorněny zeleně, glukosa žlutě, sfingosin modře, bíle je variabilní řetězec mastných kyselin (zde C16:0).

Důkazem velmi vysoké virulence je malá infekční dávka bakterií (10-100) (Marejková 2015). Kromě Shiga toxinu je možné nalézt v kmenech STEC i další faktory virulence. Jedním z nich je například adhezenční faktor *intimin* kódovaný genem *eae*, který je zodpovědný za těsnou adhezi k enterocytům tlustého střeva (Bryan 2015).

Pozoruhodnou vlastností Shiga toxinu je jeho možné využití společně s terapeutickými léky v cílené léčbě rakoviny. Jak již bylo zmíněno, skládá se z A a B podjednotky, a právě B podjednotka hraje v této oblasti důležitou roli.

(Engedal 2011). Zdravé buňky jsou chráněné pomocí sfingolipidů, které vytváří odolnou vnější fosfolipidovou vrstvu biomembrány. V případě rakoviny dochází ke změnám metabolismu a složení glykosfingolipidů (GSL) a v nádorových tkáních významně narůstá exprese Gb3. Holotoxin Stx má oproti konvenčním chemoterapeutikům řadu výhodných vlastností. Buňky usmrcuje účinným způsobem při nízkých dávkách a k terapeutickým účelům stačí Stx aplikovat jednou případně opakovat v řádu jednotek (Ishitoya 2004). Dále je možno využít inherentní toxicitu Shiga toxinu, případně vektory (prostřednictvím vazebných podjednotek) k aplikaci dalších potřebných látek k diagnostice, terapii nebo imunizaci (Bergan et al 2012). Kombinace cisplatinu a Shiga toxinu Stx1 může posloužit jako účinná léčba maligních nádorových buněk rezistentních vůči běžným léčivům. Stx1 dokáže obnovit citlivost maligních mesoteliomů na cis-platinu (Johansson et al 2010). Shiga toxin B podjednotka se rovněž zdá jako velmi vhodný antigenní nosič při vývoji očkovacích látek (Bergan et al 2012). Hlavní problém využití aktivního Stx spočívá v možných vedlejších účincích. Ačkoliv ve spojitosti s STEC mohou nastat život ohrožující komplikace, u purifikovaného Stx je to velmi nepravděpodobné. Přesto je zapotřebí dalšího výzkumu k posouzení krátkodobých i dlouhodobých účinků Stx (Engedal 2011).

## **1.5. Metody analýzy toxinů a jejich původců**

K identifikaci hledaného bakteriálního infekčního agens dochází převážně v mikrobiologických laboratořích. Hlavním úkolem těchto laboratoří je nepřímá (nepřímý průkaz) nebo přímá (přímý průkaz) diagnostika původce infekce. *Nepřímý průkaz* je založen na využití poznatků o daném patogenu a průkazu protilátek nejčastěji prostřednictvím sérologie. Oproti tomu *přímým důkazem* prokazujeme přítomnost patogenního organismu nebo jeho částí přímo ve vzorku. K tomu se využívají izolační a mikroskopické metody, průkazy nukleových kyselin, průkazy antigenů etc. (Votava 2014).

### **1.5.1. Kultivace**

Abychom mohli určitý patogen dále studovat, je vhodné pomocí kultivace získat čistou kolonii pro další výzkum. K pozitivnímu růstu bakterií je třeba vytvořit optimální podmínky, zahrnující dostatek živin, vody, vhodnou teplotu a pH etc. V současné době můžeme využít široké spektrum kultivačních půd, agarů a tekutých médií. Každé z těchto kultivačních médií má specifické složení a je vhodné pro určitou skupinu biologických agens. Živná média můžeme rozdělit podle konzistence (tekuté a pevné), složení (přirozené a syntetické) a účelu k jakému jsou určeny (Votava 2005). Příklady kultivačních půd jsou uvedeny v tabulce č. 3. Ačkoliv existuje řada doporučených kultivačních půd a médií pro konkrétní biologická agens, je rozdíl v jejich

účinnosti. To znamená, že ačkoliv se jedná o vhodnou půdu k růstu daného mikroorganismu, může se stát, že na jiné, rovněž doporučené, půdě poroste patogen lépe a rychleji. Stejně je to i v případě tekutých médií.

Tab. 3: Příklady kultivačních půd, jejich vlastnosti a vhodné organismy (Zdroj: Juránková 2011, Koukalová 2005)

Název média	Vlastnosti	Kultivované mikroorganismy
<b>Endova půda</b>	obsahuje laktosu a Schiffovo reagens; selektivně diagnostická půda	G- bakterie; <i>Enterobacteriaceae</i> : <i>Shigella sp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> etc.
<b>MacConkey agar</b>	vlastnosti podobné jako Endova půda; selektivně diagnostická půda	G- bakterie; <i>Enterobacteriaceae</i> : <i>Shigella sp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> etc.
<b>Deoxycholát-citrátový agar</b>	obsahuje Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , deoxycholan, citrát železitý; selektivně diagnostická půda	G- bakterie; <i>Salmonella sp.</i> , <i>Shigella sp.</i> , etc.
<b>Krevní agar</b>	obsahuje 7-10 % beraních erytrocytů; diagnostická půda	G+ i G- bakterie; <i>Neisseria sp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Shigella sp.</i> , <i>E. coli</i> , etc.
<b>Čokoládový agar</b>	zahřátím krevního agaru na 80 °C (hemolýza)	<i>Haemophilus sp.</i> , <i>Neisseria sp.</i>
<b>Sabouraudův agar</b>	obsahuje glukosu a pepton; selektivní půda	kvasinky a plísně
<b>Luria-Bertani</b>	obsahuje kaseinové peptony a peptidy; selektivně diagnostická půda	<i>E. coli</i> , <i>Shigella sp.</i>
<b>Brain-heart infusion</b>	obsahuje infuzi z vařeného hovězího srdce a mozku; selektivně diagnostická půda	G+ i G- bakterie; <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Meningococcus sp.</i> , <i>Pneumococcus sp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Shigella sp.</i> etc.

### 1.5.2. Metody imunodetekce

Kromě běžných kultivačních a jiných biologických diagnostických metod, jsou čím dál častěji neopomenutelnou součástí diagnostiky rovněž tzv. CIDT (culture-independent diagnostic tests). Jedná se o soubor specializovaných imunodetekčních metod, které mají řadu výhod a jak z názvu vyplývá nejsou závislé na kultivaci biologických agens. Často jsou rychlejší, méně náročné na materiál, manipulaci, uchovávání nebo převoz. Různá biologická agens rostou velmi pomalu, což je nežádoucí v situacích, kdy potřebujeme rychle diagnostikovat o jaký mikroorganismus případně toxin se jedná (Doggett 2016).

Imunologických detekčních metod existuje celá řada. Metody imunodetekce jsou založeny na interakcích antigen-protilátka a můžeme je rozdělit do dvou skupin – *imunoprecipitační* a *imunoanalytické*. První skupina zahrnuje imunodifúzní a imunodetekční optické metody. Jednoduchá radiální imunodifúze je založena na inkubaci antigenů ve speciálním gelu obsahujícím protilátky a výsledkem této inkubace je imunoprecipitační prstenec. Na základě velikosti prstence je určeno množství antigenu ve vzorku. Imunodetekční optické metody využívají k detekci spektrofotometrii. Imunoanalytické metody jsou zaměřeny na značení antigenu případně protilátky, k čemuž se využívají převážně enzymy, radioizotopy případně chemické nebo fluorescenční látky. Pro diagnostiku gramnegativních fakultativně anaerobních tyček z čeledi *Enterobacteriaceae* se používá především přímý kultivační průkaz s využitím biochemických enterotestů I, II a testu ELISA (Jílek et al 2002).

ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) je založena na detekci antigenu prostřednictvím protilátky značené enzymem. Obvykle se používá 96 nebo 384 jamková destička a enzymy avidin-peroxidáza neboli HRP (horseradish peroxidase) a alkalická fosfatáza. Z důvodu nižšího detekčního limitu se prioritně využívá HRP (Lin 2015). Enzymy katalyzují barevnou reakci a nejčastěji vzniká barevný produkt z bezbarvého substrátu (Jílek et al 2002). I v případě ELISA rozdělujeme několik metodologických typů, ELISA přímá, nepřímá, sendvičová a kompetitivní. U *přímé* metody je protilátka konjugována s enzymem k detekci antigenu přímo. Pokud je sekundární protilátka použita k amplifikaci signálu primární protilátky připojené na antigen, jedná se o *nepřímou* metodu. *Sendvičová* ELISA se vyznačuje nejvyšší citlivostí ze zmíněných metod a jamky destičky jsou při ní vyplněny protilátkami. Do jamek se následně přidá vzorek a mezi protilátkou a antigenem vzniká vazba. Poté se aplikuje druhá protilátka s navázaným enzymem, který rozpozná odlišný antigenní determinant totožného antigenu. Při *kompetitivní* metodě dochází k interakci imobilizovaných antigenů na

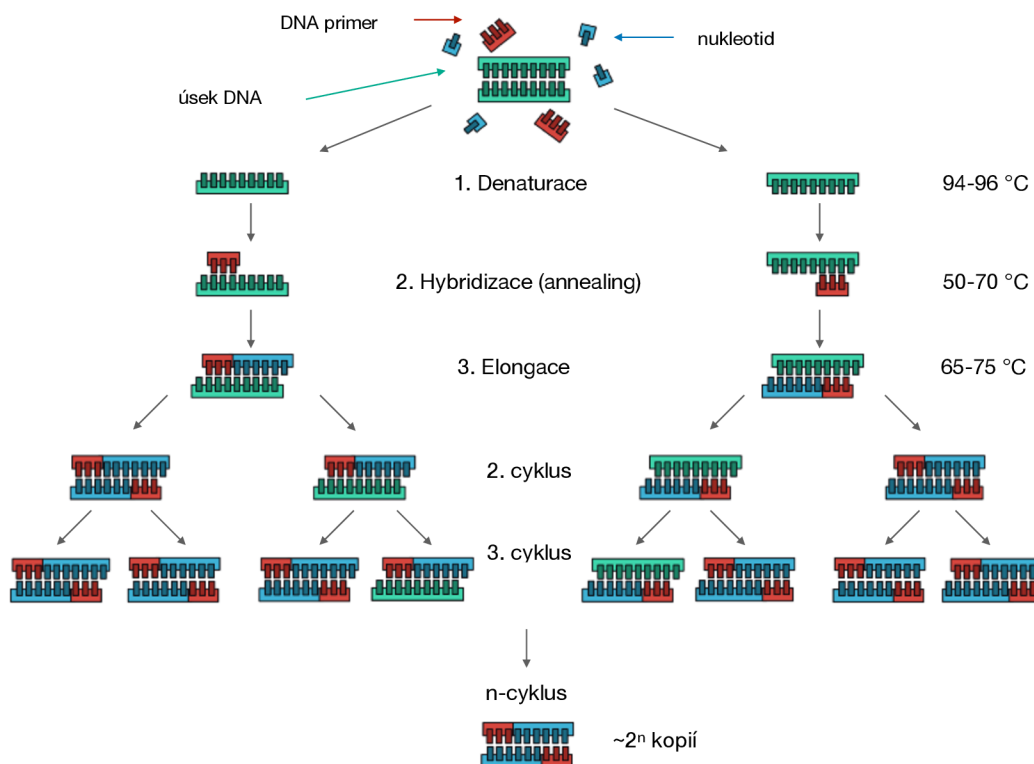


destičce se směsí komplexu *protilátka-antigen* a volné protilátky v kapalně fázi (Lin 2015).

### 1.5.3. Detekce pomocí PCR

Nesmíme opomenout diagnostiku pomocí polymerázové řetězové reakce neboli metodu PCR (Polymerase Chain Reaction). Ačkoliv jsou konvenční kvantifikační metody založené na biochemickém, sérologickém a kultivačním principu bezpochyby spolehlivým nástrojem, jedná se o velmi pracné a zdlouhavé procesy. Oproti tomu PCR metoda je nejen efektivní, ale i rychlá (Ďuráčová et al 2018). Pokud se zaměříme na efektivitu a rychlost v rámci proteomické analýzy a diagnostiky, existují metody vhodnější nežli PCR. Těmi jsou například hmotnostní spektrometrie, proteinová microarray, gelová elektroforéza etc.

Nicméně PCR a její varianty lze s úspěchem využívat k rychlé detekci a identifikaci. Například na základě porovnání tří detekčních metod, PCR, RTQ-PCR a ddPCR ve studii *Comparing the performance of conventional PCR, RTQ-PCR, and droplet digital PCR assays in detection of Shigella*, došli vědci k závěru, že metoda ddPCR (droplet digital PCR) byla ze všech tří zmíněných metod nejvýhodnější. Předkultivace trvala kratší dobu a limit detekce pro genomový řetězec DNA byl 10-5 ng/μl, což vykazuje vyšší citlivost oproti zbylým metodám (Yang et al 2020). Kontraindikováno je použití PCR v situaci, kdy je nutné diagnostikovat neznámý vzorek (Ďuráčová et al 2018). Jak již vyplývá z dříve řečeného, PCR dokáže odhalit přítomnost i velmi malého množství patogenní (virové či bakteriální) DNA. Princip PCR spočívá v odhalení hledané (známé) nukleotidové sekvence nukleové kyseliny a následné amplifikaci této sekvence. Díky tomu můžeme získat větší množství kopií studovaného úseku DNA i z malého vzorku. Na základě typu výchozího templátového řetězce rozdělujeme DNA-PCR a RNA-PCR (Jílek et al 2002). PCR probíhá za účasti dvou primerů, které s oběma stranami amplifikovaného úseku DNA jednoho templátu hybridizují, dále jsou přítomny čtyři deoxynukleosidtrifosfáty a termoresistentní DNA-polymeráza. Tato směs se opakovaně zahřívá a ochlazuje a cyklus se několikrát opakuje (Koolman, Röhm 2012). Průběh PCR popisuje obrázek č.2



Obr. 2: Průběh polymerázové řetězové reakce

#### 1.5.4. Hmotnostní spektrometrie – identifikace a cílená proteomická analýza

Proteomická analýza zahrnuje identifikační a kvantifikační technologie k stanovení celkového proteinového obsahu ve zkoumaném organismu (tkáni, buňce) nebo vybraných jednotlivých proteinů (Aslam 2016).

Pokročilou analytickou metodou v této oblasti je právě již zmiňovaná hmotnostní spektrometrie (MS, mass spectrometry). Je založená na měření poměru hmoty a elektrického náboje  $m/z$  (*mass to charge ratio*), čímž je nápomocná při určování molekulární hmotnosti proteinů. MS sestává ze tří hlavních technologických částí. K převedení plynných molekul vzorku na ionty, případně k přesunu existujících iontů vzorku do plynné fáze slouží *zdroj iontů*. Dřívější technologie narážela v tomto kroku na problém spočívající v nadměrné fragmentaci termolabilních a větších molekul. Průlom nastal v 80. letech vývojem MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) a ESI (Electrospray ionization) (Domon et Aebersold 2006). Druhým modulem MS je *hmotnostní analyzátor*, který využívá elektromagnetická pole k roztřídění iontů na základě jejich hmotnosti. Hmotnostních analyzátorů existuje celá řada a mohou tak pracovat na odlišných principech, nicméně výsledkem je vždy poměr  $m/z$  (Matthiesen et Bunkenborg 2013). Využití magnetických polí se týká například relativně nového Orbitrapu nebo FT-ICR. Orbitrap má oproti FT-ICR výhodu spočívající

v absenci velmi nákladného supravodivého magnetu (Domon et Aebersold 2006). Třetí částí je *detektor* zaznamenávající signál, jenž lze dále elektronicky zesílit a uložit. Slouží k počítání vybraných specifických iontů v reálném čase. Stejně jako v případě analyzátorů, i mezi detektory můžeme nalézt různé druhy, například elektronový multiplikátor, induktivní detektor nebo scintilační počítač (Matthiesen et Bunkenborg 2013).

Obecně lze říci, že se získaný vzorek peptidů zavede do systému kapalinové chromatografie, který je propojen s MS, čímž dochází k eluci do iontového zdroje. Vzniklé kationty jsou následně přivedeny do akcelerační komory, kde je zvyšována jejich rychlost. Poté vstupují do magnetického pole, kde dojde k usměrnění jejich pohybu. Peptidy jsou většinou v hmotnostním spektrometru podrobeny fragmentaci na menší části a ty dopadají nakonec na detektor, kde jsou detekovány a zaznamenány (Pertile 2006).

Použité metody se liší na základě využití různých zdrojů iontů, hmotnostních analyzátorů a detektorů. V rámci této bakalářské práce jsme se rozhodli pro techniku tandemové hmotnostní spektrometrie LC-MS/MS (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry) na přístroji Orbitrap s využitím nanoelektrosprejové ionizace (Fenn et al 1989). Výsledkem tohoto měření jsou základní raw data s fragmentačními spektry, která porovnáváme se známými proteinovými sekvencemi biologického agens, což se celé děje pomocí specifických softwarů a databází. Získané informace jsou následně zaneseny do tabulky, kde jsou uvedeny zjištěné proteiny a peptidy (Grebe et Singh 2011).

#### **1.5.5. Příprava proteinového vzorku**

Dosažení kvalitního výsledku proteomické analýzy závisí do značné míry na čistotě a komplexitě vzorku. Kvalitu dat ovlivňuje tedy i znečištění z různých zdrojů. S tím souvisí i fakt, že se často ve výsledcích objeví hodnoty proteinů nejen zkoumané buněčné kultury, ale i proteinů z kultivačního média, oděvu nebo kožního keratinu (Rogers et Bomgarden 2016). Pokud jsou vzorky proteinů kontaminované chemicky čistícími prostředky, lze je přechistit pomocí filtrů (Matthiesen et Bunkenborg 2013).

Příprava proteomického vzorku se liší v závislosti na zdroji použitého materiálu. V případě analýzy bakteriálních toxinů se za první krok považuje *lýza* buněk. Lýzy můžeme docílit použitím různých chemických a biologických látek (pufry, detergenty etc.) nebo fyzikálními silami (French press, ultrazvukový sonikátor) (Domon et Aebersold 2006). Následuje *denaturace*, ke které se využívají chaotropy, detergenty, teplo etc. Působení těchto činidel zvyšuje proteinovou digesci a pomáhá při solubilizaci a rozvíjení vyšší struktury proteinů. Po denaturaci následuje redukce s alkylací a enzymatická

digesce. Konečný proteinový vzorek je tedy štěpen na kratší části a výsledný peptidový vzorek je následně analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie s předřazenou frakcionací pomocí kapalinové chromatografie (Domon et Aebersold 2006). Nejčastěji používanou proteázou, z důvodu relativně nízké ceny a vysoké aktivity, k přípravě vzorků pro následnou hmotnostní spektrometrii je trypsin. Používá se často v poměru 1:50 trypsinu k celkovému proteinovému obsahu. Po digesci je vhodné zajistit odstranění kontaminantů za použití např. mikrokolon s reverzní fází. Dosáhneme tak vyšší citlivosti před samotnou hmotnostně spektrometrickou analýzou (Matthiesen et Bunkenborg 2013). Příprava kvalitního vzorku pro hmotnostní spektrometrii je velmi důležitá k dosažení hodnotných a přesných výsledků. Výhody a nevýhody některých metod přípravy proteinových vzorků jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tab. 4: Výhody a nevýhody některých používaných metodik k přípravě vzorků pro MS (Zdroj: Makridakis et Vlahou 2017)

	<b>Digesce v roztoku</b>	<b>GeLC-MS</b>	<b>FASP</b>
<b>Výhody</b>	Bez výrazných ztrát proteinů; rychlý průběh; kompatibilní s label free metodami a metodami využívající izotopové značení	Bez výrazných ztrát proteinů; efektivní extrakce proteinů; malé množství potřebného materiálu pro kvalitní výsledky (5-10 µg); čištění vzorku	Efektivní extrakce proteinů; čištění vzorku; kompatibilní s label free metodami a metodami využívající izotopové značení
<b>Nevýhody</b>	Nepříliš účinná proteinová extrakce	Časová náročnost; pracný postup	Vyšší množství potřebného materiálu pro kvalitní výsledky (100–200 µg); ztráta bílkovin ve filtračních jednotkách

## 2. Praktická část

### 2.1. Laboratorní materiál

#### 2.1.1. Bakteriální kmeny

Proteomická charakterizace probíhala u tří bakteriální kmenů *Shigella dysenteriae* a jednoho bakteriálního kmenu *Escherichia coli* (Tab. 5). Výzkum probíhal na pracovišti Katedry molekulární patologie a biologie, Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany.

Tab. 5: Seznam bakteriálních kmenů a jejich očekávaných toxinů, označení NCTC (National Collection of type culture), (Zdroj: phe-culturecollections.org.uk)

bakteriální kmen (NCTC označení*)	kmen	sérotyp	očekávaný toxin
<b>NCTC 04837</b>	<i>Shigella dysenteriae</i>	1	Shiga toxin, Stx
<b>NCTC 08379</b>	<i>Shigella dysenteriae</i>	1	Shiga toxin, Stx
<b>NCTC 09347</b>	<i>Shigella dysenteriae</i>	9	Shiga toxin, Stx
<b>NCTC 13562</b>	<i>Escherichia coli</i>	O104:H4	Shiga toxin, Stx1, Stx2

#### 2.1.2. Agary a tekutá média

- ✦ Brain Heart Infusion (BD, Le Pont-de-Claix, Francie)
- ✦ Columbia Agar with Sheep Blood, poskytnuto FNHK mikrobiologie (Oxoid, Německo)
- ✦ Luria Bertani agar (Serva, Německo)
- ✦ Luria Bertani broth (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ✦ MacCONKEY broth (Merck Group, Darmstadt, Německo)
- ✦ MacCONKEY agar (Merck Group, Darmstadt, Německo)
- ✦ Nutrient broth (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ✦ Nutrient agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

#### 2.1.3. Chemické látky

- ✦ 2-butanol (Sigma-aldrich, St. Louis, USA)
- ✦ Acetonitril (ACN) (Merck Group, Darmstadt, Německo)
- ✦ Ammonium bicarbonate (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ✦ Benzonáza (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ✦ Beta-merkapt ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ✦ CellLytic™ Express (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

- ◆ Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ◆ Dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ◆ EDTA free protein inhibitor cocktail (Roche, Německo)
- ◆ Ethyl acetát (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ◆ Hydrogenuhlíčan amonný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ◆ Jodacetamid (IAA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ◆ Kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ◆ Kyselina octová (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ◆ Kyselina trifluoroctová (TFA) (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, USA)
- ◆ Methanol (Merck, Darmstadt, Německo)
- ◆ MOPS SDS Running Buffer (20X) (Novex, Carlsbad, USA)
- ◆ NuPAGE™ Sample Reducing Agent (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- ◆ NuPAGE™ LDS Sample Buffer (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- ◆ NuPAGE™ Bis-Tris gel 4-12 % (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- ◆ NuPAGE™ Antioxidant (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- ◆ PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ◆ Precision Plus protein standard Kaleidoscope (Bio-Rad, Hercules, USA)
- ◆ Proteinové standardy albuminu (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ◆ Pufr na elektroforézu (Bio-rad, USA)
- ◆ Sodium deoxycholate monohydrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ◆ Thiosíran sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ◆ Tris (2-karboxyetyl) fosfin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ◆ Tris-HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ◆ Trypsin, Sequencing Grade Modified (Promega, Madison, USA)
- ◆ Uhlíčan sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ◆ Voda LC-MS Chromasolv (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ◆ Vzorkový pufr na elektroforézu (Bio-rad, USA)
- ◆ xTractor™ Buffer (Clontech laboratories, USA)

#### **2.1.4. Kapalinová chromatografie a kolony**

- ◆ Ultra microspin C18 kolony (Harvard Apparatus, Holliston, USA)
- ◆ UltiMate 3000 RSLC-nano HPLC system (Dionex, Sunnyvale, USA)
- ◆ Předkolona Acclaim PepMap100 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ◆ Separační kolona Acclaim PepMap RSLC (Thermo Fisher Scientific, USA)

### **2.1.5. Kity**

- ♦ Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA)

### **2.1.6. Laboratorní materiál**

- ♦ Filtr 0,22 µm spin Ultrafree-MC (Amicon, Millipore Corporation, Bedford, USA)
- ♦ Fólie na mikrotitrační destičky (AB Sciex, Foster City, USA)
- ♦ Indikátorové pH papírky (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- ♦ Koncentrační a odsolovací filtry Amicon, (různé velikosti Amicon, Millipore Corporation, Bedford, USA)
- ♦ Laboratorní plast – kultivační zkumavky s větracím víčkem, Petriho misky, kličky různé velikosti
- ♦ Laboratorní sklo – zásobní lahve, Ehrlenmeyerovy baňky, kádinky, odměrné válce
- ♦ Mikropipety – různý objem (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- ♦ Mikrotitrační destička (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
- ♦ Mikrozukavky a kryozukavky – různý objem (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- ♦ Ochranné osobní pomůcky (latexové rukavice, rouška/respirátor, plášť, brýle)
- ♦ Špičky pro mikropipety – různý objem (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- ♦ Vaničky pro multikanálovou pipetu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- ♦ Vialky pro HPLC (Waters, Milford, USA)
- ♦ Zkumavky centrifugační – různý objem (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)

### **2.1.7. Přístroje a programové vybavení**

- ♦ Analytické váhy – Mettler Toledo AG (Laboratory & Weighing Technologies, Greifensee, Švýcarsko)
- ♦ Elektroforetická vana s příslušenstvím (Invitrogene, UK)
- ♦ Flowbox (Bioair, Itálie)
- ♦ Fluostar optima (BMG labtech)
- ♦ Hlubokomrazící box PowerFREEZE -87 °C VXE (Jouan SA, Saint Herblain, Francie)
- ♦ Hmotnostní spektrometr QExactiv (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ♦ Proteome Discoverer 2.4 (Thermo Fisher Scientific, USA)

- ♦ Magnetická míchačka Hotplate & Stirrer JENWAY 1000 (Jenway, Dunmow, Velká Británie)
- ♦ Minicentrifuga stolní (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- ♦ Paradigm Detection Platform (Beckman Coulter, Brea, USA)
- ♦ Multimode Analysis Software (Beckman Coulter, Brea, USA)
- ♦ Termomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- ♦ Ultrasonic Processor UP200ST (Hielscher, Německo)
- ♦ Vakuová odparka 5301 (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- ♦ Vortex MS2 (IKA Works, Wilmington, USA)

## 2.2. Kultivace

Bakteriální kmeny z ampulí byly revitalizovány a nasazeny na plotny a do kultivačních zkumavek. Po 24hodinové inkubaci při teplotě 37 °C, byla změřena optická denzita (OD) a její hodnoty zaznamenány pro pozdější kontrolu. Po dosažení dostatečně vysoké hodnoty OD byly vzorky s využitím 10% glycerolu zpracovány do formy tzv. prestocků, které byly následně zamrazeny na -80 °C. Další kultivace u vybraných bakteriálních kmenů probíhala za použití dříve připravených prestocků. Pro kultivace z prestocků byla vybrána tekutá média LB, BH a krevní agar. Naočkováno bylo osm kultivačních zkumavek s tekutým médiem a čtyři plotny s krevním agarem, poskytnutým mikrobiologickým oddělením Fakultní nemocnice Hradec Králové. Následně byly zkumavky umístěny do třepacího inkubátoru a plotny do klasického inkubátoru při 37 °C po dobu 24 hodin.

## 2.3. Izolace proteinového obsahu a jeho kvantifikace

Bakteriální lyza proběhla třemi odlišnými metodami. První metodou byla mechanická destrukce bakteriálních buněk za použití blokového ultrazvuku Ultrasonic Processor UP200ST. Tato metoda je účinná, ale nese s sebou riziko denaturace extrahovaného proteinu, proto se prováděla na ledu, aby nedocházelo k přílišnému zahřívání bakteriální kultury. V druhém případě se jednalo o chemickou destrukci bakteriálních buněk s využitím nedenedurujícího CellLytic™ Express. Třetí použitou metodou byl var v lyzačním pufru s obsahem deoxycholátu sodného (DOCHNa).

### 2.3.1. Sonikace

Jednotlivé vzorky s narostlou kulturou byly z kultivačních zkumavek převedeny do zkumavek centrifugačních a za použití centrifugy stočeny na 7000 x g při 4 °C po dobu 5 minut. Následně byl odebrán supernatant, ke kterému byly přidány inhibitory proteáz a umístěn na led. Vzniklá peleta se resuspendovala v 3 ml 100mM Tris-HCl a po přidání 70 µl inhibitorů proteáz



byla společně se supernatantem, kvůli lepší lýze, umístěna do mrazáku na 60 minut, při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sonikace probíhala celkově pětkrát v 30sekundových intervalech s 30sekundovými pauzami a průběžným chlazením na ledu, aby nedošlo k přehřátí vzorku a následné denaturaci. Následně se vzorky umístily znovu do centrifugy a stočily na  $10\ 000\ \text{x g}$  při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  po 30 minut. Vzniklý lyzát byl odebrán, peleta resuspendována v 1 ml 20 mM Tris-HCl a stočena na  $5\ 000\ \text{x g}$  při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 minut. Po stočení byl lyzát i supernatant přefiltrován na  $0,22\ \mu\text{m}$  filtrech. Po filtraci byly vzorky převedeny do Amiconu 3000 MWCO a centrifugovány na  $5\ 000\ \text{x g}$  při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 15 minut. Peleta propláchnuta 2 ml 20 mM Tris-HCl, supernatant zredukován na 1 ml, lyzát zredukován na 0,5 ml, vzorky byly podrobně označeny a uloženy do mrazáku na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3.2. Bakteriální lýza s využitím CellLytic™ Express**

Vzorky z kultivačních zkumavek se ve zkumavkách centrifugačních přesunuly do centrifugy a stočily při  $7\ 000\ \text{x g}$  při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 minut. Následně byl supernatant přefiltrován přes  $0,22\ \mu\text{m}$  filtry a po přidání inhibitorů proteáz ( $20\ \mu\text{l}/1\ \text{ml}$  supernatantu) zamražen na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzniklá peleta se resuspendovala v 3 ml Brain-heart média, bylo přidáno 150 mg CellLytic™ Express a proběhla 15minutová inkubace v třepacím inkubátoru. Takto zlyzované vzorky byly zamrazeny na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3.3. Bakteriální lýza s využitím deoxycholátu sodného**

Z ploten s krevním agarem byly kličkou sebrány bakteriální kolonie a převedeny do fyziologického roztoku (PBS). Následně se zkumavky krátce zvortexovaly a stočily na  $7\ 300\ \text{rpm}$  při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 20 minut. Mezitím byl připraven 5% DOCHNa v 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , přičemž navážka byla 1 g DOCHNa na 20 ml 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Po 20 minutách se vzniklá peleta resuspendovala v malém množství PBS a znovu stočila za stejných podmínek. Po centrifugaci byl odebrán supernatant a peleta se dvakrát promývala v PBS pufru. Připravený lyzační roztok 5% deoxycholátu DOCHNa v 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  byl použit k resuspendaci pelety v množství 200-400  $\mu\text{l}$ . Uloženo k inkubaci do termomixeru při  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  na 10 minut, poté zvortexováno a krátce stočeno. Do lyzátu přidána benzonáza, která se nechala působit 20 minut na ledu. Následně stočeno na  $14\ 000\ \text{rpm}$  při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 minut a odebrán supernatant. Vzniklý lyzát byl v množství 2 x 20  $\mu\text{l}$  nasazen na plotnu pro kontrolu sterility a zbytek zamražen na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro pozdější měření bílkoviny, plotny umístěny do inkubátoru na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  do druhého dne.

### 2.3.4. Kvantifikace proteinového vzorku

Ke stanovení proteinového obsahu vzorku byla využita metoda BCA, jejímž principem je chemická reakce sodných solí bichinoninové kyseliny (2,2-bichinolin-4, 4-dikarboxylová kyselina) s ionty mědi. Bílkovinná kvantifikace probíhala na mikrotitrační destičce s využitím proteinových standardů hovězího sérového albuminu (kalibrační řada). Diluentem pro rozpuštění vzorků byla destilovaná voda a vzorky byly ředěny v poměru 4:1, čemuž odpovídalo množství 20  $\mu$ l vzorku a 5  $\mu$ l diluentu. Nanáška slepého vzorku a standardů byla 25  $\mu$ l. Tzv. working reagent byl připraven smísením roztoků z kitu – bichinoninic acid solution a copper sulfate solution v poměru 50:1. Na mikrotitrační destičku byly postupně nanášeny proteinové standardy albuminu (kalibrační řada), vzorky a následně přidáno 200  $\mu$ l working reagentu do každé jamky. Destička překrytá folií se umístila do termomixéru k inkubaci na 30 minut při 37 °C. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byl měřen obsah bílkoviny s využitím programu Multimode Analysis Software při 562 nm na přístroji Paradigm Detection Platform.

### 2.4. Gelová elektroforéza (1D SDS-PAGE)

Gelová elektroforéza probíhala s využitím NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris gelů. Zvolené gely obsahovaly celkem 12 jamek. Nejprve byly připraveny vzorky podle tabulky č. 6 a následně inkubovány v termobloku po dobu 10 minut při teplotě 70 °C. Smícháním 50 ml dvacetkrát koncentrovaného vzorkového pufru (20X MOPS SDS) s 950 ml deionizované vody vznikl vzorkový pufr o žádané koncentraci. V případě redukujících podmínek byl do vzniklého vzorkového pufru přidán antioxidant (500  $\mu$ l antioxidantu/200 ml 1X SDS pufru).

Tab. 6: Příprava vzorků pro 1D SDS-PAGE elektroforézu

	redukující podmínky	neredukující podmínky
<b>vzorek</b>	x $\mu$ l	x $\mu$ l
<b>NuPAGE™ LDS Sample Buffer</b>	2,5 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l
<b>NuPAGE™ Sample Reducing Agent</b>	1 $\mu$ l	– $\mu$ l
<b>deionizovaná voda</b>	do 6,5 $\mu$ l	do 7,5 $\mu$ l
<b>celkové množství</b>	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

Do první jamky byl nanášen proteinový standard Precision Plus protein standard Kaleidoscope a do dalších jamek bylo nanášeno 10  $\mu$ l (20  $\mu$ l) připravených vzorků. Po umístění gelů do elektroforetické vany a naplnění

MOPS SDS pufru probíhala elektroforéza 50 minut při konstantních 200 V a 100 mA. Po vyjmutí gelů z kazet byly gely obarveny koloidní modří podle metody dle Jungblutta.

## **2.5. Příprava vzorků pro MS**

### **2.5.1. Enzymatické štěpení lyzátů připravených s 5% DOCHNa**

Enzymatické štěpení proteinových vzorků probíhalo u supernatantů a lyzátů, které obsahovaly 100 µg bílkoviny dvěma různými postupy. Ke štěpení lyzátů připravených varem s 5% DOCHNa (vzorky 1-4C) byla využita redukční a alkylační činidla 200 mM dithiothreitol (DTT) a 400 mM iodacetamid (IAA). Dalšími potřebnými látkami byl 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a trypsin. Po odebrání požadovaného množství vzorku (100 µg digestu), byla tato nanáška doplněna 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , aby celkový objem dosáhl 200 µl. Následně bylo přidáno 200mM DTT tak, aby výsledná koncentrace byla 10 mM a proběhla redukce. Takto připravený vzorek se nechal reagovat při 37 °C po dobu 60 minut v termomixeru. Po 60 minutách byl do vzorku přidán 400 mM IAA (výsledná koncentrace 20 mM) a při laboratorní teplotě se nechal inkubovat po dobu 30 minut v temnu. Přebytečné množství IAA bylo zneutralizováno přidáním 200 mM DTT (výsledná koncentrace 10 mM) 15 minut při laboratorní teplotě. Aby výsledná koncentrace DOCHNa klesla na 0,5 %, byl 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  naředěn 10x. Poté byl přidán trypsin v poměru bílkovina/trypsin 20:1 a zkontrolováno pH pomocí indikátorového papírku (hodnota 8). Vzorky byly inkubovány do dalšího dne v termomixeru při 37 °C.

### **2.5.2. Enzymatické štěpení vzorků připravených s Cellytic™ Express**

Vzorky připravené lýzou s Cellytic™ Express (1-16A) byly před samotným štěpením přesráženy. Nejdříve byly centrifugovány při 21 000 x g po dobu 30 minut při 4 °C. Odebrán supernatant a vzniklá peleta promyta 500 µl 90% acetonem (-20 °C). Znovu stočeno na 21 000 x g po dobu 15 minut při 4 °C. Odebrán aceton, peleta vysušena a resuspendována v 50 µl 4 % DOCHNa. Následně proběhlo zředění 150 µl  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pro dosažení výsledné koncentrace DOCHNa 1 %.

Štěpení probíhalo s využitím alkylačního činidla 400 mM IAA a redukčního činidla 100 mM DTT. Po odebrání požadovaného množství vzorku (100 µg digestu), byla nanáška dorovnána 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  k dosažení celkového objemu 200 µl. Přidáním 4 mM DTT (3.7/2.3 µl 100 mM DTT/25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) a inkubací při 700 rpm po dobu 45 minut při 60 °C došlo k redukci. Následná alkylace probíhala po přidání 16 mM IAA (3.7/2.3 µl 400 mM IAA/25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) a inkubaci ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Přidán trypsin v poměru bílkovina/trypsin 30:1 a zkontrolováno pH. Vzorky byly uloženy do termomixeru při 37 °C k inkubaci do dalšího dne.

## **Odstranění přebytečného DOCHNa**

Následující den byly umístěny všechny vzorky (připravené s 5% DOCHNa i s CellLyctic™ Express) z termomixeru na led a okyseleny přibližně 20  $\mu$ l 1% TFA, aby se výsledná hodnota pH pohybovala okolo 2. Bezprostředně po okyselení bylo vše zvortexováno po dobu 60 s. Došlo k vytvoření bílé sraženiny deoxycholátu. Vzorky byly centrifugovány při 7 000 x g po dobu 5 minut. Byl odebrán supernatant, vysrážený deoxycholát byl propláchnut 1% TFA, znovu centrifugován 2 minuty při 10 000 x g a poté byl odebrán supernatant. Protože nedošlo k úplnému vysrážení deoxycholátu, bylo přidáno 700  $\mu$ l ethyl-acetátu (EtAc). Následně bylo vše 30 s vortexováno a stočeno při 10 000 rpm po dobu 30 s. Odstraněna byla horní vrstva (organická fáze) EtAc s obsahem DOCHNa. Znovu bylo přidáno 500  $\mu$ l EtAc a celý postup byl 2 x opakován. Zbytek EtAc byl odpařen ve vakuové odparce.

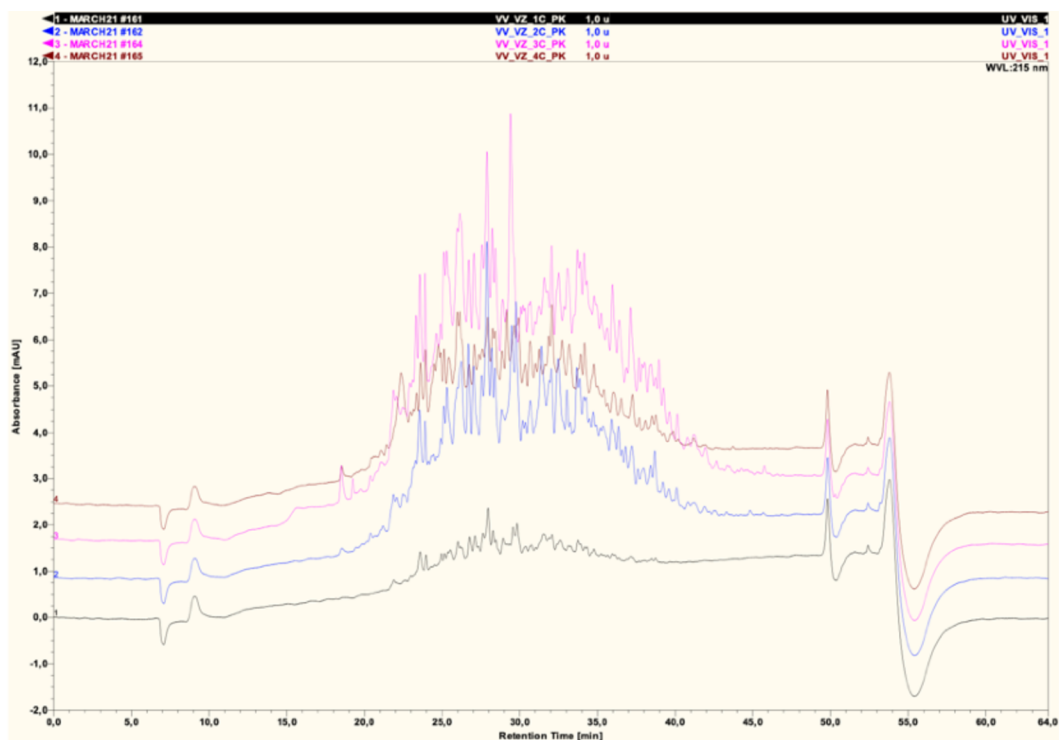
Odsolovací SPE kolonka (solid phase extraction) byla kondicionována 1 ml acetonitrilu (ACN), ekvilibrována 2 ml pufru A (2% ACN, 0,1% TFA) a poté byl nanesen vzorek a prokapaná frakce nanášena znovu. Následně bylo vše promyto 0,5 ml pufru A a eluováno 0,5 ml pufru B (50% ACN, 0,1% TFA). Vysušeno ve vakuové odparce a zamrazeno do měření na -20 °C.

### **2.5.3. Kapalinová chromatografie s UV kontrolou a následná analýza pomocí hmotnostní spektrometrie**

Před samotnou analýzou vzorků na hmotnostním spektrometru, byla provedena kapalinová chromatografie s využitím UV detekce, ke kontrole čistoty daných vzorků (1-16A, 1-4C). Vzorky prošlé purifikací (peptidové směsi) byly rozpuštěny v pufru A (0,1% TFA, 2% ACN), a následně analyzovány na chromatografu UltiMate 3000 RSLC-nano System (Dionex) s UV detekcí pro kontrolu čistoty a kvality vzorku. Výsledný chromatogram popisuje obrázek č. 3. Následně byly vzorky pomocí autosampleru nanášeny na předkolonu Acclaim PepMap100 (C18, 3  $\mu$ m; 30,075 x 220 mm) a separovány na koloně Acclaim PepMap RSLC (C18, 2  $\mu$ m; 0,075 x 150 mm) s využitím gradientu mobilní fáze A (0,1% kyselina mravenčí) a mobilní fáze B (80% ACN/0,1% HCOOH). Průtoková rychlost předkolonou byla nastavena na 200  $\mu$ l/min po dobu 5 minut, separace probíhala s konstantní průtokovou rychlostí 300 nl/min a při konstantní teplotě kolony 40 °C. Analýza byla sledována při vlnové délce 215 nm. Separace probíhala konkrétně přes lineární gradient ze 4 na 55% ACN v 0,1% HCOOH po dobu 89 minut.

Výsledný rozseparovaný eluent pokračoval online do nanosprejového zdroje, odkud byl vpraven do hmotnostního spektrometru (QExactive, Thermo Scientific). Následná analýza proběhla v pozitivním iontovém módu s rozlišením 70 000 v případě MS a 17 500 u MS/MS s maximální dobou

plnění 100 ms. Ionty byly zaznamenány v oblasti 350-1650 m/z, ze které bylo vybíráno vždy 7-12 nejintenzivnějších prekurzorů v daném čase ve spektru MS. Normalizovaná fragmentační energie HCD (Higher-energy C-trap dissociation) byla 27 eV. Po fragmentaci byly vzniklé peptidové fragmenty usměrněny k detektoru, kde byly zaznamenány v podobě hmotnostního fragmentačního spektra. Výsledná data byla následně zpracována a vyhodnocena pomocí programu Proteome Discoverer.



Obr. 3: Příklad výsledného chromatogramu z UltiMate 3000 RSLC-nano System (Dionex) s UV detekcí při vlnové délce 215 nm se znázorněním píků analytů a složek mobilní fáze (systémové píky), 200 ng v nástřiku

## 3. Výsledky a diskuse

### 3.1. Měření proteinového obsahu ve vzorku

V níže přiložených tabulkách jsou uvedeny naměřené koncentrace (množství) bílkovin v jednotlivých vzorcích. V prvním případě (tab. 7) se jedná o vzorky (lyzáty a supernatanty), pro jejichž lýzu byl využit CellLytic™ Express, druhá tabulka (tab. 8) obsahuje hodnoty naměřené u vzorků lyzovaných s využitím 5% deoxycholátu sodného. Třetí sada vzorků, která byla lyzována metodou sonikace, nebyla nakonec pro analýzy využita.

Vzorky 1-4 a 9-12 z první tabulky (tab. 7) jsou lyzáty a supernatanty s LB médiem, vzorky 5-8 a 13-16 s médiem BH a pro lyzáty z druhé tabulky, vzorky 1-4 (tab. 8), bylo využito pouze médium BH. Z tabulek je patrné, že vyšších hodnot bílkovinné koncentrace ve vzorcích bylo dosaženo využitím lyzační metody CellLytic™ Express.

Tab. 7: Naměřené hodnoty bílkoviny u lyzátů a supernatantů připravených lyzační metodou s využitím CellLytic™ Express

Číslo vzorku	Druh vzorku	Obsah bílkoviny [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]
1A	lyzát	3,432
2A	lyzát	3,688
3A	lyzát	3,340
4A	lyzát	3,231
5A	lyzát	6,127
6A	lyzát	6,794
7A	lyzát	6,172
8A	lyzát	6,971
9A	supernatant	3,833
10A	supernatant	3,668
11A	supernatant	3,104
12A	supernatant	3,161
13A	supernatant	5,154
14A	supernatant	7,093
15A	supernatant	6,162
16A	supernatant	6,227

Tab. 8: Naměřené hodnoty bílkovin lyzátů připravených lyzační metodou s 5% DOCHNa

Číslo vzorku	Druh vzorku	Bílkovina ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
1C	lyzát	0,494
2C	lyzát	0,651
3C	lyzát	0,727
4C	lyzát	1,208

### 3.2. Gelová elektroforéza

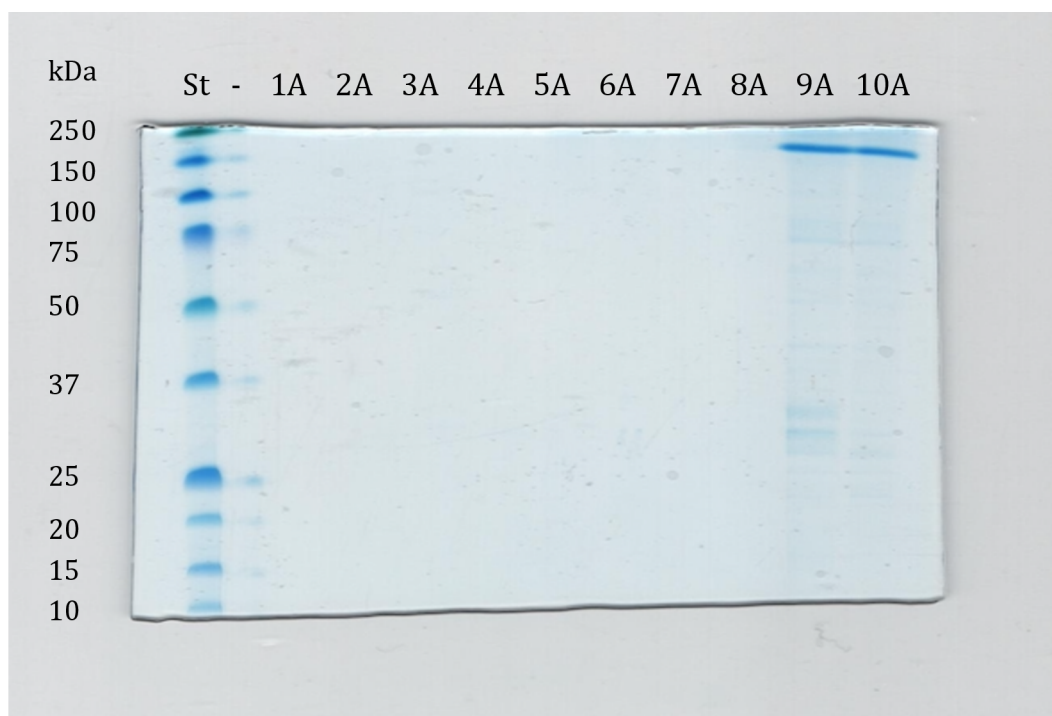
Výsledky gelové elektroforézy u redukujících i neredukujících vzorků můžeme pozorovat na obrázcích č. 3, 4. Pro lepší přehlednost a orientaci ve výsledcích odpovídají řádky v tabulce č. 9 sloupcům v gelu. Pořadí nanášených vzorků bylo v případě redukujících i neredukujících vzorků stejné proto je uvedena pouze jedna tabulka.

Tab. 9: Přehled vzorků na gelu s uvedením konkrétních kmenů a použitých médií

Vzorek č.	Kmen	Druh vzorku	Médium
<b>standard</b>			
-	-	-	-
1A	NCTC 04837	lyzát	LB
2A	NCTC 08379	lyzát	LB
3A	NCTC 09347	lyzát	LB
4A	NCTC 13562	lyzát	LB
5A	NCTC 04837	lyzát	BH
6A	NCTC 08379	lyzát	BH
7A	NCTC 09347	lyzát	BH
8A	NCTC 13562	lyzát	BH
9A	NCTC 04837	supernatant	LB
10A	NCTC 08379	supernatant	LB
<b>standard</b>			
-	-	-	-
11A	NCTC 09347	supernatant	LB
12A	NCTC 13562	supernatant	LB
13A	NCTC 04837	supernatant	BH
14A	NCTC 08379	supernatant	BH
15A	NCTC 09347	supernatant	BH

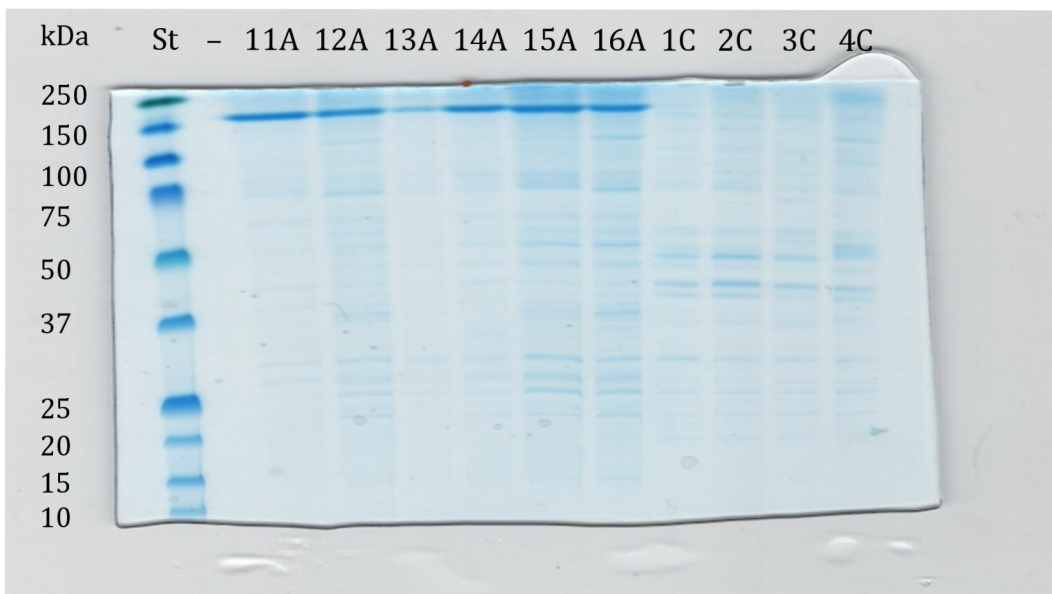
Vzorek č.	Kmen	Druh vzorku	Médium
16A	NCTC 13562	supernatant	BH
1C	NCTC 04837	lyzát	BH
2C	NCTC 08379	lyzát	BH
3C	NCTC 09347	lyzát	BH
4C	NCTC 13562	lyzát	BH

Na výsledných 1D gelech je znázorněna separace proteinových vzorků. V případě separovaných vzorků 1-8A (redukováná i neredukovaná forma) na obrázku č. 4 a 5 představujících bakteriální lyzáty vybraných kmenů, nejsou jednotlivé bandy viditelné. To může být způsobeno chybou během měření bílkovinného obsahu (interference lyzačního média etc.) a tedy nižší než detekovatelnou nanáškou, v případě zvoleného barvení. U vzorků 9-16A je u redukováné i neredukované formy patrný výrazný band v oblasti 150 kDa. Bez bližší MS analýzy nelze v současné době s přesností určit identitu bandu.

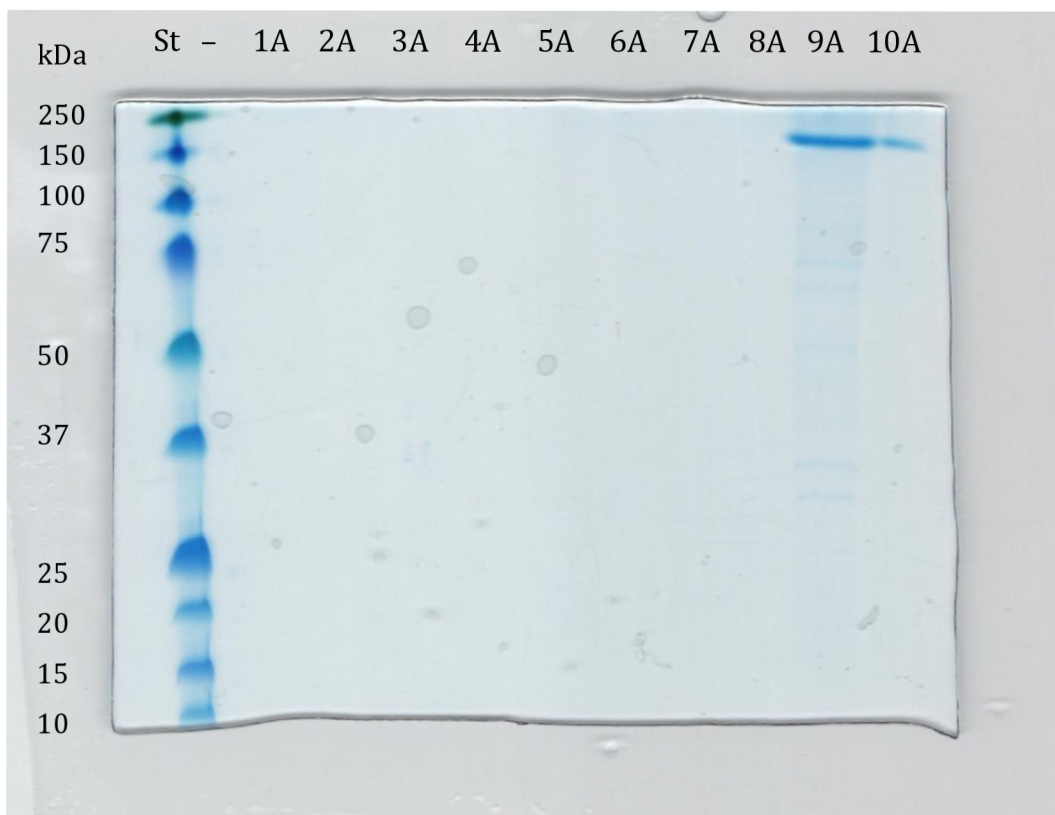


Obr. 4: Výsledný 1D gel, neredukovaná forma – vzorky 1-10A, nanáška 10 µg (10-20 µl), vlevo bandy standardu Kaleidoscope s uvedenými velikostmi

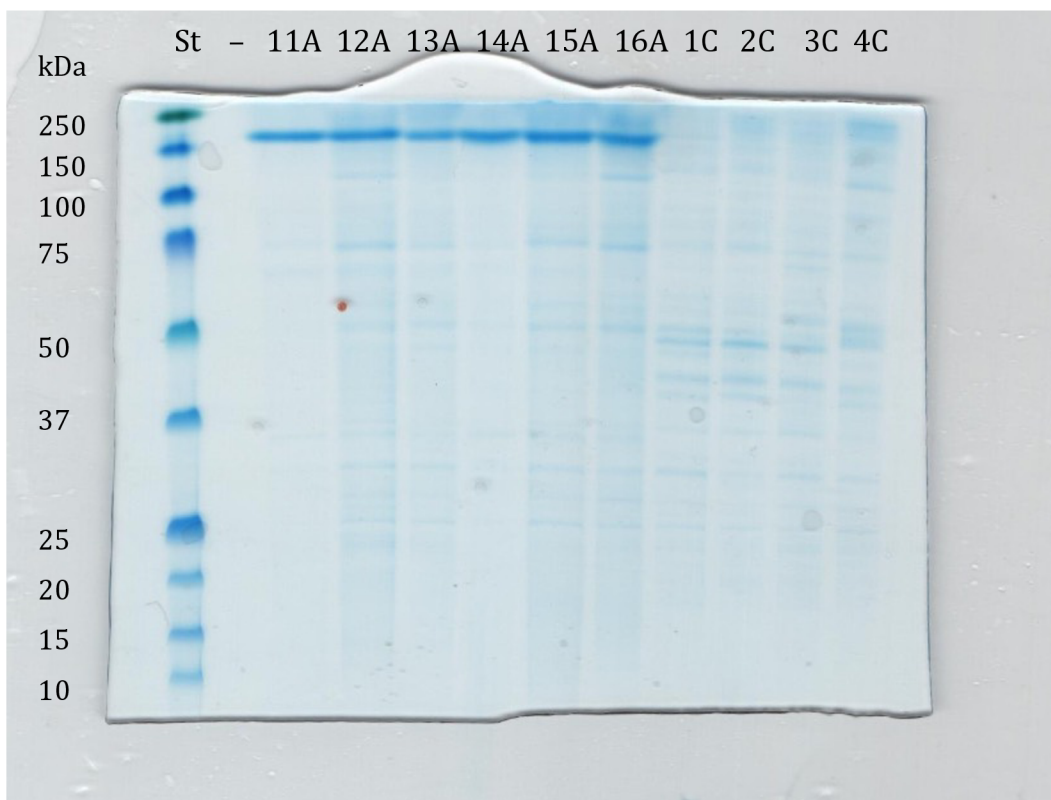




Obr. 5: Výsledný 1D gel, neredukovaná forma - vzorky 11-16A, 1-4C, nanáška 10 µg (10-20 µl), vlevo bandy standardu Kaleidoscope s uvedenými velikostmi



Obr. 6: Výsledný 1D gel, redukována forma - vzorky 1-10A, nanáška 10 µg (10-20 µl), vlevo bandy standardu Kaleidoscope s uvedenými velikostmi



Obr. 7: Výsledný 1D gel, redukováná forma – vzorky 11-16A, 1-4C, nanáška 10 µg (10-20 µl), vlevo bandy standardu Kaleidoscope s uvedenými velikostmi

### 3.3. Identifikace proteinů s využitím LC-MS/MS

Databázové prohledávání proběhlo s využitím programu Proteome discoverer verze 2. 4. Databáze Swiss-Prot, proti které byly zjišťovány proteiny ve vzorcích, byla velmi rozsáhlá a obsahovala celkem 337 766 sekvencí pro jednotlivé proteiny. Celkově bylo ve všech vzorcích detekováno 1984 proteinů. Cílem této práce bylo najít Shiga toxin a jeho dvě podjednotky (StxA a StxB). Pro přehlednost je zde uvedena i tabulka (Tab. 10) se soupisem vzorků, u kterých byly Shiga toxiny detekovány.

Tab. 10: Vzorky ve kterých byly detekovány proteiny kódující Shiga toxin

číslo vzorku	kmen	lýza
1A	NCTC 04837	CellLytic™ Express
2A	NCTC 08379	CellLytic™ Express
1C	NCTC 04837	5 % DOCHNa
2C	NCTC 08379	5 % DOCHNa

Peptidy pro podjednotku A (StxA) byly objeveny ve dvou vzorcích a v obou případech se jednalo o lyzáty. Peptidy pro podjednotku B (StxB) se podařilo detekovat ve 4 vzorcích, a i v tomto případě se jednalo o lyzáty. V souvislosti

s objevenými sekvencemi peptidů byly dohledány konkrétní pozice, kde se sekvence v proteinu vyskytují viz tabulky č. 11 a 12.

Tab. 11: Vzorky s konkrétními sekvencemi a pozicí v podjednotce A

Číslo vzorku	Sekvence	Modifikace	Pozice sekvence v proteinu
<b>2C</b>	HSLTTSYLDLMSHS GTSLTQSVAR		155-178
<b>1C, 2C</b>	LSSVLPDYHGQDS VR		228-242
<b>1C, 2C</b>	MASDEFPSMCPAD GR	1x Carbamidomethyl [C10]	274-288
<b>2C</b>	FADFSHVTFPGTTA VTLSGDSSYTTLQR		114-141
<b>1C, 2C</b>	MASDEFPSMCPAD GR	1x Carbamidomethyl [C10]; 1x Oxidation [M]	274-288
<b>1C, 2C</b>	FVTVTAEALR		183-192
<b>1C, 2C</b>	NNLYVTGFVNR		96-106
<b>1C, 2C</b>	TNNVFYR		107-113
<b>2C</b>	ILWDSSTLGAILMR		297-310
<b>1C, 2C</b>	TYVDSLNVIR		34-43
<b>1C, 2C</b>	GIDPEEGRFNNLR		78-90
<b>1C</b>	TLDDLGR		202-210

Tab. 12: Vzorky s konkrétními sekvencemi a pozicí v podjednotce B

Číslo vzorku	Sekvence	Modifikace	Pozice sekvence v proteinu
<b>1C, 2C</b>	VEYTKYNDDDTFTV K		29-43
<b>1C, 2C</b>	TNACHNGGGFSEVI FR	1x Carbamidomethyl [C4]	74-89
<b>1C, 2C</b>	VGDKELFTNR		44-53
<b>1C, 2C, 1A, 2A</b>	YNDDDTFTVK		34-43

Detekované podjednotky StxA a StxB byly dohledány v databázi UniProt a na jejím podkladu, byly toxiny označeny příslušným kódem viz tabulka č. 13.

Tab. 13: Detekované podjednotky Shiga toxinu s kódy UniProt a pokrytím peptidů

UNIPROT	Nalezený toxin	Pokrytí (%)
Q32GM1	Shiga toxin podjednotka A – StxA	50
Q7BQ98	Shiga toxin podjednotka B – StxB	46

U kmenů NCTC 09347 (*S. dysenteriae*) a NCTC 13562 (*E. coli*) nebyl Shiga toxin za pomoci hmotnostní spektrometrie detekován. Důvodem může být nízká produkce toxinu, neefektivní nebo nedostatečné enzymatické štěpení. Vzhledem k pozitivním nálezům u vzorků, které byly připraveny odlišnou lyzační metodou (CellLytic™ Express a 5 % DOCHNa), je chyba z důvodu špatně zvolené lyzační metody nepravděpodobná. Na základě těchto výsledků bude vhodné stejnou metodiku u zbývajících dvou kmenů, u kterých nedošlo k detekci Shiga toxinu důkladně zopakovat.

Z důvodu ztížených pracovních podmínek v důsledku protiepidemických vládních opatření probíhala praktická část s časovými prodlevami a řadu metod tak bylo nutné zopakovat. Proto do této práce již nebyly zahrnuty růstové křivky a nebyla znovu provedena vybraná metodika k detekci Shiga toxinů u zbylých kmenů, kde nedošlo k detekci. Shiga toxin má řadu pozoruhodných vlastností a jeho cílená proteomická analýza je tak velmi důležitá. V případě opakování této práce bych kromě vybraných proteomických metod zvolila ještě další postupy k porovnání jejich účinnosti a k dosažení dalších kvalitních výsledků.

## Závěr

V bakalářské práci jsem se věnovala proteomické charakterizaci čtyř bakteriálních kmenů produkujících Shiga toxin, z nichž tři studované kmeny představovala *Shigella dysenteriae* a jeden kmen *Escherichia coli*. Teoretická část práce byla věnována charakteristice a patogenitě daných kmenů, různým metodám kultivace, popisu Shiga toxinu a v neposlední řadě také imunodetekčním metodám včetně průběhu kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Praktická (experimentální část) probíhala v laboratoři Katedry molekulární patologie a biologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Univerzity obrany. Pro jednotlivé kmeny *S. dysenteriae* (NCTC 04837, NCTC 08379 a NCTC 09347) a *E. coli* (NCTC 13562) byla po jejich revitalizaci zvolena optimální metoda kultivace společně s vhodnými médii. Bakteriální kultury byly lyzovány třemi způsoby, sonikací, nedenaturujícím CellLytic™ Express a varem v deoxycholátu sodném. K dalšímu zpracování byly využity vzorky připravené druhým a třetím jmenovaným lyzačním mechanismem. K měření proteinového obsahu vzorku byla zvolena metoda BCA. Purifikované vzorky po enzymatickém štěpení byly zkontrolovány na kapalinové chromatografii s UV detektorem kvůli ověření čistoty. Po separaci získaných (extrahovaných) proteinů proběhla jejich detekce na hmotnostním spektrometru (QExactive) a vyhodnocení (Proteome Discoverer 2.4). Získané výsledky byly porovnány s databází Swiss Prot a byly zaznamenány detekované aminokyselinové sekvence.

Podjednotky StxA a StxB byly detekovány u dvou kmenů *Shigella dysenteriae* (NCTC 04837, NCTC 08379), u nichž se shodovaly nalezené aminokyselinové sekvence s proteinovou databází Swiss Prot. Zbývající dva kmeny *S. dysenteriae* a *E. coli* (NCTC 09347 a NCTC 13562), u kterých nedošlo k detekci hledaného toxinu, bych v budoucnu ráda zpracovala znovu s využitím stejných metodických postupů, k dodatečnému prokázání přítomnosti aminokyselinových sekvencí kódujících Shiga toxin.

## Seznam použitých zkratk

**2D-PAGE** – dvourozměrná gelová elektroforéza (Two-dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

**ACN** – acetonitril

**aHUS** – atypický hemolyticko-uremický syndrom

**BCA** – Bicinchoninic Acid Assay

**BH** – Brain Heart infusion

**BSL** – BioSafety Level

**CDC** – Centrum pro kontrolu nemocí (Centers for Disease Control and Prevention)

**CIDT** – diagnostické testy nezávislé na buněčné kultuře (Culture-independent diagnostic tests)

**ddPCR** – digitální polymerázová řetězová reakce (Droplet digital polymerase chain reaction)

**DOCHNa** – deoxycholát sodný

**EAEC** – enteroagregativní *E. coli*

**EHEC** – enterohemoragická *E. coli*

**EIEC** – enteroinvazivní *E. coli*

**ELISA** – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

**EPEC** – enteropatogenní *E. coli*

**ESI** – ionizace elektrosprejem (Electrospray ionization)

**ETEC** – enterotoxigenní *E. coli*

**FT-ICR** – Fourier-transform ion cyclotron resonance

**HGT** – horizontální přenos genetické informace (Horizontal gene transfer)

**HRP** – křenová peroxidáza (horseradish peroxidase)

**HUS** – hemolyticko-uremický syndrom

**ICAT** – afinitní značení kódované pomocí izotopů (Isotope-coded affinity tag)

**IEC** – ionexová chromatografie (ion exchange chromatography)

**iTRAQ** – izobarické značení pro relativní a absolutní kvantifikaci (Isobaric tags for relative and absolute quantitation)

**LB** – Luria Bertani broth/agar

**LC-MS/MS** – kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry)

**MALDI** – laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (matrix assisted laser desorption/ionization)

**MBB** – mikrobiologický bezpečnostní box

**MS** – hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry)

**NCTC** – National Collection of Type Culture

**OD** – optická denzita (optical density)

**PCR** – polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)

**RTQ-PCR** – kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Real-time PCR)

**SDS-PAGE** – sodium dodecyl sulfát – polyakrylamidová gelová elektroforéza (sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)

**SEC** – molekulární síťová chromatografie (size exclusion chromatography)

**SILAC** – stabilní značení izotopů v buněčné kultuře pomocí aminokyselin (Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture)

**STEC** – shigatoxigenní *E. coli*

**STEC-HUS** – hemolyticko-uremický syndrom způsobený shigatoxigenní *E. coli*

**SÚJB** – Státní úřad pro jadernou bezpečnost

**TFA** – kyselina trifluoroctová

**TMA** – trombotické mikroangiopatie

**TTP** – trombocytopenická purpura

## Seznam zdrojů

ASLAM, Bilal, Madiha BASIT, Muhammad Atif NISAR, Mohsin KHURSHID a Muhammad Hidayat RASOOL. Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2017, 55(2), 182-196. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/bmw167

BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996. ISBN 8023802976

BENEŠ, Jiří. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, c2009. ISBN 978-80-7262-644-1.

BERGAN, Jonas, Anne Berit DYVE LINGELEM, Roger SIMM, Tore SKOTLAND a Kirsten SANDVIG. Shiga toxins. *Toxicon* [online]. 2012, 60(6), 1085-1107. ISSN 00410101. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxicon.2012.07.016

BERGEY, David Hendricks. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. 1984. USA: Springer-Verlag New York, 2005. ISBN 9780387241449

BRYAN, Allen, Ilan YOUNGSTER a Alexander J. MCADAM. Shiga Toxin Producing Escherichia coli. *Clinics in Laboratory Medicine* [online]. 2015, 35(2), 247-272. ISSN 02722712. Dostupné z: doi:10.1016/j.cll.2015.02.004

CARROLL, Karen C., Jeffery A. HOBDEN, Steve MILLER, Stephen A. MORSE a Timothy A. MIETZNER et al. Jawetz, *Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. 27. New York: McGraw-Hill Education, 2016. ISBN 9780-0-71-82498-9.

DOGGETT, Norman A., Harshini MUKUNDAN, Elliot J. LEFKOWITZ, et al. Culture-Independent Diagnostics for Health Security. *Health Security* [online]. 2016, 14(3), 122-142. ISSN 2326-5094. Dostupné z: doi:10.1089/hs.2015.0074

DOMON, B. a Ruedi AEBERSOLD. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science* [online]. 2006, 312(5771), 212-217. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1124619

DURACOVA, Miloslava, Jana KLIMENTOVA, Alena FUCIKOVA a Jiri DRESLER. Proteomic Methods of Detection and Quantification of Protein Toxins. *Toxins* [online]. 2018, 10(3). ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins10030099

ENGEDAL, Nikolai, Tore SKOTLAND, Maria L. TORGERSEN a Kirsten SANDVIG. Shiga toxin and its use in targeted cancer therapy and imaging. *Microbial Biotechnology* [online]. 2011, 4(1), 32-46. ISSN 17517915. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00180.x

FENN, J., M MANN, C. MENG, S. WONG a C. WHITEHOUSE. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* [online]. 1989, 246(4926), 64-71. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.2675315

GREBE, Stefan KG a Ravinder J SINGH. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory – Where to From Here? The Clinical Biochemist. *Reviews* [online]. 2011, 32(1), 5-31. ISSN 1838-0212. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3052391/>



- GROISMAN, Eduardo A a Howard OCHMAN. Pathogenicity Islands: Bacterial Evolution in Quantum Leaps. *Cell* [online]. 1996, **87**(5), 791-794 [cit. 2021-5-10]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)81985-6
- HORÁČEK, Jiří. *Základy lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum, 2000. ISBN 8024600064.
- HRDINA, Vratislav, Radomír HRDINA, Luděk JAHODÁŘ, Zdeněk MARTINEC a Vladimír MĚRKA. *Přírodní toxiny a jedy*. Praha: Galén, c2004. ISBN 80-246-0823-5
- ISHITOYA, SATOSHI, HISAO KURAZONO, HIROYUKI NISHIYAMA, et al. Verotoxin Induces Rapid Elimination of Human Renal Tumor Xenografts in SCID Mice. *Journal of Urology* [online]. 2004, **171**(3), 1309-1313. ISSN 0022-5347. Dostupné z: doi:10.1097/01.ju.0000100110.11129.85
- JOHANSSON, D, C ANDERSSON, J MOHARER, A JOHANSSON a P BEHNAM-MOTLAGH. Cisplatin-induced expression of Gb3 enables verotoxin-1 treatment of cisplatin resistance in malignant pleural mesothelioma cells. *British Journal of Cancer* [online]. 2010, **102**(2), 383-391. ISSN 0007-0920. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bjc.6605467
- JOKIRANTA, T. Sakari. HUS and atypical HUS. *Blood* [online]. 2017, **129**(21), 2847-2856. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2016-11-709865
- JURÁNKOVÁ, Jana. *Klinická mikrobiologie v laboratorní praxi: bakalářský obor Zdravotní laborant*. Brno: Masarykova univerzita, 2011. ISBN 978-80-210-5657-2.
- JÍLEK, Petr. *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví*. Praha: Karolinum, 2002. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0459-0.
- KONOWALCHUK, J, J I SPEIRS a S STAVRIC. Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli. *Infection and Immunity* [online]. 1977, **18**(3), 775-779. ISSN 0019-9567. Dostupné z: doi:10.1128/IAI.18.3.775-779.1977
- KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- KOUKALOVÁ, Dagmar. *Praktická cvičení z lékařské mikrobiologie I*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2005. ISBN 80-244-0980-1.
- LIN, Alice V. Direct ELISA. HNASKO, Robert, ed. ELISA [online]. New York, NY: Springer New York, 2015, 2015, s. 61-67. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-2741-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2742-5\_6
- MAKRIDAKIS, Manousos a Antonia VLAHOU. GeLC-MS: A Sample Preparation Method for Proteomics Analysis of Minimal Amount of Tissue. SARWAL, Minnie M. a Tara K. SIGDEL, ed. *Tissue Proteomics* [online]. New York, NY: Springer New York, 2018, 2017-10-10, s. 165-175. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-7852-6. Dostupné z: doi:10.1007/7651\_2017\_76
- MAREJKOVÁ, Monika, Petr PETRÁŠ, Miluše VAŠÁKOVÁ Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie, SZÚ: *Zjišťování přítomnosti genů kódujících produkci Shiga toxinů Stx1 a Stx2 u klinických izolátů Escherichia coli*. 15. 2006. ISSN 1211-7358.
- MATTHIESEN, Rune a Jakob BUNKENBORG. Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics* [online]. Totowa,

- NJ: Humana Press, 2013, 2013-3-29, s. 1-45. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-62703-391-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-62703-392-3\_1
- MAYER, Chad L., Caitlin S. LEIBOWITZ, Shinichiro KUROSAWA a Deborah J. STEARNS-KUROSAWA. Shiga Toxins and the Pathophysiology of Hemolytic Uremic Syndrome in Humans and Animals. *Toxins* [online]. 2012, 4(11), 1261-1287. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins4111261
- MELTON-CELSA, Angela R. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiology Spectrum* [online]. 2014, 2(4). ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013
- MUELLER, Matthew a Christopher R. TAINTER. *Escherichia coli*. *Escherichia coli* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls publishing, 2020. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298
- MUKHOPADHYAY, Sarmishta, Sayak GANGULI a Santanu CHAKRABARTI. Shigella pathogenesis: molecular and computational insights. *AIMS Molecular Science* [online]. 2020, 7(2), 99-121. ISSN 2372-0301. Dostupné z: doi:10.3934/molsci.2020007
- O'BRIEN, AD a RK HOLMES. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiological Reviews* [online]. 1987, 51(2), 206-220. ISSN 0146-0749. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373104/
- PERTILE, Eva a Vladimír ČABLÍK. *Instrumentální metody analýzy*. Ostrava: VŠB – Technická univerzita Ostrava, 2006. ISBN 80-248-1049-2.
- POPOFF, Michel R. Bacterial Exotoxins. RUSSELL, W. a H. HERWALD, ed. *Concepts in Bacterial Virulence* [online]. Basel: KARGER, 2004, 2004, s. 28-54. Contributions to Microbiology. ISBN 3-8055-7786-9. Dostupné z: doi:10.1159/000081688
- ROGERS, John C. a Ryan D. BOMGARDEN. Sample Preparation for Mass Spectrometry-Based Proteomics; from Proteomes to Peptides. MIRZAEI, Hamid a Martin CARRASCO, ed. *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016, 2016-12-15, s. 43-62. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-3-319-41446-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-41448-5\_3
- RUSSO, Lisa M., Angela R. MELTON-CELSA a Alison D. O'BRIEN. Shiga Toxin (Stx) Type 1a Reduces the Oral Toxicity of Stx Type 2a. *Journal of Infectious Diseases* [online]. 2016, 213(8), 1271-1279. ISSN 0022-1899. Dostupné z: doi:10.1093/infdis/jiv557
- RYAN, Kenneth J. *Sherris medical microbiology*. Seventh edition. New York: McGraw-Hill, 2018. ISBN 978-1259859809.
- SAKURADA, Koichi a Hikoto OHTA. No promising antidote 25 years after the Tokyo subway sarin attack: A review. *Legal Medicine* [online]. 2020, 47. ISSN 13446223. Dostupné z: doi:10.1016/j.legalmed.2020.101761
- TAKEDA, Y. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and its infection: from 1977 to 1995. *Japanese Journal of Clinical Medicine* [online]. 1997, 55(3), 635-640. ISSN 0047-1852. Dostupné z: PMID: 086772

- VARGA, Marian, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jiří DOŠKAŘ. Molecular characterization of a new efficiently transducing bacteriophage identified in meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Virology* [online]. 2016, 97(1), 258-268. ISSN 0022-1317. Dostupné z: doi:10.1099/jgv.0.000329
- VOTAVA, Miroslav. *Klinická mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-7503-0.
- VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5.
- WALSH, Patrick R. a Sally JOHNSON. Eculizumab in the treatment of Shiga toxin haemolytic uraemic syndrome. *Pediatric Nephrology* [online]. 2019, 34(9), 1485-1492. ISSN 0931-041X. Dostupné z: doi:10.1007/s00467-018-4025-0
- YANG, Jin, Nana ZHANG, Jun LV, et al. Comparing the performance of conventional PCR, RTQ-PCR, and droplet digital PCR assays in detection of *Shigella*. *Molecular and Cellular Probes* [online]. 2020, 51. ISSN 08908508. Dostupné z: doi:10.1016/j.mcp.2020.101531