



Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Plzni
Ústav mikrobiologie



**Proteolytické enzymy vegetativních
forem a spor bakterie *Paenibacillus***

larvae

(Dizertační práce)

Jaroslav Hrabák

Plzeň, 2007



Název: *Proteolytické enzymy vegetativních forem a spor bakterie
Paenibacillus larvae
(Proteolytic Enzymes of Vegetative Forms and Spores of the
Bacterium Paenibacillus larvae)*

Autor: *Ing. Jaroslav Hrabák*

Pracoviště: *Ústav mikrobiologie
Lékařská fakulta v Plzni
Univerzita Karlova v Praze*

Adresa fakulty: *Husova 3, 305 06 Plzeň*

Adresa pracoviště: *Dr. E. Beneše 13, 305 99 Plzeň*

Školitel: *RNDr. Karel Martinek, Ph.D.*

Studijní program: *Všeobecné lékařství*

Obor: *Lékařská mikrobiologie*

Rok vydání: *2007*

Místo vydání: *Plzeň*

Počet číslovaných stran: *94*

Počet obrázků: *33*

Počet tabulek: *5*

Počet příloh: *0*

Počet citovaných pramenů: *75*



Obsah

Obsah.....	2
Prohlášení.....	6
Předmluva.....	7
Souhrn.....	8
Summary.....	10
1. Úvod.....	12
1.1. Taxonomické zařazení bakterie <i>Paenibacillus larvae</i>	12
1.2. Patogeneze moru včelího plodu.....	14
1.3. Fyziologie bakterie <i>P. larvae</i> s ohledem na sporulaci.....	14
1.4. Proteázy bakterie <i>P. larvae</i>	15
1.4.1. Proteázy sekretované kulturou <i>P. larvae</i> do MYPGP média.....	17
1.5. Vliv extraktu z příškarů na antibakteriální aktivitu peptidů podílejících se na imunitní odpovědi včelích larev.....	18
1.6. Kultivace bakterie <i>P. larvae</i>	19
2. Cíle práce.....	22
3. Materiál a metody.....	23
3.1. Kultivace <i>P. larvae</i>	23
3.1.1. Izoláty bakterie <i>P. larvae</i>	23
3.1.2. Kultivační média a příprava kultur.....	23
3.1.3. Příprava spor.....	24
3.1.4. Stanovení koncentrace bakterií ve vzorku.....	24
3.2. SDS – PAGE (elektroforéza na polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného) a detekce proteinů na gelu.....	25
3.2.1. Přístrojové vybavení.....	25
3.2.2. Chemikálie.....	25
3.2.3. Zásobní roztoky.....	26
3.2.4. Příprava X% separačního gelu.....	28
3.2.5. Příprava 5% zaostřovacího gelu.....	29
3.2.6. Příprava vzorku a vlastní elektroforéza.....	29
3.2.7. Barvení proteinů pomocí Coomassie modři.....	29
3.2.8. Detekce proteinů stříbrem.....	30
3.2.9. Přibližné stanovení molekulové hmotnosti proteinu.....	30
3.2.10. Archivace gelů.....	30
3.3. Zymografie.....	30
3.3.1. Přístrojové vybavení.....	30
3.3.2. Chemikálie.....	31
3.3.3. Zásobní roztoky.....	32
3.3.4. Příprava gelů a vzorku.....	32
3.3.5. Renaturace proteinů.....	32
3.3.6. Inkubace gelu.....	32
3.3.7. Detekce proteolytické aktivity.....	33
3.3.8. Přibližné stanovení molekulové hmotnosti.....	33
3.4. Lytická aktivita vzorků.....	33
3.4.1. Přístrojové vybavení.....	33
3.4.2. Provedení.....	33
3.5. Elektronová mikroskopie.....	34
3.5.1. Přístrojové vybavení.....	34
3.5.2. Provedení.....	34



3.6. Stabilita sekretovaných proteáz.....	34
3.6.1. Teplotní stabilita.....	34
3.6.2. Stabilita v čase.....	34
3.7. Gelová filtrace na SEPHADEXu G-50, G-100, G-200.....	35
3.7.1. Přístrojové vybavení.....	35
3.7.2. Chemikálie.....	35
3.7.3. Příprava kolony.....	35
3.7.4. Provedení.....	35
3.8. Iontově výměnná chromatografie na DEAE-celulóze.....	36
3.8.1. Přístrojové vybavení.....	36
3.8.2. Chemikálie.....	36
3.8.3. Zásobní roztoky.....	36
3.8.4. Příprava nosiče.....	37
3.8.5. Test vhodného pH.....	37
3.8.6. Provedení chromatografie.....	37
3.8.7. Konzervace kolony.....	38
3.9. Afinitní chromatografie.....	38
3.9.1. Přístrojové vybavení.....	38
3.9.2. Chemikálie.....	38
3.9.3. Zásobní roztoky.....	38
3.9.4. Příprava kolony.....	39
3.9.5. Provedení.....	39
3.10. Stanovení proteolytické aktivity pomocí kapkové metody.....	40
3.10.1. Přístrojové vybavení.....	40
3.10.2. Chemikálie.....	40
3.10.3. Příprava gelu.....	40
3.10.4. Nanesení vzorků na gel, inkubace a vyhodnocení.....	41
3.11. Měření koncentrace proteinů podle M.M. Bradford.....	41
3.11.1. Přístrojové vybavení.....	41
3.11.2. Chemikálie.....	41
3.11.3. Zásobní roztoky.....	42
3.11.3. Provedení.....	42
3.12. Štěpení BSA / kaseinu.....	42
3.12.1. Přístrojové vybavení.....	42
3.12.2. Chemikálie.....	43
3.12.3. Provedení.....	43
3.13. Sporulace <i>P. larvae</i>	43
3.13.1. Stanovení počtu termorezistentních spor.....	43
3.13.2. Statistická analýza.....	43
3.14. Vyšetření základních biochemických vlastností proteáz spor.....	44
3.14.1. Test optimálních inkubačních podmínek při zymografii.....	44
3.14.2. Inhibice.....	44
3.14.3. Testování vlivu kovových iontů na metaloproteázy.....	45
3.15. Elektroeluce proteinů z povrchu spor.....	45
3.15.1. Přístrojové vybavení.....	46
3.15.2. Chemikálie.....	46
3.15.3. Zásobní roztoky.....	46
3.15.4. Provedení.....	47
3.16. Extrakce proteinového pláště spory chemickou cestou.....	47
3.16.1. Přístrojové vybavení.....	47



3.16.2. Chemikálie.....	47
3.16.3. Zásobní roztoky.....	47
3.16.4. Provedení.....	48
3.17. Infekční pokus <i>in vitro</i> podle E. Genersch a kol. (2006)	48
3.17.1. Přístrojové vybavení.....	48
3.17.2. Chemikálie a suroviny.....	48
3.17.3. Krmná směs.....	48
3.17.4. Provedení.....	49
3.18. Infekční pokus v pokusném včelstvu I.....	49
3.18.1. Přístrojové vybavení.....	49
3.18.2. Suroviny.....	50
3.18.3. Provedení.....	50
3.19. Infekční pokus v pokusném včelstvu II.....	50
3.19.1. Přístrojové vybavení.....	50
3.19.2. Chemikálie a suroviny.....	50
3.19.3. Provedení.....	51
4. Výsledky.....	52
4.1. Kultivace v MYPGP bujónu.....	53
4.1.1. Sekretované proteiny v MYPGP médiu.....	54
4.1.2. Sekretované proteázy v MYPGP médiu.....	56
4.1.3. Lytická aktivita vzorků kultury <i>P. larvae</i>	56
4.1.4. Elektron-mikroskopické vyšetření vzorků.....	57
4.2. Srovnání proteolytické aktivity sekretovaných produktů u různých kmenů <i>P. larvae</i>	58
4.3. Stabilita sekretovaných proteáz.....	58
4.4. Purifikační postupy pro izolaci sekretovaných proteáz <i>P. larvae</i>	61
4.4.1. Afinity chromatografie.....	61
4.4.2. Purifikace na DEAE celulóze s předchozí inkubací nanášeného vzorku při pokojové teplotě.....	62
4.5. Štěpení BSA/kaseinu.....	65
4.6. Sporulace na MYPGP a HCBB agaru.....	65
4.7. Extrakce proteáz z povrchových struktur spory.....	68
4.7.1. Extrakce Tritonem X-100.....	68
4.7.2. Extrakce proteáz extrakčním pufrem podle C.S. Hayese a P. Setlowa (1997).....	69
4.7.3. Elektroeluce povrchových proteinů.....	69
4.8. Germinace spor zbavených pláště.....	70
4.9. Srovnání proteolytické aktivity proteáz izolovaných z povrchových struktur spor u různých kmenů <i>P. larvae</i>	70
4.10. Biochemické vlastnosti proteáz vázaných ve vnějších strukturách spory.....	72
4.11. Infekční pokusy.....	72
4.11.1. Infekční pokus <i>in vitro</i> podle E. Genersch a kol. (2006).....	72
4.11.2. Infekční pokus v pokusném včelstvu I.....	72
4.11.3. Infekční pokus v pokusném včelstvu II.....	72
5. Diskuze.....	73
5.1. Kultivace v MYPGP bujónu.....	73
5.2. Srovnání proteolytické aktivity sekretovaných produktů u různých kmenů <i>P. larvae</i>	74
5.3. Stabilita sekretovaných proteáz.....	75



5.4. Purifikační postupy pro izolaci sekretovaných proteáz <i>P. larvae</i>	75
5.4.1. Afinitní chromatografie.....	76
5.4.2. Purifikace na DEA celulóze s předchozí inkubací nanášeného vzorku při pokojové teplotě.....	76
5.5. Štěpení BSA/kaseinu.....	77
5.6. Sporulace na MYPGP a HCBB agaru.....	77
5.7. Extrakce proteáz z povrchových struktur spory.....	79
5.8. Germinace spor zbavených pláště.....	80
5.9. Srovnání proteolytické aktivity proteáz izolovaných z povrchových struktur spor u různých kmenů <i>P. larvae</i>	80
5.10. Biochemické vlastnosti proteáz vázaných ve vnější struktuře spory.....	81
5.11. Infekční pokusy.....	81
6. Dosažené výsledky.....	83
Použité zkratky.....	84
Literatura.....	86



Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracoval samostatně a za použití citovaných pramenů. Veškeré publikované fotografie a nákresy jsem pořídil sám, pokud není uvedeno jinak. Převzaté fotografie a nákresy byly použity s výslovným souhlasem autora.

Tímto uděluji souhlas k půjčování této dizertační práce, avšak jakákoliv její reprodukce (včetně mechanického, elektronického, fotografického či jiného záznamu) je možná pouze po předchozím písemném souhlasu autora.

V Plzni dne 1.9.2006

Jaroslav Hrabák



Předmluva

Předkládaná dizertační práce se zabývá vlastnostmi velmi zajímavého mikroba – bakterie *Paenibacillus larvae* se zvláštním důrazem na proteolytické enzymy. Tato bakterie je z ekonomického hlediska významným veterinárním patogenem – způsobuje nemoc označovanou jako mor včelího plodu, na nějž dosud existuje pouze jediná účinná terapie – spálení veškerého kontaminovaného materiálu včetně samotných včel. Patogeneze tohoto onemocnění a důležité faktory patogenity však zůstávají záhadou. V poslední době lze v literatuře zaznamenat nárůst článků týkajících se molekulární epidemiologie *P. larvae*, ale ani jejich výsledky zatím nekonvergují k poznání patogenetických vlastností tohoto mikroba. Přístup ke zjištění faktorů patogenity může být dvojitý – hledání jejich genů přímo v genomu mikroorganismu nebo studium již vytvořených metabolitů. První přístup by byl za použití moderních technologií snazší. Druhý je mnohem náročnější a zřejmě také nákladnější. I přesto jsem si pro řešení vybral přístup druhý, jednak z důvodů toho, že naše laboratoř nedisponuje příslušnými technologiemi pro práci s DNA na takové úrovni, ale také i proto, že je tento přístup klasickou a hezkou biochemií.

Na tomto místě bych chtěl poděkovat všem, kteří se na výsledcích této práce jakkoliv podíleli. Jedná se především o mého šolitele RNDr. Karla Martínka, Ph.D., o RNDr. Olgu Hruškovou-Heidingsfeldovou, CSc. z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, které děkuji za cenné rady a spolupráci na některých pokusech, o RNDr. Oldřicha Benadu, CSc. z Mikrobiologického ústavu AV ČR, bez něhož by nebyla možná práce na elektron-mikroskopickém průkazu temperovaného bakteriofága v lyzujících kulturách *P. larvae*. Nesmím rovněž zapomenout poděkovat Ing. Daliboru Titěrovi, CSc. a paní Marcelě Haklové z Výzkumného ústavu včelařského, s.r.o., kde se při dlouhých diskuzích o moru včelího plodu zrodila celá řada podnětných nápadů. Dále můj dík patří studentce všeobecného lékařství Evě Chudáčkové, která se podílela na mnoha experimentech týkajících se spor *P. larvae*. Vděčný jsem i všem dalším pracovníkům Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Plzni za poskytnutí přátelského prostředí na pracovišti. V neposlední řadě patří můj dík rodině a přátelům za pomoc ne sice odbornou, ale neméně důležitou.

Jaroslav Hrabák



Souhrn

Bakterie *Paenibacillus larvae* je díky extrémní odolnosti spor nejnebezpečnějším bakteriálním patogenem včel. Pro své vlastnosti a vzhledem k omezené patogenitě pouze pro včely může být použita jako modelový organizmus ke studiu gram-positivních sporulujících aerobních tyčinek. V této práci jsme se zaměřili na doplnění informací o sekretovaných proteázách a na studium proteáz vázaných ve struktuře spory. Ke kultivaci *P. larvae* bylo použito MYPGP médium. V tomto médiu byla zjištěna lýza kultury po 40ti hodinách od naočkování, doprovázená poklesem pH pod hodnotu 6,4. Jako příčina lýzy byla prokázána indukce temperovaného bakteriofága BLA. Ke sporulaci *P. larvae* byl navržen nový agar s označením HCBB. Při srovnání schopností sporulace 31 sbírkových kmenů na MYPGP agaru a na agaru HCBB byl HCBB agar vyhodnocen jako vhodné sporulační médium s mediánem sporulace $4,2 \times 10^6$ spor/cm² v aerobní atmosféře a $5,65 \times 10^6$ spor/cm² v aerobní atmosféře s 10 % CO₂. Pro purifikaci sekretovaných proteáz byla použita jednodenní kultura *P. larvae*, inkubovaná 24 hodin při pokojové teplotě. Po aplikaci takto připraveného vzorku na kolonu s DEAE-celulózou došlo k optimální purifikaci 87/74 kDa a 42/40 kDa proteáz. Následně byla provedena analýza štěpení bovinního sérového albuminu a kaseinu purifikovanými proteázami, avšak ani jeden z těchto substrátů nebyl štěpen. Sekretované proteázy se ukázaly být stabilní po dobu minimálně 14 dní při 4 °C, 3 dny při pokojové teplotě a pouze 24 hodin při 35 °C. Aktivita zůstala zachována i při zahřátí na 60 °C po dobu 10 minut. Se zvyšováním teploty docházelo k poklesu aktivity proteáz. Při srovnání profilů sekretovaných proteáz u sbírkových kmenů se všechny různé varianty nacházely u vzorků signifikantně patogenních, tj. nebyl prokázán vliv konkrétní proteázy ve virulenci *P. larvae*. Pro extrakci proteáz vázaných ve vnějších strukturách spory se podařilo sestavit speciální elektroforetické zařízení, umožňující extrakci proteinů až z 10⁸ spor. Extrahované proteázy se nejspíše nalézají ve vnějším proteinovém plášti spory. Jedná se pravděpodobně o metaloproteázy inhibované 1,10-phenantrolinem s pH optimem ležícím v oblasti neutrálního pH. Srovnáním profilu proteáz vázaných v proteinovém plášti spory u sbírkových kmenů byly zjištěny 3 různé kombinace detekovaných proteáz. Vzhledem k tomu, že se všechny varianty vyskytovaly u izolátů izolovaných z klinického materiálu, tj. u signifikantně patogenních kmenů, není žádná z kombinací sama o sobě nutným faktorem patogenity. Infekčním pokusem *in vitro* a *in vivo* byla testována virulence spor zbavených proteinového pláště. Bylo prokázáno, že spory zbavené proteinového pláště jsou stejně virulentní jako spory



nativní. Proto je pravděpodobné, že proteázy vázané v proteinovém plášti spory nemají ve virulenci *P. larvae* významnou úlohu.



Summary

Due to the high resistance of the spores, the bacterium *Paenibacillus larvae* is the most dangerous bacterial pathogen of the honey bee (*Apis mellifera*). Thanks to its biological properties and restricted pathogenicity, this bacterium can be used as a model organism to study gram positive sporulating aerobic rods. This work is focused on completing information about secreted proteases of this bacterium and in a study of proteases bound in a spore structure. MYPGP medium was used for the cultivation of *P. larvae*. In this medium, lysis of the culture was shown after 40 hours of cultivation. The pH of the medium decreased below 6.4 by lysis. The induction of temperate bacteriophage BLA was detected as a causative agent of this lysis. A new sporulation medium called HCBB agar was proposed for the sporulation of *P. larvae*. In comparison with HCBB agar with MYPGP agar by 31 strains of *P. larvae* stored in our collection, HCBB agar was evaluated as an appropriate sporulation medium with a median of sporulation 4.2×10^6 spores per cm^2 in aerobic conditions and 5.65×10^6 spores per cm^2 in aerobic conditions with 10 % CO_2 . For purification of the secreted proteases, a one-day culture incubated at room temperature was used. Optimal purification of 87/74 kDa and 42/40 kDa proteases was observed after application of this sample on a DEAE-cellulose column. In the next step, analysis of the activity of purified proteases against bovine serum albumine was done. The secreted proteases have been stable for 14 days at 4 °C, for 3 days at room temperature and only 24 hrs at 35 °C. Proteolytic activity remained stable after heating at 60 °C for 10 minutes. With the increasing temperature, the proteolytic activity decreased. In comparing proteolytic patterns by the different 31 strains, all variants were presented in significantly pathogenic strains, so that there is no protease responsible for the virulence of *P. larvae*. For the extraction of proteases from the external structures of the spores, special electrophoretical equipment was constructed. This apparatus performs the easy extraction of proteases from 10^8 spores. The extracted proteases are probably located in the spore coat. These proteases were identified as metalloproteases inhibited by 1,10-phenantroline with an optimum of pH in the neutral value. Three combinations of the detected proteases were observed in the 31 strains of *P. larvae*. All these variants were shown in isolates collected from clinical material, so that no one protease is an essential virulence factor. The virulence of the decoated spores was tested *in vitro* and *in vivo*. These experiments proved the same virulence of the decoated and native spores. According to this result, we can hypothesize



that the proteases bound in the spore coat do not have an essential function in the virulence of *P. larvae*.



Úvod

1.1. Taxonomické zařazení bakterie *Paenibacillus larvae*

Bakterie *Paenibacillus larvae* způsobuje nejzávažnější bakteriální onemocnění včely medonosné (*Apis mellifera*) – mor včelího plodu. Jedná se o sporulující, pohyblivou, gram-pozitivní tyčinku, velikosti $0,5 - 1 \times 2,5 - 5 \mu\text{m}$, obvykle tvořící řetízky (Hansen a Brodsgaard, 2001). Spory jsou velké $0,6 \times 1,3 \mu\text{m}$ (Hansen a Brodsgaard 2001) a díky své extrémní odolnosti vůči fyzikálně – chemickým vlivům jsou příčinou vysoké nebezpečnosti moru včelího plodu.

Kultivace bakterie *Paenibacillus larvae* se poprvé podařila G.F.Whiteovi (1906), který své výsledky publikoval v práci „The Bacteria of the Apiary with Special Reference to Bee Diseases“ a původce moru včelího plodu nazval *Bacillus larvae*.

V roce 1950 popsal H. Katznelson (1950) dalšího příslušníka rodu *Bacillus*, který byl spjatý s méně závažným a sporadicky se vyskytujícím onemocněním včelího plodu, a nazval jej *Bacillus pulvifaciens*.

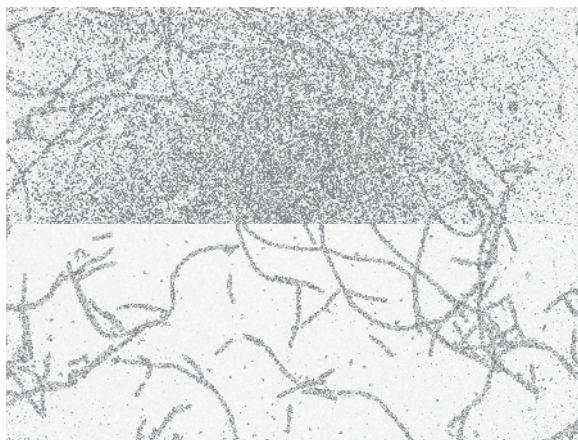
Na základě analýzy rRNA navrhli C. Ash a kol. (1993) ustavení nového rodu *Paenibacillus*, do něhož byli přeřazeni i *B. larvae* a *B. pulvifaciens*.

Diferenciace mezi oběma taxony byla nanejvýš obtížná a v rutinním diagnostickém provozu takřka neproveditelná (Gordon a kol. 1973).

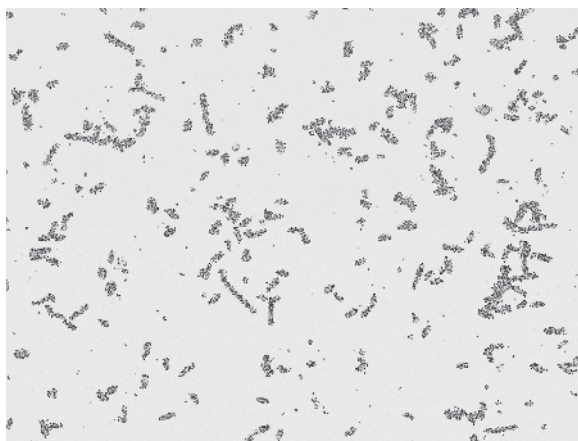
M. Heyndrickx a kol. (1996) provedli detailní biochemicko-genetickou studii mnoha kmenů obou druhů (SDS-PAGE celobuněčných proteinů, plynová chromatografie mastných kyselin, fenotypová analýza, DNA-DNA hybridizace, restriční analýza ribosomální DNA, RAPD) a zjistili pouze drobné odchylky mezi nimi. Ty, podle názoru autorů, neopravňovaly zařazení *P. larvae* a *P. pulvifaciens* do samostatných druhů. Byl tedy navržen pouze jediný druh *P. larvae* s rozdělením do dvou poddruhů *P. larvae* subsp. *larvae* a *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. Přesto byl za původce moru včelího plodu nadále považován pouze poddruh *larvae*.

Další změnu v taxonomii přinesla práce E.Genersch a kol. (2006), která na základě taxonomické studie obou poddruhů navrhla zrušení členění do poddruhů s tím, že by nadále byl považován za původce moru včelího plodu *P. larvae*, zahrnující i dřívější poddruh *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*, který se údajně vyznačoval nízkou patogenitou s jinými příznaky než mor včelího plodu. Na základě pokusů bylo prokázáno, že i některé sbírkové kmeny poddruhu *pulvifaciens* mohou vyvolat onemocnění se stejnými příznaky jako mor včelího plodu, dokonce někdy s rychlejším průběhem (de Graf a kol. 2006).

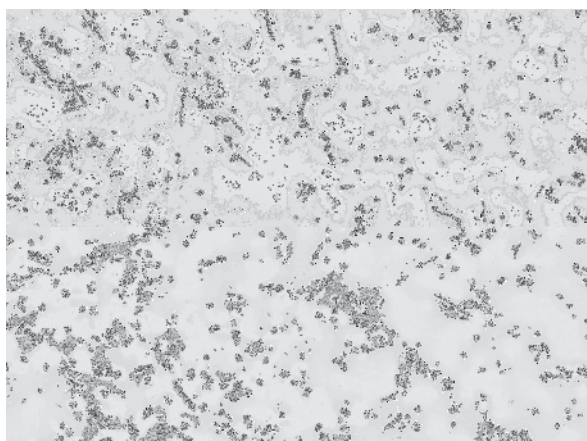
Z výše citovaných prací vyplývá, že druh *P. larvae* je z hlediska fenotypu a genotypu poměrně heterogenní.



Obr. 1. Vegetativní formy bakterie *Paenibacillus larvae*.



Obr.2. Vegetativní formy a sporangia *Paenibacillus larvae*. Centrálně a subterminálně uložené spory.



Obr.3. Spory *Paenibacillus larvae*.



1.2. Patogeneze moru včelího plodu

Pokud se spora bakterie *P. larvae* dostane do žaludku včelí larvy, okamžitě vyklíčí a vegetativní forma následně proniká přes peritrofickou membránu a epitel žaludku do hemolymfy. Obvykle během metamorfózy dochází k výraznému pomnožení bakterie v tkáních larvy (Jaeckel, 1930; Bamrick, 1964; Davidson, 1973), které poté vykazují nekrotické znaky (Gregorc a Bowen, 1998). Bakteriální kultura sporuluje a mění celou larvu v tekutou hmotu (angl. rope), v níž již nelze rozeznat jednotlivé hostitelské buňky (Drobníková, 1983). Hmota následně vysychá a mění se v útvar pevně přiléhající ke spodní stěně buňky včelího plástu – tzv. příškvár (angl. scale).

Molekulární mechanizmy patogeneze moru včelího plodu nejsou dosud známy. Proces penetrace parazita do hemolymfy včelí larvy nebyl dosud vysvětlen. E.W. Davidson (1973) na základě elektron-mikroskopické studie patogeneze moru včelího plodu vyslovila hypotézu, že by významným faktorem průniku bakterie do hemolymfy mohl být pohyb tyčinky a tedy mechanické rozrušení tkáně. Pohyb sice může být významným faktorem patogenity při pronikání některých bakterií (*Helicobacter* sp., *Vibrio cholerae*, atd.) mukózními vrstvami (Salyers a Whitt, 2002), avšak zdá se nepravděpodobné, že by pouhý pohyb umožňoval tyčince průnik přes vrstvu epitelu. Zmíněná hypotéza nebyla dosud potvrzena žádnou biomechanickou studií. S největší pravděpodobností se bude jednat o souhru několika různých faktorů.

V souvislosti s destrukcí tkání larvy se často uvádí význam proteáz, které mohou hrát jak nutriční, tak penetrační úlohu (Dancer a Chantawannakul, 1997; Glinski a Jarosz, 1998; Hansen a Brodsgaard, 2001). Jejich přesná úloha v patogenezi moru včelího plodu dosud zjištěna nebyla.

1.3. Fyziologie bakterie *P. larvae* s ohledem na sporulaci

P. larvae je zajímavým mikrobem, neboť je schopen metabolizovat glukózu všemi třemi metabolickými dráhami, známými u lékařsky významných bakterií, tj. dráhou Embden-Meyerhof-Parnasovou (EMP), dráhou pentoso-fosfátovou (PP) a Entner-Doudoroffovou dráhou (ED) (Julian a Bulla, 1971). Například bakterie *Bacillus cereus* a *B. subtilis* využívají pouze dráhy EMP a PP.

G.St. Julian a L.A. Bulla (1971) zjistili represí citrátového cyklu během vegetativního růstu. Naopak na konci stacionární fáze (těsně před sporulací) u sporulující kultury je citrátový cyklus aktivován. To může způsobit skutečnost, že *P. larvae* na umělých



živných půdách sporuluje obtížně. Exogenní zdroje uhlíku přítomné v médiu tak mohou působit represi syntézy některých enzymů potřebných právě ke sporulaci, např. NADH oxidázy, proteáz, ribonukleáz, a enzymů citrátového cyklu (Julian a Bulla, 1971).

1.4. Proteázy bakterie *P. larvae*

Na produkci proteáz bakterií *P. larvae* bylo možné usuzovat podle ztekucování želatiny při růstu na umělých živných médiích. G.F. White (1906) ve své pilotní práci nedokázal tento znak vyhodnotit, neboť *P. larvae* není schopen růstu při teplotách, při nichž zůstává želatina v pevném stavu. A. Maasen (1908) změnil design pokusu a slabé ztekucování želatiny zaregistroval. Zjistil dále, že tento efekt je inhibován přítomností glukózy v médiu.

A.P. Sturtevant (1924) zjistil, že lze prokázat proteolytickou aktivitu izolátů příškarů i kultury *P. larvae* pěstované na půdě s vaječným žloutkem, ale přímé provedení pokusu v rostoucí kultuře *in vitro* nepřinášelo spolehlivé výsledky. A.G. Lochhead (1928) zaznamenal u znaku ztekucování želatiny variabilitu v rámci testovaných kmenů. E.R. Stoilowa (1938) uvádí, že jí testované kmeny želatinu ztekucují a koagulují mléko bez hydrolýzy.

Na základě výše zmíněných znaků bylo možné usuzovat na významnou produkci proteáz bakterií *P. larvae*.

Za pilotní práci zabývající se proteázami bakterie *P. larvae* lze považovat práci E.C. Holsta a A.P. Sturtevant publikovanou v roce 1940. Tito autoři zjistili, že extrakt z příškarů vyvolává během několika hodin při 37 °C peptonizaci mléka. Pokud do mléka očkovali kulturu *P. larvae*, pozorovali pouze okyselení a srážení. Na základě těchto údajů vyslovili hypotézu, že proteázy musí být přítomny v příškaru ještě před očkováním a jsou nezávislé na následné germinaci spor a vegetativním růstu bakterie. Zmíněná práce dále uvádí, že proteolytická aktivita suspenze příškarů může být inaktivována zahřátím na 93 °C po 20 minut, avšak bez vlivu na germinaci spor.

N.G. Patel a T.A. Gochnauer (1972) provedli detailní biochemickou studii intracelulárních proteáz *P. larvae* a proteáz sekretovaných do média během sporulace. Ve studii použili metody papírové chromatografie a elektroforézu. Ztekucování želatiny detekovali změnou viskozity a rovněž pomocí chloridu rtuťnatého. U proteáz produkovaných během sporulace zjistili štěpení azoalbuminu, stanovili pH optimum (pH 6,6) a teplotní optimum (60 °C). Proteolytická aktivita byla inhibována EDTA a Zn^{2+} .



Aktivita reverzibilně inhibovaných proteáz byla navrácena ionty Co^{2+} a Cu^{2+} . Podle výsledků chromatografie a elektroforézy autoři usuzují na přítomnost dvou proteáz ve vysporulované kultuře a jedné proteázy ve vegetativních formách *P. larvae*. Velmi zajímavý je uváděný výsledek po srážení kyselinou trichloroctovou. Ta, v koncentraci 10%, proteiny ze vzorku nesrážela – jednalo se o nijak nepurifikovaný vzorek. Výsledky však nebyly podpořeny detekcí aktivity proteáz po proběhlém srážení. Na základě logické analýzy však tedy nelze závěr o nesrážení proteáz potvrdit, neboť ty jsou ve vzorku obvykle přítomny v koncentraci pod detekční hranicí i při detekci proteinů stříbrem (při SDS PAGE) a jejich koncentrace je tak v porovnání s ostatními proteiny přítomnými ve vzorku zanedbatelná (Dancer a Chantawannakul, 1997; Hrabák, 2004a; Hrabák a Martínek, 2006)

B.N. Dancer a P. Chantawannakul (1997) studovali proteázy přítomné v rozkládajících se tkáních a v příškvarech včelích larev napadených *P. larvae*. K detekci proteolytické aktivity použili kasein, azokasein, elastázu, kolagenázu a zymografii s kaseinovým substrátem. Byla zjištěna velká variabilita mezi aktivitou testovaných vzorků. Společným znakem u všech vzorků byly proteázy s pH optimem okolo 6,8, inhibované 1,10-phenantrolinem. Teplotní optimum těchto enzymů leželo mezi 60 – 65 °C, přičemž při zahřátí na 70 – 80 °C docházelo k prudkému poklesu aktivity. Na základě zjištěných vlastností autoři předpokládali jejich podobnost s proteázou sekretovanou bakterií *Bacillus thermoproteolyticus*. Avšak specifický substrát nebyl proteázami izolovanými z příškvarek a rozkládajících se larev infikovaných *P. larvae* štěpen. Rovněž aktivita nebyla inhibována specifickým inhibitorem této proteázy – phosphoramidonem.

Provedením denaturující elektroforézy (SDS-PAGE) s následným převrstvením gelu agarem s kaseinem (modifikace zymografie) identifikovali několik proteolytických pruhů v oblasti 21 – 23 kDa. Proces renaturace proteinů však nebyl standardní vzhledem k tomu, že autoři, místo používaného Tritonu X-100, použili pouze promytí v destilované vodě. I přesto, dodecylsulfát sodný (SDS) nezpůsobil ztrátu proteolytické aktivity. Při použití nativní elektroforézy s následným převrstvením gelu agarem s přidavkem odstředěného mléka byly detekovány celkem čtyři pruhy značící proteolytickou aktivitu. Tyto proteázy se v příškvarech a rozkládajících se larvách vyskytovaly v různých kombinacích. Žádná z detekovaných proteáz nebyla reprezentována viditelným pruhem na gelu při detekci proteinů stříbrem.

Zmíněné práce (Holst a Stuerdevant, 1940; Dancer a Chantawannakul, 1997) přinášejí zajímavé údaje o proteolytické aktivitě produktů patologického procesu moru



včelího plodu a její variabilitě. Autoři B.N. Dancer a P. Chantawannakul (1997) v úvodu své práce uvádějí, že studium proteáz v podmínkách *in vitro* je obtížné vzhledem k nesnadné kultivaci bakterie *P. larvae*. S tímto tvrzením však nelze souhlasit. I když oproti *in vitro* kultivaci např. bakterie *Escherichia coli* jsou nároky *P. larvae* vyšší, lze v lékařské mikrobiologii najít celou řadu běžných patogenů kultivovatelných obtížněji (např. *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*). Tvrzení o ne nesnadné kultivaci rovněž podporuje fakt, že *P. larvae* roste na běžných agarech používaných v mikrobiologické diagnostice (krevní agar, čokoládový agar, atp.) (Borracci a kol., 2003).

Přímé použití příškvarů a rozkládajících se larev s sebou přináší vyšší technické nároky na provedení experimentu. Pro studium kinetických vlastností enzymů je bezpodmínečně nutné použít dostatečně purifikovaný materiál. Vlastní purifikace proteáz z kadaverozního materiálu je obtížná díky velkému množství balastních proteinů. Naopak při použití kultivace mikroorganismu v podmínkách *in vitro*, lze kultivaci optimalizovat s ohledem na množství a zastoupení těchto balastních proteinů. Další nevýhodou je i průkaz původu proteáz. V případě použití materiálu získaného z hostitelského organismu je nutné znát alespoň částečnou sekvenci aminokyselin studovaných enzymů (v případě proteáz *P. larvae* není jejich sekvence dosud známa), abychom mohli vyloučit jejich přítomnost v genomu hostitele. I když se B.N. Dancer a P. Chantawannakul (1997) odvolávají na práci, v níž autoři nenalezli proteolytické enzymy v infikovaném včelím plodu při žádném jiném infekčním onemocnění včel (Bailey a Ball, 1991), nelze spolehlivě hostitelský původ proteáz vyloučit. Ostatně L. Bailey a B.V. Ball (1991) v citované práci netvrdí, že při ostatních onemocněních nejsou produkovány proteázy, ale pouze, že není sráženo mléko hnilobnými produkty tkání včelích larev.

1.4.1. Proteázy sekretované kulturou *P. larvae* do MYPGP média

Autor této práce se ve své diplomové práci zabýval studiem proteáz sekretovaných do MYPGP média během růstu kultury *P. larvae* (Hrabák, 2004a; Hrabák a Martínek, 2006). Během primární detekce proteolytických enzymů se podařilo zymograficky identifikovat aktivitu v oblasti 87, 74 a 42 kDa u dvoudenní kultury bakterie *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. V pětidenní kultuře bylo možné identifikovat změny v proteolýze slábnutím aktivity 74 kDa a naopak zesílením proteolytické aktivity v oblasti 42 kDa a zcela novou aktivitu v oblasti 40 kDa. U pětidenní kultury však dochází k lýze části tyčinek, proto



nelze aktivním proteázám v této kultuře jednoznačně přisoudit extracelulární charakter. Dle charakterizace proteáz provedené pomocí zymografie autor předpokládá charakter metaloproteáz či proteáz se závislostí na kovových iontech, neboť byly inhibovány chelátory kovových iontů. Aktivita byla nejvyšší při neutrálním pH (lze uvažovat o vyloučení aspartátových proteáz) a ke své aktivitě nevyžadovaly redukční činidlo (vyloučení cysteinových proteáz). Byly štěpeny substráty, jenž jsou obvykle specifické pro aspartátové proteázy a metaloproteázy a neštěpeny substráty používané pro některé serinové a cysteinové proteázy (Bz-Arg-pNA, Bz-Phe-Val-Arg-pNA).

Oproti práci B.N. Dancera a P. Chantawannakula (1997) a E. Carpany a spolupracovníků (1995) nebylo detekováno štěpení kaseinu, ale pouze želatiny. Tato skutečnost je v porovnání s prací B.N. Dancera a P. Chantawannakula (1997) vysvětlitelná odlišností použitého materiálu. V porovnání s prací E. Carpany a kol. (1995) se nabízí vysvětlení, že v autorově diplomové práci nebyly nalezeny vhodné podmínky pro činnost těchto proteáz.

1.5. Vliv extraktu z příškarů na antibakteriální aktivitu peptidů podílejících se na imunitní odpovědi včelích larev

Z. Glinski a J. Jarosz (1998) studovali vliv extraktů z příškarů na proteiny, které se účastní v imunitní obraně hmyzu proti bakteriálním nákazám. Ze včely medonosné se podařilo P. Casteelsovi a kol. (1990) izolovat dvě skupiny proteinů s antibakteriální aktivitou, především proti gram-negativním tyčinkám. Jedná se o proteiny označované jako apidaecin a abaecin. Tyto proteiny jsou funkčně podobné s proteinem cecropin, izolovaným z mūr (Casteels a kol., 1990). O něm je známo, že je štěpen proteázou produkovanou *Bacillus thuringiensis* (Dalhammar a Steiner, 1984).

Z. Glinski a J. Jarosz (1998) testovali aktivitu proteinů apidaecin a abaecin izolovaných ze včel a komerčně dostupného cecropinu jako inhibitorů růstu *Escherichia coli*, měřenou zónou lýzy bakterie na pevném agaru. Zjistili, že extrakt z příškarů spolehlivě inhiboval aktivitu těchto proteinů s antibakteriálním účinkem. Autoři usuzují, že se jedná o aktivitu exoproteáz *P. larvae*. Bohužel nebyl prokázán přímý vliv extraktu z příškarů na zmíněné proteiny (důkaz štěpení), ale na jejich inaktivaci bylo usuzováno jen podle inhibice antibakteriální aktivity proti *E. coli*. Vzhledem k tomu, a uvážíme-li, že k pokusu nebyly použity purifikované proteázy, je nutné zmíněný efekt proteázám přisuzovat s velkou opatrností.



1.6. Kultivace bakterie *P. larvae*

Jak již bylo zmíněno výše, považují někteří autoři „obtížnou“ kultivaci bakterie *P. larvae* za překážku detailní studie biochemických vlastností sekretovaných proteinů. Proto je zapotřebí zvládnout techniku kultivace *P. larvae* a pro případ práce se sporami navrhnout vhodnou metodiku přípravy bakteriálních spor *in vitro*.

P. larvae neroste v chudých živných médiích, proto se jeho izolace podařila teprve v roce 1906 G.F. Whiteovi. Ten ke kultivaci s úspěchem použil agar s bujónem připraveným ze včelích larev (White, 1906). Příprava takového agaru je náročná, a proto byla hledána jiná kultivační média. V roce 1907 nahradil G.F. White bujón nezahřátou sterilní infuzí ze včelích larev (White, 1907), posléze jej zcela nahradil přidavkem vaječného žloutku (White, 1919). A.P. Sturtevant (1924) obohatil žloutkové médium peptonem a kvasničným extraktem. Následně (Sturtevant, 1930) ještě přidal extrakt z mrkve. To umožnilo zvýšit citlivost kultivačního vyšetření moru včelího plodu (Sturtevant, 1932).

Přesto byla nadále uváděna velmi nízká citlivost kultivačního vyšetření, neboť bylo zapotřebí inokulum s minimálním množstvím 5×10^4 spor a růst mohl, díky dlouhé lag-fázi, trvat i 30 dní (Holst a Sturtevant, 1940). E.C. Holst a A.P. Sturtevant (1940) navrhli diagnostické médium, které umožňovalo i teoretický záchyt jedné spory během 4 dnů kultivace. Toto médium se skládalo z glukózy, peptonu, kvasničného extraktu, extraktu z mrkve a cysteinu. Bohužel na něm nedocházelo ke sporulaci a kultura během krátké doby lyzovala. Proto oba autoři ve stejné práci navrhli médium pro uchovávání kmenů *P. larvae* (Holst a Sturtevant, 1940). To mělo stejné složení, ovšem bez přidavku extraktu z mrkve. Ten se ukázal jako inhibitor sporulace. Médium bylo testováno řadou kmenů *P. larvae* a sporulace v různé míře byla zjištěna vždy (Holst a Sturtevant, 1940).

Výše zmíněné studie však byly založeny na empirickém poznání kultivačních podmínek *P. larvae*. V roce 1942 publikoval A.G. Lochhead práci zaměřenou na exaktní zjištění růstových faktorů potřebných pro kultivaci *P. larvae* (Lochhead, 1942). Lochhead (1942) testoval médium skládající se z deseti aminokyselin (cystein, alanin, prolin, asparagin, kyselina glutamová, kyselina asparagová, arginin, leucin, glycin a lysin) a sedmi růstových faktorů (thiamin, biotin, vitamín B₆, kyselina pantotenová, inositol, kyselina nikotinová a riboflavin). *P. larvae* však nebyl na tomto médiu schopen růstu. Úspěchu dosáhl až přidáním peptonu v kombinaci s růstovými faktory. Samotný pepton ale k růstu *P. larvae* nestačil. Z růstových faktorů se dále ukázal zásadním thiamin. Médium skládající se z peptonu a thiaminu se jevílo pro kultivaci *P. larvae* jako dostačující. Thiamin (vitamín B₁)



je tedy esenciálním růstovým faktorem pro *P. larvae* (Lochhead, 1942). A.G. Lochhead (1942) rovněž testoval zaměnitelnost peptonu za kaseinový hydrolyzát. Kaseinový hydrolyzát však nebyl schopen pepton v médiu nahradit. Autor bohužel neuvádí bližší charakteristiku peptonu a kaseinového hydrolyzátu, proto nelze tento zajímavý výsledek interpretovat.

Otázka diagnostické kultivace *P. larvae* byla v podstatě vyřešena výše zmíněnou prací E.C. Holsta a A.P. Sturtevanta (1940), nicméně problém sporulace *in vitro* není uspokojivě vyřešen doposud. G. St. Julian a L.A. Bulla (1971) použili pro sporulaci médium MD s kvasničným extraktem, glukózou a K_2HPO_4 a získali při použití kmene *P. larvae* NRRL B-2605 2×10^7 spor v mililitru. T.A. Gochnauer (1973) obdržel 10^8 spor v mililitru kmene *P. larvae* 34A v médiu z mozkové a srdcové infuze s thiaminem. Významnou prací v oblasti sporulace je práce D.W. Dingmana a D.P. Stahlyho (1983), kteří prokázali sporulaci *P. larvae* na pevném médiu nazvaném MYPGP (Mueller-Hinton broth, yeast extract, sodium pyruvate, glucose, K_2HPO_4 , agar). V tekutém MYPGP médiu sporulace pozorována nebyla (Dingman a Stahly, 1983). Autoři dále navrhli tekuté médium vhodné pro sporulaci kmene *P. larvae* B-3650, které má označení TMYGP a skládá se z kvasničného extraktu, glukózy, pyruvátu sodného a Tris-maleinového pufru. Všechny složky musí mít optimalizované složení, neboť jejich nízká i vysoká koncentrace vede k inhibici sporulace. Například koncentrace Tris-maleinového pufru 45 mM vede k poklesu množství vyprodukovaných spor přibližně o jeden řád (v médiu je koncentrace pufru 30 mM). Při koncentraci vyšší než 75 mM ke sporulaci takřka nedocházelo (Dingman a Stahly, 1983). Práce N. Bakhiet a D.P. Stahlyho (1985) ukázala, že spory získané *in vitro* v TMYGP médiu mají běžnou strukturu bakteriálních spor a v tomto médiu tak dochází ke kompletní sporulaci. TMYGP však bylo navrženo pouze pro jeden konkrétní kmen *P. larvae* a schopnost sporulace různých kmenů se liší. Nejedná se tedy o univerzální sporulační médium (osobní sdělení D. Titěry a M. Haklové z Výzkumného ústavu včelařského v Dole, nepublikovaná data). MYPGP médium je v současnosti nejrozšířenějším médiem užívaným při diagnostické kultivaci *P. larvae*.

S.E. Borracci a kol. (2003) testovali pro kultivaci a sporulaci Columbia agar s hovězími krvinkami, čokoládový agar se základem Columbia agaru a krevní agar s hovězí krví. Kultivace probíhala v atmosféře s 30 % CO_2 po dobu až devíti dnů. Autoři zjistili výborný růst *P. larvae* na obou agarech se základem Columbia agaru, ale ke sporulaci na



těchto půdách nedocházelo, nebo byly spory vyvinuty pouze částečně. Nejlepší sporulace dosáhli na krevním agaru s hovězí krví.



1. Cíle práce

Práce byla rozdělena do dvou dílčích celků – doplnění informací o biochemických vlastnostech proteáz sekretovaných vegetativními formami *P. larvae* a na studium biochemických vlastností proteáz vázaných ve vnějších vrstvách spory a jejich významu v patogenezi moru včelího plodu. V případě proteáz sekretovaných vegetativními formami *P. larvae* byl cíl vytyčen k navržení vhodného purifikačního postupu, zdokonalení detekčních technik proteáz a srovnání proteolytické aktivity deponovaných izolátů.

V případě studia proteáz vázaných ve vnějších strukturách spory bylo cílem navržení vhodného extrakčního postupu, lokalizace proteáz ve struktuře spory, vliv inhibitorů proteáz na germinaci spor (možnost nového přístupu k desinfekci) a ověření významu proteáz v patogenezi moru včelího plodu.

K dosažení vytyčených cílů v případě proteáz sekretovaných vegetativními formami *P. larvae* bylo zapotřebí:

- optimalizovat kultivaci bakterie *P. larvae* vzhledem k množství balastních proteinů ve vzorku,
- navrhnout vhodný purifikační postup,
- analyzovat aktivitu proteáz.

K dosažení cílů v případě studia proteáz vázaných ve struktuře spory bylo zapotřebí:

- navrhnout a ověřit vhodné sporulační médium,
- vybrat vhodný kmen *P. larvae* ke studiu,
- navrhnout optimální extrakční postup proteáz,
- lokalizovat proteázy ve struktuře spory,
- nalézt vhodné inhibitory proteáz,
- otestovat vliv inhibitorů na germinaci spor,
- ověřit virulenci spor zbavených proteáz ve srovnání se sporami nativními



2. Materiál a metody

3.1. Kultivace *P. larvae*

3.1.1. Izoláty bakterie *P. larvae*

Izoláty bakterie *P. larvae* byly získány z Výzkumného ústavu včelařského, s.r.o., kde byla provedena jejich identifikace. Jednalo se o izoláty ze včelstev s diagnózou moru včelího plodu z ČR a Rakouska. Specifikace kmenů je uvedena v tabulce. Vegetativní formy byly uchovávány v kultivačním médiu při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Spory byly uchovávány v suchém stavu při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Číslo izolátu	Původ	Pigment	Číslo izolátu	Původ	Pigment
BRD 205 01	Měl	G	BRD 205 20	Měl	G
BRD 205 02	Měl	G	BRD 205 21	Měl	G
BRD 205 04	Měl	ORP	BRD 205 22	Měl	G
BRD 205 06	Příškvar	G	BRD 205 23	Měl	G
BRD 205 07	Příškvar	ORP	BRD 205 24	Měl	G
BRD 205 08	Příškvar	ORP	BRD 205 25	Měl	G
BRD 205 10	Příškvar	G	BRD 205 26	Měl	G
BRD 205 11	Měl	ORP	BRD 205 27	Měl	G
BRD 205 12	Měl	ORP	BRD 205 28	Měl	G
BRD 205 13	Příškvar	ORP	BRD 205 29	Měl	G
BRD 205 14	Měl	G	BRD 205 31	Měl	ORP
BRD 205 15	Měl	G	BRD 205 33	Měl	G
BRD 205 16	Měl	G	BRD 205 34	Měl	G
BRD 205 17	Měl	G	BRD 205 35	Měl	G
BRD 205 18	Měl	G	BRD 205 36	Měl	G
BRD 205 19	Měl	G			

Tab. I. Sbírkové kmeny *P. larvae* (Označení: Příškvar – viz odstavec „1.2. Patogeneze moru včelího plodu“, Měl – voskové zbytky po odstranění víček včelích buněk včelami spadlé na dno úlu, G – šedivý pigment po 7 denní kultivaci na MYPGP agaru, ORP – oranžovo-červený pigment po 7 denní kultivaci na MYPGP agaru.)

3.1.2. Kultivační média a příprava kultur

Jako pevné médium byl zvolen MYPGP agar (Dingman a Stahly, 1983), který sloužil k izolaci jednotlivých bakteriálních kolonií. Kultivace trvala 2-7 dní při teplotě $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ v aerobních podmínkách. Jednotlivé kolonie byly očkovány do tekutého MYPGP média a kultivovány 2 nebo 5 dní. Médium s narostlou kulturou bylo centrifugováno (5000 g) po dobu 30 min. Supernatant prostý bakterií byl použit pro další zpracování.



Jako sporulační médium byl použit HCBB agar. Kultivace na tomto agaru probíhala 14 dní při teplotě 35°C.

MYPGP agar:

15 g Mueller-Hintonův bujón

15 g agar

10 g kvasničný extrakt

3 g K₂HPO₄

1 g pyruvát sodný

1000 ml destilovaná voda

pH média bylo upraveno pomocí KOH na hodnotu 7,3. Médium bylo sterilizováno při 121°C po dobu 20 min.

(Tekuté MYPGP médium mělo stejné složení, ovšem bez přídavku agaru.)

HCBB agar:

Složka A: 80 g krevní báze (Difco)

2,5 g aktivní uhlí

500 ml destilovaná voda

Složka B: 2,5 g hemoglobin (Sigma)

500 ml destilovaná voda

Složky A a B byly sterilizovány při 121°C po dobu 20 min. Po ochlazení na 60°C smíchány a rozlity do Petriho misek / zkumavek.

3.1.3. Příprava spor

Vysporulovaná kultura byla smyta z kultivačního média dostatečným množstvím destilované vody (dle plochy agaru). Spory byly 3× promyty destilovanou vodou a usušeny ve zkumavce při 35 °C. Po vysušení byly spory před uložením do lednice inkubovány 1 týden při 35 °C.

3.1.4. Stanovení koncentrace bakterií ve vzorku

Koncentrace celkového počtu bakterií ve vzorku byla stanovena přímým počítáním na Bürkerově komůrce a/nebo měřením absorbance při 565 nm.



Pro stanovení živých bakterií (CFU) byla zvolena metoda vyočkování vhodně ředěného vzorku na MYPGP agar.

Přístrojové vybavení

- Bürkerova komůrka
- Mikroskop
- Termostat
- Spektrofotometr

3.2. SDS – PAGE (elektroforéza na polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného) a detekce proteinů na gelu

Pro účely této práce byly použity gely s koncentrací 10 % a 15 % akrylamidu. Detekce proteinů na gelu byla provedena barvením Coomassie modří (citlivost 0,1-1 µg na pruh), popřípadě detekcí stříbrem (citlivost 2-10 ng na pruh) (Bollag a Edelstein, 1991). Byla použita metodika uváděná D.M. Bollagem a S.J. Edelsteinem (1991), modifikovaná v naší laboratoři.

3.2.1. Přístrojové vybavení

- Elektroforetická vana - P8DS cell (OWL Separation Systems, Inc.)
- Příslušenství pro elektroforézu (skla, hřebeny, spacery)
- Zdroj stejnosměrného napětí 200 V, 20 mA
- Třepačka
- Plastové kontejnery (20 × 20 × 2 cm)
- Celofán

3.2.2. Chemikálie

- Akrylamid
- Bis-akrylamid (N,N'-methylenebisacrylamide)
- Tris (2-hydroximethyl-2-methyl-1,3-propanediol)
- SDS (sodium dodecyl sulfate)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylene-ethylenediamine)
- Persulfát amonný (APS)
- 2-merkapt ethanol (ME)



- Glycerol
- Bromfenolová modř (Bromophenol Blue)
- Coomasie modř (Coomasie Blue R-250)
- Glycin
- Kyselina chlorovodíková (HCl)
- n-Buthylalkohol
- Methanol
- Ledová kyselina octová
- Formaldehyd
- Kyselina citrónová
- Thiosíran sodný ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)
- Uhličitan sodný (Na_2CO_3)
- Dusičnan stříbrný (AgNO_3)

3.2.3. Zásobní roztoky

- 2M Tris (pH upraveno pomocí HCl na 8,8) (dále jen Tris-HCl)
- 1M Tris-HCl (pH 6,8)
- 10% (w/v) SDS (uchováváno při pokojové teplotě)
- 10% persulfát amonný (rozplněno po 0,2 ml a uchováváno při -20°C neomezeně dlouho)
- nasycený n-buthylalkohol ve vodě

Roztok A:

- 30% (w/v) akrylamid
 - 0,8% (w/v) bis-akrylamid
- (uchováváno v lednici při 4°C , používáno po několik měsíců)

Roztok B:

- 75 ml 2M Tris-HCl (pH 8.8)
 - 4 ml 10% SDS
 - 21 ml destilovaná voda
- (uchováváno v lednici při 4°C , používáno několik měsíců)

*Roztok C:*

- 50 ml 1M Tris-HCl (pH 6.8)
- 4 ml 10% SDS
- 46 ml destilovaná voda

(uchováváno v lednici při 4°C, používáno po několik měsíců)

Elektroforetický pufr:

- 3 g Tris
- 14,4 g glycin
- 1 g SDS
- doplnit destilovanou vodou do 1 l.

(uchováváno v lednici při 4°C, používáno po několik měsíců)

Vzorkový pufr:

- 0,6 ml 1M Tris-HCl (pH 6.8)
- 5 ml 50% glycerol
- 2 ml 10% SDS
- 1 ml 1% bromfenolová modř
- 0,9 ml destilovaná voda

(uchováváno v lednici při 4 °C, používáno po několik měsíců)

- Těsně před smícháním vzorkového pufru se vzorkem byl přidán 2-merkcaptoethanol do výsledné koncentrace 14,4 mM

Barvicí roztok:

- 1 g Coomasie modř R-250
- 450 ml methanol
- 450 ml destilovaná voda
- 100 ml ledová kyselina octová

(uchováváno neomezeně dlouho při pokojové teplotě)

Odbarvovací roztok:

- 100 ml methanol
- 100 ml ledová kyselina octová



- 800 ml destilovaná voda
(uchováváno neomezeně dlouho při pokojové teplotě)

Sušící roztok:

- 100 ml ethanol
- 40 ml glycerol
- 860 ml destilovaná voda
(uchováváno při pokojové teplotě, používáno po několik měsíců)

Formaldehydový fixační roztok pro detekci proteinů stříbrem:

- 40% methanol
- 0,5 ml 37% formaldehydu na 1000 ml roztoku
(uchováváno při pokojové teplotě, používáno maximálně 1 měsíc)

Roztok thiosíranu sodného:

- 0,02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ v destilované vodě
(uchováváno neomezeně dlouho při pokojové teplotě)

Roztok dusičnanu stříbrného:

- 0,1% AgNO_3

Vyvíjecí roztok:

- 3% uhličitan sodný
- 0,0004% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
- 0,5 ml 37% formaldehydu na 1000 ml roztoku (přidáno těsně před použitím)
(roztok bez formaldehydu uchováván neomezeně dlouho při pokojové teplotě)

3.2.4. Příprava X% separačního gelu

Jednotlivé roztoky byly smíchány v níže uvedeném množství, přidáno 50 μl APS a 7,5 μl TEMED. Roztok byl rychle nalit mezi elektroforetická skla v držáku a převrstven 1 ml vodného roztoku nasyceného n-buthylalkoholem.

- $(7,5 - \frac{X}{3})$ ml destilovaná voda
- 2,5 ml roztok B



- $\frac{x}{3}$ ml roztok A

3.2.5. Příprava 5% zaostřovacího gelu

Po proběhlé polymeraci byl ze separačního gelu slit nasycený roztok n-buthylalkoholu, zbylý n-buthylakohol spláchnut destilovanou vodou a gel převrstven 5% zaostřovacím gelem, do něhož byly posléze umístěny hřebeny pro vytvoření jamek pro vzorek. Gel byl připraven dle níže uvedeného postupu.

- 2,3 ml destilovaná voda
- 0,67 ml roztok A
- 1 ml roztok C
- 50 μ l APS
- 5 μ l TEMED

3.2.6. Příprava vzorku a vlastní elektroforéza

20 μ l vzorku bylo smícháno se 7 μ l vzorkového pufru. Směs byla inkubována 30 minut při pokojové teplotě. Takto připravený vzorek v množství 20 μ l byl nanesen do jamky v gelu umístěném v elektroforetické vaně s nalitým elektroforetickým pufrem. Elektroforéza probíhala při stabilizovaném napětí 200 V tak dlouho, dokud modrá barva (bromfenolová modř) nedospěla těsně ke spodní části gelu. Poté byl gel vyjmut, rychle opláchnut vodou a byla provedena detekce proteinů.

Molekulová hmotnost byla zjištěna pomocí standardu molekulových hmotností, který byl obvykle umístěn na gelu v první dráze.

3.2.7. Barvení proteinů pomocí Coomassie modři

Gel byl umístěn do barvicího roztoku a barven za pomalého třepání na třepačce po dobu 30 min. Poté byl barvicí roztok slit a nahrazen odbarvovacím roztokem a odbarvován na třepačce do požadovaného odbarvení. Odbarvovací roztok byl několikrát vyměněn.

Obarvené proteiny se vyznačují sytě modrou barvou, pozadí je průhledné, někdy slabě namodralé. Citlivost metody byla 0,1 μ g na jednotlivý pruh (gel 10 cm \times 8 cm \times 0,75 mm, 10 jamek) (Bollag a Edelstein, 1991).



3.2.8. Detekce proteinů stříbrem

Gel byl fixován formaldehydovým fixačním roztokem 10 minut za pomalého míchání, následně opláchnut 2×5 minut destilovanou vodou. Poté byla destilovaná voda nahrazena roztokem thiosíranu sodného a gel v tomto roztoku máčen 1 minutu. Následně důkladně opláchnut 2× po 20ti vteřinách velkým množstvím destilované vody (vzhledem k velikosti použitého kontejneru). Poté, za pomalého míchání máčen v roztoku dusičnanu stříbrného. Po opláchnutí gelu destilovanou vodou a následně malým množstvím vyvíjecího roztoku byl máčen ve vyvíjecím roztoku do požadované intenzity pruhů. Vyvíjení bylo zastaveno přidáním 2,5 ml 2,3M kyseliny citronové na 50 ml vyvíjecího roztoku, mícháno 10 minut. Na závěr byl gel promyt 3×10 minut destilovanou vodou a převeden do sušícího roztoku.

3.2.9. Přibližné stanovení molekulové hmotnosti proteinu

Molekulová hmotnost proteinů byla stanovena výpočtem podle polynomu druhého řádu, získaného aproximací rozložení známých molekulových hmotností molekulového standardu, umístěného obvykle v první dráze, metodou nejmenších čtverců.

3.2.10. Archivace gelů

Gel byl po provedené detekci/odbarvení vyfotografován a umístěn přes noc do sušícího roztoku. Poté byl umístěn mezi dva listy celofánu napuštěné sušícím roztokem a napnut na skleněnou desku. Sušení probíhalo cca 1 týden při laboratorní teplotě, později 4 hodiny při 50 °C.

3.3. Zymografie

Zymografie byla použita pro detekci proteolytické aktivity, stanovení molekulové hmotnosti a základních vlastností studovaných proteáz. Námí použitá metodika byla modifikována podle M.J. Northa (1997), G.W. Olivera a kol. (1999) a Ch. Paecha a kol. (1993).

3.3.1. Přístrojové vybavení

- Elektroforetická vana - P8DS cell (OWL Separation Systems, Inc.)
- Příslušenství pro elektroforézu (skla, hřebeny, spacers)
- Zdroj stejnosměrného napětí 200 V, 20 mA



- Třepačka
- Inkubátor
- pH metr
- Plastové kontejnery (20 × 20 × 2 cm)

3.3.2. Chemikálie

- Akrylamid
- Bis-akrylamid (N,N'-methylenebisacrylamide)
- Tris (2-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-propanediol)
- SDS (sodium dodecyl sulfate)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylene-ethylenediamine)
- Persulfát amonný (APS)
- 2-merkapt ethanol
- Glycerol
- Bromfenolová modř
- Coomasie modř R-250
- Glycin
- Octan sodný
- Kyselina chlorovodíková (HCl)
- Hydroxid sodný (NaOH)
- Dithiothreitol (DTT)
- n-Buthylalkohol
- Iso-propylalkohol
- Methanol
- Ledová kyselina octová
- Želatina (Sigma)
- Kasein (Sigma)
- Chlorid sodný (NaCl)
- Chlorid vápenatý (CaCl₂)
- Síran zinečnatý (ZnSO₄)
- Síran měďnatý (CuSO₄)
- Chlorid hořečnatý (MgCl₂)
- Síran železitý (Fe₂(SO₄)₃)



- Triton X-100

3.3.3. Zásobní roztoky

Shodné s SDS-PAGE.

Renaturační roztok:

- 2,5% (v/v) Triton X-100
- 1M NaCl

Speciální odbarvovací roztok:

- 200 ml iso-propylalkohol
- 200 ml ledová kyselina octová
- 200 ml H₂O

3.3.4. Příprava gelů a vzorku

Příprava gelů a vzorku byla totožná s SDS-PAGE, avšak v rozdělovacím gelu byl kopolymerizován substrát. 10% rozdělovací gel měl následující složení:

- 5,41 ml destilovaná voda
- 2,5 ml roztok B
- 3,33 ml roztok A
- 1,25 ml 2% (w/v) želatina / kasein
- 50 µl APS
- 5 µl TEMED

(roztoky substrátů byly uchovávány při –20°C neomezeně dlouho)

3.3.5. Renaturace proteinů

Gel byl umístěn do renaturačního roztoku a promýván na třepačce po dobu 30 min. Renaturační roztok byl 3× vyměněn.

3.3.6. Inkubace gelu

Bude popsáno v odstavci (3.14.).



3.3.7. *Detekce proteolytické aktivity*

Zásadně pouze pomocí Coomasie modří, shodně s SDS-PAGE (viz odst. 3.2.7.). Proteolytická aktivita se jevila jako světlý pruh různé intenzity na modrém pozadí.

3.3.8. *Přibližné stanovení molekulové hmotnosti*

Stejně jako u SDS-PAGE byl obvykle v první jamce umístěn standard molekulových hmotností. Dráha se standardem byla ihned po proběhlém elektroforetickém dělení odříznuta a tento proužek byl barven v barvicím roztoku. Po dostatečném obarvení byl proužek odbarvován ve speciálním odbarvovacím roztoku do požadované intenzity pruhů. Poté převeden do sušícího roztoku. Výpočet byl proveden shodně s SDS-PAGE (viz odst. 3.2.9.). Protože však docházelo k délkovým deformacím gelu v závislosti na zpracování, bylo vždy počítáno s relativní vzdáleností příslušného pruhu vztahované k délce gelu.

3.4. *Lytická aktivita vzorků*

Metoda byla použita ke sledování lytické aktivity produktů *P. larvae* na zástupce gram-negativních a gram-pozitivních bakterií a testovaný tentýž kmen *P. larvae*.

3.4.1. *Přístrojové vybavení*

- Centrifuga
- Spektrofotometr pro měření v mikrotitračních destičkách při 450 nm
- Termostat 35 °C

3.4.2. *Provedení*

Vzorky bujónové kultury *P.larvae* byly centrifugovány (18 000 g, 10 min.). 20 µl supernatantu bylo napipetováno k 180 µl bakteriální suspenze ve vhodném pufru. Suspenze byly připraveny z bakterií *P. larvae* (BRD 205 01), *Bacillus subtilis* (CCM 2217), *Staphylococcus aureus* (CCM 1484), *Streptococcus pyogenes* (CCM 4425), *Enterobacter cloacae* (CCM 1903) a *Escherichia coli* (CCM 4751) v koncentraci 10⁶ CFU/ml. Následně byla měřena absorbance při 450 nm v pětiminutových krocích po dobu 5 hodin. Vzorky byly paralelně inkubovány při 20 °C a 35 °C. Lytická aktivita byla hodnocena jako pokles absorbance.



3.5. Elektronová mikroskopie

Elektron-mikroskopické vyšetření vzorků pro průkaz bakteriofága v lyzující kultuře probíhalo v Laboratoři elektronové mikroskopie Mikrobiologického ústavu AV ČR podle metodiky pospané J. Šmardou a H. Slováčkovou (2004) a O. Benadou a V. Pokorným (1990).

3.5.1. Přístrojové vybavení

- Centrifuga
- Elektronový mikroskop Philips CM 100

3.5.2. Provedení

Vzorky byly centrifugovány pro odstranění bakterií (10 000 g, 10 min.). 5 μ l supernatantu bylo nanášeno na aktivovanou síťku potaženou uhlíkovou vrstvou (Benada a Pokorný, 1990). Po 30s adsorpci byla síťka promyta 1% molybdenátem amonným, a negativně barvena v 1 ml 2% uranyl acetátu. Síťky byly prohlíženy elektronovým mikroskopem při zvětšení 46 000 \times .

3.6. Stabilita sekretovaných proteáz

Vzorky byly centrifugovány pro odstranění bakterií (10 000 g, 10 min.). Poté byl objem supernatantu rozdělen po 1 ml do zkumavek. Jedna zkumavka byla vždy zamrazena (-20°C).

3.6.1. Teplotní stabilita

Vzorky byly exponovány teplotám 50, 60, 70, 80 a 90 °C po dobu 10 minut. Poté byly zamrazeny (-20°C) a následně podrobeny SDS-PAGE analýze a zymografii.

3.6.2. Stabilita v čase

Vzorky byly umístěny při pokojové teplotě, při 4 °C a při 35 °C. Každý den po dobu 14 dní byla odebrána jedna zkumavka se vzorkem a zamrazena (-20°C). Poté byla provedena SDS-PAGE analýza a zymografie.



3.7. Gelová filtrace na SEPHADEXu G-50, G-100, G-200

Gelová filtrace byla prováděna především podle návodů firmy Pharmacia Fine Chemicals (Pharmacia Fine Chemicals, 1975, 1976a, 1976b, 1976c, 1979), jejíž produkty byly použity – značkové kolony, SEPHADEX.

3.7.1. Přístrojové vybavení

- Chromatografická kolona s adaptérem (průměr 15 mm, délka 50 cm)
- Spektrofotometr pro měření koncentrace proteinů při 280 nm, nebo při 595 nm podle M.M. Bradford
- Dialyzační střevo

3.7.2. Chemikálie

- SEPHADEX G-50, G-100, G-200
- Tris (2-hydroximethyl-2-methyl-1,3-propanediol)
- EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)
- Kyselina chlorovodíková (HCl)
- Merthiolát sodný (sodium mercuriate)

3.7.3. Příprava kolony

SEPHADEX byl nabobtnán přes noc v destilované vodě s 0,01 % merthiolátu sodného pro zabránění růstu mikroorganismů. Kolona byla naplněna standardním postupem tak, aby nedocházelo ke vzniku bublin (Pharmacia Fine Chemicals, 1976c).

3.7.4. Provedení

Vzorek (5 ml) byl nanesen na kolonu a eluován destilovanou vodou nebo puftrem s 0,01 % merthiolátu sodného. Průtoková rychlost byla nastavena na 20 ml/hod. Frakce byly jímány po 5ti mililitrech a příslušné frakce neobsahující nízkomolekulární složky poté sloučeny a uchovávány zamražené při -80°C .

Po proběhlém dělení byla kolona promyta 50ti ml destilované vody s 0,01 % merthiolátu sodného a uzavřena proti vyschnutí.



3.8. Iontově výměnná chromatografie na DEAE-celulóze

Test vhodného pH, provedení vlastní chromatografie, uchovávání a regenerace nosiče byly prováděny jak je popsáno D.M. Bollagem a S.J. Edelsteinem (1991), N.M. Hopperem (1999) a v návodech firmy Pharmacia Fine Chemicals (1980).

3.8.1. Přístrojové vybavení

- Chromatografická kolona s adaptérem (průměr 15 mm, délka 15 cm)
- Jímač frakcí
- Magnetická míchačka (zařízení pro vytvoření koncentračního gradientu)
- pH metr
- Spektrofotometr pro měření koncentrace proteinů při 280 nm, nebo při 595 nm podle M.M. Bradford.

3.8.2. Chemikálie

- DEAE celulóza
- Tris (2-hydroximethyl-2-methyl-1,3-propanediol)
- Glycin
- Chlorid sodný (NaCl)
- Kyselina chlorovodíková (HCl)
- Octan sodný
- Hydroxid sodný (NaOH)
- Iso-propylalkohol

3.8.3. Zásobní roztoky

Octanový pufr:

- 1M octan sodný (pH upraveno HCl na pH 3)

Roztok hydroxidu sodného:

- 0,5M NaOH

Trisový ekvilibrační pufr:

- 1M Tris-HCl (pH 7; 8; 9)



Glycinový ekvilibrační pufr:

- 1M Glycin (pH 5; 6)

3.8.4. Příprava nosiče

DEAE celulóza byla ponechána nabobtnat přes noc v dostatečném množství destilované vody. Poté byla naplněna na kolonu standardním postupem tak, aby nedocházelo ke vzniku bublin a promyta:

- 20ti ml octanového pufru (průtoková rychlost 20 ml/hod),
- 50ti ml roztoku hydroxidu sodného (promýt a zbytek nechat přes noc v koloně),
- 20ti ml octanového pufru (průtoková rychlost 20 ml/hod).

Po aktivaci byla kolona promyta 50ti ml jedním z příslušných pufrů a před nanáškou vzorku ponechána v pufru 2 hodiny.

3.8.5. Test vhodného pH

1 ml aktivovaného nosiče byl napipetován do zkumavek a promyt daným pufrům, nechán sedimentovat a supernatant odstraněn. Vzorek byl dialyzován přes noc proti 20 mM pufru. Následně byl 1 ml vzorku převedeného do pufru nanesen na nosič ve zkumavce o příslušném pH, promíchán a nechán sedimentovat. Supernatant byl zamražen. Poté byl nosič promyt 1 ml čistého 20mM pufru a opět nechán sedimentovat a supernatant opět zamražen. Eluce se uskutečnila 1 ml pufru s koncentrací 1M NaCl.

Všechny frakce byly podrobeny SDS-PAGE a zymografii. V ideálním stavu se vzorek proteázy nacházel pouze ve frakci s NaCl.

3.8.6. Provedení chromatografie

Na kolonu ekvilibrovanou nejvhodnějším pufrům byl nanesen vzorek po odsolení a převedení do vhodného 20mM pufru na SEPHADEXu G-50. Kolona byla promyta 20mM pufrům s následnou elucí roztokem NaCl v 20mM pufru. Proteiny byly eluovány gradientem NaCl o koncentraci 0-0,5 M, který byl připraven pomocí spojených nádob a magnetické míchačky. V kádince umístěné na míchačce bylo 80 ml 20mM pufru, ve druhé kádince 80 ml 20mM pufru s 0,5M NaCl. Frakce byly jímány automatickým jímačem frakcí po 1,5 ml. Průtoková rychlost kolonou byla většinou nastavena na 20 ml/hod.



Koncentrace bílkoviny v jednotlivých frakcích byla měřena na spektrofotometru při vlnové délce 280 nm, nebo podle M.M. Bradford (viz odst. 3.11.). Frakce byly zamraženy a uchovávány při -80°C .

3.8.7. Konzervace kolony

Kolona byla důkladně propláchnuta destilovanou vodou a promyta stejně jako při aktivaci. Následně důkladně promyta destilovanou vodou a převedena do 50% isopropylalkoholu a uzavřena proti vyschnutí.

3.9. Afinitní chromatografie

Byla použita metoda afinitní chromatografie s navázaným chelátorem kovů (EDTA). Kolona byla připravena v naší laboratoři následně popsáním způsobem.

3.9.1. Přístrojové vybavení

- Chromatografická kolona s adaptérem (průměr 15 mm, délka 5 cm)
- Spektrofotometr pro měření koncentrace proteinů při 280 nm, nebo při 595 nm podle M.M. Bradford
- Dialyzační střevo

3.9.2. Chemikálie

- Sepharosa 4B
- Tris (2-hydroximethyl-2-methyl-1,3-propanediol)
- Kyselina chlorovodíková (HCl)
- EDTA
- Chlorid zinečnatý (ZnCl_2)
- Hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4)
- Chlorid sodný (NaCl)

3.9.3. Zásobní roztoky

Ekvilibrační pufr:

- 50mM Tris-HCl, pH 7,5
- 1 mg/ml ZnCl_2

*Promývací pufr:*

- 50mM Tris-HCl, pH 7,5
- 150mM NaCl

Eluční pufr I.:

- 10mM Na₂HPO₄, pH 7,5
- 150mM NaCl

Eluční pufr II.:

- 10mM Na₂HPO₄, pH 4
- 800mM NaCl

Eluční pufr III.:

- 50mM EDTA
- 500mM NaCl, pH 6,5

3.9.4. Příprava kolony

Kolona pro afinitní chromatografii byla připravena podle J. Poratha a kol. (1975).

Postup přípravy nosiče byl následující:

- 2 g EDTA byly rozpuštěny v 10 ml 2M Na₂CO₃,
- následně bylo přidáno 15 ml Sepharosy B a inkubováno při 65 °C po 24 hod.,
- po inkubaci byl roztok naplněn do kolony a promyt 250 ml destilované vody,
- poté byla kolona promyta 20 ml ekvilibračního pufru.

3.9.5. Provedení

Na ekvilibrovanou kolonu byl nanesen vzorek po odsolení a převedení do ekvilibračního pufru na SEPHADEXu G-50. Kolona s naneseným vzorkem byla promyta 20 ml promývacího pufru. Následovala nanáška elučních pufrů v dávkách po 10 ml. Frakce, počínaje nanáškou promývacího pufru, byly jímány po 1,5 ml. Průtoková rychlost byla nastavena na 20 ml/hod.



3.10. Stanovení proteolytické aktivity pomocí kapkové metody

Pro vyšetřování proteolytické aktivity ve frakcích po purifikačních krocích byla použita kapková metoda na polyakrylamidovém gelu s kopolymerizovanou želatinou (K. Martínek - osobní sdělení).

3.10.1. Přístrojové vybavení

- Skla a příslušenství pro nalití gelu pro SDS-PAGE
- Třepačka
- Inkubátor
- pH metr
- Plastové kontejnery (20 × 20 × 2 cm)

3.10.2. Chemikálie

- Akrylamid
- Bis-akrylamide (N,N'-methylenebisacrylamide)
- Tris (2-hydroximethyl-2-methyl-1,3-propanediol)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylene-ethylenediamine)
- Persulfát amonný (APS)
- Coomasie modř R-250
- Kyselina chlorovodíková (HCl)
- n-Buthylalkohol
- Methanol
- Ledová kyselina octová
- Želatina (Sigma)
- Penicilin
- Streptomycin

3.10.3. Příprava gelu

Gel byl připraven smísením níže uvedených chemikálií, nalitím do soupravy pro přípravu gelů pro elektroforézu a převrstven nasyceným n-buthylalkoholem (viz kapitola 3.3.). Po polymeraci byl gel vyjmut, důkladně opláchnut destilovanou vodou a umístěn do plastového kontejneru spolu s navlhčenou buněčnou vatou. Před nanesením vzorku byl gel umístěn na 1 hodinu do termostatu (35 °C), aby došlo k vysušení povrchu gelu.



- 4,66 ml destilovaná voda
- 2,5 ml 500mM Tris-HCl (pH 7.0)
- 0,5 ml penicilin (1000 j/ml)
- 0,5 ml streptomycin (1000 j/ml)
- 1 ml želatina (2% w/v)
- 3,33 ml roztok A (viz SDS-PAGE)
- 50 µl APS
- 7,5 µl TEMED

3.10.4. Nanesení vzorků na gel, inkubace a vyhodnocení

Pomocí skleněné mřížkované šablony a pipety byly na gel nanесeny 1µl kapky vzorků, plastový kontejner byl uzavřen a utěsněn před vysycháním parafilmem. Gel byl inkubován při 35 °C přes noc, následně obarven pomocí Coomassie modří a odbarven (viz odstavec 3.3.). Přítomná proteolytická aktivita se projevila jako světlé skvrny na modrém pozadí.

3.11. Měření koncentrace proteinů podle M.M. Bradford

Koncentrace proteinů, především ve frakcích po chromatografii, byla měřena námi modifikovanou metodou v mikrotitračních destičkách podle M.M. Bradford (1976).

3.11.1. Přístrojové vybavení

- Spektrofotometr
- Jednorázové plastové kyvety, mikrotitrační destičky
- Malé zkumavky

3.11.2. Chemikálie

- Serva Blue G barva
- 1 mg/ml bovinní sérový albumin (BSA)
- 95% ethanol
- 85% kyselina fosforečná



3.11.3. Zásobní roztoky

Roztok A:

- 100 ml 95% ethanol
 - 200 ml 85% kyselina fosforečná
 - 350 mg Serva Blue G
- (uchováváno neomezeně při pokojové teplotě)

Pracovní roztok:

- 425 ml destilovaná voda
 - 15 ml 95% ethanol
 - 30 ml 85% kyselina fosforečná
 - 30 ml roztok A
- (skladováno v tmavé lahvi při pokojové teplotě, uchováváno po několik týdnů)

3.11.3. Provedení

Do zkumavky bylo napipetováno 100 μ l příslušně naředěného proteinu v používaném pufru a přidán 1 ml pracovního roztoku. V případě mikrotitrační destičky se jednalo o 20 μ l příslušně naředěného proteinu v používaném pufru a 200 μ l pracovního roztoku. Směs byla důkladně protřepána a inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Kalibrační řada (min. 4 vzorky) byla vytvořena ředěním BSA. Vzorky byly odečítány na spektrofotometru při vlnové délce 595 nm. Nejprve byla vytvořena kalibrační křivka (v měřitelném rozsahu lineární závislost) a poté odečítána koncentrace proteinu.

3.12. Štěpení BSA / kaseinu

Pro hrubou analýzu velikosti štěpných produktů byl zvolen elektroforeticky homogenní bovinní sérový albumin a kasein.

3.12.1. Přístrojové vybavení

- Termostat
- pH metr
- Zkumavky
- Mrazák



3.12.2. Chemikálie

- Bovinní sérový albumin (BSA)
- Kasein
- Tris (2-hydroximethyl-2-methyl-1,3-propanediol)
- Kyselina chlorovodíková (HCl)

3.12.3. Provedení

Substrát byl rozpuštěn ve 100mM Tris-HCl (pH 7,0) v koncentraci 1 mg/ml. Do zkumavky bylo napipetováno 1 ml pufovaného substrátu a přidáno 50 μ l testovaného vzorku. Směs byla inkubována při 35 °C. Během inkubace bylo odebíráno 50 μ l směsi a vzorek okamžitě zamražen. Vzorky (kontrola, směs bezprostředně po nanáše proteázy, směs po 1 hodině, 2 hodinách, 3 hodinách a 24 hodinách) byly vyšetřeny SDS-PAGE (viz kapitola 3.3.) a vyhodnoceny.

3.13. Sporulace *P. larvae*

3.13.1. Stanovení počtu termorezistentních spor

Termorezistence byla definována jako schopnost spory přežít zahřátí na 65°C po dobu 15 minut (Dingman a Stahly, 1983). Vzorky byly po zahřátí ochlazeny na pokojovou teplotu a po příslušném naředění destilovanou vodou (dle koncentrace vzorku) vyočkovány na plotnu MYPGP agar a kultivovány při 37 °C po dobu 5 dní.

Přístrojové vybavení

- Bürkerova komůrka (orientační stanovení CFU/ml)
- Mikroskop
- Termostat

3.13.2. Statistická analýza

Data získaná při srovnání počtu CFU na různých médiích byla srovnávána t-testem na hladině významnosti $p < 0,05$ (Reif, 2000).



3.14. Vyšetření základních biochemických vlastností proteáz spor

3.14.1. Test optimálních inkubačních podmínek při zymografii

Pro stanovení přibližné hodnoty pH optima byly proužky gelu inkubovány v pufrch o různém pH (Mueller a Fried, 1999).

Provedení

Gel byl po renaturaci rozřezán na stejně široké pruhy (šířka 1 cm) a inkubován v Petriho miskách s 20 ml pufru. Gely byly inkubovány při 35 °C přes noc.

Použité pufrы

- 50mM octan sodný, pH upraveno kyselinou octovou na hodnotu 3,5
- 100mM octan sodný, pH upraveno kyselinou octovou hodnotu 5
- 100mM Tris, pH upraveno kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 7
- 100mM Tris, pH upraveno kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 9
- 50mM glycin, pH upraveno hydroxidem sodným na hodnotu 10.

3.14.2. Inhibice

Test inhibice byl prováděn inkubací gelu v přítomnosti příslušného inhibitoru (North, 1997; Wolz, 1999). Inhibice byla zjišťována jako vizuální pokles intenzity pruhů.

Provedení

Při testování inhibičního vzoru probíhala renaturace v ledově vychlazeném renaturačním roztoku. Jednotlivé nařezané pruhy byly umístěny do zkumavek s obsahem 2 ml. Inhibitor byl přidán do pufru s největší patrnou aktivitou. Pufr byl nalit v množství 1 ml do zkumavky s gelem a inkubován 24 hodin při 37 °C. Nepostradatelnou při pokusu byla kontrola, tj. gel inkubovaný v pufru bez inhibitoru.

Inhibitor	Inhibovaná proteáza	Výsledná koncentrace
PMSF	Serinové (cysteinové)	1 mM
Leupeptin	Serinové (cysteinové)	0,1 mM
E64	Cysteinové	0,02 mM
Pepstatin	Aspartátové	0,1 mM
EDTA	Metaloproteázy	2mM
EGTA	Metaloproteázy	10 mM
1,10-phenantrolin	Metaloproteázy	2mM

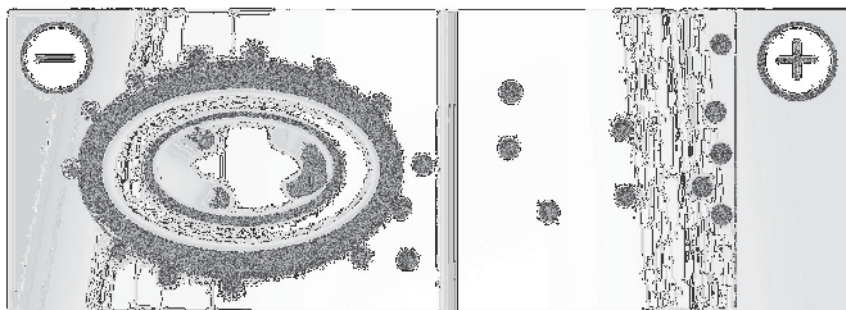
Tab. II. Použité inhibitory proteáz a jejich obvyklá koncentrace

3.14.3. Testování vlivu kovových iontů na metaloproteázy

Jako inhibitor byl použit 1,10-phenantrolin ve výsledné koncentraci v pufru 2 mM/l. Do takto připraveného pufru byl umístěn proužek gelu a přidána příslušná sůl v koncentraci 10 mM/l. Jednalo se o soli CaCl_2 , ZnSO_4 , CuSO_4 , MgCl_2 a $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin. V pokusu byla zavedena kontrola bez inhibitoru a kontrola s inhibitorem bez přídavku iontů (Mueller a Fried, 1999; Wolz, 1999).

3.15. Elektroeluce proteinů z povrchu spor

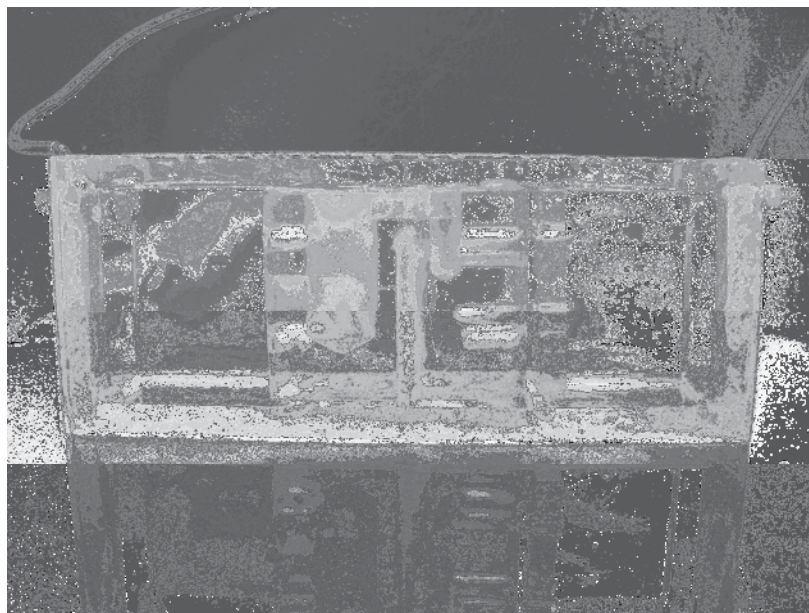
K extrakci povrchových proteinů pláště spory bylo použito elektroforetické zařízení zkonstruované pro tyto účely autorem dizertační práce.



Obr. 4. Princip elektroeluce. Spory fixovány pevným sítím (agarózový gel) od prostoru v němž dochází k hromadění eluovaných proteinů. Prostor je od anody oddělen celofánovou membránou. (Kresba: Eva Chudáčková)

3.15.1. Přístrojové vybavení

- Speciální elektroforetická vana (viz obr. 4 a 5)
- Zdroj stejnosměrného napětí 200 V, 20 mA



Obr. 5. Elektroforetická vana pro elektroeluci proteinů z pláště spory naplněná pufrem.

(Foto: E. Chudáčková)

3.15.2. Chemikálie

- Tris (2-hydroximethyl-2-methyl-1,3-propanediol)
- SDS (sodium dodecyl sulfate)
- Glycin
- Kyselina chlorovodíková (HCl)
- Agaróza

3.15.3. Zásobní roztoky

Elektroforetický pufr:

- 3 g Tris
- 14,4 g glycin
- 1 g SDS
- doplnit destilovanou vodou do 1 l.

(uchováváno v lednici při 4°C, používáno po několik měsíců)



Agaróza:

- 1,5% agaróza

3.15.4. Provedení

1 ml sporové suspenze s koncentrací 10^8 CFU/ml byl napipetován do příslušné jamky v elektroforetické vaně naplněné elektroforetickým pufrém. Následně byl zapnut proudový zdroj a napětí nastaveno na hodnotu 200 V. Elektroeluce probíhala 4 hodiny. Během elektroeluce docházelo k ubývání pufru v komůrce eluátu, proto byl do ní elektroforetický pufr průběžně doplňován.

3.16. Extrakce proteinového pláště spory chemickou cestou

Pro účely této studie byla použita technika popsaná C.S. Hayesem a P. Setlowem (1997).

3.16.1. Přístrojové vybavení

- Centrifuga
- Termostat 37 °C
- Dialyzační střevo

3.16.2. Chemikálie

- Tris (2-hydroximethyl-2-methyl-1,3-propanediol)
- SDS (sodium dodecyl sulfate)
- Močovina
- Dithiothreitol (DTT)
- EDTA
- Kyselina chlorovodíková (HCl)

3.16.3. Zásobní roztoky

Extrakční pufr:

- 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 1% SDS
- 8 M močovina
- 50 mM DTT



- 10 mM EDTA
(pufr uchováván neomezeně při -20°C)

Dialyzační pufr:

- 100 mM Tris-HCl, pH 7,5

3.16.4. Provedení

1 ml sporové suspenze s koncentrací 10^8 CFU/ml byl umístěn do zkumavky a centrifugován při 15 000 g, 10 minut. Supernatant byl odstraněn a k peletě přidáno 0,5 ml extrakčního pufru. Spory byly v pufru roztřepány a inkubovány 90 min při 37 °C. Po následné centrifugaci byl oddělen supernatant od peletety. Spory zbavené pláště byly uchovávány při -20 °C. Supernatant byl dialyzován proti dialyzačnímu pufru 24 hod s trojnásobnou výměnou pufru. Vzorek byl pro další zpracování uchováván při -20°C.

3.17. Infekční pokus *in vitro* podle E. Genersch a kol. (2006)

K infekčnímu pokusu byla použita metodika podle Y.S.C. Penga a kol. (1992) modifikovaná E. Genersch a kol. (2006).

3.17.1. Přístrojové vybavení

- Termostat 35°C
- Mikrotitrační destička s plochým dnem
- Stereoskopický mikroskop
- Přelarovací lžička

3.17.2. Chemikálie a suroviny

- Fruktóza
- Glukóza
- Včelí mateří kašička

3.17.3. Krmná směs

- 66 % včelí mateří kašička (v/v)
- 3 % glukóza (w/v)
- 3 % fruktóza (w/v)



3.17.4. Provedení

Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo pipetováno 50 μl krmné směsi a přidán 1 μl inokula tak, aby výsledná koncentrace byla 1×10^5 CFU/ml. Následně byly do jamky přeneseny pomocí přelarovací lžičky larvičky včely medonosné (*Apis mellifera*) stáří cca 12 – 36 hod. Mikrotitrační destička byla inkubována v termostatu při 35 °C s 95% relativní vlhkostí. Druhý, čtvrtý a šestý den byly larvy přeneseny do mikrotitrační destičky s čerstvou krmnou směsí. Každý den byly sledovány změny na larvách pomocí stereoskopického mikroskopu. Úhyn larev byl detekován jako ztráta článkování, nebo ustání pohybů larvy, nebo jako změna barvy z perleťově bílé na hnědou. Každý pokus čítal 5 larev negativní kontroly – ke krmné směsi přidán pouze 1 μl destilované vody, 5 larev pozitivní kontroly – ke krmné směsi přidán 1 μl inokula získaného z příškvary a 20 larev testované skupiny – ke krmné směsi přidán 1 μl inokula vegetativních forem, resp. spor zbavených pláště.

3.18. Infekční pokus v pokusném včelstvu I.

Pro simulaci co nejbližších podmínek ve včelstvu byl zkonstruován laboratorní úl na jeden rámeček rámkové míry 39×24 cm s prosklenými stěnami, který umožňoval sterilizaci horkým vzduchem (viz obr. 6).

3.18.1. Přístrojové vybavení

- Prosklený laboratorní úl na jeden rámeček rámkové míry 39×24 cm



Obr. 6. Laboratorní úl na jeden rámeček rámkové míry 39×24 cm.



3.18.2. Suroviny

- Med květový
- Fermentovaný pyl

3.18.3. Provedení

Rámek s larvičkami stáří 12-36 hodin byl vyjmut ze včelstva a rozdělen drátěnou mřížkou na sektory po 50ti buňkách. Do každé buňky v pokusném sektoru byl přidán 1 μ l inokula v koncentraci 1×10^7 CFU/ml, resp. 1 μ l destilované vody jako kontrola. Rámek byl následně umístěn do pokusného úlu a bylo k němu přidáno cca 1000 včel s matkou. Včely byly krmeny pomocí krmítka květovým medem a fermentovaným pylem. Progrese onemocnění/vynášení larev byla sledována denně přes skleněné stěny úlu, které byly jinak kryty polystyrénovými deskami. Infikované larvy po skončení pokusu byly mikroskopicky a kultivačně vyšetřovány na přítomnost *P. larvae*. Pokusný úl byl po proběhlém pokusu 3 \times v 24 hodinových intervalech sterilizován horkým vzduchem (180 °C, 2 hod), skla autoklávováním (121 °C, 20 min), včely utraceny a spáleny.

3.19. Infekční pokus v pokusném včelstvu II.

Pro simulaci co nejbližších podmínek ve včelstvu byl zkonstruován laboratorní úl velikosti 10 \times 14 \times 12 cm prosklenými stěnami, který umožnil sterilizaci horkým vzduchem (viz obr. 7).

3.19.1. Přístrojové vybavení

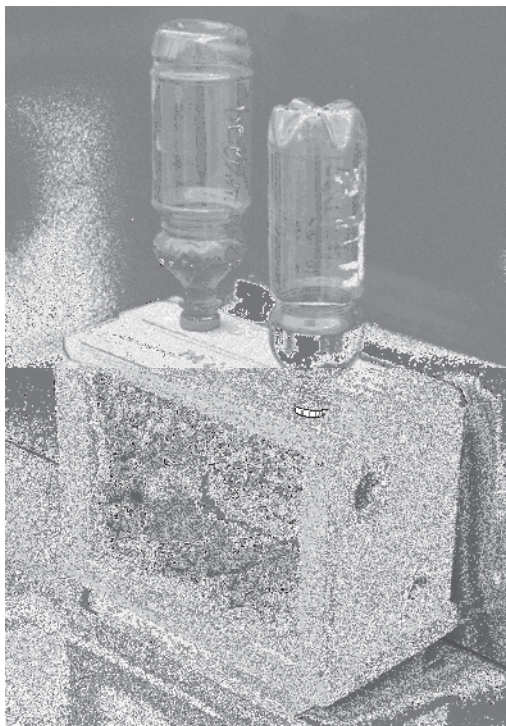
- Prosklený laboratorní úl
- Včelařský kuřák
- Dřevěná krabice pro narkotizaci včel
- Lednice

3.19.2. Chemikálie a suroviny

- Dusičnan amonný
- Med květový
- Fermentovaný pyl

3.19.3. Provedení

Přibližně 500 včel bylo smeteno do vhodné dřevěné krabice se zasítovanými otvory (tzv. roják). Do rozpáleného včelařského kuřáku byl přidán dusičnan amonný. Vznikající oxid dusný byl použit k narkotizaci včel v rojáku. Narkotizované včely byly umístěny do pokusného úlu a vpuštěna včelí matka. Následně bylo nasazeno krmítko a úl umístěn na 12 hodin do lednice s teplotou 10 °C.



Obr. 7. Laboratorní úl na 2 včelstva osazený včelami a s nasazenými krmítky

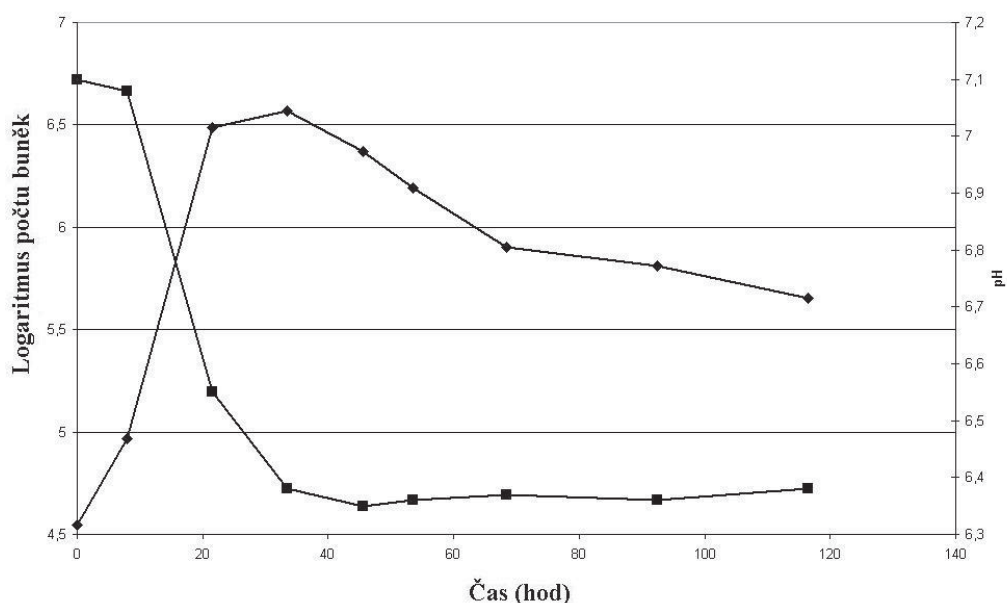
Po této době byl úl vyjmut a ponechán při pokojové teplotě. Včely byly krmeny medem s koncentrací testovaného mikroorganismu 1×10^5 CFU/ml a fermentovaným pylem. Po vystavění a zaklazení plástů matkou byla denně sledována progrese onemocnění prosklenými stěnami. Infikované larvy byly po skončení pokusu mikroskopicky a kultivačně vyšetřeny na přítomnost *P. larvae*. Po skončeném pokusu byly včely utraceny a spáleny. Pokusný úl byl 3× v 24 hodinových intervalech sterilizován horkým vzduchem (180 °C, 2 hod), skla autoklávováním (121 °C, 20 min).

3. Výsledky

4.1. Kultivace v MYPGP bujónu

K pokusu byl použit izolát bakterie *P. larvae* BRD 205 01, jako standardní zástupce druhu *P. larvae* z hlediska biochemických a patogenetických vlastností.

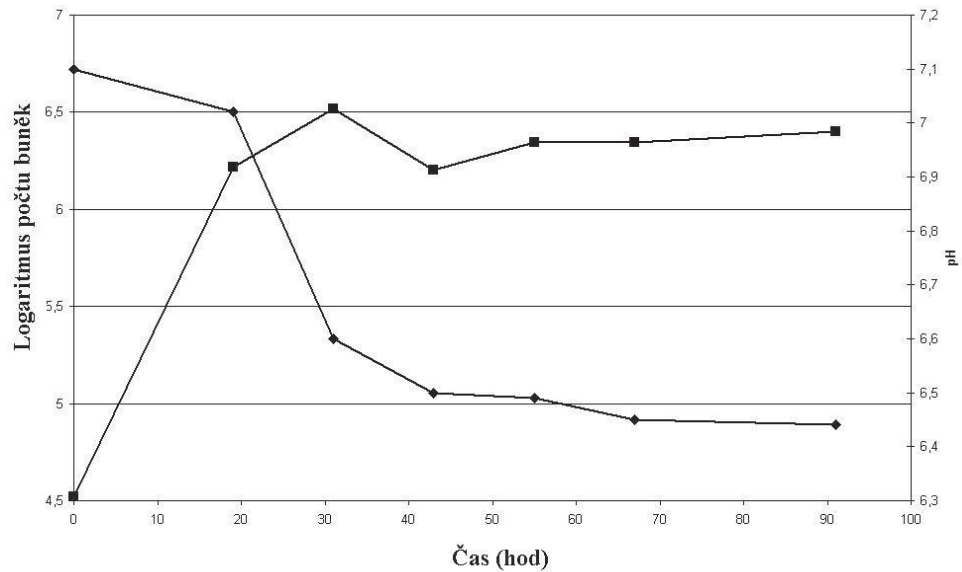
Charakteristická růstová křivka bakterie *P. larvae* v MYPGP médiu je znázorněna na obrázku 8. K maximálnímu nárůstu docházelo po dvaceti hodinové kultivace při optimálních kultivačních podmínkách (35 °C). V té době se nacházelo v médiu 4×10^6 CFU/ml. Plato bylo pozorováno po dobu deseti hodin. Po něm docházelo k lýze kultury. Tento úbytek buněk byl doprovázen poklesem pH pod hodnotu 6,4.



Obr. 8. Růstová křivka *P. larvae* (BRD 205 01) v MYPGP médiu

Růstovou křivku v pufrovaném MYPGP médiu znázorňuje obrázek 9. Až do stacionární fáze se růst shodoval s růstem v klasickém MYPGP médiu, avšak poté nedocházelo k lýze kultury. Rovněž pH zůstalo nad hodnotou 6,4.

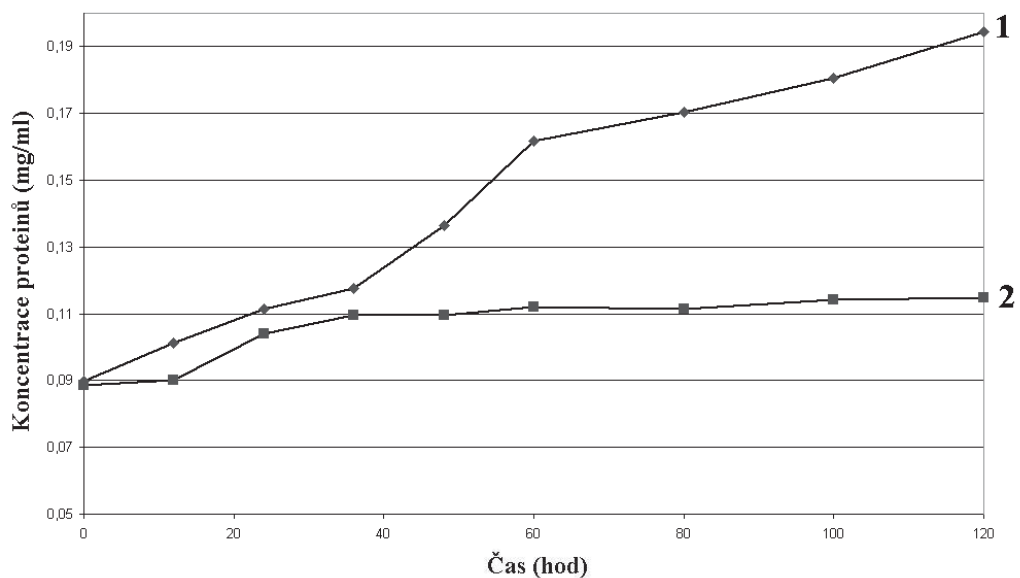
V žádném z obou médií nebyly detekovány spory ani sporangia.



Obr. 9. Růstová křivka *P. larvae* (BRD 205 01) v pufovaném MYPGP médiu

4.1.1. Sekretované proteiny v MYPGP médiu

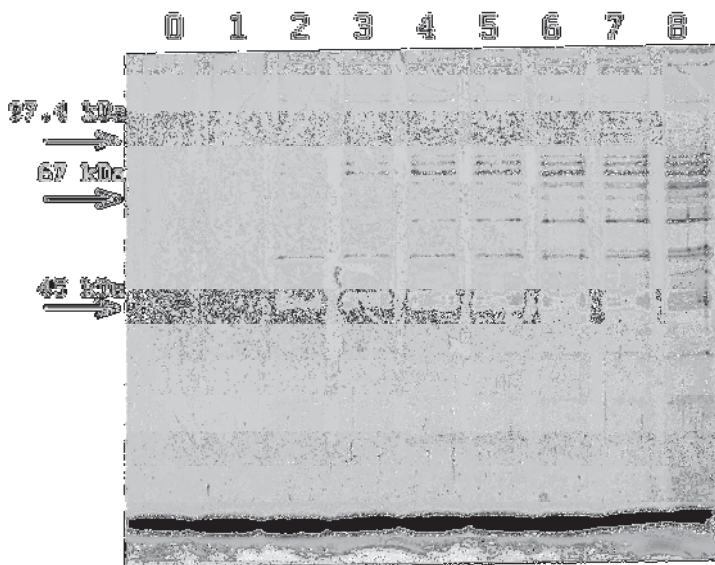
Na křivce znázorňující koncentraci proteinů v médiu měřené podle M.M. Bradford (viz kapitola 3.11.) (viz obr. 10) je zcela jasně patrný nárůst koncentrace proteinů v klasickém MYPGP médiu v době, kdy došlo k lýze buněk (inflexní bod). V případě pufovaného MYPGP média se po skončené exponenciální fázi koncentrace proteinů ustálila na konstantní hodnotě.



Obr. 10. Koncentrace proteinů v nepufovaném (1) a pufovaném (2) MYPGP médiu s nárůstem *P. larvae* (BRD 205 01).

Při SDS-PAGE analýze (metodika viz 3.2.) bylo možné první sekretované proteiny v MYPGP médiu detekovat po dvaceti hodinách kultivace (viz obr. 11). Intenzita pruhů v případě pufrovaného MYPGP média zcela kopírovala koncentraci proteinů v médiu, přičemž profil byl shodný s klasickým MYPGP médiem.

Ve vzorcích lyzující kultury bylo možné zjistit výskyt dalších proteinů s vysokou molekulovou hmotností (obr. 11, dráhy 6-8)



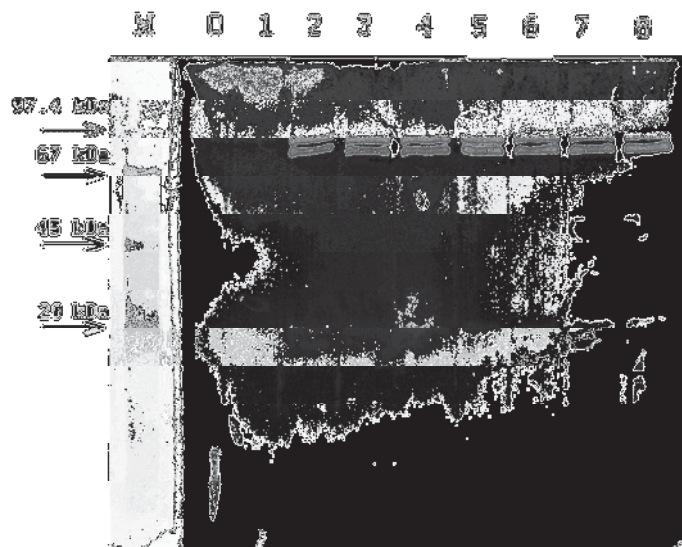
Obr. 11. SDS-PAGE analýza sekretovaných proteinů *P. larvae* (BRD 205 01) do MYPGP média. 10% polyakralamidový gel. Šipky s hodnotami ukazují molekulovou hmotnost dle standardu molekulových hmotností (není na gelu). Čísla jednotlivých drah korespondují s časem odběru vzorku s periodou 12 hodin (čas odběru = číslo dráhy × 12 hodin)

4.1.2. Sekretované proteázy v MYPGP médiu

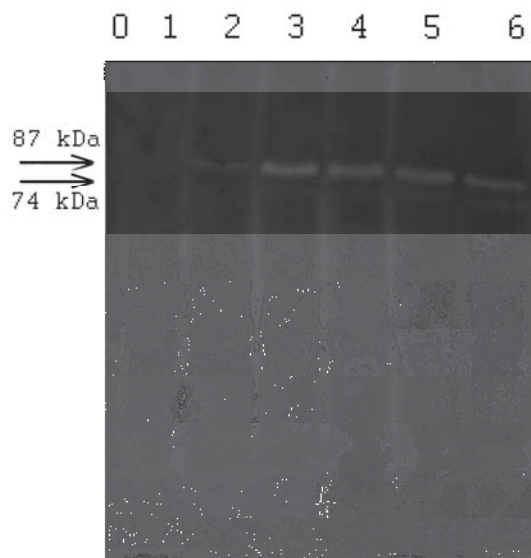
Proteolytická aktivita zjišťovaná pomocí zymografie (viz kapitola 3.3.) s inkubací gelu ve 100 mM Tris-HCl pufru (pH 7,5) byla patrná již ve vzorcích média několik hodin po začátku kultivace (viz obr. 12). Nejprve se v médiu objevily proteázy v oblasti 87 a 74 kDa, které byly zjištělné i ve 120ti hodinové kultuře. Se zvyšující se dobou kultivace byl na zymogramu zaznamenán pokles aktivity 87 kDa proteázy a naopak nárůst aktivity proteázy 74kDa. Po 100 hodinách se začaly objevovat proteázy v oblasti 40 a 42 kDa.

Profil proteáz v pufrovaném médiu byl shodný s profilem v nepufrovaném médiu. Intenzita jednotlivých pruhů korespondovala s růstovou křivkou mikroba (viz obr. 13). 87kDa proteáza se v médiu objevila již po 12ti hodinách kultivace, avšak 74 kDa až po 55

hodinách. Proteolytická aktivita v oblasti 40 a 42 kDa byla pomocí zymografie těžko prokazatelná.



Obr. 12. Proteolytická aktivita *P. larvae* (BRD 205 01) v MYPGP médiu. 10% polyakrylamidový gel s 0,2 % želatiny. Čísla jednotlivých drah korespondují s časem odběru vzorku s periodou 12 hodin (čas odběru = číslo dráhy × 12 hodin), M – dráha se standardem molekulových hmotností.



Obr. 13. Proteolytická aktivita *P. larvae* (BRD 205 01) v pufrovaném MYPGP médiu. 10% polyakrylamidový gel s 0,2 % želatiny. Čísla jednotlivých drah korespondují s časem odběru vzorku s periodou 12 hodin (čas odběru = číslo dráhy × 12 hodin).

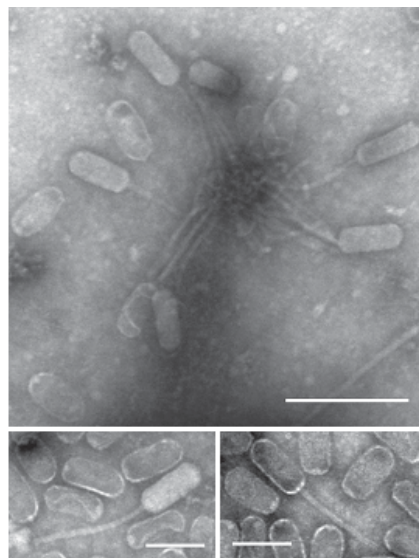
4.1.3. Lytická aktivita vzorků kultury *P. larvae*

Lytická aktivita všech vzorků odebraných z kultur *P. larvae* (BRD 205 01) v nepufrovaném a pufrovaném MYPGP médiu byla vyšetřena tak, jak je popsáno v odstavci 3.4. Vzhledem k tomu, že k lýze kultury docházelo při poklesu pH pod hodnotu 6,4, byl pro pokus zvolen fosfátový pufr (2,38% K_2HPO_4 , 0,88% Na_2HPO_4 , pH 6,0). Během pokusu nedošlo u žádného ze vzorků k poklesu absorbance, tudíž nebyla zaznamenána lýza buněk zástupců gram-negativních a gram-positivních bakterií, ani lýza téhož kmene *P. larvae* – BRD 205 01.

4.1.4. Elektron-mikroskopické vyšetření vzorků

Všechny vzorky odebrané během kultivace *P. larvae* v nepufrovaném a pufrovaném MYPGP médiu byly použity k přímému elektron-mikroskopickému vyšetření, tak jak je popsáno v odstavci 3.5.

Ve vzorcích lyzující kultury byly nalezeny fágové částice charakteristické morfologie – s baciliformní hlavičkou a flexibilním ocáskem (viz obr. 14). Na základě morfologických vlastností byl bakteriofág identifikován jako BLA (Drobníková a Ludvík, 1982), resp. PBL1 (Dingman a kol., 1984).

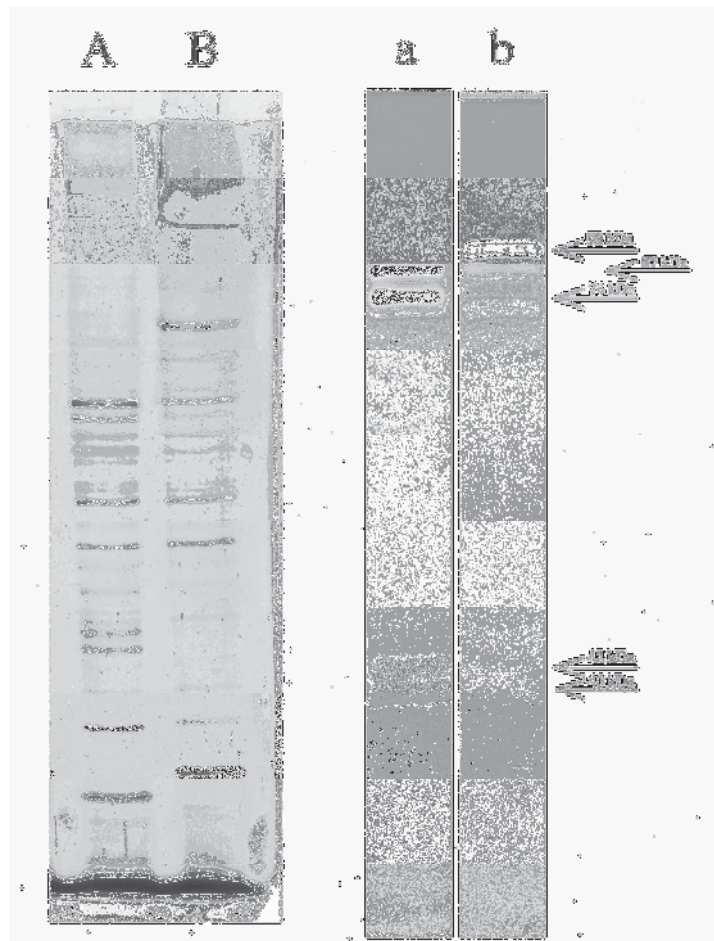


Obr. 14. Negativně obarvené partikule bakteriofága BLA v lyzující kultuře *P. larvae* v nepufrovaném MYPGP médiu. A – intaktní bakteriofágy a částice bez DNA tvořící typickou strukturu „flower-like“. B – detail intaktní virové částice. C – detail částice neobsahující DNA. Měřítka – obr. A 200 nm, obr. B a C 100 nm. (Foto: O. Benada)

Ve vzorcích se vyskytovaly dvě různé formy bakteriofágů – intaktní partikule (obr. 14B) a partikule neobsahující DNA (obr. 14C). Počet partikulí neobsahujících DNA několika násobně převyšoval počet intaktních částic. Hlavička intaktních fágových partikulí byla velká v průměru 110×40 nm. Hlavička bakteriofágů neobsahujících DNA měla velikost v průměru 100×55 nm. Ocásek byl u obou forem průměrně 170 nm dlouhý a jeho průměr činil 8 nm.

4.2. Srovnání proteolytické aktivity sekretovaných produktů u různých kmenů *P. larvae*

Na obrázku 15 jsou znázorněny profily sekrečních produktů zjištěné pomocí SDS-PAGE (10% polyakrylamidový gel) a pomocí zymografie (10% polyakrylamidový gel + 0,2% želatina).



Obr. 15. Profily sekrečních produktů po 6ti denní kultivaci *P. larvae* v MYPGP médiu. Velká písmena – SDS-PAGE (10% polyakrylamidový gel), malá písmena – zymografie (10% polyakrylamidový gel + 0,2% želatina).



U některých izolátů *P. larvae* byla zaregistrována rovněž proteolytická aktivita v oblasti 98 kDa.

Z analýzy SDS-PAGE lze zjistit odlišnosti mezi některými proteiny s malou molekulovou hmotností (10-30 kDa) a v oblasti mezi 60 – 100 kDa.

V tabulce III. jsou uvedeny kombinace jednotlivých sekrečních profilů pro různé izoláty *P. larvae*.

Číslo izolátu	Proteiny	Proteázy	Číslo izolátu	Proteiny	Proteázy
BRD 205 01	A	A	BRD 205 20	A	b
BRD 205 02	A	A	BRD 205 21	B	b
BRD 205 04	A	A	BRD 205 22	A	b
BRD 205 06	A	A	BRD 205 23	A	a
BRD 205 07	A	A	BRD 205 24	A	a
BRD 205 08	B	B	BRD 205 25	A	a
BRD 205 10	A	B	BRD 205 26	A	a
BRD 205 11	B	B	BRD 205 27	A	a
BRD 205 12	B	B	BRD 205 28	A	a
BRD 205 13	B	B	BRD 205 29	A	a
BRD 205 14	A	A	BRD 205 31	B	b
BRD 205 15	A	A	BRD 205 33	B	b
BRD 205 16	B	B	BRD 205 34	A	b
BRD 205 17	A	B	BRD 205 35	B	a
BRD 205 18	B	B	BRD 205 36	A	b
BRD 205 19	B	B			

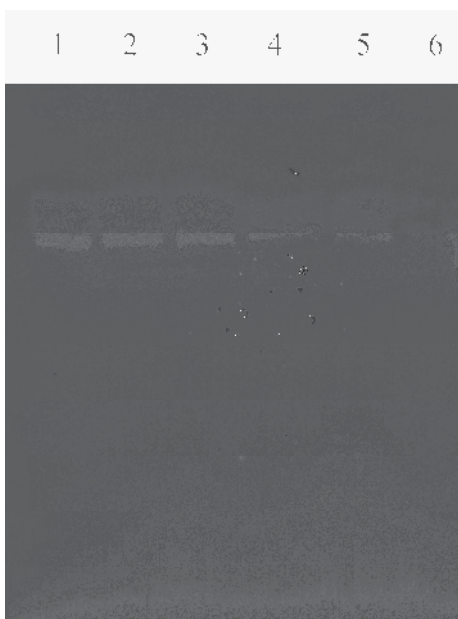
Tab III. Profily sekrečních produktů *P. larvae* kultivovaného v MYPGP médiu po dobu 6 dní. Analyzováno zymografií a SDS-PAGE. Jednotlivé profily označené písmeny jsou zobrazeny na obr. 15.

Z tabulky III. vyplývají rovněž četnosti různých kombinací. Kombinace Aa se vyskytuje u celkem 14ti izolátů a je tedy nejčetnější. Kombinace Ab se vyskytuje u pěti, kombinace Ba u žádného a kombinace Bb u deseti izolátů.

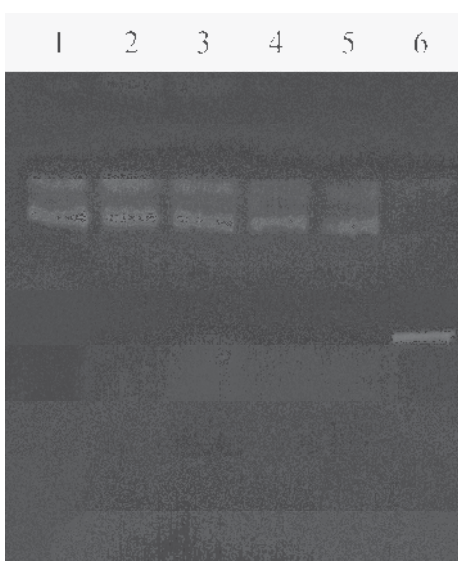
4.3. Stabilita sekretovaných proteáz

Teplotní stabilitu proteáz zjišťovanou metodikou popsanou v odstavci 3.6 ukazuje obrázek 16. Z něj je patrné, že aktivita proteáz zůstala takřka beze změny až do 60 °C. Poté došlo k poklesu aktivity. Při 90 °C byla již aktivita patrná slabě, ale je zřejmé, že určitá část enzymu zůstala stále aktivní.

Časová stabilita při pokojové teplotě je dokumentována obrázkem 17. Proteázy zůstaly stabilní po minimálně 3 dny bez zymograficky detekovatelné ztráty aktivity. Značná část aktivity 87, 74 kDa proteáz zůstala zachována i po osmi dnech. Po 14ti dnech došlo ke ztrátě aktivity těchto vysokomolekulárních proteáz, a naopak se objevila aktivní proteáza v oblasti 56 kDa.

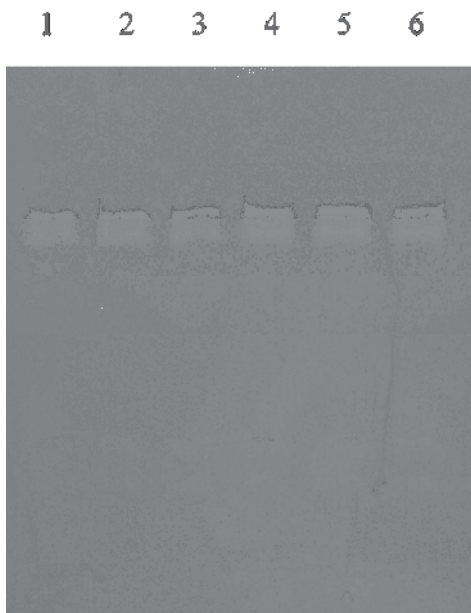


Obr. 16. Teplotní stabilita proteáz zjišťovaná zymografií - 10% polyakrylamidový gel s 0,2 % želatiny. 1 – vzorek bez expozice, 2 – vzorek zahřátý na 50 °C, 3 – vzorek zahřátý na 60 °C, 4 – vzorek zahřátý na 70 °C, 5 – vzorek zahřátý na 80 °C, 6 – vzorek zahřátý na 90 °C.

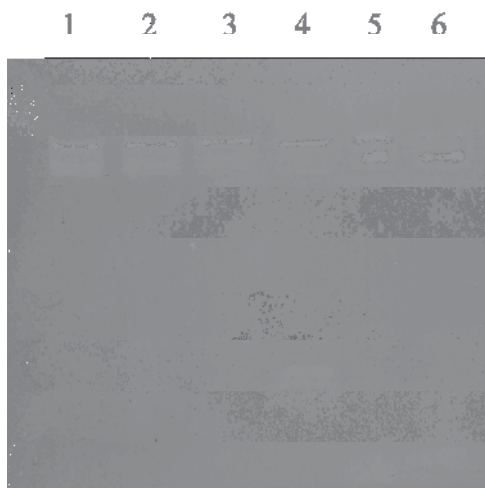


Obr. 17. Stabilita proteáz v čase při pokojové teplotě. 1 – 0 dnů, 2 – 1 den, 3 – 2 dny, 4 – 4 dny, 5 – 8 dnů, 6 – 14 dnů. Zymografie - 10% polyakrylamidový gel s 0,2 % želatiny.

Při 4 °C zůstaly proteázy bez patrné ztráty aktivity i po čtrnáctém dnu inkubace (viz obr. 18). Při teplotě 35 °C došlo k poklesu proteolytické aktivity již druhý den. Čtrnáctý den byla při zymografii stále patrná aktivita 87/74kDa proteáz. Aktivita v oblasti 56 kDa nebyla při této teplotě zjištěna (obr. 19).



Obr. 18. Stabilita proteáz při 4 °C. 1 – 0 dnů, 2 – 1 den, 3 – 2 dny, 4 – 4 dny, 5 – 8 dnů, 6 – 14 dnů. Zymografie - 10% polyakrylamidový gel s 0,2 % želatiny.

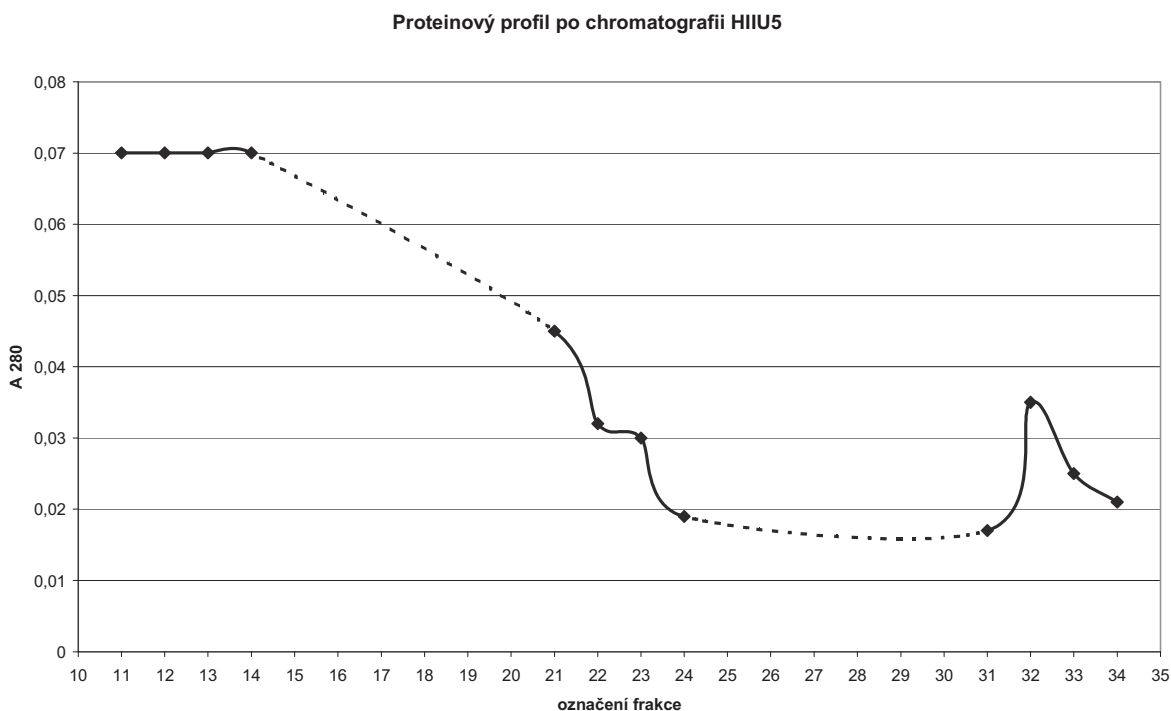


Obr. 19. Stabilita proteáz při 35 °C. 1 – 0 dnů, 2 – 1 den, 3 – 2 dny, 4 – 4 dny, 5 – 8 dnů, 6 – 14 dnů. Zymografie - 10% polyakrylamidový gel s 0,2 % želatiny.

4.4. Purifikační postupy pro izolaci sekretovaných proteáz *P. larvae*

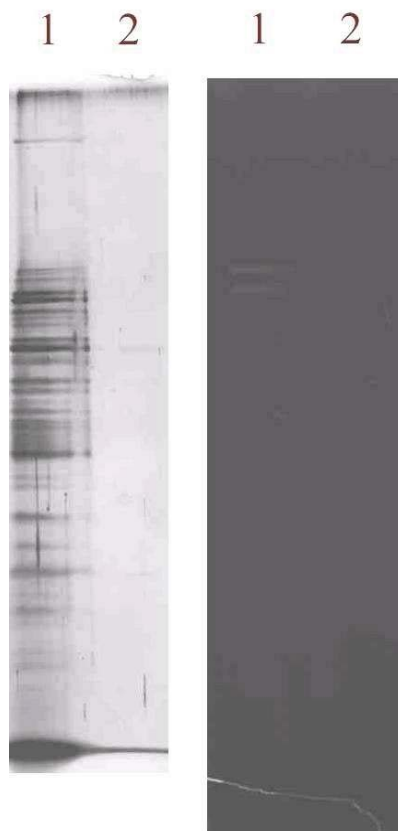
4.4.1. Afinitní chromatografie

Proteinový profil po chromatografii na afinitním nosiči (bis-carboxymethyl amino agaróza – viz 3.9.) zobrazuje obr. 20. Z tohoto grafu je zřejmé, že došlo k navázání proteinů na připravený afinitní nosič. Při eluci pufrů o pH 6,5 a 4,5 docházelo ještě k vymývání nespecificky navázaných proteinů. Proteolytická aktivita je na zymogramu slabě patrná ve frakci s označením 32, tj. jedná se o pufr s přidavkem 0,05M EDTA.



Obr. 20. Proteinový profil po afinitní chromatografii (bis-carboxymethyl amino agaróza). Označení frakcí: Ab – A číslo elučního pufru (1-3), b číslo frakce eluované tímtož pufrém (1-3 frakce od každého pufru).

Obrázek 21 ukazuje analýzu vstupních a výstupních vzorků po afinitní chromatografii. Dráha 1 obsahuje analýzu nanášky na afinitní kolonu (vzorek převedený do vhodného pufru přes Sephadex G-50). Dráha 2 analýzu frakce č. 32, která byla zahuštěna pomocí ultrafiltru 10×. Z analýz je patrné, že během purifikačního procesu došlo k významné ztrátě aktivity proteázy. Při analýze proteinů lze zaznamenat, kromě dominantního proužku v oblasti cca 75 kDa (může představovat proteázu), další pruhy v oblasti od cca 60 do 70 kDa a v oblasti malých molekul (do cca 20 kDa).



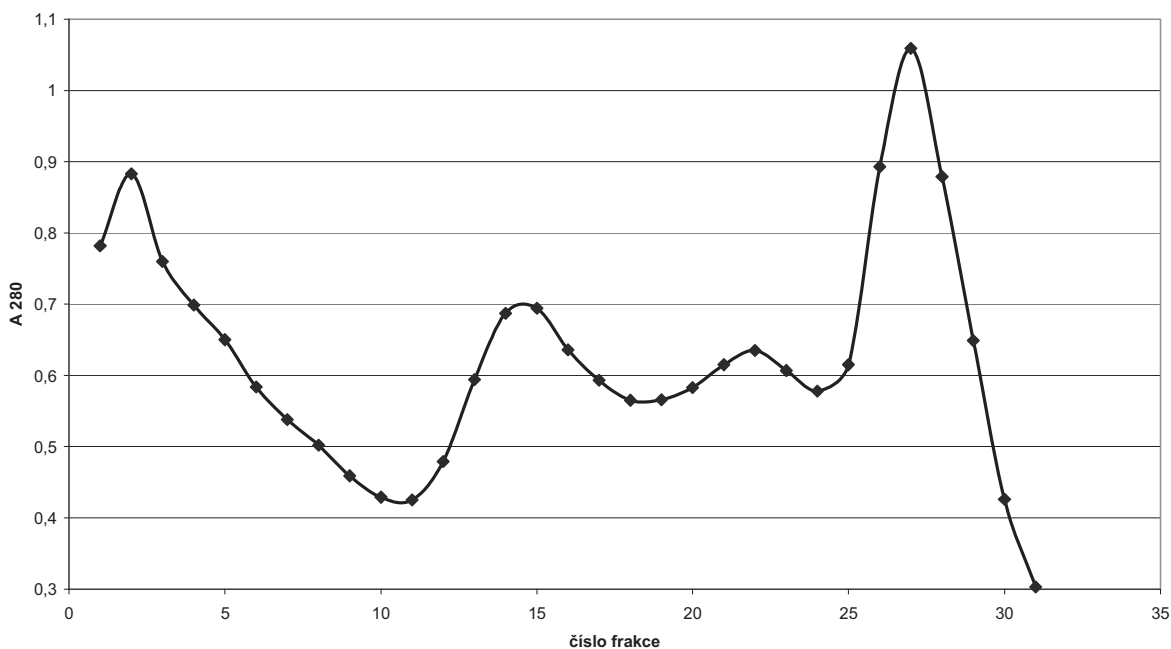
Obr. 21. Analýza vstupních (1) a výstupních (2) vzorků afinitní chromatografie. Pruh vlevo – SDS-PAGE analýza (10% polyakrylamidový gel), vpravo – zymografie (10% polyakrylamidový gel + 0,2% želatína).

4.4.2. Purifikace na DEAE celulóze s předchozí inkubací nanášeného vzorku při pokojové teplotě

Proteinový profil výchozího vzorku je stejný jako na obr. 21 (1). Po odstranění buněk z média byl výchozí materiál pro purifikaci inkubován 24 hod. při pokojové teplotě. Po této době nebyly ve vzorku detekovány takřka žádné proteiny (SDS-PAGE při detekci proteinů stříbrem), avšak aktivita proteáz zůstala zachována. Purifikované proteázy nebyly ve vzorku při SDS-PAGE analýze reprezentovány žádným pruhem (detekce stříbrem). V čele elektroforézy byl patrný silný pruh nízkomolekulárních složek. Po jejich odstranění na SEPHADEXu G-200 (jímány pouze 2 frakce – nízko- a vysokomolekulární složky – viz kapitola 3.7.) byl tento vzorek nanesen na kolonu DEAE celulózy (kapitola 3.8.).

Profil koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích je znázorněn na obr. 22. Z tohoto grafu je patrné, že chromatografie proběhla za optimálních podmínek a ve frakcích se nacházely relativně vysoké koncentrace proteinů.

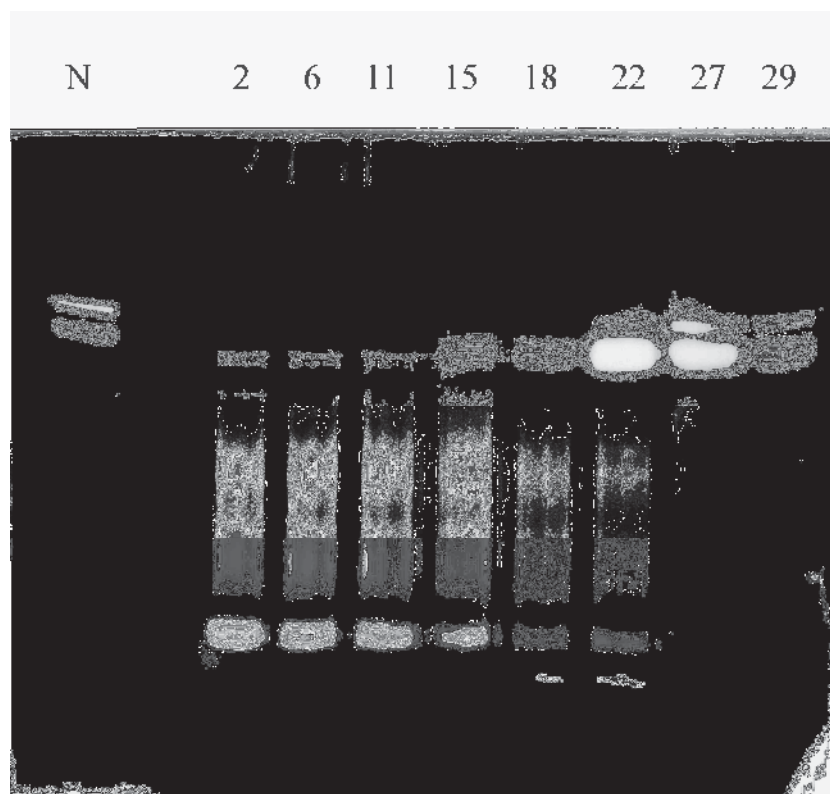
Profil proteinů po chromatografii H11L2



Obr. 22. Proteinový profil po chromatografii na DEAE celulóze. Nanášený vzorek byl inkubován 24 hod. při pokojové teplotě s následným odstraněním nízkomolekulárních složek na koloně SEPHADEXu G-200

Analýza vybraných frakcí zymografií (viz obr. 23) potvrdila úspěšnost chromatografie. Podařilo se oddělit jak proteázy oblasti 87-74 kDa, tak proteázy v oblasti 42 a 40 kDa. Aktivita reprezentovaná proteolytickým pruhem na zymografickém gelu potvrzuje rovněž zahuštění vzorku během chromatografie. K významnému zahuštění dochází především u proteáz 42,40 kDa, které byly v nanášeném vzorku při zymografii pouze slabě patrné. Tyto proteázy však nejsou, na rozdíl od proteáz 87,74 kDa, reprezentovány žádným lokálním maximem v profilu koncentrace proteinů jednotlivých frakcí (viz obr. 22).

I přesto, že profil koncentrace proteinů jednotlivých chromatografických frakcí naznačil jejich velkou koncentraci, SDS-PAGE analýza potvrdila pouze přítomnost jediného pruhu, který je v hledané oblasti 74 kDa (viz obr. 24).



Obr. 23. Analýza frakcí po chromatografii na DEAE celulóze (10% polyakrylamidový gel + 0,2% želatina). Nad dráhou je označeno číslo frakce, N – vzorek nanášený na kolonu s DEAE celulózou.



Obr. 24. SDS-PAGE analýza frakce č. 22 (10% polyakrylamidový gel). Viditelný protein se nachází v oblasti 74 kDa.



4.5. Štěpení BSA/kaseinu

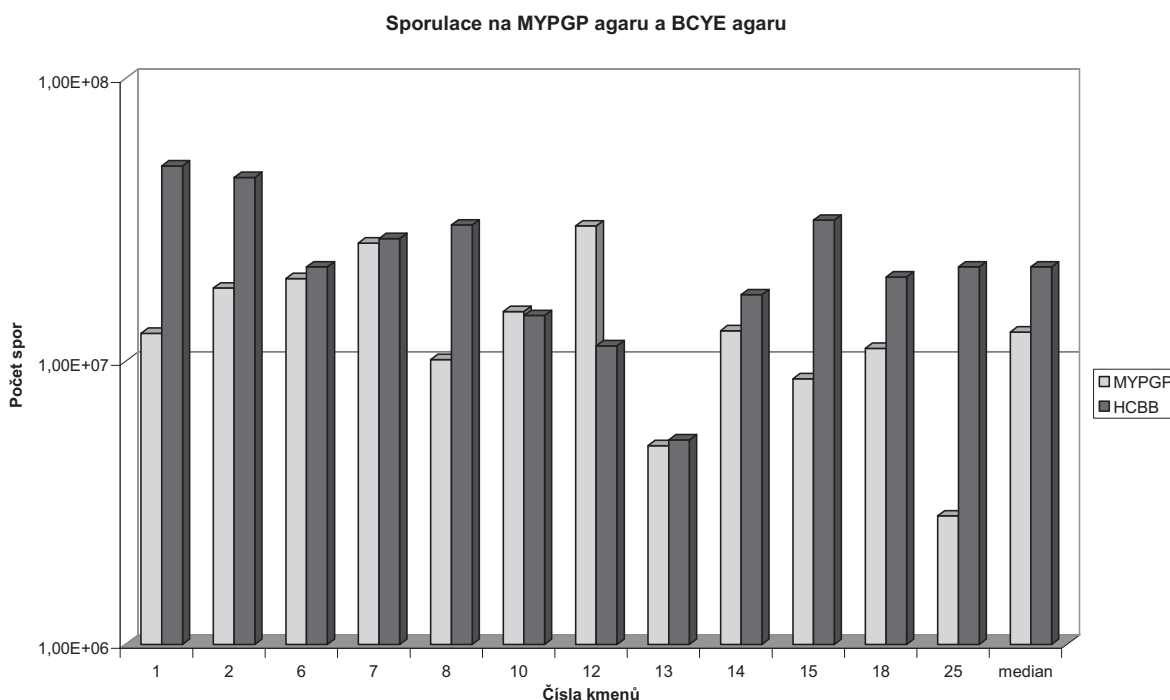
Při analýze štěpení BSA (viz 3.12.) neštěpila purifikovaná 74 kDa proteáza ani 42kDa proteáza bovinní sérový albumin na fragmenty detekovatelné při SDS-PAGE analýze mezi čelem elektroforézy a pruhem BSA. Bylo možné však zaregistrovat zvyšování intenzity pruhu nízkomolekulárních složek v čele elektroforézy. Spektrofotometrické měření neprokázalo žádné změny reagujícího vzorku.

Ani jeden z testovaných druhů kaseinu (celkem 3 druhy od různých firem) nebyl testovanými vzorky štěpen.

4.6. Sporulace na MYPGP a HCBB agaru

Při použití složky Mueller-Hintonova bujónu od firmy HiMedia v MYPGP agaru nebyla na něm zaznamenána sporulace u žádného z kmenů. Při nahrazení této složky produktem firmy Difco již k částečné sporulaci docházelo.

Porovnání sporulace na MYPGP a HCBB agaru ukazuje obrázek 25.



Obr. 25. Srovnání sporulace na HCBB a MYPGP agaru (Mueller-Hinton bujón od firmy Difco). Hodnoty z plochy 5 cm². Číslo kmenů uváděna ve formátu BRD 205 xx.

Statistická analýza jednoznačně prokázala ($p < 0,05$), že sporulace na HCBB agaru je lepší než na agaru MYPGP. Medián hodnot pro HCBB médium činil $4,2 \times 10^6$ spor/cm²



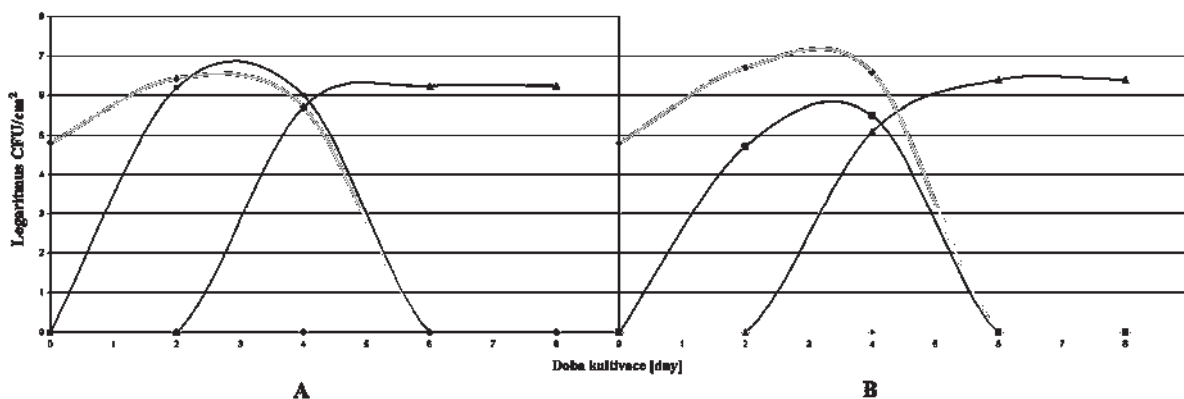
(přepočteno na plochu agaru) ($\sigma_x = 7,71 \times 10^5$) a pro MYPGP médium $2,5 \times 10^6$ spor/cm² ($\sigma_x = 1,23 \times 10^5$).

Dále byl srovnáván vliv kultivačních podmínek, tj. sporulace v aerobní atmosféře a atmosféře s 10 % CO₂. Výsledky pro jednotlivé kmeny ukazuje tabulka IV. V aerobních podmínkách bylo získáno průměrně $7,78 \times 10^6$ CFU/cm² ($\sigma_x = 1,10 \times 10^6$, medián = $4,20 \times 10^6$), zatímco v atmosféře s 10 % CO₂ $6,81 \times 10^6$ CFU/cm² ($\sigma_x = 7,78 \times 10^6$, medián = $5,65 \times 10^6$). Rozdíl mezi těmito hodnotami je statisticky neprůkazný na zvolené hladině významnosti $p < 0,05$.

Číslo kmene	Počet spor [CFU/cm ²]			
	Celkový počet		Počet termorez. Spor	
	AE	CO ₂	AE	CO ₂
BRD20501	1,28×10 ⁵	4,80×10 ⁵	1,36×10 ⁴	1,34×10 ⁴
BRD20502	8,00×10 ⁵	1,02×10 ⁶	1,32×10 ⁴	3,82×10 ⁴
BRD20506	3,20×10 ⁵	1,46×10 ⁶	2,02×10 ⁴	4,20×10 ⁴
BRD20507	3,80×10 ⁴	1,00×10 ⁵	3,00×10 ³	8,20×10 ³
FMP20508	9,60×10 ⁴	1,94×10 ⁶	2,40×10 ³	3,10×10 ⁴
FMP20510	6,70×10 ⁴	8,54×10 ⁴	3,08×10 ³	3,22×10 ⁴
BRD20512	1,00×10 ⁵	2,50×10 ⁵	1,00×10 ³	3,80×10 ⁴
BRD20513	8,32×10 ⁴	1,58×10 ⁵	1,00×10 ³	1,90×10 ⁴
BRD20514	4,80×10 ⁴	6,40×10 ⁴	8,64×10 ³	3,32×10 ³
BRD20516	9,06×10 ⁴	1,03×10 ⁵	7,60×10 ³	2,37×10 ⁴
BRD20517	4,80×10 ⁴	3,68×10 ⁵	2,95×10 ³	2,00×10 ³
BRD20518	3,43×10 ⁵	2,00×10 ⁵	6,00×10 ³	1,32×10 ⁴
BRD20522	2,47×10 ⁵	1,87×10 ⁶	7,98×10 ⁴	1,35×10 ⁵
BRD20523	5,60×10 ⁶	3,17×10 ⁵	8,74×10 ⁴	5,89×10 ⁴
BRD20525	1,37×10 ⁵	2,27×10 ⁵	9,02×10 ⁴	1,14×10 ⁴
BRD20526	8,64×10 ⁴	4,80×10 ⁴	4,40×10 ³	2,85×10 ³
BRD20527	2,81×10 ⁵	1,02×10 ⁵	1,14×10 ⁴	1,92×10 ⁴
BRD20529	7,52×10 ⁶	5,28×10 ⁶	1,70×10 ⁶	1,76×10 ⁵
BRD20534	1,70×10 ⁵	1,23×10 ⁵	8,53×10 ³	9,20×10 ³
BRD20535	8,00×10 ⁴	2,24×10 ⁴	1,62×10 ³	1,00×10 ³
BRD20536	4,48×10 ⁴	8,64×10 ⁴	3,34×10 ⁴	5,00×10 ⁴

Tab. IV. Sporulace jednotlivých kmenů na HCBB agaru a aerobních podmínkách (AE) a v atmosféře s 10 % CO₂ (CO₂).

Obrázek 26 ukazuje vývoj různých stádií dobře sporulujícího kmene *P. larvae* BRD 205 29 na HCBB agaru. Z obrázku je patrné, že v aerobní atmosféře došlo ke sporulaci dříve, než za přítomnosti CO₂. Avšak sporulace je skončena shodně šestý den kultivace.



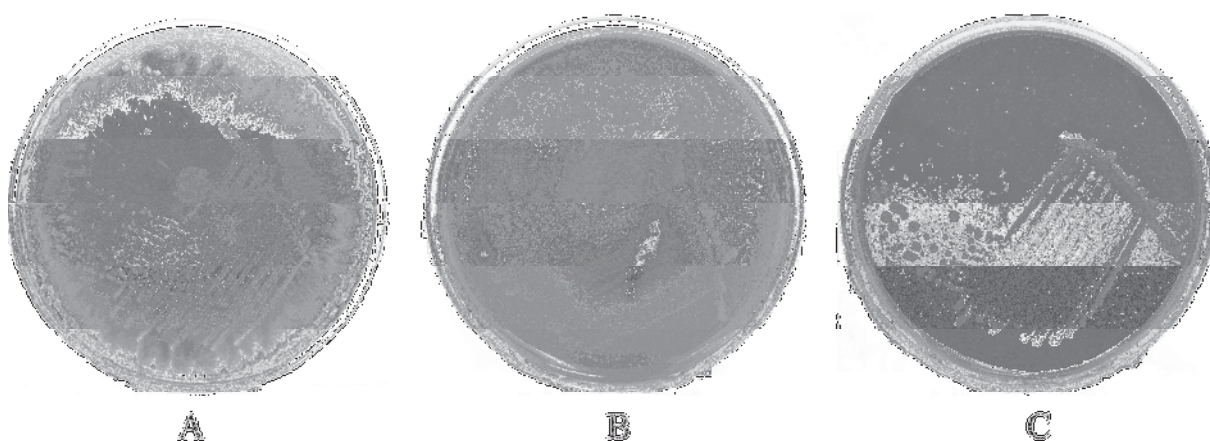
Obr. 26. Různá stádia bakterie *P. larvae* BRD 205 29 na HCBB agaru v aerobní atmosféře (A) a atmosféře s 10 % CO₂ (B).

◆ vegetativní buňky, ■ sporangia, ▲ celkový počet spor.

Výsledky počtu termorezistentních spor ukazují, že se v aerobní atmosféře tvoří pouze 3,48 % těchto spor z celkového množství. V atmosféře s 10 % CO₂ se jedná o 5,09 %. Jedná se však o rozdíl statisticky neprůkazný ($p < 0,05$).

V anaerobních podmínkách nedocházelo ke sporulaci na žádném z médií a u žádného z kmenů.

Na obrázku 27 je možné porovnat charakter růstu *P. larvae* na různých kultivačních médiích. Na krevních agarech a na agaru MYPGP tvořil tento mikrob drsné kolonie veliké dle nutriční kapacity média. Na agaru HCBB se jednalo o kolonie hladké velikosti do 3 mm.



Obr. 27. Růst *P. larvae* BRD 205 29 na různých kultivačních médiích. HCBB agar (A), krevní agar se základem Columbia (B) a PVX čokoládový agar (C) po 3 dnech kultivace při 35 °C v aerobní atmosféře s 10 % CO₂.

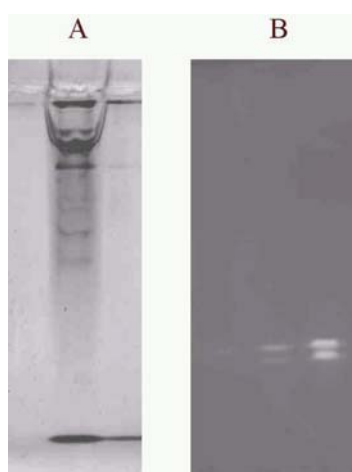
4.7. Extrakce proteáz z povrchových struktur spory

4.7.1. Extrakce Tritonem X-100

Při extrakci Tritonem X-100 došlo k uvolnění proteáz z povrchových struktur spory, avšak při použití SDS-PAGE a při zymografii docházelo k interakci Tritonu X-100 s dodecylsulfátem sodným, takže byly tyto techniky nepoužitelné (viz obr. 28). Úspěšné nebylo ani snižování koncentrace Tritonu X-100. K dobrému rozdělení došlo při použití nativní elektroforézy (tj. bez SDS) (viz obr. 29). O detekovaných proteázách lze pouze konstatovat, že se jednalo o molekuly s malou molekulovou hmotností bez jejího přesného stanovení (z podstaty metody).



Obr. 28. Proteázy extrahované z povrchu spor Tritonem X-100. Zymografie - 10% polyakrylamidový gel + 0,2% želatina.



Obr. 29. Proteázy extrahované z povrchu spor Tritonem X-100. Nativní elektroforéza (pH 8,5), A – 10% polyakrylamidový gel, B – zymografie 10% polyakrylamidový gel + 0,2% želatina.



4.7.2. *Extrakce proteáz extrakčním pufrem podle C.S. Hayese a P. Setlowa (1997)*

Výsledky extrakce proteinového pláště chemickou cestou podle C.S. Hayese a P. Setlowa (viz kapitola 3.16.) ukazuje obrázek 30. Z tohoto obrázku je patrné, že došlo k extrakci minimálně osmnácti proteinů, avšak při zymografii nebyla detekována žádná aktivita. Aktivita nebyla zjištěna ani ve vzorku před ani po dialýze.



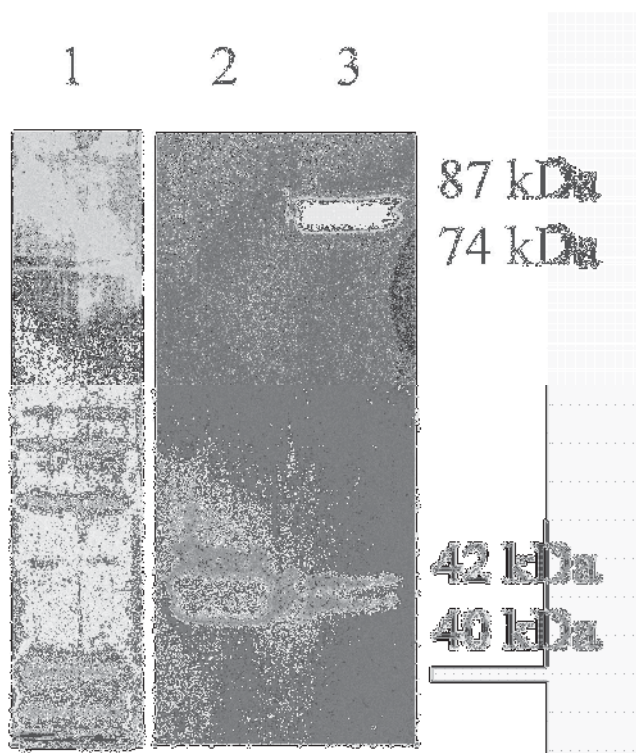
Obr. 30. SDS-PAGE analýza proteinů izolovaných ze spor chemickou cestou podle C.S. Hayese a P. Setlowa (1997). 10% polyakrylamidový gel.

4.7.3. *Elektroeluce povrchových proteinů*

Bylo odzkoušeno několik různých napětí a různých časů pro extrakci proteinů z povrchových struktur spory (viz kapitola 3.15.). Nejlépe se osvědčilo napětí 200 V po dobu 4 hodin. Během elektroeluce docházelo k ubývání pufru z malé jamky elektroforetické vany, v níž je koncentrován eluát. Proto musel být doplňován do této jamky pufr tak, aby nedocházelo ke změnám v průchodu elektrického proudu. Následkem zahřívání docházelo rovněž k deformacím agarózového gelu (závislé na teplotě v laboratoři), což však nemělo vliv na výsledek. Eluát nebyl v žádném případě kontaminován sporiemi.

Výsledky elektroeluce při 200 V po 4 hodiny ukazuje obrázek 31. Ve srovnání s výsledky extrakce chemickou cestou lze pozorovat úbytek některých proteinů v oblasti 60 – 80 kDa, avšak rámcový profil proteinů zůstává shodný (srovnej obr. 29 a 30). Zymografie (viz obr. 31) však ukázala excelentní schopnost elektroeluce extrahovat povrchové proteázy ze spor (100 μ l vzorku extrahováno z 10^8 spor). Obrázek 31 rovněž poukazuje na zajímavou

shodu mezi proteázami extrahovanými ze spor a proteázami sekretovanými vegetativními formami *P. larvae* do MYPGP média. 42 a 40kDa proteázy se velikostně shodují.



Obr. 31. Výsledky elektroeluce povrchových proteinů proteinového pláště spory. 1 – SDS-PAGE analýza elektroeluátu - 10% polyakrylamidový gel, 2,3 – zymografie - 10% polyakrylamidový gel + 0,2% želatina. 2 – vzorek povrchových proteinů spor, 3 – sekreční produkt *P. larvae* BRD 205 01 po 5denní kultivaci v MYPGP médiu (pro srovnání).

4.8. Germinace spor zbavených pláště

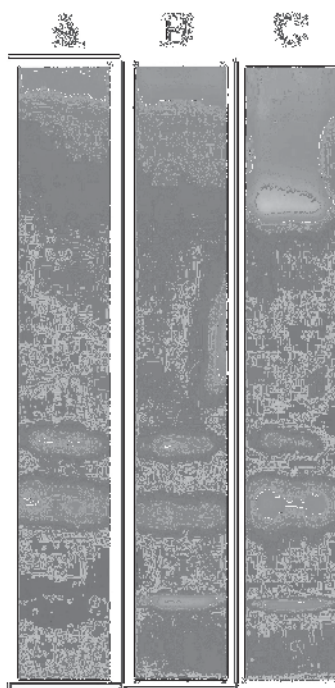
Po kultivaci inokula stejné kvantity spor zbavených pláště všemi výše zmíněnými metodami bylo zjištěno, že schopnost germinace spor zbavených pláště zůstává shodná se schopností germinace spor neošetřených.

4.9. Srovnání proteolytické aktivity proteáz izolovaných z povrchových struktur spor u různých kmenů *P. larvae*

Spory všech deponovaných kmenů *P. larvae* byly zpracovány metodou elektroeluce (metodika viz 3.15.) a výsledné vzorky zpracovány zymografií (metodika viz 3.3.). Z obr. 32 jsou patrné 3 profily, které byly u různých kmenů *P. larvae* detekovány. Profil A obsahuje pouze proteázy velikosti 40 a 42 kDa. U profilu B je ještě přítomná proteolytická aktivita v čele elektroforézy, u níž nebylo možné stanovit molekulovou hmotnost. Jedná se o

molekulu menší 10ti kDa. U profilu C je navíc patrná aktivita v oblasti 56 kDa. Tabulka V. ukazuje profily proteáz u jednotlivých izolátů *P. larvae*. Z tabulky V. vyplývá, že profil C je nejčastější kombinací proteáz u námi deponovaných izolátů *P. larvae* (15/31). Profil B vykazuje celkem 10 izolátů. Profil A je zastoupen nejméně, a to u pouhých šesti izolátů z 31.

Analýza SDS-PAGE (kapitola 3.2.) neukázala žádné diference mezi jednotlivými kmeny. Všechny profily se shodovaly s profilem zobrazeným na obrázku 31.



Obr. 32. Profily proteáz izolovaných z povrchu spor různých kmenů *P. larvae*. Zymografie – 15% polyakrylamidový gel + 0,2% želatina.

Číslo izolátu	Profil	Číslo izolátu	Profil	Číslo izolátu	Profil	Číslo izolátu	Profil
BRD 205 01	A	BRD 205 12	A	BRD 205 20	B	BRD 205 28	C
BRD 205 02	C	BRD 205 13	A	BRD 205 21	A	BRD 205 29	C
BRD 205 04	C	BRD 205 14	C	BRD 205 22	C	BRD 205 31	C
BRD 205 06	C	BRD 205 15	C	BRD 205 23	C	BRD 205 33	B
BRD 205 07	B	BRD 205 16	C	BRD 205 24	C	BRD 205 34	A
BRD 205 08	C	BRD 205 17	B	BRD 205 25	C	BRD 205 35	C
BRD 205 10	B	BRD 205 18	B	BRD 205 26	B	BRD 205 36	B
BRD 205 11	B	BRD 205 19	B	BRD 205 27	A		

Tab. V. Profil proteáz izolovaných ze spor u různých izolátů *P. larvae*. Vyšetřováno zymografií 10% polyakrylamidový gel s 0,2 % želatiny. Profil A,B,C – viz obr. 32



4.10. Biochemické vlastnosti proteáz vázaných ve vnějších strukturách spory

Pro biochemické analýzy (viz kapitola 3.14.) byl použit kmen BRD 205 02, který ve svém proteinovém plášti obsahoval všechny čtyři detekované proteázy (viz tab. V). Dle analýzy zymografií bylo zjištěno, že všechny viditelné pruhy mají shodné biochemické vlastnosti. Nejvhodnější pH pro inkubaci gelů bylo 7,0. Proteázy byly inhibovány pouze 1,10-phenantrolinem, žádný z ostatních testovaných inhibitorů, ani EDTA v koncentraci 8 mM, proteázy izolované z proteinového pláště spory neinhibovaly. Reaktivace inhibice proteáz se nepodařila přidáním žádného kovového iontu (testovány soli CaCl₂, ZnSO₄, CuSO₄, MgCl₂ a Fe₂(SO₄)₃).

4.11. Infekční pokusy

4.11.1. Infekční pokus in vitro podle E. Genersch a kol. (2006)

Čtvrtý den od zahájení pokusu došlo k úhynu 50/53/60 % larev, včetně larev kontrolních skupin. Rozdíl úhynu mezi pozitivní a negativní kontrolou nebyl zaznamenán. Osmý den dosahovala mortalita u všech skupin 100 %. U žádné z larev potenciálně infikovaných suspenzí z příškvaru, suspenzí spor promytých destilovanou vodou, ani spor zbavených proteinového pláště podle C.S. Hayese a P. Setlowa (1997), nebyl kultivačně ani mikroskopicky prokázán *P. larvae*.

4.11.2. Infekční pokus v pokusném včelstvu I.

V případě suspenze z příškvaru a promytých spor došlo při každém opakování pokusu během 24 hodin od inokulace k odstranění více než 92 % larviček. U vegetativních forem a spor zbavených pláště bylo odstraňování larviček včelami nižší, avšak dosahovalo v průměru 54 %. Během trojnásobného opakování pokusu se podařilo infikovat pouze jedinou larvu suspenzí z příškvaru. Ostatní larvy byly odstraněny včelami bez pozorování klinické manifestace moru včelího plodu.

4.11.3. Infekční pokus v pokusném včelstvu II.

Při tomto testu se podařilo infikovat larvy v pokusném včelstvu krmené směsí do níž byla přidána suspenze z příškvarů a rovněž larvy v pokusném včelstvu krmené směsí se suspenzí spor zbavených pláště podle C.S. Hayese a P. Setlowa (1997). Mor včelího plodu byl u larev prokázán podle klinických příznaků a mikrobiologickým průkazem *P. larvae*.



5. Diskuze

5.1. Kultivace v MYPGP bujónu

Výsledky analýzy sekretovaných proteinů dokazují, že *P. larvae* sekretuje během svého růstu velké množství proteinů. Ty mohou hrát významnou roli v patogenezi moru včelího plodu, avšak jejich význam ani bližší charakterizace nebyla dosud nikdy popsána.

Lýza buněk bez zjevné sporulace ve většině sporulačních médií zásadně komplikuje výzkum látek, jež jsou uvolňovány sporulujícími buňkami. My jsme předpokládali, že tato lytická aktivita může být způsobena aktivitou látek podobných lysozymu, které by mohl *P. larvae* produkovat a proti nimž by mohl během růstu *in vitro* ztrácet odolnost. Dále pak jako následek vysoké koncentrace metabolitů, jenž způsobí úhyn vegetativních forem, a v neposlední řadě jako důsledek indukce temperovaného bakteriofága. Právě lysogenie byla pozorována u většiny izolátů *P. larvae* a bylo popsáno několik druhů bakteriofágů napadajících tuto bakterii (Drobníková a Ludvík, 1982; Benada a kol., 1984; Dingman a kol. 1984; Campana a kol., 1991).

Temperovaný bakteriofág může být indukován prostřednictvím poškození buněčné DNA a různými stresovými faktory (Benada a kol., 1984). K jeho indukci u *P. larvae* byla nejčastěji používána cis-platina a její deriváty a expozice ultrafialovému záření (Drobníková a Ludvík, 1982; Benada a kol., 1984; Drobníková a kol., 1988). Mezi stresové faktory, způsobující indukci je možné řadit i pokles pH média a akumulaci metabolitů. Prudký pokles pH média během exponenciální fáze růstu *P. larvae* byl pozorován již dříve G. St. Julianem a L. A. Bullou (1971), kteří tento jev přisoudili akumulaci organických kyselin v médiu jako důsledku metabolismu glukózy. Oba autoři však lýzu kultury nepozorovali, což může být způsobeno odlišným kultivačním médiem.

Naše výsledky prokázaly, že příčinou lýzy kultury je právě indukce temperovaného bakteriofága. K té dochází následkem poklesu pH a akumulací metabolitů v médiu. Jak bylo ukázáno, ani jedna z podmínek není sama o sobě podmínkou postačující. Proto by bylo v budoucnu vhodné studovat proces indukce bakteriofága na tomto modelu detailně, a to studiem signálních drah, které nejspíše vyústí v autoproteolytickou destrukci represoru temperovaného bakteriofága a tím ke spuštění lytické fáze růstu, jak bylo popsáno u jiných bakterií a jejich temperovaných bakteriofágů (Koudelka a kol., 2004).

Námi nalezený bakteriofág byl identifikován podle morfologických vlastností jako BLA (Drobníková a Ludvík, 1982), resp. PBL1 (Dingman a kol., 1984). Jeho bližší charakterizace nebyla možná, neboť sekvence DNA žádného z popsaných bakteriofágů *P.*



larvae není dosud známa. Vzhledem k tomu, že ve vzorcích převažoval výskyt bakteriofágů bez DNA, nemohla být provedena kvantifikace fágových partikulí metodou PFU.

Z výše uvedených důvodů je nutné postupovat opatrně při interpretaci výsledků sekrečních produktů získaných *in vitro* v pozdních fázích růstu, neboť ty mohou obsahovat produkty kódované fágovou DNA.

Někdy bývá zmiňována antibiotická aktivita sekrečních produktů *P. larvae*. Ta je zdůvodňována tím, že se vždy v přiškvaru nachází pouze čistá kultura *P. larvae* (Drobníková, 1983). V dostupné literatuře však nelze najít žádný důkaz, který by antimikrobiální aktivitu produktů této bakterie prokazoval. Naše testy, zabývající se lytickou aktivitou sekrečních produktů *P. larvae*, žádné látky s baktericidními/bakteriostatickými účinky neprokázaly. Naopak při pokusech docházelo k nárůstu testovaných bakteriálních kultur. Lytická aktivita vzorků odebraných z lyzující kultury neměla žádný vliv na tentýž kmen *P. larvae*, i když pH pufru bylo v oblasti, kdy kultura lyzovala. Tím byl potvrzen výše diskutovaný výsledek, že pokles pH není postačující podmínkou lýzy kultury. Rovněž byla potvrzena indukce temperovaného bakteriofága, jako kauzální příčina tohoto jevu, neboť lysogenní kmeny bakterií se obvykle vyznačují rezistencí k superinfekci tímtež bakteriofágem (Prescott a kol., 1996).

V souvislosti s nenalezením látek s antibiotickou aktivitou je však pravda, že tato aktivita se u sporulujících gram pozitivních aerobních tyčinek obvykle objevuje až v době sporulace (Silo-Suh a kol., 1994), proto by námi prováděnou metodikou nemusela být zaznamenána. Ovšem při kultivaci *P. larvae* na různých agarech dochází často k přerůstání sporulující kultury zástupci gram negativních i gram pozitivních bakterií a hub (četná pozorování autora nedokumentovaná ve výsledcích).

5.2. Srovnání proteolytické aktivity sekretovaných produktů u různých kmenů *P. larvae*

Výsledky srovnání izolátů po 6denní kultivaci v MYPGP médiu ukazují na velkou variabilitu sekreční aktivity různých kmenů *P. larvae*.

Při srovnání proteolytické aktivity sekrečních produktů byly zjištěny dva odlišné profily sekretovaných proteinů a dva profily sekretovaných proteáz. Profily sekretovaných proteinů se lišily pouze v několika detekovatelných pruzích v oblasti malých a velkých molekulových hmotností. Profil proteáz se lišil pouze přítomností 98kDa proteázy v profilu námi označeném jako „b“. Tyto výsledky ukazují nevelké rozdíly mezi jednotlivými kmeny



P. larvae. Je ale pravdou, že některé proteiny, které mohou být esenciální v patogenezí moru včelího plodu, nemusí být metodou SDS-PAGE vůbec detekovány. V tom případě by se mohly jednotlivé izoláty lišit podstatněji. Z pokusu je zároveň patrné, že 98kDa proteáza není při metodě SDS-PAGE reprezentována žádným pruhem.

V každém případě by bylo vhodné srovnat virulenci jednotlivých kmenů s ohledem na profil sekrečních produktů *in vitro*. Je však zřejmé, že žádná ze zjištěných kombinací nereprezentuje nepatogenní kmen, neboť izoláty z příškvarů, tj. izoláty signifikantně patogenní, vykazovaly všechny kombinace kromě kombinace „Ba“, která nebyla zjištěna u žádného z testovaných kmenů.

5.3. Stabilita sekretovaných proteáz

Zjištěné údaje o stabilitě proteáz dokazují, že se jedná o proteázy relativně velmi stabilní. I když N.G. Patel a T.A. Gochner (1972) a B.N. Dancer a P. Chantawannakul (1997) použili odlišný materiál, i oni zjistili dobrou teplotní stabilitu proteáz *P. larvae*. Otázkou zůstává původ těchto proteáz z hlediska evoluce mikroorganismu. Fyziologická teplota ve včelstvu bývá obvykle okolo 35 °C v době, kdy včely plodují (Veselý a kol., 2003). K jejímu překročení dochází zřídka a může se projevit patologickými stavy včelího plodu, až kolapsem včelstva (Hrabák, 2006). Je zřejmé, že vegetativní formy *P. larvae* nejsou exponovány vysokým teplotám, proto tedy nelze předpokládat ani selekční tlak na vysoké pH optimum a teplotní stabilitu proteáz.

Degradaci proteáz v čase a nárůst aktivity 56 kDa proteázy, která může vznikat štěpením z 87/74 kDa proteáz, ukázal již autor ve své diplomové práci (Hrabák, 2004a; Hrabák a Martínek, 2006).

5.4. Purifikační postupy pro izolaci sekretovaných proteáz *P. larvae*

Na základě analýzy sekretovaných produktů *P. larvae* během růstu v tekutém MYPGP médiu, byla jako výchozí materiál pro purifikaci použita 24 hodinová kultura v MYPGP médiu.

V naší práci jsme se dále zaměřili na purifikaci vysokomolekulárních proteáz. Z analýzy sekretovaných produktů se jako nejvhodnější vstupní vzorek pro zpracování jeví 24 hodinová kultura v klasickém MYPGP médiu. Ta již vykazuje aktivitu 87 a 74kDa proteázy, která se v čase mění pouze nepatrně. Ve vzorku je rovněž přítomné malé množství balastních proteinů.



5.4.1. Afinitní chromatografie

Metoda afinitní chromatografie na bis-carboxymethyl amino agaróze sice přinesla očekávané výsledky ve smyslu purifikace jediného proteinu ze vzorku. Ve stejné oblasti byla rovněž patrná proteolytická aktivita, avšak intenzita proteolytického pruhu při zymografii byla velmi slabá. Úspěch nepřineslo ani následné zahuštění ultrafiltrací. Na základě zmíněných výsledků lze konstatovat, že afinitní chromatografie na bis-carboxymethyl amino agaróze je sice účinnou, avšak nevhodnou metodou purifikace proteáz sekretovaných *P. larvae* do MYPGP média.

5.4.2. Purifikace na DEA celulóze s předchozí inkubací nanášeného vzorku při pokojové teplotě

Stěžejním při purifikaci se ukázala inkubace vzorku při pokojové teplotě po dobu min. 18 hodin. Po této době dochází k proteolytické destrukci většiny proteinů přítomných ve vzorku. Během tohoto procesu lze zjistit nárůst intenzity pruhu v čele elektroforézy, ale proteinový profil se, kromě slábnutí pruhů, nemění. Z toho lze usuzovat na přítomnost proteázy s exopeptidázovým charakterem, nikoliv však endoproteázy. Aktivita proteáz se během inkubace zřetelně nemění.

Takto předpřipravený vzorek stačí již zbavit nízkomolekulárních složek použitím molekulárního síta, kdy dojde zároveň k převedení do vhodného pufru. Po aplikaci na kolonu s nosičem pro iontovou výměnu nedochází k ucpávání kolony nízkomolekulárními složkami a celý proces chromatografie poskytuje mnohem lepší výsledky (viz obr. 22, 23). Dochází zároveň ke koncentraci proteinů, takže již není potřeba purifikační postup ničím doplňovat.

Z obrázku 23 je rovněž patrná neočekávaná purifikace nízkomolekulárních složek. Ty nebyly v nanášce vůbec detekovány. Lze usuzovat, že k tomuto jevu došlo buď díky zahuštění vzorku, nebo posttranslační úpravou prekurzoru v aktivní formu enzymu. K aktivaci může dojít během purifikace z dosud neznámých důvodů. Lze takřka vyloučit, že by tato aktivace mohla být způsobena pouhým proteolytickým štěpením některou z detekovaných proteáz nebo autokatalytickou reakcí, neboť ke zvýšení aktivity nízkomolekulárních proteáz nikdy nedocházelo při pouhé inkubaci vzorku při různých teplotách.

Výsledný vzorek po provedené purifikaci obsahuje pouze jediný pruh při SDS-PAGE analýze v oblasti 74 kDa. Ten sice není příliš silný, což značí nízkou koncentraci



proteázy, potvrzenou i stanovením koncentrace proteinů ve vzorku, avšak při zymografii byla zjištěna vysoká aktivita purifikované proteázy. Na základě tohoto výsledku lze konstatovat, že při purifikaci došlo k vyčištění hledané proteázy na 99 % (Hooper, 1999; Bauer a Stubbs, 1999). U frakcí s detekovanou aktivitou 40,42 kDa nebyl při SDS-PAGE analýze detekován žádný pruh ani po deseti násobném zahuštění vzorku ultrafiltrací, což ukazuje na vysokou aktivitu těchto molekul.

Dosažené výsledky rovněž ukazují, že proteázy ve vstupním vzorku nejsou při SDS-PAGE analýze a detekci proteinů stříbrem reprezentovány žádným pruhem. Tato skutečnost dokazuje jak zmiňovanou vysokou aktivitu, tak zároveň vysokou senzitivitu zymografie.

Ač byla testována celá řada purifikačních postupů a jejich kombinací, ukázal se výše zmíněný postup s inkubací vzorku při pokojové teplotě jako nejefektivnější.

5.5. Štěpení BSA/kaseinu

Výsledky štěpení BSA lze srovnávat s prací N.G. Patela a T.A. Gochnauera (1972), kteří použili ovalbumin k detekci proteolytické aktivity extraktu z příškarů a intracelulárních proteáz vegetativních forem *P. larvae*. V jejich případě byl albumin štěpen. Částečný neúspěch při našem pokusu může spočívat v nízké citlivosti spektrofotometrické metody, popřípadě v odlišnosti druhu použitého albuminu.

Negativní výsledky štěpení kaseinu jsou v rozporu s pracemi N.G. Patela a T.A. Gochnauera (1972) a B.N. Dancera a P. Chantawannakula (1997), kteří štěpení kaseinu u produktů *P. larvae* detekovali a dokonce byli schopni při použití azokaseinu změřit základní kinetická data. Ani jeden z námi použitých druhů kaseinu nebyl proteázami štěpen (produkty firmy Sigma, Difco a Imuna) i přesto, že byly testovány metodiky z obou citovaných prací.

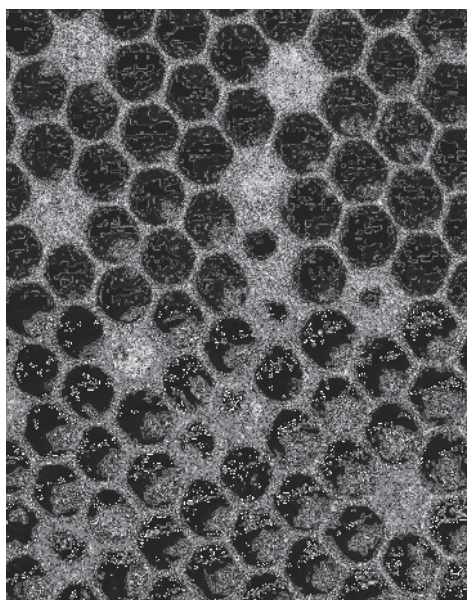
Náš výsledek je rovněž v korelaci s dřívějšími zjištěními autora této práce (nepublikovaná data), který zjistil rozpory v uváděném srážení mléka proteázami *P. larvae*. I přes použití různých druhů odstředěného mléka, včetně odstředěného čerstvě nadojeného mléka, nedošlo po přidání vzorku *P. larvae* k jeho srážení ani peptonizaci, jak je uváděno některými autory (Holst a Stuertevant, 1940; Drobníková, 1983; Carpana a kol., 1995).

5.6. Sporulace na MYPGP a HCBB agaru

Sporulace *P. larvae* na umělých živných médiích je problematická. Schopnost sporulace na MYPGP agaru je dána původem surovin k přípravě média. V případě použití

Mueller-Hintonova bujónu od firmy HiMedia jsme v naší laboratoři nezaznamenali žádný náznak sporulace u deponovaných kmenů *P. larvae*. Úspěchu bylo dosaženo až při použití této složky od firmy Difco. To potvrzuje tvrzení D.W. Dingmana a D.P. Stahlyho (1983), že Mueller-Hintonův bujón může být inhibítoem sporulace. Respektive lze tento výsledek zpřesnit tvrzením, že Mueller-Hintonův bujón může obsahovat komponenty, které jsou inhibítoem sporulace. D.W. Dingman a D.P. Stahly (1983) tvrdí, že pro sporulaci je nutná přítomnost glukózy, pyruvátu a kvasničného extraktu. V námi navrženém HCBB agaru není žádná z těchto složek implicitně přítomna a ke sporulaci na tomto médiu dochází. Jako zdroj bílkovin je zde přítomen hemoglobin. Látky produkované během růstu *P. larvae* mohou být absorbovány aktivním uhlím, pročež nedochází k jejich akumulaci v médiu. To může mít příznivý vliv na vitalitu a sporulaci mikroba. Jako zdroj růstových faktorů obsahuje HCBB agar základ pro krevní agar. Jednou z jejích komponent je i agar, sloužící coby zpevňující složka.

Rovněž zajímavý je fakt, že na HCBB agaru roste *P. larvae* v hladkých hlenovitých koloniích (forma S), kdežto na ostatních používaných médiích (MYPGP, krevní agar, čokoládový agar,...) ve formě R. Tento fakt je nutné vzít v úvahu v případě, že by se kultivace na HCBB agaru prosadila do diagnostické praxe.



Obr. 33. Včelí buňky proražené díky vznikajícím plynům při infekci včelích larev *P. larvae*

I když je *P. larvae* fakultativně anaerobním mikrobem schopným růst i v anaerobní atmosféře bez přítomnosti kyslíku (St. Julian a Bulla, 1971; Hansen a Brodsgaard, 2001),



byla zjištěna sporulace pouze za přítomnosti kyslíku. Lze tedy vyslovit hypotézu, že kyslík (aerobní respirace) je důležitým faktorem pro jeho sporulaci. Ta je potvrzena tím, že ke sporulaci nedocházelo v anaerobním kultivačních podmínkách. Podobnost by bylo možné hledat u ostatních gram pozitivních sporulujících tyčinek, jako například u *Bacillus anthracis*. Zde bylo dokázáno, že k jeho sporulaci dochází ve striktně aerobních podmínkách (Liu a kol., 2004), například až po otevření těla při pitvě. Jistou obdobu této situace by bylo teoreticky možné hledat i v patogenezi moru včelího plodu. V určité fázi onemocnění dochází k nárůstu tlaku plynů uvnitř včelí buňky a následnému protržení víčka buňky (viz obr. 33) (Hrabák, 2004b). Vznikající plyny jsou převážně na bázi sloučenin síry (Titěra a kol., 2003) a mohou tedy v buňce snižovat oxido-redukční potenciál. Po jejich uvolnění dochází k odvětrání buňky a tím k vytvoření striktně aerobních podmínek potřebných pro sporulaci. Tuto hypotézu je potřeba doplnit pokusem *in vivo*, který by byl náročný, nikoliv však nerealizovatelný.

5.7. Extrakce proteáz z povrchových struktur spory

V literatuře je popsána řada extrakčních postupů k odstranění proteinového pláště spory (Driks, 1999).

Jako první extrakční činidlo byl zvolen Triton X-100 (Bollag a Edelstein, 1991). Při tomto postupu k extrakci proteáz sice došlo, avšak následná práce se vzorkem byla komplikovaná. Díky interakci s dodecylsulfátem sodným nebylo možné použít ani metodu SDS-PAGE, ani zymografii za přítomnosti SDS. Jedinou možnou metodou byla nativní elektroforéza. Ta však nepřináší informace o molekulové hmotnosti, neboť rychlost migrujících molekul je závislá nejen na velikosti, ale i na jejich náboji. Takto extrahovaný vzorek by se také obtížně purifikoval.

Další metoda extrakce pomocí komplexního extrakčního pufru (Hayes a Setlow, 1997) se rovněž ukázala být nevhodnou. I když složky pufru bylo možné odstranit ze vzorku dialýzou, vedl tento postup k ireverzibilní inaktivaci proteolytické aktivity. Tento postup je spíše vhodný k získání spor zbavených pláště, na což byl původně navržen (Hayes a Setlow, 1997).

Na základě předchozích experimentů z naší laboratoře, kdy byly buňky z nichž měly být extrahovány povrchové proteiny, nanесeny přímo do elektroforézy, bylo sestrojeno zařízení pro velkokapacitní extrakci proteinů. Předpokládali jsme, že kortex spory je velice



odolný a k jeho rozrušení nedochází. Tato hypotéza byla potvrzena i při barvení spor, které se ve světelném mikroskopu jeví stejně jako spory s pláštěm.

K zabránění kontaktu eluovaného vzorku s elektrodou, byla jamka s tímto vzorkem oddělena od elektrodového prostoru celofánovou membránou. Po optimalizaci podmínek elektroeluce se tato metoda ukázala být nejvhodnější k extrakci povrchových proteinů z pláště spory. S takto získaným vzorkem lze pracovat bez jeho dalších úprav.

Elektroeluce povrchových proteinů pomocí standardních elektroforetických systémů umožňuje nanášku cca 20 μ l vzorku (dle typu elektroforézy), kdežto námi zkonstruované zařízení umožňuje zpracování až 1 ml vzorku. Optimální koncentrace spor ve vzorku se zdá být okolo 1×10^8 spor/ml. Během procesu elektroeluce dochází zároveň k odstranění nízkomolekulárních složek s elektrickým nábojem z výstupního vzorku. Tyto jsou odplavovány do prostoru elektrody. Vyplavování těchto složek by bylo možné regulovat použitou membránou na zařízení.

Výsledky dále ukázaly, že spory obsahují velké množství vysoce aktivních proteáz, jejichž pH optimum je podobné proteázám sekretovaným do média (zymografické gely byly inkubovány stejným způsobem jako při analýze sekrečních produktů).

5.8. Germinace spor zbavených pláště

Naše výsledky zcela korespondují s pozorováními popsány A. Driksem (1999) u druhu *Bacillus subtilis*. Proteinový plášť není ani u bakterie *P. larvae* nutnou komponentou potřebnou pro germinaci a je pro sporu postradatelný.

5.9. Srovnání proteolytické aktivity proteáz izolovaných z povrchových struktur spor u různých kmenů *P. larvae*

Při srovnávání proteolytické aktivity proteáz izolovaných z pláště spory lze částečně vycházet z práce B.N. Dancera a P. Chantawannakula (1997), kteří srovnávali proteolytickou aktivitu vodných extraktů z příškarů. Tyto extrakty však nejsou standardními vzorky a mohou být kontaminovány proteiny a proteázami hostitele.

V případě našeho postupu se jedná o vzorky získané za přísně standardizovaných podmínek, nekontaminované hostitelskými tkáněmi. Výsledky našich pokusů ukazují, že se ve sbírce deponovaných kmenů nachází tři různé varianty podle zastoupení jednotlivých velikostí proteáz, stejně jako v práci B.N. Dancera a P. Chantawannakula (1997). Ti však k analýze použili nativní elektroforézu, avšak stejně jako oni, i my jsme zaznamenali ve



vzorcích čtyři různé proteázy. Na základě získaných údajů je nepravděpodobné, že by výskyt pouze jediné z těchto proteáz byl významným faktorem patogenity, neboť všechny tyto profily byly zastoupeny u izolátů získaných z příškarů, tj. izolátů signifikantně patogenních.

5.10. Biochemické vlastnosti proteáz vázaných ve vnější struktuře spory

Na základě biochemických vlastností proteáz izolovaných z vnějších struktur spory lze předpokládat, že se jedná o enzymy podobné s těmi, které izolovali někteří autoři (Patel a Gochnauer, 1972; Dancer a Chantawannakul, 1997) z příškarů. Vzhledem k tomu, že příškar je v podstatě čistá sporová kultura, lze předpokládat, že k uvolňování těchto proteáz z pláště spory dochází.

5.11. Infekční pokusy

Dle literárních předpokladů (Driks, 1999) není proteinový plášť nutnou podmínkou germinace spor u sporulujících tyčinek. Vzhledem k tomu, že však tento plášť obsahuje vysoce aktivní proteázy, předpokládali jsme jeho významnou úlohu ve virulenci *P. larvae*. Náš předpoklad byl umocněn pozorováním u sporulujících mikrobů významných v humánní medicíně, především u *Bacillus anthracis*, kde se předpokládá, že jediným infekčním stádiem jsou právě spory, nikoliv vegetativní formy (Liu a kol., 2004). Obdobné pozorování u původce moru včelího plodu zdokumentoval i H.L.A. Tarr (1937), který uvádí, že perorálně podávané vegetativní formy *P. larvae* nejsou pro včelí larvy infekční. Naopak M. Haklová (osobní sdělení, 2006) na základě experimentů prováděných ve Výzkumném ústavu včelařském uvádí, že je možné včelí larvičky perorálně nakazit suspenzí 24 hodinové kultury *P. larvae*.

Naše pokusy ukázaly možnost nakazit včelí larvy i sporamai zbavenými vnějšího proteinového pláště, které již nevykazují jakoukoliv vnější proteolytickou aktivitu. Na základě těchto výsledků lze jednoznačně konstatovat, že proteázy vázané v proteinovém plášti spory nemají esenciální úlohu ve virulenci *P. larvae* a patogenezí moru včelího plodu. Výsledky předchozích prací (Hrabák, 2004a; Hrabák a Martínek, 2006) ukazují, že proteázy podobné proteázám vázaným ve struktuře spory jsou sekretovány až v pozdějších fázích růstu. Proto se lze domnívat, že tyto proteázy hrají pouze nutriční význam spočívající v kompletní destrukci tkání hostitele a při procesu sporulace jsou zakomponovány do proteinového pláště spory.



Nelze tedy usuzovat na schopnost proteinového pláště spory být nositelem faktorů patogenity u *P. larvae*. Spíše se bude jednat o strukturu chránící sporu před vnějšími vlivy (Driks, 1999).

Bez povšimnutí nemůže zůstat obtížnost nakažení včelích larviček morem včelího plodu. Opomineme-li pokus *in vitro*, bylo v případě přímé inokulace infekční suspenze do buňky s larvičkou zaznamenáno výborné čistící chování včel, tj. včely kontaminované larvičky okamžitě odstranily bez klinické manifestace onemocnění a sporulace mikroba. To i přesto, že pokusné včelstvo bylo vystaveno stresovým podmínkám laboratorního chovu. Toto chování bylo zaznamenáno i při nízkých dávkách suspenze (1 μ l) pipetovanými tenkými špičkami (použity špičky pro nanášku vzorku na elektroforézu) tak, aby nedošlo k jakémukoliv kontaktu s larvičkou. Úspěchu bylo dosaženo pouze tehdy, bylo-li pokusné včelstvo nakaženo potravou s vysokou koncentrací spor.

Ve včelařské literatuře se uvádí (Hrabák, 2004b) celá řada okolností, při nichž může být mor včelího plodu přenesen, například přenos zavíječem voskovým (*Galleria mellonella*), roztočem *Varroa destructor* a včelařskými pomůckami. Na základě získaných zkušeností, vědomi si nebezpečnosti této informace pro laickou včelařskou veřejnost, lze předpokládat, že hlavním mechanismem přenosu je loupež včel v infikovaných včelstvech (resp. donesení infikovaného medu obecně) a šíření včelími plásty s příškvary. Rizikovost ostatních hypotetických mechanismů přenosu by bylo nutné verifikovat vhodnými pokusy, neboť v dostupné literatuře nejsou o rizikovosti přenosu moru včelího plodu údaje.



6. Dosažené výsledky

Během práce se podařilo:

- optimalizovat kultivaci *P. larvae* s ohledem na následnou purifikaci sekretovaných proteáz,
- zjistit stabilitu sekretovaných proteáz,
- nalézt vhodný postup pro purifikaci 87/74 a 42/40 kDa proteáz,
- srovnat profily sekretovaných proteáz u 31 sbírkových kmenů,
- navrhnout nové sporulační médium pro *P. larvae*,
- nalézt vhodný extrakční postup pro proteázy vázané v proteinovém plášti spory,
- provést základní biochemickou charakterizaci proteáz vázaných v proteinovém plášti spory,
- prokázat, že proteázy vázané v proteinovém plášti spory nejsou esenciálním faktorem virulence *P. larvae*.



Použité zkratky

Zkratka	Anglický ekvivalent	Český ekvivalent/význam (pokud je používáno)
APS	amonium persulfate	persulfát amonný
BLA		označení bakteriofága
BSA	bovine serum albumin	bovinní serový albumin
CFU	colony forming unit	jednotka tvořící kolonii (počet živých bakterií)
DEAE-cell.	diethylaminoethyl cellulose	diethylaminoethyl celulóza
E64	L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido -(4-guanido)butane	
DTT	dithiothreitol	
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	etylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetraacetic acid	
HCBB		označení agaru
HCl		kyselina chlorovodíková
ME	mercaptoethanol	merkaptoethanol
MYPGP		označení agaru
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotin amid adenin dinukleotid
PBL1		označení bakteriofága
PFU	plaque forming unit	jenotka tvořící plaky (počet živých bakteriofágů)
PMSF	phenylmethysulfonylfluoride	
PVX		označení čokoládového agaru firmy Biomerieux
SDS	sodiumdodecylsulfate	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	sodiumdodecylsulfate – polyacrylamide gel electro- phoresis	polyakrilamidová elektroforéza za denaturujících podmínek dodecylsulfátu sodného



Zkratka	Anglický ekvivalent	Český ekvivalent/význam (pokud je používáno)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylene-ethylenediamine	
Tris	2-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-propanediol	
σ_x		rozptyl (statistická veličina)



Literatura

Ash C., Priest F.G., Collins D.: Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test, *Antonie van Leeuwenhoek* (64), 253-260, 1993.

Bamrick J.F.: Resistance to American foulbrood in honey bees 5. Comparative pathogenesis in resistant and susceptible larvae, *Insect Pathology* (6), 284-304, 1964.

Bakhiet N., Stahly D.P.: Ultrastructure of Sporulating *Bacillus larvae* in a Broth Medium, *Applied and Environmental Microbiology* (50), 690-692, 1985.

Bailey L., Ball B.V.: *Honey Bee Pathology*, Academic Press, London, 1991.

Bauer M.M.T., Stubbs M.T.: Crystallization of Proteinases, In: Sterchi E.E., Stöcker W. (Ed): *Proteolytic Enzymes – Tools and Targest*, Springer Verlag, Berlin, 1999.

Benada O., Ludvík J., Drobníková V.: Morphology of a new bacteriophage isolated from *Bacillus larvae*. *Folia Microbiologica* (29), 520-521, 1984.

Benada O., Pokorný V.: Modification of the polaron sputter-coater unit for glow discharge activation of carbon support films, *Journal of Electron Microscopic Technique*. (16), 235-239, 1990.

Bollag D.M., Edelstein S.J: *Protein Methods*, Wiley-Lis, Inc., New York, 1991.

Borracci S.E., Chacana P.A., Palacio A., Terzolo H.R.: In Vitro Generation of *Paenibacillus larvae* Spores. XXXVIIIth Apimondia International Apicultural Congress - Book of Abstracts, Ljubljana, 2003.



Bradford M.M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry* (72), 248-254, 1976.

Campana C.F., Bakhiet N., Stahly D.P.: Morphology of *Bacillus larvae* bacteriophage PBL3 and physical map of its DNA, *Journal of Invertebrate Pathology* (57), 141-143, 1991.

Carpana E., Marocchi L., Gelmini L.: Evaluation of the API 50CHB system for the identification and biochemical characterization of *Bacillus larvae*, *Apidologie* (26), 11-16, 1995.

Casteels P., Ampe C., Riviere J., Damme J. Van, Elicone C., Fleming M., Jacobs F., Temper P.: Isolation and Characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*), *European Journal of Biochemistry* (187), 381-386, 1990.

Dancer B.N., Chantawannakul P.: The Proteases of American Foulbrood Scales, *Journal of Invertebrate Pathology* (70), 79-87, 1997.

Dalhamar G., Steiner H.: Characterization of Inhibitor A, a Protease from *Bacillus thuringiensis* which Degrades Attacins and Cecropins, Two Classes of Antibacterial Proteins in Insect, *European Journal of Biochemistry* (139), 247-252, 1984.

Davidson E.W.: Ultrastructure of American Foulbrood Diseases Pathogenesis in Larvae of the Worker Honey Bee, *Apis mellifera*, *Journal of Invertebrate Pathology* (21), 53-61, 1973.

Dingman, D., Bakhiet N., Field C., Stahly D.: Isolation of two bacteriophages from *Bacillus larvae*, PBL1 and PBL0.5, and partial characterization of PBL1, *Journal of General Virology* (65), 1101-1105, 1984.



Dingman D.W., Stahly D.P.: Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components, *Applied and Environmental Microbiology* (46), 860-869, 1983.

Driks A.: *Bacillus subtilis* Spore Coat, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (63), 1-20, 1999.

Drobníková V.: Tlumení moru včelího plodu, Ministerstvo zemědělství ČR, Praha, 1983.

Drobníková V., Ludvík J.: Bacteriophage of *Bacillus larvae*, *Journal of Apicultural Research* (21), 53-56, 1982.

Drobníková V., Pytelová I., Machová M.: Honey bee infectious Diseases, Research Report of the Apiculture Research Institute, Dol, 1988.

Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., Fries, I.: Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* and *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (56), 501-511, 2006.

Glinski Z., Jarosz J.: Exoproteinase of *Bacillus larvae* destroys the “in vitro” antibacterial activity of cecropins of lepidodteran insects and antibacterial response peptides from the honeybee, *Apiacta* (33), 1-8, 1998.

Gochnauer T.A.: Growth, protease formation, and sporulation of *Bacillus larvae* in aerated broth culture, *Journal of Invertebrate Pathology* (22), 251-257, 1973.

Gordon R.E., Haynes W.C., Pang C.H.N.: The genus *Bacillus*, In: Laskin A.I., Lechevalier H.A.: *Handbook of Microbiology*, Chemical Rubber Press, Cleveland, 1973.



de Graf D.C., Vos P.D., Heyndrickx M., Trappen S.V., Peren N., Jacobs F.J.: Identification of *Paenibacillus larvae* up to subspecies level: an obstacle for AFB diagnosis, *Journal of Invertebrate Pathology* (91), 115-123, 2006.

Gregorc A., Bowen I.D.: Histopathological changes in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood, *Cell Biology International* (22), 137-144, 1998.

Hansen H., Brodsgaard C.J.: American foulbrood – biology and control, *Euroconference on MOMEDITO Proceedings, Prague*, 75 – 96, 2001.

Hayes C.S., Setlow P.: Analysis of Deamidation of Small, Acid-Soluble Spore Proteins from *Bacillus subtilis* In Vitro and In Vivo, *Journal of Bacteriology* (179), 6020-6027, 1997.

Heyndrickx M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Janssen P., Kersters K., De Vos P., Logan N.A., Ali N., Berkeley R.C.W.: Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a Later Subjective Synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a Subspecies of *P. larvae*, with Emended Description of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*, *International Journal of Systematic Bacteriology* (46), 270-279, 1996.

Holst E.C., Sturtevant A.P.: Relation of proteolytic enzymes to phase of life cycle of *Bacillus larvae*, and two new culture media for this organism, *Journal of Bacteriology* (40), 723-731, 1940.

Hopper N.M.: Purification of Proteases, In: Sterchi E.E. and Stocker W. (Ed.): *Proteolytic Enzymes: Tools and Targest*. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1999.



Hrabák J.: Charakterizace secernovaných proteáz bakterie *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* - diplomová práce, Fakulta aplikovaných věd ZČU, Plzeň, 2004a.

Hrabák J.: Mor včelího plodu, Včelařství (9), volná příloha – leták, 2004b.

Hrabák J.: Klinická diagnostika nemocí včelího plodu, Včelařství (7), 2006.

Hrabák J., Martínek K.: Screening of secreted proteases of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* by using substrate SDS polyacrylamide gel electrophoresis, Journal of Apicultural Research, 2006, *In Press*.

Jaeckel S.: Zur pathologischen Anatomie der Biene *Apis mellifica* L. während der Metamorphose bei böartiger Faulbrut (*Bacillus larvae* White), Archiv der Bienenkunde (11), 41-92, 1930.

Julian G.St., Bulla L.A.: Physiology of Sporeforming Bacteria Associated with Insects – IV. Glukose Catabolism in *Bacillus larvae*, Journal of Bacteriology (108), 828-834, 1971.

Katznelson H.: *Bacillus pulvifaciens* (n.sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae, Journal of Bacteriology (59), 153-155, 1950.

Koudelka A.P., Hufnagel L.A., Koudelka G.B.: Purification and Characterization of the Repressor of the Shiga Toxin-Encoding Bacteriophage 933W: DNA Binding, Gene Regulation, and Autocleavage, Journal of Bacteriology (186), 7659-7669, 2004.

Liu H., Bergman N.H., Thomason B., Shallom S., Hazen A., Crossno J., Rasko D.A., Ravel J., Read T.D., Peterson S.N., Yates III J., Hanna P.C.: Formation and Composition of the *Bacillus anthracis* Endospore, Journal of Bacteriology (186), 164-168, 2004.



Lochhead A.G.: Cultural studies of *Bacillus larvae* (White), Agricultural Sciences (9), 80-89, 1928.

Lochhead A.G.: Growth Factor Requirements of *Bacillus larvae*, White, Journal of Bacteriology (44), 185-189, 1942.

Maassen A.: Zur Etiologie der sogenannten Faulbrut der Honigbienen, Arb. Biol. Reichs. Land- und Forstwirtschaft (6), 53-70, 1908.

Mueller T.J., Fried B.: Electrophoretic analysis of proteases in *Echinostoma caproni* and *Echinostoma trivolvis*, Journal of Parasitology (85), 174-180, 1999.

North M.J.: Parasite Proteinases, In: Rogan M.T. (Ed.): Analytical Parasitology, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1997.

Oliver G.W., Stetler-Stevenson W.G., Kleiner D.E.: Zymography, Casein Zymography, and Reverse Zymography-Activity assays for proteases and their inhibitors, In: Sterchi E.E. and Stocker W. (Ed.): Proteolytic Enzymes: Tools and Target. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1999.

Paech Ch., Christianson T., Blasig S.: Enhanced Zymography of Proteases, Analytical Biochemistry (231), 440-441, 1993.

Patel N.G., Gochnauer T.A.: The Production and Properties of *Bacillus larvae* Proteases, Insect Biochemistry (2), 321-333, 1972.

Peng Y.S.C., Museem E., Fong A., Montague M.A., Tyler T.: Effects of chlortetracycline on honey bee *Volvaria* larvae reared in vitro, Journal of Invertebrate Pathology (60), 127-133, 1992.



Pharmacia Fine Chemicals: Sephadex – Gel filtration in theory and practice, Uppsala, 1975.

Pharmacia Fine Chemicals: DEAE-Sepharose CL-6B, CM-Sepharose CL-6B – for ion exchange chromatography, Uppsala, 1976a.

Pharmacia Fine Chemicals: Sephadex – a unique substance for modern chromatography, Uppsala, 1976b.

Pharmacia Fine Chemicals: Sephadex – theory and experimental technique, Uppsala, 1976c.

Pharmacia Fine Chemicals: Sephadex ion exchanger – a guide to ion exchange chromatography, Uppsala, 1977.

Pharmacia Fine Chemicals: Gel filtration – theory and practice, Uppsala, 1979.

Pharmacia Fine Chemicals: Ion Exchange Chromatography – principles and methods, Uppsala, 1980.

Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.: Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation, *Nature* (258), 598-599, 1975.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A.: *Microbiology – Third Edition*, The McGraw-Hill Companies Inc., Columbus, 1996.

Reif J.: *Metody matematické statistiky*, Západočeská univerzita v Plzni, Plzeň, 2000.

Salyers A.A., Whitt D.D.: *Bacterial Pathogenesis – A Molecular Approach*, American Society for Microbiology Press, Washington, 2002.



Silo-Suh L.A., Lethbridge B.J., Raffel S.J., He H., Clardy J., Handelsman J.: Biological Activities of Two Fungistatic Antibiotics Produced by *Bacillus cereus* UW85, Applied and Environmental Microbiology (60), 2023-2030, 1994.

Stoilowa E.R.: Vergleichende bakteriologische Untersuchungen an einigen deutschen Stämmen des *Bacillus larvae*, des Erregers der bösartigen Faulbrut der Honigbiene, Zentr. Bakt. Parasitenk. (99), 124-130, 1938.

Sturtevant A.P.: The development of American foulbrood in relation to the metabolism of its causative agent, Journal of Agricultural Research (28), 129-168, 1924.

Sturtevant A.P. Preliminary report concerning factors related to certain of the growth phases of *Bacillus larvae*, Journal of Economic Entomology (23), 129-168, 1930.

Sturtevant A.P.: Relation of commercial honey to the spread of American foulbrood, Journal of Agricultural Research (45), 257-285, 1932.

Šmarda J., Slováčková H.: Ten New Temperate Bacteriophages of *Citrobacter youngae*. Folia Microbiologica (49): 671-678, 2004.

Tarr H.L.A.: Studies on American foulbrood. I. The relative pathogenicity of vegetative cells and endospores of *Bacillus larvae* for the blood of the bee, Annals Applied Biology (24): 377-384, 1937.

Titěra D., Lenicek J., Haklová M., Sekyra M.: Volatile Substance Produced by *Paenibacillus larvae* and its Detection Using SPME. XXXVIIIth Apimondia International Apicultural Congress - Book of Abstracts, Ljubljana, 2003.

Veselý V.: Včelařství, Nakladatelství Brázda, Praha, 2003.



White G.F.: The bacteria of the apiary, with special reference to bee Diseases, Bureau of Entomology Technical Series no. 14, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.,1906.

White G.F.: The cause of American foulbrood, Bureau of Entomology Technical Series no. 94, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.,1907.

White G.F.: Unheated egg-yolk media, Science (49), 362, 1919.

Wolz R.L.: Strategies for Inhibiting Proteases of Unknown Mechanism, In: Sterchi E.E. and Stocker W. (Ed.): Proteolytic Enzymes - Tools and Targets, Springer Verlag, Berlin, 1999.