

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Charakterizace vybraných kmenů bakterie
Staphylococcus aureus s ohledem na produkci
proteinových toxinů

Bakalářská práce

Autor: Kateřina Nagyová
Studijní program: B1501/ Biologie
Studijní obor: 1501R015/ Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.
Odborný konzultant: Mgr. Ing. Miloslava Ďuráčová



Zadání bakalářské práce

Autor: Kateřina Nagyová

Studium: S16BI071BP

Studijní program: B1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Název bakalářské práce: **Charakterizace vybraných kmenů bakterie *Staphylococcus aureus* s ohledem na produkci proteinových toxinů**

Název bakalářské práce AJ: Characterization of selected strains of *Staphylococcus aureus* with respect to the production of protein toxins

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Bakalářská práce je zaměřena na charakterizaci vybraných kmenů zlatého stafylokoka (růstové křivky, optimalizace růstového média a agaru a jiných kultivačních podmínek, apod.). S ohledem na produkci jednotlivých proteinových toxinů bude vybrána optimální metoda kultivace, doba kultivace, vhodná média a postupy pro získání těchto toxinů v nativní formě pro následné analýzy pomocí hmotnostní spektrometrie.

1. Hennekinne, J., De Buyser, M. and Dragacci, S. (2012), *Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiol Rev*, 36: 815-836. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x
2. Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Current opinion in microbiology*. 2014;0:32-37. doi:10.1016/j.mib.2013.11.004.

Garantující pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

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

Oponent: Mgr. Klára Kubelková, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 6.1.2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

Jméno a příjmení

Ráda bych zde poděkovala RNDr. Aleně Myslivcové Fučíkové, Ph.D. za všechny odborné rady, vstřícnost a čas, který mi při mé bakalářské práci věnovala. Také děkuji Mgr. Ing. Miloslavě Ďuráčové za odborné rady a čas, který mi v laboratoři věnovala. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem pracovníkům v laboratořích Katedry molekulární patologie a biologie, Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Univerzity obrany, zejména Mgr. Věře Vozandychové, Lence Lukšíkové a Bc. Jitce Žákové za jejich trpělivost a praktické rady.

Anotace

NAGYOVÁ, K. *Charakterizace vybraných kmenů bakterie Staphylococcus aureus s ohledem na produkci proteinových toxinů*. Hradec Králové, 2020. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Myslivcová Fučíková Alena. 53 s.

Bakalářská práce je zaměřena na charakterizaci vybraných kmenů *Staphylococcus aureus* (růstové křivky, optimalizace růstového média a agaru a jiných kultivačních podmínek apod.). S ohledem na produkci jednotlivých proteinových toxinů byla vybrána optimální metoda kultivace, doba kultivace, vhodné médium a postupy pro získání těchto toxinů v nativní formě pro následnou analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie. Práce obsahuje rešerši, ve které jsou zahrnuty informace o bakterii a zejména o jejích toxinech, včetně metod, které se pro práci s proteiny nejčastěji používají. V praktické části byla porovnávána dvě média pomocí metody růstových křivek, které ukázaly, že vhodnějším médiem je LB médium. Při extrakci proteinů z bakterie byly použity dvě metody (ultrazvuk a lyzační pufr), z nichž se podařilo analyzovat pomocí nano LC MS na QExactive pouze jednu sadu vzorků, a to vzorky lyzované ultrazvukem. U těchto vzorků byly nalezeny pouze dva toxiny (gama hemolyzin-podjednotka b a exfoliativní toxin A).

Klíčová slova

Staphylococcus aureus, kultivace, proteinové toxiny

Annotation

NAGYOVÁ, K. *Characterization of selected strains of Staphylococcus aureus with respect to the production of protein toxins*. Hradec Králové, 2020. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Myslivcová Fučíková Alena. 53 p.

The bachelor thesis is focused on the characterization of selected strains of *Staphylococcus aureus* (growth curves, optimization of growth medium and agar and other culture conditions, etc.). With regard to the production of individual protein toxins, the optimal culture method, culture time, suitable medium and procedures for obtaining these toxins in native form for subsequent analysis by mass spectrometry were selected. The thesis contains a theoretical part, which includes information about the bacterium and especially about its toxins, including the methods that are most often used to work with proteins. In the practical part, two media were compared using the method of growth curves, which showed that the more suitable medium is LB medium. Two methods (ultrasound and lysis buffer) were used to extract proteins from the bacterium, of which only one set of samples was analyzed by nano LC MS on QExactive, namely samples lysed by ultrasound. Only two toxins (Gamma hemolysin-subunit b and Exfoliative toxin A) were found in these samples

Keywords

Staphylococcus aureus, cultivation, protein toxins

Obsah

Úvod	11
1 Teoretická část	12
1.1 Proteinové toxiny	12
1.1.1 Toxiny poškozující buněčnou membránu	13
1.1.2 Superantigeny	18
1.2 Možnosti analýzy proteinových toxinů bakterie <i>Staphylococcus aureus</i>	22
1.2.1 Kultivace	22
1.2.2 Extrakce proteinů	22
1.2.3 Detekční a separační metody	23
2 Experimentální část.....	27
2.1 Materiál.....	27
2.1.1 Vzorky bakterií	27
2.1.2 Laboratorní materiál	29
2.1.3 Agary/Média.....	29
2.1.4 Chemikálie	29
2.1.5 Kity.....	30
2.1.6 Kapalinové chromatografy, kolony a příslušenství	30
2.1.7 Hmotnostní spektrometr	30
2.1.8 Přístrojové vybavení.....	31
2.1.9 Programové vybavení.....	31
2.2 Kultivace.....	31
2.2.1 Růstové křivky	32
2.2.2 CFU výpočet	33
2.3 Lýza bakterií a extrakce proteinů	33
2.4 Stanovení proteinového obsahu vzorku	34
2.5 1D SDS-PAGE	35
2.5.1 Stříbření gelů.....	36

2.6	Enzymatické štěpení proteinového vzorku	36
2.7	LC-MS/MS analýza peptidové směsi	37
3	Výsledky a diskuze	39
3.1	Vyhodnocení růstových křivek	39
3.2	CFU přepočet.....	40
3.3	Naměřený proteinový obsah ve vzorcích.....	41
3.4	Gelová elektroforéza	45
3.5	Identifikace pomocí nano LC-MS/MS.....	46
	Závěr.....	48
	Literatura	49

Seznam zkratek

AcN – acetonitril

ADAM 10 – buněčný receptor (A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10)

APC – buňky reprezentující antigen (antigen presenting cells)

APS – amonium persulfát

C5a – buněčný receptor (complement component 5a receptor 1)

C5L2 – buněčný receptor (G protein-coupled receptor 77)

CCR5 – buněčný receptor (C-C chemokine receptor type 5)

CD11b – Integrin alfa M receptor (ITGAM)

CWA – proteiny připojené k buněčné stěně (cell wall anchored proteins)

CXCR1 – buněčný receptor (C-X-C chemokine receptor type 1)

CXCR2 – buněčný receptor (C-X-C chemokine receptor type 2)

ELISA – analytická metoda ke stanovení různých antigenů (enzyme-linked immunosorbent assay)

ESI – elektrosprejová ionizace

ETs – enterotoxin

FA – kyselina mravenčí (formic acid)

FPR2 – buněčný receptor (formyl peptid receptor 2)

Hla – hemolyzin alfa

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)

LB – Luria Bertani médium/ agar (Luria Bertani broth/agar)

LuK – leukocidin

MALDI-TOF MS – laserová desorpce/ionizace za účasti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization mass spektrometry)

MHC II – MHC glykoproteiny II. třídy

MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

MSCRAMM – povrchové složky rozpoznávající molekuly adhezivní matrice (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules)

NA – živný agar (nutrient agar)

NB – živné médium (nutrient broth)

PBS – fyziologický roztok (phosphate buffered saline)

PSM – moduliny rozpustné ve fenolu (phenol soluble modulins)

PVL – Panton Valentin leukocidin

SA – *Staphylococcus aureus*

SaPI – stafylokokové ostrovy patogenity (staphylococcal pathogenicity islands)

SDS-PAGE – 1 D elektroforéza za přítomnosti dodecyl sulfátu sodného na polyakrylamidovém gelu

SE – stafylokokový enterotoxin (staphylococcal enterotoxin)

SEIT – stafylokokový toxin, podobný enterotoxinu (staphylococcal enterotoxins like toxin)

TCR - T – lymfocytární receptor (T-cell receptor)

TEMED – tetrametyletylendimin

TFA – kyselina trifluoroctová (trifluoroacetic acid)

Úvod

Staphylococcus aureus je grampozitivní bakterie, která je řazena do kmenu *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Bacillales*, čeledi *Staphylococcaceae* a rodu *Staphylococcus* (Strasheim et al. 2013). Vyskytuje se především na kůži a nosní sliznici teplokrevných živočichů, kde může způsobit různé specifické i nespecifické záněty od mírných až po velmi závažné (Oliveira et al. 2018). Mezi nejznámější onemocnění patří otravy z jídel, syndrom toxického šoku, stafylokoková meningitida, syndrom opařené kůže, nebo bulózní impetigo (puchýřová forma impetiga) (Fetsch 2018).

Staphylococcus aureus ve vztahu k člověku kolonizuje asi čtvrtinu lidské populace, aniž by způsobil zjevné zdravotní komplikace a je odpovědný za zhruba 40 % všech nozokomiálních infekcí (Bonar et al. 2015). Má vysoký potenciál získat antimikrobiální rezistenci (Denis 2017) a podle vyhlášky č. 474/2002 Sb., jsou některé jeho toxiny v seznamu vysoce rizikových biologických agens a toxinů - příloha č. 1., 3. Toxiny a jejich podjednotky - 13. *Staphylococcus aureus* enterotoxiny, hemolyzin alfa toxin, a toxin syndromu toxického šoku (dříve znám jako *Staphylococcus enterotoxin F*) (Státní úřad pro jadernou bezpečnost, subj.cz). Z hlediska nebezpečnosti řadíme bakterii *Staphylococcus aureus* do biologického rizika 2, což znamená, že práce s touto bakterií by měla být prováděna v laboratorních podmínkách BSL-2 (Biosafety level-2) (Emmert 2013).

Z těchto důvodů je důležité mít přehled o produkci toxinů bakterie *Staphylococcus aureus* a umět tyto toxiny rychle identifikovat. Cílem této bakalářské práce je sepsání dosavadních poznatků o bakterii *Staphylococcus aureus*, zejména o jejích toxinech. V praktické části zvolit vhodné laboratorní metody pro získání bakteriálních toxinů vybraných šestnácti kmenů *Staphylococcus aureus* a následně tyto kmeny charakterizovat dle identifikovaných toxinů.

1 Teoretická část

Staphylococcus aureus má buněčnou stěnu tvořenou jako typická grampozitivní bakterie. Je tvořena lipidovou membránou, silnou vrstvou peptidoglykanu a teichoovými kyselinami, které dodávají buněčné stěně negativní náboj (Oliveira et al. 2018).

Jako patogen, má široké schopnosti virulence, tedy různé schopnosti vyvolat v hostiteli onemocnění. Tyto faktory virulence jsou často kódovány i mimo nukleoid, například na plazmidech, které mohou být přenášeny horizontálním genovým přenosem mezi kmeny. Oblast v genomu, kde jsou nakumulovány geny pro faktory virulence nazýváme ostrovy patogenity. Ke kódování těchto faktorů může docházet i pomocí temperovaných fágů, které mohou být integrovány v podobě profágu do chromozomu bakteriální buňky (Fetsch 2018). Faktory virulence můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupina je zodpovědná za kolonizaci hostitelského organismu a druhá za fyzické známky infekce (Medved'ová a Valík 2012). Mezi faktory virulence první skupiny patří například proteiny kovalentně vázané k buněčné stěně, které umožňují vazbu s povrchem hostitelské buňky. Jsou jimi CWA proteiny (cell wall anchored proteins). Největší skupinou CWA je MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) a řadíme sem například clumping factor A, nebo fibronectin binding protein A (Bonar et al. 2015). Dalšími virulenčními faktory mohou být proteiny, které zachycují železo z hemoglobinu (D.Lowy 2011), nebo exopolymery, které mají obrannou funkci a zodpovídají za odolnost vůči antimikrobiálním mechanismům hostitelského organismu, jako je například působení antimikrobiálních peptidů, nebo fagocytóza leukocyty. Z druhé skupiny jsou významným faktorem virulence enzymy, nebo toxiny, které na rozdíl od ostatních faktorů, vylučuje bakterie do okolí a tím přímo působí na hostitelské buňky (Otto 2014b).

1.1 Proteinové toxiny

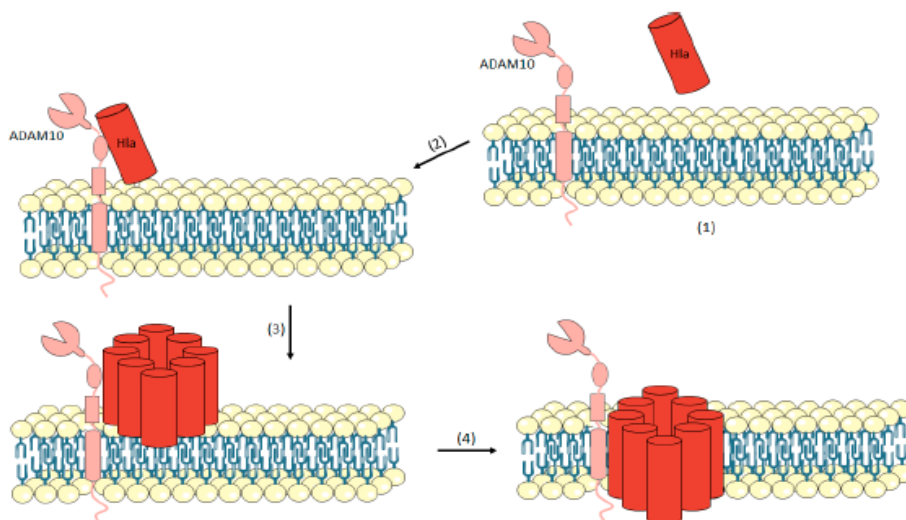
Proteinové toxiny jsou proteiny vylučované bakterií do extracelulární matrix během postexponenciální a stacionární růstové fáze, nebo se dostávají z bakterie během zničení bakteriální buňky (Kong et al. 2016). Pro organismus hostitele jsou

to ve většině případů negativně působící látky, které napomáhají například při šíření infekce a adaptaci bakterie (Zhang et al. 2017). Rozdělujeme je do dvou hlavních skupin. Toxiny, které při působení poškozují buněčnou membránu a superantigeny (Fetsch 2018).

1.1.1 Toxiny poškozující buněčnou membránu

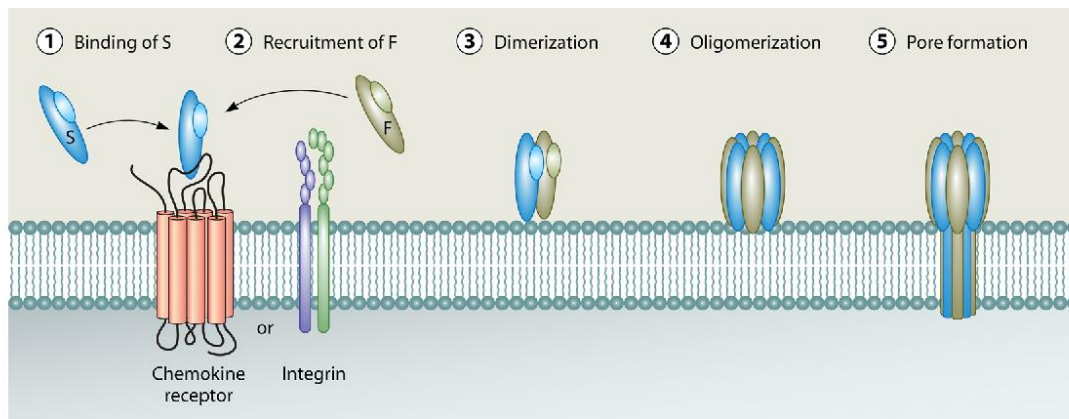
Mezi toxiny poškozující buněčnou membránu, tedy cytolyziny (působí cytolytickou aktivitou vůči buňkám hostitelského organismu), řadíme toxiny, které dělíme do dvou skupin. První skupina zahrnuje cílenější specifické toxiny, které vyžadují počáteční interakci s receptorem pro následnou lyzi buňky a druhá zahrnuje toxiny, které působí bez interakce s receptory (působí enzymaticky) (Zhang et al. 2017). Toxiny první skupiny mají velikost zhruba 32-40 kDa (Reyes-Robles et Torres 2016). Lýza je uskutečňována díky schopnosti těchto toxinů tvořit póry v buněčné membráně, čímž se významně naruší integrita celé buňky (Seilie et Bubeck Wardenburg 2017). Toxiny poškozující buněčnou membránu v interakci s receptory jsou konkrétně: hemolyziny, leukotoxiny a moduliny rozpustné ve fenolu (Otto 2014b).

Hemolyziny patří mezi cytolytické exotoxiny, které napadají zejména erytrocyty (Fetsch 2018), a působí v interakci s receptory (Otto 2014b). Významným zástupcem je alfa toxin (Hla, Alfa hemolyzin). Alfa toxin je 33,3 kDa velký, ve vodě rozpustný monomer, který při navázání na hostitelskou buňku oligomerizuje a tvoří póry v plazmatické membráně (Zhang et al. 2017). Póry tvoří vytlačováním specifického transmembránového proteinu skrz lipidovou dvojvrstvu za vzniku hydrofilního transmembránového kanálu (obr. 1) (Seilie et Bubeck Wardenburg 2017). V bakterii je jeho gen obvykle umístěn v nukleoidu. Napadá B lymfocyty, T lymfocyty, monocyty, makrofágy, krevní destičky, erytrocyty a jiné nemyeloidní buňky, jako jsou epiteliální a endoteliální buňky (Reyes-Robles et Torres 2016). Na hostitelskou buňku působí interakcí s hostitelským proteinovým receptorem, který se nazývá ADAM10 (Vandenesch et al. 2012). Další hemolyziny vzhledem k jejich funkci, nebo působení jsou rozřazené v následujících skupinách toxinů. Stále se z jedná o hemolyziny, ale zároveň mají i vlastnosti, které jsou si bližší s jinými skupinami (Otto 2014b).



Obr. 1: Mechanismus působení alfa toxinu na membránu hostitelské buňky (Zdroj: Oliveira et al. 2018).

Leukocidiny jsou bikomponentní exotoxiny. Skládají se ze dvou ve vodě rozpustných monomerů, které označujeme jako komponenty S a F. Tvoří společně heterooligomerní komplexy. Mezi leukocidiny řadíme Panton – Valentine leukocidin (LukSF-PV nebo PVL), gama-hemolysin AB (HlgAB), gama-hemolysin CB (HlgCB), leukocidin AB (LukAB, nebo LukHG) a leukocidin ED (LukED). Podskupiny třídy S jsou LukS-PV, HlgA, HlgC, LukE a LukA / H. Podskupiny třídy F jsou LukF-PV, HlgB, LukD a LukB / G (Seilie et Bubeck Wardenburg 2017). K leukocidinům řadíme i leukocidin FM (lukFM), který je izolován z kmenů, které napadají skot (Grumann et al. 2014). Při tvorbě póru v buněčné membráně hostitele se nejprve monomer třídy S naváže na buněčný receptor. Po navázání dojde ke konformační změně a vznikne vazba (dimerizace) s monomerem třídy F. Poté dochází k oligomerizaci a vzniká transmembránový, beta barelový pór (obr. 2) (Oliveira et al. 2018).



Obr. 2: Mechanismus působení leukocidinů na membránu hostitelské buňky (Zdroj: Alonzo et Torres 2014).

Nejznámějším leukocidinem je Panton – Valentine leukocidin. Napadá monocyty, makrofágy a neutrofilny (Oliveira et al. 2018). Receptory pro působení Panton – Valentine leukocidinu jsou C5a a C5L2, které se nachází na membráně monocytů, neutrofilů, ale i například T lymfocytů (Zhang et al. 2017). Má dvě jednotky o velikosti 23,8 kDa a 31,6 kDa (uniprot.org). Geny pro LukS-PV i LukF-PV jsou kódovány přes temperované fágy. (Seilie et Bubeck Wardenburg 2017). Panton – Valentine leukocidin se v 85 % pojí s kmeny *Staphylococcus aureus*, které jsou methicilin rezistentní (MRSA-methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*) a způsobují pneumonii, infekce kůže a měkkých tkání. Geny pro Panton Valentine leukocidin jsou také detekovány u kmenů, které způsobují tkáňovou nekrózu, furunkuly a kožní abscesy (Oliveira et al. 2018).

Dalšími leukocidiny, které jsou izolovány z kmenů, které napadají člověka, jsou leukocidin ED (lukED) a leukocidin AB (lukAB) (Seilie et Bubeck Wardenburg 2017). Leukocidin AB je kódován v genomu a váže se na hostitelskou buňku přes receptor CD11b. Napadá monocyty, leukocyty, neutrofilny a dendritické buňky (Reyes-Robles et Torres 2016). Tento toxin zvyšuje přežití bakterie *Staphylococcus aureus* v hostitelském organizmu, jelikož svým působením napomáhá při úniku před imunitní odpovědí hostitele, konkrétně před neutrofilny a fagocytózou makrofágy. Na rozdíl od předešlých leukotoxinů dochází u leukocidinu AB k dimerizaci ještě před navázáním na receptor (Oliveira et al. 2018).

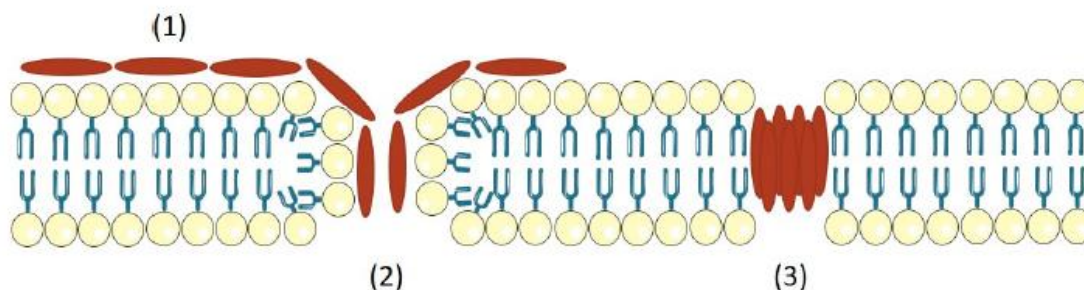
Leukocidin ED je na rozdíl od většiny leukocidinů kódován na tzv. ostrovech patogenity (SaPI) a interaguje s erytrocyty, neutrofilů a makrofágy (Reyes-Robles et Torres 2016). Tento toxin je převážně izolován z kmenů, odebraných od pacientů, kteří trpěli impetigem, průjmem spojeným s antibiotiky, furunkuly anebo krevními infekcemi (Alonzo et Torres 2014). Jednotka lukE má velikost 35,2 kDa a jednotka lukD má velikost 36,8 kDa. Podjednotka lukE se však může spojovat i s podjednotkou HlgB a podjednotka lukD se může spojovat s podjednotkou HlgA (uniprot.org). Receptory pro leukocidin ED jsou CCR5, CXCR1 a CXCR2 (Alonzo et Torres 2014).

Jelikož se jedná o bikomponentní toxin, tak mezi leukocidiny řadíme také gama-toxin, nebo-li gama hemolyzin. Je to dvou komponentní exotoxin, který stejně jako Alfa-toxin, oligomerizuje a tvoří transmembránové kanály skrz fosfolipidovou dvojvrstvu, čímž poté dochází k lyzi napadené buňky (Gouaux et al. 1997);(Huseby et al. 2007). Interaguje s erytrocyty, neutrofilů i lymfocyty. Komponenty označujeme jako hlgA (Gamma-hemolysin component A), hlgB (Gamma-hemolysin component B) a hlgC (Gamma-hemolysin component C) (Vandenesch et al. 2012). HlgA má velikost 34,9 kDa, hlgB má 36,7 kDa a hlgC má 35,6 kDa. Při sekvenční vazbě a spojením jednotky S a jednotky F tvoří heterooligomerní komplexy. HlgB (F) se spojuje buď s HlgA (S), čímž se vytvoří AB toxin, nebo s HlgC (S), čímž se vytvoří CB toxin (uniprot.org).

Moduliny rozpustné ve fenolu (PSM) jsou alfa helikální peptidy, které napomáhají k tvorbě biofilmu a šíření infekce v hostiteli (Peschel et Otto 2013). Přispívají k lyzi neutrofilů a k několika typům projevu infekce, jako jsou kožní infekce anebo bakterémie (přítomnost bakterie v krvi) (Otto 2014a). PSM vyvolávají zánětlivé reakce interakcí s FPR2 receptorem, ale jejich cytolytická aktivita je na FPR2 nezávislá. Dělí se na podskupiny, které označujeme jako PSM α , β , γ , δ a další. Ve spojitosti se *Staphylococcus aureus* je nejpodstatnější PSM α , která je kódována v genomu (Otto 2014b) a způsobuje lyzi neutrofilů po fagocytóze. Což může vysvětlovat vysokou toxicitu některých agresivních kmenů (Fetsch 2018).

Do PSM řadíme i delta hemolyzin, který je značen PSM γ (Peschel et Otto 2013). PSM γ napadá především erytrocyty a jeho velikost je výjimečně malá, je to 2,8 Da (uniprot.org). Jednotlivé skupiny PSM se liší svým nábojem. PSM α má kladný

náboj, PSM β negativní a PSM γ má náboj neutrální. Jako předchozí toxiny tvořící póry i PSM oligomerizují a tvoří krátkodobé transmembránové kanály (obr. 3) (Oliveira et al. 2018).



Obr. 3: Nespecifická cesta PSM toxinů při oligomerizaci a tvorbě transmembránového kanálu (Zdroj: Oliveira et al. 2018).

Staphylococcus aureus sekretuje velké množství enzymů, které napomáhají virulenci v hostitelském organismu. Jsou to především proteázy aureolysin, cysteinové proteázy staphopain A a B, stafylokináza anebo stafylokoaguláza. Nejvýznamnější toxiny, které sice také poškozují membránu hostitele, ale již působí enzymaticky, jsou exfoliativní toxiny a beta hemolyzin (Otto 2014b).

Exfoliativní toxiny jsou specifické serinové proteázy, které rozpoznávají a štěpí desmozomální kadheriny (transmembránové proteiny podílející se na mezibuněčných spojích) v povrchových vrstvách kůže. Způsobují SSSS (stafylokokový syndrom opařené kůže), nebo-li Ritterovu chorobu, která je charakterizována především odlupováním kůže, horečkou, malátností a bulózním impetigem (Bukowski et al. 2010). Exfoliativní toxiny známe čtyři, jsou to exfoliativní toxin A (ETA), exfoliativní toxin B (ETB), exfoliativní toxin C (ETC) a exfoliativní toxin D (ETD). Hlavními zástupci exfoliativních toxinů, které poškozují lidskou kůži jsou ETA a ETB. ETC byl izolován z koně a nepoškozuje lidskou kůži. Exfoliativní toxin ETD byl poprvé izolován v roce 2002, a to z klinického materiálu (Oliveira et al. 2018). ETA je kódován temperovaným fágem, ETB na plazmidu a ETD na ostrovech patogenity. ETA i ETB mají velikost 27 kDa a ETA je tepelně stabilní, zatímco ETB je teplotně labilní (Mariutti et al. 2017). Exfoliativní toxiny jsou ale produkovány jen cca 5 % kmenů *Staphylococcus aureus* (Oliveira et al. 2018).

Beta hemolyzin, nebo-li fosfolipáza C (uniprot.org) je exotoxin s velikostí 35 kDa (Dinges et al. 2000). Enzymaticky se jedná o sfingomyelinázu, která při napadení hydrolyzuje sfingomyelin a tím dochází k lyzi erytrocytů. Tento hemolyzin má také lymfotoxické vlastnosti a stejným způsobem, jako napadá erytrocyty, napadá i lidské lymfocyty a neutrofile (Huseby et al. 2007). Je kódován na ostrovech patogenity (Otto 2014b).

1.1.2 Superantigeny

Superantigenní toxiny napadají hostitele opět pomocí buněčného receptoru, ale narozdíl od předešlé skupiny toxinů, které poškozují buněčnou membránu, superantigeny buněčnou membránu nepoškozují (Fetsch 2018). Stafylokokové superantigeny jsou skupinou pyrogenních proteinů s vysokou molekulovou hmotností, které napadají T lymfocyty, makrofágy, eozinofily a epiteliální buňky (Bachert et al. 2002). Původně byly všechny superantigeny řazeny mezi enterotoxiny, jelikož způsobují po požití zvracení a gasteritidy (záněty trávicí soustavy). Zjistilo se ale, že ne všechny superantigeny způsobují tyto potíže a proto je rozdělujeme na stafylokokové enterotoxiny (SEs) (tab. 1), stafylokokové toxiny podobné enterotoxinům (SEIT) (tab. 2) a toxiny syndromu toxického šoku (TSST-1). Většina superantigenů je kódována na mobilních genetických elementech jako jsou například plazmidy. Jsou ovšem výjimky, jako je SEIX, který je kódován na chromozomu (Grumann et al. 2014). V roce 2018 bylo popsáno více jak 23 různých stafylokokových superantigenů: stafylokokové enterotoxiny A – E, G – J, L – Q a R – T (SEA-SEE, SEG-SEJ, SEL-SEQ, SER-SET), stafylokokové toxiny podobné enterotoxinům K – Q a U – X (SEIK-SEIQ, SEIU-SEIX) a TSST-1 (Oliveira et al. 2018).

Stafylokokové enterotoxiny jsou globulární, jednořetězcové, teplotně stabilní proteiny, které známe především jako původce otrav z jídla (Fetsch 2018). Jsou poměrně odolné, což jim umožňuje zůstat neporušené v potravě a vyvolat onemocnění (Pinchuk et al. 2010). Způsobují nevolnost, zvracení a gastritidy (Fetsch 2018). Jejich velikost je cca 20-30 kDa a díky nespecifické interakci s hlavním histokompatibilním komplexem třídy II (MHC II) stimulují T lymfocyty (Otto 2014b). Po stimulaci T lymfocytů se vyplaví velké množství cytokinů a tím dochází k stavům akutní intoxikace hostitelského organismu. Většina genů pro

enterotoxiny je kódována na genetických mobilních elementech (Pinchuk et al. 2010).

Stafylokokový enterotoxin (SE)	Vlastnost
SEA	Nejběžnější SE toxin, který je spojován s otravou z jídla
SEB	Byl studován, jako biologická zbraň
SEC	Běžný zvířecí izolát
SED	Otrava z jídla
SEE	Otrava z jídla
SEF	Spojován se syndromem toxického šoku
SEG	Menší role při otravě z jídla
SEH	Otrava z jídla
SEI	Menší role při otravě z jídla

Tab. 1: Přehledová tabulka stafylokokových enterotoxinů a jejich vlastností (Zdroj: Pinchuk et al. 2010)

Z globálního hlediska je nejvýznamnějším stafylokokovým enterotoxinem SEB toxin (*staphylococcal enterotoxin B*). SEB toxin je velký 28 kDa, je extrémně stabilní a snadno vyrobitelný ve velkém množství. Už při nízkých koncentracích může SEB způsobit selhání organismu a smrt. Během šedesátých let měly Spojené státy útočný program, kde byl SEB toxin studován jako biologická zbraň. Na základě těchto výzkumů bylo určeno, že 50% smrtelná dávka SEB toxinu je 0,02 µg/kg tělesné hmotnosti člověka, který je vystaven danému množství toxinu vzdušnou cestou (Fries et Varshney 2013).

SE	Velikost (kDa)	Genetický element
SEA	27,1	Temperovaný fág
SEB	28,4	Chromosom - ostrovy patogenity, plazmid
SEC ₁₋₃	~27,5	Ostrovy patogenity
SED	26,9	Plazmid
SEE	26,4	Temperovaný fág (hypotetická lokace)
SEG	27	Chromosom
SEH	25,1	Chromosom
SEI	24,9	Chromosom
SEK	25,3	Plazmid
SEL	24,7	Chromosom - ostrovy patogenity
SEM	24,8	Chromosom
SEN	26,1	Chromosom
SEO	26,8	Chromosom
SEP	26,7	Temperovaný fág
SEQ	25,2	Chromosom - ostrovy patogenity, temperovaný fág
SER	27	Plazmid
SES	26,2	Plazmid
SET	22,6	Plazmid

Tab. 2: Přehledová tabulka SE, jejich velikosti a genetického elementu, kde jsou kódovány (Zdroj: Fetsch 2018)

Ke stafylokokovým enterotoxinům řadíme i toxiny, které jsou enterotoxinům podobné. Tyto toxiny nazýváme souhrnně enterotoxin-like toxiny (SEls) a stejně jako enterotoxiny jsou původci otrav z jídla a ke kódování dochází na genetických mobilních elementech (Argudín et al. 2010). Mají také velmi podobnou charakteristiku při napadení hostitele a velikost (Tab. 3) (Fetsch 2018).

Stafylokokový toxin podobný enterotoxinu (SEIs)	Velikost (kDa)	Genetický element
SEIJ	28,6	Plazmid
SEIU	27,2	Chromosom
SEIV	27,6	Chromosom
SEIW	26,7	Chromosom
SEIX	19,3	Chromozom
SEIY	22,5	Chromozom

Tab. 3: Přehledová tabulka SEIs, jejich velikosti a genetického elementu, kde jsou kódovány (Zdroj: Fetsch 2018)

Toxin syndromu toxického šoku je nejznámější stafylokokový superantigen o velikosti 22kDa. Dříve byl řazen mezi enterotoxiny pod zkratkou SEF, ale jelikož nezpůsobuje otravy z jídla, je uváděn zvlášť (Otto 2014b). Syndrom toxického šoku je nejčastěji spojován s ženami, které během menstruace používají vysoce absorpční tampony. Existují dvě klinické formy syndromu toxického šoku a tím je právě zmíněný syndrom menstruačního toxického šoku a nemenstruačního toxického šoku (Que et Moreillon 2015). Mezi symptomy řadíme horečku (38,9 °C), hypotenzi (nízký tlak), vyrážku a intoxikaci tří orgánových soustav, a to například jater, kardiovaskulární soustavy, vylučovací soustavy, sliznic, gastrointestinální soustavy, svalové soustavy a centrálního nervového systému. Rozdíl mezi stafylokokovým a streptokokovým syndromem toxického šoku je ten, že u streptokokového syndromu toxického šoku dochází k napadení pouze dvou orgánových soustav (Klompas 2010). Nemenstruační toxický šok je spojován nejčastěji s chirurgickými zákroky a s primárními stafylokokovými infekcemi, jako je například kožní infekce. Syndrom toxického šoku nemusí způsobovat nutně pouze TSST-1, ale může ho způsobit i řada enterotoxinů, jako je například SEB nebo SEC (Stevens et Bryant 2011). K syndromu toxického šoku dochází interakcí toxinu s MHC II a TCR (T-lymfocytárních receptorů) na buňkách APC (buňkách reprezentujících antigen) a T lymfocytech. Tímto způsobem mohou dané toxiny stimulovat až 20 % celé populace T lymfocytů a iniciují uvolnění cytokinů, které jsou zánětlivé a v tomto množství způsobují syndrom toxického šoku (Moza et al. 2007).

1.2 Možnosti analýzy proteinových toxinů bakterie

Staphylococcus aureus

1.2.1 Kultivace

Staphylococcus aureus je fakultativně anaerobní bakterie, která vytváří hladké, vypouklé, lesklé, kruhové kolonie. Koky, které kolonie tvoří, mají cca 0,5-1,5 μm a rostou v typických shlucích způsobených nedokončením septa při buněčném dělení. V závislosti na podmínkách růstu mohou mít různá zbarvení, ovšem nejčastěji se setkáme se žlutými (zlatými) odstíny. *Staphylococcus aureus* je kataláza pozitivní, oxidáza negativní, nepohyblivá, netvoří spory a na krevním agaru tvoří typickou β -hemolýzu (Medved'ová et Valík 2012).

Staphylococcus aureus je obvykle kultivován při 37 °C, po dobu 24 hodin, na různých druzích agaru. Typicky se jedná o tzv. nutrient agar, LB (Luria Bertani) agar, nebo TSA (tryptický sójový agar). Při kultivaci v tekutém médiu by měly být použity provzdušňovací zkumavky, aby docházelo k růstu bakterií, jelikož je *Staphylococcus aureus* aerobní až fakultativně anaerobní bakterie (Missiakas et Schneewind 2013). Protože je *Staphylococcus aureus* tolerantní vůči mnoha faktorům, jako je pH, soli (až 15 %), teplota i antibiotika, roste na širokém spektru médií a v širokém spektru růstových podmínek (Medved'ová et Valík 2012).

1.2.2 Extrakce proteinů

Při extrakci proteinů z bakterie bereme v úvahu umístění proteinů v těle bakterie a následné zpracování proteinů. Zvolená metoda by měla účinně rozbít tělo buňky a vyplavit proteiny do extracelulární tekutiny. Metody extrakce se dělí na dvě skupiny. První je mechanické rozbíjení buňky, při kterém je na buňku vyvíjen různě velký tlak. Radíme sem například French press, nebo vysokotlaký homogenizátor. Do druhé skupiny spadají metody nemechanické, které se ještě dělí na chemické (např. detergenty), biologické (např. enzymy) a fyzikální (např. teplo). Při chemickém rozrušování buňky se používají zejména lyzační pufrы, které většinou fungují na principu změny pH. Chemická lýza se dá rozdělit na alkalickou a lýzu způsobenou detergenty, které mají schopnost narušit hydrofobně-hydrofilní interakce (iontovým detergentem může být např. SDS). Enzymaticky se dá rozrušit

buňka například lyzozymem a u fyzikálních se jedná zejména o tepelné změny (var, mraz) (Islam et al. 2017).

1.2.3 Detekční a separační metody

Pro detekci a separaci toxinů *Staphylococcus aureus* se využívá široká škála laboratorních metod, které se rozdělují na přímé a nepřímé. Přímé se ještě dělí na imunologické a fyzikálně chemické a do nepřímých se řadí molekulárně biologické metody, jako je například polymerázová řetězová reakce nebo-li PCR (Šťástková et al. 2012)

Imunologické metody fungují na principu vazby antigen a protilátka. Antigen obvykle znázorňuje molekulu, která v organismu zahájí imunologickou odpověď, což způsobí produkci protilátek. Antigenem může být v laboratorní praxi část zkoumané bakterie, nebo třeba její toxin (Bursová et al. 2014). Mezi imunologické metody řadíme například reverzní pasivní latexovou aglutinaci (RPLA), metodu ELISA anebo western blotting (Fetsch 2018). Z těchto metod se nejčastěji používá metoda ELISA.

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je široce používaná kolorimetrická metoda, která se provádí pomocí imobilizace umělých antigenů nebo zachycením protilátek na plastových nosičích (mikrotitrační destička) (Wu et al. 2016). Kromě reakce antigen-protilátka se při této metodě využívá i přítomnosti enzymu, který slouží k označení protilátky (Bursová et al. 2014). Je několik typů metody ELISA (přímá, nepřímá a sendvičová) a nejčastěji se pro detekci stafylokokových toxinů využívá sendvičová ELISA. Při sendvičové verzi se používají dvě protilátky, které jsou specifické pro různé části daného antigenu. Tento typ se provádí na mikrotitrační destičce a jedna protilátka je navázána v jamce destičky a druhá, která je označena enzymem, slouží k detekci antigenu (Crowther 2000). U této metody je nevýhoda, že laboratorní soupravy jsou k dispozici pouze pro detekci pěti enterotoxinů (SEA až SEE) (Duracova et al. 2019). Další nevýhodou pro použití metody ELISA je ta, že během procesu může dojít ke křížené reakci s jinými antigeny (Šťástková et al. 2012)

Do detekčních fyzikálně chemických metod řadíme například biosenzory, hmotnostní spektrometrii a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii a do

separačních fyzikálně chemických metod řadíme například SDS PAGE (Bursová et al. 2014). V současné době je naprosto převažující identifikační metodou v proteomice hmotnostní spektrometrie, v rámci které se přednostně využívá nejvíce spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která umožní efektivní rozdělení studované komplexní směsi peptidů, měkkých ionizačních technik, zejména elektrosprejové ionizace (ESI) a následné detekce pomocí vysokorozlišujícího hmotnostního spektrometru. Tato kombinace zajistí velice dobrou senzitivitu a specifitu při identifikacích většiny proteinů, resp. Jejich peptidů (de Hoffmann 2005).

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) je druh gelové elektroforézy na polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného. Jedná se o běžně využívanou metodu pro separaci proteinových molekul podle velikosti a náboje (Backman a Persson 2018). Polyakrylamidový gel se skládá ze dvou částí, z horního (zaostřovacího) gelu a spodního (separačního) gelu. Oba gely mají odlišné pH a obsahují jiné množství polyakrylamidu. Dodecylsírany sodný zajišťuje denaturaci proteinů a dodává jim uniformní negativní náboj. Samotná elektroforéza probíhá tak, že se do připravených jamek na horním gelu vloží připravené vzorky a standard. Poté se do gelu vypouští elektrický proud a pomocí elektrického proudu prostupují proteiny gelem. Menší proteiny prostupují rychleji a větší pomaleji, takže vzniká škála proteinů rozřazených od největší velikosti po nejmenší (Brunelle et Green 2014). Po ukončení elektroforézy se může gel obarvit. K obarvení se většinou užívá Coomassie brilliant blue, nebo-li brilantová modř, která výsledné bandy zvýrazní, anebo se může gel tzv. stříbřit, což zviditelní hůře viditelné bandy a zkontroluje se tím i čistota vzorku (Kavran et Leahy 2014).

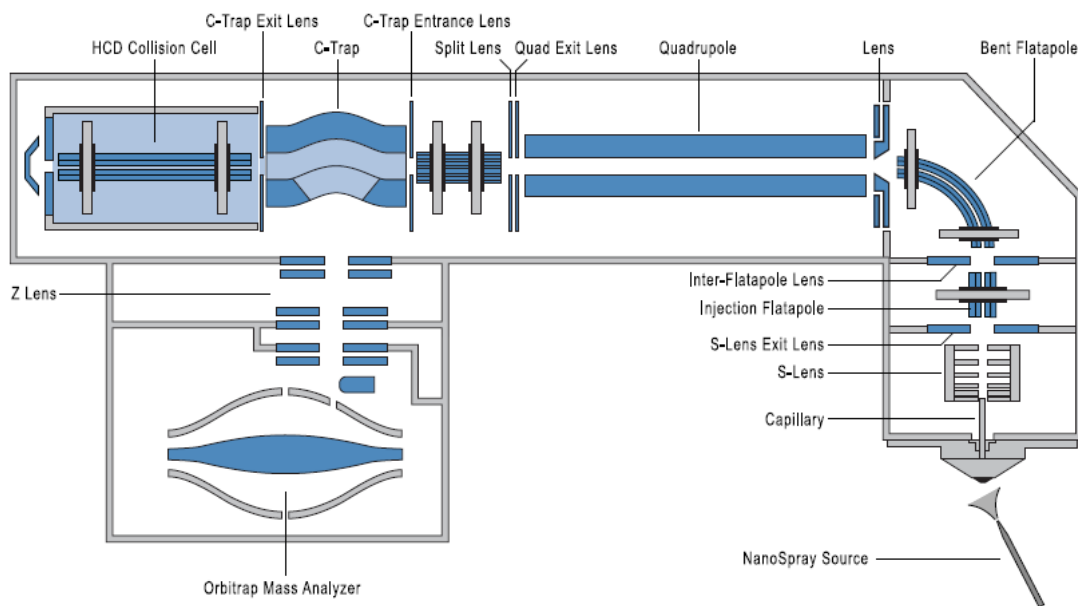
Hmotnostní spektrometr je analytický přístroj, který na vstupu vytváří ionty ze zkoumaného vzorku a měří jejich hmotnost, resp. velikost. Podle typu uspořádání slouží k analýze biologických látek (proteinů, peptidů), ale třeba i syntetických polymerů (Friedecký et Lemr 2012). Každý hmotnostní spektrometr má tři části. Jde o zdroj iontů, který zkoumaný vzorek převede do plynné iontové fáze, dále jeden či více analyzátorů, které analyzují hmotnost iontů a rozdělí je podle poměru

hmotnosti a náboje (m/z) a detektor, který separované ionty zachycuje a počítá (de Hoffmann 2005).

V této bakalářské práci je používána metoda nano LC-MS/MS a v tomto případě jsou ionty separovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) online připojené přes nanoelektrosprejovou ionizaci k hmotnostnímu spektrometru QExactive (obr. 4). Iontovým zdrojem je zde elektrosprej, který ionizuje vzorek za atmosférického tlaku (de Hoffmann 2005). Využívá se tak elektrická energie k přenosu iontů z roztoku do plynné fáze (Ho et al. 2003). Vzorek je společně s polárním rozpouštědlem veden kapilárou, na kterou působí vysoké napětí. Vysoké napětí vytváří elektrické pole, které způsobuje hromadění iontů v kapce vycházející z kapiláry, což poté vytváří tzv. Taylorův kužel (de Hoffmann 2005). Takto vznikající kapičky s vysokým nábojem, generované z hrotu elektrospreje, prochází tlakovým a potenciálovým gradientem a směřují k analyzátoru. Díky zvýšené teplotě elektrického zdroje, a protiproudu sušícího a zamlžovacího plynu, se nabitě kapičky stále zmenšují, dochází k odpařování rozpouštědla a zvyšuje se povrchový náboj, až dojde k vytlačení iontů do plynného stavu (Ho et al. 2003).

Vzniklé ionty tedy dále pokračují k hmotnostnímu analyzátoru, kterým je v tomto případě tzv. orbitrap. Postupně ionty prochází přes kvadrupól, který je schopen vybrat na základě velikosti m/z prekurzory z plynného vzorku a ty poté posílat selektivně dál. Dalším velmi důležitým místem je C-trap, kde dochází k zachycení a stlačení vybraných iontů, které následně vyšle do HCD kolizní cely, kde dojde k narušení struktury peptidů a jejich fragmentaci na menší části, které se následně vrací do C-trapu. V C-trapu dojde opět ke stlačení a vyslání vzorku, ovšem nyní již do orbitrapu, kde se vzorek analyzuje a vytváří se hmotnostní spektrum, které je díky softwaru překládáno uživateli k další analýze. V tomto případě orbitrap slouží nejen jako analyzátor, ale i jako detektor (Michalski et al. 2011). Orbitrap tvoří dvě elektrody, kde jedna obklopuje druhou a mezi nimi působí elektrostatické pole. Elektrostatické pole způsobuje, že ionty obíhají centrální elektrodu axiálně i radiálně a mění se frekvence těchto oscilací poté umožňuje stanovení u iontů hodnoty m/z (Dunn 2011). Pro určení toxinů *Staphylococcus*

aureus se výsledná data z hmotnostního spektrometru zpracovávají ve vybraném softwaru a hledají se shody v databázích (Tonacini et al. 2019).



Obr. 4: Schéma hmotnostního spektrometru QExactive (Zdroj: Michalski et al. 2011)

2 Experimentální část

2.1 Materiál

2.1.1 Vzorky bakterií

K charakterizaci bylo použito 16 kmenů bakterie *Staphylococcus aureus*, z nichž všechny byly k dispozici ve sbírkách Katedry molekulární patologie a biologie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany na pracovišti v Hradci Králové. V následující tabulce se nachází seznam použitých kmenů s očekávanými toxiny. Kmeny nesou označení podle toho, odkud pochází, jsou to NCTC National collection of type culture, CCM Czech collection of microorganisms a ostatní pochází z Národní referenční laboratoře pro stafylokoky, od RNDr. Petra Petráše, CSc. U kmenu 1. CCM 4516 nebyl očekáván žádný toxin, jelikož se jedná o kontrolní kmen.

Kmen	Očekávaný toxin
1. CCM 4516	Žádný
2. 5_14/484	SEA, SED
3. 7_13/648	SEC, SED
4. 10_14/341	SEC, TSST-1
5. 12_14/13	Exfoliativní toxin B
6. 4_14/592	SED
7. 3_14/597	SEC
8. 8_14/360	TSST-1
9. 9_14/583	SEA, TSST-1
10. 11_15/504	Exfoliativní toxin A
11. 6_12/281	SEB, SEC
12. 13_14/586	Exfoliativní toxin A+B
13. 1_14/565	SEA
14. 2_14/577	SEB
15. NCTC 10654	SEB
16. NCTC 5660	Alfa toxin, Beta toxin

Tab. 4: Přehledová tabulka použitých kmenů *Staphylococcus aureus* s očekávaným toxinem

Název toxinu	Uniprot číslo
TSST-1	P06886
Enterotoxin A	P0A0L2
Enterotoxin B	P01552
Enterotoxin C1,2,3	P01552, P34071, P01553
Enterotoxin D	P20723
Exfoliativní toxin B	P09332
Exfoliativní toxin A	P09331
Alfa toxin	P09616
Beta toxin	A7LAI8

Tab. 5: Přehledová tabulka očekávaných toxinů s odpovídajícím UniProt číslem (Zdroj: uniprot.org)

2.1.2 Laboratorní materiál

- 0,22 µm spin filtr Ultrafree-MC (Amicon, Millipore Corporation, Bedford, USA)
- Běžné laboratorní sklo (Ehrlenmeyerovy baňky, lahve pro uchovávání roztoků)
- Centrifugační zkumavky, různé objemy (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
- Indikátorové pH papírky (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Koncentrační a odsolovací filtry Amicon, (různé velikosti Amicon, Millipore Corporation, Bedford, USA)
- Krycí fólie na mikrotitrační destičky (AB Sciex, Foster City, USA)
- Laboratorní plast – Petriho misky, kličky, kultivační zkumavky s větracím víčkem
- Mikropipety, různé objemy (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Mikrotitrační destičky (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
- Mikrozkušavky, různé objemy (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Ochranné osobní pomůcky (nitrilové rukavice, obličejový štít)
- Špičky pro mikropipety, různé objemy (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Vaničky pro multikanálovou pipetu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Vialky pro HPLC (Waters, Milford, USA)

2.1.3 Agary/Média

- Luria Bertani Broth (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Luria Bertani agar (Serva, Německo)
- Nutrient broth (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Nutrient agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

2.1.4 Chemikálie

- 2-butanol (Sigma-aldrich, St. Louis, USA)
- Acetonitril (ACN) (Merck Group, Darmstadt, Německo)
- Benzonáza (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Beta-merkapt ethanol
- Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

- Dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Dusičnan stříbrný
- EDTA free protein inhibitor cocktail (Roche, Německo)
- Hydrogenuhlíčitán 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)
- Močovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, 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)
- Thiosíran sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Tris(2-karboxyetyl)fosfin (TCEP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Tris-HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Trypsin, Sequencing Grade Modified (Promega, Madison, USA)
- Uhlíčitán 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)

2.1.5 Kity

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

2.1.6 Kapalinové chromatografy, kolony a příslušenství

- Ultra microspin C18 kolonky (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)

2.1.7 Hmotnostní spektrometr

- QExactive (Thermo Fisher Scientific, USA)

2.1.8 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy Mettler Toledo AG (Laboratory & Weighing Technologies, Greifensee, Švýcarsko)
- Elektroforetická vana s příslušenstvím (Invitrogene, UK)
- Eppendorf stolní minicentrifuga (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Eppendorf vakuová odparka 5301 (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Flowbox (Bioair, Itálie)
- Fluostar optima (BMG labtech)
- Hlubokomrazicí box PowerFREEZE -87°C VXE (Jouan SA, Saint Herblain, Francie)
- Magnetická míchačka Hotplate & Stirrer JENWAY 1000 (Jenway, Dunmow, Velká Británie)
- Paradigm Detection Platform (Beckman Coulter, Brea, USA)
- Termomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Ultrasonic Processor UP200ST (Hielscher, Německo)
- Vortex MS2 (IKA Works, Wilmington, USA)

2.1.9 Programové vybavení

- Multimode Analysis Software (Beckman Coulter, Brea, USA)
- Proteom Discoverer 2.4 (Thermo Fisher Scientific, USA)

2.2 Kultivace

Pro kultivaci bakteriálních kmenů byla zvolena na začátku dvě média a agary. LB agar (P160004)/médium (L3022) a Nutrient agar (CM0003)/médium (CM0001). Všechny kmeny byly nejprve naočkovány z kryozkumavek na agarové plotny obou druhů agaru, aby se zjistila životnost a čistota kultury. Inkubace probíhala při 37°C přes noc, do dalšího dne. Poté byla přenesena narostlá kultura do tekutého média o objemu cca 9 ml a kultivována aerobně v termostatu, při mírném třepání a opět při teplotě 37°C. Další kultivace probíhala již jen na jednom vybraném médiu, které bylo vybráno porovnáním výsledků z růstových křivek. Společně s růstovými křivkami byl prováděn ještě CFU (Colony forming unit) přepočít, který byl zaznamenáván vždy na začátku a na konci měření růstových křivek u obou médií. Pro CFU přepočít byl použit pouze jeden kmen a to CCM 4516.

2.2.1 Růstové křivky

Růstové křivky byly charakterizovány pomocí přístroje Fluostar optima, kde byla porovnávána dvě média, která jsou zmíněna v kapitole kultivace (LB, Nutrient). Nejprve byla provedena kultivace na agarových plotnách pro všech 16 kmenů na obou typech agaru. Poté byla narostlá kolonie z plotny přenesena bakteriologickou kličkou do čiré zkumavky, kde již bylo připravené příslušné médium o objemu 3 ml. Zaznamenalo se OD (optická denzita) každého vzorku a do dalšího dne se nechalo kultivovat s větracím víčkem při 37°C a mírného míchání cca 200 RPM.

Další den se opět změřilo OD každého vzorku ve zkumavkách a jelikož bylo OD u všech kmenů větší než 0,1, byly vzorky ředěny odpovídajícím médiem na OD 0,1, aby každý vzorek začínal růst při stejném OD. Příklad: Bylo OD 1,9 u 3 ml bakteriální suspenze a jelikož bylo potřeba 5 ml bakteriální suspenze o OD 0,1, tak bylo odebráno do nové zkumavky 0,2632 ml bakteriální suspenze a 4,737 ml odpovídajícího média.

Po přípravě vzorků byla připravena mikrotitrační destička (TPP96), kam byl pipetou přenesen blank (čisté médium) a vzorky o množství 200 μ l. Do krajních jamek byla dána voda o množství 350 μ l, kvůli odpařování. Mikrotitrační destička vypadala po přípravě následovně.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
B	V	B	1	1	1	2	2	2	3	3	3	V
C	V	B	4	4	4	5	5	5	6	6	6	V
D	V	B	7	7	7	8	8	8	9	9	9	V
E	V	B	10	10	10	11	11	11	12	12	12	V
F	V	B	13	13	13	14	14	14	15	15	15	V
G	V	B	16	16	16							V
H	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V

Tab. 6: Předloha pro mikrotitrační destičku k růstovým křivkám. V= voda, B=Blank, číslo= číslo kmenu.

V tabulce (Tab. 6), která znázorňuje mikrotitrační destičku jsou symboly pro vodu, blank a číslo kmenu. Destičky byly použity dvě, jelikož jedna destička vystačila pro kmeny jednoho média. Vzorky byly aplikovány v tripletu.

Pro růstové křivky byla nastavena metoda Growth curve na 24 hodin se 145 cykly.

2.2.2 CFU výpočet

CFU přepočet byl prováděn jako kontrolní metoda, která patří mezi nepřímé metody a výsledkem je zjištěný počet životaschopných buněk v 1 ml média. Přepočet byl prováděn na začátku a na konci růstových křivek. Byl prováděn u obou médií a u obou médií byl použit kmen č. 1, tedy CCM 4516.

Výpočet byl prováděn tak, že po úpravě OD vzorku bylo odebráno 50 μ l, které se poté rozředilo desítkově společně s fyziologickým roztokem (PBS). Do první zkumavky bylo přeneseno 450 μ l PBS a k tomu 50 μ l bakteriální suspenze a tím se vytvořila koncentrace 10^{-1} , v další zkumavce bylo připraveno 450 μ l PBS a přidávalo se 50 μ l roztoku z první zkumavky a tím se vytvořila koncentrace 10^{-2} . Tímto způsobem byly naředěné koncentrace 10^{-4} a 10^{-5} , popřípadě i 10^{-6} .

Poslední dvě koncentrace byly vysety na plotny vždy v duplikátu, na odpovídající agar a nechaly se kultivovat do dalšího dne, opět při 37°C. Nanáška na jednu plotnu byla 50 μ l. Další den byly plotny spočítány, a to samé bylo provedeno na konci růstové křivky.

Přepočet byl následující. Byly zprůměrovány obě plotny s danou koncentrací a daným typem média. Poté byly průměry převedeny na stejné řády a následně se sečetly. Nakonec bylo vycházející číslo vyděleno počtem ředění (v tomto případě 2) a vynásobeno 20, jelikož bylo na plotnu pipetováno množství 50 μ l. Výsledek byl znásoben ředěním, na které bylo převáděno.

2.3 Lýza bakterií a extrakce proteinů

Lýza bakteriálních buněk byla uskutečněna dvakrát. Při prvním pokusu byl použit blokový ultrazvuk Ultrasonic Processor UP200ST a podruhé lyzační pufr xTractor™ Buffer.

Při použití ultrazvuku byla narostlá kultura přenesena do centrifugačních zkumavek a stočena při 7000 x g, po dobu 5 minut, při 4 °C. Poté byl odebrán supernatant a peleta byla resuspendována v 1,2 ml PBS. Po resuspendaci byly vzorky sonikovány šestkrát po dobu 3 minut, při 20 kHz a 30 W. Mezi 3 minutami sonikace byla vždy 1,5 minut pauza. Poté byly vzorky opět stočeny v centrifuze, při 10 000 g, po dobu 30 minut a při 4 °C a byl odebrán lyzát, který byl filtrován přes

0,22 μm filtr. Lyzáty i supernatanty byly poté skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalšího použití.

Při druhém pokusu, při použití lyzačního pufru bylo po kultivační fázi, tekuté médium s narostlou kulturou přeneseno do centrifugačních zkumavek a stočeno při 7000 x g , po dobu 15 minut, při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byl supernatant odebrán a uchován při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do filtrování na filtrech Amicon 10K. Pelety, které zůstaly na dně centrifugačních zkumavek byly resuspendovány v lyzačním pufru, který byl odměřen v poměru 20 ml pufru k 1 g pelety. Pelety vzorků měly v průměru 0,17 g, tedy pelety byly resuspendovány v 3,4 ml pufru. Po resuspendaci byly přidány EDTA free proteinové inhibitory (1 tableta=1 ml destilované vody) a jelikož bakteriální kultura rostla v 9 ml média, tak bylo přidáváno k resuspendované peletě 180 μl roztoku proteinových inhibitorů. Aby se snížila viskozita roztoku během lyzování bakteriálních buněk, byla přidána benzonáza. Vzorek byl lyzován po dobu 10 minut za pokojové teploty a mírného třepání. Po dané době byl lyzát centrifugován při 1200 x g , po dobu 20 minut a při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lyzát byl odebrán do nové zkumavky a společně se supernatanty byl objem zredukován pomocí membránových Amicon filtrů 10K, které byly následně promyty 20 mM TrisHCl o pH 8,5 a výsledné vzorky byly skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4 Stanovení proteinového obsahu vzorku

Měření bílkoviny bakteriálních lyzátů a supernatantů bylo provedeno tzv. bicinchoninovou metodou (BCA), která spočívá v reakci sodných solí kyseliny bicinchoninové s měďnými ionty. Měření probíhalo na mikrotitrační destičce, kam byla postupně nanášena kalibrační řada a vzorky. Pro kalibrační řadu byly použity proteinové standardy albuminu. Nanáška do každé jamky byla 10 μl v případě blanku a standardů. Vzorky byly ředěny pětkrát, takže 4:1, což ve výsledku znamenalo 2 μl vzorku a 8 μl vody. Po přípravě destičky byl smíchán tzv. working reagent a to smícháním chemikálií z kitu - copper sulfate solution a bicinchoninic acid solution v poměru 1:50. Do každé jamky bylo potřeba přidat 190 μl working reagentu a inkubovat poté destičku v termomixeru po dobu 30 minut při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Koncentrace bílkoviny byla měřena na přístroji Paradigm, v programu Multimode Analysis Software při 562 nm.

2.5 1D SDS-PAGE

Při přípravě 1D SDS-PAGE elektroforézy byly nejprve připraveny polyakrylamidové gely podle následující tabulky. Bylo připravováno množství na 16 gelů. První byl připravován spodní, separační (10%) gel a poté horní, zaostřovací (4%) gel. Gely byly připraveny dle následující tabulky (Tab. 7).

Chemikálie	4% gel	10% gel
akrylamid mix	3,2 ml	30 ml
0,5M Tris HCl pH 6,8	8 ml	
1,5M Tris HCl pH 8,8		30 ml
deionizovaná voda	20,48 ml	58,8 ml
10% SDS	320 μ l	1200 μ l
10% APS	160 μ l	448 μ l
TEMED	32 μ l	44,8 μ l

Tab. 7: Přehledová tabulka pro přípravu 16 polyakrylamidových gelů

Do kazety na elektroforézu byl přidán separační (10%) gel, který byl převrstven 1 ml 2-butanolu pro vyrovnání startu a zabránění přístupu vzduchu. Takto se gel nechal polymerovat po dobu cca 60 minut. Po polymerizaci byl připraven zaostřovací (4%) gel. Z kazet byl odebrán 2-butanol a spodní gel byl převrstven horním, kam byl vmezeřen hřeben na jamky. Horní gel polymeroval cca 30-45 minut.

Pro samotnou elektroforézu byl nejprve připraven redukující vzorkový pufr v poměru 9 (vzorkový pufr) :1 (β -merkaptoethanol). Vzorkový pufr byl třikrát koncentrován a již v něm byla obsažena bromfenolová modř. Redukující vzorkový pufr byl namíchan se vzorkem v poměru 1 (pufr) :2 (vzorek) a takto připravené vzorky byly nahřívány v termobloku po dobu 10 minut, při 70 °C.

Po dané době byly vzorky zchlazeny pod tekoucí vodou a byly připraveny vany s gely pro SDS-PAGE elektroforézu. Nanáška do jedné jamky byla 30 μ l a jako standard byl použit Precision Plus protein standard Kaleidoscope.

Elektroforéza probíhala při 200 V (konstantní) a 100 mA po dobu cca 50 minut. Po dokončení elektroforézy byly gely vyjmuty z kazet a obarveny metodou dle Jungblutta koloidní modří.

2.5.1 Stříbření gelů

Pro stříbření gelů byly gely nejprve fixovány v roztoku 50% methanolu s 5% kyselinou octovou po dobu 20 minut. Poté byly promyty v 50% methanolu po dobu 10 minut a přes noc byly ponechány na třepačce v deionizované vodě.

Další den byly gely promyty v 0,02% thiosíranu sodném po dobu 1 minuty, dvakrát promyty v deionizované vodě po dobu 1 minuty a inkubovány ve studeném 0,1% dusičnanu stříbrném po dobu 20 minut. Po vyjmutí z dusičnanu byly gely promyty v deionizované vodě po dobu 1 minuty a nechány se vyvíjet ve 2% uhličitanu sodném s formaldehydem. Po dosažení optimálního zbarvení bylo vyvíjení dokončeno a gel byl promyt v 5% kyselině octové. Uchovávány byly poté gely v 1% kyselině octové při 4 °C.

2.6 Enzymatické štěpení proteinového vzorku

Pro štěpení a následnou purifikaci byly připraveny vzorky, které obsahovaly každý 30 µg bílkoviny. Takto byly připraveny jak lyzáty, tak i supernatanty. Jako alkylační a redukční činidla byl použit 10 mM TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine), 10 mM IAA (iodacetamid) a 10 mM DTT (dithiothreitol), které se ředily dle ředění v tabulce 8 (Tab. 8).

Látka	Množství dané látky	Objem vody
TCEP	0,3 mg	100 µl
IAA	0,2 mg	100 µl
DTT	15,4 mg	10 ml

Tab. 8: Ředění použitých alkylačních a redukčních činidel

Dále byla také potřeba 8M urea, 1M HN_4HCO_3 , deionizovaná voda a 0,2 µg trypsinu. Nejprve byla naředěna 8M urea na koncentraci 1M urey ve vzorku (7 dílu vzorku: 1 dílu urey). Následně bylo přidáno ke každému vzorku 5,1 µl 10 mM TCEP a nechalo se takto reagovat na 45 minut, při 600 rpm a 37 °C v termomixeru. Poté bylo přidáno 15,3 µl 10 mM IAA a opět se nechávalo reagovat, tentokrát na

5 minut, při 600 rpm a při 37 °C. Po zreagování bylo přidáno 7,65 µl DTT, upraveno pH pomocí 1M HN_4HCO_3 na 8,5 a ke každému vzorku byly přidány 3 µl (0,2 µg/µl) trypsinu. Štěpení vzorků trypsinem probíhalo do dalšího dne při 37 °C a 300 rpm v termomixeru.

Další den byly vzorky okyseleny pomocí 10% TFA pro zastavení reakce trypsinu a následovalo čištění vzorků pomocí tzv. SPE kolonek. Pro čištění vzorků byl potřeba metanol, roztok 60% acetonitrilu (AcN) s 0,1% kyselinou mravenčí (FA) a roztok 2% acetonitrilu s 0,1% trifluoroctovou kyselinou (TFA). Kolonky byly stáčeny na stolní centrifuze. Nejprve byly kolonky aktivovány 200 µl metanolu a stočeny na 1000 rpm po dobu 1 minuty. Poté bylo přidáno 200 µl 60% AcN, 0,1% FA a stočeno na 1000 rpm po dobu 1 minuty. Dále bylo 2x za sebou přidáno 200 µl 2% AcN, 0,1% TFA na 1000 rpm po dobu 1 minuty. Po tomto stočení byl do každé kolonky přidán vzorek, který byl stočen na 1500 rpm po dobu 1 minuty. Každý vzorek byl pak promyt a odsolen 200 µl 2% AcN, 0,1% TFA na 1500 rpm po dobu 1 minuty. Následně byl vzorek eluován do nově označené zkumavky pomocí 200 µl 60% AcN, 0,1% FA při 1500 rpm po dobu 1 minuty. Před dalším zpracováním byly vzorky ještě odpařeny a výsledná peptidová směs byla poté uchovávána ve zkumavkách při - 80 °C.

2.7 LC-MS/MS analýza peptidové směsi

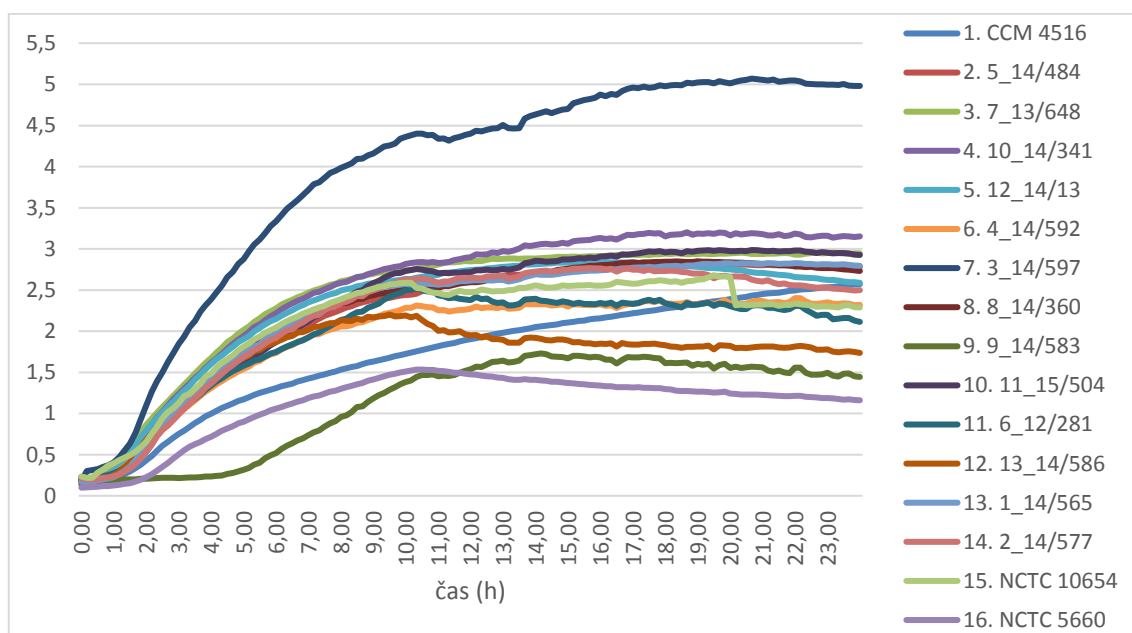
Purifikované vzorky byly rozpuštěny ve 20 µl roztoku 2% AcN, 0,1% TFA. 1 µl z takto vytvořené směsi byl analyzován nejprve pomocí kapalinového chromatografu UltiMate 3000 RSLC-nano HPLC s UV detekcí, z důvodu zjištění kvality vzorku. Separace jednotlivých vzorků probíhala přes lineární gradient 5 – 45% AcN, 0,1% TFA, po dobu okolo 81 minut, při průtoku 360 nL/min a s nastavením UV detekce na 215 nm. Tato analýza i následná analýza na hmotnostním spektrometru byla prováděna v uspořádání s předkolonou Acclaim PepMap100 (75 µm × 20 mm) naplněnou 3 µm C18 částicemi a separační kolonou Acclaim PepMap RSLC (75 µm × 150 mm) naplněnou 2 µm C18 částicemi. Samotná separace před analýzou na hmotnostním spektrometru byla provedena přes lineární gradient 3 - 44% AcN v 0,1% FA, po dobu 89 minut, při průtoku 300 nL / min. Separace byla opět monitorována přes UV detekci, při 214 nm. Vzorek dále

přímo pokračoval do nano elektrospreje v hmotnostním spektrometru QExactive a byl analyzován v pozitivním módu při rozlišení 70000 (MS) a 17500 (MS / MS). Pro fragmentaci bylo vybráno vždy 12 nejintenzivnějších prekurzorů v MS spektru, v oblasti 350-1650 m/z .

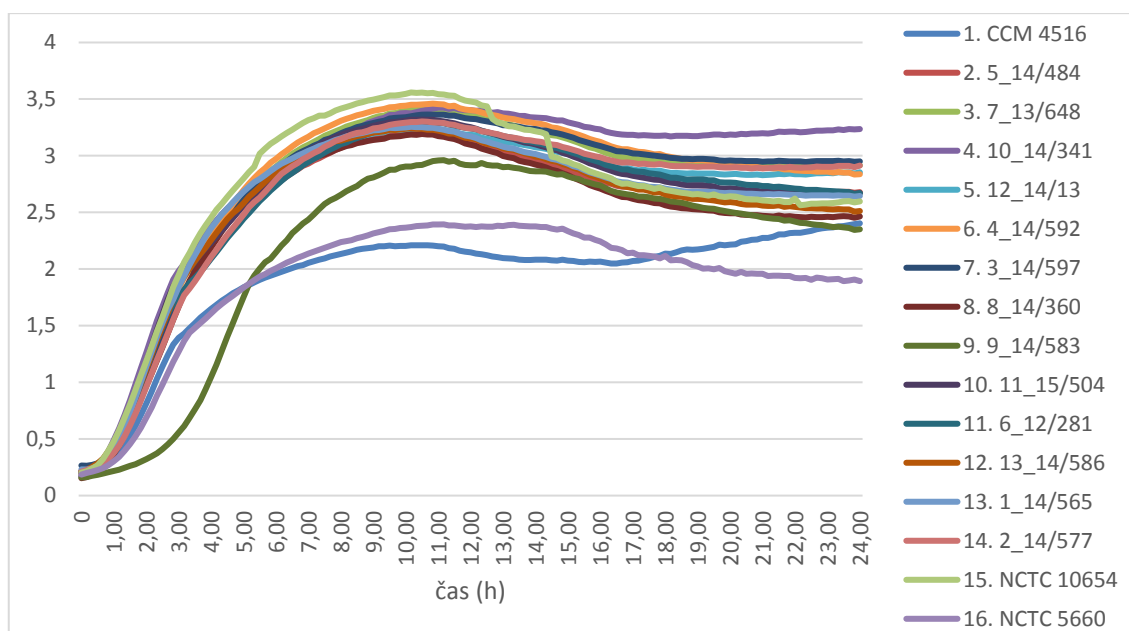
3 Výsledky a diskuze

3.1 Vyhodnocení růstových křivek

Po zprůměrování tripletů byl průběh růstových křivek zaznamenán v grafu, kde je patrný růst každého kmenu. Graf ukazuje závislost času (osa x) na optické denzitě (osa y). U obou růstových křivek můžeme vidět, že média jsou pro kultivaci bakterie *Staphylococcus aureus* vhodná, jelikož je u obou patrný bakteriální růst. Ovšem u kmenů, které byly kultivovány na NA médiu (Graf. 1) je exponenciální fáze pozvolnější a je těžší určit další fáze. U růstových křivek NA média zaznamenáváme také vyšší nárůst bakterií kmenu 7. U kmenů, které byly kultivovány na LB médiu (Graf. 2) jsou fáze lépe rozlišitelné a u většiny kmenů na tomto médiu můžeme pozorovat vyšší nárůst, než u NA média, proto bylo vyhodnoceno LB médium jako vhodnější pro kultivaci vybraných kmenů *Staphylococcus aureus*.



Graf. 1: Růstové křivky kmenů SA (1-16) na NA médiu



Graf. 2: Růstové křivky kmenů SA (1-16) na LB médiu

3.2 CFU přepoččet

Při CFU přepočtu došlo u výsledku na začátku růstové křivky (Tab. 9), u NA media k chybě, kdy výsledek vyšel o řád nižší, než by měl být. V tomto případě nemůžeme do pokusu plně započítat tento přepoččet, jelikož u CFU přepočtu, které bylo prováděno u NA media, na začátku růstové křivky došlo k chybnému kroku, kdy nebyla řádně vysušena agarová plotna a pokus byl prováděn znovu, na znovu rozmražené kultuře a jelikož došlo k opětovnému zamražení kultury, tak došlo k lyzi několika bakterií a výsledek je tedy výrazně menší. Ovšem u CFU přepočtu, který byl prováděn na konci růstové křivky (Tab. 10) můžeme vidět, že se bakteriím daří spíše na LB médiu.

Na začátku růstové křivky (OD=0.1) -průměr z obou duplikátů				
Médium	Plotna (10^{-4})	Plotna (10^{-5})	Plotna (10^{-6})	výsledek
LB	563	64		$1,2030 \cdot 10^8 / \text{ml}$
NA		8	0,5	$1,3 \cdot 10^7 / \text{ml}$

Tab. 9: Naměřené OD na začátku růstové křivky

	Na konci růstové křivky – průměr z obou duplikátů			
Médium	Plotna (10^{-4})	Plotna (10^{-5})	Plotna (10^{-6})	výsledek
LB		305,5	32,5	$6,305 \cdot 10^8/\text{ml}$
NA	937	235,5		$3,292 \cdot 10^8/\text{ml}$

Tab. 10: Naměřené OD na konci růstové křivky

3.3 Naměřený proteinový obsah ve vzorcích

K dispozici máme porovnání naměřené bílkoviny po lyzaci bakterií, nejprve metodou ultrazvuku (tab. 11, 12) a poté metodou lyzačního pufru (tab. 13,14). U lyzátů můžeme vidět, že u 2. pokusu byla bílkovina o něco vyšší, což mohlo být způsobeno použitím membránových Amicon filtrů, které v prvním pokusu použity nebyly a tím došlo ke koncentraci bílkoviny v menší množství tekutiny.

U supernatantů můžeme vidět, že naopak u 1. pokusu byla naměřena vyšší bílkovina. Bohužel v tuto chvíli není patrné, jaký je pro tento rozdíl důvod.

Naměřená bílkovina u lyzátů (kmeny 1-16) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ - 1. pokus	
1	0,427
2	0,374
3	0,322
4	0,341
5	0,333
6	0,347
7	0,284
8	0,319
9	0,309
10	0,356
11	0,423
12	0,392
13	0,338
14	0,318
15	0,336
16	0,409

Tab. 11: Naměřená bílkovina SA lyzátů (1-16) – pokus 1, zlyzovaných pomocí ultrazvuku

Naměřená bílkovina u supernatantů (kmeny 1-16) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ - 1. pokus	
1	2,233
2	2,692
3	2,667
4	2,820
5	2,276
6	1,928
7	1,919
8	2,085
9	1,562
10	2,730
11	2,538
12	2,446
13	2,439
14	2,145
15	1,874
16	2,070

Tab. 12: Naměřená bílkovina SA supernatantů (1-16) – pokus 1

Naměřená bílkovina u lyzátů (kmeny 1-16) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ - 2. pokus	
1	0,575
2	0,410
3	0,349
4	0,355
5	0,431
6	0,317
7	0,412
8	0,395
9	0,533
10	0,423
11	0,524
12	0,490
13	0,425
14	0,425
15	0,452
16	0,708

Tab. 13: Naměřená bílkovina SA lyzátů (1-16) – pokus 2, zlyzovaných pomocí lyzačního pufru

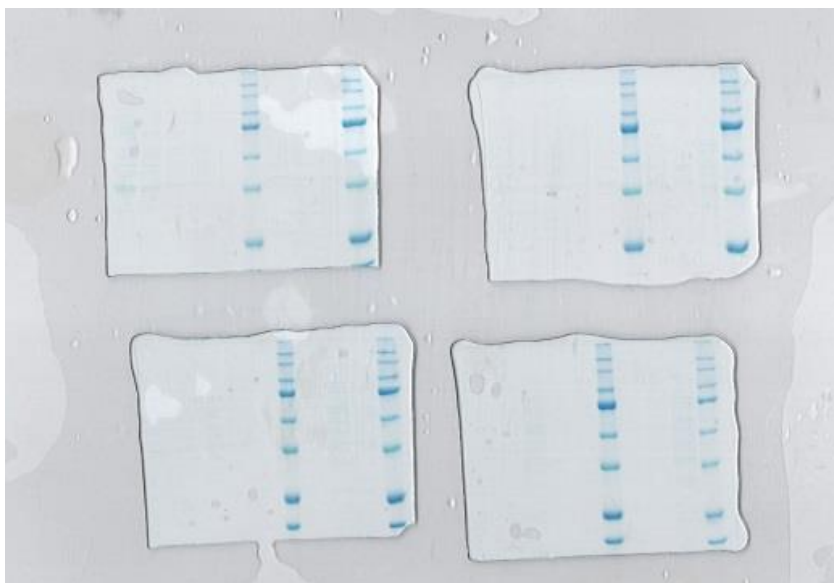
Naměřená bílkovina u supernatantů (kmeny 1-16) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ - 2. pokus	
1	0,517
2	0,734
3	0,619
4	0,756
5	0,747
6	0,853
7	0,730
8	0,713
9	0,863
10	0,884
11	1,037
12	1,101
13	0,877
14	0,732
15	0,630
16	0,838

Tab. 14: Naměřená bílkovina SA supernatantů (1-16) – pokus 2

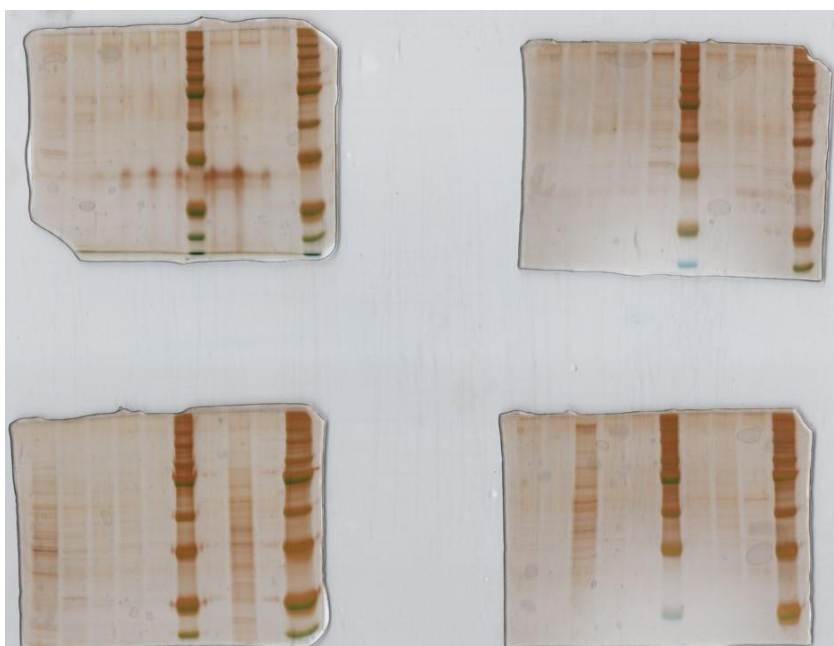
3.4 Gelová elektroforéza

Na výsledných polyakrylamidových 1D gelech (obr. 4) můžeme vidět přehledně pouze bandy proteinového standardu Kaleidoscope, který nám potvrzuje, že byla gelová elektroforéza provedena správně.

Na druhém obrázku (obr. 5) jsou gely již stříbřeny a bandy jsou mnohem lépe viditelné. Byla provedena gelová elektroforéza a proteiny byly seřazeny podle své velikosti od největšího po nejmenší. Bohužel místa, kde se měly nacházet toxiny, byla i přes stříbření vidět velmi špatně (oblast, kde se měly nacházet proteiny s velikostí okolo cca 35 kDa).



Obr. 4: Výsledné bandy obarvené koloidním modřením (elektroforéza vzorků z 1. pokusu)



Obr. 5: Výsledné bandy stříbřené (vzorky z 1. pokusu)

3.5 Identifikace pomocí nano LC-MS/MS

Pomocí programu Proteome Discoverer 2.4 bylo u všech lyzátů detekováno celkem 261 proteinů a u všech supernatantů celkem 73 proteinů. Nejvíce proteinů bylo detekováno ze supernatantů u kmenu 3, u kterého bylo nalezeno 38 proteinů z celkových 73. U lyzátů bylo zajímavé, že u jednoho kmenu bylo detekováno

výrazně více proteinů než u lyzátů ostatních kmenů a tím byl kmen 15, u kterého bylo nalezeno 215 proteinů z celkových 261 proteinů.

U vzorků z prvního pokusu, srovnáním výsledků z hmotnostní spektrometrie s existující databází stafylokokových proteinů, byly nalezeny dva toxiny. Jsou jimi exfoliativní toxin A a podjednotka B z gama hemolysinu (Tab. 15, tab. 16).

Název toxinu	vzorek	kmen
Bi-componentní gama-hemolysin HlgAB/HlgCB-podjednotka B	Lyzát i supernatant	15. NCTC 10654
Exfoliativní toxin A	Supernatant	12. 13_14/586

Tab. 15: nalezené toxiny u vzorků z prvního pokusu (lyzovaných ultrazvukem)

Gama hemolysin-podjednotka b	P0A077
Exfoliativní toxin A	P09331

Tab. 16: Nalezené toxiny s odpovídajícím UniProt číslem

Pro hmotnostní spektrometrii byly použity pouze vzorky z 1. pokusu. Na výsledcích bylo patrné, že buď bylo špatně provedené štěpení trypsinem, nebo byla nesprávně použita lyzační metoda ultrazvukem. V budoucnu bude potřeba touto metodou dodělat zbylé vzorky, které byly zpracovány v druhém pokusu.

Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala bakterií *Staphylococcus aureus*, konkrétně jejími proteinovými toxiny. V teoretické části byla sepsána rešerše o bakterii, toxinech, které produkuje a nejčastěji používaných metodách kultivace a zpracování získaných proteinů z dané bakterie. V experimentální části bylo vybráno 16 kmenů *Staphylococcus aureus*, které byly dostupné v laboratořích Katedry molekulární patologie a biologie, Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Univerzity obrany. Nejprve byla pro tyto kmeny zvolena vhodná kultivační metoda a pro jejich charakterizaci byly sestaveny růstové křivky pomocí Fluostar Optima. Na základě růstových křivek bylo zvoleno médium, na kterém byl zaznamenán lepší růst. Dále byly bakterie znovu kultivovány, tentokrát již na vybraném médiu a lyzovány dvěma metodami, nejprve ultrazvukem a poté lyzačním pufrem. Vyextrahované proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE 1D elektroforézy a detekovány na hmotnostním spektrometru QExactive. Výsledky z hmotnostního spektrometru byly následně vyhodnoceny v programu Proteome Discoverer 2.4, ve kterém byly hledány shody s databází proteinů bakterie *Staphylococcus aureus*.

Bohužel byl vyhodnocen pouze první pokus, kdy byly bakterie lyzovány ultrazvukem a ve výsledných shodách s databází proteinů byly objeveny pouze dva toxiny. Druhý pokus, v rámci kterého byly bakterie lyzovány lyzačním pufrem, nebyl z časových, technických důvodů a vládních karanténních opatření, kvůli SARS-CoV-2, dokončen. Do budoucna bych tento pokus ráda dokončila, popřípadě zvolila jiný postup.

Literatura

ALONZO, Francis a Victor J. TORRES, 2014. The Bicomponent Pore-Forming Leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. **78**(2), 199–230. ISSN 1092-2172, 1098-5557. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.00055-13

ANON., nedatováno. seznam vysoce rizikových biologických agens a toxinů. *Státní úřad pro jadernou bezpečnost* [online]. Dostupné z: www.sujb.cz

ANON., nedatováno. uniprot.org. *uniprot* [online]. Dostupné z: www.uniprot.org

ARGUDÍN, María Ángeles, María Carmen MENDOZA a María Rosario RODICIO, 2010. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins* [online]. **2**(7), 1751–1773. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins2071751

BACKMAN, Lars a Karina PERSSON, 2018. The No-Nonsense SDS-PAGE. In: Teresa L. SINGLETON, ed. *Schizosaccharomyces pombe* [online]. New York, NY: Springer New York, s. 89–94 [vid. 2020-05-04]. ISBN 978-1-4939-7545-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-7546-4_8

BACHERT, Claus, Philippe GEVAERT a Paul van CAUWENBERGE, 2002. *Staphylococcus aureus* superantigens and airway disease. *Current Allergy and Asthma Reports* [online]. **2**(3), 252–258. ISSN 1529-7322, 1534-6315. Dostupné z: doi:10.1007/s11882-002-0027-9

BONAR, Emilia, Iwona WÓJCIK a Benedykt WLADYKA, 2015. Proteomics in studies of *Staphylococcus aureus* virulence. *Acta Biochimica Polonica* [online]. **62**(3), 367–381. ISSN 0001-527X, 1734-154X. Dostupné z: doi:10.18388/abp.2015_1083

BRUNELLE, Julie L. a Rachel GREEN, 2014. One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). In: *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 151–159 [vid. 2020-05-06]. ISBN 978-0-12-420119-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4

BUKOWSKI, Michal, Benedykt WLADYKA a Grzegorz DUBIN, 2010. Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins* [online]. **2**(5), 1148–1165. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins2051148

BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renáta KARPÍŠKOVÁ a Petra MYŠKOVÁ, 2014. *Mikrobiologické laboratorní metody*. 1. vyd. B.m.: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-676-6.

CROWTHER, John R., 2000. Systems in ELISA. In: John R. CROWTHER *ELISA Guidebook, The* [online]. New Jersey: Humana Press, s. 9–44 [vid. 2020-03-11]. ISBN 978-1-59259-049-0. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-049-7:9

DE HOFFMANN, Edmond, 2005. Mass Spectrometry. In: JOHN WILEY & SONS, INC., ed. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., s. 1301191913151518.a01.pub2 [vid. 2020-05-24].

ISBN 978-0-471-23896-6. Dostupné

z: doi:10.1002/0471238961.1301191913151518.a01.pub2

DENIS, Olivier, 2017. Route of transmission of *Staphylococcus aureus* s. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. **17**(2), 124–125. ISSN 14733099. Dostupné

z: doi:10.1016/S1473-3099(16)30512-6

DINGES, Martin M., Paul M. ORWIN a Patrick M. SCHLIEVERT, 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **13**(1), 16–34.

ISSN 1098-6618, 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.13.1.16

D.LOWY, Franklin, 2011. How *Staphylococcus aureus* Adapts to its host. *The New England Journal of Medicine*. **2011**(364, 21).

DUNN, Warwick B., 2011. Mass Spectrometry in Systems Biology. In: *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 15–35 [vid. 2020-05-25]. ISBN 978-0-12-

385118-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-385118-5.00002-5

DURACOVA, Miloslava, Jana KLIMENTOVA, Alena MYSLIVCOVA FUCIKOVA, Lenka ZIDKOVA, Valeria SHESHKO, Helena REHULKOVA, Jiri DRESLER a Zuzana

KROCOVA, 2019. Targeted Mass Spectrometry Analysis of *Clostridium perfringens* Toxins. *Toxins* [online]. **11**(3), 177. ISSN 2072-6651. Dostupné

z: doi:10.3390/toxins11030177

EMMERT, Elizabeth A. B., 2013. Biosafety Guidelines for Handling Microorganisms in the Teaching Laboratory: Development and Rationale †. *Journal of Microbiology & Biology Education* [online]. **14**(1), 78–83. ISSN 1935-7877, 1935-7885. Dostupné

z: doi:10.1128/jmbe.v14i1.531

FETSCH, Alexandra, 2018. *Staphylococcus aureus*. Berlin, Německo: Elsevier.

ISBN 978-0-12-809671-0.

FRIEDECKÝ, David a K LEMR, 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab.* **20 (41)**(3), 152–157.

FRIES, Bettina C. a Avanish K. VARSHNEY, 2013. Bacterial Toxins—Staphylococcal Enterotoxin B. *Microbiology Spectrum* [online]. **1**(2) [vid. 2020-05-04]. ISSN 2165-

0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.AID-0002-2012

GOUAUX, Eric, Michael HOBAUGH a Langzhou SONG, 1997. α -Hemolysin, γ -hemolysin, and leukocidin from *Staphylococcus aureus*: Distant in sequence but similar in structure. *Protein Science* [online]. **6**(12), 2631–2635. ISSN 09618368.

Dostupné z: doi:10.1002/pro.5560061216

GRUMANN, Dorothee, Ulrich NÜBEL a Barbara M. BRÖKER, 2014. *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions and genetics. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. **21**, 583–592. ISSN 15671348. Dostupné

z: doi:10.1016/j.meegid.2013.03.013

HO, C. S., C. W. K. LAM, M. H. M. CHAN, R. C. K. CHEUNG, L. K. LAW, L. C. W. LIT, K. F. NG, M. W. M. SUEN a H. L. TAI, 2003. Electrospray ionisation mass spectrometry:

principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist. Reviews*. **24**(1), 3–12. ISSN 0159-8090.

HUONG, Truong Thanh, Markéta KOMÍNKOVÁ, Roman GURÁŇ, Branislav RUTTKAY-NEDECKÝ, Pavel KOPEL, Libuše TRNKOVÁ, Ondřej ZÍTKA, Vojtěch ADAM a René KIZEK, 2014. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. **1**, 64–66.

HUSEBY, Medora, Ke SHI, C. Kent BROWN, Jeff DIGRE, Fikre MENGISTU, Keun Seok SEO, Gregory A. BOHACH, Patrick M. SCHLIEVERT, Douglas H. OHLENDORF a Cathleen A. EARHART, 2007. Structure and Biological Activities of Beta Toxin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* [online]. **189**(23), 8719–8726. ISSN 0021-9193, 1098-5530. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00741-07

ISLAM, Mohammed S., Aditya ARYASOMAJULA a Ponnambalam SELVAGANAPATHY, 2017. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines* [online]. **8**(3), 83. ISSN 2072-666X. Dostupné z: doi:10.3390/mi8030083

KAVRAN, Jennifer M. a Daniel J. LEAHY, 2014. Silver Staining of SDS-polyacrylamide Gel. In: *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 169–176 [vid. 2020-05-04]. ISBN 978-0-12-420119-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-420119-4.00014-8

KLOMPAS, Michael, 2010. Toxic Shock Syndromes. In: *Decision Making in Medicine* [online]. B.m.: Elsevier, s. 336–337 [vid. 2020-05-04]. ISBN 978-0-323-04107-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-04107-2.50120-4

KONG, Cin, Hui-min NEOH a Sheila NATHAN, 2016. Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins* [online]. **8**(3), 72. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins8030072

MARIUTTI, Ricardo B., Natayme R. TARTAGLIA, Núbia SEYFFERT, Thiago Luiz de Paula CASTRO, Raghuvir K. ARNI, Vasco A. AZEVEDO, Yves LE LOIR a Koji NISHIFUJI, 2017. Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. In: Shymaa ENANY a Laura E. CROTTY ALEXANDER, ed. *The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus* [online]. B.m.: InTech [vid. 2020-05-04]. ISBN 978-953-51-2983-7. Dostupné z: doi:10.5772/66528

MEDVEĐOVÁ, Alžběta a Ľubomír VALÍK, 2012. *Staphylococcus aureus*: Characterisation and Quantitative Growth Description in Milk and Artisanal Raw Milk Cheese Production. In: Ayman AMER EISSA, ed. *Structure and Function of Food Engineering* [online]. B.m.: InTech [vid. 2020-05-04]. ISBN 978-953-51-0695-1. Dostupné z: doi:10.5772/48175

MICHALSKI, Annette, Eugen DAMOC, Jan-Peter HAUSCHILD, Oliver LANGE, Andreas WIEGHAUS, Alexander MAKAROV, Nagarjuna NAGARAJ, Juergen COX, Matthias MANN a Stevan HORNING, 2011. Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. **10**(9), M111.011015. ISSN 1535-9476, 1535-9484. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.M111.011015

MISSIAKAS, Dominique M. a Olaf SCHNEEWIND, 2013. Growth and Laboratory Maintenance of *Staphylococcus aureus*. In: Richard COICO, Tim KOWALIK, John QUARLES, Brian STEVENSON a Ron TAYLOR, ed. *Current Protocols in Microbiology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., s. mc09c01s28 [vid. 2020-05-04]. ISBN 978-0-471-72925-9. Dostupné z: doi:10.1002/9780471729259.mc09c01s28

MOZA, Beenu, Ashok K VARMA, Rebecca A BUONPANE, Penny ZHU, Christine A HERFST, Melissa J NICHOLSON, Anne-Kathrin WILBUER, Nilufer P SETH, Kai W WUCHERPFENNIG, John K MCCORMICK, David M KRANZ a Eric J SUNDBERG, 2007. Structural basis of T-cell specificity and activation by the bacterial superantigen TSST-1. *The EMBO Journal* [online]. **26**(4), 1187–1197. ISSN 0261-4189, 1460-2075. Dostupné z: doi:10.1038/sj.emboj.7601531

OLIVEIRA, Diana, Anabela BORGES a Manuel SIMÕES, 2018. Staphylococcus aureus Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins* [online]. **10**(6), 252. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins10060252

OTTO, Michael, 2014a. Phenol-soluble modulins. *International Journal of Medical Microbiology* [online]. **304**(2), 164–169. ISSN 14384221. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijmm.2013.11.019

OTTO, Michael, 2014b. Staphylococcus aureus toxins. *Current Opinion in Microbiology* [online]. **17**, 32–37. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2013.11.004

PESCHEL, Andreas a Michael OTTO, 2013. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **11**(10), 667–673. ISSN 1740-1526, 1740-1534. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro3110

PINCHUK, Irina V., Ellen J. BESWICK a Victor E. REYES, 2010. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins* [online]. **2**(8), 2177–2197. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins2082177

QUE, Yok-Ai a Philippe MOREILLON, 2015. Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock Syndrome). In: John E. BENNETT, Raphael DOLIN a Martin J. BLASER, ed. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Eighth edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. ISBN 978-1-4557-4801-3.

REYES-ROBLES, Tamara a Victor J. TORRES, 2016. Staphylococcus aureus Pore-Forming Toxins. In: Fabio BAGNOLI, Rino RAPPUOLI a Guido GRANDI, ed. *Staphylococcus aureus* [online]. Cham: Springer International Publishing, s. 121–144 [vid. 2020-05-04]. ISBN 978-3-319-72061-6. Dostupné z: doi:10.1007/82_2016_16

SEILIE, E. Sachiko a Juliane BUBECK WARDENBURG, 2017. Staphylococcus aureus pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. **72**, 101–116. ISSN 10849521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcdb.2017.04.003

STEVENS, Dennis L. a Amy E. BRYANT, 2011. Group A Streptococcal and Staphylococcal Infections. In: *Tropical infectious diseases: principles, pathogens and practice*. Third edition. Edinburgh: Saunders/Elsevier. ISBN 978-0-7020-3935-5.

STRASHEIM, Wilhelmina, Marleen KOCK, Andries DREYER a Marthie EHLERS, 2013. Molecular markers of resistance in coagulase-negative staphylococci implicated in catheter-related bloodstream infections. In: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* [online]. Formatex Research Center. Microbiology Book Series, 4. ISBN 978-84-939843-9-7. Dostupné z: <http://www.antimicrobialbook.org/>

ŠŤÁSTKOVÁ, Zora, Renata KARPÍŠKOVÁ a Renata BORKOVCOVÁ, 2012. Možnosti detekce stafylokokových enterotoxinů. *Chemické listy*. (106), 745–749.

TONACINI, Jenna, Dario STEPHAN, Guido VOGEL, Marc-André AVONDET, Franka KALMAN, Julien CROVADORE, François LEFORT a Bruno SCHNYDER, 2019. Intact Staphylococcus Enterotoxin SEB from Culture Supernatant Detected by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Toxins* [online]. **11**(2), 101. ISSN 2072-6651. Dostupné z: [doi:10.3390/toxins11020101](https://doi.org/10.3390/toxins11020101)

VANDENESCH, François, G. LINA a Thomas HENRY, 2012. Staphylococcus aureus Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. **2** [vid. 2020-02-17]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: [doi:10.3389/fcimb.2012.00012](https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00012)

WU, Shijia, Nuo DUAN, Huajie GU, Liling HAO, Hua YE, Wenhui GONG a Zhouping WANG, 2016. A Review of the Methods for Detection of Staphylococcus aureus Enterotoxins. *Toxins* [online]. **8**(7), 176. ISSN 2072-6651. Dostupné z: [doi:10.3390/toxins8070176](https://doi.org/10.3390/toxins8070176)

ZHANG, Xiaopeng, Xiaomei HU a Xiancai RAO, 2017. Apoptosis induced by Staphylococcus aureus toxins. *Microbiological research*. **2017**(205), 19–24.